

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Μεταπτυχιακή διατριβή
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΟΜΑΔΑΣ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΙΑ ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ
BILGE WASTE

Μιχαήλ Φωτούλα

Λεμεσός 2016

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

Μεταπτυχιακή Διατριβή
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΟΜΑΔΑΣ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΙΑ ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ
BILGE WASTE

Μιχαήλ Φωτούλα
Επιβλέπων Καθηγητής
Δρ Ιωάννης Βυρίδης

Λεμεσός 2016

ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΟΜΑΔΑΣ ΑΠΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ
ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΓΙΑ ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗ
ΤΟΥ BILGE WASTE**

Παρουσιάστηκε από

Φωτούλα Μιχαήλ

Επιβλέπων καθηγητήςΔρ.Ιωάννης Βυρίδης.....

Μέλος επιτροπής:Δρ.Μιχάλης Κουτίνας.....

Μέλος επιτροπής:Δρ.Μάρλεν Βάσκες.....

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

[Μάιος, 2016]

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright ©Φωτούλα Μιχαήλ 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών σπουδών Περιβαλλοντικές Βιοεπιστήμες και Τεχνολογία στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή Δρ. Ιωάννη Βυρίδη που με στήριξε στην προσπάθεια αυτή παρέχοντας μου ταυτόχρονα την πολύτιμη και καταλυτική καθοδήγηση του μέσα από ένα ευχάριστο κλίμα συνεργασίας για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για το χρόνο που μου αφιέρωσε καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω την διδακτορικό Ευτυχία Μαρία Δράκου της οποίας η βοήθεια, οι συμβουλές και η καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν καταλυτική και για την υπομονή που υπέδειξε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για τη συμπαράσταση, οικονομική και ηθική, και την κατανόηση τους σε όλο το διάστημα των σπουδών μου καθώς και για την ανελλιπή στήριξη και υπομονή που μου έδειξαν όλα αυτά τα χρόνια ούτως ώστε να πετύχω τους στόχους μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος Περιβαλλοντικές Βιοεπιστήμες και Τεχνολογία του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου με τίτλο «*Δημιουργία ομάδας από επιλεγμένα μικροβιακά στελέχη για βιοδιάσπαση του bilge waste*» Σκοπός της εργασίας είναι η εύρεση κατάλληλων στελεχών – ομάδας μικροοργανισμών για την αποτελεσματική και γρήγορη βιοδιάσπαση του bilge waste.

Αρχικά, στο πρώτο κεφάλαιο με τίτλο «*Θεωρητικό Υπόβαθρο*» γίνεται αναφορά στη βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου. Αναφέρονται χαρακτηριστικά και σύσταση του bilge waste και για τη βιοαποικοδόμηση των υδρογονανθράκων. Έπειτα γίνεται αναφορά για τις συμβατές διαλυτές ουσίες, το εμπορικό carrier Mutag BioChip™, τα τσόφλια αυγών και για την προσθήκη νιτρικών σε συνθήκες υψηλής αλατότητας που διαθέτει το απόβλητο για προσαρμογή.

Στο δεύτερο κεφάλαιο με τίτλο «*Πειραματικές Μεθόδους και Τεχνικές*» περιγράφεται η θεωρεία των μικροβιολογικών και βιοχημικών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν. Γίνεται αναφορά στις διαδικασίες απομόνωσης των μικροοργανισμών, στα θρεπτικά υλικά, στις τεχνικές αποστείρωσης και απολύμανσης καθώς επίσης στην ασηπτική τεχνική και φυγοκέντρωση. Τέλος περιγράφονται οι βιοχημικές τεχνικές η φασματοσκοπία UV-VIS και η αναλυτική μέθοδος του COD.

Στο τρίτο κεφάλαιο με τίτλο «*Πειραματικό Μέρος*» περιγράφεται η πειραματική διαδικασία που θα ακολουθείτο για τη βιοδιάσπαση του bilge water. Επιπλέον αναλύονται οι βιολογικές μεθόδους που πραγματοποιήθηκαν για ακινητοποίηση των κυττάρων. Αρχικά αναφέρεται η προσθήκη συμβατών διαλυτών ουσιών για προσαρμογή σε υψηλή αλατότητα που διαθέτει το απόβλητο και στη συνέχεια ο συνδυασμός τους με νιτρικά για βιοδιάσπαση του αποβλήτου. Στη συνέχεια εξετάστηκαν διάφορα βακτηριακά στελέχη για δημιουργία ομάδας βακτηρίων που σχηματίζουν βιοφίλμ με προσθήκη του εμπορικού carrier Mutag BioChip™ σε influent και effluent bilge waste. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια νέα μέθοδος για την ακινητοποίηση των βακτηρίων που είναι τα κελύφη αυγών που φαίνεται να είναι πολύ αποδοτικά.

Στο τέταρτο κεφάλαιο με τίτλο «*Αποτελέσματα-Συζήτηση Αποτελεσμάτων*» παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο με τίτλο *Συμπεράσματα – Μελλοντική Έρευνα* παραθέτονται τα συμπεράσματα που έχουν προκύψει από τα πειραματικά αποτελέσματα στα πλαίσια της παρούσας Πτυχιακής Διατριβής, καθώς και εισηγήσεις για μελλοντική έρευνα στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε.

ABSTRACT

This thesis is a part of the Master program Environmental Life Sciences and Technology of the Technological University of Cyprus entitled "Creating group of selected microbial strains for biodegradation of bilge waste" aims to investigate the biodegradation of bilge wastewater through a constructed microbial consortium.

To begin with, in the first chapter entitled "Theoretical Background" refers to the biological treatment of waste. It indicates the characteristics and composition of bilge and biodegradation of hydrocarbons. After referring to the compatible solutes, the commercial carrier Mutag BioChip™, the shells of eggs and adding nitrates in high salinity conditions available to the waste for adjustment.

The second chapter is named "Experimental Methods and Techniques" and describes the theory of microbiological and biochemical techniques that have been used for immobilization of cells. This chapter references to isolate processes of microorganisms in culture media, the sterilization and disinfection techniques, as well as to aseptic technique and centrifugation. Finally, it describes biochemical techniques, the UV-VIS spectroscopy and the analytical method of COD.

The third chapter is called "Experimental" and describes the experimental procedure for the biodegradation of bilge water. In addition, it explains the biological methods that have been used. Firstly, it referees to the addition of compatible solutes for adaptation to high salinity featuring the waste. After that, it describes the combination of them with nitrates for biodegradation of the waste. To continue with, this chapter presents the various bacterial strains that have been examined in order to create a group of bacteria. It has to be mentioned that these bacteria forms biofilms by adding the commercial carrier of Mutag BioChip™ onto influent and effluent bilge waste. In the end of this chapter, a new method for the immobilization of bacteria which are the egg shells tends to be very efficient.

Last but not least, the fourth chapter is entitled "Results-Discussion of Results" which presents and discuss the results of the experimental procedure.

To conclude with the fifth chapter, refers to the Conclusions & Future Research, which provides the conclusions that have been emerged from the experimental results in the present Dissertation Thesis and suggestions for future research in the experimental procedure that was followed.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	v
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	vi
ABSTRACT	viii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xiii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xiv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ	xv
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	xvi
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ	xvii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	xviii
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	1
1.1 Βιολογική επεξεργασία.....	1
1.1.1 Απόβλητο bilge.....	1
1.1.2 Βιοαποικοδομηση υδρογονανθράκων του πετρελαίου	6
1.1.3 Αλόφιλοι μικροοργανισμοί.....	6
1.2 Διεθνής Σύμβαση για την πρόληψη Ρύπανσης από πλοία.....	8
1.3 Μέθοδοι αύξησης βιοδιάσπασης	8
1.3.1 Συμβατές διαλυτές ουσίες.....	8
1.3.2 Απόδοση των διαδικασιών που χρησιμοποιούν μεμβράνες	12
1.3.3 Carrier -Mutag BioChip™	13
1.3.4 Κελύφωφ αυγών	15

1.3.5	Νιτρικά.....	17
2	Μεθοδολογία-Πειραματικές Τεχνικές.....	19
2.1	Μικροβιολογικές Τεχνικές.....	19
2.1.1	Εμπλουτισμός και απομόνωση μικροοργανισμών	19
2.1.2	Τεχνικές αποστείρωσης και απολύμανσης.....	20
2.1.3	Φυγοκέντριση:	20
2.2	Βιοχημικές Τεχνικές	21
2.2.1	Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-VIS)	21
2.2.2	Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)	22
2.2.3	Ανάλυση Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (COD):	23
2.2.3	Μέτρηση οπτικής πυκνότητας.....	24
3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	26
3.1	Βιοχημικές Τεχνικές	26
3.1.1	Βακτηριακά Στελέχη	26
3.1.2	Διαδικασία παρασκευής βιομέσων:.....	27
3.1.3	Προετοιμασία Βιολογικών στελεχών	28
3.2	Δειγματοληψία.....	29
3.3	Πειράματα ακινητοποίησης κυττάρων	30
3.3.1	Συμβατές διαλυτές ουσίες:	30
3.3.2	Συμβατές διαλυτές ουσίες και νιτρικά:	30
3.3.3	Πειράματα με carrier Mutag Biochip™:	31
3.3.4	Πείραμα επανεξέτασης βακτηρίων:	32
3.3.4	Πείραμα με effluent waste:.....	32
3.3.5	Συγκριτικά πειράματα:	33

4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
4.1	Συμβατές διαλυτές ουσίες.....	35
4.1.1	Δοκιμές διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυσίνης - βεταΐνης (GB) για μείωση του COD του bilge waste	35
4.1.2	Δοκιμές συγκεντρώσης 1mM γλυσίνης- βεταΐνης σε συνδυασμό με νιτρικά	36
4.2	Προσθήκη carrier ως μέσο ακινητοποίησης των κυττάρων	38
4.2.1	Mutag BioChip™	38
4.2.2	Mutag BioChip™	39
4.3	Επανεξέταση στελεχών.....	40
4.4	Εξέταση στελεχών σε effluent	42
4.5	Συγκριτικά αποτελέσματα και κελύφη αυγών ως μέσο ακινητοποίησης	43
5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	48
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Φυσικές και χημικές ιδιότητες του BWOP και περιεχόμενο υδρογονάνθρακα.....	5
Πίνακας 3.1: Παλιά ομάδα βακτηριακών στελεχών.....	27
Πίνακας 3.2: Νέα ομάδα βακτηριακών στελεχών	27
Πίνακας 3.3: Συνταγή Βιομέσου για ενεργοποίηση των μικροοργανισμών	29

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 0.1: Κατανομή αποβλήτων στο Πλοίο	xix
Εικόνα 1.1: Απεικόνιση εμπορικού carrier.....	15
Εικόνα 2.1: Α) Μεθοδος διαδοχικών αραιώσεων σε υγρή φάση, Β) Διακριτές αποικίες σε τρυβλίο.....	20
Εικόνα 2.2: Συσκευή φυγοκέντρισης.....	21
Εικόνα 2.3: Συσκευή thermoreactor.....	44
Εικόνα 2.4: UV/VIS spectrometer Jenway 7315	24
Εικόνα 3.1: Τοποθέτηση αποβλήτου και μέσο ακινητοποίησης του στις Duran	33
Εικόνα 3.2: Δείγματα bilge σε δοκιμαστικούς σωλήνες του COD.....	34

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 2.1: Καμπύλη βαθμονόμησης για υπολογισμό χημικά απαιτούμενου οξυγόνου COD	25
Γράφημα 4.1: Οπτική πυκνότητα των συμβατών διαλυτών ουσιών συναρτήσει του χρόνου	35
Γράφημα 4.2: Προσαρμογή με βεταΐνη και νιτρικά	37
Γράφημα 4.3: Εξέταση βακτηρίων με προσθήκη εμπορικού carrier	38
Γράφημα 4.4: Εξέταση βακτηρίων με προσθήκη εμπορικού carrier	39
Γράφημα 4.5: Επανεξέταση βακτηριακών στελεχών	41
Γράφημα 4.6: Εξέταση βακτηριακών στελεχών σε effluent	42
Γράφημα 4.7: Εξέταση νέας ομάδας με κελύφη αυγών και σύγκριση με παλιά ομάδα	44
Γράφημα 4.8: Σύγκριση εμπορικού carrier με κελύφη αυγών	45
Γράφημα 4.9: Σύγκριση νέας ομάδας με παλιά ομάδα	46
Γράφημα 4.10: Ποσοστά απομάκρυνσης COD	47

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΕΕ: Ευρωπαϊκή Ένωση

ΠΔ: Πτυχιακή Διατριβή

ΤΕΠΑΚ: Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

AOS: Ενεργοποιημένο κέλυφος στρεϊδίων

BWOP: Bilge waste ελαιώδους φάσης

COD: Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο

EPA: Περιβαλλοντική Υπηρεσία Προστασίας

GB: γλυσίνη-βεταΐνη

GESAMP: Ομάδα Εμπειρογνομόνων για Επιστημονικές Πτυχές της Θαλάσσιας Προστασίας Περιβάλλοντος

IMO: Διεθνής Ναυτιλιακός Οργανισμός

MARPOL: Διεθνής Σύμβαση για την Πρόληψη της Ρύπανσης από Πλοία

MBR: Βιοαντιδραστήρες με μεμβράνες

OD: Οπτική Πυκνότητα

TOC: Ολικός Οργανικός Άνθρακας

UASB: Αντιδραστήρας ανοδικής ροής μέσω στρώματος λάσπης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ρύπανση της θάλασσας από πετρέλαιο, η οποία προκαλείται κυρίως από προσάραξη των δεξαμενόπλοιων, είναι ένα από τα επείγοντα και σοβαρά περιβαλλοντικά ζητήματα από όλο τον κόσμο. Αποτελεί πρόσφορο κομμάτι για επιστημονική έρευνα και ανάλυση από τη στιγμή που η μελέτη της ρύπανσης των θαλασσών είναι ένα νέο σχετικά πεδίο έρευνας. Το θαλάσσιο περιβάλλον αποδεδειγμένα είναι ένας στόχος άμεσης ανάπτυξης των ανθρώπινων δραστηριοτήτων αλλά και αποδέκτης των συνεπειών τους. Η ρύπανση του θαλάσσιου περιβάλλοντος κυρίως από τα απόβλητα πλοίων τα τελευταία χρόνια κινεί το ενδιαφέρον για έρευνα.

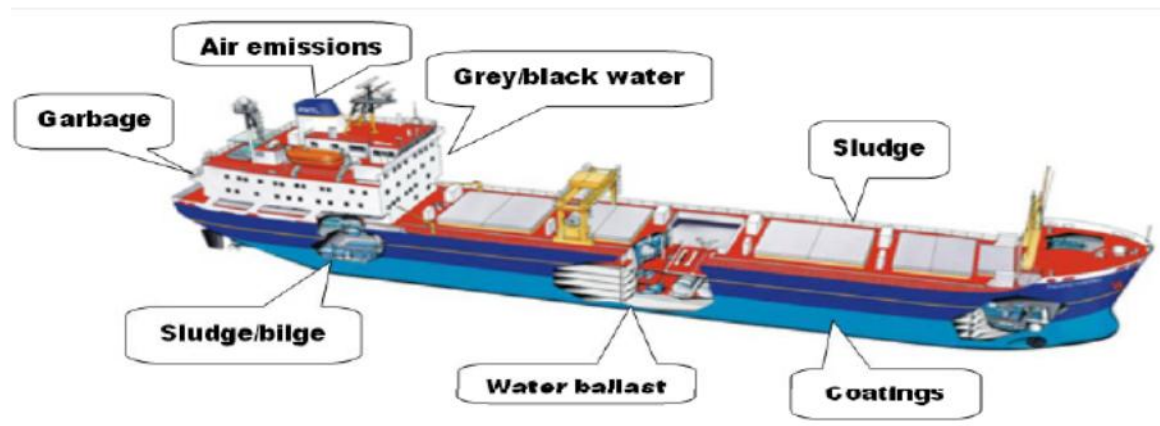
Οι λειτουργίες του πλοίου παράγουν επίσης απόβλητα που συλλέγονται στο χαμηλότερο μέρος του σκάφους, που ονομάζονται απόβλητα bilge. Αυτά που περιέχουν πετρέλαιο - απόβλητα bilge πρέπει να διαχειρίζονται σωστά για να αποφευχθεί η ρύπανση του περιβάλλοντος. Με αυτές τις ανησυχίες, υπάρχει ένα μεγάλο μέρος της έρευνας για βιοαποικοδόμηση πετρελαιοκηλίδας. Η βιοαποικοδόμηση δεδομένων υδρογονανθράκων εξαρτάται από την κατάσταση της διασποράς τους.

Οι κύριες πηγές ρύπανσης από πετρέλαιο θα συμπεριλάβουν την εκμετάλλευση του πετρελαίου και τη μεταφορά του σε δεξαμενόπλοια, πλύσιμο bilge και έρματος απαλλαγής. Ένα από τα πιο σοβαρά προβλήματα που προκύπτει από τις λιμενικές δραστηριότητες είναι η ανεπαρκής διαχείριση των υγρών αποβλήτων από τα πλοία. Τα bilge απόβλητα, τα οποία αποτελούνται από λάδια, γράσα και θαλασσινό νερό, μπορεί να είναι τα πιο επιζήμια για το περιβάλλον.

Η Θαλάσσια ρύπανση ορίζεται ως “η εισαγωγή από τον άνθρωπο, άμεσα ή έμμεσα, επιβλαβών ουσιών ή ενέργειας στο θαλάσσιο περιβάλλον, περιλαμβάνοντας και τις εκβολές των ποταμών, που έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή του θαλάσσιου οικοσυστήματος (διατήρηση των φυσικών πόρων), κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, ανυπέρβλητα εμπόδια στις θαλάσσιες δραστηριότητες (αλιεία) καθώς και ελάττωση των ανέσεων (θαλάσσιος τουρισμός, αναψυχή)”. Σύμφωνα με τον ορισμό αυτό, έμφαση δίνεται σε ανθρωπογενείς και όχι σε φυσικές πηγές. Επιπλέον έμφαση δίνεται στις δυσμενείς επιδράσεις που μπορεί να έχει μια χημική ουσία και όχι απλά στην παρουσία της. Τέλος ρύπανση δεν προκαλείται μόνο από χημικές ουσίες αλλά και από την ενέργεια (πχ ραδιενέργεια, θερμική ενέργεια) (Γαλβά, 2012).

Οι πλέον σημαντικές κατηγορίες ρύπων που καταλήγουν στο θαλάσσιο περιβάλλον είναι τα βαρέα μέταλλα, το πετρέλαιο και τα προϊόντα του, τα διάφορα φυτοφάρμακα και απορρυπαντικά, τα απορρίμματα (πλαστικά, ελαστικά και μεταλλικά αντικείμενα), τα αστικά λύματα και οι μικροοργανισμοί (βακτηρίδια, μύκητες και ιοί), τα απόβλητα (άχρηστα βιομηχανικά υλικά κατεργασίας τροφίμων, βυρσοδεψείων και σφαγείων) και τα ραδιενεργά υλικά (Γαλβά, 2012)

Όσον αφορά τα απόβλητα που προέρχονται από τα πλοία αναφέρονται ακολούθως: κατάλοιπα καθαρισμών δεξαμενών φορτίων (sludge), μείγματα μηχανοστασίου (bilge, sludge), κατάλοιπα καυσίμων (sludge), απόβλητα / σκουπίδια (garbage), αποχετευτικά και μη ύδατα (black – grey water), υφαλοχρώματα (coatings) καυσαέρια (air emissions) και θαλάσσιο έρμα (water ballast) τα οποία παρουσιάζονται στη πιο κάτω εικόνα (Γαλβά, 2012).



Εικόνα 0.1: Κατανομή αποβλήτων στο Πλοίο

Σημαντικοί ρυπαντές για το θαλάσσιο περιβάλλον που προέρχονται από πλοία χωρίζονται σε πετρελαιοειδή και μη πετρελαιοειδή απόβλητα. Τα πετρελαιοειδή απόβλητα είναι τα εξής: τα πλούσια σε υδρογονάνθρακα κατάλοιπα, τα κατάλοιπα καύσης και καθαρισμών δεξαμενών φορτίου, Crude oils με 5% sludge που δε χρησιμοποιείτε σα καύσιμη ύλη, επεξεργασία με COW, κατάλοιπα φτωχά σε υδρογονάνθρακα, διαρροές από τα μηχανοστάσια και Crude oils με 1% sludge που δε χρησιμοποιείτε σα καύσιμη ύλη. Τα μη πετρελαιοειδή απόβλητα είναι: υγρά απόβλητα από τα ιατρεία των πλοίων και τα αποχωρητήρια, επεξεργασμένα απόβλητα και υγρά απόβλητα που ζυγίζουν 19-38 lt (Γιαννακοπούλου, 2012).

Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις δημιουργίας πετρελαιοκηλίδων είναι πολύ σοβαρές επεκτεινόμενες σε όλη τη θαλάσσια τροφική αλυσίδα από το πλαγκτόν, την αναπαραγωγή ψαριών και οστρακοειδών, τα φύκια, τα ασπόνδυλα, τον ορυκτό πλούτο. Εκτός από τις περιβαλλοντικές υπάρχουν και κοινωνικό-οικονομικές επιπτώσεις από τη δημιουργία πετρελαιοκηλίδων όπως ότι πλήττεται ο τουρισμός γιατί οι ακτές ελκύουν τους τουρίστες και υπάρχει τουριστική ανάπτυξη τους (MEPC-IMO, 2009) (Γιαννακοπούλου, 2013).

