

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ
ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΧΗΜΙΟΛΙΘΟΤΡΟΦΟΥΣ
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΑΠΟΤΟΞΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Παναγιώτης Αχιλλέως

Λεμεσός 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

INHIBITION OF CELL LYSIS TO ACIDOPHILIC
MICROORGANISMS AND MICROBIAL STRATEGIES
TO ALLEVIATE THIS

Παναγιώτης Αχιλλέως

Λεμεσός 2016

Σύμβουλος καθηγητής
Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Προπτυχιακή διατριβή

**INHIBITION OF CELL LYSIS TO ACIDOPHILIC
MICROORGANISMS AND MICROBIAL STRATEGIES
TO ALLEVIATE THIS**

Παρουσιάστηκε από

Παναγιώτη Αχιλλέως

Επιβλέπων καθηγητής Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

Μέλος επιτροπής: Δρ. Μιχάλης Κουτίνας

Μέλος επιτροπής: Δρ. Πέτρος Σάββα

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

[Μάιος, 2016]

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Panayiotis Achilleos, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω των επιβλέποντα καθηγητή και μέντορα μου Δρ. Ιωάννη Βυρίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας και παροτρύνοντας με να ασχοληθώ με την διερεύνηση ενός τόσο ενδιαφέροντος και συνάμα πρωτοποριακού θέματος. Ο κύριος Βυρίδης στάθηκε αρωγός στην ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας προσφέροντας με μεγάλη προθυμία τις γνώσεις του περί του παρόντος θέματος, οι οποίες πηγάζουν από μια πολυετή και παράλληλα διεθνώς αναγνωρισμένη πορεία στον τομέα της έρευνας περί βιοτεχνολογικών τεχνολογιών.

Επίσης νιώθω την υποχρέωση να μεταφέρω τις θερμές μου ευχρηστίες στα διευθυντικά στελέχη της εταιρίας Hellenic Copper Mines κύριο Κως/νο Ξυδά και Νίκο Μέρσσιο για την ευκαιρία που μου έδωσαν για δύο συνεχόμενες χρονιές να εργαστώ στο πλευρό τους και συγκεκριμένα στο τμήμα Χημείου της εταιρίας αλλά και όλη την ομάδα που απαρτίζει το εκάστοτε τμήμα για τη πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διάρκεια της απασχόλησης μου. Η καλοκαιρινή μου απασχόληση στην μεταλλευτική εταιρεία αποτέλεσε κομβικό σημείο για την μετέπειτα εξέλιξη του παρόντος project, αφού μου πρόσφερε την ευκαιρία να κατανοήσω θεμελιώδης αρχές αλλά και θωρήσεις όσων αφορά την βιοεκχύλιση ορυκτών μεταλλευμάτων και μεθόδων επεξεργασίας τους.

Επιπρόσθετα θέλω να ευχαριστήσω την διδακτορική φοιτήτρια Έφη Δράκου αλλά και την Arevik Vardanyan για την στήριξη που μου πρόσφεραν όσο καιρό προσπαθούσα να φέρω ης πέρας την ερευνητική μου διατριβή.

Τέλος η παρούσα πτυχιακή εργασία είναι αφιερωμένη από τα βάθη της ψυχής μου στην οικογένεια μου για την απρόσκοπτη και ανιδιοτελή στήριξη που μου πρόσφεραν όλο αυτό το διάστημα, από την πρώτη μέρα της ζωής μου μέχρι και σήμερα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή έχει ως απώτερο σκοπό την πειραματική παρατήρηση της συμπεριφοράς οξεόφιλων μικροοργανισμών, οι οποίοι εδραιώνονται σε όξινα μεταλλευτικά περιβάλλοντα, στην παρουσία ψηλού οργανικού φορτίου (SMPs), αλλά και την παρατήρηση του ποσοστού αναστολής των εν λόγω μικροοργανισμών λόγω οργανικών διαλυτών μικροβιακών προϊόντων καθώς και την εύρεση μιας βιοτεχνολογικής μεθόδου για να ξεπεραστεί το στάδιο αναστολής επαναφέροντας την χαμένη ισορροπία στο περιβάλλον τους. Η διατριβή αποτελείται από τρία κεφάλαια και αναπτύσσεται ως εξής:

Στο πρώτο κεφάλαιο παρουσιάζεται το θεωρητικό υπόβαθρο της βιοτεχνολογικής μεθόδου βιοεκχύλισης. Στα πλαίσια της περιγραφής της τεχνολογίας παραθέτονται κάποιες πληροφορίες για τις κύριες διαδικασίες της μεθόδου, αλλά επίσης και για τους κύριους οξεόφιλους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν σε αυτή. Επιπρόσθετα επεξηγείται ο λόγος για τον οποίο δημιουργήθηκαν οι πρώτες υποψίες για την ύπαρξη του φαινομένου αναστολής των βιοδιεργασιών.

Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφεται αναλυτικά η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε. Αρχικά περιγράφονται οι πρώτες προσπάθειες δημιουργίας του διαλύματος με υψηλό οργανικό φορτίο ή αλλιώς Cellysis, αλλά επίσης και η συμπεριφορά των οξεόφιλων μικροοργανισμών στην παρουσία του προαναφερθέντα διαλύματος. Στη συνέχεια περιγράφεται η διαδικασία παρασκευής του τελικού διαλύματος Cellysis από την τριτοβάθμια επεξεργασία του σταθμού επεξεργασίας λυμάτων Σ.Α.Λ.Α καθώς επίσης και η πειραματική διαδικασία όλων των απαραίτητων αναλύσεων για την πλήρη περιγραφή των χαρακτηριστικών (COD, Protein determination, Carbohydrates analysis κ.α.) του δείγματος. Επιπρόσθετα περιγράφεται η δημιουργία καλλιεργειών για τον προσδιορισμό του βαθμού αναστολής που προκαλεί το μικροβιακό διάλυμα Cellysis όσον αφορά την βιομετατροπή του δισθενή σιδήρου σε τρισθενή.

Στο τρίτο κεφάλαιο παραθέτονται οι συνθήκες ανάπτυξης των καλλιεργειών συμπεριλαμβανομένων των περιεκτικοτήτων σε Cellysis αλλά επίσης και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δισθενή σιδήρου, COD και MPN analysis ανά τακτά χρονικά διαστήματα υπό μορφή πινάκων και γραφικών παραστάσεων. Επιπρόσθετα παρατίθεται η προσπάθεια εύρεσης λύσης στο προκύπτων πρόβλημα διαμέσου βιοτεχνολογικών μεθόδων. Στο τέλος παρουσιάζονται τα συμπεράσματα

που εξάγονται από τα αποτελέσματα των πειραμάτων ενώ γίνονται εισηγήσεις και για μελλοντική ερευνά και εργασίες.

Βάση αποτελεσμάτων που προέκυψαν από την πειραματική παρατήρηση των υπό εξέταση καλλιιεργειών οξεόφιλων μικροοργανισμών στην παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου του ποσοστού οξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III) βρέθηκε ότι σε επίπεδα 0.341 g/L COD η παρατήρηση αναστολής των βιοδιεργασιών οξείδωσης διήρκεσε μόλις 2 με 3 μέρες ενώ σε επίπεδα οργανικού φορτίου της τάξης των 0.8312 g/L COD και πάνω, οι διεργασίες οξείδωσης παρουσιάζουν παρατεταμένη αναστολή σε βάθος χρόνου. Εν συνεχεία, διαμέσου διαφόρων δοκιμών βρέθηκε ότι οι μικροοργανισμοί *Acidocella aminolytica* οι οποίοι απομονώθηκαν στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου παρουσιάζουν την ιδιότητα να καταναλώνουν το έντονο οργανικό φορτίο και να επαναφέρουν την χαμένη απόδοση βιομετατροπής του δισθενούς σιδήρου.

Λέξεις κλειδιά: βιοοξείδωση, βιοαναγωγή, έντονο οργανικό φορτίο, κυτταρική λύση, απενεργοποίηση βιοδιεργασιών, χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, οπτική πυκνότητα, οξεόφιλοι αυτότροφοι, ετερότροφοι μικροοργανισμοί, στασιμότητα, ολικοί υδατάνθρακες, βιοδιάσπαση.

ABSTRACT

During my degree's final graduation project was investigated factors that inhibit acidophilic iron oxidizer microorganisms. These microorganisms have the ability to oxidize the Fe^{2+} to Fe^{3+} and S to SO_4^{2-} and are the main catalyst during bioleaching process. Bioleaching is a low-cost mining technology based on the use of acidophilic bacteria for the extraction of metals from ores. The problem that focused on was the inhibition of organic compounds to acidophilic iron oxidizers microorganisms. The main origin of those organic compounds is from the cells lysis or during cells metabolism. Furthermore was examined if acidophilic heterotrophic microorganism can biodegrade the organics and also if can alleviate the inhibition. Up to date, no study has examined these factors.

Keywords: acidophilic iron oxidizer bacteria, biooxidation, bioreduction, cells lysis, inhibition, biodegradation, COD, MPN, Carbohydrates.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.....	i
ABSTRACT	viii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xiii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xvi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xvii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xix
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 Βιοτεχνολογία.....	1
1.2 Ιστορικό βιοτεχνολογίας	1
1.3 Κύριες εφαρμογές βιοτεχνολογίας	2
1.4 Βιοτεχνολογία και μεταλλευτικά περιβάλλοντα	2
1.5 Κύπρος προπύργιο εξόρυξης χαλκού.	3
1.6 Μέθοδος Βιοεκχύλισης σε Σωρούς - Εξαγωγή σε οργανικό διαλύτη – Ηλεκτροανάκτηση (HBL/SX/EW).....	4
1.7 Μικροοργανισμοί που λαμβάνουν χώρα στην βιοεκχύλιση	5
1.7.1 <i>Acidithiobacillus</i> ή <i>Thioobacillus ferrooxidans</i>	6
1.7.2 <i>Leptospirillum ferriphilum</i>	6
1.7.3 <i>Acidithiobacillus caldus</i>	7
1.7.4 Οξείδωση του σιδήρου και βιοεκχύλιση του χαλκού.....	8
1.8 Απόδοση της βιοεκχύλισης.....	10
1.9 SMPs / Celllysis.....	11
1.10 <i>Acidocella</i> (ACRBs).....	13

1.11	<i>Acidocella aminolytica</i>	14
1.12	<i>Heterotrophic Iron Reducers</i>	14
1.13	<i>Heterotrophic Iron Reducers Acidiphilium cryptum (J1)</i>	15
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	17
2.1	Αποστείρωση σκευών με την βοήθεια αυτόκαυστου (autoclave).....	17
2.2	Δημιουργία διαλύματος autotrophic, heterotrophic basal salt και Trace element... 17	
2.3	Δημιουργία διαλύματος autotrophic και heterotrophic media.	20
2.4	Καλλιέργεια μικροοργανισμών.	20
2.5	Παραγωγή μικροβιακού διαλύματος Cellysis.	21
2.6	Δημιουργία διαλύματος $K_2Cr_2O_7$ περιεκτικότητας 0.002 M.	23
2.7	Δημιουργία διαλύματος H_2SO_4 15%.....	24
2.8	Παρασκευή διαλύματος Fe (II) περιεκτικότητας 5 gr/L.	24
2.9	Παρασκευή διαλύματος Fe (III) περιεκτικότητα 5 gr/L.....	25
2.10	Προσδιορισμός δισθενούς σιδήρου Fe (II) με την χρήση $K_2Cr_2O_7$	25
2.11	Προσδιορισμός ανόργανων θεικών (SO_4^{2+}).....	26
2.12	Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (C.O.D.).....	28
2.13	Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας (O.D.).....	32
2.14	Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων (Carbohydrates).....	33
2.15	Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών διαμέσου της τεχνικής COOMASIE BRILLIANT BLUE G-250-BASED.	36
2.16	Προσδιορισμός μικροβιακού πληθυσμού (M.P.N).	41
2.17	Δημιουργία αερόβιων και αναερόβιων καλλιιεργειών για διερεύνησης του ποσοστού αναστολής της βιοοξειδωσης του Fe(II) σε Fe(III).	44

3	ΑΝΑΛΥΣΗ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	47
3.1	Παρατήρηση της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου μικτής καλλιέργειας <i>Iron oxidizer</i> μικροοργανισμών.....	47
3.2	Παρατήρηση της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> μικροοργανισμών.....	49
3.3	Παρατήρηση της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας <i>Leptospirillum ferriphilum</i> μικροοργανισμών.....	53
3.4	Επαναληπτικό πείραμα παρατήρησης της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> μικροοργανισμών	57
3.5	Παρατήρηση της αναστολής βιοοαναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) και πιθανής ταυτόχρονη κατανάλωσης οργανικού φορτίου διαμέσου μικτής καλλιέργειας <i>Heterotrophic iron reducer (H.I.R)</i> και καθαρής καλλιέργειας <i>J1</i> μικροοργανισμών.....	60
3.6	Επαναληπτικό πείραμα παρατήρησης της αναστολής βιοοαναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) και πιθανής ταυτόχρονη κατανάλωσης οργανικού φορτίου διαμέσου μικτής καλλιέργειας <i>Heterotrophic iron reducer (H.I.R)</i> και καθαρής καλλιέργειας <i>J1</i> μικροοργανισμών.....	62
3.7	Πείραμα παρατήρησης της αναστολής βιοοξειδωσης του S ⁰ σε SO ₄ ²⁻ παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus caldus</i> μικροοργανισμών.....	65
3.8	Ανάπτυξη ετερότροφων μικροοργανισμών <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> προς κατανάλωση οργανικού φορτίου του διαλύματος Cellysis.	68
3.9	Επαναληπτικό πείραμα ανάπτυξη ετερότροφων μικροοργανισμών <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> προς κατανάλωση οργανικού φορτίου του διαλύματος Cellysis περιεκτικότητα 5% και 15% του συνολικού όγκου της καλλιέργειας.	70
3.10	Παρατήρησης της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> σε συνδυασμό με <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> μικροοργανισμών.....	72

3.11 Επαναληπτικό πείραμα παρατήρησης της αναστολής βιοοξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* σε συνδυασμό με *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών. 75

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά δομής και λειτουργία οξεόφιλων μικροοργανισμών.....	8
Πίνακας 2: Βασικά άλατα του βιομέσου για αυτότροφους μικροοργανισμούς (10 x Autotrophic Basal Salts).....	18
Πίνακας 3: Βασικά άλατα του βιομέσου για ετερότροφους μικροοργανισμούς (10 x Heterotrophic Basal Salts).....	18
Πίνακας 4: Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace elements).....	19
Πίνακας 5: Αποτελέσματα απορροφήσεων πρότυπων διαλυμάτων θειικού αμμωνίου (NH ₄) ₂ SO ₄	27
Πίνακας 6: Πίνακας αποτελεσμάτων συγκέντρωσης σε σχέση με την απορρόφηση.	30
Πίνακας 7: Πίνακας απορροφήσεων πρότυπων διαλυμάτων προς παρασκευή καμπύλης βαθμονόμησης.....	35
Πίνακας 8: Πίνακας απορροφήσεων πρότυπων διαλυμάτων προς παρασκευή καμπύλης βαθμονόμησης.....	40
Πίνακας 9: MPN για <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (first day samples, 6 th day last change)	42
Πίνακας 10: McCrady's Table για υπολογισμό μικροβιακού πληθυσμού.....	42
Πίνακας 11: Προετημασία καλλιέργειας με τελικό όγκο 100 mL.	45
Πίνακας 12: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών μικτής καλλιέργειας <i>Iron oxidizer</i> σε pH 1.8-2.	48
Πίνακας 13: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> μικροοργανισμών σε pH 2-2.5.....	51
Πίνακας 14: MPN για <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (first day samples, 6 th day last change).	52
Πίνακας 15: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας <i>Leptospirillum ferriphilum</i> μικροοργανισμών σε pH 2-2.5.....	54
Πίνακας 16: MPN για <i>Leptospirillum ferriphilum</i> (first day samples, 5 th day last change)....	55

Πίνακας 17: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> μικροοργανισμών στο επαναληπτικό πείραμα σε pH 2-2.5.....	58
Πίνακας 18: MPN για <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (first day samples, 16 th day last change)	59
Πίνακας 19: Σύσταση αναερόβιας καλλιέργειας <i>Heterotrophic iron reducer (H.I.R)</i> και καθαρής καλλιέργειας <i>J1</i> μικροοργανισμών.....	61
Πίνακας 20: Σύσταση αερόβιας καλλιέργειας <i>Heterotrophic iron reducer (H.I.R)</i> και καθαρής καλλιέργειας <i>J1</i> μικροοργανισμών.....	61
Πίνακας 21: Σύσταση αναερόβιας καλλιέργειας <i>Heterotrophic iron reducer (H.I.R)</i> και καθαρής καλλιέργειας <i>J1</i> μικροοργανισμών.....	63
Πίνακας 22: Σύσταση αερόβιας καλλιέργειας <i>Heterotrophic iron reducer (H.I.R)</i> και καθαρής καλλιέργειας <i>J1</i> μικροοργανισμών.....	63
Πίνακας 23: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus caldus</i> σε pH 2-2.5.	65
Πίνακας 24: MPN αποτελεσμάτων για <i>Acidithiobacillus caldus</i> μικροοργανισμούς στην παρουσία οργανικού φορτίου.	66
Πίνακας 25: 1 Σύσταση αναερόβιας καλλιέργειας <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> μικροοργανισμών με Cellysis ως πηγή θρεπτικών.....	68
Πίνακας 26: Σύσταση αερόβιας καλλιέργειας <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> μικροοργανισμών με Cellysis ως πηγή θρεπτικών.....	69
Πίνακας 27: Σύσταση αερόβιας καλλιέργειας <i>ACRBs</i> μικροοργανισμών με Cellysis ως πηγή θρεπτικών	70
Πίνακας 28: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> σε συνδυασμό με <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> μικροοργανισμών σε pH 2-2.2.	73
Πίνακας 29: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> απουσία <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> μικροοργανισμών σε pH 2-2.2.	73

Πίνακας 30: Σύσταση καλλιιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* σε συνδυασμό με *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών σε pH 2-2.2. 76

Πίνακας 31: Σύσταση καλλιιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* απουσία *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών σε pH 2-2.2. 76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση της μεθόδου HBL / SX / EW.....	5
Εικόνα 2: Δείγμα μικροβιακής λάσπης από τριτοβάθμια επεξεργασία λυμάτων.	23
Εικόνα 3: Φιλτράρισμα διαλύματος μικροβιακής λάσπης προς παραγωγή διαλύματος Cellysis	23
Εικόνα 4: Πειραματική διάταξη προσδιορισμού Fe (II) και τελική αλλαγή δειγμάτων	26
Εικόνα 5: Δημιουργία δειγμάτων για σκοπούς ανάλυσης M.P.N	44
Εικόνα 6: Μικτές καλλιέργειες <i>Iron oxidizer</i> μικροοργανισμών	49
Εικόνα 7: Καθαρές καλλιέργειες <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> μικροοργανισμών	53
Εικόνα 8: Καθαρές καλλιέργειες <i>Leptospirillum ferriphilum</i> μικροοργανισμών	57
Εικόνα 9: Καθαρή <i>J1</i> και μικτή καλλιέργεια <i>Heterotrophic iron reducer (H.I.R)</i> μικροοργανισμών παρουσίας υψηλού οργανικού φορτίου. 0.2078 gr/L.	64
Εικόνα 10: Καλλιέργειες <i>Acidithiobacillus caldus</i> μικροοργανισμών παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου Cellysis. pH 2-2.5	67
Εικόνα 11: Καθαρές και μικτές καλλιέργειες <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> και <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> μικροοργανισμών παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου.....	75
Εικόνα 12: Καθαρές και μικτές καλλιέργειες <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> και <i>Acidocella aminolytica (ACRBs)</i> μικροοργανισμών παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου.....	77

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για προσδιορισμό ανόργανων θεικών σε βιοτεχνολογικά δείγματα.....	28
Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γλυκόζης για ανάλυση C.O.D	30
Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης προς προσδιορισμό σακχάρων σε υπό ανάλυση δείγματα.....	36
Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών.	40
Διάγραμμα 5: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 2.1 g/L.....	48
Διάγραμμα 6: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 1.137 g/L.....	51
Διάγραμμα 7: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 7.203 g/L.....	55
Διάγραμμα 8: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 4.156 g/L.....	59
Διάγραμμα 9: 5 Συνολικό διάγραμμα ποσοστού μετατροπής Fe (III) σε Fe (II) σε συγκέντρωση Cellysis 15% του τελικού όγκου της καλλιέργειας για αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Τιμή αρχική COD = 0.6234 gr/L.	62
Διάγραμμα 10: Συνολικό διάγραμμα ποσοστού μετατροπής Fe (III) σε Fe (II) σε συγκέντρωση Cellysis 5% του τελικού όγκου της καλλιέργειας για αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Τιμή αρχική COD = 0.2078 gr/L.	63
Διάγραμμα 11: Ποσοστό μετατροπής S ⁰ σε SO ₄ ² παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 4.156 g/L.....	66
Διάγραμμα 12: Συνολικό διάγραμμα ποσοστού ανάπτυξης <i>Acidocella aminolytica</i> (ACRBs) με θρεπτικό υπόστρωμα Cellysis 5% του τελικού όγκου της καλλιέργειας για αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες. Τιμή COD = 0.2078 g/L.....	69

Διάγραμμα 13: Συνολικό διάγραμμα ποσοστού ανάπτυξης <i>Acidocella aminolytica</i> (ACRBs) με θρεπτικό υπόστρωμα Cellysis 5% και 15% του τελικού όγκου της καλλιέργειας για αερόβιες συνθήκες. Τιμή COD _{5%} = 0.2078 g/L και COD _{15%} = 0.6234 g/L.	71
Διάγραμμα 14: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe(III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 4.156 g/L παρουσία και απουσία <i>Acidocella aminolytica</i> (ACRBs) μικροοργανισμών	74
Διάγραμμα 15: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe(III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 4.156 g/L παρουσία και απουσία <i>Acidocella aminolytica</i> (ACRBs) μικροοργανισμών	77

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Κύπρος ήταν γνωστή κατά την αρχαιότητα για τα πλούσια κοιτάσματα χαλκού. Μάλιστα η λατινική ονομασία του χαλκού (cuprium) προέρχεται από την έκφραση “Cuprium aes”, που σημαίνει «μέταλλο της Κύπρου». Η ολοένα αυξανόμενη ζήτηση χαλκού σε συνδυασμό με την ανεξέλεγκτη και πολύχρονη εκμετάλλευση των ορυκτών αποθεμάτων οδήγησε την αφθονία του νησιού σε χαμηλά επίπεδα. Σήμερα η μεγαλύτερη δραστηριότητα εξόρυξης χάλκινων και άλλων ορυκτών μετάλλων σημειώνεται στο μεταλλείο της Σκουριώτισσας. Μετά την επανεκκίνηση των διαδικασιών εξόρυξης το 1996 στο μεταλλείο εφαρμόστηκε μια πρωτοποριακή και άκρος αποδοτική τεχνική εξόρυξης και επεξεργασία του ορυκτού χαλκού. Η επεξεργασία φτωχών μεταλλευμάτων χαλκού καθώς και χαλκούχων απορριμμάτων παλαιών εκμεταλλεύσεων γίνεται πλέον διαμέσου βιοεκχυστηκών διαδικασιών. Η διαδικασία βιοεκχύλισης πραγματοποιείται σε σορούς υπό όξινο περιβάλλον με την βοήθεια οξεόφιλων μικροοργανισμών και αποτελεί μια άκρος οικονομική αλλά και αποδοτική τεχνική με πολύ χαμηλό δείκτη επικινδυνότητας τόσο για τον άνθρωπο αλλά και το περιβάλλον.

Το πρόβλημα το οποίο παρατηρήθηκε κατά την λειτουργία της βιοεκχύλισης είναι ότι, στην παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου η διαδικασία βιοεκχύλισης χάνει την αποδοτικότητα της αφού παρατηρείται αναστολή των βιοδιεργασιών των μικροοργανισμών που λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία. Η αναστολή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ανάκτησης των μεταλλοφόρων κοιτασμάτων και εν συνεχεία τον επηρεασμό της συνολικής διαδικασίας παραγωγής των μεταλλοφόρων προϊόντων. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην βιοεκχύλιση των ορυκτών μεταλλευμάτων διαμέσου της οξειδωσης του δισθενούς σιδήρου (Fe (II)) σε τρισθενή (Fe (III)) αλλά επίσης και του S^{2-} ή S^0 σε SO_4^{2-} . Η προέλευση του οργανικού φορτίου προέρχεται κυρίως από την κυτταρική λύση ή κατά των κυτταρικό μεταβολισμό. Μέχρι σήμερα δεν έχει εξεταστεί σε πιο βαθμό το έντονο αυτό οργανικό φορτίο μπορεί να επηρεάσει τους εν λόγω μικροοργανισμούς. Έτσι σκοπός της παρούσας ερευνάς είναι να προσδιοριστεί το ποσοστό αναστολής, καθώς επίσης και η εύρεση μίας λύσης διαμέσου βιοτεχνολογικών μεθόδων κατά την οποία θα ξεπεραστεί το στάδιο της στασιμότητας, επιτυγχάνοντας και πάλι την επαναφορά της χαμένης απόδοσης βιοεκχύλισης.

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Βιοτεχνολογία.

Με τον όρο βιοτεχνολογία, εννοούμε το σύνολο των τεχνικών διαδικασιών που απότερο σκοπό έχουν την βέλτιστη εκμετάλλευση και χρησιμοποίηση των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων της ζώσας ύλης, δηλαδή τόσο ολόκληρων των οργανισμών όσο και συστατικών που προέρχονται από αυτούς π.χ. ένζυμά, με στόχο τη βιομηχανική - μαζική παραγωγή κάποιου προϊόντος χρήσιμου στη διατροφή, στην ιατρική, στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία συνθέσεων κ.α. Έτσι, αυξάνεται η παραγωγή των ήδη παραγόμενων προϊόντων και προάγεται η παραγωγή νέων προϊόντων με μεγάλη προστιθέμενη αξία και σημασία για την ανθρωπότητα.

Το 1984 το Αμερικανικό Κογκρέσο όρισε τη Βιοτεχνολογία ως **«το σύνολο των εμπορικών τεχνικών που χρησιμοποιούν έμβιους οργανισμούς, ή ουσίες προερχόμενες από αυτούς, για την παραγωγή ή τροποποίηση κάποιου προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών οικονομικά σημαντικών φυτών και ζώων, και για την ανάπτυξη μικροοργανισμών για επίδραση στο περιβάλλον»**

Αναπόσπαστο κομμάτι για την αξιοποίηση και κατανόηση της ολοκληρωμένης έννοιας της βιοτεχνολογίας αποτελεί η Βιοχημική Μηχανική η οποία αφορά τη χρήση των αρχών εκείνων της χημικής μηχανικής που απαιτούνται για το σχεδιασμό, τη λειτουργία και τη βελτιστοποίηση βιομηχανικών βιοδιεργασιών.[Γεώργιος Αγγελής, 2007]

1.2 Ιστορικό Βιοτεχνολογίας.

Γενικά αν και η βιοτεχνολογία γνώρισε καθολική αποδοχή στα τέλη του 20 αιώνα η έννοια αυτή ήταν ριζωμένη ανέκαθεν και συνυπήρχε από τα βάθη της αρχαιότητας με την ανθρώπινη πρόοδο και εξέλιξη. Το πιο απλό και χειροπιαστό παράδειγμα η βιοτεχνολογική χρήση παραγωγής τροφίμων, όπως κρασιού, ξυδιού, τυριού, ψωμιού και αργότερα μύρας και γιαουρτιού διαμέσου ζυμωτικών διαδικασιών. Επίσης στις αρχές του εικοστού αιώνα χρησιμοποιούνται για πρώτη φορά βιοτεχνολογικές μέθοδοι παραγωγής οργανικών οξέων, διαλυτών και βιομάζας κάτω από μη άσηπτες συνθήκες και εν συνεχεία περίπου το 1940, με την ανάπτυξη των μεθόδων αποστείρωσης παράγονται με βιοχημικές διεργασίες πολλά προϊόντα όπως αντιβιοτικά (πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη κ.α.), βιταμίνη Β12,

αλκαλοειδή, γιβερελλίνες, κορτιζόνη, 5'-νουκλεοτίδια, δεξτράνες, ένζυμα κ.λ.π. Τα τελευταία 20 χρόνια η Βιοτεχνολογία γνώρισε το απόγειο λόγω δύο νέων επιτευγμάτων, αρχικά την αποκρυπτογράφιση των ενζυμικών λειτουργιών αλλά και της τροποποίησης του DNA διαμέσου της γενετικής μηχανικής.[Γεώργιος Αγγελής, 2007]

1.3 Κύριες Εφαρμογές Βιοτεχνολογίας.

Γενικά η βιοτεχνολογία βρίσκει εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων και ποτών που περιλαμβάνουν ζύμωση (π.χ. τυρί, ξύδι, γιαούρτι, αλκοολούχα ποτά). Επίσης στην παραγωγή ενζύμων, αιθυλικής αλκοόλης και άλλων διαλυτών, κιτρικού οξέος, βιταμινών, μονοκυτταρικής πρωτεΐνης για ζωοτροφές, αντιβιοτικών και άλλων φαρμάκων. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει στον τομέα παραγωγή ενέργειας από ανακυκλώσιμες ύλες (παραγωγή αιθανόλης ή/και βιοαερίου από κυτταρινούχες πρώτες ύλες), καθώς επίσης και στον βιολογικό καθαρισμό των υγρών και στερεών αποβλήτων και τέλος στην εξόρυξη πετρελαίου και δέσμευση αζώτου. Η βιοτεχνολογία ενισχύει την προσφορά της στους πιο πάνω βιομηχανικούς τομείς με την παροχή διεργασιών που περιλαμβάνουν τη δράση ενζύμων ή βιολογικών κυττάρων (βιοχημικές διεργασίες). [Γεώργιος Αγγελής, 2007]

1.4 Βιοτεχνολογία και μεταλλευτικά περιβάλλοντα.

