



Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Διδακτορική Διατριβή

**ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΕΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΨΕΥΔΟ-ΚΑΤΑΛΥΣΗ:
ΑΠΟΚΡΥΠΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ
(Ag) ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΥΛΙΚΑ**

Ευστάθιος Θεοφίλου

Λεμεσός, Μάιος 2020

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Διδακτορική Διατριβή

ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΕΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΨΕΥΔΟ-ΚΑΤΑΛΥΣΗ:
ΑΠΟΚΡΥΠΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΟΥ
ΑΡΓΥΡΟΥ (Ag) ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Ευστάθιος Θεοφίλου

Λεμεσός, Μάϊος 2020

Έντυπο Έγκρισης

Διδακτορική Διατριβή

**ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΕΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΨΕΥΔΟ-ΚΑΤΑΛΥΣΗ:
ΑΠΟΚΡΥΠΤΟΓΡΑΦΗΣΗ και ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ
ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (Ag) ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ
ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ**

Υποβλήθηκε από

Ευστάθιος Θεοφίλου

Επιβλέπων: Κώστας Κώστα, Καθηγητής

Υπογραφή _____

Μέλος της Επιτροπής: Νικόλαος Καλογεράκης, Καθηγητής

Υπογραφή _____

Μέλος της Επιτροπής: Ιωάννης Πασχαλίδης, Καθηγητής

Υπογραφή _____

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Λεμεσός, Μάιος 2020

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Στάθης Θεοφίλου, 2020

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Στην πολυαγαπημένη μου Μητέρα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αναμφισβήτητα η ευγνωμοσύνη μπορεί να αποτελέσει μέρος της καθημερινότητας του κάθε ανθρώπου και να συναντηθεί σε πολλές μορφές, αποτελώντας ένα σημαντικό παράγοντα που οδηγεί στην ευτυχία. Επίσης, σύμφωνα με τον Αμερικανό συγγραφέα William Arthur Ward, όταν αισθάνεται κάποιος ευγνωμοσύνη και δεν το εκφράζει, αντιστοιχεί με το να τυλίξει ένα δώρο και να μην το δώσει. Ως εκ τούτου, ολοκληρώνοντας την παρούσα Διδακτορική Διατριβή, και αναγνωρίζοντας συνάμα πως η ευγνωμοσύνη αποτελεί ένα θετικό συναίσθημα το οποίο μπορεί και πρέπει να εκδηλώνεται, αισθάνομαι έντονη την ανάγκη να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς έναν από τους σημαντικότερους ανθρώπους της ζωής μου, τον Καθηγητή, Κύριο και Μέντορα μου Κώστα Ν. Κώστα, ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης. Η αμέριστη στήριξη, οι συμβουλές, η βοήθεια και οι παραινήσεις του σε σημαντικά ζητήματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης μελέτης, αποδείχτηκαν ζωτικής σημασίας για την ομαλή διεκπεραίωση της. Στο σημείο αυτό αναφέρεται πως η συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή βασίστηκε στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Κατάλυσης του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου που τελεί υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Κώστα Ν. Κώστα.

Ολοκληρώνοντας λοιπόν ένα από τους σημαντικότερους στόχους της ζωής μου, θα ήταν παράλειψη μου να μην αναγνωρίσω και να εξυμνήσω την τεράστια και ευρέως αναγνωρισμένη συνεισφορά του Καθηγητή Κώστα Ν. Κώστα τόσο στο επιστημονικό γίγνεσθαι, όσο και στον ακαδημαϊκό τομέα. Πρόκειται για ένα καθηγητή πρότυπο για τους φοιτητές του, με απaráμιλλο ήθος και ζήλο, ο οποίος διατηρεί ως κύριο μέλημα του την εμφύσηση των γνώσεων του σε μελλοντικούς επιστήμονες, επιδιώκοντας παράλληλα και την καλλιέργεια της συνείδησης και του πνεύματος. Είναι επίσης γνωστό πως ο Κύριος Κώστας Ν. Κώστα αποτελεί ένα προσιτό και πρόθυμο άνθρωπο να βοηθήσει τον συνάνθρωπο του ανεξαρτήτως κοινωνικής τάξης, ηλικιακής κατηγορίας και επαγγελματικής κατάρτισης. Αναμφίβολα οι φοιτητές, οι εκπαιδευτικοί αλλά και κάθε άνθρωπος που έχει την ευκαιρία και την τιμή να συνεργαστεί ή να γνωρίσει τον Κύριο Κώστα αποκομίζει, κατά γενική ομολογία, μονάχα θετικές εντυπώσεις και αισθάνεται ιδιαίτερα τυχερός. Έτσι και εγώ με την σειρά μου, αισθάνομαι πραγματικά πολύ τυχερός για τα όσα μπόρεσα να αποκομίσω από τον Δρ. Κώστα Ν. Κώστα καθ' όλη την διάρκεια της πανεπιστημιακής μου

φοίτησης αλλά και για το ότι μου προσφέρθηκε η ευκαιρία να εμπλακώ ενεργά με τον επιστημονικό τομέα της κατάλυσης.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τους καθηγητές Ιωάννη Πασχαλίδη από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου και Νικόλαο Καλογεράκη από την Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης οι οποίοι αποτέλεσαν μέλη της εξεταστικής επιτροπής της διατριβής μου.

Επίσης, αναγνωρίζοντας τις εξαιρετικές συμβουλές, την πολύτιμη βοήθεια, την καθοδήγηση και την σημαντική ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου αισθάνομαι έντονη την ανάγκη να ευχαριστήσω θερμά τον επίσης Καθηγητή και Άνθρωπο Δρ Πέτρο Σάββα. Αναντίρρητα η συμβολή του για την επιτυχή ολοκλήρωση της εν λόγω διατριβής ήταν τεράστια, και η παράγραφος αυτή αποτελεί την ελάχιστη δυνατή ένδειξη ευγνωμοσύνης προς το πρόσωπό του.

Αισθάνομαι επίσης ευγνώμων στους καθηγητές Δρ Αλέξανδρο Χαραλαμπίδη και Δρ Μιχάλη Κουτίνα οι οποίοι αποτέλεσαν μέλη της επιτροπής αξιολόγησης της διδακτορικής μου πρότασης παρέχοντας μου πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις. Ευχαριστώ επίσης τον Δρ Κωσταντίνο Καπνίση για την καθοδήγηση και βοήθεια του σχετικά με την διεκπεραίωση της ανάλυσης Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) στο εργαστήριο "Εμβιομηχανικής και Βιοσυστημάτων" (Biomechanics and Living Systems Analysis - BioLISYS) του Τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών και Επιστήμης και Μηχανικής Υλικών του ΤΕΠΑΚ, τον Δρ Παντελή Χαρισιάδη για την διεκπεραίωση της ανάλυσης της Φασματοσκοπίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) στο εργαστήριο "Νερό και Υγεία" του Διεθνούς Ινστιτούτου Κύπρου για την Περιβαλλοντική και Δημόσια Υγεία στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, τον Δρ Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη για την διεκπεραίωση της ανάλυσης Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR-IR) στα διδακτικά εργαστήρια του τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΤΕΠΑΚ αλλά και την Δρ Λουΐζα Ποταμίτη για την διεκπεραίωση της ανάλυσης Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (TEM) στο τμήμα Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και Μοριακής Παθολογίας του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω τόσο στον καθηγητή Δρ Βασίλη Φωτόπουλο όσο και στην και στην Δρ Χρυστάλλα Αντωνίου, με την βοήθεια και καθοδήγηση των οποίων πραγματοποιήθηκε η γονιδιακή ανάλυση του βακτηρίου *E. coli* στο εργαστήριο "Μοριακής Βιολογίας Φυτών" του τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του ΤΕΠΑΚ.

Επιπλέον, αισθάνομαι έντονα την ανάγκη να ευχαριστήσω την γυναίκα μου Έλενα Διονυσίου για την συγκινητική της συμπαράσταση, την ενθάρρυνση, την απεριόριστη κατανόηση και την θαυμαστή στήριξη της κατά την διάρκεια των Διδακτορικών μου σπουδών. Θα ήθελα να της εκφράσω την αγάπη μου και να την ευχαριστήσω ξανά για την υπομονή της.

Ακόμα, οφείλω να ευχαριστήσω την εταιρεία "EUROMARKET" και τον διευθυντή της κύριο Στάθη Κυριάκου αφού αποτελεί τον άνθρωπο ο οποίος αφιέρωσε σημαντικό χρόνο και κόπο για την μελέτη και την όσο το δυνατόν καλύτερη οργάνωση της κατασκευής η οποία χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση πειραμάτων σε πραγματικές συνθήκες που σχετίζονται με το θέμα με το οποίο καταπιάνεται η συγκεκριμένη μελέτη. Εξαιρετικά κρίσιμες και σημαντικές ήταν επίσης οι συμβουλές και οι υποδείξεις του σε τεχνικά ζητήματα που αφορούσαν τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον ιδιοκτήτη της εταιρείας "Island oil" κύριο Στάθη Παπαδάκη και ιδιαιτέρως τον τεχνικό διευθυντή και εξαίρετο άνθρωπο κύριο Νίκο Στυλιανού με την σημαντική και καθοριστική βοήθεια του οποίου κατέστη εφικτή η πραγματοποίηση του πειράματος σε πραγματικές συνθήκες στο πετρελαιοφόρο πλοίο "Alexandria".

Περεταίρω, θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Ερευνητικής Ομάδας του Εργαστηρίου "Περιβαλλοντικής Κατάλυσης" του τμήματος Χημικών Μηχανικών του ΤΕΠΑΚ αλλά και τον τεχνικό Εργαστηρίων του τμήματος Χημικών Μηχανικών Δρ Αντώνη Νικολαΐδη, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη τους κυρίως κατά την εκτέλεση του εργαστηριακών πειραμάτων. Η συνεργασία μαζί τους σε ένα φιλικό και ευχάριστο κλίμα, γεμάτο θετική ενέργεια, διευκόλυνε και συνέβαλε σημαντικά στην πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης. Ευχαριστώ επίσης και την κυρία

Ζωή Κυπερέση, γραμματέα του Τμήματος Χημικών Μηχανικών για την πολύτιμη στήριξη και ενθάρρυνσή της καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την τεράστια και απεριόριστη αγάπη μου για την οικογένειά μου αλλά και τους καρδιακούς μου φίλους ευχαριστώντας τους για την ηθική στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή (Δ.Δ.) αφορά την μελέτη και αποκρυπτογράφηση των ιδιοτήτων στηριζόμενων στερεών υλικών αργύρου (Ag). Ειδικότερα, η βακτηριοκτόνος δράση των υλικών, που παρασκευάστηκαν και χαρακτηρίστηκαν στο πλαίσιο της εργασίας αυτής, διερευνήθηκε ως προς την αναστολή των βακτηρίων, που περιλαμβάνονται στις διατάξεις της συνθήκης για διαχείριση του νερού έρματος των πλοίων, η οποία ψηφίστηκε από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO) το 2004, και αποτελούν δείκτες μικροβιακής μόλυνσης του νερού. Τα στηριζόμενα στερεά αργύρου (x% κ.β. Ag/υπόστρωμα) και σε μικρότερο βαθμό τα στηριζόμενα υλικά χαλκού, βρέθηκαν να παρουσιάζουν εξαιρετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι και των τριών βακτηρίων (*E. Coli*, *E. faecalis* και *V. parahaemolyticus*) που μελετήθηκαν. Η φόρτιση του μετάλλου (Ag ή Cu) βρέθηκε να έχει θετική επίδραση στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα των στηριζόμενων στερεών.

Ο άργυρος (Ag), σε όποια μορφή και αν χρησιμοποιείται (διάλυμα Ag^+ ή νανοσωματιδίων), αποτελεί ένα ισχυρό και πολύ γνωστό αντιμικροβιακό παράγοντα με ευρέως διαδεδομένη βακτηριοκτόνο δράση την οποία η ανθρωπότητα εκμεταλλεύεται εδώ και πολλά χρόνια. Παρόλο που βρίσκονται ακόμα υπό διερεύνηση οι μηχανισμοί με τους οποίους, κυρίως τα νανοσωματίδια άργυρου, ασκούν την αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα, η επικρατούσα θεωρία αποδίδει την αντιμικροβιακή δράση τους στην έκπλυση ιόντων αργύρου (Ag^+), τα οποία απελευθερώνονται από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων, στο εκάστοτε υπό επεξεργασία διάλυμα. Αυτό θεωρείται ότι οδηγεί στην επακόλουθη παραγωγή περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες ευθύνονται για την αναστολή της έκφρασης αριθμού βακτηριακών γονιδίων. Ωστόσο, η παρούσα μελέτη παραθέτει, για πρώτη φορά μέχρι σήμερα, σημαντικές πληροφορίες που ανατρέπουν την έως τώρα επικρατούσα θεωρία και οι οποίες υποστηρίζουν πως η λύση – αναστολή των μικροβίων (βακτηρίων) ακολουθεί ένα ετερογενή διεπιφανειακό μηχανισμό που πραγματοποιείται στην επιφάνεια των μονομεταλλικών στηριζόμενων στερεών άργυρου (x κ.β. % Ag/γ- Al_2O_3). Συγκεκριμένα, μέσω εξειδικευμένων πειραμάτων και χρήση κατάλληλου συμπλοκοποιητή (οξαλικό οξύ) αποδείχτηκε πως η αντιμικροβιακή δράση των στερεών x% κ.β. Ag/γ- Al_2O_3 δεν μπορεί να αποδοθεί (σε σημαντικό βαθμό) στην δράση των ελεύθερων ιόντων αργύρου και ως εκ

τούτου πρέπει να οφείλεται στην αλληλεπίδραση των βακτηρίων με την επιφάνεια του στερεού (κρυσταλλίτες $\text{Ag}^{\delta+}$).

Στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. έχει επίσης βρεθεί ότι η επεξεργασία των βακτηρίων με τα ανωτέρω στερεά οδηγεί στο σχηματισμό οργανικών υπολειμμάτων στην επιφάνεια του εκάστοτε μεταλλικού στηριζόμενου στερεού (αποτελέσματα SEM), τα οποία φαίνεται να προκύπτουν από την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της εξωτερικής μεμβράνης των βακτηρίων (αποτελέσματα ATR-FTIR).

Με σκοπό την περεταίρω μελέτη και εν τέλει αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού με τον οποίο συντελείται η παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή, πραγματοποιήθηκε στοχευμένη εξέταση της έκφρασης σημαντικών γονιδίων που εμπλέκονται κυρίως σε αμυντικούς μηχανισμούς που αναπτύσσει το κύτταρο σε μια προσπάθεια μετριασμού της τοξικότητας που υφίσταται. Η γονιδιακή αυτή εξέταση πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια της ξεχωριστής επεξεργασία βακτηρίων *E. coli* είτε με το στερεό υλικό 1% $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ είτε με διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου Ag^+ . Το γονίδιο *pldA* το οποίο κωδικοποιεί την φωσφολιπάση A της εξωτερικής μεμβράνης (OMPLA), βρέθηκε ότι επάγεται σημαντικά κατά την επεξεργασία των *E. coli* με το στερεό $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (αλλά όχι με ιόντα Ag^+). Το γεγονός αυτό οδηγεί στη δημιουργία οπών (πιθανώς μέσω του σχηματισμού ROS) στην εξωτερική μεμβράνη (που επιβεβαιώθηκαν μέσω TEM), προκαλώντας παράλληλα μη αναστρέψιμη διαταραχή του κύκλου της κυτταρικής αναπνοής.

Η ενεργοποίηση της OMPLA φαίνεται να είναι το πρώτο στάδιο του αντιμικροβιακού μηχανισμού. Η εν λόγω πρωτεΐνη/ένζυμο φαίνεται να ενεργοποιείται λόγω της διατάραξης της κατανομής του φορτίου στη βακτηριακή μεμβράνη η οποία λαμβάνει χώρα μετά την αλληλεπίδραση της μεμβράνης με την επιφάνεια του στερεού (κρυσταλλίτες $\text{Ag}^{\delta+}$). Επιπλέον, στην περίπτωση της βακτηριακής επεξεργασίας με το στερεό $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, μια μπλε οξειδάση του χαλκού (CueO), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cueO*, επάγεται σημαντικά και εμφανίζεται να διαδραματίζει κρίσιμο/ρυθμιστικό ρόλο στην οξειδωτική μεταφορά αργύρου από την επιφάνεια του στηριζόμενου στερεού στο κύτταρο. Κάτι τέτοιο οδηγεί στον επαγόμενο εκτοπισμό (από τον Ag^+) του χαλκού Cu (I) από πρωτεϊνικούς του υποδοχείς όπως οι CusS και CusR, προκαλώντας έτσι την απελευθέρωση ασταθούς χαλκού και ROS στο εσωτερικό του κυττάρου.

Ως αποτέλεσμα των πιο πάνω, παρατηρείται και η σημαντική επαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διασυνδεδεμένα συστήματα ομοιόστασης του χαλκού Cu (I), όπως η ΑΤΡάση τύπου P (κωδικοποιημένη από το γονίδιο *copA*). Τέλος, τα αυξημένα επίπεδα αργύρου και χαλκού στο κυτταρόπλασμα της *E. coli* φαίνεται να προκαλούν την πρόωμη καταστολή του γονιδίου *zntA* μετά από επεξεργασία είτε με το στερεό Ag/γ-Al₂O₃ είτε με διάλυμα Ag⁺.

Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα, προτείνεται στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., ένας ολοκληρωμένος ψευδο-καταλυτικός μηχανισμός για την αντιμικροβιακή επεξεργασία των βακτηρίων *E. coli* με στηριζόμενα στερεά υλικά αργύρου (ψευδο-καταλύτες). Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποβούν καθοριστικής σημασίας όσον αφορά την ανάπτυξη και κατανόηση της έννοιας της αντιμικροβιακής ετερογενούς ψευδο-κατάλυσης, στοχεύοντας μεταξύ άλλων στην αντιμετώπιση σημαντικών περιβαλλοντικών ζητημάτων μέσω της ανάπτυξης νέων/καινοτόμων τεχνολογιών.

Ένα σύγχρονο σχετικά περιβαλλοντικό ζήτημα το οποίο δύναται να αντιμετωπιστεί με τη βοήθεια της ψευδο-καταλυτικής διεργασίας αποτελεί η επεξεργασία του νερού έρματος (ballast water) το οποίο χρησιμοποιείται από τα πλοία για την διασφάλιση των βέλτιστων δυνατών συνθηκών πλεύσης.

Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προκαταρκτικής (απλοποιημένης) τεχνοοικονομικής μελέτης που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, αποδεικνύεται πως η προτεινόμενη ψευδο-καταλυτική τεχνολογία παρουσιάζει σημαντικά τεχνικά και κυρίως οικονομικά πλεονεκτήματα, έναντι υφιστάμενων εμπορικών τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται σήμερα για την επεξεργασία του νερού έρματος των πλοίων.

Λέξεις κλειδιά: [Ιοντικός Άργυρος, αντιμικροβιακή ψευδο-κατάλυση, βακτήρια, μηχανισμός αναστολής, νερό έρματος, αποστείρωση]

ABSTRACT

Silver has been long known to be a strong antimicrobial agent and has been used as such either in its ionic form (i.e., in solution) or in the form of nanoparticles. Although silver nanoparticles (AgNPs) appear to be promising for certain medical/pharmaceutical applications, they present significant disadvantages when it comes to environmental applications due to the need for metal (AgNPs) recovery. The present Doctoral Thesis examines the antimicrobial properties and mechanism of action of immobilized silver and Copper nanoparticles' (Cu and Ag-iNPs). The supported solids which have been developed and characterized within the present work, were found to present excellent antimicrobial properties against the three indicator-bacteria (*E. coli*, *E. faecalis* and *V. Parahemolyticus*) which are defined within the IMO Annex IV regulation for Ballast Water Treatment.

The exact mechanisms of the antibacterial effect of nanometals are still being investigated, but the most possible theory suggests that the antimicrobial activity of nanosilver is due to free metal ion toxicity arising from the dissolution of the metal from the surface of the nanoparticles to the main liquid solution. However, within the present study, through custom-designed experiment using a Ag^+ complexing agent (oxalic acid), it was proven that the antimicrobial activity of immobilized silver nanoparticles (Ag-iNPs) is exerted against *Escherichia coli* bacteria, even in the presence of a suitable Ag^+ scavenger, proving that their bactericidal property is not attributed to the dissolution of surface silver (as free Ag^+).

ATR-FTIR studies indicated the presence of possible phospholipid residues on used Ag-iNPs surface, while SEM and TEM studies indicated the formation of large holes on the external membrane of the bacteria (*E. coli*) after treatment with silver supported solids (Ag/ γ - Al_2O_3). In addition, Reactive Oxygen Species (ROS) were found to be formed during the antimicrobial treatment with Ag/ γ - Al_2O_3 .

The regulation of key enzymes involved in bactericidal mechanism of *E.coli*, was also examined, after their treatment either with either immobilized silver nanoparticles (Ag-iNPs) or AgNO_3 . *PldA* gene, which encodes outer membrane's phospholipase A (OMPLA), was found to be up-regulated after treatment with Ag-iNPs. OMPLA's activation appears to be the initial step of Ag-iNPs bactericidal mechanism that ultimately leads to the creation of

holes on the outer membrane (OM), irreversibly disturbing the cells' respiration cycle. In addition, after treatment with Ag-iNPs, Blue copper oxidase CueO (encoded by *cueO* gene) was found to be over-produced and appears to play a key-role in the oxidative transfer of silver from the surface of Ag-iNPs to the cell. This was found to lead to the Ag-induced displacement of copper from its native protein sites such as CusS/CusR, a fact that causes the release of labile copper and ROS inside the cell.

Based on the above information, a detailed pseudo-catalytic mechanism is, for the first time, proposed within the present Doctoral Thesis, regarding the antimicrobial action of silver supported solids (Ag-iNPs) against *E. coli*. The results of the present work might be considered decisive for the development of the new concept of antimicrobial heterogeneous pseudo-catalysis towards the addressing of major environmental problems through the development of novel technologies for the confrontation of current technological challenges, such as the disinfection of Ships Ballast Water (SBW).

Towards this end, a pilot/prototype experiment was performed, within this work, regarding the antimicrobial treatment of part of the Ballast Water of a real-active ship, using the pseudo-catalytic technology. The results obtained through the pilot experiment, can be at least considered promising and clearly indicate that the proposed pseudo-catalytic process might be an attractive method for the successful confrontation of this significant environmental issue.

Finally, according to the results of the basic/simplified technoeconomic analysis, performed within the present study, the proposed pseudo-catalytic process present significant technological and mainly economical advantages against the existing, commercial technologies that are currently used for the treatment of Ships' Ballast Water.

Keywords: [Ag⁺, antimicrobial pseudo-catalysis, bacteria, inhibition mechanism, ballast water, pseudo-catalytic disinfection]

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	xi
ABSTRACT	xiv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	xvi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xx
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xxii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ	xxx
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	xxxii
ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	xxxv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	1
1.1. Εισαγωγή	1
1.2. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	8
1.2.1. Αντιμικροβιακές Ιδιότητες του Στοιχειακού (Ag^0) και Ιοντικού (Ag^+) Άργυρου	8
1.2.2. Μηχανισμοί Δράσης του Άργυρου στα Βακτήρια	9
1.2.3. Κυτταρική Δομή των Βακτηρίων και ο Τρόπος με τον οποίο "Προσελκύεται" ο Άργυρος	12
1.2.4. Κυτταρικοί Μηχανισμοί Αντιμετώπισης Τοξικών Μετάλλων	14
1.2.5. DNA και Γονιδιακή Έκφραση	16
1.2.6. Επεξεργασία του Νερού Έρματος	17
1.2.6.1. Υπόβαθρο	17
1.2.6.2. Προδιαγραφές για τις Τεχνολογίες Επεξεργασίας του Νερού Έρματος	21
1.2.6.3. Αξιολόγηση των Υπάρχοντων Τεχνολογιών Επεξεργασίας-Αποστείρωσης του Νερού Έρματος	22
1.2.6.4. Επικινδυνότητα Παθογόνων Μικροοργανισμών Νερού Έρματος	27
1.2.6.5. Όρια Συνθήκης του IMO για τους Παθογόνους Μικροοργανισμούς στο Νερό Έρματος	28
	xvi

1.2.6.6.	Βακτήρια <i>E. coli</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahemolyticus</i> και η Ομάδα Βακτηρίων <i>Intestinal Enterococci</i>	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ		34
2.1.	Κατάλυση και Ψευδο-κατάλυση	34
2.1.1.	Κατάλυση	36
2.1.2.	Ψευδο-κατάλυση	37
2.1.3.	Αξιολόγηση Στερεών Καταλυτικών και Ψευδο-καταλυτικών Στερεών	40
2.1.4.	Μεταλλικά Στηριζόμενα Στερεά	41
2.1.5.	Αλληλεπιδράσεις Μετάλλου-Φορέα (Υποστρώματος)	43
2.1.6.	Μέθοδος Υγρού Εμποτισμού (Wet Impregnation Method)	
2.1.7.	Κρυσταλλική Δομή Μετάλλων και Φορέων της Παρούσας Μελέτης	
2.2.	Εφαρμογές της Κατάλυσης	46
2.3.	Αναλυτικές Τεχνικές Φυσικοχημικού Χαρακτηρισμού Στερεών Υλικών και Βακτηρίων	49
2.3.1.	Προσδιορισμός Ειδικής Επιφάνειας (B.E.T.)	49
2.3.2.	Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)	53
2.3.3.	Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP – MS)	56
2.3.4.	Φασματομετρία Ορατού – Υπεριώδους (UV – Vis)	60
2.3.5.	Φασματοσκοπία Υπερύθρου, Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection – Infrared Radiation, ATR - IR)	65
2.3.6.	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)	71
2.3.7.	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)	75
2.3.8.	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	79
2.4.	Μέθοδος Λυοφιλοποίησης Βακτηρίων	84
2.5.	Η Μέθοδος Εμβολιασμού Θρεπτικών Υποστρωμάτων	85

2.6.	Μέθοδος Διήθησης μέσω Ηθμομεμβράνης υπό Κενό – MF method	87
2.7.	Επιλογή Θρεπτικών Υποστρωμάτων	89
2.8.	Μέθοδοι Αποστείρωσης	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		101
3.1.	Σύνθεση Στηριζόμενων Μεταλλικών Στερεών Υλικών	102
3.2.	Αντιμικροβιακά Πειράματα σε Στερεά Υλικά	106
3.3.	Αναλυτικές Τεχνικές Φυσικοχημικού Χαρακτηρισμού Στερεών Υλικών και Αποκρυπτογράφησης του Ψευδο-Καταλυτικά Επαγόμενου Μηχανισμού Βακτηριακής Αναστολής	119
3.3.1.	Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)	119
3.3.2.	Μελέτη Υφής των Στερεών Υλικών με την Τεχνική Β.Ε.Τ.	120
3.3.3.	Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP – MS)	120
3.3.4.	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)	123
3.3.5.	Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)	125
3.3.6.	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία – Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR-IR)	127
3.3.7.	Ανίχνευση - Υπολογισμός των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS) σε Διάλυμα, με Φασματοφωτομετρία Ορατού – Υπεριώδους (UV – Vis.)	128
3.3.8.	Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (qRT-PCR)	128
3.4.	Μελέτη της Αντιμικροβιακής Δραστηριότητας του Ακίνητοποιημένου Ag σε Πραγματικές Συνθήκες	132
3.5.	Αποστείρωση	133
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ		135
4.1.	Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός Στερεών Υλικών	136
4.1.1.	Εύρεση Πραγματικής Φόρτισης Μετάλλου (Ag, Cu και Ce)	136
4.1.2.	Προσδιορισμός Ειδικής Επιφάνειας (Β.Ε.Τ.)	139
4.2.	Αντιμικροβιακή Δραστηριότητα	140

4.2.1.	Αργυρόγραμμα στο Στερεό Υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃	141
4.2.2.	Επίδραση της Φόρτισης Αργύρου στις Αντιμικροβιακές Ιδιότητες των Μονομεταλλικών Στηριζόμενων Στερεών Ag/γ-Al ₂ O ₃	144
4.2.3.	Επίδραση της χημικής σύστασης του υποστρώματος	156
4.2.4.	Επίδραση της Φόρτισης Cu στις Αντιμικροβιακές Ιδιότητες των Μονομεταλλικών Στηριζόμενων Στερεών Cu/γ-Al ₂ O ₃	161
4.2.5.	Διμεταλλικά στηριζόμενα στερεά (Ag-Cu/γ-Al ₂ O ₃)	169
4.2.6.	Επίδραση του Θαλασσινού Νερού	174
4.2.7	Μελέτη της Σταθερότητας του Ag/CeO ₂ -γ-Al ₂ O ₃	176
4.3.	Μελέτη του Επαγόμενου Μηχανισμού Βακτηριακής Αναστολής	179
4.3.1.	Μελέτη της Συνεισφοράς των Ελεύθερων Ιόντων Αργύρου (Ag ⁺) στην Αντιμικροβιακή Δράση του Στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃	180
4.3.2.	Επίδραση Οξειδωτικής Κατάστασης του Αργύρου	186
4.3.3.	Μελέτες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM)	189
4.3.4.	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία – Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR-FTIR)	193
4.3.5.	Φασματοφωτομετρικές Μελέτες Ορατού (Vis.): Ανίχνευση Ελευθέρων Ριζών	196
4.3.6.	Μελέτες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (TEM)	201
4.3.7.	Στοχευμένη Μελέτη της Γονιδιακής Έκφρασης του Βακτηρίου <i>E. coli</i>	205
4.4.	Πιλοτική Δοκιμή της Ψευδο-καταλυτικής Τεχνολογίας για την Επεξεργασία Νερού Έρματος Πλοίου	218
4.5.	Προκαταρκτική (απλοποιημένη) Τεχνοοικονομική Μελέτη για την Αποστείρωση - Μικροβιολογική Επεξεργασία του Νερού Έρματος των Πλοίων	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1	Αξιολόγηση των υπάρχοντων τεχνολογιών επεξεργασίας του νερού έρματος.	23
Πίνακας 2	Όρια απόρριψης του νερού έρματος σύμφωνα με τον κανονισμό D2 (IMO, 2004).	29
Πίνακας 3	Οι βασικοί τύποι δονήσεων των μοριακών δομών στην IR φασματοσκοπία.	66
Πίνακας 4	Πειραματικές συνθήκες κατά τη διεξαγωγή των αντιμικροβιακών πειραμάτων.	107
Πίνακας 5	Το ζεύγος εκκινητών για κάθε υπό ανάλυση γονίδιο και η θερμοκρασία ανασύνδεσής τους - Ta (°C).	131
Πίνακας 6	Πραγματική φόρτιση των στηριζόμενων υλικών Ag με βάση την τεχνική AAS.	137
Πίνακας 7	Πραγματική φόρτιση μετάλλου των παρασκευασθέντων στερεών με βάση την τεχνική ICP-MS.	138
Πίνακας 8	Ειδική επιφάνεια, όγκος και μέγεθος των πόρων των στερεών που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ.	140
Πίνακας 9	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. coli</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	145
Πίνακας 10	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. coli</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	147
Πίνακας 11	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. faecalis</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	149
Πίνακας 12	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>V. parahemolyticus</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	154
Πίνακας 13	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. coli</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO ₂ -γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	157
Πίνακας 14	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. faecalis</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO ₂ -γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	158

Πίνακας 15	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. coli</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	163
Πίνακας 16	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. faecalis</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	165
Πίνακας 17	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>V. parahemolyticus</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	167
Πίνακας 18	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. coli</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	169
Πίνακας 19	Αριθμός αποικιών βακτηρίου <i>E. faecalis</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.	171
Πίνακας 20	Έκπλυση μετάλλου της ενεργού φάσης των στερεών που χρησιμοποιήθηκαν για επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων (για 2 ώρες) στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.	185
Πίνακας 21	Τα υπό ανάλυση γονίδια της <i>E. coli</i> και ο ρόλος της αντίστοιχης κωδικοποιημένης πρωτεΐνης.	207
Πίνακας 22	Σημαντική επαγωγή ή καταστολή των υπό εξέταση γονιδίων εξαιτίας είτε του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ είτε του διαλύματος ιόντων Ag ⁺ συγκέντρωσης 3 ppb.	208
Πίνακας 23	Βασικά χαρακτηριστικά των πιο κοινών μεθόδων για την ετήσια επεξεργασία νερού έρματος όγκου 8000 m ³ .	

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1.	Η συσχέτιση μεταξύ της εκφόρτωσης και της λήψης φορτίου σε συνδυασμό με την πλήρωση και την εκκένωση των δεξαμενών έρματος [1].	4
Σχήμα 1.2.	Σχηματική αναπαράσταση της αναστολής της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την μεταφορική πρωτεΐνη του Fe (III) εντός του κυττάρου [17].	11
Σχήμα 1.3.	Η δομή της εξωκυτταρικής μεμβράνης των θετικών κατά Gram (α) και αρνητικών κατά Gram (β) βακτηρίων [300].	13
Σχήμα 1.4.	Σχηματική αναπαράσταση της απόρριψης μη αυτόχθονων ειδών με την μέθοδο της ανταλλαγής νερού έρματος [289].	19
Σχήμα 1.5.	Επεξεργασία του νερού έρματος σε λιμενικές εγκαταστάσεις [15].	20
Σχήμα 1.6.	Ηλεκτρονική φωτογραφία (SEM) του βακτηρίου <i>E.coli</i> [263].	30
Σχήμα 1.7.	Ηλεκτρονική φωτογραφία (SEM) του βακτηρίου <i>Vibrio cholera</i> [266].	31
Σχήμα 1.8.	Ηλεκτρονική φωτογραφία (AFM) του βακτηρίου <i>Enterococcus faecalis</i> [264].	33
Σχήμα 2.1.	Συγκριτικό διάγραμμα ομογενούς και ετερογενούς καταλυτικής αντίδρασης ($\Delta G^\circ < 0$).	35
Σχήμα 2.2.	Σχηματική αναπαράσταση ενός μεταλλικού στηριζόμενου στερεού, όπου P οι ενισχυτές [2].	38
Σχήμα 2.3.	Σχηματική αναπαράσταση της επιφάνειας σωματιδίου δραστικής φάσης (1: κενά, 2: επιπλέον άτομα, 3: πολλαπλά επίπεδα, 4: αναβαθμίδες, 5: εσοχές) [3].	39
Σχήμα 2.4.	Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης παρασκευής μεταλλικών στηριζόμενων υλικών με υγρό εμποτισμό [56].	41
Σχήμα 2.5.	Διεργασία υγρού εμποτισμού κατά την διαδικασία παρασκευής στηριζόμενου στερεού υλικού Ag [4] [5].	42
Σχήμα 2.6.	Διαφορετικές απόψεις της κρυσταλλικής δομής του Άργυρου (Ag) [10].	44
Σχήμα 2.7.	Διαφορετικές απόψεις της κρυσταλλικής δομής του Χαλκού (Cu) [11].	45
Σχήμα 2.8.	Η κρυσταλλική δομή του CeO_2 [12].	45
Σχήμα 2.9.	Η Κρυσταλλική δομή του γ - Al_2O_3 [13].	46
Σχήμα 2.10.	Η διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών της κατάλυσης στην προστασία του περιβάλλοντος και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής [63].	48

Σχήμα 2.11.	Διάγραμμα τυπικής συσκευής για μετρήσεις B.E.T. (Micromeritics, n.d). Όπου, 1. Βαλβίδα κενού, 2. Βαλβίδα μερικού κενού, 3. Βαλβίδα Ηλίου, 4. Βαλβίδα μερικής ανάλυσης αερίου, 5. Βαλβίδα ολικής ανάλυσης αερίου, 6. Αέριο πίεσης κορεσμού, 7. Βαλβίδα απομόνωσης κάτω θαλάμων, 8. Βαλβίδα θαλάμου βαθμονόμησης, 9. Βαλβίδα Θαλάμου δείγματος, 10. Βαλβίδα κυλίνδρου μερικής πίεσης κορεσμού, 11. Βαλβίδα κυλίνδρου ολικής πίεσης κορεσμού, 12. Θάλαμος βαθμονόμησης, 13. Ρυθμιστής πιέσεως, 14. Μετρητής κενού, 15. Θέση δοχείου με υγρό άζωτο, και 16. Σωλήνας πίεσης κορεσμού.	50
Σχήμα 2.12.	Ισόθερμος ($T=77K$) B.E.T για εμπορικό δείγμα CaO.	51
Σχήμα 2.13	Ενεργειακές μεταπτώσεις στην φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης [7].	53
Σχήμα 2.14.	Αρχή της ατομικής φασματοσκοπίας. Α: Νέφος ατόμων, Β, Β': Δέσμη διερχόμενης ακτινοβολίας ομοαξονικά και κάθετα με τον ανιχνευτή αντίστοιχα και Γ: Ανιχνευτής [8].	54
Σχήμα 2.15.	(α) Διάταξη συσκευής ΦΑΑ με φούρνο από σωλήνα γραφίτη [7] και (β) εγκάρσια θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη.	55
Σχήμα 2.16.	Το θερμοκρασιακό προφίλ των περιοχών και ζωνών σε μια τυπική πηγή επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.	58
Σχήμα 2.17.	Τα μέρη ενός φασματοφωτόμετρου μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.	60
Σχήμα 2.18.	Το Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα [14].	61
Σχήμα 2.19.	Οι πιθανές ηλεκτρονικές διεγέρσεις οργανικών μορίων.	62
Σχήμα 2.20.	Η αύξηση της συγκέντρωσης του υπό εξέταση διαλύματος αυξάνει την ποσότητα της ακτινοβολίας που απορροφάται.	63
Σχήμα 2.21.	Η ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων στις οργανικές ενώσεις που απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, διευκολύνει την ανάλυση τέτοιων φασμάτων.	67
Σχήμα 2.22.	Απλοποιημένο σχεδιάγραμμα του εσωτερικού ενός τυπικού φασματοφωτόμετρου υπέρυθρης φασματοσκοπίας.	68
Σχήμα 2.23.	Απλοποιημένη διαδικασία καταγραφής ενός υπέρυθρου φάσματος.	69
Σχήμα 2.24.	Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο (συνήθως υπό γωνία 45°) υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις.	70
Σχήμα 2.25.	Διάγραμμα λειτουργίας ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.	73
Σχήμα 2.26.	Σχηματική αναπαράσταση του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης [9].	76
Σχήμα 2.27.	Σχηματική απεικόνιση πλέγματος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (ΗΜΔ) με διάμετρο 3mm [9].	78

Σχήμα 2.28.	Τα στάδια της αντίδρασης PCR [123].	80
Σχήμα 2.29.	Αναπαράσταση διασποράς εμβολίου σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα [199].	86
Σχήμα 2.30.	Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου MF όπως χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα Διατριβή [203].	89
Σχήμα 2.31.	Χαρακτηριστική εικόνα θρεπτικού υποστρώματος CHROMagar E.C.C., με αποικίες του βακτηρίου <i>E. Coli</i> [200].	93
Σχήμα 2.32.	Χαρακτηριστική εικόνα θρεπτικού υποστρώματος Vibrio T.C.B.S. Agar [201].	94
Σχήμα 2.33.	Χαρακτηριστική εικόνα θρεπτικών υποστρωμάτων Enterococcus Pfizer Selective Agar [202].	95
Σχήμα 2.34.	Εικόνα τυπικού αυτόκαυστου [271].	97
Σχήμα 2.35.	Εικόνα θαλάμου νηματικής ροής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία [195].	99
Σχήμα 3.1.	Εναπόθεση Ag, Cu ή Ag-Cu σε σφαιρίδια γ -Al ₂ O ₃ με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού.	103
Σχήμα 3.2.	Εμβάπτιση των σφαιριδίων γ -Al ₂ O ₃ με οξείδιο του δημητρίου (5% κ.β. CeO ₂).	105
Σχήμα 3.3.	Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των "καταλυτικών" πειραμάτων. (A ₁ , A ₂ , A ₃ , A ₄) Μετρητής ροής αερίων, (B) μετρητής θερμοκρασίας θερμαντικού μανδύα (heating mantle), (Γ) μετρητής θερμοκρασία του διαλύματος εσωτερικά του αντιδραστήρα, (Δ) μετρητής ανάδευσης - στροφές ανά λεπτό, (E) μετρητής πίεσης, (Z) μετρητής ροής υγρού, (H) συσκευή ρύθμισης της διαφορικής πίεσης, (Θ) μετρητής όγκου του διαλύματος, (1) χειροκίνητη βαλβίδα αερίων, (2) σύστημα ελέγχου ροής μάζας (mass flow control), (3) βαλβίδα ελέγχου ροής (check valve), (4) θάλαμος ανάμιξης αερίων (distributor blender), (5) PLCIB31, (6) θερμαντικός μανδύας αντιδραστήρα, (7) θερμοστοιχείο ή θερμοζεύγος του διαλύματος (thermocouple), (8) θερμοστοιχείο του θερμαντικού μανδύα (thermo couple of heating mantle), (9) μηχανισμός ανάδευσης, (10) μανομετρική βαλβίδα ελέγχου αντίστροφης ροής (backpressure), (11) συσκευή ρύθμισης της πίεσης του υγρού (damper), (12) αντλία Gilson, (13) τετράπορτη βαλβίδα (14) μικρομετρική βαλβίδα ελέγχου της πίεσης, (15) έξοδος αερίων προϊόντων, (16) τρίπορτη βαλβίδα, (17) χειροκίνητη βαλβίδα εξόδου υγρού για τη ρύθμιση της διαφορικής πίεσης, (18) έξοδος υγρού.	109

Σχήμα 3.4.	Πίνακας ελέγχου και ρύθμισης διαφόρων παραμέτρων της πειραματικής συσκευής, μέσω λογισμικού, που χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη των αντιμικροβιακών πειραμάτων.	110
Σχήμα 3.5.	Παράδειγμα πίνακα αυτοματοποιημένου προγράμματος διαδοχικής εκτέλεσης εντολών για τις ανάγκες των αντιμικροβιακών πειραμάτων με στερεά υλικά.	111
Σχήμα 3.6.	Σύστημα αντιδραστήρα-μηχανισμού ανάδευσης. (α) Μηχανισμός ανάδευσης, (β) έξοδος αέριων προϊόντων, (γ) είσοδος αέριου μίγματος τροφοδοσίας, (δ) θερμοστοιχεία (thermocouples), (ε) καλάθι Mahoney-Robinson, (ζ) είσοδος υγρού.	115
Σχήμα 3.7.	Τρισδιάστατη σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής επεξεργασίας νερού έρματος πλοίου εντός της οποίας τοποθετήθηκε ποσότητα 25 kg του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/QSG.	133
Σχήμα 3.8.	Το εσωτερικό της δεξαμενής έρματος WBAPP του πετρελαιοφόρου πλοίου "Alexandria".	
Σχήμα 4.1.	"Αργυρόγραμμα". Παρεμπόδιση της ανάπτυξης αποικιών του βακτηρίου <i>E. coli</i> μετά την τοποθέτηση κονιορτοποιημένου στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ σε μέρος του υποστρώματος.	142
Σχήμα 4.2.	α) Ανεπηρέαστη ανάπτυξη των αποικιών του βακτηρίου <i>E. coli</i> μετά από διασπορά εμβολίου όγκου 1 mL, β) Ολοκληρωτική παρεμπόδιση της ανάπτυξης των αποικιών του βακτηρίου <i>E. coli</i> μετά την τοποθέτηση κονιορτοποιημένου στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος.	143
Σχήμα 4.3.	Παρεμπόδιση της ανάπτυξης των αποικιών του βακτηρίου <i>E. coli</i> και ανάπτυξη αντιμικροβιακών ζωνών μετά την τοποθέτηση κονιορτοποιημένου στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ σε συγκεκριμένα σημεία της επιφάνειας του θρεπτικού υποστρώματος.	144
Σχήμα 4.4	Ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου <i>E.coli</i> σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος με τα στερεά x% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ (x = 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 % κ.β.). Συνθήκες αντίδρασης: w _s =4gr, V _{διαλ.} =180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.	146
Σχήμα 4.5.	Επωασθήσες αποικίες σε δείγματα που λήφθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος <i>E. coli</i> με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ .	148
Σχήμα 4.6.	Επωασθήσες αποικίες σε δείγματα που λήφθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος <i>E. faecalis</i> με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃ .	150

- Σχήμα 4.7.** (α) αναστολή των βακτηρίων *E. coli* κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, σφαιρίδια γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα, και, (β) αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, σφαιρίδια γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα. Συνθήκες αντίδρασης για (α) και (β): w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm. 152
- Σχήμα 4.8.** Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli*, *E. faecalis* και *V. parahaemolyticus*, σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων με το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm. 155
- Σχήμα 4.9.** (α) αναστολή των βακτηρίων *E. coli* κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃, σφαιρίδια CeO₂-γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα, και, (β) αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃, σφαιρίδια CeO₂-γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα. Συνθήκες αντίδρασης για (α) και (β): w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm. 160
- Σχήμα 4.10.** Ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E.coli* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος με τα στερεά x% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ (x = 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 % κ.β.). Συνθήκες αντίδρασης: w_s=4 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm. 163
- Σχήμα 4.11.** Επωασθήσες αποικίες σε δείγματα που λήφθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος *E. coli* με το στερεό 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. 165
- Σχήμα 4.12.** Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli*, *E. faecalis* και *V. parahaemolyticus*, σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων με το στερεό υλικό 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.
- Σχήμα 4.13.** Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli*, *E. faecalis* και *V. parahaemolyticus*, σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων με το στερεό υλικό 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.

- Σχήμα 4.14.** Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli* (α) και *E. faecalis* (β) σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων με τα στερεά υλικά 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ και 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.
- Σχήμα 4.15.** Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli* και *E. faecalis* σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων θαλασσινού νερού με το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.
- Σχήμα 4.16.** Βακτηριακή αναστολή που προκύπτει κατά την μακροχρόνια (72 ώρες) επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. coli* σε θαλασσινό νερό στα στερεά υλικά 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ και CeO₂-γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα (blank). Συνθήκες αντίδρασης: w_s=3 gr, V_{διαλ.}=180 mL, Q_{υγρού}=10 mL/min, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm.
- Σχήμα 4.17.** Ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή που επιτυγχάνεται με χρήση του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και διαλύματος ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag⁺) συγκέντρωσης 0.3 ppb σε μικροβιακό διάλυμα *E. coli*. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm. (ένθετο γράφημα: Η συγκέντρωση του αργύρου που απελευθερώνεται στο υπό επεξεργασία μικροβιακό διάλυμα σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας).
- Σχήμα 4.18.** Ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή που επιτυγχάνεται με χρήση του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και διαλύματος ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag⁺) συγκέντρωσης 0.3 ppb σε μικροβιακό διάλυμα *E. coli*, μετά την προσθήκη οξαλικού οξέος συγκέντρωσης 5 ppb. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm.
- Σχήμα 4.19.** Ποσοστιαία ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. coli* μετά από επεξεργασία με α) το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και β) διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag⁺) συγκέντρωσης 0.3 ppb, με ή χωρίς την προσθήκη οξαλικού οξέος (συμπλοκοποιητικού παράγοντα) σε κάθε περίπτωση.
- Σχήμα 4.20.** Ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας χρησιμοποιώντας α) 20% O₂/He, β) He και γ) H₂ ως αέριο ρεύμα τροφοδοσίας και το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ ως αντιμικροβιακό παράγοντα. Συνθήκες αντίδρασης: T=25 °C, P=1 atm, Q_{υγρού}=10 mL/min, Q_{αερίου}=100 mL/min, stirring=150 rpm.

- Σχήμα 4.21.** Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM) βακτηρίων *E. coli* πριν και μετά από αντιμικροβιακή επεξεργασία. **(α)** ομάδα υγιών βακτηρίων από το τυφλό πείραμα, **(β)** ομάδα παραμορφωμένων και εμφανώς ταλαιπωρημένων βακτηρίων τα οποία είχαν υποστεί αντιμικροβιακή επεξεργασία και **(γ)** εμφανώς ταλαιπωρημένο βακτήριο το οποίο βρίσκεται προσκολλημένο ή πολύ κοντά στην επιφάνεια του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. 190
- Σχήμα 4.22.** Μικροσκοπικές παρατηρήσεις της επιφάνειας του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ πριν **(γ)** και μετά **(α, β)** την χρήση του για επεξεργασία βακτηριακών διαλυμάτων *E. coli*, μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). 192
- Σχήμα 4.23.** Υπέρυθρο φάσμα (ATR-FTIR) του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ (μαύρο) και των σφαιριδίων γ-Al₂O₃ (μπλε), που είχαν προηγουμένως χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων *E. coli* με την διαφορά τους (κόκκινο) να υποδεικνύει την ύπαρξη συγκεκριμένων οργανικών ομάδων στην επιφάνεια του στερεού υλικού (Ag/γ-Al₂O₃). 193
- Σχήμα 4.24.** Ορατό φάσμα του μικροβιακού διαλύματος *E. coli*, στην παρουσία του δείκτη κυανού του μεθυλενίου, πριν (—) και κατά (---) την αντιμικροβιακή επεξεργασία με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Σημειώνεται πως το ορατό φάσμα του στερεού υλικού με δείκτη βρέθηκε να είναι ακριβώς το ίδιο με το φάσμα πριν την αντιμικροβιακή επεξεργασία. 194
- Σχήμα 4.25.** Προτεινόμενος προκαταρκτικός μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης του στερεού Ag/γ-Al₂O₃: (1) η αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων *E. coli* προσελκύεται από τον οξειδωμένο άργυρο της επιφάνειας του στερεού, (2) ο άργυρος αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με την βακτηριακή μεμβράνη προκαλώντας την παραμόρφωση του φορτίου της και την ενεργοποίηση λυπολυτικών ενζύμων της μεμβράνης (όπως η φωσφολιπάση A), (3) υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης μέσω του σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), (4) σχηματισμός οπών στην μεμβράνη του κυττάρου, (5) λύση των μικροβιακών κυττάρων. 201
- Σχήμα 4.26.** Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM), βακτηρίων *E. coli* πριν **(δ, ε)** και μετά **(α-γ)** από ψευδο-καταλυτική επεξεργασία τους με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. 203
- Σχήμα 4.27.** Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM), που λήφθηκαν σε θρυμματισμένα σφαιρίδια του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. **(α)** σωματίδια με ομοιόμορφη επικάλυψη/εναπόθεση Ag, **(β)** σωματίδια με ανομοιόμορφη επικάλυψη Ag. 205

- Σχήμα 4.28.** Σημαντικό βήμα προτεινόμενου μηχανισμού: Αλληλεπίδραση των συσσωματωμάτων αργύρου της ψευδο-καταλυτικής επιφάνειας με το ένζυμο του περιπλάσματος CueO, με αποτέλεσμα την απόσπαση ιόντων αργύρου (Ag^+) από την επιφάνεια του στερεού. 211
- Σχήμα 4.29.** Προτεινόμενος, από την παρούσα διατριβή, μηχανισμός βακτηριακής αναστολής που αποδίδεται, (α) στην ψευδο-καταλυτική επεξεργασία των βακτηρίων *E. coli* και (β) στην επεξεργασία των βακτηρίων *E. coli* με διάλυμα ελευθέρων ιόντων Ag^+ . 215
- Σχήμα 4.30.** Το πετρελαιοφόρο πλοίο "Alexandria".
- Σχήμα 4.31.** Τρισδιάστατο σχέδιο τυπικής κατασκευής στο εσωτερικό της οποίας τοποθετείται το μονομεταλλικό στερεό αργύρου (1% κ.β. Ag/QSG).
- Σχήμα 4.32.** Η βακτηριακή αναστολή που προκύπτει κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. coli* χρησιμοποιώντας "καταλύτη" 1% κ.β. Ag/QSG, σφαιρίδια υποστρώματος QSG αλλά και στο τυφλό πείραμα (blanc).
- Σχήμα 4.33.** Διαμόρφωση των δεξαμενών του νερού έρματος ανάλογα με τον τύπο πλοίου [55].

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
Ag	Άργυρος
Ag ⁺	Ιοντικός άργυρος
ATP	Adenosine triphosphate
ATR - IR	Υπέρυθρη Φασματοσκοπία – Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης
cfu	colony forming unit
C _m	Συνολική Φόρτιση Μετάλλου
DIMSI	Dopant-Induced Metal-Support Interactions
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EEA	European Environment Agency
Ea	Ενέργεια Ενεργοποίησης
et al.	et alii (and others)
FIB	Fecal Indicator Bacteria
GEF	Global Environment Facility
H ₂	υδρογόνο
H ₂ O	νερό
hν	ακτινοβολία
IMO	International Maritime Organization
ICP - MS	Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος
MEPC	Marine Environmental Protection Committee
MF	Membrane Filtration
O ₂	οξυγόνο
O ₃	όζον

P	πίεση
q	Θερμότητα
SEM	Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης
SMSI	Strong Metal Support Interactions
t	χρόνος
T	θερμοκρασία
TDP	Thermal Death Point
TDT	Thermal Death Time
TNTC	Too Numerous to Count
UN	United Nations
US CG	United States Coast Guard
US EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultraviolet (υπεριώδης)
V	όγκος
<i>V. parahemolyticus</i>	<i>Vibrio parahemolyticus</i>
WHO	World Health Organization
$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	$\gamma\text{-αλούμινα}$
λ	μήκος κύματος
ρ	πυκνότητα

ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η πρωτοτυπία της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έγκειται στην ανάπτυξη ακινητοποιημένων νανοσωματιδίων αργύρου (immobilized Silver Nanoparticles – Ag-iNPs) σε επιφάνειες στερεών υποστρωμάτων και κυρίως στη μελέτη τους ως προς τη διεργασία αντιμικροβιακής επεξεργασίας βακτηριακών διαλυμάτων *E. coli*, *E. faecalis* και *V. Parahemolyticus*. Σημειώνεται ότι, παρόλο που η μελέτη της αντιμικροβιακής επεξεργασίας βακτηρίων με χρήση διαλυμάτων ιοντικού αργύρου ή κολλοειδών διαλυμάτων νανοσωματιδίων αργύρου αναφέρεται εκτεταμένα στη διεθνή βιβλιογραφία, η μελέτη ακινητοποιημένων νανοσωματιδίων Ag αναφέρεται για πρώτη φορά στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. Η απόκτηση βασικής γνώσης στο αντικείμενο μελέτης της αντιμικροβιακής διεργασίας σε στερεά υλικά όπως και η μελέτη της δυνατότητας ανάπτυξης στηριζόμενων νανοσωματιδίων Ag σε εμπορικά διαθέσιμα μεταλλοξείδια, αποτελούν σημαντικές παραμέτρους που θα καθορίσουν σε μεγάλο βαθμό τη δυναμική εφαρμογής μιας τέτοιας μελλοντικής αντιμικροβιακής τεχνολογίας στη βιομηχανία.

Στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής έχει αποδειχτεί πως τα ακινητοποιημένα νανοσωματίδια Ag παρουσιάζουν εξαιρετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των βακτηρίων που έχουν μελετηθεί. Επιπλέον, με χρήση εξειδικευμένων πειραμάτων έχει αποδειχτεί, για πρώτη φορά, πως η υψηλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα που παρουσιάζουν τα εν λόγω στερεά υλικά δεν οφείλεται στην επιφανειακή διάλυση (surface dissolution) του αργύρου από τη στερεά φάση προς το διάλυμα (ως ιόντα Ag^+), αλλά οφείλεται στην κατευθείαν αλληλεπίδραση της επιφάνειας του στερεού υλικού με την εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, είναι δηλαδή ένα διεπιφανειακό φαινόμενο. Το γεγονός αυτό αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, αφού η μέχρι σήμερα επικρατούσα θεωρία αποδίδει αποκλειστικά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του αργύρου στη δράση των ιόντων Ag^+ .

Η λεπτομερής μελέτη του μηχανισμού αντιμικροβιακής δράσης του στερεού $Ag/\gamma-Al_2O_3$, που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, οδήγησε στην αποκάλυψη πολύ σημαντικών νέων πληροφοριών για τον εν λόγω μηχανισμό, ενώ επιβεβαίωσε και άλλες που ήταν ήδη γνωστές. Συγκεκριμένα, για πρώτη φορά έγινε χρήση/συνδυασμός ενός τόσο μεγάλου αριθμού επιστημονικών τεχνικών χαρακτηρισμού (ICP-MS, BET, AAS,

ATR-FTIR, UV-Vis, SEM, TEM, ανάλυση γονιδιακής έκφρασης με RT-PCR) για την μελέτη της εν λόγω διεργασίας. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πιο πάνω λεπτομερή μελέτη, προτείνεται στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., ένας λεπτομερής μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης των μεταλλικών στηριζόμενων υλικών αργύρου (Ag-iNPs), ο οποίος δεν ήταν γνωστός μέχρι σήμερα. Με βάση τον προτεινόμενο μηχανισμό, η αντιμικροβιακή δράση των στηριζόμενων νανοσωματιδίων αργύρου μπορεί να θεωρηθεί ως μια διεπιφανειακή, ψευδο-καταλυτική διεργασία, η οποία επάγεται από την αλληλεπίδραση της στερεάς επιφάνειας (ακινητοποιημένα νανοσωματίδια Ag) με τα βακτήρια.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (μηχανιστικά και άλλα) μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη νέων στερεών υλικών, ή τη βελτιστοποίηση υφισταμένων, για συγκεκριμένες περιβαλλοντικές και άλλες εφαρμογές, όπως π.χ., για την επεξεργασία/αποστείρωση του νερού έρματος των πλοίων (ships' Ballast Water), που αποτελεί ένα μείζον περιβαλλοντικό θέμα σήμερα. Με βάση τις εξαιρετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες που παρουσίασαν τα στερεά x% κ.β. Ag/υπόστρωμα, πραγματοποιήθηκαν πιλοτικά πειράματα αντιμικροβιακής επεξεργασίας νερού έρματος (με χρήση του στερεού 1%κ.β. Ag/QSG) σε πραγματικό, εν ενεργεία πλοίο. Η τελευταία προσπάθεια αποτελεί ουσιαστικά την πρώτη πιλοτική δοκιμή της ψευδο-καταλυτικής αντιμικροβιακής διεργασίας για την επίλυση συγκεκριμένου περιβαλλοντικού προβλήματος (επεξεργασία νερού έρματος).

Τέλος, με βάση την προκαταρκτική, απλοποιημένη τεchnο-οικονομική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, φαίνεται πως η προτεινόμενη ψευδο-καταλυτική διεργασία πιθανόν να παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων υφιστάμενων μεθόδων που είναι διαθέσιμες στο εμπόριο και χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό σήμερα.

Με βάση τα πιο πάνω, γίνεται αντιληπτό πως η καινοτομία της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι πολύπλευρη και επεκτείνεται σε διάφορους τομείς, αναδεικνύοντας ταυτόχρονα την αντιμικροβιακή ψευδο-κατάλυση ως, πιθανώς, ένα σημαντικό εργαλείο για την αντιμετώπιση σύγχρονων περιβαλλοντικών ζητημάτων, μέσα από την ανάπτυξη κατάλληλων «πράσινων» τεχνολογιών οι οποίες δύναται να χρησιμοποιηθούν σε πρακτικές εφαρμογές.

ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή έχει ως κύριο στόχο τη μελέτη και αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού της αντιμικροβιακής δράσης των στηριζόμενων νανοσωματιδίων άργυρου σε στερεά υποστρώματα (x% κ.β. Ag/υπόστρωμα), καθώς και την πιθανή εφαρμογή των εν λόγω υλικών για την αντιμετώπιση σύγχρονων περιβαλλοντικών ζητημάτων όπως είναι η αποστείρωση του νερού έρματος των πλοίων. Αναλυτικά, επιτεύχθηκαν οι παρακάτω στόχοι:

1) Σύνθεση και λεπτομερής φυσικοχημικός χαρακτηρισμός μονομεταλλικών (Ag, Cu) και διμεταλλικών (Ag-Cu) στηριζόμενων στερών υλικών με χρήση των τεχνικών BET, AAS, ICP-MS, SEM και TEM, με σκοπό το συσχετισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους (π.χ., φόρτιση μετάλλου, πορώδες, ειδική επιφάνεια, διασπορά μετάλλων, μορφολογία επιφάνειας κ.ο.κ) με την παρατηρούμενη μικροβιακή δραστηριότητα τους έναντι τόσο αρνητικών όσο και θετικών κατά Gram βακτηρίων.

2) Μελέτη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων (ως ποσοστιαία μικροβιακή αναστολή) των παρασκευασθέντων στηριζομένων στερεών υλικών (Ag/ γ -Al₂O₃, Cu/ γ -Al₂O₃, Ag-Cu/ γ -Al₂O₃ και Ag/CeO₂- γ -Al₂O₃) ως προς την επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων των βακτηρίων *E. coli* & *V. Parahaemolyticus* (αρνητικά κατά Gram) και *E. Faecalis* (θετικά κατά Gram) σε ειδικά σχεδιασμένο αυτόκλειστο αντιδραστήρα.

3) Μελέτη της επίδρασης της φόρτισης της ενεργού φάσης (Ag ή Cu), των παρασκευασθέντων στερεών (εύρος φόρτισης 0.05-1% κ.β. Ag ή Cu), με την παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή, μετά από επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων *E. coli*.

4) Διερεύνηση της επίδρασης/συνεισφοράς του υποστρώματος (γ -Al₂O₃, CeO₂- γ -Al₂O₃ και QSG) στην παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή τόσο θετικών όσο και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

5) Μελέτη της επίδρασης της οξειδωτικής κατάστασης των νανοσωματιδίων αργύρου στην επιφάνεια του στερεού Ag/ γ -Al₂O₃ στη παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή βακτηρίων *E. Coli*, μέσω του ελέγχου της χημικής σύστασης του αέριου μίγματος τροφοδοσίας (H₂, O₂/He, He).

6) Επίδραση της χρήσης θαλασσινού νερού στις αντιμικροβιακές ιδιότητες του στερεού 1% Ag/ γ -Al₂O₃ και μελέτη της σταθερότητας του στηριζόμενου στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/CeO₂- γ -Al₂O₃, όσον αφορά την αντιμικροβιακή του δραστηριότητα, σε μεγάλα χρονικά διαστήματα (χρήση αντιδραστήρα συνεχούς ροής) επεξεργασίας μικροβιακού διαλύματος *E. Coli* σε θαλασσινό νερό.

8) Διεξαγωγή πειραμάτων με χρήση κατάλληλου παράγοντα συμπλοκοποίησης (C₂O₄²⁻) των τυχόν ελεύθερων ιόντων Ag⁺ που υπάρχουν στο εκάστοτε υπό επεξεργασία μικροβιακό διάλυμα, με σκοπό την εξακρίβωση κατά πόσο οι παρατηρούμενες αντιμικροβιακές ιδιότητες του στερεού 1% κ.β. Ag/ γ -Al₂O₃ προκύπτουν από έκπλυση ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag⁺) από την επιφάνεια του προς το μικροβιακό διάλυμα.

9) Λεπτομερής μελέτη του μηχανισμού αντιμικροβιακής δράσης του στερεού 1% κ.β. Ag/ γ -Al₂O₃, ως ακολούθως:

α) Ανίχνευση πιθανών παραγωμένων ριζών υδροξυλίου ([•]OH) κατά την αντιμικροβιακή επεξεργασία βακτηρίων *E. Coli*, μέσω χρήσης φασματοφωτομετρίας UV-Vis και κατάλληλου radicals scavenger (methylthioninium chloride – MB).

β) Χαρακτηρισμός πιθανών υπολειμμάτων που προκύπτουν στην επιφάνεια του στερεού Ag/ γ -Al₂O₃, μετά από επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. Coli*, μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) και Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας – Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR-IR).

γ) Χαρακτηρισμός μικροβίων *E. coli* πριν και μετά την επεξεργασία τους με άργυρο (Ag/ γ -Al₂O₃ ή διάλυμα Ag⁺) με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM).

δ) Γενετική ανάλυση (gene expression analysis) της σημαντικής καταστολής ή επαγωγής γονιδίων της *E. coli*, που σχετίζονται κυρίως με αμυντικούς μηχανισμούς του βακτηρίου, κατά την επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων είτε με ακινητοποιημένο άργυρο (στηριζόμενα νανοσωματίδια σε γ -Al₂O₃), είτε με διάλυμα ιόντων Ag⁺.

10) Διερεύνηση της πιθανότητας χρήσης της μεθόδου ψευδο-καταλυτικής αποστείρωσης που προτείνεται στην παρούσα διατριβή, για την αποτελεσματική, οικονομική και περιβαλλοντικά φιλική επεξεργασία νερού έρματος των πλοίων, μέσα από πιλοτικό πείραμα σε εν ενεργεία πλοίο και βασική/απλοποιημένη τεχνο-οικονομική μελέτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1.Εισαγωγή

Η αξία ορισμένων μετάλλων για τους ζωντανούς οργανισμούς θεωρείται ζωτικής σημασίας, αφού τα μέταλλα αυτά είναι υπεύθυνα για την πραγματοποίηση συγκεκριμένων κυτταρικών λειτουργιών που δεν μπορούν να διεκπεραιωθούν από οργανικά μόρια. Η δομή των κυτταρικών μεμβρανών και του DNA αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα καθώς βασίζονται στην ύπαρξη συγκεκριμένων μεταλλικών ιόντων. Εντούτοις, τόσο τα απαραίτητα αυτά μέταλλα, όταν παρουσιάζονται σε περίσσεια, όσο και ορισμένα μη χρήσιμα μέταλλα, μπορούν να αποβούν θανατηφόρα για τα κύτταρα. Τέτοια μέταλλα που χαρακτηρίζονται ως εξαιρετικά δηλητηριώδη για τα περισσότερα βακτήρια ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις αποτελούν ο άργυρος (Ag), ο υδράργυρος (Hg), το τελλούριο (Te) κ.α. Εξαιτίας μάλιστα αυτής της υψηλής τοξικότητας τους, και όπως τεκμηριώνεται από πολλές περιγραφές και χειρόγραφα συγγράμματα (π.χ. ο Πάπυρος του Edwin Smith - 1500 π.Χ.), τα μέταλλα αυτά χρησιμοποιούνταν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες από αρχαιοτάτων χρόνων [16] [17] [18] [19] [20].

Διάφορες πρόσφατες κυρίως μελέτες, κατέδειξαν πως οι αμυντικοί μηχανισμοί των κυττάρων - βακτηρίων, που ενεργοποιούνται στην παρουσία των προαναφερθέντων μετάλλων, υπερνικούνται από την αντιμικροβιακή δραστηριότητα που αναπτύσσουν τα συγκεκριμένα μέταλλα. Η δράση των μετάλλων αυτών στηρίζεται σε ορισμένες τοξικές χημικές ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν όπως η διατάραξη των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βιοφίλμ, η συνεργιστική βακτηριοκτόνος δράση που ασκούν παρουσία άλλων βιοκτόνων, η διάνοιξη της κυτταρικής μεμβράνης και η επιλεκτική αναστολή διάφορων μεταβολικών οδών [21] [17] [22] [20].

Ενδεικτικά, ο άργυρος (Ag), και ειδικότερα ο ιοντικός άργυρος (Ag^+), αποτελεί ένα ισχυρό και πολύ γνωστό αντιμικροβιακό παράγοντα με ευρέως διαδεδομένη βακτηριοκτόνο δράση την οποία η ανθρωπότητα εκμεταλλεύεται εδώ και πολλά χρόνια. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τις ποικίλες και πολύπλευρες χρήσεις του μετάλλου αυτού, κάτι που σε συνδυασμό με την ταχεία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας, τον καθιστά ως το πιο ευρέως εμπορεύσιμο αλλά και το πλέον χρησιμοποιημένο νανοϋλικό σε καταναλωτικά προϊόντα.

Σχετικές μάλιστα έρευνες και επιστημονικές μελέτες δείχνουν πως τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ιδιαίτερα αυξητική τάση στη χρήση μεταλλικού άργυρου, ιόντων αργύρου (Ag^+) και νανοσωματιδίων άργυρου σε πολλούς τομείς όπως η ιατρική, η βιοϊατρική, ο καθαρισμός του νερού και του αέρα, η παραγωγή τροφίμων, τα καλλυντικά, τα ρούχα, και πολλά άλλα προϊόντα οικιακής χρήσης [21] [23]. Παράλληλα με τις πολλές χρήσεις του άργυρου, σημαντικές παράμετροι χρίζουν ιδιαίτερης προσοχής όπως για παράδειγμα η διατήρηση χαμηλής τοξικότητας για τα ανθρώπινα κύτταρα [24] [17] [16] [25] [26] [27] [28] [29].

Γίνεται έτσι προφανές πως η ανθρωπότητα είναι πλέον εκτεθειμένη περισσότερο από κάθε άλλη φορά σε μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων που περιέχουν άργυρο σε διάφορες μορφές, τα οποία εκτός από τη χρήση για την οποία προορίζονται, έχουν επίσης βακτηριοκτόνο δράση [16] [17] [25] [26] [27] [30]. Ως εκ τούτου, κρίνεται επιτακτική η αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών δράσης του άργυρου η οποία ενδέχεται να επηρεάσει την τωρινή και μελλοντική του χρήση.

Παρόλο που τα ελεύθερα ιόντα αργύρου (Ag^+) θεωρούνται πως αποτελούν τον κυρίαρχο μηχανισμό με τον οποίο όλες οι μορφές άργυρου ασκούν αντιμικροβιακή δραστηριότητα [17] [25] [21] [24], κάποιες άλλες αντιμικροβιακές ιδιότητες που δεν ασκούνται από τον άργυρο που βρίσκεται διαλυμένος (ως ιοντικός άργυρος), μαζί με τον βαθμό στον οποίο συμβάλλουν στην βακτηριακή αναστολή, χρίζουν περεταίρω εξέτασης στοχεύοντας στον πλήρη διασαφηνισμό τους [17] [25] [31] [32]. Ενδεικτικά σημειώνεται πως σε αντίθεση με τα πολλά επιστημονικά άρθρα που επικεντρώνονται στις ευεργετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες του άργυρου και ειδικότερα των νανοϋλικών αργύρου, πιο πρόσφατα [16] [21] [24] [33] [34] [35] [36], ένας συγκριτικά αρκετά μικρότερος αριθμός επιστημονικών συγγραμμάτων πραγματεύεται την αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών αντιμικροβιακής δράσης του άργυρου, οι οποίοι ακόμα παραμένουν ασαφείς.

Σημειώνεται επίσης πως κάποιες επιστημονικές μελέτες υποστηρίζουν πως ο στοιχειακός άργυρος (Ag^0) παρουσιάζει σημαντικά μικρότερη έως ανύπαρκτη αντιμικροβιακή δραστηριότητα [29] [31]. Ωστόσο, ο στοιχειακός άργυρος υπό την μορφή νανοσωματιδίων, κερδίζει συνεχώς έδαφος σήμερα ως ο επικρατέστερος εμπορικά αντιμικροβιακός παράγοντας [18] [34] [36]. Η ικανότητα ρύθμισης του μεγέθους του

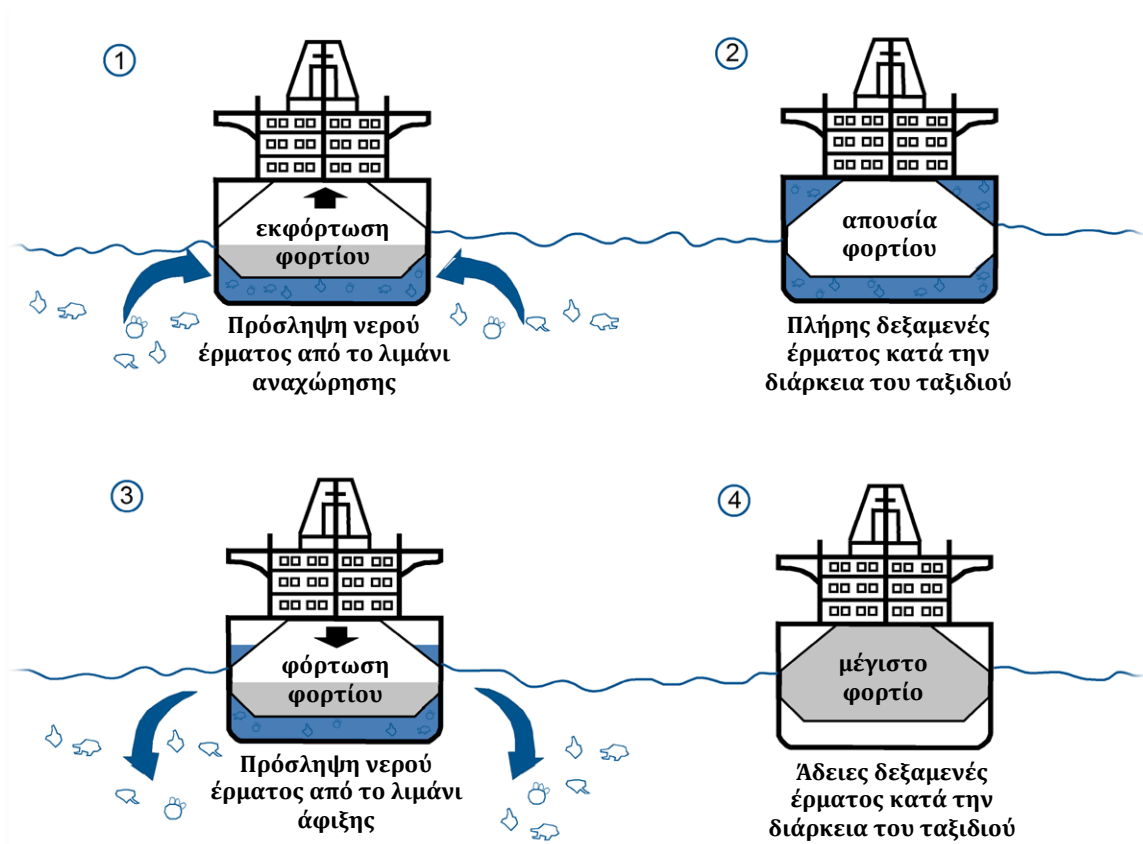
μετάλλου στα εν λόγω υλικά, κάτι που μπορεί να επηρεάσει τις χημικές, φυσικές και οπτικές ιδιότητες τους, ανέδειξε την νανοτεχνολογία ως ένα από τους σπουδαιότερους σήμερα τομείς όσον αφορά την αντιμικροβιακή επεξεργασία-αποστείρωση [25] [35] [28] [37].

Παρά το γεγονός ότι οι μηχανισμοί με τους οποίους ο άργυρος ασκεί την αντιμικροβιακή του δράση δεν έχουν αποκρυπτογραφηθεί, πιστεύεται πως η ιδιότητα αυτή στηρίζεται στην δημιουργία ελεύθερων ιόντων άργυρου (Ag^+) και την επακόλουθη παραγωγή περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων του κυττάρου [21] [17] [36] [38]. Επιπλέον, τα ιόντα αργύρου που προκύπτουν έπειτα από την οξείδωση του στοιχειακού άργυρου, πιστεύεται πως αλληλεπιδρούν με αρνητικά φορτισμένα ένζυμα και πρωτεΐνες που θεωρούνται ζωτικής σημασίας για ένα κύτταρο, προκαλώντας την αλυσιδωτή καταστολή μεταβολικών μονοπατιών [39], ή προάγουν τον σχηματισμό κοιλοτήτων στην εξωκυτταρική μεμβράνη, κάτι που μεταφράζεται σε σοβαρές εξωσκελετικές μορφολογικές αλλαγές [24] [17] [25] [36] [23]. Επιπρόσθετα, η παραγωγή περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) που προωθείται από την ύπαρξη ελεύθερων ιόντων άργυρου, πέρα από το οξειδωτικό στρες που προκαλεί στο κύτταρο, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπανόρθωτες ζημιές στο DNA εξαιτίας της διείσδυσης τους στο εσωτερικό του κυττάρου [17] [25] [36] [29] [40] [41].

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής (Δ.Δ.) επιχειρείται, για πρώτη φορά, η ανάπτυξη και μελέτη ακινητοποιημένων νανοσωματιδίων αργύρου σε στερεά υλικά, όσον αφορά την αντιμικροβιακή επεξεργασία βακτηριακών διαλυμάτων. Η επιτυχία μιας τέτοιας προσπάθειας θα μπορούσε να αποβεί καθοριστική για την αποτελεσματική αντιμετώπιση υφιστάμενων περιβαλλοντικών ζητημάτων, όπως είναι η αποτελεσματική, οικονομικά βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική αποστείρωση του νερού έρματος των πλοίων [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49].

Ο όρος έρμα αναφέρεται στο σύνολο των βαρών που τοποθετούνται στα πλοία, ούτως ώστε να προσδώσουν αυξημένη ευστάθεια ιδιαίτερα σε δυσμενείς καιρικές συνθήκες, να αποκαταστήσουν την απώλεια βάρους λόγω της κατανάλωσης των καυσίμων και του νερού, να υποβοηθήσουν την βύθιση της έλικας και της πλώρης, να ρυθμίσουν την ταχύτητα αλλά και για να εξασφαλίσουν τις όσο το δυνατόν καλύτερες συνθήκες πλεύσης.

Όπως είναι γνωστό, διακρίνονται δύο ειδών έρματα, το μόνιμο που αποτελείται από μια ποικιλία βαρών που τοποθετούνται στον πυθμένα του πλοίου και είχε εκτεταμένη χρήση κυρίως πριν το 1880, αλλά και το προσωρινό ή αλλιώς υδάτινο έρμα, το οποίο άρχισε να χρησιμοποιείται με την εμφάνιση των πρώτων πλοίων από χάλυβα και είναι ουσιαστικά θαλασσινό νερό [50]. Με το νερό αυτό γεμίζονται σήμερα ειδικές δεξαμενές που υπάρχουν στα πλοία και είναι γνωστές ως "δεξαμενές έρματος". Οι συγκεκριμένες δεξαμενές ως επί το πλείστο γεμίζουν πριν από την αναχώρηση των πλοίων από το εκάστοτε λιμάνι στο οποίο βρίσκονται, και αδειάζουν στο λιμάνι άφιξής τους. Η ποσότητα θαλασσινού νερού που χρησιμοποιείται, είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το βάρος του φορτίου το οποίο μεταφέρει κάθε πλοίο [51] [52].



Σχήμα 1.1. Η συσχέτιση μεταξύ της εκφόρτωσης και της λήψης φορτίου σε συνδυασμό με την πλήρωση και την εκκένωση των δεξαμενών έρματος [1].

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, 3-5 δισεκατομμύρια τόνοι θαλασσινού νερού μεταφέρονται από τα πλοία κάθε χρόνο σε παγκόσμια κλίμακα [53], εξαιτίας του ότι η

ναυτιλία αποτελεί τον κυριότερο και καθοριστικότερο παράγοντα εμπορίου υλικών αγαθών και μεταφορών. Επιπρόσθετα, η ανάπτυξη και ο σχεδιασμός περισσότερο προηγμένων πλοίων για την αντιμετώπιση των αυξανόμενων αναγκών εμπορίου, ως αποτέλεσμα της αύξησης του πληθυσμού και του υπερκαταναλωτισμού, οδηγεί αναπόφευκτα στην αύξηση της ποσότητας υδάτινου έρματος που χρησιμοποιείται από τα πλοία. Σημαντικό ζήτημα που προκύπτει αποτελεί η μεταφορά, μέσω του υδάτινου έρματος, δισεκατομμυρίων υδάτινων ειδών όπως παθογόνα αλλά και μη βακτήρια, ιοί, θαλάσσια φύκη, αυγά, σπόρια, μικροάλγη, μικρά ασπόνδυλα και προνύμφες διάφορων υδάτινων φυτών και ψαριών. Έτσι, εύκολα μπορεί κανείς να αντιληφθεί πως οι φυσικοί φραγμοί των υδάτινων θαλάσσιων οικοσυστημάτων, που ευθύνονται για τον ομοιόμορφο διασκορπισμό των ειδών, βρίσκονται υπό απειλή [44] [48]. Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί πως τα περισσότερα είδη τα οποία φιλοξενούνται στις δεξαμενές των πλοίων, δεν καταφέρνουν να επιβιώσουν κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους από λιμάνι σε λιμάνι, ούτε μπορούν να προσαρμοστούν στα ύδατα στα οποία απελευθερώνονται λόγω των δυσμενών συνθηκών που επικρατούν στις δεξαμενές αυτές. Όταν όμως οι συνθήκες αποδεικνύονται ευνοϊκές, καθίσταται εφικτή η μεταφορά μέρους των προαναφερθέντων ειδών στον προορισμό του εκάστοτε πλοίου, διαταράσσοντας κατ' επέκταση το τοπικό οικοσύστημα όντας μη αυτόχθονα είδη [54].

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό ναυσιπλοΐας (IMO), οι συνέπειες που προκύπτουν μέσω της ελλιπούς ή ακόμα και ανύπαρκτης σε ορισμένες περιπτώσεις επεξεργασίας του υδάτινου έρματος, έχουν αρνητικό αντίκτυπο σε πολλούς τομείς. Πέρα από την οικολογική ισορροπία των θαλασσών, επηρεάζεται και η οικονομία τόσο σε τοπική όσο και σε διεθνή κλίμακα, όπως επίσης και η ανθρώπινη υγεία, γεγονός που προσδίδει ιδιαίτερη βαρύτητα στην ορθολογική επεξεργασία του υδάτινου έρματος. Δεν είναι τυχαίο άλλωστε το γεγονός πως το θέμα της ραγδαίας εξάπλωσης υδρόβιων χωροκατακτητικών ειδών, συμπεριλαμβανομένων παθογόνων βακτηρίων και ιών, μέσω κυρίως του υδάτινου έρματος των πλοίων, αναγνωρίζεται ως μια από τις μεγαλύτερες απειλές όσων αφορά τη θαλάσσια βιοποικιλότητα, την οικονομία και τη δημόσια υγεία. Την άποψη μάλιστα αυτή υποστηρίζουν πολλοί διεθνείς οργανισμοί και οργανώσεις όπως τα Ηνωμένα Έθνη (UN), ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), το Παγκόσμιο Ταμείο

Προστασίας του Περιβάλλοντος (GEF) και ο Διεθνής Οργανισμός Ναυσιπλοΐας (IMO) [47] [55].

Ως εκ τούτου, δεδομένης της πολύ υψηλής πυκνότητας βακτηρίων στο υδάτινο έρμα, της τάξης των 10^8 βακτηρίων ανά λίτρο, φαντάζει ιδιαίτερα εύκολη η μεταφορά δισεκατομμυρίων μικροοργανισμών μέσω των δεξαμενών έρματος [44]. Επίσης, λόγω των υψηλών αναπαραγωγικών τους ρυθμών, της ευρείας αντοχής τους σε ένα μεγάλο φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών και της ικανότητάς τους να επιβιώνουν κάτω από αντίξοες συνθήκες παραμένοντας σε αδράνεια, τα βακτήρια εισβάλλουν απρόσκοπτα στα παράκτια υδάτινα οικοσυστήματα, με όλες τις καταστροφικές συνέπειες που μπορεί να επισύρει κάτι τέτοιο. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από το ότι πολλοί μικροοργανισμοί μπορεί να μεταφερθούν, να εμβολιασθούν και να εξαπλωθούν σε νέα περιβάλλοντα, μέσω των τεχνικών ανταλλαγής του υδάτινου έρματος και κατ' επέκταση με μεταφορά των μικροοργανισμών με τον άνεμο όταν αυτοί βρίσκονται υπό την μορφή αερολύματος [42].

Έτσι, καθίσταται επιτακτική η αντιμετώπιση κυρίως των βακτηρίων και των ιών λόγω του τεράστιου αριθμού τους σε σύγκριση με τη βιολογική εισβολή ειδών από φυτοπλαγκτόν και ζωοπλαγκτόν σε μέχρι πρότινος παρθένα νερά, ως προς τα συγκεκριμένα είδη. Αναμφίβολα, μερικά παθογόνα βακτήρια ελλοχεύουν σοβαρούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία και χρίζουν άμεσης, αποτελεσματικής και οικολογικά φιλικής αντιμετώπισης. Όπως άλλωστε περιγράφεται στο άρθρο των Dobbbs και Rogerson για τους μικροοργανισμούς του νερού έρματος, σε αντίθεση με τα μεγάλα ζώα των οποίων οι πληθυσμοί μπορούν να κατανεμηθούν σε συγκεκριμένα γεωγραφικά όρια, οι αυτόνομοι μικροοργανισμοί (βακτήρια – ιοί) λόγω του μεγέθους τους και των χαρακτηριστικών τους, στερούνται γεωγραφικών περιορισμών κάτι που τελικά θα οδηγήσει αργά ή γρήγορα στην παγκόσμια εξάπλωση τους σε κάθε βιολογικό οικοσύστημα του πλανήτη [44] [43].

Έτσι, ο Διεθνής Οργανισμός Ναυσιπλοΐας (IMO) ο οποίος είναι υπεύθυνος μεταξύ άλλων για τη θέσπιση κανονισμών και την προώθηση νομοθεσιών όσον αφορά την ναυτιλιακή βιομηχανία, προέβηκε τον Φεβρουάριο του 2004 στην ετοιμασία μιας διεθνούς συνθήκης σχετικά με τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων η οποία τέθηκε εν τέλει σε ισχύ τον Σεπτέμβριο του 2017. Το γεγονός αυτό επισήμανε για ακόμα μια φορά πως η διαχείριση του υδάτινου έρματος αποτελεί ένα

σύνθετο ζήτημα που ενισχύει την ανάγκη για προστασία της βιοποικιλότητας, για εξεύρεση αποτελεσματικών τεχνικών - λύσεων και για θέσπιση διεθνών κανονισμών με στόχο την ολοκληρωτική διευθέτηση του. Για τον σκοπό αυτό και για την ολοκληρωτική κατάρτιση της συνθήκης, ο Διεθνής Οργανισμός Ναυσιπλοΐας (IMO), εξέδωσε πάνω από 15 σειρές κατευθυντήριων γραμμών και άλλων εγγράφων που εμπεριέχονται στις αποφάσεις και τις εγκυκλίους της Επιτροπής Προστασίας του Θαλάσσιου Περιβάλλοντος (MEPC). Η συνθήκη αυτή μάλιστα υιοθετήθηκε αργότερα από την Ακτοφυλακή και την Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA) των Ηνωμένων Πολιτειών, αναγνωρίζοντας, μεταξύ άλλων, πως η ανεξέλεγκτη διάθεση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων στη θάλασσα οδηγεί σε απρόβλεπτους, ανεπιθύμητους και δυσμενείς εμβολιασμούς των νερών με παθογόνους μικροοργανισμούς. Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες οι μικροοργανισμοί αυτοί, ευθύνονται για το ξέσπασμα πανδημιών αλλά και την εμφάνιση ασθενειών τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε ζώα και φυτά [56]. Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι μέσα από την συγκεκριμένη συνθήκη γίνεται προσπάθεια για έλεγχο των συγκεντρώσεων πέντε ομάδων μικροοργανισμών κατά την απόρριψη του υδάτινου έρματος όπως φαίνεται στον Πίνακα 2. Μεταξύ των πέντε ομάδων μικροοργανισμών για τις οποίες τέθηκαν συγκεκριμένα όρια, συμπεριλαμβάνονται τρία είδη βακτηρίων – δεικτών (indicator species) των οποίων η τήρηση των συγκεντρώσεων στα επιθυμητά πλαίσια αποσκοπεί στην διασφάλιση της προστασίας της δημόσιας υγείας και των οικοσυστημάτων που ενδέχεται να επηρεαστούν.

Εν τούτοις, όπως δείχνουν οι δημοσιευμένες επιστημονικές μελέτες [56] [46] [57] [58], το μερικό επικρατών σήμερα καθεστώς ανταλλαγής νερού το οποίο σταδιακά καταργείται αλλά και οι τρέχουσες τεχνολογίες επεξεργασίας του υδάτινου έρματος δεν αποδεικνύονται αρκετά αποτελεσματικές όσον αφορά στην καταστροφή του βιοφίλμ και των ιζημάτων που βρίσκονται στις δεξαμενές των πλοίων. Τα συγκεκριμένα βιοφίλμ περιέχουν πληθώρα παθογόνων βακτηρίων ενώ τα ιζήματα κατακάθονται στον πυθμένα των δεξαμενών και αποτελούν καταφύγιο για πολλούς μικροοργανισμούς. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα εμπόδια πρακτικής φύσεως που παρουσιάζονται σχετικά με την τοποθέτηση και εγκατάσταση ενός συστήματος επεξεργασίας του νερού έρματος αλλά και τα οικονομικά όπως και περιβαλλοντικά ζητήματα που εγείρει η χρήση των μέχρι στιγμής

πιστοποιημένων μεθόδων/συστημάτων επεξεργασίας, καθιστά επιτακτική την ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών - αποτελεσματικότερων μεθόδων επεξεργασίας [42].

Αυτός είναι και ο βασικός στόχος της παρούσας Δ.Δ., η μελέτη δηλαδή, μιας εναλλακτικής μεθόδου αντιμικροβιακής επεξεργασίας του νερού έρματος (και όχι μόνο), με χρήση μεταλλικά στηριζόμενων στερεών υλικών αργύρου ή και χαλκού.

1.2. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

1.2.1. Αντιμικροβιακές Ιδιότητες του Στοιχειακού (Ag^0) και Ιοντικού (Ag^+) Άργυρου

Ο άργυρος, ο οποίος αξιοποιείται από αρχαιότατων χρόνων για σκοπούς απολύμανσης και αποστείρωσης, αποτελεί σήμερα το πλέον διαδεδομένο μέταλλο που χρησιμοποιείται σε μια πληθώρα εφαρμογών για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών [17] [21] [23] [31] [37] [131] [132] [20]. Χαρακτηριστικά οι Gallo et al. σε μια πρόσφατη έρευνα τους σχετικά με τις επιφανειακές αντιμικροβιακές ιδιότητες ορθοπεδικών εμφυτευμάτων αναφέρουν πως ο άργυρος αποτελεί το περισσότερο προτιμητέο και χρησιμοποιούμενο μέταλλο για βιοϊατρικές εφαρμογές, με την μελλοντική έρευνα να επικεντρώνεται στις μεθόδους χρήσης και σταθεροποίησης του άργυρου ούτως ώστε να επιτυγχάνεται η αναστολή παθογόνων βακτηρίων χωρίς ταυτόχρονα να παρατηρείται ο αρνητικός επηρεασμός υγιών γειτονικών ευκαρυωτικών κυττάρων και η συσσώρευση του άργυρου εντός του οργανισμού [16].

Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός επιστημονικών μελετών πραγματεύονται τη χρήση διάφορων μορφών αργύρου όπως τα νανοσωματίδια αργύρου, για την καταπολέμηση πολλών παθογόνων βακτηρίων [16] [25]. Προκύπτει έτσι ότι η χρήση του άργυρου ενδείκνυται για την αποτελεσματική αναστολή ενός ευρέως φάσματος μικροοργανισμών, καθώς πέρα από την αναστολή των βακτηρίων ο άργυρος προκαλεί την αδρανοποίηση μυκήτων, ιών και αλγών [133] [134] [135].

Ωστόσο, δεν έχει γίνει ακόμα κατορθωτή η αποκρυπτογράφηση και κατανόηση των μηχανισμών δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου αλλά και του άργυρου σε επίπεδα νανοκλίμακας γενικότερα. Ίσως αυτό να οφείλεται και στις διαφορές που προκύπτουν στο μηχανισμό δράσης του άργυρου ανάλογα με την μορφή στην οποία χρησιμοποιείται γεγονός που δικαιολογεί επίσης την μη καταγραφή βακτηριακής αντίστασης στην

μικροβιοκτόνο δράση του μεταλλικού άργυρου (Ag^0) [136]. Η επικρατέστερη σήμερα θεωρία που υποστηρίζεται από σειρά επιστημονικών μελετών, περιλαμβάνει την δράση των ιόντων αργύρου (Ag^+) που προέρχονται από τα νανοσωματίδια (λόγω επιφανειακής διάλυσης), τα οποία αλυσιδωτά προκαλούν σημαντικής μορφής βλάβες και μορφολογικές αλλαγές στο εκάστοτε κύτταρο [137] [21] [24] [38]. Σε ορισμένα μάλιστα βακτήρια παρατηρήθηκε συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, συμπύκνωση και περιορισμός του DNA στο κέντρο του κυττάρου αλλά και δημιουργία οπών στην εξωκυτταρική μεμβράνη από την οποία διαχέονται διάφορα κυτταρικά συστατικά εκτός του κυττάρου [24] [21].

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως ενώ όλες οι περιγραφόμενες μορφές αργύρου ασκούν τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες μέσω της απελευθέρωσης και επιφανειακής έκπλυσης ιόντων αργύρου [25] [38] [31], αναφέρεται (χωρίς να υποδεικνύεται) πως η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των νανοσωματιδίων αργύρου ενδεχομένως να μην οφείλεται στη δράση των ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag^+) [138] [139] [138] [140]. Τονίζεται επίσης πως ο στοιχειακός άργυρος (Ag^0) παρουσιάζει σημαντικά μειωμένες έως ανύπαρχτες αντιμικροβιακές ιδιότητες. Κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, σε πρόσφατη μελέτη των Xiu et al., αναφέρεται πως η βακτηριακή αναστολή ήταν μηδενική σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη του βακτηρίου E.coli χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια άργυρου τα οποία συντέθηκαν και ελέγχθηκαν υπό αυστηρά αναγωγικές συνθήκες ούτως ώστε να αποφευχθεί η οξείδωση του άργυρου και η μετατροπή του σε ιοντικό άργυρο [29] [31].

1.2.2. Μηχανισμοί Δράσης του Άργυρου στα Βακτήρια

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται αυξανόμενο ενδιαφέρον τόσο για την παρασκευή όσο και την μελέτη νανοσωματιδίων αργύρου (Ag NPs), λόγω του ότι τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια έχουν βρεθεί να εμφανίζουν ενδιαφέρουσες αντιβακτηριακές ιδιότητες [141]. Ωστόσο, παρόλο που οι μηχανισμοί δράσης του άργυρου μελετώνται διεξοδικά από την επιστημονική κοινότητα, δεν έχουν ακόμα αποκρυπτογραφηθεί πλήρως [28] [24]. Με βάση την υφιστάμενη γνώση, οι πιο συνηθισμένοι μηχανισμοί τοξικότητας με τους οποίους εικάζεται πως ο τα νανοσωματίδια αργύρου, αλλά και ο ιοντικός άργυρος κατ' επέκταση, αποκτούν βακτηριοκτόνο ιδιότητα, είναι οι ακόλουθοι:

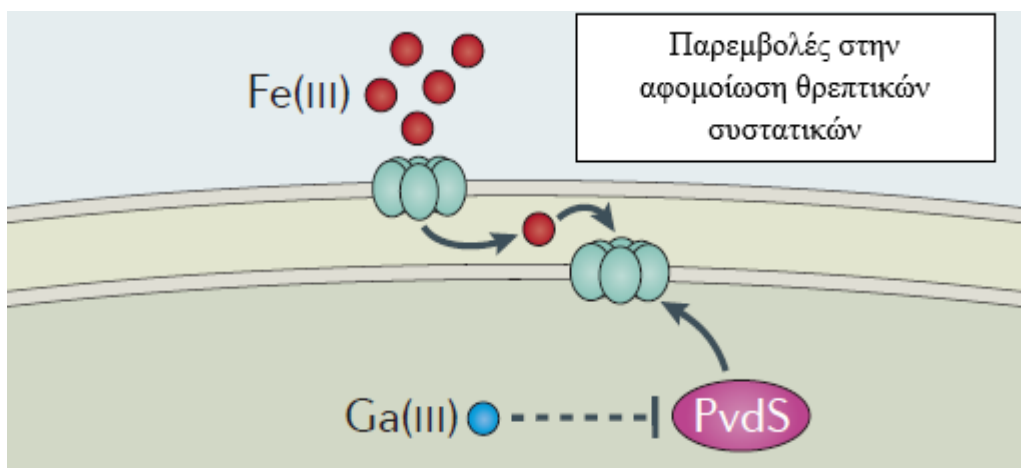
α) Μέσα από διάφορες αντιδράσεις πραγματοποιείται η επιφανειακή έκπλυση κατιόντων αργύρου (Ag^+) που ευθύνονται για τουλάχιστον ένα σημαντικό μέρος της παρατηρούμενης τοξικότητας. Τα ελεύθερα αυτά ιόντα αλληλεπιδρούν με ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την ομαλή λειτουργία του αναπνευστικού συστήματος των βακτηρίων, όπως η NADH αφυδρογονάση που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων [142]. Περαιτέρω, τα ελεύθερα ιόντα αργύρου δεσμεύονται, σε ορισμένες περιπτώσεις, σε ένζυμα που συμμετέχουν στην διαδικασία της γλυκόλυσης, προκαλώντας την αδρανοποίησή τους [143] [144]. Έτσι συντελείται η διατάραξη του κύκλου της κυτταρικής αναπνοής και συγκεκριμένα η αποσύζευξη της αναπνοής από την διαδικασία της σύνθεσης ATP [22] [144] [145] [146] [147] [148]. Επιπλέον, τα ιόντα αργύρου δύνανται να συνδέονται με μεταφορικές πρωτεΐνες προκαλώντας τόσο την διαρροή πρωτονίων από το μικροβιακό κύτταρο και συνάμα την κατάρρευση της πρωτονιεγερτικής δύναμης [22], όσο και την αναστολή της πρόσληψης φωσφορικών ιόντων από τα βακτήρια. Επιπρόσθετα, τα κατιόντα αργύρου πέραν του γεγονότος ότι ευθύνονται για μια φάση αδράνειας στην οποία περιπίπτουν τα βακτήρια, αυξάνουν την συχνότητα των μεταλλάξεων κατά την διάρκεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, η οποία λαμβάνει χώρα κατά την αντιγραφή του DNA, ενώ μπορούν ακόμα και να προκαλέσουν μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα των βακτηρίων όπως η συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, η αποκόλληση του κυτταρικού τοιχώματος και η δημιουργία οπών στην εξωκυτταρική μεμβράνη [17] [25].

β) Η δημιουργία περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) όπως για παράδειγμα τα ανιόντα υπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και οι ρίζες υδροξυλίου και οξυγόνου, μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες και κατ' επέκταση λύση του κυττάρου αφού επιτίθενται στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, εμποδίζουν την φυσιολογική λειτουργία των μιτοχονδρίων ή/και προκαλούν ανεπανόρθωτες βλάβες στο DNA [41]. Τα μέταλλα όπως ο άργυρος, μπορούν παρουσία διαλυμένου οξυγόνου, να δράσουν ως καταλύτες για την δημιουργία περίσσειας δραστικών ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, έρευνες έχουν αποδείξει πως τα νανοσωματίδια αργύρου αλληλοεπιδρούν κατευθείαν με ένζυμα που αποτελούν μέρος του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος του κυττάρου, αναστέλλοντας την λειτουργία τους, ενώ στα βακτηριακά κύτταρα η

αλληλεπίδραση ιόντων αργύρου με τις ομάδες θειόλης των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, αυξάνει και πάλι την παραγωγή ελευθέρων ριζών [149] [150] [151] [152].

γ) Τα οξειδωμένα ιόντα άργυρου μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, δημιουργώντας κοιλώματα (οπές) που μπορεί στο τέλος να επιφέρουν τη λύση του κυττάρου [24] [17] [25]. Αξίζει να σημειωθεί πως η αλληλεπίδραση μεταξύ των νανο-κατιόντων και των βακτηριακών κυττάρων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των θετικά φορτισμένων ιόντων και της αρνητικά φορτισμένης κυτταρικής μεμβράνης τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών κατά gram βακτηρίων [25]. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως η εξωκυτταρική μεμβράνη η οποία περιέχει πολυμερή με ιδιαίτερα υψηλή ηλεκτροαρνητικότητα προσελκύει έντονα μεταλλικά κατιόντα όπως τα ιόντα αργύρου (Ag^+) [153]. Εξαιτίας μάλιστα της ικανότητας των πολυμερών αυτών να συντονίζουν την πορεία των μετάλλων, θεωρείται πως η εξωκυτταρική μεμβράνη αποτελεί το κυτταρικό συστατικό που δέχεται την εντονότερη μεταλλικά επαγόμενη τοξικότητα [21].

δ) Τα κατιόντα άργυρου μπορούν να περιορίσουν την αφομοίωση θρεπτικών συστατικών από το κύτταρο. Κάτι τέτοιο μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας της παρεμπόδισης της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν την δημιουργία των μεταφορικών πρωτεϊνών που ευθύνονται για την είσοδο των εν λόγω θρεπτικών στο εσωτερικό του κυττάρου διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (Σχήμα 1.2) [17] [154] [155].



Σχήμα 1.2. Σχηματική αναπαράσταση της αναστολής της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την μεταφορική πρωτεΐνη του $Fe(III)$ εντός του κυττάρου [17].