Η σύνθεση του πετρελαίου από το bilge waste πλοίων είναι ένας σημαντικός ρύπος των λυμάτων του πλοίου και η απόρριψη των υπολειμμάτων πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον απαγορεύεται (Sun et al. 2010). Οι λιμενικές εγκαταστάσεις υποδοχής και εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων bilge αναγνωρίζεται ως σημαντικό προληπτικές δράσεις για την ελαχιστοποίηση της ρύπανσης των παράκτιων υδρογονανθράκων. Τα απόβλητα αυτά είναι υγρά κατάλοιπα που δημιουργούνται κατά την κανονική λειτουργία του πλοίου και να συγκεντρωθούν στο κάτω μέρος της γάστρας. Αποτελούνται κυρίως από μια φάση θαλασσινού νερού και μια ελαιώδη φάση, η οποία περιέχει συνήθως ντίζελ και καύσιμα πετρελαίου, και άλλα υπολείμματα υδρογονάνθρακα (Nievas et al. 2005).

Στη παρούσα διατριβή γίνεται αναφορά στα ελαφρά κατάλοιπα (bilge) και για την περαιτέρω επεξεργασία αυτού του συγκεκριμένου αποβλήτου με διάφορες βιολογικές μεθόδους. Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η βιοδιάσπαση του αποβλήτου bilge με διάφορες βιολογικές μεθόδους και η δημιουργία ομάδας βακτηρίων που είναι πιο αποτελεσματικά στη βιοδιάσπαση του αποβλήτου.

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

1.1 Βιολογική επεξεργασία

1.1.1 Απόβλητο bilge

Οι λειτουργικές απορρίψεις από ποντοπόρα πλοία, συμπεριλαμβανομένων των απορρίψεων Bilgewater, απελευθέρωση πετρελαίου σε θαλάσσια οικοσυστήματα τα οποία μπορεί ενδεχομένως να βλάψουν τη θαλάσσια ζωή, την επίγεια ζωή, την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Bilgewater, είναι ένα μίγμα από ελαιώδη υγρά και άλλους ρύπους από μία ποικιλία πηγών σε πλοίο. Αποτελεί χρόνια πηγή ρύπανσης από πετρέλαιο και έχει εκτιμηθεί ότι αντιπροσωπεύει το 20% του ελαιώδους νερού που απελευθερώνεται από τα πλοία στους ωκεανούς σε όλο τον κόσμο. Συγκεκριμένα είναι ένα μίγμα ενός συμπλόκου πολλών ενώσεων συμπεριλαμβανομένων ελαιωδών υγρών και άλλων ρύπων, όπως τα μέταλλα, απορρυπαντικά, και διαλύτες, τα οποία προέρχονται από διάφορες πηγές (π.χ., κινητήρες, σωληνώσεις, και μηχανικές πηγές που βρίσκονται στο μηχανοστάσιο ενός πλοίου) και συσσωρεύονται στη σεντίνα του πλοίου. Μεγάλα πλοία καίνε κυρίως πετρέλαιο και χρησιμοποιούν πετρέλαιο βασισμένο σε λιπαντικά έλαια και τα υδραυλικά υγρά, και η πιθανή πηγή του περισσότερου λαδιού στο Bilgewater είναι διαρροές λαδιού κινητήρα, υδραυλικά υγρά, και σωληνώσεις καυσίμου. Αυτές οι πηγές πετρελαίου πιθανότατα να περιέχουν σχετικά βαριά συστατικά με υψηλότερα σημεία βρασμού σε σύγκριση με εκείνα που αναμένονται από σκάφη βενζίνης που χρησιμοποιείται ως καύσιμο. Λάδι σε Bilgewater εμφανίζεται σε διάφορες μορφές που βασίζονται κατά κύριο λόγο από το μέγεθος των σταγονιδίων ελαίου: απελευθερώνεται, διασκορπίζεται και γαλακτωματοποιείται. Γαλακτωματοποιημένο έλαιο (δηλαδή, έλαιο σταγονίδια μικρότερα από 20 μm) είναι το πιο δύσκολο για τη επεξεργασία επειδή η ουδέτερη πλευστότητα του το καθιστά δύσκολο να διαχωριστούν μόνο από την βαρύτητα. Το Bilgewater δεν μπορεί πάντα να διατηρείται επί του σκάφους, πολλά σκάφη πρέπει να το αντιμετωπίσουν με ένα διαχωριστήρα ελαίου-νερού (OWS) πριν από την απόρριψη.

Εκτός από το λάδι και υδρογονάνθρακες, το Bilgewater περιέχει ένα μίγμα από άλλους μολυντές, και η ποσότητα των ρύπων ποικίλει ανάλογα με λειτουργίες του πλοίου, την απόδοση

του εξοπλισμού, και επισκευών, μεταξύ άλλων. Για παράδειγμα, τα δείγματα Bilgewater συλλέγονται από μια ποικιλία των πλοίων που περιείχε πολλαπλούς ρύπους προτεραιότητας EPA, συμπεριλαμβανομένων των μετάλλων, συμβατικούς ρύπους και θρεπτικές ουσίες (π.χ., αζώτου και φωσφόρου που περιέχουν τις ενώσεις, αιωρούμενα στερεά), και οργανικές μαζί με σημαντικές συγκεντρώσεις από απορρυπαντικά, διαλύτες, και πολυαρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH). Η παρουσία αυτών των άλλων ενώσεων στα αποτελέσματα του Bilgewater σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ρύπων και μεταξύ των ρύπων και επιφανειών, περιπλέκει τις διαδικασίες επεξεργασίας. Επιπλέον, η συμπεριφορά αυτών των ενώσεων, εάν απελευθερωθούν στο περιβάλλον διαφέρει και το τοξικό δυναμικό τους εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα τους σε ένα δεδομένο υδατικό περιβάλλον και χαρακτηριστικά του ίδιου του, θερμοκρασία, pH, αλατότητα, κ.λπ.). Πιθανές επιδράσεις μπορούσαν να περιλαμβάνουν διαταραχή της λειτουργίας του οργάνου ή αναπαραγωγή σε υδρόβια ζωή, βιοσυσσώρευση στις υδάτινες τροφικές αλυσίδες, οξεία θνησιμότητα, μείωση του οξυγόνου και του ευτροφισμού (εμπλουτισμού) (McLaughlin et al. 2014).

Ρυθμιστικές αρχές έχουν περιορίσει την έκταση των επιτρεπόμενων απορρίψεων και απαιτήσεις επεξεργασίας σε μια προσπάθεια να μειώσει ή να εξαλείψει την απόρριψη πετρελαίου στη θάλασσα [Διεθνής Σύμβαση για την Πρόληψη της Ρύπανσης από Πλοία (MARPOL 1973/1978), Νόμος καθαρού νερού. Ενέργεια για την πρόληψη της ρύπανσης από τα πλοία] (McLaughlin et al. 2014).

Μεταξύ άλλων, ο Διεθνής Ναυτιλιακός Οργανισμός (IMO) καθορίζει το πρότυπο για την ανάπτυξη κανονισμών σχετικά με την επεξεργασία και τη διάθεση των ελαιώδων Bilgewater. Το παράρτημα I της MARPOL (73/78) απαιτεί από όλα τα πλοία άνω των 400 κόρων να αντιμετωπίζονται με απαλλαγή λαδιού ή πετρελαιοειδών μιγμάτων, ενώ καθ 'οδόν και αν ο εξοπλισμός περιορίζει τη συγκέντρωση απόρριψης πετρελαίου στον ωκεανό έως 15 ppm. Bilgewater είναι μία από τις 27 ειδικές επιτρεπτές απορρίψεις που ρυθμίζονται από το VGP και τα πρότυπα εκκένωσης είναι σε γενικές γραμμές σύμφωνα με τις απαιτήσεις του IMO (15 ppm περιεκτικότητα σε λάδι περιορισμού απαλλαγής για ποντοπόρα πλοία) με μερικές πρόσθετες πρακτικές διαχείρισης και κοντά στην ακτή περιορισμούς τοποθεσίας απαλλαγής. Αντίθετα, ο νόμος του Καναδά Ναυτιλίας (2001), έχει ένα πιο αυστηρό περιορισμό απαλλαγής και ορίζει καναδικά εγχώρια σκάφη που πρέπει να συμμορφώνονται με το όριο περιεκτικότητας του

πετρελαίου 5 ppm για τις απορρίψεις Bilgewater για καναδικά εσωτερικά ύδατα (McLaughlin et al. 2014).

Οι διάφορες εναλλακτικές τεχνολογίες που έχουν προταθεί για την επεξεργασία του bilgewater για να ανταποκρίνονται στα διεθνή επίπεδα πρότυπο εκκένωσης, όπως η οξείδωση υγρού αέρα, υπερδιήθηση, η αποτέφρωση και βιοαποικοδόμηση. Ωστόσο, η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των διεργασιών επεξεργασίας αποβλήτων bilge για την ελαχιστοποίηση του κόστους είναι ερευνητικά θέματα παγκόσμιου ενδιαφέροντος. Τα συστήματα βιοαντιδραστήρα είναι ελκυστικά για τη διενέργεια βιολογικής αποκατάστασης σε ex situ εφαρμογές, λόγω του χαμηλού κόστους σε σύγκριση με άλλα μέσα της επεξεργασίας των αποβλήτων. Ως εκ τούτου, η βιοαποικοδόμηση ως τεχνολογία αποκατάστασης για τα απορρίμματα bilge φαίνεται να είναι μια βιώσιμη επιλογή (Nievas et al. 2006).

Τα παράγωγα προϊόντα του πετρελαίου και τα υπολείμματα είναι σύνθετα μίγματα ενώσεων υδρογονάνθρακα, έχουν μικροβιακές κοινότητες που έχουν χρησιμοποιηθεί για να επιτευχθεί ευρεία βιοαποικοδόμηση υδρογονάνθρακα (Nievas et al. 2006).

Αυτό το υπόλειμμα, συνήθως ένα μίγμα των ρεμάτων που εκχέονται στη σεντίνα του πλοίου, θα μπορούσε να περιέχει ουσίες που μπορούν να αναστείλουν μικροβιακή βιοαποικοδόμηση (όπως βαρέα μέταλλα, αλογονωμένων διαλυτών, συστατικά χρώματος). Ένας πολύ περιορισμένος αριθμός μελετών έχουν επικεντρωθεί σε βιοαποικοδόμηση των αποβλήτων bilge. Δημοσιεύονται μελέτες που έχουν δείξει βιοαποικοδόμηση BWOP, με την προσθήκη ενός βιοεπιφανειοδραστικού, από αυτόχθονη μικροχλωρίδας αξιολογώντας την σύνθεση της ελαιώδης φάσης του μέσου διφασική καλλιέργειας. Ως εκ τούτου, η βιοαποικοδόμηση, καθώς η τεχνολογία αποκατάστασης για τα απορρίμματα bilge φαίνεται να είναι μια βιώσιμη επιλογή (Nievas et al. 2006).

Η ικανότητα αυτής της φυσικής κοινότητας για την αποικοδόμηση υδρογονανθράκων αξιολογήθηκε με τη βοήθεια μιας δοκιμασίας BWOP βιοαποικοδόμηση σε βιοαντιδραστήρα σε εργαστήριο παρτίδας χωρίς την προσθήκη τασιενεργού. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η πρώτη μελέτη όπου η αποτελεσματικότητα βιοαποικοδόμησης των αποβλήτων bilge αξιολογήθηκε από τη μείωση υδρογονανθράκων σε ένα διφασικό μέσο αντίδρασης (BWOP + θαλασσινό νερό) κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός της μικροβιακής κοινότητας

αποβλήτων bilge διεξήχθη απομονώνοντας επιλεκτικούς μικροοργανισμούς και την αξιολόγηση των δυνατοτήτων εξευτελιστικών υδρογονανθράκων τους (Nievas et al. 2006).

Η βιοαποικοδόμηση των ελαιωδών αποβλήτων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως φυσικοχημικές ιδιότητες αποβλήτων, η προσαρμογή μικροοργανισμών στις ενώσεις υδρογονάνθρακα, και περιβαλλοντικές συνθήκες. Όσον αφορά τη σύνθεση των αποβλήτων, η BWOP είχε 71.33wt% του TOC με υγρή βάση και λαμβάνοντας υπόψη ότι η περιεκτικότητα σε νερό ήταν 15 v / v%, η τιμή TOC σε ξηρή βάση ήταν περίπου 86.4wt%. Τα καύσιμα και τα ντίζελ πετρελαίου είναι τα κύρια καύσιμα που χρησιμοποιούνται στα πλοία, και ως εκ τούτου, αυτά είναι τα αναμενόμενα κλάσματα πετρελαίου στα απορρίμματα bilge. Επιπλέον, η μετρούμενη πυκνότητα των αποβλήτων και η χημική σύνθεση (Πίνακας 1) ήταν αρκετά παρόμοιες με αυτές που βρέθηκαν για το εμπορικό πετρέλαιο ντίζελ. Το ιξώδες των αποβλήτων ήταν υψηλότερο από εκείνη του πετρελαίου ντίζελ πιθανώς λόγω της παρουσίας του πετρελαίου σε καύσιμα και λιπαντικά έλαια στην BWOP. Σύμφωνα με τη χημική του σύνθεση, τα απόβλητα bilge πρέπει να θεωρούνται επικίνδυνα (Nievas et al. 2006).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία στη συγκεκριμένη εργασία οι χαρακτηριζόμενοι BWOP αυτοχθόνων μικροοργανισμοί ανήκουν στο γένος *Pseudomonas* και είναι στενά συνδεδεμένα με *P. stutzeri* όπως φαίνεται από 16S rDNA φυλογενετική ανάλυση. Βιοαποικοδόμηση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, πετρελαίου ντίζελ και πετρελαίου αποδείχθηκε. Τα στελέχη αυτά αντανακλούν μέρος του δυναμικού υποβάθμιση υδρογονανθράκων των αποβλήτων bilge ιθαγενής μικροβιακής κοινότητας. Αυτή η κοινότητα ήταν σε θέση να βιοδιασπά το BWOP χωρίς την προσθήκη εξωτερικών τασιενεργών σε μία δοκιμασία βιοαποικοδόμησης σχετικά υψηλής περιεκτικότητας σε έλαιο. Επομένως μπορεί να επιτευχθεί υψηλή βιολογική απομάκρυνση του συνόλου των υδρογονανθράκων και αρωματικών υδρογονανθράκων (Nievas et al. 2006).

Συνοψίζοντας, το Bilgewater είναι ένας από τους σημαντικότερους ρύπους που απειλούν το θαλάσσιο περιβάλλον λόγω της άμεσης απαλλαγής τους από τα πλοία στη θάλασσα. Οι διαχωριστές νερού λαδιού (OWS) που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη αντιμετώπιση του bilge water. Οι διεργασίες OWS είναι διαχωριστές βαρύτητας με βάση τη μεταβολή της πυκνότητας μεταξύ των φάσεων ελαίου και ύδατος. Τα καθαριστικά του bilge water μπορεί να δημιουργήσουν ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό. Όταν η γαλακτωματοποίηση λαμβάνει χώρα, η

διαφορά άνωσης του πετρελαίου και του νερού είναι πολύ μικρή για να αντιμετωπιστεί σωστά μέσω της υπάρχουσας τεχνολογίας OWS (Emadian et al. 2015).

Φυγόκεντροι OWSs χρησιμοποιούν επίσης τη διαφορά πυκνότητας μεταξύ ελαίου και νερού σε ξεχωριστό λάδι από Bilgewater, αλλά η φυγόκεντρος δύναμη που επιβλήθηκε στην Bilgewater υπό αγωγή προκαλεί τα μη αναμίξιμα υγρά ή στερεά να διαχωριστούν πιο αποτελεσματικά από τη βαρύτητα και μόνο. Θεραπείες στίλβωσης περιλαμβάνουν απορρόφηση και προσρόφηση, βιολογική επεξεργασία, πήξη και η κροκύδωση, επίπλευση, ηλεκτροχημικά απογαλακτωματοποίησης και καθαρισμό, ή υπερδιήθηση. Η προσθήκη τέτοιων μονάδων στίλβωσης έχει δείξει αποτελεσματικότητα στην αντιμετώπιση Bilgewater σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του πετρελαίου, αν και η επιρροή των παραμέτρων λειτουργίας μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των τεχνολογιών επεξεργασίας (McLaughlin et al. 2014).

Table 1
BWOP physical and chemical properties and hydrocarbon content

Density (kg m ⁻³)	888 (15 °C)
Dynamic viscosity (Pa s × 10 ³)	45.67 (20 °C) 37.97 (25 °C) 31.97 (30 °C)
Kinematic viscosity (m ² s ⁻¹ × 10 ⁶)	19.95 (40 °C)
Flash point (°C)	118
TOC (wt%)	71.33
TN (wt%)	0.055
Water (v/v%)	15.00
Hydrocarbons content of the BWOP	g/kg BWOP
<i>Aliphatics</i>	
Resolved	170.58
UCM ^a	118.16
Total aliphatic	288.74
<i>PAHs</i>	
Fluorene	0.16
Phenanthrene	0.62
Anthracene	0.06
3-Methyl phenanthrene	0.44
2-Methyl phenanthrene	0.48
9-Methyl phenanthrene	0.33
1-Methyl phenanthrene	0.41
2,7-Dimethyl phenanthrene	0.52
Fluoranthene	0.20
Pyrene	0.20
Total PAHs	3.41

Πίνακας 1.1: Φυσικές και χημικές ιδιότητες του BWOP και περιεχόμενο υδρογονάνθρακα

1.1.2 Βιοαποικοδομηση υδρογονανθράκων του πετρελαίου

Οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί να αποικοδομήσουν τους υδρογονάνθρακες πετρελαίου και τις σχετικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένοι στο θαλάσσιο και όχι μόνο περιβάλλον. Πάνω από 200 είδη βακτηρίων και μυκήτων έχουν αποδείξει ότι αποικοδομούν τους υδρογονάνθρακες που κυμαίνονται από το μεθάνιο ως τις ενώσεις με περισσότερα από 40 άτομα άνθρακα (Zobell, 1973).

Στο θαλάσσιο περιβάλλον, τα βακτήρια αποτελούν κυρίαρχους βιοαποδομητές υδρογονανθράκων με εύρος κατανομής που καλύπτει ακόμη και τα ακραία κρύα ανταρκτικά και αρκτικά περιβάλλοντα (Jordan et al. 1980). Η κατανομή των μικροοργανισμών που καταναλώνουν υδρογονάνθρακες συσχετίζεται επίσης με την ιστορική έκθεση του περιβάλλοντος σε υδρογονάνθρακες. Εκείνα τα περιβάλλοντα με μια πρόσφατη ή χρόνια μόλυνση πετρελαίου θα έχουν υψηλότερο ποσοστό των μικροβιακών αποδομητών υδρογονανθράκων σε σχέση με τις αρρύπαντες περιοχές. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει ούτε ένα γένος βακτηρίων με τη μεταβολική ικανότητα να αποικοδομεί όλα τα συστατικά που βρίσκονται μέσα στο αργό πετρέλαιο. Στη φύση, η βιοδιάσπαση ενός αργού πετρελαίου περιλαμβάνει χαρακτηριστικά μια διαδοχή ειδών μέσα στα συσσωματώματα μικροοργανισμών με συνεργιστική δράση. Οι μικροοργανισμοί που δεν καταναλώνουν υδρογονάνθρακες μπορούν επίσης να διαδραματίσουν έναν σημαντικό ρόλο στην τελική απομάκρυνση του πετρελαίου από το περιβάλλον. Η αποικοδόμηση του πετρελαίου περιλαμβάνει προοδευτικές ή διαδοχικές αντιδράσεις, στις οποίες ορισμένοι οργανισμοί μπορούν να πραγματοποιήσουν την αρχική επίθεση στο συστατικό του πετρελαίου. Έτσι παράγονται ενδιάμεσες ενώσεις που χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από μια διαφορετική ομάδα οργανισμών, με μια διαδικασία που οδηγεί σε περαιτέρω αποικοδόμηση (Karrick, 1977)

1.1.3 Αλόφιλοι μικροοργανισμοί

Η διαθεσιμότητα του νερού, που εκφράζεται και ως ενεργότητα νερού a_w , είναι ο λόγος της τάσης των ατμών του αέρα σε ισορροπία με κάποια ουσία ή διάλυμα ως προς την τάση ατμών του καθαρού νερού. Γενικά, το νερό διαχέεται από μια περιοχή υψηλής συγκέντρωσης νερού και χαμηλής κατά συνέπεια συγκέντρωσης διαλυμένης ουσίας σε μια περιοχή χαμηλότερης συγκέντρωσης νερού και υψηλότερης συγκέντρωσης διαλυμένης ουσίας με τη διαδικασία της

ώσμωσης. Το θαλασσινό νερό περιέχει 3% περίπου χλωριούχο νάτριο και μικρές ποσότητες πολλών άλλων ανόργανων συστατικών και χημικών στοιχείων. Οι μικροοργανισμοί που ζουν στη θάλασσα έχουν συνήθως συγκεκριμένες απαιτήσεις για το ιόν του νατρίου, πέραν του ότι για να αναπτυχθούν άριστα χρειάζονται την ενεργότητα του θαλασσινού νερού. Τέτοιου είδους οργανισμοί ονομάζονται αλόφιλοι. Για την ανάπτυξη τους, οι αλόφιλοι οργανισμοί απαιτούν έστω και λίγο χλωριούχο νάτριο (NaCl) ενώ η άριστη ποσότητα ποικίλει από οργανισμό σε οργανισμό. Κατά συνέπεια οι όροι ήπιος αλόφιλο και μετρίως αλόφιλο χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν αλόφιλα με μικρές (1-6%) και ενδιάμεσες απαιτήσεις (6-15%) σε NaCl αντίστοιχα. Γενικά οι περισσότεροι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να αντεπεξέλθουν με επιτυχία σε περιβάλλοντα με πολύ χαμηλή ενεργότητα του νερού και είτε πεθαίνουν είτε αφυδατώνονται και αδρανοποιούνται. Οι οργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν σε πολύ αλμυρά περιβάλλοντα ονομάζονται ακραίοι αλόφιλοι και χρειάζονται περίπου 15-30% NaCl ανάλογα βέβαια και με το είδος του οργανισμού, προκειμένου να βρεθούν σε συνθήκες άριστης ανάπτυξης.