Εκτός από τους πιο πάνω βιομηχανικούς τομείς η βιοτεχνολογία βρίσκει σημαντικές εφαρμογές και στον τομέα της μεταλλουργίας. Η χρήση μικροοργανισμών για την εξαγωγή χαλκού είναι πιθανώς, η αρχαιότερη εφαρμογή βιοτεχνολογικής μεθόδου και συγκεκριμένα φέρει την ονομασία βιοεκχύλιση. Η εκχύλιση φτωχών μεταλλευμάτων χαλκού καθώς και χαλκούχων απορριμμάτων παλαιών εκμεταλλεύσεων γίνεται από μόνη της στη φύση, υπάρχουν δε πολλές μαρτυρίες σε κείμενα αρχαία ελληνικά, ρωμαϊκά και μεταγενέστερα περί γαλάζιων υγρών που αναβλύζουν από τη γη. Πιο πρόσφατα, με την εμφάνιση της φτηνής και αξιόπιστης τεχνολογίας της εξαγωγής μετάλλου με οργανικό διαλύτη για τη συγκέντρωση αραιών διαλυμάτων, η εκχύλιση σωρών και απορριμμάτων έχει γίνει μια ελκυστική και ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος. **Η εκχύλιση σε σωρούς** εφαρμόστηκε πρώτα σε οξειδωμένα, κυρίως, μεταλλεύματα. Βρέθηκε όμως, ότι σε πολλούς σωρούς εκχύλισης, οι οποίοι ήταν μικτής σύστασης (με θειούχα και οξειδωμένα ορυκτά), η βακτηριακή εκχύλιση έπαιζε σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση χαλκού και από τα θειούχα. Σήμερα, οι περισσότερες

εγκαταστάσεις ανάκτησης χαλκού έχουν σωρούς θειούχων μεταλλευμάτων όπου εφαρμόζουν τη βακτηριακή εκχύλιση.

1.5 Κύπρος προπύργιο εξόρυξης χαλκού.

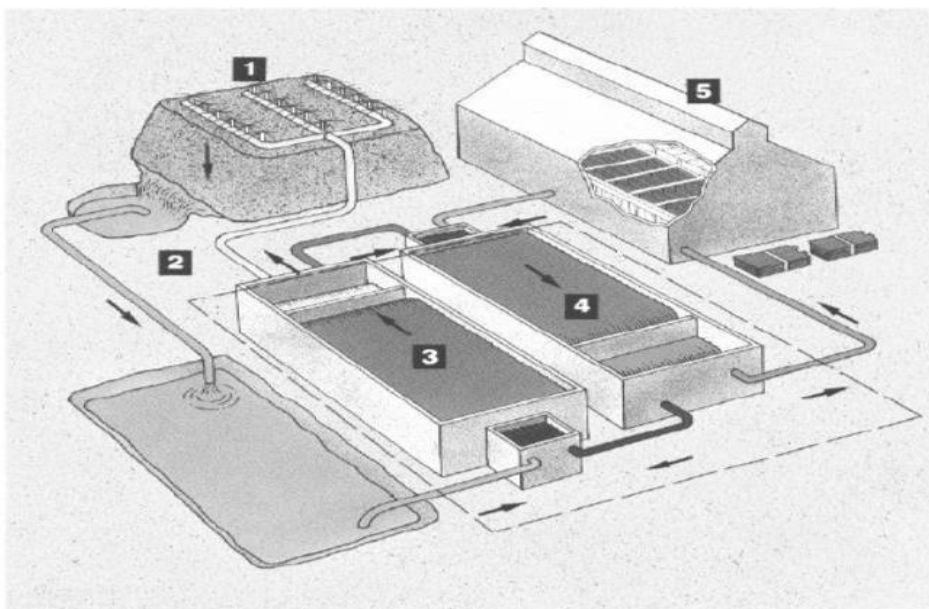
Η σύνδεση της Κύπρου με τον χαλκό είναι γνωστή και χρονολογείται από τα πρώτα στάδια παραγωγής και διάδοσης της χρήσης του μετάλλου. Ο χαλκός της Κύπρου εξήγητο σε όλο τον τότε γνωστό κόσμο, λαμβάνοντας ως αντάλλαγμα άλλα προϊόντα. Σήμερα η μοναδική μεταλλευτική δραστηριότητα που υπάρχει στη Κύπρο είναι το μεταλλείο χαλκού της Σκουριώτισσας, που άρχισε ξανά τη λειτουργία του στα μέσα του 1996 με την παραγωγή καθόδων μεταλλικού χαλκού (99,99%), εφαρμόζοντας την μέθοδο της βιοεκχύλισης σωρών με ελαφρά όξινο διάλυμα - εξαγωγής με οργανικό διαλύτη - ηλεκτρανάκτησης (Leaching - SX - EW). Μάλιστα το 2012 γιόρτασαν παραγωγή 50.000 τόνων χαλκού σε 4.000 χρόνια λειτουργίας.

Τα χαλκούχα κοιτάσματα της Κύπρου είναι συνδεδεμένα με τα ηφαιστειακά πετρώματα της οφιολιθικής ακολουθίας του Τροόδους και εκμετάλλευση τους μέχρι στιγμής έχει γίνει σε έξι μεταλλευτικές περιοχές: Σκουριώτισσα - Μαυροβούνι - Απλίκι, Ταμασός - Μιτσερό, Καλαβασός, Λίμνη, Καμπιά - Καπέδες και Σιά - Μαθιάτης. Το μέγεθος των γνωστών κοιτασμάτων ποικίλει από 50 χιλιάδες τόνους μέχρι 17 εκατομμύρια τόνους, ενώ η περιεκτικότητα σε χαλκό κυμαίνεται από 0.3% μέχρι 4.5%.

Τα κοιτάσματα χαλκού της Κύπρου σχηματίστηκαν κατά μήκος των αξόνων διεύρυνσης του ωκεάνιου πυθμένα στα όρια αποκλινόντων λιθοσφαιρικών πλακών του φλοιού της γης. Σε τέτοια περιβάλλοντα, παρατηρείται έκχυση λαβών και δημιουργία νέου φλοιού κατά μήκος των ορίων απομάκρυνσης των λιθοσφαιρικών πλακών. Ο σχηματισμός των κοιτασμάτων αυτών οφείλεται στη κυκλοφορία θερμών μεταλλοφόρων διαλυμάτων, τα οποία προέρχονται από τη διείδυση θαλάσσιου νερού μέσα στα πετρώματα του ωκεάνιου φλοιού. Τα μέταλλα που περιέχονται στα θερμά διαλύματα προέρχονται από την απόπλυση των πετρωμάτων του ωκεάνιου φλοιού. Τα θερμά μεταλλοφόρα διαλύματα εκβάλλονται στον θαλάσσιο πυθμένα υπό μορφή θερμών πιδάκων, όπου γίνεται η καθίζηση των μετάλλων υπό μορφή θειούχων ενώσεων ως αποτέλεσμα των φυσικοχημικών συνθηκών που επικρατούν στον θαλάσσιο πυθμένα.

1.6 Μέθοδος Βιοεκχύλισης σε Σωρούς - Εξαγωγή σε οργανικό διαλύτη - Ηλεκτροανάκτηση (HBL/SX/EW).

Αφού συλλεγεί το πλούσιο πέτρωμα σε μεταλλοφόρα ιόντα και προεπεξεργαστεί, στην συνέχεια τοποθετείται σε ιδικά διαμορφωμένο χώρο και πάνω σε αδιαπέρατες γεωμεμβράνες υπό την μορφή σωρών. Στην συνέχεια αφού δημιουργηθεί το κατάλληλο σύστημα σωληνώσεων για μεταφορά του θεικού οξέος τότε οι σωροί ραντίζονται με θεικό οξύ υπό συνεχή ελεγχόμενη ροή. Το οξύ διηθείται μέσα από το σωρό, διαλύοντας τον χαλκό με την συμβολή πάντοτε των οξεόφιλων μικροοργανισμών οι οποίοι διαμέσου της βιοεκχύλισης βοηθούν την απελευθέρωση των μεταλλικών ιόντων από τα πετρώματα. Το μεταλλοφόρο διάλυμα συσσωρεύεται στο κάτω μέρος των σωρών και συλλέγεται διαμέσου ιδικά διαμορφωμένου συστήματος αγωγών και οδηγείται σε λίμνη αποθήκευσης. Το διάλυμα έπειτα τροφοδοτείται σε εγκατάσταση εξαγωγής με οργανικό διαλύτη, όπου έρχεται σε επαφή με κατάλληλο οργανικό αντιδραστήριο για να σχηματίσει σύμπλοκο διαλυτό στην οργανική φάση. Η φορτισμένη με χαλκό οργανική φάση προχωρεί στην εγκατάσταση απογύμνωσης, όπου έρχεται σε επαφή με όξινο ηλεκτρολύτη που επανεξάγει το χαλκό στην υδατική φάση, σχηματίζοντας ένα πυκνό καθαρό διάλυμα. Ο οργανικός διαλύτης αναγεννάται και επιστρέφει διαμέσου του διαμορφωμένου συστήματος στο προηγούμενο στάδιο. Ο ηλεκτρολύτης αντλείται στα κελία ηλεκτροανάκτησης όπου διαμέσου εφαρμογής διαφοράς δυναμικού προκύπτει προϊόν καθαρότητας 99.9% προσκολλημένο στην κάθοδο.



Εικόνα 1: Σχηματική παράσταση της μεθόδου HBL / SX / EW.

1.7 Μικροοργανισμοί που λαμβάνουν χώρα στην βιοεκχύλιση.

Γενικά σε όξινα μεταλλευτικά περιβάλλοντα και κυρίως κατά τις διαδικασίες βιοεκχύλισης, χρησιμοποιούνται κατά αποκλειστικότητα οξεόφιλοι μικροοργανισμοί. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται σε pH χαμηλότερο του 3. Διαθέτουν την ιδιότητα να οξειδώνουν το Fe^{2+} και το Θείο S σε Fe^{3+} και SO_4^{2-} αντίστοιχα και ως επί των πλείστων τους αποτελούν προκαρυωτικούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα κατά τις διεργασίες βιοεκχύλισης συμμετέχουν οι μικροοργανισμοί *Acidithiobacillus ferrooxidans* οι οποίοι πραγματοποιούν τις αντιδράσεις οξείδωσης $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$, S^{2-} ή $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$, οι μικροοργανισμοί *Acidithiobacillus thiooxidans* και *Acidithiobacillus caldus* οι οποίοι πραγματοποιούν μόνο τη αντίδραση S^{2-} ή $S^0 \rightarrow SO_4^{2-}$ και τέλος οι μικροοργανισμοί *Leptospirillum ferrooxidans* οι οποίοι και πάλι πραγματοποιούν μόνο την αντίδραση οξείδωσης $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$.

Χημειολιθότροφοι - αυτότροφοι (obligate autotrophs): οξειδώνουν ανόργανες ενώσεις θείου για την παροχή της απαραίτητης ενέργειας για ανάπτυξη σ' ένα περιβάλλον όπου το CO_2 είναι η μόνη πηγή άνθρακα. Δεν είναι ικανοί να παράγουν ενέργεια από οργανικά υποστρώματα (*T. thiooxidans*, *T. ferrooxidans*). Σε αντίθεση οι μικτότροφοι (facultative autotrophs): παράγουν ενέργεια για την αφομοίωση άνθρακα είτε από την οξείδωση θείου είτε από την οξείδωση οργανικών ενώσεων (*T. novellus*, *T. intermedius*). [D.B. Johnson, 2002]

1.7.1 *Acidithiobacillus* ή *Thioobacillus ferrooxidans*.

Το όνομα του γένους *Thioobacillus* χρησιμοποίησε πρώτος ο Beijerinck το 1904 για να περιγράψει εκείνα τα βακτήρια που οξειδώνουν ανόργανες ενώσεις του θείου και αποθέτουν θείο εκτός του κυττάρου. Όλα τα μέλη του γένους *Thioobacillus* μπορούν να χρησιμοποιήσουν την οξείδωση του θείου για την παραγωγή μεταβολικά χρήσιμης ενέργειας. Γι' αυτό το λόγο, περιγράφονται ως χημειολιθότροφα.

Μορφολογικά, οι θειοβάκιλλοι είναι μικρού έως μέσου μήκους ράβδοι, αρνητικοί κατά Gram (-), που αναπαράγονται με δυαδική διάσπαση (διχοτόμηση), χωρίς παραγωγή σπορίων. Ένα είδος (*A. ferrooxidans*) είναι ικανό να χρησιμοποιεί και δισθενή σίδηρο εκτός από θείο ως οξειδώσιμο υπόστρωμα. Το φυσικό τους περιβάλλον μπορεί να είναι θαλάσσιο, υδατικό ή χερσαίο, αλλά βρίσκονται κατ' εξοχήν στα όξινα νερά μεταλλείων στα οποία εξορύσσονται μεταλλεύματα που περιέχουν θειούχα ορυκτά. Οι *T. thiooxidans* είναι καθαρά χημειολιθότροφα βακτήρια που οξειδώνουν το ανόργανο θείο. Είναι αερόβια και αντέχουν σε τιμές pH κάτω από 2.0. Οι *T. ferrooxidans* είναι παρόμοια με τον *T. thiooxidans* αλλά μπορούν να οξειδώνουν και δισθενή σίδηρο πέρα από τα θειούχα ορυκτά. [K. Harneit, 2006]

1.7.2 *Leptospirillum ferriphilum*.

Οι μικροοργανισμοί *Leptospirillum* αποτελούν επίσης γένος βακτηρίων σιδήρου - οξειδωτικά (iron oxidizer) τα οποία παίζουν και αυτά σημαντικό ρόλο στη βιομηχανική βιοεκχύλιση. Είναι αερόβια βακτήρια τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη απόδοση βιοοξειδωσης σε συνεχόμενης ροής δεξαμενές. Επίσης βάση παλιότερων ερευνών ο λόγος που το γένος *Leptospirillum* παρουσιάζει τόσο μεγάλη απόδοση βιοοξειδωσης είναι ότι, στις πλείστες περιπτώσεις ο μεγάλος λόγος δισθενούς σιδήρου προς τρισθενή απενεργοποιεί τα πλείστα οξεόφιλα βακτήρια.

Οι μικροοργανισμοί *Leptospirillum ferriphilum* αποτελούν Gram – αρνητικά (-) βακτήρια με σπειροειδές σχήμα. Διαθέτουν διαστάσεις 0.3 – 0.5 microns πλάτος και 0.9 - 3.0 μικρά σε μήκος. Μεταβολικά αποτελούν κλασικούς χημειολιθότροφους οργανισμούς, για τον καθορισμό του άνθρακα με τη χρήση δισθενούς σιδήρου ως δότης ηλεκτρονίων τους και το οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων. [Nicolette J. Coram, 2001]

1.7.3 *Acidithiobacillus caldus*.

Το γένος των μικροοργανισμών *Acidithiobacillus caldus* αποτελεί εξαιρετικά οξεόφιλο και μέτρια θερμοφιλο γένος της κατηγορίας των χημειολιθότροφων γαμμαπρωτεοβακτηρίων το οποίο εδραιώνεται σε όξινα μεταλλευτικά κυρίως περιβάλλοντα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί παρουσιάζουν την ικανότητα να αντλούν ενέργεια διαμέσου της οξείδωσης του θείου και ταυτόχρονης αναγωγής των θειικών ανόργανων ενώσεων στο περιβάλλον του. Γενικά το γένος

Acidithiobacillus caldus αποτελεί ένα από τα τρία αναγνωρισμένα είδη *Acidithiobacillus* μεταξύ των οποίων και οι μικροοργανισμοί *A. thiooxidans* και *A. ferrooxidans* τα οποία αναλύθηκαν πιο πάνω και αποτελούν τους κύριους μικροοργανισμούς οι οποίοι λαμβάνουν χώρα κατά τις διαδικασίες βιοεκχύλισης. Γενικά αυτά τα βακτήρια ζουν σε εξαιρετικά όξινα περιβάλλοντα (pH 1-3) και συνήθως είναι άμεσα συνυφασμένα με τις δραστηριότητες εξόρυξης χαλκού και τα συστήματα αποχέτευσης φυσικού οξέος. Όλα αυτά τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αντλούν ενέργεια από την οξείδωση του θείου με ταυτόχρονη αναγωγή των ανόργανων ενώσεων θείου και επίσης ευδοκιμούν σε εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων. Από τα τρία είδη, όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω οι μικροοργανισμοί *A. ferrooxidans* είναι μοναδική στο να είναι επίσης σε θέση να λάβουν ενέργεια μέσω της οξείδωσης του δισθενούς σιδήρου, καθώς επίσης και όντας προαιρετικά αναερόβιοι παρουσιάζουν και την ικανότητα να χρησιμοποιούν τρισθενή σίδηρο ως εναλλακτική πηγή δέκτη ηλεκτρονίων.

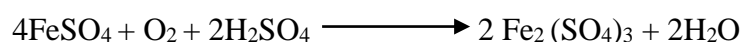
Οι μικροοργανισμοί *Acidithiobacillus caldus* αν και δεν έχουν περιγραφή πλήρως εν του της είναι γνωστό ότι δεν διαθέτουν την ικανότητα άντλησης ενέργεια διαμέσου της οξείδωσης του δισθενή σιδήρου σε τρισθενή. Σε αντίθεση με τα άλλα δύο είδη του γένους, οι *A. caldus* ευδοκιμούν σε θερμοκρασίες μέχρι και 45 έως 50 °C. Τέλος προκειμένου να λύσουν το πρόβλημα αφομοίωσης θρεπτικών και ενέργεια στα ακραία αυτά περιβάλλοντα, έχουν αναπτύξει ένα διαφορετικό μεταβολικό μηχανισμό από τα υπόλοιπα γένη του παρόντος είδους. Γενικά ο μεταβολισμός των θειικών και τετραθειονικών στοιχείων αποτελούν ενδιάμεσα στάδια του γενικού μεταβολικού μονοπατιού που χρησιμοποιούν οι παρόντες μικροοργανισμοί για την οξείδωση του S⁰ σε SO₄²⁻. Η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την αποσύνθεση των τετραθειονικών στοιχείων είναι μια περιπλασμική (η περιπλασμική έκφραση δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών, που κρίνονται απαραίτητοι για την αύξηση της σταθερότητας) ομοδιμερές πρωτεΐνη με μέγιστη δραστηριότητα σε pH 3. [Jorge Valdes, 2009]

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά δομής και λειτουργία οξεόφιλων μικροοργανισμών.

	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
<i>Μορφή και μέγεθος κυττάρων</i>	ράβδοι 0.5x1.5i m	ράβδοι 0.5x2.0i m	σπειροειδή	σφαιροειδή 1.0i m
<i>Περίβλημα κυττάρου</i>	αρνητικό κατά Gram	αρνητικό κατά Gram	αρνητικό κατά Gram	
<i>Φυσικό περιβάλλον</i>	όξινα νερά μεταλλείων	όξινα νερά μεταλλείων	όξινα νερά μεταλλείων	θερμές πηγές
<i>Πηγές ενέργειας</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , SO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻ ,θειούχα ορυκτά	S ⁰ , SO ₃ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	Fe ²⁺	Fe ²⁺ , S ⁰
<i>Πηγές άνθρακα</i>	CO ₂	CO ₂	CO ₂	CO ₂ , οργανικός C
<i>Πηγές αζώτου</i>	NH ₄ ⁺ , N ₂	NH ₄ ⁺ , N ₂	NH ₄ ⁺	
<i>Εύρος pH</i>	1.0-5.0	0.5-5.0	1.5-5.0	0.5-5.0
<i>Βέλτιστο pH</i>	(2.5)	(2.0)	(3.0)	(1.5)
<i>Θερμοκρασία ανάπτυξης (βέλτιστη)</i>	5-40°C (35°C)	5-40°C (28°C)	5-40°C (30°C)	60-75°C (70°C)

1.7.4 Οξείδωση του σιδήρου και βιοεκχύλιση του χαλκού.

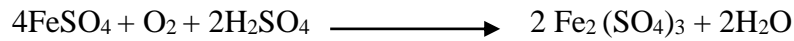
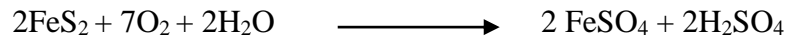
Η οξείδωση του δισθενούς θεικού σιδήρου από τον *T. ferrooxidans* περιγράφεται από την αντίδραση:



Σε σύγκριση με το στοιχειακό θείο, η οξείδωση του δισθενούς σιδήρου αποδίδει χαμηλό ποσό ενέργειας. Επομένως, χρειάζεται να οξειδωθούν μεγαλύτερες ποσότητες σιδήρου κατά την ανάπτυξη σ' αυτό το υπόστρωμα, γεγονός που εξηγεί τις υψηλές ταχύτητες οξείδωσης που παρατηρούνται. Η μέγιστη απόδοση ενέργειας είναι 2 μόρια ATP ανά ιόν τρισθενούς σιδήρου που παράγεται.

Γενικά οι θειοβάκιλλοι θεωρούνται ως οι πιο σημαντικοί οργανισμοί για τη βιολογική εκχύλιση ορυκτών. Η εξαγωγή μετάλλων από τα μεταλλεύματα μπορεί να ενισχυθεί από τη δράση αυτών των βακτηρίων με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς: τον άμεσο και τον έμμεσο. Η **άμεση** βακτηριακή εκχύλιση συμβαίνει με την προσβολή των αδιάλυτων συστατικών του ορυκτού από τα βακτήρια με αποτέλεσμα την οξείδωσή τους. Προϋποθέτει στενή επαφή

(προσκόλληση) μεταξύ των βακτηρίων και του ορυκτού. Ένα παράδειγμα του άμεσου μηχανισμού αποτελεί η βακτηριακή οξείδωση του πυρίτη.



Και στις δύο αντιδράσεις χρησιμοποιούνται οξεόφιλοι μικροοργανισμοί ως καταλύτες.

Σε αντίθεση η **έμμεση** εκχύλιση, δεν γίνεται με προσβολή του ορυκτού από τα βακτήρια. Κατ' αυτήν, τα βακτήρια παράγουν Fe^{3+} από την οξείδωση διαλυτού Fe^{2+} . Στη συνέχεια, ο τρισθενής σίδηρος, ως ισχυρό οξειδωτικό μέσο, οξειδώνει άλλα ορυκτά στο μέταλλευμα, τα οποία, μεταπίπτουν σε διαλυτή μορφή. Στον έμμεσο μηχανισμό οφείλεται η εκχύλιση των θειούχων ορυκτών του χαλκού. Σε όξινες συνθήκες ένα μικρό ποσοστό του δισθενή σιδήρου στα ορυκτά διαλύεται. Έτσι ο δισθενής σίδηρος είναι διαθέσιμος για οξείδωση.



Ο χαλκοπυρίτης CuFeS_2 είναι το πιο διαδεδομένο χαλκούχο ορυκτό στο κόσμο (70% χαλκούχων ορυκτών). Στη Σκουριώτισσα αποτελεί το κύριο ορυκτό διαμέσου του οποίου εξορύσσεται ο χαλκός. Η αντίδραση σχηματισμού του χαλκοπυρίτη είναι καθαρά χημική, δηλαδή μπορεί να συμβαίνει απουσία οξυγόνου και βακτηρίων. Ο δισθενής σίδηρος που παράγεται από την αναγωγή του τρισθενούς επαναοξειδώνεται βακτηριακά. Το στοιχειακό θείο που παράγεται ή βρίσκεται μέσα στο ορυκτό μετατρέπεται επίσης λόγω μικροοργανισμών σε θειικό οξύ. Το θειικό οξύ διατηρεί το pH σε επίπεδα ευνοϊκά για τα βακτήρια και μπορεί επίσης να δράσει ως μέσον εκχύλισης για οξειδωμένα ορυκτά που μπορεί να συνυπάρχουν στο θειούχο μέταλλευμα. Βεβαίως, τα περισσότερα θειούχα ορυκτά μπορούν να εκχυλιστούν και με τον άμεσο μηχανισμό με τη διαφορά ότι η βακτηριακή εκχύλιση τους συμβαίνει με μικρότερη ταχύτητα σε σύγκριση με τη χημική οξείδωση από τον τρισθενή σίδηρο. Είναι πολύ πιθανό να συμβαίνουν και οι δύο μηχανισμοί εκχύλισης ταυτόχρονα.

Ο μηχανισμός εκχύλισης που συμβαίνει σε κάθε μία εφαρμογή της βιοεκχύλισης, σε δεδομένη φάση της διεργασίας, εξαρτάται όχι μόνο από το συγκεκριμένο μέταλλευμα και την καλλιέργεια βακτηρίων που χρησιμοποιείται αλλά, επίσης, από τη μεταφορά μάζας και

διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως π.χ. τη θερμοκρασία, το pH και τη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Η χρήση βακτηρίων για την εξαγωγή χαλκού είναι πιθανώς η αρχαιότερη εφαρμογή της τεχνολογίας βιοεκχύλισης.

1.8 Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της βιοεκχύλισης.

- **Υπόστρωμα:** Η σύσταση του υποστρώματος αποτελεί ένα από τους πιο σημαντικούς παράγοντες στην διαδικασία της βιοεκχύλισης. Ορυκτά με υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικά άλατα προκαλούν αναστολή και επιφέρουν καταστροφή της βακτηριακής δραστηριότητας.
- **Αερισμός :** Η επαρκής παροχή οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα αποτελεί προϋπόθεση για την ανάπτυξη και την υψηλή δραστηριότητα των βακτηρίων εκχύλισης. Το διοξείδιου του άνθρακα χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς ως πηγή άνθρακα για παραγωγή βιομάζας. Επιπλέον η παροχή οξυγόνου είναι πολύ σημαντική για την δραστηριότητα του μικροοργανισμού εκχύλισης καθώς επιταχύνει τις αντιδράσεις οξειδωσης μειώνοντας το χρόνο του κύκλου εκχύλισης.
- **pH:** Η προσαρμογή του pH είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης, όταν το pH είναι αλκαλικό τότε παρατηρείται σχηματισμός ιζημάτων (π.χ. γιαροσίτης) που εμποδίζουν την φυσική διήθηση του διαλύματος εκχύλισης μέσα στο σωρό. Οι τιμές πρέπει να είναι από 1,8 – 2,5.
- **Θερμοκρασία:** Διάφορες ομάδες βακτηρίων που μπορούν να επιβιώσουν σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασιών. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί εκχύλιση σε 4 °C αλλά και 50 °C. Οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί επιβιώνουν σε θερμοκρασία 30 - 40 °C, γύρω στους 50 °C επιβιώνουν οι μέτριοι θεرمόφιλοι μικροοργανισμοί και πάνω από 65 °C επιβιώνουν οι ακραίοι θεرمόφιλοι μικροοργανισμοί. Οι αλλαγές της θερμοκρασίας μπορούν να προκαλέσουν τροποποιήσεις στο μικροβιακό πληθυσμό. Συμπερασματικά οι βέλτιστες συνθήκες είναι από 28-30 °C.

- Άλλοι Παράγοντες: Η οξείδωση του μετάλλου γίνεται από τους οξεόφιλους μικροοργανισμούς. Η δραστηριότητα των οξεόφιλων μικροοργανισμών μπορεί να ανασταλεί από πολλούς άλλους παράγοντες όπως είναι τα ψηλά ποσοστά οργανικών ενώσεων τα οποία προέρχονται κυρίως από διαλυτά μικροβιακά προϊόντα ή αλλιώς soluble microbial product (SMP), από ποσότητες οργανικού διαλύτη ο οποίος τροφοδοτείται στις σωρούς κατά την ανακύκλωσή του και τέλος από οργανικές ενώσεις οι οποίες βρίσκονται αυτούσιες στα υπό επεξεργασία πετρώματα.

1.9 SMPs / Cellysis.

Γενικά τα διαλυτά μικροβιακά προϊόντα τα οποία αποδείχτηκε διαμέσου εργαστηριακών δοκιμών ότι κατά κύριο λόγο ευθύνονται για την αναστολή των μικροβιολογικών διεργασιών μπορούν είτε να παραχθούν διαμέσου των μεταβολικών διεργασιών των μικροοργανισμών και εν συνεχεία κυτταρικής λύσης ή παραγωγής μεταβολικών προϊόντων είτε διαμέσου παραγωγής εξωπολυσακχαριτών (EPS).

Η πολυμερή εξωκυττάρια ουσία (extracellular polymeric substance, EPS) ή εξωπολύσακχαριτης απεκκρίνεται από τους μικροοργανισμούς προς δημιουργία βιοφίλμ διαμέσου προσπάθειας των μικροοργανισμών να προστατευθούν από τις διάφορες διακύμανσης στο περιβάλλον τους αλλά επίσης και για να βελτιστοποιήσουν την μεταξύ τους επικοινωνία διαμέσου βιοχημικών σημάτων. Σε μερικά βιοφίλμ βρέθηκε ότι περιέχουν υδάτινες διώρυγες, οι οποίες βοηθούν στην διανομή τόσο των θρεπτικών συστατικών αλλά και σηματοδοτικών μορίων. Σε ανεξέλεγκτη όμως παραγωγή εξωπολυσακχαριτών οι μικροοργανισμοί φαίνεται να επιβαρύνουν το περιβάλλον το οποίο του φιλοξενεί αφού οι ίδιοι απομονώνονται και οι βιοδιεργασίες στις οποίες συνήθως πραγματοποιούν, εξασθενούν με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται αναστολή στην ανάπτυξή τους.

