

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΑΠΟ
ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΜΕΝΗ ΛΑΣΠΗ

Μαρία Ανδρονίκου

Λεμεσός 2016

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

Πτυχιακή εργασία

ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΑΠΟ
ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΜΕΝΗ ΛΑΣΠΗ

Μαρία Ανδρονίκου

Σύμβουλος καθηγητής
Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

Λεμεσός 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Μαρία Ανδρονίκου, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

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

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, η οποία υλοποιήθηκε στα Ερευνητικά Εργαστήρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Δρ. Βυρίδη Ιωάννη ο οποίος μου προσέφερε το ενδιαφέρον θέμα και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντάς μου τη δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο συγκεκριμένο επιστημονικό τομέα. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε, καθώς και για την απρόσκοπτη υποστήριξη και καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής διατριβής μου, χωρίς την βοήθεια του οποίου η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής δεν θα ήταν δυνατή καθώς και την άψογη συνεργασία σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στις Δρ. Arevik Vardanyan και Νάσια Καφά για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Ευχαριστώ επίσης τους γονείς μου για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν το διάστημα αυτό και καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου καθώς και τους καρδιακούς μου φίλους για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο περιορισμός των αποθεμάτων του φωσφόρου και το μεγάλο κόστος για την εξόρυξη του, αναγκάζει την επιστημονική κοινότητα να στραφεί σε νέες βιοχημικές μεθόδους μέσω των οποίων μπορεί να πραγματοποιηθεί ανάκτηση του από ρεύματα αποβλήτων με χρήση μικροοργανισμών. Στην παρούσα εργασία, σκοπός είναι η μελέτη της δυνατότητας της βιολογικής προσέγγισης για την εξαγωγή του φωσφόρου με χρήση οξεόφιλων μικροοργανισμών από αναερόβια χωνεμένη λάσπη η οποία προέρχεται από σταθμό βιολογικού καθαρισμού λυμάτων, με απώτερο σκοπό να επιτευχθεί ανάκτηση του.

Η εργασία αποτελείται από 4 κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στις συμβατές οργανικές ουσίες, πότε παράγονται και πως αυτές θα μπορούσαν να επιδρούν σε οξεόφιλους μικροοργανισμούς όταν αυτοί βρίσκονται υπό την επήρεια ενός στρεσογόνου παράγοντα.

Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στην λάσπη και πως επεξεργάζεται στην Κύπρο και στην τεχνική της βιοεκχύλισης με την οποία θα πραγματοποιηθούν τα πειράματα. Ακόμη γίνεται αναφορά στα είδη των οξεόφιλων μικροοργανισμών και πιο συγκεκριμένα αυτά τα οποία θα χρησιμοποιηθούν κατά τα πειράματα μαζί με τους μηχανισμούς αντιδράσεων που καταλύουν και τους παράγοντες οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν συνθήκες στρες σε αυτούς. Τέλος γίνεται αναφορά στις μεθόδους ανάκτησης του φωσφόρου τόσο χημικά με χρήση οργανικού διαλύτη όσο και βιολογικά με προσροφητικό μέσο τα τσόφλια αυγών.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο πρώτα για την μελέτη των οργανικών διαλυτών ουσιών σε οξεόφιλους μικροοργανισμούς, ύστερα για την βιοεκχύλιση του φωσφόρου χρησιμοποιώντας σίδηρο-οξειδωτικούς, θείο-οξειδωτικούς και Sulphate-reducing bacteria (SRB) μικροοργανισμούς και τέλος για την ανάκτηση του φωσφόρου με χημικό και βιολογικό τρόπο.

Στο τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζονται και αναλύονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από όλα τα πειράματα. Παρουσιάζονται τα συμπεράσματα που εξάγονται από τα πειραματικά αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας και δίνονται εισηγήσεις για μελλοντική έρευνά.

Λέξεις κλειδιά: Φώσφορος, αναερόβια λάσπη, βιοεκχύλιση, ανάκτηση, τσόφλια αυγών.

ABSTRACT

The restriction of the metal stock and the large cost for their extraction are the main reasons that are forcing the scientific community to focus on new biochemical methods by which the recovery of materials from waste streams can be carried out using microorganisms. In this thesis the aim was to study the possibility of biological approach to phosphorus bioleaching using acidophilic microorganisms from anaerobically digested sludge derived from wastewater treatment plant, with an aim to achieve phosphorus recovery.

The thesis consists of four chapters. The first chapter has a reference to the compatible solutes substances, the conditions under they are produced and how they could impact on acidophilic microorganisms when they are under the influence of a stressor.

The second chapter refers to the sludge and the process that is occurring in Cyprus and the technique of bioleaching with which the experiments will take place. Furthermore, this chapter is referring to the species of acidophilic microorganisms and more particularly those which are used in the experiments with the reaction mechanisms and some parameters which may cause stress to them. Finally, there is a reference to the phosphorus recovery methods such as the chemical method using organic solvent and the biological approach using egg shells as adsorbent.

The third chapter details the experiments performed in the laboratory firstly for the study of compatible solutes in acidophilic microorganisms, following the bioleaching of phosphorus using iron oxidizers, sulfur oxidizers and Sulphate-reducing bacteria (SRB) microorganisms and finally how to recover phosphorus with chemical and biological way.

The fourth chapter presents and analyzes the results obtained in all experiments. Furthermore the conclusions drawn from the experimental results of this thesis are presented and finally suggestions for future research are being provided.

Keywords: Phosphorus, anaerobic sludge, bioleaching, extraction, egg shells.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT	v
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xiii
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xiv
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xv
1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΜΒΑΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΣΙΔΗΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	1
1.1 Ορισμός συμβατών οργανικών ουσιών	2
1.1.1 Βεταΐνη	2
1.1.2 Τρεχαλόζη	3
2 ΧΡΗΣΗ ΟΞΕΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΕΡΩΒΙΑ ΛΑΣΠΗ	4
2.1 Φώσφορος.....	4
2.2 Νομοθετικό πλαίσιο Κύπρου.....	5
2.3 Λάσπη από βιολογικό σταθμό καθαρισμού λυμάτων	5
2.3.1 Επεξεργασία Λάσπης στην Κύπρος	5
2.4 Βιοεκχύλιση.....	6
2.4.1 Πλεονεκτήματα	6
2.4.2 Μειονεκτήματα.....	7
2.5 Σύντομη ιστορική ανασκόπηση και προοπτικές βιοεκχύλισης.....	7

2.6	Βιολογικά στοιχεία αναφορικά με τους αυτότροφους μικροοργανισμούς που συμβάλουν στη βιοεκχύλιση.....	8
2.6.1	Οξειδωση του θείου.....	10
2.6.2	Οξειδωση του σιδήρου	12
2.7	Sulphate-reducing bacteria (SRB).....	13
2.8	Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοεκχύλιση με οξεόφιλους μικροοργανισμούς	14
2.8.1	Το Υπόστρωμα	14
2.8.2	Η Θερμοκρασία	14
2.8.3	Το pH.....	14
2.8.4	Ο Αερισμός.....	15
2.8.5	Η Ύπαρξη Οργανικών Ενώσεων.....	15
2.9	Ανάκτηση μετάλλων με χρήση οργανικού διαλύτη	15
2.10	Βιολογική ανάκτηση φωσφόρου με χρήση τσοφλιών αυγών	16
2.11	Σκοπός Εργασίας	18
3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
3.1	Οργανικές διαλυτές ουσίες.....	19
3.1.1	Υλικά και μέθοδοι	19
3.1.2	Μέτρηση δισθενούς Σιδήρου Fe ²⁺	22
3.2	Βιοεκχύλιση Φωσφόρου από χωνεμένη λάσπη βιολογικού καθαρισμού λυμάτων	23
3.2.1	Χαρακτηριστικά λάσπης	24
3.2.2	Υλικά και μέθοδοι	25
3.3	Ανάκτηση Φωσφόρου	28
3.3.1	Χρήση οργανικού διαλύτη	28
3.3.2	Βιολογική ανάκτηση με τσόφλια αυγών	29
4	ΑΝΑΛΥΣΗ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	31
4.1	Οργανικές διαλυτές ουσίες.....	31

4.2	Βιοεκχύλιση Φωσφόρου από χωνεμένη λάσπη βιολογικού καθαρισμού λυμάτων	35
4.2.1	Πείραμα 1	36
4.2.2	Πείραμα 2	37
4.2.3	Πείραμα 3	39
4.2.4	Πείραμα 4	40
4.3	Ανάκτηση Φωσφόρου	41
4.3.1	Χρήση οργανικού διαλύτη	41
4.3.2	Χρήση τσοφλιών αυγών	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		47
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ		50
Μηνιαία αποτελέσματα αναλύσεων αναερόβια χωνεμένης λάσπης		50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Παρουσίαση φυσιολογικών χαρακτηριστικών των οξεόφιλων βακτηρίων που οξειδώνουν τον σίδηρο και το θείο	10
Πίνακας 2: Βασικά άλατα του βιομέσου για αυτότροφους μικροοργανισμούς (10x Autotrophic Basal Salts).....	20
Πίνακας 3: Διάλυμα ιχνοστοιχείων (trace elements).	20
Πίνακας 4: Μέσες ετήσιες τιμές μετάλλων από τις αναλύσεις της αναερόβιας λάσπης	24

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης φωσφορικών στο μήκος κύματος των 436 nm.....	25
Διάγραμμα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης φωσφόρου με την μέθοδο του Ασκορβικού οξέως .	30
Διάγραμμα 3: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας	31
Διάγραμμα 4: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε 15g/L NaCl με χρήση τρεχαλόζης και βεταΐνης σε συγκεντρώσεις 1 και 5 mM.....	32
Διάγραμμα 5: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε 15g/L NaCl με χρήση KCl 1g/L, τρεχαλόζης και βεταΐνης σε συγκεντρώσεις 1 και 5 mM...	33
Διάγραμμα 6: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε 25g/L NaCl με χρήση τρεχαλόζης 1mM και βεταΐνης 10 mM	34
Διάγραμμα 7: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε 35g/L NaCl με χρήση τρεχαλόζης 1mM και βεταΐνης 10 mM	35
Διάγραμμα 8: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά) πειράματος 1 με χρήση σίδηρο-οξειδωτικών (iron), θείο-οξειδωτικών (sulpher) και μείγμα των δύο ειδών (mix) μικροοργανισμών	36
Διάγραμμα 9: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά ιόντα) με προοξυνισμένη λάσπη μίας ημέρας.....	37
Διάγραμμα 10: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά ιόντα) με προοξυνισμένη λάσπη πέντε ημερών	38
Διάγραμμα 11: Οι τιμές του pH για όλες τις διαφορετικές συνθήκες των καλλιεργειών κατά την εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά ιόντα) με προοξυνισμένη λάσπη μίας και πέντε ημερών	39
Διάγραμμα 12: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά) με χρήση σίδηρο-οξειδωτικών (iron), θείο-οξειδωτικών (sulpher) και μείγμα των δύο ειδών (mix) μικροοργανισμών.....	40

Διάγραμμα 13: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά) με χρήση SRB μικροοργανισμών, <i>At. ferrooxidans</i> 13, <i>L. ferriphilum</i> CC και μίγμα σίδηρο-οξειδωτικών και θείο-οξειδωτικών μικροοργανισμών	41
Διάγραμμα 14: Απορρόφηση φωσφόρου από τσόφλια αυγών τα οποία υπέστησαν πυρόλυση στους 600 °C για 3 ώρες.....	42
Διάγραμμα 15: Απορρόφηση φωσφόρου από τσόφλια αυγών τα οποία υπέστησαν πυρόλυση στους 800 °C για 2 ώρες.....	43
Διάγραμμα 16: Απορρόφηση φωσφόρου από τσόφλια αυγών τα οποία υπέστησαν πυρόλυση στους 900 °C για 1 ώρες.....	43

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή μορίου της βεταΐνης	2
Εικόνα 2: Δομή μορίου της τρεχαλόζης	3
Εικόνα 3: Μηχανισμός οξείδωσης του θείου (From Brock Biology of microorganism's p.356).....	11
Εικόνα 4: Σχηματική παράσταση της διαδικασίας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (oxidative phosphorylation) (From Brock Biology of microorganisms p.356).....	12
Εικόνα 5: Σχηματική παράσταση της διαδικασίας οξείδωσης του σιδήρου (From Brock Biology of microorganisms p.356).....	12
Εικόνα 6: Μεταβολικός κύκλος των SRB (μαύρα βέλη)	13
Εικόνα 7: Οι καλλιέργειες με διαφορετική περιεκτικότητα σε NaCl (0, 15, 30 και 50 mg/L) που πραγματοποιήθηκαν	21
Εικόνα 8: Καλλιέργειες των 15 g/L NaCl με οργανικές διαλυτές ουσίες.....	22
Εικόνα 9: Καλλιέργειες των 30 g/L NaCl με οργανικές διαλυτές ουσίες.....	22
Εικόνα 10: Η χρωματική αλλαγή των δειγμάτων κατά την τιτλοδότηση. Δεξιά (πράσινο) η ενδιάμεση αλλαγή και αριστερά η τελική αλλαγή (μωβ χρώμα)	23
Εικόνα 11: Μίγμα υδατικής προς οργανική φάση με οργανική φάση να αποτελεί η κηροζίνη με benzyl-dimethyl-amine (BDMA)	28

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Παρουσιάζονται συνοπτικά όλες οι σημαντικές συντομογραφίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στο κείμενο της πτυχιακής π.χ.:

ΤΕΠΑΚ: Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

ΕΟΚ: Ευρωπαϊκή Οικονομική Κοινότητα

ΕΚ: Ευρωπαϊκή Κοινότητα

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

APS	Θειοφωσφορική Αδενοσίνη
ATP	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
BOD	Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο
CO ₂	Διοξείδιο του Άνθρακα
COD	Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο
DNA	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
Fe	Σίδηρος
Fe ²⁺	Δισθενής Σίδηρος
FeSO ₄	Θεικός Σίδηρος
gr/L	Γραμμάρια ανά Λίτρο
H ₂ O	Νερό
H ₂ SO ₄	Θειϊκό Οξύ
H ₂ S	Υδρόθειο
KCl	Χλωριούχο κάλιο
mL	Χιλιοστό του λίτρου
NaCl	Χλωριούχο νάτριο
O ₂	Οξυγόνο
P	Φώσφορος
pH	Πε-χα
PO ₄ ³⁻	Φωσφορικά ιόντα
S	Θείο
UV-Vis Spectroscopy	Φασματομετρίας Μοριακής Απορρόφησης στο Υπεριώδες-Ορατό
μL	Μικρόλιτρο

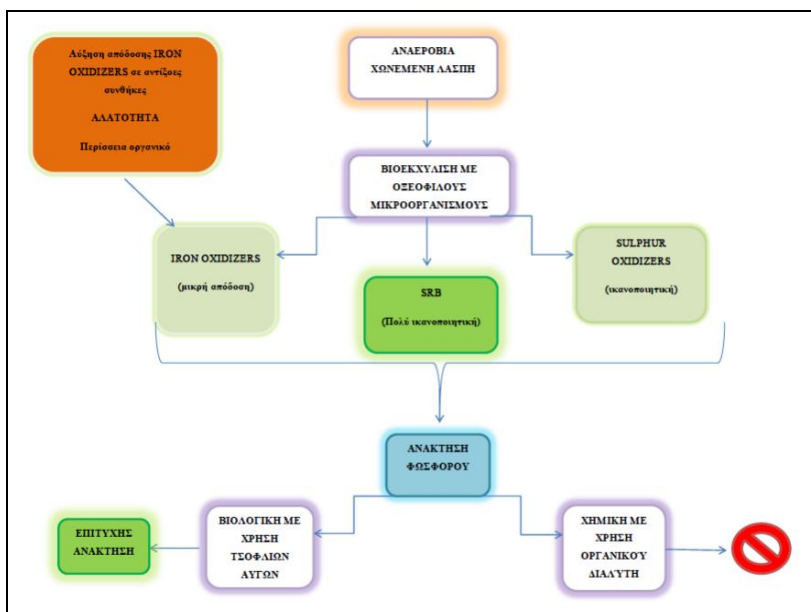
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ζούμε σε μια εποχή στην οποία έχει φανεί πως αποτελεί επιτακτική ανάγκη για τον άνθρωπο να καταφύγει σε νέες τάσεις τεχνολογίας στον τρόπο που προσεγγίζουμε την διαχείριση περιβαλλοντικών θεμάτων. Αφενός γιατί θα πρέπει να επιτύχει στις περιβαλλοντικές προκλήσεις στα καινούρια θέματα διαχείρισης, ανακύκλωσης, επαναχρησιμοποίησης και ανάκτησης πολύτιμων υλικών, αφετέρου δε γιατί το οικονομικό όφελος μέσα από αυτές τις διαδικασίες είναι μεγάλο. Σε αυτή την προσπάθεια, η συμβολή της επιστήμης της Βιοτεχνολογίας είναι τεράστια αφού αποτελεί ένα ραγδαία αναπτυσσόμενο σύνθετο επιστημονικό κλάδο ο οποίος στοχεύει στην αξιοποίηση της εντυπωσιακής προόδου που έχει πραγματοποιηθεί στις Βιολογικές και συναφείς επιστήμες, με σκοπό την ανάπτυξη νέων και προηγμένων προϊόντων και υπηρεσιών. Η συνεισφορά της Βιοτεχνολογίας είναι σημαντική στους τομείς της υγείας, της βιομηχανίας, της διατροφής, της πρωτογενούς παραγωγής, της ενέργειας, του περιβάλλοντος και της ποιότητας ζωής της σύγχρονης κοινωνίας, με τεράστιες επενδύσεις σε παγκόσμια κλίμακα στην εκπαίδευση, την έρευνα και τις εφαρμογές της.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ο σκοπός είναι να μελετηθεί η εξαγωγή του φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη προερχόμενη από επεξεργασία των λυμάτων σε Βιολογικό Σταθμό Καθαρισμού με χρήση βιολογικών μεθόδων με απώτερο σκοπό την ανάκτηση του. Λόγω της ύπαρξης στην λάσπη μεγάλων ποσοτήτων οργανικών τα οποία αποτελούν στρεσογόνο παράγοντα για την διαβίωση των μικροοργανισμών εξετάζεται σε πρώτο στάδιο η δυνατότητα διαβίωσης οξεόφιλων σίδηρο-οξειδωτικών βακτηρίων σε ένα στρεσογόνο παράγοντα που είναι η αυξημένη αλατότητα, και μελετάται κατά πόσο η ανάπτυξη τους σε τέτοιο περιβάλλον μπορεί να βοηθηθεί με την χρήση συμβατών οργανικών ουσιών (Compatible Solutes).

Σε δεύτερο στάδιο μελετάται η βιοεγχύλιση φωσφόρου από την λάσπη και μελετούνται πιθανοί τρόποι ανάκτησης του. Καθόλη την διεργασία σκοπός ήταν να διερευνηθούν σε εργαστηριακή κλίμακα όλες οι απαραίτητες παράμετροι οι οποίες είχαν να κάνουν με την χρήση βακτηρίων, τα οποία χρησιμοποιώντας τη λάσπη ως υπόστρωμα, έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν την μεγαλύτερη εξαγωγή του φωσφόρου από αυτήν. Συγκεκριμένα τα βακτήρια τα οποία μελετήθηκαν ανήκουν στα οξεόφιλα βακτήρια και συγκεκριμένα είναι σίδηρο-οξειδωτικά, θείο-οξειδωτικά και Sulphate-reducing bacteria (SRB).

Στο πιο κάτω σχεδιάγραμμα διατυπώνονται τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν στην παρούσα εργασία.



Το θέμα αυτό επιλέχθηκε κυρίως για δύο λόγους. Ο πρώτος λόγος οφείλεται στην προσωπική μου επιθυμία να ασχοληθώ μελλοντικά με τεχνολογίες σύγχρονες και φιλικές προς το περιβάλλον με απώτερο σκοπό την ανάκτηση υλικών από απόβλητα. Ο δεύτερος λόγος έχει να κάνει με την περιορισμένη υπάρχουσα επιστημονική μελέτη του συγκεκριμένου θέματος. Μέχρι σήμερα η ανάκτηση του φωσφόρου πραγματοποιείται με χρήση φυσικοχημικών μεθόδων. Ελάχιστες είναι οι προσπάθειες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν με χρήση βιολογικών μεθόδων, οπότε τα όποια ευρήματα από αυτήν θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση για περαιτέρω μελέτη και πιθανών να χρησιμοποιηθούν και από την επιστημονική κοινότητα στο μέλλον μιας και η τεχνολογία ανάκτησης χρήσιμων υλικών μέσω μικροοργανισμών είναι το αντικείμενο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος.

