

## ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΦΥΣΑΛΙΔΩΝ ΟΖΟΝΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΤΟΥ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ ΑΠΟ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

**Π. Σερίδου<sup>1</sup>, Ν. Καλογεράκης<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά, Ελλάδα

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, American University of Sharjah, Sharjah, UAE

(\*[nicolas.kalogerakis@enveng.tuc.gr](mailto:nicolas.kalogerakis@enveng.tuc.gr))

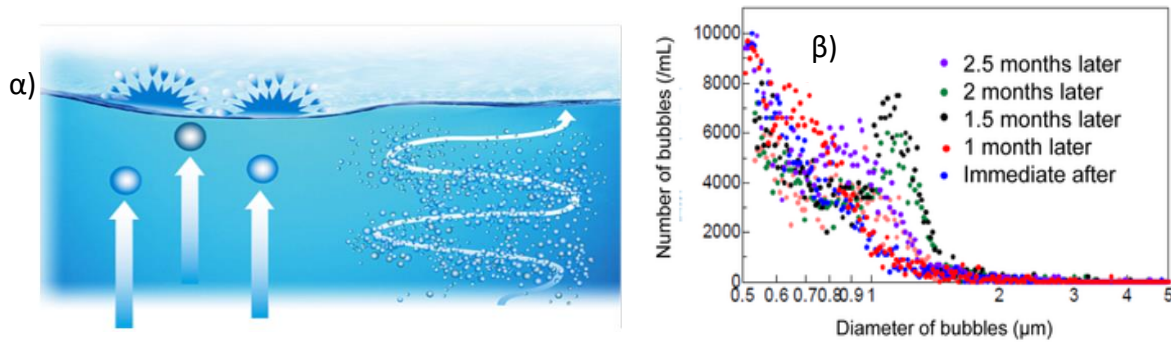
### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έρευνα πάνω στην τεχνολογία των νανοφουσαλίδων αέρα (Nanobubbles, NBs) έχει παρουσιάσει σημαντική άνοδο τα τελευταία χρόνια λόγω του πλήθους των εφαρμογών τους, συμπεριλαμβανομένης και της επεξεργασίας νερού και λυμάτων. Εκμεταλλευόμενοι την πιο κύρια ιδιότητα των νανοφουσαλίδων, η οποία είναι η μεγάλη παραμονή τους μέσα σε υγρά διαλύματα και την ισχυρή οξειδωτική και απολυμαντική δράση του όζοντος, κεντρικό αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο μηχανισμός απολύμανσης με την εναλλακτική τεχνολογία των νανοφουσαλίδων όζοντος. Πιο αναλυτικά, η σύζευξη του όζοντος με τις νανοφουσαλίδες δύναται να ενισχύσει την απολυμαντική δράση του καθώς και την υπολειμματική του συγκέντρωση με σκοπό την αντικατάσταση της συμβατικής μεθόδου της οζόνωσης, η οποία παρουσιάζει χαμηλή υπολειμματική συγκέντρωση όζοντος καθώς και της χλωρίωσης με σκοπό την αποφυγή των τοξικών παραπροϊόντων που επιφέρει η χρήση του χλωρίου. Στην συγκεκριμένη επιστημονική έρευνα μελετήθηκε η απολύμανση δύο παθογόνων μικροοργανισμών *Escherichia coli* και *Klebsiella pneumoniae*, οι οποίοι αποτελούν μικροβιολογικοί δείκτες της ποιότητας του πόσιμου νερού και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα εξουδετέρωσης αυτών των παθογόνων μικροοργανισμών σε διάφορες συγκεντρώσεις διαλυμένου όζοντος. Τέλος, εξετάστηκε ο χρόνος ημιζωής του διαλυμένου όζοντος στην περίπτωση του οζονισμού με και χωρίς την ύπαρξη νανοφουσαλίδων.