

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ



TECHNOLOGICAL  
EDUCATIONAL INSTITUTE *of*  
CRETE  
DEPARTMENT *of* AGRICULTURAL  
TECHNOLOGY

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΙΜΟΤΗΤΑ  
ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ  
ΒΡΙΣΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ»

ΚΟΥΡΟΥΤΖΙΔΟΥ ΕΛΕΝΗ ΚΥΡΙΑΚΗ  
ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: ΜΑΝΙΟΣ ΘΡΑΣΥΒΟΥΛΟΣ

ΙΟΥΝΙΟΣ, 2014

Στον πατέρα μου Άγγελο που το ήθελε πολύ και δεν πρόλαβε γιατί άργησα ...

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ</b> .....	<b>I</b>
<b>ΛΙΣΤΑ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ</b> .....	<b>II</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟ ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΑΠΟ ΤΑ ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ. ....	1
1.2 ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ. ....	3
1.3 ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΤΗΝ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ. ....	4
1.4 ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	5
<b>2 ΥΛΙΚΑ</b> .....	<b>6</b>
2.1 ΣΥΝΤΟΜΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ. ....	6
2.2 ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ. ....	7
<b>3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b> .....	<b>10</b>
3.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ .....	10
3.2 ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	12
3.3 ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΤΟ ΘΕΡΜΟΛΟΥΤΡΟ ( WATERBATH).....	14
3.4 ΤΡΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ. ....	15
<b>4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b> .....	<b>17</b>
<b>5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>29</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>30</b>



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εργασία αυτή έχει ως στόχο, την δυνατότητα ταυτοποίησης μιας μεθόδου για την αναερόβια βιοδιάσπαση φαινολικών ενώσεων που συναντούμε σε υγρά απόβλητα και οργανικά υπολείμματα. Πρόκειται για δύσκολα βιοδιασπώμενα οργανικά μόρια που φέρουν σημαντικό ρυπαντικό φορτίο. Η μέθοδος βασίστηκε στην αξιολόγηση, από τους Miller and Wolin (1974), της ικανότητας των αναερόβιων οργανισμών να αποσυνθέτουν φαινολικές ενώσεις. Για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης έρευνας, χρησιμοποιήθηκε ως δοκιμαζόμενη ουσία ( φαινολική ένωση) το Gallic acid ( GA / 3, 4, 5 – trihydroxybenzoic). Η ουσία αυτή επιλέχθηκε γιατί σύμφωνα με μελέτη (Borja R. et al., 1993) φαινολικές ενώσεις όπως το gallic acid, p-coumaric acid και το gentistic acid υπάρχουν σε σημαντική ποσότητα σε υγρά απόβλητα ελαιουργείων. Επιπροσθέτως άλλη μια έρευνα ( Mousa L., Forster CF., 1999) έδειξε ότι τέτοιου είδους οργανικά μόρια είναι πολύ δύσκολο να διασπασθούν σε αναερόβιες συνθήκες και μάλιστα το gallic acid θεωρείται ως αναστολέας της αναερόβιας διάσπασης. Όλα τα παραπάνω όμως δοκιμάστηκαν σε αναερόβιους χωνευτήρες για 3- 24 ώρες.

Η εργασία αυτή εξέτασε το ενδεχόμενο της διάσπασης αυτών των δύσκολα βιοδιασπόμενων οργανικών ενώσεων, επιλέγοντας το GA, με μια πιο παρατεταμένη περίοδο έκθεσης σε αναερόβιους μικροοργανισμούς. Δημιουργήθηκαν μίγματα διαφόρων συγκεντρώσεων Gallic acid και λάσπης αποβλήτων (αναερόβιοι οργανισμοί), που υπο σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας, γινόταν καθημερινή μέτρηση των παραγόμενων από την βιοδιάσπαση αερίων. Έτσι, μετά από 23 μέρες βρέθηκε ότι στα δείγματα των 1000ppm GA με λάσπη παρήχθησαν  $87,6 \pm 2,4$  ml αερίου, ενώ στα δείγματα που δεν είχε προστεθεί λάσπη μόνο  $9,3 \pm 1,0$  ml αερίου. Αντιστοίχως, σε δείγματα μίγματος GA και λάσπης 500 ppm συγκέντρωσης παρήχθησαν  $48,0 \pm 8,0$  ml αερίου, ενώ στα δείγματα που απουσίαζε η λάσπη είχαμε  $6,5 \pm 1,0$  ml αερίου. Τέλος, στα μίγματα συγκέντρωσης 100 ppm GA  $30,8 \pm 4,7$  ml αερίου συλλέχθηκαν και  $9,6 \pm 2,3$  ml στα αντίστοιχα χωρίς λάσπη. Κάθε δείγμα επαναλαμβανόταν 6 φορές για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Επίσης, δείγματα που αποτελούνταν από σκέτη λάσπη και αποσταγμένο νερό παρήγαγαν  $13,6 \pm 5,1$  ml. Σε άλλα που προστέθηκαν 200 ppm σουκρόζης σε μίγματα πήραμε

34,1 ± 2,7 ml αερίου. Τα δείγματα που περιείχαν μόνο GA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μόνο λάσπη και μίγμα (GA - λάσπης) και σουκρόζη χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, ως βάση για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας. Τα αποτελέσματα λοιπόν, μας έδειξαν ότι ακόμη και σε υψηλές συγκεντρώσεις το Gallic acid μπορεί να βιοδιασπαστεί σε αναερόβιες συνθήκες αν υπάρχει επαρκής χρόνος.

# ABSTRACT

Aim of the paper was to test the applicability of a low cost method suggested by Miller and Wolin (1974) for evaluating the ability of anaerobic microorganisms to decompose phenolic compounds found in olive mill wastewater (OMW). Gallic acid (GA / 3, 4, 5 – trihydroxybenzoic) was used as test substance. When 1000 ppm of GA with sludge were used the average cumulative value of gas volumes (in ml) collected daily in each of the six replicas was  $87.6 \pm 2.4$  ml (standard error), where when no sludge was added only  $9.3 \pm 1.0$  ml were produced. Similarly the respective values for the 500 ppm mixture was  $48.0 \pm 8.0$  ml when sludge was used and  $6.5 \pm 1.0$  when no sludge was added. For the 100 ppm GA mixture the average cumulative value of produced gases were  $30.8 \pm 4.7$  ml and  $9.6 \pm 2.3$  respectively. Sludge mixed with distilled water produced in average  $13.6 \pm 5.1$  ml where 200 ppm sucrose produced  $34.1 \pm 2.7$  ml. These results suggest that GA is an easily decomposable, under anaerobic conditions, compound even in high concentrations (1000 ppm) if adequate fermentation time is provided. The produced gases volumes are strongly related ( $r^2 = 0.9501$ ) with the GA's concentration in the mixtures.

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## *1.1 Περιβαλλοντικό πρόβλημα από τα υγρά απόβλητα των ελαιουργείων.*

Η ανάγκη για κατάλληλη διαχείριση και επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων (ΥΑΕ) παραμένει ένα από τα σημαντικότερα και μεγαλύτερα προβλήματα στις ελαιοπαραγωγικές χώρες της Μεσογείου. Συγκεκριμένα, στο νησί της Κρήτης παράγονται ετησίως πάνω από 500000m<sup>3</sup> ΥΑΕ και επί του παρόντος αποθηκεύονται σε δεξαμενές εξάτμισης ( Εικ. 1, 2). Τα απόβλητα αυτά φέρουν υψηλό ρυπαντικό φορτίο με COD ως και 200 g/L. Το οργανικό τους κλάσμα περιλαμβάνει σάκχαρα, τανίνες, πολυφαινόλες, πολυαλκοόλες, πηκτίνες και λιπίδια, με το φαινολικό κλάσμα να ευθύνεται για τα περισσότερα προβλήματα που σχετίζονται με την μολυσματικότητα των ΥΑΕ. Οι αντιμικροβιακές επιδράσεις των φαινολικών ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος, παραμένουν το κύριο μειονέκτημα στη διάσπαση των ΥΑΕ τόσο με αερόβιες όσο και με αναερόβιες διαδικασίες.

Προκειμένου να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, μια ποικιλία μεθόδων έχει προταθεί για την επεξεργασία των ΥΑΕ. Ωστόσο, στην Κρήτη το κύριο πρόβλημα σχετίζεται με α) το μικρό μέγεθος των βιομηχανιών ελαιολάδου, β) τη διασπορά των ελαιοτριβείων (περισσότερα από 650 στο νησί) σε μεγάλες περιοχές και γ) τη χαμηλή εγχώρια και διεθνή τιμή αγοράς του ελαιόλαδου, η οποία δεν επιτρέπει την εφαρμογή τεχνολογικά ορθών και αποτελεσματικών μεθόδων επεξεργασίας και διαχείρισης των ΥΑΕ.





