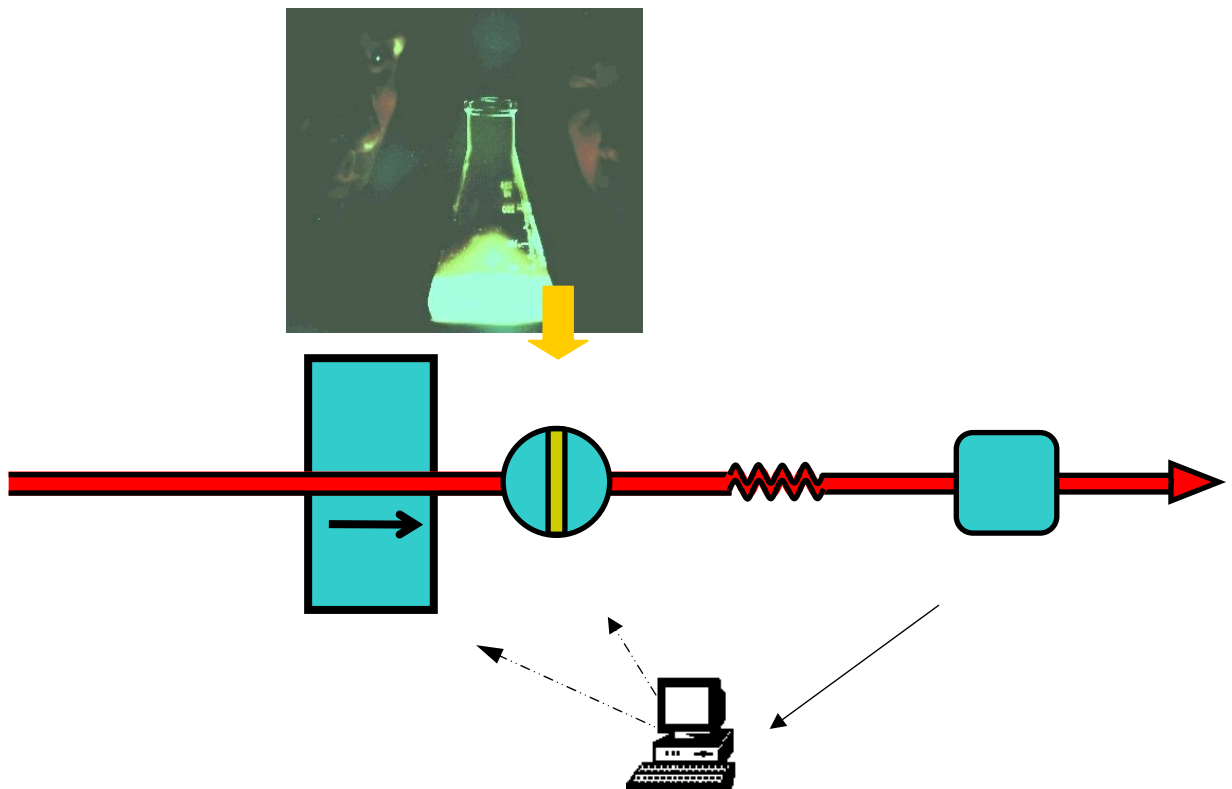


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ
ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ



ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ Μ. ΚΩΜΑΪΤΗΣ

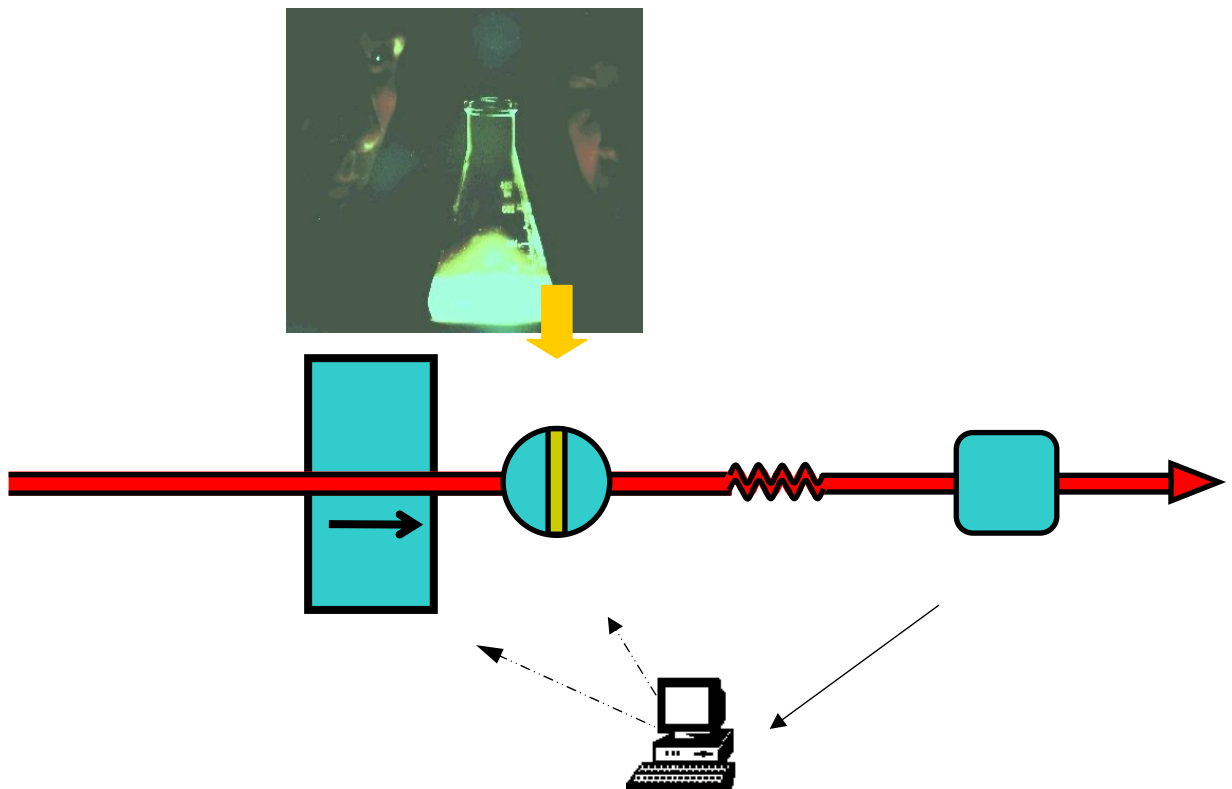
ΑΘΗΝΑ 2011

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. Α. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ
ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ**



ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ Μ. ΚΩΜΑΪΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. Α. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗΝ
ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ

ΕΥΣΤΡΑΤΙΟΣ Μ. ΚΩΜΑΪΤΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Κ. Α. ΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α(επιβλέπων)
Μ.ΠΟΛΥΣΙΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α
Μ.ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. ΓΕΩΡΓΙΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α
Μ. ΠΟΛΥΣΙΟΥ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α
Μ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α
Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α
Δ. ΓΕΩΡΓΑΚΟΠΟΥΛΟΣ	ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α
Ν. ΘΩΜΑΙΔΗΣ	ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Ε.Κ.Π.Α
Π. ΤΑΡΑΝΤΙΑΝΗΣ	ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α

ΑΘΗΝΑ 2011

Στην οικογένειά μου

“Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Γενικό Τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα”

(Νόμος 5343/32, άρθρο 202)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο Διευθυντή του Εργαστηρίου Καθηγητή κ. Μ. Πολυσιού που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω την ερευνητική μου εργασία εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες.

Θερμότατα ευχαριστώ τον επιβλέποντα μου Καθηγητή κ. Κ. Γεωργίου ο οποίος εκτός από ανάθεση του θέματος και την εποπτεία της διεξαγωγής των πειραμάτων στάθηκε δίπλα μου υποστηρίζοντας με και μεταδίνοντας τις γνώσεις του, τον επιστημονικό τρόπο σκέψης, την υπομονή, την επιμονή και την ορθή αντιμετώπιση των πραγμάτων. Ακόμη ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών Καθηγητή κ. Μ. Κουμπάρη για την πολύτιμη βοήθειά του στην αντιμετώπιση τεχνικών θεμάτων της διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος της Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας κ. Δ. Γεωργακόπουλο για την πολύτιμη συνεισφορά του στη διεξαγωγή των μικροβιακών πειραμάτων και εξήγηση των δεδομένων στο Εργαστήριο Γεωργικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής τον επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Ν. Θωμαΐδη, τον Καθηγητή του Γενικού τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Σ. Χαρουτουγιάν και τον επίκουρο Καθηγητή του Γενικού τμήματος του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Π. Ταραντίλη για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Επίσης να ευχαριστήσω όλους τους Καθηγητές μου στο Χημικό Τμήμα του ΕΚΠΑ που μου έδωσαν τα απαραίτητα εφόδια για να ανταπεξέλθω τις δυσκολίες που συνάντησα κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Επίσης τους συνεργάτες και φίλους κ. Ευστάθιο Βασιλείου, κ. Κωνσταντίνα Πουλή, κ. Ελένη Λαμπρινέα, κ. Κανάκη Χαράλαμπο, κ. Ελευθέριο Πετράκη, κ. Ειρήνη Αναστασάκη και κ. Νάντια Ασπρακά για την πολύτιμη στήριξη τους. Επίσης τους παρασκευαστές του Γενικού Εργαστηρίου Χημείας του Γ.Π.Α κ. Ζαχαρούλα Θαλασσινού και Γεώργιο Κόσσυφα για την πολύτιμη βοήθειά τους, αγαστή συνεργασία τους και προμήθεια οποιουδήποτε χημικού αντιδραστηρίου και χημικών οργάνων-σκευών απαιτήθηκαν για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής,

καθώς και για την άρτια οργάνωση και διεξαγωγή των εργαστηριακών ασκήσεων Ανόργανης και Αναλυτική Χημείας που εκτέλεσα ως μέρος του επικουρικού μου έργου για το προπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών των φοιτητών του Γ.Π.Α. Ιδιαίτερη ευχαριστία θα ήθελα να αποδώσω στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Γεράσιμο Κρεμμύδα του εργαστηρίου Γενικής Μικροβιολογίας για την βοήθεια που μου παρείχε στην εκμάθηση μικροβιολογικών τεχνικών και παροχή συμβουλών ως προς το μικροβιολογικό τμήμα της διατριβής αυτής. Επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ και ΕΤΕΠ του Γενικού εργαστηρίου Χημείας του Γ.Π.Α. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την περιβαλλοντολόγο κα Χρυσή Παπαδημητρίου για την βοήθεια της σε πειραματικό κομμάτι της διατριβής αυτής που πραγματοποιήθηκε στο Τεχνολογικό παρκο Θεσσαλονίκης. Επίσης τις προπτυχιακές φοιτήτριες Αλεξία Αλευρά και Κωνσταντίνα Καμούτσα για τη συμμετοχή σε επαναληπτικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη.....	1
Summary.....	5

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

1.1. Ορισμός και είδη φωταύγειας.....	9
1.2. Χημειοφωταύγεια.....	11
1.3. Βιοφωταύγεια.....	13
1.4. Βιοαισθητήρες.....	15
1.5. <i>Vibrio fischeri</i>	21
1.5.1. <i>Vibrio fischeri</i> –Αντίδραση φωταύγειας.....	23
1.5.2. Εφαρμογές <i>Vibrio fischeri</i>	24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ

2.1. Ιστορική εξέλιξη.....	27
2.2. Γενικές αρχές λειτουργίας της τεχνικής.....	28
2.3. Θεωρητικά στοιχεία FI	
2.3.1. Διασπορά του δείγματος.....	32
2.3.2. Αμοιβαία διασπορά δείγματος και αντιδραστηρίου.....	34
2.3.3. Επίδραση του αντιδραστήρα στη μορφή των καμπυλών FI.....	37
2.3.4. Συντελεστής Διασποράς-Διασπορά και εφαρμογές συστημάτων FI.....	40
2.3.5. Επίδραση διαφόρων παραμέτρων στην τιμή του συντελεστή διασποράς.....	41
2.4. Οργανολογία	
2.4.1. Συστήματα προώθησης αντιδραστηρίων.....	42
2.4.2. Συστήματα εισαγωγής δείγματος.....	43
2.4.3. Αντιδραστήρες.....	44

2.4.4. Ανιχνευτές.....	44
2.4.5. Συστήματα καταγραφής και επεξεργασίας σημάτων.....	45
2.4.6. Εμπορικά συστήματα FI.....	45
2.5. Διαμορφώσεις συστημάτων FI.....	45
2.6. Εφαρμογές FI στην ανάλυση.....	48

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΗ FI

3.1. Ανάπτυξη μονάδος ανιχνευτή.....	51
3.2. Ανάπτυξη αναλυτή ροής.....	56
3.3. Λογισμικό.....	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ *Vibrio fischeri*

4.1. Διαλύματα -Υλικά.....	62
4.2. Παρασκευή αιωρήματος παρακαταθήκης βιοφωταυγών βακτηρίων.....	64
4.3. Παρασκευή βιοφωταυγούς αιωρήματος εργασίας.....	66
4.4. Μέτρηση πληθυσμού βακτηρίων του αιωρήματος εργασίας.....	67
4.5. Εφαρμογή των βιοφωταυγών κυτταρικών βιοαισθητήρων <i>Vibrio fischeri</i>	70
στον αυτοματοποιημένο αναλυτή εισαγωγής δείγματος σε ροή	
4.6. Ελαχιστοποίηση ανάπτυξης αιωρήματος εργασίας.....	77
4.7. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αναλυτή δείγματος σε ροή	
4.7.1. Μονοδιαυλικό σύστημα ροής.....	79
4.7.2. Σταθερότητα αιωρήματος εργασίας.....	80
4.7.3. Επαναληψιμότητα.....	81
4.7.4. Εκτίμηση Τοξικότητας.....	84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

5.1. Εισαγωγή.....	89
5.2. Πειραματικό μέρος.....	90
5.3. Επίδραση pH.....	93
5.4. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

6.1. Εισαγωγή.....	96
6.2. Πειραματικό μέρος	
6.2.1. Αντιδραστήρια.....	96
6.2.2. Επεξεργασία δειγμάτων.....	97
6.2.3. Πειραματική διάταξη αυτοματοποιημένου αναλυτή ροής με χρήση <i>Vibrio fischeri</i>	97
6.2.4. Πειράματα με υδατικά διαλύματα μεθανόλης.....	98
6.2.5. Πειράματα με υδατικά διαλύματα διμεθυλο σουλφοξειδίου.....	99
6.3. Αποτελέσματα και συζήτηση	
6.3.1. Πειράματα με διαλύτη MeOH:H ₂ O 20:80% v/v.....	99
6.3.2. Πειράματα με DMSO 5% v/v.....	102
6.4. Συμπεράσματα.....	109

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΛΛΕΥΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

7.1. Εισαγωγή.....	111
7.2. Πειραματικό μέρος.....	111
7.2.1. Αντιδραστήρια.....	111
7.2.2. Δοκιμές διαλυτών-Βελτιστοποίηση.....	112
7.2.3. Πειραματική διάταξη αυτοματοποιημένου αναλυτή ροής με χρήση <i>Vibrio fischeri</i>	117
7.2.4. Βιοδοκιμή <i>Daphnia magna</i>	117
7.3. Αποτελέσματα μεθόδου <i>Vibrio fischeri</i>	118
7.4. Βιοδοκιμή με <i>Daphnia magna</i> -Σύγκριση με <i>Vibrio fischeri</i>	122
7.5. Συμπεράσματα.....	125

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΙΚΩΣ ΚΑΤΑΠΙΟΝΗΜΕΝΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

8.1. Εισαγωγή.....	126
8.2. Μέθοδος και αντιδραστήρια	
8.2.1. Πειραματική διάταξη –δειγματοληψία.....	126
8.2.2. <i>Vibrio fischeri</i> -Εκχύλιση με MeOH-H ₂ O 20:80 v/v.....	127
8.2.3 <i>Vibrio fischeri</i> -Εκχύλιση με DMSO-H ₂ O 20:80 v/v	127
8.2.4. Αριθμός υπεροξειδίων.....	128
8.2.5 Αριθμός Ανισιδίνης.....	130
8.3. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	131
Γενικά Συμπεράσματα.....	152
Μελλοντική εργασία-Προοπτικές.....	156
Παράρτημα I	
Κώδικας του προγράμματος.....	157
Συντμήσεις.....	162
Βιβλιογραφία.....	164

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σύμφωνα με την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης η ποιότητα των υδάτων καθώς και ο βαθμός της ρύπανσης εκτιμούνται με χημικές μεθόδους. Οι μέθοδοι αυτές, σε αντίθεση με τις βιοδοκιμές, δεν συνεκτιμούν συνεργιστικές και ανταγωνιστικές δράσεις οι οποίες είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα και κατά συνέπεια την τοξικότητα διαφόρων τάξεων ρυπαντών. Οι βιοδοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση τοξικότητας, για προκαταρκτικό ημιποσοτικό προσδιορισμό και έλεγχο πριν την εκτέλεση λεπτομερέστερων χημικών αναλύσεων.

Είναι γνωστό πόσο επιτακτική είναι η ανάγκη αυτοματοποίησης αναλυτικών μεθόδων, ώστε μεγάλος αριθμός αναλύσεων ρουτίνας να μπορεί να διεκπεραιώνεται αξιόπιστα σε μικρό χρόνο και να καθίσταται δυνατή η κατασκευή φορητών αναλυτικών οργάνων ώστε να μεταβαίνει άμεσα το εργαστήριο στο χώρο δειγματοληψίας και όχι το δείγμα στο εργαστήριο.

Στη διατριβή αυτή περιγράφεται η ανάπτυξη κι εφαρμογή βιοφωταυγών κυτταρικών βιοαισθητήρων για εκτίμηση τοξικότητας. Οι βιοαισθητήρες βασίζονται σε φωταυγή βακτήρια *Vibrio fischeri*. Στην παρούσα διατριβή η εφαρμογή τους γίνεται με ενσωμάτωση σε πλήρως αυτοματοποιημένο αναλυτή εισαγωγής δείγματος σε ροή που συνδέεται με μικροϋπολογιστή ώστε να ελέγχεται ο χρονισμός των αναλύσεων και να γίνεται σχετικά απλά η λήψη και η στατιστική επεξεργασία των αναλυτικών δεδομένων. Οι αναλυτές εισαγωγής δείγματος διαθέτουν τα πλεονεκτήματα της ευκολίας σε χρήση, της μεγάλης ταχύτητας των αναλύσεων καθώς και το ότι έχουν μικρό κατασκευαστικό και λειτουργικό κόστος συγκρινόμενα με πολλά αναλυτικά όργανα υψηλού κόστους και κατανάλωσης αναλωσίμων.

Η ερευνητική εργασία περιλαμβάνει τις ακόλουθες ενότητες:

(α) Ανάπτυξη αυτοματοποιημένου αναλυτή εισαγωγής δείγματος σε ροή (Κεφάλαιο 3). Αναπτύχθηκε αυτοματοποιημένος αναλυτής ροής αποτελούμενος από απλά μέρη: περισταλτική αντλία, βαλβίδα έγχυσης χαμηλής πίεσης, μονάδα ανιχνευτή αποτελούμενη από κυψελίδα ροής τύπου πίδακα και από λυχνία φωτοπολλαπλασιαστή υψηλής ευαισθησίας για την ανίχνευση ασθενών ακτινοβολιών. Κεντρική μονάδα είναι ηλεκτρονικός υπολογιστής ο οποίος

χρησιμοποιείται για έλεγχο και λήψη δεδομένων από τον αναλυτή. Το λογισμικό του προγράμματος αναπτύχθηκε σε γλώσσα Lab View.

(β) Ανάπτυξη του αιωρήματος των βιοφωταυγών κυτταρικών βιοαισθητήρων *Vibrio fischeri* (Κεφάλαιο 4). Βρέθηκαν οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πετυχαίνεται με οικονομικό τρόπο η καλλιέργεια των βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* έτσι ώστε να βρίσκονται στην κατάλληλη φάση ανάπτυξής τους και φωταύγειας για εφαρμογή στον αναλυτικό σύστημα που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 3. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται το πρωτόκολλο παραγωγής του βακτηριακού αιωρήματος εργασίας.

(γ) Εφαρμογή των βιοφωταυγών κυτταρικών βιοαισθητήρων *Vibrio fischeri* (Κεφάλαιο 4) στον αυτοματοποιημένο αναλυτή εισαγωγής δείγματος σε ροή. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση βιοαισθητήρα ροής με τα εξής χαρακτηριστικά:

i) Μονοδιαυλικό σύστημα.

ii) Φέρον ρεύμα είναι το τοξικό δείγμα.

iii) Μετρούμενη αναλυτική παράμετρος είναι η % παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των βακτηρίων *Vibrio fischeri*.

Επιτεύχθηκε υψηλή επαναληψιμότητα παρά το ότι η μετρούμενη αναλυτική παράμετρος είναι η βιοφωταύγεια του βακτηριακού αιωρήματος εργασίας και όχι κάποιου φωταυγούς ομοιογενούς χημικού διαλύματος (διαλύτη-διαλυμένης ουσίας). Στην περίπτωση του βακτηριακού αιωρήματος εργασίας *Vibrio fischeri* υπάρχουν έντονα φαινόμενα καθίζησης τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της αρχικής μικρής ομοιογένειας τους αιωρήματος βακτηρίων. Το πρόβλημα αυτό επιλύθηκε με συνεχή ανάδευση του αιωρήματος εργασίας των βακτηρίων πριν την εισαγωγή τους στη ροή του φέροντος ρεύματος καθώς και τη λήψη μετρήσεως τυφλού ανά 12 εγχύσεις. Επιτεύχθηκε με τον τρόπο αυτό επαναληψιμότητα των εγχύσεων του βακτηριακού αιωρήματος 0,7 % RSD για δέκα διαδοχικές εγχύσεις αιωρήματος εργασίας σε φέρον ρεύμα απιονισμένου ύδατος.

(δ) Στον βακτηριακό βιοαισθητήρα ροής επιτεύχθηκε η εκτίμηση τοξικότητας μεταλλοιδόντων (Κεφάλαιο 5). Αποδεικνύεται ότι η τοξικότητα που μετράται δεν οφείλεται σε μεταβολές του pH λόγω υδρόλυσης των μεταλλοιδόντων. Το χαμηλότερο όριο μέτρησης των καμπυλών της % παρεμπόδισης ήταν $1,0 \times 10^{-4}$ M για τα ιόντα Cu^{2+} , $1,0 \times 10^{-4}$ M για τα ιόντα Pb^{2+} και $1,0 \times 10^{-5}$ M για τα ιόντα Hg^{2+} .

(ε) Προσδιορισμό τοξικότητας φαινολικών αντιοξειδωτικών ενώσεων σε πρότυπα διαλύματα καθώς και σε διάφορα είδη ελαίων μετά από εκχύλιση και προσπάθεια συσχέτισης με μετρήσεις φαινολικών συστατικών (Κεφάλαιο 6). Από τον προσδιορισμό της τοξικότητας φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών εξήχθησαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Βρέθηκαν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις μεθανόλης και διμεθυλο σουλφοξειδίου. Οι συγκεντρώσεις που επιλέγηκαν, ενώ επιτρέπουν τη διάλυση ή εκχύλιση των φαινολικών ουσιών από το ελαιόλαδο, δεν είναι εξαιρετικά τοξικές για τους βιοαισθητήρες.
- Με χρήση του συστήματος που αναπτύχθηκε έγινε δυνατή η συσχέτιση τοξικότητας των φαινολικών αντιοξειδωτικών με τη δομή και το μοριακό τους βάρος.
- Σημειώνεται ότι για πρώτη φορά παρουσιάζονται μετρήσεις τοξικότητας φαινολικών ουσιών που συναντώνται στα τρόφιμα με *Vibrio fischeri*.

(στ) Προσδιορισμό τοξικότητας αλδευδών με την τεχνολογία που αναπτύχθηκε και τη βιοδοκιμή *Daphnia magna* (Κεφάλαιο 7). Από το πείραμα με επιλογή διαλύτη υδατικού διαλύματος DMSO 5 % v/v προέκυψαν τα εξής:

- Ταχύς (περίπου 2 δείγματα/min) και επαναλήψιμος προσδιορισμός (1 %RSD, n=3) της τοξικότητας των αλδευδών.
- Η τοξικότητα των αλδευδών, για τον ίδιο βαθμό ακορεστότητας, αυξάνεται με αύξηση του μοριακού βάρους.
- Η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι ταχύτερη από τη βιοδοκιμή με *Daphnia magna* που απαιτεί ένα 24ωρο αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών αυτών με το υπό εξέταση τοξικό διάλυμα αλδευδών.

Το όριο ανίχνευσης της αναπτυχθείσας μεθόδου έφτασε σε τάξη συγκεντρώσεων 10^{-4} M.

(ζ) Προσδιορισμό τοξικότητας εκχυλισμάτων θερμικά καταπονημένων ελαίων (Κεφάλαιο 8). Τα συμπεράσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:

i) Για όλα τα λάδια κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι οι καμπύλες παρεμπόδισης έχουν την ίδια μορφή, δηλαδή: χαμηλότερα είναι η καμπύλη παρεμπόδισης των 100 °C, αμέσως ψηλότερα αυτή των 190 °C και ψηλότερα όλων η καμπύλη παρεμπόδισης των 150 °C.

ii) Οι καμπύλες παρεμπόδισης δεν παρουσιάζουν αυξητική τάση με την αύξηση του χρόνου θερμικής καταπόνησης για όλα τα είδη ελαίων: η καμπύλη παρεμπόδισης στους 100 °C για το παρθένο ελαιόλαδο είναι φθίνουσα ενώ για το ελαιόλαδο σταθερή.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου που αναπτύχθηκε με τα αντίστοιχα διαγράμματα του αριθμού Totox συμπεραίνεται ότι η μορφή των καμπυλών των δύο μεθόδων είναι πανομοιότυπη για το παρθένο ελαιόλαδο και για το ελαιόλαδο. Μεγαλύτερες τιμές % παρεμπόδισης και Totox παρατηρούνται για τους 150 °C, μικρότερες για τους 190 °C και ακόμα μικρότερες για τους 100 °C για αμφοτέρω ελαία. Αρκετά καλή συσχέτιση των δύο συγκρινόμενων μεθόδων παρατηρήθηκε και για το πυρηνέλαιο.

Για τα υπόλοιπα τρία έλαια δεν υπάρχει συσχέτιση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων εκτός από μία μέτρια συσχέτιση των καμπυλών της μεθόδου που αναπτύχθηκε με αυτές του αριθμού υπεροξειδίων στους 150 °C και 190 °C.

Δηλαδή, δεν παρατηρήθηκε, για όλα τα έλαια, ότι μεγαλύτερη % παρεμπόδιση – τοξικότητα στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri* συνοδεύεται από αντίστοιχο μεγαλύτερο αριθμό Totox.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αναλυτική Χημεία-Βιοαισθητήρες-Αυτοματοποίηση
ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κυτταρικός βιοαισθητήρας, *Vibrio fischeri*, Τεχνική εισαγωγής δείγματος σε ροή, Εκτίμηση τοξικότητας

SUMMARY

In accordance with the legislation of the European Union the quality of water and the degree of contamination is assessed by chemical methods. However, these methods in contrast with bioassays, do not account for synergistic and competitive actions which could affect bioavailability and consequently the toxicity of different classes of pollutants. Bioassays may be used for assessment of toxicity as preliminary semiquantitative measurements before carrying out more detailed chemical analyses. Moreover, a large number of routine analysis can be performed rapidly and reliably through the development of automated analytical systems. A special benefit concerns the development of portable analytical instrumentation. In this way samples are not transported in the laboratory; the laboratory moves to the sampling area.

In the present PhD thesis, the development and implementation of bioluminescent whole cell biosensors, for assessment of toxicity, fluidic system is described. Biosensors are based on luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. Bacteria are implemented in an automated flow analyzer controlled by a microcomputer. In this way, beyond high sampling rates, precise transport of *Vibrio fischeri*'s cells biosensor is achieved.

The research work includes the following modules;

(a) Description and development of the lab-made automated flow injection analyzer (Chapter 3). The novel analyzer is constructed by simple parts; peristaltic pump, low pressure injection valve, laboratory made detector unit that consists of a wall-jet flow cell and a Photomultiplier Tube (PMT) providing high sensitivity for low level light signals. All parts of the analyzer are connected to a computer that provides for data acquisition and control. This was achieved through development of appropriate software in Lab View language. After further research and development by an instrument manufacturer instrumentation can be miniaturized to a compact portable analyzer.

(b) Development of *Vibrio fischeri* bioluminescent whole cell biosensors suspension (Chapter 4). The development of stock suspension and repeatable working

suspension of the bacteria, for application on the flow system is described. Steady signal of the working *Vibrio fischeri* suspension has been achieved, while the bacteria were cultivated to reach the appropriate phase of growth.

(c) Implementation of bioluminescent biosensors in the automated flow injection analyzer, development and optimization of the constructed analyzer (Chapter 4). The characteristics of the developed fluidic system are;

i) Single line system.

ii) Toxic sample is the carrier stream.

iii) Analytical parameter is %inhibition of bioluminescence.

High reproducibility was achieved despite the fact that the measured analytical parameter is the bioluminescence of a bacterial working suspension instead of a homogenous chemical solution. Cells from *Vibrio fischeri*'s suspension settle quickly rendering measurements impossible. The problem was tackled through constant stirring of the working suspension before sample injection. Stability is being constantly checked through blank measurement every 12 injections. In this way, results were highly precise, 0,7 % RSD for ten injections of working suspension in the flow of deionised carrier stream.

(d) Determination of heavy metals toxicity through the developed system (Chapter 5). It was proved that this toxicity was not a result of pH changes due to metal ion hydrolysis. The lower concentrations assessed were $1,0 \times 10^{-4}$ M for Cu^{2+} , $1,0 \times 10^{-4}$ M for Pb^{2+} και $1,0 \times 10^{-5}$ M for Hg^{2+} .

(e) Assessment of toxicity due to phenolics and antioxidant compounds, in standard solutions as well as in different olive oil extracts and comparison with conventional chemical methods of analysis for phenols, was also investigated (Chapter 6). Results are;

- Appropriate concentrations of methanol and DMSO have been determined. The concentrations chosen, permit partial extraction of phenolics from olive oil, but at the same time they are not extremely toxic for *Vibrio fischeri*.
- Using the developed methodology the correlation of phenolic antioxidants with structure and molecular weight was possible.
- It should be noted that is the first time that results of toxicity of food phenolics to *Vibrio fischeri* are presented.

(f) Determination of aldehydes toxicity and comparison of the developed methodology with *Daphnia magna* is presented (Chapter 7). Experimental results, obtained, using aqueous solution of DMSO 5 % v/v are;

- Rapid (2 samples/min) and reproducible (1% RSD, n=3) determination of aldehydes toxicity.
- Toxicity of aldehydes goes along molecular weight for the same degree of saturation.
- The developed method is much faster than the *Daphnia magna* biotest that requires 24 hours contact of *Daphnia Magna* microorganisms with toxic solutions.
- Detection limits down to 10^{-4} M were achieved.

(g) Toxicity determination of thermally stressed olive oil extracts with the developed technology-correlation with Totox values (Chapter 8) showed that;

i) Common for all oils is that their % inhibition curves along time had the same shape. Lower % inhibition curves for 100 °C, middle % inhibition curves for 190 °C and highest % inhibition curves for 150 °C thermal stressing.

ii) % inhibition curves were not dependent on the time of thermal stressing for all types of oils e.g % inhibition curve for 100 °C thermal stressing of virgin olive oil decreases along time whereas it remains constant for olive oil.

Comparison with Totox number results indicated that % inhibition curves have the same shape for virgin olive oil and olive oil: Higher values of % inhibition showed

higher Totox numbers for 150 °C, lower for 190 °C and even lower for 100 °C thermal stressed oils, respectively. Good correlation was also found for olive kernel oil.

For soyabean, sunflower and corn oil no correlation with Totox number was observed. However, there is a moderate correlation of *Vibrio fischeri* method with that of Peroxide Value for 150 °C and 190 °C.

SCIENTIFIC AREA : Analytical Chemistry : Biosensors-Automation

KEYWORDS: Whole cell biosensor, *Vibrio fischeri*, Flow injection, Toxicity assessment.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΦΩΤΑΥΓΕΙΑ

1.1. Ορισμός και Είδη Φωταύγειας

Με τον όρο φωταύγεια χαρακτηρίζουμε οποιαδήποτε εκπομπή φωτός που τελείται χωρίς τη βοήθεια θέρμανσης. Η έντασή της σε ορισμένα μήκη κύματος ή σε στενές ζώνες του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος είναι μεγαλύτερη από την ένταση της θερμικής ακτινοβολίας που εκπέμπουν τα σώματα αυτά στην ίδια θερμοκρασία. Φωταύγεια παρατηρείται σε στερεά, σε υγρά διαλύματα ακόμα και σε ζωντανούς οργανισμούς.

Αν η παραγόμενη φωταύγεια προέρχεται από χημική αντίδραση τότε γίνεται η παρακάτω κατάταξη:

1) **Χημειοφωταύγεια** αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης. Μια μερική περίπτωση της είναι κι η ηλεκτροχημειοφωταύγεια αποτέλεσμα μιας ηλεκτροχημικής αντίδρασης.

2) **Βιοφωταύγεια**. Καλείται η φωταύγεια που εκπέμπει ένας ζωντανός οργανισμός χάρη σε κάποια χημική αντίδραση που συντελείται μέσα του με ένα από τα αντιδρώντα να είναι συνήθως το μοριακό οξυγόνο της ατμόσφαιρας.

Αν η φωταύγεια προέρχεται από κάποιο είδος ακτινοβόλησης τότε διακρίνεται στα εξής είδη :

1) **Καθοδοφωταύγεια** όπου το φως παράγεται λόγω ακτινοβόλησης με α σωματίδια.

2) **Φωτοφωταύγεια**: Τέτοια φωταύγεια είναι ο φωσφορισμός και ο φθορισμός.

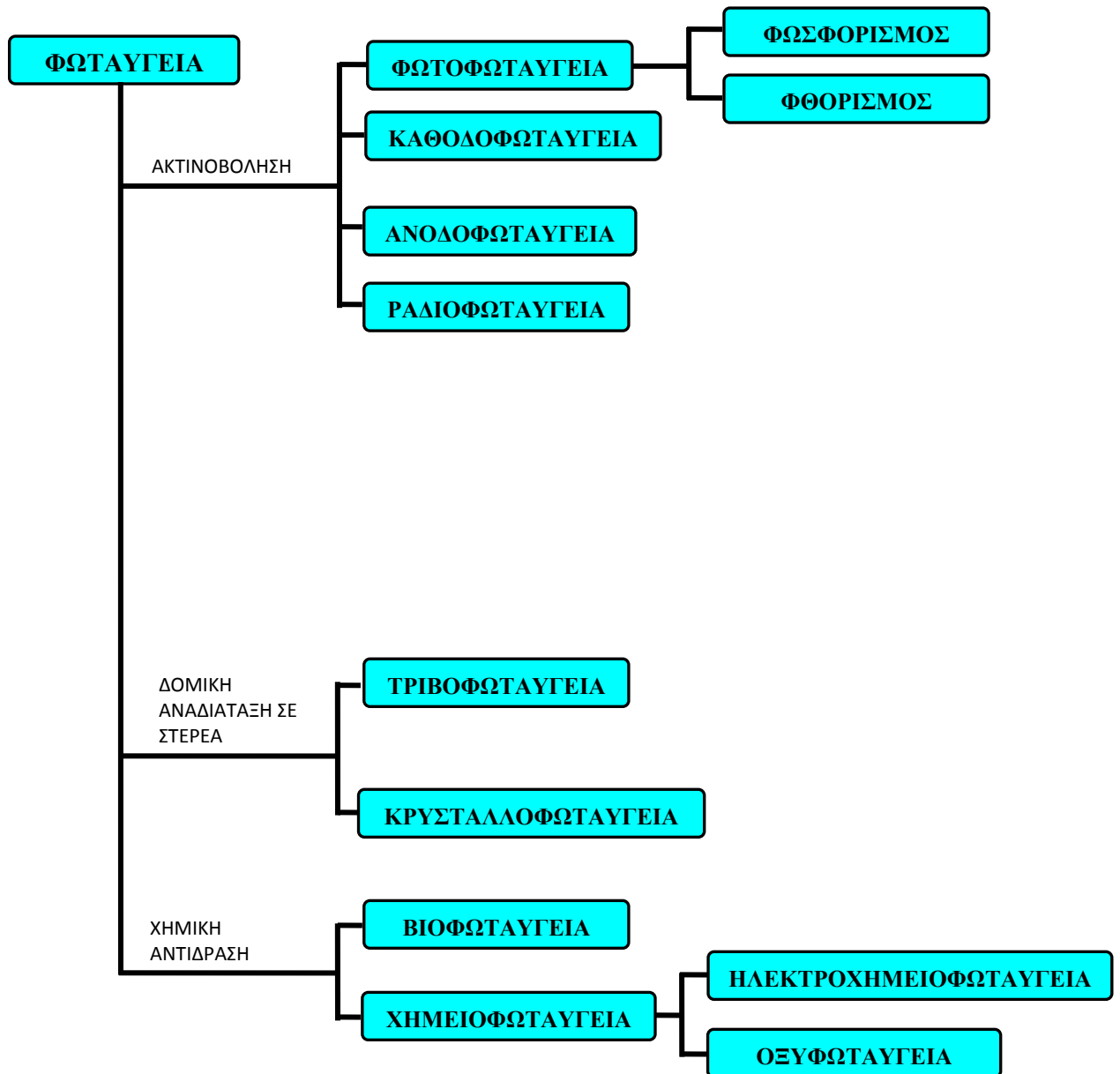
3) **Ανοδοφωταύγεια** όπου το φως παράγεται λόγω ακτινοβόλησης με β σωματίδια.

4) **Ραδιοφωταύγεια** όπου εδώ το φως προέρχεται από έκθεση κατάλληλων υλικών σε ιονίζουσα ακτινοβολία υψηλής ενέργειας όπως είναι οι ακτινοβολίες β και γ.

Αν το παραγόμενο φως οφείλεται σε θέρμανση τότε αυτή μπορεί να είναι είτε **θερμοφωταύγεια** ή **πυροφωταύγεια**.

Τέλος αν η φωταύγεια προκαλείται από κάποια δομική αναδιάταξη σε στερεά σώματα τότε χωρίζεται σε τριβοφωταύγεια και κρυσταλλοφωταύγεια [1-3].

Τα κυριότερα είδη φωταύγειας παρουσιάζονται στο παρακάτω συγκεντρωτικό διάγραμμα.



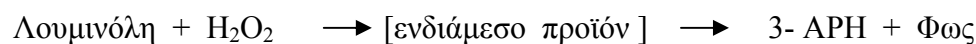
Σχήμα 1.1. Χαρακτηριστικότερα είδη φωταύγειας.

1.2. Χημειοφωταύγεια

Ως χημειοφωταύγεια ορίζεται η εκπομπή φωτός που είναι το αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης. Αν Α και Β είναι τα αντιδρώντα σώματα το φαινόμενο μπορεί να παρασταθεί με την παρακάτω εξίσωση

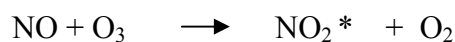


Το [Α] μπορεί να είναι η λουμινόλη και το [Β] υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η αποδιέγερση των ασταθών ενδιάμεσων προϊόντων σε χαμηλότερο επίπεδο ενέργειας είναι υπεύθυνη για την εκπομπή του φωτός.



3-APH = 3-αμινο φθαλικό οξύ

Η πλέον απλή αντίδραση χημειοφωταύγειας που έχει μελετηθεί εκτενώς είναι αυτή του μονοξειδίου του αζώτου NO με το όζον O₃



Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1970 για την ανίχνευση του μονοξειδίου του αζώτου στα καυσαέρια των αυτοκινήτων. Η χρήση της χημικής αυτής αντίδρασης εφαρμόστηκε και για την παρακολούθηση των επιπέδων του NO στην ατμόσφαιρα.

Οι χημειοφωταυγείς αντιδράσεις μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες :

1. Χημικές αντιδράσεις στις οποίες γίνεται οξείδωση κατάλληλης χημικής ένωσης

2. Αντιδράσεις εκπομπής φωτός από ένα ζωντανό οργανισμό όπως η πυγολαμπίδα και οι οποίες ονομάζονται αντιδράσεις βιοφωταύγειας
3. Αντιδράσεις εκπομπής φωτός που γίνονται με τη βοήθεια του ηλεκτρικού ρεύματος οι οποίες ονομάζονται αντιδράσεις ηλεκτροχημειοφωταύγειας

Εφαρμογές

1. Ανάλυση αερίων για τον προσδιορισμό μικρών ποσοτήτων προσμίξεων ή επικίνδυνων ουσιών στον ατμοσφαιρικό αέρα. Έτσι προσδιορίζονται και άλλες ενώσεις όπως οξείδια του αζώτου και του θείου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα που αναφέρεται παραπάνω είναι το NO.

2. Ανάλυση ανόργανων ουσιών σε υγρή φάση.
3. Ανάλυση οργανικών ενώσεων με χρήση ενζύμων.
4. Ανίχνευση βιομορίων σε τεχνικές όπως ELISA και Western blot.
5. Ανίχνευση αλληλουχίας DNA.
6. Φωτισμό αντικειμένων. Φωτισμός έκτακτης ανάγκης, διακοσμήσεις.
7. Παιδικά παιχνίδια.
8. Καύση ορισμένων ριζών όπως *CH, OH* εκπέμπει ακτινοβολία σε ορισμένα μήκη κύματος [1, 4-7].

1.3. Βιοφωταύγεια

Βιοφωταύγεια ορίζεται η παραγωγή και εκπομπή φωτός από ένα ζωντανό οργανισμό φυτικό ή ζωικό σε διάφορα μήκη κύματος [8 - 11]. Είναι το αποτέλεσμα μιας χημικής αντίδρασης κατά τη διάρκεια της οποίας η χημική ενέργεια μετατρέπεται με τη βοήθεια του οξυγόνου σε φωτεινή. Η χημική αντίδραση μπορεί να γίνει στο εσωτερικό ή και στο εξωτερικό του κυττάρου. Η τριφωσφορική αδενοσίνη

συμμετέχει στις περισσότερες περιπτώσεις. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται σε πολλές ομάδες οργανισμών που είναι διαφορετικές μεταξύ τους όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, οι πυγολαμπίδες και διάφοροι άλλοι θαλάσσιοι οργανισμοί. Το φως προέρχεται από συγκεκριμένα κύτταρα από αδένες ή όργανα που έχουν παρόμοια δομή με τα μάτια. Στα βακτήρια έχει βρεθεί ότι η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοφωταύγεια ελέγχεται από ένα οπερόνιο που ονομάζεται οπερόνιο Lux. Στις πυγολαμπίδες η παραγωγή φωτός ρυθμίζεται ως εξής. Τα φωτοκύτταρα που βρίσκονται στο άκρο της κοιλιάς περιέχουν λουσιφερίνη και λουσιφεράση που εκπέμπουν φως μόνον όταν αντιδρούν με οξυγόνο. Κοντά σε αυτές βρίσκονται συγκεντρωμένα τα μιτοχόνδρια που δίνουν ενέργεια στα κύτταρα με τη βοήθεια του οξυγόνου. Η όλη διαδικασία διαρκεί μόνο ένα κλάσμα του δευτερολέπτου. Το νευρικό σήμα που ενεργοποιεί τη λάμψη προκαλεί την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου. Το NO περνά εύκολα από το ένα κύτταρο στο άλλο. Το μονοξείδιο του αζώτου φτάνει στα μιτοχόνδρια και διακόπτει τη λειτουργία τους. Τότε το οξυγόνο φτάνει στα φωτοκύτταρα που εκπέμπουν όσο το μονοξείδιο του αζώτου είναι σε κυκλοφορία.

Η βιοφωταύγεια είναι η κύρια πηγή φωτός στα βάθη των ωκεανών. Μπορεί να είναι συνεχής ή να ανεμοσβήνει και να έχει διάφορα χρώματα από κόκκινο έως πράσινο - μπλε.



Εικόνα 1. Φωτογραφική απεικόνιση μη βιοφωταυγούς πυγολαμπίδας (πάνω φωτογραφία) και βιοφωταυγούς πυγολαμπίδας.

1.4. Βιοαισθητήρες

Σύμφωνα με την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης η ποιότητα των υδάτων καθώς και ο βαθμός της μόλυνσης εκτιμούνται με χημικές μεθόδους (προσδιορισμό βαρέων μετάλλων, οργανικών ενώσεων κλπ). Οι μέθοδοι αυτές, σε αντίθεση με τις βιοδοκιμές, δεν συνεκτιμούν συνεργιστικές κι ανταγωνιστικές δράσεις οι οποίες είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα και κατά συνέπεια την τοξικότητα διαφόρων τάξεων ρυπαντών [12].

Περιορισμοί των χημικών μεθόδων είναι οι ακόλουθοι:

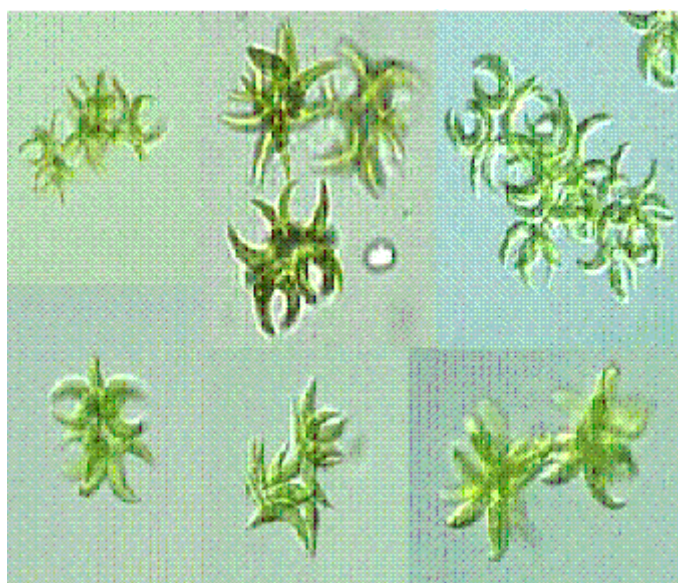
- Δεν υπολογίζουν συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις που είναι δυνατόν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα και την τοξικότητα των ρυπαντών.
- Κάποιοι τοξικοί ρυπαντές σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να μη μπορούν να ανιχνευτούν.
- Το προφίλ κάποιων τοξικών ρυπαντών μπορεί να μην είναι γνωστό ακόμη
- Συνήθως προϋποθέτουν ακριβή οργανολογία: HPLC-MS-MS, ICP-MS, κ.α.
- Μπορεί να είναι χρονοβόρες αφού προϋποθέτουν μεταφορά των προς ανάλυση δειγμάτων στο εργαστήριο.
- Δε δίνουν τη δυνατότητα για ταχύ ημιποσοτικό έλεγχο (screening) που θα μπορούσε να αποτρέψει την εκτέλεση περιττών αναλύσεων.
- Εμφανίζουν σημαντική δυσκολία στην ανάπτυξη φορητών “συστημάτων έγκαιρης προειδοποίησης” αφού τα χρησιμοποιούμενα όργανα απαιτούν για την ορθή λειτουργία τους και την αξιοπιστία της ανάλυσης αυστηρά ελεγχόμενες-πιστοποιημένες συνθήκες.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των βιοδοκιμών είναι το ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση τοξικότητας για προκαταρκτικό ημιποσοτικό προσδιορισμό έλεγχο πριν την εκτέλεση λεπτομερέστερων χημικών αναλύσεων, που μπορεί να απαιτούν μεγάλο χρόνο ανάλυσης ή να είναι ακριβείς και να μην επιτρέπουν την παρακολούθηση της τοξικότητας [13].

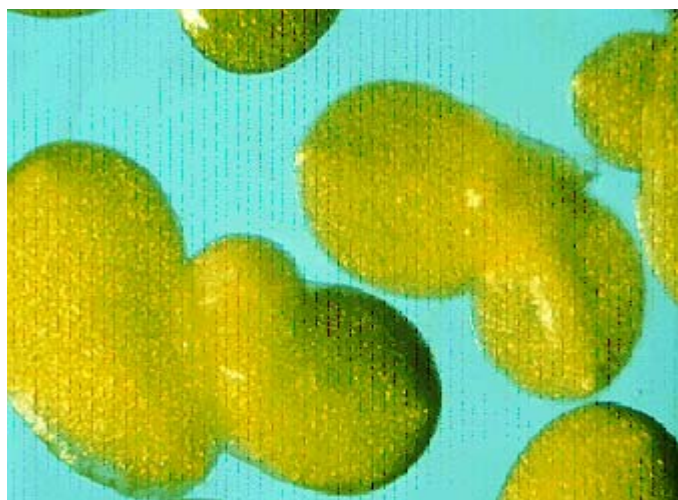
Στις βιοδοκιμές χρησιμοποιούνται ζώντες οργανισμοί που ανήκουν και στα τρία τροφικά επίπεδα: Παραγωγοί, Καταναλωτές και Αποικοδομητές [14]. Με τον τρόπο αυτό διερευνούνται οι τοξικές επιδράσεις σε αντιπροσωπευτικούς οργανισμούς του

οικοσυστήματος και είναι δυνατή η αξιολόγηση των επιπτώσεων στο περιβάλλον [15, 16].

Χαρακτηριστικά παράδειγματα οργανισμών που ανήκουν στην τάξη των παραγωγών είναι τα μικροφύκη *Selenastrum capricornutum* και *Lemma minor* (Εικόνες 2 και 3). Στις βιοδοκιμές στις οποίες χρησιμοποιούνται για εκτίμηση τοξικότητας κάποιου δείγματος, η αποτίμηση της τοξικότητας γίνεται με τον υπολογισμό της παρεμπόδισης ανάπτυξής τους σε μέγεθος (*Lemma minor*) ή σε αριθμό (*Selenastrum capricornutum*) εντός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος (συνήθως μετά το πέρας των 5 ημερών επώασης των οργανισμών αυτών μέσα σε κάποιο τοξικό δείγμα).

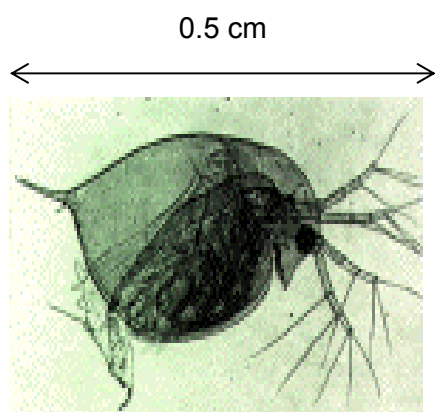


Εικόνα 2. *Selenastrum capricornutum*



Εικόνα 3. *Lemma minor*

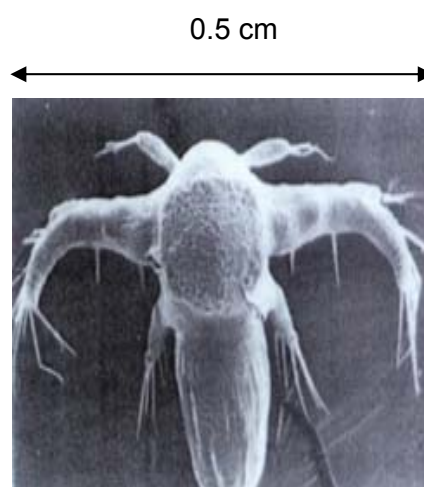
Στους καταναλωτές ανήκουν τα οστρακόδερμα όπως οι μικροοργανισμοί *Daphnia magna* (Εικόνα 4), *Ceriodaphnia dubia* (Εικόνα 5) και *Thamnocephalus platyurus* (Εικόνα 6). Σε αυτήν την περίπτωση η εκτίμηση της τοξικότητας γίνεται με τον υπολογισμό της θνησιμότητας των οργανισμών αυτών (αριθμός νεκρών οργανισμών) μετά την παραμονή τους για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, συνήθως μία έως δύο μέρες, εντός του τοξικού δείγματος.



Εικόνα 4. *Daphnia magna*



Εικόνα 5. *Ceriodaphnia dubia*



Εικόνα 6 . *Thamnocephalus platyurus*

Στους αποικοδομητές ανήκουν τα φωτοβακτήρια όπως είναι τα *Vibrio fischeri* (Εικόνα 7), τα *Vibrio harveyi* κ.α. Εδώ η εκτίμηση τοξικότητας γίνεται με τον προσδιορισμό της παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας των βακτηρίων αυτών όταν έρθουν σε επαφή με το εξεταζόμενο τοξικό δείγμα συνήθως για 15 έως και 30 λεπτά.



Εικόνα 7. Βιοφωταυγές διάλυμα βακτηρίων *Vibrio fischeri*

Η χρήση βιοφωταυγών οργανισμών [17] για εκτίμηση της τοξικότητας πήρε μεγάλη έκταση την τελευταία δεκαετία μιας και οι βιοδοκιμές έχουν πια αναγνωριστεί ως απαραίτητα τεστ παράλληλα με τις χημικές αναλύσεις [16, 18]. Προς το παρόν, η νομοθεσία της Ε.Ε επιβάλλει την εκτίμηση της ποιότητας των υδάτων και της ρύπανσης κυρίως μέσω χημικών μεθόδων. Ωστόσο κάποιες χώρες ενσωμάτωσαν τα τελευταία χρόνια βιοδοκιμές τοξικότητας κι έθεσαν όρια τοξικότητας στις εθνικές τους νομοθεσίες.

Βιοαισθητήρας είναι αναλυτική διάταξη για την ανίχνευση μιας ουσίας και συνδυάζει ένα βιολογικό συστατικό με κάποια φυσικοχημική παράμετρο ενός ανιχνευτή. Χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ουσιών και άλλων παραμέτρων βιολογικού ενδιαφέροντος.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα εμπορικού βιοαισθητήρα είναι ο βιοαισθητήρας της γλυκόζης στο αίμα ο οποίος χρησιμοποιεί το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης. Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των οργανοληπτικών συστατικών τροφίμων.

Τα κύρια μέρη του βιοαισθητήρα είναι τα εξής:

A. Το βιολογικό στοιχείο (ιστός, οργανέλλα, μικροοργανισμός, κυτταρικός υποδοχέας, αντίσωμα, ένζυμο, νουκλεϊκό οξύ, κλπ).

B. Ο ανιχνευτής ή αλλιώς το αισθητήριο που μετατρέπει το σήμα που προκύπτει από την αλληλεπίδραση ενός συστατικού με το βιολογικό στοιχείο σε διαφορετικό σήμα. Το σήμα αυτό μπορεί να μετρηθεί εύκολα και ακολούθως να ποσοτικοποιηθεί (ηλεκτρικό, φασματοσκοπικό κ.α.).

Γ. Ηλεκτρονικά μέρη ή επεξεργαστές σημάτων που εμφανίζουν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο τα αποτελέσματα.

Ένας βιοαισθητήρας πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά.

1. Το βιολογικό στοιχείο πρέπει να είναι πολύ εξειδικευμένο και σταθερό για πολλούς προσδιορισμούς.
2. Η αντίδραση να είναι ανεξάρτητη από φυσικοχημικές παραμέτρους όπως θερμοκρασία και pH. Αυτό επιτρέπει την ανάλυση των δειγμάτων με ελάχιστη επεξεργασία.
3. Η απόκριση πρέπει να είναι ακριβής, αναπαραγώγιμη και να έχει γραμμική σχέση σε ευρεία περιοχή τιμών χωρίς να χρειάζεται συμπύκνωση ή αραίωση. Θα πρέπει να είναι επίσης απαλλαγμένη από ηλεκτρονικό θόρυβο.
4. Αν ο βιοκαταλύτης πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για επεμβατική παρακολούθηση σε κλινικές καταστάσεις ο καθετήρας πρέπει να είναι μικρός και βιοσυμβατός και να μην έχει τοξικά ή αντιγονικά αποτελέσματα. Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε βιοαντιδραστήρες θα πρέπει να είναι αποστειρωμένος. Αυτή η διεργασία κατά προτίμηση πραγματοποιείται σε αυτόκαυστο αλλά αν πρόκειται για ένζυμα αυτά δεν μπορούν να αντέξουν τόσο δραστικές συνθήκες θερμικής υγρής επεξεργασίας. Σε κάθε περίπτωση δεν πρέπει να είναι επιρρεπείς σε πρωτεόλυση ή σε συγκέντρωση προσμίξεων.
5. Ένας καλός βιοαισθητήρας θα πρέπει να είναι φτηνός, μικρός, φορητός και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και από ημι-ειδικευμένους χειριστές.
6. Για τον βιοαισθητήρα θα πρέπει να υπάρχει η κατάλληλη αγορά. Είναι φανερό ότι υπάρχει μικρή σχετικά ανάπτυξη βιοαισθητήρα αν άλλοι παράγοντες ενθαρρύνουν τη χρήση παραδοσιακών μεθόδων και αποθαρρύνουν την αποκέντρωση εργαστηριακών δοκιμών.

Η βιολογική απόκριση του βιοαισθητήρα καθορίζεται από την βιοκαταλυτική μεμβράνη που υποβοηθά τη μετατροπή των αντιδρώντων σε προϊόντα. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν πολλά πλεονεκτήματα που τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα για τέτοια συστήματα.

Αρχές Ανίχνευσης

Φασματοσκοπική. Βασίζεται σε μεταβολές απορρόφησης ή φθορισμού κατάλληλης ουσίας –δείκτη [19].

Ηλεκτροχημική. Βασίζεται στην ενζυματική κατάλυση μιας αντίδρασης που παράγει ή καταναλώνει ηλεκτρόνια (οξειδοαναγωγικά ένζυμα). Συνήθως ως αισθητήρας χρησιμοποιείται ένα σύνθετο ηλεκτρόδιο. Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να υπάρχει και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας [20-22].

Άλλα. Ο βιοαισθητήρας Επιφανειακού Συντονισμού Πλασμονίων Οφείλεται σε διέγερση επιφανειακών πλασμονίων από το φώς όταν προσπέσει σε επίπεδες επιφάνειες χρυσού ή αργύρου (SPR). ή πάνω στην επιφάνεια μεταλλικών νανοσωματιδίων (LSPR). Θερμομετρικοί και μαγνητικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται σπάνια.

Εφαρμογές

Σήμερα οι βιοαισθητήρες έχουν πολλές εφαρμογές. Στις εφαρμογές είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός ενός μορίου στόχου η διαθεσιμότητα κατάλληλου βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης, και η δυνατότητα χρησιμοποίησης φορητών συστημάτων ανίχνευσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα παρακάτω.

Παρακολούθηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε ασθενείς με διαβήτη.

Ιατρικά προβλήματα εφόσον έχει καθοριστεί ο στόχος π.χ τρανσαμινάση.

Περιβαλλοντικές εφαρμογές όπως η ανίχνευση φυτοφαρμάκων ή άλλων τοξικών ουσιών στα νερά ποταμών.

Ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών.

Τηλεπισκόπηση αερομεταφερομένων βακτηρίων π.χ για την καταπολέμηση βιοτρομοκρατικών δραστηριοτήτων.

Καθορισμός συγκεντρώσεων τοξικών συστατικών πριν και μετά την βιοαποκατάσταση.

Ανίχνευση και προσδιορισμός οργανοφωσφορικών ενώσεων.

Προσδιορισμός καταλοίπων φαρμάκων σε τρόφιμα όπως αντιβιοτικά, αυξητικοί παράγοντες σε προϊόντα όπως το κρέας, το μέλι κλπ

Ανίχνευση ναρκωτικών ουσιών και αξιολόγηση τους.

Ανίχνευση τοξικών μεταβολιτών όπως π.χ, μυκοτοξίνες.

Χρήση σε πρωτεϊνική μηχανική .

Εναλλακτική λύση στη μικροβιολογική ανάλυση.

Γενικότερη εφαρμογή στην ανάλυση των τροφίμων (μικρού μοριακού βάρους ενώσεις υδατοδιαλυτές βιταμίνες κ.α).

1.5. *Vibrio fischeri*

Το γένος *Vibrio* περιλαμβάνει περισσότερα από 50 είδη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων της οικογένειας *Vibrionaceae* ραβδοειδούς-κυλινδρικής μορφής (βάκιλοι) που δεν σχηματίζουν σπόρια και βρίσκονται κυρίως σε θαλάσσιο περιβάλλον [23]. Είναι ετεροτροφικός μικροοργανισμός με κύριο χαρακτηριστικό την ικανότητα βιοφωταύγειάς του. Κινείται με τη βοήθεια πολικών μαστιγίων και μπορεί είτε να είναι αυτότροφος οργανισμός σε διάφορα υδρόβια περιβάλλοντα (θαλάσσια παράκτια ύδατα, εκβολές ποταμών, εγκαταστάσεις υδατοκαλλιεργειών κ.α.) είτε να βρίσκεται σε συμβίωση με διάφορους θαλάσσιους οργανισμούς όπως με το κοράλλι, με μαλάκια, ψάρια, γαρίδες, φύκη και ζωοπλαγκτόν. Σε κάποια ψάρια, κοράλια ή καρκινοειδή προκαλούν ασθένειες δημιουργώντας έτσι μία σχέση παρασιτισμού-παθογόνου δράσης [24].

Τα *Vibrio* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών στο υδάτινο περιβάλλον, με την απορρόφηση της διαλελυμένης οργανικής ουσίας, την αποικοδόμηση της χιτίνης και την παραγωγή σημαντικών πολυακόρεστων λιπαρών οξέων απαραίτητων για την τροφική αλυσίδα. Μάλιστα τα βακτήρια του γένους *Vibrio* είναι εκ των πρωταρχικών παραγωγών αντιμικροβιακών ουσιών μιας και εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα σε αυτές. Αρκετά είδη επίσης, είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, με τα περισσότερα στελέχη από αυτά (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*) να έχουν συνδεθεί με την πρόκληση γαστρεντερίτιδας και σηψαιμίας. Τροφική δηλητηρίαση μπορούν να

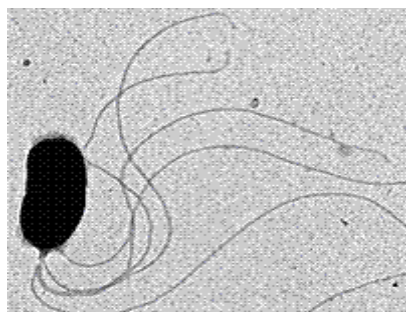
προκαλέσουν κυρίως από τη λήψη μη καλοψημένων θαλασσινών τροφών (καβούρια, γαρίδες κ.α.).

Είδη του γένους *Vibrio* γνωστά για τις βιοφωταυγείς τους ιδιότητες είναι τα *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio phosphoreum* και *Vibrio fischeri*. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως μετρούμενη αναλυτική παράμετρος η βιοφωταύγεια που παράγεται από το είδος *Vibrio fischeri*.

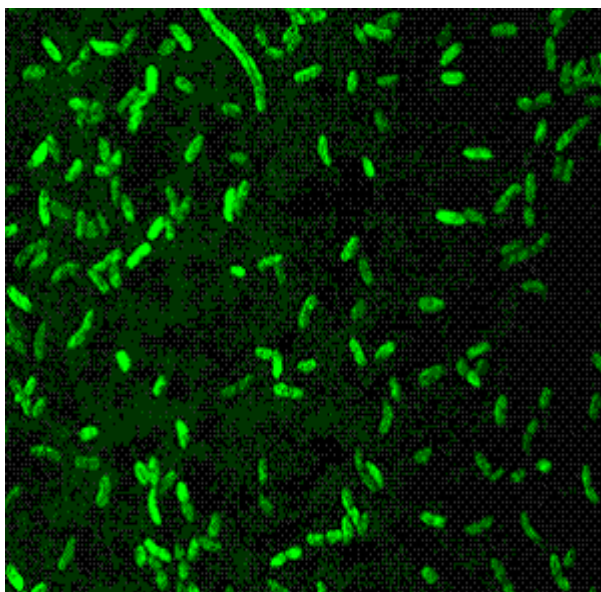
Τα χαρακτηριστικά του *Vibrio fischeri* δεν παρεκκλίνουν πολύ από τα γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Vibrio* που περιγράφηκαν προηγουμένως. Το είδος αυτό λοιπόν χαρακτηρίζεται ως εξής:

Βασίλειο: *BACTERIA*
Φύλλο: *Protobacteria*
Κλάση: *Gamma Proteobacteria*
Τάξη: *Vibrionales*
Οικογένεια: *Vibrionaceae*
Γένος: *Vibrio*
Είδος: *fischeri*

Τα βακτήρια του είδους αυτού είναι παθογόνα για ορισμένα είδη ασπονδύλων, προκαλώντας τους την επονομαζόμενη νόσο “luminous *Vibriosis*”. Ελεύθερα *Vibrio fischeri* αποικοδομούν οργανική ύλη και βρίσκονται σε πολύ μικρούς αριθμούς σε ωκεανούς και κυρίως σε περιοχές με εύκρατο και υποτροπικό κλίμα. Σε αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις απαντώνται σε συμβιωτική μορφή με θαλάσσιες μορφές ζωής σε μεγάλο βάθος, εντός εξειδικευμένων οργάνων φωτισμού, όπου αναπτύσσονται και εκπέμπουν βιοφωταύγεια.