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στην σημερινή εποχή, η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων λυμάτων εξαιτίας της αστικοποίησης και της εκβιομηχάνισης συνιστά μια σοβαρή απειλή για τους υπάρχοντες υδάτινους πόρους. Κατά συνέπεια, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για καινοτόμες μεθόδους επεξεργασίας νερού που έχουν ως σκοπό να προσφέρουν υψηλής ποιότητας νερό στο χαμηλότερο δυνατό κόστος. Σε αυτό το πλαίσιο εντάσσεται η τεχνολογία των νανοφουσαλίδων όζοντος, η οποία είναι μια τεχνολογία αιχμής που έχει τραβήξει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια. Οι νανοφουσαλίδες, οι οποίες έχουν οριστεί ως μικροσκοπικές σφαιρικές φυσαλίδες με διάμετρο κάτω από 1μm, παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που τις διαφοροποιούν από τις μακροφυσαλίδες, όπως είναι το μικρό μέγεθος τους και η υψηλή στασιμότητα τους στην υδατική φάση <sup>[1], [2]</sup>. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία μπορούν να παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στην υγρή φάση, και όπως φαίνεται και στο *Σχήμα 1*, μέχρι και μήνες <sup>[3]</sup>, εν αντιθέσει με τις μακροφυσαλίδες, οι οποίες δεν είναι σταθερές και ανεβαίνουν γρήγορα στην επιφάνεια του νερού, όπου και εκρήγνυνται. Γίνεται αντιληπτό ότι εξαιτίας των μοναδικών τους ιδιοτήτων, υπάρχουν υψηλοί ρυθμοί μεταφοράς μάζας λόγω της μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας μεταξύ της αέριας και της υγρής φάσης συμβάλλοντας στην προώθηση χημικών αντιδράσεων, φυσικής προσρόφησης και μεταφοράς μάζας στη διεπιφάνεια αερίου-υγρού <sup>[4], [5]</sup>. Από την άλλη πλευρά, το όζον έχει ισχυρή οξειδωτική δράση και μπορεί να διασπαστεί ταχύτατα στην υδατική φάση σχηματίζοντας οξειδωτικά μέσα μεταξύ των οποίων και η ρίζα υδροξυλίου (OH<sup>•</sup>) και εμφανίζει καλύτερη απόδοση στην εξουδετέρωση παθογόνων βακτηρίων και ιών <sup>[6]</sup>. Ωστόσο, η μέθοδος απολύμανσης με όζον περιορίζεται από το γρήγορο ρυθμό μείωσης της οξειδωτικής ικανότητας του διαλυμένου όζοντος. Ο χρόνος ημιζωής του όζοντος στην υδατική φάση υπολογίζεται 20min