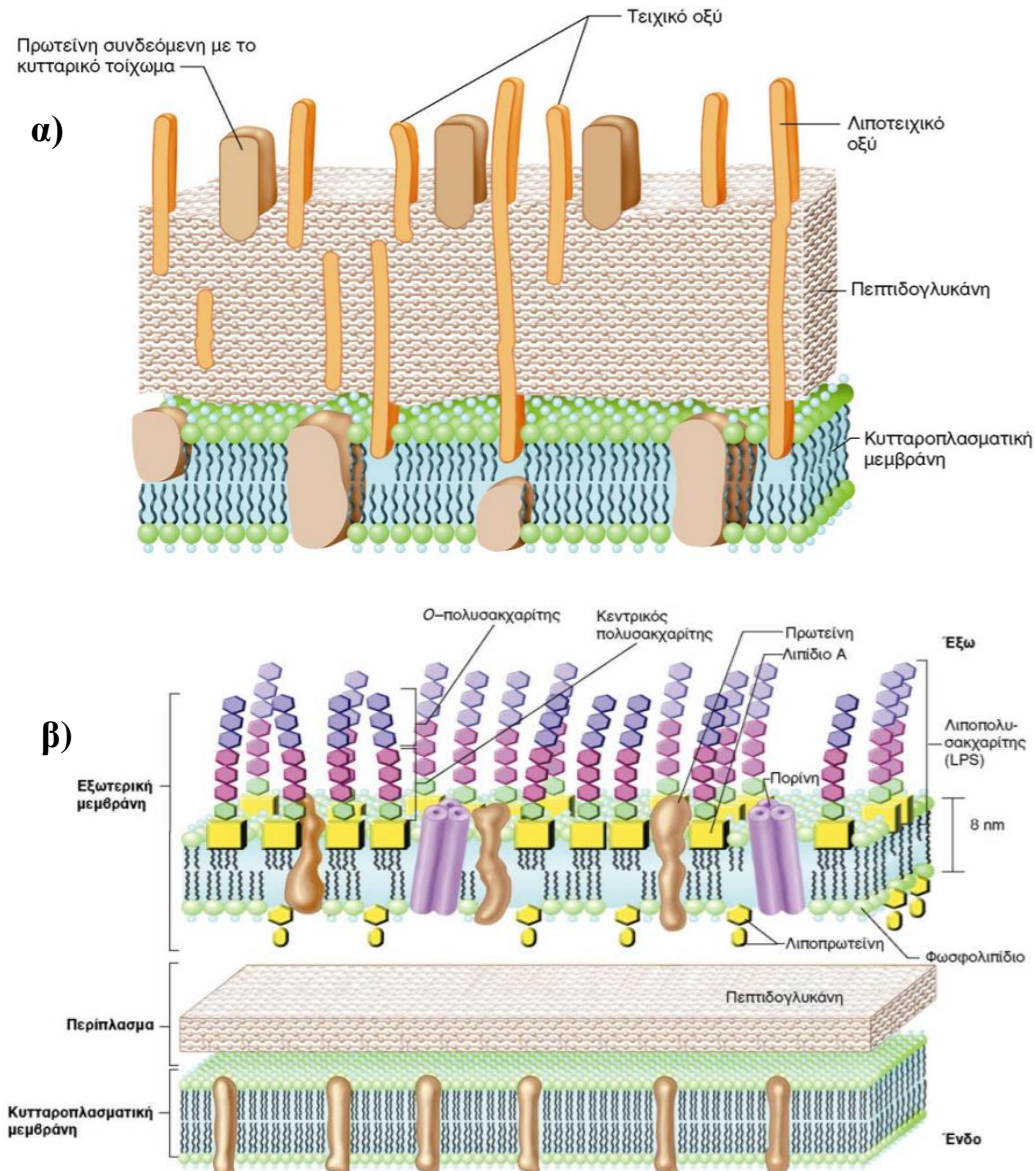
Τονίζεται πως στις περισσότερες περιπτώσεις η αναστολή της ανάπτυξης και ο κυτταρικός θάνατος, πιθανότατα να οφείλονται στον συνδυασμό διαφορετικών μηχανισμών [17].

Με εξαίρεση της περιπτώσεις στις οποίες κάποιο τοξικό μέταλλο δύναται να προκαλέσει την ολοκληρωτική παρεμπόδιση της λήψης θρεπτικών ή και άλλων ουσιών από το κύτταρο, η ενδοκυτταρική συσσώρευση του μετάλλου θεωρείται πως αποτελεί το πρώτο βήμα της δηλητηρίασης που συντελείται. Σημειώνεται πως κάθε μικροοργανισμός χαρακτηρίζεται από διαφορετικό σύμπλεγμα μεταφορικών πρωτεϊνών μέσω των οποίων συντελείται η λήψη και η αποβολή διαφόρων μετάλλων, με τις δραστηριότητες του εκάστοτε συμπλέγματος να αποδεικνύονται καθοριστικές σχετικά με τη συσσώρευση μετάλλων [156]. Εν τούτοις, παραμένει ακόμα άγνωστη η πορεία και ο τρόπος εισόδου εσωτερικά του κυττάρου μερικών τοξικών μετάλλων όπως ο άργυρος (Ag) και ο μόλυβδος (Pb), η πρόσληψη των οποίων πραγματοποιείται μέσω μεταφορικών πρωτεϊνών που ευθύνονται για την πρόσληψη αλλά και ρύθμιση της συγκέντρωσης θρεπτικών ουσιών και απαραίτητων μετάλλων. Εξαιτίας των εν λόγω πρωτεϊνών οι οποίες βρίσκονται συνήθως στην εξωκυτταρική μεμβράνη, πραγματοποιούνται συγκεκριμένα είδη μεταφοράς μετάλλων όπως η απευθείας μεταφορά μέσω πορίνων ή περιπλασμικών μεταφορέων [157] αλλά και η συν-μεταφορά μέσω πρόσδεσης σε μόρια χαμηλού μοριακού βάρους όπως φωσφορικά ανιόντα, αμινοξέα, πεπτίδια και οργανικά οξέα [158].

1.2.3. Κυτταρική Δομή των Βακτηρίων και ο Τρόπος με τον οποίο "Προσελκύεται" ο Άργυρος

Όπως είναι επιστημονικά αποδεδειγμένο, το βακτηριακό τοίχωμα των κυττάρων, τόσο στα κατά Gram θετικά όσο και στα κατά Gram αρνητικά βακτήρια, είναι αρνητικά φορτισμένο. Πιο συγκεκριμένα, στα κατά Gram θετικά βακτήρια, η παρουσία τειχοϊκών οξέων που προσδένονται στα στρώματα πεπτιδογλυκάνης αλλά και στην υποκείμενη πλασματική μεμβράνη αποτελούν τον κύριο λόγο για το αρνητικό φορτίο αυτού του είδους βακτηρίων καθώς τα συγκεκριμένα οξέα περιέχουν αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στη δομή τους (Σχήμα 1.3α). Από την άλλη, η εξωτερική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων μπορεί να μην προσδένεται με τειχοϊκά οξέα, ωστόσο διαθέτει ισχυρότερο αρνητικό φορτίο από τα θετικά κατά Gram βακτήρια. Το γεγονός αυτό βασίζεται στον ισχυρά ανιοντικό χαρακτήρα των εξωπολυσακχαριτών, οι οποίοι προσδένονται στην

εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων αυτών με την βοήθεια λιποπρωτεϊνών, αλλά και από τις αρνητικές ομάδες που περιέχουν θειόλη και είναι παρούσες στα υπολείμματα κυστεΐνης των πρωτεϊνών που διασχίζουν κατακόρυφα την εξωτερική μεμβράνη (Σχήμα 1.3β). Ως εκ τούτου, έχει αποδειχτεί πως, η αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων ιόντων αργύρου με την κυτταρική μεμβράνη, μπορεί να λάβει χώρα κυρίως στα κατά Gram αρνητικά αλλά και στα κατά Gram θετικά βακτήρια [159] [160] [149].



Σχήμα 1.3. Η δομή της εξωκυτταρικής μεμβράνης των θετικών κατά Gram (α) και αρνητικών κατά Gram (β) βακτηρίων [300].

1.2.4. Κυτταρικοί Μηχανισμοί Αντιμετώπισης Τοξικών Μετάλλων

Παρόλο που μέχρι στιγμής δεν έχει αποκρυπτογραφηθεί πλήρως ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου ο άργυρος και άλλα τοξικά μέταλλα ασκούν τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες, οι μηχανισμοί φυσιολογικής προσαρμογής και αντίστασης στα εν λόγω μέταλλα μελετώνται διεξοδικά εδώ και δεκαετίες. Αποσκοπώντας λοιπόν στην αντιμετώπιση του επαγόμενου από τοξικά μέταλλα στρες, τα κύτταρα υιοθετούν ορισμένους από τους μηχανισμούς που περιγράφονται πιο κάτω.

- **Μειωμένη πρόσληψη:** Η ρύθμιση, η έκφραση και η δραστηριότητα των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην πρόσληψη αλλά και την αποβολή μετάλλων θεωρείται καθοριστική για την πρόληψη αλλά και αντιμετώπιση της συγκέντρωσης τοξικών μετάλλων. Πολλοί μικροοργανισμοί και κυρίως βακτήρια έχουν αναπτύξει αξιοπρόσεχτους ρυθμιστικούς μηχανισμούς για τον έλεγχο της δραστηριότητας των μεταφορέων μετάλλων της εξωκυτταρικής μεμβράνης ενώ αναφέρεται πως ορισμένοι από τους εν λόγω μεταφορείς ελέγχονται από μόρια-ρυθμιστές που μπορούν να δεσμεύσουν μεταλλικά ιόντα [161] [162].

- **Αποβολή:** Πολλοί καθοριστικοί γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για την κωδικοποίηση μιας σειράς μεταφορέων της κυτταρικής μεμβράνης, υπεύθυνων για την μεταφορά τοξικών μετάλλων έξω από το κύτταρο [163] [144]. Η έκφραση των εν λόγω συστημάτων ρύθμισης της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης τοξικών μετάλλων ελέγχεται από εξαιρετικά ευαίσθητους ρυθμιστές στους οποίους συνδέονται τα μεταλλικά ιόντα και των οποίων η δραστηριότητα εξαρτάται κυρίως από την υδρόλυση της ATP [164] [165].

- **Εξωκυτταρική παγίδευση:** Ορισμένοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν σημαντική επαγωγή της έκφρασης εξωκυτταρικών πολυμερών [166] ή σιδηροφόρων [167] [168] που περιέχουν λειτουργικές ομάδες ικανές να συμπλοκοποιούν μεταλλικά ιόντα, ως απόκριση στην αυξημένη συγκέντρωση τοξικών μετάλλων. Ως εκ τούτου τα εξωκυτταρικά πολυμερή και σιδηροφορείς που παράγονται δύναται να παγιδεύουν μεταλλικά ιόντα στο εξωκυτταρικό περιβάλλον [169]. Διαλυτοί σιδηροφορείς που δεσμεύονται σε τοξικά μέταλλα, υπόκεινται σε περιορισμένη έως μηδενική πρόσληψη από τους μεμβρανικούς

μεταφορείς [170]. Πολύ πιθανή θεωρείται επίσης η πρόσδεση των μεταλλικών ιόντων σε πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μεμβράνης αλλά και λιποπολυσακχαρίτες [171].

- **Ενδοκυτταρική παγίδευση:** Αρκετοί μικροοργανισμοί προκαλούν την αδρανοποίηση τοξικών μεταλλικών ιόντων μέσω της μετατροπής τους σε μεταλλικά οξείδια, σουλφίδια μετάλλων ή ακόμα και συσσωματωμάτων μετάλλων-πρωτεϊνών, παρόλο που ο βιοχημικός μηχανισμός μέσω του οποίου συντελείται κάτι τέτοιο παραμένει ασαφής [172]. Έτσι, συντελείται η αποτελεσματική παγίδευση τοξικών μετάλλων είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στο περίπλασμα. Επιπρόσθετα, πολλά βακτήρια και άλλοι μικροοργανισμοί δεσμεύουν, παγιδεύουν ή αποθηκεύουν μέταλλα μέσα από την δράση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών όπως οι μεταλλοθειονίνες [173] [174] [175].

- **Επιδιόρθωση:** Ορισμένα κυτταρικά μόρια τα οποία διαθέτουν λειτουργικές ομάδες με αυξημένη ευαισθησία στην οξειδοαναγωγή, θεωρούνται ευάλωτα στην οξείδωση εξαιτίας πρωτογενών αντιδράσεων με μέταλλα ή εξαιρετικά δραστικά μεταλλικά παραπροϊόντα. Τα μόρια αυτά δύναται να επισκευαστούν μέσω συγκεκριμένων ενζύμων ή αντιοξειδωτικών [151].

- **Μεταβολική παράκαμψη:** Τα κύτταρα ορισμένες φορές παρακάμπτουν μεταβολικές οδούς που περιέχουν διαταραγμένα ένζυμα λόγω της ύπαρξης τοξικών μετάλλων, είτε παράγοντας εναλλακτικές πρωτεΐνες με πυρήνες που δεν δεσμεύονται με τοξικά μεταλλικά ιόντα είτε μετατοπίζοντας τις εκάστοτε χημικές ενώσεις προς εναλλακτικά μεταβολικά μονοπάτια [176].

- **Χημική μετατροπή:** Τα μέταλλα δύναται να υποβάλλονται σε συγκεκριμένες οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις εντός των κυττάρων. Οι εν λόγω αντιδράσεις προκαλούν την μεταβολή της χημικής δραστηριότητας των ατόμων των μετάλλων μετριάζοντας την τοξικότητα και μειώνοντας την διαθεσιμότητα τους. Αυτή η διαδικασία μπορεί να οδηγήσει στην μεταβολή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του μετάλλου, στην δημιουργία ιζημάτων μεταλλικών κρυστάλλων ή ακόμα και στην παραγωγή οργανομεταλλικών ενώσεων [165].

1.2.5. DNA και Γονιδιακή Έκφραση

Το δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ (Deoxyribonucleic Acid, DNA) αποτελεί το σύνολο των γενετικών πληροφοριών που καθορίζουν τη βιολογική ανάπτυξη όλων των κυτταρικών μορφών ζωής και της πλειονότητας των ιών. Συναντάται συνήθως με τη μορφή διπλής έλικας.

Το ριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ (Ribonucleic acid, RNA), αποτελεί την δεύτερη κατηγορία πολυμερών νουκλεϊκών οξέων που απαντώνται στο κύτταρο. Αποτελείται από μονομερή νουκλεοτίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της μετάφρασης του κώδικα αντιστοίχισης μέρους των αζωτούχων βάσεων του DNA με τα αμινοξέα της εκάστοτε παραγόμενης πολυπεπτιδικής αλυσίδας, σχηματίζοντας έτσι την πρωτοταγή δομή μιας πρωτεΐνης. Στο σχηματισμό των πρωτεϊνών εμπλέκονται 20 διαφορετικά αμινοξέα, ενώ ο αριθμός των διαφορετικών βάσεων του RNA είναι και πάλι 4, η αδενίνη, η ουρακίλη, η γουανίνη και η κυτοσίνη (A, U, G, C). Κάθε αμινοξύ κωδικοποιείται από μία τριάδα νουκλεοτιδίων (τριπλέτα) του mRNA που ονομάζεται "κωδικονιο". Πιο συγκεκριμένα ένα κωδικόνιο αποτελεί μία τριπλέτα βάσεων της κωδικής αλυσίδας του γονιδίου, η οποία κωδικοποιεί ένα αμινοξύ [105].

Η χημική ανάλυση των μορίων του DNA και του RNA φανερώνει πως πρόκειται για δύο μακρομοριακές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους αποτελούμενες από νουκλεοτίδια. Ωστόσο η σημαντικότερη διαφορά τους έγκειται στο ότι το μόριο του RNA αποτελείται από μια μόνο αλυσίδα η οποία εμφανίζεται από ελικοειδής μέχρι ευθύγραμμη, ανάλογη της μιας εκ των δύο αλυσίδων που απαρτίζουν την διπλή έλικα του DNA. Επιπλέον, το σάκχαρο που συναντάται στα νουκλεοτίδια του RNA είναι η ριβόζη, αντί της δεοξυριβόζης που συναντάται στο DNA, ενώ όπως προαναφέρεται η ουρακίλη του RNA αντικαθιστά την αζωτούχο βάση θυμίνη που υπάρχει στο μόριο του DNA.

Πέρα από το mRNA που μεταφέρει αμινοξέα σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσώματα του κυττάρου χρησιμοποιώντας το ένζυμο της RNA πολυμεράσης, ένα άλλο τύπο RNA αποτελεί το μεταφορικό RNA (tRNA) που πρόκειται για το δομικό συστατικό των ριβοσωμάτων και επιτελεί σημαντικές μεταφορές αμινοξέων που προορίζονται για την πρωτεϊνοσύνθεση με βάση την αρχή της συμπληρωματικότητας των βάσεων [105].

Ως εκ τούτου, τα γονίδια τα οποία αποτελούν συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων του DNA που περιέχουν αποθηκευμένη μία συγκεκριμένη γενετική πληροφορία, μεταγράφονται σε mRNA και μεταφράζονται σε πρωτεΐνες. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *γονιδιακή έκφραση* και πέρα από τις πρωτεΐνες ως γονιδιακό προϊόν μπορεί να προκύψει επίσης RNA. Έτσι τα γονίδια μέσω των γονιδιακών προϊόντων τους ελέγχουν κάθε κυτταρική δραστηριότητα και κατευθύνουν τη φυσική ανάπτυξη και συμπεριφορά ενός οργανισμού [105].

1.2.6. Επεξεργασία του Νερού Έρματος

1.2.6.1. Υπόβαθρο

Η πρώτη οργανωμένη παγκόσμια προσπάθεια για την εύρεση πιθανών μεθόδων επεξεργασίας του νερού έρματος πραγματοποιήθηκε κατά την δεκαετία του 1980, κάτω από τις έντονες ανησυχίες για την ύπαρξη παθογόνων βακτηρίων και ιών με παντελώς άγνωστη ποικιλομορφία στο νερό αυτό (Σχήμα 1.4) [47]. Η πλέον συνηθισμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα για τον μετριασμό ή και την αποτροπή της εμφάνισης των ανεπιθύμητων επιπτώσεων που προκύπτουν από την εισβολή μη αυτόχθονων και επικίνδυνων μικροοργανισμών σε διάφορες περιοχές του πλανήτη, είναι η ανταλλαγή του υδάτινου έρματος με "καθαρό" θαλάσσιο νερό. Η εν λόγω διαδικασία καθορίζεται μέσα από αυστηρούς κανονισμούς και οδηγίες που εξέδωσε ο διεθνής οργανισμός ναυσιπλοΐας (IMO), ωστόσο αναμένεται να εγκαταλειφθεί στο άμεσο μέλλον, καθώς υπάρχουν αυστηρές κατευθυντήριες γραμμές για τοποθέτηση εγκεκριμένου συστήματος επεξεργασίας σε κάθε πλοίο που χρησιμοποιεί υδάτινο έρμα μέχρι το 2024 [177].

Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής εξαρτάται μεταξύ άλλων από την δομή και τον σχεδιασμό του πλοίου. Συγκεκριμένα, υπάρχουν τρεις τύποι ανταλλαγής του υδάτινου έρματος [178]:

α) η μέθοδος ανταλλαγής γνωστή και ως "sequential method", κατά την οποία πραγματοποιείται πλήρης εκκένωση και επαναπλήρωση της δεξαμενής ή των δεξαμενών του εκάστοτε πλοίου με θαλασσινό νερό, χρησιμοποιώντας το υπάρχον σύστημα αντλιών και σωληνώσεων για την πλήρωση και άδειασμα των δεξαμενών. Σύμφωνα με τις οδηγίες από τον διεθνή οργανισμό ναυσιπλοΐας (IMO), η απόρριψη νερού από τις δεξαμενές του

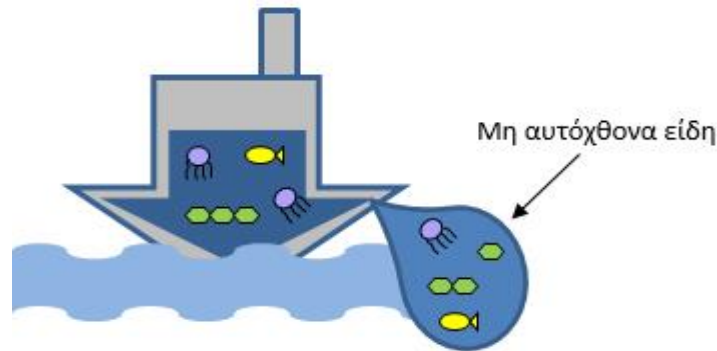
πλοίου συνεχίζεται έως ότου δεν είναι εφικτή η αναρρόφηση περεταίρω ποσότητας νερού. Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως κατά την διάρκεια του αδειάσματος και επαναπλήρωσης των δεξαμενών του πλοίου μπορεί να προκύψουν προβλήματα με την σταθερότητα, την πλεύση και την αντοχή της γάστρας του πλοίου. Επίσης η αποτελεσματικότητα της μεθόδου κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα αφού δεν είναι εφικτή η απομάκρυνση των ιζημάτων και των μικροοργανισμών που βρίσκονται στον πυθμένα των δεξαμενών. Αντ' αυτού, πραγματοποιείται εναιώρηση των συγκεκριμένων ιζημάτων και μικροοργανισμών στον νέο υδάτινο όγκο που εισέρχεται στις δεξαμενές [58].

β) η μέθοδος της συνεχής απόπλυσης, γνωστή και ως "flow through method", σύμφωνα με την οποία οι δεξαμενές του πλοίου ξεπλένονται-υπερχειλίζουν μέσω της άντλησης καθαρού θαλάσσιου νερού κατά την διάρκεια του ταξιδιού ενός πλοίου. Έτσι το νερό έρματος το οποίο αποτελεί νερό από το εκάστοτε λιμάνι στο οποίο προσαράζει το πλοίο, απορρίπτεται σταδιακά στην ανοιχτή θάλασσα. Η μέθοδος αυτή απαιτεί ξεχωριστό σύστημα πρόσληψης και απόρριψης νερού. Σύμφωνα με τις υποδείξεις του διεθνή οργανισμού ναυσιπλοΐας (IMO), ο υδάτινος όγκος που απορρίπτεται μέσω υπερχειλίσης των δεξαμενών πρέπει να ισούται τουλάχιστον με τον τριπλάσιο όγκο χωρητικότητας τους [179]. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μέθοδος, παρά το ότι υπερτερεί έναντι της προηγούμενης μεθόδου, η αποτελεσματικότητά της κυμαίνεται και πάλι σε σχετικά χαμηλά επίπεδα [58].

γ) η μέθοδος της ταυτόχρονης εκκένωσης και πλήρωσης των δεξαμενών με ίση ροή, γνωστή και ως "dilution method", η οποία περιλαμβάνει την άντληση νερού στο εσωτερικό των δεξαμενών έρματος και παράλληλα άδειασμα νερού από το κάτω μέρος του πλοίου. Κάτι τέτοιο συμβάλλει στη διατήρηση της στάθμης του υδάτινου έρματος εντός της δεξαμενής σε σταθερό επίπεδο, εκμηδενίζοντας έτσι τις ενδεχόμενες εσωτερικές πιέσεις στις οποίες θα υποβαλλόταν οποιαδήποτε δεξαμενή και διασφαλίζοντας την ακεραιότητα και την σταθερότητα του πλοίου. Επιπρόσθετα, με την συγκεκριμένη μέθοδο καθίσταται εφικτή η απομάκρυνση τυχόν ιζημάτων που είχαν κατακαθίσει στη δεξαμενή έρματος [47] [178].

Επισημαίνεται ξανά πως λόγω της μειωμένης τους αποτελεσματικότητας αλλά και σύμφωνα και με τα χρονοδιαγράμματα της συνθήκης του IMO, σχετικά με τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων, οι πιο πάνω τεχνικές

ανταλλαγής του υδάτινου έρματος αναμένεται να εγκαταλειφθούν σταδιακά, μέχρι το 2024, καθώς όλα τα πλοία θα υποχρεούνται να φέρουν σύστημα επεξεργασίας.



Σχήμα 1.4. Σχηματική αναπαράσταση της απόρριψης μη αυτόχθονων ειδών με την μέθοδο της ανταλλαγής νερού έρματος [289].

Επιπρόσθετα, έχοντας ως στόχο τον περιορισμό των ευρύτερων κοινωνικο-οικονομικών αρνητικών επιπτώσεων που προκύπτουν από την μεταφορά και απόρριψη υδάτινου έρματος, έχουν εγκριθεί αρκετές μέθοδοι από τον διεθνή οργανισμό ναυσιπλοΐας (ΙΜΟ), οι οποίες χρησιμοποιούνται για την σχετικά ικανοποιητική επεξεργασία του υδάτινου έρματος και, εν πάση περιπτώση, πληρούν τα κριτήρια που προνοούνται στη σχετική συνθήκη του 2004 [106]. Ωστόσο, δεδομένου του γεγονότος πως αρκετά μεγάλη ποσότητα υδάτινου έρματος χρειάζεται να επεξεργαστεί για να καθαριστεί από μια μεγάλη γκάμα από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς προτού απορριφθεί στη θάλασσα, σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, οι υπάρχουσες τεχνολογίες παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Σε συνδυασμό μάλιστα με το γεγονός ότι οι τεχνολογίες αυτές πρέπει να παρουσιάζουν υψηλή αποτελεσματικότητα σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, εύκολα μπορεί κανείς να αντιληφθεί τα ζητήματα που προκύπτουν [180] [55]. Συγκεκριμένα, οι πιστοποιημένες τεχνολογίες επεξεργασίας του νερού έρματος που χρησιμοποιούνται σήμερα και πληρούν τους κανονισμούς και τις κατευθυντήριες γραμμές του ΙΜΟ, περιλαμβάνουν [55] [58]:

- επεξεργασία του νερού έρματος σε εγκαταστάσεις του λιμανιού στο οποίο προσαράζει το εκάστοτε πλοίο (Σχήμα 1.5)

- χρησιμοποίηση καθαρού/επεξεργασμένου νερού ως υδάτινο έρμα για τις δεξαμενές των πλοίων
- χρήση φίλτρων ή υδροκυκλώνων
- εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας
- εκμετάλλευση διαφόρων ειδών θερμότητας για την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού
- χρήση υπερήχων
- χρήση μη οξειδωτικών αλλά και οξειδωτικών χημικών βιοκτόνων ουσιών όπως το χλώριο, το διοξείδιο του χλωρίου και το όζον
- δημιουργία ανοξικών συνθηκών
- εφαρμογή ηλεκτρομαγνητικών πεδίων



Σχήμα 1.5. Επεξεργασία του νερού έρματος σε λιμενικές εγκαταστάσεις [15].

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως ο IMO, εκπόνησε σχετικό χρονοδιάγραμμα με στόχο την ομαλότερη εφαρμογή της σύμβασης που ψηφίστηκε το 2004, το οποίο περιλαμβάνει την εφαρμογή των ποικίλων τεχνολογιών επεξεργασίας του υδάτινου έρματος ανάλογα με το έτος κατασκευής και την χωρητικότητα του κάθε πλοίου. Συγκεκριμένα, πλοία τα οποία έχουν κατασκευαστεί πριν το 2009 και διαθέτουν ολική χωρητικότητα υδάτινου έρματος μικρότερη από 1500 m³ ή μεγαλύτερη από 5000 m³, όφειλαν να πραγματοποιούν ανταλλαγή ή επεξεργασία του έρματος μέχρι το 2016, ενώ από το 2016 και έπειτα

καθιερώθηκε ως υποχρεωτική η επεξεργασία του έρματος ως η μόνη επιλογή καθαρισμού του νερού. Για πλοία που έχουν επίσης κατασκευαστεί πριν το 2009 και διαθέτουν ολική χωρητικότητα έρματος μεταξύ 1500 και 5000 m³, πραγματοποιείται επεξεργασία, ανταλλαγή θαλάσσιου έρματος μέχρι το 2014. Από το 2014 και έπειτα πραγματοποιείται αποκλειστικά επεξεργασία του έρματος για πλοία που εμπίπτουν στα όρια της συγκεκριμένης χωρητικότητας. Επιπλέον, πλοία τα οποία διαθέτουν ολική χωρητικότητα υδάτινου έρματος μικρότερη από 1500 m³ ή μεταξύ 1500 και 5000 m³, και έχουν κατασκευαστεί από το 2009 και έπειτα, υποχρεούνται να διαθέτουν σύστημα επεξεργασίας του θαλασσινού νερού χωρίς να επιτρέπεται η ανταλλαγή του. Όσο αφορά τα πλοία με έτος κατασκευής μεταξύ των ετών 2009 και 2011 που χαρακτηρίζονται από χωρητικότητα έρματος μεγαλύτερη από 5000 m³, οφείλουν και πάλι να πραγματοποιούν ανταλλαγή ή επεξεργασία του έρματος μέχρι το 2016, ενώ τα πλοία που χαρακτηρίζονται από τον ίδιο όγκο χωρητικότητας νερού και έχουν κατασκευαστεί από το 2012 και έπειτα, οφείλουν να πραγματοποιούν μόνο επεξεργασία του υδάτινου έρματος [58]. Συμπληρωματικά αναφέρεται πως έπειτα από τις 8 Σεπτεμβρίου 2017, ημερομηνία κατά την οποία τέθηκε σε ισχύ η προαναφερθείσα συνθήκη διαχείρισης του νερού έρματος, όλα τα πλοία υποχρεούνται να διαθέτουν και να διατηρούν σχέδιο/πλάνο διαχείρισης του νερού έρματος τους, αρχείο διαχείρισης και επεξεργασίας του νερού αλλά και διεθνές πιστοποιητικό διαχείρισης του νερού έρματος. Τα πλοία μάλιστα που κατασκευάζονται μετά από τις 8 Σεπτεμβρίου 2017 δια νόμου υποχρεούνται να διαθέτουν σύστημα επεξεργασίας του νερού έρματος. Τέλος, σταδιακά όλα τα πλοία είναι υποχρεωμένα διαθέτουν σχετικό σύστημα επεξεργασίας μέχρι το 2024. Το γεγονός αυτό υπονοεί την σταδιακή εγκατάλειψη των μεθόδων που προϋποθέτουν ανταλλαγή του νερού έρματος με "καθαρό" θαλασσινό νερό μακριά από παράκτιες περιοχές μέχρι το 2024 [177].

1.2.6.2. Προδιαγραφές για τις Τεχνολογίες Επεξεργασίας του Νερού Έρματος

Η ποσότητα νερού που χρειάζεται να επεξεργαστεί με την χρήση οποιασδήποτε μεθόδου είναι εξαιρετικά μεγάλη, με τις ροές υδάτινου έρματος να κυμαίνονται από 100-6000 τόνους ανά ώρα (t/h). Ωστόσο ο λειτουργικός χώρος που μπορεί να τοποθετηθεί ένα σύστημα επεξεργασίας είναι πολύ μικρός, καθιστώντας έτσι την αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης των μικροοργανισμών στόχων σε χαμηλούς υδραυλικούς χρόνους

παραμονής, αλλά και το μέγεθος του εξοπλισμού επεξεργασίας, ως τα κυριότερα κριτήρια επιλογής της εκάστοτε μεθόδου [46].

Αναμφισβήτητα, οποιαδήποτε τεχνολογία που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του νερού έρματος γενικότερα, δεν πρέπει να επηρεάζει την ομαλή λειτουργία του πλοίου ενώ πρέπει ταυτόχρονα να συμβαδίζει με τους επικείμενους σχεδιαστικούς περιορισμούς του. Επιπρόσθετα, κρίνεται ως ιδιαίτερα σημαντικό να πληρούνται συγκεκριμένα κριτήρια εν πλω, όπως η αποτελεσματικότητα της μεθόδου με το λιγότερο δυνατό κόστος, η υψηλή βιολογική αποδοτικότητα, η εναρμόνιση με την λειτουργία του πλοίου και με το επίπεδο εκπαίδευσης και ειδίκευσης του πληρώματος, η δεδομένη ασφάλεια και διαφύλαξη της προστασίας του περιβάλλοντος, ο μη επηρεασμός άλλων οργανισμών και οικοσυστημάτων γενικότερα μέσα από την μέθοδο αυτή και η πιστοποίηση της συγκεκριμένης μεθόδου από κάποιο αρμόδιο διεθνή οργανισμό [58] [181].

1.2.6.3. Αξιολόγηση των Υπάρχοντων Τεχνολογιών Επεξεργασίας-Αποστείρωσης του Νερού Έρματος

Οι τεχνολογίες αποστείρωσης του θαλασσινού νερού περιορίζονται στη χρήση διάφορων μεθόδων και τεχνικών, οι οποίες έχουν αποδειχτεί ως οικονομικά δαπανηρές ή/και μη περιβαλλοντικά φιλικές, γεγονός που θα αποτελέσει τελικά τον καθοριστικότερο παράγοντα κατάργησής τους. Γενικότερα, η επεξεργασία του νερού μπορεί να πραγματοποιηθεί με μηχανικές ή/και φυσικές μεθόδους, αλλά και με την χρήση ακτινοβολίας και χημικών κυρίως για την καταπολέμηση ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 1, με βάση τις υπάρχουσες τεχνολογίες για την επεξεργασία του νερού έρματος, είτε που χρησιμοποιούνται άμεσα είτε που βρίσκονται σε πιλοτικά ή ερευνητικά στάδια, αποτελεσματικότερες για την απολύμανση του νερού αποδεικνύονται οι παρακάτω τεχνικές, οι οποίες ωστόσο παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα:

Πίνακας 1. Αξιολόγηση των υπάρχοντων τεχνολογιών επεξεργασίας του νερού έρματος

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	Περιβαλλοντική	Οικονομική	Αποστείρωση	
BW Exchange	Sequential	***	**	*
	Flow Through	***	**	*
Treat after Deballasting (port facilities)	***	*	***	
Ballast with treated water	***	*	***	
Filtration and Cyclonic separation	***	**	*	
Filtration (removal of SS)/ UV radiation	***	*	***	
Heat – Thermal treatment	***	*	**	
Microwaves	***	*	***	
Ultrasound	***	*	*	
Electric Pulse	***	*	*	
Biocides (Chlorine, Ozone)	*	**	***	
Deoxygenation	***	*	**	
Electro-ionization/Magnetic separation	***	*	**	
Electrolysis/Electrochloration	*	*	***	
Photocatalysis/Ozone (UV/Ag-TiO ₂ + O ₃)	**	*	***	

* Χαμηλή, ** Μέτρια, *** Υψηλή

- Η ανταλλαγή του νερού έρματος με θαλασσινό νερό όπως περιγράφεται παραπάνω, παρόλο που αποτελεί μια ιδιαίτερα περιβαλλοντικά φιλική και σχετικά οικονομική μέθοδο, παρουσιάζει σημαντικά προβλήματα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως η μέθοδος αυτή σε πολλές περιπτώσεις δεν δύναται να πραγματοποιηθεί λόγω ζητημάτων ασφάλειας και λειτουργικότητας των πλοίων που ενδέχεται να προκύψουν αλλά και λόγω διάφορων γεωγραφικών περιορισμών. Επιπρόσθετα τονίζεται πως η συγκεκριμένη μέθοδος, ανεξάρτητα από την διαδικασία που επιλέγεται για την διεκπεραίωση της, διακρίνεται από χαμηλή βιολογική αποτελεσματικότητα [57].
- Η επεξεργασία του νερού έρματος σε εγκαταστάσεις του λιμανιού στο οποίο προσαράζει το εκάστοτε πλοίο φαντάζει ως μια ιδανική μέθοδος, ωστόσο συγκεκριμένες ιδιαιτερότητες όπως η ποσότητα του νερού έρματος που απαιτείται σε σύντομα χρονικά διαστήματα αλλά και το γεγονός πως τέτοιες εγκαταστάσεις δεν είναι δυνατό, και σε μερικές περιπτώσεις επιθυμητό, να ανεγερθούν σε κάθε λιμάνι, καθιστά

την μέθοδο αυτή ως ανέφικτη και αναποτελεσματική ως προς την γενικότερη εφαρμογή της.

- Η χρησιμοποίηση καθαρού/επεξεργασμένου νερού ως υδάτινο έρμα για τις δεξαμενές των πλοίων παρουσιάζει τις ίδιες με την παραπάνω μέθοδο δυσκολίες, σχετικά με την ανέγερση ειδικών εγκαταστάσεων, πέραν του γεγονότος πώς τέτοιες εγκαταστάσεις απαιτούν διεξοδική επιστημονική έρευνα σχετικά με τα είδη και τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς που απαιτούν επεξεργασία, ούτως ώστε να καταστεί εφικτή η προσαρμογή των εγκαταστάσεων αυτών στο εκάστοτε τοπικό θαλάσσιο περιβάλλον.
- Η χρήση φίλτρων ή υδροκυκλώνων για την επεξεργασία του νερού έρματος τόσο κατά την απόρριψη όσο και κατά την πρόσληψη νερού σε συνδυασμό με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας χαρακτηρίζεται ως ένας αρκετά αποτελεσματικός συνδυασμός για την απολύμανση του νερού όταν μάλιστα χρησιμοποιείται η σωστή δοσολογία ακτινοβολίας κάτι που δεν εγείρει την δημιουργία επικίνδυνων παραπροϊόντων. Παρ' αυτά, το σχετικά υψηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας των συγκεκριμένων μεθόδων, σε συνδυασμό με την εξάρτηση της απολυμαντικής αποτελεσματικότητας της ακτινοβολίας από το μέγεθος και την μορφολογία των μικροοργανισμών αλλά και την περιεκτικότητα του νερού σε αιωρούμενα σωματίδια, αποτελούν τους κύριους λόγους αμφισβήτησης τους. Επίσης, το γεγονός ότι οι "μηχανισμοί επισκευής" των βακτηριακών κυττάρων ενδεχομένως να αποκαταστήσουν την βλάβη που προκαλείται λόγω έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία, επηρεάζει και πάλι την αποδοτικότητα της εν λόγω μεθόδου. Κρίνεται έτσι σημαντικόι οι οργανισμοί που απαντώνται στο νερό έρματος να εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία για αρκετό χρονικό διάστημα ούτως ώστε να υποστούν ανεπανόρθωτη βλάβη του DNA. Κάτι τέτοιο υποδηλώνει πως η πολύ υψηλή ροή του νερού έρματος δεν ενδείκνυται αφού δεν παρέχεται αρκετός χρόνος δράσης για την υπεριώδη (UV) ακτινοβολία.
- Μια υποσχόμενη μέθοδο αποτελεί η θερμική επεξεργασία η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με την εκμετάλλευση της παραπανίσιας θερμότητας που παράγεται από τις μηχανές του πλοίου ή με την χρήση θερμότητας που παράγεται από εφεδρικά συστήματα λέβητων που είναι εγκατεστημένα στο εκάστοτε σκάφος. Συγκεκριμένα, για

την αδρανοποίηση των περισσότερων από τους ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς που εμπεριέχονται στο νερό έρματος, απαιτούνται θερμοκρασίες πάνω από 40 °C. Αυτός είναι και ο σημαντικότερος λόγος για τον οποίο η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται κυρίως για υδάτινο έρμα που προέρχεται από θερμά περιβάλλοντα, καθώς σε τέτοιες περιπτώσεις χρειάζεται λιγότερη αύξηση της θερμοκρασίας για την επιτυχή απολύμανση του νερού, και κατ' επέκταση λιγότερη κατανάλωση ενέργειας. Κάτι τέτοιο καθιστά την συγκεκριμένη μέθοδο λειτουργικά βιώσιμη. Σε αντίθετη περίπτωση, η χρήση θαλασσινού νερού ως υδάτινο έρμα από ψυχρές περιοχές, συμβάλλει στην δραματική αύξηση του λειτουργικού κόστους της θερμικής επεξεργασίας του νερού. Επίσης, άλλοι παράγοντες που πρέπει να ελέγχονται και να ρυθμίζονται όπως για παράδειγμα η ύπαρξη πλεονάσματος θερμότητας, οι απώλειες θερμότητας κατά την μεταφορά της στις δεξαμενές του πλοίου αλλά και ο κίνδυνος διάβρωσης των δεξαμενών αυτών, αυξάνει κατά πολύ την αβεβαιότητα της μεθόδου αυτής [55].

- Αναμφίβολα η χρήση μικροκυμάτων για την θερμική επεξεργασία του υδάτινου έρματος, παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά θέρμανσης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους θέρμανσης του νερού. Ωστόσο το υψηλό οικονομικό κόστος λειτουργίας και εγκατάστασης, μαζί με τον ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο διάβρωσης υλικών εξαιτίας των μικροκυμάτων, οδήγησε στην υποβάθμιση της συγκεκριμένης μεθόδου, παρόλα τα υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας που παρουσιάζει.
- Είναι γνωστό πως η χρήση μη οξειδωτικών βιοκτόνων όπως η γλουταραλδεΐδη και οι ναφθοκινόνες αλλά κυρίως οξειδωτικών βιοκτόνων όπως το χλώριο, το διοξειδίο του χλωρίου και το όζον, αποτελούν μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδο για την απολύμανση και γενικότερα την επεξεργασία του υδάτινου έρματος. Δεδομένου του γεγονότος ότι οι δοκιμές με μη οξειδωτικά βιοκτόνα βρίσκονται ακόμα σε πειραματικά στάδια, η απολύμανση του θαλασσινού νερού που χρησιμοποιείται ως νερό έρματος γίνεται με την χρήση οξειδωτικών βιοκτόνων, η αποτελεσματικότητα των οποίων όμως επηρεάζεται από συγκεκριμένες παραμέτρους όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία του νερού και ο χρόνος αντίδρασης. Επιπλέον, παρόλο που η προεπεξεργασία του νερού πριν από την χρήση των χημικών αυτών βιοκτόνων μειώνει κατά πολύ την απαιτούμενη ποσότητα για την απολύμανση του, ελλοχεύουν και πάλι σημαντικοί περιβαλλοντικοί

κίνδυνοι, λόγω των τοξικών παραπροϊόντων που προκύπτουν, τα οποία πέρα από την καταστροφή των οικοσυστημάτων στα οποία διοχετεύονται, θέτουν επίσης και σοβαρά ζητήματα όσων αφορά την ανθρώπινη υγεία.

- Η δημιουργία ανοξικών συνθηκών μέσω της αφαίρεσης του οξυγόνου από το νερό έρματος χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές, αποτελεί μια μέθοδο με όχι και τόσο ψηλά επίπεδα αποτελεσματικότητας λόγω της ανάπτυξης αναερόβιων μικροοργανισμών. Παράλληλα η μέθοδος αυτή προϋποθέτει και υψηλό λειτουργικό κόστος καθιστώντας την ασύμφορη [55].
- Η μέθοδος του ηλεκτρο-ιονισμένου μαγνητικού διαχωρισμού κρίνεται ως μια αρκετά αποτελεσματική λύση για την επεξεργασία του υδάτινου έρματος. Εντούτοις, τόσο οι διαδοχικές διεργασίες που απαιτούνται, για την δημιουργία ιόντων αζώτου και οξυγόνου τα οποία θα βοηθήσουν στον σχηματισμό συσσωματωμάτων, όσο και το μαγνητικό φίλτράρισμα που ακολουθεί, αποτελούν ιδιαίτερα δαπανηρές διαδικασίες.
- Η ηλεκτρόλυση/ηλεκτροχλωρίωση αποτελεί μια ελκυστική μέθοδο για επεξεργασία του νερού έρματος λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητας που προσφέρει. Πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτρόλυση αποτελεί μια ηλεκτροχημική διαδικασία όπου το συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα που διέρχεται από το νερό έρματος χρησιμοποιείται για τη δημιουργία διαφόρων ενώσεων με σημαντικές απολυμαντικές ικανότητες όπως το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), το υποχλωριώδες ιόν (OCl^-), το υποβρωμικό οξύ (HBrO), το υποβρωμικό ιόν (BrO^-) και οι ρίζες υδροξυλίου (OH^\cdot). Η ηλεκτροχλωρίωση αποτελεί μια διαδικασία δημιουργίας δραστικών ενώσεων χλωρίου μέσω διέλευσης ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου του προς επεξεργασία νερού που χαρακτηρίζεται από υψηλή συγκέντρωση άλατος (NaCl). Πέρα από την συγκέντρωση χλωρίου στο νερό, η αποτελεσματικότητα της ηλεκτροχλωρίωσης εξαρτάται επίσης από την θερμοκρασία και τον χρόνο αντίδρασης/επεξεργασίας. Ωστόσο, σημαντικό πρόβλημα και ταυτόχρονα μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δημιουργία παραπροϊόντων, με τα πλέον επικίνδυνα να προέρχονται από την αντίδραση του χλωρίου με οργανική ύλη. Επομένως κρίνεται απαραίτητη η ουδετεροποίηση τέτοιων ενώσεων όπως το χλωροφόρμιο πριν την απόρριψη του επεξεργασμένου νερού έρματος με τον κίνδυνο,

της θαλάσσιας ρύπανσης να ελλοχεύει πάντοτε, εγείροντας σημαντικά περιβαλλοντικά ζητήματα [182].

- Σε μια πρόσφατη έρευνα, οι Wu et al. το 2011, διερευνήσαν την δυνατότητα επεξεργασίας του υδάτινου έρματος με χρήση της φωτοκατάλυσης. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η αναστολή των μικροοργανισμών δεικτών *Escherichia coli* και *Vibrio alginolyticus* σε ειδικούς αντιδραστήρες με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας και λεπτών μεμβρανών διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) εμποτισμένων με νανοσυμπλέγματα αργύρου (Ag), σε συνδυασμό με την ροή όζοντος (O_3). Η αποδοτικότητα αναχαίτησης των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν ήταν μεγαλύτερη όταν η ένταση της ακτινοβολίας και η ροή όζοντος ήταν αυξημένες, και ήταν ιδιαίτερα εμφανής κατά τα πρώτα στάδια της διαδικασίας. Κυριότερα όμως μειονεκτήματα της όλης διαδικασίας αποτελούν η χρήση όζοντος το οποίο μπορεί να πλήξει καταστροφικά το τοπικό περιβάλλον αλλά και το υψηλό κόστος λειτουργίας της μεθόδου λόγω της χρησιμοποίησης υπεριώδους ακτινοβολίας. Εν τούτοις, μέσα από την μελέτη αυτή διαφάνηκε πως η συνδυασμένη UV/Ag- TiO_2 / O_3 επεξεργασία του υδάτινου έρματος, είναι μια υποσχόμενη μέθοδος για την αντιμετώπιση του μικροβιακού φορτίου, ενισχύοντας παράλληλα την σημαντικότητα του τομέα της κατάλυσης [45].

1.2.6.4. Επικινδυνότητα Παθογόνων Μικροοργανισμών Νερού Έρματος

Αναμφισβήτητα, έχουν καταγραφεί πολλά περιστατικά σε πολλές χώρες του πλανήτη, στις οποίες εισήχθησαν μέσω του υδάτινου έρματος των πλοίων παθογόνα στελέχη μικροοργανισμών όπως το *Vibrio cholerae* και το *Vibrio parahaemolyticus*, προκαλώντας επιδημίες ή πανδημίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η επιδημία χολέρας που ξέσπασε το 1991 στην Λατινική Αμερική, η οποία προκάλεσε δέκα χιλιάδες θανάτους και περισσότερα από ένα εκατομμύριο περιστατικά διάγνωσης χολέρας. Για την εκδήλωσή της μάλιστα πιστεύεται πως ευθύνεται το υδάτινο έρμα των πλοίων που κατέφθασαν στην περιοχή από την Ασία [47] [56].

Η χολέρα αποτελεί μια σοβαρή επιδημική νόσο στην οποία αποδίδονται οχτώ μεγάλες πανδημίες από το 1817. Η προτελευταία που ξεκίνησε το 1961 από την Ινδονησία, προκαλεί σήμερα τεράστια προβλήματα στην Νοτιοανατολική Ασία και την Αφρική ενώ

προηγουμένως είχε επηρεάσει και την Ευρώπη, τη Βόρειο Αμερική και την Ιαπωνία. Αρκετά νέα κρούσματα που αναφέρθηκαν στο Τέξας των Ηνωμένων Πολιτειών το 1981, μερικά σποραδικά κρούσματα που προέκυψαν στη Λουϊζιάνα και τον Περσικό κόλπο αργότερα, η επανεμφάνιση του στελέχους *Vibrio cholerae* O139 στην Ινδία και το Μπαγκλαντές το 1992, γεγονός το οποίο μπορεί να θεωρηθεί η αιτία του ξεσπάσματος της 8ης πανδημίας, τα κρούσματα χολέρας που διαπιστώθηκαν το 1994 σε 94 διαφορετικές χώρες, αλλά και διάφορες άλλες περιπτώσεις μόλυνσης που παρατηρούνται μέχρι και σήμερα, αποδόθηκαν κυρίως στην μεταφορά του νερού έρματος από τα πλοία και την απόρριψη του χωρίς να υποβληθεί σε επεξεργασία [49] [183] [184] [47] [43].

Γενικότερα, η παγκόσμια μετακίνηση του νερού έρματος από τα πλοία έχει δημιουργήσει ένα μηχανισμό διασποράς των παθογόνων και επικίνδυνων για τον άνθρωπο μικροοργανισμών σε μεγάλες αποστάσεις. Ως φυσικό επακόλουθο προκύπτει η διατάραξη της ισορροπίας όσον αφορά την παγκόσμια διασπορά των μικροοργανισμών, καθώς και το ξέσπασμα πανδημιών που οφείλονται σε υδατογενή νοσήματα.

1.2.6.5. Όρια Συνθήκης του IMO για τους Παθογόνους Μικροοργανισμούς στο Νερό Έρματος

Λαμβάνοντας υπόψη τα όσα έχουν προαναφερθεί, ο διεθνής οργανισμός ναυσιπλοΐας (IMO), προέβηκε στην θέσπιση συγκεκριμένων ορίων με στόχο τον περιορισμό της μετακίνησης μη αυτόχθονων ειδών σε παρθένες, ως προς τα είδη αυτά, περιοχές [50].

Τα όρια αυτά συμπεριλαμβάνονται στη "διεθνή συνθήκη σχετικά με τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων" που ψηφίστηκε το 2004 από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO), και παρουσιάζονται αναλυτικά στον "κανονισμό D2" του "Παραρτήματος 4" της σχετικής συνθήκης. Έτσι, τα όρια που πρέπει να διέπουν την απόρριψη υδάτινου έρματος σχετικά με τους μικροοργανισμούς γενικότερα αλλά και συγκεκριμένα είδη βακτηρίων, απαγορεύουν την απόρριψη υδάτινου έρματος που δεν πληρεί τα κριτήρια του Πίνακα 2 [180].

Πίνακας 2. Όρια απόρριψης του νερού έρματος σύμφωνα με τον κανονισμό D2 (IMO, 2004)

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	ΌΡΙΟ ΑΠΟΡΡΙΨΗΣ ΣΤΟ ΝΕΡΟ ΕΡΜΑΤΟΣ
<i>Φυτοπλαγκτόν/Ζωοπλαγκτόν</i> $\geq 50 \mu m$	< 10 βιώσιμων οργανισμών / m ³ νερού
<i>Φυτοπλαγκτόν/Ζωοπλαγκτόν</i> 10 - 50 μm	< 10 βιώσιμων οργανισμών / mL νερού
<i>Vibrio cholerae (O1 και O139)</i>	< 1 cfu / 100 mL νερού
<i>Escherichia coli</i>	< 250 cfu / 100 mL νερού
<i>Intestinal Enterococci</i>	< 100 cfu / 100 mL νερού

1.2.6.6. Βακτήρια *E. coli*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* και η Ομάδα Βακτηρίων *Intestinal Enterococci*

Το βακτήριο *Escherichia coli* αποτελεί ένα αρνητικό κατά Gram, δυνητικά αναερόβιο, ραβδόμορφο βακτήριο του γένους *Escherichia*, της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Το βακτήριο αυτό που σε συντομογραφία είναι γνωστό ως *E.coli*, έχει μελετηθεί διεξοδικά για πάνω από 60 χρόνια με αποτέλεσμα την πλήρη αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος του το 1997. Μπορεί να βρεθεί στο φυσικό περιβάλλον, τα τρόφιμα, το νερό και τα σε μέρη του πεπτικού συστήματος των ανθρώπων και των ζώων. Υπάρχουν πάρα πολλά στελέχη του συγκεκριμένου βακτηρίου απαρτίζοντας μια μεγάλη και ποικιλόμορφη ομάδα. Παρά το γεγονός πως τα περισσότερα από τα στελέχη αυτά είναι αβλαβή, υπάρχουν κάποια τα οποία έχουν αναγνωριστεί ως παθογόνα αφού παράγουν επικίνδυνες τοξίνες. Συγκεκριμένα, μερικοί τύποι του βακτηρίου *E.coli* μπορούν να προκαλέσουν διάρροια, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, νεφρική ανεπάρκεια, πνευμονία και άλλες σοβαρές ασθένειες [185] [186].

Υπό κανονικές συνθήκες τα βακτήρια *E.coli* αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του εντέρου, και έτσι απαντώνται στο πεπτικό σύστημα όλων των θηλαστικών, αποτελώντας μάλιστα μια σημαντική ένδειξη μιας υγιούς ανθρώπινης γαστρεντερικής οδού αφού παρεμποδίζουν άλλα παθογόνα βακτήρια να αποικίσουν την περιοχή αυτή. Τα παθογόνα όμως στελέχη της συγκεκριμένης ομάδας βακτηρίων μπορούν να προκαλέσουν είτε ασθένειες που σχετίζονται με την εντερική οδό, όπως διάρροια, είτε ασθένειες εκτός του

εντέρου. Αξίζει να αναφερθεί πως οι τύποι του βακτηρίου *E.coli* που προκαλούν διάρροια, μεταδίδονται μέσω μολυσμένου νερού ή τροφής και μέσω επαφής με ζώα ή άλλα άτομα [185] [186] [187].



Σχήμα 1.6. Ηλεκτρονική φωτογραφία (SEM) του βακτηρίου *E.coli* [263].

Επιπρόσθετα, με απώτερο σκοπό την προστασία της δημόσιας υγείας, μερικά μη επιβλαβή είδη του βακτηρίου αυτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την κοπρανώδη μόλυνση του νερού. Έτσι, δεν είναι απαραίτητος ο έλεγχος του υπό εξέταση όγκου νερού για όλα τα παθογόνα βακτήρια που πιθανόν να περιέχει. Επίσης, το βακτήριο *E.coli* μπορεί να επιβιώσει στο θαλασσινό νερό για πολλές εβδομάδες ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν. Ως εκ τούτου, σε συνδυασμό με το γεγονός πως αποτελεί ανώτερο δείκτη για την διακρίβωση τυχόν κοπρανώδους μόλυνσης, σε σύγκριση με άλλους μικροβιακούς δείκτες, μπορεί να χαρακτηριστεί ως ορθή (δίκαιη) η συμπερίληψη του στα βακτήρια που ελέγχονται για την εξακρίβωση της ποιότητας του νερού έρματος όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 [188] [185] [187] [186] [189].

Τα *Vibrio*, αποτελούν μια ομάδα αρνητικών κατά Gram, πολύ κινητικών βακτηρίων. Όσον αφορά τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά, τα συγκεκριμένα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως καμπυλωτά ραβδία με ένα και μοναδικό πολικό μαστίγιο. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανοχή που επιδεικνύουν τα βακτήρια του γένους *Vibrio* σε αλκαλικό περιβάλλον στο οποίο δύσκολα μπορούν να επιβιώσουν τα περισσότερα εντερικά βακτήρια. Αντιθέτως, παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία σε όξινες συνθήκες με αποτέλεσμα ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού τους να πεθαίνει στο στομάχι. Τα βακτήρια λοιπόν που επιβιώνουν, μπορούν να αποικήσουν το λεπτό έντερο απ' όπου και εκκρίνουν την ισχυρή

εντεροτοξίνη της χολέρας από την οποία πήρε την ονομασία της η ομόνυμη ασθένεια. Σημειώνεται στο σημείο αυτό πως το βακτήριο *Vibrio parahemolyticus* (το οποίο μελετήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ.) αποτελεί και αυτό ένα περιστασιακά παθογόνο είδος, συγγενικό με το είδος *Vibrio cholerae*, με όμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά.



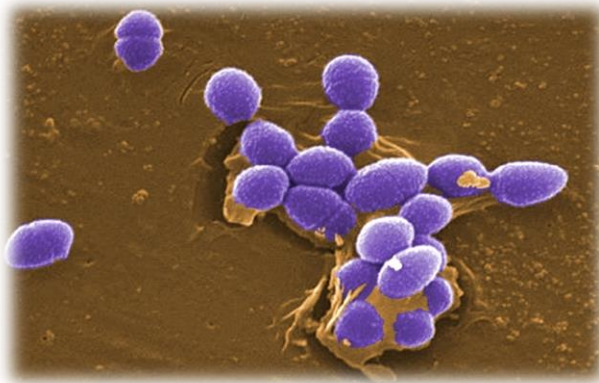
Σχήμα 1.7. Ηλεκτρονική φωτογραφία (SEM) του βακτηρίου *Vibrio cholera* [266].

Ένας πολύ μεγάλος αριθμός βακτηρίων *Vibrio*, μερικά εκ των οποίων δυνητικά παθογόνα, ζουν ελεύθερα στη φύση σε αλμυρά ή υφάλμυρα νερά στα οποία αναπτύσσονται ταχέως και συχνά σε συνδυασμό με υδρόβια φυτά, ζωοπλαγκτόν, κωπήποδα και οστρακοειδή. Συγκεκριμένα, ορισμένα στελέχη του είδους *Vibrio cholerae* μπορούν να προκαλέσουν ήπιες ή ασυμπτωματικές λοιμώξεις, ενώ τα τοξινογόνα στελέχη *Vibrio cholerae* O1 και *Vibrio cholerae* O139, είναι υπεύθυνα για το ξέσπασμα επιδημιών χολέρας. Η συγκεκριμένη ασθένεια μεταδίδεται με την κατανάλωση νερού ή τροφίμων που έχουν μολυνθεί από φορέα της ασθένειας.

Αξίζει ακόμα να αναφερθεί πως το ξέσπασμα πανδημιών χολέρας, σε συνδυασμό με το γεγονός πως το βακτήριο *Vibrio cholerae* αποτελεί ένα χρήσιμο δείκτη που υποδεικνύει κατά πόσον το υδάτινο έρμα μεσολαβεί για την μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών [47] [48], έχει υποχρεώσει τον ΙΜΟ να συμπεριλάβει τα στελέχη *Vibrio cholerae* O1 και *Vibrio cholerae* O139 στα όρια που θεσπίστηκαν, όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 [190] [191].

Οι εντερόκοκκοι (*Intestinal enterococci*), αποτελούν υποομάδα μιας μεγαλύτερης ομάδας βακτηρίων που ορίζονται ως κοπρανοειδής στρεπτόκοκκοι, και περιέχει είδη του γένους *Streptococcus*. Τα συγκεκριμένα βακτήρια είναι θετικά κατά Gram βακτήρια που παρουσιάζουν σχετικά αυξημένη αντοχή σε αλκαλικά περιβάλλοντα. Επίσης οι εντερόκοκκοι, χαρακτηρίζονται ως δυνητικά αναερόβια βακτήρια που συμβιώνουν στο έντερο με άλλα βακτήρια και μπορούν να ανιχνευθούν στα κόπρανα τόσο του ανθρώπου όσο και άλλων θερμόαιμων θηλαστικών, είτε μεμονωμένα, είτε σε ζεύγη ή μικρές αλυσίδες.

Διάφορα είδη που περιέχονται στην υποομάδα των εντερόκοκκων αποτελούν τα βακτήρια *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* και *E. hirae*. Τα βακτήρια μάλιστα που συμπεριλαμβάνονται στην συγκεκριμένη υποομάδα χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση κοπρανοειδής μόλυνσης (FIB) με στόχο τον χαρακτηρισμό της ποιότητας του πόσιμου νερού σε ολόκληρο τον κόσμο. Επιπρόσθετα, η αφθονία τους σε περιττώματα ανθρώπων και ζώων, και ο συσχετισμός τους με την κατάσταση της ανθρώπινης υγείας σε γλυκό και θαλασσινό νερό, αναδεικνύει τα βακτήρια αυτά ως ένα εργαλείο για την αξιολόγηση του νερού που χρησιμοποιείται παγκοσμίως για σκοπούς αναψυχής. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από την αυξημένη αντοχή που παρουσιάζουν οι εντερόκοκκοι σε υδάτινα οικοσυστήματα. Εν τούτοις μερικοί εντερόκοκκοι που ανιχνεύονται στο νερό μπορεί να προέρχονται από άλλα ενδιαιτήματα, όπως το έδαφος, σε περίπτωση που η πιθανότητα κοπρανοειδούς μόλυνσης του νερού έχει προηγουμένως αποκλειστεί.



Σχήμα 1.8. Ηλεκτρονική φωτογραφία (AFM) του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* [264].

Είναι γνωστό πως οι εντερόκοκκοι ως ευκαιριακά παθογόνα αποτελούν την αιτία για εκατομμύρια μολύνσεις ανθρώπων αλλά και ζώων. Αναντίρρητα το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την σημαντικότητα των εντερόκοκκων ως μικροβιακοί δείκτες της ποιότητας του νερού και κατ' επέκταση των κινδύνων που παραμονεύουν για την δημόσια υγεία, αναδεικνύουν ως επιτακτική την ανάγκη για συμπερίληψη της συγκεκριμένης ομάδας βακτηρίων στα όρια που θεσπίστηκαν από τον ΙΜΟ όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 [192] [193] [194].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

2.1. Κατάλυση και Ψευδο-κατάλυση

2.1.1. Κατάλυση

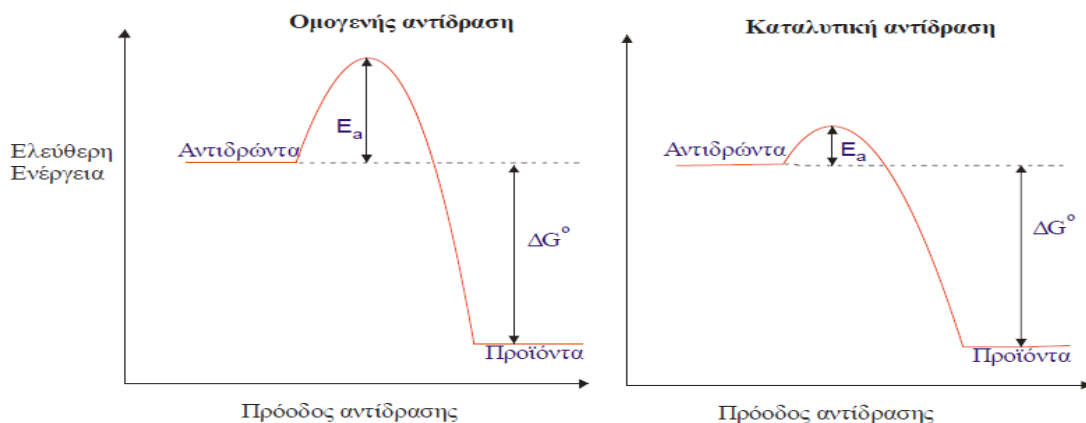
Κατάλυση (catalysis) ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ξένες χημικές ουσίες που καλούνται "*καταλύτες*", μεταβάλλουν θετικά τον ρυθμό πραγματοποίησης μιας χημικής αντίδρασης, αυξάνοντας τον. Επιπλέον οι συγκεκριμένες ουσίες - καταλύτες, δεν καταναλίσκονται, ούτε μεταβάλλουν τη θερμοδυναμική που διέπει την αντίδραση που επηρεάζουν, κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες [62] [61] [67] [68] [60]. Αξίζει να αναφερθεί πως οι περισσότεροι καταλύτες βρίσκονται σε υγρή ή στερεή μορφή, χωρίς όμως να αποκλείεται η χρήση καταλύτη στην αέρια φάση [59].

Όπως είναι γνωστό, η κατάλυση διακρίνεται σε δύο μεγάλους κλάδους, την ομογενή κατάλυση (homogeneous catalysis) και την ετερογενή κατάλυση (heterogeneous catalysis). Η διαφορά μεταξύ τους εστιάζεται στο ότι η ομογενής κατάλυση προκύπτει όταν ο καταλύτης βρίσκεται στην ίδια φάση με τα αντιδρώντα σε αντίθεση με την ετερογενή κατάλυση όπου καταλύτης και αντιδρώντα βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις. Ωστόσο, σχετικά με την ομογενή κατάλυση, συχνά παρατηρείται το γεγονός πως τόσο ο καταλύτης όσο και οι ουσίες που περιλαμβάνονται στην αντίδραση, είναι διαλυμένες σε κάποιο διαλύτη. Από την άλλη πλευρά, η ετερογενής κατάλυση διεξάγεται στην επιφάνεια στερεών σωμάτων, ακόμα και αν οι ουσίες που περιλαμβάνονται στην αντίδραση βρίσκονται στην υγρή ή στην αέρια φάση. Για το λόγο μάλιστα αυτό η ετερογενής κατάλυση καλείται και επιφανειακή κατάλυση (surface catalysis) ή κατάλυση επαφής (contact catalysis) [3]. Ακόμα, σημαντικό πλεονέκτημα της ετερογενούς κατάλυσης αποτελεί ο εύκολος διαχωρισμός του χρησιμοποιούμενου καταλύτη από την ροή των προϊόντων, προσφέροντας μια απρόσκοπτη συνέχιση των καταλυτικών διεργασιών.

Η χημική προσέγγιση της καταλυτικής διεργασίας, θεωρεί ότι η καταλυτική αντίδραση αποτελεί μια κυκλική διεργασία, η οποία ξεκινά με ρόφηση των αντιδρώντων στα καταλυτικά ενεργά κέντρα και ολοκληρώνεται με την εκρόφηση των ροφημένων προϊόντων και την έξοδο τους στην ρευστή φάση μέσω των πόρων του καταλύτη. Πέρα όμως από την κλασική χημική θεώρηση που υποστηρίζει πως ένας καταλύτης επιταχύνει

το ρυθμό με τον οποίο μια αντίδραση φτάνει σε χημική ισορροπία λόγω της μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης (E_a) του αργού βήματος της αντίδρασης, μερικοί καταλύτες εξυπηρετούν άλλες εφαρμογές με διαφορετικό χημικό μηχανισμό λειτουργίας. Αξίζει στο σημείο αυτό να σημειωθεί πως ποικίλοι καταλύτες συντίθενται με στόχο την εκμετάλλευση των εξαιρετικών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών, λόγω των απολυμαντικών ιδιοτήτων του μετάλλου που χρησιμοποιείται ως ενεργός φάση, αλλά και της διασποράς του μετάλλου στο χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα έτσι ώστε να σχηματίζονται μεταλλικά νανοκρυσταλλικά ενεργά κέντρα, σταθεροποιημένα στην επιφάνεια του υποστρώματος [59] [69].

Αρνητικό σημείο όσο αφορά τον τομέα της κατάλυσης αποτελεί ο τυχόν αρνητικός επηρεασμός, γνωστός και ως δηλητηρίαση, της δομής και της σύστασης του καταλύτη. Οι συνηθέστερες μεταβολές που μπορούν να προκύψουν στη δομή του καταλύτη κατά τη διάρκεια μιας καταλυτικής αντίδρασης, αφορούν αλλαγές στην κρυσταλλική του φάση, δημιουργία νέων κρυσταλλικών φάσεων και μεταβολή του λόγου των επιφανειακών προς των συνολικών ατόμων μετάλλου, λόγω κυρίως φαινομένων συσσωμάτωσης ή φράξιμο των πόρων του [68] [61].



Σχήμα 2.1. Συγκριτικό διάγραμμα ομογενούς και ετερογενούς καταλυτικής αντίδρασης ($\Delta G^\circ < 0$).

2.1.2. Ψευδο-κατάλυση

Ψευδο-κατάλυση ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο εμφανίζονται ορισμένες καταλυτικές ιδιότητες, αλλά δεν είναι πραγματικά καταλυτικές. Για παράδειγμα, εάν ένα οξύ ή βάση, υπάρχει σε σχεδόν σταθερή συγκέντρωση καθ' όλη τη διάρκεια της

αντίδρασης σε ένα διάλυμα (λόγω χρήσης ρυθμιστικού διαλύματος ή μεγάλης περισσειας), έχει βρεθεί ότι μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό αυτής της αντίδρασης και επίσης να καταναλωθεί κατά τη διεργασία [131]. Επομένως, το οξύ ή η βάση δεν είναι *καταλύτης* σε αυτή την περίπτωση, και το φαινόμενο δεν μπορεί να ονομαστεί *κατάλυση*, σύμφωνα με την καθιερωμένη έννοια αυτών των όρων στη χημική κινητική, παρόλο που ο μηχανισμός μιας τέτοιας διαδικασίας συχνά σχετίζεται με αυτόν μιας καταλυτικής αντίδρασης. Σε αυτές και σε ανάλογες περιπτώσεις (που δεν περιλαμβάνουν απαραίτητα οξέα ή βάσεις), συνίσταται ο όρος *ψευδο-κατάλυση* [131].

Για παράδειγμα, η επιτάχυνση της υδρόλυσης ενός εστέρα σε καρβοξυλικό οξύ και αλκοόλη από ένα οξύ Brønsted, ονομάζεται όξινη κατάλυση, ενώ η επιτάχυνση, με το ίδιο οξύ, της υδρόλυσης ενός αμιδίου, περιγράφεται ως ψευδοκατάλυση από το οξύ καθώς ο "όξινος ψευδοκαταλύτης" καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχηματίζοντας ιόντα αμμωνίου [131].

Στη περίπτωση της παρούσας Δ.Δ., έχει αποδειχθεί (Κεφάλαιο 4) ότι πληρείται η μια από τις 2 βασικές προϋποθέσεις της κατάλυσης που σχετίζεται με την μη κατανάλωση του καταλύτη κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι ο ακινητοποιημένος άργυρος στην επιφάνεια του υποστρώματος – Ag/γ-Al₂O₃ (ψευδο-καταλύτης), δεν καταναλώνεται κατά την διάρκεια των αντιμικροβιακών πειραμάτων. Εν τούτοις, ο ψευδο-καταλυτικός μηχανισμός που προτείνεται στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο βήμα που πραγματοποιείται την αντίδραση μεταξύ της μερικώς αρνητικά φορτισμένης μεμβράνης των βακτηρίων με την μερικώς θετικά φορτισμένη (Ag^{δ+}) επιφάνεια του στερεού υλικού (x% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃).

2.1.3. Αξιολόγηση Στερεών Καταλυτικών και Ψευδο-καταλυτικών Στερεών

Στοχεύοντας στην γενικότερη αξιολόγηση ενός στερεού καταλύτη, συμπεριλαμβανομένων και των ψευδο-καταλυτών με αντιμικροβιακή ενεργότητα, ενδείκνυται να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

(i) *Καταλυτική Ενεργότητα*: εκφράζει το ρυθμό της συγκεκριμένης αντίδρασης και προσδιορίζεται από την ποσότητα του αντιδρώντος που καταναλώνεται ανά μονάδα

χρόνου και όγκου, βάρους ή επιφάνειας του καταλύτη, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης.

(ii) *Εκλεκτικότητα*: ορίζεται ως ο λόγος του ρυθμού παραγωγής ενός επιθυμητού προϊόντος προς τον ολικό ρυθμό μετατροπής (κατανάλωσης) του αντιδρώντος. Η εκλεκτικότητα ενός καταλύτη σχετίζεται με την επιτάχυνση του ρυθμού της αντίδρασης προς το σχηματισμό ενός ή περισσότερων επιθυμητών προϊόντων, αφού συνήθως δεν παράγεται μόνο ένα προϊόν από τα αντιδρώντα. Σε πειραματικές συνθήκες είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της εκλεκτικότητας μιας αντίδρασης, αφού εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η πίεση, η σύσταση των αντιδρώντων, ο βαθμός μετατροπής των αντιδρώντων, ο βαθμός μετατροπής της αντίδρασης και η χημική σύσταση του καταλύτη [70].

(iii) *Σταθερότητα*: ορίζεται ως η μεταβολή της ενεργότητας και εκλεκτικότητας που παρουσιάζει ο καταλύτης σε σχέση με το χρόνο αντίδρασης για συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης (θερμοκρασία, πίεση, σύσταση τροφοδοσίας και υγρής φάσης).

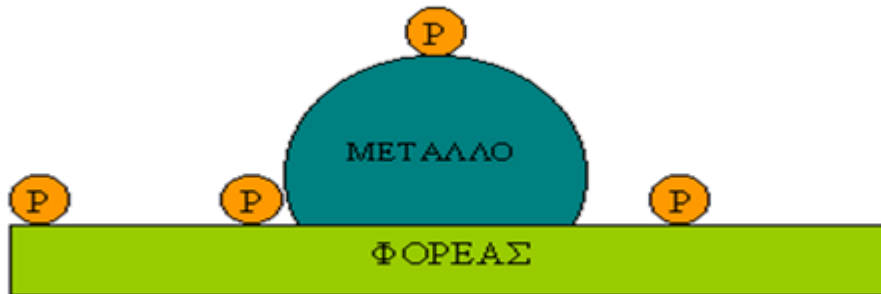
(iv) *Μηχανική αντοχή*: ορίζεται ως η αντίσταση του καταλύτη σε φαινόμενα τριβής κατά την επαφή του με το προϊόν της αντίδρασης (αέριο/υγρό) σε υψηλές ταχύτητες ή πιέσεις. Τα χαρακτηριστικά αντίστασης του καταλύτη στη μεταφορά μάζας και θερμότητας εξαρτώνται από το μέγεθος, το σχήμα, την πυκνότητα και το πορώδες των καταλυτικών κόκκων.

(v) *Χαρακτηριστικά αντίστασης στη μεταφορά μάζας και θερμότητας*: καθορίζουν τη σπουδαιότητα των φαινομένων μεταφοράς μάζας και θερμότητας στην καταλυτική συμπεριφορά, τα οποία εξαρτώνται από το μέγεθος, το σχήμα και την πυκνότητα των στερεών καταλυτικών κόκκων (πορώδες, χημική σύσταση, κ.ά.) [66].

2.1.4. Μεταλλικά Στηριζόμενα Στερεά

Τα μεταλλικά στηριζόμενα στερεά (όπως οι καταλύτες) αποτελούνται από τρία κύρια μέρη: (α) την (καταλυτικά) ενεργό φάση (μέταλλο), (β) το φορέα (υπόστρωμα) και (γ) τους ενισχυτές [71] [2]. Οι ενισχυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνήθως σε ελάχιστες συγκεντρώσεις και συγκεκριμένες αντιδράσεις προκειμένου να διατηρήσουν την υφή του

στερεού ή να έχουν επενέργεια στο ρυθμό ή/και την εκλεκτικότητα της αντίδρασης [71] [72].

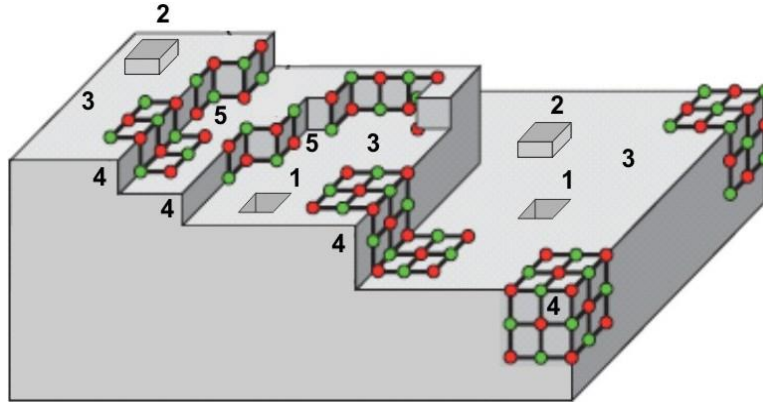


Σχήμα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση ενός μεταλλικού στηριζόμενου στερεού, όπου P οι ενισχυτές [2].

(α) Ενεργός ή Δραστική Φάση (Active Phase)

Η δραστική ή αλλιώς ενεργή φάση του καταλύτη ή ψευδο-καταλύτη προσδιορίζεται από το μέταλλο, το οποίο ευθύνεται για τη δημιουργία ενεργών κέντρων που προωθούν τη χημειορόφηση (ή άλλης μορφής ηλεκτρονική αλληλεπίδραση) και την επιφανειακή αντίδραση [71] [72]. Η δράση μιας στερεής φάσης δεν εκδηλώνεται σε όλη την επιφάνειά της. Υπάρχουν ορισμένα σημεία της επιφάνειάς της τα οποία είναι υπεύθυνα για την καταλυτική ή ψευδο-καταλυτική της συμπεριφορά και ονομάζονται ενεργά κέντρα ή ενεργές θέσεις. Ο αριθμός των δραστικών θέσεων που εμφανίζει ένας καταλύτης (ή ψευδο-καταλύτης) ανά μονάδα μάζας (g) είναι ανάλογος του εμβαδού της επιφάνειας του ($m^2 \cdot g^{-1}$). Στον τομέα της κατάλυσης, ως ενεργός φάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια πληθώρα χημικών ενώσεων ή στοιχείων, όπως ο άργυρος στην παρούσα διατριβή, τα οποία δύναται να αλληλεπιδρούν με τα αντιδρώντα της αντίδρασης όταν επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Στην ετερογενή κατάλυση ή ψευδο-κατάλυση ως δραστικές φάσεις αποτελούν κυρίως τα στερεά μέταλλα (Pt, Ag, Cu, Pd), τα οξειδία μετάλλων (AgO, CuO, Cr₂O₃, V₂O₅) και τα σουλφίδια μετάλλων (MoS₂, Co₈S₉). Εξαιτίας του ότι η κατάλυση αποτελεί ένα επιφανειακό φαινόμενο, επιλέγονται στερεά με όσο το δυνατό μεγαλύτερη επιφάνεια ανά μονάδα μάζας ($m^2 \cdot g^{-1}$), ώστε να επιτυγχάνεται η όσο το δυνατόν καλύτερη επαφή με τα αντιδρώντα [68] [62] [67] [4].

Αναφορικά με τη δομή της δραστικής φάσης, η επιφάνεια των σωματιδίων της δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως επίπεδη. Σύμφωνα με μελέτες μικροσκοπίας, τα σωματίδια της δραστικής φάσης αποτελούνται από μικροκρυσταλλίτες, η επιφάνειά των οποίων χαρακτηρίζεται από διάφορα κενά (vacancies), επιπλέον άτομα (adatoms), και στις πλείστες περιπτώσεις πολλαπλά επίπεδα (terraces) που διαφέρουν κατά ένα ατομικό επίπεδο (step) δημιουργώντας εσοχές (kinks) [61] [70] [4] [73] [74].



Σχήμα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση της επιφάνειας σωματιδίου δραστικής φάσης (1: κενά, 2: επιπλέον άτομα, 3: πολλαπλά επίπεδα, 4: αναβαθμίδες, 5: εσοχές) [3].

(β) Φορέας ή Υπόστρωμα (Carrier or Support)

Ο φορέας, γνωστό και ως υπόστρωμα, αποτελεί το υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για τη διασπορά της δραστικής φάσης, με απώτερο σκοπό την αύξηση της επιφάνειας και επαφής με την αέρια ή υγρή φάση [3] [71] [72] [68]. Το υπόστρωμα αποτελεί συνήθως πορώδες υλικό, τις πλείστες φορές μεταλλοξείδιο, με ειδική επιφάνεια που ξεπερνά την τιμή των $10 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Μερικά ευρέως χρησιμοποιούμενα υποστρώματα αποτελούν τα οξείδια των μετάλλων ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, SiO_2 , TiO_2 , La_2O_3 κ.α.), ο ενεργός άνθρακας και οι ζεόλιθοι. Η χρήση των καταλυτικών φορέων αποσκοπεί στην αύξηση της ειδικής επιφάνειας της δραστικής φάσης, στη βελτίωση της αντοχής τόσο σε δηλητηριάσεις όσο και σε συσσωματώσεις μικρών μεταλλικών κρυσταλλιτών (sintering) [2] [71] [72]. Επιπλέον, μεταξύ των κυριότερων παραμέτρων που ενδείκνυται να χαρακτηρίζουν τα υποστρώματα συμπεριλαμβάνονται η εξαιρετικά μεγάλη επιφάνεια ανά μονάδα μάζας που καθορίζεται από το είδος του υλικού και τη μέθοδο παρασκευής του, ο συγκεκριμένος όγκος πόρων ανά μονάδα μάζας, η υψηλή χημική σταθερότητα και η υψηλή μηχανική αντοχή.

Επιπρόσθετα, εξίσου σημαντικές ιδιότητες του υποστρώματος αποτελούν η υψηλή υδροθερμική αντοχή του υλικού η οποία αποτρέπει την αλλοίωση του υποστρώματος στην ύπαρξη υψηλών θερμοκρασιών αντίδρασης και παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων H_2O στο προϊόν ή/και στην τροφοδοσία, αλλά και η ικανότητα εναπόθεσης δραστικής φάσης που ευνοεί την υψηλή διασπορά της δραστικής φάσης (π.χ. επιφανειακή τάση) [66].

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε ως καταλυτικός φορέας το οξείδιο του αργυλίου ($\gamma-Al_2O_3$), το οποίο αποτελεί τον πλέον εμπορικότερο καταλυτικό φορέα. Υπάρχουν αρκετοί τύποι οξειδίου του αργυλίου που διαφέρουν σημαντικά ως προς τις φυσικές τους ιδιότητές, όπως η κρυσταλλική δομή και η ειδική επιφάνεια. Ακόμα, ο τρόπος παρασκευής, η καθαρότητα και η θερμική κατεργασία αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν τη δομή του εν λόγω στερεού.

2.1.5. Αλληλεπιδράσεις Μετάλλου-Φορέα (Υποστρώματος)

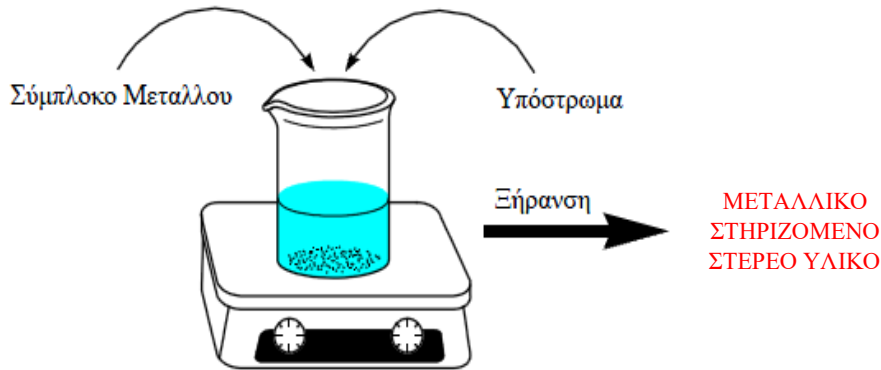
Παρόλο που αρχικά επικρατούσε η άποψη πώς ο φορέας αποτελούσε ένα αδρανές υλικό το οποίο απλά σταθεροποιούσε την δραστική φάση, εν τούτοις μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ του μετάλλου και του φορέα. Εξάλλου, αποδεδειγμένα ο φορέας έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει όχι μόνο την ηλεκτρονική δομή της διεπιφάνειας της δραστικής φάσης με το υπόστρωμα, αλλά και την μορφολογία της. Πρόσφατες έρευνες αναφέρονται σε άμεση εμπλοκή του υποστρώματος τόσο στην ενεργότητα όσο και στην εκλεκτικότητα των συγκεκριμένων αντιδράσεων [72] [71].

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ μετάλλου και φορέα διακρίνονται σε έμμεσες και άμεσες [75] [4] [71]. Στις έμμεσες αλληλεπιδράσεις υπάγονται διάφορα φαινόμενα αλληλεπιδράσεων όπως η προσρόφιση παρεμποδιστών και δηλητηρίων του μετάλλου στο φορέα, η επίδραση στη μορφολογία και την κρυσταλλική δομή του μετάλλου, η δράση του φορέα ως εφεδρικής αποθήκης προσροφημένων αντιδρώντων, η διάχυση (spillover) προσροφημένων ειδών από το μέταλλο στο φορέα, κ.ά. Αντιθέτως, ως άμεσες αλληλεπιδράσεις χαρακτηρίζονται οι αλληλεπιδράσεις μετάλλου-υποστρώματος που δεν μπορούν να ενταχθούν στις έμμεσες και σχετίζονται με γεωμετρικές και ηλεκτρονικές αλληλεπιδράσεις. Στην συγκεκριμένη κατηγορία εμπίπτουν χαρακτηριστικά φαινόμενα

όπως οι “Ισχυρές Αλληλεπιδράσεις Μετάλλου - Φορέα” (SMSI) και “Επαγόμενων από Ενίσχυση Αλληλεπιδράσεων Μετάλλου-Φορέα” (DIMSI) [75] [71] [4] [76].

2.1.6. Μέθοδος Υγρού Εμποτισμού (Wet Impregnation Method)

Ο υγρός εμποτισμός (wet impregnation) χαρακτηρίζεται ως η πιο συνήθης διεργασία για την παρασκευή μεταλλικών και μονολιθικών στηριζόμενων στερεών υλικών. Ως εκ τούτου, η εναπόθεση μετάλλων π.χ. Ag, Cu στο υπόστρωμα πραγματοποιείται συνήθως με την συγκεκριμένη μέθοδο. Πιο συγκεκριμένα, ο φορέας/υπόστρωμα εμβαπτίζεται σε αιώρημα πρόδρομης ένωσης το οποίο περιέχει το επιθυμητό δραστικό στοιχείο. Στην παρούσα διατριβή, ως ενεργός φάση των στερεών υλικών που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν ως προς την αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα χρησιμοποιήθηκε κυρίως ο άργυρος (Ag), σε ορισμένες περιπτώσεις ο χαλκός (Cu) αλλά και κράμα Άργυρου – Χαλκού (Ag - Cu) . Στο Σχήμα 2.4 παρουσιάζεται η πειραματική διάταξη της παρασκευής μεταλλικών στηριζόμενων στερεών με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού [77] [78].

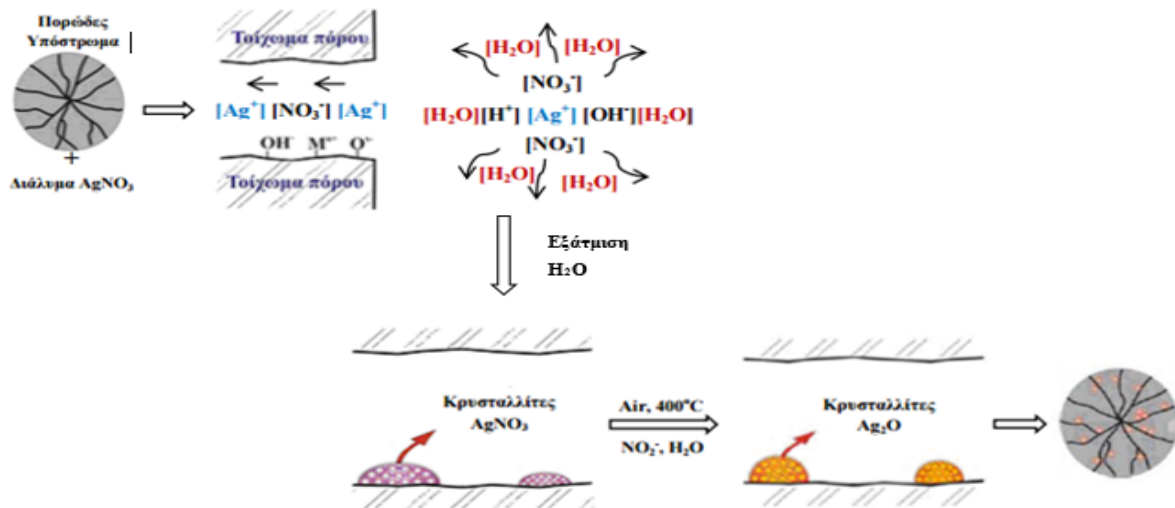


Σχήμα 2.4. Σχηματική απεικόνιση πειραματικής διάταξης παρασκευής μεταλλικών στηριζόμενων υλικών με υγρό εμποτισμό [56].

Κατά τη διεργασία του υγρού εμποτισμού η πρόδρομη ένωση μετακινείται προς το εσωτερικό του υποστρώματος, με την επιτυχή έκβαση της να βασίζεται στον περιορισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του φορέα και της πρόδρομης ένωσης. Το γεγονός αυτό, συνεισφέρει στην αποφυγή ανομοιόμορφης κατανομής των ιόντων κατά την εμβάπτιση του καταλύτη. Η εναπόθεση των ενεργών ιόντων πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της ξήρανσης, η οποία επιτυγχάνεται με απλή εξάτμιση. Μέσω της εξάτμισης, αυξάνεται η συγκέντρωση της πρόδρομης ουσίας στο διάλυμα που εμπεριέχεται στους πόρους του

υποστρώματος και επιτυγχάνεται εναπόθεση της κρυσταλλικής φάσης που περιέχει τα ενεργά ιόντα στην επιφάνεια του φορέα. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως η εναπόθεση πραγματοποιείται από κοινού και στις δύο διαδικασίες, εμβάπτισης και ξήρανσης. Επιπλέον, ο απλός εμποτισμός στηρίζεται σε δύο μηχανισμούς σχετικά με την μεταφορά της πρόδρομης ένωσης στο πορώδες του υποστρώματος ως ακολούθως [77] [79]:

- 1) Αρχικά η υγρή φάση που δημιουργείται με την εμβάπτιση των πορώδων τεμαχίων στο διάλυμα του εμποτισμού, κάτω από την επίδραση τριχοειδών δυνάμεων κινείται προς το εσωτερικό των πόρων
- 2) Εξαιτίας της γρηγορότερης κίνησης των μορίων του διαλύτη σε σχέση με αυτά της πρόδρομης ουσίας, κατά μήκος της ακτίνας του σφαιριδίου παρουσιάζεται μια βαθμωτή συγκέντρωση της πρόδρομης ένωσης. Υπό αυτές τις συνθήκες, πραγματοποιείται σε μεγάλο σχετικά χρονικό διάστημα (td), αυξημένη μεταφορά της πρόδρομης ένωσης με διεργασίες διάχυσης, με σκοπό την ολοκληρωμένη και ομοιογενή κατανομή της. Συμπερασματικά, διαπιστώνεται ότι στον απλό εμποτισμό, πραγματοποιείται πλήρης κατανομή των συγκεντρώσεων της ένωσης σε μικρό χρονικό διάστημα στο διαλύτη, ενώ στη διαδικασία της ξήρανσης κύριο ρόλο διαδραματίζει η κατανομή της ένωσης στην επιφάνεια του υποστρώματος [66].



Σχήμα 2.5. Διεργασία υγρού εμποτισμού κατά την διαδικασία παρασκευής στηριζόμενου στερεού υλικού Ag [4] [5].

Περεταίρω, η διεργασία του εμποτισμού επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους, οι οποίες αναλύονται παρακάτω και προσδιορίζουν την κατανομή του δραστικού καταλυτικού στοιχείου κατά μήκος ενός τεμαχιδίου φορέα [77] [79]:

- Θερμοκρασία: Παράλληλα με την άνοδο της θερμοκρασίας του εμποτισμού, αυξάνεται και η διαλυτότητα της πρόδρομης ένωσης. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο επιτυγχάνεται η εναπόθεση σχετικά δυσδιάλυτων αλάτων, ενώ το ιξώδες του διαλύματος παρουσιάζει μείωση κάτι που ευθύνεται για την ομοιόμορφη κατανομή του διαλύματος στους πόρους του καταλυτικού φορέα.

- Είδος διαλύτη: Το νερό αποτελεί τον συνηθέστερο διαλύτη στη βιομηχανία, σε ορισμένες όμως περιστάσεις αντικαθίσταται με οργανικούς διαλύτες έχοντας ως στόχο τη μείωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαλύτη – φορέα.

- Είδος και ποσότητα προσθέτων: Στις πλείστες περιπτώσεις πραγματοποιείται χρήση οργανικών προσθέτων, τα οποία δημιουργούν σύμπλοκα με το πρόδρομο άλας, βελτιώνοντας τη διαλυτότητα της πρόδρομης ένωσης.

- Χρόνος εμποτισμού: Διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην κατανομή της πρόδρομης ουσίας ανάμεσα στους πόρους του υποστρώματος. Η ομοιομορφία της κατανομής βελτιώνεται με τη μεγαλύτερη χρονική διάρκεια του εμποτισμού.

Κατά την ξήρανση παρατηρούνται διαδικασίες όπως η διασπορά, η μακροκατανομή και η εναπόθεση της στηριζόμενης φάσης στην επιφάνεια του υποστρώματος οι οποίες υποκινούνται από την εξάτμιση του διαλύτη, την μετακίνηση της υγρής φάσης στο πορώδες σύστημα του υποστρώματος, την διάχυση της διαλυμένης ουσίας στο εσωτερικό του φορέα (πορώδες) και την καθίζηση της φάσης που περιέχει το ενεργό ιόν. Η διαδικασία της εξάτμισης, κινείται από την εξωτερική επιφάνεια προς το εσωτερικό του κόκκου του καταλυτικού φορέα.

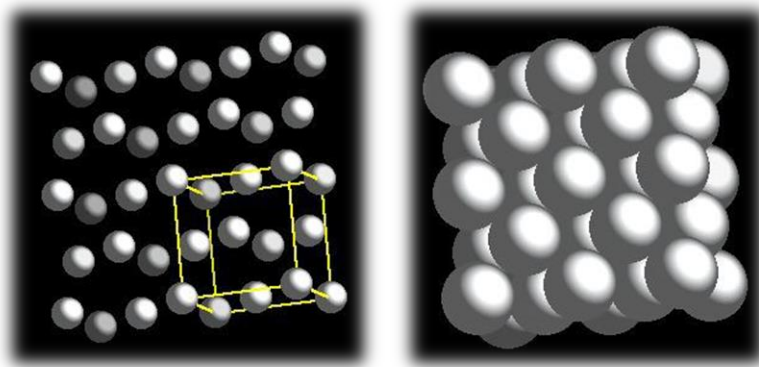
2.1.7. Κρυσταλλική Δομή Μετάλλων και Φορέων της Παρούσας Μελέτης

- Κρυσταλλική Δομή Ag:

Ο Άργυρος (Ag) αποτελεί ένα βαρύ και μαλακό μέταλλο γκρίζου χρώματος με έντονη μεταλλική λάμψη. Ανήκει στην 11^η ομάδα του περιοδικού πίνακα με ατομικό αριθμό 47

και σχετική ατομική μάζα 107,8682 g/mol. Επίσης, ο άργυρος θεωρείται ημι-ευγενές μέταλλο και συγκαταλέγεται στα στοιχεία μετάπτωσης με θερμοκρασία τήξης 961,78 °C και βρασμού 2162 °C. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί το γεγονός πως το συγκεκριμένο μέταλλο παρουσιάζει την υψηλότερη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα καθώς και την υψηλότερη οπτική ανακλαστικότητα από όλα τα μέταλλα [80] [81].

Η κρυσταλλική του δομή παρουσιάζει κυβικό συμπαγές σχήμα (cubic close packed, ccp), όπου οι κυβικές παράμετροι απαιτούν πλευρές $a, b, c = 408.53 \text{ pm}$ και γωνίες $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$ [10].

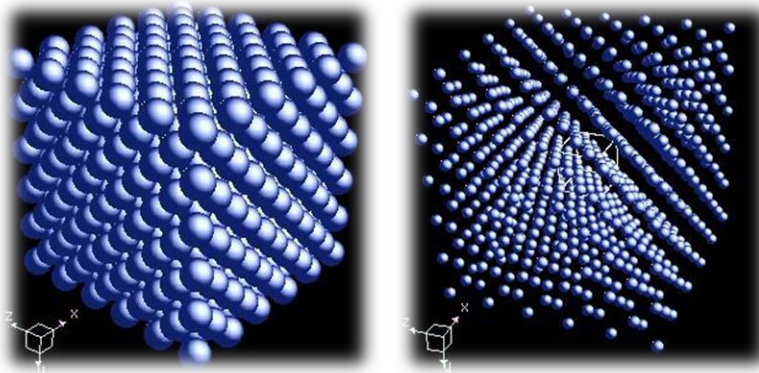


Σχήμα 2.6. Διαφορετικές απόψεις της κρυσταλλικής δομής του Άργυρου (Ag) [10].

- Κρυσταλλική Δομή Cu:

Ο Χαλκός (Cu) αποτελεί ένα κοκκινωπό εξαιρετικά όλκιμο και ελατό μέταλλο με λαμπερή μεταλλική όψη. Ανήκει στην 11^η ομάδα του περιοδικού πίνακα με ατομικό αριθμό 29 και σχετική ατομική μάζα 63,546 g/mol. Αποτελεί ένα από τα λίγα μέταλλα που εμφανίζονται στη φύση στην μεταλλική τους μορφή και χαρακτηρίζεται από θερμοκρασία τήξης 1084,6 °C και θερμοκρασία βρασμού 2567 °C. Επίσης ο χαλκός σχηματίζει μια μεγάλη ποικιλία χημικών ενώσεων, συνήθως με οξειδωτικές καταστάσεις +1 και +2. Παρουσιάζει ακόμα πολύ υψηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα αμέσως μετά τον άργυρο που παρουσιάζει την υψηλότερη ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα [80] [82].

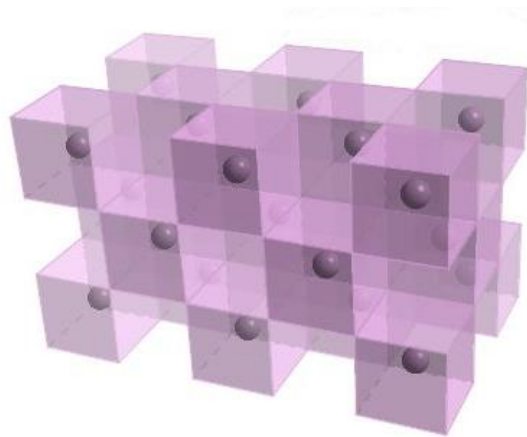
Η κρυσταλλική του δομή παρουσιάζει κυβικό συμπαγές σχήμα (cubic close packed, ccp), όπου οι κυβικές παράμετροι απαιτούν πλευρές $a, b, c = 361.49 \text{ pm}$ και γωνίες $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$ [11].



Σχήμα 2.7. Διαφορετικές απόψεις της κρυσταλλικής δομής του Χαλκού (Cu) [11].

- Κρυσταλλική Δομή CeO₂:

Το οξείδιο του δημητρίου (CeO₂) αποτελεί μια ωχρή κιτρινο-λευκή σκόνη που παρουσιάζει φλουοριτική κυβική δομή και θερμοκρασία τήξης και βρασμού τους 2400 °C και 3500 °C, αντίστοιχα [12] [83]. Αναφορικά με την κρυσταλλική του δομή, κάθε ανιόν O²⁻ περιβάλλεται από 4 κατιόντα Ce⁴⁺ και κάθε κατιόν Ce⁴⁺ από 8 ανιόντα O²⁻. Ως εκ τούτου τα άτομα Ce⁴⁺ σχηματίζουν ένα τετράεδρο γύρω από το κεντρικό O²⁻ με κάθε άτομο Ce⁴⁺ να βρίσκεται στο κέντρο ενός κύβου που σχηματίζεται από τα ανιόντα O²⁻.



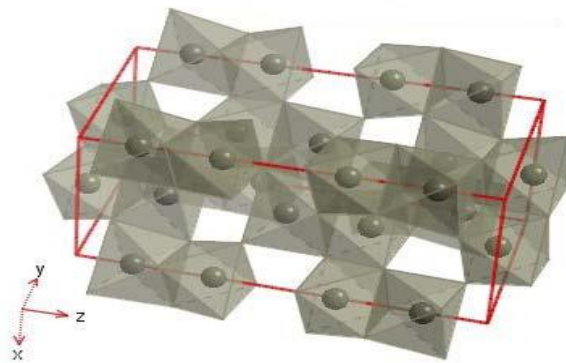
Σχήμα 2.8. Η κρυσταλλική δομή του CeO₂ [12].

Επιπρόσθετα, η χρήση του οξειδίου του δημητρίου ενδείκνυται τόσο για την αποφυγή συσσωματωμάτων του μετάλλου (ενεργού κέντρου) στην επιφάνεια του καταλύτη όσο και για την διατήρηση της κατανομής του μεγέθους των πόρων του. Επίσης η ευκολία

μετάβασης του από την Ce^{4+} στην Ce^{3+} οξειδωτική κατάσταση και αντιστρόφως, παρέχει την δυνατότητα ελευθέρωσης αλλά και αποθήκευσης οξυγόνου υπό αναγωγικές και οξειδωτικές συνθήκες αντίστοιχα [84].

- Κρυσταλλική Δομή $\gamma-Al_2O_3$:

Το $\gamma-Al_2O_3$ είναι άσπρο κρυσταλλικό στερεό με οκταεδρική κρυσταλλική δομή σχήματος τετραγωνικής διπυραμίδας και θερμοκρασία τήξης και βρασμού τους $2054^\circ C$ και $3000^\circ C$, αντίστοιχα. Τα κατιόντα Al^{3+} συνδέονται μεταξύ τους με έξι γειτονικά ανιόντα O^{2-} , δηλαδή παρουσιάζει αριθμό ένταξης ίσο με 6 [68] [13].



Σχήμα 2.9. Η Κρυσταλλική δομή του $\gamma-Al_2O_3$ [13].

2.2. Εφαρμογές της Κατάλυσης

Η κατάλυση, και κατ' επέκταση (τουλάχιστον εν μέρει) η ψευδο-κατάλυση (pseudo-catalysis) αποτελεί ένα αξιοθαύμαστο φαινόμενο με εξαιρετικά σημαντική συμβολή στην βελτίωση τόσο της σύγχρονης βιομηχανικής οικονομίας, όσο και του βιοτικού επιπέδου του ανθρώπινου είδους, κυρίως μέσα από τις πολλές εφαρμογές της με σκοπό την προστασία του περιβάλλοντος (Σχήμα 2.10). Καθοριστικός είναι μάλιστα ο ρόλος που διαδραματίζει σήμερα στον τομέα της επιστημονικής έρευνας, αλλά και σε επίπεδο βιομηχανικών εφαρμογών. Το γεγονός αυτό τεκμηριώνεται μέσα από την ευρεία χρήση των καταλυτικών διεργασιών που ξεπερνούν σε ποσοστό το 80% σχετικά με τη βιομηχανική παραγωγή χημικών προϊόντων, φαρμακευτικών υλών, όπως επίσης και στην επεξεργασία υγρών καυσίμων. Ενδεικτικές είναι επίσης και οι διάφορες έρευνες που πραγματοποιούνται κατά καιρούς και υποδεικνύουν περαιτέρω αύξηση της παγκόσμιας

αγοράς και κατ' επέκταση χρήσης διαφόρων τύπων στηριζόμενων στερεών υλικών τα επόμενα χρόνια [59].

Οι καταλυτικές τεχνικές δύναται να εφαρμόζονται σε ποικίλους τομείς, όπως για παράδειγμα η παραγωγή ενέργειας, η βιομηχανία τροφίμων, η παραγωγή βιομηχανικών χημικών ουσιών σε μεγάλη κλίμακα και υψηλή καθαρότητα, η μαζική παραγωγή φαρμακευτικών υλικών, η βιοιατρική, η βιοτεχνολογία κ.α. [59] [60] [61].

