

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



Πτυχιακή εργασία

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕ
ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΥΨΗΛΗ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Γιώργος Γιασουμής

Λεμεσός 2015

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

Πτυχιακή εργασία

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕ
ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΥΨΗΛΗ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ

Γιώργος Γιασουμής

Σύμβουλος καθηγητής
Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

Λεμεσός 2015

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Γιώργος Γιασουμής, 2015

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή Δρ. Ιωάννη Βυρίδη για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε. Παράλειψη μου θα ήταν να μην εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην διδακτορικό φοιτήτρια Μαρία Πάτσαλου για την απλόχερη βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια των εργαστηριακών πειραμάτων. Οι γνώσεις της και οι συμβουλές της ήταν αναγκαίες για την υλοποίηση της εργασίας.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους φίλους μου και την σύντροφο μου οι οποίοι ήταν δίπλα μου κατά την διάρκεια των σπουδών μου, στηρίζοντας με σε κάθε δύσκολη στιγμή.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της πτυχιακής εργασίας ήταν η απομόνωση ενός μικροβιακού στελέχους μέσω μικροβιακών διεργασιών από διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα, το οποίο να έχει την ικανότητα να βιοδιασπά υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης σε υψηλής προστιθέμενης αξίας χημικές ουσίες.

Η γλυκερόλη είναι το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιοντίζελ σε αναλογία 1 προς 10, μέσω της εστεροποίησης των τριγλυκεριδίων που υπάρχουν στα διάφορα λίπη και στα λιπαρά οξέα. Κατά την διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, οι βιομηχανίες παραγωγής βιοντίζελ ανά το παγκόσμιο παρουσίασαν εκθετική αύξηση σε ρυθμούς παραγωγής με αποτέλεσμα την δημιουργία μεγάλων αποθεμάτων γλυκερόλης τα οποία δεν μπορούν να αφεθούν ελεύθερα στο περιβάλλον. Σε συνδυασμό με την ύπαρξη αποτελεσματικής χρήσης της γλυκερόλης σε μεγάλες ποσότητες και την ελαχιστοποίηση της χρηματικής της αξίας σε βαθμό που να θεωρείται απόβλητο, υπάρχει έντονο ενδιαφέρον διερεύνησης νέων τρόπων αξιοποίησης της.

Το ηλεκτρικό οξύ είναι μια ουσία με ποικίλες εφαρμογές σε πολλά πεδία όπως στην φαρμακοβιομηχανία, στις γεωργικές καλλιέργειες, στην βιομηχανία τροφίμων και στην χημική βιομηχανία. Λόγω της εξειδικευμένης του χρήσης, το αυξανόμενο κόστος των ορυκτών πρώτων υλών καθώς και την δυσκολία παραγωγής του, θεωρείται ως μιας υψηλής χρηματικής αξίας ουσία η οποία μπορεί να παραχθεί και βιοτεχνολογικά από μικροοργανισμούς βιοδιασπώντας γλυκερόλη.

Η βιβλιογραφική μελέτη έδειξε ότι η απομόνωση ενός τέτοιου μικροοργανισμού απαιτούσε την δειγματοληψία από διάφορα περιβαλλοντικά δείγματα προερχόμενα από Φρέσκα Φρούτα, Ακατέργαστη Γλυκερόλη, Πρωτοβάθμια Ιλύ, Δευτεροβάθμια Ιλύ, Ενεργοποιημένη Ιλύ, Δείγματα απομονωμένων μικροοργανισμών από Πορτοκάλια και από Βοδινά στομάχια, τα οποία έδωσαν και τις μέγιστες πιθανότητες εξεύρεσης του.

Ακολουθώντας τις ενδεικνύμενες μικροβιολογικές μεθόδους (Ενδυνάμωση δειγμάτων, Εμβολιασμός σε τρυβλία, Δημιουργία καθαρής καλλιέργειας σε τρυβλία, Δημιουργία καθαρής υγρής καλλιέργειας, Απομόνωση μικροοργανισμού) και τεχνικές ανάλυσης (Φασματοσκοπία UV/Vis, Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης HPLC), έγινε κατορθωτή η απομόνωση μικροβιακού στελέχους προερχόμενο τα δείγματα Βοδινών Στομαχιών.