στους 20°C, επομένως η υπολειμματικότητα του όζοντος είναι μηδαμινή, λόγω της ταχείας διάσπασής του προς οξυγόνο. Εν αντιθέσει ο χρόνος ημιζωής του όζοντος στην αέρια φάση είναι 3 μέρες στους 20°C [7], επομένως επισημαίνεται ότι η υπολειμματική δράση του δύναται να ενισχυθεί.



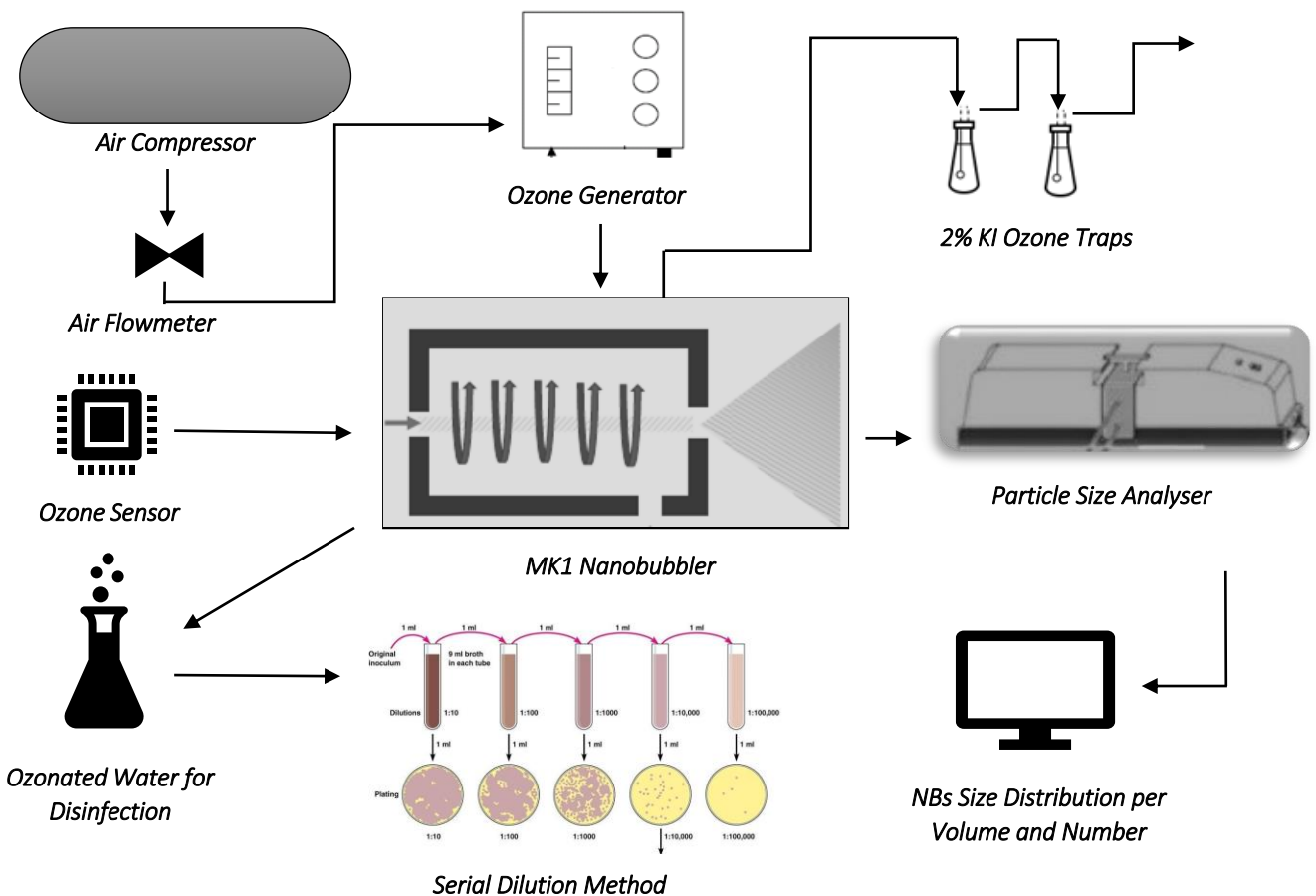
**Σχήμα 1.** α) Η υψηλή σταθερότητα των νανοφουσαλίδων στο νερό και σχεδόν αμελητέα άνωση σε σύγκριση με τις μακροφουσαλίδες, β) ο αυξημένος χρόνος ημιζωής στο υδατικό διάλυμα μέχρι και 2.5 μήνες [3].

**ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ**

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της εφαρμογής της απολύμανσης με νανοφουσαλίδες όζοντος στην εξουδετέρωση παθογόνων βακτηρίων καθώς και αξιολόγηση της υπολειπόμενης δράσης των νανοφουσαλίδων όζοντος.

**ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

Στο Σχήμα 2 περιλαμβάνεται η πειραματική διάταξη.



**Σχήμα 2.** Πειραματική Διάταξη της απολύμανσης με νανοφουσαλίδες όζοντος.

Για την παραγωγή των νανοφουσαλίδων το εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας διαθέτει μια ειδική συσκευή παραγωγής νανοφουσαλίδων με δυνατότητα παραγωγής  $> 10^6$  bubbles/mL και μέσο όρο διαμέτρου 93 nm. Η συσκευή αυτή είναι τοποθετημένη σε μια δεξαμενή με νερό βρύσης όγκου 350 L, όπου ο εμπλουτισμένος σε όζον αέρας διοχετεύεται μέσω της συσκευής παραγωγής νανοφουσαλίδων. Ο απαιτούμενος αέρας παράγεται από έναν συμπιεστή και η παροχή ρυθμίζεται με ένα ροόμετρο αερίων στα 10 Lpm. Το υπολειμματικό όζον οδηγείται σε παγίδες ιωδιούχου καλίου (2% KI), προστίθενται 10mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N και έπειτα ακολουθεί η τιτλοδότηση του με θειοθειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του από τις Σχέσεις 1 και 2.