Εικόνα 8. Φωτογραφική απεικόνιση του *Vibrio fischeri* από μικροσκόπιο. Διακρίνεται το βακτήριο (μαύρο κυλινδρικό σωματίδιο) και τα μαστίγιά του (ισχνές γραμμές).



Εικόνα 9. Φωτογραφική απεικόνιση βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri*.

Ένα μαλάκιο (καλαμάρι) γνωστό για τη συμβίωσή του με το βακτήριο *Vibrio fischeri* είναι το *Euprymna scolopes* [25, 26]. Το καλαμάρι αυτό έχει μέγεθος περίπου 5 εκατοστών και αφθονεί στα νερά της Χαβάης και των νήσων Midway στον κεντρικό Ειρηνικό ωκεανό.

1.5.1. *Vibrio fischeri* -Αντίδραση Φωταύγειας

Η βιοφωταύγεια που παράγουν τα βακτήρια *Vibrio fischeri* οφείλεται στην παρακάτω ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση:



Όπου FMNH_2 ανηγμένη μορφή της μονονουκλεοτιδικής φλαβίνης, κοινώς λουσιφερίνης, RCHO μεγάλου μοριακού βάρους λιπαρή αλειφατική αλδεϋδη (7-16 άτομα άνθρακα πιθανώς η $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}$).

Η εκπομπή βιοφωταύγειας οφείλεται στην αντίδραση οξειδωσης που καταλύεται από το ένζυμο λουσιφεράση. Η λουσιφερίνη δεσμεύεται από τη λουσιφεράση και αντιδρά με το οξυγόνο δημιουργώντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο, την 4-υπεροξυ-φλαβίνη. Το σύμπλοκο αυτό οξειδώνει την αλειφατική αλδεϋδη και παράγεται το οξύ RCOOH και ενδιάμεσο σταθερό σύμπλοκο λουσιφεράσης – υδροξυφλαβίνης. Το σύμπλοκο αυτό βρίσκεται σε διηγεμένη κατάσταση και μεταπίπτει αργά σε σταθερή κατάσταση εκπέμποντας γαλαζοπράσινο φως στα 490 nm [27, 28].

Σε πολλά βακτήρια έχει παρατηρηθεί η ικανότητα ρύθμισης της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων και επομένως η εμφάνιση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου. Κατά το σύστημα αίσθησης μεγέθους πληθυσμού (Quorum Sensing) η έκφραση ορισμένων γονιδίων επάγεται όταν η πυκνότητα του βακτηριακού πληθυσμού υπερβεί ένα κατώφλι, ενώ η έκφρασή τους σταματά όταν η πυκνότητα βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα [29a]. Η πρώτη φορά που βιβλιογραφικά αναφέρθηκε ένας τέτοιος μηχανισμός ήταν στο βακτήριο *Vibrio fischeri*, κατά τη συμβίωσή του με τον θαλάσσιο οργανισμό *Eurytmna scolopes* [29b].

Στα διάφορα στελέχη του γένους *Vibrio* η αίσθηση μεγέθους πληθυσμού γίνεται μέσω του συστήματος LuxR/LuxI και ελέγχει την έκφραση των γονιδίων lux, τα οποία βρίσκονται οργανωμένα σε ένα οπερόνιο. Η έκφραση των γονιδίων lux είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της βιοφωταύγειας. Έχει αποδειχθεί ότι, συγκεκριμένα στελέχη των γενών *Vibrio fischeri* και *Vibrio harvei* έχουν την ικανότητα της βιοφωταύγειας όταν η πυκνότητα του πληθυσμού αποκτήσει τιμές 10^9 - 10^{10} CFU/mL, υπό συνθήκες συμβίωσης (in vivo) με το *Eurytmna scolopes* [29c]. Σε εργαστηριακές συνθήκες (in vitro) ορισμένα στελέχη του γένους *Vibrio* παρουσιάζουν το μέγιστο της βιοφωταύγειάς τους όταν η πυκνότητα του πληθυσμού αποκτήσει τιμές 10^8 - 10^9 CFU/mL [29d].

1.5.2. Εφαρμογές *Vibrio fischeri*

Τα *Vibrio fischeri* βρίσκουν εφαρμογές στον προσδιορισμό της τοξικότητας οργανικών και ανόργανων συστατικών [29-32].

Ο τοξικολογικός έλεγχος επικίνδυνων ουσιών μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Συνήθης είναι ο συνδυασμός χρωματογραφικών μεθόδων με βιολογικά ή βιοχημικά τεστ. Μια τέτοια μέθοδος βασίζεται στο συνδυασμό η υψηλής διακριτικής ικανότητας χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (High Performance Thin Layer Chromatography,

HPTLC) σε συνδυασμό με βιολογικά τεστ. Έχει αναφερθεί ότι η παρεμπόδιση της φωταύγειας του βακτηρίου *Vibrio fischeri* είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης των αποβλήτων σε πενταχλωροφαινόλη (20-80 ng) [33, 34].

Η τοξικότητα δραστικών χρωμάτων βαφής υφάνσιμων υλικών που είναι δύσκολο να αποδομηθούν εκτιμήθηκε με τη βοήθεια του *Vibrio fischeri* [35]. Άλλοι ερευνητές [36] μελέτησαν την τοξικότητα και βιοαποικοδόμηση οκτώ φαινολικών συστατικών (πέντε μονοφαινολών και τριών διφαινολών) αποβλήτων βιομηχανίας πετρελαίου χρησιμοποιώντας *Vibrio fischeri*. Οικοτοξικολογική έρευνα βιομηχανικών αποβλήτων που περιείχαν φαινολικές ενώσεις έχει πραγματοποιηθεί με 4 μικροοργανισμούς: *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Brachionus plicatilis* και *Vibrio fischeri* [37]. Μελετήθηκε η επίδραση που είχε η επεξεργασία των αποβλήτων τόσο στην πρώτη ύλη όσο και στο τελικό προϊόν. Η εκτίμηση των κινδύνων από απόβλητα φαρμακοβιομηχανιών επιτεύχθηκε με χρήση του βιοφωταγούς βακτηρίου *Vibrio fischeri* σε συνδυασμό και με άλλα τοξικολογικά τεστ. Συγχρόνως μελετήθηκε [38] και η βιοαποικοδόμηση των τοξικών συστατικών των αποβλήτων αυτών. Το *Vibrio fischeri* έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για τη μέτρηση της τοξικότητας μετάλλων και άλλων επιμολυντών σε υψηλές συγκεντρώσεις (ppm) σε επιλεγμένα περιβαλλοντικά δείγματα [39]. Όμως μέταλλα και άλλες τοξικές ουσίες βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε απόβλητα. Για την εκτίμηση της τοξικότητας αυτών των τοξικών ουσιών απαιτείται ένα πιο ευαίσθητο τεστ. Έτσι αναπτύχθηκε δοκιμή χρόνιας τοξικότητας (chronic toxicity test) για να μετρήσει τις υπολανθάνουσες επιδράσεις των τοξικών σε πολλές γενεές του *Vibrio fischeri*. Οι Hsieh και συνεργάτες [39] μελέτησαν την τοξικότητα διαφόρων στοιχείων όπως As, Se, Cd, Cr(III), Cr(VI), Cu, Pb, Sb, Ag, Tl, Zn, Hg και Ni στο *Vibrio fischeri* χρησιμοποιώντας τη δοκιμή χρόνιας τοξικότητας. Μεταξύ των στοιχείων αυτών το πλέον τοξικό ήταν το Be και το λιγότερο τοξικό το Tl.

Η τοξικότητα ιόντων ψευδαργύρου, χαλκού, κοβαλτίου και χρωμίου εκτιμήθηκε με χρησιμοποίηση βιοαισθητήρων με *Vibrio fischeri* [40]. Με τη βοήθεια επίσης του φωτοβακτηρίου *Vibrio fischeri* εκτιμήθηκε η τοξικότητα του καδμίου και του νιτριλοτριοξικού οξέος σε νερό της θάλασσας [41].

Βιοαισθητήρες με *Vibrio fischeri* έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της τοξικότητας αποβλήτων ελαιουργείων μετά από διάφορες επεξεργασίες που έχουν υποστεί, όπως ηλεκτροκροκίδωση και βραδεία καθίζηση. Αυτές οι διεργασίες μείωσαν την παρεμπόδιση της φωταύγειας του *Vibrio fischeri* [42]. Άλλοι ερευνητές

[43, 44] χρησιμοποίησαν το βακτήριο *Vibrio fischeri* και μελέτησαν την τοξικότητα πρότυπων και πραγματικών αποβλήτων ελαιουργίας τα οποία είχαν υποστεί φωτοκαταλυτική οξείδωση με διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Βρέθηκε σημαντική μείωση της τοξικότητας στο πρότυπο και στα απόβλητα κατά 74% και 68%, αντιστοίχως. Το πρότυπο μίγμα περιείχε οκτώ φαινολικές ενώσεις που συνήθως βρίσκονται σε απόβλητα ελαιουργείων.

Βιοαισθητήρες του *Vibrio fischeri* που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση τοξικότητας διαφόρων ρυπαντών συσχετίστηκαν και συγκρίθηκαν με βιοαισθητήρες με άλλου τύπου βακτήρια, πχ βιοαισθητήρες με *Escherichia coli* [45].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΕ ΡΟΗ

2.1. Ιστορική εξέλιξη

Κατά τη δεκαετία του 1960-1970 οι χρησιμοποιούμενοι αναλυτές ροής (Flow Injection, FI) παρουσίαζαν προβλήματα μόλυνσης του δείγματος από το προηγούμενο δείγμα που δεν είχε απομακρυνθεί πλήρως. Για τον πλήρη διαχωρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν φυσαλίδες αέρα δημιουργώντας έτσι τον αναλυτή συνεχούς αεριοδιαχωριζόμενης ροής. Παράλληλα είχαν εμφανιστεί κάποιες άλλες τεχνικές που δύνανται να θεωρηθούν ως πρόδρομοι της τεχνικής της εισαγωγής δείγματος σε ροή. Η ερευνητική εργασία των Ruzicka και Hansen [46] ήταν αυτή που όρισε την τεχνική.

Η τεχνική αυτή είναι ώριμη, ηλικίας τριάντα ετών, πρόσφερε ταχύτητα, αυτοματοποίηση, οικονομία χώρου και χαμηλού κόστους συσκευές στα αναλυτικά εργαστήρια. Η σχετική βιβλιογραφία είναι πολύ πλούσια σε ερευνητικές εργασίες, μονογραφίες, εκθέσεις και εφαρμογές προερχόμενες από τη φαρμακευτική, την ωκεανογραφία, το περιβάλλον, τη γεωργία, τον έλεγχο της παραγωγής, την ανακάλυψη φαρμάκων, κλινικές δοκιμές και την επιστήμη και τεχνολογία τροφίμων. Η FI είναι κύριο στοιχείο ή σύστημα διαχείρισης διαλυτών για πολλά φασματοσκοπικά και ηλεκτροχημικά όργανα επειδή παρέχει τη δυνατότητα προκατεργασίας του δείγματος, απομάκρυνση της μήτρας και αυτόματη επαναβαθμονόμηση του ανιχνευτή.

Τα τελευταία χρόνια από την τεχνική FI προέκυψαν οι ακόλουθες θυγατρικές τεχνικές: η Διαδοχική Έγχυση, (Sequential Injection, SI), Έγχυση Σφαιριδίων (Bead Injection, BI), και Διαδοχική Χρωματογραφία Έγχυσης (Sequential Injection Chromatography, SIC). Η SI και η BI επέτρεψαν τη μείωση του όγκου του δείγματος από mL σε μ L, παρέχοντας έτσι οικονομία σε αντιδραστήρια και ελάττωση των παραγομένων αποβλήτων. Οι BI, SIC, SI είναι πλέον αξιόπιστες επειδή για αλλαγή της χημείας-αναλύτη αλλάζει μόνο το πρωτόκολλο της αυτοματοποίησης και δεν επαναδιαμορφώνεται το σύστημα έγχυσης. Οι αναλογίες ανάμιξης, η προσθήκη αντιδραστηρίων, η αλληλουχία αντιδράσεων, ο χρόνος αντίδρασης, τα αντιδραστήρια έκλυσης απλώς επιλέγονται με τον υπολογιστή. Το μειονέκτημα είναι ότι τα

πρωτόκολλα χρήσης του λογισμικού είναι πολύπλοκα και απαιτούν κόπο κατά την ανάπτυξη κάθεμιας εφαρμογής-ανάλυσης [2, 3, 47-53].

2.2 Γενικές Αρχές Λειτουργίας της τεχνικής

Η ανάλυση με έγχυση δείγματος, Flow Injection (FI), αποτελείται από μια ομάδα τεχνικών βασισμένων στην έγχυση ενός υγρού δείγματος σε κινούμενο συνεχή φορέα ενός κατάλληλου υγρού. Το εγχυόμενο δείγμα σχηματίζει ζώνη που μεταφέρεται στον ανιχνευτή ενώ καταγράφονται οι μεταβολές κάποιας παραμέτρου καθώς το δείγμα ρέει μέσα στο διάλυτο.

Η τεχνική εισαγωγής δείγματος σε ροή (FI) χρησιμοποιεί συνεχή πρόσθια ροή για να μεταφέρει την εγχυόμενη ζώνη του δείγματος, να την αναμίξει με αντιδραστήρια και να μεταφέρει το προϊόν στον ανιχνευτή για μέτρηση [2, 3, 48].

Η τεχνική της διαδοχικής έγχυσης (SI) χρησιμοποιεί προγραμματισμένη ροή για την ανάμιξη και μεταφορά εγχυόμενων ζωνών δείγματος και αντιδραστηρίων και να τα μεταφέρει μαζί με τα παραγόμενα προϊόντα στη κυψελίδα ροής. Προγραμματισμός της ροής συμπεριλαμβανομένων αναστροφών ροής, επιταχυνόμενο σταμάτημα ροής (stop flow acceleration), ροής παλμών (flow pulsing) είναι μοναδικά εργαλεία που προσφέρουν μοναδικές δυνατότητες για το χειρισμό διαλυμάτων σε μικροκλίμακα.

Η έγχυση σφαιριδίων (BI) χρησιμοποιεί προγραμματισμένη ροή για να χειριστεί ακριβείς όγκους αιωρούμενων μικροσφαιριδίων που χρησιμοποιούνται ως μεταφορείς αντιδραστηρίων και αναλυτών. Αυτό επιτρέπει την ανανέωση της στερεάς φάσης ένα κρίσιμο στάδιο όταν οι επιφάνειες των σφαιριδίων μολυνθούν ή δυσλειτουργούν [51].

Η Διαδοχική Χρωματογραφία Έγχυσης (SIC) χρησιμοποιεί προγραμματισμένη ροή με καθορισμένους όγκους εγχυόμενων δειγμάτων για να δημιουργήσουν κλιμακωτές εκλούσεις και να καθαρίζουν ή να ανανεώνουν η στατική φάση. Είναι μια νέα τεχνολογία που φιλοδοξεί να γεφυρώσει το χάσμα μεταξύ της τεχνικής διαχωρισμού HPLC με την οποία προσδιορίζονται πολλαπλά συστατικά και πειραμάτων που αποβλέπουν στον προσδιορισμό ενός μόνον αναλύτη [50].

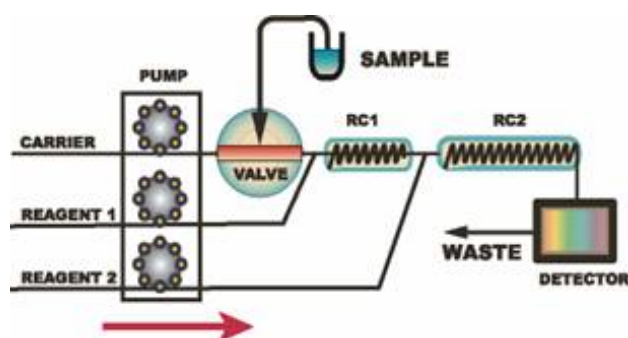
Τα βασικά χαρακτηριστικά της τεχνικής εισαγωγής δείγματος σε ροή (FI) είναι:

1. Η συνεχής ροή που δεν διακόπτεται από φυσαλίδες.
2. Τα δείγματα εκχύνονται ή εισάγονται απ' ευθείας σε ροή.
3. Τα εισαγόμενα δείγματα και αντιδραστήρια μεταφέρονται συνεχώς μέσω των σωληνώσεων στον ανιχνευτή. Εκτός της μεταφοράς είναι δυνατή η εκτέλεση

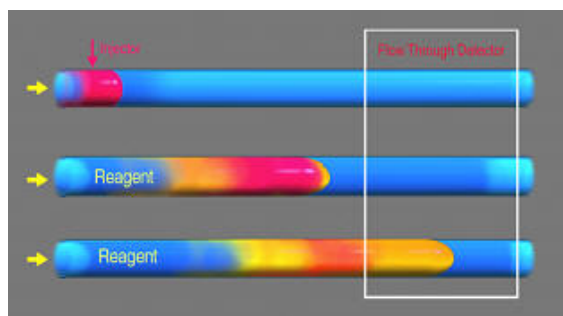
διαφόρων φυσικοχημικών διεργασιών πχ χημικές αντιδράσεις, διάχυση, εκχύλιση, διαπίδυση κλπ.

4. Ο προσδιορισμός του αναλύτη γίνεται στην κυψελίδα ροής.
5. Κατά τη χρονική στιγμή μέτρησης του σήματος δεν επιτυγχάνεται κατάσταση φυσικής ή χημικής ισορροπίας. Αυτό δεν δημιουργεί σφάλματα διότι, εφόσον δεν μεταβάλλεται η διάταξη του αναλύτη κατά τη διάρκεια των μετρήσεων, τηρούνται πανομοιότυπες φυσικές και χημικές συνθήκες εξασφαλίζοντας πολύ καλή επαναληψιμότητα.
6. Ο χρόνος διάρκειας της μέτρησης είναι επαναλήψιμος. Σημειώνεται ότι μικρές διακυμάνσεις στο χρόνο μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα σοβαρά σφάλματα.
7. Η μερική διασπορά ή η αραίωση του δείγματος καθ'όλην τη χρονική διάρκεια της μεταφοράς προκαθορίζεται με έλεγχο των γεωμετρικών και υδροδυναμικών χαρακτηριστικών του συστήματος.

Ένα δείγμα εγχύεται σε συνεχές ρεύμα κατάλληλου διαλύματος-μεταφορέα όπως φαίνεται στην εικόνα 10 για παράδειγμα, αναμιγνύεται για ορισμένο χρονικό διάστημα που εξαρτάται από την ταχύτητα ροής, τη διάμετρο, το μήκος του σωλήνα και κινείται προς τον ανιχνευτή που καταγράφει συνεχώς το λαμβανόμενο σήμα. Η διαμόρφωση του δείγματος κατά τη ροή φαίνεται στην εικόνα 11. Ο ανιχνευτής μπορεί να είναι φωτόμετρο, φθορισμόμετρο, αγωγιμόμετρο, εκλεκτικό ηλεκτρόδιο. Απαραίτητο εξάρτημα της συσκευής είναι η περισταλτική αντλία. Η τεχνική χρησιμοποιείται σε χημικές, ιατρικές και βιομηχανικές αναλύσεις.



Εικόνα 10. Σύστημα FI.



Εικόνα 11. Διαμόρφωση του δείγματος κατά τη ροή. τρία διαφορετικά στιγμιότυπα κατά τη ροή: α) εισαγωγή του δείγματος, β) ροή προς τον ανιχνευτή και γ) στον ανιχνευτή.

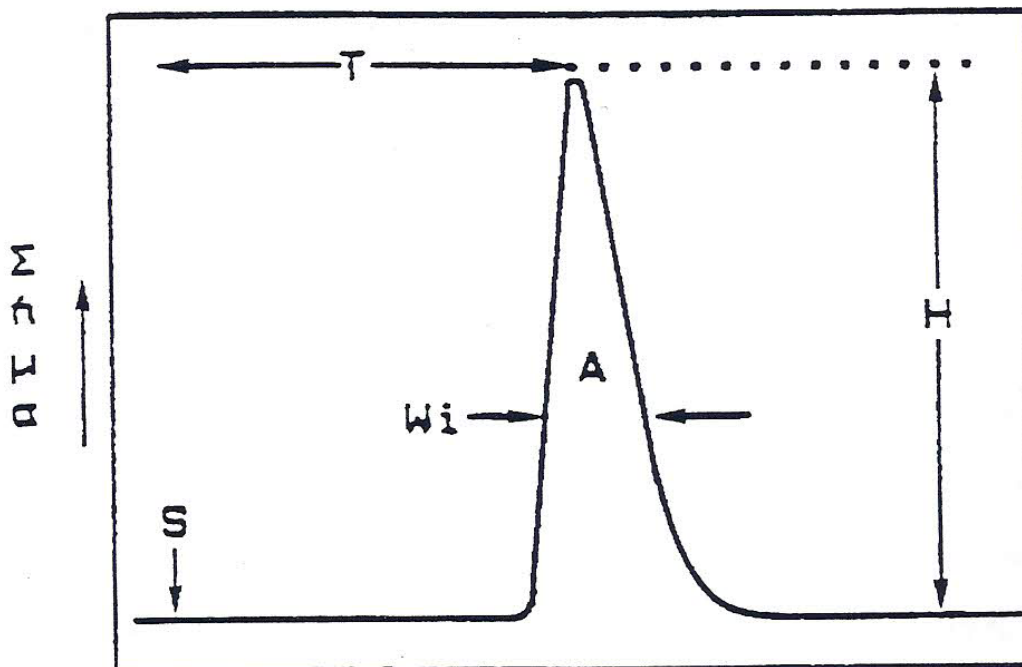
Στο σχήμα 2.1 φαίνεται η συνηθισμένη μορφή απόκρισης ενός συστήματος FI . Η συγκέντρωση του δείγματος είναι ανάλογη του ύψους, του πλάτους της καμπύλης ή του εμβαδού. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης απαιτείται η δημιουργία καμπύλης αναφοράς. Σε περίπτωση που ο ανιχνευτής έχει γραμμική απόκριση ισχύουν οι ακόλουθες εξισώσεις.

$$H=K_1C \quad A=K_2C \quad W_i=K_3 \log(C)+a \quad (2.1)$$

όπου H το ύψος, A το εμβαδόν, W_i το πλάτος της κορυφής μετρημένο σε ορισμένο ύψος κοινό για όλα τα δείγματα και K_1 , K_2 , K_3 συντελεστές αναλογίας που εξαρτώνται από τον όγκο του δείγματος, τη συγκέντρωση του αντιδραστηρίου, τη διασπορά του κ.α. Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή εισαγωγής του δείγματος μέχρι το μέγιστο της κορυφής είναι ο χρόνος παραμονής (T) κατά τη διάρκεια του οποίου λαμβάνει χώρα η χημική αντίδραση, ενώ ο χρόνος που απαιτείται για την απόρριψη (ξέπλυμα) των προϊόντων αντίδρασης από τον ανιχνευτή είναι ο χρόνος έκπλυσης. Ένα καλά σχεδιασμένο σύστημα FI έχει πολύ γρήγορη απόκριση γιατί ο χρόνος T είναι εντός της περιοχής 5-20 s. Έτσι ένας κύκλος ανάλυσης δειγμάτων είναι μικρότερος από 30 s και είναι δυνατόν να αναλυθούν δύο δείγματα ανά λεπτό. Οι ενιέμενοι όγκοι ποικίλλουν μεταξύ 1 και 200 μL . Αυτό κάνει την FI μια απλή, αυτόματη μικροχημική τεχνική ικανή για την ανάλυση πολλών δειγμάτων μικρού όγκου με μικρή κατανάλωση αντιδραστηρίων.

Η μέτρηση του πλάτους της κορυφής δίνει πολύ μεγαλύτερη γραμμική περιοχή λόγω της λογαριθμικής σχέσης. Οι καμπύλες αναφοράς που κατασκευάζονται με χρήση του πλάτους της κορυφής παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη γραμμική περιοχή διότι το πλάτος

της κορυφής μετρημένο σε μονάδες χρόνου συνδέεται με τη συγκέντρωση λογαριθμικά.



Σχήμα 2.1. Τυπικό καταγράφημα ανιχνευτή σε απλό σύστημα FI.

Η μέτρηση του ύψους της κορυφής δίνει μεγαλύτερη ακρίβεια αλλά μικρότερο εύρος της καμπύλης αναφοράς. Το μειονέκτημα αυτό μπορεί να αντισταθμιστεί αν, εκμεταλλευόμενοι το χρονοισμό, την άριστη επαναληψιμότητα των συστημάτων FI, μετρηθεί όχι το ύψος της κορυφής, αλλά το αναλυτικό σήμα από κάποιο σημείο στο ανερχόμενο ή κατερχόμενο τμήμα της καμπύλης κάτι αντίστοιχο με τη μέτρηση λίγο αριστερά ή λίγο δεξιά του μήκους κύματος μέγιστης απορρόφησης στη φασματοφωτομετρία.

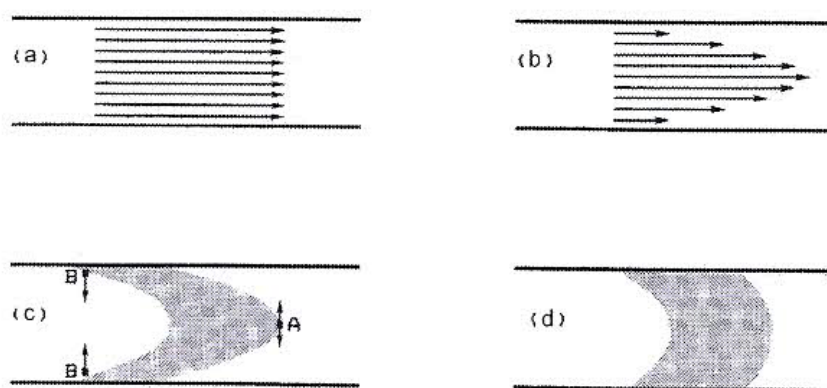
2.3. Θεωρητικά στοιχεία FI

Η καμπύλη απόκρισης ενός συστήματος FI είναι αποτέλεσμα δυο διεργασιών, αμφότερων κινητικής φύσης: της φυσικής της διασποράς του δείγματος στον φορέα και της χημικής αντίδρασης. Οι μετρήσεις που γίνονται χωρίς να επιτευχθεί φυσική ή

χημική ισορροπία είναι μοναδικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της FI σε σύγκριση με προηγούμενες αυτοματοποιημένες ή μη τεχνικές.

2.3.1. Διασπορά του Δείγματος

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί που συνεισφέρουν στη διασπορά της ζώνης του δείγματος στο ρεύμα του φέροντος αντιδραστηρίου που ρέει σε ευθύγραμμο δίαυλο. α) αξονική διασπορά οφειλομένη στη μεταφορά κατά τη διεύθυνση της ροής και β) την ακτινική διασπορά οφειλόμενη στην διάχυση που γίνεται κάθετα προς τη διεύθυνση της ροής.

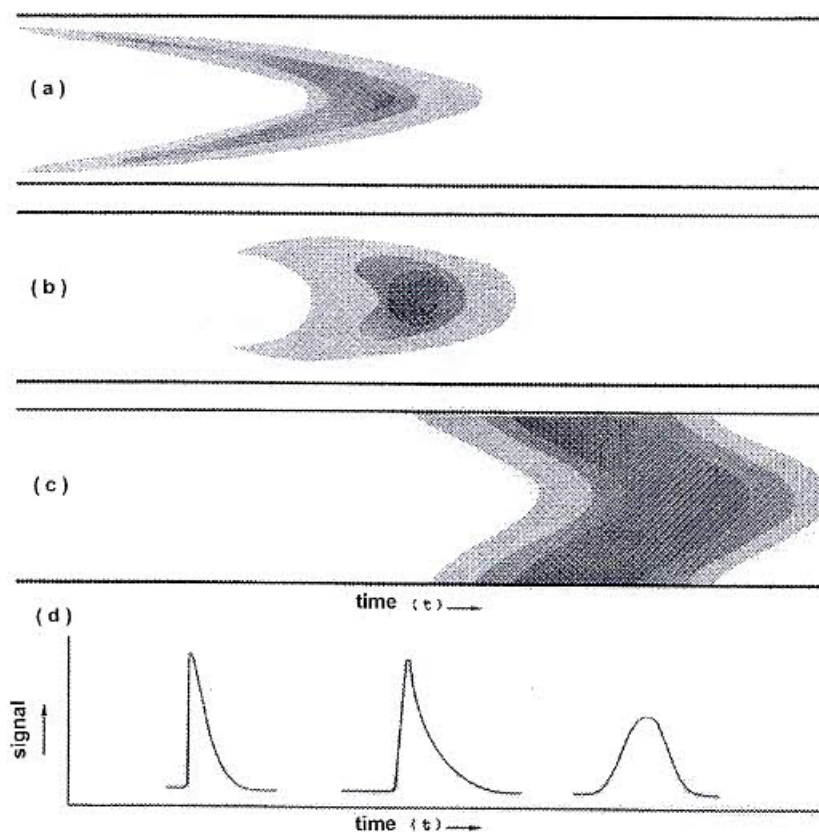


Σχήμα 2.2 Μέτωπο ταχυτήτων στη τυρβώδη (a), και τη στρωτή ροή (b). Ακτινική διασπορά του δείγματος (c) και του δείγματος μετά από εκτεταμένη ακτινική διασπορά (d).

Σε κανονικές συνθήκες FI η ροή είναι στρωτή (Σχήμα 2.2). Σε αντίθεση με την τυρβώδη ροή το δημιουργούμενο προφίλ ταχυτήτων έχει σχήμα παραβολής. Μόρια του δείγματος σε επαφή με τα τοιχώματα του σωλήνα έχουν ταχύτητα μηδέν ενώ εκείνα που βρίσκονται στο κέντρο του σωλήνα έχουν ταχύτητα διπλάσια της μέσης ταχύτητας. Κατ' αυτό τον τρόπο το ρέον δείγμα διασπείρεται αξονικά στο ρεύμα του αντιδραστηρίου. Αν η αξονική διασπορά ήταν ο μοναδικός μηχανισμός ανάμιξης τα μόρια του δείγματος στα τοιχώματα του σωλήνα δεν θα έφθαναν ποτέ τον ανιχνευτή και το δείγμα δεν θα εκλουόταν ποτέ από το σύστημα. Αυτό το οποίο επιτρέπει την υλοποίηση της τεχνικής FI είναι η ακτινική διασπορά που οφείλεται στη διάχυση. Η αξονική κίνηση των μορίων του δείγματος επιβραδύνεται καθώς αυτές διαχέονται από το κέντρο του σωλήνα στο τοίχωμα και επιταχύνεται ενώ τα μόρια του δείγματος

διαχέονται από το τοίχωμα στο κέντρο του σωλήνα. Αυτός είναι ο μηχανισμός της ακτινικής διασποράς και το σχήμα της ζώνης δείγματος μετά από εκτεταμένη ακτινική διασπορά φαίνεται στο σχήμα 2d.

Το σχήμα 2.3 δείχνει τις ζώνες των δειγμάτων, και τις αντίστοιχες FI κορυφές για ευθύγραμμους σωλήνες με διαφορετικό μήκος.



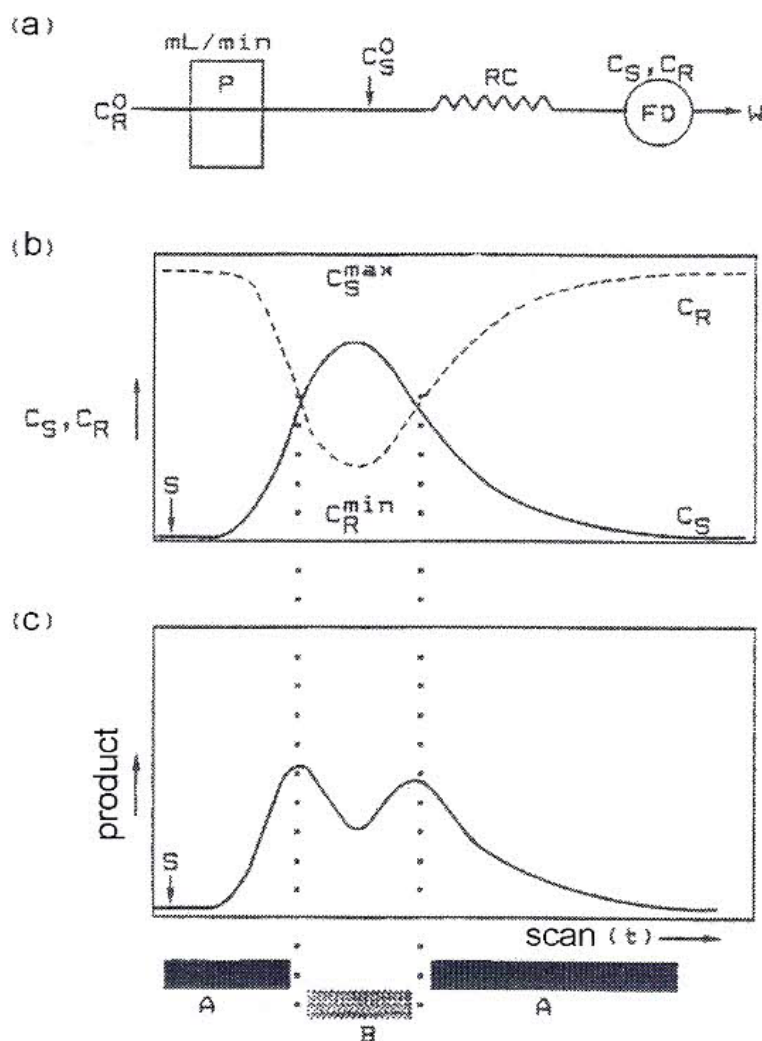
Σχήμα 2.3. Διαμόρφωση της ζώνης του δείγματος όπως επηρεάζεται από τη διασπορά λόγω μεταφοράς (a), λόγω διάχυσης (c), και με συνδυασμό μεταφοράς και διάχυσης (b). Οι χρόνοι παραμονής αυξάνονται κατά τάξη μεγέθους από το (a) προς το (c). Οι λιγότερο σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν σε μικρότερη συγκέντρωση δείγματος και μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιδραστηρίου. Φαίνονται επίσης οι μορφές των κορυφών που αντιστοιχούν σε κάθε περίπτωση (d).

Οι έντονα σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση δείγματος. Ο χρόνος παραμονής T αυξάνει από το (a) στο (c). Οι ελαφρώς σκιασμένες περιοχές αντιστοιχούν σε μικρότερη συγκέντρωση δείγματος και μεγαλύτερη συγκέντρωση

αντιδραστηρίου. Στο πρώτο στάδιο όπου η διασπορά ελέγχεται από τη μεταφορά, η διάχυση δεν έχει ακόμα εξελιχθεί γιατί το δείγμα μόλις έχει εισαχθεί στη ροή. Στο τρίτο στάδιο έχει περάσει αρκετός χρόνος και η διάχυση έχει διαμορφώσει τη ζώνη του δείγματος (c). Η ενδιάμεση περίπτωση (b) απαντάται σε όλα τα συστήματα FI. Η περίπτωση αυτή μελετάται πειραματικά με προσομοιώσεις με σκοπό την δημιουργία εμπειρικών σχέσεων ανάμεσα στις παραμέτρους του συστήματος και την περιγραφή των καμπυλών που παριστάνουν τη σχέση συγκέντρωσης χρόνου.

2.3.2. Αμοιβαία Διασπορά Δείγματος-Αντιδραστηρίου

Όπως φαίνεται στο σχήμα 2.4 όχι μόνο το δείγμα διασπείρεται στο αντιδραστήριο αλλά και το αντιδραστήριο διασπείρεται στο δείγμα. Στο σχήμα 2.4 φαίνεται η αμοιβαία διασπορά δείγματος – αντιδραστηρίου. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μιας μεθόδου FI ενός διαύλου θα πρέπει να αποφευχθεί η έλλειψη αντιδραστηρίου στο κέντρο της ζώνης δείγματος.



Σχήμα 2.4. Αμοιβαία Διασπορά Δείγματος-Αντιδραστηρίου σε μονοδιαυλικό σύστημα. Περιοχή με περίσσεια αντιδραστηρίου (A) και περιοχή με χαμηλή συγκέντρωση αντιδραστηρίου (B).

Έστω C_S^0 και C_R^0 οι αρχικές συγκεντρώσεις του δείγματος και του αντιδραστηρίου πριν την εισαγωγή του δείγματος. C_S και C_R είναι οι συγκεντρώσεις στον ανιχνευτή. Οι συγκεντρώσεις του δείγματος και του αντιδραστηρίου φαίνονται στο σχήμα 2.4 (b). Διπλή κορυφή (Σχήμα 2.4.c) παρατηρείται όταν η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου στο κέντρο της ζώνης του δείγματος δεν είναι αρκετή για πλήρη αντίδραση.

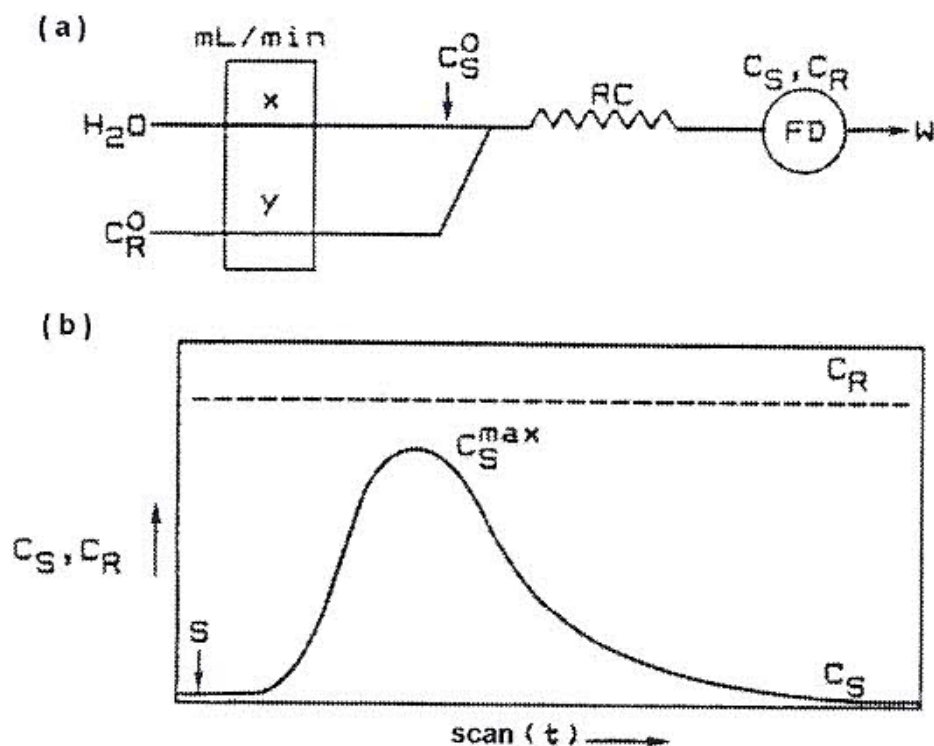
Στο κέντρο της ζώνης του δείγματος θα έχουμε συγκεντρώσεις C_S^{\max} και C_R^{\min} όπως φαίνεται στο σχήμα 2.4(b). Αν η C_R^{\min} είναι μικρότερη από τη στοιχειομετρικά απαιτούμενη για την αντίδραση με την C_S^{\max} τότε καταγράφεται η διπλή κορυφή του

σχήματος. Στην περίπτωση αυτή το ύψος της καμπύλης στο C_S^{\max} δεν εξαρτάται γραμμικά από τη συγκέντρωση του δείγματος και απαιτείται να ληφθεί φροντίδα για την αύξηση της διασποράς του δείγματος ώστε η C_R^{\min} να επαρκεί για την πλήρη αντίδραση στο κέντρο της ζώνης του δείγματος. Αυτό επιτυγχάνεται εύκολα σε συστήματα δύο διαύλων.

Οι συγκεντρώσεις του δείγματος και του αντιδραστηρίου κατά μήκος της ζώνης του δείγματος για σύστημα δύο διαύλων φαίνεται στο σχήμα 2.5. Θα πρέπει να τονιστεί ότι συστήματα δύο διαύλων έχουν ως αποτέλεσμα μεγαλύτερους συντελεστές διασποράς καθώς το δείγμα εισάγεται σε ρεύμα νερού που ενώνεται με το ρεύμα του αντιδραστηρίου. Σε αυτά τα συστήματα FI η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου C_R είναι σταθερή κατά μήκος της ζώνης του δείγματος και εξαρτάται μόνο από την αναλογία των ταχυτήτων των ρευμάτων του δείγματος x και του αντιδραστηρίου y . Είναι δε ίση με:

$$C_R = C_R^0 \{ y / (x+y) \} \quad (2.2)$$

Μεταβάλλοντας τις ταχύτητες ροής η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου μεταβάλλεται αποφεύγοντας έτσι την παρασκευή νέων διαλυμάτων.



Σχήμα 2.5. Αμοιβαία διασπορά δείγματος αντιδραστήριου σε σύστημα δύο διαύλων. Οι ταχύτητες ροής στους διαύλους είναι x και y . C_S η συγκέντρωση του δείγματος, C_R συγκέντρωση αντιδραστήριου. Υπόλοιποι συμβολισμοί όμοιοι με σχήμα 2.4. [47].

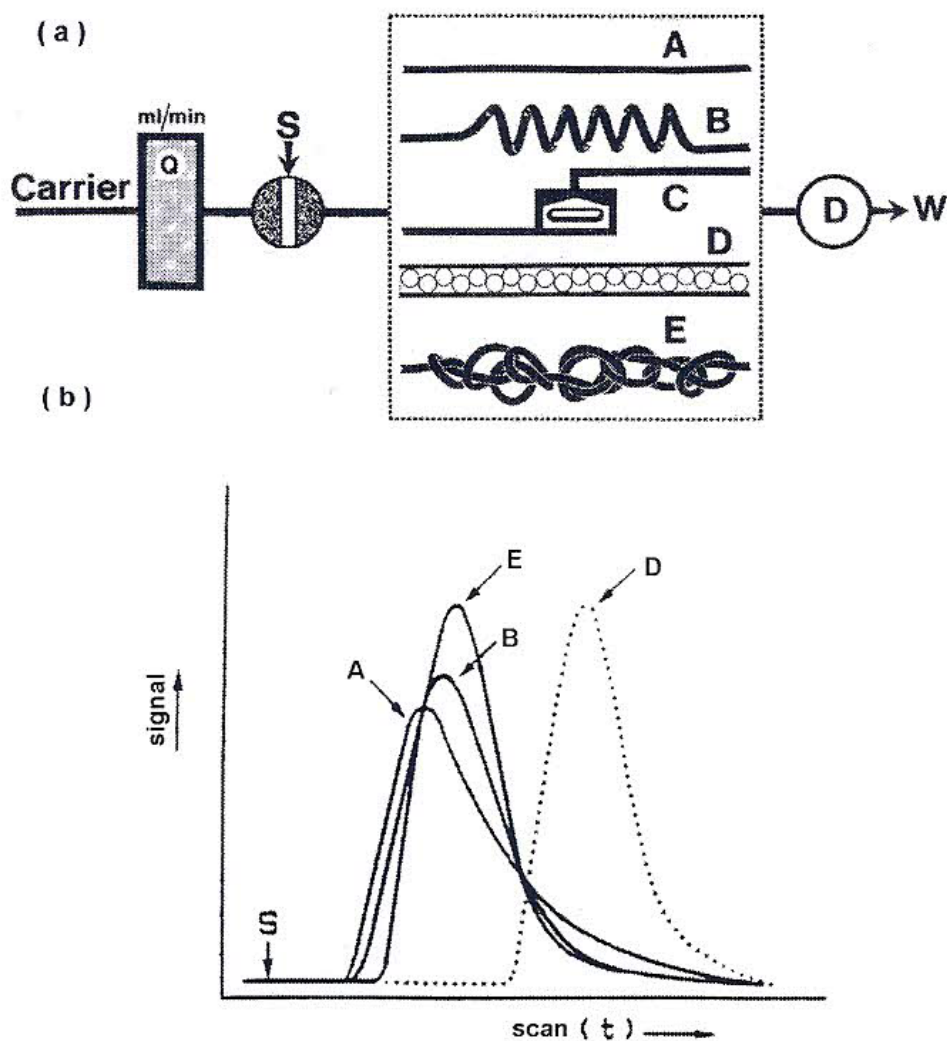
2.3.3. Επίδραση του Αντιδραστήρα στη μορφή των καμπυλών FI

Εκτός από τη διάχυση, ακτινική διασπορά μπορεί να επιτευχθεί με δευτερεύουσα ακτινική ροή. Δευτερεύουσα ακτινική ροή οφειλόμενη σε φυγόκεντρες δυνάμεις μπορεί να δημιουργηθεί λόγω περιέλιξης ή πλεξίματος του ευθύγραμμου σωλήνα (σχήμα 2.6, B και E). Η πλήρωση των σωλήνων με σφαιρίδια φτιαγμένα από αδρανή ύλη και διάμετρο ελαφρώς μικρότερη της διαμέτρου του σωλήνα (σχήμα 2.6, D) είναι ο καλύτερος τρόπος για την επαγωγή δευτερεύουσας ροής. Αυτό το είδος του αντιδραστήρα ονομάζεται αντιδραστήρας σφαιριδίων (single bead string reactor). Ο αντιδραστήρας αυτός παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα του πλεκτού, μεγαλύτερη μείωση του εύρους των κορυφών και είναι ο μοναδικός αντιδραστήρας που επιτρέπει την ταυτόχρονη παρουσία περισσοτέρων του ενός δειγμάτων χωρίς να γίνεται ανάμειξη. Λόγω της παρουσίας των σφαιριδίων παρουσιάζονται αυξημένες τριβές και αναπτύσσονται σχετικά υψηλές πιέσεις. Η πλήρωση με στερεά αντιδραστήρια δίνει

τη δυνατότητα χρήσης αντιδραστηρίων ελάχιστα διαλυτών στο διαλύτη. Στο σχήμα 2.6.C φαίνεται ένας αντιδραστήρας θαλάμου ανάμειξης για την πραγματοποίηση ογκομετρήσεων ενώ αυτό του σχήματος A ένα ευθύγραμμου τύπου αντιδραστήρα. Στον αντιδραστήρα αυτό η ροή οφείλεται μόνο στη διάχυση και λαμβάνονται κορυφές ασύμμετρες και πλατειές. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2.6.E ο πλεκτός αντιδραστήρας παρουσιάζει το μικρότερο χρόνο έκλυσης και τη μεγαλύτερη ευαισθησία (υψηλότερη και στενότερη κορυφή).

Μια άλλη μορφή αντιδραστήρα αποτελείται από πλάκα Plexiglas πάνω στην οποία χαράσσεται ημικυλινδρικός διάυλος ο οποίος καλύπτεται με δεύτερη πλάκα. Με τα συστήματα αυτά επιτυγχάνονται αναλύσεις ελάχιστων ποσοτήτων δείγματος με αμελητέα κατανάλωση αντιδραστηρίων.

Υπάρχουν και αντιδραστήρες μεμβράνης όπου αντιδραστήρια διαχεόμενα μέσω μεμβράνης συναντούν το δείγμα που ρέει.



Σχήματα 2.6. Επίδραση του αντιδραστήρα στη μορφή των καταγραφμάτων.

Η μελέτη των καμπυλών FI και η πρόβλεψη του σχήματος τους με βάση τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου συστήματος FI μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση θεωρητικών προτύπων. Έχουν προταθεί κατά καιρούς πρότυπα χωρίς να είναι πάντοτε επιτυχημένα. Ικανοποιητικά αποτελέσματα βρέθηκαν μόνο σε οριακές περιπτώσεις όπως το πρότυπο των διαδοχικών θαλάμων και αυτό της διάχυσης. Στο τελευταίο θεωρείται ότι η διασπορά οφείλεται μόνο σε μεταφορά και διάχυση και όχι σε δευτερεύουσα ροή. Η επίδραση της μεταφοράς και της διάχυσης περιγράφεται από μαθηματική εξίσωση. Ο Taylor έδωσε ακριβείς λύσεις σε οριακές καταστάσεις όπου η μεταφορά γίνεται είτε πολύ γρήγορα είτε πολύ αργά. Στην πρώτη περίπτωση αγνοήθηκε η διάχυση και στη δεύτερη θεωρείται ότι η αξονική διασπορά επιδρά πολύ λίγο σε σχέση με τη διάχυση [47, 48].

2.3.4. Συντελεστής Διασποράς-Διασπορά και εφαρμογές συστημάτων FI

Μια πολύ χρήσιμη παράμετρος για την περιγραφή ενός συστήματος FI είναι ο συντελεστής διασποράς D . Ο συντελεστής διασποράς D είναι ο λόγος της συγκέντρωσης του δείγματος C^0 πριν την εισαγωγή του προς τη συγκέντρωση C^{\max} όταν περνά από τον ανιχνευτή.

$$D = C^0 / C^{\max} \quad (2.3)$$

Ο συντελεστής διασποράς είναι ανάλογος της αραιώσης. $D=1$ αντιστοιχεί σε μη αραιωμένο δείγμα, ενώ $D=10$ αντιστοιχεί σε αραιώση 1:10. Ανάλογα με το συντελεστή διασποράς τα συστήματα FI χαρακτηρίζονται περιορισμένης διασποράς ($D=1-3$), μεσαίας διασποράς ($D=3-10$) ή μεγάλης διασποράς $D > 10$.

Συστήματα περιορισμένης διασποράς ($D=1-3$). Στα συστήματα αυτά οι ταχύτητες ροής είναι μεγάλες, ο όγκος του δείγματος σε σχέση με τον όγκο του αντιδραστήρα είναι μεγάλος. Ενδείκνυται στην περίπτωση που ο προσδιορισμός πρέπει να γίνει σε δείγμα αυτούσιο δηλαδή χωρίς οιαδήποτε κατεργασία, αραιώση ή προσθήκη αντιδραστήριου.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η χρήση ηλεκτροδίου υάλου για μέτρηση pH και ο προσδιορισμός ιόντων μετάλλων με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης.

Συστήματα μεσαίας διασποράς ($D=3-10$). Χρησιμοποιούνται όταν πρόκειται να προσδιοριστεί συστατικό του δείγματος αφού πρώτα με χημική αντίδραση μετασχηματιστεί σε ανιχνεύσιμη μορφή. Τα συστήματα αυτά επιτρέπουν την συνεχή ανάμειξη με τα χημικά αντιδραστήρια καθώς και τον έλεγχο αντίδρασης. Τα περισσότερα χρησιμοποιούμενα συστήματα FI είναι μεσαίας διασποράς. Χαρακτηρίζονται από αντιδραστήρες μεγάλου όγκου και προσθήκης ενός ή περισσότερων χημικών αντιδραστηρίων. Δεν χαρακτηρίζονται γενικά από μεγάλη ευαισθησία και δυνατότητα πολλών μετρήσεων.

Συστήματα μεγάλης διασποράς ($D > 10$). Δημιουργούνται με χρήση εξωτερικού θαλάμου ανάμειξης εφοδιασμένου με αναδευτήρα που ο όγκος του είναι χαρακτηριστικός του συστήματος. Δημιουργείται έτσι μια νέα αναλυτική τεχνική. [47, 48] οι ογκομετρήσεις FI.

2.3.5. Επίδραση διαφόρων παραμέτρων στην τιμή του συντελεστή διασποράς

Η συνολική διασπορά μπορεί να θεωρηθεί ως αποτέλεσμα των διασπορών που υφίσταται το δείγμα στα κύρια μέρη του συστήματος και ειδικότερα στο σύστημα εισαγωγής, στον αντιδραστήρα και στον ανιχνευτή. Μια άλλη παράμετρος η οποία πρέπει να συνυπολογιστεί είναι οι συνδέσεις που παρεμβάλλονται μεταξύ των τμημάτων αυτών και συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της ολικής διασποράς.

Η εξίσωση παρακάτω περιγράφει τη σχέση του συντελεστή διασποράς με τον όγκο V_s του δείγματος όπου k σταθερά που εξαρτάται από το συγκεκριμένο σύστημα

$$1/D = 1 - e^{-kV_s} \quad (2.4)$$

Αύξηση του όγκου του δείγματος συνεπάγεται μείωση της διασποράς. Ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση του εύρους της κορυφής με συνέπεια τη μείωση της συχνότητας μετρήσεων.

Για ευθύγραμμο διάυλο μήκους L και ακτίνας R ο μέσος χρόνος παραμονής T_m εξαρτάται από τον όγκο του αντιδραστήρα V_r και την ταχύτητα ροής Q εκφρασμένης σε mL/min.

$$T_m = V_r/Q = \pi R^2 L / Q \quad (2.5)$$

Όταν ο T_m είναι παραπλήσιος του χρόνου εμφάνισης του μεγίστου της κορυφής τόσο πιο συμμετρική είναι η καμπύλη. Έχει βρεθεί ότι η διασπορά εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα του T_m .

$$D = k_1 T_m^{1/2} \quad (2.6)$$

Όπου k_1 σταθερά που εξαρτάται από το σύστημα. Από συνδυασμό των δυο τελευταίων εξισώσεων προκύπτει ότι η διασπορά είναι απ' ευθείας ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του μήκους και της ακτίνας του διαύλου και αντιστρόφως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας της ταχύτητας ροής. Περιελιγμένοι διάυλοι μειώνουν δραστικά τη διασπορά. Έχει βρεθεί ότι για ακτίνα περιέλιξης εικοσαπλάσια της εσωτερικής ακτίνας του διαύλου η διασπορά μειώνεται στο 1/4 της τιμής που έχει σε ευθύγραμμο διάυλο.

Όταν ο αντιδραστήρας είναι πληρωμένος με σφαιρίδια αδρανούς υλικού η διασπορά ισούται περίπου με το 1/10 της διασποράς σε ευθύγραμμο δίαυλο ίδιου όγκου και διαμέτρου [47, 48].

2.4. Οργανολογία

Τα κύρια μέρη ενός αναλυτή FI είναι το σύστημα προώθησης των αντιδραστηρίων, το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, ο αντιδραστήρας, ο ανιχνευτής και ο καταγραφέας ή H/Y.

2.4.1. Συστήματα προώθησης αντιδραστηρίων.

Η προώθηση των αντιδραστηρίων γίνεται με τη βοήθεια περισταλτικών αντλιών. Με αυτές γίνεται ρύθμιση της ταχύτητας ροής, αναρρόφηση διαλυμάτων και προώθηση αντιδραστηρίων σε ένα ή περισσότερους διαύλους. Μειονεκτούν στο γεγονός ότι η ροή δεν είναι τελείως ελεύθερη παλμών. Ανάπτυξη παλμών στατικού ηλεκτρισμού επιβάλλει τη λήψη ειδικών μέτρων ιδίως στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ως ανιχνευτές εκλεκτικά ηλεκτρόδια. Το πρόβλημα χρήσης διαβρωτικού διαλύτη αντιμετωπίζεται με χρήση ανθεκτικών σωλήνων από κατάλληλο υλικό όπως TEFLON. Οι αντλίες δεν πρέπει να παρουσιάζουν αυξομειώσεις της ταχύτητας ροής ιδίως όταν χρησιμοποιούνται τεχνικές βαθμίδωσης συγκέντρωσης.

Ορισμένα προβλήματα που μπορεί να παρουσιαστούν στις περισταλτικές αντλίες αντιμετωπίζονται με χρήση συστημάτων που λειτουργούν με πίεση αερίου ή αξιοποιούν τη βαρύτητα. Επειδή όμως στα συστήματα αυτά η ρύθμιση της ροής είναι πολύ δύσκολη η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη μόνο για αναλύσεις ρουτίνας ή επιδείξεις.

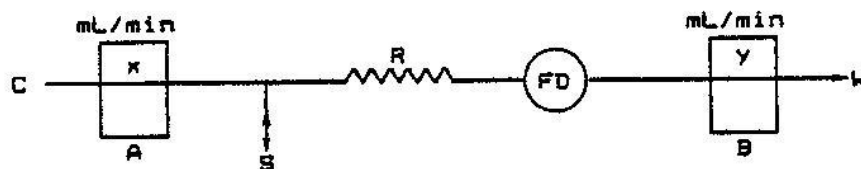
Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται αντλίες σύριγγας, που δεν παρουσιάζουν τα ανωτέρω μειονεκτήματα είναι απαραίτητη η περιοδική διακοπή της λειτουργίας τους για γέμισμα με το διάλυμα των αντιδραστηρίων. Αυτό είναι σημαντικό μειονέκτημα.

2.4.2. Συστήματα Εισαγωγής Δείγματος

Οι μέθοδοι εισαγωγής δείγματος βασίζονται σε άμεση μέτρηση του όγκου ή μέτρηση και έλεγχο του χρόνου.

Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι βαλβίδες εισαγωγής δείγματος που χρησιμοποιούνται στις χρωματογραφικές μεθόδους. Σε αυτές τις βαλβίδες δειγματοληψίας ο όγκος του δείγματος καθορίζεται από τον όγκο του βρόγχου δειγματοληψίας. Ακολούθως με στροφή της βαλβίδας κατά εξήντα μοίρες εισάγεται το δείγμα στη ροή του φέροντος ρεύματος. Η στροφή της βαλβίδας μπορεί να γίνει είτε με το χέρι ή πνευματικά ή με ηλεκτρικό ενεργοποιητή ελεγχόμενο με χρονοδιακόπτη ή με κατάλληλο ηλεκτρονικό σύστημα. Πολλές φορές χρησιμοποιούνται ιδιοκατασκευές των ερευνητών. Τα υλικά κατασκευής είναι συνήθως TEFLON, PVC και άλλα πολυμερή και έτσι υπάρχει μεγάλη ποικιλία βαλβιδών.

Το σύστημα εισαγωγής με μέτρηση του χρόνου βασίζεται στην αναρρόφηση του δείγματος στο διάυλο για ορισμένο χρονικό διάστημα (σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.7. Σύστημα εισαγωγής με μέτρηση χρόνου. Στην πρώτη φάση η ταχύτητα ροής x της αντλίας A είναι μεγαλύτερη της y της αντλίας B . Ακολούθως η αντλία A σταματά τη λειτουργία της, οπότε από την αντλία B γίνεται αναρρόφηση δείγματος. Με έλεγχο του χρόνου κατά τον οποίο η αντλία βρίσκεται εκτός λειτουργίας ρυθμίζεται ο ογκος του δείγματος που αναρροφάται. Τέλος η αντλία A επαναλαμβάνει τη λειτουργία της και όσο δείγμα έχει παγιδευτεί στο σπείραμα R προχωρά προς τον ανιχνευτή. S είναι το ενιόμενο δείγμα.

Όταν η ταχύτητα ροής διατηρείται σταθερή τότε ο όγκος του δείγματος που αναρροφάται είναι γραμμική συνάρτηση του χρόνου. Μεταβάλλοντας λοιπόν το

χρόνο αναρρόφησης είναι δυνατό να μεταβληθεί ο όγκος του δείγματος που εισάγεται στον αναλυτή. Έτσι η βαλβίδα εισαγωγής αντικαθίσταται από μια δεύτερη που έχει τη δυνατότητα για αυτόνομο ξεκίνημα – σταμάτημα.

2.4.3. Αντιδραστήρες

Οι διάφοροι τύποι αντιδραστήρων που χρησιμοποιούνται στη FI περιγράφονται στο εδάφιο 2.3.3 (σχήμα 2.6). Το συνηθισμένο υλικό κατασκευής των διαύλων είναι το TEFLON ή κάποιο άλλο κατάλληλο πλαστικό υλικό. Όταν πρόκειται για εκχυλίσεις, διάχυση αερίων και διαπίδυση χρησιμοποιούνται ειδικά συστήματα με μεμβράνες που επιτρέπουν ή αποκλείουν εκλεκτικά τη διόδο σε διαλύτες ή άλλα συστατικά [54].

2.4.4. Ανιχνευτές

Ανιχνευτές που διαθέτουν κυψελίδα ροής και χρησιμοποιούνται στην τεχνική της αεροδιαχωριζόμενης ροής ή στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη FI. Στις χρωματογραφικές μεθόδους υπάρχει πολλές φορές ανάγκη για μη εκλεκτικούς ανιχνευτές, ενώ στη FI επιδιώκεται η μεγαλύτερη δυνατή εκλεκτικότητα του ανιχνευτή.

Για το σχεδιασμό ενός συστήματος FI πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη :

Η επίδραση της κυψελίδας ροής στο πλάτος των κορυφών. Η αύξηση του πλάτους των κορυφών οφείλεται κυρίως στον λεγόμενο νεκρό όγκο (όγκος της κυψελίδας ροής) του ανιχνευτή. Κυψελίδες με όγκο μικρότερο των 20 μL είναι κατάλληλες για την τεχνική αυτή.

Οι ανιχνευτές προσδιορίζουν τη συγκέντρωση του διαλύματος σε όλη τη μάζα ή στο μέρος εκείνο με το οποίο έρχεται σε επαφή. Στην πρώτη περίπτωση εμπίπτουν οι φασματοσκοπικοί ανιχνευτές και στη δεύτερη οι ηλεκτροχημικοί. Στην περίπτωση των τελευταίων, ανιχνευτών λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής του δείγματος σε όλη τη ζώνη πρέπει να ληφθεί πρόνοια ώστε το μεγαλύτερο μέρος της ζώνης να έρχεται σε επαφή με το ηλεκτρόδιο [2, 47, 48].

Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με διάφορους ανιχνευτές ροής. Τα είδη των ανιχνευτών φαίνονται παρακάτω.

Είδη Ανιχνευτών FI

Ηλεκτροχημικοί

α) Βολταμετρικοί, β) ποτενσιομετρικοί

Φασματοσκοπικοί

α) μοριακής απορρόφησης β) χημειοφωταύγειας γ) μοριακής εκπομπής- φθορισμού δ) ατομικής εκπομπής ε) ατομικής απορρόφησης στ) φασματοφωτομετρίας υπερύθρου ζ) φασματομετρίας Raman

Άλλοι

α) φασματομετρίας μάζας, β) ραδιοχημικής ανίχνευσης, γ) ενθαλπιομετρίας.

2.4.5. Συστήματα καταγραφής και επεξεργασίας σημάτων

Ο Η/Υ είναι απαραίτητος για τη λήψη δεδομένων και έλεγχο του αναλυτή FI. Η λήψη δεδομένων γίνεται με χρήση αναλογοψηφιακού μετατροπέα ενώ ο έλεγχος με χρήση ψηφιακών γραμμών εισόδου του Η/Υ. Εναλλακτικά σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατή η χρήση της σειριακής πύλης RS232 του Η/Υ. Ο Η/Υ χρησιμοποιείται επίσης για αποθήκευση αποτελεσμάτων και κατάλληλη παρουσίαση στον χειριστή του συστήματος [2, 47, 48].

2.4.6. Εμπορικά συστήματα FI

Συνήθως οι ερευνητικές ομάδες κατασκευάζουν τα δικά τους όργανα. Τα τελευταία όμως χρόνια αναπτύχθηκε μεγάλος αριθμός συστημάτων FI από διάφορες εταιρείες όπως η QuickChem της Lachet USA, Multiflow της Control Equipment Corporation FIA star Flow Injection Unit κ.α.

2.5. Διαμορφώσεις συστημάτων FI

Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί περιλαμβάνουν μεταφορά του δείγματος χωρίς να παρεμβαίνει χημική διεργασία καθώς και χημικούς διαχωρισμούς με συστήματα δύο φάσεων όπου ιόντα ή αέρια διαχέονται μέσω μεμβράνης ή ουσίες μετατρέπονται ή

προσυγκεντρώνονται σε προπληρωμένες στήλες. Παρακάτω θα παρατεθούν δύο συστήματα μονοδιαυλικά και δύο διαύλων [47].

Τα μονοδιαυλικά συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για απλή μεταφορά του δείγματος στον ανιχνευτή (συστήματα περιορισμένης διασποράς $D=1-3$) ή να επιτρέψουν την προσαρμογή της αντίδρασης (συστήματα μεσαίας διασποράς $D=3-10$) εφόσον δεν χρειάζεται σταδιακή προσθήκη αντιδραστηρίων. Η αντίδραση πρέπει να γίνεται σε ένα στάδιο με σταθερές συνθήκες και τα αντιδραστήρια να είναι συμβατά μεταξύ τους (εδάφιο 2.3.4).

Τα συστήματα δύο διαύλων επιτρέπουν την ύπαρξη σταθερής περίσσειας αντιδραστηρίου σε όλη τη ζώνη του δείγματος. Λόγω της διασποράς του δείγματος η επιτυγχάνομενη ευαισθησία είναι μικρότερη από αυτή της αντίστοιχης μη αυτοματοποιημένης μεθόδου.