Το συγκεκριμένο αερόβιο στέλεχος (Βοδ. Στομ. Β pH 7 pH 5.8) κατά την διάρκεια των πειραμάτων παρουσίασε προσαρμογή και ικανοποιητική ανάπτυξη σε βιομέσα με υψηλές συγκεντρώσεις γλυκερόλης (ακατέργαστη 500ml/L και καθαρή 20ml/L), όπως επίσης και την μεγαλύτερη απόδοση όσον αφορά την βιοδιάσπαση της γλυκερόλης σε ηλεκτρικό οξύ και σε μικρότερες ποσότητες διάφορες άλλες ουσίες.

Επιπλέον έγιναν πειράματα με σκοπό την παρατήρηση της ανάπτυξης συναρτήσει αλλαγών στις περιβαλλοντικές συνθήκες επώασης του. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν είναι αλλαγές στην αλατότητα, στο pH, στην συγκέντρωση γλυκερόλης, στην θερμοκρασία και στην χρήση θρεπτικότερων υποστρωμάτων για την μελέτη της διαυξικής ανάπτυξης του.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως με την χρήση συγκεκριμένων θεικών και φωσφορικών αλάτων ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ή σε θερμοκρασία 30°C μπορεί να καλλιεργηθεί σε ένα μεγάλο εύρος ενεργής οξύτητας (pH 5.8-7) και να προκύψει μεγάλη ανάπτυξη. Επίσης τα αποτελέσματα έδειξαν πως όσο μικρότερη ποσότητα ακατέργαστης και καθαρής γλυκερόλης χρησιμοποιείται, τόσο γρηγορότερη είναι η ανάπτυξη ενώ μεγάλο ρόλο στον χρόνο βιοδιάσπασης της γλυκερόλης παίζει και η προσθήκη άλλων θρεπτικών υποστρωμάτων (yeast extract).

Λέξεις κλειδιά: Γλυκερόλη, Ηλεκτρικό Οξύ, Μικροοργανισμός, Ανάπτυξη

ABSTRACT

The aim of the thesis was the isolation of a strain through microbial processes from various environmental samples, which have the ability to biodegrade high concentrations of glycerol into high added-value chemicals.

Glycerol is the main by-product of biodiesel production at ratio 1 to 10, by the esterification of triglycerides found in various fats and fatty acids. During the last decade, the worldwide biodiesel industry experienced exponential growth in production rates and as a result the creation of large glycerol stocks which cannot be released into the environment. Combined with the lack of efficient use of glycerol in large quantities and the minimize of glycerol's financial value to an extent of waste, there is a keen interest to explore new modes of exploitation.

Succinic acid is a substance with various applications in many fields such as pharmaceutical, agricultural crops, in the food industry and the chemical industry. Due to the specialized usage, the rising cost of fossil raw materials and the difficulty of the production, glycerol is regarded as a high monetary value substance which can be produced biotechnological by microorganisms.

The literature study showed that the isolation of such microorganism required the sampling of various environmental samples such as Fresh Fruits, Raw Glycerol, Primary Sludge, Secondary Sludge, Activated Sludge, Samples of microorganisms isolated from Oranges and from Beef Stomachs, which they showed a potential in bioconverting glycerol into succinic acid.

Following the appropriate microbiological methods (Empowerment samples, plates, creating a pure culture plates, creating pure liquid culture, isolation of the microorganism) and analytical techniques (spectroscopy UV/Vis, High pressure liquid chromatography HPLC), was made possible the isolation of a strain derived from Beef Stomachs (B.S)

This aerobic strain (B.S. B pH 7 pH 5.8) during the experiments showed a good adaptation and growth in high concentrations of glycerol (crude 500ml /L and pure 20ml /L), as well as great efficiency on the glycerol's biodegradation into succinic acid and in lesser amounts various other substances.

Additional experiments were performed in order to observe the microorganism's development in a function of changes happened in the environmental conditions of incubation. Factors studied include changes in salinity, pH, glycerol's concentration, temperature and the use of another nutritious substrate for studying the change in development.

The results showed that the use of particular sulphates and phosphates salts ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) or at a temperature of 30°C can result the microorganism's grown in a wide range of active acidity (pH 5.8-7) and give a great development. Also the experiments showed that the smaller amount of raw and pure glycerol is used, the faster is the growth. Moreover the use of some other more efficient nutrients (yeast extract) can change glycerol's biodegradation time.

Keywords: Glycerol, Succinic Acid, Microorganism, Development