$$C_{O_3out}(mg/L) = F_{O_3out}(mg/min)/Q \quad (1)$$

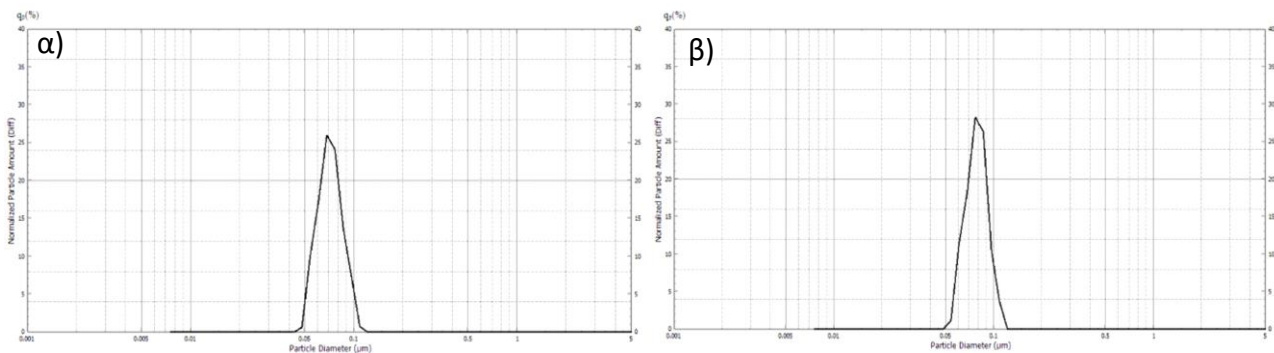
$$F_{O_3out}(mg/min) = V*N*24/T \quad (2)$$

Όπου Q είναι η ροή όζοντος σε L/min, V είναι ο όγκος του Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> που τιτλοδοτείται στις παγίδες 2 % KI, N είναι η κανονικότητα του διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και, T είναι ο χρόνος οζόνωσης σε min.

Οι προαναφερθείσες εξισώσεις χρησιμοποιήθηκαν για να μετρηθεί το όζον που παράγεται κατευθείαν από τον οζονιστήρα και υπολογίστηκε ίσο με 2.5 (mg/L) σε παροχή αέρα 10 Lpm. Η συνεχής καταγραφή του διαλυμένου όζοντος γίνεται με έναν αισθητήρα όζοντος, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τη δεξαμενή και όταν φτάσει στην επιθυμητή τιμή συγκέντρωσης σταματάει η λειτουργία του MK1 Nanobubbler και το οζονισμένο νερό συλλέγεται για την μετέπειτα πειραματική διαδικασία. Η αρχική συγκέντρωση των βακτηριών υπολογίζεται περίπου 10<sup>8</sup> CFU/mL από την οπτική πυκνότητα στο UV-Vis Spectrophotometer, σύμφωνα με την κλίμακα McFarland και με κατάλληλες αραιώσεις μελετάται η απολύμανση σε διάφορες αρχικές βακτηριακές συγκεντρώσεις. Δειγματοληψίες πραγματοποιούνται τα χρονικά διαστήματα από 0 μέχρι 30min, και επιπλέον εξετάζεται η περίπτωση αναγέννησης των βακτηρίων την επόμενη μέρα. Η βακτηριακή συγκέντρωση (CFU/mL) υπολογίζεται με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων. Τέλος, η κατανομή του μεγέθους (διαμέτρου) των φουσαλίδων ως προς τον όγκο και τον αριθμό, αξιολογείται με laser diffraction με το όργανο Shimadzu Sald-7500nano (7nm-400μm).