Όταν γίνεται χρήση μίγματος μη συμβατών αντιδραστηρίων, χρησιμοποιείται σύστημα προανάμειξης αντιδραστηρίων και κατόπιν εισαγωγή του δείγματος στο μίγμα που προκύπτει. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η χρησιμοποίηση ασταθών αντιδραστηρίων παραγόμενων *in situ* { Br_2 , Mn(III) , Ag(II) , Cr(III) }.

Στην περίπτωση αντιδράσεων πολλών σταδίων χρησιμοποιούνται συστήματα πολλών διαύλων με σταδιακή προσθήκη αντιδραστηρίων. Η ουσία που προσδιορίζεται αντιδρά για ορισμένο χρόνο με το πρώτο αντιδραστήριο μέχρι που συναντά το ρεύμα του δευτέρου αντιδραστηρίου και έπειτα προωθείται προς τον ανιχνευτή και προσδιορίζεται. Τα στάδια της ανάλυσης είναι απόλυτα καθορισμένα και επαναλήψιμα. Η καλύτερη γωνία αποτελεσματικής ανάμειξης είναι εκείνη των 30° . Αν ένα από τα αντιδραστήρια δεν είναι σε διαλυτή μορφή χρησιμοποιούνται στήλες πληρωμένες με το αντιδραστήριο. Σε αδρανή υλικά πλήρωσης είναι δυνατή και η ακινητοποίηση ενζύμων. Αν το αδρανές υλικό έχει διάμετρο κατά τι μικρότερη της εσωτερικής διαμέτρου της στήλης είναι δυνατόν να προστεθούν και άλλα πλεονεκτήματα (βλέπε σχήμα 2.6). Επίσης είναι δυνατή η χρησιμοποίηση ιονανταλλακτικών στηλών για προκατεργασία του δείγματος ή σχηματισμό ανιχνεύσιμης ποσότητας χημικής ουσίας. Με τις στήλες επιτυγχάνεται οικονομία στην κατανάλωση αντιδραστηρίου και αποφεύγεται η αραίωση του δείγματος γιατί βρίσκεται σε επαφή μόνο με στερεό αντιδραστήριο.

Για τη βελτίωση της εκλεκτικότητας έχουν αναπτυχθεί συστήματα εκχύλισης με μικρή κατανάλωση οργανικού διαλύτη και μείωση των κινδύνων λόγω τοξικότητας. Η επιτυχία της εκχύλισης σε μικροκλίμακα οφείλεται στον διαμερισμό του δείγματος

σε μικροσταγονίδια μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται οι σταγόνες του οργανικού διαλύτη.

Η διάχυση αερίου από το ρεύμα του δείγματος σε ρεύμα αντιδραστηρίου με τα δύο ρεύματα να ρέουν παράλληλα ή αντιπαράλληλα και διαχωρισμένα με μεμβράνη είναι μια εκλεκτική τεχνική. Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να διαχωριστούν και να προσδιοριστούν επιτυχώς αέρια όπως CO₂, SO₂, NH₃, HCl, HCN και HF. Η αντικατάσταση της μεμβράνης διάχυσης από μεμβράνη διαπίδυσης επιτρέπει διαχωρισμούς μικρομοριακών ενώσεων από μεγαλομοριακές π.χ. πρωτεΐνες.

Στην τεχνική παράλληλων αναλύσεων με χρησιμοποίηση βαλβίδας επιλογής έξι διευθύνσεων και ισάριθμων διαύλων αποθήκευσης η τεχνική επεκτείνεται και σε μεθόδους με χρόνους ανάλυσης μέχρι και 10 λεπτών.

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν και άλλες τεχνικές όπως το πρότυπο LOV (Lab-on-Valve) που επιτρέπει τη βελτίωση και εφαρμογή των τεχνικών SI και BI στην περιοχή των μl μέσω ολοκλήρωσης και σμίκρυνσης. Η εφαρμογή της SI-LOV βελτιώνει σημαντικά τις δυνατότητες της τεχνικής FI [51].

Η απλότητα της διαμόρφωσης FI-LOV προτιμάται για αναλύσεις ρουτίνας, ενώ η SI-LOV και BI-LOV χρησιμοποιούνται σε προηγμένα ερευνητικά όργανα και αξιόπιστες πλατφόρμες σε μικροκλίμακα για αυτοματοποίηση πολλών διαφορετικών αναλύσεων.

Στην τεχνική των συγχωνευμένων ζωνών γίνεται ταυτόχρονη εισαγωγή δείγματος και αντιδραστηρίου σε δυο διαφορετικά ρεύματα που συναντώνται κατά τη ροή προς τον ανιχνευτή. Πλεονέκτημα είναι η οικονομία στα αντιδραστήρια και η εκτίμηση τυχόν παρεμποδιστικής δράσης ουσιών που συνυπάρχουν.

Οι τεχνικές βαθμιδωτής συγκέντρωσης που περιλαμβάνουν και τις τεχνικές ογκομετρήσεων και ηλεκτρονικής βαθμονόμησης αξιοποιούν πληροφορίες όχι μόνο στην κορυφή των καμπυλών FI αλλά και στο ανερχόμενο ή/και κατερχόμενο τμήμα των καμπυλών.

Η μέτρηση του ύψους κορυφής είναι κινητική ενός σημείου δηλαδή σταθερού χρόνου. Συνδυασμός με την τεχνική αναχαίτισης ροής επιτρέπει στη τεχνική FI την εκτέλεση κινητικών μετρήσεων πολλαπλών σημείων [47].

2.6. Εφαρμογές FI στην Ανάλυση

Οι έλεγχοι που επιβάλλονται από τις κρατικές υπηρεσίες και ο μεγάλος αριθμός δειγμάτων καθιστούν αναγκαία και ταχεία μέθοδο ελέγχου. Μια τέτοια τεχνική όπως η FI βοηθά πάρα πολύ στον έλεγχο της παραγωγής γιατί πέραν των άλλων είναι απλή, οικονομική και αυτοματοποιημένη. Η αποδοχή της FI οφείλεται αναμφίβολα στην πολλαπλή χρησιμότητα της και τη δυνατότητα ανάλυσης ενός πολύ μεγάλου αριθμού οργανικών και ανόργανων ενώσεων σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής FI μαζί με τα συστήματα που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια συντέλεσαν στο να αρχίζει να καθιερώνεται σε αναλύσεις ρουτίνας. Ο όγκος της σχετικής βιβλιογραφίας αυξάνεται καθημερινά με πολύ γρήγορο ρυθμό.

Πεδία Εφαρμογής

Ορισμένα από τα πεδία εφαρμογής είναι :

Περιβάλλον [12-18, 25, 31, 35-42, 55-57, 102, 110-112]. Κλινική Ανάλυση [58-60]. Βιοανάλυση, Βιοτεχνολογία, Ανοσολογική Ανάλυση [60,61], Φαρμακευτική Ανάλυση [22, 38, 54, 56, 58, 63 -71, 112], Τρόφιμα, Βιομηχανική Ανάλυση, Ιατροδικαστική- Εγκληματολογία [62], Εκπαίδευση και Γενικές Εφαρμογές. [52, 56]. Χαρακτηριστικά αναφέρονται οι εφαρμογές στη Φαρμακευτική Ανάλυση και στη Χημεία των Τροφίμων.

Εφαρμογές στην Ανάλυση Τροφίμων

Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί σε πολλά τρόφιμα [56]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα έχουμε τον προσδιορισμό του αριθμού ιωδίου [72], τον προσδιορισμό ελεύθερων λιπαρών οξέων [73,74]. όπως και του αριθμού υπεροξειδίων σε ελαιόλαδο [75]. Στο ελαιόλαδο προσδιορίστηκαν επίσης συστατικά του ελαιολάδου με 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) [76] καθώς και φαινολικά συστατικά του [34], η αντιοξειδωτική ενεργότητα με ABTS [77,78] καθώς και η τιμή της ανισιδίνης [79]. Προσδιορίστηκαν απόβλητα ελαιουργίας [42,43], και γαλλικό οξύ σε ελιές [80].

Άλλα θρεπτικά συστατικά που προσδιορίστηκαν είναι: L-λυσίνη σε τρόφιμα [81], σάκχαρα όπως γλυκόζη φρουκτόζη λακτόζη [83], ολικά σάκχαρα, και ασκορβικό οξύ

σε χυμούς φρούτων [84], γλωρογενικό οξύ σε τρόφιμα [87], ρεσβερατρόλη σε κόκκινο κρασί [91] ρουτίνη και κερκετίνη σε συμπληρώματα τροφίμων [93].

Χρησιμοποιήθηκε για προσδιορισμό EDTA σε κονσέρβες [94], για παγίδευση μικρών μορίων σε κυκλοδεξτρίνες [97] και για προσδιορισμό αζώτου και φωσφόρου σε φυτικούς ιστούς [96].

Ορισμένοι ερευνητές μελέτησαν συστατικά θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων όπως τηγανισμένα ελαιόλαδα [98], φαινολικά συστατικά τους [99] και σχηματιζόμενες αλδεΰδες [100] και διάφορα φυτικά έλαια [103-105].

Επίσης χρησιμοποιήθηκε για προσδιορισμό της τοξικότητας διαφόρων συστατικών σε διάφορα τρόφιμα όπως νιτρώδη [82], εντομοκτόνα-παρασιτοκτόνα σε λαχανικά [85], μελαμίνη [88], αντιβιοτικά [86], καζεΐνη [19] στο γάλα, φορμαλδεΰδη σε νερό [89], χρωστική Σουδάν Ι σε καυτερή σάλτσα [92], κοβάλτιο σε κρόκο αυγών και ιστό ψαριών και ανθρώπινο ορό [90], μυκοτοξίνη πατουλίνη σε μήλα [95].

Μελλοντικές Προοπτικές Εξέλιξης της FI

Η γενική πεποίθηση είναι ότι η FI θα χρησιμοποιηθεί στο μέλλον πάρα πολύ στα ακόλουθα πεδία :

1. Ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων όπως έχει ήδη αρχίσει να γίνεται πχ. τρόφιμα.
2. Το σύστημα θα σμικρυνθεί σημαντικά με κατάλληλες βελτιώσεις.
3. Βελτίωση της ευαισθησίας με χρήση μικροστηλών.
4. Σύνδεση της FI με άλλες ενόργανες συσκευές για πληρέστερη ταυτοποίηση των δειγμάτων.
5. Εύκολη καταγραφή διαφόρων συστατικών κατά τη διάρκεια μιας διεργασίας πχ στη βιομηχανία.
6. Ανάπτυξη νέων τεχνικών FI με χρήση νέων ευαίσθητων αισθητήρων

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΗ FI

Για την εκτίμηση της παρεμπόδισης στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri* αναπτύχθηκε αυτοματοποιημένος αναλυτής εισαγωγής δείγματος σε ροή (Flow Injection Analyser). Ο αναλυτής ενσωματώνει ιδιοκατασκευασμένο λουμινόμετρο ροής ως ανιχνευτή. Αποτελείται από δύο τμήματα: φωτοπολλαπλασιαστή και κυψελίδα ροής. Ο αναλυτής περιλαμβάνει περισταλτική αντλία, για την ροή των υγρών διαλυμάτων και αιωρημάτων των βακτηρίων, βαλβίδα έγχυσης δείγματος σε ροή και σπείραμα ανάμειξης. Ιδιαίτερα σημαντική θέση στην διάταξη έχει ο H/Y ο οποίος χρησιμοποιείται για έλεγχο του αναλυτή και τη λήψη δεδομένων από τον ανιχνευτή. Αυτό πετυχαίνεται με κατάλληλα προγράμματα που αναπτύχθηκαν με χρήση της αντικειμενοστραφούς γλώσσας προγραμματισμού Lab View. Ο αναλυτής αποτελείται από σχετικά απλά υλικά, χαμηλού κόστους, υψηλής ευαισθησίας μέτρησης σημάτων φωτεινής ακτινοβολίας, μεγάλης επαναληψιμότητας, και μπορεί να αναλύσει ποσοτικά πολλά δείγματα σε μικρό χρονικό διάστημα (σε αντίθεση με τις συνήθεις βιοδοκιμές). Λόγω της απλότητάς του επιδέχεται σμίκρυνση πράγμα που αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα στη χημική ανάλυση μιας και θα μπορεί να μεταφερθεί πια το όργανο στο χώρο δειγματοληψίας και όχι αποκλειστικά το δείγμα στο εργαστήριο.

3.1. Ανάπτυξη μονάδος ανιχνευτή

Η μονάδα του ανιχνευτή αποτελείται από δύο μέρη, έναν φωτοπολλαπλασιαστή και μια κυψελίδα ροής η οποία έχει και δυνατότητα θερμοστάτησης.

Φωτοπολλαπλασιαστής

Η ένταση φωταύγειας των βακτηρίων είναι ασθενής στο ορατό. Για να μπορέσει να ανιληφθεί κανείς το μέγεθός της πρακτικά, αρκεί να φανταστεί μια κωνική φιάλη των 50 mL μιας αναπτυχθείσας και ανασυσταμένης βιοφωταυγούς καλλιέργειας των βακτηρίων *Vibrio fischeri* σε συνθήκες απολύτου σκότους. Η καλλιέργεια αυτή εισαγάζεται στη ροή του

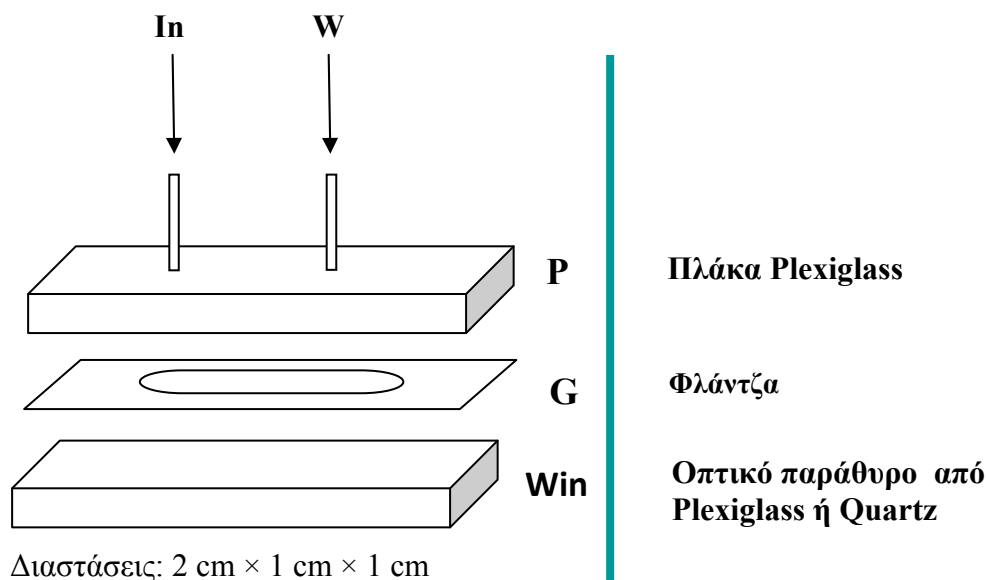
εκάστοτε φέροντος ρεύματος και η φωταύγειά της είναι η μετρούμενη αναλυτική παράμετρος. Το φως θυμίζει σε ένταση και χρώμα τις φωσφορίζουσες ενδείξεις ώρας κάποιου ρολογιού. Στην περίπτωση μάλιστα που η καλλιέργεια είναι στο βέλτιστο σημείο της και αναδευθεί έντονα θα μπορούσε κανείς να παρομοιάσει την παρατηρούμενη φωταύγεια με εκείνη των φωσφορίζουσων ράβδων ρύθμισης κυκλοφορίας των τροχονόμων.

Καλόν είναι ο ανιχνευτής να παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία ώστε να ανιχνεύει αρκετά μικρά σήματα και να μπορεί να μετρά αξιόπιστα σήματα πολύ μικρής έντασης. Αν αναλογιστεί κανείς ότι η παρεμπόδιση της φωταύγειας των βακτηρίων αυτών είναι μεγάλη ή ακόμη και 100% όσο μεγαλώνει η συγκέντρωση του εκάστοτε φέροντος ρεύματος (ρύπου ή διαλύτη), στη ροή του οποίου θα εισαχθεί συγκεκριμένος όγκος του βιοφωταυγούς αιωρήματος βακτηρίων, τότε αντιλαμβάνεται ότι η εκπεμπόμενη ακτινοβολία είναι εξαιρετικά μικρή.

Για το λόγο αυτό για το αναπτυχθέν σύστημα επιλέχθηκε ως ανιχνευτής ένας φωτοπολλαπλασιαστής (Photomultiplier Tube, PMT). Η λυχνία φωτοπολλαπλασιαστή παρέχει υψηλή ευαισθησία, απαραίτητη για τα αναμενόμενα χαμηλά επίπεδα φωτεινής ακτινοβολίας. Ο φωτοπολλαπλασιαστής είναι HC135-01 της Hamamatsu. Ο φωτοπολλαπλασιαστής διαθέτει πηγή υψηλού δυναμικού και διαιρετικό κύκλωμα (divider circuit) με το οποίο τεμαχίζεται η υψηλή τάση σε πολλές μικρότερες. Ο φωτοπολλαπλασιαστής διαθέτει επίσης κύκλωμα το οποίο μετατρέπει τις μετρήσεις του ρεύματος σε δυναμικό. Το δυναμικό οδηγείται σε αναλογοψηφιακό μετατροπέα όπου μετατρέπεται σε ψηφιακή μορφή. Τα δεδομένα αυτά αποστέλλονται μέσω της RS232 θύρας της λυχνίας του φωτοπολλαπλασιαστή στον H/Y.

Κυψελίδα ροής

Επιλέχθηκε η διαμόρφωση πίδακα η οποία έδωσε δυνατότητα εκμετάλλευσης του μεγαλύτερου μέρους της επιφάνειας του οπτικού παράθυρου της λυχνίας φωτοπολλαπλασιαστή και παρουσιάζεται στο σχήμα 3.1.



Σχήμα 3.1: Ιδιοκατασκευασμένη κυψελίδα ροής

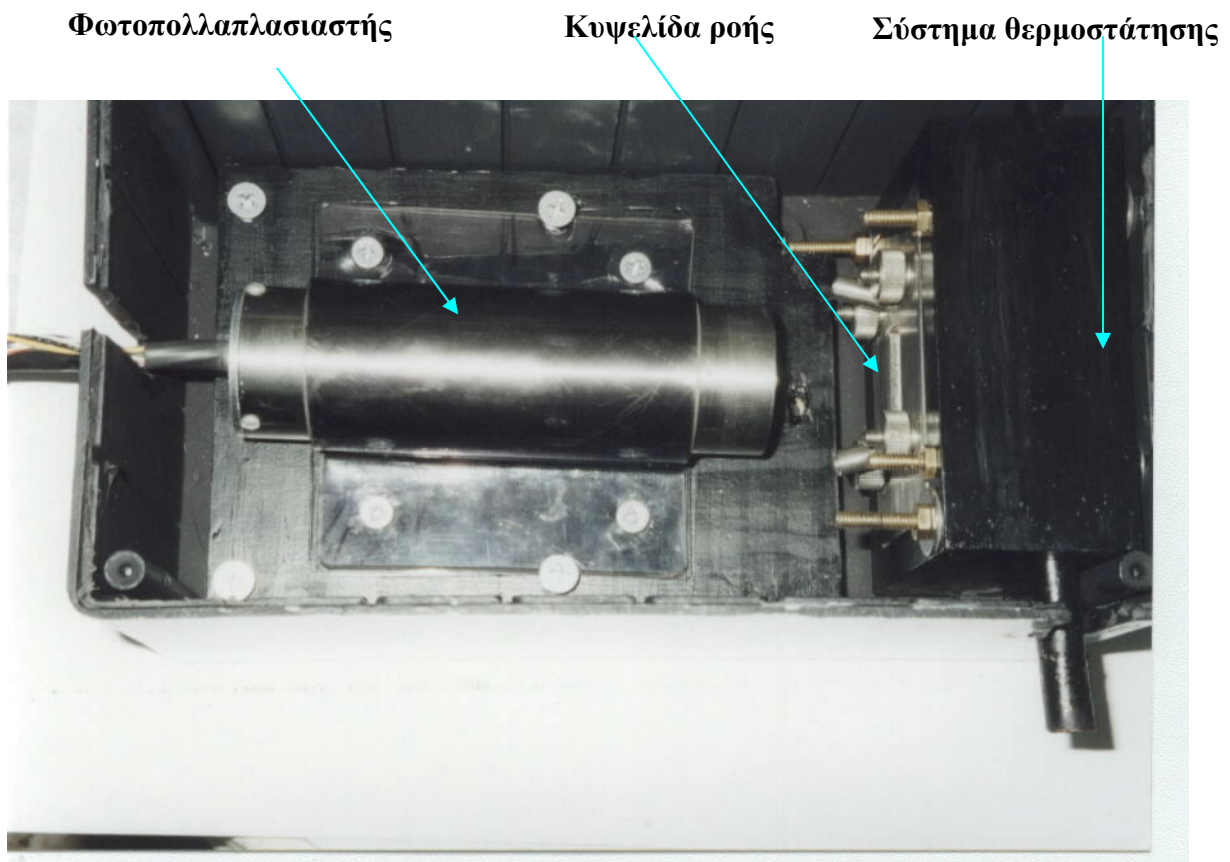
Στο σχήμα 3.1 φαίνεται η κυψελίδα ροής [105a]. Η κυψελίδα ροής αποτελείται από δύο πλάκες από πολυμεθυλ μεθακρυλικό (plexiglass) στις οποίες ενδιάμεσα παρεμβάλλεται μία ελαστική φλάντζα πάχους 2 χιλιοστών. Στο κέντρο της φλάντζας έχει αφαιρεθεί κομμάτι εμβαδού 0,8 τετραγωνικών εκατοστών ($0,8 \text{ cm}^2$). Η φλάντζα τοποθετείται μεταξύ των 2 πλακών plexiglass. Έτσι ο όγκος που δημιουργείται στο διάκενο φλάντζας και των δύο πλακών είναι 160 μL . Στις 4 άκρες έκαστης πλάκας έχουν ανοιχθεί κατάλληλες οπές ώστε να βιδωθούν βίδες για να μην υπάρχει διαρροή υγρών. Για τον ίδιο λόγο μεταξύ πλακών και φλάντζας τοποθετείται σιλικόνη. Η πίεση που ασκείται από τις βίδες στις πλάκες του plexiglass δεν πρέπει να είναι υπερβολική. Εξαιρετικά έντονη πίεση έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των πλακών plexiglass ή την φραγή της ροής. Η πίεση ρυθμίζεται με σταδιακή αύξηση των στροφών στις βίδες ώστε να πάψει διαρροή της κυψελίδας στην περιοχή από 0,1 έως 20 ml/min.

Η κυψελίδα ακολούθως στερεώνεται μεταξύ δύο πλακών από χάλυβα. Η κατασκευή αυτή τοποθετείται σε ειδική υποδοχή της πλάκας αλουμινίου του συστήματος θερμοστάτησης. Η είσοδος του αιωρήματος των βακτηρίων *Vibrio fischeri* καθώς και η έξοδος γίνεται μέσω 2 σωλήνων PTFE (πολυ-τετραφθοροαιθυλένιο) οι οποίοι εφαρμόζουν σε κατάλληλες οπές προς τον εσωτερικό χώρο της κυψελίδας. Για να σταθεροποιηθούν τα δύο σημεία ένωσης σωλήνα PTFE-οπής plexiglass τοποθετείται ισχυρή κόλλα ρητίνης (bisonite) η οποία αφήνεται επί 48 ώρες για πολυμερισμό-σταθεροποίηση. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ερμητική εφαρμογή των σωλήνων PTFE και αποφεύγονται οποιαδήποτε διαρροές εισερχόμενων και εξερχόμενων διαλυμάτων.

Στην έτερη πλάκα του plexiglass πριν από την τοποθέτηση της κυψελίδας μεταξύ των δύο χαλύβδινων πλακών τοποθετείται επιφάνεια καθρέφτη. έτσι ώστε να αντανακλά τη φωτεινή ακτινοβολία προς τον φωτοπολλαπλασιαστή. Μ'αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αξιοποίηση της μετρούμενης ακτινοβολίας αφού το οπτικό αυτό παράθυρο είναι ευθυγραμμισμένο με τη λυχνία του φωτοπολλαπλασιαστή (win, σχήμα 3.1).

Θερμοστάτηση της κυψελίδας ροής

Για τον θερμοκρασιακό έλεγχο των πειραμάτων, τοποθετείται η κυψελίδα ροής εντός θερμοστατούμενου αλουμινένιου πλαισίου το οποίο στο εσωτερικό του είναι κενό ώστε να μπορεί να κυκλοφορεί μέσα του νερό σταθερής θερμοκρασίας που παρέχεται από υδατόλουτρο (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Φωτογραφική απεικόνιση του εσωτερικού της μονάδος ανιχνευτή.

Ο ανιχνευτής τοποθετείται εντός παραλληλεπιπέδου πλαστικού περιέκτη που αποτελείται από δύο μέρη που εφαρμόζουν μεταξύ τους ερμητικά. Σε συγκεκριμένα σημεία του πλαστικού αυτού περιέκτη έχουν ανοιχθεί τρύπες ώστε να περνούν τα καλώδια που θα συνδέουν τον φωτοπολλαπλασιαστή με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Από την απέναντι πλευρά πλευρά ανοίχτηκαν διατομές ώστε να περνούν οι δύο σωλήνες teflon εσωτερικής διαμέτρου 0,8 mm που οδηγούν στην είσοδο (In) και την έξοδο (W) της κυψελίδος ροής.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα σημεία σύνδεσης των δύο τμημάτων του περιέκτη καθώς και τα σημεία στα οποία έχουν ανοιχτεί οπές καλύπτονται με μόνιμο ελαστικό (permanent elastic selant-Vaber 240). Έτσι επιτυγχάνεται η φωτοστεγανότητα του ανιχνευτή από οποιαδήποτε παράσιτη φωτεινή ακτινοβολία από το περιβάλλον. Εισροή τέτοιας ακτινοβολίας θα καθιστούσε το σύστημα αναξιόπιστο και θα οδηγούσε σε θετικά σφάλματα μέτρησης από τον φωτοπολλαπλασιαστή. Σημειώνεται ότι το εσωτερικό του περιέκτη είναι χρωματισμένο με

μαύρο χρώμα. Με το μέτρο αυτό μειώνεται περαιτέρω η παράσιτη ακτινοβολία. Μεγάλη ένταση φωτεινής ακτινοβολίας, όπως της ηλιακής, θα οδηγούσε ακόμα και σε κάψιμο της λυχνίας του φωτοπολλαπλασιαστή. Πριν τεθεί σε λειτουργία ο ανιχνευτής γίνεται δοκιμή φωτοστεγανότητας μέσω κατάλληλου ειδικά εγκατεστημένου λογισμικού. Το μετρούμενο σήμα από τον ανιχνευτή είναι μηδενικό, όταν από την κυψελίδα ροής περνάει μη φωταυγές διάλυμα. Με τον τρόπο αυτό βεβαιώνεται ότι δεν υπάρχει εισροή παράσιτης ακτινοβολίας και ο ανιχνευτής είναι απόλυτα φωτοστεγανός, έτοιμος για απόλυτες, αξιόπιστες, επαναλήψιμες μετρήσεις.

3.2. Ανάπτυξη αναλυτή ροής

Ο αναλυτής ροής αποτελείται από περισταλτική αντλία και βαλβίδα έγχυσης δείγματος σε ροή. Η βελτιστοποίησή του αναλυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.

Περισταλτική αντλία

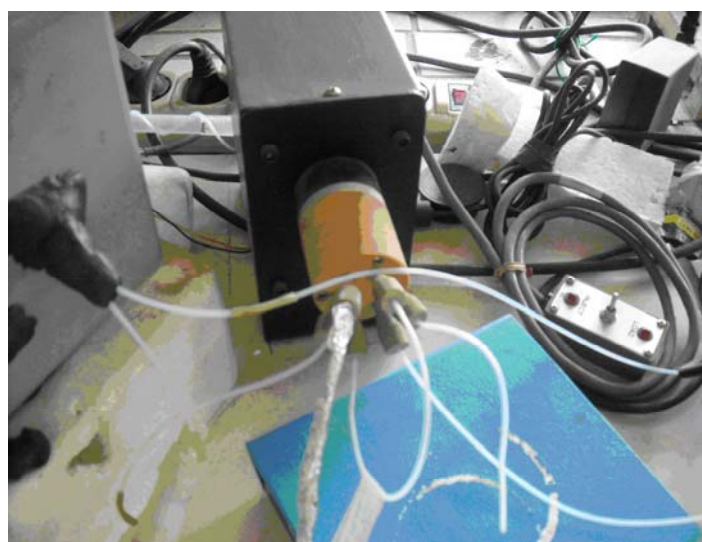
Για την κίνηση των υγρών διαλυμάτων επιλέχθηκε περισταλτική αντλία ICP-8 της Ismatec. Αυτή η αντλία διαθέτει 8 θέσεις και έτσι δίνει τη δυνατότητα δοκιμής πολλών συνδυασμών ροής και ανάμειξης πολλών αντιδραστηρίων που θα είναι ίσως απαραίτητα για την επίτευξη αντιδράσεων χημειοφωταύγειας. Με αυτήν την αντλία μπορεί να αυξομειώνεται κατά βούληση μεγάλο εύρος ταχυτήτων ροής ανάλογα με τις επιθυμητές συνθήκες των πειραμάτων. Η περισταλτική αυτή αντλία έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να ελέγχεται χειροκίνητα αλλά και από ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω θύρας RS-232 και καταλλήλου λογισμικού προγράμματος που περιγράφεται στο εδάφιο 3.3.



Εικόνα 13. Περισταλτική αντλία

Βαλβίδα έγχυσης

Χρησιμοποιείται η βαλβίδα έγχυσης VCI Valco C22Z-3186EH, η οποία βρίσκει εφαρμογή στην υγρή χρωματογραφία χαμηλής πίεσης. Η βαλβίδα ελέγχεται από τον Η/Υ του συστήματος μέσω ηλεκτρονικής μονάδας διασύνδεσης.

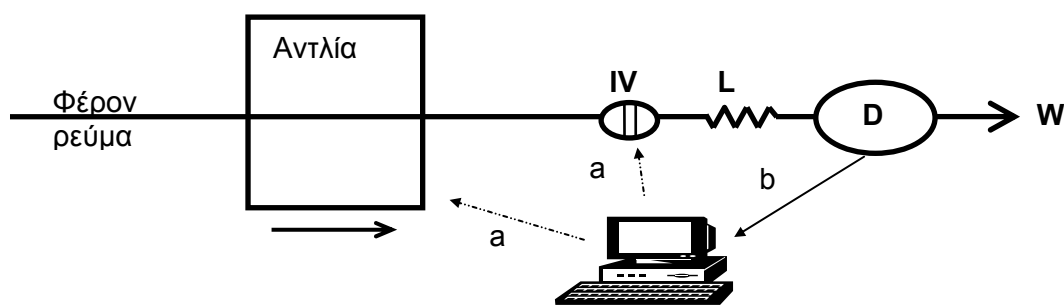


Εικόνα 14. Βαλβίδα έγχυσης

Σπείραμα ανάμειξης

Μεταξύ της βαλβίδας έγχυσης και της μονάδας ανιχνευτή παρεμβάλλεται σπείραμα ανάμειξης καταλλήλων διαστάσεων. Επιλέχθηκε να έχει μήκος 100 cm και εσωτερική διαμέτρο 0,5 mm. Το σπείραμα αυτό είναι επίσης από πολυτετραφθοροαιθυλένιο και οι περιελίξεις του έγιναν γύρω από πλαστική ράβδο διαμέτρου 1 cm. Το σπείραμα ανάμειξης εξασφαλίζει την ανάμειξη του ενιόμενου αιωρήματος βιοφωταγών βακτηρίων με το φέρον ρεύμα του τοξικού διαλύματος. Η ανάμειξη αυτή οφείλεται τόσο στη μεταφορά κατά μήκος του σπειράματος όσο και στις φυγόκεντρες δυνάμεις που αναπτύσσονται λόγω περιέλιξης.

Επίσης, όπως θα εξηγηθεί αργότερα, επιλέχθηκε μονοδιαυλικό σύστημα ροής. Συνολικά και διαγραμματικά ο αυτοματοποιημένος αναλυτής εισαγωγής δείγματος σε ροή που αναπτύχθηκε φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα 3.2.



Σχήμα 3.2. Αυτοματοποιημένος αναλυτής εισαγωγής δείγματος σε ροή. **D**: μονάδα ανιχνευτή; **IV**: βαλβίδα έγχυσης; **L**: σπείραμα ανάμειξης; **W**: απόβλητα; **a**: ψηφιακές γραμμές ελέγχου και **b**: γραμμή λήψεως δεδομένων.



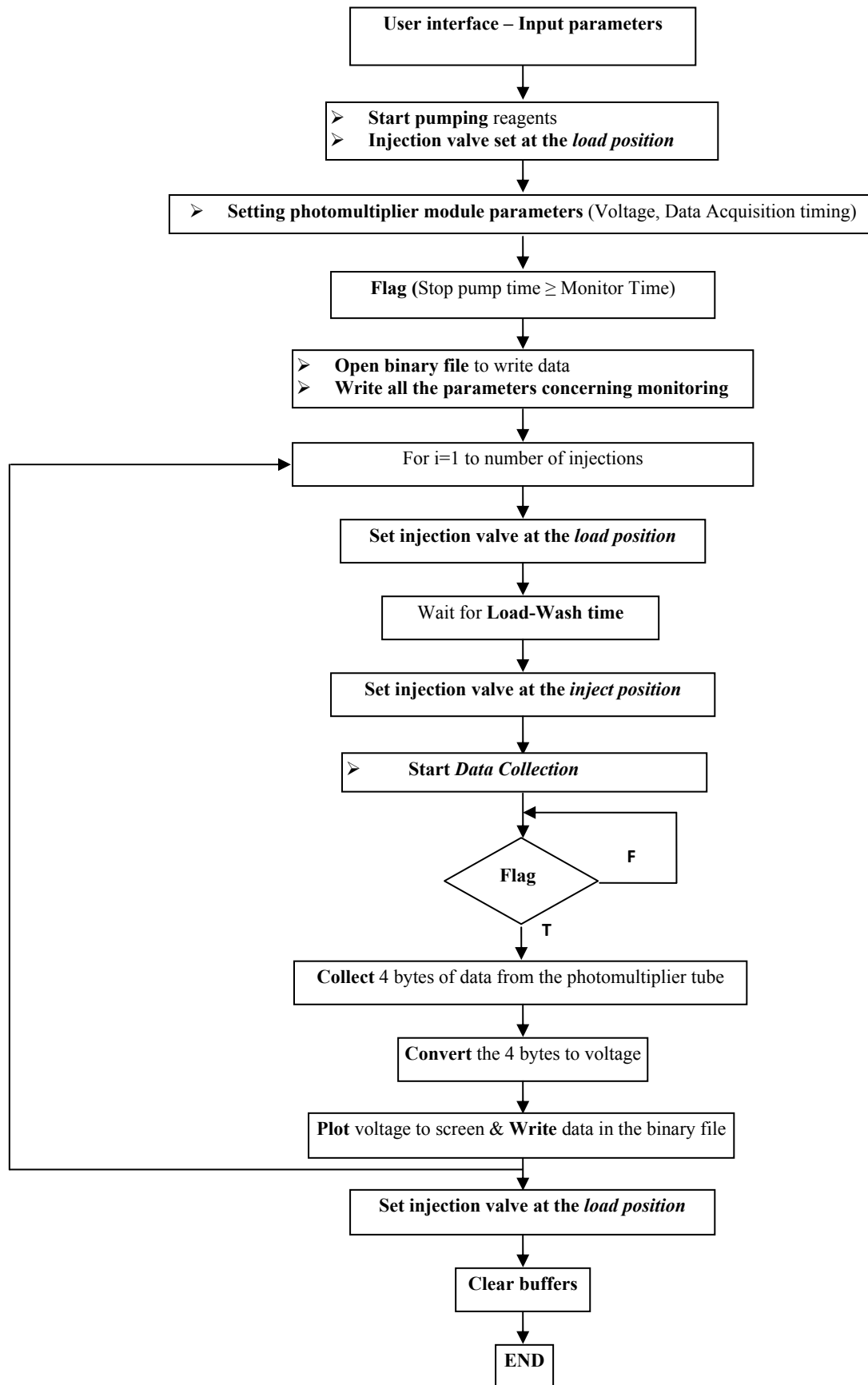
Εικόνα 15. Φωτογραφική απεικόνιση του αυτοματοποιημένου αναλυτή ροής

3.3. Λογισμικό

Το λογισμικό που ελέγχει τον αυτοματοποιημένο αναλυτή αναπτύχθηκε σε γλώσσα προγραμματισμού Lab View [105a], μια αντικειμενοστραφή γλώσσα προγραμματισμού η οποία έχει αναπτυχθεί ώστε να υποστηρίζει αυτοματοποιημένες διαδικασίες. Το λογισμικό διαθέτει λειτουργίες για:

- α) Λήψη δεδομένων από τον ανιχνευτή.
- β) Έλεγχο της αντλίας και της βαλβίδας εισαγωγής.
- γ) Έλεγχο για ύπαρξη φυσαλίδων και διόρθωση των σημάτων.
- δ) Επεξεργασία δεδομένων: ποσοτικές μετρήσεις και διόρθωση ολίσθησης γραμμής βάσης.
- ε) Αποθήκευση δεδομένων σε αρχεία κειμένου.

Το διάγραμμα ροής του προγράμματος φαίνεται στο σχήμα 3.3 και ο κώδικας στο Παράρτημα I.



Σχήμα 3.3 Διάγραμμα ροής του προγράμματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ *Vibrio fischeri*

Το μετρούμενο σήμα-αναλυτική παράμετρος στην παρούσα διατριβή είναι η ακτινοβολία των βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri*. Για αυτό επιλέχθηκε το στέλεχος *Vibrio fischeri* NRRL-11177 της Dr Lange S.A. Τα βακτήρια αυτά ήταν λυοφιλιωμένα εντός πλαστικών σωληναρίων κατάλληλα αποστειρωμένων και πωματισμένων ώστε να εξασφαλίζονται ασηπτικές συνθήκες. Μέσα στην συσκευασία υπήρχαν 50 τέτοια σωληνάρια με λυοφιλιωμένα βακτήρια. Σύμφωνα με τις οδηγίες πρέπει η ποσότητα λυοφιλιωμένων βακτηρίων που βρίσκεται εντός του φιαλιδίου να διαλύεται σε κατάλληλο υγρό ανασύστασης και να χρησιμοποιείται για αναλύσεις σε όργανα όπως αυτό της Microtox (Microtox Model 500 Analyzer , ένα θερμοκρασιακά ελεγχόμενο φωτόμετρο στους 15 °C ή στους 27 °C που έχει εφαρμογή για μετρήσεις τοξικότητας σε στατικές συνθήκες).

Κάθε τέτοιο σωληνάριο λυοφιλιωμένων βακτηρίων χρησιμοποιείται για την ανάλυση ενός μόνο δείγματος. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η αναπαραγωγή των βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* ώστε να υπάρχει δυνατότητα ανάλυσης περισσότερων δειγμάτων, πειραματικής αυτονομίας καθώς και σημαντικής μείωσης του κόστους ανάλυσης αφού θα ήταν ασύμφορο να αγοράζονται διαρκώς βακτήρια.

Η αναπαραγωγή των λυοφιλιωμένων βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

4.1. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ - ΥΛΙΚΑ

Αντιδραστήρια

Τα άλατα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν NH₄Cl, NaCl, CaCl₂, MgCl₂·6H₂O, NaHCO₃, MgSO₄·7H₂O της Merck (Darmstadt, Germany). Τρυπτόνη και εκχύλισμα ζύμης της Serva.

Τεχνητό θαλασσινό νερό

Όπως αναφέρεται στο εδάφιο 1.5. τα *Vibrio fischeri* είναι θαλάσσια βακτήρια. Συνεπώς καθίσταται αναγκαία η παρασκευή τεχνητού θαλασσιού νερού. Αυτή γίνεται [101] με διάλυση σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου των παρακάτω αντιδραστηρίων: 28,13 g NaCl, 0,77 g KCl, 1,21 g CaCl₂, 4,8 g MgCl₂·6H₂O, 0,11 g NaHCO₃ και 3,50 g MgSO₄·7H₂O. και αραιώση μέχρι τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης με απιονισμένο νερό.

Θρεπτικό υλικό

Το DSMZ No 6904 επιλέχθηκε ως θρεπτικό υλικό, καταχωρημένο στη βιβλιογραφία [101]. Αυτό εξασφάλισε ικανοποιητική ένταση φωταύγειας των βακτηρίων.

Το θρεπτικό υλικό παρασκευάζεται ως εξής:

Σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου μεταφέρονται 3 g εκχύλισματος ζύμης, 4 g NH₄Cl και 5 g τρυπτόνης. Ακολουθεί προσθήκη 250 mL τεχνητού θαλασσινού νερού και αραιώση μέχρι τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης με απιονισμένο νερό.

Μετά τη διάλυση, 50 mL θρεπτικού υλικού κατανέμονται σε στενόλαιμες κωνικές φιάλες των 100 mL. Το στόμιο των φιαλών αυτών πωματίζεται με υδρόφιλο βαμβάκι και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο πριν τοποθετηθούν στον επωαστικό κλίβανο για αποστείρωση. Κάθε κωνική φιάλη, των 100 mL με τα 50 mL θρεπτικού υλικού, εισάγεται στον επωαστικό κλίβανο για αποστείρωση επί 20 λεπτά σε πίεση 1,5 atm σε θερμοκρασία 100 °C. Οι φιάλες δεν πρέπει να είναι ερμητικά κλειστές, ώστε να γίνει αποστείρωση του θρεπτικού υλικού το οποίο βρίσκεται στο εσωτερικό τους.

Διάλυμα ανασύστασης

Στο διάλυμα ανασύστασης επαναιωρούνται τα βακτήρια μετά την απομάκρυνσή τους από το θρεπτικό υλικό. Αυτό πρέπει αφ'ενός να διατηρεί τη φωταύγεια των βακτηρίων και αφ'ετέρου να μην αποτελεί τροφή-θρεπτικό υλικό για τα βακτήρια. Το διάλυμα παρασκευάζεται ως εξής:

Σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου προστίθενται 28,13 g NaCl, 0,77 g KCl, 1,21g CaCl₂, 4,8 g MgCl₂·6H₂O και αραιώνεται μέχρι τη χαραγή με απιονισμένο νερό.

Μετά την παρασκευή το διάλυμα ανασύστασης αποστειρώνεται στο κλίβανο αποστείρωσης στους 100 °C και σε πίεση 1,5 atm.

4.2. Παρασκευή αιωρήματος παρακαταθήκης βιοφωταυγών βακτηρίων

Επειδή απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες, η ακόλουθη πειραματική διαδικασία εκτελείται σε ειδικό θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow).

Για να είναι ο θάλαμος καθαρός και ελεύθερος από μικρόβια που μπορεί να μολύνουν τις καλλιέργειες ακολουθείται το εξής πρωτόκολλο εργασίας:

α) Καθαρίζονται όλες οι επιφάνειες του θαλάμου και οι παλάμες του αναλυτή με διάλυμα νερού/αιθανόλης 70/30 % v/v.

β) Για 15 λεπτά μένουν αναμμένες οι λάμπες υπεριώδους ώστε να σαρώσουν επιφανειακά με τις ακτίνες υπεριώδους ακτινοβολίας όλα τα μέρη του θαλάμου καθώς και την εξωτερική επιφάνεια οποιουδήποτε υλικού το οποίο θα χρησιμοποιηθεί όπως μικροβιολογικός κρίκος, αυτόματα σιφώνια, κωνικές φιάλες κ.α. Με τον τρόπο αυτόν πετυχαίνεται επιφανειακή αποστείρωση του χώρου εργασίας και οποιουδήποτε υλικού εμπλέκεται στην πειραματική διαδικασία.

γ) Δέκα λεπτά μετά το άνοιγμα των λαμπτήρων UV μπαίνει σε λειτουργία ο ανεμιστήρας-κυκλοφορητής αέρα ώστε να εξασφαλιστούν σταθερές ατμοσφαιρικές συνθήκες και να υπάρχουν σταθερά ρεύματα αέρα προς το εξωτερικό του θαλάμου.

δ) Μετά το πέρας των 15 λεπτών τίθενται εκτός λειτουργίας μόνον οι λαμπτήρες UV, ενώ ο ανεμιστήρας-κυκλοφορητής συνεχίζει τη λειτουργία του.

Το παραπάνω πρωτόκολλο εργασίας στο θάλαμο νηματικής ροής ακολουθείται σε κάθε μικροβιολογική διαδικασία στη διατριβή αυτή.

Μόλις ετοιμαστεί ο θάλαμος αποστείρωσης ανάβεται στο κέντρο περίπου του θαλάμου μία λυχνία φυσικού αερίου γύρω από την φλόγα της οποίας, γίνονται όλες οι πειραματικές διαδικασίες για να αποστειρώνεται κάθε υλικό όπως απαιτείται (μικροβιολογικός κρίκος κ.α.) και να εξασφαλίζονται ακόμα αυστηρότερες ασηπτικές συνθήκες.

Τότε φέρεται από την καταψύξη ένα φιαλίδιο με τα λυοφιλωμένα βακτήρια του στελέχους *Vibrio fischeri* NRRL-11177 της Dr Lange S.A. Πυρώνεται στη φλόγα της λυχνίας ο μικροβιολογικός κρίκος, ώστε να καθαριστεί ασηπτικά από άλλα μικρόβια. Αφού ο δακτύλιος έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αποσπάται από το φιαλίδιο μικρή ποσότητα

λυοφιλιωμένων βακτηρίων. Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται με εμβάπτιση του δακτυλίου σε κωνική φιάλη που περιέχει 50 mL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού. Σημειώνεται ότι πριν τον πωματισμό πρέπει το στόμιο της κωνικής φιάλης να αποστειρωθεί με τη φλόγα της λυχνίας.

Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε επωαστικό αναδευτήρα στον οποίο είναι δυνατή η ρύθμιση της ταχύτητας αναδεύσεως και ο θερμοκρασιακός έλεγχος. Η καλλιέργεια αφήνεται εκεί για ανάδευση στους 25 °C για δύο ημέρες. Η επιλογή του χρόνου επώασης έγινε μετά από παρατήρηση στις 24 και 48 ώρες. Στις 24 ώρες η καλλιέργεια ήταν διαυγής και δεν παρουσίαζε φωταύγεια διότι το βακτήριο δεν είχε αναπτυχθεί επαρκώς. Σε συνθήκες απολύτου σκότους δεν εξέπεμπε καμμία ορατή ακτινοβολία. Μετά από 48 ώρες η καλλιέργεια είχε θολώσει αρκετά και είχε χάσει τη διαύγειά της. Ήταν πλέον εμφανής η ανάπτυξη στη μάζα του θρεπτικού υλικού μεγάλης ποσότητας βακτηρίων που είχαν τη μορφή κίτρινης χοντρόκοκκης σκόνης. Παρατηρώντας την κωνική φιάλη σε σκοτεινό θάλαμο διακρινόταν φωτεινή ακτινοβολία παρεμφερής σε ένταση και χρώμα με αυτή των φωσφορίζοντων δεικτών ρολογιού ή με εκείνη των φωσφορίζουσών ράβδων ρύθμισης κυκλοφορίας των τροχονόμων.

1400 μL από αυτήν την καλλιέργεια μαζί με 600 μL γλυκερόλης προστίθενται με αυτόματο σιφώνιο σε πλαστικό φιαλίδιο Eppendorf των 2 mL και το φιαλίδιο φυλάσσεται σε καταψύκτη στους -80 °C. Το φιαλίδιο χρησιμοποιείται ως αιώρημα παρακαταθήκης. Κάθε φορά που γίνεται πειραματική διαδικασία ανοίγεται ένα από αυτά τα φιαλίδια, αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με τη βοήθεια αυτόματου σιφωνίου μεταφέρεται ο επιθυμητός όγκος αιωρήματος παρακαταθήκης εντός της κωνικής φιάλης των 100 mL με τα 50 mL θρεπτικού υλικού. Το υλικό του φιαλιδίου το οποίο απομένει, επανακαταψύχεται στους -80 °C. Με τον τρόπο εργασίας που περιγράφηκε ανωτέρω έγινε δυνατή η παρασκευή 35 αιωρημάτων παρακαταθήκης βακτηρίων από μία μόλις συσκευασία λυοφιλιωμένων βακτηρίων. Έτσι πετυχαίνεται οικονομία. Ταυτόχρονα με τον τρόπο αυτό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των φιαλιδίων και της πολλαπλής χρήσης τους, σε περίπτωση μείωσης της φωταύγειας των βακτηρίων ενός εκ των φιαλιδίων η οποία είναι δυνατόν να οφείλεται σε γήρανση, επιμόλυνση ή πιθανή μετάλλαξή τους, το φιαλίδιο απορρίπτεται και επιλέγεται άλλο. Στη συγκεκριμένη διατριβή χρειάστηκε να παρασκευαστούν συνολικά μόλις τρεις σειρές διαλυμάτων παρακαταθήκης παρά το μεγάλο όγκο καλλιεργιών εργασίας που απαιτήθηκαν για τα πειράματα (περίπου 1900). Μία από τις τρεις σειρές αιωρημάτων

παρακαταθήκης χρειάστηκε να απορριφθεί κατά τη διάρκεια των πειραμάτων λόγω γήρανσης των βακτηρίων ενώ μία ακόμα λόγω πιθανής μετάλλαξης των βακτηρίων με αποτέλεσμα την απώλεια της φωταύγειάς τους. Με τον τρόπο αυτό έγιναν δυνατές αναλύσεις με κατανάλωση μόλις μερικών εμπορικών φιαλιδίων λυοφιλωμένων βακτηρίων.

Τέλος πρέπει να τονιστεί ότι το αιώρημα παρακαταθήκης πρέπει να διατηρηθεί σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα, δηλαδή να παραμείνει όσο το δυνατόν περισσότερο στον ίδιο βαθμό ανάπτυξης. Από αυτό άλλωστε θα εκκινούν οι επόμενες καλλιέργειες βακτηρίων *Vibrio fischeri*. Αυτό σε συνδυασμό με τις σταθερές συνθήκες επώασης της καλλιέργειας που μπορούν να διασφαλιστούν στον επωαστικό αναδευτήρα (δηλαδή επιλογή σταθερής επιθυμητής ταχύτητας ανάδευσης και σταθερής θερμοκρασίας) αυξάνει σημαντικά την επαναληψιμότητα της φωταύγειας της καλλιέργειας. Βέβαια η χαμηλή θερμοκρασία λόγω της φύλαξης του αιωρήματος παρακαταθήκης στους -80°C είναι δυνατόν να καταστρέψει τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων. Για να αποφευχθεί αυτή η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης, προστίθεται γλυκερόλη.

4.3. Παρασκευή βιοφωταυγούς αιωρήματος εργασίας

Με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου ή αυτομάτου σιφωνίου μεταγγίζεται επιθυμητός όγκος αιωρήματος παρακαταθήκης, σε ασηπτικές πάντα συνθήκες, σε κωνική φιάλη με το αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό. Η καλλιέργεια αναπτύσσεται μετά από 48 ώρες.

Μεταγγίζονται, ασηπτικά πάντα στο θάλαμο αποστείρωσης, 20,00 mL από την αναπτυχθείσα καλλιέργεια σε 2 αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρωσης. Ισοσταθμίζεται η μάζα των σωλήνων, τοποθετούνται αντιδιαμετρικά στους υποδοχείς της φυγοκέντρου (Biofuge Stratos) και φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 8000 στροφές στους 25°C .

Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό ταχέως και χωρίς έντονες αναταράξεις ώστε να μην απωλεσθεί σημαντική ποσότητα βακτηρίων.

Τα βακτήρια που παραμένουν στο κάτω μέρος του σωλήνα φυγοκέντρωσης επαναιωρούνται σε 20,00 mL διαλύματος ανασύστασης. Για την επιτάχυνση της διαδικασίας αναδύεται ο σωλήνας φυγοκέντρωσης σε συσκευή τύπου “Vortex”. Αυτό το αιώρημα βακτηρίων-υγρού ανασύστασης είναι στο εξής το αιώρημα εργασίας. Η ένταση της φωταύγειας αυτού του ανασυσταμένου βιοφωταυγούς αιωρήματος βακτηρίων θα είναι κάθε φορά η μετρούμενη αναλυτική παράμετρος-σήμα στον αυτοματοποιημένο αναλυτή εισαγωγής δείγματος.

4.4. Μέτρηση πληθυσμού βακτηρίων του αιωρήματος εργασίας

Πρέπει να σημειωθεί ότι η αναπτυγμένη καλλιέργεια των βακτηρίων πρέπει να δίνει μέγιστο επίπεδο φωταύγειας. Για το βακτήριο *Vibrio fischeri* η μέγιστη ένταση φωτεινής ακτινοβολίας πετυχαίνεται σε ένα χρονικό παράθυρο. Αυτό περιγράφεται αναλυτικά στο εδάφιο 1.5.1 (φαινόμενο Quorum Sensing).

Κύριος σκοπός του πρώτου μικροβιολογικού πειράματος ήταν ο υπολογισμός του πληθυσμού των βακτηρίων και επίσης να αποδειχθεί ότι τα ανεπτυγμένα βακτήρια είναι τα *Vibrio fischeri* και όχι κάποια άλλα που προήλθαν από επιμόλυνση.

Παρασκευάζεται νέο αιώρημα εργασίας σύμφωνα με το εδάφιο 4.3. Με το μικροβιολογικό κρίκο εμβαπτίζεται ποσότητα από αυτό σε 50 mL αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού που βρίσκεται εντός της κωνικής φιάλης των 100 mL. Η καλλιέργεια αυτή των βακτηρίων αφέθηκε να αναπτυχθεί στον επωαστικό αναδευτήρα στους 25 °C για 48 ώρες.

Παράλληλα παρασκευάζεται στερεό θρεπτικό υλικό (nutrient agar) με το οποίο θα πληρωθούν τα τρυβλία που θα χρησιμοποιηθούν για τον προσεγγιστικό υπολογισμό του αριθμού βακτηρίων ανά mL θρεπτικού υλικού. Η διαδικασία για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού πλήρωσης των τρυβλίων ανάπτυξης είναι η εξής:

Αναμιγνύονται 3 μέρη διαλύματος τεχνητού θαλασσινού νερού με ένα μέρος αποστειρωμένου νερού βρύσης σε αποστειρωμένο δοχείο. Στη συνέχεια προστίθεται στο δοχείο αυτό 8⁰/₀₀ στερεός θρεπτικός ζωμός και ακολούθως 2% άγαρ. Το παχύρρευστο βαθύ πορτοκαλλόχρουν διάλυμα που προκύπτει θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου γίνει πλήρης διαλυτοποίηση. Μόλις γίνει αυτό, αφήνεται το δοχείο κάποιο χρονικό διάστημα ώστε να μειωθεί η υψηλή του θερμοκρασία με απώτερο στόχο όταν προστεθεί στα τρυβλία να μην παραχθούν υδρατμοί, οι οποίοι θα συμπυκνωθούν αργότερα στο εσωτερικό πάνω τοίχωμα του καπακιού του τρυβλίου. Ακόμα δεν πρέπει να αφεθεί το θρεπτικό άγαρ (nutrient agar) να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου, αφού τότε θα στερεοποιηθεί και δε θα μπορεί να απλωθεί στο τρυβλίο. Σε αυτήν την περίπτωση θα πρέπει το στερεό πια αυτό υλικό να επαναθερμανθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να λιώσει.

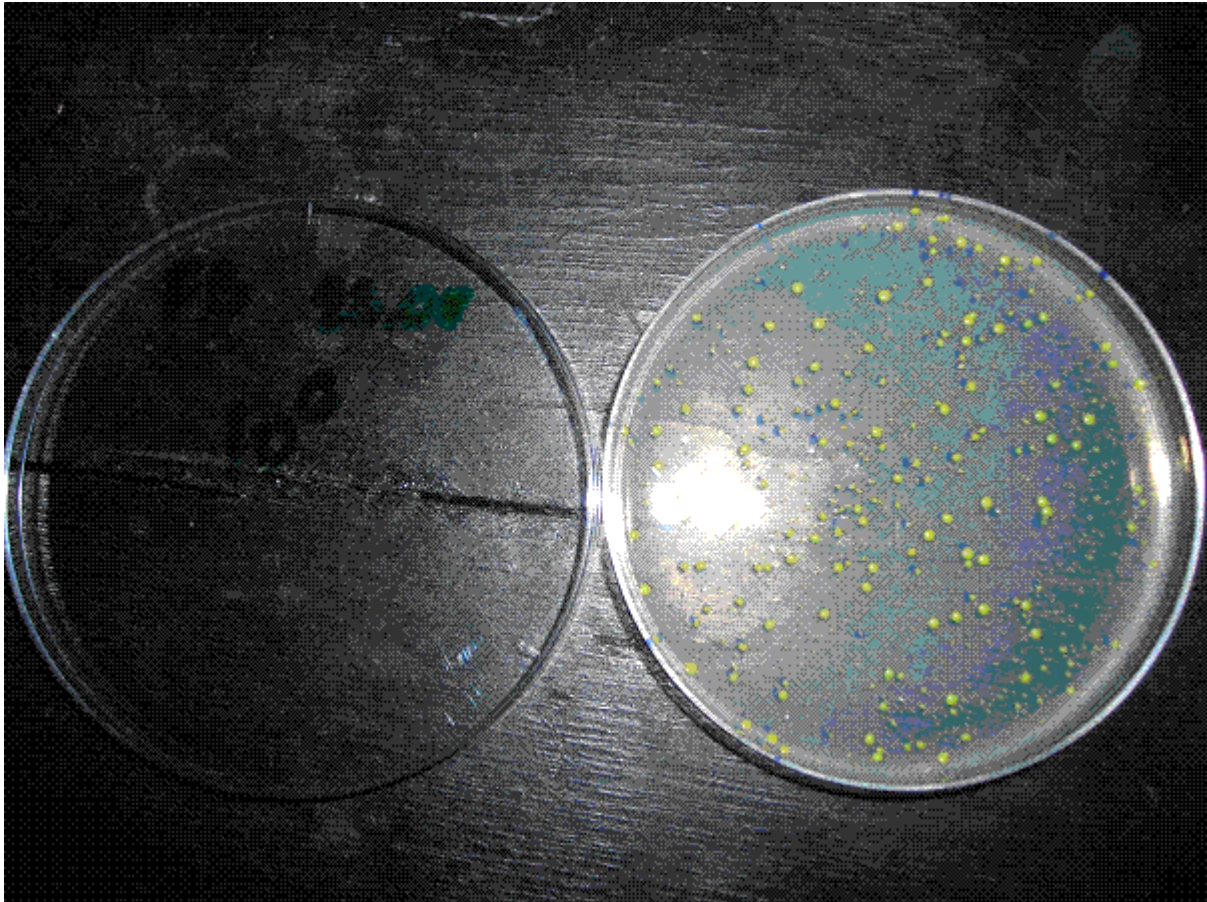
Αφού λοιπόν κατέβει η θερμοκρασία στο επιθυμητό επίπεδο με προσοχή, πάντα εντός του θαλάμου αποστείρωσης (laminar flow), μεταγγίζεται σε κάθε τρυβλίο το θρεπτικό αυτό διάλυμα και αφήνεται μικρό χρονικό διάστημα να απομακρυνθούν τυχόν υδρατμοί για να κλειστεί με το καπάκι του. Στη συνέχεια αφήνεται να στερεοποιηθεί. Πληρώνονται σε

ασηπτικές πάντα συνθήκες στο θάλαμο αποστείρωσης, με αυτόματο σιφόνιο, 8 φιαλίδια Eppendorf των 2 mL με 900 μ L αποστειρωμένο διάλυμα ανασύστασης.

100 μ L από το αιώρημα εργασίας το οποίο αναπτύχθηκε όπως περιγράφεται στο εδάφιο 4.3 εγχέονται στο πρώτο από τα πλαστικά φιαλίδια. Το φιαλίδιο αναδεύεται σε vortex ώστε να ομογενοποιηθεί. Από το ομογενοποιημένο αυτό διάλυμα εγχέονται στη συνέχεια 100 μ L στο επόμενο φιαλίδιο κ.ο.κ. μέχρις ότου συμπληρωθεί και το όγδοο φιαλίδιο. Αυτή η διαδικασία είναι η διαδοχική δεκαδική αραιώση που έφτασε μέχρι και 10^{-8} της αρχικής καλλιέργειας βακτηρίων.

Από κάθε φιαλίδιο Eppendorf εγχέονται 100 μ L σε 2 από τα τρυβλία. Η ποσότητα αυτή των 100 μ L βακτηριακού αιωρήματος απλώνεται ομοιόμορφα κυκλικά πάνω στην επιφάνεια του στερεοποιημένου θρεπτικού υλικού με τη βοήθεια μιας γυάλινης ράβδου σχήματος αγγλικού λάμδα (Λ). Αυτό γίνεται για να αποφευχθεί τοπική συγκέντρωση βακτηρίων σε διάφορα σημεία του θρεπτικού υλικού πράγμα που θα δυσκολέψει την μέτρηση των αποικιών που θα αναπτυχθούν. Κάθε αραιώση εμβολιάζεται σε δύο τρυβλία ώστε να εξαχθεί μέσος όρος.

Μετά τον εμβολιασμό τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο προς επώαση στους 25 $^{\circ}$ C για 2-3 μέρες.



Εικόνα 16. Τρυβλίο με αποικίες βακτηρίων *Vibrio fischeri* σε αραιώση 1×10^{-6} .

Όταν ολοκληρώθηκε ο χρόνος ανάπτυξης των αποικιών των βακτηρίων παρατηρήθηκε ότι για τις αραιώσεις μέχρι και 10^{-5} οι αναπτυχθείσες αποικίες βακτηρίων, όπως απεικονίζονται στην εικόνα 16, ήταν τόσο πυκνές (συνέπιπταν δύο ή περισσότερες αποικίες σε κάποιο σημείο) και πολυάριθμες που καθιστούσε σχεδόν αδύνατη την καταμέτρησή τους. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των βακτηρίων μόνο για 6 συνολικά τρυβλία των αραιώσεων $10^{-6} - 10^{-8}$. Βρέθηκαν τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 4.1. Αποτελέσματα ανάπτυξης αποικιών *Vibrio fischeri* σε τρυβλία με τη μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων.

Αραίωση	Αριθμός αποικιών		Μέσος όρος
	Τρυβλίο 1	Τρυβλίο 2	
10^{-8}	5	3	4
10^{-7}	31	42	37
10^{-6}	233	218	226

Με αναγωγή των αραιώσεων στην 10^{-6} (6^η δεκαδική αραιώση) υπολογίστηκαν 400, 370 και 226 αποικίες αντίστοιχα. Με μέσο όρο 332 αποικίες. Κατά συνέπεια στην αραιώση 10^{-1} αντιστοιχούν $3,32 \times 10^7$ αποικίες. Αυτός ο αριθμός βακτηρίων προέρχεται από τα 100 μL του αιωρήματος εργασίας που παρασκευάστηκε. Δηλαδή υπάρχουν περίπου $3,32 \times 10^8$ βιοφωταυγή βακτήρια ανά mL. Ο αριθμός είναι σύμφωνος με τη διεθνή βιβλιογραφία που αναφέρει ότι για να υπάρχει φωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri* θα πρέπει ο πληθυσμός των βακτηρίων να ανέρχεται μέχρι και 10^{10} (φαινόμενο Quorum Sensing, εδάφιο 1.5.1).

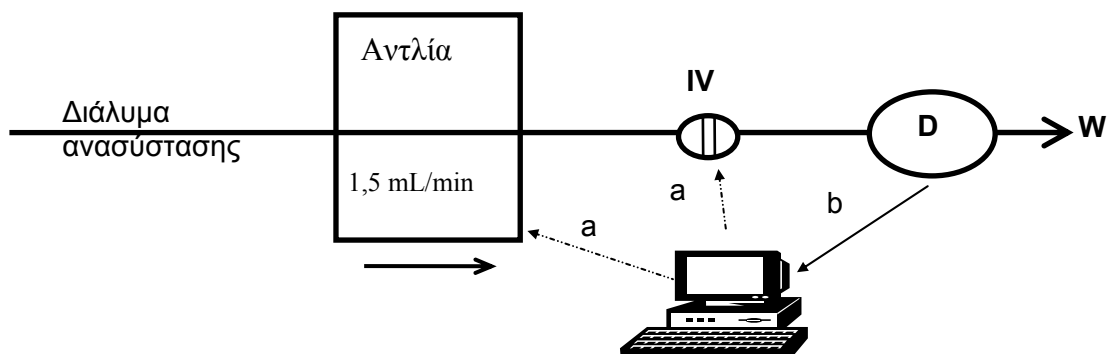
Επίσης διαπιστώθηκε ότι οι κίτρινες αναπτυχθείσες αποικίες είναι όντως *Vibrio fischeri* αφού ταιριάζουν με την περιγραφή και τις εικόνες της σχετικής βιβλιογραφίας. Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι οι αποικίες αυτών των τρυβλίων είναι φωταυγείς σε συνθήκες απολύτου σκότους. Η φωταύγειά τους είναι αντίστοιχης έντασης με εκείνης φωσφορίζοντων δεικτών ρολογιού.

