

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



## Πτυχιακή διατριβή

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ  
ΜΟΝΟΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΩΝ ΚΑΤΑΛΥΤΩΝ  
 $Ag/\gamma-Al_2O_3$  ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ  
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΕΡΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΛΟΙΩΝ

Στάθης Θεοφίλου

Λεμεσός 2016



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

## Πτυχιακή διατριβή

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ  
ΜΟΝΟΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΣΤΗΡΙΖΟΜΕΝΩΝ ΚΑΤΑΛΥΤΩΝ  
 $Ag/\gamma-Al_2O_3$  ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ  
ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΝΕΡΟΥ ΕΡΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΠΛΟΙΩΝ

Στάθης Θεοφίλου

Επιβλέπων καθηγητής Δρ. Κώστας Ν. Κώστα

Λεμεσός 2016

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Στάθης Θεοφίλου, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σύμφωνα με επιστημονική έρευνα που πραγματοποιήθηκε από το Πανεπιστήμιο Baylor, του Τέξας, στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, προκειμένου να διαπιστωθεί τι πραγματικά μπορεί να καταστήσει ένα άνθρωπο ευτυχισμένο, αποδείχτηκε πως ανεξάρτητα με τον τρόπο ζωής ή τον χρηματικό πλούτο, οι άνθρωποι μπορούν να αισθάνονται ευτυχισμένοι εφόσον προσθέσουν στην ζωή τους ένα σημαντικό συστατικό όπως είναι η ευγνωμοσύνη. Αναμφισβήτητα η ευγνωμοσύνη μπορεί να αποτελέσει μέρος της καθημερινότητας του κάθε ανθρώπου και να συναντηθεί σε πολλές μορφές. Αξίζει επίσης να σημειωθεί πως ο Αμερικανός συγγραφέας William Arthur Ward, τόνισε κάποτε ότι όταν αισθάνεσαι ευγνωμοσύνη και δεν το εκφράζεις, αντιστοιχεί με το να τυλίξεις ένα δώρο και να μην το δώσεις. Ως εκ τούτου, ολοκληρώνοντας την παρούσα πτυχιακή εργασία, και αναγνωρίζοντας συνάμα πως η ευγνωμοσύνη αποτελεί ένα θετικό συναίσθημα το οποίο μπορεί και πρέπει να εκδηλώνεται όταν κάποιος αντιληφθεί πως έχει ωφεληθεί επι σκοπού, αισθάνομαι πραγματικά την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσοι συνέβαλαν στην διεκπεραίωση της, ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη το γεγονός πως η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία βασίστηκε στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Κατάλυσης του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου που τελεί υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή Δρ. Κώστα Ν. Κώστα, αλλά και το ότι με τις παραινέσεις του εν λόγω Καθηγητή παρασχέθηκαν όλα τα αναλώσιμα και υλικά που κρίθηκαν απαραίτητα για την ολοκλήρωση της, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Αναπληρωτή Καθηγητή και Άνθρωπο Δρ. Κώστα Ν. Κώστα. Αναμφίβολα, τόσο η αμέριστη στήριξη και η εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπο μου όσο και η καθοριστική βοήθεια, οι γνώσεις και οι συμβουλές του σε σημαντικά ζητήματα που προέκυψαν κατά την διάρκεια της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, αποδείχτηκαν ζωτικής σημασίας για την επιτυχή έκβαση της εργασίας αυτής. Επίσης, 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 προσφέρεται η ευκαιρία μέσα από το θέμα της συγκεκριμένης διατριβής, και το αντικείμενο κατ' επέκταση με το οποίο καταπιάνεται, να εμπλακώ ενεργά με τον επιστημονικό τομέα της κατάλυσης.

Ακόμα, αναγνωρίζοντας την τεράστια συμβολή και βοήθεια της, τόσο στην απρόσκοπτη εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και στην συγγραφή της παρούσας μελέτης, αισθάνομαι έντονη την ανάγκη να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς την διδακτορική φοιτήτρια Μπάρμπαρα Κωνσταντίνου. Αναντίρρητα οι συμβουλές, οι υποδείξεις, η συγκινητική προθυμία και το αμείωτο ενδιαφέρον που επέδειξε, σε συνδυασμό με την καθοδήγηση και συμπαράσταση που μου προσέφερε κατά την χρονοβόρα και επίπονη εκτέλεση των εργαστηριακών πειραμάτων, ήταν καθοριστικά για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Επιπλέον, οφείλω πραγματικά να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό συνεργάτη Χριστόδουλο Π. Θεολογίδη με τον οποίο είχα την τιμή να συνεργαστώ, αφού αποτελεί τον άνθρωπο ο οποίος αφιέρωσε σημαντικό χρόνο και κόπο για την μελέτη και την όσο το δυνατόν καλύτερη οργάνωση του θέματος με το οποίο καταπιάνεται η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία. Εξαιρετικά κρίσιμες και σημαντικές ήταν επίσης οι συμβουλές και οι υποδείξεις του σε ζητήματα που σχετίζονται με την μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων νερού που χρησιμοποιήθηκαν.

Περεταίρω, θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Ερευνητικής Ομάδας του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Κατάλυσης, Βασιλική Χατζηγιωνά και Χαρούλα Πισκοπιανού 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.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου αλλά και τους καρδιακούς μου φίλους για την ηθική στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αναμφίβολα, η επεξεργασία που υφίσταται το νερό έρματος το οποίο χρησιμοποιείται από τα πλοία για την βέλτιστη δυνατή πλεύση αποτελεί ένα από τα φλέγοντα περιβαλλοντικά ζητήματα που ταλανίζουν σήμερα την επιστημονική κοινότητα και όχι μόνο. Γι' αυτό τον λόγο άλλωστε πολλοί διεθνής οργανισμοί και κρατικοί φορείς έσπευσαν να θεσπίσουν μέτρα και κανονισμούς στο πρόσφατο παρελθόν σχετικά με την αλόγιστη απόρριψη του υδάτινου έρματος στη θάλασσα. Αποκορύφωμα αποτέλεσε η συνθήκη σχετικά με τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων που εγκρίθηκε από την διπλωματική διάσκεψη του Διεθνούς Οργανισμού Ναυσιπλοΐας (ΙΜΟ) τον Φεβρουάριο του 2004. Ωστόσο, οι διάφορες πιστοποιημένες μέθοδοι επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται επι του παρόντος, αποσκοπώντας στην διαφύλαξη της ποιότητας του περιβάλλοντος αλλά και της ανθρώπινης υγείας, παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα, γεγονός που θα οδηγήσει τελικά στην αντικατάστασή τους από φιλικότερες προς το περιβάλλον και πιο οικονομικές μεθόδους.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψη πως η διασφάλιση της δημόσιας υγείας αποτελεί προτεραιότητα για κάθε σύγχρονη κοινωνία και αναγνωρίζοντας συνάμα την σημασία της τήρησης των ορίων αναφορικά με την επιτρεπόμενη συγκέντρωση μικροοργανισμών που απορρίπτονται στη θάλασσα με το υδάτινο έρμα του εκάστοτε πλοίου, η παρούσα Πτυχιακή Εργασία πραγματεύεται με την μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας του οξειδωμένου άργυρου σε υδάτινα διαλύματα που περιείχαν είτε αρνητικά είτε θετικά κατά Gram βακτήρια, ως ενεργός φάση σε μονομεταλλικούς στηριζόμενους καταλύτες Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ειδικότερα, τα βακτήρια που εξετάστηκαν αποτελούν τα βακτήρια που εμπεριέχονται στις διατάξεις της συνθήκης που ψηφίστηκε από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (ΙΜΟ) το 2004 και αποτελούν δείκτες μικροβιακής μόλυνσης του νερού. Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δραστηριότητας των συντιθέμενων καταλυτών ως προς την αναστολή των βακτηρίων *E. coli*, *V. parahemolyticus* και του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* που συμπεριλαμβάνεται στην ομάδα βακτηρίων *Intestinal enterococci*, με τα αποτελέσματα να κρίνονται άκρως ενθαρρυντικά.

Πιο συγκεκριμένα, στην εργασία αυτή γίνεται αρχικά αναφορά στις βασικές αρχές και θεωρήσεις του φαινομένου της κατάλυσης ενώ παράλληλα περιγράφονται διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό καταλυτών. Ακολούθως επιχειρείται μια εμπεριστατωμένη ανασκόπηση των τεχνικών επεξεργασίας του υδάτινου

έρματος καθώς και των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία που προκύπτουν από την απόρριψη παθογόνων μικροοργανισμών στη θάλασσα, με τα βακτήρια *E. coli*, *V. parahemolyticus* και *Enterococcus faecalis*, να αναλύονται διεξοδικά. Επίσης, αφού τονίζονται οι εξέχουσες αντιμικροβιακές ιδιότητες του ιοντικού άργυρου και των μηχανισμών με τους οποίους καταλύεται η αναστολή των διάφορων μικροοργανισμών, περιγράφονται οι πειραματικές διατάξεις που ακολουθήθηκαν για την σύνθεση, τον χαρακτηρισμό και την μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Προχωρώντας στο κυρίως μέρος της εργασίας παρουσιάζονται και αναλύονται τα αποτελέσματα σχετικά με την προκύπτουσα ποσοστιαία αναστολή των μικροοργανισμών αλλά και τα αποτελέσματα χαρακτηρισμού των υπό μελέτη καταλυτών. Ολοκληρώνοντας παρατίθενται τα συμπεράσματα που απορρέουν από την μελέτη αυτή, αναφέροντας επίσης πεδία στα οποία αναμένεται να εστιαστεί η μελλοντική έρευνα.

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως η εν λόγω Πτυχιακή Εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κώστα Ν. Κώστα.

**Λέξεις κλειδιά:** [Ιοντικός Άργυρος, αντιμικροβιακή κατάλυση, βακτήρια, νερό έρματος, καταλυτική απολύμανση]



## ABSTRACT

It is widely known that ships lower tanks, in order to ensure the desired level of stability and maneuverability along with trim and structural integrity, are filled with seawater, the so called ballast water. When ships load cargo, ballast water which contains phytoplankton, zooplankton and a huge variety of microorganisms, is discharged back in the sea. As a result ballast water discharges in the sea, are introducing a lot of microorganisms such as bacterial pathogens that can cause the spread of diseases in many regions of the world. Thus, the fact that those pathogens are introduced to new marine environments, could pose serious risks for the environment, the local marine ecosystems and the human health of the local communities. Taking in mind that transportation of pathogenic species by ships through ballast water is one of the current issues the shipping industry is trying to address, strict regulations, are enforced recently by the International Marine Organization (IMO), regarding Human Pathogens: *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* and *Intestinal enterococci*. The current methods for ballast water treatment are neither appropriate nor effective for the microbial disinfection of ballast water. Therefore antimicrobial heterogeneous catalysis using silver whose antimicrobial properties are already known, seems as an ideal solution for the disinfection of ballast water.

Thus, taking into account that the protection of public health is a priority for any modern society, and recognizing at the same time the importance of respecting the limits for the allowable concentration of microorganisms discarded at sea with ship's ballast water, the present Thesis deals with the study of the antimicrobial activity of oxidized silver ( $\text{Ag}^+$ ) in aqueous solutions containing either negative or Gram-positive bacteria, as an active phase in monometallic  $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  supported catalysts. Specifically, the bacteria examined, are the bacteria contained in the provisions of the Treaty adopted by the International Maritime Organization (IMO) in 2004, which are also indicators of microbial contamination of water. Therefore, the synthesized catalyst activity in inhibiting the bacteria *E. coli*, *V. parahemolyticus* (related species with *V. cholerae*) and the bacterium *Enterococcus faecalis*, that is included in the bacteria group *Intestinal enterococci*, was conducted, with results being highly encouraging.

In particular, this work is initially concerned with the basic principles and considerations of the phenomenon of catalysis while various techniques used for the physicochemical characterization of catalysts are briefly described. Subsequently, it is

attempted a thorough review of ballast water treatment techniques along with the risks arising for human health due to the sea disposal of pathogenic microorganisms. The antimicrobial effects of dissolved ionic silver ( $\text{Ag}^+$ ) are described afterwards, along with the analysis of its most common mechanisms of action. Then, the experimental procedure followed for the synthesis, characterization and study of the antimicrobial activity of monometallic supported catalysts is outlined just before the presentation of the results of this work and the future work that has to be done.

It is also worth mentioning that this Thesis elaborated in Environmental Science and Technology Department of the Cyprus University of Technology, under the supervision of Associate Professor Mr. Costas N. Costa.

**Keywords:** [ $\text{Ag}^+$ , antimicrobial catalysis, bacteria, ballast water, catalytic disinfection]

# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ</b>	ix
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ</b>	xii
<b>ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ</b>	xiii
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ</b>	xviii
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	xx
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ</b>	1
1.1. Εφαρμογές της Κατάλυσης	1
1.2. Καταλυτικό Φαινόμενο	3
1.2.1. Αξιολόγηση Καταλυτών	5
1.2.2. Μεταλλικοί Στηριζόμενοι Καταλύτες	6
1.2.3. Αλληλεπιδράσεις Μετάλλου – Φορέα	8
1.2.4. Σύνθεση Μεταλλικών Στηριζόμενων Καταλυτών	9
1.2.5. Κρυσταλλική Δομή Μετάλλων και Φορέων που Χρησιμοποιήθηκαν στην Παρούσα Εργασία	12
1.2.6. Χημική προσρόφηση	13
1.2.6.1. Διασπαστική Χημική Προσρόφηση H <sub>2</sub>	14
1.2.6.2. Διασπαστική Χημική Προσρόφηση O <sub>2</sub>	15
1.3. Αναλυτικές Τεχνικές Φυσικοχημικού Χαρακτηρισμού Καταλυτών	16
1.3.1. Προσδιορισμός Ειδικής Επιφάνειας (BET)	16
1.3.2. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)	20

1.4.	Βιβλιογραφική Ανασκόπηση για την μέχρι πρότινος επεξεργασία του νερού έρματος	23
1.4.1.	Προδιαγραφές που πρέπει να πληρούν οι τεχνολογίες επεξεργασίας του νερού έρματος	27
1.4.2.	Αξιολόγηση των υπάρχοντων τεχνολογιών επεξεργασίας-αποστείρωσης του νερού έρματος	27
1.5.	Οι κίνδυνοι που προκύπτουν από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που εμπεριέχονται στο νερό έρματος	31
1.5.1.	Τα όρια-κανονισμοί που θεσπίστηκαν από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO), για τους παθογόνους μικροοργανισμούς που εμπεριέχονται στο νερό έρματος	32
1.5.2.	Τα βακτήρια <i>E. coli</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahemolyticus</i> και η ομάδα βακτηρίων <i>Intestinal Enterococci</i>	33
1.6.	Αντιμικροβιακές Ιδιότητες του Άργυρου (Ag) και οι χρήσεις του ιοντικού Άργυρου (Ag <sup>+</sup> ) ως αντιμικροβιακός παράγοντας	37
1.6.1.	Κυτταρική δομή των βακτηρίων και ο τρόπος με τον οποίο "προσελκύεται" ο Άργυρος	39
1.6.2.	Μηχανισμοί δράσης του Άργυρου στα βακτήρια	39
1.7.	Βιβλιογραφική Ανασκόπηση Αποστείρωσης – Μέθοδοι Αποστείρωσης	41
1.8.	Λυοφιλοποιημένα Βακτήρια	48
1.9.	Η μέθοδος εμβολιασμού των θρεπτικών υποστρωμάτων – Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία	48
1.9.1.	Η μέθοδος της διήθησης μέσω ηθμομεμβράνης υπό κενό – MF method	56

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	60
2.1. Σύνθεση Στηριζόμενων Μεταλλικών Καταλυτών	60
2.2. Καταλυτικές μετρήσεις	62
2.3. Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός Καταλυτών	70
2.3.1 Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)	70
2.3.2 Μελέτη Υφής Καταλυτικών Συστημάτων	71
2.4 Αποστείρωση	71
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ</b>	73
3.1 Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός Καταλυτών	74
3.1.1 Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)	74
3.1.2 Προσδιορισμός Ειδικής Επιφάνειας (BET)	74
3.2 Αντιμικροβιακή καταλυτική δραστηριότητα	75
3.2.1 Επίδραση των μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> και του υποστρώματος γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> στην αναστολή του βακτηρίου <i>E. coli</i>	76
3.2.2 Επίδραση των μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> και του υποστρώματος γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> στην αναστολή του βακτηρίου <i>E. faecalis</i>	82
3.2.3 Επίδραση των μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> και του υποστρώματος γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> στην αναστολή του βακτηρίου <i>V. parahemolyticus</i>	88
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	90
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	92

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1</b>	Αξιολόγηση των υπάρχοντων τεχνολογιών επεξεργασίας του νερού έρματος	28
<b>Πίνακας 2</b>	Τα όρια απόρριψης του νερού έρματος σύμφωνα με τον κανονισμό D2 (IMO, 2004)	33
<b>Πίνακας 3</b>	Πειραματικές συνθήκες κατά τη διεξαγωγή των καταλυτικών πειραμάτων	62
<b>Πίνακας 4</b>	Συνολική φόρτιση των καταλυτών σε άργυρο με βάση την τεχνική AAS	74
<b>Πίνακας 5</b>	Ειδική επιφάνεια όγκου και μέγεθος των πόρων των στερεών καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία	75
<b>Πίνακας 6</b>	Οι αποικίες του βακτηρίου <i>E. coli</i> στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης	76
<b>Πίνακας 7</b>	Οι αποικίες του βακτηρίου <i>E. coli</i> στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης	78
<b>Πίνακας 8</b>	Οι αποικίες του βακτηρίου <i>E. coli</i> στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης	79
<b>Πίνακας 9</b>	Οι αποικίες του βακτηρίου <i>E. faecalis</i> στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης	83
<b>Πίνακας 10</b>	Οι αποικίες του βακτηρίου <i>E. faecalis</i> στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης	85

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1</b>	Η συσχέτιση μεταξύ της εκφόρτωσης και της λήψης φορτίου σε συνδυασμό με την πλήρωση και την εκκένωση των δεξαμενών έρματος (Wankhede, A, 2010)	xx
<b>Σχήμα 2</b>	Η διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών της κατάλυσης στην προστασία του περιβάλλοντος και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής (Misono, 1995)	3
<b>Σχήμα 3</b>	Συγκριτικό διάγραμμα ομογενούς και ετερογενούς καταλυτικής αντίδρασης ( $\Delta G_0 < 0$ )	5
<b>Σχήμα 4</b>	Σχηματική αναπαράσταση ενός στηριζόμενου καταλύτη, όπου P οι ενισχυτές (Satterfield, 1980)	6
<b>Σχήμα 5</b>	Γραφική αναπαράσταση της επιφάνειας σωματιδίου δραστικής καταλυτικής φάσης (1: κενά, 2: επιπλέον άτομα, 3: πολλαπλά επίπεδα, 4: αναβαθμίδες, 5: εσοχές) (Κορούλης κ.α., 2003)	7
<b>Σχήμα 6</b>	Πειραματική διάταξη παρασκευής καταλυτών με υγρό εμποτισμό (Θεολογίδης, 2008)	9
<b>Σχήμα 7</b>	Διεργασία υγρού εμποτισμού κατά την διαδικασία παρασκευής στηριζόμενου καταλύτη Ag (Θεολογίδης, 2008 & Oberlin, 1976)	11
<b>Σχήμα 8</b>	Ο μηχανισμός διασπαστικής χημικής προσρόφησης του H <sub>2</sub> στην καταλυτική επιφάνεια καθώς και της διάχυσης του ατομικού H στο υπόστρωμα (Costa et al., 2007)	15
<b>Σχήμα 9</b>	Αναπαράσταση του τρόπου και θέσης προσρόφησης ατομικού οξυγόνου σε επιφάνεια μετάλλου	16
<b>Σχήμα 10</b>	Σχηματική αναπαράσταση της προσρόφησης και διάσπασης του O <sub>2</sub> στην επιφάνεια μεταλλοξειδίου που διαθέτει κενές θέσεις οξυγόνου (όπου M: μέταλλο) (Σάββα, 2001)	16
<b>Σχήμα 11</b>	Διάγραμμα τυπικής συσκευής για μετρήσεις B.E.T. (Micromeritics, n.d)	17

<b>Σχήμα 12</b>	Ενεργειακές μεταπτώσεις στην φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης (Στράτης κ.α., 2004)	20
<b>Σχήμα 13</b>	Αρχή της ατομικής φασματοσκοπίας. Α: Νέφος ατόμων, Β, Β': Δέσμη διερχόμενης ακτινοβολίας ομοαξονικά και κάθετα με τον ανιχνευτή αντίστοιχα και Γ: Ανιχνευτής (Υφαντής, 1999)	21
<b>Σχήμα 14</b>	(α) Διάταξη συσκευής ΦΑΑ με φούρνο από σωλήνα γραφίτη (Στράτης κ.α., 2004), (β) εγκάρσια θερμαινόμενος φούρνος γραφίτη	22
<b>Σχήμα 15</b>	Αναπαράσταση της απόρριψης μη αυτόχθονων ειδών με την μέθοδο της ανταλλαγής νερού έρματος (Πανέρας, Α, 2014)	24
<b>Σχήμα 16</b>	Αναστολή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την μεταφορική πρωτεΐνη του Fe (III) εντός του κυττάρου (Lemire et al., 2013)	41
<b>Σχήμα 17</b>	Αναπαράσταση διασποράς εμβολίου σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Θεολογίδης, 2014)	50
<b>Σχήμα 18</b>	Αναπαράσταση της μεθόδου MF (Θεολογίδης, 2014)	59
<b>Σχήμα 19</b>	Εναπόθεση Ag σε σφαιρίδια $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού	61
<b>Σχήμα 20</b>	Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των καταλυτικών πειραμάτων	64
<b>Σχήμα 21</b>	Πίνακας ελέγχου και ρύθμισης διαφόρων παραμέτρων της πειραματικής συσκευής που χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη των καταλυτικών πειραμάτων	65
<b>Σχήμα 22</b>	Σύστημα αντιδραστήρα-μηχανισμού ανάδευσης	69



<b>Εικόνα 1</b>	Το Ιαπωνικό στρείδι <i>Crassostrea gigas</i> (Tucker, 2010)	xxi
<b>Εικόνα 2</b>	Ο Ευρωπαϊκός πράσινος κάβουρας που επηρέασε την οικολογική ισορροπία των ιθαγενών ειδών της Αφρικής, της Ιαπωνίας, της Αυστραλίας και της Αμερικής (Telnes, 2005)	xxii
<b>Εικόνα 3</b>	Διαφορετικές απόψεις της κρυσταλλικής δομής του Άργυρου (Ag) (Winter, 2016)	12
<b>Εικόνα 4</b>	Η Κρυσταλλική δομή της $\gamma$ - $Al_2O_3$ (Winter, 2016)	13
<b>Εικόνα 5</b>	Ισόθερμος (T=77K) B.E.T για εμπορικό δείγμα CaO	18
<b>Εικόνα 6</b>	Επεξεργασία του νερού έρματος σε λιμενικές εγκαταστάσεις (Gollasch, et al., 2015)	26
<b>Εικόνα 7</b>	Το βακτήριο <i>E.coli</i> (Nordqvist, 2015)	34
<b>Εικόνα 8</b>	Το βακτήριο <i>Vibrio cholerae</i> (Cortinas et al., 2016)	35
<b>Εικόνα 9</b>	Το βακτήριο <i>Enterococcus faecalis</i> (Wardell, 2011)	37
<b>Εικόνα 10</b>	Το αυτόκαυστο (HIRAYAMA, 2002)	44
<b>Εικόνα 11</b>	Τα διάφορα προγράμματα τα οποία μπορούν να επιλεγθούν στο αυτόκαυστο	45
<b>Εικόνα 12</b>	Ο θάλαμος νηματικής ροής (Θεολογίδης, 2014)	47
<b>Εικόνα 13</b>	Θαλάσσια ερυθροφύκη (HomeAquaria, 2013)	52
<b>Εικόνα 14</b>	Το θρεπτικό υπόστρωμα CHROMagar E.C.C., με αποικίες του βακτηρίου <i>E. Coli</i>	55
<b>Εικόνα 15</b>	Το θρεπτικό υπόστρωμα <i>Vibrio</i> T.C.B.S. Agar	55
<b>Εικόνα 16</b>	Θρεπτικά υπόστρώματα <i>Enterococcus</i> Pfizer Selective Agar	56
<b>Εικόνα 17</b>	Αυτοματοποιημένο πρόγραμμα διαδοχικής εκτέλεσης εντολών για τις ανάγκες των καταλυτικών πειραμάτων	66
<b>Εικόνα 18</b>	Η αυξημένη αντιμικροβιακή καταλυτική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε για πολύ μεγάλες αρχικές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών	81

<b>Εικόνα 19</b>	Η αντιμικροβιακή καταλυτική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε για το βακτήριο <i>E. faecalis</i> για 60 λεπτά επεξεργασίας	84
<b>Εικόνα 20</b>	Η απουσία αποικιών του βακτηρίου <i>V. parahemolyticus</i> από τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν για ανάπτυξη του τυφλού δείγματος	89
<b>Γράφημα 1</b>	Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου <i>E.coli</i> που προέκυψε για κάθε καταλύτη στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας	77
<b>Γράφημα 2</b>	(α) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου <i>E. coli</i> που προέκυψε χρησιμοποιώντας τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου (0.05% κ.β. Ag / $\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ) στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας, (β) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου <i>E. coli</i> που προέκυψε χρησιμοποιώντας σφαιρίδια υποστρώματος ( $\gamma$ -αλούμινα) στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας, (γ) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου <i>E. coli</i> που προέκυψε για το πείραμα ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας	80
<b>Γράφημα 3</b>	Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου <i>E. coli</i> που προέκυψε χρησιμοποιώντας τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου, σφαιρίδια υποστρώματος ( $\gamma$ -αλούμινα) και στο πείραμα ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας	82

- Γράφημα 4** (α) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που προέκυψε χρησιμοποιώντας τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου (0.05% κ.β. Ag / γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας, (β) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που προέκυψε χρησιμοποιώντας σφαιρίδια υποστρώματος (γ-αλούμινα) στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας, (γ) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που προέκυψε για το πείραμα ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας 86
- Γράφημα 5** Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που προέκυψε χρησιμοποιώντας τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου, σφαιρίδια υποστρώματος (γ-αλούμινα) και στο πείραμα ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας 87

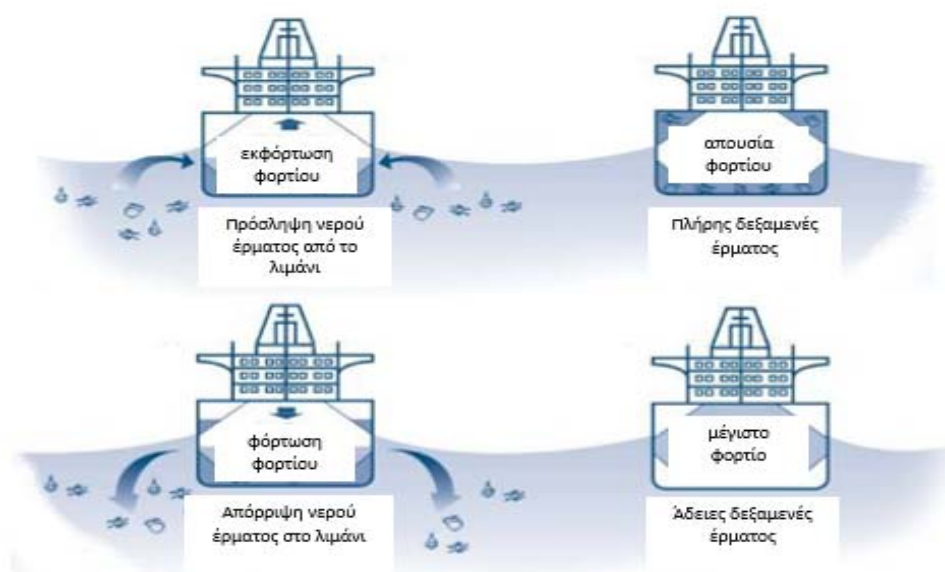
## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

AAS	Atomic Absorption Spectroscopy
Ag	Άργυρος
Ag <sup>+</sup>	Ιοντικός άργυρος
ATP	Adenosine triphosphate
cfu	colony forming unit
C <sub>m</sub>	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>
Ea	Ενέργεια Ενεργοποίησης
et al.	et alii (and others)
FIB	Fecal Indicator Bacteria
GEF	Global Environment Facility
H <sub>2</sub>	υδρογόνο
H <sub>2</sub> O	νερό
hν	ακτινοβολία
IMO	International Maritime Organization
MEPC	Marine Environmental Protection Committee
MF	Membrane Filtration
O <sub>2</sub>	οξυγόνο
O <sub>3</sub>	όζον

P	πίεση
q	θερμότητα
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	Ultra Violet (υπεριώδης)
V	όγκος
<i>V. parahemolyticus</i>	<i>Vibrio parahemolyticus</i>
WHO	World Health Organization
$\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	$\gamma$ -αλούμινα
$\lambda$	μήκος κύματος
$\rho$	πυκνότητα

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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 (International Maritime Organization, 2016). 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 (EMSA, 2016 & Australian Marine Environment Protection Association, 2016).



**Σχήμα 1:** Η συσχέτιση μεταξύ της εκφόρτωσης και της λήψης φορτίου σε συνδυασμό με την πλήρωση και την εκκένωση των δεξαμενών έρματος (Wankhede, A, 2010)

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, 3-5 δισεκατομμύρια τόνοι θαλασσινού νερού μεταφέρονται από τα πλοία κάθε χρόνο σε παγκόσμια κλίμακα (Lloyd's register marine, 2015), 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 ρυθμών 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 φύκια, 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 κατάρρευση (Dobbs et al., 2005 & Ruiz et al., 2000).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Αυστραλία, της οποίας η οικονομία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις εξαγωγές πρώτων υλών όπως κάρβουνο, σιτηρά, σιδηρομεταλλεύματα και ροκανίδια. Ως εκ τούτου, τα Ιαπωνικά σκάφη που καταφθάνουν στη περιοχή για να μεταφέρουν αυτά τα προϊόντα, αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες πηγές διοχέτευσης υδάτινου έρματος στα λιμάνια της χώρας. Το γεγονός αυτό αποτελεί την κύρια αιτία της εξάπλωσης του Ιαπωνικού στρείδιου *Crassostrea gigas* στις Αυστραλιανές ακτές με αποτέλεσμα τον ανταγωνιστικό εκτοπισμό των αυτόχθονων ειδών όπως για παράδειγμα το στρείδι *Saccostreu culculluta*, κάτι που προκάλεσε, όπως είναι φυσικό, τεράστια βιολογικά και οικονομικά προβλήματα (Williams et al., 1988 & Harris, 2008).



**Εικόνα 1:** Το Ιαπωνικό στρείδι *Crassostrea gigas* (Tucker, 2010)

Αξίζει 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. Ωστόσο όταν 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 (Hallegraeff et al., 1992).

Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τον διεθνή οργανισμό ναυσιπλοΐας (IMO), οι συνέπειες που προκύπτουν μέσω της ελλιπούς ή της ανύπαρκτης επεξεργασίας του υδάτινου έρματος έχουν αρνητικό αντίκτυπο σε πολλούς τομείς. Πέρα από την οικολογική ισορροπία του πλανήτη, 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 βέβαια ο Διεθνής Οργανισμός Ναυσιπλοΐας (IMO) (Takashi et al., 2008).