Σε όλη την χρονική διάρκεια της έρευνας αυτής μελετήθηκαν διάφορα επιστημονικά άρθρα και μελέτες σχετικά και συνυφασμένα με τις διάφορες πτυχές που καλύπτονται αναφορικά με το θέμα που επιλέχθηκε. Η όλη πειραματική διαδικασία διάρκεσε περίπου 10 μήνες χωρίς να παρουσιαστούν ιδιαίτερες δυσκολίες ή προβλήματα κατά την πραγματοποίηση της πέρα από τα αναμενόμενα.

1 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΥΜΒΑΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ ΣΙΔΗΡΟ-ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Πολλοί μικροοργανισμοί επιβιώνουν σε φυσικές και γεωχημικές ακραίες συνθήκες, οι οποίες αμφισβητούν τα φυσικοχημικά όρια της ζωής, όπως ακραίες θερμοκρασίες, pH, αλατότητα, πίεση, ξήρανση, ακτινοβολία, και άλλα. Αυτά ονομάζονται ως ακραιόφιλα. Μεταξύ αυτών, και είναι και οι οξεόφιλοι μικροοργανισμοί που ευδοκιμούν σε όξινα περιβάλλοντα με pH μικρότερο από 4,0. Αυτά είναι μια διαφορετική ομάδα οργανισμών που περιλαμβάνεται στα αρχαία, βακτήρια, μύκητες, άλγη, και πρωτόζωα τα οποία αναπτύσσονται σε όξινες συνθήκες, και αναφέρθηκαν από φυσικά περιβάλλοντα, όπως πισίνες θείου και θερμοπίδακες, και τεχνητά περιβάλλοντα, όπως περιοχές που συνδέονται με τις ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η εξόρυξη μεταλλευμάτων άνθρακα και μετάλλου (Bertoldo et al. 2004) (Sharma et al. 2012).

Οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν δυσκολίες στο να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα στα οποία οι συνθήκες χαρακτηρίζονται από στρεσογόνους παράγοντες. Τέτοιες αντίξοες συνθήκες μπορούν να αποτελέσουν η υψηλή αλατότητα, η υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία και η ξηρασία (Galinski 1995) (Wood et al. 2001) (Ron 2012). Για την υψηλή αλατότητα σχετικά λίγοι οργανισμοί είναι σε θέση να προσαρμοστούν. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να ζήσουν σε τέτοιο περιβάλλον κατηγοριοποιούνται ως αλόφιλοι (Halophile) και αλατοανεκτικοί (Halotolerant) μικροοργανισμοί (DasSarma & Aroga 2001). Αυτά τα είδη μικροοργανισμών χρησιμοποιούν ενέργεια για να αποκλείσουν το άλας από το να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα ώστε να αποφευχθεί η πρωτεϊνική συνάθροιση. Προκειμένου να επιζήσουν σε περιβάλλοντα με υψηλές αλατότητες, τα αλόφιλα και αλατοανεκτικά βακτήρια υιοθετούν στρατηγικές που αποτρέπουν την καταστροφή του κυττάρου λόγω ωσμωτικής μετακίνηση του νερού από το κυτταρόπλασμά τους (Kempf & Bremer 1998). Συσσωρεύουν οργανικές ενώσεις στο κυτταρόπλασμα οι οποίες μπορούν να συντεθούν στο κύτταρο ή να συσσωρευτούν από το περιβάλλον και έτσι εξισορροπούν την ωσμωτική πίεση για να προστατεύουν τις πρωτεΐνες, καθώς και να προστατεύουν τα ένζυμα σε περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες, σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε ξηρασία στο κυτταρόπλασμα αποτρέποντας τη λύση του κυττάρου (Margesin & Schinner 2001). Αυτές οι ουσίες καλούνται συμβατές οργανικές ουσίες (Compatible Solutes ή Osmoprotectants).

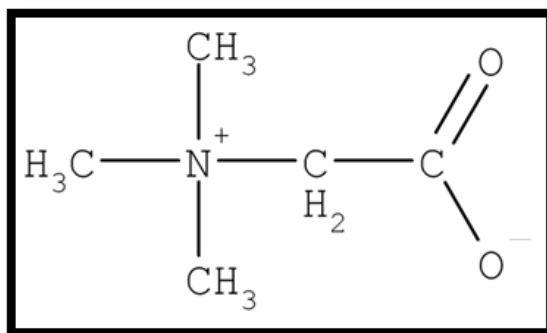
1.1 Ορισμός συμβατών οργανικών ουσιών

Οι συμβατές οργανικές ουσίες είναι μικρά μόρια που δρουν ως οσμολύτες και βοηθούν τους οργανισμούς να επιβιώνουν σε συνθήκες ακραίας οσμωτικής πίεσης, υψηλή ή χαμηλή θερμοκρασία και ξηρασία. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών αποτελούν οι βεταΐνες, τα αμινοξέα, και η τρεχαλόζη (ή τρεαλόζη ζάχαρη). Αυτά τα μόρια συσσωρεύονται στα κύτταρα και εξισορροπούν την οσμωτική διαφορά μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του κυττάρου και βοηθά στην διατήρηση της πίεσης, τον όγκο των κυττάρων, και τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών, όλα όσα χρειάζονται για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους (McNeil et al. 1999).

Οι συμβατές οργανικές ουσίες που παράγονται από τα αλόφιλα και αλατοανεκτικά βακτήρια υπάρχουν διαθέσιμες στο εμπόριο και έχουν δοκιμαστεί ως συστατικό προσθήκης στο βιομέσο ή το υπόστρωμα που χρησιμοποιούν διάφοροι μικροοργανισμοί όταν αυτοί βρίσκονται σε συνθήκες στρες με πολύ καλά αποτελέσματα (Vallero et al. 2003) (Zhang et al. 2016) (Galinski 1995). Για αυτό τον λόγο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον το πώς θα ήταν ικανές να βοηθήσουν και τους Χημειολιθότροφους μικροοργανισμούς σε κάποιο στρεσογόνο παράγοντα στον οποίο εκτίθενται όπως είναι η περίσσεια οργανικού.

1.1.1 Βεταΐνη

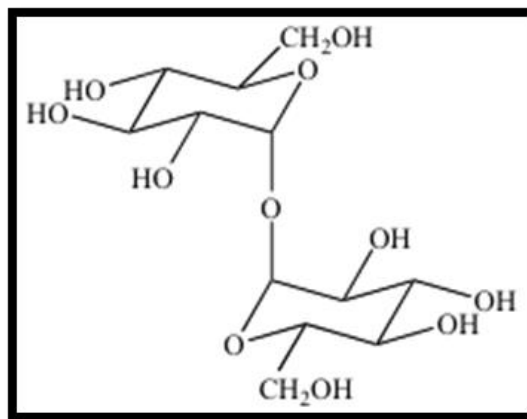
Η βεταΐνη (Betaine) είναι μία οργανική ένωση, η οποία παράγεται από το αμινοξύ γλυκίνη, με αντικατάσταση των τριών ατόμων υδρογόνου της αμινικής ομάδας της με τρία μεθύλια. Ο χημικός της τύπος είναι: $(\text{CH}_3)_3\text{-N}^+\text{-CH}_2\text{-COO}^-$ (McNeil et al. 1999).



Εικόνα 1: Δομή μορίου της βεταΐνης

1.1.2 Τρεχαλόζη

Η τρεχαλόζη, είναι ένας φυσικός άλφα-συνδεδεμένος δισακχαρίτης που σχηματίζεται από ένα α, α-1,1-γλυκοζίτη δεσμό μεταξύ δύο μονάδων α-γλυκόζης. Η τρεχαλόζη υπάρχει στην ερυσιβώδη σίκαλη, και στο trehala μάννα, μια ουσία που γίνεται από σκαθάρια. Μπορεί να συντεθεί από βακτήρια, μύκητες, φυτά , και ζώα ασπόνδυλα και βοηθά τα φυτά και τα ζώα να αντέχουν σε παρατεταμένες περιόδους ξηρασίας. Έχει δυνατότητες κατακράτησης νερού, και χρησιμοποιείται σε τρόφιμα και καλλυντικά. Η τρεχαλόζη σχηματίζει μια γέλη, καθώς τα κύτταρα αφυδατώνονται και αποτρέπεται η διάσπαση του εσωτερικού των οργανιδίων του κυττάρου (Feofilova et al. 2014).



Εικόνα 2:Δομή μορίου της τρεχαλόζης

2 ΧΡΗΣΗ ΟΞΕΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ ΦΩΣΦΟΡΟΥ ΑΠΟ ΑΝΑΕΡΩΒΙΑ ΛΑΣΠΗ

2.1 Φώσφορος

Ο φώσφορος είναι ένα βασικό στοιχείο για όλη τη ζωή στη γη. Χωρίς την ύπαρξη του φωσφόρου σε βιολογικά μόρια όπως η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ (DNA), η ζωή δεν θα είναι δυνατή. Ο φώσφορος είναι ένα ουσιαστικό στοιχείο για όλα τα έμβια όντα το οποίο δεν έχει άλλο δυνατό υποκατάστατο. Ο φώσφορος είναι ένα χημικό στοιχείο και κατά συνέπεια δεν είναι άπειρες οι ποσότητες του στην φύση. Λόγω της ταχείας αύξησης του πληθυσμού και της μείωσης των αποθεμάτων φωσφόρου, υπάρχει τόσο ο περιβαλλοντικός, όσο και ο οικονομικός λόγος να υπάρξει ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του φωσφόρου (Bergquist 2011).

Ο φώσφορος μπορεί επίσης να βρεθεί στα ορυκτά, στα οστά και τα δόντια. Έτσι, ο φώσφορος είναι ένα ουσιαστικό μέρος της ανθρώπινης διατροφής και ένα ζωτικό στοιχείο για τα φυτά. Πράγματι, η ασφάλεια των τροφίμων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των φωσφορικών λιπασμάτων. Καθώς τα φυσικά αποθέματα φωσφόρου συνεχίζουν να μειώνονται, είναι απαραίτητο να βελτιωθεί αποδοτικότητα των πόρων, επενδύοντας στην ανακύκλωση και ανάκτηση των φωσφόρου (Withers et al. 2015).

Ένα σημαντικό κλάσμα του φωσφόρου που καταναλώνεται από την κοινωνία καταλήγει σε αστικά λύματα. Στα λύματα, ο φώσφορος είναι ένας ρύπος. Όταν ελευθερώνεται στο περιβάλλον, ο φώσφορος μπορεί να προκαλέσει ευρύ ευτροφισμό των παραληφθέντων νερών. Αυτό ήταν το κίνητρο για την εφαρμογή των κανονιστικών προτύπων για την απομάκρυνση του φωσφόρου σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Schütte et al. 2015). Συνολικά, η περιβαλλοντική και ρυθμιστική ανάγκη για την απομάκρυνση του φωσφόρου, μαζί με την μη ανανεώσιμη φύση του, έχει δώσει σημαντικό κίνητρο για τον τομέα της επεξεργασίας των λυμάτων να προβαίνουν σε ανάκτηση του φωσφόρου από τα λύματα (Desmidt et al. 2015).

2.2 Νομοθετικό πλαίσιο Κύπρου

Για εναρμόνιση με την πράξη της Ευρωπαϊκής κοινότητας με τίτλο «Οδηγία του Συμβουλίου 91/271/ΕΟΚ της 21^{ης} Μαΐου 1991 για την επεξεργασία λυμάτων» το Υπουργικό Συμβούλιο εξέδωσε τον Κανονισμό ΚΔΠ 772/2003 «Ο Περί Ελέγχου της Ρύπανσης των Νερών» (Απόρριψη Αστικών Λυμάτων). Σε αυτόν αναφέρεται όλες οι απαραίτητες παράμετροι που πρέπει να ελέγχονται καθώς και οι τιμές των ορίων των διαφόρων χαρακτηριστικών των λυμάτων πριν την επεξεργασία καθώς και του νερού και της λάσπης μετά όπως για παράδειγμα το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD), το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD), το άζωτο, ο φώσφορος, κ.α. (Κυπριακή Βουλή 2003).

2.3 Λάσπη από βιολογικό σταθμό καθαρισμού λυμάτων

2.3.1 Επεξεργασία Λάσπης στην Κύπρο

Σύμφωνα με πληροφορίες που πάρθηκαν από τους ίδιους τους βιολογικούς σταθμούς στην Κύπρο, η λάσπη η οποία παράγεται υποβάλλεται στην πλέον προηγμένη επεξεργασία (αναερόβια και φυγοκέντρηση) η οποία υπάρχει σήμερα με τη χρήση τελευταίου τύπου μηχανημάτων. Περαιτέρω, το βιοαέριο που παράγεται κατά την επεξεργασία της λάσπης χρησιμοποιείται για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας η οποία καλύπτει ήδη το 40% των αναγκών του σταθμού σε ενέργεια. Επιπρόσθετα το βιοαέριο χρησιμοποιείται για εσωτερική χρήση για τη θέρμανση της λάσπης στους χωνευτές.

2.3.1.1 Στάδια επεξεργασίας της λάσπης

Στις δεξαμενές πρωτοβάθμιας και δευτεροβάθμιας καθίζησης συσσωρεύεται λάσπη η οποία απομακρύνεται στην μεν πρώτη περίπτωση στον παχυντή βαρύτητας στη δε δεύτερη στους μηχανικούς παχυντές. Από τους παχυντές η λάσπη αντλείται στους αναερόβιους χωνευτές. Γίνεται δηλαδή χώνευση (μεσοφιλική 35 °C) της λάσπης όπου επιτυγχάνεται περαιτέρω μείωση του οργανικού και παράλληλα μικροβιολογικού φορτίου με αποτέλεσμα την παραγωγή σταθεροποιημένης λάσπης.

Ακολούθως η χωνευμένη λάσπη αφυδατώνεται σε ειδικές μηχανές φυγοκέντρησης απ' όπου συλλέγεται και μεταφέρεται για περαιτέρω αποξήρανση στον ήλιο σε ειδικά διαμορφωμένες πλατείες από μπετόν. Η αποξηραμένη λάσπη ελέγχεται στο χημείο για περιεκτικότητα

βαρέων μετάλλων και εφόσον πληρούνται οι προδιαγραφές, διατίθεται σαν εδαφοβελτιωτικό για χρήση στη γεωργία. Η λάσπη χρησιμοποιείται και σαν καύσιμη ύλη από το Τσιμεντοποιείο Βασιλικού (ΣΑΛΑ n.d.).

2.4 Βιοεκχύλιση

Η βιοεκχύλιση ορίζεται ως το αποτέλεσμα της δράσης ορισμένων μικροοργανισμών για την διαλυτοποίηση, μεταφορά και απόθεση μετάλλων και ορυκτών στο περιβάλλον (BRANDL 2008). Η χρήση βακτηρίων για την εξαγωγή χαλκού χαρακτηρίζεται ως μία από τις αρχαιότερες εφαρμογές της βιοεκχύλισης. Υπάρχει καταγεγραμμένο σε αρχαία ελληνορωμαϊκά κείμενα αλλά και μεταγενέστερα, η παρατήρηση πως η ίδια η φύση προκαλούσε την εκχύλιση φτωχών μεταλλευμάτων ιδιαίτερα χαλκού και χαρακτηριστικά τα κείμενα αυτά αναφέρονται σε υγρά γαλάζιου χρώματος τα οποία αναβλύζονταν από τη γη.

2.4.1 Πλεονεκτήματα

Αναλυτικά, τα πλεονεκτήματα των βιοϋδρομεταλλουργικών μεθόδων σε σχέση με τις κλασσικές πυρομεταλλουργικές τεχνικές είναι πως αρχικά οι πυρομεταλλουργικές απαιτούν πλουσιότερα μεταλλεύματα ως πρώτη ύλη. Δεν μπορούν να κατεργαστούν τα πιο φτωχά μεταλλεύματα με οικονομικό τρόπο χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της πυρομεταλλουργίας. Η βιοχημική εκχύλιση είναι εφαρμόσιμη σε όλες τις ποιότητες μεταλλευμάτων καθώς και σε απορρίμματα από τη συμβατική κατεργασία τους. Για παράδειγμα, η οριακή περιεκτικότητα χαλκού για βακτηριακή εκχύλιση είναι κάτω από 0.3%, περίπου 0.15% (LUNDGREN, D.G. 1986),(ΑΓΑΤΖΙΝΗ –ΛΕΟΝΑΡΔΟΥ 2004).

Επίσης, η βιολογική εκχύλιση σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους έχει πολύ χαμηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η θερμοκρασία λειτουργίας δεν διαφέρει από αυτή του περιβάλλοντος. Άρα από περιβαλλοντικής απόψεως, η βακτηριακή εκχύλιση είναι ακίνδυνη. Δε συνοδεύεται από θειώδεις εκπομπές και το απόρριμμα παράγεται είτε σε υγρά είτε σε στερεά μορφή, η οποία είναι ελεγχόμενη. Τέλος, η βακτηριακή κατεργασία έχει χαμηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας. Για παράδειγμα, ο χαλκός μπορεί να παραχθεί από στείρα εκμετάλλευσης με το 35-50% του κόστους της συμβατικής τήξης θειούχων συμπυκνωμάτων (TORMA A.E. 1986).

2.4.2 Μειονεκτήματα

Τα κύρια μειονεκτήματα των βακτηριακών μεθόδων είναι οι χαμηλές ταχύτητες αντίδρασης, σε σύγκριση με μεθόδους εξαγωγής μετάλλων σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση, με χρήση ισχυρών οξέων και οξειδωτικών ή αναγωγικών μέσων, η έλλειψη εκλεκτικότητας και η δύσκολη προσαρμογή σε ακραίες συνθήκες, τυπικές των βιομηχανικών κατεργασιών, όπως είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, θερμοκρασίες, πιέσεις, διατμήσεις ανάδευσης (ΑΓΑΤΖΙΝΗ –ΛΕΟΝΑΡΔΟΥ 2004).

Μελέτες βελτιστοποίησης των παραγόντων εκχύλισης δείχνουν ότι είναι δυνατή η ταχεία βακτηριακή εκχύλιση συμπυκνωμάτων θειούχων ορυκτών. Κατά συνέπεια, η βιοεκχύλιση είναι και οικονομικά, εκτός από περιβαλλοντικά, βιώσιμη εναλλακτική λύση σε σύγκριση με τις συμβατικές υδρομεταλλουργικές μεθόδους αλλά δεν αναμένεται να αντικαταστήσει τις μεθόδους τήξεως των θειούχων συμπυκνωμάτων (TORMA A.E. 1986). Είναι πάντως εφαρμόσιμη όταν το συμπύκνωμα υπόκειται σε υψηλό κόστος μεταφοράς ή όταν το μέγεθος ενός πλούσιου κοιτάσματος είναι μικρό, ώστε να μην δικαιολογείται η ακριβή εγκατάσταση συμβατικού εργοστασίου ανάκτησης του μετάλλου.

Οι συνήθεις υδρομεταλλουργικές διεργασίες καθαρισμού του μεταλλοφόρου διαλύματος και ανάκτησης των μετάλλων (εξαγωγή με οργανικούς διαλύτες, χημική καταβύθιση, ιοντοεναλλαγή, ηλεκτράνάκτηση) είναι απόλυτα συμβατές με τη μικροβιακή εξαγωγή και μαζί μ' αυτήν αποτελούν την ολοκληρωμένη μέθοδο.

Αναμένεται, όμως, ότι οι νέες μηχανικές σχεδιάσεις αντιδραστήρων, μαζί με τη συνεχιζόμενη εξέλιξη στη γενετική μηχανική, θα καταστήσουν δυνατή την ανάπτυξη νέων βιοϋδρομεταλλουργικών μεθόδων ικανών να ξεπεράσουν τους περιορισμούς αυτούς.