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη πρώτη φάση του πειράματος μετρήθηκε η κατανομή των νανοφουσαλίδων ως προς τον όγκο και τον αριθμό τους έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη νανοφουσαλίδων στην υδατική φάση. Όπως απεικονίζεται στην γραφική παράσταση παρακάτω (Σχήμα 3), η μέση διάμετρος των νανοφουσαλίδων υπολογίστηκε ίση με 0.71nm ως προς τον αριθμό και 0.78 ως προς τον όγκο.



**Σχήμα 3.** Η κατανομή του μεγέθους (διάμετρος) των νανοφουσαλίδων ως προς α) τον αριθμό τους και ως προς β) τον όγκο τους.

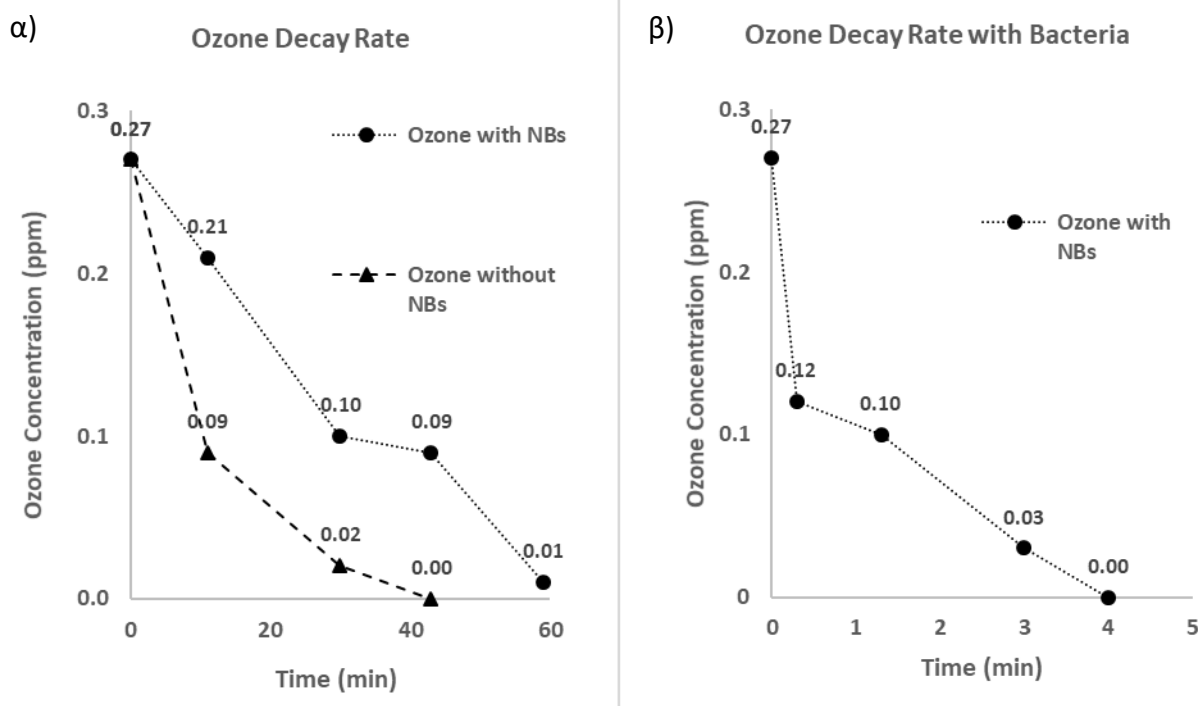
Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του ζ-δυναμικού (με το όργανο Zetasizer Nano ZS90) με σκοπό να συγκριθούν οι τιμές που προκύπτουν από τα δείγματα νερού με και χωρίς νανοφουσαλίδες αέρα. Το ζήτα δυναμικό ή ηλεκτροκινητικό δυναμικό μπορεί να αποτελέσει μια ένδειξη σταθερότητας ενός κolloειδούς συστήματος.