Όταν ένας οργανισμός αναπτύσσεται σε θρεπτικό υλικό με χαμηλή ενεργότητα νερού, μπορεί να αποκτήσει νερό από το περιβάλλον αυξάνοντας την εσωτερική συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών. Η αύξηση στην εσωτερική συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών επιτυγχάνεται με άντληση ανόργανων ιόντων μέσα στο κύτταρο από το περιβάλλον, όπως επίσης και με σύνθεση από τον ίδιο τον οργανισμό ή συγκέντρωση μιας οργανικής διαλυτής ουσίας (συμβατές διαλυμένες ουσίες).

Γενικά στους μικροοργανισμούς είναι γνωστές ποικίλες συμβατές διαλυμένες ουσίες. Στην περίπτωση ορισμένων ακραίων αλόφιλων Αρχαίων και ελάχιστων ακραίων αλόφιλων Βακτηρίων μπορεί να είναι ιόντα καλίου από το KCl (χλωριούχο κάλιο). Ωστόσο, σε σύγκριση με τα υποχρεωτικά αλόφιλα archaea, έχουν λιγότερο μελετηθεί με μόνο μερικές αναφορές για τον σχεδιασμό της διαδικασίας παραγωγής Ουσιαστικά η μέγιστη ποσότητα των συμβατών διαλυμένων ουσιών που σχηματίζεται ή μπορεί να συσσωρευθεί αποτελεί γενετικά καθορισμένο χαρακτηριστικό το οποίο καθορίζει αν ένας μικροοργανισμός είναι αλοανεκτικός, αλόφιλος ή ακραίος αλόφιλος. Μερικές ουσίες που χρησιμοποιούνται από κάποιους οργανισμούς ως συμβατές ουσίες είναι το αμινοξύ προλίνη, η γλυκινοβηταΐνη που είναι ένα παράγωγο του αμινοξέος γλυκίνη και συναντάται ευρέως μεταξύ αλόφιλων βακτηρίων και κυανοβακτηρίων. [Brock Biology of Microorganism, 11th edn].

1.2 Διεθνής Σύμβαση για την πρόληψη Ρύπανσης από πλοία

Διεθνής Σύμβαση για την Πρόληψη της Ρύπανσης από Πλοία (MARPOL 73/78) είναι μια διεθνής συμφωνία για να επιτευχθεί η πλήρης εξάλειψη της παγκόσμιας ρύπανσης του θαλάσσιου περιβάλλοντος από πετρέλαιο και άλλες επιβλαβείς ουσίες, καθώς και η ελαχιστοποίηση των τυχαίων απορρίψεων των εν λόγω ουσιών (IMO, 1989). Το παράρτημα I της MARPOL 73/78, περιλαμβάνει προτάσεις για τη διαχείριση των σεντινόνερων που περιορίζουν την απαλλαγή των αποβλήτων (Nievas et al. 2006).

Ποντοπόρα πλοία παράγουν εκατομμύρια τόνους αποβλήτων πετρελαίου ετησίως (GESAMP 2007). Πλοία που σχετίζονται με τις λειτουργικές απορρίψεις, συμπεριλαμβανομένης της απαλλαγής των Bilgewater, αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες ανθρωπογενείς εισροές του πετρελαίου στο θαλάσσιο περιβάλλον και εκτιμάται ότι θα είναι ακόμη υψηλότερο από τυχαίες διαρροές πετρελαίου [Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας (NRC) το 2003; Pavlakis et al. 2001; GESAMP 2007; Etkin 2010]. Παρά το γεγονός ότι το πετρέλαιο εισέρχεται στο θαλάσσιο περιβάλλον μέσω δύο διαρροών και χρόνιων κυκλοφοριών, μεγαλύτερη προσπάθεια και επεξεργασία μπορεί να μειώσει συχνές μικρές κυκλοφορίες, ενώ καταστροφική και τυχαίες διαρροές πετρελαίου είναι λιγότερο εύκολο να αποφευχθούν. Λιγότερη δουλειά έχει γίνει για να κατανοήσουν την απειλή που τίθεται από αυτές τις χρόνιες κυκλοφορίες που είναι ύποπτες για πρόκληση αξιοσημείωτων περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Οι τοξικολογικές επιδράσεις του πετρελαίου στο περιβάλλον είναι μία συνάρτηση όχι μόνο του όγκου του ελαίου που απελευθερώνεται αλλά επίσης και άλλοι παράγοντες όπως η φύση του ελαίου που απελευθερώνεται και το φυσικό και βιολογικό οικοσύστημα εκτεθειμένη. Πετρέλαιο στο θαλάσσιο περιβάλλον μπορεί να προκαλέσει βλάβη στη θαλάσσια ζωή, την επίγεια ζωή, την ανθρώπινη υγεία, και τους φυσικούς πόρους (McLaughlin et al. 2014).

1.3 Μέθοδοι αύξησης βιοδιάσπασης

1.3.1 Συμβατές διαλυτές ουσίες

Αλόφιλα βακτήρια είναι μικροοργανισμοί που προσαρμόζονται σε μέτριες και υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού. Βρίσκονται σε όλους τους τρεις τομείς της ζωής: Αρχαία, βακτήρια και

Ευκαρυωτικά. Αναπτύσσονται σε εκτεταμένο φάσμα των συγκεντρώσεων άλατος (3-15% NaCl, w/v και άνω), σε αντίθεση με τα πραγματικά αλόφιλα archaea των οποίων η ανάπτυξη περιορίζεται σε περιβάλλοντα υψηλής αλατούχου διαλύματος.

Η δυνατότητα ταχείας προσαρμογής στις αλλαγές στην συγκέντρωση εξωτερικού άλατος τους καθιστά δυνατούς υποψήφιους για βιοδιεργασία. Τα αλόφιλα βακτήρια παράγουν ένζυμα, μεταβολίτες, συμβατές διαλυμένες ουσίες, πολυσακχαρίτες και χρωστικές ουσίες οι οποίες έχουν υψηλή εμπορική αξία (Shivanand & Mugeraya 2011).

Οι συμβατές διαλυμένες ουσίες είναι οι εξαιρετικά διαλυτές, χαμηλού μοριακού βάρους οργανικές ενώσεις που κάνουν αλόφιλα βακτήρια ευέλικτα στην προσαρμογή τους στην αλατότητα. Περιλαμβάνουν αμινοξέα, υδατάνθρακες, βεταΐνες, εκτοΐνες ή τα παράγωγά τους, σάκχαρα και πολυόλες. Εκτός από την σταθεροποίηση των αποτελεσμάτων τους, προσφέρουν μια πληθώρα φυσιολογικών και των δυνητικών βιοτεχνολογικών εφαρμογών που κυμαίνονται από σταθεροποιητές των βιομορίων, ανταγωνιστές άλατος, υγραντήρες, στρες-προστατευτικούς παράγοντες για θεραπευτικούς παράγοντες και καλλυντικά έργα. Σταθεροποιούν ένζυμα, DNA και ολόκληρα κύτταρα έναντι καταπονήσεων όπως κατάψυξη, ξήρανση και θέρμανση. Αυξάνουν τη φρεσκάδα των τροφίμων με τη σταθεροποίηση των συστατικών. Επαγωγή οσμολυτών σε κύτταρα μπορεί να αυξήσει την αναδίπλωση των πρωτεϊνών και έτσι να βελτιώσει την ανοχή άλατος το οποίο θα μπορούσε να είναι χρήσιμο στην γεωργία. Εξερευνώντας τις σημαντικές εφαρμογές των συμβατών διαλυτών ουσιών θα μπορούσε να είναι μια ελκυστική πρόταση για την εμπορευματοποίηση. Επιπλέον, θα διαφωτίσει τις βάσεις των προσαρμογών των μετρίως αλόφιλων βακτηρίων (Shivanand & Mugeraya 2011).

Συμβατές διαλυμένες ουσίες έχουν πρωτεΐνο-σταθεροποιητικές ιδιότητες που βοηθούν στη σωστή αναδίπλωση των αλυσίδων πολυπεπτιδίου. Λόγω σταθεροποιητικής δράση τους στα πρωτεϊνικά μόρια αυτά μερικές φορές αναφέρονται ως χημικοί συνοδοί. Διαμορφωτική μετατόπιση της πρωτεΐνης προς διπλωμένα, η μητρική - όπως καταστάσεις που προκαλούνται από προτιμησιακό αποκλεισμό της διαλυμένης ουσίας είναι υπεύθυνη για τη συνοδό - όπως επιδράσεις. Συμβατές διαλυμένες ουσίες ασκούν την επίδρασή τους μέσω αλλαγών στη δομή διαλύτη ή / και ανεπαίσθητες αλλαγές στις δυναμικές ιδιότητες της πρωτεΐνης και όχι με την αλλαγή της δομής της ίδιας της πρωτεΐνης. Αλληλεπιδρούν επίσης με νουκλεϊνικά οξέα και μπορεί να επηρεάσει αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-DNA (Shivanand & Mugeraya 2011).

Τα αλόφιλα βακτήρια συνήθως συνθέτουν ή συσσωρεύουν *συμβατές διαλυμένες ουσίες* για να διατηρηθεί η οσμωτική ισορροπία σε απόκριση προς υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι εξωτερικού περιβάλλοντος. Αυτά τα οργανικά μόρια (συμβατές διαλυτές ουσίες) είναι συμβατά με τον ενδοκυτταρικό μηχανισμό ακόμα και σε γραμμομοριακές συγκεντρώσεις και ως εκ τούτου το όνομα. Υποστηρίζουν τους όγκους των κυττάρων, σπαργή και τις συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών εντός του συστήματος των κυττάρων. Ως αποτέλεσμα, ένα κατάλληλο επίπεδο ενυδάτωσης του κυτταροπλάσματος επιτυγχάνεται και την ανάπτυξη των κυττάρων μπορεί να προχωρήσει υπό ωσμωτικά δυσμενείς συνθήκες (Shivanand & Mugeraya 2011).

Οι στρατηγικές επιβίωσης σε περιβάλλοντα φυσιολογικού ορού που υιοθετούν οι αλόφιλοι μικροοργανισμοί είναι: η στρατηγική «*συμβατής διαλυμένης ουσίας*» και η στρατηγικής «αλάτι - in». Η στρατηγική συμβατής διαλυμένης ουσίας χρησιμοποιείται σε πλειοψηφία από μετρίως αλόφιλα και halotolerant βακτήρια, ορισμένες ζύμες, άλγη και μύκητες, όπου αυτή ακολουθήθηκε σε ένα μέρος της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Σε αυτή τη στρατηγική τα κύτταρα διατηρούν χαμηλές συγκεντρώσεις αλατιού στο κυτταρόπλασμα τους με την εξισορρόπηση της οσμωτικής δυναμικής μέσω της σύνθεσης ή πρόσληψης οργανικών συμβατών διαλυτών ουσιών. Ως εκ τούτου, αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να προσαρμοστούν σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων άλατος (Shivanand & Mugeraya 2011).

Η στρατηγική αλάτι-in απασχολείται από αληθινά αλόφιλα, συμπεριλαμβανομένων αλόφιλα αρχαία και εξαιρετικά αλόφιλα βακτήρια. Αυτοί οι μικροοργανισμοί προσαρμόζονται στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος και δεν μπορεί να επιβιώσουν όταν η αλατότητα του μέσου μειώνεται. Εν γένει δεν συνθέτουν οργανικές διαλυμένες ουσίες για να διατηρηθεί η οσμωτική ισορροπία. Αυτή η προσαρμογή περιλαμβάνει την επιλεκτική εισροή ιόντων K^+ στο κυτταρόπλασμα. Όλα τα ένζυμα και τα δομικά στοιχεία των κυττάρων πρέπει να προσαρμόζονται στις υψηλές συγκεντρώσεις άλατος για την ορθή κυτταρική λειτουργία.

Οι συμβατές διαλυτές ουσίες όπως αναφέρθηκε περιλαμβάνουν πολυόλες όπως γλυκερόλη, σάκχαρα και τα παράγωγά τους, τα αμινοξέα και τα παράγωγά τους, και τεταρτοταγείς αμίνες όπως γλυκίνη βεταΐνης και ectoines (Shivanand & Mugeraya 2011).

Η βεταΐνη είναι συμβατή διαλυτή ουσία που συμβαίνει σε αλόφιλα φωτότροφα βακτήρια, χημειοτροφικά βακτήρια και αρχαιοβακτήρια. Έχει θεραπευτικό δυναμικό για τη αντιμετώπιση και προφύλαξη από λιπώδη διήθηση του ήπατος, η οποία είναι το αρχικό στάδιο της κίρρωσης.

Επιπλέον, οι βεταΐνες μειώνουν παρενέργειες των αντιφλεγμονωδών παρασκευασμάτων. Οι αντιπηκτικές ιδιότητες τους εμποδίζουν το σχηματισμό θρόμβου και να μειώσει την πιθανότητα των καρδιακών προσβολών, εμφράγματα και εγκεφαλικά επεισόδια. Είναι χρήσιμες στην ενίσχυση PCR του GC-πλούσιων πρότυπα DNA για να αυξηθεί η απόδοση του προϊόντος και την ειδικότητα. Η βεταΐνη αποδείχθηκε ότι είναι ένα πιο αποτελεσματικό κρυσταλλικό από την αλβουμίνη του ορού ή τρεαλόζη / δεξτράνη, ιδιαίτερα υπό συνθήκες διέγερσης μακροχρόνιας αποθήκευσης (Shivanand & Mugeraya 2011).

Η εκτοΐνη (1,4,5,6-τετραϋδρο-2-μεθυλο-4-πυριμιδίνη καρβοξυλικό οξύ) είναι μια από τις πιο κοινές οσμωτικές διαλυμένες ουσίες στο βακτηριακό τομέα Η εκτοΐνη παράγεται από ορισμένα ακραία αλόφιλα και πρόκειται για ένα κυκλικό παράγωγο του ασπαρτικού αμινοξέος [*Brock Biology of Microorganism, 11th edn*]. Πρώτα ανακαλύφθηκε στο haloalkaliphilic φωτοσυνθετικό βακτήριο θείου, halochloris Ectothiorhodospira, αλλά αργότερα μια μεγάλη ποικιλία από αλόφιλα και halotolerant βακτήρια βρέθηκαν να παράγουν αυτήν την ένωση, συχνά μαζί με παράγωγο του 5-υδροξυ. Εκτοΐνες είναι κοινά σε αερόβια ετερότροφα ευβακτήρια. Το μόριο έναρξης στη βιοσύνθεση εκτοΐνης είναι το ασπαρτικό ημιαλδεΰδης, το οποίο είναι ένα ενδιάμεσο στο μεταβολισμό των αμινοξέων. Η αλδεΰδη μετατρέπεται σε L-2,4-διαμινοβουτυρικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια ακετυλιώνεται προς από Nγ -acetyldiaminobutyric οξύ (NADA). Το τελικό βήμα είναι η κυκλοποίηση αυτής της διαλυμένης ουσίας για να σχηματίσει εκτοΐνη (Shivanand & Mugeraya 2011).

Οι εκτοΐνες έχουν αποκτήσει μεγάλη προσοχή στον τομέα της βιοτεχνολογίας ως προστατευτικοί παράγοντες για ένζυμα, DNA και ολόκληρα κύτταρα έναντι καταπονήσεων όπως κατάψυξη, ξήρανση και θέρμανση. Τα τελευταία χρόνια επιπλέον ιδιότητες του ενδιαφέροντος βρέθηκαν για εκτοΐνη. Προβάλλεται ο ισχυρισμός ότι αναστέλλει τις επιδράσεις της UV-A-προκαλούμενη και επιτάχυνση της γήρανσης του δέρματος, και ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται ως καλλυντικό δερματολογικών πρόσθετο στο ενυδατικά για τη φροντίδα των ηλικιωμένων, ξηρό ή ερεθισμένο δέρμα (Shivanand & Mugeraya 2011).

Είναι καλά γνωστό ότι η αποδοτικότητα των μικροοργανισμών προς ρύπων μειώνεται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, αλλά η χρήση των αλόφιλων ή halotolerant μικροοργανισμών μπορούν να ξεπεράσουν αυτούς τους περιορισμούς.

Ορισμένες έρευνες έχουν διεξαχθεί σε επεξεργασία λυμάτων φυσιολογικού ορού κάτω από αερόβιες συνθήκες, που περιλαμβάνουν διάφορες τεχνικές και τύπους φυσιολογικού ορού λυμάτων. Αλόφιλα εμβόλια συμμετείχαν σε περισσότερες τέτοιες αερόβιες έρευνες, στις οποίες οι συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου κυμαίνονταν από 10 g / L έως 150 g / L. Batch-αντιδραστήρες τρέφονται, εκ περιτροπής biodiscs, και λειτουργίες δέσμης αλληλούχησης χρησιμοποιήθηκαν για να διατηρήσουν τη βιομάζα σε βιοαντιδραστήρες, καθώς και μεμβράνες. Η αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης COD μειώθηκε κατά την περιστροφή biodiscs χρησιμοποιήθηκαν για την κατεργασία των λυμάτων μελάσα στα οποία η συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου αυξήθηκε από 50 έως 100 g / L. Έχει προταθεί ότι η αποτελεσματική συγκράτηση ιλύος και επαρκής χρόνος προσαρμογής μπορεί να οδηγήσει σε καλή απόδοση στην αφαίρεση ρύπων (Yang et al. 2013).

1.3.2 Απόδοση των διαδικασιών που χρησιμοποιούν μεμβράνες

Οι αντιδραστήρες που τα κύτταρα τους είναι ακινητοποιημένα σε βιοφίλμ είναι χρήσιμοι όσον αφορά στην επίτευξη καλής συγκράτησης βιομάζας που απαιτείται για την επιτυχή βιολογική επεξεργασία των λυμάτων. Ωστόσο, ο σχηματισμός του βιοφίλμ σε διαφορετικές αλατότητες (και ιδιαίτερα σε υψηλές αλατότητες) είναι προβληματικός, όπως υποδεικνύεται από ασταθή κοκκοποίηση σε αντιδραστήρες UASB υπό συνθήκες φυσιολογικού ορού και ασταθή σχηματισμό βιομεμβράνης σε αναερόβιες φίλτρα. Αντίθετα, η χρήση του βιοαντιδραστήρα μεμβράνης (MBR) προσφέρει μια πολλά υποσχόμενη λύση σε αυτά τα προβλήματα. Πρώτον, η βιομάζα θα πρέπει να διατηρείται αποτελεσματικά, παρέχοντας μια καλή ευκαιρία για να προσαρμοστούν. Δεύτερον, αλόφιλοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα βιοαντιδραστήρα λόγω της κατακράτησης της βιομάζας μεμβράνη υποβοηθούμενη και αυτό μπορεί καταπολέμησει διακυμάνσεις στην συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου εισρέοντος, δεδομένου ότι οι μικροοργανισμοί έχουν αποδειχθεί ότι είναι σε θέση να επιβιώσουν σε περιβάλλοντα με ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου.

Επιπλέον, το υψηλότερο δυνατό σύνολο συγκέντρωσης αιωρούμενων στερεών (TSS), το οποίο προκύπτει από τη διατήρηση της μεμβράνης, μπορεί να καταστήσει δυνατό υψηλά ογκομετρικά φορτία και έτσι αντισταθμίζει την μειωμένη κινητική υποβάθμιση. Τέλος, η συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών στο απόβλητο μειώνεται. Η προηγούμενη συζήτηση δείχνει σαφώς ότι

εκθέσεις MBR είναι μια καλή επιλογή για την επεξεργασία των λυμάτων φυσιολογικού ορού. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για να ακινητοποιηθούν τα κύτταρα όπως μεμβράνες, εμπορικά carrier κλπ αναφέρονται πιο κάτω (Yang et al. 2013).

1.3.3 Carrier -Mutag BioChip™

Χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση των μικροοργανισμών σε συστήματα τελικής υψηλής βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων. Διαθέτει υψηλή απόδοση για υποβάθμιση, ελάχιστο απαιτούμενο όγκο, χαμηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις και υψηλότερα δεδομένα απόδοσης. Διαφορετικοί στόχοι επεξεργασίας, όπως η υποβάθμιση COD, νιτροποίηση, απονιτροποίηση και η αναερόβια τεχνολογία επιτεύχθηκαν με εξαιρετικά αποτελέσματα. Από τη δική μας άποψη, τα επιχειρήματα αυτά είναι ιδιαίτερα πειστικά. Σε όλες τις περιπτώσεις, παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερο μεταβολικό ρυθμό από ό, τι οι ανταγωνιστές τους (Multi Umwelttechnologie AG, 2009).

