



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΣΧΟΛΗ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΥΔΑΤΙΝΩΝ ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΒΙΟΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΩΝ ΔΙΑΤΑΡΑΚΤΩΝ
ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ**

Κόκκορης Θανάσης

**Επιβλέπων: Αναπληρωτής Καθηγητής
Δ. Μαμάης**

Αθήνα, Νοέμβριος 2015

Ευχαριστίες

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους με βοήθησαν κατά τη διάρκεια εκπόνησής της.

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δανιήλ Μαμάη που μου εμπιστεύτηκε την ανάληψη της συγκεκριμένης εργασίας. Η επιστημονική του καθοδήγηση, συμπαράσταση και η διάθεσή του για συνεργασία συνέβαλαν καταλυτικά στην ολοκλήρωσή της.

Εξαιρετικά σημαντική ήταν η βοήθεια της υποψήφιας διδάκτορος Κορίνας Αντωνίου που με καθοδηγούσε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης, την υποψήφια διδάκτορα Έλενα Κουμάκη που με βοηθούσε όποτε υπήρχε ανάγκη. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους υπόλοιπους εργαζόμενους στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας για το κλίμα συνεργασίας και την προθυμία τους να με συμβουλευσουν σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και στους φίλους μου με στηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια που χρειάστηκαν ώστε να τελειώσω τη φοίτησή μου στη σχολή Πολιτικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Κόκκορης Θανάσης

Νοέμβριος, 2015

Περίληψη

Ολοένα και μεγαλύτερη είναι η ανησυχία της επιστημονικής κοινότητας για την αυξανόμενη συγκέντρωση ενδοκρινικών διαταρακτών και φαρμακευτικών ενώσεων στους υδάτινους αποδέκτες. Έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι ενώσεις διαταράσσουν τα οικοσυστήματα και οφείλονται για πολλές διαταραχές στην υγεία τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της βιοαποδόμησης των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ενώσεων σε αερόβιες, αναερόβιες και ανοξικές συνθήκες, καθώς και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που μπορούν να βιοαποδομήσουν τις συγκεκριμένες ουσίες. Για το σκοπό αυτό διεξήχθησαν πειράματα στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Τεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, τα οποία διήρκησαν 3 μήνες. Μελετήθηκαν οι ενδοκρινικοί διαταράκτες bisphenol-A, triclosan και nonylphenol και οι φαρμακευτικές ενώσεις diclofenac, ibuprofen, naproxen και ketoprofen. Για κάθε μία από τις 3 συνθήκες υπήρχαν 7 καλλιέργειες μικροοργανισμών σε διπλό αντίτυπο (duplicate) καθώς και ένα duplicate που περιείχε μεθανόλη, οποία χρησίμευε για έλεγχο (control batch).

Κάθε εβδομάδα γινόταν εμπλουτισμός των καλλιεργειών με θρεπτικά συστατικά και μετρούνταν το pH, η οπτική πυκνότητα, το οξυγόνο καθώς και τα αμμωνιακά στις αερόβιες, ο δισθενής και τρισθενής σίδηρος στις αναερόβιες και τα νιτρικά στις ανοξικές. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας μετρήθηκε η βιομάζα που είχε αναπτυχθεί, το ποσοστό απομάκρυνσης των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ενώσεων από τις καλλιέργειες καθώς και οι ομάδες μικροοργανισμών που είχαν αναπτυχθεί με τη εφαρμογή της μοριακής μεθόδου FISH.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων προέκυψαν τα εξής βασικά συμπεράσματα: Σε αερόβιες συνθήκες επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη απομάκρυνση των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ενώσεων, ενώ αναπτύσσεται περισσότερη βιομάζα. Επίσης, οι σημαντικότερες ομάδες μικροοργανισμών που φαίνεται να συμμετέχουν στην βιοαποδόμηση των ουσιών είναι τα α-Proteobacteria, γ-Proteobacteria και το φύλο Firmicutes.

Abstract

Increasingly greater is the concern of the scientific community about the increasing concentration of the endocrine disruptors and pharmaceutical compounds in water bodies. It has been shown that these compounds disrupt the ecosystems and are responsible for many health disorders in both human and animals.

The purpose of this study was to evaluate the biodegradation of endocrine disruptors and pharmaceutical compounds in aerobic, anaerobic and anoxic conditions, as well as the identification of microorganisms which can biodegrade these substances. The study was conducted at the Sanitary Engineering Laboratory of the School of Civil Engineering at the National Technical University Athens and lasted 3 months. The endocrine disruptors bisphenol-A, triclosan and nonylphenol and the pharmaceuticals diclofenac, ibuprofen, naproxen and ketoprofen were studied. For each of the three conditions there were seven cultures of microorganisms in duplicate as well as one duplicate that contained methanol, which used for control.

Every week, the cultures were enriched with nutrients and pH, optical density and oxygen were measured, as well as ammonium in aerobic, ferrous and ferric iron in anaerobic and nitrates in anoxic conditions. At the end of the experiment procedure biomass and the percentage of removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals from cultures were evaluated and estimated, which group of microorganisms were developed, with the use of the molecular method FISH.

From the measurement results emerged that the higher percentage of removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals was achieved at aerobic conditions and the higher concentration of biomass was developed. Also, α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria and the phylum Firmicutes seem to participate mostly at the biodegradation of the substances.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	I
Περίληψη.....	II
Abstract	III
Περιεχόμενα	IV
Κατάλογος πινάκων.....	VII
Κατάλογος εικόνων	VIII
Κατάλογος διαγραμμάτων.....	IX
Συντομογραφίες.....	X
Κεφάλαιο 1° – Εισαγωγή.....	1
1.1 Αντικείμενο εργασίας.....	1
1.2 Διάρθρωση εργασίας	2
Κεφάλαιο 2° - Θεωρητικό Μέρος.....	3
2.1 Ενδοκρινικοί Διαταράκτες (EDCs)	3
2.1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των EDCs	4
2.1.2 Μηχανισμοί δράσης των EDCs	4
2.1.3 Επιπτώσεις των EDCs	5
2.2 Φαρμακευτικές ενώσεις.....	7
2.2.1 Διαδρομή των PPCPs στο περιβάλλον	7
2.3 Οι υπό εξέταση χημικές ουσίες στην παρούσα εργασία	9
2.3.1 Δισφαινόλη-A – Bisphenol-A (BPA).....	9
2.3.1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	9
2.3.1.2 Πηγές και χρήσεις.....	10
2.3.1.3 Βιοδιάσπαση της BPA.....	11
2.3.2 Τρικλοζάνη-Triclosan (TCS).....	12
2.3.2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	12
2.3.2.2 Πηγές και χρήσεις.....	13
2.3.2.3 Βιοδιάσπαση της TCS	14
2.3.3 Εννεύλοφαινόλη-Nonylphenol (NP)	15
2.3.3.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	15
2.3.3.2 Πηγές και χρήσεις.....	16
2.3.3.3 Βιοδιάσπαση της NP	16
2.3.4 Δικλοφενάκη-Diclofenac (DCF)	17
2.3.4.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	17
2.3.4.2 Πηγές και χρήσεις.....	18

2.3.4.3 Βιοδιάσπαση της DCF.....	18
2.3.5 Ιβουπροφαίνη-Ibuprofen (IBU).....	19
2.3.5.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	19
2.3.5.2 Πηγές και χρήσεις.....	20
2.3.5.3 Βιοδιάσπαση της IBU.....	20
2.3.6 Ναπροξένη-Naproxen (NPX).....	21
2.3.6.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	21
2.3.6.2 Πηγές και χρήσεις.....	22
2.3.6.3 Βιοδιάσπαση της NPX.....	22
2.3.7 Κετοπροφένη-Ketoprofen (KFN).....	23
2.3.7.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	23
2.3.7.2 Πηγές και χρήσεις.....	24
2.3.7.3 Βιοδιάσπαση της KFN.....	25
2.4 Κατηγορίες μικροοργανισμών.....	25
2.5 Προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί.....	27
2.5.1 Βακτήρια.....	28
2.5.2 Αρχαία.....	30
2.6 Κατηγορίες βακτηρίων που συμβάλουν στη βιοδιάσπαση ενδοκρινικών διαταρακτών και φαρμακευτικών ουσιών.....	31
Κεφάλαιο 3 ^ο – Πειραματικό μέρος.....	39
3.1 Γενικά.....	39
3.2 Παρασκευή καλλιεργειών.....	40
3.2.1 Εισαγωγή.....	40
3.2.2 Αναερόβιες και ανοξικές συνθήκες.....	40
3.2.3 Αερόβιες συνθήκες.....	41
3.3 Συντήρηση καλλιεργειών.....	42
3.4 Υλικά και όργανα.....	42
3.4.1 Υλικά για την παρασκευή και συντήρηση των καλλιεργειών.....	42
3.4.2 Διαλύματα.....	43
3.4.3 Όργανα.....	44
3.4.4 Υλικά και διαδικασία παρασκευής MM και RAMM.....	44
3.4.5 Διαλύματα βιταμινών και S-T.....	46
3.4.6 Trace element mixture.....	46
3.5 Μετρήσεις.....	47
3.5.1 Μέτρηση pH.....	47
3.5.2 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας.....	48

3.5.3 Μέτρηση Fe^{2+}/Fe^{3+}	49
3.5.4 Μέτρηση νιτρικών NO_3-N	49
3.5.5 Μέτρηση αμμωνιακών NH_4-N	50
3.5.6 Μέτρηση O_2	50
3.6 Μέτρηση συγκέντρωσης ουσιών.....	51
3.6.1 Προετοιμασία δειγμάτων για την μέτρηση τους στον αέριο φασματογράφο	51
3.6.1.1 Δείγματα από τις ογκομετρικές φιάλες.....	52
3.6.2 Περιγραφή της λειτουργίας του αέριου φασματογράφου	52
3.7 Μέτρηση TSS/VSS.....	56
3.7.1 Ορισμοί.....	56
3.7.2 Όργανα	56
3.7.3 Διαδικασία μέτρησης.....	56
3.8 Πρωτόκολλο εφαρμογής της μεθόδου Φθορίζουσα Επί τόπου Υβριδοποίηση (Fluorescent in situ Hybridization- FISH).....	59
3.8.1 Εισαγωγή.....	59
3.8.2 Πρωτόκολλο ανάλυσης FISH.....	61
Κεφάλαιο 4° - Αποτελέσματα	65
4.1 Εισαγωγή.....	65
4.2 Αρχικό δείγμα.....	66
4.3 Αερόβιες συνθήκες.....	67
4.3.1 Μεταβολή φυσικοχημικών παραμέτρων	67
4.3.2 Αναγνώριση επικρατέστερων μικροοργανισμών υπό αερόβιες συνθήκες.....	71
4.4 Ανοξικές συνθήκες	77
4.5.1 Μεταβολή φυσικοχημικών παραμέτρων	77
4.5.2 Αναγνώριση επικρατέστερων μικροοργανισμών υπό ανοξικές συνθήκες.....	80
4.5 Αναερόβιες συνθήκες.....	86
4.4.1 Μεταβολή φυσικοχημικών παραμέτρων	86
4.4.2 Αναγνώριση επικρατέστερων μικροοργανισμών υπό αναερόβιες συνθήκες.....	89
4.6 Συγκριτική αξιολόγηση ως προς την επικράτηση των μικροοργανισμών	95
Κεφάλαιο 5° – Συμπεράσματα	98
Κεφάλαιο 6 – Βιβλιογραφία.....	101

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 2.1 Κατηγορίες ουσιών σύμφωνα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες.....	4
Πίνακας 2.2 Παραδείγματα ρύπων και οι αντίστοιχες διαταραχές που προκαλούν στα ζώα	6
Πίνακας 2.3 Διάκριση των εξεταζόμενων ενώσεων	9
Πίνακας 2.4 Ιδιότητες της BPA	10
Πίνακας 2.5 Ιδιότητες της TCS	13
Πίνακας 2.6 Ιδιότητες της NP.....	16
Πίνακας 2.7 Ιδιότητες της TCS	18
Πίνακας 2.8 Ιδιότητες της IBU	20
Πίνακας 2.9 Ιδιότητες της NPX.....	22
Πίνακας 2.10 Ιδιότητες της KFN.....	24
Πίνακας 2.11 Κατηγορίες μικροοργανισμών βάσει των θρεπτικών και ενεργειακών απαιτήσεών τους.....	27
Πίνακας 2.12 Τάξεις των α-Proteobacteria.....	32
Πίνακας 2.13 Τάξεις των β-Proteobacteria.....	34
Πίνακας 2.14 Τάξεις των γ-Proteobacteria	35
Πίνακας 2.15 Ομοταξίες και Τάξεις του φύλου Firmicutes	37
Πίνακας 3.1 Μετρήσεις καλλιεργειών	47
Πίνακας 3.2 Ιχνηλάτες	60
Πίνακας 3.3 Συγκεντρώσεις φορμαμιδίου στο διάλυμα υβριδοποίησης.....	62
Πίνακας 3.4 Συγκέντρωση NaCl και EDTA στο διάλυμα έκπλυσης	63
Πίνακας 4.1 Συντομογραφίες μικροοργανισμών	66
Πίνακας 4.2 pH και οξυγόνο των καλλιεργειών σε αερόβιες συνθήκες.....	68
Πίνακας 4.3 Αποτελέσματα μετρήσεων αμμωνιακών	69
Πίνακας 4.4 Βιομάζα και οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών υπό αερόβιες συνθήκες	70
Πίνακας 4.5 pH των καλλιεργειών υπό ανοξικές συνθήκες	77
Πίνακας 4.6 Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης νιτρικών.....	78
Πίνακας 4.7 Βιομάζα και οπτική πυκνότητα καλλιεργειών υπό ανοξικές συνθήκες ..	80
Πίνακας 4.8 pH των καλλιεργειών υπό αναερόβιες συνθήκες	87
Πίνακας 4.9 Αποτελέσματα τρισθενούς και ολικού σιδήρου	87

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 2.1 (α) Φυσιολογική δράση των ορμονών, (β) Αγωνιστική δράση των EDCs, (γ) Ανταγωνιστική δράση των EDCs.....	5
Εικόνα 2.2 Μοριακή δομή της BPA	10
Εικόνα 2.3. Μοριακή δομή της TCS.....	13
Εικόνα 2.4 Μοριακή δομή της NP.....	15
Εικόνα 2.5 Μοριακή δομή της DCF	17
Εικόνα 2.6 Μοριακή δομή της IBU	19
Εικόνα 2.7 Μοριακή δομή της NPX.....	21
Εικόνα 2.8 Μοριακή δομή της KFN.....	24
Εικόνα 2.9 α) Βακτήριο με Gram-αρνητικό κυτταρικό τοίχωμα, β) Βακτήριο με Gram-θετικό κυτταρικό τοίχωμα	29
Εικόνα 2.10 Το δέντρο της ζωής	30
Εικόνα 2.11 <i>Nitrosomonas europaea</i>	34
Εικόνα 2.12 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Εικόνα 2. 13 <i>Bacillus subtilis</i>	38
Εικόνα 3.1 Αναερόβιες καλλιέργειες (αριστερά), Ανοξικές καλλιέργειες (κέντρο), Αερόβιες καλλιέργειες (δεξιά).....	42
Εικόνα 3.2 Ηλεκτρονικό pH-μετρο	48
Εικόνα 3.3 Φασματοφωτόμετρο	48
Εικόνα 3.4 Αντιδραστήρια HACH Fe ²⁺ /Fe ³⁺	49
Εικόνα 3.5 Αντιδραστήρια HACH NO ₃ -N	50
Εικόνα 3.6 Αντιδραστήρια HACH NH ₄ -N	50
Εικόνα 3.7 Οξυγονόμετρο	51
Εικόνα 3.8 Ξηραντήρας	57
Εικόνα 3.9 Φούρνος των 105 °C.....	58
Εικόνα 3.10 Φούρνος των 550 °C.....	58
Εικόνα 3.11: Διάγραμμα ροής της μεθόδου FISH.....	60

Κατάλογος διαγραμμάτων

Διάγραμμα 4.1 Ποσοστά μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα.....	67
Διάγραμμα 4.2 Απομάκρυνση ουσιών σε αερόβιες συνθήκες	69
Διάγραμμα 4.3 Οπτική πυκνότητα μεθανόλης και ουσιών.....	70
Διάγραμμα 4.4 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες μεθανόλης	71
Διάγραμμα 4.5 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες bisphenol-A.....	72
Διάγραμμα 4.6 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες triclosan.....	73
Διάγραμμα 4.7 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες nonylphenol.....	73
Διάγραμμα 4.8 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες diclofenac	74
Διάγραμμα 4.9 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες ibuprofen	75
Διάγραμμα 4.10 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες naproxen.....	75
Διάγραμμα 4.11 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες ketoprofen	76
Διάγραμμα 4.12 Απομάκρυνση των ουσιών υπό ανοξικές συνθήκες	79
Διάγραμμα 4.13 Οπτική πυκνότητα μεθανόλης και ουσιών.....	79
Διάγραμμα 4.14 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες μεθανόλης	81
Διάγραμμα 4.15 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες bisphenol-A.....	81
Διάγραμμα 4.16 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της triclosan.....	82
Διάγραμμα 4.17 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της nonylphenol	83
Διάγραμμα 4.18 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της diclofenac	83
Διάγραμμα 4.19 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της ibuprofen.....	84
Διάγραμμα 4.20 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της naproxen.....	85
Διάγραμμα 4.21 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της ketoprofen	85
Διάγραμμα 4.22 Απομάκρυνση ουσιών σε αναερόβιες συνθήκες.....	88
Διάγραμμα 4.23 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της μεθανόλης	89
Διάγραμμα 4.24 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της bisphenol-A... ..	90
Διάγραμμα 4.25 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της triclosan.....	90
Διάγραμμα 4.26 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της nonylphenol ..	91
Διάγραμμα 4.27 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της diclofenac	92
Διάγραμμα 4.28 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της ibuprofen.....	92
Διάγραμμα 4.29 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της naproxen.....	93
Διάγραμμα 4.30 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της ketoprofen	94

Συντομογραφίες

ALF	α-Proteobacteria - α-Πρωτεοβακτήρια
APs	Αλκυλοφαινόλες
ARH	Archaea - Αρχαία
BAC	Bacillus - Βάκιλλοι
BET	β-Proteobacteria - β-Πρωτεοβακτήρια
BPA	Bisphenol-A - Δισφαινόλη-A
DCF	Diclofenac - Δικλοφενάκη
DEN	Methanol-utilizing bacteria - Βακτήρια που καταναλώνουν μεθανόλη
EDCs	Endocrine disrupting compounds – ενδοκρινικοί διαταράκτες
EUB	Eubacteria - Βακτήρια
FISH	Fluorescent in-situ hybridization-Φθορίζουσα Επί τόπου Υβριδοποίηση
FRM	Firmicutes
GAM	γ-Proteobacteria - γ-Πρωτεοβακτήρια
IBU	Ibuprofen - Ιβουπροφένη
KFN	Ketoprofen - Κετοπροφένη
MM	Mineral medium
NP	Nonylphenol - Εννεύλοφαινόλη
NPEO	Nonylphenol ethoxylate - αιθοξυλιωμένη εννεύλοφαινόλη
NPX	Naproxen - Ναπροξένη
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug - Μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
NTR	Nitrosomonas
PPCPs	Pharmaceutical and Personal Care Products - φαρμακευτικές ενώσεις και προϊόντα προσωπικής περιποίησης
PSE	Pseudomonas
RAMM	Reduced anaerobic mineral medium
SPH	Sphingomonas
TCS	Triclosan
TSS	Total Suspended Solids-Ολικά αιωρούμενα στερεά
VSS	Volatile Suspended Solids-Πτητικά αιωρούμενα στερεά

Κεφάλαιο 1^ο – Εισαγωγή

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας και της βιομηχανίας, ειδικά τις τελευταίες δεκαετίες, έχει βελτιώσει σε σημαντικό βαθμό τις συνθήκες ζωής του ανθρώπου με την πληθώρα προϊόντων που παράγει. Παράλληλα, όμως, με την ταχεία παραγωγή προϊόντων δημιουργούνται και πολλά υγρά απόβλητα, τα οποία καταλήγουν σε υδάτινους αποδέκτες με αποτέλεσμα τη διαταραχή των οικοσυστημάτων. Όμως, ο άνθρωπος, αλλά και όλοι οι έμβιοι οργανισμοί, είναι άμεσα εξαρτημένοι από το περιβάλλον που ζουν και οι διαταραχές στο περιβάλλον προκαλούν επιπτώσεις στην υγεία τους.

Ένας από τους πολλούς παράγοντες που συμβάλλουν στην υποβάθμιση των οικοσυστημάτων είναι η ανεξέλεγκτη χρήση χημικών. Τα τελευταία χρόνια, το επιστημονικό ενδιαφέρον στρέφεται γύρω από κάποιες συγκεκριμένες ουσίες που έχει αποδειχτεί πως οφείλονται για πολλά προβλήματα υγείας του ανθρώπου. Τέτοιες ουσίες είναι οι ενδοκρινικοί διαταράκτες και οι φαρμακευτικές ενώσεις, οι οποίες είτε περιέχονται στα χιλιάδες προϊόντα που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος, όπως πλαστικά, καλλυντικά, απορρυπαντικά κ.τ.λ. είτε περιέχονται στα φάρμακα.

Αυτές οι ουσίες τις περισσότερες φορές καταλήγουν στις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων. Έχει αποδειχθεί όμως ότι η ικανότητα απομάκρυνσης αυτών των ουσιών από τέτοια συστήματα είναι μικρή με αποτέλεσμα τελικά να καταλήγουν στο περιβάλλον. Οι ποσότητες που καταλήγουν είναι πολύ μικρές αλλά τα προβλήματα που προκαλούν είναι πολύ σημαντικά. Έχουν μελετηθεί διάφοροι τρόποι απομάκρυνσης τέτοιων ουσιών, όπως η χρήση ενεργού άνθρακα και η χρήση ακτινοβολίας UV, όμως λίγες πληροφορίες υπάρχουν σχετικά με την τύχη τους στο υδάτινο περιβάλλον

1.1 Αντικείμενο εργασίας

Στα πλαίσια του ενδιαφέροντος που έχει δημιουργηθεί για τους ενδοκρινικούς διαταράκτες και τις φαρμακευτικές ενώσεις, εκπονήθηκε η παρούσα διπλωματική

εργασία στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Τεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου. Αντικείμενο της εργασίας ήταν η μελέτη της ικανότητας βιοαποδόμησης αυτών των ουσιών σε αερόβιες, αναερόβιες και ανοξικές συνθήκες, καθώς και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που μπορούν να βιοαποδομήσουν τις συγκεκριμένες ουσίες..

1.2 Διάρθρωση εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελείται συνολικά από πέντε κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο περιλαμβάνεται η εισαγωγή, το αντικείμενο και η διάρθρωση της εργασίας.

Το δεύτερο περιλαμβάνει το θεωρητικό μέρος, όπου γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση για τις δυο ομάδες ουσιών που εξετάζονται. Ακολουθεί η περιγραφή των ιδιοτήτων κάθε ένωσης ξεχωριστά. Αναλύονται, επίσης, οι σημαντικότερες κατηγορίες μικροοργανισμών που βιοαποδομούν τις ουσίες σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Το τρίτο κεφάλαιο ασχολείται με το πειραματικό μέρος όπου περιγράφονται οι μικρόκοσμοι που παρασκευάστηκαν και όλες οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται η παρουσίαση των αποτελεσμάτων όπως προέκυψαν από την πειραματική διαδικασία. Παρουσιάζονται οι μικροοργανισμοί που μετρήθηκαν για κάθε ένωση ξεχωριστά και για τις τρεις συνθήκες (αερόβιες, αναερόβιες, ανοξικές) και σχολιάζονται τα αποτελέσματα.

Το πέμπτο κεφάλαιο περιλαμβάνει τα συμπεράσματα, όπου γίνεται η συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων υπό τρεις διαφορετικές σκοπιές, ως προς τις ουσίες που βιοαποδομούνται, ως προς τους μικροοργανισμούς που τις βιοαποδομούν και ως προς τις τρεις συνθήκες των πειραμάτων.

Τέλος, παρουσιάζεται η βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα διπλωματική εργασία.

Κεφάλαιο 2^ο - Θεωρητικό Μέρος

2.1 Ενδοκρινικοί Διαταράκτες (EDCs)

Τα ζώα και τα φυτά, αλλά και ο άνθρωπος, έχουν ένα σύστημα παραγωγής χημικών ουσιών, τις ορμόνες, οι οποίες μεταβιβάζουν πληροφορίες μεταξύ των κυττάρων και ελέγχουν ποικίλες βασικές λειτουργίες των οργανισμών, όπως η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη και η συντήρηση. Ο άνθρωπος και τα ζώα χρησιμοποιούν διάφορους αδένες για να παράξουν τις ορμόνες, οι οποίες στη συνέχεια μεταφέρονται στα όργανα που παραλαμβάνουν την πληροφορία. Όμως, υπάρχουν χημικές ουσίες που μιμούνται τις ορμόνες και παρεμβαίνουν στο ενδοκρινικό σύστημα των οργανισμών με αποτέλεσμα να προκαλούνται ανεπιθύμητες αντιδράσεις ή διαταραχές, επηρεάζοντας την υγεία, την σωστή ανάπτυξη και την αναπαραγωγική τους ικανότητα. Αυτές οι ουσίες ονομάζονται ενδοκρινικοί διαταράκτες (Endocrine Disrupting Compounds-EDCs) (Birkett and Lester, 2003). Σύμφωνα με τον ορισμό που δόθηκε από την Αμερικανική Εταιρία Προστασίας Περιβάλλοντος (U.S. Environmental Protection Agency-EPA) ο ενδοκρινικός διαταράκτης είναι ένας εξωγενής παράγοντας, που επεμβαίνει στη σύνθεση, έκκριση, μεταβολισμό, δεσμευτική ικανότητα ή απέκκριση των φυσικών ορμονών του σώματος, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ομοιόσταση, την αναπαραγωγή και την ανάπτυξη (<http://www2.epa.gov/>).

Το πρόβλημα των ενδοκρινικών διαταρακτών άρχισε να γίνεται εμφανές ήδη από τις αρχές του 1900, αλλά τα τελευταία χρόνια έχει έρθει στο προσκήνιο ως ένα σοβαρό θέμα για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία, προκαλώντας μεγάλο ενδιαφέρον και προσοχή στην επιστημονική κοινότητα παγκοσμίως (Birkett and Lester, 2003). Υπάρχουν, όμως, διάφορες απόψεις μεταξύ των επιστημόνων σχετικά με το αν τελικά επηρεάζουν το ενδοκρινολογικό σύστημα των οργανισμών. Πολλοί πιστεύουν πως η έκθεση σε μικρές ποσότητες αυτών των ουσιών δεν είναι ανησυχητική. Από την άλλη μεριά, οι επιστήμονες υποστηρίζουν πως οι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι επικίνδυνοι κυρίως για τα έμβρυα, τα βρέφη και τα παιδιά μικρής ηλικίας που βρίσκονται σε κρίσιμο αναπτυξιακό στάδιο και πιθανότατα να αποκτήσουν μόνιμη βλάβη στο ορμονικό τους σύστημα (Colborn et al., 1993).

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες περιέχονται σε πολλά προϊόντα της καθημερινής μας χρήσης, όπως πλαστικά μπουκάλια, πλαστικά παιδικά παιχνίδια, καλλυντικά, απορρυπαντικά, φυτοφάρμακα, εντομοκτόνα και παρασιτοκτόνα, ακόμα και είδη κλωστοϋφαντουργίας (Rahman Kabir, et al., 2015; Hampl, et al., 2014). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το παρασιτοκτόνο DDT, το οποίο ξεκίνησε να χρησιμοποιείται ευρέως μετά το 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο. Πλέον, όμως, η χρήση του έχει απαγορευτεί, καθώς διαπιστώθηκε πως προκαλεί διαταραχές στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών και των πουλιών (Birkett and Lester, 2003).

2.1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των EDCs

Η τύχη και η συμπεριφορά των EDCs επηρεάζονται από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Λόγω των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, οι περισσότεροι ενδοκρινικοί διαταράκτες τείνουν να προσροφούνται σε στερεές επιφάνειες ή σε μικροοργανισμούς. Η προσρόφηση αυτών των ουσιών εξαρτάται από τη διαλυτότητά τους και από τους συντελεστές προσρόφησης. Για να είναι εφικτή απαιτείται μικρή διαλυτότητα στο νερό και μεγάλο συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού (K_{ow}) ή συντελεστή κατανομής άνθρακα/νερού (K_{oc}).

Πίνακας 2.1 Κατηγορίες ουσιών σύμφωνα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες

ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΗ ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	ΧΑΜΗΛΗ	ΜΕΣΗ	ΥΨΗΛΗ
Υδατοδιαλυτότητα	Διάλυση (mg/L)	<1	—	1000
Σταθερά Henry	Εξάτμιση (atm*m ³ /mol)	>10 ⁻²	10 ⁻² -10 ⁻⁷	<10 ⁻⁷
K_{oc}	Προσρόφηση (log K_{oc})	<3	—	>3
K_{ow}	Βιοσυσσώρευση (log K_{ow})	<2,5	>2,5- <4	>4

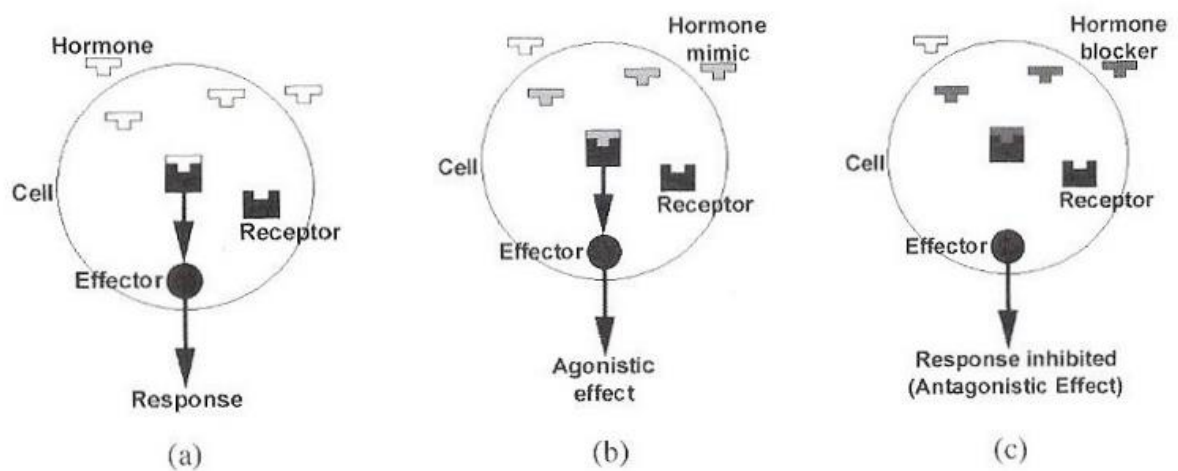
Πηγή: (Birkett and Lester, 2003)

2.1.2 Μηχανισμοί δράσης των EDCs

Ένας ενδοκρινικός διαταράκτης μπορεί να δράσει με ένα από τους παρακάτω τρόπους:

1. Πρόσδεση και ενεργοποίηση του υποδοχέα των οιστρογόνων (estrogen receptor) και ως εκ τούτου να δρα ως οιστρογόνο (διεγερτική επίδραση, Εικόνα 2.1β)

2. Πρόσδεση αλλά όχι ενεργοποίηση του υποδοχέα με αποτέλεσμα να μην παράγεται η επιθυμητή ορμόνη (ανταγωνιστική επίδραση, Εικόνα 2.1γ)
3. Πρόσδεση σε άλλο υποδοχέα
4. Τροποποίηση του μεταβολισμού των φυσικών ορμονών
5. Τροποποίηση του αριθμού των υποδοχέων σε ένα κύτταρο
6. Τροποποίηση της παραγωγής των φυσικών ορμονών (Vlachogianni, et al., 2013)



Εικόνα 2.1 (α) Φυσιολογική δράση των ορμονών, (β) Αγωνιστική δράση των EDCs, (γ) Ανταγωνιστική δράση των EDCs (Πηγή: Birkett and Lester, 2003)

2.1.3 Επιπτώσεις των EDCs

Λόγω της εκτεταμένης χρήσης των ενδοκρινικών διαταρακτών σε πολλά προϊόντα της καθημερινής μας χρήσης, ο άνθρωπος έρχεται συνεχώς σε επαφή με αυτούς, το οποίο έχει αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία του. Πιο συγκεκριμένα, οι μεταβολές στο ορμονικό σύστημα παρατηρούνται κυρίως στο αναπαραγωγικό σύστημα και εκδηλώνονται στους οργανισμούς με περιστατικά υπογεννητικότητας, διαταραχές των σεξουαλικών ορμονών, θηλεοποίηση των αρσενικών ατόμων, αποβολές εμβρύων, αλλά και εγκεφαλικές δυσλειτουργίες, μείωση της προστασίας του ανοσοποιητικού συστήματος, ακόμα και εμφάνιση καρκίνου (Nicolopoulou-Stamati et al., 2001).

Διαταραχές, όμως, έχουν παρατηρηθεί και στα ζώα, η πλειοψηφία των οποίων περιλαμβάνει αναπαραγωγικές και αναπτυξιακές ανωμαλίες, που πιθανόν συντελούν

στη μείωση του πληθυσμού. Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα ρύπων και πώς επηρεάζουν τα ζώα.

Πίνακας 2.2 Παραδείγματα ρύπων και οι αντίστοιχες διαταραχές που προκαλούν στα ζώα

ΕΙΔΟΣ	ΡΥΠΟΣ	ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ
Θηλαστικά		
Πάνθηρας	Hg, DDE, PCB	κρυσορχία
Βαλτική φώκια	PCBs	στεριότητα, υπερπλασία του φλοιού των επινεφριδίων
Φάλανα γένους Beluga	PCBs, Dieldrin, 2,3,7,8-TCDD	ερμαφροδιτισμός
Ευρωπαϊκή βίδρα	PCBs	αναπαραγωγική εξασθένιση
Πουλιά		
Δυτικός γλάρος	DDT	θηλεοποίηση
Πετρίτης	DDE	λέπτυνση του κελύφους του αυγού
Ψαροφάγα πουλιά	PCDD, PCDF	αποτυχία αναπαραγωγής, παραμόρφωση
Θαλάσσια χελιδόνια	PHAHs	μείωση εκκόλαψης, μορφολογικές ανωμαλίες
Ερπετά		
Χελώνα γένους Chelydra serpentina	οργανοχλωριούχες ενώσεις	αναπτυξιακές ανωμαλίες, θυλεοποίηση
Αμερικανικός αλιγάτορας	DDE	χαμηλή απόδοση εκκόλαψης, ανωμαλίες σε αρσενικά και θηλυκά
Ψάρια		
Ασπρόψαρο	στεροειδή οιστρογόνα	αυξημένη βιτελλογενίνη στα αρσενικά ψάρια
Πλευρονήκτης	nonylphenol, octylphenol	βιτελλογενίνη στα αρσενικά ψάρια
Ιριδίζουσα πέστροφα	nonylphenol, οιστρογόνα	βιτελλογενίνη στα αρσενικά ψάρια

[Πηγή: Birkett and Lester, 2003]

2.2 Φαρμακευτικές ενώσεις

Τα φάρμακα (Pharmaceutical and Personal Care Products - PPCPs) είναι χημικές ενώσεις τις οποίες έχει δημιουργήσει ο άνθρωπος με στόχο τη θεραπεία και την πρόληψη ασθενειών. Τα φάρμακα έχουν συμβάλει, σαφώς, στη βελτίωση της υγείας του ανθρώπου και στην αντιμετώπιση πολλών ασθενειών που παλιότερα ήταν θανατηφόρες. Ο μέσος όρος ζωής, επίσης, έχει αυξηθεί κατά πολύ σε σχέση με τα παλιότερα χρόνια. Για τους ίδιους λόγους χρησιμοποιούνται και στα ζώα.