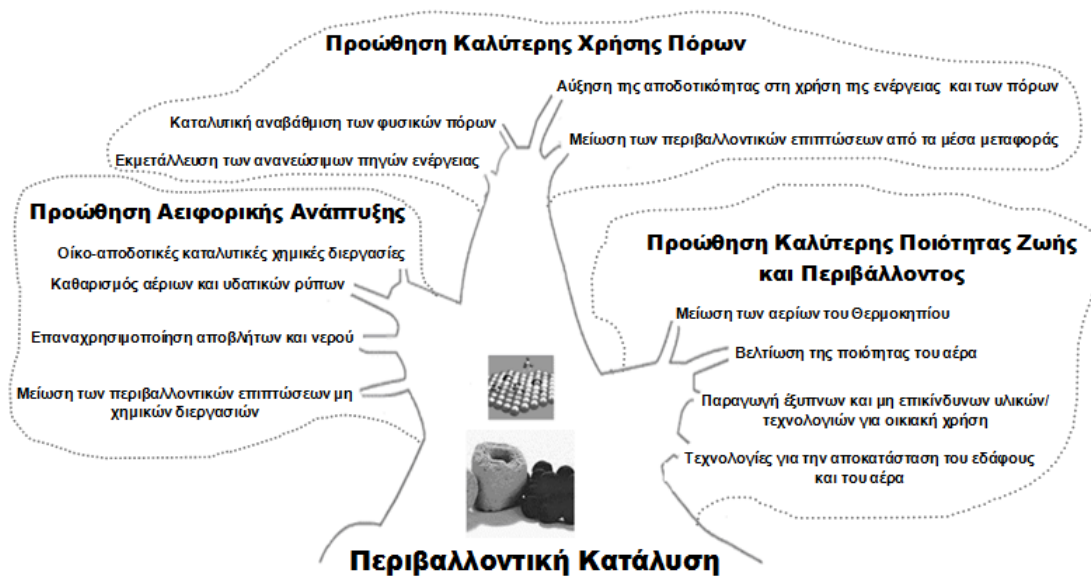
Αξίζει να αναφερθεί πως παρόλο που η εκτεταμένη εκμετάλλευση του καταλυτικού φαινομένου από την ανθρωπότητα ξεκίνησε κατά κύριο λόγο στα τέλη του 20^{ου} αιώνα, η χρησιμοποίηση του κυρίως για την παραγωγή τροφίμων και ποτών χρονολογείται πριν πολλούς αιώνες. Συμπερασματικά, η κατάλυση συγκεντρώνει ολοένα και περισσότερο την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας, αναδεικνύοντας συνάμα την τεράστια σημασία για την ανθρώπινη ευημερία. Η αξία της ενισχύεται μάλιστα μέσα από την αυξανόμενη προοπτική εφαρμογής της σε νευραλγικούς τομείς με οικονομικές και περιβαλλοντικές προεκτάσεις όπως για παράδειγμα η ναυτιλιακή βιομηχανία [59] [62].

Δεδομένου λοιπόν του ότι τα περιβαλλοντικά ζητήματα έχουν αρχίσει να απασχολούν έντονα τη διεθνή επιστημονική κοινότητα ενώ παράλληλα αποτελούν αντικείμενο συζήτησης και προβληματισμού από την παγκόσμια πολιτική σκηνή, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη εφαρμογής της ετερογενούς κατάλυσης στον τομέα της περιβαλλοντικής τεχνολογίας. Κάτι τέτοιο μπορεί χωρίς αμφιβολία να προσφέρει λύσεις σε σημαντικότερα περιβαλλοντικά θέματα, όπως η ατμοσφαιρική και υδατική ρύπανση και μόλυνση. Επιπρόσθετα, αποτελεί το θεμέλιο λίθο για την Πράσινη και Αειφορική Χημεία, που έχει ως στόχο την πρόληψη της ρύπανσης ή/και της μόλυνσης, και κατ' επέκταση την προστασία του περιβάλλοντος. Ακόμα, η εφαρμογή της κατάλυσης στον τομέα της προστασίας του περιβάλλοντος και της βελτίωσης παράλληλα της ποιότητας ζωής του ανθρώπου, μπορεί να θέσει τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την επίτευξη μιας αειφορικής ανάπτυξης [63]. Εξ' άλλου, η περιβαλλοντική κατάλυση θα εξακολουθήσει να αποτελεί ένα ενδιαφέρον και ελπιδοφόρο τομέα της παρούσας και μελλοντικής έρευνας, αλλά και μια τεχνολογία ιδιαίτερης σημασίας για μια βιώσιμη οικονομία [64].

Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως το ενδιαφέρον των ερευνητών όσον αφορά τις εφαρμογές της περιβαλλοντικής κατάλυσης, περιορίστηκε αρχικά στο τομέα της αέριας ρύπανσης, παραγκωνίζοντας την καταλυτική επεξεργασία υδατικών μέσων. Η καθυστέρηση αυτή της χρήσης της κατάλυσης σε υδατικά περιβάλλοντα οφείλεται κυρίως στις δυσκολίες που παρουσιάστηκαν σχετικά με την ανεύρεση καταλυτών υψηλής ενεργότητας και σταθερότητας [65] [4]. Ενδεικτικά αναφέρεται πως στην υγρή φάση απαιτείται η εφαρμογή της ετερογενούς κατάλυσης η οποία αποτελεί εκ φύσεως μια πολυπλοκότερη καταλυτική διεργασία [59].

Επιπρόσθετα, η ευρεία χρήση της κατάλυσης στον τομέα της προστασίας του υδάτινου περιβάλλοντος είναι πλέον δεδομένη. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Περιβάλλοντος της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕΑ), η μόλυνση και η ρύπανση των υδάτων προκαλούν σημαντικά προβλήματα σχετικά με την διαθεσιμότητα κατάλληλου νερού που απαιτείται για τις διάφορες ανθρώπινες δραστηριότητες αλλά και την ευημερία και τη διατήρηση της ζωής των ποικίλων υδάτινων οικοσυστημάτων. Επομένως, προκύπτει αδήριτη ανάγκη για την ανάπτυξη και εφαρμογή τεχνολογιών, όχι μόνο για την υφιστάμενη επεξεργασία υδατικών αποβλήτων, αλλά και για την επεξεργασία οποιουδήποτε υδατικού όγκου που απορρίπτεται στο περιβάλλον και ενδέχεται να προκαλέσει οικολογική καταστροφή. Καθίσταται λοιπόν προφανές πως η κατάλυση μπορεί να διαδραματίσει έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών επεξεργασίας νερού.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αυξανόμενο ενδιαφέρον για εφαρμογή της ετερογενούς κατάλυσης για επεξεργασία του υδάτινου έρματος των πλοίων. Είναι γνωστό πως οι μέχρι και σήμερα τεχνολογίες επεξεργασίας που εφαρμόζονται για την απολύμανση ειδικότερα, αλλά και για την γενικότερη επεξεργασία του νερού έρματος, περιλαμβάνουν την χρήση σημαντικών ποσών ενέργειας ή επιβλαβών χημικών ουσιών για την επίτευξη μιας επιτυχούς κάθαρσης. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός αυτό, φαντάζει αναπόφευκτη η μελλοντική ευρεία εφαρμογή της ετερογενούς κατάλυσης, για απολυμαντικούς κυρίως σκοπούς, στο πλαίσιο της γενικότερης επεξεργασίας του υδάτινου έρματος. Έτσι διασφαλίζεται και η αποφυγή της υποβάθμισης των υδάτινων οικοσυστημάτων που πρόκειται να απορριφθεί το συγκεκριμένο νερό, ενώ πληρούνται επίσης διάφορες περιβαλλοντικές νομοθεσίες, όρια και κανονισμοί [66].



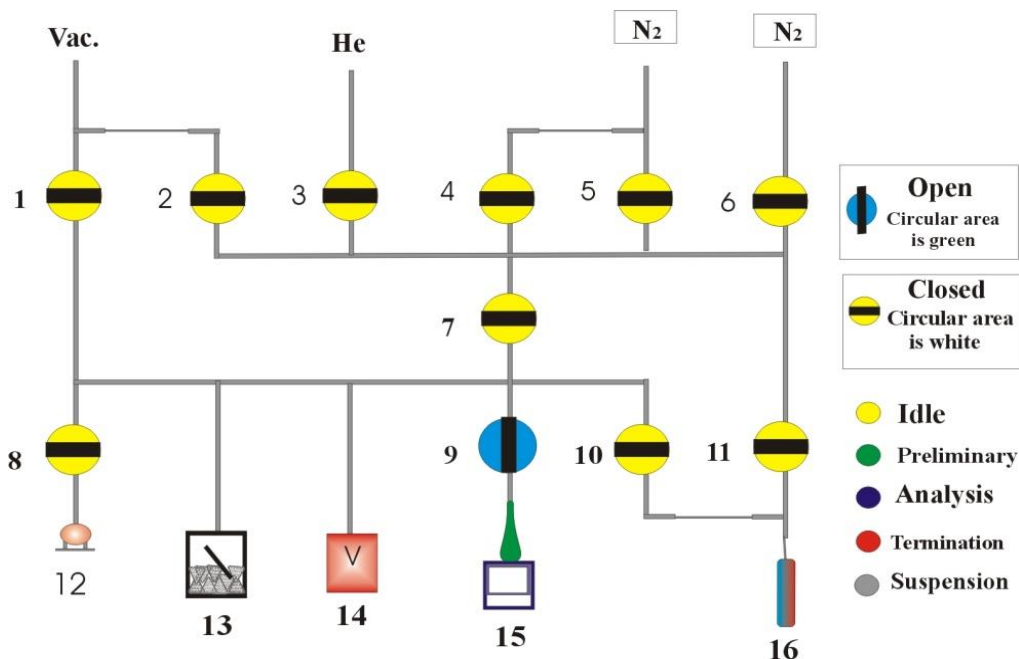
Σχήμα 2.10. Η διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών της κατάλυσης στην προστασία του περιβάλλοντος και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής [63].

2.3. Αναλυτικές Τεχνικές Φυσικοχημικού Χαρακτηρισμού Στερεών Υλικών και Βακτηρίων

Με στόχο τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των παρασκευασθέντων καταλυτών αλλά και την παράλληλη αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού βακτηριακής αναστολής από τον άργυρο (Ag), χρησιμοποιήθηκαν στοχευμένα παραδοσιακές και σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές οι οποίες αναλύονται παρακάτω.

2.3.1. Προσδιορισμός Ειδικής Επιφάνειας (B.E.T.)

Η πλέον γνωστή μέθοδος B.E.T., αποτελεί την πρώτη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ειδικής επιφάνειας αλλά και της κατανομής των πόρων σε ένα στερεό. Αναπτύχθηκε το 1938 από τους Brunauer, Emmett και Teller, χάρη στους οποίους πήρε και το όνομα της, με βάση τα αρχικά των ονομάτων τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόζεται πλέον σε ποικίλους τομείς όπως η ιατρική, η φαρμακευτική βιομηχανία και η κατάλυση, ενώ όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, έχει πλέον αυτοματοποιηθεί [70] [6].



Σχήμα 2.11. Διάγραμμα τυπικής συσκευής για μετρήσεις B.E.T. (Micromeritics, n.d). Όπου, 1. Βαλβίδα κενού, 2. Βαλβίδα μερικού κενού, 3. Βαλβίδα Ηλίου, 4. Βαλβίδα μερικής ανάλυσης αερίου, 5. Βαλβίδα ολικής ανάλυσης αερίου, 6. Αέριο πίεσης κορεσμού, 7. Βαλβίδα απομόνωσης κάτω θαλάμων, 8. Βαλβίδα θαλάμου βαθμονόμησης, 9. Βαλβίδα Θαλάμου δείγματος, 10. Βαλβίδα κυλίνδρου μερικής πίεσης κορεσμού, 11. Βαλβίδα κυλίνδρου ολικής πίεσης κορεσμού, 12. Θάλαμος βαθμονόμησης, 13. Ρυθμιστής πίεσεως, 14. Μετρητής κενού, 15. Θέση δοχείου με υγρό άζωτο, και 16. Σωλήνας πίεσης κορεσμού.

Η λειτουργία της μεθόδου στηρίζεται στη φυσική προσρόφηση ενός αδρανούς αερίου, συνήθως του αζώτου, στην επιφάνεια του υπό εξέταση στερεού. Ως εκ τούτου, η ολική επιφάνεια του στερεού (m^2/g) προσδιορίζεται εύκολα από την ποσότητα του προσροφημένου αερίου. Αξίζει να σημειωθεί πως, τόσο οι συνθήκες που επικρατούν για μια προσροφημένη μονομοριακή στοιβάδα, όσο και η επιφάνεια που καταλαμβάνει κάθε μόριο, πρέπει να μπορούν να προσδιοριστούν. Για τη μέτρηση της ολικής επιφάνειας των στερεών, οι Brunauer, Emmett και Teller, ανέπτυξαν τη θεωρία της φυσικής προσρόφησης πολλαπλών στοιβάδων, με βάση την παρακάτω εξίσωση [85] [70]:

$$\frac{P}{(P_0 - P)V} = \frac{1}{V_m C} + \frac{(C - 1) P}{V_m C P_0} \quad (1)$$

Όπου, "V" ο όγκος του προσροφημένου αερίου στην μερική πίεση P, "V_m" ο όγκος του προσροφημένου αερίου για τη δημιουργία μονομοριακής στοιβάδας, "P₀" η τάση ατμών

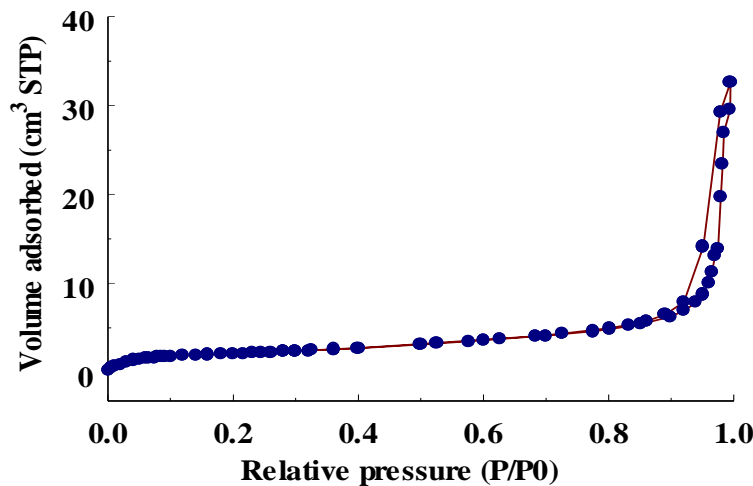
του αερίου στη θερμοκρασία του πειράματος και "C" μια σταθερά εξαρτώμενη από τη θερμότητα προσρόφησης και της λανθάνουσας θερμότητας υγροποίησης του αερίου.

Η σταθερά "C" υπολογίζεται από τον τύπο:

$$C = \exp \frac{(q_1 - q_2)}{RT} \quad (2)$$

Όπου, "q₁" η θερμότητα προσρόφησης για την πρώτη στοιβάδα (kcal.mol⁻¹), "q₂" η λανθάνουσα θερμότητα υγροποίησης του αερίου (ισούται με την θερμότητα προσρόφησης για όλες τις επόμενες στοιβάδες) (kcal.mol⁻¹).

Εξάλλου, ο όγκος του προσροφημένου αερίου σε συνάρτηση με την σχετική πίεση P/P₀, παρουσιάζεται στην παρακάτω γραφική παράσταση του ισόθερμου B.E.T.. Παρόλο που η συγκεκριμένη τεχνική παρέχει τη δυνατότητα εξέτασης της προσρόφησης σε σχετικές πιέσεις με εύρος από 0 έως 1, εντούτοις εξειδικεύεται σε πιέσεις από 0.05 έως 0.3, όπου η "Εξίσωση 1" ακολουθείται ικανοποιητικά [70] [85] [86]. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην υπερεκτίμηση του ειδικού όγκου που εμφανίζει το υπό μελέτη στερεό σε υψηλότερες πιέσεις και την υποτίμησή του σε χαμηλότερες. Η γραφική παράσταση του λόγου P/V(P₀-P) συναρτήσει της σχετικής πίεσεως P/P₀, δύναται να είναι ευθεία γραμμή όταν η εξίσωση B.E.T. ("Εξίσωση 1") ακολουθείται.



Σχήμα 2.12. Ισόθερμος (T=77K) B.E.T για εμπορικό δείγμα CaO.

Η κλίση της ευθείας υπολογίζεται από :

$$S = \frac{C - 1}{CV_m} \quad (3)$$

και η αποτέμνουσά της από:

$$I = \frac{1}{CV_m} \quad (4)$$

Για τον υπολογισμό του απαιτούμενου όγκου του προσροφημένου αερίου για το σχηματισμό μιας μονομοριακής στοιβάδας, χρησιμοποιούνται η κλίση και η αποτέμνουσα σύμφωνα με τον τύπο:

$$V_m = \frac{1}{S + I} \quad (5)$$

Η ολική επιφάνεια δίνεται από την σχέση :

$$S_g = \left[\frac{V_m \cdot N_{AV}}{V} \right] \cdot a \quad (6)$$

Όπου, Ολική επιφάνεια (S_g) = (αριθμός των προσροφημένων μορίων της μονοστοιβάδας) x (εμβαδόν μορίου). Δηλαδή, N_{AV} : αριθμός Avogadro (6.023×10^{23} μόρια/mol), V : γραμμομοριακός όγκος αερίου (STP) ($22.400 \text{ cm}^3/\text{mol}$), και a : επιφάνεια προβολής του μορίου του αερίου ($\text{cm}^2/\text{μόριο}$), που υπολογίζεται ως εξής:

$$\alpha = 1.09 \left[\frac{M}{N_{AV} \rho} \right] \quad (7)$$

Όπου, M : το μοριακό βάρος του αερίου (g/gmol), και ρ : η πυκνότητα του υγροποιημένου αερίου στη θερμοκρασία του πειράματος (g/cm^3).

Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιείται άζωτο, η ολική ειδική επιφάνεια του στερεού δίνεται από τον τύπο:

$$S_g = 4.35 \times V_m \quad [m^2 / g] \quad (8)$$

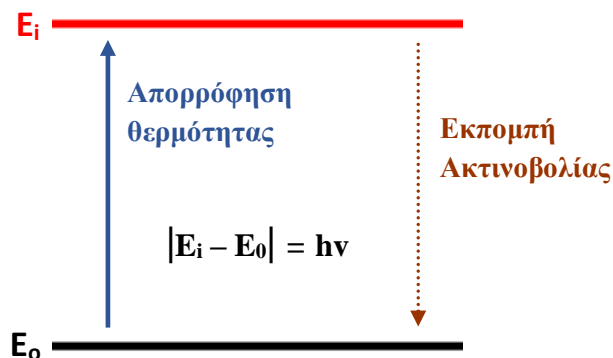
2.3.2. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)

Η ατομική φασματοσκοπία βασίζεται σε δύο σημαντικά αξιώματα της κβαντικής θεωρίας του Max Planck, με το πρώτο να αναφέρει πως για τη μετάβαση ενός σωματιδίου από τη μια κατάσταση στην άλλη, απορροφάει ή εκπέμπει ποσότητα ενέργειας ίση ακριβώς με τη διαφορά ενεργειών των δύο καταστάσεων (κβάντωση). Νοείται πως όλες οι πιθανές θέσεις που βρίσκονται τα σωματίδια (άτομα, ιόντα και μόρια), χαρακτηρίζονται από ορισμένα ποσά ενέργειας. Περαιτέρω, το δεύτερο αξίωμα υποστηρίζει ότι η ακτινοβολία που εκπέμπουν ή απορροφούν άτομα ή μόρια για τη μετάβασή τους σε διαφορετική ενεργειακή κατάσταση, η συχνότητα (ν) ή το μήκος κύματος (λ) της ακτινοβολίας, σχετίζεται με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ενεργειακών καταστάσεων και μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

$$E_i - E_0 = h\nu = h\frac{c}{\lambda} \quad (9)$$

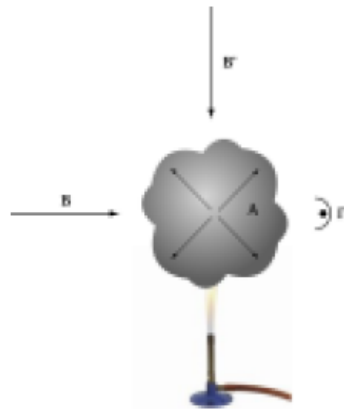
Όπου, " E_i " η ενέργεια της υψηλότερης κατάστασης, " E_0 " η ενέργεια της χαμηλότερης κατάστασης, " c " η ταχύτητα του φωτός και " h " η σταθερά του Planck.

Τα ατομικά φάσματα που προκύπτουν εντοπίζονται στο ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (160-880 nm), το οποίο περιλαμβάνει την υπεριώδη (UV), ορατή και εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία. Στο σχήμα 2.13 παρουσιάζονται οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μεταξύ δύο ενεργειακών επιπέδων E_0 και E_i [7] [4].



Σχήμα 2.13. Ενεργειακές μεταπτώσεις στην φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης [7].

Επίσης, η αρχή της ατομικής φασματοσκοπίας αποδίδεται σχηματικά στο Σχήμα 2.14 [4] [8]. Ένα υποθετικό νέφος ατόμων του στοιχείου A μένουν ελεύθερα από κάθε δεσμό, ενώ παράλληλα στα άτομα αυτά δίδεται ενέργεια με τη μορφή θερμότητας. Ως εκ τούτου μερικά άτομα θα μεταπηδήσουν για ελάχιστα ns σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας ορισμένης συχνότητας ν κατά την αποδιέγερση των ατόμων σε ορισμένη θερμοκρασία αποτελεί ένα μέτρο του αριθμού των ατόμων που διεγέρθηκαν, επομένως και μέτρο του συνολικού αριθμού ατόμων του A που περιέχονται στο νέφος. Αν στο νέφος των ατόμων προσπέσει κατάλληλη δέσμη ακτινοβολίας, τότε η απορρόφηση της ακτινοβολίας αποτελεί πάλι μέτρο της συγκέντρωσης των ατόμων στο χώρο του νέφους.



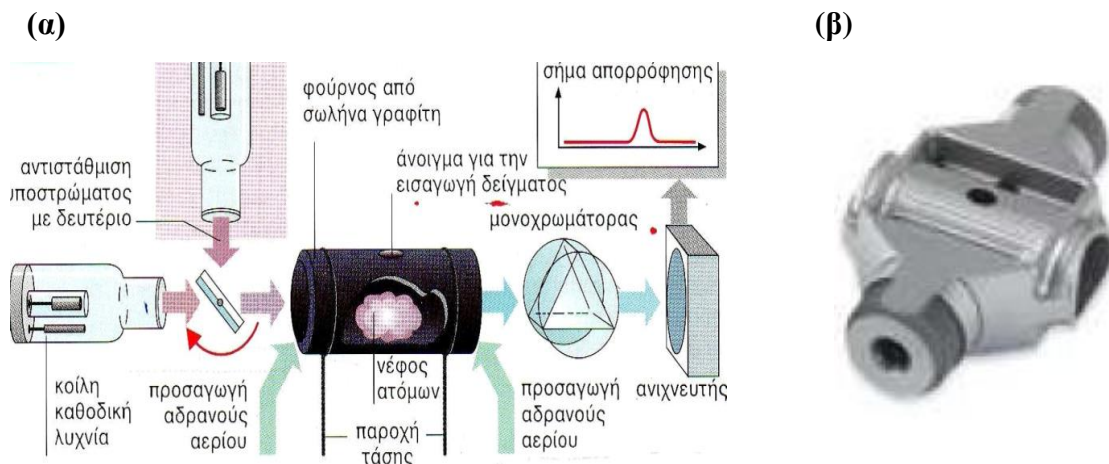
Σχήμα 2.14. Αρχή της ατομικής φασματοσκοπίας. A: Νέφος ατόμων, B, B': Δέσμη διερχόμενης ακτινοβολίας ομοαξονικά και κάθετα με τον ανιχνευτή αντίστοιχα και Γ: Ανιχνευτής [8].

Όταν η ακτινοβολία διέρχεται από τα άτομα της θεμελιώδους κατάστασης, προκαλείται μείωση της έντασης αφού μέρος της ακτινοβολίας απορροφάται από τα άτομα που υφίστανται διέγερση. Ο αριθμός των ατόμων που συμμετέχουν στο φαινόμενο καθορίζουν την ένταση της απορροφούμενης ακτινοβολίας. Η ένταση της απορροφούμενης ακτινοβολίας εξαρτάται επίσης από τον αριθμό των ατόμων που συμμετέχουν στο φαινόμενο. Στη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης η ελάττωση της έντασης συνδέεται με την έννοια της ατομικής απορρόφησης σύμφωνα με το νόμο των Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = K_\nu \beta \log e - 0.4343 K_\nu \beta \quad (10)$$

Όπου "A" η ατομική απορρόφηση, "I₀" η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, "I" η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας, "K_v" ο συντελεστής ανάλογος του αριθμού των ατόμων ανά μονάδα όγκου και "β" το μήκος που διασχίζει η ακτινοβολία μέσα από το ομοιογενές ατομικό νέφος.

Ανάλογα με το σύστημα ατομοποίησης που εφαρμόζεται, διακρίνονται οι επιμέρους τεχνικές: (α) με φλόγα, (β) με φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη, (γ) ψυχρού ατμού και (δ) γεννήτρια υδριδίων. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία για τον προσδιορισμό μεταλλικών ιόντων έγινε χρήση της μεθόδου της ατομικής απορρόφησης φούρνου ηλεκτρικά θερμαινόμενου γραφίτη [4] [8]. Σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός με τις τεχνικές της φλόγας ή του πλάσματος. Στο Σχήμα 2.15 παρουσιάζεται η διάταξη και τα μέρη της συσκευής φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης με φούρνο από σωλήνα γραφίτη, όπως και ο εγκάρσια θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη (Transverse Heated Graphite Atomizer, THGA).



Σχήμα 2.15. (α) Διάταξη συσκευής ΦΑΑ με φούρνο από σωλήνα γραφίτη [7] και (β) εγκάρσια θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη.

Ο φούρνος γραφίτη θεωρείται ως μια κυψελίδα όπου εισάγεται το δείγμα και παραμένει μερικώς παγιδευμένο. Όταν ο φούρνος διαρρέεται από ρεύμα, θερμαίνεται επιταχύνοντας τις επιθυμητές θερμοκρασίες που απαιτούνται για κάθε στάδιο, πιο συγκεκριμένα όμως η θερμοκρασία ατομοποίησης εξαρτάται όχι μόνο τη φύση του στοιχείου αλλά και του δείγματος. Η φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης με φούρνο από σωλήνα γραφίτη, αποτελεί αξιόπιστη φασματοσκοπική τεχνική με πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης για μεγάλο

αριθμό μετάλλων. Παρουσιάζει επίσης αυξημένη ευαισθησία, λόγω του σύντομου χρόνου ατομοποίησης του δείγματος και μέσο χρόνο παραμονής των ατόμων στην οπτική διαδρομή μεγαλύτερο από 1s, ανάλογα με την παροχή του αδρανούς αερίου μέσα στον φούρνο [7].

2.3.3. Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, ICP – MS)

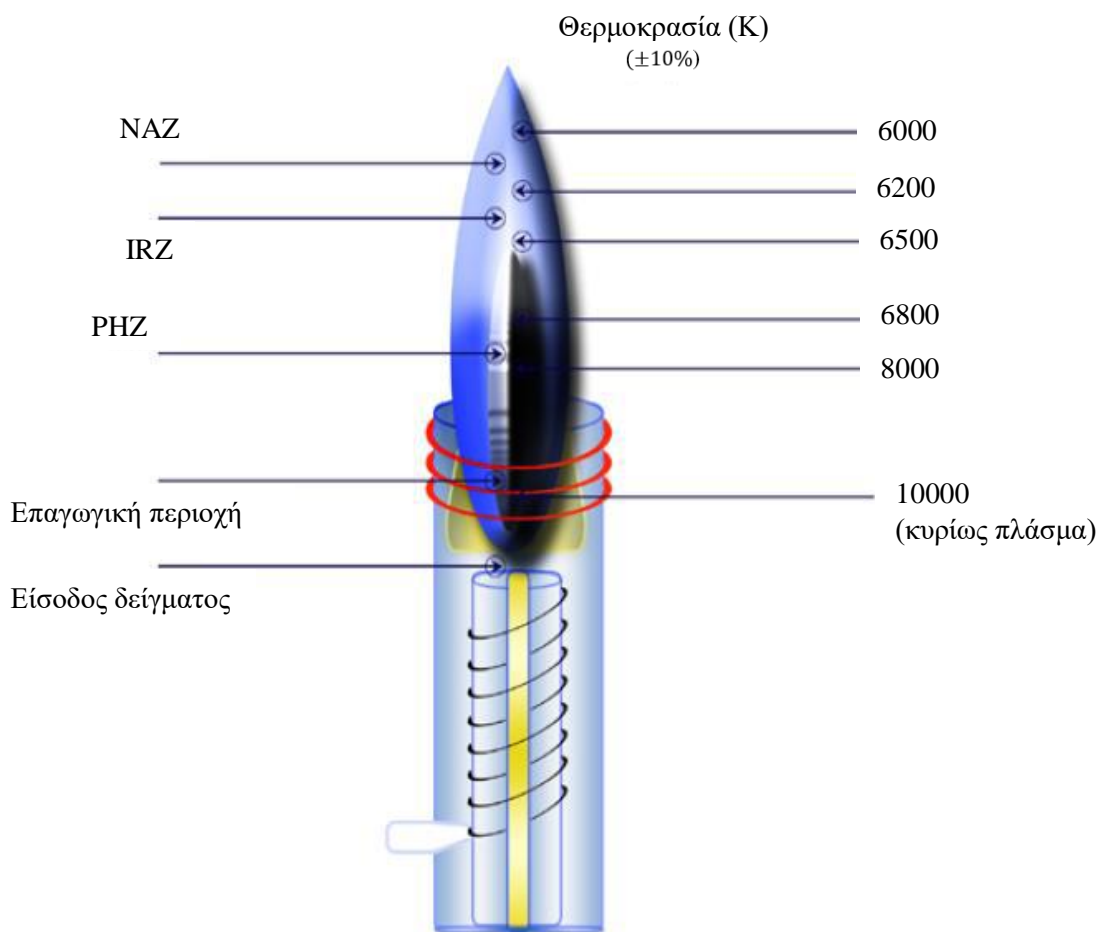
Η φασματομετρία μάζας με πηγή επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP-MS) αποτελεί μια από τις ισχυρότερες και πλέον ευαίσθητες μεθόδους όσον αφορά την ποιοτική αλλά και ποσοτική ανίχνευση ποικίλων στοιχείων και ιχνοστοιχείων. Ειδικότερα, με την συγκεκριμένη τεχνική καθίσταται δυνατός ο σύγχρονος προσδιορισμός σχεδόν όλων των στοιχείων του περιοδικού πίνακα με υψηλή ευαισθησία και ασυνήθιστα μεγάλη γραμμική αναλυτική περιοχή, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα εφαρμογής της σε καίριους τομείς όπως η γεωχημική έρευνα, το περιβάλλον, η πυρηνική χημεία κ.α. Εν συντομία, το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα αποτελεί μια πηγή ιόντων σε πολύ ψηλή θερμοκρασία, ικανό να προκαλέσει την πλήρη διάσπαση των ενώσεων του εκάστοτε υπό ανάλυση δείγματος, ενώ ακολούθως παρατηρείται ικανοποιητικός ιονισμός των υπό ανάλυση στοιχείων. Τα ιόντα που προκύπτουν διαχωρίζονται και ανιχνεύονται από το φασματοφωτόμετρο μάζας [87] [88].

Πιο συγκεκριμένα, το πλάσμα περιγράφεται γενικά ως «αέριο που περιέχει θετικά ιόντα και ελεύθερα ηλεκτρόνια ουδέτερου κατά προσέγγιση φορτίου». Το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP) αποτελεί ένα ειδικό τύπο πλάσματος που τροφοδοτείται με ισχύ από μια γεννήτρια ραδιοσυχνότητας εξ' επαγωγής. Ειδικότερα, το πλάσμα δημιουργείται μέσα στο πυρσό (torch) ο οποίος αποτελείται από τρεις ομόκεντρους σωλήνες χαλαζία, που περιβάλλονται από σπείρες επαγωγικού πηνίου συνδεδεμένου με μια γεννήτρια υψηλής ραδιοσυχνότητας. Καθώς λοιπόν παρέχεται ισχύ από την γεννήτρια, ταλαντευόμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία δημιουργούνται στο τέλος του πυρσού. Το πλάσμα δημιουργείται όταν το αδρανές αέριο (συνήθως αργό) περνάει μέσα από το δεύτερο εσωτερικό σωλήνα χαλαζία και με τη βοήθεια ηλεκτρικής εκκένωσης (σπινθήρα) σχηματίζονται ελεύθερα ηλεκτρόνια τα οποία υπό την επίδραση του προαναφερθέντος ταλαντευόμενου μαγνητικού πεδίου επιταχύνονται και ακολούθως συγκρούονται με άτομα

αργού σχηματίζοντας έτσι ιόντα και επιπλέον ελεύθερα ηλεκτρόνια τα οποία συμβάλλουν στην γένεση του κατάλληλου περιβάλλοντος για ατομοποίηση και διέγερση. Αυτό το περιβάλλον καλείται επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα, θερμοκρασίας 6000-10000 K στην περιοχή που ονομάζεται "Συνήθης Αναλυτική Ζώνη" (NAZ, Normal Analytical Zone) όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.16, όπου παρουσιάζονται οι διάφορες θερμοκρασιακές περιοχές της φλόγας. Επιπλέον, ένα δεύτερο ψυκτικό ρεύμα αργού διέρχεται ελικοειδώς μεταξύ του) μεσαίου και εξωτερικού σωλήνα για να ψύξει το μεσαίο σωλήνα, προφυλάσσοντας τον έτσι από το πλάσμα υψηλής θερμοκρασίας που περιέχει [88] [89] [90].

Ανάμεσα στα πιο διαδεδομένα και χρησιμοποιούμενα αέρια συγκαταλέγονται το αργό (Ar) και το ήλιο (He) λόγω του ότι παρουσιάζουν καλύτερα χαρακτηριστικά για ατομοποίηση, ιονισμό και διέγερση του προσδιοριζόμενου στοιχείου και είναι επίσης ευρύτατα διαθέσιμα στο εμπόριο. Το Αργό χαρακτηρίζεται από ενέργεια ιοντισμού 15,8 eV, κατέχοντας έτσι την υψηλότερη ενέργεια από όλα τα άλλα στοιχεία πέρα από Ήλιο (He), το Νέον (Ne) και το Φθόριο (F). Ως εκ τούτου, σε ένα πλάσμα Αργού, το οποίο έχει εξαιρετική σταθερότητα, τα προς ανάλυση στοιχεία ενός δείγματος δύναται να ιονίζονται μέσω κρούσεων με κατιόντα Ar^+ , διεγερμένα άτομα Ar ή ηλεκτρόνια με μεγάλη ενέργεια.

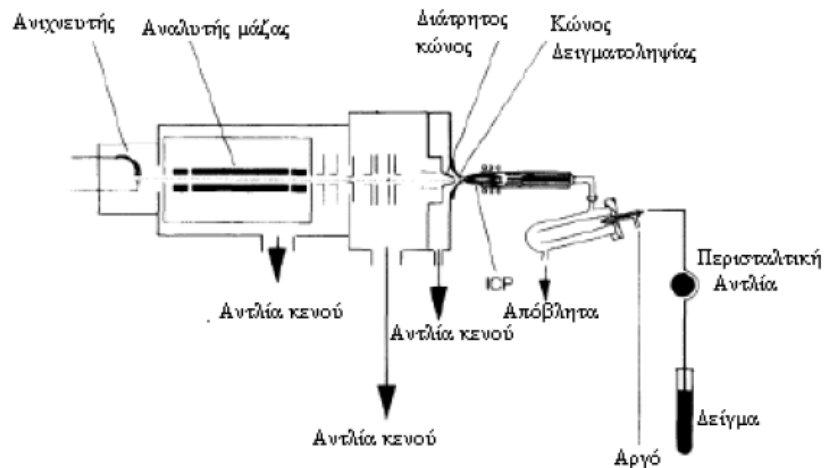
Ειδικότερα, το ρεύμα αερίου στο οποίο εμπεριέχεται ο αναλύτης, διέρχεται από μια ζώνη ψύξης ούτως ώστε να επιτευχθεί η συμπύκνωση αλλά και η απομάκρυνσή του, φτάνοντας στο πλάσμα ως αερόλυμα ξηρών στερεών σωματιδίων. Αξίζει να αναφερθεί πως η ενέργεια του πλάσματος δεν είναι απαραίτητη για την εξάτμιση του διαλύτη, παρέχοντας έτσι περισσότερη διαθέσιμη ενέργεια για την ατομοποίηση. Καταληκτικά, το πλάσμα κατευθύνεται προς το φασματοφωτόμετρο μάζας όπου διαχωρίζονται και καταμετρούνται τα παραγόμενα ιόντα ανάλογα με τον λόγο μάζας-φορτίου [90]. Με στόχο μάλιστα την μέτρηση ισοτοπικών αναλογιών με υψηλότερη ακρίβεια, το φασματοφωτόμετρο μάζας διαθέτει ένα ανιχνευτή για κάθε επιθυμητό ισότοπο.



Σχήμα 2.16. Το θερμοκρασιακό προφίλ των περιοχών και ζωνών σε μια τυπική πηγή επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.

Ένα Φασματοόμετρο Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος διαθέτει σαν ατομοποιητή το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP). Επίσης, τα κυριότερα μέρη του οργάνου όπως παρουσιάζονται στο παρακάτω Σχήμα 2.17, περιλαμβάνουν το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, την πηγή ιόντων ICP, το σύστημα εισαγωγής των ιόντων, το σύστημα κενού, τον αναλυτή μάζας, τον ανιχνευτή των ιόντων και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια του οποίου γίνεται η διαχείριση και η αποτίμηση των δεδομένων. Αξίζει να σημειωθεί πως τα προς ανάλυση υγρά δείγματα εισάγονται με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας στον εκνεφωτή με σταθερή ροή, όπου μετατρέπεται σε αερόλυμα με πολύ μικρές σταγόνες (aerosol) [91] [92]. Σημειώνεται πως η χρήση ενός τέτοιου εκνεφωτή μειώνει την απαιτούμενη συγκέντρωση του αναλύτη κατά μια τάξη

μεγέθους. Επίσης, μόλις τα στοιχεία του εκάστοτε δείγματος μετατραπούν σε ιόντα, αυτά μεταφέρονται στο φασματόμετρο μάζας μέσω των κώνων διεπαφής. Η περιοχή διεπαφής (διασύνδεσης) σε ένα φασματόμετρο, μεταφέρει τα ιόντα που ταξιδεύουν στο ρεύμα του πλάσματος αργού σε ατμοσφαιρική πίεση (1-2 torr), στην περιοχή χαμηλών πιέσεων την οποία χρειάζεται το φασματόμετρο μάζας για να λειτουργήσει ($<1 \times 10^{-5}$ torr). Κάτι τέτοιο γίνεται εφικτό μέσω της ενδιάμεσης περιοχής κενού η οποία δημιουργείται από τους δύο κώνους διεπαφής (διασύνδεσης), τον κώνο δειγματοληψίας (sampler) και τον κώνο αποκωρυφωτή (skimmer), οι οποίοι αποτελούν μεταλλικούς δίσκους με μια μικρή οπή ($\sim 1\text{mm}$) στο κέντρο. Στόχος των δύο αυτών κώνων καθίσταται η διασφάλιση της σωστής πορείας της δέσμης που προέρχεται από τον πυρσό. Αξίζει να αναφερθεί πως για αποφυγή φραξίματος των κεντρικών οπών των κώνων η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένους περιορισμούς σχετικά με την ποσότητα των ολικών διαλυμένων στερεών (TDS) στο εκάστοτε υπό ανάλυση δείγμα ($<0,2\%$ TDS) [87] [88] [89].



Σχήμα 2.17. Τα μέρη ενός φασματοφωτόμετρου μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος.

Παραπέρα, η τεχνική ICP-MS παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως είναι η ταχεία πολυστοιχειακή ανάλυση, τα χαμηλά όρια ανίχνευσης ($< \text{ppt}$), η δυνατότητα ανάλυσης ισοτόπων, η μεγάλη γραμμική περιοχή, η μεγάλη ταχύτητα (10800 αναλύσεις ανά 8h) και η απλότητα των ληφθέντων φασμάτων. Στα βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνονται πέρα από το υψηλό κόστος λειτουργίας, οι ισοβαρείς παρεμποδίσεις μεταξύ ουσιών με ίδια μάζα και φορτίο. Ωστόσο, όταν πριν από περίπου 20 χρόνια έγινε

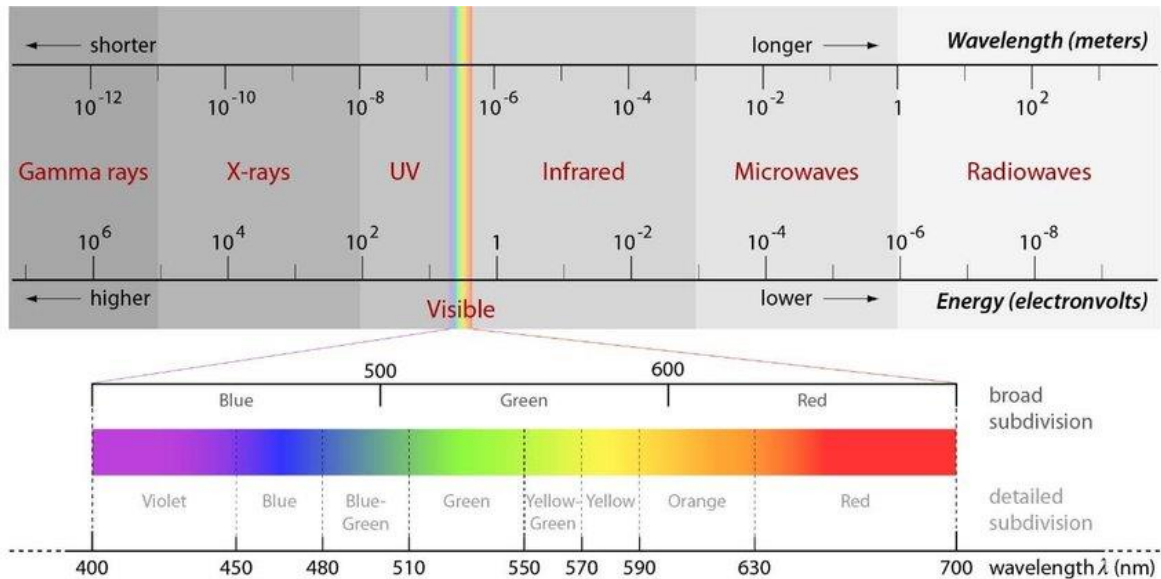
εμπορικά διαθέσιμο το πρώτο φασματοόμετρο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, κατέστη αστραπιαία ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο σε πάρα πολλά εργαστήρια, τόσο για συνήθεις αναλύσεις όσο και για ερευνητικούς σκοπούς σε διάφορους τομείς [87] [93].

2.3.4. Φασματομετρία Ορατού – Υπεριώδους (UV – Vis)

Η Φασματοσκοπία και η φασματομετρία αποτελεί ένα κλάδο ο οποίος περιλαμβάνει μια πληθώρα μεθόδων και τεχνικών που ενδείκνυνται για χημική ανάλυση της δομής της ύλης (ουσιών, μορίων, ατόμων κλπ.). Οι περισσότερες από αυτές βασίζονται στην επίδραση κατάλληλης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε μια ουσία η οποία δεσμεύεται από τα άτομα, ή τα μόρια της ύλης, καταλήγοντας σε ηλεκτρονιακές διεγέρσεις, διεγέρσεις πυρήνων αλλά και αλλαγές στην περιστροφή και τη δόνηση των μορίων. Μέσα από την αποβολή της εν λόγω ακτινοβολίας που απορροφάται από τα εκάστοτε άτομα ή μόρια, καθίσταται εφικτή η επιστροφή τους στην αρχική κατάσταση (θεμελιώδης κατάσταση). Έτσι προκύπτει το φάσμα απορρόφησης το οποίο μεταφράζεται ως καταγραφή της απορρόφησης της ακτινοβολίας σε συνάρτηση με το μήκος κύματος, ή τη συχνότητα της ακτινοβολίας. Ως εκ τούτου η φασματομετρία UV-VIS πραγματεύεται με απορροφήσεις και ανακλάσεις ακτινοβολίας στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Στο σημείο αυτό αναφέρεται πως η περιοχή υπεριώδους ακτινοβολίας εκτείνεται από 10 μέχρι 380 nm μήκους κύματος (λ) και το ορατό φώς μεταξύ 380 και 780 nm (βλέπε Σχήμα 2.18) [94].

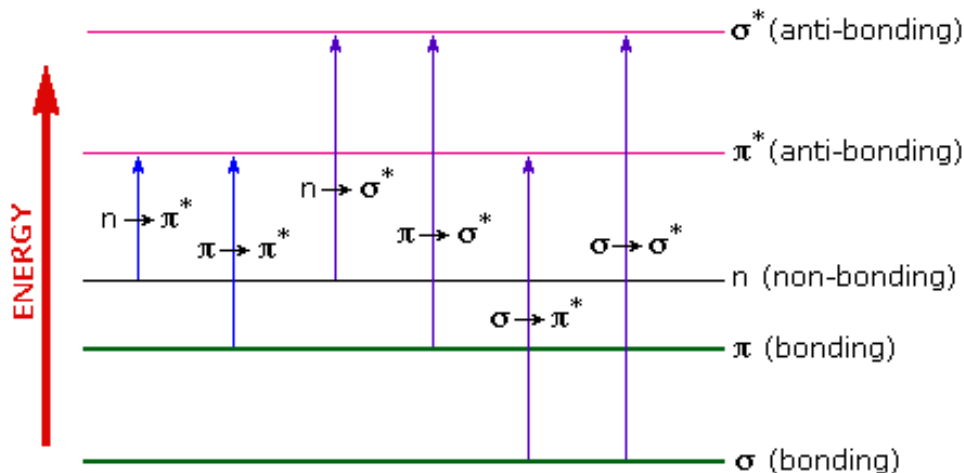
Οι απορροφήσεις ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στα δύο προαναφερθέντα τμήματα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος προκύπτουν λόγω των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονική δομή των μορίων. Στην φασματομετρία UV-VIS, η απορρόφηση ενέργειας συγκεκριμένου μήκους κύματος ευθύνεται για την ανύψωση ή πτώση των εξωτερικών ηλεκτρονίων από τη μια ηλεκτρονιακή τροχιά σε μια άλλη. Η αλληλεπίδραση μάλιστα ενός εκάστοτε μορίου μιας χημικής ένωσης και της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αποδίδεται σε μεταβολές στη διπολική του ροπή οι οποίες προέρχονται από την αλλαγή της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας του μορίου. Έτσι προκύπτουν οι μεταβάσεις των ηλεκτρονίων από τη θεμελιώδη σε διεγερμένες ενεργειακά καταστάσεις (excited states) λόγω απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην υπεριώδη-ορατή περιοχή του

φάσματος. Ούτως ώστε λοιπόν να πραγματοποιηθεί απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας σε κάποιο υπό εξέταση δείγμα απαιτείται όπως τα φωτόνια που προσκρούουν στο δείγμα να χαρακτηρίζονται από ενέργεια ίση με αυτή που χρειάζεται για να προκληθεί μια κβαντισμένη ενεργειακή μεταβολή [94] [95].



Σχήμα 2.18. Το Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα [14].

Μόρια λοιπόν που περιέχουν δεσμικά και μη δεσμικά ηλεκτρόνια (n-electrons) μπορούν να απορροφήσουν ενέργεια με τη μορφή υπεριώδους ή ορατού φωτός διεγείροντας τα σε υψηλότερα αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά. Οι ευκολότερα πραγματοποιήσιμες ηλεκτρονιακές διεγέρσεις χαρακτηρίζονται από απορρόφηση ενέργειας – ακτινοβολίας μεγαλύτερου μήκους κύματος. Σαν γενικός κανόνας μάλιστα επικρατεί η θεωρία πως μια ενεργειακά ευνοούμενη ηλεκτρονιακή διέγερση αποτελεί η μεταβίβαση του εκάστοτε ηλεκτρονίου από το "υψηλότερο κατειλημμένο μοριακό τροχιακό" (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO) προς το "χαμηλότερο ενεργειακά μη κατειλημμένο μοριακό τροχιακό" (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO). Στο παρακάτω Σχήμα 2.19 παρουσιάζονται οι ηλεκτρονιακές διεγέρσεις που παρατηρούνται σε οργανικά μόρια, με τις δύο πρώτες (μπλέ) να ευνοούνται ενεργειακά στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος από 200 μέχρι 800 nm [96] [94].



Σχήμα 2.19. Οι πιθανές ηλεκτρονικές διεγέρσεις οργανικών μορίων.

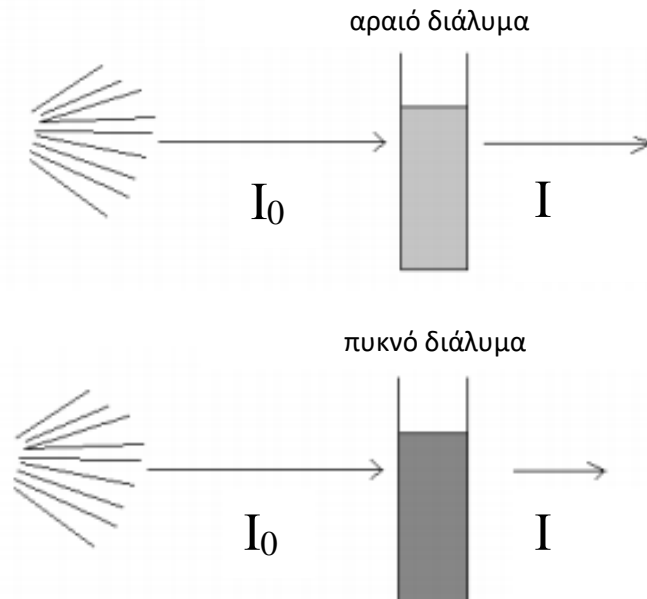
Η ενέργεια των μερικών eV που χαρακτηρίζει τις ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις που περιγράφονται παραπάνω, προκύπτει από την σχέση (9) του υποκεφάλαιου 1.3.2. Επίσης, οι ποσοτικές μετρήσεις που πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας τη φασματοφωτομετρία UV-VIS βασίζονται στο γεγονός πως η ακτινοβολία που απορροφάται εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που απορροφά την συγκεκριμένη ακτινοβολία. Η ποσοτική σχέση δίνεται και πάλι από το νόμο των Beer-Lambert:

$$A = \log(I_0/I) = -\log T = \log(100/\% T) = \alpha b C_{g/L} = \epsilon b C_{mol/L} \quad (11)$$

Όπου "A" η απορρόφηση ακτινοβολίας, "I₀" η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, "I" η ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας, "T" η διαπερατότητα, "b" η απόσταση που διάνυσε η δέσμη στο δείγμα (cm), "ε" ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης (M⁻¹cm⁻¹) και "C" η συγκέντρωση του δείγματος (M=mol/L).

Ο πιο πάνω νόμος υποδηλώνει ότι η απορρόφηση ενός διαλύματος είναι άμεσα ανάλογη με τη συγκέντρωση της απορροφητικής ουσίας στο διάλυμα (Σχήμα 2.20) και το μήκος της διαδρομής που διάνυσε η ακτινοβολία. Έτσι, διατηρώντας σταθερό το μήκος διαδρομής, η φασματομετρία UV/Vis μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της απορροφητικής ουσίας στο εκάστοτε υπό ανάλυση διάλυμα. Κρίνεται επίσης απαραίτητη η γνώση του ρυθμού μεταβολής της απορρόφησης ανάλογα

με την συγκέντρωση, κάτι το οποίο μπορεί να προσδιοριστεί είτε βιβλιογραφικά είτε μέσα από την κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης [96].



Σχήμα 2.20. Η αύξηση της συγκέντρωσης του υπό εξέταση διαλύματος αυξάνει την ποσότητα της ακτινοβολίας που απορροφάται.

Το φως - ακτινοβολία που χρησιμοποιείται για κάποια UV-Vis φασματομετρική ανάλυση πρέπει να χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένο μήκος κύματος ή έστω να εμπίπτει σε ένα συγκεκριμένο εύρος. Αυτό το μήκος κύματος αντιστοιχεί φυσικά στην ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που απορροφάται από τα μόρια της υπό ανάλυση ουσίας. Πρακτικά, για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κάθε εξεταζόμενης ουσίας ενδείκνυται η εκ των προτέρων γνώση του μήκους κύματος στο οποίο παρατηρείται η μεγαλύτερη δυνατή απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας [94] [95].

Συμπερασματικά, στα κύρια μέρη ενός φασματοφωτόμετρου συγκαταλέγονται [97]:

- 1) Η λυχνία παραγωγής φωτός που επιλέγεται ανάλογα με το επιθυμητό φάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (UV, Vis).
- 2) Το όργανο παραγωγής μονοχρωματικής που αποσκοπεί στην επίτευξη του ενδεδειγμένου μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ώστε να απορροφάται από την ουσία της οποίας επίκειται η ποσοτικοποίηση της. Τέτοια όργανα μπορεί να είναι α) μονοχρωμάτορες, β) φίλτρα γ) πρίσματα και δ) φράγματα περιθλάσεως.

3) Οι κυψελίδες οι οποίες αποτελούν μικρά γυάλινα κυλινδρικά ή ορθογώνια δοχεία στα οποία τοποθετείται το υπό ανάλυση διάλυμα/δείγμα και για το λόγο αυτό ενδείκνυται η διαρκής σχολαστική καθαριότητα τους αφού οποιαδήποτε ακαθαρσία αναμένεται να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα. Χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένο πάχος και διάμετρο ενώ κατασκευάζονται από διάφορα υλικά ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μήκος κύματος.

4) Φωτοκύτταρο (ανιχνευτής φωτός) μέσω του οποίου πραγματοποιείται η μέτρηση της ακτινοβολίας που τελικά διέρχεται μέσα από το διάλυμα/δείγμα.

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως πολλές ουσίες που δεν φέρουν χρωμοφόρες ομάδες στο μόριο τους (αόρατες), γίνονται ορατές και κατ' επέκταση μετρήσιμες φασματομετρικά έπειτα από σχετικές αντιδράσεις συμπλοκοποίησης με άλλες ενδεδειγμένες χημικές ουσίες.

2.3.5. Φασματοσκοπία Υπερύθρου, Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflection – Infrared Radiation, ATR - IR)

Το υπέρυθρο τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από τα 0,7 μm έως τα 300 μm , μεταξύ των μικροκυμάτων και του ορατού φωτός, και διαχωρίζεται στο εγγύς (0,8-2,5 μm), το μέσο (2,5-25 μm) και το άπω (25-300 μm) υπέρυθρο φάσμα. Η εγγύς υπέρυθρη περιοχή αντιστοιχεί στις υπερτονικές και τις αρμονικές δονήσεις ή δονήσεις συνδυασμού, ενώ η άπω υπέρυθρη περιοχή παρέχει πληροφορίες για τις μοριακές περιστροφές και τις δονήσεις βαρέων ατόμων και κρυσταλλικού πλέγματος. Αντιστοίχως, η μέση υπέρυθρη ακτινοβολία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη βασικών μεταβολών στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας. Κατά την διάρκεια μάλιστα αυτών των μεταβολών, οι οποίες ονομάζονται θεμελιώδεις ή κανονικές δονήσεις (Πίνακας 3), όλα τα άτομα διέρχονται από τη θέση ισορροπίας τους ταυτόχρονα και φθάνουν στις ακραίες θέσεις τους την ίδια στιγμή κατά τη διάρκεια της ταλάντωσης [98] [99] [100].

Ως εκ τούτου, η μέθοδος της υπέρυθρης φασματοσκοπίας στηρίζεται στην απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας από τα μόρια της εκάστοτε υπό ανάλυση ένωσης, διεγείροντας τα σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες δόνησης ή περιστροφής. Συγκεκριμένα, τα μήκη

κύματος της ενέργειας που απορροφάται από τα μόρια, εξαρτάται άμεσα από τους χημικούς δεσμούς οι οποίοι είναι παρόντες στο μόριο. Σημειώνεται πως κάθε μόριο διαθέτει τα δικά του πλήρως διακριτά και ποσοτικοποιημένα δονητικά επίπεδα, τα οποία συχνά αναφέρονται ως αποτύπωμα [98] [101] [100].

Πίνακας 3. Οι βασικοί τύποι δονήσεων των μοριακών δομών στην IR φασματοσκοπία.

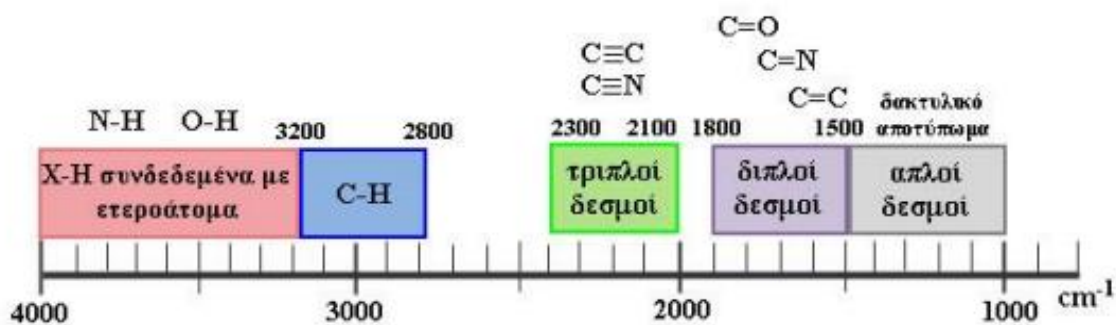
A/A	Τύπος Δόνησης	Περιγραφή Δόνησης
1	Δονήσεις τάσης	δύο συνδεδεμένα άτομα πάλλονται συνεχώς μεταξύ τους, μεταβάλλοντας τη μεταξύ τους απόσταση κατά μήκος του άξονα του δεσμού
2	Δονήσεις κάμψης	συνεχή μεταβολή της γωνίας μεταξύ δύο δεσμών - χωρίζονται σε 4 υποκατηγορίες
2.1	<i>Δονήσεις ψαλιδιού ή παραμόρφωσης</i>	δύο άτομα που είναι συνδεδεμένα με ένα κεντρικό άτομο κινούνται εμπρός πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας (in-plane) και προς τη μεταξύ τους διεύθυνση
2.2	<i>Δονήσεις αιώρησης</i>	μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εμπρός και πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας (in-plane) που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς
2.3	<i>Δονήσεις σείσης</i>	μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εκτός του επιπέδου ισορροπίας (out-of-plane) που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς
2.4	<i>Δονήσεις συστροφής</i>	μία δομική μονάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από τον δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο τμήμα του μορίου εκτός του επιπέδου ισορροπίας (out-of-plane)

Ωστόσο, ενεργά υπέρυθρα μόρια θεωρούνται μόνο τα μόρια στα οποία οι δονήσεις και οι περιστροφές των ατόμων τους χαρακτηρίζονται από μια διαρκή μεταβολή της διπολικής τους ροπής. Έτσι, μία μεταβολή του δονητικού επιπέδου, λόγω απορρόφησης ή εκπομπής υπέρυθρης ακτινοβολίας, συμβαίνει όταν υπάρχει μεταβολή της ηλεκτρικής διπολικής ροπής του μορίου όταν τα άτομα μετατοπίζονται το ένα ως προς το άλλο. Επίσης, δεδομένου του γεγονότος πως η περιοδική μεταβολή της διπολικής ροπής λόγω περιστροφής ή δόνησης επιτυγχάνεται μόνο σε ορισμένες συχνότητες, απορρόφηση υπέρυθρης ακτινοβολίας συμβαίνει όταν η προσπίπτουσα αυτή ακτινοβολία και το δίπολο χαρακτηρίζονται από την ίδια συχνότητα. Οι δονήσεις μάλιστα που προκαλούν μεγάλη

μεταβολή στη διπολική ροπή του μορίου, έχουν σαν αποτέλεσμα την απορρόφηση μεγαλύτερης ποσότητας υπέρυθρης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας [102] [103] [100].

Επιπλέον, τα φωτόνια της εκπεμπόμενης υπέρυθρης ακτινοβολίας, απορροφώνται από κάποιο μόριο όταν η ενέργεια τους ($E=h\nu$) είναι ίση με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δύο δονητικών καταστάσεων του μορίου. Οι δύο αυτές δονητικές καταστάσεις περιλαμβάνουν αυτήν στην οποία βρίσκεται αρχικά το μόριο και αυτή στην οποία μπορεί να διεγερθεί εφόσον πάντοτε η μετάπτωση αυτή είναι επιτρεπτή. Έτσι, μόνο μεταπτώσεις μεταξύ διαδοχικών ενεργειακών επιπέδων είναι επιτρεπτές ($E_0 \rightarrow E_1 \rightarrow E_2$).

Συμπερασματικά, η φασματοσκοπία υπέρυθρου αναδεικνύεται ως μια σημαντική και αποτελεσματική αναλυτική τεχνική, για τον χαρακτηρισμό, τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό οποιασδήποτε χημικής ένωσης, με το ανακτώμενό φάσμα από μια τέτοια ανάλυση να αντιστοιχεί στους κανονικούς τρόπους δόνησης των μορίων. Κατ' επέκταση, το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα κάθε μορίου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική ανάλυση αλλά και την απόδοση της μοριακής δομής μιας ένωσης, παρέχοντας πληροφορίες τόσο για τη φύση των ατόμων που βρίσκονται στο μόριο όσο και για τη διάταξή τους στον χώρο. Η αύξηση της πολυπλοκότητας λοιπόν του εκάστοτε υπό ανάλυση φάσματος βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με τον αριθμό των ατόμων σε ένα μόριο. Εν τούτοις, η ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων σε ένα μόριο, που απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, διευκολύνει την ερμηνεία πολύπλοκων φασμάτων (Σχήμα 2.21) [100] [101] [99].



Σχήμα 2.21. Η ύπαρξη χαρακτηριστικών ομάδων στις οργανικές ενώσεις που απορροφούν σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, διευκολύνει την ανάλυση τέτοιων φασμάτων.

Ένα όργανο υπέρυθρης φασματοσκοπίας περιλαμβάνει τα εξής μέρη (Σχήμα 2.22) [102] [99]:

1) Την υπέρυθρη πηγή, όπου υπέρυθρη ακτινοβολία εκπέμπεται σε όλη την υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος από μία πηγή μελανού σώματος και εν συνεχεία, μέσω μίας κατάλληλης διάταξης οπτικών η ακτινοβολία αυτή φτάνει στο προς ανάλυση δείγμα και έπειτα στον ανιχνευτή.

2) Την πηγή laser που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία εσωτερικής αναφοράς, τη μέτρηση των κυματαριθμών και τη ρύθμιση της διάρκειας των παλμών.

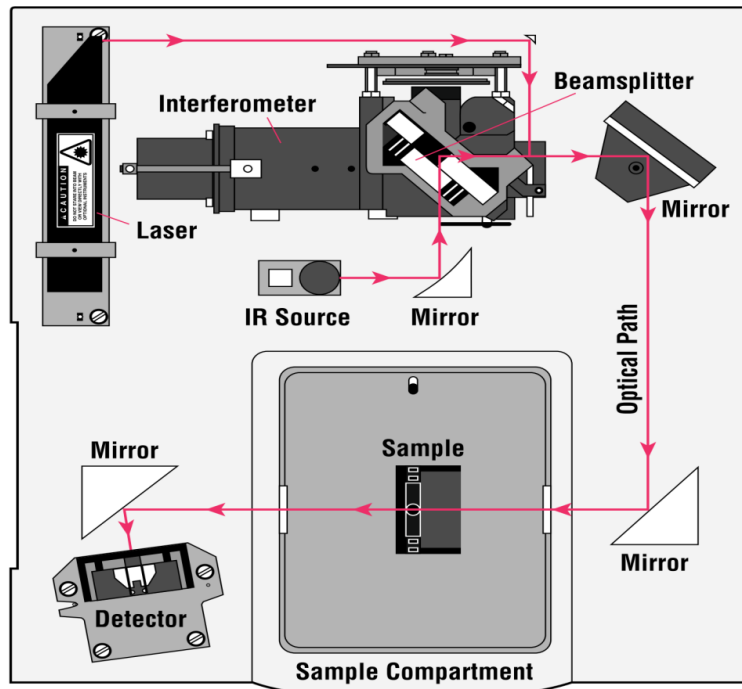
3) Το συμβολόμετρο όπου εισέρχεται η δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας ούτως ώστε να καταστεί εφικτή η φασματική κωδικοποίηση και η παραγωγή του συμβολογραφήματος το οποίο τελικά εξέρχεται από το συμβολόμετρο.

4) Το διαμέρισμα του δείγματος όπου η δέσμη διαπερνά την επιφάνεια του δείγματος με αποτέλεσμα την απορρόφηση των συγκεκριμένων χαρακτηριστικών συχνοτήτων ενέργειας του εκάστοτε υπό εξέταση μορίου.

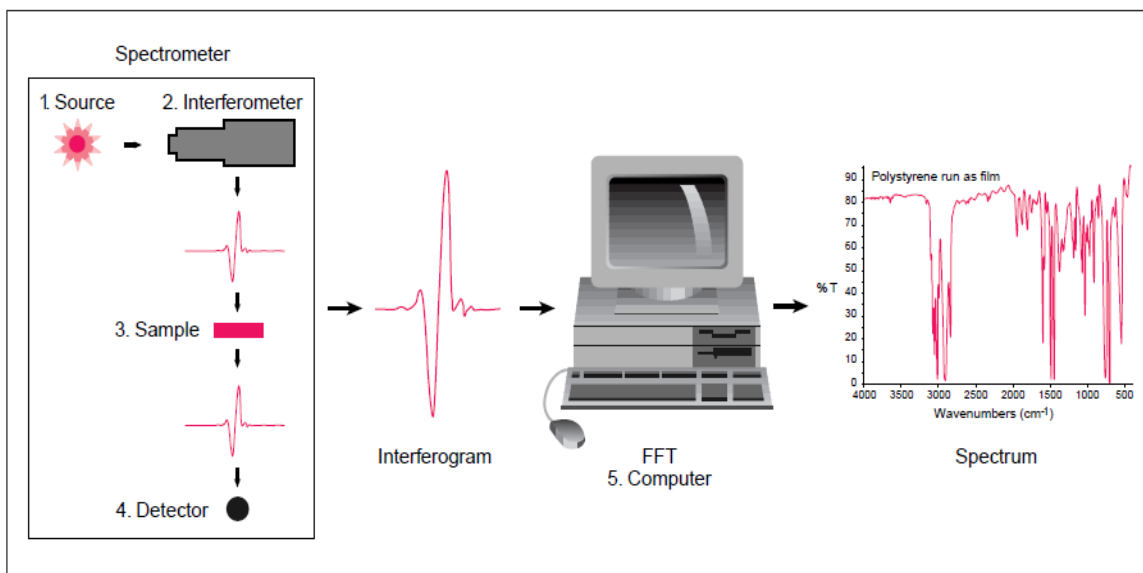
5) Τον ανιχνευτή στον οποίο φτάνει τελικά η δέσμη για την τελική μέτρηση των συμβολογραφημάτων.

6) Τον Η/Υ όπου το μετρούμενο ψηφιοποιημένο σήμα μέσω του μετασχηματισμού Fourier μετατρέπεται σε υπέρυθρο φάσμα το οποίο λαμβάνεται για περαιτέρω επεξεργασία και ερμηνεία (Σχήμα 2.23).

Τα τυπικά φασματοφωτόμετρα υπέρυθρου όπως έχει ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιούνται στην ανάλυση στερεών, υγρών και αερίων, μέσω της διαπερατότητας της υπέρυθρης ακτινοβολίας από το δείγμα. Στην περίπτωση υγρών ή στερεών δειγμάτων, η ένταση των φασματικών χαρακτηριστικών καθορίζεται από το πάχος του δείγματος, το οποίο δεν μπορεί να υπερβαίνει τις λίγες δεκάδες μικρόμετρα (μm).



Σχήμα 2.22. Απλοποιημένο σχεδιάγραμμα του εσωτερικού ενός τυπικού φασματοφωτόμετρου υπέρυθρης φασματοσκοπίας.

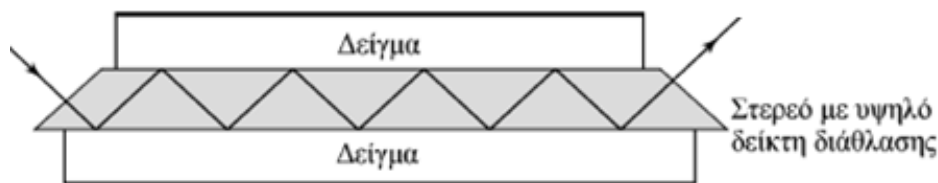


Σχήμα 2.23. Απλοποιημένη διαδικασία καταγραφής ενός υπέρυθρου φάσματος.

Ανάμεσα λοιπόν στα κύρια πλεονεκτήματα αυτής της αναλυτικής τεχνικής συγκαταλέγεται η δυνατότητα απόκτησης φασμάτων από ένα μεγάλο εύρος στερεών, υγρών και αερίων. Αρκετές είναι όμως οι περιπτώσεις που απαιτείται ειδική προετοιμασία του δείγματος ούτως ώστε να ανακτηθούν υψηλής ποιότητας φάσματα.

Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί ιδιαίτερα η σημασία της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου με την Μέθοδο της Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR), δεδομένου του ότι η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται από την αποτελεσματική αντιμετώπιση των κυριότερων προκλήσεων της υπέρυθρης ανάλυσης. Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνεται η προετοιμασία του εκάστοτε δείγματος, οι φασματικές μεταβολές αλλά και η φασματική επαναληψιμότητα. Περαιτέρω, η εν λόγω τεχνική κρίνεται κατάλληλη για τη μελέτη δειγμάτων μεγάλου πάχους ή υψηλά απορροφητικών και αδιαφανών στερεών ή υγρών υλικών που περιλαμβάνουν λεπτά φιλμ και επικαλύψεις, κονιοποιημένα υλικά (σκόνες), νήματα, πάστες, κόλλες, λεπτά υμένα πολυμερών και υδατικά διαλύματα. Όσον αφορά τα στερεά υπό ανάλυση δείγματα, η πιο κοινή μορφή προετοιμασίας του δείγματος πραγματοποιείται την μετατροπή του σε σκόνη και την διασπορά του σε μία μήτρα [104] [102].

Η λειτουργία της τεχνικής ATR στηρίζεται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (total internal reflection) το οποίο προκύπτει όταν μία δέσμη ακτινοβολίας εισάγεται από ένα μέσο υψηλής πυκνότητας με μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης σε ένα μέσο χαμηλότερης πυκνότητας με μικρότερο δείκτη διάθλασης. Λαμβάνοντας υπόψη πως το κλάσμα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που ανακλάται αυξάνεται όσο μεγαλώνει η γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας, η υπέρυθρη ακτινοβολία κατευθύνεται υπό συγκεκριμένη γωνία, σε έναν κρύσταλλο με υψηλό δείκτη διάθλασης, πάνω στον οποίο τοποθετείται το δείγμα. Σημειώνεται πως ο δείκτης διάθλασης του κρυστάλλου πρέπει να είναι σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν του δείγματος. Αυτή η εσωτερική ανάκλαση δημιουργεί ένα παροδικό κύμα που επεκτείνεται πέρα από την επιφάνεια του κρυστάλλου και φτάνει έως το δείγμα που είναι σε επαφή με τον κρύσταλλο (Σχήμα 2.24). Επομένως, τίθεται ως προϋπόθεση η πολύ καλή επαφή μεταξύ δείγματος και κρυστάλλου λόγω του ότι αυτό το παροδικό κύμα προεξέχει μόνο λίγα μικρόμετρα (0.5-5 μm) έξω από την επιφάνεια του κρυστάλλου και μέσα στο δείγμα [104] [102].



Σχήμα 2.24. Η δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο (συνήθως υπό γωνία 45°) υφίσταται πολλαπλές ολικές ανακλάσεις.

Κατ' επέκταση, το δημιουργούμενο και κατευθυνόμενο κύμα ακτινοβολίας εξασθενεί καθώς διεισδύει και εκτείνεται κατά μήκος του δείγματος, νοουμένου του ότι το δείγμα απορροφά ενέργεια σε συγκεκριμένες περιοχές του υπέρυθρου ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Έτσι, από την μέτρηση και καταγραφή της προκύπτουσας αποσβένουσας ακτινοβολίας συναρτήσει του μήκους κύματος, προκύπτει ένα IR φάσμα το οποίο προσομοιάζει ένα συμβατικό φάσμα απορρόφησης [104] [99].

Συμπερασματικά, η ATR-FTIR φασματοσκοπία αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μη καταστρεπτικές και πλέον ευέλικτες μεθόδους, μέσω τα οποίας παρέχεται η δυνατότητα λήψης φασμάτων πολύ υψηλής ποιότητας για μια αρκετά ευρεία γκάμα υλικών.

2.3.6. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) αποτελεί μία από τις πιο σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους η οποία χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια παρέχει την δυνατότητα ανάλυσης της μικροδομής ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η διαφορά στη λειτουργία του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης σε σχέση με την λειτουργία του οπτικού μικροσκοπίου, έγκειται στη χρήση μιας δέσμης ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας αντί για φως, ούτως ώστε να επιτυγχάνεται η εξέταση των εκάστοτε δειγμάτων σε λεπτομερέστερη κλίμακα [105]. Έτσι, αποφεύγονται οι περιορισμοί που παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο στο οποίο λόγω της φύσης του φωτός τα επίπεδα μεγεθύνσεων δεν ξεπερνούν τις 1000x και η διακριτική ικανότητα τα 0.2 μm. Η ανακάλυψη λοιπόν καθώς και η εφαρμογή των ηλεκτρονικών μικροσκοπίων βασίστηκε κυρίως στην ανάγκη της εξέτασης του εσωτερικού του κυττάρου που απαιτούσε μεγεθύνσεις μεγαλύτερες από τις 10,000x [105] [106] [107].

Αναλυτικότερα, η κυματική φύση των ηλεκτρονίων επιτρέπει την εστίαση τους όπως ακριβώς και στην περίπτωση των φωτεινών κυμάτων αλλά σε πολύ πιο μικρή επιφάνεια όπως για παράδειγμα είναι ο κόκκος από κάποιο υπό εξέταση υλικό. Κατά την ανάλυση μάλιστα οποιουδήποτε δείγματος, η δέσμη ηλεκτρονίων ενέργειας 1–50 keV που χρησιμοποιεί το μικροσκόπιο σαρώνει την επιφάνεια του, ενώ ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με αυτό παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τα άτομα των στοιχείων που απαρτίζουν το εξεταζόμενο υλικό-δείγμα. Τα εν λόγω άτομα εκπέμπουν κυρίως δευτερογενή (secondary) και οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια όπως και ακτίνες X, με την έντασή τους να επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας [108]. Τα οπισθοσκεδαζόμενα (backscattered) ηλεκτρόνια μάλιστα εκπέμπονται από μεγαλύτερο βάθος μέσα στο δείγμα και αυξάνονται αναλογικά με τον ατομικό αριθμό του δείγματος. Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως τα ηλεκτρόνια της δέσμης διεισδύουν στο δείγμα ανάλογα με τον ατομικό του αριθμό, και ταξιδεύουν προς διάφορες κατευθύνσεις έως ότου συγκρουστούν ελαστικά με τον πυρήνα του ατόμου, ειδικά σε μεγάλα άτομα, κάτι που τελικά προκαλεί την προαναφερθείσα εκπομπή - σκέδαση των ηλεκτρονίων προς οποιαδήποτε κατεύθυνση κατακρατώντας το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειάς τους. Ως εκ τούτου οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ της δέσμης των ηλεκτρονίων και του δείγματος περιλαμβάνουν συσσώρευση φορτίου ηλεκτρονίων στο δείγμα (φόρτιση) όταν το δείγμα δεν είναι αγωγίμο, ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων, μη ελαστική σκέδαση ηλεκτρονίων και θέρμανση του δείγματος. Επίσης η διείσδυση της δέσμης ηλεκτρονίων στο δείγμα καθορίζεται και από τον αριθμό των ηλεκτρονίων στη δέσμη, τη διάμετρο της δέσμης και την ταχύτητα-ενέργεια των ηλεκτρονίων [109] [110] [111].

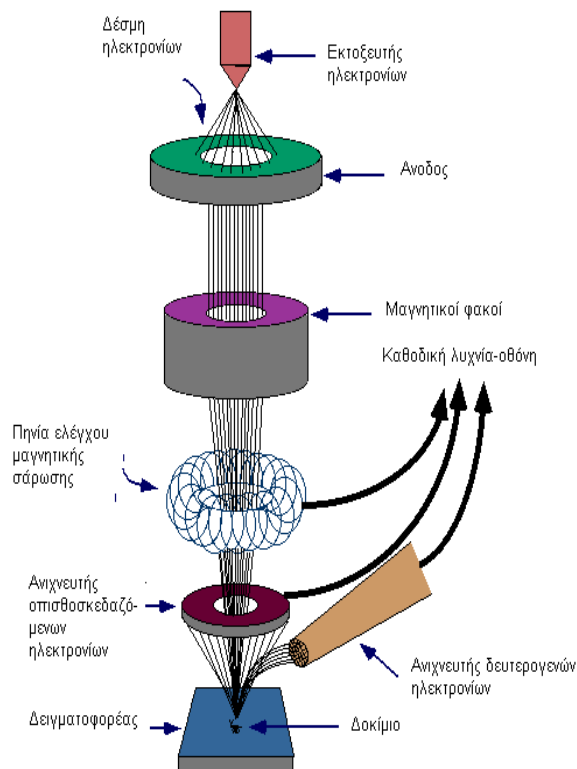
Από την άλλη πλευρά, τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, τα οποία αφορούν τα χαλαρά συγκρατούμενα ηλεκτρόνια των ατόμων που συγκρούονται με τα ηλεκτρόνια της δέσμης και εν τέλει διαφεύγουν από τα άτομα, χαρακτηρίζονται από χαμηλή ενέργεια και εκπέμπονται πολύ κοντά στην επιφάνεια του δείγματος, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες για την απεικόνιση της συγκεκριμένης επιφάνειας. Σημειώνεται πως κάθε προσπίπτον ηλεκτρόνιο μπορεί να παράγει αρκετά δευτερογενή. Επιπλέον, λόγω του ότι τα δευτερογενή ηλεκτρόνια παράγονται όταν η δέσμη εισέρχεται στην επιφάνεια αλλά

κυρίως όταν η οπισθοσκεδαζόμενη δέσμη εξέρχεται από την επιφάνεια, παρατηρείται μεγαλύτερη εκπομπή των εν λόγω ηλεκτρονίων όταν και η εκπομπή οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων είναι μεγάλη. Ως εκ τούτου, οι εικόνες των δευτερογενών και των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων είναι πολύ παρόμοιες [111] [109].

Δεδομένου λοιπόν του ότι η λειτουργία του SEM στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις του προς εξέταση δείγματος και της προσπίπτουσας σε αυτό δέσμης ηλεκτρονίων, οι βασικές διατάξεις που συναντώνται σε ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης περιλαμβάνουν το σύστημα παραγωγής δέσμης ηλεκτρονίων, το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης, το σύστημα πληροφοριών και τέλος το σύστημα κενού. Παραπέρα, στα βασικά στάδια λειτουργίας του μικροσκοπίου όπως παρουσιάζονται και στο παρακάτω Σχήμα 2.25 συγκαταλέγονται ο σχηματισμός αρχικά μιας δέσμης ηλεκτρονίων από την πηγή η οποία επιταχύνεται προς το δείγμα μέσω ενός θετικού ηλεκτρικού δυναμικού, η χρήση μεταλλικών ανοιγμάτων, ηλεκτρομαγνητικών φακών και πηνίων σάρωσης, ούτως ώστε να επιτευχθεί μια λεπτή εστιασμένη μονοχρωματική δέσμη η οποία σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος και η καταγραφή των αλληλεπιδράσεων δέσμης-δείγματος από τους ανιχνευτές με την επακόλουθη μετατροπή τους σε εικόνα [106] [107] [111] [108].

Επιπλέον, κατά την χρήση του οργάνου η στήλη ενδείκνυται να λειτουργεί υπό κενό έτσι ώστε να μπορεί να παραχθεί και διατηρηθεί σταθερή η ακτίνα των ηλεκτρονίων χωρίς αυτά να συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται. Το κενό της τάξης των 2×10^{-3} Pa επιτυγχάνεται με την χρήση δύο αντλιών.

Επίσης, οι πληροφορίες που λαμβάνονται για το εκάστοτε υπό εξέταση δείγμα αποδίδονται στους διάφορους ανιχνευτές που συναντώνται σε ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης οι οποίοι δέχονται τα σήματα που παράγονται από την αλληλεπίδραση της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα, αλλά και το σύστημα μεγέθυνσης, παρουσίασης και καταγραφής των δεδομένων. Στους εν λόγω ανιχνευτές συγκαταλέγονται οι ανιχνευτές δευτερογενών ηλεκτρονίων, ο ανιχνευτής ευρέως πεδίου (Large Field Detector, LFD), ο ανιχνευτής σε ατμοσφαιρική πίεση (Gaseous Electron Detector GED), οι ανιχνευτές για τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, καθώς και ο ανιχνευτής μέσω του οποίου ανιχνεύεται η ενεργειακή διασπορά ακτινών – X [107] [108].



Σχήμα 2.25. Διάγραμμα λειτουργίας ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Αξίζει ακόμα να σημειωθεί πως η λήψη εικόνων από ένα συμβατικό SEM προϋποθέτει πέρα από την σταθεροποίηση τους σε ένα ειδικό υποδοχέα, την έστω και επιφανειακή ηλεκτρική αγωγιμότητα των δειγμάτων. Ως εκ τούτου τα μεταλλικά αντικείμενα απαιτούν ελάχιστη ειδική προετοιμασία πριν την μικροσκοπική τους ανάλυση ενώ σε άλλες περιπτώσεις, όπως π.χ. τα βιολογικά δείγματα, πραγματοποιείται μια επικάλυψη των προς ανάλυση δειγμάτων με μια πολύ λεπτή επίστρωση κάποιου ηλεκτρικά αγώγιμου υλικού το οποίο συνήθως εναποτίθεται στο δείγμα μέσω ψεκασμού σε συνθήκες υψηλού κενού. Τέτοια ηλεκτρικά αγώγιμα υλικά αποτελούν ο χρυσός, το κράμα χρυσού/παλλάδιου, το ιρίδιο, η πλατίνα, το βολφράμιο, το όσμιο, το χρώμιο και ο γραφίτης [112] [113] [114].

Παραπέρα, τα βιολογικά δείγματα όπως τα βακτήρια αλλά και άλλοι οργανισμοί, κύτταρα ή ιστοί, απαιτούν χημική σταθεροποίηση ούτως ώστε να επιτευχθεί η διατήρηση και σταθεροποίηση της δομής τους. Η διαδικασία της χημικής τους σταθεροποίησης περιλαμβάνει την τοποθέτηση του δείγματος σε διάλυμα χημικού σταθεροποιητή όπως για

παράδειγμα η γλουταραλδεΐδη, αλλά και την επακόλουθη αφυδάτωση του μέσα από την σταδιακή τοποθέτηση του σε διαλύματα οργανικού διαλύτη (π.χ. αιθανόλη) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις έτσι ώστε να αντικατασταθεί το νερό που περιέχεται στο εκάστοτε δείγμα [112] [113] [114].

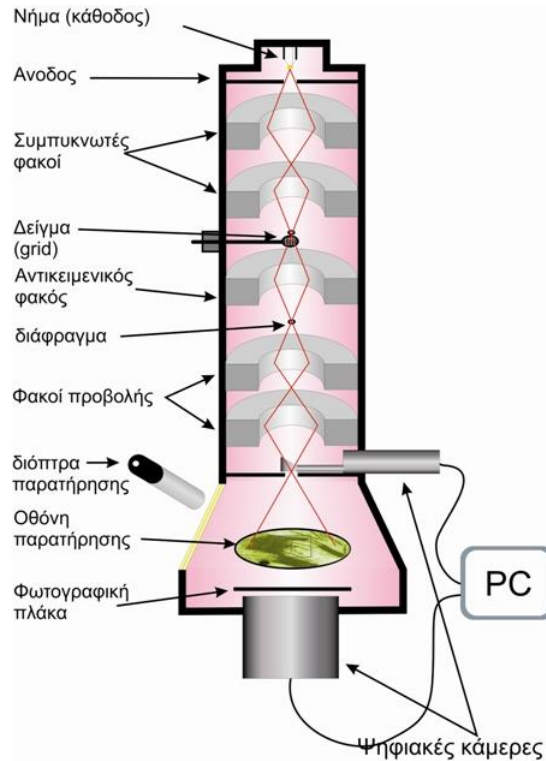
Συμπερασματικά μια ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την μορφολογία και τη σύσταση της επιφανείας του εκάστοτε υπό εξέταση δείγματος. Επιπλέον, μια ημι-ποσοτική στοιχειακή ανάλυση του υλικού του δείγματος γίνεται εφικτή ανιχνεύοντας την διασπορά των ενεργειών των ακτινών X που δημιουργούνται στην επιφάνεια του. Έτσι το SEM καθίσταται ένα απαραίτητο εργαλείο – όργανο έρευνας με μεγάλη δυνατότητα εστίασης και αλλαγής μεγέθυνσης σε ένα ευρύ πεδίο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εξέταση τόσο της μικροδομής στερεών δειγμάτων όσο και για την ανάκτηση εικόνων υψηλού βαθμού διείσδυσης [115] [111] [105].

2.3.7. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)

Η συνεχής εξέλιξη του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης το έχει καταστήσει ως το μοναδικό επιστημονικό όργανο το οποίο μπορεί να προσφέρει ένα τόσο ευρύ φάσμα τεχνικών χαρακτηρισμού σε πολύ υψηλή ανάλυση για ποικίλου τύπου δείγματα. Καθώς μάλιστα η νανοτεχνολογία αλλά και άλλοι σχετικοί κλάδοι αναπτύσσονται ραγδαία, καθίσταται επιτακτική η χρήση της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης για τον πλήρη και ικανοποιητικό χαρακτηρισμό υλικών και συσκευών σε νανοκλίμακα [116].

Η πηγή ηλεκτρονίων στο TEM αποτελείται συνήθως από ένα νήμα βολφραμίου το οποίο εκπέμπει ηλεκτρόνια μέσω πυρακτώσεως. Ανάμεσα στο εν λόγω νήμα, που αποτελεί την κάθοδο, και την άνοδο εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού (60-100 kV) ούτως ώστε να επιτευχθεί η επιτάχυνση των ηλεκτρονίων [108]. Για την ρύθμιση της πορείας τους χρησιμοποιούνται ηλεκτρομαγνητικοί φακοί, όπως αναπαρίστανται σχηματικά στο παρακάτω Σχήμα 2.26, στους οποίους μεταβάλλοντας την ένταση του μαγνητικού τους πεδίου δύναται η εστίαση της παραγόμενης δέσμης ηλεκτρονίων στο δείγμα. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του συμπυκνωτή φακού (condenser lens), ενώ με τον

αντικειμενικό φακό (objective lens) επιτυγχάνεται η εστίαση της εικόνας στην οθόνη και με τον φακό προβολής (intermediate, projector lens) ρυθμίζεται η επιθυμητή μεγέθυνση. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως το πάχος του δείγματος δεν ξεπερνά συνήθως τα 100 nm ούτως ώστε να διαπερνάται από την ηλεκτρονιακή δέσμη. Κατά συνέπεια μερικά ηλεκτρόνια σκεδάζονται ελαστικά και τα περισσότερα δεν σκεδάζονται καθόλου [111] [108].



Σχήμα 2.26. Σχηματική αναπαράσταση του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης [9].

Η τελική εικόνα λαμβάνεται σε μια οθόνη επικαλυμμένη με φωσφορίζουσα ουσία η οποία διεγείρεται από τα προσπίπτοντα σε αυτήν ηλεκτρόνια αφού διαπεράσουν το δείγμα, με τα πιο χοντρά σημεία του δείγματος που δεν διαπερνώνται από την δέσμη ηλεκτρονίων να προκύπτουν ως σκοτεινές περιοχές (ηλεκτρονιόφιλες, ηλεκτρονικά πυκνές, electron dense). Στις περιοχές αυτές τα ηλεκτρόνια σκεδάζονται ισχυρότερα. Κάτι τέτοιο παρατηρείται σε δείγματα όπως οι καταλύτες που περιέχουν μέταλλα όπως ο άργυρος (Ag) ή ο χρυσός (Au). Αντιθέτως τα διαπερατά σημεία (ηλεκτρονικά διαφανή, electron lucent) προσδίδουν φωτεινές περιοχές. Αυτή επίσης η διαφοροποίηση μεταξύ σκοτεινών και

φωτεινών περιοχών καθίσταται εφικτή μέσω εκλεκτικής "χρώσης" του δείγματος [116] [108].

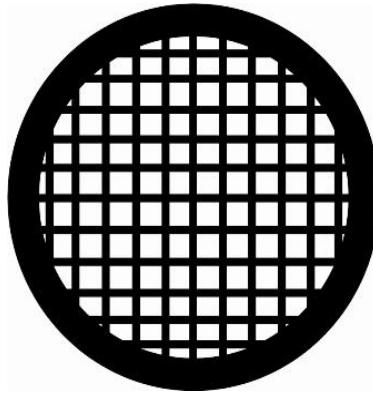
Οι εικόνες που παρατηρούνται στην οθόνη του μικροσκοπίου κατά την εκάστοτε εξέταση ενός δείγματος δύναται να απεικονιστούν με ειδικές ενσωματωμένες φωτογραφικές μηχανές. Τα πιο σύγχρονα μάλιστα μικροσκόπια διαθέτουν ενσωματωμένη ψηφιακή φωτογραφική μηχανή μαζί με μικροϋπολογιστή με αποτέλεσμα την απευθείας ψηφιοποίηση και αποθήκευση οποιασδήποτε εικόνας [116].

Ακόμα, με στόχο τη διασφάλιση της απρόσκοπτης κίνησης των ηλεκτρονίων, ολόκληρο το σύστημα που απαρτίζει ένα Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης βρίσκεται σε υψηλό κενό της τάξης των 10^{-4} Torr τουλάχιστον, συμπεριλαμβανομένων της πηγής ηλεκτρονίων, των ηλεκτρομαγνητικών φακών, του δείγματος της οθόνης και του συστήματος φωτογράφισης.

Λόγω του τρόπου λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου προκύπτουν διάφοροι περιορισμοί ως προς τη φύση των δειγμάτων των οποίων καθίσταται εφικτή η παρατήρηση και ανάλυση τους. Η επιτυχής παρατήρηση ενός δείγματος με το κλασικό ΗΜΔ και με τις κλασσικές μικροσκοπικές μεθόδους απαιτείται η αντοχή του σε υψηλό κενό, η επίδειξη σταθερότητας στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων, η τήρηση του πάχους του δείγματος στα επιτρεπτά όρια και η επιτρεπόμενη διαφορική σκέδαση των ηλεκτρονίων [111].

Οι ιδιότητες αυτές που πρέπει να χαρακτηρίζουν οποιοδήποτε υπό εξέταση δείγμα φαντάζουν απαγορευτικές σχετικά με την απευθείας εξέταση ενός βιολογικού δείγματος (π.χ. βακτήρια) χωρίς προηγουμένως να υποστεί απαραίτητη προκατεργασία. Η επεξεργασία ενός τέτοιου δείγματος πριν την μικροσκοπική του παρατήρηση περιλαμβάνει αρχικά την μονιμοποίηση (fixation) του που αποσκοπεί στην ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των διαδικασιών του κυττάρου είτε με χημικούς είτε με φυσικούς τρόπους. Ακολουθεί η αφυδάτωση που πραγματεύεται την αντικατάσταση του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκοόλη ή ακετόνη και στη συνέχεια με τον ενδιάμεσο διαλύτη 1,2-εποξυπροπάνιο (προπυλενοξείδιο) που αποτελεί διαλύτη των εποξικών ρητινών που χρησιμοποιούνται στην εμπότιση - έγκλειση μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η κοπή ενός βιολογικού παρασκευάσματος σε λεπτές τομές. Κάτι τέτοιο

προϋποθέτει την αντικατάσταση του μέσου αφυδάτωσης με το μέσο έγκλεισης το οποίο όντας υγρό, στερεοποιείται με πολυμερισμό κατά την έκθεση του σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 70°C) ή υπεριώδη ακτινοβολία. Στα μέσα έγκλεισης συγκαταλέγονται εποξικές ή άλλες ρητίνες. Έπειτα πραγματοποιείται η κοπή του εκάστοτε δείγματος σε πολύ λεπτές τομές, πάχους 50-100 nm, προτού τοποθετηθεί σε ειδικά πλέγματα από χαλκό, νικέλιο, χρυσό ή άνθρακα (Σχήμα 2.27), που τοποθετούνται στο ΗΜΔ. Τέλος πραγματοποιείται χρώση των βιολογικών δειγμάτων έτσι ώστε να καταστεί εφικτή η σκέδαση των επιταχυνόμενων ηλεκτρονίων και να επιτευχθεί η απαραίτητη αντίθεση (contrast). Έτσι ελαττώνεται κάπως η ολοκληρωτική διαπερατότητα των βιολογικών δειγμάτων από τα ηλεκτρόνια που οφείλεται στα πολύ ελαφριά στοιχεία που απαρτίζουν ένα τέτοιο δείγμα (C, H, O και N) [111] [9].



Σχήμα 2.27. Σχηματική απεικόνιση πλέγματος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (ΗΜΔ) με διάμετρο 3mm [9].

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα η αρχική μελέτη του βακτηρίου *E. coli* μετά από "καταλυτική" επεξεργασία που διεξήχθη για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιείται αρνητική χρώση του δείγματος λόγω του ότι δεν δίδεται ιδιαίτερη σημασία στην εσωτερική δομή του δείγματος. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για βακτήρια, ιούς, πρωτεϊνικά μόρια, νουκλεϊκά οξέα κ.τ.λ. Με την εν λόγω μέθοδο δεν απαιτείται η μονιμοποίηση του δείγματος, παρά μόνο η τοποθέτηση και διασπορά του πάνω στα πλέγματα που είναι καλυμμένα με μια πολύ λεπτή μεμβράνη, από πλαστικό ή άνθρακα. Ακολούθως πραγματοποιείται χρώση του δείγματος με ένα διάλυμα που περιέχει ένα βαρύ μέταλλο, όπως για παράδειγμα το

φωσφοβολφραμικό οξύ (PTA), το μολυβδαινικό αμμώνιο, το οξικό ουρανύλιο, η βολφραμική μεθυλαμίνη, το μυρμηκικό ουρανύλιο ή συνδυασμούς τους. Το πλεονέκτημα της εναλλακτικής αυτής μεθόδου έγκειται στην απλή και γρήγορη επεξεργασία που απαιτεί το δείγμα κάτι που επιτρέπει την ταχεία διάγνωση ιώσεων φυτών και ζώων [116] [108].

2.3.8. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Αρχικά αναφέρεται πως ως γονιδιακή έκφραση ορίζεται η διαδικασία μέσω της οποίας η γενετική πληροφορία που εμπεριέχεται σε ένα γονίδιο χρησιμοποιείται για την σύνθεση ενός λειτουργικού γονιδιακού προϊόντος όπως οι πρωτεΐνες ως επί το πλείστον [117]. Αποσκοπώντας λοιπόν στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, διερευνώνται συνήθως αλλαγές στην έκφραση (αύξηση ή μείωση) του εκάστοτε υπό μελέτη γονιδίου μέσα από την μέτρηση της αφθονίας του αντίγραφου του εν λόγω γονιδίου. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι μελέτες γονιδιακής έκφρασης μπορούν επίσης να περιλαμβάνουν την εξέταση των μονοπατιών έκφρασης ή καταστολής για συγκεκριμένα γονίδια [118] [119] [120].

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR), επίσης γνωστή και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR) αλλά και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) χαρακτηρίζεται ως μια από τις πιο ισχυρές και ευαίσθητες διαθέσιμες τεχνικές για γονιδιακές αναλύσεις. Ως εκ τούτου αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη μέθοδο στον κλάδο της μοριακής βιολογίας, η οποία χαρακτηρίζεται από αναρίθμητες εφαρμογές τόσο σε ερευνητικό όσο και σε διαγνωστικό επίπεδο [121]. Η ανακάλυψη της έγινε το 1983 από τον βιοχημικό Karry Mullis ο οποίος τιμήθηκε αργότερα με το βραβείο Νόμπελ [119].

Η PCR αποτελεί μια ενζυμική μέθοδο μέσω της οποίας επιτυγχάνεται η ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, κάτι το οποίο θεωρείται απαραίτητο για μετέπειτα τεχνικές επεξεργασίας, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά. [122] [123].

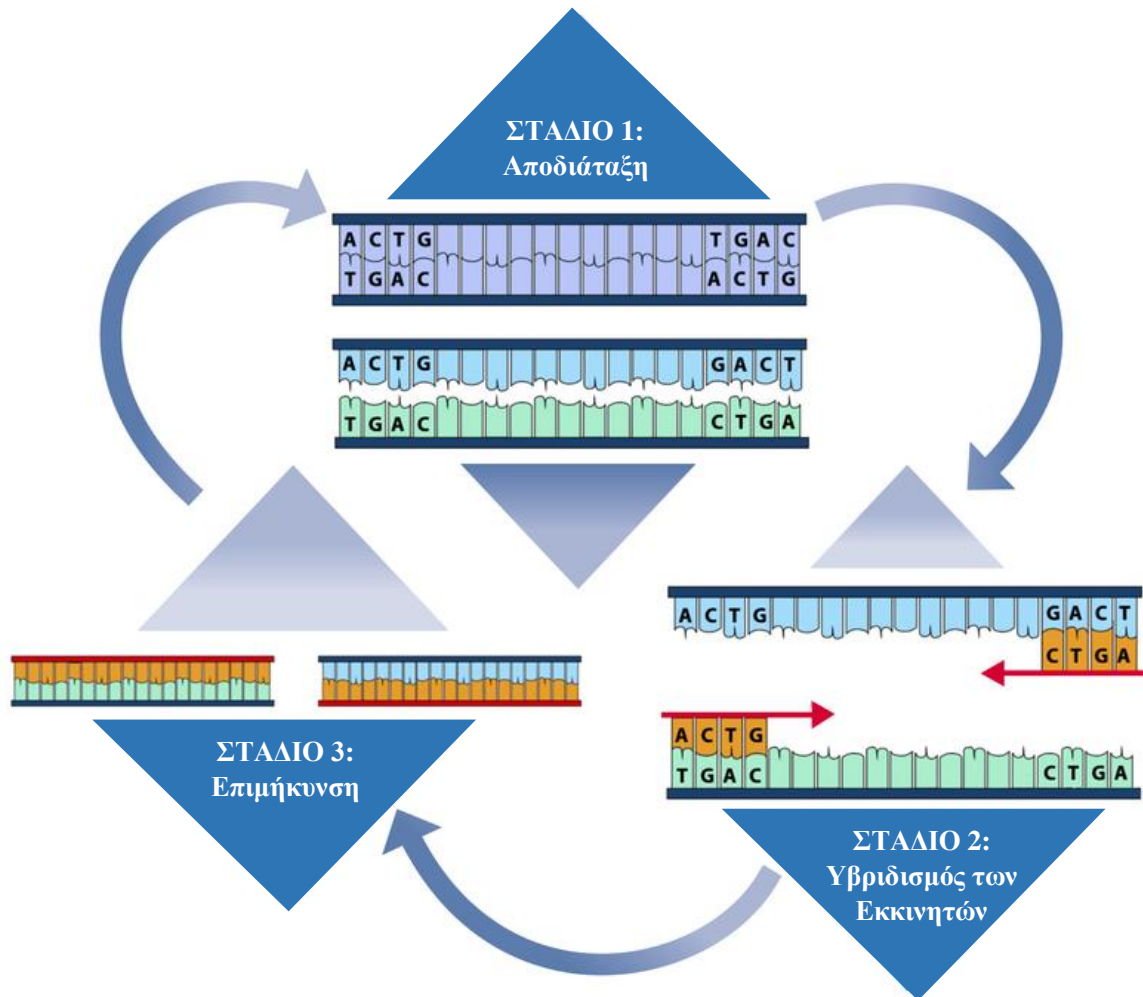
Η συγκεκριμένη αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε 3 διαδοχικά επαναλαμβανόμενα στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αποδιάταξη - διαχωρισμό των δύο αλυσίδων

του DNA με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95 °C για περίπου 30 δεύτερα έως 1 λεπτό. Ακολουθεί ο υβριδισμός των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA μέσω μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65 °C για περίπου 30 δεύτερα έως 1 λεπτό. Το τρίτο στάδιο ονομάζεται "επιμήκυνση" και πραγματεύεται τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 72 °C, τη βέλτιστη δηλαδή θερμοκρασία δράσης του ενζύμου της Taq πολυμεράσης. Ως εκ τούτου η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxy nucleotide triphosphates, dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο [124] [119].

Τα προαναφερθέντα στάδια τα οποία παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.28 επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές, με την όλη αντίδραση PCR να εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), μια προγραμματιζόμενη συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα ικανή να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Κάπως έτσι ρυθμίζεται η επιθυμητή θερμοκρασία και η διάρκεια κάθε σταδίου.

Βασικά συστατικά για την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR αποτελούν η DNA πολυμεράση, οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές, το γενετικό υλικό ή αλλιώς η αλληλουχία στόχος, το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και ιόντα Mg^{2+} όπως επίσης και νουκλεοτίδια (dNTPs) που αποτελούν τα δομικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας [122].

Η DNA πολυμεράση αποτελεί ένα ένζυμο που απαντάται σε όλους τους οργανισμούς (ευκαρυωτικούς, προκαρυωτικούς και ιούς) και συμμετέχει στην αντιγραφή του DNA. Δύναται να αντιγράψει ένα υπάρχον μόριο DNA το οποίο και χρησιμοποιεί ως εκμαγείο, ωστόσο δεν μπορεί να συνθέσει ένα νέο μόριο DNA. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην αντίδραση PCR έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq), ενδιαίτημα του οποίου αποτελούν οι θερμές πηγές. Η εν λόγω Taq πολυμεράση διαθέτει τη βασική ιδιότητα να παραμένει δραστική σε υψηλές θερμοκρασίες με τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της να είναι οι 72 °C, ενώ επίσης δεν καταστρέφεται από τη θέρμανση σε υψηλότερες θερμοκρασίες όπως οι 95 °C για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα [122].



Σχήμα 2.28. Τα στάδια της αντίδρασης PCR [123].

Μέσω λοιπόν της Taq πολυμεράσης συντίθεται μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA χρησιμοποιώντας ένα μονόκλωνο μόριο ως αρχικό εκμαγείο και έναν εκκινητή ως σημείο εκκίνησης. Η κατεύθυνση της σύνθεσης της νέας αλυσίδας είναι 5'-3'. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως με την πάροδο των κύκλων της PCR αυξάνεται ο αριθμός των λανθασμένων βάσεων που εισάγονται στη νεοσυντιθέμενη αλυσίδα του DNA καθώς η λειτουργικότητα και η πιστότητα της αντιγραφής φθίνουν σταδιακά [119].