**Εικόνα 2:** Ο Ευρωπαϊκός πράσινος κάβουρας που επηρέασε την οικολογική ισορροπία των ιθαγενών ειδών της Αφρικής, της Ιαπωνίας, της Αυστραλίας και της Αμερικής (Telnes, 2005)



Ως εκ τούτου, δεδομένης της πολύ υψηλής πυκνότητας βακτηρίων στο υδάτινο έρμα, κάτι που μεταφράζεται σε αριθμούς ως  $10^8$  βακτήρια ανά λίτρο, φαντάζει ιδιαίτερα εύκολη η μεταφορά δισεκατομμυρίων μικροοργανισμών μέσω των δεξαμενών έρματος (Dobbs et al., 2005). 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, ενισχύεται η άποψη πως 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 (Baier et.al., 2015).

Έτσι, καθίσταται ως πρωτεύον ζήτημα 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 υπονομεύουν σοβαρούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία και χρίζουν άμεσης, αποτελεσματικής και οικολογικά φιλικής αντιμετώπισης. Όπως άλλωστε περιγράφεται στο άρθρο των Dobbs 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 (Dobbs et al., 2005 & Albert et al., 2013).

Περαιτέρω, τον Μάρτιο του 2000 εκπονήθηκε από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO) ένα πρόγραμμα παγκόσμιων διαστάσεων, με την ονομασία "Removal of Barriers for the Implementation of the Control of the Water of Ballast and Measures of Administration in Developing Countries", γνωστό και ως "Global Programme of Administration of Water of Ballast – GloBallast" το οποίο διήρκεσε μέχρι και τον Δεκέμβριο του 2004. Το πρόγραμμα αυτό, υποστηριζόμενο από τα Ηνωμένα Έθνη και την θαλάσσια βιομηχανία μεταφορών, και χρηματοδοτούμενο από το Παγκόσμιο Ταμείο Προστασίας του Περιβάλλοντος (GEF), είχε ως πρωταρχικό σκοπό την μείωση της μεταφοράς μη αυτόχθονων ειδών από το υδάτινο έρμα των πλοίων, μέσω της εφαρμογής των μέτρων εθελοντικού χαρακτήρα που

συμπεριλαμβάνονται στο ψήφισμα A.868 της γενικής συνέλευσης του Διεθνούς Οργανισμού Ναυσιπλοΐας (IMO) το 1997 (Takashi et al., 2008). Τα συγκεκριμένα μέτρα εμπεριέχονται και στην διεθνή συνθήκη σχετικά με 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.

Αναγνωρίζεται λοιπόν ότι 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. 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 εκπόνηση μιας διεθνούς συνθήκης σχετικά με τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων. Η συνθήκη αυτή υιοθετήθηκε αργότερα και 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 (Cohen et al., 2015).

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 των οποίων η τήρηση των συγκεντρώσεων τους στα επιθυμητά πλαίσια αποσκοπεί στην διασφάλιση της προστασίας της δημόσιας υγείας και των οικοσυστημάτων που ενδέχεται να επηρεαστούν.

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). Επιπλέον σημειώνεται πως η συνθήκη αυτή θα τεθεί σε ισχύ ένα χρόνο μετά την επικύρωσή της από τα τριάντα (30) κράτη μέλη του οργανισμού τα οποία θα αντιπροσωπεύουν το 35% σε χωρητικότητα φορτίου, της

παγκόσμιας εμπορικής ναυτιλίας. Μέχρι στιγμής η συνθήκη έχει υπογραφεί από 47 κράτη μέλη, με το ποσοστό της χωρητικότητας σε φορτίο να μην έχει υπολογιστεί ακριβώς, χωρίς όμως να ξεπερνά ακόμα το όριο του 35% (International Maritime Organization, 2016).

Περαιτέρω, με το τέλος του επιτυχούς προγράμματος "GloBallast" που προαναφέρθηκε, ο Διεθνής Οργανισμός Ναυσιπλοΐας (IMO), την 1<sup>η</sup> του Απρίλη το 2005 ξεκίνησε μια προκαταρκτική φάση διάρκειας 18 μηνών, ενός νέου προγράμματος με την ονομασία "GloBallast Partnerships", προετοιμάζοντας έτσι το έδαφος για την πλήρη εφαρμογή του. Κύριος στόχος του προγράμματος αυτού ήταν και πάλι να βοηθηθούν ιδιαίτερα ευάλωτες χώρες ή περιοχές, να θεσπίσουν νομικές και πολιτικές μεταρρυθμίσεις αλλά και να συμμετάσχουν σε διάφορες δραστηριότητες για την επίτευξη των στόχων και την ομαλή εναρμόνιση με την συνθήκη για τον έλεγχο και τη διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων που εγκρίθηκε από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO), το 2004 (Takashi et al., 2008).

Ωστόσο, όπως δείχνουν ποικίλες επιστημονικές μελέτες (Cohen et al., 2015 & Balaji et al., 2011 & Endresen et al. 2004 & Tsolaki et al. 2010), το υπάρχων καθεστώς ανταλλαγής νερού αλλά και οι τρέχουσες τεχνολογίες επεξεργασίας του υδάτινου έρματος δεν αποδεικνύονται 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 που παρουσιάζονται για την επί του πλοίου αποτελεσματική επεξεργασία του υδάτινου έρματος και την αυξημένη ανάπτυξη πολλών βακτηρίων εντός των δεξαμενών έρματος, καθιστά επιτακτική την ανάγκη εξεύρεσης εναλλακτικών - αποτελεσματικότερων μεθόδων επεξεργασίας (Baier et al., 2015).

Αναμφίβολα, μια ελπιδοφόρα λύση για τον περιορισμό των κινδύνων για την ανθρώπινη υγεία και την υπάρχουσα βιοποικιλότητα αποτελεί η εφαρμογή ετερογενούς αντιμικροβιακής κατάλυσης χρησιμοποιώντας άργυρο ως ενεργό φάση των συντιθέμενων καταλυτών. Αναμφισβήτητα, μεταξύ πολλών μετάλλων, ο ιοντικός άργυρος ( $Ag^+$ ) αποτελεί ένα υποσχόμενο μέταλλο για εφαρμογές στον τομέα της αντιμικροβιακής ετερογενούς κατάλυσης αφού οι αντιμικροβιακές του ιδιότητες είναι ήδη ευρέως γνωστές και αξιοποιήσιμες.

Στόχος της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας ήταν η μελέτη της αντιμικροβιακής δραστηριότητας του οξειδωμένου άργυρου σε υδάτινα διαλύματα που περιείχαν είτε αρνητικά είτε θετικά κατά Gram βακτήρια, ως ενεργός φάση σε μονομεταλλικούς στηριζόμενους καταλύτες Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της δραστικότητας των καταλυτών ως προς την αναστολή των βακτηρίων *E. coli*, *V. parahemolyticus* και του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* που συμπεριλαμβάνεται στην ομάδα βακτηρίων *Intestinal enterococci*, των τριών δηλαδή κύριων κατηγοριών μικροοργανισμών που εμπεριέχονται στα όρια του Διεθνούς Οργανισμού Ναυσιπλοΐας (IMO), ως μικροβιακοί δείκτες. Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως για την εκπλήρωση της συγκεκριμένης Πτυχιακής Εργασίας, πραγματοποιήθηκε φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των καταλυτών που παρασκευάστηκαν, με τη χρήση συσκευής μέτρησης της ειδικής επιφάνειας και της κατανομής του μεγέθους πόρων ποικίλων στερεών υλικών (BET).

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

## 1.1. Εφαρμογές της Κατάλυσης

Αναμφισβήτητα η κατάλυση 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. Ως εκ τούτου, καθοριστικός είναι 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 περεταίρω αύξηση της παγκόσμιας αγοράς και κατ' επέκταση χρήσης διαφόρων τύπων καταλυτών τα επόμενα χρόνια (Σπυροπούλου, 2015). Ακόμα, 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. Αξίζει να αναφερθεί πως παρόλο που η εκτεταμένη εκμετάλλευση του καταλυτικού φαινομένου από την ανθρωπότητα ξεκίνησε κατά κύριο λόγο στα τέλη του 20<sup>ου</sup> 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 (Σπυροπούλου, 2015 & Ευσταθίου, 2005).

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

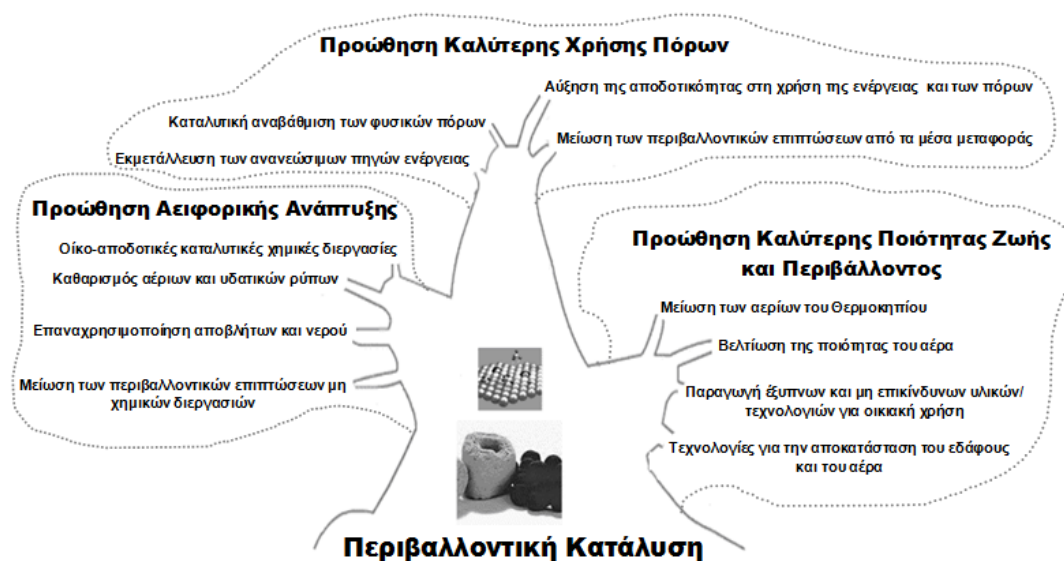
ατμοσφαιρική και υδατική ρύπανση και μόλυνση. Επιπρόσθετα, αποτελεί το θεμέλιο λίθο για την Πράσινη και Αειφορική Χημεία, που έχει ως στόχο την πρόληψη της ρύπανσης ή/και της μόλυνσης, και κατ' επέκταση την προστασία του περιβάλλοντος. Ακόμα, η εφαρμογή της κατάλυσης στον τομέα της προστασίας του περιβάλλοντος και της βελτίωσης παράλληλα της ποιότητας ζωής του ανθρώπου, μπορεί να θέσει τις απαραίτητες προϋποθέσεις για την επίτευξη μιας αειφορικής ανάπτυξης (Misono, 1995). 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 (Garin, 2004).

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 (Pirkaniemi, 2002 & Θεολογίδης, 2008). Ενδεικτικά αναφέρεται πως στην υγρή φάση απαιτείται η εφαρμογή της ετερογενούς κατάλυσης η οποία αποτελεί εκ φύσεως μια πολυπλοκότερη καταλυτική διεργασία (Σπυροπούλου, 2015).

Επιπρόσθετα, η ευρεία χρήση της κατάλυσης στον τομέα της προστασίας του υδάτινου περιβάλλοντος είναι πλέον δεδομένη. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Περιβάλλοντος της Ευρωπαϊκής Ένωσης (EEA), 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, στα πλαίσια 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 (Κωνσταντίνου, 2012).



**Σχήμα 2:** Η διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών της κατάλυσης στην προστασία του περιβάλλοντος και στη βελτίωση της ποιότητας ζωής (Misono, 1995)

## 1.2. Καταλυτικό Φαινόμενο

Ως *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 (Κορδούλης κ.α., 2003 & Καλαμαράς, 2006 & Ευσταθίου, 2005 & Ευσταθίου, 2002). Αξίζει να αναφερθεί πως οι περισσότεροι καταλύτες βρίσκονται σε υγρή ή στερεή μορφή, χωρίς όμως να αποκλείεται η χρήση καταλύτη στην αέρια φάση (Σπυροπούλου, 2015).

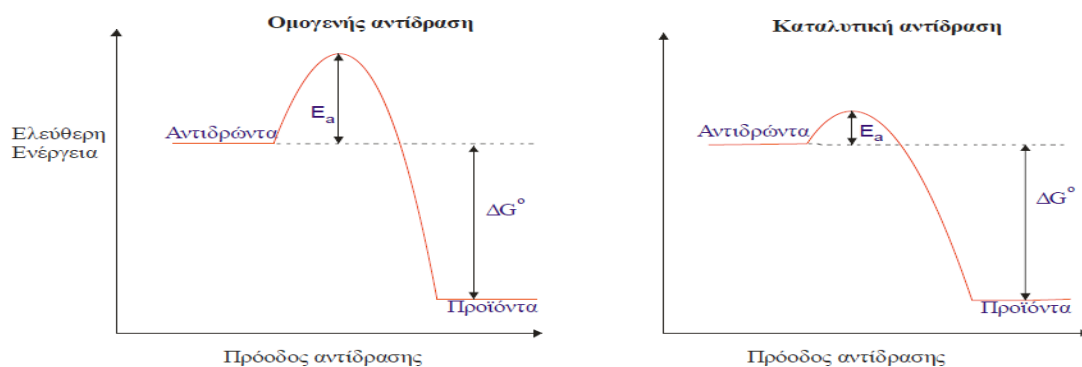
Όπως είναι γνωστό, η κατάλυση διακρίνεται σε δύο μεγάλους κλάδους, την ομογενή κατάλυση (homogeneous catalysis) και την ετερογενή κατάλυση (heterogeneous catalysis). Η διαφορά μεταξύ τους εστιάζεται στο ότι η ομογενής κατάλυση προκύπτει όταν ο καταλύτης βρίσκεται στην ίδια φάση με τα αντιδρώντα σε αντίθεση 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) (Κορδούλης κ.α., 2003). 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.

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 (Καλαμαράς, 2006 & Ευσταθίου, 2005).

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, ποικίλοι καταλύτες συντίθενται με στόχο την εκμετάλλευση των εξαιρετικών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών. Η αντιμικροβιακή δράση των συγκεκριμένων καταλυτών οφείλεται κυρίως στις εκ φύσεως απολυμαντικές ιδιότητες 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 (Guridi et al., 2015 & Σπυροπούλου, 2015).



Σχήμα 3: Συγκριτικό διάγραμμα ομογενούς και ετερογενούς καταλυτικής αντίδρασης ( $\Delta G^\circ < 0$ )

### 1.2.1. Αξιολόγηση Καταλυτών

Για την γενικότερη αξιολόγηση ενός καταλύτη, συμπεριλαμβανομένων και των καταλυτών με αντιμικροβιακή ενεργότητα, θα πρέπει 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 (Κώστα, 2003).

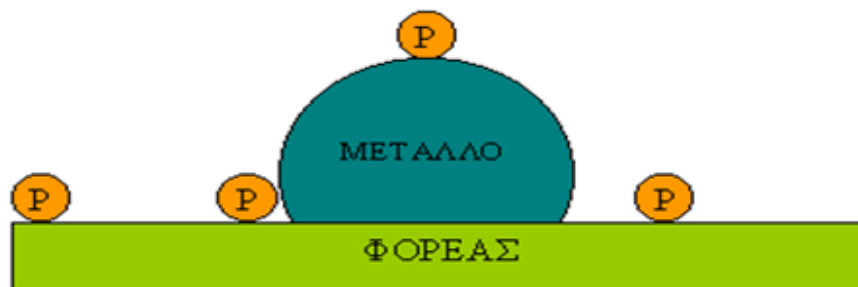
(iii) *Σταθερότητα*: ορίζεται ως η μεταβολή της ενεργότητας και εκλεκτικότητας που παρουσιάζει ο καταλύτης σε σχέση με το χρόνο αντίδρασης για συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης (θερμοκρασία, πίεση, σύσταση τροφοδοσίας και υγρής φάσης).

(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.) (Κωνσταντίνου, 2012).

### 1.2.2. Μεταλλικοί Στηριζόμενοι Καταλύτες

Οι μεταλλικοί στηριζόμενοι καταλύτες αποτελούνται από τρία κύρια μέρη τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικότερα στη συνέχεια: (α) την καταλυτικά ενεργό φάση (μέταλλο), (β) το φορέα (υπόστρωμα) και (γ) τους ενισχυτές (Satterfield, 1980 & Σάββα 2001). Οι ενισχυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνήθως σε ελάχιστες συγκεντρώσεις και συγκεκριμένες καταλυτικές αντιδράσεις προκειμένου να διατηρήσουν την υφή του καταλύτη ή να έχουν επενέργεια στο ρυθμό ή/και την εκλεκτικότητα της αντίδρασης (Σάββα, 2001 & Costa 2001).



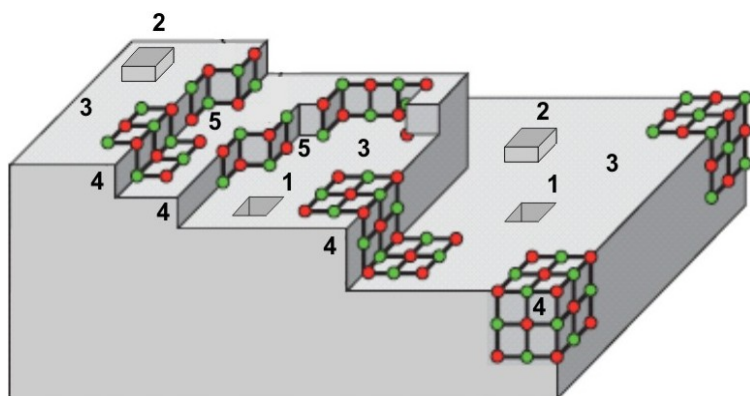
**Σχήμα 4:** Σχηματική αναπαράσταση ενός στηριζόμενου καταλύτη, όπου P οι ενισχυτές (Satterfield, 1980).

#### (α) Ενεργός ή Δραστική Φάση (Active Phase)

Η δραστική ή αλλιώς ενεργή φάση του καταλύτη προσδιορίζεται από το μέταλλο, το οποίο ευθύνεται για τη δημιουργία ενεργών κέντρων που προωθούν τη χημειορόφηση και την επιφανειακή αντίδραση (Σάββα, 2001 & Costa 2001). Η καταλυτική δράση μιας στερεής φάσης δεν εκδηλώνεται σε όλη την επιφάνειά της. Υπάρχουν ορισμένα σημεία της επιφάνειάς της τα

οποία είναι υπεύθυνα για την καταλυτική της συμπεριφορά και ονομάζονται ενεργά κέντρα ή ενεργές θέσεις. Ο αριθμός των δραστικών θέσεων που εμφανίζει ένας 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, τα οποία δύναται να αλληλεπιδρούν με τα αντιδρώντα της αντίδρασης όταν επιτευχθούν οι κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Στην ετερογενή κατάλυση ως δραστικές φάσεις αποτελούν κυρίως τα στερεά μέταλλα (Pt, Ag, Cu, Pd), τα οξείδια μετάλλων (AgO, CuO, Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) και τα σουλφίδια μετάλλων (MoS<sub>2</sub>, Co<sub>8</sub>S<sub>9</sub>). Εξαιτίας του ότι η κατάλυση είναι 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 (Καλαμαράς, 2006 & Ευσταθίου, 2005 & Κορδούλης κ.α., 2003 & Θεολογίδης, 2008).

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) (Ευσταθίου, 2005 & Κώστα, 2003 & Θεολογίδης, 2008 & Stoltze, 2000 & Tamaru, 1978).



**Σχήμα 5:** Γραφική αναπαράσταση της επιφάνειας σωματιδίου δραστικής καταλυτικής φάσης (1: κενά, 2: επιπλέον άτομα, 3: πολλαπλά επίπεδα, 4: αναβαθμίδες, 5: εσοχές) (Κορούλης κ.α., 2003)

#### (β) Καταλυτικός Φορέας ή Υπόστρωμα (Catalytic Carrier or Support)

Ο καταλυτικός 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 (Κορδούλης κ.α., 2003 & Σάββα, 2001 & Costa

et al., 2001 & Καλαμαράς, 2006). Το υπόστρωμα αποτελεί συνήθως πορώδες υλικό, συνήθως μεταλλοξείδιο, με ειδική επιφάνεια να ξεπερνά την τιμή των  $10 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Μερικά ευρέως χρησιμοποιούμενα υποστρώματα αποτελούν τα οξειδία των μετάλλων ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ,  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{La}_2\text{O}_3$  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 σε δηλητηριάσεις και σε συσσωματώσεις μικρών μεταλλικών κρυσταλλιτών (sintering) (Satterfield, 1980 & Σάββα, 2001 & Costa, 2001). Επιπλέον, μεταξύ των κυριότερων παραμέτρων που πρέπει 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, η υψηλή υδροθερμική αντοχή του υλικού η οποία αποτρέπει την αλλοίωση του υποστρώματος στην ύπαρξη υψηλών θερμοκρασιών αντίδρασης και παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων  $\text{H}_2\text{O}$  τόσο στο προϊόν όσο ή/και στην τροφοδοσία, αλλά και η ικανότητα εναπόθεσης δραστικής φάσης που ευνοεί την υψηλή διασπορά της δραστικής φάσης (π.χ. επιφανειακή τάση) αποτελούν εξίσου σημαντικές ιδιότητες του υποστρώματος (Κωνσταντίνου, 2012).

Στην παρούσα Πτυχιακή Εργασία χρησιμοποιήθηκε ως καταλυτικός φορέας η  $\gamma$ -αλούμινα, η οποία αποτελεί τον πλέον εμπορικότερο καταλυτικό φορέα. Υπάρχουν αρκετοί τύποι αλουμίνας που διαφέρουν σημαντικά ως προς τις φυσικές τους ιδιότητες, 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.

### **1.2.3. Αλληλεπιδράσεις Μετάλλου-Φορέα**

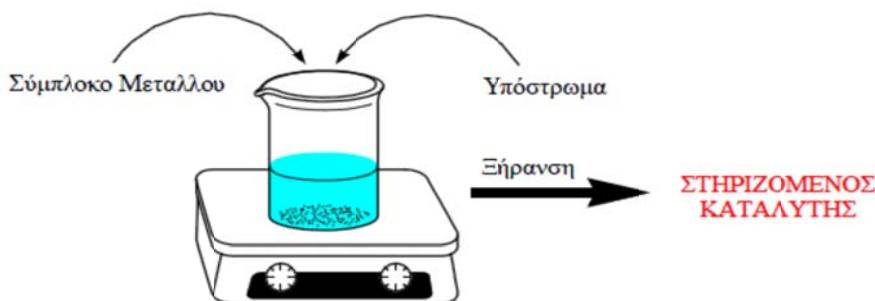
Παρόλο που αρχικά επικρατούσε η άποψη ότι ο φορέας αποτελούσε ένα αδρανές υλικό το οποίο απλά σταθεροποιούσε την δραστική φάση, εν τούτοις μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ του μετάλλου και του φορέα. Εξάλλου, όπως είναι αποδεδειγμένο, ο φορέας έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει όχι μόνο 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 (Σάββα, 2001 & Costa et al., 2001). Οι

αλληλεπιδράσεις μεταξύ μετάλλου και φορέα διακρίνονται σε έμμεσες και άμεσες (Zhang et al., 1994 & Σάββα, 2001 & Θεολογίδης, 2008). Στις έμμεσες αλληλεπιδράσεις υπάγονται διάφορα φαινόμενα αλληλεπιδράσεων όπως η προσρόφιση παρεμποδιστών και δηλητηρίων του μετάλλου στο φορέα, η επενέργεια στη μορφολογία και την κρυσταλλική δομή του μετάλλου, η δράση του φορέα στο ρόλο ως εφεδρικής αποθήκης προσροφημένων αντιδρώντων, η διάχυση (spillover) προσροφημένων ειδών από το μέταλλο στο φορέα, κ.ά.

Αντιθέτως, ως άμεσες αλληλεπιδράσεις χαρακτηρίζονται οι αλληλεπιδράσεις φορέα-υποστρώματος που δεν μπορούν να ενταχθούν στις έμμεσες και σχετίζονται με γεωμετρικές και ηλεκτρονικές αλληλεπιδράσεις μετάλλου-φορέα. Στην συγκεκριμένη κατηγορία εμπίπτουν χαρακτηριστικά φαινόμενα όπως οι “Ισχυρές Αλληλεπιδράσεις Μετάλλου - Φορέα” (SMSI) και “Επαγόμενων από Ενίσχυση Αλληλεπιδράσεων Μετάλλου-Φορέα” (DIMSI) (Zhang et al., 1994 & Σάββα, 2001 & Θεολογίδης, 2008 & Taylor, 1948).

#### 1.2.4. Σύνθεση Μεταλλικών Στηριζόμενων Καταλυτών

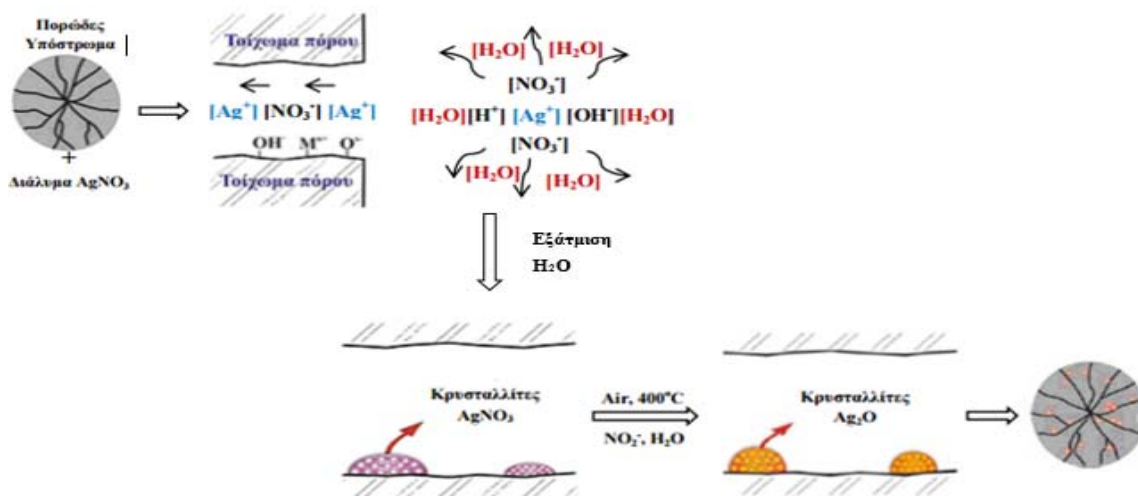
Αναμφισβήτητα, ο υγρός εμποτισμός (wet impregnation) χαρακτηρίζεται ως η πιο συνήθης διεργασία για την παρασκευή μεταλλικών και μονολιθικών στηριζόμενων καταλυτών. Ως εκ τούτου, η εναπόθεση μετάλλων π.χ. Ag, Cu στο υπόστρωμα πραγματοποιείται συνήθως με την συγκεκριμένη μέθοδο. Πιο συγκεκριμένα, ο καταλυτικός φορέας εμβαπτίζεται σε αιώρημα πρόδρομης ένωσης το οποίο περιέχει το επιθυμητό δραστικό καταλυτικό στοιχείο. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ως ενεργή φάση χρησιμοποιήθηκε ο άργυρος (Ag). Στο "Σχήμα 6" απεικονίζεται η πειραματική διάταξη της παρασκευής μεταλλικών καταλυτών με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού (Σάββα, 2008 & Efstathiou et al., 2003-2005-2006).



Σχήμα 6: Πειραματική διάταξη παρασκευής καταλυτών με υγρό εμποτισμό (Θεολογίδης, 2008)

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 (Λυκουργιώτης, 1987 & Σάββα, 2008):

- 1) Αρχικά η υγρή φάση που δημιουργείται με την εμβάπτιση των πορώδη 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 (Κωνσταντίνου, 2012).



**Σχήμα 7:** Διεργασία υγρού εμποτισμού κατά την διαδικασία παρασκευής στηριζόμενου καταλύτη Ag (Θεολογίδης, 2008 & Oberlin, 1976)

Περαιτέρω, 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 (Λυκουργιώτης, 1987 & Σάββα, 2008):

- **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 περιπτώσεις 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.

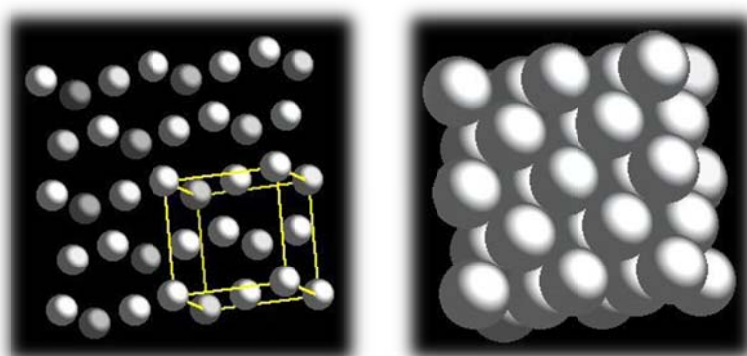
Αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την ξήρανση παρατηρούνται διαδικασίες όπως η διασπορά, η μακροκατανομή και η εναπόθεση της στηριζόμενης φάσης στην επιφάνεια του υποστρώματος οι οποίες υποκινούνται από την εξάτμιση του διαλύτη, την μετακίνηση της υγρής φάσης στο πορώδες σύστημα του υποστρώματος, την διάχυση 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.

### 1.2.5. Κρυσταλλική Δομή Μετάλλων και Φορέων που Χρησιμοποιήθηκαν στην Παρούσα Εργασία

#### - Κρυσταλλική Δομή Ag

Ο Άργυρος (Ag) αποτελεί ένα βαρύ και μαλακό μέταλλο γκρίζου χρώματος με έντονη μεταλλική λάμψη. Ανήκει στην 11<sup>η</sup> ομάδα του περιοδικού πίνακα με ατομικό αριθμό 47 και σχετική ατομική μάζα 107,8682 g/mol. Επίσης, ο άργυρος θεωρείται 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 (Martienssen et al., 2005 & Hammond, 2000).

Η κρυσταλλική του δομή παρουσιάζει κυβικό συμπαγές σχήμα (cubic close packed, ccp), όπου κυβικές παράμετροι απαιτούν πλευρές  $a, b, c = 408.53 \text{ pm}$  και γωνίες  $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$  (Winter, 2016).

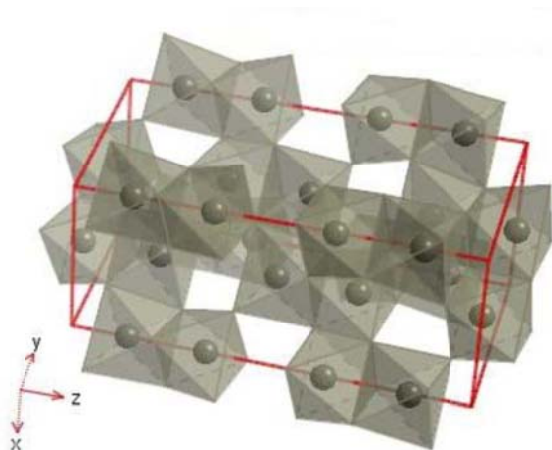


Εικόνα 3: Διαφορετικές απόψεις της κρυσταλλικής δομής του Άργυρου (Ag) (Winter, 2016)



### - Κρυσταλλική Δομή $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$

Η  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  είναι άσπρο κρυσταλλικό στερεό με οκταεδρική δομή σχήματος τετραγωνικής διπυραμίδας και θερμοκρασία τήξης και βρασμού τους  $2054^\circ\text{C}$  και  $3000^\circ\text{C}$ , αντίστοιχα. Τα κατιόντα  $\text{Al}^{3+}$  συνδέονται μεταξύ του με έξι γειτονικά ανιόντα  $\text{O}_2^-$ , δηλαδή παρουσιάζει αριθμό ένταξης ίσο με 6 (Καλαμαράς, 2006 & Winter, 2016).