Στα PPCPs περιλαμβάνονται:

- Συνταγογραφούμενα φάρμακα
- Κτηνιατρικά φάρμακα
- Καλλυντικά
- Αρώματα
- Αντηλιακά
- Διαγνωστικές ουσίες
- Συμπληρώματα διατροφής (π.χ. βιταμίνες) (U.S. Environmental Protection Agency)

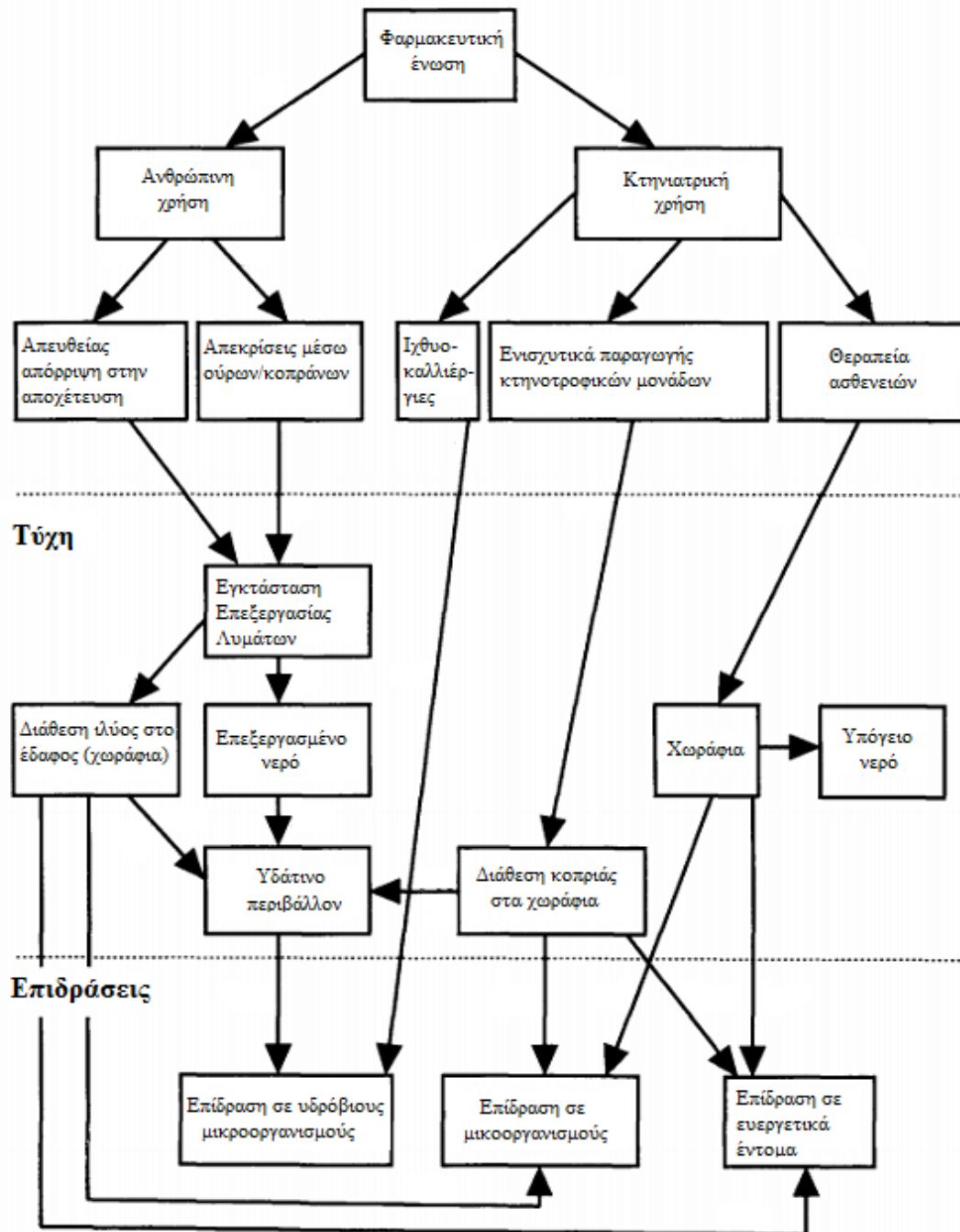
Τα φάρμακα, όμως, περιέχουν πολλούς χημικούς ρύπους, οι οποίοι είναι βλαβεροί για το περιβάλλον, όταν καταλήγουν σ' αυτό. Νοσοκομειακά απόβλητα, ανθρώπινη χρήση, απεκκρίσεις στο δίκτυο, παράνομα φάρμακα, καθώς και χρήση σε κτηνοτροφικές μονάδες είναι οι συνήθεις τρόποι με τους οποίους καταλήγουν τα φάρμακα στο υδάτινο περιβάλλον.

Είναι γνωστό ότι τα φάρμακα είναι ανθεκτικά για να διατηρούν τη δομή τους και να μπορούν να επιτελούν τον σκοπό τους, τη θεραπεία, δηλαδή, των ασθενειών. Αυτό, όμως, έχει σαν αποτέλεσμα να μη βιοδιασπώνται εύκολα και να παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο περιβάλλον, διαταράσσοντας το οικοσύστημα.

2.2.1 Διαδρομή των PPCPs στο περιβάλλον

Εκατοντάδες τόνοι φαρμάκων παράγονται κάθε χρόνο παγκοσμίως. Οι φαρμακευτικές ουσίες μεταβολίζονται σχεδόν εξ' ολοκλήρου στο ήπαρ. Όμως, παράγονται μεταβολίτες, επικίνδυνοι για το περιβάλλον, στο οποίο και θα

καταλήξουν μέσω του ουροποιητικού συστήματος και κατ' επέκταση των αποχετεύσεων. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2.1) παρουσιάζεται η διαδρομή των φαρμακευτικών ενώσεων κατά την ανθρώπινη και την κτηνιατρική χρήση μέχρι να καταλήξουν στο περιβάλλον (Halling-Sorensen, et al., 1997).



Σχήμα 2.1 Η διαδρομή των φαρμακευτικών ενώσεων μέχρι να καταλήξουν στο περιβάλλον [Πηγή: Halling-Sorensen, et al., 1997]

2.3 Οι υπό εξέταση χημικές ουσίες στην παρούσα εργασία

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν συνολικά επτά χημικές ενώσεις. Οι ενώσεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στους ενδοκρινικούς διαταράκτες και τις φαρμακευτικές ενώσεις.

Πίνακας 2.3 Διάκριση των εξεταζόμενων ενώσεων

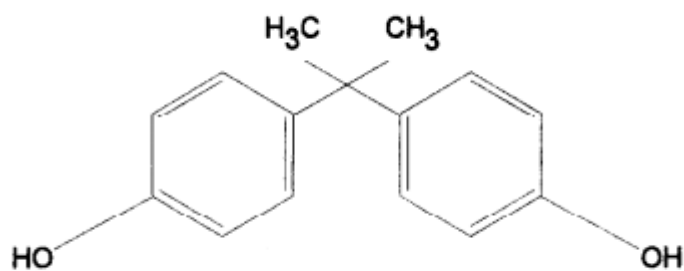
Ενδοκρινικοί Διαταράκτες	Φαρμακευτικές Ενώσεις
<i>bisphenol-A (BPA)</i>	<i>diclofenac (DCF)</i>
<i>triclosan (TCS)</i>	<i>ibuprofen (IBU)</i>
<i>nonylphenol (NP)</i>	<i>naproxen (NPX)</i>
	<i>ketoprofen (KFN)</i>

Στη συνέχεια ακολουθεί περιγραφή της κάθε ένωσης.

2.3.1 Δισφαινόλη-A – Bisphenol-A (BPA)

2.3.1.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η Bisphenol-A (BPA) ανήκει στην κατηγορία των ενδοκρινικών διαταρακτών. Ο χημικός της τύπος είναι $C_{15}H_{16}O_2$ και η ονομασία της κατά IUPAC 4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol. Η BPA είναι μία οργανική ένωση και αποτελείται από δύο δακτυλίους φαινόλης που ενώνονται μεταξύ τους μέσω δύο συνδεδεμένων μεθυλίων (Kang, et al., 2005). Είναι άχρωμο στερεό, διαλύεται εύκολα σε οργανικούς διαλύτες, αλλά ελάχιστα στο νερό. Για πρώτη φορά παρασκευάστηκε από το Ρώσο χημικό A.P. Dianin το 1891, ενώ έχει τεθεί σε εμπορική χρήση από το 1957. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της BPA φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.



Εικόνα 2.2 Μοριακή δομή της BPA [Πηγή: Staples, et al., 1998]

Πίνακας 2.4 Ιδιότητες της BPA

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ BPA	
Χημικός τύπος	$C_{15}H_{16}O_2$
Μοριακό βάρος	228 g/mol
Ειδικό βάρος	1,060-1,195 g/cm ³ στους 20-25 °C
Σημείο βρασμού	220 °C στα 4 mm Hg
Σημείο τήξης	150-155 °C
Υδατοδιαλυτότητα	120-300 μg/L στους 20-25 °C
Τάση ατμών	$8,7 \cdot 10^{-10}$ - $3,96 \cdot 10^{-7}$ mm Hg στους 20-25 °C
pKa	9,59-11,30

[Πηγή: Staples, et al., 1998]

2.3.1.2 Πηγές και χρήσεις

Η BPA είναι μία χημική ένωση που παράγεται σε μεγάλες ποσότητες και εντοπίζεται τόσο σε βιομηχανικό όσο και σε οικιακό επίπεδο. Ως πρώτη ύλη, η BPA, χρησιμοποιείται ευρέως στην παραγωγή πολυανθρακικών πλαστικών, εποξικών ρητινών, πολυεστερικών ρητινών και άλλων πολυμερών υλικών αλλά και ως επιβραδυντικό φλόγας (Huang, et al., 2015 ; Li, et al., 2012). Η BPA, όμως, υπάρχει

και σε πολλά προϊόντα καθημερινής χρήσης όπως σακουλές αποθήκευσης φαγητού, μπιμπερό, κονσέρβες, οπτικούς δίσκους CDs, βερνίκια, φιάλες, φακούς επαφής, παιχνίδια καθώς και άλλα πλαστικά προϊόντα που χρησιμοποιούμε καθημερινά (Kang, et al., 2005; Michałowicz, et al., 2015; Staples, et al., 1998). Ανήκει στις χημικές ενώσεις με το μεγαλύτερο όγκο παραγωγής και υπολογίζεται ότι παράγονται ετησίως περίπου 3 εκατομμύρια τόνοι σε όλο τον πλανήτη (Zhang, et al., 2013).

Η BPA μπορεί να καταλήξει στο περιβάλλον με τους εξής τρόπους:

1. Εκροές από τις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων (ΕΕΛ) σε υδάτινους αποδέκτες
2. Διάθεση οικιακών απορριμμάτων σε Χώρους Ανεξέλεγκτης Διάθεσης Απορριμμάτων (Χ.Α.Δ.Α.)
3. Εκροές από βιομηχανίες που παράγουν τη BPA ή τη χρησιμοποιούν ως πρώτη ύλη για την παραγωγή άλλων προϊόντων
4. Στραγγίδια από Χώρους Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων (Χ.Υ.Τ.Α.)

2.3.1.3 Βιοδιάσπαση της BPA

Από την έρευνα των Kang και Kondo (2002) αποδείχθηκε ότι η BPA είναι εύκολα βιοδιασπάσιμη σε αερόβιες συνθήκες. Ο χρόνος ημίσειας ζωής για την αποδόμηση της BPA κυμαινόταν από 2 έως 3 μέρες στα τρία δείγματα του πειράματος, ενώ η συγκέντρωσή της ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης τη δέκατη μέρα (< 0,005 mg/L). Επιπλέον παρατηρήθηκαν βακτήρια με υψηλή ικανότητα διάσπασης της BPA, τα οποία ανήκαν στο γένος *Pseudomonas*. Δεν υπήρχαν, όμως, παρόμοια αποτελέσματα στα δείγματα όπου επικρατούσαν αναερόβιες συνθήκες. Ο βαθμός απομάκρυνσης της BPA ήταν μικρότερος από 10% σε διάστημα 10 ημερών.

Άμεση εμφάνιση βιοδιάσπασης της BPA και χρόνος ημίσειας ζωής ίσος με 14,5 ημέρες σε δείγματα από θαλάσσια ιζήματα υπό αερόβιες συνθήκες αναφέρθηκε από τους Ying και Kookana (2003). Παρατήρησαν, όμως, μια χρονική καθυστέρηση 35 ημερών ως προς την έναρξη βιοδιάσπασης της BPA σε δείγματα θαλασσινού νερού και η χημική ένωση αποδομήθηκε σχεδόν πλήρως σε 56 ημέρες σε αερόβιες συνθήκες.

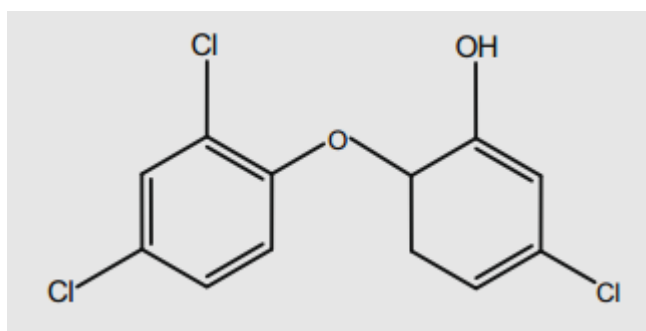
Οι Sakai et al., (2007) χρησιμοποίησαν στα πειράματά τους βακτήρια για να μελετήσουν τη βιοδιάσπαση της BPA και συγκεκριμένα τα στελέχη *Sphingomonas* sp. strain BP-7 και *Pseudomonas* sp. strain BP-14, τα οποία απομόνωσαν από θαλασσινό νερό. Το *Sphingomonas* sp. strain BP-7 άρχισε να αναπτύσσεται ύστερα από 20 ημέρες καλλιέργειας καταναλώνοντας ταυτόχρονα τη BPA. Σε 40 ημέρες είχε διασπαστεί πάνω από 95% της ουσίας. Αντίθετα, το *Pseudomonas* sp. strain BP-14 δε βιοδιέσπασε τη BPA και παρουσίασε μικρή ανάπτυξη, ενώ σε δείγμα που περιείχε και τα δύο βακτήρια η BPA διασπάστηκε σε 7 ημέρες.

Οι Li et al. (2012), απομόνωσαν και χρησιμοποίησαν το βακτήριο *Bacillus* sp. GZB για διάσπαση της BPA σε ανοξικές, αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες. Χρησιμοποιώντας NO_3^- ως δέκτη ηλεκτρονίων (ανοξικές συνθήκες) δεν υπήρχε σχεδόν καθόλου απομάκρυνση της BPA, ενώ στα δείγματα που προστέθηκε Fe^{3+} (αναερόβιες συνθήκες) υπήρχε ικανοποιητική βιοαποδόμηση. Σε αερόβιες συνθήκες, στα δείγματα υπήρχε απομάκρυνση της BPA που κυμαινόταν από 81,6% έως και 100% για διάφορες τιμές pH.

2.3.2 Τρικλοζάνη-Triclosan (TCS)

2.3.2.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η Triclosan (TCS) είναι η δεύτερη υπό εξέταση ένωση, η οποία ανήκει στην κατηγορία των ενδοκρινικών διαταρακτών. Η ονομασία της κατά IUPAC είναι 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol και ο χημικός της τύπος είναι $\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}_2$. Είναι χλωριωμένη αρωματική ένωση και περιέχει τις χαρακτηριστικές ομάδες των φαινολών και των αιθέρων. Πρόκειται για μία υδρόφοβη ένωση με αντιμικροβιακή δράση, η οποία προσροφάται εύκολα σε κάποιο οργανικό υλικό (Cantwell et al., 2010). Συναντάται με τη μορφή λευκής σκόνης και έχει αρωματική οσμή. Η TCS διαλύεται εύκολα σε οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη), λιγότερο σε αραιά αλκαλικά διαλύματα και ελάχιστα στο νερό. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της TCS φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.



Εικόνα 2.3. Μοριακή δομή της TCS [Πηγή: Chen, et al., 2009]

Πίνακας 2.5 Ιδιότητες της TCS

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ TCS	
Χημικός τύπος	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
Μοριακό βάρος	289,54
Ειδικό βάρος	1,51-1,59 g/cm ³
Σημείο βρασμού	373,62 °C
Σημείο τήξης	56-58 °C
Υδατοδιαλυτότητα	4,612 mg/L
Τάση ατμών	4*10 ⁻⁶ mmHg στους 20°C
pKa	8,14 στους 20 °C
Kow	4,76 στους 20 °C

[Πηγή: Orhon, et al., 2014; Chen, et al., 2009]

2.3.2.2 Πηγές και χρήσεις

Η TCS είναι ένας αντιμικροβιακός παράγοντας ευρέως φάσματος, η οποία δρα αναστέλλοντας τη βακτηριακή βιοσύνθεση των λιπιδίων. Λόγω της αποτελεσματικότητάς της και της θερμικής της σταθερότητας, η TCS ενσωματώνεται σε πλήθος φαρμακευτικών προϊόντων και προϊόντων προσωπικής υγιεινής, όπως

σαπούνια, οδοντόκρεμες, αντισηπτικά, καλλυντικά και απορρυπαντικά (Lee G., et al., 2013). Εξαιτίας αυτής της ευρείας εφαρμογής, όμως, η TCS εντοπίζεται σε μεγάλο αριθμό περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπως νερά ποταμών, υπόγεια νερά, ιζήματα, σε έμβιους οργανισμούς, ακόμα και στο μητρικό γάλα. Έχει ανιχνευθεί, επίσης, σε γεωργικά εδάφη ύστερα από την απόθεση βιολογικής ιλύος από Εγκατάσταση Επεξεργασίας Λυμάτων (Kim, et al., 2011).

2.3.2.3 Βιοδιάσπαση της TCS

Η TCS που καταλήγει στις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων έχει συνήθεις συγκεντρώσεις από 1-10 $\mu\text{g/L}$. Ο βαθμός απομάκρυνσής της είναι περίπου 90%, από το οποίο, το 40-60% οφείλεται στη βιοδιάσπαση, ενώ το υπόλοιπο προσροφάται στη λάσπη (Chen, et al., 2011). Οι Chen et al., μελέτησαν τη βιοδιάσπαση της TCS σε αερόβιες, αναερόβιες και ανοξικές συνθήκες. Μετά από 80 ώρες, η αρχική συγκέντρωση μειώθηκε σημαντικά στις αερόβιες συνθήκες από 30 $\mu\text{g/L}$ σε 15 $\mu\text{g/L}$, ενώ στις αναερόβιες και ανοξικές μειώθηκε μόνο από 32 $\mu\text{g/L}$ σε 28 $\mu\text{g/L}$ και από 32 $\mu\text{g/L}$ σε 29 $\mu\text{g/L}$, αντίστοιχα.

Σε μελέτη των Lee, et al. (2013), βρέθηκε ότι κατά τη διαδικασία της βιοδιάσπασης της TCS αναπτύχθηκαν 11 αλληλουχίες γονιδιώματος που ανήκαν σε 3 γένη βακτηρίων, 1 αλληλουχία στο γένος *Deffluvibacter* της οικογένειας α -Proteobacteria, 7 αλληλουχίες στο γένος *Alicyclophilus* της οικογένειας β -Proteobacteria και 3 στο γένος *Stenotrophomonas* της οικογένειας γ -Proteobacteria.

Οι Kim et al. (2011) μελέτησαν τη βιοδιάσπαση της TCS από τρία βακτήρια, τα οποία ήταν το *Sphingomonas wittichii* RW1, το *Burkholderia xenovorans* LB400 και το *Sphingomonas* sp. PH-07. Τα πειράματά τους έδειξαν πως μόνο το βακτήριο του γένους *Sphingomonas* sp. PH-07 μεταβόλιζε την TCS σε ενδιάμεσα προϊόντα που περιελάμβαναν υδροξυλιωμένες ενώσεις (μονοϋδροξυ-triclosan και διϋδροξυ-triclosan).

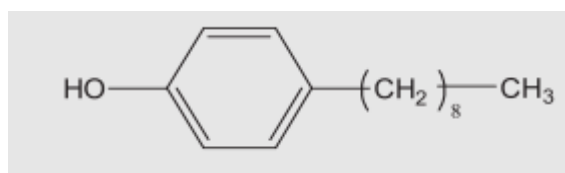
Οι Lolas et al (2012) διεξήγαγαν, επίσης, πειράματα για τη βιοδιάσπαση της triclosan σε αερόβιες συνθήκες. Ύστερα από τον εμπλουτισμό των καλλιιεργειών με 2 mg/L TCS, η βιοδιάσπασή της ξεκινούσε αμέσως και η συγκέντρωσή της μειωνόταν

σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα (<3 ng/L) μέσα σε 90 ώρες. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο FISH (fluorescent in-situ hybridization) προσδιόρισαν πως το βακτήριο του γένους *Methylobacillus* είχε αναπτυχθεί στις καλλιέργειες και χρησιμοποίησε την TCS ως πηγή άνθρακα. Με τη μέθοδο MAR (microautoradiography), όμως, δεν μπόρεσαν να προσδιορίσουν τα βακτήρια *Methylobacillus*, αλλά στελέχη του γένους *Stenotrophomonas*, γεγονός που υποδεικνύει πως υπάρχει ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών που βιοαποδομούν την TCS.

2.3.3 Εννεύλοφαινόλη-Nonylphenol (NP)

2.3.3.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η nonylphenol (NP), οποία κατά IUPAC ονομάζεται 4-(2,4-dimethylheptan-3-yl)phenol ανήκει στην οικογένεια των αλκυλοφαινολών (APs). Η NP μπορεί να προέρχεται από τη σταδιακή διάσπαση των αιθοξυλιωμένων εννεύλοφαινολών (nonylphenol ethoxylate-NPEOs), όταν αυτές καταλήξουν είτε σε Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων είτε στο υδάτινο περιβάλλον (Wang, et al., 2014). Είναι γενικά υδρόφοβες ενώσεις με λιποφιλική συμπεριφορά και έχουν την τάση να προσροφόνται στο έδαφος (Ying, et al., 2002). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της NP φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.



Εικόνα 2.4 Μοριακή δομή της NP [Πηγή: Yu, et al., 2007]

Πίνακας 2.6 Ιδιότητες της NP

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ NP	
Χημικός τύπος	C ₁₅ H ₂₄ O
Μοριακό βάρος	220 g/mol
Ειδικό βάρος	0,953 g/cm ³
Σημείο βρασμού	290-320 °C
Σημείο τήξης	-8 °C
Υδατοδιαλυτότητα	1,6 mg/L στους 20 °C
Τάση ατμών	2,4*10 ⁻⁵ mm Hg
pKa	10,25
Kow	4,48

[Πηγές: Yu, et al., 2007; Sarmah, et al., 2008]

2.3.3.2 Πηγές και χρήσεις

Οι NPs είναι ουσίες με ευρεία οικιακή και βιομηχανική χρήση. Χρησιμοποιούνται σε απορρυπαντικά, καλλυντικά, χρώματα, καθαριστικά για μηχανικά μέρη αλλά και ως γαλακτωματοποιητές. Τις συναντάμε, επίσης, στη γεωργία σε ζιζανιοκτόνα και εντομοκτόνα. Η κατάληξη αυτών των ουσιών είναι στο υδάτινο περιβάλλον, είτε άμεσα είτε μέσω Εγκαταστάσεων Επεξεργασίας Λυμάτων (Planas, et al., 2002).

2.3.3.3 Βιοδιάσπαση της NP

Σύμφωνα με τους Di Gioia et al. (2007) οι NPs δύσκολα βιοδιασπώνται και όχι πλήρως, πιθανώς λόγω της λιποφιλικής τους συμπεριφοράς που τις καθιστούν λιγότερο προσβάσιμες σε στους μικροοργανισμούς. Σε πείραμα που διεξήγαγαν απομόνωσαν το βακτήριο *Pseudomonas putida* και παρατήρησαν ότι μπορούσε να διασπάσει τις αιθοξυλιωμένες εννεύαλοφαινόλες (NPnEO) αλλά όχι την NP.

Οι Wang et al. (2014), απομόνωσαν 2 βακτήρια από ιζήματα ποταμού για να μελετήσουν τη βιοδιάσπαση της NP. Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι το ένα

βακτήριο ανήκει στο γένος *Rhizobium* και το άλλο στο γένος *Sphingobium*. Και τα δύο έδειξαν σημαντική ικανότητα στη βιοδιάσπαση της NP.

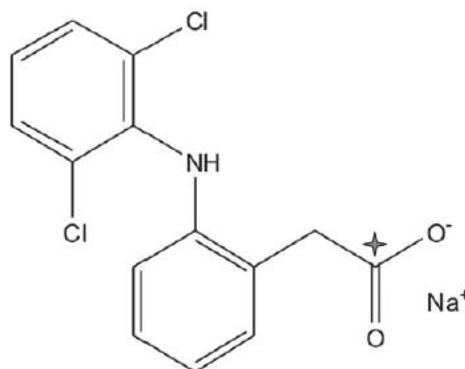
Οι Ying et al. (2008) διεξήγαγαν, επίσης, πειράματα για να μελετήσουν τη βιοδιασπασιμότητα της NP σε αερόβιες και σε ανοξικές συνθήκες, χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς που περιείχονταν σε λύματα. Παρατήρησαν πως όλη η ποσότητα της NP είχε διασπαστεί σε 21 ημέρες με το χρόνο ημίσειας ζωής να κυμαίνεται σε μόλις λίγες ημέρες στις αερόβιες συνθήκες, ενώ αντίθετα στις ανοξικές συνθήκες δεν υπήρχε σημαντικά μείωση της συγκέντρωσης της αρχικής ποσότητας της NP.

Τη βιοδιάσπαση της NP μελέτησαν και οι Yuan et al. (2004) σε αερόβιες συνθήκες. Στα πειράματά τους φάνηκε ότι η NP διασπάστηκε από μικροοργανισμούς με το ρυθμό διάσπασης να παίρνει τιμές από 0,007 έως 0,051 d⁻¹ και το χρόνο ημίσειας ζωής να κυμαίνεται από 13,6 έως 99 ημέρες. Από τα βακτήρια που απομονώθηκαν το *Pseudomonas* sp. φαίνεται να είχε την καλύτερη βιοδιασπαστική ικανότητα.

2.3.4 Δικλοφενάκη-Diclofenac (DCF)

2.3.4.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η Diclofenac (DCF) (2-[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetic acid κατά IUPAC) ανήκει στην κατηγορία των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (non-steroidal anti-inflammatory drug - NSAID) (Al-Rajab, et al., 2010). Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της DCF φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.



Εικόνα 2.5 Μοριακή δομή της DCF [Πηγή Al-Rajab, et al., 2010]

Πίνακας 2.7 Ιδιότητες της TCS

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΣΤΟΥΣ DCF	
Χημικός τύπος	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO ₂
Μοριακό βάρος	296,15 g/mol
Σημείο τήξης	283-285 °C
Υδατοδιαλυτότητα	2,37 mg/L στους 25 °C
Τάση ατμών	6,14*10 ⁻⁸ mm Hg στους 25 °C
pKa	4,15
Kow	4,51

[Πηγή: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov]

2.3.4.2 Πηγές και χρήσεις

Κύρια πηγή της DCF είναι οι φαρμακοβιομηχανίες, αφού περιέχεται σε πολλά φαρμακευτικά προϊόντα και προϊόντα προσωπικής φροντίδας (pharmaceuticals and personal care products - PPCPs). Χρησιμοποιείται για να θεραπεύσει τον πόνο από επώδυνες καταστάσεις, όπως ρευματοειδή αρθρίτιδα, διαστρέμματα και εξάρθρωσεις, πονοκέφαλο, πονόδοντο και δυσμηνόρροια. Χορηγείται με τη μορφή χαπιών, αλοιφής ή σε διαλυτή μορφή για ενδοφλέβια χορήγηση. Υπολογίζεται ότι καταναλώνονται παγκοσμίως περίπου 940 τόνοι DCF ετησίως (Al-Rajab, et al., 2010).

2.3.4.3 Βιοδιάσπαση της DCF

Σε μελέτη που διεξήχθη από τους Gröning et al. (2007), διαπιστώθηκε ότι η DCF αποικοδομείται γρήγορα μέσα σε βιοαντιδραστήρα σταθερής κλίνης, υπό αερόβιες συνθήκες.

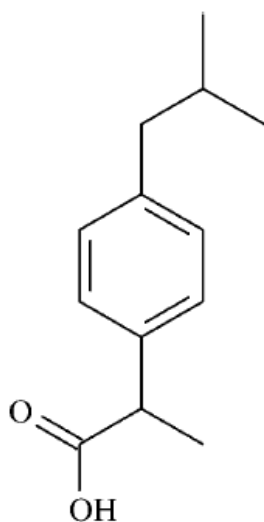
Οι Hata et al. (2010) χρησιμοποίησαν το μύκητα *Phanerochaete sordida* για να βιοδιασπάσουν τη DCF. Παρατήρησαν ότι σε 3 μέρες η συγκέντρωση της είχε μειωθεί κατά 90%, ενώ σε 6 μέρες είχε εξαφανιστεί όλη η ποσότητα της.

Σε πειράματά τους οι Casas et al. (2015), μελέτησαν τη βιοδιάσπαση της DCF σε αερόβιες συνθήκες και μέτρησαν βαθμό απομάκρυνσης της τάξης του 30%.

2.3.5 Ιβουπροφαίνη-Ibuprofen (IBU)

2.3.5.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η Ibuprofen (IBU), που κατά IUPAC ονομάζεται (*RS*)-2-(4-(2-methylpropyl)phenyl)propanoic acid, ανήκει επίσης στην κατηγορία των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. Είναι άχρωμο, κρυσταλλικό στερεό και είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό, αλλά πολύ ευδιάλυτη στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες (αιθανόλη, μεθανόλη, ακετόνη). Οι φυσικοχημικές της ιδιότητες φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.



Εικόνα 2.6 Μοριακή δομή της IBU [Πηγή Winkler, et al., 2001]

Πίνακας 2.8 Ιδιότητες της IBU

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ IBU	
Χημικός τύπος	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Μοριακό βάρος	206,28 g/mol
Ειδικό βάρος	1,03 g/cm ³
Σημείο βρασμού	157 °C
Σημείο τήξης	75-77 °C
Υδατοδιαλυτότητα	21 mg/L στους 25 °C
Τάση ατμών	4,74*10 ⁻⁵ mm Hg στους 25 °C
pKa	4,91
Kow	3,97

[Πηγή: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov]

2.3.5.2 Πηγές και χρήσεις

Η IBU είναι ένα φάρμακο με ευρεία χρήση, καθώς χρησιμοποιείται για τον πόνο ύστερα από χειρουργική επέμβαση, για την οστεοαρθρίτιδα, την ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη δυσμηνόρροια, τον πονόδοντο, τον πονοκέφαλο, αλλά και ως αντιπυρετικό (Winkler, et al., 2001). Η ετήσια, παγκόσμια παραγωγή IBU ανέρχεται σε μερικούς χιλιάδες τόνους (Nowak, et al., 2013).

2.3.5.3 Βιοδιάσπαση της IBU

Ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης της IBU στις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων είναι η βιοδιάσπαση. Ωστόσο, τα αποτελέσματα για τη βιοδιάσπασή της είναι αμφιλεγόμενα. Οι Richardson and Bowron (1985) κατέταξαν την IBU ως βιοδιασπάσιμη στο υδάτινο περιβάλλον, ενώ οι Quintana et al. (2005) αναφέρουν πως σε 28 ημέρες δεν υπήρχε καθόλου διάσπαση. Σύμφωνα με τους Nowak, et al. (2013)

ο βαθμός απομάκρυνσης, ανάλογα και με τις εποχιακές συνθήκες, κυμαίνεται από 60 έως 98% .

Οι Marco-Urrea et al. (2010) χρησιμοποίησαν 4 μύκητες λευκής σήψης (white-rot fungi) για τη βιοδιάσπαση της IBU, οι οποίοι ήταν οι *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum* και *Phanerochaete chrysosporium*. Σε 7 ημέρες σε όλες τις καλλιέργειες, η IBU είχε διασπαστεί και η συγκέντρωσή της είχε μειωθεί σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα.

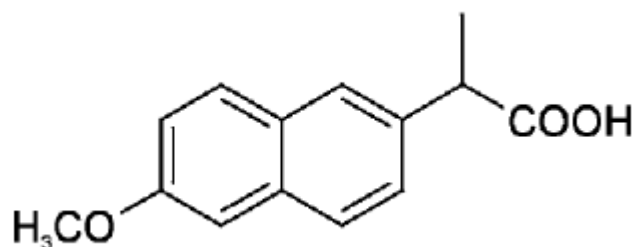
Στα πειράματά τους, οι Winkler et al. (2001), μελέτησαν τη διάσπαση της IBU σε δείγματα που έλαβαν από ποταμούς και παρατήρησαν ότι απομακρυνόταν σε μικρό χρονικό διάστημα από την εισαγωγή της στους βιοαντιδραστήρες. Στα δείγματα, επίσης, υπήρχαν δύο μεταβολίτες της IBU, η hydroxy-ibuprofen και η carboxy-ibuprofen, οι οποίοι ήταν και αυτοί βιοδιασπάσιμοι.

Σε έρευνα που έκαναν οι Casas et al. (2015) διαπίστωσαν πως η IBU είναι εύκολα βιοαποδομήσιμη.

2.3.6 Ναπροξένη-Naproxen (NPX)

2.3.6.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η Naproxen (NPX) (ή 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propionic acid κατά IUPAC) είναι ένα προπανικό οξύ που ανήκει στα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Marco-Urrea, et al., 2010). Συναντάται με τη μορφή σκόνης, είναι πρακτικά αδιάλυτη στο νερό ενώ διαλύεται εύκολα στους οργανικούς διαλύτες. Οι φυσικοχημικές της ιδιότητες εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα.