**Εικόνα 1.2:** Ανοικτές δεξαμενές εξάτμισης αποβλήτων ελαιουργείων.

## ***1.2 Αναερόβια αποδόμηση φαινολικών συστατικών των υγρών αποβλήτων.***

Η αναερόβια χώνευση μπορεί να θεωρηθεί ως μια κατάλληλη λύση στο πρόβλημα, καθώς η χρήση του εκλυόμενου μεθανίου για την παραγωγή ενέργειας θα μπορούσε να αντισταθμίσει το κόστος της επεξεργασίας. Είναι όμως πολύ σημαντικό να αποδειχθεί ότι οι αναερόβιοι οργανισμοί είναι ικανοί να αποσυνθέσουν τα συστατικά των ΥΑΕ και κυρίως τα φαινολικά μόρια. Μελέτη που έγινε από τους Borja et al. έδειξε ότι φαινολικές ενώσεις όπως το γαλλικό οξύ, το p- κουμαρικό οξύ και το gentistic acid υπάρχουν στα ΥΑΕ σε σημαντικές ποσότητες. Επίσης, έρευνα των Borja et al., FitzGibbon et al. και Mousa and Forster, αναφέρει ότι τέτοιου είδους μόρια είναι πολύ δύσκολο να αποσυντεθούν σε αναερόβιες συνθήκες. Συγκεκριμένα οι Mousa and Forster θεώρησαν το GA ως αναστολέα της αναερόβιας διάσπασης. Εξαιτίας της αντιμικροβιακής τους δράσης, τα φαινολικά συστατικά θεωρούνται ως μικροβιακοί παρεμποδιστές. Οι FitzGibbon et al. βρήκαν ότι οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων ανέστειλαν το ρυθμό ανάπτυξης μυκήτων σε τρία από τα τέσσερα είδη μυκήτων που ελέγχθηκαν. Εντούτοις, οι Mousa and Forster έδειξαν ότι προσθέτοντας γλυκόζη σε ένα καλά αναμειγμένο σύστημα ιλύος αυξήθηκε η διάσπαση του GA αλλά και ο ρυθμός με τον οποίο αυτή έγινε. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο λειτούργησε η γλυκόζη ώστε να εξουδετερωθεί η ανασταλτική επίδραση του GA, δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά από τους ερευνητές. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι παραπάνω μελέτες ασχολήθηκαν με την αναερόβια αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων για ένα σύντομο χρονικό διάστημα ( 3-24 ώρες), ενώ δεν υπάρχει καμιά πληροφορία για μια πιο παρατεταμένη χρονική περίοδο.

Η μελέτη αυτή αποτελεί μια προσπάθεια να καθοριστεί η αποτελεσματικότητα της αναερόβιας επεξεργασίας των ΥΑΕ ως μια μέθοδος με χαμηλό κόστος. Αυτή η μέθοδος δε θα πρέπει να έχει κανένα περιορισμό πραγματικού χρόνου, επιτρέποντας την πλήρη και λεπτομερή εκτίμηση της επεξεργασίας. Η μέθοδος Miller and Wolin επιτρέπει την παρακολούθηση της συμπεριφοράς ενός μορίου μετά από έκθεσή του σε αναερόβιους μικροοργανισμούς σε ανοξικές συνθήκες,

μετρώντας τα παραγόμενα αέρια (κυρίως CH<sub>4</sub>).

### ***1.3 Στάδια αναερόβιας αποδόμησης και παράμετροι που την επηρεάζουν.***

Αναερόβια αποδόμηση όπως αναφέρθηκε είναι διάσπαση πολύπλοκων οργανικών μορίων στα δομικά τους συστατικά χωρίς την παρουσία οξυγόνου. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην παραγωγή βιοαερίου, ενός πολύτιμου ενεργειακά προϊόντος. Αυτό είναι ένα μίγμα αερίων, κυρίως μεθανίου ( CH<sub>4</sub>) και διοξειδίου του άνθρακα ( CO<sub>2</sub>). Η αναερόβια αποδόμηση γίνεται από αναερόβιους μικροοργανισμούς ( βακτήρια) και για αυτό το λόγο ονομάζεται και βιοαποδόμηση.

Η αναερόβια βιοαποδόμηση γίνεται σε τέσσερα στάδια που είναι :

- **Υδρόλυση ( Hydrolysis):** μεγάλα οργανικά μόρια ( όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη κ.α.) διασπώνται σε μικρότερα μόρια όπως σάκχαρα, λιπαρά οξέα, αμινοξέα και νερό.
- **Όξινη φάση ( Acidogenesis):** περαιτέρω διάσπαση αυτών των μικρότερων μορίων σε οργανικά οξέα, διοξείδιο του άνθρακα, υδρόθειο και αμμωνία.
- **Εστεροποίηση ( Acetogenesis):** τα προϊόντα της όξινης φάσης χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εστέρων, διοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνου.
- **Μεθανογένεση ( Methanogenesis):** από τα προϊόντα της εστεροποίησης παράγεται τελικά μεθάνιο, διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο.

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την αναερόβια αποδόμηση είναι οι εξής:

- **Θερμοκρασία.** Τα αναερόβια βακτήρια ή αλλιώς μεθανοβακτήρια ( methane formers) παρουσιάζουν ένα θερμοκρασιακό εύρος στο οποίο

είναι περισσότερο παραγωγικά. Οι διάφορες ομάδες βακτηρίων που λαμβάνουν χώρα στην αναερόβια αποδόμηση έχουν διαφορετικά επίπεδα άριστης θερμοκρασίας. Αυτό οδηγεί στη διάκριση δύο κύριων διακυμάνσεων θερμοκρασίας στις οποίες η χώνευση μπορεί να πραγματοποιηθεί βέλτιστα και οικονομικότερα. Αυτά τα επίπεδα είναι 25° – 38°C, μεσόφιλη ζώνη και 50° – 70°C, θερμόφιλη ζώνη. Η θερμόφιλη διαδικασία σε σχέση με τη μεσόφιλη, οδηγεί συνήθως σε μεγαλύτερη διάσπαση και γρηγορότερο ρυθμό εις βάρος μιας λιγότερο σταθερής διαδικασίας.

- **Οξύτητα.** Τα αναερόβια βακτήρια έχουν μια βέλτιστη οξύτητα στην οποία είναι παραγωγικότερα. Όπως και με τη θερμοκρασία, οι διαφορετικές ομάδες βακτηρίων δεν έχουν την ίδια βέλτιστη τιμή του pH. Η ιδανική οξύτητα για μεθανογένεση είναι να κυμαίνεται το pH μεταξύ του 6 και 8. Η πολυπλοκότητα του συστήματος αυξάνεται από το γεγονός ότι τα ενδιάμεσα προϊόντα της χώνευσης έχουν μια τάση να χαμηλώνουν το pH. Αυτό κάνει την εξισορρόπηση του pH ένα σημαντικό ζήτημα.
- **Χρόνος.** Όταν η αποδόμηση γίνεται στη μεσόφιλη ζώνη, ο χρόνος της χώνευσης είναι τουλάχιστο 15 – 30 ημέρες. Σε ψηλότερες θερμοκρασίες η αποδόμηση γίνεται ταχύτερα και απόδοση αυξάνεται. Η διεργασία της αναερόβιας αποδόμησης ευνοείται από υγρό, θερμό και σκοτεινό περιβάλλον.

#### **1.4 Σκοποί της πτυχιακής εργασίας**

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν πρώτα από όλα να ελέγξει τη δυνατότητα εφαρμογής μιας χαμηλού κόστους μεθόδου για την αναερόβια αποδόμηση του GA, μια πρότυπη φαινολική ένωση που εντοπίζεται συνήθως στα ΥΑΕ. Επίσης, να εκτιμήσει την ικανότητα των αναερόβιων μικροοργανισμών να αποσυνθέτουν το GA σε διάφορες συγκεντρώσεις.

## 2 ΥΛΙΚΑ

### *2.1 Σύντομη περιγραφή πειραματικής διαδικασίας.*

Στη μελέτη αυτή το GA επιλέχθηκε ως πρότυπη φαινολική ένωση των ΥΑΕ. Ελέγχθηκαν διαλύματα που περιείχαν GA σε συγκεντρώσεις των 100ppm, 500ppm και 1000ppm προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της συγκέντρωσης GA στην αποδόμησή του από αναερόβιους μικροοργανισμούς. Ιλύς μετά από αναερόβια επεξεργασία αστικών λυμάτων από τον βιολογικό οργανισμό Ηρακλείου Κρήτης παρείχε τους απαραίτητους αναερόβιους μικροοργανισμούς. Η δραστηριότητα των αναερόβιων μικροοργανισμών αξιολογήθηκε με τη χρήση μιας απλής οργανικής ένωσης της σουκρόζης, η οποία θεωρείται ως ένας από τους επονομαζόμενους παράγοντες αναερόβιας ανάπτυξης. Σε γυάλινες φιάλες των 250ml προστέθηκε συνολικός όγκος 155ml από κάθε μείγμα.