Όσον αφορά την αναστολή των βιοδιεργασιών οξεόφιλων μικροοργανισμών διαμέσου κυτταρικής λύσης, βάση εργαστηριακών δοκιμών όπου εξετάστηκαν οι ρυθμοί οξείδωσης πυρίτη από μικροοργανισμούς *Acidithiobacillus ferrooxidans* βρέθηκε ότι στην περίπτωση όπου τοποθετήθηκαν μικροοργανισμοί *Acidiphilium acidophilum* στην είδη υφιστάμενη καλλιέργεια ο ρυθμός οξείδωσης του δισθενούς σιδήρου ελαττώθηκε. Γενικά ο ρυθμός οξείδωσης του πυρίτη ήταν περιορισμένος στην περίπτωση όπου συνυπήρχαν και τα δυο είδη μικροοργανισμών αλλά επίσης και σε περιπτώσεις όπου τοποθετήθηκαν και άλλου είδους

ετερότροφοι μικροοργανισμοί. Τα αποτελέσματα έδειξαν ακόμη ότι στην περίπτωση αυξημένης παρουσίας οργανικού φορτίου που παρέμεναν στο διάλυμα μετά την ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων φάνηκε υπεύθυνο για την μείωση του ποσοστού οξειδωσης σιδηροπυρίτη. Επιπρόσθετα μετά από αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο προκύπτων βιομέσο από την συνύπαρξη των προαναφερθέντων μικροοργανισμών φάνηκε ότι τα υψηλά επίπεδα οργανικού φορτίου που παρουσιάστηκαν μετά την ανάπτυξη των ετερότροφων μικροοργανισμών, προήλθαν και από υψηλό ποσοστό διανοιγμένων κυττάρων. Τέλος μετά από τιτλοδότηση των διαλυμένων ιόντων χαλκού με εναπομένουσα διαλυμένο οργανικό άνθρακα που προέρχονται από ανάπτυξη μικροοργανισμών *Acidiphilium acidophilum* φάνηκε επίσης υπεύθυνη για την μείωση απόδοσης της οξειδωσης του σιδηροπυρίτη. Τα στοιχεία αυτά δημιουργούν την υποψία ότι κατά την ανάπτυξη ετερότροφων οξεόφιλων μικροοργανισμών σε όξινα μεταλλευτικά περιβάλλοντα πιθανός να μειώνεται η απόδοση βιοεκχύλιση αφού κατά την διαδικασία αυτή τα επίπεδα οργανικού φορτίου στο περιβάλλον αυξάνονται λόγω μεταβολισμού των κυττάρων ή διαμέσου μεταβολικών ιδιοτήτων των μικροοργανισμών. Η πιο πάνω αναφορά δημιούργησε και την ανάγκη διερεύνησης του ποσοστού αναστολής της βιοεκχύλισης στην παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου η αλλιώς μικροβιακού διαλύματος Cellysis το οποίο πήρε το όνομά του από την διαδικασία κυτταρικής λύση που περιγράφηκε πιο πάνω.[Eric. A. Marchand, 2002]

Επίσης σε μεταγενέστερες μελέτες διερευνήθηκε κατά πόσο τα υψηλά οργανικά επίπεδα που παρουσιάζονται σε όξινα περιβάλλοντα μεταλλευτικών αποβλήτων μπορούν να επηρεάσουν την μεταγενέστερη επεξεργασία του αποβλήτου, προς ανάκτηση όλων των εναπομένοντα ποσοστών μεταλλευμάτων διαμέσου βιοεκχύλισης. Συγκεκριμένα στις αναφορές τα soluble microbial product (SMP) που προκύπτουν από την μικροβιακή δραστηριότητα (κυτταρική ανάπτυξη και αποσύνθεση) σε όξινα μεταλλευτικά περιβάλλοντα φαίνεται να είναι υπεύθυνα για την παρατεταμένη αναστολή της διαδικασίας βιοοξειδωσης του σιδηροπυρίτη. Τέλος σε πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν έγινε προσπάθεια περιγραφής της αλληλεπίδρασης των SMPs σε σχέση με την βιοοξειδωση του δισθενής σιδήρου σε όξινο περιβάλλον. Έτσι αποδείχθηκε και πάλι ότι, στην παρουσία υψηλού ποσοστού οργανικού φορτίου το οποίο προήλθε από κυτταρική λύση διαμέσου έκθεσης των μικροβιακών κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες, στο ποσοστό βιομετατροπής του Fe (II) σε Fe (III) παρουσίασε μείωση της τάξεως του 87%. Επιπρόσθετα η επιβράδυνσή της οξειδωσης του σιδηροπυρίτη

φαίνεται να είναι άμεσα συνυφασμένη με την προσθήκη οργανικού φορτίου για ανάπτυξη ετερότροφων οξεόφιλων ή οξεοανεκτικών μικροοργανισμών. Εν κατακλείδι, σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν από την προσθήκη βιομέσου ανάπτυξης ετερότροφων μικροοργανισμών απαλλαγμένο από μικροβιακά κύτταρα, σε καλλιέργειες *Iron Oxidizer* μικροοργανισμών στην παρουσία δισθενή σιδήρου και pH 2.5, η απόδοση βιομετατροπής του δισθενή σιδήρου ελαττώθηκε αισθητά.

Στο παρόν άρθρο γίνεται για πρώτη φορά αναφορά στον όρο Cellysis ο οποίος παραπέμπει στο φαινόμενο ανατολής της βιοοξειδωσης του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή και ως κύρια πηγή προέλευσης του αποτελεί η μικροβιακή κυτταρική λύση.[Tesfayohanes Yacob, 2013]

1.10 Acidocella (ACRBs).

Οι μικροοργανισμοί *Acidocella* αποτελούν ετερότροφους μικροοργανισμούς που εδραιώνονται σε ακραία όξινα μεταλλευτικά και μη περιβάλλοντα. Κανένα από τα είδη αυτά δεν ανήκει στην κατηγορία των χημιολυθότροφων μικροοργανισμών αφού δεν παρουσιάζουν την ιδιότητα εκμετάλλευσης του S^0 ή Fe^{2+} ή οποιουδήποτε άλλου μετάλλου διαμέσου οξείδωσης για άντληση ενέργειας αν και η μερική προσθήκη συγκεκριμένων μετάλλων σε αναπτυσσόμενες καλλιέργειες συνεισφέρει σημαντικά στην τόνωση της ανάπτυξης. Επιπρόσθετα οι μικροοργανισμοί αυτοί παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή στην παρουσία βαρέων μετάλλων όπως καδμίου, χαλκού, νικελίου και ψευδαργύρου, ενώ η παρουσία αυτών των μετάλλων στο περιβάλλον ανάπτυξης των μικροοργανισμών επεκτείνει τον χρόνο ανάπτυξης και καλλιέργειας των εν λόγω μικροοργανισμών. Τα γένη *Acidocella* όπως ακριβώς και τα οξεόφιλα γένη περιέχουν υψηλά ποσοστά phosphorus-free liposmino acid στην κυτταρική τους μεμβράνη. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν απομονωθεί μέχρι στιγμής από νερά και ιζήματα τα οποία προέρχονται από αγωγούς μεταφοράς όξινων μεταλλευτικών αποβλήτων αλλά επίσης και από δείγματα εδάφους με πλούσια περιεκτικότητα σε χαλκούχα ορυκτά. Σε αυτό το περιβάλλον οι μικροοργανισμοί *Acidocella* βρέθηκαν να συνυπάρχουν με γένη μικροοργανισμών *Acidiphilium* και *Acidithiobacillus*. Γενικά οι μικροοργανισμοί αυτοί βρέθηκαν επίσης να αναπτύσσονται σε θερμές πηγές αλλά και σε όξινο χώμα αγροκτημάτων ενώ αποτελεί το πιο συχνά απαντώμενο είδος μικροοργανισμών σε όξινα τροπικά εδάφη. Τέλος όξινες λάσπες και περιεχόμενα αποχετεύσεων με pH κοντά στο 2 αποτελούν συχνή πηγή των εν λόγω μικροοργανισμών. Βάση ανάλυσης των μικροοργανισμών του γένους *Acidocella*

διαμέσου της τεχνικής του 16S-rDNA παρουσίασαν ομοιότητα της τάξεως 92 – 94 % με τα γένη *Acidiphilium*. [George M Garrity, 2005]

1.11 *Acidocella aminolytica*.

Τα στελέχη *Acidocella aminolytica* αποτελούν gram (-) αρνητικά βακτήρια, μη κινητικά με ραβδοειδές σχήμα, τα οποία δεν παρουσιάζουν την ιδιότητα δημιουργίας ενδοσπορίων. Οι αποικίες τους διαθέτουν χρώμα ασπροκίτρινο, ενώ είναι κυρίως αερόβιοι. Παρουσιάζονται προαιρετικά μεθυλότροφοι, ενώ διαφέρουν από τα υπόλοιπα στελέχη του είδους τους αφού διαθέτουν την ικανότητα να βιοαποδομούν έντονα οργανικά ποσοστά ως πηγή ενέργειας. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 30 °C και συνθήκες pH κοντά στο 3–4. Τέλος δεν παρουσιάζουν την ικανότητα αναγωγής των νιτρώδη σε νιτρικά, ενώ οξειδώνουν το οξικό οξύ σε CO₂ και H₂O. Στην παρούσα ερευνητική διατριβή οι μικροοργανισμοί παρουσιάζονται με την ονομασία ACRBs αντί για *Acidocella aminolytica*. [George M Garrity, 2005]

1.12 *Heterotrophic Iron Reducers*.

Η ικανότητα αναγωγής του τρισθενή σιδήρου σε δισθενή είναι ευρέως διαδεδομένη μεταξύ των βακτηρίων *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Bacteroides*, και *Desulfovibrio*. Επιπρόσθετα μερικοί μύκητες έχουν επίσης την ικανότητα αυτή. Γενικά η όλη διαδικασία αναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) ευνοείται σε αναερόβιες συνθήκες, εν τούτοις μερικές φορές συμβαίνει και σε αερόβιες, αν και αυθόρμητη χημική επανοξείδωση μπορεί να συμβεί γρήγορα σε μη όξινων, αερόβια περιβάλλοντα. Για αρκετό καιρό οι μελετητές προσπάθησαν να δώσουν μια ερμηνεία στο μηχανισμό που ακολουθείται από τα βακτήρια για την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή, καταλήγοντας σε τρεις κύριες εικασίες. Αρχικά όταν η φυσικοχημική φύση του περιβάλλοντος (pH, δυναμικό οξειδοαναγωγής) αλλάζει, τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν αυθόρμητη χημική αναγωγή. Εναλλακτικά, τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιούν τον τρισθενές σίδηρο σε όξινα κυρίως υδατικά περιβάλλοντα για άντληση ενέργειας διαμέσου του συστήματος ferrireductase, στο οποίο χρησιμοποιείται μια αλυσίδα ενζύμων για ηλεκτρονιακή μεταφορά διαμέσου φωσφορυλίωσης, κατά την οποία δεν έχει εξακριβωθεί επακριβώς η ολοκληρωμένη βιοδιεργασία που ακολουθείται. Γενικά η αναγωγή του Fe (III) έχει παρατηρηθεί σε ουδετερόφιλα, ετερότροφα βακτήρια παρόλα αυτά έχει

παρατηρηθεί και διαμέσου οξεόφιλων χημειολιθότροφων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί *Thiobacillus thiooxidans* μπορούν να ανάξουν των τρισθενή σίδηρο όταν αναπτύσσονται αερόβια στην παρουσία στοιχειακού θείου. Επίσης μπορούν να πραγματοποιήσουν την διεργασία βιοαναγωγής αναερόβια στην παρουσία επίσης θείου σε τιμές pH μικρότερες 1.8. Τέλος οι εν λόγω μικροοργανισμοί μπορούν να ανάξουν χαλκούχα στοιχεία διαμέσου οξειδωσης θεικών στοιχείων. Γενικά λίγα γένη της εν λόγω κατηγορίας έχουν περιγραφή σε κάποιο βαθμό μερικά εκ των οποίων τα *Acidiphilium cryptum*, *A. angustum*, *A. facilis*, και *A. rubrum*. Τα προαναφερθήσα βακτήρια είναι κατά κύριο λόγο κατά gram (-) αρνητικά αερόβια βακτήρια τα οποία στο περιβάλλον τους πάντα υπάρχει μεγάλη περιεκτικότητα δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου. Γενικά η διαλυτότητα του τρισθενούς σιδήρου είναι άμεσα συνυφασμένη με την μεταβολή του pH και γενικά τα στραγγίσματα από μεταλλευτικές δραστηριότητας περιέχουν πάντοτε υψηλές συγκεντρώσεις. Υπάρχει, ως εκ τούτου, μια σημαντική αντίθεση μεταξύ ουδετερόφιλων, που ζουν σε περιβάλλοντα στα οποία ο τρισθενής σίδηρος βρίσκεται κυρίως σε αδιάλυτο άμορφη ή κρυσταλλική μορφή, και οξεόφιλα τα οποία συχνά εκτίθενται σε υψηλές συγκεντρώσεις διαλυτού τρισθενούς σιδήρου. Γενικά τα οξεόφιλα βακτήρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη απόδοση βιοαναγωγής του Fe (III) σε Fe II).[D.B. Johnson, 2002]

1.13 Heterotrophic Iron Reducers *Acidiphilium cryptum* (J1).

Οι μικροοργανισμοί *Acidiphilium cryptum* ή (J1) όπως έχουν μετονομαστεί αποτελούν gram (-) αρνητικά, αερόβια, μεσόφιλα, ραβδοειδούς μορφής βακτήρια που αναπτύσσονται σε λεπτό οργανικά μέσα μεταξύ pH 1.9 και 5.9 αλλά όχι σε pH 6.1. Μικρές ποσότητες οργανικών υποστρωμάτων παρουσιάζονται ευνοϊκές για την ανάπτυξη τους, αλλά υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν πρόβλημα αφού σε πειραματικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζεται στασιμότητα στη ανάπτυξη τους. Τα οργανικά προϊόντα πέψης που χρησιμοποιούνται σε συμβατικά βακτηριολογικών μέσων αποτελούν επίσης ανασταλτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους καθώς και το οξικό νάτριο είναι έντονα ανασταλτικό σε συγκέντρωση 0,01%. Ενδοσπόρια δεν σχηματίζονται, και μερικά στελέχη είναι κινητικά με τη βοήθεια ενός πολικού μαστίγιου ή δύο πλευρικών μαστιγίων. Η περιεκτικότητα της γουανίνης-συν-κυτοσίνη διαμέσου δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος κυμαίνεται μεταξύ 68 και 70 mole%. Γενικά το γένος *Acidiphilium cryptum* παρουσιάζει κάποια καταλυτικά στοιχεία αλλά η

αντίδραση της οξειδάσης είναι πολύ ασθενής έως ανύπαρκτη. Αυτό το γένος διαφέρει από τα είδη *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* και άλλα ετερότροφα βακτήρια από την απαίτηση του για υψηλή συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου και την μεγάλη ευαισθησία του σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών υποστρωμάτων. Διαφέρει επίσης από το είδος *Pseudomonas* αφού παρουσιάζει αδυναμία πραγματοποίησης αντιδράσεων οξειδάσης και ειδικά με την αναστολή της από οξικά στοιχεία. Τέλος διακρίνεται εύκολα από οξεόφιλα βακτήρια γένους του *Thiobacilli* από την αδυναμία αξιοποίησης του θείου και δισθενούς σιδήρου ως πηγές ενέργειας και από την υψηλή περιεκτικότητα γουανίνη-συν-κυτοσίνη του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος.[Arthur P. Harrison Jr, 1981]

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.

2.1 Αποστείρωση σκευών με την βοήθεια αυτόκαυστου (autoclave).

Η αποστείρωση των σκευών και ιδιαίτερα των υάλινων αλλά και άλλων αντικειμένων τα οποία προορίζονται για χρήση στις βιοτεχνολογικές πειραματικές εφαρμογές είναι ιδιαίτερα σημαντική. Σε κάθε περίπτωση απώτερος σκοπός είναι η αποφυγή επιμόλυνσης από άλλο είδος μικροοργανισμού από αυτού που χρησιμοποιείται στο πείραμα ελέγχου. Ανάπτυξη μολυσματικών περιστατικών στις υπό εξέταση καλλιέργειες μπορεί να αποβεί μοιραία όσων αφορά την φυσιολογική εξέλιξη του πειράματος αλλά επίσης και στην εξαγωγή των αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων. Έτσι πριν την έναρξη κάθε πειράματος προηγείται ένα πλάνο με τα αντιδραστήρια που θα χρησιμοποιηθούν, τις συνθήκες του πειράματος, αλλά επίσης και ένας λεπτομερής κατάλογος με όλα τα αναγκαία προς χρήση σκευή (ογκομετρικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως, duran bottles, ογκομετρικοί κύλινδροι κ.α.).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος αποστείρωσης είναι με την χρήση αυτόκαυστου. Κάθε σκεύος αφού πλυθεί μέχρις ο του καθαριστεί από προηγούμενα αντιδραστήρια ξεπλένεται με αποιονισμένο νερό και αφήνεται να στεγνώσει. Στην συνέχεια επικαλύπτεται το στόμιο του με την χρήση χαρτιού και αλουμινόχαρτου και τοποθετείται στο autoclave σε κάθετη διάταξη. Το αυτόκαυστο ελέγχεται έτσι ώστε να περιέχει ικανοποιητική ποσότητα απιονισμένου νερού και έπειτα τίθεται σε λειτουργία στους 180 °C . Με το πέρας της διαδικασίας τα σκεύη είναι πλέον απαλλαγμένα από πάσης φύσεως μολυσματικούς παράγοντες και έτοιμα για χρήση.

2.2 Δημιουργία διαλύματος autotrophic, heterotrophic basal salt and Trace element.

Κατά την ανάπτυξη αλλά και την συντήρηση ενός μικροοργανισμού η βασικότερη προϋπόθεση είναι ο μικροοργανισμός να βρίσκεται σε ένα περιβάλλον υδατικό η μη το οποίο να του επιτρέπει να ευδοκιμεί όπως ακριβώς θα συνέβαινε αν αυτός αναπτυσσόταν στην φύση. Έτσι διαμέσου διαφόρων πειραματικών δοκίμων τα autotrophic and heterotrophic basal salt δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης για όλα τα είδη μικροοργανισμών είτε αυτότροφους είτε ετερότροφους. Επίσης σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η προσθήκη ποσότητας Trace element στα διαλύματα αφού το διάλυμα αυτό αποτελεί μίγμα διαφόρων

θρεπτικών και είναι αναγκαίο για τα αρχικά στάδια ανάπτυξης μιας μικροβιακής καλλιέργειας. Γενικά η σύσταση των διαλύματων αυτών παρουσιάζεται πιο κάτω.

Πίνακας 2: Βασικά άλατα του βιομέσου για αυτότροφους μικροοργανισμούς (10 x Autotrophic Basal Salts).

Συστατικά	gr/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,5
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	1,5
KCl	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
KH_2PO_4	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,14

Πίνακας 3: Βασικά άλατα του βιομέσου για ετερότροφους μικροοργανισμούς (10 x Heterotrophic Basal Salts).

Συστατικά	gr/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	1,5
KCl	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5
KH_2PO_4	0,5
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,14

Πίνακας 4: Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace elements).

Συστατικά	gr/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1
CoSO ₄ ·7H ₂ O	1
Cr ₂ (SO ₄) ₃ ·15H ₂ O	0,5
H ₃ BO ₃	0,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,5
NiSO ₄ ·6H ₂ O	1
Na ₂ SeO ₄ ·10H ₂ O	1
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0,1
NaVO ₃	0,1

Βάση των πιο πάνω χημικών ενώσεων ζυγίζονται οι αναγραφόμενες ποσότητες με την βοήθεια βαρκούλας ζυγίσεως και ζυγού ακριβείας και έπειτα τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε duran bottle όπου με την προσθήκη απιονισμένου νερού ανάγεται ο όγκος του τελικού διαλύματος στα 1000 mL.

2.3 Δημιουργία διαλύματος autotrophic και heterotrophic media.

Για την δημιουργία αυτότροφου η ετερότροφου βιομέσου, ανάλογα με τον απαιτούμενο όγκο διαλύματος προστίθεται και ανάλογη ποσότητα autotrophic ή heterotrophic basal salt. Για παράδειγμα για τελικό όγκο αυτότροφου βιομέσου 200 mL σε μια duran των 250 mL προστίθενται 20 mL αυτότροφου basal salt συμπυκνωμένο 10 φορές, 200 μ L Trace Element το οποίο προσδίδει ενέργεια στους μικροοργανισμούς και 180 mL απιονισμένου νερού. Στην συνέχεια ρυθμίζεται το pH στα απαιτούμενα επίπεδα (κάτω από 3 για οξεόφιλους μικροοργανισμούς) και τέλος εφαρμόζεται autoclave για αποστείρωση. Όταν τελειώσει η διαδικασία της αποστείρωσης και το διάλυμα κρυώσει τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί.

2.4 Καλλιέργεια μικροοργανισμών.

Η διαδικασία δημιουργίας καλλιέργειας μικροοργανισμών μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Αρχικά από τριβλία στα οποία υπάρχουν είδη ανεπτυγμένες αποικίες με την βοήθεια ενός loop συλλέγεται ποσότητα βιομάζας και εμβολιάζεται σε υγρό βιομέσο προς δημιουργία υγρής καλλιέργειας. Επίσης για δημιουργία υγρής καλλιέργειας μπορεί να πραγματοποιηθεί εμβολιασμός σε υγρό βιομέσο από είδη υπάρχουσα υγρή καλλιέργεια. Για ανάπτυξη μικροοργανισμών σε στερεή καλλιέργεια πραγματοποιείται εμβολιασμός κατευθείαν από άλλες αποικίες μικροοργανισμών που βρίσκονται είδη ανεπτυγμένες σε τριβλία με την μέθοδο των παράλληλων γραμμών ή απλά από υγρή καλλιέργεια κατευθείαν εμβολιασμός πάνω σε στερεό υπόστρωμα και κατανομή του εμβολίου με την βοήθεια ενός loop.

Κατά την δημιουργία υγρού βιομέσου με επιθυμητό όγκο τα 400 mL και συγκέντρωση γλυκόζης 5 g/L για δημιουργία καλλιέργειας ετερότροφού οξεόφιλου μικροοργανισμού, έπειτα από υπολογισμούς ζυγίζονται 2 g στερεάς γλυκόζης και 40 mL heterotrophic basal salt . Τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε μια duran των 500 mL.

Κατά την δημιουργία του στερεού υποστρώματος χρησιμοποιούνται 20 g/L αγαρόζη (πηκτικό μέσω) , 20 mL /L basal salt (heterotrophic base solution) 5 g/L γλυκόζη και επιθυμητό όγκο διαλύματος 200 mL. Έτσι, ζυγίζονται 4 g/L αγαρόζη , 1 g/L γλυκόζη και τοποθετούνται 20 mL/L basal salt και ο όγκος ανάγεται στα 200 mL με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH στο 2.5-3 με την χρήση H₂SO₄ και NaOH.

Αφού ολοκληρωθεί η προετοιμασία των βιομέσων τότε τα υγρά διαλύματα τοποθετούνται στο autoclave για μια ώρα έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί αποστείρωση. Με το πέρας της αποστείρωσης τα σκεύη αφήνονται να κρυώσουν και στην συνέχεια τοποθετείται το βιομέσω που περιέχει αγαρόζη σε τριβλία (6 τριβλία). Λόγω της ύπαρξης αγαρόζης τα διαλύματα στερεοποιούνται και έτσι γίνεται εφικτός ο εμβολιασμός τους από προ υπάρχουσα αποικία του εν λόγω γένους μικροοργανισμών. Στα δύο τριβλία εφαρμόζεται η μέθοδος των παράλληλων γραμμών όπου με την βοήθεια ενός Loop εμβολιάζεται ο μικροοργανισμός ο οποίος βρίσκεται ανεπτυγμένος σε παλιότερα τριβλία.

2.5 Παραγωγή μικροβιακού διαλύματος Cellysis.

Πρώτος τρόπος – παραγωγή Cellysis από μικροβιακά κύτταρα *Heterotrophic iron reducer* (H.I.R).

Από υγρή καλλιέργεια μικροοργανισμών *Heterotrophic iron reducer* πάρθηκε ποσότητα 200 mL και τοποθετήθηκε σε duran των 500 mL. Με την βοήθεια ενός loop από τις είδη ανεπτυγμένες αποικίες του ίδιου μικροοργανισμού πάρθηκε αρκετή ποσότητα βιομάζας και τοποθετήθηκε στην υγρή καλλιέργεια. Η προσθήκη αυτή έγινε προκειμένου να αυξηθεί το ποσοστό οργανικής ύλης στο διάλυμα, έτσι ώστε κατά την ανάλυση COD να επιτευχθεί πιο ψηλό ποσοστό οργανικού φορτίου. Για να διατηρηθούν ευνοϊκές συνθήκες για τους μικροοργανισμούς *Heterotrophic iron reducer* τοποθετήθηκαν 100 mL Heterotrophic media στην duran από όπου αρχικά αντλήσαμε τα 200 mL. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε η duran με το μίγμα μικροοργανισμών στο αυτόκαυστο έτσι ώστε να επέλθει λύση των μικροβιακών κυττάρων και εν συνέχεια παραγωγή διαλύματος με υψηλό ποσοστό οργανικού φορτίου. Αφού η διαδικασία ολοκληρώθηκε, πραγματοποιήθηκε water bath για να κρυώσει το σκεύος πιο γρήγορα μετά το autoclave. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε ποσότητα 40 mL από το διάλυμα σε falcon tube και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές φυγοκεντρίσεις στις 6000 rpm και στους 4 °C για 25 λεπτά, όπου κάθε φορά συλλεγόταν το υπερκείμενο υγρό και απομακρυνόταν τα pellets. Αφού πλέον όλο το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε και απομακρύνθηκαν όλα τα στερεά συσσωματώματα, στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε φιλτράρισμα με την βοήθεια σύριγγας και μικρόφιλτρου. Τέλος ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος κοντά στο 1.8 και πλέον το διάλυμα Cellysis είναι έτοιμο για χρήση. Για το προσδιορισμό της περιεκτικότητας του διαλύματος σε οργανικά πραγματοποιήθηκε COD ανάλυση.

Δεύτερος τρόπος – παραγωγής μικροβιακού διαλύματος Cellysis από μικροβιακή λάσπη.

Για την παρασκευή διαλύματος ψηλού οργανικού φορτίου αυτή την φορά χρησιμοποιήθηκε αντί για υγρή καλλιέργεια συγκεκραμένου οξεόφιλου μικροοργανισμού, μικροβιακή λάσπη η οποία προέρχεται από το σταθμό επεξεργασίας Σ.Α.Λ.Α των αστικών λυμάτων της πόλης Λεμεσού η οποία περιέχει οργανικά αποθέματα διαφορών προελεύσεων. Γενικά τα οργανικά αυτά αποθέματα προέρχονται από μικροβιακή λάσπη η οποία προκύπτει κατά το δεύτερο και τρίτο στάδιο της επεξεργασίας των αστικών λυμάτων. Η λάσπη πιθανότατα περιέχει νεκρά βακτηριακά κύτταρα τα οποία προήλθαν από κυτταρική λύση διαμέσου μεταβολών στην θερμοκρασία, pH, αλατότητα αλλά επίσης μπορεί να αποτελούν αποτέλεσμα κύριων βιολογικών ή μεταβολικών μικροβιακών διεργασιών. Έτσι από μικροβιακή λάσπη αρχικά σε 8 δοχεία Falcon tube τοποθετήθηκε ποσότητα δείγματος 35 mL και έπειτα τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο. Στην συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση για 20 λεπτά στις 4000 rpm και στους 4 °C. Με το πέρας της φυγοκέντρισης απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό, συλλέχθηκαν τα pellets με την βοήθεια απιονισμένου νερού και τοποθετήθηκαν σε μια duran των 1000 mL. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρις ο του εξαντληθεί όλο το δείγμα μικροβιακής λάσπης. Στην συνέχεια προστέθηκε απιονισμένο νερό στην duran των 1000 mL οπού προηγουμένως συλλέχθηκαν τα pellets ανάλογα με τον επιθυμητό τελικό όγκο του παραγόμενου διαλύματος. Σημαντικό σημείο στην παραγωγή του διαλύματος είναι τα δυο επόμενα βήματα. Αρχικά το δοχείο με τα συλλεγόμενα pellets τοποθετήθηκε στο αυτόκαυστο έτσι ώστε να προκληθεί η διάνοιξη των μικροβιακών κυττάρων αλλά επίσης για να προληφθεί η επιμόλυνση του δείγματος από κάποιου άλλου είδους μικροοργανισμό. Αφού η διαδικασία ολοκληρώθηκε, πραγματοποιήθηκε water bath για να κρυώσει το σκεύος πιο γρήγορα μετά το autoclave. Το επόμενο καθοριστικό βήμα είναι η εφαρμογή φιλτραρίσματος διαμέσου διηθητικού χαρτιού. Έτσι με την χρήση 6 κωνικών φιάλων και διηθητικού χαρτιού πραγματοποιήθηκε το φιλτραρίσαμε του διαλύματος από την μικροβιακή λάσπη. Τέλος τα διάλυμα που προέκυψαν από τις 6 ογκομετρικές συλλέχθηκαν σε μία ογκομετρική και ρυθμίστηκε το pH του ενιαίου διαλύματος κοντά στο 1.8 με την προσθήκη H₂SO₄. Η πιο πάνω διαδικασία αποτελεί την παρασκευή του διαλύματος με υψηλό οργανικό φορτίο ή αλλιώς Cellysis και βάση αυτής δημιουργήθηκαν όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα. Σε κάθε περίπτωση με το πέρας της δημιουργίας διαλύματος Cellysis εφαρμοζόταν ανάλυση C.O.D_{600nm} και αν το διάλυμα παρουσίαζε απορροφήσεις εντός των

ορίων της ανάλυσης, όπως περιγράφεται και στο σημείο 1.13.1 τότε κρινόταν κατάλληλο για χρήση.



Εικόνα 2: Δείγμα μικροβιακής λάσπης από τριτοβάθμια επεξεργασία λυμάτων.



Εικόνα 3: Φιλτράρισμα διαλύματος μικροβιακής λάσπης προς παραγωγή διαλύματος Cellysis.

2.6 Δημιουργία διαλύματος $K_2Cr_2O_7$ περιεκτικότητας 0.002 M.

Για την δημιουργία διαλύματος διχρωμικού καλίου ($K_2Cr_2O_7$) περιεκτικότητας 1M χρειάζεται να διαλυτοποιηθεί ποσότητα 294,184 g στερεού διχρωμικού καλίου σε ποσότητα 1 L απιονησμένου νερού λόγω του μοριακού βάρους της ένωσης. Έτσι με την βοήθεια βαρκούλας και αναλυτικού ζυγού ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα και τοποθετείται σε μία duran bottle

των 1000 mL. Στην συνέχεια γεμίζεται το σκεύος μέχρι την χαραγή των 1000 mL, τοποθετείται σε αυτό μαγνητάκι ανάδευσης και εν συνεχεία τίθεται σε ανάδευση με την βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Η ανάδευση είναι αναγκαία αφού λόγω της μεγάλης ποσότητας στερεού $K_2Cr_2O_7$ καθιζάνει ως ίζημα. Όταν πλέον παρατηρηθεί πλήρης διαλυτοποίηση του στερεού διχρομικού τότε το διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση. Το $K_2Cr_2O_7$ προορίζεται για τον προσδιορισμό του δισθενούς σιδήρου σε βιοτεχνολογικά δείγματα. Κατά τον προσδιορισμό του Fe (II) χρησιμοποιείται διάλυμα $K_2Cr_2O_7$ περιεκτικότητας 0,002 M. Έτσι για την παρασκευή του εν λόγω διαλύματος με τελικό όγκο 250 mL, βάση του γνωστού τύπου της αραιώσης $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ από πυκνό διάλυμα περιεκτικότητας 1 M αντλείται ποσότητα 0.5 mL και τοποθετείται σε ποσότητα 245 mL απιονισμένου H_2O .