Εικόνα 2.7 Μοριακή δομή της NPX [Πηγή Quintana, et al., 2005]

Πίνακας 2.9 Ιδιότητες της NPX

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ NPX	
Χημικός τύπος	C ₁₄ H ₁₄ O ₃
Μοριακό βάρος	230,26 g/mol
Ειδικό βάρος	1,197 g/cm ³
Σημείο βρασμού	403,8 °C
Σημείο τήξης	150 °C
Υδατοδιαλυτότητα	15,9 mg/L στους 25 °C
Τάση ατμών	1,89*10 ⁻⁶ mm Hg στους 25 °C
pKa	4,15
Kow	3,18

[Πηγή: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov]

2.3.6.2 Πηγές και χρήσεις

Η NPX είναι μία φαρμακευτική ένωση με αναλγητικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιπυρετικές ιδιότητες. Χρησιμοποιείται κυρίως για την ανακούφιση του πόνου και την αντιμετώπιση των συμπτωμάτων της οστεοαρθρίτιδας και της ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Επειδή η ναπροξένη είναι φάρμακο που δε χρειάζεται συνταγογράφηση η χρήση της είναι πολύ εκτεταμένη και εντοπίζονται σε επιφανειακά και υπόγεια νερά, ακόμα και σε πόσιμο νερό, ποσότητες που ποικίλουν από ng/L έως μερικά μg/L. Η NPX δεν απομακρύνεται εξ' ολοκλήρου από τις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων με αποτέλεσμα να καταλήγει στο περιβάλλον (Marco-Urrea, et al., 2010).

2.3.6.3 Βιοδιάσπαση της NPX

Οι Grenni, et al. (2012) μελέτησαν τη βιοδιάσπαση της NPX από βακτήρια. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της ήταν 27 ημέρες, ενώ παρατήρησαν πως μετά την 20^η ημέρα η συγκέντρωσή της άρχισε να μειώνεται με πιο γρήγορο ρυθμό, ώσπου εξαφανίστηκε όλη την 44^η ημέρα. Από τη φυλογενετική ανάλυση με τη μέθοδο FISH (Fluorescent

In-Situ Hybridization), διαπίστωσαν ότι στα αρχικά δείγματα που είχαν πάρει από το ποτάμι υπήρχαν κυρίως βακτήρια της οικογένειας β -Proteobacteria. Όμως μετά από 20 ημέρες, στα δείγματα που είχε προστεθεί η NPX άρχισε να παρατηρείται αύξηση βακτηρίων που ανήκουν στις οικογένειες α -Proteobacteria και γ -Proteobacteria.

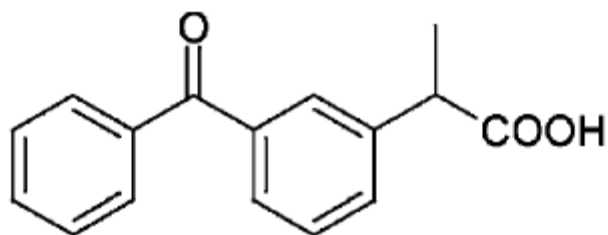
Αντίθετα, οι Wojcieszynska et al. (2014) δεν κατέληξαν σε παρόμοια αποτελέσματα. Χρησιμοποίησαν το βακτήριο *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 για να μελετήσουν τη βιοδιάσπαση της NPX. Μετά από 35 ημέρες, μόνο το 28% της αρχικής ουσίας είχε απομακρυνθεί, ενώ ταυτόχρονα άρχισε να μειώνεται και ο πληθυσμός του *S. maltophilia*, πιθανόν επειδή δε μπορούσε να χρησιμοποιήσει τη NPX σαν πηγή άνθρακα.

Στα πειράματα που διεξήγαγαν οι Quintana et al. (2005), υπό αερόβιες συνθήκες, η συγκέντρωση της δε μειώθηκε στις 28 ημέρες, που ήταν και ο χρόνος εκτέλεσης των πειραμάτων.

2.3.7 Κετοπροφένη-Ketoprofen (KFN)

2.3.7.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Η τελευταία προς εξέταση χημική ένωση είναι η ketoprofen (KFN). Η KFN, που κατά IUPAC ονομάζεται 2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid, ανήκει και αυτή στην κατηγορία των μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAIDs). Πρόκειται για ουσία με λευκό ή ημίλευκο χρώμα που παρασκευάζεται σε μορφή κρυσταλλικής σκόνης με πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό. Διατίθεται με συνταγογράφηση σε κάψουλες ή γέλη. Οι φυσικοχημικές της ιδιότητες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.



Εικόνα 2.8 Μοριακή δομή της KFN [Πηγή Quintana, et al., 2005]

Πίνακας 2.10 Ιδιότητες της KFN

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ KFN	
Χημικός τύπος	C ₁₆ H ₁₄ O ₃
Μοριακό βάρος	254,28 g/mol
Σημείο τήξης	94 °C
Υδατοδιαλυτότητα	51 mg/L
pKa	4,45
Kow	3

[Πηγή: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov]

2.3.7.2 Πηγες και χρήσεις

Η KFN είναι μία δραστική ουσία με αντιφλεγμονώδη, αναλγητική και αντιπυρετική δράση. Είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, της οστεοαρθρίτιδας και της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας (Diaz-Reval, et al., 2004). Η KFN μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του πόνου που οφείλεται σε κράμπες και για την ανακούφιση του πόνου μετά από χειρουργική επέμβαση (συμπεριλαμβανομένης της οδοντιατρικής χειρουργικής επέμβασης), πόνος μετά τον τοκετό και ήπιο έως μέτριο πόνο που σχετίζεται με εξάρθρωσεις και διαστρέμματα. Δε θα πρέπει, όμως να λαμβάνεται σε συνδυασμό με άλλα μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα γιατί υπάρχει κίνδυνος γαστρεντερικού έλκους.

2.3.7.3 Βιοδιάσπαση της KFN

Οι Marco-Urrea, et al. (2010) χρησιμοποίησαν το μύκητα *Trametes versicolor* για να μελετήσουν την ικανότητά του στην αποδόμηση της KFN. Ο μύκητας εξάλειψε την KFN συγκέντρωσης 10 mg/L σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα μέσα σε 10 ώρες, ενώ τη χαμηλής συγκέντρωσης 40 μg/L την αφαίρεσε σε ποσοστό περίπου 95% σε 5 ώρες.

Τα αποτελέσματα των Quintana et al. (2005) ήταν διφορούμενα αφού στην πρώτη σειρά πειραμάτων που έκαναν παρατήρησαν πως όλη η ποσότητα της KFN, σε αερόβιες συνθήκες, είχε διασπαστεί. Δεν είχαν, όμως, παρόμοια αποτελέσματα στη δεύτερη σειρά πειραμάτων, μιας και σε 28 ημέρες φάνηκε να μην είναι βιοδιασπασίμη.

Οι Radjenovic et al. (2009) ύστερα από εργαστηριακή έρευνα συμπέραναν επίσης ότι η KFN έχει μικρή βιοδιασπασιμότητα.

2.4 Κατηγορίες μικροοργανισμών

Οι οργανισμοί είναι δυνατόν να καταταγούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τα κριτήρια που χρησιμοποιεί κανείς.

Με βάση την πολυπλοκότητα της βιολογικής τους οργάνωσης διακρίνονται σε πρώτιστα και ανώτερους οργανισμούς. Τα πρώτιστα είναι όλοι οι μονοκύτταροι οργανισμοί, καθώς και αυτοί που αποτελούνται από περισσότερα κύτταρα, αλλά χωρίς διαφοροποίηση των λειτουργιών. Χαρακτηρίζονται από μικρό βαθμό πολυπλοκότητας και διακρίνονται σε βακτήρια, μύκητες, άλγη και πρωτόζωα. Τα βακτήρια αποτελούνται από ένα μικρό και σχετικά ατελές κύτταρο και συνιστούν την πιο στοιχειώδη αυτόνομη βιολογική οντότητα. Στους ανώτερους οργανισμούς ανήκουν τα φυτά και τα ζώα και χαρακτηρίζονται από διαφοροποίηση των κυττάρων και σημαντικό βαθμό πολυπλοκότητας.

Με βάση το είδος του άνθρακα που απαιτείται για τη δόμηση του κυτταρικού υλικού διακρίνονται σε ετεροτροφικούς και αυτοτροφικούς. Αν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιούνται μόνο απλές οργανικές ενώσεις, τότε οι οργανισμοί διακρίνονται ως

ετεροτροφικοί. Αν ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται ανόργανος άνθρακας, όπως CO₂, ο οποίος μέσω του μεταβολισμού μετατρέπεται σε οργανικό, τότε ο οργανισμός χαρακτηρίζεται ως αυτοτροφικός. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα φυτά, τα άλγη και ορισμένα βακτήρια.

Άλλη διάκριση των οργανισμών σχετίζεται με τον τρόπο πρόσληψης της απαιτούμενης ενέργειας για τη σύνθεση και τις λειτουργίες του οργανισμού. Αν η ενέργεια προσλαμβάνεται μέσω εξώθερμων χημικών αντιδράσεων ο οργανισμός χαρακτηρίζεται ως χημικοσυνθετικός, ενώ αν προσλαμβάνεται από το ηλιακό φως χαρακτηρίζεται ως φωτοσυνθετικός.

Οι οργανισμοί, επίσης, διακρίνονται σε λιθοτροφικούς και οργανοτροφικούς. Λιθοτροφικός ονομάζεται ένας οργανισμός όταν αποκτά την ενέργειά του από την οξείδωση ανόργανων ενώσεων, ενώ οργανοτροφικός όταν αυτός αποκτά την ενέργειά του από την οξείδωση οργανικών ενώσεων.

Τέλος, με βάση τη φύση του τελικού δέκτη ηλεκτρονίων κατά την οξειδοαναγωγή, οι οργανισμοί χωρίζονται σε αερόβιους και αναερόβιους. Αν ο δέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο τότε ο μεταβολισμός χαρακτηρίζεται ως αερόβιος, ενώ αν ο δέκτης είναι ένωση διάφορη του οξυγόνου, π.χ. άλλη οργανική ένωση, νιτρικά (NO₃), θειικά (SO₄) ή διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), τότε ο μεταβολισμός χαρακτηρίζεται ως αναερόβιος (Πηγή: Σύγγραμμα «Περιβαλλοντική Τεχνολογία»).

Ακολουθεί πίνακας όπου φαίνονται οι τύποι των μικροοργανισμών βάσει των θρεπτικών και των ενεργειακών τους απαιτήσεων.

Πίνακας 2.11 Κατηγορίες μικροοργανισμών βάσει των θρεπτικών και ενεργειακών απαιτήσεών τους

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΠΗΓΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ, ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ, ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ	ΤΥΠΙΚΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ
Φωτολιθοαυτοτροφικοί	Φως για ενέργεια Ανόργανοι δότες ηλεκτρονίων CO ₂ ως πηγή άνθρακα	Άλγη Κυανοβακτήρια
Φωτολιθοετεροτροφικοί	Φως για ενέργεια Ανόργανοι δότες ηλεκτρονίων Οργανικός άνθρακας	Ειδικές κατηγορίες βακτηρίων Purple non-sulfur Green sulfur
Χημικολιθοαυτοτροφικοί	Χημική ενέργεια (ανόργανη πηγή) Ανόργανοι δότες ηλεκτρονίων CO ₂ ως πηγή άνθρακα	Νιτροβακτηρίδια Βακτήρια οξείδωσης S
Χημικολιθοετεροτροφικοί	Χημική ενέργεια (ανόργανη πηγή) Ανόργανοι δότες ηλεκτρονίων Οργανικός άνθρακας	Μιξοτροφικά βακτήρια
Χημικοοργανοετεροτροφικοί	Χημική ενέργεια (οργανική πηγή) Οργανικοί δότες ηλεκτρονίων Οργανικός άνθρακας	Πλειονότητα μη φωτοσυνθετικών βακτηρίων Πρωτόζωα Μύκητες

[Πηγή: Σημειώσεις Μεταπτυχιακού Μαθήματος «Βιοχημικές Διεργασίες στο Υδάτινο Περιβάλλον»]

2.5 Προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί

Οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί μπορεί να είναι είτε μονοκύτταροι με συνήθεις διαστάσεις από 0,2 έως 10 μm είτε να σχηματίζουν αποικίες όμοιων μονοκύτταρων μικροοργανισμών. Το βασικό τους χαρακτηριστικό είναι ότι δε διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα, το γενετικό τους υλικό δηλαδή δεν περιβάλλεται από πυρηνική μεμβράνη (όπως συμβαίνει στους ευκαρυωτικούς) αλλά είναι συγκεντρωμένο σε μια περιοχή μες στο κυτταρόπλασμα. Επίσης, έχουν πλασματική μεμβράνη, κυτταρικό τοίχωμα, κάψα (ορισμένα βακτήρια), ριβοσώματα και πλασμίδια (σε κάποιες περιπτώσεις). Αναπαράγονται μονογονικά με διχοτόμηση

χωρίς αυτό να συνεπάγεται αλλαγές στην κυτταρική τους δομή ή στις ιδιότητες τους μικροοργανισμού, ενώ κινούνται με μαστίγια ή βλεφαρίδες. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί χωρίζονται σε 2 μεγάλα βασίλεια (kingdoms), τα βακτήρια και τα αρχαία (Garrity et al. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001)

2.5.1 Βακτήρια

Όπως αναφέρθηκε τα βακτήρια ανήκουν στους προκαρυωτικούς οργανισμούς. Στη συνέχεια το βασίλειο διαιρείται σε 23 φύλα (phylum). Με εξαίρεση τα Κυανοβακτήρια και τα Ακτινοβακτήρια, τα υπόλοιπα φύλα διαιρούνται σε ομοταξίες (classes), τάξεις (orders), οικογένειες (families), γένη (genera) και είδη (species).

Τα βακτήρια μπορούν επίσης να ταξινομηθούν με βάση το κυτταρικό τους τοίχωμα σε 3 υποκατηγορίες:

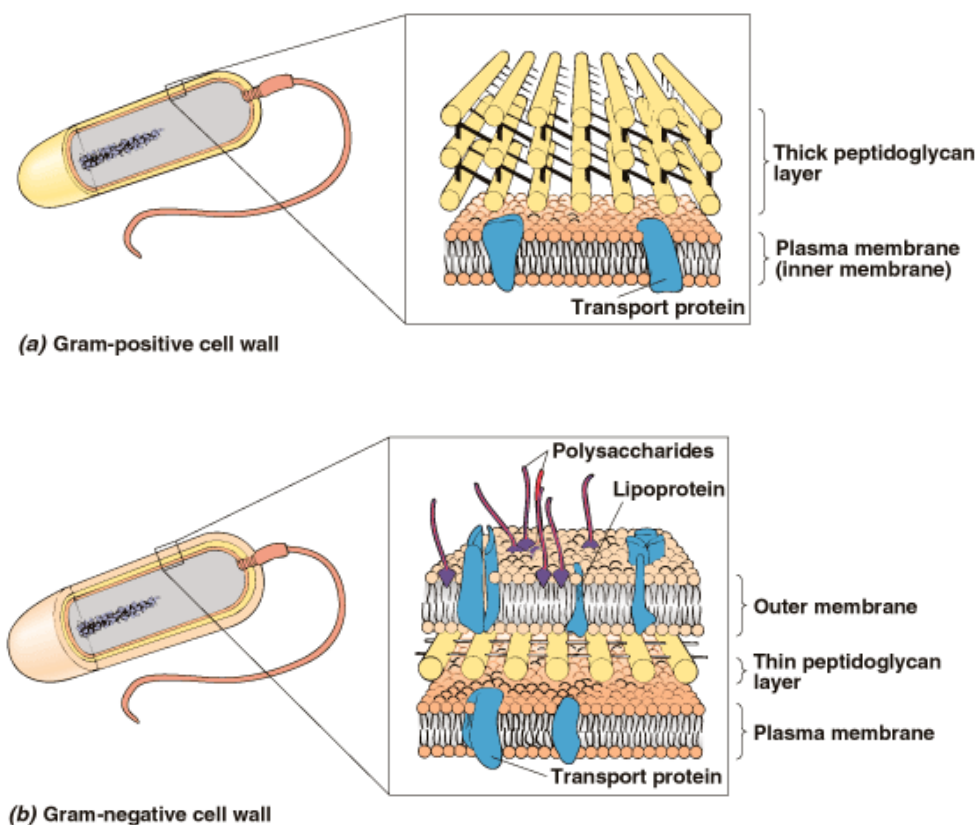
- 1) Βακτήρια με Gram-αρνητικό κυτταρικό τοίχωμα
- 2) Βακτήρια με Gram-θετικό κυτταρικό τοίχωμα
- 3) Βακτήρια χωρίς κυτταρικό τοίχωμα

Βακτήρια με Gram-αρνητικό κυτταρικό τοίχωμα: Το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από μία εξωτερική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες, μία εσωτερική μεμβράνη, η οποία είναι ένα σχετικά λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης που περιέχει μουραμικό οξύ, καθώς και μίγμα άλλων συστατικών μέσα και έξω από το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης. Το σχήμα αυτών των κυττάρων μπορεί να είναι σφαιρικό, οβάλ, ραβδοειδές, ελικοειδές ή νηματοειδές, ενώ κάποια βακτήρια μπορεί να περιβάλλονται και από κάψα.

Βακτήρια με Gram-θετικό κυτταρικό τοίχωμα: Τα βακτήρια αυτής της κατηγορίας δεν έχουν εξωτερική μεμβράνη παρά μόνο ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Μερικά βακτήρια μπορεί να περιέχουν τειχοϊκά οξέα, πολυσακχαρίτες ή μυκολικά οξέα σα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος. Το σχήμα τους μπορεί να είναι σφαιρικό, ραβδοειδές ή νηματοειδές. Η αναπαραγωγή τους γίνεται με διαίρεση ενώ κάποια βακτήρια μπορεί να σχηματίζουν ενδοσπόρια, δηλαδή ανθεκτικές μορφές όταν οι συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές για το κύτταρο. Τα

βακτήρια αυτής της κατηγορίας είναι κυρίως ετερότροφα χημικοσυνθετικά και περιέχουν αερόβια και αναερόβια είδη.

Βακτήρια χωρίς κυτταρικό τοίχωμα: Τα βακτήρια αυτής της κατηγορίας ονομάζονται κοινώς μυκοπλάσματα. Δε συνθέτουν πεπτιδογλυκάνη και είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά των οποίων η δράση βασίζεται στην αναστολή κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα τα μυκοπλάσματα να είναι υπεύθυνα για πολλές ασθένειες. Το κυτταρόπλασμα περιβάλλεται από κυτταρική μεμβράνη ενώ συναντώνται σε πολλές μορφές. Τα περισσότερα είδη δε διαθέτουν μηχανισμούς κίνησης (Garrity et al. : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001).

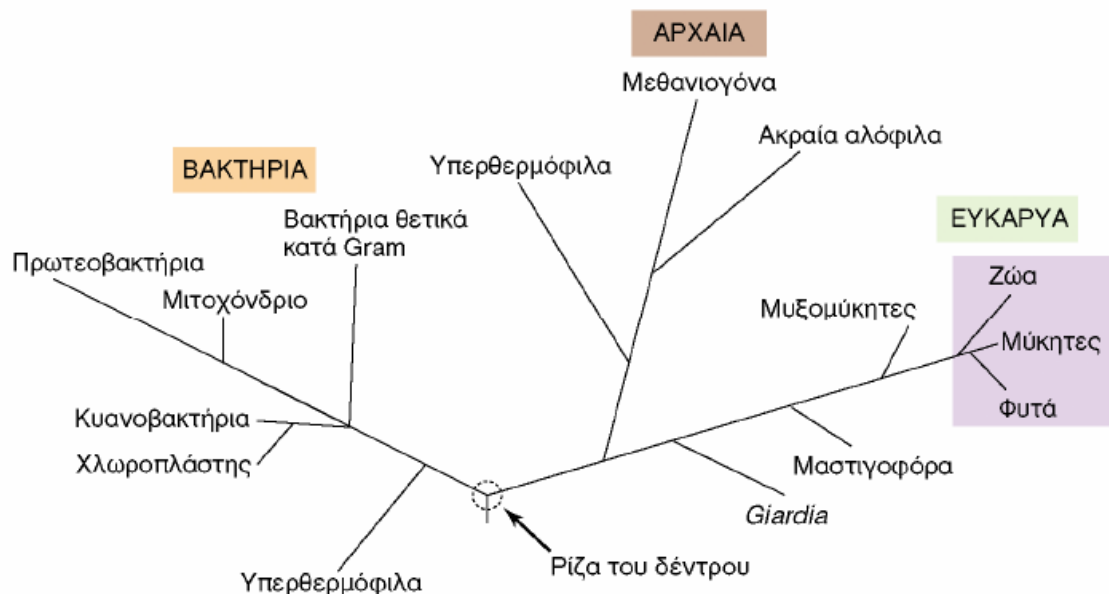


Εικόνα 2.9 α) Βακτήριο με Gram-αρνητικό κυτταρικό τοίχωμα, β) Βακτήριο με Gram-θετικό κυτταρικό τοίχωμα (Πηγή: School of Biological Sciences, University of Texas, Austin)

2.5.2 Αρχαία

Τα αρχαία αναπτύσσονται κυρίως στο έδαφος ή σε υδάτινο, υπεράλυμο ή υπέρθερμο περιβάλλον. Ορισμένα αρχαία εντοπίζονται και σαν ξενιστές στο πεπτικό σύστημα των ζώων. Υπάρχουν αερόβια και αναερόβια αρχαία τα οποία μπορεί να είναι είτε χημικολιθοαυτοτροφικά είτε οργανοτροφικά. Είναι μεσόφιλα ή θερμοφιλα, με μερικά είδη να αναπτύσσονται ακόμα και σε 110 °C. Οι σημαντικότερες κατηγορίες αρχαίων περιλαμβάνει: a) τα μεθανογόνα, b) τα αρχαία αναγωγής θεικών ιόντων (sulfate-reducing Archaea), c) τα αλογονοφιλικά αρχαία, d) τα αρχαία που διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα και e) τα εξαιρετικά υπερθερμοφιλα αρχαία που μεταβολίζουν το θείο (Πηγή: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

Τα μεθανογόνα είναι αποκλειστικά αναερόβια και ο μεταβολισμός τους είναι μοναδικός στη βιολογία καθώς προσλαμβάνουν την ενέργεια που χρειάζονται παράγοντας φυσικό αέριο (μεθάνιο). Τα μεθανογόνα είναι προκαρυωτικά κύτταρα με μεγάλη οικολογική σημασία δεδομένου ότι αποικοδομούν την οργανική ύλη, ενώ το περισσότερο φυσικό αέριο που έχει συσσωρευτεί στο γήινο φλοιό οφείλεται στο μεταβολισμό τους (Πηγή: Brock Biology of Microorganisms).



Εικόνα 2.10 Το δέντρο της ζωής (Πηγή: Brock Biology of Microorganisms – ελληνική μετάφραση: Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών)

2.6 Κατηγορίες βακτηρίων που συμβάλουν στη βιοδιάσπαση ενδοκρινικών διαταρακτών και φαρμακευτικών ουσιών

Όπως παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο 2.4, οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τη βιοδιάσπαση των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ουσιών είτε είναι αντικρουόμενες είτε εμφανίζουν πολλαπλά είδη μικροοργανισμών που βιοαποδομούν τις εν λόγω ουσίες. Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής επιλέχθηκαν για μελέτη 4 γένη βακτηρίων: το *Sphingomonas*, το *Nitrosomonas*, και το *Pseudomonas*, τα οποία ανήκουν στο φύλο Proteobacteria και το *Bacillus*, το οποίο ανήκει στο φύλο Firmicutes.

Proteobacteria : Τα Proteobacteria αποτελούν ένα από τα πιο ποικιλόμορφα φύλα των προκαρυωτικών μικροοργανισμών και περιλαμβάνουν 5 ομοταξίες (classes) που προσδιορίζονται με τα ελληνικά γράμματα α, β, γ, δ, ε. Από πλευράς φυσιολογίας τα proteobacteria μπορεί να είναι είτε φωτότροφα, είτε χημειολιθοτροφικά, είτε χημειοργανότροφα. Ως ομάδα οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι όλοι αρνητικοί κατά Gram και παρουσιάζουν ευρύτατη μεταβολική ποικιλομορφία (Πηγή: Brock Biology of Microorganisms, ελληνική μετάφραση, 2005). Επιπλέον, η μελέτη τους έχει μεγάλη σημασία για τη βιολογία καθώς περιλαμβάνουν και πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για ασθένειες των φυτών και των ζώων, αλλά και του ανθρώπου (Gupta, 2000).

α-Proteobacteria : Τα α-Proteobacteria είναι μία σημαντική ομάδα βακτηρίων η οποία έχει συμβάλει σημαντικά στην εξέλιξη της ζωής. Πολλοί είναι αυτοί που πιστεύουν ότι τα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων προέρχονται από α-Proteobacteria που ζούσαν μέσα σε άλλα κύτταρα (endosymbiosis). Υποστηρίζεται, επίσης, ότι το ευκαρυωτικό κύτταρο προήλθε από τη σύντηξη ή τη μακροχρόνια συμβίωση ενός ή περισσότερων α-Proteobacteria και αρχαίων. Επιπλέον, πολλά γένη αυτής της ομάδας, όπως το *Rickettsiales*, το *Brucella* και το *Bartonella*, είναι παθογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα α-Proteobacteria παρουσιάζουν τεράστια ποικιλία ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά και το μεταβολισμό τους. Το σχήμα τους μπορεί να είναι ραβδωτό, κοκκοειδές, σπειρωτό ή νηματοειδές, ενώ ο μεταβολισμός μπορεί να ανήκει σε όλες τις κατηγορίες του Πίνακα 2.10. Είναι είτε ακίνητα είτε κινούνται με μαστίγια (Πηγές: www.bacterialphylogeny.info, Holt & Iudica – Systematic Biology).

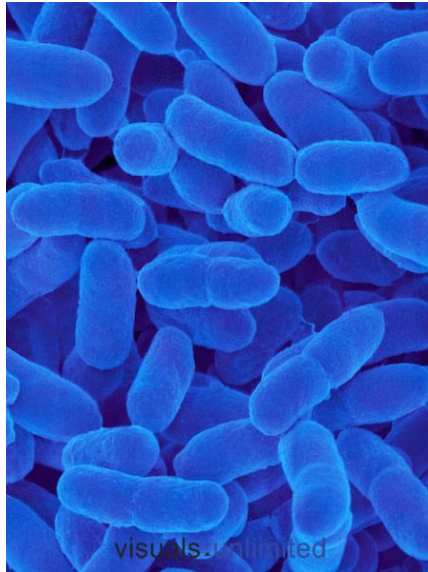
Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τάξεις των α-Proteobacteria.

Πίνακας 2.12 Τάξεις των α -Proteobacteria

Τάξεις των α -Proteobacteria
Caulobacterales
Kopriimonadales
Kordiimonadales
Parvularculales
Rhizobiales
Rhodobacterales
Rhodospirillales
Rickettsiales
Sphingomonadales

[Πηγή: rdp.cme.msu.edu/probematch]

Sphingomonas: Το γένος *Sphingomonas* ανήκει στην οικογένεια Sphingomonadaceae, της τάξης Sphingomonadales, της ομοταξίας α -Proteobacteria. Είναι αυστηρώς αερόβιο βακτήριο ραβδόμορφου σχήματος και ανήκει στους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς. Το ποσοστό γουανίνης-κυτοσίνης στο DNA τους (% G-C content) κυμαίνεται από 61% έως 67%. Το γένος *Sphingomonas* έχει πάνω από 20 είδη τα οποία χωρίζονται ανάλογα με τις φυλογενετικές και τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Λόγω της ικανότητάς τους να βιοδιασπούν οργανικές ενώσεις και να βιοσυνθέτουν εξωπολυσακχαρίτες, βρίσκουν πολλές εφαρμογές στη βιοτεχνολογία (White, et al., 1996). Κάποια είδη, μάλιστα του *Sphingomonas*, και ειδικά το *Sphingomonas raucimobilis*, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου, καθώς προκαλεί νοσοκομειακές λοιμώξεις, οι οποίες αντιμετωπίζονται συνήθως με χορήγηση αντιβιοτικών (Maragakis, et al., 2009).



Εικόνα 2.10 *Sphingomonas paucimobilis* (Πηγή: [visualsunlimited.photoshelter.com](https://www.visualsunlimited.com))

β-Proteobacteria: Τα περισσότερα β-Proteobacteria είναι χημειοαυτοτροφικά βακτήρια και ποικίλουν αρκετά σε σχήμα. Παίρνουν την ενέργειά τους από ανόργανες ενώσεις και παράγουν όλες τις απαραίτητες οργανικές ενώσεις που χρειάζεται το κύτταρο. Πολλά από τα βακτήρια αυτής της τάξης ανήκουν στους νιτροποιητές, τα οποία οξειδώνουν ενώσεις του αζώτου. Υπάρχουν, όμως, και φωτοσυνθετικά βακτήρια τα οποία περιέχουν βακτηριοχλωροφύλλη και χρησιμοποιούν το ηλιακό φως για να μετατρέψουν το διοξείδιο του άνθρακα σε τροφή. Το σχήμα τους ποικίλει και μπορεί να είναι ραβδωτό, σφαιρικό ή νηματοειδές. Ως προς την απαίτηση οξυγόνου είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. (Πηγή: Holt & Iudica – Systematic Biology).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τάξεις των β-Proteobacteria.

Πίνακας 2.13 Τάξεις των β-Proteobacteria

Τάξεις των β-Proteobacteria
Burkholderiales
Hydrogenophilales
Methylophilales
Neisseriales
Nitrosomonadales
Procabacteriales
Rhodocyclales

[Πηγή: rdp.cme.msu.edu/probematch]

Nitrosomonas: Το *Nitrosomonas* ανήκει στην οικογένεια Nitrosomonadaceae της τάξης Nitrosomonadales, της ομοταξίας β-Proteobacteria. Είναι αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα βακτήρια, μικρού έως μεγάλου μήκους, συνήθως αυτοκινούμενα με μαστίγια και διαθέτουν περιφερειακά συστήματα μεμβρανών. Τα *Nitrosomonas sp.* είναι αυστηρώς αερόβια αυτοτροφικοί μικροοργανισμοί. και προσλαμβάνουν ενέργεια από την οξείδωση της αμμωνίας (Πηγή: Brock Biology of Microorganisms). Συγκεκριμένα, το είδος *Nitrosomonas europaea* είναι απαραίτητο στα συστήματα απομάκρυνσης της αμμωνίας καθώς την οξειδώνει σε νιτρώδη (Shi, et al., 2004).



Εικόνα 2.11 *Nitrosomonas europaea* [Πηγή: Joint Genome Institute, United State Department of Energy]

γ-Proteobacteria: Τα γ-Proteobacteria είναι μία μεγάλη, ποικιλόμορφη ομάδα η οποία περιλαμβάνει τους περισσότερους σημαντικούς μικροβιακούς οργανισμούς, όπως το *Escherichia*, το *Enterobacter*, το *Francisella* και το *Pasteurella*. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί αυτής της ομοταξίας είναι μονοκύτταροι. Τα γ-Proteobacteria μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, στους φωτοαυτοτροφικούς και τους ετεροτροφικούς μικροοργανισμούς. Τα βακτήρια της πρώτης ομάδας είναι υποχρεωτικά αναερόβια και διαθέτουν βακτηριοχλωροφύλλη για να φωτοσυνθέτουν και να μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα σε χρήσιμες οργανικές ενώσεις. Παίρνουν ηλεκτρόνιο κυρίως από το υδρόθειο και όχι από το νερό και απαντούνται συχνά σε ανοξικό περιβάλλον. Η άλλη ομάδα περιλαμβάνει τους ετερότροφους μικροοργανισμούς, οι οποίοι είναι αερόβιοι ή προαιρετικά αναερόβιοι. Περιλαμβάνει πολλά είδη τα οποία οφείλονται για ασθένειες του ανθρώπου, όπως το *Escherichia coli*, το *Pasteurella pestis*, το *Francisella* και το *Legionella*. (Πηγή: Holt & Iudica – Systematic Biology).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τάξεις των γ-Proteobacteria.

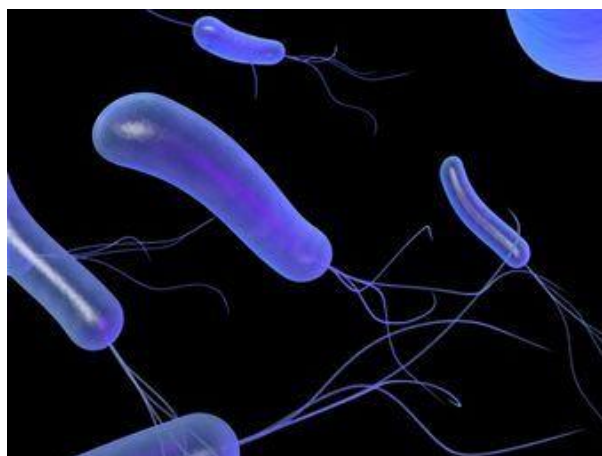
Πίνακας 2.14 Τάξεις των γ-Proteobacteria

Τάξεις των γ-Proteobacteria
Acidithiobacillales
Aeromonadales
Alteromonadales
Cardiobacteriales
Chromatiales
Enterobacteriales
Legionellales
Methylococcales
Oceanospirillales
Pasteurellales
Pseudomonadales
Thiotrichales
Vibrionales
Xanthomonadales

[Πηγή: rdp.cme.msu.edu/probematch]

Pseudomonas: Το *Pseudomonas* ανήκει στην οικογένεια Pseudomonadaceae της τάξης Pseudomonadales, της ομοταξίας γ-Proteobacteria. Είναι ευθύγραμμο ή κεκαμμένα ραβδόμορφα βακτήρια με μέγεθος 0,5-1,0 μm × 1,5-4,0 μm. Είναι επίσης προαιρετικά αερόβιο βακτήριο και αρνητικό κατά Gram. Δε σχηματίζει σπόρια και

δεν έχει έλυτρα, αποφύσεις ή εκβλαστήματα, ενώ κινούνται με ένα ή περισσότερα μαστίγια. Ορισμένα είδη είναι χημειολιθοτροφικά και χρησιμοποιούν H₂ ή CO ως μοναδικό ηλεκτρονιοδότη, αν και υπάρχουν κάποια είδη τα οποία υπό αναερόβιες συνθήκες μπορούν να χρησιμοποιήσουν το νιτρικό ιόν ως ηλεκτρονιοδέκτη. Ορισμένα *Pseudomonas sp.* είναι παθογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα το *Pseudomonas aeruginosa* σχετίζεται συχνά με μολύνσεις του ουροποιητικού και του αναπνευστικού συστήματος, αλλά και με διασυστημικές λοιμώξεις, συνήθως σε άτομα που υπέστησαν εκτεταμένες βλάβες στο δέρμα. Απαντά συνήθως στο περιβάλλον νοσοκομείων και μολύνει εύκολα ασθενείς με μειωμένη ανθεκτικότητα. Το βακτήριο είναι εκ φύσεως ανθεκτικό σε πολλά από τα συνήθη αντιβιοτικά και συχνά η θεραπεία του είναι δύσκολη (Πηγή: Brock Biology of Microorganisms).