Εικόνα 4: Η Κρυσταλλική δομή της  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  (Winter, 2016)

### 1.2.6. Χημική Προσρόφηση

Το φαινόμενο της *χημικής προσρόφησης* ή *χημειορόφησης*, παρουσιάζεται σε όλες τις καταλυτικές διεργασίες, όπου στην επιφάνεια του προσροφητικού μέσου (καταλύτη) προσροφάται τουλάχιστο ένα από τα αντιδρώντα αυτά βρίσκεται στην υγρή, ή στην αέρια φάση (Θεολογίδης, 2008 & Ευσταθίου, 2005 & Thomas et al., 1997). Στην περίπτωση όπου το προσροφημένο αντιδρών βρίσκεται στην αέρια φάση, η έκταση προσρόφησης του στην επιφάνεια του στερεού εξαρτάται από τη φύση, τη μέθοδο σύνθεσης, την κατεργασία του προσροφητή, αλλά και από τη θερμοκρασία και την πίεση του αερίου. Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει επίσης και το δυναμικό αλληλεπίδρασης (E) μεταξύ του αερίου και της επιφάνειας (Κώστα, 2003 & Shustorovich, 1991).

Η διεργασία της προσρόφησης σύμφωνα με την ισχύ της αλληλεπίδρασης, κατηγοριοποιείται σε φυσική και χημική προσρόφηση (Κώστα, 2003 & Shustorovich, 1991). Η

φυσική προσρόφηση οφείλεται στις ασθενείς δυνάμεις (Van der Waals, δεσμού υδρογόνου) που αναπτύσσονται μεταξύ του αερίου και της επιφάνειας του στερεού, ενώ η χημική προσρόφηση είναι αποτέλεσμα της καταλυτικής αντίδρασης. Συγκεκριμένα, η τελευταία χαρακτηρίζεται αρχικά από τη χημική προσρόφηση ενός ή περισσότερων αντιδρώντων στην επιφάνεια του καταλύτη, ακολούθως από την επαναδιάταξη των χημικών δεσμών και τελικά από την εκρόφηση των προϊόντων από την επιφάνεια του καταλύτη. Επομένως, διαπιστώνεται ότι η χημική προσρόφηση οφείλεται στην ύπαρξη ακορεστότητας στον αριθμό ένταξης των επιφανειακών ατόμων (surface atoms) ενός στερεού, σε σχέση με τα άτομα στο κρυσταλλικό του πλέγμα (bulk atoms). Έτσι, η χημική προσρόφηση οφείλεται στην ύπαρξη διαθέσιμων δεσμικών τροχιακών από τα άτομα της επιφάνειας ενός στερεού (μέταλλο, ημιαγωγός), τα οποία διατίθενται για τη δημιουργία χημικού δεσμού (Ευσταθίου, 2005). Η ενθαλπία της χημικής προσρόφησης κυμαίνεται από 40 μέχρι 280 kJ/mol (Κώστα, 2003 & Shustorovich, 1991). Συμπερασματικά, η χημική προσρόφηση των αντιδρώντων τόσο στη δραστική φάση, όσο και στον καταλυτικό φορέα, αποτελεί το κυριότερο φαινόμενο μιας καταλυτικής αντίδρασης.

Η χημική προσρόφηση διακρίνεται σε μοριακή (associative adsorption), όπου το μόριο προσροφάται αυτούσιο στην επιφάνεια και διασπαστική (dissociative adsorption), όπου το μόριο διασπάται σε δύο ή περισσότερα προσροφημένα είδη, σύμφωνα με τις πιο κάτω αντιδράσεις:



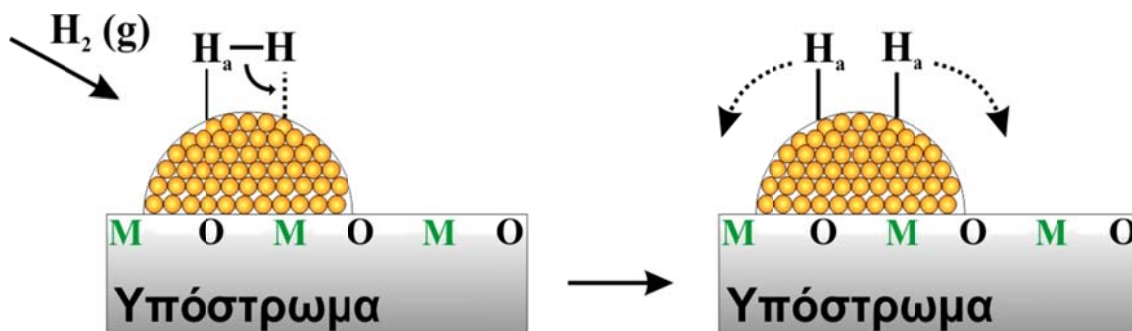
### 1.2.6.1. Διασπαστική Χημική Προσρόφηση $\text{H}_2$

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, το μόριο του  $\text{H}_2$  προσροφάται ως επί το πλείστο διασπαστικά σε μια στερεή επιφάνεια, και ανάλογα με το είδος του μετάλλου η προσρόφηση μπορεί να χαρακτηριστεί ενεργοποιημένη ή όχι. Καθοριστικό ρόλο στη διασπαστική προσρόφηση του  $\text{H}_2$  σε επιφάνεια μετάλλου, έχουν τα ηλεκτρόνια της επιφανείας του s και d (Σάββα, 2008).

Κατά τη διάρκεια προσέγγισης του  $\text{H}_2$  στην επιφάνεια του μετάλλου, τα μοριακά τροχιακά του ( $1\sigma$  και  $1\sigma^*$ ) αλληλεπικαλύπτονται με τα ηλεκτρόνια s της επιφάνειας. Όταν τα ηλεκτρόνια σθένους του επιφανειακού ατόμου είναι πλήρως κατειλημμένα, δημιουργούνται απωθητικές δυνάμεις με το s ηλεκτρόνιο του  $\text{H}_2$ , με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενεργειακού φράγματος. Όσο

το  $H_2$  πλησιάζει ολοένα και περισσότερο την επιφάνεια του μετάλλου, παρατηρείται μετακίνηση φορτίου, από το  $1\sigma$  τροχιακό του  $H_2$  στο  $d$  τροχιακό του μετάλλου με ταυτόχρονη μετακίνηση φορτίου από το  $d$  τροχιακό του μετάλλου στο αντιδεσμικό τροχιακό ( $1\sigma^*$ ) του  $H_2$  (back-donation). Με την παραπάνω διαδικασία ενισχύεται η διασπαστική προσρόφηση του  $H_2$  στην επιφάνεια του μετάλλου (Nobuhara et al., 2004).

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές μελέτες αναφέρεται αυξημένη χημική προσρόφηση  $H_2$  σε στηριζόμενους καταλύτες όπως Pt, Pd (Θεολογίδης, 2008 & Cuello et al., 1976 & Siculo et al., 2009), εξαιτίας της διάχυσης των προσροφημένων ειδών από μια στερεή επιφάνεια σε άλλη στην οποία δεν πραγματοποιείται άμεση προσρόφηση του (φαινόμενο spillover) επομένως η έκταση της προσρόφησης  $H_2$  είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το είδος της επαφής μετάλλου-υποστρώματος (Costa et al., 2007 & Θεολογίδης, 2008 & Σάββα, 2001).

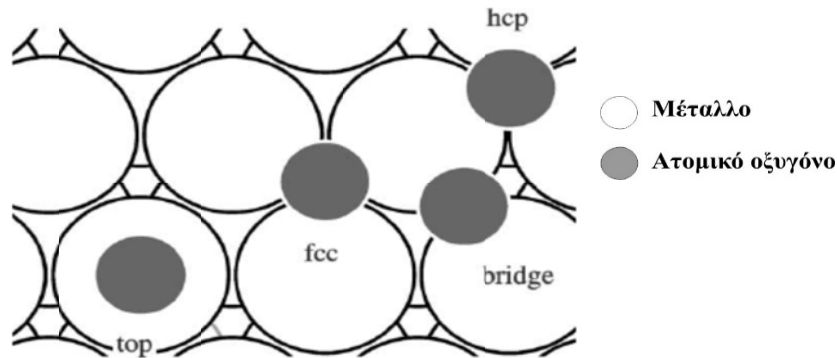


**Σχήμα 8:** Ο μηχανισμός διασπαστικής χημικής προσρόφησης του  $H_2$  στην καταλυτική επιφάνεια καθώς και της διάχυσης του ατομικού H στο υπόστρωμα (Costa et al., 2007)

### 1.2.6.2. Διασπαστική Χημική Προσρόφηση $O_2$

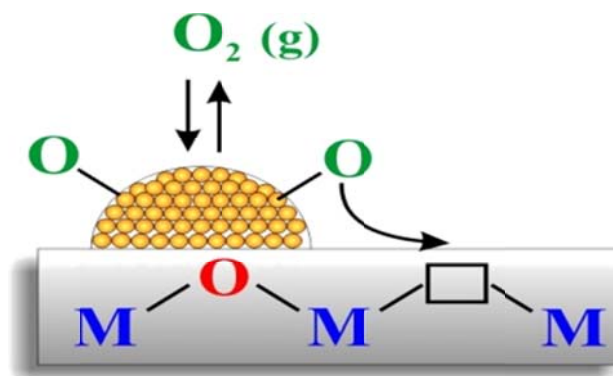
Παρόμοια με το  $H_2$ , έτσι και το  $O_2$  προσροφάται διασπαστικά στην επιφάνεια των περισσότερων μετάλλων (Ag, Cu, Ni, Pt, Pd) (Spruit et al., 1989 & Sault et al., 1986 & Li et al., 2006 & Σάββα, 2001 & Ευσταθίου, 2005). Σημειώνεται πως το  $O_2$  παρουσιάζει πιο εύκολη προσρόφηση στα μέταλλα που δεν παρουσιάζουν ημιπλήρη  $d$  τροχιακά ή δεν έχουν καθόλου  $d$  τροχιακά. Αρχικά, το  $O_2$  φυσιοροφάται στην επιφάνεια του στερεού και ακολουθεί διάσπαση και έπειτα χημειορρόφησή του (Li et al., 2006 & Σάββα, 2001). Τη φυσιορρόφηση του μοριακού  $O_2$  ακολουθεί σημαντική μεταφορά της ηλεκτρονιακής πυκνότητας από την επιφάνεια στα  $\pi^*_{2p}$  τροχιακά του  $O_2$  με αποτέλεσμα ο δεσμός O-O να διευρύνεται και παράλληλα να εξασθενεί μέχρι τη διάσπασή του (Σάββα, 2001 & Xu, 2001). Η διάσπαση μοριακού  $O_2$  πραγματοποιείται είτε on

top είτε γεφυρωτά. Ακολούθως, το μοριακό  $O_2$  μπορεί να διαχυθεί στην επιφάνεια του υποστρώματος και να διασπαστεί σε ατομικό οξυγόνο.



**Σχήμα 9:** Αναπαράσταση του τρόπου και θέσης προσρόφησης ατομικού οξυγόνου σε επιφάνεια μετάλλου

Η προσρόφηση του οξυγόνου στη δραστική φάση καταλυτών, πιθανόν να προκαλέσει πλήρωση των κενών θέσεων με ατομικό O, αν το υπόστρωμα μεταλλοξειδίων χαρακτηρίζεται από ακορεστότητα. Ισορροπία παρουσιάζεται ανάμεσα στο οξυγόνο στην αέρια φάση και το αντίστοιχο προσροφημένο οξυγόνο στον κρυσταλλίτη της ενεργού φάσης.



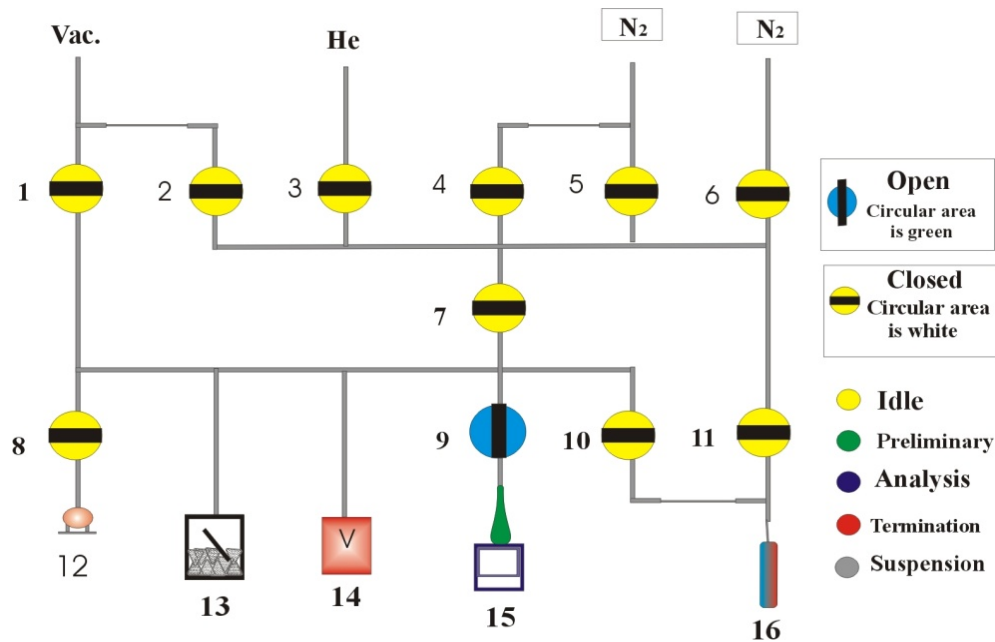
**Σχήμα 10:** Σχηματική αναπαράσταση της προσρόφησης και διάσπασης του  $O_2$  στην επιφάνεια μεταλλοξειδίου που διαθέτει κενές θέσεις οξυγόνου (όπου M: μέταλλο) (Σάββα, 2001)

### 1.3. Αναλυτικές Τεχνικές Φυσικοχημικού Χαρακτηρισμού Καταλυτών

#### 1.3.1. Προσδιορισμός Ειδικής Επιφάνειας (BET)

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 (Κώστα, 2003 & Micromeritics, n.d.):



**Σχήμα 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 (Gregg et al., 1967 & Κώστα, 2003):

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

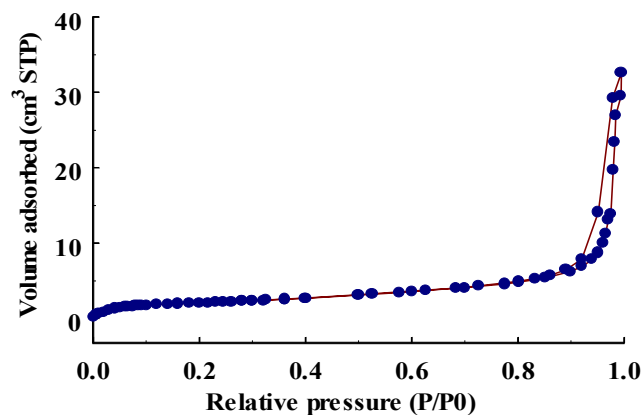
Όπου,  $V$  = όγκος του προσροφημένου αερίου στην μερική πίεση  $P$ ,  $V_m$  = όγκος του προσροφημένου αερίου για τη δημιουργία μονομοριακής στοιβάδας,  $P_0$  = τάση ατμών του αερίου στη θερμοκρασία του πειράματος και  $C$  = σταθερά, εξαρτώμενη από τη θεرمότητα προσρόφησης και λανθάνουσας θερμοότητας υγροποίησης του αερίου.

Η σταθερά  $C$  υπολογίζεται από τον τύπο:

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

Όπου,  $q_1$  = θερμοότητα προσρόφησης για την πρώτη στοιβάδα ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ ),  $q_2$  = λανθάνουσα θερμοότητα υγροποίησης του αερίου (ισούται με την θερμοότητα προσρόφησης για όλες τις επόμενες στοιβάδες) ( $\text{kcal.mol}^{-1}$ ).

Εξάλλου, ο όγκος του προσροφημένου αερίου σε συνάρτηση με την σχετική πίεση  $P/P_0$ , παρουσιάζεται στην παρακάτω γραφική παράσταση του ισόθερμου B.E.T.. Παρόλο που η συγκεκριμένη τεχνική διαθέτει δυνατότητα εξέτασης της προσρόφησης σε σχετικές πιέσεις από 0 έως 1, εντούτοις εξειδικεύεται σε πιέσεις από 0.05 έως 0.3, όπου εξίσωση 1 ακολουθείται ικανοποιητικά (Κώστα, 2003 & Gregg et al., 1967 & Snith et al., 1981). 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  $P/V(P_0 - P)$  συναρτήσει της σχετικής πίεσεως  $P/P_0$ , δύναται να είναι ευθεία γραμμή όταν η εξίσωση B.E.T. (1) ακολουθείται.



Εικόνα 5: Ισόθερμος ( $T=77\text{K}$ ) B.E.T για εμπορικό δείγμα  $\text{CaO}$

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 ( $6.023 \times 10^{23}$  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 ( $\text{g/gmol}$ ), και  $\rho$ : η πυκνότητα του υγροποιημένου αερίου στη θερμοκρασία του πειράματος ( $\text{g/cm}^3$ ).

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

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

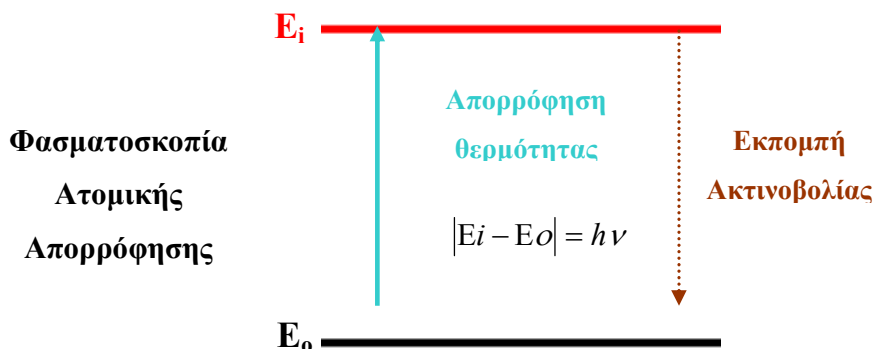
### 1.3.2. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)

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 ( $\nu$ ) ή το μήκος κύματος ( $\lambda$ ) της ακτινοβολίας, σχετίζεται με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ενεργειακών καταστάσεων και μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση:

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

Όπου,  $E_i$ : ενέργεια της υψηλότερης,  $E_o$ : ενέργεια της χαμηλότερης κατάστασης,  $c$ : ταχύτητα του φωτός και  $h$ : σταθερά του Planck.

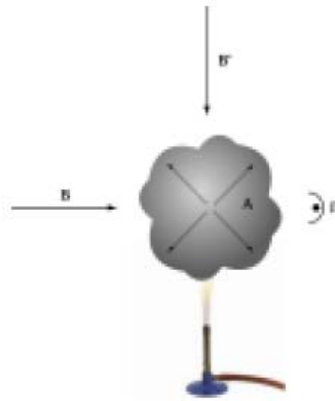
Τα ατομικά φάσματα που προκύπτουν εντοπίζονται στο ορατό τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος (160-880 nm), το οποίο περιλαμβάνει την υπεριώδη (UV), ορατή και εγγύς υπέρυθη ακτινοβολία. Παρακάτω παρουσιάζονται οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μεταξύ δύο ενεργειακών επιπέδων  $E_o$  και  $E_i$  (Στράτης κ.α., 2004 & Θεολογίδης, 2008).



Σχήμα 12: Ενεργειακές μεταπτώσεις στην φασματοσκοπία ατομικής απορρόφησης (Στράτης κ.α., 2004)



Επίσης, η αρχή της ατομικής φασματοσκοπίας αποδίδεται σχηματικά στο "Σχήμα 13" (Θεολογίδης, 2008 & Υφαντής, 1999). 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  $\nu$  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.



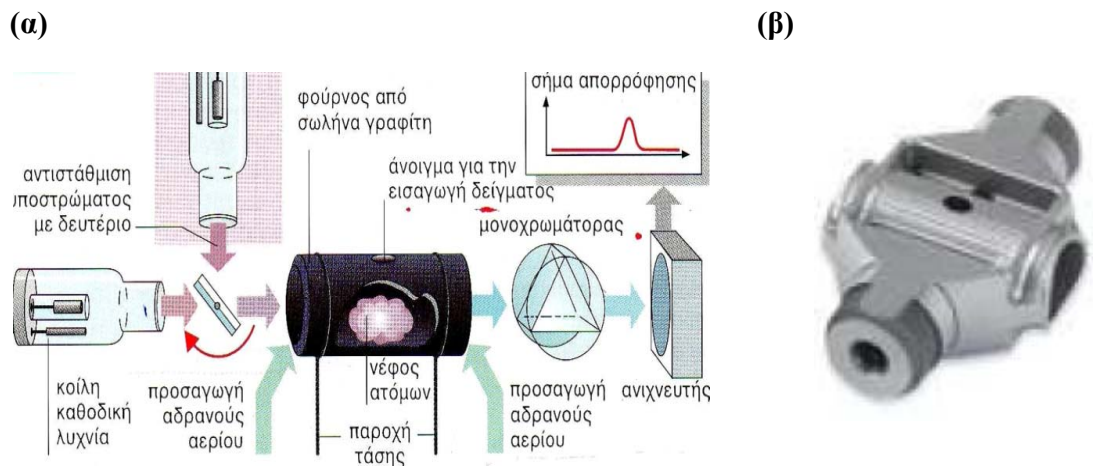
**Σχήμα 13:** Αρχή της ατομικής φασματοσκοπίας. A: Νέφος ατόμων, B, B': Δέσμη διερχόμενης ακτινοβολίας ομοαξονικά και κάθετα με τον ανιχνευτή αντίστοιχα και Γ: Ανιχνευτής (Υφαντής, 1999)

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  $A$ : ατομική απορρόφηση,  $I_0$ : ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας,  $I$ : ένταση της εξερχόμενης ακτινοβολίας,  $K_v$ : συντελεστής ανάλογος του αριθμού των ατόμων ανά μονάδα όγκου και  $\beta$ : 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 (Θεολογίδης, 2008 & Υφαντής, 1999). Σε ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις δεν είναι δυνατός ο προσδιορισμός με τις τεχνικές της φλόγας ή του πλάσματος. Στο "Σχήμα 14" 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 14:** (α) Διάταξη συσκευής ΦΑΑ με φούρνο από σωλήνα γραφίτη (Στράτης κ.α., 2004), (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.

#### **1.4. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση για την μέχρι πρότινος επεξεργασία του νερού έρματος**

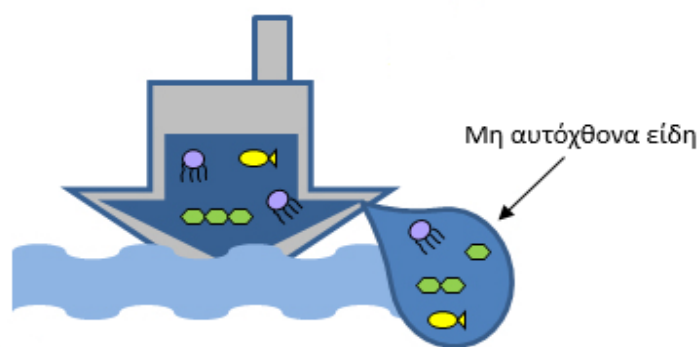
Η πρώτη οργανωμένη παγκόσμια προσπάθεια για την εύρεση πιθανών μεθόδων επεξεργασίας του νερού έρματος πραγματοποιήθηκε κατά την δεκαετία του 1980, κάτω από τις έντονες ανησυχίες για την ύπαρξη παθογόνων βακτηρίων και ιών με παντελώς άγνωστη ποικιλομορφία στο νερό αυτό (Takahashi et al., 2008). Όπως είναι ευρέως γνωστό, η πιο 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).

Επίσης, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής εξαρτάται μεταξύ άλλων από την δομή και τον σχεδιασμό του πλοίου. Συγκεκριμένα, υπάρχουν τρεις τύποι ανταλλαγής του υδάτινου έρματος (ABS, 2010):

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 αδειασμα 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 (Tsolaki et al., 2010).

β) η μέθοδος της συνεχής απόπλυσης, γνωστή και ως "flow through method", σύμφωνα με την οποία οι δεξαμενές του πλοίου ξεπλένονται-υπερχειρίζουν 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 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. Ωστόσο, η συγκεκριμένη μέθοδος, παρά το ότι υπερτερεί έναντι της προηγούμενης μεθόδου, η αποτελεσματικότητά της κυμαίνεται και πάλι σε σχετικά χαμηλά επίπεδα (Tsolaki et al., 2010).

γ) η μέθοδος της ταυτόχρονης εκκένωσης και πλήρωσης της δεξαμενής με ίση ροή, γνωστή και ως "dilution method", η οποία περιλαμβάνει την άντληση νερού στο εσωτερικό της δεξαμενής έρματος και παράλληλα άδειασμα νερού από το κάτω μέρος της δεξαμενής. 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, δεν τίθεται σε κίνδυνο η ασφάλεια του πληρώματος του εκάστοτε πλοίου, ενώ με την συγκεκριμένη μέθοδο καθίσταται εφικτή η απομάκρυνση τυχόν ιζημάτων που είχαν κατακαθίσει στη δεξαμενή έρματος (Takahashi et al., 2008 & ABS, 2010).



**Σχήμα 15:** Αναπαράσταση της απόρριψης μη αυτόχθονων ειδών με την μέθοδο της ανταλλαγής νερού έρματος (Πανέρας, Α, 2014)

Περαιτέρω, έχοντας πάντοτε ως στόχο τον περιορισμό των ευρύτερων κοινωνικο-οικονομικών αρνητικών επιπτώσεων που προκύπτουν από την αλόγιστη μεταφορά και απόρριψη

υδάτινου έρματος, πολλές είναι οι μέθοδοι που έχουν εγκριθεί από τον διεθνή οργανισμό ναυσιπλοΐας (IMO) και χρησιμοποιούνται για την ικανοποιητική επεξεργασία του υδάτινου έρματος μέσα από την επίτευξη των στόχων και των κριτηρίων που εμπεριέχονται στη συνθήκη για τον έλεγχο και την διαχείριση του υδάτινου έρματος και των ιζημάτων των πλοίων. 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 ότι οι τεχνολογίες αυτές πρέπει να παρουσιάζουν υψηλή αποτελεσματικότητα σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, εύκολα μπορεί κανείς να αντιληφθεί τα ζητήματα που προκύπτουν (Gonçalves et al., 2012).

Συγκεκριμένα, οι τεχνολογίες επεξεργασίας του νερού έρματος που χρησιμοποιούνται σήμερα και πληρούν τους κανονισμούς καθώς και τις κατευθυντήριες γραμμές του διεθνή οργανισμού ναυσιπλοΐας (IMO), πέρα από την ανταλλαγή νερού, περιλαμβάνουν (Tsolaki et al., 2010):

- ❖ επεξεργασία του νερού έρματος σε εγκαταστάσεις του λιμανιού στο οποίο προσαράζει το εκάστοτε πλοίο
- ❖ 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



**Εικόνα 6:** Επεξεργασία του νερού έρματος σε λιμενικές εγκαταστάσεις (Gollasch, et al., 2015)

Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως ο διεθνής οργανισμός ναυσιπλοΐας (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  $1500 \text{ m}^3$  ή μεγαλύτερη από  $5000 \text{ m}^3$ , οφείλουν να πραγματοποιούν ανταλλαγή ή επεξεργασία του έρματος μέχρι το 2016, ενώ από το 2016 και έπειτα καθίσταται 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  $5000 \text{ m}^3$ , πέρα από την επεξεργασία, ανταλλαγή θαλάσσιου έρματος πραγματοποιείται 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  $1500 \text{ m}^3$  ή μεταξύ  $1500$  και  $5000 \text{ m}^3$ , 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 διαθέτουν χωρητικότητα έρματος μεγαλύτερη από  $5000 \text{ m}^3$ , 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 (Tsolaki et al., 2010).

#### **1.4.1. Προδιαγραφές που πρέπει να πληρούν οι τεχνολογίες επεξεργασίας του νερού έρματος**

Η ποσότητα νερού που χρειάζεται να επεξεργαστεί με την χρήση οποιασδήποτε μεθόδου είναι τεράστια, 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 (Balaji et al., 2011).

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 ουδέτερο διεθνή οργανισμό (Tsolaki et al., 2010 & Hallegraeff, 1998).

#### **1.4.2. 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 ασύμφορες ή/και καθόλου 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	Δυνατότητες Αποστείρωσης	
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)	*(DBP's)	**	***	
DEOXYGENATION	***	*	**	
ELECTRO-IONIZATION MAGNETIC SEPARATION	***	*	**	
PHOTOCATALYSIS/ OZONE (UV/Ag-TiO <sub>2</sub> +O <sub>3</sub> )	**	*	***	

\*Χαμηλή, \*\*Μέτρια, \*\*\*Υψηλή

- Η ανταλλαγή του νερού έρματος με θαλασινό 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 τεχνική που επιλέγεται για την διεκπεραίωση της, διακρίνεται από χαμηλή βιολογική αποτελεσματικότητα (Endresen et al., 2004).

- 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 πως 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 υψηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας των συγκεκριμένων μεθόδων μαζί 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 και παραγκωνισμού τους.
- 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 έχουν εγκατασταθεί 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 δαπάνη 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.

- 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 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 τεράστιοι περιβαλλοντικοί κίνδυνοι λόγω των τοξικών παραπροϊόντων που προκύπτουν τα οποία πέρα από την καταστροφή των οικοσυστημάτων στα οποία διοχετεύονται, θέτουν επίσης και σοβαρά ζητήματα όσον 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.

- 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 φιλτράρισμα που ακολουθεί, αποτελούν ιδιαίτερα δαπανηρές διαδικασίες.
- Σε μια πρόσφατη έρευνα, οι Wu et al. το 2011, διερευνήσαν την επικείμενη επεξεργασία του υδάτινου έρματος στα πλαίσια του τομέα 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 της τιτάνιας (TiO<sub>2</sub>) εμποτισμένων με νανοσυμπλέγματα αργύρου (Ag), σε συνδυασμό με την ροή όζοντος (O<sub>3</sub>). Σε αντίθεση με την αποτελεσματικότητα που επιδεικνύει κάθε μεμονωμένη διαδικασία, ο συνδυασμός των παραπάνω μεθόδων παρουσίασε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όσο αφορά την απαλλαγή του θαλασσινού νερού έρματος από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς. Μάλιστα, 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<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> επεξεργασία του υδάτινου έρματος, έχει ισχυρό δυναμικό σχετικά με την αντιμετώπιση του μικροβιακού φορτίου, ενισχύοντας παράλληλα την σημαντικότητα του τομέα της κατάλυσης.

### **1.5. Οι κίνδυνοι που προκύπτουν από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που εμπεριέχονται στο νερό έρματος**

Αναντίρρητα, 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 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.