2.5 Σύντομη ιστορική ανασκόπηση και προοπτικές βιοεκχύλισης

Η παρατήρηση του φαινομένου της βιοεκχύλισης διαφαίνεται σε παλιές αναφορές όπως του Παράκελσου, ενός αλχημιστή του μεσαίωνα ο οποίος περιγράφει την καταβύθιση διαλυτού χαλκού από τα νερά μεταλλείων. Πιο σύγχρονοι όπως οι Basil Valentine και Georgius Agricola περιγράφουν την ανάκτηση θεικού χαλκού ("blue vitriol") σε νερά μεταλλείου από σωρούς μεταλλεύματος εκτεθειμένους σε φυσική διάβρωση. Η δράση των βακτηρίων ήταν συνυφασμένη με τη διαλυτοποίηση των ορυκτών του χαλκού. Καταγράφεται πως στα μέσα του 18^{ου} αιώνα, στα μεταλλεία Rio Tinto της Ισπανίας γινόταν εκχύλιση σωρών στείρων ή

φτωχών θειούχων μεταλλευμάτων σε μεγάλη κλίμακα, αλλά τότε η διαλυτοποίηση αυτή εθεωρείτο ως καθαρά χημική διεργασία. Φυσική εκχύλιση μετάλλων γινόταν επίσης στο Περού, στον Καναδά (1923), στις Η.Π.Α. (1926) και σε άλλες χώρες με άγνοια της συμβολής των μικροοργανισμών (ΑΓΑΤΖΙΝΗ –ΛΕΟΝΑΡΔΟΥ 2004).

Σε αναφορά από τους Colmer & Hinkle το 1947 έχει καταγραφεί η ανακάλυψη της παρουσίας και του ρόλου του βακτηρίου *Thiobacillus ferrooxidans* στα όξινα νερά λιγνιτωρυχείου. Μέχρι τη δεκαετία του '70, τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκαν, κυρίως, για την εκχύλιση χαλκού. Στην περίοδο του 1978, αποδιδόταν στη βακτηριακή δράση ποσοστό του 18% της παραγωγής χαλκού από φτωχά κοιτάσματα στις Η.Π.Α. και πάνω από το 10% της συνολικής παραγωγής. Τα τελευταία χρόνια, έχουν διεξαχθεί επιστημονικές έρευνες σχετικά με την βιοεκχύλιση μετάλλων από διάφορα δείγματα, όπως η ιλύς, στάχτες, ιζήματα, έδαφος κλπ (Xiang et al. 2010).

Η εφαρμογή της τεχνολογίας βιοεκχύλισης αναμένεται πως θα επεκταθεί περαιτέρω στο μέλλον κυρίως όταν η βιομηχανία επιδείξει μεγαλύτερη εμπιστοσύνη στην χρήση της. Οι μελλοντικές εξελίξεις θα περιλαμβάνουν και τη γενετική μετατροπή μικροοργανισμών με απώτερο σκοπό να υπάρξει βελτίωση των βακτηρίων που χρησιμοποιούνται στην εξαγωγή και ανάκτηση μετάλλων.

2.6 Βιολογικά στοιχεία αναφορικά με τους αυτότροφους μικροοργανισμούς που συμβάλουν στη βιοεκχύλιση

Οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί οι οποίοι συμμετέχουν στην διαδικασία της βιοεκχύλισης διακρίνονται σε θειοβάκιλλους οι οποίοι έχουν τους μηχανισμούς να οξειδώνουν το θείο και οξειδοσιδηροβάκιλλους οι οποίοι αντίστοιχα οξειδώνουν το σίδηρο.

Περιγράφονται ως χημειολιθότροφα καθώς μπορούν να χρησιμοποιήσουν την οξείδωση ενώσεων όπως θείο και σίδηρο για την παραγωγή μεταβολικά χρήσιμης ενέργειας.

Μπορούν να υπαχθούν σε τρεις κατηγορίες, σύμφωνα με την ικανότητά τους για παραγωγή ενέργειας και αφομοίωση άνθρακα:

- Χημειολιθότροφοι - αυτότροφοι (obligate autotrophs): ικανοί να οξειδώνουν ανόργανες ενώσεις θείου για την παροχή της απαραίτητης ενέργειας για ανάπτυξη σ' ένα περιβάλλον όπου το CO₂ είναι η μόνη πηγή άνθρακα. Δεν είναι ικανοί να παράγουν ενέργεια από οργανικά υποστρώματα (*T. thiooxidans*, *T. ferrooxidans*).

- Μικτότροφοι (facultative autotrophs): ικανοί να παράγουν ενέργεια για την αφομοίωση άνθρακα είτε από την οξείδωση θείου είτε από την οξείδωση οργανικών ενώσεων (*T. novellus*, *T. intermedius*).
- Χημειολιθοτροφικοί ετερότροφοι: αυτά τα βακτήρια είναι ανίκανα να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας διοξείδιο του άνθρακα ως τη μόνη πηγή άνθρακα. Η διαφορά τους από τα ετερότροφα είναι η χημειοσυνθετική τους ικανότητα (*T. acidophilus*, *T. versutus*).

Η μορφολογία των θειοβάκιλλων διαγράφεται να είναι μικρού έως μέσου μήκους ράβδοι, αρνητικοί κατά Gram, οι οποίοι αναπαράγονται με δυαδική διάσπαση (διχοτόμηση), χωρίς την παραγωγή σπορίων. Οι *T. ferrooxidans* έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν εκτός από τις ανόργανες ενώσεις θείου και δισθενή σίδηρο ως οξειδώσιμο υπόστρωμα. Μπορούν να διαβιούν σε θαλάσσιο, υδατικό ή χερσαίο περιβάλλον, αλλά βρίσκονται κατ' εξοχήν στα όξινα νερά μεταλλείων στα οποία εξορύσσονται μεταλλεύματα που περιέχουν θειούχα ορυκτά.

Τα είδη που έχουν βιομηχανική σημασία λόγω της ικανότητάς τους να οξειδώνουν θειούχα ορυκτά είναι τα εξής:

- *T. thiooxidans* (απομονώθηκε από τους Waksman & Joffe, 1921). Τα μέλη αυτού του είδους είναι καθαρά χημειολιθότροφα βακτήρια που οξειδώνουν το ανόργανο θείο. Είναι αερόβια και αντέχουν σε τιμές pH κάτω από 2.0.
- *T. ferrooxidans* (απομονώθηκε από τους Colmer & Hinkle, 1947). Τα μέλη αυτού του είδους είναι παρόμοια με τον *T. thiooxidans* αλλά μπορούν να οξειδώνουν και δισθενή σίδηρο πέρα από τα θειούχα ορυκτά. (ΑΓΑΤΖΙΝΗ –ΛΕΟΝΑΡΔΟΥ 2004)(Madigan T., Michael, Martinko M., John, Stahl A., David, Clark P. 2012)

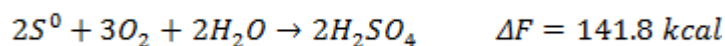
Πίνακας 1: Παρουσίαση φυσιολογικών χαρακτηριστικών των οξειφιλών βακτηρίων που οξειδώνουν τον σίδηρο και το θείο (σελ 53 από ΑΓΑΤΖΙΝΗ –ΛΕΟΝΑΡΔΟΥ 2004)

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

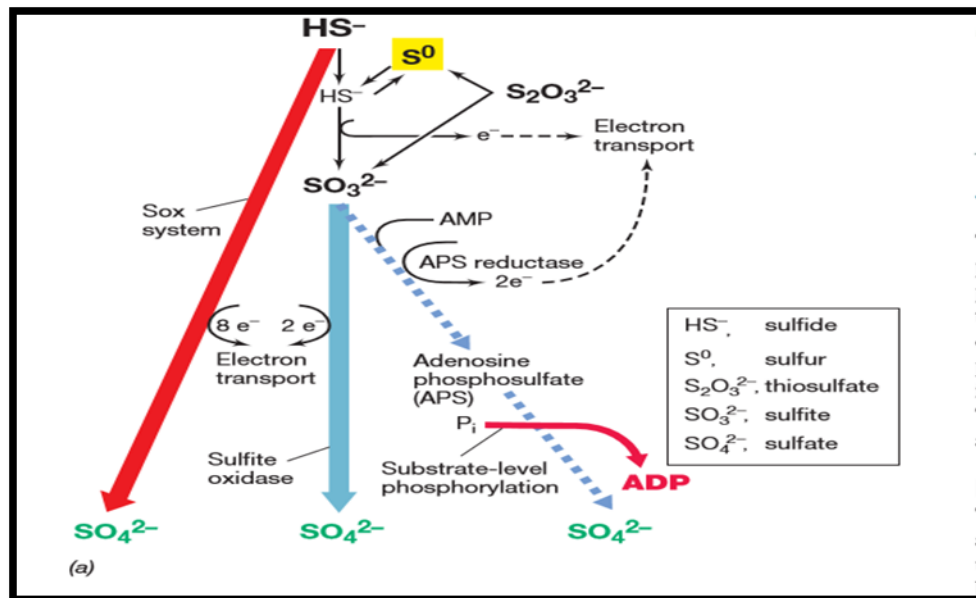
0

2.6.1 Οξείδωση του θείου

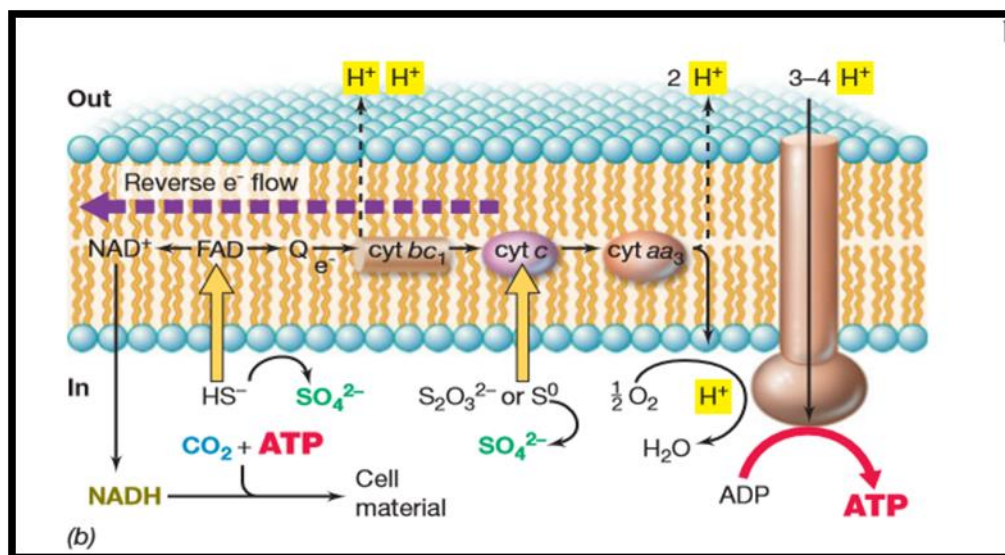
Σ' όλους τους θειοβάκιλλους λειτουργεί ένα κοινό οξειδωτικό σύστημα, που αποτελείται από τις αντιδράσεις παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο. Όπως διατυπώνεται και στην Εικόνα 3, το S αντιπροσωπεύει την πολυμερισμένη μοριακή κατάσταση (δομή δακτυλίου S₈) του στοιχειακού θείου. Η οξείδωση των θειούχων προς θειικά έχει, επίσης, ως ενδιάμεσο το S₈ ή κολλοειδές θείο. Το θειώδες είναι ένα βασικό ενδιάμεσο που οξειδώνεται καταλυτικά προς θειικό. Αυτή η ενζυμική δράση παράγει το μεγαλύτερο ποσό ενέργειας. Ένας άλλος μηχανισμός οξείδωσης του θειώδους έχει ως ενδιάμεσο το πλούσιο σε ενέργεια APS (adenosine phosphosulfate). Η συνολική αντίδραση είναι:



Όλοι οι παραπάνω μετασχηματισμοί καταλύονται από τα αντίστοιχα ένζυμα, τα οποία δρουν ως μέσα μεταφοράς ηλεκτρονίων από δότη σε δέκτη (Εικόνα 4). Τα ειδικά ενζυμικά συστήματα που απαιτούνται για την κάθε δράση συντίθενται αποκλειστικά από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς (Madigan T., Michael, Martinko M., John, Stahl A., David, Clark P. 2012)(ΑΓΑΤΖΙΝΗ –ΛΕΟΝΑΡΔΟΥ 2004).



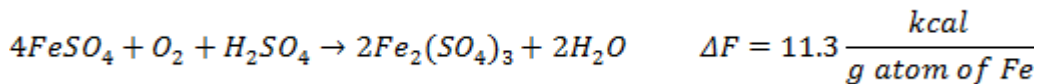
Εικόνα 3: Μηχανισμός οξείδωσης του θείου (From Brock Biology of microorganism's p.356).



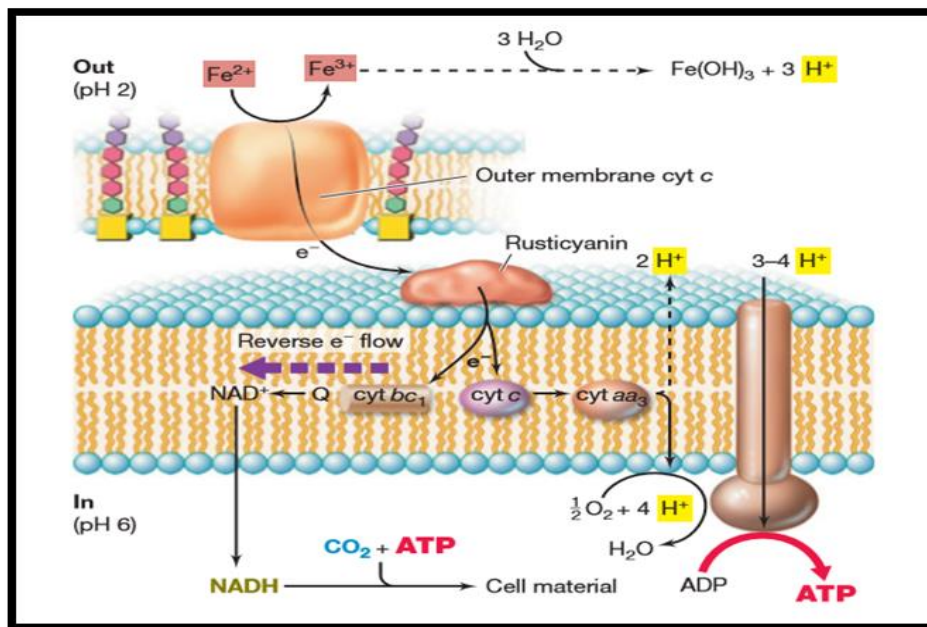
Εικόνα 4: Σχηματική παράσταση της διαδικασίας οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (oxidative phosphorylation) (From Brock Biology of microorganisms p.356)

2.6.2 Οξείδωση του σιδήρου

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



Σε σύγκριση με το στοιχειακό θείο, η οξείδωση του δισθενούς σιδήρου αποδίδει χαμηλό ποσό ενέργειας λόγω της αντίστροφης κίνησης των ηλεκτρονίων (Εικόνα 5). Επομένως, χρειάζεται να οξειδωθούν μεγαλύτερες ποσότητες σιδήρου κατά την ανάπτυξη σ' αυτό το υπόστρωμα, γεγονός που εξηγεί τις υψηλές ταχύτητες οξείδωσης που παρατηρούνται. Η μέγιστη απόδοση ενέργειας είναι 2 μόρια ATP ανά ιόν τρισθενούς σιδήρου που παράγεται.

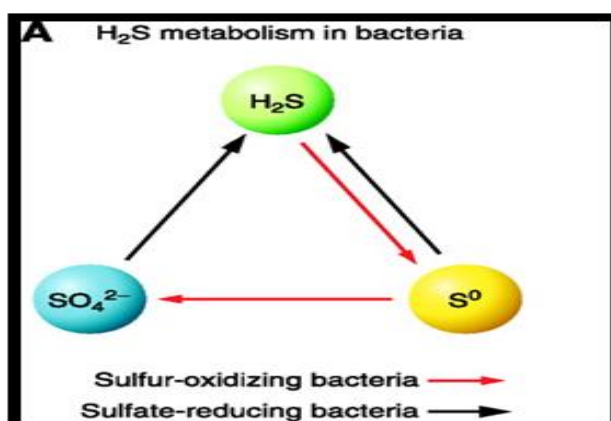
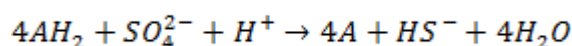


Εικόνα 5: Σχηματική παράσταση της διαδικασίας οξείδωσης του σιδήρου (From Brock Biology of microorganisms p.356)

2.7 Sulphate-reducing bacteria (SRB)

Οι SRB είναι μια διακριτή και πανταχού παρούσα ομάδα των αναερόβιων προκαρυωτικών. Είναι ενωμένη με μια κοινή ικανότητα να πραγματοποιεί μείωση των θεικών ως κύριο συστατικό των βιοενεργειακών διαδικασιών τους. Όλοι αυτοί οι οργανισμοί χρησιμοποιούν τα θειικά ή το θείο ως ένα τερματικό δέκτη ηλεκτρονίων για την οξείδωση οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Παρόλη αυτήν την φαινομενική φυσιολογική ενότητα, τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί μια τεράστια μορφολογική, οικολογική, διατροφική και μεταβολική διαφορά μεταξύ αυτής της ομάδας των βακτηρίων. Οι SRB βρίσκονται σε ποικίλα περιβάλλοντα και έχουν μεγάλο χρηστικό και ακαδημαϊκό ενδιαφέρον. Η πρακτική σημασία τους προκύπτει τόσο από οικονομικό ενδιαφέρον όσο και τις περιβαλλοντικές ανησυχίες. Οι SRB βρίσκονται σε πολλά αναερόβια περιβάλλοντα στη φύση, και οι φυσιολογικές δραστηριότητές τους είναι υψίστης σημασίας για πολλές οικολογικές κοινότητες. Επιπλέον, υπάρχουν αυξανόμενες βιοχημικές και γενετικές ενδείξεις ότι αυτοί οι οργανισμοί άρχισαν εξελικτική απόκλιση σε πρώιμο χρόνο. Αυτή η μακρά εξελικτική ιστορία έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη σε αυτούς τους οργανισμούς μια ποικιλία από μοναδικές πρωτεΐνες και βιοχημικές διεργασίες με έντονη ακαδημαϊκή σημασία και τις θεμελιώδεις ιδέες.

Αυτοί οι οργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιούν μια ποικιλία από δότες ηλεκτρονίων (AH_2) και μπορούν να χρησιμοποιήσουν την οξείδωση αυτών των ενώσεων για τη μείωση των θεικών καθώς και του στοιχειακού θείου μετατρέποντας τα σε υδρόθειο (H_2S).



Εικόνα 6: Μεταβολικός κύκλος των SRB (μαύρα βέλη)

2.8 Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοεκχύλιση με οξεόφιλους μικροοργανισμούς

Η βιοεκχύλιση με οξεόφιλους μικροοργανισμούς, μπορεί να επηρεάζεται άμεσα από το περιβάλλον, από βιολογικούς αλλά και φυσικοχημικούς παράγοντες μιας και κάθε είδος μικροοργανισμού επιδρά με διαφορετικό μηχανισμό κατά την διαδικασία. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες παραμέτρους κάτω από οποίες μπορούν να αναπτυχθούν. Γνωρίζοντας και κατανοώντας τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του μικροοργανισμού που χρησιμοποιείται κάθε φορά, αποτελεί σημαντικό σημείο για να βελτιστοποιείται η απόδοση των βακτηρίων με σκοπό πάντα την μεγαλύτερη ανάκτηση μετάλλων.

2.8.1 Το Υπόστρωμα

Η σύσταση του υποστρώματος το οποίο θα χρησιμοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα κατά την διαδικασία της βιοεκχύλισης. Ορυκτά με υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικά άλατα προκαλούν αναστολή και επιφέρουν καταστροφή της βακτηριακής δραστηριότητας.

2.8.2 Η Θερμοκρασία

Διάφορες ομάδες βακτηρίων που μπορούν να επιβιώσουν σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασιών. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί εκχύλιση σε 4°C αλλά και 50°C. Οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί επιβιώνουν σε θερμοκρασία 30-40°C, γύρω στους 50°C επιβιώνουν οι μέτριοι θεرمόφιλοι μικροοργανισμοί και πάνω από 65°C επιβιώνουν οι ακραίοι θεرمόφιλοι μικροοργανισμοί. Οι αλλαγές της θερμοκρασίας μπορούν να προκαλέσουν τροποποιήσεις στο μικροβιακό πληθυσμό. Συμπερασματικά, οι βέλτιστες συνθήκες για τους οξεόφιλους μικροοργανισμούς είναι από 30-35°C.