Τα Mutag BioChip™ που απεικονίζονται στην **Εικόνα 1.1** χρησιμοποιούνται σε αντιδραστήρες ρευστοποιημένης κλίνης, "Mutag-FBR", και χρησιμεύουν για τη βιολογική επεξεργασία των εξαιρετικά φορτωμένων βιομηχανικών και αστικών λυμάτων. Η διαδικασία επεξεργασίας είναι αερόβια ή / και αναερόβια που λειτουργεί σε υψηλά φορτία όγκου, επιτρέποντας στους αντιδραστήρες και λεκάνες να είναι πολύ μικρότερες από τα συμβατικά φυτά και μειώνοντας έτσι το κόστος τους. Οι μικροοργανισμοί στη διαδικασία ρευστοποιημένης κλίνης είναι αναγκαίοι για βιολογική ακινητοποίηση κατεργασίας στην επιφάνεια φορέα. Η δραστική επιφάνεια, με μέσο την ανοιχτή επιφάνεια, όπου οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε προστατευόμενες περιοχές, θα πρέπει να έχουν τη μέγιστη διαθέσιμη επιφάνεια χρησιμοποιώντας ένα ελάχιστο του συνολικού του όγκου. Δεν είναι το γεγονός της παροχής υψηλού όγκου φορέα, αλλά μάλλον το μέγεθος της ενεργής (προστατευμένης) επιφάνειας. Το Mutag BioChip™ παρέχει μια προστατευμένη επιφάνεια περίπου $3000 \text{ m}^2 / \text{m}^3$ και θα πρέπει να παρέχονται σε διαφορετικά υλικά, συνδυασμό υλικών, την πυκνότητα και μεγέθη πόρων, σύμφωνα με τις απαιτήσεις, τα χαρακτηριστικά των λυμάτων και τη διαδικασία (Multi Umwelttechnologie AG, 2009).

Το Mutag BioChip παρέχει έως και 10 φορές υψηλότερο ειδικό ποσοστό μεταβολισμού σε σύγκριση με συμβατικό φορέα. Τα πλεονεκτήματα του είναι οι χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις,

επέκταση ποσοστού απόδοσης, μέγιστη ασφάλεια κατά τη λειτουργία, περιορισμός κόστους, απαιτείται μικρός όγκος αντίδρασης και παρουσιάζει υψηλότερη απόδοση σε συστήματα βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων (Multi Umwelttechnologie AG, 2009).

Αυτό το συγκεκριμένο υλικό carrier έχει αναπτυχθεί για το COD, αλλά και για τη N-βιοαποικοδόμηση σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων βιομηχανικών και αστικών. Λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του, η τυπική εφαρμογή επιτρέπει τη χρήση σε αερόβια, αναερόβια, αλλά και για ανοξική διαδικασία. το αποτέλεσμα μετριέται σε πολύ υψηλά δεδομένα απόδοσης για την απονιτροποίηση, νιτροποίηση και COD-υποβάθμιση.

Το αποτέλεσμα σε παράλληλα βιολογικές δοκιμασίες και σε σύγκριση με συμβατικούς φορείς, ο όγκος πλήρωσης για την Biochip Mutag μειώθηκε μέχρι και 90% από τα ίδια αποτελέσματα απόδοσης. Αυτό είναι το γεγονός, ότι η ειδική και προστατευμένη επιφάνεια για την ανάπτυξη των ενεργών λεπτών βιοφίλμ είναι το κλειδί για την υψηλή απόδοση και όχι ο όγκος του υλικού φορέα με υψηλή εσωτερικό όγκο (Multi Umwelttechnologie AG, 2009).

Οι μικροοργανισμοί στο BioChip προστατεύονται στους πόρους και η ανοικτή επιφάνεια καθαρίζεται από τη διατμητική δύναμη κατά τη μετακίνηση και τριβή μεταξύ τους. Λάσπη, ιλύος και άλλες καταθέσεις των υλικών στο εσωτερικό των μεταφορέων δεν είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, αυτοκαθαριζόμενα με τη δύναμη διάτμησης είναι ένα από τα πλεονεκτήματα της Mutag BioChip™. Το Mutag BioChip™ διαμορφώνονται σε παραβολοειδούς νιφάδες, οι οποίες ωφείλονται σε εύκολη πλευρά ροής και βελτιστοποιημένη κίνηση. Τα οφέλη παραβολοειδούς στην εύκολη και ενεργή μετακίνηση του φορέα και αποτρέπει την απόφραξη σε περιοχές διατήρησης. Οι φορείς έχουν ανασταλεί και είναι σε συνεχή κίνηση στον βιοαντιδραστήρα. Το Mutag BioChip™ είναι διαθέσιμο σε πολλές διαφορετικές συνθέσεις υλικού και ορίζονται τα μεγέθη των πόρων, σύμφωνα με τις απαιτήσεις και τις εφαρμογές (Multi Umwelttechnologie AG, 2009).

Με την παροχή των μεταφορέων, ο σχεδιασμός του σχετίζεται με αεριστήρες, κόσκινα, οθόνες κατακράτησης, ακροφύσια ψεκασμού αντί αφρού και άλλα αναπόσπαστα μέρη στον βιοαντιδραστήρα είναι επίσης σημαντική κατά την κατασκευή του συστήματος ως συνόλου, και μπορούν να παρασχεθούν κατόπιν αιτήσεως. Το carrier Mutag BioChip™ δεν χρησιμοποιείται μόνο σε νέες εγκαταστάσεις, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την αναβάθμιση των υφιστάμενων διαδικασιών ενεργού ιλύος. Η διαδικασία βιοφίλμ μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως μόνη στάσιμη μέθοδος, σε συνδυασμό με τα προκαταρκτικά στάδια επεξεργασίας και στο τελικό στάδιο στίλβωσης (Multi Umwelttechnologie AG, 2009).



Εικόνα 1.1: Απεικόνιση εμπορικού carrier

1.3.4 Κελύφων αυγών

Η παραγωγή των αυγών σε βιομηχανικό επίπεδο οδηγεί σε μια σημαντική ποσότητα υπολείμματος κελύφους, το οποίο θεωρείται ως απόβλητο ή χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα στη γεωργία. Εν γένει, τα κελύφη αυγών θεωρείται ότι δεν έχουν καμία οικονομική αξία, ακόμα κι αν είναι πλούσια σε μέταλλα και αμινοξέα που θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για διάφορες βιομηχανίες. Οι πιθανές εφαρμογές των κελύφων κυμαίνονται από χαμηλές επενδύσεις διεργασίας, όπως λιπάσματα και ζωοτροφές σε υψηλές επενδύσεις για το μετασχηματισμό ως υλικό για κατανάλωση από τον άνθρωπο, για απορρόφηση των βαρέων μετάλλων, για επεξεργασία χαρτιού, καταλύτες για την παραγωγή βιοντίζελ, παραγωγή υδρολυμένης ή συμπυκνωμένης πρωτεΐνης, των οστών και οδοντικά εμφυτεύματα (Oliveira et al. 2013)

Για ανάπτυξη των βιομηχανικών εγκαταστάσεων, η οποία μπορεί να χρησιμοποιήσει υπολείμματα κελύφους του αυγού, ώστε να προσθέσουν αξία από τη χρήση αυτών των υλικών σε περιβαλλοντικά ασφαλείς τρόπους. Η χρήση αυτών των κελυφών ως εναλλακτική πηγή του CaCO₃ (ανθρακικού ασβεστίου) μπορεί να μειώσει τον αντίκτυπο των φυσικών αποθεμάτων από ασβεστόλιθο, μια μη ανανεώσιμη φυσική πηγή.

Σύμφωνα με Neves (1998) και το Boron (2004) το κέλυφος του αυγού είναι ένα προστατευτικό φράγμα, ακόμη και κατά τη διείσδυση των μικροοργανισμών. Το κέλυφος είναι ένα βιοκεραμικό σύνθετο υλικό με εξωκυτταρικά συναρμολογημένη δομή, η λειτουργία των οποίων είναι η

προστασία των περιεχομένων του αυγού και μπορεί να εξασφαλίσει την απαραίτητη για το σχηματισμό του σκελετού του νεοσσού ασβεστίου. Το κέλυφος του αυγού αποτελείται από αρκετά πορώδη στρώματα, τα οποία είναι διαπερατά από το νερό και αέρια, επιτρέποντας στο έμβρυο να αναπνέει (Neves, 1998). Κατά τη διάρκεια της βιομηχανικής επεξεργασίας των κελυφών των αυγών τα διαφορετικά συστατικά διαχωρίζονται (Oliveira et al. 2013).

Το ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), το κύριο συστατικό του κελύφους, είναι ένα άμορφο κρύσταλλος που εμφανίζεται φυσικά με τη μορφή ασβεστίτη (εξαγωνικό κρύσταλλο), με χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (13 mg / L , στους $18 \text{ }^\circ\text{C}$). Ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3) σε σκόνη που λαμβάνεται από κελύφη αυγών μπορεί να δράσει ως ένας παράγοντας στην απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από το νερό και το έδαφος. Ο Liao et al. (2010) και De Paula et al. (2008) έδειξαν ότι τα παράγωγα από τα απόβλητα κέλυφος του αυγού μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να αφαιρέσει αποτελεσματικά διάφορα δυσθενή ιόντα μετάλλων, όπως ο μόλυβδος, το κάδμιο και το χαλκό, από υδατικό διάλυμα. Επίσης ο Ok et al. (2011) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα απόβλητα κέλυφος του αυγού μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτική λύση για CaCO_3 για την ακινητοποίηση των βαρέων μετάλλων στα εδάφη (Oliveira et al. 2013).

Το οξείδιο του ασβεστίου (CaO) είναι μια πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται από τη χημική βιομηχανία για την παραγωγή ασβέστη. Τα κελύφη των αυγών είναι μια εξαιρετική πηγή αυτής της ουσίας και θα μπορούσε να προσφέρει μια εναλλακτική πρώτη ύλη για το βιομηχανικό τομέα, αλλά με ένα οικονομικό μειονέκτημα όσον αφορά τον ανταγωνισμό με το ορυκτό προϊόν (Neves, 1998). Επιπρόσθετα μπορεί να χρησιμοποιηθούν με παρόμοιο τρόπο με εργασίες που πραγματοποιήθηκαν από τον Lee et al. (2009) ο οποίος ανέπτυξε ενεργοποιημένου κελύφους στρεπιδίων (AOS) με πυρόλυση στους $750 \text{ }^\circ\text{C}$ υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η AOS είναι μια κατάλληλη και βιώσιμη ουσία για την απομάκρυνση του φωσφόρου (έλεγχος ευτροφισμού) σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Η AOS θα παρουσιάσει σημαντικό πλεονέκτημα έναντι ασβέστη ως πηγή ιόντων υδροξυλίου, λόγω της κοκκώδους φύσης του, η οποία επιτρέπει τον εύκολο χειρισμό και οδηγεί σε αργή διάλυση σε νερό. Ωστόσο, σύμφωνα με Αρβανιτογιάννης (2008), η πυρόλυση είναι μια διαδικασία υψηλού κόστους (Oliveira et al. 2013).

Η σκόνη που λαμβάνεται μέσω αυτής της διαδικασίας, εκτός του ότι είναι μια πηγή ασβεστίου, περιέχει πρωτεΐνες που απομένουν από τα ασπράδι (ασπράδι αυγού), τις μεμβράνες και τη μήτρα κέλυφος.

Τα κελύφη αυγών όπως αναφέρθηκε παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν σε άλλες μελέτες για απορρόφηση-δέσμευση φωσφόρου και είχαν αποδοτικά αποτελέσματα. Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως προσροφητικό υλικό για βιοεξυγίανση αποβλήτου δηλαδή για δημιουργία βιοφίλμ και επεξεργασία του αποβλήτου. Με βάση τα αποτελέσματα αποδεικνύει ότι τα τσόφλια αυγών θεωρούνται προσροφητικά υλικά για επεξεργασία λυμάτων. Μερικά προσροφητικά υλικά είναι η τέφρα, σμεκτίτες (φυλλόμορφοι άργιλοι), ενεργός άνθρακας, μοριακά κόσκινα κ.ά (Oliveira et al. 2013).

1.3.5 Νιτρικά

Είναι γνωστό ότι για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών χρειάζονται τα νιτρικά (θρεπτικά συστατικά). Το N (άζωτο) και P (φώσφορο) είναι θρεπτικές ουσίες οι οποίες είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη της βιομάζας. Επομένως, πρέπει να είναι μονίμως διαθέσιμα σε επαρκή βαθμό στα λύματα, προκειμένου να εξασφαλιστεί η βέλτιστη βιολογική απομάκρυνση ρύπων από τους μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση κάθε έλλειψης σε N & P, η αποτελεσματικότητα βιοαποικοδόμησης μειώνεται δραστικά, ανάλογα με την ένταση της έλλειψης σε θρεπτικά συστατικά (Multi Umwelttechnologie AG)

Η C-N-P αναλογία: Η βιομάζα που μόνιμα δημιουργείται εκ νέου λόγω της βιοαποικοδόμησης των ρύπων (ανάπτυξη της βιομάζας), ενσωματώνει N & P, καθώς και C στην ουσία της. Η C: N: P-αναλογία στην ουσία της βιομάζας είναι 100:5:1 σε γενικές γραμμές. Ο Άνθρακας είναι διαθέσιμος στα λύματα, με τη μορφή των COD, ενώ τα θρεπτικά συστατικά N & P είναι τουλάχιστον σε ορισμένες εφαρμογές και ειδικότερα σε βιομηχανικά απόβλητα, αν δεν είναι επαρκώς ή καθόλου διαθέσιμα και θα πρέπει να προστεθούν (Multi Umwelttechnologie AG).

Επομένως, χρησιμοποιείται η αναλογία αυτή για βέλτιστες συνθήκες και βέλτιστη απόδοση στην απομάκρυνση των ρύπων. Στη προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ammonium nitrate (νιτρικό αμμώνιο) το οποίο αντιστοιχεί στην πιο πάνω αναλογία.

Ο μεταβολισμός και ως εκ τούτου η ανάπτυξη, καθώς και η εκ νέου παραγωγή της βιομάζας απαιτούν την επαρκή διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η βέλτιστη απόδοση βιοαποικοδόμησης της Biochip Mutag, το σύστημα MBBR δεν πρέπει να

περιορίζεται σε θρεπτικά συστατικά. Υπό ορισμένες συνθήκες, μπορεί να είναι αναγκαίο να προστεθεί το θρεπτικών Ν (άζωτο) και Ρ (φώσφορος) (Multi Umwelttechnologie AG)

Η παρακολούθηση γίνεται με τη μέτρηση των φιλτραρισμένων δειγμάτων από την έξοδο MBBR. Προτεινόμενες συγκεντρώσεις, εκτός εάν οι απαιτήσεις της παραμέτρου εξόδου δεν είναι αυστηρότερες:

- NH₄-N (αμμώνιο-αζώτου)
- PO₄-P (ορθοφωσφορικό-φώσφορος)

Αν οι συγκεντρώσεις πρέπει να πέσουν κάτω από τις τιμές που αναφέρονται παραπάνω, η αντίστοιχη προμήθεια πρέπει να αυξηθεί, με την προϋπόθεση ότι πληρούνται οι απαιτήσεις της παραμέτρου εξόδου επιτρέπουν για αυτό. Με αυτό, διασφαλίζεται ότι η βιοκοινότητα επαρκώς τροφοδοτείται με θρεπτικά συστατικά.

Σε γενικές γραμμές, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι το κλείσιμο των θρεπτικών συστατικών είναι μονίμως προσαρμοσμένο στην τρέχουσα ταχύτητα ροής (Q) και στην αντίστοιχη συγκέντρωση COD! (Multi Umwelttechnologie AG)

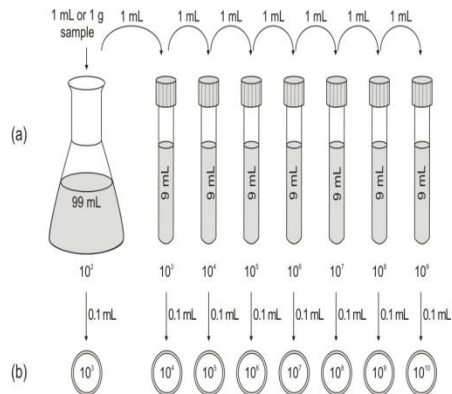
2 Μεθοδολογία-Πειραματικές Τεχνικές

2.1 Μικροβιολογικές Τεχνικές

2.1.1 Εμπλουτισμός και απομόνωση μικροοργανισμών

Η διαδικασία της απομόνωσης είναι σημαντική, γιατί δίνει στελέχη μικροοργανισμών για λεπτομερείς, ελεγχόμενες εργαστηριακές μελέτες και για εφαρμογές τόσο στους τομείς της βιοτεχνολογίας όσο και της βιομηχανικής και περιβαλλοντικής μικροβιολογίας. Ο πειραματιστής θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσεκτικός δεδομένου του ότι σε ένα περιβάλλον δεν υπάρχει ένας μικροοργανισμός αλλά πολλά είδη διαφορετικών οργανισμών και έτσι θα πρέπει να φροντίσει να εφαρμόσει τις τεχνικές εκείνες που θα του δώσουν τον επιθυμητό για εκείνο μικροοργανισμό. Η τεχνική της καλλιέργειας εμπλουτισμού είναι η πιο συνήθης στρατηγική που ακολουθείται. Σε μια καλλιέργεια εμπλουτισμού επιλέγονται θρεπτικά υλικά και συνθήκες επώασης που ευνοούν τον επιθυμητό οργανισμό και περιορίζουν τους υπόλοιπους. Καλλιέργειες εμπλουτισμού δημιουργούνται με απευθείας αραίωση του υλικού ενοφθαλμισμού σε ισχυρά επιλεκτικό θρεπτικό μέσο και έτσι απομονώνονται πολλοί ευρέως διαδεδομένοι προκαρύωτες. Η διαδικασία εμπλουτισμού «εξαντλητικών αραιώσεων» εφαρμόζεται συνεχιζόμενα όταν αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί στα διάφορα βιομέσα. Σε ένα επιλεκτικό μέσο καλλιέργειας προστίθεται μια υπάρχουσα καλλιέργεια εμπλουτισμού, ή ένα φυσικό δείγμα νερού, εδάφους κ.ο.κ και υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις. Ο τελευταίος σωλήνας στον οποίο εμφανίζεται κυτταρική αύξηση θα πρέπει να περιέχει 10 κύτταρα. Για τη λήψη αμιγούς καλλιέργειας, δείγμα αυτού ακριβώς του σωλήνα χρησιμοποιείται ως υλικό ενοφθαλμισμού και η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται (Madigan, T.M., 2005).

Αμιγής αραίωση εκτός από την αραίωση σε υγρή φάση μπορεί να προκύψει και με άλλους τρόπους όπως ανάδευση σε τηγμένο Άγαρ ή πιο συνήθης με γραμμική επίστρωση σε τρυβλία. Κατά προτίμηση οι οργανισμοί που αναπτύσσονται καλά σε τρυβλία με άγαρ να καλλιεργούνται με τη μέθοδο της γραμμικής επίστρωσης, καθώς είναι γρήγορη και εύκολη. Με διαδοχικές λήψεις και γραμμικές επιστρώσεις μιας ευδιάκριτης αποικίας είναι εφικτό να ληφθεί μια αμιγής καλλιέργεια ή οποία μπορεί να μεταφερθεί στη συνέχεια σε υγρή καλλιέργεια (Madigan, T.M., 2005).



(A)

(B)

Εικόνα 2.1: Α) Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων σε υγρή φάση, Β) Διακριτές αποικίες σε τρυβλίο

2.1.2 Τεχνικές αποστείρωσης και απολύμανσης

Τόσο για την απολύμανση όσο και για την αποστείρωση χρησιμοποιούνται συνήθως φυσικές μέθοδοι. Οι καθιερωμένες μέθοδοι για θανάτωση ή απομάκρυνση ανεπιθύμητων μικροοργανισμών είναι η θέρμανση σε υψηλές θερμοκρασίες, η ακτινοβολία και η διήθηση (Madigan, T.M., 2005).

2.1.3 Φυγόκεντρωση:

Η φυγόκεντρος δύναμη είναι μια πλασματική δύναμη που «αισθάνεται» ένα σώμα το οποίο εκτελεί κυκλική κίνηση, η δύναμη αυτή μοιάζει να το σπρώχνει να φύγει από την κυκλική του τροχιά, προς τα έξω. Γενικά όσο μεγαλύτερο είναι το σώμα και όσο πιο μεγάλη η ταχύτητα περιστροφής, τόσο μεγαλύτερη είναι και η φυγόκεντρος δύναμη [Serway, Beichner & Jewett, 2000]. Στη μικροβιολογία χρησιμοποιείται αρκετά η φυγόκεντρος, συνήθως για την καθίζηση ενός μικροοργανισμού.



Εικόνα 2.2: Συσκευή φυγοκέντρισης

2.2 Βιοχημικές Τεχνικές

2.2.1 Φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (UV-VIS)

Η φασματοφωτομετρία απορρόφησης αποτελεί αναμφίβολα μια από τις χρησιμότερες αναλυτικές τεχνικές στη φαρμακευτική ανάλυση. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ονομάζεται χρωμοφόρο και η εμφάνιση των χαρακτηριστικών ταινιών απορρόφησης των διαφόρων χρωμοφόρων ομάδων σε ένα φάσμα απορρόφησης είναι ενδεικτική για την ύπαρξη των ομάδων αυτών στο μόριο. Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους – ορατού (περίπου 190-800 nm) χρησιμοποιείται κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών, με συσχέτιση του ποσοστού απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προς τη συγκέντρωση της ουσίας που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση (ποσοτική φασματοφωτομετρία).