Αναμφισβήτητα λοιπόν 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 (Drake et al., 2007 & McCarthy et al., 1994 & Cohen et al., 2012 & Takahashi et al., 2008 & Albert et al., 2013).

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 διανομή των μικροοργανισμών, καθώς και το ξέσπασμα πανδημιών που οφείλονται σε υδατογενή νοσήματα.

### **1.5.1. Τα όρια-κανονισμοί που θεσπίστηκαν από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO), για τους παθογόνους μικροοργανισμούς που εμπεριέχονται στο νερό έρματος**

Αναμφίβολα, η απόρριψη νερού έρματος από τα πλοία το οποίο δεν υπόκειται προηγουμένως σε επεξεργασία, αποτελεί μια από τις σημαντικότερες αιτίες για την διατάραξη της οικολογικής ισορροπίας (Baier et al., 2014). Ως εκ τούτου, 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 (International Maritime Organization, 2016).

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 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 παρακάτω πίνακα (Gonçalves et al., 2012).

**Πίνακας 2:** Τα όρια απόρριψης του νερού έρματος σύμφωνα με τον κανονισμό D2 (IMO, 2004)

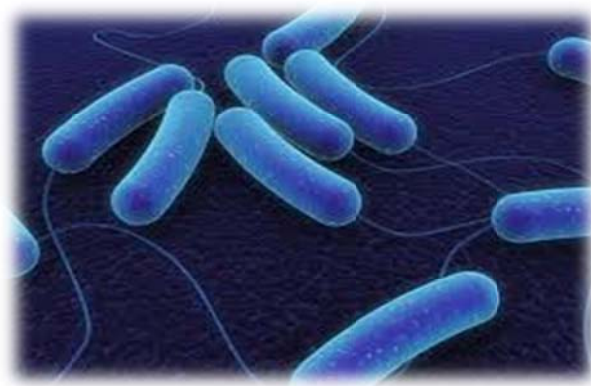
ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	Όριο ΑΠΟΡΡΙΨΗΣ ΣΤΟ ΝΕΡΟ ΕΡΜΑΤΟΣ
Φυτοπλαγκτόν/Ζωοπλαγκτόν ≥ 50 μm	< 10 βιώσιμων οργανισμών / m <sup>3</sup> νερού
Φυτοπλαγκτόν/Ζωοπλαγκτόν 10 - 50 μm	< 10 βιώσιμων οργανισμών / mL νερού
<i>Vibrio cholerae</i> (O1 και O139)	< 1 cfu / 100 mL νερού
<i>Escherichia coli</i>	< 250 cfu / 100 mL νερού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

### 1.5.2. Τα 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 ανευρεθεί στο περιβάλλον, τα τρόφιμα, το νερό και τα έντερα 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.

Υπό κανονικές συνθήκες τα βακτήρια *E.coli* αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας του εντέρου, και έτσι απαντώνται στα έντερα όλων των θηλαστικών, αποτελώντας μάλιστα μια σημαντική ένδειξη μιας υγιούς ανθρώπινης γαστρεντερικής οδού αφού παρεμποδίζουν άλλα παθογόνα βακτήρια να αποικήσουν 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 (Public Health Agency of Canada, 2015 & ECDC, 2016 & Rudd, 2000



**Εικόνα 7:** Το βακτήριο *E.coli* (Nordqvist, 2015)

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, και σε συνδυασμό με το γεγονός πως αποτελεί κατά πολύ ανώτερο δείκτη για την διακρίβωση τυχόν κοπρανώδους μόλυνσης σε σύγκριση με άλλους μικροβιακούς δείκτες, μπορεί να χαρακτηριστεί ως αναπόφευκτη (δίκαιη) η συμπερίληψη του στα βακτήρια που ελέγχονται για την εξακρίβωση της ποιότητας του νερού έρματος όπως παρουσιάζεται στον "Πίνακα 2" (CDC,

2015 & Public Health Agency of Canada, 2015 & ECDC, 2016 & Rudd, 2000 & Edberg et al., 2000).

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 ομώνυμη ασθένεια. Σημειώνεται στο σημείο αυτό πως το βακτήριο *Vibrio parahemolyticus* αποτελεί και αυτό ένα περιστασιακά παθογόνο είδος, συγγενικό με το είδος *Vibrio cholerae*, με όμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά.



**Εικόνα 8:** Το βακτήριο *Vibrio cholera* (Cortinas et al., 2016)

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. Όπως είναι γνωστό η χολέρα αποτελεί μια εκκριτική διάρροια που χαρακτηρίζεται από εκκρίσεις μεγάλων ποσοτήτων υδαρών κοπράνων και

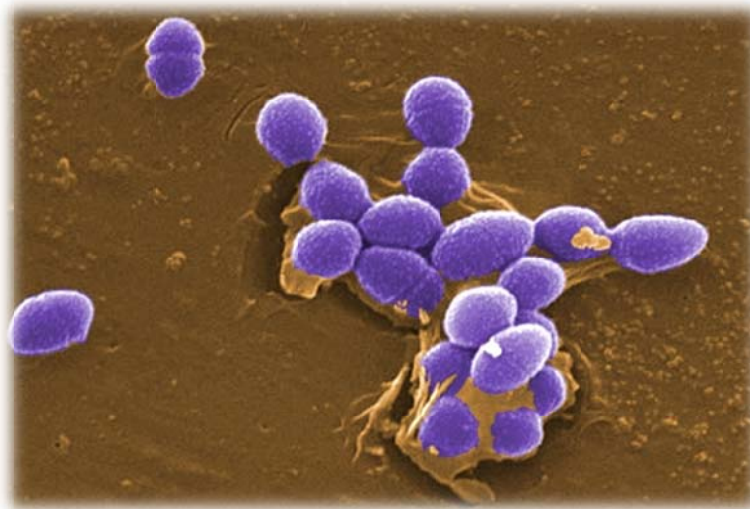
εμετούς. Κάτι τέτοιο έχει σαν αποτέλεσμα την ταχεία αφυδάτωση του οργανισμού, που μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε θάνατο. Επιπλέον, η συγκεκριμένη ασθένεια μεταδίδεται με την κατανάλωση νερού ή τροφίμων που έχουν μολυνθεί από τα κόπρανα κάποιου φορέα της ασθένειας.

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 (Takashi et al., 2008 & Ruiz et al., 2000), τα στελέχη *Vibrio cholerae* O1 και *Vibrio cholerae* O139 συμπεριλαμβάνονται στα όρια που θεσπίστηκαν από τον Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO) όπως παρουσιάζεται στον "Πίνακα 2" (Nair, 2008 & Baron, 1996).

Οι εντερόκοκκοι (*Intestinal enterococci*), αποτελούν υποομάδα μιας μεγαλύτερης ομάδας βακτηρίων που ορίζονται ως κοπρανώδης στρεπτόκοκκοι, και περιέχει είδη του γένους *Streptococcus*. Τα συγκεκριμένα βακτήρια είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια που παρουσιάζουν σχετικά αυξημένη αντοχή σε αλκαλικά περιβάλλοντα. Επίσης οι εντερόκοκκοι, χαρακτηρίζονται ως προαιρετικά 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 κοπρανώδης 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 δίκαιος 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 ενδιαίτηματα όπως το έδαφος σε περίπτωση που η πιθανότητα κοπρανώδης μόλυνσης του νερού έχει προηγουμένως αποκλειστεί.





**Εικόνα 9:** Το βακτήριο *Enterococcus faecalis* (Wardell, 2011)

Είναι γνωστό πως οι εντερόκοκκοι ως ευκαιριακά παθογόνα είναι η 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 Διεθνή Οργανισμό Ναυσιπλοΐας (IMO) όπως φαίνεται στον "Πίνακα 2" (BVSDE, 2012 & Byappanahalli et al., 2012 & Boehm et al., 2014).

### **1.6. Αντιμικροβιακές Ιδιότητες του Αργύρου (Ag) και οι χρήσεις του ιοντικού Αργύρου (Ag<sup>+</sup>) ως αντιμικροβιακός παράγοντας**

Αναντίρρητα, ορισμένα μέταλλα θεωρούνται απαραίτητα για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς αφού η πραγματοποίηση συγκεκριμένων κυτταρικών λειτουργιών διεκπεραιώνεται μόνο από τα μέταλλα αυτά και όχι από συνηθισμένα οργανικά μόρια. Για παράδειγμα, κάποια μεταλλικά ιόντα θεωρούνται ζωτικής σημασίας όσο αφορά την δομή των κυτταρικών μεμβρανών και του DNA. Ωστόσο, τα απαραίτητα αυτά μέταλλα είναι θανατηφόρα για όλα τα κύτταρα όταν παρουσιάζονται σε περίσσεια. Από την άλλη πλευρά, ορισμένα μη χρήσιμα για το κύτταρο μέταλλα όπως ο άργυρος (Ag), ο υδράργυρος (Hg) και το τελλούριο (Te), μπορούν να αποβούν εξαιρετικά δηλητηριώδες για τα περισσότερα βακτήρια ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Λόγω μάλιστα της υψηλής τοξικότητας που παρουσιάζουν τα μέταλλα

αυτά, υπάρχουν αρκετές περιγραφές και συγγράμματα όπως ο Πάπυρος του Edwin Smith - ένα αρχαίο αιγυπτιακό ιατρικό κείμενο που χρονολογείται από το 1500 π.Χ., τα οποία τεκμηριώνουν την χρήση τους ως αντιμικροβιακούς παράγοντες από αρχαιοτάτων χρόνων (Lemire et al., 2013 & Gallo et al., 2014 & Lkhagvajav et al., 2015 & Lok et al., 2007).

Ανάμεσα στις αντιμικροβιακές ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα μέταλλα αυτά συγκαταλέγονται η διατάραξη των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βιοφίλμ, η συνεργική βακτηριοκτόνος δράση που ασκούν παρουσία άλλων βιοκτόνων, η διάνοιξη της κυτταρικής μεμβράνης και η επιλεκτική αναστολή διάφορων μεταβολικών οδών. Όλα τα παραπάνω επιβεβαιώνουν το γεγονός πως οι αμυντικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιεί το κύτταρο υπερνικούνται από την δράση των τοξικών χημικών ιδιοτήτων των συγκεκριμένων μετάλλων (Feng et al., 2000 & Lemire et al., 2013).

Αναμφισβήτητα, ο ιοντικός άργυρος ( $Ag^+$ ) αποτελεί έναν πολύ γνωστό αντιμικροβιακό παράγοντα με ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τις ποικίλες χρήσεις του μετάλλου αυτού, κάτι που σε συνδυασμό με την ταχεία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας, τον καθιστά ως το πιο ευρέως εμπορευματοποιημένο αλλά και το πλέον χρησιμοποιημένο νανοϋλικό σε καταναλωτικά προϊόντα. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ιδιαίτερα αυξητική τάση για χρήση του άργυρου σε βιοϊατρικές εφαρμογές, για τον καθαρισμό του νερού και του αέρα, στην παραγωγή τροφίμων, σε καλλυντικά, σε ρούχα, και πολλά άλλα προϊόντα οικιακής χρήσης. (Feng et al., 2000 & Fabrega et al., 2010)

Αξίζει στο σημείο αυτό να αναφερθεί πως ο στοιχειακός άργυρος ( $Ag(0)$ ) παρουσιάζει σημαντικά μειωμένες έως ανύπαρχτες αντιμικροβιακές ιδιότητες μέσα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη του βακτηρίου E.coli με νανοσωματίδια άργυρου τα οποία συντέθηκαν και ελέγχθηκαν υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, ούτως ώστε να αποφευχθεί η οξειδωση του άργυρου και η μετατροπή του σε ιοντικό άργυρο (Xiu et al., 2012 & Radzig et al., 2012).

### **1.6.1. 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 τεχικών 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. Από την άλλη μεριά, 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 και τεκμηριώνεται από τον 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. Ως εκ τούτου αποδεικνύεται, διευκολύνεται αλλά και ενισχύεται η ισχυρή αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων ιόντων αργύρου κυρίως με τα κατά gram αρνητικά αλλά και με τα κατά gram θετικά βακτήρια (Todar, 2012 & Ahmed et al., 2016).

### **1.6.2. Μηχανισμοί δράσης του Άργυρου στα βακτήρια**

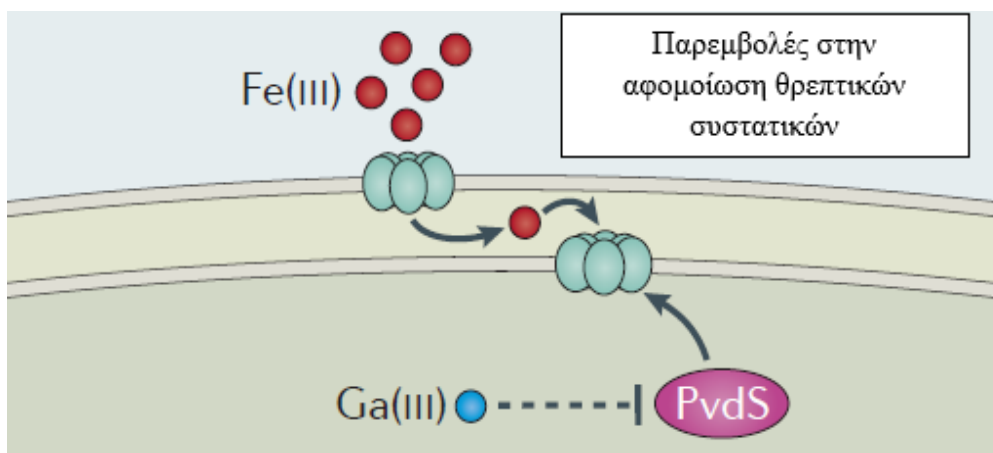
Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται αυξανόμενο ενδιαφέρον τόσο για την παρασκευή όσο και την μελέτη νανοσωματιδίων αργύρου (Ag NPs), λόγω του ότι τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια έχουν βρεθεί να εμφανίζουν ενδιαφέρουσα αντιβακτηριακή δράση. Ωστόσο, παρόλο που οι μηχανισμοί δράσης των νανο-ιόντων αργύρου μελετώνται διεξοδικά από την επιστημονική κοινότητα που επικεντρώνεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των νανοσωματιδίων διαφόρων μετάλλων, δεν έχουν ακόμα αποκρυπτογραφηθεί πλήρως (Guzman et al., 2012 & Jung et al., 2008). Εν τούτοις, οι πιο συνηθισμένοι μηχανισμοί τοξικότητας με τους οποίους ο ιοντικός άργυρος γενικότερα αλλά και τα νανοσωματίδια αργύρου αποκτούν βακτηριοκτόνο ιδιότητα, είναι οι ακόλουθοι:

α) Μέσα από διάφορες αντιδράσεις απελευθερώνονται κατιόντα άργυρου ( $Ag^+$ ) που αλληλοεπιδρούν με ένζυμα τα οποία είναι υπεύθυνα για την αλυσιδωτή αντίδραση του αναπνευστικού συστήματος των βακτηρίων, όπως η NADH αφυδρογονάση, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την αποσύζευξη της αναπνοής από την διαδικασία της σύνθεσης ATP. Επιπλέον τα ιόντα αργύρου μπορούν να συνδέονται με μεταφορικές πρωτεΐνες προκαλώντας τόσο την διαρροή πρωτονίων από το μικροβιακό κύτταρο και συνάμα την κατάρρευση της πρωτονιεγερτικής δύναμης όσο και την αναστολή της πρόσληψης φωσφορικών ιόντων από τα βακτήρια. Επιπρόσθετα, τα κατιόντα άργυρου 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 της πολυμεράσης 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 συμύκνωση του DNA στο κέντρο του κυττάρου.

β) Η δημιουργία περίσσειας δραστικών μορφών οξυγόνου 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. 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 άργυρου αλληλοεπιδρούν κατευθείαν με ένζυμα που αποτελούν μέρος του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος του κυττάρου, αναστέλλοντας την λειτουργία τους, ενώ στα βακτηριακά κύτταρα τα ιόντα αργύρου που αλληλοεπιδρούν με τις ομάδες θειόλης των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας, αυξάνει και πάλι την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

γ) Τα οξειδωμένα ιόντα άργυρου μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, δημιουργώντας τεράστια κοιλώματα που μπορεί στο τέλος να επιφέρουν τη λύση του κυττάρου. 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 (Marambio-Jones et al., 2010).

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 (Lemire et al., 2013).



**Σχήμα 16:** Αναστολή της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την μεταφορική πρωτεΐνη του Fe (III) εντός του κυττάρου (Lemire et al., 2013)

Τονίζεται πως στις περισσότερες περιπτώσεις η αναστολή της ανάπτυξης και ο κυτταρικός θάνατος, πιθανότατα να οφείλεται στον συνδυασμό διαφορετικών μηχανισμών (Lemire et al., 2013).

### 1.7. Βιβλιογραφική Ανασκόπηση Αποστείρωσης – Μέθοδοι Αποστείρωσης

Αναντίρρητα, 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 απρόσκοπτη 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. Επίσης, με την βοήθεια του λύχνου Bunsen, πέραν της δυνατότητας που παρέχει για γρήγορη αποστείρωση ορισμένων αντικειμένων, δημιουργούνται οι απαιτούμενες ασηπτικές συνθήκες στο χώρο εργασίας.

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 όμως, δεν είναι εφικτή η καταστροφή όλων των προϊόντων του μικροβιακού κυττάρου. Επιπρόσθετα η αποστείρωση θεωρείται απαραίτητη σε περίπτωση δημιουργίας καθαρής καλλιέργειας. 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 (Θεολογίδης, 2014).

Οι πιο κοινοί στόχοι των αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται είναι η κυτταρική μεμβράνη ή ειδικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα δεσοξυριβοζονουκλεϊκά οξέα (DNA – RNA) του κυττάρου. Ως γνωστόν η κυτταρική μεμβράνη κατέχει διπλό ρόλο αφού αφενός περιβάλλει το κύτταρο διαχωρίζοντας το από το εξωτερικό περιβάλλον και αφετέρου ρυθμίζει την διακίνηση μορίων και πληροφοριών από και προς το κύτταρο μέσω ειδικών πρωτεϊνών. Η καταστροφή της λοιπόν προκαλεί λύση του κυττάρου και διασπορά των συστατικών του στο εξωκυττάριο περιβάλλον. Αντίστοιχα, διάφορες πρωτεΐνες με δομή ευαίσθητη στη θερμότητα και σε διάφορες χημικές ουσίες, όταν μετουσιωθούν οδηγούν σε καταστροφή του DNA με αποτέλεσμα την δυσλειτουργία ή την προβληματική αντιγραφή του εκάστοτε κυττάρου.

Μια πολύ σημαντική παράμετρος που συσχετίζεται με την αύξηση των μικροβιακών κυττάρων και την κατανομή τους στο φυσικό περιβάλλον αποτελούν οι περιβαλλοντικές συνθήκες. Ως εκ τούτου μια διεξοδική εξέταση του πως οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών, μπορεί να βοηθήσει στην επιλογή των κατάλληλων μεθόδων αποστείρωσης ανάλογα με το είδος και τον μικροοργανισμό που χρίζει επεξεργασίας αφού τα όρια στα οποία επιβιώνουν οι μικροοργανισμοί ποικίλουν. Οι υπάρχουσες μέθοδοι αποστείρωσης για την αναχαίτηση των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, διαχωρίζονται σε φυσικές και χημικές.

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη, μη εκλεκτική μέθοδος αποστείρωσης αποτελεί η χρήση θερμότητας για αύξηση της θερμοκρασίας πέρα από τα ιδανικά για επιβίωση και ανάπτυξη των μικροοργανισμών επίπεδα. 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 θανάτωσή τους με ρυθμό ανάλογο ως προς την επικρατούσα θερμοκρασία. Οι κύριοι 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) (Θεολογίδης, 2014).

Η φύση της θερμότητας με την οποία επιτυγχάνεται η αποστείρωση διακρίνεται σε υγρή και ξηρή με τους μηχανισμούς δράσης της θερμότητας σε κάθε περίπτωση να διαφέρουν. Η θανάτωση των μικροοργανισμών στην χρήση ξηρής θερμότητας προέρχεται μέσα από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ενώ στην χρήση υγρής θερμότητας πραγματοποιείται μετουσίωση των πρωτεϊνών των μικροβιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, μερικές χρήσιμες παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την διάρκεια μιας διαδικασίας θερμικής αποστείρωσης είναι το θερμικό σημείο θανάτου (TDP) και ο θερμικός χρόνος θανάτου (TDT), ή αλλιώς η θερμοκρασία και ο χρόνος που απαιτείται.

Με τη χρήση ξηρής θερμότητας αποστειρώνονται υλικά, αντικείμενα και σκεύη που παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή σε υψηλές και απότομες μεταβολές της θερμοκρασίας (νυστέρια, σπάτουλες, τρυβλία, δοκιμαστικοί σωλήνες, ογκομετρικοί κύλινδροι, γυάλινοι διανομείς, ποτήρια ζέσεως, σιφόνια, μεταλλικά αντικείμενα, σύριγγες κ.α.). Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως για μια επιτυχή αποστείρωση με ξηρή θερμότητά, απαιτείται περισσότερος χρόνος και υψηλότερη θερμοκρασία λόγω της μεγαλύτερης ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών σε αυτή την μέθοδο, σε σύγκριση με την υγρή θερμότητα. Για σκοπούς εφαρμογής ξηρής θερμότητας χρησιμοποιείται λύχνος Bunsen, ανάφλεξη έπειτα από εμβάπτισμα σε διάλυμα 70% αιθυλαλκοόλης, κλίβανος με ανακυκλωμένο θερμό αέρα και υπέρυθη ακτινοβολία. Σημειώνεται για τις τελευταίες δύο τεχνικές απαιτείται διαφορετική θερμοκρασία για διαφορετικό χρονικό διάστημα.

Η υγρή θερμότητα αποτελεί μια από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους αποστείρωσης με ιδιαίτερα υψηλή αποτελεσματικότητα λόγω του ότι καταστρέφει κάθε είδους μικροβιακά κύτταρα και σπόρια. Με την μέθοδο αυτή θανατώνονται αρχικά οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, ενώ τα

σπόρια ορισμένων βακτηρίων όπως και κάποιοι ανθεκτικοί ιοί θανατώνονται σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και υψηλότερη θερμοκρασία. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η αποστείρωση με υγρή θερμότητα επιτυγχάνεται με χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με την χρήση ξηρής θερμότητας, γεγονός που ευνοεί την αποστείρωση θερμικά ευπαθών αντικειμένων και υλικών. Για σκοπούς εφαρμογής υγρής θερμότητας μπορεί να χρησιμοποιηθεί βρασμός, ατμός 100 °C χωρίς πίεση, αυτόκαυστο με υδρατμούς σε θερμοκρασία 121 °C υπό πίεση (Θεολογίδης, 2014).

Το αυτόκαυστο 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 καλλιεργειών 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 15 lb (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.



**Εικόνα 10:** Το αυτόκαυστο (HIRAYAMA, 2002)

Επιπρόσθετα, υπάρχουν διάφορα προγράμματα τα οποία μπορούν να επιλεγθούν ανάλογα με το σκοπό που χρησιμοποιείται το αυτόκαυστο όπως φαίνονται στην παρακάτω εικόνα. 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.

Setting example				
Cycle	Program	Steriliz. Temp.	Steriliz. Time	Heat-retent. Temp.
1. Sterilizing	1 - 1	121°C	27 min.	—
2. Sterilizing/Keep Warm	2 - 1	121°C	27 min.	50°C
3. Melting/Keep Warm	3 - 1	Melting temp. 100°C	Melting time 30 min.	50°C
4. Instrument Sterilizing	4 - 1	135°C	3 min.	—

<p><b>1. Sterilizing</b> For water, culture media, reagents and other fluids. After completion and cooling to a selected temp., air is expelled automatically through the exhaust valve.</p> <p>Sterilizing temp.: 115°C to 135°C Timer: 1 to 300 min. Exhaust temp.: 0°C to 45°C.</p>	<p><b>3. Melting/Keep Warm</b> To melt or keep culture media at a fixed temp. (This function is not for sterilizing but prevents solidifying).</p> <p>Melting temp.: 60°C to 114°C Timer: 0 to 300 min., 72 hrs. Incubation temp.: 45°C to 60°C</p>
<p><b>2. Sterilizing/Keep Warm</b> After sterilizing culture media, reagents and other liquids, and cooling down naturally to a selected temp., air is expelled automatically from the exhaust valve. High temp. prevents solidifying.</p> <p>Sterilizing temp.: 115°C to 135°C Timer: 1 to 300 min. Exhaust temp.: 0°C to 45°C Incubation temp.: 45°C to 60°C.</p>	<p><b>4. Instrument Sterilizing</b> For flasks, beakers, test tubes, other lab instruments. When completed, the exhaust valve opens and the temp. drops to 100°C. Thus, cool down period can be shortened. Suitable for equipment that can withstand sharp drops in pressure and for sterilizing waste.</p> <p>Sterilizing temp.: 115°C to 135°C Timer: 1 to 300 min.</p>

Εικόνα 11: Τα διάφορα προγράμματα τα οποία μπορούν να επιλεγθούν στο αυτόκαυστο

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.

Μια άλλη όχι ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο αποστείρωσης αποτελεί η ψύξη των μικροοργανισμών σε χαμηλότερες από τις θερμοκρασίες στις οποίες η επιβίωση τους είναι εφικτή. Η απόδοση της συγκεκριμένης μεθόδου εξαρτάται και πάλι από το είδος του μικροοργανισμού, την ένταση και την διάρκεια της ψύξης. Αξίζει να σημειωθεί πως η αργή ψύξη μπορεί να αποβεί περισσότερο καταστροφική για τους διάφορους μικροοργανισμούς λόγω της δημιουργίας παγοκρυστάλλων που μπορούν να διασπάσουν την κυτταρική δομή.

Συγκεκριμένα για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, θερμοκρασία από 0 μέχρι 7 °C είναι ικανή να μειώσει την μεταβολική τους δραστηριότητα. Περαιτέρω, θερμοκρασία από -20 μέχρι -70 °C όπως επίσης και το υγρό άζωτο με θερμοκρασία -196 °C, μπορεί να προκαλέσει επιβράδυνση του μεταβολισμού και μερική θανάτωση του μικροβιακού πληθυσμού που εκτίθεται σε τέτοιες ακραίες συνθήκες (Θεολογίδης, 2014).

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 μάλιστα 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 νερού, 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 μέγιστη αλλά και τους μύκητες που παρουσιάζουν ενδιάμεση αντίσταση. Έτσι, η θανατογόνος δόση ακτινοβολίας για επιτυχή αποστείρωση κυμαίνεται από 1000-6000  $\mu\text{w}/\text{sec}/\text{cm}^2$  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.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν και διάφοροι τύποι ιονίζουσας ακτινοβολίας, όπως για παράδειγμα οι ακτίνες  $\chi$  και  $\gamma$ , που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αποτελεσματική και γρήγορη αποστείρωση. Συγκεκριμένα οι ακτίνες αυτές εκπέμπονται σε μικρότερα μήκη κύματος απ' ότι η υπεριώδης ακτινοβολία και επομένως διαθέτουν μεγαλύτερη ενέργεια. Κάτι τέτοιο αυξάνει σημαντικά την διαπερατότητα τους ελαχιστοποιώντας το μειονέκτημα της άμεσης έκθεσης των μικροοργανισμών στην ακτινοβολία όπως προαναφέρθηκε κατά την χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας. Επίσης, σε τέτοια υψηλά ποσά ενέργειας ευνοείται ο ιονισμός των μορίων (π.χ. του νερού), κάτι που προκαλεί την γένεση διάφορων ριζών οι οποίες όντας εξαιρετικά ενεργές και δραστικές με ελάχιστο χρόνο ημιζωής, επιτίθονται και καταστρέφουν κυτταρικό DNA και πρωτεΐνες (Θεολογίδης, 2014).

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  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{m}$  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 καλλιιεργειών ενώ παράλληλα διασφαλίζεται η υγεία του εκάστοτε ερευνητή. Επίσης σε τέτοιου είδους θαλάμους η αποστείρωση ενισχύεται με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας.



**Εικόνα 12:** Ο θάλαμος νηματικής ροής (Θεολογίδης, 2014)

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 ( $\text{O}_3$ ). 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 φορμαλδεΐδη 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 (Θεολογίδης, 2014 & UNIVERSITY OF COLORADO BOULDER, 2008).

### **1.8. Λυοφιλοποιημένα Βακτήρια**

Η λυοφιλοποίηση αποτελεί μια ευρέως διαδεδομένη και ενδεικνύομενη 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 καλλιεργειών διαφόρων μικροοργανισμών. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αποδειχτεί πολύ χρήσιμη αφού ενισχύει την χρήση μικροοργανισμών για σκοπούς ελέγχου των συστατικών διαφόρων θρεπτικών υποστρωμάτων, για επιστημονικές έρευνες και εκπαιδευτικά προγράμματα αλλά και για βιομηχανικές εφαρμογές. Σύμφωνα μάλιστα 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 προσρόφιση οποιονδήποτε τοξικών ουσιών που μπορεί να σχηματιστούν κατά την διαδικασία της λυοφιλοποίησης (Microbiologics, 2016).

### **1.9. Η μέθοδος εμβολιασμού των θρεπτικών υποστρωμάτων – Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία**

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

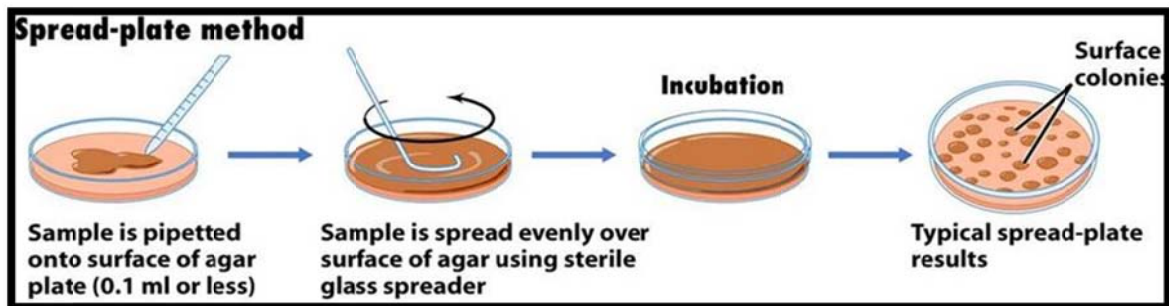
μικροοργανισμού από υγρή καλλιέργεια αλλά και κύτταρα μικροοργανισμού που αναπτύχθηκε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, μπορούν εξίσου να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο. Τόσο στην πρώτη όσο και στην δεύτερη περίπτωση τα κύτταρα δύναται είτε να μεταφερθούν αμέσως σε στερεό ή υγρό θρεπτικό υπόστρωμα είτε να διατηρηθούν για σύντομο χρονικό διάστημα σε φυσιολογικό ορό ή διάλυμα Ringer και να μεταφερθεί 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 μικροβιολογικά 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 (Θεολογίδης, 2014).

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 (Θεολογίδης, 2014).

Για την επιτυχή διεκπεραίωση της παρούσας πτυχιακής διατριβής, πραγματοποιείται ασηπτική μεταφορά εναιωρήματος (0.1 mL) 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. Αξίζει να αναφερθεί πως με το πέρας της διασποράς των μικροβιακών κυττάρων, τα τρυβλία παρέμεναν ανοικτά για εξάτμιση της υγρασίας και κατ' επέκταση ακινητοποίηση των κυττάρων.



Σχήμα 17: Αναπαράσταση διασποράς εμβολίου σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Θεολογίδης, 2014)

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 (Θεολογίδης, 2014).