Σε απόλυτη τιμή όσο μεγαλύτερη τιμή έχει το ζήτα δυναμικό, τόσο σταθερότερο θεωρείται το σύστημα διότι εμποδίζεται η συσσωμάτωση, καθώς τα σωματίδια απωθούνται ισχυρά μεταξύ τους. Εν αντιθέσει, η χαμηλή τιμή του ζ-δυναμικού υποδεικνύει ότι τα σωματίδια τείνουν να έρχονται πιο κοντά και να συσσωματώνονται<sup>[2]</sup>. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία<sup>[8]</sup>, μείωση στο ζ-δυναμικό σημαίνει μεγαλύτερο μέγεθος-διάμετρος των νανοφουσαλίδων. Κάποια προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι και στις δύο περιπτώσεις η τιμή του ζ-δυναμικού είναι αρνητικές και δείχνουν μεγαλύτερες τιμές σε διαλύματα με νανοφουσαλίδες, σύμφωνα με τον Πίνακα 1.

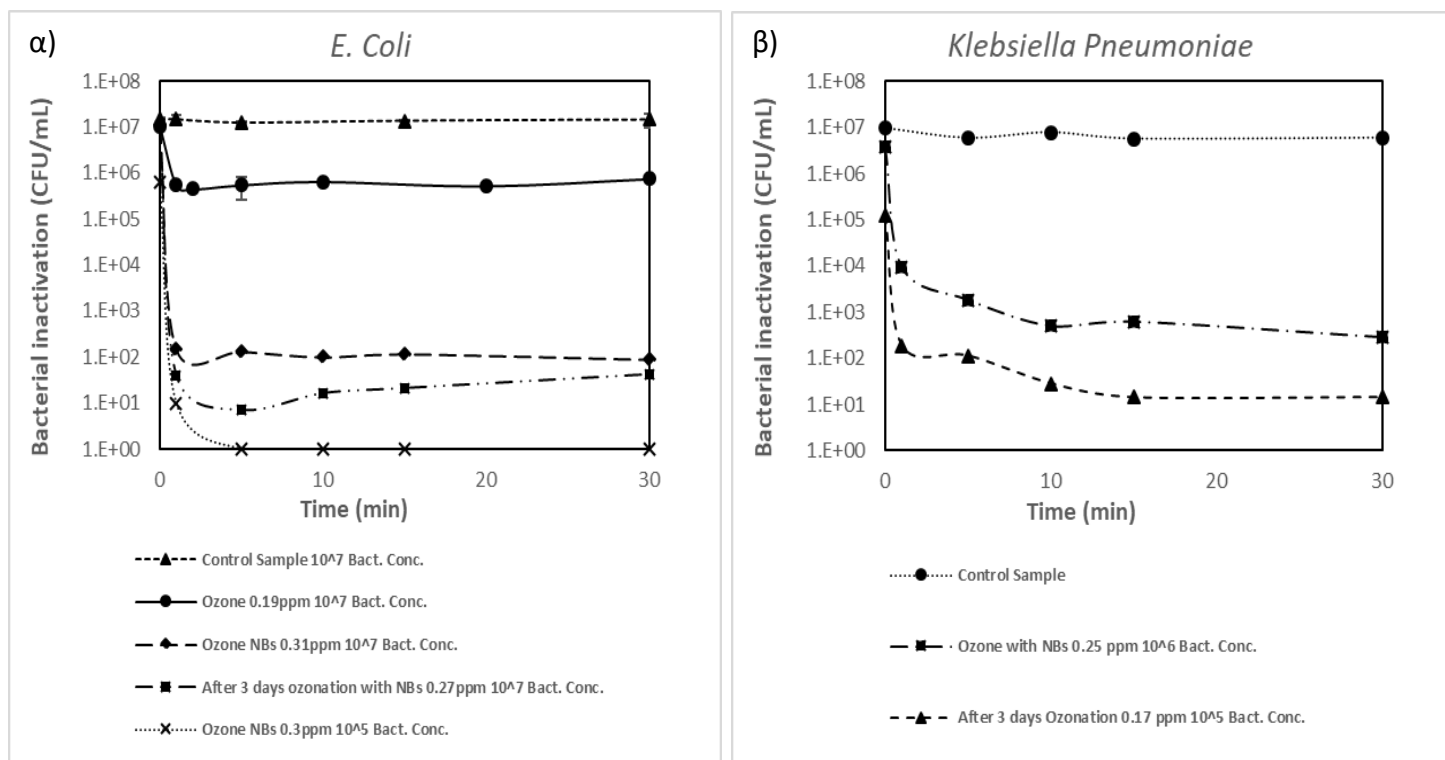
**Πίνακας 1.** Οι τιμές του ζ-δυναμικού σε υδατικό διάλυμα με και χωρίς νανοφουσαλίδες σε θερμοκρασία 25°C