Για κάθε συγκέντρωση GA μελετήθηκαν τα ακόλουθα μείγματα: το μείγμα I, το οποίο περιείχε 155ml διαλύματος GA χωρίς λάσπη, το μείγμα II, το οποίο περιείχε 150ml διαλύματος GA + 5ml αναερόβια επεξεργασμένη ιλύς, το μείγμα III το οποίο περιείχε 150ml διαλύματος σουκρόζης 200ppm + 5ml ιλύς και το μείγμα IV, το οποίο περιείχε 150ml απιονισμένο νερό + 5ml ιλύς. Προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι στατιστικώς έγκυρα, κάθε δείγμα ελέγχθηκε δημιουργώντας έξι πανομοιότυπα δείγματα. Σε όλα τα μείγματα το pH διορθώθηκε σε μια τιμή μεταξύ 7,2 και 7,5 και προστέθηκε 1ml οξειδοαναγωγικού δείκτη, resazurin 1% για να παρατηρούνται αλλαγές στο pH. Ο resazurin είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος δείκτης για αναγωγικές συνθήκες.

Το σύστημα γίνεται άχρωμο σε κατάσταση αναγωγής, ενώ μεταβάλλεται από βιολετί σε πορτοκαλί/κόκκινο όταν αυτό γίνεται όξινο. Έπειτα οι φιάλες σφραγίστηκαν χρησιμοποιώντας ελαστικά πώματα. Με τη βοήθεια ενός

συστήματος βελόνας ( αιματολογική πεταλούδα) που χρησιμοποιείται για τη δειγματοληψία αίματος και τη χρήση πεπιεσμένου αερίου αζώτου, απομακρύνθηκε το οξυγόνο από τις φιάλες. Έχοντας δημιουργήσει αναερόβιες συνθήκες, οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε ένα υδατόλουτρο προκειμένου να ελέγχεται και να διατηρείται η θερμοκρασία του βιοαντιδραστήρα στους 35° C. Χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα βελόνας και μια γυάλινη σύριγγα των 20ml, καταγραφόταν ο όγκος των αερίων που παραγόταν καθημερινά για μια περίοδο 23 ημερών, μετά το πέρας της οποίας η παραγωγή όλων των μειγμάτων είχε σχεδόν σταματήσει.

## **2.2 Συσκευές και υλικά πειράματος.**

Για τη διεξαγωγή του συγκεκριμένου πειράματος χρησιμοποιήθηκε μια σειρά από συσκευές και υλικά που αναφέρονται παρακάτω.

- **Water bath ( θεرمόλουτρο):** πρόκειται για μεταλλική κατασκευή που περιέχει νερό και διαθέτει αυτόματο σύστημα για τη ρύθμιση και διατήρηση της θερμοκρασίας σε συγκεκριμένα επίπεδα. Στο θερμόλουτρο τοποθετούνται τα φιαλίδια έχοντας σταθερή θερμοκρασία 35°C σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος.
- **Αναλυτικός ζυγός:** για τη ζύγιση των χρησιμοποιούμενων ουσιών.
- **Μαγνητικός αναδευτήρας:** για την ομογενοποίηση των παρασκευαζόμενων διαλυμάτων.
- **Πεχάμετρο:** για τη μέτρηση και ρύθμιση του pH των διαλυμάτων.
- **Φιάλες:** γυάλινες φιάλες αντιδραστηρίων των 250ml με ανοιχτό λαιμό ( Εικ. 3).
- **Πώματα:** πλαστικά πώματα που εφαρμόζουν στις φιάλες, τις σφραγίζουν και τις στεγανοποιούν. Τα πώματα αυτά χρησιμοποιούνται μια μόνο φορά ( Εικ. 3).
- **Σύστημα βελόνας ( αιματολογική πεταλούδα):** αυτή είναι μόνιμα

τοποθετημένη πάνω στο πώμα και προσαρμοσμένη με ένα συνδετικό, (SCALP VEIN SET (Size: 21G).

- **Συνδετικό:** τύπου Luer Lock, με βανάκι που ανοίγει και κλείνει τη ροή, VYGON Lipid- Resistant 3 Way Stopcock ( Εικ. 3).
- **Σύριγγα:** γυάλινη σύριγγα τύπου Luer Lock των 20ml που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των παραγόμενων αερίων, GLASS VAN ( Hypodermic Syringe) Borosilacate Glass. Επίσης, χρησιμοποιείται και μια απλή πλαστική σύριγγα των 5ml για την προσθήκη της ιλύος στη φιάλη ( Εικ. 3).
- **Ιλύς ( λάσπη βιολογικού καθαρισμού):** ιλύς που προέρχεται από αστικά λύματα και έχει υποστεί αναερόβια επεξεργασία. Συλλέγεται από αντιδραστήρα του βιολογικού καθαρισμού Ηρακλείου.
- **Φαινολική ένωση:** υδατικά διαλύματα του Gallic acid ( GA) του οποίου η βιοαποδομισιμότητα ερευνάται, σε συγκεντρώσεις των 1000ppm, 500ppm και 100ppm.
- **Resazurin :** οξειδοαναγωγικός δείκτης. Μας χρησιμεύει στο να αντιληφθούμε οπτικά τις μεταβολές του pH. (7- Hydroxy- 3H- phenoxazin- 3 one 10 oxide), Sodium salt, (  $C_{12}H_6NO_4Na$ ), FW 251.2, Dye content approx. 91%, pH 3.8 ( orange) – pH 6.5 ( violet).
- **NaOH :** διάλυμα NaOH 0,1 N και 1 N για τη διόρθωση του pH.
- **N :** αέριο άζωτο 99,999% κ.ο καθαρότητα, για την απομάκρυνση του οξυγόνου από τις φιάλες και τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών.
- **Sucrose**



**Εικόνα 3** : Φιαλίδια, πώματα, συνδετικά, σύστημα βελόνας και σύριγγα.



## 3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 3.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Η φαινολική ένωση που επιλέχθηκε να ερευνηθεί στην παρούσα μελέτη είναι όπως έχει ήδη αναφερθεί το Gallic acid ( 3, 4, 5 – trihydroxybenzoic acid). Πρόκειται για ουσία που τη συναντούμε σε υγρά απόβλητα ( π.χ ελαιουργείων) και που δύσκολα αποδομείται. Παρασκευάστηκαν λοιπόν, υδατικά διαλύματα των 1000ppm, 500ppm και 100ppm GA. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν για να μελετηθεί και το κατά πόσο η συγκέντρωση του οξέος επηρεάζει την αποδόμηση. Επίσης, έγιναν και διαλύματα NaOH 0,1N και 1N, για τη διόρθωση του pH και διάλυμα σουκρόζης 200ppm που χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η δραστηκότητα των αναερόβιων μικροοργανισμών της ιλύος ( Εικ. 4).

Ακολούθησε η διόρθωση του pH για κάθε συγκέντρωση του GA, προσθέτοντας μερικές σταγόνες NaOH 1N ή 0,1N μέχρι το pH να γίνει 7 – 7,2. Πρέπει να σημειωθεί ότι η προσθήκη ιλύος που θα ακολουθήσει, δεν αλλάζει την οξύτητα γιατί το pH της κυμαίνεται γύρω στο 7 ( Εικ. 5).



**Εικόνα 4** : Υδατικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.



**Εικόνα 5**: Διόρθωση- ρύθμιση pH των διαλυμάτων.

### **3.2 Τοποθέτηση δειγμάτων**

Σε κάθε γυάλινο φιαλίδιο τοποθετήθηκαν 150ml GA 1000ppm, 5 ml ιλύος και 1-2 ml resazurin 1%. Το μείγμα αυτό όπως και τα υπόλοιπα που θα περιγραφούν έγιναν σε εξαπλή επανάληψη για να υπάρχει σύγκριση και εγκυρότητα στα αποτελέσματα. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα 500ppm και για τα 100ppm. Επιπλέον, σχηματίστηκαν και κάποια μείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως συγκριτικοί παράγοντες και αυτά είναι :

- δείγμα που περιείχε 150ml απιονισμένο νερό και 5ml ιλύος και
- δείγμα 150ml σουκρόζης 200ppm και 5ml ιλύος.