4.5. Εφαρμογή των βιοφωταυγών κυτταρικών βιοαισθητήρων *Vibrio fischeri* στον αυτοματοποιημένο αναλυτή εισαγωγής δείγματος σε ροή

Στο πείραμα αυτό έγινε μία πρώτη δοκιμή εφαρμογής των βιοφωταυγών κυτταρικών βιοαισθητήρων *Vibrio fischeri* στον αναπτυχθέντα αναλυτή εισαγωγής δείγματος σε ροή, ώστε να επιλεγθεί η καταλληλότερη διάταξη.

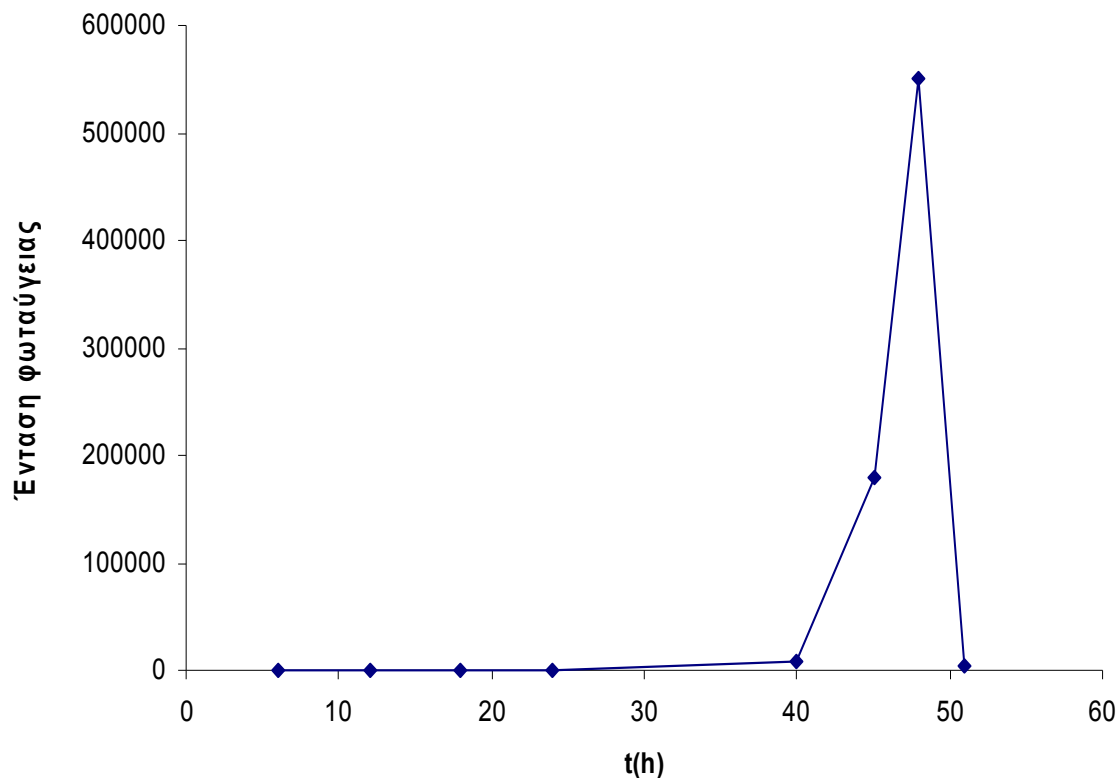
Αναπτύχθηκαν 24 νέες καλλιέργειες βακτηρίων και παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα αιωρήματα εργασίας, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 4.3, για χρόνους επώασης 8 έως 51 ώρες. Για κάθε χρόνο επώασης αναπτύσσονται 3 καλλιέργειες βακτηρίων. Τα αιωρήματα εργασίας που προκύπτουν δοκιμάστηκαν στον αυτοματοποιημένο αναλυτή ροής είτε σαν ενιόμενο δείγμα ή σαν φέρον ρεύμα.

Στο πείραμα αυτό δοκιμάζονται δύο διατάξεις του αυτοματοποιημένου αναλυτή ροής. Αμφότερες διατάξεις είναι μονοδιαυλικές. Στην πρώτη, φέρον ρεύμα είναι το διάλυμα ανασύστασης στη ροή του οποίου ενιόνται μέσω της βαλβίδας έγχυσης 50 μL από το βιοφωταυγές αιώρημα εργασίας των βακτηρίων, με ταχύτητα ροής 1,5 mL/min. Ακολούθως μετρείται η ένταση φωταύγειας σε σχετικές μονάδες από τον ανιχνευτή. Τιμή της έντασης (μετρούμενη αναλυτική παράμετρος) θεωρείται το ύψος της κορυφής που εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή. Διαγραμματικά:



Σχήμα 4.1. Αυτοματοποιημένος αναλυτής εισαγωγής δείγματος σε ροή. **D**: μονάδα ανιχνευτή; **IV**: βαλβίδα έγχυσης; **W**: απόβλητα; a: ψηφιακές γραμμές ελέγχου και b: γραμμή λήψεως δεδομένων.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 4.2:

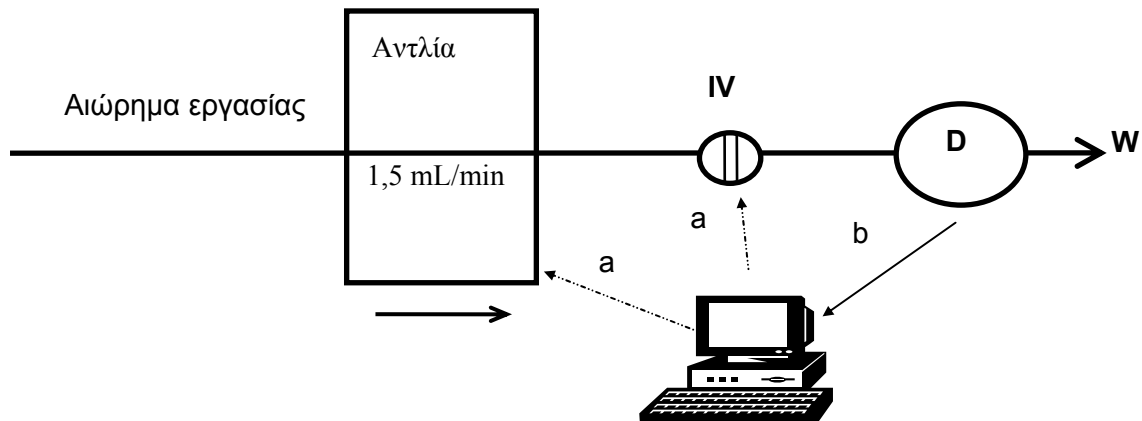


Σχήμα 4.2. Ένταση φωταύγειας αιωρήματος εργασίας συναρτήσει του χρόνου επώασης, με έγχυση 50μL σε φέρον ρεύμα διαλύματος ανασύστασης.

Οι τιμές έντασης φωταύγειας του παραπάνω διαγράμματος είναι ο μέσος όρος των 3 υψών κορυφών που καταγράφονται στον οθόνη του υπολογιστή (τρία αιωρήματα για κάθε επιλεγμένο χρόνο επώασης. Παρατηρείται ότι το σήμα είναι μηδενικό για το πρώτο 24ωρο, πράγμα αναμενόμενο αφού δεν έχουν αναπτυχθεί βακτήρια όπως αναφέρεται και στο εδάφιο 4.2. Μικρή σχετικά ένταση βιοφωταύγειας καταμετρείται μετά την έλευση 40 ωρών επώασης. Στις 48 ώρες παρατηρείται η μέγιστη τιμή έντασης φωταύγειας.

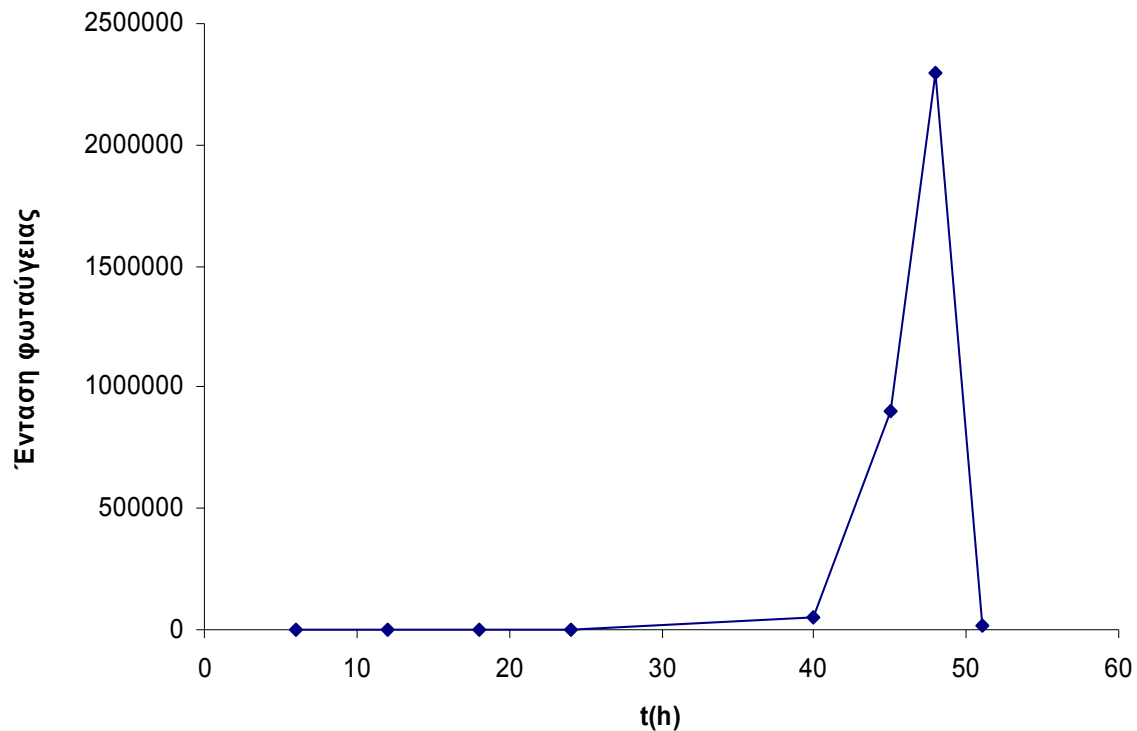
Στις 51 ώρες επώασης παρατηρείται κατακόρυφη πτώση της φωταύγειας των βακτηρίων. Αυτό αποδεικνύει και πειραματικά τον τρόπο με τον οποίο φωτίζουν τα βιοφωταυγή βακτήρια *Vibrio fischeri*, δηλαδή με το φαινόμενο Quorum Sensing (εδάφιο 1.5.1.): τα βακτήρια εκπέμπουν φωτεινή ακτινοβολία μόνο όταν βρίσκονται εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής πληθυσμού των. Από κει και πέρα, παύουν να ακτινοβολούν. Γι' αυτό είναι σημαντικό να καθορίζεται κάθε φορά η περιοχή φωταύγειας των αιωρημάτων εργασίας ώστε να μετρούνται όσο το δυνατόν μεγαλύτερης έντασης σήματα στον ανιχνευτή.

Στη δεύτερη διάταξη εφαρμόζεται μονοδιαυλικό σύστημα ροής με τη διαφορά ότι σε αυτό, το φέρον ρεύμα είναι το αιώρημα εργασίας των βακτηρίων. Η ταχύτητα ροής είναι και εδώ 1,5 mL/min και ενίονται μέσω της βαλβίδας έγχυσης 50 μ L από το αιώρημα εργασίας των βακτηρίων. Διαγραμματικά παριστάνεται στο σχήμα 4.3:



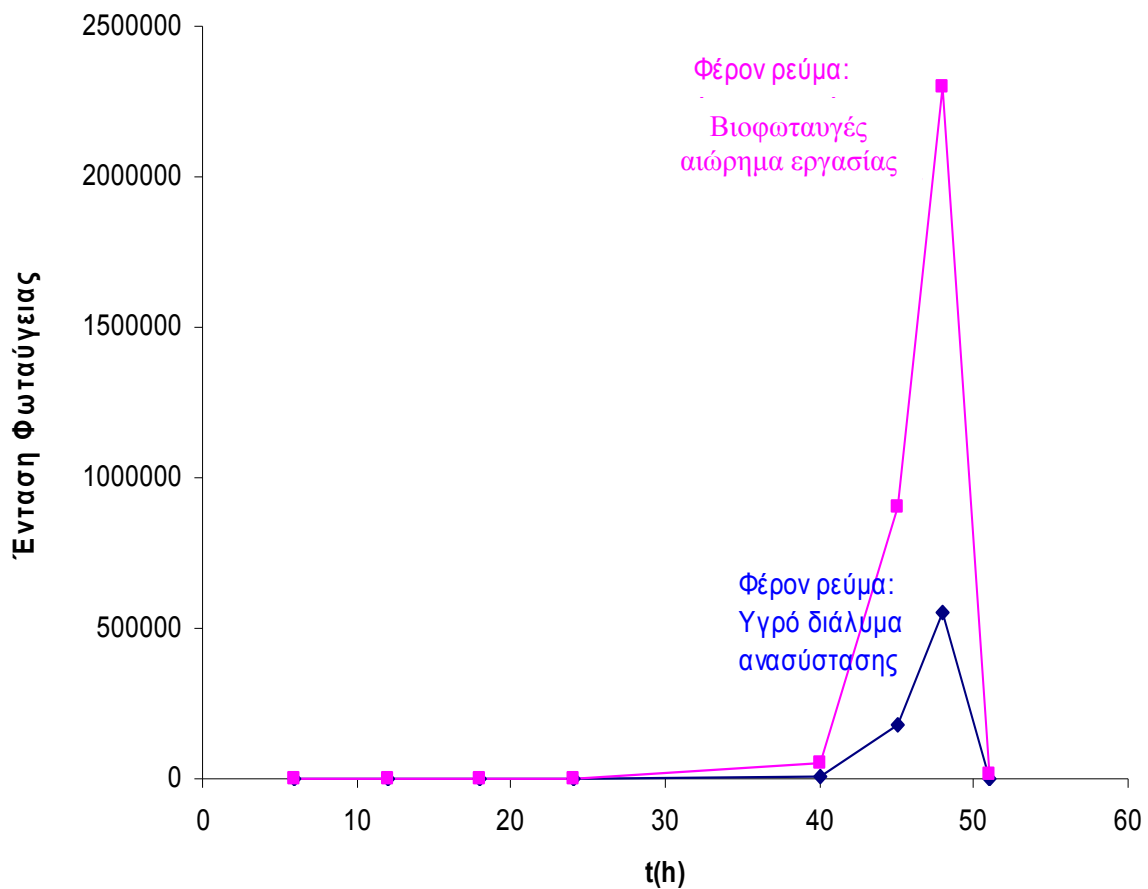
Σχήμα 4.3. Αυτοματοποιημένος αναλυτής εισαγωγής δείγματος σε ροή. **D:** μονάδα ανιχνευτή; **IV:** βαλβίδα έγχυσης; **W:** απόβλητα; **a:** ψηφιακές γραμμές ελέγχου και **b:** γραμμή λήψεως δεδομένων.

Τα αποτελέσματα για αυτή τη σειρά πειραμάτων σ'αυτήν την πειραματική διάταξη παρουσιάζονται στο σχήμα 4.4:



Σχήμα 4.4. Ένταση φωταύγειας αιωρήματος εργασίας συναρτήσει του χρόνου επώασης, με έγχυση 50μL σε φέρον ρεύμα αιωρήματος εργασίας. Σημειώνεται ότι ενίεται αιώρημα βακτηρίων *Vibrio fischeri* σε αιώρημα *Vibrio fischeri*.

Παρατηρείται ίδια τάση με αυτήν της πρώτης διαμόρφωσης: μηδενικής έντασης φωταύγεια για το πρώτο 24ωρο, μέγιστο έντασης φωταύγειας στις 48 ώρες επώασης καθώς και κατακόρυφη πτώση της έντασης ακτινοβολίας στις 51 ώρες. Σε εκείνο που διαφέρουν οι δυο διαμορφώσεις είναι ότι οι μετρούμενες εντάσεις ακτινοβολίας για τον ίδιο χρόνο επώασης είναι πολύ μεγαλύτερες στη δεύτερη διάταξη (πχ 2.400.000 έναντι 550.000 για χρόνο 48 ωρών) όπως φαίνεται στο σχήμα 4.4. Αυτό είναι λογικό αφού στη δεύτερη, φωταύγεια έχει και το φέρον ρεύμα. Συγκριτικό διάγραμμα μετρήσεων για τις δύο διατάξεις φαίνεται στο σχήμα 4.5.



Σχήμα 4.5. Συγκριτικό διάγραμμα μετρήσεων για τις δύο διαμορφώσεις με διαφορετικό φέρον ρεύμα.

Η δεύτερη δοκιμασθείσα διαμόρφωση παρότι παρουσιάζει μεγαλύτερα σήματα έντασης φωταύγειας από την πρώτη, έχει τρία ουσιώδη μειονεκτήματα:

α) Επιλέγοντας για φέρον ρεύμα το βιοφωταυγές αιώρημα εργασίας βακτηρίων υπάρχει μεγάλη κατανάλωσή του. Στην πρώτη διαμόρφωση, απαιτούνται συνολικά μόλις 0,500 mL βιοφωταυγούς αιωρήματος εργασίας (100 μ L που θα ενίνονται και 400 μ L για την έκπλυση-πλήρωση της βαλβίδας έγχυσης. Στη δεύτερη διαμόρφωση, η κατανάλωση είναι πολύ μεγαλύτερη, περίπου 4 mL, αφού χρειάζεται να πληρωθεί όλη η διαδρομή από την περισταλτική αντλία μέχρι και τα απόβλητα.

β) Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων στη δεύτερη διαμόρφωση είναι σημαντικά μικρότερη από εκείνη της πρώτης διαμόρφωσης. Συγκεκριμένα στην πρώτη διαμόρφωση η επαναληψιμότητα τριών μετρήσεων ήταν 4,8% RSD ενώ της δεύτερης ήταν χειρότερη από 10% RSD. Πρέπει να τονιστεί ότι η χαμηλή επαναληψιμότητα είναι αναμενόμενη αφού δεν πρέπει να ξεχνά κανείς ότι το αιώρημα εργασίας βακτηρίων δεν είναι ένα ομοιογενές χημικό διάλυμα εργασίας (διαλύτη-διαλυμένης ουσίας). Συνεπώς με την πάροδο του χρόνου υπάρχουν έντονα φαινόμενα καθίζησης τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της αρχικής μικρής ομοιογένειας. Αυτό το πρόβλημα υφίσταται σε μικρότερο βαθμό για την πρώτη διαμόρφωση μιας και γίνεται χειρισμός μόλις 0,5 mL αιωρήματος.

γ) Στην δεύτερη διαμόρφωση παρατηρήθηκε ότι αναπτύσσονταν μεγάλες πιέσεις που είχαν σαν αποτέλεσμα την αποσύνδεση των διαύλων PTFE. Αυτό προφανώς οφείλεται σε εγκλωβισμό, απόθεση των βακτηρίων *Vibrio fischeri* στους στενούς διαύλους εσωτερικής διαμέτρου 0,5 mm.

Εκτός αυτών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με φέρον ρεύμα αυτούσια την αναπτυγμένη καλλιέργεια βακτηρίων (χωρίς φυγοκέντρηση και επαναιώρηση σε διάλυμα ανασύστασης). Σε αυτήν την προσέγγιση παρουσιάστηκαν τα τρία προηγούμενα μειονεκτήματα καθώς και άλλα δύο :

α) Η παρουσία του θρεπτικού υλικού επάγει την αύξηση του αριθμού τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη συνεχή μεταβολή της βιοφωταύγειας, στο αυτοματοποιημένο σύστημα, με επκόλουθο αποτέλεσμα την ολίσθηση της γραμμής βάσης.

β) Η έκπλυση της κυψελίδας ροής είναι πιο δύσκολη και χρονοβόρα αφού το θρεπτικό υλικό έχει μεγαλύτερο ιξώδες και το υλικό του προσκολλάται πιο έντονα στα τοιχώματα των πλακών plexiglass της κυψελίδας.

Από αυτά τα πρωταρχικά-ενδεικτικά πειράματα που περιγράφησαν ακριβώς προηγουμένως εξάγονται τα παρακάτω σημαντικά συμπεράσματα που βοήθησαν στην περαιτέρω ανάπτυξη και βελτιστοποίηση του αυτοματοποιημένου αναλυτή-βιοαισθητήρα:

1) Η χρησιμοποίηση καλλιέργειας βακτηρίων ή αιωρήματος εργασίας ως φέρον ρεύμα με έγχυση του δείγματος (διάλυμα ρύπων, αντιοξειδωτικών κ.α όπως θα αναφερθεί στα επόμενα κεφάλαια) δεν είναι δυνατή λόγω της πολύ χαμηλής επαναληψιμότητας, της μεγάλης κατανάλωσης αιωρημάτων βακτηρίων και των τεχνικών προβλημάτων στον αυτοματοποιημένο αναλυτή ροής.

2) Η εφαρμογή διδιαυλικού συστήματος ροής με το αιώρημα εργασίας βακτηρίων στον ένα δίαυλο θα είχε τα ίδια μειονεκτήματα. Συνεπώς η εφαρμογή μονοδιαυλικού συστήματος είναι η καταλληλότερη.

3) Απαιτείται αύξηση της επαναληψιμότητας της εισαγωγής σε ροή του βακτηριακού αιωρήματος.

4) Είναι σημαντική η μείωση του χρόνου ανάπτυξης του βιοφωταυγούς αιωρήματος εργασίας *Vibrio fischeri* από 48 ώρες.

4.6. Ελαχιστοποίηση χρόνου ανάπτυξης αιωρήματος εργασίας

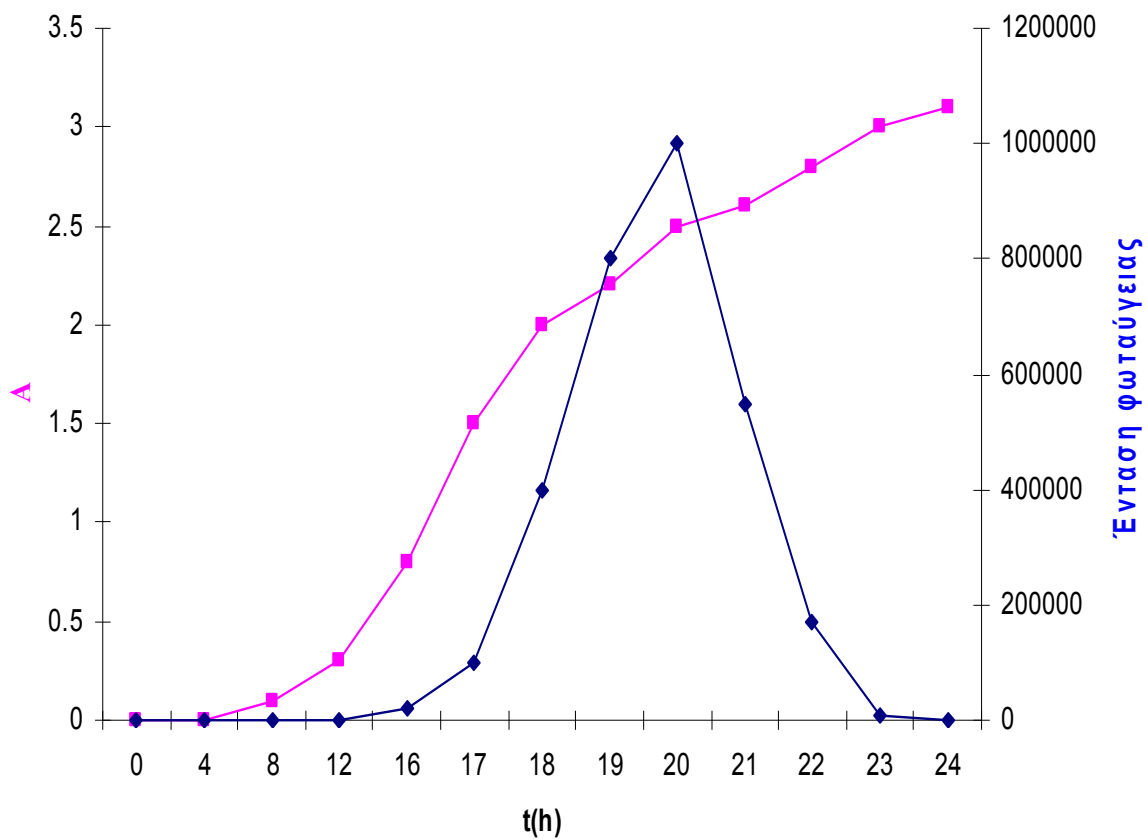
Πραγματοποιήθηκε πείραμα με σκοπό να μελετηθεί το χρονικό παράθυρο στο οποίο εκπέμπουν φως τα βιοφωταυγή βακτήρια ώστε να επιλεγθεί η βέλτιστη στιγμή απομόνωσής τους. Όπως προαναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο (4.5) οι συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας είχαν ως αποτέλεσμα να αναπτύσσονται οι καλλιέργειες βακτηρίων σε 48 περίπου ώρες. Το γεγονός μάλιστα ότι με τον μικροβιολογικό κρίκο εμβαπτίζεται κάθε φορά ένας τυχαίος και μη επαναλήψιμος όγκος βακτηριακού αιωρήματος παρακαταθήκης στα 50 mL θρεπτικού διαλύματος καθιστούσε ανακριβή την επιλογή του χρόνου.

Γι' αυτό εισήχθησαν διαφορετικοί όγκοι αιωρήματος παρακαταθήκης βακτηρίων στις κωνικές φιάλες των 100 mL με τα 50 mL θρεπτικού διαλύματος και δοκιμάστηκαν διαφορετικές

ταχύτητες ανάδευσης και διαφορετικές θερμοκρασίες στον επωαστικό αναδευτήρα για καλλιέργειες διαφορετικής επώασης. Στα πειράματα αυτά απόκριση ήταν η απορρόφηση στα 600nm και η ένταση της φωταύγειας.

Από αυτές τις δοκιμές επιλέχθηκε να ενίονται 20 μL αιωρήματος παρακαταθήκης βακτηρίων στα 50 mL θρεπτικού διαλύματος, η θερμοκρασία επώασης να είναι σταθερή στους 21 $^{\circ}\text{C}$, η ταχύτητα ανάδευσης να είναι σταθερή και ίση με 190 rpm (στροφές ανά λεπτό). Σε αυτές τις συνθήκες όπως φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα 4.6 η μέγιστη ένταση καλλιέργειας επιτυγχάνεται μετά από 20 ώρες επώασης.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται καθαρά το φαινόμενο Quorum Sensing: Μετά τις 20 ώρες αν και ο πληθυσμός των βακτηρίων αυξάνει, η φωταύγεια μειώνεται.

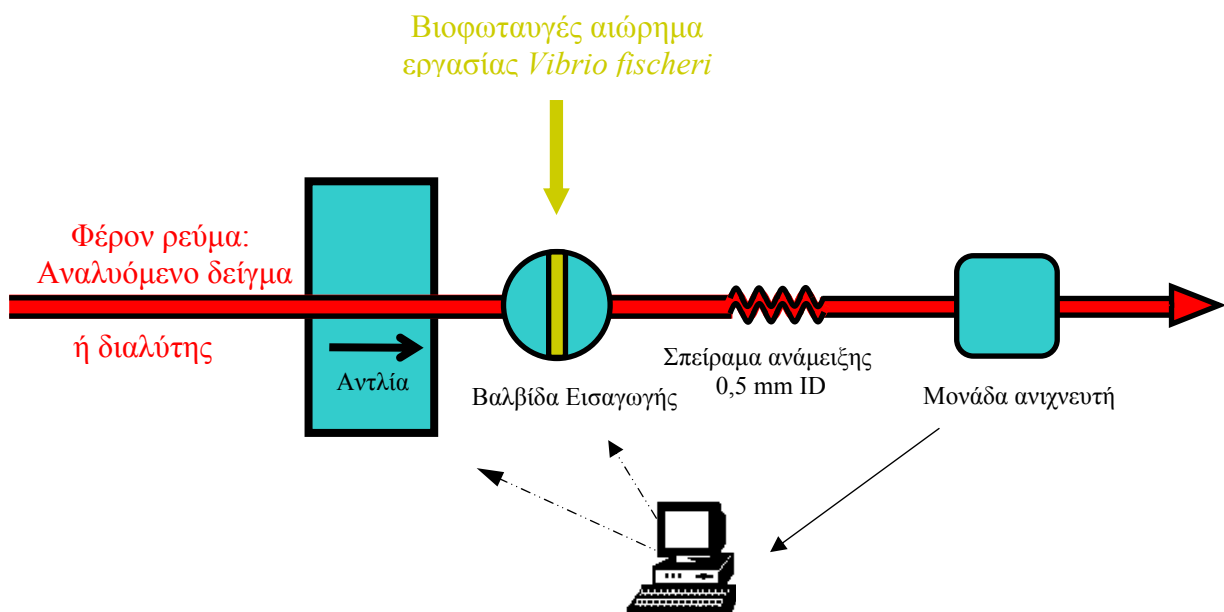


Σχήμα 4.6. Συγκριτικό διάγραμμα μετρήσεων απορρόφησης στα 600 nm και έντασης φωταύγειας με έγχυση του αιωρήματος εργασίας σε διάλυμα ανασύστασης σε μονοδιαυλικό σύστημα.

4.7. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση αναλυτή δείγματος σε ροή

4.7.1. Μονοδιαυλικό σύστημα ροής

Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 4.4 επιλέχθηκε μονοδιαυλικό σύστημα ροής. Φέρον ρεύμα είναι είτε το αναλυόμενο δείγμα ή κάποιος διαλύτης ενώ μέσω της βαλβίδας έγχυσης ενίεται συγκεκριμένος όγκος ανασυσταμένου αιωρήματος βακτηρίων. Οι συνθήκες όπως η ταχύτητα ροής, η διάμετρος των διαύλων, ο διαλύτης, το μήκος των σπειραμάτων ανάμειξης και η θερμοκρασία μεταβάλλονται ανάλογα με τον αναλύτη. Σε κάθε εφαρμογή γίνεται βελτιστοποίηση του συστήματος ροής. Ο γενικός τύπος διαμόρφωσης του αναλυτή έχει την ακόλουθη γενική μορφή:



Σχήμα 4.7. Μονοδιαυλικός αυτοματοποιημένος αναλυτής ροής εισαγωγής δείγματος

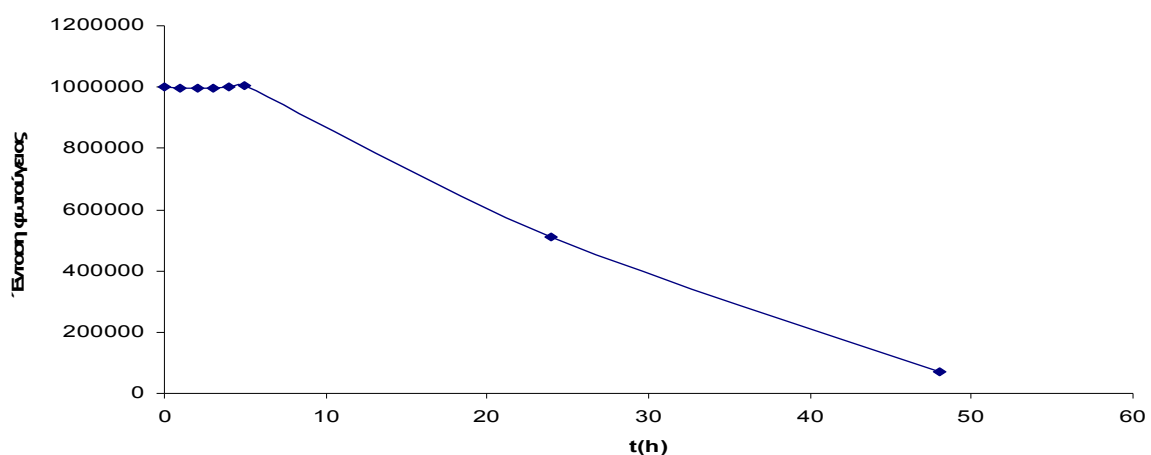
Επιλέγεται κάθε φορά κάποια ταχύτητα ροής και αφήνεται χρόνος ώστε να πληρωθούν όλοι οι δίαυλοι με τον αναλύτη ή το διαλύτη. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα πληρώνεται η βαλβίδα εισαγωγής με το αιώρημα εργασίας των βακτηρίων. Το χρονικό διάστημα αυτό είναι απαραίτητο ώστε να εκπλυθούν οι δίαυλοι του αναλύτη από τον προηγούμενο, να

αποκατασταθεί σταθερή πίεση στο σύστημα ροής καθώς και για να απομακρυνθούν τυχούσες φυσαλίδες που δημιουργούν σφάλματα στη μέτρηση φωταύγειας από τον ανιχνευτή.

4.7.2. Σταθερότητα αιωρήματος εργασίας

Σημαντική παράμετρος για την εφαρμογή των *Vibrio fischeri* στο σύστημα ροής που αναπτύχθηκε είναι η σταθερότητα της έντασης φωταύγειας στον χρόνο. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γίνει η καλλιέργεια *Vibrio fischeri* με τέτοιο τρόπο ώστε η φωταύγεια να παραμένει σταθερή για όσο το δυνατό μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Με τον τρόπο αυτό δίνεται η δυνατότητα για πολλαπλές μετρήσεις χρησιμοποιώντας το ίδιο αιώρημα εργασίας. Ο όγκος του αιωρήματος εργασίας είναι 40 mL, οπότε, για μια μέτρηση που ολοκληρώνεται σε 1 λεπτό απαιτούνται 0,5 mL αιωρήματος εργασίας είναι ιδιαίτερα σημαντικό να έχουμε σταθερή φωταύγεια για περίπου 1 ώρα και 20 λεπτά.

Για τον έλεγχο της σταθερότητας της φωταύγειας το αιώρημα εργασίας φυλάσσεται στην κατάψυξη στους -20°C και ανά ώρα ενίονται 50 μL στη ροή του διαλύματος ανασύστασης, αφού πρώτα έλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθως καταγράφεται η ένταση της ακτινοβολίας από τον ανιχνευτή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα 4.8:



Σχήμα 4.8. Σταθερότητα αιωρήματος εργασίας βακτηρίων φυλασσόμενου στους -20°C .

Όπως μπορεί να διαπιστώσει κανείς από το παραπάνω διάγραμμα το αιώρημα βακτηρίων διατηρεί σταθερή τη φωταύγειά του για τουλάχιστον 5 ώρες. Σε πείραμα κατά το οποίο το αιώρημα εργασίας δεν φυλάσσεται στην κατάψυξη, μεταξύ των διαδοχικών μετρήσεων η φωταύγεια παρέμεινε σταθερή για μόλις μισή ώρα.

4.7.3. Επαναληψιμότητα

Όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 4.4 η επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην επιλεγείσα μονοδιαυλική διαμόρφωση του αναλυτή ροής δεν ήταν ικανοποιητική λόγω της καθίζησης των βιοφωταυγών βακτηρίων με την πάροδο του χρόνου στον περιέκτη τους. Η παρατήρηση αυτή έδωσε την ιδέα χρησιμοποίησης μικρότερου όγκου δοχείου (15 mL) στο οποίο τοποθετείται μικρός μαγνητικός αναδευτήρας 1 cm. Με συνεχή και σταθερή ανάδευση του βακτηριακού αιωρήματος εργασίας σε δοχείο μικρού όγκου επιτεύχθηκε μία πολύ καλή ομοιογένεια στη συγκέντρωση των βακτηρίων του διαλύματος ανασύστασης. Σημειώνεται ότι υψηλές ταχύτητες ανάδευσης καταπονούν μηχανικά τα βακτήρια και έχουν σαν αποτέλεσμα πιθανή καταστροφή της μεμβράνης τους, που προκαλεί μείωση της φωταύγειας. Μεγάλη ταχύτητα ανάδευσης είναι δυνατόν να δημιουργήσει δίνη με επακόλουθη συνέπεια την αναρρόφηση αέρα αντί του αιωρήματος εργασίας στον βρόχο δειγματοληψίας με επακόλουθο την καταγραφή θορυβωδών σημάτων.

Με την ανάδευση του βιοφωταυγούς αιωρήματος εργασίας πραγματοποιήθηκαν 10 διαδοχικές εγχύσεις των 100 μ L σε φέρον ρεύμα διαλύματος ανασύστασης. Η ταχύτητα ροής ήταν 1,5mL/min. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2: Επαναληψιμότητα 10 διαδοχικών εγχύσεων 100 μL βακτηριακού αιωρήματος εργασίας.

Α/Α έγχυσης	Ένταση Βιοφωταύγειας, αυθαίρετες μονάδες
1	$1,060 \times 10^6$
2	$1,040 \times 10^6$
3	$1,057 \times 10^6$
4	$1,049 \times 10^6$
5	$1,049 \times 10^6$
6	$1,050 \times 10^6$
7	$1,048 \times 10^6$
8	$1,065 \times 10^6$
9	$1,049 \times 10^6$
10	$1,054 \times 10^6$
Μέσος όρος	$1,052 \times 10^6$
Τυπική απόκλιση	7094
%Τυπική απόκλιση	0,7

Όπως φαίνεται με την ανάδευση του αιωρήματος εργασίας αυξάνεται η επαναληψιμότητα των μετρήσεων σε ικανοποιητικότατο βαθμό (0,7 % RSD, $n=10$). Το πείραμα αυτό επαναλήφθηκε για 20 διαδοχικές εγχύσεις. Η επαναληψιμότητα τώρα βρέθηκε να είναι 7% RSD, $n=20$. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά αποφασίστηκαν τα εξής:

A) Να χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας εντός του περιέκτη αιωρήματος εργασίας όγκου 15 mL.

B) Να χρησιμοποιούνται 12 διαδοχικές εγχύσεις με χρήση της ίδιας ποσότητας του αιωρήματος εργασίας, παρόλο που σε αυτό το πείραμα μόλις 100 μL βακτηριακού αιωρήματος ενίονται στη ροή του φέροντος ρεύματος, καταναλώνονται ακόμα 400 μL βακτηριακού αιωρήματος για την πλήρωση των βρόγχων του συστήματος ροής και απομάκρυνση τυχουσών φυσαλιδών. Συνεπώς για 12 εγχύσεις σε αυτό το σύστημα θα

καταναλωθούν συνολικά περίπου 6 mL με καλή επαναληψιμότητα. Μετά τις 12 εγχύσεις καινούρια ποσότητα του βιοφωταυγούς αιωρήματος εργασίας τοποθετείται στον περιέκτη.

Βελτιστοποίηση εγχυόμενου όγκου αιωρήματος εργασίας

Ελέγχθηκε η χρήση των ακόλουθων όγκων ενιόμενου βακτηριακού αιωρήματος εργασίας για δέκα διαδοχικές εγχύσεις: 80, 100 και 200 μL . Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3. Πειράματα βελτιστοποίησης ενιόμενου όγκου βιοφωταυγούς αιωρήματος εργασίας για 10 διαδοχικές εγχύσεις.

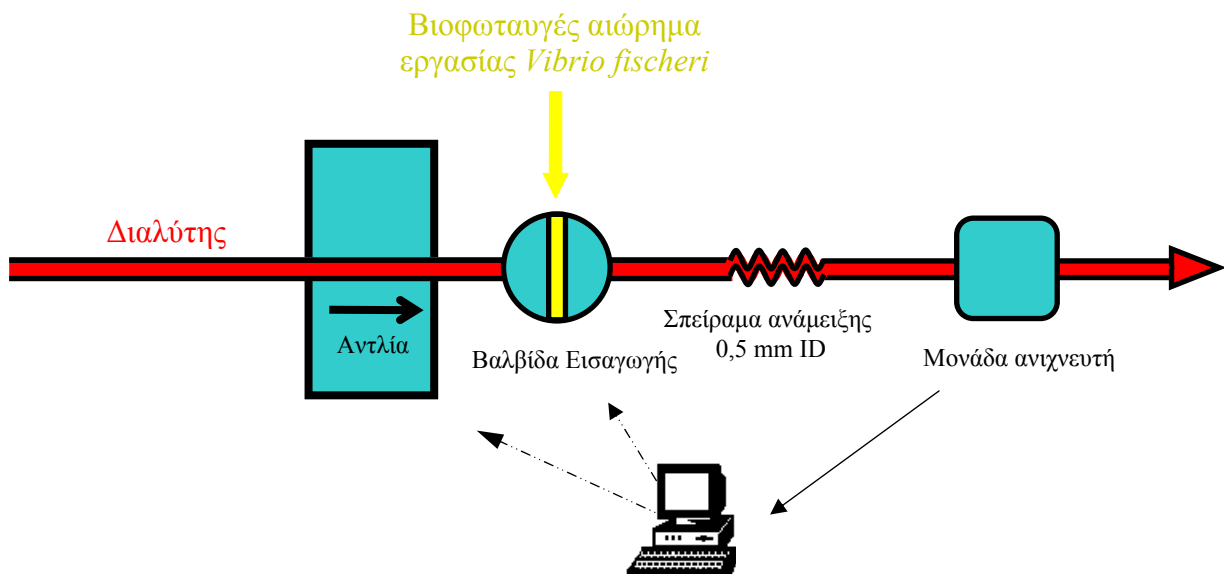
Όγκος (μL) εγχυόμενου αιωρήματος εργασίας	Ένταση βιοφωταύγειας, αυθαίρετες μονάδες	% RSD, n=10	Καταναλισκόμενος όγκος αιωρήματος, μL , για μία έγχυση
80	$8,41 \times 10^5$	0,6	480
100	$1,052 \times 10^6$	0,7	500
200	$2,010 \times 10^6$	7	600

Για 80 μL ενιόμενου βιοφωταυγούς αιωρήματος βακτηρίων η επαναληψιμότητα ήταν στα ίδια επίπεδα με αυτή των 100 μL και η κατανάλωση κατά 20 μL λιγότερη (περίπου 480 μL για κάθε ένεση). Όμως το μετρούμενο σήμα φωταύγειας (ύψος κορυφής) ήταν σημαντικά μικρότερο (περίπου 20% μικρότερη η ένταση φωταύγειας σε σχέση με αυτή των 100 μL) κάτι το οποίο είναι σημαντικό μειονέκτημα κατά την μέτρηση χαμηλών σημάτων φωταύγειας. Χαμηλά σήματα αναμένονται σε δείγματα υψηλής τοξικότητας. Από την άλλη, η χρήση βρόγχου των 200 μL μπορεί μεν να αυξάνει τα μετρούμενα φωτεινά σήματα (περίπου 100% μεγαλύτερη από αυτή των 100 μL) αλλά έχει το μειονέκτημα της μεγαλύτερης κατανάλωσης αιωρήματος εργασίας βακτηρίων (περίπου 600 μL ανά έγχυση) και ακόμα σημαντική μείωση της επαναληψιμότητας (7% RSD). Γι'αυτούς τους λόγους επιλέχθηκε να εγχύονται 100 μL αιωρήματος εργασίας των *Vibrio fischeri*.

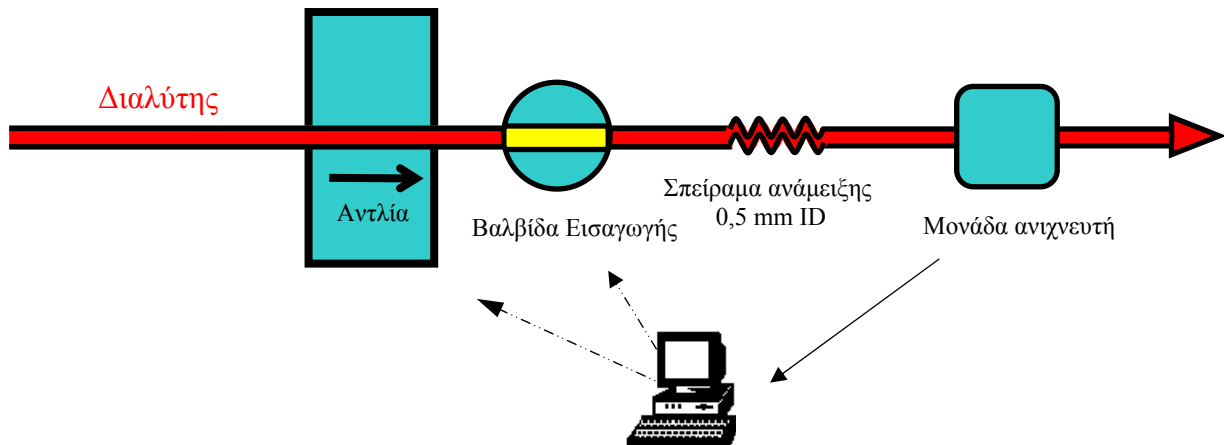
4.7.4. Εκτίμηση τοξικότητας

Για να γίνει εκτίμηση της τοξικότητας ενός διαλύματος υπολογίζεται η % παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας του σύμφωνα με το ακόλουθο πειραματικό πρωτόκολλο:

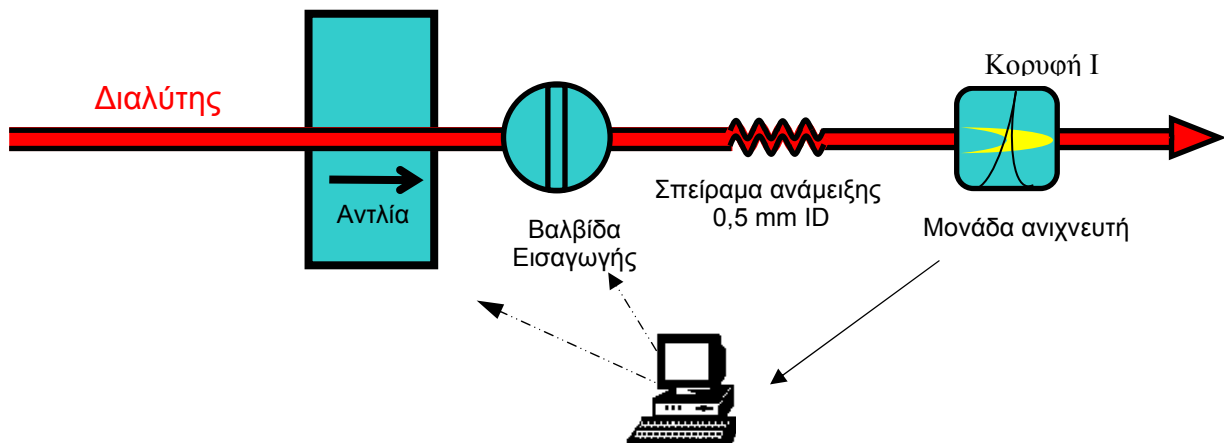
1ο στάδιο: Το πρώτο βήμα είναι η εκτίμηση της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri* με εισαγωγή τους στη ροή του διαλύτη (τυφλό). Εγχέονται 100 μL του αιωρήματος εργασίας των *Vibrio fischeri* στη ροή του φέροντος ρεύματος-διαλύτη. Τα 100 μL βιοφωταυγούς αιωρήματος αναμιγνύονται με το διαλύτη καθώς ρέουν μέσω του σπειράματος ανάμειξης προς τον ανιχνευτή. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στα σχήματα 4.9-4.11. Το σήμα που καταγράφεται από τον ανιχνευτή παρουσιάζεται ως κορυφή I, σχήμα 4.11 ή στην εικόνα 17.



Σχήμα 4.9. Πλήρωση βαλβίδας έγχυσης με αιώρημα εργασίας *Vibrio fischeri*.



Σχήμα 4.10 Εισαγωγή 100 µL του αιωρήματος εργασίας *Vibrio fischeri* στη ροή του διαλύτη.



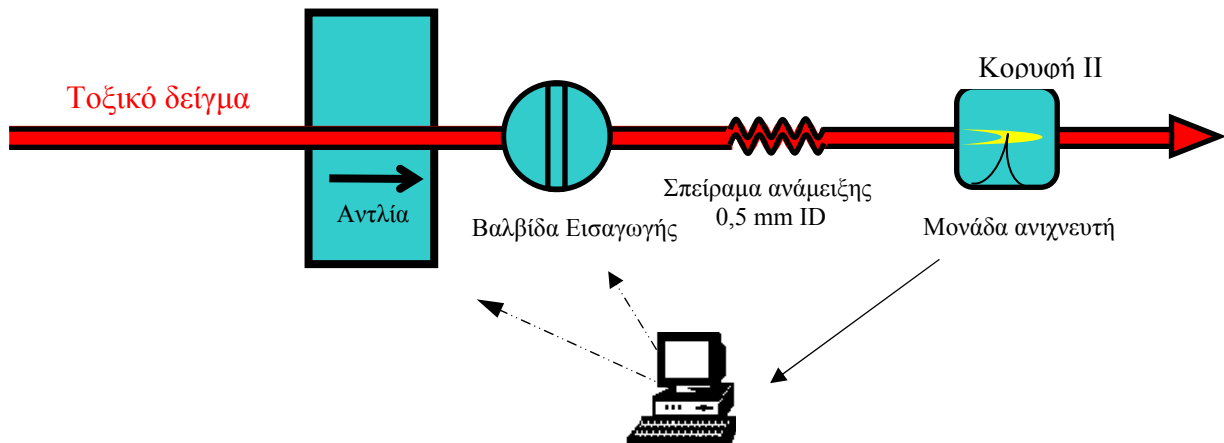
Σχήμα 4.11: Προώθηση του, αναμεμιγμένου με διαλύτη, αιωρήματος εργασίας *Vibrio fischeri* στον ανιχνευτή.

2ο Στάδιο : Εκτίμηση της βιοφωταύγειας του *Vibrio fischeri* με εισαγωγή του τοξικού διαλύματος-ρύπου. Ακολουθείται ακριβώς η διαδικασία που ακολουθήθηκε στο 1ο στάδιο με

τη διαφορά ότι τώρα φέρον ρεύμα είναι το τοξικό δείγμα. Εδώ αναμένεται μικρότερη σε ύψος μετρούμενη κορυφή II, σχήμα 4.11 ή εικόνα 17.

Οι υπολογισμοί γίνονται με χρήση των δύο κορυφών που λαμβάνονται:

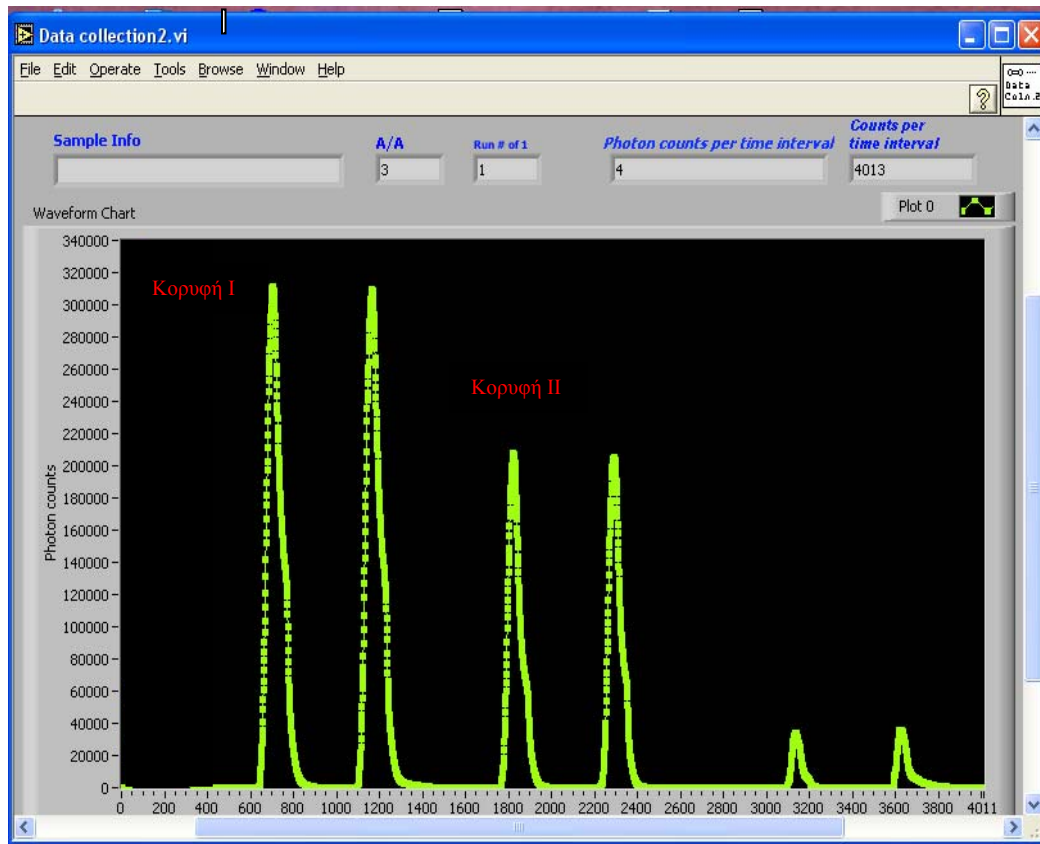
$$\% \text{ παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας} = (\text{Κορυφή I} - \text{Κορυφή II}) \times 100 / \text{Κορυφή I} \quad (4.1)$$



Σχήμα 4.12: Προώθηση του, αναμειγμένου με το τοξικό δείγμα, αιωρήματος εργασίας *Vibrio fischeri* στον ανιχνευτή.

Με βάση το παραπάνω περιγραφέν πειραματικό πρωτόκολο εκτίμησης της % παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό-ενδεικτικό πείραμα. Το τοξικό δείγμα ήταν κάθε φορά υδατικό διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης μετάλλου. Για κάθε τοξικό διάλυμα καθώς και για το διαλύτη (δηλαδή το απιονισμένο νερό) γίνονταν 2 εγχύσεις 100 μL αιωρήματος *Vibrio fischeri*.

Οι παραμέτροι του συστήματος ήταν: όγκος εισαγόμενου αιωρήματος 100 μL , ταχύτητα ροής 1,5 mL/min και μήκος του σπειράματος ανάμειξης, 100 cm. Στην οθόνη του υπολογιστή στο λογισμικό Labview που αναπτύχθηκε λαμβάνεται το παρακάτω καταγράφημα (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Καταγράφημα προσδιορισμού τοξικότητας. Οριζόντιος άξονας: χρόνος (s), κατακόρυφος: ένταση βιοφωταύγειας. Βιοφωταύγεια από αριστερά προς τα δεξιά: λευκού (1η και 2η κορυφή), διαλύματος ρύπου 3,0 mM (3η και 4η κορυφή) και 10,0 mM (5η και 6η κορυφή).

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι με αυτό το αρχικό πείραμα αναδεικνύεται η δυνατότητα εκτίμησης τοξικότητας κάποιου ρύπου μέσω της πτώσης της έντασης της φωταύγειας των βιοφωταυγών βακτηρίων. Το σύστημα ροής μπορεί με τον κατάλληλο τρόπο καλλιέργειας και χρήσης των βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* μαζί με την απαραίτητη βελτιστοποίηση των συνθηκών ροής να αποτελέσει έναν ταχύ, ακριβή, επαναλήψιμο αυτοματοποιημένο κυτταρικό βιοαισθητήρα. Σύμφωνα με τα όσα περιγράψαμε σε αυτό το κεφάλαιο λοιπόν και με βάση το προαναφερθέν πρωτόκολλο εκτίμησης της % παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας σχεδιάστηκαν και τα επόμενα πειράματα προσδιορισμού τοξικότητας διαφόρων κατηγοριών ρύπων όπως βαρέα μέταλλα, φαινολικές

ενώσεις, αλδεϋδικές ενώσεις κ.λ.π όπως και της προσπάθεια εφαρμογής αυτών των βιοαισθητήρων για την εκτίμηση της ποιότητας διαφόρων θερμικώς καταπονημένων ελαίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΒΙΟΦΩΤΑΥΓΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

5.1. Εισαγωγή

Η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης προβλέπει τον έλεγχο της ποιότητας των υδάτων και την εκτίμηση του βαθμού ρύπανση τους τόσο με χημικές μεθόδους όσο και με βιοδοκιμές. Οι χημικές μέθοδοι, σε αντίθεση με τις βιοδοκιμές, δεν συνεκτιμούν συνεργιστικές και ανταγωνιστικές δράσεις οι οποίες είναι δυνατόν να επηρεάσουν την βιοδιαθεσιμότητα και κατά συνέπεια την τοξικότητα διαφόρων τάξεων ρυπαντών. Οι βιοδοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εκτίμηση της τοξικότητας για προκαταρκτικό ημιποσοτικό έλεγχο πριν την εκτέλεση λεπτομερών χημικών αναλύσεων.

Μία κατηγορία ρύπων είναι τα βαρέα μέταλλα. Εφαρμογές ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων για προκαταρκτικό ημιποσοτικό έλεγχο βαρέων μετάλλων είναι οι βιοαισθητήρες [102]. Μικροοργανισμοί που περιέχουν γονίδια λουξ άρχισαν να χρησιμοποιούνται παράλληλα με τις χημικές αναλύσεις κατά τα τελευταία έτη. Το θαλάσσιο φωτοβακτήριο *Vibrio fischeri* αποτελεί αυτοσυντηρούμενη μονάδα “αντιδραστήριο” φωταύγειας.

Κενό στη βιβλιογραφία αποτελεί το γεγονός ότι δεν υπάρχουν μέθοδοι βασισμένες στην εφαρμογή των βακτηρίων αυτών σε αυτοματοποιημένα συστήματα ώστε να γίνουν διαθέσιμες ολοκληρωμένες διατάξεις για ταχείς ελέγχους και συνεχή παρακολούθηση. Ακολουθεί λοιπόν σ’ αυτό το κεφάλαιο ανάπτυξη αυτοματοποιημένης μεθόδου-τεχνικής ροής για προσδιορισμό τοξικότητας βαρέων μετάλλων έχοντας σαν αναλυτική παράμετρο την % παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri*.

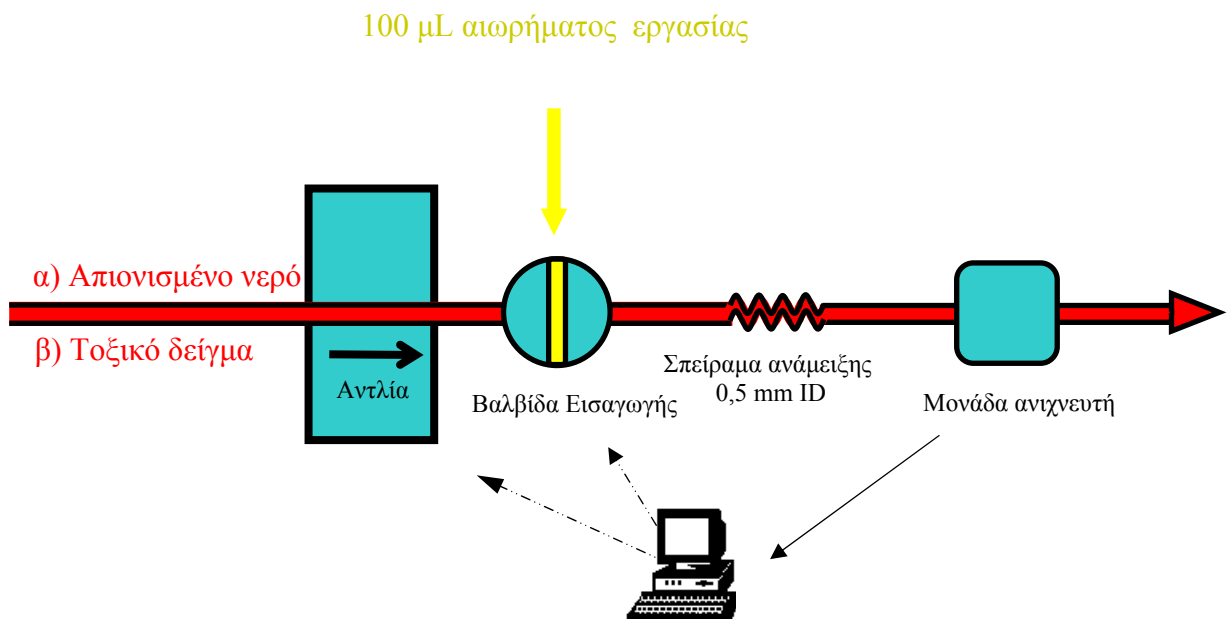
5.2. Πειραματικό μέρος

Αντιδραστήρια

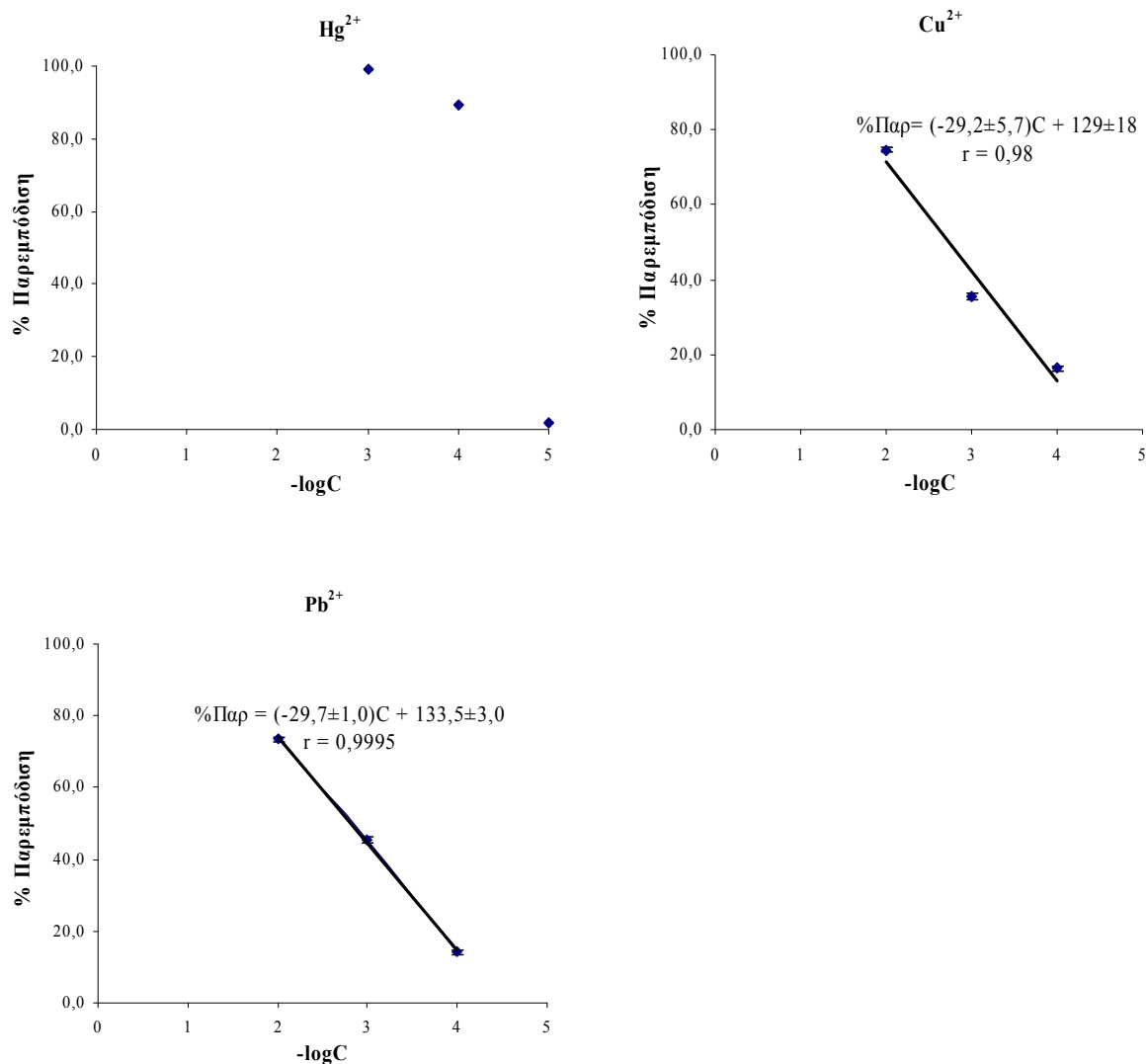
Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας της Merck (Darmstadt, Germany). Παρασκευάστηκαν πυκνά υδατικά διαλύματα παρακαταθήκης κατιόντων υδραργύρου (Hg^{2+}), χαλκού (Cu^{2+}) και μολύβδου (Pb^{2+}) συγκεντρώσεως 0,0200 M διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα HgCl_2 , $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ και $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ αντίστοιχα. Παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα οξικών και φωσφορικών με pH εύρους από 3-6 και από 7-11, αντίστοιχα. Το pH για κάθε διάλυμα ρυθμίστηκε στην ακριβή τιμή του με πυκνό διάλυμα NaOH και πυκνό διάλυμα HCl αναλυτικής καθαρότητας. Παρασκευάστηκαν διαλύματα με συγκεντρώσεις κυμαινόμενες από $1,00 \times 10^{-3}$ M έως $1,00 \times 10^{-5}$ M για τα ιόντα Hg^{2+} , $1,00 \times 10^{-2}$ M έως $1,00 \times 10^{-4}$ M για τα ιόντα Cu^{2+} και $1,00 \times 10^{-2}$ M έως $1,00 \times 10^{-4}$ M για τα ιόντα Pb^{2+} .