Δείγμα	Z-δυναμικό
Υδατικό διάλυμα χωρίς NBs	15.9
Υδατικό διάλυμα με NBs	21.9

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο χρόνος ημιζωής του όζοντος ( $t_{1/2}$ ) σε νερό με νανοφουσαλίδες και χωρίς. Στο Σχήμα 4α παρατηρείται ότι ο χρόνος ημιζωής του όζοντος είναι σημαντικά μεγαλύτερος με την ύπαρξη νανοφουσαλίδων. Η θερμοκρασία και των δύο μετρήσεων είναι  $16 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Η αύξηση στο χρόνο ημιζωής υποδηλώνει ότι το όζον μπορεί να παραμένει σε αέρια μορφή στην υδατική φάση μέσω των νανοφουσαλίδων και να διαλύεται στο νερό μετά από κάποιο χρονικό διάστημα<sup>[9]</sup>. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε ο χρόνος ημιζωής του όζοντος μετά τον εμβολιασμό με μικροβιακή κοινότητα αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης  $9.7 \times 10^5$  σε υδατικό διάλυμα νανοφουσαλίδων όζοντος. Όπως δείχνει το Σχήμα 4β ο χρόνος μειώνεται ραγδαία και μάλιστα μηδενίζεται η υπολειμματική συγκέντρωση μόλις στα 4min.



**Σχήμα 4.** Ο χρόνος ημιζωής του όζοντος α) σε υδατικό διάλυμα με νανοφουσαλίδες και χωρίς, και β) με αρχική βακτηριακή συγκέντρωση  $9.7 \times 10^5$ .



**Σχήμα 5.** Επίδραση του όζοντος στην αδρανοποίηση του βακτηρίου α) *E. Coli* και β) *Klebsiella pneumoniae* σε συνάρτηση με το χρόνο.

Στο Σχήμα 5α απεικονίζεται αδρανοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού *E. Coli* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις όζοντος και αρχικές βακτηριακές συγκεντρώσεις. Σε κανένα από τα πειράματα δεν παρατηρήθηκε αναγέννηση βακτηρίου την επόμενη μέρα. Για συγκέντρωση όζοντος 0.3-0.31 ppm, το συμπέρασμα που μπορεί να διεξαχθεί είναι ότι παρατηρείται διαφορετική τάση αδρανοποίησης όταν υπάρχουν διαφορετικές αρχικές βακτηριακές συγκεντρώσεις. Αναλυτικότερα για αρχική συγκέντρωση 10<sup>7</sup> (CFU/mL) η βακτηριακή συγκέντρωση μειώνεται σε 10<sup>2</sup> και για αρχική συγκέντρωση 10<sup>5</sup> παρατηρείται η πλήρης αδρανοποίηση του παθογόνου μικροοργανισμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά το πέρας κάθε πειράματος το νερό βρύσης ανανεώνεται σε αντίθεση με την περίπτωση της απολύμανσης με 0.27 ppm, όπου η συσκευή παραγωγής ναοφουσαλιδών λειτούργησε για 3 μέρες με καθημερινή λειτουργία 1 ώρα και την τρίτη μέρα συλλέχθηκε το οζονισμένο νερό για την πειραματική διαδικασία. Φαίνεται λοιπόν ότι η μικρότερη συγκέντρωση όζοντος έδειξε καλύτερη απόδοση σε σύγκριση με υψηλότερη συγκέντρωση διαλυμένου όζοντος και ίδια αρχική βακτηριακή συγκέντρωση.