Με τον όρο εκκινητές (Primers) καλούνται τα ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που επίκειται να πολλαπλασιαστεί. Ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα της PCR και αποτελούνται συνήθως από 18-30 βάσεις. Μικρότεροι εκκινητές οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές

διαθέτουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αυξάνοντας παράλληλα την πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών οι οποίες μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού. Επιπλέον ενδείκνυται η απόλυτη συμπληρωματικότητα των εκκινητών προς την αλληλουχία στόχο, σε αντίθεση με την ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα που πρέπει να παρουσιάζουν μεταξύ τους [124] [125] [126].

Η θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature - T_m), αποτελεί τη θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της. Ειδικότερα, υψηλό ποσοστό σε βάσεις G και C οδηγεί σε αύξηση της T_m , καθώς οι βάσεις G και C ενώνονται με τις συμπληρωματικές τους στο δίκλωνο DNA με τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τις βάσεις A και T που ενώνονται με δύο δεσμούς υδρογόνου. Σε μια αντίδραση PCR η T_m των εκκινητών κυμαίνεται τυπικά από 58-68 °C, με την διαφορά της T_m για τους δύο εκκινητές να μην διαφέρει σημαντικά (<3-5 °C) [122].

Ως αρχικό υλικό το οποίο αποτελεί την αλληλουχία στόχο μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA ή RNA του οποίου έχει προηγουμένως προκύψει η μεταγραφή στην πιο σταθερή μορφή του, το συμπληρωματικό DNA (Complementary DNA, cDNA). Πολύ μικρές ποσότητες DNA (της τάξης των 25-100 ng ανά αντίδραση τελικού όγκου 50 μ l) θεωρούνται επαρκείς για τις περισσότερες αντιδράσεις PCR. Η υψηλή καθαρότητα, κάτι που μεταφράζεται ως αποφυγή της ύπαρξης υπολειμμάτων αιθανόλης ή αλάτων, αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για την διατήρηση της απόδοσης της PCR σε υψηλό επίπεδο [127] [119].

Μέσω του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης επιτυγχάνεται η διατήρηση του pH και η συγκέντρωση αλάτων στις βέλτιστες συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης. Το εν λόγω διάλυμα περιέχει επίσης ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}), η βέλτιστη συγκέντρωση των οποίων για κάθε αντίδραση PCR ευθύνεται για την αποδοτική δράση του ενζύμου της DNA πολυμεράσης.

Σχετικά με την κινητική της αντίδρασης PCR, η αύξηση των προϊόντων είναι εκθετική, λόγω του ότι κάθε παραγόμενο μόριο DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για τον επόμενο κύκλο. Εν τούτοις, η PCR χωρίζεται πρακτικά στις τρεις πιο κάτω φάσεις:

α) *Εκθετική φάση*: αρχίζει ο πολλαπλασιασμός της αλληλουχίας στόχου με όλα τα αντιδραστήρια να βρίσκονται σε επάρκεια και την αντίδραση να είναι πολύ αποτελεσματική. Σε κάθε κύκλο διπλασιάζονται τα μόρια της αλληλουχίας στόχου.

β) *Γραμμική φάση*: μειώνεται η παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου εξαιτίας της μείωσης της ποσότητας των αντιδραστηρίων.

γ) *Φάση πλατώ*: τερματίζεται η σύνθεση νέων μορίων DNA εξαιτίας της εξάντλησης ενός ή περισσότερων αντιδραστηρίων [122].

Παραπέρα, η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR) πραγματοποιείται με την αντίστροφη μεταγραφή που ορίζεται ως η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση). Η ανακάλυψη μάλιστα του εν λόγω ενζύμου οδήγησε στη διαμόρφωση του κεντρικού δόγματος της βιολογίας στη σημερινή του μορφή, επισύροντας παράλληλα σημαντική ώθηση στη μοριακή βιολογία και την έρευνα λόγω της μετατροπής των ευαίσθητων μορίων RNA σε σταθερά, συμπληρωματικά μόρια DNA, τα οποία δύναται να υπόκεινται σε χειρισμούς και μελέτης όπως τα υπόλοιπα μόρια DNA. Έτσι η συνένωση της αντίστροφης μεταγραφής με την κλασική ή την ποσοτική PCR, αναβάθμισε τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, ενώνοντας την αντίστροφη μεταγραφή με την κλασική ή την ποσοτική PCR [122] [119].

Σημειώνεται πως απαραίτητα αντιδραστήρια για την διεκπεραίωση της αντίδρασης σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA αποτελούν η αντίστροφη μεταγραφάση, το αρχικό υλικό RNA, τα dNTPs και οι κατάλληλοι εκκινητές. Για τη σύνθεση cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία είδη εκκινητών: 1) οι Oligo-dT εκκινητές, 2) μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών και 3) ειδικοί εκκινητές για το γονίδιο στόχο. Οι Oligo-dT εκκινητές αποτελούν ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που χρησιμοποιούνται όπως και τα άλλα δύο είδη για την σύνθεση ακέραιων μορίων mRNA, χωρίς όμως να συνίστανται σε περιπτώσεις μεγάλων μορίων mRNA [128] [129].

Η σύνθεση cDNA συντελείται συνήθως στους 45-55 °C, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ένζυμο, για χρονικό διάστημα από 15 λεπτά έως 1 ώρα. Μετά το πέρας της αντίδρασης

σχηματίζεται ένα δίκλωνο υβριδικό μόριο που περιέχει μια αλυσίδα DNA και μια αλυσίδα RNA, με την τελευταία να καταστρέφεται μαζί με την αντίστροφη μεταγραφάση με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (85 °C). Έτσι το νεοσύστατο cDNA είναι συμπληρωματικό του αρχικού RNA και μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί ως αρχικό υλικό στην κλασική αντίδραση PCR [119].

Επιπλέον, η ποσοτική PCR αφού έτυχε ραγδαίας εξέλιξης από την ανακάλυψη της το 1993, αποτελεί σήμερα μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA και cDNA. Πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που ανιχνεύουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από την εκάστοτε χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα χρωστική ουσία (π.χ. SYBR Green), καθώς αυτή ενσωματώνεται στα προϊόντα της PCR.

Η βασική διαφορά ανάμεσα στην ποσοτική και την κλασική PCR έγκειται στη φάση της αντίδρασης στην οποία συλλέγονται τα δεδομένα και εξάγονται τα αποτελέσματα. Στην ποσοτική PCR η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιείται όταν η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης σε αντίθεση με την κλασική PCR κατά την οποία απαιτείται πρώτα να ολοκληρωθούν όλοι οι κύκλοι της αντίδρασης φτάνοντας στη φάση κορεσμού (πλατώ) [128] [119].

Τη σημαντικότερη παράμετρο για την επιτυχή ποσοτικοποίηση οποιουδήποτε δείγματος αποτελεί η τιμή C_p (Crossing point), που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline) και φτάνει σε συγκεκριμένη τιμή - όριο καταγραφής. Ο αυτοματοποιημένος υπολογισμός του εν λόγω ορίου εξαρτάται από την διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου. Αξίζει τέλος να σημειωθεί πως η παραγωγή του προϊόντος της αντίδρασης PCR παρουσιάζει γραμμική συσχέτιση με τον παραγόμενο φθορισμό [130] [129] [122].

2.4. Μέθοδος Λυοφιλοποίησης Βακτηρίων

Η λυοφιλοποίηση αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη και ενδεικνυόμενη μέθοδο που χρησιμοποιείται με σκοπό την επιτυχή διατήρηση ενός στελέχους κάποιου μικροοργανισμού μέσω αφυδάτωσης του σε συνθήκες κατάψυξης. Μπορεί επίσης να

ανταγωνιστεί με επιτυχία τις παραδοσιακές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή φύλαξη και διατήρηση καλλιεργείων διαφόρων μικροοργανισμών. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αποδειχτεί πολύ χρήσιμη αφού ενισχύει την χρήση μικροοργανισμών για σκοπούς ελέγχου των συστατικών διάφορων θρεπτικών υποστρωμάτων, για επιστημονικές έρευνες και εκπαιδευτικά προγράμματα αλλά και για βιομηχανικές εφαρμογές. Σύμφωνα με τους Obara et.al., σε μία μέθοδο λυοφιλοποίησης που ανέπτυξαν, χρησιμοποιούνται: α) ένα θρεπτικό υλικό εναιώρησης που περιέχει ζελατίνη η οποία δρα ως φορέας για τον μικροοργανισμό, β) αποβουτυρωμένο γάλα, ασκορβικό οξύ και δεξτρόζη ούτως ώστε να διασφαλιστεί η ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών κατά την διάρκεια τόσο της ψύξης όσο και της φύλαξης τους και γ) ενεργός άνθρακας για την προσρόφηση οποιονδήποτε τοξικών ουσιών που μπορεί να σχηματιστούν κατά την διαδικασία της λυοφιλοποίησης [197] [198].

2.5. Η Μέθοδος Εμβολιασμού Θρεπτικών Υποστρωμάτων

Στον κλάδο της Μικροβιολογίας, ο όρος εμβόλιο καθορίζεται ως μια μικρή ποσότητα μικροβιακών κυττάρων ή σπορίων ενός μικροοργανισμού, αλλά και ως μια μικρή ποσότητα ενός είδους ή μίγματος μικροοργανισμών που βρίσκονται σε εναιώρημα. Ως εκ τούτου, κύτταρα μικροοργανισμού από υγρή καλλιέργεια αλλά και κύτταρα μικροοργανισμού που αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, μπορούν εξίσου να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο. Τόσο στην πρώτη όσο και στην δεύτερη περίπτωση τα κύτταρα δύναται είτε να μεταφερθούν αμέσως σε στερεό ή υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, είτε να διατηρηθούν για σύντομο χρονικό διάστημα σε φυσιολογικό ορό ή διάλυμα Ringer και να μεταφερθούν στη συνέχεια ως εναιώρημα. Κάτι τέτοιο μπορεί να πραγματοποιηθεί όταν για διάφορους λόγους χρειάζεται να υπολογιστεί το μέγεθος του εμβολίου.

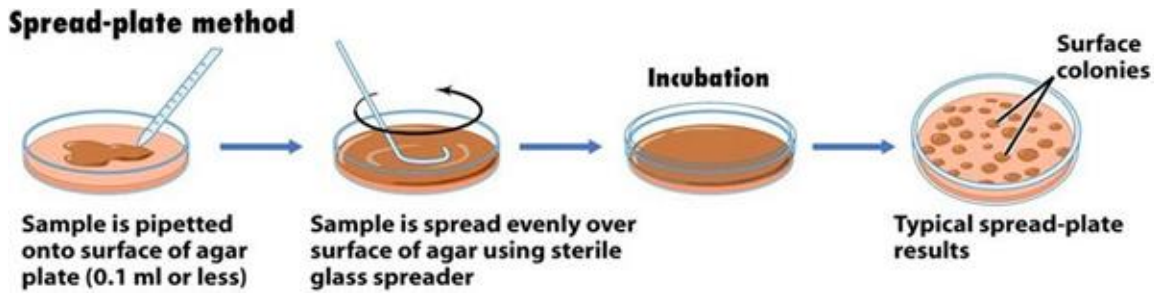
Κατ' επέκταση ως εμβολιασμός αναφέρεται η μεταφορά του εμβολίου σε υγρό ή στερεό αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα. Η όλη διαδικασία απαιτεί την εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών ούτως ώστε να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο ο κίνδυνος επιμόλυνσης του εμβολίου με ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς. Επιπλέον, κατά τον εμβολιασμό αναμένεται ότι οι υπάρχοντες μικροοργανισμοί που εμπεριέχονται στο εμβόλιο θα αυξηθούν και θα πολλαπλασιαστούν δίνοντας νέες αποικίες σε στερεά υποστρώματα και δημιουργώντας μια ομοιόμορφη καλλιέργεια σε υγρά θρεπτικά

υποστρώματα. Επιπλέον, πολύ χρήσιμα εργαλεία που χρησιμοποιούνται ευρέως για την επιτυχή μεταφορά και διοχέτευση του εμβολίου στο εκάστοτε υπόστρωμα αποτελούν το σιφώνιο, η ηλεκτρονική πιπέτα, ο κρίκος εμβολιασμού, η ανατομική βελόνα, η ανατομική λαβίδα και ο βαμβακοφόρος στυλεός [199].

Όπως είναι γνωστό, στο φυσικό τους περιβάλλον οι μικροοργανισμοί απαντώνται και αναπτύσσονται σαν πληθυσμιακές ομάδες πολλών διαφορετικών ειδών και όχι σαν μεμονωμένα κύτταρα. Το γεγονός αυτό δυσχεραίνει την ανάλυση ενός συγκεκριμένου είδους κάτι που προϋποθέτει διαχωρισμό του από τυχόν άλλα είδη μικροοργανισμών. Για να θεωρηθεί λοιπόν επιτυχής οποιαδήποτε μικροβιολογική μελέτη, πρέπει απαραίτητα να απομονωθεί ο υπό εξέταση μικροοργανισμός, με τη δημιουργία καθαρής καλλιέργειας. Ως καθαρή ορίζεται η καλλιέργεια η οποία έχει προκύψει από μία βιώσιμη αναπαραγωγική μονάδα (cfu) ενός είδους μικροοργανισμού.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι, οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε συνδυασμό, με τις οποίες μπορεί να καταστεί εφικτή η δημιουργία καθαρής καλλιέργειας μικροοργανισμού. Οι πλέον συνηθέστερες από αυτές τις μεθόδους συμπεριλαμβάνουν την χρήση των κατάλληλων θρεπτικών υποστρωμάτων, τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, τη μέθοδο της αραιώσης του εμβολίου με θρεπτικό υπόστρωμα σε τρυβλίο, τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και τη διασπορά των μικροβιακών κυττάρων στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υποστρώματος (Σχήμα 2.29) [199].

Για την επιτυχή διεκπεραίωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής (Δ.Δ.), πραγματοποιείτο ασηπτική μεταφορά εναιωρήματος με το υπό ανάλυση βακτηριακό είδος σε εκλεκτικά στερεά θρεπτικά υποστρώματα με την βοήθεια ηλεκτρονικής πιπέτας ακριβείας. Ακολούθως, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο διανομέα, γινόταν η διασπορά του εμβολίου στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχανόταν η ανάπτυξη μόνο του εξεταζόμενου μικροοργανισμού αποφεύγοντας συνάμα τυχόν επιμολύνσεις, πράγμα εξαιρετικά δύσκολο αφού η όλη διαδικασία γινόταν κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Επίσης, μπορούσαν μετά από μια περίοδο επώασης να καταμετρηθούν οι μικροβιακές αποικίες.



Σχήμα 2.29. Αναπαράσταση διασποράς εμβολίου σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα [199].

Ο ενδεδειγμένος αριθμός μικροβιακών αποικιών είναι συνήθως 30-300 αποικίες για τρυβλία με διάμετρο 9 cm. Για τον σκοπό αυτό ενδεχομένως να απαιτείται αραιώση του αρχικού δείγματος χρησιμοποιώντας την μέθοδο των αρχικών αραιώσεων, με την καταλληλότερη να είναι η αραιώση 10^{-4} ανεξαρτήτως συγκέντρωσης του αρχικού δείγματος [199].

2.6. Μέθοδος Διήθησης μέσω Ηθμομεμβράνης υπό Κενό – MF method

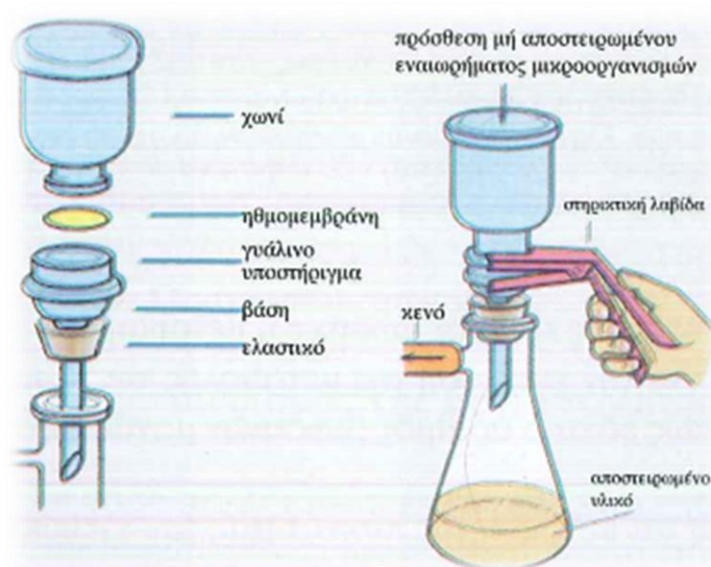
Είναι γνωστό πως, υπάρχουν πολλοί και επικίνδυνοι ρύποι που εμπεριέχονται στο νερό, οι οποίοι μπορούν να ανιχνευθούν μόνο μετά από εξειδικευμένες αναλύσεις [132]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα βαρέα μέταλλα και οι παθογόνοι μικροοργανισμοί. Ορισμένα μάλιστα βακτήρια χρίζουν ιδιαίτερης προσοχής αφού αποτελούν σοβαρή απειλή για την ανθρώπινη υγεία. Αξίζει να σημειωθεί πως έχουν επιλεγεί ορισμένοι μικροοργανισμοί δείκτες, η παρουσία των οποίων υποδηλώνει και την παρουσία ανεπιθύμητων και δύσκολα ανιχνεύσιμων παθογόνων βακτηρίων. Οι συγκεκριμένοι δείκτες είναι ακίνδυνοι και μπορούν εύκολα να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν [203].

Η μέθοδος της διήθησης μέσω ηθμομεμβράνης υπό κενό ή αλλιώς τεχνική MF (membrane filters), αποτελεί την πιο διαδεδομένη και πλέον αποτελεσματική μέθοδο μικροβιακής ανάλυσης νερού [204]. Με την βοήθεια της μεθόδου αυτής επιτυγχάνεται η ποσοτική εκτίμηση του βακτηριακού πληθυσμού, αφού δεν ευνοείται η διέλευση των βακτηριακών κυττάρων διαμέσου των πολύ μικρών πόρων των ηθμομεμβράνων που χρησιμοποιούνται [203]. Η εν λόγω μέθοδος στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε κατά την

προκατεργασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση τους με διάφορες τεχνικές όπως για παράδειγμα οι φασματοφωτομετρικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει την απομάκρυνση των οποιονδήποτε μικροοργανισμών (και στερεών μικρο-σωματιδίων) από το εκάστοτε διάλυμα που επίκειται να αναλυθεί, για αποφυγή επιμόλυνσης των οργάνων που θα χρησιμοποιηθούν.

Αναλυτικά, τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την διεκπεραίωση της απαιτούμενης προκατεργασίας των δειγμάτων για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής με την χρήση της τεχνικής MF ήταν τα ακόλουθα:

1. Συναρμολόγηση των γυάλινων ή μεταλλικών δοχείων που συναποτελούν την συσκευή χρησιμοποιώντας τα απαραίτητα εργαλεία και υλικά (Σχήμα 2.30).
2. Προσεχτική αφαίρεση της ηθμομεμβράνης (διάμετρος πόρων 0.45 μm), από το φακελάκι συσκευασίας στο οποίο βρίσκεται, με την χρήση λαβίδας.
3. Τοποθέτηση της ηθμομεμβράνης στο σημείο υποδοχής.
4. Προσθήκη ελάχιστης ποσότητας δείγματος νερού μέχρι να επικολληθεί η ηθμομεμβράνη στο σημείο υποδοχής και να αποφευχθεί έτσι η διαφυγή νερού από το πλάι χωρίς να έχει διηθηθεί.
5. Ενεργοποίηση της αντλίας κενού η οποία διευκολύνει την διέλευση του νερού διαμέσου της ηθμομεμβράνης.
6. Σταδιακή και αργή προσθήκη της απαιτούμενης ποσότητας δείγματος νερού, το οποίο διαπερνά μέσω της ηθμομεμβράνης και εισέρχεται στη φιάλη, με τους μικροοργανισμούς να παραμένουν στην επιφάνεια.
7. Αναμονή για μερικά δευτερόλεπτα και αφαίρεση της ηθμομεμβράνης.



Σχήμα 2.30. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου MF όπως χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα Διατριβή [203].

2.7. Επιλογή Θρεπτικών Υποστρωμάτων

Κάθε μικροοργανισμός προσλαμβάνει τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται για κάλυψη των αναγκών του από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Ως εκ τούτου, το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την εργαστηριακή ανάπτυξη των εκάστοτε επιθυμητών μικροοργανισμών, πρέπει να περιέχει την σωστή σύσταση των υλικών που απαιτούνται, ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, το σημαντικότερο συστατικό του νεπού βάρους του κυττάρου είναι το νερό με ποσοστό που κυμαίνεται από 70% – 90%, ενώ το 95% του ξηρού βάρους του κυττάρου καταλαμβάνουν τα χημικά στοιχεία C, O, N, H, P, S, K, Ca, Mg, Fe και Cl. Αξίζει να αναφερθεί πως τα πρώτα έξι χημικά στοιχεία, τα οποία χαρακτηρίζονται ως εξαιρετικά κρίσιμα για την επιβίωση και ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αποτελούν δομικά συστατικά για διάφορα ζωτικά οργανικά μακρομόρια όπως οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα. Η διαθεσιμότητα τους μάλιστα για κάθε μικροβιακό κύτταρο, έγκειται στην ενζυμική διάσπαση άλλων πιο σύνθετων χημικών ουσιών, είτε φυτικής είτε ζωικής προέλευσης [199].

Αναμφισβήτητα, όλη η μέχρι σήμερα μελέτη και πρόοδος που έχει επιτευχθεί όσον αφορά τον τομέα της μικροβιολογίας και κατ' επέκταση όλες οι υπάρχουσες μικροβιολογικές γνώσεις και παρατηρήσεις, οφείλονται σε μεγάλο βαθμό στην *in vitro* ανάπτυξη και διατήρηση των μικροοργανισμών. Κάτι τέτοιο γίνεται εφικτό μέσα από την χρησιμοποίηση των κατάλληλων θρεπτικών υποστρωμάτων, η επιλογή ή η παρασκευή των οποίων μπορεί να υποβοηθηθεί από την μελέτη και κατανόηση του φυσικού περιβάλλοντος των εκάστοτε μικροοργανισμών. Έτσι, μικροβιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα χαρακτηρίζεται κάθε υγρό ή στερεό μέσο το οποίο είναι ικανό να υποστηρίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και να καλύψει τις θρεπτικές τους απαιτήσεις. Κάθε θρεπτικό μέσο το οποίο αποσκοπεί στην ανάπτυξη μικροοργανισμών στο εργαστήριο, καλείται υπόστρωμα καλλιέργειας και πρέπει να περιέχει νερό, πηγή άνθρακα και ενέργειας, πηγή αλάτων τόσο ανόργανων όσο και οργανικών, πηγή αζώτου και διάφορα άλλα ιχνοστοιχεία.

Επιπρόσθετα, τα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να διαχωριστούν σε υγρά, αλλά και στερεά τα οποία προκύπτουν με την προσθήκη του πολυσακχαρίτη άγαρ σε υγρά υποστρώματα. Ο πολυσακχαρίτης αυτός ευθύνεται για την στερεοποίηση των θρεπτικών υποστρωμάτων σε θερμοκρασίες κάτω από 50 °C. Πιο συγκεκριμένα, η υγρή μορφή στην οποία αναπτύσσονται μια ποικιλία μικροοργανισμών σε μεγάλες συγκεντρώσεις, ονομάζεται θρεπτικός ζωμός. Ωστόσο, όταν ο ζωμός αυτός περιέχει περισσότερα του ενός είδους μικροοργανισμών, καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη η ταυτοποίησή τους με γυμνό μάτι. Με την προσθήκη όμως ενός πηκτικού παράγοντα όπως το άγαρ, ο ζωμός μετατρέπεται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο βοηθά στην εύκολη ανάπτυξη μικροοργανισμών όπως τα βακτήρια και οι μύκητες. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί αναπτύσσονται ως μεμονωμένες αποικίες, αναδεικνύοντας την ποικιλομορφία του υπό εξέταση δείγματος και καθιστώντας ευκολότερο τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση διαφορετικού είδους μικροοργανισμών [199].

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως το άγαρ, το οποίο αποτελεί ένα πολυμερές της γαλακτόζης που εκχυλίζεται από τα κυτταρικά τοιχώματα θαλάσσιων ερυθροφυκών, δεν μπορεί να αποικοδομηθεί από τους μικροοργανισμούς και έτσι δεν επηρεάζει την ανάπτυξη τους και δεν έχει καμία θρεπτική αξία. Σημαντικό είναι και το γεγονός πως ένα στερεό θρεπτικό

υπόστρωμα που περιέχει άγαρ, μπορεί να επανυγροποιηθεί σε θερμοκρασίες 80 – 100 °C. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό πως το άγαρ συνεισφέρει σημαντικά στην παρασκευή διαφόρων τύπων στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων και στην δημιουργία καθαρής καλλιέργειας μικροοργανισμού.

Επίσης, με την αποστείρωση κάθε θρεπτικού υποστρώματος μετά την παρασκευή του, γίνεται εφικτή η θανάτωση όλων των μικροοργανισμών και η καταστροφή των σπορίων τους. Μάλιστα, για την δημιουργία μεγάλων επιφανειών με τις οποίες παρέχεται ιδανική έκταση στους μικροοργανισμούς για ανάπτυξη, τα θρεπτικά υποστρώματα τοποθετούνται σε τρυβλία Petri όπου και αφήνονται να στερεοποιηθούν.

Ένας άλλος διαχωρισμός θρεπτικών υποστρωμάτων βασίζεται στην χημική τους σύσταση και περιλαμβάνει χημικώς ορισμένα και σύνθετα (ή εμπειρικά) υποστρώματα. Ως χημικώς ορισμένα χαρακτηρίζονται τα υποστρώματα τα οποία είτε παρασκευάζονται εργαστηριακά είτε παρασκευάζονται βιομηχανικά, η χημική τους σύσταση είναι πλήρως καθορισμένη τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά. Από την άλλη, σύνθετα ή εμπειρικά ονομάζονται τα υποστρώματα των οποίων η χημική σύσταση δεν είναι γνωστή, αφού περιέχουν συστατικά μη καθορισμένης χημικής σύστασης. Τέτοιου είδους υποστρώματα περιέχουν μια ποικιλία ενώσεων ούτως ώστε να διευκολύνεται όσο το δυνατόν περισσότερο η ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών (μη εκλεκτικά).

Ακόμα, τα θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να διαχωριστούν σε γενικού τύπου, εκλεκτικά και διαγνωστικά, ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών ή ακόμα και του μικροοργανισμού που μπορεί να αναπτυχθεί. Συγκεκριμένα, τα υποστρώματα γενικού τύπου επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού μικροβιακών ειδών. Προκειμένου λοιπόν να καλύψουν τις απαιτήσεις πολλών και διαφορετικών μικροοργανισμών, περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία θρεπτικών συστατικών.

Αντιθέτως, τα εκλεκτικά υποστρώματα δεν επιτρέπουν παραμόνο την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Χρίζει στο σημείο αυτό ιδιαίτερης αναφοράς το γεγονός πως οποιοδήποτε υπόστρωμα γενικού τύπου μπορεί να μετατραπεί σε εκλεκτικό εφόσον κατά την παρασκευή του προστεθεί κάποια χημική ουσία που ευνοεί μόνο την ανάπτυξη του επιθυμητού είδους μικροοργανισμού ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξη όλων

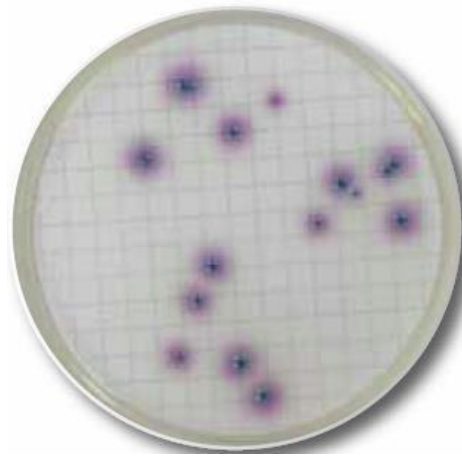
των υπολοίπων. Κάτι τέτοιο μπορεί επίσης να επιτευχθεί με αλλαγή είτε του pH είτε των πηγών άνθρακα ή αζώτου. Επιπρόσθετα, σε περίπτωση που απαιτείται η απομόνωση και κατ' επέκταση η ανάπτυξη κάποιου είδους μικροοργανισμού ο οποίος βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο φυσικό του περιβάλλον, ιδιαίτερα βοηθητική είναι η χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων εμπλουτισμού. Λόγω του ότι τα υποστρώματα αυτά ευνοούν την ανάπτυξη συγκεκριμένου είδους προσομοιάζοντας τις βέλτιστες γι' αυτό φυσικοχημικές συνθήκες, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εκλεκτικά. Στην περίπτωση αυτή δεν χρησιμοποιούνται ανασταλτικοί παράγοντες που αποτρέπουν την ανάπτυξη άλλων ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Αντισταθμιστικά, για την τελική επικράτηση και ολοκληρωτική ανάπτυξη του προς μελέτη μικροοργανισμού, πραγματοποιούνται ανακαλλιέργειες χρησιμοποιώντας υποστρώματα εμπλουτισμού. Επιπλέον, ως διαγνωστικά ονομάζονται τα υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό ομάδων ή ακόμα και ειδών μικροοργανισμών και για μια προκαταρκτική, στοιχειώδη ταυτοποίηση μικροοργανισμών, με βάση τα φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά. Σημειώνεται ότι τα πιο πολλά διαγνωστικά υποστρώματα είναι ταυτόχρονα και εκλεκτικά, κάτι που μεταφράζεται ως παρεμπόδιση της ανάπτυξης μιας συγκεκριμένης ομάδας μικροοργανισμών και διαχωρισμό των ειδών ή των στελεχών μιας άλλης, βάσει των φυσιολογικών τους χαρακτηριστικών [199].

Άλλο ένα διαχωρισμό αποτελούν τα βακτηριολογικά και τα μυκητολογικά θρεπτικά υποστρώματα, η οποία γίνεται ανάλογα με την ικανότητα του κάθε υποστρώματος να ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων, αντίστοιχα. Με στόχο να επιτευχθεί η ανάπτυξη του επιθυμητού μικροοργανισμού, τόσο τα βακτηριολογικά όσο και τα μυκητολογικά υποστρώματα πρέπει να αντιπροσωπεύουν το φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης του μικροοργανισμού αυτού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το ιδανικό pH ανάπτυξης που κυμαίνεται από 3.8 – 5.6 για τους μύκητες και από 6.5 – 7.5 για τα βακτήρια.

Επίσης, υπάρχουν και άλλες κατηγορίες υποστρωμάτων, όπως τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για μικροβιολογικές δοκιμές και τα θρεπτικά υποστρώματα για προσδιορισμό και ταυτοποίηση διάφορων μικροοργανισμών. Τα πρώτα, σε συνδυασμό με την χρήση συγκεκριμένων μικροοργανισμών δεικτών, προσδιορίζουν είτε την αναστολή

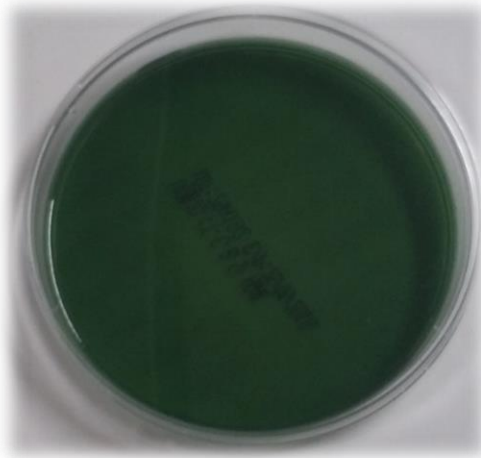
είτε την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών από την περιεχόμενη στο υπόστρωμα χημική ουσία. Όσον αφορά τον προσδιορισμό και ταυτοποίηση μικροοργανισμών, υπάρχουν εκατοντάδες εμπορικά υποστρώματα τα οποία μέσω εξειδικευμένων τεχνικών, επιτυγχάνουν τον άμεσο προσδιορισμό του υπό ανάλυση είδους. Παράδειγμα τέτοιων υποστρώματα αποτελούν τα γνωστά "API TEST", τα οποία βασίζονται στη χρωματική αλλαγή του υποστρώματος [199].

Για τους σκοπούς της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για την καλύτερη δυνατή διασφάλιση της ανάπτυξης αποκλειστικά των υπό μελέτη μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, για την ανάπτυξη και ταυτοποίηση της *E. Coli*, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα CHROMagar E.C.C., στο οποίο οι μικροβιακές αποικίες του συγκεκριμένου βακτηρίου παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό βιολετί χρώμα (Σχήμα 2.31). Το εν λόγω υπόστρωμα, αποτελείται από 0,4 g/L χρωμογονικό μίγμα, 3 g/L ζύμη και εκχύλισμα πεπτόνης, 5 g/L χλωριούχο νάτριο, 10 g/L άγαρ, 2,2 g/L δισόξινο φωσφορικό νάτριο, 2,7 g/L όξινο διφωσφορικό νάτριο, 1 g/L πυροσταφιλικό νάτριο, 1 g/L τρυπτοφάνη, 1 g/L σορβιτόλη και 0,15 g/L τεργιτόλη. Η τιμή του τελικού pH του υποστρώματος είναι 6,8 με απόκλιση +/- 0,2 ενώ διαθέτει ανοιχτό κίτρινο χρώμα [200].



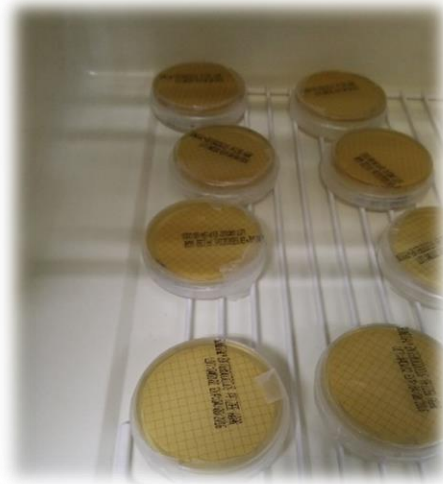
Σχήμα 2.31. Χαρακτηριστική εικόνα θρεπτικού υποστρώματος CHROMagar E.C.C., με αποικίες του βακτηρίου *E. Coli* [200].

Επιπρόσθετα, για την ανάπτυξη και ταυτοποίηση του βακτηρίου *Vibrio parahemolyticus*, χρησιμοποιήθηκε το πολύ εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Vibrio T.C.B.S. Agar, στο οποίο οι μικροβιακές αποικίες του συγκεκριμένου βακτηρίου παρουσιάζουν ένα πράσινο χρωματισμό (Σχήμα 2.32). Το υπόστρωμα αυτό περιέχει αναστολείς για τα θετικά κατά Gram όπως και για άλλα ανεπιθύμητα βακτήρια. Αποτελείται από 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 10 g/L πεπτόνης, 10 g/L κιτρικό νάτριο, 10 g/L θειοθειικό νάτριο, 8 g/L χολή βοδιού, 20 g/L σουρκόζη, 10 g/L χλωριούχο νάτριο, 1 g/L κιτρικό σίδηρο, 15 g/L άγαρ, 0,04 g/L μπλε της θυμόλης και 0,04 g/L μπλε της βρωμοθυμόλης. Η τιμή του τελικού pH του υποστρώματος είναι 8,4 με απόκλιση +/- 0,2 ενώ διαθέτει πράσινο διαυγές χρώμα [201].



Σχήμα 2.32. Χαρακτηριστική εικόνα θρεπτικού υποστρώματος Vibrio T.C.B.S. Agar [201].

Επιπλέον, για την ανάπτυξη και ταυτοποίηση του βακτηρίου *Enterococcus faecalis*, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Enterococcus Pfizer Selective Agar, στο οποίο οι μικροβιακές αποικίες του συγκεκριμένου βακτηρίου παρουσιάζουν ένα χαρακτηριστικό καφέ χρώμα (Σχήμα 2.33). Το συγκεκριμένο υπόστρωμα περιέχει διάφορους αναστολείς για την αποφυγή της ανάπτυξης ανεπιθύμητων βακτηρίων. Αποτελείται από 5,35 g/L εκχύλισμα ζύμης, 3,3 g/L πεπτόνης, 1 g/L ένυδρη εσκουλίνη, 10 g/L εκχύλισμα χολής, 17 g/L τρυπτόνη, 0,5 g/L κιτρική αμμωνία του τρισθενούς σιδήρου, 5 g/L χλωριούχο νάτριο, 0,25 g/L αζίδιο του νατρίου, 1 g/L κιτρικό νάτριο και 14 g/L άγαρ. Η τιμή του τελικού pH του υποστρώματος είναι 7,1 με απόκλιση +/- 0,2 ενώ διαθέτει πρασινωπό διαυγές χρώμα [202].



Σχήμα 2.33. Χαρακτηριστική εικόνα θρεπτικών υποστρωμάτων Enterococcus Pfizer Selective Agar [202].

2.8. Μέθοδοι Αποστείρωσης

Για την παρούσα αλλά και για οποιαδήποτε μικροβιακή μελέτη, μια εξαιρετικά σημαντική πτυχή αποτελεί η διατήρηση ασηπτικών συνθηκών εργασίας. Έτσι μπορεί να αποφευχθεί η επιμόλυνση με άλλους μικροοργανισμούς δημιουργώντας σφάλματα και προβλήματα στην ανάλυση του υπό μελέτη μικροοργανισμού, αλλά και να προστατευθεί η ανθρώπινη υγεία. Ως εκ τούτου, τόσο ο πάγκος εργασίας όσο και τα διάφορα εργαστηριακά αντικείμενα και σκεύη που χρησιμοποιούνται υφίστανται ειδική επεξεργασία.

Όπως είναι γνωστό, μέσω της αποστείρωσης επιτυγχάνεται θανάτωση των ιών, των μικροβιακών κυττάρων και καταστροφή των σπορίων τους με αποτέλεσμα την απώλεια της αναπαραγωγικής τους ικανότητας. Με τις υπάρχουσες μεθόδους αποστείρωσης (την καθεμία από μόνη της) όμως, δεν είναι εφικτή η καταστροφή όλων των προϊόντων του μικροβιακού κυττάρου. Ανάλογα μάλιστα με την μέθοδο που χρησιμοποιείται, πραγματοποιείται και η ανάλογη θανάτωση των μικροοργανισμών, ενώ η αποτελεσματικότητα της κάθε μεθόδου εξαρτάται από το είδος του μικροβιακού κυττάρου, την συγκέντρωση ή την ένταση του αντιμικροβιακού παράγοντα που χρησιμοποιείται, την οργανική φόρτιση και τις φυσικές συνθήκες του περιβάλλοντος αλλά και από τον αριθμό, το είδος, την φυσική κατάσταση και τον ρυθμό θανάτου των μικροοργανισμών [195]. Οι

υπάρχουσες μέθοδοι αποστείρωσης για την αναχαίτηση των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, διαχωρίζονται σε φυσικές και χημικές.

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη, μη εκλεκτική μέθοδος αποστείρωσης, η οποία αξιοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., αποτελεί η χρήση θερμότητας για αύξηση της θερμοκρασίας πέρα από τα ιδανικά επίπεδα για επιβίωση και ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Πρόκειται για μια οικονομική και ασφαλή μέθοδο με υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας. Η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την αύξηση των μικροοργανισμών και τον ρυθμό ανάπτυξης τους και τελικά να επιφέρει την θανάτωση τους με ρυθμό ανάλογο ως προς την επικρατούσα θερμοκρασία. Οι κύριος μηχανισμός δράσης της θερμότητας έγκειται στην καταστροφή των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης και στην μετουσίωση της δομής διαφόρων πρωτεϊνών αλλά και των δεσοξυριβοζονουκλεϊκών οξέων (DNA – RNA) [195].

Το αυτόκαυστο (Σχήμα 2.34) αποτελεί ένα όργανο το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως τόσο για την ταχεία και αποδοτική αποστείρωση θρεπτικών υποστρωμάτων, υγρών διαλυμάτων, γυάλινων αντικειμένων, πλαστικών και μεταλλικών εργαλείων όσο και για την καταστροφή παλαιών και ανεπιθύμητων μικροβιακών καλλιιεργειών και την αποστείρωση μολυσμένων αντικειμένων προτού απορριφθούν, αφού τοποθετηθούν σε ειδικά θερμοανθεκτικά σακούλια. Στο αυτόκαυστο για την όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη αποστείρωση, επιτυγχάνονται θερμοκρασίες υψηλότερες από 100 °C μέσω ατμού κάτω υπό πίεση. Ως εκ τούτου, ο ατμός με πίεση 1 bar (121°C) είναι ικανός να θανατώσει όλους τους μικροοργανισμούς εντός 15 λεπτών, παρά το ότι η συνολική διαδικασία μπορεί να διαρκέσει για αρκετά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα λόγω της προγραμματιζόμενης αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν διάφορα προγράμματα τα οποία μπορούν να επιλεγθούν ανάλογα με το σκοπό που χρησιμοποιείται το αυτόκαυστο. Τέτοια προγράμματα αποτελούν η αποστείρωση, το λιώσιμο ή η αποστείρωση και ακολούθως η διατήρηση υψηλής θερμοκρασίας που χρησιμοποιείται συνήθως για θρεπτικά υποστρώματα και η αποστείρωση εργαλείων, αντικειμένων και σκευών.



Σχήμα 2.34. Εικόνα τυπικού αυτόκαυστου [271].

Ακόμα, τις κυριότερες παραμέτρους που καθορίζουν την αποδοτικότητα της αποστείρωσης στο αυτόκαυστο αποτελούν: η πίεση, ο χρόνος, η θερμοκρασία, η υγρασία και ο εγκλωβισμένος αέρας στο θάλαμο του αυτόκαυστου αλλά και η ποσότητα των προς αποστείρωση υλικών.

Επίσης, η μη ιονίζουσα ακτινοβολία αποτελεί ακόμα μια διαδεδομένη μέθοδο αποστείρωσης. Παράδειγμα τέτοιου είδους ακτινοβολίας αποτελεί η υπεριώδης ακτινοβολία η οποία προωθεί την δημιουργία δεσμών μεταξύ των γειτονικών αζωτούχων βάσεων της θυμίνης στις αλυσίδες του DNA. Οι μεταλλάξεις αυτές ευθύνονται για την καταστροφή και την παρεμπόδιση της αντιγραφής του DNA των κυττάρων αφού τα διμερή της θυμίνης δεν επιτρέπουν την ομαλή αντιγραφή. Το δραστικότερο μήκος κύματος που μπορεί να προκαλέσει θανάτωση ενός κυττάρου λόγω άμεσης απορρόφησης της ακτινοβολίας από το DNA, είναι τα 260 nm. Επιπλέον, η υπεριώδης ακτινοβολία χρησιμοποιείται για αποστείρωση υγρών διαλυμάτων και αποβλήτων, πόσιμο νερό, θαλάμων εμβολιασμού σε μικροβιολογικά εργαστήρια αλλά και του αέρα κυρίως σε νοσοκομεία. Σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός πως για θανάτωση των μικροοργανισμών απαιτείται η απευθείας έκθεση τους στην εκπεμπόμενη ακτινοβολία. Όπως μάλιστα και σε άλλες μεθόδους αποστείρωσης, τα μη σπορογόνα βακτήρια αντιστέκονται λιγότερο στην ακτινοβολία σε σύγκριση με τα σπόρια των διαφόρων βακτηρίων που αντιστέκονται πολύ περισσότερο, αλλά και τους μύκητες που παρουσιάζουν ενδιάμεση αντίσταση. Έτσι, η θανατογόνος δόση ακτινοβολίας για επιτυχή

αποστείρωση κυμαίνεται από 1000-6000 $\mu\text{wn/sec/cm}^2$ ενώ εξαρτάται από τον τύπο της ακτινοβολίας, τον χρόνο έκθεσης των μικροοργανισμών σε αυτή, το είδος, τον αριθμό και το στάδιο του κύκλου ζωής των μικροβιακών κυττάρων.

Επιπλέον, μια άλλη περιστασιακή μέθοδο αποστείρωσης αποτελεί η διήθηση. Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει την διέλευση υπό κενό, είτε υγρών είτε αερίων δειγμάτων, διαμέσου ηθμού. Ο ηθμός αυτός μπορεί να είναι δίσκος από άσβεστο, πλαστικές μεμβράνες κ.α., και διαθέτει κατάλληλου μεγέθους πόρους (0,22–2 μm) ούτως ώστε να κατακρατούνται οι υπάρχοντες μικροοργανισμοί. Συγκεκριμένα, σε περιπτώσεις κυρίως υγρών και θερμοευαίσθητων διαλυμάτων που απαιτείται να αποστειρωθούν, ενδείκνυται η χρήση υγρής διήθησης. Επιπρόσθετα, μέσω διήθησης καθίσταται εφικτή ακόμα και αποστείρωση του αέρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο θάλαμος νηματικής ροής που περιλαμβάνει ειδικές ηθμομεμβράνες οι οποίες βοηθούν στην επίτευξη αποστείρωσης του αέρα εντός του συγκεκριμένου οργάνου μέσω κατακράτησης των σωματιδίων διαμέτρου 0,3 μm σε ποσοστό 99,97 %. Ο καθαρός αέρας που εξέρχεται είτε κάθετα είτε οριζόντια από το συγκεκριμένο όργανο, δημιουργεί ένα στρώμα προστασίας των συνθηκών εντός αυτού. Το γεγονός αυτό εκμηδενίζει τις πιθανότητες επιμόλυνσης μικροβιακών καλλιεργειών ενώ παράλληλα διασφαλίζεται η υγεία του εκάστοτε ερευνητή. Επίσης σε τέτοιου είδους θαλάμους η αποστείρωση ενισχύεται με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Ένας τέτοιος θάλαμος χρησιμοποιήθηκε και στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. (Σχήμα 2.35).



Σχήμα 2.35. Εικόνα θαλάμου νηματικής ροής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία [195].

Αναμφίβολα, ακόμα μια πολύ αποτελεσματική μέθοδος αποστείρωσης αποτελεί η χρήση χημικών αντιμικροβιακών παραγόντων οι οποίοι επιλέγονται με βάση τους μικροοργανισμούς που επίκειται να θανατωθούν. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών αποτελούν οι φαινολικές ενώσεις, τα αλογόνα, οι αλκόολες, τα βαρέα μέταλλα, τα απορρυπαντικά, τα παράγωγα οργανικών οξέων, οι αλδεύδες, διάφορα αέρια χημειοαποστειρωτικά και πολλοί οξειδωτικοί παράγοντες όπως το όζον (O₃). Μάλιστα, οι χημικοί αυτοί παράγοντες διαχωρίζονται σε συγκεκριμένες κατηγορίες ανάλογα με την δράση τους, το είδος του μικροοργανισμού που αναστέλλουν και τον τρόπο χρήσης τους. Ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος για την επιλογή της αποδοτικότερης χημικής ουσίας είναι η κατανόηση του μηχανισμού δράσης και κατ' επέκταση του κυτταρικού στόχου της ουσίας αυτής.

Συγκεκριμένα, η αποστείρωση γίνεται με πτητικές ουσίες οι οποίες μπορούν να αποβούν τοξικές για τους μικροοργανισμούς όπως για παράδειγμα το αιθυλενοξειδίο ή άλλες ετεροκυκλικές ενώσεις, η φορμαλδεΰδη και οι οζόνες. Επίσης για το σκοπό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθούν διάφορες αλκοόλες όπως η αιθανόλη και η ισοπροπανόλη με συγκεντρώσεις από 70% μέχρι 90% στις οποίες καταστρέφεται η κυτταρική δομή και αποδιατάσσονται οι πρωτεΐνες των περισσότερων βακτηρίων και μυκήτων αλλά και ορισμένων ιών. Αξίζει να σημειωθεί πως τα υδατικά διαλύματα αιθανόλης αποδεικνύονται αποτελεσματικότερα αφού η αποδιάταξη των πρωτεϊνών απαιτεί νερό. Ωστόσο, οι συγκεκριμένες χημικές ουσίες αδυνατούν να καταστρέψουν βακτηριακά ενδοσπόρια [195] [196].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε αρχικά στην διακρίβωση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων στηριζόμενων στερεών αργύρου με διάφορες φορτίσεις μετάλλου (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β.) σε υδατικά διαλύματα που περιείχαν συγκεκριμένα είδη βακτηρίων. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε AgNO_3 ως πρόδρομη ένωση του Ag και $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ως υπόστρωμα για την διεξαγωγή των πλείστων πειραμάτων. Συγκεκριμένα, για τη διεκπεραίωση των εν λόγω πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε σύνθεση μονομεταλλικών στηριζόμενων στερεών $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, στους οποίους μεταβαλλόταν η φόρτιση του Ag με την βοήθεια της κατάλληλα προσαρμοσμένης μεθόδου του υγρού εμποτισμού (wet impregnation method). Αποσκοπώντας στη διακρίβωση της συνεισφοράς του υποστρώματος στο μηχανισμό βακτηριακής αναστολής παρασκευάστηκε μονομεταλλικό στερεό υλικό χρησιμοποιώντας την ίδια ενεργή φάση (Ag) αλλά οξείδιο του δημητρίου (CeO_2) ως υπόστρωμα. Επιπρόσθετα για την μελέτη της επίδρασης της φύσης της ενεργούς φάσης, παρασκευάστηκαν αντίστοιχα στερεά υλικά χρησιμοποιώντας χαλκό (Cu) για ένα εύρος ποσοστιαίας φόρτισης μετάλλου. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως εξετάστηκε επίσης η ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή χρησιμοποιώντας στερεό υλικό με κράμα Άργυρου – Χαλκού (1% κ.β. $\text{Cu-Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) ως ενεργό φάση.

Χρησιμοποιώντας μια σειρά τεχνικών και προσεκτικά σχεδιασμένων πειραματικών διατάξεων που περιγράφονται πιο κάτω όπως επίσης και μέσα από την ανάλυση της γονιδιακής ρύθμισης συγκεκριμένων στοχευμένων γονιδίων του βακτηρίου *E. coli*, επιχειρήθηκε η αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού στον οποίο στηρίζεται η παρατηρούμενη αντιμικροβιακή δραστηριότητα των συντιθέμενων στηριζόμενων στερεών υλικών αργύρου, αλλά και χαλκού σε υδάτινα διαλύματα που περιείχαν συγκεκριμένα είδη βακτηρίων.

Θα πρέπει να αναφερθεί πως έπειτα από την προκαταρκτική μελέτη (screening) της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των στερεών υλικών που παρασκευάστηκαν με διαφορετικές φορτίσεις Ag, επιλέγηκε το στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ και ακολούθως το στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ για τη διεκπεραίωση όλων των αναγκαίων πειραμάτων που ακολούθησαν. Επίσης, το μονομεταλλικό υλικό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση τεχνοοικονομικής μελέτης σύγκρισης της ετερογενούς

αντιμικροβιακής ψευδο-κατάλυσης με άλλες εμπορικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την αποτελεσματική επεξεργασία του νερού έρματος των πλοίων. Η επεξεργασία θαλασσινού νερού έρματος σε πραγματικές συνθήκες και συγκεκριμένα σε δεξαμενή του πετρελαιοφόρου πλοίου "Alexandria" πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/QSG.

Στη συνέχεια παρατίθεται εκτενής αναφορά στη μέθοδο σύνθεσης των στερεών και στις πειραματικές διατάξεις και τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής

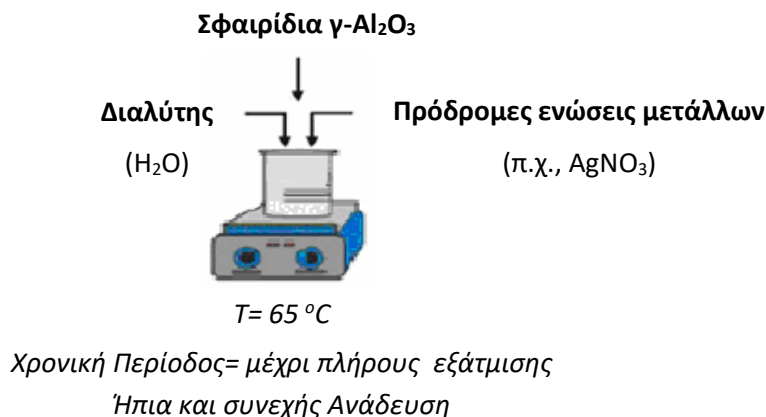
3.1. Σύνθεση Στηριζόμενων Μεταλλικών Στερεών Υλικών

Για την παρασκευή των μονομεταλλικών στερεών x% Ag/ γ -Al₂O₃ χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμος AgNO₃ (Panreac, code 131459), ως πρόδρομη ένωση του μεταλλικού άργυρου (Ag).

Η σύνθεση των στηριζόμενων στερεών Ag σε μεταλλοξείδιο γ -Al₂O₃ πραγματοποιήθηκε αρχικά με εναπόθεση της δραστικής φάσης (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β. Ag) στο υπόστρωμα, η οποία επιτυγχάνεται με την καταλλήλως προσαρμοσμένη μέθοδο του υγρού εμποτισμού, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.1. Συγκεκριμένα, τέσσερα γραμμάρια (4 gr) υποστρώματος (γ -Al₂O₃ - Sasol, code 604130), τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο περιείχε προκαθορισμένη ποσότητα απιονισμένου νερού (18 M Ohm) ούτως ώστε ο τελικός όγκος (μετά την προσθήκη διαλύματος AgNO₃) να είναι 100 mL. Ακολούθως, στο απιονισμένο νερό προστίθενται συγκεκριμένες αναλογίες υδατικού διαλύματος της πρόδρομης ένωσης του μετάλλου (AgNO₃) με σκοπό την επίτευξη της επιθυμητής φόρτισης. Για την επίτευξη φόρτισης 1% κ.β. Ag σε 4 gr στερεού, προστέθηκαν 40 mL αραιωμένου πρότυπου διαλύματος του πρόδρομου άλατος AgNO₃ (0,315 gr σε 200 mL H₂O) σε απιονισμένο νερό ($V_{\text{τελικό}} = 100\text{mL}$).

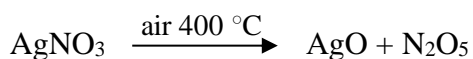
Το εκάστοτε προκύπτον διάλυμα παράμενε σε ήπια ανάδευση και θέρμανση (65 °C) έτσι ώστε ο χρόνος εξάτμισης του να κυμαινόταν από 4-6 h αποσκοπώντας στη σταδιακή μείωση του όγκου του διαλύματος στους πόρους του υποστρώματος, και κατά συνέπεια την αύξηση της συγκέντρωσης της μεταλλικής φάσης - Ag στα εσωτερικά τοιχώματα των πόρων του υποστρώματος. Η ενεργοποίηση της έναρξης της κρυστάλλωσης του μετάλλου

στην εσωτερική επιφάνεια του υποστρώματος προκύπτει αμέσως μετά την υπέρβαση της συγκέντρωσης κορεσμού. Σημειώνεται ότι το pH του εκάστοτε διαλύματος κατά τη διάρκεια της εξάτμισης παρέμενε μεγαλύτερο από το 7 (pH=8), ούτως ώστε τα επιφανειακά άτομα οξυγόνου του $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ να παρέμεναν ελεύθερα, για να δεσμεύουν τα ιόντα Ag^+ από τη διαλυτοποίηση του αντίστοιχου νιτρικού πρόδρομου άλατος $\text{Ag}(\text{NO}_3)$, (η πρόδρομη ένωση $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ δίσταται σε Ag^+ και NO_3^-).



Σχήμα 3.1. Εναπόθεση Ag, Cu ή Ag-Cu σε σφαιρίδια $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού.

Ακολούθως πραγματοποιείται ήπια ξήρανση του υλικού στους $120\text{ }^\circ\text{C}$ στοχεύοντας στη πλήρη εξάτμιση του νερού και στο σχηματισμό κρυσταλλιτών της ανάλογης πρόδρομης ένωσης στην επιφάνεια του υποστρώματος. Κατά τη διάρκεια του υγρού εμποτισμού, ο κυρίαρχος μηχανισμός εναπόθεσης του δραστικού στοιχείου είχε βρεθεί να είναι η μη ελεγχόμενη καθίζηση στο εσωτερικό των πόρων του υποστρώματος [70] [4]. Ακολουθούσε πύρωση του μεταλλικού στηριζόμενου στερεού στους $400\text{ }^\circ\text{C}$ παρουσία αέρα για 2 ώρες που αποτελούσε το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού. Οι υψηλές θερμοκρασίες στις οποίες υπόκειται το στερεό υλικό κατά την πύρωση (παρουσία αέρα) οδηγούν στην οξειδωσή του, επιφέροντας την απομάκρυνση αζωτούχων ενώσεων και το σχηματισμό κρυστάλλων AgO στα τοιχώματα του υποστρώματος.



Παράλληλα, μέσω της οξειδωσης που πραγματοποιείται, γίνεται κατορθωτή η απομάκρυνση ορισμένων στοιχείων που πιθανώς να εισάγονται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του υλικού με το σχηματισμό πτητικών ενώσεων (NO_2 , CO_2 , NH_3), καθώς και ανθρακούχων υπολειμμάτων που πιθανόν να εισήχθησαν στο μονομεταλλικό στερεό κατά την παρασκευή του. Επιπλέον, η διαδικασία της πύρωσης οδηγεί σε σταθεροποίηση της δομής των κρυσταλλιτών του μετάλλου και την αποφυγή συσσωμάτωσης τους κατά την αποθήκευση του στερεού για μελλοντική χρήση.

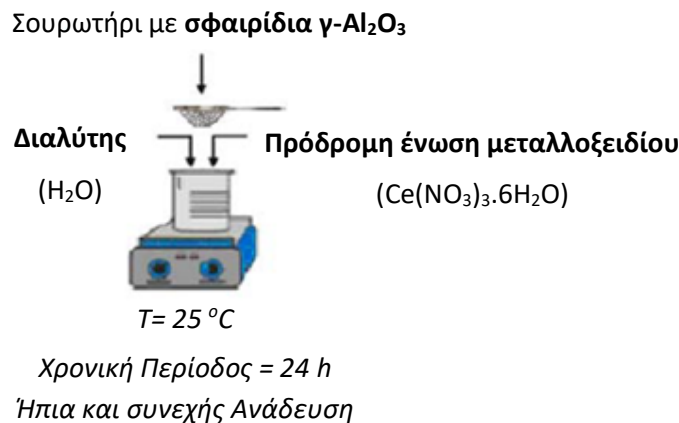
Ακολουθώντας την ίδια μέθοδο, παρασκευάστηκαν και τα στερεά υλικά στα οποία χρησιμοποιήθηκε χαλκός (Cu) ως ενεργός φάση με διαφορετικές φορτίσεις μετάλλου (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β. Cu) σε μεταλλοξείδιο $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (Sasol, code 604130). Ως πρόδρομη ένωση του χαλκού (Cu) χρησιμοποιήθηκε ο Ημι(πενταένυδρος) Νιτρικός Χαλκός (II), $(\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O})$ - Sigma Aldrich). Η πρόδρομη αυτή ένωση δίσταται σε Cu^{2+} και 2NO_3^- προτού τα κατιόντα χαλκού (Cu^{2+}) δεσμευτούν από τα ελεύθερα επιφανειακά άτομα οξυγόνου του $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$.

Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάστηκε επίσης και το διμεταλλικό υλικό $\text{Ag-Cu}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ στο οποίο χρησιμοποιήθηκε χαλκός (Cu) και άργυρος (Ag) ως ενεργός φάση με διαφορετικές φορτίσεις μετάλλων (0.5 και 1% κ.β. Ag-Cu) σε μεταλλοξείδιο $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (Sasol, code 604130), όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.1. Ως πρόδρομη ένωση του άργυρου (Ag) χρησιμοποιήθηκε ο AgNO_3 (Panreac, code 131459) και ως πρόδρομη ένωση του χαλκού χρησιμοποιήθηκε ο $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich).

Για την μελέτη της επίδρασης της χημικής σύστασης του υποστρώματος των μεταλλικών στηριζόμενων στερεών υλικών στην παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή, παρασκευάστηκε μονομεταλλικό υλικό με άργυρο (Ag) φόρτισης 1% κ.β. σε σφαιρίδια $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ τα οποία προηγουμένως, μέσω της κατάλληλης πρόδρομης ένωσης ($\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Sigma Aldrich) επικαλύφθηκαν με οξείδιο του δημητρίου ($\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) προτού εναποτεθεί σε αυτά η δραστική φάση (1% κ.β. Ag) μέσω υγρού εμποτισμού.

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία σύνθεσης μονομεταλλικού στερεού 1% κ.β. Ag σε οξείδιο του δημητρίου ($\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) περιλάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

α) Επίστρωση (επικάλυψη) των σφαιριδίων $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ με οξείδιο του δημητρίου (5% κ.β. CeO_2) μέσω της τεχνικής της εμφάπτισης. Η παρασκευή του μικτού μεταλλοξειδίου πραγματοποιήθηκε με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας (4g) σφαιριδίων $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ σε υδατικό διάλυμα πρόδρομης ένωσης μεταλλοξειδίου συγκέντρωσης 0,12 M (5,1 g $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ σε 100 mL H_2O) προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή σύσταση του μεταλλοξειδίου στο φορέα (5% κ.β. CeO_2), υπό συνεχή ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου για 24h (Σχήμα 3.2). Ακολούθως τα επικαλυμμένα σφαιρίδια ($\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) τοποθετήθηκαν αρχικά για ξήρανση στους 120 °C για 6 ώρες και έπειτα για πύρωση στους 600 °C για 4 ώρες.



Σχήμα 3.2. Εμφάπτιση των σφαιριδίων $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ με οξείδιο του δημητρίου (5% κ.β. CeO_2).

(β) Εναπόθεση της δραστικής φάσης (1% κ.β. Ag) στο υπόστρωμα με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Ακολούθως, το δείγμα αφέθηκε για ξήρανση στους 120 °C για 12 h αλλά και στη συνέχεια πύρωση παρουσία αέρα στους 500 °C για 4 h.

Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο της πύρωσης (οξειδωση του υλικού σε υψηλές θερμοκρασίες) είναι οι ακόλουθες [205]:

- Αποσύνθεση του ιοντικού συμπλόκου της πρόδρομης ένωσης. Απομάκρυνση του αζώτου και σύνδεση του σχηματιζόμενου οξειδίου του μετάλλου (κρυσταλλίτων AgO) με τον φορέα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση της δομής των κρυσταλλιτών και την αποφυγή συσσωμάτωσης.

- Απομάκρυνση ορισμένων στοιχείων που εισάγονται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του στερεού υλικού με το σχηματισμό πτητικών ενώσεων (όπως π.χ., NO₂, CO₂, NH₃, κ.α.).
- Απομάκρυνση ανθρακούχων ακαθαρσιών που πιθανόν να εισήχθησαν στο στερεό κατά την παρασκευή του.
- Περαιτέρω αντιδράσεις εναλλαγής υποκαταστατών ανάμεσα στις επιφανειακές ομάδες (OH, O₂⁻) και ένωση των υποκαταστατών με τα ιόντα του μετάλλου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρότερων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρόδρομης ένωσης και φορέα.

3.2. Αντιμικροβιακά Πειράματα σε Στερεά Υλικά

Η διεξαγωγή των αντιμικροβιακών πειραμάτων σε στερεά υλικά πραγματοποιήθηκε σε ειδικά σχεδιασμένο αντιδραστήρα "*Πλήρους Μίξης Συνεχούς Ανάδευσης*" (Continuous Stirred Tank Reactor, CSTR), ο οποίος διακρίνεται από την ικανότητα μεγιστοποίησης της επιφάνειας επαφής μεταξύ των τριών φάσεων (υγρής, αέριας και στερεής) που αλληλεπιδρούν κατά την διάρκεια των πειραμάτων και την ελαχιστοποίηση των εξωτερικών φαινομένων μεταφοράς μάζας. Ο αντιδραστήρας είναι εξοπλισμένος με καλάθι τύπου Mahoney-Robinson (Auto clave Engineers, U.S.A., και PID Eng & Tech, Spain) στο οποίο τοποθετούνται τα σφαιρίδια των στηριζόμενων στερεών αργύρου. Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων τηρούνταν σχετικά σταθερές συνθήκες, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Σε όλα τα "καταλυτικά" πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, ο αντιδραστήρας παρέμενε αυτόκλειστος καθ' όλη τη διαδικασία, με σταθερή συνήθως τη στερεή φάση, όπου στην προκειμένη περίπτωση ήταν τα σφαιρίδια του στερεού υλικού. Όσον αφορά την αέρια φάση (αέριο μίγμα τροφοδοσίας O₂/He), βρισκόταν υπό συνεχή ροή σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (T = 25°C) και πίεσης (P = 1.3 atm). Εξαιρέση φυσικά αποτελούν τα αντιμικροβιακά πειράματα συνεχούς ροής που περιγράφονται εκτενώς σε μεταγενέστερα υποκεφάλαια.

Η πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τα αντιμικροβιακά πειράματα παρουσιάζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 3.3. Η συσκευή αποτελείται κυρίως από τρία μέρη: τον αντιδραστήρα, το σύστημα ελέγχου ροής των αερίων και την αντλία (τύπου

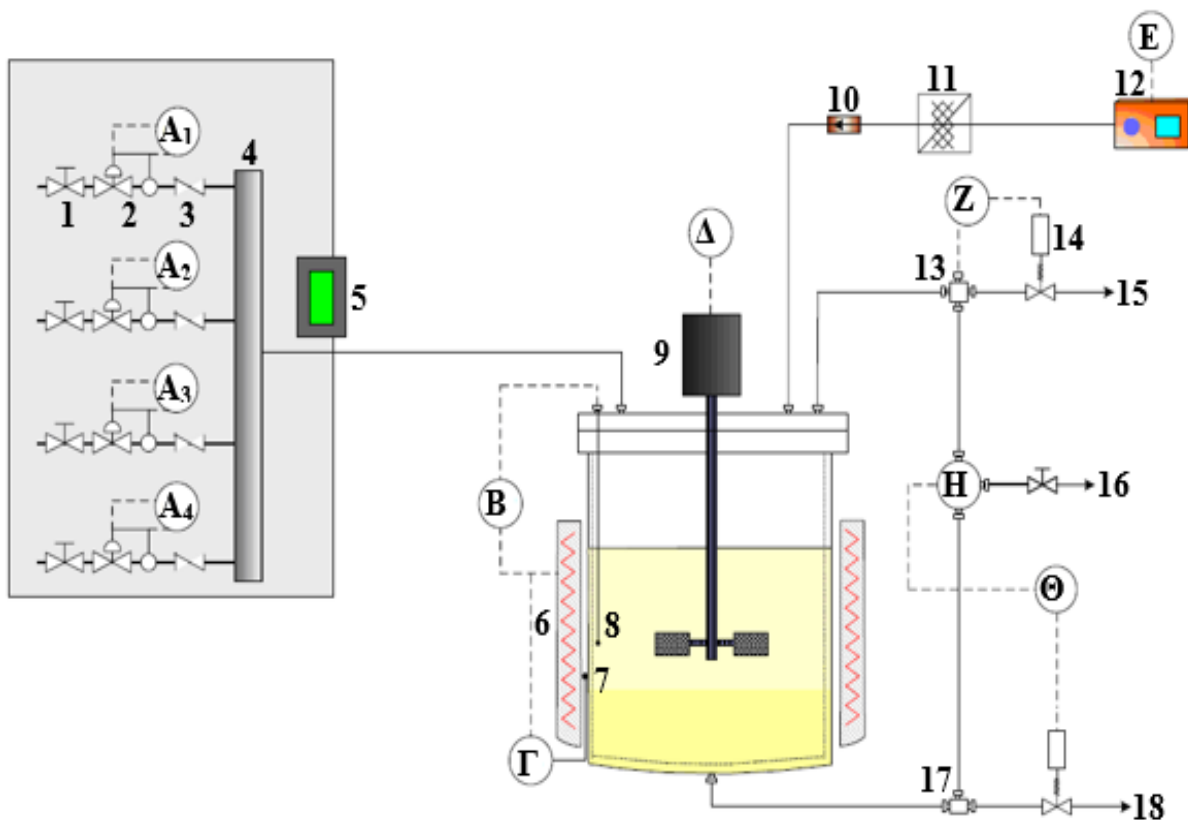
HPLC) τροφοδοσίας διαλύματος μικροοργανισμών. Η μάζα της κλίνης του στερεού που χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση των πλείστον πειραμάτων ήταν 1 g υπό μορφή σφαιριδίων $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ διαμέτρου 1.8 mm, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 4 g για τον ίδιο όγκο διαλύματος. Τα σφαιρίδια τοποθετούνταν σε ειδικά σχεδιασμένο καλάθι τύπου Mahoney-Robinson από μεταλλικό πλέγμα, το οποίο διατηρεί σταθερά τα σφαιρίδια ενώ παράλληλα επιτρέπει τη ροή του υγρού διαμέσου τους. Ο αντιδραστήρας τύπου CSTR, στον οποίο τοποθετείτο το καλάθι, χαρακτηρίζεται από χωρητικότητα υγρού μέχρι 200 mL. Επιπλέον, ο αντιδραστήρας συμπεριλαμβάνει σημεία εισόδου και εξόδου τόσο του διαλύματος, όσο και των αερίων. Οι απαιτούμενες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης σε κάθε στάδιο του αντιμικροβιακού πειράματος, ελέγχονταν με την βοήθεια αντίστοιχων ανιχνευτών (sensors).

Πίνακας 4. Πειραματικές συνθήκες κατά τη διεξαγωγή των αντιμικροβιακών πειραμάτων.

Παράμετρος	Τιμή
pH	7-8
Ανάδευση, rpm	150
Μάζα υλικού, g	1-4
Μερική πίεση, atm	1.3
Όγκος διαλύματος, mL	100-192
Ροή αέρα (O_2/He), mL/min	100
Θερμοκρασία αντίδρασης, °C	25
Αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού, cfu	≈ 300

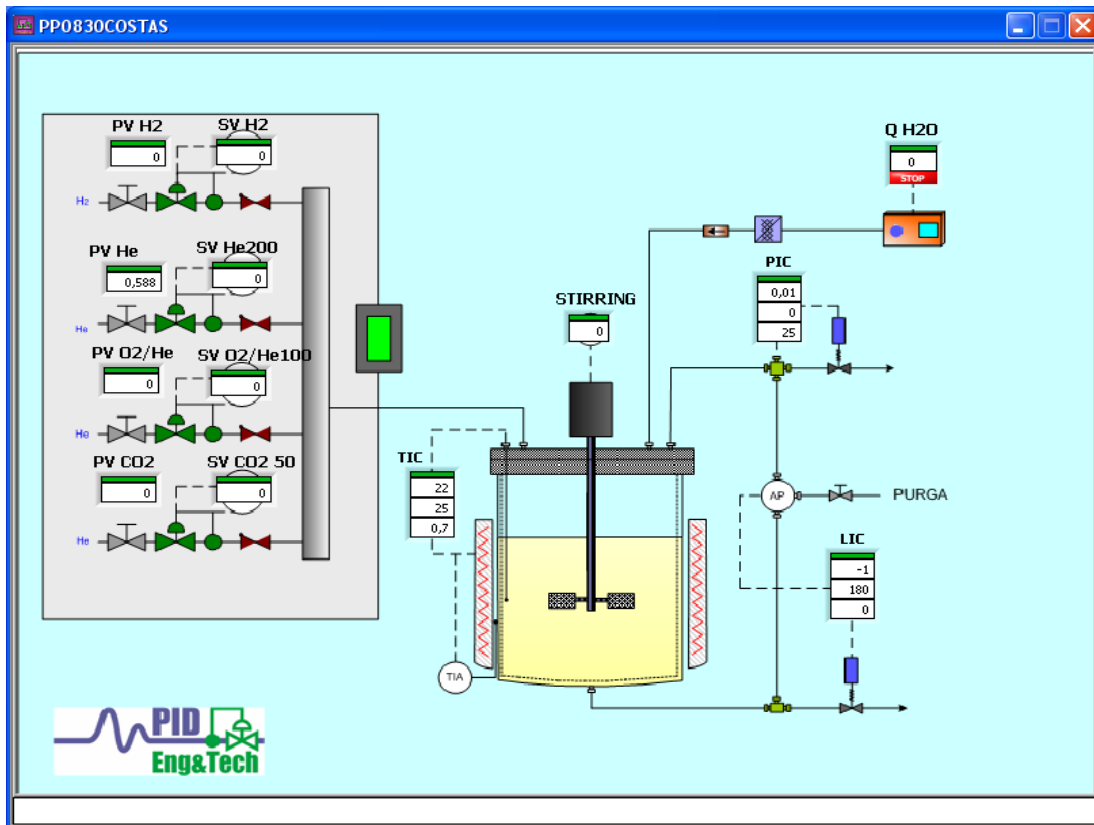
Το σύστημα ελέγχου και μέτρησης της ροής των αερίων, περιλαμβάνει τέσσερις βαλβίδες ελέγχου μαζικής ροής και ενός θαλάμου ανάμειξης (mixing chamber) που χρησιμοποιήθηκε για την in situ προετοιμασία αερίου μίγματος συγκεκριμένης σύστασης συντείνοντας στην καλή ανάμιξη των αερίων και τον σχηματισμό ομοιογενούς αερίου μίγματος. Η σύσταση και συνολική ροή της αέριας τροφοδοσίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20% κ.ο. O_2 /80% κ.ο. He και 100cc/min αντίστοιχα. Η προσθήκη σταθερής ροής (24

mL/min) διαλύματος μικροοργανισμών στην τροφοδοσία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντλίας HPLC (Gilson-max pressure 32 mPa) εξοπλισμένης με μονομετρική βαλβίδα.



Σχήμα 3.3. Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των "καταλυτικών" πειραμάτων. (A₁, A₂, A₃, A₄) Μετρητής ροής αερίων, (B) μετρητής θερμοκρασίας θερμαντικού μανδύα (heating mantle), (Γ) μετρητής θερμοκρασία του διαλύματος εσωτερικά του αντιδραστήρα, (Δ) μετρητής ανάδευσης - στροφές ανά λεπτό, (E) μετρητής πίεσης, (Z) μετρητής ροής υγρού, (H) συσκευή ρύθμισης της διαφορικής πίεσης, (Θ) μετρητής όγκου του διαλύματος, (1) χειροκίνητη βαλβίδα αερίων, (2) σύστημα ελέγχου ροής μάζας (mass flow control), (3) βαλβίδα ελέγχου ροής (check valve), (4) θάλαμος ανάμιξης αερίων (distributor blender), (5) PLCIB31, (6) θερμαντικός μανδύας αντιδραστήρα, (7) θερμοστοιχείο ή θερμοζεύγος του διαλύματος (thermocouple), (8) θερμοστοιχείο του θερμαντικού μανδύα (thermo couple of heating mantle), (9) μηχανισμός ανάδευσης, (10) μονομετρική βαλβίδα ελέγχου αντίστροφης ροής (backpressure), (11) συσκευή ρύθμισης της πίεσης του υγρού (damper), (12) αντλία Gilson, (13) τετράπορτη βαλβίδα (14) μικρομετρική βαλβίδα ελέγχου της πίεσης, (15) έξοδος αερίων προϊόντων, (16) τρίπορτη βαλβίδα, (17) χειροκίνητη βαλβίδα εξόδου υγρού για τη ρύθμιση της διαφορικής πίεσης, (18) έξοδος υγρού.

Στο Σχήμα 3.4 παρουσιάζεται ο πίνακας ελέγχου μέσω λογισμικού ο οποίος διευκόλυνε την ρύθμιση και τον έλεγχο των σημαντικότερων παραμέτρων κατά τη διάρκεια των αντιμικροβιακών πειραμάτων. Μέσω του συγκεκριμένου λογισμικού γινόταν εφικτός ο προσδιορισμός, έλεγχος και παρακολούθηση παραμέτρων όπως η θερμοκρασία, η πίεση, η ροή του αέριου μίγματος τροφοδοσίας και ο όγκος του διαλύματος στον αντιδραστήρα.



Σχήμα 3.4. Πίνακας ελέγχου και ρύθμισης διαφόρων παραμέτρων της πειραματικής συσκευής, μέσω λογισμικού, που χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη των αντιμικροβιακών πειραμάτων.

Η χρήση αυτοματοποιημένου προγράμματος διαδοχικής εκτέλεσης διευκόλυνε σε μεγάλο βαθμό τις πειραματικές διαδικασίες των εν λόγω πειραμάτων. Το πρόγραμμα ακολουθούσε συγκεκριμένα διαδοχικά στάδια, βάση των απαιτήσεων του πειράματος, τα οποία καθορίζονταν από τον χρήστη. Συγκεκριμένα, η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τη διεκπεραίωση των αντιμικροβιακών πειραμάτων της παρούσας διατριβής, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.5.

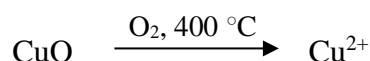
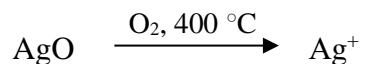
Session Table Session Time Units

Test Time			Session 1	Session 2	Session 3	Session 4	Session 5	Session 6	Session 7	Session 8	Session 9	Session 10
00:00:00 - Days 01			Session 1	Session 2	Session 3	Session 4	Session 5	Session 6	Session 7	Session 8	Session 9	Session 10
Session Time			Safety	Condition	Clean He	Oxidation	Clean He	Reduction	Clean He	Trasnfer	Nothing	Reaction
00:00:00 - Days 01			810	30	90	120	90	120	60	8	60	60
Remaining Time			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
00:00:00 - Days 01												
Operator												
Value												
Next Session #			2	3	4	5	6	7	End	9	End	End
<input type="checkbox"/> SHOW ALL	✓	LIC SV1	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180
RUN	✓	PIC SV1	0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
STOP	✓	PV H2 MI1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VIEW	✓	PV He100 MI5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	✓	PV He200 MI3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LAUNCH	✓	PV He50 MI7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	✓	Q H2O C	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0
	✓	Q H2O R	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	✓	SV H2 MI50	0	0	0	0	0	100	0	0	0	95
	✓	SV He100 MI54	0	0	0	100	0	0	0	0	0	5
	✓	SV He200 MI52	0	120	120	0	120	0	120	120	120	0
	✓	SV He50 MI56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	✓	TIC SV1	25	25	500	500	300	300	25	25	25	25

Σχήμα 3.5. Παράδειγμα πίνακα αυτοματοποιημένου προγράμματος διαδοχικής εκτέλεσης εντολών για τις ανάγκες των αντιμικροβιακών πειραμάτων με στερεά υλικά.

Πειραματική διαδικασία

Με την ολοκλήρωση της σύνθεσης των στερεών υλικών, προζυγισμένη ποσότητα σφαιριδίων (συνήθως 1 g) του προς μελέτη υλικού τοποθετείτο στο ειδικό καλάθι του αντιδραστήρα. Η χρησιμοποίηση των υπό μελέτη στερεών στην αντιμικροβιακή αντίδραση απαιτεί την *in-situ* προκατεργασία (pretreatment) τους μέσα στον αντιδραστήρα, η οποία περιλαμβάνει αρχικά πύρωση στους 400°C παρουσία αέρα για 2h. Η πύρωση (οξειδωση) αποσκοπεί τόσο στην απομάκρυνση της υγρασίας, του CO₂ και άλλων ουσιών που πιθανόν να είχαν προσροφηθεί στην επιφάνεια του στερεού όσο και στην οξειδωση του άργυρου (ή του χαλκού) στην επιφάνεια του στερεού ούτως ώστε να αποκτήσει την μέγιστη βακτηριοκτόνο δράση του.



Μετά την ολοκλήρωση της προκατεργασίας του στερεού υλικού στον αντιδραστήρα, ακολουθούσε ψύξη του αντιδραστήρα υπό ροή He (120cc/min), μέχρι να επιτευχθεί θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Αφού ο αντιδραστήρας φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, τότε γίνεται η εισαγωγή του διαλύματος μικροοργανισμών με σταθερή ροή (24 mL/min) για 8 min, υπό συνεχή ροή He. Σημειώνεται ότι καθ' όλη την διάρκεια των μικροβιακών μελετών λαμβάνονταν όλα τα απαραίτητα μέτρα προστασίας τόσο του ερευνητή όσο και του μικροοργανισμού που μελετάται. Κάτι τέτοιο θα συνέβαλλε στην αποτροπή της επιμόλυνσης του πειράματος από άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης, τα εργαστηριακά αντικείμενα υφίσταντο για αυτό το λόγο ειδική επεξεργασία με αιθανόλη και υπεριώδη ακτινοβολία (UV-light) ενώ όλες οι άλλες διαδικασίες πραγματοποιούνταν σε θάλαμο νηματικής ροής ούτως ώστε να τηρούνται οι απαραίτητες συνθήκες αποστείρωσης. Συγκεκριμένα, το αρχικό διάλυμα των μικροοργανισμών παρασκευαζόταν ως ακολούθως:

- i.* Το φιαλίδιο με τα λυοφιλοποιημένα σφαιρίδια μεμονωμένου στελέχους του υπό μελέτη μικροοργανισμού αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 15 λεπτά.

- ii.* Με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας αφαιρείται ένα λυοφιλοποιημένο σφαιρίδιο και μεταφέρεται σε πλαστικό φιαλίδιο που περιέχει 0.5 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού.
- iii.* Πραγματοποιείται διάλυση του λυοφιλοποιημένου σφαιριδίου χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο μάκτρο.
- iv.* Το παρασκευασθέν διάλυμα στο οποίο περιέχεται ο μικροοργανισμός τοποθετείται σε μηχανήμα vortex για 1-2 λεπτά έχοντας ως στόχο την ομοιογενοποίηση του.
- v.* Ποσότητα 0.1 mL από το παρασκευασθέν διάλυμα αραιώνεται σε 199.9 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού.

Επιπρόσθετα, επιδιώκοντας την δημιουργία βέλτιστων συνθηκών για την διαβίωση των βακτηρίων, αποκλείοντας ταυτόχρονα το θάνατο των βακτηρίων λόγω έλλειψης τροφής ή απαραίτητων θρεπτικών ουσιών και ιχνοστοιχείων, 4.8 mL θρεπτικού ορρού (Tryptic Soy Broth - TSB) προστίθεται σε κάθε μικροβιακό διάλυμα. Η ιδανική ποσότητα ορρού που επρόκειτο να προστεθεί σε κάθε παρασκευασμένο μικροβιακό διάλυμα ανάλογα με τον όγκο του, αποφασίστηκε μέσα από μια σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας βακτηριακά διαλύματα στα οποία προστίθεται διαφορετικός όγκος TSB.

Εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης μικροοργανισμών στο συγκεκριμένο διάλυμα, σε μερικές περιπτώσεις παρασκευάζονταν αραιωμένα διαλύματα χρησιμοποιώντας την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων με σκοπό η συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο διάλυμα να εμπίπτει στο επιθυμητό όριο των 30-300 cfu.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε μερικά πειράματα, έχοντας ως στόχο την λεπτομερέστερη εξέταση της αναστολής των μικροοργανισμών από το στερεό, δεν πραγματοποιείτο περαιτέρω αραιώση του εν λόγω διαλύματος, με την αρχική συγκέντρωση του διαλύματος να ορίζεται ως πάρα πολλές αποικίες για να μετρηθούν (TNTC).

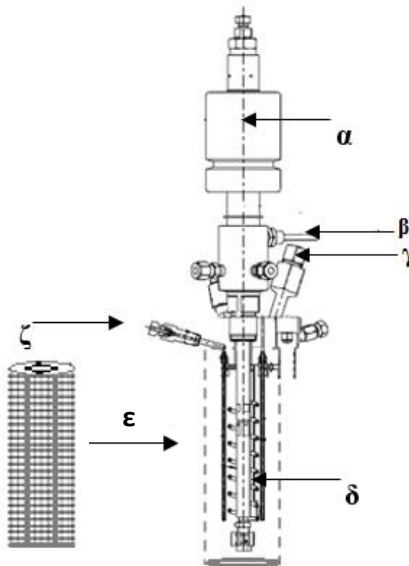
Στη συνέχεια, με την ενεργοποίηση της ροής του αερίου μίγματος (O_2/He), σηματοδοτείτο η έναρξη της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε ειδικά αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια με σκοπό την

ανάπτυξη καλλιεργείων σε εκλεκτικά υποστρώματα, έτσι ώστε να εξεταστεί η αναστολή των μικροοργανισμών από το εκάστοτε στηριζόμενο στερεό.

Ακόμα, ούτως ώστε να διασφαλιστεί πως η βακτηριακή αναστολή οφειλόταν στη βακτηριοκτόνο δράση των υπό εξέταση μονομεταλλικών στερεών υλικών, διεξήχθησαν πειράματα χρησιμοποιώντας μόνο σφαιρίδια υποστρώματος ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$). Επίσης, συμπληρωματικά πειράματα διεξήχθησαν χωρίς να χρησιμοποιηθούν ούτε σφαιρίδια υποστρώματος ούτε σφαιρίδια στηριζόμενου στερεού υλικού για σκοπούς σύγκρισης (blank).

Στοχεύοντας στην εξέταση κατά πόσο η παρατηρούμενη βακτηριοκτόνος δράση των παρασκευασθέντων μονομεταλλικών στηριζόμενων στερεών αποδίδεται στην απελευθέρωση-έκπλυση ιόντων αργύρου από την επιφάνεια τους, πραγματοποιήθηκαν αρκετά αντιμικροβιακά πειράματα χρησιμοποιώντας οξαλικό οξύ, συγκέντρωσης 5 ppb, το οποίο προστίθεται στο μικροβιακό διάλυμα πριν από την επεξεργασία του. Ως γνωστό το οξαλικό οξύ διίσταται σε οξαλικά ανιόντα ($\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$), τα οποία δρουν ως ισχυροί χημικοί παράγοντες συμπλοκοποίησης οι οποίοι προσδένονται με τα ελεύθερα ιόντα αργύρου (Ag^+) στο μικροβιακό μέσο (υγρό). Ως εκ τούτου μειώνεται σημαντικά (αν όχι ολοκληρωτικά) για τα βακτήρια, η βιοδιαθεσιμότητα οποιωνδήποτε ιόντων αργύρου (Ag^+) τα οποία έχουν υποστεί έκπλυση από το εκάστοτε στερεό υλικό. Για λόγους σύγκρισης, η ίδια συγκέντρωση οξαλικού οξέος προστέθηκε στην περίπτωση χρήσης διαλύματος ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag^+) συγκέντρωσης 0,3 ppb, για την επεξεργασία συγκεκριμένων μικροβιακών διαλυμάτων.

Όλα τα μεταλλικά στερεά υλικά που παρασκευάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής αξιολογήθηκαν ως προς τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες, έτσι ώστε να βρεθεί η, κατά το δυνατό, βέλτιστη χημική σύσταση του στερεού (φόρτιση και είδος μετάλλου, είδος υποστρώματος), η οποία οδηγεί στις βέλτιστες αντιμικροβιακές ιδιότητες.



Σχήμα 3.6. Σύστημα αντιδραστήρα-μηχανισμού ανάδευσης. (α) Μηχανισμός ανάδευσης, (β) έξοδος αέριων προϊόντων, (γ) είσοδος αέριου μίγματος τροφοδοσίας, (δ) θερμοστοιχεία (thermocouples), (ε) καλάθι Mahoney-Robinson, (ζ) είσοδος υγρού.

- **Μέθοδος διασποράς εμβολίου – Spread plate method**

Με την χρήση ηλεκτρονικής πιπέτας ακριβείας πραγματοποιείται ασηπτική μεταφορά εναιωρήματος (0.1 mL) με το υπό ανάλυση βακτηριακό είδος σε εκλεκτικά στερεά θρεπτικά υποστρώματα. Ακολούθως, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο διανομέα, γινόταν η διασπορά του εμβολίου στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος. Αξίζει να αναφερθεί η συχνή αποστείρωση του διανομέα μετά από κάθε εμβολιασμό. Σημειώνεται πως με το πέρας της διασποράς των μικροβιακών κυττάρων, τα τρυβλία παρέμεναν ανοικτά για εξάτμιση της υγρασίας και κατ' επέκταση ακινητοποίηση των κυττάρων. Στη συνέχεια τα τρυβλία αφού σφραγίζονταν με πάραφιλμ τοποθετούνταν ανάποδα σε θάλαμο επώασης σε σταθερή θερμοκρασία (37 °C). Χρησιμοποιώντας μετρητή αποικιών με χρωματιστό φωτισμό πραγματοποιείται η καταμέτρηση των αποικιών μετά από 24 και 48 ώρες επώασης.

- **Μελέτη της Επίδρασης της Αέριας Τροφοδοσίας στην Παρατηρούμενη Βακτηριακή Αναστολή**

Αποσκοπώντας στην μελέτη της επίδρασης του αέριου μίγματος τροφοδοσίας στην παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή, διεξήχθησαν εξειδικευμένα αντιμικροβιακά πειράματα συνεχούς ροής με διαφορετική τροφοδοσία αερίου κάθε φορά. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικά αέρια μίγματα α) Ήλιον (He), β) 20% Οξυγόνο σε Ήλιον (20 %O₂/ 80% He) και γ) Υδρογόνο (H₂).

Για κάθε πείραμα η ροή τροφοδοσίας μικροβιακού διαλύματος εντός του αντιδραστήρα ήταν 10 mL/min. Ο ενεργός όγκος διαλύματος εντός του αντιδραστήρα ήταν 180 mL ενώ η μάζα του στερεού που χρησιμοποιήθηκε για τα εν λόγω πειράματα ήταν 3g (1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃) που τοποθετήθηκε στο ειδικό καλάθι του αντιδραστήρα. Σημειώνεται πως το εν λόγω υλικό παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό βακτηριακής αναστολής από όλα τα άλλα στερεά υλικά που παρασκευάστηκαν και εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Όλες οι άλλες πειραματικές συνθήκες παρέμειναν ίδιες όπως και στα προηγούμενα αντιμικροβιακά πειράματα που διεξήχθησαν (Πίνακας 4).

Λόγω της λειτουργίας του αντιδραστήρα σε συνεχή ροή, ήταν απαραίτητη η προπαρασκευή μικροβιακού διαλύματος όγκου 2 λίτρων (2L) ούτως ώστε να καταστεί εφικτή η εξέταση της συνεισφοράς του εκάστοτε αέριου μίγματος τροφοδοσίας στην παρατηρούμενη αναστολή της *E. coli*. Για την παρασκευή του εν λόγω διαλύματος χρησιμοποιείται διαλυμένο λυοφιλοποιημένο σφαιρίδιο *E. coli* σε αποστειρωμένο νερό (0,1 mL) όπως περιεγράφηκε πιο πάνω, που προστίθεται σε 50 mL ορρού Tryptic Soy Broth (TSB) και ακολούθως τοποθετείται για επώαση σε περιτρεφόμενο επωαστήρα (orbital incubator) για 12 ώρες. Τα 50 mL ορρού με το εμβόλιο *E. coli* αραιώνονταν σε 1950 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού έτσι ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός όγκος των 2L. Επίσης, προστίθεται σε κάθε μικροβιακό διάλυμα η κατάλληλη ποσότητα οξαλικού οξέος ούτως ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 5 ppb στον τελικό όγκο του διαλύματος.

Όπως και σε προηγούμενα αντιμικροβιακά πειράματα, πριν από την εισαγωγή του μικροβιακού διαλύματος προς επεξεργασία στον αντιδραστήρα, πραγματοποιείται in-situ προκατεργασία (pretreatment) του στερεού μέσα στον αντιδραστήρα, όπως περιεγράφηκε

πιο πάνω. Με το πέρας της προκατεργασίας του υλικού στον αντιδραστήρα, πραγματοποιείται μείωση της θερμοκρασίας υπό ροή He 120cc/min στους 25°C. Όταν ο αντιδραστήρας έφτανε σε θερμοκρασία δωματίου, τότε ακολουθούσε η εισαγωγή του διαλύματος E. coli υπό συνεχή ροή όπως περιγράφεται παραπάνω αλλά και η σχεδόν ταυτόχρονη ενεργοποίηση της ροής του εκάστοτε αερίου μίγματος.

Στοχεύοντας στη μελέτη της βακτηριακής αναστολής που παρουσίασε το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ σε κάθε πείραμα, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε ειδικά αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια με σκοπό την ανάπτυξη καλλιιεργειών σε εκλεκτικά υποστρώματα. Με την χρήση ηλεκτρονικής πιπέτας ακριβείας πραγματοποιείται ασηπτική μεταφορά εναιωρήματος (0.1 mL) με το υπό ανάλυση βακτηριακό είδος σε εκλεκτικά στερεά θρεπτικά υποστρώματα όπως περιγράφεται στην μέθοδο της διασποράς εμβολίου. Η επώαση των βακτηρίων πραγματοποιείται και επίσης σε θάλαμο επώασης με σταθερή θερμοκρασία (37 °C). Χρησιμοποιώντας μετρητή αποικιών με χρωματιστό φωτισμό πραγματοποιείται η καταμέτρηση των αποικιών μετά από 24 και 48 ώρες επώασης.

Τέλος, ούτως ώστε να διασφαλιστεί πως η βακτηριακή αναστολή οφειλόταν στη βακτηριοκτόνος δράση του στηριζόμενου μεταλλικού στερεού, διεξήχθησαν πειράματα χρησιμοποιώντας μόνο σφαιρίδια υποστρώματος (CeO₂-γ-Al₂O₃) και χρησιμοποιώντας τα ίδια μίγματα αέριας τροφοδοσίας. Επίσης, συμπληρωματικά πειράματα διεξήχθησαν χωρίς να χρησιμοποιηθούν ούτε σφαιρίδια υποστρώματος ούτε σφαιρίδια μεταλλικού στηριζόμενου στερεού υλικού για σκοπούς σύγκρισης (blank), με στόχο τον αποκλεισμό της πιθανότητας η αναστολή των βακτηρίων να προκύπτει εξαιτίας της έλλειψης οξυγόνου.

- **Μελέτη της Σταθερότητας των Στηριζόμενων Στερεών υπό Συνεχή Ροή Βακτηριακού Διαλύματος**

Αποσκοπώντας στη μελέτη της σταθερότητας της απόδοσης των στερεών υλικών Ag έπειτα από συνεχόμενη επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος, διεξήχθησαν εξειδικευμένα αντιμικροβιακά πειράματα συνεχούς ροής και διάρκειας 48 ωρών χωρίς διακοπή. Η ιδιαιτερότητα των εν λόγω πειραμάτων έγκειται στη χρήση θαλασσινού νερού για την

πραγματοποίηση τους, έτσι ώστε να διαφανεί η καταλληλότητα της μεθόδου για αντιμετώπιση ποικίλων περιβαλλοντικών ζητημάτων όπως η επεξεργασία – αποστείρωση του νερού έρματος των πλοίων.

Για κάθε πείραμα ο ρυθμός ροής εισόδου του μικροβιακού διαλύματος εντός του αντιδραστήρα ήταν 10 mL/min. Ο ενεργός όγκος διαλύματος εντός του αντιδραστήρα ήταν 180 mL ενώ η μάζα του υλικού (1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃) που χρησιμοποιήθηκε για τα εν λόγω πειράματα ήταν 3g τα οποία τοποθετήθηκαν στο ειδικό καλάθι του αντιδραστήρα. Η επιλογή του συγκεκριμένου στερεού έγκειται στο γεγονός ότι αυτό παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό βακτηριακής αναστολής από όλα τα άλλα στερεά υλικά που παρασκευάστηκαν και εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής. Όλες οι άλλες πειραματικές συνθήκες παρέμειναν ίδιες όπως και στα προηγούμενα αντιμικροβιακά πειράματα που διεξήχθησαν (Πίνακας 4).

Στοχεύοντας στην μελέτη της βακτηριακής αναστολής που παρουσίασε το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ και κατ' επέκταση της σταθερότητας του κατά τη διάρκεια της αντίδρασης λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 16, 24, 28, 32, 36, 44, 48 και 72 ώρες) σε ειδικά αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια με σκοπό την ανάπτυξη καλλιιεργειών σε εκλεκτικά υποστρώματα. Η ανάπτυξη των εν λόγω δειγμάτων πραγματοποιείτο με την μέθοδο που περιεγράφηκε αναλυτικά πιο πάνω.

3.3. Αναλυτικές Τεχνικές Φυσικοχημικού Χαρακτηρισμού Στερεών Υλικών και Αποκρυπτογράφησης του Ψευδο-Καταλυτικά Επαγόμενου Μηχανισμού Βακτηριακής Αναστολής

Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των στερεών υλικών περιελάμβανε τον προσδιορισμό της πραγματικής συνολικής φόρτισης τους στα επιμέρους μέταλλα και μεταλλοξείδια με χρήση της Φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης (AAS) αλλά και της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS). Πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη της υφής των στερεών μέσω μικροσκοπικών αναλύσεων (SEM και TEM), καθώς και προσδιορισμός της ειδικής τους επιφάνειας με τη χρήση της τεχνικής B.E.T. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιώντας τις προαναφερθείσες τεχνικές αλλά και άλλες σύγχρονες ισχυρές αναλυτικές τεχνικές που θα αναφερθούν πιο κάτω,

επιχειρήθηκε η αποκρυπτογράφιση του μηχανισμού βακτηριακής αναστολής που αποδίδεται στη δράση των παρασκευασθέντων στερεών υλικών.

3.3.1. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)

Η χρήση της μεθόδου Φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της συνολικής φόρτισης (%) του αργύρου (ή του Cu) στην επιφάνεια των σφαιριδίων $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. Για τις αναλύσεις με τη φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης, εφοδιασμένης με φούρνο θερμαινόμενου γραφίτη (GF-990), χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο PG-990 της PG Instruments Ltd με διορθωτή υποβάθρου σήματος Zeeman και εγκάρσια θερμαινόμενη κυβελίδα ατομοποίησης (Transversely Heated Graphite Tube Atomizer, THGA). Το φασματοφωτόμετρο ήταν εξοπλισμένο με αυτόματο δειγματολήπτη (graphite furnace auto sampler, ASC-990) και μονάδα ψύξης, η οποία λειτουργούσε κατά τη διάρκεια των μετρήσεων.

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε αρχικά κονιορτοποίηση των σφαιριδίων ($W_{\text{cat}} = 50\text{mg}$) και έπειτα διαλυτοποίηση του στερεού με θέρμανση ($55\text{ }^\circ\text{C}$) σε αποστακτήρα (reflux) που περιείχε διάλυμα οξέων 72 mL HNO_3 (Riedel-deHaen), 24 mL HCl (Aldrich), 4 mL HF (Scharlau), μέχρι πλήρη διαλυτοποίηση του. Το διάλυμα που προέκυπτε λαμβάνοταν με ιδιαίτερη προσοχή μέσω πιπέτας και μεταφερόταν σε ογκομετρική φιάλη, προσθέτοντας απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν οι απαιτούμενες αραιώσεις ανάλογα με το ανώτατο όριο προσδιορισμού της συγκέντρωσης του υπό μελέτη μετάλλου από τη συγκεκριμένη τεχνική.

3.3.2. Μελέτη Υφής των Στερεών Υλικών με την Τεχνική B.E.T.

Ο προσδιορισμός της ειδικής επιφάνειας (m^2/g), του ειδικού όγκου των πόρων (cm^3/g), και της μέσης διαμέτρου των πόρων (nm) των υπό μελέτη μεταλλοξειδίων πραγματοποιήθηκε μετά από φυσική προσρόφηση-εκρόφηση αερίου N_2 σε θερμοκρασία υγρού N_2 ($\approx -200^\circ\text{C}$) με τη χρήση της μεθόδου B.E.T. Η μέθοδος βασίζεται στην ανάπτυξη ενός μοντέλου που περιγράφει τη φυσική πολυστρωματική προσρόφηση αδρανούς αερίου στη θερμοκρασία υγροποίησης του σε επιφάνειες στερεών. Για τον προσδιορισμό της ειδικής επιφάνειας των

στερεών υλικών, που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Δ. Δ., χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Micromeritics Gemini III Surface Area and Pore Size Analyzer [139].

Πριν από κάθε μέτρηση πραγματοποιείται απαέρωση των δειγμάτων με το σύστημα Micromeritics Smart Prep Programmable Degas System στους 30°C για 10 min και στους 180 °C για 12 h. Η μέτρηση της ειδικής επιφάνειας B.E.T. πραγματοποιήθηκε σε 7 σχετικές πιέσεις (P/P_0) αζώτου στην περιοχή 0.05-0.35, όπου ισχύει η γραμμικότητα της εξίσωσης B.E.T. Ο όγκος και η μέση διάμετρος των πόρων των στερεών προέκυψε από τις ισόθερμες προσρόφησης-εκρόφησης (40 σημεία στην περιοχή P/P_0 από 0.0-1.0) με βάση τη μέθοδο B.J.H [140]. Η τεχνική έχει σήμερα αυτοματοποιηθεί πλήρως, επομένως η χρήση της γίνεται σχετικά πιο απλή μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή.

3.3.3. Φασματομετρία Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP – MS)

Η μέθοδος της Φασματομετρίας Μάζας Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP—MS) χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της πραγματικής φόρτισης του άργυρου (Ag) που εναποτέθηκε στο υπόστρωμα (γ -αλούμινα) για τα στερεά υλικά στα οποία χρησιμοποιήθηκε ο άργυρος ως ενεργός φάση αλλά και για την εύρεση της φόρτισης του δημητρίου (Ce) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για εμβάπτιση των σφαιριδίων γ -Al₂O₃ (στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂- γ -Al₂O₃). Οι εν λόγω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας φασματογράφο μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος της εταιρείας Thermo Scientific (Thermo XSeries II, Germany).

Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε αρχικά κονιορτοποίηση των σφαιριδίων του υπό εξέταση στερεού υλικού ($W_{cat} = 50\text{mg}$) και έπειτα διαλυτοποίηση του με θέρμανση (55 °C) σε αποστακτήρα που περιείχε διάλυμα οξέων (72 mL HNO₃ (Riedel-deHaen), 24 mL HCl (Aldrich) και 4 mL HF (Scharlau)) σε σφαιρική φιάλη, μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή του. Το προκύπτον διάλυμα μεταφερόταν με ιδιαίτερη προσοχή σε ογκομετρική φιάλη (100 mL), προσθέτοντας απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν οι απαιτούμενες αραιώσεις χρησιμοποιώντας ως διαλύτη 2% HNO₃ ούτως ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση μετάλλου ίση με 75 ppb η οποία εμπίπτει στο αναλυτικό εύρος του οργάνου. Ταυτόχρονα στο εκάστοτε δείγμα προστίθετο

η απαραίτητη ποσότητα Ίνδιου (internal standard) ούτως ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 50 ppb στον τελικό όγκο δείγματος.