2.7 Δημιουργία διαλύματος H_2SO_4 15%.

Για την δημιουργία διαλύματος θειικού οξέος περιεκτικότητας 15% και τελικού όγκου 400 mL από πυκνό διάλυμα H_2SO_4 καθαρότητα 100% , βάση του γνωστού τύπου της αραιώσης $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, σε μία duran bottle των 500 mL τοποθετείται ποσότητα 360 mL απιονισμένου H_2O και στην συνέχεια από το πυκνό διάλυμα μεταφέρεται ποσότητα 60 mL H_2SO_4 . Λόγω των άκρως διαβρωτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζει το θειικό οξύ η παρασκευή των διαλυμάτων πραγματοποιείται σε γυάλινα σκεύη και επιβάλετε η χρήση προστατευτικών γυαλιών ενώ η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στον απαγωγό. Γενικά το διάλυμα θειικού οξέος περιεκτικότητας 15% χρησιμοποιείται κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας δισθενούς σιδήρου σε βιοτεχνολογικά δείγματα.

2.8 Παρασκευή διαλύματος Fe (II) περιεκτικότητας 5 gr/L.

Για την παρασκευή υγρού διαλύματος δισθενούς σιδήρου χρησιμοποιείται η χημική ένωση επταένυδρο όξινο θειικό σιδήρου ($HFeSO_4 \cdot 7H_2O$). Έτσι βάση του μοριακού βάρους της ένωσης το οποίο ανέρχεται στα 278 g/mole εξ αυτών τα 56 g αποτελούν τον δισθενή σίδηρο. Λόγω του ότι επιθυμητή περιεκτικότητα στο προς παρασκευή διάλυμα είναι τα 5gr/L βάση αναλογίας θα πρέπει να ζυγιστούν 24,8 g $HFeSO_4 \cdot 7H_2O$. Τέλος επειδή επιθυμητός όγκος του προς παρασκευή διαλύματος Fe (II) είναι τα 250 mL θα πρέπει να ζυγιστεί το ένα τέταρτο της εκτιμημένης ποσότητας. Με τη βοήθεια βαρκούλας ζυγίσεων και ζυγού ακριβείας ζυγίζεται η

απαραίτητη ποσότητα (που ανέρχεται στα 6.2 g) και τοποθετείται σε μια ογκομετρική φιάλη των 250 mL. Στην συνέχεια τοποθετούνται 5 mL θεικού οξέος περιεκτικότητας 15% και απιονησμένο νερό μέχρι την χαραγή των 250 mL. Τέλος ρυθμίζεται το pH στο 1.8 και το διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση. Η προσθήκη των 5 mL H₂SO₄ πραγματοποιείται έτσι ώστε να διατηρηθεί το pH του διαλύματος σε χαμηλά επίπεδα προς αποφυγή δημιουργίας ιζήματος αλλά επίσης και την αποφυγή αυθόρμητης οξείδωσης του Fe(II) σε Fe(III).

2.9 Παρασκευή διαλύματος Fe (III) περιεκτικότητα 5 gr/L.

Για την παρασκευή υγρού διαλύματος τρισθενούς σιδήρου χρησιμοποιείται η χημική ένωση θεικού σιδήρου με μοριακό τύπο Fe₂(SO₄)₃. Έτσι βάση του μοριακού βάρους της ένωσης το οποίο ανέρχεται στα 399.88 g/mol εξ αυτών τα 56 g αποτελούν τον τρισθενή σίδηρο. Όμως λόγω παρουσίας 2 ατόμων Fe στην χημική ένωση στους υπολογισμούς η μάζα του σιδήρου διπλασιάζεται. Άρα στα 399.88 g/mol Fe₂(SO₄)₃ τα 112 g/mol αποτελούνται από Fe (III). Λόγω του ότι επιθυμητή περιεκτικότητα στο προς παρασκευή διάλυμα είναι τα 5 g/L βάση αναλογίας θα πρέπει να ζυγιστούν 17.85 g Fe₂(SO₄)₃. Τέλος επειδή επιθυμητός όγκος του προς παρασκευή διαλύματος Fe (III) είναι τα 250 mL θα πρέπει να ζυγιστεί το ένα τέταρτο της εκτιμημένης ποσότητας. Με την βοήθεια βαρκούλας ζυγίσεων και ζυγού ακριβείας ζυγίζεται η απαραίτητη ποσότητα (που ανέρχεται στα 4.46 g) και τοποθετείται σε μια ογκομετρική φιάλη των 250 mL. Στην συνέχεια τοποθετούνται 5 mL θεικού οξέος περιεκτικότητας 15% και απιονησμένο νερό μέχρι την χαραγή των 250 mL. Η προσθήκη των 5 mL H₂SO₄ πραγματοποιείται έτσι ώστε να διατηρηθεί το pH του διαλύματος σε χαμηλά επίπεδα προς αποφυγή δημιουργίας ιζήματος.

2.10 Προσδιορισμός δισθενούς σιδήρου Fe (II) με την χρήση K₂Cr₂O₇.

Ο προσδιορισμός του σιδήρου Fe (II) σε βιοτεχνολογικά δείγματα αλλά γενικά και σε χημικά διαλύματα πραγματοποιείται διαμέσου συμπλοκομετρικής αντίδραση μεταξύ του Fe (II) και του K₂Cr₂O₇. Κατά την πειραματική ολοκλήρωση της μεθόδου αυτής λαμβάνεται δείγμα 1 mL με την βοήθεια πιπέτας από τις καλλιέργειες οι οποίες περιέχουν ποσότητα Fe (II). Στη συνέχεια το δείγμα αυτό τοποθετείται σε ένα μικρό ποτήρι ζέσεως ή μια μικρή κωνική φιάλη. Στο δοχείο αυτό τοποθετείται ποσότητα 4 mL διαλύματος θεικού οξέος περιεκτικότητας 15%.

Το H_2SO_4 λειτουργεί ως καταλύτης στην αντίδραση μεταξύ Fe (II) και $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ αφού μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης του συμπλόκου και έτσι η αντίδραση πραγματοποιείται σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα. Τέλος για σκοπούς παρατήρησης της πλήρους δέσμευση του Fe (II) από το $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ στο υπό μελέτη δείγμα τοποθετείται ποσότητα 50 μL συμπλοκομετρικού δείκτη Barium Diphenylamine Sulphonate. Κατά την τιτλοδότηση το διάλυμα που περιέχει Fe (II) και H_2SO_4 τιτλοδοτείτε με $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ περιεκτικότητας 0,002 M παρουσία δείκτη. Αρχικά το διάλυμα φέρει χρώμα κιτρινοπράσινο ενώ με την προσθήκη $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ μετατοπίζεται προς βυσσινή. Το τέλος της αντίδρασης σημαίνεται με την πρώτη αλλαγή του διαλύματος σε βυσσινή χρώμα. Ο υπολογισμός της περιεκτικότητας του δείγματος σε Fe (II) είναι ανάλογος της ποσότητας $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ που χρησιμοποιήθηκε και η μετατροπή της συγκέντρωσης βασίζεται στην σχέση:

$$C_{\text{Fe (II)}} = V_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} * C_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} * 6 \text{ mole} * M.B_{\text{Fe (II)}}$$



Εικόνα 4: Πειραματική διάταξη προσδιορισμού Fe (II) και τελική αλλαγή δειγμάτων.

2.11 Προσδιορισμός ανόργανων θεικών (SO_4^{2+})

Δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης.

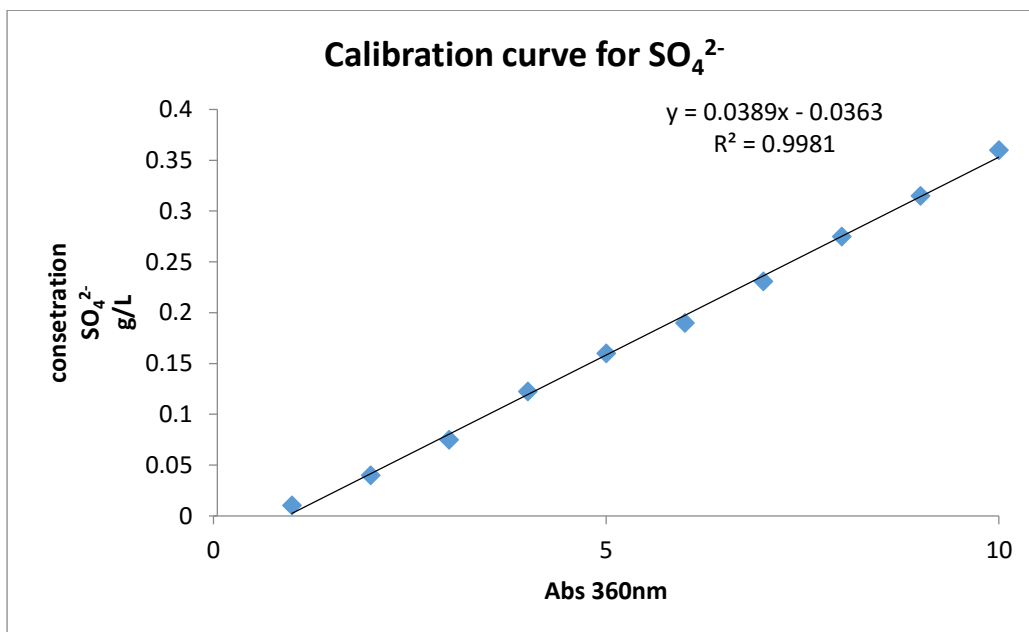
Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα 30% περιεκτικότητας γλυκερόλης ($\rho=1.26\text{g}/\text{cm}^3$). Διαμέσου του τύπου της πυκνότητας σε μία duran bottle 250 mL τοποθετείται ποσότητα 29 mL Glycerol και 71 mL αποιονισμένου νερού (DW). Στην συνέχεια στο διάλυμα που παρασκευάστηκε τοποθετείται ποσότητα 0.5 g από στερεό αντιδραστήριο BaCl_2 αφού επιθυμητή περιεκτικότητα του BaCl_2 στο διάλυμα είναι 0.5%. Επόμενο βήμα αποτελεί η παρασκευή διαλύματος 4%

Trichloroacetic acid $C_2HCl_3O_2$ (TCA). Και πάλι διαμέσου του τύπου της πυκνότητας σε μία duran bottle 250 mL τοποθετείται ποσότητα 2.45 mL TCA και εν συνέχεια 97.55 mL αποιονισμένου νερού (DW).

Ο προσδιορισμός των ανόργανων θεικών (SO_4^{2+}) πραγματοποιείται με ανάλυση φασματοσκοπικής απορρόφησης στα 360nm. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται παρασκευή πρότυπης καμπύλης απορρόφησης. Βάση του πίνακα που ακολουθεί παρασκευάζονται τα πρότυπα διαλύματα $(NH_4)_2SO_4$. Στην συνέχεια αφού παρασκευαστούν τα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης, πραγματοποιείται μέτρηση τους στο φασματοφωτόμετρο και καταγράφονται οι απορροφήσεις. Εν συνεχεία βάση των απορροφήσεων που προκύπτουν δημιουργείται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα απορροφήσεων πρότυπων διαλυμάτων θεικού αμμωνίου $(NH_4)_2SO_4$.

N	$(NH_4)_2SO_4$, ml	H ₂ O, ml	Concentration of $(NH_4)_2SO_4$, μg/ml	#Abs (360nm)	#Abs (360nm)	Average #Abs
1	0.002	0.198	0.01	0.01	0.011	0.0105
2	0.004	0.196	0.02	0.035	0.045	0.04
3	0.006	0.194	0.03	0.075	0.075	0.075
4	0.008	0.192	0.04	0.125	0.12	0.1225
5	0.01	0.190	0.05	0.155	0.165	0.16
6	0.02	0.180	0.1	0.19	0.19	0.19
7	0.04	0.160	0.2	0.22	0.24	0.23
8	0.06	0.140	0.3	0.275	0.275	0.275
9	0.08	0.120	0.4	0.3	0.33	0.315
10	0.1	0.1	0.5	0.35	0.37	0.36



Διάγραμμα 1: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για προσδιορισμό ανόργανων θεικών σε βιοτεχνολογικά δείγματα.

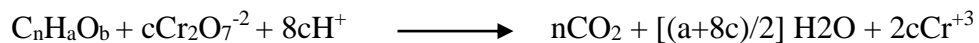
Γενικά η μετρήσεις των πρότυπων διαλύματων προς κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αλλά και των βιοτεχνολογικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν διαμέσου της εξής διαδικασία. Από τα προς ανάλυση δείγματα με την βοήθεια πιπέτας λαμβάνεται ποσότητα 0.2 mL και τοποθετείται σε ένα COD σωλήνα. Στην συνέχεια από τα διάλυμα TCA και BaCl₂ λαμβάνεται ποσότητα 2,8 και 2 mL αντιστοίχως και τοποθετείται επίσης στον COD σωλήνα. Ακολουθεί καλή ανακίνηση του σωλήνα και στην συνέχεια ανάλυση του διαλύματος στα 360nm. Βάση της εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης και της απορρόφησης που προκύπτει εξάγεται η περιεκτικότητα του δείγματος σε SO₄. Η σχέση που χρησιμοποιείται είναι $x = (\text{Abs} + 0.036) / 0.038$ και όπου X η συγκέντρωση του προς ανάλυση δείγματος σε SO₄²⁻.

2.12 Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (C.O.D.).

Ο όρος C.O.D η αλλιώς χημικά απαιτούμενο οξυγόνο αναφέρεται στην ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για την πλήρη οξείδωση της υπό μελέτη οργανικής ύλης και μετατροπής της σε CO₂ και H₂O. Η οργανική ύλη αποτελεί το σύνολο των οργανικών ενώσεων που διαθέτει ένα δείγμα και η οξείδωση πραγματοποιείται διαμέσου ενός ισχυρά οξειδωτικού παράγοντα. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών και

χαμηλού pH παρουσία θειικού αργύρου (Ag_2SO_4) το οποίο λειτουργεί καταλυτικά στην όλη αντίδραση, ενώ στις πλείστες περιπτώσεις το ρόλο του οξειδωτικού μέσου διαδραματίζει το διχρωμικό κάλιο ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Επιπρόσθετα για σκοπούς βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης, προστίθεται θειικός υδράργυρος (HgSO_4) ο οποίος είναι υπεύθυνος για την εξουδετέρωση χλωριόντων που πιθανός να υπάρχουν στο υπό ανάλυση δείγμα.

Γενικά ο προσδιορισμός του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου βασίζεται στην μέθοδο κλειστής επαναροής. Γενικά όλες οι ενώσεις οργανικές και μη κατά κανόνα οξειδώνονται στην παρουσία ενός ισχυρού οξειδωτικού παράγοντα σε όξινο πάντοτε περιβάλλον. Στο γεγονός αυτό βασίζεται και η αρχή της παρούσας μεθόδου. Η γενική μορφή της αντίδρασης είναι η εξής:



Και όπου $C = (2n/3) + (a/6) - (b/3)$

Τέλος ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του προς ανάλυση δείγματος γίνεται με φασματοφωτομέτρηση (φασματοφωτόμετρο JENWAY 7315 spectrophotometer) στα 600 nm. Η αναγωγή της απορρόφησης που προκύπτει από την μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται διαμέσου της εξίσωσης της πρότυπης καμπύλης.

Η μέτρηση του COD χρησιμοποιείται πολλές φορές αντί αυτής του B.O.D ή και συμπληρωματικά. Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της μεθόδου COD έναντι του BOD είναι η ταχύτητα μέτρησης η οποία ολοκληρώνεται σε 2-3 ώρες σε αντίθεση με αυτή του BOD το οποίο χρειάζεται 5 ημέρες για να ολοκληρωθεί. Το μειονέκτημα όμως της μεθόδου είναι ότι κατά την BOD ανάλυση προσδιορίζονται μόνο τα βιοαποικοδομήσιμα οργανικά που εμπεριέχονται στο υπό μελέτη δείγμα, ενώ η COD περιλαμβάνει τα ολικά (βιοαποικοδομήσιμα και μη).

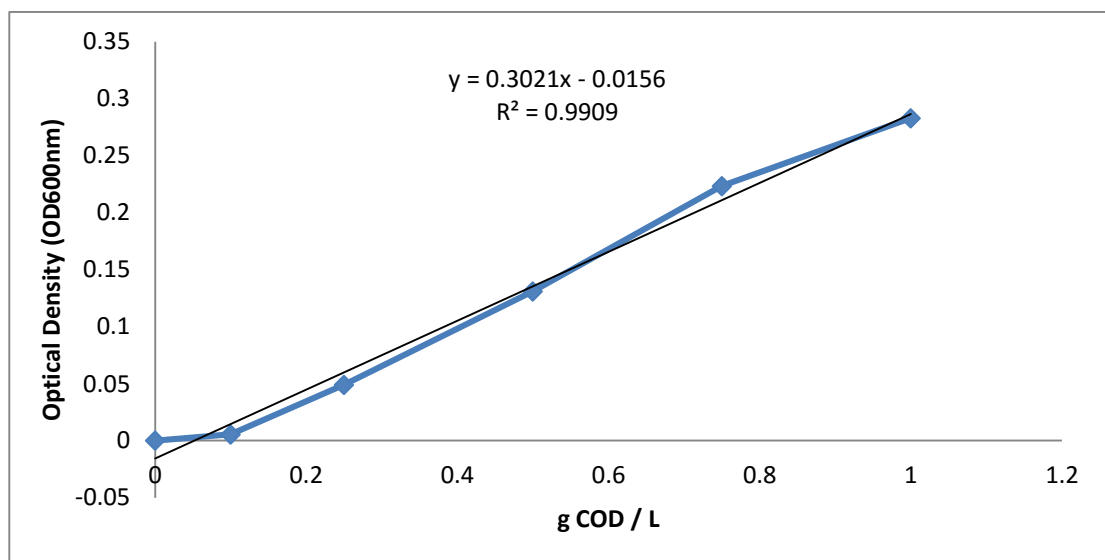
Δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης.

Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης όσον αφορά τον προσδιορισμό του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου σε βιοτεχνολογικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης. Έτσι από στερεό δείγμα γλυκόζης με την βοήθεια βαρκούλας ζυγίσεως και ζυγού ακριβείας ζυγίστηκαν οι απαραίτητες ποσότητες στερεής γλυκόζης και δημιουργήθηκαν υγρά δείγματα περιεκτικότητας 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 , 1 g/L καθώς και ένα δείγμα με 0 g/L γλυκόζης το οποίο αποτελεί και το τυφλό δείγμα. Τα δείγματα

αυτά αναλύθηκαν στο φασματοφωτόμετρο όπως ακριβώς περιγράφεται και η διαδικασία ανάλυσης των άγνωστων δειγμάτων πιο κάτω και τέλος βάση των απορροφήσεων που προέκυψαν από την φασματοφωτομετρική ανάλυση στα 600 nm δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

Πίνακας 2: Πίνακας αποτελεσμάτων συγκέντρωσης σε σχέση με την απορρόφηση.

x = COD (g/L)	y = OD
1	0.283
0.75	0.2235
0.5	0.131
0.25	0.049
0.1	0.0055
0	0



Διάγραμμα 2: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης γλυκόζης για C.O.D analysis.

Ανάλυση δειγμάτων.

Κατά την πειραματική εφαρμογή της μεθόδου προσδιορισμού του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου αρχικά βάσει της περιεκτικότητας του προς ανάλυση δείγματος σε οργανική ύλη (βάση βιβλιογραφίας ή εμπειρικών δοκιμών) αποφασίζεται κατά πόσο θα πραγματοποιηθεί αραιώση στο υπό εξέταση δείγμα. Σε περίπτωση όπου αναμένεται το δείγμα να περιέχει υψηλό οργανικό φορτίο τότε καλό θα ήταν να πραγματοποιηθούν αραιώσεις του δείγματος της τάξεως των πέντε και δέκα φορές αναλόγως με τα όρια ανίχνευσης της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης. Στην περίπτωση όπου πραγματοποιείται αραιώση πέντε φορές, τότε ποσότητα 0,2 mL από το δείγμα τοποθετείται σε ένα falcon tube και αραιώνεται με 1 mL απιονισμένου νερού. Σε περίπτωση όπου πραγματοποιείται αραιώση δέκα φορές, τότε ποσότητα 0,1 mL από το δείγμα τοποθετείται σε ένα falcon tube και αραιώνεται με 1 mL απιονισμένου νερού. Καλό θα ήταν να πραγματοποιείται μια μέτρηση χωρίς αραιώση σε περίπτωση όπου δεν υπάρχουν ενυδατικά στοιχεία για την περιεκτικότητα του προς ανάλυση δείγματος σε οργανικά.

Αφού ετοιμαστούν οι αραιώσεις τότε ανάλογα με το επαναληπτικό εύρος στο οποίο επιθυμείτε να πραγματοποιηθεί η μέτρηση (δημιουργία διπλέτων ή τριπλέτων), ετοιμάζονται και οι COD σωλήνες. Στους σωλήνες αυτούς αναγράφεται η σήμανση της αραιώσης, το είδος του δείγματος και η ημερομηνία μέτρησης. Από τα αραιωμένα και μη δείγματα μεταφέρεται ποσότητα 1 mL στους σωλήνες και έπειτα τοποθετείται ποσότητα 0,6 mL $K_2Cr_2O_7$ (αποτελούμενο από 10,216 g ξηρού $K_2Cr_2O_7$, 167 mL H_2SO_4 και 33,3 g $HgSO_4$ σε συνολικό όγκο υδατικού διαλύματος 1000 mL) και 1,4 mL H_2SO_4 (αποτελούμενο από 5,5 g Ag_2SO_4 /kg $HgSO_4$ ($\rho=1,84$ g/mL)). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στον απαγωγό με ιδιαίτερη προσοχή και φορώντας πάντοτε προστατευτικά γυαλιά λόγω μεγάλης επικινδυνότητας, τοξικότητας και διαβρωτικότητας των αντιδραστήρων. Επίσης προσοχή συνίσταται στο γεγονός ότι η αντίδραση μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$ και $H_2SO_4 + Ag_2SO_4$, είναι ισχυρά εξώθερμη κυρίως λόγω της παρουσίας του δευτέρου. Στην συνέχεια τα σωληνάκια αφού σφραγιστούν με βιδωτό πώμα Teflon και ανακινηθούν καλά τοποθετούνται στο C.O.D αντιδραστήρα (Lovibond-ET 125) και αφήνονται να αντιδράσουν για 2 ώρες στους 150 °C. Μετά το τέλος της αντίδρασης αφήνονται να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία πραγματοποιείται μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 600 nm. Κατά την μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιείται γυάλινη κυψελίδα αφού λόγω των ισχυρών οξέων σε περίπτωση χρήσης της πλαστικής τα αποτελέσματα θα αλλοιώνονταν, λόγω διαβρωτικής δράσης των οξέων. Επίσης με το τερματισμό μέτρησης κάθε δείγματος

αποφεύγεται το ξέπλυμα της κυψελίδας. Με το τέλος της ανάλυσης οι τιμές απορρόφησης, διαμέσου της καμπύλης βαθμονόμησης και της εξίσωσης που προκύπτει από την ανάλυση των πρότυπων διαλύματων, ανάγονται σε περιεκτικότητα mg / L οργανικών.

2.13 Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας (O.D.).

Η μέθοδος του προσδιορισμού της οπτικής πυκνότητας χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό του ποσοστού ανάπτυξης καλλιιεργειών στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Η τεχνική της φασματομετρίας μοριακής απορρόφησης χρησιμοποιείται επίσης και για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση οργανικών και ανόργανων ουσιών. Κυρίως εξετάζει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε περιοχές μήκους κύματος από τα 160-780 nm. Κάθε ομάδα παρουσιάζει απορρόφηση σε διαφορετικό μήκος κύματος της ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα να εκπέμπουν διαφορετικά χρώματα. Η μέθοδος είναι βασισμένη στο νόμο του Beer-Lambert όπου $A = \epsilon \cdot b \cdot C$ και απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης.

Η μέτρηση γίνεται στα 600 nm, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και διαφορετικά μήκη κύματος. Παρ' όλα αυτά πρέπει να χρησιμοποιείται συνεχώς το ίδιο μήκος κύματος για την ανάλυση του ίδιου τύπου κυττάρων. Η απορρόφηση του δείγματος η οποία μετράτε, συσχετίζεται είτε με τον αριθμό των κυττάρων ανά μονάδα όγκου είτε με τη συγκέντρωση ξηρής βιομάζας, με χρήση καμπύλης βαθμονόμησης. Πιο ακριβές αποτελέσματα προκύπτουν όταν η απορρόφηση είναι μεταξύ 0.1 και 0.5. Επιπρόσθετα επειδή το ποσοστό σκέδασης του φωτός κατά την φασματοφωτομετρική ανάλυση επηρεάζεται πολύ από το σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων, η οπτική πυκνότητα που προκύπτει από την ανάλυση του δείγματος είναι συνάρτηση των δύο πιο πάνω παραγόντων.

Επομένως χρειάζεται να κατασκευάσουμε μια ανεξάρτητη καμπύλη βαθμονόμησης κάθε φορά που αλλάζουμε τις συνθήκες προκειμένου να επιτύχουμε ακριβή αποτελέσματα. Αυτό συμβαίνει γιατί το σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων εξαρτάται από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και από τη σύσταση των θρεπτικών.[Richard A. Bone, 1992]

Κατά την πειραματική ολοκλήρωση του προσδιορισμού της μικροβιακής ανάπτυξης σε ένα βιοτεχνολογικό δείγμα ή σε μια καλλιέργεια υπό ανάπτυξη, αρχικά θα πρέπει να τεθεί σε λειτουργία το φασματοφωτόμετρο (JENWAY 7315 spectrophotometer). Αφού το μηχάνημα

εκκινήσει τότε επιλέγεται η λειτουργία εφαρμογής της μοριακής ή ατομικής απορρόφησης και εν συνεχεία γίνονται οι ανάλογες ρυθμίσεις ανάλογα με το φάσμα απορρόφησης στο οποίο επιθυμείτε να πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ανάπτυξης διαμέσου της οπτικής πυκνότητας η απορρόφηση ρυθμίζεται στα 600 nm. Για να ολοκληρωθεί η ανάλυση των υπό εξέταση δειγμάτων και γενικά η προετημασία της εφαρμογής κρίνεται αναγκαίο πριν την οποιαδήποτε ενέργεια να πραγματοποιηθεί η διαδικασία του autozero. Επιλέγεται μια πλαστική κυψελίδα, ξεπλένεται, τοποθετείται σε αυτή νερό και εν συνεχεία αφού σκουπιστεί καλά στις πλευρές από όπου θα περάσει η δέσμη φωτός για σκοπούς ανάλυσης του δείγματος, τοποθετείται στην ιδική υποδοχή του αναλυτή, πάντοτε με τον σωστό προσανατολισμό και τέλος πιέζεται το κουμπί με την ένδειξη του εκμηδενιστεί. Το auto zero πραγματοποιείται για να υπάρχει ένα μέτρο σύγκριση ανάμεσα στα δείγματα προς ανάλυση σε σχέση με δείγμα το οποίο παρουσιάζει 100% διαύγεια. Αφού όλες οι ρυθμίσεις έχουν ολοκληρωθεί τότε λαμβάνεται ποσότητα 1,5 mL από το προς ανάλυση δείγμα με την βοήθεια πιπέτας, τοποθετείται στην πλαστική κυψελίδα και τέλος πραγματοποιείται η ανάλυση. Σε περίπτωση όπου στο φασματοφωτόμετρο εμφανιστεί αντί για τιμή απορρόφησης σε νανόμετρα, η ένδειξη 1+ τότε θα πρέπει να πραγματοποιηθεί αραίωση του υπό εξέταση δείγματος και εν συνεχεία ξανά ανάλυση του. Για εισαχθεί νέο δείγμα στην κυψελίδα θα πρέπει πρώτα να απομακρυνθεί το παλιό δείγμα και εν συνεχεία να ξεπλυθεί η κυψελίδα και να σκουπιστεί. Σκούπισμα απαιτείται και μετά την εισαγωγή του καινούριου δείγματος. Τέλος σε καμία περίπτωση κατά την εισαγωγή του δείγματος δεν πρέπει να περιέχονται φυσαλίδες στην κυψελίδα αφού λόγω σκέδασης της δέσμης φωτός τα αποτελέσματα της ανάλυσης θα αλλοιωθούν.

2.14 Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων (Carbohydrates).