2.8.3 Το pH

Η προσαρμογή του pH είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης, όταν το pH είναι αλκαλικό τότε παρατηρείται σχηματισμός ιζημάτων (π.χ. γιαροσίτης) που

εμποδίζουν την φυσική διήθηση του διαλύματος εκχύλισης. Για την ύπαρξη βέλτιστων συνθηκών οι τιμές του pH θα πρέπει να κυμαίνονται από 1,8–2,5.

2.8.4 Ο Αερισμός

Η ύπαρξη επαρκούς παροχής οξυγόνου αποτελεί κομβικό σημείο στην ανάπτυξη και την υψηλή δραστηριότητα των βακτηρίων εκχύλισης γιατί η παροχή οξυγόνου είναι πολύ σημαντική για την δραστηριότητα του μικροοργανισμού εκχύλισης καθώς επιταχύνει τις αντιδράσεις οξείδωσης μειώνοντας το χρόνο του κύκλου εκχύλισης.

2.8.5 Η Ύπαρξη Οργανικών Ενώσεων

Θα πρέπει να επισημανθεί πως η οξείδωση του μετάλλου που γίνεται από τους οξειόφιλους μικροοργανισμούς επηρεάζεται και από την ύπαρξη οργανικών ενώσεων κατά την διαδικασία της βιοεκχύλισης. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα των οξειόφιλων μικροοργανισμών μπορεί να ανασταλεί από την ύπαρξη υψηλών ποσοστών οργανικών ενώσεων.

Η ιλύς είναι πλούσια σε οργανικές ενώσεις, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη των βακτηρίων βιοεκχύλισης και επομένως της αποτελεσματικότητας της διαλυτοποίησης των μετάλλων. Σημαντικές ανασταλτικές επιδράσεις στην λάσπη αναερόβιας χώνεψης ή εκχύλιση λάσπης στην οξείδωση του σιδήρου και διαλυτοποίηση των μετάλλων, έχουν αποδοθεί γενικά σε διαλυτή οργανική ύλη που υπάρχει στη λυματολάσπη. Για αυτόν τον λόγο δοκιμάστηκε και η χρήση των συμβατών οργανικών ουσιών (Compatible Solutes).

2.9 Ανάκτηση μετάλλων με χρήση οργανικού διαλύτη

Ο οργανικός διαλύτης είναι μία ουσία η οποία είναι ικανή να αντιδρά χημικά με μέταλλο ή σύμπλοκο της υδατικής φάσης, δημιουργώντας ένα οργανομεταλλικό σύμπλοκο, που είναι διαλυτό στην οργανική φάση. Η διεργασία της εξαγωγής μετάλλων με οργανικούς διαλύτες περιλαμβάνει την κατανομή μίας διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών φάσεων, οι οποίες βρίσκονται σε επαφή. Κατ' επέκταση η εξαγωγή ενός μετάλλου με

οργανικό διαλύτη είναι μία τεχνική διαχωρισμού, στην οποία το μέταλλο μεταφέρεται από τη μία φάση σε άλλη, μη αναμίξιμη, η οποία βρίσκεται σε επαφή με την πρώτη

Τα κύρια χαρακτηριστικά, που πρέπει να έχει ένας οργανικός διαλύτης για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα, είναι

1. Να είναι σχετικά φθηνός.
2. Να έχει πολύ χαμηλή διαλυτότητα στην υδατική φάση.
3. Να είναι σταθερός. Δηλαδή να έχει την ικανότητα να ανακυκλώνεται για πολλούς μήνες σε ένα κύκλωμα εξαγωγής με οργανικούς διαλύτες χωρίς να διασπάται.
4. Να μην σχηματίζει σταθερά γαλακτώματα (emulsions), όταν αναμιγνύεται με υδατικά διαλύματα. Το ιξώδες του θα πρέπει να είναι αρκετά χαμηλό, ώστε να αποφεύγεται ο ατελής διαχωρισμός από την υδατική φάση λόγω γαλακτωματοποίησης.
5. Να είναι σταθερός κατά την αποθήκευσή του και κατά την επαφή του με οξέα ή βάσεις
6. Να διαχωρίζεται εύκολα από την υδατική φάση.
7. Να έχει την δυνατότητα υψηλής φόρτισης στο προς εξαγωγή μέταλλο και άρα να μπορεί να εξάγει μεγάλη ποσότητα μετάλλου ανά μονάδα αντιδραστηρίου.
8. Να μπορεί το μέταλλο που εξάχθηκε να διαχωριστεί εύκολα από το οργανικό αντιδραστήριο και ταυτόχρονα το τελευταίο να αναγεννάται εύκολα.
9. Να μην είναι εύφλεκτος, πτητικός και τοξικός (τουλάχιστον σε κανονικές συνθήκες).
10. Να είναι αρκετά διαλυτός σε αλειφατικούς και αρωματικούς διαλύτες, τα οποία συνήθως χρησιμοποιούνται ως διαλυτικά μέσα.
11. Να αντιδρά γρήγορα με το προς εξαγωγή μέταλλο ή σύμπλοκο

2.10 Βιολογική ανάκτηση φωσφόρου με χρήση τσοφλιών αυγών

Το τσόφλι του αυγού αντιπροσωπεύει περίπου το 11% του συνολικού βάρους (περίπου μέσος όρος 60 g) του αυγού (Stadelman 2000). Τα αυγά χρησιμοποιούνται σε τεράστιες ποσότητες από τους κατασκευαστές τροφίμων και τα εστιατόρια και τα τσόφλια απορρίπτονται ως απόβλητα. Έχει αναφερθεί ότι περίπου το 28% του συνόλου των αυγών που παράγονται αποστέλλονται σε εμπορικές δραστηριότητες για την παραγωγή προϊόντων (Poland, A.L.,

Sheldon 2001). Τα τσόφλια που προκύπτουν από τις πράξεις αυτές ως κατάλοιπα αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό ρεύμα αποβλήτων και συνήθως διατίθενται σε χώρους υγειονομικής ταφής χωρίς προεπεξεργασία. Περιστασιακά, μερικά ποσοστά αυτών των παραπροϊόντων επαναχρησιμοποιούνται και εφαρμόζονται ως λίπασμα ή ζωοτροφή λόγω του υψηλού διατροφικού περιεχομένου τους, όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο και φώσφορο (Tacon 1982).

Για την ανάκτηση των βιολογικών πόρων και την επαναχρησιμοποίηση τους, πολλές διερευνήσεις έχουν διεξαχθεί ώστε να εξερευνηθούν χρήσιμες εφαρμογές για τα τσόφλια των αυγών. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έχει δείξει ότι το κέλυφος αυγών φαίνεται να είναι σε θέση να προσροφά αποτελεσματικά ορισμένα βαρέα μέταλλα και οργανικές ενώσεις (Kuh, S.E., Kim 2000) (Chojnacka 2005) (Koumanova, B., Peeva, P., Allen, S.J., Gallagher, K.A., Healy 2002) (Tullett 1987) (Parsons 1982) (Vijayaraghavan, K., Jegan, J., Jegan, J., Jegan 2005). Στην πραγματικότητα, η πορώδης φύση του τσοφλιού το καθιστά ως ένα ελκυστικό υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προσροφητικό. Τα τσόφλια συνήθως αποτελούνται από κεραμικά υλικά τα οποία είναι διατεταγμένα σε μία δομή τριών στρωμάτων, δηλαδή την επιδερμίδα στην εξωτερική επιφάνεια, ένα σπογγώδες (ασβεστολιθικό) στρώμα και ένα εσωτερικό πεταλοειδές (ή θηλοειδούς προεξοχής) στρώμα (Stadelman 2000) (Nakano, T., Ikawa, N.I., Ozimek 2003). Τα σπογγώδες και θηλοειδούς προεξοχής στρώματα σχηματίζουν ένα πλέγμα που αποτελείται από πρωτεϊνικές ίνες συνδεδεμένες με ασβεστίτη (ανθρακικό ασβέστιο), που αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 90% του υλικού (Kuh, S.E., Kim 2000) (Stadelman 2000). Τα δύο στρώματα είναι επίσης κατασκευασμένα κατά τέτοιο τρόπο ώστε υπάρχουν πολλές κυκλικές οπές (πόροι). Κάθε τσόφλι ενός αυγού έχει εκτιμηθεί ότι περιέχει μεταξύ 7.000 και 17.000 πόρους. Κατά μέσο όρο, το τσόφλι ζυγίζει 5-6 g, με αξιόλογες μηχανικές ιδιότητες αντοχής στη θραύση (>30 N) και είναι πάχους 300-350 μm. Αυτή η δομή διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην προστασία των περιεχομένων του αυγού από το μικροβιακό και φυσικό περιβάλλον και στον έλεγχο της ανταλλαγής νερού και αερίων σε ολόκληρο το κέλυφος. Η χημική σύνθεση του τσοφλιού έχει αναφερθεί ως 94% ανθρακικό ασβέστιο, 1% ανθρακικό μαγνήσιο, 1% φωσφορικό ασβέστιο και περίπου το 4% της οργανικής ύλης (Stadelman 2000).

Μία από αυτές τις προσεγγίσεις γίνεται και με χρήση τσοφλιών αυγών τα οποία έχουν υποστεί πυρόλυση μετατρέποντας το ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3) σε οξείδιο του ασβεστίου (CaO) το οποίο με τα φωσφορικά στα διαλύματα μπορεί να μετατρέπεται σε φωσφορικό

ασβέστιο. Η μέθοδος αυτή δοκιμάστηκε από τους Köse και Kivanç (Köse & Kivanç 2011) με επιτυχία.

2.11 Σκοπός Εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι σε πρώτο στάδιο η μελέτη πως η χρήση οργανικών διαλυτών ουσιών μπορεί να βοηθήσει τους σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς ώστε να επιταχυνθεί η βιοεκχύλιση σε συνθήκες αυξημένου στρες. Σε δεύτερο στάδιο, μελετάται κάτω από ποιες συνθήκες και παραμέτρους θα μπορέσει να πραγματοποιηθεί εκχύλιση φωσφόρου από λάσπη η οποία προέρχεται από βιολογικό σταθμό καθαρισμού λυμάτων με την χρήση σίδηρο-οξειδωτικών, θείο-οξειδωτικών βακτηρίων καθώς και αναερόβιων SRB. Τελικό στάδιο της εργασίας μελετούνται η χημική και βιοχημική προσέγγιση με τις οποίες θα μπορέσει να επιτευχθεί η ανάκτηση του φωσφόρου μετά την βιοεκχύλιση.

3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Οργανικές διαλυτές ουσίες

Υπάρχουν μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε ακραία περιβάλλοντα και συνθήκες, αναπτύσσοντας μηχανισμούς που τα καταστούν ικανά να επιβιώνουν. Κάποιοι από αυτούς παράγουν ουσίες οι οποίες καλούνται συμβατές οργανικές ουσίες. Παραδείγματα τέτοιων ουσιών αποτελούν οι βεταΐνες, τα αμινοξέα, και η τρεχαλόζη. Αυτά τα μόρια συσσωρεύονται στα κύτταρα και εξισορροπούν την οσμωτική διαφορά ώστε να βοηθά στην διατήρηση της πίεσης, τον όγκο των κυττάρων, και τη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών, όλα όσα χρειάζονται για τη βιωσιμότητα των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό τους. Γενικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει στρεσογόνος παράγοντας.

Σε αυτό το πείραμα παρακολουθείται αρχικά πως θα επηρεαστεί η συμπεριφορά των σίδηρο-οξειδωτικών μικροοργανισμών σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας για να διαφανεί ο χρόνος προσαρμογής τους και στην συνέχεια επαναλαμβάνονται οι ίδιες συνθήκες όταν σε αυτούς προστεθεί μια τέτοια ουσία και πως η συγκέντρωση της μπορεί να αλλάξει το τελικό αποτέλεσμα. Οι ουσίες που θα μελετηθούν είναι η βεταΐνη και η τρεχαλόζη.

Για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι μικροοργανισμοί κατά την πειραματική διαδικασία, αρχικά πραγματοποιείται καλλιέργεια-εμπλουτισμός (enrichment) έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να βρίσκονται σε κατάσταση κατάλληλης ανάπτυξης.

3.1.1 Υλικά και μέθοδοι

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αξιοποιήθηκαν μικροοργανισμοί που ήταν σίδηρο-οξειδωτικοί. Οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε βιομέσο το οποίο περιέχει βασικά άλατα για αυτότροφους μικροοργανισμούς, διάλυμα ιχνοστοιχείων καθώς και διαλύματος δισθενή σιδήρου 1M (55 g/L) ως πηγή Fe^{2+} όπως αναφέρεται και στην βιβλιογραφία.

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

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

Πίνακας 3: Διάλυμα ιχνοστοιχείων (trace elements).

Συστατικά	gr/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 15\text{H}_2\text{O}$	0,5
H_3BO_3	0,6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
NaVO_3	0,1

Προετοιμάζονται καλλιέργειες με διαφορετική περιεκτικότητα NaCl. Συγκεκριμένα ετοιμάστηκαν καλλιέργειες που περιείχαν 0, 15, 30 και 50 g/L NaCl, 90 mL από το διάλυμα των βασικών αλάτων για αυτότροφους μικροοργανισμούς αραιωμένο κατά 10 φορές, 10 μ L διαλύματος ιχνοστοιχείων, 10 mL από διάλυμα Fe^{2+} (1M ή 55g/L) και 5 mL από την καλλιέργεια-εμπλουτισμός. Πραγματοποιείται ρύθμιση του pH στο 1,9-2.



Εικόνα 7: Οι καλλιέργειες με διαφορετική περιεκτικότητα σε NaCl (0, 15, 30 και 50 mg/L) που πραγματοποιήθηκαν

Με τις ίδιες συνθήκες για αλατότητας 15 g/L NaCl πραγματοποιήθηκε πείραμα με την προσθήκη συμβατών διαλυτών ουσιών συγκεκριμένα τρεαλόζης (D-(+)-Trehalose dihydrate) και βεταΐνης (Betaine) σε συγκέντρωση 1 και 5 mM καθώς και χλωριούχου καλίου (KCl) σε συγκέντρωση 1 g/L.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες (Erlenmayer flask) σε διπλά δείγματα για κάθε διαφορετική περίπτωση και τοποθετούνται για επώαση στους 33 °C σε αερόβιες συνθήκες και με συνεχή ανάδευση στις 100 στροφές ανά λεπτό (rpm). Καθόλη την διάρκεια του πειράματος προσδιοριζόταν η συγκέντρωση Fe^{2+} για την περιγραφή της βακτηριακής μεταβολικής δραστηριότητας.



Εικόνα 8: Καλλιέργειες των 15 g/L NaCl με οργανικές διαλυτές ουσίες



Εικόνα 9: Καλλιέργειες των 30 g/L NaCl με οργανικές διαλυτές ουσίες

3.1.2 Μέτρηση δισθενούς Σιδήρου Fe^{2+}

Για την καταμέτρηση της ποσότητας του δισθενή σιδήρου σε όλα τα πειράματα πραγματοποιείται τιτλοδότηση με χρήση διχρωμικού καλίου 0,1 N ($K_2Cr_2O_7$) ως οξειδωτικό μέσο και προσθήκη θειικού οξέος (H_2SO_4) 15% η ποσότητα του οποίου ήταν πάντα ανάλογα με την αραίωση που πραγματοποιείται (π.χ. για αραίωση 5 φορές αν η αρχική ποσότητα του δείγματος είναι 2 mL τότε προστίθενται 8 mL του θειικού οξέος). Στο κάθε δείγμα γίνεται και προσθήκη 50 μ L του δείκτη Barium Diphenylamine Sulphonate. Η χρωματική αλλαγή λόγω

του δείκτη είναι το άχρωμο διάλυμα να μετατρέπεται ενδιάμεσα σε πράσινο και η τελική αλλαγή, ενδεικτική για το τέλος της τιτλοδότησης είναι το μωβ χρώμα.

Ο υπολογισμός της ποσότητας του δισθενούς σιδήρου υπολογίζεται από την ποσότητα του διχρωμικού καλίου που καταναλώνεται. Συγκεκριμένα για κάθε 1 mL $K_2Cr_2O_7$ που καταναλώνεται ισοδυναμεί με 0.005585 g Fe^{2+} . Επιπλέον αν πραγματοποιείται αραίωση πολλαπλασιάζουμε με αυτήν και τέλος γίνεται προσαρμογή της τιμής στο λίτρο.



Εικόνα 10: Η χρωματική αλλαγή των δειγμάτων κατά την τιτλοδότηση. Δεξιά (πράσινο) η ενδιάμεση αλλαγή και αριστερά η τελική αλλαγή (μωβ χρώμα)

3.2 Βιοεγχύλιση Φωσφόρου από χωνεμένη λάσπη βιολογικού καθαρισμού λυμάτων

Ένα σημαντικό κλάσμα του φωσφόρου που καταναλώνεται από την κοινωνία καταλήγει σε αστικά λύματα. Στα λύματα, ο φώσφορος είναι ένας ρύπος. Όταν ελευθερώνεται στο περιβάλλον, ο φώσφορος μπορεί να προκαλέσει ευρύ ευτροφισμό των παραληφθέντων νερών. Η περιβαλλοντική και ρυθμιστική ανάγκη για την απομάκρυνση του φωσφόρου, μαζί με την μη ανανεώσιμη φύση του, έχει δώσει σημαντικό κίνητρο για τον τομέα της επεξεργασίας των λυμάτων να προβαίνουν σε ανάκτηση του φωσφόρου. Στην Κύπρο η αποξηραμένη λάσπη ελέγχεται στο χημείο για περιεκτικότητα βαρέων μετάλλων και εφόσον πληρούνται οι προδιαγραφές, διατίθεται σαν εδαφοβελτιωτικό για χρήση στη γεωργία ή χρησιμοποιείται σαν καύσιμη ύλη από το Τσιμεντοποιείο Βασιλικού.

Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκαν οι συνθήκες στις οποίες θα μπορεί να επιτευχθεί η μεγαλύτερη βιοεκχύλιση του φωσφόρου από την χωνεμένη λάσπη με την χρήση σίδηρο-οξειδωτικών και θείο-οξειδωτικών μικροοργανισμών.

Για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι μικροοργανισμοί στην διαδικασία της βιοεκχύλισης αρχικά πραγματοποιείται καλλιέργεια-εμπλουτισμός (enrichment) έτσι ώστε οι μικροοργανισμοί να βρίσκονται σε κατάσταση κατάλληλης ανάπτυξης.

3.2.1 Χαρακτηριστικά λάσπης

Σύμφωνα με την χημική ανάλυση που πραγματοποιεί ο βιολογικός σταθμός καθαρισμού των λυμάτων στην παραγόμενη αναερόβια χωνεμένη λάσπη, σε αυτήν περιέχονται κατά ετήσιο μέσο όρο τα μέταλλα και οι αντίστοιχες ποσότητες τους όπως φαίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Μέσες ετήσιες τιμές μετάλλων από τις αναλύσεις της αναερόβιας λάσπης

Είδος μετάλλου	Ποσότητες σε mg/Kg
Νικέλιο	13,96
Χρώμιο	38,70
Υδράργυρος	0,14
Κάδμιο	4,34
Μόλυβδος	5,36
Χαλκός	172,54
Ψευδάργυρος	711,33
Ολικός φώσφορος	6600
Ολικό άζωτο	11600
Αμμωνιακό άζωτο	1771

3.2.2 Υλικά και μέθοδοι

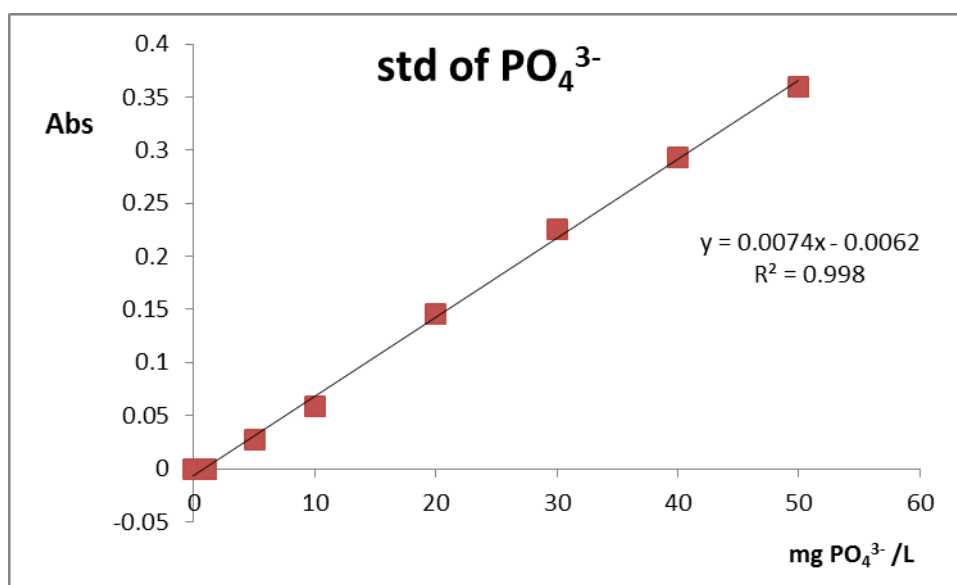
3.2.2.1 Πείραμα 1

Στο πείραμα αυτό παρακολουθείται η δυνατότητα βιοεκχύλισης από αναερόβια λάσπη του φωσφόρου. Συγκεκριμένα μελετάται πως μπορεί να επιτευχθεί γρηγορότερα και πιο αποτελεσματικά συγκρίνοντας καλλιέργειες οι οποίες περιέχουν μικροοργανισμούς α) σίδηρο οξειδωτικούς, και β) θείο-οξειδωτικούς. Σε πλαστικά φιαλίδια (Falcon Tubes) των 50 mL μεταφέρονται 5 g λάσπης μαζί με 0.5 mL διάλυμα των βασικών αλάτων για αυτότροφους μικροοργανισμούς 10X, 2mL g Fe²⁺/L συγκέντρωσης 1 M , 2.5 mL από διάλυμα Θείο θεικό νάτριο (Sodium Thiosulfate) επίσης συγκέντρωσης 1 M και τέλος 20 mL μικροοργανισμών. Σε όλες τις καλλιέργειες το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 1.6.