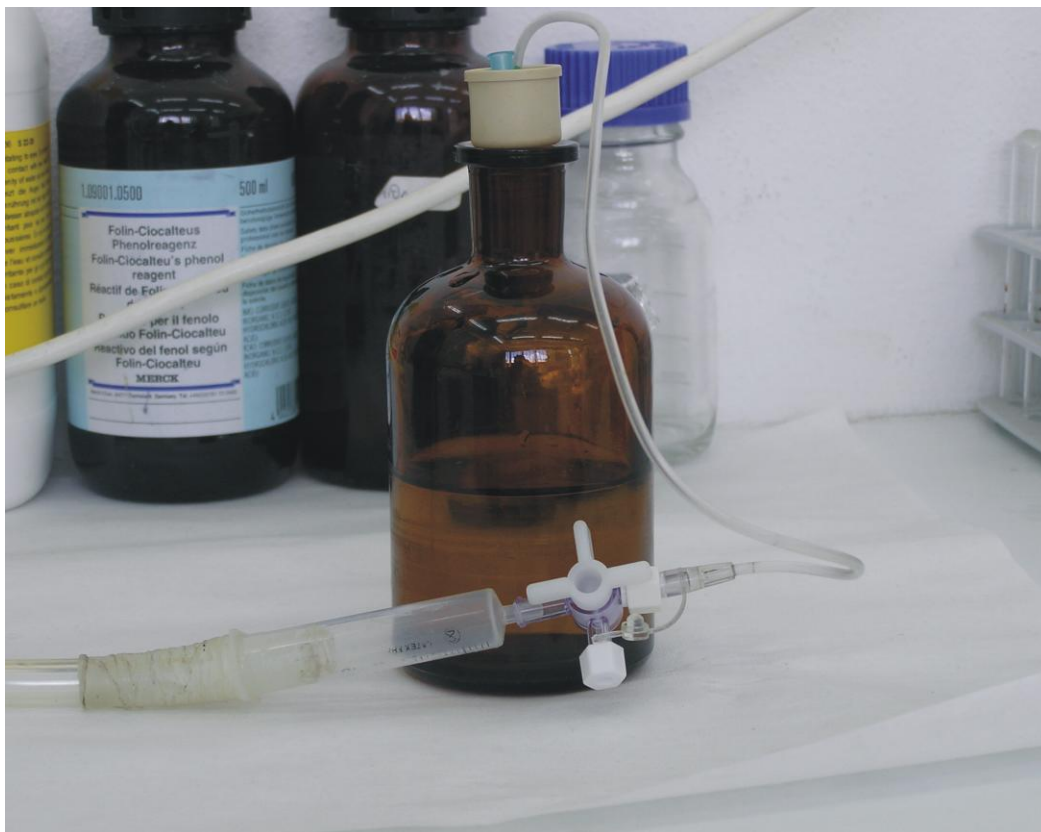
Αφού ετοιμάστηκαν όλα τα δείγματα, τα φιαλίδια σφραγίστηκαν με τα πλαστικά πώματα έτσι ώστε να εφαρμόζουν πλήρως. Πάνω σε αυτά, τρυπώντας τα, τοποθετήθηκε το σύστημα της βελόνας ( αιματολογική πεταλούδα) με το

συνδετικό που φέρει και το βανάκι για το άνοιγμα και κλείσιμο της ροής ( Εικ. 6).



**Εικόνα 6:** Δείγματα μόλις πριν εγκατασταθούν στο θεرمόλουτρο.

Επόμενο βήμα στην πειραματική διαδικασία είναι η δημιουργία ανοξικής ατμόσφαιρας στα φιαλίδια. Αυτό έγινε με τη χρήση αερίου αζώτου (N) σε πίεση περίπου 2 bar μέσω του συνδετικού. Η απομάκρυνση του οξυγόνου ολοκληρώνεται σε περίπου 3-4 λεπτά και όταν έχουμε την κατάλληλη ένδειξη από τη χρωστική που χρησιμοποιήθηκε για την ύπαρξη οξυγόνου ( Εικ. 7).



**Εικόνα 7:** Εφαρμογή αερίου N στο δείγμα για τη δημιουργία ανοξικής ατμόσφαιρας.

### ***3.3 Εγκατάσταση στο θερμόλουτρο (waterbath).***

Αρχικά ετοιμάστηκε η συσκευή, προσθέτοντας νερό ( κατά προτίμηση απιονισμένο για να αποφευχθεί η συσσώρευση αλάτων στη συσκευή) λιγότερο από το μισό της χωρητικότητάς του. Έπειτα η συσκευή τέθηκε σε λειτουργία. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε λίγο πάνω από τους 35°C. Όταν έφτασε στα επιθυμητά επίπεδα τοποθετήθηκαν μέσα στο θερμόλουτρο τα φιαλίδια ( Εικ. 8). Σημειώνεται ότι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας η θερμοκρασία ελεγχόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με εξωτερικό θερμόμετρο και γινόταν οι απαραίτητες ρυθμίσεις όταν χρειαζόταν.



Εικόνα 8: Εγκατάσταση των δειγμάτων στο θερμόλουτρο (waterbath).

### ***3.4 Τρόπος και συχνότητα μετρήσεων.***

Οι μετρήσεις γινόταν καθημερινά και την ίδια ώρα, με τη γυάλινη σύριγγα των 20ml, της οποίας το έμβολο έχουμε λιπάνει με κάποιο λιπαντικό (καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με το μαγειρικό λάδι). Η σύριγγα τοποθετείται σε μια υποδοχή του συνδετικού (βανάκι) κάνοντας μια ελαφριά συστροφή. Ανοίγουμε το βανάκι με τέτοιο τρόπο που να επιτρέπεται η διάχυση των αερίων από το φιαλίδιο στη σύριγγα. Στις πρώτες μετρήσεις πρέπει να κρατάμε το έμβολο της σύριγγας γιατί η πίεση των αερίων είναι μεγάλη και μπορεί να εκτιναχθεί το έμβολο και να σπάσει. Προσέχουμε όμως να μην ασκούμε πίεση. Αν η σύριγγα γεμίσει (20ml) και δεν έχει ολοκληρωθεί η μέτρηση (υπάρχουν

ακόμη αέρια στο μπουκάλι) κρατάμε το έμβολο με πίεση στην τελευταία ένδειξη, κλείνουμε τη ροή από το φιαλίδιο, αδειάζουμε τη σύριγγα και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία από την αρχή. Στις επόμενες μετρήσεις που η πίεση δεν είναι και τόσο μεγάλη για να πάρουμε ότι αέριο υπάρχει στο μπουκάλι, στροβιλίζουμε απαλά το έμβολο χωρίς να ασκούμε καμιά απολύτως πίεση. Η εφαρμογή ολοκληρώνεται όταν παίρνουμε μόνο μηδενικές μετρήσεις και αυτό συμβαίνει στις 23 περίπου ημέρες ( Εικ. 9).



**Εικόνα 9** : Δείγματα στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας.

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω, η γενική αντίδραση της υπό μελέτης φαινολικής ένωσης, ήταν θετική. Και οι τρεις συγκεντρώσεις των δειγμάτων, GA (100ppm, 500ppm, 1000ppm) και λάσπης, παράγαγαν μεγάλες ποσότητες αερίων, οι αθροιστικές τιμές των οποίων για την περίοδο των 23 ημερών φαίνεται στον Πίνακα 1. Είναι εμφανές ότι καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση του GA, αυξήθηκε και ο όγκος των παραγόμενων αερίων, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί που είναι παρόντες στην λάσπη έχουν την ικανότητα να βιοδιασπούν το GA. Ειδικότερα, όταν χρησιμοποιήθηκαν 1000ppm GA με λάσπη, η μέση τιμή ( των έξι πανομοιότυπων δειγμάτων) του αθροιστικού όγκου αερίων που συλλέχθηκαν ήταν  $87,6 \pm 2,4$  ml, ενώ όταν δεν προστέθηκε καθόλου λάσπη ο όγκος των αερίων ήταν  $9,3 \pm 1$  ml. Οι αντίστοιχες τιμές για τα 500ppm GA ήταν  $48,0 \pm 8,0$  ml όταν χρησιμοποιήθηκε λάσπη και  $6,5 \pm 1.0$  ml χωρίς την παρουσία ιλύος, ενώ για τα 100ppm GA ήταν  $30.8 \pm 4,7$  ml και  $9,6 \pm 2,3$  ml αντίστοιχα. Η ιλύς που αναμείχθηκε με απιονισμένο νερό παράγαγε  $13,6 \pm 5,1$  ml, ενώ το διάλυμα που περιείχε 200ppm σουκρόζης και λάσπη παράγαγε  $34,1 \pm 2,7$  ml.