Εικόνα 2.12 *Pseudomonas aeruginosa* (Πηγή: domekaformadero.wordpress.com)

Firmicutes: Άλλο ένα φύλο των βακτηρίων είναι το Firmicutes. Υπάρχουν περίπου 2475 είδη σε 255 γένη, τα περισσότερα από τα οποία έχουν Gram-θετικό κυτταρικό τοίχωμα. Τα γένη των Firmicutes χωρίζονται με βάση το ποσοστό γουανίνης - κυτοσίνης στο DNA (G-C % content). Υπάρχουν βέβαια και κάποια είδη που διαθέτουν πορώδη εξωκυτταρική μεμβράνη, που τα κάνει Gram-αρνητικά. Το σχήμα τους μπορεί να είναι στρογγυλό (κοκκοειδές) ή ραβδόμορφο. Πολλά βακτήρια του φύλου Firmicutes μετατρέπονται σε ενδοσπόρια προκειμένου να επιβιώσουν σε αντίξοες συνθήκες. Πολλά, επίσης, είναι παθογόνα ενώ άλλα οφείλονται για την αλλοίωση του κρασιού και της μύρας (Πηγή: <http://www.earthlife.net>)

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι ομοταξίες και οι τάξεις του φύλου Firmicutes.

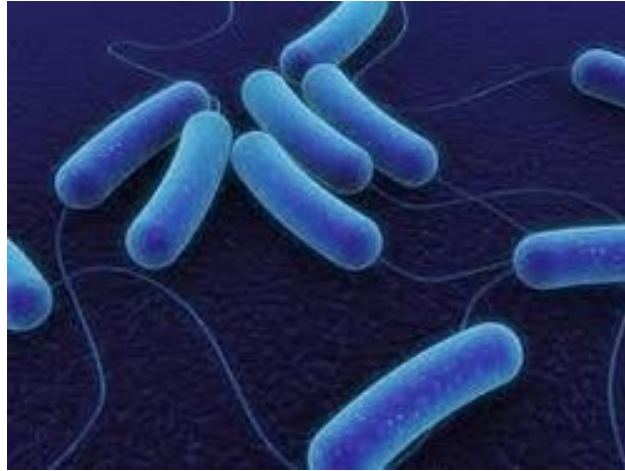
Πίνακας 2.15 Ομοταξίες και Τάξεις του φύλου Firmicutes

Ομοταξίες και Τάξεις του φύλου Firmicutes	
Ομοταξία	Τάξη
Bacilli	Bacillales
	Lactobacillales
Clostridia	Clostridiales
	Halanaerobiales
	Thermoanaerobacteriales
Mollicutes	Acholeplasmatales
	Anaeroplasmatales
	Entomoplasmatales
	Mycoplasmatales

[Πηγή: rdp.cme.msu.edu/probematch]

Bacillus: Το *Bacillus* ανήκει στην οικογένεια Bacillaceae της τάξης Bacillales, της ομοταξίας Bacilli του φύλου Firmicutes. Έχουν ραβδόμορφο σχήμα και είναι Gram-θετικά βακτήρια. Κάποια είδη αναπτύσσονται σε αερόβιες συνθήκες, ενώ κάποια άλλα σε αναερόβιες. Υπό αντίξοες, για την ανάπτυξή του, περιβαλλοντικές συνθήκες το *Bacillus* μετατρέπεται σε οβάλ ενδοσπόρια, μια κατάσταση στην οποία μπορεί να παραμείνει για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Είδη του γένους *Bacillus* αναπτύσσονται συνήθως καλά σε τεχνητά μέσα που περιέχουν κάποια πηγή άνθρακα. Πολλά *Bacillus sp.* παράγουν εξωκυτταρικά υδρολυτικά ένζυμα που διασπών σύνθετα πολυμερή, όπως πολυσακχαρίτες νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια, επιτρέποντας στους οργανισμούς αυτούς να χρησιμοποιούν τα συγκεκριμένα προϊόντα ως πηγές άνθρακα και δότες ηλεκτρονίων. Πολλά *Bacillus sp.*, επίσης, παράγουν αντιβιοτικά, όπως π.χ. βακιτρακίνη, πολυμιξίνη, τυροκιδίνη, γραμμικιδίνη και κικουλίνη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η παραγωγή αντιβιοτικών σχετίζεται με τη διαδικασία της

σπορίωσης. Το αντιβιοτικό απελευθερώνεται όταν η καλλιέργεια εισέλθει στη στάσιμη φάση της σπορίωσης (Πηγή: Brock Biology of Microorganisms).



Εικόνα 2.13 *Bacillus subtilis* (Πηγή: <http://www.mitushipharma.com/probiotics.html>)

Κεφάλαιο 3^ο– Πειραματικό μέρος

3.1 Γενικά

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η βιοαποδόμηση των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ενώσεων σε αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες καθώς και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που βιοαποδομούν αυτές τις ενώσεις. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι ενδοκρινικοί διαταράκτες bisphenol-A (BPA), triclosan (TCS) και nonylphenol (NP) και οι φαρμακευτικές ενώσεις diclofenac (DCF), ibuprofen (IBU), naproxen (NPX) και ketoprofen (KFN). Οι ομάδες μικροοργανισμών που μελετήθηκαν ήταν τα Eubacteria, Archaea, α-Proteobacteria, β-Proteobacteria, γ-Proteobacteria και Firmicutes, ενώ τα είδη που επιλέχθηκαν ήταν τα *Sphingomonas sp.*, *Nitrosomonas sp.*, *Pseudomonas sp.* και *Bacillus sp.* Τα πειράματα και οι μετρήσεις έγιναν στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας της σχολής Πολιτικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. και διήρκησαν από τις 6 Νοεμβρίου 2014 έως τις 5 Μαρτίου 2015. Στην συνέχεια του κεφαλαίου αυτού περιγράφονται το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε καθώς και οι πειραματικές μέθοδοι και πειραματικές συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση των πειραμάτων.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε μια καλλιέργεια για κάθε ουσία (7 ουσίες), καθώς και ένα πείραμα ελέγχου (control), που περιείχε μόνο μεθανόλη υπό τρεις συνθήκες, αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες. Στις αερόβιες συνθήκες γινόταν η προσθήκη αμμωνιακού αζώτου και οξυγόνου, στις ανοξικές νιτρικού αζώτου και στις αναερόβιες τρισθενούς σιδήρου. Όλες οι καλλιέργειες ήταν σε διπλό αντίτυπο (duplicate), ενώ τα αποτελέσματα που φαίνονται στο κεφάλαιο 4 είναι οι μέσοι όροι των μετρήσεων καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

3.2 Παρασκευή καλλιέργειών

3.2.1 Εισαγωγή

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε μια καλλιέργεια για κάθε ουσία (7 ουσίες), καθώς και ένα πείραμα ελέγχου (control), που περιείχε μόνο μεθανόλη υπό τρεις συνθήκες, αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες. Όλες οι καλλιέργειες ήταν σε διπλό αντίτυπο (duplicate), Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την παρασκευή συνολικά 48 καλλιέργειών μικροοργανισμών (μικροκόσμων). Στις 16 επικρατούσαν αναερόβιες συνθήκες, στις 16 ανοξικές ενώ στις υπόλοιπες 16 επικρατούσαν αερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια της παραγράφου περιγράφονται οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν για την δημιουργία των μικροκόσμων σε αναερόβιες, ανοξικές και αερόβιες συνθήκες.

3.2.2 Αναερόβιες και ανοξικές συνθήκες

Στα μπουκάλια serum των 160 ml, τα οποία τυλίγονται με αλουμινόχαρτο για φωτοπροστασία, προστίθενται νερό βρύσης, ανάμικτο υγρό και χωνεμένη ιλύ έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση πτητικών αιωρούμενων στερεών 308 mg VSS/L και τελικός όγκος 97,5 ml. Οι ποσότητες του ανάμικτου υγρού και της χωνεμένης ιλύος ήταν ισομοιρασμένες σε όρους πτητικών αιωρούμενων στερεών (VSS). Στη συνέχεια τα μπουκάλια σφραγίζονται και γίνεται purging με αέριο άζωτο για 10 λεπτά. Ύστερα, παρασκευάζονται τα διαλύματα που περιέχουν τις 7 ουσίες. Στις 5 κωνικές φιάλες των 100 ml προστίθενται 72 μ L από τα 5 πρότυπα διαλύματα (BPA, IBU, KFN, NPX, DCF) και στις 2 των 250 ml προστίθενται 72 μ L από τα πρότυπα διαλύματα της TCS και της NP συγκέντρωσης 10 gr/L (μία ουσία σε κάθε κωνική). Αφήνονται εντός του απαγωγού, ο οποίος λειτουργεί στη μέγιστη ένταση, για 30 min ώστε να εξατμιστεί η μεθανόλη στην οποία είναι διαλυμένα τα σκευάσματα και να μείνει μόνο η στερεή ουσία. Ύστερα, προστίθενται 60 ml mineral medium (MM) στις κωνικές των 100 ml και 180 ml στις κωνικές των 250 ml και τοποθετούνται στην πλάκα ανάδευσης, όπου και αναδεύονται για 5 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρούνται 12,5 ml από τις κωνικές των 100 ml και 37,5 ml από τις κωνικές των 250 ml, με σύριγγες των 20 ml και 50 ml αντίστοιχα, και εισάγονται στις καλλιέργειες. Επιπλέον, προστίθενται 40 ml reduced anaerobic mineral medium (RAMM) στις καλλιέργειες

των BPA, IBU, KFN, NPX, DCF και 15 ml RAMM στις άλλες δύο (TCS, NP). Συνολικά, δηλαδή, 52,5 ml RAMM/MM και τελικός όγκος σε κάθε μπουκάλι 150 ml με 200 mg VSS/L. Στη συνέχεια, σε κάθε μπουκάλι serum εκχύνονται 52 μ L S-T, 500 μ L βιταμινών και 40 μ L από διάλυμα μεθανόλης συγκέντρωσης 1877 mg/L. Τέλος, γίνεται η μέτρηση του τρισθενή σιδήρου στις αναερόβιες καλλιέργειες και των νιτρικών στις ανοξικές, και προστίθεται FeCl_3 ή KNO_3 ανάλογα την ποσότητα που καταναλώθηκε έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50 mg/L (Σημείωση: Τα δύο πειράματα ελέγχου δεν περιέχουν κάποια από τις 7 ουσίες.)

3.2.3 Αερόβιες συνθήκες

Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την παρασκευή των αερόβιων καλλιεργειών. Στα δοχεία των 200 ml, τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο, εισάγονται νερό βρύσης και ισομοιρασμένες ποσότητες σε όρους πτητικών αιωρούμενων στερεών ανάμικτου υγρού και χωνεμένης ιλύος, έτσι ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση πτητικών αιωρούμενων στερεών 308 mg VSS/L και τελικός όγκος 97,5 ml. Στη συνέχεια σε κάθε κωνική προστίθενται 30 μ L από τα πρότυπα διαλύματα και αφήνονται εντός του απαγωγού για 30 λεπτά. Ύστερα, οι κωνικές γεμίζονται με 105 ml MM η καθεμία και αναδεύονται για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, ογκομετρούνται 52,5 ml από κάθε κωνική και εισάγονται στα δοχεία των 200 ml, ώστε να επιτευχθεί τελικός όγκος 150 ml. Σε κάθε καλλιέργεια προστίθενται 52 μ L S-T, 500 μ L βιταμινών και 40 μ L από διάλυμα μεθανόλης (συγκέντρωσης 1877 mg/L). Τέλος, γίνεται η μέτρηση αμμωνιακών και ανάλογα την ποσότητα που έχει καταναλωθεί προστίθεται NH_4Cl έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 5 mg/L. Όπως και στις αναερόβιες/ανοξικές, τα δύο αντίτυπα του πειράματος ελέγχου δεν περιείχε κάποια από τις ουσίες υπό μελέτη. Τέλος, σε κάθε δοχείο τοποθετείται ένας διαχυτήρας και τα δοχεία καλύπτονται με parafilm. Ο διαχυτήρας λειτουργεί για 15 min/h. Η συγκέντρωση του οξυγόνου πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 4-8 mg/L.



Εικόνα 3.1 Αναερόβιες καλλιέργειες (αριστερά), Ανοξικές καλλιέργειες (κέντρο), Αερόβιες καλλιέργειες (δεξιά)

3.3 Συντήρηση καλλιεργειών

Μετά τη δημιουργία των μικροκόσμων ακολούθησε η συντήρησή τους η οποία επαναλαμβανόταν κάθε 7 ημέρες. Η διαδικασία είναι ίδια με αυτή που ακολουθείται κατά την παρασκευή τους, με τη διαφορά ότι πρώτα αφαιρείται ποσότητα 52,5 ml από κάθε δοχείο. Στις αναερόβιες και τις ανοξικές γίνεται με χρήση σύριγγας ενώ στις αερόβιες με ογκομετρικό κύλινδρο. Στη συνέχεια ετοιμάζονται οι κωνικές με τα διαλύματα ουσιών-MM και εισάγονται στα μπουκάλια, καθώς επίσης και το απαιτούμενο RAMM, σύμφωνα με τις ως άνωθεν ποσότητες. Μετά, εμπλουτίζονται με διάλυμα S-T, βιταμινών και μεθανόλης. Τέλος, γίνεται η μέτρηση του τρισθενή σιδήρου στις αναερόβιες καλλιέργειες, των νιτρικών στις ανοξικές και των αμμωνιακών στις αερόβιες. Ανάλογα την ποσότητα που έχει καταναλωθεί προστίθεται NH_4Cl έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 5 mg/L και FeCl_3 ή KNO_3 έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 50 mg/L.

3.4 Υλικά και όργανα

3.4.1 Υλικά για την παρασκευή και συντήρηση των καλλιεργειών

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή/συντήρηση των καλλιεργειών είναι:

- 32 serum μπουκάλια των 160 ml
- 32 πώματα βουτυλίου και αποσπώμενα αλουμινένια σφραγίσματα

- 16 γυάλινα δοχεία των 200 ml
- 16 διαχυτήρες οξυγόνου
- 5 κωνικές φιάλες των 100 ml και 2 των 250 ml
- Αλουμινόχαρτο
- Πιπέτες των 100, 1000 και 5000 μl με τα αντίστοιχα tips
- Σύριγγες των 100 μL, 10 ml, 20 ml και 50 ml
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 ml, 100 ml και 1 L
- Ανάμικτο υγρό και χωνεμένη ιλύ από το Κέντρο Επεξεργασίας Λυμάτων Ψυττάλειας (ΚΕΛΨ)
- Φιάλη αερίου αζώτου N₂
- Parafilm

3.4.2 Διαλύματα

Για την παρασκευή και τη συντήρηση των μικροκόσμων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

- Mineral medium (MM)
- Reduced anaerobic mineral medium (RAMM)
- NH₄Cl (1.5 gr N/L)
- FeCl₃ (15 gr Fe/L)
- KNO₃ (15 gr N/L)
- Οι ουσίες:
 1. Bisphenol-A
 2. Triclosan
 3. Nonylphenol
 4. Diclofenac
 5. Ibuprofen
 6. Naproxen
 7. Ketoprofen

Συγκέντρωσης 10 gr/L διαλυμένες σε μεθανόλη

- Διάλυμα μεθανόλης (1877 mg/L)
- Διάλυμα βιταμινών (Vitamin solution)

- Διάλυμα σεληνίου-βολφραμίου (S-T solution)
- Μίγμα ιχνοστοιχείων (trace element mixture)

3.4.3 Όργανα

Όλες οι διαδικασίες παρασκευής διαλυμάτων και οι διάφορες μετρήσεις έγιναν με τη βοήθεια των παρακάτω οργάνων του Εργαστηρίου:

- Ηλεκτρονικός ζυγός (ακρίβειας 0,0001 g) και ύαλος
- Ηλεκτρονικό pH-μετρο
- Φασματοφωτόμετρο
- Αντιδραστήρια HACH για τη μέτρηση αμμωνιακών και νιτρικών
- Πλάκα ανάδευσης
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Απαγωγός αερίων
- Φούρνος στους 105 °C
- Ψυγεία στους 4 °C και -18 °C
- Διηθησιόμετρο
- Φίλτρα διήθησης
- Αντλία κενού
- Ανοξειδωτες μεταλλικές λαβίδες
- Ξηραντήρας με κατάλληλο αφυγραντικό μέσο
- Οξυγονόμετρο
- Φυγόκεντροι
- Ποτήρια ζέσεως
- Απιονιστής
- Χρονόμετρο

3.4.4 Υλικά και διαδικασία παρασκευής MM και RAMM

Για την παρασκευή των διαλυμάτων MM και RAMM χρησιμοποιήθηκαν:

- 2 φιάλες serum των 2 L

- 1 πώμα βουτυλίου και αποσπώμενο αλουμινένιο σφράγισμα
- Χλωριούχο μαγνήσιο $MgCl_2$
- Χλωριούχο ασβέστιο $CaCl_2$
- Χλωριούχο αμμώνιο NH_4Cl
- Όξινο φωσφορικό κάλιο K_2HPO_4
- Μείγμα ιχνοστοιχείων (trace element mixture)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο $NaHCO_3$
- Ένυδρο θειούχο νάτριο $Na_2S \cdot 9H_2O$
- Resazurin
- Απιονισμένο νερό

Για την παρασκευή του MM ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Ογκομετρώνται 2 L απιονισμένου νερού. Αδειάζεται εντός της μίας φιάλης serum το 1L. Με τη βοήθεια του ζυγού, μετρούνται και προστίθενται μες στη φιάλη: 0,2 gr $MgCl_2$, 0,1 gr $CaCl_2$, 1 gr NH_4Cl και 0,8 gr K_2HPO_4 . Με τον ογκομετρικό σωλήνα μετρούνται 20 ml trace element mixture και προστίθενται και αυτά μες στο διάλυμα. Τέλος συμπληρώνεται το υπόλοιπο απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στο μαγνητικό αναδευτήρα όπου και αφήνεται για 30 min, ενώ ταυτόχρονα χορηγείται και αέρας με τη βοήθεια αεριστήρα.

Για την παρασκευή του RAMM ακολουθείται αρχικώς η ίδια διαδικασία με την παρασκευή του MM, γεμίζεται δηλαδή μία φιάλη serum 2 L με 1 L απιονισμένο νερό, προστίθενται 0,2 gr $MgCl_2$, 0,1 gr $CaCl_2$, 1 gr NH_4Cl , 0,8 gr K_2HPO_4 , 20 ml trace element mixture και το υπόλοιπο απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια η φιάλη σφραγίζεται αεροστεγώς με καπάκι βουτυλίου και πώμα αλουμινίου. Ύστερα τοποθετείται εντός του απαγωγού και διοχετεύεται αέριο άζωτο για 30 λεπτών ενώ ταυτόχρονα τοποθετείται στο πώμα μία βελόνα για να απελευθερώνεται ο αέρας. Με τον τρόπο αυτό φεύγει από τη φιάλη το οξυγόνο και επικρατούν αναερόβιες συνθήκες. Μετά το πέρας των 30 λεπτών αφαιρούνται από το διάλυμα 50 ml και εκχύνονται με σύριγγα 50 ml $NaHCO_3$ (αλκαλικό διάλυμα για διατήρηση του pH) και 10 ml $Na_2S \cdot 9H_2O$ για διατήρηση αναερόβιων συνθηκών. Τέλος προστίθενται 10 μL resazurin.

3.4.5 Διαλύματα βιταμινών και S-T

Το διάλυμα βιταμινών παρασκευάζεται ως εξής: Σε 1 L απιονισμένο νερό εισάγονται:

- ✓ 20 mg βιοτίνη
- ✓ 20 mg φολικόοξύ
- ✓ 100 mg υδροχλωρική πυριδοξίνη
- ✓ 50 mg υδροχλωρική θειαμίνη
- ✓ 50 mg ριβοφλαβίνη
- ✓ 50 mg νικοτινικόοξύ
- ✓ 50 mg DL-παντοθενικό οξύ
- ✓ 5 mg βιταμίνη B12
- ✓ 50 mg p-άμινο-βενζοϊκό οξύ

Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετείται στο μαγνητικό αναδευτήρα για 30 λεπτά και ύστερα διατηρείται στο ψυγείο στους 4 °C.

Για το διάλυμα σεληνίου-βολφραμίου (S-T solution), εισάγονται σε 1 L απιονισμένο νερό:

- ✓ 4 gr NaOH
- ✓ 6 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- ✓ 8 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Στη συνέχεια το διάλυμα αναδεύεται για 30 λεπτά στο μαγνητικό αναδευτήρα.

3.4.6 Trace element mixture

Το μίγμα ιχνοστοιχείων (trace element mixture) αποτελείται από:

- ✓ 4,5 gr Nitriiloacetic acid
- ✓ 556 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ 86 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- ✓ 170 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- ✓ 210 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- ✓ 19 mg H_3BO_3 , 20 NiCl₂
- ✓ 10 mg NaMoO₄

διαλυμένα σε 1 L απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια το διάλυμα αναδεύεται και διατηρείται στο ψυγείο στους 4 °C.

3.5 Μετρήσεις

Κάθε εβδομάδα συλλεγόταν δείγμα από τις καλλιέργειες για να πραγματοποιηθούν οι διάφορες μετρήσεις. Κατά την εξαγωγή του υγρού από τα δοχεία (52,5 ml) αποθηκευόταν μία ποσότητα από τα πειράματα ελέγχου και από άλλη μία από τις 7 ουσίες (μία κάθε εβδομάδα), και από τις 3 συνθήκες (αναερόβιες, ανοξικές, αερόβιες). Οι μετρήσεις που γίνονταν φαίνονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.1 Μετρήσεις καλλιεργειών

	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ					
ΣΥΝΘΗΚΕΣ	pH	Οπτική πυκνότητα στα 605 nm	Fe ²⁺ /Fe ³⁺	NO ₃ -N	NH ₄ -N	O ₂
ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ	✓	✓	✓	×	×	×
ΑΝΟΞΙΚΕΣ	✓	✓	×	✓	×	×
ΑΕΡΟΒΙΕΣ	✓	✓	×	×	✓	✓

Περιοδικά επίσης γινόταν η μέτρηση των στερεών (TSS και VSS), η μέτρηση των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ουσιών και η μέτρηση FISH.

3.5.1 Μέτρηση pH

Η μέτρηση του pH γίνεται με φορητό ηλεκτρονικό pH-μετρο WTW315I. Το pH-μετρο ελέγχεται μία φορά το μήνα ως προς την κλίση του και το ισοηλεκτρικό σημείο (0 mV, pH 7,00). Γίνεται βαθμονόμηση του οργάνου (calibration) στις περιοχές pH 4,00 και 7,00 με κατάλληλα διαλύματα buffer, γίνεται επαλήθευση με άλλα buffer και καταγράφεται η διαφορά η οποία θα πρέπει να είναι της τάξης ±0,1 μονάδες pH.

Κατόπιν καταγράφεται η τιμή της κλίσης (slope) και του δυναμικού και παρατηρείται η απόκλιση από τη θεωρητική τιμή.



Εικόνα 3.2 Ηλεκτρονικό pH-μετρο

3.5.2 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Αρχικά γεμίζεται κυψελίδα των 10 ml με απιονισμένο νερό και τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο. Το φασματοφωτόμετρο ρυθμίζεται στα 605 nm και γίνεται μηδενισμός. Στη συνέχεια, στην κυψελίδα τοποθετείται το εκάστοτε δείγμα και γίνεται η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.



Εικόνα 3.3 Φασματοφωτόμετρο

3.5.3 Μέτρηση $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$

Στα δείγματα από τις αναερόβιες καλλιέργειες γίνεται μέτρηση του δισθενούς και του τρισθενούς σιδήρου. Αρχικώς το δείγμα διηθείται και στη συνέχεια γίνεται αραιώση 1 προς 10. Ύστερα 2 ml από το διηθημένο δείγμα εκχύνονται σε έτοιμα αντιδραστήρια της εταιρείας HACH και γίνεται μέτρηση με τη μέθοδο LCK 320 μέσω barcode στο φασματοφωτόμετρο. Το αντιδραστήριο ανακινείται και μετά από χρόνο 5 λεπτών μετριέται ο δισθενής σίδηρος. Στη συνέχεια, αλλάζεται καπάκι στο αντιδραστήριο και ανακινείται ξανά. Μετά από 5 λεπτά μετριέται ο ολικός σίδηρος, οπότε η διαφορά των δύο μετρήσεων είναι ο τρισθενής.



Εικόνα 3.4 Αντιδραστήρια HACH $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$

3.5.4 Μέτρηση νιτρικών $\text{NO}_3\text{-N}$

Στα δείγματα από τις ανοξικές καλλιέργειες γίνεται μέτρηση των νιτρικών. Το δείγμα διηθείται και αραιώνεται με διάλυση 1 προς 5. Στη συνέχεια 1 ml από το διηθημένο δείγμα εκχύνεται στο αντιδραστήριο της HACH. Επίσης μες στο αντιδραστήριο εισάγονται 200 μL από το διάλυμα Α. Ύστερα από 15 λεπτά γίνεται μέτρηση των νιτρικών με τη μέθοδο LCK 339 με barcode, όπου το αντιδραστήριο τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο.



Εικόνα 3.5 Αντιδραστήρια HACH NO₃-N

3.5.5 Μέτρηση αμμωνιακών NH₄-N

Η μέτρηση αμμωνιακών γινόταν στα δείγματα από τις αερόβιες καλλιέργειες. Ομοίως, τα δείγματα διηθούνταν και στη συνέχεια γινόταν αραιώση 1 προς 2. Εκχύνονταν 5 ml στο αντιδραστήριο της HACH, ανακινούταν και παρέμενε για 15 λεπτά. Στη συνέχεια μετρούνταν τα αμμωνιακά με το φασματοφωτόμετρο με τη μέθοδο LCK 304.



Εικόνα 3.6 Αντιδραστήρια HACH NH₄-N

3.5.6 Μέτρηση O₂

Στις αερόβιες καλλιέργειες, επίσης, μετριέται κάθε δύο εβδομάδες το διαλυτό οξυγόνο με το οξυγονόμετρο, το οποίο πρέπει να κυμαίνεται σε τιμές μεγαλύτερες από 4 mg/L.



Εικόνα 3.7 Οξυγονόμετρο

3.6 Μέτρηση συγκέντρωσης ουσιών

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των επτά ουσιών δύο φορές, την 34^η (μη-μόνιμες συνθήκες, μη-εγκλιματισμένη βιομάζα) και 109^η ημέρα (μόνιμες συνθήκες, εγκλιματισμένη βιομάζα). Στα επόμενα υποκεφάλαια παρουσιάζεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε.

3.6.1 Προετοιμασία δειγμάτων για την μέτρηση τους στον αέριο φασματογράφο

Η διαδικασία της εκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) πραγματοποιείται ώστε τα δείγματα που έχουν συλλεχθεί να αναλυθούν από τον αέριο φασματογράφο GC-MS και να δώσουν τις συγκεντρώσεις των επτά εξεταζόμενων ουσιών. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε διαλυτό δείγμα.

3.6.1.1 Δείγματα από τις ογκομετρικές φιάλες

Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε συσκευή κενού, στην οποία προσαρμόζονται στήλες C18 (500 mg–6 ml). Οι στήλες ενεργοποιούνται με την προσθήκη και διέλευση με φυσική ροή 6 ml (3x2 ml) οξικού αιθυλεστέρα, 6 ml (3x2 ml) μεθανόλη και 6 ml (3x2ml) υπερκάθαρο νερό. Όταν τελειώσει η αρχική διαδικασία κλείνονται οι στρόφιγγες των στηλών και προστίθενται 4 ml υπερκάθαρο νερό. Στη συνέχεια προσαρμόζονται στις στήλες σύριγγες χωρητικότητας 50 ml και αδειάζονται τα δείγματα. Έπειτα ανοίγει η παροχή των στηλών και φιλτράρονται τα 10 ml των δειγμάτων. Όταν στεγνώσουν οι στήλες αφαιρούνται οι σύριγγες και πραγματοποιείται έκπλυση των στηλών με 2ml οξιτισμένου νερού με pH 2,5. Τέλος, προσαρμόζεται στην συσκευή κενού αντλία για 60 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί ξήρανση των στηλών.

Έπειτα από την ξήρανση πραγματοποιείται έκπλυση των στηλών με 6ml (3x2 ml) οξικού αιθυλεστέρα με αποτέλεσμα οι ουσίες να εκχυλιστούν και να καταλήξουν στα σκουρόχρωμα φιαλίδια συνολικού όγκου 15 ml. Τέλος τα φιαλίδια αποθηκεύονται στην κατάψυξη για συντήρηση, μέχρι να αναλυθούν με τη χρήση του αέριου φασματογράφου GC–MS.

3.6.2 Περιγραφή της λειτουργίας του αέριου φασματογράφου

Παραγωγοποίηση

Μετά την διαδικασία της εκχύλισης ακολουθεί η παραγωγοποίηση των δειγμάτων. Αρχικά τα δείγματα υφίστανται εξάτμιση έως ότου ξεραθούν με τη βοήθεια αζώτου (N₂). Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml οξικού αιθυλεστέρα και το δείγμα αναδεύεται με vortex (δονητή δοκιμαστικών σωλήνων) για 30 sec.

Έπειτα 1 ml δείγματος μεταγγίζεται από τα σκουρόχρωμα φιαλίδια σε διάφανα φιαλίδια με κωνικό πάτο και πραγματοποιείται η πλήρης εξάτμιση του δείγματος με χρήση αζώτου. Επιπλέον, γίνεται προσθήκη 60 µL εσωτερικών προτύπων (BPA και MCF). Επαναλαμβάνεται η πλήρης εξάτμιση του δείγματος με χρήση αζώτου.

Στη συνέχεια προστίθενται 50 µL BSTFA 1% TMCS καθώς και 10 µL πυριδίνης. Το δείγμα αναδεύεται με vortex και τοποθετείται σε λουτρό στους 70 °C για 20 λεπτά. Το παραγωγοποιημένο δείγμα που προκύπτει αφήνεται για να επανέλθει σε

θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά και οδηγείται για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο.

Ανάλυση με Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας

- Αρχή λειτουργίας αέριου χρωματογράφου

Στην αέρια χρωματογραφία (GC – Gas Chromatography) ο διαχωρισμός των συστατικών (αέριων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών, και ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο). Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από τη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες, που εξαρτώνται από την τάση ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση. Η αέρια χρωματογραφία κατανομής βασίζεται στη θεωρία των πλακών. Σύμφωνα με τη θεωρία των [Martin et al., 1940], η κίνηση μιας ουσίας μέσα από τη χρωματογραφική στήλη μπορεί να θεωρηθεί ως μετακίνηση μέσω διαδοχικών θαλάμων (ζωνών) εξισορροπήσεως, που ονομάζονται θεωρητικές πλάκες. Ως θεωρητική πλάκα ορίζεται ο απαιτούμενος όγκος της στήλης, ώστε μέσα σε αυτόν να αποκαθίσταται η ισορροπία μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Η ισορροπία αυτή περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής:

$$K=CS/CM$$

Όπου CS και CM είναι οι συγκεντρώσεις του συστατικού στην στατική και στην κινητή φάση αντίστοιχα.

- Στήλες

Όταν μια ουσία A εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο, παρασυρόμενη από την κινητή φάση, εισέρχεται με αυτή στη στήλη. Στο θάλαμο 1, μέρος της ουσίας A διαλύεται στην διαλυτή φάση με ταχύτατη αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων (συντελεστής K). Την επόμενη στιγμή, το μέρος της ουσίας A, που βρίσκεται στην αέρια φάση, παρασυρόμενο από το φέρον αέριο εισέρχεται στο θάλαμο 2, όπου μέρος του διαλύεται στην υγρή φάση με ταχύτατη αποκατάσταση ισορροπίας, ενώ συγχρόνως νέα αέρια φάση εισέρχεται στο θάλαμο 1, με αποκατάσταση νέας ισορροπίας. Την επόμενη στιγμή, το μέρος της ουσίας A που βρίσκεται στην αέρια φάση του θαλάμου 2, παρασυρόμενο εισέρχεται στο θάλαμο 3, με αποκατάσταση ισορροπίας σε αυτόν κ.ο.κ. Στην περίπτωση μίγματος ουσιών, όσο μεγαλύτερος είναι ο συντελεστής K μιας ουσίας, τόσο βραδύτερα κινείται μέσα στη στήλη και τόσο βραδύτερα εξέρχεται από αυτήν, δηλαδή έχει μεγαλύτερο χρόνο συγκρατήσεως, tR.

Έτσι, επιτυγχάνεται διαχωρισμός των συστατικών, λόγω διαφορετικών συντελεστών κατανομής. Η επιλογή του είδους της στήλης αποτελεί το πιο ουσιαστικό βήμα στην ανάλυση με αέρια χρωματογραφία. Τα κύρια χαρακτηριστικά της είναι ο αριθμός θεωρητικών πλακών, το ύψος ισοδύναμο με μία θεωρητική πλάκα, η διαχωριστικότητα, η χωρητικότητα, ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης.

- Φέρον Αέριο

Αποτελεί την κινητή φάση και πρέπει να είναι χημικώς αδρανές έναντι του υλικού κατασκευής του μηχανήματος, του πληρωτικού υγρού της στήλης και των προς διαχωρισμό ουσιών. Η επιλογή του φέροντος αερίου γίνεται κυρίως βάσει του τύπου του ανιχνευτή, γιατί πρέπει να διαφέρει από τις διαχωριζόμενες ουσίες ως προς τουλάχιστον μία ιδιότητα όπως τη θερμική αγωγιμότητα ή την πυκνότητα στην οποία βασίζεται η λειτουργία του ανιχνευτή. Συνήθως χρησιμοποιούνται He, N₂, Ar, H₂, CO₂ με προτιμότερο το He, επειδή έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα και μικρή πυκνότητα, που επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής αερίου, με αντίστοιχη μείωση του χρόνου αναλύσεως. Το φέρον αέριο μεταφέρεται από τη φιάλη όπου βρίσκεται σε πίεση 100–200 atm, μέσω ενός ρυθμιστή (μειωτήρα) πίεσεως, ο οποίος με τη βοήθεια ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά την πίεση στις 1 με 2 atm. Ένα ροόμετρο μέσα από το οποίο διέρχεται το αέριο μετράει με μεγάλη ακρίβεια την ταχύτητά του.

- Εισαγωγή δείγματος

Το δείγμα εισάγεται στην αρχή της στήλης με μικροσύριγγα, μέσα από κατάλληλο στόμιο εισαγωγής που φράσσεται με παχύ διάφραγμα από θερμοανθεκτικό ελαστικό (septum), το οποίο επιτρέπει την είσοδο του δείγματος, αλλά όχι την έξοδο αυτού ή του φέροντος αερίου. Η εισαγωγή του δείγματος πρέπει να είναι ακαριαία, ο όγκος του ο μικρότερος δυνατός και ο χώρος εισαγωγής να θερμαίνεται υψηλότερα από τη θερμοκρασία της στήλης.

- Θερμοστατούμενος Κλίβανος

Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος και η στήλη, καθώς και σε πολλούς αέριους χρωματογράφους και ο ανιχνευτής, θερμοστατούνται, συνήθως μεταξύ 50–300 °C, είτε όλα μαζί είτε χωριστά. Η διαχωριστικότητα αυξάνεται όταν η θερμοκρασία ελαττώνεται, μείωση όμως της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση του χρόνου tR, και επομένως αύξηση του χρόνου αναλύσεως. Όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της χρωματογράφησης, συχνά είναι δύσκολο

να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός και ανίχνευση των συστατικών ενός μίγματος όταν τα σημεία ζέσεως τους ή και οι πολικότητες τους καλύπτουν ευρείες περιοχές. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κορυφές των πτητικότερων συστατικών (χαμηλά σημεία ζέσεως) εμφανίζονται η μία κοντά στην άλλη ή αλληλεπικαλύπτονται (μικρή διαχωριστικότητα), ενώ οι κορυφές των λιγότερο πτητικών ουσιών, είναι μικρού ύψους, πλατιές και σε ορισμένες περιπτώσεις απέχουν τόσο πολύ μεταξύ τους (υπέμετρη διαχωριστικότητα), ώστε ενώσεις υψηλού σημείου ζέσεως να μην ανιχνεύονται. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται η θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία, όπου η θερμοκρασία μεταβάλλεται με βάση προκαθορισμένο πρόγραμμα.