Ειδικότερα, για την ποσοτικοποίηση των άγνωστων διαλυμάτων, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα αργύρου, χαλκού και δημητρίου με συγκεντρώσεις 0, 25, 50, 75 και 100 ppb χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης για κάθε μέταλλο. Τα εν λόγω πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας 2% νιτρικό οξύ το οποίο χρησιμοποιήθηκε και πάλι ως διαλύτης για την προετοιμασία των απαραίτητων καμπύλων βαθμονόμησης.

Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως το νιτρικό οξύ (2%) που χρησιμοποιήθηκε τόσο στην προκατεργασία των υπό εξέταση δειγμάτων όσο και κατά την διάρκεια των φασματομετρικών αναλύσεων, είχε προηγουμένως φιλτραριστεί μέσω ηθιμομεμβράνης υπό κενό, με φίλτρα (Whatman, UK) διαμέτρου 47 mm και διάμετρου πόρων 0.2 μm. Επίσης όλα τα δείγματα είχαν φιλτραριστεί με φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.2 μm πριν από την ανάλυση τους.

Το σύστημα ψύξης του οργάνου βρισκόταν σε λειτουργία καθ' όλη την διάρκεια της ανάλυσης ενώ παράλληλα χρησιμοποιείτο αέριο Αργό (99.999%) για τους σκοπούς της ανάλυσης. Επιπρόσθετα, ο αρχικός καθαρισμός του οργάνου προηγήθηκε της δοκιμής της απόδοσης του μέσα από την ανίχνευση της συγκέντρωσης διαφόρων μετάλλων. Επίσης, πριν από την ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η κατασκευή των καμπύλων βαθμονόμησης για τα μέταλλα Ag, Cu και Ce. Σημειώνεται πως τόσο πριν όσο και μετά την ανάλυση κάθε δείγματος πραγματοποιείται ανάλυση δειγμάτων ελέγχου τα οποία αποτελούσαν δείγματα της καμπύλης βαθμονόμησης.

Επίσης, αποσκοπώντας στη διακρίβωση της πιθανότητας τυχόν έκπλυσης ιοντικού αργύρου (Ag^+), χαλκού (Cu) αλλά και δημητρίου (Ce) από την επιφάνεια των διάφορων παρασκευασθέντων στερεών, πραγματοποιήθηκαν φασματομετρικές αναλύσεις μικροβιακών διαλυμάτων τα οποία έτυχαν προηγουμένως επεξεργασίας, χρησιμοποιώντας στερεά υλικά τα οποία περιείχαν τα εν λόγω μέταλλα είτε ως ενεργό φάση είτε ως στοιχείο του υποστρώματος. Επιπρόσθετα αναλύθηκαν μη στηριζόμενα σφαιρίδια υποστρώματος γ-αλούμινας για σκοπούς σύγκρισης. Οι αναλύσεις αυτές οι οποίες στόχευαν τόσο στην

ποιοτική ανίχνευση όσο και στην ποσοτικοποίηση των προαναφερθέντων μετάλλων στα εξεταζόμενα διαλύματα πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο ακριβώς τρόπο με τον οποίο πραγματοποιήθηκαν οι αναλύσεις διακρίβωσης της φόρτισης μετάλλου για τα στερεά υλικά, που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., και χρησιμοποιώντας τις ίδιες καμπύλες βαθμονόμησης για τα μέταλλα Ag, Cu και Ce. Συγκεκριμένα, προστέθηκε η απαραίτητη ποσότητα Ίνδιου (internal standard) ούτως ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση 50 ppb στον τελικό όγκο δείγματος, καθώς επίσης και η ενδεικνυόμενη ποσότητα πυκνού HNO₃ για την επίτευξη τελικής συγκέντρωσης 2% νιτρικού οξέος. Επίσης, τα επεξεργασμένα υδατικά διαλύματα φιλτράρονταν χρησιμοποιώντας ανεξάρτητα φίλτρα με διάμετρο πόρου 0,2 μm, τα οποία ενσωματώνονταν σε σύριγγα.

Σημειώνεται πως πριν από το τελικό φιλτράρισμα των δειγμάτων προηγείτο η διήθηση τους μέσω ηθμομεμβράνης υπό κενό (MF method). Συγκεκριμένα, η επιθυμητή ποσότητα δείγματος τοποθετείτο στο φίλτρο της συσκευής διήθησης του δείγματος με ηθμομεμβράνη διαμέτρου πόρων 0.45 μm. Πριν την τοποθέτηση ολόκληρης της ποσότητας του δείγματος στη συσκευή, πραγματοποιείτο προσθήκη της ελάχιστης δυνατής ποσότητας δείγματος ούτως ώστε να επικολληθεί η ηθμομεμβράνη στο σημείο διήθησης και να αποφευχθεί η διαφυγή νερού χωρίς να έχει διηθηθεί. Στη συνέχεια με την βοήθεια αντλίας κενού διευκολυνόταν η διέλευση του δείγματος διαμέσου της ηθμομεμβράνης.

3.3.4. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Για την βαθύτερη εξέταση του μηχανισμού βακτηριακής αναστολής πραγματοποιήθηκαν μικροσκοπικές αναλύσεις μικροβιακών διαλυμάτων αφού προηγουμένως έτυχαν επεξεργασίας με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ αλλά και με μη στηριζόμενα σφαιρίδια αλούμινας. Επίσης πραγματοποιήθηκαν μικροσκοπικές μελέτες για την διερεύνηση της ύπαρξης τυχόν κυτταρικών υπολειμμάτων στην επιφάνεια των στηριζόμενων στερεών υλικών. Όλες οι παραπάνω αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Quanta 200 (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) σε διάφορες μεγεθύνσεις. Όλα τα υπό εξέταση δείγματα καλύπτονταν με μεμβράνες χρυσού πάχους 0,5 - 0,6 nm, χρησιμοποιώντας επιστρωτή SC7640 - sputter coater (Quorum Technologies,

Kent, UK), ούτως ώστε να αποφευχθούν φαινόμενα αλληλεπίδρασης της δέσμης ηλεκτρονίων με το δείγμα.

Αρχικά, προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή πυκνότητα βακτηρίων στο διάλυμα το οποίο θα υπόκειτο σε αντιμικροβιακή επεξεργασία και ακολούθως να παρατηρηθεί στο μικροσκόπιο, ενδεικνυόταν η διάλυση τριών λυοφιλοποιημένων σφαιριδίων μεμονωμένου στελέχους μικροοργανισμού σε 0.5 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού, αντί για ένα. Τόσο τα διαλύματα που έχουν υποστεί επεξεργασία με μονομεταλλικό στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ όσο και τα διαλύματα που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία, όπως επίσης και μη χρησιμοποιημένα σφαιρίδια στερεού υλικού και σφαιρίδια γ-Al₂O₃, έτυχαν της ίδιας επεξεργασίας σταθεροποίησης προτού τοποθετηθούν στο μικροσκόπιο.

Πιο συγκεκριμένα, σε καθένα από 5 ειδικά σωληνάρια falcon, χωρητικότητας 1.5 mL που χρησιμοποιήθηκαν για φυγοκέντριση τοποθετήθηκε ποσότητα 0.75 mL μικροβιακού διαλύματος το οποίο έτυχε επεξεργασίας. Τα σωληνάρια αυτά πληρώθηκαν προσθέτοντας επίσης 0.75 mL ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer Saline (PBS). Παρομοίως, σε καθένα από 5 διαφορετικά ειδικά σωληνάρια falcon χωρητικότητας 1.5 mL που προορίζονταν και αυτά για φυγοκέντριση, τοποθετήθηκε ποσότητα 0.75 mL μικροβιακού διαλύματος το οποίο επεξεργάστηκε χρησιμοποιώντας μόνο σφαιρίδια οξειδίου του αργυρίου και 0.75 mL ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer Saline (PBS). Τα 10 συνολικά σωληνάρια υπέστησαν στη συνέχεια διαδοχικές φυγοκεντρίσεις, αφαιρώντας το υπερκείμενο και προσθέτοντας ρυθμιστικό διάλυμα PBS μετά το τέλος κάθε φυγοκέντρισης. Έπειτα από ικανοποιητικό αριθμό φυγοκεντρίσεων, οι οποίες ήταν αρκετές για την παρατήρηση στερεού υπολείμματος στον πυθμένα των σωληναρίων, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 0,1 M ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate Buffer (PB) όπως επίσης και διάλυμα 4% γλουταραλδεΐδης (Merck Millipore, Germany). Όλα τα μικροβιακά δείγματα αφέθηκαν μέχρι την επόμενη μέρα στους 4 °C και σε pH 7.2. Ακολούθως αφυδατώθηκαν μέσω της σταδιακής προσθήκης τους σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (10, 30, 50, 70, 90 and 100%), για 30 λεπτά σε κάθε συγκέντρωση με εξαίρεση την τελευταία (100%) στην οποία αφέθηκαν μέχρι πλήρους εξάτμισης της αιθανόλης. Ειδικοί υποδοχείς άνθρακα (carbon tips) χρησιμοποιήθηκαν για

την σταθεροποίηση των αποξηραμένων βακτηρίων σε συγκεκριμένα στηρίγματα προτού επικαλυφτούν με χρυσό (P=10⁻² mbar, V=2.2 kV, I=15 mA, t=10 sec).

Όσον αφορά την περίπτωση των μικροσκοπικών αναλύσεων της "καταλυτικής" επιφάνειας, 4 σφαιρίδια στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ που προηγουμένως χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα επεξεργασίας μικροβιακών διαλυμάτων, όπως επίσης και 4 σφαιρίδια του ίδιου στερεού που δεν χρησιμοποιήθηκαν προηγουμένως σε τέτοια πειράματα, υπέστησαν την ίδια προαναφερθείσα επεξεργασία και αφυδάτωση όπως στην περίπτωση των βακτηρίων, προτού παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Παρομοίως, 4 σφαιρίδια οξειδίου του αργυρίου που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα επεξεργασίας μικροβιακών διαλυμάτων, όπως επίσης και 4 σφαιρίδια γ-Al₂O₃ που δεν χρησιμοποιήθηκαν ποτέ σε μικροβιακά πειράματα, έτυχαν της ίδιας επεξεργασίας. Όπως στην περίπτωση των βακτηρίων, έτσι και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί υποδοχείς άνθρακα (carbon tips) για την σταθεροποίηση των σφαιριδίων προτού επικαλυφτούν με χρυσό (P=10⁻² mbar, V=2.2 kV, I=15 mA, t=10 sec).

3.3.5. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM)

Αποσκοπώντας στον χαρακτηρισμό των κρυσταλλινών αργύρου στην επιφάνεια των παρασκευασθέντων στερεών Ag/γ-Al₂O₃ καθώς και στην διακρίβωση του μεγέθους τους, πραγματοποιήθηκαν μικροσκοπικές μελέτες με την χρήση της Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης. Παράλληλα επιδιώχθηκε η ανίχνευση τυχόν μορφολογικών αλλαγών στα βακτηριακά κύτταρα E. coli τα οποία προηγουμένως επεξεργάστηκαν με το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Για σκοπούς σύγκρισης πραγματοποιήθηκαν επίσης μετρήσεις σε δείγματα βακτηρίων τα οποία δεν είχαν προηγουμένως υποστεί αντιμικροβιακή επεξεργασία (blanc). Οι εν λόγω μελέτες πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης τύπου JEOL 1010 με δυναμικό επιτάχυνσης 80 kV με ενσωματωμένη ψηφιακή κάμερα Olympus- Megaview G2.

Προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή πυκνότητα στα διαλύματα που θα τύγγαναν αντιμικροβιακής επεξεργασία και ακολούθως θα μελετούνταν στο μικροσκόπιο, ενδεικνυόταν η διάλυση τριών λυοφιλοποιημένων σφαιριδίων μεμονωμένου στελέχους

μικροοργανισμού σε 0.5 mL απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού, αντί για ένα. Τόσο τα διαλύματα που έχουν υποστεί επεξεργασία με το μονομεταλλικό στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ όσο και τα διαλύματα που δεν είχαν υποστεί καμία επεξεργασία, όπως επίσης και σφαιρίδια Ag/γ-Al₂O₃, έτυχαν της ίδιας επεξεργασίας σταθεροποίησης προτού τοποθετηθούν στο μικροσκόπιο.

Όσον αφορά την προκατεργασία των βιολογικών δειγμάτων που εξετάστηκαν (βακτήρια που είτε είχαν υποστεί αντιμικροβιακή επεξεργασία είτε δεν έτυχαν οποιασδήποτε επεξεργασίας με στερεό υλικό), πραγματοποιήθηκε αρχικά η αρνητική τους χρώση χρησιμοποιώντας φωσφοβολφραμικό οξύ (H₃PW₁₂O₄₀) ούτως ώστε να καταστεί εφικτή η άμεση παρατήρηση τους στο μικροσκόπιο. Συγκεκριμένα, με την βοήθεια πιπέτας, ποσότητα του υπό εξέταση δείγματος μεταφερόταν και απλωνόταν σε ειδικά πλέγματα (grids) τα οποία ήταν καλυμμένα με μια πολύ λεπτή μεμβράνη χαλκού (Σχήμα 2.27). Ακολουθούσε η μετέπειτα ξήρανση του κάθε δείγματος στους 25 °C προτού εισαχθεί στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης.

Επειδή αρχικά δεν έγινε κατορθωτή ούτε η άμεση παρατήρηση μορφολογικών αλλαγών στα βακτήρια που είχαν επεξεργαστεί με στερεό υλικό ούτε η εμπειριστατωμένη παρατήρηση τους παρά τον μεγάλο αριθμό βακτηρίων που εμβολιάστηκαν στο υπό επεξεργασία διάλυμα. Ως εκ τούτου θεωρήθηκε απαραίτητη η περεταίρω κατεργασία των βιολογικών δειγμάτων η οποία περιελάμβανε τα εξής στάδια:

- 1) Τοποθέτηση της απαραίτητης ποσότητας των προς εξέταση βιολογικών δειγμάτων σε ειδικά σωληνάρια (falcon tubes).
- 2) Διαδοχικές φυγοκεντρήσεις των δειγμάτων σε 4,000 rpm ούτως ώστε να παρατηρηθεί ικανοποιητικό στερεό υπόλειμμα (pellet) στον πυθμένα των σωληναρίων.
- 3) Μονιμοποίηση (fixation) για την ακινητοποίηση (νέκρωση) όλων των διαδικασιών του κυττάρου που επιτεύχθηκε με την χρήση γλουταραλδεύδης 2.5% και ακολούθως ξέπλυμα με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer pH 7.2). Εκ νέου μονιμοποίηση με την χρήση τετροξειδίου του οσμίου (OsO₄) - 1% και έπειτα ξέπλυμα ξανά όπως παραπάνω.
- 4) Αφυδάτωση μέσω σταδιακής αντικατάστασης του νερού του μονιμοποιημένου δείγματος με αιθυλική αλκοόλη και στη συνέχεια με τον ενδιάμεσο διαλύτη 1,2-

εποξυπροπάνιο (προπυλενοξείδιο) ο οποίος αποτελεί διαλύτη των εποξικών ρητινών που χρησιμοποιούνται στο επόμενο στάδιο.

5) Εμπότιση – έγκληση έτσι ώστε να καταστεί εφικτή η κοπή των υπό εξέταση βιολογικών παρασκευασμάτων σε λεπτές τομές αφού προηγουμένως πραγματοποιηθεί αντικατάσταση του μέσου αφυδάτωσης με το μέσο έγκλησης που πριν πολυμεριστεί ήταν υγρό και στερεοποιείτο με πολυμερισμό μετά από την έκθεση του σε υψηλή θερμοκρασία (περίπου 60°C). Το μέσο έγκλησης που χρησιμοποιείτο ήταν εποξική ρητίνη.

6) Κόψιμο των δειγμάτων με τον μικροτόμο σε πολύ λεπτές τομές, 80-100 nm, και έπειτα τοποθέτηση τους σε ειδικά πλέγματα (Copper 300mesh grids).

7) Χρώση των δειγμάτων ούτως ώστε να μειωθεί η ολοκληρωτική διαπερατότητα τους και να επιτευχθεί έτσι η μερική σκέδαση των ηλεκτρονίων και ο κατ' επέκταση σχηματισμός της εικόνας, καθώς έτσι δημιουργείται η απαιτούμενη αντίθεση. Η χρωστικές ουσίες που προτιμήθηκε για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής ήταν ο οξικός ουρανυλεστέρας και κιτρικός μόλυβδος.

Όσον αφορά την περίπτωση των μικροσκοπικών αναλύσεων της στερεής επιφάνειας, 4 σφαιρίδια του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ που χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα επεξεργασίας μικροβιακών διαλυμάτων, όπως επίσης και 4 σφαιρίδια του ίδιου στερεού υλικού που δεν χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως σε αντιμικροβιακά πειράματα, υπέστησαν την ίδια προαναφερθείσα επεξεργασία και αφυδάτωση όπως στην περίπτωση των βακτηρίων, προτού παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο.

3.3.6. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία – Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR-IR)

Οι φασματοσκοπικές μελέτες υπερύθρου που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, είχαν ως στόχο την εξέταση των υπολειμμάτων που παρατηρήθηκαν στην επιφάνεια του μεταλλικού στηριζόμενου στερεού μετά από την επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων ως προς την χημική τους σύσταση και προέλευση, αλλά και την πιθανή δημιουργία δεσμών μεταξύ της επιφάνειας του στερεού υλικού και συστατικών της εξωκυτταρικής μεμβράνης. Η εν λόγω φασματοσκοπική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου " Spectrum II Perkin Elmer FTIR" εξοπλισμένο με υψηλής απόδοσης ανιχνευτή MIR δευτεριωμένης θειικής τριγλυκίνης (DTGS), παράθυρα KBr και

με οριζόντιας εφαρμογής εξάρτημα εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (H-ATR) με υψηλό δείκτη διάθλασης και κρύσταλλο από γερμάνιο (Ge). Για το σύνολο των φασμάτων που λήφθηκαν χρησιμοποιήθηκε η περιοχή των 500-4000 cm^{-1} και φασματική ανάλυση 4 cm^{-1} . Για την λήψη του τελικού φάσματος λαμβάνονταν 100 σαρώσεις στους 293 K.

Συγκεκριμένα, για τις πραγματοποιηθείσες φασματοσκοπικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε αρχικά το στερεό υλικό Ag/ γ - Al_2O_3 πριν και μετά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος, καθώς και αμιγή σφαιρίδια γ - Al_2O_3 πριν και μετά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος για σκοπούς σύγκρισης. Προτού γίνουν οποιεσδήποτε αναλύσεις, όλα τα δείγματα πλένονταν διεξοδικά με αποστειρωμένο νερό, ξηραίνονταν σε αδρανή ατμόσφαιρα για 24 ώρες σε ειδικό ξηραντήρα και σε θερμοκρασία δωματίου και τελικά θρυμματιζόνταν με σκοπό την δημιουργία εξαιρετικά λεπτόκοκκης σκόνης.

3.3.7. Ανίχνευση - Υπολογισμός των Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ROS) σε Διάλυμα, με Φασματοφωτομετρία Ορατού – Υπεριώδους (UV – Vis.)

Η ανίχνευση δραστικών μορφών οξυγόνου και κυρίως ριζών υδροξυλίου (OH^\bullet) στο μικροβιακό διάλυμα, κατά την διάρκεια των αντιμικροβιακών πειραμάτων, οι οποίες συμβάλλουν στην αναστολή των βακτηρίων, όντας δευτερεύων και συμπληρωματικός μηχανισμός, πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους Thermo Scientific Evolution 300. Αρχικά, 0.05 mL από το δείκτη κυανού του μεθυλενίου (methylthioninium chloride) συγκέντρωσης 1M, προστέθηκε σε δείγμα 1,95 mL ανεπεξέργαστου μικροβιακού διαλύματος το οποίο λήφθηκε από μικροβιακό διάλυμα συνολικού όγκου 0.2 L και το οποίο προοριζόταν για ψευδο-καταλυτική επεξεργασία. Η ίδια ποσότητα δείγματος στο οποίο προστέθηκε η ίδια ποσότητα δείκτη, λήφθηκε μετά από 15 λεπτά επεξεργασίας του αρχικού μικροβιακού διαλύματος, όπου παρατηρείται ο μέγιστος ρυθμός βακτηριακής αναστολής και κατ' επέκταση η μέγιστη δυνατή παραγωγή ελευθέρων ριζών. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως ο εν λόγω δείκτης αποχρωματίζεται καθώς οξειδώνεται στην παρουσία υδροξυλικών ριζών. Ακολούθως λήφθηκε το φάσμα απορρόφησης των προαναφερθέντων δειγμάτων στην ορατή περιοχή (400-800 nm). Για σκοπούς σύγκρισης, μετρήθηκε επίσης το φάσμα δείγματος, έπειτα από

την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας δείκτη, το οποίο υπέστη "καταλυτική" επεξεργασία αλλά δεν περιείχε βακτήρια.

3.3.8. Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Αντίστροφης Μεταγραφής (qRT-PCR)

Η ανάλυση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων κλειδιών της *E. coli* τα οποία σχετίζονται με αμυντικούς μηχανισμούς του κυττάρου, έγινε με την τεχνική qRT-PCR. Συγκεκριμένα, μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποιήθηκε για προσδιορισμό των γονιδίων των οποίων η επαγωγή ή η καταστολή σχετίζεται άμεσα με την ύπαρξη και δράση του άργυρου, επιλέγηκαν προς ανάλυση τα γονίδια που καταγράφονται στον Πίνακα 21, στον οποίο περιγράφεται επίσης ο ρόλος της κάθε πρωτεΐνης που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο γονίδιο. Με αυτό τον τρόπο κατέστη εφικτή η τεκμηριωμένη κατάρτιση ενός πιθανού μηχανισμού βακτηριακής αναστολής.

Για την λήψη ικανοποιητικής ποσότητας βακτηριακού RNA, κάτι το οποίο αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την γενετική τους ανάλυση, ποσότητα από διαλυμένο λυοφιλοποιημένο σφαιρίδιο *E. coli* σε αποστειρωμένο νερό (0,1 mL) προστίθετο σε 50 mL ορρού Tryptic Soy Broth (TSB) προτού τοποθετηθεί για επώαση σε περιστρεφόμενο επωαστήρα (orbital incubator) για 12 ώρες.

Με το πέρας της επώασης, ποσότητα 10 mL από το παραπάνω μικροβιακό διάλυμα χρησιμοποιείτο, κάθε φορά, για την παρασκευή μικροβιακών διαλυμάτων ποσότητας 200 mL, στα οποία η τελική συγκέντρωση βακτηρίων έφτανε περίπου τα 10^9 κύτταρα. Τα διαλύματα αυτά επεξεργάζονταν εν συνεχεία είτε με την χρήση 1g του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ είτε με την χρήση διαλύματος ελευθέρων ιόντων αργύρου Ag⁺ συγκέντρωσης 3 ppb, χρησιμοποιώντας νιτρικό άργυρο (AgNO₃) ως πρόδρομη ένωση. Σε κάθε διάλυμα προστίθετο επίσης η απαραίτητη ποσότητα πυκνότερου οξαλικού οξέος ούτως ώστε να επιτυγχάνεται συγκέντρωση 5 ppb οξαλικών ριζών στον τελικό όγκο του διαλύματος.

Η επεξεργασία των βακτηρίων τόσο με την χρήση στηριζόμενων στερεών υλικών Ag όσο και με την χρήση διαλύματος 3 ppb Ag⁺, επαναλήφθηκε 3 φορές, για κάθε περίπτωση, ούτως ώστε να ληφθούν οι αντίστοιχες βιολογικές επαναλήψεις για κάθε εξεταζόμενο χρονικό σημείο και σε κάθε περίπτωση βακτηριακής επεξεργασίας. Τα χρονικά σημεία

στα οποία πραγματοποιείται λήψη δείγματος (25 mL) για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης ήταν τα 0, 5 και 25 λεπτά για κάθε περίπτωση. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως για σκοπούς σύγκρισης διεξήχθησαν τυφλά πειράματα (blank experiments) χωρίς να χρησιμοποιηθούν ούτε σφαιρίδια στερεού υλικού ούτε διάλυμα Ag^+ και ακολουθώντας ακριβώς την ίδια διαδικασία που περιεγράφηκε πιο πάνω. Η εξέταση της βακτηριακής αναστολής και στις 3 πειραματικές διαδικασίες (στερεό υλικό, διάλυμα Ag^+ και τυφλά) συνεχίστηκε για περίοδο 8 ωρών παρά την λήψη των απαραίτητων δειγμάτων για την πραγματοποίηση της ανάλυσης των επιθυμητών γονιδίων της *E. coli* από τα πρώτα 25 λεπτά. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα CHROMagar E.C.C., στα οποία τοποθετείτο δείγμα 0,1 mL με διασπορά εμβολίου. Όσον αφορά τις υπόλοιπες πειραματικές παραμέτρους που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων στην εκάστοτε περίπτωση, όπως π.χ., ροή του αέριου μίγματος τροφοδοσίας, θερμοκρασία και ανάδευση, παρέμεναν σταθερές και ίδιες με τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενα πειράματα (Πίνακας 4 - Πειραματικές συνθήκες κατά τη διεξαγωγή των αντιμικροβιακών πειραμάτων).

Τα δείγματα για την γονιδιακή ανάλυση του βακτηρίου *E. coli* και για τα χρονικά σημεία των 0, 5 και 25 λεπτών συλλέγονταν σε ειδικά σωληνάρια falcon χωρητικότητας 50 mL και τύγγαναν άμεσης φυγοκέντρισης (10.000 rpm) για 10 λεπτά. Με διαδοχικές φυγοκεντρίσεις και απόρριψη του υπερκείμενου υγρού επιτυγχανόταν η λήψη πυκνότερου στερεού υπολείμματος κυττάρων. Το προκύπτον στερεό υπόλειμμα που λαμβανόταν στον πυθμένα των σωληνάρων για κάθε χρονικό σημείο (της εκάστοτε περίπτωσης επεξεργασίας), υποβαλλόταν σε εκχύλιση του ολικού RNA με την χρήση του χημικού αντιδραστηρίου NucleoZol ακολουθώντας το αναλυτικό πρωτόκολλο "MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG", Germany (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I).

Η διακρίβωση της ποιότητας και της ποσότητας του εξαχθέντος RNA πραγματοποιείται με μέτρηση ποσότητας 1 μ L από κάθε δείγμα χρησιμοποιώντας την συσκευή Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) η οποία παρέχει την δυνατότητα μέτρησης πολύ μικρών ποσοτήτων RNA (ή DNA) σε ελάχιστο χρόνο. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι λόγοι A260/A280 και A260/A230. Επιπλέον, η ακεραιότητα του RNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

Ακολούθως απομακρύνονταν τυχόν υπολείμματα γονιδιακού DNA στα υπό ανάλυση δείγματα με βάση το πρωτόκολλο "DNase treatment Cat. No. NU01a, HT Biotechnology LTD", England (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι).

Έπειτα, για να καταστεί εφικτή η ανάλυση RT-qPCR, ποσότητα 1 µg του ολικού RNA μετατρεπόταν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας το εμπορικό Primescript 1st Strand Synthesis Kit σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Takara, Japan) (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι).

Η ανάλυση Real-time PCR διεξήχθη χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Biorad IQ5 (Biorad, USA). Το μίγμα αντίδρασης για κάθε γονίδιο περιείχε 4 µL cDNA σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης (RT) (αραίωση 1:5), 0,75 µM του ανάλογου ζεύγους εκκινήτων (Πίνακας 5) και 5 µL από το μίγμα χρωστικής, πολυμεράσης και νουκλεοτιδίων (master mix - SYBRGreen Super Mix, Invitrogen, USA). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τριπλέτες με τις εξής συνθήκες του θερμικού κυκλοποιητή: αρχική αποδιάταξη στους 95 °C για 5 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι διπλές έλικες, ακολουθούμενη από 40 κύκλους ενίσχυσης (95 °C για 30 s, θερμοκρασία ανασύνδεσης (Ta °C - Πίνακας 5) για 30 s, και 72° C για 30 s). Η ειδίκευση των εκκινήτων και η πιθανότητα δημιουργίας διμερών μεταξύ τους παρακολουθείτο με βάση την καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων με την αύξηση της θερμοκρασίας (61 κύκλοι με 0.5 °C αύξηση μεταξύ 65-95 °C).

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *16S (RrSB)* χρησιμοποιήθηκαν ως ενδογενή γονίδια αναφοράς με σκοπό την κανονικοποίηση των γονιδίων στόχων [144]. Επιπλέον, η σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των υπό ανάλυση γονιδίων καθώς και η στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων της ανάλυσης RT-qPCR data (pairwise fixed reallocation randomization test) πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα "REST" σύμφωνα με τους Pfaffl et al. [206].

Πίνακας 5. Το ζεύγος εκκινητών για κάθε υπό ανάλυση γονίδιο και η θερμοκρασία ανασύνδεσής τους - Ta (°C).

Γονίδιο Στόχος	Forward Sequence (5'-3')	Reverse Sequence (5'-3')	Ta	Βιβλιογραφία
<i>GapA</i>	GCTACTACCGCTACTCA GAAAACC	GAACGGTCAGGTCAA CTACAGATAC	60	[206]
<i>ZntA</i>	GGAAGAGGTGGCGATT AACA	TTCTGACAGCACTTC CAACG	60	[206]
<i>PldA</i>	AAATCCTGGTGGCAACT GTC	AACCTGCAAAACGGT AATCG	60	Σχεδιάστηκε για τους σκοπούς της παρούσας Διατριβής (Gene ID: 948307)
<i>CueO</i>	TACCGATCCCTGATTTG CTC	GACTTCACCCGGTAC TTCCA	60	[206]
<i>CusR</i>	AAATCGGCAACCTGAA ACTG	GTTACGCTCCGCCAA TAAAG	60	[206]
<i>CopA</i>	CCAGACGATATCCCGCT TTA	GCGCTGTAAATGAG CAACA	60	[206]
<i>RrSB (16S)</i>	CAGCCACACTGGAAC GAGA	GTTAGCCGGTGCTTC TTCTG	60	[206]

3.4. Μελέτη της Αντιμικροβιακής Δραστηριότητας του Ακίνητοποιημένου Ag σε Πραγματικές Συνθήκες

Για την διακρίβωση της δυνατότητας εμπορικοποίησης και περαιτέρω μελέτης και εξέλιξης της μεθόδου επεξεργασίας του νερού έρματος που προτείνεται από την παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκε επεξεργασία νερού έρματος σε πραγματικές συνθήκες σε δεξαμενή νερού έρματος του πετρελαιοφόρου πλοίου "Alexandria" χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/QSG.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας 25 kg υποστρώματος Quarzo Sferico Grigio (QSG) διαμέτρου 3-5 mm, το οποίο παραχωρήθηκε από την εταιρεία κατασκευής μονάδων βιολογικού καθαρισμού και επεξεργασίας νερού "S.K. EUROMARKET LTD", παρασκευάστηκε μονομεταλλικό στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/QSG με την μέθοδο του υγρού εμποτισμού που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.1. Ο καταλύτης προκατεργάστηκε όπως επίσης αναφέρεται στο υποκεφάλαιο 3.1.

Το στερεό υλικό που παρασκευάστηκε τοποθετήθηκε σε ειδικά σχεδιασμένη κατασκευή, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.7, μέσω της οποίας καθίστατο εφικτή η επαφή σχεδόν ολόκληρου του υπό επεξεργασία όγκου νερού με το στερεό υλικό, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται βέλτιστη απόδοση βακτηριακής αναστολής. Η εν λόγω κατασκευή σχεδιάστηκε και συναρμολογήθηκε στις εγκαταστάσεις της εταιρείας "S.K. EUROMARKET LTD", με τρόπο ώστε να επιτυγχάνεται η τοποθέτηση της σε οποιαδήποτε δεξαμενή έρματος του πλοίου.



Σχήμα 3.7. Τρισδιάστατη σχηματική αναπαράσταση της κατασκευής επεξεργασίας νερού έρματος πλοίου εντός της οποίας τοποθετήθηκε ποσότητα 25 kg του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/QSG.

Τελικό στάδιο του πειράματος αποτέλεσε η τοποθέτηση της αναπτυχθείσας κατασκευής στο εσωτερικό δεξαμενής έρματος του υπό μελέτη πλοίου χωρητικότητας 105 m³ θαλασσινού νερού και η επακόλουθη λήψη δειγμάτων για παρακολούθηση του μικροβιακού φορτίου της δεξαμενής ανά τακτά χρονικά διαστήματα (πριν και μετά την έναρξη λειτουργίας της συσκευής). Σημειώνεται πως η επιλογή της δεξαμενής έρματος στην οποία τοποθετήθηκε η κατασκευή επιλέχθηκε μετά από μελέτη του αναλυτικού σχεδίου της χωρητικότητας των δεξαμενών του πλοίου, και ήταν η δεξαμενή WBAPP (Σχήμα 3.8 - ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ). Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως για τους σκοπούς του πειράματος, φουσητήρας (CL 2R22) [209], συγκεκριμένων προδιαγραφών

(0.94KW/3PH/60Hz/380-480V), προσαρτήθηκε στην κατασκευή για την διοχέτευση αέρα διαμέσου του στερεού έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η οξείδωση της ενεργού φάσης (Ag), έτσι ώστε να επιτυγχάνεται βέλτιστη αξιοποίηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του στερεού υλικού (Ag/QSG).



Σχήμα 3.8. Το εσωτερικό της δεξαμενής έρματος WBAPP του πετρελαιοφόρου πλοίου "Alexandria".

3.5. Αποστείρωση

Οι αποστειρωμένες συνθήκες εργασίας γενικότερα, αλλά και η αποστείρωση ειδικότερα, αποτελούσε ένα σημαντικό παράγοντα για την επιτυχή διεκπεραίωση των πειραματικών αναλύσεων στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Μέσω της διασφάλισης των κατάλληλων συνθηκών αποστείρωσης γινόταν εφικτός ο περιορισμός στο ελάχιστο οποιουδήποτε κινδύνου επιμόλυνσης κάτι που θα οδηγούσε σε πειραματικά σφάλματα και κατ' επέκταση λανθασμένα αποτελέσματα.

Συγκεκριμένα, με χρήση κατάλληλου αυτόκαυστου και επιλέγοντας το κατάλληλο πρόγραμμα, πραγματοποιείτο αποστείρωση με υδρατμούς στους 121 °C υπό πίεση, τόσο

των γυαλικών και άλλων σκευών που χρησιμοποιούνταν για τους σκοπούς της παρούσας πειραματικής εργασίας όσο και για την θανάτωση των μικροοργανισμών από τα χρησιμοποιημένα-εμβολιασμένα τρυβλία προτού αυτά απορριφθούν. Επίσης με την χρήση του αυτόκαυστου παρασκευαζόταν αποστειρωμένο νερό το οποίο τοποθετείτο σε ειδική φιάλη.

Επίσης με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας γινόταν κατορθωτή η αποστείρωση διάφορων ηλεκτρονικών πιπέτων, λαβίδων, πλαστικών διάφανων φιαλιδίων και γυάλινων διανομέων. Επιπλέον, με την χρήση φλόγιστρου και αιθανόλης επιτυγχανόταν η αποστείρωση των διανομέων που χρησιμοποιούνταν για διασπορά του δείγματος στα τρυβλία, ενώ με την χρήση αιθανόλης αποστειρωνόταν και ο πάγκος στον οποίο πραγματοποιείτο καταμέτρηση των μικροοργανισμών.

Σημειώνεται ότι ο εμβολιασμός των τρυβλίων και η προετοιμασία τους πριν αυτά τοποθετηθούν στον θάλαμο επώασης, γινόταν πάντοτε σε θάλαμο νηματικής ροής μετά την αποστείρωση αυτού και των περιεχομένων του με υπεριώδη ακτινοβολία για 20 λεπτά.

Τέλος, η εξωτερική αποστείρωση του αντιδραστήρα αλλά και των γύρω από αυτόν πάγκων γινόταν με αιθανόλη πριν από την διεξαγωγή οποιουδήποτε πειράματος.

4. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αναμφισβήτητα, η ετερογενής αντιμικροβιακή ψευδο-κατάλυση (όπως θα αποδειχτεί παρακάτω), αναμένεται να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στο προσεχές μέλλον, όσον αφορά την επιτυχή αντιμετώπιση παθογόνων βακτηρίων στο νερό αλλά και τον αέρα. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και μέσα από τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αναγνωρίζοντας την αντιμικροβιακή δράση των συντιθέμενων στερεών υλικών Ag/γ-Al₂O₃, Cu/γ-Al₂O₃, Ag-Cu/γ-Al₂O₃, Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ και Ag/QSG έναντι στα βακτήρια που εξετάστηκαν. Ως εκ τούτου, αναλύονται παρακάτω τόσο τα αποτελέσματα δραστηριότητας που λήφθηκαν στα στερεά που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, όσο και τα ευρήματα που προέκυψαν μέσα από τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των στερεών υλικών, καθώς επίσης και τα αποτελέσματα που αφορούν την διερεύνηση του μηχανισμού της αντιμικροβιακής δράσης των εν λόγω υλικών.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ επιβεβαιώθηκε πως η υψηλή βακτηριακή αναστολή που παρατηρείται οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων και της στερεής επιφάνειας ενώ παράλληλα επιχειρήθηκε μια προσπάθεια αποκρυπτογράφησης του κυρίαρχου μηχανισμού μέσω του οποίου συντελείται η θανάτωση των βακτηρίων. Επιβεβαιώθηκε επίσης πως η παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή οφείλεται στη δράση του στερεού υλικού και όχι στην ύπαρξη ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag⁺) στο εκάστοτε επεξεργασμένο διάλυμα. Επίσης, παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα που αφορούν την αναστολή τόσο των κατά gram θετικών βακτηρίων όπως είναι το βακτήριο *E. faecalis*, όσο και των αρνητικών κατά gram βακτηρίων όπως είναι τα βακτήρια *E. coli* και *V. parahaemolyticus* μετά από επεξεργασία με τα υπό μελέτη στερεά.

Επιπρόσθετα, εξετάζεται η επίδραση του υποστρώματος (γ-Al₂O₃, CeO₂-γ-Al₂O₃ και Quarzo Sferico Grigio - QSG) στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των αντίστοιχων στηριζόμενων στερεών υλικών αργύρου (Ag). Επιπλέον, επιχειρώντας μια πιο εμπειριστατωμένη εξέταση του μηχανισμού αναστολής των βακτηρίων, παρατίθενται τα ευρήματα που προέκυψαν μέσα από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις τόσο των βακτηρίων (πριν και μετά από επεξεργασία) όσο και της επιφάνειας των στηριζόμενων υλικών

αργύρου, αλλά και τα αποτελέσματα της φασματοσκοπικής ανάλυσης των εν λόγω στερεών χρησιμοποιώντας υπέρυθρη φασματοσκοπία εξασθενημένης ολικής ανάκλασης.

Ακόμα, εξετάστηκε η πιθανότητα εμπορικής χρήσης της προτεινόμενης μεθόδου της ετερογενούς αντιμικροβιακής ψευδο-κατάλυσης για την αποστείρωση υδάτινου έρματος των πλοίων στο προσεχές μέλλον. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε προκαταρκτική τεχνοοικονομική μελέτη στην οποία συγκρίνονται οι πλέον εμπορικά χρησιμοποιημένες μέθοδοι για την επεξεργασία του νερού έρματος σε σχέση με την προτεινόμενη λύση που προκύπτει από την παρούσα Διατριβή.

Πέραν της προκαταρκτικής τεχνοοικονομικής μελέτης, πραγματοποιήθηκε πιλοτική δοκιμή της προτεινόμενης τεχνολογίας για την επεξεργασία νερού έρματος πλοίων σε πραγματικές συνθήκες και συγκεκριμένα σε δεξαμενή νερού έρματος του πετρελαιοφόρου πλοίου "Alexandria" χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/QSG. Μέσα από την πιλοτική εφαρμογή εξετάστηκε επίσης η ανάγκη για περαιτέρω εξέλιξη ή και τροποποίηση της εν λόγω μεθόδου ούτως ώστε να επιτυγχάνεται πρωτίστως αποτελεσματική και περιβαλλοντικά φιλική αποστείρωση του νερού έρματος των πλοίων.

4.1. Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός Στερεών Υλικών

4.1.1. Εύρεση Πραγματικής Φόρτισης Μετάλλου (Ag, Cu και Ce)

Με στόχο την εύρεση της πραγματικής φόρτισης (% κ.β.) του άργυρου (Ag), του χαλκού (Cu) και του οξειδίου του δημητρίου (CeO_2) στην επιφάνεια των σφαιριδίων $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της Φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης (AAS) και Φασματοσκοπίας Μάζας - Επαγωγικά Συζευγμένου Πλάσματος (ICP-MS) με τις οποίες αναλύθηκαν τα πλείστα από τα στερεά υλικά που παρασκευάστηκαν στην παρούσα Δ.Δ.

Ο Πίνακας 6 συνοψίζει τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με την τεχνική της Φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης και αφορούν την εξακρίβωση της πραγματικής φόρτισης του άργυρου για τα στερεά $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ με ονομαστική φόρτιση 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β. Ag. Τα αποτελέσματα του Πίνακα 6 φανερώνουν πως οι φορτίσεις άργυρου που ανιχνεύθηκαν μέσω της τεχνικής AAS, απέχουν σημαντικά από τις αντίστοιχες ονομαστικές φορτίσεις αργύρου για κάθε στερεό. Σημειώνεται πως σχετικά μικρές διαφοροποιήσεις από την ονομαστική φόρτιση (μέχρι και $\pm 10\%$), είναι δυνατόν να

οφείλονται είτε στην ακρίβεια του οργάνου είτε σε σφάλματα κατά την διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων που έγιναν για την παρασκευή των απαιτούμενων πρότυπων διαλυμάτων, για την προετοιμασία της καμπύλης βαθμονόμησης, από την οποία προέκυψε η πραγματική φόρτιση αργύρου των στερεών υλικών. Παρ' όλ' αυτά, οι τιμές πραγματικής φόρτισης, που έχουν υπολογιστεί με την μέθοδο AAS, είναι σημαντικά χαμηλότερες από τις ονομαστικές φορτίσεις, γεγονός που ενισχύει ακόμα περισσότερο τη βακτηριοκτόνο δράση του άργυρου, ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές φορτίσεις αφού ακόμα και το υλικό με ονομαστική φόρτιση 0.05% κ.β. Ag παρουσίασε ολοκληρωτική βακτηριακή αναστολή σε αρκετά σύντομο χρονικό διάστημα όπως περιγράφεται σε επόμενα υποκεφάλαια.

Πίνακας 6. Πραγματική φόρτιση των στηριζόμενων υλικών Ag με βάση την τεχνική AAS.

Ονομαστική Φόρτιση Ag (% κ.β.)	Πραγματική Φόρτιση Ag (% κ.β.) (AAS)
0.05	0.021
0.1	0.0496
0.2	0.0894
0.5	0.221
1	0.413

Με βάση τα πιο πάνω, κρίθηκε σκόπιμη η επιβεβαίωση της πραγματικής φόρτισης των στερεών Ag/ γ -Al₂O₃ με ονομαστική φόρτιση 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β. Ag, όπως επίσης και η μελέτη των στερεών Cu/ γ -Al₂O₃ με ονομαστική φόρτιση 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β. Cu χρησιμοποιώντας την τεχνική της φασματοσκοπίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS). Με την εν λόγω τεχνική εξετάστηκε επίσης, εκτός από την πραγματική φόρτιση των μετάλλων της ενεργού φάσης (Ag-Cu/ γ -Al₂O₃ και Ag/CeO₂- γ -Al₂O₃), και η πραγματική φόρτιση του μεταλλοξειδίου εμβάπτισης του υποστρώματος για το στερεό υλικό Ag/CeO₂- γ -Al₂O₃.

Ο Πίνακας 7 συνοψίζει τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί με την τεχνική ICP-MS σε σχέση με την πραγματική φόρτιση των στερεών Ag/ γ -Al₂O₃. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, τα αποτελέσματα αυτά δεν διαφέρουν σημαντικά από τα αποτελέσματα που προέκυψαν

χρησιμοποιώντας την τεχνική AAS. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως ενδεχομένως ο άργυρος αλλά και ο χαλκός να μην προσκολλώνται ικανοποιητικά στο υπόστρωμα με την μέθοδο του υγρού εμποτισμού που χρησιμοποιείται. Εν τούτοις, τα αποτελέσματα του Πίνακα 7 υποδεικνύουν πως μέσω της εμφάνισης του υποστρώματος ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$), χρησιμοποιώντας οξείδιο του δημητρίου (CeO_2), επιτυγχάνεται αρκετά καλή επικάλυψη και προσκόλληση του μεταλλοξειδίου, και δη του CeO_2 , στο υπόστρωμα. Περεταίρω αξίζει να αναφερθεί πως από την σύγκριση της πραγματικής φόρτισης των στερεών $\text{Cu}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ με την πραγματική φόρτιση των στερεών υλικών $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ για τις ίδιες ονομαστικές φορτίσεις, η ποσότητα χαλκού που προσκολλάται στο υπόστρωμα είναι στατιστικά η ίδια με την ποσότητα αργύρου και, ως εκ τούτου, ο βαθμός επιτυχίας της τεχνικής εμποτισμού δεν φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του μετάλλου.

Πίνακας 7. Πραγματική φόρτιση μετάλλου των παρασκευασθέντων στερεών με βάση την τεχνική ICP-MS.

Στερεό υλικό	Ονομαστική Φόρτιση (% κ.β.)			Πραγματική Φόρτιση (% κ.β.) ICP-MS		
	Ag	Cu	Ce	Ag	Cu	Ce
$\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	0.05	---	---	0.0245	---	---
	0.1	---	---	0.0474	---	---
	0.2	---	---	0.0901	---	---
	0.5	---	---	0.282	---	---
	1	---	---	0.428	---	---
$\text{Cu}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	---	0.05	---	---	0.0186	---
	---	0.1	---	---	0.0394	---
	---	0.2	---	---	0.0805	---
	---	0.5	---	---	0.224	---
	---	1	---	---	0.387	---
$\text{Ag-Cu}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	0.5	0.5	---	0.277	0.246	---
$\text{Ag}/\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	1	---	5	0.562	---	6.14

Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δραστηριότητα των στερεών υλικών που παρασκευάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής (βλέπε κεφ. 4.2.1.), αποδεικνύουν πως ακόμα και σε πολύ χαμηλές φορτίσεις μετάλλου, και κυρίως άργυρου, μπορούν να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις αναστολής των εξεταζόμενων μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε πολύ καλή συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία στην οποία αναφέρεται η αυξημένη τοξικότητα (αντιμικροβιακή δράση) ορισμένων μη χρήσιμων για τα κύτταρα μετάλλων, ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις [16] [17] [18] [19].

4.1.2. Προσδιορισμός Ειδικής Επιφάνειας (B.E.T.)

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Προσδιορισμού Ειδικής Επιφάνειας (B.E.T.), κατέστη εφικτός ο προσδιορισμός της ειδικής (ολικής) επιφάνειας (m^2/g) και του μεγέθους των πόρων των στερεών (σφαιριδίων $\gamma-Al_2O_3$) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική εργασία. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατίθενται συγκριτικά στον παρακάτω Πίνακα 8. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, η ειδική επιφάνεια των υπό μελέτη στερεών 0.05 - 1% κ.β. Ag/ $\gamma-Al_2O_3$ κυμαίνεται από 194 έως 199 m^2/g , ενώ η ειδική επιφάνεια των στερεών υλικών 0.05 - 1% κ.β. Cu/ $\gamma-Al_2O_3$ κυμαίνεται από 196 έως 202 m^2/g . Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν την σταδιακή ελάττωση (σε πολύ μικρό βαθμό) της ειδικής επιφάνειας των στερεών υλικών με αύξηση της φόρτισης του μετάλλου, ενώ παρατηρούνται ελαφρώς χαμηλότερες ειδικές επιφάνειες στην περίπτωση των στηριζόμενων στερεών Cu. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στην καλύτερη προσκόλληση του άργυρου (Ag) στο υπόστρωμα σε σύγκριση με το χαλκό (Cu). Όπως έχει αποδειχθεί και μέσα από τα αποτελέσματα προσδιορισμού της πραγματικής φόρτισης των μετάλλων (Ag, Cu) που παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Παρ' όλ' αυτά, φαίνεται ξεκάθαρα ότι τόσο ο όγκος, όσο και το μέγεθος των πόρων της $\gamma-Al_2O_3$ δεν επηρεάζονται σημαντικά από τη διεργασία εναπόθεσης του μετάλλου, γεγονός το οποίο μπορεί να θεωρηθεί αναμενόμενο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 8, η εμφάνιση του υποστρώματος με CeO_2 (καταλύτης Ag/ CeO_2 - $\gamma-Al_2O_3$) επηρέασε, σε μικρό αλλά σημαντικό βαθμό, τόσο τον όγκο όσο και το μέγεθος των πόρων του οξειδίου του αργυρίου. Επομένως, οι προσαρμοσμένες μέθοδοι του υγρού εμποτισμού και της εμφάνισης του υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας

διδασκατορικής διατριβής μπορούν να θεωρηθούν επιτυχημένες. Παρ' όλ' αυτά οι συνθήκες σύνθεσης, των στερεών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα Δ.Δ., πιθανόν να μην είναι οι βέλτιστες, αφού η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών σύνθεσης των εν λόγω υλικών δεν αποτελούσε στόχο και δεν διερευνήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ.

Πίνακας 8. Ειδική επιφάνεια, όγκος και μέγεθος των πόρων των στερεών που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ.

Στερεό υλικό	B.E.T. (m ² /g)	Όγκος Πόρων (mL/g)
0.05% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃	199	45.8
0.1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃	199	45.1
0.2% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃	196.5	45
0.5% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃	195	44.9
1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃	194	44.6
0.05% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃	202	47.3
0.1% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃	200	46.7
0.2% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃	198	45.9
0.5% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃	197	45
1% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃	196	44.9
0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃	195	44.8
1% κ.β. Ag/CeO ₂ -γ-Al ₂ O ₃	172	39.9

4.2. Αντιμικροβιακή Δραστηριότητα

Στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. διερευνήθηκε η αντιμικροβιακή συμπεριφορά των μεταλλικών στηριζόμενων στερεών που παρασκευάστηκαν (Ag/γ-Al₂O₃, Cu/γ-Al₂O₃, Ag-Cu/γ-Al₂O₃, Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ και Ag/QSG) όσον αφορά την αναστολή βακτηριακών διαλυμάτων *E. coli*, *E. faecalis* και *V. parahaemolyticus* σε θερμοκρασία δωματίου [40] [207] [149]. Υπενθυμίζεται ότι τα εν λόγω βακτήρια-δείκτες, μαζί με τα επιτρεπόμενα όρια τους στο νερό έρματος, περιλαμβάνονται στον "κανονισμό D2" του "Παραρτήματος 4" της

συνθήκης του Διεθνή Οργανισμού Ναυσιπλοΐας (IMO) που αφορά τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων [114].

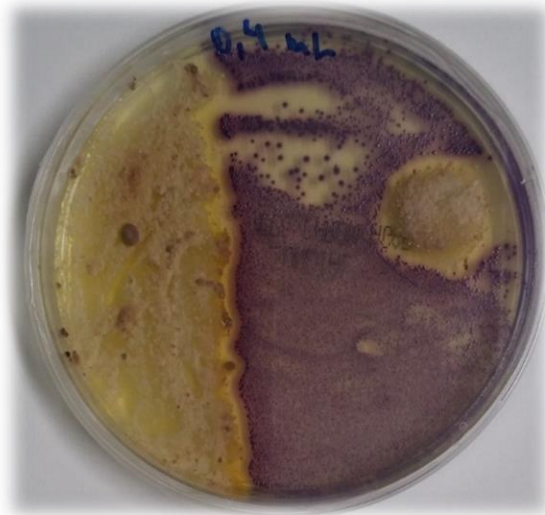
4.2.1. Αργυρόγραμμα στο Στερεό Υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃

Για την προκαταρκτική αξιολόγηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του άργυρου, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή "αργυρογράμματος" σε τρυβλία εκλεκτικού υποστρώματος CHROMagar E.C.C., μέσω διασποράς πυκνού εμβολίου *E. coli*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται αρχικά ο θρυμματισμός μερικών κόκκων του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ ούτως ώστε να προκύψει μια λεπτόκοκκη σκόνη η οποία τοποθετείται στην επιφάνεια εκλεκτικού υποστρώματος CHROMagar E.C.C. Πριν από την προσθήκη του κονιορτοποιημένου στερεού στην επιφάνεια του υποστρώματος πραγματοποιείται με την μέθοδο της διασποράς εμβολίου η προσθήκη και εξάπλωση πυκνού εμβολίου του βακτηρίου *E. coli* όγκου 1 mL (αντί για 0,1 mL που συνήθως διασπείρεται με την εν λόγω μέθοδο), σε ολόκληρη την επιφάνεια του τρυβλίου. Το εμβόλιο βακτηρίων προέκυπτε μετά από διάλυση λυοφιλοποιημένου σφαιριδίου *E. coli* σε αποστειρωμένο νερό χωρίς περεταίρω αραιώσεις ούτως ώστε να επιτευχθεί εξαιρετικά μεγάλη αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών για τους σκοπούς του συγκεκριμένου πειράματος.

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως η συγκεκριμένη τεχνική ποιοτικού κυρίως ελέγχου της βακτηριοκτόνου δράσης ποικίλων αντιμικροβιακών παραγόντων, αποτελεί μια αρκετά συνηθισμένη πρακτική κατά τον έλεγχο και εντοπισμό της ενδεικνυόμενης συγκέντρωσης σε διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα όπως τα αντιβιοτικά. Η συγκέντρωση και η δράση του εκάστοτε φαρμάκου-αντιβιοτικού διαπιστώνεται καθώς αυτό διαχέεται ακτινωτά γύρω από ένα διηθητικό χαρτί το οποίο προηγουμένως εμποτίζεται με το εξεταζόμενο αντιβιοτικό και τοποθετείται στην επιφάνεια εκλεκτικού τρυβλίου. Κάπως έτσι δημιουργείται μια ευδιάκριτη ζώνη αναστολής της μικροβιακής αύξησης γύρω από το αντιβιοτικό που καλείται συνολικά ως "αντιβιογράμμα" [195].

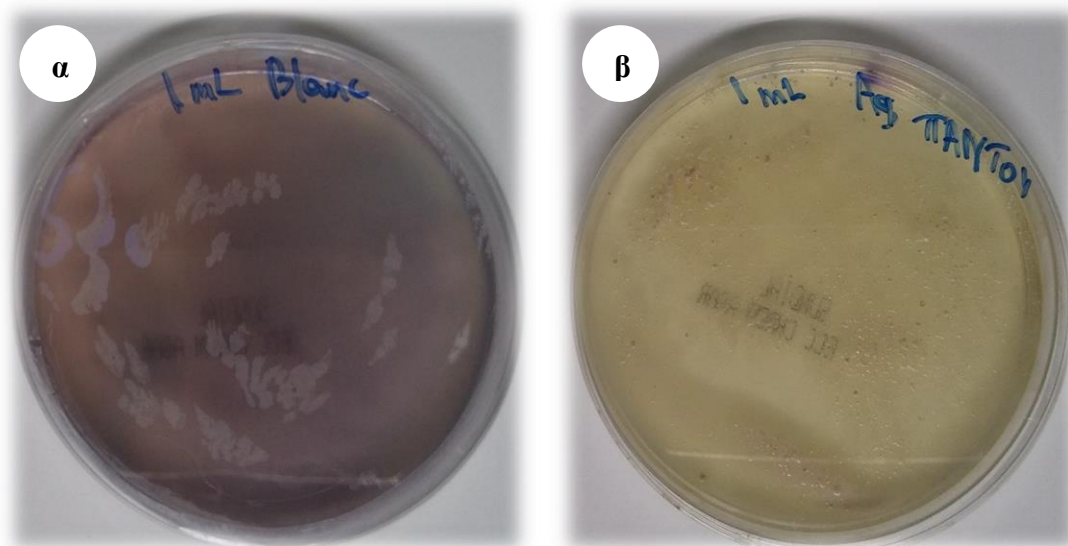
Αναφορικά με το "αργυρόγραμμα" που πραγματοποιήθηκε για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, κατόπιν της διασποράς εμβολίου πραγματοποιείται η διασπορά του θρυμματισμένου στερεού υλικού σε συγκεκριμένα σημεία ή περιοχές του εκλεκτικού

υποστρώματος όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1 όπου επιχειρήθηκε η επικάλυψη του μισού σχεδόν τρυβλίου με το στερεό αργύρου καθώς και η τοποθέτηση του σε ένα συγκεκριμένο σημείο στην πλευρά η οποία δεν ήταν επικαλυμμένη πλήρως με στερεό υλικό. Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 4.1, στις περιοχές του υποστρώματος στις οποίες προηγήθηκε προσθήκη του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ παρεμποδίστηκε και αναστάληκε η ανάπτυξη αποικιών του βακτηρίου *E. coli* μετά την επώαση του για 24 ώρες σε θερμοκρασία 37°C, παρά την αρχικά αυξημένη συγκέντρωση τους. Ιδιαίτερα εμφανής είναι επίσης η περιοχή γύρω από τον διάσπαρτο υλικό (Σχήμα 4.1 – δεξιά) στην οποία δεν παρατηρείται οποιαδήποτε ανάπτυξη βακτηρίων, υποδεικνύοντας ξεκάθαρα την ύπαρξη ισχυρών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων από το εξεταζόμενο στερεό.



Σχήμα 4.1. "Αργυρόγραμμα". Παρεμπόδιση της ανάπτυξης αποικιών του βακτηρίου *E. coli* μετά την τοποθέτηση κονιορτοποιημένου στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ σε μέρος του υποστρώματος.

Στη συνέχεια, για σκοπούς καλύτερης αξιολόγησης πραγματοποιήθηκε η διασπορά του κονιορτοποιημένου στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ σε ολόκληρη την επιφάνεια υποστρώματος σε ένα από δύο τρυβλία στα οποία προηγουμένως πραγματοποιήθηκε διασπορά πυκνού εμβολίου *E. coli* όγκου 1 mL. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.2 και αναδεικνύουν ξεκάθαρα τις ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες του αργύρου (Ag), ακόμα και σε αρκετά χαμηλή συγκέντρωση, τουλάχιστον όσο αφορά τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια *E. coli*.



Σχήμα 4.2. α) Ανεπηρέαστη ανάπτυξη των αποικιών του βακτηρίου *E. coli* μετά από διασπορά εμβολίου όγκου 1 mL, β) Ολοκληρωτική παρεμπόδιση της ανάπτυξης των αποικιών του βακτηρίου *E. coli* μετά την τοποθέτηση κονιορτοποιημένου στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος.

Τέλος, με στόχο την παρατήρηση των ευδιάκριτων ζωνών αναστολής της μικροβιακής αύξησης γύρω από το διάσπαρτο στερεό (Ag/γ-Al₂O₃), πραγματοποιήθηκε η επανειλημμένη σημειακή τοποθέτηση κονιορτοποιημένου στερεού υλικού σε εκλεκτικό υπόστρωμα στο οποίο προηγήθηκε διασπορά πυκνού εμβολίου *E. coli* όπως και προηγουμένως. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.3 όπου παρατηρείται ξεκάθαρα η δημιουργία αντιμικροβιακών ζωνών γύρω από τα σημεία που τοποθετήθηκε το στερεό Ag/γ-Al₂O₃, γεγονός που ενισχύει ακόμα περισσότερο τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του εν λόγω στερεού.



Σχήμα 4.3. Παρεμπόδιση της ανάπτυξης των αποικιών του βακτηρίου *E. coli* και ανάπτυξη αντιμικροβιακών ζωνών μετά την τοποθέτηση κονιορτοποιημένου στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ σε συγκεκριμένα σημεία της επιφάνειας του θρεπτικού υποστρώματος.

4.2.2. Επίδραση της Φόρτισης Αργύρου στις Αντιμικροβιακές Ιδιότητες των Μονομεταλλικών Στηριζόμενων Στερεών Ag/γ-Al₂O₃

Με σκοπό την καταρχήν ποσοτικοποίηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των συντιθέμενων στερεών Ag/γ-Al₂O₃, μελετήθηκε αρχικά στερεό με μια τυπική (σύμφωνα με αντίστοιχα στερεά που χρησιμοποιούνται βιομηχανικά σε άλλες εφαρμογές) φόρτιση μετάλλου (1% κ.β.). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας 4 gr του εν λόγω στερεού επεξεργάστηκε ποσότητα υδατινού διαλύματος συνολικού όγκου 180 mL, που περιείχε 0,1 mL εμβολίου *E. coli*, το οποίο προέκυψε από διάλυση λυοφιλοποιημένου σφαιριδίου *E. coli* σε αποστειρωμένο νερό, για 2 ώρες (τελικός χρόνος παραμονής). Δείγματα από το επεξεργασμένο νερό λαμβάνονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα και έπειτα από την καλλιέργεια τους σε εκλεκτικά τρυβλία, με την μέθοδο της διασποράς εμβολίου, καταμετρήθηκαν οι αποικίες μετά από 24 ώρες επώασης σε θερμοκρασία 37°C. Σημειώνεται πως για σκοπούς σύγκρισης, πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα χρησιμοποιώντας μόνο σφαιρίδια υποστρώματος (4 gr γ-Al₂O₃) αλλά και τυφλά πειράματα (χωρίς 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ ή γ-Al₂O₃), όπως περιγράφεται προηγουμένως. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται συγκριτικά στον Πίνακα 9.

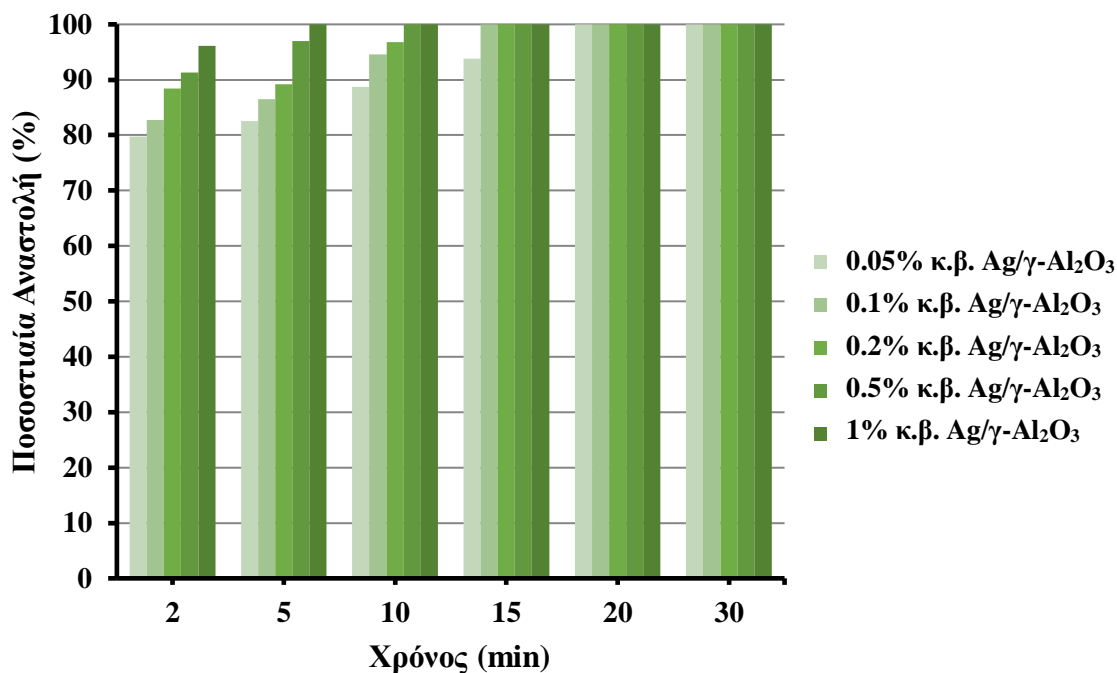
Πίνακας 9. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. coli* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	<i>Τυφλό Πείραμα (Blanc)</i> <i>E. coli</i> (cfu) – 24h
0	278	295	290
2	53	293	293
5	2	289	298
10	0	296	291
20	0	297	295
30	0	293	303
40	0	292	296
60	0	294	295
80	0	297	292
100	0	294	301
120	0	298	299

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 9, γίνεται αντιληπτό πως το συντιθέμενο μονομεταλλικό στηριζόμενο στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ διαθέτει αξιοπρόσεκτες αντιμικροβιακές ιδιότητες τουλάχιστον όσο αφορά, στην προκειμένη περίπτωση, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια *E. coli*. Η σχεδόν ολοκληρωτική αναστολή των βακτηρίων που παρατηρήθηκε από τα πρώτα πέντε λεπτά, επιβεβαιώνει την ισχυρή δράση του αργύρου ως αντιμικροβιακού παράγοντα. Επίσης διαπιστώνεται πως το υπόστρωμα (γ-Al₂O₃) δεν φαίνεται να παρουσιάζει οποιαδήποτε αντιμικροβιακή δραστηριότητα καθώς η βακτηριακή αναστολή που προέκυψε, μετά από 120 λεπτά επεξεργασίας, ήταν μηδενική.

Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την προκαταρκτική ποσοτικοποίηση της δραστηριότητας του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, εξετάστηκαν στη συνέχεια όλα τα στηριζόμενα στερεά που αναπτύχθηκαν με διαφορετικές φορτίσεις Ag. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τις ίδιες πειραματικές συνθήκες προσδιορίστηκε ο χρόνος για την επίτευξη πλήρους αναστολής των μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί παρουσιάζονται συγκριτικά στο Σχήμα 4.4, το οποίο παρουσιάζει την ποσοστιαία

αναστολή των βακτηρίων που προσδιορίστηκε στο κάθε στερεό συναρτήσει του χρόνου επεξεργασίας του εκάστοτε βακτηριακού διαλύματος.



Σχήμα 4.4. Ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E.coli* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος με τα στερεά x% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ (x = 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 % κ.β.). Συνθήκες αντίδρασης: w_s=4 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Σχήματος 4.4, προκύπτει ότι με αύξηση της φόρτισης Ag αυξάνεται ελαφρώς και η δραστηριότητα των στερεών x% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Επίσης, όπως ήταν αναμενόμενο και όπως προκύπτει και μέσα από το Σχήμα 4.4, η επίτευξη πλήρους αναστολής των βακτηρίων επιτυγχάνεται σε διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας για κάθε στερεό υλικό και συγκεκριμένα με αύξηση της φόρτισης της ενεργού φάσης, ελαττώνεται ο χρόνος επίτευξης πλήρους βακτηριακής αναστολής.

Παρ' όλ' αυτά, σύμφωνα με τα τελευταία αποτελέσματα, ακόμα και στο στερεό με την χαμηλότερη φόρτιση μετάλλου είναι δυνατόν να επιτευχθεί πλήρης αναστολή των μικροοργανισμών από τα πρώτα 20 λεπτά επεξεργασίας. Για τον λόγο αυτό, και έτσι ώστε να μπορεί να επιτευχθεί λεπτομερέστερη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των υπό μελέτη στερεών, επιλέχθηκε η χρήση του στερεού με φόρτιση 1% κ.β. σε Ag, ενώ η μάζα του στερεού που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που ακολούθησαν καθορίστηκε στο 1

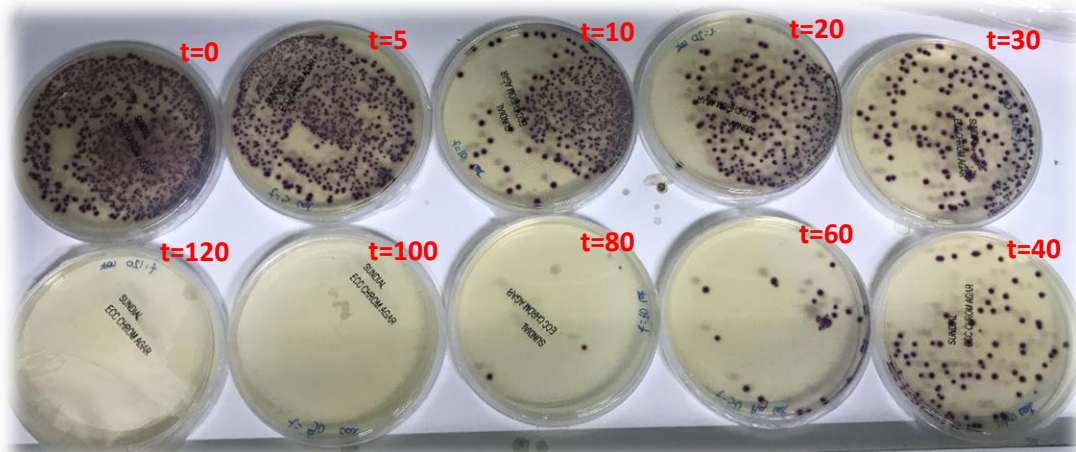
gr. Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης 1 gr του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας 180 mL βακτηριακού διαλύματος *E. coli*, συγκριτικά με την αναστολή που προέκυψε χρησιμοποιώντας μόνο σφαιρίδια υποστρώματος (1gr γ-Al₂O₃) αλλά και στα τυφλά πειράματα.

Πίνακας 10. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. coli* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

Χρόνος Δειγματοληψίας (min)	1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	Τυφλό Πείραμα (Blanc) <i>E. coli</i> (cfu) – 24h
0	289	294	293
2	268	301	299
5	221	296	291
10	192	297	295
20	146	300	294
30	96	293	299
40	55	298	298
60	22	299	304
80	3	295	291
100	0	289	302
120	0	294	301

Με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 10 γίνεται προφανές πως ο Άργυρος (ακίνητοποιημένος ή/και ενδεχομένως ιοντικός άργυρος (Ag⁺) που εκπλένεται από την επιφάνεια του στερεού Ag/γ-Al₂O₃), ασκεί σημαντική αντιμικροβιακή δράση θανατώνοντας σχεδόν όλα τα υπάρχοντα βακτήρια *E. coli*, σε χρονικό διάστημα μικρότερο των δύο ωρών κατά το οποίο λαμβάνονταν δείγματα από το επεξεργασμένο βακτηριακό διάλυμα όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.5.

Πέραν της αντιμικροβιακής ενεργότητας του στηριζόμενου άργυρου (Ag/γ-Al₂O₃), στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. εξετάστηκε επίσης και η αντιμικροβιακή απόδοση των εν λόγω στερεών έναντι στο *Enterococcus faecalis*, ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, το οποίο αποτελεί το δεύτερο μικροοργανισμό που περιλαμβάνεται στο σχετικό κανονισμό της MARPOL για την επεξεργασία του νερού έρματος των πλοίων [177].



Σχήμα 4.5. Επωασθήσες αποικίες σε δείγματα που λήφθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος *E. coli* με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃.

Για την μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε επίσης 1 gr του στερεού υλικού με την υψηλότερη φόρτιση μετάλλου (1% κ.β.) για την επεξεργασία 180 mL υδατικού διαλύματος που περιείχε 0,1 mL εμβολίου *E. faecalis* μετά από κατάλληλη αραιώση και το οποίο προέκυψε από διαλυτοποίηση λυοφιλοποιημένου σφαιριδίου *E. faecalis* σε αποστειρωμένο νερό, όπως και στην περίπτωση του βακτηρίου *E. coli*.

Όπως και προηγουμένως, λήφθηκαν δείγματα από το επεξεργασμένο διάλυμα σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα και ακολούθησε καλλιέργεια τους σε εκλεκτικά τρυβλία Enterococcus Pfizer Selective Agar με την μέθοδο της διασποράς εμβολίου. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά από 24 ώρες επώασης στη θερμοκρασία των 37°C, παρουσιάζονται συγκριτικά στον Πίνακα 11 (σε σχέση με τα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας μόνο 1gr σφαιρίδια γ-Al₂O₃ αλλά και στα τυφλά πειράματα).

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 11 υποδεικνύουν την ύπαρξη σημαντικής αντιμικροβιακής δραστηριότητας του υπό μελέτη μονομεταλλικού στηριζόμενου στερεού (Ag/γ-Al₂O₃), αφού είναι φανερή η θανάτωση των θετικών κατά Gram βακτηρίων *E. faecalis* με την πάροδο του χρόνου (Σχήμα 4.6). Επίσης, όπως διαπιστώνεται και για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, το υπόστρωμα (γ-Al₂O₃) δεν φαίνεται να παρουσιάζει οποιαδήποτε αντιμικροβιακή δραστηριότητα αφού η βακτηριακή αναστολή ήταν μηδενική. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί η σαφώς μειωμένη ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* που προκύπτει με το πέρας 120 λεπτών (77%), σε σχέση με την πλήρη αναστολή που

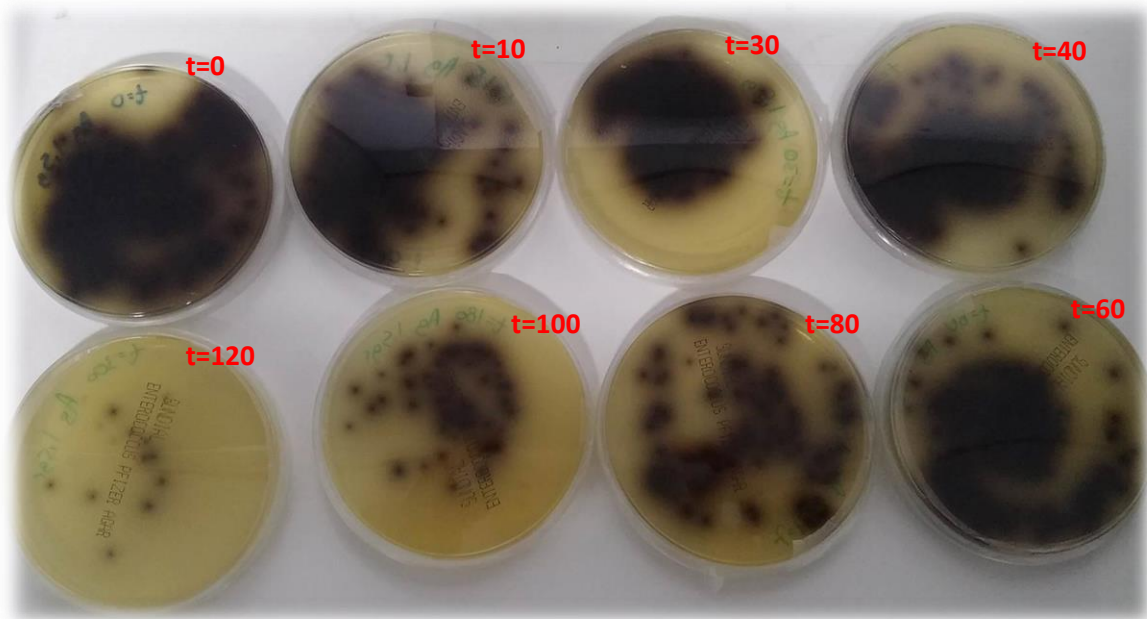
καταγράφηκε σε λιγότερα από 100 λεπτά επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος *E. coli* (Πίνακας 10), χρησιμοποιώντας την ίδια μάζα στερεού (1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃).

Πίνακας 11. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. faecalis* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	<i>1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ E. faecalis (cfu) – 24h</i>	<i>γ-Al₂O₃ E. faecalis (cfu) – 24h</i>	<i>Τυφλό Πείραμα (Blanc) E. faecalis (cfu) – 24h</i>
0	296	286	297
2	287	284	304
5	275	289	289
10	259	287	292
20	234	294	291
30	212	295	292
40	186	299	294
60	177	289	298
80	156	291	297
100	121	290	300
120	68	294	296

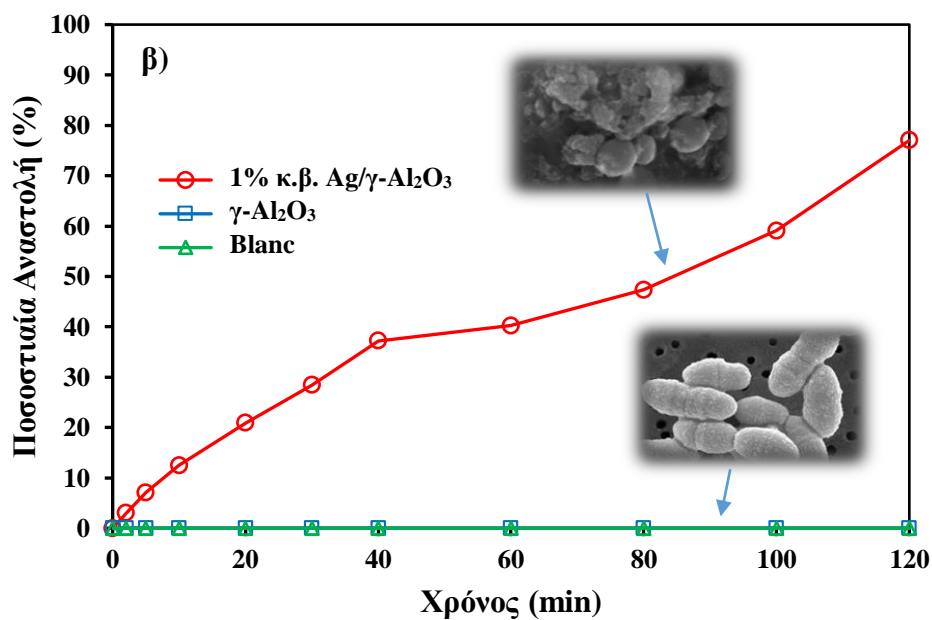
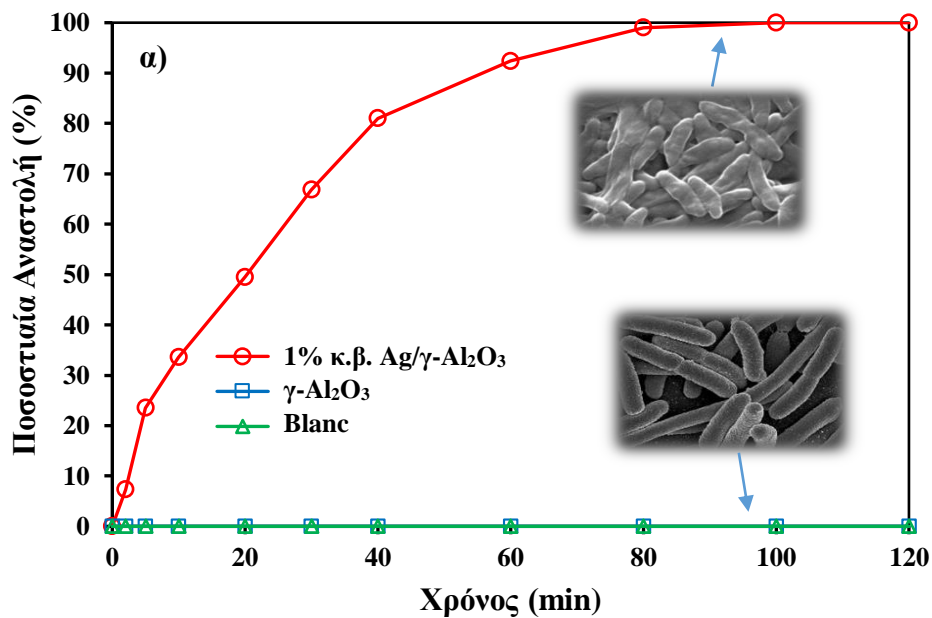
Η μειωμένη αντιμικροβιακή απόδοση του στερεού Ag/γ-Al₂O₃ έναντι του βακτηρίου *E. faecalis* βρίσκεται σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία όπου αναφέρεται η ύπαρξη αρνητικότερου φορτίου στην μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, λόγω κυρίως του εξαιρετικά ανιοντικού χαρακτήρα των εξωπολυσακχαριτών που προσδένονται σε αυτήν, σε σύγκριση με το χαμηλότερο αρνητικό φορτίο της κυτταρικής μεμβράνης των θετικών κατά Gram βακτηρίων [159]. Για τον λόγο μάλιστα αυτό και εξαιτίας της ενισχυμένης εξωκυτταρικής τους μεμβράνης, τα θετικά κατά Gram βακτήρια παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή σε μια πληθώρα αντιβιοτικών παραγόντων. Στην προκειμένη περίπτωση, το αρνητικότερο φορτίο της εξωκυτταρικής μεμβράνης των *E. coli*, αναμένεται να έλκεται σε μεγαλύτερο βαθμό από το θετικό φορτίο της επιφάνειας του

στερεού Ag/γ-Al₂O₃, το οποίο υφίσταται λόγω της ύπαρξης οξειδωμένων κρυσταλλιτών αργύρου (Ag^{δ+}).



Σχήμα 4.6. Επωασθήσες αποικίες σε δείγματα που λήφθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος *E. faecalis* με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃.

Με βάση τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.7 τα συγκριτικά αποτελέσματα για την αναστολή των βακτηρίων *E. coli* και *E. faecalis* συναρτήσει του χρόνου επεξεργασίας, που παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, σφαιρίδια γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα απουσία στερεού υλικού και γ-αλούμινας (blanc). Όπως παρατηρείται στο Σχήμα 4.7, το υπό μελέτη μονομεταλλικό στερεό (1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃), παρουσιάζει σημαντικά υψηλή αναστολή τόσο για τα αρνητικά (*E. coli*), όσο και για τα θετικά (*E. faecalis*) κατά Gram βακτήρια. Συγκεκριμένα, για το βακτήριο *E. coli* παρατηρείται πλήρης πρακτικά αναστολή μετά από 80 λεπτά επεξεργασίας ενώ η αναστολή του *E. faecalis* ήταν 47.3% για το ίδιο χρονικό διάστημα. Σημειώνεται ότι η αναστολή χρησιμοποιώντας σφαιρίδια γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα, μπορεί να θεωρηθεί ως ανύπαρκτη και για τα δύο βακτήρια. Επίσης, η αναστολή των βακτηρίων και στις δύο περιπτώσεις, επιβεβαιώνεται από μικροσκοπικές παρατηρήσεις επεξεργασμένων μικροβιακών διαλυμάτων που αναλύονται εκτενέστερα στη συνέχεια (υποκεφάλαιο 4.3).



Σχήμα 4.7. (α) αναστολή των βακτηρίων *E. coli* κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, σφαιρίδια γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα, και, (β) αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, σφαιρίδια γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα. Συνθήκες αντίδρασης για (α) και (β): w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm.

Το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Vibrio parahemolyticus* είναι το τρίτο βακτήριο που μελετήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. και το τρίτο που περιλαμβάνεται στο σχετικό κανονισμό της MARPOL για την επεξεργασία του νερού έρματος των πλοίων [177]. Όπως και προηγουμένως, μελετήθηκε η δυνατότητα αναστολής του συγκεκριμένου βακτηρίου, χρησιμοποιώντας 1 gr του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ για την επεξεργασία 180 mL βακτηριακού διαλύματος που περιείχε 0,3 mL εμβολίου *V. parahemolyticus* μετά από κατάλληλη αραιώση και το οποίο προέκυψε μετά από διαλυτοποίηση του κατάλληλου λυοφιλοποιημένου σφαιριδίου σε αποστειρωμένο νερό. Η αυξημένη ποσότητα αρχικού εμβολίου (0,3 mL) σε σύγκριση με τις περιπτώσεις των βακτηρίων *E. coli* και *E. faecalis*, οφείλεται στην χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση του εν λόγω βακτηρίου στο αρχικό εμβόλιο.

Μετά από τακτική λήψη δειγμάτων από το επεξεργασμένο βακτηριακό διάλυμα, σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, και έπειτα από καλλιέργεια των δειγμάτων σε εκλεκτικά τρυβλία *Vibrio* T.C.B.S. Agar, με την μέθοδο της διασποράς εμβολίου, λήφθηκαν, μετά από 24 ώρες επώασης σε θερμοκρασία 37°C, τα αποτελέσματα που καταγράφονται στον Πίνακα 12. Για σκοπούς σύγκρισης, πραγματοποιήθηκαν επίσης τυφλά πειράματα.

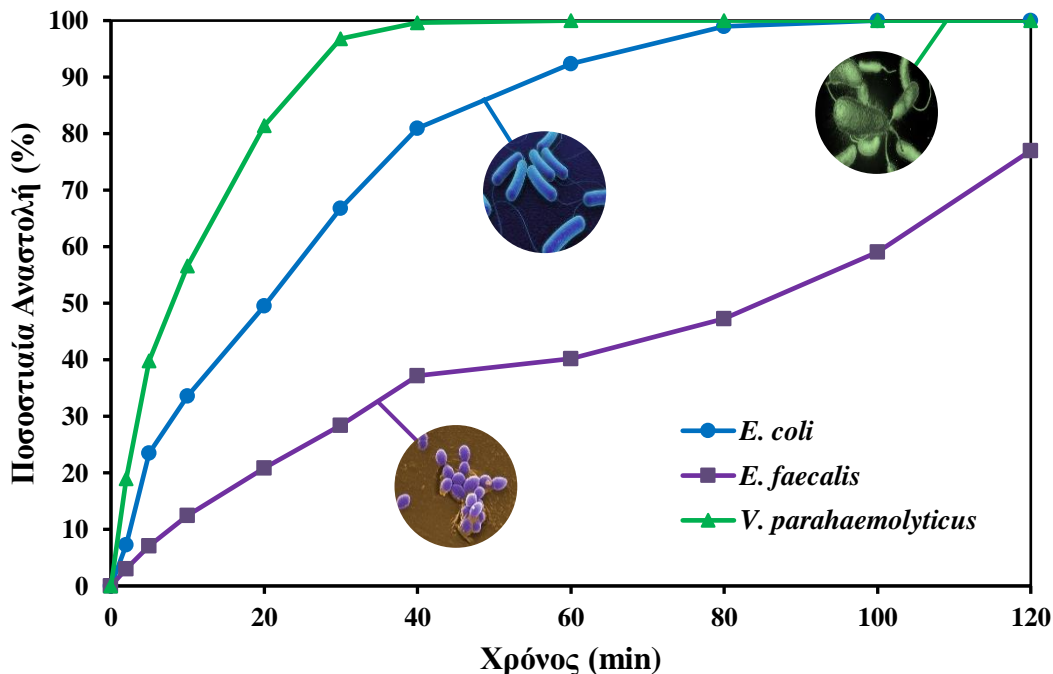
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 12 παρατηρείται αρχικά αυξημένη ευαισθησία του βακτηρίου *V. Parahemolyticus* έναντι στον ακινητοποιημένο άργυρο (Ag/γ-Al₂O₃) καθώς επιτυγχάνεται σχεδόν πλήρης αναστολή των βακτηρίων από τα πρώτα 30 λεπτά επεξεργασίας. Σημειώνεται ότι παρά την αυξημένη ποσότητα αρχικού εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε για το βακτήριο *V. Parahemolyticus*, ο αρχικός αριθμός των αποικιών του (t=0) εμφανίζεται μειωμένος σε σχέση με τον αντίστοιχο αριθμό των άλλων δύο υπό εξέταση βακτηρίων.

Εν τούτοις, εξ' αιτίας του ότι το βακτήριο *Vibrio parahemolyticus* ανήκει στην ομάδα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως και το βακτήριο *E. coli*, παρατηρείται σημαντικά αυξημένη ποσοστιαία αναστολή, σε σχέση κυρίως με το *E. faecalis*, για τους ίδιους χρόνους επεξεργασίας με το στερεό Ag/γ-Al₂O₃.

Πίνακας 12. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *V. parahaemolyticus* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ <i>V. parahaemolyticus</i> (cfu) – 24h	<i>Τυφλό Πείραμα (Blanc)</i> <i>V. parahaemolyticus</i> (cfu) – 24h
0	221	218
2	179	216
5	133	221
10	96	224
20	41	219
30	7	222
40	1	218
60	0	217
80	0	214
100	0	224
120	0	228

Στο Σχήμα 4.8 παρουσιάζεται συγκριτικά η ποσοστιαία αναστολή που λήφθηκε, στο πλαίσιο των πιο πάνω πειραμάτων, για κάθε βακτήριο, το οποίο έτυχε επεξεργασίας (κάτω από τις ίδιες συνθήκες) με το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.8, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια *E. coli* και *V. parahaemolyticus* εμφανίζονται να είναι περισσότερο ευαίσθητα έναντι στον ακινητοποιημένο άργυρο, σε σχέση με το θετικό κατά Gram βακτήριο *E. faecalis*. Συγκεκριμένα, ο χρόνος επίτευξης πλήρους αναστολής για τα βακτηριακά διαλύματα *E. coli* και *V. parahaemolyticus* είναι 80 και 40 λεπτά αντίστοιχα. Αντίθετα, στην περίπτωση του βακτηριακού διαλύματος *E. faecalis* δεν επιτυγχάνεται πλήρης αναστολή, ακόμα και μετά από 120 λεπτά (συνολική διάρκεια πειράματος) επεξεργασίας με το στερεό Ag/γ-Al₂O₃. Η επιτευχθείσα αναστολή του *E. faecalis* μετά από 120 λεπτά επεξεργασίας ανέρχεται στο 77% (Σχήμα 4.8).



Σχήμα 4.8. Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli*, *E. faecalis* και *V. parahaemolyticus*, σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων με το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.

4.2.3. Επίδραση της χημικής σύστασης του υποστρώματος

Με στόχο την εξέταση της συμβολής της χημικής σύστασης του υποστρώματος στην βακτηριακή αναστολή που προκύπτει, πραγματοποιήθηκαν αντιμικροβιακά πειράματα χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ το οποίο παρασκευάστηκε με εμφάπτιση του υποστρώματος (γ-Al₂O₃) με 5% κ.β. οξειδίου του δημητρίου (CeO₂). Συγκεκριμένα, με το εν λόγω στερεό, και για σκοπούς σύγκρισης με την αναστολή που παρουσίασε το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, επεξεργάστηκαν μικροβιακά διαλύματα *E. coli* και *E. faecalis*.

Η αναστολή του βακτηρίου *E. coli* μελετήθηκε χρησιμοποιώντας 1 gr του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ για την επεξεργασία 180 mL βακτηριακού διαλύματος, υπό τις ίδιες ακριβώς συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν στην περίπτωση του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃.

Μετά από τακτική λήψη δειγμάτων από το επεξεργασμένο βακτηριακό διάλυμα, σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα, και έπειτα από καλλιέργεια των δειγμάτων σε εκλεκτικά υποστρώματα CHROMagar E.C.C., με την μέθοδο της διασποράς εμβολίου, λήφθηκαν, μετά από 24 ώρες επώασης σε θερμοκρασία 37°C, τα αποτελέσματα που καταγράφονται στον Πίνακα 13. Για σκοπούς σύγκρισης, πραγματοποιήθηκαν επίσης αντιμικροβιακά πειράματα χρησιμοποιώντας μόνο σφαιρίδια υποστρώματος (1gr CeO₂-γ-Al₂O₃) αλλά και τυφλά πειράματα.

Πίνακας 13. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. coli* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

<i>Χρόνος Δειματοληψίας (min)</i>	1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	CeO₂-γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	<i>Τυφλό Πείραμα (Blanc)</i> <i>E. coli</i> (cfu) – 24h
0	291	288	291
2	262	289	294
5	221	293	289
10	164	296	297
20	113	299	299
30	58	294	293
40	25	292	292
60	2	286	288
80	0	291	296
100	0	294	303
120	0	290	299

Σύμφωνα με τον Πίνακα 13, το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ παρουσιάζει σημαντικά αυξημένη αντιμικροβιακή δραστηριότητα συγκριτικά με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Συγκεκριμένα, για το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ επιτεύχθηκε πρακτικά πλήρης βακτηριακή αναστολή των βακτηρίων μετά από 60 λεπτά επεξεργασίας ενώ για το στηριζόμενο υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ ο αντίστοιχος χρόνος επίτευξης πλήρους αναστολής ήταν τα 80 λεπτά. Επίσης, η αναστολή των βακτηρίων *E. coli* που επιτεύχθηκε για το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ προκύπτει υψηλότερη για όλα τα χρονικά

σημεία που εξετάστηκαν, κατά την διάρκεια του συνολικού χρόνου επεξεργασίας, σε σχέση με την αντίστοιχη αναστολή του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃.

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ εξετάστηκε επίσης έναντι στα θετικά κατά Gram βακτήρια *E. faecalis*.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά από 24 ώρες επώασης στη θερμοκρασία των 37°C, παρουσιάζονται συγκριτικά στον Πίνακα 14 (σε σχέση με τα αποτελέσματα χρησιμοποιώντας μόνο 1gr σφαιρίδια CeO₂-γ-Al₂O₃ αλλά και στα τυφλά πειράματα).

Πίνακας 14. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. faecalis* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

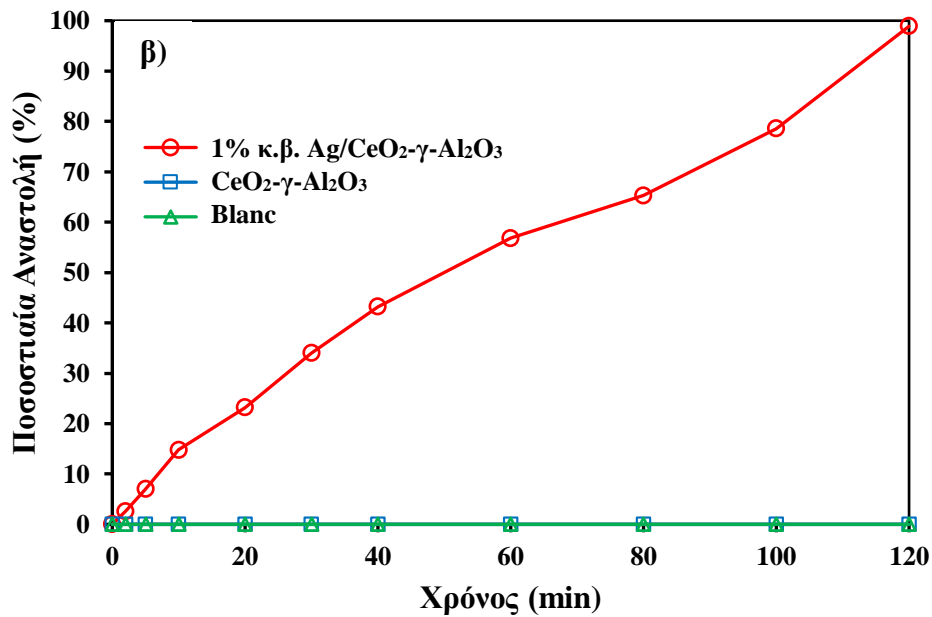
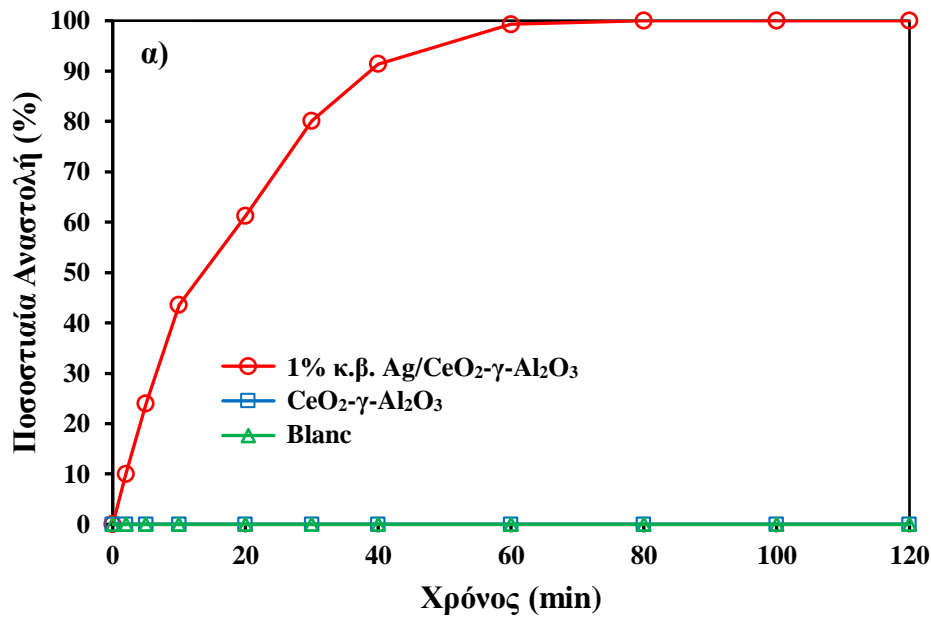
Χρόνος Δειγματοληψίας (min)	1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ <i>E. faecalis</i> (cfu) – 24h	CeO₂-γ-Al₂O₃ <i>E. faecalis</i> (cfu) – 24h	Τυφλό Πείραμα (Blanc) <i>E. faecalis</i> (cfu) – 24h
0	271	278	281
2	264	282	284
5	252	276	282
10	231	275	286
20	208	284	287
30	179	281	289
40	154	288	292
60	117	286	287
80	94	293	286
100	58	289	294
120	3	292	299

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 14, επιβεβαιώνεται ότι το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ παρουσιάζει υψηλότερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα, συγκριτικά με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Συγκεκριμένα, η αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που επιτεύχθηκε με το πέρας του τελικού χρόνου επεξεργασίας (120 λεπτά) χρησιμοποιώντας το στηριζόμενο υλικό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ ήταν 98,9% ενώ η αναστολή του εν λόγω βακτηρίου που επιτεύχθηκε στον ίδιο χρόνο επεξεργασίας χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ ήταν 77%.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η χημική σύσταση του υποστρώματος μπορεί να επηρεάζει την αντιμικροβιακή δραστηριότητα που προκύπτει σε κάθε αντιμικροβιακό πείραμα. Κάτι τέτοιο πιθανόν να οφείλεται στην επίτευξη υψηλότερης πραγματικής φόρτισης μετάλλου (Ag), όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 7, όπου η πραγματική φόρτιση του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ (0,562% κ.β.) ήταν σαφώς υψηλότερη από την πραγματική φόρτιση του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ (0,428% κ.β.).

Επιπρόσθετα, η αυξημένη αναστολή τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων πιθανόν να οφείλεται και στην ιδιαιτερότητα που παρουσιάζει στη δομή του το οξείδιο του δημητρίου (CeO₂). Συγκεκριμένα το οξείδιο του δημητρίου παρουσιάζει κενές θέσεις οξυγόνου στην επιφάνεια και την εσωτερική του δομή, κάτι που μπορεί να διατηρεί τον άργυρο που βρίσκεται στην επιφάνεια του στερεού υλικού διαρκώς οξειδωμένο (Ag⁺). Γίνεται έτσι ευκολότερη και με πιο γρήγορο ρυθμό η προσέλκυση της αρνητικά φορτισμένης εξωκυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, κάτι που αποτελεί το πρώτο βήμα του μηχανισμού βακτηριακής αναστολής, όπως αναλύεται στα επόμενα κεφάλαια της παρούσας Δ.Δ. (κεφάλαιο 4.3.).

Στο Σχήμα 4.9 παρουσιάζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα για την αναστολή των βακτηρίων *E. coli* (8α) και *E. faecalis* (8β) συναρτήσεως του χρόνου επεξεργασίας, που επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας 1 gr του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃, σφαιρίδια υποστρώματος CeO₂-γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα (blanc). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν πως η προκύπτουσα βακτηριακή αναστολή οφείλεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των μεταλλικών στηριζόμενων στερεών, οι οποίες επηρεάζονται από την σύσταση του υποστρώματος.



Σχήμα 4.9. (α) αναστολή των βακτηρίων *E. coli* κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃, σφαιρίδια CeO₂-γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα, και, (β) αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃, σφαιρίδια CeO₂-γ-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα. Συνθήκες αντίδρασης για (α) και (β): w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm.

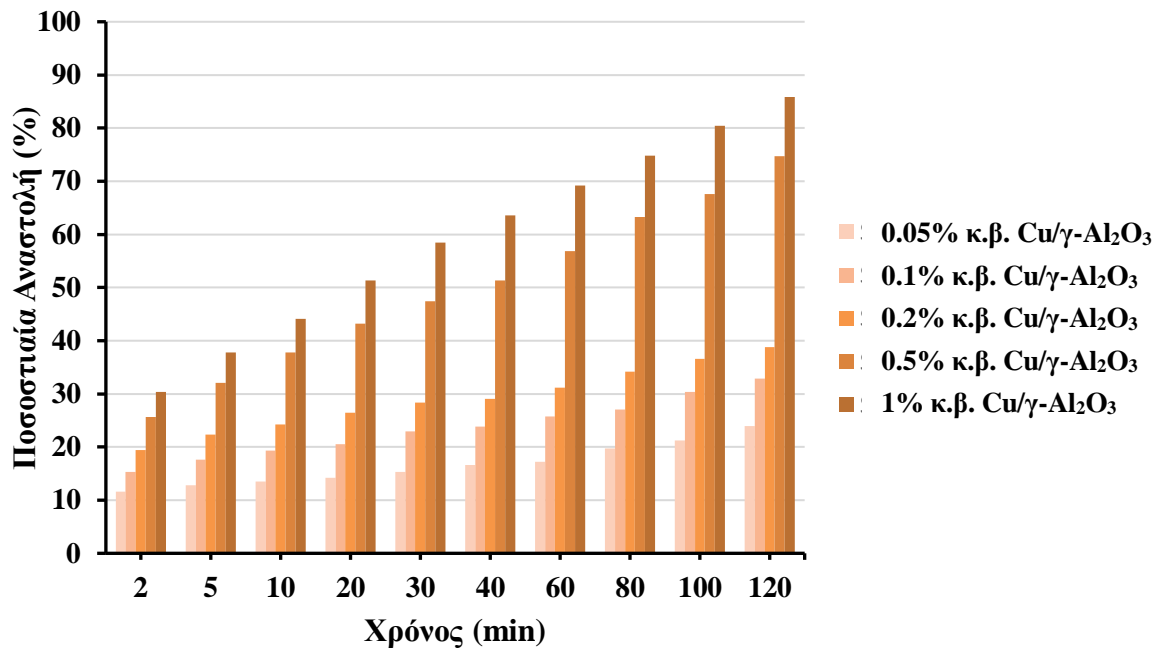
4.2.4. Επίδραση της Φόρτισης Cu στις Αντιμικροβιακές Ιδιότητες των Μονομεταλλικών Στηριζόμενων Στερεών Cu/ γ -Al₂O₃

Εκτός από τις γνωστές και εις βάθος μελετημένες αντιμικροβιακές ιδιότητες του άργυρου (υπό την μορφή διαλύματος ή νανοσωματιδίων) ορισμένα ιόντα άλλων μετάλλων όπως ο χαλκός παρουσιάζουν αξιοπρόσεχτες αντιμικροβιακές ιδιότητες οι οποίες αξιοποιούνται σε ένα σημαντικό αριθμό εφαρμογών [16] [17] [25] [208] [209]. Στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. αναπτύχθηκε σειρά μονομεταλλικών στηριζόμενων στερεών Cu/ γ -Al₂O₃ με φορτίσεις μετάλλου 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β., χρησιμοποιώντας την καταλλήλως προσαρμοσμένη μέθοδο του υγρού εμποτισμού που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 3.1., με σκοπό την μελέτη των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων, ως προς τα υπό μελέτη βακτήρια.