Μέθοδος

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία των τοξικών διαλυμάτων Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} ήταν το απιονισμένο νερό. Σημειώνεται ότι επιλέχθηκε απιονισμένο νερό και όχι διάλυμα ανασύστασης ώστε να αποφευχθούν διάφορες αλληλεπιδράσεις των συστατικών του με τα διαλυόμενα μεταλλικά ιόντα, όπως η καταβύθιση ιζημάτων. Το σήμα του τυφλού δείγματος είναι η ένταση της βιοφωταύγειας με εισαγωγή 100 μL αιωρήματος βιοφωταυγών βακτηρίων σε ρεύμα απιονισμένου ύδατος. Με αντικατάσταση του απιονισμένου ύδατος από τοξικό δείγμα καταγράφεται το σήμα του δείγματος. Ακολούθως υπολογίζεται η % παρεμπόδιση με το τρόπο που αναφέρθηκε στο εδάφιο 4.7.4. Μεταξύ της βαλβίδας έγχυσης και κυψελίδας ροής παρεμβλήθηκε σπείραμα αναμίξεως 100 cm και η ροή ήταν 1,5 mL/min. Διαγραμματικά ο αυτοματοποιημένος αναλυτή ροής φαίνεται στο σχήμα 5.1. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων κυμάνθηκε από 0,7-1,0 % RSD.



Σχήμα 5.1. Αναλυτής ροής για εφαρμογή των βιοφωταγών βιοαισθητήρων. Φέρον ρεύμα :
α) απιονισμένο νερό, β) Τοξικό δείγμα.

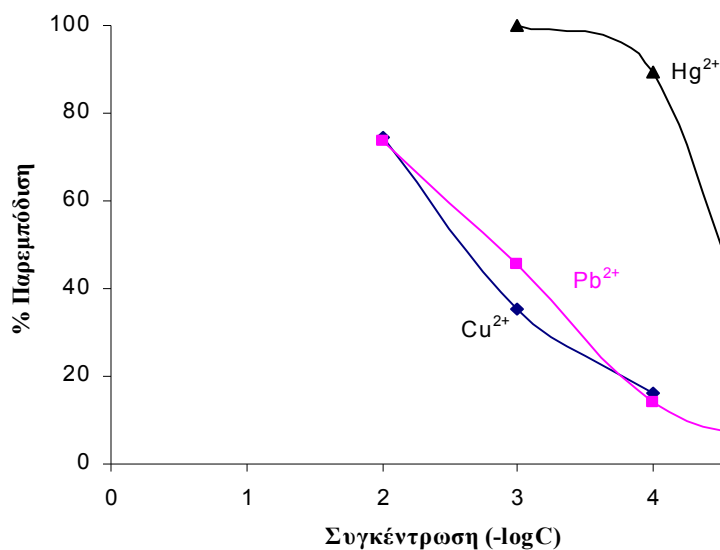


Σχήμα 5.2 Καμπύλες % παρεμπόδισης βιοφωταύγειας για κάθε αναλυόμενο τοξικό δείγμα.

Ο άξονας των συγκεντρώσεων είναι λογαριθμικός μοριακής συγκέντρωσης (C). Μπορεί να παρατηρήσει κανείς ότι δεν υπάρχει γραμμική εξάρτηση της % παρεμπόδισης (τοξικότητας) με την συγκέντρωση για όλα τα μεταλλοίοντα. Άριστη γραμμική εξάρτηση παρουσιάζει η καμπύλη της % παρεμπόδισης του δισθενούς μολύβδου (συντελεστής συσχέτισης $r = 0,9995$), λιγότερο αυτή του δισθενούς χαλκού. Για τον δισθενή υδράργυρο δεν παρατηρήθηκε γραμμικότητα. Ακόμα οι δραστικές-αποτελεσματικές συγκεντρώσεις τοξικότητας έφτασαν στα 10^{-4} M έως και 10^{-5} M. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι η σχετικά μικρή ευαισθησία του συστήματος οφείλεται στο γεγονός ότι ο χρόνος επαφής των βιοφωταυγών βακτηρίων με τα τοξικά διαλύματα είναι της τάξεως των 4 έως 5 s. Όσος χρόνος δηλαδή απαιτείται για τη

μεταφορά του επόμενου αιωρήματος μέσω του σπειράματος ανάμειξης στον ανιχνευτή. Αξίζει να σημειωθεί ότι εμπορικά συστήματα για μέτρηση τοξικότητας απαιτούν χρόνους 15-30 min για μια μέτρηση σε αντίθεση με το παρουσιαζόμενο στο οποίο απαιτούνται μόλις 1 έως 2 λεπτά.

Από το συγκεντρωτικό διάγραμμα 5.3 των τριών καμπυλών διαπιστώνεται ότι μεγαλύτερη τοξικότητα από τα τρία αυτά μεταλλικά κατιόντα είχαν αυτά του δισθενούς Hg^{2+} που σχεδόν εξάλειψαν ολοκληρωτικά τη βιοφωταγεία των *Vibrio fischeri* (99,8% παρεμπόδιση) για συγκέντρωση $1,00 \times 10^{-5} M$.

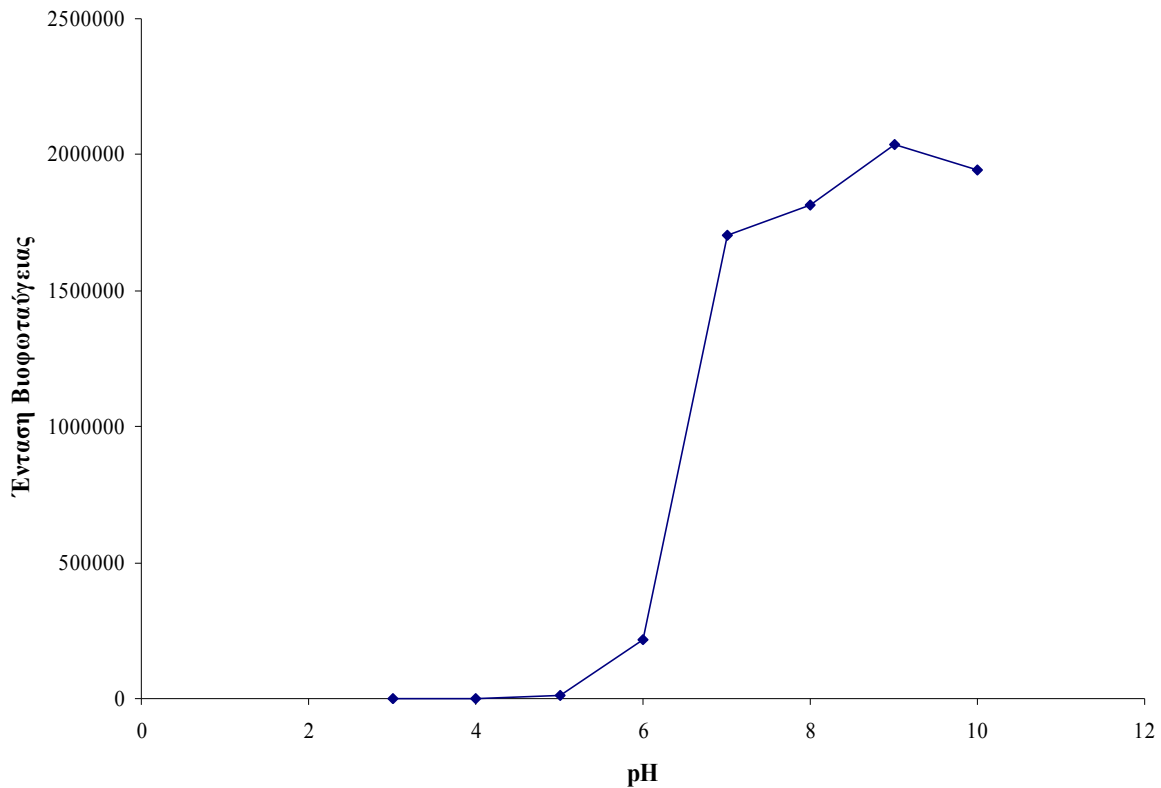


Σχήμα 5.3. Καμπύλες παρεμπόδισης για ιόντα χαλκού, μολύβδου και υδραργύρου.

5.3. Επίδραση pH

Η υδρόλυση των αλάτων τροποποιεί το pH των υδατικών διαλυμάτων. Για να επιβεβαιωθεί ότι η απόκριση του συστήματος οφειλόταν στα βαρέα μέταλλα και όχι στις μεταβολές του pH λόγω της υδρόλυσης, ελέγχθηκαν οι αποκρίσεις του συστήματος σε φέροντα ρεύματα διαφόρων pH στις περιοχές 3-10 χρησιμοποιώντας ως τυφλό $pH=5,50$ που είναι το pH του απιονισμένου νερού. Κάθε φορά φέρον ρεύμα ήταν κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα. Για κάθε σημείο του διαγράμματος γίνονται 3 εγχύσεις και το αιώρημα εργασίας ανανεώνεται κάθε 12 εγχύσεις. Σε κάθε ανανέωση τα αποτελέσματα κανονικοποιούνται σε σχέση με τις

προηγούμενες 12 εγχύσεις. Κανονικοποιημένα αποτελέσματα αυτού του πειράματος φαίνονται στο σχήμα 5.4.



Σχήμα 5.4: Ένταση της βιοφωταύγειας συναρτήσει του pH.

Από το σχήμα 5.4 συμπεραίνεται ότι η βιοφωταύγεια του *Vibrio fischeri* ευνοείται σε περιοχές pH από 5 έως 10. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το pH του αιωρήματος εργασίας των *Vibrio fischeri* ήταν 6,22.

Το pH για διαλύματα Hg^{2+} συγκεντρώσεων $1,0 \times 10^{-2} - 1,0 \times 10^{-5}$ M ήταν 3,75-4,47. για συγκεντρώσεις διαλυμάτων $1,0 \times 10^{-2} - 1,0 \times 10^{-4}$ M Cu^{2+} και Pb^{2+} το pH κυμαινόταν στις περιοχές 4,24-4,93 και 4,23-5,00, αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι η μείωση της βιοφωταύγειας που φαίνεται στο σχήμα 5.4 δεν οφείλεται στο pH αλλά στην τοξικότητα οξικών ιόντων/οξικού οξέος. Όπως αντιλαμβάνεται κανείς η διαφοροποίηση του pH η οποία οφείλεται στην υδρόλυση των μεταλλοϊόντων δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα τοξικότητας. Για να μετρηθεί η διασπορά πρώτα καταγράφεται το σήμα έντασης βιοφωταύγειας (Ds) του βιοφωταύγου αιωρήματος όταν χρησιμοποιηθεί ως φέρον ρεύμα και μετά το σήμα από 100 μL του ίδιου αιωρήματος που ενίονται σε φέρον ρεύμα απιονισμένου νερού (Do). Το σήμα Ds διαιρούμενο με το Do δίνει τη διασπορά η οποία στο αναπτυχθέν σύστημα βρέθηκε

ίση με 4,52. Αυτό σημαίνει ότι το pH στην κυψελίδα ροής ήταν μεταξύ 5,50 (pH απιονισμένου νερού) και 6,22 (pH του αιωρήματος εργασίας των κυττάρων του *Vibrio fischeri*).

5.4. Αποτελέσματα και συζήτηση

Συμπερασματικά επιτεύχθηκε η ανάπτυξη ενός αυτόματοποιημένου αναλυτή ροής, ο οποίος βασίζεται στα βιοφωταυγή βακτήρια *Vibrio fischeri*, και ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της τοξικότητας του νερού. Αποδείχτηκε επίσης ότι αυτός ο μικροβιακός βιοαισθητήρας, ο βασισμένος στην παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας του *Vibrio fischeri*, μπόρεσε να μετρήσει την τοξικότητα τριών βαρέων μετάλλων. Ο βιοαισθητήρας μέτρησε την παρεμπόδιση γρήγορα και με ακρίβεια 0,7% RSD. Τα κατώτερα όρια της % παρεμπόδισης των καμπυλών βαθμονόμησης ήταν $1,0 \times 10^{-4}$ M για το Pb^{2+} , $1,0 \times 10^{-4}$ M για το Cu^{2+} και $1,0 \times 10^{-5}$ M για τον Hg^{2+} [18]. Τα όρια αυτά θα ήταν δυνατόν να μειωθούν περαιτέρω αν γίνει αναχαίτιση της ροής ώστε να δοθεί μεγαλύτερος χρόνος αλληλεπίδρασης του τοξικού διαλύματος και των βακτηρίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ

6.1. Εισαγωγή

Είναι γνωστή η σημασία διαφόρων φαινολικών και αντιοξειδωτικών ουσιών καθώς και η ανάγκη προσδιορισμού τους με διάφορες μεθόδους (Folin, ABTS, DPPH κ.α.) ειδικότερα σε τρόφιμα. Σε αυτό το κεφάλαιο θα περιγραφεί η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου εκτίμησης τοξικότητας με την ανάπτυξη και εφαρμογή βιοαισθητήρα ροής. Επίσης παρουσιάζονται προσπάθειες συσχέτισης της νέας αυτή μεθόδου με κλασικές χημικές μεθόδους προσδιορισμού.

6.2. Πειραματικό μέρος

6.2.1. Αντιδραστήρια

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν: φαινόλη (pro analysi) της Merck, τυροσόλη (4-υδροξυφαινεθυλαλκοόλη) 98% καθαρότητας της Acros Organics, φερουλικό οξύ (4-υδροξυ-3-μεθοξυκινναμωμικό οξύ) της Sigma-Aldrich, γαλλικό οξύ μονοϋδατωμένο 99% καθαρότητας της Riedel-de Haën, πρωτοκατεχουικό οξύ (3,4-διυδροξυ βενζοϊκό οξύ) της Sigma-Aldrich, καφεϊκό οξύ (3,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ) της Sigma-Aldrich, π-κουμαρικό οξύ της Sigma-Aldrich, trans-κινναμωμικό οξύ, καθαρότητας>99% της Alfa Aesar, 4-υδροξυ βενζοϊκό οξύ της Sigma-Aldrich Chemie, 2,4- διυδροξυ βενζοϊκό οξύ της Sigma-Aldrich, βενζοϊκό οξύ, καθαρότητας >99% της Alfa Aesar, 4-υδροξυ, 3-μεθοξυ βενζοϊκό οξύ της Sigma-Aldrich, 4-υδροξυ, 3-μεθοξυ –φαιλαιθυλ- οξικό οξύ της Sigma-Aldrich.

Το διμεθυλο σουλφοξείδιο (DMSO) που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρότητας >99,8% της Merck.

Η μεθανόλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν καθαρότητας >99,8% της Merck.

Παρασκευάστηκαν μεθανολικά διαλύματα παρακαταθήκης φαινόλης συγκέντρωση $1,00 \times 10^{-2}$ M, τυροσόλης $1,00 \times 10^{-2}$ M, φερουλικού οξέος $1,00 \times 10^{-3}$ M και γαλλικού οξέος $1,00 \times 10^{-4}$ M.

Παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης σε DMSO τυροσόλης συγκέντρωσης $5,00 \times 10^{-2}$ M, πρωτοκατεχουϊκού οξέος $1,00 \times 10^{-2}$ M, γαλλικού οξέος 0,500M, φαινόλης $1,00 \times 10^{-2}$ M, καφεικού οξέος $1,00 \times 10^{-3}$ M, π-κουμαρικού οξέος $5,00 \times 10^{-3}$ M, φερουλικού οξέος $5,00 \times 10^{-2}$ M, κινναμωμικού οξέος $1,00 \times 10^{-3}$ M, 4-υδροξυ-βενζοϊκού οξέος $5,00 \times 10^{-4}$ M, 2,4-διυδροξυ-βενζοϊκού οξέος $1,00 \times 10^{-3}$ M, βενζοϊκού οξέος $1,00 \times 10^{-3}$ M, 4-υδρόξυ, 3-μεθοξυ-βενζοϊκού οξέος $1,00 \times 10^{-3}$ M και 4-υδροξυ,3-μεθοξυ-φαινυλο οξικό οξύ $1,00 \times 10^{-4}$ M.

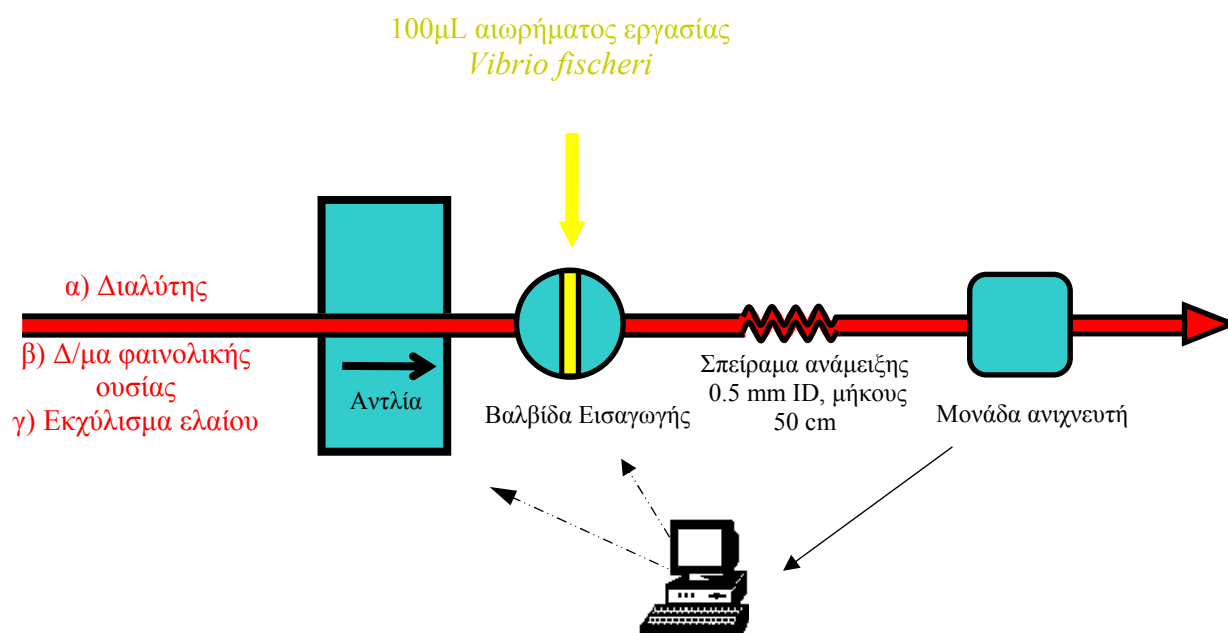
6.2.2. Επεξεργασία δειγμάτων

Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση ελαίων ως εξής:

Εκχυλίζονται 6,000 g ελαίου με 3,00 mL διαλύτη σε δοκιμαστικό σωλήνα. Μετά την απομάκρυνση του εκχυλίσματος η διαδικασία επαναλαμβάνεται με 3,00 επιπλέον mL διαλύτη και το εκχύλισμα ενώνεται με το πρώτο. Το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιείται ως ενιόμενο τοξικό δείγμα στον αναπτυσθέντα αυτοματοποιημένο αναλυτή ροής.

6.2.3. Πειραματική διάταξη αυτοματοποιημένου αναλυτή ροής με χρήση *Vibrio fischeri*

Επιλέχθηκε ταχύτητα ροής 3,00 mL/min. Φέρον ρεύμα είναι όπως φαίνεται στο σχήμα 6.1 είτε ο διαλύτης, ή το διάλυμα φαινολικής ουσίας ή το εκχύλισμα ελαίου. Τυφλό είναι η κορυφή φωταύγειας που λαμβάνεται με έγχυση 100 μ L αιωρήματος εργασίας στη ροή του διαλύτη. Απόκριση του τοξικού δείγματος είναι η κορυφή φωταύγειας με έγχυση 100 μ L αιωρήματος εργασίας στη ροή φέροντος ρεύματος διαλύματος φαινολικής ουσίας ή εκχυλίσματος ελαίου.



Σχήμα 6.1: α) Διαλύτης των ελαίων μπορεί να είναι: MeOH:H₂O 20:80% v/v ή απιονισμένο νερό ή DMSO:H₂O 20:80% v/v. Τοξικό δείγμα είναι: β) το διάλυμα φαινολικής ουσίας ή γ) το εκχύλισμα ελαίου.

Μετρούμενη αναλυτική παράμετρος είναι η % παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας που μετράται όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 4.

6.2.4. Πειράματα με υδατικά διαλύματα μεθανόλης

Από τη βιβλιογραφία ο καταλληλότερος διαλύτης για εκχύλιση φαινολικών ουσιών από διάφορα τρόφιμα είναι μεθανόλης:νερού 80:20% v/v . Όμως με την έγχυση των 100μL βακτηριακού αιωρήματος στη ροή του μίγματος MeOH-H₂O 80-20% v/v καταγράφηκε ισχνό σήμα βιοφωταύγειας στον ανιχνευτή του συστήματος ροής. Η ένταση βιοφωταύγειας ήταν περίπου 65 % μικρότερη από αυτή των 100 μL βακτηριακού αιωρήματος σε φέρον ρεύμα απιονισμένου νερού. Ήταν εμφανές ότι το μίγμα διαλυτών ήταν τοξικό για τα βακτήρια *Vibrio fischeri* και συγκεκριμένα η τοξικότητα αυτή οφειλόταν στην παρουσία της μεθανόλης. Πράγματι δοκιμάστηκε ως φέρον ρεύμα καθαρή μεθανόλη και επιβεβαιώθηκε η τοξικότητά της αφού μειώθηκε κατά 95% η φωταύγεια των βακτηρίων. Έτσι δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις μεθανόλης στο διαλύτη 40-60% (περίπου 50% παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας) και MeOH-H₂O 20-80% v/v που παρουσιάζει μόλις 15% τοξικότητα για τα

βακτήρια *Vibrio fischeri*. Το τελευταίο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για εφαρμογή στο αυτοματοποιημένο σύστημα.

Αυτή η επιλογή έγινε έχοντας σαν κριτήριο τη μικρή τοξικότητα που έχει το διάλυμα αυτό στα βακτήρια *Vibrio fischeri* ώστε να μπορούν να λαμβάνονται υψηλά και αξιόπιστα σήματα. Επειδή στο διαλύτη που επιλέχθηκε η διαλυτότητα των φαινολικών ουσιών δεν είναι μεγάλη, έγινε δυνατή η παρασκευή αραιών διαλυμάτων παρακαταθήκης μόνο για τις 4 ενώσεις (τυροσόλη, φερουλικό οξύ, φαινόλη και γαλλικό οξύ).

6.2.5. Πειράματα με υδατικά διαλύματα διμεθυλο σουλφοξειδίου

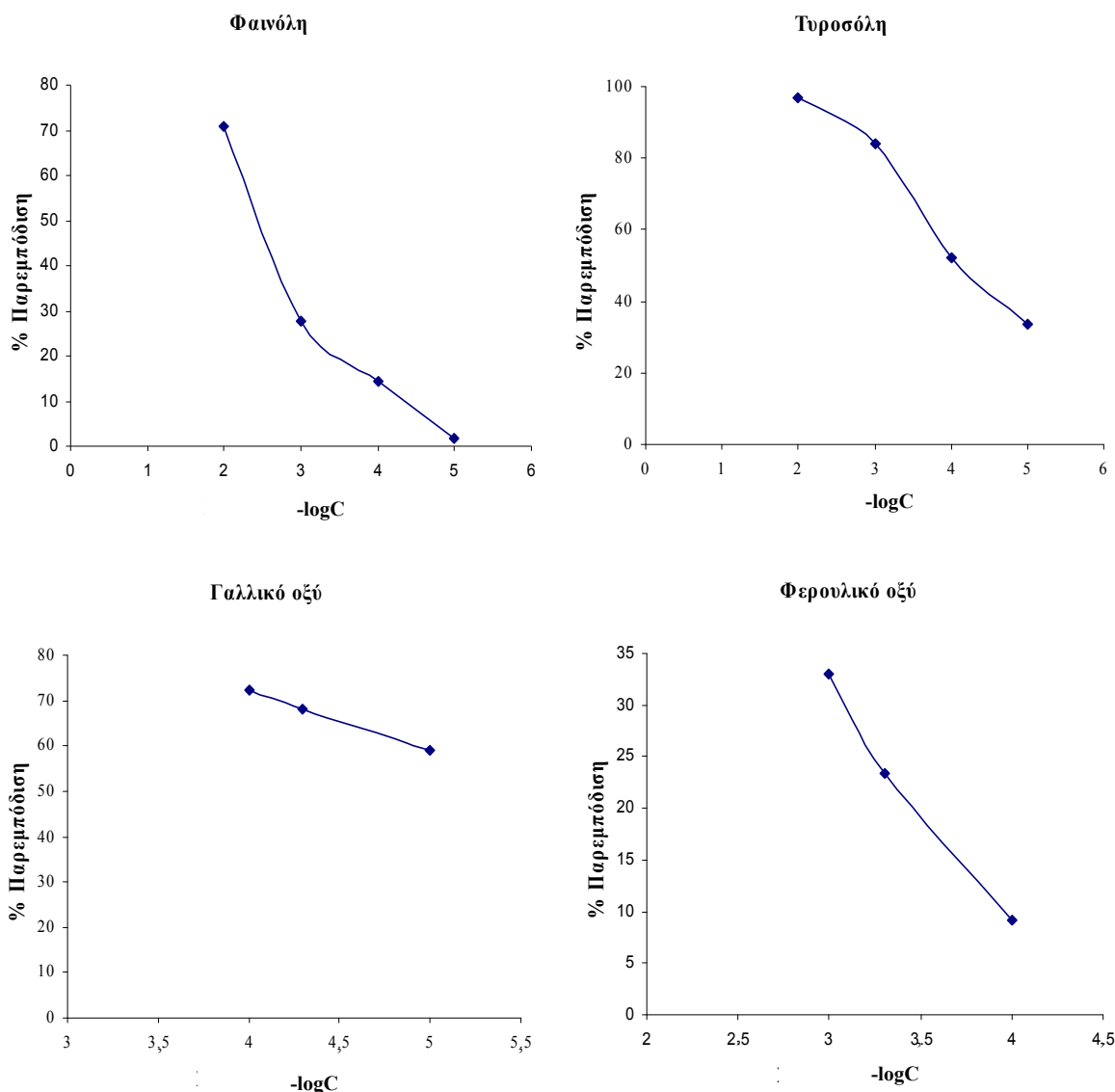
Προκειμένου να γίνει δυνατή η διάλυση περισσότερων φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα διμέθυλοσουλφοξειδίου (DMSO). Το DMSO είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης, γνωστός για την εξαιρετική διαλυτική του ικανότητα. Επιλέχθηκε η χρήση υδατικού διαλύματος DMSO 5% v/v.

Με την χρήση αυτού του διαλύτη επιτεύχθηκε η διαλυτοποίηση περισσότερων φαινολικών ενώσεων: τυροσόλη, πρωτοκατεχουϊκό οξύ, γαλλικό οξύ, φαινόλη, καφεϊκό οξύ, το πικουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, κινναμωμικό οξύ, 4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ και 2-4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ, βενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυ, 3-μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυ, 3-μεθοξυ φαινυλο-οξικό οξύ. Επίσης έγινε δυνατή η παρασκευή διαλυμάτων παρακαταθήκης τυροσόλης, φαινόλης, γαλλικού και φερουλικού οξέος, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές με χρήση MeOH: H₂O 20:80% v/v.

6.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

6.3.1. Πείραμα με διαλύτη MeOH: H₂O 20:80% v/v

Τα πειραματικά αποτελέσματα προσδιορισμού τοξικότητας παρουσιάζονται στο σχήμα 6.2. Στο σχήμα αυτό, όπως και στα υπόλοιπα σχήματα του κεφαλαίου 6 και 7, δεν παρουσιάζονται οι τυπικές αποκλίσεις διότι ήταν στην περιοχή 0,7-1% RSD και δεν ήταν δυνατή η διάκρισή τους.



Σχήμα 6.2: Καμπύλες % παρεμπόδισης συναρτήσει της συγκέντρωσης για φαινόλη, τυροσόλη, φερουλικό οξύ και γαλλικό οξύ.

Από τις παραπάνω καμπύλες παρεμπόδισης συμπεραίνονται τα εξής:

A) Η τυροσόλη είναι τοξικότερη της φαινόλης αφού για την ίδια συγκέντρωση παρουσιάζει μεγαλύτερη % παρεμπόδιση στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri* (πχ. για συγκέντρωση $1,00 \times 10^{-2}$ M η φαινόλη παρουσιάζει 70 % παρεμπόδιση ενώ η τυροσόλη η % παρεμπόδισή της στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri* φθάνει σχεδόν το 100%).

B) Για την ίδια συγκέντρωση το φερουλικό οξύ είναι τοξικότερο από το γαλλικό οξύ.

Γ) Δεν μπορούν να βγουν ανάλογα συμπεράσματα για όλες τις αναλυόμενες ουσίες αφού δεν υπάρχει η δυνατότητα διάλυσης του φερουλικού και του γαλλικού οξέος σε μεγαλύτερες

συγκεντρώσεις ($1,0 \times 10^{-2}$ M). Αυτό το πρόβλημα παρακάμπτεται με χρήση διαλύτη 5% v/v DMSO όπως θα αναφερθεί στην επόμενη παράγραφο.

Δ) Διαπιστώνεται ότι το σύστημα που αναπτύχθηκε είναι ικανό να προσδιορίσει φαινολικές-αντιοξειδωτικές ενώσεις μέσω της καταγραφής της % παρεμπόδισης στην βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri* δίνοντας έτσι νέες προοπτικές όπως πχ. στο να μελετηθούν εκχυλίσματα ελαιολάδων πριν ή μετά τη θερμική καταπόνηση. Αυτό είναι δυνατό γιατί το ελαιόλαδο περιέχει σημαντικές ποσότητες φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

Ταυτόχρονα στα έλαια μετρήθηκε η ολική αντιοξειδωτική τους ικανότητα με τη μέθοδο DPPH και υπολογίστηκε η αντιοξειδωτική τους ενεργότητα σε μονάδες Trolox (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), TEAC. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1. Απόκριση κυτταρικών βιοαισθητήρων *Vibrio fischeri* σε εκχυλίσματα ελαιολάδων

Εκχύλιση με:	% Πτώση Βιοφωταύγειας		
	H ₂ O:MeOH 80:20%v/v	H ₂ O	TEAC [#]
Παρθένο Ελαιόλαδο			
Μυτιληνιώ ^α , Ένωση αγροτικών συνεταιρισμών Λέσβου (ΛΕΣΣΕΛ),	72	83	2,10
Μ Μυτιληνιώ ^β , Ένωση αγροτικών συνεταιρισμών Λέσβου (ΛΕΣΣΕΛ),	67	69	2,03
Σπιτικό ^α , Ελαιουργική, Κεντρική Συνεταιριστική Ένωση Παραγωγών Ελαιοκομικών Προϊόντων	65	74	2,11
Μινέρβα Ορεινές Περιοχές ^α , Μινέρβα Α.Ε.	63	76	2,04
Πεζά Π.Ο.Π ^γ , Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Πεζών	63	66	2,21
Carreffur ^α υπερμάρκετ	59	69	2,25
Ελαιόλαδο			
Μινέρβα Κλασικό ^α , Μινέρβα Α.Ε.	54	38	1,75
Λιοδόχι ^α , Κορε Α.Ε.	43	49	1,40
Πορηνέλαιο			
Νίκη ^α , Μινέρβα Α.Ε.	33	52	3,02
Χρυσός Καρπός ^α , Ελαίς Α.Ε.	33	30	2,29

[#]Trolox Ισοδύναμη Αντιοξειδωτική Ενεργότητα, σε μονάδες mmol trolox Kg⁻¹ λαδιού.

Συσκευασμένα σε : ^απλαστικό διαφανές δοχείο, ^βσκουρόχρωμο πράσινο γυάλινο δοχείο και ^γαδιαφανής tetrapak χάρτινη συσκευασία.

Είναι ενδιαφέρον το ότι οι τιμές της % παρεμπόδισης και για τα δύο είδη εκχυλισμάτων είναι υψηλότερες στα παρθένα ελαιόλαδα. Αυτό συμβαίνει πιθανώς γιατί ως γνωστόν η περιεκτικότητα των ελαιολάδων αυτών είναι υψηλή σε φαινολικές, αντιοξειδωτικές ουσίες. Στα πυρηνέλαια παρατηρούμε υψηλότερες τιμές TEAC και DPPH αλλά χαμηλότερες τιμές % παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας των βακτηρίων. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι στο πυρηνέλαιο ανακτώνται επιπρόσθετα και άλλες ουσίες μιας και το πυρηνέλαιο παράγεται με εκχύλιση του πυρήνα. Ανάλογος σχολιασμός μπορεί να γίνει και για τα πειραματικά αποτελέσματα που παριστάνονται στον πίνακα 6.2.

Πίνακας 6.2. Αποτελέσματα ανάλυσης διαφόρων ειδών ελαιολάδων με 4 μεθόδους

	% Παρεμπόδιση βιοφωταύγειας	Αντιοξειδωτική ενεργότητα ¹		Ολικές φαινόλες ¹
		DPPH	ABTS	
<i>Εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο</i>				
Μυτιληγιώ, ΛΕΣΕΛ ²	76	19,8	12,7	7,7
Μυτιληγιώ, ΛΕΣΕΛ ³	71	19,1	14,1	11,9
Σπιτικό, Ελαιουργική ²	72	19,8	14,7	12,7
Ορεινές Περιοχές, Μινέρβα ²	70	19,1	14,4	11,3
Πεζά Π.Ο.Π., ΕΑΣ Πεζών ³	69	20,7	15,8	11,2
Carreffur ³	58	21,2	17,5	10,8
<i>Ελαιόλαδο</i>				
Κλασικό, Μινέρβα ²	74	16,5	6,4	3,5
Λιοδόχι, Κορέ ²	45	13,1	8,3	6,0
<i>Πυρηνέλαιο</i>				
Νίκη, Μινέρβα ²	57	28,4	0,2	0,7
Χρυσός Καρπός, Ελαίς ²	71	21,5	0,3	0,9

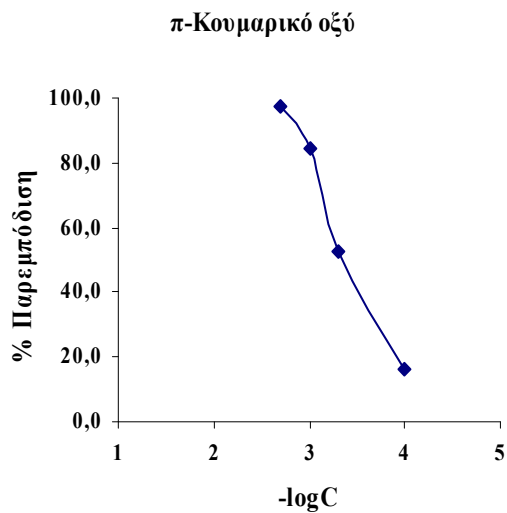
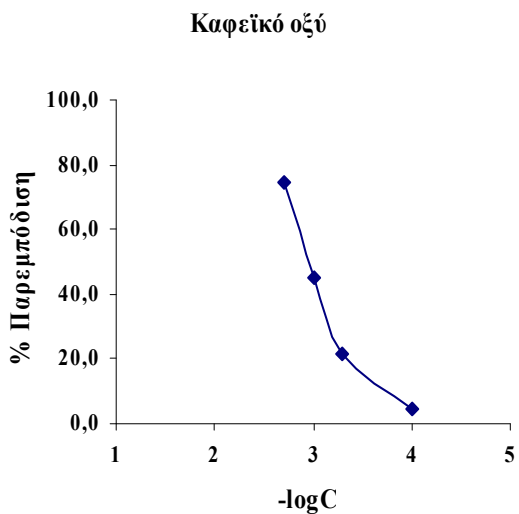
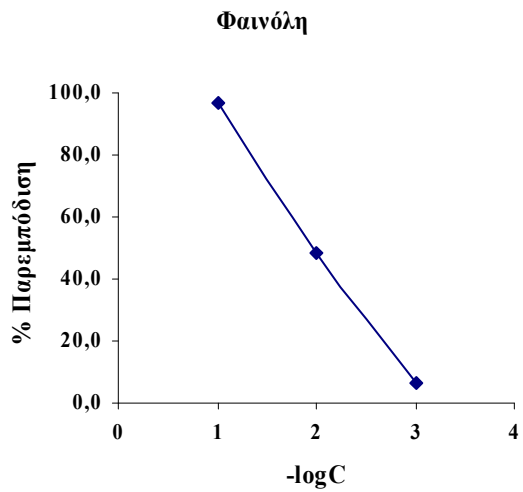
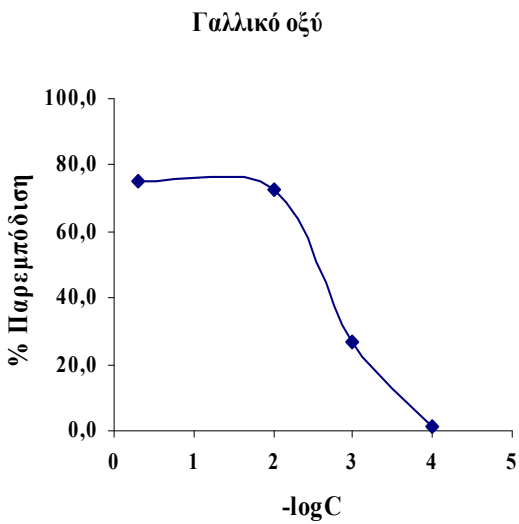
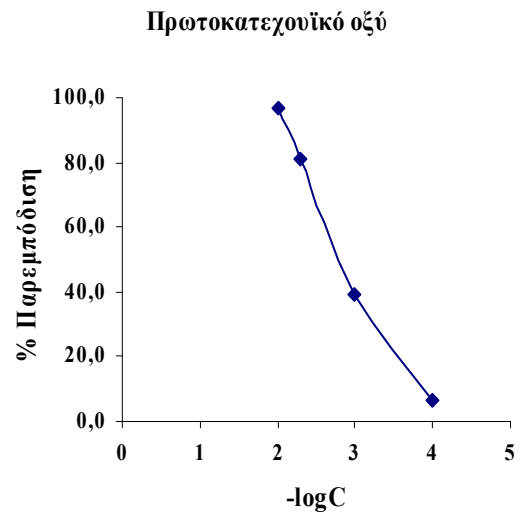
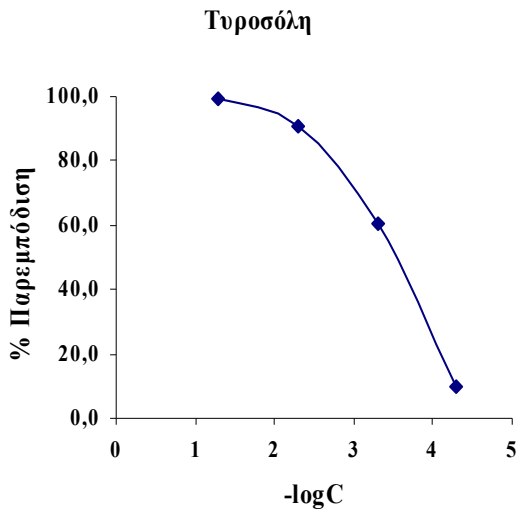
¹ mmol trolox Kg⁻¹ ελαιολάδου, ολικές φαινόλες με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

² Διαφανής συσκευασία

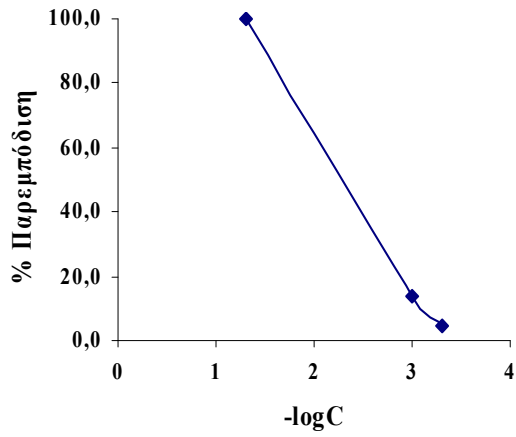
³ Αδιαφανής συσκευασία

6.3.2 Πειράματα με DMSO 5% v/v

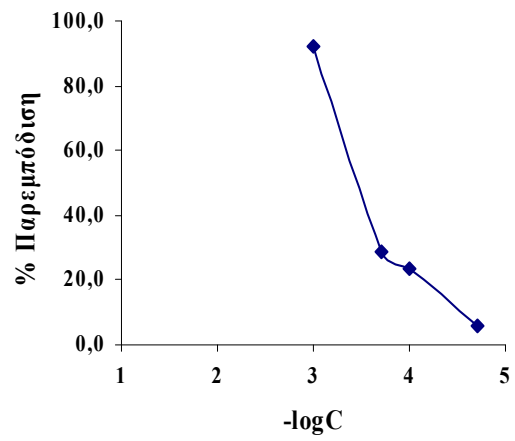
Τα αποτελέσματα φαίνονται στο σχήμα 6.3.



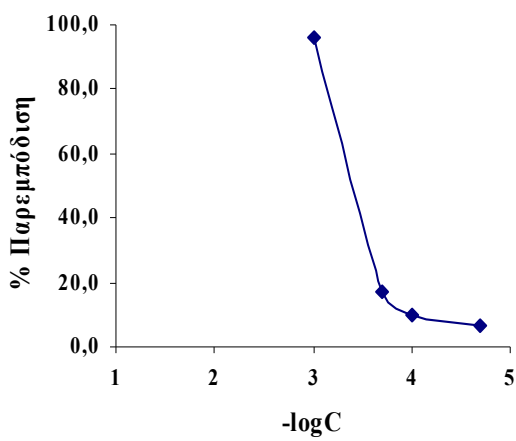
Φερουλικό οξύ



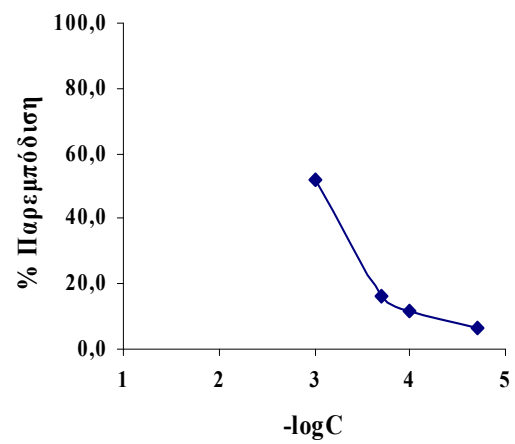
Κιναμφομικό οξύ

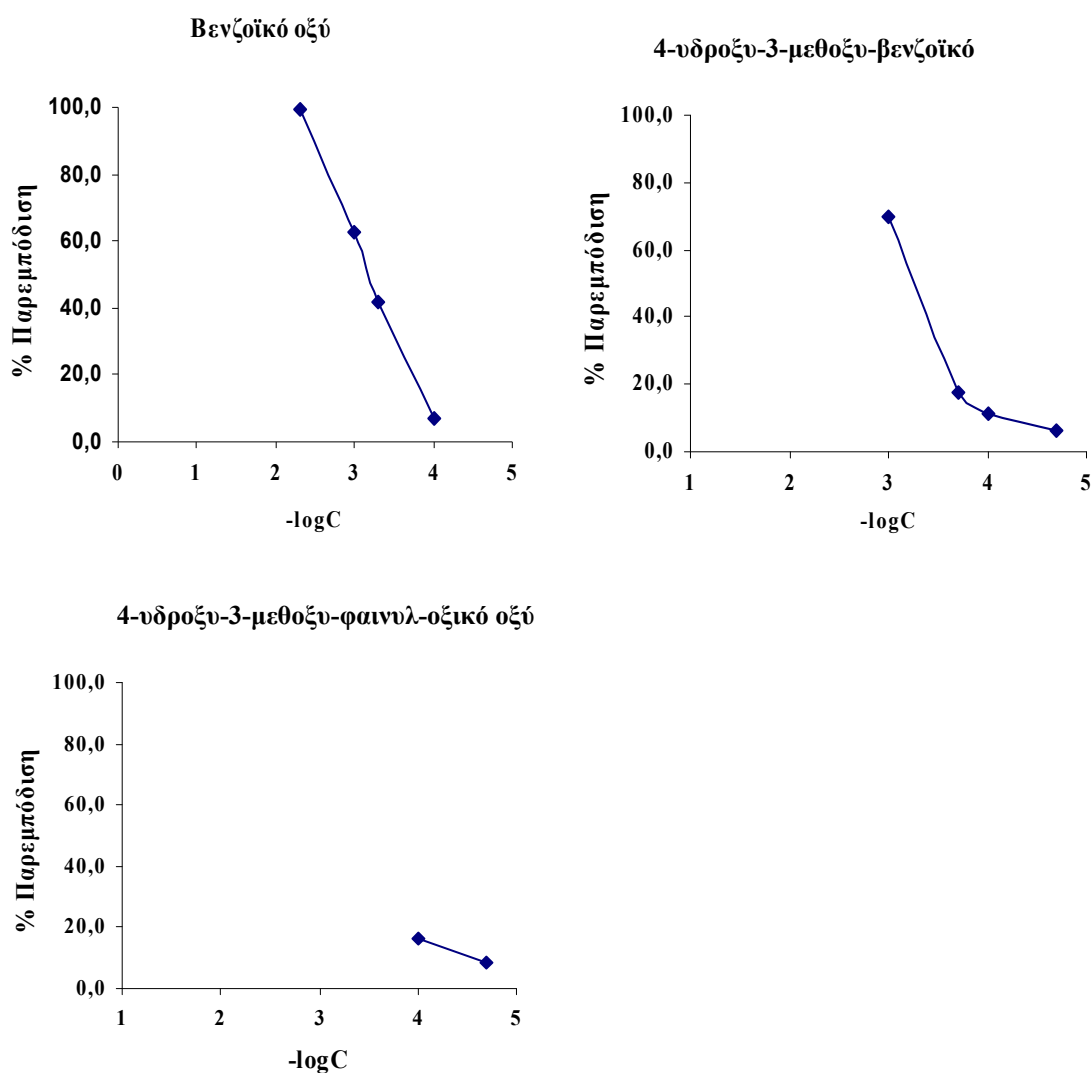


4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ



2,4-διυδροξυ-βενζοϊκό οξύ

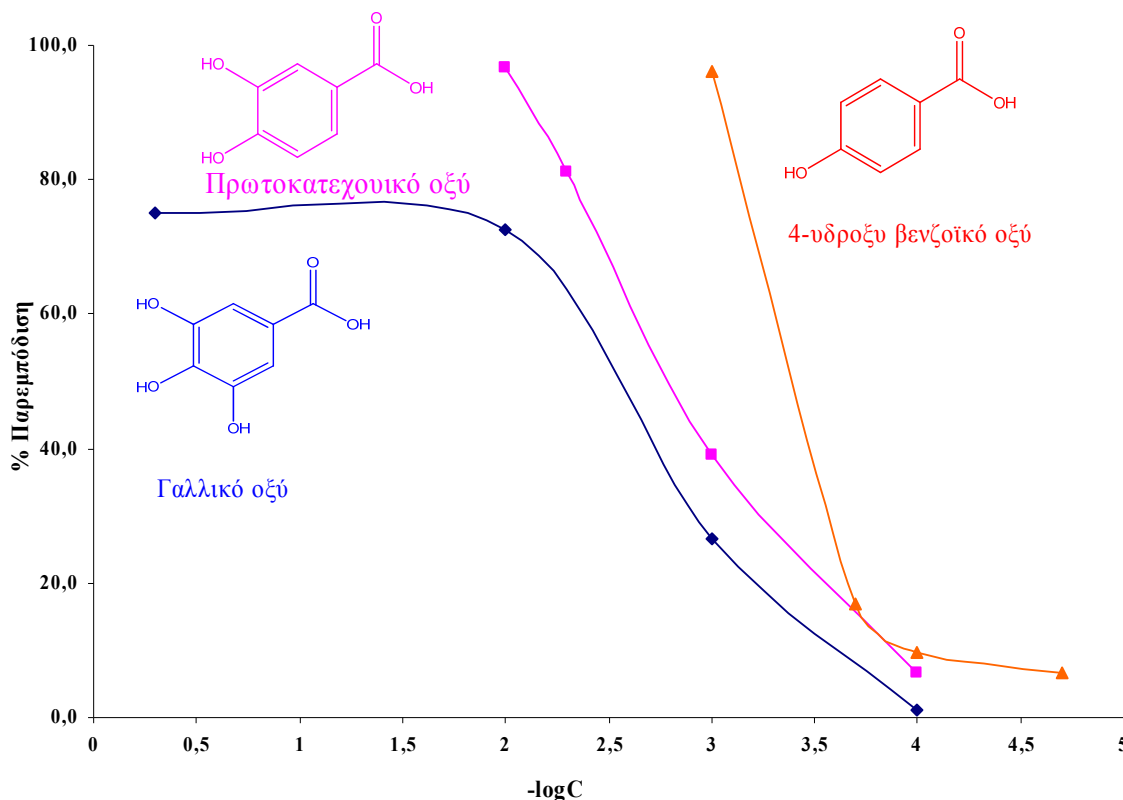




Σχήμα 6.3. Καμπύλες παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας από φαινολικές ενώσεις.

Η τοξικότητα των αρωματικών-φαινολικών ενώσεων που μελετώνται αφορά την επίδρασή τους-την τοξικότητά τους στα βιοφωταυγή βακτήρια *Vibrio fischeri* και όχι στη τοξικότητά τους στον ανθρώπινο οργανισμό. Δηλαδή δε γίνεται καμμία υποβάθμιση της θρεπτικής αξίας των ουσιών αυτών. Άλλωστε είναι γνωστή η ευεργετική αντιοξειδωτική δράση διαφόρων τροφίμων (τσάι, φρούτα κλπ.) τα οποία είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές-φαινολικές ουσίες.

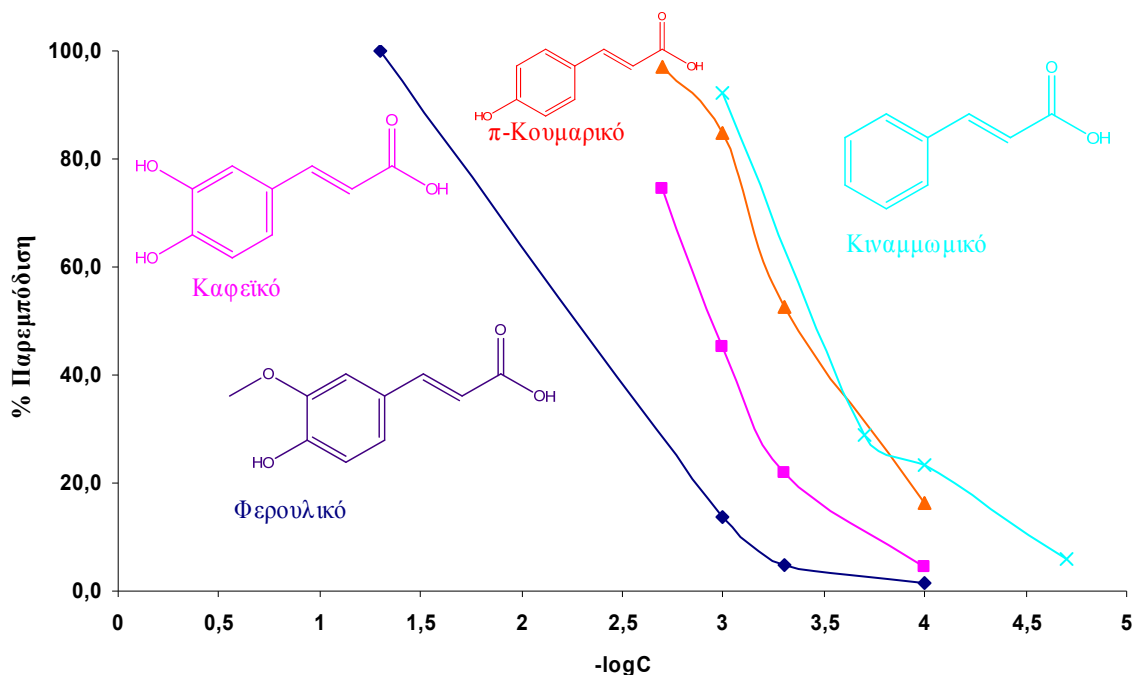
Ακολούθως παρατίθενται συγκριτικά διαγράμματα τοξικότητας των αναλυθέντων ουσιών στα οποία παρατηρείται η επίδραση της δομής των φαινολικών ενώσεων στην τοξικότητά τους στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri*.



Σχήμα 6.4: Συγκριτικό διάγραμμα καμπυλών παρεμπόδισης γαλλικού, πρωτοκατεχουϊκού και 4-υδροξυ βενζοϊκού οξέος. Επίδραση του αριθμού υδροξυλίων στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri*.

Στο σχήμα 6.4 παρατίθενται οι καμπύλες παρεμπόδισης του γαλλικού, πρωτοκατεχουϊκού και 4-υδροξυ βενζοϊκού οξέος και διαπιστώνεται η επίδραση του αριθμού των υδροξυλομάδων στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri*. Οι τρεις αυτές ενώσεις έχουν κοινό δομικό “σκελετό” το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ και διαφέρουν μόνο στον αριθμό υδροξυλίων που έχουν προστεθεί στον βενζολικό δακτύλιο σε όρθο θέση από την υδροξυλομάδα. Το πρωτοκατεχουϊκό οξύ συγκεκριμένα έχει μία επιπλέον υδροξυλομάδα ενώ το γαλλικό δύο. Παρατηρείται λοιπόν από τα καμπύλες παρεμπόδισης ότι πιο τοξικό είναι το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ που διαθέτει μία υδροξυλομάδα, μετά το πρωτοκατεχουϊκό οξύ που διαθέτει δύο υδροξυλομάδες και ακόμα λιγότερο το γαλλικό οξύ με τρεις υδροξυλομάδες. Επίσης φαίνεται εδώ ότι δεν επιδρά

στη τοξικότητα των ενώσεων το μοριακό βάρος μιας και το γαλλικό οξύ με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

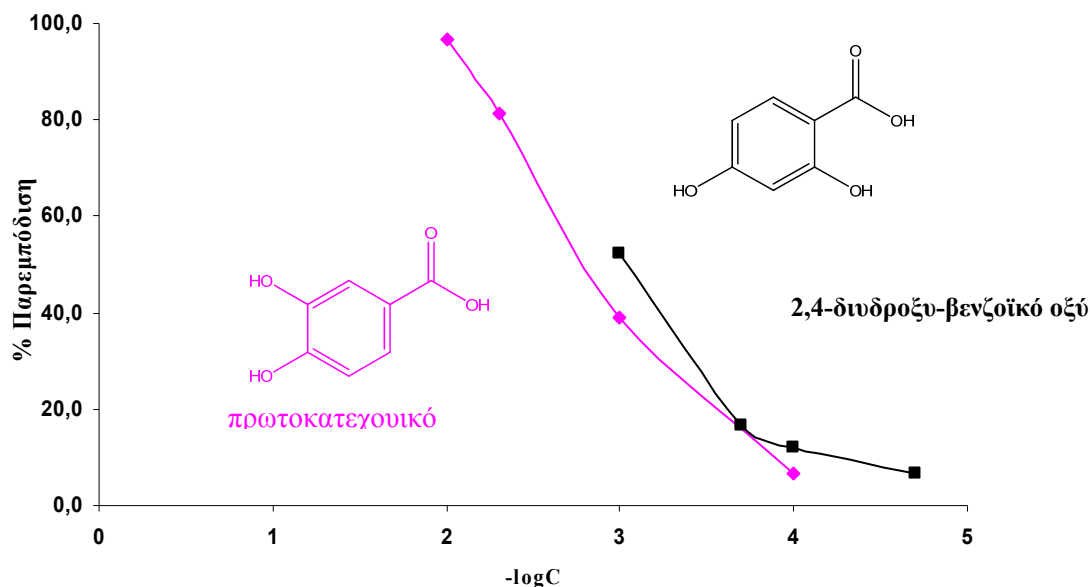


Σχήμα 6.5. Συγκριτικό διάγραμμα καμπυλών παρεμπόδισης για το κινναμωμικό, το π-κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ.

Στο ίδιο με πριν αποτέλεσμα-συμπέρασμα μπορεί να καταλήξει κανείς αν συγκρίνει τις καμπύλες παρεμπόδισης του κινναμωμικού, του π-κουμαρικού και του καφεϊκού οξέος. Οι τρεις αυτές ενώσεις έχουν κοινό δομικό “σκελετό” το κινναμωμικό οξύ. Αυτό που είναι διαφορετικό είναι ο αριθμός υδροξυλίων στο βενζολικό δακτύλιο. Το κινναμωμικό οξύ δεν έχει καμμία, το π-κουμαρικό οξύ διαθέτει μία υδροξυλομάδα, ενώ το καφεϊκό οξύ διαθέτει δυο υδροξυλομάδες. Και εδώ η τοξικότητα αυξάνει αντιστρόφως ανάλογα με τον αριθμό υποκατεστημένων υδροξυλίων, δηλαδή μεγαλύτερη τοξικότητα παρουσιάζει το κινναμωμικό οξύ που δεν διαθέτει στο βενζολικό δακτύλιο υδροξυλομάδα, λιγότερο τοξικό είναι το π-κουμαρικό οξύ με μία υδροξυλομάδα και ακόμα λιγότερο τοξικό το γαλλικό οξύ που έχει δύο υδροξυλομάδες.

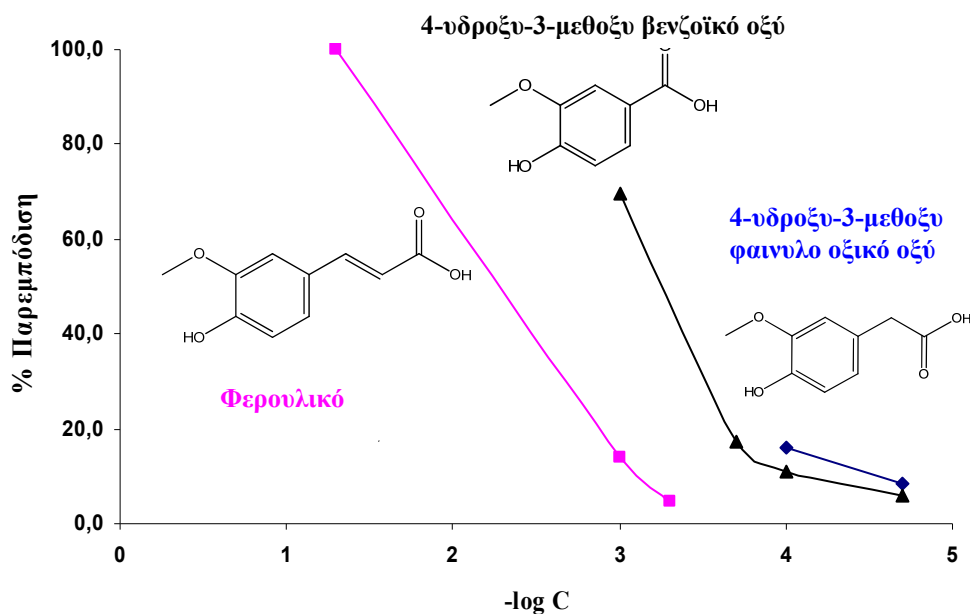
Σε αυτό το σχήμα επίσης παρουσιάζεται και η καμπύλη παρεμπόδισης του φερουλικού οξέος. Το φερουλικό οξύ διαθέτει σκελετική δομή κινναμωμικού οξέος και διαθέτει μια όρθο υποκατεστημένη υδροξυλομάδα (όπως ακριβώς και το καφεϊκό οξύ), διαφέρει στο ότι έχει μία μεθοξυ ομάδα σε μέτα θέση, θέση στην οποία το καφεϊκό οξύ διαθέτει μια υδροξυλομάδα. Σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται ότι η υδροξυλομάδα για την ίδια σκελετική

δομή και για την ίδια θέση υποκατάστασης προκαλεί μεγαλύτερη τοξικότητα από τη μεθόξυ ομάδα.



Σχήμα 6.6. Συγκριτικό διάγραμμα καμπυλών παρεμπόδισης για το 2,4-δι-υδροξυβενζοϊκό οξύ και το πρωτοκατεχονικό οξύ.

Στο σχήμα 6.6 παρατίθενται οι καμπύλες παρεμπόδισης του 2,4-διυδροξυβενζοϊκού και του πρωτοκατεχονικού οξέος. Οι δύο αυτές ενώσεις έχουν διαφορά μόνο ως προς την θέση της μίας από τις δύο υδροξυλομάδες. Στο πρωτοκατεχονικό οξύ είναι σε όρθο θέση ενώ στο 2,4-διυδροξυβενζοϊκό οξύ σε μέτα. Παρατηρείται ότι στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri* πιο μεγάλη είναι η παρεμπόδιση (τοξικότητα) του 2,4-διυδροξυβενζοϊκού οξέος. Δηλαδή το σύστημα που αναπτύχθηκε είναι δυνατόν να διακρίνει την επίδραση της θέσης της ομάδας στο βενζολικό δακτύλιο.



Σχήμα 6.7. Συγκριτικό διάγραμμα καμπυλών παρεμπόδισης για το 4-υδροξυ-3-μεθοξυ βενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυ-3-μεθοξυ- φαινυλο οξικό οξύ και για το φερουλικό οξύ.

Στο σχήμα 6.7 συγκρίνονται ως προς την τοξικότητά τους το 4-υδροξυ-3-μεθοξυ βενζοϊκό οξύ και το 4-υδροξυ-3-μεθοξυ φαινυλο οξικό οξύ. Αυτά τα δύο οξέα διαφέρουν μόνο στο ότι το πρώτο διαθέτει υποκατεστημένο βενζολικό δακτύλιο με μυρμηγκικό οξύ ενώ το δεύτερο οξικό οξύ. Φαίνεται λοιπόν εδώ ότι ρόλο παίζει το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας-μοριακό βάρος μιας και μεγαλύτερη παρεμπόδιση εμφανίζει το 4-υδροξυ-3-μεθοξυ φαινυλο οξικό οξύ. Για το φερουλικό οξύ, που έχει ως υποκαταστάτη προπενικό οξύ, δε μπορεί να διαπιστωθεί τίποτα παραπάνω από τη σύγκρισή του με τα άλλα δύο οξέα παρά μόνο ότι ρόλο παίζει το είδος της δραστικής ομάδας.

6.4. Συμπεράσματα

Από αυτό το πείραμα μπόρεσαν να εξαχθούν αρκετά σημαντικά συμπεράσματα:

- Το σύστημα που αναπτύχθηκε δίνει την δυνατότητα της εκτίμησης της τοξικότητας φαινολικών αντιοξειδωτικών βάσει της παρεμπόδισής τους στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri*.
- Με τη χρησιμοποίηση του DMSO ως διαλύτη μπόρεσαν να διαλυθούν και να εξεταστούν ακόμα περισσότερες ενώσεις και σε ευρύτερη περιοχή συγκεντρώσεων.

- Με χρήση του συστήματος που αναπτύχθηκε έγινε δυνατή η συσχέτιση τοξικότητας των φαινολικών αντιοξειδωτικών με τη δομή και το μοριακό βάρος.
- Σημειώνεται ότι για πρώτη φορά παρουσιάζονται μετρήσεις τοξικότητας των φαινολικών ουσιών με *Vibrio fischeri* σε ροή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΛΔΕΥΔΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

7.1. Εισαγωγή

Αλδεϋδες παράγονται σε σημαντικές ποσότητες κατά τη θερμική καταπόνηση (τηγάνισμα, ψήσιμο) των ελαίων [103]. Οι αλδεϋδικές ενώσεις όπως η ακρολεΐνη (acrolein) και η 4-υδροξυ-t-2-εννεανάλη [104] είναι γνωστές για την τοξικότητά τους και έχουν ενοχοποιηθεί ως υπεύθυνες για την πρόκληση διαφόρων ασθενειών όπως ο καρκίνος, το σύνδρομο Parkinson και η ασθένεια Alzheimer καθώς και άλλες ασθένειες του νευρικού συστήματος [105]. Γι αυτό το λόγο άλλωστε έχουν αναπτυχθεί διάφορες χημικές αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό τους. Στο κεφάλαιο αυτό μελετάται η απόκριση του συστήματος που αναπτύχθηκε σε διαλύματα αλδεϋδών. Μετρούμενη αναλυτική παράμετρος είναι η % παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας αιωρήματος εργασίας των *Vibrio fischeri* το οποίο ενίεται σε φέρον ρεύμα 5% υδατικού διαλύματος DMSO με ταχύτητα ροής 3,0 mL/min. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε βιοδοκιμή πιστοποιημένη από την Ευρωπαϊκή Ένωση με χρήση των μικροοργανισμών *Daphnia magna* ώστε να γίνει σύγκριση αποτελεσμάτων με την νέα αναπτυχθείσα μέθοδο.