- Αρχή λειτουργίας φασματοφωτομετρίας μαζών

Τα ηλεκτρόνια σχετικά υψηλής ενεργειακής στάθμης όταν προσκρούσουν σε μόρια μιας ενώσεως, που βρίσκεται σε αέρια φάση και σε συνθήκες υψηλού κενού, τα μόρια της ενώσεως μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό, συνήθως, φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα/ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Το αποτέλεσμα είναι ένα διάγραμμα που δείχνει την ένταση του μετρούμενου ρεύματος (πάντοτε σε σχετικές και όχι απόλυτες μονάδες), ως συνάρτηση του λόγου m/z και ονομάζεται φάσμα μαζών της ουσίας. Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος.

Τα φασματόμετρα μαζών αποτελούνται από τα ακόλουθα κοινά και διακριτά τμήματα: α) Το σύστημα εισαγωγή του δείγματος, β) την πηγή ιόντων, γ) τον αναλυτή μαζών και δ) τον ανιχνευτή. Εκτός από αυτά τα τμήματα, κάθε φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει συστήματα δημιουργίας υψηλού κενού, καθώς και συστήματα παρουσιάσεως των φασμάτων. Η φασματομετρία μαζών μπορεί να συνδυαστεί με την αέρια χρωματογραφία που σήμερα αποτελεί τη συνηθέστερη τεχνική για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση εξαιρετικά πολύπλοκων οργανικών ενώσεων. Το φασματόμετρο μαζών δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής επιλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα. Ο αναλυτής μαζών του φασματόμετρου μαζών ρυθμίζεται έτσι, ώστε να επιτρέπει την ανίχνευση ιόντος με προκαθορισμένη τιμή

m/z, οπότε πλέον το χρωματογράφημα παρέχει χρωματογραφικές κορυφές μόνο για τις ουσίες που παρέχουν το συγκεκριμένο ιόν.

Στην παρούσα εργασία η ανάλυση πραγματοποιείται με αέριο χρωματογράφο Agilent 7890A συζευγμένο με φασματογράφο μάζας Agilent 5975C. Η στήλη που χρησιμοποιείται είναι η DB5MS (30 m x 0,25 μm x 0,32 mm) από τη Supelco, USA. Το φέρον αέριο είναι το ήλιο (99,999 %) με μια σταθερή ροή 0,9 mL/min.

3.7 Μέτρηση TSS/VSS

3.7.1 Ορισμοί

TSS: Τα ολικά αιωρούμενα στερεά (Total Suspended Solids - TSS) αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των ολικών στερεών (TS), τα οποία λόγω μεγέθους συγκρατούνται κατά τη διήθηση μέσω τυποποιημένου φίλτρου GF/C.

VSS: Τα πτητικά αιωρούμενα στερεά (Volatile Suspended Solids - VSS) είναι τα αιωρούμενα στερεά που εξαερώνονται σε θερμοκρασία 550 °C και κατά προσέγγιση είναι τα οργανικά στερεά.

3.7.2 Όργανα

Για τη μέτρηση των TSS και VSS των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Φούρνοι των 105 °C και 550 °C
- Ηλεκτρονικός ζυγός (ακρίβειας 0,0001 g)
- Διηθησιόμετρο
- Φίλτρα διήθησης
- Αντλία κενού
- Ανοξείδωτες μεταλλικές λαβίδες
- Ξηραντήρας με κατάλληλο αφυγραντικό μέσο
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 ml

3.7.3 Διαδικασία μέτρησης

Αρχικώς, τα φίλτρα τοποθετούνται στο φούρνο των 550 °C για 15 min. Στη συνέχεια τοποθετούνται στον ξηραντήρα μέχρι να επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα αποξηραμένα φίλτρα είναι έτοιμα πλέον προς χρήση.



Εικόνα 3.8 Ξηραντήρας

Ζυγίζεται ένα φίλτρο με τον ηλεκτρονικό ζυγό και σημειώνεται το βάρος. Στη συνέχεια τοποθετείται στο διηθησιόμετρο με τη σαγρέ (wrinkled) επιφάνεια προς τα πάνω. Ογκομετρείται μία ποσότητα δείγματος με τον ογκομετρικό κύλινδρο, και αφού καταγραφεί ο όγκος, ρίχνεται μες στο διηθησιόμετρο και μπαίνει σε λειτουργία η αντλία κενού. Το φίλτρο, με τα στερεά πλέον στην πάνω επιφάνεια, τοποθετείται σε αλουμινόχαρτο και μπαίνει στο φούρνο των 105 °C όπου και παραμένει για 24 ώρες. Ύστερα, το φίλτρο τοποθετείται στον ξηραντήρα, και αφού παραμείνει έως ότου επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ζυγίζεται και καταγράφεται η μάζα του. Η συγκέντρωση των TSS υπολογίζεται από τη σχέση:

$$TSS (mg/L) = \frac{m_{105^{\circ}C} - m_o}{V}$$

Όπου, $m_{105^{\circ}C}$ η μάζα του φίλτρου μετά καύση στους 105 °C και την ξήρανση (mg)

m_o η αρχική μάζα του φίλτρου (mg)

V ο όγκος του δείγματος (L)



Εικόνα 3.9 Φούρνος των 105 °C

Ακολουθεί ο υπολογισμός των VSS. Το αποξηραμένο φίλτρο τοποθετείται στο φούρνο των 550 °C για 15 λεπτά. Ύστερα τοποθετείται στον ξηραντήρα μέχρι να επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κατόπιν, το φίλτρο ζυγίζεται και καταγράφεται η μάζα του. Η συγκέντρωση των VSS υπολογίζεται με τον ακόλουθο τύπο:

$$VSS (mg/L) = \frac{m_{105^{\circ}C} - m_{550^{\circ}C}}{V}$$

Όπου, $m_{105^{\circ}C}$ η μάζα του φίλτρου μετά καύση στους 105 °C και την ξήρανση (mg)

$m_{550^{\circ}C}$ η μάζα του φίλτρου μετά καύση στους 550 °C και την ξήρανση (mg)

V ο όγκος του δείγματος (L)



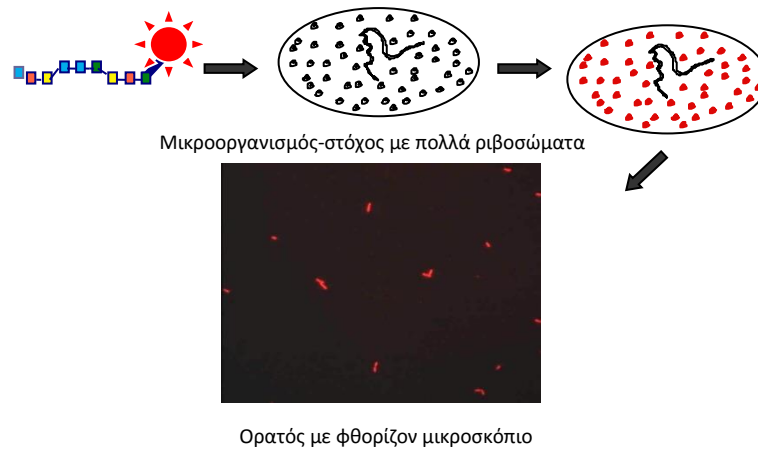
Εικόνα 3.10 Φούρνος των 550 °C

3.8 Πρωτόκολλο εφαρμογής της μεθόδου Φθορίζουσα Επί τόπου Υβριδοποίηση (Fluorescent In-Situ Hybridization - FISH)

3.8.1 Εισαγωγή

Η μέθοδος FISH είναι ιδανική για την επιλεκτική εύρεση μιας συγκεκριμένης ομάδας σε ένα σύνολο μικροοργανισμών. Στηρίζεται σε αναλύσεις του ριβοσωμικού ριβονουκλεϊκού οξέος (16S rRNA) που έγιναν με τη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών και αποκάλυψαν σύντομες ακολουθίες ολιγονουκλεοτιδίων μοναδικές για ορισμένες ομάδες μικροοργανισμών, για ορισμένα γένη ή ακόμα και συγκεκριμένα είδη. Αυτό οδήγησε στην κατασκευή μοριακών εργαλείων και επέτρεψε τη μελέτη των περιβαλλοντικών δειγμάτων βάσει του γενότυπου αντί του φαινότυπού τους. Τα εν λόγω μοριακά εργαλεία στη συνέχεια του κειμένου θα καλούνται ιχνηλάτες.

Η αρχή της μεθόδου μπορεί να συνοψιστεί ως εξής: Οι ιχνηλάτες που αποτελούνται από μονές αλυσίδες ολιγονουκλεοτιδίων γνωστής ακολουθίας εισέρχονται στα κύτταρα και υβριδοποιούν τις συμπληρωματικές τους ακολουθίες ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) στα ριβοσώματα. Αν δεν βρεθεί συμπληρωματική ακολουθία RNA, τότε δεν πραγματοποιείται υβριδοποίηση και άρα οι προστιθέμενοι ιχνηλάτες απομακρύνονται σε ακόλουθο στάδιο καθαρισμού. Έτσι μόνο τα κύτταρα που στοχεύονται από τα μοριακά εργαλεία, κρατούν τις ακολουθίες των ολιγονουκλεοτιδίων και καθώς αυτές είναι χαρακτηρισμένες με φθορίζουσες ουσίες, τα κύτταρα που έχουν υβριδοποιηθεί μπορούν να παρατηρηθούν με μικροσκόπιο φθορισμού λόγω της φυσικής ενίσχυσης του φθορίζοντος σήματος από το μεγάλο αριθμό των ριβοσωμάτων σε κάθε κύτταρο.



Εικόνα 3.11: Διάγραμμα ροής της μεθόδου FISH

Στην παρούσα διπλωματική, η μέθοδος FISH χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των βακτηρίων που βιοαποδομούν τους ενδοκρινικούς διαταράκτες και τις φαρμακευτικές ουσίες, όπως αναλύθηκαν στο Κεφάλαιο 2. Για την ταυτοποίηση των βακτηρίων επιλέχθηκαν οι ιχνηλάτες που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.2 Ιχνηλάτες

Ιχνηλάτης	Ομάδα-Στόχος	Φθορίζουσα ουσία	Ακολουθία
EUB338	Ευβακτήρια	Cy3	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'
ARCH915	Αρχαία	Cy3	5'- GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT -3'
DEN67	Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν τη μεθανόλη	Texas-Red	5'- CAAGCACCCGCGCTGCCG -3'
ALF968	α -Proteobacteria	Cy3	5'- GGT AAG GTT CTG CGC GTT -3'
SPH120	Sphingomonas sp.	Texas-Red	5'- GGG CAG ATT CCC ACG CGT -3'
BET42a	β - Proteobacteria	Cy3	5'- GCC TTC CCA CTT CGT TT -3'
NSE1472	Nitrosomonas sp.	Texas-Red	5'- ACC CCA GTC ATG ACC CCC -3'
GAM42a	γ - Proteobacteria	Cy3	5'- GCC TTC CCA CAT CGT TT -3'
PAE997	Pseudomonas sp.	Texas-Red	5'- TCT GGA AAG TTC TCA GCA -3'
LGC354b	Firmicutes	Cy3	5'- CGG AAG ATT CCC TAC TGC -3'
LGC353b	Bacillus sp.	Texas-Red	5'- GCG GAA GAT TCC CTA CTG C -3'

3.8.2 Πρωτόκολλο ανάλυσης FISH

Για τις ανάγκες τις παρούσας διπλωματικής εργασίας, συλλέχθηκαν δύο δείγματα από όλες τις καλλιέργειες την 97^η και την 119^η ημέρα (εγκλιματισμένη βιομάζα) με στόχο την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών με τη μοριακή μέθοδο FISH. Παρακάτω παρουσιάζεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε.

Παρασκευή Διαλύματος 4% w/v PFA/PBS

Κάτω από τον απαγωγό προστίθενται 4 gr παραφορμαλδεΐδης (PFA) σε 80 ml υπερκάθαρου νερού και θερμαίνεται στους 60°C για περίπου 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 3 σταγόνες 1M NaCl για να καθαρίσει και αφήνεται να κρυώσει. Μετά, προστίθενται 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (PBS) συγκέντρωσης 10 M, μια μικρή ποσότητα 5 M θειϊκού οξέος ωστόσο το pH φτάσει 7.2 καθώς και ο απαραίτητος όγκος υπερκάθαρου νερού ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4 °C για 24 ώρες.

Σταθεροποίηση δειγμάτων

Συλλέγονται δυο δείγματα όγκου 37,5 ml για Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς και 25 ml για Gram θετικών από κάθε καλλιέργεια και μεταφέρονται σε tube corning των 50 ml. Για την επίτευξη του βέλτιστου φθορισμού, η σταθεροποίηση των Gram-αρνητικών μικροοργανισμών πραγματοποιείται με την προσθήκη 12.5 ml διαλύματος παραφορμαλδεΐδης και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (4% w/v PFA/PBS), ενώ των Gram-θετικών με 25 ml καθαρής αιθανόλης (98%). Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4 °C για 4-16 ώρες. Στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται στις 10000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά και το υπερκείμενο αφαιρείται. Για την επαναδιάλυση των δειγμάτων, προστίθεται 1,5 ml 1 M PBS και τα μείγματα μεταφέρονται σε tube των 2 ml. Οι διαδικασίες της φυγοκέντρωσης, αφαίρεσης υπερκειμένου επαναλαμβάνονται και πραγματοποιείται επαναδιάλυση σε 1,5 ml μείγματος αναλογίας 1/1 v/v PBS/αιθανόλης. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20°C έως 3 μήνες.

Τοποθέτηση σε πλακίδια

Το δείγμα αφήνεται να έρθει σε υγρή μορφή και αναταράσσεται για να επαναδιαλυθεί. 10 μL τοποθετούνται σε μια θέση του μικροσκοπικού πλακιδίου και απλώνονται με την άκρη της μικροπιπέτας σε όλη την επιφάνεια. Όταν

συμπληρωθούν οι 12 θέσεις του πλακιδίου, τοποθετείται στον φούρνο στους 46 °C μέχρι να στεγνώσουν τα δείγματα.

Αφυδάτωση

Τα πλακίδια τοποθετούνται κάθετα σε ειδικό δοχείο (Corlin jar), στο οποίο έχει προστεθεί ποσότητα διαλύματος αιθανόλης, συγκέντρωσης 50% v/v, ώστε η περιοχή των πλακιδίων με δείγμα να είναι πλήρως καλυμμένη, για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, τα πλακίδια μεταφέρονται διαδοχικά σε δεύτερο και τρίτο δοχείο με διαλύματα αιθανόλης συγκέντρωσης 80% v/v και 98% v/v για 3 λεπτά στο καθένα και αφήνονται να στεγνώσουν.

Υβριδοποίηση

Σε tube 2 ml παρασκευάζεται το διάλυμα υβριδοποίησης υπό σκότος, προσθέτοντας 360 μ L NaCl (5 M), 40 μ L Tris-HCl (1 M) και φορμαμίδιο αναλόγως τον ιχνηλάτη που θα χρησιμοποιηθεί (Πίνακας 3.3). Τέλος, στο καπάκι του tube, προστίθενται 2 μ L SDS (10% v/v) για την αποφυγή καθίζησης.

Πίνακας 3.3 Συγκεντρώσεις φορμαμιδίου στο διάλυμα υβριδοποίησης

Ιχνηλάτης	% v/v Φορμαμίδιο	Φορμαμίδιο (μ L)	Υπερκάθαρο νερό (μ L)
EUB338	35	700	900
ARCH915	35	700	900
DEN67	35	700	900
ALF968	20	400	1200
SPH120	30	600	1000
BET42a	35	700	900
NSE1472	50	1000	600
GAM42a	35	700	900
PAE997	0	-	1600
LGC354b	35	700	900
LGC353b	20	400	1200

Σε κάθε θέση του πλακιδίου, προστίθενται 8 μ L διαλύματος υβριδοποίησης, 1 μ L ιχνηλάτη (τελική συγκέντρωση 5 ng/ml) και 1 μ L 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (20 ng/ml). Στη συνέχεια, τα πλακάκια εισάγονται σε υγρό και σκοτεινό θάλαμο και αφήνονται για 2 ώρες στους 46 °C.

Έκπλυση

Σε 50 ml tube corning προστίθενται 1000 ml Tris-HCl (1 M), NaCl και EDTA σύμφωνα με τη συγκέντρωση φορμαμίδιου που εισάχθηκε στο βήμα της υβριδοποίησης (Πίνακας 3.4) και υπερκάθαρο νερό μέχρι τα 50 ml. Τέλος, προστίθενται 50 μ L SDS (10%).

Πίνακας 3.4 Συγκέντρωση NaCl και EDTA στο διάλυμα έκπλυσης

Ιχνηλάτης	% v/v Φορμαμίδιο	NaCl (mM)	5 M NaCl (μ L)	EDTA (μ L)
EUB338	35	80	800	500
ARCH915	35	80	800	500
DEN67	35	80	800	500
ALF968	20	225	2250	500
SPH120	30	112	1120	500
BET42a	35	80	800	500
NSE1472	50	28	280	500
GAM42a	35	80	800	500
PAE997	0	900	9000	-
LGC354b	35	80	800	500
LGC353b	20	225	2250	500

Τα πλακίδια εκπλένονται μέσα σε σκοτεινό, θερμαινόμενο λουτρό για 20 λεπτά στους 48 °C. Ακολουθεί έκπλυση με υπερκάθαρο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν σε σκοτεινό μέρος.

Αποθήκευση πλακιδίων

Προστίθενται 2-3 σταγόνες αντι-αποχρωστικής ουσίας (Citifluor), τα δείγματα καλύπτονται με καλυπτρίδες σε χαμηλό φωτισμό και φυλάσσονται στους -20 °C σε ειδικά δοχεία.

Παρατήρηση-Καταμέτρηση

Τα πλακίδια παρατηρούνται στο μικροσκόπιο υπό φθορισμό με το κατάλληλο φίλτρο (Cy3 ή TexasRed), το οποίο είναι συμβατό με τη φθοροφόρο ουσία του ιχνηλάτη, για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων στοχευμένων μικροοργανισμών (target group) και μετά με το φίλτρο DAPI για την εύρεση του συνόλου των μικροοργανισμών. Για κάθε δείγμα 20 περίπου ζεύγη φωτογραφιών (Cy3-DAPI ή TexasRed-DAPI) χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση του ποσοστού γένος ή κλάση που στοχεύουμε /σύνολο μικροοργανισμών (target group/DAPI) με τη χρήση του προγράμματος Image-Pro.

Αξιολόγηση μετρήσεων

Για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τέθηκαν κριτήρια για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο FISH και την απόρριψη εσφαλμένων μετρήσεων, τα οποία θα αναλυθούν σε αυτή την παράγραφο. Για να είναι οι μετρήσεις δεκτές πρέπει να πληρούν τα παρακάτω κριτήρια:

A) Το άθροισμα των βακτηρίων και των αρχαίων θα πρέπει να είναι κυμαίνεται μεταξύ 80-120%. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι τα βακτήρια και τα αρχαία μετριούνται σε δείγματα Gram-αρνητικών μικροοργανισμών (δείγματα σε διάλυμα 4% w/v PFA/PBS), όμως ένα μέρος των Gram-θετικών μικροοργανισμών (δείγματα σε καθαρή αιθανόλη) δεν μπορεί να παρατηρηθεί γιατί ο ιχνηλάτης δεν θα διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμά τους.

B) Το ποσοστό ενός υποσυνόλου (πχ γένος) ή το άθροισμα των υποσυνόλων θα πρέπει να είναι ίσο ή μικρότερο της μεγαλύτερης κατηγορίας του (πχ τάξη) με ένα αποδεκτό σφάλμα (+/-5%).

Γ) Η τυπική απόκλιση των δύο μετρήσεων σε ένα αντίτυπο δεν μπορεί να ξεπερνά το 15%. Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση που το ποσοστό είναι κάτω του 8% του συνόλου των μικροοργανισμών μιας και το σφάλμα μπορεί να είναι μεγαλύτερο. Σε αυτή την περίπτωση δεν τέθηκε κάποιο κριτήριο, αφού η μέτρηση θεωρείται χαμηλή για να ληφθεί υπόψιν.

Δ) Η τυπική απόκλιση των δύο αντιτύπων (duplicate) δεν μπορεί να ξεπερνά το 20%.

Κεφάλαιο 4^ο - Αποτελέσματα

4.1 Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της ικανότητας βιοαποδόμησης των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ουσιών σε αερόβιες, αναερόβιες και ανοξικές συνθήκες, καθώς και η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που μπορούν να βιοαποδομήσουν τις συγκεκριμένες ουσίες. Τα πειράματα, όπως περιγράφηκε αναλυτικά και στο Κεφάλαιο 3, διήρκησαν από 6/11/2014 έως τις 5/3/2015. Εξετάστηκαν 7 ουσίες, οι οποίες ήταν η bisphenol-A, η triclosan, η nonylphenol, η diclofenac, η ibuprofen, η naproxen και η ketoprofen ενώ το πείραμα ελέγχου (control) περιείχε μόνο μεθανόλη. Για κάθε ουσία υπήρχε μια καλλιέργεια σε διπλό αντίτυπο υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες. Ο χρόνος παραμονής ήταν 20 ημέρες και μετά από 3 φορές το χρόνο παραμονής, δηλαδή 60 ημέρες, θεωρήθηκε ότι επικρατούσαν στις καλλιέργειες μόνιμες συνθήκες (εγκλιματισμός βιομάζας).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται αποτελέσματα από μετρήσεις του pH, της οπτικής πυκνότητας, του δισθενούς/τρισθενούς σιδήρου, των νιτρικών, των αμμωνιακών και του οξυγόνου των καλλιεργειών. Τα αποτελέσματα είναι οι μέσοι όροι των εβδομαδιαίων μετρήσεων από τα δύο αντίτυπα μετά τον εγκλιματισμό της βιομάζας ως το τέλος των πειραμάτων (60^η μέρα-119^η μέρα). Τα TSS και VSS μετρήθηκαν μια φορά στο τέλος των πειραμάτων, ενώ οι τιμές που φαίνονται στο παρόν κεφάλαιο είναι οι μέσοι όροι των δύο αντιτύπων. Επίσης, μετρήθηκε η τελική συγκέντρωση των ουσιών πριν τον εγκλιματισμό (34^η ημέρα), όπου η θεωρητική συγκέντρωση των ουσιών εντός των καλλιεργειών ήταν περίπου 2,6 mg/L, και σε εγκλιματισμένη βιομάζα (109^η ημέρα), όπου η θεωρητική συγκέντρωση είχε φτάσει τα 3,0 mg/L. Οι τιμές που φαίνονται παρακάτω είναι οι μέσοι όροι του ποσοστού απόκλισης από τη θεωρητική τιμή (ποσοστό απομάκρυνσης). Τέλος, έγινε η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των επικρατέστερων μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες, όπως προέκυψε από τη μέθοδο FISH. Οι ομάδες μικροοργανισμών που ανιχνεύθηκαν σε κάθε συνθήκη φαίνονται στον πίνακα 4.1, ενώ τα αποτελέσματα που φαίνονται σε όλο κεφάλαιο 4, είναι οι μέσοι όροι δύο δειγμάτων (97^η και 119^η μέρα).

Τα σφάλματα στους πίνακες και οι μπάρες στα διαγράμματα είναι η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Ακολουθεί ο Πίνακας 4.1 όπου αναλύονται οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στα διαγράμματα.

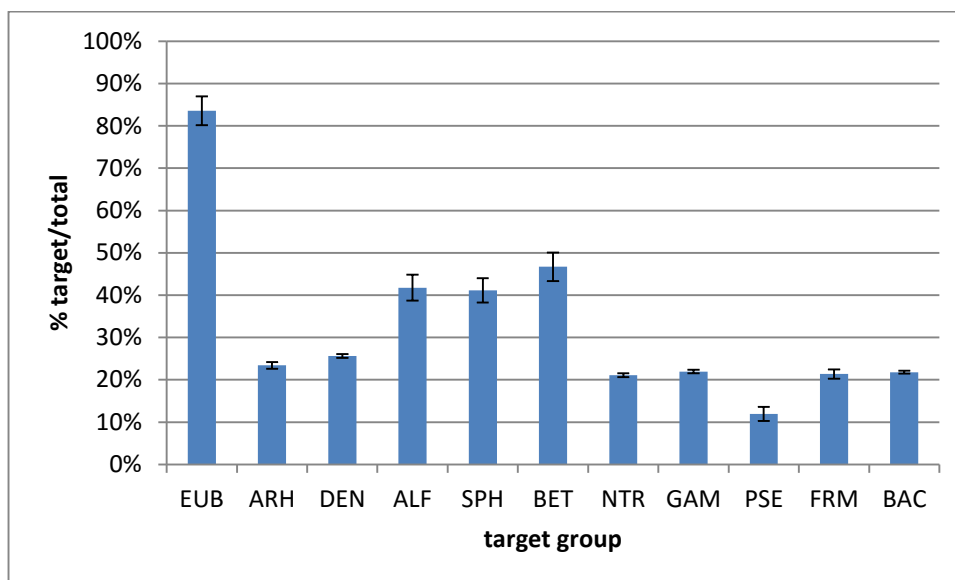
Πίνακας 4.1 Συντομογραφίες μικροοργανισμών

Συντομογραφία	Όνομα	Αερόβιες	Ανοξικές	Αναερόβιες
EUB	Eubacteria - Βακτήρια	✓	✓	✓
DEN	Methanol-utilizing bacteria - Βακτήρια που καταλώνουν μεθανόλη	✓	✓	✓
ARH	Archaea - Αρχαία	×	✓	✓
ALF	α-Proteobacteria - α-πρωτεοβακτήρια	✓	✓	✓
SPH	<i>Sphingomonas</i>	✓	×	×
BET	β-Proteobacteria - β-πρωτεοβακτήρια	✓	✓	✓
NTR	<i>Nitrosomonas</i>	✓	×	×
GAM	γ-Proteobacteria - γ-πρωτεοβακτήρια	✓	✓	✓
PSE	<i>Pseudomonas</i>	✓	✓	✓
FRM	Firmicutes	✓	✓	✓
BAC	<i>Bacillus</i>	✓	✓	✓

4.2 Αρχικό δείγμα

Στο Διάγραμμα 4.1 δίνονται τα αποτελέσματα του μικροσκοπικού προσδιορισμού των βακτηρίων στο αρχικό δείγμα όλων των μικροκόσμων. Παρατηρείται ότι στο αρχικό δείγμα υπήρχαν όλες οι ομάδες μικροοργανισμών (target group) σε

ικανοποιητικά επίπεδα με τα βακτήρια να υπερέχουν έναντι των αρχαίων, ενώ υψηλό ήταν και το ποσοστό των τάξεων α - και β -Proteobacteria. Επίσης, φαίνεται ότι σχεδόν όλα τα α -Proteobacteria ήταν του γένους *Sphingomonas*.



Διάγραμμα 4.1 Ποσοστά μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα

4.2 Αερόβιες συνθήκες

4.3.1 Μεταβολή φυσικοχημικών παραμέτρων

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του pH, του οξυγόνου, των αμμωνιακών $\text{NH}_4\text{-N}$, της οπτικής πυκνότητας καθώς και της βιομάζας (TSS και VSS).

Πίνακας 4.2 pH και οξυγόνο των καλλιιεργειών σε αερόβιες συνθήκες

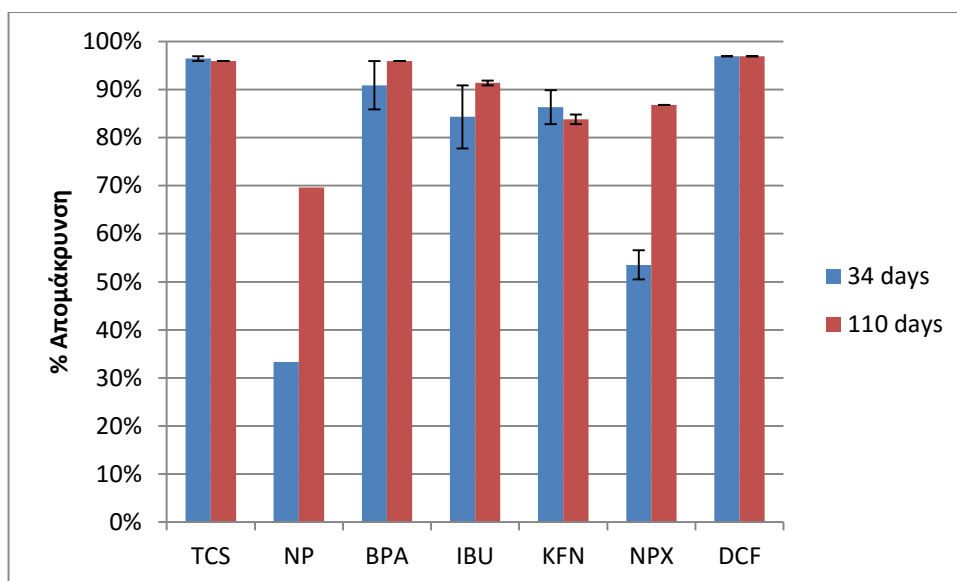
Ουσία	pH	O ₂ (mg/L)
MeOH	7,54±0,64	7,87±0,51
BPA	7,33±0,56	8,04±0,52
TCS	7,50±0,61	8,20±0,42
NP	7,37±0,54	8,06±0,46
DCF	7,34±0,48	8,07±0,48
IBU	7,43±0,44	7,74±0,58
NPX	7,46±0,68	7,90±1,00
KFN	7,11±0,38	8,04±0,57

Το pH κυμάνθηκε γύρω από την τιμή 7,38 η οποία ήταν ευνοϊκή για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, μιας και ήταν εντός του εύρους 6-9, παρόλο που υπήρχε μια μικρή πτώση του pH της τάξης της μιας μονάδας, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης του οξυγόνου ήταν περίπου 8 mg/L με μόνο τις καλλιέργειες που περιείχαν naproxen να παρουσιάζουν μια σχετικά μεγάλη διακύμανση, όμως και σε αυτή την περίπτωση η συγκέντρωση του διαλυμένου O₂ ήταν πάνω από το επιτρεπόμενο όριο, δηλαδή 4 mg/L.

Πίνακας 4.3 Αποτελέσματα μετρήσεων αμμωνιακών

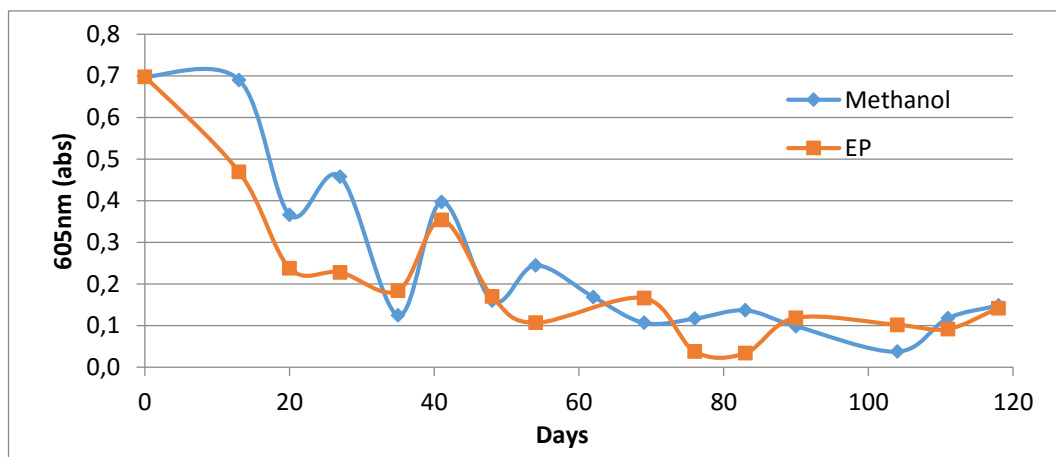
Ουσία	NH ₄ -N remained (mg/L)	NH ₄ -N consumed (mg/L)
MeOH	0,3±0,4	4,7
BPA	0,3±0,1	4,7
TCS	0,2±0,2	4,8
NP	0,4±0,3	4,6
DCF	0,1±0,1	4,9
IBU	0,3±0,3	4,7
NPX	0,6±0,8	4,4
KFN	0,7±0,7	4,3

Όπου NH₄-N remained η συγκέντρωση αμμωνιακών που απέμεινε στην καλλιέργεια και NH₄-N consumed η συγκέντρωση αμμωνιακών που καταναλωνόταν κάθε εβδομάδα. Παρότι υπάρχει μια διακύμανση, φαίνεται ότι οι τιμές των αμμωνιακών κυμαίνονταν σε χαμηλά επίπεδα, ενώ πάνω από 85% των αμμωνιακών απομακρύνονταν την εβδομάδα. Η ποσότητα που καταναλωνόταν ήταν και αυτή που προσετίθετο κάθε εβδομάδα. Τα αμμωνιακά καταναλώνονταν κυρίως από τα *Nitrosomonas sp.*, αν και μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν από άλλα είδη ως πηγή αζώτου.



Διάγραμμα 4.2 Απομάκρυνση ουσιών σε αερόβιες συνθήκες

Παρατηρείται πως η απομάκρυνση όλων των ουσιών κυμαινόταν σε υψηλά ποσοστά, δηλαδή πάνω από 84% εκτός από την NP που απομακρύνθηκε σε ποσοστό 70%. Επίσης, φαίνεται ότι οι καλλιέργειες της NP και της NPX έπρεπε να εγκλιματιστούν για να απομακρυνθούν σε ικανοποιητικά επίπεδα.



Διάγραμμα 4.3 Οπτική πυκνότητα μεθανόλης και ουσιών

Στο διάγραμμα φαίνεται πως με την πάροδο του χρόνου η βιομάζα μειωνόταν και σταθεροποιήθηκε γύρω από την τιμή 0,1 μετά την πάροδο των 60 ημερών.