Στη φασματομετρία απορρόφησης μετριέται η απορρόφηση (A) ή η διαπερατότητα (T) του δείγματος και με ανάλυση:

$$A = -\log T = -\log(P/P_0) = \epsilon \cdot b \cdot c$$

A= απορρόφηση

P₀= ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

P= ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση από το διάλυμα

T= διαπερατότητα ίση με P₀/P που εκφράζεται και στα εκατό (%T)

a = σταθερά αναλογίας που καλείται απορροφητικότητα. Έχει μονάδες $\text{g}^{-1}\text{L cm}^{-1}$

Οργανολογία

Για τη μέτρηση της απορροφήσεως χρησιμοποιούνται φωτόμετρα και φασματοφωτόμετρα. Κατατάσσονται σε απλής (μονής) ή διπλής δέσμης. Ανεξάρτητα από τον τύπο του φασματοφωτόμετρου, η μέτρηση της απορροφήσεως είναι πάντοτε σχετική, απαιτείται δηλαδή σύγκριση της απορροφήσεως του δείγματος με την απορρόφηση του τυφλού ή του πρότυπου διαλύματος.

Παρέχουν όλα τις ίδιες βασικές δομικές μονάδες, δηλαδή: 1) μια πηγή ακτινοβολίας σταθερής ισχύος που αναφέρεται και ως απλή πηγή φωτός, 2) ένα επιλογέα μήκους κύματος για την απομόνωση της επιθυμητής ακτινοβολίας, 3) μια κυψελίδα για την τοποθέτηση του δείγματος, 4) ένα ανιχνευτή ακτινοβολίας που μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ηλεκτρικό και 5) ένα σύστημα μετρήσεως, το οποίο συνήθως περιλαμβάνει ενισχυτή του σήματος και όργανο αναγνώσεως (Χατζηιωάννου, Θ.Π., 2010).

2.2.2 Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (COD)

Είναι η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται για την πλήρη χημική οξείδωση των οργανικών ενώσεων που υπάρχουν στα νερά σε διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και νερό (H_2O). Στην περιβαλλοντική χημεία, η μέτρηση της χημικής ζήτησης σε οξυγόνο (COD) χρησιμοποιείται συνήθως για την έμμεση μέτρηση της συγκέντρωσης οργανικών ενώσεων στο νερό. Οι περισσότερες εφαρμογές του COD καθορίζουν το ύψος των οργανικών ρύπων που βρίσκονται σε επιφανειακά ύδατα (π.χ. λίμνες και ποτάμια), κάνοντας έτσι το COD ένα χρήσιμο μέτρο της ποιότητας των υδάτων. Η διαδικασία δοκιμής COD βασίζεται στη χημική-αποσύνθεση των οργανικών και ανόργανων ρυπαντών, που διαλύονται ή αιωρούνται στο νερό. Το αποτέλεσμα μιας μέτρησης COD δείχνει την ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό που καταναλώνουν οι ρυπαντές, κατά τη διάρκεια δύο ωρών της αποσύνθεσης από μια λύση του βρασμού διχρωμικό κάλιο ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Το COD προσδιορίζεται σε χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο (mg/L), γεγονός που δείχνει τη μάζα του οξυγόνου που καταναλώνεται ανά λίτρο διαλύματος. Όσο μεγαλύτερο είναι το COD, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό της ρύπανσης του δείγματος. Για

ρύπους που μπορούν να οξειδωθούν βιολογικά για τη μέτρηση τους χρησιμοποιείτε η μέθοδος μέτρησης του βιολογικά απαιτούμενου οξυγόνου BOD (Βασιλάτος, X).

Η μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δύο διαλυμάτων. Τα πρότυπα διαλύματα είναι το διχρωμικό κάλιο ($K_2Cr_2O_7$) 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 το αντιδραστήριο θειϊκού οξέος (H_2SO_4), σύστασης 5,5 g Ag_2SO_4 / kg H_2SO_4 ($\rho=1.84g/ml$). Το διχρωμικό κάλιο σε όξινο περιβάλλον χρησιμοποιείται σαν ισχυρό οξειδωτικό μέσο των οργανικών ενώσεων στο δείγμα ενώ ο θειϊκός άργυρος χρησιμοποιείται σαν καταλύτης για την οξείδωση αυτή και ο θειϊκός υδράργυρος χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση των χλωριούχων ιόντων που συνήθως υπάρχουν στο δείγμα (M. 2006; Tsai & Olson 1991). Η μέτρηση του COD έναντι του BOD παρουσιάζει πλεονεκτήματα ως προς την ταχύτητα στο χρόνο ανάλυσης (η μέτρηση ολοκληρώνεται σε 2-3 ώρες ενώ η μέτρηση του BOD απαιτεί 5 ημέρες). Έχει όμως το μειονέκτημα να προσδιορίζει τόσο τη βιοαποδομήσιμη όσο και τη μη βιοαποδομήσιμη οργανική ύλη (Βασιλάτος, X).

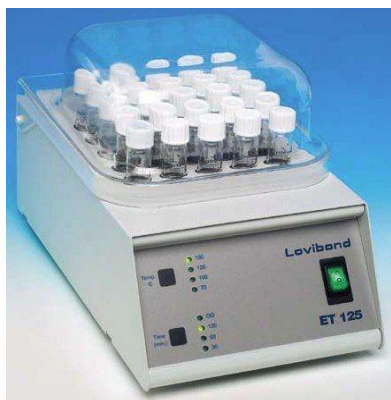
Για τον υπολογισμό του COD στα δείγματα πρώτα χρειάστηκε να φτιαχτεί μια καμπύλη βαθμονόμησης. Για την καμπύλη φτιάχτηκε διάλυμα γλυκόζης 1g/L προσθέτοντας σε 500ml απιονισμένου νερού 0,470g γλυκόζης και στην συνέχεια ακολουθήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις γλυκόζης (0,025 g/L, 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,25 g/L, 0,5 g/L, 0,75 g/L, 1 g/L).

Έπειτα σε 1ml από τα δείγματα, τα διαλύματα γλυκόζης και ένα τυφλό δείγμα νερού προσθέσαμε 0.6 ml πρότυπου διαλύματος 1 και 1.4 ml πρότυπου διαλύματος 2. Το τυφλό δείγμα με νερό χρησιμοποιήθηκε για να αφαιρεθεί η οπτική απορρόφηση από το χρώμα των πρότυπων διαλυμάτων. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων για την μέτρηση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου έγινε στα 600nm. Από τις μετρήσεις των διαλυμάτων γλυκόζης κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμηση από την οποία βρέθηκε το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο των δειγμάτων.

2.2.3 Ανάλυση Χημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (COD):

Αρχικά τοποθετείται 1,5 ml (duplicated) από κάθε δείγμα σε eppendorf tubes για φυγοκέντριση με σκοπό καταβύθιση σωματιδίων για να έχουμε καθαρό δείγμα, να φεύγουν τα στερεά και να

παραμένει μόνο το υγρό. Τα δείγματα αν περιέχουν μεγάλη ποσότητα οργανικού συνήθως χρειάζονται αραιώση. Έπειτα γίνεται αραιώση 1:10 δηλαδή ένα 1ml από το δείγμα και 9ml νερό. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες για COD τοποθετείται 1 ml φιλτραρισμένο δείγμα. Στη συνέχεια προσθέτονται τα αντιδραστήρια, 0,6 ml διχρωμικού καλίου και 1,4 ml διαλύματος θειϊκού οξέος. Κλείσιμο καλά με τα ειδικά πώματα και ανακινούμαι ελαφρά και προσεκτικά τους σωλήνες. Τοποθέτηση των σωλήνων στο thermo-reactor (**Εικόνα 2.3**) για 120 λεπτά στους 150°C. Τέλος μέτρηση την οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 600nm με την χρήση του όργανο τύπου UV/VIS spectrometer Jenway 7315 το οποίο απεικονίζεται στην **Εικόνα 2.4**:



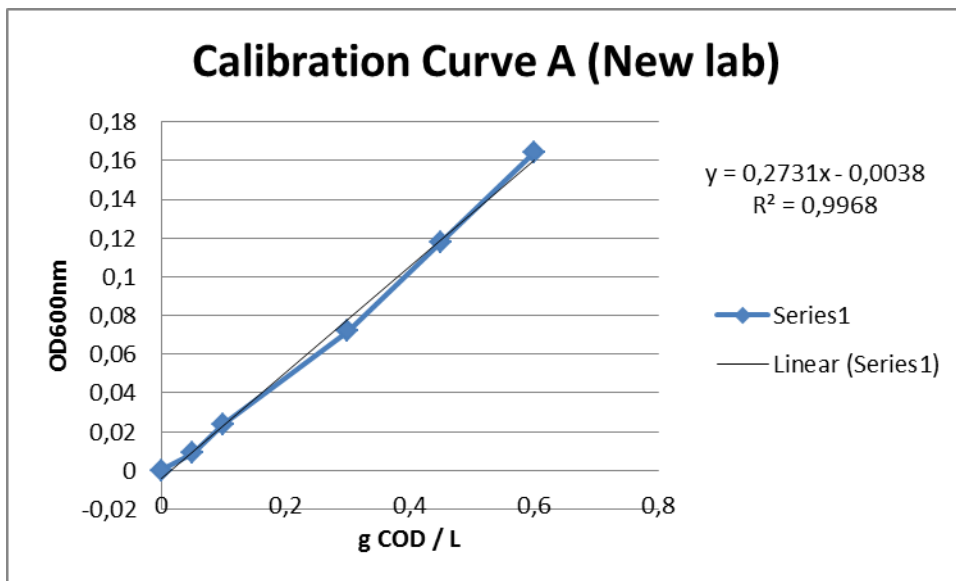
Εικόνα 2.3: Συσκευή thermoreactor



Εικόνα 2.4: UV/VIS spectrometer Jenway 7315

2.2.3 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε σε φασματοφωτόμετρο ορατής – υπεριώδης ακτινοβολίας. Σε γυάλινη κυψελίδα τοποθετήθηκε 1ml φιλτραρισμένο από τα δείγματα και μετρήσαμε την οπτική απορρόφηση τους σε 600 nm. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η πιο κάτω καμπύλη βαθμονόμησης στο **Γράφημα 2.1** με εξίσωση $y = 0,2731x - 0,0038$. Η καμπύλη είναι γραμμική με $R^2 = 0,9968$ και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί με ακρίβεια για να βρούμε το COD του αποβλήτου. Έχοντας γνωστές συγκεντρώσεις: την απορρόφηση του αποβλήτου (y), το a και το b , προκύπτει το x που είναι το άγνωστη συγκέντρωση. Άρα, η καμπύλη $y = 0,2731x - 0,0038$ χρησιμοποιήθηκε για συγκεντρώσεις COD από 0-1 g/L.



Γράφημα 2.1: Καμπύλη βαθμονόμησης για τον υπολογισμό χημικά απαιτούμενο οξυγόνου COD

3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία έχει ως κύριο θέμα την βιοδιάσπαση του bilge waste. Συγκεκριμένα αναφέρονται όλες οι βιολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη βιοδιάσπαση του bilge. Καίριο θέμα είναι και η δημιουργία ομάδας μικροβιακών στελεχών που προκύπτει από τη επεξεργασία του αποβλήτου. Όπως θα δούμε και παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν διάφορα βακτήρια για εντοπισμό των βέλτιστων βακτηρίων υπό αυτές τις συνθήκες.

3.1 Βιοχημικές Τεχνικές

3.1.1 Βακτηριακά Στελέχη

Τα διάφορα στελέχη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την πτυχιακή εργασία είχαν απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε προηγούμενες μελέτες. Ορισμένα στελέχη βρίσκονταν αποθηκευμένα σε γλυκερόλη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε υγρή καλλιέργεια ενώ κάποια άλλα ή και ίδια στελέχη βρίσκονταν σε στερεή μορφή σε τρυβλία Petri. Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης τους (βέλτιστο pH, θερμοκρασία) καθώς και η συνταγή του βιομέσου δηλαδή η πηγή άνθρακα και τα ανόργανα συστατικά που χρησιμοποιούν για το μεταβολισμό τους ήταν ήδη γνωστά από την προηγούμενη πτυχιακή εργασία όπου είχε γίνει η απομόνωσή τους.

Στα αρχικά στάδια της εργασίας έγινε επανακαλλιέργεια των μικροοργανισμών αυτών ούτως ώστε να ενεργοποιηθούν οι μικροοργανισμοί που ήταν σε ανενεργή μορφή. Πάρθηκαν δείγματα από καθαρές καλλιέργειες αποθηκευμένες σε γλυκερόλη καθώς και από καλλιέργειες που βρίσκονταν σε τρυβλία petri στο εκκολαπτήριο.

Τα βακτηριακά στελέχη που επαναενεργοποιήθηκαν είναι τα εξής: *S1*, *S6*, *LVD-10*, *LA9*, *Ind-1* και *D2*, *LVD-10*, *ci-D2*, *ExInd-2*, *StePE*, *En-SW* και *Hal-CG*: παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1** και **3.2** αντίστοιχα. Επίσης εξετάστηκαν και τα βακτήρια: *K*, *A.S* και *Klon-LVD*.

Πίνακας 3.1: Παλιά ομάδα βακτηριακών στελεχών

<i>LVD-10</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S1</i>	<i>Citrobacter sp</i>
<i>S6</i>	<i>Citrobacter sp</i>
<i>Ind-1</i>	<i>Indigenous 1</i>
<i>D2</i>	<i>Enterobacter sp</i>
<i>LA9</i>	<i>Enterobacter sp</i>

Πίνακας 3.2: Νέα ομάδα βακτηριακών στελεχών

<i>LVD-10</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>ci-D2</i>	<i>Citrobacter sp</i>
<i>ExInd-2</i>	<i>Exiguobacterium profundum</i>
<i>Ste-PE</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>En-SW</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>
<i>Hal-CG</i>	<i>Halomonas meridian</i>

3.1.2 Διαδικασία παρασκευής βιομέσων:

Γενικά η διαδικασία που ακολουθείται για την παρασκευή τόσο των υγρών όσο και των στερεών βιομέσων είναι η ίδια, με τη μόνη διαφορά ότι στο στερεό βιομέσο προστίθεται άγαρ. Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής: Αρχικά ζυγίζονται τα συστατικά στις επιθυμητές ποσότητες και τοποθετούνται σε δοχεία Duran. Ακολούθως συμπληρώνεται το μείγμα με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας αποσταγμένου νερού και η τοποθέτηση του μαγνητικού αναδευτήρα είναι απαραίτητη για την ομοιογενοποίηση του μίγματος. Το δοχείο τοποθετείται σε

κλίβανο για να αποστειρωθεί. Η χρονική διάρκεια που χρειάζεται για την αποστείρωση είναι περίπου ενάμιση ώρα αν και η πλήρης αποστείρωση επιτυγχάνεται σε 20 λεπτά στους 120° C. Αφού τελειώσει η αποστείρωση το υγρό αφήνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να κατέλθει η θερμοκρασία του και να ρυθμιστεί το pH του (γύρω στο 7) με τη χρήση διαλυμάτων NaOH 1M και H₂SO₄ 20%. Εμπειρικά η ρύθμιση του pH θεωρείται πιο σωστό να γίνεται πριν την αποστείρωση του μίγματος για να μην υπάρξει η παραμικρή πιθανότητα επιμόλυνσης του. Αφότου γίνει η αποστείρωση καλό θα ήταν να μετριέται το pH για επαλήθευση ότι βρίσκεται στη σωστή τιμή. Τέλος, το βιομέσο τοποθετείται σε αποστειρωμένα serum bottles ή σε τρυβλία petri ανάλογα με την καλλιέργεια: υγρή ή στερεή (Αγαθαγγέλου, Μ 2014).

3.1.3 Προετοιμασία Βιολογικών στελεχών

Σε αρχικό στάδιο όπως αναφέρθηκε στο **3.1.1** έγινε επανακαλλιέργεια των μικροοργανισμών ούτως ώστε να γίνει η ενεργοποίησή τους. Ο εμβολιασμός των αρχικών στελεχών τόσο από τις αποθηκευμένες σε γλυκερόλη αποικίες όσο και από τα τρυβλία petri έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες οι οποίες περιγράφησαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Ο εμβολιασμός των αρχικών στελεχών πραγματοποιήθηκε σε τρυβλία Petri και τοποθετήθηκαν στο εκκολαπτήριο (Sanyo incubator) στους 30 °C για 2-3 μέρες μέχρι να παρατηρηθεί ανάπτυξη αποικιών. Η συνταγή του βιομέσου που ακολουθήθηκε φαίνεται στον **πίνακα 3.1**.

Ο λόγος που εμβολιάζουμε το απόβλητο είναι λόγω υψηλής αλατότητας που διαθέτει και έτσι η φαινόλη φαίνεται να λειτουργεί καλύτερα σε αυτές της συνθήκες εξαιτίας και των υδρογονανθράκων που περιέχει το απόβλητο.

Ο εμβολιασμός των στελεχών γίνεται κάθε φορά σε 100% bilge waste και 10% carrier με εμβόλιο 4% v/v για κάθε βακτηριακή καλλιέργεια. Η μόνη διαφορά είναι η χρήση διαφορετικού carrier ή χρήση διαφορετικών βακτηρίων.

Πίνακας 3.3: Συνταγή Βιομέσου για ενεργοποίηση των μικροοργανισμών

Συστατικά	Ποσότητα (g/L)
NaCl	15
KH ₂ PO ₄	0.5
NH ₄ Cl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
K ₂ HPO ₄	0.2
Yeast	0.5
Phenol	0.5

3.2 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία είναι ένα από τα σημαντικότερα βήματα για την απομόνωση των επιθυμητών μικροοργανισμών. Οι παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη σε μια δειγματοληψία είναι οι πιο κάτω: χρονική περίοδος/συχνότητα (επίδραση καιρικών συνθηκών , θερμοκρασία υγρασία), θέση δειγματοληψίας (εάν το δείγμα είναι από νερό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το βάθος εάν ο επιθυμητός μικροοργανισμός είναι αυτότροφος, ετερότροφος, αερόβιος κ.ο.κ., αριθμός και διάταξη θέσεων δειγματοληψίας, όγκος δείγματος και όργανα δειγματοληψίας (Κανινή, Γ.)

Όλα τα δείγματα πάρθηκαν από την εταιρεία Ecofuel Cyprus Ltd. που βρίσκεται στη Λεμεσό, στο Ζύγι. Η εταιρεία αναλαμβάνει την συλλογή, επεξεργασία και διαχωρισμό ελαιώδων αποβλήτων. Είναι μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων και πετρελαιωδών. Γίνεται λήψη αποβλήτου (influent) πριν υποβληθεί σε οποιαδήποτε διεργασία για να επεξεργαστεί σε εργαστηριακό πεδίο με διάφορες μικροβιακές μεθόδους με συγκεκριμένα βακτήρια. Το απόβλητο έχει pH 7 και αλατότητα 35 g/L NaCl.

3.3 Πειράματα ακινητοποίησης κυττάρων

3.3.1 Συμβατές διαλυτές ουσίες:

Στο πρώτο πείραμα με συμβατές διαλυτές ουσίες έγινε μεταφορά και ενεργοποίηση των στελεχών από υγρές καλλιέργειες που είχαν αποθηκευτεί σε γλυκερόλη. Αρχικά ενεργοποιήθηκε το μείγμα των μικροοργανισμών σε βιομέσο με φαινόλη το οποίο περιείχε αλατότητα 15 g/L NaCl στο απόβλητο το οποίο έχει αλατότητα 35g/L NaCl. Επώαση για 2-3 ημέρες στους 30°C με στροφές 100 rpm για σχηματισμό αποικιών.

Έγινε έλεγχος διαφορετικών συγκεντρώσεων βεταΐνης (GB): 0mM, 1mM, 5mM και 10mM σε 100% bilge waste με τελικό όγκο 200ml όπου με τα 10ml εμβολιασμός του αποβλήτου από το βιομέσο που παρασκευάστηκε.

Συλλέχθηκαν δείγματα (triplicate) μετά από 24, 48, 72 και 96 ώρες από την προσθήκη του αποβλήτου. Για την ανάλυση του COD των δειγμάτων λαμβάνεται 1,5ml δείγμα από κάθε συγκέντρωση και τοποθέτηση σε erpendorf tubes για φυγοκέντριση 2 λεπτά σε 1040 rpm για καταβύθιση των σωματιδίων ώστε να έχουμε καθαρό δείγμα και να καθιζάνουν τα ιζήματα. Λόγω του ότι δείγματα έχουν μεγάλη ποσότητα οργανικού συνήθως χρειάζονται αραιώση. Γίνεται αραιώση 1:10 δηλαδή ένα 1ml από το δείγμα και 9ml νερό. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες για COD τοποθετείται 1 ml φιλτραρισμένο δείγμα. Στη συνέχεια προσθέτονται τα αντιδραστήρια, 0.6 ml διχρωμικού καλίου και 1,4 ml διαλύματος θειϊκού οξέος. Κλείσιμο καλά με τα ειδικά πώματα και ανακινούνται ελαφρά και προσεκτικά τους σωλήνες. Τοποθέτηση των σωλήνων στο thermo-reactor για 120 λεπτά στους 150°C. Τέλος μέτρηση την οπτική απορρόφηση των δειγμάτων στα 600nm με την χρήση του όργανο τύπου UV/VIS spectrometer Jenway 7315.