Την τιμή του φωσφόρου που απελευθερώνεται στις καλλιέργειες την μετράμε φασματοσκοπικά στο μήκος κύματος των 436 nm με την χρήση των αντιδραστηρίων του Test 1-78 NANOCOLOR ortho- Phosphate της εταιρίας MACHEREY-NAGEL σύμφωνα πάντα με τις οδηγίες που παρέχονταν από το τεστ.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τους φωσφόρου χρησιμοποιείται η εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη βαθμονόμησης που φαίνεται στο διάγραμμα 1

Το φασματοφωτόμετρο με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις είναι το Jenway 7315.



Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης φωσφορικών στο μήκος κύματος των 436 nm

3.2.2.2 Πείραμα 2

Στο δεύτερο πείραμα ο σκοπός είναι να μετρηθεί ο φώσφορος που περιέχεται στην λάσπη καθώς και η μεταβολή στο pH των καλλιεργειών από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς στις περιπτώσεις που η λάσπη ήταν:

- a) προ οξινισμένη (pre-acidified) για 5 μέρες
- b) προ οξινισμένη (pre-acidified) για 1 μέρα και
- c) χωρίς καμία κατεργασία

Ως προ-οξινισμένη χαρακτηρίζεται η λάσπη η οποία διατηρείται σε χαμηλό pH για μια χρονική περίοδο. Για την περίπτωση της 5 ημερών προ οξινισμένης λάσπης, σε 6 πλαστικά φιαλίδια των 50 mL μεταφέρεται λάσπη σε συγκέντρωση 20 g/L. Ζυγίστηκαν οι ανάλογες ποσότητες μάζας και μεταφέρθηκαν στα φιαλίδια όπου στην συνέχεια προστέθηκαν 35 mL του διαλύματος των βασικών αλάτων για αυτότροφους μικροοργανισμούς. Το pH ρυθμίζεται αρχικά στις τιμές 1, 2 και 3. Αφήνονται για 5μέρες σε επώαση στους 30 °C και στα 100 rpm.

Για την περίπτωση της 1 ημέρας προ οξινισμένης λάσπης, και πάλι σε 6 φιαλίδια των 50 mL μεταφέρεται λάσπη σε συγκέντρωση 20 g/L, σε 35 mL διαλύματος των βασικών αλάτων για αυτότροφους μικροοργανισμούς. Το pH επίσης ρυθμίζεται ανά 2 φιαλίδια για τιμές 1, 2 και 3. Αφήνονται για 1 μέρα σε επώαση στους 30 °C και στα 100 rpm.

Κατά την ημέρα έναρξης του πειράματος, ετοιμάζονται 4 φιαλίδια των 50 mL με 20 g/L λάσπης. Τα δύο μόνο με διάλυμα των βασικών αλάτων για αυτότροφους μικροοργανισμούς και δισθενή σίδηρο και τα άλλα δυο περιείχαν το διάλυμα των βασικών αλάτων για αυτότροφους μικροοργανισμούς, δισθενή σίδηρο και μικροοργανισμούς. Το pH ρυθμίζεται αρχικά στην τιμή 2.

Για τα προ οξινισμένα δείγματα, αυτά φυγοκεντρήθηκαν, και το ελαιώρημα απομακρύνεται προσεκτικά έτσι ώστε να μην απομακρυνθεί και η λάσπη. Στην συνέχεια προστίθενται 13 mL από το διάλυμα των βασικών αλάτων για αυτότροφους μικροοργανισμούς μαζί με, 2 mL Fe^{2+} 1M ώστε να αντιστοιχούν σε 3 g/L και τέλος 20 mL με μίγμα από μικροοργανισμοί (10 mL σίδηρο-οξειδωτικούς και 10 mL θείο-οξειδωτικούς).

Την τιμή του φωσφόρου που απελευθερώνεται στις καλλιέργειες την μετράμε και πάλι φασματοσκοπικά στο μήκος κύματος των 436 nm με την χρήση των αντιδραστηρίων του Test 1-78 NANOCOLOR ortho-Phosphate της εταιρίας MACHEREY-NAGEL σύμφωνα

πάντα με τις οδηγίες που παρέχονταν. Και πάλι το φασματοφωτόμετρο με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις είναι το Jenway 7315.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης τους φωσφόρου χρησιμοποιείται η εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη βαθμονόμησης που φαίνεται στο διάγραμμα 1.

3.2.2.3 Πείραμα 3

Στο πείραμα αυτό θέλουμε να μελετήσουμε πως το είδος των μικροοργανισμών μπορεί να επηρεάσει την εξαγωγή του φωσφόρου από λάσπη απλά χρησιμοποιήθηκαν μεγαλύτερες ποσότητες. Η πορεία του πειράματος αφορούσε την χρήση σίδηρο-οξειδωτικών και θείο-οξειδωτικών μικροοργανισμών τόσο ξεχωριστά όσο και συνδυασμός τους. Σε φιάλες Duran των 500 mL μεταφέρθηκε ζυγισμένη λάσπη ποσότητας 78,5 g/L. Σε αυτή προστέθηκαν 205 mL διαλύματος των βασικών αλάτων για αυτότροφους μικροοργανισμούς, 25 mL Fe^{2+} και 20 mL μικροοργανισμοί.

Οι φιάλες τοποθετήθηκαν για επώαση στους 33 °C και στους 75 rpm. Για να έχουμε καλύτερη ανάδευση της λάσπης και να παρουσιάζεται μια καλύτερη ομοιογένεια του μίγματος και να μπορεί να γίνεται μια καλή μέτρηση και του pH ανά τακτά διαστήματα μέσα στην βδομάδα γίνεται ανακίνηση των φιαλών με το χέρι. Το pH την πρώτη βδομάδα απλά το καταμετράμε. Από την δεύτερη βδομάδα και μετά οι καλλιέργειες με τους μικροοργανισμούς επαναφέρονται στην τιμή pH 2.

3.2.2.4 Πείραμα 4

Στο συγκεκριμένο πείραμα το ζητούμενο ήταν να ελεγχθεί το ενδεχόμενο του κατά πόσο μπορούσε να αυξηθεί η βιοεκχύλιση του φωσφόρου αν οι ίδιες συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι στιγμής εφαρμόζονταν και σε άλλους μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν SRB μικροοργανισμοί, *At. ferrooxidans* 13, *L. ferriphilum* CC και μίγμα σίδηρο-οξειδωτικών και θείο-οξειδωτικών μικροοργανισμών. Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν με τον ίδιο τρόπο που καλλιεργούνταν και στα προηγούμενα πειράματα. Οι SRB καλλιεργήθηκαν σε αναερόβιες συνθήκες και το pH είχε την τιμή 2.

3.3 Ανάκτηση Φωσφόρου

3.3.1 Χρήση οργανικού διαλύτη

Για την ανάκτηση του φωσφόρου αρχικά πραγματοποιήθηκε πείραμα βασισμένο σε δημοσιευμένο άρθρο των Jia-Qian Jiang και O. Mwabonje (Jiang & Mwabonje 2009)(Mwabonje 2010) στο οποίο οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν διάφορους οργανικούς διαλύτες ως οργανική φάση η οποία περιείχε διάφορες οργανικές ενώσεις με μεγάλη ικανότητα δημιουργίας οργανομεταλλικών συμπλόκων και πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό. Συγκεκριμένα, υποστηρίζουν πως ανάμιξη 4:1 υδατικής προς οργανική φάση με οργανική φάση να αποτελεί η κηροζίνη με benzyl-dimethyl-amine (BDMA) σε αναλογία 2:1 στις 250 rpm για 4 ώρες και μετέπειτα σε ηρεμία σε διαχωριστικές χοάνες για 2 ώρες μπορούν να πετύχουν μετέπειτα ανάκτηση του φωσφόρου έως 93%. Πραγματοποιήθηκε πείραμα το οποίο βασίστηκε σε αυτές τις πληροφορίες για διαλύματα τα οποία περιείχαν ως φωσφορικά ιόντα άλας K_2HPO_4 συγκέντρωσης 50 mg/L. Από αυτό το διάλυμα στην συνέχεια 50 mL αναμείχθηκαν με 8 mL N,N – dimethyl-benzylamine και 16 mL κηροζίνης (αναλογία 1:2) σε τρεις διαφορετικές συνθήκες:

1. Απλό (όπως είναι χωρίς άλλη μετατροπή)
2. Το pH του άλατος να πάρει την τιμή 13
3. Προσθήκη 0,5 mL υπεροξειδίου (H_2O_2)



Εικόνα 11: Μίγμα υδατικής προς οργανική φάση με οργανική φάση να αποτελεί η κηροζίνη με benzyl-dimethyl-amine (BDMA)

3.3.2 Βιολογική ανάκτηση με τσόφλια αυγών

Για να ελεγχθεί αν ισχύει πράγματι η προσρόφηση του φωσφόρου πάνω στα τσόφλια, ετοιμάστηκε διάλυμα άνυδρου δισόξινου φωσφορικού καλίου (KH_2PO_4) συγκέντρωσης 1550 mg/L το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως πηγή φωσφόρου (φωσφορικά ιόντα). Τα τσόφλια για να χρησιμοποιηθούν απαιτείται να υπάρχει κάποια προεπεξεργασία. Συγκεκριμένα, τα τσόφλια αφού πλυθούν θερμαίνονται στους 100°C για 24 ώρες για να αφαιρεθεί η υγρασία και θρυμματίζονται με την χρήση εργαστηριακού θρυμματιστή. Για την πραγματοποίηση του πειράματος απαιτούνται τρεις κατηγορίες συνθηκών πυρόλυσης των τσοφλιών. Στην πρώτη θα πραγματοποιηθεί πυρόλυση στους 600 °C για 3 ώρες, ενώ στις επόμενες θα υπάρχει πυρόλυση στους 800 °C για 2 ώρες και τέλος στους 900 °C για 1 ώρα.

Για την κάθε κατηγορία τσοφλιών (600 °C, 800 °C και 900 °C) θα προετοιμαστούν 7 δείγματα διαφορετικής μάζας τσοφλιών συγκεκριμένα 0.05g, 0.5g, 1g, 2.5g, 5g, 7.5g και 10g. Για τα μη πυρολυμένα τσόφλια θα προετοιμαστεί μόνο ένα δείγμα, του 1g. Τα ζυγισμένα τσόφλια τοποθετούνται σε serum bottles και μεταφέρεται σε αυτά 40 mL από το διάλυμα άνυδρου δισόξινου φωσφορικού καλίου. Επίσης ετοιμάζονται και δύο control τα οποία περιέχουν μόνο 40 mL από το διάλυμα άνυδρου δισόξινου φωσφορικού καλίου. Όλα τα δείγματα φυλάγονται στους 33°C για 24 ώρες..

Για την μέτρηση του φωσφόρου στο πείραμα αυτό, χρησιμοποιείται η μέθοδος του Ασκορβικού οξέως. Για την μέθοδο αυτή απαιτούνται να αναμειχθούν σε συγκεκριμένη σειρά και όγκους ορισμένα αντιδραστήρια. Τα αντιδραστήρια αυτά και ο όγκος τους για 100 mL μείγματος (Combined Reagent) είναι:

- i. 50 mL διάλυμα θεικού οξέος (H_2SO_4) συγκέντρωσης 5 N
- ii. 5 mL διάλυμα Potassium Antimonyl Tartrate
- iii. 15 mL διάλυμα Ammonium Molybdate
- iv. 30 mL διάλυμα Ascorbic Acid 0.1 M

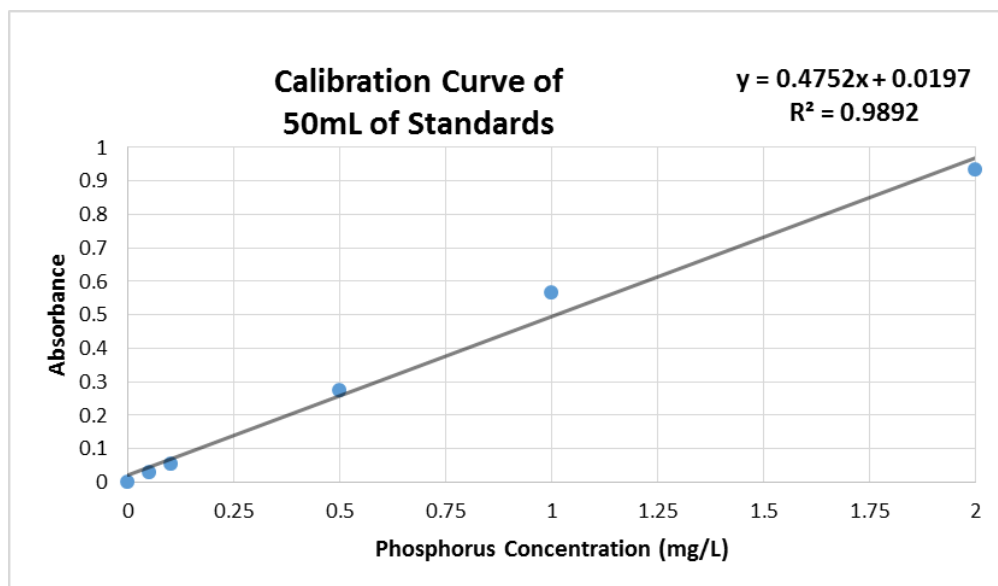
Η μέθοδος του Ασκορβικού οξέως μετρά μέχρι 2 mg/L φωσφόρου. Για να μετρηθεί ο φώσφορος στα δείγματά, πρέπει πρώτα να αραιωθούν σε απιονισμένο νερό. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί 50 mL αραιωμένου δείγματος. Άρα ο τελικός όγκος της αραιώσης θα πρέπει να είναι 50 mL. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο πείραμα ήταν 50x, 250x, και 500x. Οπότε αντίστοιχα οι όγκοι αναλογούν σε 49 mL απιονισμένο νερό + 1 mL δείγμα,

49.8 mL απιονισμένο νερό + 200 μ L δείγμα και τέλος 49.9 mL απιονισμένο νερό + 100 μ L δείγμα.

Η μέτρηση του φωσφόρου γίνεται με την προσθήκη σε κάθε αραιωμένο δείγμα 8 mL μεικτού αντιδραστηρίου όπου αναδεύονται καλά με το χέρι και αφήνονται σε ηρεμία για χρόνο 10 λεπτά τουλάχιστον αλλά να μην υπερβαίνει τα 30 λεπτά. Στα διαλύματα η ύπαρξη φωσφόρου παρατηρείται και οπτικά λόγω της χρωματικής αλλαγής των διαλυμάτων. Συγκεκριμένα όσα περισσότερα φωσφορικά ιόντα υπάρχουν στο διάλυμα, τόσο πιο μπλε είναι το χρώμα του διαλύματος ενώ αν δεν υπάρχουν καθόλου τότε το διάλυμα είναι διαυγές.

Την τιμή του φωσφόρου που απελευθερώνεται στις καλλιέργειες την μετράμε και πάλι φασματοσκοπικά στο μήκος κύματος των 880 nm. Το φασματοφωτόμετρο με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις είναι το Jenway 7315.

Η καμπύλη βαθμονόμησης μέσω της οποίας εξάγεται η εξίσωση με την οποία μετατρέπεται η απορρόφηση σε συγκέντρωση φωσφόρου φαίνεται στο διάγραμμα 2.

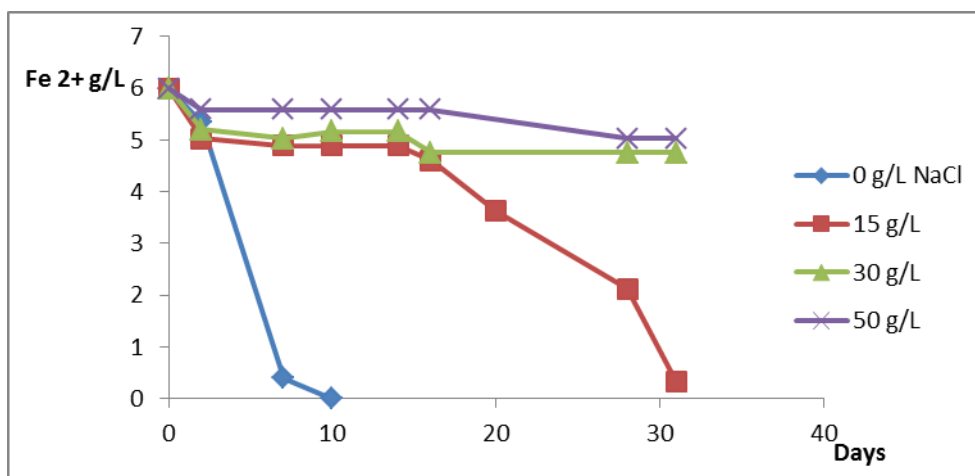


Διάγραμμα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης φωσφόρου με την μέθοδο του Ασκορβικού οξέως

4 ΑΝΑΛΥΣΗ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Οργανικές διαλυτές ουσίες

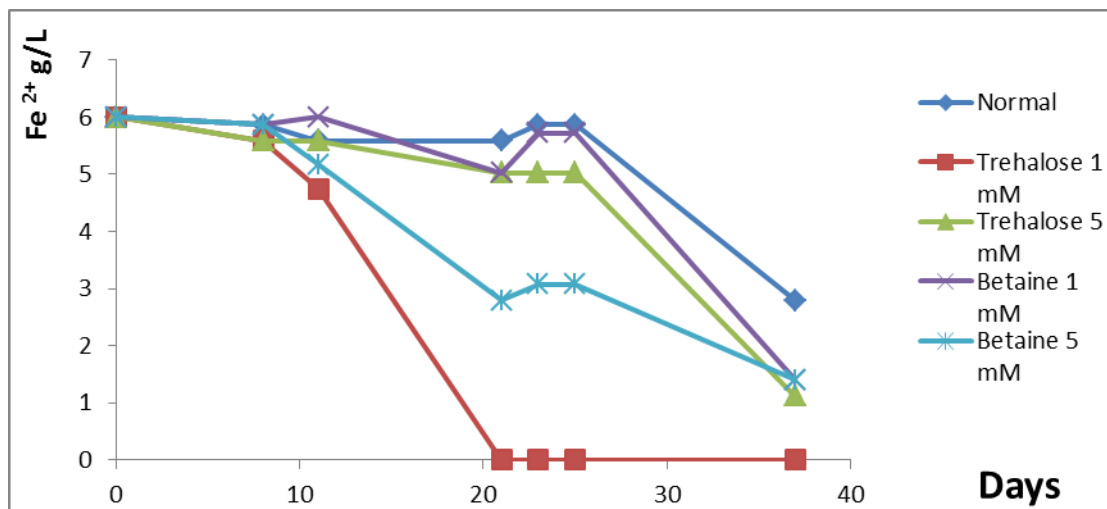
Από το πείραμα προσθήκης σίδηρο-οξειδωτικών μικροοργανισμών σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας, φάνηκε πως οι μικροοργανισμοί χρειάστηκαν 10 μέρες να καταναλώσουν 6 g/L Fe^{2+} σε συνθήκες μηδενικής αλατότητας. Στην περίπτωση που οι καλλιέργειες περιείχαν αλάτι, τα αποτελέσματα ήταν πολύ διαφορετικά ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα, στις καλλιέργειες που είχαν 15 g/L NaCl, ο χρόνος προσαρμογής των μικροοργανισμών ήταν 31 μέρες. Για τα 30 g/L NaCl για τον ίδιο χρόνο υπήρξε μια μικρή μείωση περίπου 1 g/L αλλά στην συνέχεια υπήρξε μια σταθερότητα. Για τα 50 g/L NaCl επίσης υπήρξε μια πολύ μικρή μείωση αλλά και σε αυτήν την περίπτωση δεν παρατηρήθηκε προσαρμογή των μικροοργανισμών μέσα στα χρονικά πλαίσια διεξαγωγής του πειράματος. Όλες οι πιο πάνω παρατηρήσεις περιγράφονται στο διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 3: Κατανάλωση διασθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας

Ίσως αν το πείραμα διαρκούσε περισσότερο χρόνο να υπήρχε περαιτέρω μείωση στην ποσότητα του διασθενή σιδήρου ο οποίος θα καταναλωνόταν από τους μικροοργανισμούς, όμως η πρώτη αίσθηση των αποτελεσμάτων μάλλον φανερώνει πως σε αυτές τις συνθήκες στρες λόγω αυξημένης αλατότητας δεν υπάρχει προσαρμογή.