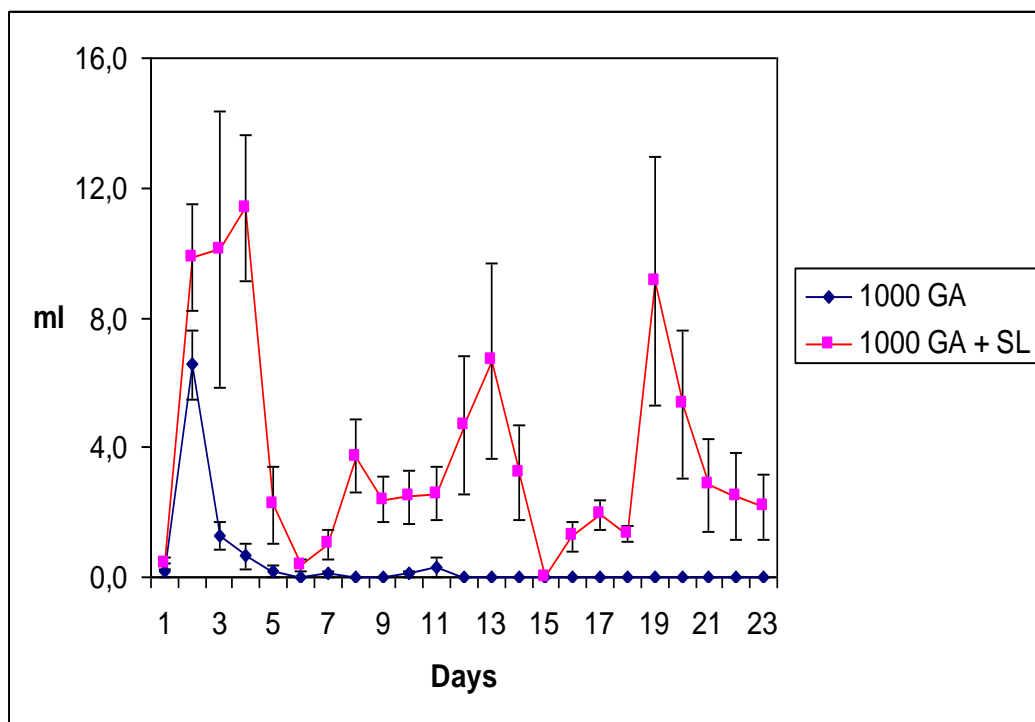


**Πίνακας 1:** Μέση τιμή ( των έξι πανομοιότυπων δειγμάτων) του αθροιστικού όγκου αερίων που παρήχθησαν από τα διαφορετικά μείγματα GA, σουκρόζης και νερού υπολογισμένα σε μια περίοδο 23 ημερών.

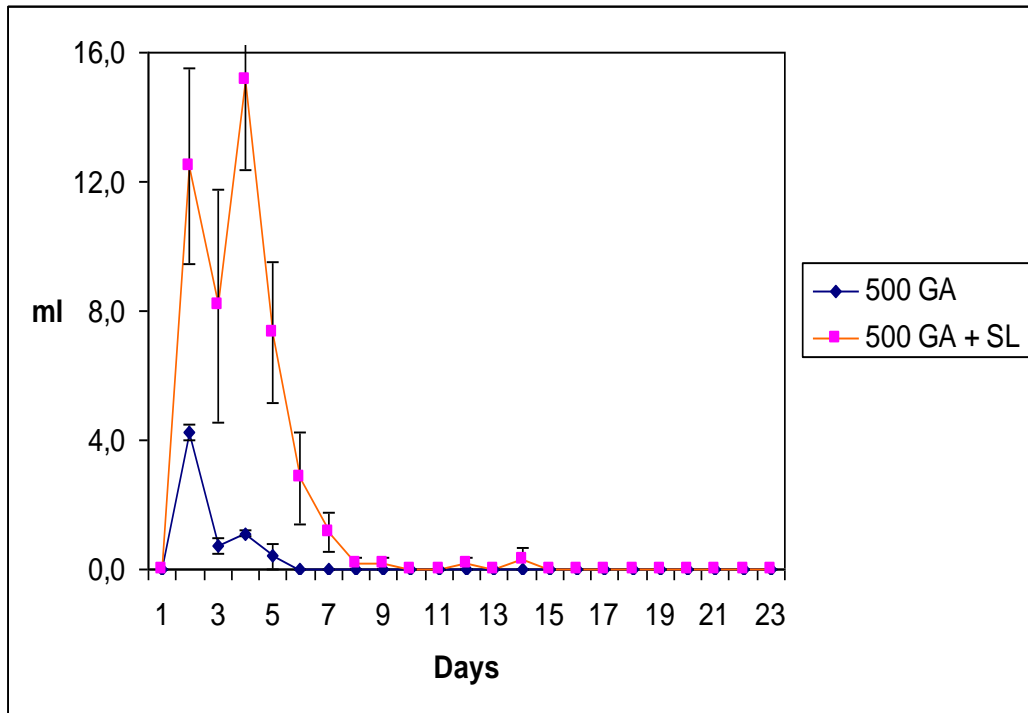
<b>Ουσία</b>	<b>Με ιλύ (ml αερίου = SE)</b>	<b>Χωρίς λάσπη (ml αερίου = SE)</b>
1000ppm GA	87,6 ± 2,4	9,3 ± 1,0
500ppm GA	48,0 ± 8,0	6,5 ± 1,0
100ppm GA	30,8 ± 4,7	9,6 ± 2,3
Μόνο απιονισμένο νερό	3,6 ± 5,1	-
200ppm σουκρόζη	34,1 ± 2,7	-

Η παραγωγή αερίων της αναερόβιας επεξεργασμένης ιλύος με απιονισμένο νερό ( και στα έξι δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ως συγκριτικοί παράγοντες), δείχνει ότι η ιλύς ήταν ένα υπόστρωμα πλούσιο σε αναερόβιους μικροοργανισμούς, το οποίο παρείχε επίσης και τα θρεπτικά συστατικά που έλειπαν από το σύστημα χώνευσης. Αυτές οι πολύ καλές συνθήκες που επικρατούσαν στο σύστημα χώνευσης, είχαν ως αποτέλεσμα και στις τρεις συγκεντρώσεις (1000ppm, 500ppm, 100ppm) GA να παράγονται καθημερινά μεγάλα ποσά αερίων συγκριτικά με τα μείγματα στα οποία δεν προστέθηκε καθόλου λάσπη. Οι Εικόνες 10-12 απεικονίζουν το προφίλ της ημερήσιας παραγωγής αερίου σε σχέση με το χρόνο για τις τρεις συγκεντρώσεις GA των 1000ppm, 500ppm και 100ppm αντίστοιχα. Αν η μέση παραγωγή αερίων που καταγράφηκε στα δείγματα που υπήρχε μόνο νερό και λάσπη ( δηλαδή 13,6 ml), αφαιρεθεί από τις αντίστοιχες τιμές των μειγμάτων GA/λάσπης, τότε οι καθαρές τιμές παραγωγής αερίων (δηλαδή αυτές που αντιστοιχούν στην παραγωγή αερίου που προέρχεται αποκλειστικά από την αποδόμηση του GA), για τα μείγματα με συγκέντρωση

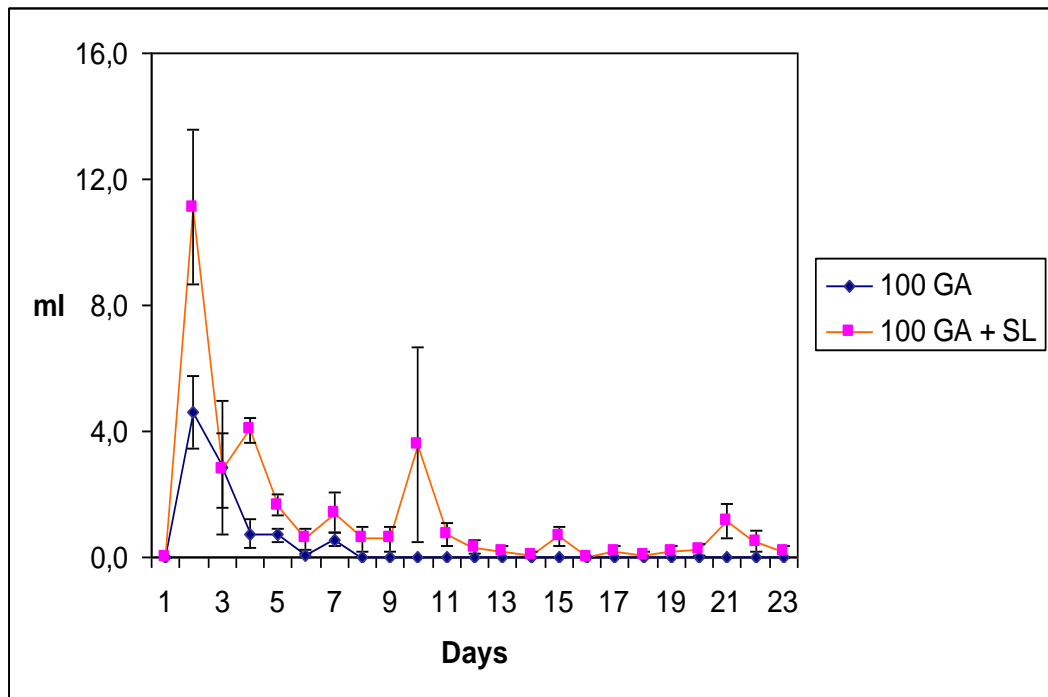
1000, 500, 100 ppm είναι 74,0, 34,4 και 17,2 ml αντίστοιχα, είναι πολύ μεγαλύτερες από τους όγκους που μετρήθηκαν στα μείγματα που δεν περιείχαν λάσπη ( Πίνακας 1).