Παραπέρα, όπως είναι γνωστό, 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 και κυρίως την χημική σύσταση του μικροβιακού κυττάρου. Συγκεκριμένα, το σημαντικότερο συστατικό του νωπού βάρους του κυττάρου είναι το νερό με ποσοστό που κυμαίνεται από 70% – 90%, ενώ το 95% του ξηρού βάρους του κυττάρου καταλαμβάνουν τα αμέταλλα 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 (Θεολογίδης, 2014).

Αναμφισβήτητα, όλη η μέχρι σήμερα μελέτη και πρόοδος που έχει διενεργηθεί όσο 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 αποκρυπτογράφηση και κατανόηση του φυσικού περιβάλλοντος των εκάστοτε μικροοργανισμών. Έτσι, μικροβιολογικό θρεπτικό υπόστρωμα χαρακτηρίζεται κάθε υγρό ή στερεό μέσο το οποίο είναι ικανό να υποστηρίξει 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. Περαιτέρω, με την προσθήκη 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 (Θεολογίδης, 2014).



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, 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 φανερό πως το άγαρ συνεισφέρει σημαντικά στην παρασκευή διαφόρων τύπων στερεών θρεπτικών υποστρωμάτων και στην δημιουργία καθαρής καλλιέργειας μικροοργανισμού.



**Εικόνα 13:** Θαλάσσια ερυθροφύκη (HomeAquaria, 2013)

Επίσης, με την αποστείρωση κάθε θρεπτικού υποστρώματος μετά την παρασκευή του, γίνεται εφικτή η θανάτωση όλων των μικροοργανισμών και η καταστροφή των σποριών 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 μεριά, σύνθετα ή εμπειρικά ονομάζονται τα υποστρώματα των οποίων η χημική τους 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 μικροοργανισμών.

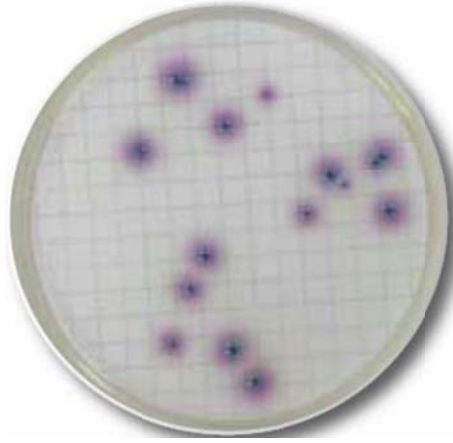
Ακόμα, τα θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να διαχωριστούν σε γενικού τύπου, εκλεκτικά και διαγνωστικά, ανάλογα με το είδος των μικροοργανισμών ή ακόμα και του μικροοργανισμού που μπορεί να αναπτυχθεί. Συγκεκριμένα, τα υποστρώματα γενικού τύπου υποστηρίζουν την ανάπτυξη ενός μεγάλου αριθμού μικροβιακών ειδών. 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. 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. Ωστόσο, 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 (Θεολογίδης, 2014).

Άλλο ένα διαχωρισμό αποτελούν τα βακτηριολογικά και τα μυκητολογικά θρεπτικά υποστρώματα που 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. Όσο 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 υποστρωμάτων αποτελούν τα γνωστά "API TEST", τα οποία βασίζονται στη χρωματική αλλαγή του υποστρώματος (Θεολογίδης, 2014).

Στην παρούσα Πτυχιακή εργασία 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. Το εν λόγω υπόστρωμα το οποίο αναμφίβολα κατέστησε την ανίχνευση του βακτηρίου *E. Coli* εξαιρετικά εύκολη, αποτελείται από 0,4 g/L χρωμογονικό μείγμα, 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 (Sundial Co. Ltd, 2015)



**Εικόνα 14:** Το θρεπτικό υπόστρωμα CHROMagar E.C.C., με αποικίες του βακτηρίου *E. Coli*

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. Το υπόστρωμα αυτό το οποίο 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 (Sundial Co. Ltd, 2015).



**Εικόνα 15:** Το θρεπτικό υπόστρωμα Vibrio T.C.B.S. Agar

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. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα περιέχει διάφορους αναστολείς για την αποφυγή της ανάπτυξης ανεπιθύμητων βακτηρίων, και συγκεκριμένα 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 (Sundial Co. Ltd, 2015).



Εικόνα 16: Θρεπτικά υπόστρωμα Enterococcus Pfizer Selective Agar

### 1.9.1. Η μέθοδος της διήθησης μέσω ηθιμομεμβράνης υπό κενό – MF method

Αναμφισβήτητα, υπάρχουν πολλοί και επικίνδυνοι ρύποι που εμπεριέχονται στο νερό, οι οποίοι μπορούν να ανιχνευθούν μόνο μετά από εξειδικευμένες αναλύσεις. 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.

Ως εκ τούτου, για μια μικροβιολογική ανάλυση οποιουδήποτε δείγματος νερού, η ανάπτυξη μιας καλλιέργειας σε ευνοϊκές συνθήκες, αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τον επιτυχή ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των μικροοργανισμών που εμπεριέχονται στο δείγμα. Για

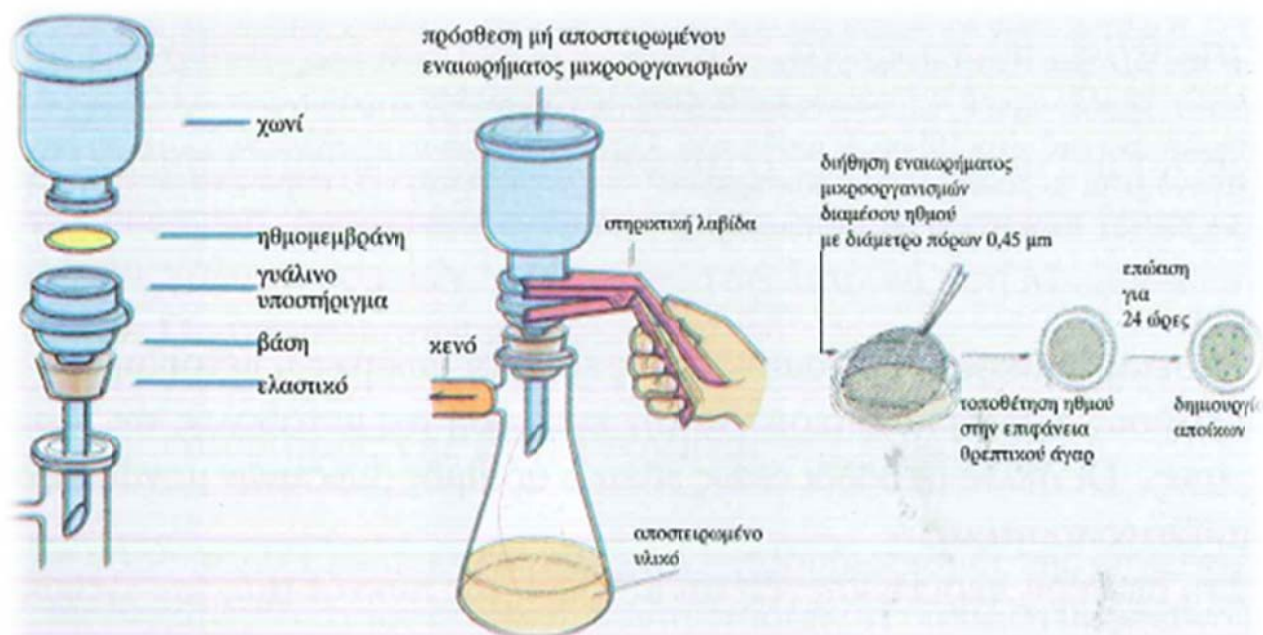
τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνδυαστικά διάφορες σύγχρονες τεχνικές όπως τα εκλεκτικά και διαγνωστικά θρεπτικά υποστρώματα, οι ελεγχόμενες συνθήκες επώασης και οι αναστολείς ανάπτυξης (Θεολογίδης, 2014).

Όπως είναι γνωστό, 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 (EPA, 2016). Επιτυγχάνεται έτσι η ποσοτική εκτίμηση του βακτηριακού πληθυσμού, αφού δεν ευνοείται η διέλευση των βακτηριακών κυττάρων διαμέσου των πολύ μικρών πόρων των ηθμομεμβράνων που χρησιμοποιούνται. Οι μεμβράνες αυτές μπορούν έτσι να τοποθετηθούν στην επιφάνεια στερεών εκλεκτικών ή διαγνωστικών θρεπτικών υποστρωμάτων τα οποία και διατηρούνται σε κλίβανο επώασης στις κατάλληλες συνθήκες ούτως ώστε κάθε κύτταρο μικροοργανισμού που εμπεριέχεται στο υπό εξέταση δείγμα να σχηματίσει ευδιάκριτη αποικία. Οι εν λόγω αποικίες αντιστοιχούν στο σύνολο των μικροοργανισμών (βιώσιμες μονάδες, cfu) του αρχικού δείγματος. Αξίζει να αναφερθεί πως η συγκεκριμένη τεχνική πέραν του γεγονότος ότι μπορεί να παρέχει πληροφορίες σε λιγότερο από 24 ώρες, χαρακτηρίζεται και από περιορισμένες απαιτήσεις προεπεξεργασίας του δείγματος αλλά και από μεγαλύτερο όγκο νερού που μπορεί να ελεγχθεί σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους ανάλυσης (Θεολογίδης, 2014).

Αναλυτικά, τα βήματα που ακολουθούνται για την διεκπεραίωση μιας μικροβιακής ανάλυσης με την χρήση της τεχνικής MF είναι τα ακόλουθα (Θεολογίδης, 2014):

1. Αποστείρωση των γυάλινων ή μεταλλικών δοχείων που συναποτελούν την συσκευή αλλά και των απαραίτητων εργαλείων και υλικών.
2. Προσεχτική αφαίρεση της ηθμομεμβράνης (διάμετρος πόρων 0.45  $\mu\text{m}$ ) από το φακελάκι συσκευασίας στο οποίο βρίσκεται με την χρήση αποστειρωμένης λαβίδας.
3. Τοποθέτηση της ηθμομεμβράνης στο σημείο τιτλοδότησης.
4. Μέτρηση 100 ml δείγματος νερού.
5. Προσθήκη ελάχιστης ποσότητας δείγματος νερού μέχρι να επικολληθεί η ηθμομεμβράνη στο σημείο τιτλοδότησης και να αποφευχθεί έτσι η διαφυγή νερού από το πλάι χωρίς να έχει διηθηθεί.

6. Τίθεται σε λειτουργία η αντλία υπό κενό η οποία διευκολύνει την διέλευση του νερού διαμέσου της ηθμομεμβράνης.
7. Τιτλοδότηση της συνολικής ποσότητας δείγματος νερού, το οποίο διαπερνά μέσω της αποστειρωμένης ηθμομεμβράνης και εισέρχεται στη φιάλη, με τους μικροοργανισμούς να παραμένουν στην επιφάνεια.
8. Αναμονή για μερικά δευτερόλεπτα και αφαίρεση της ηθμομεμβράνης.
9. Τοποθέτηση της ηθμομεμβράνης με τους μικροοργανισμούς στην επιφάνεια τρυβλίου που εμπεριέχει το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για τον υπό εξέταση μικροοργανισμό υπο ασηπτικές συνθήκες.
10. Τοποθέτηση των τρυβλίων σε θάλαμο επώασης αφού αναποδογυριστούν. Παραμονή τους σε συγκεκριμένη θερμοκρασία (37 °C) για ορισμένο χρόνο (24 – 48h), ώστε να πραγματοποιηθεί η επώαση των μικροοργανισμών.
11. Ταυτοποίηση των αποικιών με βάση πρωτόκολλα (κυρίως χρώμα, οσμή, μορφολογία).
12. Τοποθέτηση των τρυβλίων σε ειδική συσκευή καταμέτρησης των αποικιών. Ενδείκνυται μάλιστα η χρήση ηθμομεμβράνων που χωρίζονται σε τετράγωνα για την ευκολότερη καταμέτρηση των αποικιών (κυρίως μέσω του χρώματος). Σημειώνεται πως όταν ο αριθμός των αποικιών είναι μεγαλύτερος των 80, συνιστάται η επανάληψη της ανάλυσης αφότου αραιωθεί το αρχικό δείγμα. Ως εκ τούτου, οι μετρήσεις των αποικιών είναι απαραίτητο να γίνονται μετά τις προκαθορισμένες ώρες επώασης.
13. Σύγκριση των αποτελεσμάτων με βάση τα επιτρεπτά όρια που ορίζει η νομοθεσία για κάθε περίπτωση.



Σχήμα 18: Αναπαράσταση της μεθόδου MF (Θεολογίδης, 2014)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρούσα Πτυχιακή Διατριβή είχε ως στόχο τον έλεγχο της αντιμικροβιακής ιδιότητας στηριζόμενων καταλυτών αργύρου σε υδάτινα διαλύματα που περιείχαν συγκεκριμένα είδη βακτηρίων. Ως ενεργή φάση χρησιμοποιήθηκε ο Ag, και ως υπόστρωμα η  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Για τη διεκπεραίωση των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε σύνθεση του μονομεταλλικού στηριζόμενου καταλύτη Ag/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ , στον οποίο μεταβαλλόταν η φόρτιση του Ag. Οι φορτίσεις του Ag που μελετήθηκαν ήταν 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β. Στη συνέχεια παρατίθεται εκτενής αναφορά στη μέθοδο σύνθεσης των καταλυτών και στις πειραματικές διατάξεις και τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

### 2.1. Σύνθεση Στηριζόμενων Μεταλλικών Καταλυτών

Για την παρασκευή του μονομεταλλικού καταλύτη Ag/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  χρησιμοποιήθηκε η εμπορικά διαθέσιμη πρόδρομη ένωση  $\text{AgNO}_3$  της εταιρίας Aldrich, με στόχο την παραγωγή μεταλλικού άργυρου (Ag).

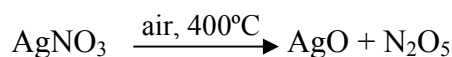
Η σύνθεση των καταλυτών Ag στηριζόμενων σε μεταλλοξείδιο  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  πραγματοποιήθηκε αρχικά με την εναπόθεση της δραστικής φάσης (0.05, 0.1, 0.2, 0.5 και 1% κ.β. Ag) στο υπόστρωμα, η οποία επιτυγχάνεται με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού, όπως παρουσιάζεται στο "Σχήμα 19". Τέσσερα γραμμάρια (4 gr) υποστρώματος, τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο περιείχε 100 mL απιονισμένου νερού. Στο διάλυμα προστέθηκαν συγκεκριμένες αναλογίες υδατικού διαλύματος της πρόδρομης ένωσης του μετάλλου  $\text{AgNO}_3$  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  $\text{AgNO}_3$  σε απιονισμένο νερό ( $V_{\text{τελικό}} = 100\text{mL}$ ). Ο χρόνος εξάτμισης του διαλύματος κυμαίνεται από 4-6 h και αποσκοπεί 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. Όταν επιτευχθεί η υπέρβαση της συγκέντρωσης κορεσμού, ενεργοποιείται η έναρξη της κρυστάλλωσης του μετάλλου στην εσωτερική επιφάνεια του υποστρώματος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι το pH του διαλύματος κατά τη διάρκεια της εξάτμισης παρέμεινε πάνω από το 7 (pH=8), ούτως ώστε τα επιφανειακά άτομα οξυγόνου της  $\text{Al}_2\text{O}_3$  να παραμείνουν

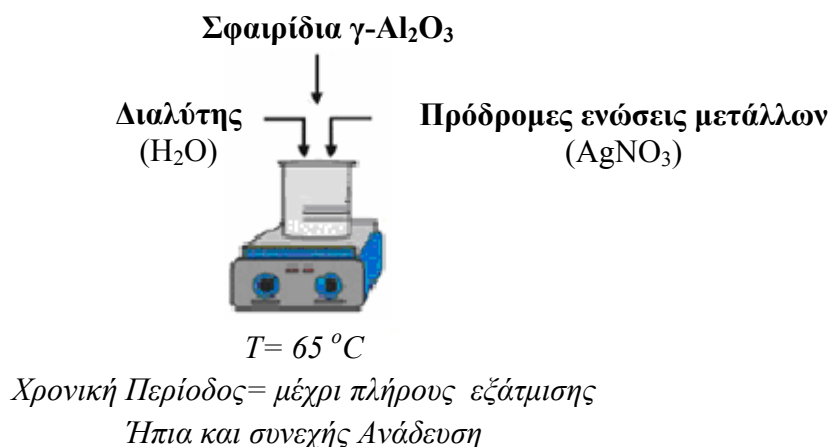


ελεύθερα, και να δεσμεύουν τα ιόντα  $\text{Ag}^+$  από τη διαλυτοποίηση του αντίστοιχου νιτρικού πρόδρομου άλατος  $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ . Η πρόδρομη ένωση  $\text{Ag}(\text{NO}_3)$  δίσταται σε  $\text{Ag}^+$  και  $\text{NO}_3^-$ .

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ήπια ξήρανση του καταλύτη στους  $120^\circ\text{C}$  προκειμένου να σχηματιστούν κρυσταλλίτες της ανάλογης πρόδρομης ένωσης στην επιφάνεια του υποστρώματος. Κατά τη διάρκεια του υγρού εμποτισμού, τον κυρίαρχο μηχανισμό εναπόθεσης του δραστικού στοιχείου αποτελεί η μη ελεγχόμενη καθίζηση στο εσωτερικό των πόρων του υποστρώματος. Το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού, αποτελεί η πύρωση του καταλύτη στους  $400^\circ\text{C}$  παρουσία αέρα για 2 h. Οι υψηλές θερμοκρασίες στις οποίες υπόκειται ο καταλύτης κατά την πύρωση οδηγούν στην οξείδωσή του, προκαλώντας την απομάκρυνση αζωτούχων ενώσεων και το σχηματισμό κρυστάλλων  $\text{AgO}$  στα τοιχώματα του καταλυτικού φορέα.



Παράλληλα, μέσω της οξείδωσης που πραγματοποιείται, απομακρύνονται ορισμένα στοιχεία που εισάγονται κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του καταλύτη με το σχηματισμό πτητικών ενώσεων ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ), καθώς και ανθρακούχων ακαθαρσιών που πιθανόν να εισήχθησαν στον καταλύτη κατά την παρασκευή του. Επιπλέον, η διαδικασία της πύρωσης οδηγεί σε σταθεροποίηση της δομής των κρυσταλλιτών και την αποφυγή συσσωμάτωσής τους κατά την αποθήκευση του καταλύτη για μελλοντική χρήση.



**Σχήμα 19:** Εναπόθεση Ag σε σφαιρίδια  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  με τη μέθοδο του υγρού εμποτισμού

## 2.2. Καταλυτικές μετρήσεις

- *Διάταξη Εκτέλεσης Καταλυτικών Πειραμάτων*

Η διεξαγωγή των καταλυτικών πειραμάτων πραγματοποιήθηκε σε ειδικά σχεδιασμένο αντιδραστήρα *Πλήρους Μίξης Συνεχούς Ανάδευσης* (Continuous Stirred Tank Reactor, CSTR), ο οποίος διακρίνεται από την ικανότητα του να μεγιστοποιεί την επιφάνεια επαφής μεταξύ των τριών φάσεων της ύλης (υγρής, αέριας και στερεής) 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 του καταλύτη. Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων τηρούνταν σχετικά σταθερές συνθήκες, οι οποίες παρουσιάζονται στον "Πίνακα 3". Σε όλα τα καταλυτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, ο αντιδραστήρας παρέμεινε αυτόκλειστος καθ' όλη τη διαδικασία, με σταθερή συνθήως στερεή φάση όπου στην προκειμένη περίπτωση ήταν τα σφαιρίδια του καταλύτη. Όσον αφορά την αέρια φάση (αέριο μίγμα τροφοδοσίας O<sub>2</sub>/He) βρισκόταν υπό συνεχή ροή σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας (T = 25°C) και πίεσης (P = 1.3 atm).

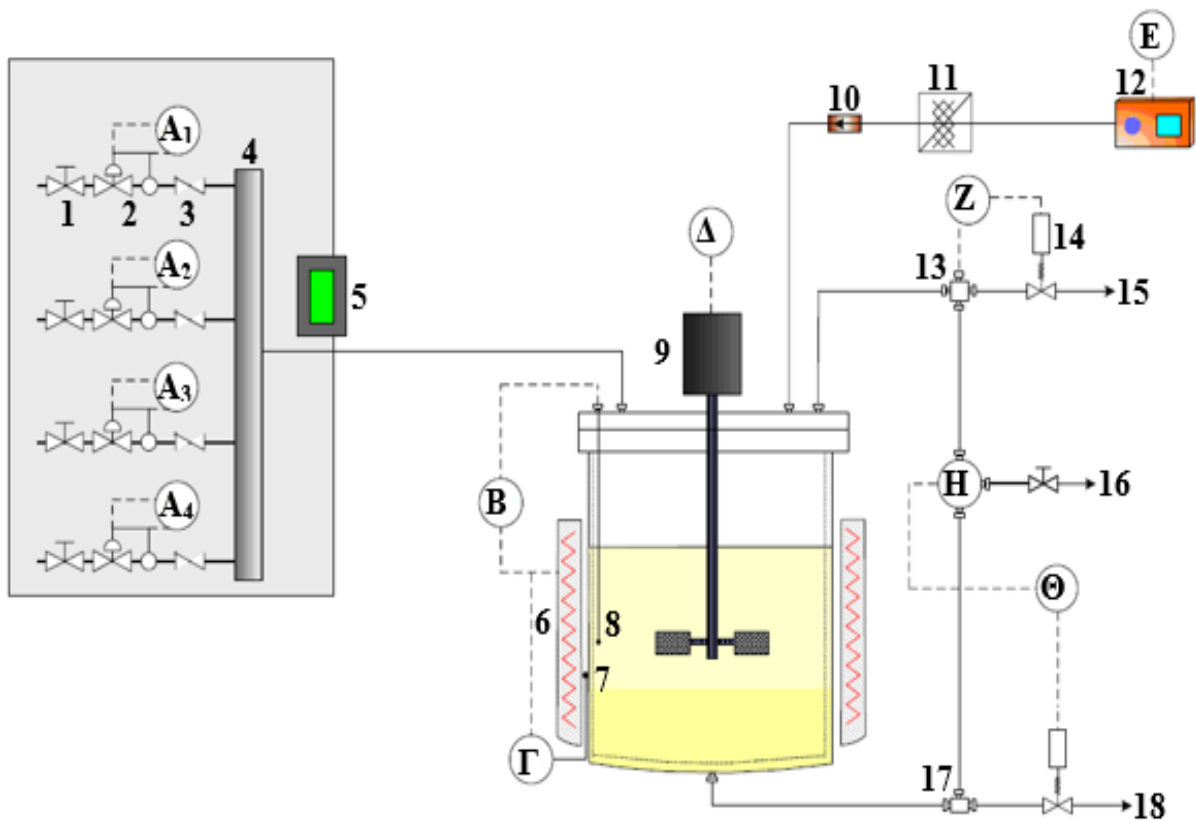
**Πίνακας 3:** Πειραματικές συνθήκες κατά τη διεξαγωγή των καταλυτικών πειραμάτων

Παράμετρος	Τιμή
pH	7-8
Ανάδευση, rpm	150
Μάζα καταλύτη, g	1-4
Μερική πίεση, atm	1.3
Όγκος διαλύματος, mL	100-192
Ροή οξυγόνου (O <sub>2</sub> ), mL/min	100
Θερμοκρασία αντίδρασης, °C	25
Αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού, cfu	TNTC

Η πειραματική συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για τα καταλυτικά πειράματα περιγράφεται στο "Σχήμα 20". Η συσκευή αποτελείται κυρίως από τρία μέρη: τον αντιδραστήρα, το σύστημα ελέγχου ροής των αερίων και την αντλία (τύπου HPLC)

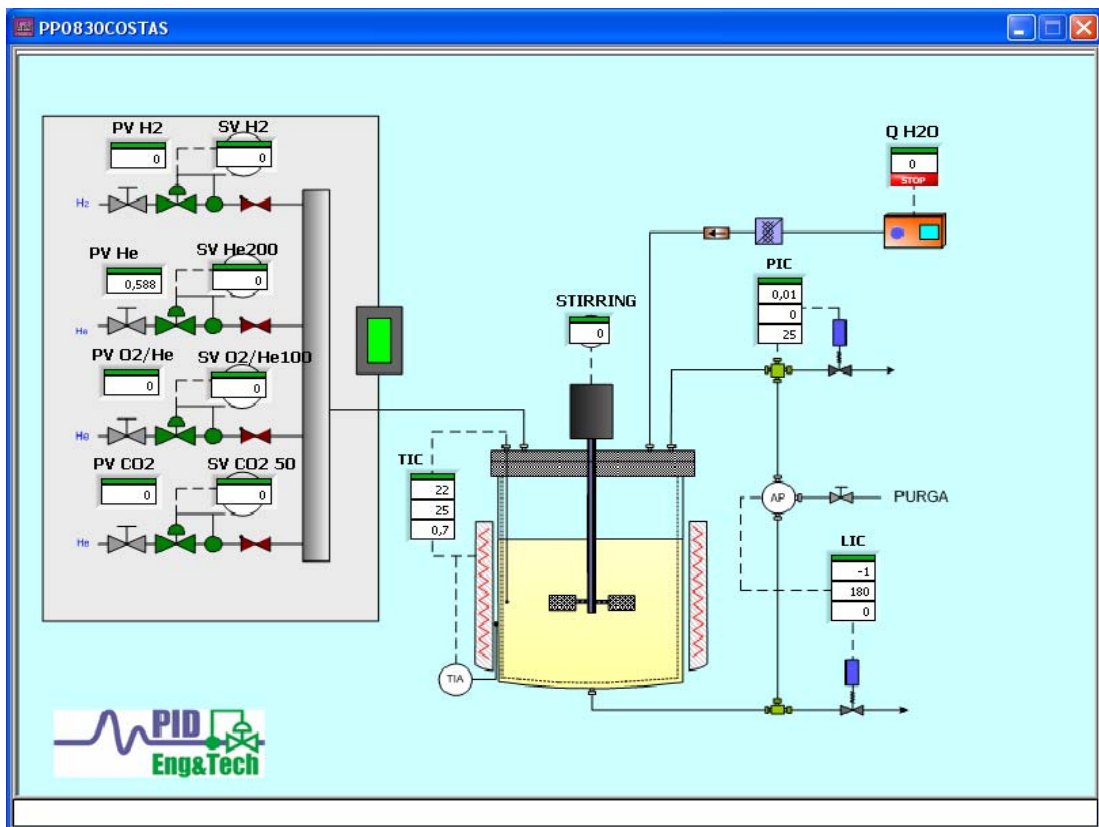
τροφοδοσίας διαλύματος μικροοργανισμών. Η μάζα της καταλυτικής κλίνης που χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση των πειραμάτων ήταν κυρίως 1 g υπό μορφή σφαιριδίων  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  διαμέτρου 1.8 mm, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν 4 g με μεγαλύτερο όμως όγκο διαλύματος. Τα 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, έχει 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 καταλυτικού πειράματος, ελέγχονταν με την βοήθεια αντίστοιχων ανιχνευτών.

Όλα τα μέρη της συσκευής εσωκλείονται σε ένα θερμαινόμενο μεταλλικό περίβλημα (hotbox) όπου η θερμοκρασία ρυθμίζεται ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος. Το σύστημα ελέγχου και μέτρησης της ροής των αερίων, περιλαμβάνει τέσσερις βαλβίδες ελέγχου μαζικής ροής και ενός θαλάμου ανάμειξης (mixing chamber) και χρησιμοποιήθηκε για την *in situ* προετοιμασία αέριου μίγματος συγκεκριμένης σύστασης συντείνοντας στην καλή ανάμιξη των αερίων και τον σχηματισμό ομοιογενούς αέριου μίγματος. Η σύσταση και η συνολική ροή της αέριας τροφοδοσίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20% κ.ο.  $\text{O}_2$  /80% κ.ο. He με ροή 100cc/min αντίστοιχα, για την επίτευξη της αντίδρασης ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων. Η προσθήκη σταθερής ροής (24 mL/min) διαλύματος μικροοργανισμών στην τροφοδοσία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση HPLC αντλίας (Gilson-max pressure 32 mPa) εξοπλισμένης με μανομετρική βαλβίδα.



**Σχήμα 20:** Σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των καταλυτικών πειραμάτων. (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>) Μετρητής ροής αερίων, (B) μετρητής θερμοκρασίας μεταλλικού περιβλήματος (hotbox), (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) φούρνος-θερμαινόμενο μεταλλικό περίβλημα (hotbox), (7) θερμοστοιχείο ή θερμοζεύγος του διαλύματος (thermocouple), (8) θερμοστοιχείο του μεταλλικού περιβλήματος (thermo couple of hot box), (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

Στο "Σχήμα 21" που ακολουθεί, παρουσιάζεται ο πίνακας ελέγχου ο οποίος διευκόλυνε την ρύθμιση και τον έλεγχο των σημαντικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια των καταλυτικών πειραμάτων. Μέσω του συγκεκριμένου λογισμικού μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν παράμετροι όπως η θερμοκρασία, η πίεση, η ροή του αέριου μίγματος τροφοδοσίας και ο όγκος του διαλύματος στον αντιδραστήρα.



**Σχήμα 21:** Πίνακας ελέγχου και ρύθμισης διαφόρων παραμέτρων της πειραματικής συσκευής που χρησιμοποιήθηκε για την επίτευξη των καταλυτικών πειραμάτων

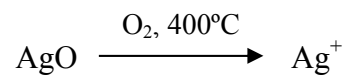
Η χρήση αυτοματοποιημένου προγράμματος διαδοχικής εκτέλεσης διευκόλυνε σε μεγάλο βαθμό τις πειραματικές διαδικασίες των καταλυτικών πειραμάτων. Το πρόγραμμα ακολουθούσε συγκεκριμένα διαδοχικά στάδια όπου πληρούσαν τις απαραίτητες προϋποθέσεις. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τη διεκπεραίωση των καταλυτικών πειραμάτων της παρούσας διατριβής, παρουσιάζεται στην πιο κάτω εικόνα.