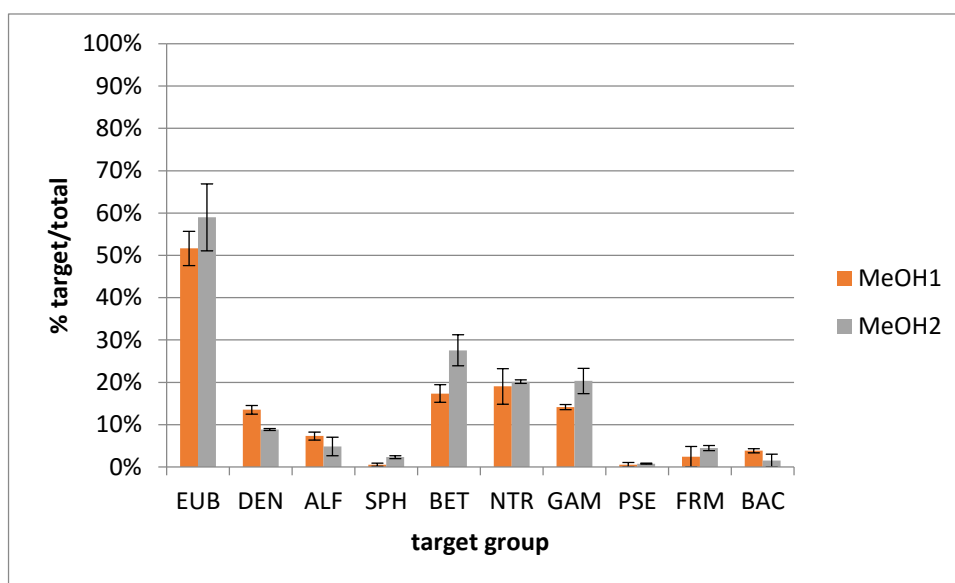
Πίνακας 4.4 Βιομάζα και οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών υπό αερόβιες συνθήκες

Ουσία	TSS (mg/L)	VSS (mg/L)	605 nm
MeOH	90±29	64±19	0,149±0,045
BPA	178±159	70±54	0,228±0,145
TCS	96±42	51±10	0,140±0,010
NP	142±32	42±1	0,128±0,032
DCF	122±77	65±36	0,145±0,102
IBU	72±4	45±1	0,085±0,018
NPX	114±56	45±9	0,141
KFN	84±8	40±6	0,128±0,013

Στον Πίνακα 4.4 φαίνεται πως οι τιμές κυμάνθηκαν γύρω από τα 112,2 mg TSS/L και 52,7 mg VSS/L, ενώ παρατηρείται καλή συσχέτιση με την οπτική πυκνότητα.

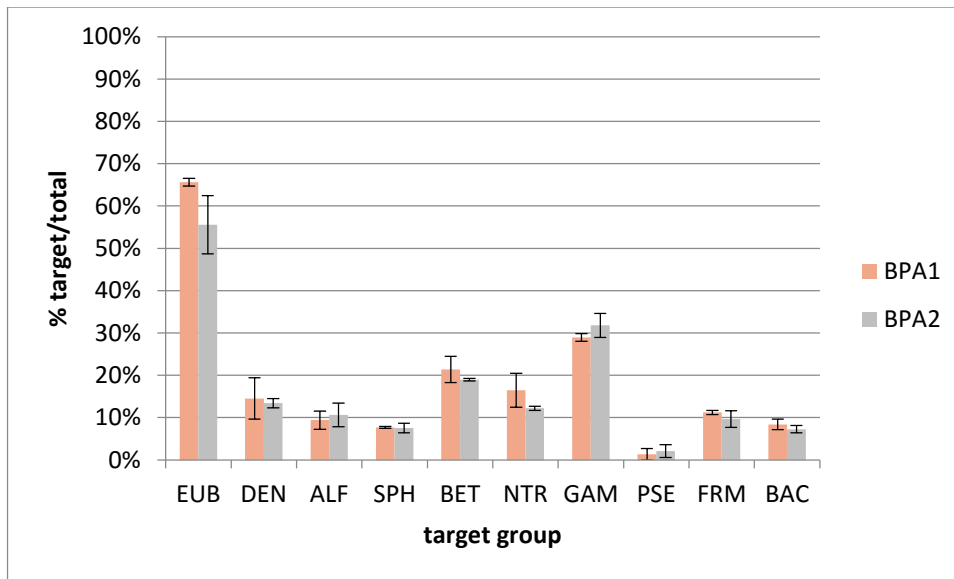
4.3.2 Αναγνώριση επικρατέστερων μικροοργανισμών υπό αερόβιες συνθήκες

Στο παρακάτω υποκεφάλαιο φαίνονται τα αποτελέσματα κάθε καλλιέργειας που μετρήθηκαν με τη μέθοδο FISH. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι από δυο μετρήσεις και οι μπάρες δείχνουν την τυπική απόκλιση.



Διάγραμμα 4.4 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες μεθανόλης

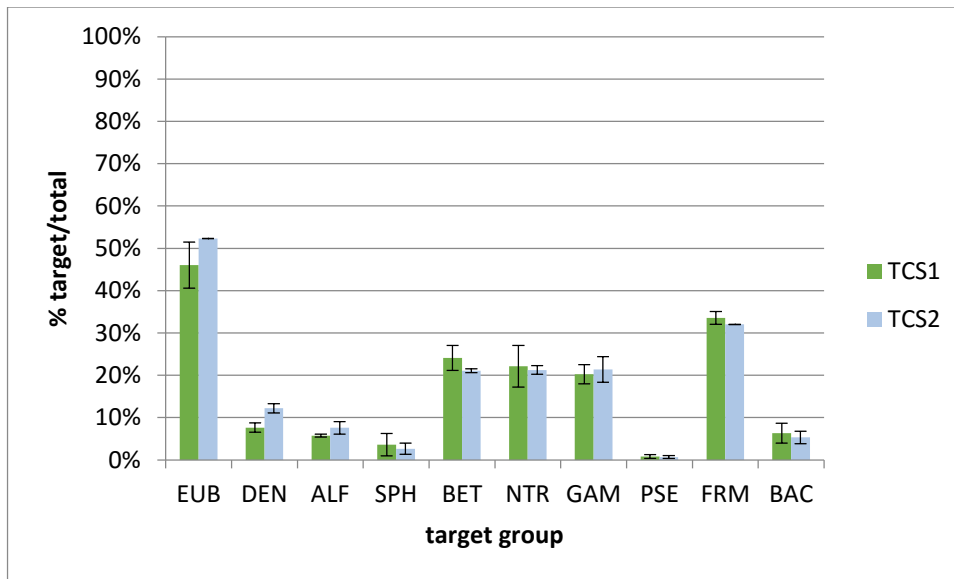
Στο πείραμα ελέγχου (Διάγραμμα 4.4) παρατηρείται ότι τα βακτήρια είναι σε ποσοστό περίπου 55%. Μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρείται στα β-Proteobacteria, περίπου 22% με τα *Nitrosomonas* sp. να αποτελούν το 91% των β-Proteobacteria και τα γ-Proteobacteria με ποσοστό 17%. Τα χαμηλότερα ποσοστά καταλαμβάνουν τα *Pseudomonas* sp., τα *Sphingomonas* sp., περίπου 1% το καθένα, όπως επίσης το φύλο Firmicutes, 3%, και κατ' επέκταση το γένος *Bacillus*. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι αναπτύχθηκαν άλλα είδη από την τάξη γ-Proteobacteria. Επίσης, οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν τη μεθανόλη είναι περίπου 11%.



Διάγραμμα 4.5 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες bisphenol-A

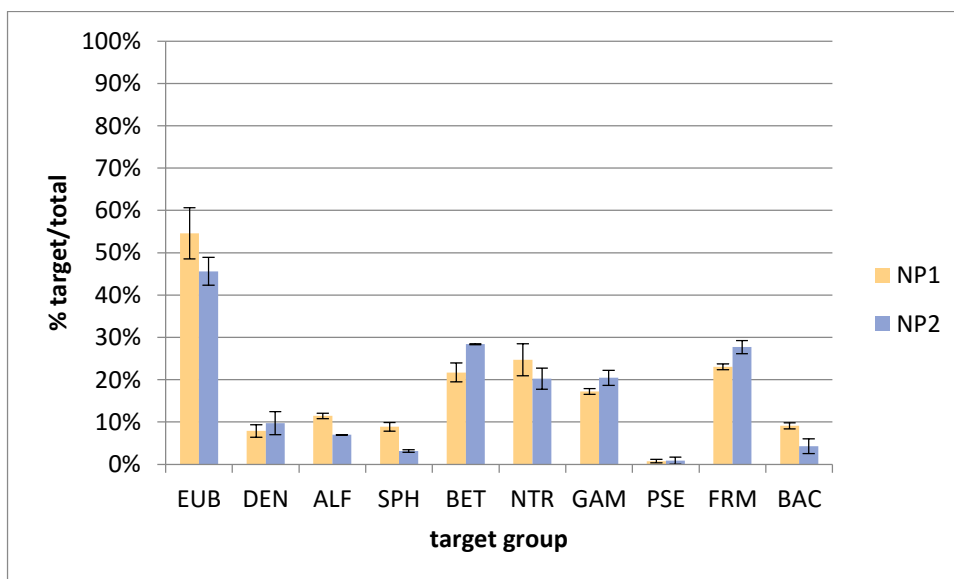
Όπως παρουσιάστηκε στο διάγραμμα 4.2 η απομάκρυνση της bisphenol-A στις 110 ημέρες ήταν $96\% \pm 0\%$. Στο διάγραμμα 4.5 τα βακτήρια φαίνεται ότι αποτελούν το 61% περίπου του συνόλου των μικροοργανισμών. Μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνει η τάξη γ -Proteobacteria, περίπου 30%, με τα *Pseudomonas sp.* να αποτελούν μόλις το 6,5% των γ -Proteobacteria. Η τάξη β -Proteobacteria, τα *Nitrosomonas sp.* και τα βακτήρια που χρησιμοποιούν μεθανόλη φαίνεται ότι κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα με το πείραμα ελέγχου.

Το ποσοστό απομάκρυνσης της triclosan ήταν υψηλό $96\% \pm 0\%$ στις 110 μέρες λειτουργίας. Στο διάγραμμα 4.6 φαίνεται τα βακτήρια να αποτελούν περίπου το 49% του συνόλου. Μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρείται να έχουν τα βακτήρια του φύλου Firmicutes, με το γένος *Bacillus* να αποτελεί το 18% του ποσοστού των Firmicutes, ενώ τα γένη *Pseudomonas* και *Sphingomonas* καταλαμβάνουν και πάλι τα χαμηλότερα ποσοστά, περίπου 1% και 3% αντίστοιχα.

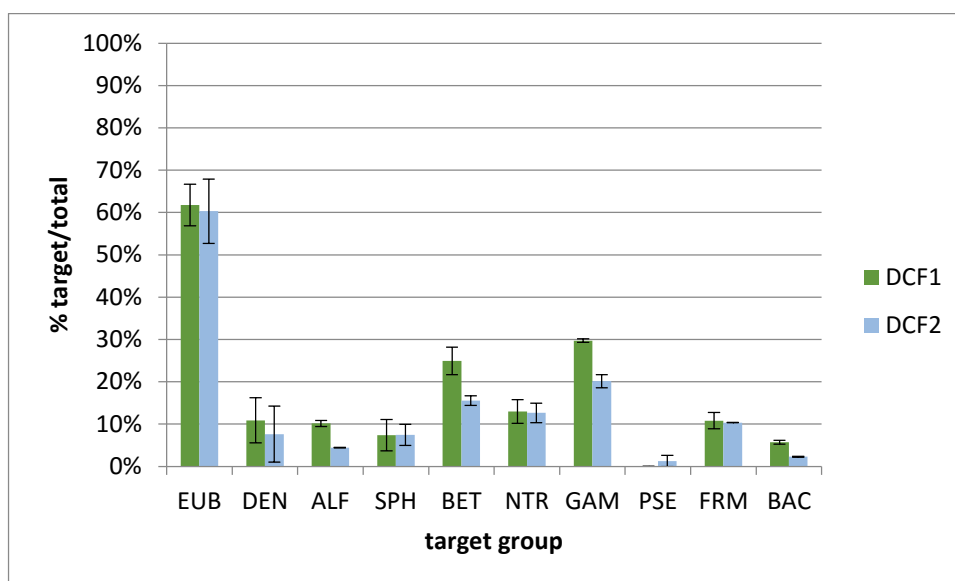


Διάγραμμα 4.6 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες triclosan

Η απομάκρυνση της nonylphenol μετά από 110 ημέρες ήταν 70%. Τα βακτήρια φαίνεται να είναι σε ποσοστό περίπου 50% (Διάγραμμα 4.7). Μεγαλύτερα ποσοστά καταλαμβάνουν το φύλο Firmicutes (περίπου 25%) και η τάξη β -Proteobacteria, επίσης στο 25%, με τα *Nitrosomonas sp.* να αποτελούν το 88% των β -Proteobacteria, ενώ μόλις το 26% των Firmicutes ανήκουν στο γένος *Bacillus*. Χαμηλότερο ποσοστό καταλαμβάνουν τα *Pseudomonas sp.*, περίπου 1%.



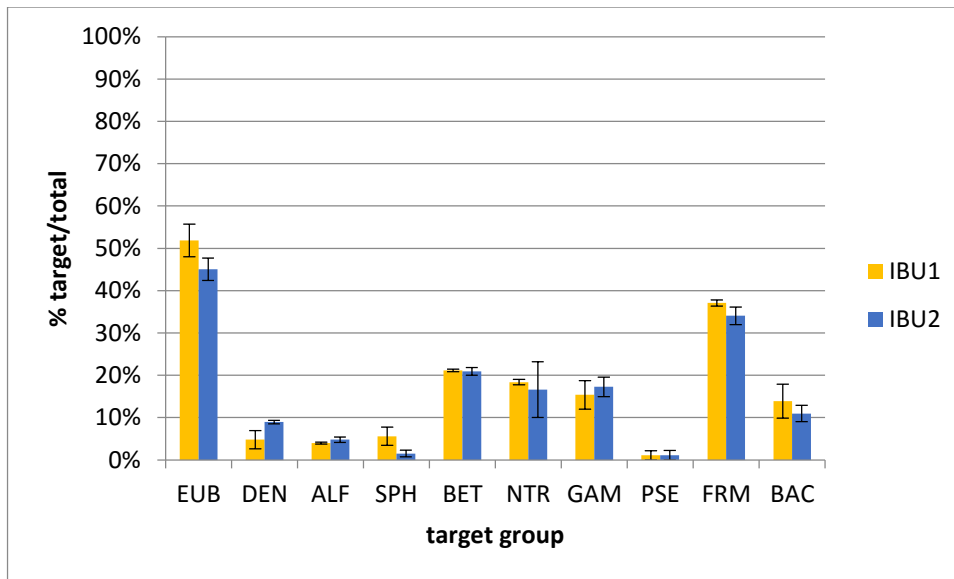
Διάγραμμα 4.7 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες nonylphenol



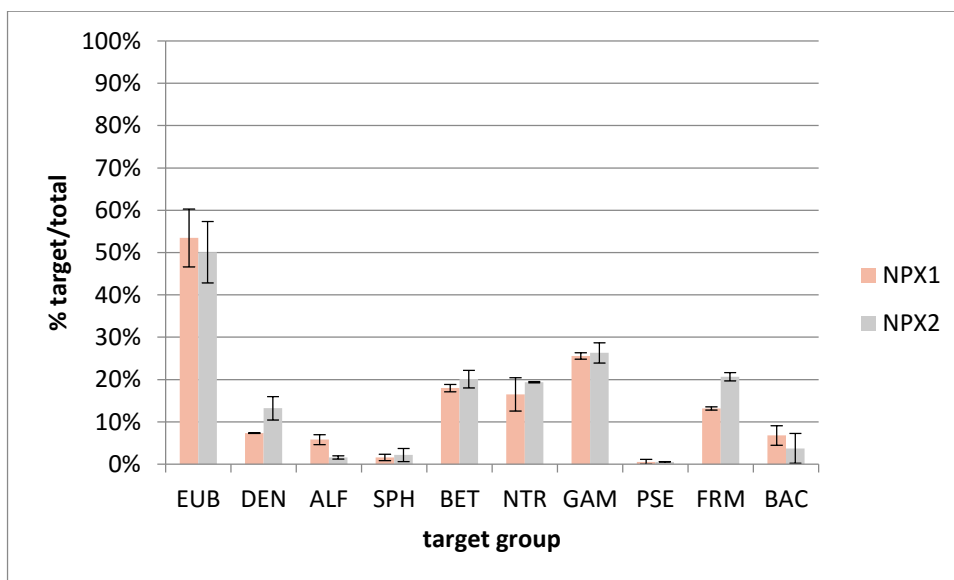
Διάγραμμα 4.8 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες diclofenac

Όπως παρουσιάστηκε στο διάγραμμα 4.2 η diclofenac σε 110 ημέρες είχε απομακρυνθεί σε ποσοστό $97\% \pm 0\%$. Στο διάγραμμα 4.8 παρατηρείται πως τα βακτήρια αποτελούν περίπου το 61% του συνόλου με υψηλότερο ποσοστό να καταλαμβάνει η τάξη γ -Proteobacteria (περίπου 25%), ενώ τα *Pseudomonas sp.* είναι μόλις στο 1%. Τα βακτήρια που χρησιμοποιούν τη μεθανόλη και τα β -Proteobacteria φαίνεται ότι κυμαίνονται σε παρόμοια επίπεδα με το πείραμα ελέγχου.

Η απομάκρυνση της ibuprofen σε αερόβιες συνθήκες ήταν $91\% \pm 1\%$ στις 110 ημέρες. Εδώ παρατηρείται πως τα βακτήρια αποτελούν το 48% περίπου του συνόλου των μικροοργανισμών, με το φύλο Firmicutes να είναι η επικρατέστερη ομάδα σε ποσοστό 36%, ενώ τα *Bacillus sp.* αποτελούν το 35% των Firmicutes. Τα *Pseudomonas sp.* βρίσκονται και σε αυτό το διάγραμμα στο 1%. Επίσης, φαίνεται ότι τα β -Proteobacteria, τα *Nitrosomonas sp.* και τα γ -Proteobacteria κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα με το πείραμα της μεθανόλης (control).

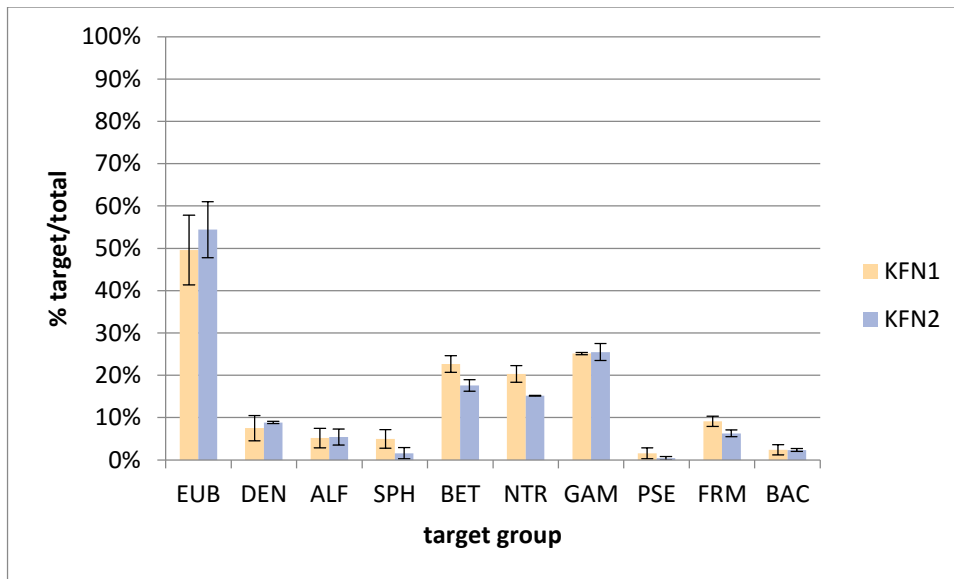


Διάγραμμα 4.9 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες ibuprofen



Διάγραμμα 4.10 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες naproxen

Στις 110 μέρες λειτουργίας, η naproxen είχε απομακρυνθεί σε ποσοστό $87\% \pm 0\%$. Στο διάγραμμα 4.10 τα βακτήρια κατέχουν ποσοστό περίπου 52%. Υψηλά είναι τα ποσοστά των γ -Proteobacteria, περίπου 26%, και των Gram-θετικών Firmicutes, περίπου 17%, ενώ τα υπόλοιπα είδη δε δείχνουν καμία σημαντική μεταβολή από το πείραμα ελέγχου. Χαμηλότερα είναι τα ποσοστά των *Sphingomonas sp.* και των *Pseudomonas sp.*, 2% και 1% αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4.11 Μικροοργανισμοί στις αερόβιες καλλιέργειες ketoprofen

Τέλος, η απομάκρυνση της ketoprofen μετά από 110 ημέρες μετρήθηκε ίση με $84\% \pm 1\%$. Στο διάγραμμα 4.11 φαίνεται ότι τα βακτήρια αποτελούν το 52% του συνόλου με την τάξη γ -Proteobacteria να κατέχει ποσοστό περίπου 25%, ενώ τα *Pseudomonas sp.* κυμαίνονταν πάλι σε χαμηλά επίπεδα αφού αποτελούν μόλις το 4% των γ -Proteobacteria. Όλες οι υπόλοιπες ομάδες που μετρήθηκαν είχαν παρόμοιες τιμές με το πείραμα της μεθανόλης (control).

Συμπερασματικά για τις αερόβιες συνθήκες, φαίνεται ότι ο βαθμός βιοαποδόμησης είναι αρκετά υψηλός για όλες τις ουσίες (84%-97%), με εξαίρεση την NP όπου το ποσοστό απομάκρυνσης ήταν 70%. Οι τιμές pH και διαλυτού O_2 ήταν εντός του εύρους αποδοχής, παρόλο που υπήρξαν μικρές διακυμάνσεις κατά την διάρκεια των πειραμάτων, δεν φάνηκε να επηρεάζεται η βιομάζα, η οποία παρέμεινε σε ικανοποιητικά επίπεδα. Σε όλες τις καλλιέργειες, περίπου το 54% της βιομάζας ήταν βακτήρια, ενώ το άθροισμα των τριών τάξεων α -, β -, γ -Proteobacteria συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο μέρος των βακτηρίων (83%-106%). Τα β -Proteobacteria είχαν υψηλά ποσοστά (περίπου 20%) σε όλες τις καλλιέργειες, όμως το μεγαλύτερο μέρος τους ήταν οι αυτοτροφικοί *Nitrosomonas sp.* για αυτό το λόγο η απομάκρυνση των αμμωνιακών ήταν υψηλή, αφού πάνω από το 85% απομακρυνόταν την εβδομάδα. Τα γ -Proteobacteria και το φύλο Firmicutes φαίνεται ότι ήταν σε υψηλά επίπεδα, ενώ έχουν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ τους.

Η ομοταξία γ -Proteobacteria φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ανάπτυξη στις καλλιέργειες με τις ουσίες BPA, NPX, DCF και KFN. Αντιθέτως, το φύλο Firmicutes φαίνεται να αναπτύσσεται στις καλλιέργειες με IBU, TCS και NP. Οι υπόλοιπες ομάδες φαίνεται να παρέμειναν στα ίδια επίπεδα με το πείραμα ελέγχου. Σε παρόμοια συμπεράσματα φαίνεται να καταλήγουν οι Kang και Kondo (2002) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η BPA είναι εύκολα βιοδιασπάσιμη. Επίσης, οι Sakai et al. (2007) χρησιμοποίησαν βακτήρια του γένους *Pseudomonas sp.* για να βιοαποδομήσουν τη BPA, χωρίς να παρατηρηθεί όμως απομάκρυνση, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος, αφού στις καλλιέργειες της BPA δεν έχουν αναπτυχθεί βακτήρια αυτού του είδους. Αντίθετα, οι Li et al. (2012) που χρησιμοποίησαν βακτήρια του γένους *Bacillus sp.* έδειξαν ότι μπορούν να βιοαποδομήσουν τη BPA ενώ οι Yuan et al. (2004) χρησιμοποίησαν *Pseudomonas sp.* για τη βιοαποδόμηση της NP, το οποίο δε συνέβη στο παρόν πείραμα αφού δεν αναπτύχθηκαν *Bacillus sp.* και *Pseudomonas sp.* αντίστοιχα στο παρόν πείραμα.

4.4 Ανοξικές συνθήκες

4.5.1 Μεταβολή φυσικοχημικών παραμέτρων

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του pH, των νιτρικών, της οπτικής πυκνότητας καθώς και των TSS και VSS.

Πίνακας 4.5 pH των καλλιεργειών υπό ανοξικές συνθήκες

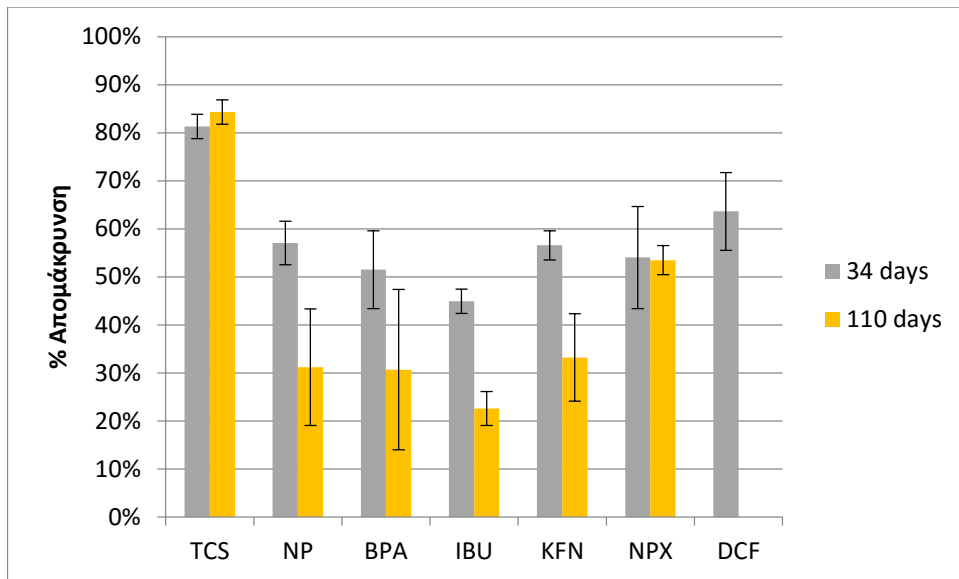
Ουσία	pH
MeOH	6,76±0,12
BPA	6,71±0,14
TCS	6,69±0,24
NP	6,67±0,24
DCF	6,73±0,16
IBU	6,76±0,17
NPX	6,74±0,15
KFN	6,69±0,12

Το pH παρέμεινε σταθερό στις ανοξικές συνθήκες καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και μέση τιμή περίπου 6,72.

Πίνακας 4.6 Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης νιτρικών

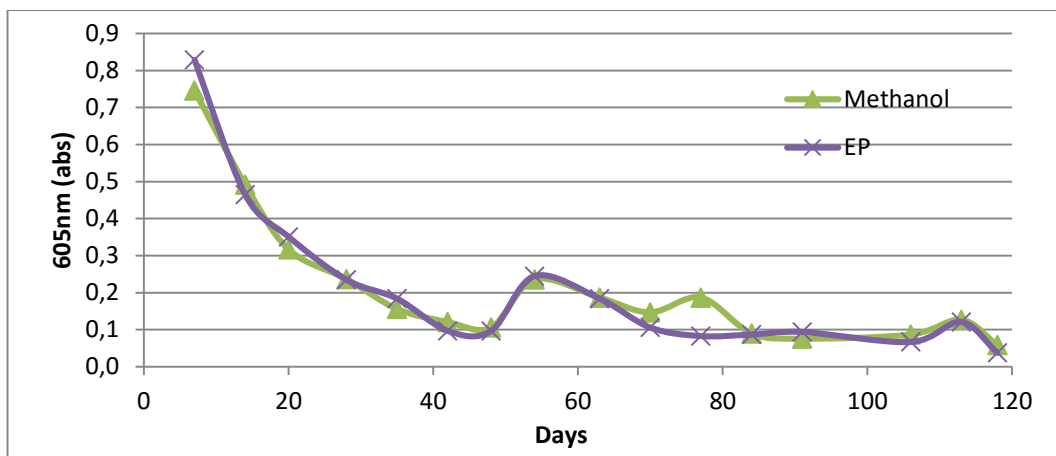
Ουσία	NO ₃ -N remained (mg/L)	NO ₃ -N consumed (mg/L)
MeOH	44,4±6,1	5,7
BPA	41,4±16,5	8,7
TCS	48,6±6,6	1,5
NP	43,8±8,0	6,3
DCF	31,4±8,3	18,6
IBU	33,1±13,0	16,9
NPX	32,8±3,0	17,2
KFN	45,2	4,8

Στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της συγκέντρωσης νιτρικών των καλλιεργειών υπό ανοξικές συνθήκες, όπως μετρήθηκαν από το φασματοφωτόμετρο. Η NO₃-N remained είναι η συγκέντρωση νιτρικών που παρέμενε μες στα δοχεία ενώ η NO₃-N consumed είναι η συγκέντρωση που καταναλωνόταν. Στο πείραμα ελέγχου, η ποσότητα των νιτρικών που ανάγεται σε νιτρώδη φαίνεται ότι είναι περίπου 5,7 mg/L ή 1,6 meq/L (μη-πλήρης αναγωγή), ενώ τα 0,5 mg/L μεθανόλης την εβδομάδα δίνουν μόλις 0,2 meq/L. Το έλλειμμα ηλεκτρονίων θεωρείται ότι είναι η νεκρή βιομάζα, η οποία μπορεί να παράγει 0,2 meq/mg, αλλά γενικά οι τιμές νιτρικών που καταναλώνονται είναι μάλλον αυξημένες συγκριτικά με το δόση ηλεκτρονίων που εισάγεται. Στις καλλιέργειες των DCF, IBU, NPX, φαίνεται αυξημένη η κατανάλωση νιτρικών, περίπου 18 mg NO₃-N/L, ενώ οι υπόλοιπες κυμαίνονται στα επίπεδα του πειράματος ελέγχου. Εξαίρεση αποτελεί η καλλιέργεια της TCS, στην οποία δεν φαίνεται να καταναλώνονται νιτρικά. Παρατηρείται ότι σχεδόν όλη η ποσότητα των νιτρικών παρέμενε και καταναλωνόταν πολύ λίγη.



Διάγραμμα 4.12 Απομάκρυνση των ουσιών υπό ανοξικές συνθήκες

Από το διάγραμμα 4.12 διαπιστώνεται πως η απομάκρυνση των ουσιών ήταν σχετικά χαμηλή, περίπου δηλαδή 29%, και μόνο η triclosan παρουσίασε υψηλή απομάκρυνση 84%, παρά τη χαμηλή κατανάλωση νιτρικών που υπέδειξε. Η NPX επίσης είχε μια μέση απομάκρυνση της τάξεως του 53%. Η DCF στις 110 μέρες ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης, αλλά θεωρείται ότι αλλοιώθηκε το δείγμα ανάλυσης..



Διάγραμμα 4.13 Οπτική πυκνότητα μεθανόλης και ουσιών

Από το διάγραμμα 4.13 φαίνεται πως η βιομάζα στις καλλιέργειες της μεθανόλης και των υπόλοιπων ουσιών συνεχώς μειώνεται και σταθεροποιείται γύρω από την τιμή 0,1.

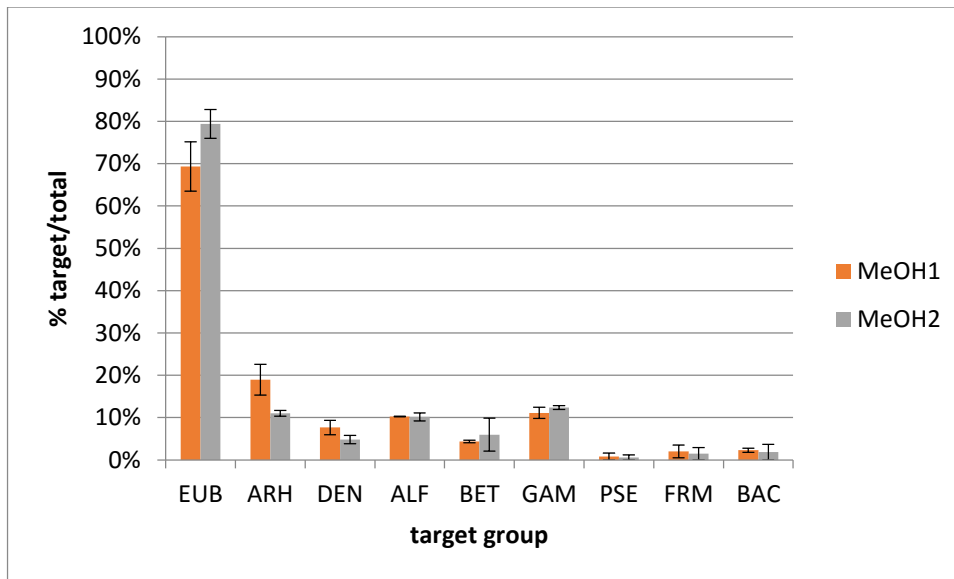
Πίνακας 4.7 Βιομάζα και οπτική πυκνότητα καλλιεργειών υπό ανοξικές συνθήκες

Ουσία	TSS (mg/L)	VSS (mg/L)	605 nm
MeOH	21±1	10±1	0,059±0,001
BPA	21±2	11±1	0,050±0,003
TCS	17±2	7±2	0,026±0,004
NP	18±6	6±2	0,028±0,006
DCF	16±3	9±2	0,035±0,004
IBU	19±2	13±2	0,042±0,007
NPX	19±10	9 ±4	0,040±0,011
KFN	20±3	8±4	0,045±0,001

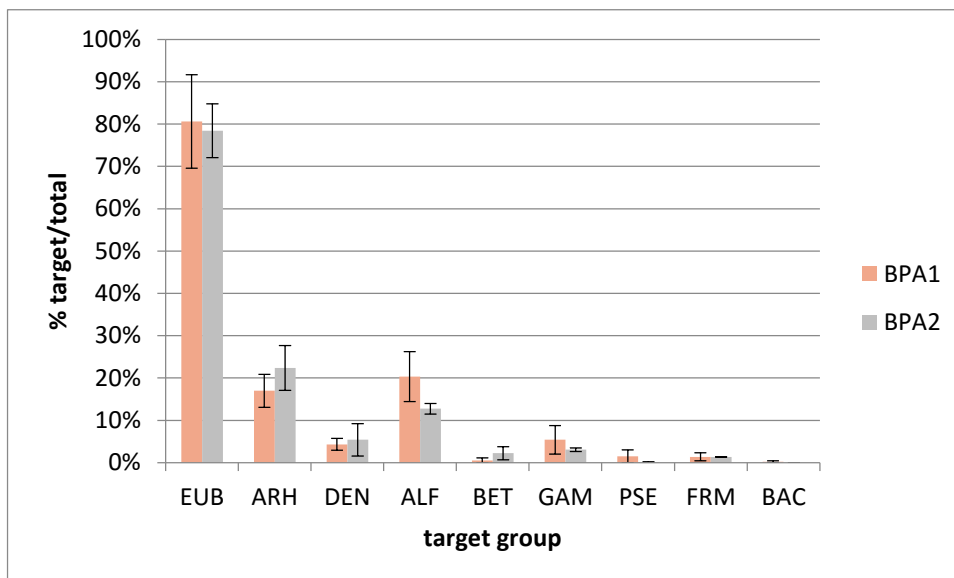
Οι τιμές των TSS και VSS κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, δηλαδή γύρω από τα 18,9 mg/L και 9,2 mg/L αντίστοιχα. Επίσης, τα αποτελέσματα των στερεών και της οπτικής πυκνότητας δεν έδειξαν καλή συσχέτιση, λόγω κυρίως της χαμηλής τιμής της βιομάζας. Όμως, οι τιμές οπτικής πυκνότητας παρουσιάζονται κυρίως για να δείξουν την τάση μείωσης της βιομάζας με την πάροδο του χρόνου.