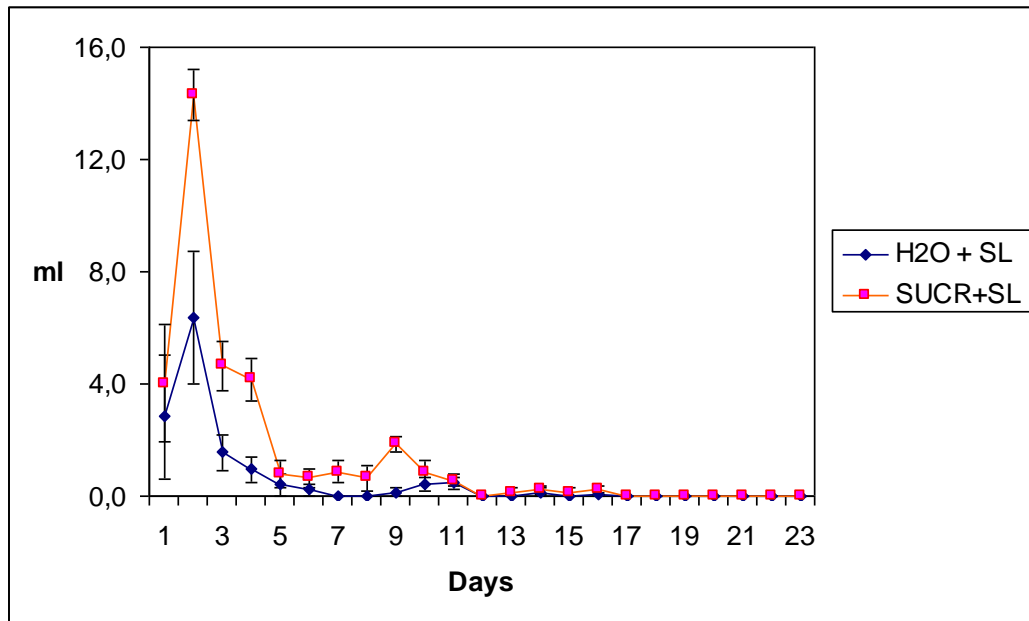
**Εικόνα 10:** Μέση ημερήσια παραγωγή αερίων(και των έξι πανομοιότυπων δειγμάτων) από τα μείγματα των 1000ppm GA, με και χωρίς λάσπη.



**Εικόνα 11:** Μέση ημερήσια παραγωγή αερίων(και των έξι πανομοιότυπων δειγμάτων) από τα μείγματα των 500ppm GA, με και χωρίς λάσπη.



**Εικόνα 12:** Μέση ημερήσια παραγωγή αερίων(και των έξι πανομοιότυπων δειγμάτων) από τα μείγματα των 100ppm GA, με και χωρίς λάσπη.



**Εικόνα 13:** Μέση ημερήσια παραγωγή αερίων(και των έξι πανομοιότυπων δειγμάτων) από τα μείγματα απιονισμένου νερού-λάσπης και σουκρόζης-λάσπης.

Επίσης, σύμφωνα και με προηγούμενες μελέτες, τα μείγματα GA επέδειξαν μια καθυστέρηση στην παραγωγή αερίων συγκριτικά με το μείγμα σουκρόζης και το μείγμα απιονισμένου νερού. Στις Εικόνες 10-12 (με ή χωρίς λάσπη) παρουσιάζεται πολύ χαμηλή ( μείγμα των 1000ppm) ή ακόμα και μηδενική (τα μείγματα των 500ppm και 100ppm) παραγωγή αερίων κατά τη διάρκεια του πρώτου 24ωρου, ενώ όπως φαίνεται στην Εικόνα 13, το μείγμα σουκρόζης παρουσιάζει μια μέση τιμή  $4,0 \pm 2,1$  ml. Ακόμα και όταν αναμείχθηκαν 5 ml ιλύος με νερό, παρήχθησαν  $2,28 \pm 2,2$  ml αερίων (τα δεδομένα φαίνονται και στην Εικόνα 13). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν πλήρως με τη μελέτη των Bojja et al., FitzGibbon and Mousa and Forster, οι οποίοι παραθέτουν ότι το GA είναι δύσκολο να αποδομηθεί αναερόβια σε χρόνους κάτω των 24 ωρών. Εντούτοις, 48 ώρες μετά την εγκατάσταση, και τα τρία μείγματα του GA παρήγαγαν σημαντικές ποσότητες αερίων, αποδεικνύοντας ότι αν δοθεί επαρκής χρόνος στο σύστημα χώνευσης, το GA μπορεί να αποδομηθεί από τους αναερόβιους μικροοργανισμούς, υπερβαίνοντας με αυτόν τον τρόπο την ανασταλτική του

επίδραση που έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία.

Το τελευταίο επιχείρημα ενισχύεται περισσότερο από το γεγονός ότι ακόμα και στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (1000ppm), το GA συνεχίζει να παράγει σημαντικά ποσά αερίου, γεγονός που σημαίνει και πάλι ότι δεν υπάρχει ένδειξη τοξικής επίδρασης του GA στους αναερόβιους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στη λάσπη. Απεναντίας, όταν το GA εκτέθηκε σε αυτούς τους μικροοργανισμούς για μεγάλο χρονικό διάστημα παρουσίασε πολύ καλή συμπεριφορά αποδόμησης, παράγοντας σχεδόν συνεχώς αέρια σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής δοκιμής. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, προτείνεται ότι το GA μπορεί να αποδομηθεί υπό αναερόβιες συνθήκες ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις εάν παρέχεται επαρκής χρόνος στο σύστημα χώνευσης και αν διατίθεται η κατάλληλη μικροβιακή ποικιλία. Αυτά τα ευρήματα βρίσκονται σε συμφωνία με τους FitzGibbon et al. και τους Borja et al., οι οποίοι έδειξαν ότι ο ρυθμός ανάπτυξης του μύκητα *Geotrichum candidum* δεν επηρεάστηκε από το GA, ενώ η ανάπτυξη άλλων μυκήτων αναστάλθηκε. Η αναερόβια επεξεργασμένη ιλύς μπορεί να θεωρηθεί ως ένα καλό μικροβιακό υπόστρωμα χάρη στην τεράστια ποικιλία και τον τεράστιο αριθμό μικροοργανισμών που περιέχονται σ' αυτή.

Το GA, είναι ένα καρβοξυλιωμένο, υδροξυλικό παράγωγο αρωματικών υδρογονανθράκων που μπορεί να υδρολυθεί σε θερμό νερό. Με τη βοήθεια της θερμότητας μπορεί να αποδομηθεί δίνοντας διοξείδιο του άνθρακα και το υψηλά αναγωγικό μόριο 1,2,3-τριυδροξυ βενζένιο (αναφέρεται επίσης και ως πυρογαλλόλη ( $C_6H_3(OH)_3$ )), σύμφωνα με την αντίδραση  $C_6H_2(OH)_3COOH + \text{θερμότητα} \rightarrow C_6H_3(OH)_3 + CO_2$ . Η πυρογαλλόλη είναι μια υψηλή αναγωγική ένωση η οποία τείνει να αποτρέπει τη ζύμωση των σύνθετων υδατανθράκων σε απλά σάκχαρα. Έχοντας αυτές τις ιδιότητες του GA υπόψη, η χαμηλή απόδοση από την αναερόβια βιοαποδόμηση των μειγμάτων GA και ιλύος, κατά τη διάρκεια του πρώτου 24ώρου της ζύμωσης, μπορεί να αποδοθεί σε μερικά διαλυτά μόρια που προκύπτουν από την αρχική αποδόμηση του GA (μετατροπή σε  $C_6H_3(OH)_3$ ) ή σε ένα σύμπλεγμα λιπιδίων στην λάσπη το οποίο δυσκολεύει και είναι ανασταλτικό για τους υδρολυτικούς αναερόβιους μικροοργανισμούς. Επιπλέον φαίνεται ότι η καθυστέρηση που παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια του πρώτου 24ώρου της χώνευσης και αναφέρθηκε προηγούμενα και από αρκετούς άλλους