3.3.2 Συμβατές διαλυτές ουσίες και νιτρικά:

Στο δεύτερο πείραμα με τις συμβατές διαλυτές ουσίες ακολουθήθηκε περίπου η ίδια διαδικασία με την διαφορά ότι επιλέγηκε η συγκέντρωση 1mM βεταΐνης ως βέλτιστη από το προηγούμενο πείραμα και έγινε μια προσαρμογή με νιτρικά για περίπου 2 βδομάδες με προσθήκη και αφαίρεση αποβλήτου. Αρχικά παρασκευάστηκαν 2 control διαλύματα: το πρώτο είχε 0mM βεταΐνης δηλαδή μόνο bilge waste και το δεύτερο περιείχε bilge waste με νιτρικά. Έπειτα

παρασκευάστηκε ένα διάλυμα με bilge waste και 1mM και ένα διάλυμα που περιείχε 1mM βεταΐνης δηλαδή ζυγίστηκαν 0,0234 gr μαζί με νιτρικά για να εντοπιστεί ο καλύτερος συνδυασμός που απομακρύνει το COD. Ο υπολογισμός των νιτρικών προέκυψε από την γνωστή αναλογία C:N:P που αντιστοιχεί σε 100:5:1. Στο προκείμενο πείραμα χρησιμοποιήθηκε ammonium nitrate και έτσι έγιναν οι κατάλληλες μετατροπές για να βρεθεί η ποσότητα των νιτρικών και με βάση την αναλογία τοποθετήθηκαν 0,112g νιτρικών σε τελικό όγκο και αυτή τη φορά 200ml όπου τα 190ml είναι το απόβλητο και 10ml εμβολιασμός του αποβλήτου με βακτήρια. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων και τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας ήταν ακριβώς η ίδια. Συλλέχτηκαν δείγματα 24, 48, 72 και 96 ώρες. Έπειτα έγινε προσθαφαίρεση αποβλήτου με τελικό όγκο 250ml έγιναν οι κατάλληλες μετατροπές για τα (triplicate) της 8^{ης}, 9^{ης} και 10^{ης} ημέρας και μετά ακολούθησε πάλι προσθαφαίρεση του αποβλήτου και πάρθηκαν δείγματα 14^{ης} και 16^{ης} ημέρας. Παρατηρήθηκε πως προσαρμόζονται τα νιτρικά και η βεταΐνη στο απόβλητο με το πέρασμα 2 εβδομάδων.

3.3.3 Πειράματα με carrier Mutag Biochip™:

Στο 1^ο πείραμα εξετάστηκαν 6 διαφορετικά στελέχη βακτηρίων στο απόβλητο με carrier αυτή τη φορά για να εντοπιστεί ο κατάλληλος μικροοργανισμός που απομακρύνει το COD. Το carrier είναι το λεγόμενο εμπορικό Mutag Biochip™. Κάθε βακτήριο αναπτύχθηκε ξεχωριστά. Ο συνολικός όγκος ήταν 500ml με 10% carrier περίπου 50ml, με εμβόλιο 4% v/v κάθε βακτηριακή καλλιέργεια. Ελέγχθηκαν τα βακτήρια *S1*, *S6*, *D2*, *LVD-10*, *LA9* και *Ind-1*. Πάρθηκαν δείγματα (duplicate) για τις πρώτες 3^{ες} μέρες που θεωρούνται σημαντικές, έπειτα έγινε γέμισμα και αφαίρεση αποβλήτου και πάρθηκαν δείγματα για 4^η, 5^η και 7^η ημέρα. Μετά πάλι προσθήκη και αφαίρεση αποβλήτου και δείγματα για 8^η, 9^η και 10^η ημέρα δηλαδή αυτή τη φορά διήρκησε περίπου 1^{1/2} εβδομάδα. Η πειραματική διαδικασία για την ανάλυση των δειγμάτων ακριβώς ίδια με τα προηγούμενα πειράματα.

Στο 2^ο πείραμα εξετάστηκαν 6 διαφορετικά στελέχη βακτηρίων στο απόβλητο με ακριβώς τις ίδιες συνθήκες με το προηγούμενο πείραμα. Ο συνολικός όγκος ήταν 500ml με 10% carrier περίπου 50ml με εμβόλιο 4%v/v κάθε βακτηριακή καλλιέργεια. Ελέγχθηκαν τα βακτήρια *Ste-P.E*, *En-SW*, *A.S*, *K*, *Ind-2* και *Hal-GC*. Εξετάστηκαν ακόμα 6 στελέχη βακτηρίων με τις ίδιες

συνθήκες. Πάρθηκαν δείγματα (duplicated) για τις πρώτες 3^{ης} μέρες, έπειτα έγινε γέμισμα και αφαίρεση αποβλήτου και πάρθηκαν δείγματα για 4^η και 7^η ημέρα. Μετά πάλι προσθήκη και αφαίρεση αποβλήτου και δείγματα για 8^η, 9^η και 10^η ημέρα δηλαδή διήρκησε περίπου 1^{1/2} εβδομάδα όπως και το προηγούμενο. Η πειραματική διαδικασία για την ανάλυση των δειγμάτων ακριβώς ίδια με τα προηγούμενα πειράματα.

3.3.4 Πείραμα επανεξέτασης βακτηρίων:

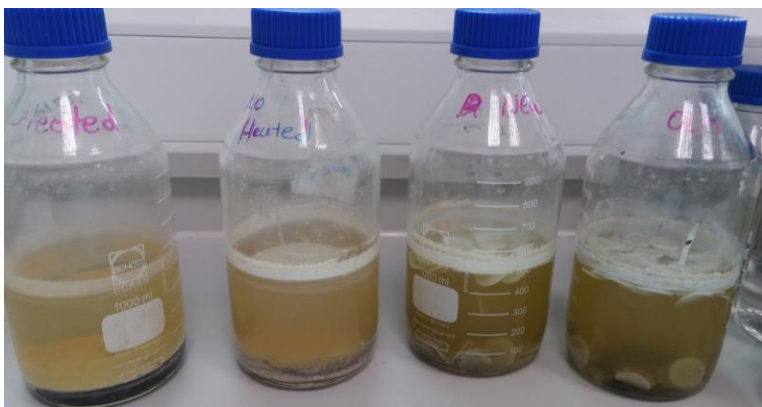
Επανεξετάστηκαν ορισμένα στελέχη για επαλήθευση των αποτελεσμάτων. Τα στελέχη που επιλέγηκαν ήταν με βάση τη μείωση του COD από τα 2 προηγούμενα πειράματα. Τα παλιά στελέχη είναι τα εξής: *klon-LVD*, *Ind-1*, *S6* και *sp.D2*. Τα νέα στελέχη που επιλέγηκαν είναι τα εξής: *Ste-P.E*, *En-SW*, *Ind-2* και *Hal-GC*. Αυτό το πείραμα έγινε συγκεκριμένα από υγρή καλλιέργεια (ολικός όγκος 6ml σε falcon tubes των 15ml). Πάρθηκαν δείγματα (duplicate) για 1^η, 2^η, 3^η, 4^η και 6^η ημέρα, έπειτα έγινε γέμισμα και αφαίρεση αποβλήτου και πάρθηκαν δείγματα για 7^η, 8^η και 9^η ημέρα. Διήρκησε περίπου 1^{1/2} εβδομάδα όπως και το προηγούμενο. Η πειραματική διαδικασία για την ανάλυση των δειγμάτων ακριβώς ίδια με τα προηγούμενα πειράματα.

3.3.4 Πείραμα με effluent waste:

Επανεξέταση στελεχών αυτή τη φορά σε effluent για τελική επιλογή ομάδας βακτηρίων. Το effluent είναι το ήδη επεξεργασμένο απόβλητο με διάφορες διεργασίες οπότε αναμένεται να έχει χαμηλότερο COD από το influent. Από το προηγούμενο πείραμα ξεχώρισαν τα εξής στελέχη *Ste-P.E*, *En-SW*, *sp.ci-.D2* και *Hal-CG*. Επανεξετάστηκαν όμως και τα εξής: *sp.D2*, *Ex-Ind2*, *LVD-10* και *S6*. Πάρθηκαν δείγματα (duplicated) για 1^η, 2^η και 3^η ημέρα, έπειτα έγινε γέμισμα και αφαίρεση αποβλήτου και πάρθηκαν δείγματα για 6^η, 8^η και 9^η ημέρα. Διήρκησε περίπου 1^{1/2} εβδομάδα όπως και το προηγούμενο. Η πειραματική διαδικασία για την ανάλυση των δειγμάτων ακριβώς ίδια με τα προηγούμενα πειράματα.

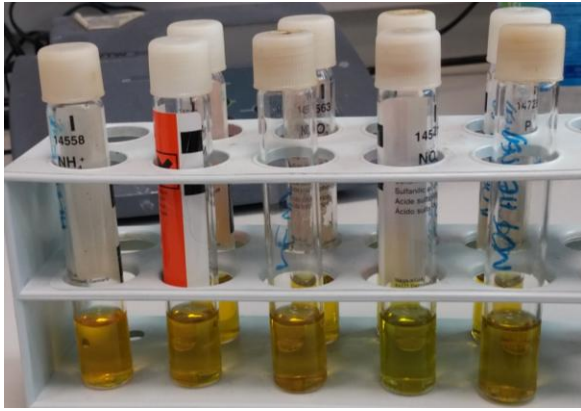
3.3.5 Συγκριτικά πειράματα:

Προετοιμασία εμβολίου για επανεξέταση των στελεχών για σύγκριση νέας ομάδας με παλιά ομάδα με χρήση εμπορικού carrier Mutag BioChip™. Στη δεύτερη περίπτωση έγινε σύγκριση νέας ομάδας με carrier εμπορικό με 2 διαφορετικές περιπτώσεις κελύφη αυγών: βρασμένα και μη βρασμένα. Ο λόγος που επιλέχθηκαν τα κελύφη αυγών ως μέσο ακινητοποίησης είναι λόγω της ιδιότητας τους στη καλύτερη δέσμευση φωσφόρου. Το βράσιμο έγινε στους 800°C. Στη εικόνα 3.1 διαφαίνεται από τις φιάλες Duran η διαφορά στο χρώμα του αποβλήτου ανάλογα με το μέσο ακινητοποίησης που χρησιμοποιείται.



Εικόνα 3.1: Τοποθέτηση αποβλήτου και μέσο ακινητοποίησης του στις Duran

Ο τελικός όγκος είναι 500ml όπου εμβολιασμός σε 100% BW και 10%carrier. Εμβόλιο από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια 4%v/v. Τα βρασμένα κελύφη αυγών (CaO) ζύγιζαν περίπου 55,15gr ενώ τα μη βρασμένα κελύφη αυγών (CaCO₃) ήταν 62,2gr. Πάρθηκαν δείγματα (duplicated) για 1^η και 5^η ημέρα, έπειτα έγινε γέμισμα και αφαίρεση αποβλήτου και πάρθηκαν δείγματα για 6^η και 7^η ημέρα. Μετά πάλι πρόσθηκη και αφαίρεση αποβλήτου και δείγματα για 8^η και 12^η ημέρα δηλαδή αυτή τη φορά διήρκησε περίπου 2 εβδομάδες. Η πειραματική διαδικασία για την ανάλυση των δειγμάτων ακριβώς ίδια με τα προηγούμενα πειράματα. Στην εικόνα 3.2 απεικονίζονται τα δείγματα τα οποία είναι έτοιμα για μέτρηση της οπτικής πυκνότητάς τους.



Εικόνα 3.2: Δείγματα bilge σε δοκιμαστικούς σωλήνες του COD

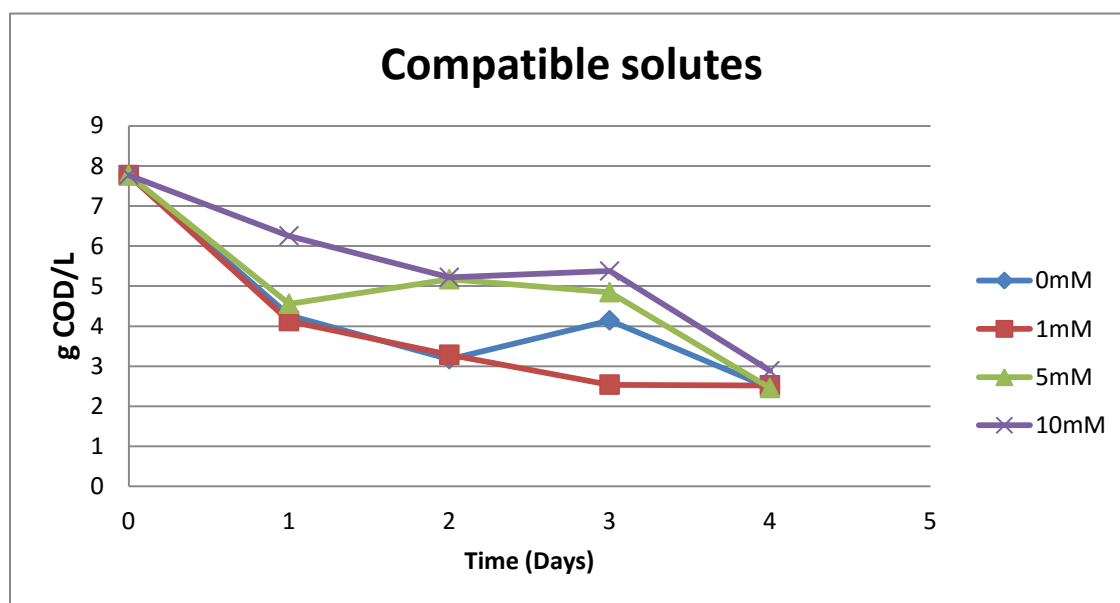
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο προηγούμενο κεφάλαιο περιγράφηκαν λεπτομερώς όλες οι πειραματικές διαδικασίες για την ενεργοποίηση των μικροοργανισμών καθώς επίσης και όλα τα στάδια που ακολουθήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων. Πιο κάτω θα παρουσιαστούν αναλυτικά τα αποτελέσματα τόσο του influent και του effluent αποβλήτου με τα βακτηριακά στελέχη που επιλέγονταν κάθε φορά με τα διαφορετικά μέσα ακινητοποίησης των κυττάρων. Επίσης παρουσιάζονται και τα συγκριτικά αποτελέσματα νέας ομάδας και παλιάς ομάδας.

4.1 Συμβατές διαλυτές ουσίες

4.1.1 Δοκιμές διαφορετικών συγκεντρώσεων γλυκίνης - βεταΐνης (GB) για μείωση του COD του bilge waste

Εντοπισμός βέλτιστης συγκέντρωσης γλυκίνης-βεταΐνης από διαφορετικές συγκεντρώσεις της: 0mM, 1mM, 5mM και 10 mM για μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου bilge. Σε αυτό το πείραμα το βιομέσο είναι ένας συνδυασμός βακτηρίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο πιο κάτω **Γράφημα 4.1**:

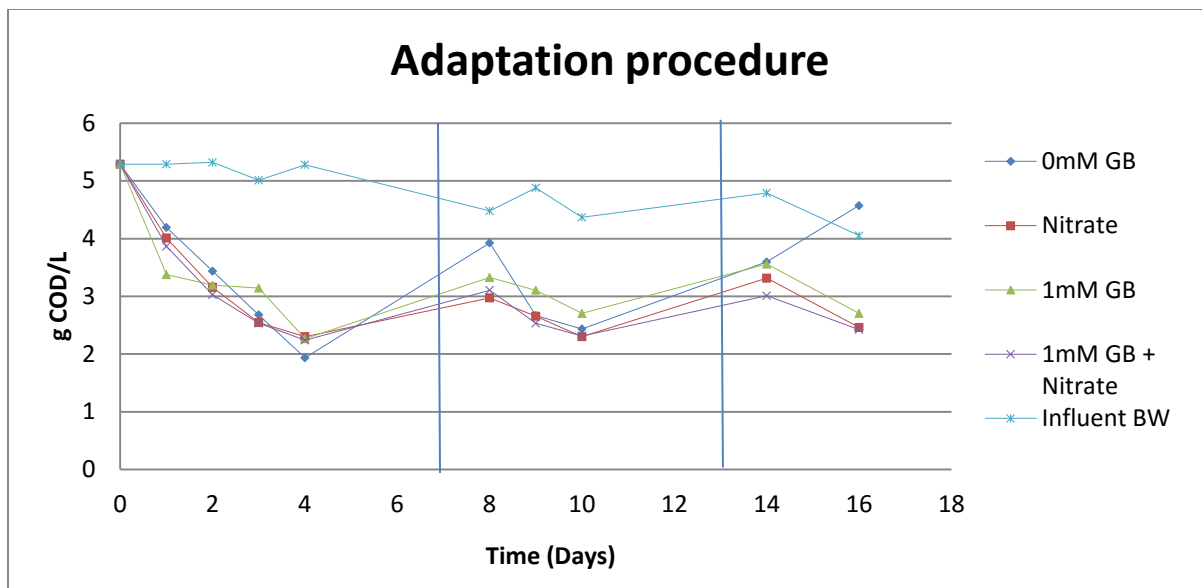


Γράφημα 4.1: Οπτική πυκνότητα των συμβατών διαλυτών ουσιών συναρτήσει του χρόνου

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βέλτιστη συγκέντρωση είναι 1mM γλυσίνης- βεταΐνης που έχει πιο αποτελεσματική απομάκρυνση του COD του bilge waste και ακολούθως είναι η συγκέντρωση 5mM. Αν και δεν είχαν μεγάλη διαφορά επιλέγηκε η συγκέντρωση 1mM για να εξεταστούν έπειτα σε συνδυασμό με νιτρικά. Ο λόγος που επιλέγηκε ήταν η σταθερότητα που είχε όλο το χρονικό διάστημα και λόγω της εμφανής μείωσης που είχε από τις πρώτες 24 ώρες. Η συγκέντρωση 5mM είχε αρκετές αυξομειώσεις και μια απότομη μείωση στις 96 ώρες γεγονός που δείχνει μια αστάθεια ή ίσως να χρειάζεται λίγες μέρες για να εγκλιματιστεί. Τέλος η συγκέντρωση 10mM δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη μεταβολή τις πρώτες 24ώρες, ενώ στις 48 και 72 ώρες παραμένει σχεδόν στάσιμη. Μόνο στις 96 ώρες εμφανίζει απότομη μείωση αλλά εξακολουθεί να έχει το υψηλότερο COD από τις άλλες συγκεντρώσεις. Επομένως, η χρήση χαμηλής συγκέντρωσης συμβατών ουσιών π.χ προσθήκη 1mM στο bilge waste είναι η πιο αποτελεσματική για εγκλιματισμό σε ψηλή αλατότητα αφού παρουσιάζει πολύ πιο γρήγορη βιοαποικοδόμηση σε σχέση με ψηλές συγκεντρώσεις.

4.1.2 Δοκιμές συγκεντρώσεως 1mM γλυσίνης- βεταΐνης σε συνδυασμό με νιτρικά

Όπως αναφέρθηκε επιλέγηκε η συγκέντρωση 1mM βεταΐνης. Επιπλέον ελέγχθηκαν νιτρικά με βάση την αναλογία C:N:P και 1mM βεταΐνης με νιτρικά για να εντοπιστεί η πιο αποτελεσματική μείωση του οργανικού φορτίου του bilge. Σε αυτό το πείραμα το βιομέσο είναι πάλι ένας συνδυασμός 6 βακτηρίων περίπου. Η μόνη διαφορά σε αυτό το πείραμα είναι ότι έγινε προσθαφαίρεση αποβλήτου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 4.2:**



Γράφημα 4.2: Προσαρμογή με βεταΐνη και νιτρικά

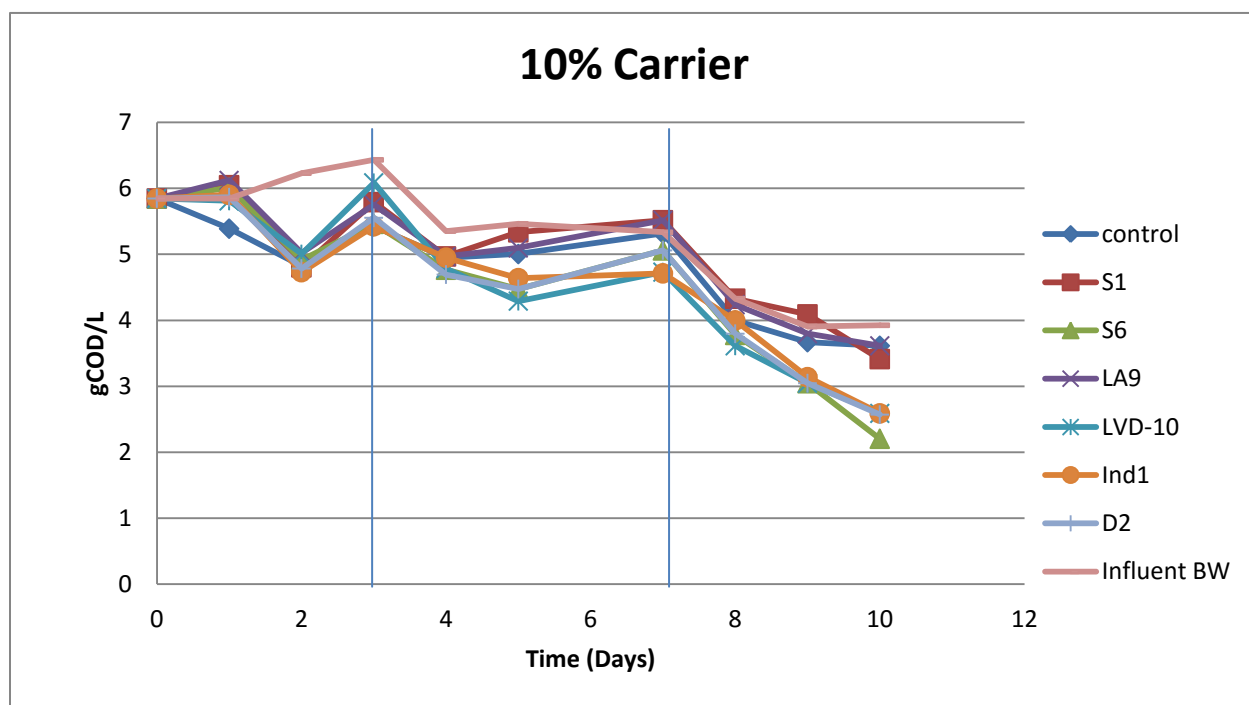
Από τη γραφική παρατηρούμε ο συνδυασμός νιτρικών με 1mM betaine απομακρύνει περισσότερο το COD και η μείωση αυτή λόγω glycine betaine (GB) είναι πιο έντονη τις πρώτες μέρες. Όμως πιο αποτελεσματική καθ' όλο το χρονικό διάστημα και με την προσθαφαίρεση του αποβλήτου είναι ο συνδυασμός 1mM βεταΐνης με τα νιτρικά. Αυτό συμβαίνει ότι τα νιτρικά επιταχύνουν την απομάκρυνση του COD περισσότερο από ότι οι συμβατές διαλυτές ουσίες και σε συνδυασμό με τη βεταΐνη που προσαρμόζεται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας που έχει το απόβλητο. Σημείωση ότι και τα νιτρικά απουσία βεταΐνης απομακρύνουν σημαντικά το COD, ειδικά με την προσθήκη του αποβλήτου παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα από τη 1mM βεταΐνης και φαίνεται να έχουν παρόμοιο αλλά χαμηλότερο ρυθμό βιοδιάσπασης με το συνδυασμό βεταΐνης και νιτρικών. Στις 48 και 72 ώρες η βεταΐνη, τα νιτρικά και ο συνδυασμός νιτρικών και βεταΐνης έχουν παρόμοια οργανικά φορτία με τη βεταΐνη να παρεκκλίνει ελάχιστα. Παρατηρείται ότι στις 96 ώρες το control εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή περίπου στο 1,93 g/L και αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι ίσως να αναπτύσσονται και στο απόβλητο κάποιοι μικροοργανισμοί λόγω υψηλής αλατότητας και έτσι απομακρύνουν το COD του αποβλήτου. Την 9^η μέρα δηλαδή μετά από μια εβδομάδα μεγάλη μείωση του COD εκτός από το συνδυασμό νιτρικών με βεταΐνη, παρουσιάζει πάλι και το control. Όμως κατά την ανανέωση αποβλήτου αυξάνεται ραγδαία το οργανικό φορτίο του. Εν τέλει, με τη προσθαφαίρεση του αποβλήτου παρατηρείται ότι δεν απομακρύνει τόσο αποτελεσματικά το COD η βεταΐνη, ενώ ο συνδυασμός

βεταΐνης και νιτρικών όπως και τα νιτρικά είναι πολύ αποδοτικά και παρουσιάζουν ελάχιστη διαφορά μεταξύ τους.