4.5.2 Αναγνώριση επικρατέστερων μικροοργανισμών υπό ανοξικές συνθήκες

Στο διάγραμμα 4.14 παρουσιάζονται οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί που αναγνωρίστηκαν στο πείραμα με μεθανόλη. Παρατηρείται ότι τα βακτήρια αποτελούν το 74% του συνόλου κι τα αρχαία το 15%, δηλαδή συνολικά εντοπίστηκε μια μεγάλη μάζα μικροοργανισμών (89%). Όλοι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε χαμηλά ποσοστά με τα α- και γ-Proteobacteria να είναι λίγο υψηλότερα σε σχέση με τα υπόλοιπα, 10% και 12% αντίστοιχα, ενώ τα *Pseudomonas sp.* μόλις 1%. Επίσης, τα βακτήρια που καταναλώνουν τη μεθανόλη ήταν περίπου 6%. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ενώ δεν έχει εντοπιστεί η μεγαλύτερη μάζα των βακτηρίων αφού το άθροισμα των τάξεων α-, β-, γ-Proteobacteria είναι μόλις το 36% των ευβακτηρίων.



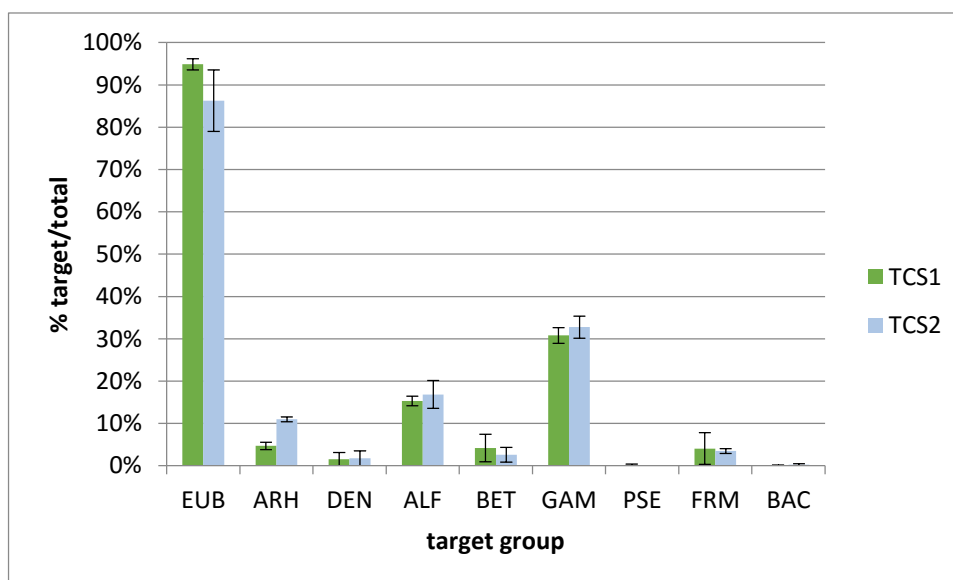
Διάγραμμα 4.14 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες μεθανόλης



Διάγραμμα 4.15 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες bisphenol-A

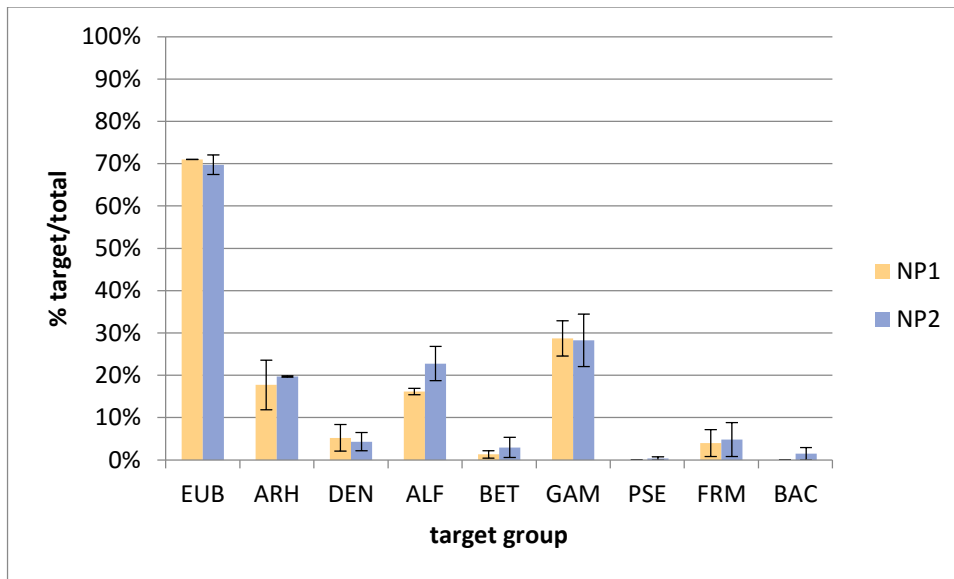
Στο διάγραμμα 4.15 φαίνεται ότι τα βακτήρια αποτελούν το 80% του συνόλου και τα αρχαία το 20%. Τα α - Proteobacteria αποτελούν περίπου 17% του συνόλου, ενώ όλοι οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε ποσοστά μικρότερα από 5%, με τα *Bacillus sp.* να μην ανιχνεύονται σχεδόν καθόλου. Από τα παραπάνω φαίνεται η καλλιέργεια της BPA να μην έχει αξιοσημείωτες διαφορές με το πείραμα ελέγχου, με μόνη διαφορά το χαμηλό ποσοστό των γ -Proteobacteria (4%). Επίσης, μεγάλη μάζα

των ευβακτηρίων φαίνεται να μην έχει ανιχνευτεί, αφού το άθροισμα των τριών ομάδων του φύλου Proteobacteria φτάνει το 28% των ευβακτηρίων.



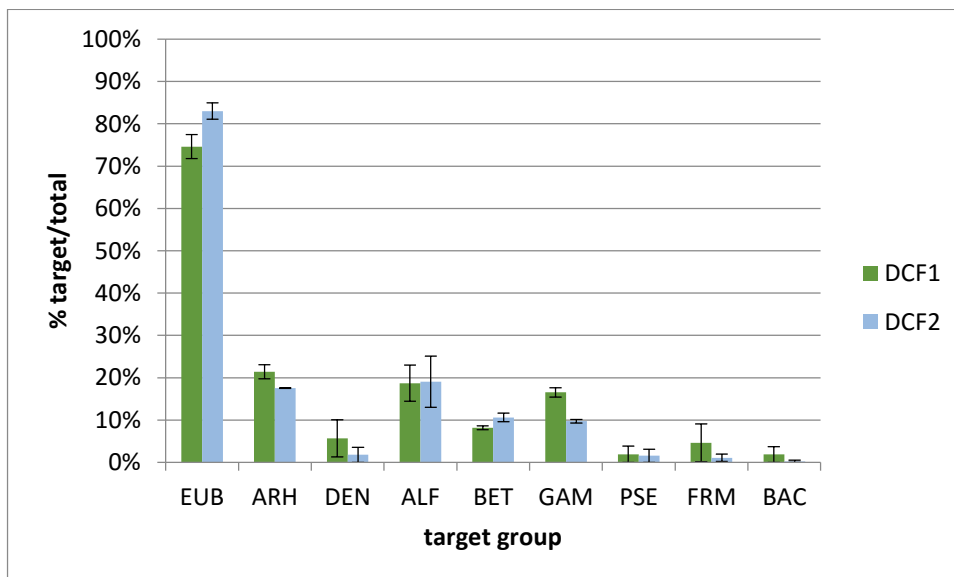
Διάγραμμα 4.16 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της triclosan

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η απομάκρυνση της triclosan ήταν η υψηλότερη ($84\% \pm 4\%$). Στο διάγραμμα 4.16 παρατηρείται ότι τα βακτήρια βρίσκονται σε ποσοστό 91% και τα αρχαία σε ποσοστό 8%. Υψηλότερο ποσοστό καταγράφεται στα γ- Proteobacteria, περίπου 32%, ενώ δεν ανιχνεύονται τα γένη των *Bacillus* και *Pseudomonas*.



Διάγραμμα 4.17 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της nonylphenol

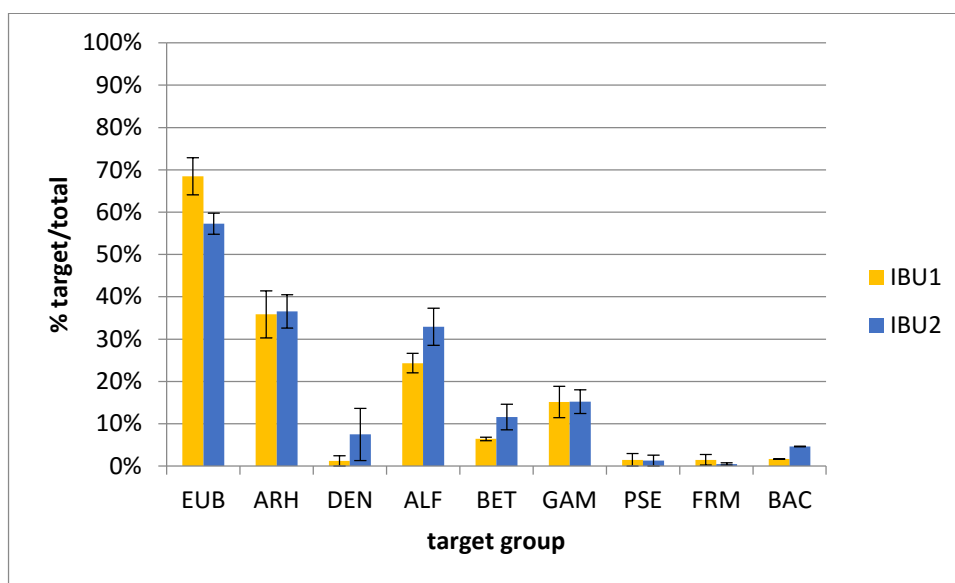
Όπως φαίνεται εδώ τα βακτήρια αποτελούν περίπου το 70% και τα αρχαία το 19%. Μεγαλύτερα ποσοστά καταλαμβάνουν οι τάξεις των α- και γ-Proteobacteria, 19% και 28% αντίστοιχα, ενώ όλοι οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε ποσοστά μικρότερα από 5% και κοντά στο εύρος τιμών του πειράματος ελέγχου.



Διάγραμμα 4.18 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της diclofenac

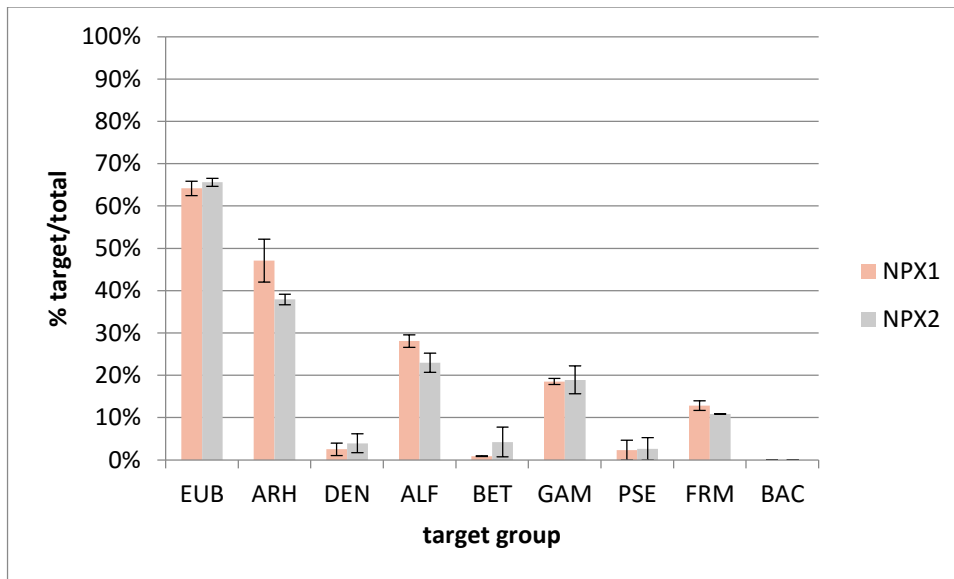
Η diclofenac στις 110 ημέρες μετρήθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης, αλλά θεωρείται ότι η τιμή αυτή δεν είναι σωστή γιατί αλλοιώθηκε το δείγμα. Στο

διάγραμμα 4.27 παρατηρείται ότι τα βακτήρια αποτελούν το 79% του συνόλου, ενώ τα αρχαία το 19%. Μεγαλύτερα ποσοστά καταλαμβάνουν τα α - και γ - Proteobacteria, περίπου 19% και 13% αντίστοιχα, ενώ τα *Bacillus sp.* μόλις 1%. Οι καλλιέργειες της DCF παρότι δείχνουν μεγάλη κατανάλωση νιτρικών, δεν φαίνεται να έχουν ιδιαίτερες διαφορές ως προς τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας με τις καλλιέργειες της μεθανόλης (control), με μόνη εξαίρεση τη μικρή αύξηση των α - Proteobacteria.



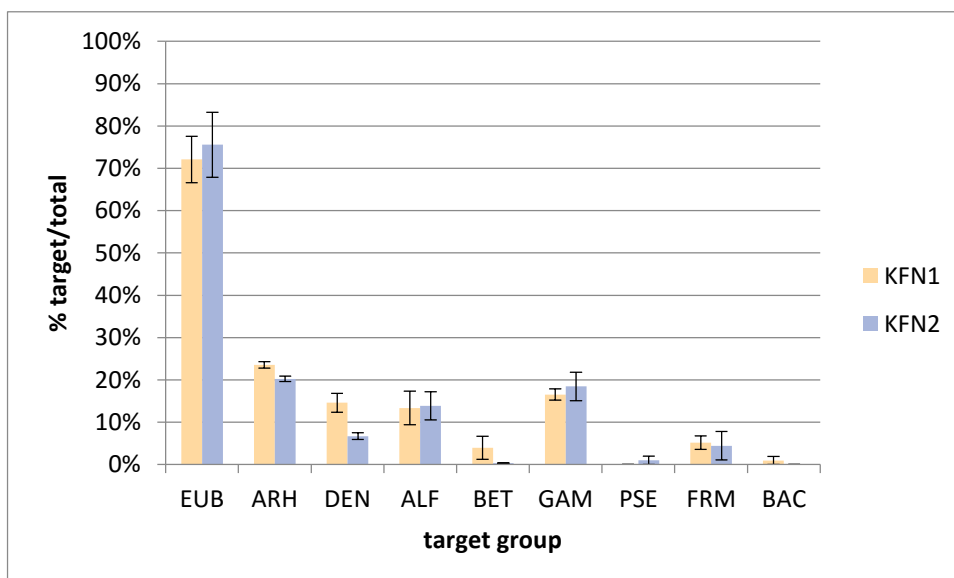
Διάγραμμα 4.19 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της *ibuprofen*

Η *ibuprofen* είχε χαμηλή απομάκρυνση, δηλαδή $23\% \pm 5\%$ στις 110 μέρες λειτουργίας, αλλά κατέδειξε υψηλή ικανότητα αναγωγής νιτρικών ιόντων. Σε αυτό το διάγραμμα φαίνεται ότι τα βακτήρια αποτελούν το 63% του συνόλου των μικροοργανισμών και τα αρχαία το ιδιαίτερα αυξημένο 36%. Τα α -Proteobacteria βρίσκονται σε ποσοστό 29%, το οποίο είναι και το υψηλότερο, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό έχουν τα γένη *Pseudomonas sp.*, περίπου 1%. Οι υπόλοιπες ομάδες δεν έδειξαν κάποια διαφορά με τα πειράματα ελέγχου.



Διάγραμμα 4.20 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της naproxen

Η απομάκρυνση της naproxen σε 110 ημέρες ήταν $53\% \pm 4\%$. Στο διάγραμμα 4.20 φαίνεται ότι τα βακτήρια βρίσκονται σε ποσοστό 65% και τα αρχαία 45%, το οποίο είναι και το υψηλότερο ποσοστό στις ανοξικές συνθήκες. Υψηλότερο είναι επίσης το ποσοστό των α -Proteobacteria, περίπου 26% και του φύλου Firmicutes, περίπου 12%, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου *Bacillus sp.*



Διάγραμμα 4.21 Μικροοργανισμοί στις ανοξικές καλλιέργειες της ketoprofen

Στο διάγραμμα 4.21 παρατηρείται ότι τα βακτήρια συναντώνται σε ποσοστό 74%, ενώ τα αρχαία σε ποσοστό 22%. Υψηλότερα είναι τα ποσοστά των α - και γ -Proteobacteria, 14% και 18%, ενώ χαμηλότερα είναι τα ποσοστά των *Pseudomonas sp.* και *Bacillus sp.*, λιγότερο από 1%. Γενικά, οι καλλιέργειες KFN παρέμειναν στα ίδια επίπεδα με τα πειράματα μεθανόλης.

Συμπερασματικά για τις ανοξικές συνθήκες, φαίνεται ότι μόνο η TCS απομακρύνθηκε σε ικανοποιητικό ποσοστό 84%, ενώ η NPX έδειξε μια μέση βιοαποδόμηση της τάξεως του 53%. Το pH διατηρήθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα, χωρίς διακυμάνσεις, ενώ η βιομάζα μετά την πάροδο των 60 ημερών κυμάνθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα, περίπου 6-13 mg VSS/L. Όσον αφορά την αναγωγή των νιτρικών φαίνεται ότι οι καλλιέργειες IBU, NPX και DCF έδειξαν μια ιδιαίτερα αυξημένη κατανάλωση, σε αντίθεση με την TCS που φάνηκε να διατηρεί τη συγκέντρωση του νιτρικού αζώτου σταθερή. Σε όλες τις καλλιέργειες, το ποσοστό των βακτηρίων (περίπου 74%) υπερέιχε των αρχαίων, ενώ το άθροισμά τους πλησίαζε όλη τη μάζα των μικροοργανισμών (89%-107%). Στις καλλιέργειες που περιείχαν IBU και NPX φάνηκε μια αύξηση των αρχαίων και της ομοταξίας των α -Proteobacteria, ενώ μόνο στην καλλιέργεια της NPX υπήρξε μια μικρή αύξηση του φύλου Firmicutes. Τέλος, τα γ -Proteobacteria επικράτησαν στις καλλιέργειες της TCS και της NP. Οι υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών δεν έδειξαν κάποια ιδιαίτερη διαφορά με το πείραμα ελέγχου. Σε παρόμοιο αποτέλεσμα κατέληξαν και οι Li et al. (2012) οι οποίοι χρησιμοποίησαν βακτήρια του γένους *Bacillus sp.* αλλά δε βιοαποδόμησαν τη BPA σε ανοξικές συνθήκες, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του πειράματος αφού στις καλλιέργειες της BPA δεν είχαν αναπτυχθεί σχεδόν καθόλου *Bacillus sp.*

4.5 Αναερόβιες συνθήκες

4.4.1 Μεταβολή φυσικοχημικών παραμέτρων

Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις του pH, και του τρισθενούς και ολικού σιδήρου. Για τη βιομάζα και την

οπτική πυκνότητα δεν υπάρχουν τιμές γιατί ο σίδηρος που προσετίθετο αντιδρούσε δημιουργώντας ιζήματα, τα οποία επηρέαζαν όλες τις μετρήσεις.

Πίνακας 4.8 pH των καλλιιεργειών υπό αναερόβιες συνθήκες

Ουσία	pH
MeOH	6,61±0,17
BPA	6,59±0,15
TCS	6,59±0,31
NP	6,59±0,28
DCF	6,59±0,15
IBU	6,56±0,18
NPX	6,64±0,15
KFN	6,64±0,12

Το pH κυμάνθηκε σε σταθερό σχεδόν επίπεδο γύρω από την τιμή 6,60 χωρίς μεγάλες αποκλίσεις.

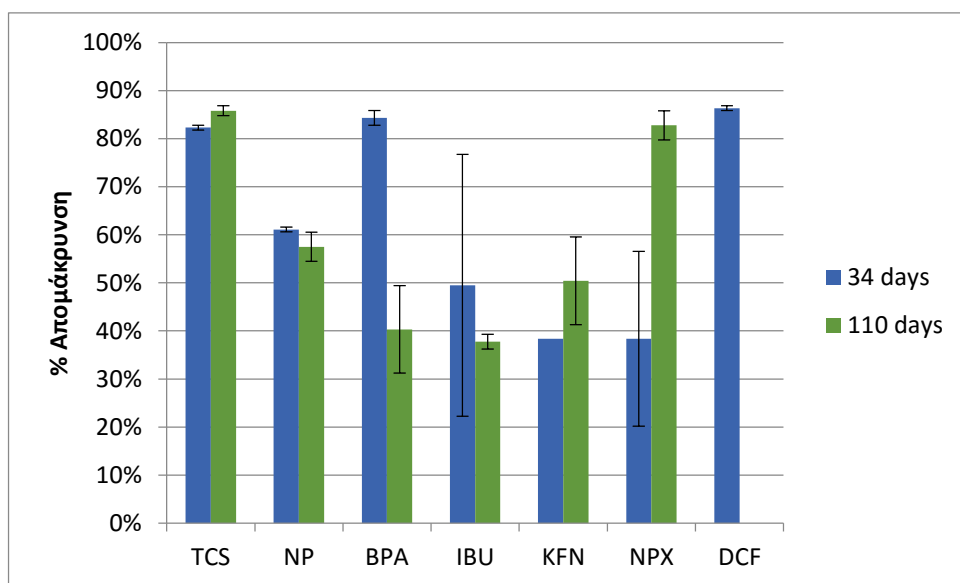
Πίνακας 4.9 Αποτελέσματα τρισθενούς και ολικού σιδήρου

Ουσία	Fe ³⁺ (mg/L)	Fe ³⁺ /Fe _{tot}
MeOH	37,7±19,3	70%
BPA	21,3±3,0	31%
TCS	45,6±10,5	84%
NP	47,6±3,2	86%
DCF	19,1±6,6	52%
IBU	20,1±14,2	48%
NPX	21,6±9,5	29%
KFN	11,7±2,2	39%

Στον πίνακα 4.6 παρουσιάζονται οι μετρήσεις της συγκέντρωσης του τρισθενούς σιδήρου (Fe³⁺), όπως προέκυψαν από το φασματοφωτόμετρο καθώς και ο τρισθενής σίδηρος ως ποσοστό του ολικού που μετρήθηκε. Οι τιμές έχουν αρκετές διακυμάνσεις και δείχνουν κάποιες αποκλίσεις μεταξύ τους κυρίως γιατί κάθε εβδομάδα γινόταν ανάλυση σε ένα δείγμα από μια καλλιέργεια και σύμφωνα με αυτή τη μέτρηση γινόταν η προσθήκη τρισθενούς σιδήρου σε όλες. Σύμφωνα με τη στοιχειομετρία της αντίδρασης οξείδωσης της μεθανόλης, τα 0,5 mg/L μεθανόλης που προσετίθονταν αντιστοιχούν σε 0,19 meq/L, ενώ με αυτή τη μεταφορά ηλεκτρονίων ο Fe³⁺ που

ανάγεται σε Fe^{2+} είναι περίπου 10,3 mg/L. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι υπάρχει καλή συσχέτιση με τη μετρούμενη ποσότητα, περίπου δηλαδή 12,3 mg Fe^{3+} /L.

Παρατηρείται επίσης ότι οι ουσίες bisphenol-A, diclofenac, ibuprofen, naproxen και ketoprofen μετατρέπουν τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή σε ικανοποιητικό επίπεδο (το χρώμα των καλλιεργειών ήταν μαύρο με κοκκώδη εμφάνιση). Αντιθέτως στις καλλιεργείες που περιέχουν triclosan και nonylphenol (χρώμα καλλιεργειών κίτρινο με αφρώδη εμφάνιση), ο τρισθενής παραμένει σε υψηλή συγκέντρωση. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές οι δύο ουσίες λειτουργούν περισσότερο ως δέκτες ηλεκτρονίων παρά ως δότες, δρουν δηλαδή ανταγωνιστικά ως προς τη μετατροπή του Fe^{3+} σε Fe^{2+} .



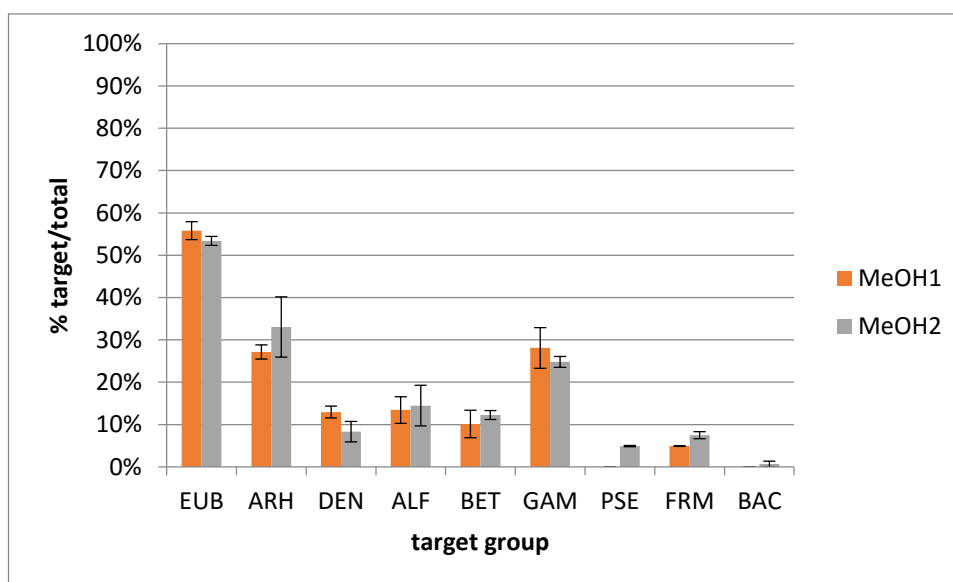
Διάγραμμα 4.22 Απομάκρυνση ουσιών σε αναερόβιες συνθήκες

Από το διάγραμμα 4.22 φαίνεται πως η απομάκρυνση των ουσιών υπό αναερόβιες συνθήκες δεν ήταν ιδιαίτερα υψηλή με εξαίρεση την triclosan και τη naproxen που απομακρύνθηκαν σε ποσοστό περίπου 86% και 83%, αντίστοιχα, ενώ οι υπόλοιπες είχαν μια μέση απομάκρυνση σε ποσοστό περίπου 47%. Η diclofenac δεν ανιχνεύτηκε, δηλαδή ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης, γεγονός που οφείλεται περισσότερο στην αλλοίωση του δείγματος παρά στη βιοαποδόμηση. Επίσης, πρέπει να τονιστεί ότι ανάλογα τη μορφή του ιζήματος σιδήρου που δημιουργήθηκε μπορεί

να προκληθήκε μια αβιοτική απομάκρυνση των ουσιών. Όμως, αυτή η αβιοτική απομάκρυνση δεν αναμένεται να είναι σημαντική, γιατί παρόμοια αποτελέσματα υπήρχαν και σε άλλο πείραμα που διεξάχθηκε χωρίς την προσθήκη σιδήρου (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται γιατί είναι εκτός του πλαισίου της παρούσας διπλωματικής).

4.4.2 Αναγνώριση επικρατέστερων μικροοργανισμών υπό αναερόβιες συνθήκες

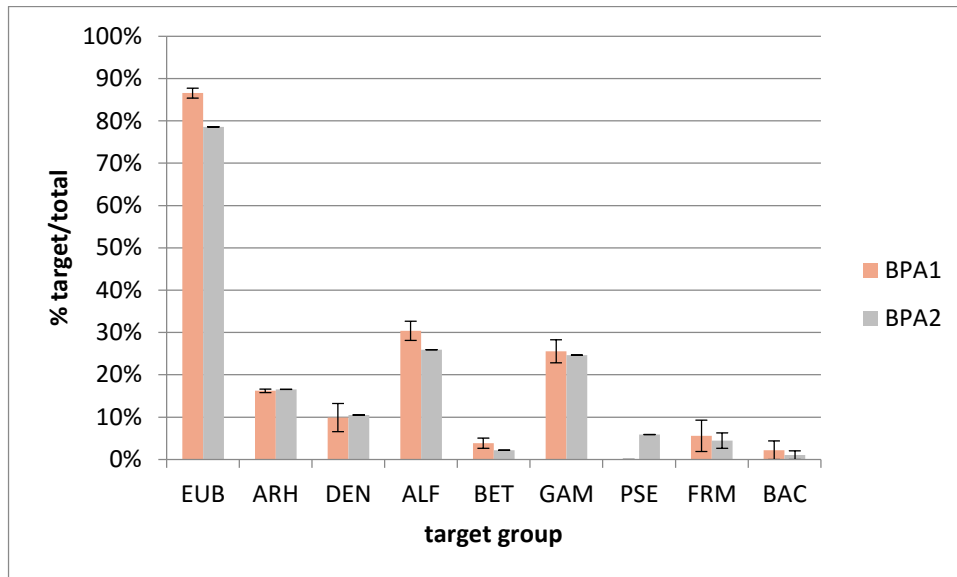
Στο πείραμα ελέγχου (Διάγραμμα 4.23) τα βακτήρια αποτελούν περίπου το 55%, ενώ τα αρχαία το 30%. Υψηλότερο ποσοστό κατέχουν τα γ -Proteobacteria, περίπου 26%. Το χαμηλότερο ποσοστό καταλαμβάνουν τα *Pseudomonas sp.* ενώ δεν υπάρχουν σχεδόν καθόλου *Bacillus sp.* Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ταυτοποιήθηκε μια αρκετά μεγάλη μάζα μικροοργανισμών, αφού το άθροισμα των βακτηρίων και των αρχαίων είναι περίπου 85%. Όπως επίσης ταυτοποιήθηκε η μεγαλύτερη μάζα των ευβακτηρίων, γιατί το άθροισμα των α -, β -, γ - Proteobacteria (52%) πλησιάζει το ποσοστό τους.



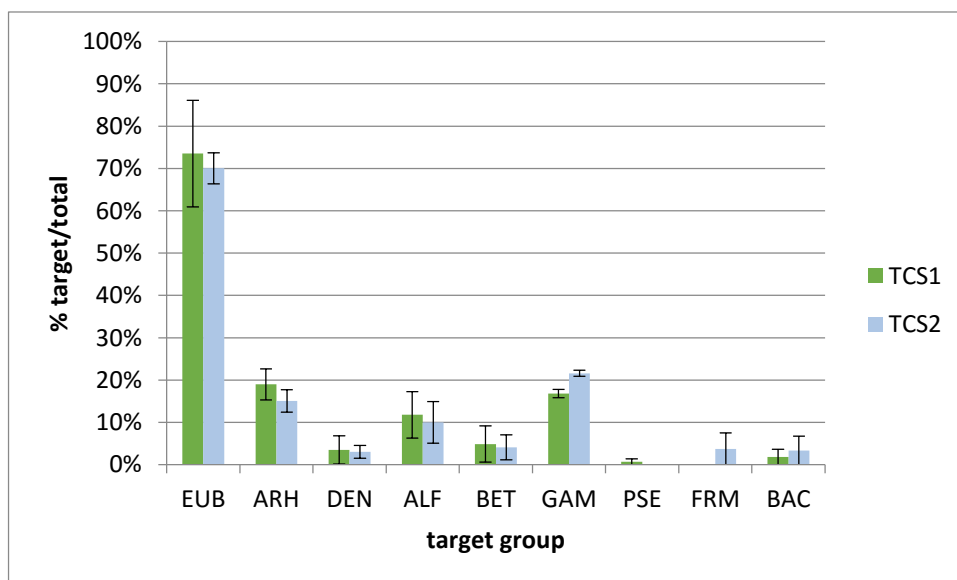
Διάγραμμα 4.23 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της μεθανόλης

Στο διάγραμμα 4.24 παρατηρείται πως τα βακτήρια αποτελούν περίπου το 83% του συνόλου και τα αρχαία το 16%, δείχνοντας με αυτό τον τρόπο μια απόκλιση από

το πείραμα ελέγχου. Μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνει η ομοταξία α-Proteobacteria, περίπου 28%, ενώ δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διαφορά από το πείραμα της μεθανόλης στις υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών.



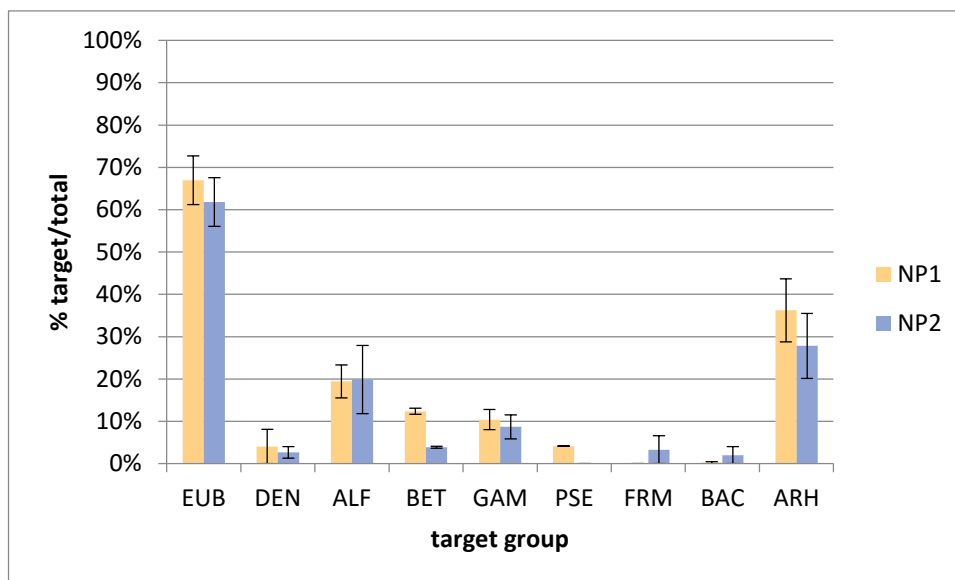
Διάγραμμα 4.24 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της bisphenol-A



Διάγραμμα 4.25 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της triclosan

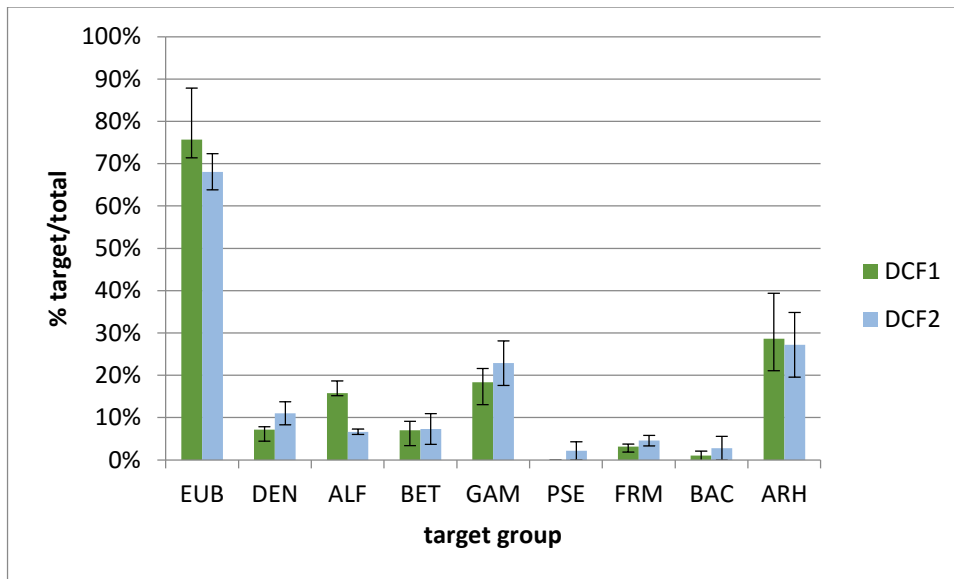
Παρότι η απομάκρυνση της triclosan ήταν αρκετά υψηλή, περίπου 86%±1%, δεν μετρήθηκε σημαντική αναγωγή τρισθενούς σιδήρου και δεν παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας με το πείραμα

ελέγχου (Διάγραμμα 4.25). Τα βακτήρια είναι σε ποσοστό 72% και τα αρχαία περίπου 17%, όμως, μόνο το 48% των ευβακτηρίων ταυτοποιήθηκε ως το άθροισμα των α-, β-, γ- Proteobacteria, δείχνοντας με αυτόν τον τρόπο ότι υπάρχει μια σημαντική μερίδα μικροοργανισμών που δεν ανιχνεύτηκε..