Η μέθοδος carbohydrates analysis ή μέθοδος φαινόλης θειικού οξέος είναι μια ταχεία και απλή μέθοδος η οποία διαμέσου φασματοφωτομετρικών απορροφήσεων επιτυγχάνει την ακριβής ποσοτικοποίηση των συνολικών υδατανθράκων σε ένα δείγμα. Διαμέσου της τεχνικής αυτής γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός όλων των κατηγοριών υδατανθράκων εμπειροχόμενων των μονο-, δι-, ολιγο- και πολυσακχαριτών. Παρόλα αυτά λόγω διαφορετικών απορροφήσεων της κάθε κατηγορίας υδατανθράκων η ποσοτικοποίηση των υδατανθράκων ανάγεται σε όρους ενός μόνο υδατάνθρακα (στην προκυμμένη περίπτωση γλυκόζης). Το πυκνό θειικό οξύ διαμέσου

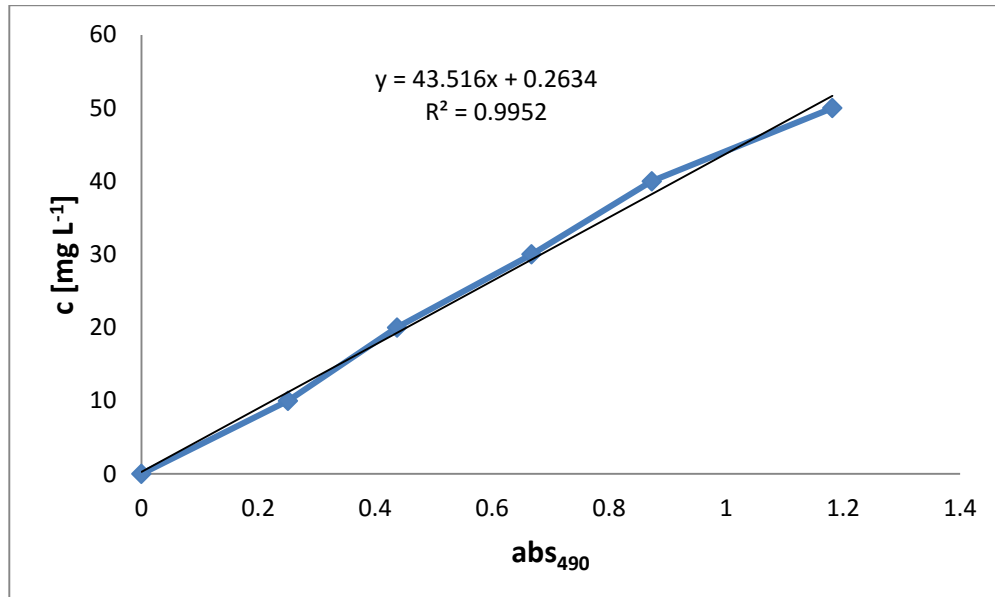
υδρόλυσης διασπά τους πολυσακχαρίτες ολιγοσακχαρίτες και δισακχαρίτες σε μονοσακχαρίτες. Επίσης αφυδατώνει τις πεντόζες σε φουρφουράλη και τις εξόζες σε υδροξυμεθυλφουρφουράλη. Στην συνέχεια με την προσθήκη της φαινόλης και αντίδραση της με τα προϊόντα των πιο πάνω αντιδράσεων παράγονται προϊόντα χρυσοκίτρινου χρώματος. Λόγο των έγχρωμων προϊόντων που παράγονται καθίσταται δυνατή η ανάλυση του δείγματος διαμέσου φασματοφωτομετρικής απορρόφησης. Γενικά η μέθοδος αυτή ενδεικνύει μεγάλη ακρίβεια στο προσδιορισμό των συνολικών υδατανθράκων. Ανάλογα με την σύσταση του προς εξέταση δείγματος επιλέγεται και το κατάλληλο μήκος κύματος προς απορρόφηση. Ενδεικτικά για δείγματα πλούσια σε ξυλόζη (πεντόζη) όπως π.χ. πίτουρο σιταριού ή καλαμποκιού, η ξυλόζη θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί για να καταστρωθεί η πρότυπη καμπύλη για τη μέτρηση της απορρόφησης στα 480 nm. Ενώ για δείγματα πλούσια σε εξόζες, η γλυκόζη χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον για να καταστρώσουμε την πρότυπη καμπύλη για μέτρηση της απορρόφησης στα 490 nm.

Κατά την πρακτική ολοκλήρωση της πειραματικής προβλέπεται η δημιουργία τόσο των διαλύματα της φαινόλης με περιεκτικότητα 80% w/w, το διάλυμα θεικού οξέος αλλά και το διάλυμα γλυκόζης ($C_6H_{12}O_6$) το οποίο επίσης προπαρασκευάστηκε με συγκέντρωση 100 g/L. Χρησιμοποιώντας την γνωστή μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων ($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$) παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα σε μικρά Falcon tubes γλυκόζης τελικού όγκου 50 mL για το δείγμα των 50 mg/L και 15 mL για τα δείγματα των 0, 10, 20, 30 και 40 mg/L. Για σκοπούς μεγαλύτερης ακρίβειας θεωρείτε σωστό να δημιουργηθούν διπλές για όλα τα δείγματα εκτός από το τυφλό. Βάση υπολογισμών από το αρχικό διάλυμα γλυκόζης 100 g/L πρέπει να παραχθούν διαλύματα με συγκεντρώσεις 0, 10, 20, 30, 40 και 50 mg/L. Για το άγνωστο δείγμα πραγματοποιείται αραιώση δια χίλια αφού σε τελικό όγκο 10 mL τοποθετήθηκαν 0,1 mL δείγματος και 9,9 mL απιονισμένου νερού. Από τα διαλύματα αυτά λαμβάνετε 1 mL δείγμα και τοποθετείτε σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Το πείραμα όπως προαναφέρθηκε γίνεται σε διπλή βάση έτσι ώστε να ληφθούν όσο το δυνατό πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα. Στην συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στον απαγωγό, όπου εκεί τοποθετείτε σε κάθε δοκιμαστικό με την βοήθεια πιπέτας 0,025 mL φαινόλης και έπειτα γίνεται ανάδευση με vortex. Τέλος τοποθετείτε με προσοχή ποσότητα 2,5 mL πυκνού θεικού οξέος και ξανά ανάδευση με vortex. Λόγο εξώθερμης φύσεως της αντίδρασης του δείγματος με το θεικό οξύ τα δείγματα αφήνεται να κρυώσουν για 15 λεπτά

στον απαγωγό. Αφού πλέον τα διαλύματα κρυώσουν, σε δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετείτε ποσότητα 1 mL και πραγματοποιήθηκε μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 490 nm. Λόγο της προσθήκης θειικού οξέος η μέτρηση πραγματοποιείται σε γυάλινη κυψελίδα ξεκινώντας από το 0 για auto zero και έπειτα από το πιο αραιό διάλυμα προς το πιο πυκνό χωρίς να ξεπλένετε η κυψελίδα κάθε φορά, έτσι ώστε να μην υπάρξει πιθανή αλλοίωση των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 7: Πίνακας απορροφήσεων πρότυπων διαλυμάτων προς παρασκευή καμπύλης βαθμονόμησης.

	a	b	c	average	stdev
0	0	0	0	0	0
10	0.274	0.234	0.245	0.251	0.020664
20	0.446	0.447	0.419	0.437333	0.015885
30	0.676	0.648	0.679	0.667667	0.017098
40	0.893	0.849	0.877	0.873	0.022271
50	1.144	1.168	1.233	1.181667	0.046047



Διάγραμμα 3: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης προς προσδιορισμό σακχάρων σε υπό ανάλυση δείγματα.

2.15 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών διαμέσου της τεχνικής COOMASIE BRILLIANT BLUE G-250-BASED.

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών μπορεί να επιτευχθεί σε διαφορετικά επίπεδα:

1. Ποσοτικός προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης,
2. Προσδιορισμός επιπέδων δράσης μιας πρωτεΐνης,
3. Προσδιορισμός συγκεκριμένης πρωτεΐνης

Κάθε μία ομάδα από τις παραπάνω προσεγγίσεις περιλαμβάνει πλήθος συγκεκριμένων μεθόδων με μεγαλύτερη ή μικρότερη ακρίβεια και ευαισθησία, αλλά και μεγαλύτερο ή μικρότερο κόστος. Για το λόγο αυτό κάθε ερευνητής είναι απαραίτητο πριν ακόμη από την επιλογή της μεθόδου που θα ακολουθήσει, να αποφασίσει την μεθοδολογική προσέγγιση, δηλαδή να λύσει ουσιαστικά το πρόβλημα τι επιθυμεί να αποδείξει με την έρευνά του.

Ποσοτικός προσδιορισμός συνολικής πρωτεΐνης

Με τις συγκεκριμένες μεθόδους υπολογίζεται η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης που υπάρχει σε ένα δείγμα ή εκχύλισμα, ανεξάρτητα από τη δομή και τη λειτουργία της.

Έτσι για παράδειγμα μπορεί να υπολογιστεί η συνολική πρωτεΐνη στον ορό του αίματος, που όπως είναι γνωστό περιέχει ποσότητες αλβουμίνης, αιμοσφαιρινών, ινοδογόνο και άλλων πρωτεϊνών πήξης του αίματος, διαφόρων ορμονών, κυττοκινών κ.α. Στην περίπτωση εκχυλίσματος βακτηριακών κυττάρων υπάρχουν πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, διάφορα ένζυμα κ.α.

Οι βασικές μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού είναι ο φασματομετρικός προσδιορισμός και διάφορες χρωματικές αντιδράσεις με την παράλληλη χρήση πρότυπων διαλυμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις.

α. Φασματομετρικός προσδιορισμός πρωτεΐνης

Οι πρωτεΐνες λόγω της παρουσίας αρωματικών ενώσεων (τυροσίνης και τρυπτοφάνης) έχουν την ιδιότητα να απορροφούν στην υπεριώδη περιοχή του φάσματος με μέγιστο στα 280 nm. Η τεχνική αυτή δεν έχει πολύ μεγάλη ακρίβεια, ευαισθησία και εξειδίκευση, αφού και μια σειρά από άλλες ουσίες απορροφούν στο ίδιο μήκος κύματος. Καθαρό διάλυμα πρωτεΐνης με συγκέντρωση 1 mg/ml παρουσιάζει απορρόφηση 1.0.

Επειδή τα νουκλειικά οξέα απορροφούν στα 260 nm έχει υπολογιστεί ο λόγος απορρόφησης 280/260 nm που όταν ισούται με 1.75 τότε το διάλυμα περιέχει καθαρές πρωτεΐνες, ενώ όταν έχει απορρόφηση 0.5 τότε στο διάλυμα υπάρχουν καθαρά νουκλειικά οξέα.

Γενικά η φασματομετρία είναι πολύ χρήσιμη κατά την διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού των πρωτεϊνών.

β. Γενική μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεΐνης – μέθοδος διουρίας (Biuret)

Αποτελεί την πιο γενική μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού, γιατί η μόνη προϋπόθεση για την εμφάνιση της χρωματικής αντίδρασης (με ιώδες χρώμα) είναι η ύπαρξη των πεπτιδικών δεσμών. Συγκεκριμένα τα ιόντα χαλκού από το διάλυμα του θειϊκού χαλκού (CuSO_4) σε αλκαλικό περιβάλλον δημιουργούν σύμπλοκα με το άζωτο του αμιδίου των αμινοξέων. Η ευαισθησία της μεθόδου δεν είναι πολύ ικανοποιητική (από 1 mg πρωτεΐνης), όμως αποτελεί

την πρώτη προσέγγιση για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών μετά τη φασματομετρία.

γ. Μέθοδος Bradford

Αποτελεί ακόμη μία μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού που βασίζεται στη δημιουργία συμπλόκου χρωστικής – πρωτεΐνης και αλλαγής χρώματος του αντιδραστηρίου. Συγκεκριμένα η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν δημιουργήσει σύμπλοκο σε αραιό όξινο διάλυμα με μέγιστο απορρόφησης στα 595 nm.

Η μέθοδος αυτή είναι πολύ γρήγορη, απλή και πολύ ευαίσθητη (μπορεί να προσδιορίσει ουσίες από 5 μg).

δ. Μέθοδος ξανθοπρωτεΐνης

Ανήκει στις λεγόμενες χρωματικές αντιδράσεις που συμβάλλουν στον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας κάποιο από τα χαρακτηριστικά τους. Για παράδειγμα η αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης μπορεί να υπολογίσει τις πρωτεΐνες εκείνες που περιέχουν αμινοξέα με αρωματικές ενώσεις.

Στη συγκεκριμένη τεχνική το HNO_3 αρχικά και η μετέπειτα προσθήκη NaOH παρουσία πρωτεϊνών με αρωματικά αμινοξέα δίνουν αρχικά κίτρινο χρώμα και στη συνέχεια πορτοκαλί. [K. E. Βοργιάς, 1993]

Κατά την πειραματική ολοκλήρωση του προσδιορισμού της περιεκτικότητας του προς ανάλυση δείγματος σε πρωτεΐνες, αρχικά πρέπει να παραχθούν τα απαραίτητα διαλύματα. Για την παραγωγή του **coomassie brilliant blue G-250** αντιδραστηρίου τελικού όγκου 250 mL ζυγίζεται 0,01 g Brilliant Blue και τοποθετείται σε μια duran 250 mL. Στην συνέχεια τοποθετείται ποσότητα 5 mL αιθανόλης περιεκτικότητας 95% και 10mL H_2PO_4 περιεκτικότητας 95%. Τέλος ο όγκος του διαλύματος ανάγεται στα 250 mL με απιονισμένο νερό, το διάλυμα ανακινείται καλά για πλήρες ομοιογενοποίηση και φυλάγεται στους 4 °C.

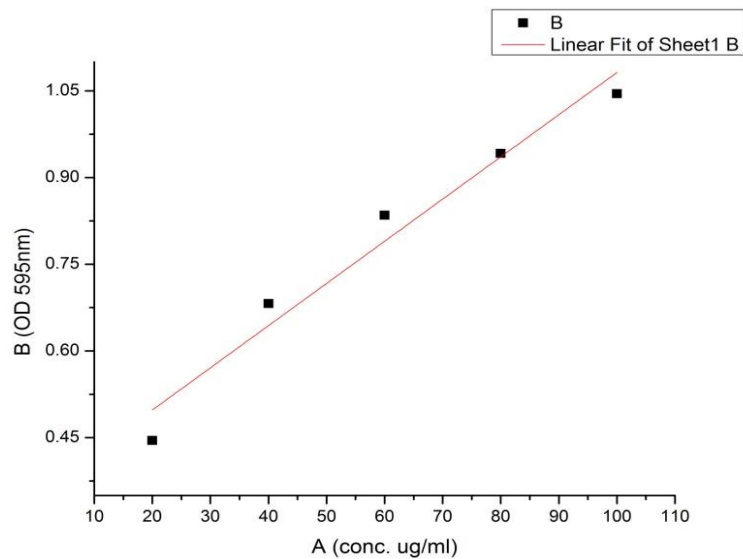
Στο επόμενο βήμα αποτελεί η συλλογή της βιομάζας από το βιοτεχνολογικό δείγμα. Αρχικά αριθμάτε 1 Eppendorf tube για κάθε δείγμα, στην συνέχεια με την βοήθεια ζυγού ακριβείας ζυγίζεται κάθε tube ξεχωριστά και οι τιμές που προκύπτουν καταγράφονται σε πίνακα. Στην

συνέχεια αφού καταγραφτούν τα βάρη των άδειων Eppendorf tubes εισάγεται με την βοήθεια πιπέτας 1mL δείγματος στο tube με την αντίστοιχη ονομασία. Προσοχή, με κάθε νέα δειγματοληψία πρέπει να χρησιμοποιείται καινούρια tip, έτσι ώστε να μην προκληθεί επιμόλυνση των καλλιιεργειών. Εν συνέχεια τα Eppendorf tubes τοποθετούνται στην φυγόκεντρο στις 10400 rpm για δύο λεπτά. Έπειτα απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και το εναπομένοντα συσσωμάτωμα αποτελεί την βιομάζα. Με το τέλος της φυγοκέντρωσης, σε περίπτωση που δεν παρατηρηθεί αρκετή ποσότητα στερεής βιομάζας στον πυθμένα του tube τότε η διαδικασία θα πρέπει να επαναληφθεί προσθέτοντας ακόμα 1 mL δείγματος στο tube. Για να ολοκληρωθεί η ανάλυση του προς εξέταση δείγματος ζυγίζονται τα Eppendorf tubes τα οποία περιέχουν την συλλεγόμενη βιομάζα και οι τιμές που προκύπτουν καταγράφονται στον προαναφερθέντα πίνακα.

Κατά την ανάκτηση των δειγμάτων και τον προσδιορισμό της απορρόφησης του κάθε δείγματος πραγματοποιείται μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 595 nm. Αρχικά για την προετοιμασία των δειγμάτων, εισάγεται ποσότητα 250 μ L NaOH περιεκτικότητας 2 M και 750 μ L αποιονισμένου νερού σε κάθε Eppendorf tube και ανακινείται καλά μέχρι πλήρους ομογενοποίησης. Τα προηγούμενα βήματα μπορούν να αντικατασταθούν με προσθήκη 1mL NaOH περιεκτικότητας 0.5 M. Στην συνέχεια ακολουθείται θέρμανση των δειγμάτων στους 95 °C για 15 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία θέρμανσης, τότε μεταφέρεται το περιεχόμενο των Eppendorf tubes σε falcon tubes των 15 mL. Για την φασματοσκοπική ανάλυση δημιουργείται επίσης ένα τυφλό δείγμα το οποίο περιέχει μόνο ποσότητα 1 mL αποιονισμένου νερού. Τέλος σε κάθε falcon tubes τοποθετείται ποσότητα 1mL από το προπαρασκευασμένο διάλυμα Coomassie Brilliant Blue G-250 και ακολουθεί χειροκίνητη ανάδευση για καλή ομογενοποίηση. Τα διαλύματα αφήνονται να ηρεμίσουν για 10 λεπτά και έπειτα μετριέται η απορρόφηση τους στα 595 nm. Βάση της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης και την εξίσωσης που προκύπτει ανάλογα με την απορρόφηση προσδιορίζεται και η περιεκτικότητα του δείγματος σε πρωτεΐνες εκφρασμένη πάντοτε μ g/mL δείγματος.

Πίνακας 8: Πίνακας απορροφήσεων πρότυπων διαλυμάτων προς παρασκευή καμπύλης βαθμονόμησης

conc. ug/ml	OD 595nm
20	0.445
40	0.682
60	0.835
80	0.942
100	1.045



Διάγραμμα 4: Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών.

2.16 Προσδιορισμός μικροβιακού πληθυσμού M.P.N. (most probable number).

Γενικά η μέθοδος M.P.N or most probable number αποτελεί μια πολύ διαδεδομένη και ευρέως χρησιμοποιημένη μέθοδος για τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού σε υπό εξέταση δείγμα. Ως αποτέλεσμα εκφράζει χαρακτηριστικά τον αριθμό κυττάρων ανά mL δείγματος και βασίζεται στην μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων αλλά και την οπτική παρατήρηση της χρωματικής αλλαγής των υπό εξέταση δειγμάτων. Σημαντικός παράγοντας για την ορθολογιστική ολοκλήρωση της μεθόδου αλλά και την εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων είναι η χρήση αποστερημένων αντιδραστηρίων, εξοπλισμού και η συνεχής χρήση του Laminar Flow Hood σε παρουσία φλόγας αφού η μέθοδος παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία σε επιμόλυνσης.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού θα πρέπει να παρατηρείται καθημερινά η χρωματική αλλαγή των δειγμάτων (η οποία προέρχεται την ανάπτυξη του πληθυσμού και εν συνεχεία από κάποια μεταβολική η βιολογική διεργασία π.χ. βιοξείδωση του Fe (II) to Fe (III)). Ο υπολογισμός θα πρέπει να πραγματοποιηθεί την μέρα όπου δεν θα παρατηρείται πλέον χρωματική αλλαγή στα υπό εξέταση δείγματα, αλλά επίσης και όταν η τελευταία αραιώση παρουσιάσει και στις δυο διπλέτες ή και στις τρεις τριπλέτες θετική ανάπτυξη μικροοργανισμού. Ιδανική ανάπτυξη μικροοργανισμού θα πρέπει να παρατηρείται υπό κανονικές συνθήκες περίπου στις αραιώσεις 10^{-6} με 10^{-7} . Για παράδειγμα αν η αραιώση 10^{-7} παρουσιάζει μια θετική επανάληψη και μια αρνητική ενώ η αραιώση 10^{-6} παρουσιάζει και τις δύο επαναλήψεις θετικές τότε είναι προτιμότερο να χρησιμοποιηθεί η αραιώση 10^{-6} για τον υπολογισμό του μικροβιακού πληθυσμού.

Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων βασίζεται στην μέθοδο υπολογισμού διαμέσου του πίνακα McCrady.[Scott Sutton, 2010]

Πίνακας 9: MPN για *Acidithiobacillus ferrooxidans* (first day samples, 6th day last change).

Dilutions 10 ^{-x}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Normal	++	++	++	++	++	++	--	--	--
30%	++	++	++	++	++	++	--	--	--
20%	++	++	++	++	++	++	--	--	--

Πίνακας 10: McCrady's Table για υπολογισμό μικροβιακού πληθυσμού.

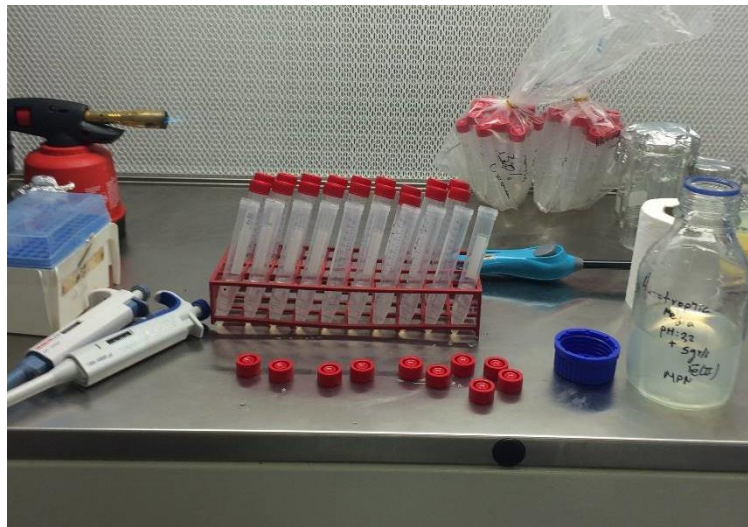
POSITIVES FOR BACTERIAL GROWTH			EQUATION
First Dilution	Second Dilution	Third Dilution	
2	0	0	
2	0	1	5×10^x
2	0	2	5.02×10^x
2	1	0	6×10^x
2	1	1	13×10^x
2	1	2	20×10^x
2	2	0	25×10^x
2	2	1	70×10^x
2	2	2	110×10^x

Equation for all samples $2.5 \times 10^x = 2.5 \times 10^7 \times 2(0.5 \text{ mL of bacteria}) = 5 \times 10^7 \text{ cell/mL}$

Αρχικά όπως περιεγράφηκε και στο σημείο 3 θα πρέπει να παρασκευαστεί η αναγκαία ποσότητα αυτότροφου ή ετερότροφου βιομέσου ανάλογα με τον αριθμό των προς ανάλυση δειγμάτων, στην συνέχεια θα πρέπει να ακολουθηθούν όλες οι αναγκαίες ενέργειες για την παρασκευή του $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ή πιο απλά διαλύματος δισθενούς σιδήρου και εν συνεχεία να γίνει η κατάλληλη αναγωγή στην επιθυμητή προς χρήση ποσότητα. Επόμενο στάδιο αν η τεχνική θα εφαρμοστεί για προσδιορισμό μικροβιακού πληθυσμού σε υγρή καλλιέργεια είναι η ετοιμασία της καλλιέργειας. Αν το δείγμα θα εφαρμοστεί σε ενεργό καλλιέργεια απλά πρέπει να παρθεί δείγμα από τον καλλιέργεια. Και στις δύο περιπτώσεις αναγκαίο κρίνεται να ακολουθηθούν τα ακόλουθα βήματα όπως αυτά καθαρίζονται πιο κάτω, έτσι ώστε οι διαδοχικές αραιώσεις να πραγματοποιηθούν με ορθό τρόπο. Όσον αφορά το πείραμα διπλές ή τριπλές μπορούν να δώσουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα.

Έτσι για κάθε δείγμα θα χρειαστούν 18 falcon tubes (9 falcon tubes για κάθε επανάληψη) σε κάθε σωλήνα θα πρέπει να αναγραφεί το όνομα του δείγματος, το γένος του μικροοργανισμού και ο αριθμός αραιώσης. Στο σκεύος με το αυτότροφο ή ετερότροφο βιομέσο θα πρέπει να προστεθεί ανάλογη ποσότητα διαλύματος δισθενούς σιδήρου έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση στα υπό εξέταση δείγματα. Στην συνέχεια από το εμπλουτισμένο με δισθενή σίδηρο διάλυμα βιομέσου προστίθεται ποσότητα 9 mL σε κάθε falcon tube. Στην συνέχεια ανάλογα αν το υπό ανάλυση δείγμα αποτελεί δείγμα από ενεργή καλλιέργεια, τοποθετείτε ποσότητα ενός mL με την βοήθεια πιπέτα στο αρχικό Falcon tube με την ένδειξη αραιώσης 10^{-1} και εν συνεχεία πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις. Αν το δείγμα αποτελεί δείγμα καλλιέργειας θα πρέπει πρώτα από το βιομέσω να τοποθετηθεί ποσότητα στο falcon tube με τα pellets, ο σωλήνας να ανακινηθεί καλά μέχρι όλα τα συσσωματώματα να διαλυτοποιηθούν εντελώς όπως αυτά προέκυψαν από την διαδικασία 4, ενεργοποίησης και εν συνεχεία από τον συγκεκριμένο σωλήνα να μεταφερθεί ποσότητα 1 mL στο αρχικό Falcon tube με την ένδειξη αραιώσης 10^{-1} . Για να δημιουργηθούν οι διαδοχικές αραιώσεις θα πρέπει από τον σωλήνα με την ένδειξη 10^{-1} να μεταφερθεί ποσότητα δείγματος 1 mL στον επόμενο σωλήνα με την ένδειξη 10^{-2} και εν συνεχεία η ίδια διαδικασία θα πρέπει να επαναληφθεί μέχρι να συμπληρωθεί και η αραιώση 10^{-9} . Θα πρέπει επίσης να χρησιμοποιείτε διαφορετικό tip σε κάθε νέα προσθήκη δείγματος για την επόμενη αραιώση και επίσης οι σωλήνες να αναδεύονται πριν να παρθεί από αυτούς νέο δείγμα. Θυμηθείτε ότι σε αρχικό σωλήνα με 9 mL βιομέσου τοποθετήθηκε 1 mL δείγματος και έτσι επιτεύχθηκε η αρχική αραιώση 10^{-1} . Τα προηγούμενα

βήματα θα πρέπει να επαναληφθούν έτσι ώστε να πραγματοποιηθούν οι διπλές ή τριπλές. Με το τέλος της προετοιμασίας όλων των δειγμάτων θα πρέπει να φυλαχθούν σε κάθετη παράταξη όλοι οι σωλήνες μέσα στο incubator.



Εικόνα 5: Δημιουργία δειγμάτων για σκοπούς ανάλυσης M.P.N.

2.17 Δημιουργία αερόβιων και αναερόβιων καλλιεργειών για διερεύνησης του ποσοστού αναστολής της βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III).

Κατά την δημιουργία αερόβιων καλλιεργειών στις πλείστες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται κωνικές φιάλες των 250 mL οι οποίες σκεπάζονται με βαμβάκι για ελεγχόμενο αερισμό ενώ για την δημιουργία αναερόβιων καλλιεργειών χρησιμοποιούνται serum bottoms χωρητικότητας 125 mL οι οποίες γεμίζονται μέχρι πληρώσεως και έπειτα σφραγίζονται με silica, έτσι ώστε να διασφαλίζονται ανοξικές συνθήκες. Πριν την έναρξη του πειράματος δημιουργείται ένας πίνακας στον οποίο αναγράφονται οι αναγκαίες ποσότητες βιομέσων, υγρών καλλιεργειών, διαλύματος Cellysis και δισθενούς ή τρισθενούς σιδήρου ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Πιο κάτω παρουσιάζεται ένας τυπικός πίνακας προετοιμασίας καλλιέργειας.

Πίνακας 3: Προετημασία καλλιέργειας με τελικό όγκο 100 mL.

Type	Culture (mL)	Cellysis (mL)	Media + 5gr/L Fe (III)	Total volume (mL)	Times
Control	-	-	100	100	X1
Normal	5	-	95	100	X 2
40% CL	5	40	55	100	X 2
30% CL	5	30	65	100	X 2
20% CL	5	20	75	100	X 2
10% CL	5	10	85	100	X 2
5% CL	5	5	90	100	X 2
1% CL	5	1	94	100	X 2
Total amount	70	212	1318	-	-

Βάση πλάνου θα χρειαστούν 70 mL υγρής καλλιέργειας μικροοργανισμού, 212 mL διαλύματος Cellysis και 1318 mL αυτότροφου ή ετερότροφού βιομέσο εμπλουτισμένο με δισθενή ή τρισθενή σίδηρο ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Έτσι πριν ξεκινήσει το πείραμα θα πρέπει να προετοιμαστούν τα ανάλογα διαλύματα όπως επεξηγούνται με λεπτομέρεια στα σημεία 1.3. Επίσης θα πρέπει τα διαλύματα να είναι πλήρως αποστειρωμένα και να διαθέτουν το ίδιο pH, έτσι ώστε να μην χρειαστεί να ρυθμιστεί το pH μετά την δημιουργία των καλλιεργείων, αφού είναι επιθυμητό να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης. Επίσης όλα τα σκεύη που προορίζονται για χρήση θα πρέπει επίσης να είναι πλήρως αποστειρωμένα και να αναγράφεται πάνω η χρήση του κάθε σκεύους αλλά και η περιγραφή (π.χ. ονομασία, ημερομηνία, pH, μικροοργανισμός) αν αυτό αποτελεί κωνική φιάλη ή serum bottom στα οποία θα δημιουργηθούν οι βιαντιδραστήρες. Τέλος αφού όλα τα σκεύη, αντιδραστήρια και διαλύματα είναι έτοιμα τότε απλά πραγματοποιείται η δημιουργία

των καλλιεργειών. Στην τελευταία στήλη του πίνακα αναγράφεται ο βαθμός επαναληψιμότητας κατά την πειραματική ολοκλήρωση της δημιουργίας των καλλιεργειών. Βάση της επαναληψιμότητας δημιουργούνται διπλέτες ή τριπλέτες κατά την δημιουργία των καλλιεργειών. Στο τέλος της ανάλυσης των δειγμάτων και κατά την δημιουργία των καμπύλων περιγραφής του ποσοστού αναστολής των εκάστοτε μικροοργανισμών διαμέσου του προσδιορισμού της περιεκτικότητας των καλλιεργειών σε δισθενή σίδηρο, υπολογίζεται ο μέσος όρος για κάθε δείγμα και εν συνέχεια οι καμπύλες δημιουργούνται βάση των προκειπτόμενων μέσων τιμών για κάθε δείγμα.