Το επόμενο πείραμα πραγματοποιήθηκε κυρίως για να ελεγχθεί το κατά πόσον οι μικροοργανισμοί μπορούν να προσαρμοστούν αν στις καλλιέργειες προστεθούν συμβατές οργανικές ουσίες. Από το πείραμα φάνηκε πως τόσο η βεταΐνη όσο και η τρεχαλόζη ίσως να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν τον χρόνο προσαρμογής των μικροοργανισμών στην αλατότητα. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4 ,η συγκέντρωση 1 mM τρεχαλόζης σε χρονική περίοδο περίπου 20 ημερών μπορούσε να βοηθήσει τους μικροοργανισμούς να προσαρμοστούν και να καταναλώσουν πλήρως τον αρχικό δισθενή σίδηρο αρχικής συγκέντρωσης ίση με 6 g/L. Επίσης, φάνηκε πως και η συγκέντρωση 5 mM βεταΐνης παρουσίασε στον ίδιο χρόνο αισθητή μείωση στη τιμή του δισθενή σιδήρου περίπου στην μισή τιμή.

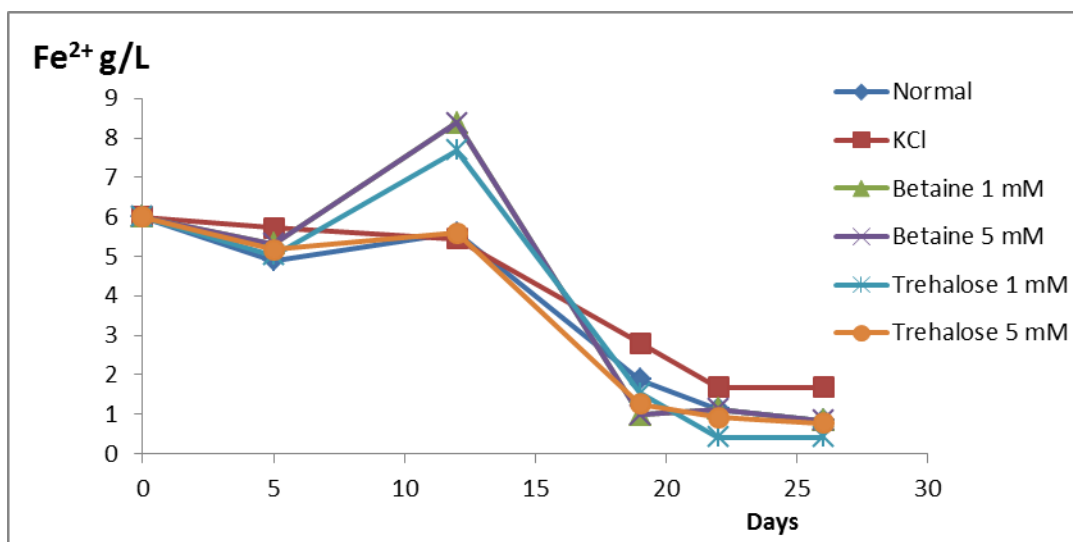


Διάγραμμα 4: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε 15g/L NaCl με χρήση τρεχαλόζης και βεταΐνης σε συγκεντρώσεις 1 και 5 mM

Όμως συγκρίνοντας τα αποτελέσματα και με το πείραμα της αλατότητας χωρίς την προσθήκη συμβατών διαλυτών ουσιών φαίνεται πως με το πέρασμα των 30 ημερών οι μικροοργανισμοί αρχίζουν να καταναλώνουν αισθητά τον δισθενή σίδηρο ανεξάρτητα αν έχουν προστεθεί ή όχι συμβατές διαλυτές ουσίες. Με βάση αυτή την παρατήρηση οι ενδείξεις πως η τρεχαλόζη ή η βεταΐνη βοηθούν τους μικροοργανισμούς τελικά να ξεπεράσουν το στρες της αλατότητας δεν επαληθεύονται απόλυτα. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε

επανάληψη του πειράματος για να φανεί τελικά αν η προσθήκη των συμβατών διαλυτών ουσιών βοηθά πρακτικά στην προσαρμογή των μικροοργανισμών σε συνθήκες στρες.

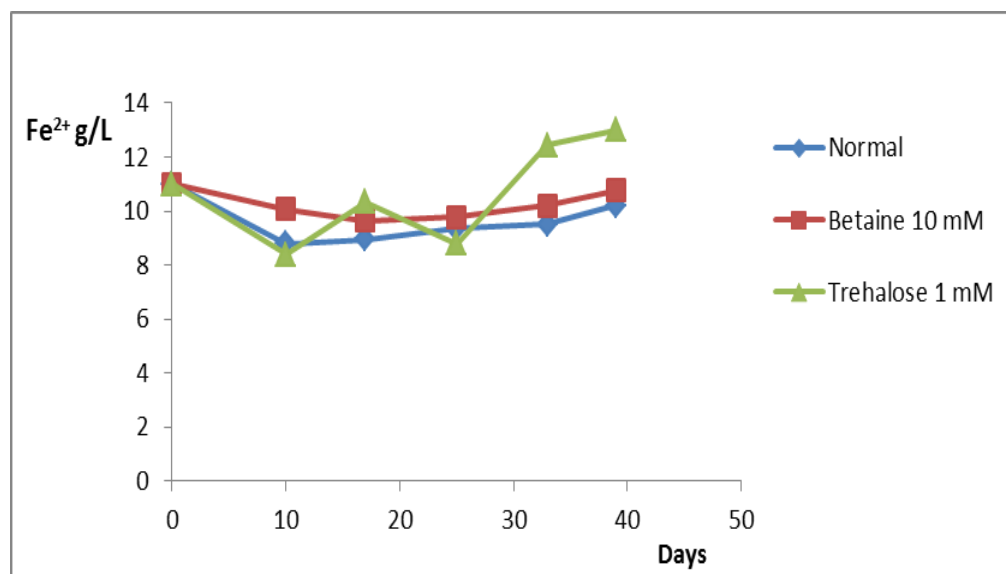
Μελετώντας και πάλι στις ίδιες συνθήκες και ίδιες συγκεντρώσεις προσθέτοντας επιπλέον ακόμα μια περίπτωση του χλωριούχου καλίου (KCl) τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στο διάγραμμα 5. Αυτό που παρατηρείται από τα αποτελέσματα είναι πως ενώ αρχικά για όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται μείωση του δισθενή σιδήρου για όλες τις διαφορετικές καλλιέργειες, από την 5^η μέρα και μετά παρατηρείται αύξηση στην τιμή του δισθενή σιδήρου. Αυτό οφείλεται μάλλον στο γεγονός πως οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να αντιστρέφουν την αντίδραση και αντί να μετατρέπουν τον δισθενή σίδηρο σε τρισθενή σίδηρο, πραγματοποιούν το αντίθετο. Μετά από την άνοδο αυτή παρατηρείται και πάλι μείωση του δισθενή σιδήρου μέχρι περίπου την 20^η μέρα όπου όλες οι καλλιέργειες σταθεροποιούνται περίπου. Ούτε εδώ τα αποτελέσματα ήταν και τόσο ενθαρρυντικά. Από όσο διαφαίνεται πάντα συγκριτικά με τα αποτελέσματα του πρώτου πειράματος όπου υπήρχε μόνο αλάτι, ναι μπορεί να μειωθεί η διάρκεια της προσαρμογής των μικροοργανισμών με την προσθήκη των οργανικών διαλυτών ουσιών, αλλά δεν υπάρχει σταθερότητα στα αποτελέσματα. Ίσως η χρήση τέτοιων ουσιών να μην μπορούν να βοηθήσουν τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς.



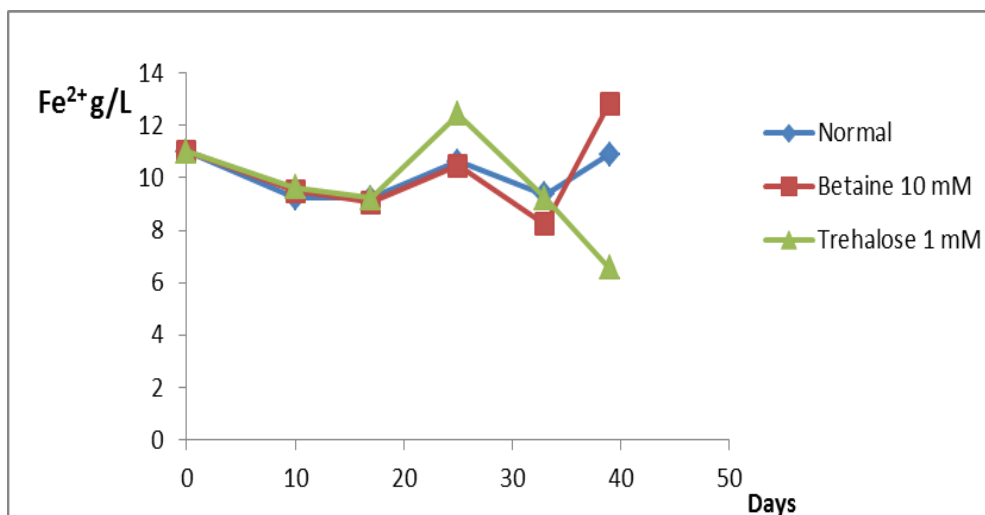
Διάγραμμα 5: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε 15g/L NaCl με χρήση KCl 1g/L, τρεχαλόζης και βεταΐνης σε συγκεντρώσεις 1 και 5 mM

Θέλοντας να ελεγχθούν όσο γίνεται περισσότερο όλα τα ενδεχόμενα πριν αποφανθούμε πως η χρήση των οργανικών διαλυτών ουσιών, ανεξάρτητα από την συγκέντρωση στην οποία τις προσθέτουμε, δεν ανταποκρίνονται στις προσδοκίες για την χρήση τους σε σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς κάτω από συνθήκες στρες, πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετα πείραμα στο οποίο οι καλλιέργειες είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε αλάτι, 25 και 35 g/L, και διαφορετική συγκέντρωση της βεταΐνης ίση με 10 mM.

Σε αυτό το πείραμα τα αποτελέσματα ήταν ακόμη πιο χαώδη. Εδώ η μεταβολές του δισθενή σιδήρου ήταν πολύ διαφορετικές για κάθε είδος ουσίας και για κάθε διαφορετική συγκέντρωση σε αλάτι. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα 6 και 7 η εναλλαγή της μετατροπής του δισθενή σιδήρου σε τρισθενή και το αντίστροφο είναι κάτι που παρατηρείται ακόμη πιο έντονα. Ίσως η προσθήκη τους να προωθεί μηχανισμούς αντίθετους στους μικροοργανισμούς από τους επιθυμητούς σε τόσο αυξημένες συνθήκες αλατότητας και για αυτό να παρατηρούνται οι διακυμάνσεις.



Διάγραμμα 6: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε 25g/L NaCl με χρήση τρεχαλόζης 1mM και βεταΐνης 10 mM



Διάγραμμα 7: Κατανάλωση δισθενή σιδήρου από σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς σε 35g/L NaCl με χρήση τρεχαλόζης 1mM και βεταΐνης 10 mM

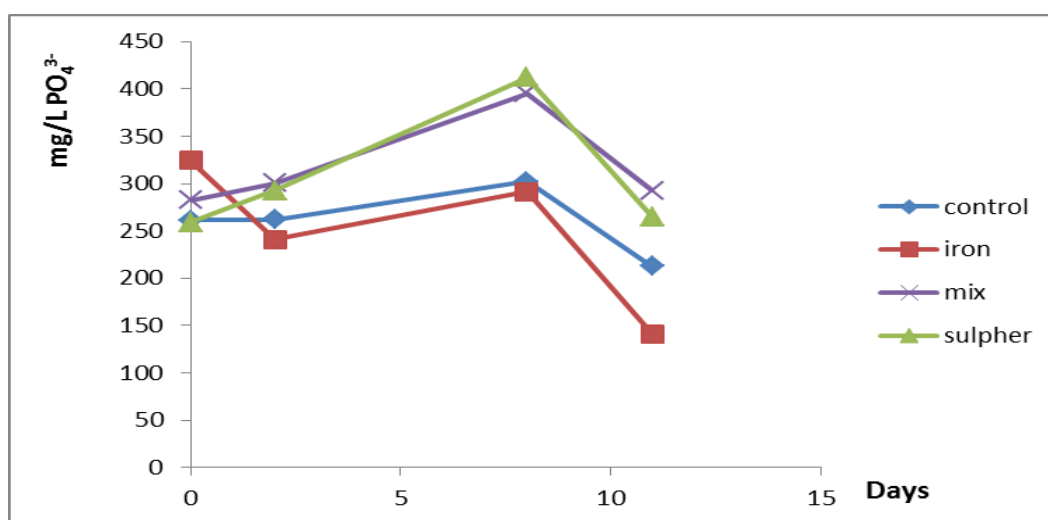
Προφανώς, έχοντας εξαντλήσει τα περισσότερα σενάρια τα οποία θα μπορούσαν να αποδώσουν πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα χρήσης οργανικών ουσιών σε σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς φαίνεται ξεκάθαρα πως τα αποτελέσματα είναι απογοητευτικά. Το ζητούμενο ήταν αν τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά για έναν στρεσογόνο παράγοντα όπως είναι η αλατότητα, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη και για άλλους στρεσογόνους παράγοντες όπως για παράδειγμα το υψηλό οργανικό που περιέχεται στην λάσπη που προέρχεται από τον βιολογικό καθαρισμό των λυμάτων. Προφανώς αφού τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, δεν προχωράει και η περαιτέρω διερεύνησης σε άλλους στρεσογόνους παράγοντες.

4.2 Βιοεκχύλιση Φωσφόρου από χωνεμένη λάσπη βιολογικού καθαρισμού λυμάτων

Στα πειράματα αυτά μεγάλο ενδιαφέρον παρουσίαζε ο εντοπισμός των ιδανικών συνθηκών για να επιτευχθεί εξαγωγή της μέγιστης δυνατής ποσότητα φωσφόρου μέσω βιολογικής επεξεργασίας. Μελετήθηκαν διαφορετικοί μικροοργανισμοί για τον σκοπό αυτό. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν σίδηρο-οξειδωτικοί, θείο-οξειδωτικοί μικροοργανισμοί καθώς και μίγμα αυτών. Επίσης μελετήθηκε και πως η προεπεξεργασία της λάσπης μπορεί να επηρεάσει την βιοεκχύλιση.

4.2.1 Πείραμα 1

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε το είδος των μικροοργανισμών. Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων όπως φαίνονται και στο διάγραμμα 8 η καλύτερη εξαγωγή επιτυγχάνεται από τους θείο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς. Καλή απόδοση παρουσιάζουν και οι μικτοί μικροοργανισμοί όμως το προβάδισμά το έχουν οι θείο-οξειδωτικοί. Εδώ έχουμε και μια πρώτη ένδειξη πως ο φώσφορος για να μπορεί να εξαχθεί από την λάσπη έχει καλύτερα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται θείο-οξειδωτικοί μικροοργανισμοί. Μία άλλη παρατήρηση είναι το χρονικό διάστημα στο οποίο πετυχαίνεται αυτή η μέγιστη τιμή. Αυτή λαμβάνει χώρα γύρω στις 6-8 μέρες. Το μεγάλο πρόβλημα που αντιμετωπίζεται κατά την όποια πειραματική διαδικασία με λάσπη είναι το pH. Οι τιμές του στις αρχικές καλλιέργειες λόγω του ψηλού οργανικού φορτίου κυμαίνονται γύρω στο 6-7. Όμως οι μικροοργανισμοί οι συγκεκριμένοι δεν μπορούν να προσαρμοστούν εύκολα σε αυτές τις τιμές για τον λόγο αυτό προσαρμόστηκε στην αρχική τιμή 1.6. Οι μετέπειτα μετρήσεις του pH, παρουσίασαν ανόδους στην τιμή πράγμα που υποδηλώνει την ύπαρξη μεγάλης ποσότητας οργανικού το οποίο ανεβάζει την τιμή του ή πως οι μικροοργανισμοί προσάρμοσαν τις καλλιέργειες στην τιμή που αυτοί μπορούν να πετύχουν τις καλύτερες, βέλτιστες για αυτούς συνθήκες όπου μπορεί να επιτευχθεί και το ζητούμενο, δηλαδή μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του φωσφόρου που μπορούν να εξαχθούν από την λάσπη.