4.2 Προσθήκη carrier ως μέσο ακινητοποίησης των κυττάρων

4.2.1 Mutag BioChip™

Σε αυτό το πείραμα εξετάστηκαν 6 βακτήρια ξεχωριστά όχι σαν ομάδα όπως προηγουμένως με σκοπό να επιλεγούν αυτά που είναι πιο αποτελεσματικά σε bilge waste με προσθήκη εμπορικού carrier (Mutag BioChip™) και που σχηματίζουν βιοφίλμ. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο πιο κάτω Γράφημα 4.3:



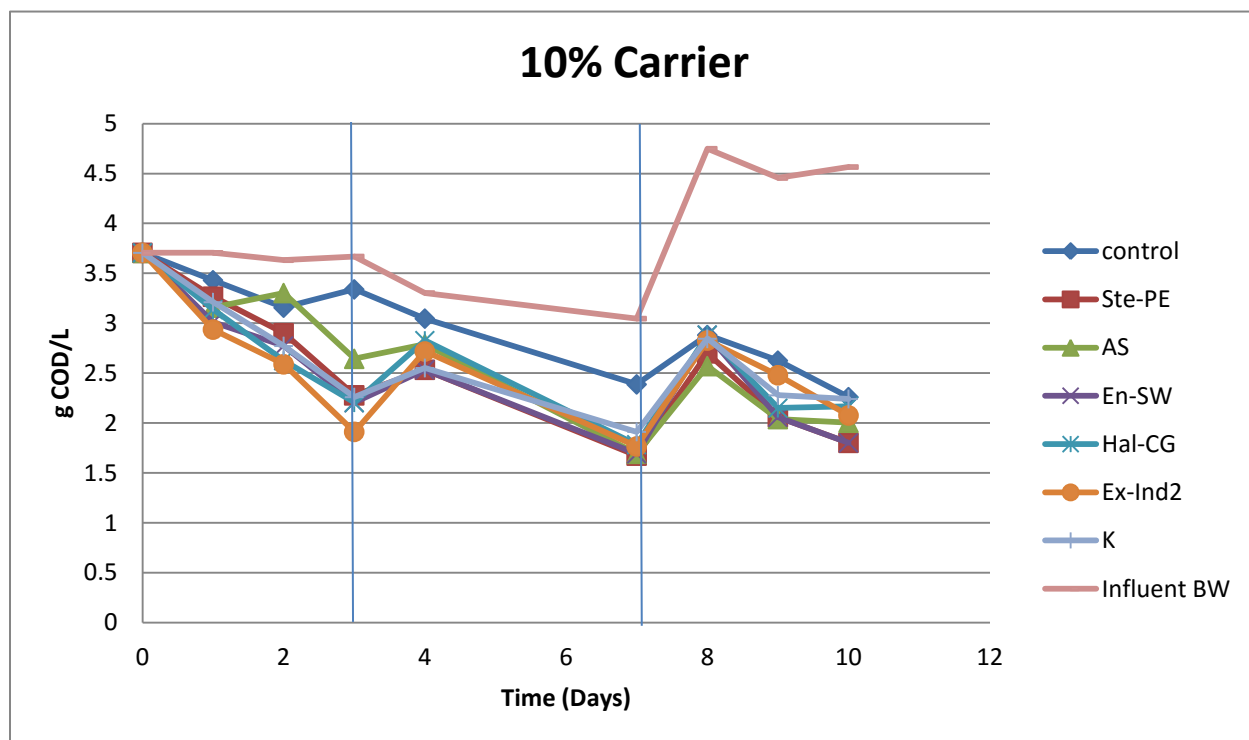
Γράφημα 4.3: Εξέταση βακτηρίων με προσθήκη εμπορικού carrier

Παρατηρούμε ότι τα βακτήρια *Citrobacter sp* (S6), *Pseudomonas aeruginosa* (LVD-10), *Enterobacter sp* (D2) και Indigenous 1 (Ind-1) προσαρμόζονται πιο εύκολα με την προσθήκη carrier και μειώθηκε αισθητά το οργανικό τους φορτίο. Την ψηλότερη βιοδιάσπαση σημειώνει ο S6 που φτάνει μέχρι και 2 g/L και ακολουθούν ο D2 με τον Ind-1. Από την άλλη ο *Citrobacter*

sp (*SI*) έχει την ψηλότερη τιμή οργανικού φορτίου όλο το χρονικό διάστημα και είναι πολύ μικρή η μείωση του σε σχέση με το απόβλητο. Συγκεκριμένα στις 24 ώρες παρατηρείται σημαντική μείωση του οργανικού φορτίου στο βακτήριο *LVD-1* και *D2*. Στις 72 ώρες προπορεύονται ο *S6* και *Ind-1* και με την ανανέωση του αποβλήτου γίνεται ένα ξεκαθάρισμα στις τιμές. Μετά από μια εβδομάδα φαίνεται να μειώνεται σημαντικά το οργανικό φορτίο και του *Ind-1*. Επίσης με το πέρασμα 10 ημερών τα επικρατέστερα βακτήρια είναι ο *S6*, *LVD-10*, *Ind-1* και *D2*. Αντίστοιχα ο *Enterobacter sp* (*LA9*) και *SI* έχουν ψηλότερο οργανικό φορτίο που φτάνει μέχρι και 3,5-4 g/L.

4.2.2 Mutag BioChip™

Εξετάστηκαν 6 διαφορετικά βακτήρια με σκοπό να επιλεγούν αυτά που είναι πιο αποτελεσματικά σε bilge waste με προσθήκη carrier (Mutag BioChip™). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο πιο κάτω **Γράφημα 4.4:**

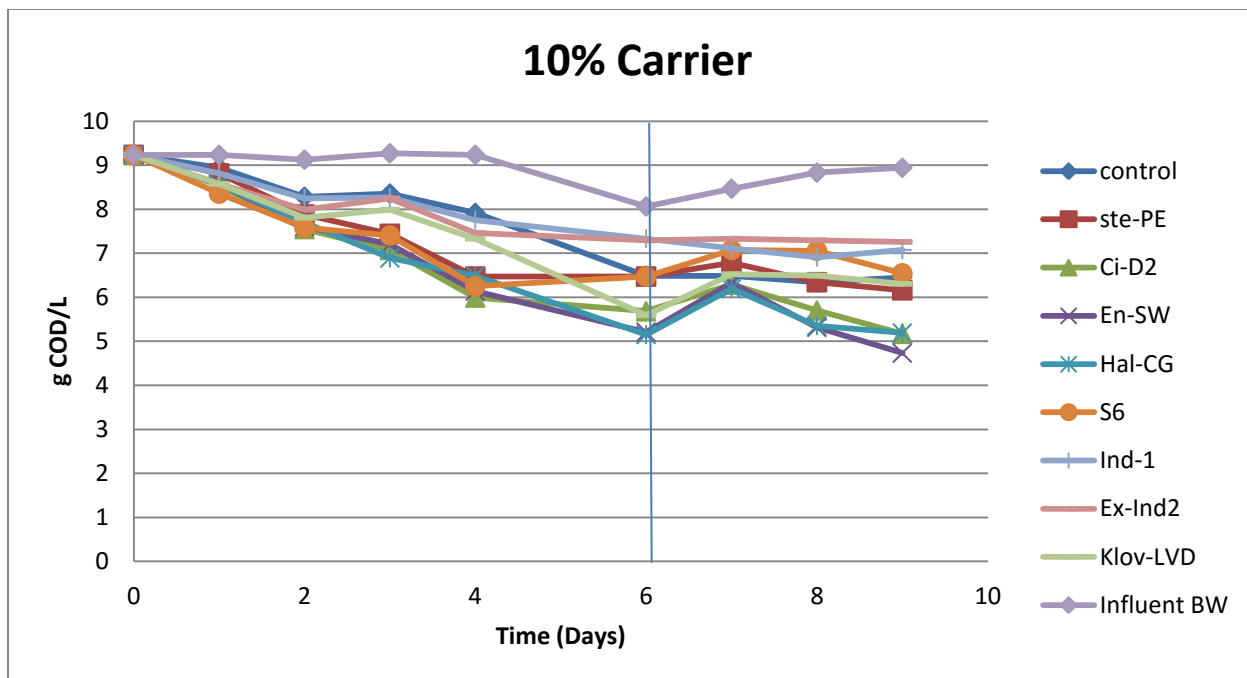


Γράφημα 4.4: Εξέταση βακτηρίων με προσθήκη εμπορικού carrier

Παρατηρείται ότι ο *Exiguobacterium profundum* (*ExInd-2*), *Enterobacter hormaechei* (*SW*) και *Halomonas meridiana* (*CG*) και ακολούθως ο *Stenotrophomonas maltophilia* (*PE*) να έχουν περισσότερη μείωση οργανικού φορτίου. Ο *A.S* αν και δεν είχε άμεση βιοδιάσπαση του COD, φαίνεται να έχει προσαρμοστεί στις 96 ώρες και την 10^η μέρα το COD του φτάνει μέχρι 2 g/L. Ο *ExInd-2* τις πρώτες 3 μέρες έχει το μικρότερο οργανικό φορτίο αλλά με την ανανέωση του αποβλήτου παρατηρείται ότι δεν έχει και τόσο μεγάλη βιοδιάσπαση με το COD του να φτάνει μέχρι 2g/L. Το ίδιο ισχύει και στη περίπτωση του *K*, όπου τις πρώτες μέρες έχει χαμηλό οργανικό φορτίο ενώ με την ανανέωση του αποβλήτου την 3^η μέρα το COD παρουσιάζει αύξηση. Το *SW* φαίνεται ότι λειτουργεί αντίστροφα, διότι μετά την ανανέωση του αποβλήτου παρουσιάζει την πιο σημαντική μείωση και φτάνει μέχρι και 1,8 g/L. Αυτό συμβαίνει και στο *Ste-P.E* ο οποίος τις 2 πρώτες ημέρες είχε ψηλό οργανικό φορτίο ενώ στις 72 ώρες δείχνει σημαντική μείωση. Την τελευταία μέρα με τον *S.W* και τον *A.S* παρουσιάζουν το πιο χαμηλό οργανικό φορτίο. Από την άλλη πλευρά ο *CG* και ο *K* εν τέλει έχουν τα ψηλότερα οργανικά φορτία περίπου στο 2,25g/L και με την ανανέωση του αποβλήτου αυξάνεται το οργανικό φορτίο τους.

4.3 Επανεξέταση στελεχών

Επανεξέταση στελεχών για εύρεση νέας ομάδας βακτηρίων που να απομακρύνουν πιο αποτελεσματικά το COD. Επιλέγηκαν τα βακτήρια που είχαν μεγαλύτερη απομάκρυνση του COD από τα δύο προηγούμενα πειράματα που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Στο **Γράφημα 4.5** φαίνονται τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού:

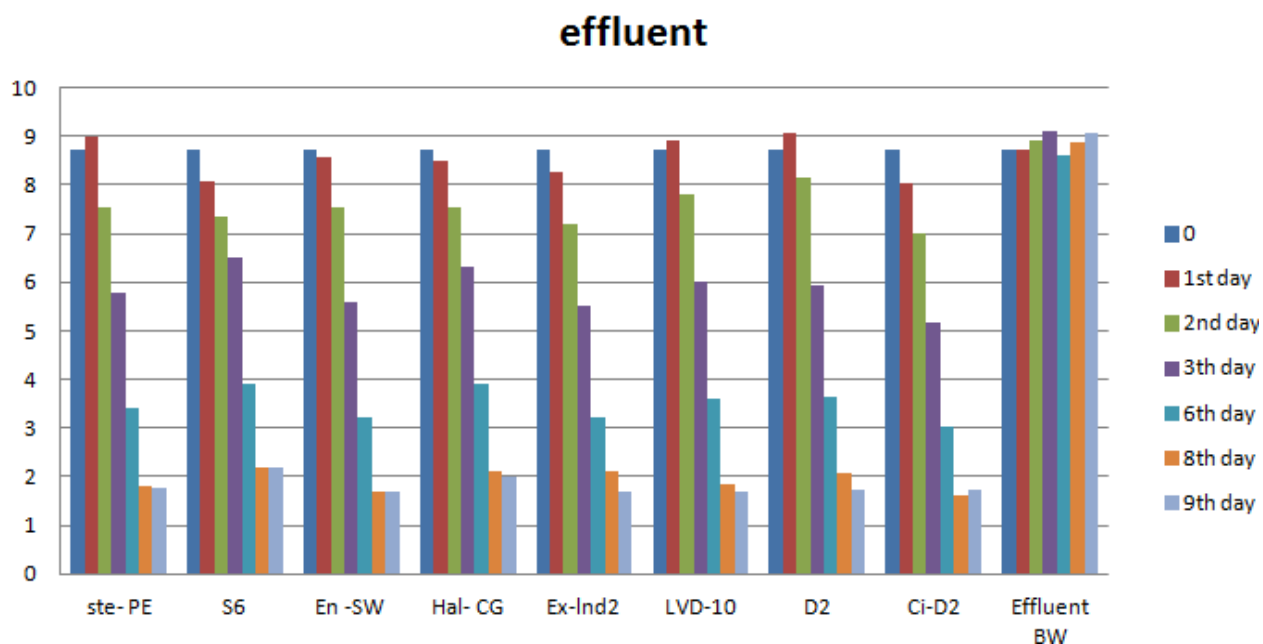


Γράφημα 4.5: Επανεξέταση βακτηριακών στελεχών

Σε αυτό το πείραμα καλύτερη μείωση του COD είχε ο ci-D2, SW, CG και με το πέρασμα των ημερών ο PE. Την καλύτερη απομάκρυνση είχε ο SW και την πιο αργή φαίνεται να είχε ο A2 (Ind-2). Στις 24 ώρες την χαμηλότερη τιμή οργανικού φορτίου παρουσιάζουν ο S6 και ci-D2 ενώ την ψηλότερη ο P.E. Αν και μεταξύ τους τα βακτήρια δεν είχαν και ιδιαίτερη διαφορά τις πρώτες ώρες. Στις 72 και ακόμα καλύτερα στις 96 ώρες είναι πιο ξεκάθαρες οι αποδόσεις των βακτηρίων, όπου ο CG ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα βακτήρια. Στη συνέχεια με την ανανέωση του αποβλήτου εξακολουθούν ci-D2, CG και SW να έχουν τις πιο καλύτερες αποδόσεις στη μείωση του COD. Στη συνέχεια παρατηρείται ότι και ο P.E σημειώνει σημαντική μείωση στις 96 ώρες αλλά με την ανανέωση του αποβλήτου φτάνει το COD του μέχρι τα 6g/L αλλά έχει εμφανή διαφορά από τα τρία πρωτοπόρα βακτήρια. Την 9^η ημέρα την καλύτερη απόδοση έχει ο SW με 4,7 g COD/L ενώ τη χειρότερη παρουσιάζει ο *Klebsiella oxytoca* (Klov-LVD) με 7,25 g COD/L. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή τη φορά το απόβλητο είχε πολύ ψηλό οργανικό φορτίο που έφτανε μέχρι το 9,27 g COD/L για αυτό και παρουσίαζαν μια αστάθεια τα βακτήρια και δυσκολεύονται να βιοδιασπάσουν το COD από τις πρώτες μέρες. Χρειάστηκε ένα χρονικό διάστημα να μειωθεί το οργανικό φορτίο και επίσης για αυτό το λόγο το COD έφτασε μόνο μέχρι το 4,7.

4.4 Εξέταση στελεχών σε effluent

Από το προηγούμενο πείραμα ξεχώρισαν τα εξής στελέχη: *Enterobacter hormaechei* EnSW, *citrobacter sp.ci-D2*, *Halomonas meridiana* HalCG και *Stenotrophomonas maltophilia* StePE. Σε αυτό πείραμα εξετάστηκαν: *Enterobacter hormaechei* EnSW, *citrobacter sp.ci-D2*, *Halomonas meridian* HalCG, *Stenotrophomonas maltophilia* StePE, *Pseudomonas aeruginosa* LVD-10, *Enterobacter sp.D2*, S6 και *Exiguobacterium profundum* ExInd-2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 4.6**:



Γράφημα 4.6: Εξέταση βακτηριακών στελεχών σε effluent

Με το πέρασμα των ημερών καλύτερη απόδοση στη μείωση του COD είχαν τα εξής στελέχη: *EnSW*, *sp.ci-D2*, *StePE*, και *ExInd-2*. Μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης του COD είχε το βακτήριο *EnSW* με 80,6%, ακολούθως *ExInd-2* με ποσοστό 80,3%. Σημαντική απομάκρυνση είχε και *Citrobacter sp.(ci-D2)* με 80,1% και τέλος *Ste-PE* με 79,7%. Μεγάλα τα ποσοστά απομάκρυνσης με ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους. Να σημειωθεί ότι το effluent απόβλητο είχε χαμηλότερο COD λόγω του ότι είναι ήδη επεξεργασμένο σε αντίθεση με το influent που δεν έχει υποστεί επεξεργασία και είναι δεδομένο ότι θα έχει μεγαλύτερο COD.

Στις 24 ώρες μεγαλύτερη απόδοση έχει ο *ci-D2* και ο *S6*, ενώ ψηλό οργανικό φορτίο παρουσιάζει ο *D2* και ο *Ste-PE*. Στις 48 ώρες καλύτερη απόδοση έχει ο *ci-D2* και *Ex-Ind2* ενώ τη χειρότερη απόδοση ο *D2*. Έπειτα στις 72 ώρες επικρατέστερα είναι *ci-D2*, *En-SW* και *Ex-Ind2*. Με το πέρασμα μιας βδομάδας περίπου περισσότερη μείωση έχουν και πάλι *ci-D2*, *En-SW* και *Ex-Ind2*. Ενώ ψηλότερο οργανικό φορτίο έχει *D2* και *S6*, ο οποίος τις πρώτες μέρες σημειώνει σημαντική μείωση. Με την ανανέωση του αποβλήτου την 8^η ημέρα καλύτερα αποτελέσματα δείχνουν ο *Ste-PE*, *En-SW*, *Ex-Ind2* και *ci-D2*. Τέλος την 9^η ημέρα ο *En-SW*, *Ex-Ind2*, *ci-D2* και *LVD-10* έχουν τα χαμηλότερα οργανικά φορτία γύρω στο 1,69-1,72 g/L και ψηλότερα φορτία έχουν ο *S6* και *Hal-CG* γύρω στο 2-2,20 g/L.