συγγραφείς μπορεί να σχετίζεται με τα υδρολυτικά βακτήρια. Τέτοιου τύπου βακτήρια εκκρίνουν ορισμένα εξωκυτταρικά ένζυμα, με τη βοήθεια των οποίων οι διάφορες ενώσεις στο σύστημα χώνευσης αποδομούνται και υγροποιούνται. Κατά τη μελέτη της αποδόμησης του GA ( μαζί με την λάσπη από τα αστικά λύματα), η υγροποίηση πολύπλοκων πολυμερών ουσιών μπορεί να αποτελεί το στάδιο περιορισμού του ρυθμού και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη. Στην περίπτωση αυτή, η υδρόληση αναμένεται να παρεμποδιστεί περισσότερο από το GA. Οι ενζυματικές αντιδράσεις που εμπλέκουν ενζυμική απενεργοποίηση υποδηλώνουν την εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού υδρόλησης από διάφορες παραμέτρους όπως το pH, το υπόστρωμα και το χρόνο της χώνευσης. Υπάρχει η άποψη, για την αύξηση του ρυθμού υδρόλησης σε αυξανόμενη βιοαποδόμηση, ότι ο ρυθμός υδρόλυσης του οργανικού κλάσματος καθορίζεται από την προσρόφηση των υδρολυτικών ενζύμων στις βιοαποδομήσιμες επιφάνειες. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την προσθήκη σύνθετων ενζύμων προκειμένου να βελτιωθεί η απόδοση της αναερόβιας χώνευσης από την αναερόβια επεξεργασμένη ιλύ.

Μπορεί να θεωρηθεί ότι η αναερόβια επεξεργασμένη ιλύς που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι ένα τέλειο μικροβιακό υπόστρωμα χάρη στην τεράστια ποικιλία της μικροβιακής του βιομάζας, αλλά το μειονέκτημά της είναι ότι περιέχει επίσης, σύνθετα οργανικά μόρια τα οποία συμβάλλουν στην ανασταλτική δράση του GA. Η εργασία αυτή έδειξε ότι όντως λαμβάνει χώρα αποδόμηση με την προϋπόθεση ότι δίνεται στο σύστημα μια χρονική περίοδος μεγαλύτερη των 24 ωρών ώστε να ρυθμιστεί.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα συμπληρωματικό υπόστρωμα βελτιώνει τη χώνευση και συνεπώς τα επίπεδα βιοαερίων, ως συνέπεια της θετικής συνεργιστικής δράσης που επιτυγχάνεται στο μέσο χώνευσης αλλά και στην παροχή των θρεπτικών συστατικών που λείπουν από το συμπληρωματικό υπόστρωμα. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την αύξηση του αερίου που παράγεται όταν η σουκρόζη αναμιγνύεται με τη λάσπη. Η ίδια εξήγηση μπορεί να δοθεί και στην περίπτωση της αντίθετης δράσης της γλυκόζης από την ανασταλτική δράση του GA που αναφέρθηκε από τους Mousa and Forster. Η γλυκόζη, είναι ένα εύκολα αποδομήσιμο οργανικό μόριο, δρα ως πηγή ενέργειας για τους

μικροοργανισμούς, προωθώντας την ανάπτυξη των κυτταρικών ιστών τους με αποτέλεσμα την αύξηση της μικροβιακής βιομάζας. Για το λόγο αυτό πιθανολογείται ότι η προσθήκη γλυκόζης επηρεάζει τη μικροβιακή έκκριση εξοκυτταρικών ενζύμων τα οποία αποδομούν τις φαινολικές ενώσεις πιο δραστικά.

Όσον αφορά στο τρίτο στάδιο του μηχανισμού της χώνευσης, τη μεθανογένεση, πρέπει να αναφερθεί ότι η διαδικασία στηρίζεται σε υποχρεωτικά αναερόβια μικρόβια, των οποίων ο συνολικός ρυθμός ανάπτυξης είναι πιο αργός από των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνα για τα προηγούμενα στάδια ( υδρόλυση και ακετογένεση). Οι φαινολικές ενώσεις που συνδέονται με σύνθετα λιπίδια στην λάσπη είναι πολύ σταθερές και ισχυρά παρεμποδιστικές για τη μεθανογένεση. Εντούτοις, οι τοξικές φαινολικές ενώσεις μπορούν να αποδομηθούν αποτελεσματικά από τις βακτηριακές βιομάζες. Στη λειτουργία αυτή σημαντικό ρόλο εκτιμάται ότι παίζουν ορισμένα ένζυμα.

Συσχετίζοντας την πορεία εξέλιξης των παραγόμενων αερίων με το χρόνο, για τις συγκεντρώσεις των 1000ppm και 100ppm μειγμάτων GA, παρατηρήθηκε ότι παρουσίασαν μια σχεδόν παράλληλη συμπεριφορά. Γενικά, υπήρξαν έξι κύριες κορυφώσεις στη διάρκεια των 23 ημερών. Οι δυο πρώτες κορυφώσεις ( κοινές για όλα δείγματα της διαδικασίας) σημειώθηκαν τη δεύτερη και τέταρτη ημέρα, πιθανώς ως αποτέλεσμα της πρωτογενούς αποσύνθεσης και των δύο υποστρωμάτων ( GA και σουκρόζης) και των υπολοίπων ενώσεων που υπάρχουν στη λάσπη. Είναι πιθανό ότι στο στάδιο αυτό το κυρίαρχο αέριο που παράγεται στα μείγματα του GA και ιλύος να είναι CO<sub>2</sub>. Μια πιθανή εξήγηση αυτής της υπόθεσης είναι ότι, καθώς αποσυντίθενται οι εύκολα αποδομήσιμες ουσίες στη λάσπη, παρέχουν και τα απαραίτητα ένζυμα για την υδρόλυση και την ακετογένεση του ανθεκτικού GA στο μείγμα. Καταγράφηκε μια τρίτη κορυφή ( για τα μείγματα των 1000ppm και 100ppm GA και σουκρόζης) μεταξύ της όγδοης και δέκατης ημέρας, πιθανώς κυρίως λόγω του μεθανίου (CH<sub>4</sub>) που παράχθηκε από τις αποδομήσιμες ενώσεις στη λάσπη και από τα υποπροϊόντα (δηλαδή CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>) του δεύτερου σταδίου της χώνευσης ( ακετογένεση) του GA.

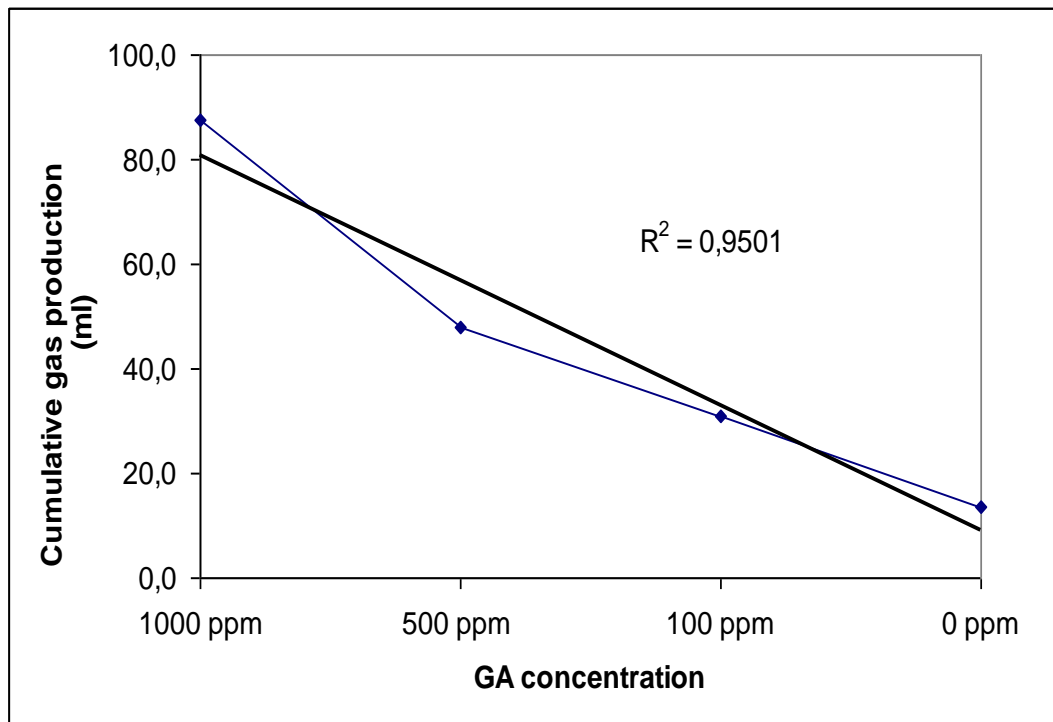
Η καθυστερημένη μεθανογένεση του GA μπορεί να συνδέεται με τα μεθανογενή