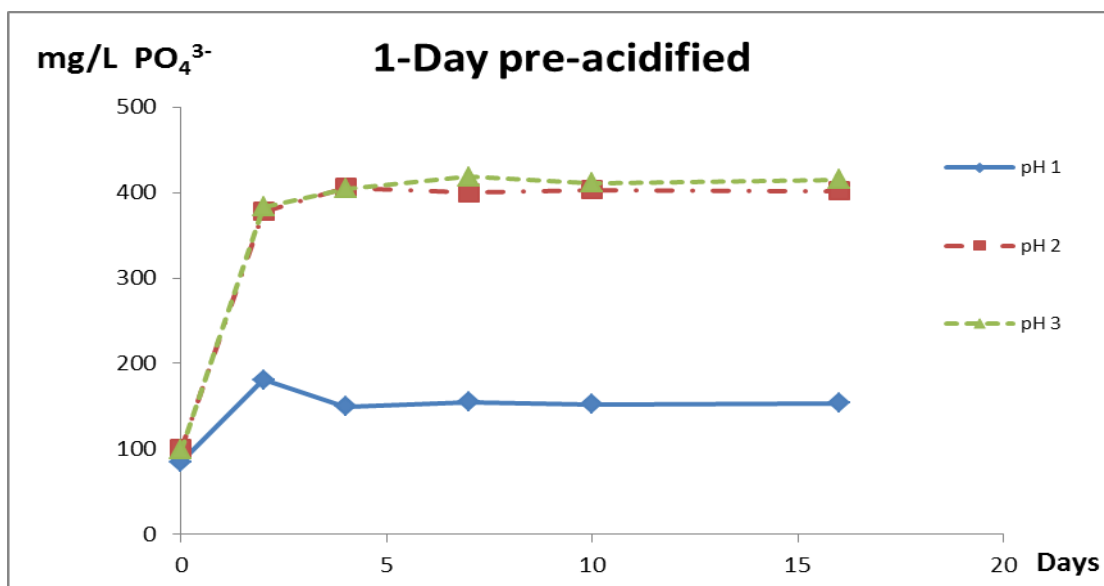


Διάγραμμα 8: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά) πειράματος 1 με χρήση σίδηρο-οξειδωτικών (iron), θείο-οξειδωτικών (sulphur) και μείγμα των δύο ειδών (mix) μικροοργανισμών

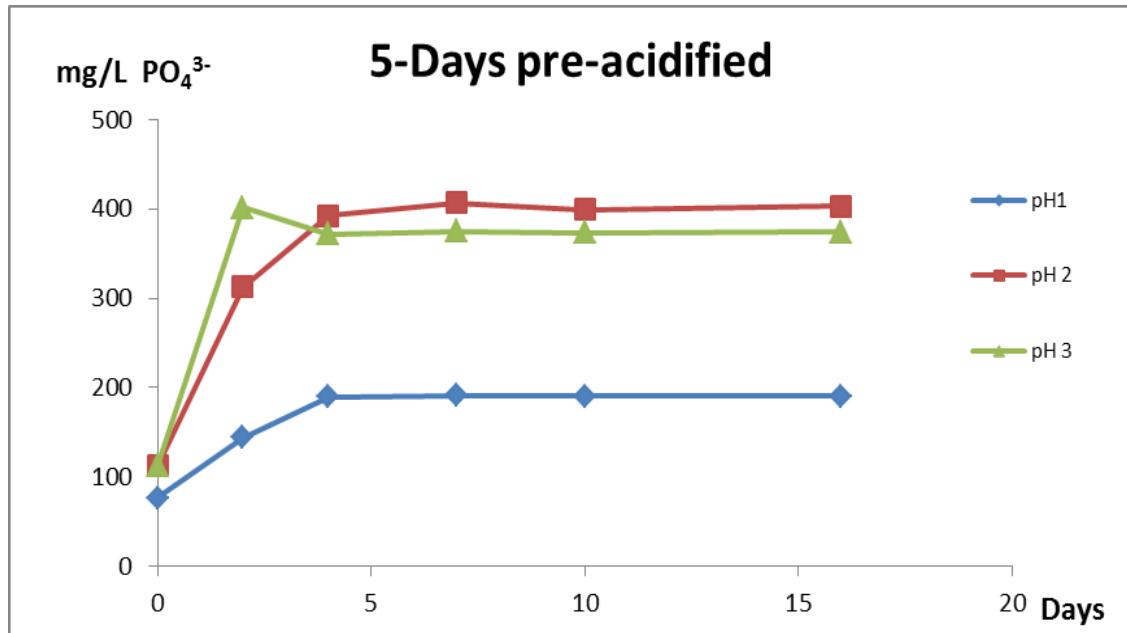
4.2.2 Πείραμα 2

Για να ελεγχθεί και ο παράγοντας του μεγάλου οργανικού φορτίου που μπορεί να περιέχεται μέσα στην λάσπη και πως αυτό μπορεί να προκαλεί αλλαγές στην τιμή του pH πραγματοποιήθηκε προ-οξίνιση της λάσπης. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε προοξίνιση για 5 μέρες και 1 μέρα για τιμές του pH προκαθορισμένες και ίσες με 1, 2, και 3.

Από τα διαγράμματα 9 και 10 των αποτελεσμάτων, διαφαίνεται πως η συγκέντρωση του φωσφόρου (στην μορφή των όρθο-φωσφορικών ιόντων) για την περίπτωση της προ-οξίνισης για 1 μέρα, τόσο το pH 2 όσο και το 3 έχουν παραπλήσιες τιμές εξαγωγής του φωσφόρου με ελάχιστα να έχει το προβάδισμα η τιμή για το pH 3. Στην περίπτωση των 5 ημερών, παρατηρείται μια παρόμοια εικόνα με την διαφορά πως το pH 2 έχει ελαφρύ προβάδισμα σε ότι αφορά την τιμή της συγκέντρωσης του φωσφόρου (στην μορφή των όρθο-φωσφορικών ιόντων). Αυτό που παρατηρείται από τα διαγράμματα είναι σε χρονική περίοδο λιγότερη και από 5 μέρες επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή η οποία μπορεί να εξαχθεί από την λάσπη.

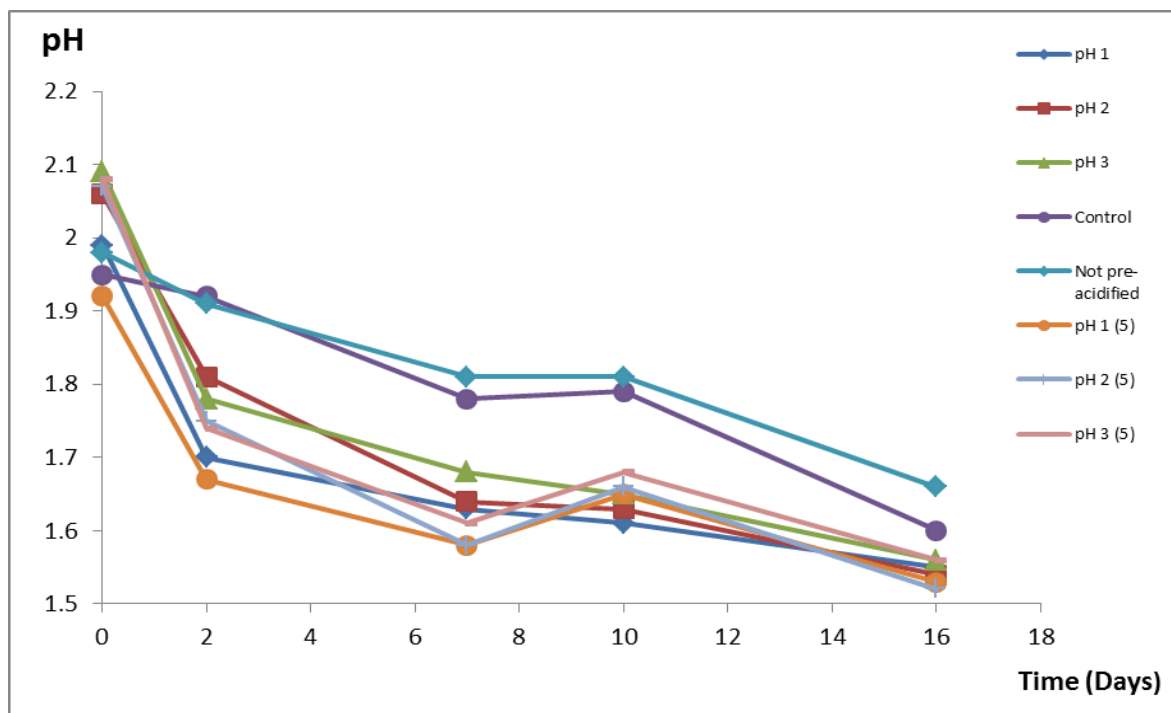


Διάγραμμα 9: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά ιόντα) με προοξυνισμένη λάσπη μίας ημέρας



Διάγραμμα 10: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνομένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά ιόντα) με προοξυνισμένη λάσπη πέντε ημερών

Οι τιμές του pH για όλες τις διαφορετικές συνθήκες των καλλιιεργειών όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 11, παρουσιάζουν μείωση με την πάροδο του χρόνου. Στο διάστημα από την αρχή του πειράματος έως την 2^η μέρα παρατηρείται σχετικά απότομη μεταβολή. Στην συνέχεια γίνεται με χαμηλότερους ρυθμούς. Αντίθετα, από την 7^η μέρα μέχρι την 10^η μέρα φαίνεται να υπάρχει μία τάση σε όλες τις καλλιέργειες να αυξάνεται το pH. Μοιάζει σαν να προσπαθούν οι μικροοργανισμοί να επαναφέρουν τις καλλιέργειες στις ιδανικές συνθήκες λειτουργίας τους. Μετά την 10^η μέρα, συνεχίστηκε η πτώση της τιμής του pH.

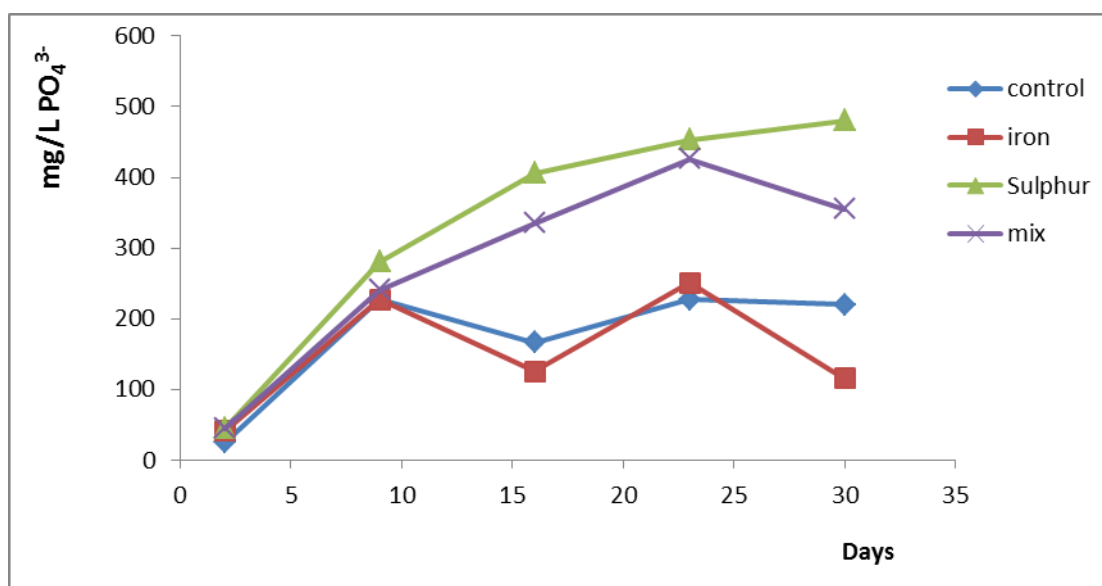


Διάγραμμα 11: Οι τιμές του pH για όλες τις διαφορετικές συνθήκες των καλλιεργειών κατά την εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά ιόντα) με προοξυνισμένη λάσπη μίας και πέντε ημερών

4.2.3 Πείραμα 3

Σε αυτό το πείραμα το ζητούμενο ήταν να μελετηθεί ποιο είδος μικροοργανισμών από τους οξεόφιλους μπορεί να προκαλέσει την μέγιστη εξαγωγή του φωσφόρου από λάσπη. Η πορεία του πειράματος αφορούσε την χρήση σίδηρο-οξειδωτικών και θείο-οξειδωτικών μικροοργανισμών ξεχωριστά αλλά και σε συνδυασμό τους. Έχει διαφανεί και από προηγούμενο πείραμα πως οι θείο-οξειδωτικοί μικροοργανισμοί αλλά και οι μικτοί των δύο ειδών, παρουσιάζουν να έχουν την δυνατότητα να διαλυτοποιούν τον περιεχόμενο φώσφορο που υπάρχει στην λάσπη. Σε αυτό το πείραμα φαίνεται και πάλι αυτή η συμπεριφορά στους μικροοργανισμούς. Η ιδιαιτερότητα στα αποτελέσματα αυτά όπως φαίνονται και από το διάγραμμα 12 είναι η παρατήρηση πως με τους θείο-οξειδωτικούς δεν παρατηρείται να υπάρχει αυξομείωση στην τιμή των όρθο-φωσφορικών ιόντων όπως παρατηρείται στους σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς οι οποίοι μάλιστα αναστέλλουν την αύξηση της ποσότητας των ιόντων στο διάλυμα των καλλιεργειών. Αυτή η παρατήρηση στάθηκε η

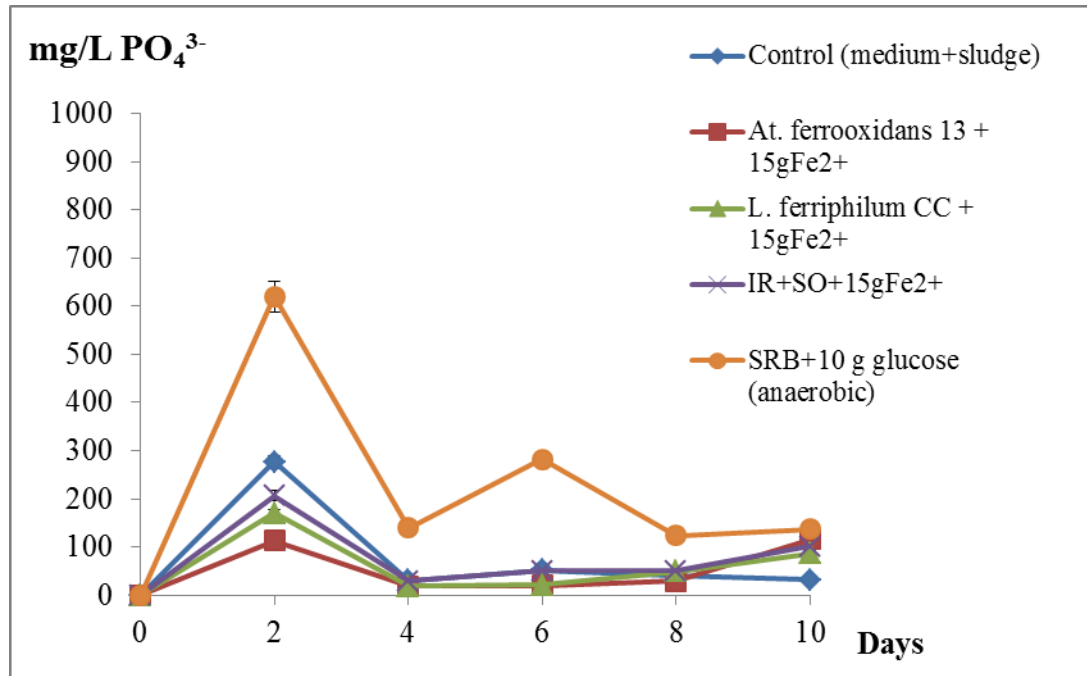
αφορμή για την πραγματοποίηση του 4^{ου} πειράματος με πιο συγκεκριμένα είδη μικροοργανισμών.



Διάγραμμα 12: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά) με χρήση σίδηρο-οξειδωτικών (iron), θείο-οξειδωτικών (sulphur) και μείγμα των δύο ειδών (mix) μικροοργανισμών

4.2.4 Πείραμα 4

Το συγκεκριμένο πείραμα έγινε σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και χωρίς επανάληψη λόγω έλλειψης χρονικών περιθωρίων όμως τα σχετικά αποτελέσματα δείχνουν να έχουν εντοπιστεί οι κατάλληλοι μικροοργανισμοί που να δίνουν καλύτερα αποτελέσματα σε ότι αφορά την βιοεκχύλιση του φωσφόρου. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 13 οι αναερόβιοι SRB μικροοργανισμοί μπορούν να εξαγάγουν την διπλάσια ποσότητα από ότι οι αερόβιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στα προηγούμενα πειράματα της πτυχιακής εργασίας και μάλιστα σε διάστημα 2 μόλις ημερών.



Διάγραμμα 13: Εκχύλιση φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη (μετρημένο σε φωσφορικά) με χρήση SRB μικροοργανισμών, *At. ferrooxidans* 13, *L. ferriphilum* CC και μίγμα σίδηρο-οξειδωτικών και θείο-οξειδωτικών μικροοργανισμών

Δυστυχώς δεν είχε απομείνει περισσότερος χρόνος για να μελετηθούν περαιτέρω ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες των μικροοργανισμών με τις οποίες θα μπορούσε ίσως να αυξηθεί ακόμη περισσότερο η ποσότητα του φωσφόρου που ελευθερώνεται από την λάσπη. Ίσως σε μελλοντικές έρευνες να υπάρξει αυτή η δυνατότητα.

4.3 Ανάκτηση Φωσφόρου

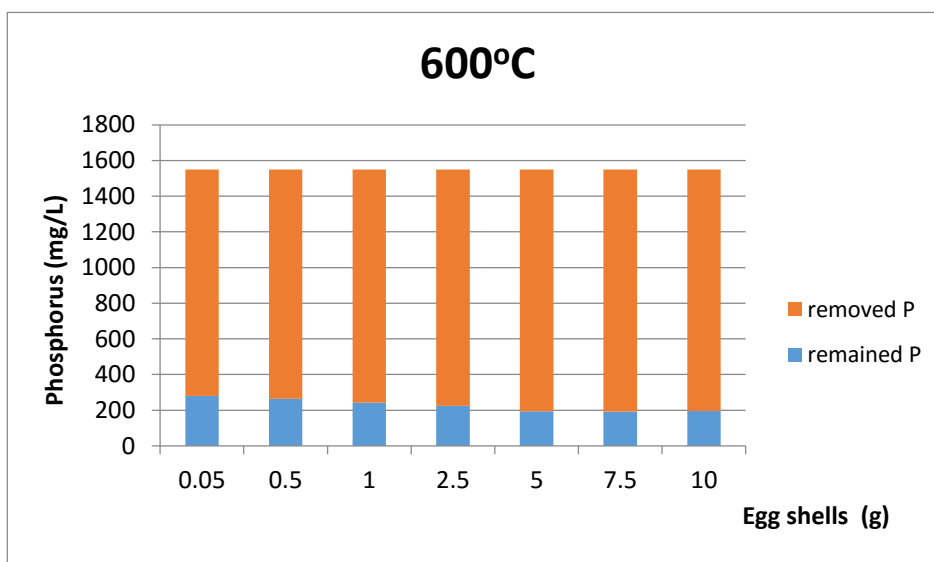
4.3.1 Χρήση οργανικού διαλύτη

Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν πέτυχε καθόλου σε σχέση με τα ευρήματα που παρουσίασαν οι Jia-Qian Jiang και O. Mwabonje (Jiang & Mwabonje 2009) (Mwabonje 2010). Τα ποσοστά ανάκτησης του φωσφόρου ήταν μηδενικά συγκρίνοντας τα με τα αποτελέσματα που περιγράφει το άρθρο. Μελετώντας την περιορισμένη βιβλιογραφία που υπάρχει σχετικά με το θέμα έχει εντοπιστεί ακόμη μια διατριβή της Bergquist (Bergquist 2011) η οποία αναφέρει

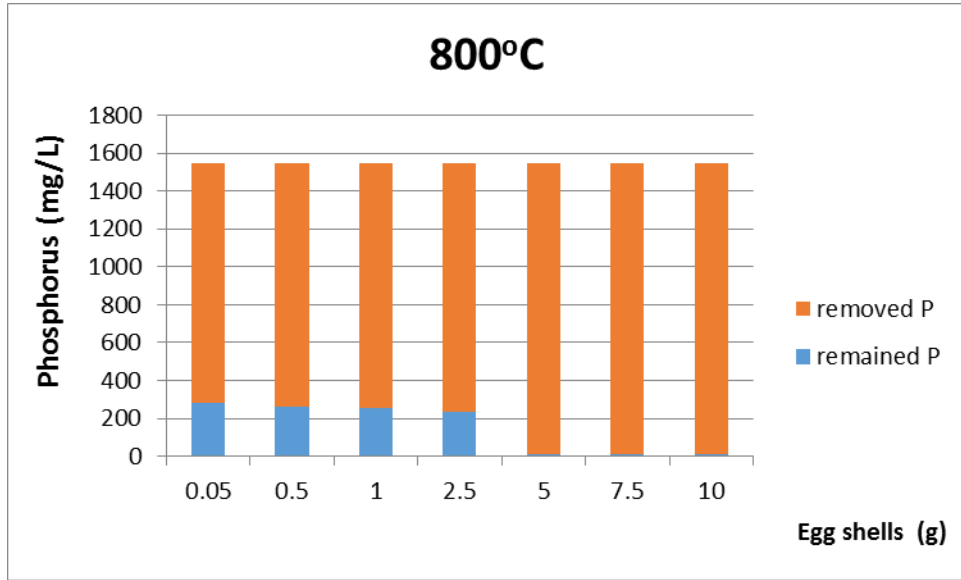
πως και στην δική της προσπάθεια να αναπαράγει τα αποτελέσματα του πειράματος δεν κατάφερε να έχει επιτυχία.