7.2 Πειραματικό μέρος

7.2.1 Αντιδραστήρια

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια: Βουτανάλη, πεντανάλη, εξανάλη, t-2 εξενάλη, οκτανάλη, ενδεκανάλη της Merck, t-2-εννεανάλη, δεκανάλη, t,t-2,4-δεκαδιενάλη της Alfa Aesar, t-2-επτενάλη και t,t-2,4-επταδιενάλη της Sigma-Aldrich.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεθανόλη, αιθανόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο καθαρότητας >99,8% της Merck.

7.2.2 Δοκιμές διαλυτών - Βελτιστοποίηση

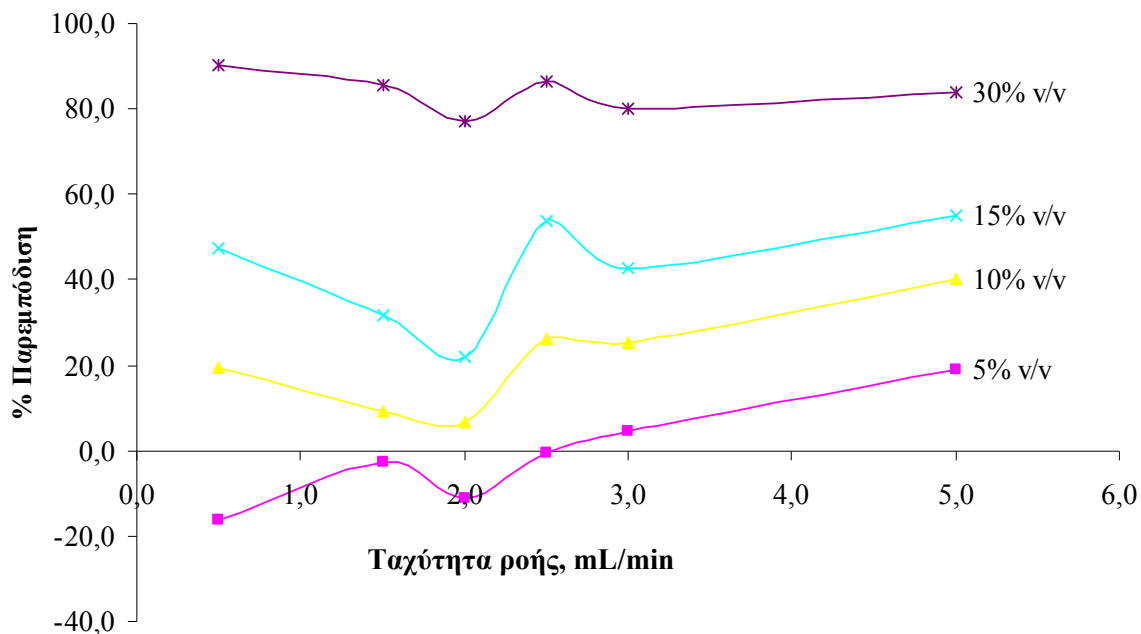
Αρχικά πραγματοποιήθηκε δοκιμή τριών διαλυτών σε διάφορες συγκεντρώσεις υδατικών διαλυμάτων με διαφορετικές ταχύτητες ροής: μεθανόλης, αιθανόλης και διμεθυλο σουλφοξειδίου (DMSO), ως φέρον ρεύμα στον αυτοματοποιημένο αναλυτή ροής. Η αξιολόγηση των διαλυτών έγινε με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

A) Μειωμένη παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri*. Μεγάλη τοξικότητα του διαλύτη θα προκαλεί μεγάλη πτώση της βιοφωταύγειας με αποτέλεσμα να μη μπορεί να προσδιοριστεί ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων των διαλύματων των αλδεϋδικών ενώσεων.

B) Μεγάλη διαλυτότητα των αλδεϋδικών ενώσεων ώστε να μπορεί να διαλυτοποιήσει όσο το δυνατόν περισσότερες.

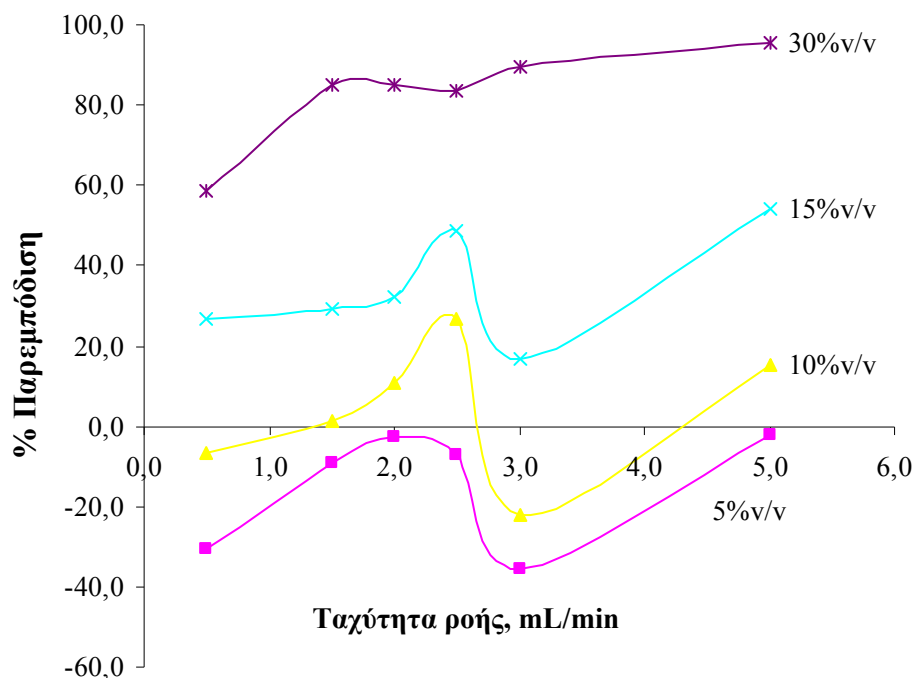
Γ) Τα καταγραφόμενα από τον αναλυτή ροής να παρουσιάζουν υψηλές, οξείες και επαναλήψιμες κορυφές.

Στα επόμενα σχήματα 7.1, 7.2, 7.3 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της βελτιστοποίησης.



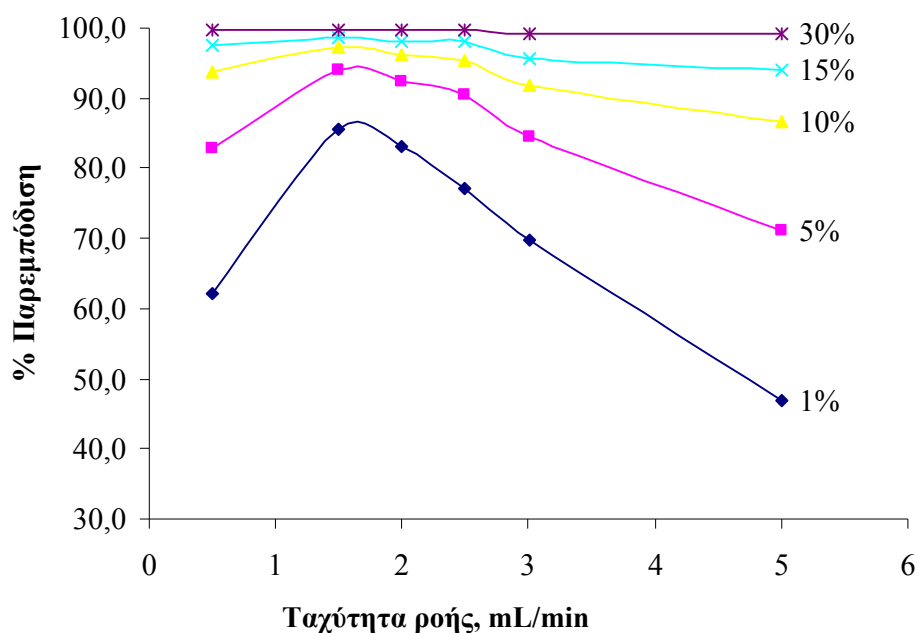
Σχήμα 7.1. Καμπύλες παρεμπόδισης υδατικών διαλυμάτων διμεθυλοσουλφοξειδίου συγκεντρώσεως από 5% έως 30% v/v συναρτήσει της ταχύτητας ροής.

Παρατηρείται ότι για την ίδια ταχύτητα ροής η % παρεμπόδιση (και κατά συνέπεια η τοξικότητα) είναι μεγαλύτερη για το διάλυμα μεγαλύτερης περιεκτικότητας. Ακόμα παρατηρείται ότι το διάλυμα συγκεντρώσεως 5% v/v για ταχύτητα ροής 2,5 mL/min δεν είναι τοξικό (μηδενική η % παρεμπόδιση) και μάλιστα τιμές ταχύτητας ροής 1,5 έως 2 mL/min ευνοούν-αυξάνουν τη βιοφωταύγεια των βακτηρίων. Το διάλυμα αρχίζει να είναι ελάχιστα τοξικό για ταχύτητα ροής μεγαλύτερης των 3 mL/min. Επίσης σε όλες τις παραπάνω καμπύλες παρεμπόδισης παρατηρείται μια κοιλάδα και όρος σε ταχύτητα ροής 2 και 2,5 mL/min.



Σχήμα 7.2. Καμπύλες παρεμπόδισης υδατικών διαλυμάτων μεθανόλης συγκεντρώσεως από 5% έως 30% v/v συναρτήσει της ταχύτητας ροής.

Παρόμοια συμπεράσματα εξάγονται και για τα υδατικά διαλύματα μεθανόλης. Όπως φαίνεται στο σχήμα 7.2 οι καμπύλες παρεμπόδισης έχουν παρόμοια μορφή με αυτές του DMSO με τρεις διαφορές: α) Τα υδατικά διαλύματα της μεθανόλης είναι λιγότερο τοξικά από αυτά των υδατικών διαλυμάτων DMSO για την ίδια συγκέντρωση β) Η κοιλάδα στις καμπύλες παρεμπόδισης εμφανίζεται εδώ στα 3 mL/min γ) Η συγκέντρωση 5% v/v αυξάνει τη βιοφωταύγεια των βακτηρίων για όλες τις τιμές ταχύτητας ροής.



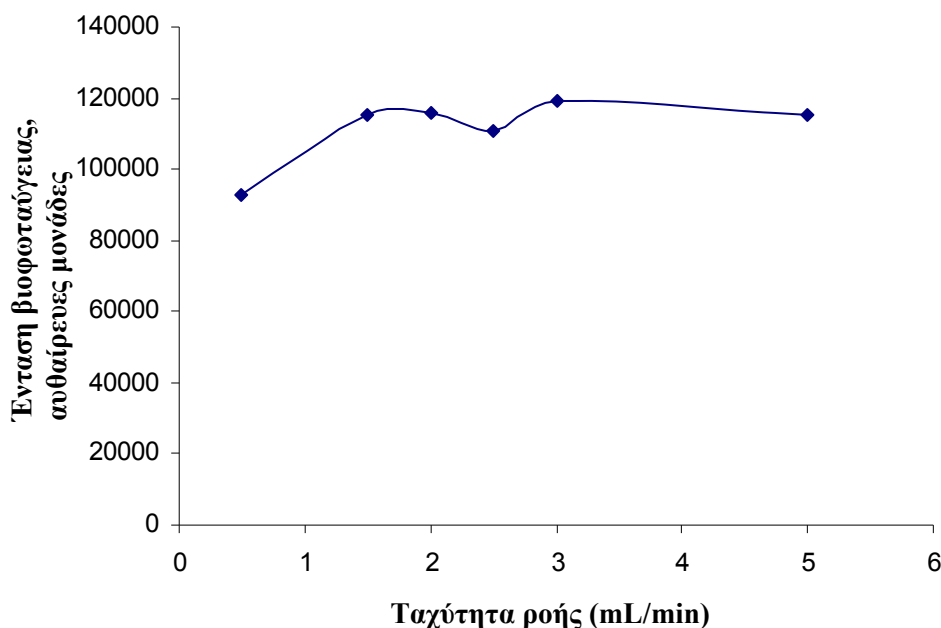
Σχήμα 7.3. Καμπύλες παρεμπόδισης υδατικών διαλυμάτων αιθανόλης συγκεντρώσεως από 5% έως 30% v/v συναρτήσει της ταχύτητας ροής.

Τα υδατικά διαλύματα αιθανόλης εμφανίζουν παρόμοια τάση με τα διαλύματα μεθανόλης και DMSO, δηλαδή αύξηση της συγκέντρωσης προκαλεί μεγαλύτερη παρεμπόδιση για την ίδια ταχύτητα ροής. Είναι επίσης εμφανές ότι η αιθανόλη όμως είναι πολύ τοξικότερη από τη μεθανόλη για τις ίδιες συγκεντρώσεις. Ακόμα και η πιο χαμηλή συγκέντρωση (5%v/v) προκαλεί μεγάλη σχετικά παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των βακτηρίων (από 70-100% όπως φαίνεται στο σχήμα 7.3. Λόγω αυτής της μεγάλης τοξικότητας απορρίπτεται η αιθανόλη ως διαλύτης των αλδεϋδών μιας και θα είναι σχεδόν αδύνατο να εκτιμηθεί η τοξικότητα τους σε ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων αφού ο ίδιος ο διαλύτης είναι εξαιρετικά τοξικός για τα βακτήρια.

Έτσι απορρίπτοντας την αιθανόλη απέμεινε η επιλογή μεταξύ μεθανόλης και DMSO. Παρότι η μεθανόλη λοιπόν είναι λιγότερο τοξική από το DMSO, δεν έχει μεγάλη διαλυτική ικανότητα και ήταν δυνατό να διαλύσει μέχρι και και την εξανάλη σε συγκέντρωση μέχρι 10^{-3} M. Έτσι επιλέχθηκε διαλύτης το DMSO συγκεντρώσεως 5% v/v με ταχύτητα ροής

3 mL/min. Στις συγκεκριμένες τιμές συγκέντρωσης και ταχύτητας ροής η τοξικότητα του διαλύτη είναι σχετικά μικρή (μικρότερη του 5% όπως φαίνεται στο σχήμα 7.1, δόθηκε η δυνατότητα της διάλυσης αλδεϋδών μεγαλύτερου μοριακού βάρους (μέχρι και δέκα άτομα άνθρακα). Τέλος και σε αυτήν την ταχύτητα ροής η ανάλυση του δείγματος είναι ταχεία (περίπου 35 s). Επιπροσθέτως, οι κορυφές των καταγραφμάτων είναι οξείες και η επαναληψιμότητα 10 ενέσεων 50 μL του ίδιου αιωρήματος εργασίας σε φέρον ρεύμα υδατικού διαλύματος DMSO 5% v/v ήταν καλύτερη από 1% RSD, n=10.

Επίσης έγινε πείραμα ώστε να δοκιμαστεί η αντοχή των βακτηρίων στη μηχανική καταπόνηση τους εντός των μικροσωληνώσεων καθώς και να εξεταστεί κατά πόσο επηρεάζεται η βιοφωταύγειά τους από την κινητική ενέργεια που παίρνουν από την κίνησή τους με τη βοήθεια της περισταλτικής αντλίας σε διαφορετικές ταχύτητες ροής. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος παρουσιάζονται στο σχήμα 7.4.

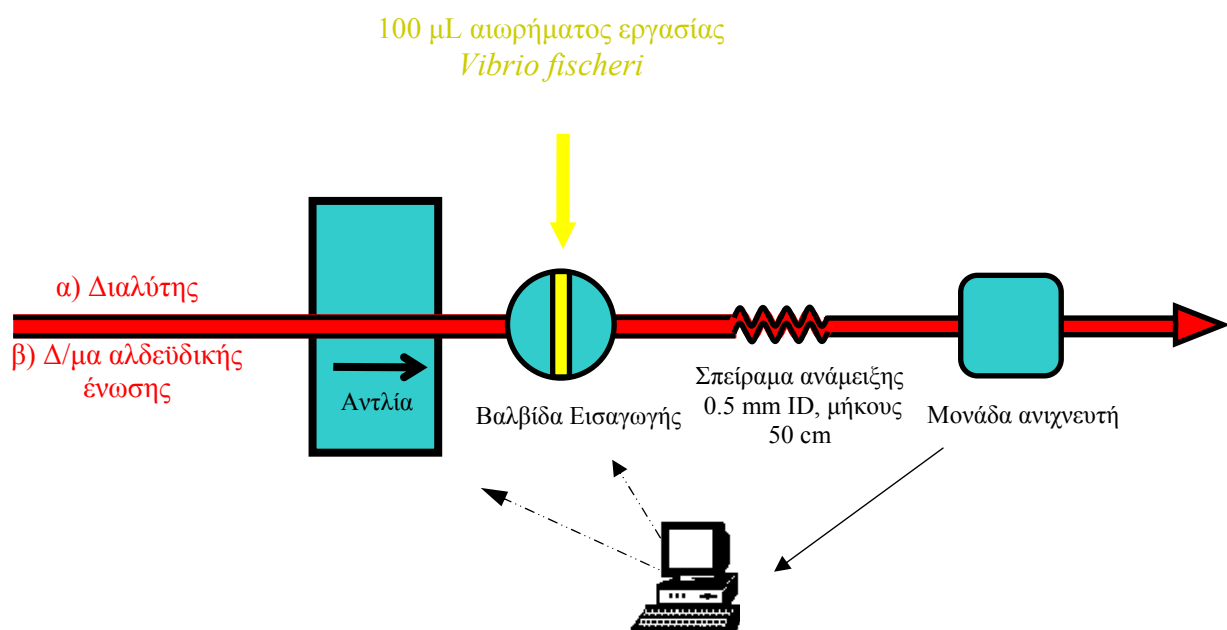


Σχήμα 7.4. Επίδραση της ταχύτητας ροής στην ένταση της βιοφωταύγειας.

Διαπιστώνεται ότι το αιώρημα εργασίας έχει αρκετά σταθερή ένταση φωταύγειας για ταχύτητες ροής από 1,5 έως και 5mL/min. Στη χαμηλή ταχύτητα ροής 0,5 mL/min, παρατηρείται μικρή σχετική πτώση της έντασης της βιοφωταύγειας, πιθανώς λόγω του αυξημένου χρόνου αλληλεπίδρασής τους με το διαλύτη μέχρι να φτάσουν στον ανιχνευτή.

7.2.3 Πειραματική διάταξη αυτοματοποιημένου αναλυτή ροής με χρήση *Vibrio fischeri*

Ο βιοαισθητήρας προσδιορισμού τοξικότητας διαλυμάτων αλδεϋδικών, με διαλύτη υδατικό διάλυμα διμεθυλοσουλφοξειδίου συγκεντρώσεως 5-30% v/v, έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: Βέλτιστη ταχύτητα ροής 3,00 mL/min. Φέρον ρεύμα είναι ο διαλύτης των αναλυόμενων αλδεϋδικών ενώσεων. Τυφλό είναι η κορυφή φωταύγειας που λαμβάνεται με έγχυση 100 μ L αιωρήματος εργασίας στη ροή του διαλύτη. Απόκριση του τοξικού δείγματος είναι η κορυφή φωταύγειας με έγχυση 100 μ L αιωρήματος εργασίας στη ροή φέροντος ρεύματος διαλύματος αλδεϋδικής ένωσης. Διαγραμματικά ο αυτοματοποιημένος αναλυτής ροής παριστάνεται στο σχήμα 7.5



Σχήμα 7.5: Υδατικό διάλυμα DMSO 5-30% v/v είναι ο α) διαλύτης. Τοξικό δείγμα είναι: β) το διάλυμα αλδεϋδικής ένωσης.

Μετρούμενη αναλυτική παράμετρος είναι η % παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας που μετράται όπως έχει περιγραφεί στο κεφάλαιο 4.

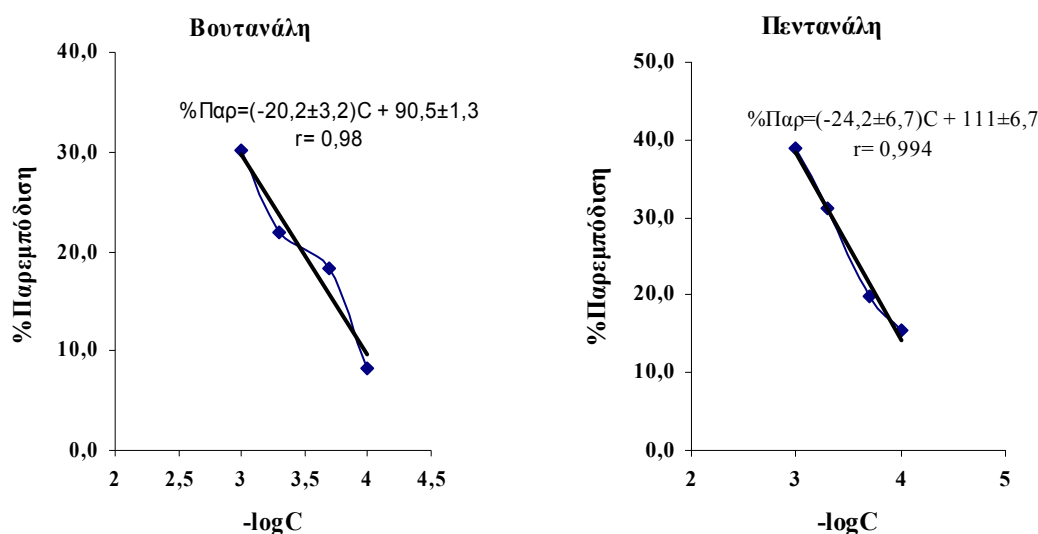
7.2.4. Βιοδοκιμή *Daphnia magna*

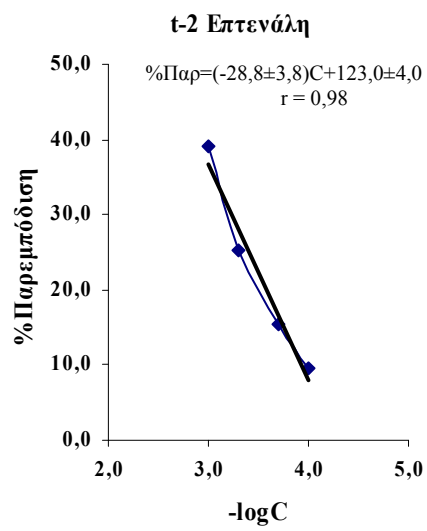
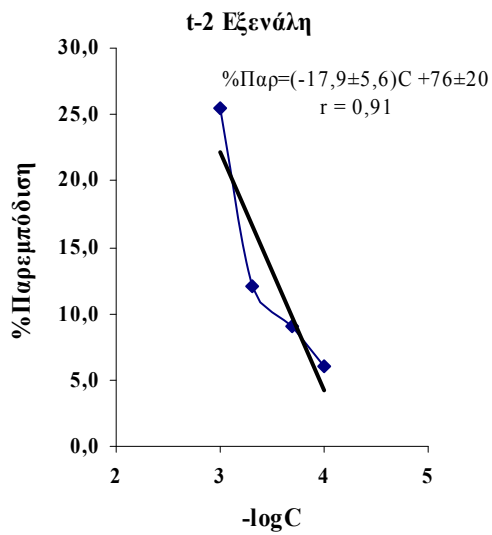
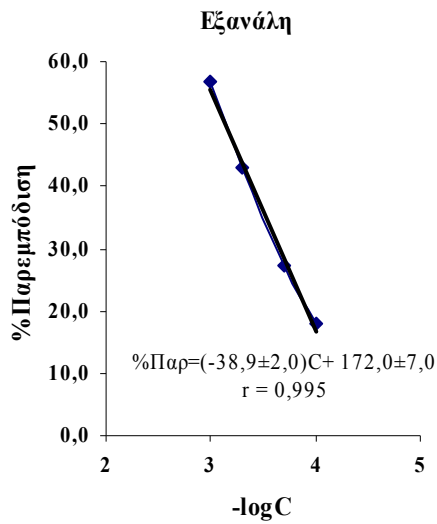
Για λόγους σύγκρισης της μεθόδου *Vibrio fischeri* πραγματοποιήθηκε βιοδοκιμή χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς *Daphnia magna* ακολουθώντας το εξής πρωτόκολο εργασίας:

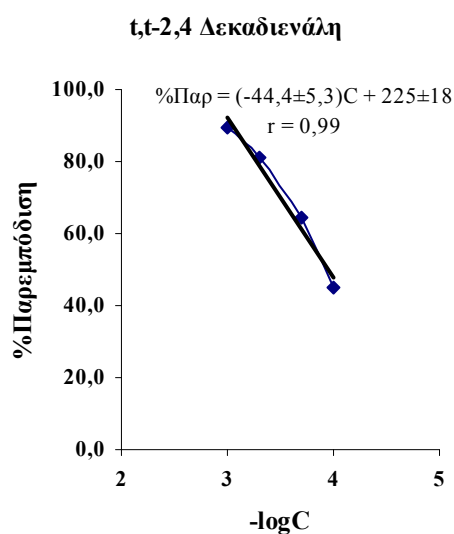
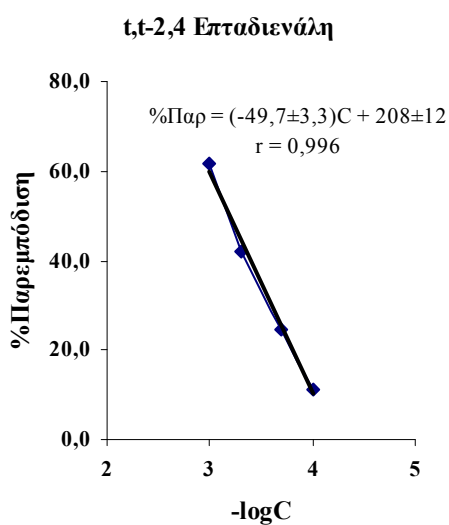
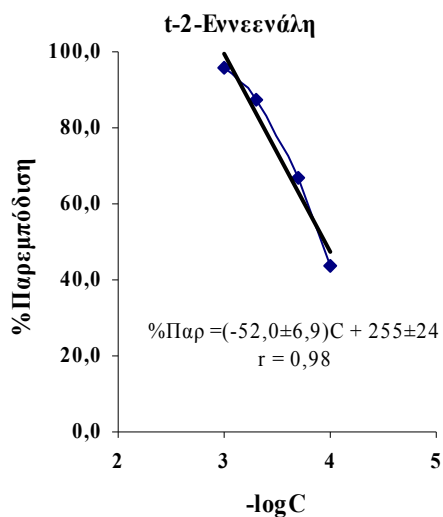
Χρησιμοποιείται ειδικό διαφανές πλαστικό δοχείο που περιλαμβάνει 5X5=25 κυβικές θέσεις. Η κάθε θέση έχει όγκο 10 mL. Σε κάθε μία από αυτές τις θέσεις προστίθενται με σιφόνιο 5,00mL από το εξεταζόμενο τοξικό διάλυμα αλδεϋδης και εμβαπτίζονται με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας Pasteur και φωτισμού 5 μικροοργανισμοί *Daphnia magna* (οι μικροοργανισμοί είναι αυτοί που παραλαμβάνονται μετά την επώαση επί 3 ημέρες καταλλήλων εφιππίων, τα οποία θα μπορούσε να περιγράψει κανείς ως μικροσκοπικά καστανόμαυρα “αυγά”) σε τρυβλία σε σταθερή θερμοκρασία 22 °C σε εμφιαλωμένο νερό (στο συγκεκριμένο πείραμα Βίκος) μέσα σε επωαστικό κλίβανο και με πηγή φωτός έντασης 3000 lux. Αυτό που μετράται είναι πόσοι μικροοργανισμοί παραμένουν ζωντανοί μετά από 24 ώρες [45, 106-114].

7.3. Αποτελέσματα μεθόδου *Vibrio fischeri*

Στο σχήμα 7.6 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσεων τοξικότητας αλδεϋδικών ενώσεων με τη χρήση του αυτοματοποιημένου αναλυτή ροής.

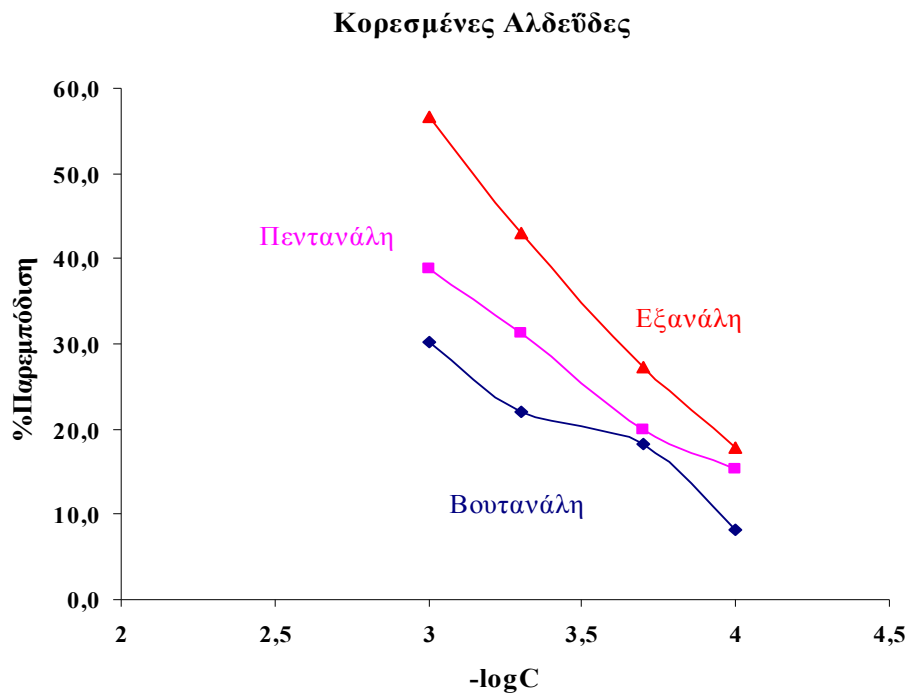




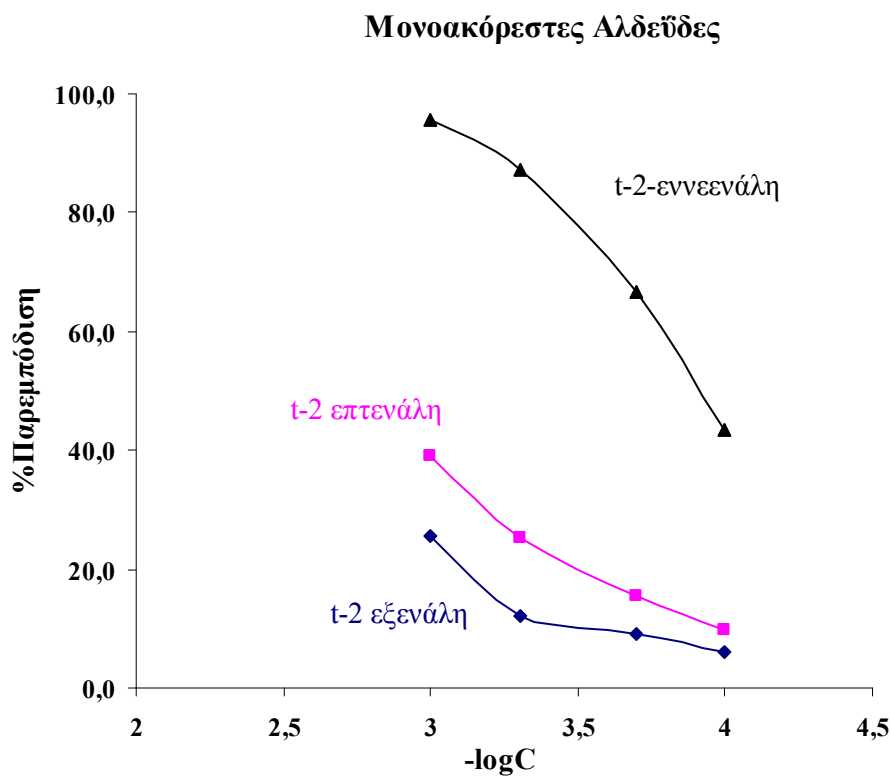


Σχήμα 7.6. Καμπύλες παρεμπόδισης αλδεϋδικών ενώσεων.

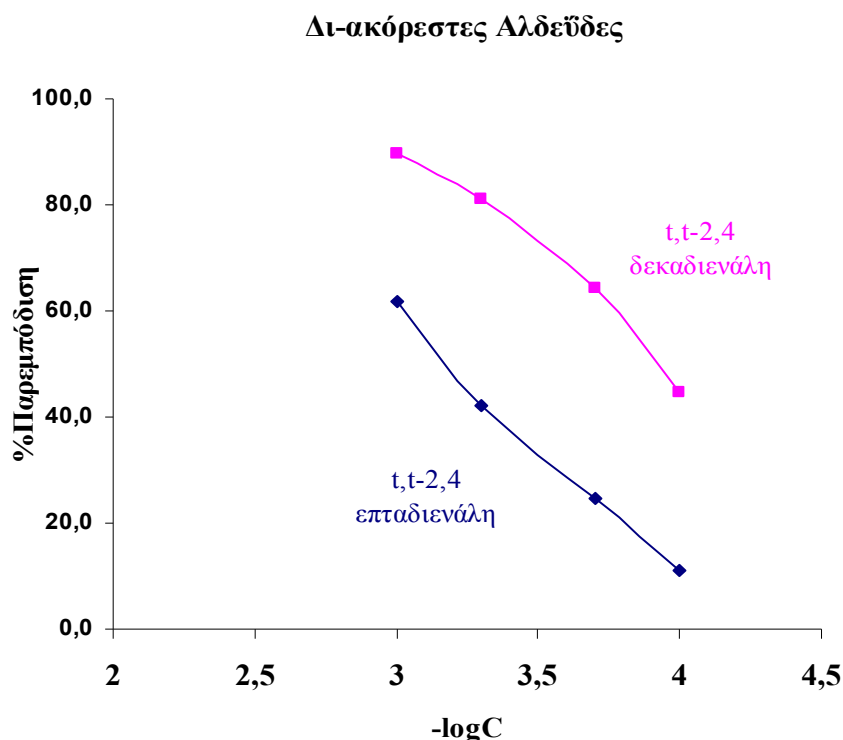
Από τις παραπάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρείται για τις περισσότερες αλδεϋδες, ικανοποιητική γραμμικότητα της καμπύλης παρεμπόδισης και επίσης αύξηση της τοξικότητας (% παρεμπόδισης) με την αύξηση του μοριακού βάρους. Το τελευταίο διαπιστώνεται ευκολότερα από τα ακόλουθα συγκριτικά διαγράμματα 7.7, 7.8, 7.9:



Σχήμα 7.7. Καμπύλες παρεμπόδισης για τις κορεσμένες αλδεϋδες βουτανάλη, πεντανάλη και εξανάλη



Σχήμα 7.8. Καμπύλες παρεμπόδισης για τις μονοακόρεστες αλδεϋδες t-2-εξενάλη, t-2-επτενάλη, t-2-εννεενάλη.



Σχήμα 7.9. Καμπύλες παρεμπόδισης για τις δι-ακόρεστες αλδεϋδες t,t-2,4 επταδιενάλη και t,t-2,4 δεκαδιενάλη

Από τα τρία παραπάνω σχήματα 7.7, 7.8, 7.9 συμπεραίνεται λοιπόν ότι για τον ίδιο βαθμό κορεσμού η τοξικότητα (% παρεμπόδιση) των αλδεϋδών στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri* είναι ανάλογη του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας-του μοριακού βάρους. Κάθε τιμή σε αυτά τα διαγράμματα προέρχεται από τον υπολογισμό του μέσου όρου τριών ενέσεων 100 μ L βακτηριακού αιωρήματος στο εκάστοτε φέρον ρεύμα διαλύματος αλδεϋδικής ένωσης. Η επαναληψιμότητα αυτών των τριπλετών ήταν εξαιρετική (μικρότερη του 1%).

7.4. Βιοδοκιμή με *Daphnia magna*-Σύγκριση με *Vibrio fischeri*

Σε αυτό το σημείο θα παρατεθούν και τα πειραματικά αποτελέσματα μιας πιστοποιημένης βιοδοκιμής για προσδιορισμό τοξικότητας των αλδεϋδών που αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τον μικροοργανισμό *Daphnia magna*. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Τεχνολογικό πάρκο Θεσσαλονίκης. Μελετήθηκε η τοξικότητα των αλδεϋδών που αναλύθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη (υδατικό διάλυμα DMSO 5%v/v). Η τοξικότητα με τη βιοδοκιμή αυτή προσδιορίζεται με το ποσοστό θνησιμότητας αυτών των μικροοργανισμών μετά την παραμονή τους στο εκάστοτε τοξικό διάλυμα επί ένα 24ωρο.

Μεγαλύτερη θνησιμότητα των μικροοργανισμών *Daphnia magna* σημαίνει και μεγαλύτερη τοξικότητα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί για εκτίμηση κυρίως χρόνιας τοξικότητας διαφόρων παρασιτοκτόνων οργανικών ουσιών [106], νανοσωματιδίων όπως πχ τα φουλαρένια [107], διαφόρων μετάλλων [108], διαφόρων ιχνοστοιχείων όπως του σεληνίου [109], για ταχεία ημιποσοτική εκτίμηση της τοξικότητας χημικών αποβλήτων [110] επιφανειοδραστικών [111], φαρμακευτικών σκευασμάτων [112], πολυχλωριωμένων και πολυβρωμιωμένων επιβραδυντικών καύσης [113] και πεπτιδίων [114].

Για κάθε αραίωση εκτελούνται τρεις μετρήσεις. Τα πειραματικά αποτελέσματα του πρώτου αυτού πειράματος παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1. Συγκεντρωτικός πίνακας προσδιορισμού τοξικότητας αλδεϋδών σε μικροοργανισμούς *Daphnia magna*.

Συγκέντρωση (-logC)	Αριθμός Ζωσών <i>Daphnia magna</i>			
	3	4	5	6
Βουτανάλη	0	14	15	-
Πεντανάλη	1	13	15	-
Εξανάλη	2	12	15	-
t-2-εξανάλη	0	1	14	-
τρανς-2-επτανάλη	-	0	12	15
Δεκανάλη	-	0	13	15
t-2-εννεενάλη	-	0	13	15
οκτανάλη	-	0	12	15
t,t-2,4 – δεκαδιενάλη	-	0	6	14
t,t-2,4 επταδιενάλη	-	0	14	15

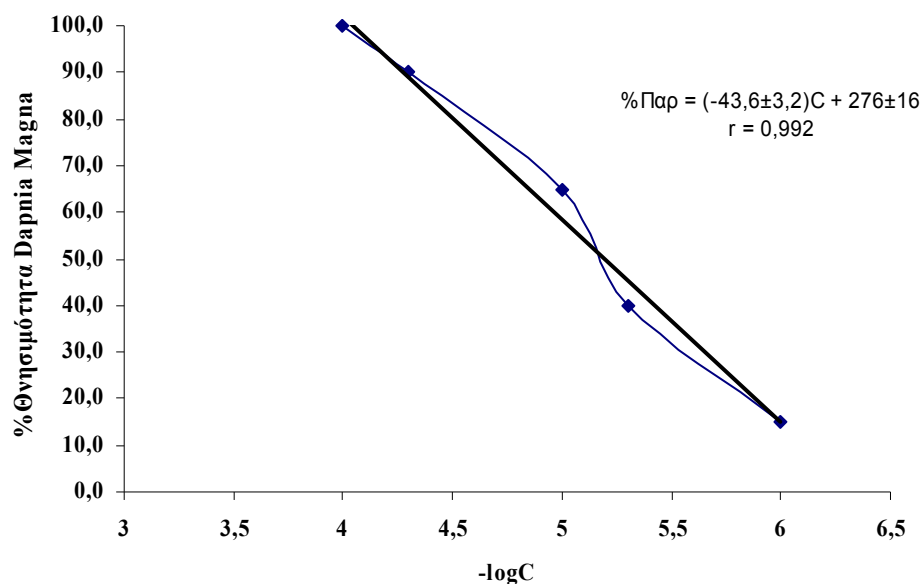
Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται ο αριθμός από τις 15 *Daphnia magna* που έμειναν ζωντανές μετά την παραμονή τους επί ένα 24ωρο στο αντίστοιχο διάλυμα αλδεϋδης. Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι αυξανόμενου του μοριακού βάρους, για τον ίδιο βαθμό ακορεστότητας, αυξάνεται και η τοξικότητα της αλδεϋδης αφού απομένουν λιγότεροι μικροοργανισμοί *Daphnia magna* ζωντανοί. Επίσης παρατηρείται, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από το αυτοματοποιημένο σύστημα ροής ότι μεγαλύτερη τοξικότητα έχει η t,t-2,4 δεκαδιενάλη. Ακόμα φαίνεται ότι για κάποιες αλδεϋδες το όριο ανίχνευσης (τοξικότητας) έφτασε ακόμα το 10^{-6} M (για τις περισσότερες αλδεϋδες ήταν 10^{-4} M, 10^{-5} M). Με τη μέθοδο

του αυτοματοποιημένου αναλυτή ροής που περιγράφηκε και αναλύθηκε στην παράγραφο 7.2 το όριο ανίχνευσης ήταν περίπου δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο. Αυτό συνέβη γιατί μετρήθηκε η τοξικότητα σε συνθήκες ροής όπου ο χρόνος επαφής του βιοφωταγούς αιωρήματος *Vibrio fischeri* με το τοξικό δείγμα ήταν μόλις 4-5 s. Για να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης της ίδιας τάξεως και με τη μέθοδο των *Vibrio fischeri* έχει προαναφερθεί ότι πρέπει να διακοπεί η ροή ώστε να επιδράσει ο ρύπος για τουλάχιστον μισή ώρα στα βιοφωταυγή βακτήρια *Vibrio fischeri*.

Στον πίνακα 7.2 παρουσιάζονται αποτελέσματα από εκτενή πειράματα για την πλέον τοξική αλδεϋδη η οποία βρέθηκε ότι ήταν η t,t-2,4 –δεκαδιενάλη (Πίνακας 6). Σημειώνεται ότι χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αραίωση 4 θέσεις κάθεται από τις οποίες περιείχε 5 μικροοργανισμούς *Daphnia magna*.

Πίνακας 7.2. Συγκεντρωτικός πίνακας προσδιορισμού θνησιμότητας μικροοργανισμών *Daphnia magna* συναρτήσει της συγκέντρωσης t,t 2,4-δεκαδιενάλης.

	<i>Ζώσες Daphnia magna</i>				
C (mol/L)	A Θέση	B Θέση	C Θέση	D Θέση	%Θνησιμότητα
$1,00 \times 10^{-4}$	0	0	0	0	100
$5,00 \times 10^{-5}$	0	0	1	1	90
$1,00 \times 10^{-5}$	2	2	1	2	65
$5,00 \times 10^{-6}$	3	3	3	3	40
$1,00 \times 10^{-6}$	4	4	4	5	15
0	5	5	5	5	0



Σχήμα 7.10. Τοξικότητα t,t 2,4-δεκαδιενάλης συναρτήσει της συγκέντρωσης.

7.5. Συμπεράσματα

Είναι αντιληπτό ότι από αυτό το πείραμα προσδιορισμού τοξικότητας αλδεϋδών με τη χρήση του συστήματος που αναπτύχθηκε επιτεύχθηκαν τα εξής:

- Ταχεία (περίπου 2 δείγματα/min) και επαναλήψιμη (0,7-1% RSD, n=3) εκτίμηση προσδιορισμού της τοξικότητας των αλδεϋδών.
- Η τοξικότητα των αλδεϋδών για τον ίδιο βαθμό ακορεστότητας αυξάνεται με την αύξηση του μοριακού βάρους.
- Η μέθοδος αυτή είναι ταχύτερη από τη βιοδοκιμή με *Daphnia magna* που απαιτεί ένα 24ωρο αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών με το τοξικό διάλυμα αλδεϋδών.
- Το όριο ανίχνευσης με την αναπτυχθείσα σε αυτή τη διατριβή μέθοδο των βιοφωταγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* έφτασε στην τάξη συγκέντρωσης 10^{-4} M. Με τη βιοδοκιμή με τους μικροοργανισμούς *Daphnia magna* το όριο ανίχνευσης ήταν ακόμα μικρότερο (10^{-5} M). Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι τα ίδια όρια ανίχνευσης είναι εφικτά και με τη μέθοδο των βιοφωταγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* αρκεί να αλληλεπιδρούσε το βιοφωταγές αιώρημα βακτηρίων με το τοξικό ρεύμα ρύπου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (πάνω από 30 min) με αναχαίτιση της ροής. Σκοπός όμως της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη βιοαισθητήρα σε συνθήκες ροής με ταχεία απόκριση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΠΙΘΑΝΗΣ ΤΟΞΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΘΕΡΜΙΚΩΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΜΕΝΩΝ ΕΛΑΙΩΝ

8.1. Εισαγωγή

Ως γνωστόν κατά τη θερμική καταπόνηση (τηγάνισμα) διαφόρων ελαίων (ελαιολάδων και σπορελαίων) παράγονται διάφορες τοξικές ενώσεις (όπως αλδεΐδες, υπεροξειδία κ.α) επικίνδυνες για την υγεία, πολλές από τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί ή θεωρούνται ύποπτες για διάφορες παθήσεις όπως καρκίνος, Αλτσχάιμερ κλπ. Η ποσότητα των ουσιών αυτών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι το είδος του ελαίου, ο χρόνος και η θερμοκρασία της θερμικής καταπόνησης.

Στο κεφάλαιο αυτό πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της τοξικότητας εκχυλισμάτων θερμικώς καταπονημένων ελαίων με τη χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος που αναπτύχθηκε. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις που σχετίζονταν με την ποιότητα των ελαίων: προσδιορισμοί αριθμού ανισιδίνης, αριθμού υπεροξειδίων και του αριθμού Totox. Τέλος, στο κεφάλαιο αυτό γίνεται προσπάθεια συσχέτισμού των αποτελεσμάτων αυτών με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με χρήση του βιοαισθητήρα ροής.

8.2. Μέθοδος και αντιδραστήρια

Αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν άμυλο, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1000 N, DMSO και CH_3COOH αναλυτικής καθαρότητας της Merck, ανισιδίνη της Sigma –Aldrich.

8.2.1. Πειραματική διάταξη-Δειγματοληψία

Εξετάστηκε η τοξικότητα εκχυλισμάτων από 6 διαφορετικά είδη φυτικών ελαίων: ηλιελαίου, αραβοσιτελαίου, πυρηνελαίου, σογιελαίου, έξαιρετικά παρθένου ελαιολάδου και ενός ραφινρισμένου ελαιολάδου. Κάθε έλαιο καταπονήθηκε θερμικά σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (στους 100, 150 και 190 °C) για 8 ώρες σε κάψες από pyrex διαμέτρου 20 cm. Σε κάθε κάψα προστέθηκαν 200 g ελαίου. Έτσι η επιφάνεια επαφής κάθε ελαίου με τον αέρα

ήταν περίπου 314 cm². Η θέρμανση πραγματοποιήθηκε σε 3 θερμαντικές συσκευές Heidolph MR3001 (μία για κάθε θερμοκρασία καταπόνησης). Για τον συνεχή έλεγχο θερμοστάτησης χρησιμοποιήθηκαν θερμομέτρα. Για κάθε λάδι σε κάθε θερμοκρασία γινόταν λήψη 35 mL ελαίου έπειτα από μισή, 2, 5 και 8 ώρες θερμικής καταπόνησης. Η ποσότητα αυτή ήταν επαρκής για προσδιορισμούς α) τοξικότητας με χρήση του βιοαισθητήρα ροής *Vibrio fischeri*, β) αριθμού ανισιδίνης και γ) αριθμού υπεροξειδίων.

8.2.2. *Vibrio fischeri* - Εκχύλιση με MeOH-H₂O 20:80 v/v

Στο πείραμα αυτό ηλιέλαιο, εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο και πυρηνέλαιο, καταπονήθηκαν θερμικά όπως περιγράφεται στο εδάφιο 8.2.1.

Ζυγίζονται 5,000 g θερμικά καταπονημένου ελαίου εντός δοκιμαστικού σωλήνα με πώμα. Προστίθενται 2,5mL MeOH-H₂O 20:80 v/v και αναδεύεται ο σωλήνας για ένα λεπτό σε vortex. Μετά ο σωλήνας τοποθετείται στη φυγόκεντρο για να επιταχυνθεί ο διαχωρισμός των φάσεων. Συλλέγεται το εκχύλισμα με γυάλινο σιφόνιο Pasteur. Η εναπομένουσα φάση του ελαίου επανακχυλίζεται με τον ίδιο τρόπο και το δεύτερο εκχύλισμα ενώνεται με το πρώτο. Λαμβάνονται 1,25 mL του εκχυλίσματος μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 25,0 mL και συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με το εκχυλιστικό μέσο. Το διάλυμα που προκύπτει από την αραιώση αυτή είναι το τοξικό δείγμα που θα εισαχθεί ως φέρον ρεύμα στο μονοδιαυλικό αυτοματοποιημένο αναλυτή ροής. Η αραιώση γίνεται έτσι ώστε η τοξική δράση να μειωθεί όπως απαιτείται από την ανθεκτικότητα των βακτηρίων *Vibrio fischeri*.

8.2.3. *Vibrio fischeri* - Εκχύλιση με DMSO-H₂O 20:80 v/v

Στο πείραμα αυτό ηλιέλαιο, παρθένο ελαιόλαδο, πυρηνέλαιο, αραβοσιτέλαιο, σογιέλαιο και ελαιόλαδο, καταπονήθηκαν θερμικά. Ακολουθείται η διαδικασία εκχύλισης που περιγράφεται στο εδάφιο 8.2.2 με αντικατάσταση της MeOH από DMSO. Το εκχύλισμα αυτό συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με τον διαλύτη εκχύλισης. Το διάλυμα που προκύπτει από την αραιώση αυτή είναι το τοξικό δείγμα που θα εισαχθεί ως φέρον ρεύμα στο μονοδιαυλικό αυτοματοποιημένο αναλυτή ροής που αναπτύχθηκε στο κεφάλαιο 7.

8.2.4 Αριθμός υπεροξειδίων (Peroxide value)

Η οξειδωτική τάγγιση οφείλεται σε οξείδωση του λίπους και συντελείται με πολλά ενδιάμεσα στάδια που περιλαμβάνουν κυρίως σχηματισμό υπεροξειδίων που σταδιακά μετατρέπονται σε αλδεϋδες και κετόνες. Αυτά τα δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, ειδικά οι αλδεϋδες, εμφανίζουν χαρακτηριστική δυσοσμία. Η συνηθέστερη μέθοδος μέτρησης είναι ο αριθμός υπεροξειδίων ο οποίος αναφέρεται σε αριθμό χλιοστοϊσοδυνάμων O_2 ανά χιλιόγραμμο λίπους (meq O_2 / Kg). Η επίσημη μέθοδος προσδιορισμού PV βασίζεται σε ιωδομετρική ογκομέτρηση [115]. Η μέθοδος βασίζεται στον προσδιορισμό του ιωδίου που απελευθερώνουν τα υπεροξειδία από κορεσμένο διάλυμα KI. Κάθε δείγμα ελαιολάδου αναλύθηκε εις τριπλούν. Το πρότυπο διάλυμα ογκομέτρησης ήταν $Na_2S_2O_3$ κανονικότητας 0,1000 N (Merck).

Πειραματική διαδικασία :

Σε κωνική φιάλη των 300 mL ζυγίζεται ακριβής ποσότητα ελαίου σε αναλυτικό ζυγό. Η ποσότητα που ζυγίζεται από το κάθε δείγμα θερμικά καταπονημένου ελαίου κυμαίνεται, στο συγκεκριμένο πείραμα, σε μία περιοχή εύρους 1,5 – 5 g. Αυτό γίνεται με βάση τις οδηγίες που δίνει η επίσημη μέθοδος προσδιορισμού υπεροξειδίων των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων [115] (Πίνακας 8.1):

Πίνακας 8.1 : Βάρος λιπαρής ύλης και αναμενόμενης τιμής υπεροξειδίων σε meq O₂/Kg.

Αναμενόμενη τιμή υπεροξειδίων (meq)	Ενδεικνυόμενο Βάρος (g)
0 έως 12	5,0 έως 2,0
12 έως 20	2,0 έως 1,2
20 έως 30	1,2 έως 0,8
30 έως 50	0,8 έως 0,5
50 έως 90	0,5 έως 0,3

Ακολουθως στην κωνική φιάλη προστίθενται με ογκομετρικό κύλινδρο 10,0 mL χλωροφόρμιο αναδεύεται το δείγμα ελαίου μέχρι να διαλυθεί πλήρως και προστίθενται 15,0 mL οξικού οξέος. Το διάλυμα αναδεύεται και προστίθεται 1,00 mL κορεσμένου διαλύματος ιωδιούχου καλίου. Η κωνική φιάλη πωματίζεται με βαμβάκι και αναδεύεται για ένα λεπτό. Στη συνέχεια αφήνεται για 5 λεπτά σε συνθήκες σκότους. Μετά το πέρας του χρόνου προστίθενται 75,0 mL απιονισμένου ύδατος με ογκομετρικό κύλινδρο. Το διάλυμα της κωνικής φιάλης ογκομετρείται με πρότυπο διάλυμα θειοθειικού νατρίου 0,0100 N μέχρι να εξαφανιστεί η κίτρινη χροιά που έχει αποκτήσει το ογκομετρούμενο διάλυμα. Μόλις εξαφανιστεί η χροιά αυτή προστίθενται 4-5 σταγόνες διαλύματος αμύλου περιεκτικότητας 1 % w/v. Το ογκομετρούμενο διάλυμα αποκτά μπλε χρώση και η ογκομέτρηση με το πρότυπο διάλυμα Na₂S₂O₃ 0,0100 N συνεχίζεται μέχρι τελικού σημείου-αποχρωματισμού. Για λόγους ελέγχου της ποιότητας των αντιδραστηρίων γίνεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα ογκομέτρηση τυφλού διαλύματος. Η τιμή υπεροξειδίων, Peroxide Value (PV), υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$PV = \frac{V \times T \times 1000}{m} \quad (8.1)$$

Όπου:

V είναι ο όγκος σε mL του προτύπου διαλύματος Na₂S₂O₃ που καταναλώθηκε για την ογκομέτρηση.

T είναι ο τίτλος- κανονικότητα του προτύπου διαλύματος Na₂S₂O₃ ίσος με 0,0100 N.

m είναι η μάζα του δείγματος ελαίου που ζυγίστηκε εντός της κωνικής φιάλης.

Για κάθε δείγμα υπολογίζεται ο μέσος όρος τριών μετρήσεων συνοδευόμενος από την τυπική απόκλιση.

8.2.5. Αριθμός Ανισιδίνης

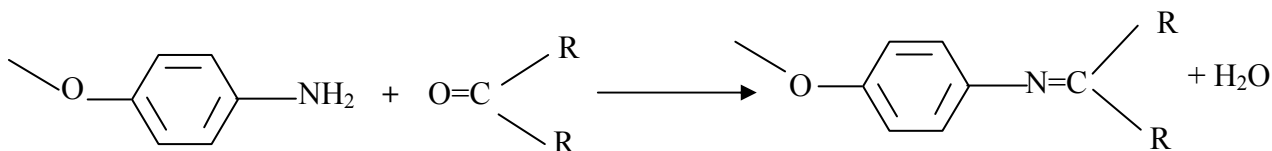
Ο αριθμός ανισιδίνης προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο IUPAC [116].

Ο δείκτης της π-ανισιδίνης αποτελεί προσδιορισμό του περιεχομένου σε αλδεύδες των λιπαρών υλών που αναλύονται, βασικά των α- και β- ακόρεστων αλδευδών.

Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης στα 350 nm της έγχρωμης ουσίας που σχηματίζεται κατά την αντίδραση των αλδευδικών συστατικών που βρίσκονται στο δείγμα με την π-ανισιδίνη.

Η ένταση του χρώματος των προϊόντων της αντίδρασης, εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση των αλδευδών αλλά και από τη δομή τους. Η μοριακή απορροφητικότητα μεταβάλλεται μέσα σε μια ευρεία περιοχή τιμών ανάλογα με τη δομή των αλδευδών.

Η παρουσία διπλού δεσμού σε συζυγιακή θέση με την καρβονυλική ομάδα, ενισχύει αισθητά τη μοριακή απορροφητικότητα. Για το λόγο αυτό οι α-β- ακόρεστες αλδεύδες συνεισφέρουν πολύ στο δείκτη της π-ανισιδίνης. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η εξής:



Διάλυμα Εργασίας: Παρασκευάζεται αρχικά το διάλυμα ανισιδίνης: Εντός ογκομετρικής φιάλης ζυγίζονται 0,1250 g στερεής ανισιδίνης που αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με παγόμορφο οξικό οξύ.

Διάλυμα Α: Σε ογκομετρική φιάλη των 25,0 mL ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό κατάλληλη ποσότητα θερμικά καταπονημένου ελαίου. Η ποσότητα που ζυγίζεται επιλέγεται έτσι ώστε το επεξεργασθέν με τη μέθοδο της ανισιδίνης δείγμα ελαίου να δίνει απορρόφηση εντός της γραμμικής περιοχής ισχύος νόμου του Beer (δηλαδή από 0,1 έως 1,2 μονάδες απορρόφησης). Η ζυγισθείσα ποσότητα ελαίου αραιώνεται με ισοοκτάνιο μέχρι τη χαραγή.

Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με βιδωτό πώμα προστίθενται 5,00 mL από το διάλυμα Α. Στη συνέχεια στο ίδιο δοχείο προστίθεται με αυτόματο σιφόνιο 1,00 mL από το διάλυμα εργασίας. Το μίγμα αναδεύεται, πωματίζεται ο δοκιμαστικός σωλήνας και αφήνεται επί 5 λεπτά στο σκοτάδι. Με το πέρασμα των 5 λεπτών μετρείται η απορρόφηση του μίγματος σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης (Jasco V550) στα 350 nm.

Κάθε δείγμα θερμικά καταπονημένου ελαίου αναλύεται εις τριπλούν. Κάθε μέτρηση στα παρακάτω διαγράμματα-αποτελέσματα είναι ο μέσος όρος τριών μετρήσεων. Επίσης μετράται και διάλυμα τυφλού.

Ο αριθμός ανισιδίνης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{Δείκτης Ανισιδίνης} = \frac{25 (1,2 A_b - A_s)}{m} \quad (8.2)$$

Όπου:

m είναι η μάζα του δείγματος σε g.

A_b είναι η τιμή της απορρόφησης πριν την προσθήκη π-ανισιδίνης.

A_s είναι η τιμή της απορρόφησης μετά την προσθήκη π-ανισιδίνης.

8.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Τα αποτελέσματα % παρεμπόδισης εκχυλισμάτων των μη θερμικά καταπονημένων ελαίων με χρήση διαλύτη MeOH-H₂O 20:80 v/v στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri* παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα 8.2:

Πίνακας 8.2. Πειραματικά αποτελέσματα τοξικότητας εκχυλισμάτων καταπονημένων ελαίων με την τεχνολογία που αναπτύχθηκε.

	% Παρεμπόδιση±SD, n=3
Ηλιέλαιο	19,9 ± 0,7
Πυρηνέλαιο	44,8 ± 1,0
Σογιέλαιο	35,3 ± 0,8
Αραβοσιτέλαιο	33,5 ± 0,8
Ελαιόλαδο	35,3 ± 0,8
Παρθένο ελαιόλαδο	48,3 ± 1,0

Όπως παρατηρεί κανείς όλα τα εκχυλίσματα ελαίων προκαλούν παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri*. Τα μη θερμικώς καταπονημένα λάδια περιέχουν εξαιρετικά μικρές συγκεντρώσεις καρβονυλικών ενώσεων και υπεροξειδίων. Αυτό λοιπόν που προκαλεί την πτώση βιοφωταύγειας είναι πιθανόν η περιεκτικότητά τους σε φαινολικές – αντιοξειδωτικές ενώσεις και μέταλλα. Τις υψηλότερες τιμές παρεμπόδισης εμφανίζουν το παρθένο ελαιόλαδο και το πυρηνέλαιο, αμέσως μικρότερες το ελαιόλαδο, το σογιέλαιο και το αραβοσιτέλαιο και τη μικρότερη παρεμπόδιση εμφανίζει το ηλιέλαιο. Είναι γνωστό ότι το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο και το πυρηνέλαιο είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η τοξικότητα αυτή αφορά τα βακτήρια και όχι την τοξικότητα στον ανθρώπινο οργανισμό η οποία εκτιμάται ως ένα σημείο με τον ποσοτικό προσδιορισμό καρβονυλικών ενώσεων και υπεροξειδίων, δηλαδή με υπολογισμό της παραμέτρου Totox. Κατά τη θερμική καταπόνηση καταστρέφονται τα αντιοξειδωτικά και παράγονται τοξικά υπεροξείδια και αλδεϋδικές ενώσεις. Η ταχύτητα της διαδικασίας αυτής και η ποσότητα των ενώσεων που παράγονται ή καταστρέφονται διαφέρει ανάλογα με τον τύπο ελαίου και την αρχική περιεκτικότητα αυτού σε αντιοξειδωτικά. Για να μπορέσει να εξαχθεί κάποια συσχέτιση προτείνονται για μελλοντική ερευνητική εργασία τα εξής:

- 1) Απομόνωση μόνο των καρβονυλικών ενώσεων και χωριστά των υπεροξειδίων με κατάλληλη διαδικασία – εκχυλίσσεις – διαλύτες ώστε να εκτιμηθεί ξεχωριστά η επίδραση κάθε τύπου ενώσεων στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri*.
- 2) Σταθεροποίηση των πειραματικών συνθηκών θερμικής καταπόνησης των ελαίων. Μία τέτοια προτεινόμενη μέθοδος είναι η μέθοδος Rancimat η οποία εξασφαλίζει σταθερή θερμοκρασία καταπόνησης του ελαίου και σταθερή παροχή ποσότητας ατμοσφαιρικού οξυγόνου έτσι ώστε να αυξηθεί η επαναληψιμότητα της θερμικής καταπόνησης. Τα κλάσματα που λαμβάνονται στη μέθοδο Rancimat είναι υδατικά και κατά συνέπεια δεν απαιτείται εκχύλιση.

Τα πειραματικά αποτελέσματα της ανάλυσης των εκχυλισμάτων ελαίων με χρήση διαλύματος H₂O-MeOH 80:20 % v/v των θερμικώς καταπονημένων ελαίων στον αναπτυχθέντα βιοαισθητήρα ροής παρουσιάζονται στον πίνακα 8.3.

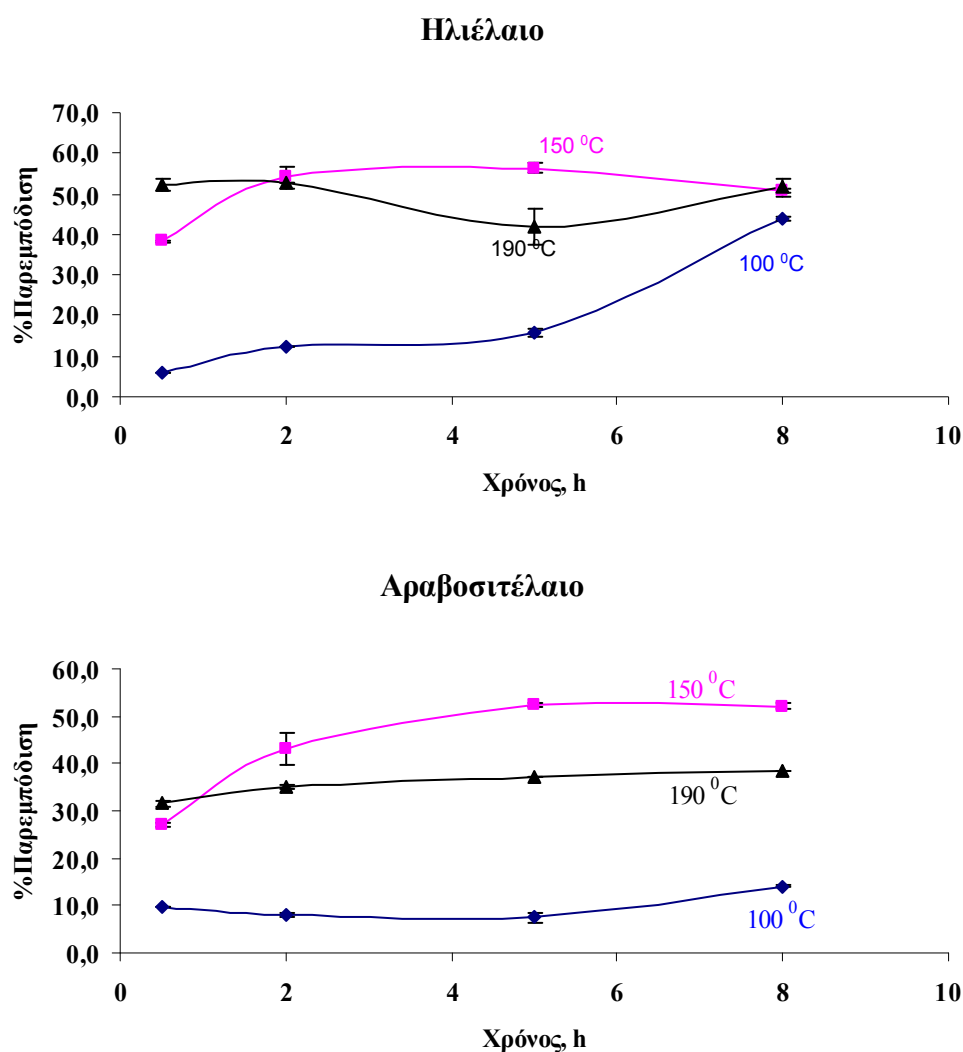
Πίνακας 8.3. % Παρεμπόδιση βιοφωταύγειας επαγόμενης από εκχύλισμα θερμικά καταπονημένου ελαίου με H₂O-MeOH 80:20 % v/v .