Με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης φόρτισης Cu, στα αναπτυχθέντα στερεά x% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃, μελετήθηκε το κάθε υλικό χωριστά ως προς τις αντιμικροβιακές ιδιότητες που παρουσιάζει σε μικροβιακό διάλυμα *E. coli*, χρησιμοποιώντας τις ίδιες ακριβώς πειραματικές συνθήκες.

Συγκεκριμένα, 4 gr του εκάστοτε στερεού υλικού (x% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃) χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία 180 mL, μικροβιακού διαλύματος σε συνθήκες περιβάλλοντος (T=25 °C, P=1 atm, ροή αέρα). Κάθε μικροβιακό διάλυμα περιείχε 0,1 mL εμβολίου *E.coli*, όπως ακριβώς και στην περίπτωση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των στερεών x% κ.β. Ag/ γ -Al₂O₃ (για σκοπούς σύγκρισης). Τα αποτελέσματα όσον αφορά την ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων, που λήφθηκαν σε κάθε στερεό συναρτήσει του χρόνου επεξεργασίας του εκάστοτε μικροβιακού διαλύματος, παρουσιάζονται συγκριτικά στο Σχήμα 4.10.

Ο προσδιορισμός της ποσοστιαίας αναστολής σε κάθε χρονική στιγμή προέκυψε μέσα από την λήψη δειγμάτων επεξεργασμένου νερού ανά τακτά χρονικά διαστήματα και έπειτα από την καλλιέργεια των δειγμάτων σε εκλεκτικά τρυβλία με την μέθοδο της διασποράς εμβολίου (βλέπε υποκεφάλαιο 3.2. για λεπτομέρειες).



Σχήμα 4.10. Ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E.coli* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος με τα στερεά x% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ (x = 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 % κ.β.). Συνθήκες αντίδρασης: w_s=4 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.10, παρομοίως με την περίπτωση των στερεών x% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ (Σχήμα 4.4.), έτσι και ο χαλκός παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Εν τούτοις, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των Πινάκων 1 και 3, προκύπτει ότι η αναστολή που επιτυγχάνεται για κάθε φόρτιση μετάλλου στην περίπτωση των στερεών Cu/γ-Al₂O₃ είναι σαφώς μικρότερη από την αναστολή που επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τα στερεά Ag/γ-Al₂O₃ για ολόκληρο το χρονικό διάστημα της αντιμικροβιακής επεξεργασίας (2 ώρες). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως ακόμα και στην περίπτωση του στερεού με την υψηλότερη φόρτιση Cu (1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃), δεν επιτυγχάνεται πλήρης αναστολή του βακτηρίου *E. coli* μετά από 2 ώρες επεξεργασίας, σε αντίθεση με την περίπτωση των στερεών x% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, όπου όλα τα στερεά, ανεξαιρέτως φόρτισης μετάλλου, παρουσίασαν πλήρη βακτηριακή αναστολή μετά από μόλις 20 λεπτά επεξεργασίας.

Τέλος, όπως και στην περίπτωση των στερεών Ag, έτσι και στην περίπτωση των στερεών υλικών Cu, παρατηρείται αύξηση της αντιμικροβιακής δραστηκότητας των στερεών με

αύξηση της φόρτισης του Cu. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Σχήματος 4.10, Η επίδραση της φόρτισης του μετάλλου φαίνεται να γίνεται εντονότερη για φορτίσεις Cu μεγαλύτερες του 0.2% κ.β. Οι πραγματικοί λόγοι που οδηγούν στα πιο πάνω αποτελέσματα θα συζητηθούν διεξοδικά σε επόμενο υποκεφάλαιο, όπου θα γίνει ανάλυση του μηχανισμού της αντιμικροβιακής διεργασίας (κεφ. 4.3.).

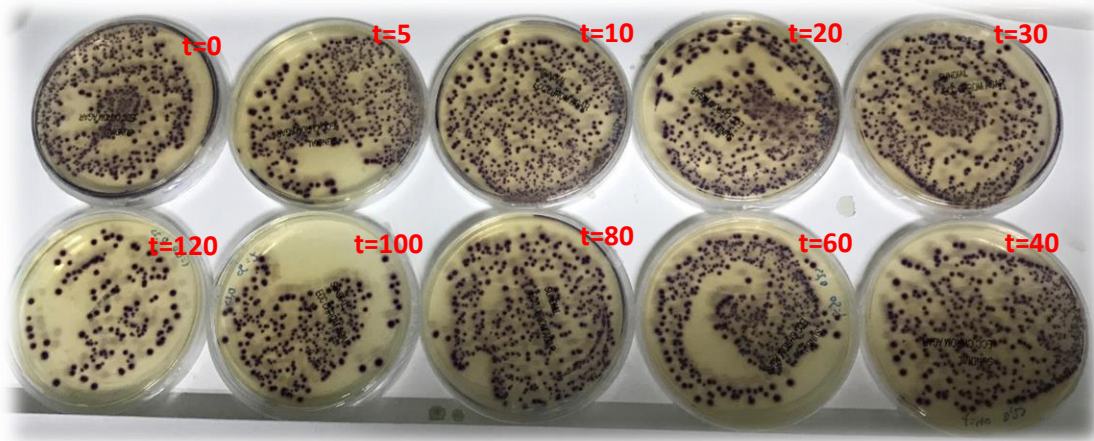
Με σκοπό την ακριβέστερη σύγκριση της δραστικότητας του στερεού 1% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃ σε σχέση με την αντιμικροβιακή δραστηριότητα του στερεού 1% κ.β. Ag/ γ -Al₂O₃ όσο και για την εκτενέστερη εξέταση του μηχανισμού αναστολής του συγκεκριμένου βακτηρίου, πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας 1 gr του υλικού με την υψηλότερη φόρτιση μετάλλου (1% κ.β. Cu), για την επεξεργασία του ίδιου όγκου μικροβιακού διαλύματος *E. coli*. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 15 (συγκριτικά με τα αποτελέσματα του τυφλού πειράματος).

Πίνακας 15. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. coli* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

Χρόνος Δειγματοληψίας (min)	1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	Τυφλό Πείραμα (Blanc) <i>E. coli</i> (cfu) – 24h
0	276	288
2	269	287
5	258	279
10	244	286
20	217	293
30	199	295
40	186	292
60	155	289
80	129	296
100	111	294
120	95	291

Τα αποτελέσματα τόσο του Πίνακα 15 όσο και του Σχήματος 4.10 υποδεικνύουν πως το επαγόμενο από το χαλκό, στρες στο οποίο υπόκεινται τα βακτηριακά κύτταρα της *E. coli*, φαίνεται να είναι ευκολότερα διαχειρίσιμο και αντιμετώπισιμο μέσω των μηχανισμών

αποτοξικοποίησης που διαθέτουν τα κύτταρα, σε σχέση με την αντίστοιχη τοξικότητα που προκαλείται εξαιτίας των υλικών άργυρου. Κάτι τέτοιο πιθανώς να οφείλεται και στα εξαιρετικά αμυντικά συστήματα που αναπτύχθηκαν από τα προκαρυωτικά κύτταρα με στόχο την ρύθμιση και ομοιόσταση της συγκέντρωσης συγκεκριμένων μετάλλων τα οποία χρησιμοποιούνται για καθοριστικές κυτταρικές διεργασίες [144] [208].



Σχήμα 4.11. Επωασθήσες αποικίες σε δείγματα που λήφθηκαν σε διαφορετικούς χρόνους επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος *E. coli* με το στερεό 1% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃.

Ακολούθως, όπως έγινε και στην περίπτωση των στερεών Ag/ γ -Al₂O₃, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του υλικού 1% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃ ως προς την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. faecalis* όγκου 180 mL χρησιμοποιώντας 1 gr από το εν λόγω στερεό υλικό. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 16, παρατηρείται σημαντικά μειωμένη ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* συναρτήσει του χρόνου επεξεργασίας που, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, αποδίδεται κατά κύριο λόγο στη διαφορετική μορφολογία της εξωκυτταρικής του μεμβράνης, σε σχέση με το βακτήριο *E. coli*. Σημειώνεται ότι αντίστοιχη συμπεριφορά είχε παρατηρηθεί και στην περίπτωση του στερεού 1% κ.β. Ag/ γ -Al₂O₃.

Πίνακας 16. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. faecalis* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ <i>E. faecalis</i> (cfu) – 24h	<i>Τυφλό Πείραμα (Blanc) <i>E. faecalis</i> (cfu) – 24h</i>
0	283	292
2	277	293
5	271	299
10	266	289
20	249	294
30	234	293
40	218	298
60	201	301
80	184	303
100	171	290
120	156	297

Επιπλέον, τα αποτελέσματα του Πίνακα 16 που καταδεικνύουν, όπως και προηγουμένως, ότι η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του υπό μελέτη μονομεταλλικού στηριζόμενου στερεού 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ είναι σαφώς ασθενέστερη από την αντιμικροβιακή δραστηριότητα που παρουσίασε το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Σημειώνεται ότι η ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* που προκύπτει με το πέρας 120 λεπτών ήταν μόλις 44.8%, σε σχέση με την ποσοστιαία αναστολή που καταγράφηκε κατά την επεξεργασία υδάτινου διαλύματος που περιείχε βακτήρια *E. coli* (65.6%), χρησιμοποιώντας την ίδια μάζα στερεού υλικού με την ίδια φόρτιση (1% κ.β. Cu).

Ωστόσο, η έστω και μικρή (αλλά σημαντική) αναστολή των υπό εξέταση θετικών κατά Gram βακτηρίων *E. faecalis*, υποδεικνύει πως ο στηριζόμενος χαλκός (ίσως σε αυξημένες συγκεντρώσεις) θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ένας αντιμικροβιακός παράγοντας.

Τέλος, με σκοπό την απόκτηση μιας πιο ολοκληρωμένης εικόνας, όσον αφορά την αντιμικροβιακή απόδοση του στερεού 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃, μελετήθηκε η αντιμικροβιακή του δραστηριότητα έναντι του αρνητικού κατά Gram βακτηρίου *V. parahemolyticus*.

Συγκεκριμένα, 1 gr του στερεού 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ για την επεξεργασία 180 mL όγκου μικροβιακού διαλύματος που περιείχε 0,3 mL εμβολίου *V. parahemolyticus* μετά από κατάλληλη αραιώση. Υπενθυμίζεται πως η αυξημένη ποσότητα αρχικού εμβολίου (0,3 mL) σε σύγκριση με τις περιπτώσεις των βακτηρίων *E. coli* και *E. faecalis*, οφείλεται στην χαμηλότερη συγκέντρωση του εν λόγω βακτηρίου (υγιή κύτταρα) στο αρχικό (μητρικό) μικροβιακό διάλυμα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν συνοψίζονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *V. parahemolyticus* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

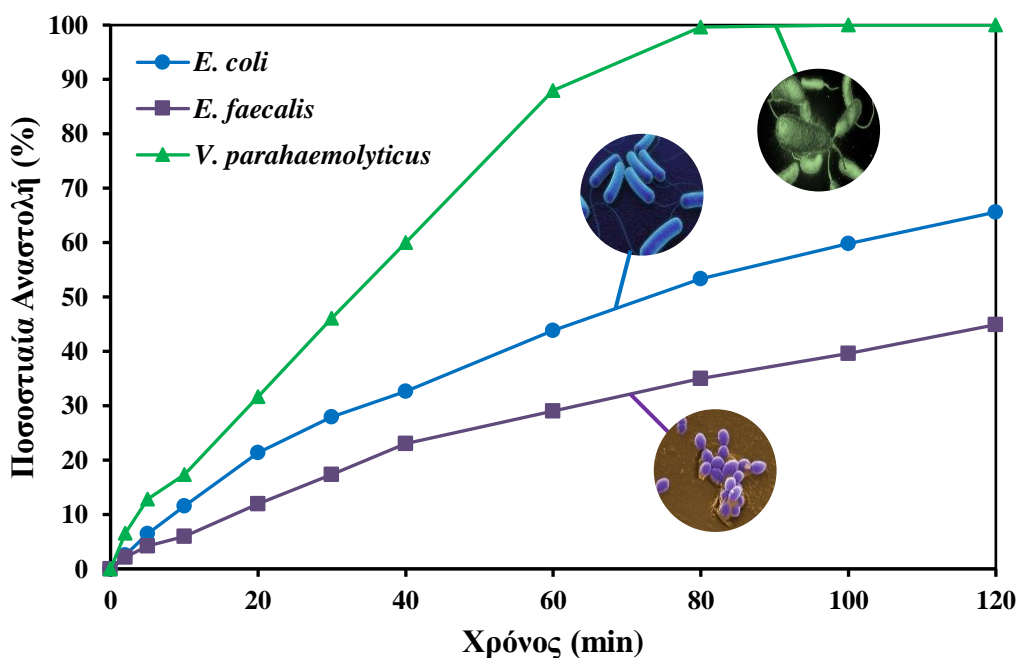
<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	<i>1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ V. parahemolyticus (cfu) – 24 h</i>	<i>Τυφλό Πείραμα (Blanc) V. parahemolyticus (cfu) – 24 h</i>
0	243	251
2	227	246
5	212	248
10	201	253
20	166	254
30	131	244
40	97	247
60	29	255
80	1	256
100	0	252
120	0	249

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 17 επιβεβαιώνουν την αυξημένη ευαισθησία που παρουσιάζει το βακτήριο *V. Parahemolyticus* (σε σχέση με τα *E. coli* και *E. faecalis*) απέναντι στον ακινητοποιημένο χαλκό καθώς επιτυγχάνεται πρακτικά πλήρης αναστολή του βακτηρίου μετά από 80 λεπτά επεξεργασίας. Παρ' όλ' αυτά επιβεβαιώνεται επίσης η μικρότερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα του στηριζόμενου χαλκού (1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃) έναντι της αντίστοιχης δραστηριότητας του στηριζόμενου αργύρου (1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃). Ενδεικτικά αναφέρεται πως η πλήρης αναστολή του βακτηρίου *V. Parahemolyticus* στην περίπτωση επεξεργασίας του με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, είχε

πρακτικά επιτευχθεί μετά από μόλις 30 λεπτά επεξεργασίας. Βέβαια, στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί η ελαφρώς χαμηλότερη πραγματική φόρτιση μετάλλου που επιτυγχάνεται με την μέθοδο του υγρού εμποτισμού για τα στερεά Cu/γ-Al₂O₃ σε σχέση με την φόρτιση μετάλλου που επιτυγχάνεται για τα υλικά Ag/γ-Al₂O₃, για την ίδια ονομαστική φόρτιση μετάλλου. Η μειωμένη πραγματική φόρτιση χαλκού στα αντίστοιχα στερεά (Cu/γ-Al₂O₃) ενδεχομένως να επιφέρει και μειωμένη βακτηριακή αναστολή. Παρ' όλ' αυτά, η μικρή διαφορά στη φόρτιση μετάλλου (≈ 10%) δεν μπορεί να εξηγήσει την μεγάλη διαφορά στη δραστικότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των στερεών 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ για όλους τους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν.

Σημειώνεται ότι παρά την αυξημένη ποσότητα αρχικού εμβολίου του βακτηρίου *V. Parahaemolyticus*, ο αρχικός αριθμός των αποικιών του (t=0) είναι μικρότερος σε σχέση με τα άλλα δύο υπό εξέταση βακτήρια. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει επίσης την αυξημένη ευαισθησία του εν λόγω μικροοργανισμού, αφού φαίνεται πως η συγκέντρωση των υγιών κυττάρων που εμπεριέχονται στο λυοφιλοποιημένο σφαιρίδιο είναι σαφώς μικρότερη από την αντίστοιχη συγκέντρωση για τους μικροοργανισμούς *E. coli* και *E. faecalis*.

Στο Σχήμα 4.12 παρουσιάζεται συγκριτικά η ποσοστιαία αναστολή που έχει επιτευχθεί για κάθε υπό μελέτη βακτήριο χρησιμοποιώντας το υλικό 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.12, μετά από 120 λεπτά επεξεργασίας η αναστολή που επιτεύχθηκε για το θετικό κατά Gram βακτήριο *E. faecalis* έφτασε το 44,9% ενώ η αναστολή των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων *E. coli* και *V. parahaemolyticus* ήταν σαφώς υψηλότερη και έφτασε το 65,6% και 100%, αντίστοιχα.



Σχήμα 4.12. Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli*, *E. faecalis* και *V. parahaemolyticus*, σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων με το στερεό υλικό 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.

4.2.5. Διμεταλλικά στηριζόμενα στερεά (Ag-Cu/γ-Al₂O₃)

Λαμβάνοντας υπόψιν τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που έχουν ληφθεί στα μονομεταλλικά στηριζόμενα στερεά Ag και Cu, παρασκευάστηκε διμεταλλικός στηριζόμενος καταλύτης (Ag-Cu κ.β./γ-Al₂O₃) με σκοπό την διερεύνηση της ύπαρξης πιθανής συνέργιας μεταξύ των δύο μεταλλικών φάσεων (Ag και Cu) όσον αφορά την υπό μελέτη αντιμικροβιακή διεργασία, έναντι των μικροοργανισμών *E.coli* και *E. faecalis*.

Ως εκ τούτου, μέσω της προσαρμοσμένης μεθόδου του υγρού εμποτισμού, παρασκευάστηκε στερεό Ag-Cu/γ-Al₂O₃ με ονομαστική φόρτιση Cu και Ag 0.5% κ.β., έκαστος. Για σκοπούς άμεσης σύγκρισης με τα προηγούμενα υπό μελέτη στερεά, χρησιμοποιήθηκε 1 gr του εν λόγω διμεταλλικού υλικού για την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. coli* όγκου 180 mL που περιείχε 0,1 mL εμβολίου.

Ο υπολογισμός της ποσοστιαίας αναστολής των βακτηρίων, στο χρονικό διάστημα επεξεργασίας των 2 ωρών, έγινε κατορθωτός μετά από λήψη δειγμάτων ανά τακτά χρονικά

διαστήματα όπως αναφέρεται σε λεπτομέρεια προηγουμένως (υποκεφάλαιο 3.2.). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. coli* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 0.5% κ.β Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	0.5% κ.β Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	<i>Τυφλό Πείραμα (Blanc) <i>E. coli</i> (cfu) – 24h</i>
0	281	294
2	266	291
5	241	298
10	220	289
20	186	295
30	146	293
40	118	289
60	84	295
80	60	296
100	43	299
120	16	302

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 18, το στερεό 0.5% κ.β Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Ωστόσο, σημειώνεται πως δεν επιτεύχθηκε πλήρης αναστολή των βακτηρίων στον χρόνο επεξεργασίας που εξετάστηκε, σε αντίθεση με την περίπτωση του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ όπου πλήρης αναστολή των βακτηρίων *E. coli* επιτεύχθηκε μετά από περίπου 80 λεπτά επεξεργασίας (Σχήμα 4.8). Παρ' όλ' αυτά, η αναστολή που παρουσίασε το υπό μελέτη διμεταλλικό στηριζόμενο υλικό ήταν υψηλότερη από την αναστολή που παρουσίασε μεμονωμένα το υλικό 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ για κάθε χρόνο επεξεργασίας. Τα αποτελέσματα αυτά δεν φαίνεται να υποδεικνύουν την ύπαρξη οποιουδήποτε φαινομένου συνέργιας μεταξύ των δύο μεταλλικών φάσεων (Ag και Cu).

Στη συνέχεια εξετάστηκε η αντιμικροβιακή συμπεριφορά του διμεταλλικού στερεού υλικού έναντι στα θετικά κατά Gram βακτήρια, και συγκεκριμένα του βακτηρίου *E.*

faecalis υπό τις συνθήκες που περιεγράφηκαν προηγουμένως. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν καταγράφονται στον Πίνακα 19.

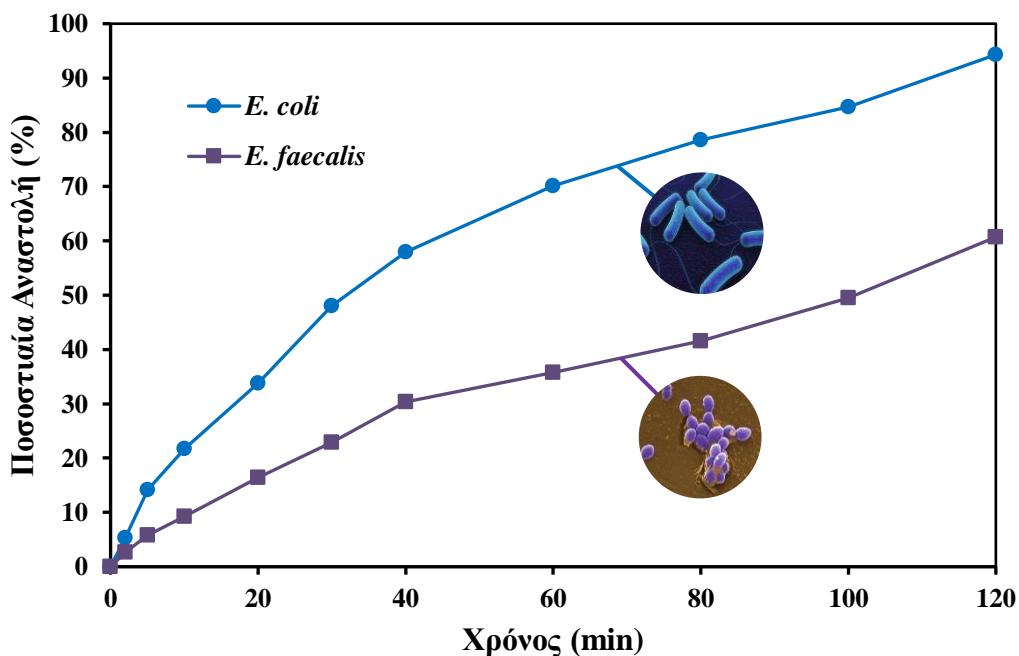
Πίνακας 19. Αριθμός αποικιών βακτηρίου *E. faecalis* σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχου βακτηριακού διαλύματος με το στερεό 0.5% κ.β Ag–0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ και μετά από 24 ώρες επώασης.

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	0.5% κ.β Ag–0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ <i>E. coli</i> (cfu) – 24h	<i>Τυφλό Πείραμα (Blanc)</i> <i>E. coli</i> (cfu) – 24h
0	293	297
2	285	293
5	276	295
10	266	299
20	245	303
30	226	305
40	204	299
60	188	293
80	171	296
100	148	298
120	115	301

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 19 φανερώνουν τη σημαντική δραστηριότητα που παρουσιάζει το διμεταλλικό στερεό 0.5% κ.β Ag–0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ έναντι του βακτηρίου *E. faecalis*. Παρ' όλ' αυτά, όπως και στην περίπτωση του βακτηρίου *E. coli*, η δραστηριότητα του διμεταλλικού στερεού είναι σημαντικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη δραστηριότητα του μονομεταλλικού στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, αλλά σαφώς υψηλότερη από την δραστηριότητα του υλικού 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. Όπως και προηγουμένως, τα αποτελέσματα αυτά δεν φαίνεται να υποδεικνύουν την ύπαρξη οποιουδήποτε φαινομένου συνέργειας μεταξύ των δύο μεταλλικών φάσεων.

Στο Σχήμα 4.13 παρουσιάζεται συγκριτικά η ποσοστιαία αναστολή που προέκυψε για κάθε βακτήριο που επεξεργάστηκε χρησιμοποιώντας το στηριζόμενο υλικό 0.5% κ.β. Ag–0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.13, μετά από 120 λεπτά επεξεργασίας η

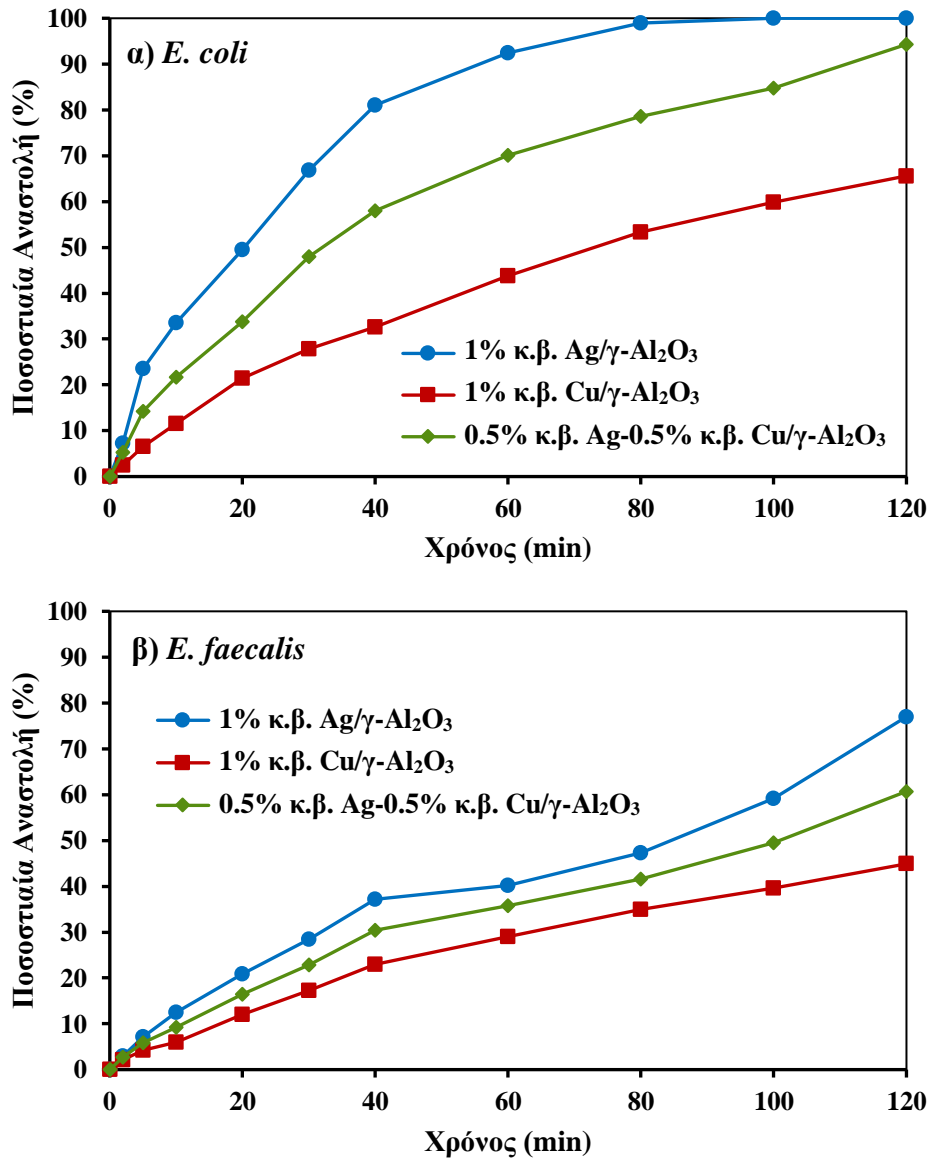
αναστολή για το θετικό κατά Gram βακτήριο *E. faecalis* έφτασε το 60,7% ενώ η αντίστοιχη αναστολή του αρνητικού κατά Gram βακτηρίου ήταν 94,3%.



Σχήμα 4.13. Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli*, *E. faecalis* και *V. parahaemolyticus*, σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων με το στερεό υλικό 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: $w_s=1$ gr, $V_{\text{διαλ.}}=180$ mL, $T=25$ °C, $p=1$ atm, stirring=150 rpm.

Τα αποτελέσματα της βακτηριακής αναστολής που επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τα στερεά που παρασκευάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. (1% κ.β. Ag/ γ -Al₂O₃, 1% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃ και 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃), παρουσιάζονται συγκριτικά στο Σχήμα 4.14 για κάθε βακτήριο ξεχωριστά (*E. coli* και *E. faecalis*). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.14, και για τα δύο υπό μελέτη βακτήρια, η υψηλότερη αναστολή παρατηρήθηκε στην περίπτωση του στερεού 1% κ.β. Ag/ γ -Al₂O₃ ενώ η χαμηλότερη χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Cu/ γ -Al₂O₃. Σημειώνεται πως το διμεταλλικό στηριζόμενο υλικό

0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/ γ - Al_2O_3 , παρουσίασε ενδιάμεση βακτηριακή αναστολή σε σχέση με τα άλλα δύο στερεά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.



Σχήμα 4.14. Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E. coli* (α) και *E. faecalis* (β) σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων με τα στερεά υλικά 1% κ.β. Ag/ γ - Al_2O_3 , 1% κ.β. Cu/ γ - Al_2O_3 και 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/ γ - Al_2O_3 . Συνθήκες αντίδρασης: $w_s=1$ gr, $V_{\text{διαλ.}}=180$ mL, $T=25$ °C, $p=1$ atm, stirring=150 rpm.

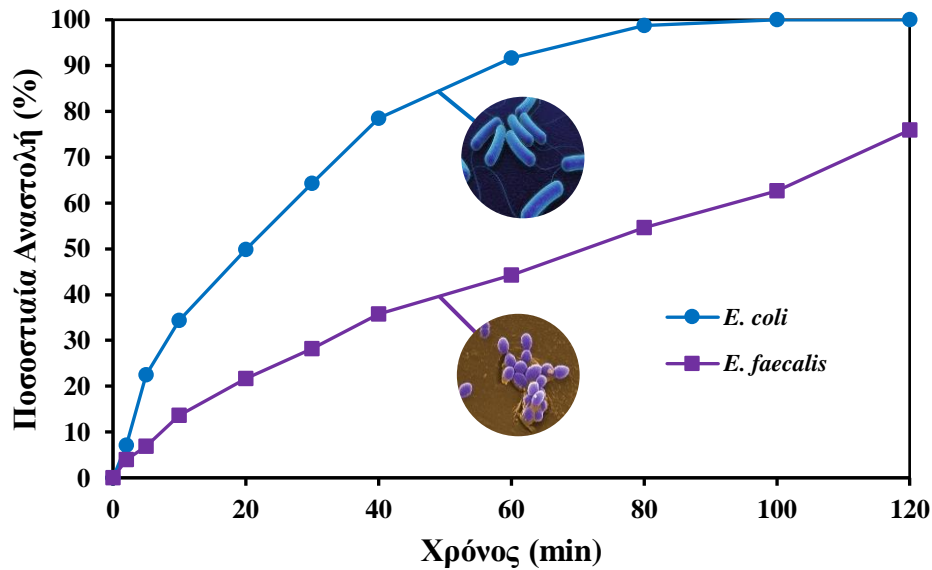
Λαμβάνοντας έτσι υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα και σε συνδυασμό με την βακτηριακή ποσοστιαία αναστολή που παρουσίασαν τα προηγούμενα στερεά υλικά που εξετάστηκαν (1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ και 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃) στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, επιλέχθηκε εν τέλει το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ για την περαιτέρω εξέταση της αντιμικροβιακής συμπεριφοράς του. Σε όλα τα πειράματα που ακολούθησαν χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο στερεό. Σημειώνεται πως το εν λόγω στερεό υλικό παρουσίασε την υψηλότερη ποσοστιαία αναστολή και για τα 3 βακτήρια που εξετάστηκαν στο συντομότερο χρονικό διάστημα κατά την διάρκεια των 2 ωρών επεξεργασίας.

4.2.6. Επίδραση του Θαλασσινού Νερού

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, υπάρχει σήμερα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την εύρεση νέων/καινοτόμων τεχνολογιών για την επεξεργασία του υδάτινου έρματος των πλοίων.

Ως εκ τούτου προκειμένου να διακριβωθεί η συμπεριφορά και η ενεργότητα των στερεών υλικών, που παρασκευάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., στις πραγματικές συνθήκες που επικρατούν σε μια δεξαμενή νερού έρματος πλοίων, πραγματοποιήθηκαν στοχευμένα πειράματα χρησιμοποιώντας θαλασσινό νερό. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια *E. coli* αλλά και βακτήρια *E. faecalis*, ούτως ώστε να αποτυπωθεί μια πιο σφαιρική εικόνα της δυνατότητας αναστολής τους, από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (στερεά υλικά) που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ επεξεργάστηκαν διαλύματα θαλασσινού νερού που περιείχαν είτε εμβόλιο *E. coli* είτε εμβόλιο *E. faecalis*. Τα αποτελέσματα λαμβάνονταν μετά από την λήψη δειγμάτων του επεξεργασμένου θαλασσινού νερού και έπειτα από καλλιέργεια τους σε αντίστοιχα εκλεκτικά τρυβλία, όπως περιεγράφηκε λεπτομερώς προηγουμένως. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν (% αναστολή vs χρόνος) παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.15. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Σχήματος 4.15, το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ φαίνεται να παρουσιάζει σημαντική αντιμικροβιακή δράση έναντι στους δύο μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Επιπλέον, τόσο η αναστολή του βακτηρίου *E. coli* όσο και αυτή του βακτηρίου *E. faecalis* δεν φαίνεται να μεταβάλλεται σημαντικά σε σχέση με την αντίστοιχη αναστολή που

καταγράφηκε για τους ίδιους μικροοργανισμούς χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο γλυκό νερό σε προηγούμενα πειράματα (υποκεφάλαιο 4.2.2.).



Σχήμα 4.15. Ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E.coli* και *E. faecalis* σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας αντίστοιχων βακτηριακών διαλυμάτων θαλασσινού νερού με το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, T=25 °C, p=1 atm, stirring=150 rpm.

Συγκεκριμένα, για το βακτήριο *E. coli* μετά από σχεδόν 80 λεπτά επεξεργασίας με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ επιτεύχθηκε πλήρης αναστολή όπως ακριβώς και στην περίπτωση επεξεργασίας διαλύματος του συγκεκριμένου βακτηρίου (με το ίδιο υλικό) σε αποστειρωμένο-απιονισμένο γλυκό νερό. Στην περίπτωση του βακτηρίου *E. faecalis*, μετά από 120 λεπτά επεξεργασίας με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ επιτεύχθηκε αναστολή που ανέρχεται στο 76%, ενώ η αντίστοιχη ποσοστιαία αναστολή που επιτεύχθηκε στην περίπτωση επεξεργασίας μικροβιακού διαλύματος που παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας αποστειρωμένο-απιονισμένο γλυκό νερό ήταν 77%.

Ως εκ τούτου, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ δεν φαίνεται να επηρεάζεται αρνητικά (τουλάχιστον στον πρώτο κύκλο του πειράματος), κάτι που θα μπορούσε να συμβεί είτε λόγω δηλητηρίασης του στερεού Ag/γ-Al₂O₃ από ιόντα του θαλασσινού νερού που θα μπορούσαν να προσροφούνται αναντίστρεπτα στην

επιφάνεια του, είτε λόγω πλήρωσης της επιφάνειας του με ιόντα που βρίσκονται σε περίσσεια στο θαλασσινό νερό (π.χ., Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-}).

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως και για τα δύο βακτήρια που εξετάστηκαν, σε ορισμένα χρονικά σημεία δειγματοληψίας, η αναστολή που καταγράφηκε στο θαλασσινό νερό ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη από την αντίστοιχη αναστολή που καταγράφηκε στο γλυκό αποστειρωμένο-απιονισμένο νερό.

Για να αποκλειστεί η πιθανότητα απενεργοποίησης/δηλητηρίασης του στερεού 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ πραγματοποιήθηκαν διαδοχικά πειράματα (5 κύκλοι) τόσο με διάλυμα βακτηρίων *E. coli* όσο και με διάλυμα βακτηρίων *E. faecalis*. Βρέθηκε ότι η ενεργότητα του μονομεταλλικού στηριζόμενου στερεού δεν επηρεάζεται αφού η αναστολή των βακτηρίων δεν παρουσίασε αξιοσημείωτη μεταβολή, σε σχέση με αυτή που επιτεύχθηκε στον πρώτο κύκλο του πειράματος.

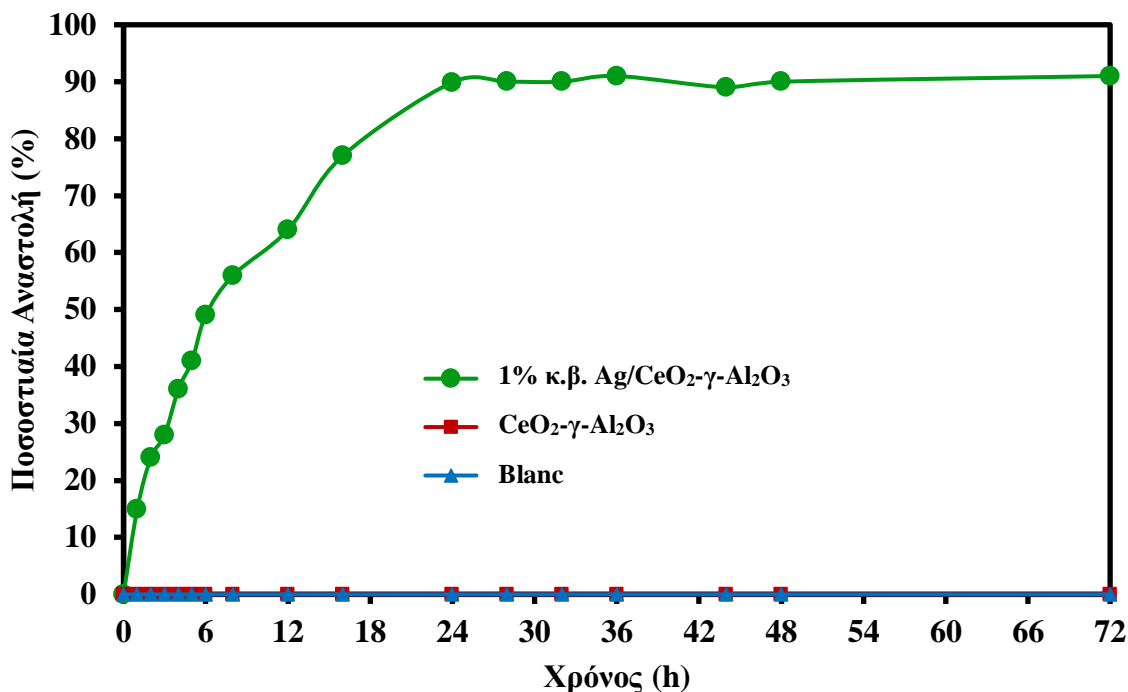
4.2.7. Μελέτη της Σταθερότητας του $\text{Ag}/\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$

Με σκοπό τη διερεύνηση της δυνατότητας εμπορικής χρήσης της τεχνολογίας επεξεργασίας/αποστείρωσης που προτείνεται στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε η σταθερότητα των στηριζόμενων υλικών Ag σε μεγάλους χρόνους αντίδρασης (επεξεργασίας βακτηριακού διαλύματος).

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, το οποίο παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό βακτηριακής αναστολής από όλα τα άλλα στερεά που αναπτύχθηκαν και εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε συνεχής επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. coli* σε θαλασσινό νερό, σε αντιδραστήρα συνεχούς ροής, για 72 ώρες.

Η σχετικά αυξημένη μάζα στερεού (3 gr) που χρησιμοποιήθηκε συγκριτικά με τα υπόλοιπα αντιμικροβιακά πειράματα της παρούσας εργασίας οφείλεται στην εξαιρετικά υψηλή συγκέντρωση των βακτηρίων *E. coli* που χρησιμοποιήθηκε στο υπό επεξεργασία διάλυμα, σε μια προσπάθεια προσομοίωσης της πραγματικής συγκέντρωσης των μικροοργανισμών σε μια τυπική δεξαμενή έρματος πλοίου. Η ροή του υγρού στον αντιδραστήρα, κατά την διάρκεια του πειράματος ήταν σταθερή στα 10 mL/min (χρόνος παραμονής=20 λεπτά).

Αντίστοιχα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τόσο με χρήση του υποστρώματος $\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ όσο και χωρίς την χρήση οποιουδήποτε στερεού, ακολουθώντας τις ίδιες υπόλοιπες συνθήκες στον αντιδραστήρα. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται συγκριτικά (βακτηριακή αναστολή vs χρόνος αντίδρασης) στο Σχήμα 4.16.



Σχήμα 4.16. Βακτηριακή αναστολή που προκύπτει κατά την μακροχρόνια (72 ώρες) επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. coli* σε θαλασσινό νερό στα στερεά υλικά 1% κ.β. Ag/CeO₂-Al₂O₃ και CeO₂-Al₂O₃ αλλά και στο τυφλό πείραμα (blank). Συνθήκες αντίδρασης: $w_s=3$ gr, $V_{\text{διαλ.}}=180$ mL, $Q_{\text{υγρού}}=10$ mL/min, $P = 1.3$ atm, $T = 25$ °C και ανάδευση = 150 rpm

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.16, πιθανότατα λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης βακτηρίων στο θαλασσινό νερό που υπόκειται σε επεξεργασία, σε συνδυασμό με την λειτουργία του αντιδραστήρα σε συνεχή ροή, η σταθερή κατάσταση (steady state) επιτυγχάνεται μετά από 24 ώρες συνεχούς λειτουργίας του αντιδραστήρα, χρόνος στον οποίο η βακτηριακή αναστολή φτάνει το 90%, τιμή η οποία παραμένει σταθερή μέχρι και την ολοκλήρωση του πειράματος στις 72 ώρες (Σχ. 4.16).

Σημειώνεται ότι στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας αποκλειστικά σφαιρίδια υποστρώματος (CeO₂-γ-Al₂O₃) αλλά και στα τυφλά πειράματα (blank),

παρατηρήθηκε μηδενική βακτηριακή αναστολή, επιβεβαιώνοντας πως η παρατηρούμενη αναστολή οφειλόταν αποκλειστικά στη βακτηριοκτόνο δράση του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃.

Τα πιο πάνω αποτελέσματα θεωρούνται ιδιαίτερα ενθαρρυντικά και ενισχυτικά όσον αφορά την καταλληλότητα της μεθόδου ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας που προτείνεται στην παρούσα διατριβή, για την αποτελεσματική αποστείρωση του υδάτινου έρματος των πλοίων. Η πολύ υψηλή ποσοστιαία αναστολή που επιτυγχάνεται (90%) και η μεγάλη και η μεγάλη σταθερότητα που φαίνεται να παρουσιάζει το στηριζόμενο στερεό υλικό αργύρου, αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα της εν λόγω καινοτόμου τεχνολογίας που προτείνεται. Ωστόσο κρίνεται απαραίτητη η μελέτη της οικονομικής βιωσιμότητας της μεθόδου αυτής σε σχέση με τις σήμερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την αποστείρωση του νερού έρματος. Μια τέτοια προκαταρκτική τεχνο-οικονομική μελέτη παρουσιάζεται στο υποκεφάλαιο 4.4. της παρούσας διατριβής.

Τέλος, είναι εξαιρετικά σημαντική η πιλοτική εφαρμογή της εν λόγω τεχνολογίας στις πραγματικές συνθήκες που επικρατούν σε ένα πλοίο. Μια τέτοια προσπάθεια παρουσιάζεται στο υποκεφάλαιο 4.5. της παρούσας Δ.Δ.

4.3. Μελέτη του Επαγόμενου Μηχανισμού Βακτηριακής Αναστολής

Αναγνωρίζοντας πως η αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού βακτηριακής αναστολής εξαιτίας της δράσης του άργυρου μπορεί να συμβάλει καθοριστικά στην ανάδειξη και εκμετάλλευση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των στηριζόμενων υλικών αργύρου σε διάφορες εφαρμογές, και δεδομένου του ότι η υπάρχουσα βιβλιογραφία επικεντρώνεται περισσότερο στη μελέτη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του άργυρου σε διαλύματα ιόντων ή νανοσωματιδίων αργύρου, παρά στην εξέταση του μηχανισμού με τον οποίο εκδηλώνεται η κυτταρική τοξικότητα που επάγεται, επιχειρείται, στα υποκεφάλαια που ακολουθούν, η εξέταση του μηχανισμού βακτηριακής αναστολής, μέσω σειράς εξειδικευμένων πειραμάτων που έχουν σχεδιαστεί στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. για το σκοπό αυτό.

Από την αποκρυπτογράφηση του εν λόγω μηχανισμού, μέσα από τα πειράματα της παρούσας διατριβής, δύναται να αναθεωρηθεί ή να συμπληρωθεί η μέχρι τώρα

πληροφόρηση που υπάρχει σε σχέση με τον μηχανισμό με τον οποίο ο άργυρος προκαλεί την παρατηρούμενη μικροβιακή αναστολή, και εν γένει, να βελτιωθεί η περαιτέρω κατανόηση της όλης αντιμικροβιακής διαδικασίας. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να οδηγήσει στην βελτίωση των υπαρχουσών ή την ανάπτυξη καινοτόμων αντιμικροβιακών τεχνολογιών χρησιμοποιώντας μονομεταλλικά στηριζόμενα στερεά με πολλαπλές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα για την απολύμανση του νερού έρματος των πλοίων, η διαχείριση του οποίου αποτελεί μείζον περιβαλλοντικό ζήτημα σήμερα.

Όλα τα πειράματα που παρουσιάζονται στο παρόν υποκεφάλαιο πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Τα εν λόγω πειράματα αποσκοπούσαν στην απόκτηση των ακόλουθων πληροφοριών: α) εξέταση κατά πόσο η βακτηριοκτόνος δράση προέρχεται κατευθείαν από την επιφάνεια των στηριζόμενων υλικών αργύρου ή κατά πόσο αυτή επάγεται λόγω της διάλυσης ιόντων αργύρου (Ag⁺) από την επιφάνεια του στερεού, β) εξακρίβωση της οξειδωτικής κατάστασης των κρυσταλλιτών (clusters) αργύρου στην επιφάνεια του στερεού σε πραγματικές συνθήκες πειράματος, γ) εξέταση της πιθανότητας εμπλοκής ενός μηχανισμού παραγωγής ελευθέρων ριζών στον ευρύτερο μηχανισμό αναστολής των βακτηρίων, δ) μικροσκοπική μελέτη (SEM, TEM) της επιφάνειας του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ πριν και μετά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος, ε) μικροσκοπική μελέτη (SEM, TEM) των βακτηρίων (*E. coli*) πριν και μετά την επεξεργασία τους με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, ζ) μελέτη της χημικής σύστασης της επιφάνειας του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ με την επεξεργασία βακτηριακού διαλύματος, και η) μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του βακτηρίου *E. coli* κατά την διάρκεια της αντιμικροβιακής επεξεργασίας.

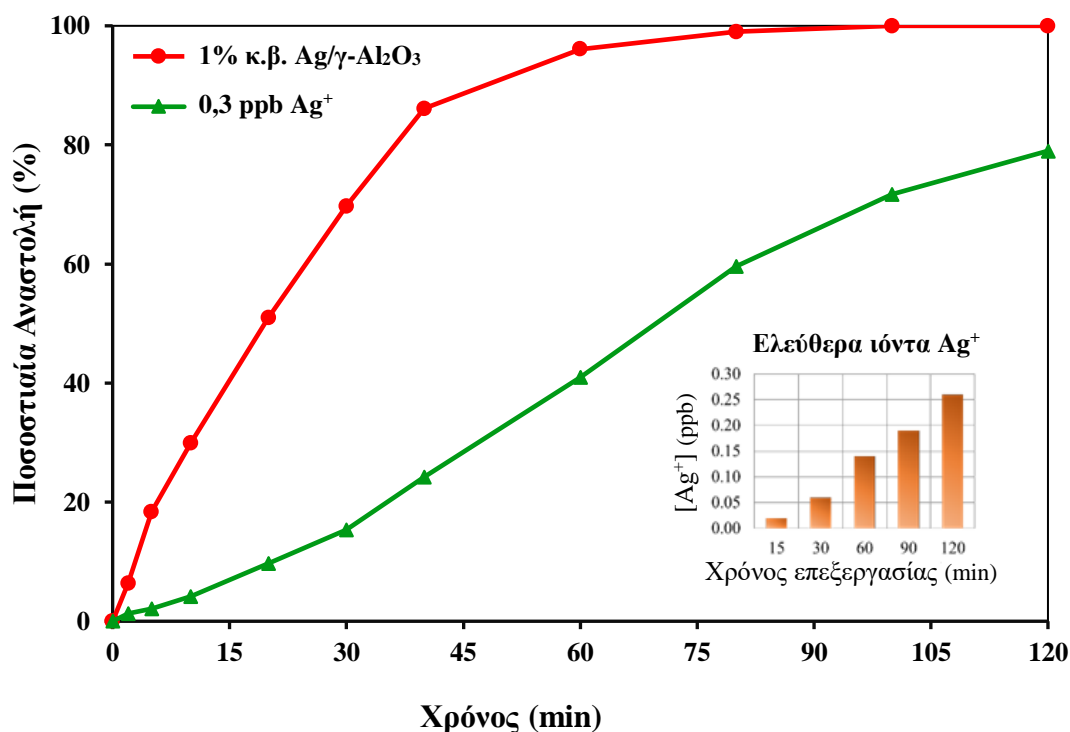
4.3.1 Μελέτη της Συνεισφοράς των Ελευθέρων Ιόντων Αργύρου (Ag⁺) στην Αντιμικροβιακή Δράση του Στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃

Με σκοπό να διασαφηνιστεί κατά πόσο η παρατηρούμενη αντιμικροβιακή δράση των στερεών Ag/γ-Al₂O₃ οφείλεται στον ακινητοποιημένο (immobilized) άργυρο, στην επιφάνεια του στερεού, ή σε τυχόν ιόντα Ag⁺ που εκπλένονται από την επιφάνεια του, κατά την διάρκεια της αντιμικροβιακής διεργασίας, επιχειρήθηκε μέσω της τεχνικής ICP-MS, η ποσοτικοποίηση ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag⁺) στο μικροβιακό διάλυμα μετά από επεξεργασία του με το μονομεταλλικό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Τα αποτελέσματα

έδειξαν ότι πολύ μικρή ποσότητα αργύρου εκπλένεται από την επιφάνεια του στερεού προς το μικροβιακό διάλυμα υπό την μορφή ελεύθερων ιόντων άργυρου (Ag^+). Συγκεκριμένα, μετά από 2 ώρες αντιμικροβιακής επεξεργασίας διαλύματος που περιείχε βακτήρια *E. coli*, η συγκέντρωση ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag^+) στο υπό ανάλυση διάλυμα βρέθηκε να είναι 0,26 ppb.

Με βάση το πιο πάνω αποτέλεσμα, διεξήχθησαν αντιμικροβιακά πειράματα με την χρήση 0.3 ppb Ag^+ , με σκοπό την εξακρίβωση κατά πόσο η μικρή αυτή ποσότητα ελευθέρων ιόντων αργύρου μπορεί να οδηγήσει στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα που παρατηρήθηκε στο στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται, συγκριτικά με αυτά του στερεού 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, στο Σχήμα 4.17. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.17, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα που καταγράφηκε χρησιμοποιώντας 0,3 ppb ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag^+) για την επεξεργασία βακτηριακού διαλύματος *E. coli*, ήταν σημαντικά μειωμένη συγκριτικά με την μικροβιοκτόνο δραστηριότητα του στηριζόμενου στερεού 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η συγκέντρωση ιόντων αργύρου (Ag^+) που χρησιμοποιήθηκε (0,3 ppb), είναι υψηλότερη από αυτή που μετρήθηκε μετά από την δίωρη επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος με στηριζόμενο στερεό Ag , ενώ η πραγματική συγκέντρωση ιόντων αργύρου σε μικρότερους χρόνους επεξεργασίας (ένθετο γράφημα του Σχήματος 4.17) βρέθηκε να είναι σαφώς χαμηλότερη των 0.3 ppb.

Συγκεκριμένα, όπως παρατηρείται στο Σχήμα 4.17, μετά από 80 λεπτά επεξεργασίας του μικροβιακού διαλύματος *E. coli*, η αναστολή που προέκυψε στην περίπτωση χρήσης διαλύματος ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag^+) ήταν χαμηλότερη του 60% σε αντίθεση με την πρακτικά πλήρη αναστολή που καταγράφηκε στην περίπτωση της επεξεργασίας των βακτηρίων με το στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. Σε μικρότερους χρόνους επεξεργασίας οι διαφορές που παρατηρούνται είναι ακόμα πιο έντονες αφού, μετά από 40 λεπτά επεξεργασίας με το διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag^+) η αναστολή που επιτυγχάνεται είναι μόλις 24%, ενώ στον αντίστοιχο χρόνο η αναστολή που προέκυψε με χρήση του στερεού 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ φτάνει το 89%.



Σχήμα 4.17. Ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή που επιτυγχάνεται με χρήση του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και διαλύματος ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag⁺) συγκέντρωσης 0.3 ppb σε μικροβιακό διάλυμα *E. coli*. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm. (ένθετο γράφημα: Η συγκέντρωση του αργύρου που απελευθερώνεται στο υπό επεξεργασία μικροβιακό διάλυμα σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας).

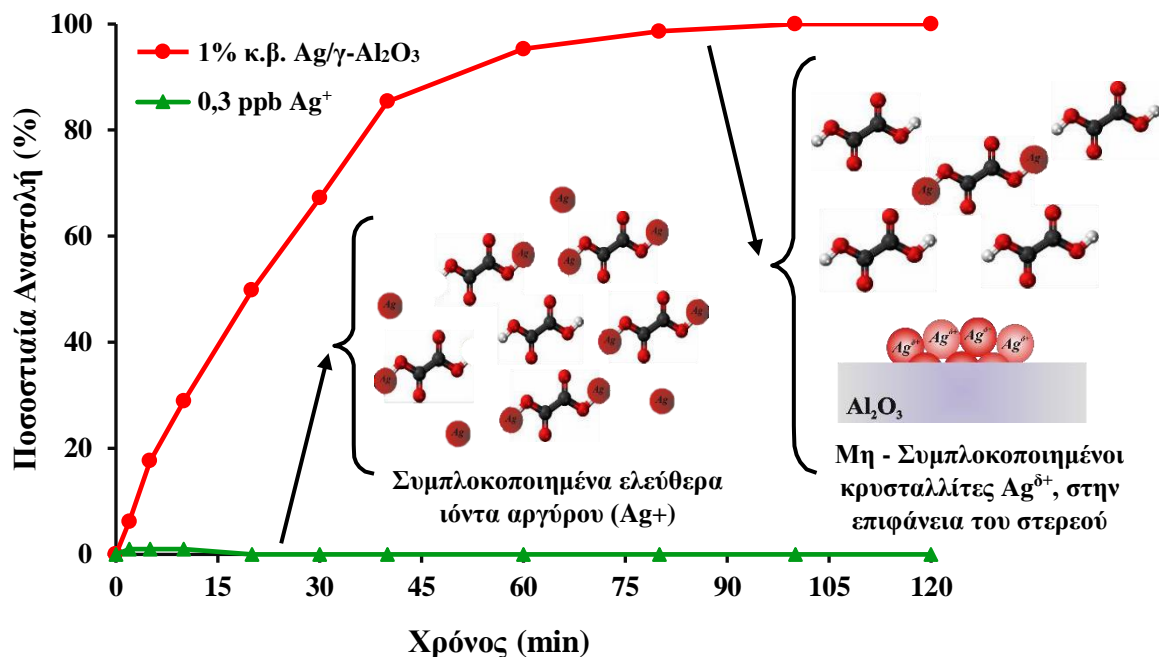
Με βάση τα πιο πάνω αποτελέσματα μπορεί καταρχάς να εξαχθεί το συμπέρασμα πως η παρατηρούμενη αντιμικροβιακή δράση του μονομεταλλικού στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, δεν μπορεί να αποδοθεί εξολοκλήρου στην έκπλυση ιόντων αργύρου από την επιφάνεια του προς το υπό επεξεργασία διάλυμα. Αντίθετα, τα αποτελέσματα του Σχήματος 4.18 υποδεικνύουν πως η αναστολή των βακτηρίων από τα ελεύθερα ιόντα αργύρου (Ag⁺), δεν φαίνεται να είναι η κύρια οδός μέσω της οποίας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ ασκεί την παρατηρούμενη αντιμικροβιακή του δράση.

Για την πιο λεπτομερή μελέτη του μηχανισμού της αντιμικροβιακής διεργασίας στα στερεά Ag/γ-Al₂O₃, κρίθηκε σκόπιμη η εξουδετέρωση/απενεργοποίηση των ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag⁺) από το υπό επεξεργασία μικροβιακό διάλυμα, αποκλείοντας έτσι την όποια συνεισφορά τους στην εν τέλει παρατηρούμενη μικροβιακή αναστολή. Συγκεκριμένα, η

εξουδετέρωση/απενεργοποίηση τους έγινε εφικτή μετά από την in-situ συμπλοκοποίηση τους με οξαλικό οξύ. Σημειώνεται ότι, το οξαλικό οξύ στις συνθήκες επεξεργασίας του εκάστοτε μικροβιακού διαλύματος, αναμένεται να δίσταται μερικώς σε οξαλικά ανιόντα ($C_2O_4^{2-}$), τα οποία θα συμπλοκοποιούν τα ελεύθερα ιόντα αργύρου, σχηματίζοντας δυσδιάλυτο ίζημα ($Ag_2C_2O_4$) [210]. Το γεγονός αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την δραστική μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των τυχόν ελεύθερων ιόντων αργύρου προς τα βακτήρια που περιέχονται στο διάλυμα.

Στο Σχήμα 4.18 συγκρίνεται η αντιμικροβιακή δραστικότητα (ως ποσοστιαία αναστολή) του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, με την αντίστοιχη δραστικότητα διαλύματος ελεύθερων ιόντων αργύρου (συγκέντρωσης 0,3 ppb), όσον αφορά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. coli* στην παρουσία οξαλικού οξέος, συγκεντρώσεως 5 ppb. Όπως φαίνεται ξεκάθαρα στο Σχήμα 4.18, η αντιμικροβιακή δραστικότητα του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία του οξαλικού οξέος αφού μετά από σχεδόν 80 λεπτά επεξεργασίας επιτυγχάνεται πρακτικά πλήρης βακτηριακή αναστολή, όπως και στην περίπτωση απουσίας οξαλικού οξέος (Σχήμα 4.17). Αντιθέτως, η δραστικότητα των ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag^+) φαίνεται πρακτικά να εκμηδενίζεται στην παρουσία οξαλικού οξέος, γεγονός που θεωρείται αναμενόμενο, λόγω της συμπλοκοποίησης και άρα εξουδετέρωσής τους. Με βάση το αποτέλεσμα αυτό, θα μπορούσε καταρχάς να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το οξαλικό οξύ δεν φαίνεται να επηρεάζει την διαθεσιμότητα του οξειδωμένου αργύρου που βρίσκεται ακινητοποιημένος στην επιφάνεια του υποστρώματος, λόγω, πιθανώς, στερικών παρεμποδίσεων και ασυμβατότητας φορτίων [211] [212].

Επιπλέον, τα πιο πάνω αποτελέσματα συμβάλλουν στην περαιτέρω ενίσχυση της άποψης ότι η συμβολή των ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag^+) στην γενικότερη βακτηριακή αναστολή που παρατηρείται χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, είναι μάλλον ασήμαντη.



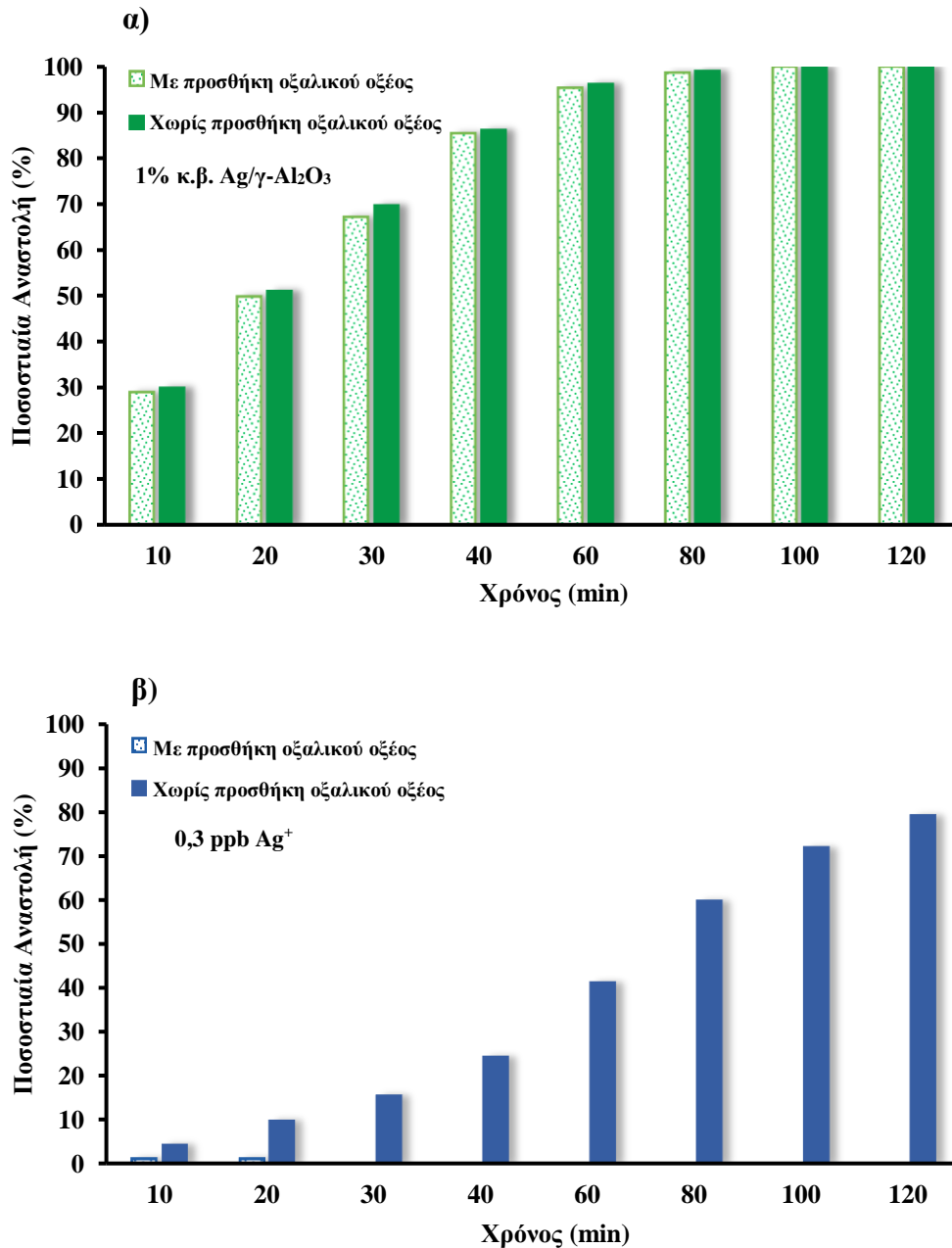
Σχήμα 4.18. Ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή που επιτυγχάνεται με χρήση του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και διαλύματος ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag⁺) συγκέντρωσης 0.3 ppb σε μικροβιακό διάλυμα *E. coli*, μετά την προσθήκη οξαλικού οξέος συγκέντρωσης 5 ppb. Συνθήκες αντίδρασης: w_s=1 gr, V_{διαλ.}=180 mL, P = 1.3 atm, T = 25 °C και ανάδευση = 150 rpm.

Η πραγματική επίδραση της παρουσίας H₂C₂O₄ στο βακτηριακό διάλυμα φαίνεται καλύτερα στο Σχήμα 4.19 όπως παρουσιάζονται συγκριτικά τα αποτελέσματα (ποσοστιαία αναστολή) που προκύπτουν κατά την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. coli*, παρουσία ή απουσία οξαλικού οξέος (συμπλοκοποιητικού παράγοντα), χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ (Σχήμα 4.19α) ή διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου (Σχήμα 4.19β).

Όπως φαίνεται ξεκάθαρα στο Σχήμα 4.19, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα του ακινητοποιημένου αργύρου (Ag/γ-Al₂O₃) πρακτικά μένει αμετάβλητη, ενώ τα ελεύθερα ιόντα Ag⁺ απενεργοποιούνται πλήρως στην παρουσία H₂C₂O₄.

Ανεξάρτητα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.18 και 4.19, η επιφανειακή διάλυση (surface dissolution) ή εκπλυση μεταλλικών στοιχείων από την επιφάνεια στερεών υλικών, κατά την χρήση τους, είναι ένα σημαντικό ζήτημα που δύναται να καθορίσει την δυνατότητα εμπορικοποίησης ή όχι μιας τεχνολογίας. Για το σκοπό αυτό

πραγματοποιήθηκε μελέτη του φαινομένου της έκπλυσης μετάλλου από την επιφάνεια όλων των στερεών που αναπτύχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., με χρήση της τεχνικής ICP-MS.



Σχήμα 4.19. Ποσοστιαία ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. coli* μετά από επεξεργασία με **α)** το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και **β)** διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag⁺) συγκέντρωσης 0.3 ppb, με ή χωρίς την προσθήκη οξαλικού οξέος (συμπλοκοποιητικού παράγοντα) σε κάθε περίπτωση.

Ο Πίνακας 20 παρουσιάζει συγκριτικά τις συγκεντρώσεις των μετάλλων Ag, Cu και Ce που έχουν προσδιοριστεί σε μικροβιακό διάλυμα το οποίο έχει υποστεί επεξεργασία με στηριζόμενο στερεό υλικό Ag ή Cu, ή Ag-Cu, για 2 ώρες.

Πίνακας 20. Έκπλυση μετάλλου της ενεργού φάσης των στερεών που χρησιμοποιήθηκαν για επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων (για 2 ώρες) στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.

Στερεό υλικό	Χρόνος Επεξεργασίας	Εξεταζόμενο Μέταλλο	Συγκέντρωση στο επεξεργασμένο ΔΜ (ppb)
0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃	2 h	Ag	0,289
0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃		Cu	209,05
1% κ.β. Ag/γ-Al ₂ O ₃		Ag	0,26
1% κ.β. Ag/CeO ₂ -γ-Al ₂ O ₃		Ag	0,214
1% κ.β. Ag/CeO ₂ -γ-Al ₂ O ₃		Ce	9,22
1% κ.β. Cu/γ-Al ₂ O ₃		Cu	569
1% κ.β. Ag/QSG		Ag	n. d.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 20, η έκπλυση του χαλκού από τη στερεή επιφάνεια είναι σημαντική τόσο στην περίπτωση του στερεού 0.5% κ.β. Ag-0.5% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃ όσο και στην περίπτωση του στερεού υλικού 1% κ.β. Cu/γ-Al₂O₃. Ο σχετικά υψηλός βαθμός έκπλυσης του χαλκού από τη στερεή επιφάνεια αποδεικνύει πως τα εν λόγω υλικά πιθανώς να είναι ακατάλληλα για οποιαδήποτε πρακτική εφαρμογή, υπό τις παρούσες συνθήκες.

Αντίθετα, η έκπλυση άργυρου από τα στερεά υλικά 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ και 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ είναι πολύ μικρή (≈ 2000 φορές μικρότερη από αυτήν του Cu) και μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Συγκεκριμένα, το ποσοστό έκπλυσης του Ag από την επιφάνεια του στερεού υπολογίζεται στο 3.5% περίπου ανά έτος συνεχιζόμενης χρήσης του, το οποίο θεωρείται πολύ αποδεκτό.

Τα αποτελέσματα (με βάση τον Πίνακα 20) είναι ακόμα καλύτερα στην περίπτωση του στερεού Ag/QSG, όπου δεν ανιχνεύθηκε οποιαδήποτε συγκέντρωση Ag στο διάλυμα, ακόμα και μετά από 2 ώρες συνεχόμενης χρήσης του ($C_{Ag} < 0.1$ ppb). Αντίστοιχα με τον Ag, στην περίπτωση του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃, το ποσοστό έκπλυσης Ce

υπολογίζεται στο $\approx 10\%$ ανά έτος συνεχόμενης χρήσης του, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί οριακά αποδεκτό για πιθανή πρακτική εφαρμογή.

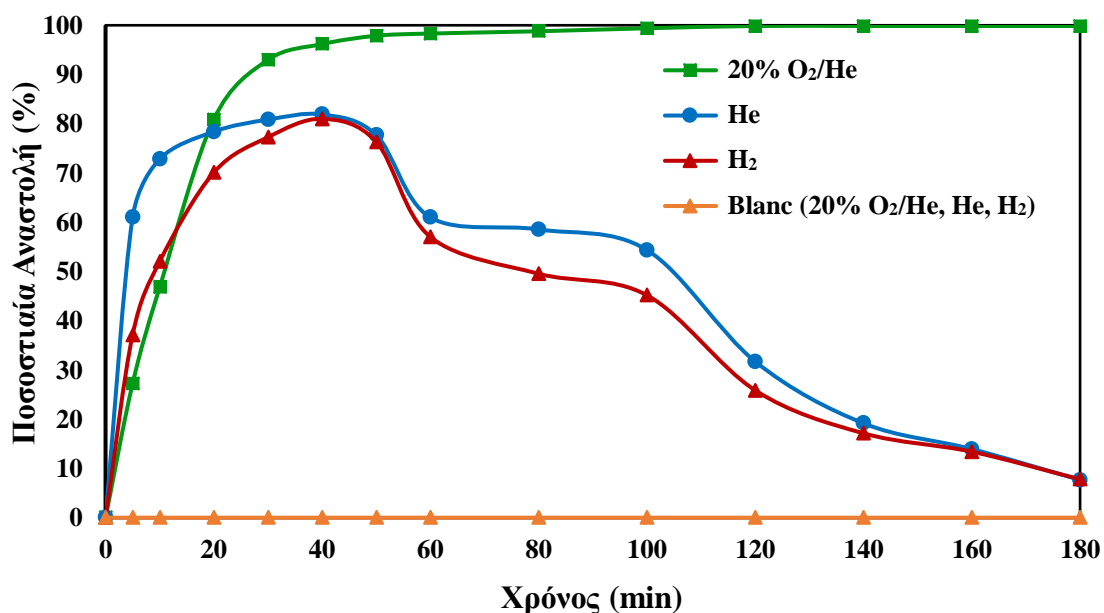
4.3.2. Επίδραση Οξειδωτικής Κατάστασης του Αργύρου

Με σκοπό την μελέτη της επίδρασης της οξειδωτικής κατάστασης του Ag (στην επιφάνεια του στερεού) και συγκεκριμένα κατά πόσο αυτή επηρεάζει την σντιμικροβιακή δράση του στερεού υλικού, διεξήχθησαν εξειδικευμένα αντιμικροβιακά πειράματα συνεχούς ροής με το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃, χρησιμοποιώντας 3 διαφορετικά αέρια μίγματα τροφοδοσίας: α) 20% Οξυγόνο σε Ήλιον (20% O₂/He), β) Ήλιον (He) και γ) Υδρογόνο (H₂). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν 3 gr του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ το οποίο παρουσίασε την υψηλότερη ενεργότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα υλικά που εξετάστηκαν, για την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος με πολύ υψηλή συγκέντρωση βακτηρίων *E. coli*, ροής 10 mL/min και με διαφορετικό αέριο μίγμα τροφοδοσίας κάθε φορά. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τα εν λόγω πειράματα, παρουσιάζονται συγκριτικά στο Σχήμα 4.20.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Σχήματος 4.20, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε 20% O₂/He στην τροφοδοσία του αντιδραστήρα, το σύστημα φαίνεται να φτάνει σε σταθερή κατάσταση περίπου 60 λεπτά μετά την εκκίνηση της διεργασίας, όπου επιτυγχάνεται πρακτικά πλήρης αναστολή των βακτηρίων (Σχήμα 4.20).

Αντίθετα, στην περίπτωση χρήσης καθαρού Ηλίου (He) ως αέριο ρεύμα τροφοδοσίας, η παρατηρούμενη μικροβιακή αναστολή έφτασε μέχρι και το 80% κατά τα πρώτα 40 λεπτά επεξεργασίας, ενώ στην συνέχεια άρχισε να μειώνεται σταδιακά φτάνοντας τελικά κάτω από το 10%, έπειτα από 180 λεπτά συνεχόμενης ροής και επεξεργασίας στον αντιδραστήρα.

Παρόμοια αποτελέσματα λήφθηκαν και στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε καθαρό H₂ στην τροφοδοσία του αντιδραστήρα, με την ελάττωση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ να γίνεται ελαφρώς πιο έντονη σε σχέση με την περίπτωση τροφοδοσίας καθαρού He.



Σχήμα 4.20. Ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας χρησιμοποιώντας α) 20% O₂/He, β) He και γ) H₂ ως αέριο ρεύμα τροφοδοσίας και το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ ως αντιμικροβιακό παράγοντα. Συνθήκες αντίδρασης: T=25 °C, P=1 atm, Q_{υγρού}=10 mL/min, Q_{αερίου}=100 mL/min, stirring=150 rpm.

Η αρχικά αυξανόμενη αναστολή του *E. coli* που παρατηρείται (Σχήμα 4.20), οφείλεται πιθανότατα στο διαλυμένο οξυγόνο που βρίσκεται στο μικροβιακό διάλυμα, μέσω του οποίου οξειδώνεται ο ακινητοποιημένος άργυρος και κατ' επέκταση καθίσταται δυνατή η βακτηριακή αναστολή. Η δραματική όμως μείωση του διαλυμένου οξυγόνου στον όγκο του επεξεργασμένου διαλύματος, εξαιτίας της συνεχούς διοχέτευσης Ηλίου (He) ή Υδρογόνου (H₂), σταδιακά εκτοπίζει και εν τέλει αφαιρεί εντελώς το οξυγόνο από το διάλυμα, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η επανα-οξείδωση του άργυρου, ο οποίος στην περίπτωση αυτή, αναμένεται να βρίσκεται στην εντελώς ανηγμένη του μορφή (Ag⁰).

Σημειώνεται ότι για επιβεβαίωση του πραγματικού λόγου (παράγοντα) που οδηγεί στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.20, διεξήχθησαν τυφλά πειράματα (blank experiments), απουσία του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ και χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης/επεξεργασίας που περιγράφηκαν πιο πάνω.

Συγκεκριμένα, στα πειράματα που διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας μόνο σφαιρίδια υποστρώματος (CeO₂-γ-Al₂O₃), χρησιμοποιώντας τα ίδια μίγματα αέριας τροφοδοσίας

όπως και προηγουμένως, προέκυψε μηδενική ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή για το εκάστοτε αέριο ρεύμα τροφοδοσίας, υποδεικνύοντας πως η παρατηρούμενη αναστολή στις περιπτώσεις χρήσης του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ οφείλεται αποκλειστικά στη δράση του άργυρου, και όχι του υποστρώματος.

Παρόμοια, μηδενική ποσοστιαία αναστολή παρατηρήθηκε και στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν απουσία οποιουδήποτε στερεού υλικού για τις τρεις διαφορετικές αέριες τροφοδοσίες (20% O₂/He, He και H₂) φανερώνοντας πως στην περίπτωση απουσίας O₂ στην τροφοδοσία, η παρατηρούμενη αναστολή των βακτηρίων δεν αποδίδεται στην έλλειψη διαλυμένου οξυγόνου στο βακτηριακό διάλυμα, αλλά στην αλλαγή της οξειδωτικής κατάστασης του επιφανειακού Ag.

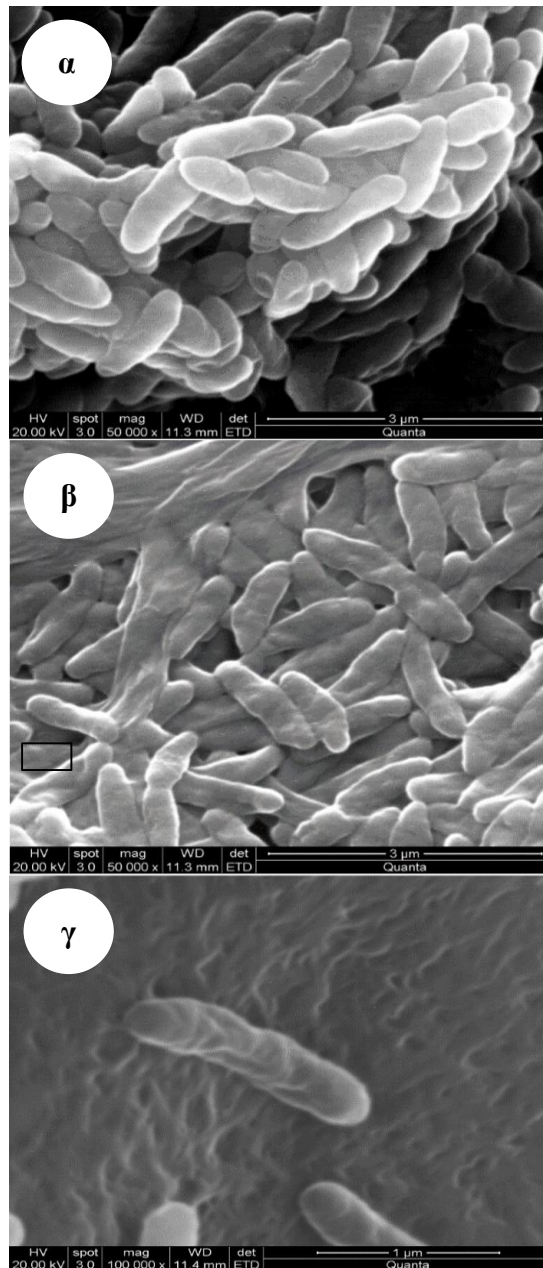
Σύμφωνα με τα πιο πάνω αποτελέσματα, η υψηλή βακτηριακή αναστολή που παρατηρείται στην περίπτωση χρήσης του αέριου ρεύματος τροφοδοσίας 20% O₂/He κατά την αντιμικροβιακή επεξεργασία, αποδίδεται στην μερική οξείδωση του μεταλλικού αργύρου (Ag⁰) που βρίσκεται ακινητοποιημένος στην επιφάνεια του στερεού υπό μορφή νανο-συσσωματωμάτων (nano-clusters). Έτσι ο άργυρος αποκτά το απαιτούμενο θετικό φορτίο (Ag^{δ+}) για την προσέλκυση της αρνητικά φορτισμένης εξωκυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. Ως εκ τούτου, μέσω της συνεχής οξείδωσης του επιφανειακού αργύρου στην επιφάνεια του στερεού 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ λόγω της περίσσειας οξυγόνου στο υπό επεξεργασία διάλυμα, ευνοείται η αναστολή των βακτηρίων η οποία διατηρείται σε σταθερά υψηλό ποσοστό.

4.3.3. Μελέτες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM)

Για τη διερεύνηση τυχόν μορφολογικών αλλαγών που υπόκεινται τα βακτηριακά κύτταρα, οι οποίες ενδεχομένως να επιφέρουν τελικά και την λύση τους, έγινε μελέτη επεξεργασμένων (με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃) βακτηρίων *E. coli* και *E. faecalis*, με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Επιπλέον, με στόχο τη γενικότερη μελέτη του αντιμικροβιακού μηχανισμού βακτηριακής αναστολής πραγματοποιήθηκαν εκτενείς μικροσκοπικές παρατηρήσεις της επιφάνειας του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ πριν και μετά την χρήση του προς επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων.

Το Σχήμα 4.21 παρουσιάζει συγκριτικά ενδεικτικές εικόνες που λήφθηκαν από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM), σε υγιή βακτήρια *E.coli*, τα οποία δεν έχουν υποστεί επεξεργασία (Σχήμα 4.21α) και βακτήρια *E.coli* τα οποία είχαν προηγουμένως τύχει επεξεργασίας με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ (Σχήμα 4.21β-γ). Με παρόμοια αποτελέσματα να ισχύουν και για το βακτήριο *E. faecalis*, στην περίπτωση των βακτηρίων που υπέστησαν αντιμικροβιακή επεξεργασία, βρέθηκαν σημαντικές μορφολογικές αλλαγές, πιθανώς λόγω αλληλεπίδρασης του ακινητοποιημένου άργυρου με την εξωκυτταρική τους μεμβράνη. Επιπλέον, η παρούσα μικροσκοπική μελέτη (Σχήμα 4.21γ) αποκάλυψε πως σε ορισμένες περιπτώσεις τα βακτήρια βρέθηκαν να είναι προσκολλημένα (πολύ κοντά) στην επιφάνεια του στερεού υλικού (Ag/γ-Al₂O₃), κάτι που υποδεικνύει ότι οι παρατηρούμενες βακτηριοκτόνες ιδιότητες του στερεού πιθανόν να αποτελούν ένα ετερογενές φαινόμενο το οποίο σχετίζεται άμεσα με την στερεά επιφάνεια. Συγκεκριμένα, η παρατήρηση μικροβίων προσκολλημένων ή έστω πολύ κοντά στην επιφάνεια του στερεού, υποδεικνύει πως ο μηχανισμός αναστολής των βακτηρίων πιθανόν να περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο βήμα προσκόλλησης ή αλληλεπίδρασης τους με την στερεά επιφάνεια.

Επιδιώκοντας την περαιτέρω εξέταση της πιο πάνω υπόθεσης, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική μελέτη (SEM), της επιφάνειας του μονομεταλλικού στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, πριν και μετά την χρήση του στην επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων *E. coli* και *E. faecalis*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.22, η μικροσκοπική παρατήρηση της επιφάνειας του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, που χρησιμοποιήθηκε για επεξεργασία βακτηριακού διαλύματος *E. coli*, καταδεικνύει την ύπαρξη υπολειμμάτων καθώς και τον σχηματισμό μιας ιδιόμορφης δομής η οποία παρατηρείται για πρώτη φορά (Σχήμα 4.22α-β). Σημειώνεται ότι, τα κατάλοιπα αυτά αλλά και η συγκεκριμένη επιφανειακή δομή δεν είχε παρατηρηθεί στην περίπτωση του ίδιου στερεού το οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε προηγουμένως για επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων (Σχήμα 4.22γ).



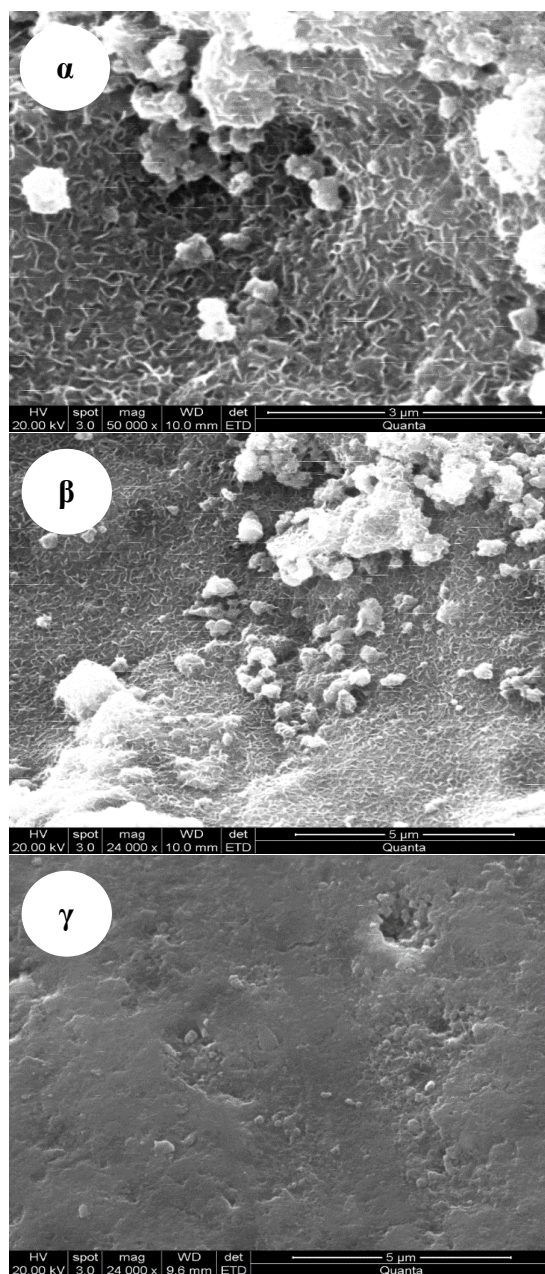
Σχήμα 4.21. Εικόνες Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM) βακτηρίων *E. coli* πριν και μετά από αντιμικροβιακή επεξεργασία. (α) ομάδα υγιών βακτηρίων από το τυφλό πείραμα, (β) ομάδα παραμορφωμένων και εμφανώς ταλαιπωρημένων βακτηρίων τα οποία είχαν υποστεί αντιμικροβιακή επεξεργασία και (γ) εμφανώς ταλαιπωρημένο βακτήριο το οποίο βρίσκεται προσκολλημένο ή πολύ κοντά στην επιφάνεια του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃.

Παρόμοια, η επιφάνεια σφαιριδίων οξειδίου του αργυρίου ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$), τα οποία προηγουμένως χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος, δεν παρουσίασε οποιαδήποτε υπολείμματα ή μορφολογικές αλλαγές, όπως ακριβώς και στην περίπτωση του Σχήματος 4.22γ. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η δημιουργία των εν λόγω υπολειμμάτων και μορφολογικών αλλαγών που παρατηρήθηκαν (Σχήμα 4.22α-β) προϋποθέτει ή είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης αντιμικροβιακής δραστηριότητας.

Αξίζει να αναφερθεί, πως από υπολογισμούς που έχουν γίνει, τόσο το μέγεθος (≈ 20 nm) όσο και το σχήμα/μορφολογία των εν λόγω υπολειμμάτων που παρατηρήθηκαν στην επιφάνεια του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, μετά την χρήση του για επεξεργασία βακτηριακού διαλύματος *E. coli*, ομοιάζουν με το μέγεθος (10-20 nm) και το σχήμα των φωσφολιπιδίων, τα οποία αποτελούν βασικά δομικά στοιχεία της εξωκυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων [32].

Σημειώνεται τέλος πως για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία προκατεργασίας και ως εκ τούτου οι οποιοσδήποτε παρατηρούμενες διαφορές δεν μπορούν να αποδοθούν στην προκατεργασία των δειγμάτων, αλλά μόνο στην ύπαρξη ή όχι αντιμικροβιακής δράσης.

Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν την παρουσία ενός ενδιάμεσου βήματος που πιθανόν να εμπλέκεται στο μηχανισμό αναστολής των βακτηρίων, το οποίο φαίνεται να λαμβάνει χώρα στη επιφάνεια του στερεού (Ag/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) και οδηγεί στο σχηματισμό των παρατηρούμενων υπολειμμάτων άγνωστης σύστασης. Ωστόσο, με βάση τα αποτελέσματα αυτά, θα μπορούσε κάποιος να ισχυριστεί ότι τα παρατηρούμενα αυτά υπολείμματα αποτελούν οργανικά κατάλοιπα τα οποία προκύπτουν από τη λύση των βακτηρίων. Εάν κάτι τέτοιο ευσταθεί, τότε είναι πιθανό τα υπολείμματα αυτά να προκύπτουν από το σχηματισμό ασθενών χημικών δεσμών (ή παρόμοιας αλληλεπίδρασης) μεταξύ των συσσωματωμάτων άργυρου στην επιφάνεια του στερεού Ag/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ και των οργανικών συστατικών της εξωκυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων *E. coli*. Η τελευταία υπόθεση θα διερευνηθεί διεξοδικά στα υποκεφάλαια που ακολουθούν και κυρίως στο υποκεφάλαιο 4.3.4.



Σχήμα 4.22. Μικροσκοπικές παρατηρήσεις της επιφάνειας του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ πριν (γ) και μετά (α, β) την χρήση του για επεξεργασία βακτηριακών διαλυμάτων *E. coli*, μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM).

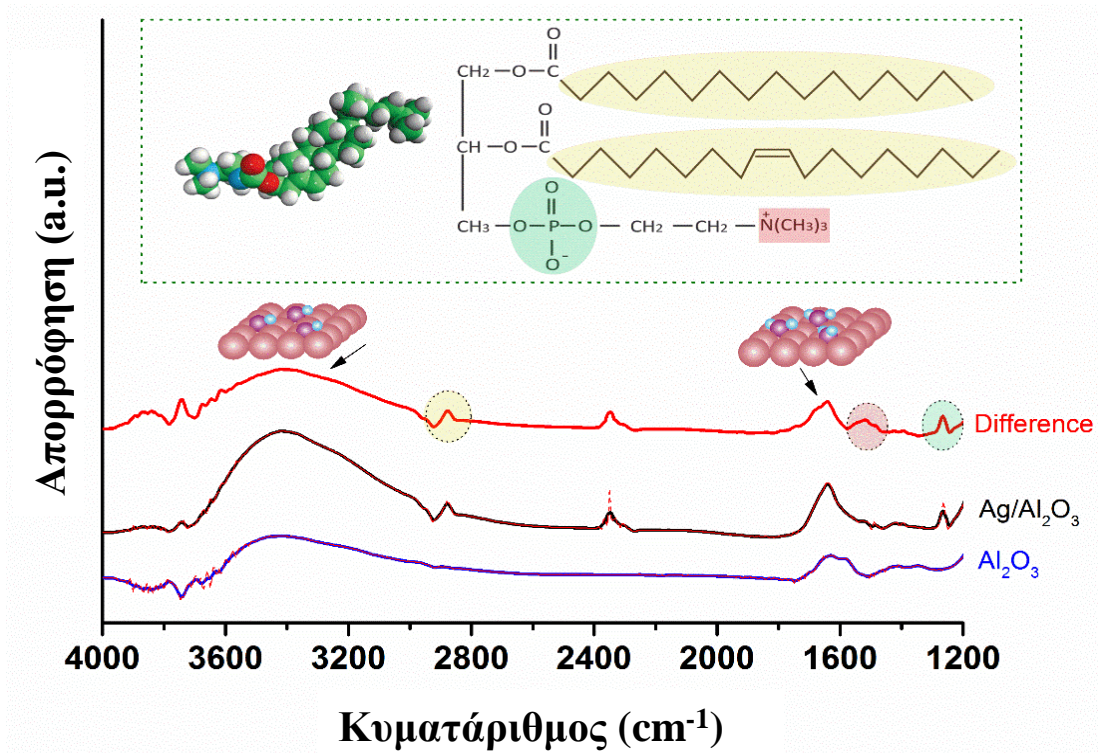
4.3.4. Υπέρυθρη Φασματοσκοπία – Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR-FTIR)

Σε συνέχεια των προηγούμενων αποτελεσμάτων, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της χημικής σύστασης των υπολειμμάτων που έχουν παρατηρηθεί στην επιφάνεια του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ (αποτελέσματα SEM) μετά από αντιμικροβιακή επεξεργασία μικροβιακού διαλύματος *E. coli*. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν φασματοσκοπικές μελέτες, μέσω Υπέρυθρης Φασματοσκοπίας – Εξασθενημένης Ολικής Ανάκλασης (ATR-IR), στο στηριζόμενο στερεό αργύρου 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και σε σφαιρίδια γ-Al₂O₃, πριν και μετά την επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων. Στο Σχήμα 4.23 παρουσιάζονται τα υπέρυθρα φάσματα που λήφθηκαν σε σκόνη στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃ και σφαιρίδιων οξειδίου του αργυρίου, που είχαν προηγουμένως χρησιμοποιηθεί για επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων. Όλες οι παρατηρούμενες κορυφές προσδιορίστηκαν βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων [213] [214] [150].

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.23, πέρα από ορισμένες ομοιότητες μεταξύ των φασμάτων του στερεού υλικού και του υποστρώματος, παρουσιάζονται διακριτές διαφορές όσον αφορά τη φύση και την ένταση των κορυφών που προκύπτουν.

Συγκεκριμένα, και τα δύο φάσματα παρουσιάζουν δύο ευρείες κορυφές, με τη μία να βρίσκεται στην περιοχή των 1600-1700 cm⁻¹ και την άλλη στην περιοχή των 3000-3600 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν στις δονήσεις έκτασης των δεσμών του προσροφημένου νερού [214], και στις δονήσεις έκτασης των προσροφημένων υδροξυλίων, αντίστοιχα [214] [213]. Ωστόσο, στο φάσμα του μονομεταλλικού στηριζόμενου στερεού διακρίνονται 4 μοναδικές κορυφές στους 1260, 1520, 2350 και 2880 cm⁻¹ που δεν εμφανίζονται στο φάσμα του γ-Al₂O₃. Από τη διαφορά των δύο φασμάτων, καθίσταται δυνατή η καλύτερη αξιολόγηση των εν λόγω κορυφών (Σχήμα 4.23). Συγκεκριμένα, η πρώτη κορυφή στους 1260 cm⁻¹ αντιστοιχεί σε προσροφημένα φωσφορικά ανιόντα (PO²⁻) στην επιφάνεια του στερεού [150] [214], η δεύτερη (1520 cm⁻¹) σε προσροφημένες οργανικές ενώσεις που περιέχουν δεσμούς C-N [213], η τρίτη (2350 cm⁻¹) σε προσροφημένες οργανικές ενώσεις που περιέχουν δεσμούς P-H [214] [150], ενώ η τέταρτη κορυφή στους 2880 cm⁻¹ αποτελεί χαρακτηριστική κορυφή για οργανικές ενώσεις που περιέχουν δεσμούς C-H.

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να αναφερθεί ότι όλες οι ανωτέρω ομάδες/ρίζες (PO^{2-} , C-N, P-H, C-H) που παρατηρούνται στο φάσμα του χρησιμοποιημένου στερεού 1% κ.β. Ag/ γ - Al_2O_3 , αποτελούν βασικές μονάδες των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων που εξετάστηκαν [213].



Σχήμα 4.23. Υπέρυθρο φάσμα (ATR-FTIR) του στερεού 1% κ.β. Ag/ γ - Al_2O_3 (μαύρο) και των σφαιριδίων Al_2O_3 (μπλε), που είχαν προηγουμένως χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων *E. coli* με την διαφορά τους (κόκκινο) να υποδεικνύει την ύπαρξη συγκεκριμένων οργανικών ομάδων στην επιφάνεια του στερεού υλικού (Ag/ γ - Al_2O_3).

Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν σημαντική ένδειξη ότι συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης (χωρίς να αποκλείονται και ενδοκυτταρικά συστατικά) πιθανότατα σχηματίζουν δεσμούς με τον ακινητοποιημένο άργυρο στην επιφάνεια του στερεού κατά την διάρκεια της εκάστοτε αντιμικροβιακής επεξεργασίας μικροβιακών διαλυμάτων. Πιο συγκεκριμένα, φωσφολιπίδια της εξωκυτταρικής μεμβράνης ή ακόμα και πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος φαίνεται να προσκολλώνται στην στερεά επιφάνεια είτε πριν είτε μετά την αποκοπή τους από την υπόλοιπη μεμβράνη, ή ακόμα και μετά την γενικότερη λύση του κυττάρου.

Ωστόσο, η δημιουργία χημικών δεσμών μεταξύ των φωσφολιπιδίων, τα οποία είναι ενσωματωμένα στην κυτταρική μεμβράνη, και των συσσωματωμάτων άργυρου στην στερεή επιφάνεια μπορεί να θεωρηθεί στο στάδιο αυτό ως εξαιρετικά δύσκολη, αφού κάτι τέτοιο προϋποθέτει την πολύ κοντινή προσέγγιση των φωσφολιπιδίων και του άργυρου, κάτι που μεταφράζεται αριθμητικά σε επίπεδο μερικών Angstrom. Τέτοια πολύ κοντινή προσέγγιση πιστεύεται πως θα παρεμποδίζεται λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων και ιδιαίτερα λόγω της παρουσίας πολυσακχαριτών που περιβάλλουν την εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων [32]. Πέραν τούτου, η απευθείας προσκόλληση των φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια του στηριζόμενου στερεού μέσω της δημιουργίας χημικών δεσμών με τον άργυρο, αναμένεται να αποτελεί μια ενεργειακά απαγορευμένη διεργασία, καθιστώντας ακόμα πιο απίθανο ένα τέτοιο σενάριο. Θεωρείται ως πολύ πιο πιθανό σενάριο τα φωσφολιπίδια να προσκολλώνται στην επιφάνεια του στερεού αφού προηγουμένως αποκοπούν από την υπόλοιπη κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός άλλου, χωριστού μηχανισμού. Σημειώνεται ότι αρκετοί ερευνητές αναφέρουν το σχηματισμό περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως είναι οι υδροξυλικές ρίζες, ως τον κύριο μηχανισμό αναστολής των βακτηρίων κατά την επεξεργασία τους με ελεύθερα ιόντα αργύρου (Ag^+) ή νανοσωματίδια άργυρου [16] [17] [25] [28] [29] [31] [38] [68]. Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα και στην περίπτωση του στερεού $Ag/\gamma-Al_2O_3$, όπου η πιθανή δημιουργία ROS θα μπορούσε να είναι ο ενδιάμεσος μηχανισμός στον οποίο οφείλεται η αποκόλληση των φωσφολιπιδίων από την εξωκυτταρική μεμβράνη των *E. coli*.

4.3.5. Φασματοφωτομετρικές Μελέτες Ορατού (Vis.): Ανίχνευση Ελευθέρων Ριζών

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των προηγούμενων υποκεφαλαίων και με σκοπό την διερεύνηση της πιθανής δημιουργίας ελευθέρων ριζών, κατά την διάρκεια της αντιμικροβιακής διεργασίας, χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτομετρία Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis.), σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 3 (Πειραματικό Μέρος).

Συγκεκριμένα, η παρουσία ριζών υδροξυλίου ($\cdot OH$) κατά την αντιμικροβιακή επεξεργασία των βακτηρίων *E. coli* επιβεβαιώθηκε μετά από την ποιοτική ανάλυση, που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δείκτη κυανού του μεθυλθενίου (methylthioninium

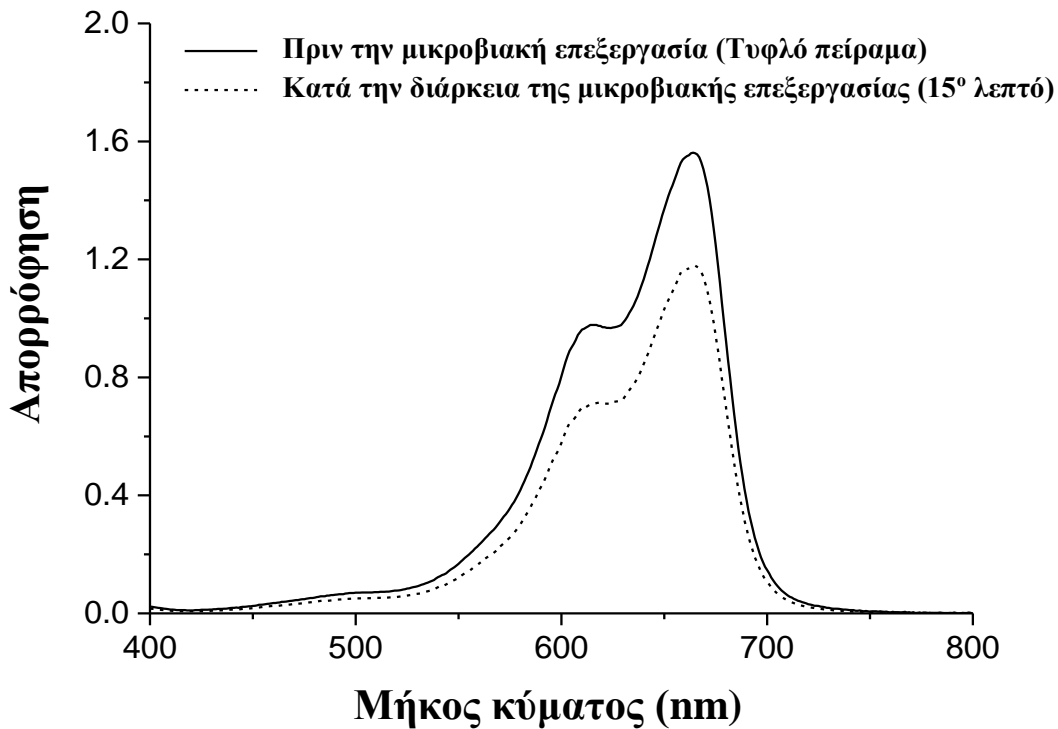
chloride – MB) ως παγίδα δέσμευσης των παραγόμενων ριζών, και φασματοφωτομέτρου ορατού/υπεριώδους για την λήψη φασμάτων σε δείγματα πριν και μετά την αντιμικροβιακή επεξεργασία. Όπως έχει προαναφερθεί, ο δείκτης MB αποχρωματίζεται καθώς οξειδώνεται στην παρουσία υδροξυλικών ριζών. Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί παρουσιάζονται συγκριτικά στο Σχήμα 4.24.

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.24, το ορατό φάσμα (έπειτα από την προσθήκη του δείκτη) του μικροβιακού διαλύματος, που λήφθηκε κατά την διάρκεια της αντιμικροβιακής επεξεργασίας με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη απορρόφηση σε σχέση με το φάσμα του τυφλού πειράματος (κατά ≈25%). Σημειώνεται ότι το φάσμα του τυφλού πειράματος (διάλυμα κυανού του μεθυλενίου με στερεό υλικό αλλά χωρίς βακτήρια) ταυτίζεται απόλυτα με το φάσμα του μικροβιακού διαλύματος (με MB) προτού υποστεί αντιμικροβιακή επεξεργασία, γεγονός που αποδεικνύει ότι ούτε το στερεό υλικό, ούτε και το μικροβιακό διάλυμα χωριστά μπορούν να επάγουν την παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων ελευθέρων ριζών.

Ως εκ τούτου, η αντιμικροβιακή επεξεργασία του εκάστοτε βακτηριακού διαλύματος οδηγεί σε σημαντική μείωση (περίπου 25%) τόσο του ύψους όσο και του εμβαδού του φάσματος του κυανού του μεθυλενίου, υποδεικνύοντας την σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του δείκτη στο διάλυμα. Όπως αναφέρεται από τους Satoh et al. και Iwamori et al., η μείωση αυτή αποδίδεται στον σχηματισμό υδροξυλικών ριζών (·OH) οι οποίες ευθύνονται για την υδροξυλίωση του δείκτη και, κατ' επέκταση, τον σχηματισμό νέων άχρωμων προϊόντων, τα οποία ελαττώνουν τη συνολική απορρόφηση του υπό ανάλυση δείγματος [215] [216].