Test Time		Session 1	Session 2	Session 3	Session 4	Session 5	Session 6	Session 7	Session 8	Session 9	Session 10
09:01:15 - Days 01	Aliases	Session 1	Session 2	Session 3	Session 4	Session 5	Session 6	Session 7	Session 8	Session 9	Session 10
	Description	safety	Clean with He	Oxidation	Clean with He	Reduction	Clean with He	IRON/HEP	nothing	stable	stable str
	SessionTime (min)	?	150	120	80	120	390	8	?	15	20
	Conditional Jump?	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Session Time	Control Parameters										
10:00:15 - Days 01	Operator										
Remaining Time	Value										
10:01:45 - Days 01	Next Session #	2	3	4	5	6	Enc	8	9	10	Enc
<input type="checkbox"/> SHOW A	✓ ITC	TI									
<input type="button" value="RUN"/>	✓ LVL	SVL	18U	18L	18U	18U	18J	18L	18U	18U	18U
<input type="button" value="STOP"/>	✓ LCC	MV1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<input type="button" value="VIEW"/>	✓ Q H2O	C	0	0			0	24	0	4	4
<input type="button" value="1"/>	✓ Q H2O	F	0	0			0	1	1	1	1
<input type="button" value="LAUNCH"/>	✓ PCC	SVL	0	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
	✓ Pv -2	M11	0	0			0	0	0	0	0
	✓ Pv O2/He	M11	0	0			0	0	0	0	0
	✓ Pv -6	M16	U	U			U	U	U	U	U
	✓ Pv CO2	M15	0	0			0	0	0	0	0
	✓ STARTING	SV	U	U			U	U	U	U	400
	✓ STIRRING	F	0	0			0	0	0	0	1
	✓ Sv -2	M14	0	0	0	100	0	0	0	0	0
	✓ Sv O2/He	M14	0	0	100	0	0	0	0	0	0
	✓ Sv -e200	M19	0	120	0	120	120	120	120	120	120
	✓ Sv CO2 E0	M13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	✓ TIC	SVL	25	500	500	300	500	25	25	25	25

Εικόνα 17: Αυτοματοποιημένο πρόγραμμα διαδοχικής εκτέλεσης εντολών για τις ανάγκες των καταλυτικών πειραμάτων

- **Πειραματική διαδικασία**

Με την ολοκλήρωση της σύνθεσης των καταλυτών, προζυγισμένη ποσότητα σφαιριδίων τοποθετείτο στο ειδικό καλάθι του αντιδραστήρα. Η χρησιμοποίηση των υπό μελέτη καταλυτών στην καταλυτική 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 CO<sub>2</sub> και άλλων ουσιών που πιθανόν να είχαν προσροφηθεί στην επιφάνεια του στερεού όσο και στην οξειδωση του άργυρου στην επιφάνεια του καταλύτη ούτως ώστε να αποκτήσει την ενδεδειγμένη βακτηριοκτόνο δράση του.



Αφού ολοκληρωθεί η προκατεργασία του καταλύτη στον αντιδραστήρα, ακολουθείται συγκεκριμένη διαδικασία έως ότου ξεκινήσει η αντίδραση. Αρχικά, υπό ροή He 120cc/min, πραγματοποιείται η μείωση της θερμοκρασίας από τους 400 °C όπου επιτεύχθηκε η οξειδωση του καταλύτη, στους 25°C. Αφού ο αντιδραστήρας φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου, τότε γίνεται η εισαγωγή διαλύματος μικροοργανισμών με σταθερή ροή 24 mL/min στον αντιδραστήρα για 8 min, υπό συνεχή ροή He. Περαιτέρω, για την οποιαδήποτε μικροβιακή μελέτη θεωρείται απόλυτα απαραίτητο να λαμβάνονται μέτρα προστασίας τόσο του ερευνητή όσο και του μικροοργανισμού που μελετάται. Κάτι τέτοιο θα συμβάλει στην αποτροπή της επιμόλυνσης από άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης, τα εργαστηριακά αντικείμενα υφίστανται 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 αποστειρωμένες συνθήκες. Συγκεκριμένα, το αρχικό διάλυμα των μικροοργανισμών παρασκευάζεται ως ακολούθως:

- i.* Το φιαλίδιο με τα λυοφιλοποιημένα σφαιρίδια μεμονωμένου στελέχους 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 μηχανήματα 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.

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.

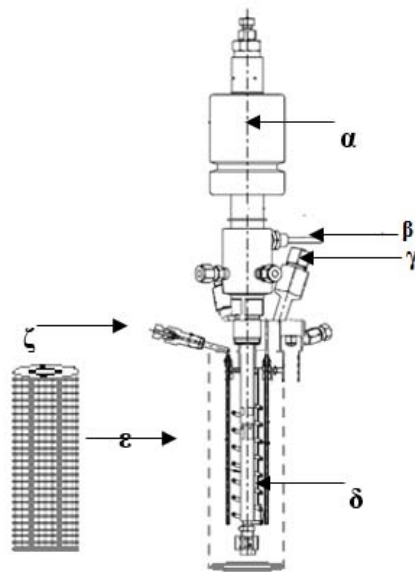
Αξίζει να σημειωθεί ότι στα περισσότερα πειράματα, έχοντας ως στόχο την λεπτομερέστερη εξέταση της αναστολής των μικροοργανισμών από τον καταλύτη, δεν πραγματοποιείται περαιτέρω αραιώση του εν λόγω διαλύματος, με την αρχική συγκέντρωση του διαλύματος να ορίζεται ως πάρα πολλές αποικίες για να μετρηθούν (TNTC).

Στη συνέχεια, με την ενεργοποίηση της ροής του αερίου μίγματος της αντίδρασης (O<sub>2</sub>/He) σηματοδοτείτο η έναρξή της. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, λαμβάνονταν δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε ειδικά αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια με σκοπό την ανάπτυξη καλλιεργειών σε εκλεκτικά υποστρώματα, για να εξεταστεί η αναστολή των μικροοργανισμών από τον καταλύτη.

#### ▪ Η μέθοδος της 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 σημειωθεί η συχνή αποστείρωση του διανομέα μετά από κάθε εμβολιασμό. Αξίζει να αναφερθεί 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 με σταθερή θερμοκρασία 37 °C. Χρησιμοποιώντας μετρητή αποικιών με χρωματιστό φωτισμό πραγματοποιείται η καταμέτρηση των αποικιών μετά από 24 και 48 ώρες επώασης.





**Σχήμα 22:** 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

#### ▪ Η μέθοδος της διήθησης μέσω ηθμομεμβράνης υπό κενό – MF method

Με την χρήση ηλεκτρονικής πιπέτας ακριβείας πραγματοποιείται ασηπτική μεταφορά ποσότητας 10 mL με το υπό ανάλυση βακτηριακό είδος στη συσκευή διήθησης του δείγματος. Νοείται πως προηγουμένως έχει τοποθετηθεί η απαραίτητη ηθμομεμβράνη με διάμετρο πόρων 0.45 μm, στο σημείο τιτλοδότησης της συσκευής. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως πριν την τοποθέτηση της ολικής ποσότητας δείγματος στη συσκευή, πραγματοποιείται προσθήκη της ελάχιστης δυνατής ποσότητας δείγματος ούτως ώστε να επικολληθεί η ηθμομεμβράνη στο σημείο τιτλοδότησης και να αποφευχθεί έτσι η διαφυγή νερού από το πλάι χωρίς να έχει διηθηθεί. Στη συνέχεια με την βοήθεια μιας αντλίας υπό κενό, διευκολυνόταν η διέλευση του δείγματος διαμέσου της ηθμομεμβράνης. Έπειτα, η ηθμομεμβράνη με τους μικροοργανισμούς τοποθετείτο στην επιφάνεια τρυβλίου που εμπεριέχει το εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για τον υπό εξέταση μικροοργανισμό υπο ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία αυτά αφού σφραγίζονταν με πάραφιλμ τοποθετούνταν ανάποδα σε θάλαμο επώασης με σταθερή θερμοκρασία 37 °C, για 24 με 48 ώρες. Έτσι, καθίστατο εφικτή η καταμέτρηση των αποικιών του υπο εξέταση βακτηρίου.

Ενδεικτικά αναφέρεται πως τα αέρια προϊόντα της αντίδρασης θα μπορούσαν να μετρούνται με φασματογράφο μάζας (On-line Quadrupole Mass Spectrometer, MS) και με αναλυτές αερίων, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν εξετάστηκε στην παρούσα διατριβή.

Αξίζει ακόμα να σημειωθεί πως μελετήθηκαν όλοι οι καταλύτες που παρασκευάστηκαν ως προς την καταλυτική τους συμπεριφορά, έτσι ώστε να διακριβωθεί ο καταλύτης με την καλύτερη ανιμικροβιακή ιδιότητα ανάλογα με την φόρτισή του.

### **2.3. Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός Καταλυτών**

Ο φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των καταλυτών περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της συνολικής φόρτισης των καταλυτών στα επιμέρους μέταλλα και μεταλλοξείδια με χρήση της φασματομετρίας μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, καθώς και μελέτη της υφής των καταλυτών και τον προσδιορισμό της ειδικής τους επιφάνειας με τη χρήση της τεχνικής B.E.T.

#### **2.3.1. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)**

Η χρήση της μεθόδου Φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της συνολικής φόρτισης (%) του αργύρου 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 φασματόμετρο PG-990 της PG Instruments Ltd με διορθωτή υποβάθρου σήματος Zeeman και εγκάρσια θερμαινόμενη κυψελίδα 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 που περιείχε διάλυμα οξέων 72 mL  $\text{HNO}_3$  (Riedel-deHaen), 24 mL  $\text{HCl}$  (Aldrich), 4 mL  $\text{HF}$  (Scharlau), μέχρι πλήρη διαλυτοποίησή του. Το διάλυμα που προκύπτει λαμβάνεται με ιδιαίτερη προσοχή μέσω πιπέτας και μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη, προσθέτοντας απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται οι απαιτούμενες αραιώσεις ανάλογα με το ανώτατο όριο προσδιορισμού της συγκέντρωσης του υπό μελέτη μετάλλου από τη συγκεκριμένη τεχνική.

### 2.3.2. Μελέτη Υφής Καταλυτικών Συστημάτων

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  $N_2$  ( $\approx -200^\circ C$ ) 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 καταλυτών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Micromeritics Gemini III Surface Area and Pore Size Analyzer [139].

Πριν από κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε απαέρωση των δειγμάτων με το σύστημα Micromeritics Smart Prep Programmable Degas System στους  $30^\circ C$  για 10 min και στους  $180^\circ C$  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.

### 2.4. Αποστείρωση

Οι αποστειρωμένες συνθήκες εργασίας γενικότερα αλλά και η αποστείρωση ειδικότερα, αποτελούσε ένα σημαντικό παράγοντα για την επιτυχή διεκπεραίωση της πειραματικής ανάλυσης της παρούσας διατριβής. Έτσι γινόταν εφικτός ο περιορισμός στο ελάχιστο οποιουδήποτε κινδύνου επιμόλυνσης κάτι που θα οδηγούσε σε αυξημένα σφάλματα και κατ' επέκταση λανθασμένα αποτελέσματα.

Με την βοήθεια του αυτόκαυστου και επιλέγοντας το κατάλληλο πρόγραμμα, πραγματοποιείτο αποστείρωση με υδρατμούς στους  $121^\circ C$  υπό πίεση, τόσο των γυαλικών και άλλων σκευών που χρησιμοποιούνταν για τους σκοπούς της παρούσας πειραματικής διαδικασίας όσο και για την θανάτωση των μικροοργανισμών λόγω της υψηλής θερμοκρασίας από τα χρησιμοποιημένα-εμβολιασμένα τρυβλία προτού αυτά διατεθούν. Επίσης με την χρήση του αυτόκαυστου παρασκευαζόταν αποστειρωμένο νερό το οποίο ήταν τοποθετημένο σε ειδική φιάλη.

Επίσης με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας γινόταν κατορθωτή η αποστείρωση διάφορων γυαλικών, ηλεκτρονικών πιπέτων, λαβίδων, πλαστικών διάφανων φιαλιδίων και γυάλινων διανομέων.

Ακόμα, με την χρήση φλόγιστρου και αιθανόλης επιτυγχανόταν η αποστείρωση των διανομέων που χρησιμοποιούνταν για διασπορά του δείγματος στα τρυβλία, ενώ με την χρήση αιθανόλης αποστειρώνόταν ο πάγκος στον οποίο πραγματοποιείτο καταμέτρηση των μικροοργανισμών.

Σημειώνεται πως 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.

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

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αναμφισβήτητα, η ετερογενής αντιμικροβιακή κατάλυση, αναμένεται να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στο προσεχές μέλλον, όσον αφορά την επιτυχή αποστείρωση του υδάτινου έρματος σε σύντομο χρονικό διάστημα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και μέσα από τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, αναγνωρίζοντας την αντιμικροβιακή δράση των συντιθέμενων μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> με διαφορετική φόρτιση, στα διάφορα βακτήρια που εξετάστηκαν. Ως εκ τούτου, αναλύονται παρακάτω τόσο η δραστηριότητα που παρουσίασαν οι καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ως προς την αναστολή κάθε βακτηρίου ξεχωριστά, όσο και τα ευρήματα που προέκυψαν μέσα από τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των καταλυτών.

Αρχικά, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσα από τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον φυσικοχημικό χαρακτηρισμό των καταλυτών που παρασκευάστηκαν και μελετήθηκαν ως προς τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Συγκεκριμένα, έχοντας ως στόχο τον προσδιορισμό της συνολικής φόρτισης του άργυρου (Ag) και της ειδικής επιφάνειας και του μεγέθους των πόρων των στερεών καταλυτών, αναλύονται τα αποτελέσματα από τις τεχνικές φασματοσκοπίας ατομικής απορρόφησης (AAS) και προσδιορισμού ειδικής επιφάνειας (B.E.T.) αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιείται εκτενής αναφορά στην αντιμικροβιακή καταλυτική δράση που παρουσίασαν οι υπό ανάλυση μονομεταλλικοί στηριζόμενοι καταλύτες σε υδάτινα διαλύματα που περιείχαν συγκεκριμένα είδη βακτηρίων. Πιο στοχευμένα, παρουσιάζεται αναλυτικά η 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. parahemolyticus*, μετά από καταλυτική επεξεργασία. Περαιτέρω, εξετάζεται η συμβολή του υποστρώματος γ-άλουμινας (γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) στη θανάτωση των μικροοργανισμών, ελέγχοντας έτσι τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του υποστρώματος. Ακόμα, επιχειρείται η ανεύρεση της μικρότερης φόρτισης ενεργού φάσης, στην οποία καθίσταται κατορθωτή η παρατήρηση της θανάτωσης των βακτηρίων, με απώτερο σκοπό την ανάλυση της σταδιακής αναστολής των μικροοργανισμών συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης.

### 3.1. Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός Καταλυτών

#### 3.1.1. Φασματοσκοπία Ατομικής Απορρόφησης (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS)

Με στόχο την ανεύρεση της συνολικής φόρτισης (% κ.β.) του Άργυρου στην επιφάνεια των σφαιριδίων  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ , χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης με την οποία αναλύθηκαν οι πλείστοι από τους καταλύτες που παρασκευάστηκαν. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε καταλύτη ξεχωριστά που παρουσιάζονται στον παρακάτω "Πίνακα 4", φανερώνουν πως οι φορτίσεις άργυρου που ανιχνεύθηκαν με βάση την μέθοδο της Φασματοσκοπίας Ατομικής Απορρόφησης, απέχουν αρκετά από τις αντίστοιχες ονομαστικές φορτίσεις αργύρου για κάθε καταλύτη. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται είτε σε σφάλματα κατά την διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων που έγιναν για την Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων για προετοιμασία της καμπύλης βαθμονόμησης από την οποία προέκυψε η πραγματική συγκέντρωση αργύρου των καταλυτών ή σε προβληματική λειτουργία του οργάνου. Το ενδεχόμενο να θεωρούνται τα παρακάτω αποτελέσματα αντιπροσωπευτικά θεωρείται άκρως απίθανο, παρόλο που κάτι τέτοιο ενισχύει ακόμα περισσότερο τη βακτηριοκτόνο δράση του άργυρου ακόμα και σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις.

**Πίνακας 4:** Συνολική φόρτιση των καταλυτών σε άργυρο με βάση την τεχνική AAS

Ονομαστική Φόρτιση (% κ.β.)	Πραγματική Φόρτιση Ag (% κ.β.) (AAS)
0.05% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	0.0023
0.1% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	0.0045
0.2% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	0.0073
1% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	0.0085

#### 3.1.2. Προσδιορισμός Ειδικής Επιφάνειας (B.E.T.)

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Προσδιορισμού Ειδικής Επιφάνειας (B.E.T.), κατέστη εφικτός ο προσδιορισμός της ειδικής (ολικής) επιφάνειας ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) και του μεγέθους των πόρων των καταλυτών (σφαιριδίων  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τα

αποτελέσματα που προέκυψαν με βάση την συγκεκριμένη μέθοδο παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα, με την ειδική επιφάνεια των υπό μελέτη καταλυτών να κυμαίνεται από 194,3 έως 199,2 m<sup>2</sup>/g. Επίσης σύμφωνα με τα αποτελέσματα του "Πίνακα 5" φαίνεται ξεκάθαρα ότι τόσο ο όγκος, όσο και το μέγεθος των πόρων της  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  δεν επηρεάζονται από τη διεργασία εναπόθεσης του μετάλλου. Το γεγονός αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού η κατάλυση αποτελεί επιφανειακό φαινόμενο.

**Πίνακας 5:** Ειδική επιφάνεια όγκου και μέγεθος των πόρων των στερεών καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία

Καταλύτης	B.E.T. (m <sup>2</sup> /g)	Όγκος Πόρων (mL/g)
0.05% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	199.2	45.7688
0.1% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	198.7	45.1432
0.2% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	196.5	44.9878
0.5% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	195.4	44.8767
1% κ.β. Ag / $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	194.3	44.6355

### 3.2. Αντιμικροβιακή καταλυτική δραστηριότητα

Η αυξημένη μικροβιακή αντοχή σε ποικίλους αντιμικροβιακούς παράγοντες, σε συνδυασμό με το δυσβάσταχτο οικονομικό και περιβαλλοντικό κόστος που χαρακτηρίζει αρκετές υπάρχουσες μεθόδους επεξεργασίας, καθιστά επιτακτική την ανάγκη προώθησης μιας καινοτόμου μεθόδου για την αποστείρωση - επεξεργασία του νερού έρματος, η οποία βασίζεται στην ανάπτυξη και μελέτη στερεών καταλυτών. Πιο συγκεκριμένα, λόγω του ότι η δραστική φάση των συγκεκριμένων καταλυτών αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη δραστηριότητα του καταλύτη, ο άργυρος φαντάζει ως μια ιδανική δραστική φάση. Ως εκ τούτου, η γενικότερη επίδραση των μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών που παρασκευάστηκαν, σχετικά με την αναστολή των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναλύεται παρακάτω.

### 3.2.1. Επίδραση των μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και του υποστρώματος γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> στην αναστολή του βακτηρίου *E. coli*

Έχοντας ως στόχο μια πρώτη και σφαιρική διακρίβωση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των συντιθέμενων καταλυτών, χρησιμοποιήθηκαν αρχικά 4 γραμμάρια από τον καταλύτη με την υψηλότερη φόρτιση μετάλλου (1%). Με την συγκεκριμένη μάζα καταλύτη επεξεργάστηκε ποσότητα υδάτινου 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. Λαμβάνοντας έτσι δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα από το επεξεργασμένο νερό και έπειτα από την καλλιέργεια των δειγμάτων σε εκλεκτικά τρυβλία με την μέθοδο της διασποράς εμβολίου, παρατηρήθηκαν τα πιο κάτω αποτελέσματα μετά από 24 και 48 ώρες επώασης σε θερμοκρασία 37°C.

**Πίνακας 6:** Οι αποικίες του βακτηρίου *E. coli* στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης

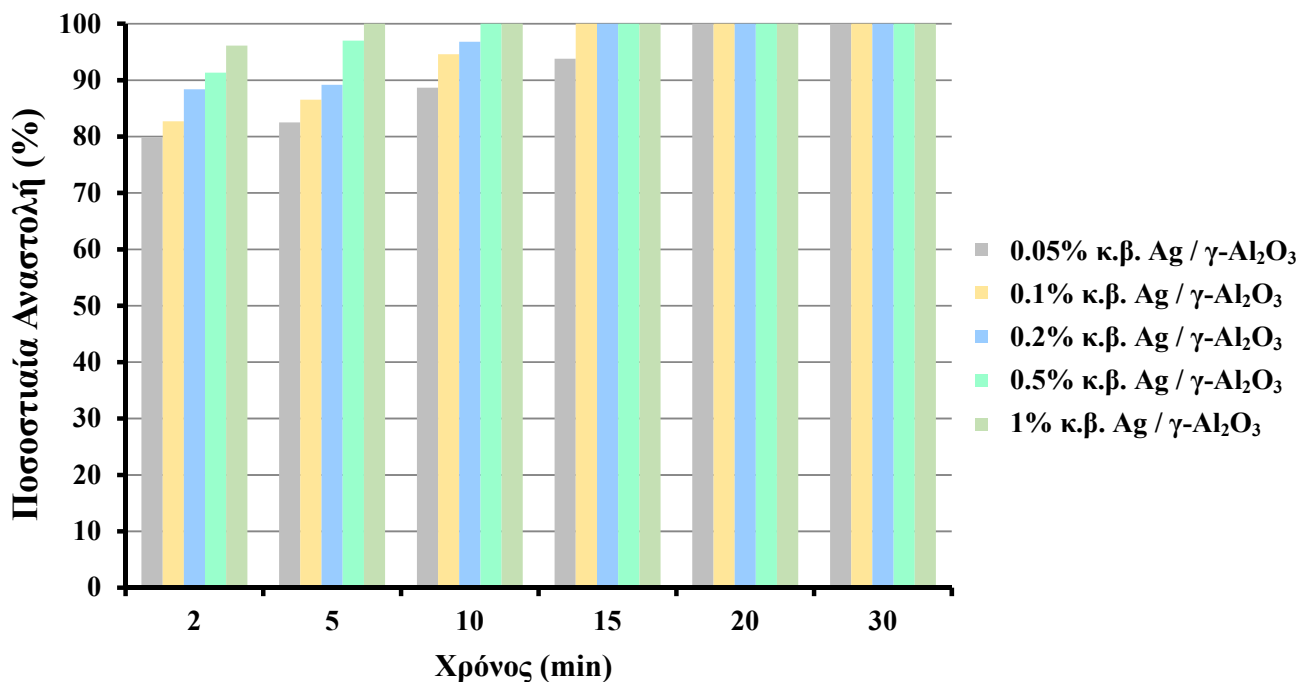
Χρόνος Δειγματοληψίας (min)	<i>E. coli</i> (cfu) – 24h	<i>E. coli</i> (cfu) – 48h
0	78	83
2	3	4
5	0	1
10	0	0
20	0	0
30	0	0

Εύκολα λοιπόν μπορεί να γίνει αντιληπτό πως οι συντιθέμενοι μονομεταλλικοί στηριζόμενοι καταλύτες διαθέτουν αξιοπρόσεκτες αντιμικροβιακές ιδιότητες τουλάχιστον όσο αφορά στην προκειμένη περίπτωση τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια όπως είναι η *E. coli*. Μάλιστα, η σχεδόν ολοκληρωτική αναστολή των βακτηρίων από τα πρώτα πέντε λεπτά, επιβεβαιώνει ακράδαντα την ισχυρή δράση του αργύρου ως αντιμικροβιακός παράγοντας.

Ακόμα, καθοριστική για την μετέπειτα πορεία των καταλυτικών πειραμάτων της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποδείχτηκε η εξέταση της δραστηριότητας για κάθε συντιθέμενο καταλύτη ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, μέσα από καταλυτικά πειράματα κατά τα οποία χρησιμοποιείτο 4 gr καταλύτη για όλες τις φορτίσεις ενεργού φάσης με σκοπό την θανάτωση των βακτηρίων *E. coli* που εμπεριέχονταν σε υδάτινο διάλυμα όγκου 180 mL, προσδιοριζόταν το χρονικό διάστημα για



την επίτευξη 100% ποσοστιαίας αναστολής των μικροοργανισμών. Αναλυτικότερα, τα αποτελέσματα για την ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων που παρουσίασε κάθε καταλύτης συναρτήσει του χρόνου επεξεργασίας του εκάστοτε υδάτινου διαλύματος παρουσιάζονται στην παρακάτω γραφική παράσταση.



**Γράφημα 1:** Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E.coli* που προέκυψε για κάθε καταλύτη στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας

Γίνεται λοιπόν φανερό πως το σύνολο των καταλυτών που παρασκευάστηκαν παρουσιάζουν σημαντική αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Είναι χρήσιμο να τονιστεί επίσης πως η επίτευξη ολοκληρωτικής ποσοστιαίας αναστολής των βακτηρίων πραγματοποιείται σε διαφορετικό χρόνο για κάθε φόρτιση ενεργού φάσης, με ολοένα και μικρότερο χρονικό διάστημα όσο αυξάνεται η φόρτιση του καταλύτη.

Επιπλέον, όπως παρατηρείται μέσα από το εν λόγω γράφημα, ακόμα και στον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου προκύπτει ολοκληρωτική ποσοστιαία αναστολή των μικροοργανισμών από τα πολύ πρώιμα στάδια επεξεργασίας. Έτσι, με δεδομένου του ότι οι υπόλοιποι καταλύτες παρουσιάζουν ολοκληρωτική ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων σε μικρότερο χρονικό διάστημα, και αποσκοπώντας στην εκτενέστερη εξέταση της αναστολής του συγκεκριμένου βακτηρίου, χρησιμοποιήθηκε 1 gr του καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση

μετάλλου (0,05%), για την επεξεργασία του ίδιου όγκου υδάτινου διαλύματος με μικροοργανισμούς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω "Πίνακα 7".

**Πίνακας 7:** Οι αποικίες του βακτηρίου *E. coli* στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης

<b>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</b>	<b><i>E. coli</i> (cfu) – 24h</b>	<b><i>E. coli</i> (cfu) – 48h</b>
0	289	294
2	268	269
5	231	233
10	203	208
20	156	161
30	114	119
40	71	73
60	44	45
90	12	16
120	2	3

Όπως είναι προφανές, ο ιοντικός άργυρος ( $Ag^+$ ), ασκεί την αντιμικροβιακή του δράση θανατώνοντας σχεδόν όλα τα υπάρχοντα βακτήρια *E. coli* εντός του χρονικού διαστήματος των δύο ωρών κατά το οποίο λαμβάνονταν δείγματα από το επεξεργασμένο υδάτινο διάλυμα.

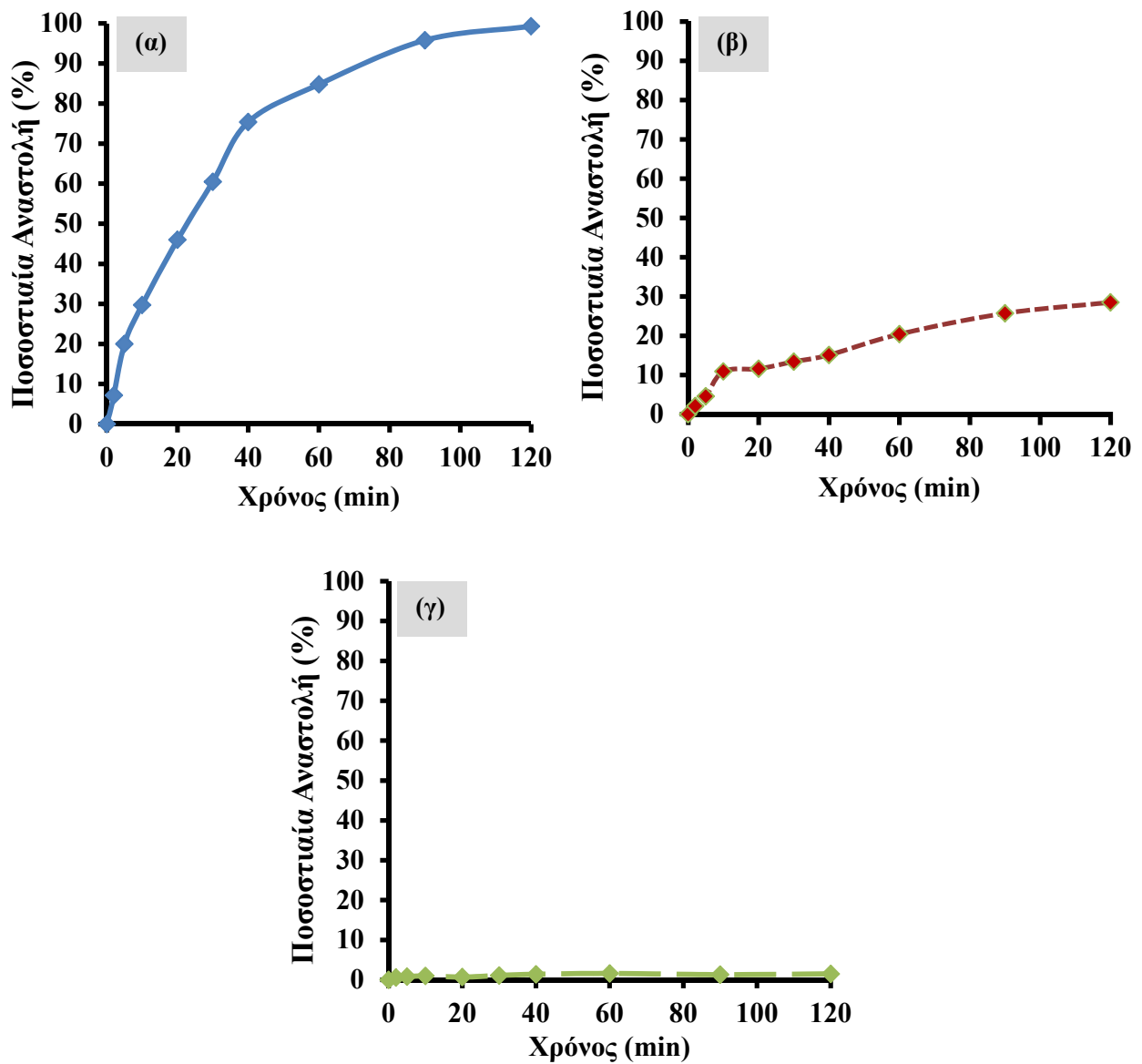
Περαιτέρω, με στόχο την διακρίβωση της συμβολής του υποστρώματος στην αναστολή των βακτηρίων και κατ' επέκταση της ανίχνευσης τυχόν αντιμικροβιακής του δράσης, πραγματοποιήθηκε επανάληψη της προαναφερθείσας πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιώντας αποκλειστικά 1 gr σφαιριδίων γ-αλούμινας ( $\gamma-Al_2O_3$ ) αντί καταλύτη. Ακόμα, η εν λόγω καταλυτική πειραματική δοκιμή πραγματοποιήθηκε ούτως ώστε να αποδειχτεί πως για την παρατηρούμενη βακτηριακή αναστολή ευθύνεται ο άργυρος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν καταγράφονται στον πιο κάτω πίνακα.