Θ, °C	Χρόνος καταπόνησης, h			
	½	2	5	8
<i>Ηλιέλαιο</i>				
100	4,8	27,1	45,0	59,7
150	35,5	58,9	75,2	81,6
190	39,9	41,7	55,3	48,1
<i>Παρθένο ελαιόλαδο</i>				
100	69,1	65,6	66,8	65,3
150	74,1	74,5	70,0	69,6
190	75,8	46,1	49,9	48,5
<i>Πυρηγέλαιο</i>				
100	9,1	6,7	14,7	10,6
150	17,3	31,8	33,8	21,8
190	40,8	55,9	37,2	47,1

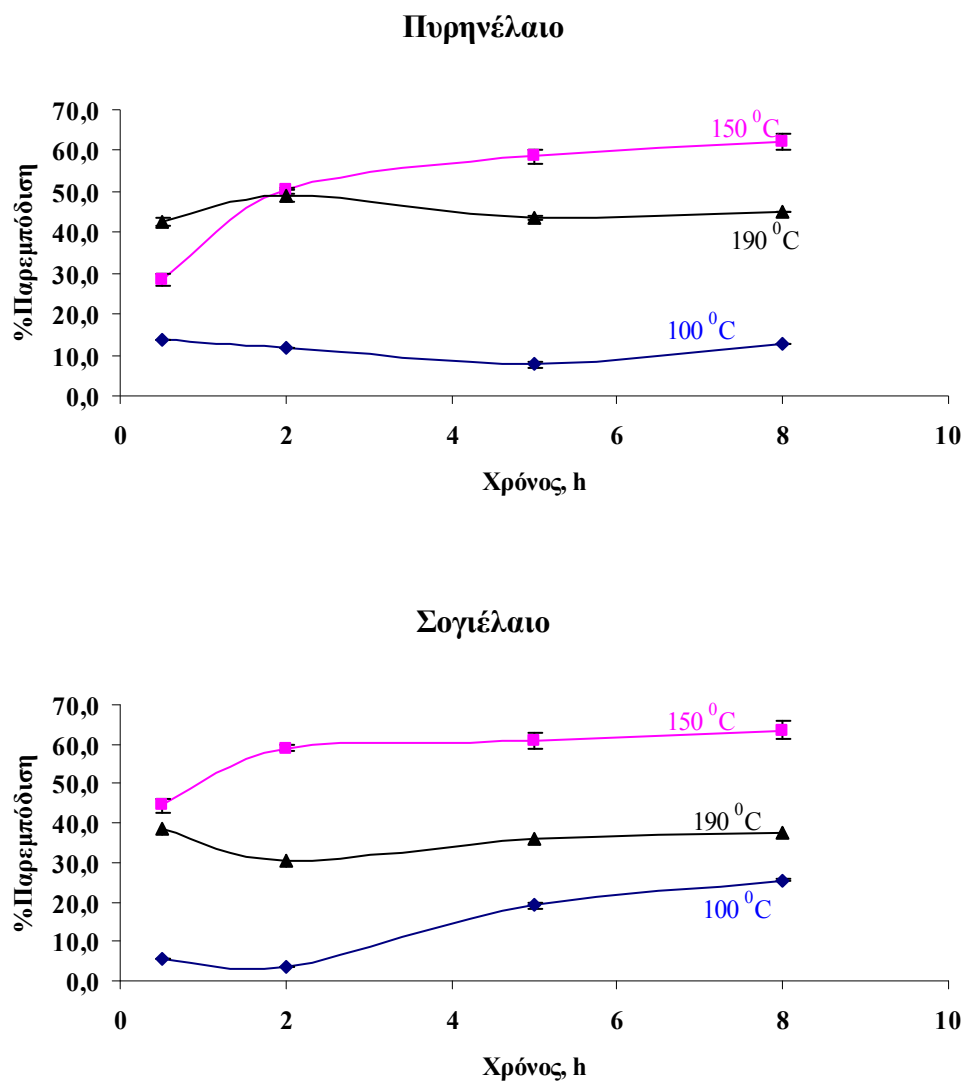
Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται για το ηλιέλαιο αύξηση της % παρεμπόδισης με την αύξηση του χρόνου θερμικής καταπόνησης στους 100, 150 και 190 °C. Εξάιρεση αποτελεί η τιμή της % παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας για θερμική καταπόνηση στους 190 °C επί 8 h. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο ότι οι αρχικά παραγόμενες τοξικές ενώσεις καταστρέφονται. Για τους 100 και 150 °C η % παρεμπόδιση των εκχυλισμάτων του παρθένου ελαιολάδου παραμένει σχετικά σταθερή ακόμα και για 8 ώρες θερμικής καταπόνησης. Αυτό οφείλεται πιθανόν στο εξής: Το παρθένο ελαιόλαδο ως γνωστόν είναι πλούσιο σε φαινολικές-αντιοξειδωτικές ουσίες οι οποίες όμως είναι τοξικές για τα βακτήρια *Vibrio fischeri*. Κατά τη διάρκεια της θερμικής καταπόνησης αυτές οι ουσίες καταστρέφονται, οπότε μειώνεται η παρεμπόδισή τους στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων, ενώ παράλληλα παράγονται άλλες ενώσεις (όπως υπεροξειδία και καρβονυλικές ενώσεις) που είναι τοξικές για τα βακτήρια. Είναι πιθανόν λοιπόν ότι η ταχύτητα καταστροφής των αντιοξειδωτικών ενώσεων είναι ίση με την ταχύτητα παραγωγής άλλων τοξικών ενώσεων, διαδικασίες που δρουν “ανταγωνιστικά” στην παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri* και για αυτό το

λόγο οι τιμές της % παρεμπόδισης στο παρθένο ελαιόλαδο είναι περίπου σταθερές για αυτές τις δύο θερμοκρασίες. Στους 190 °C φαίνεται ότι από τις δύο ώρες θερμικής καταπόνησης η ταχύτητα παραγωγής τοξικών ενώσεων υπερτερεί αυτής της καταστροφής των αντιοξειδωτικών ενώσεων. Στο πυρηνέλαιο δεν υπάρχει κάποια τέτοια συσχέτιση. Το μόνο που μπορεί να συμπεράνει κανείς είναι ότι για τον ίδιο χρόνο θερμικής καταπόνησης η % παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας.

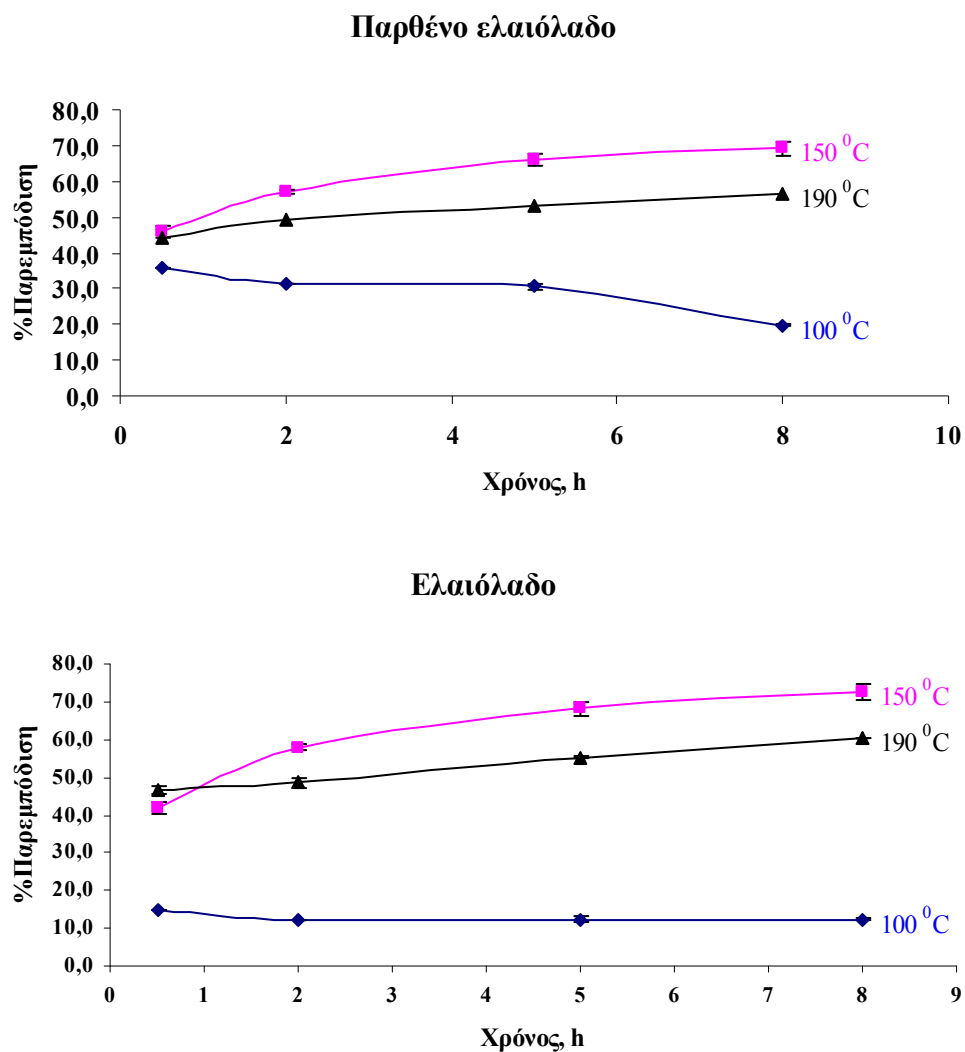
Τα αποτελέσματα τοξικότητας των εκχυλισμάτων των θερμικά καταπονημένων ελαίων με χρήση διαλύτη DMSO παρουσιάζονται στα σχήματα 8.1, 8.2, 8.3.



Σχήμα 8.1. Μεταβολή της % παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri* συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για ηλιέλαιο και αραβοσιτέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.



Σχήμα 8.2. Μεταβολή της % παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri* συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για πυρηνέλαιο και σογιέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.



Σχήμα 8.3. Μεταβολή της % παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri* συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για παρθένο ελαιόλαδο και ελαιόλαδο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.

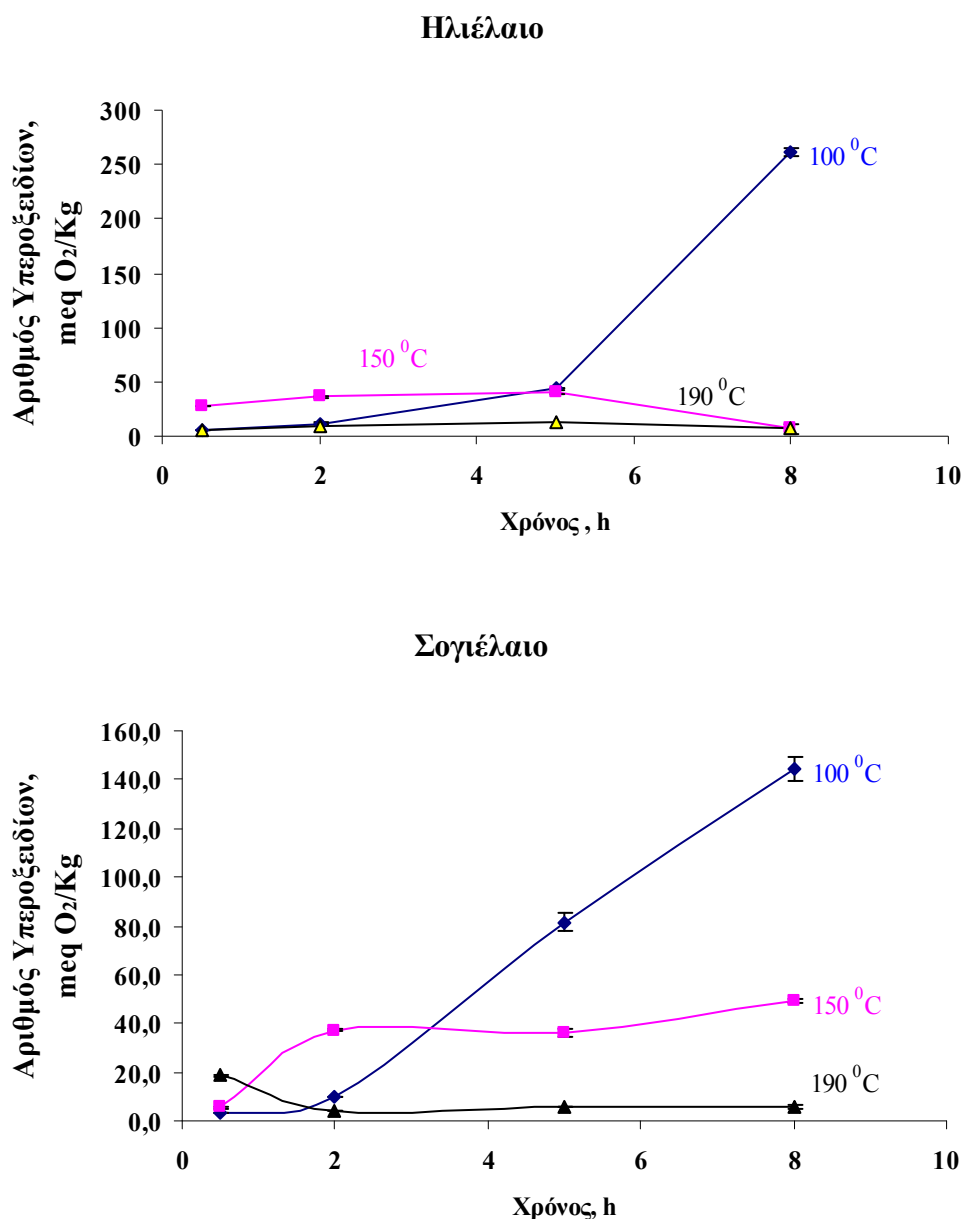
Συμπερασματικά:

A) Για όλα τα λάδια το κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι οι καμπύλες παρεμπόδισης έχουν την ίδια μορφή, δηλαδή: χαμηλότερα είναι η καμπύλη παρεμπόδισης των 100 °C, αμέσως ψηλότερα αυτή των 190 °C και ψηλότερα όλων η καμπύλη παρεμπόδισης των 150 °C.

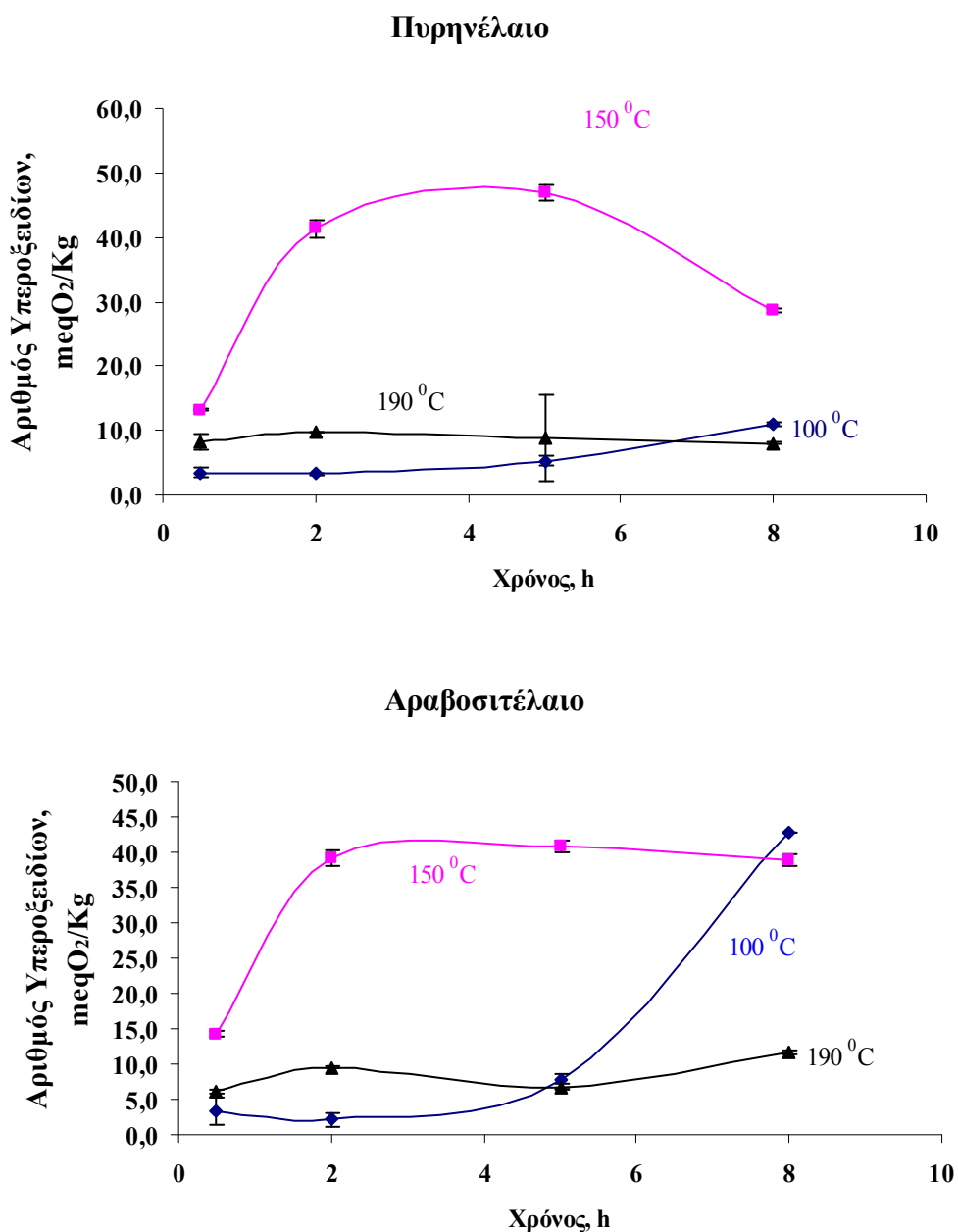
B) Οι καμπύλες παρεμπόδισης δεν παρουσιάζουν αυξητική τάση με την αύξηση του χρόνου θερμικής καταπόνησης για όλα τα είδη ελαίων. Για παράδειγμα η καμπύλη παρεμπόδισης στους 100°C για το παρθένο ελαιόλαδο είναι φθίνουσα ενώ για το ελαιόλαδο σταθερή.

Σε όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν με την νέα τεχνολογία έγιναν επίσης μετρήσεις κλασικών παραμέτρων που σχετίζονται με την οξείδωση των ελαίων: αριθμού υπεροξειδίων και αριθμού ανισιδίνης. Επίσης έγινε και υπολογισμός του αριθμού Totox. Στόχος ήταν η εκτίμηση πιθανών συσχετίσεων.

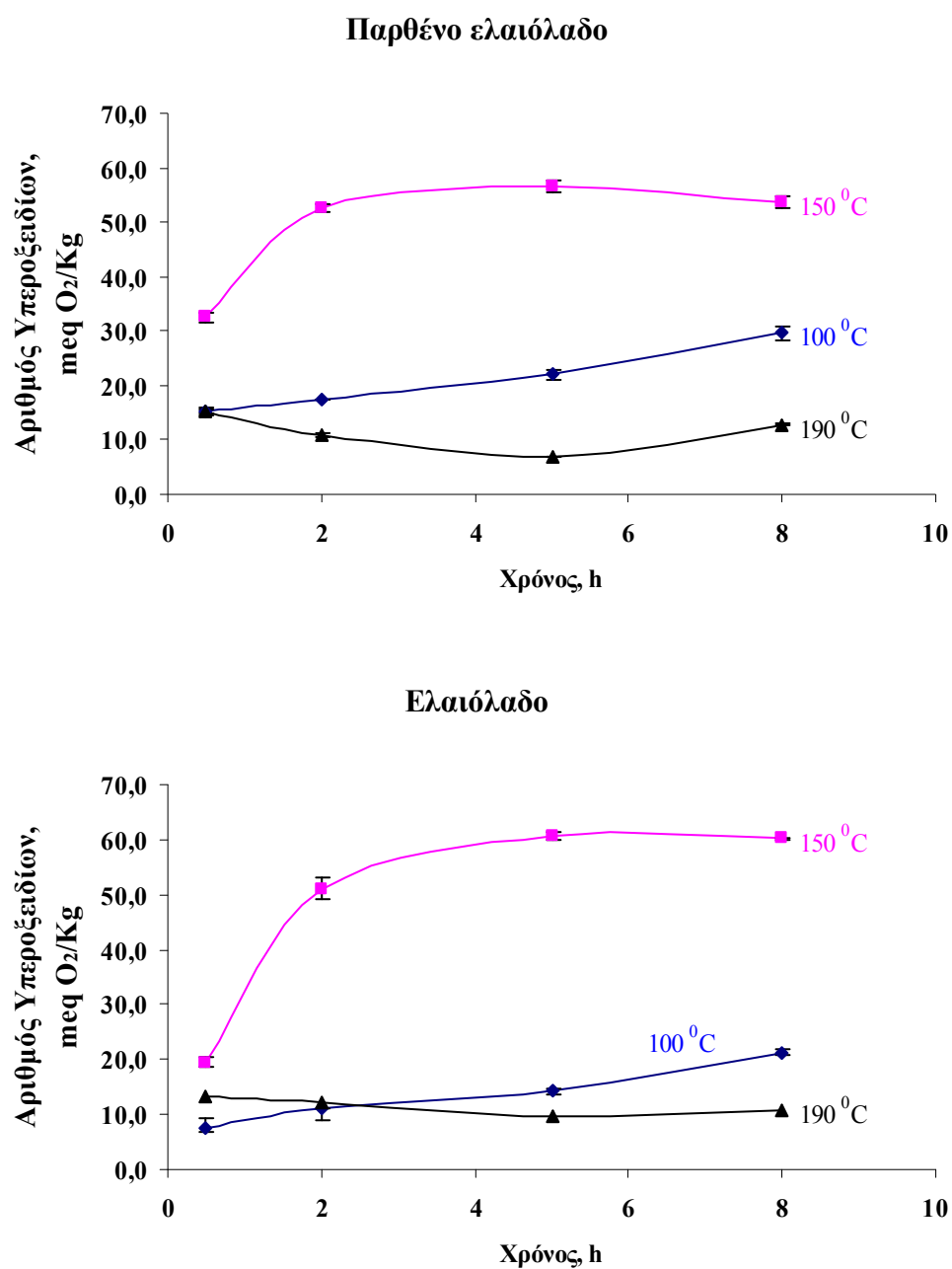
Τα πειραματικά αποτελέσματα για τον προσδιορισμό αριθμού υπεροξειδίων στα δείγματα θερμικά καταπονημένου ελαίων παρουσιάζονται στα σχήματα 8.4-8.6.



Σχήμα 8.4. Μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για ηλιέλαιο και σογιέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.



Σχήμα 8.5. Μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για πυρηνέλαιο και αραβοσιτέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.

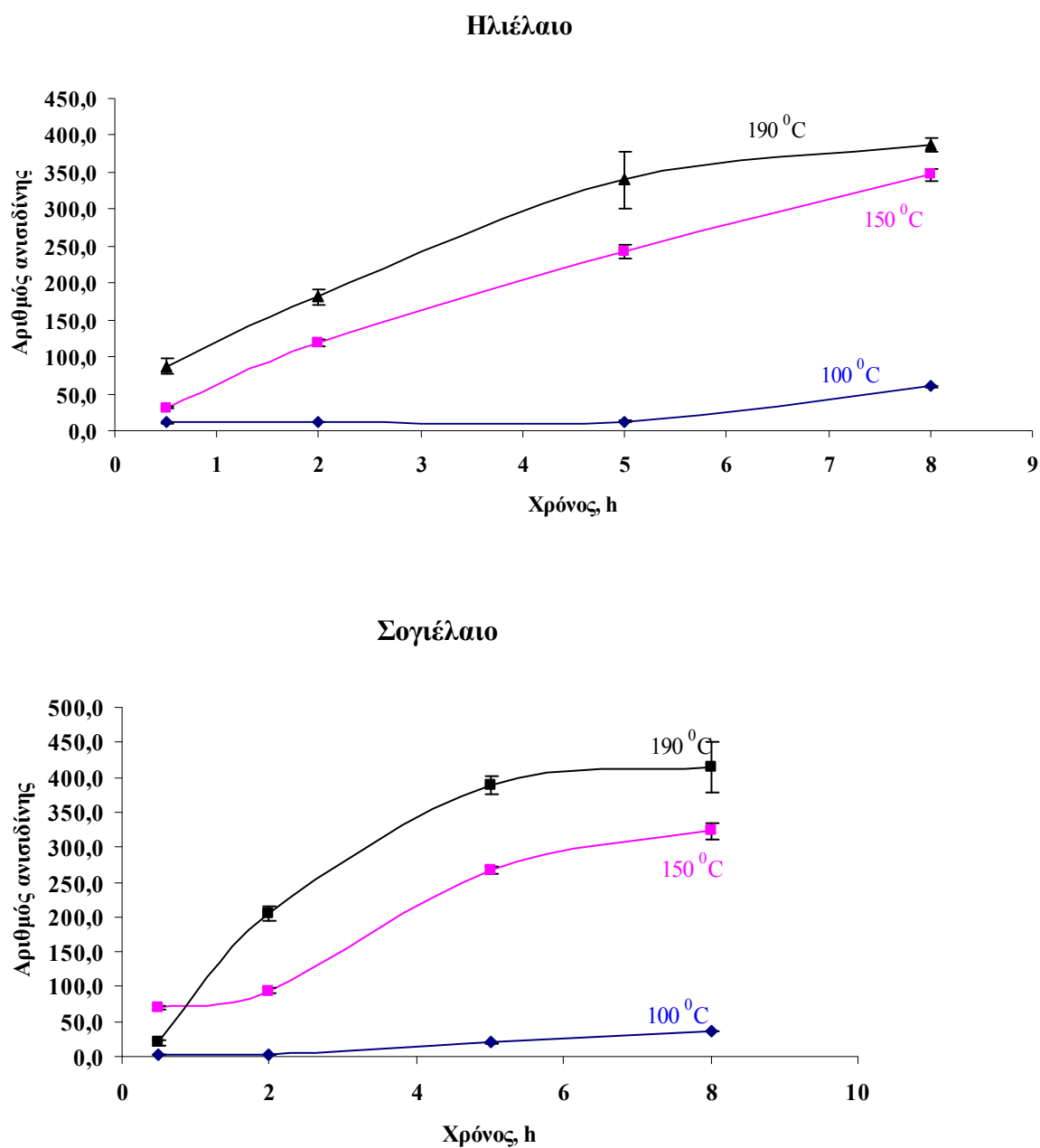


Σχήμα 8.6. Μεταβολή του αριθμού υπεροξειδίων συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για παρθένο ελαιόλαδο και ελαιόλαδο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.

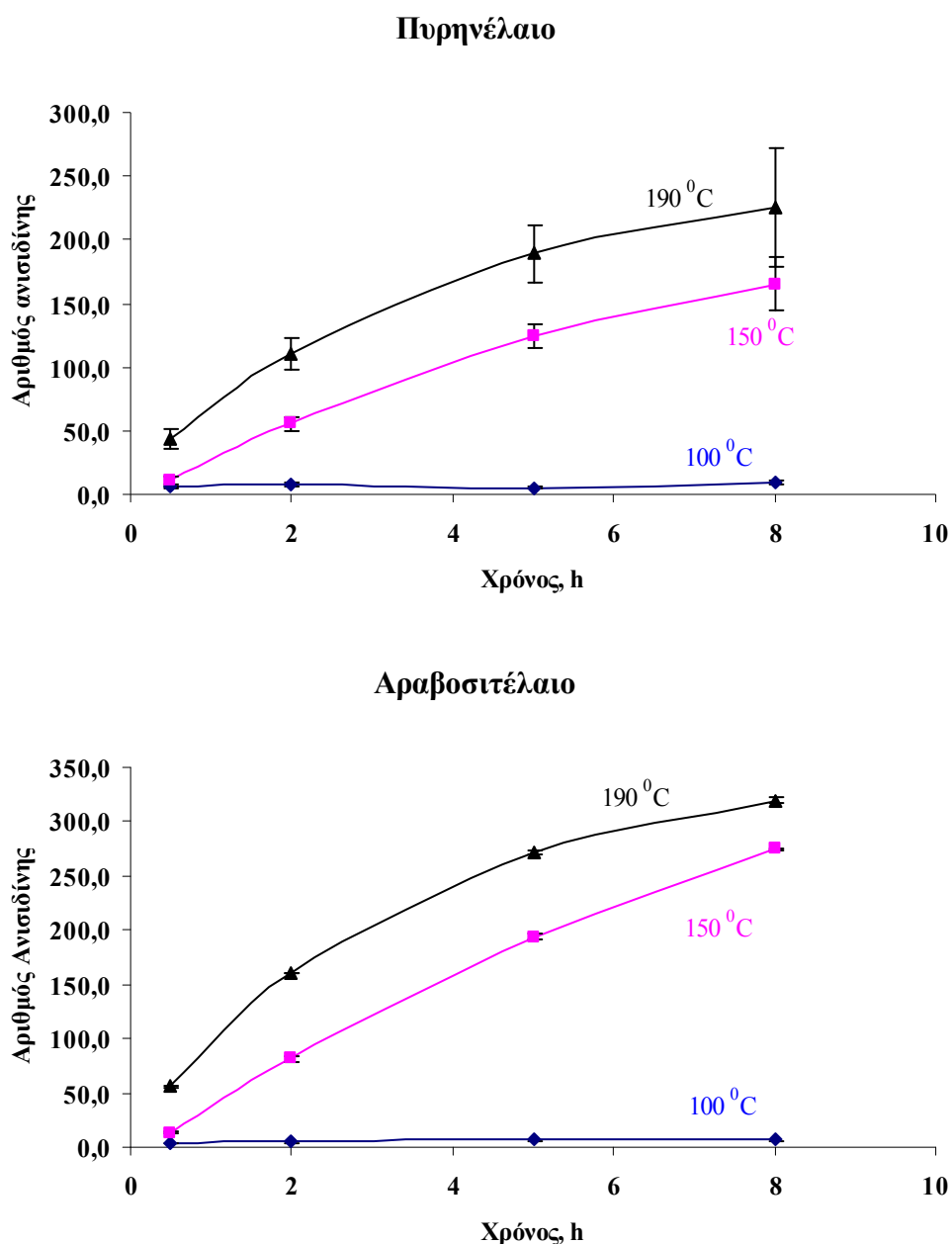
Τα υπεροξείδια σε ένα οξειδωμένο έλαιο είναι ενδιάμεσα προϊόντα που αποσυντίθενται κυρίως σε διάφορες καρβονυλικές ενώσεις. Η αποσύνθεση αυτή επιταχύνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και του χρόνου καταπόνησης και επομένως ο αριθμός υπεροξειδίων μπορεί να μειωθεί με την παρατεταμένη θέρμανση του ελαίου. Αυτό παρατηρείται και στο

συγκεκριμένο πείραμα για όλους τους τύπους ελαίων όπως φαίνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα που παρατίθενται στα παραπάνω σχήματα 8.4, 8.5, 8.6. Μάλιστα παρατηρείται ότι για όλα τα είδη ελαίων ο αριθμός υπεροξειδίων δεν είναι ανάλογος ούτε της θερμοκρασίας ούτε του χρόνου θέρμανσης. Έτσι για όλα τα είδη ελαίων που μελετήθηκαν, η καμπύλη αριθμού υπεροξειδίων για τους 150 °C (ενδιάμεση θερμοκρασία) είναι υψηλότερη από αυτές των 100 °C και 190 °C. Στους 150 °C δηλαδή ευνοείται ο σχηματισμός υπεροξειδίων. Αντίθετα οι καμπύλες αριθμού υπεροξειδίων για τους 190 °C κυμαίνεται στα ίδια ή χαμηλότερα επίπεδα με αυτές των 100°C. Επιπλέον σε όλα τα έλαια στους 150 °C και 190 °C παρατηρείται μείωση του αριθμού υπεροξειδίων για 2 ή 5 ώρες θερμικής καταπόνησης. Μόνο στους 100 °C για όλα τα έλαια ο αριθμός υπεροξειδίων αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου καταπόνησης.

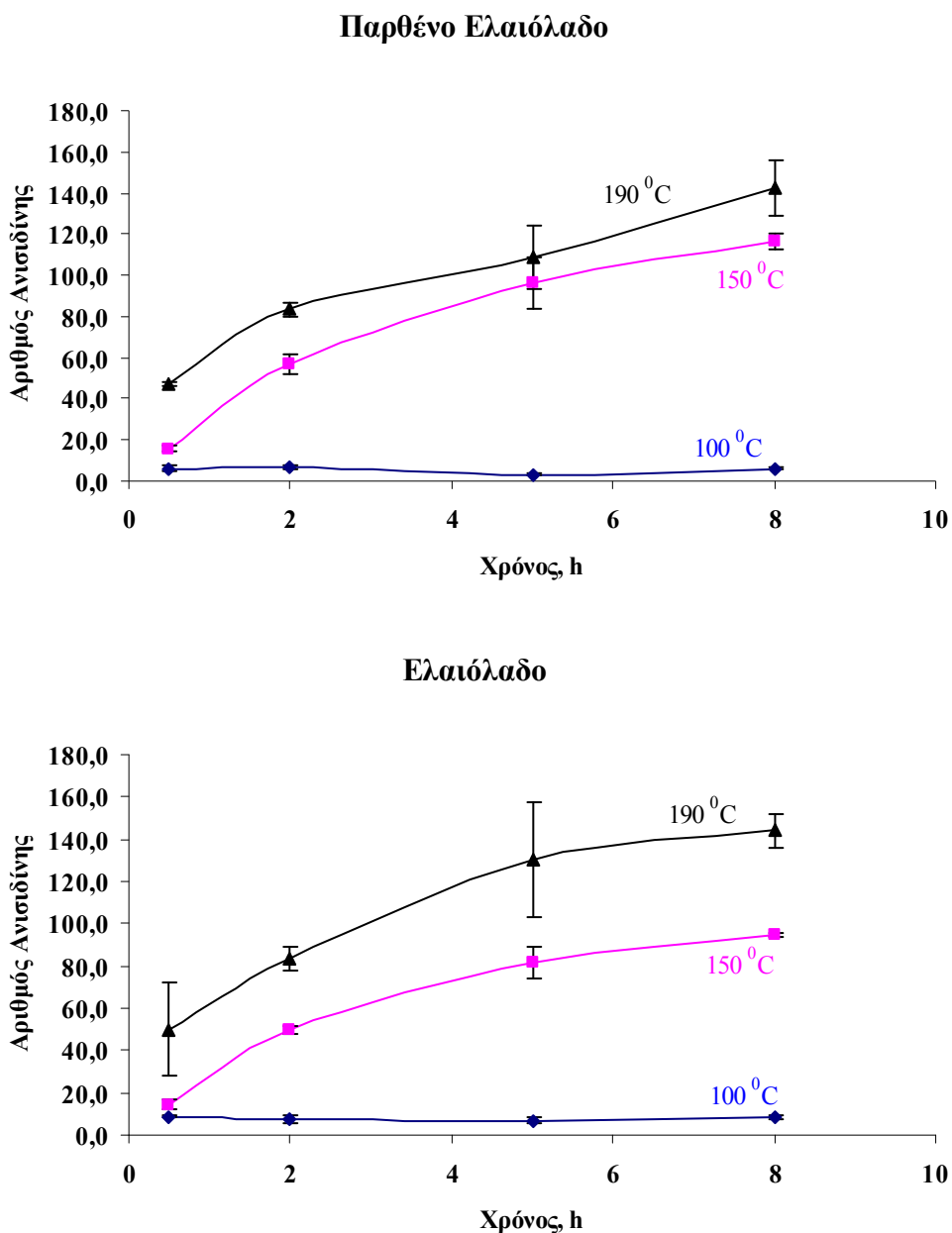
Τα αποτελέσματα με τη μέθοδο της ανισιδίνης για όλα τα έλαια παρουσιάζονται στα παρακάτω σχήματα 8.7, 8.8, 8.9.



Σχήμα 8.7. Μεταβολή του αριθμού ανισιδίνης συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για ηλιέλαιο και σογιέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.



Σχήμα 8.8. Μεταβολή του αριθμού ανισιδίνης συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για πυρηνέλαιο και αραβοσιτέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.



Σχήμα 8.9. Μεταβολή του αριθμού ανισιδίνης συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για πυρηνέλαιο και αραβοσιτέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών πειραμάτων.

Από τα διαγράμματα αυτά μπορεί να συμπεράνει κανείς τα εξής:

1) Για όλα τα είδη θερμικά καταπονημένων ελαίων παρατηρείται ότι ο αριθμός ανισιδίνης αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου καταπόνησης για 150 °C και 190 °C. Για τους 100 °C παρατηρείται για όλα τα έλαια σταθερότητα του αριθμού ανισιδίνης. Για τον ίδιο

χρόνο θερμικής καταπόνησης παρατηρείται αύξηση του αριθμού ανισιδίνης με αύξηση της θερμοκρασίας (μεγαλύτερες τιμές δείκτη ανισιδίνης για τους 190 °C, ενδιάμεσες για 150 °C και μικρότερες για τους 100 °C). Εξάιρεση αποτελεί το σογιέλαιο για μισή ώρα θερμικής καταπόνησης στους 150 °C.

2) Για τη θερμοκρασία των 190 °C το έλαιο με το μεγαλύτερο αριθμό ανισιδίνης είναι το ηλιέλαιο. Το δεύτερο μεγαλύτερο αριθμό ανισιδίνης παρουσιάζει το σογιέλαιο. Ενδιάμεσες τιμές αριθμού ανισιδίνης εμφανίζουν το αραβοσιτέλαιο και το πυρηνέλαιο. Τις μικρότερες τιμές παρουσιάζουν το παρθένο ελαιόλαδο και το ελαιόλαδο, με το πρώτο να έχει το μικρότερο αριθμό ανισιδίνης σε αυτή τη θερμοκρασία.

3) Για τους 150 °C και πάλι μεγαλύτερες τιμές αριθμού ανισιδίνης εμφανίζει το ηλιέλαιο και το σογιέλαιο. Ενδιάμεσες τιμές εμφανίζουν το αραβοσιτέλαιο και το πυρηνέλαιο. Τις μικρότερες τιμές αριθμού ανισιδίνης εμφανίζουν το παρθένο ελαιόλαδο και το ελαιόλαδο. Σε αυτή τη θερμοκρασία το παρθένο ελαιόλαδο εμφανίζει λίγο μεγαλύτερες τιμές δείκτη ανισιδίνης από το ελαιόλαδο. Αυτό μπορεί να οφείλεται και στο διαφορετικό τρόπο παρασκευής και στη διαφορετική χημική σύσταση.

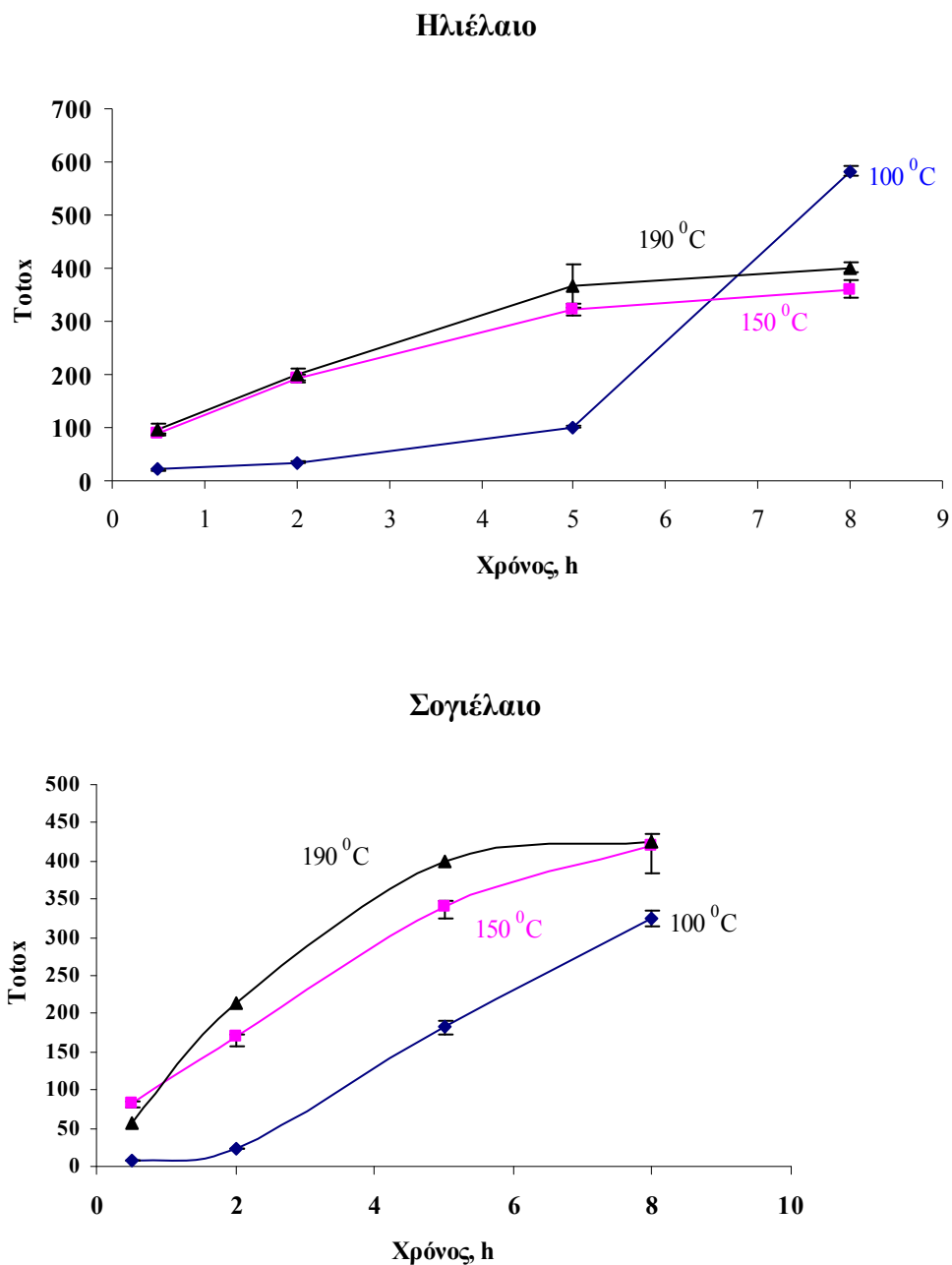
4) Για τους 100 °C εμφανίζονται μεγαλύτερες τιμές αριθμού ανισιδίνης για το ηλιέλαιο και το σογιέλαιο, όπως ακριβώς συνέβη και στους 150 °C και στους 190 °C. Στους 100 °C τα υπόλοιπα τέσσερα έλαια παρουσιάζουν μικρές και σταθερές τιμές αριθμού ανισιδίνης. Αυτό δείχνει ότι τα έλαια αυτά ανθίστανται στην παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων σε αυτή τη θερμοκρασία ακόμα και για 8 ώρες θερμικής καταπόνησης.

5) Συνολικά αποφαίνεται κανείς ότι πιο ανθεκτικά έλαια στην παραγωγή καρβονυλικών ενώσεων κατά τη θερμική καταπόνηση, είναι το παρθένο ελαιόλαδο και το ελαιόλαδο. Το πυρηνέλαιο και το αραβοσιτέλαιο παρουσιάζουν ενδιάμεση τέτοια ανθεκτικότητα. Το ηλιέλαιο και το σογιέλαιο παρουσιάζουν μικρότερη ανθεκτικότητα από όλα τα άλλα.

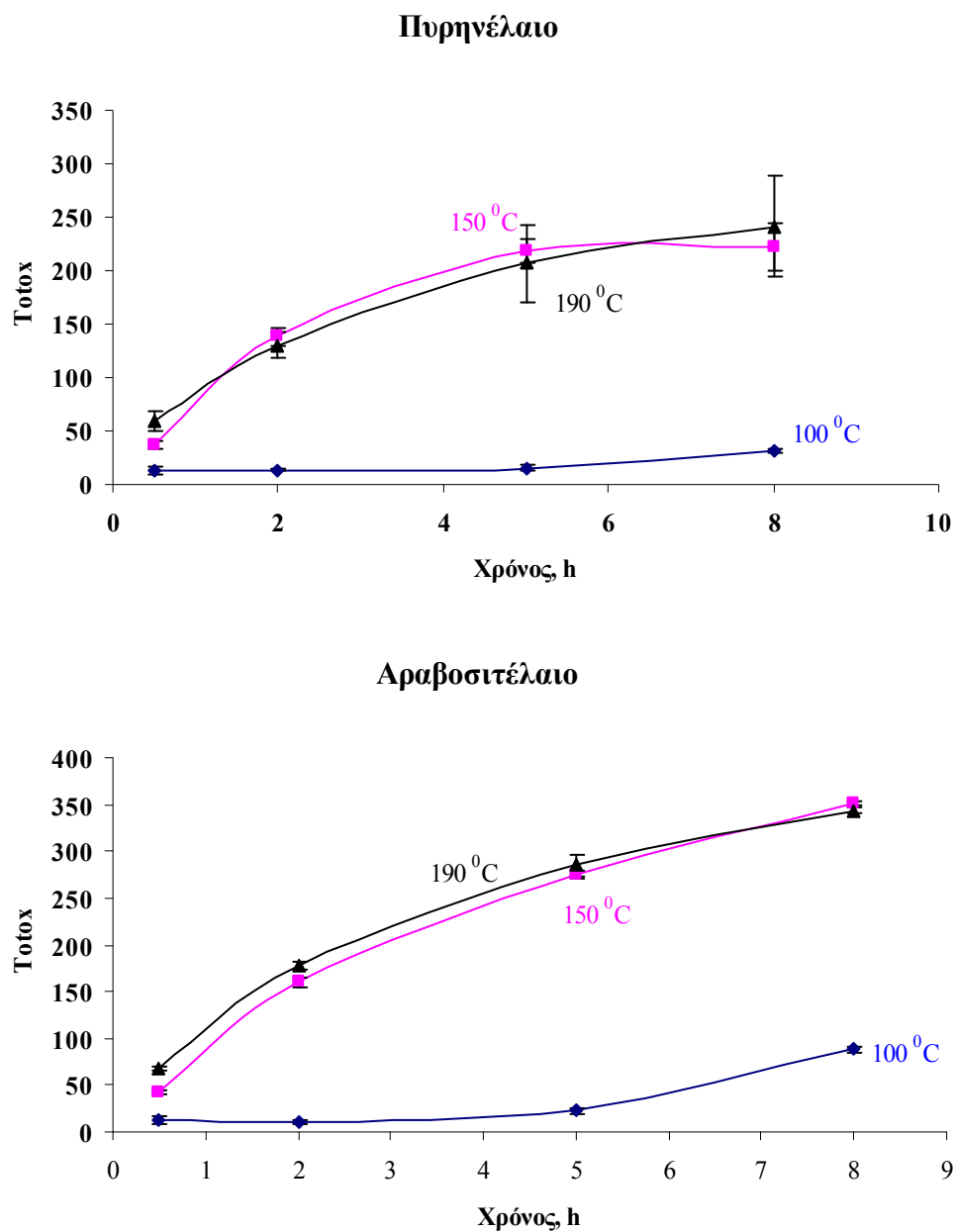
Μία άλλη παράμετρος η οποία χρησιμοποιείται για την εκτίμηση οξειδωτικής καταπόνησης είναι ο αριθμός Totox (Total Toxicity) ο οποίος υπολογίζεται με τον ακόλουθο τρόπο:

$$\text{Totox} = 2 \times \text{PV} + \text{AV} \quad (8.3)$$

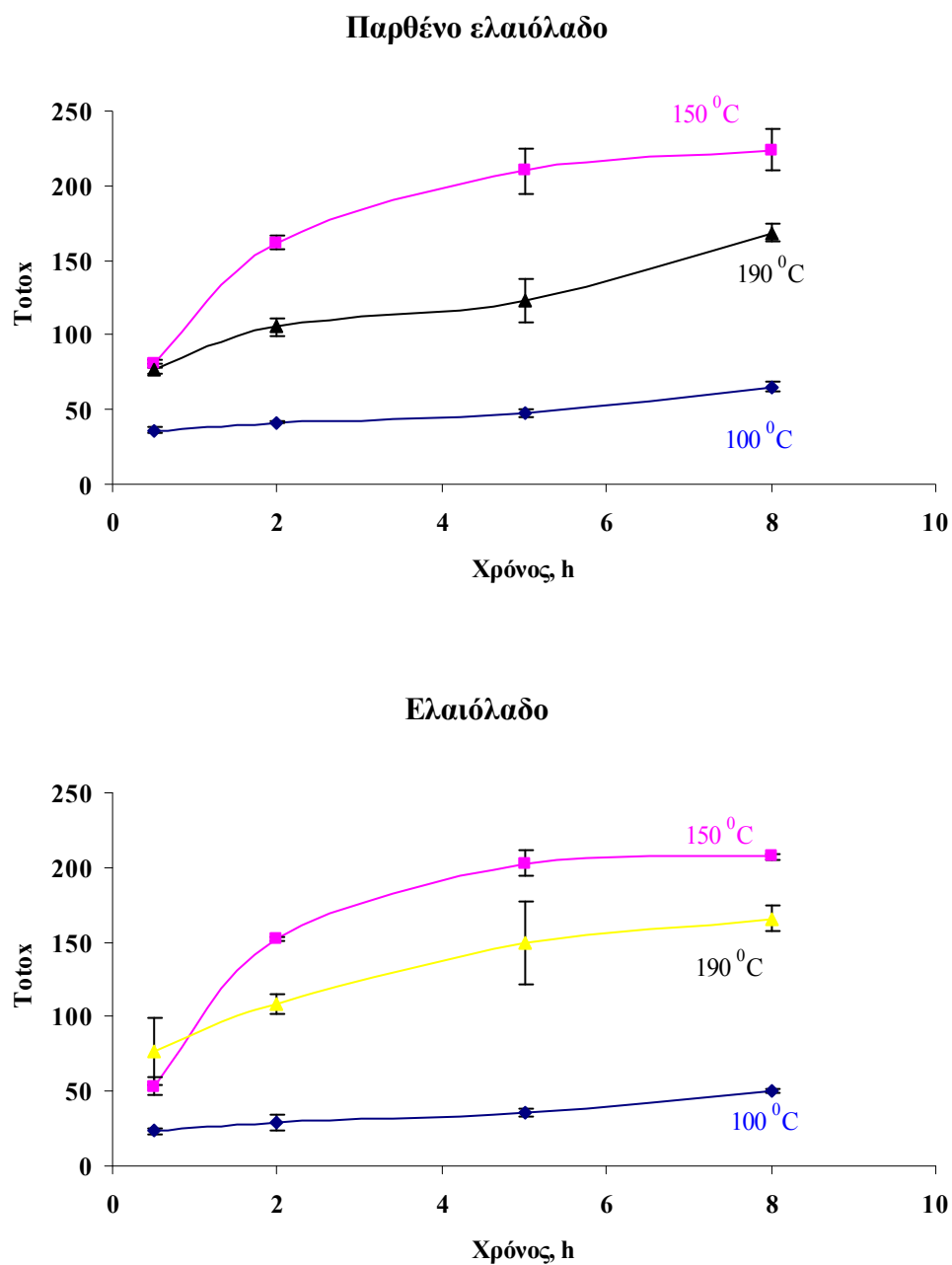
Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα σχήματα 8.10, 8.11 και 8.12.



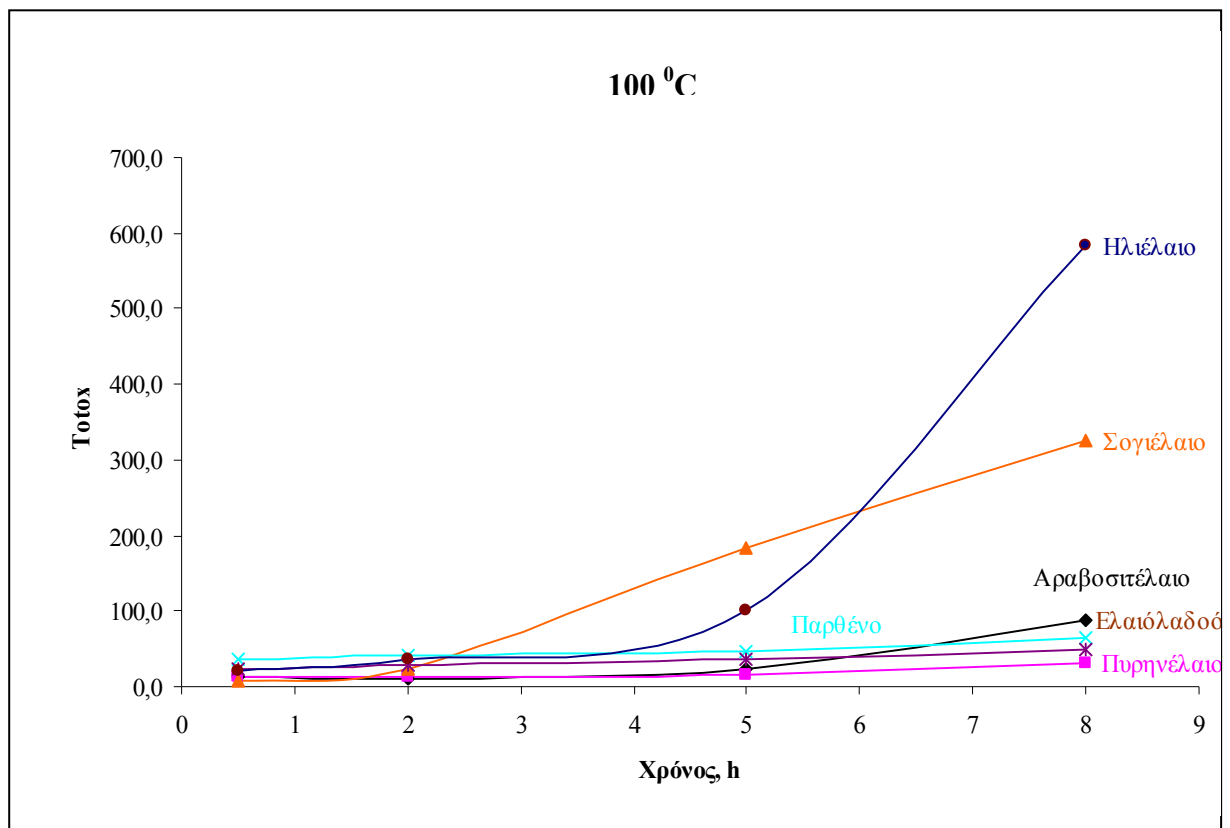
Σχήμα 8.10. Μεταβολή του αριθμού Totox συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για ηλιέλαιο και σογιέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών ζευγών πειραμάτων.



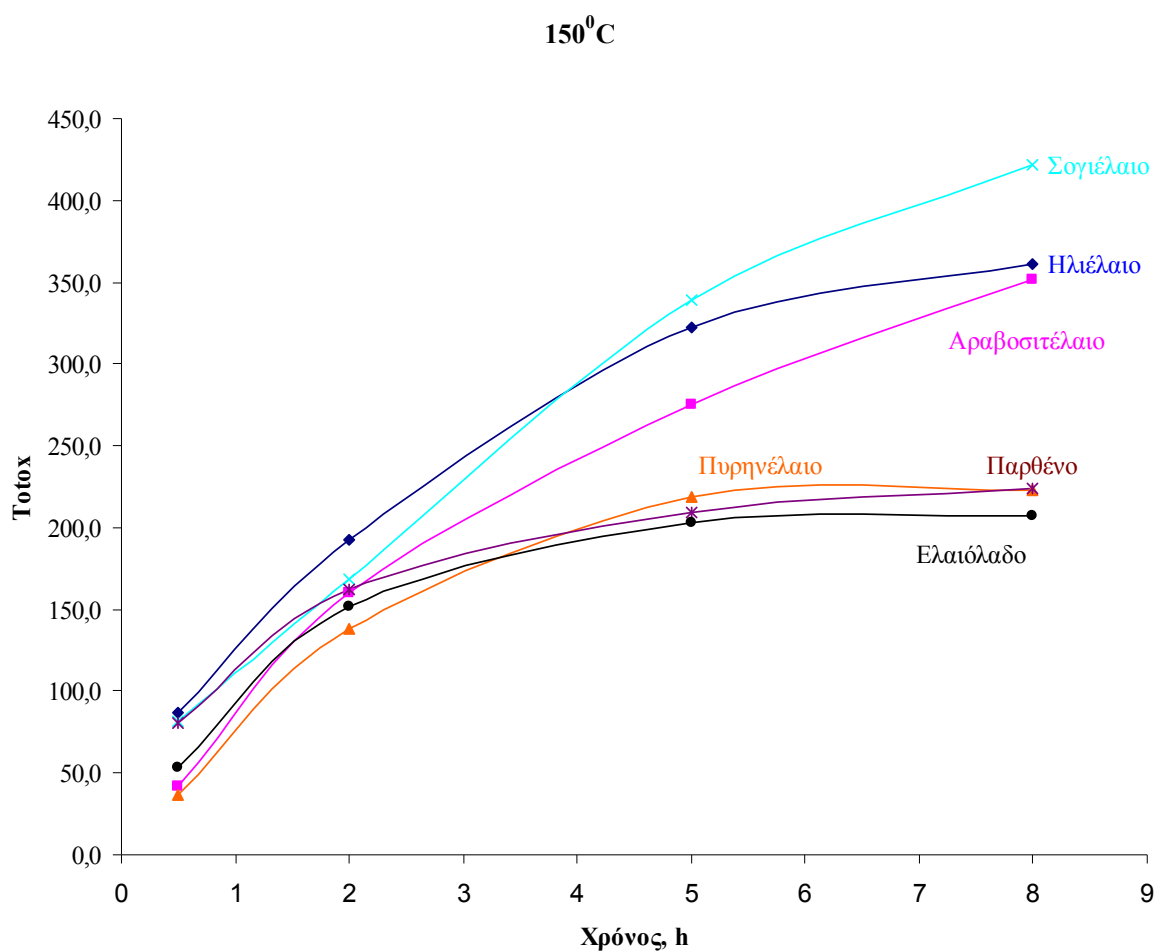
Σχήμα 8.11. Μεταβολή του αριθμού Totox συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για πυρηνέλαιο και αραβοσιτέλαιο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών ζευγών πειραμάτων.



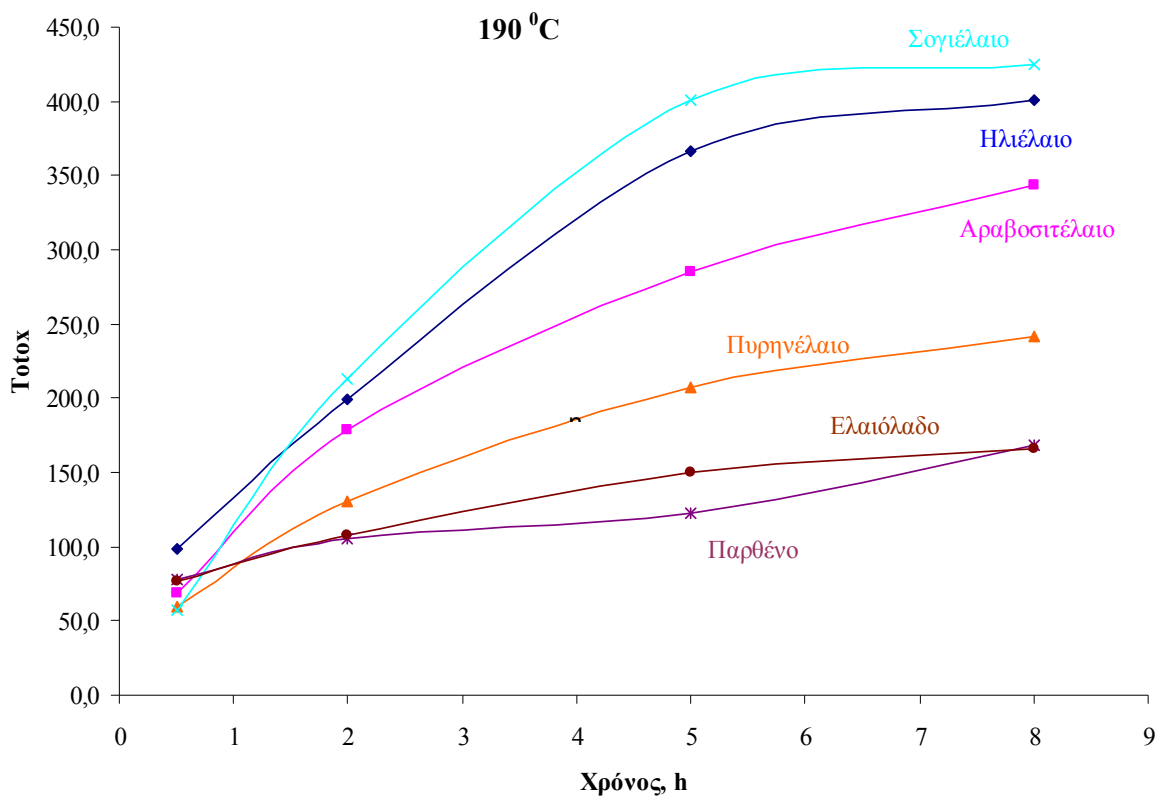
Σχήμα 8.12. Μεταβολή του αριθμού Totox συναρτήσει του χρόνου θερμικής καταπόνησης για παρθένο ελαιόλαδο και ελαιόλαδο. Κάθε σημείο είναι ο μέσος όρος τριών ζευγών πειραμάτων.



Σχήμα 8.13. Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής του αριθμού Totox για όλα τα έλαια συναρτήσει του χρόνου καταπόνησης στους 100 °C.



Σχήμα 8.14. Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής του αριθμού Totox για όλα τα έλαια συναρτήσει του χρόνου καταπόνησης στους 150 °C.



Σχήμα 8.15. Συγκριτικό διάγραμμα μεταβολής του αριθμού Totox για όλα τα έλαια συναρτήσει του χρόνου καταπόνησης στους 190 °C.

Από τα συγκριτικά αυτά διαγράμματα συμπεραίνονται τα εξής:

A) Στους 100 °C (σχήμα 8.13) παρατηρούνται ευδιάκριτα δύο ομάδες μετά τις δύο ώρες θερμικής καταπόνησης. Στην πρώτη ομάδα βρίσκονται το ηλιέλαιο και το σογιέλαιο που έχουν πολύ μεγαλύτερους αριθμούς Totox από τα υπόλοιπα 4 έλαια. Τα 4 υπόλοιπα έλαια έχουν χαμηλές και Totox καθ' όλη τη διάρκεια θερμικής καταπόνησης.

B) Για τους 150 °C παρατηρούνται 2 περιοχές. Στην πρώτη με τις μεγαλύτερες τιμές αριθμού Totox ανήκουν το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο και το αραβοσιτέλαιο. Στη δεύτερη ομάδα κατατάσσονται το παρθένο ελαιόλαδο, το πυρηνέλαιο και το ελαιόλαδο.

Γ) Στους 190 °C πλέον ξεχωρίζουν πλήρως οι καμπύλες αριθμού Totox. Η κατάταξη κατά σειρά αυξανόμενου αριθμού Totox είναι εμφανής και είναι ακόλουθη:

Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο \approx ελαιόλαδο < Πυρηνέλαιο < Αραβοσιτέλαιο < Ηλιέλαιο < Σογιέλαιο.