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα πιο πάνω αποτελέσματα βρίσκονται σε πολύ καλή συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία επιβεβαιώνεται η δημιουργία ριζών υδροξυλίου κατά την βακτηριοκτόνο διεργασία, χρησιμοποιώντας είτε ελεύθερα ιόντα αργύρου (Ag⁺) είτε νανοσωματίδια αργύρου (Ag-NPs) [16] [25] [17] [28] [29] [31] [38] [217] [218] [219] [220]. Επίσης, το γεγονός ότι δεν ανιχνεύονται ελεύθερες ρίζες απουσία των βακτηρίων ή απουσία του στερεού Ag/γ-Al₂O₃, υποδηλώνει ότι για την παραγωγή ελευθέρων ριζών απαιτείται η αλληλεπίδραση – αντίδραση μεταξύ των συσσωματωμάτων αργύρου στην επιφάνεια του στερεού υλικού και των βακτηρίων.

Σημαντικός αριθμός μελετών αναφέρουν πως η παραγωγή περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), όπως είναι οι υδροξυλικές ρίζες ($\cdot\text{OH}$), αποτελούν μέρος ενός ιδιόμορφου μηχανισμού υδρόλυσης φωσφολιπιδίων ο οποίος ενεργοποιείται μέσω συγκεκριμένων ενζύμων που βρίσκονται στην εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων [219] [221] [222] [223] [224] [225] [226]. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση του βακτηρίου *E. coli*, η φωσφολιπάση A της εξωκυτταρικής μεμβράνης, έχει βρεθεί να ευθύνεται για την υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της εξωτερικής μεμβράνης μέσω μηχανισμού παραγωγής ελεύθερων ριζών [219] [225]. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης A προκύπτει όταν η ακεραιότητα της εξωκυτταρικής μεμβράνης τίθεται σε "κίνδυνο", και όταν η κατανομή του φορτίου της μεμβράνης επηρεάζεται-αλλοιώνεται από εξωκυτταρικούς παράγοντες [222] [225] [224] [223].



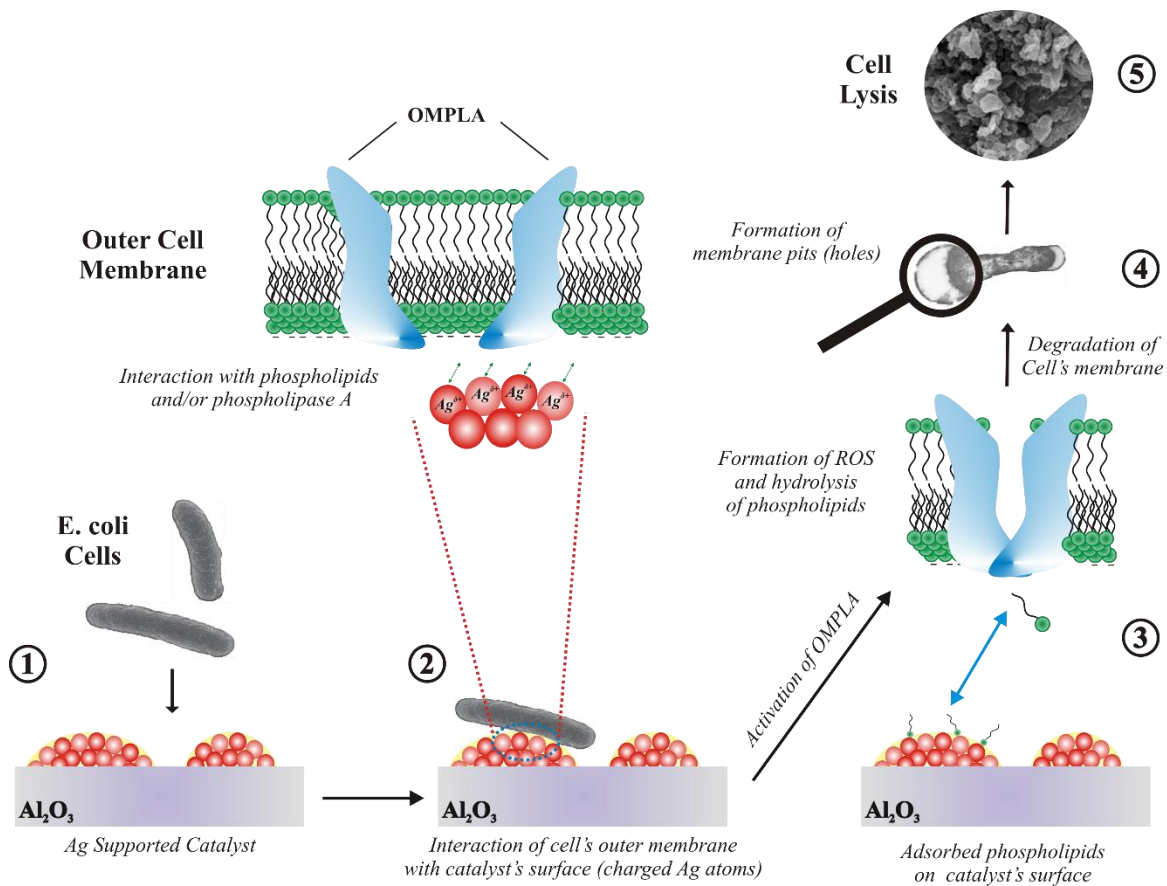
Σχήμα 4.24. Ορατό φάσμα του μικροβιακού διαλύματος *E. coli*, στην παρουσία του δείκτη κυανού του μεθυλενίου, πριν (—) και κατά (---) την αντιμικροβιακή του επεξεργασία με το στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. Σημειώνεται πως το ορατό φάσμα του στερεού υλικού με δείκτη βρέθηκε να είναι ακριβώς το ίδιο με το φάσμα πριν την αντιμικροβιακή επεξεργασία.

Κατά συνέπεια σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έχουν περιγραφεί, μέχρι αυτό το σημείο, στο Κεφάλαιο 3, προτείνεται ένας πιθανός μηχανισμός για την περιγραφόμενη αντιμικροβιακή δράση του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, ο οποίος παρουσιάζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 35. Σύμφωνα με τον μηχανισμό αυτό, τα βακτήρια προσεγγίζουν αρχικά την επιφάνεια του μεταλλικού στηριζόμενου στερεού (Ag/γ-Al₂O₃), όπου τα μερικώς οξειδωμένα άτομα αργύρου (Ag^{δ+}) αλληλεπιδρούν (π.χ. ηλεκτροστατικά) με την αρνητικά φορτισμένη εξωκυτταρική μεμβράνη αλλά και τα αρνητικά φορτισμένα στρώματα πεπτιδογλυκάνης των βακτηρίων. Μια τέτοια αλληλεπίδραση αναμένεται να οδηγήσει σε διαφοροποίηση/αλλοίωση της κατανομής του φορτίου της μεμβράνης, θέτοντας έτσι σε "κίνδυνο" την ακεραιότητα της και ενεργοποιώντας παράλληλα την φωσφολιπάση A. Αξίζει να σημειωθεί πως, με δεδομένο τον αποκλεισμό της πιθανότητας ύπαρξης και δράσης τυχόν ελεύθερων ιόντων αργύρου (Σχήμα 4.18), θεωρείται δεδομένο πως το στερεό υλικό ευθύνεται εξ' ολοκλήρου για την παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή και πως η μόνη πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ της εξωκυτταρικής μεμβράνης και του περιβλήματος της, με την επιφάνεια του στερεού υλικού, φαίνεται να είναι ηλεκτροστατικής φύσης.

Στην πραγματικότητα, η ηλεκτροστατική διαταραχή της κατανομής του φορτίου της εξωκυτταρικής μεμβράνης από εξωτερικούς παράγοντες, όπως είναι η εφαρμογή μιας εξωτερικής ηλεκτροστατικής δύναμης ή τάσης, αποτελεί ένα πολύ γνωστό φαινόμενο το οποίο εφαρμόζεται ήδη εμπορικά για την επεξεργασία (αποστείρωση) τροφίμων σε βιομηχανική κλίμακα [227] [228] [229]. Σε πρόσφατο τους άρθρο, οι Reddy και Penchalaraju, αναφέρουν πως η εφαρμογή εξωτερικής τάσης (φορτίου) σε διάφορα βακτήρια, και ειδικότερα σε αρνητικά κατά gram βακτήρια, οδηγεί στον σχηματισμό κοιλοτήτων - οπών στην κυτταρική μεμβράνη και κατ' επέκταση στη λύση του κυττάρου ως αποτέλεσμα της ανεπανόρθωτης ζημιάς της μεμβράνης [227]. Ενδεικτικά αναφέρεται πως σε διάφορες μελέτες περιγράφεται επίσης η δημιουργία οπών στην εξωτερική μεμβράνη βακτηρίων έπειτα από την επεξεργασία τους είτε με ελεύθερα ιόντα είτε με νανοσωματίδια αργύρου [21] [17] [25]. Η δημιουργία οπών στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων που εξετάζονται στην παρούσα εργασία, αναμένεται να αυξήσει τη διαπερατότητα της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη διαταραχή του ζωτικής σημασίας

αναπνευστικού κύκλου των εν λόγω βακτηρίων, κάτι που τελικά θα επιφέρει την λύση τους. Επιπρόσθετα, πολλές μελέτες υποδεικνύουν πως η εφαρμογή ηλεκτροστατικής δύναμης, ακόμη και σε αποστάσεις που φθάνουν τις μερικές εκατοντάδες νανόμετρα από τα βακτήρια (*L. innocua*, *L. sakei*, *E. coli* και *S. typhimurium*), είναι ικανή να προκαλέσει διαταραχή της κατανομής φορτίου της εξωκυτταρικής μεμβράνης και ως εκ τούτου πόλωση και μορφολογική παραμόρφωση τους με την επαγόμενη δημιουργία οπών [228] [229] [230]. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα, ενισχύουν την προαναφερθείσα υπόθεση πως η αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων και της επιφάνειας του στερεού πρέπει να είναι ηλεκτροστατικής φύσεως.

Γίνεται έτσι προφανές πως, για πρώτη φορά μέχρι σήμερα, φαίνεται να ανατρέπεται η επικρατούσα αντίληψη πως η βακτηριακή αναστολή που αποδίδεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες του άργυρου που χρησιμοποιείται σε διάφορες μορφές, οφείλεται αποκλειστικά στην ύπαρξη ελεύθερων ιόντων άργυρου στο υπό επεξεργασία υγρό διάλυμα [16] [17] [25]. Αντιθέτως, η αντιμικροβιακή δράση του στερεού Ag/ γ -Al₂O₃ φαίνεται να οφείλεται σε ένα ετερογενές φαινόμενο το οποίο λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του μονομεταλλικού στηριζόμενου στερεού (ψευδο-κατάλυση σύμφωνα με τον ορισμό κατά IUPAC [231]).



Σχήμα 4.25. Προτεινόμενος προκαταρκτικός μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης του στερεού Ag/γ-Al₂O₃: (1) η αρνητικά φορτισμένη κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων *E. coli* προσελκύεται από τον οξειδωμένο άργυρο της επιφάνειας του στερεού, (2) ο άργυρος αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με την βακτηριακή μεμβράνη προκαλώντας την παραμόρφωση του φορτίου της και την ενεργοποίηση λυπολυτικών ενζύμων της μεμβράνης (όπως η φωσφολιπάση Α), (3) υδρόλυση των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης μέσω του σχηματισμού δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), (4) σχηματισμός οπών στην μεμβράνη του κυττάρου, (5) λύση των μικροβιακών κυττάρων.

4.3.6. Μελέτες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (TEM)

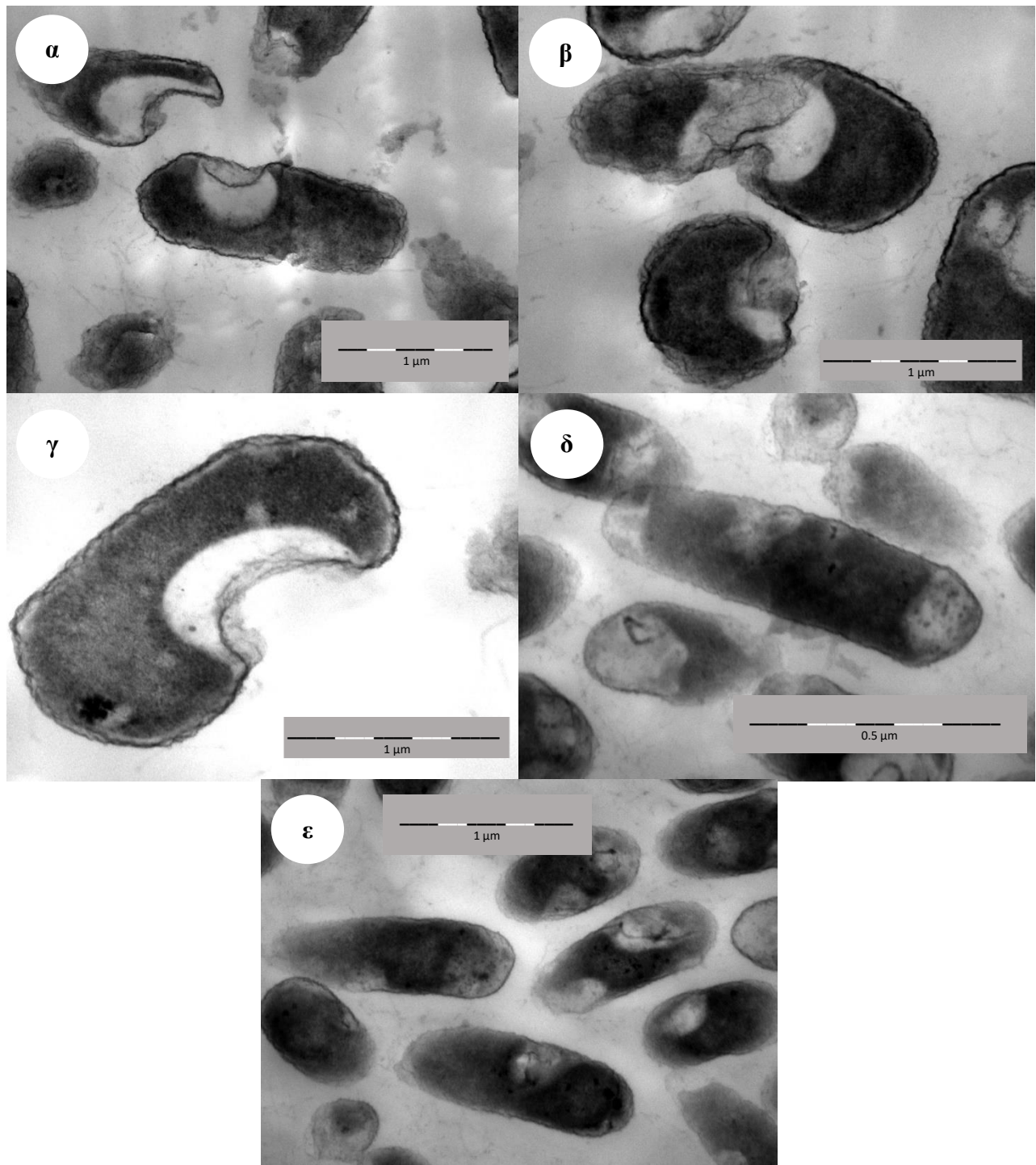
Με βάση τον προκαταρκτικό μηχανισμό που προτείνεται στο Σχήμα 4.25, η παρούσα Δ.Δ. επικεντρώθηκε σε επιπρόσθετα, εξειδικευμένα πειράματα με σκοπό την λεπτομερέστερη μελέτη των βημάτων 3-5 του προτεινόμενου μηχανισμού (Σχήμα 4.25).

Αποσκοπώντας πρωτίστως στην διακρίβωση περαιτέρω μορφολογικών αλλαγών, η παρατήρηση των οποίων δεν κατέστη εφικτή μέσω SEM, όπως επίσης και οπών στην εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, οι οποίες αναφέρονται στην υπάρχουσα βιβλιογραφία [17] [21] [25], πραγματοποιήθηκε λεπτομερής μικροσκοπική μελέτη

βακτηρίων *E. coli* πριν και μετά την επεξεργασία τους με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, με την βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM).

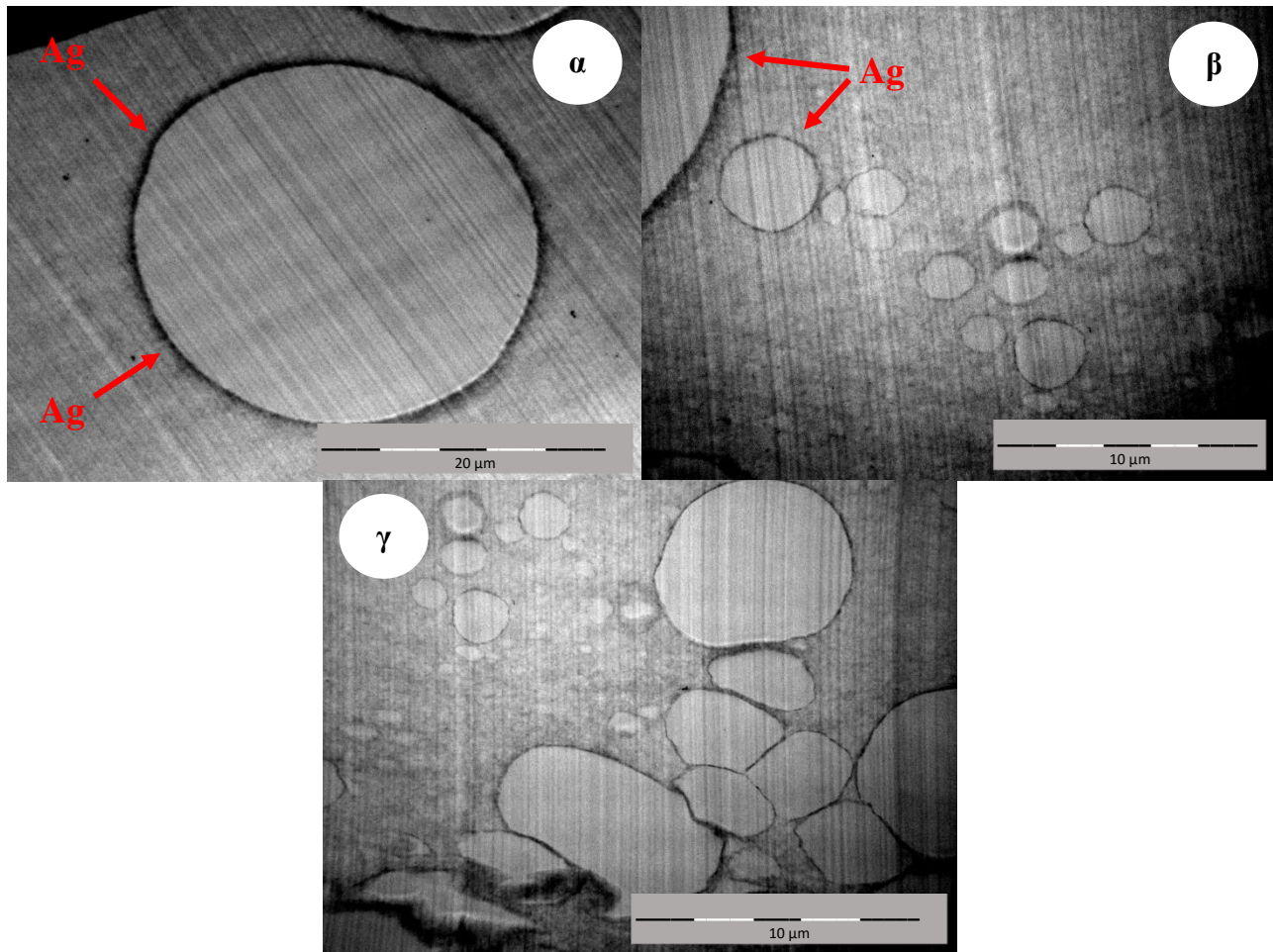
Στο Σχήμα 4.26, παρουσιάζονται οι εικόνες που λήφθηκαν από επεξεργασμένα βακτήρια *E. coli* (Σχήμα 4.26α-γ) με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, καθώς και εικόνες που λήφθηκαν από υγιή βακτήρια (Σχήμα 4.26δ-ε), από τυφλό πείραμα απουσία στερεού υλικού (blank). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.26, τα βακτήρια τα οποία έχουν προηγουμένως υποστεί ψευδο-καταλυτική επεξεργασία (Σχήμα 4.26α-γ), εμφανίζονται σημαντικά παραμορφωμένα σε σχέση με τα υγιή βακτήρια (Σχήμα 4.26δ-ε). Συγκεκριμένα, τα επεξεργασμένα βακτήρια εμφανίζουν μεγάλες οπές ή ακόμα και αποκοπή ενός μεγάλου μέρους τους. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν πως η ψευδοκαταλυτική επεξεργασία και κατ' επέκταση ο άργυρος, ευθύνεται αποκλειστικά για την ύπαρξη σοβαρών μορφολογικών αλλαγών στην εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων *E. coli*, ικανών να προξενήσουν τη λύση του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται να επιβεβαιώνεται ο προκαταρκτικός μηχανισμός βακτηριακής αναστολής που προτείνεται στην παρούσα διατριβή (Σχ. 4.25), καθώς στα ψευδο-καταλυτικά επεξεργασμένα βακτήρια διακρίνονται εμφανείς οπές στην εξωκυτταρική μεμβράνη, οι οποίες μπορούν να αποδοθούν στην ηλεκτροστατική έλξη που δέχονται τα βακτήρια από το τοπικά συσσωρευμένο θετικό φορτίο των μερικώς οξειδωμένων επιφανειακών κρυσταλλινών αργύρου (Ag^{δ+}). Αυτό αναμένεται ότι θα οδηγεί στην διαταραχή της κατανομής φορτίου της εξωκυτταρικής μεμβράνης και, ως εκ τούτου, θα πυροδοτεί την έναρξη του ψευδο-καταλυτικά επαγόμενου μηχανισμού βακτηριακής αναστολής (Σχήμα 4.25) που οδηγεί στην δημιουργία οπών στην βακτηριακή μεμβράνη και στην επακόλουθη λύση των κυττάρων (Σχήμα 4.26α-γ).

Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως δεν ανιχνεύθηκαν οποιεσδήποτε μορφολογικές αλλαγές ή σημάδια αλλοίωσης των βακτηρίων τα οποία επεξεργάστηκαν με σφαιρίδια υποστρώματος (γ-Al₂O₃), γεγονός που επιβεβαιώνει πως το οξείδιο του αργυρίου δεν παρουσιάζει οποιαδήποτε βακτηριοκτόνο δράση.



Σχήμα 4.26. Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM), βακτηρίων *E. coli* πριν (δ, ε) και μετά (α-γ) από ψευδο-καταλυτική επεξεργασία τους με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃.

Παράλληλα με τις πιο πάνω εικόνες, η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) χρησιμοποιήθηκε επίσης για την μελέτη της επιφάνειας του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.27. Σημειώνεται ότι, πριν από την λήψη των εν λόγω ηλεκτρονικών φωτογραφιών, προηγήθηκε θρυμματισμός των σφαιριδίων του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, σύμφωνα με την μέθοδο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3. Στο Σχήμα 4.27 παρουσιάζονται τόσο σωματίδια στερεού τα οποία προέρχονται από επιφανειακά στρώματα του σφαιριδίου (περίμετρος), όσο και κάποια που προέρχονται από εσωτερικά στρώματα. Στα σωματίδια, τα οποία προέρχονται από τα εξωτερικά στρώματα του σφαιριδίου, φαίνεται να έχει επιτευχθεί πολύ ικανοποιητική εναπόθεση αργύρου (Ag) η οποία εμφανίζεται στις ηλεκτρονικές φωτογραφίες ως μια λεπτή μαύρη στοιβάδα που καλύπτει περιμετρικά τα σωματίδια (egg-shell distribution), ειδικότερα στο Σχήμα 4.27α-β. Αντίθετα, στα σωματίδια που προέρχονται από τα εσωτερικά σωματίδια του σφαιριδίου, η εναπόθεση Ag δεν φαίνεται να είναι πολύ ομοιόμορφη (Σχήμα 4.27γ). Παρ' όλ' αυτά, το γεγονός αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα για την αντιμικροβιακή διεργασία, αφού η διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα, κατά κύριο λόγο, στα εξωτερικά στρώματα των σφαιριδίων του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. Σύμφωνα και με την κλίμακα των εικόνων που λήφθηκαν, τα συσσωματώματα (κρυσταλλίτες) αργύρου στην επιφάνεια του υποστρώματος έχουν μέσο μέγεθος 150 nm (100-300 nm) κάτι που κρίνεται λογικό με βάση την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση τους, καθώς και την φόρτιση του αργύρου (≈1% κ.β.). Σημειώνεται πως το μέγεθος αυτό (μερικές εκατοντάδες nm) έρχεται σε πολύ καλή συμφωνία με το μέγεθος των οπών που έχουν παρατηρηθεί στα επεξεργασμένα βακτήρια (Σχήμα 4.27α-γ).



Σχήμα 4.27. Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM), που λήφθηκαν σε θρυμματισμένα σφαιρίδια του στερεού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃. (α) σωματίδια με ομοιόμορφη επικάλυψη/εναπόθεση Ag, (β) σωματίδια με ανομοιόμορφη επικάλυψη Ag.

4.3.7. Στοχευμένη Μελέτη της Γονιδιακής Έκφρασης του Βακτηρίου *E. coli*

Επιδιώκοντας την εκτενέστερη ανάλυση αλλά και επιβεβαίωση των προαναφερθέντων ευρημάτων σχετικά με τον ψευδο-καταλυτικό μηχανισμό βακτηριακής αναστολής, πραγματοποιήθηκε στοχευμένη ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης του βακτηρίου *E. coli*. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η έκφραση μιας ομάδας γονιδίων (Πίνακας 21), που σχετίζονται κυρίως με αμυντικούς μηχανισμούς που αναπτύσσει το βακτήριο *E. coli*, τόσο κατά την επεξεργασία του με το στερεό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, όσο και κατά την επεξεργασία του με διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag⁺) συγκέντρωσης 3 ppb (AgNO₃). Για σκοπούς σύγκρισης η ανάλυση των επιλεγμένων γονιδίων πραγματοποιήθηκε επίσης σε

βακτήρια τα οποία δεν είχαν προηγουμένως υποστεί οποιαδήποτε επεξεργασία για τα ίδια χρονικά σημεία (τυφλά πειράματα). Η βακτηριακή απόκριση/έκφραση των γονιδίων, μελετήθηκε χωριστά για κάθε τοξικό παράγοντα και για τα χρονικά σημεία των 0, 5 και 25 λεπτών μετά την έναρξη της εκάστοτε επεξεργασίας. Σε όλες τις περιπτώσεις, προηγήθηκε προσθήκη οξαλικού οξέος ($H_2C_2O_4$), συγκέντρωσης 5 ppb, με σκοπό τον περιορισμό της δράσης των ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag^+), ιδιαίτερα στην περίπτωση της επεξεργασίας με το στερεό 1% κ.β. $Ag/\gamma-Al_2O_3$.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται συγκριτικά στον Πίνακα 22 (αναλυτικά στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ). Σημειώνεται πως η έκφραση μερικών από τα υπό μελέτη γονίδια στα τυφλά πειράματα αποδίδεται στην εναλλαγή των φάσεων ανάπτυξης (normal growth) του πληθυσμού των βακτηρίων.

Πιο κάτω αναλύεται ο ρόλος του κάθε γονιδίου στον γενικότερο μηχανισμό βακτηριακής αναστολής καταδεικνύοντας την διαφοροποίηση του μηχανισμού ανάλογα με τον τοξικό παράγοντα που χρησιμοποιείται για βακτηριακή επεξεργασία. Σημειώνεται ότι τα συγκεκριμένα γονίδια επιλέγηκαν με βάση τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τόσο στη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων όσο και στη ρύθμιση της συγκέντρωσης διάφορων μετάλλων ενδοκυτταρικά [231] [232] [233]. Ο γνωστός ρόλος των γονιδίων αυτών (πρωτεϊνών που κωδικοποιούν) συνοψίζεται στον Πίνακα 21.

Όπως προαναφέρθηκε, η εξακρίβωση σημαντικής καταστολής ή επαγωγής των γονιδίων προκύπτει μέσω σύγκρισης της γονιδιακής έκφρασης στην περίπτωση της ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας με την περίπτωση επεξεργασίας με το διάλυμα ιόντων αργύρου (Ag^+) αλλά και το τυφλό πείραμα για τα χρονικά σημεία των 5 και 25 λεπτών.

Πίνακας 21. Τα υπό ανάλυση γονίδια της *E. coli* και ο ρόλος της αντίστοιχης κωδικοποιημένης πρωτεΐνης.

Γονίδιο	Κωδικοποιημένη Πρωτεΐνη	Λειτουργία Κωδικοποιημένης Πρωτεΐνης στην <i>E. coli</i>
<i>CueO</i>	Μπλε οξειδάση του χαλκού (Blue copper oxidase) - CueO	Εμπλέκεται στην αντιμετώπιση της επαγόμενης από τον χαλκό τοξικότητας του περιβάλλοντος μέσω της οξείδωσης του Cu^+ σε Cu^{2+} αφού έτσι παρεμποδίζεται η εισχώρηση του στο κυτταρόπλασμα.
<i>CopA</i>	Χαλκομεταφορική ATPάση τύπου P (Copper-exporting P-type ATPase)	Εξάγει ιόντα Cu^+ από το κυτταρόπλασμα στο περίπλασμα δεσμεύοντας 2 ιόντα ανά μονομερές. Εμπλέκεται επίσης στην εξαγωγή άργυρου από το κυτταρόπλασμα.
<i>CusR</i>	Μεταγραφική ρυθμιστική πρωτεΐνη (Transcriptional regulatory protein) - CusR	Αποτελεί μέρος του αλληλένδετου ρυθμιστικού συστήματος του χαλκού CusS/CusR που εμπλέκεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις χαλκού και άργυρου. Ενεργοποιεί την έκφραση του ρυθμιστικού συστήματος cusCFBA λόγω των αυξημένων συγκεντρώσεων ιόντων χαλκού και άργυρου. Σημειώνεται πως η μεταφορική πρωτεΐνη CusS ενεργοποιείται στην παρουσία αυξημένης συγκέντρωσης ιόντων Cu^{2+} .
<i>GapA</i>	Αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A) - GAPDH	Καταλύει την οξειδωτική φωσφορυλίωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (G3P) σε 1,3-διφωσφογλυκερικό (1,3-BPG) στην παρουσία του συνένζυμου NAD (δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης) το οποίο αποτελεί το πρώτο βήμα του μονοπατιού της γλυκόλυσης που σχετίζεται με την δημιουργία του πυροσταφυλικού. Συνιστά μοριακό στόχο όπου δεσμεύονται τα ελεύθερα ιόντα αργύρου Ag^+ , προκαλώντας την αδρανοποίηση της.
<i>PldA</i>	Φωσφολιπάση A της εξωκυτταρικής μεμβράνης (Outer membrane Phospholipase A) - OMPLA	Ευθύνεται για την υδρόλυση φωσφολιπιδίων από την εξωκυτταρική μεμβράνη μέσω της παραγωγής περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου. Η σημαντική επαγωγή της οδηγεί σε διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης και κυτταρικό θάνατο.
<i>ZntA</i>	Μεταφορική ATPάση τύπου P για Ψευδάργυρο/Κάδμιο/Μόλυβδο (Zinc/cadmium/lead-transporting P-type ATPase)	Παρέχει αντίσταση στον ψευδάργυρο, το κάδμιο και το μόλυβδο, συνδυάζοντας την υδρόλυση του ATP με την εξαγωγή των εν λόγω μετάλλων από το κύτταρο. Μπορεί επίσης να δεσμεύσει νικέλιο, χαλκό, κοβάλτιο και υδράργυρο.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 22, η έναρξη του μηχανισμού αναστολής των βακτηρίων, μετά από επεξεργασία με το στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, σχετίζεται άμεσα με την επαγωγή του γονιδίου *pldA*. Σημειώνεται πως το γονίδιο *pldA* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία ευθύνεται για την σύνθεση του λιπολυτικού ενζύμου Φωσφολιπάση A που βρίσκεται ενσωματωμένο στην εξωκυτταρική μεμβράνη (OMPLA) του *E. coli* [231]

[232] [233]. Επίσης, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο υποκεφάλαιο, η έκφραση του εν λόγω γονιδίου προκύπτει έπειτα από τη διατάραξη της ακεραιότητας της εξωκυτταρικής μεμβράνης αλλά και έπειτα από τον επηρεασμό της ομαλής κατανομής του φορτίου της εξωκυτταρικής μεμβράνης εξαιτίας εξωτερικών παραγόντων [222] [225] [148]. Στην περίπτωση της *E.coli*, η Φωσφολιπάση (OMPLA) ευθύνεται για την υδρόλυση φωσφολιπιδίων από την εξωκυτταρική μεμβράνη μέσω της παραγωγής περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) [219] [225] [148], γεγονός που επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της παρούσας Δ.Δ.

Πίνακας 22. Στατιστικά σημαντική επαγωγή ή καταστολή των υπό εξέταση γονιδίων λόγω διαφορετικής διαδικασίας επεξεργασίας διαλύματος βακτηρίων *E. coli*.

<i>Σύγκριση χρονικών σημείων</i>		<i>CueO</i>	<i>CopA</i>	<i>CusR</i>	<i>GapA</i>	<i>PldA</i>	<i>ZntA</i>
Bla (0) vs Bla (5)		-----	-----	-----	▲	-----	-----
Bla (0) vs Bla (25)		-----	-----	-----	▲	-----	-----
Bla (5) vs Bla (25)		-----	-----	-----	▲	-----	▲
5 min	Bla (5) vs Cat (5)	-----	-----	▲	-----	▲	-----
	Bla (5) vs AgNO ₃ (5)	-----	-----	-----	-----	-----	▲
	AgNO ₃ (5) vs Cat (5)	▲	▲	▲	-----	-----	▼
25 min	Bla (25) vs Cat (25)	▲	▲	-----	▼	▲	▼
	Bla (25) vs AgNO ₃ (25)	▼	▼	-----	-----	-----	▼
	AgNO ₃ (25) vs Cat (25)	▲	▲	-----	-----	▲	-----

Bla = Τυφλό πείραμα (Blanc), **AgNO₃** = διάλυμα ιόντων Ag⁺ [3 ppb], **Cat** = 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃

Σύμφωνα λοιπόν με τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, ο σχηματισμός ROS αποτελεί μόνο ένα μέρος του ευρύτερου μηχανισμού βακτηριακής αναστολής. Αξίζει να αναφερθεί πώς, αρκετές επιστημονικές μελέτες αναφέρουν πως ο σχηματισμός περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου όπως οι υδροξυλικές ρίζες ($\bullet\text{OH}$) αποτελούν μέρος ενός μηχανισμού φωσφολιπιδικής υδρόλυσης που ενεργοποιείται από συγκεκριμένα ένζυμα της εξωκυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων [219] [225] [222].

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 22, φαίνεται να επιβεβαιώνουν τον προκαταρκτικό μηχανισμό αντιμικροβιακής δράσης που προτάθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ.

(Σχήμα 4.25), αφού το γονίδιο *pldA* φαίνεται να επάγεται σημαντικά μετά από 5 λεπτά ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας του βακτηρίου *E.coli*. Ως εκ τούτου, ο ευρύτερος μηχανισμός βακτηριακής αναστολής φαίνεται να ξεκινά με την επαγωγή των επιπέδων μεταγραφής του εν λόγω γονιδίου. Σύμφωνα με τον προκαταρκτικό μηχανισμό που προτείνεται στο Σχήμα 4.25, αυτό μπορεί να αποδοθεί στην προσέγγιση των βακτηρίων στην επιφάνεια του στερεού (ψευδο-καταλύτη) όπου προκύπτει αλληλεπίδραση (π.χ. ηλεκτροστατική) μεταξύ των μερικώς οξειδωμένων ατόμων αργύρου της επιφάνειας του στερεού ($Ag^{\delta+}$), με την αρνητικά φορτισμένη εξωτερική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων. Μια τέτοια αλληλεπίδραση οδηγεί στην σημαντική διατάραξη της κατανομής του φορτίου της εξωκυτταρικής μεμβράνης [228] [230] [227], θέτοντας σε κίνδυνο την ακεραιότητα της, με αποτέλεσμα να επάγεται η ενεργοποίηση του λιπολυτικού ενζύμου OMPLA.

Κατά συνέπεια, η φωσφολιπιδική υδρόλυση και κατ' επέκταση η αποκόλληση των φωσφολιπιδίων από την εξωτερική μεμβράνη, η οποία συντελείται όπως προαναφέρθηκε μέσα από την παραγωγή ROS, οδηγεί στην ανεπανόρθωτη διάτρηση της μεμβράνης των βακτηρίων [219] [225] [222]. Το γεγονός αυτό προκαλεί αλυσιδωτά την αύξηση της διαπερατότητας της εξωκυτταρικής μεμβράνης διαταράσσοντας τον κύκλο της κυτταρικής αναπνοής κάτι που τελικά επιφέρει την λύση του κυττάρου [145] [144] [22] [20] [146] [234] [147].

Όπως έχει άλλωστε επιβεβαιωθεί στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, μετά την επεξεργασία των βακτηρίων *E. coli* με το στερεό 1% κ.β. $Ag/\gamma-Al_2O_3$ έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός οπών στην εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων (αποτέλεσμα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης – Σχήμα 4.26), λόγω της αλληλεπίδρασης της με την επιφάνεια του μεταλλικού στηριζόμενου στερεού. Υπενθυμίζεται ότι, παρόμοια αποτελέσματα έχουν ήδη αναφερθεί στην περίπτωση επεξεργασίας των βακτηρίων *E. coli* με διάλυμα ιόντων αργύρου (Ag^+) ή νανο-σωματιδίων αργύρου (Ag-NPs) [24] [17] [25]. Αξίζει ακόμα να αναφερθεί πως η μη-επαγωγή του γονιδίου *pldA* μετά από 25 λεπτά επεξεργασίας με διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου επιβεβαιώνει πως σχεδόν ολόκληρη η συγκέντρωση των ιόντων αργύρου (Ag^+) συμπλοκοποιείται από το οξαλικό οξύ, κάτι το οποίο έχει ήδη αποδειχθεί μέσω των αντιμικροβιακών πειραμάτων του υποκεφαλαίου 4.2.

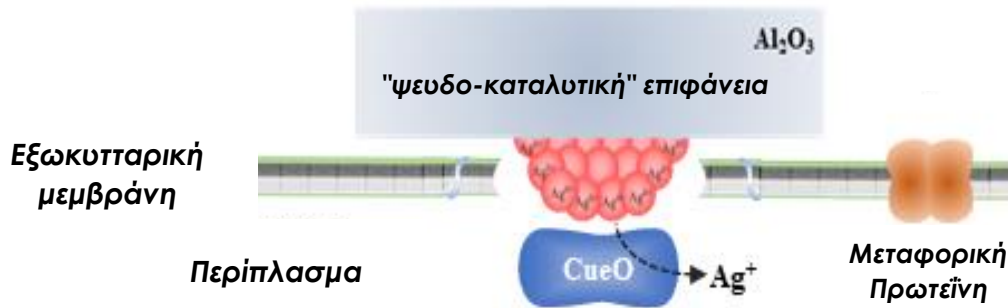
Επιπρόσθετα, η σχετικά ομοιόμορφη κατανομή των ελεύθερων ιόντων Ag^+ γύρω από την εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων δεν αναμένεται να επηρεάζει σημαντικά την κατανομή του φορτίου της βακτηριακής μεμβράνης. Αντίθετα, στην περίπτωση του ακινητοποιημένου άργυρου ($Ag/\gamma-Al_2O_3$), το τοπικά ισχυρό θετικό φορτίο των επιφανειακών νανοσυμπλεγμάτων αργύρου αναμένεται να προκαλεί την διατάραξη του φορτίου της βακτηριακής μεμβράνης και κατά συνέπεια να ενεργοποιεί τους κυτταρικούς μηχανισμούς για αποκατάσταση της ομαλής κατανομής φορτίου στην εξωκυτταρική μεμβράνη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 22, μετά από επεξεργασία των βακτηρίων με το στερεό $Ag/\gamma-Al_2O_3$, για μόλις 5 λεπτά, παρατηρείται σημαντική επαγωγή των γονιδίων *CusR* και *CueO*, τα οποία κωδικοποιούν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες *CusR* και *CueO*. Η πρωτεΐνη *CueO* εντοπίζεται στο περίπλασμα των βακτηρίων και είναι υπεύθυνη για την οξείδωση του $Cu(I)$ στο κύτταρο, στην μη τοξική μορφή του $Cu(II)$. Το σύμπλεγμα πρωτεϊνών *CusR* και *CusS* εντοπίζεται επίσης στο περίπλασμα των βακτηρίων και αποτελεί υποδοχέα του $Cu(II)$. Σημειώνεται ότι ο Ag^0 και Ag^+ παρουσιάζουν πολύ παρόμοιες χημικές ιδιότητες με τα Cu^+ και Cu^{2+} , αντίστοιχα και ως εκ τούτου τα Ag^0 και Ag^+ εκλαμβάνονται από το κύτταρο ως Cu^+ και Cu^{2+} , αντίστοιχα [174] [235] [175] [236].

Με βάση τα πιο πάνω αναμένεται ότι οι ψευδο-καταλυτικά δημιουργηθείσες οπές στην εξωκυτταρική μεμβράνη των *E. coli* λόγω της δράσης του ενζύμου OMPLA, καθιστούν εφικτή την αλληλεπίδραση του ακινητοποιημένου, στην επιφάνεια του στηριζόμενου στερεού αργύρου, με ένζυμα του περιπλάσματος, που βρίσκονται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη, όπως το *CueO*. Το εν λόγω ένζυμο αναμένεται να οξειδώνει τον μεταλλικό ή ελαφρά οξειδωμένο άργυρο που βρίσκεται στην επιφάνεια του στερεού, σε ιοντικό άργυρο (Ag^+), αποσπώντας τον έτσι από την επιφάνεια του ακινητοποιημένου νανοσυμπλέγματος όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.28. Ο "ευκίνητος" ιοντικός άργυρος, εν τέλει, αλληλεπιδρά με υποδοχείς οξειδωμένου χαλκού (Cu^{2+}) του περιπλάσματος όπως ο *CusS* (Σχήμα 4.29) ο οποίος αποτελεί μέρος του αλληλένδετου ρυθμιστικού συστήματος του χαλκού *CusS/CusR*. Ως εκ τούτου η μεταφορική πρωτεΐνη *CusS*, και η *CusR* κατ' επέκταση, απενεργοποιούνται είτε εξαιτίας της αναγωγής του ιοντικού αργύρου Ag^+ σε μεταλλικό άργυρο Ag^0 , ο οποίος ενδεχομένως να εισέρχεται στο κυτταρόλασμα

προκαλώντας οξεία τοξικότητα, είτε εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του ιοντικού άργυρου με τις ομάδες θειόλης της πρωτεΐνης CusS. Επιβεβαιώνοντας τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, οι Feng et. al. έχουν αποδείξει την παρουσία μεταλλικού άργυρου στο κυτταρόπλασμα των βακτηρίων *E. coli*, μετά την επεξεργασία τους με διάλυμα νανοσωματιδίων αργύρου [21].

Επιπλέον, ο επαγόμενος από τον άργυρο εκτοπισμός του χαλκού Cu από τους φυσικούς πρωτεϊνικούς του υποδοχείς πυροδοτεί την ανεξέλεγκτη εισαγωγή χαλκού εντός του βακτηριακού κυττάρου. Το γεγονός αυτό αναμένεται να προκαλέσει τον σχηματισμό περίσσειας υδροξυλικών ριζών [241], σύμφωνα με την υφιστάμενη βιβλιογραφία [219] [25] [220] [17] [28] [29].



Σχήμα 4.28. Σημαντικό βήμα προτεινόμενου μηχανισμού: Αλληλεπίδραση των συσσωματωμάτων αργύρου της ψευδο-καταλυτικής επιφάνειας με το ένζυμο του περιπλάσματος CueO, με αποτέλεσμα την απόσπαση ιόντων αργύρου (Ag^+) από την επιφάνεια του στερεού.

Παρά το γεγονός πως τα δισθενή ιόντα χαλκού θεωρούνται ζωτικής σημασίας για την βακτηριακή ανάπτυξη και επιβίωση, η τοξικότητα των ιόντων χαλκού (Cu^+) ευθύνεται για την απαραίτητη, σε βακτήρια όπως το *E. coli*, λειτουργία συστημάτων για τον σχολαστικό έλεγχο της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης χαλκού. Έτσι, η αλληλεπίδραση του οξειδωμένου άργυρου με τον πρωτεϊνικό υποδοχέα δισθενή χαλκού του περιπλάσματος CusS, αναμένεται να εγείρει την επαγωγή γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν αλληλένδετα συστήματα ομοιόστασης του χαλκού όπως το οπερόνιο CusCFBA, η χαλκομεταφορική ATPάση τύπου P που κωδικοποιείται από το γονίδιο *corA*, και η μπλε οξειδάση του χαλκού - CueO, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cueO* [242] [175] [236] [235] [174]. Τα συστήματα αυτά ασχολούνται πρωτίστως με την αποτοξίνωση του περιπλάσματος και την παρεμπόδιση της εισαγωγής Cu^+ στο κυτταρόπλασμα όπως επίσης και με την

μεταφορά χαλκού σε ορισμένες περιπτώσεις από το κυτταρόπλασμα στο περίπλασμα. Συγκεκριμένα, η μπλε οξειδάση του χαλκού CueO, η οποία φαίνεται να έχει ένα κρίσιμο ρόλο στην ψευδο-καταλυτική διεργασία που μελετάται στην παρούσα Δ.Δ., αποτελεί μια οξειδάση πολλαπλών ιόντων χαλκού η οποία παρέχει προστασία στο κύτταρο από πιθανές ζημιές, λόγω τοξικότητας από αυξημένες συγκεντρώσεις Cu^+ σε ένζυμα του περιπλάσματος.

Παράλληλα, η χαλκομεταφορική ΑΤΡάση τύπου P ευθύνεται για την απομάκρυνση χαλκού Cu^+ από το κυτταρόπλασμα στο περίπλασμα [239]. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, τα γονίδια *cueO* και *copA* παρουσιάζουν σημαντική επαγωγή έπειτα από την ψευδο-καταλυτική επεξεργασία των *E. coli*. Κάτι τέτοιο θεωρείται αναμενόμενο αφού πέρα από το στρες του κυττάρου εξαιτίας του άργυρου, που επάγεται στο περίπλασμα από την CueO (Σχ. 4.28), τα βακτήρια *E. coli* εντείνουν τις προσπάθειες τους για ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του χαλκού μετά από την ακατάστατη διείσδυση χαλκού και άργυρου από το περίπλασμα στο κυτταρόπλασμα [236].

Όσον αφορά την περίπτωση του γονιδίου *copA*, επάγεται σημαντικά έπειτα από την πάροδο 25 λεπτών επεξεργασίας με το στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ εξαιτίας της αυξημένης ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης χαλκού και αργύρου. Το γονίδιο *CueO* συνεχίζει να παρουσιάζει σημαντική επαγωγή μετά από 25 λεπτά ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας αλλά σε μικρότερη έκταση απ' ότι τα επίπεδα μεταγραφής του *copA* (Πίνακας 22), γεγονός που είναι αναμενόμενο, αφού το κύτταρο προσπαθεί να αποβάλει τα ιόντα Ag^+ και Cu^{2+} από το κυτταρόπλασμα, παρά να εισάγει νέα ιόντα Ag^+ από το περίπλασμα. Επιπρόσθετα, η σημαντική καταστολή τόσο του γονιδίου *copA* όσο και του γονιδίου *cueO* μετά από 25 λεπτά επεξεργασίας με διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου Ag^+ [3 ppb], δικαιολογείται από το γεγονός πως τα ελεύθερα ιόντα αργύρου (εντός και εκτός του κυττάρου) συμπλοκοποιούνται, λόγω της παρουσίας οξαλικών ανιόντων, και κατ' επέκταση αναστέλλονται οι σχετικοί ενδοκυτταρικοί μηχανισμοί απομάκρυνσης τους. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει το διαφορετικό μηχανισμό αναστολής των βακτηρίων *E. coli* ανάλογα με τον βακτηριοκτόνο παράγοντα που χρησιμοποιείται.

Επιπρόσθετα με τα πιο πάνω, τα υψηλά ενδοκυτταρικά επίπεδα χαλκού και αργύρου τα οποία προκαλούν την ρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορα συστήματα

ομοιόστασης του χαλκού, περιορίζουν την έκφραση γονιδίων όπως το *zntA*, το οποίο κωδικοποιεί δευτερεύοντες μηχανισμούς αποτοξίνωσης. Το εν λόγω γονίδιο κωδικοποιεί τον σχηματισμό μιας ΑΤΡάσης μεταφοράς ιόντων μετάλλων, τύπου P, η οποία προσδίδει αντοχή στα τοξικά επίπεδα για ένα ευρύ φάσμα δισθενών μεταλλικών ιόντων όπως ο ψευδάργυρος, το κάδμιο και ο μόλυβδος [233]. Παρόλο που οι Dutta et al. υποστηρίζουν πως η εν λόγω ΑΤΡάση παρουσιάζει δραστικότητα σε κάποιο βαθμό στην παρουσία ιόντων Cu^{2+} [243], το γονίδιο *zntA* καταστέλλεται σημαντικά μετά από 25 λεπτά επεξεργασίας χρησιμοποιώντας είτε στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ είτε διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag^+).

Με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την γονιδιακή ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., σε συνδυασμό με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, προτείνεται ένας λεπτομερής πιθανός μηχανισμός βακτηριακής αναστολής των *E. coli* τόσο ψευδο-καταλυτικά όσο και κατά την χρήση διαλύματος ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag^+). Ο προτεινόμενος λεπτομερής μηχανισμός παρουσιάζεται διαγραμματικά στο Σχήμα 4.29.

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.29, στην περίπτωση επεξεργασίας των βακτηρίων με το στερεό 1% κ.β. $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, ο μηχανισμός ξεκινά με την προσέγγιση του νανοσυμπλέγματος αργύρου, που βρίσκεται στην επιφάνεια του στερεού, στα βακτήρια *E. coli* (βήμα (i)) και την επακόλουθη ηλεκτροστατική έλξη της εξωκυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου με την στερεή επιφάνεια (βήμα (ii)). Όπως περιεγράφηκε προηγουμένως, μια τέτοια αλληλεπίδραση προκαλεί την υδρόλυση φωσφολιπιδίων από την κυτταρική μεμβράνη, μέσω ενεργοποίησης του ενζύμου OMPLA, η οποία βρίσκεται ενσωματωμένη στην εξωκυτταρική μεμβράνη. Τα υδρολυμένα φωσφολιπίδια προσροφούνται, στη συνέχεια, στην επιφάνεια του στερεού υλικού ($\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$), ενώ παράλληλα δημιουργούνται οπές στην εξωκυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου (βήμα (iii)).

Εν τούτοις, τα βήματα (ii) και (iii) δεν φαίνεται να εμπλέκονται στον βακτηριοκτόνο μηχανισμό που προκύπτει κατά την χρήση διαλύματος ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag^+) (Σχήμα 4.29β), με την ομοιόμορφη κατανομή των ιόντων περιμετρικά του βακτηρίου να μην επάγει την ενεργοποίηση του ενζύμου OMPLA. Ως εκ τούτου, στην εν λόγω περίπτωση δεν προκύπτει η δημιουργία οπών ενώ η κυριότερη διαφορά σε σχέση με την

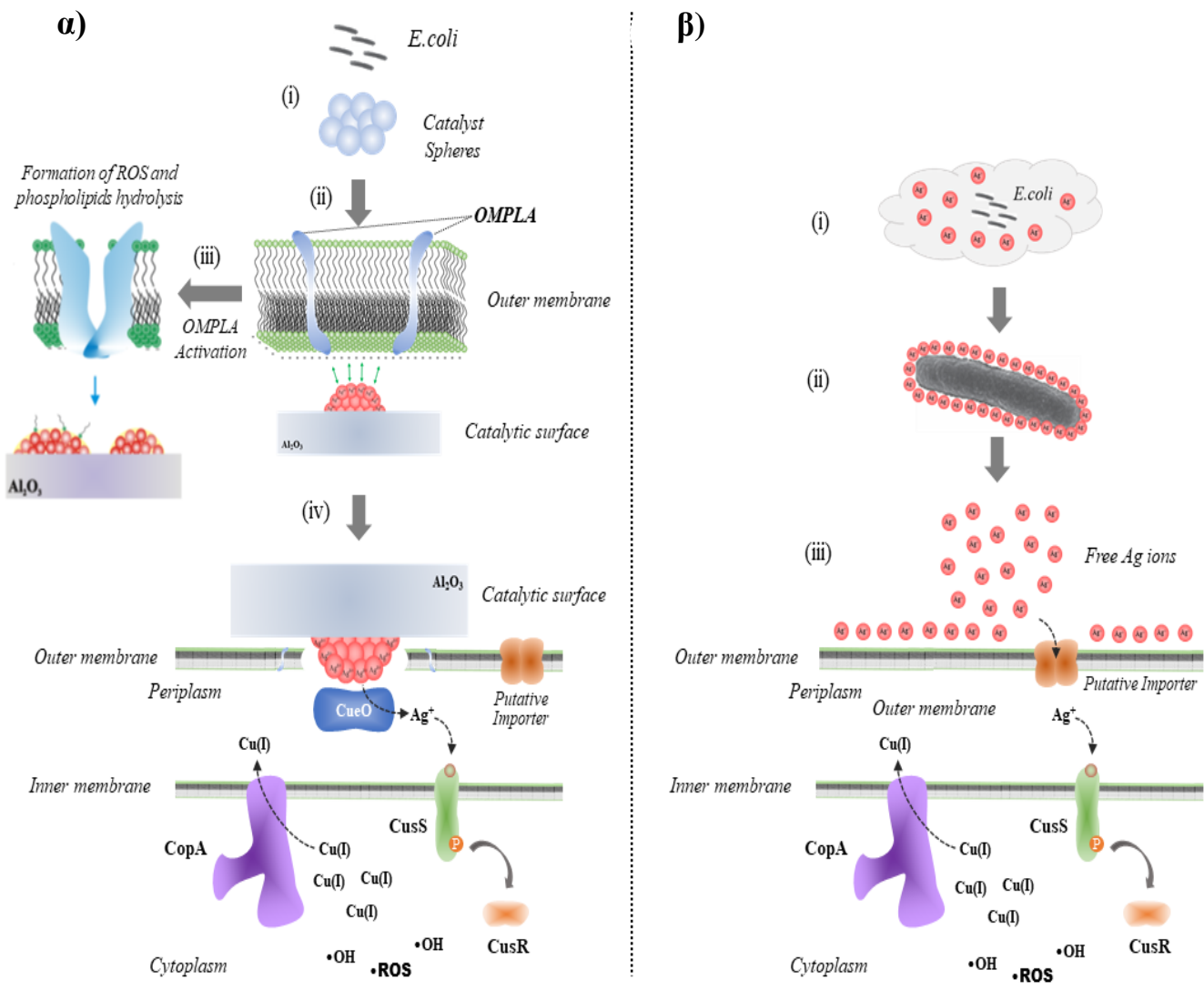
καταλυτική ψευδο-επεξεργασία έγκειται στον αριθμό των ιόντων Ag^+ που τελικά διαπερνούν την εξωκυτταρική μεμβράνη της *E. coli*. Στο σημείο αυτό σημειώνεται πως η ροή ιόντων αργύρου στο εσωτερικό του κυττάρου αναμένεται να είναι μικρότερη συγκριτικά με τον ψευδο-καταλυτικό μηχανισμό βακτηριακής αναστολής.

Στην περίπτωση της επεξεργασίας με το στερεό 1% κ.β. $Ag/\gamma-Al_2O_3$ (Σχ. 4.29α), ακολουθεί η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CueO με τους κρυσταλλίτες αργύρου ($Ag^{\delta+}$) στην επιφάνεια του στερεού (βήμα (iv)), με αποτέλεσμα την οξείδωση του σχεδόν μεταλλικού άργυρου σε Ag^+ και την επαγόμενη μεταφορά του στο περίπλασμα.

Αντίθετα, κατά την επεξεργασία των βακτηρίων χρησιμοποιώντας διάλυμα ελευθέρων ιόντων αργύρου, δεν αναμένεται (και δεν παρατηρείται) η επαγωγή του γονιδίου *cueO*, σε αντίθεση με την περίπτωση ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας (Πίνακας 22), εξαιτίας του γεγονότος πως τα ιόντα που τελικά διαπερνούν την εξωκυτταρική μεμβράνη (μέσω των πόρων της) είναι ήδη οξειδωμένα.

Τα βήματα που ακολουθούν στη συνέχεια είναι παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις διαφορετικής επεξεργασίας και σχετίζονται με την διατάραξη/εμπλοκή των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ομοιόσταση των ιόντων χαλκού στο περίπλασμα και κυτταρόπλασμα, όπως είναι το σύμπλεγμα πρωτεϊνών CusS/CusR. Η πιο πάνω διατάραξη επιφέρει την πλήρη αποσταθεροποίηση του κυττάρου με τελευταίο αποτέλεσμα την διατάραξη του κύκλου αναπνοής του.

Το τελευταίο γεγονός επιβεβαιώνεται από προηγούμενες επιστημονικές μελέτες. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι ο άργυρος τείνει να καταστέλλει τον κύκλο της αναπνοής του *E. coli*, είτε χρησιμοποιείται υπό μορφή νανοσωματιδίων (AgNPs) είτε υπό μορφή διαλύματος ελευθέρων ιόντων (Ag^+) [22] [143] [146] [145] [234] [147]. Η κυτταρική αναπνοή θεωρείται μια διαδικασία τεσσάρων σταδίων που περιλαμβάνει τη γλυκόλυση, την οξείδωση του δημιουργούμενου πυροσταφυλικού οξέος, τον κύκλο του Krebs και την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων [142]. Όλα αυτά τα στάδια εμπερικλείουν την συνεργασία διάφορων ενζύμων.



Σχήμα 4.29. Προτεινόμενος, από την παρούσα διατριβή, μηχανισμός βακτηριακής αναστολής που αποδίδεται, (α) στην ψευδο-καταλυτική επεξεργασία των βακτηρίων *E. coli* και (β) στην επεξεργασία των βακτηρίων *E. coli* με διάλυμα ελευθέρων ιόντων Ag⁺.

Πιο συγκεκριμένα, η αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH), η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *gapA* σε μια ευρεία ποικιλία περιβαλλοντικών συνθηκών, αποτελεί ένα εξόχως σημαντικό ένζυμο για την διαδικασία της γλυκόλυσης [244] [245]. Επίσης, η GAPDH ευθύνεται για την οξειδωτική φωσφoryλίωση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (G3P) σε 1,3-διφωσφογλυκερικό (1,3-BPG), στην παρουσία του συνένζυμου NAD (δινουκλεοτίδιο νικοτιναμιδίου-αδενίνης), το οποίο αποτελεί το

πρώτο βήμα του μονοπατιού της γλυκόλυσης που σχετίζεται με την δημιουργία του πυροσταφυλικού οξέος. Σύμφωνα με τους Wang et. al., η GAPDH συνιστά ένα μοριακό στόχο όπου δεσμεύονται τα ελεύθερα ιόντα αργύρου Ag^+ , προκαλώντας την αδρανοποίηση της εν λόγω πρωτεΐνης [143]. Έτσι, η διατάραξη της αναπνευστικής λειτουργίας της *E. coli* εξαιτίας της επαγόμενης από τον άργυρο τοξικότητας, συντελείται από τα πρώτα κιάλας στάδια πρόσληψης της γλυκόζης από το κύτταρο [143]. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 22, το γονίδιο *gapA* επάγεται σημαντικά μόνο τα τυφλά πειράματα, γεγονός που αποδεικνύει την καταστολή του στην παρουσία του στερεού 1% κ.β. $Ag/\gamma-Al_2O_3$, όπως επίσης επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 22.

Ως εκ τούτου, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας Δ.Δ., αλλά και την υπάρχουσα βιβλιογραφία, αποδεικνύεται η ύπαρξη ενός βιολογικού μονοπατιού για την καταστολή του γονιδίου *gapA* που σχετίζεται άμεσα με την δράση του αργύρου. Ο ισχυρισμός αυτός δικαιολογείται απόλυτα από την σημαντική καταστολή του γονιδίου *gapA* μετά από 25 λεπτά ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας. Επιπρόσθετα, σε αντίθεση με τα τυφλά πειράματα, η μη παρατήρηση σημαντικής επαγωγής του γονιδίου *gapA* μετά από 5 λεπτά ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας του βακτηρίου, επιβεβαιώνει τον προτεινόμενο μηχανισμό της παρούσας Δ.Δ., ο οποίος προϋποθέτει την καταρχήν διείσδυση του αργύρου εντός του κυττάρου προτού να είναι δυνατή η αλληλεπίδραση του με τα συστατικά του κυτταροπλάσματος [246] [247]. Αποκαλύπτει επίσης πως το μονοπάτι αναστολής του ενζύμου προϋποθέτει την διείσδυση των ιόντων Ag^+ στο κυτταρόπλασμα. Σημειώνεται ότι, η δημιουργία οπών στην εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων λόγω της αλληλεπίδρασής της με τον ακινητοποιημένο άργυρο στην επιφάνεια του στερεού υλικού 1% κ.β. $Ag/\gamma-Al_2O_3$, καθώς και η δράση του ενζύμου CueO, δημιουργούν τις κατάλληλες προϋποθέσεις για εισαγωγή του αργύρου στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπίδραση του με την πρωτεΐνη GAPDH. Το τελευταίο βήμα μπορεί να θεωρηθεί ως ακόμα μια πτυχή των αλληλένδετων βημάτων που συνθέτουν τον γενικότερο μηχανισμό βακτηριακής αναστολής, με την χρήση του στερεού 1% κ.β. $Ag/\gamma-Al_2O_3$.

Καταληκτικά, τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, πέρα από την παροχή σημαντικών πληροφοριών για τον μηχανισμό αναστολής των βακτηρίων,

αποτελούν αδιάσειστα στοιχεία τα οποία αποδεικνύουν το γεγονός πως η αντιμικροβιακή δράση των μονομεταλλικών στηριζόμενων στερεών άργυρου ($\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ και $\text{Ag}/\text{CeO}_2\text{-}\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) μπορεί να θεωρηθεί ως ένα ετερογενές ψευδο-καταλυτικό φαινόμενο που πραγματοποιείται στην στερεά επιφάνεια. Υπενθυμίζεται ότι η συνεισφορά των ελεύθερων ιόντων αργύρου στην καταστολή των βακτηρίων στο υπό επεξεργασία βακτηριακό διάλυμα μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (υποκεφάλαιο 3.2.).

Στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ., προτείνεται για πρώτη φορά μέχρι σήμερα, ένας λεπτομερής μηχανισμός, ο οποίος περιγράφεται εκτενώς στα Σχ. 4.25 και 4.29, και ο οποίος δικαιολογεί πλήρως τις εξαιρετικές αντιμικροβιακές ιδιότητες του ακινητοποιημένου άργυρου (x% κ.β. $\text{Ag}/\text{υπόστρωμα}$). Παρατηρώντας και αναλύοντας τον μηχανισμό αυτό μέσα από το ευρύτερο και γενικότερο πλαίσιο της αντιμικροβιακής δράσης του άργυρου, θα μπορούσε να αναθεωρηθεί η μέχρι τώρα γνώση που αφορά την αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού με τον οποίο ο άργυρος προκαλεί την παρατηρούμενη μικροβιακή αναστολή, και παράλληλα θα μπορούσε να βελτιώσει την περεταίρω και ολοκληρωμένη κατανόηση της όλης αντιμικροβιακής διαδικασίας. Η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού αναστολής των βακτηρίων (*E. coli* και άλλων) από τον άργυρο, μπορεί αλυσιδωτά να οδηγήσει στην ανάπτυξη καινοτόμων βελτιωμένων βακτηριοκτόνων τεχνολογιών χρησιμοποιώντας μονομεταλλικά στηριζόμενα στερεά (ψευδο-καταλύτες). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας Δ.Δ., η τελευταία τεχνολογία μπορεί να αποτελέσει ιδανική λύση για την απολύμανση του νερού έρματος των πλοίων, η διαχείριση του οποίου αποτελεί μείζον περιβαλλοντικό ζήτημα σήμερα [42] [44] [43] [45] [47] [57] [46] [56] [184] [48] [183] [49] [180] [207] [40] [58].

4.4. Πιλοτική Δοκιμή της Ψευδο-καταλυτικής Τεχνολογίας για την Επεξεργασία Νερού Έρματος Πλοίου

Με σκοπό την περεταίρω μελέτη και εξέλιξη της μεθόδου επεξεργασίας του νερού έρματος που προτείνεται στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, πραγματοποιήθηκε πιλοτική επεξεργασία νερού έρματος σε πραγματικές συνθήκες σε δεξαμενή του πετρελαιοφόρου πλοίου "Alexandria" (Σχήμα 4.30).



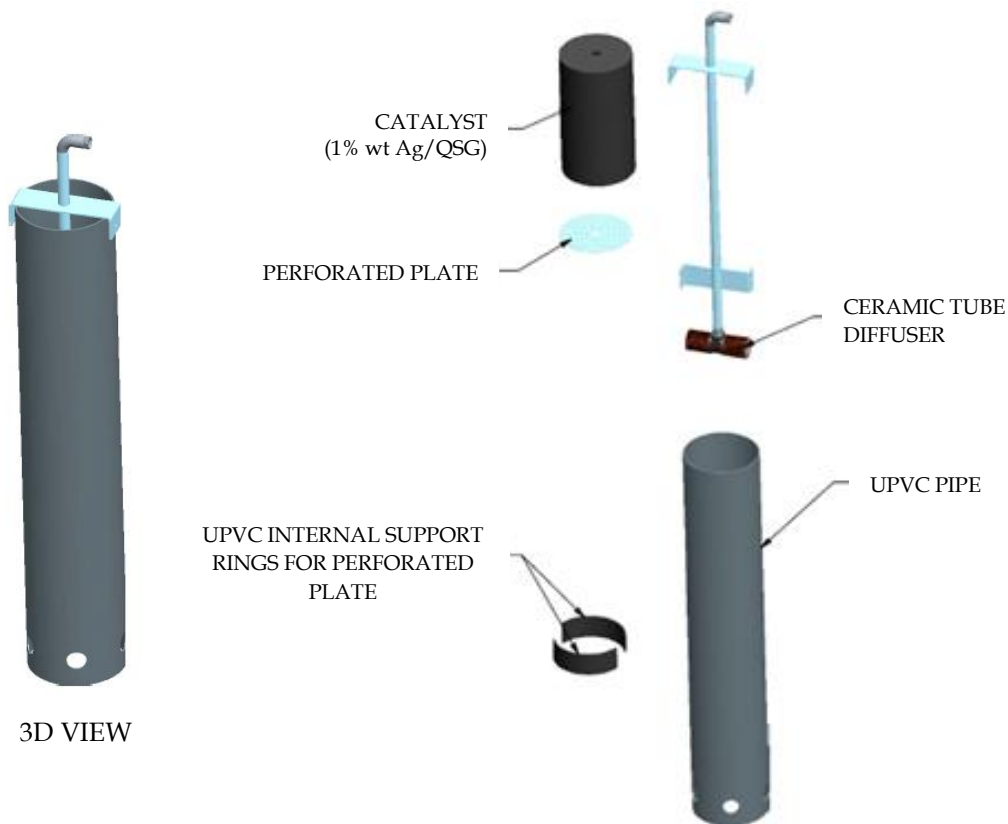
Σχήμα 4.30. Το πετρελαιοφόρο πλοίο "Alexandria".

Η επεξεργασία του υδάτινου έρματος του εν λόγω πλοίου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 25 kg του στερεού 1% κ.β. Ag/QSG. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως λόγω του υψηλού οικονομικού κόστους εξασφάλισης τέτοιας μεγάλης ποσότητας υποστρώματος γ-αλούμινας ($\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) για τους σκοπούς του συγκεκριμένου πειράματος, χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά ως υπόστρωμα το υλικό Quarzo Sferico Griggio το οποίο έχει βρεθεί να μην επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του στηριζόμενου στερεού. Το εν λόγω υλικό πέρα από το εξαιρετικά χαμηλό οικονομικό του κόστος, χρησιμοποιείται κατά κόρων σε ποικίλες εφαρμογές καθαρισμού και επεξεργασίας του νερού και ως εκ τούτου είναι εύκολα διαθέσιμο στο εμπόριο.

Επίσης, από μετρήσεις φασματοσκοπίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) που πραγματοποιήθηκαν σε μικροβιακό διάλυμα το οποίο είχε προηγουμένως υποστεί επεξεργασία με το στερεό 1% κ.β. Ag/QSG, διαπιστώθηκε πως δεν διαφεύγει καθόλου άργυρος από την στερεή επιφάνεια (Πίνακας 20, υποκεφάλαιο 4.3.1.) φανερώνοντας πως ενδεχομένως το εν λόγω υλικό να αποτελεί το ιδανικό υπόστρωμα για την επίτευξη αποτελεσματικής ψευδο-καταλυτικής αποστείρωσης του υδάτινου έρματος των πλοίων.

Για την επίτευξη του πιλοτικού πειράματος, σχεδιάστηκε εξειδικευμένη κατασκευή η οποία παρέχει την δυνατότητα κατευθείαν τοποθέτησης της σε δεξαμενή νερού έρματος πλοίου, χωρίς να απαιτούνται ιδιαίτερες τροποποιήσεις.

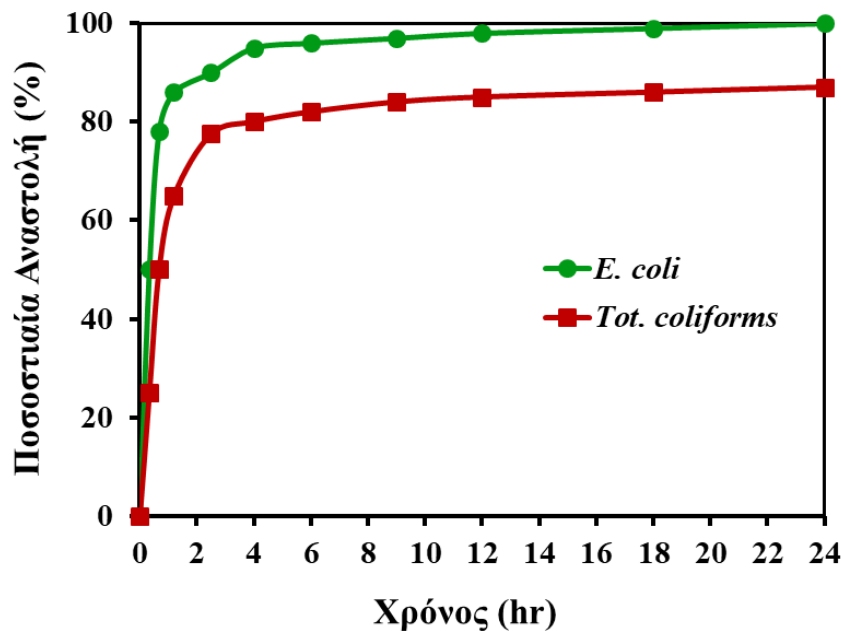
Η διάταξη, τα σχέδια της οποίας παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.31, αποτελείται από ένα σωλήνα UPVC, διαμέτρου 250 mm, ο οποίος περικλείει το στρώμα του στερεού (1% κ.β. Ag/QSG). Από το κέντρο του σωλήνα UPVC περνά ένας δεύτερος πλαστικός σωλήνας, μικρότερης διαμέτρου (200 mm), ο οποίος φτάνει περίπου μέχρι τα $\frac{3}{4}$ του ύψους του μεγάλου σωλήνα και καταλήγει σε διαχυτή (diffuser) από κεραμικό υλικό. Μέσα από τον μικρό σωλήνα διέρχεται ροή αέρα, ενώ όλο το σύστημα τοποθετείται στην δεξαμενή του νερού έρματος. Η ροή του αέρα (ο οποίος εξέρχεται από τον διάχυτη) επάγει την κυκλική κίνηση του νερού (draft) το οποίο πέρνα μέσα από το στρώμα του στερεού υλικού (Ag/QSG).



Σχήμα 4.31. Τρισδιάστατο σχέδιο τυπικής κατασκευής στο εσωτερικό της οποίας τοποθετείται το μονομεταλλικό στερεό αργύρου (1% κ.β. Ag/QSG).

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την πιλοτική δοκιμή παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.32. Όπως φαίνεται στο Σχ. 4.32, η ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E. Coli*, κατά τη διάρκεια του πιλοτικού πειράματος, έφτασε την υψηλή τιμή του 80% μόλις στα 40 λεπτά λειτουργίας της μονάδας, ενώ συνέχισε να αυξάνεται αργά φτάνοντας πρακτικά σε πλήρη αναστολή περίπου μετά από 12 ώρες συνεχούς λειτουργίας της μονάδας. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχ. 4.32 επιβεβαιώθηκαν (πέραν από τις μετρήσεις που έγιναν στα εργαστήρια του ΤΕΠΑΚ) από εξωτερικό πιστοποιημένο αναλυτικό/μικροβιολογικό εργαστήριο, σύμφωνα με το πρωτόκολλο ISO 9308-1:2014.

Πέραν από τη συγκέντρωση των βακτηρίων *E. coli*, στο εν λόγω εργαστήριο προσδιορίστηκε επίσης η συγκέντρωση των ολικών κολοβακτηριδίων (*Total coliforms*, ISO 9308-1:2014), η οποία επίσης παρουσιάζεται στο Σχ. 4.32. Όπως φαίνεται στο τελευταίο Σχήμα, η ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή των ολικών κολοβακτηριδίων ακολουθεί ένα παρόμοιο προφίλ με αυτό των *E. Coli*, παραμένοντας σε ελαφρώς χαμηλότερες τιμές (5-10%), καθόλη τη διάρκεια του πιλοτικού πειράματος.



Σχήμα 4.32. Ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή των *E. coli* και *Tot. coliforms* που επιτεύχθηκε σε σχέση με το χρόνο επεξεργασίας νερού έρματος πλοίου (πιλοτικό πείραμα) χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/QSG.

Τέλος, σημειώνεται ότι δεν βρέθηκε ανιχνεύσιμη συγκέντρωση εντερόκοκκων στο θαλασσινό νερό (με βάση το πρωτόκολλο ISO 7899-2:2002), κατά τη διάρκεια του πιλοτικού πειράματος.

Τα πιο πάνω αποτελέσματα θεωρούνται ιδιαίτερα σημαντικά, αφού επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα των στηριζομένων στερεών υλικών αργύρου σε πραγματικές συνθήκες. Το γεγονός αυτό αυξάνει σημαντικά τις δυνατότητες/πιθανότητες πρακτικής εφαρμογής την νέας τεχνολογίας της αντιμικροβιακής ψευδοκατάλυσης για την αντιμετώπιση της σημαντικής περιβαλλοντικής πρόκλησης σε σχέση με την αποστείρωση του νερού έρματος των πλοίων.

4.5. Προκαταρκτική (απλοποιημένη) Τεχνοοικονομική Μελέτη για την Αποστείρωση - Μικροβιολογική Επεξεργασία του Νερού Έρματος των Πλοίων

Κατά την διάρκεια του σχεδιασμού αλλά και της κατασκευής ενός πλοίου, οι δεξαμενές έρματος τοποθετούνται σε διάφορα μεγέθη και θέσεις, ανάλογα με το είδος του εκάστοτε πλοίου, ούτως ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα και η ακεραιότητα του βελτιώνοντας παράλληλα τις γενικότερες συνθήκες πλεύσης του (Σχήμα 4.33).

Τέτοιου τύπου δεξαμενές εξοπλίζονται με αισθητήρες για τον έλεγχο της στάθμης του νερού, διευκολύνοντας έτσι τον χειρισμό των ποικίλων βαλβίδων και αντλιών που χρησιμοποιούνται για την ασφαλή εξαγωγή και εισαγωγή νερού έρματος από και προς το εκάστοτε πλοίο αντίστοιχα. Σημειώνεται πως η προσπάθεια πλεύσης σχετίζεται τόσο με την σωστή ποσότητα όσο και με την σωστή κατανομή του νερού στις δεξαμενές του εκάστοτε πλοίου [55].

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως η συνεχής παρακολούθηση του όγκου που περιέχεται σε κάθε δεξαμενή έρματος είναι απαραίτητη για τον υπολογισμό και βελτιστοποίηση του ρυθμού εισαγωγής ή εξαγωγής νερού έρματος στις δεξαμενές. Κάτι τέτοιο γίνεται εφικτό μέσω ενός ειδικού λογισμικού με το οποίο βάση της μεταβολής του όγκου του νερού έρματος της επηρεαζόμενης δεξαμενής υπολογίζεται ο ρυθμός εισαγωγής ή εξαγωγής νερού και κατ' επέκταση ο χρόνος για την ολοκλήρωση της απαιτούμενης διαδικασίας.

Πιο συγκεκριμένα, η πολυπλοκότητα των διαδικασιών πρόσληψης ή απόρριψης νερού έρματος εξαρτάται από το μέγεθος, την διαμόρφωση, τις απαιτήσεις και τις προδιαγραφές των συστημάτων άντλησης και των σωληνώσεων του κάθε πλοίου. Λόγω μάλιστα διαφορών στην κατανομή του φορτίου αλλά και των απαιτήσεων σε καύσιμο και νερό, πολλά πλοία του ίδιου τύπου χαρακτηρίζονται από διαφορετικές ανάγκες σε νερό έρματος, παρόλο που ακόμα και οι θέσεις και τα μεγέθη των δεξαμενών τους παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη ταύτιση.

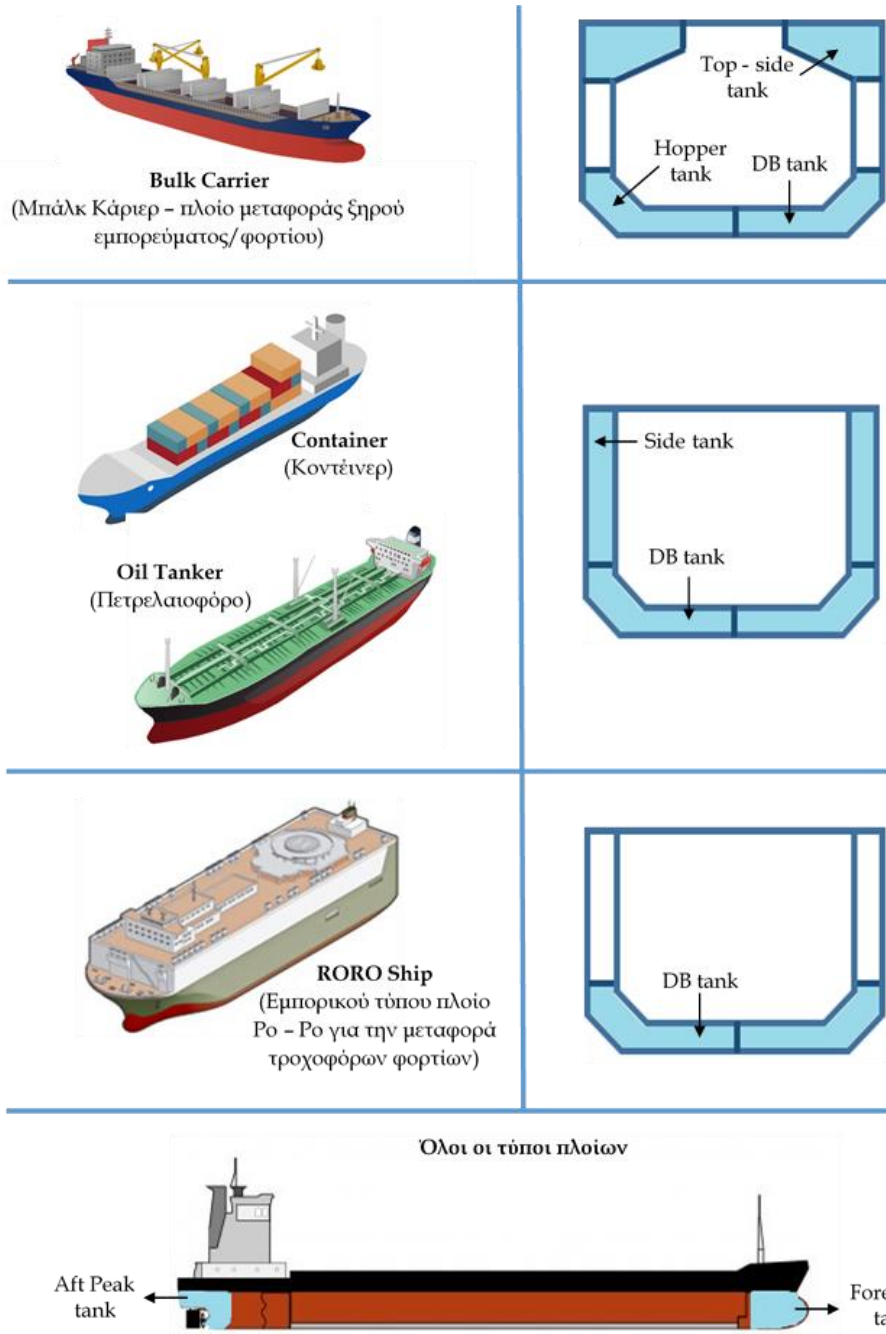
Ως εκ τούτου, η χωρητικότητα νερού έρματος κάθε πλοίου μπορεί να κυμαίνεται από αρκετά κυβικά μέτρα σε ιστιοπλοϊκά και αλιευτικά σκάφη μέχρι εκατοντάδες χιλιάδες κυβικά μέτρα σε μεγάλα εμπορευματοφόρα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως τα μεγάλα δεξαμενόπλοια δύναται να μεταφέρουν περισσότερα από 200000 m³ νερού έρματος. Επίσης ο ρυθμός απόρριψης ή πρόσληψης νερού μεταβάλλεται αναλόγως και μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να υπερβαίνει τις 15000 m³/h.

Η πρόσληψη αλλά και η απόρριψη νερού έρματος στο εκάστοτε λιμάνι γίνεται με στόχο την διατήρηση της σταθερότητας και κατ' επέκταση της πλευστότητας του πλοίου όπως αναφέρεται πιο πάνω. Περαιτέρω, ο έλεγχος αλλά και η κατάλληλη ποσοτική διαχείριση του νερού έρματος κατά την προσάραξη του πλοίου στο λιμάνι διασφαλίζει την ασφάλεια αλλά και την απρόσκοπτη διεκπεραίωση των απαραίτητων διεργασιών κατά την παραμονή του πλοίου στο εν λόγω λιμάνι. Τέλος, προτού αναχωρήσει το πλοίο από το λιμάνι στο οποίο βρίσκεται, εφοδιάζεται με την ενδεικνυόμενη ποσότητα νερού έρματος λαμβάνοντας υπόψη ένα σύνολο παραμέτρων, ούτως ώστε να επιτευχθούν οι καλύτερες δυνατές συνθήκες για το επερχόμενο ταξίδι.

Παρόμοια πολυπλοκότητα που παρουσιάζει η πρακτική διαχείρισης του νερού έρματος, παρουσιάζει και η οικονομική ανάλυση του κόστους για ένα σύστημα επεξεργασίας του νερού αυτού, λαμβάνοντας υπόψη την αρχική εγκατάσταση, πιθανές ενδεικνυόμενες τροποποιήσεις (π.χ. στο σύστημα σωληνώσεων και αντλιών του πλοίου), το λειτουργικό κόστος και το κόστος συντήρησης.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί πως η συνεχώς αυξανόμενη μικροβιακή αντοχή σε ποικίλους αντιμικροβιακούς παράγοντες, σε συνδυασμό με το υψηλό οικονομικό και

περιβαλλοντικό κόστος που χαρακτηρίζει αρκετές υφιστάμενες μεθόδους επεξεργασίας, καθιστά επιτακτική την ανάγκη προώθησης καινοτόμων μεθόδων για την αποστείρωση - επεξεργασία του νερού έρματος, όπως είναι η νέα τεχνολογία που μελετήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ.



Σχήμα 4.32. Διαμόρφωση των δεξαμενών του νερού έρματος ανάλογα με τον τύπο πλοίου [55].

Παρόλο που είναι πολλές φορές αρκετά δύσκολο να υπολογιστεί το ακριβές κόστος ενός συστήματος επεξεργασίας νερού έρματος, δημοσιεύτηκε πρόσφατα τεχνική μελέτη, από την εταιρεία "Kuwait oil tanker", στην οποία καταγράφονται τα διάφορα κόστη αγοράς και εγκατάστασης τέτοιων συστημάτων από διάφορες προμηθεύτριες εταιρείες [248]. Έτσι, σε συνδυασμό και με άλλες επιστημονικές μελέτες [249], κατέστη εφικτός ο σχηματισμός μιας καλύτερης εικόνας αναφορικά με το απαιτούμενο κόστος για την διαχείριση του νερού έρματος, ειδικότερα από πλοία που δεν διαθέτουν τέτοιου είδους συστήματα για την αποστείρωση – απολύμανση του νερού έρματος και θα πρέπει να τα εγκαταστήσουν από το μηδέν.

Με βάση την υφιστάμενη πληροφόρηση, η αγορά και εγκατάσταση ενός τυπικού συστήματος επεξεργασίας του νερού έρματος σε ένα τυπικό εμπορευματοφόρο πλοίο κοστολογείται περίπου στα €1,5 εκ., με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα πιστοποιημένα συστήματα να περιλαμβάνουν κυρίως υπεριώδη ακτινοβολία ή ηλεκτρόλυση/ηλεκτροχλωρίωση για την αποστείρωση του νερού [179]. Ειδικότερα, από τα 55 διαθέσιμα και εγκεκριμένα συστήματα από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO) για την επεξεργασία του νερού έρματος το 2018, 20 (36%) χρησιμοποιούν υπεριώδη ακτινοβολία και άλλα 20 (36%) χρησιμοποιούν ηλεκτρόλυση/ηλεκτροχλωρίωση για την επιτυχή επεξεργασία του εκάστοτε μικροβιακού φορτίου.

Με βάση τη συνθήκη για τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων που εγκρίθηκε από την διπλωματική διάσκεψη του Διεθνούς Οργανισμού Ναυσιπλοΐας (IMO) τον Φεβρουάριο του 2004 και τέθηκε σε ισχύ τον Σεπτέμβριο του 2017, διακρίνονται δύο κύρια πρότυπα διαχείρισης [177] [50]:

- D1 – Πρότυπο ανταλλαγής νερού έρματος το οποίο απαιτεί την ανταλλαγή του 95% του όγκου του νερού έρματος χρησιμοποιώντας είτε την μέθοδο της διαδοχικής ροής (sequential flow method), είτε την μέθοδο της συνεχούς απόπλυσης (flow through method), είτε την μέθοδο της ταυτόχρονης εκκένωσης και πλήρωσης (dilution method)

- D2 – Πρότυπο διασφάλισης της ποιότητας του νερού έρματος που απαιτεί την ικανοποιητική επεξεργασία του νερού μέσω της εγκατάστασης συστήματος επεξεργασίας ούτως ώστε να επιτυγχάνονται αυστηρώς καθορισμένα όρια σχετικά με το φυτοπλαγκτόν, το ζωοπλαγκτόν και συγκεκριμένα είδη βακτηρίων που θεωρούνται δείκτες εξέτασης της ποιότητας του νερού (βλ. Πίνακα 2, υποκεφ. 2.10)

Σημειώνεται επίσης πως μετά από τις 8 Σεπτεμβρίου 2017, ημερομηνία κατά την οποία τέθηκε σε ισχύ η προαναφερθείσα συνθήκη διαχείρισης του νερού έρματος, όλα τα πλοία υποχρεούνται να διαθέτουν και να διατηρούν σχέδιο/πλάνο διαχείρισης του νερού έρματος τους, αρχείο διαχείρισης και επεξεργασίας του νερού αλλά και διεθνές πιστοποιητικό διαχείρισης του νερού έρματος. Τα πλοία μάλιστα που κατασκευάζονται μετά από τις 8 Σεπτεμβρίου 2017 δια νόμου υποχρεούνται να πληρούν τα κριτήρια του προτύπου D2 ενώ σταδιακά όλα τα πλοία είναι υποχρεωμένα να προσαρμοστούν στα κριτήρια αυτά (D2) μέχρι το 2024 [177] [50].

Τα σύγχρονα συστήματα επεξεργασίας του νερού έρματος ακολουθούν μια προσέγγιση δύο σταδίων και οι κύριες διαφορές τους έγκεινται στην τεχνολογία που προτιμάται για την αντιμετώπιση βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών (2^ο στάδιο) στοχεύοντας στην επιτυχή αποστείρωση του νερού. Συγκεκριμένα, η πρωτοβάθμια - αρχική επεξεργασία με την χρήση φίλτρων και υδροκυκλώνων στοχεύει στην μείωση των μεγαλύτερων σε μέγεθος υδρόβιων οργανισμών βελτιώνοντας παράλληλα την απόδοση της μετέπειτα επεξεργασίας που περιλαμβάνει την διαχείριση του μικροβιακού φορτίου του νερού [250]. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αντιμετώπιση παθογόνων βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών επιχειρείται κυρίως μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας ή ηλεκτρόλυσης/ηλεκτροχλωρίωσης.

Στο σημείο αυτό τονίζεται πως τα οικονομικά χαρακτηριστικά κάθε συστήματος επεξεργασίας νερού έρματος αποτελούν τον πλέον σημαντικότερο παράγοντα για την τελική επιλογή και χρησιμοποίησή του, τόσο για υφιστάμενα πλοία όσο και για νέα, υπό κατασκευή πλοία. Ανάμεσα στις εξεταζόμενες οικονομικές παραμέτρους, πριν από την αγορά και εγκατάσταση οποιουδήποτε συστήματος, συγκαταλέγονται η αγορά του

συστήματος, το κόστος εγκατάστασης, το κόστος λειτουργίας, καθώς επίσης και το κόστος συντήρησης του συστήματος.

Η προκαταρκτική τεχνοοικονομική ανάλυση της προτεινόμενης μεθόδου επεξεργασίας του νερού έρματος, που προτείνεται από την παρούσα Διατριβή, καθώς και των υφιστάμενων χρησιμοποιούμενων μεθόδων, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία και η ηλεκτρόλυση/ηλεκτροχλωρίωση, αναδεικνύει τα σημαντικά πλεονεκτήματα (οικονομικά και περιβαλλοντικά) που παρουσιάζει η καινοτόμος τεχνολογία της ψευδο-καταλυτικής αποστείρωσης του νερού έρματος με τη βοήθεια μονομεταλλικών στερεών άργυρου (π.χ. 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃).

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης οι υπολογισμοί αφορούσαν ένα μεσαίου μεγέθους πετρελαιοφόρο (oil tanker) με συνολική χωρητικότητα περίπου 8000 m³ νερού έρματος. Ο τύπος και το μέγεθος του πλοίου επιλέχθηκε με βάση τον μέσο όρο του μεγέθους των πλοίων που χρησιμοποιούνται συνήθως σε υπερωκεάνια ταξίδια και την παρόμοια συχνότητα πρόσληψης και απόρριψης νερού έρματος που παρατηρείται σε πετρελαιοφόρα πλοία (oil tanker) και σε πλοία μεταφοράς ξηρού εμπορεύματος/φορτίου (bulk carrier).

Ως εκ τούτου παρουσιάζονται παρακάτω ορισμένα βασικά τεχνικά και οικονομικά στοιχεία για: α) τη μέθοδο της διαδοχικής ροής (sequential flow method), β) την υπεριώδη ακτινοβολία (UV irradiation), γ) την ηλεκτρόλυση/ηλεκτροχλωρίωση και δ) την ψευδο-καταλυτική αποστείρωση σε μονομεταλλικό στερεό αργύρου φόρτισης 1% κ.β. (1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃) που μελετήθηκε εκτενώς στην παρούσα διατριβή. Σε κάθε περίπτωση συνυπολογίζεται το κόστος αγοράς της τεχνολογίας, το κόστος εγκατάστασης, το λειτουργικό κόστος και το κόστος συντήρησης χρησιμοποιώντας το μέσο όρο από τα οικονομικά δεδομένα διάφορων εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων επεξεργασίας για κάθε κατηγορία κόστους. Τα αποτελέσματα που έχουν ληφθεί παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 23.

α) Η μέθοδος της διαδοχικής ροής (sequential flow method):

Αξίζει αρχικά να αναφερθεί πως η συγκεκριμένη τεχνική δεν περιλαμβάνει οποιοδήποτε κόστος εγκατάστασης αφού πρόκειται για απλή ανταλλαγή του νερού που βρίσκεται στις δεξαμενές έρματος του πλοίου μακριά από παράκτιες περιοχές όπως περιγράφεται στο

πρότυπο D1 της συνθήκης διαχείρισης του νερού έρματος. Παρ' όλ' αυτά, η τεχνική αυτή θα εγκαταλειφθεί σταδιακά λόγω του ότι όλα τα πλοία καλούνται βάση αυστηρών χρονοδιαγραμμάτων (μέχρι το 2024) να συμμορφωθούν με το προαναφερθέν πρότυπο D2 της σχετικής συνθήκης [50].

Παρ' όλ' αυτά, μια πρόσφατη ανάλυση κόστους της συγκεκριμένης τεχνικής αποκάλυψε πως η μέθοδος της διαδοχικής ροής χαρακτηρίζεται από το ψηλότερο λειτουργικό κόστος σε σύγκριση με τις άλλες περιγραφόμενες τεχνικές [182]. Συγκεκριμένα, για την επεξεργασία 8000 m³ νερού έρματος υπολογίζεται πως απαιτούνται €150, ποσό που αφορά το απαιτούμενο καύσιμο, ή αλλιώς ενέργεια, που απαιτείται για την πραγματοποίηση μιας ανταλλαγής. Δεδομένου λοιπόν του ότι κάθε πλοίο πραγματοποιεί ετησίως περίπου 12 ταξίδια, το ετήσιο λειτουργικό κόστος ανέρχεται στα €1800 [182].

Επιπλέον, το κόστος συντήρησης αφορά κυρίως στην συντήρηση των αντλιών ανακυκλοφορίας, πρόσληψης και απόρριψης του νερού που κοστολογείται περίπου στα €1000 ετησίως.

β) Υπεριώδης ακτινοβολία (UV irradiation):

Η υπεριώδης ακτινοβολία χρησιμοποιείται ως μέθοδος διαχείρισης του μικροβιακού φορτίου για συμμόρφωση με τα όρια του προτύπου D2 της συνθήκης του IMO (βλ. Πίνακα 2), σχετικά με τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων. Η αγορά ενός τέτοιου συστήματος κοστολογείται, κατά μέσο, όρο περίπου στα 1,2 Μ €. σύμφωνα με κατά καιρούς δημοσιεύσεις εταιρειών παροχής τέτοιου τύπου συστημάτων επεξεργασίας [248]. Παρομοίως, η εγκατάσταση συστήματος επεξεργασίας του νερού έρματος το οποίο χρησιμοποιεί υπεριώδη ακτινοβολία ανέρχεται περίπου στις €300,000 καθώς απαιτείται σημαντικός χρόνος αλλά και η πραγματοποίηση ποικίλων αλλαγών στο εκάστοτε πλοίο.

Όσον αφορά το λειτουργικό κόστος, για την επεξεργασία 8000 m³ νερού έρματος υπολογίζεται πως απαιτούνται €50 που αφορά την κατανάλωση ενέργειας. Δεδομένου λοιπόν του ότι κάθε πλοίο πραγματοποιεί ετησίως περίπου 12 ταξίδια, και συνυπολογίζοντας πως με βάση το πρότυπο D2 απαιτείται επεξεργασία του νερού τόσο κατά την πρόσληψη όσο και κατά την απόρριψη του, το ετήσιο λειτουργικό κόστος

ανέρχεται στα €1200 [182]. Προσθέτοντας επίσης το κόστος για την παρακολούθηση του κατά πόσο διασφαλίζεται η συμμόρφωση του συστήματος και κατ' επέκταση του πλοίου με τα ενδεικνύμενα όρια, το ετήσιο λειτουργικό κόστος ανέρχεται περίπου στα €1700.

Το κόστος συντήρησης ενός τέτοιου συστήματος επεξεργασίας που χρησιμοποιεί λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας περιλαμβάνει μεταξύ άλλων λαμπτήρες, καλύμματα των λαμπτήρων που πιθανόν να υποστούν φθορά και εξαρτήματα συντήρησης των αντλιών. Σε γενικές γραμμές η συντήρηση των συστημάτων που χρησιμοποιούν υπεριώδη ακτινοβολία αποτελεί μια σχετικά απλή διαδικασία αφού τις πλείστες φορές δεν απαιτείται κάτι άλλο παρά μόνο η αντικατάσταση των φθαρμένων λαμπτήρων και ο περιστασιακός καθαρισμός των καλυμμάτων τους. Το ετήσιο κόστος συντήρησης υπολογίζεται περίπου στα €2000 [251].

γ) Ηλεκτρόλυση/Ηλεκτροχλωρίωση:

Η ηλεκτροχλωρίωση θεωρείται ως μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδος διαχείρισης του μικροβιακού φορτίου. Ωστόσο, λόγω του ότι η ηλεκτροχλωρίωση προϋποθέτει τη χρήση περισσότερων εξαρτημάτων και παραμέτρων, για την επεξεργασία μικρότερων ποσοτήτων νερού απαιτείται υψηλότερο κόστος σε σύγκριση με την χρησιμοποίηση υπεριώδους ακτινοβολίας. Εν τούτοις, λόγω του ότι το κόστος δεν αυξάνεται όσο αυξάνεται ο όγκος του νερού έρματος που επίκειται να επεξεργαστεί, η ηλεκτροχλωρίωση γίνεται πιο ελκυστική μέθοδος για μεγαλύτερου μεγέθους πλοία. Έτσι, για ένα συγκεκριμένο διάστημα τιμών της ροής άντλησης νερού, το κόστος της ηλεκτροχλωρίωσης είναι το ίδιο με τα συστήματα που χρησιμοποιούν υπεριώδη ακτινοβολία [252].

Όπως λοιπόν και στην περίπτωση της υπεριώδους ακτινοβολίας, η αγορά ενός συστήματος ηλεκτροχλωρίωσης κοστολογείται κατά μέσο όρο περίπου στο 1 Μ €. σύμφωνα με κατά καιρούς δημοσιεύσεις εταιρειών παροχής τέτοιου τύπου συστημάτων επεξεργασίας, καθώς και άλλες μελέτες [248]. Η εγκατάσταση ενός τέτοιου συστήματος επεξεργασίας του νερού έρματος ανέρχεται περίπου στις €200,000 καθώς απαιτείται μεγάλος χρόνος αλλά και η πραγματοποίηση απαραίτητων τροποποιήσεων στο εκάστοτε πλοίο [253].

Ωστόσο, ανασταλτικό παράγοντα που αντισταθμίζει την υψηλή απόδοση αναστολής των βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών, αποτελούν οι επικίνδυνες για το περιβάλλον και την βιοποικιλότητα χημικές ενώσεις που σχηματίζονται ως παραπροϊόντα (π.χ. χλωροφόρμιο) της όλης αντιμικροβιακής διεργασίας. Οι ενώσεις αυτές μπορούν να αδρανοποιηθούν μέσω τις προσθήκης αλάτων του νατρίου όπως είναι το θειικό νάτριο. Ωστόσο ορισμένες φορές, πιθανόν να διαφεύγουν μικρές ποσότητες με την απόρριψη του νερού διαταράσσοντας την οικολογική ισορροπία της περιοχής στην οποία απορρίπτεται το ρυπασμένο νερό. Γίνεται λοιπόν κατανοητό πως η ηλεκτροχλωρίωση αποτελεί μια σχετικά πολύπλοκη διαδικασία επεξεργασίας του νερού έρματος, γεγονός που τις καθιστά μη προτιμητέες για πολλές ναυτιλιακές εταιρείες οι οποίες τηρούν μια φιλική προς το περιβάλλον πολιτική αποφεύγοντας τη χρήση χημικών [182].

Για την επεξεργασία 8000 m³ νερού έρματος με την πιο πάνω τεχνολογία υπολογίζεται πως απαιτούνται €30 σε ενέργεια. Ως εκ τούτου, για 12 ταξίδια, και συνυπολογίζοντας πως σε αντίθεση με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας μία και μόνο επεξεργασία του νερού είναι αρκετή, το ετήσιο λειτουργικό κόστος προκύπτει να είναι €360 [182]. Προσθέτοντας επίσης το κόστος για την αγορά των χρησιμοποιούμενων χημικών αλλά και το κόστος για την παρακολούθηση της συμμόρφωσης του συστήματος και κατ' επέκταση του πλοίου με τα ενδεικνυόμενα όρια, το ετήσιο λειτουργικό κόστος ανέρχεται περίπου στα €2650.

Λόγω και πάλι της χρήσης χημικών και της πιθανότητας διάβρωσης των δεξαμενών, το ετήσιο κόστος συντήρησης ενός συστήματος ηλεκτροχλωρίωσης ανέρχεται περίπου στα €4000 [253] [254].

δ) Ψευδο-καταλυτική αποστείρωση με χρήση μονομεταλλικού στηριζόμενου στερεού αργύρου (1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃):

Με σκοπό την διακρίβωση της τελικής τιμής πώλησης του μονομεταλλικού στερεού αργύρου ως μέθοδο για την επεξεργασία του νερού έρματος, λήφθηκαν υπόψη διάφορες παράμετροι που επηρεάζουν την συγκεκριμένη τιμή. Στις παραμέτρους αυτές συγκαταλέγονται ο κύκλος ζωής του προϊόντος (στερεού ψευδο-καταλύτη), το κόστος για την εμπορικοποίηση και διάθεση του προϊόντος, το κόστος προσέλκυσης/προσέγγισης

υποψήφιων πελατών (marketing cost) αλλά και το κόστος κατασκευής του τελικού συστήματος.

Συγκεκριμένα, το κόστος κατασκευής του συστήματος το οποίο αποτελεί και το σημαντικότερο από τα προαναφερθέντα κόστη (90% του τελικού κόστους του συστήματος), περιλαμβάνει το κόστος κατασκευής του στερεού (ψευδο-καταλύτη) αλλά και το κόστος του συστήματος ροής στο οποίο θα τοποθετηθεί το στερεό υλικό (Ag/ γ - Al_2O_3) ούτως ώστε να γίνει εφικτή η προσαρμογή του σε οποιαδήποτε δεξαμενή νερού έρματος ενός ενδιαφερόμενου πλοίου. Μια τέτοια διάταξη (κατασκευή) παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.31.