**Πίνακας 8:** Οι αποικίες του βακτηρίου *E. coli* στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	<i>E. coli (cfu) – 24 h</i>	<i>E. coli (cfu) – 48 h</i>
0	284	285
2	278	281
5	271	276
10	253	253
20	251	252
30	246	249
40	241	243
60	226	227
90	211	213
120	203	204

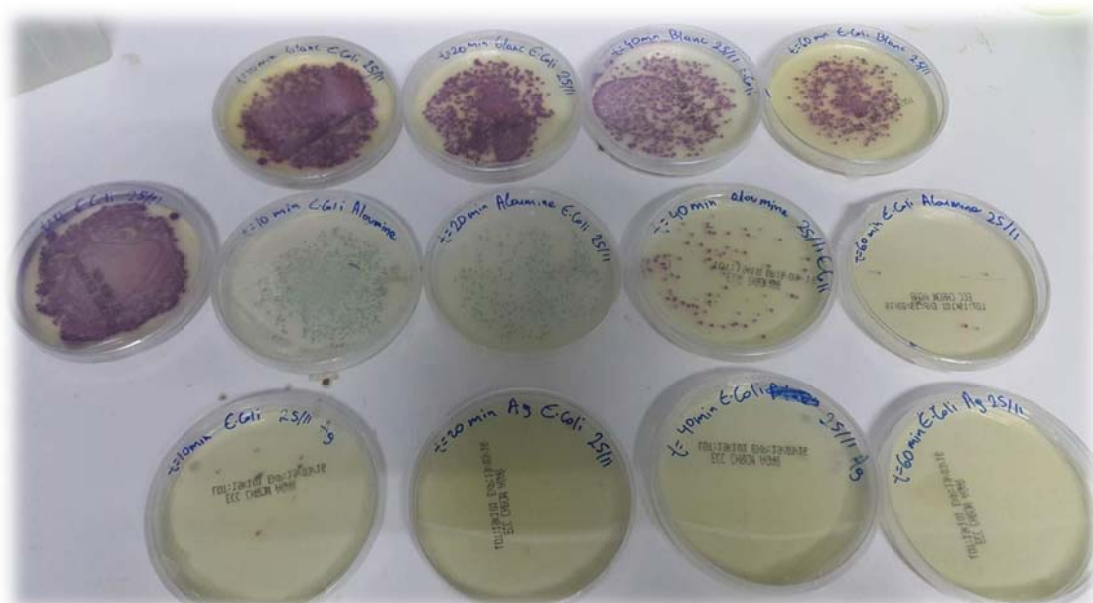
Διαπιστώνεται λοιπόν ότι παρόλη την όποια αντιμικροβιακή δράση που παρουσίασε το υπόστρωμα, η αναστολή των μικροοργανισμών είναι σαφώς μικρότερη από την βακτηριακή αναστολή που προέκυψε από τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου, για το ίδιο χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, η ποσοστιαία αναστολή μετά από 90 λεπτά επεξεργασίας του υδάτινου διαλύματος με τα βακτήρια χρησιμοποιώντας σφαιρίδια γ-αλούμινας ήταν 25,7% σε αντίθεση με την αναστολή της τάξης του 95,8% που προέκυψε όταν χρησιμοποιήθηκε ισοδύναμη μάζα καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση.

Συνοψίζοντας, παρουσιάζονται παρακάτω τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα σχετικά με την ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου επεξεργασίας, που παρατηρήθηκε α) όταν χρησιμοποιήθηκε 1 gr του καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση, β) όταν χρησιμοποιήθηκε 1 gr σφαιριδίων γ-αλούμινας αλλά και γ) στο πείραμα ελέγχου το οποίο πραγματοποιήθηκε για να διαφανεί η συμπεριφορά των βακτηρίων στο αποστειρωμένο νερό με το πέρασμα του χρόνου, απουσία καταλύτη και γ-αλούμινας.



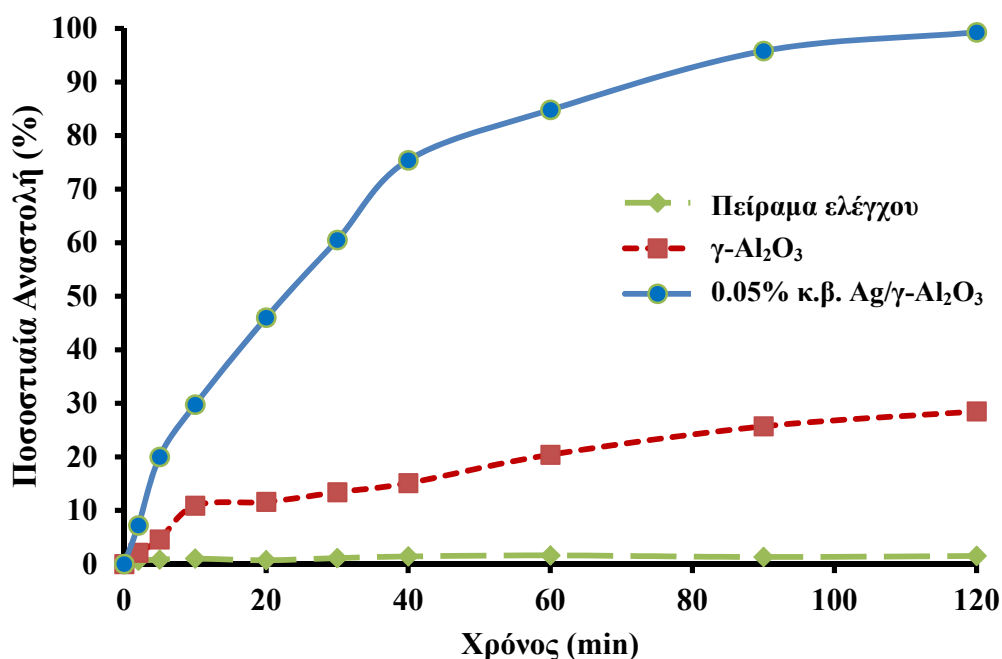
**Γράφημα 2:** (α) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. coli* που προέκυψε χρησιμοποιώντας τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου (0.05% κ.β. Ag /  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας, (β) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. coli* που προέκυψε χρησιμοποιώντας σφαιρίδια υποστρώματος ( $\gamma$ -αλούμινα) στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας, (γ) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. coli* που προέκυψε για το πείραμα ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας

Αναντίρρητα, μέσα από τα παραπάνω γραφήματα αναδεικνύονται ξεκάθαρα οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των συντιθέμενων μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών (Ag/ $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Θα αποτελούσε ωστόσο παράλειψη η μη αναγνώριση της σημαντικής αντιμικροβιακής δραστηριότητας που παρατηρήθηκε πως ασκεί η  $\gamma$ -αλούμινα. Αξίζει επίσης να αναφερθεί πως σε ορισμένες περιπτώσεις κατά τις οποίες σκόπιμα δεν πραγματοποιείτο ικανοποιητική αραίωση ούτως ώστε η αρχική συγκέντρωση βακτηρίων να εμπίπτει στο όριο 30-300 cfu, η αντιμικροβιακή καταλυτική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε κατά την επεξεργασία των επικείμενων υδάτινων διαλυμάτων ήταν σχετικά αυξημένη. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζεται και μέσα από την παρακάτω εικόνα όπου, και ενώ αρχικά η συγκέντρωση βακτηρίων ήταν πολύ μεγάλη (TNTC), έπειτα από μια ώρα επεξεργασίας οι αποικίες παρουσιάζονται εξαιρετικά μειωμένες.



**Εικόνα 18:** Η αυξημένη αντιμικροβιακή καταλυτική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε για πολύ μεγάλες αρχικές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών

Συμπληρωματικά, για σκοπούς σύγκρισης, παρατίθενται στο πιο κάτω γράφημα τα αποτελέσματα που προέκυψαν και αναλύθηκαν παραπάνω σχετικά με την ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή με την πάροδο του χρόνου για τον καταλύτη, το υπόστρωμα και το πείραμα ελέγχου:



**Γράφημα 3:** Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. coli* που προέκυψε χρησιμοποιώντας τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου, σφαιρίδια υποστρώματος ( $\gamma$ -αλούμινα) και στο πείραμα ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας

Στο σημείο αυτό αξίζει να τονιστεί ιδιαίτερα το γεγονός πως λόγω του ότι η παρούσα εργασία αποτελεί ένα εντελώς νέο εγχείρημα, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα με τα οποία μπορούν να συγκριθούν τα αποτελέσματα που προκύπτουν. Πιο συγκεκριμένα, για πρώτη φορά παρατηρούνται και αναλύονται οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του αργύρου όταν αυτός βρίσκεται σταθεροποιημένος σε μια στερεή επιφάνεια όπως είναι η  $\gamma$ -αλούμινα στην προκειμένη περίπτωση. Από την άλλη πλευρά, η βακτηριοκτόνος δράση του αργύρου έχει διαπιστωθεί πολλές φορές όταν αυτός βρίσκεται διαλυτοποιημένος σε οποιοδήποτε υδατικό διάλυμα.

### 3.2.2. Επίδραση των μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/ $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ και του υποστρώματος $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ στην αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis*

Δεδομένου του ότι οι μονομεταλλικοί στηριζόμενοι καταλύτες που παρασκευάστηκαν όπως αποδείχτηκε και στην προηγούμενη υποενότητα παρουσιάζουν έντονη αντιμικροβιακή δραστηριότητα, και λαμβάνοντας ιδιαίτερα υπόψη το γεγονός πως το βακτήριο *Enterococcus*

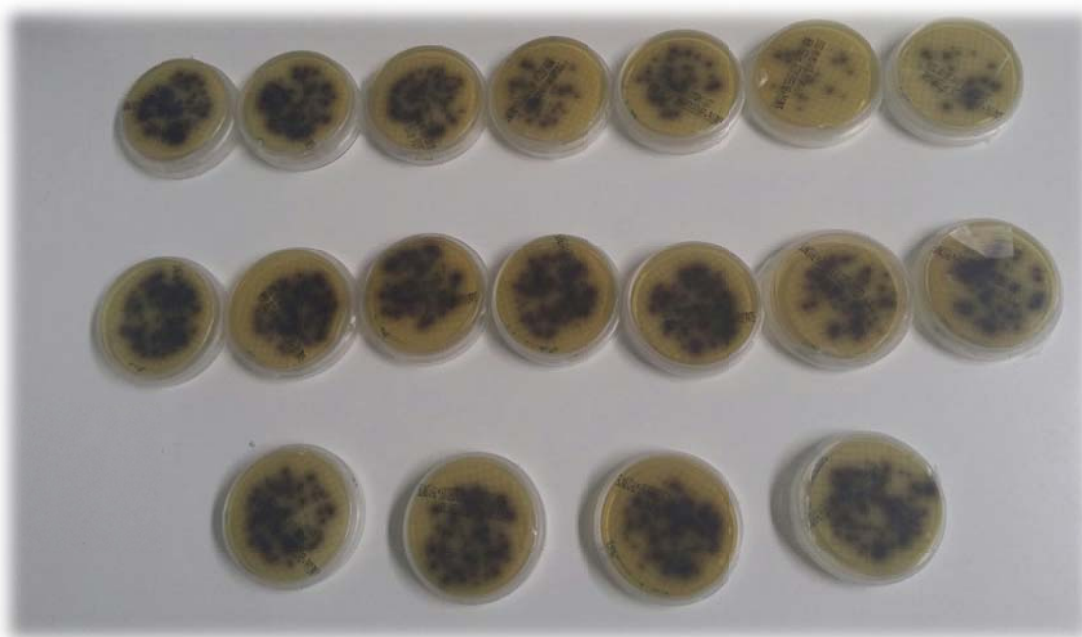
*faecalis* αποτελεί ένα θετικό κατά gram βακτήριο, επιχειρήθηκε η διακρίβωση της αναστολής του συγκεκριμένου βακτηρίου μετά από επεξεργασία τόσο από τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση όσο και από το υπόστρωμα ξεχωριστά. Ως εκ τούτου, στοχεύοντας ξανά στην λεπτομερή εξέταση της αναστολής του συγκεκριμένου βακτηρίου, χρησιμοποιήθηκε 1 gr του καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου (0,05%), για την επεξεργασία 180 mL όγκου υδάτινου διαλύματος με μικροοργανισμούς, όπως και στην περίπτωση του βακτηρίου *E. coli*. Αναφέρεται δε εκ των προτέρων πως αναμένεται να παρατηρηθεί μειωμένη ποσοστιαία αναστολή του εν λόγω βακτηρίου συναρτήσει του χρόνου αφού όντας ένα θετικό κατά gram βακτήριο διαθέτει ασθενέστερο αρνητικό φορτίο από τα αρνητικά κατά gram βακτήρια *V. parahemolyticus* και *E.coli* και επομένως δεν προσελκύεται με την ίδια ηλεκτροστατική έλξη από τον θετικά φορισμένο άργυρο ( $Ag^+$ ).

Συγκεκριμένα, για την επεξεργασία υδάτινου διαλύματος συνολικού όγκου 180 mL που περιείχε 0,1 mL εμβολίου *E. faecalis* από την κατάλληλη αραιώση, το οποίο προέκυψε μετά από διαλυτοποίηση λυοφιλοποιημένου σφαιριδίου *E. faecalis* σε αποστειρωμένο νερό, χρησιμοποιήθηκε εκ νέου 1 gr από τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου (0.05%). Έτσι, μέσα από την τακτική λήψη δειγμάτων από το επεξεργασμένο νερό σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα και έπειτα από την καλλιέργεια των δειγμάτων σε εκλεκτικά τρυβλία με την μέθοδο της διήθησης μέσω ηθμομεμβράνης υπό κενό, παρατηρήθηκαν τα πιο κάτω αποτελέσματα μετά από 24 και 48 ώρες επώασης σε θερμοκρασία 37°C.

**Πίνακας 9:** Οι αποικίες του βακτηρίου *E. faecalis* στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	<i>E. faecalis (cfu) – 24 h</i>	<i>E. faecalis (cfu) – 48 h</i>
0	139	TNTC
3	129	TNTC
8	111	TNTC
15	90	TNTC
25	67	TNTC
35	56	TNTC
45	45	TNTC
60	33	TNTC

Με μια πρώτη παρατήρηση των αποτελεσμάτων επαληθεύεται και πάλι η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των υπό ανάλυση μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών μέσα από την θανάτωση των θετικών κατά gram βακτηρίων στην προκειμένη περίπτωση, με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί η ελαφρώς μειωμένη ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* που προκύπτει (76,2%) με το πέρας 60 λεπτών, σε σχέση με την ποσοστιαία αναστολή που καταγράφηκε (84,8%) κατά την επεξεργασία υδάτινου διαλύματος που περιείχε βακτήρια *E. coli* χρησιμοποιώντας την ίδια μάζα καταλύτη με την ίδια φόρτιση (0,05%).



**Εικόνα 19:** Η αντιμικροβιακή καταλυτική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε για το βακτήριο *E. faecalis* για 60 λεπτά επεξεργασίας

Παράλληλα, με σκοπό την επαναδιακρίβωση της συμβολής του υποστρώματος στην αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* αυτή τη φορά, προσδιορίζοντας συνάμα την οποιαδήποτε προκύπτουσα αντιμικροβιακή δράση του, επιχειρήθηκε η επεξεργασία υδάτινου διαλύματος συνολικού όγκου 180 mL που περιείχε 0,1 mL εμβολίου *E. faecalis* χρησιμοποιώντας αποκλειστικά 1 gr σφαιριδίων γ-αλούμινας ( $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν τα οποία μάλιστα επιβεβαιώνουν πως για την παρατηρούμενη θανάτωση των μικροοργανισμών ευθύνεται ο ιοντικός άργυρος ( $\text{Ag}^+$ ) καταγράφονται στον πιο κάτω πίνακα:

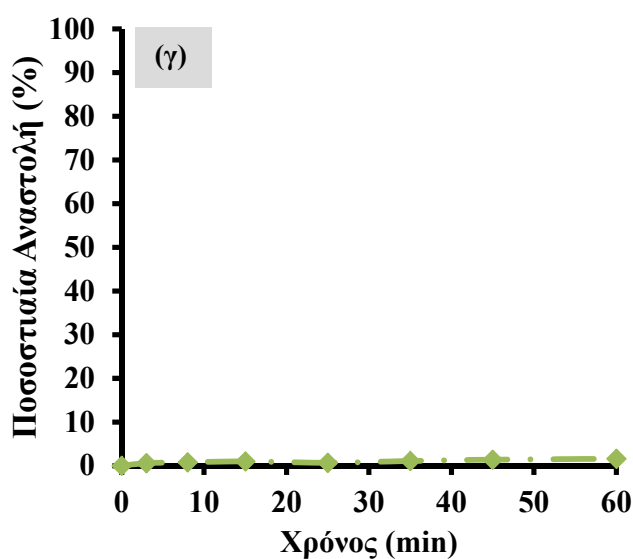
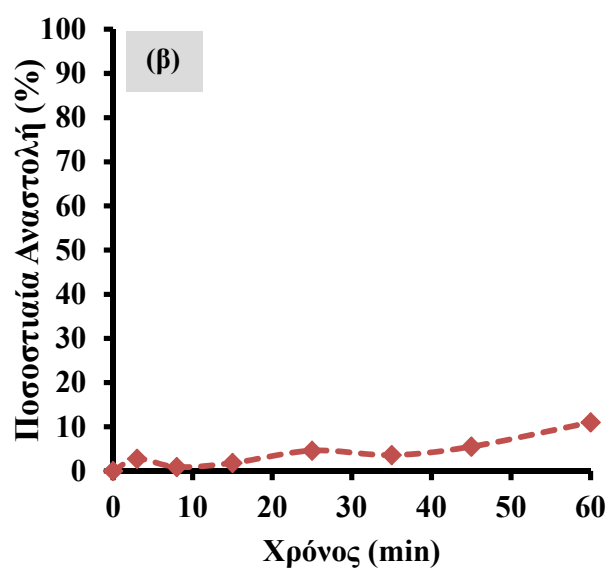
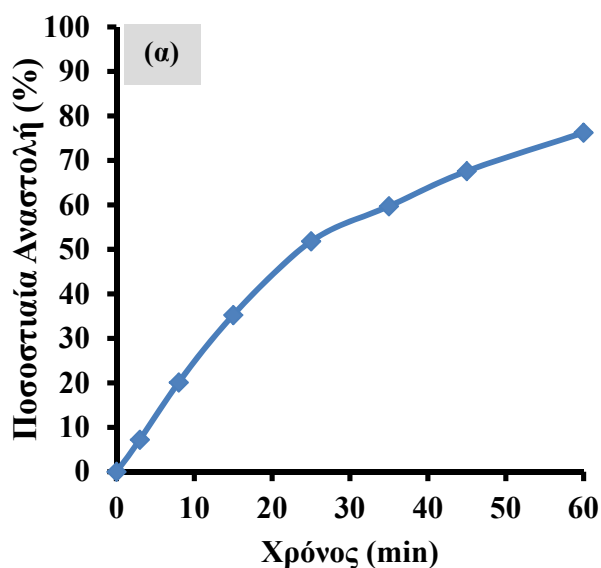


**Πίνακας 10:** Οι αποικίες του βακτηρίου *E. faecalis* στον αντίστοιχο χρόνο λήψης δείγματος μετά από 24 και 48 ώρες επώασης

<i>Χρόνος Δειγματοληψίας (min)</i>	<i>E. faecalis (cfu) – 24 h</i>	<i>E. faecalis (cfu) – 48 h</i>
0	109	TNTC
3	106	TNTC
8	108	TNTC
15	107	TNTC
25	104	TNTC
35	105	TNTC
45	103	TNTC
60	97	TNTC

Όπως καθίσταται λοιπόν φανερό, η αντιμικροβιακή δραστηριότητα που παρουσίασε στην προκειμένη περίπτωση η  $\gamma$ -αλούμινα προκύπτει σημαντικά μειωμένη σχετικά με την ποσοστιαία αναστολή που καταγράφηκε κατά την επεξεργασία των βακτηρίων *E.coli* η οποία ήταν σχεδόν η διπλάσια μετά και από την πάροδο μίας ώρας επεξεργασίας. Επιπλέον, η ποσοστιαία αναστολή του υποστρώματος όπως παρουσιάζεται στον πιο πάνω πίνακα, μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα συγκριτικά με την μικροβιοκτόνο δραστηριότητα που επέδειξε ο καταλύτης με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου. Συγκεκριμένα, η ποσοστιαία αναστολή μετά από 60 λεπτά επεξεργασίας του υδάτινου διαλύματος με τα βακτήρια χρησιμοποιώντας σφαιρίδια  $\gamma$ -αλούμινας ήταν 11%, ενώ η αναστολή που προέκυψε όταν χρησιμοποιήθηκε ισοδύναμη μάζα καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση ήταν 76,25%.

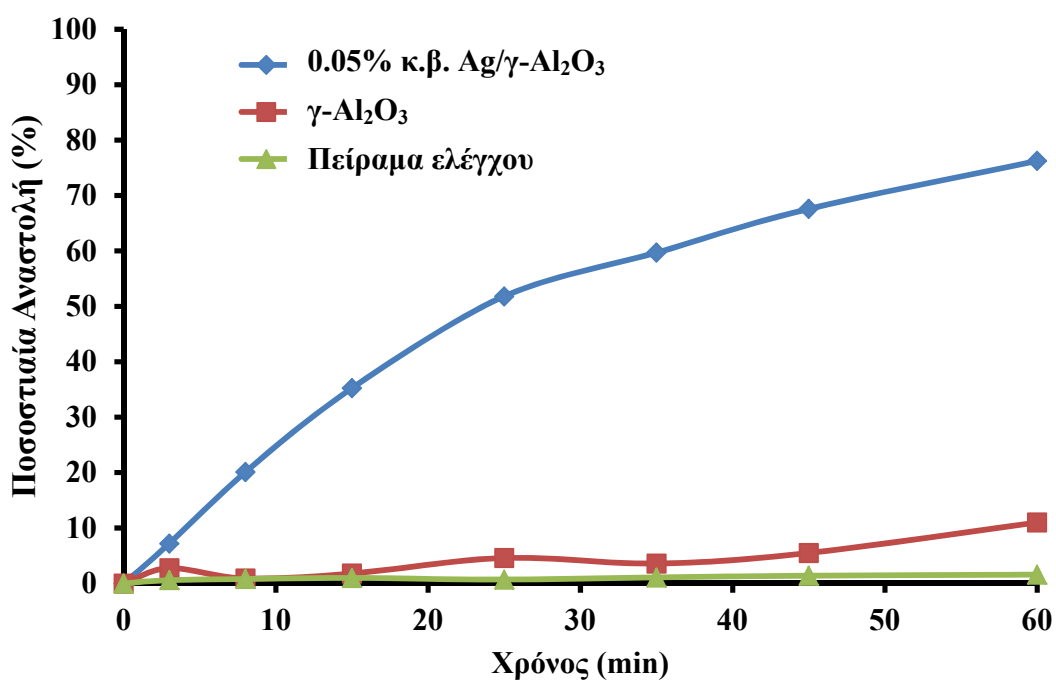
Χρησιμοποιώντας λοιπόν ως υπόβαθρο τα πιο πάνω αποτελέσματα, παρουσιάζονται στο "Γράφημα 4" τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα σχετικά με την ποσοστιαία αναστολή των βακτηρίων *E. faecalis* συναρτήσει του χρόνου επεξεργασίας, που παρατηρήθηκε α) όταν χρησιμοποιήθηκε 1 gr του καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση, β) όταν χρησιμοποιήθηκε 1 gr σφαιριδίων  $\gamma$ -αλούμινας αλλά και γ) στο πείραμα ελέγχου το οποίο πραγματοποιήθηκε για να διαφανεί η συμπεριφορά των βακτηρίων στο αποστειρωμένο νερό με το πέρασμα του χρόνου, απουσία καταλύτη και  $\gamma$ -αλούμινας.



**Γράφημα 4:** (α) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που προέκυψε χρησιμοποιώντας τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου (0.05% κ.β. Ag /  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας, (β) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που προέκυψε χρησιμοποιώντας σφαιρίδια υποστρώματος ( $\gamma$ -αλούμινα) στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας, (γ) - Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που προέκυψε για το πείραμα ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας

Αναμφίβολα, όπως και στην περίπτωση των βακτηρίων *E. coli*, έτσι και μέσα από τα παραπάνω γραφήματα επιβεβαιώνονται οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των συντιθέμενων μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών ( $\text{Ag}/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) ακόμα και στην περίπτωση των ανθεκτικότερων θετικών κατά gram βακτηρίων. Σημειώνεται παράλληλα η ελάχιστη έστω παρατηρούμενη αντιμικροβιακή δράση του υποστρώματος.

Επιπροσθέτως, με στόχο την ευκολότερη σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μέσα από την επεξεργασία των βακτηρίων *E. faecalis*, το πιο κάτω γράφημα παρουσιάζει την ποσοστιαία βακτηριακή αναστολή με την πάροδο του χρόνου για τον καταλύτη, το υπόστρωμα και το πείραμα ελέγχου:



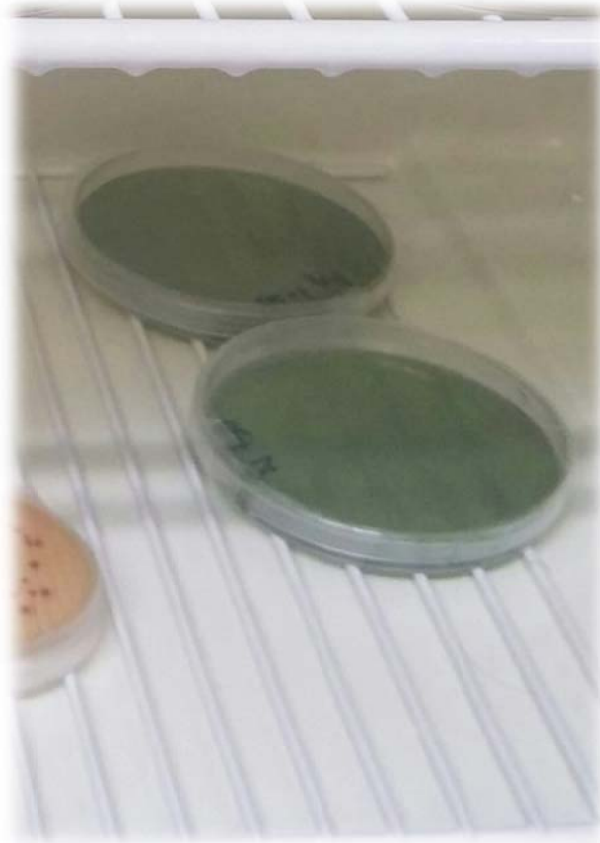
**Γράφημα 5:** Η ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου *E. faecalis* που προέκυψε χρησιμοποιώντας τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου, σφαιρίδια υποστρώματος ( $\gamma$ -αλούμινα) και στο πείραμα ελέγχου στον αντίστοιχο χρόνο επεξεργασίας

Κατά συνέπεια, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας αποτελούν ισχυρή απόδειξη του ότι ο άργυρος ασκεί την εγνωσμένη αντιμικροβιακή του δράση ακόμα και όταν βρίσκεται ακινητοποιημένος σε στερεό υπόστρωμα όπως προαναφέρθηκε. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελέσει επανάσταση για το πεδίο της αντιμικροβιακής ετερογενούς κατάλυσης.

### 3.2.3. Επίδραση των μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και του υποστρώματος γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> στην αναστολή του βακτηρίου *V. parahemolyticus*

Όπως είναι γνωστό το βακτήριο *Vibrio parahemolyticus* ανήκει στην ομάδα των αρνητικών κατά gram βακτηρίων όπως και το βακτήριο *E. coli*. Ως εκ τούτου, λόγω της όμοιας μορφολογικής τους δομής, φυσιολογικά αναμένεται να παρατηρηθεί αρκετά παρόμοια ποσοστιαία αναστολή για τα δύο αυτά βακτήρια. Έτσι, λόγω σημαντικών δυσκολιών που παρεμπόδισαν την καταλυτική επεξεργασία του βακτηρίου *V. parahemolyticus* αλλά και λόγω κυρίως αδυναμίας επίτευξης υψηλής αρχικής συγκέντρωσης του βακτηρίου αυτού, η εξέταση της βακτηριοκτόνου δράσης των συντιθέμενων καταλυτών όσον αφορά το εν λόγω βακτήριο περιορίστηκε στην υιοθέτηση του παραπάνω επιχειρήματος. Παρομοίως λοιπόν κατά την επεξεργασία του βακτηρίου *V. parahemolyticus* χρησιμοποιώντας 1 gr από τον καταλύτη με την μικρότερη φόρτιση μετάλλου, αναμένεται να προκύψει ποσοστιαία αναστολή του βακτηρίου που ξεπερνά το 90% μετά και από 90 λεπτά επεξεργασίας.

Πιο συγκεκριμένα, τα λυοφιλοποιημένα σφαιρίδια του μικροοργανισμού αυτού περιείχαν περιορισμένο αριθμό βακτηρίων τα οποία όντας εξαιρετικά ευαίσθητα, ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού τους θανατωνόταν με την διάλυση του σφαιριδίου δυσχεραίνοντας την όλη καταλυτική επεξεργασία. Παραπέρα, η πραγματοποίηση της καταλυτικής επεξεργασίας με τη χρήση φυσιολογικού ορού για την αποφυγή της ανεπιθύμητης θανάτωσης των μικροοργανισμών εξαιτίας της έλλειψης θρεπτικών συστατικών από το χρησιμοποιούμενο αποστειρωμένο νερό δεν πραγματοποιήθηκε, αφού κάτι τέτοιο πιθανόν να επηρεάσει αρνητικά την δραστηριότητα του καταλύτη. Κατ' επέκταση, και λαμβάνοντας υπόψη πως η δηλητηρίαση του καταλύτη δεν αποτελεί αντικείμενο μελέτης στην παρούσα πτυχιακή εργασία, οι προσπάθειες που έγιναν για καταλυτική επεξεργασία υδάτινου διαλύματος που περιείχε βακτήρια *V. parahemolyticus* απέβησαν άκαρπες. Όπως μάλιστα φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα δεν κατέστη εφικτή η παρατήρηση αποικιών ούτε στο τυφλό δείγμα που λήφθηκε πριν την έναρξη της επεξεργασίας.



**Εικόνα 20:** Η απουσία αποικιών του βακτηρίου *V. parahemolyticus* από τα τρυβλία που χρησιμοποιήθηκαν για ανάπτυξη του τυφλού δείγματος

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την παρούσα πτυχιακή εργασία, μελετήθηκε η πιθανή αντιμικροβιακή δραστηριότητα των συντιθέμενων μονομεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, με τα αποτελέσματα να φανερώνουν την ύπαρξη σημαντικής ποσοστιαίας αναστολής τόσο των αρνητικών όσο και των θετικών κατά gram βακτηρίων. Επίσης, τα ευρήματα της συγκεκριμένης εργασίας φυσιολογικά υποδεικνύουν πως οι καταλύτες με την ψηλότερη φόρτιση μετάλλου επιτυγχάνουν γρηγορότερη πλήρη αναστολή των βακτηρίων οποιουδήποτε προς επεξεργασία διαλύματος. Ακόμα, σημαντική για την δραστηριότητα των καταλυτών κρίνεται και η αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών αφού όπως διαφάνηκε οι υψηλότερες αρχικές συγκεντρώσεις συνοδεύονται από αυξημένη ποσοστιαία αναστολή βακτηρίων στο ίδιο χρονικό διάστημα.

Αναντίρρητα λοιπόν, τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας καταδεικνύουν εμφατικά πως ο ιοντικός άργυρος (Ag<sup>+</sup>) ο οποίος διαθέτει εγνωσμένες αντιμικροβιακές ιδιότητες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ποικίλες εφαρμογές, ασκεί έντονη αντιμικροβιακή δραστηριότητα ακόμα και όταν βρίσκεται ακινητοποιημένος σε στερεό υπόστρωμα όπως η γ-αλούμινα στην προκειμένη περίπτωση. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποβεί καθοριστικό όσον αφορά την επεξεργασία του υδάτινου έρματος των πλοίων χρησιμοποιώντας μονομεταλλικούς στηριζόμενους καταλύτες Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Στο σημείο αυτό αναφέρεται πως η καταλυτική επεξεργασία του νερού έρματος αποτελεί μια σχετικά οικονομική εξαιρετικά φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο αφού δεν επηρεάζεται η ομαλή λειτουργία και η βιωσιμότητα του υδάτινου οικοσυστήματος στο οποίο απορρίπτεται το επεξεργασμένο νερό.