4.3.2 Χρήση τσοφλιών αυγών

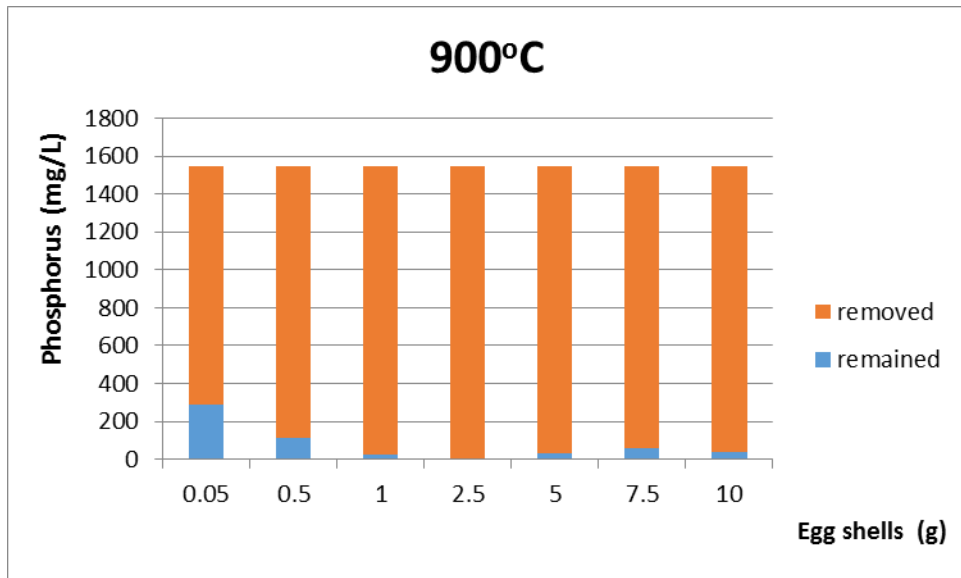
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την χρήση των τσοφλιών ως προσροφητικό μέσο μετά από 24 ώρες, για τις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες πυρόλυσης των τσοφλιών φαίνονται στα διαγράμματα 14-16. Είναι φανερό πως σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει καλή απομάκρυνση του φωσφόρου από τα διαλύματα αλλά η καλύτερη απομάκρυνση πραγματοποιείται στους 900 °C για την μάζα τσοφλιών ίση με 2.5 g όπου από την αρχική συγκέντρωση των 1550 mg/L φαίνεται να παραμένουν στο διάλυμα ποσότητα 4.240 mg/L. Τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν πως η απομάκρυνση του φωσφόρου από την υδατική φάση στην στερεή επιφάνεια των τσοφλιών είναι απόλυτα επιτυχημένη. Το θέμα που προκύπτει μετά από αυτά τα αποτελέσματα είναι να πραγματοποιηθεί περισσότερη έρευνα μέσω της οποίας θα μπορεί να συλλεχτεί από τα την επιφάνεια των τσοφλιών ο καθαρός φώσφορος.



Διάγραμμα 14: Απορρόφηση φωσφόρου από τσόφλια αυγών τα οποία υπέστησαν πυρόλυση στους 600 °C για 3 ώρες



Διάγραμμα 15: Απορρόφηση φωσφόρου από τσόφλια αυγών τα οποία υπέστησαν πυρόλυση στους 800 °C για 2 ώρες



Διάγραμμα 16: Απορρόφηση φωσφόρου από τσόφλια αυγών τα οποία υπέστησαν πυρόλυση στους 900 °C για 1 ώρες

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από όλα τα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη έρευνα, μπορούν να εξαχθούν πολλά και χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με το κάθε ένα στάδιο στο οποίο θα πρέπει να πραγματοποιηθεί ώστε τελικά να επιτευχθεί η ανάκτηση του φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη.

Αρχικά, φάνηκε πως η χρήση συμβατών διαλυτών οργανικών ουσιών δεν μπορεί να βοηθήσει του σίδηρο-οξειδωτικούς μικροοργανισμούς να ανταπεξέλθουν κάτω από την επίρεια ενός στρεσογόνου παράγοντα άρα και αποκλείστηκε η χρήση τους σε οξεόφιλους μικροοργανισμούς κατά την διάρκεια των πειραμάτων της βιοεκχύλισης που ακολούθησαν.

Σε ότι αφορά την βιοεκχύλιση του φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη φάνηκε πως μπορεί επιτευχθεί με την χρήση αερόβιων οξεόφιλων μικροοργανισμών σε ένα ικανοποιητικό βαθμό αλλά όπως διαφάνηκε τελικά, μπορεί να επιτευχθεί απομάκρυνση φωσφόρου με πολύ καλύτερη απόδοση αν χρησιμοποιηθούν συγκεκριμένα οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί SRB. Συγκεκριμένα φάνηκε πως οι θείο-οξειδωτικοί μικροοργανισμοί είναι ικανοί για την διαλυτοποίηση φωσφόρου σε συγκέντρωση κατά μέσο όρο ίση με 400-450 mg/L αλλά απαιτούν μια χρονική περίοδο 30 ημερών, ενώ για τους SRB η τιμή αυτή είχε φτάσει γύρω στα 650 mg/L σε χρονική περίοδο μόνο δύο ημερών. Το δυστύχημα είναι η έλλειψη χρόνου για την πραγματοποίηση επιπλέον πειραμάτων ώστε να υπάρξουν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα ποσοστά εξαγωγής καθώς και να ελεγχθούν όλες οι παράμετροι που υπεισέρχονται στην χρήση αυτών των μικροοργανισμών ώστε να εντοπιστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την χρήση τους στην βιοεκχύλιση του φωσφόρου από την λάσπη.

Στο κομμάτι που αφορά την ανάκτηση του φωσφόρου, ξεκαθαρίστηκε πως η χρήση οργανικού διαλύτη δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να απομακρυνθεί από την υδατική φάση ο φώσφορος. Αντίθετα, η χρήση των τσοφλιών αυγών ως προσροφητικό μέσο, έδειξε πως η βιολογική αυτή προσέγγιση μπορεί να πετύχει σχεδόν πλήρη απομάκρυνση του φωσφόρου από την υδατική φάση με τον φώσφορο να μετατρέπεται στην μορφή φωσφορικού ασβεστίου. Άρα υπάρχουν πολλές προοπτικές σε αυτή την κατεύθυνση οι οποίες χρίζουν μελέτης και περεταίρω έρευνας.

Συνοψίζοντας, η παρούσα μελέτη αποδεικνύει ότι η μικροβιακή εκχύλιση μπορεί να εφαρμοστεί έτσι ώστε ο φώσφορος που περιέχεται στην αναερόβια χωνεμένη λάσπη να ανακτηθεί αποτελεσματικά και η ανάκτηση του μπορεί να επιτευχθεί επίσης με βιολογική

διεργασία με την χρήση των τσοφλιών αυγών ως προσροφητικό μέσο. Ωστόσο, μελλοντικά, περαιτέρω συστηματικές έρευνες χρειάζονται να πραγματοποιηθούν με σκοπό την τροποποίηση και βελτιστοποίηση της διαδικασίας της βιοεκχύλισης και της ανάκτησης με σκοπό την ανάπτυξη μιας διεργασίας. εύκολα εφαρμόσιμης.

ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Έχοντας ασχοληθεί με το συγκεκριμένο θέμα και την μελέτη της υπάρχουσας βιβλιογραφίας προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ανάκτηση του φωσφόρου αποτελεί ένα θέμα το οποίο απασχολεί γενικότερα τόσο σε παγκόσμιο όσο και σε τοπικό επίπεδο λόγω της μείωσης των αποθεμάτων του αλλά και για των περιβαλλοντικών επιπτώσεων που μπορεί να προκαλέσει κυρίως λόγω των φαινομένων ευτροφισμού στα ύδατα. Με ζητούμενο την ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων και προστασία της ανθρώπινης υγείας, αλλά και την οικονομική πτυχή του θέματος, η εφαρμογή μεθόδων και τεχνολογιών απομάκρυνσης του επιβάλλεται.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι διάθεσης της αναερόβιας χωνεμένης λάσπης ως εδαφοβελτιωτικό ή ως καύσιμη ύλη σε βαριές βιομηχανίες μπορεί να χρησιμοποιείται ευρέως σήμερα. Όμως, η ανάγκη για συνεχής ανάκτηση κάποιων περιορισμένων μετάλλων όπως είναι ο φώσφορος λόγω της μείωσης των παγκόσμιων αποθεμάτων η οποία προκαλεί και την αύξηση της τιμής τους προκαλεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας να εντείνει τις έρευνες σε βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις. Έτσι, η χρήση μικροοργανισμών για την ανάκτηση του φωσφόρου από αναερόβια χωνεμένη λάσπη θα μπορούσε να είναι μια οικονομικά επιτρεπτή εναλλακτική λύση.

Ένα θέμα που παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον για μελλοντική έρευνα είναι το φωσφορικό ασβέστιο το οποίο σχηματίζεται κατά την προσρόφηση των φωσφορικών στην επιφάνεια των τσοφλιών των αυγών, πως μπορεί να αξιοποιηθεί. Ίσως να μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατευθείαν ως λίπασμα. Άλλη χρήση τους είναι να μπορούν να αντιδράσουν με ουσίες με τις οποίες να μπορεί να απομακρυνθεί το οργανικό, στην συνέχεια να μπορεί να απομακρυνθεί και ο φώσφορος και ίσως στην πορεία να μπορεί να συγκεντρωθεί στην μορφή πλέον φωσφορικού οξέος.

Ακόμη θα μπορούσε να συνδυαστεί η λάσπη με τα τσόφλια και τους SRB μαζί ώστε η προσρόφηση να γίνεται ταυτόχρονα και να μην παρουσιάζεται κορεσμός στο διάλυμα με φωσφορικά που ίσως παρεμποδίζει την επιπλέον απομάκρυνση του φωσφόρου.

Άλλο σημείο το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί για μελλοντική έρευνα στο σημείο της βιοεκχύλισης είναι να συνδυαστούν οι μικροοργανισμοί αερόβιοι και αναερόβιοι σε μια διεργασία όπου οι αερόβιοι θα μπορούν να κατεβάζουν το pH σε τιμές γύρω στο 2 όπου απαιτούν οι αναερόβιοι SRB και έτσι να υπάρχει μια διεργασία που ίσως να μπορεί να αναπτυχθεί και σε επίπεδο διεργασίας μια βιομηχανίας.

Υπάρχουν πολλές ιδέες για μελλοντική έρευνα πάνω στο θέμα αυτό και αναμένονται στο μέλλον να παρουσιαστούν πολλές καλές και καινοτόμες προσεγγίσεις όσων αφορά την ανάκτηση μετάλλων με την χρήση οξεόφιλων μικροοργανισμών αλλά και υλικών τα οποία μπορεί να φαίνονται ως απόβλητα άλλων διεργασιών, αλλά ικανά για την παροχή υλικών υψηλής οικονομικής αξίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bergquist, C., 2011. Phosphorous recovery from iron (III) phosphate sludge Phosphorous recovery from iron (III) phosphate sludge. , (Iii).
- Bertoldo, C., Dock, C. & Antranikian, G., 2004. Thermoacidophilic microorganisms and their novel biocatalysts. *Engineering in Life Sciences*, 4(6), pp.521–532.
- BRANDL, H., 2008. Microbial Leaching of Metals. In G. R. H.-J. Rehm, ed. *Biotechnology Set, Second Edition*. pp. 192–206.
- Chojnacka, K., 2005. Biosorption of Cr(III) ions by eggshells. *Hazardus Materials*, 121, pp.167–173.
- DasSarma, S. & Arora, P., 2001. Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1, pp.1–9.
Available at:
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Halophiles#4\nhttp://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902\nhttp://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub3>.
- Desmidt, E. et al., 2015. Global Phosphorus Scarcity and Full-Scale P-Recovery Techniques: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(4), pp.336–384. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389.2013.866531>.
- Feofilova, E.P. et al., 2014. Trehalose: Chemical structure, biological functions, and practical application. *Microbiology*, 83(3), pp.184–194. Available at:
<http://link.springer.com/10.1134/S0026261714020064>.
- Galinski, E., 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 37, pp.273–328.
- Jiang, J.-Q. & Mwabonje, O., 2009. Phosphorus Recovery by Liquid–Liquid Extraction. *Separation Science and Technology*, 44(13), pp.3258–3266.
- Kempf, B. & Bremer, E., 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology*, 170(5), pp.319–330.
- Köse, T.E. & Kivanç, B., 2011. Adsorption of phosphate from aqueous solutions using calcined waste eggshell. *Chemical Engineering Journal*, 178, pp.34–39.
- Koumanova, B., Peeva, P., Allen, S.J., Gallagher, K.A., Healy, M.G., 2002. Biosorption from aqueous solutions by eggshell membranes and *Rhizopus oryzae*: equilibrium and kinetic studies. *Chem. Technol.. Biotechnol.*, 77, pp.539–545.
- Kuh, S.E., Kim, D.S., 2000. Removal characteristics of cadmium ion by waste egg shell. *Environmental Technology*, 21, pp.883–890.

- LUNDGREN, D.G., et al, 1986. Chemical reactions important in bioleaching and bioaccumulation. In J. W. & Sons, ed. *"Workshop on biotechnology for the mining, metal refining and fossil fuel processing industries.* pp. 7–22.
- Madigan T., Michael, Martinko M., John, Stahl A., David, Clark P., D., 2012. *Brock Biology of microorganisms* Thirteenth. I. Cummings, Benjamin Pearson Education, ed., San Francisco: Pearson Education, Inc.,.
- Margesin, R. & Schinner, F., 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), pp.73–83.
- McNeil, S.D., Nuccio, M.L. & Hanson, a. D., 1999. Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance. *Plant physiology*, 120(4), pp.945–949.
- Mwabonje, O.N., 2010. A Trial of Using Solvent Extraction for Phosphorus Recovery. *Journal of Water Resource and Protection*, 02(09), pp.830–838.
- Nakano, T., Ikawa, N.I., Ozimek, L., 2003. Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poult. Sci.*, 82, pp.510–514.
- Parsons, A.H., 1982. Structure of the eggshell. *Poult. Sci.*, 61, pp.2013–2021.
- Poland, A.L., Sheldon, B.W., 2001. Altering the thermal resistance of foodborne bacterial pathogens with an eggshell membrane waste by-product. *Journal of Food Protection*, 64(4), pp.486–492.
- Ron, E.Z., 2012. *Bacterial Stress Response* 4th ed., Springer.
- Schütte, T. et al., 2015. Phosphorus recovery from sewage sludge by nanofiltration in diafiltration mode. *Journal of Membrane Science*, 480, pp.74–82.
- Sharma, A., Kawarabayasi, Y. & Satyanarayana, T., 2012. Acidophilic bacteria and archaea: Acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles*, 16(1), pp.1–19.
- Stadelman, W.J., 2000. Eggs and egg products No Title. In J. W. & Sons, ed. *Encyclopedia of Food Science and Technology*. New York, pp. 593–599.
- Tacon, A.G.J., 1982. Utilisation of chick hatchery waste: the nutritional characteristics of day-old chicks and egg shells. *Agric. Wastes*, (4), pp.335–343.
- TORMA A.E., 1986. Biohydrometallurgy as an emerging technology , J. Wiley & Sons, New York, . In *Workshop on biotechnology for the mining, metal , refining and fossil fuel processing industries.* pp. 49–63.
- Tullett, S.G., 1987. Egg shell formation and quality. *Egg Quality—Current Problems and Recent Advances*, pp.123–146.

- Vallero, M.V.G., Lettinga, G. & Lens, P.N.L., 2003. Assessment of compatible solutes to overcome salinity stress in thermophilic (55°C) methanol-fed sulfate reducing granular sludges. *Water Science and Technology*, 48(6), pp.195–202.
- Vijayaraghavan, K., Jegan, J., Jegan, J., Jegan, J., 2005. .: Removal and recovery of copper from aqueous solution by eggshell in a packed column. *Miner. Eng*, 18, pp.545–547.
- Withers, P.J. a et al., 2015. Greening the global phosphorus cycle: how green chemistry can help achieve planetary P sustainability. *Green Chemistry*, 17(4), pp.2087–2099. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C4GC02445A>.
- Wood, J.M. et al., 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 130(3), pp.437–460.
- Xiang, Y. et al., 2010. Bioleaching of copper from waste printed circuit boards by bacterial consortium enriched from acid mine drainage. *Journal of Hazardous Materials*, 184(1-3), pp.812–818. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.113>.
- Zhang, L., Zhu, K. & Li, A., 2016. Differentiated effects of osmoprotectants on anaerobic syntrophic microbial populations at saline conditions and its engineering aspects. *Chemical Engineering Journal*, 288, pp.116–125. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894715016526>.
- ΑΓΑΤΖΙΝΗ –ΛΕΟΝΑΡΔΟΥ, Σ., 2004. *Ειδικά θέματα υδρομεταλλουργίας* ΕΜΠ, ed., Αθήνα.
- Κυπριακή Βουλή, 2003. Ο περί ελέγχου της Ρύπανσης των νερών (Απόρριψη Αστικών Λυμάτων).
- ΣΑΛΑ, Επεξεργασία Λάσπης. Available at: <http://www.sbla.com.cy/book/export/html/14> [Accessed April 10, 2016].

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Μηνιαία αποτελέσματα αναλύσεων αναερόβια χωνομένης λάσπης

Σημείωση πως μετά από επικοινωνία με τον σταθμό η τιμή του ολικού φωσφόρου στα πιο κάτω δεδομένα είναι λάθος και η πραγματική τιμή είναι ίση με 6600 mg/Kg (Πηγή <http://www.sbla.com.cy/Methods-of-Analysis>)



ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΑΠΟΧΕΤΕΥΣΕΩΝ ΛΙΜΑΣΣΟΥ-ΑΜΑΘΟΥΣ (SEWERAGE BOARD OF LIMASSOL-AMATHUS)

Μηνιαία τιμή μηνιαίων αποτελεσμάτων αναερόβιας χωνομένης λάσπης - ΕΤΟΣ 2016
Monthly average analysis results of Anaerobically Digested Sludge - YEAR 2016

Μηνιαία Ανάλυση (Monthly Analysis)	Ολικό Στερεό Στερεό (Total Solids) (TS)	Αραιωμένο Αζώτο (Ammonium Nitrogen) (NH ₄ -N)	Ολικό Αζώτο (Total Nitrogen) (TN)	Ολικός Φωσφόρος (Total Phosphorus) (TP)	Μικροβιακή Ακτινότητα (Microbial Conductivity) (EC)	pH	Αιχμή εντερ. Παρασίτων (Helminth eggs)	Υπερφοσφορικό (Urea) (U)	Κοπρέωση (Coprolite) (C)	Μολύβδος (Lead) (Pb)	Κόβιντος (Cadmium) (Cd)	Υπερμαγγάνιο (Manganese) (Mn)	Κόπρωμα (Chromium) (Cr)	Νικέλιο (Nickel) (Ni)	
	%	mg/kg	mg/kg	mg/kg	µS/cm	-	σουλτί/1000ml	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
ΙΑΝ (JAN)	86	20	1.771	11.800	23.800	806	7,80	0	880,00	145,50	3,72	4,53	0,08	27,07	13,82
ΦΕΒ (FEB)	87	20						813,00	165,80	5,87	3,85	0,05	37,65	13,13	
ΜΑΡ (MAR)	87	20						849,00	145,00	8,35	4,10	0,18	38,10	13,88	
ΑΠΡ (APR)	88	18						738,00	187,00	0,75	2,13	0,23	34,08	14,65	
ΜΑΪ (MAY)	88	20						640,00	139,10	3,00	2,78	0,12	40,80	11,72	
ΙΟΥΝ (JUN)	88	22						702,00	149,00	4,80	3,32	0,13	30,27	13,88	
ΙΟΥΛ (JUL)	80	22						781,00	170,00	5,10	2,35	0,18	35,38	15,23	
ΑΥΓ (AUG)	81	21						732,00	181,00	5,50	8,22	0,08	38,18	11,06	
ΣΕΠ (SEP)	81	23						768,00	201,00	18,00	8,21	0,14	43,13	13,71	
ΟΚΤ (OCT)	81	22						805,00	244,00	1,78	4,48	0,18	47,82	18,84	
ΝΟΕ (NOV)	81	22						774,00	175,00	4,38	5,20	0,15	50,15	15,24	
ΔΕΚ (DEC)	82	21						761,00	189,00	2,28	4,10	0,13	43,03	14,88	
ΕΤΗΣΙΑ ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ (YEARLY AVERAGE RESULT 'S)	84	21	1.771	11.800	23.800	806	7,80	0	711,33	175,64	5,38	4,34	0,14	38,70	13,88
ΟΠΙΑ ΑΔΕΙΑ ΑΙΧΜΟΤΥΠΗΣ Αρ. 88/2012 (DISCHARGE LICENCE LWS/12 No. 88/2012)							Τίποτα (None)	2.500	1.000	750	10	10	1.000	300	

Quality Control/REPORTS/81P/ YEARLY REPORTS/ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΥΜΑΤΩΝ & ΠΑΡΙΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΛΑΣΠΗΣ/ENGLISH/SLUDGE RESULTS 2015 2/2/2016