Το κόστος παρασκευής του καταλύτη περιλαμβάνει τόσο την προμήθεια του υποστρώματος που στην προκειμένη περίπτωση πρόκειται για σφαιρίδια οξειδίου του αργυρίου (γ - Al_2O_3) όσο και την προμήθεια της ενεργούς φάσης (Άργυρος) που προκύπτει από την χρησιμοποιούμενη πρόδρομη χημική ένωση δηλαδή τον Νιτρικό Άργυρο ($AgNO_3$). Το υπόστρωμα (γ - Al_2O_3 - Sasol, code 604130) κοστολογείται στα **€45/kg**. Παρομοίως, δεδομένου του ότι για την κατασκευή ενός κιλού "καταλύτη" απαιτούνται 15,7 g $AgNO_3$ (Carlo Erba, code 423954) ούτως ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή φόρτιση (1% κ.β.), το κόστος της ενεργού φάσης για ένα κιλό "καταλύτη" αντιστοιχεί σε **€23,55**. Αμελητέα δεν μπορεί να θεωρηθεί και η κατανάλωση ηλεκτρικής ενέργειας για την παρασκευή του "καταλύτη" που κοστολογείται στα €8/kg ενώ η χρήση όλων των άλλων απαραίτητων αναλώσιμων κοστολογείται στα €5/kg "καταλύτη". Ως εκ τούτου το συνολικό κόστος παρασκευής του καταλύτη ανέρχεται στα **€81,55/kg**.

Επιπλέον, με βάση τα αποτελέσματα των εργαστηριακών πειραμάτων του καταλύτη σχετικά με την ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή ανάλογα με τον χρόνο ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας και λαμβάνοντας υπόψη την πυκνότητα των βακτηρίων σε κάθε κυβικό μέτρο θαλασσινού νερού ($\approx 10^7$ βακτήρια/ cm^3 θαλασσινού νερού) [255] [55], για την επεξεργασία 150 m^3 νερού έρματος απαιτούνται 20 kg στερεού φόρτισης άργυρου 1% κ.β., με την επίτευξη πλήρους βακτηριακής αναστολής να παρατηρείται μετά την πάροδο 36 ωρών. Ως εκ τούτου για την επεξεργασία 8000 m^3 νερού απαιτείται περίπου 1 τόνος (1070 kg) στερεού το οποίο μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις κατασκευές οι οποίες μπορούν να τοποθετηθούν σε τρεις διαφορετικές δεξαμενές έρματος από τις οποίες δύναται να

κυκλοφορήσει διαδοχικά όλη η ποσότητα νερού έρματος που χρίζει επεξεργασίας. Σχεδόν πλήρης βακτηριακή αναστολή αναμένεται να παρατηρηθεί σε μια τέτοια περίπτωση μετά την πάροδο 24-36 ωρών.

Όσο αφορά την κατασκευή η οποία μπορεί να ανατεθεί σε εταιρεία η οποία εξειδικεύεται σε κατασκευές παρόμοιου τύπου, και στο εσωτερικό της οποίας θα τοποθετηθεί η ενδεικνυόμενη ποσότητα "καταλύτη", κοστολογείται περίπου στα €5000/τμχ.

Συνυπολογίζοντας το κέρδος, η αγορά ενός συστήματος ψευδο-καταλυτικής αποστείρωσης κοστολογείται περίπου στις €200000. Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως η επεξεργασία μεγαλύτερων όγκων νερού δεν αναμένεται να επηρεάσει σημαντικά την τιμή αγοράς του συστήματος ψευδο-καταλυτικής επεξεργασίας και τουλάχιστον όχι σε βαθμό που να μην διαθέτει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι των άλλων υφιστάμενων μεθόδων. Παραπέρα, το κόστος εγκατάστασης περιλαμβάνει το κόστος ταξιδιού στο λιμάνι προσάραξης του εκάστοτε πλοίου και τα εργατικά κόστη για την εγκατάσταση. Το κόστος αυτό, (πολύ συντηρητική εκτίμηση) ανέρχεται στα €10000.

Σημειώνεται ότι, η ψευδο-καταλυτική διεργασία ως μέθοδος δεν εγείρει οποιοδήποτε ηθικό ή περιβαλλοντικό ζήτημα καθώς αποδεδειγμένα δεν προκύπτει έκπλυση του ακινητοποιημένου άργυρου από την επιφάνεια του υποστρώματος, αντίθετα με την μέθοδο της ηλεκτροχλωρίωσης που στιγματίζεται από την χρήση χημικών. Παράλληλα η ψευδο-καταλυτική αποστείρωση του θαλασσινού νερού αποτελεί μια εναλλακτική λύση και όχι σύστημα επεξεργασίας, γεγονός που με βάση τις πρόνοιες και διατάξεις της συνθήκης, σχετικά με τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων του 2004, δύναται να παρακαμφθούν αρκετές γραφειοκρατικές διαδικασίες για την τελική ένταξη της εν λόγω λύσης στην αγορά.

Όσον αφορά το λειτουργικό κόστος, και αυτό μπορεί να θεωρηθεί αρκετά χαμηλό, καθώς δεν απαιτείται οτιδήποτε πέρα από την περιστασιακή εισαγωγή αέρα στη δεξαμενή όπου πραγματοποιείται η ψευδο-καταλυτική διεργασία του νερού, καθώς και την κυκλοφορία του νερού έρματος μεταξύ των δεξαμενών. Έτσι το ετήσιο λειτουργικό κόστος (σύμφωνα με πολύ συντηρητικές εκτιμήσεις) μπορεί να ανέλθει στα €1000. Στο ποσό αυτό συμπεριλαμβάνεται επίσης το κόστος για την παρακολούθηση του κατά πόσο

διασφαλίζεται η συμμόρφωση του συστήματος και κατ' επέκταση του πλοίου με τα ενδεικνυόμενα όρια.

Το κόστος συντήρησης περιλαμβάνει την αναγέννηση ή αντικατάσταση του στερεού υλικού (π.χ. Ag/QSG ή Ag/ γ -Al₂O₃) μετά την πάροδο 5 ετών που ενδεχομένως να μειωθεί η απόδοση του σημαντικά και κυμαίνεται μεταξύ €2000 (αναγέννηση) και €8000 (αντικατάσταση), για 5 χρόνια λειτουργίας του συστήματος, ποσό που αντιστοιχεί σε €200-1600, ετησίως.

Συμπερασματικά, ακόμα και μετά από μια απλοποιημένη (πρόχειρη) ανάλυση των οικονομικών δεδομένων για τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους επεξεργασίας του νερού έρματος των πλοίων, επιβεβαιώνεται ότι η ψευδο-καταλυτική αποστείρωση αποτελεί την πιο συμφέρουσα μέθοδο επεξεργασίας. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή απόδοση βακτηριακής αναστολής που παρέχει, τις αμελητέες έως ανύπαρχτες εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα (CO₂ emissions) αλλά και την εργονομική κατασκευή ούτως ώστε να μην απαιτείται η δέσμευση οποιουδήποτε χώρου του πλοίου, προκρίνει την συγκεκριμένη μέθοδο έναντι των μέχρι τώρα πιστοποιημένων τεχνικών επεξεργασίας του νερού έρματος.

Ο Πίνακας 23 παρουσιάζει συγκεντρωτικά τα δεδομένα για κάθε μια από τις πιο πάνω αναλυόμενες μεθόδους. Όπως εύκολα διακρίνεται, η καινοτόμος μέθοδος της ψευδο-καταλυτικής αποστείρωσης αναμένεται να προσφέρει μια σοβαρή επιλογή στον τομέα της ναυτιλίας και συγκεκριμένα στην επεξεργασία του νερού έρματος των πλοίων. Ως εκ τούτου κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω δοκιμή της μεθόδου αυτής κάτω από πραγματικές συνθήκες και σε πλήρη κλίμακα.

Πίνακας 23. Βασικά χαρακτηριστικά των πιο κοινών μεθόδων για την ετήσια επεξεργασία νερού έρματος όγκου 8000 m³.

Μέθοδος Επεξεργασίας	Κόστος Αγοράς (€)	Κόστος Εγκατάστασης (€)	Κόστος Λειτουργίας (€)	Κόστος Συντήρησης (€)	Χρόνος πλήρους βακτ. αναστολής (h)	Εφαρμογή Μεθόδου	Πιθανότητα Διάβρωσης
<i>Μέθοδος της διαδοχικής ροής ανταλλαγής νερού</i>	-----	-----	1800	1000	-----	Σε ανοιχτή θάλασσα (200 ναυτικά μίλια από την πιο κοντινή ακτή) και πριν την άφιξη του πλοίου στο λιμάνι προορισμού του	Καμία
<i>Υπεριώδης Ακτινοβολία (UV Irradiation)</i>	1,200,000	300,000	1700	2000	Κατά την επεξεργασία	Κατά την πρόσληψη και απόρριψη του νερού έρματος	Καμία
<i>Ηλεκτρόλυση/ Ηλεκτροχλωρίωση</i>	1,000,000	200,000	2650	4000	24-48	Έπειτα από την πρόσληψη του νερού έρματος	Υψηλές δόσεις χημικών προάγουν την μεταλλική διάβρωση
<i>Κατάλυτική επεξεργασία</i>	200,000	10000	1000	200-1600	24-36	Έπειτα από την πρόσληψη του νερού έρματος	Καμία

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των συντιθέμενων μεταλλικών στηριζόμενων στερεών υλικών Ag/γ-Al₂O₃, Cu/γ-Al₂O₃, Ag-Cu/γ-Al₂O₃ και Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃. Τα αποτελέσματα της παρούσας Δ.Δ. φανερώνουν την ύπαρξη σημαντικής αναστολής τόσο των αρνητικών όσο και των θετικών κατά Gram βακτηρίων που έχουν μελετηθεί. Ιδιαίτερα υψηλή βακτηριοκτόνο δράση απέναντι στα βακτήρια που εξετάστηκαν παρουσίασαν τα στερεά υλικά στα οποία χρησιμοποιήθηκε ο άργυρος ως ενεργός φάση (Ag/γ-Al₂O₃).

Το στερεό 1% κ.β. Ag/CeO₂-γ-Al₂O₃ παρουσίασε την υψηλότερη αντιμικροβιακή δραστικότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα στερεά υλικά που παρασκευάστηκαν και εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας τα στερεά με την ψηλότερη φόρτιση μετάλλου παρουσιάζουν υψηλότερη αντιμικροβιακή δραστικότητα έναντι οποιουδήποτε προς επεξεργασία βακτηριακού διαλύματος. Έχει βρεθεί ότι η αντιμικροβιακή δραστικότητα των στερεών υλικών (Ag/γ-Al₂O₃) αυξάνει με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των μικροοργανισμών, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αντιμικροβιακή διεργασία είναι θετικής τάξης ως προς την συγκέντρωση των μικροοργανισμών (βακτηρίων).

Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, εξάγεται το συμπέρασμα πως η συμβολή των ελεύθερων ιόντων αργύρου (Ag⁺) στην γενικότερη βακτηριακή αναστολή που παρατηρείται χρησιμοποιώντας τα στερεά υλικά x% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, είναι μάλλον ασήμαντη. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι μετά την προσθήκη κατάλληλου συμπλοκοποιητή (οξαλικό οξύ) για την δέσμευση των ελευθέρων ιόντων αργύρου στο μικροβιακό διάλυμα, δεν επηρεάζεται η ενεργότητα, και κατ' επέκταση η αντιμικροβιακή δράση των στερεών αργύρου.

Το γεγονός αυτό αναφέρεται για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία και ανατρέπει την υφιστάμενη αντίληψη ότι η δραστικότητα του αργύρου (π.χ. νανοσωματίδια Ag) οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στην δράση των ελεύθερων ιόντων αργύρου που διαφεύγουν (λόγω επιφανειακής διάλυσης – surface dissolution) στο βακτηριακό διάλυμα.

Επιπρόσθετα, μικροσκοπικές παρατηρήσεις (SEM, TEM) τόσο των βακτηρίων όσο και των στηριζόμενων στερεών αργύρου, κατέδειξαν σοβαρές μορφολογικές αλλαγές στην βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη αλλά και στην επιφάνεια των εν λόγω στερεών. Πιο συγκεκριμένα, η μικροσκοπική παρατήρηση της επιφάνειας του στερεού υλικού 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, μετά την χρήση του προς επεξεργασία βακτηριακού διαλύματος *E. coli*, απέδειξε την ύπαρξη προσκολλημένων βακτηρίων και υπολειμμάτων στην επιφάνεια του, καθώς και τον σχηματισμό μιας ιδιόμορφης δομής η οποία παρατηρείται για πρώτη φορά (αποτελέσματα SEM). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός ετερογενούς μηχανισμού αναστολής των βακτηρίων ο οποίος συντελείται (τουλάχιστον εν μέρει) στην επιφάνεια του στηριζόμενου στερεού. Επίσης, οι μικροσκοπικές παρατηρήσεις βακτηρίων που έτυχαν αντιμικροβιακής επεξεργασίας φανέρωσαν την δημιουργία οπών στην εξωκυτταρική μεμβράνη (αποτελέσματα TEM), κάτι που βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με τον μηχανισμό βακτηριακής αναστολής που προτείνεται στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ.

Οι φασματοσκοπικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία χρησιμοποιώντας το στερεό υλικό 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃, πριν και μετά την επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων, φανέρωσαν πως συστατικά της εξωκυτταρικής μεμβράνης ή/και ενδοκυτταρικά συστατικά δύναται να σχηματίζουν δεσμούς με τον ακινητοποιημένο άργυρο στην επιφάνεια του στερεού υλικού κατά την διάρκεια της εκάστοτε αντιμικροβιακής επεξεργασίας μικροβιακών διαλυμάτων, κατά πάσα πιθανότητα μετά από την λύση του κυττάρου.

Τα ευρήματα που προκύπτουν από την παρούσα Δ.Δ., αποτελούν σημαντικές ενδείξεις σχετικά με την ύπαρξη ενός ψευδο-καταλυτικού μηχανισμού βακτηριακής αναστολής, αποδεικνύοντας πως, σε αντίθεση με την μέχρι στιγμής υπάρχουσα γνώση, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του αργύρου δεν δύναται να αποδίδονται, σε σημαντικό βαθμό, στη δράση των ελευθέρων ιόντων αργύρου (Ag⁺). Αντίθετα, ο μηχανισμός αναστολής των βακτηρίων πρέπει ενδεχομένως να θεωρείται ως ένα ετερογενές επιφανειακό ψευδο-καταλυτικό φαινόμενο που ενεργοποιείται στην στερεή επιφάνεια.

Σε ότι αφορά την οξειδωτική κατάσταση του Ag στην επιφάνεια του στερεού, βρέθηκε ότι η ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης προϋποθέτει την ύπαρξη μερικώς οξειδωμένων κρυσταλλιτών Ag στην επιφάνεια των αντίστοιχων μεταλλικών στηριζόμενων στερεών.

Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι το εν λόγω ψευδο-καταλυτικό φαινόμενο περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των οξειδωμένων και κατ' επέκταση μερικώς θετικά φορτισμένων ατόμων αργύρου στην επιφάνεια του στερεού ($\text{Ag}^{\delta+}$) με την αρνητικά φορτισμένη εξωκυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων. Μια τέτοια αλληλεπίδραση επηρεάζει την ομοιομορφία κατανομής του φορτίου της εξωκυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων, κάτι που αποτελεί το σημείο ενεργοποίησης του ψευδο-καταλυτικού μηχανισμού λύσης των βακτηρίων.

Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης του βακτηρίου *E. coli*, που πραγματοποιήθηκε από την παρούσα εργασία αποκάλυψε πολύ σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την κατανόηση του αντιμικροβιακού μηχανισμού που λαμβάνει χώρα, με την αρχική επαγωγή του γονιδίου *pldA* να αποδεικνύεται ως το πρώτο βήμα του μηχανισμού. Η επαγωγή του συγκεκριμένου γονιδίου αντανάκλα την διατάραξη της ακεραιότητας της εξωκυτταρικής μεμβράνης (λόγω αλληλεπίδρασης της με τους κρυσταλλίτες αργύρου) και φαίνεται να επάγει την ενεργοποίηση ενός δευτερεύοντος μηχανισμού παραγωγής περίσσειας ελευθέρων ριζών μέσω ειδικών ενζύμων που βρίσκονται στην εξωκυτταρική μεμβράνη (OMPLA). Κάτι τέτοιο έχει βρεθεί να οδηγεί στην υδρόλυση φωσφολιπιδίων από την εξωκυτταρική μεμβράνη, η οποία όντας διάτρητη, επιτρέπει την εξαγωγή κυτταρικών συστατικών από το περίπλασμα, καθώς και την αλληλεπίδραση ενζύμων του κυτταροπλάσματος (π.χ. CueO) με την επιφάνεια του στερεού ($\text{Ag}^{\delta+}$). Η αλληλεπίδραση του ενζύμου CueO με τους κρυσταλλίτες του αργύρου στην επιφάνεια του στερεού ($\text{Ag}^{\delta+}$) βρέθηκε να είναι ένα πολύ σημαντικό (κρίσιμο) βήμα του ψευδο-καταλυτικού μηχανισμού αφού επιτρέπει την μεταφορά ατόμων αργύρου από την επιφάνεια του στερεού προς το περίπλασμα (ως ιόντα Ag^+), γεγονός που ενεργοποιεί διάφορους αμυντικούς μηχανισμούς του βακτηρίου για μετριασμό της προκύπτουσας τοξικότητας αλλά και η διαταραχή του κύκλου της κυτταρικής αναπνοής που συντελείται στα αρχικά στάδια του συνολικού μηχανισμού βακτηριακής αναστολής.

Με βάση τις μηχανιστικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. και των αποτελεσμάτων που έχουν προκύψει, προτείνεται, για πρώτη φορά, ένας λεπτομερής μηχανισμός όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση των στηριζόμενων στερεών αργύρου (ψευδο-καταλυτικός μηχανισμός). Ο προτεινόμενος μηχανισμός μπορεί να αποτελέσει την βάση για την περεταίρω κατανόηση της αντιμικροβιακής δράσης του

αργύρου, καθώς και για την ανάπτυξη νέων/καινοτόμων τεχνολογιών για την αντιμετώπιση τρεχόντων περιβαλλοντικών προβλημάτων.

Συγκεκριμένα, η δυνατότητα χρήσης στηριζόμενων υλικών αργύρου (x% κ.β. Ag/υπόστρωμα), για αντιμικροβιακούς σκοπούς, προσφέρει πολλαπλές τεχνολογικές δυνατότητες, σε αντίθεση με τα διαλύματα είτε ιοντικού αργύρου είτε νανοσωματιδίων (nanoparticles – NPs) αργύρου. Μια τέτοια νέα τεχνολογική δυνατότητα θα μπορούσε να είναι, για παράδειγμα, η χρήση στηριζόμενων στερεών υλικών αργύρου για την αποτελεσματική αποστείρωση του νερού έρματος των πλοίων, που αποτελεί ένα μείζον περιβαλλοντικό ζήτημα σήμερα, για το οποίο απαιτούνται καινοτόμες, περιβαλλοντικά φιλικές και οικονομικά βιώσιμες λύσεις. Η υψηλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα των υλικών (Ag/υπόστρωμα) καθώς και η μη σημαντική επιφανειακή διάλυση του Ag (surface dissolution), που αποδείχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, αποτελούν σοβαρές ενδείξεις ότι η τεχνολογία αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει μια αποτελεσματική λύση για τον πιο πάνω σκοπό.

Επιπλέον, στο πλαίσιο της παρούσας Δ.Δ. έχει αποδειχθεί ότι τα εν λόγω στερεά υλικά παρουσιάζουν υψηλή σταθερότητα σε συνθήκες συνεχούς αντιμικροβιακής διεργασίας, σε θαλασσινό νερό. Το αποτέλεσμα αυτό αυξάνει ακόμα περισσότερο την πιθανότητα επιτυχούς χρήσης των εν λόγω υλικών σε πρακτικές εφαρμογές. Επιπρόσθετα με τα πιο πάνω, πιθανότατα την πιο ισχυρή απόδειξη για τις τεχνολογικές ιδιότητες που παρουσιάζει η εν λόγω μέθοδος, αποτελούν τα αποτελέσματα του πιλοτικού πειράματος (δοκιμής) που πραγματοποιήθηκαν σε δεξαμενή έρματος πραγματικού, εν ενεργεία, πλοίου ("Alexandria"). Όπως έχει αποδειχθεί, η ψευδο-καταλυτική διεργασία (χρησιμοποιώντας το στερεό 1% κ.β. Ag/QSG) οδήγησε σε πολύ υψηλή βακτηριακή αναστολή (>86% σε λιγότερο από 2 ώρες και σε πλήρη αναστολή σε περίπου 12 ώρες) για τα βακτήρια *E. coli*. Τέλος, η προκαταρκτική (απλοποιημένη) τεχνοοικονομική ανάλυση, που πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, τόσο για υφιστάμενες εμπορικές τεχνολογίες, όσο και για την προτεινόμενη ψευδο-καταλυτική τεχνολογία, απέδειξε ότι η τελευταία τεχνολογία αποτελεί την πλέον συμφέρουσα λύση (από οικονομικής απόψεως) για την επεξεργασία του νερού έρματος πλοίων.

Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η ψευδο-καταλυτική διεργασία αναμένεται να παρουσιάσει χαμηλότερο κόστος αγοράς, εγκατάστασης και λειτουργίας έναντι των υφιστάμενων μεθόδων που είναι διαθέσιμες στο εμπόριο. Το κόστος αγοράς της ψευδο-καταλυτικής τεχνολογίας

εκτιμήθηκε στις €200,000, το κόστος εγκατάστασης €10,000 και το ετήσιο κόστος λειτουργίας €1000/έτος, για πλοίο με έρμα 8000 m³.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, έχουν προσφέρει για πρώτη φορά σημαντικές ενδείξεις για την ύπαρξη ενός νέου φαινομένου/διεργασίας, που θα μπορούσε να ονομαστεί Αντιμικροβιακή Ψευδο-Κατάλυση. Ως μελλοντική εργασία για την επέκταση της ερευνητικής αυτής εργασίας θα μπορούσε να αναφερθούν τα εξής:

- i. Εξέταση της ποσοστιαίας αναστολής άλλων βακτηρίων και μικροοργανισμών (π.χ., ιών, μυκήτων, παρασίτων). Όπως είναι γνωστό, σε υδάτινους όγκους που μπορούν να χαρακτηριστούν ως απόβλητα, καθώς ακόμα και στο θαλασσινό νερό, ανιχνεύονται πολλά είδη βακτηρίων αρκετά εκ των οποίων θεωρούνται παθογόνα και ιδιαίτερα ανθεκτικά σε βακτηριοκτόνους παράγοντες. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η εξέταση της ενεργότητας των στηριζομένων υλικών αργύρου, όσον αφορά την επεξεργασία τέτοιου είδους ρευμάτων.
- ii. Περαιτέρω εξέταση της συμπεριφοράς των στερεού υλικών αργύρου σε πραγματικές συνθήκες και για μεγάλες περιόδους χρήσης. Ενδεικτικά αναφέρεται πως ενδείκνυται να μελετηθούν τυχόν αλλαγές στην κρυσταλλική φάση του στερεού και η παρουσία φαινομένων συσσωμάτωσης ή φράξιμο των πόρων του, λόγω κυρίως της παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων ιόντων στο θαλασσινό νερό, όπως τα ιόντα Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} .
- iii. Διερεύνηση της δραστηριότητας άλλων μετάλλων που αποδεδειγμένα παρουσιάζουν έντονη αντιμικροβιακή δραστηριότητα ως ελεύθερα ιόντα (διαλυμένα).
- iv. Περαιτέρω μελέτη της συνεισφοράς του υποστρώματος στη γενικότερη αναστολή των βακτηρίων. Τυχόν αλλαγή του υποστρώματος μπορεί να προκαλέσει είτε θετική είτε αρνητική επίδραση στην παρατηρούμενη ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή, γεγονός που χρίζει ιδιαίτερης μελέτης. Σημειώνεται επίσης ότι η φύση (χημική σύσταση) του υποστρώματος φαίνεται να έχει καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότερη προσκόλληση της ενεργού φάσης σε αυτό. Ιδανικά πρέπει να επιδιωχθεί η όσο το δυνατόν μικρότερη έως μηδαμινή έκπλυση του άργυρου (ή οποιουδήποτε άλλου μετάλλου της ενεργούς φάσης) από την επιφάνεια του υποστρώματος.

- v. Μελέτη της επίδρασης πιθανών ενισχυτών της ενεργούς φάσης. Συγκεκριμένα, το οξείδιο του σιδήρου (Fe_2O_3) βρέθηκε να παρουσιάζει εξαιρετικές ιδιότητες όσον αφορά την in-situ παραγωγή ριζών υδροξυλίου στο νερό. Η ιδιότητα αυτή του Fe_2O_3 θα μπορούσε να συνδυαστεί και πιθανώς να ενισχύσει την αντιμικροβιακή ενεργότητα του Ag.
- vi. Από μηχανιστικής πλευράς, σίγουρα απαιτείται περαιτέρω μελέτη του φαινομένου που παρατηρήθηκε. Η μελέτη της εν λόγω διεργασίας με χρήση in-situ φασματοσκοπίας Raman, τόσο πριν όσο και μετά την "ψευδο-καταλυτική" επεξεργασία μικροβιακών διαλυμάτων, αναμένεται να δώσει πολύ σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τον ακριβή ρόλο ορισμένων πρωτεϊνών, όπως η OMPLA και η CueO στον αντιμικροβιακό μηχανισμό.
- vii. Μελέτη της προτεινόμενης αντιμικροβιακής διεργασίας για την αποστείρωση αέριων ρευμάτων (π.χ., αέρα εσωτερικού χώρου), σε εφαρμογές που απαιτείται η ύπαρξη αποστειρωμένων εσωτερικών χώρων (π.χ., εργαστήρια, νοσοκομεία). Η μελέτη αυτή παρουσιάζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον, αλλά ταυτόχρονα και τεχνικές/πειραματικές προκλήσεις, ως προς το σχεδιασμό των εν λόγω πειραμάτων.
- viii. Απαιτείται τέλος μια ολοκληρωμένη τεχνο-οικονομική μελέτη για την προτεινόμενη νέα αντιμικροβιακή διεργασία, τόσο για την αποστείρωση του νερού έρματος των πλοίων, όσο και για πιθανές άλλες εφαρμογές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. Wankhede, «What is Ballasting and De-ballasting?», Marineinsight, 2010.
- [2] C. N. Satterfield, *Heterogeneous Catalysis in Practice* (McGraw-Hill chemical engineering series), New York: McGraw-Hill Book Company, 1980.
- [3] X. A. Κορδούλης και Α. Σ. Λυκουργιώτης, «Καταλυτικές Επιφάνειες», *Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Πάτρα*, 2003.
- [4] Χ. Θεολογίδης, «Εκλεκτική Καταλυτική Απονίτρωση Υδατικών Μέσων με Χρήση Η₂ Παρουσία Οξυγόνου σε Στηριζόμενους Καταλύτες Pd-Cu σε Σύστημα Συνεχούς Ροής», *Διδακτορική Διατριβή, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2008.
- [5] A. Oberlin, M. Endo και T. Koyama, «Filamentous growth of carbon through benzene decomposition», *Journal of Crystal Growth*, τόμ. 32, αρ. 3, pp. 335-349, 1976.
- [6] Micromeritics, «2100E Accusorb, user's manual», Micromeritics Instrument Company, USA..
- [7] Ι. Α. Στράτης, Δ. Γ. Θεμελής, Γ. Α. Ζαχαριάδης, Α. Ν. Ανθεμίδης και Α. Σ. Οικονόμου, *Ενόργανη Χημική Ανάλυση ΙΙ*, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Ζήτη, 2004.
- [8] Κ. Υφαντής, *Εγχειρίδιο των φυσικών και χημικών μεθόδων ανάλυσης*, Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, 1999.
- [9] Κ. Φασσέας, «ΤΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ», Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2010.
- [10] M. Winter, «Silver: crystal structures», The University of Sheffield and WebElements Ltd, UK, Sheffield, 2016.
- [11] M. Winter, «Copper: crystal structures», The University of Sheffield and WebElements Ltd, UK, Sheffield, 2018.
- [12] M. Winter, «Cerium dioxide», The University of Sheffield and WebElements Ltd, UK, Sheffield, 2018.
- [13] M. Winter, «Aluminium: aluminium oxide (α)», The University of Sheffield and WebElements Ltd, UK, Sheffield, 2016.
- [14] G. Verhoeven, «The reflection of two fields – Electromagnetic radiation and its role in (aerial) imaging», *AARGnews*, τόμ. 55, pp. 13-18, 2017.

- [15] S. Gollasch και M. David, «BALLAST WATER MANAGEMENT,» European Union, Marine Research Findings of the VECTORS Project, 2015.
- [16] J. Gallo, M. Holinka και C. S. Moucha, «Antibacterial Surface Treatment for Orthopaedic Implants,» *Int. J. Mol. Sci.*, τόμ. 15, pp. 13849-13880, 2014.
- [17] J. A. Lemire, J. J. Harrison και R. J. Turner, «Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications,» *Nature Reviews Microbiology*, τόμ. 11, pp. 371-384, 2013.
- [18] N. Lkhagvajav, M. Koizhaiganova, I. Yasa, E. Çelik και Ö. Sari, «Characterization and antimicrobial performance of nano silver coatings on leather materials,» *Brazilian Journal of Microbiology*, τόμ. 46, pp. 41-48, 2015.
- [19] C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, P. K. Tam, J. F. Chiu και C. M. Che, «Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities,» *J Biol Inorg Chem.*, τόμ. 12, αρ. 4, pp. 527-534, 2007.
- [20] F. Paladini και M. Pollini, «Antimicrobial Silver Nanoparticles for Wound Healing Application: Progress and Future Trends,» *Materials*, τόμ. 12, pp. 2540-2555, 2019.
- [21] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim και J. O. Kim, «A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus,» *J Biomed Mater Res.*, τόμ. 52, αρ. 4, pp. 662-668, 52.
- [22] C. Lok, C. Ho, R. Chen, Q. He, W. Yu, H. Sun, P. Tam, J. Chiu και C. Che, «Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles,» *J. Proteome Res.*, τόμ. 5, p. 916–924, 2006.
- [23] J. Fabrega, S. N. Luoma, C. R. Tyler, T. S. Galloway και J. R. Lead, «Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment,» *Environment International*, τόμ. 37, pp. 517-531, 2011.
- [24] W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim και Y. H. Park, «Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli,» *Appl. Environ. Microbiol.*, τόμ. 74, αρ. 7, pp. 2171-2178, 2008.
- [25] C. Marambio-Jones και E. M. V. Hoek, «A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment,» *Journal of Nanoparticle Research*, τόμ. 12, αρ. 5, pp. 1531-1551, 2010.
- [26] J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim, S. J. Park, H. J. Lee, S. H. Kim, Y. K. Park, Y. H. Park, C. Y. Hwang, Y. K. Kim, Y. S. Lee, D. H. Jeong και M. H. Cho,

- «Antimicrobial effects of silver nanoparticles,» *Nanomedicine*, τόμ. 3, αρ. 1, pp. 95-101, 2007.
- [27] M. Rai, A. Yadav και A. Gade, « Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials,» *Biotechnology Advances*, τόμ. 27, pp. 76-83, 2009.
- [28] M. Guzman, J. Dille και S. Godet, «Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria,» *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, τόμ. 8, pp. 37-45, 2012.
- [29] M. A. Radzig, V. A. Nadtochenko, O. A. Koksharova, J. Kiwi, V. A. Lipasova και I. A. Khmel, «Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action.,» *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, τόμ. 102, pp. 300-306, 2013.
- [30] Taglietti A, Y. A. Diaz Fernandez, E. Amato, L. Cucca, G. Dacarro, P. Grisoli, V. Necchi, P. Pallavicini, L. Pasotti και M. Patrini, «Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria,» *Langmuir*, τόμ. 28, p. 8140–8148, 2012.
- [31] Z. M. Xiu, Q. B. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin και P. J. J. Alvarez, «Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles,» *Nano Lett.*, τόμ. 12, p. 4271–4275, 2012.
- [32] Y. Tu, M. Lv, P. Xiu, T. Huynh, M. Zhang, M. Castelli, Z. Liu, Q. Huang, C. Fan, H. Fang και R. Zhou, «Destructive extraction of phospholipids from Escherichia coli membranes by graphene nanosheets,» *NATURE NANOTECHNOLOGY*, τόμ. 8, pp. 594-601, 2013.
- [33] Y. Liu, X. Wang, F. Yang και X. Yang, «Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO₂ and Ag/TiO₂ composite films,» *Microporous and Mesoporous Materials*, τόμ. 114, pp. 431-439, 2008.
- [34] G. Pyrgiotakis, J. McDevitt, A. Bordini, E. Diaz, R. Molina, C. Watson, G. Deloid, S. Lenard, N. Fix, Y. Mizuyama, T. Yamauchi, B. J. και F. Demokritou, «A chemical free, nanotechnology-based method for airborne bacterial inactivation using engineered water nanostructures,» *Environmental Science: Nano*, τόμ. 1, αρ. 1, pp. 15-26, 2014.
- [35] J. Selvamuthumari, S. Meenakshi, M. Ganesan, S. Nagaraj και K. Pandian, «Antibacterial and catalytic properties of silver nanoparticles loaded zeolite: green method for synthesis of silver nanoparticles using lemon juice as reducing agent,» *NANOSYSTEMS: PHYSICS, CHEMISTRY, MATHEMATICS*, τόμ. 7, pp. 768-773, 2016.

- [36] S. M. Disaj, F. Lotfipour, M. Barzegar-Jalali, M. H. Zarrintan και K. Adibkia, «Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles,» *Materials Science and Engineering C*, τόμ. 44, pp. 278-284, 2014.
- [37] Y. Zhang, H. Peng, W. Huang, Y. Zhou και D. Yana, «Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles,» *Journal of Colloid and Interface Science*, τόμ. 325, pp. 371-376, 2008.
- [38] S. Ahlberg, C. M. Meinke, L. Werner, M. Epple, J. Diendorf, U. Blume-Peytavi, J. Lademann, A. Vogt και F. Rancan, «Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, τόμ. 88, pp. 651-657, 2014.
- [39] J. S. McQuillan, H. G. Infante, E. Stokes και A. M. Shaw, «Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in Escherichia coli K12,» *Nanotoxicology*, τόμ. 6, αρ. 8, pp. 857-866, 2012.
- [40] C. P. Theologides, S. P. Theofilou, A. Anayiotos και C. N. Costa, «Preventing maritime transport of pathogens: the remarkable antimicrobial properties of silver-supported catalysts for ship ballast water disinfection,» *Water Science & Technology*, τόμ. 76, αρ. 3, pp. 712-718, 2017.
- [41] B. Le Ouay και F. Stellacci, «Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight,» *Nano Today*, τόμ. 10, p. 339–354, 2015.
- [42] R. E. Baier, R. L. Forsberg, A. E. Meyer και D. C. Lundquist, «Ballast tank biofilms resist water exchange but distribute dominant species,» *Management of Biological Invasions*, τόμ. 5, αρ. 3, pp. 241-244, 2014.
- [43] R. J. Albert, J. M. Lishman και J. R. Saxena, «Ballast water regulations and the move toward concentration-based numeric discharge limits,» *Ecological Applications*, τόμ. 23, pp. 289-300, 2013.
- [44] F. C. Dobbs και A. Rogerson, «Ridding Ships' BALLAST Water of Microorganisms,» *Environ. Sci. Technol.*, τόμ. 39, p. 259A–264A, 2005.
- [45] D. Wu, H. You, R. Zhang, C. Chen και D. J. Lee, «Chemical Engineering Journal,» *Ballast waters treatment using UV/Ag–TiO₂ + O₃ advanced oxidation process with Escherichia coli and Vibrio alginolyticus as indicator microorganisms*, τόμ. 174, pp. 714-718, 2011.

- [46] R. Balaji και O. B. Yaakob, «EMERGING BALLAST WATER TREATMENT TECHNOLOGIES: A REVIEW,» *Journal of Sustainability Science and Management*, τόμ. 6, pp. 126-138, 2011.
- [47] C. K. Takahashi, N. G. G. S. Lourenço, T. F. Lopes, V. L. M. Rall και C. A. M. Lopes, «BALLAST WATER: A REVIEW OF THE IMPACT ON THE WORLD PUBLIC HEALTH,» *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, τόμ. 14, αρ. 3, pp. 393-408, 2008.
- [48] G. M. Ruiz, T. K. Rawlings, F. C. Dobbs, L. A. Drake, T. Mullady, A. Huq και R. R. & Colwell, «Global spread of microorganisms by ships,» *NATURE*, τόμ. 408, pp. 49-50, 2000.
- [49] L. A. Drake, M. A. Doblin και F. C. Dobbs, «Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm,» *Marine Pollution Bulletin*, τόμ. 55, p. 333–341, 2007.
- [50] O. International Maritime, «Ballast Water Management,» IMO, 2016.
- [51] A. EMSA - European Maritime Safety, «Ballast Water,» European Union, 2016.
- [52] A. Australian Marine Environment Protection, «Why ships need ballast water,» AUSMEPA, 2016.
- [53] m. Lloyd's register, «Understanding ballast water management - Guidance for shipowners and operators,» Lloyd's Register Group Limited, 2015.
- [54] G. M. Hallegraeff και C. J. Bolch, «Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture,» *Journal of Plankton Research*, τόμ. 14, αρ. 8, pp. 1067-1084, 1992.
- [55] C. National Research, S. Commission on Engineering and Technical, B. Marine και O. Committee on Ships' Ballast, *Stemming the Tide - Controlling Introductions of Nonindigenous Species by Ships' Ballast Water*, Washington D.C.: National Academies Press, 1996.
- [56] A. N. Cohen και F. C. Dobbs, «Failure of the Public Health Testing Program for Ballast Water Treatment Systems,» *Marine Pollution Bulletin*, τόμ. 91, pp. 29-34, 2015.
- [57] Ø. Endresen, H. L. Behrens, S. Brynstad, A. B. Andersen και R. Skjong, «Challenges in global ballast water management,» *Marine Pollution Bulletin*, τόμ. 48, p. 615–623, 2004.

- [58] E. Tsolaki και E. Diamadopoulos, «Technologies for ballast water treatment: a review,» *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, τόμ. 85, pp. 19-32, 2010.
- [59] E. Σπυροπούλου, «Φασματοσκοπική μελέτη (XPS) καταλυτικών συστημάτων περιβαλλοντικού και ενεργειακού ενδιαφέροντος - μέταλλα μετάπτωσης (Fe, Co, Ni, Cu) υποστηριγμένα σε οξείδιο του δημητρίου (CeO₂),» *Πολυτεχνείο Κρήτης - Σχολή Μηχανικών Παραγωγής και Διοίκησης*, 2015.
- [60] A. M. Ευσταθίου, «Σημειώσεις Χημικής Τεχνολογίας Ι (ΧΗΜ-393),» *Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2002.
- [61] A. M. Ευσταθίου, «Σημειώσεις Κατάλυσης (ΧΗΜ-445),» *Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2005.
- [62] A. M. Ευσταθίου, «Σημειώσεις Κατάλυσης (ΧΗΜ-462),» *Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2005.
- [63] M. Misono, «Toyota Technol. Rev.,» τόμ. 44, p. 4, 1995.
- [64] F. Garin, «Environmental catalysis,» *Catalysis Today*, τόμ. 89, αρ. 3, pp. 255-268, 2004.
- [65] K. Pirkanniemi και M. Sillanpää, «Heterogeneous water phase catalysis as an environmental application: a review,» *Chemosphere*, τόμ. 48, αρ. 10, pp. 1047-1060, 2002.
- [66] M. Κωνσταντίνου, «Μελέτη της Αντίδρασης καταλυτικής αναγωγής νιτρικών και νιτρωδών ιόντων σε νερό με χρήση υδρογόνου (H₂) παρουσία οξυγόνου (O₂),» *Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2012.
- [67] X. A. Κορδούλης και A. Σ. Λυκουργιώτης, «Κατάλυση,» *Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Πάτρα*, 2003.
- [68] X. Καλαμαράς, «Μελέτη Στηριζόμενων Καταλυτών Pt, Rh και Pd σε γ-Al₂O₃ ως προς την Αντίδραση Water-Gas Shift,» *Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2006.
- [69] A. Guridi, A. K. Diederich, S. Aguila-Arcos, M. Garcia-Moreno, R. Blasi, B. M. S. W. E. Clauss-Lenzian, T. Sakinc-Gueler, R. Andrade, I. Alkorta, C. Meyer, U. Landau και E. Grohmann, «New antimicrobial contact catalyst killing antibiotic resistant clinical and waterborne pathogens,» *Materials Science and Engineering C*, τόμ. 50, pp. 1-11, 2015.

- [70] Κ. Κώστα, «Εκλεκτική Καταλυτική Αναγωγή NO με χρήση H₂ Παρουσία Περίσσειας Οξυγόνου (lean De-NO_x) σε Στηριζόμενους Καταλύτες Pt,» *Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2003.
- [71] Π. Σάββα, «Επίδραση Υποστρώματος στις Καταλυτικές Ιδιότητες Στηριζόμενων Καταλυτών Pt για την αντίδραση NO/H₂/O₂,» *Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2001.
- [72] C. N. Costa, V. N. Stathopoulos, V. C. Belessi και A. M. Efstathiou, «An Investigation of the NO/H₂/O₂ (Lean-deNO_x) Reaction on a Highly Active and Selective Pt/La_{0.5}Ce_{0.5}MnO₃ Catalyst,» *Journal of Catalysis*, τόμ. 197, pp. 350-364, 2001.
- [73] P. Stoltze, «Introduction to heterogeneous catalysis,» *Aalborg University*, 2000.
- [74] K. Tamaru, *Dynamic Heterogeneous Catalysis*, New York: Academic Press, 1978.
- [75] Z. Zhang, X. E. Verykios και M. Baerns, «Effect of Electronic Properties of Catalysts for the Oxidative Coupling of Methane on Their Selectivity and Activity,» *Catalysis Reviews*, τόμ. 36, αρ. 3, pp. 507-556, 2006.
- [76] H. S. Taylor, «The Heterogeneity of Catalyst Surfaces for Chemisorption,» *Advances in Catalysis*, τόμ. 1, pp. 1-26, 1948.
- [77] Π. Σάββα, «Σύνθεση Νέων Καταλυτών με Εφαρμογές στις Τεχνολογίες H₂ Lean De-NO_x και Παραγωγής Καθαρού H₂,» *Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος*, 2008.
- [78] A. M. Efstathiou, C. N. Costa και J. L. G. Fierro. International patent/Spanish patent/US patent/European patent application Ευρεσιτεχνία WO03068390/ES 2 192 985 B1/7, 105, 137 B2/03704721, to be granted, 2003/2005/2006.
- [79] Α. Σ. Λυκουργιώτης, *Εισαγωγή στην Κατάλυση Επαφής. Τόμος 1., Εκδόσεις Σταμούλη*, 1987.
- [80] C. Hammond, «The Elements, in Handbook of Chemistry and Physics,» *CRC press*, τόμ. 81, 2000.
- [81] W. Martienssen και H. Warlimont, *Springer Handbook of Condensed Matter and Materials Data, Τόμος 1 (εικονογραφημένη έκδοση)*, Springer, 2005.
- [82] E. Gregersen, «Copper,» *ENCYCLOPEDIA BRITANICA*, 2019.
- [83] R. A. De Souza, A. Ramadan και S. Hörner, «Modifying the barriers for oxygen-vacancy migration in fluorite-structured CeO₂ electrolytes through strain: a computer simulation study,» *Energy Environ. Sci.*, τόμ. 5, pp. 5445-5453, 2012.

- [84] M. Fernández-García, A. Martínez-Arias, J. C. Hanson και J. A. Rodriguez, «Nanostructured oxides in chemistry: characterization and properties,» *Chem Rev.*, τόμ. 104, αρ. 9, pp. 4063-4104, 2004.
- [85] S. J. Gregg και K. S. W. Sing, «Adsorption, Surface Area and Porosity,» *J. Electrochem. Soc.*, τόμ. 114, αρ. 11, 1967.
- [86] J. M. Smith, *Chemical Engineering Kinetics*, 3rd Ed., New York: McGraw-Hill, 1981.
- [87] E. T. Howard, *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: Practices and Techniques*, Academic Press, 2001.
- [88] R. Thomas, *Practical Guide to ICP-MS*, CRC Press, 2003.
- [89] K. E. Jarvis, A. L. Gray και R. S. Houk, *Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Springer Netherlands, 2012.
- [90] D. C. Harris, ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ, ΤΟΜΟΣ Β΄, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ, 2011.
- [91] Α. Ανδρουλάκη, «Εργαστηριακές σημειώσεις, Laboratory of Hydrogeochemical Engineering and Remediation of Soils,» Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, 2008-2010.
- [92] Θ. Π. Χατζιωάννου και Μ. Α. Κουπάρης, «Ενόργανη ανάλυση,» Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2003.
- [93] Α. Ε. Κελεπερτζής, *Εφαρμοσμένη Γεωχημεία*, Εκδόσεις ΙΩΝ, 2000.
- [94] Α. Π. Βαλαβανίδης, ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ: Φασματοσκοπία Υπέρυθρου, Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, Φασματομετρία Μαζών, Υπεριώδους – Ορατού, Raman, Ηλεκτρονικού Παραμαγνητικού Συντονισμού, Αθήνα: Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2006.
- [95] H. H. Jaffe και M. Orchin, *Theory and Applications of UV Spectroscopy*, New York: John Wiley and Sons, 1962.
- [96] A. Mentha, «Ultraviolet-Visible (UV-Vis) Spectroscopy – Derivation of Beer-Lambert Law,» *PharmaXChange*, 2012.
- [97] B. M. Tissue, «Single-Beam UV-Vis Spectrophotometer,» *The Chemistry Hypermedia Project*, 2000.

- [98] D. C. Harris και M. D. Bertolucci, *Symmetry and Spectroscopy: An Introduction to Vibrational and Electronic Spectroscopy*, New York: Dover Publications, INC, 1978.
- [99] Α. Βαλαβανίδης, *Βασικές αρχές μοριακής φασματοσκοπίας και εφαρμογές στην οργανική χημεία*, Αθήνα: Εκδόσεις Σύγχρονα Θέματα μη Κερδοσκοπική Εκδοτική Εταιρεία, 2008.
- [100] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011.
- [101] J. M. Thompson, *Infrared Spectroscopy*, 2018: Jenny Stanford Publishing.
- [102] T. Theophanides, *Infrared Spectroscopy: Materials Science, Engineering and Technology*, IntechOpen, 2012.
- [103] B. G. Osborne, *Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, 2000.
- [104] E. Perkin, «FT-IR Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance (ATR),» Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, 710 Bridgeport Avenue, Shelton, CT 06484-4794 USA, 2005.
- [105] N. A. Campbell και R. J. B., *Biology*, Pearson Education Inc., 8th edition , 2008.
- [106] D. A. Skoog, F. J. Holler και T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Philadelphia: Saunders College Pub., Harcourt Brace College Publishers, 1998.
- [107] J. Goldstein, D. E. Newbury, D. C. Joy, C. E. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer και J. R. Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, New York: Springer Science+Business Media, 2003.
- [108] Γ. Κυριακίδης και Β. Μπίνας, «Ηλεκτρονική Μικροσκοπία,» *Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Τμήμα Φυσικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο*, 2014.
- [109] M. Linscheid, «Analytical Chemistry: R. Kellner, J.M. Mermet, M. Otto, H.M. Widmer,» *ANGEWANDTE CHEMIE* , τόμ. 38, αρ. 13, 1999.
- [110] C. W. Oatley, W. C. Nixon και R. F. W. Pease, «Scanning electron microscopy,» *Adv. Electronics. Electron. Phys.*, τόμ. 21, p. 181–247, 1965.
- [111] R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*, New York: Springer US, Springer-Verlag US, 2005.

- [112] C. E. Jeffree και N. D. Read, «Ambient- and Low-temperature scanning electron microscopy. Electron Microscopy of Plant Cells,» *London: Academic Press*, p. 313–413, 1991.
- [113] M. J. Karnovsky, «A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy,» *Journal of Cell Biology*, τόμ. 27, αρ. 2, p. 1A–149A, 1965.
- [114] J. A. Kiernan, «Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do,» *Microscopy Today*, τόμ. 1, pp. 8-12, 2000.
- [115] X. E. Ισάρη, «Ανάπτυξη και Αξιολόγηση Σύνθετων Υλικών Ενεργού Άνθρακα και Οξειδίων Σιδήρου για την Ρόφηση Υδραργύρου και Φαινανθρενίου,» Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Πάτρα, 2015.
- [116] D. B. Williams και C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy*, New York: Plenum Press, 1996.
- [117] R. Taft, K. C. Pang, T. R. Mercer, M. Dinger και J. S. Mattick, «Non-coding RNAs: regulators of disease,» *Journal of Pathology*, τόμ. 220, pp. 1216-139, 2010.
- [118] K. J. Livak και T. D. Schmittgen, «Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method,» *Methods*, τόμ. 25, p. 402–408, 2001.
- [119] J. Winer, C. K. Jung, I. Shackel και P. M. Williams, «Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro,» *Anal. Biochem.*, τόμ. 270, αρ. 1, p. 41–49, 1999.
- [120] R. B. Merritt, L. A. Bierwert, B. Slatko, P. M. Weiner, J. Ingram, K. Sciarra και E. Weiner, «Tasting phenylthiocarbamide (ptc): a new integrative genetics lab with an old flavor,» *The American Biology Teacher*, τόμ. 5, αρ. 70, pp. 23-28, 2008.
- [121] K. J. Livak και T. D. Schmittgen, «Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method,» *Nature Protocols*, τόμ. 3, pp. 1101-1108, 2008.
- [122] M. T. Dorak, *Real-time PCR*. School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University, Newcastle-upon-Tyne, UK: Taylor & Francis group, 2006.
- [123] H. Science Learning, «What is PCR?,» The University of Waikato, 2018.

- [124] I. Afonina, M. Zivarts, I. V. Kutyavin, E. A. Lukhtanov, G. H. B. και R. B. Meyer, «Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder,» *Nucleic Acids Res.*, τόμ. 25, αρ. 13, p. 2657–2660, 1997.
- [125] I. V. Kutyavin, E. A. Lukhtanov, H. B. Gamper και R. B. Meyer, «Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization,» *Nucleic Acids Res.*, τόμ. 25, αρ. 18, pp. 3718-3723, 1997.
- [126] A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm και S. G. Rozen, «Primer3–new capabilities and interfaces,» *Nucleic Acids Res.* , τόμ. 40, αρ. 15, p. e115, 2012.
- [127] M. C. Longo, M. S. Berninger και J. L. Hartley, «Use of uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in polymerase chain reactions,» *Gene*, τόμ. 93, pp. 125-128, 1990.
- [128] K. J. Livak, S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti και K. Deetz, «Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization,» *PCR Methods Appl.*, τόμ. 4, p. 357–362, 1995.
- [129] T. Koressaar και M. Remm, «Enhancements and modifications of primer design program Primer3,» *Bioinformatics*, τόμ. 23, αρ. 10, p. 1289–1291, 2007.
- [130] J. Lakowicz, Energy Transfer. In Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press, 1983.
- [131] P. Asharani, Y. Wu, Z. Gong και S. Valiyaveetil, «Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models,» *Nanotechnology*, τόμ. 19, pp. 1-8, 2008.
- [132] J. W. Alexander, «History of the medical use of silver,» *Surg. Infect.*, τόμ. 10, pp. 289-292, 2009.
- [133] G. Vertelov, Y. Krutyakov, O. Efremenkova, A. Olenin και G. Lisichkin, «A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles,» *Nanotechnology*, τόμ. 19, αρ. 35, 2008.
- [134] E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg και R. Behra, «Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*,» *Environ. Sci. Technol.*, τόμ. 42, p. 8959–8964, 2008.
- [135] L. Sun, A. Singh, K. Vig, S. Pillai και S. Singh, «Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus,» *J. Biomed. Nanotechnol.*, τόμ. 4, p. 149–158, 2008.

- [136] N. Kose, A. Otuzbir, C. Peksen, A. Kiremitci και A. Dogan, «A silver ion-doped calcium phosphate-based ceramic nanopowder-coated prosthesis increased infection resistance,» *Clin. Orthop. Relat. Res.*, τόμ. 471, pp. 2532-2539, 2013.
- [137] P. V. Asharani, G. L. K. Mun, M. P. Hande και S. Valiyaveetil, «Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells,» *ACS Nano*, τόμ. 3, pp. 279-290, 2009.
- [138] X. Chen και H. J. Schluesener, «Nanosilver: A nanoparticle in medical application,» *Toxicology Letters*, τόμ. 176, pp. 1-12, 2008.
- [139] F. Furno, K. S. Morley, B. Wong, B. L. Sharp, P. L. Arnold, S. M. Howdle, R. Bayston, P. D. Brown, P. D. Winship και H. J. Reid, «Silver nanoparticles and polymer medical devices: a new approach to prevention of infection,» *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, τόμ. 54, pp. 1019-1024, 2004.
- [140] N. N. Lubick, «Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles – or both?,» *Environmental Science and Technology*, τόμ. 42, 2008.
- [141] N. Beyth, Y. Hourri-Haddad, A. Domb, W. Khan και R. Hazan, «Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials,» *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- [142] V. B. Borisov, R. Murali, M. L. Verkhovskaya, D. A. Bloch, H. Han, R. B. Gennis και M. I. Verkhovsky, «Aerobic respiratory chain of Escherichia coli is not allowed to work in fully uncoupled mode,» *PNAS*, τόμ. 108, αρ. 42, pp. 17320-17324, 2011.
- [143] H. Wang, A. Yan, Z. Liu, X. Yang, Z. Xu, Y. Wang, R. Wang, M. Koohi-Moghadam, L. Hu, W. Xia, H. Tang, Y. Wang, H. Li και H. Sun, «Deciphering molecular mechanism of silver by integrated omic approaches enables enhancing its antimicrobial efficacy in E. coli,» *PLOS Biology*, τόμ. 17, αρ. 6, 2019.
- [144] J. S. McQuillan και A. M. Shaw, «Differential gene regulation in the Ag nanoparticle and Ag⁺-induced silver stress response in Escherichia coli: A full transcriptomic profile,» *Nanotoxicology*, τόμ. 8, αρ. S1, p. 177–184, 2014.
- [145] J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez και M. J. Yacaman, «The bactericidal effect of silver nanoparticles,» *Nanotechnology*, τόμ. 16, αρ. 10, 2005.
- [146] S. K. Gogoi, P. Gopinath, A. Paul, A. Ramesh, S. S. Ghosh και A. Chattopadhyay, «Green fluorescent protein-expressing Escherichia coli as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles,» *Langmuir*, τόμ. 22, pp. 9322-9328, 2006.

- [147] V. A. Nadtochenko, M. A. Radzig και L. A. Khmel, «Antibacterial action of metal and semiconductor nanoparticles,» *Nanotechnologies in Russia*, τόμ. 5, pp. 277-289, 2010.
- [148] T. S. Istivan και P. J. Coloe, «Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis,» *Microbiology*, τόμ. 152, p. 1263–1274, 2006.
- [149] S. P. Theofilou, B. K. Constantinou, V. K. Chatziiona, N. Pantelidou, S. Plyastsov, K. Kapnisis, P. G. Savva, I. Meshkovsky, A. Anayiotos και C. N. Costa, «New Insights into the Antimicrobial Treatment of Water on Ag-supported Solids,» *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, τόμ. 94, p. 1134–1143, 2019.
- [150] Y. S. Tsai, S. M. Ma, S. Nishimura και I. Ueda, «Infrared spectra of phospholipid membranes: interfacial dehydration by volatile anesthetics and phase transition,» *Biochimica et Biophysica Acta*, τόμ. 1022, pp. 245-250, 1990.
- [151] J. J. Harrison, V. Tremaroli, M. A. Stan, C. S. Chan, C. Vacchi-Suzzi, B. J. Heyne, M. R. Parsek, H. Ceri και R. J. Turner, «Chromosomal antioxidant genes have metal ion-specific roles as determinants of bacterial metal tolerance,» *Environ Microbiol.*, τόμ. 10, pp. 2491-2509, 2009.
- [152] K. Helbig, C. Grosse και D. H. Nies, «Cadmium toxicity in glutathione mutants of Escherichia coli.,» *J. Bacteriol.*, τόμ. 190, p. 5439–5454, 2008.
- [153] Y. M. Zhang και C. O. Rock, «Membrane lipid homeostasis in bacteria,» *Nature Rev. Microbiol.*, τόμ. 6, p. 222–233, 2008.
- [154] M. Fauchon, G. Lagniel, J. C. Aude, L. Lombardia, P. Soularue, C. Petat, G. Marguerie, A. Sentenac, M. Werner και J. Labarre, «Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand,» *Mol. Cell*, τόμ. 9, pp. 713-723, 2002.
- [155] Y. Pereira, G. Lagniel, E. Godat, P. Baudouin-Cornu, C. Junot και J. Labarre, «Chromate causes sulfur starvation in yeast.,» *Toxicol Sci.*, τόμ. 106, αρ. 2, pp. 400-412, 2008.
- [156] K. J. Waldron και N. J. Robinson, «How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?,» *Nature Rev. Microbiol.*, τόμ. 7, pp. 25-35, 2009.
- [157] T. H. Hohle, W. L. Franck, G. Stacey και M. R. O’Brian, «Bacterial outer membrane channel for divalent metal ion acquisition,» *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, τόμ. 108, p. 15390–15395, 2011.

- [158] S. J. Beard, R. Hashim, G. Wu, M. R. B. Binet και M. N. P. R. K. Hughes, «Evidence for the transport of zinc(ii) ions via the pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*,» *FEMS Microbiol. Lett.*, τόμ. 184, pp. 231-235, 2000.
- [159] K. Todar, «Structure and Function of Bacterial Cells,» Textbook of Bacteriology - Madison, Wisconsin, 2012.
- [160] H. Ahmed, A. Yousuf, S. Afzal και S. Fatima, «Mechanisms of transport across the cell membrane,» Slide-Share, 2012.
- [161] Z. Ma, F. E. Jacobsen και D. P. Giedroc, «Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing,» *Chem. Rev.*, τόμ. 109, p. 4644–4681, 2009.
- [162] C. E. Outten και T. V. O'Halloran, «Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis,» *Science*, τόμ. 292, p. 2488–2492, 2001.
- [163] A. Gupta, K. Matsui, J. F. Lo και S. Silver, «Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*,» *Nature Medicine*, τόμ. 5, pp. 183-188, 1999.
- [164] D. H. Nies, «Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes,» *FEMS Microbiol. Rev.*, τόμ. 27, p. 313–339, 2003.
- [165] S. Silver και L. T. Phung, «Bacterial heavy metal resistance: new surprises,» *Annu. Rev. Microbiol.*, τόμ. 50, pp. 753-789, 1996.
- [166] J. J. Harrison, H. Ceri και R. J. Turner, «Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms,» *Nature Rev. Microbiol.*, τόμ. 5, p. 928–938, 2007.
- [167] C. O. Dimkpa, A. Svatos, P. Dabrowska, A. Schmidt, W. Boland και E. Kothe, «Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp.,» *Chemosphere*, τόμ. 74, pp. 19-25, 2008.
- [168] G. M. Teitzel, A. Geddie, S. K. De Long, M. J. Kirisits, M. Whiteley και M. R. Parsek, «Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*,» *J. Bacteriol.*, τόμ. 188, p. 7242–7256, 2006.
- [169] K. S. Chaturvedi, C. S. Hung, J. R. Crowley, A. E. Stapleton και J. P. Henderson, «The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection,» *Nature Chem. Biol.*, τόμ. 8, p. 731–736, 2012.
- [170] A. Braud, M. Hannauer, G. L. Mislin και I. J. Schalk, «The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity,» *J. Bacteriol.*, τόμ. 191, p. 3517–3525, 2009.

- [171] S. Langley και T. J. Beveridge, «Effect of O-side-chain lipopolysaccharide,» *Environ. Microbiol.*, τόμ. 65, p. 489–498, 1999.
- [172] D. Zannoni, F. Borsetti, J. J. Harrison και R. J. Turner, «The bacterial response to the chalcogen metalloids Se and Te,» *Adv. Microb. Physiol.*, τόμ. 53, pp. 1-71, 2008.
- [173] M. A. Carrondo, «Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint,» *EMBO J.*, τόμ. 22, p. 1959–1968, 2003.
- [174] S. Franke, G. Grass και D. H. Nies, «The product of the ybdE gene of the Escherichia coli chromosome is involved in detoxification of silver ions,» *Microbiology*, τόμ. 147, αρ. 4, pp. 965-972, 2001.
- [175] F. W. Outten, D. L. Huffman, J. A. Hale και T. V. O'Halloran, «The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in Escherichia coli,» *Journal of biological chemistry*, τόμ. 276, αρ. 33, pp. 30670-30677, 2001.
- [176] J. Lemire, R. Mailloux, C. Auger, D. Whalen και V. D. Appanna, «Pseudomonas fluorescens orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminum toxicity,» *Environ. Microbiol.*, τόμ. 12, p. 1384–1390, 2010.
- [177] O. International Maritime, «BWM Convention and Guidelines,» IMO, 2020.
- [178] ABS, «GUIDE FOR BALLAST WATER EXCHANGE,» 16855 Northchase Drive Houston, TX 77060 USA, 2010.
- [179] O. International Maritime, «Marine Environment Protection Committee (MEPC), 68th session,» IMO, 2015.
- [180] A. A. Gonçalves και G. A. Gagnon, «Recent Technologies for Ballast Water Treatment,» *Ozone: Science & Engineering*, τόμ. 34, pp. 174-195, 2012.
- [181] G. M. Hallegraeff, «Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies,» *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, τόμ. 168, pp. 297-309, 1998.
- [182] A. Vorkapić, R. Radonja και D. Zec, «COST EFFICIENCY OF BALLAST WATER TREATMENT SYSTEMS BASED ON ULTRAVIOLET IRRADIATION AND ELECTROCHLORINATION,» *Promet – Traffic & Transportation*, τόμ. 30, αρ. 3, pp. 343-348, 2018.

- [183] S. A. McCarthy και F. M. Khambaty, « International Dissemination of Epidemic Vibrio cholerae by Cargo Ship Ballast and Other Non-potable Waters,» *Applied And Environmental Microbiology*, τόμ. 60, pp. 2597-2601, 1994.
- [184] N. J. Cohen, D. D. Slaten, N. Marano, J. W. Tappero, M. Wellman, R. J. Albert, V. R. Hill, D. Espey, T. Handzel, A. Henry και R. V. Tauxe, «Preventing Maritime Transfer of Toxigenic Vibrio cholerae,» *Emerging Infectious Diseases*, τόμ. 18, pp. 1680-1682, 2012.
- [185] C. Public Health Agency of, «E. coli,» Government of Canada, 2015.
- [186] K. E. Rudd, «The Complete E. coli Genome Sequence,» Ecogene Organization, 2000.
- [187] ECDC, «E. coli Factsheet,» European Union, 2016.
- [188] P. Centers for Disease Control and, «E. coli - General Information,» U.S. Department of Health & Human Services, 2015.
- [189] S. C. Edberg, E. W. Rice, R. J. Karlin και M. J. Allen, «Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection,» *Journal of Applied Microbiology*, τόμ. 88, pp. 1068-1168, 2000.
- [190] G. B. Nair, «Vibrio cholerae,» National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Calcutta, India, 2008.
- [191] S. Baron, Medical Microbiology, 4th edition, Galveston, Texas, USA: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- [192] BVSDE, «INTESTINAL ENTEROCOCCI,» 2012.
- [193] M. N. Byappanahalli, M. B. Nevers, A. Korajkic, Z. R. Staley και V. J. Harwood, «Enterococci in the Environment,» *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, τόμ. 76, αρ. 4, pp. 685-706, 2012.
- [194] A. B. Boehm και L. M. Sassoubre, Enterococci, Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
- [195] X. Θεολογίδης, «Εργαστηριακή Άσκηση 1 (8): Μικροβιολογικά Υποστρώματα - Έλεγχος της Μικροβιακής Αύξησης - Ασηπτικές Μέθοδοι Εργασίας, ΕΤΠ 211.Ε, Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας,» Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Λεμεσός, Κύπρος, 2014.
- [196] B. UNIVERSITY OF COLORADO, «Disinfectants and Sterilization Methods,» Environmental Health & Safety, University of Colorado, 2008.

- [197] Y. Obara, S. Yamai, T. Nikkawa, Y. Shimoda και Y. Miyamoto, «Preservation and transportation of bacteria by a simple gelatin disk method,» *J. Clin. Microbiol.*, τόμ. 14, pp. 61-66, 1981.
- [198] I. Microbiologics, «Οδηγίες χρήσης μικροοργανισμών LYFO DISK®, KWIK-STIK™ και KWIK-STIK™ Plus,» 2007. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://docplayer.gr/4256427-Entheto-proiontos-mikroorganismoi-lyfo-disk-mikroorganismoi-kwik-stik-mikroorganismoi-kwik-stik-plus.html>. [Πρόσβαση 12 Ιουνίου 2019].
- [199] X. Θεολογίδης, «Εργαστηριακή Άσκηση 4 (8): Εξειδικευμένες Μικροβιακές Τεχνικές για την Καλλιέργεια των Μικροοργανισμών στο Εργαστήριο, ΕΤΠ 211.Ε, Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας,» Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Λεμεσός, Κύπρος, 2014.
- [200] L. Sundial Co., «E.C.C CHROM AGAR, ενημερωτικό υλικό - EY 03, Έκδοση: 2η,» Χρυσάνθου Επισκόπου Πάφου 2, 3022, Λεμεσός, 2015.
- [201] L. Sundial Co., «Vibrio T.C.B.S Agar, ενημερωτικό υλικό - EY 61, Έκδοση: 1η,» Χρυσάνθου Επισκόπου Πάφου 2, 3022 Λεμεσός, 2015.
- [202] L. Sundial Co., «ENTEROCOCCUS PFIZER SELECIVE AGAR, ενημερωτικό υλικό - EY 62, Έκδοση: 1η,» Χρυσάνθου Επισκόπου Πάφου 2, 3022 Λεμεσός, 2016.
- [203] X. Θεολογίδης, «Εργαστηριακή Άσκηση 3 (8): Μικροβιακή Ανάλυση Νερού με τη Μέθοδο της Διήθησης Υπό Κενό, ΕΤΠ 211.Ε, Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας,» Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Λεμεσός, Κύπρος, 2014.
- [204] A. EPA - Environmental Protection, «Methods, Models, Tools, and Databases for Water Research,» United States of America, 2016.
- [205] L. Chiuping, «The effect of boron modification of Pt/Al₂O₃ on hydrogen chemisorption,» *Appl. Sur. Sci.*, τόμ. 74, αρ. 2, pp. 171-174, 1994.
- [206] M. W. Pfaffl, G. W. Horgan και L. Dempfle, «Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR,» *Nucleic Acids Res.*, τόμ. 30, αρ. 9, 2002.
- [207] C. P. Theologides, S. P. Theofilou, P. G. Savva, G. G. Olympiou και C. N. Costa, «The New Concept of Antimicrobial Catalysis: Disinfection of Ships Ballast Water,» *Journal of Environmental and Toxicological Studies*, τόμ. 1, αρ. 1, pp. 1-4, 2017.

- [208] M. Raffi, S. Mehrwan, T. M. Bhatti, J. I. Akhter, A. Hameed, W. Yawar και M. M. Hasan, «Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*,» *Ann. Microbiol.*, τόμ. 60, pp. 75-80, 2010.
- [209] M. S. Usman, M. E. Zowalaty, K. Shameli, N. Zainuddin, M. Samala και N. A. Ibrahim, «Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles,» *International Journal of Nanomedicine*, τόμ. 8, pp. 4467-4479, 2013.
- [210] V. V. Boldyrev, «Thermal decomposition of silver oxalate,» *Thermochimica Acta*, τόμ. 388, αρ. 1-2, pp. 63-90, 2002.
- [211] O. Abollino, M. Aceto, M. Malandrino, C. Sarzanini και E. Mentasti, «Adsorption of heavy metals on Na-montmorillonite. Effect of pH and organic substances,» *Water Research*, τόμ. 37, αρ. 7, pp. 1619-1627, 2003.
- [212] L. H. Velazquez-Jimenez, R. H. Hurt, J. Matos και J. R. Rangel-Mendez, «Zirconium–Carbon Hybrid Sorbent for Removal of Fluoride from Water: Oxalic Acid Mediated Zr(IV) Assembly and Adsorption Mechanism,» *Environ. Sci. Technol.*, τόμ. 48, pp. 1166-1174, 2014.
- [213] M. Cestelli Guidi, C. Mirri, E. Fratini, V. Licursi, R. Negri, A. Marcelli και R. Amendola, «In vivo skin leptin modulation after 14 MeV neutron irradiation: a molecular and FT-IR spectroscopic study,» *Anal. Bioanal. Chem.*, τόμ. 404, pp. 1317-1326, 2012.
- [214] H. L. Casal και H. H. Mantsch, «POLYMORPHIC PHASE BEHAVIOUR OF PHOSPHOLIPID MEMBRANES STUDIED BY INFRARED SPECTROSCOPY,» *Biochimica et Biophysica Acta*, τόμ. 779, pp. 381-401, 1984.
- [215] A. Y. Satoh, J. E. Trosko και S. J. Masten, «Methylene Blue Dye Test for Rapid Qualitative Detection of Hydroxyl Radicals Formed in a Fenton's Reaction Aqueous Solution,» *Environ. Sci. Technol.*, τόμ. 41, pp. 2881-2887, 2007.
- [216] S. Iwamori, N. Nishiyama και K. Oya, «A colorimetric indicator for detection of hydroxyl radicals in atmosphere using a methylene blue dye based on nafion film,» *Polymer Degradation and Stability*, τόμ. 123, pp. 131-136, 2016.
- [217] S. Prabhu και E. K. Poulouse, «Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects,» *International Nano Letters*, τόμ. 2, αρ. 32, 2012.
- [218] M. A. Quinteros, V. Cano Aristizábal, P. R. Dalmaso, M. G. Paraje και P. L. Páez, «Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its

- relationship with the antimicrobial activity,» *Toxicol. In Vitro*, τόμ. 36, pp. 216-223, 2016.
- [219] B. Ramalingam, T. Parandhaman και S. K. Das, «Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-Negative Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*,» *ACS Appl. Mater. Interfaces*, τόμ. 8, αρ. 7, pp. 4963-4976, 2016.
- [220] I. Hwang, J. Lee, J. H. Hwang, K. J. Kim και D. G. Lee, «Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals,» *FEBS Journal*, τόμ. 279, p. 1327–1338, 2012.
- [221] P. J. Fleming, J. A. Freites, C. P. Moon, D. J. Tobias και K. G. Fleming, «Outer membrane phospholipase A in phospholipid bilayers: A model system for concerted computational and experimental investigations of amino acid side chain partitioning into lipid bilayers,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, τόμ. 1818, αρ. 2, pp. 126-134, 2012.
- [222] H. J. Snijder και B. W. Dijkstra, «Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, τόμ. 1488, αρ. 1-2, pp. 91-101, 2000.
- [223] R. Koebnik, K. P. Locher και P. Van Gelder, «Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell,» *Molecular Microbiology*, τόμ. 37, αρ. 2, pp. 239-253, 2000.
- [224] N. Dekker, «Outer-membrane phospholipase A: known structure, unknown biological function,» *Molecular Microbiology*, τόμ. 35, αρ. 4, pp. 711-717, 2000.
- [225] M. Rangl, L. Rima, J. Klement, A. Miyagi, S. Keller και S. Scheuring, «Real-time Visualization of Phospholipid Degradation by Outer Membrane Phospholipase A using High-Speed Atomic Force Microscopy,» *Journal of Molecular Biology*, τόμ. 429, αρ. 7, pp. 977-986, 2017.
- [226] L. Ahlberg, «Bacterial hole puncher could be new broad-spectrum antibiotic,» UNIVERSITY OF ILLINOIS URBANA-CHAMPAIGN, ILLINOIS NEWS BUREAU, 2015.
- [227] K. M. Reddy και M. Penchalaranju, «Pulsed Electric Field Technology in Food Processing Industry – A Review,» *International Journal of Science and Research*, τόμ. 3, αρ. 7, pp. 1144-1149, 2014.

- [228] A. J. H. Sale και W. A. Hamilton, «Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, τόμ. 148, αρ. 3, pp. 781-788, 1967.
- [229] M. Eisenbach, J. R. Zimmerman, A. Ciobotariu, H. Fischler και R. Korenstein, «Electric field effects on bacterial motility and chemotaxis,» *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, τόμ. 10, αρ. 5-6, pp. 499-510, 1983.
- [230] D. Esteban-Ferrer, M. A. Edwards, L. Fumagalli, A. Juárez και G. Gomila, «Electric Polarization Properties of Single Bacteria Measured with Electrostatic Force Microscopy,» *ACS Nano*, τόμ. 8, αρ. 10, p. 9843–9849, 2014.
- [231] P. De Geus, I. M. van Die, H. E. N. Bergmans, J. Tommassen και G. H. de Haas, «Molecular cloning of *pldA*, the structural gene for outer membrane phospholipase of *E. coli* K12,» *Molecular and General Genetics*, τόμ. 190, pp. 150-155, 1983.
- [232] R. G. Brok, E. Brinkman, R. van Boxtel, A. C. Bekkers, H. M. Verheij και J. Tommassen, «Molecular characterization of enterobacterial *pldA* genes encoding outer membrane phospholipase A,» *Journal of Bacteriology*, τόμ. 176, αρ. 3, p. 861–870, 1994.
- [233] R. Sharma, C. Rensing, B. P. Rosen και B. Mitra, «The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*,» *Journal of Biological Chemistry*, τόμ. 275, pp. 3873-3878, 2000.
- [234] S. Pal, Y. K. Tak και J. M. Song, «Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*,» *Applied and Environmental Microbiology*, τόμ. 73, pp. 1712-1720, 2007.
- [235] H. Urano, M. Yoshida, A. Ogawa, K. Yamamoto, A. Ishihama και H. Ogasawara, «Cross-regulation between two common ancestral response regulators, HprR and CusR, in *Escherichia coli*,» *Microbiology*, τόμ. 163, pp. 243-252, 2017.
- [236] G. P. Munson, D. L. Lam, F. W. Outten και T. V. O'Halloran, «Identification of a Copper-Responsive Two-Component System on the Chromosome of *Escherichia coli* K-12,» *Journal of Bacteriology*, τόμ. 182, αρ. 20, p. 5864–5871, 2000.
- [237] I. R. Loftin, S. Franke, N. J. Blackburn και M. M. McEvoy, «Unusual Cu(I)/Ag(I) coordination of *Escherichia coli* CusF as revealed by atomic resolution crystallography and X-ray absorption spectroscopy,» *Protein Sci.*, τόμ. 16, αρ. 10, p. 2287–2293, 2007.

- [238] S. A. Gudipaty, A. S. Larsen, C. Rensing και M. M. McEvoy, «Regulation of Cu(I)/Ag(I) efflux genes in *Escherichia coli* by the sensor kinase CusS,» *FEMS Microbiology Letters*, τόμ. 330, αρ. 1, pp. 30-37, 2012.
- [239] S. Franke, G. Grass, C. Rensing και D. H. Nies, «Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*,» *Journal of Bacteriology*, τόμ. 185, αρ. 13, p. 3804–3812, 2003.
- [240] S. Lutsenko και J. M. Arguello, «Metal Transporters,» *Elsevier*, 2012.
- [241] J. A. Simpson, K. H. Cheeseman, S. E. Smith και R. T. Dean, «Free-radical generation by copper ions and hydrogen peroxide. Stimulation by Hepes buffer,» *Biochemical Journal*, τόμ. 254, αρ. 2, pp. 519-523, 1988.
- [242] C. N. Lok, C. M. Ho, R. Chen, P. K. Tam, J. F. Chiu και C. M. Che, «Proteomic identification of the Cus system as a major determinant of constitutive *Escherichia coli* silver resistance of chromosomal origin,» *Journal of Proteome Research*, τόμ. 7, αρ. 6, pp. 2351-2356, 2008.
- [243] S. J. Dutta, J. Liu, A. J. Stemmler και B. Mitra, «Conservative and nonconservative mutations of the transmembrane CPC motif in ZntA: effect on metal selectivity and activity,» *Biochemistry*, τόμ. 46, pp. 3692-3703, 2007.
- [244] B. Charpentier και C. Branlant, «The *Escherichia coli* gapA Gene Is Transcribed by the Vegetative RNA Polymerase Holoenzyme Eσ70 and by the Heat Shock RNA Polymerase Eσ32,» *Journal of Bacteriology*, τόμ. 176, αρ. 3, pp. 830-839, 1994.
- [245] A. Soukri, A. Mougín, C. Corbier, A. Wonacott, C. Branlant και G. Branlant, «Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis,» *Biochemistry*, τόμ. 28, pp. 2586-2592, 1989.
- [246] S. M. Modak και C. L. Fox, «Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*,» *Biochemical Pharmacology*, τόμ. 22, αρ. 19, p. 2391–2404, 1973.
- [247] M. Yamanaka, K. Hara και J. Kudo, «Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis,» *Applied Environmental Microbiology*, τόμ. 71, αρ. 11, p. 7589–7593, 2005.
- [248] N. Riviera, «Tanker operators reveal BWMS costs,» Riviera, 2018.
- [249] K. Oguma, H. Katayama και S. Ohgaki, «Photoreactivation of *Escherichia coli* after Low- or Medium-Pressure UV Disinfection Determined by an Endonuclease

- Sensitive Site Assay,» *Appl. Environ. Microbiol.*, τόμ. 68, αρ. 12, pp. 6029-6035, 2002.
- [250] E. Briski, R. D. Linley, J. Adams και S. Bailey, «Evaluating efficacy of a ballast water filtration system for reducing spread of aquatic species in freshwater ecosystems,» *Manag. Biol. Invasions*, τόμ. 5, αρ. 3, pp. 245-253, 2014.
- [251] L. Bernhard Schulte Shipmanagement (Cyprus), Interviewee, *Ballast water system maintenance*. [Συνέντευξη]. 19 November 2019.
- [252] Filtersafe., «BWT Basics: Evaluating the Options,» FILTERSAFE TECHNOLOGY PRESS RELEASES, 2015.
- [253] D. M. King, M. Riggio και P. T. Hagan, «Preliminary Overview of Global Ballast Water Treatment Markets,» *MERC Ballast Water Discussion Papers*, Τόμ. 1 από 2, No. 2, Ref. No. [UMCES]CBL, pp. 10-130, 2010.
- [254] D. M. King, P. T. Hagan, M. Riggio και D. A. Wright, «Preview of Global Ballast Water Treatment Markets,» *Journal of marine engineering and technology*, τόμ. 11, αρ. 1, pp. 3-15, 2012.
- [255] P. Krata, W. Wawrzyński, W. Więckiewicz και J. Jachowski, «Ship's ballast tanks size and dimensions review for the purpose of model research into the liquid sloshing phenomenon,» *Maritime University of Szczecin*, τόμ. 29, αρ. 101, pp. 88-94, 2012.
- [256] K. Soo-Hwan, H. S. Lee, D. S. Ryu, S. J. Choi και D. S. Lee, «Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against Staphylococcus aureus and Escherichia coli,» *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, τόμ. 39, αρ. 1, pp. 77-85, 2011.
- [257] I. Vyrides και D. C. Stuckey, «Saline sewage treatment using a submerged anaerobic membrane reactor (SAMBR): Effects of activated carbon addition and biogas-sparging time,» *WATER RESEARCH*, τόμ. 43, pp. 933-942, 2009.
- [258] V. Iliev, D. Tomova, L. Bilyarska, A. Eliyas και L. Petrov, «Photocatalytic properties of TiO₂ modified with platinum and silver nanoparticles in the degradation of oxalic acid in aqueous solution,» *Appl. Catal. B: Environmental*, τόμ. 63, pp. 266-271, 2006.
- [259] C. P. Theologides, G. G. Olympiou, P. G. Savva, N. A. Pantelidou, B. K. Constantinou, V. K. Chatziiona, L. Y. Valanidou, C. T. Piskopianou και C. N. Costa, «Novel catalytic and mechanistic studies on wastewater denitrification with hydrogen,» *Water Sci Technol.*, τόμ. 69, pp. 680-686, 2014.

- [260] C. L. Constantinou, C. N. Costa και A. M. Efstathiou, «The remarkable effect of oxygen on the N₂ selectivity of water catalytic denitrification by hydrogen,» *Environ. Sci. Technol.*, τόμ. 41, pp. 950-956, 2007.
- [261] L. Valanidou, C. Theologides, A. A. Zorpas, P. G. Savva και C. N. Costa, «A novel highly selective and stable Ag/MgO-CeO₂-Al₂O₃ catalyst for the low-temperature ethanol-SCR of NO,» *Appl. Catal. B: Environmental*, τόμ. 107, pp. 164- 176, 2011.
- [262] C. L. Constantinou, C. N. Costa και A. M. Efstathiou, «Catalytic removal of nitrates from waters,» *Catalysis Today*, τόμ. 151, pp. 190-194, 2010.
- [263] C. Nordqvist, «E. Coli Infections: Causes, Symptoms and Treatments,» *Medical News Today*, 2015.
- [264] P. Wardell, «Enterococcus faecalis,» *Centers for Disease Control and Prevention - Bacteria in photos*, 2016.
- [265] E. P. Barrett, L. G. Joyner και P. P. Halenda, «The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms,» *J. Am. Chem. Soc.*, τόμ. 73, αρ. 1, pp. 373-380, 1951.
- [266] A. Cortinas, V. Stevens, V. Benavides και C. Guerrero, «Vibrio cholerae,» *Marine Microbial Ecology*, 2015.
- [267] C. N. Costa και A. M. Efstathiou, «Mechanistic Aspects of the H₂-SCR of NO on a Novel Pt/MgO-CeO₂ Catalyst,» *J. Phys. Chem.*, τόμ. 111, pp. 3010-3020, 2007.
- [268] C. Cuello, P. Correa, W. Haenszel, G. Gordillo, C. Brown, M. Archer και S. Tannenbaum, «Gastric Cancer in Colombia. I. Cancer Risk and Suspect Environmental Agents,» *J. Nat. Cancer Inst.*, τόμ. 57, αρ. 5, pp. 1015-1020, 1976.
- [269] L. A. Drake, G. M. Ruiz, B. S. Galil, T. L. Mullady, D. O. Friedmann και F. C. Dobbs, «Microbial ecology of ballast water during a transoceanic voyage and the effects of open-ocean exchange,» *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, τόμ. 233, pp. 13-20, 2002.
- [270] J. Harris, «Pacific oyster, *Crassostrea gigas*,» *Freshwater Ecology - Aquatic Invasion Ecology*, 2008.
- [271] HIRAYAMA, «Economic Autoclaves,» *HIRAYAMA MANUFACTURING CORP.*, 2002.
- [272] HomeAquaria, «Saltwater Algae Control: Red Algae,» 2013.

- [273] S. F. Li, X. Xue, P. Li, X. Li και Y. Jia, «First-principles studies on the adsorption of molecular oxygen on Ba (110) surface,» *Physics Letters A*, τόμ. 352, αρ. 6, pp. 526-530, 2006.
- [274] Micromeritics, «Gemini III 2375, ‘Surface Area Analyzer’, Operator’s Manual V5.01.,» Micromeritics Instrument Company, USA., 2001.
- [275] K. Nobuhara, H. Kasai, W. A. Diño και H. Nakanishi, «H₂ dissociative adsorption on Mg, Ti, Ni, Pd and La Surfaces,» *Surface Science*, τόμ. 566–568, αρ. 2, p. 703–707, 2004.
- [276] A. G. Sault, R. J. Madix και C. T. Campbell, «Adsorption of oxygen and hydrogen on Au (110)-(1 × 2),» *Surface Science*, τόμ. 169, αρ. 2, pp. 347-356, 1986.
- [277] E. Shustorovich, *Metal-Surface Reaction Energetics: Theory and Applications to Heterogeneous Catalysis*, New York: Chemisorption and Surface Diffusion VCH Pub., 1991.
- [278] M. Siculo, M. Tringali, F. Orsi και A. Santagostino, «Porphyrin pattern and methemoglobin levels in Columba livia applied to assess toxicological risk by air pollution in urban areas,» *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, τόμ. 57, αρ. 4, pp. 732-740, 2009.
- [279] M. E. M. Spruit και A. W. Kleyn, «Dissociative adsorption of O₂ on Ag (111),» *Chemical Physics Letters*, τόμ. 159, αρ. 4, pp. 342-348, 1989.
- [280] K. Telnes, «Common Shore Crab - *Carcinus maenas*,» *The Marine Flora & Fauna of Norway*, 2005.
- [281] J. M. Thomas και W. J. Thomas, *Principles and practice of heterogeneous catalysis*, Weinheim, Germany; New York: VCH, 1997.
- [282] C. Tucker, «Carol’s Cornwall,» *Eco Nature WordPress Theme*, 2010.
- [283] F. M. Van Dolah, «Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence,» *Environ. Health Perspect.*, τόμ. 108, αρ. 1, pp. 133-141, 2000.
- [284] T. D. Waite, J. Kazumi, P. V. Z. Lane, L. L. Farmer, S. G. Smith, S. L. Smith, G. Hitchcock και T. R. Capo, «Removal of natural populations of marine plankton by a large-scale ballast water treatment system,» *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, τόμ. 258, pp. 51-63, 2003.

- [285] R. J. Williams, F. B. Griffiths, E. J. Van der Wal και J. Kelly, «Cargo Vessel Ballast Water as a Vector for the Transport of Non-indigenous Marine Species,» *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, τόμ. 26, pp. 409-420, 1988.
- [286] R. Wren, «Ballast Water Treatment, U.S. Great Lakes Bulk Carrier Engineering and Cost Study, US CG, Report No. CG-D-12-13 (Volume II of II),» United States Coast Guard, 2013.
- [287] Y. Xu και M. Mavrikakis, «Adsorption and dissociation of O₂ on Cu (111): thermochemistry, reaction barrier and the effect of strain,» *Surface Science*, τόμ. 494, αρ. 2, pp. 131-144, 2001.
- [288] Θ. Καραγιάννης, «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΕΡΜΑΤΟΣ ΠΛΟΙΩΝ,» Τεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας – Επιστημονική Επιτροπή Ναυπηγών, 2011.
- [289] Α. Πανέρας, «ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΕΡΟΥ ΕΡΜΑΤΟΣ ΠΛΟΙΟΥ,» Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Κρήτη, 2014.
- [290] N. Pereira, A. Cunha και J. P. N. F. Pereira, «AMAZON ESTUARY: AN OPEN CHANNEL FOR EXOTIC MARINE AND FLUVIAL SPECIES,» σε *IV Cidesport - Congresso Internacional de Desempenho Portuário, At Santa Catarina*, 2017.
- [291] H. J. Peters, «The maritime transport crisis,» *World Bank discussion papers, Washington, DC, The World Bank*, τόμ. 220, αρ. 1, 1993.
- [292] K. Weathers και E. Reeves, «The defense of the Great Lakes against the invasion of nonindigenous species in ballast water,» *Marine Technology*, τόμ. 33, αρ. 2, pp. 92-100, 1996.
- [293] N. Riviera, «Counting the cost of ballast treatment,» Riviera, 2016.
- [294] A. Wankhede, «A Guide to Ballast Tanks on Ships,» Marine Insight, 2019.
- [295] X. Chen και H. Schluesener, «Nanosilver: a nanoparticle in medical application,» *Toxicology Letters*, τόμ. 176, pp. 1-12, 2008.
- [296] D. Esteban-Ferrer, M. A. Edwards, L. Fumagalli, A. Juárez και G. Gomila, «Electric Polarization Properties of Single Bacteria Measured with Electrostatic Force Microscopy,» *ACS Nano*, τόμ. 8, αρ. 10, p. 9843–9849, 2014.
- [297] M. J. S., H. G. Infante, E. Stokes και A. M. Shaw, «Silver nanoparticle enhanced silver ion stress response in Escherichia coli K12,» *Nanotoxicology*, τόμ. 6, αρ. 8, p. 857–866, 2012.

- [298] H. J. Snijder και B. W. Dijkstra, «Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, τόμ. 1488, αρ. 1-2, pp. 91-101, 2000.
- [299] A. D. McNaught και A. Wilkinson, IUPAC Compendium of Chemical Terminology, 2nd edn., The Gold Book, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.
- [300] M. T. Madigan, J. M. Martinko και J. Parker, ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ, ΤΟΜΟΣ Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2017.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

- Αναλυτικό Πρωτόκολλο "MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG" για την εκχύλιση του ολικού RNA με την χρήση του χημικού αντιδραστηρίου NucleoZol:

Isolation of total RNA

Total RNA (including small RNA, e.g., miRNA) is isolated with the following protocol.

1. Homogenization

Tissue

Homogenize tissue samples with a rotor-stator homogenizer or another mechanical disruption device using up to **100 mg of tissue per 1 mL NucleoZOL**. For tissues with high DNA content (e.g., spleen) it is recommended to use 50 mg of tissue/mL reagent.

For simplicity, this protocol describes RNA isolation using 1 mL of NucleoZOL. For processing the sample in 1.5 mL or 2 mL microcentrifuge tubes, use an 880 μ L aliquot of the homogenate (80 mg tissue + 800 μ L NucleoZOL). Residual homogenate can be stored at -20 ° C or -70 ° C for at least one year for later use.

Cells

Cells grown in monolayer: Remove cell culture medium and lyse cells by addition of at least **1 mL of NucleoZOL** to the culture dish (diameter 3.5 cm, 10 cm²). Ensure complete lysis by repeated pipetting. Calculate the amount of reagent based on culture dish area, not on cell number.

An insufficient volume of the reagent will lead to DNA contamination of the isolated RNA.

Cells grown in suspension: Sediment cells and lyse directly by the addition of NucleoZOL. Add at least **1 mL NucleoZOL per 10⁷ cells** and lyse cells by pipetting up and down several times.

Do not wash the cells before addition of NucleoZOL. Washing of cells might contribute to RNA degradation.

Liquid Samples

Add **1 mL NucleoZOL per 400 μ L liquid sample** for homogenization and lysis. For processing sample volumes smaller than 400 μ L, add 1 mL of NucleoZOL and add water to a final volume of 1.4 mL

Fatty acids

Homogenize lipid-rich samples as described above. Centrifuge the samples for **5 min at 12,000 x g**. After centrifugation, a fat layer appears on top of the sample. Pierce the upper layer with a syringe/pipette tip and transfer the supernatant into a new tube.

2. Precipitate contaminants

Add **400 μ L RNase-free water per 1 mL NucleoZOL** to the lysate. **Shake** the sample vigorously for **15 s**. Incubate at **room temperature for 5–15 min**.

For samples containing 100 mg tissue/mL NucleoZOL, 15 min incubation at room temperature is recommended.

Centrifuge samples for **15 min at 12,000 x g**.

Centrifugation can be performed at 4–28 ° C. A semi-solid pellet containing DNA, proteins and polysaccharides forms at the bottom of the tube. The RNA is still solubilized in the supernatant.

Transfer **1 mL supernatant** (75 % of total supernatant volume) to a fresh tube. Leave a layer of the supernatant above the DNA/protein pellet.

The pellet containing DNA, protein, and polysaccharides comprises approximately 10 % in volume of the total homogenate-water mix (e.g., about 8 % pellet for 80 mg tissue lysed in 1 mL reagent).

3. Phase separation (optional)

The basic protocol for total RNA isolation can be complemented by an optional phase separation. This is useful for samples with high DNA content and/or extracellular material.

Add **5 μ L (0.5 % of supernatant volume) 4-bromoanisole** to **1 mL transferred supernatant**. Mix well for 15 s and incubate at **room temperature** for **35 min**.

Do not substitute 4-bromoanisole with bromchloropropane or chloroform!

Centrifuge for **10 min** at **12,000 x g** (4–25 °C).

Residual DNA, proteins, and polysaccharides accumulate in the organic phase at the bottom of the tube. RNA is still solubilized in the supernatant.

4. Precipitate total RNA

Pipette RNA containing supernatant from step 2 or 3 into a fresh tube. Add **1 mL of isopropanol** per **1 mL supernatant** in order to precipitate RNA. Incubate samples at **room temperature** for **10 min**. Centrifuge samples for **10 min** at **12,000 x g**.

Typically, RNA is obtained as a white pellet at the bottom of the tube. For spleen samples, RNA forms a gel like membrane on the bottom of the tube. Upon washing with ethanol, the membrane becomes more visible.

5. Wash RNA

Use **400–600 μ L 75 % ethanol** when precipitating in 1.5 mL tubes. For larger tubes, add **500 μ L 75 % ethanol per 1 mL supernatant**

Centrifuge the pellets for **1–3 min** at **4,000–8,000 x g**. Remove ethanol from the pellet by pipetting. Repeat the ethanol washing step. **Do not dry the RNA pellet between wash steps.**

Drying the RNA pellet may lead to a decrease in solubility.

6. Reconstitute RNA

Dissolve the RNA pellet in RNase-free water to obtain an RNA concentration of 1–2 μ g/ μ L. Vortex the sample **2–5 min** at **room temperature** for efficient solubilization.

For accurate determination of RNA concentration by OD measurement with a cuvette, dilute RNA in RNase free water with a slightly alkaline pH, 1 mM NaOH or buffer with a pH > 8 (e.g., Elution Buffer AE, see ordering information, section 6.3). Distilled water typically has a pH < 7.

- Αναλυτικό Πρωτόκολλο "DNase treatment Cat. No. NU01a, HT Biotechnology LTD"
για την απομάκρυνση του γονιδιακού DNA:

Digestion of Genomic DNA in RNA Samples:

1. Prepare the following mixture: (HT Biotechnology LTD: Solution, 2units/μl)

1-2 units of DNase 1 per 1 μg DNA = 1000 ng

1 units of DNase 1 per 1 μg DNA = 1000 ng

2units/μl = 2 units per 1 μl

10 units of DNase 1 per ml x1 = 5μl

1 unit of DNase 1 100μl x2 = 0,5μl

Put: 0,5 μl DNase I (RNase-free) and Water, RNase-free Up to 50μl

2. Incubate at +37 °C (water bath) for 30 min.

3. Stop the reaction by heating to +75 °C (block heater) for 5 min.

RNA PRECIPITATION

1. For the RNA precipitation we should increase the volume of solution (> 100μl): 50μl (reaction volume) + 100μl ddH₂O = 150μl

2. Add **2.5 volumes** (400μl) of absolute ethanol and **1/10 volume** (15μl) 3M CH₃COONa pH= 5.2. Vortex for 5-10 sec. Incubate at -80°C overnight.

3. Centrifuge at maximum speed for 20 min at 4°C.

4. Discard supernatant and incubate at 50°C for 2-3 min.

5. RNA was dissolved in 20μl ddH₂O.

6. Make Nanodrop measurements (2μl RNA) for quantity and quality (ng/μl, A_{260/230}, A_{260/280}).

7. Run 1μg RNA in gel electrophoresis.

8. Store at -80°C until use.

- Αναλυτικό Πρωτόκολλο "Reverse Transcription, Takara" για την μετατροπή του ολικού RNA σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) χρησιμοποιώντας το εμπορικό Primescript 1st Strand Synthesis Kit:

Protocol: Reverse Transcription

(Refer to VIII. B. Preparation of RNA sample.)

【 For intercalator (TB Green) qPCR assay 】

1. Prepare the following reaction mixture on ice.

Prepare a slightly larger amount of master mix than required to compensate for pipetting losses. After dispensing aliquots of this mixture into the microtubes, add the RNA sample.

<Per reaction>		
Reagent	Volume	Final conc.
5X PrimeScript Buffer (for Real Time)	2 μ l	1X
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5 μ l	
Oligo dT Primer (50 μ M)*1	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M)*1	0.5 μ l	50 pmol
total RNA		
RNase Free dH ₂ O		
Total	10 μl*2	

*1 Using both Oligo dT Primer and Random 6 mers, efficient synthesis of cDNA from total RNA can be accomplished. The required amount of primer for exclusive use of each primer or a gene specific primer is as follows.

Primer	Volume	Total Amount (pmol)
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5 μ l	25 pmol
Random 6 mers (100 μ M)	0.5 μ l	50 pmol
Gene specific primer (2 μ M)	0.5 μ l	1 pmol

*2 It is possible to scale up the RT reaction as needed. Up to 500 ng of total RNA can be reverse transcribed in 10 μ l of the reaction mixture.

2. Incubate the reaction mixture under the following condition.

37°C 15 min*3 (Reverse transcription)

85°C 5 sec (Inactivation of reverse transcriptase with heat treatment)

4°C

*3 When using a gene specific primer: Perform the reverse transcription at 42°C for 15 min. If non-specific amplification products are observed at the PCR step, resetting this

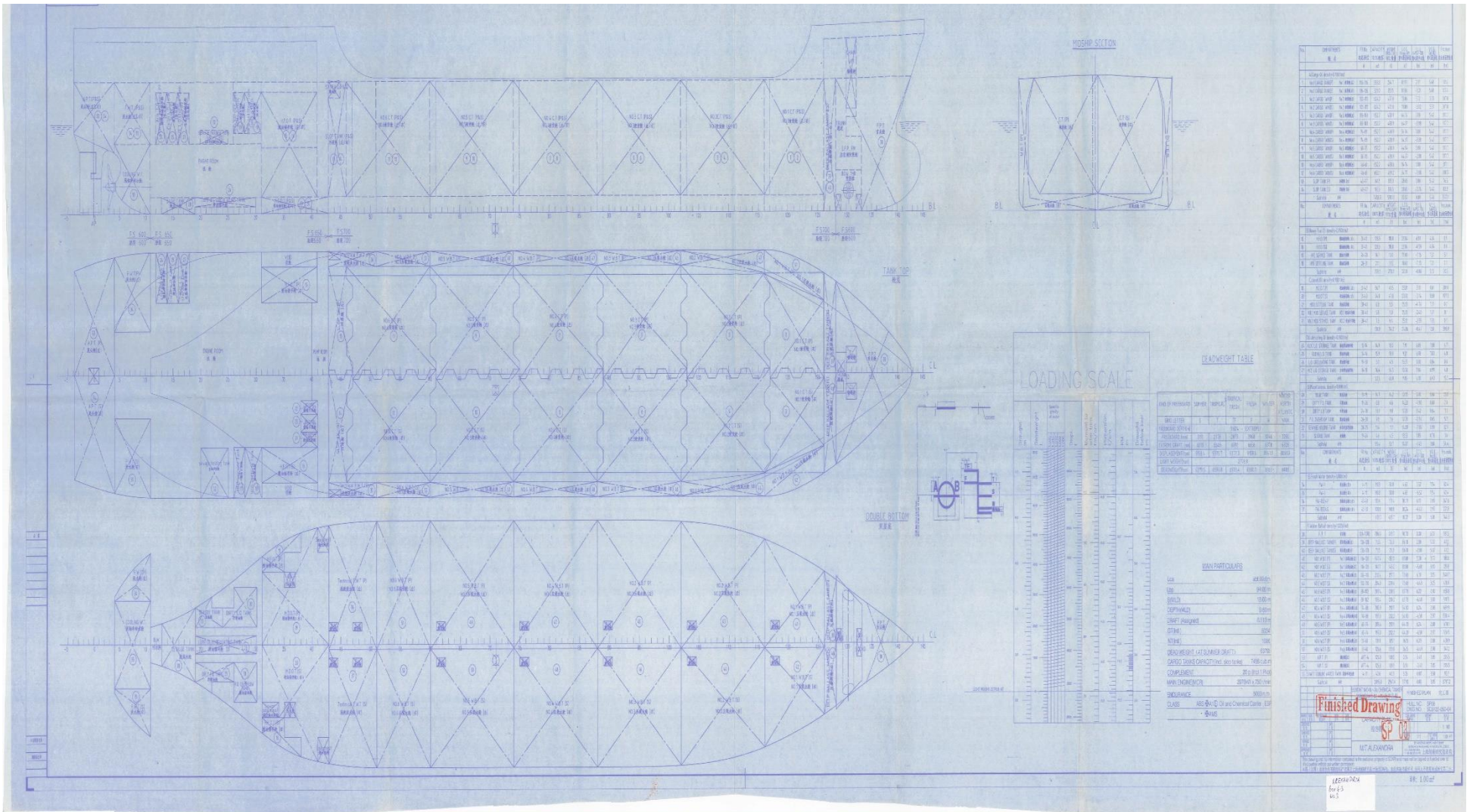
temperature to 50°C may improve the results. Note: • When the reaction mixture obtained in step 2 is used for real-time PCR, the volume of the mixture should be less than 10% of the total PCR reaction volume for real-time PCR. • The protocol of reverse transcription for probe qPCR assay (p.6) is not recommended, because background of intercalator (TB Green) might increase in real-time PCR reaction.

Note:

- When the reaction mixture obtained in step 2 is used for real-time PCR, the volume of the mixture should be less than 10% of the total PCR reaction volume for real-time PCR.
- The protocol of reverse transcription for probe qPCR assay (p.6) is not recommended, because background of intercalator (TB Green) might increase in real-time PCR reaction.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Αναλυτικό σχέδιο της χωρητικότητας των δεξαμενών έρματος του πετρελαιοφόρου πλοίου "Alexandria":



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

Πίνακας 1. Στατιστικά σημαντική επαγωγή ή καταστολή των υπό εξέταση γονιδίων λόγω διαφορετικής διαδικασίας επεξεργασίας διαλύματος βακτηρίων *E. coli*.

<i>Σύγκριση χρονικών σημείων</i>		<i>CueO</i>	<i>CopA</i>	<i>CusR</i>	<i>GapA</i>	<i>PldA</i>	<i>ZntA</i>
	Bla (0) vs Bla (5)	-1.33	1.22	1.572435	2.624423	1.807505	1.04972
	Bla (0) vs Bla (25)	1.167967	1.048989	1.987562	5.827996	2.095072	11.47164
	Bla (5) vs Bla (25)	1.554015	-1.1607	1.264003	2.220678	1.159	10.92832
5 min	Bla (5) vs Cat (5)	4.131	4.972599	2.148009	1.3491	1.748357	1.61105
	Bla (5) vs AgNO ₃ (5)	1.54328	1.023847	-1.25788	-1.518	1.164734	2.62806
	AgNO ₃ (5) vs Cat (5)	2.67771	4.85678	2.701948	2.04769	1.50108	-1.63127
25 min	Bla (25) vs Cat (25)	5.771715	15.17895	-1.30044	-5.091	9.345	-5.37774
	Bla (25) vs AgNO ₃ (25)	-1.87905	-2.42671	-1.88688	-1.202	1.554	-3.37526
	AgNO ₃ (25) vs Cat (25)	10.84531	36.83486	1.450952	-4.235	3.56771	-1.59328

Bla = Τυφλό πείραμα (Blanc), **AgNO₃** = διάλυμα ιόντων Ag⁺ [3 ppb], **Cat** = 1% κ.β. Ag/γ-Al₂O₃