Έτσι, η αντιμικροβιακή ετερογενής κατάλυση μπορεί να διαδραματίσει καθοριστικό ρόλο σχετικά με την απολύμανση του υδάτινου έρματος, εκμηδενίζοντας ταυτόχρονα τους κίνδυνους και τις αρνητικές επιπτώσεις για τον άνθρωπο, που επισύρει η αλόγιστη απόρριψη μαζικών τεράστιων συγκεντρώσεων παθογόνων μικροοργανισμών σε κάθε γωνιά του πλανήτη. Ωστόσο, εξαιτίας του γεγονότος πως πρόκειται για ένα εντελώς νέο πεδίο, σημαντική κρίνεται η μελλοντική επιστημονική έρευνα που επίκειται να πραγματοποιηθεί. Πιο συγκεκριμένα η εξέταση της ποσοστιαίας αναστολής άλλων βακτηρίων, η συμπεριφορά του καταλύτη κάτω από πραγματικές συνθήκες και η διερεύνηση της δραστηριότητας συντιθέμενων διμεταλλικών στηριζόμενων καταλυτών Cu-Ag/γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, αποτελούν περιπτώσεις που χρίζουν περαιτέρω μελέτης και ανάλυσης. Επιπλέον, εξετάζοντας την πιθανότητα το επεξεργασμένο νερό έρματος

να περιέχει σημαντικές ποσότητες αργύρου λόγω της έκλυσης του τελευταίου από την επιφάνεια του καταλύτη, καλό θα ήταν να πραγματοποιηθούν οι σχετικές επιβεβαιωτικές αναλύσεις.

Καταληκτικά, λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη προώθησης και ανέλιξης της συγκεκριμένης καινοτόμου μεθόδου που εμπίπτει στα πλαίσια της ετερογενούς αντιμικροβιακής κατάλυσης, πέρα από τα ερευνητικά στάδια στα οποία περιορίζεται μέχρι στιγμής. Αναμφίβολα κάτι τέτοιο θα προσέφερε σημαντικά στην αναβάθμιση του βιοτικού επιπέδου της ανθρωπότητας και στην προστασία του περιβάλλοντος.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ABS, 2010, 'GUIDE FOR BALLAST WATER EXCHANGE', 16855 Northchase Drive Houston, TX 77060 USA, Προσπελάστηκε 6 Οκτωβρίου 2015, [https://www.eagle.org/eagleExternalPortalWEB/ShowProperty/BEA%20Repository/Rules&Guides/Current/171\\_BallastWaterExch/Guide](https://www.eagle.org/eagleExternalPortalWEB/ShowProperty/BEA%20Repository/Rules&Guides/Current/171_BallastWaterExch/Guide).
2. Ahmed, H, Yousuf, A, Afzal, S, Fatima, S, 2012, *Mechanisms of transport across the cell membrane*, SlideShare, Προσπελάστηκε 14 Μαρτίου 2016, <http://www.slideshare.net/waqasuk/mechanisms-of-transport-across-the-cell-membrane>.
3. Albert, RJ, Lishman, JM, Saxena, JR, 2013, 'Ballast water regulations and the move toward concentration-based numeric discharge limits', *Ecological Applications*, 23(2), 2013, pp. 289–300.
4. Australian Marine Environment Protection Association, 2016, *Why ships need ballast water*, AUSMEPA, Προσπελάστηκε 26 Φεβρουαρίου 2016, <http://www.ausmepa.org.au/ships-and-the-marine-environment/11/why-ships-need-ballast-water.htm>
5. Baier, RE, Forsberg, RL, Meyer, AE, Lundquist, DC, 2014, 'Ballast tank biofilms resist water exchange but distribute dominant species', *Management of Biological Invasions* (2014) Volume 5, Issue 3: pp 241–244, Προσπελάστηκε 18 Ιουλίου 2015, [http://www.reabic.net/journals/mbi/2014/3/MBI\\_2014\\_Baier\\_etal.pdf](http://www.reabic.net/journals/mbi/2014/3/MBI_2014_Baier_etal.pdf).
6. Balaji, R, Yaakob, OB, 2011, 'EMERGING BALLAST WATER TREATMENT TECHNOLOGIES: A REVIEW', *Journal of Sustainability Science and Management* Volume 6 Number 1, June 2011: 126-138.
7. Baron, S, 1996, *Medical Microbiology*, 4th edition, University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, USA.
8. Barrett, EP, Joyner, LG, Halenda, PP, 1951, 'The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms', *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1), pp 373–380.
9. Boehm, AB, Sassoubre, LM, 2014, *Enterococci as Indicators of Environmental Fecal Contamination*, Προσπελάστηκε 18 Φεβρουαρίου 2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190421/>.



10. BVSDE, 2012, *INTESTINAL ENTEROCOCCI*, Προσπελάστηκε 15 Φεβρουαρίου 2016, [http://0nulled.com/doc/pdf/download/www\\_bvsde\\_ops-oms\\_org--bvsacg--e--cd-cagua--guias--b\\_parametos--2\\_HIT--microbologicos--6\\_04.pdf](http://0nulled.com/doc/pdf/download/www_bvsde_ops-oms_org--bvsacg--e--cd-cagua--guias--b_parametos--2_HIT--microbologicos--6_04.pdf)
11. Byappanahalli, MN, Nevers, MB, Korajkic, A, Staley, ZR, Harwood, VJ, 2012, 'Enterococci in the Environment', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 76, no. 4, pp. 685-706.
12. CDC, 2015, *E. coli - General Information*, Προσπελάστηκε 19 Φεβρουαρίου 2016, <http://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>.
13. Cohen, AN, Dobbs, FC, 2015, 'Failure of the Public Health Testing Program for Ballast Water Treatment Systems', *Marine Pollution Bulletin* 2015 Feb 15;91(1):29-34.
14. Cohen, NJ, Slaten, DD, Marano, N, Tappero, JW, Wellman, M, Albert, RJ, Hill, RV, Espey, D, Handzel, T, Henry, A, Tauxe, RV, 2012, 'Preventing Maritime Transfer of Toxigenic *Vibrio cholerae*', *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 18, No. 10, pp. 1680-1682.
15. Cortinas, A, Stevens, V, Benavides, V, Guerrero, C, 2015, *Vibrio cholerae*, Προσπελάστηκε 12 Φεβρουαρίου 2016, <http://eteamscc.com/research-log/vibrio-cholerae/>.
16. Costa, CN, Efstathiou, AM, 'Mechanistic Aspects of the H<sub>2</sub>-SCR of NO on a Novel Pt/MgO-CeO<sub>2</sub> Catalyst', *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 3010-3020.
17. Costa, CN, Stathopoulos, VN, Belessi, VC, Efstathiou, AM, 2001, 'An Investigation of the NO/H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (Lean-deNO<sub>x</sub>) Reaction on a Highly Active and Selective Pt/La<sub>0.5</sub>Ce<sub>0.5</sub>MnO<sub>3</sub> Catalyst', *Journal of Catalysis*, 197, 350–364.
18. Cuello, C, Correa, P, Haenszel, W, Gordillo, G, Brown, C, Archer, M, Tannenbaum, S, 1976, 'Gastric Cancer in Colombia. I. Cancer Risk and Suspect Environmental Agents', *J. Nat. Cancer Inst.*, 57 (5): 1015-1020.
19. Dobbs, FC, Rogerson, A, 2005, 'Ridding Ships' BALLAST Water of Microorganisms', *Environ. Sci. Technol.*, 2005, 39 (12), pp 259A–264A, Προσπελάστηκε 11 Αυγούστου 2015, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es053300v>.
20. Drake, LA, Doblin, MA, Dobbs, FC, 2007, 'Potential microbial bioinvasions via ships' ballast water, sediment, and biofilm', *Marine Pollution Bulletin* 55 (2007) 333–341.
21. Drake, LA, Ruiz, GM, Galil, BS, Mullady, TL, Friedmann, DO, Dobbs, FC, 2002, 'Microbial ecology of ballast water during a transoceanic voyage and the effects of open-ocean exchange', *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 233: 13–20, 2002.

22. ECDC, 2016, *E. coli Factsheet*, Προσπελάστηκε 19 Φεβρουαρίου 2016, [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia\\_coli/basic\\_facts/Pages/basic\\_facts.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli/basic_facts/Pages/basic_facts.aspx).
23. Edberg, SC, Rice, EW, Karlin, RJ, Allen, MJ, 2000, 'Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection', *Journal of Applied Microbiology* 2000, 88, 1068-1168.
24. Edberg, SC1, Rice, EW, Karlin, RJ, Allen, MJ, 2000, 'Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection', *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, (29):106S-116S.
25. Efstathiou, AM, Costa, CN, Fierro, JLG, International patent: WO03068390 (2003), Spanish patent: ES 2 192 985 B1 (2005), US patent: 7, 105, 137 B2 (2006), European patent application No. 03704721, to be granted.
26. EMSA, 2016, *Ballast Water*, Προσπελάστηκε 23 Φεβρουαρίου 2016, <http://www.emsa.europa.eu/implementation-tasks/environment/ballast-water.html>.
27. Endresen, Ø, Behrens, HL, Brynstad, S, Andersen, AB, Skjong, R, 2004, 'Challenges in global ballast water management', *Marine Pollution Bulletin* 48 (2004), pp 615–623.
28. EPA, 2016, *Methods, Models, Tools, and Databases for Water Research*, Προσπελάστηκε 27 Φεβρουαρίου 2016, <https://www.epa.gov/water-research/methods-models-tools-and-databases-water-research>.
29. Fabrega, J, Luoma, SN, Tyler, CR, Galloway, TS, Lead, JR, 2010, 'Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment', *Environment International* 37 (2011) 517–531.
30. Feng, QL, Wu, J, Chen, GQ, Cui, FZ, Kim, TN, Kim, JO, 2000, 'A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*', *ResearchGate*, DOI: 10.1002/1097-4636(20001215)52:43.0.CO;2-3, Προσπελάστηκε 30 Ιουλίου 2015, [https://www.researchgate.net/publication/247939816\\_A\\_mechanistic\\_study\\_of\\_the\\_antibacterial\\_effect\\_of\\_silver\\_ions\\_onEscherichia\\_coli\\_andStaphylococcus\\_aureus](https://www.researchgate.net/publication/247939816_A_mechanistic_study_of_the_antibacterial_effect_of_silver_ions_onEscherichia_coli_andStaphylococcus_aureus).
31. Gallo, J, Holinka, M, Moucha, CS, 2014, 'Antibacterial Surface Treatment for Orthopaedic Implants', *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, pp 13849-13880.
32. Garin, F, 2004, Environmental catalysis, *Catalysis Today*, Volume 89, Issue 3, 30 March 2004, Pages 255–268.

33. Gollasch, S, David, M, 2015, *BALLAST WATER MANAGEMENT*, Προσπελάστηκε 15 Απριλίου 2016, [http://www.marine-vectors.eu/Landing\\_pages/Ballast\\_water\\_management](http://www.marine-vectors.eu/Landing_pages/Ballast_water_management).
34. Gonçalves, AA, Gagnon, GA, 2012, 'Recent Technologies for Ballast Water Treatment', *Ozone: Science & Engineering*, 34: 174–195.
35. Gregg, SJ, Sing, KSW, 1967, 'Adsorption, Surface Area and Porosity', *J. Electrochem. Soc.*, volume 114, issue 11, 279C.
36. Guridi, A, Diederich, AK, Aguila-Arcos, S, Garcia-Morenoa, Blasi MR, Broszat, M, Schmieder, W, Clauss-Lenzian, E, Sakinc-Gueler, T, Andrade, R, Alkorta, I, Meyer, C, Landau, U, Grohmann, E, 2015, 'New antimicrobial contact catalyst killing antibiotic resistant clinical and waterborne pathogens', *Materials Science and Engineering C* 50, (2015), pp. 1–11.
37. Guzman, M, Dille, J, Godet, S, 2012, 'Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 8 (2012) 37–45.
38. Hallegraeff, GM, 1998, 'Transport of toxic dinoflagellates via ships' ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies', *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 168: 297-309, 1998.
39. Hallegraeff, GM, Bolch, CJ, 1992, 'Transport of diatom and dinoflagellate resting spores in ships' ballast water: implications for plankton biogeography and aquaculture', *Journal of Plankton Research* Vol.14 no.8 pp.1067-1084.
40. Hammond, CR, 2000, *The Elements*, in Handbook of Chemistry and Physics 81st edition. CRC press, Προσπελάστηκε 12 Μαρτίου 2016, [http://www-d0.fnal.gov/hardware/cal/lvps\\_info/engineering/elements.pdf](http://www-d0.fnal.gov/hardware/cal/lvps_info/engineering/elements.pdf).
41. Harris, J, 2008, 'Pacific oyster, *Crassostrea gigas*', *Aquatic Invasion Ecology*, Προσπελάστηκε 20 Δεκεμβρίου 2015, [http://depts.washington.edu/oldenlab/wordpress/wpcontent/uploads/2013/02/Crassostrea-gigas\\_Harris.pdf](http://depts.washington.edu/oldenlab/wordpress/wpcontent/uploads/2013/02/Crassostrea-gigas_Harris.pdf).
42. HIRAYAMA, 2002, *Economic Autoclaves*, Προσπελάστηκε 17 Φεβρουαρίου 2016, [http://www.hirayama-hmc.co.jp/e\\_top.html](http://www.hirayama-hmc.co.jp/e_top.html).
43. HomeAquaria, 2013, *Saltwater Algae Control: Red Algae*, Προσπελάστηκε 24 Φεβρουαρίου 2016, <http://homeaquaria.com/saltwater-algae-control-red-algae/>.

44. International Maritime Organization, 2016, *Ballast Water Management*, IMO, Προσπελάστηκε 23 Φεβρουαρίου 2016, <http://www.imo.org/en/ourwork/Environment/BallastWaterManagement/Pages/Default.aspx>
45. Jung, WK, Koo, HC, Kim, KW, Shin, S, Kim, SH, Park, YH, 2008, ‘Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*’, *Appl. Environ. Microbiol.*, April 2008 vol. 74 no. 7, pp 2171-2178.
46. Κορδούλης, ΧΑ, Λυκουργιώτης, ΑΣ, 2003, *Καταλυτικές Επιφάνειες*, Πανεπιστήμιο Πατρών, Προσπελάστηκε 11 Απριλίου 2016, [http://www.eap.gr/images/stories/pdf/KPP51\\_A\\_Katalitikes\\_Epifaneies\\_F12045.pdf](http://www.eap.gr/images/stories/pdf/KPP51_A_Katalitikes_Epifaneies_F12045.pdf).
47. Lemire, JA, Harrison, JJ, Turner, RJ, 2013, ‘Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications’, *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 11, pp 371–384, (2013).
48. Li, SF, Xue, X, Li, P, Li, X, Jia, Y, 2006, ‘First-principles studies on the adsorption of molecular oxygen on Ba (110) surface’, *Physics Letters A*, Vol. 352, Issue 6, Pages 526–530.
49. Liu, Y, Wang, X, Yang, F, Yang, X, 2008, ‘Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO<sub>2</sub> and Ag/TiO<sub>2</sub> composite films’, *Microporous and Mesoporous Materials* 114 (2008) 431–439.
50. Lkhagvajav, N, Koizhaiganova, M, Yasa, I, Çelik, E, Sari, Ö, 2015, ‘Characterization and antimicrobial performance of nano silver coatings on leather materials’, *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 1, pp 41-48.
51. Lloyd's register marine, 2015, *Understanding ballast water management - Guidance for shipowners and operators*, Lloyd's Register Group Limited, Προσπελάστηκε 16 Φεβρουαρίου 2016, [http://www.lr.org/en/\\_images/213-35824\\_Understanding\\_Ballast\\_Water\\_Management\\_0314\\_tcm155248816.pdf](http://www.lr.org/en/_images/213-35824_Understanding_Ballast_Water_Management_0314_tcm155248816.pdf)
52. Lok, CN, Ho, CM, Chen, R, He, QY, Yu, WY, Sun, H, Tam, PKH, Chiu, JF, Che, CM, 2007, ‘Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities’, *J. Biol. Inorg. Chem.* (2007) 12:527–534.

53. Marambio-Jones, C, Hoek EMV, 2010, ‘A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment’, *Journal of Nanoparticle Research* June 2010, Volume 12, Issue 5, pp 1531-1551.
54. Martienssen, W, Warlimont, H, 2005, *Springer Handbook of Condensed Matter and Materials Data*, Τόμος 1 (εικονογραφημένη έκδοση), Springer, σελ. 66. ISBN 3540443762.
55. McCarthy, SA, Khambaty, FM, 1994, ‘International Dissemination of Epidemic *Vibrio cholerae* by Cargo Ship Ballast and Other Non-potable Waters’, *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 7, July 1994, pp. 2597-2601.
56. Microbiologics, Inc., οδηγίες χρήσης μικροοργανισμών LYFO DISK®, KWIK-STIK™ και KWIK-STIK™ Plus, Προσπελάστηκε 9 Φεβρουαρίου 2016, <http://docplayer.gr/4256427-Entheto-proiontos-mikroorganismoi-lyfo-disk-mikroorganismoi-kwik-stik-mikroorganismoi-kwik-stik-plus.html>.
57. Micromeritics 2100E Accusorb, user’s manual, Micromeritics Instrument Company, USA.
58. Micromeritics Gemini III 2375, 2001, ‘Surface Area Analyzer’, Operator’s Manual V5.01.
59. Misono, M, 1995, *Toyota Technol. Rev.* 44 (1995) p. 4.
60. Nair, GB, 2008, ‘*Vibrio cholerae*’, *National Institute of Cholera and Enteric Diseases*, Calcutta, India, Προσπελάστηκε 16 Φεβρουαρίου 2016, [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/admicrob6.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/admicrob6.pdf).
61. Nobuhara, K, Kasai, H, Diño, WA, Nakanishi, H, 2004, ‘H<sub>2</sub> dissociative adsorption on Mg, Ti, Ni, Pd and La Surfaces’, *Surface Science*, Volumes 566–568, Part 2, 20 September 2004, Pages 703–707.
62. Nordqvist, C, 2015, *E. Coli Infections: Causes, Symptoms and Treatments*, Προσπελάστηκε 23 Μαρτίου 2016, <http://www.medicalnewstoday.com/articles/68511.php>.
63. Obara, Y, Yamai, S, Nikkawa, T, Shimoda, Y, Miyamoto, Y, 1981. *J. Clin. Microbiol.* 14:61-66.
64. Oberlin, A, Endo, M, Koyama, T, 1976, ‘Filamentous growth of carbon through benzene decomposition’, *Journal of Crystal Growth*, Vol. 32, Issue 3, March 1976, pp. 335-349.
65. Pirkanniemi, K, Sillanpää, M, 2002, ‘Heterogeneous water phase catalysis as an environmental application: a review’, *Chemosphere*, Volume 48, Issue 10, September 2002, Pages 1047–1060.

66. Public Health Agency of Canada, 2015, *E. coli*, Προσπελάστηκε 19 Φεβρουαρίου 2016, <http://www.phac-aspc.gc.ca/fs-sa/fs-fi/ecoli-eng.php>.
67. Radzig, MA, Nadtochenko, VA, Koksharova, OA, Kiwi, J, Lipasova, VA, Khmel IA, 2012, ‘Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 102, February 2013, pp 300–306.
68. Rai, M, Yadav, A, Gade, A, 2009, ‘Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials’, *Biotechnology Advances* 27 (2009) 76–83.
69. Rudd, KE, 2000, *The Complete E. coli Genome Sequence*, Προσπελάστηκε 19 Φεβρουαρίου 2016, <http://www.ecogene.org/sources/1>.
70. Ruiz, GM, Rawlings, TK, Dobbs, FC, Drake, LA, Mullady, T, Huq, A, Colwell, RR, 2000, ‘Global spread of microorganisms by ships’, *NATURE*, VOL. 408, 2 NOVEMBER 2000, pp. 49-50.
71. Satterfield, CN, 1980, *Heterogeneous Catalysis in Practice (McGraw-Hill chemical engineering series)*, McGraw-Hill Book Company, New York.
72. Sault, AG, Madix, RJ, Campbell, CT, 1986, ‘Adsorption of oxygen and hydrogen on Au (110)-(1 × 2)’, *Surface Science*, Volume 169, Issue 2, p. 347-356.
73. Shustorovich, E, 1991, *Metal-Surface Reaction Energetics: Theory and Applications to Heterogeneous Catalysis*, Chemisorption and Surface Diffusion VCH Pub., New York.
74. Siculo, M, Tringali, M, Orsi, F, Santagostino, A, 2009, ‘Porphyrin pattern and methemoglobin levels in *Columba livia* applied to assess toxicological risk by air pollution in urban areas’, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 57(4):732-40.
75. Smith, JM, 1981, *Chemical Engineering Kinetics*, 3rd Ed., McGraw-Hill, New York.
76. Soo-Hwan, K, Lee, HS, Ryu, DS, Choi, SJ, Lee, DS, 2011, ‘Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*’, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, February 2011, Vol. 39, No. 1, pp 77–85.
77. Spruit, MEM, Kleyn, AW, 1989, ‘Dissociative adsorption of O<sub>2</sub> on Ag (111)’, *Chemical Physics Letters*, Vol. 159, Issue 4, Pages 342-348.
78. Stoltze, P, 2000, *Introduction to heterogeneous catalysis*, Aalborg University, Προσπελάστηκε 13 Απριλίου 2016, <http://documents.mx/documents/introduction-to-heterogeneous-catalysis-stoltze.html>.

79. Sundial Co. Ltd, 2015, E.C.C CHROM AGAR, ενημερωτικό υλικό - EY 03, Έκδοση: 2<sup>η</sup>, Χρυσάνθου Επισκόπου Πάφου 2, 3022 Λεμεσός.
80. Sundial Co. Ltd, 2015, Vibrio T.C.B.S Agar, ενημερωτικό υλικό - EY 61, Έκδοση: 1η, Χρυσάνθου Επισκόπου Πάφου 2, 3022 Λεμεσός.
81. Sundial Co. Ltd, 2016, ENTEROCOCCUS PFIZER SELECIVE AGAR, ενημερωτικό υλικό - EY 62, Έκδοση: 1η, Χρυσάνθου Επισκόπου Πάφου 2, 3022 Λεμεσός.
82. Taglietti, A, Fernandez, YAD, Amato, E, Cucca, L, Dacarro, G, Grisoli, P, Necchi, V, Pallavicini, P, Pasotti, L, Patrini, M, 2012, ‘Antibacterial Activity of Glutathione-Coated Silver Nanoparticles against Gram Positive and Gram Negative Bacteria’, *Langmuir* 2012, 28 (21), pp 8140–8148.
83. Takahashi CK, Lourenço NGGS, Lopes TF, Rall VLM, Lopes CAM, 2008, ‘BALLAST WATER: A REVIEW OF THE IMPACT ON THE WORLD PUBLIC HEALTH’, *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* V.14, n.3, pp. 393-408.
84. Tamaru, K, 1978, *Dynamic Heterogeneous Catalysis*, Academic Press, New York.
85. Taylor, HS, 1948, ‘The Heterogeneity of Catalyst Surfaces for Chemisorption’, *Advances in Catalysis*, Vol. 1, pp. 1–26.
86. Telnes, K, 2005, *Common Shore Crab - Carcinus maenas*, Προσπελάστηκε 23 Μαρτίου 2016, <http://www.seawater.no/fauna/arthropoda/maenas.html>.
87. Thomas, JM, Thomas, WJ, 1997, *Principles and Practice of Heterogeneous Catalysis*, VCH.
88. Todar, K, 2012, *Structure and Function of Bacterial Cells*, Madison, Wisconsin, Προσπελάστηκε 19 Φεβρουαρίου 2016, [http://www.textbookofbacteriology.net/structure\\_6.html](http://www.textbookofbacteriology.net/structure_6.html).
89. Tsolaki, E, Diamadopoulos, E, 2010, ‘Technologies for ballast water treatment: a review’, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2010; 85: 19–32.
90. Tucker, C, 2010, *Carol's Cornwall*, Προσπελάστηκε 17 Απριλίου 2016, <http://www.carolscornwall.com/On%20the%20Beach/Mollusc-Crassostrea%20gigas09-03-09.jpg>
91. UNIVERSITY OF COLORADO BOULDER, 2008, *Disinfectants and Sterilization Methods*, Environmental Health & Safety, Προσπελάστηκε 25 Φεβρουαρίου 2016, <http://ehs.colorado.edu/resources/disinfectants-and-sterilization-methods/>.



92. Van Dolah, FM, 2000, 'Marine Algal Toxins: Origins, Health Effects, and Their Increased Occurrence', *Environ. Health Perspect.* 108 (suppl. 1):133-141 (2000).
93. Waite, TD, Kazumi, J, Lane, PVZ, Farmer, LL, Smith, SG, Smith, SL, Hitchcock, G, Capo, TR, 2003, 'Removal of natural populations of marine plankton by a large-scale ballast water treatment system', *Mar. Ecol. Prog. Ser.* Vol. 258: 51–63.
94. Wankhede, A, 2010, *What is Ballasting and De-ballasting?*, Marineinsight, Προσπελάστηκε 19 Απριλίου 2016, <http://www.marineinsight.com/guidelines/what-is-ballasting-and-de-ballasting/>.
95. Wardell, P, 2011, *Enterococcus faecalis*, bacteria in photos, Προσπελάστηκε 13 Φεβρουαρίου 2016, <http://www.bacteriainphotos.com/Enterococcus%20faecalis%20electron%20microscopy.html>.
96. Williams, RJ, Griffiths, FB, Van der Wal, EJ, Kelly, J, 1988, 'Cargo Vessel Ballast Water as a Vector for the Transport of Non-indigenous Marine Species', *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (1988) 26, pp 409-420.
97. Winter, M, 2016, Aluminium: aluminium oxide ( $\alpha$ ), Προσπελάστηκε 10 Απριλίου 2016, [https://www.webelements.com/compounds/aluminium/dialuminium\\_trioxide\\_alpha.html](https://www.webelements.com/compounds/aluminium/dialuminium_trioxide_alpha.html).
98. Winter, M, 2016, *Silver: crystal structures*, Προσπελάστηκε 10 Απριλίου 2016, [https://www.webelements.com/silver/crystal\\_structure.html](https://www.webelements.com/silver/crystal_structure.html).
99. Wren, R, 2013, '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), Προσπελάστηκε 19 Αυγούστου 2015, [www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA589362](http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA589362).
100. Wu, D, You, H, Zhang, R, Chen, C, Lee, DJ, 2011, 'Ballast waters treatment using UV/Ag–TiO<sub>2</sub> + O<sub>3</sub> advanced oxidation process with *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus* as indicator microorganisms', *Chemical Engineering Journal* 174 (2011), pp 714– 718.
101. Xiu, ZM, Zhang, QB, Puppala, HL, Colvin, VL, Alvarez, PJJ, 2012, 'Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles', *Nano Lett.* 2012, 12, 4271–4275.
102. Xu, Y, Mavrikakis, M, 2001, 'Adsorption and dissociation of O<sub>2</sub> on Cu (111): thermochemistry, reaction barrier and the effect of strain', *Surface Science*, Volume 494, Issue 2, Pages 131–144.



103. Zhang, Y, Peng, H, Huang, W, Zhou, Y, Yana, D, 2008, 'Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles', *Journal of Colloid and Interface Science* 325 (2008) 371–376.
104. Zhang, Z, Verykios, XE, Baerns, M, 2006, 'Effect of Electronic Properties of Catalysts for the Oxidative Coupling of Methane on Their Selectivity and Activity', *Catalysis Reviews* 36(3):507-556.
105. Ευσταθίου, ΑΜ, 2005, *Σημειώσεις Κατάλυσης (XHM-445)*, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.
106. Ευσταθίου, ΑΜ, 2002, *Σημειώσεις Χημικής Τεχνολογίας Ι (XHM 393)*, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.
107. Ευσταθίου, ΑΜ, 2005, *Σημειώσεις Κατάλυσης (XHM 462)*, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.
108. Θεολογίδης, Χ, 2008, 'Εκλεκτική Καταλυτική Απονίτρωση Υδατικών Μέσων με Χρήση H<sub>2</sub> Παρουσία Οξυγόνου σε Στηριζόμενους Καταλύτες Pd-Cu σε Σύστημα Συνεχούς Ροής', Διδακτορική Διατριβή, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.
109. Θεολογίδης, Χ, 2014, *Εργαστηριακή Άσκηση 1 (8): Μικροβιολογικά Υποστρώματα - Έλεγχος της Μικροβιακής Αύξησης - Ασηπτικές Μέθοδοι Εργασίας*, ΕΤΠ 211.Ε, Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Λεμεσός, Κύπρος.
110. Θεολογίδης, Χ, 2014, *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.
111. Θεολογίδης, Χ, 2014, *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.
112. Καλαμαράς, Χ, 2006, 'Μελέτη Στηριζόμενων Καταλυτών Pt, Rh και Pd σε γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ως προς την Αντίδραση Water-Gas Shift', Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.

113. Καραγιάννης, Θ, 2011, ' ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΘΑΛΑΣΣΙΟΥ ΕΡΜΑΤΟΣ ΠΛΟΙΩΝ', *Τεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας – Επιστημονική Επιτροπή Ναυπηγών*, Προσπελάστηκε 12 Ιανουαρίου 2016, [http://library.tee.gr/digital/m2575/m2575\\_karagiannis.pdf](http://library.tee.gr/digital/m2575/m2575_karagiannis.pdf).
114. Κορδούλης, ΧΑ, Λυκουργιώτης, ΑΣ, 2003, 'Κατάλυση', Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, Πάτρα.
115. Κωνσταντίνου, Μ, 2012, 'Μελέτη της Αντίδρασης καταλυτικής αναγωγής νιτρικών και νιτρωδών ιόντων σε νερό με χρήση υδρογόνου (H<sub>2</sub>) παρουσία οξυγόνου (O<sub>2</sub>)', Πτυχιακή εργασία, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.
116. Κώστα, Κ, 2003, 'Εκλεκτική Καταλυτική Αναγωγή NO με χρήση H<sub>2</sub> Παρουσία Περίσσειας Οξυγόνου (lean De-NOx) σε Στηριζόμενους Καταλύτες Pt', Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.
117. Λυκουργιώτης, ΑΣ, 1987, 'Εισαγωγή στην Κατάλυση Επαφής', Τόμος 1, Εκδόσεις Σταμούλη.
118. Πανέρας, Α, 2014, 'ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΝΕΡΟΥ ΕΡΜΑΤΟΣ ΠΛΟΙΟΥ', Πτυχιακή Διατριβή, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Κρήτη.
119. Σάββα, Π, 2001, 'Επίδραση Υποστρώματος στις Καταλυτικές Ιδιότητες Στηριζόμενων Καταλυτών Pt για την αντίδραση NO/H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>', Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.
120. Σάββα, Π, 2008, 'Σύνθεση Νέων Καταλυτών με Εφαρμογές στις Τεχνολογίες H<sub>2</sub> Lean De-NOx και Παραγωγής Καθαρού H<sub>2</sub>, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κύπρου, Κύπρος.
121. Σπυροπούλου, Ε, 2015, 'Φασματοσκοπική μελέτη (XPS) καταλυτικών συστημάτων περιβαλλοντικού και ενεργειακού ενδιαφέροντος - μέταλλα μετάπτωσης (Fe, Co, Ni, Cu) υποστηριγμένα σε οξειδίο του δημητρίου (CeO<sub>2</sub>)', Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης - Σχολή Μηχανικών Παραγωγής και Διοίκησης.
122. Στράτης, ΙΑ, Θεμελής, ΔΓ, Ζαχαριάδης, ΓΑ, Ανθεμίδης, ΑΝ, Οικονόμου, ΑΣ, 2004, *Ενόργανη Χημική Ανάλυση II*, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
123. Υφαντής, Κ, 1999, *Εγχειρίδιο των φυσικών και χημικών μεθόδων ανάλυσης*. Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνου, Αθήνα.