Δ) Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου *Vibrio fischeri* (σχήματα 8.1-8.3) με τα αντίστοιχα διαγράμματα του αριθμού Totox (σχήματα 8.13-8.15) συμπεραίνεται ότι η μορφή των καμπυλών των δύο μεθόδων είναι πανομοιότυπες για το παρθένο ελαιόλαδο και για το ελαιόλαδο: μεγαλύτερες τιμές % παρεμπόδισης και Totox για τους 150 °C, μικρότερες για τους 190 °C και ακόμα μικρότερες για τους 100 °C αντίστοιχα. Αρκετά καλή συσχέτιση των δύο συγκρινόμενων μεθόδων παρατηρείται και για το πυρηνέλαιο.

Για τα υπόλοιπα τρία έλαια δεν υπάρχει συσχέτιση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων. Το μόνο που θα μπορούσε να πει κανείς είναι ότι παρατηρείται μόνο μια μέτρια συσχέτιση των καμπυλών της μεθόδου *Vibrio fischeri* με αυτές του αριθμού υπεροξειδίων για τους 150 °C και 190 °C.

Δηλαδή, δεν παρατηρήθηκε για όλα τα έλαια ότι μεγαλύτερη % παρεμπόδιση – τοξικότητα στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri* συνοδεύεται από αντίστοιχο μεγαλύτερο αριθμό Totox. Αυτό μπορεί να αποδοθεί πιθανόν στο ότι τα δείγματα ελαίου που εξετάστηκαν, εκχυλίστηκαν με DMSO, ένα διαλύτη με μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα. Είναι λοιπόν αρκετά πιθανό να έχουν παραληφθεί στα εκχυλίσματα αυτά όχι μόνο καρβονυλικές ενώσεις και υπεροξείδια, που συμμετέχουν στον υπολογισμό του αριθμού Totox, αλλά και άλλες ενώσεις όπως φαινολικές – αντιοξειδωτικές ενώσεις οι οποίες μπορεί να συνεισφέρουν επίσης στην παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri* (κεφάλαιο 5 και 6 της διατριβής). Άλλωστε, ακόμα και τα μη θερμικά καταπονημένα λάδια παρουσιάζουν παρεμπόδιση στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri*.

Γενικά Συμπεράσματα

1) Πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη αιωρήματος παρακαταθήκης και επαναλήψιμου αιωρήματος εργασίας βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* κατάλληλων για εφαρμογή τους σε σύστημα ροής. Το αιώρημα εργασίας είχε σταθερό σήμα και τα βακτήρια *Vibrio fischeri* ήταν στην κατάλληλη φάση ανάπτυξης.

2) Αναπτύχθηκε βιοαισθητήρας ροής με τα εξής χαρακτηριστικά:

A) Μονοδιαυλικό σύστημα.

B) Φέρον ρεύμα είναι κάθε φορά το τοξικό δείγμα.

Γ) Επιτεύχθηκε υψηλή επαναληψιμότητα παρά το ότι το ότι μετρούμενη αναλυτική παράμετρος είναι η βιοφωταύγεια τους αιωρήματος εργασίας και όχι κάποιου φωταυγούς ομοιογενούς χημικού διαλύματος (διαλύτη-διαλυμένης ουσίας). Στην περίπτωση του βακτηριακού αιωρήματος εργασίας *Vibrio fischeri* υπάρχουν έντονα φαινόμενα καθίζησης τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της αρχικής μικρής ομοιογένειας τους αιωρήματος βακτηρίων. Για να επιλυθεί το σημαντικό αυτό πρόβλημα χρησιμοποιήθηκε συνεχής ανάδευση του αιωρήματος εργασίας των βακτηρίων πριν την εισαγωγή τους στη ροή του εκάστοτε φέροντος ρεύματος καθώς και η λήψη συχνών μετρήσεων τυφλού. Επιτεύχθηκε με τον τρόπο αυτόν αύξηση της επαναληψιμότητας των ενέσεων του βακτηριακού αιωρήματος (0,7% RSD για δέκα διαδοχικές εγχύσεις αιωρήματος εργασίας σε φέρον ρεύμα απιονισμένου ύδατος).

E) Μετρούμενη αναλυτική παράμετρος είναι η % παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των βακτηρίων *Vibrio fischeri* εκάστοτε τοξικού δείγματος.

3) Στον βακτηριακό βιοαισθητήρα ροής επιτεύχθηκε η εκτίμηση τοξικότητας μεταλλοϊόντων με προσδιορισμό της % παρεμπόδισης της βιοφωταύγειας των βακτηρίων, χωρίς αυτή να οφείλεται σε μεταβολές του pH λόγω υδρόλυσης. Το χαμηλότερο όριο μέτρησης των καμπυλών της % παρεμπόδισης ήταν $1,0 \times 10^{-4}$ M για τα ιόντα Cu^{2+} , $1,0 \times 10^{-4}$ M για τα ιόντα Pb^{2+} και $1,0 \times 10^{-5}$ M για τα ιόντα Hg^{2+} . Τα όρια αυτά μπορούν να χαμηλώσουν κι

άλλο αν εφαρμοστούν συνθήκες αναχαίτισης της ροής στην πειραματική διάταξη ώστε να δοθεί μεγαλύτερος χρόνος αλληλεπίδρασης τοξικού διαλύματος και βακτηρίων. Το πείραμα αυτό έδωσε σημαντικά αποτελέσματα [18] και κατευθυντήριες γραμμές για την ανάπτυξη πειραματικών διατάξεων για άλλες τοξικές, για τα βακτήρια *Vibrio fischeri*, ουσίες.

4) Με τον προσδιορισμό τοξικότητας οφειλόμενης σε φαινολικές αντιοξειδωτικές ουσίες εξήχθησαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Το σύστημα που αναπτύχθηκε δίνει την δυνατότητα εκτίμησης της τοξικότητας φαινολικών αντιοξειδωτικών βάσει της παρεμπόδισής τους στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri*.
- Με την αντικατάσταση της MeOH από το DMSO κατά τη διάλυση ή εκχύλιση μπόρεσαν να διαλυθούν και να εξεταστούν ακόμα περισσότερες ενώσεις και μάλιστα σε ευρύτερη περιοχή συγκεντρώσεων.
- Με χρήση του συστήματος που αναπτύχθηκε έγινε δυνατή η συσχέτιση τοξικότητας των φαινολικών αντιοξειδωτικών με τη δομή και το μοριακό τους βάρος.
- Σημειώνεται ότι για πρώτη φορά παρουσιάζονται μετρήσεις τοξικότητας των φαινολικών ουσιών με *Vibrio fischeri* σε αυτοματοποιημένο αναλυτή σε ροή.

5) Από το πείραμα προσδιορισμού τοξικότητας αλδευδών με τη χρήση του μονοδιαυλικού αυτού βιοαισθητήρα και την επιλογή συγκεκριμένου διαλύτη (υδατικό διάλυμα DMSO 5 % v/v) προέκυψαν τα εξής:

- Ταχύς (περίπου 2 δείγματα/min) και επαναλήψιμος προσδιορισμός (0,7-1 %RSD, n=3) της τοξικότητας των αλδευδών.
- Η τοξικότητα των αλδευδών, για τον ίδιο βαθμό ακορεστότητας αυξάνεται με αύξηση του μοριακού βάρους.
- Η μέθοδος αυτή είναι ταχύτερη από τη βιοδοκιμή με *Daphnia magna* που απαιτεί ένα 24ωρο αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών αυτών με το υπό εξέταση τοξικό διάλυμα αλδευδών.
- Το όριο ανίχνευσης της αναπτυχθείσης μεθόδου των βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* έφτασε σε τάξη συγκέντρωσης 10^{-4} M. Με τη βιοδοκιμή με τους μικροοργανισμούς *Daphnia magna* το όριο ανίχνευσης ήταν ακόμα μικρότερο (10^{-5} M). Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι τα ίδια όρια ανίχνευσης είναι εφικτά και με τη μέθοδο των βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* αρκεί να αλληλεπιδράσει το

βιοφωταυγές αιώρημα βακτηρίων με το τοξικό ρεύμα ρύπου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με αναχαίτιση της ροής. Σκοπός όμως της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη ταχέου συστήματος.

6) Ακόμα ο αναπτυχθείς βιοαισθητήρας αποδείχθηκε ικανός για τον προσδιορισμό φαινολικών αντιοξειδωτικών ουσιών. Μάλιστα επιτεύχθηκε σύγκριση τοξικότητας μεταξύ των ενώσεων που αναλύθηκαν με βάση τη δομή, την χαρακτηριστική-δραστική ομάδα και το μοριακό τους βάρος.

7) Τα συμπεράσματα που προέκυψαν εφαρμόζοντας την αναπτυχθείσα τεχνολογία για ανάλυση διαφόρων εκχυλισμάτων ελαίων είναι τα ακόλουθα:

A) Για όλα τα λάδια το κοινό χαρακτηριστικό είναι ότι οι καμπύλες παρεμπόδισης έχουν την ίδια μορφή, δηλαδή: χαμηλότερα είναι η καμπύλη παρεμπόδισης των 100 °C, αμέσως ψηλότερα αυτή των 190 °C και ψηλότερα όλων η καμπύλη παρεμπόδισης των 150 °C.

B) Οι καμπύλες παρεμπόδισης δεν παρουσιάζουν αυξητική τάση με την αύξηση του χρόνου θερμικής καταπόνησης για όλα τα είδη ελαίων. Για παράδειγμα η καμπύλη παρεμπόδισης στους 100 °C για το παρθένο ελαιόλαδο είναι φθίνουσα ενώ για το ελαιόλαδο σταθερή.

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό της παραμέτρου Totox:

A) Στους 100 °C δύο ώρες μετά την θερμική καταπόνηση παρατηρούνται ευδιάκριτα δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα βρίσκονται το ηλιέλαιο και το σογιέλαιο που έχουν πολύ μεγαλύτερους αριθμούς Totox από τα υπόλοιπα 4 έλαια. Τα τέσσερα υπόλοιπα έλαια έχουν χαμηλές τιμές Totox καθ' όλη τη διάρκεια θερμικής καταπόνησης.

B) Για τους 150 °C παρατηρούνται 2 περιοχές τοξικότητας. Στην πρώτη με τις μεγαλύτερες τιμές αριθμού Totox ανήκουν το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο και το αραβοσιτέλαιο. Στη δεύτερη ομάδα κατατάσσονται το παρθένο ελαιόλαδο, το πυρηνέλαιο και το ελαιόλαδο.

Γ) Στους 190 °C πλέον ξεχωρίζουν πλήρως οι καμπύλες αριθμού Totox. Η κατάταξη κατά σειρά αυξανόμενου αριθμού Totox είναι εμφανής και είναι η ακόλουθη:

Παρθένο ελαιόλαδο \approx Ελαιόλαδο < Πυρηνέλαιο < Αραβοσιτέλαιο < Ηλιέλαιο < Σογιέλαιο.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μεθόδου *Vibrio fischeri* με τα αντίστοιχα διαγράμματα του αριθμού Totox συμπεραίνεται ότι η μορφή των καμπυλών των δύο μεθόδων είναι πανομοιότυπες για το παρθένο ελαιόλαδο και για το ελαιόλαδο: μεγαλύτερες τιμές % παρεμπόδισης και Totox για τους 150 °C, μικρότερες για τους 190 °C και ακόμα μικρότερες για τους 100 °C, αντίστοιχα. Αρκετά καλή συσχέτιση των δύο συγκρινόμενων μεθόδων παρατηρείται και για το πυρηνέλαιο.

Για τα υπόλοιπα τρία έλαια δεν υπάρχει συσχέτιση αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων. Το μόνο που θα μπορούσε να πει κανείς είναι ότι παρατηρείται μόνο μια μέτρια συσχέτιση των καμπυλών της μεθόδου *Vibrio fischeri* με αυτές του αριθμού υπεροξειδίων για τους 150 °C και 190 °C.

Δηλαδή, δεν παρατηρήθηκε για όλα τα έλαια ότι μεγαλύτερη % παρεμπόδιση – τοξικότητα στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri* συνοδεύεται από αντίστοιχη μεγαλύτερη ολική τοξικότητα. Αυτό μπορεί να αποδοθεί πιθανόν στο ότι τα δείγματα ελαίου που εξετάστηκαν, εκχυλίστηκαν με DMSO, ένα διαλύτη με μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα. Είναι λοιπόν αρκετά πιθανό να έχουν παραληφθεί στα εκχυλίσματα αυτά όχι μόνο καρβονυλικές ενώσεις και υπεροξειδία, που συμμετέχουν στον υπολογισμό του αριθμού Totox, αλλά και άλλες ενώσεις όπως φαινολικές – αντιοξειδωτικές ενώσεις οι οποίες μπορεί να συνεισφέρουν επίσης στην παρεμπόδιση της βιοφωταύγειας των *Vibrio fischeri* (κεφάλαιο 5 και 6 της διατριβής). Άλλωστε, ακόμα και τα μη θερμικά καταπονημένα λάδια παρουσιάζουν παρεμπόδιση στη βιοφωταύγεια των βακτηρίων *Vibrio fischeri*.

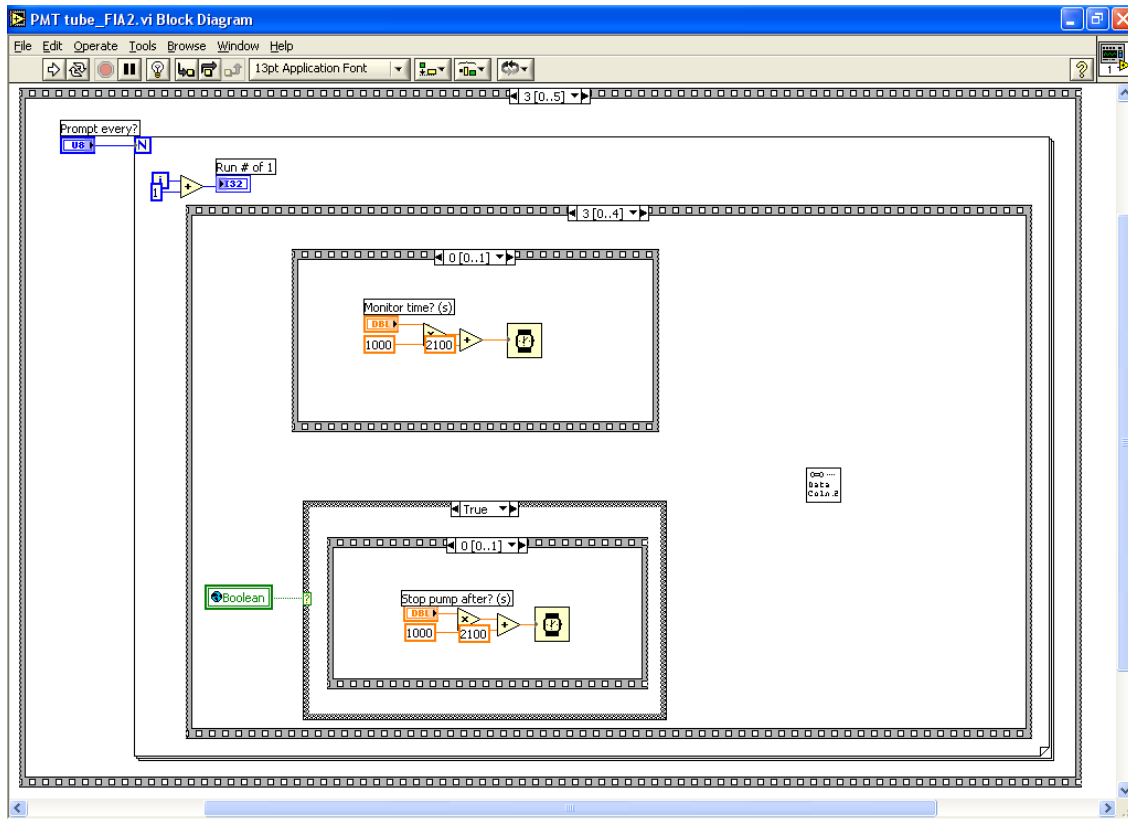
Μελλοντική εργασία-Προοπτικές

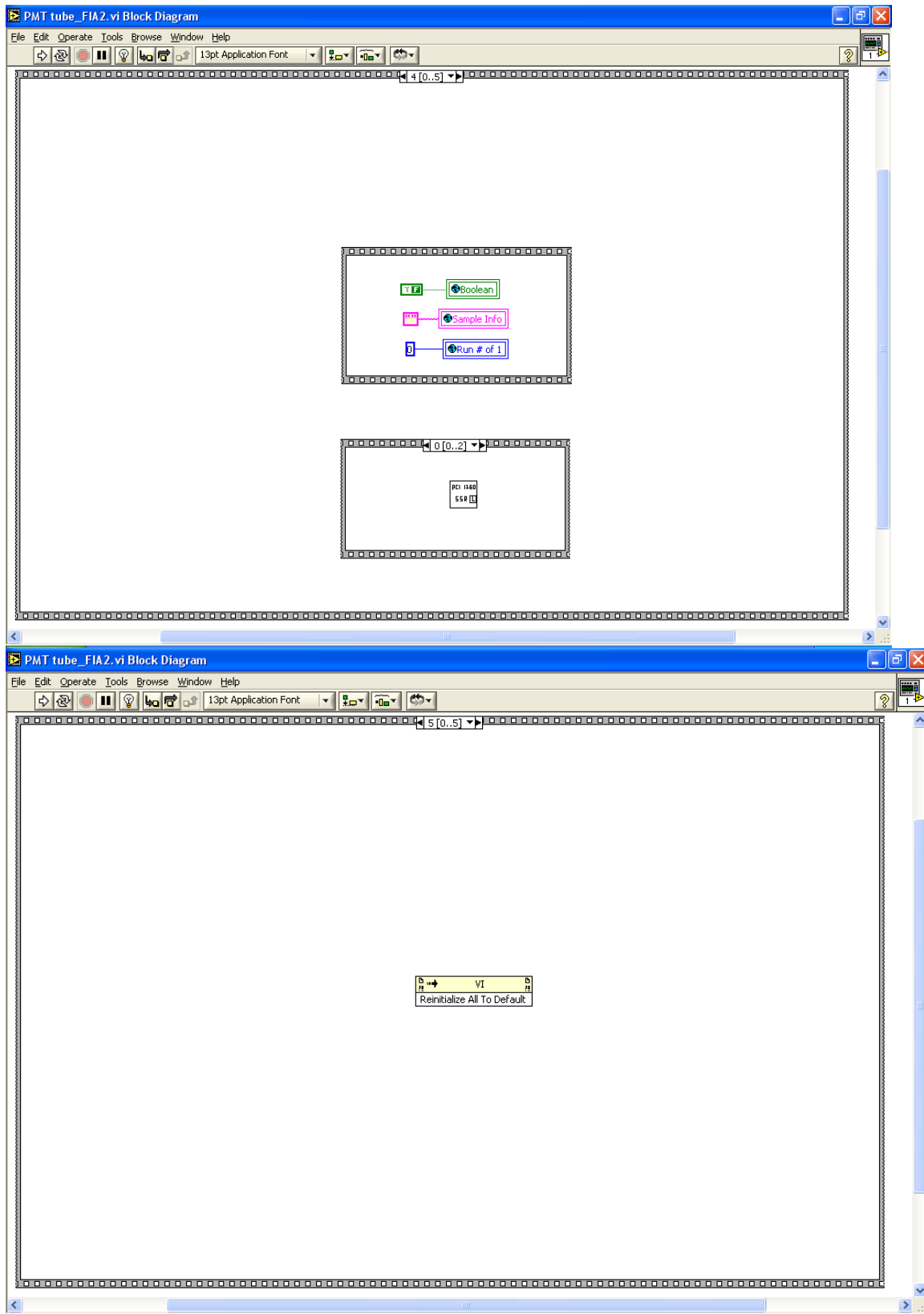
Για μελλοντική ερευνητική εργασία προτείνονται τα εξής:

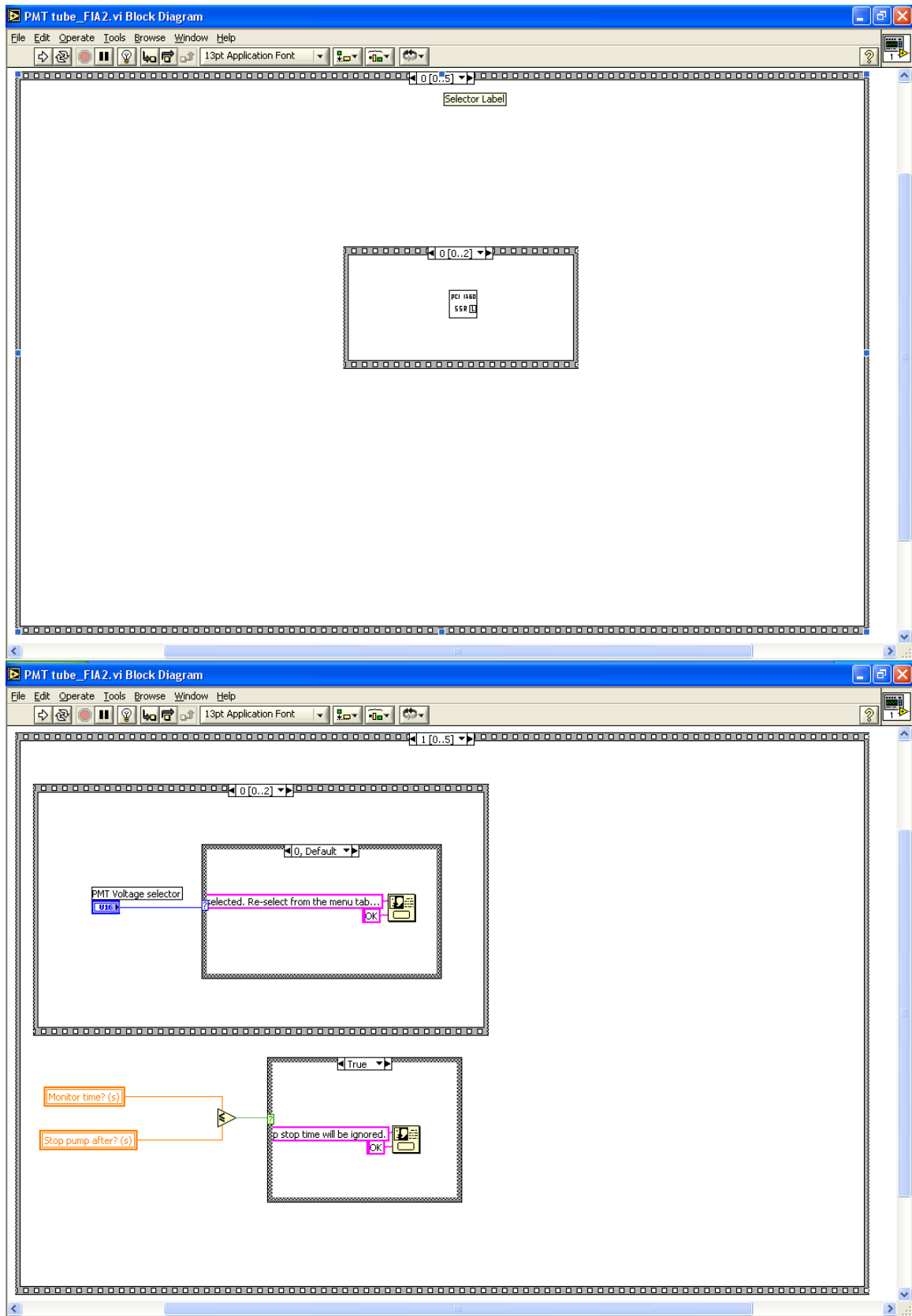
1. Σταθεροποίηση των πειραματικών συνθηκών θερμικής καταπόνησης των ελαίων. Μία τέτοια προτεινόμενη μέθοδος είναι η μέθοδος Rancimat η οποία εξασφαλίζει σταθερή θερμοκρασία καταπόνησης του ελαίου και σταθερή παροχή ατμοσφαιρικού οξυγόνου έτσι ώστε να βελτιωθεί η επαναληψιμότητα της θερμικής καταπόνησης. Τα κλάσματα που λαμβάνονται στη μέθοδο Rancimat είναι υδατικά, συνεπώς δεν χρειάζεται να γίνει εκχύλιση.
2. Απομόνωση επιμέρους καρβονυλικών ενώσεων και υπεροξειδίων και πιθανώς άλλων προϊόντων με κατάλληλη διαδικασία – εκχυλίσεις – διαλύτες και χωριστή εκτίμηση της επίδρασης κάθε ομάδας ενώσεων στη βιοφωταύγεια των *Vibrio fischeri*. Μελέτη πιθανής συνεργιστικής δράσης των διαφόρων αυτών ενώσεων θα οδηγήσει σε ασφαλέστερα συμπεράσματα.
3. Συσχέτιση της τοξικότητας και με άλλους δείκτες φυτικών ελαίων πχ οξύτητα, και μελέτη στην προκειμένη περίπτωση την επίδραση της τοξικότητας των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα βακτήρια. Αυτό μπορεί να επεκταθεί και σε θερμικώς καταπονημένα έλαια
4. Επίδραση χωριστά του ασαπωνοποίητου κλάσματος των λιπαρών υλών στην τοξικότητα των βακτηρίων.
5. Επίδραση της τοξικότητας μεμονωμένων και μιγμάτων γλυκεριδίων μετά από θερμική καταπόνηση στα *Vibrio fischeri*.
6. Βελτίωση της υπάρχουσας οργανολογίας. Κατασκευή ευκολομεταφερόμενου και αξιόπιστου οργάνου.
7. Με τη βιοδοκιμή με τους μικροοργανισμούς *Daphnia magna* το όριο ανίχνευσης ήταν ακόμα μικρότερο (10^{-6} M). Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι τα ίδια όρια ανίχνευσης είναι εφικτά και με τη μέθοδο των βιοφωταυγών βακτηρίων *Vibrio fischeri* αρκεί να αλληλεπιδράσει το βιοφωταυγές αιώρημα βακτηρίων με το τοξικό ρεύμα ρύπου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα με αναχίτιση της ροής. Σκοπός όμως της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανάπτυξη ταχύ βιοαισθητήρα σε συνθήκες ροής.

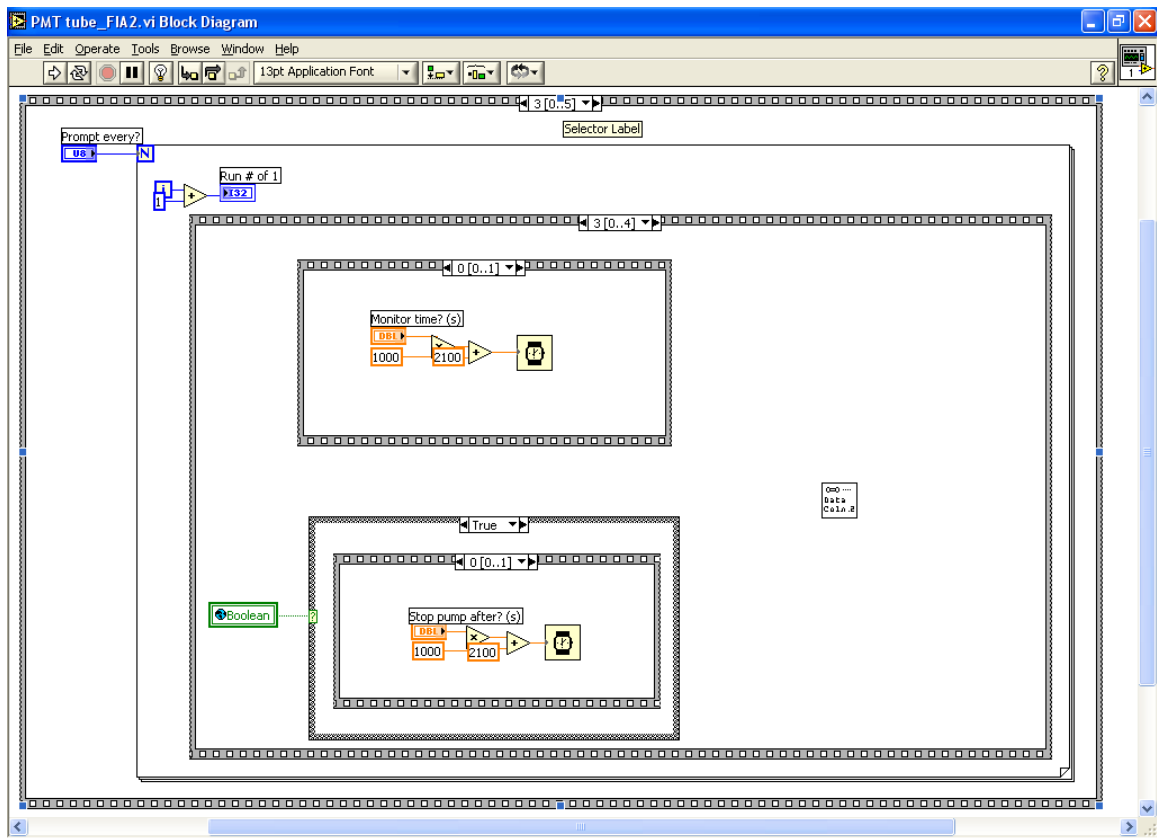
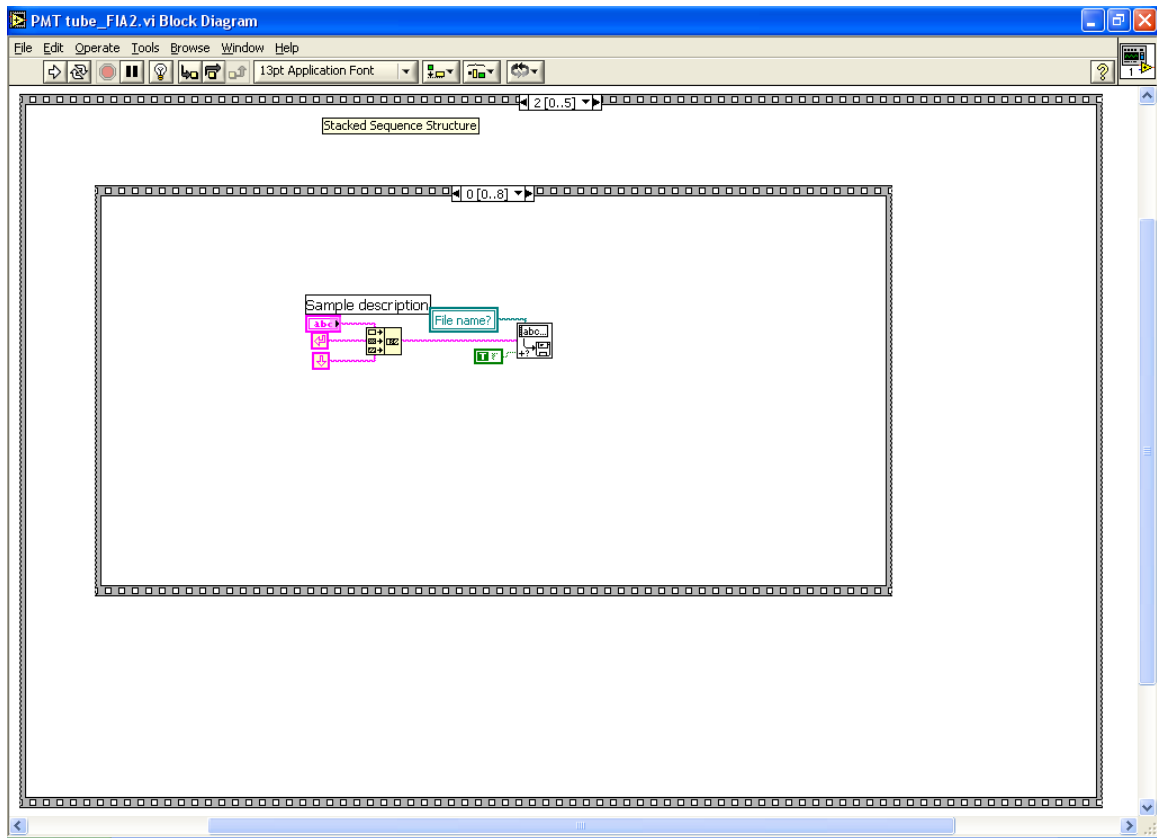
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

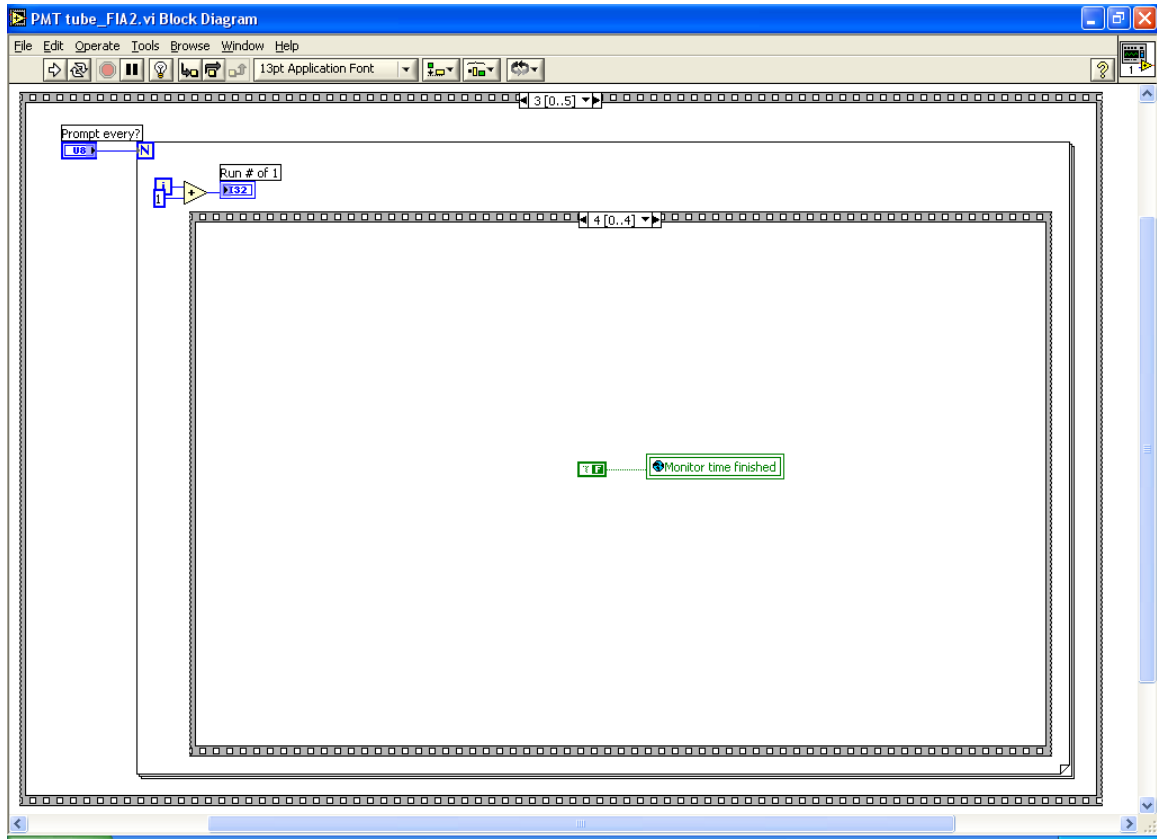
Κώδικας του προγράμματος.











ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

3-APH	3-ammino-phthalic acid	3-αμινο-φθαλικό οξύ
ABTS	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)	2,2'-αζινο-bis (3-αιθυλβενζθεαζολιν-6-σουλφονικό οξύ)
FMN	Flavin mononucleotide	Μονονουκλεοτίδιο της φλαβίνης
FMNH₂	Reduced form of flavin mononucleotide	Ανηγγμένη μορφή του μονονουκλεοτιδίου της φλαβίνης
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2 διφαινυλο-1- πικρυλοϋδραζίλιο
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry	Επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα-φασματοσκοπία μάζας
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης-Φασματοσκοπία Μαζών
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
PTFE ή Teflon	Polytetrafluoroethylene	Πολυτετραφθοροαιθυλένιο
FI	Flow Injection	Εισαγωγή δείγματος σε ροή
SI	Sequential Injection	Διαδοχική Έγχυση
BI	Bead Injection	Έγχυση σφαιριδίων
SIC	Sequential Injection Chromatography	Διαδοχική χρωματογραφία έγχυσης
CFU	Colony Forming Unit	Μονάδες σχηματισμού αποικιών
PVC	Poly-vinylchloride	Πολυβινυλο χλωρίδιο
LOV	Lab on Valve	Εργαστήριο σε βαλβίδα
TBARS	Thiobarbituric acid	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
Plexiglass	Poly (methyl methacrylate)	Πολυ (μεθυλ μεθακρυλικό), πλεξιγκλάς

TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity	trolox ισοδύναμη αντιοξειδωτική ενεργότητα
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2H-1-benzopyrane-2-carboxylic acid	6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλ-2H-1-βενζοπυρανιο-2-καρβοξυλικό οξύ
PV	peroxide value	Αριθμός υπεροξειδίων
AV	anisidine value	Αριθμός ανισιδίνης
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Garcia-Campana, A. M., Baeyens, W. R.,(eds). *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*. Marcel Dekker Inc, New York-Basel, 2001.
2. Γεωργίου, Κ.Α., *Ανάπτυξη νέων αυτοματοποιημένων φασματοφωτομετρικών μεθόδων αναλύσεως με την τεχνική της εισαγωγής δείγματος σε ροή και εφαρμογές στη φαρμακευτική ανάλυση*. Διδακτορική διατριβή. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα. 1990.
3. Θέμελης, Γ., *Αυτόματες Μέθοδοι Χημικής Ανάλυσης*. Θεσσαλονίκη 2001.
4. Rauhut, M. M., *Chemiluminescence*. In Grayson, Martin (Ed). *Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology (3rd ed)*, John Wiley and Sons, 1985, p. 247.
5. Nieman, T., *Chemiluminescence: Theory and Instrumentation. Overview* , In *Encyclopedia of Analytical Science*, Academic Press, Orlando, 1995, p. 608-613.
6. Cambell, A. K., *Detection and quantification of chemiluminescence*, In *Chemiluminescence principles and applications in biology and medicine*, 1988, p. 68-126, Ellis Horwoodm, Chichester.
7. Wampler, J.E., *Instrumentation: seeing the light and measuring it in Chemi- and Bioluminescence*. Burr J.G ed., 1985, 1-44, Marcel Dekker New York.
8. Lyzev, R., Wegrzyn, G., *Sensitivity of dark mutants of various strains of luminescent bacteria to reactive oxygen species*, Arch Microbiol, 2005, **183**, p. 203-208.
9. Hastings J. W., *Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems*. J. Mol. Evol., 1983, **19**, p. 309–321.
10. Hastings, J. W., *Bioluminescence in Cell Physiology Source Book* Sperelakis N. (ed), 3rd edition, Academic Press, San Diego, USA,1995, p. 665-668.

11. Young, R. E.; Roper, C. F., *Bioluminescent countershading in midwater animals: evidence from living squid*. Science, 1976, **191**(4231), p. 1046–1048.
12. Dewhurst, R. E., Wheeler, J. R., Chummun, K. S., Mather, J. D., Callaghan, A., Crane, M., *The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban groundwater quality*. Chemosphere, 2002, **47**, p. 547-554.
13. Forget, G., Sanchez-Bain, A., Arkhipchuk, V., Beauregard, T., Blaise C., Castillo, G., Castillo, L. E., Diaz-Baez M, C., Pica-Granados, Y., Ronco, A., Srivastava, R. C., Dutka, B. J., *Preliminary data of a single-blind, multicountry trial of six bioassays for water toxicity monitoring*. Environ. Toxicol., 2000, **15**(5), p. 362-369.
14. Clement, B., Janssen, C. R., Le Du Delepierre, A., *Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests*. Chemosphere, 1997, **35**, p. 2783- 2796.
15. Klerks, P. L., Nyman, J. A., Bhattacharyya, S., *Relationship between hydrocarbon measurements and toxicity to a chironomid, fish larva and daphnid for oils and oil spill chemical treatments in laboratory freshwater marsh microcosms*. Environ. Pollution, 2004, **129**(3), p. 345-353.
16. Farre, M.; Barcelo, D., *Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis*. Tranc-Trends in Anal. Chem, 2003, **22**, p. 299-310.
17. Deryabin, D. G., Karimov, I. F., *Simultaneous evaluation of chemiluminescence and bioluminescence in a phagocytic system*. Bull. Exp. Biol. Med., 2009, **147**, p. 349-352.
18. Komaitis, E., Vasiliou, E., Kremmydas, G., Georgakopoulos, D.G., Georgiou, C., *Development of a Fully Automated Flow Injection Analyzer Implementing Bioluminescent Biosensors for Water Toxicity Assessment*. Sensors, 2010, **10**, p. 7089-7098.
19. Hiep, H. M., *A localized surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of casein in milk*. Sci. Technol. Adv. Mater. 2007, **8**, p. 331-334.

20. Lud, S. Q., Nikolaidis, M. G, Haase, I., Fischer, M., Bausch A. R., *Field Effect of Screened Charges: Electrical Detection of Peptides and Proteins by a Thin Film Resistor*. Chem. Phys. Chem., 2006, **7**(2), p. 379-384.
21. Vockenroth, I., Atanasova, P., Knoll, W., Jenkins, A., Köper, I., *Functional tethered bilayer membranes as a biosensor platform*. IEEE Sensors 2005 - The 4-th IEEE Conference on Sensors, p. 608–610.
22. Georgiou, M. E., Georgiou, C.A., Koupparis, M.A., *Automated flow injection gradient technique for binding studies of micromolecules to proteins using potentiometric sensors. Application of bovine serum albumin with anilinonaphthalenesulfonate probe and drugs*. Anal. Chem., 1999, **71**(13), p. 2541-2550.
23. Ryan, K. J., Sherris, J. C., Sherris, *Medical microbiology-an introduction to infectious diseases*, 2004, p.992, 4th edition, McGraw-Hill, New York.
24. Thompson, F. L., Iida, T., Swings J., *Biodiversity of Vibrios*. Microbiol. Mol. Rev., 2004, **68**, p. 403-431.
25. Ruby E. G., *Ecology of a benign “infection”*: colonization of squid luminous organ by *Vibrio fischeri*, 1999, p. 217-231, Rosenberg E. (ed.) ASM Press, Washington.
26. Nyholm, S. V., McFall-Ngai, M. J., *The winnowing: establishing the squid-Vibrio symbiosis*. Nat. Rev. Microbiol. 2004: p. 632-642.
27. Hastings, J. W., *Bioluminescence in Cell Physiology Source Book*, Sperelakis N. (ed.), 3rd edition, Academic Press, San Diego, USA, 1995, p. 669-681.
28. Meighen, E.A., *Molecular biology of bacterial bioluminescence*. Microbiol. Rev., 1991, **55**, p. 123-142.

29. Zurita, J. L., Rapatto, G., Jos, A., Salguero, M., Lopez-Artiguez, M., Camean, A. M., *Toxicological effects of the lipid regulator gemfibrozil in four aquatic systems*. *Aquatic Toxicol.*, 2007, **81**, p. 106-115.
- 29a. Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B., *Quorum sensing: the power of cooperation in the world of Pseudomonas*. *Environ.Microbiol.* , 2005, **7**, p. 459–471.
- 29b. Nealson, K. H., Platt, T., Hastings, J. W., *Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system*. *J. Bacteriol*, 1970, **104**, p. 313–322.
- 29c. Dunlap, P. V., *Quorum Regulation of Luminescence in Vibrio fischeri*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1999, **1**, p. 5-12.
- 29d. Anetzberger, C., Pirch, T., Jung, K., *Heterogeneity in quorum sensing-regulated bioluminescence of Vibrio harvey*. *Mol. Microbiol*, 2009, **73**, p. 267–277.
30. Rogers, K. R., Harpe, S. L., Robertson, G., *Screening for toxic industrial chemicals using semipermeable membrane devices with rapid toxicity assays*. *Anal. Chim. Acta*, 2005, **543**, p. 229-235.
31. Hernando, M. D., Fernandez-Alba, A., R., Tauler, R., Barcelo D., *Toxicity assays applied to wastewater treatment*. *Talanta*, 2005, **65**, p. 358-366.
32. Scheerer, S., Gomez, F., Lloyd, D., *Bioluminescence of Vibrio fischeri in continuous culture. Optimal conditions for stability and intensity of photoemission*. *J. Microbiol. Methods.*, 2006, **67**, p. 321-329.
33. Weins, C., Jork, H., *Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high performance thin layer chromatography*. *J. of Chromatogr. A*, 1996, **750** (1-2), p. 403-407.
34. Georgiou, C. A., Komaitis, E. M., Vasiliou, E.G., Kremydas, G., Georgakopoulos, D.G., *Response of Vibrio fischeri Whole Cell Biosensors to Olive Oil Phenolics*. 5th Eurofed Lipid Congress and 24th Symposium of the Nordic Lipidforum, oils, Fats and Lipids: from Science to Applications, 6-19 September 2007, p. 43, Gothenburg, Sweden.

35. Kunz, A., Mansilla, H., Duran, N. A., *Degradation and toxicity study of three textile reactive dyes by ozone*. Environ. Technol., 2002, **23**(8), p. 911-918.
36. Kahru, A., Pollumaa, L., Reiman, R., Ratsep, A., Liders, M., Maloveryan, A., *The toxicity and biodegradability of eight main phenolic compounds characteristic to the oil-shale industry waste waters: A test battery approach*. Environ. Toxic., 2000, **15**(5), p. 431-442.
37. Guerre, R., *Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents*. Chemosphere, 2001, **44** (8), p. 1737-1747.
38. Gotvajin, A. Z., Zagorc-Koncan, J., *Hazard identification of pharmaceutical wastewaters using biodegradability studies*. Water Sci. and Technol., 2003, **47**(10), p. 197-204.
39. Hsieh, C. Y., Tsai, M. H., Ryan, D. K., Pancorbo, O. C., *Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fisheri* in the Microtox (R) chronic toxicity test*. Sci. of the Total Environ., 2004, **320**(1), p. 37-50.
40. Ince, N. H., Dirilgen, N., Apikyan, I. G., Tezcanli, G., Ustun, B., *Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: A statistical approach*. Arch. of Environ. Contam. and Toxic., 1999, **36**(4), p. 365-372.
41. Galic, M., Sipos L., Raspor, B., *Toxicity of cadmium and nitrilotriacetic acid in sea-water to the photobacteria *Vibrio fischeri**. Sci. of the Total Environ, 1987, **60**, p. 173-164.
42. Khoufi, S., Feki, F., Sayadi, S., *Detoxification of olive mill waste water by electrocoagulation and sedimentation processes*. J. of Hazardous Materials, 2007, **142**(1-2), p. 58-67.
43. Azabou, S., Najjar, W., Gargoubi, A., Ghorbel, A., Sayadi, S., *Catalytic wet peroxide photo-oxidation of phenolic olive oil mill wastewater contaminants- Part II. Degradation and detoxification of low molecular mass phenolic compounds in model and real effluent*. Appl. Catal. B-Environ., 2007, **77** (1-2), p. 166-174.

44. Κοφόπουλος, Χ., *Ανάπτυξη βακτηριακών βιοαισθητήρων φωταύγειας*. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2008.
- 45 Kim, B. C., Park, K.S., Kima, S. D., Gu, M. B., *Evaluation of a high throughput toxicity biosensor and comparison with a Daphnia magna bioassay*. Biosens. and Bioelectron., 2003, **18**(5-6), p.821-826.
46. Ruzicka, J., Hansen, E. H., *Flow Injection analyses. A new concept of fast continuous flow analysis*. Anal. Chim. Acta, 1975, **78**, p. 145 -157.
47. Georgiou, C. A., “*Developements in Monitoring Methods for Nutrient Solutions*”, *Nutrient, Substrate and Water Management in Protected Cropping Systems, 2003 Dahlia Greidinger Symposium*. Conference Proceedings of the international Fertiliser Society No: 530, p. 263-282, 7-10 December 2003, Izmir, Turkey.
48. Ruzicka J., Hansen E. H., *Flow Injection Analysis*. 2nd Edition, Wiley, Chichester, Sussex, 1998.
49. Ruzicka, J., Scampavia, L., *From flow injection to bead injection*. Anal. Chem., 1999, **71**, p. 257A-263A.
50. Ruzicka, J., Marshall, G. D., *Sequential injection a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*. Anal.Chim.Acta 1990, **237**, p. 329-343.
51. Ruzicka, J., *Lab on valve universal microflow analyzer based on sequential and bead injection*. Analyst, 2000, **125**, p. 1053-1060.
52. Ruzicka, J., Hansen, E. H., *Retro-review of flow analysis*.Trends Anal. Chem., 2008, **27**(5), p. 390-393.
53. Stewart, K. K., *Flow injection analysis. A review of its early history*. Talanta, 1981, **28**, p.789-796.

54. Macheras, P. E., Koupparis, M. A., *An automated flow injection serial dynamic dialysis technique for drug-protein binding studies*. Anal. Chim. Acta, 1986, **185**, p. 65-73.
55. Lannuzel, D., de Jong, J., Schoemann, V., Trevera A., Tison J. L, Chou L., *Development of a sampling and flow injection analysis technique for iron determination in the sea ice environment*. Anal. Chim. Acta, 2006, **556**, p. 476-483.
56. Christodouleas, D., Fotakis, C., Economou, A., Papadopoulos K., Timotheou-Potamia, M., Calokerinos, A., *Flow-based with chemiluminescence detection for food and environmental analysis: A review*. Anal. Lett., 2011, **44**, p. 176-215.
57. Steinberg, S. M., Poziomek, E .J., Engelman, W. H., Rogers K. R., *A review of environmental applications of bioluminescence measurements*. Chemosphere, 1995, **30**, p. 2155-2197.
58. Koupparis, M. A., Anagnostopoulou, P. I., *Automated flow-injection determination of salicylates using Trinder reaction for clinical analysis, assays and dissolution studies of formulations*. J. Pharm. Biomed. Anal., 1988, **6**(1), p. 35-46.
59. Renoe, B. W., Stewart, K. K., Beecher, G. R., *Automated multiple flow-injection analysis in clinical chemistry: Determination of albumin with bromocresol green*. Clin. Chem., 1980, **26**(2), p. 331-334.
60. Shideler, C. E., Stewart, K. K., Crump, J., *Automated multiple flow-injection analysis in clinical chemistry: Determination of total protein with biuret reagent*. Clin. Chem., 1980, **26**(2), p. 331-334.
61. Berthold, F., *Instrumentation for chemiluminescence immunoassays, in Luminescence Immunoassay and molecular applications* K. Van Dyke and R. Van Dyke eds., CRC Press, Boca Raton, 1990, p. 11-25.
62. Idris, A. M., *Flow injection, overlooked techniques in forensic analysis*. Crit. Rev in Anal. Chem., 2010, **40**(4), p. 218-225.

63. Sideris, E. E., Georgiou C. A., Koupparis M. A., Macheras P. E., *Automated flow-injection dynamic dialysis technique in the study of drug binding with cyclodextrines*. Anal. Chim. Acta, 1994, **289**, p. 87-95.
64. Koupparis, M., Macheras P., Reppas, C. *Application of automated flow injection analysis (FIA) to dissolution studies*. Int. J. Pharm., 1984, **20**(3), p. 325-333.
65. Koupparis, M., Macheras P., Tsaprounis, C., *Automated flow-injection colorimetric determination of acetaminophen for assays and dissolution studies of multicomponent dosage forms*. Int. J. Pharm., 1985, **27**(2-3), p. 349-359.
66. Georgiou, C. A., Valsami, G. N., Macheras, P. E, Koupparis M. A., *Automated flow – injection technique for use in dissolution studies of sustained –released formulations: Application to iron(II) formulations*. J. Pharm. Biomed. Anal., 1994, **12**(5), p. 635-641.
67. Anagnostopoulou, P. I., Koupparis, M. A., *Automated flow-injection phenol red method for determination of bromide salts in drugs*. Anal. Chem., 1986, **58**(2), p. 322-326.
68. Solich P., Polydorou, Ch. K., Koupparis, M. A., Efstathiou, C. A., *Computer aided fluorimetric analysis for dissolution testing of pharmaceuticals* Biomed. Chrom. 1999, **13**(2), p. 113-114.
69. Dolejsova J., Solich P., Polydorou, Ch. K., Koupparis, M.A., Efstathiou, C. E., *Flow injection fluorimetric determination of 1,4-benzodiazepines in pharmaceutical formulations after acid hydrolysis*. J. Pharm. and Biomed. Anal., 1999, **20**(1-2), p. 357-362.
70. Koupparis, M. A., Anagnostopoulou P.I., *Automated flow-injection Spectrophotometric determination of zinc using zincon: Application to analysis of waters, alloys and insulin formulations*. Analyst. 1986, **111**(11), p. 1311-1315.
71. Apostolakis, J. C., Georgiou, C. A., Koupparis, M. A., *Use of ion-selective electrodes in kinetic flow injection: Determination of phenolic and hydrazine drugs with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene using a fluoride-selective electrode*. Analyst, 1991, **116**(3), p. 233-237.

72. Thomaidis, N. S., Georgiou, C. A., *Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil iodine value*. Anal.Chim.Acta 2000, **405**, p. 239-245.
73. Νούρος, Π. Γ., *Ανάπτυξη νέων αυτοματοποιημένων μεθόδων προσδιορισμού χαρακτηριστικών ποιότητας ελαιολάδου με την τεχνική της εισαγωγής δείγματος σε ροή*. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 2001.
74. Nouros, P. G., Ceorgiou, C. A., Polissiou, M. G., *Automated flow injection spectrophotometric non-aqueous titrimetric determination of the free fatty acid content of olive oil*. Anal. Chim. Acta, 1997, **351**, p. 291-297.
75. Nouros, P. G., Ceorgiou, C. A., Polissiou, M. G., *Direct parallel flow injection multichannel spectrophotometric determination of olive oil peroxide value*. Anal. Chim. Acta, 1999, **389**, p. 239-245.
76. Nouros, P. G., Ceorgiou, C. A., Polissiou, M. G., *Determination of olive oil 2-thiobarbituric acid reactive substances by parallel flow injection*. Anal. Chim. Acta, 2000, **417**, p. 119-124.
77. Lambrinea, E. P., Georgiou, C. A., *Rapid fully automated low injection antioxidant capacity assay*. J. Agr. Food Chem., 2005, **53** (11), p. 4341-4346.
78. Lambrinea, E. P., Georgiou, C. A., *Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay*. Anal. Chim. Acta, 2004, **526**(1), p. 63-68.
79. Lambrinea, E. P., Thomaidis, N. S., Georgiou C. A., *Direct olive oil anisidine value determination by flow injection*. Anal. Chim., Acta 2001, **448** (1-2), p. 201-206.
80. Wang, X., Wang, J., Yang, N., *Flow injection chemiluminescent detection of gallic acid in olive fruits*. Food Chem., 2007, **105**, p. 340-345.
81. Divritsioti, M. H., Karalemas, I. D., Georgiou, C. A., Papastathopoulos D. S., *Flow injection analysis system for L- lysine estimation of foodstuffs using a biosensor based on*

lysine oxidase immobilization on a gold –poly(m-phenylenediamine) electrode. Anal. Lett., 2003, 36(9), p. 1939-1963.

82. He, D. Zhang Y., Hu, Y., *Chemiluminescence microflow injection analysis system on a chip for the determination of nitrite in food. Food Chem., 2007, 101, p. 667-672.*

83. Li, B., He, Y., *Simultaneous determination of glucose fructose, and lactose in food samples using a continuous flow chemiluminescence method with the aid of artificial neural networks. Luminescence. 2007, 22, p. 317-325.*

84. Liamas, N. E., Di Nazio, M. S., Fernandez, B. S., *Flow injection spectrophotometric method with on line photodegradation for determination of ascorbic acid and total sugars in fruit juices., J. Food Comp. and Anal., 2011, 24(1), p. 127-130.*

85. Li, B., He, Y., Hu, C., *Simultaneous determination of three organophosphorus pesticide residues in vegetables using continuous flow chemiluminescence method with artificial neural network calibration. Talanta, 2007, 72, p. 223-230.*

86. Liu, W., Zhang, Z., Liu, Z., *Determination of lactal antibiotics in milk using micro-flow chemiluminescence system with on-line solid phase extraction. Anal. Chim. Acta., 2007, 592, p. 187-192.*

87. Wang, X., Wang, J., Yang, N., *Chemiluminescent determination of chlorogenic acid in fruits. Food Chem., 2007, 102, p. 422-426.*

88. Wang, Z., Chen, D., Gao, X., Zong, Z., *Subpicogram determination of melamine in milk products using a luminol-myoglobin chemiluminescence system. J. Agr. Food Chem., 2009, 57, p. 3464-3469.*

89. Motyka, K., Onjia, A., Mikuska, P., Vecera, Z., *Flow –injection chemiluminescence determination of formaldehyde in water. Talanta, 2007, 71, p. 900-905.*

90. Song Z., Yue Q., Wang C., *Flow injection chemiluminescence determination of femtogram-level cobalt in egg yolk, fish tissue and human serum*. Food Chem., 2006, **94**, p. 457-463.
91. Ren, J. J., Liu, H. Y., Hao, Y. H., He, P. G., Fang, Y. Z.. *Determination of resveratrol in red wine by solid phase extraction – flow injection chemiluminescence method*. Chin. Chem. Lett., 2007, **18**, p. 985-988.
92. Liu, Y., Song, Z., Dong, F., Zang, L., *Flow injection chemiluminescence determination of Sudan I in hot chilli sauce*. J. Agric. Food Chem., 2007, **55**, p. 614-617.
93. Matyushima, T.A., Morosanova, E. I., Zolotov, Yu. A., *Microsequential injection analysis: Determination of rutin and quercetin in food supplements and pharmaceutical products*. J. Anal. Chem., 2010, **65**(3), p. 308-315.
94. Kanwal, S., Fu, X., Su, X., *Flow injection chemiluminescence determination of EDTA in canned foods*. Anal. Lett., 2011, **44**(1-3), p. 94-104.
95. Liu, H., Gao, X., Niu, L., Li, X., Song, Z., *Rapid determination of pictogram levels of patulin in apple juice using a flow injection Chemiluminescence procedure*. J. Sci. Food Agr., 2008, **88**, p. 2744-2748.
96. Stewart, J. W., Ruzicka J., *Flow injection analysis. Part V. Simultaneous determination of nitrogen and phosphorous in acid digests of plant material with a single spectrophotometer*. Anal. Chim. Acta, 1976, **82**, p. 137-41.
97. Georgiou, M. E., Georgiou, C. A., Koupparis, M. A., *Flow injection gradient techniques in spectrophotometric determination of formation constants of micromolecule cyclodextrin complexes*. Anal. Chem., 1995, **67**(1), p. 114-123.
98. Komaitis, E., Vasiliou, E., Georgapoulos, D., Georgiou, C., Oral presentation: *Assessment of Oil Quality during frying through Vibrio fischeri Whole cell Biosensors*. 2nd Greek

Congress Fats, Oils and Lipids: presence and future (Greek Lipid Forum, 7-8 June 2007, O-12., National Research Institute, Athens, Greece.

99. Komaitis, E., Vasiliou, E., Kremydas, G., Georgakopoulos, D., Georgiou, C., *Response of Vibrio fischeri Whole Cell Biosensors to Olive Oil Phenolics*. 2nd Greek Congress of Food Biotechnology and Biotechnology, 29-31 March 2007, p.312-314, Athens, Greece.

100. Komaitis, M. E., Kamoutsas, K. A., Vasiliou, E., Kremmydas, G., Georgakopoulos, D., Georgiou, C.A., *Development and Optimization of a Fully Automated Flow Injection Analyzer for Aldehydic Compounds Assessment Implementing Vibrio fischeri Whole Cell Biosensors*. 7th Aegean Analytical Chemistry Days, 29th September-3rd October 2010, Book of abstracts, p. 88, Mytilene, Greece.

101. Thouand, G., Daniel, P., Horry, H., Picart, P., Durand, M. J., Killham, K., Knox, O. G., Rousseau, M., *Comparison of the spectral emission of lux recombinant and marine bacteria bioluminescent*. Luminescence, 2003, **18**, p. 145-155.

102. Petanen, T., Romantschuk, M., *Use of bioluminescent bacterial sensors as an alternative method for measuring heavy metals in soil extracts*. Anal. Chim. Acta, 2002, **456**, p. 55-61.

103. Seppanen, C. M., Csallany, A. S., *The effect of intermittent and continuous heating of soybean oil at frying temperature on the formation of 4-hydroxy-2-trans-nonenal and other alpha-, beta-unsaturated hydroxyaldehydes*. J. Am Oil Chem. Soc., 2006, **83**(2). p. 121-127.

104. Miyake, T., Shibamoto, T. I., *Simultaneous Determination of Acrolein, Malonaldehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal Produced from Lipids Oxidized with Fenton's Reagent*. Food and Chem. Toxicol., 1996, **34** (10), p. 1009-1011.

105. Szweda, L. I., Uchida, K., Lin Tsai, Stadtman, E. R., *Healthy oils turn toxic in the fryer*. Chem. & Eng. News, 2005, **83** (19), p. 35-38.

105a. Vasiliou E., Makarovska Y., Pneumatikos I., Lolis N., Kalogeratos E., Papadakis E., Georgiou C., *Hydrogen peroxide assessment in exhaled breath condensate: condensing*

equipment-rapid flow injection chemiluminescence method. J. Braz. Chem. Soc., 2007, **18**, p.1040-1047.

106 Garric, J., Vollat, B., Duis, K., Pery, A., Junker, T., Ramil, M., Fink, G., Ternes, A. T., *Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran Daphnia magna and the green alga Pseudokirchneriella subcapitata*. Chemosphere, 2007, **69**, p. 903-910.

107 Baun, A., Sorensen, S. N., Rasmussen, R. F., Hartmann, N. B., Koch, C. B., *Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C₆₀*. Aquatic Toxicol., 2008, **86**(3), p. 379-387.

108. Jemec, A., Tisler, T., Drobne, D., Sepcic, K., Jamnik P., Ros, M., *Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids*. Comparative Biochem. and Physiol., 2008, Part C, **147**, p. 61-68.

109. Hoang, T. C., Klaine, J. S., *Characterizing the toxicity of pulsed selenium exposure to Daphnia magna*. Chemosphere, 2008, **71**(3), p. 429-438.

110. Rogers, K. R., Harper, S. L., Robertson, G., *Screening for toxic industrial chemicals using semipermeable membrane devices with rapid toxicity assays*. Anal. Chim. Acta, 2005, **543**, p. 229-235.

111. Garcia, M. T., Campos, E., Ribosa, I., *Biodegradability and ecotoxicity of amine oxide based surfactants*, Chemosphere, 2007, **69**, p. 1574-1578.

112. Grung, M., Källqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K. V., *Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline*. Ecotoxic. and Environ Safety, 2008, **71**(2), p. 328-340.

113. Nakari, T., Huhtala, S., *Comparison of toxicity of congener-153 of PCB, PBB, and PBDE to Daphnia magna*. Ecotoxic. and Environ. Safety, 2008, **71**(2), p. 514-518.

114. Lin, J., Chen, J., Cai, X., Qiao, X., Huang, L., Wang, D., Wang, Z., *Evaluation of Toxicity upon Hydrolysis of Fenoxapro-p-ethyl*. J. Agric. Food Chem., 2007, **55**, p. 7626-7629.

115. *Characteristics of Olive Oil and Olive-residue Oil and on the Relevant Methods of Analysis in Commission Regulation (EEC) no 2568/91*. Official Journal of European Community, no L 248, 5 September 1991.

116. *IUPAC Standards Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, Method 2.504, 6th Edition*, Pergamon Press, Oxford, 1979, p. 143.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ INTERNET

http://en.wikipedia.org/wiki/Vibrio_fischeri 11/08/2010

<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemiluminescence> 11/05/2010

<http://en.wikipedia.org/wiki/biosensors> 11/08/2010

<http://www.focusmag.gr/articles/view-article.rx?oid=218082> 11/08/2010

<http://en.wikipedia.org/wiki/Bioluminescence> 15/07/2011

ΓΕΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ruzicka J., Hansen E. H. *Flow Injection Analysis*, 2nd Edition, Wiley, Chichester, Sussex, 1998.

Garcia-Campana, A.M, Baeyens W.R. (eds). *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*. Marcel Dekker Inc, New York-Basel. 2001.

Χατζηγιάννου, Θ.Π., Κουμπάρης, Μ.Α. *Ενόργανη Ανάλυση*. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών, 1990.

Hastings J. W., *Bioluminescence in Cell Physiology Source Book*, Sperelakis N. (ed.), 3rd edition, Academic Press, San Diego, USA, 1995.

Rauhut, M. M., *Chemiluminescence. Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology*. Grayson M. (ed.), (3rd ed), John Wiley and Sons, 1985.

Madigan, M., Martinko, J., (eds.) *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.), Prentice Hall, 2005.

Holt, J.G., (editor) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9th ed.), Williams & Wilkins, 1994.

Ruby, E. G., *Ecology of a benign ‘infection’: colonization of the squid luminous organ by *Vibrio fischeri**, p. 217-231, Rosenberg E. (ed.), *Microbial Ecology and Infectious Disease*, ASM Press, Washington, 1999.