3 ΑΝΑΛΥΣΗ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

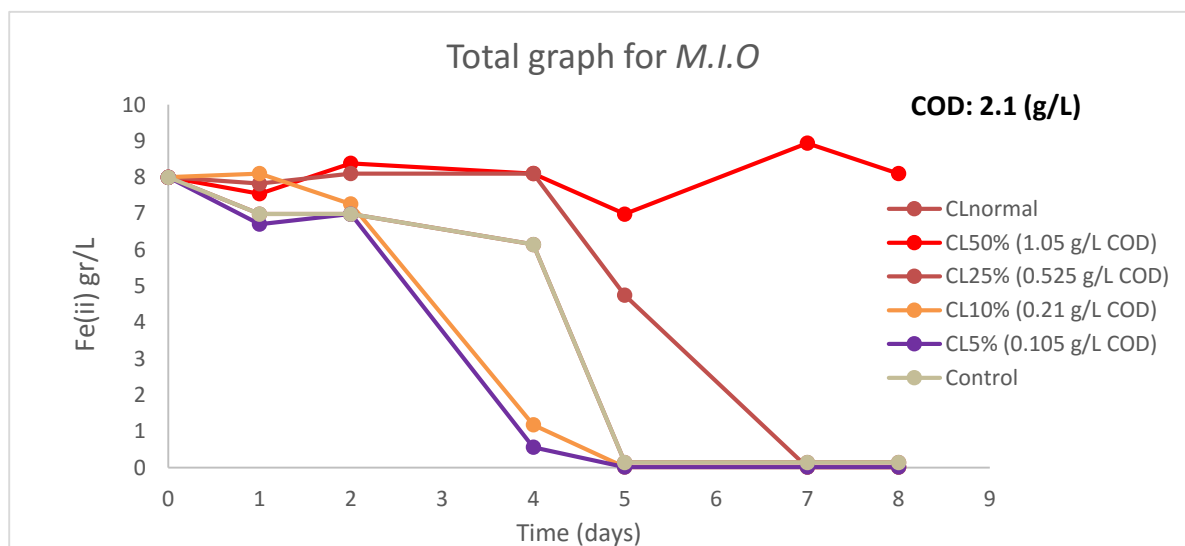
Στο κεφάλαιο 2 παρουσιάστηκαν λεπτομερώς τόσο οι τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα ερευνητική διατριβή αλλά και η διαδικασία δημιουργίας των διαφόρων τύπων καλλιιεργειών προς διερεύνηση του ποσοστού αναστολής των βιοδιεργασιών οξειδωσης ή αναγωγής του Fe (II) σε Fe (III) και αντίστροφα, διαμέσου οξεόφιλων μικροοργανισμών παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου. Πιο κάτω αναλύεται ο σκοπός του κάθε πειράματος, οι συνθήκες που επικράτησαν κατά των έλεγχο της αναστολής (π.χ. pH, περιεκτικότητα καλλιιεργειών σε Cellysis, σύσταση καλλιιεργειών κ.α.). Επίσης με το πέρας της περιγραφής για κάθε πείραμα που πραγματοποιήθηκε θα παρουσιάζονται ταυτόχρονα τα αποτελέσματα του κάθε πειράματος διαμέσου γραφημάτων αλλά και πινάκων και τέλος στο ίδιο τμήμα θα πραγματοποιείται ανάλυση και σχολιασμός των διαφόρων αποτελεσμάτων.

3.1 Παρατήρηση της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου μικτής καλλιιεργειας iron oxidizer μικροοργανισμών.

Όπως ακριβώς περιγράφεται και στα σημεία 3 και 4 του κεφαλαίου 2 για τον σκοπό της πειραματικής παρατήρησης του ποσοστού αναστολής αρχικά παράχθηκε διάλυμα Cellysis διαμέσου της διαδικασίας 2.5.1 Έτσι πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη μικροοργανισμών Heterotrophic iron reducer (H.I.R) σε υγρή καλλιιεργεια όπως περιγράφεται στο σημείο 2.4 προς παραγωγή Cellysis. Η ανάπτυξη μικροοργανισμών του γένους Heterotrophic iron reducer αποτελεί μια αρχική προσπάθεια για την δημιουργία του διαλύματος Cellysis, με το οποίο θα ασχοληθούμε καθ' όλη την διάρκεια της έρευνας και όπως προαναφέρθηκε στη εισαγωγή, παρουσιάζει την ιδιότητα αναστολής της βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) διαμέσου οξεόφιλων μικροοργανισμών. Για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών δημιουργήθηκαν δύο είδη βιομέσων. Το ένα εξ αυτών προοριζόταν για την δημιουργία υγρού υποστρώματος και το άλλο για την δημιουργία στερεού υποστρώματος. Σημαντικό παράγοντα κατά την δημιουργία των βιομέσων ήταν η ρυθμιστή του pH στο 2.5 - 3 προς δημιουργία ευνοϊκών συνθηκών ανάπτυξης για το συγκεκριμένο είδος μικροοργανισμών. Αφού οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν εφαρμόστηκε η πειραματική διαδικασία παραγωγής Cellysis (2.5.1). Εν συνεχεία και αφού είδη παρασκευάστηκαν όλα τα αναγκαία διαλύματα ακολούθησε η δημιουργία των καλλιιεργειών όπως περιγράφεται στην διαδικασία 2.4. Πιο κάτω παραβάλλεται ο πίνακας με την σύσταση των καλλιιεργειών.

Πίνακας 4: Σύσταση καλλιεργείων για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών μικτής καλλιέργειας *Iron oxidizer* σε pH 1.8-2.

	Amount of culture (mL)	Amount of Cellysis (mL)	Media (mL) + 10 g/L Fe (II)	Total volume (mL)	Times
control	0	0	100	100	X1
normal	5	0	95	100	X 2
CL 50%	5	50	45	100	X 2
CL 25%	5	25	70	100	X 2
CL 10%	5	10	85	100	X 2
CL 5%	5	5	90	100	X 2



Διάγραμμα 5: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 2.1 g/L.

Το παρόν πείραμα αποτέλεσε μια πρώτη προσπάθεια περιγραφής της συμπεριφοράς οξεόφιλων μικροοργανισμών στην παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου διαμέσου της

πειραματικής παρατήρησης του ρυθμού βιοοξειδωσης του δισθενή σιδήρου σε τρισθενή. Αν και από το διάγραμμα μπορούν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα για την συμπεριφορά των μικροοργανισμών μικτής καλλιέργειας εν του της το πείραμα δεν θεωρείται αξιόπιστο. Κατά την δημιουργία του διαλύματος Cellysis το οποίο προήλθε από θερμικό stress υγρής καλλιέργεια ετερότροφων μικροοργανισμών πιθανότατα το προκύπτων διάλυμα να περιείχε ποσότητα γλυκόζης η οποία στην συνέχεια να χρησιμοποιήθηκε από του μικροοργανισμούς των βιαντιδραστών. Έτσι στην παρουσία ενός θρεπτικού υποστρώματος τόσο ευκολά βιοδιασπάσιμο όπως η γλυκόζη, η πειραματική παρατήρηση της αναστολής των μικροοργανισμών στην παρουσία Cellysis πιθανότατα δεν είναι ενδεικτική αφού η γλυκόζη ακυρώνει την ιδιότητα του οργανικού φορτίου προς την απενεργοποίηση των βιοδιεργασιών των υπό μελέτη μικροοργανισμών.



Εικόνα 6: Μικτές καλλιέργειες *iron oxidizer* μικροοργανισμών

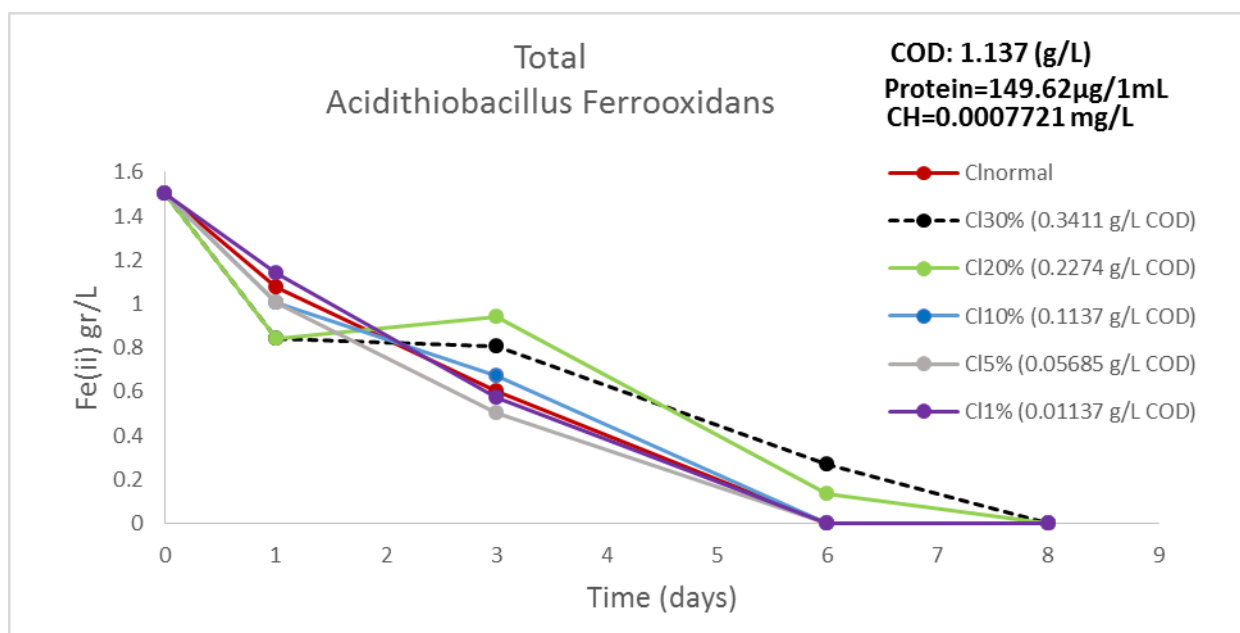
3.2 Παρατήρηση της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* μικροοργανισμών.

Στο παρών πείραμα ακολουθήθηκε διαφορετική μεθοδολογία παραγωγής του Cellysis αφού τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος κρίθηκαν αναξιόπιστα λόγω πιθανής ύπαρξης γλυκόζης στις υπό εξέταση καλλιέργειες. Έτσι όπως περιγράφεται και στο σημείο 2.5.2 του δεύτερου κεφαλαίου για την παραγωγή διαλύματος Cellysis με ψηλό οργανικό φορτίο αυτή την φορά χρησιμοποιήθηκε μικροβιακή λάσπη η οποία προέκυψε από την δευτεροβάθμια και τριτοβάθμια επεξεργασία των αστικών λυμάτων της πόλης Λεμεσού στον σταθμό επεξεργασίας Σ.Α.Λ.Α.

Η ενεργοποίηση των μικροοργανισμών και η παρασκευή των απαραίτητων διαλύματων πραγματοποιήθηκε όπως ακριβώς περιγράφονται στα σημεία 3.3 και 3.4 του προηγούμενου κεφαλαίου. Αυτή την φορά το pH των διαφόρων διαλύματων αλλά και των καλλιεργειών ρυθμιστικέ στο 2 με 2.5, ενώ τελικός όγκος καλλιεργειών ήταν τα 50 mL. Αξιοσημείωτο γεγονός είναι ότι μετά από την παραγωγή του διαλύματος Cellysis πραγματοποιήθηκαν εκτός από τον προσδιορισμό του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, αναλύσεις υδατανθράκων (Carbohydrates analysis) και προσδιορισμός της περιεκτικότητας του διαλύματος σε πρωτεΐνες (Protein determination analysis). Οι αναλύσεις αυτές αποτέλεσαν στο σύνολο τους μια προσπάθεια προσδιορισμού όχι μόνο του οργανικού φορτίου στο Cellysis διάλυμα αλλά και της ύπαρξης πιθανών ιχνοστοιχείων και θρεπτικών τα οποία όπως και στο προηγούμενο πείραμα, ενδεχομένως να δημιουργούσαν πρόβλημα. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν όπως ακριβώς περιγράφεται στα σημεία 2.13 και 2.14 ενώ εκτός αυτών πραγματοποιήθηκε και M.P.N ανάλυση έτσι ώστε να προσδιοριστεί ο ακριβής μικροβιακός πληθυσμός των καλλιεργειών όπως ακριβώς περιγράφεται στη σημείο 3.15. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αναγράφονται στο πάνω δεξιά μέρος κάθε γραφήματος αναπαράστασης της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στις καλλιέργειες, ενώ τα αποτελέσματα για το M.P.N πείραμα παρουσιάζονται σε ξεχωριστό πίνακα. Η διαδικασία υπολογισμού για τον ακριβή μικροβιακό πληθυσμό των καλλιεργειών διαμέσου της προαναφερθείσας τεχνικής περιγράφεται επίσης λεπτομερώς στο σημείο 1.12.V του θεωρητικού μέρους της παρούσας διατριβής. Πιο κάτω παραθέτονται η σύσταση των καλλιεργειών και τα αποτελέσματα από την εργαστηριακή παρατήρηση του εν λόγω πειράματος.

Πίνακας 5: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* μικροοργανισμών σε pH 2-2.5.

	Amount of culture (mL)	Amount of Cellysis (mL)	Media (mL) + 10 g/L Fe (II)	Total volume (mL)	Times
control	0	0	50	50	X1
normal	2	0	48	50	X 2
CL 30%	2	15	33	50	X 2
CL 20%	2	10	38	50	X 2
CL 10%	2	5	43	50	X 2
CL 5%	2	2.5	45.5	50	X 2
CL 1%	2	0.5	47.5	50	X 2

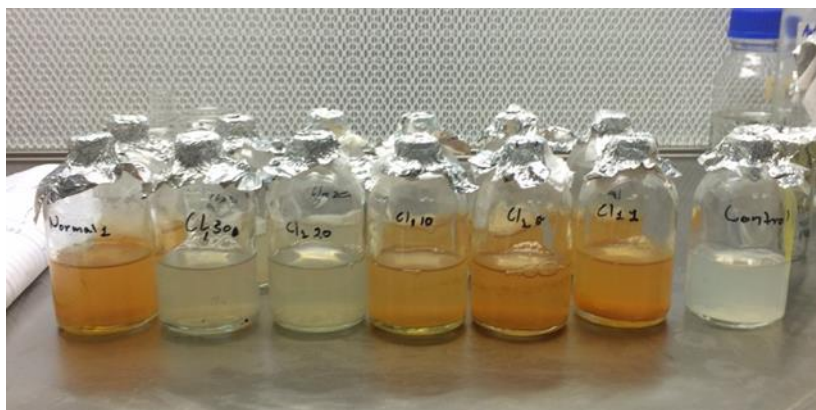


Διάγραμμα 6: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 1.137 g/L.

Πίνακας 6: MPN για *Acidithiobacillus ferrooxidans* (first day samples, 6th day last change).

Samples	Number of cells on the first day of experiment / mL	Number of cells on the last day of experiment / mL
Normal	5 x10 ⁷ cell/mL	6.0 x10 ⁷
Cell lysis 20%	5 x 10 ⁷ cell/mL	5.0 x10 ⁷
Cell lysis 40%	5 x 10 ⁷ cell/mL	2.5 x10 ⁷

Βάση του γραφήματος 3.2 παρατηρείται ελαφρύς επηρεασμός των μικροοργανισμών *Acidithiobacillus ferrooxidans* στην παρουσία διαλύματος με σχετικά υψηλό οργανικό φορτίο. Συγκρίνοντας το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της πλήρους οξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III) για την καλλιέργεια με μηδενική συγκέντρωση οργανικών σε σχέση με την καλλιέργεια με συγκέντρωση 30% Cellysis που αντιστοιχεί στα 0.3411 g/L COD παρατηρείται καθυστέρηση δύο ημερών. Επίσης βάση της καλλιέργειας με περιεκτικότητα σε Cellysis 5% δημιουργείται μια υπόνοια ότι ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου οι μικροοργανισμοί επηρεάζονται ανασταλτικά, εν τούτοις σε παρουσία μικρού οργανικού φορτίου πιθανότατα τα οργανικά μπορεί να λειτουργήσουν ευεργετικά αυξάνοντας την απόδοση της βιοοξείδωσης. Οι μικροοργανισμοί *Acidithiobacillus ferrooxidans* αν και αυτότροφοι οι οποίοι αντλούν ενέργεια διαμέσου βιοδιεργασιών οξείδωσης του Fe (II), όπως εξηγήθηκε και στο σημείο 1, του θεωρητικού μέρους, μικρό οργανικό φορτίο μπορεί να αποτελέσει πηγή θρεπτικών και να είναι βιοδιαθέσιμο. Τέλος βάση του πειράματος M.P.N οι βιαντιδραστικές παρουσιάζουν σχετικά υψηλή δραστηριότητα αφού τόσο στο δείγμα normal αλλά και σε συγκεντρώσεις Cellysis 30% και 20% οι μικροβιακός πληθυσμός παρουσίασε τιμή **5 x 10⁷ cell/mL** κατά την πρώτη μέρα δειγματοληψίας από τις καλλιέργειες.



Εικόνα 7: Καθαρές καλλιέργειες *Acidithiobacillus ferrooxidans* μικροοργανισμών.

3.3 Παρατήρηση της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας *Leptospirillum ferriphilum* μικροοργανισμών.

Για την πειραματική παρατήρηση της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe(II) διαμέσου μικροοργανισμών του γένους *Leptospirillum ferriphilum* κρίθηκε αναγκαία η δημιουργία νέου διαλύματος Cellysis το οποίο προέρχεται και πάλι από μικροβιακή λάσπη του σταθμού επεξεργασίας λυμάτων Σ.Α.Λ.Α. Όπως και την προηγούμενη φορά η διαδικασία δημιουργίας του Cellysis διαλύματος ακολουθεί την ίδια διαδικασία που περιγράφεται στο σημείο 2.5.2 του προηγούμενου κεφαλαίου. Αυτή την φορά για να επιτευχθεί μεγαλύτερο ποσοστό οργανικού φορτίου στο προς παραγωγή διάλυμα κατά την φυγοκέντριση της μικροβιακής λάσπης συλλέχθηκαν πιο πυκνά συσσωματώματα, ενώ κατά την διαδικασία φιλτραρίσματος το διάλυμα αφέθηκε να φιλτραριστεί κατά την διάρκεια της νύκτας.

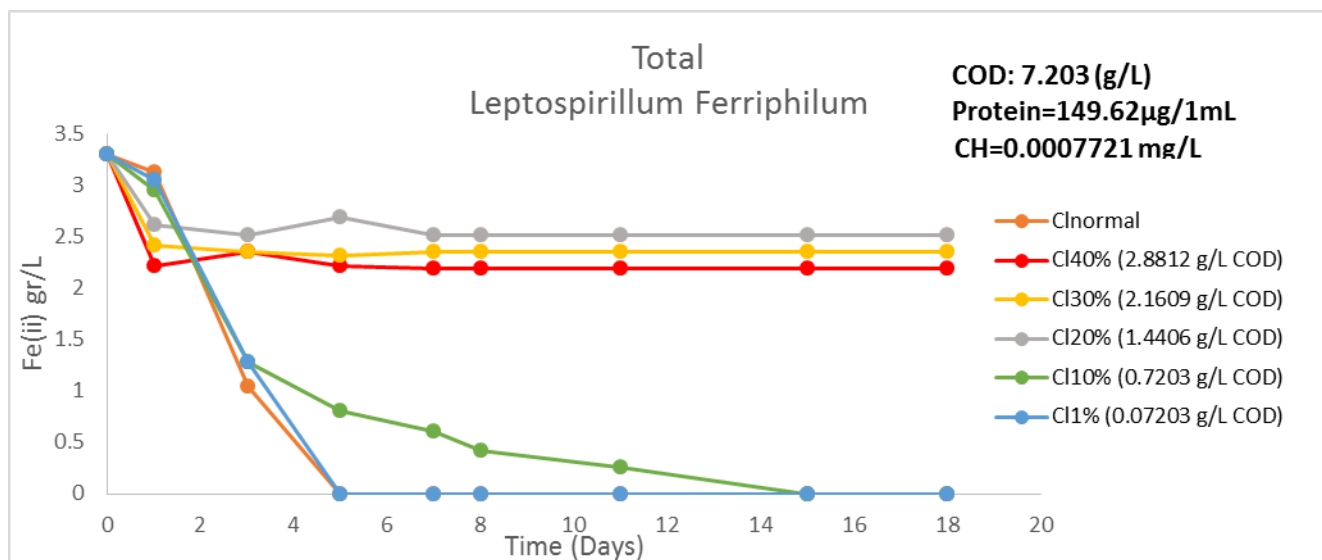
Μετά από την παραγωγή του διαλύματος Cellysis πραγματοποιήθηκαν και πάλι αναλύσεις προς προσδιορισμό του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, των ολικών υδατανθράκων (Carbohydrates analysis) και προσδιορισμός της περιεκτικότητας του διαλύματος σε πρωτεΐνες (Protein determination analysis).

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν και πάλι όπως ακριβώς περιγράφεται στα σημεία 2.14 και 2.13 ενώ αυτή την φορά πραγματοποιήθηκε M.P.N ανάλυση τόσο κατά την αρχική μέρα έναρξης του πειράματος αλλά και μετά την λήξη, έτσι ώστε να προσδιοριστεί επακριβώς ο μικροβιακός πληθυσμός των καλλιεργειών πριν και μετά την επίδραση του οργανικού stress. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων αναγράφονται στο πάνω δεξιά μέρος κάθε γραφήματος

αναπαράστασης της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στις καλλιέργειες, ενώ τα αποτελέσματα για τα M.P.N πείραμα παρουσιάζονται σε ξεχωριστούς πίνακες. Πιο κάτω παραθέτονται η σύσταση των καλλιεργειών και τα αποτελέσματα από την εργαστηριακή παρατήρηση του εν λόγω πειράματος.

Πίνακας 7: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Leptospirillum ferriphilum* μικροοργανισμών σε pH 2-2.5.

	Amount of culture (mL)	Amount of Cellysis (mL)	Media (mL) + 10 g/L Fe (II)	Total volume (mL)	Times
control	0	0	50	50	X1
normal	2	0	48	50	X 2
CL 40%	2	20	28	50	X2
CL 30%	2	15	33	50	X 2
CL 20%	2	10	38	50	X 2
CL 10%	2	5	43	50	X 2
CL 1%	2	0.5	47.5	50	X 2



Διάγραμμα 7: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellulose με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 7.203 g/L.

Πίνακας 8: MPN για *Leptospirillum ferriphilum* (first day samples, 5th day last change).

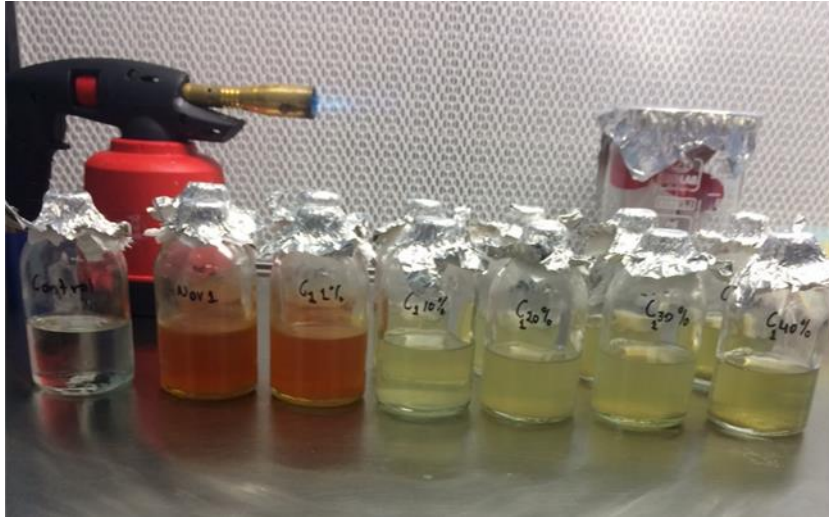
Samples	Number of cells on the first day of experiment / mL	Number of cells on the last day of experiment / mL
Normal	5×10^5 cell/mL	140×10^6
Cell lysis 20%	5×10^5 cell/mL	-
Cell lysis 40%	5×10^5 cell/mL	-

Βάση αποτελεσμάτων με το πέρας του πειράματος ελέγχου του Cellulose συγκέντρωσης 7.203 g/L σε σχέση με το ποσοστό αναστολής των μικροοργανισμών *Leptospirillum ferriphilum* το εν λόγω πείραμα κρίνεται επιτυχής αφού διακρίνεται ξεκάθαρα ότι σε συγκεντρώσεις 40%, 30%, 20% Cellulose παρατηρείτε μεγάλο ποσοστό αναστολής της βιοοξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III) διαμέσου του εν λόγω μικροοργανισμού. Επίσης σε συγκέντρωση 10% Cellulose παρατηρείτε επιβράδυνση σε βάθος χρόνου της οξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III). Τέλος βάση του δείγματος 1% Cellulose ενισχύεται η θεωρία περί ευεργετικής δράσης των χαμηλών συγκεντρώσεων οργανικού φορτίου σε σχέση με την ενίσχυση των βιοδιεργασιών διαμέσου των οξεόφιλων μικροοργανισμών. Τέλος με την δημιουργία του συγκεκριμένου διαλύματος Cellulose το οποίο διαθέτει εξαιρετικά ψηλό οργανικό ποσοστό (7.203 g/L), φαίνεται ότι το

ποσοστό αναστολής της βιομετατροπής του Fe(II) σε Fe(III) διαμέσου οξειδωτικών μικροοργανισμών είναι άμεσα συνυφασμένο με την συγκέντρωση της οργανικής ύλης (Cellysis) αλλά επίσης και με την σύσταση της. Βάση πειραμάτων σε περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε Cellysis με υψηλό ποσοστό COD χρειάστηκε μικρότερη συγκέντρωση διαλύματος στην καλλιέργεια για να προκληθεί το ίδιο ποσοστό αναστολής του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Αντίστοιχα στη περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε Cellysis με χαμηλό ποσοστό COD χρειάστηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση στην καλλιέργεια για να παρατηρηθεί παρόμοιας τάξης αναστολή του υπό εξέταση μικροοργανισμού.

Βάση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού των μικροοργανισμών *Leptospirillum ferriphilum* φαίνεται ότι αρχικά οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό μικροβιακού πληθυσμού αφού πάρθηκε δείγμα από την αρχική μέρα εκκίνησης του πειράματος. Επίσης παρουσιάζεται χαμηλό ποσοστό αναστολής της βιομετατροπής του Fe (II) σε Fe (III). Τα αποτελέσματα είναι λογικά αφού κατά τα αρχικά στάδια δειγματοληψίας οι μικροοργανισμοί δεν προλαβαίνουν να επηρεαστούν από την παρουσία του Cellysis και έτσι η ανάπτυξη τους παρουσιάζεται σταθερή.

Σε αντίθεση το δεύτερο πείραμα για τον μικροβιακό προσδιορισμό παρουσιάζει ενδιαφέροντα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση του Cellysis στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Όπως φαίνεται το υψηλό οργανικό φορτίο της καλλιέργειας όχι μόνο αναστέλλει την βιομετατροπή του Fe (II) σε Fe (III), αλλά φαίνεται να είναι υπεύθυνο και για το μεγάλο ποσοστό θανάτωσης των μικροοργανισμών. Στο δείγμα απουσίας οργανικού φορτίου ο μικροοργανισμός παρουσιάζει εξαιρετικά μεγάλο ποσοστό ανάπτυξης με μικροβιακή συγκέντρωση ίση με 140×10^6 cell / mL, ενώ στα άλλα δύο δείγματα το ποσοστό ανάπτυξης είναι μηδενικό.



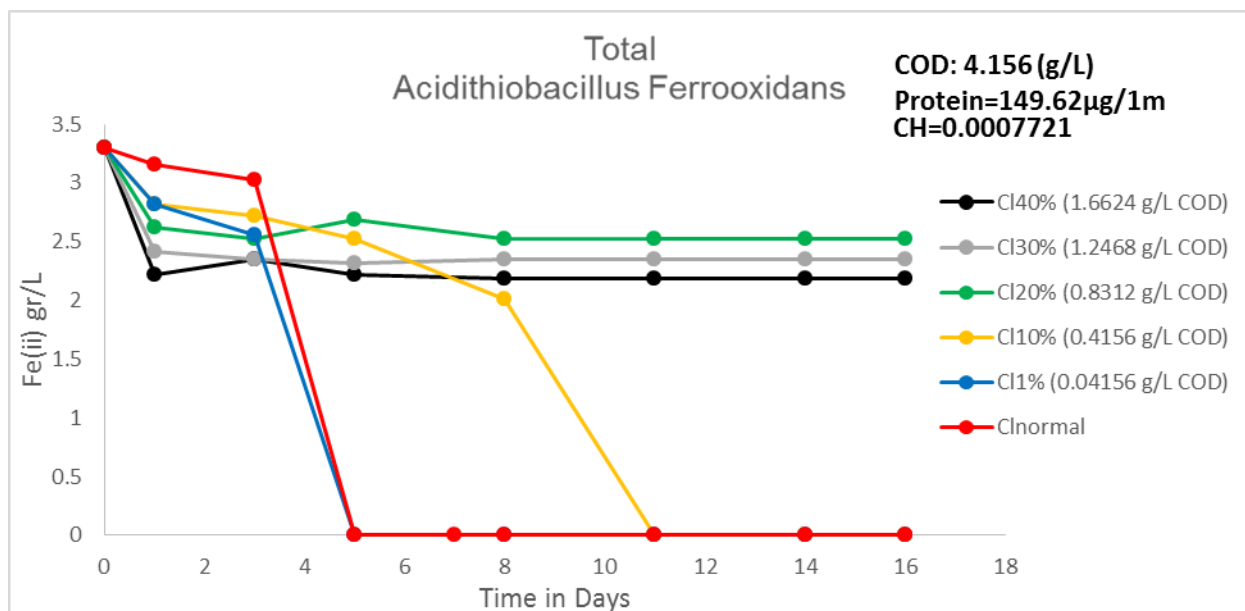
Εικόνα 8: Καθαρές καλλιέργειες *Leptospirillum ferriphilum* μικροοργανισμών.

3.4 Επαναληπτικό πείραμα παρατήρησης της αναστολής βιοξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* μικροοργανισμών.