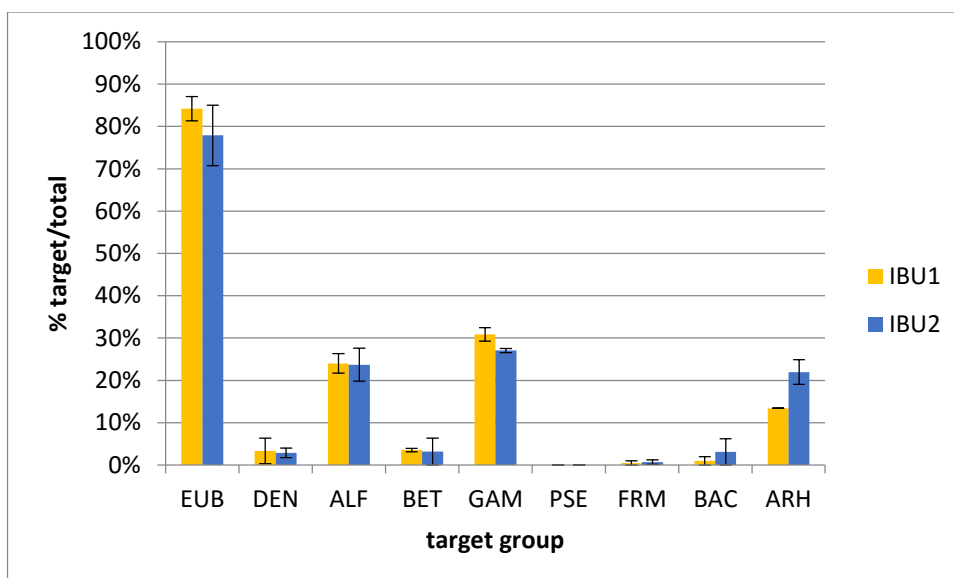
Διάγραμμα 4.26 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της nonylphenol

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.26, τα βακτήρια βρίσκονται σε ποσοστό 64%, ενώ τα αρχαία σε ποσοστό 32%. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπήρχε ιδιαίτερη μεταβολή από το πείραμα ελέγχου με αξιοσημείωτο, όμως, το μικρό ποσοστό των γ-Proteobacteria, περίπου 10%. Επίσης, πάλι φαίνεται ότι δεν ανιχνεύτηκε όλη η μάζα των ευβακτηρίων, αφού το άθροισμα των τριών ομάδων των Proteobacteria ήταν μόλις 37%.



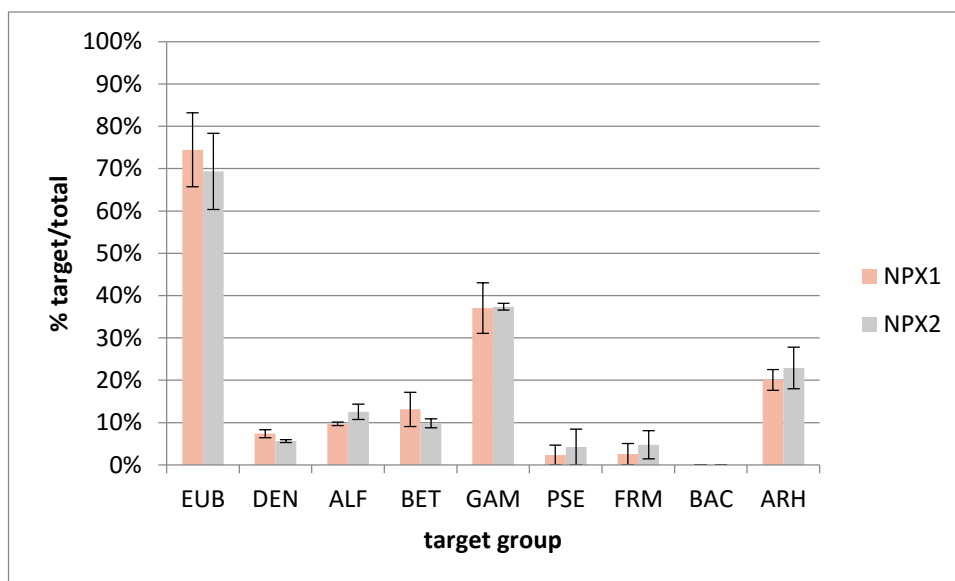
Διάγραμμα 4.27 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της diclofenac

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μετά τις 110 μέρες λειτουργίας η diclofenac ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης, το οποίο οφείλεται στην αλλοίωση του δείγματος προς μέτρηση. Στο διάγραμμα 4.27 φαίνεται ότι τα βακτήρια αποτελούν το 72%, ενώ τα αρχαία το 28%. Το μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνουν τα γ -Proteobacteria, περίπου 21%, ενώ πολύ χαμηλά είναι τα ποσοστά των *Bacillus sp.* και *Pseudomonas sp.*, 2% και 1% αντίστοιχα, χωρίς όμως να υπάρχει ιδιαίτερη μεταβολή από τη μικροβιακή κοινότητα του πειράματος ελέγχου.



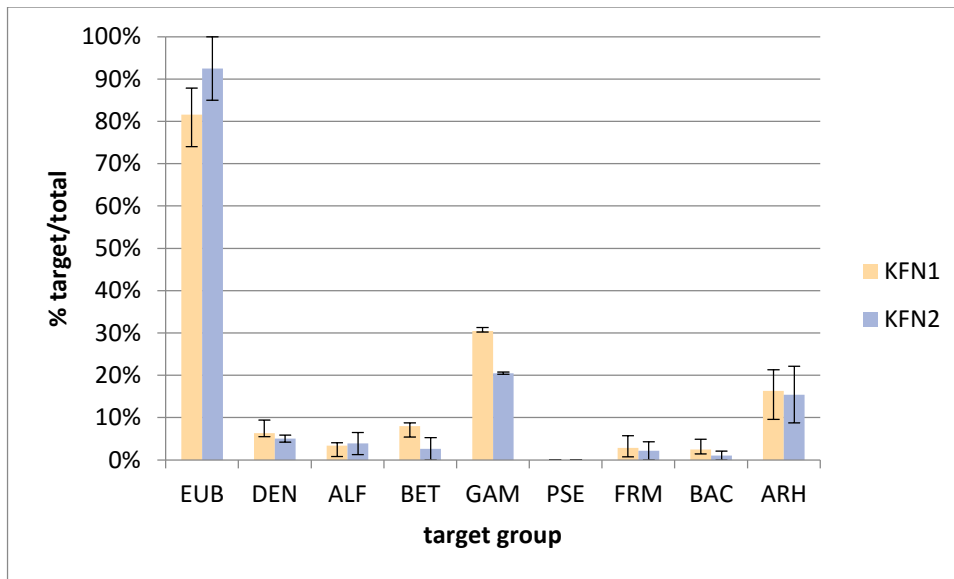
Διάγραμμα 4.28 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της ibuprofen

Όπως παρατηρείται στο διάγραμμα 4.28, τα βακτήρια στο πείραμα με ibuprofen, αποτελούν το 81% του συνόλου των μικροοργανισμών και τα αρχαία το 18%, δείχνοντας μια διαφορετική σύνθεση βιομάζας από την καλλιέργεια της μεθανόλης, χωρίς όμως να ξεχωρίζει κάποια ομάδα μικροοργανισμών. Εξαιρέση ίσως αποτελεί το υψηλό ποσοστό των α - Proteobacteria, περίπου 24%.



Διάγραμμα 4.29 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της paroxen

Μία από τις μεγαλύτερες απομακρύνσεις έδειξε η καλλιέργεια της paroxen σε ποσοστό 83%±4%. Στο διάγραμμα 4.29 φαίνεται ότι τα βακτήρια καταλαμβάνουν 72% και τα αρχαία 21%, δείχνοντας έτσι μια μικρή αύξηση ευβακτηρίων από το πείραμα ελέγχου. Αξιοσημείωτο είναι, επίσης, το μεγάλο ποσοστό της ομοταξίας των γ -Proteobacteria, περίπου 37%.



Διάγραμμα 4.30 Μικροοργανισμοί στις αναερόβιες καλλιέργειες της ketorprofen

Σε αυτό το διάγραμμα φαίνεται ότι τα βακτήρια αποτελούν περίπου το 87% και τα αρχαία το 16%, τα οποία αν συγκριθούν με το πείραμα ελέγχου δείχνουν μια μικρή διαφορά στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας. Ενδιαφέρον είναι το μικρό ποσοστό των α -Proteobacteria, περίπου 4% και το μεγάλο ποσοστό ευβακτηρίων που δεν ταυτοποιήθηκε (περίπου 60% των ευβακτηρίων)..

Συμπερασματικά για τις αναερόβιες καλλιέργειες, παρατηρείται ότι μόνο η TCS και η NPX έδειξαν μια σημαντική απομάκρυνση (περίπου 84%), ενώ οι υπόλοιπες ουσίες είχαν μια μέση απομάκρυνση της τάξεως του 47%. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι οι καλλιέργειες της TCS και NP δεν έδειξαν σημαντική παραγωγή δισθενούς σιδήρου. Γεγονός το οποίο μάλλον οφείλεται στην ιδιότητα αυτών των ουσιών να λειτουργούν ως δέκτες παρά ως δότες ηλεκτρονίων και να είναι ανταγωνιστικές ως προς την αναγωγή τρισθενούς σιδήρου. Οι υπόλοιπες ουσίες είχαν υψηλή παραγωγή δισθενούς σιδήρου, περίπου 30 mg/L, συγκριτικά με το πείραμα ελέγχου (17 mg/L). Όσον αφορά τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας, φαίνεται ότι στις περισσότερες καλλιέργειες δεν ανιχνεύτηκε η μεγαλύτερη μάζα των ευβακτηρίων κυρίως λόγω της μη-στόχευσής της, ενώ το ποσοστό των ευβακτηρίων κυμαινόταν μεταξύ 72-87%. Εξαιρέση αποτελούν το πείραμα ελέγχου και η καλλιέργεια της NPX, όπου το μεγαλύτερο ποσοστό των ευβακτηρίων αποτελείται από α -, β -, γ -Proteobacteria, περίπου 94% και 83% αντιστοίχως. Επίσης, τα αρχαία ήταν περίπου 30% στις

καλλιέργειες της μεθανόλης, της NPX και της DCF, ενώ στις υπόλοιπες ήταν περίπου 18%. Τα α -Proteobacteria επικράτησαν στις καλλιέργειες που περιείχαν IBU και BPA, ενώ ανιχνεύτηκαν σε χαμηλά επίπεδα στις καλλιέργειες της KFN. Τα γ -Proteobacteria είχαν υψηλό ποσοστό στις καλλιέργειες που περιείχαν NPX, ενώ ήταν ιδιαίτερα χαμηλά στις καλλιέργειες της NP. Για τις υπόλοιπες ομάδες μικροοργανισμών, δεν υπήρξαν ιδιαίτερες μεταβολές μεταξύ των καλλιεργειών.

4.6 Συγκριτική αξιολόγηση ως προς την επικράτηση των μικροοργανισμών

Στην παρούσα παράγραφο θα γίνει μια συγκριτική αξιολόγηση ως προς την επικράτηση των μικροοργανισμών, με σκοπό την επιλογή των κατάλληλων ιχνηλατών, σε περίπτωση μέτρησης ενός περιβαλλοντικού δείγματος υδάτινου αποδέκτη ρυπασμένου με ενδοκρινικούς διαταράκτες και φαρμακευτικές ουσίες.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου FISH δείχνουν ότι, στις ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες, η μεγαλύτερη μάζα των μικροοργανισμών ανιχνεύτηκε αφού το άθροισμα των ευβακτηρίων και αρχαίων κυμαινόταν μεταξύ 85-107%. Επομένως, μικρό ή ανύπαρκτο ήταν το ποσοστό των Gram-θετικών βακτηρίων που δεν μετρήθηκε.

Τα βακτήρια στις αερόβιες συνθήκες αποτελούν περίπου 54%, ενώ στις αναερόβιες και τις ανοξικές το 73% και 74% αντίστοιχα. Αν και δεν υπήρχαν μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ των καλλιεργειών, φαίνεται ότι και στις τρεις συνθήκες οι καλλιέργειες της bisphenol-A έχουν υψηλό ποσοστό βακτηρίων (61%, 83%, 80% σε αερόβιες, αναερόβιες και ανοξικές αντίστοιχα), ενώ υψηλά είναι και τα ποσοστά των καλλιεργειών της diclofenac (61%) στις αερόβιες, της ketoprofen (87%) στις αναερόβιες και της triclosan (91%) στις ανοξικές. Επίσης, το πείραμα ελέγχου και η καλλιέργεια της NP στις αναερόβιες συνθήκες είχαν τα χαμηλότερα ποσοστά βακτηρίων, 55% και 64% αντίστοιχα.

Τα αρχαία στις αναερόβιες και στις ανοξικές συνθήκες βρέθηκαν περίπου 22% και 23% αντίστοιχα. Τα μεγαλύτερα ποσοστά αρχαίων έχουν αναπτυχθεί στις καλλιέργειες της μεθανόλης (30%), της nonylphenol (32%) και της diclofenac στις

αναερόβιες συνθήκες, ενώ στις ανοξικές στις καλλιέργειες της ibuprofen (36%) και της naproxen (42%).

Χαμηλά ήταν τα ποσοστά των α -Proteobacteria στις αερόβιες συνθήκες, περίπου 7% και σχετικά πιο υψηλά στις αναερόβιες και ανοξικές, περίπου 16% και 19% αντίστοιχα. Στις ανοξικές τα μεγαλύτερα ποσοστά εμφανίζονται στις καλλιέργειες της ibuprofen (29%) και της naproxen (26%), ενώ στις αναερόβιες στις καλλιέργειες της ibuprofen (24%) και της bisphenol-A (28%). Στις αερόβιες, δεν φάνηκε κάποια σημαντική ανάπτυξη αυτής της τάξης, ενώ σχεδόν όλα τα α -Proteobacteria ήταν του αερόβιου γένους *Sphingomonas*.

Τα β -Proteobacteria φαίνεται πως αναπτύχθηκαν ως επί το πλείστον στις αερόβιες καλλιέργειες, χωρίς ιδιαίτερες διακυμάνσεις, το μεγαλύτερο μέρος των οποίων ήταν τα αυτοτροφικά *Nitrosomonas sp.* Αντίθετα, σχετικά χαμηλά ήταν τα ποσοστά των β -Proteobacteria στις αναερόβιες και τις ανοξικές συνθήκες, περίπου 6% και 4% αντίστοιχα. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η ομάδα των β -Proteobacteria δεν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βιοαποδόμηση των ουσιών προς μελέτη.

Τα γ -Proteobacteria ήταν σχετικά υψηλά και στις τρεις συνθήκες, περίπου 23% στις αερόβιες, 24% στις αναερόβιες και 18% στις ανοξικές. Υψηλό όμως ποσοστό έχει δείξει και το πείραμα ελέγχου σε όλες τις συνθήκες, με αποτέλεσμα να φαίνεται ότι μόνο σε συγκεκριμένες καλλιέργειες η ομοταξία αυτή έχει βιοαποδομήσει τις ουσίες. Μεγαλύτερο ποσοστό στις αερόβιες εμφανίζεται στις καλλιέργειες της bisphenol-A (30%), ενώ στις αναερόβιες στις καλλιέργειες της naproxen (37%). Επιπλέον στις ανοξικές συνθήκες, υψηλό ποσοστό εμφανίζεται στις καλλιέργειες της nonylphenol (28%) και της triclosan (32%). Πάρα αυτά, δεν έχει ταυτοποιηθεί το γένος των γ -Proteobacteria που αναπτύχθηκε στις συγκεκριμένες καλλιέργειες. Το μόνο γνωστό είναι ότι δεν έχουν αναπτυχθεί σχεδόν καθόλου *Pseudomonas sp.* αφού το ποσοστό τους έφτανε μόλις το 1%.

Παρατηρείται επίσης ότι το φύλο Firmicutes έχει αναπτυχθεί μόνο στις αερόβιες συνθήκες, περίπου 18%, με τα υψηλότερα ποσοστά να σημειώνονται στις καλλιέργειες της ibuprofen (36%), της triclosan (33%) και της nonylphenol (25%). Μόνο στις καλλιέργειες της naproxen στις ανοξικές αναπτύχθηκαν Firmicutes σε ποσοστό 12%. Τα *Bacillus sp.* επίσης έχουν αναπτυχθεί μόνο στις αερόβιες στις

καλλιέργειες της ibuprofen (12%), ενώ στις άλλες καλλιέργειες είναι σε χαμηλά επίπεδα.

Τέλος, τα βακτήρια που χρησιμοποιούν τη μεθανόλη (DEN) αναπτύχθηκαν σε χαμηλά σχετικά ποσοστά, και χωρίς μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των καλλιεργειών, 10%, 6% και 5% στις αερόβιες, αναερόβιες και ανοξικές συνθήκες αντίστοιχα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής μελετήθηκε η ικανότητα βιοαποδόμησης των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ενώσεων από μικροοργανισμούς σε τρεις διαφορετικές συνθήκες, αερόβιες, αναερόβιες και ανοξικές. Μελετήθηκαν οι ενδοκρινικοί διαταράκτες bisphenol-A, triclosan και nonylphenol και οι φαρμακευτικές ενώσεις diclofenac, ibuprofen, naproxen και ketoprofen. Όλες οι καλλιέργειες ήταν σε διπλό αντίτυπο (duplicate) ενώ υπήρχαν duplicates που περιείχαν μόνο μεθανόλη (πείραμα ελέγχου – control).

Τα κυριότερα συμπεράσματα, που προέκυψαν από την ανάλυση των πειραματικών μετρήσεων του 4^{ου} Κεφαλαίου, συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Η μεγαλύτερη απομάκρυνση των ουσιών επιτυγχάνεται στις αερόβιες συνθήκες, περίπου 89%. Στις αναερόβιες και τις ανοξικές συνθήκες η triclosan έχει τη μεγαλύτερη απομάκρυνση (πάνω από 84%). Επιπλέον, η naproxen, ενώ έχει υψηλή απομάκρυνση στις αναερόβιες (πάνω από 83%), παρουσιάζει 53% στις ανοξικές συνθήκες. Η απομάκρυνση των υπολοίπων ουσιών κυμάνθηκε γύρω από την τιμή 29% και 47% για τις ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες αντιστοίχως. Πιο συγκεκριμένα, η ibuprofen απομακρύνεται σχεδόν πλήρως μόνο σε αερόβιες συνθήκες. Αντιθέτως, πιο δύσκολα βιοαποδομείται η nonylphenol, αφού παρουσιάζει απομάκρυνση 70% σε αερόβιες και μόλις 31% σε ανοξικές συνθήκες.
- Στις αερόβιες συνθήκες, επίσης, η συγκέντρωση των VSS (περίπου 52,7 mg/L) ήταν ως και 5 περίπου φορές μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα δείγματα που εξετάστηκαν σε ανοξικές συνθήκες (περίπου 9,2 mg/L). Η βιομάζα, όμως, που αναπτύχθηκε δεν φάνηκε να έχει ιδιαίτερες μεταβολές μεταξύ των καλλιεργειών στις ίδιες συνθήκες.
- Αυξημένη ήταν η κατανάλωση των αμμωνιακών στις αερόβιες συνθήκες (περίπου 85% απομακρύνονταν) κυρίως λόγω της ανάπτυξης του αυτοτροφικού γένους *Nitrosomonas*. Η αναγωγή των νιτρικών στις ανοξικές συνθήκες ήταν αυξημένη στις καλλιέργειες των DCF, IBU, NPX, (περίπου

35% απομακρύνονταν), ενώ η καλλιέργεια της TCS φάνηκε να μην καταναλώνει νιτρικά. Στις αναερόβιες συνθήκες, η αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου ήταν υψηλή στις καλλιέργειες που περιείχαν bisphenol-A, diclofenac, ibuprofen, naproxen και ketoprofen (περίπου 60%) συγκριτικά με το πείραμα ελέγχου (30%). Όμως, οι καλλιέργειες της triclosan και nonylphenol δεν έδειξαν σημαντική παραγωγή δισθενούς σιδήρου, το οποίο μάλλον οφείλεται στην ιδιότητα αυτών των ουσιών να δρουν ως δέκτες παρά ως δότες ηλεκτρονίων.

- Όσον αφορά τη σύνθεση της μικροβιακή κοινότητας, φαίνεται ότι:
 - Στις ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες, η μεγαλύτερη μάζα των μικροοργανισμών ανιχνεύτηκε, δείχνοντας ότι το ποσοστό των Gram-θετικών βακτηρίων που δεν μετρήθηκε ήταν μικρό.
 - Τα βακτήρια στις αερόβιες συνθήκες είναι σε χαμηλότερο ποσοστό (περίπου 54%) από ότι στις αναερόβιες και στις ανοξικές (73% και 74% αντίστοιχα).
 - Σε αερόβιες συνθήκες, τα *γ-Proteobacteria* και τα *Firmicutes* ήταν οι επικρατέστερες ομάδες μικροοργανισμών, ενώ έχουν μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ τους. Η τάξη *γ-Proteobacteria* φαίνεται να έχει μεγαλύτερη ανάπτυξη στις καλλιέργειες με τις ουσίες BPA, NPX, DCF και KFN. Αντιθέτως, το φύλο *Firmicutes* φαίνεται να αναπτύσσεται στις καλλιέργειες με IBU, TCS και NP.
 - Σε ανοξικές συνθήκες, οι καλλιέργειες που περιείχαν IBU και NPX είχαν μια αύξηση των αρχαίων και της ομοταξίας των *α-Proteobacteria*, ενώ μόνο στις καλλιέργειες της NPX υπήρξε μια μικρή αύξηση του φύλου *Firmicutes*. Τέλος, τα *γ-Proteobacteria* επικράτησαν στις καλλιέργειες της TCS και NP.
 - Σε αναερόβιες συνθήκες, οι ομάδες των επικρατέστερων μικροοργανισμών εξαρτώνται από τις ουσίες που βιοαποδομούνται. Τα *α-Proteobacteria* επικράτησαν στις καλλιέργειες της IBU και της BPA, ενώ ανιχνεύθηκαν σε χαμηλά επίπεδα στις καλλιέργειες που περιείχαν KFN και τα *γ-Proteobacteria* είχαν υψηλό ποσοστό στις καλλιέργειες της NPX,

ενώ ήταν ιδιαίτερα χαμηλά στις καλλιέργειες της NP. Επίσης, φαίνεται ότι ένα μεγάλο μέρος ευβακτηρίων που διαδραματίζει ρόλο στη βιοαποδόμηση συγκεκριμένων διαταρακτών και των φαρμακευτικών ουσιών δεν ανιχνεύτηκε.

Βασικά συμπεράσματα

Τα βασικά συμπεράσματα που συνοψίζονται από τα παραπάνω είναι:

- ✓ Σε αερόβιες συνθήκες επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη απομάκρυνση των ενδοκρινικών διαταρακτών και των φαρμακευτικών ενώσεων, ενώ αναπτύσσεται περισσότερη βιομάζα.
- ✓ Οι σημαντικότερες ομάδες μικροοργανισμών που φαίνεται να συμμετέχουν στην βιοαποδόμηση των ουσιών είναι τα α - Proteobacteria, γ - Proteobacteria και το φύλο Firmicutes.
- ✓ Σε ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες, αναπτύχθηκαν α -Proteobacteria, τα οποία όμως δεν ταυτοποιήθηκαν.
- ✓ Σε αερόβιες συνθήκες, αναπτύχθηκε είτε η ομοταξία γ - Proteobacteria είτε το φύλο Firmicutes, ανάλογα την ουσία που εισήχθηκε στην κάθε καλλιέργεια.
- ✓ Σε όλες τις συνθήκες αναπτύχθηκαν γ -Proteobacteria, όμως τα ποσοστά των *Pseudomonas* sp. ήταν ελάχιστα σε σχέση με το σύνολο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Ανδρεαδάκης Α., Πανταζίδου Μ., Σταθόπουλος, «Περιβαλλοντική Τεχνολογία», Εκδ. Συμμετρία.
- Νουτσόπουλος Κ., Σημειώσεις Μεταπτυχιακού Μαθήματος Ε.Μ.Π. «Βιοχημικές Διεργασίες στο Υδάτινο Περιβάλλον».
- Brock Biology of Microorganisms – Brock: Βιολογία των μικροοργανισμών, Ελληνική μετάφραση, 2005, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Διεθνής Βιβλιογραφία

- Al-Rajab A. J., Sabourin L., Lapen D. R., Topp E., (2010). The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac is readily biodegradable in agricultural soils, *Science of the Total Environment*, vol. 409, 78-82.
- Birkett J.W., Lester J.N., (2003). *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*, Lewis Publishers, London.
- Cantwell M. G., Wilson B. A., Zhu J., Gordon T. W., King J., W., Olsen C. R., Burgess R. M., Smith J. P., (2010). Temporal trends of triclosan contamination in dated sediment cores from four urbanized estuaries: Evidence of preservation and accumulation, *Chemosphere*, vol. 78, 347-352.
- Casas M. E., Chhetri R. K., Ooi G., Hansen K. M. S., Litty K., Christensson M., Kragelund C., Andersen H. R., Bester K., (2015). Biodegradation of pharmaceuticals in hospital wastewater by staged Moving Bed Biofilm Reactors (MBBR), *Water Research*, vol. 83, 293-302.
- Chen X., Nielsen J. L., Furgal K., Liu Y., Lolas I. B., Bester K., (2011). Biodegradation of triclosan and formation of methyl-triclosan in activated sludge under aerobic conditions, *Chemosphere*, vol. 84, 452-456.
- Chen X., Pauly U., Rehfus S., Bester K., (2009). Personal care compounds in a reed bed sludge treatment system, *Chemosphere*, vol. 76, 1094–1101.

- Colborn T., Vom Saal F. S., Soto A. M., (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans.
- Di Goia D., Michelles A., Bogialli S., Fava F., Barberio C., (2007). Selection and characterization of aerobic bacteria capable of degrading commercial mixtures of low-ethoxylated nonylphenols, *Journal of Applied Microbiology*.
- Díaz-Reval M. I., Ventura-Martínez R., Déciga-Campos M., Terrón J. A., Cabré F., López-Muñoz F. J., (2004). Evidence for a central mechanism of action of S-(+)-ketoprofen, *European Journal of Pharmacology*, vol. 483, 241-248.
- Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition, Volume two The Proteobacteria, Springer.
- Grenni P., Patrolecco L., Ademollo N., Tolomei A., Caracciolo A. B., (2012). Degradation of Gemfibrozil and Naproxen in a river water ecosystem, *Microchemical Journal*.
- Gröning J., Held C., Garten C., Claußnitzer U., Kashabek S. R., Schlömann M., (2007). Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate, *Chemosphere*, vol. 69, 509-516.
- Gupta R. S., (2000). The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes, *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 24, 367-402.
- Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P. F., HoltenLützhof H. C., Jorgensen S. E., (1997). Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- A Review, *Chemosphere*, vol. 36, 357-393.
- Hampl R., Kubátová J., Stárka L., (2014). Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.
- Hata T., Kawai S., Okamura H., Nishida T., (2010). Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation, *Biodegradation*, vol. 21, 681-689.
- Huang H., Li Y., Liu J., Tong J., Su X., (2015). Detection of bisphenol A in food packaging based on fluorescent conjugated polymer PPESO3 and enzyme system, *Food Chemistry*, vol. 185, 233-238.

- Kang J. H., Kondo F., (2002). Bisphenol a degradation by bacteria isolated from river water, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 43, 265-269.
- Kang J.H., Katayama Y., Kondo F., (2006). Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals, *Toxicology*, vol. 217, 81-90.
- Kim Y. M., Murugesan K., Schmidt S., Bokare V., Jeon J. K., Kim E. J., Chang Y. S., (2011). Triclosan susceptibility and co-metabolism – A comparison for three aerobic pollutant-degrading bacteria, *Bioresource Technology*, vol. 102, 2206-2212.
- Lee D. G., Cho K. C., Chu K. H., (2013). Identification of triclosan-degrading bacteria in a triclosan enrichment culture using stable isotope probing, *Biodegradation*, vol. 25, 55-65.
- Li G., Zu L., Wong P. K., Hui X., Lu Y., Xiong J., An T., (2012). Biodegradation and detoxification of bisphenol A with one newly-isolated strain *Bacillus* sp. GZB: Kinetics, mechanism and estrogenic transition, *Bioresource Technology*, vol. 114, 224-230.
- Lolas I. B., Chen X., Bester K., Nielsen J. L., (2012). Identification of triclosan-degrading bacteria using stable isotope probing, fluorescence in situ hybridization and microautoradiography, *Microbiology*, vol. 158, 2796–2804.
- Maragakis L. L., Chaiwarith R., Srinivasan A., Torriani F. J., Avdic E., Lee A., Ross T. R., Carroll K. C., Perl T. M., (2009). *Sphingomonas paucimobilis* Bloodstream Infections Associated with Contaminated Intravenous Fentanyl, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15.
- Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Blánquez P., Vicent T., Caminal G., (2010). Biodegradation of the analgesic naproxen by *Trametes versicolor* and identification of intermediates using HPLC-DAD-MS and NMR, *Bioresource Technology*, vol. 101, 2159-2166.
- Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Cruz-Morató C., Caminal G., Vicent T., (2010). White-rot fungus-mediated degradation of the analgesic ketoprofen and identification of intermediates by HPLC–DAD–MS and NMR, *Chemosphere*, vol. 78, 474-481.
- Marco-Urrea E., Pérez-Trujillo M., Vicent T., Caminal G., (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of

degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*, *Chemosphere*, vol. 74, 765-772.

- Michałowich J., Mokra K., Bąk A., (2015). Bisphenol A and its analogs induce morphological and biochemical alterations in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study), *Toxicology in vitro*, vol. 29, 1464-1472.
- Nicolopoulou-Stamati P., Hens L., Howard C. V., (2001). *Endocrine Disruptors: Environmental Health and Policies*, Springer Netherlands.
- Nowak K. M., Girardi C., Miltner A., Gehre M., Schäffer A., Kästner M., (2013). Contribution of microorganisms to non-extractable residue formation during biodegradation of ibuprofen in soil, *Science of the Total Environment*, vol. 445-446, 377-388.
- Orhon A. K., (2014). *Triclosan in biological wastewater treatment: Fate, kinetics and population dynamic aspects*, Middle East Technical University.
- Planas C., Guadayol J. M., Droguet M., Escalas A., Rivera J., Caixach J., (2002). Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS, *Water Research*, vol. 36, 982-988.
- Quintana J. B., Weiss S., Reemtsma T., (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor, *Water Research*, vol. 39, 2654-2664.
- Radjenović J., Petrović M., Barceló D., (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment, *Water Research*, vol. 43, 831-841.
- Rahman Kabir E., Sharfin Rahman M., Rahman I., (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 40, 241-258.
- Richardson M. L., Bowron J. M., (1985). The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 37, 1-12.

- Sakai K., Yamanaka H., Moriyoshi K., Ohmoto T., Ohe T., (2007). Biodegradation of bisphenol A and related compounds by *Sphingomonas* sp. strain BP-7 isolated from seawater, Department of Biochemistry, vol. 71, 51-57.
- Sarmah A. K., Northcott G. L., (2008). Laboratory degradation studies of four endocrine disruptors in two environmental media, Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 27, 819-827.
- Shi J., Fujisawa S., Nakai S., Hosomi M., (2004). Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*, Water Research, vol. 38, 2323-2330.
- Staples C. A., Dome P. B., Klecka G. M., Oblock S. T., Harris L. R., (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A, Chemosphere, vol. 36, 2149-2173.
- Vlachogianni T., Fiotakis K., Loridas S., Valavanidis A. Environmental Pollution by Endocrine Disrupting Chemicals. Adverse Developmental, Reproductive and Immune Effects in the Wildlife and in Human Health, Department of Chemistry, University of Athens.
- Wang Z., Yang Y., Sun W., Xie S., (2014). Biodegradation of nonylphenol by two alphaproteobacterial strains in liquid culture and sediment microcosm, International Biodeterioration & Biodegradation, vol. 92, 1-5.
- White D. C., Sutton S. D., Ringelberg D. B., (1996). The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology, Current Opinion in Biotechnology, vol. 7, 301-306.
- Winkler M., Lawrence J. R., Neu T. R., (2001). Selective degradation of ibuprofen and clofibric acid in two model biofilm systems, Water Research, vol. 35, 3197-3205.
- Wojcieszynska D., Domaradzka D., Hupert-Kocurek K., Guzik U., (2014). Bacterial degradation of naproxen e Undisclosed pollutant in the environment, Journal of Environmental Management, vol. 145, 157-161.
- Ying G. G., Kookana R. S., (2003). Degradation of Five Selected Endocrine-Disrupting Chemicals in Seawater and Marine Sediment, Environmental Science & Technology, vol. 37, 1256-1260.
- Ying G. G., Toze S., Hanna J., Yu X. Y., Dillon P. J., Kookana R. S., (2008). Decay of endocrine-disrupting chemicals in aerobic and anoxic groundwater, Water Research, vol. 42, 1133-1141.

- Ying G. G., Williams B., Kookana R., (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review, *Environment International*, vol. 28, 215-226.
- Yu Z., Peldszus S., Huck P. M., (2008). Adsorption characteristics of selected pharmaceuticals and an endocrine disrupting compound—Naproxen, carbamazepine and nonylphenol—on activated carbon, *Water Research*, vol. 42, 2873-2882.
- Yuan S. Y., Yu C. H., Chang B. V., (2004). Biodegradation of nonylphenol in river sediment, *Environmental Pollution*, vol. 127, 425-430.
- Zhang W., Yin K., Chen L., (2013). Bacteria-mediated bisphenol A degradation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, 5681–5689.

Ιστότοποι

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://comenius.susqu.edu/biol/202/> Holt J. R., Iudica C. A., *Systematic Biology: The Science of Biodiversity*
- rdp.cme.msu.edu/probematch
- <http://www.earthlife.net/prokaryotes/firmicutes.html>
- www2.epa.gov