4.5 Συγκριτικά αποτελέσματα και κελύφη αυγών ως μέσο ακινητοποίησης

Η δημιουργία της νέας ομάδας βακτηρίων με βάση όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είναι οι εξής:

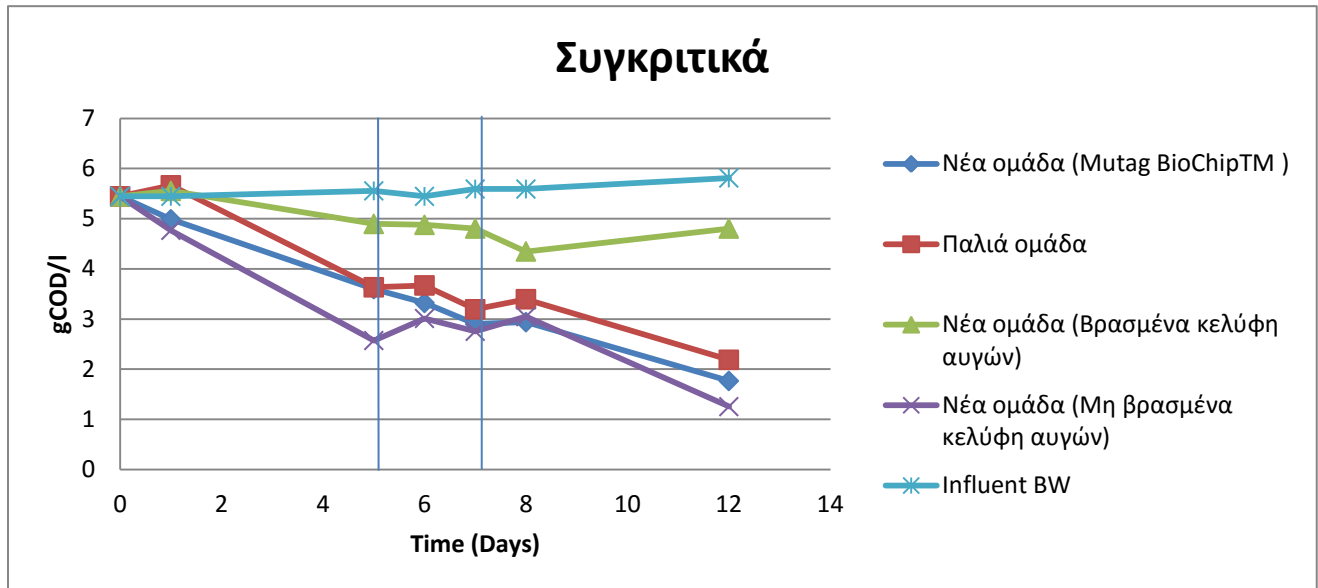
- 1) *Enterobacter hormaechei EnSW*
- 2) *Citrobacter sp.ci-D2*
- 3) *Halomonas meridiana Hal-CG*
- 4) *Stenotrophomonas maltophilia StePE*
- 5) *Pseudomonas aeruginosa LVD-10*
- 6) *Exiguobacterium profundum ExInd-2.*

Η παλιά ομάδα βακτηρίων ήταν η εξής:

- 1) *Indigenous 1 (Ind-1)*
- 2) *S1 citrobacter sp.*
- 3) *S6 citrobacter sp.*
- 4) *Enterobacter sp. D2*
- 5) *Enterobacter sp. LA9*

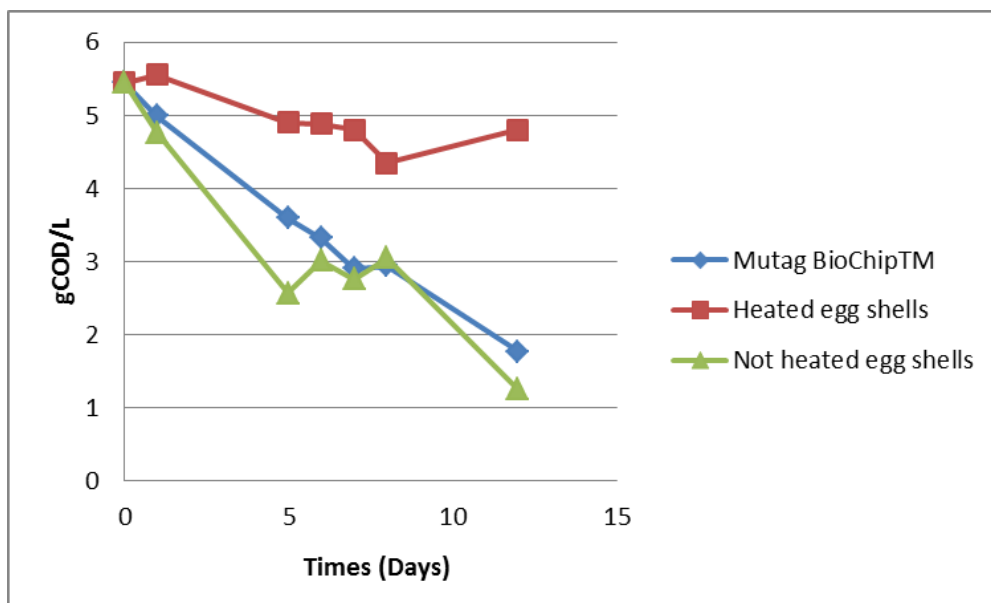
6) *Pseudomonas aeruginosa* LVD-10

Σε αυτό το πείραμα έγινε σύγκριση της νέας ομάδας με την παλιά ομάδα και σύγκριση εμπορικού carrier Mutag BioChip™, βρασμένων κελυφών αυγού και μη βρασμένων κελυφών αυγού. Σημείωση ότι τα τρία τελευταία μέσα ακινητοποίησης περιείχαν βακτήρια της νέας ομάδας και μόνο. Τα συγκριτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 4.7:**



Γράφημα 4.7: Εξέταση νέας ομάδας με κελύφη αυγών και σύγκριση με παλιά ομάδα

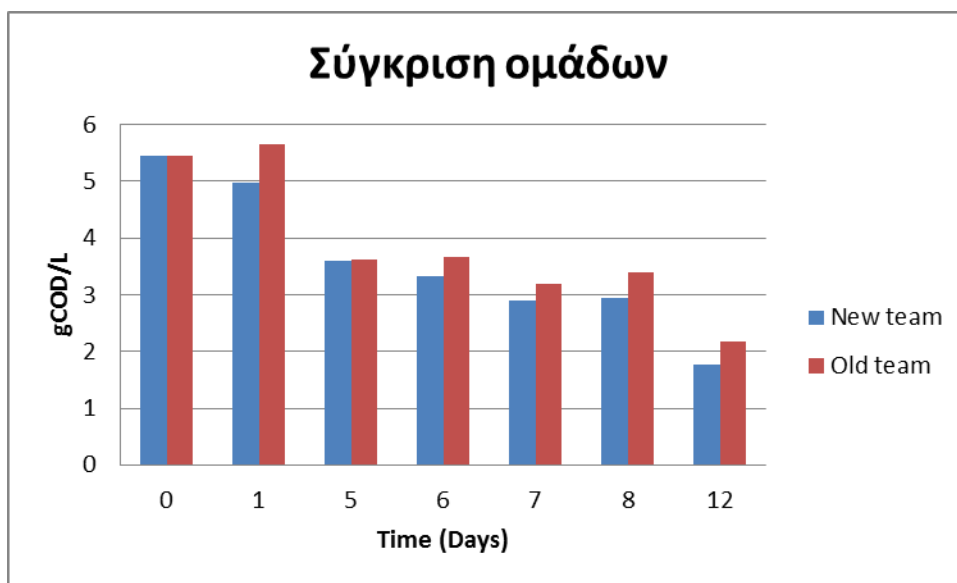
Καλύτερη απομάκρυνση του COD είχαν τα μη βρασμένα κελύφη αυγών και η νέα ομάδα είναι πιο αποτελεσματική από την παλιά ομάδα. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι τα κελύφη αυγών λόγω του ανθρακικού ασβεστίου που περιέχουν, σε αυτή τη έρευνα είχαν πολύ καλά αποτελέσματα και συγκαταλέγονται ως προσροφητικά υλικά με την ιδιότητα τους αυτή να απομακρύνουν το COD.



Γράφημα 4.8: Σύγκριση εμπορικού carrier με κελύφη αυγών

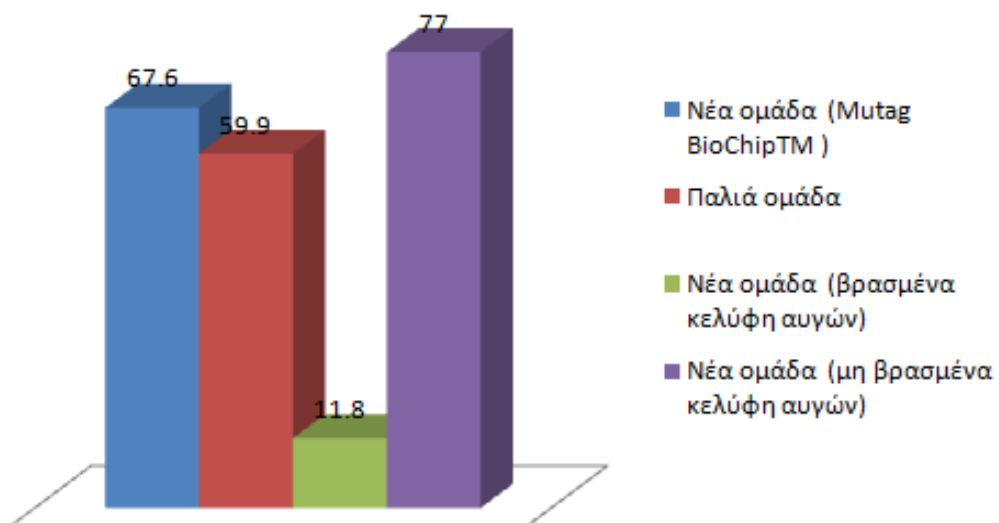
Στο πιο πάνω **Γράφημα 4.8** παρατηρείται ότι τα μη βρασμένα κελύφη αυγών έχουν την πιο αποτελεσματική μείωση όλο το χρονικό διάστημα και έχουν καλύτερα αποτελέσματα από το carrier Mutag BioChipTM. Στα βρασμένα κελύφη αυγών φαίνεται ότι το COD παραμένει στα ίδια επίπεδα, δεν σημειώνει σημαντική μεταβολή με ποσοστό απομάκρυνσης μόλις 11,8% που φαίνεται στο **Γράφημα 4.10**. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι με το βράσιμο το αρχικό ανθρακικό ασβέστιο, που ήταν υπεύθυνο για την ακινητοποίηση των κυττάρων του αποβλήτου, μετατρέπεται σε οξείδιο του ασβεστίου. Το οξείδιο του ασβεστίου όπως αναφέρθηκε χρησιμεύει στην δέσμευση του φωσφόρου. Τα μη βρασμένα κελύφη όμως έχουν υψηλό ποσοστό απομάκρυνσης που φτάνει μέχρι και 77% ενώ το εμπορικό carrier φτάνει μέχρι και 67,5%. Συγκεκριμένα στις 24 ώρες τα μη βρασμένα κελύφη είχαν τη μεγαλύτερη μείωση και ακόμα περισσότερο την 5^η ημέρα. Η ομάδα του εμπορικού carrier σημειώνει και αυτή σημαντική μείωση αλλά όχι στα ίδια επίπεδα με τα μη βρασμένα κελύφη. Με εξαίρεση όμως τη 7^η και 8^η ημέρα που δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές. Την 12^η ημέρα μειώνεται αρκετά το COD της ομάδας των μη βρασμένων κελυφών αλλά και της νέας ομάδας εμπορικού carrier μέχρι και το 1,25 g/L και 1,76 g/L αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά τα βρασμένα κελύφη αυγών δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερη μεταβολή ειδικά κατά την 5^η, 6^η και 7^η ημέρα. Την 8^η ημέρα σημειώνει

μια μικρή μείωση το COD του αλλά τη 12^η ημέρα αυξάνεται και φτάνει στα 4,7 g/L, σχεδόν τριπλάσιο από τις άλλες δύο ομάδες.



Γράφημα 4.9: Σύγκριση νέας ομάδας με παλιά ομάδα

Από το **γράφημα 4.9** προκύπτει ότι η νέα ομάδα που δημιουργήθηκε μετά από μια σειρά πειραμάτων είναι και αποδεδειγμένα πιο αποτελεσματική από τη ήδη υπάρχουσα παλιά ομάδα. Ειδικά στις πρώτες 24 h που είναι και οι πιο σημαντικές έχουν σημαντική διαφορά, διότι όσο περνάν οι μέρες προσαρμόζονται τα βακτήρια και μειώνεται το COD τους. Αυτό φαίνεται και από το ποσοστό απομάκρυνσης τους **στο γράφημα 4.10** όπου η νέα ομάδα έχει 67,6 % απομάκρυνση του οργανικού φορτίου ενώ η παλιά ομάδα έχει 59,9%. Η μοναδική περίπτωση που αντικρίζουν ίδιο COD είναι η 5^η ημέρα και είναι λογικό διότι όσο προχωρούν οι μέρες μειώνεται το COD και έχουν περίπου τα ίδια επίπεδα αφού δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά. Με την ανανέωση όμως του αποβλήτου, την 6^η και 7^η ημέρα πάλι παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα η νέα ομάδα. Επίσης, την 8^η ημέρα, αφού προηγήθηκε ανανέωση του αποβλήτου την 7^η μέρα, παρατηρείται ότι η νέα ομάδα παραμένει στα ίδια επίπεδα ενώ της παλιάς ομάδας το COD αυξάνεται. Τέλος την 12^η ημέρα πάλι εξακολουθεί η νέα ομάδα να προηγείται της παλιάς και έτσι να έχει μεγαλύτερη απομάκρυνση του COD του αποβλήτου.



Γράφημα 4.10: Ποσοστά απομάκρυνσης COD

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ζήτηση για θαλάσσιες μεταφορές τα τελευταία χρόνια βρίσκεται σε άνθηση. Επομένως, η επιβάρυνση των θαλασσών από τη μεταφορά δισεκατομμυρίων πετρελαιοειδών από πετρελαιοφόρα που μετακινούνται ανά τον κόσμο, αποτελεί μια σημαντική πηγή επιβάρυνσης του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Έχουν γίνει ελάχιστες μελέτες για τη βιοδιάσπαση του αποβλήτου, εφόσον είναι ένα θέμα πολύ επίκαιρο και τώρα άρχισε να κινεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Μελετήθηκαν διάφορες βιολογικές μέθοδοι στη παρούσα εργασία για να επιτευχθεί η βιοδιάσπαση του αποβλήτου.

Συνοψίζοντας, με όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η χρήση χαμηλής συγκέντρωσης συμβατών διαλυτών ουσιών έχει μεγαλύτερη απομάκρυνση οργανικού φορτίου, δηλαδή μεγαλύτερη βιοαποικοδόμηση του bilge waste. Όπως επίσης ο συνδυασμός βεταΐνης με νιτρικά είναι εξίσου αποδοτικός.

Τα κελύφη αυγού, αφενός μεν είναι μια νέα ανερχόμενη μέθοδος που φαίνεται να δρα πολύ αποτελεσματικά, αφετέρου δε είναι μια οικονομική μέθοδος που ακολουθεί περιβαλλοντικά μονοπάτια. Συγκεκριμένα, τα μη βρασμένα κελύφη αυγών σημείωσαν εξαιρετική απόδοση με ποσοστό απομάκρυνσης COD 77%, εν αντιθέσει με τα βρασμένα κελύφη που φαίνεται να χάνουν τη ιδιότητα τους αυτή, λόγω του ότι απομακρύνεται το ανθρακικό ασβέστιο με τη πυρόλυση με ποσοστό απομάκρυνσης, μόλις 11,7%.

Μετά από μια σειρά διαδοχικών πειραμάτων σε influent και effluent επιλέχθηκε η νέα ομάδα βακτηρίων που ήταν αποδοτική κάτω από τις συνθήκες και τα μέσα ακινητοποίησης κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένα πειράματα το COD του αποβλήτου ήταν ιδιαίτερα ψηλό π.χ. 9 mg/L, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο για την προσαρμογή των βακτηρίων στη συγκεκριμένη περίπτωση. Γι' αυτό και κάποια βακτήρια χρειάζονταν ορισμένο χρονικό διάστημα για να δράσουν παρά από τις πρώτες ημέρες που θεωρούνται κρίσιμες και σημαντικές για την διάσπαση. Σε σπάνιες περιπτώσεις μπορεί να χρειαστεί και αραιώση του αποβλήτου που εξαιτίας της θολότητας του δεν μπορεί να επεξεργαστεί και έτσι αλλοιώνει τα αποτελέσματα. Ως εκ τούτου, δεν μπορεί να παρατηρηθεί και μεγάλη διαφορά μεταξύ των δειγμάτων.

Εν κατακλείδι, το μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης παρατηρείται να πετυχαίνουν τα κελύφη αυγών. Εκτός αυτού, δημιουργεί εντύπωση το γεγονός ότι εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης και από το εμπορικό carrier που βρίσκεται ήδη στην αγορά.

Μελλοντική έρευνα-Προτεινόμενα πειράματα

Μετά από την πρόσφατη ανακάλυψη ότι τα κελύφη των αυγών εκτός από το να δεσμεύουν φώσφορο, απομακρύνουν σημαντικά το COD. Επομένως, πλέον θεωρούνται προσροφητικά εκτός από πορώδη υλικά. Θα ήταν ιδανικό να εξελιχθεί αυτή η έρευνα με την εξέταση των κελυφών αυγού σε διάφορες συγκεντρώσεις έτσι ώστε να εντοπιστεί η βέλτιστη συγκέντρωση που βιοδιασπά το COD του αποβλήτου bilge. Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι στην προκειμένη περίπτωση αποτελούσε το 10% του διαλύματος.

Μείζονος σημασίας θεωρείται η προσαρμογή των εργαστηριακών συνθηκών που πραγματοποιήθηκαν σε πιλοτικές εφαρμογές με τη χρήση βιοαντιδραστήριων είτε αερόβιων είτε αναερόβιων. Από την άλλη, ήσσονος σημασίας αποτελεί η μελέτη νέων βακτηρίων που θα μπορούν να διασπών το απόβλητο και να σχηματίζουν βιοφίλμ.

Επίσης θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν τα συγκεκριμένα πειράματα αλλά αυτή τη φορά υπό αναερόβιες συνθήκες. Όπως και η προσθήκη υποστρωμάτων όπως αποκόμματα χλόης που περιέχουν συμβατές διαλυτές ουσίες (Suwannopradol et al. 2012) θα μπορούσε να είναι μια πιθανή λύση για χαμηλό κόστος και εύκολη εφαρμογή.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Emadian, S.M. et al., 2015. Treatment of a low-strength bilge water of Caspian Sea ships by HUASB technique. *Ecological Engineering*, 82, pp.272–275. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.055>.
- McLaughlin, C. et al., 2014. Characterizing shipboard bilgewater effluent before and after treatment. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(8), pp.5637–5652.
- Multi Umwelttechnologie AG, Instructions and recommendations for the operation of Mutag BioChip™ carrier media: Mutag BioChip™ and sustainable solutions for environmental protection
- Multi Umwelttechnologie AG, 2009, *Mutag BioChip™*, viewed 2 April 2016, < http://www.mutag-biochip.com/files/mutag_biochiptm_flyer_en.pdf>
- Multi Umwelttechnologie AG, 2009, *Pool of information*, Product information in details, viewed 2 April 2016, < http://www.mutag-biochip.com/product_information_in_detail.html>
- Nievas, M.L. et al., 2006. Biodegradation of bilge waste from Patagonia with an indigenous microbial community. *Bioresource Technology*, 97(18), pp.2280–2290.
- Nievas, M.L. et al., 2005. Effect of pH modification on bilge waste biodegradation by a native microbial community. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 56(3), pp.151–157.
- Oliveira, D. a., Benelli, P. & Amante, E.R., 2013. A literature review on adding value to solid residues: Egg shells. *Journal of Cleaner Production*, 46, pp.42–47.
- Serway, R.A., Beichner, R.J. and Jewett, J.W., 2000. Physics for scientists and engineers with modern physics, vol.1
- Shivanand, P. & Mugeraya, G., 2011. Halophilic bacteria and their compatible solutes -osmoregulation and potential applications. *Current Science*, 100(10), pp.1516–1521.
- Sun, C. et al., 2010. Development of a biofilm-MBR for shipboard wastewater treatment: The effect of process configuration. *Desalination*, 250(2), pp.745–750.

Yang, J. et al., 2013. Impact of Na⁺ on Biological Wastewater Treatment and the Potential of Anaerobic Membrane Bioreactors: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(24), pp.2722–2746. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389.2012.694335>.

Αγαθαγγέλου, Μ 2014, ‘Βιομετατροπή φερουλικού οξέος σε βανιλικό οξύ και βανιλίνη από απομονωθέντες μικροοργανισμούς’, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου, Λεμεσός.

Βασιλάτος, Χ *Προσδιορισμός φυσικοχημικών παραμέτρων υγρών αποβλήτων και υδάτων (DO, BOD, COD, TOC)*.

Γλαβά, Μ.Ε 2012, ‘Μελέτη διάθεσης και διαχείρισης αποβλήτων πλοίων’, Πτυχιακή Εργασία, Τ.Ε.Ι Κρήτης, Ηράκλειο.

Γκαρλιαρίδης, Α 2010, ‘Σχέδιο παραλαβής & διαχείρισης αποβλήτων πλοίων της Λιμενικής εγκατάστασης ευθύνης της Γ.Μ.Μ. Α.Ε. ΛΑΡΚΟ’, Πτυχιακή Εργασία, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Χανιά.

Κανινή, Γ, Τεχνικές Επιλεκτικής Απομόνωσης μικροοργανισμών από Περιβαλλοντικά δείγματα, Τομέας Βοτανικής, Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Χατζιωάννου, Θ.Π, Μ.Α.Κουππαρή, Αθήνα 2010, Ενόργανη ανάλυση, 7^{ος} τόμος, σελ.168-204. Κεφ.8