Για την πειραματική παρατήρηση της αναστολής βιοξείδωσης του Fe (II) διαμέσου μικροοργανισμών του γένους *Acidithiobacillus ferrooxidans* για το επαναληπτικό πείραμα, πραγματοποιήθηκε μίξη των εναπομείναντα ποσοτήτων προηγούμενων διαλυμάτων Cellysis και εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν και πάλι αναλύσεις προς προσδιορισμό του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, των ολικών υδατανθράκων (Carbohydrates analysis) και προσδιορισμός της περιεκτικότητας του διαλύματος σε πρωτεΐνες (Protein determination analysis). Τα αποτελέσματα αναγράφονται στα γραφήματα που ακολουθούν με την περιγραφή της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στις καλλιέργειες. Πιο κάτω παραθέτονται η σύσταση των καλλιεργειών στο επαναληπτικό πείραμα και τα αποτελέσματα από την εργαστηριακή παρατήρηση του εν λόγω πειράματος.

Πίνακας 9: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* μικροοργανισμών στο επαναληπτικό πείραμα σε pH 2-2.5.

	Amount of culture (mL)	Amount of Cellysis (mL)	Media + 10 g/L Fe (II) (mL)	Total volume (mL)	Times
control	0	0	50	50	X 1
normal	2	0	48	50	X 2
CL 40%	2	20	28	50	X 2
CL 30%	2	15	33	50	X 2
CL 20%	2	10	38	50	X 2
CL 10%	2	5	43	50	X 2
CL 1%	2	0.5	47.5	50	X 2



Διάγραμμα 8: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 4.156 g/L.

Πίνακας 10: MPN για *Acidithiobacillus ferrooxidans* (first day samples, 16th day last change).

Samples	Number of cells on the first day of experiment / mL	Number of cells on the last day of experiment / mL
Normal	5×10^7 cell/mL	6.0×10^6
Cell lysis 20%	5×10^7 cell/mL	-
Cell lysis 40%	5×10^7 cell/mL	-

Γενικά φαίνεται ότι το ποσοστό αναστολής της βιομετατροπής του Fe(II) σε Fe (III) διαμέσου οξεόφιλων μικροοργανισμό είναι άμεσα συνυφασμένο με την συγκέντρωση της οργανικής ύλης (Cellysis) αλλά επίσης και με την σύσταση της. Το γεγονός αυτό επαληθεύεται και βάση του προηγούμενου πειράματος που πραγματοποιήθηκε με τους εν λόγω μικροοργανισμούς. Στο προηγούμενο πείραμα χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Cellysis το οποίο διέθετε φτωχότερο ποσοστό οργανικού φορτίου και συγκεκριμένα 1.137 gr/L. Έτσι όπως διακρίνεται και στα γραφήματα 3.2 και 3.4 το ποσοστό αναστολής της οξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III) σε σχέση με το χρόνο διαφέρει αρκετά αφού στο πρώτο πείραμα. Οι βιοδιεργασία μετατροπής του

δισθενούς σιδήρου απλά είναι πιο αργή σε βάθος χρόνου, ενώ στο επαναληπτικό πείραμα οι μικροοργανισμοί σε συγκεντρώσεις Cellysis 4.156 gr/L φαίνεται να απενεργοποιούνται εντελώς στις περιπτώσεις όπου τοποθετήθηκε μεγάλη συγκέντρωση οργανικού φορτίου στις καλλιέργειες και εν συνεχεία να παρατηρείτε και στασιμότητα της μετατροπής του σιδήρου.

Βάση πειραμάτων σε περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε Cellysis με ψηλό ποσοστό COD στην καλλιέργεια παρατηρήθηκε ψηλό ποσοστό αναστολής του υπό εξέταση μικροοργανισμού. Αντίστοιχα στη περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε Cellysis με χαμηλό ποσοστό COD παρατηρήθηκε πιο χαμηλό ποσοστό αναστολής των βιοδιεργασιών τους μικροοργανισμού.

Η πειραματική μέτρηση της συγκεντρώσεις του Fe (II) γίνεται έτσι ώστε να προσδιοριστεί το ποσοστό αναστολής της βιομετατροπής του Fe (II) σε Fe (III).

Τα αποτελέσματα για το M.P.N πείραμα κυμάνθηκαν τόσο στο αρχικό πείραμα όσο και στο επαναληπτικό πείραμα στα ίδια επίπεδα δίνοντας έτσι την ευχέρεια για καλύτερη παρατήρηση του παράγοντα επηρεασμού των μικροοργανισμών στην παρουσία οργανικού φορτίου αφού ήταν πλέον γνωστό ότι η μικροβιακή ενεργότητα και στα δύο πειράματα ήταν η ίδια .

3.5 Παρατήρηση της αναστολής βιοαναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) και πιθανής ταυτόχρονη κατανάλωσης οργανικού φορτίου διαμέσου μικτής καλλιέργειας *Heterotrophic iron reducer (H.I.R)* και καθαρής καλλιέργειας *J1* μικροοργανισμών.

Το παρών πείραμα αποτελεί μια πρώτη προσπάθεια εύρεσης μια βιοτεχνολογικής λύσης στο πρόβλημα αναστολής που παρουσιάζουν οι οξεόφιλοι μικροοργανισμοί σε περίπτωση stress λόγω υψηλού οργανικού φορτίου στο περιβάλλον τους. Για σκοπούς προσδιορισμού του ποσοστού βιομετατροπής του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή και εν συνεχεία πιθανή κατανάλωση του Cellysis ως πηγή άνθρακα θρεπτικό, δημιουργήθηκαν δύο τύποι καλλιεργείων. Και για τις δύο κατηγορίες μικροοργανισμών δημιουργήθηκαν καλλιέργειες με αναερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, οι οποίοι περιείχαν 15% του συνολικού τους όγκου, Cellysis. Για τις αναερόβιες συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν serum bottle, ενώ για τις αερόβιες συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 mL. Η διαδικασία δημιουργίας των καλλιεργείων περιγράφεται στο σημείο 3,.. του τρίτου κεφαλαίου, το pH ρυθμίστηκε στο 3. Η σύσταση των καλλιεργείων παρουσιάζεται στους πιο κάτω πίνακες.

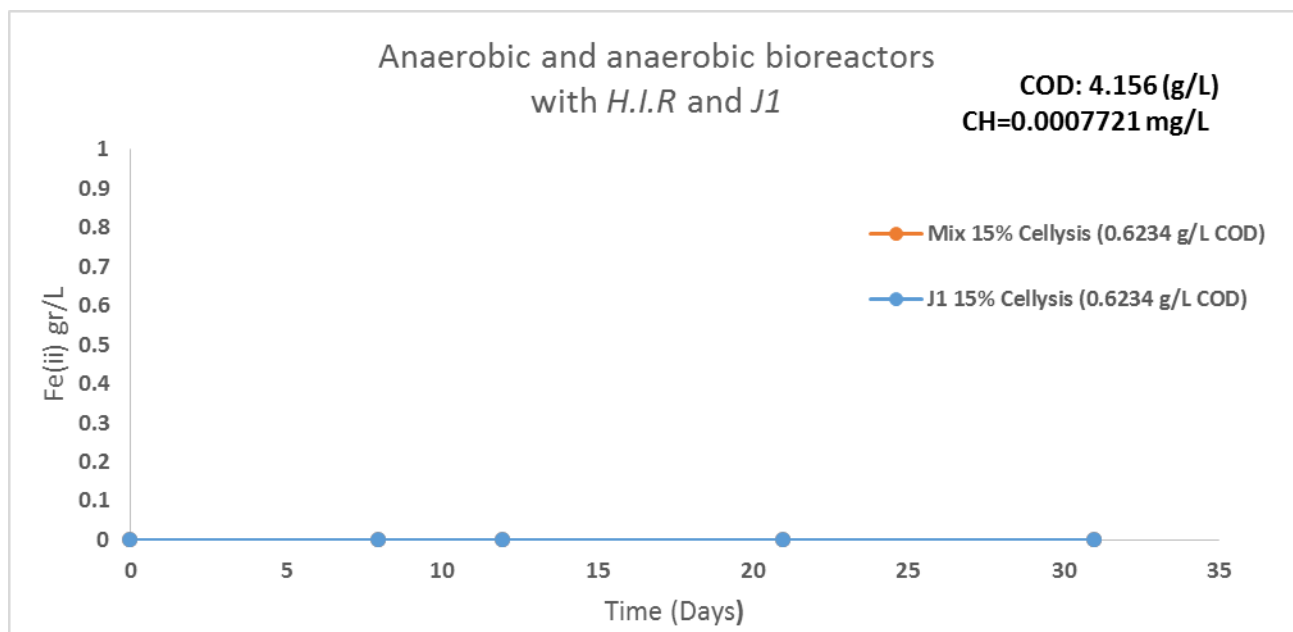
Πίνακας 11: Σύσταση αναερόβιας καλλιέργειας.

Culture	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
Mix	15 mL	81 mL	4 mL	100 mL	X2
J1	15 mL	81 mL	4 mL	100 mL	X2

Πίνακας 12: Σύσταση αερόβιας καλλιέργειας.

Culture	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
Mix	15 mL	81ml	4 mL	100 mL	X2
J1	15 mL	81ml	4 mL	100 mL	X2

Όπως προκύπτει από τις εργαστηριακές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε τακτά χρονικά οι μικροοργανισμοί *Heterotrophic iron reducer (H.I.R)* αλλά και τα *J1* στελέχη δεν παρουσίασαν την οποιαδήποτε δραστηριότητα αφού όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί δεν υπήρξε η παραμικρή ένδειξη βιομετατροπής του Fe (III) σε Fe (II). Πιθανότατα ο λόγος αναστολής των ετερότροφων βακτηρίων να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση οργανικού φορτίου το οποίο υπήρχε στις καλλιέργειες. Οι μικροοργανισμοί ως ετερότροφοι υπό κανονικές συνθήκες θα έπρεπε να παρουσίαζαν την ικανότητα βιοδιάσπασης του οργανικού κλάσματος. Όμως όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί, παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή των εν λόγω μικροοργανισμών.



Διάγραμμα 9: Συνολικό διάγραμμα ποσοστού μετατροπής Fe (III) σε Fe (II) σε συγκέντρωση Cellysis 15% του τελικού όγκου της καλλιέργειας για αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Τιμή αρχική COD = 0.6234 gr/L.

3.6 Επαναληπτικό πείραμα παρατήρησης της αναστολής βιοαναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) και πιθανής ταυτόχρονη κατανάλωσης οργανικού φορτίου διαμέσου μικτής καλλιέργειας *Heterotrophic iron reducer (H.I.R)* και καθαρής καλλιέργειας *J1* μικροοργανισμών.

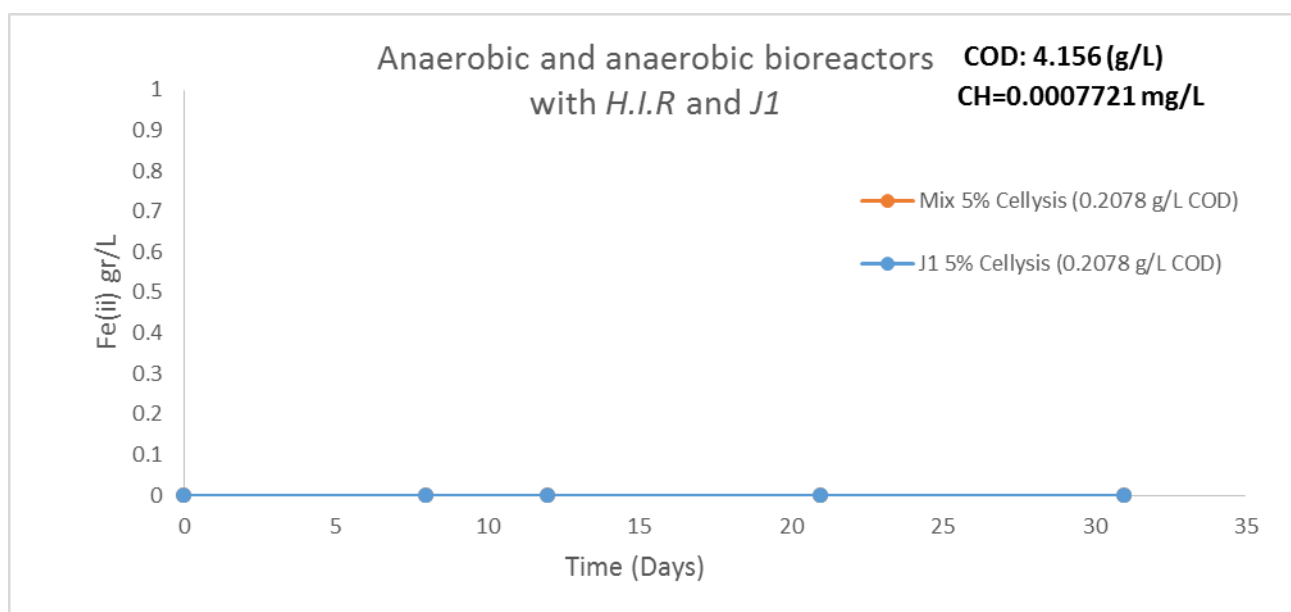
Στο επαναληπτικό πείραμα ελέγχου της αναστολής βιοαναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) διαμέσου μικτής καλλιέργειας *Heterotrophic iron reducer (H.I.R)* και καθαρής καλλιέργειας *J1* μικροοργανισμών στην παρουσία ψηλού οργανικού φορτίου ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία που προγράφηκε στο πείραμα 4.5 με την μόνη διαφοροποίηση να έγκειται στην συγκέντρωση Cellysis στις καλλιέργειες. Στο παρών πείραμα αντί για 15% του συνολικού όγκου της καλλιέργειας Cellysis χρησιμοποιήθηκε μόνο 5% που ανάγεται σε 0.2078 g/L C.O.D. Η σύσταση των καλλιιεργειών παρουσιάζεται πιο κάτω όπως επίσης και τα γραφήματα με την συμπεριφορά των μικροοργανισμών στην παρουσία Cellysis.

Πίνακας 13: Σύσταση αναερόβιας καλλιέργειας.

Culture	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
Mix	5 mL	91 mL	4 mL	100 mL	X2
J1	5 mL	91 mL	4 mL	100 mL	X2

Πίνακας 14: Σύσταση αερόβιας καλλιέργειας.

Culture	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
Mix	5 mL	91ml	4 mL	100 mL	X2
J1	5 mL	91ml	4 mL	100 mL	X2



Διάγραμμα 10: Συνολικό διάγραμμα ποσοστού μετατροπής Fe (III) σε Fe (II) σε συγκέντρωση Cellysis 5% του τελικού όγκου της καλλιέργειας για αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες. Τιμή αρχική COD = 0.2078 gr/L.

Βάση αποτελεσμάτων σε βάθος χρόνου 31 ημερών από την αρχική λειτουργία της καλλιέργειας αν και χρησιμοποιήθηκε μικρότερη ποσότητα οργανικού φορτίου από το προηγούμενο πείραμα, εν τούτοις επίσης δεν παρατηρήθηκε η οποιαδήποτε βιομετατροπή αναγωγής του Fe (III) σε Fe (II). Το γεγονός αυτό επισημοποιεί το συμπέρασμα ότι οι οξεόφιλοι μικροοργανισμοί *Heterotrophic iron reducer (H.I.R)* αδυνατούν τελικά να συμβάλουν θετικά στην βιοαποικοδόμηση του οργανικού φορτίου που περιέχεται στο περιβάλλον τους και εν συνεχεία να ξεπεράσουν δημιουργούμενο stress επαναφέροντας και πάλι την απόδοση βιοεκχύλισης στα επιθυμητά επίπεδα. Ακόμα μια υπόνοια που δημιουργείται είναι ότι πιθανότατα οι μικροοργανισμοί να μην είχαν ενεργοποιηθεί επαρκώς και έτσι να μην κατάφεραν να ανταπεξέλθουν στις ανάγκες του παρόντος πειράματος. Γενικά όμως οι βλέψεις για αντιμετώπιση του προβλήματος αναστολής των βιοδιεργασιών λόγω οργανικού stress στρέφονται προς άλλες κατευθύνσεις αφού οι μικροοργανισμοί *Heterotrophic iron reducer (H.I.R)* μετά την ολοκλήρωση των δύο τελευταίων πειραμάτων αν και ετερότροφοι παρουσίασαν χαμηλή απόδοση κατανάλωσης του οργανικού φορτίου.



Εικόνα 9: Καθαρή J1 και μικτή καλλιέργεια *Heterotrophic iron reducer (H.I.R)* μικροοργανισμών παρουσίας ψηλού οργανικού φορτίου. 0.2078 gr/L.

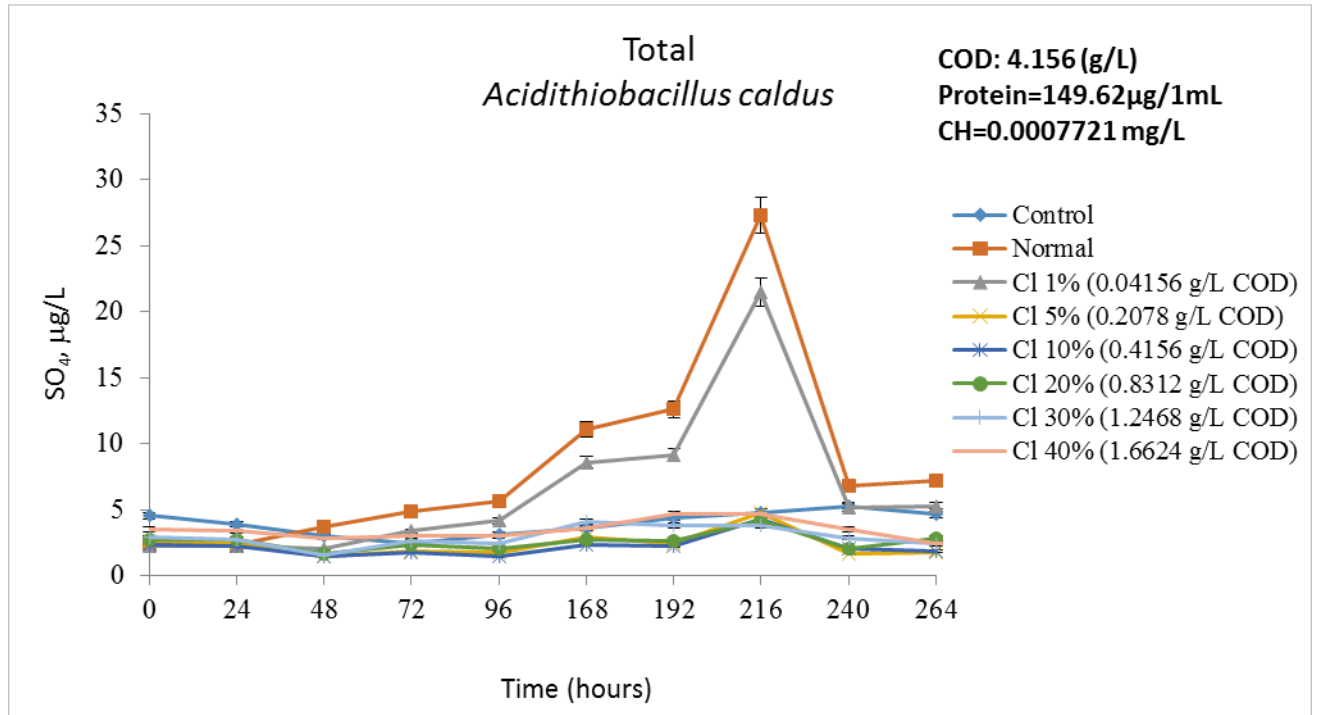
3.7 Πείραμα παρατήρησης της αναστολής βιοοξειδωσης του S⁰ σε SO₄²⁻ παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus caldus* μικροοργανισμών.

Για την πειραματική παρατήρηση της αναστολής βιοοξειδωσης του S⁰ διαμέσου μικροοργανισμών του γένους *Acidithiobacillus caldus* ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στα υπόλοιπα πειράματα με την μόνη διαφορά ότι στις καλλιέργειες τοποθετήθηκαν αντί για δισθενή σίδηρο Fe (II), S⁰ αφού οι μικροοργανισμοί *Acidithiobacillus caldus* όπως περιγράφεται και στο σημείο 6.ΠΙ του θεωρητικού μέρους αδυνατούν να βιοοξειδώσουν τον δισθενή σίδηρο σε τρισθενή. Το παρών πείραμα πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να παρατηρηθεί κατά πόσο το υψηλό οργανικό φορτίο επηρεάζει όχι μόνο τις βιοδιεργασίες οξειδωσης των μετάλλων στους σωρούς βιοεκχύλισης αλλά και των ενώσεων θείου. Πιο κάτω παραθέτονται η σύσταση των καλλιεργειών για το παρών πείραμα και τα αποτελέσματα από την εργαστηριακή παρατήρηση του εν λόγω πειράματος.

Πίνακας 15: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus caldus* σε pH 2-2.5.

	Amount of culture (mL)	Amount of Cellysis (mL)	Media + 5 μg/L S ⁰ (mL)	Total volume (mL)	Times
control	0	0	50	50	X1
normal	2	0	48	50	X 2
CL 40%	2	20	28	50	X 2
CL 30%	2	15	33	50	X 2
CL 20%	2	10	38	50	X 2
CL 10%	2	5	43	50	X 2

CL 5%	2	2.5	45.5	50	X 2
CL 1%	2	0.5	47.5	50	X 2



Διάγραμμα 11: Ποσοστό μετατροπής S^0 σε SO_4^{2-} παρουσία Celllysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 4.156 g/L.

Πίνακας 16: MPN αποτελεσμάτων για *Acidithiobacillus caldus* μικροοργανισμούς στην παρουσία οργανικού φορτίου.

Samples	Number of cells on the first day of experiment / mL	Number of cells on the last day of experiment / mL
Normal	2.5×10^7	6.0×10^6
Cell lysis 20%	6.0×10^6	-
Cell lysis 40%	6.0×10^6	-

Βάση αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του SO_4^{2-} ανά τακτά χρονικά διαστήματα, φαίνεται ότι το διάλυμα Cellysis διαμέσου αύξησης του οργανικού φορτίου των καλλιέργειών αναστέλλει τις βιοδιεργασίες οξείδωσης του S^0 σε SO_4^{2-} . Συγκεκριμένα στις καλλιέργειες με ποσοστό 5, 10, 20, 30 και 40% παρατηρείται παρατεταμένη αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και εν συνεχεία του ποσοστού βιοξείδωσης του στοιχειακού θείου. Ο μικροοργανισμός *Acidithiobacillus caldus* όπως διακρίνεται στο διάγραμμα 11 αλλά και στα αποτελέσματα του MPN πειράματος που φαίνονται πιο πάνω, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία σε υψηλά ποσοστά οργανικού φορτίου αφού μόλις 0.2078 g/L COD ήταν αρκετά για την πλήρη αναστολή του σε βάθος χρόνου.

Βάση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού των μικροοργανισμών *Acidithiobacillus caldus* φαίνεται το ψηλό οργανικό φορτίο της καλλιέργειας όχι μόνο αναστέλλει την βιομετατροπή του S^0 σε SO_4^{2-} αλλά φαίνεται να είναι υπεύθυνο και για το μεγάλο ποσοστό θανάτωσης των μικροοργανισμών. Στο δείγμα απουσίας οργανικού φορτίου ο μικροοργανισμός παρουσιάζει εξαιρετικά μεγάλο ποσοστό ανάπτυξης με μικροβιακή συγκέντρωση ίση με 6.0×10^6 cells / mL, ενώ στα δείγματα 20 και 40% περιεκτικότητα σε Cellysis του τελικού όγκου της καλλιέργειας, το ποσοστό ανάπτυξης είναι μηδενικό



Εικόνα 10: Καλλιέργειες *Acidithiobacillus caldus* μικροοργανισμών παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου Cellysis. pH = 2-2.5.

3.8 Ανάπτυξη ετερότροφων μικροοργανισμών *Acidocella aminolytica* (ACRBs) προς κατανάλωση οργανικού φορτίου του διαλύματος Cellysis.

Στο πλαίσιο εύρεσης λύσης για καταπολέμηση του ανασταλτικού παράγοντα της βιομετατροπής του Fe (II) σε Fe (III) λόγω της ύπαρξης ψηλού οργανικού φορτίου ελέγχθηκε κατά ποσό οι μικροοργανισμοί *Acidocella aminolytica* (ACRBs) οι οποίοι απομονώθηκαν στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, ως ετερότροφοι και άκρος αποδοτικοί στην κατανάλωση έντονων οργανικών υποστρωμάτων, μπορούν τελικά να αποτελέσουν το κλειδί στην επαναφορά της απόδοσης των βιοδιεργασιών μικροοργανισμών που εδραιώνονται σε όξινα μεταλλευτικά περιβάλλοντα.

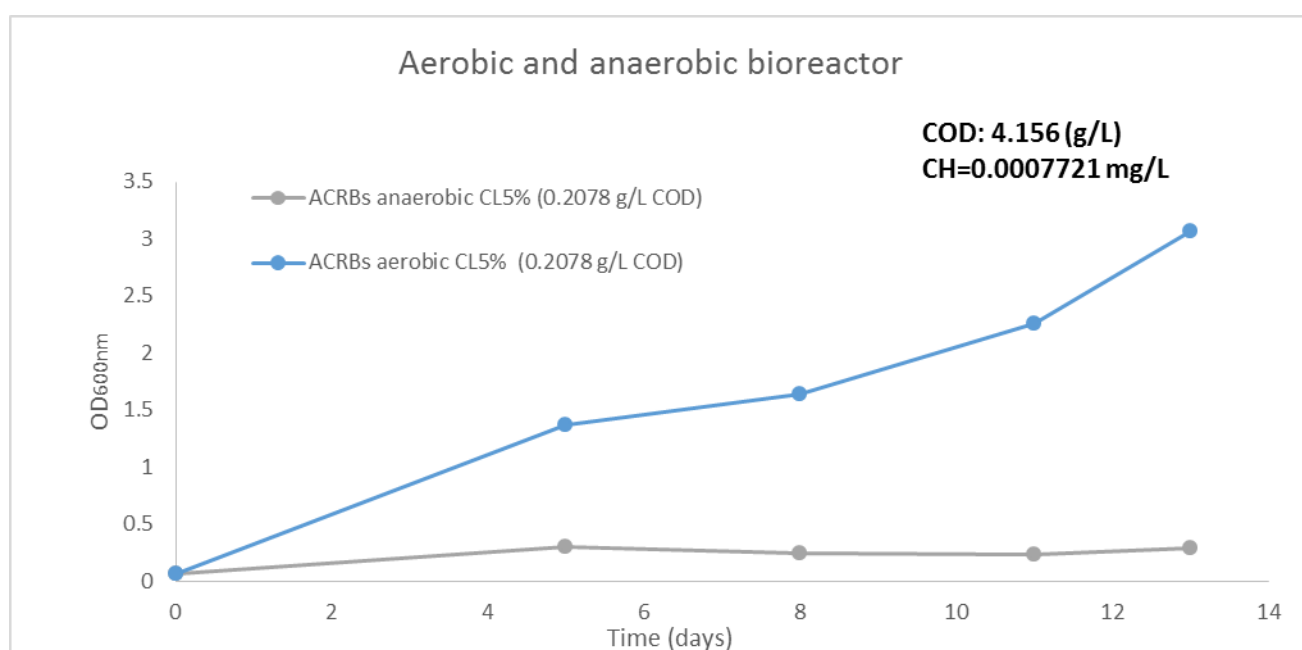
Αρχικά οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε μικτή υγρή και στερεή καλλιέργεια με όλες τις προϋποθέσεις ανάπτυξης ετερότροφων μικροοργανισμών όπως ακριβώς περιγράφετε στο σημείο 2.3 και 2.4 του δεύτερου κεφαλαίου. Στην συνέχεια για να εξακριβωθεί κατά πόσο οι μικροοργανισμοί μπορούν τελικά να καταναλώσουν το οργανικό φορτίο του διαλύματος Cellysis δημιουργήθηκαν αερόβιοι και αναερόβιοι βιαντιδραστήρες με την ύπαρξη Cellysis ως μόνη πηγή άνθρακα. Η σύσταση των καλλιέργειών αλλά και τα αποτελέσματα της ανάλυσης οπτικής πυκνότητας στα 600 nm παρουσιάζονται στους πίνακες και στο διάγραμμα που ακολουθούν.

Πίνακας 17: Σύσταση αναερόβιας καλλιέργειας *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών με Cellysis ως πηγή θρεπτικών.

Culture	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
control	5 mL	95 mL	0 mL	100 mL	X2
ACRBs	5 mL	91 mL	4 mL	100 mL	X2

Πίνακας 18: Σύσταση αερόβιας καλλιέργειας *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών με Cellysis ως πηγή θρεπτικών.

Culture	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
control	5 mL	95 mL	0 mL	100 mL	X2
ACRBs	5 mL	91 mL	4 mL	100 mL	X2



Διάγραμμα 12: Συνολικό διάγραμμα ποσοστού ανάπτυξης *Acidocella aminolytica* (ACRBs) με θρεπτικό υπόστρωμα Cellysis 5% του τελικού όγκου της καλλιέργειας για αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες. Τιμή COD = 0.2078 g/L.