Στο Σχήμα 5β αντίστοιχα απεικονίζεται η αδρανοποίηση του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae*. Από το διάγραμμα γίνεται αντιληπτό ότι και σε αυτή την περίπτωση διαπιστώνεται ότι η προ-οζόνωση του νερού έχει καλύτερη απολυμαντική δράση σε μικρότερες συγκεντρώσεις όζοντος. Αυτό μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι η συγκέντρωση των ναοφουσαλιδών στο νερό είναι μεγαλύτερη όταν λαμβάνει χώρα αυτή η προεργασία, λαμβάνοντας υπόψη και την αξιοσημείωτη σταθερότητα που παρουσιάζουν και έχει ως αποτέλεσμα την υψηλότερη απολυμαντική δράση. Άξιο αναφοράς επιπροσθέτως είναι το γεγονός ότι η οζόνωση δεν λαμβάνει χώρα καθόλη τη διάρκεια του πειράματος αλλά η αδρανοποίηση γίνεται με την αρχική συγκέντρωση του διαλυμένου όζοντος. Όπως φαίνεται και από τα δύο διαγράμματα η αδρανοποίηση των υπό μελέτη βακτηρίων είναι

σημαντικά ικανοποιητική σε όλες τις αρχικές βακτηριακές συγκεντρώσεις και φυσικά μεγαλύτερη σε υψηλότερη συγκέντρωση όζοντος με εξαίρεση τις συγκεντρώσεις που έχουν προκύψει από προγενέστερο οζονισμό.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα βασικά συμπεράσματα που διεξήχθησαν από την παρούσα ερευνητική εργασία είναι ότι η ύπαρξη νανοφουσαλίδων στο υδατικό διάλυμα δύναται να παρουσιάζει καλύτερη απόδοση στην υπολειμματική συγκέντρωση του όζοντος. Αναλυτικότερα, στα 40 λεπτά η συγκέντρωση του διαλυμένου όζοντος στο νερό είχε μηδενιστεί ενώ στο νερό με νανοφουσαλίδες υπήρχε υπολειμματική συγκέντρωση ίση με 0.09 ppm. Επιπλέον καλύτερη απολυμαντική δράση στους παθογόνους μικροοργανισμούς διαπιστώθηκε όταν το νερό δεν ανανεώθηκε αντ' αυτού προηγήθηκε η προ-διεργασία του οζονισμού. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η διαδικασία της απολύμανσης πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά και μόνο με την αρχική συγκέντρωση του διαλυμένου όζοντος δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] A. Agarwal, W. J. Ng, and Y. Liu, "Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment," *Chemosphere*, vol. 84, no. 9, pp. 1175–1180, 2011.
- [2] A. Gurung, O. Dahl, and K. Jansson, "The fundamental phenomena of nanobubbles and their behavior in wastewater treatment technologies," *Geosystem Eng.*, vol. 19, no. 3, pp. 133–142, 2016.
- [3] K. Ebina *et al.*, "Oxygen and Air Nanobubble Water Solution Promote the Growth of Plants, Fishes, and Mice," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, pp. 2–8, 2013.
- [4] T. Uchida *et al.*, "Transmission electron microscopic observations of nanobubbles and their capture of impurities in wastewater," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–9, 2011.
- [5] F. Y. Ushikubo *et al.*, "Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 361, no. 1–3, pp. 31–37, 2010.
- [6] U.S. EPA., "Wastewater Technology Fact Sheet Ozone Disinfection," *Off. Water Washington, D.C.*, p. 7, 1999.
- [7] MKS Instruments, "Ozone Data & Conversion Tables Plasma & Reactive Gas Solutions Ozone Data & Conversion Tables," 2004.
- [8] J. N. Meegoda, S. A. Hewage, and J. H. Batagoda, "Stability of Nanobubbles," *Environ. Eng. Sci.*, vol. 00, no. 00, p. ees.2018.0203, 2018.
- [9] M. Sumikura, M. Hidaka, H. Murakami, Y. Nobutomo, and T. Murakami, "Ozone micro-bubble disinfection method for wastewater reuse system," *Water Sci. Technol.*, vol. 56, no. 5, pp. 53–61, 2007.