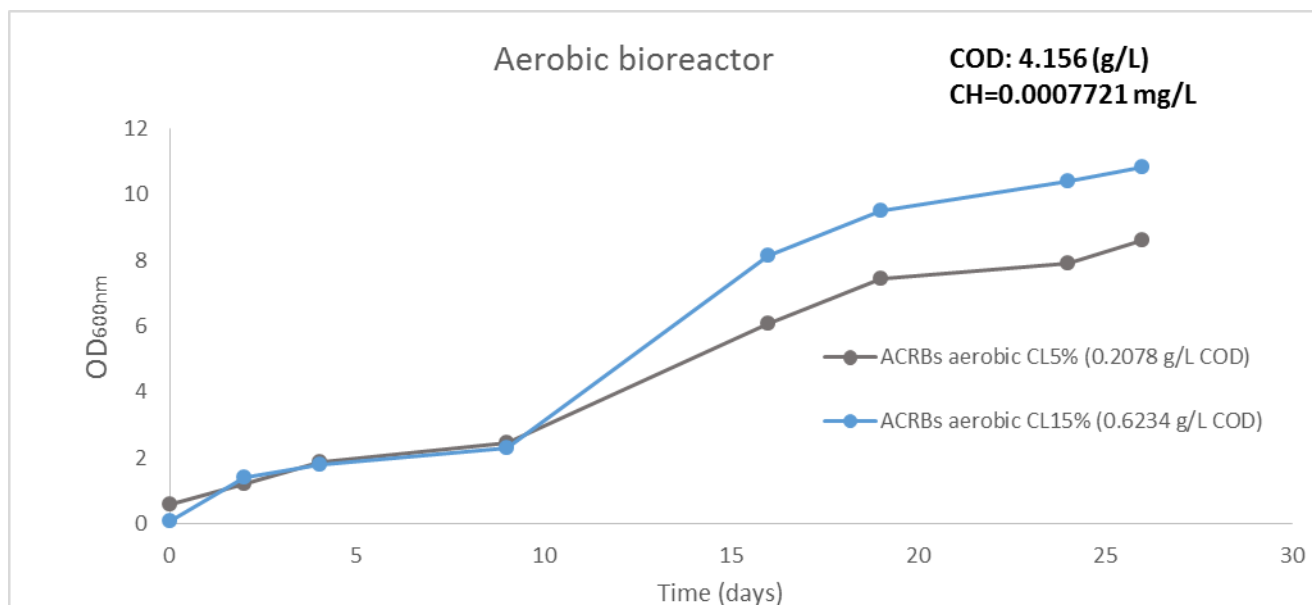
Βάση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης οπτικής παρατήρησης οι μικροοργανισμοί ACRBs παρουσιάζουν την ικανότητα αποικοδόμησης του Cellysis και χρησιμοποίησης του ως θρεπτικό υπόστρωμα. Βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης παρουσιάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες αφού σε διάστημα 14 ημερών οι μικροοργανισμοί παρουσίασαν ανάπτυξη πέραν των 3 μονάδων οπτικής πυκνότητας.

3.9 Επαναληπτικό πείραμα ανάπτυξη ετερότροφων μικροοργανισμών *Acidocella aminolytica* (ACRBs) προς κατανάλωση οργανικού φορτίου του διαλύματος Cellysis περιεκτικότητα 5% και 15% του συνολικού όγκου της καλλιέργειας.

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για να εξακριβωθεί κατά πόσο όντως οι μικροοργανισμοί *Acidocella aminolytica* (ACRBs) παρουσιάζουν την ικανότητα χρησιμοποίησης του Cellysis ως θρεπτικό υπόστρωμα αλλά επίσης και να διερευνηθεί πως οι εν λόγω μικροοργανισμοί συμπεριφέρονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου. Έτσι ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία δημιουργίας καλλιεργειών όπως και στο πείραμα 4.7 με την μόνη διαφοροποίηση ότι δημιουργήθηκαν μόνο αερόβιες καλλιέργειες περιεκτικότητα 5% (COD = **0.2078gr/L**) και 15% (COD = **0.6234 g/L**) του συνολικού ενεργού όγκου. Η σύσταση των καλλιεργειών παρουσιάζεται πιο κάτω όπως επίσης παρουσιάζεται και το διάγραμμα των αποτελεσμάτων της οπτικής παρατήρησης στα 600 nm.

Πίνακας 19: Σύσταση αερόβιας καλλιέργειας ACRBs μικροοργανισμών με Cellysis ως πηγή θρεπτικών.

TYPE	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
Control 5%	5 mL	95 mL	0 mL	100 mL	X1
ACRBs 5%	5 mL	91 mL	5 mL	100 mL	X2
Control 15%	15 mL	80 mL	0 mL	100 mL	X1
ACRBs 15%	15 mL	80 mL	5mL	100 mL	X2



Διάγραμμα 13: Συνολικό διάγραμμα ποσοστού ανάπτυξης *Acidocella aminolytica* (ACRBs) με θρεπτικό υπόστρωμα Cellysis 5% και 15% του τελικού όγκου της καλλιέργειας για αερόβιες συνθήκες. Τιμή COD_{5%} = 0.2078 g/L και COD_{15%} = 0.6234 g/L.

Βάση των γραφημάτων που προκύπτει από την ανάλυση οπτική πυκνότητα των υπό εξέταση δειγμάτων επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί *Acidocella aminolytica* (ACRBs) διαθέτουν την ικανότητα αποικοδόμησης του οργανικού ποσοστού που διαθέτει το διάλυμα Cellysis. Βάση των καμπύλων στην περίπτωση της καλλιέργειας με περιεκτικότητα 15% Cellysis το οποίο βάση αναλογίας ανάγεται σε **0.6234 g/L** οργανικού μίγματος οι μικροοργανισμοί σε βάθος χρόνου 25 ημερών παρουσίασαν πιο έντονη ανάπτυξη εν σύγκριση με την καλλιέργεια με περιεκτικότητα 5% του συνολικού του όγκου και ακριβής ποσότητα **0.2078 g/L** οργανικής. Το γεγονός αυτό είναι ενθαρρυντικό αφού οι μικροοργανισμοί φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό κατανάλωσης των δύσκολα έμμονων οργανικών τα οποία περιέχονται στην μικροβιακή λάσπη της τριτοβάθμιας επεξεργασίας αποβλήτων του Σ.Α.Λ.Α. Τέλος βάση ανάλυσης για τον προσδιορισμό του C.O.D των βιαντιδραστήρων επισφραγίζεται το συμπέρασμα ότι οι εν λόγω μικροοργανισμοί μειώνουν την περιεκτικότητα των οργανισμών στο περιβάλλον τους αφού σε αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την 9 ημέρα δραστηριότητας τόσο για τις καλλιέργειες των 15% και 5% σε περιεκτικότητας Cellysis η τιμή του οργανικού φορτίου μειώθηκε στα **0.5235 g/L** και **0.187 g/L** για τους δύο βιαντιδραστήρες αντίστοιχα.

3.10 Παρατήρησης της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* σε συνδυασμό με *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών.

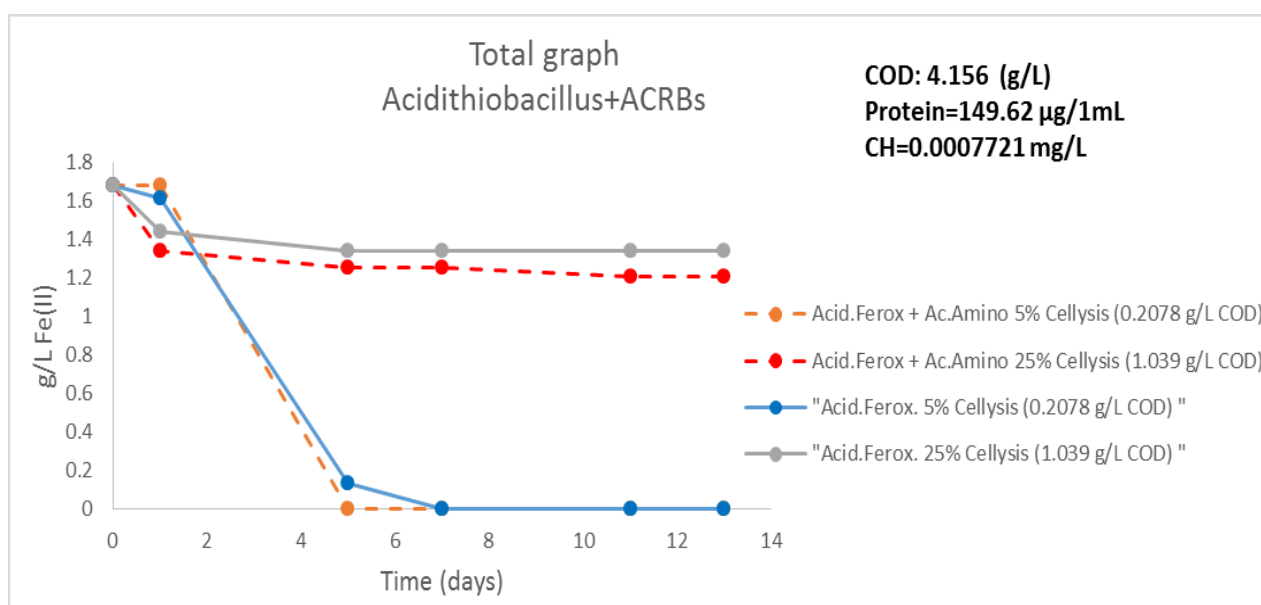
Το παρόν πείραμα αποτελεί μια εναλλακτική λύση ένατη αυτής που δοκιμάστηκε στα πειράματα 3.5 και 3.6 του παρόντος κεφαλαίου για την υπερπήδηση του σημείου στασιμότητας που προκαλείτε στην περίπτωση ύπαρξης υψηλού οργανικού ποσοστού στο περιβάλλον των οξεόφιλων μικροοργανισμών. Έτσι ακριβώς όπως και στα προηγούμενα πειράματα δημιουργήθηκαν καλλιέργειες οι οποίοι περιείχαν 5% και 25% του τελικού τους όγκου Cellysis. Για τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 mL οι οποίες καλύφθηκαν με χαρτί και αλουμινόχαρτο για ελεγχόμενο αερισμό τους αλλά επίσης και μείωση της πιθανότητας επιμόλυνσης τους. Ως καλλιέργειες μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν *Acidithiobacillus ferrooxidans* αφού βάση προηγούμενων πειραματικών ελέγχων αλλά και βάση βιβλιογραφίας αποτελούν τους πιο δραστήριο γένος εκ των οξεόφιλων *Iron oxidizer* μικροοργανισμών. Επίσης στις καλλιέργειες τοποθετήθηκαν και μικροοργανισμοί *Acidocella aminolytica* (ACRBs) από το τρέχον πείραμα 3.8 του ίδιου κεφαλαίου αλλά επίσης και ποσότητα από είδη ανεπτυγμένες αποικίες σε στερεό υπόστρωμα, αφού αποδείχθηκε ότι οι εν λόγω μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν το έντονο οργανικό φορτίου του διαλύματος Cellysis ως πηγή θρεπτικών. Για σκοπούς καλύτερης παρατήρησης εκτός από τους μικτές καλλιέργειες με *Acidithiobacillus ferrooxidans* και *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμούς δημιουργήθηκαν και αποκλειστικοί καλλιέργειες με *Acidithiobacillus ferrooxidans* μικροοργανισμούς ως μέτρο σύγκρισης της ταχύτητας οξείδωσης μεταξύ απουσίας και παρουσίας των *Acidocella aminolytica* (ACRBs) και εν συνεχεία να εξακριβωθεί αν τελικά τα δύο είδη μπορούν να λειτουργήσουν συνεργιστικά έτσι ώστε να ξεπεραστεί το σημείο στασιμότητας. Η σύσταση των καλλιεργειών όπως επίσης και το συνολικό διάγραμμα της βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσιάζονται πιο κάτω.

Πίνακας 20: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* σε συνδυασμό με *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών σε pH 2-2.2.

	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
CL 5%	5 mL	90 mL	5 mL	100 mL	X3
CL 25%	25 mL	70 mL	5 mL	100 mL	X3

Πίνακας 21: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* απουσία *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών σε pH 2-2.2.

	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
CL 5%	5 mL	90 mL	5 mL	100 mL	X2
CL 25%	25 mL	70 mL	5 mL	100 mL	X2



Διάγραμμα 14: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe(III) παρουσία Cellysis με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 4.156 g/L παρουσία και απουσία *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών .

Βάση των αποτελεσμάτων από την πειραματική παρατήρηση της βιομετατροπής του Fe (II) σε Fe (III) στο παρόν πείραμα εμφανίζεται μια θετική εξέλιξη όσων αφορά την διερεύνηση του ανασταλτικού παράγοντα που παρατηρείται στην παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου. Οι μικροοργανισμοί ACRBs όντας ετερότροφοι διαθέτουν την ικανότητα να βιοδιασπούν το έντονο οργανικό φορτίο που διαθέτει το διάλυμα Cellysis και με αυτό τον τρόπο να συμβάλουν ευεργετικά στην βιοοξειδωση του Fe (II) σε Fe (III) αφού πλέων το οργανικό φορτίο των καλλιέργειών χαμηλώνει σε τέτοια επίπεδα έτσι ώστε να μπορούν πλέων οι μικροοργανισμοί *Acidithiobacillus ferrooxidans* να λειτουργήσουν σε φυσιολογική βάση. Βάση της καμπύλης που δημιουργείται για τις καλλιέργειες με περιεκτικότητα Cellysis 5% του συνολικού όγκου της καλλιέργειας στην περίπτωση συνύπαρξης μικτής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* και *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών η ταχύτητα πλήρους οξειδωσης του δισθενούς σιδήρου ήταν μεγαλύτερη από αυτή που παρουσιάζει η καθαρή καλλιέργεια *Acidithiobacillus ferrooxidans* μικροοργανισμών.

Ακόμα μία παρατήρηση που πηγάζει από τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του δισθενούς σιδήρου στις καλλιέργειες με περιεκτικότητα 25% του συνολικού όγκου των καλλιέργειών Cellysis, είναι ότι η καμπύλη που αντιστοιχεί στην μικτή καλλιέργεια μικροοργανισμών, αρχικά παρουσιάζει μια μικρή μεταβολή στην βιοοξειδωση του δισθενή σιδήρου σε τρισθενή στην συνέχεια όμως παρουσιάζεται απενεργοποίηση όλων βιοδιεργασιών, πράγμα που συμβαίνει επίσης και στις καθαρές καλλιέργειες *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ακόμα και οι μικροοργανισμοί *Acidocella aminolytica* (ACRBs) αδυνατούν να αντεπεξέλθουν σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου, αφού αυτό φαίνεται να τους σκοτώνει.



Εικόνα 11: Καθαρές και μικτές καλλιέργειες *Acidithiobacillus ferrooxidans* και *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου.

3.11 Επαναληπτικό πείραμα παρατήρησης της αναστολής βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία οργανικού φορτίου διαμέσου καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* σε συνδυασμό με *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών.

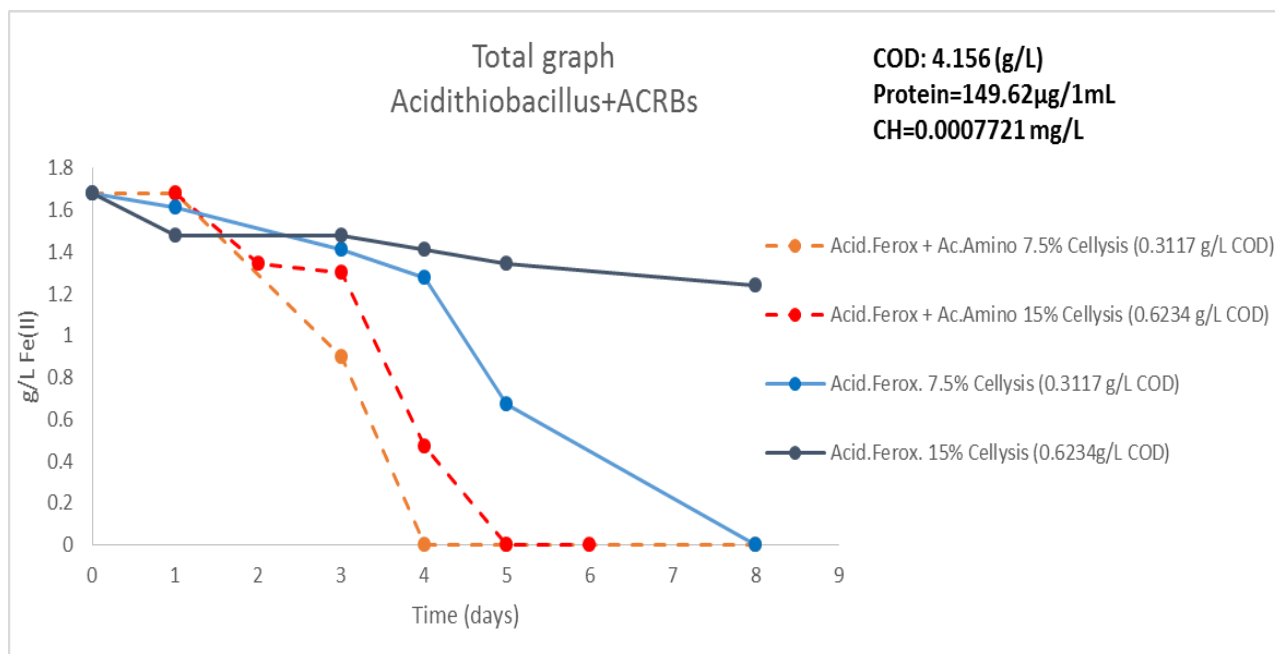
Αφού πλέον βάση των αποτελεσμάτων του πειράματος 4.9 είναι γνωστό ότι οι μικροοργανισμοί *Acidocella aminolytica* (ACRBs) παρουσιάζουν ευεργετική δράση όσον αφορά την παρατήρηση αναστολής της βιοοξειδωσης του δισθενή σε τρισθενή σιδήρου διαμέσου οξεόφιλων μικροοργανισμών, στο παρών πείραμα έγινε προσπάθεια παρατήρησης της εν λόγω ιδιότητας σε ψηλές συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου από τη στην προηγούμενη πειραματική άσκηση. Έτσι ακριβώς όπως και στα προηγούμενα πειράματα δημιουργήθηκαν καλλιέργειες οι οποίοι περιείχαν 7.5% και 15% του τελικού τους όγκου Cellysis. Ενώ και πάλι για τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες των 250 mL οι οποίες καλύφθηκαν με χαρτί και αλουμινόχαρτο για ελεγχόμενο αερισμό τους αλλά επίσης και μείωση της πιθανότητας επιμόλυνσης τους. Οι συνθήκες πειραματικής παρατήρησης για τα πειράματα 3.9 και 3.10 ήταν ακριβώς πανομοιότυπες με την μόνη διαφοροποίηση να βρίσκεται στην πειραματική παρατήρηση της περιεκτικότητας των καλλιεργειών σε Cellysis. Η σύσταση των καλλιεργειών όπως επίσης και το συνολικό διάγραμμα της βιοοξειδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσιάζονται πιο κάτω.

Πίνακας 22: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* σε συνδυασμό με *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών σε pH 2-2.2.

	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
CL 7.5%	7.5 mL	87.5 mL	5 mL	100 mL	X3
CL 25%	15 mL	80 mL	5 mL	100 mL	X3

Πίνακας 23: Σύσταση καλλιεργειών για έλεγχο της αναστολής των μικροοργανισμών καθαρής καλλιέργειας *Acidithiobacillus ferrooxidans* απουσία *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών σε pH 2-2.2.

	Cellysis	Media + 5gr/L Fe (III)	Bacteria	Total volume	Times
CL 7.5%	7,5 mL	87.5 mL	5 mL	100 mL	X2
CL 25%	15 mL	80 mL	5 mL	100 mL	X2



Διάγραμμα 15: Ποσοστό μετατροπής Fe (II) σε Fe (III) παρουσία *Cellysis* με περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο 4.156 g/L παρουσία και απουσία *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών .



Εικόνα 12: Καθαρές και μικτές καλλιέργειες *Acidithiobacillus ferrooxidans* και *Acidocella aminolytica* (ACRBs) μικροοργανισμών παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου.

Βάση των αποτελεσμάτων από την πειραματική παρατήρηση της βιομετατροπής του Fe (II) σε Fe (III) στο παρών πείραμα επισφραγίζεται η πειραματική παρατήρηση του γεγονότος ότι οι μικροοργανισμοί ACRBs αποτελούν την λύση του προβλήματος του φαινομένου αναστολής

των βιοδιεργασιών των οξεόφιλων μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα βάση των προκύπτων καμπυλών που δημιουργούνται από τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των καλλιέργειών σε δισθενή σίδηρο ανά τακτά χρονικά διαστήματα, διακρίνεται ότι στις καλλιέργειες με μικτή καλλιέργεια *Acidithiobacillus ferrooxidans* και *ACRBs* μικροοργανισμών ο ρυθμός βιοξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III) παρουσία Cellysis περιεκτικότητα 7.5% και 15% οι οποίες ανέρχονται βάση αναλογίας στα 0.3117 g/L και 0.6234 g/L αντίστοιχα, παρουσιάζεται αυξημένος με την πλήρη οξείδωση των δειγμάτων να παρατηρείται στις 4 και 5 ημέρες αντίστοιχα. Οι καθαρές καλλιέργειες *Acidithiobacillus ferrooxidans* μικροοργανισμών βάση και προηγούμενων πειραμάτων παρουσιάζουν αισθητή αναστολή των βιοδιεργασιών σε βάθος χρόνου σε περιεκτικότητα Cellysis 7.5% του τελικού της καλλιέργειας, ενώ για περιεκτικότητα 15% παρατηρείται σχεδόν στασιμότητα της βιομετατροπής του Fe (II) σε Fe (III).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- * Γενικά στην παρούσα ερευνητική διατριβή αρχικός στόχος ήταν ο προσδιορισμός του ποσοστού αναστολής οξεόφιλων μικροοργανισμών που εδραιώνονται σε όξινα μεταλλευτικά περιβάλλοντα, στην παρουσία οργανικού φορτίου και εν συνεχεία η εύρεση μίας βιοτεχνολογικής μεθόδου για αντιμετώπιση του φαινομένου.
- * Διαμέσου των πειραματικών παρατηρήσεων βρέθηκε ότι το ποσοστό αναστολής των βιοδιεργασιών των εν λόγω μικροοργανισμών είναι άμεσα συνυφασμένο με την περιεκτικότητα των καλλιέργειών σε οργανικό φορτίο.
- * Οι μικροοργανισμοί *Acidithiobacillus ferroxidans* οι οποίοι είναι ένα από τα πιο δραστικά γένη που συμμετέχουν στις διεργασίες βιοεκχύλισης, στην περίπτωση όπου στις καλλιέργειες υπήρχε περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο της τάξης των 0.341g/L COD η παρατήρηση αναστολής των βιοδιεργασιών οξείδωσης του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή διήρκησε μόλις 2 με 3 μέρες. Σε αντίθεση, στο επαναληπτικό πείραμα όπου στις καλλιέργειες τοποθετήθηκε ποσότητα οργανικού της τάξης των 0.8312g/L COD και πάνω, οι διεργασίες οξείδωσης παρουσιάζουν παρατεταμένη αναστολή σε βάθος χρόνου. Επιπρόσθετα, βάση των πειραμάτων MPN που πραγματοποιήθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις διαλύματος Cellysis, οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό θνησιμότητας.
- * Στο πλαίσιο των πειραματικών παρατηρήσεων εξετάστηκαν επίσης οι μικροοργανισμοί *Leptosirillum ferrophilum* και *Acidithiobacillus caldus* οι οποίοι πραγματοποιούν βιοδιεργασίες οξείδωσης του Fe (II) σε Fe (III) και S⁰ σε SO₄²⁺ αντίστοιχα. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί παρουσίασαν τα ίδια αποτελέσματα αναστολής με του μικροοργανισμούς *Acidithiobacillus ferroxidans* αφού στην παρουσία υψηλού οργανικού της τάξεως των 0.8312g/L COD και πάνω, οι διεργασίες οξείδωσης παρουσιάζουν παρατεταμένη αναστολή σε βάθος χρόνου. Επίσης βάση των αποτελεσμάτων από τον προσδιορισμό του μικροβιακού πληθυσμού (MPN) παρουσιάστηκαν υψηλά ποσοστά θνησιμότητας και στις δύο καλλιέργειες τα οποία κυμάνθηκαν από 6.0 x 10⁶ κύτταρα στις καλλιέργειες με μηδενική περιεκτικότητα σε οργανικά σε μηδενικό αριθμό κυττάρων στις καλλιέργειες με συγκέντρωση σε οργανικά 0.8312g/L COD .
- * Στο πλαίσιο εύρεσης μιας βιοτεχνολογικής μεθόδου για την εξάλειψη του εν λόγω φαινομένου, δημιουργήθηκαν καλλιέργειες με *Heterotrophic Iron Reducer (HIR)* μικροοργανισμών αλλά και καθαρές καλλιέργειες *Acidiphilium cryptum (JI)*. Η

επιλογή των εν λόγω μικροοργανισμών έγινε αφού όντας ετερότροφοι πιθανότατα να παρουσίαζαν την ικανότητα βιοαποικοδόμησης του οργανικού φορτίου και εν συνέχεια επαναφοράς της χαμένης απόδοσης των βιοδιεργασιών βιοεκχύλισης. Τελικά οι μικροοργανισμοί δεν στάθηκαν ικανοί να βιοαποικοδομήσουν το οργανικό φορτίο αφού και αυτοί σε υψηλές συγκεντρώσεις Cellysis παρουσίασαν υψηλό ποσοστό θνησιμότητας.

- * Τέλος, διαμέσου των μικροοργανισμών μικτής καλλιέργειας *Acidocella* (ACRBs) αλλά και καθαρής καλλιέργειας *Acidocella Aminolytica* οι οποίοι απομονώθηκαν στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μηχανικής του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, επιτεύχθηκε η υπερπήδηση του σημείου στασιμότητας και εν συνέχεια η αύξηση της απόδοσης των βιοδιεργασιών βιοεκχύλισης. Οι μικροοργανισμοί ACRBs τοποθετήθηκαν σε καλλιέργειες σε συνδυασμό με μικροοργανισμούς *Acidithiobacillus ferroxidans* παρουσία Cellysis. Ο ρυθμός βιομετατροπής του Fe (II) σε Fe (III) στην περίπτωση συνύπαρξης των δύο γενών μικροοργανισμών ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με τις καθαρές καλλιέργειες *Acidithiobacillus ferroxidans*, τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές συγκεντρώσεις οργανικού φορτίου.

Μελλοντική Έρευνα:

- Σε μελλοντικά στάδια θα πραγματοποιηθούν πειραματικές παρατηρήσεις της αναστολής των βιοδιεργασιών βιοεκχύλισης Cu^+ (χαλκού) στην παρουσία υψηλού οργανικού φορτίου αντί για δισθενή σιδήρου (Fe (II)). Η επιλογή του χαλκού γίνεται έτσι ώστε να δοθούν πιο ρεαλιστικές συνθήκες παρατήρησης του φαινομένου της αναστολής, όπως ακριβώς συμβαίνει και στις σορούς βιοεκχύλισης του Μεταλλείου της Σκουριώτισσας. Στην συνέχεια θα εφαρμοστεί ακριβός η ίδια διαδικασία πειραματικής παρατήρησης της συμπεριφοράς των οξειδωτικών βακτηρίων σε συνδυασμό με ACRBs μικροοργανισμούς για να διερευνηθεί κατά πόσο μπορεί να ξεπεραστεί και πάλι το σημείο αναστολής.
- Ακόμη μια μελλοντική πειραματική παρατήρηση που μπορεί να πραγματοποιηθεί είναι η δημιουργία καλλιέργειών ACRBs μικροοργανισμών προς παρατήρηση της ικανότητας βιοδιάσπασης εξωπολυσακχαριτών που πιθανότητα να δημιουργούνται από τους οξεόφιλους μικροοργανισμούς και ενδεχόμενος να συνεισφέρουν στο φαινόμενο αναστολής των βιοδιεργασιών βιοεκχύλισης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arthur P. Harrison Jr, *Acidiphilium cryptum* gen. nov., sp. nov., Heterotrophic Bacterium From Acidic Mineral Environments, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 01/07/1981.

<http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem>

- Δρ. Κ. Ε. Βοργιάς, Δομής και Λειτουργίας Πρωτεϊνών, Φωτομετρία, Protein Determination, 1993.

<https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/BIOL199/Fotometria.pdf>

- Γεώργιος Αγγελής. 2007. Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία.
- D.B. Johnson, T.A.M. Bridge, Reduction of ferric iron by acidophilic heterotrophic bacteria: evidence for constitutive and inducible enzyme systems in *Acidiphilium* spp., D.B. Johnson School of Biological Sciences, University of Wales, Bangor, February 2002.

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2002.01535.x/full>

- Eric. A. Marchand , Joann Silverstein, Influence of Heterotrophic Microbial Growth on Biological Oxidation of Pyrite, Department of Civil Engineering, University of Nevada, Colorado, 2002.

- George M Garrity , Bergey's manual of systematic bacteriology. / Volume Two, The proteobacteria. Part C, New York , Springer, 2005.

<https://books.google.com.cy/books?id=dgejA4wa5R4C&pg=PA67&lpg=PA67&dq=Acidocella+aminolytica+characteristics&source=bl&ots=cX1OBSzJgh&sig=Uraapd>

mQiiGnq06Z4xcccDuGcNQ&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwigtavgmqfMhVILcAKHSrLAUoQ6AEILDAD#v=onepage&q=Acidocella%20aminolytica&f=false

- Jorge Valdes, Raquel Quatrini, Kevin Hallberg, Mark Dopson³, Pablo D. T. Valenzuela, and David S. Holmes, Draft Genome Sequence of the Extremely Acidophilic Bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 Reveals Metabolic Versatility in the Genus *Acidithiobacillus*, ¹Center for Bioinformatics and Genome Biology, Bangor University ,6 July 2009.

<http://jb.asm.org/content/191/18/5877.full>

- K. Harneit , A. Göksel, D. Kock¹, J.-H. Klock, T. Gehrke², W. Sand ,Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*, Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Dept. Microbiology Ohnhorststr, Hamburg, Germany, 15 May 2006.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304386X06000983>

- Nicolette J. Coram and Douglas E. Rawlings, Molecular Relationship between Two Groups of the Genus *Leptospirillum* and the Finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. Dominates South African Commercial Biooxidation Tanks That Operate at 40°C, Department of Microbiology, University of Stellenbosch , 7 November 2001.

<http://aem.asm.org/content/68/2/838.short>

- Richard A. Bone^{*}, John T. Landrum[†], Araceli Cains^{*}, Optical density spectra of the macular pigmentin vivo and in vitro, Department of Physics, Florida International University, University Park Campus, Miami, FL 33199, U.S.A., January, 1992.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0042698992901183>

- Scott Sutton, The Most Probable Number Method and Its Use in QC Microbiology, Journal of GXP Compliance, The Microbiology Network , 2010.

<http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/QCMicrobiology.pdf>

- Tesfayohanes Yacob,* Sachin Pandey, JoAnn Silverstein, and Harihar Rajaram, Soluble Microbial Products Decrease Pyrite Oxidation by Ferric Iron at $\text{pH} < 2$, Departments of Civil, Environmental, and Architectural Engineering, University of Colorado, June 18, 2013.