βακτήρια, τα οποία μπορεί να ελαττώνονται από το πολύπλοκο υπόστρωμα του συστήματος χώνευσης GA-ιλύς αλλά και από την πτώση του pH από την ακετογένεση, η οποία έχει πιθανώς ξεκινήσει από τη δεύτερη μέρα. Οι παραπάνω υποθέσεις συμφωνούν επαρκώς με τις μεταβολές του χρώματος που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, με τη χρήση του δείκτη resazurin, το οποίο μεταβάλλεται από βιολετί σε πορτοκαλί/ κόκκινο την δεύτερη μέρα, επιβεβαιώνοντας την αργή πτώση του pH καθώς η χώνευση προχωράει από το στάδιο της υδρόλυσης στο στάδιο της ακετογένεσης. Καθώς το πείραμα συνεχίστηκε (από 13η μέρα στην 21η μέρα) το χρώμα μεταβλήθηκε πάλι σε κόκκινο/βιολετί, μια ένδειξη ότι η οξεογένεση επικαλύφθηκε αποτελεσματικά από την παραγωγή  $\text{CH}_4$ . Ήταν φανερό ότι το χρώμα των μειγμάτων GA χωρίς την προσθήκη λάσπης παρέμεινε βιολετί, γεγονός που δείχνει ότι δεν έλαβε χώρα σχεδόν καθόλου αποδόμηση απουσία των μικροοργανισμών.

Η Εικόνα 14 παρουσιάζει τη συσχέτιση της αθροιστικής παραγωγής αερίων σε σχέση με τη συγκέντρωση του GA. Όπως είναι εμφανές, υπάρχει μια σχεδόν γραμμική σχέση μεταξύ της παραγωγής αερίου και της συγκέντρωσης υποστρώματος (συντελεστής συσχέτισης  $r^2 = 0,95$ ). Η σχέση αυτή είναι πολύ σημαντική για τον κατάλληλο σχεδιασμό και λειτουργία ενός αναερόβιου συστήματος χώνευσης που επεξεργάζεται ΥΑΕ, καθώς θα επιτρέψει τον καθορισμό της αναμενόμενης παραγωγής αερίων σε σχέση με τη συγκέντρωση της φαινόλης.

Όλες οι δοκιμές διεξήχθησαν στους  $35^\circ\text{C}$ , δηλαδή εντός του μεσοφιλικού εύρους. Φυσικά, υψηλότερες θερμοκρασίες ( εντός του θερμοφιλικού εύρους) θα είχαν οδηγήσει σε αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας και συνεπώς τους ρυθμούς αποσύνθεσης και παραγωγής αερίων. Ωστόσο, δεν ήταν σκοπός της παρούσας εργασίας να επιταχύνει τους ρυθμούς αποδόμησης, αλλά να ελέγξει την εφαρμοσιμότητα μιας απλής, χαμηλού κόστους μεθόδου για την αποδόμηση δύσκολα αποδομήσιμων ενώσεων στα ΥΑΕ από αναερόβιους μικροοργανισμούς που υπάρχουν σε αστικά υγρά απόβλητα.



**Εικόνα 14:** Γραμμική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ συγκέντρωσης GA και παραγωγής αερίων.

Είναι ενδιαφέρον ότι, η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αποκτήθηκαν από την εργασία αυτή έδειξαν ότι, παρά την ετερογένεια της ιλύος που χρησιμοποιήθηκε ως πηγή μικροβιακής βιομάζας και τη συνολική πολυπλοκότητα του συστήματος που χρησιμοποιήθηκε, τα αποτελέσματα ήταν εντός των ορίων εμπιστοσύνης 92-95%. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η μέθοδος ήταν καλά εφαρμόσιμη για την εργασία αυτή, ενώ το σύστημα μπορούσε να αναπαραχθεί και να λειτουργήσει ικανοποιητικά, δηλαδή το βιοχημικό κομμάτι που κατέχει σημαντικό ρόλο σε όλη τη διαδικασία, ελέγχεται και ρυθμίζεται από τους διάφορους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν, δρουν και αντιδρούν.

Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι δεν έγινε καμιά απόπειρα να προσδιοριστεί η σύνθεση των βιοαερίων που παρήχθησαν κατά τη διάρκεια της συνολικής πειραματικής διαδικασίας. Διαφορετικά αέρια θα πρέπει να παρήχθησαν, δηλαδή α) πτητικά λιπαρά οξέα (VFA's) που προέρχονται από πρωτεΐνες, λίπη και

υδατάνθρακες από τη λάσπη στο στάδιο της υδρόλυσης, β)  $\text{CO}_2$  και  $\text{H}_2$  από το στάδιο της ακετογένεσης και γ)  $\text{CH}_4$  και  $\text{CO}_2$  από το στάδιο της μεθανογένεσης. Επιπρόσθετες πληροφορίες για τη σύνθεση της αέριας φάσης θα δώσουν μια καλύτερη άποψη για τη διαδικασία της βιοαποδόμησης, δηλαδή για το ποιά αέρια παράγονται, σε τι αναλογίες του συνολικού όγκου αερίων και από ποιους συγκεκριμένους μηχανισμούς.

## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βιομηχανία εξαγωγής ελαιολάδου παράγει τοξικά απόβλητα τα οποία συχνά αποθηκεύονται σε ανοιχτούς λάκκους ή δεξαμενές εξάτμισης. Ωστόσο, εξαιτίας του μεγάλου όγκου και του υψηλού μολυσματικού δυναμικού αυτών των πλούσιων σε φαινόλες αποβλήτων, η ανάπτυξη μιας χαμηλού κόστους και αποτελεσματικής επεξεργασίας βιοαποδόμησης αποτελεί μια ελκυστική προσέγγιση για τις βιομηχανικές ανάγκες των μονάδων επεξεργασίας ΥΑΕ. Οι φαινολικές ενώσεις που συνδέονται με τα πολύπλοκα λιπίδια των ΥΑΕ, είναι πολύ σταθερές και ισχυρά ανασταλτικές για τη μεθανογένεση, ως αποτέλεσμα της αντιμικροβιακής δράσης τους ( εξαιτίας των μορίων του οργανικού οξέος αλλά και του χαμηλού pH).

Στην παρούσα εργασία η αποτελεσματικότητα των αναερόβιων μικροοργανισμών να αποδομήσουν το gallic acid εκτιμήθηκε με την παραγωγή του βιοαερίου, βασίστηκε δηλαδή στους όγκους των αερίων που παρήχθησαν. Εφαρμόζοντας την ποσοτική, χαμηλού κόστους μέθοδο που προτείνεται από τους Miller and Wolin, σε αυτή τη μελέτη αξιολογήθηκε η επίδρασή της στην αποδόμηση του gallic acid. Επίσης, έγινε σχολιασμός των αποτελεσμάτων. Τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν δείχνουν ότι α) η τεχνική μπορεί να δώσει πολύ χρήσιμες πληροφορίες για την αναερόβια βιοαποδόμηση των φαινολικών ενώσεων, ειδικότερα αν συνδυαστεί με χρωματογραφία αερίων για την ποιοτική ανάλυση των παραγόμενων αερίων, β) το gallic acid αποδομείται εύκολα κάτω από αναερόβιες συνθήκες, προτείνοντας ότι η αναερόβια χώνευση θα μπορούσε να αποτελέσει πιθανή λύση στην επεξεργασία των ΥΑΕ και γ) απαιτείται παρατεταμένος χρόνος ( μερικών ημερών) για την αποδόμηση του GA αλλά και άλλων παρόμοιων ενώσεων.

# BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Miller T. and Wolin M, 1974. Serum bottle modification of Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology* 27 (5): 985-987.
- Bajwa HS and Forster CF, 1988. The inhibition of anaerobic processes by vegetable tanning agents. *Environ.Technol.Letters* 9: 1349-1360.
- Costello DJ, Greenfield PF and Lee PL, 1991. Dynamic modeling of a single-state high-rate anaerobic reactor. I Model derivation. *Water Res* 25 (7) : 847-855.
- Borja R, Martin A, Maestro R, Alba JA and Fiestas JA, 1992. Enhancement of the anaerobic-digestion of olive mill wastewater by removal of phenolic inhibitors. *Process Biochem*, 27: 231-237.
- Borja R, Martin A, Maestro R, Luque M and Duran M, Batt, Chris, 1993. Enhancement of the anaerobic-digestion of wine distillery wastewater by the removal of phenolic inhibitors. *Bioresource Technology* 45 (2): 99-104.
- FitzGibbon F, Singh D, McMullan G and Marchant R., 1998. The effect of phenolic acids and molasses spent wash concentration on distillery wastewater remediation by fungi. *Process Biochemistry* 33 (8): 799-803.
- Mousa L, Forster CF., 1998. The effect of trace organics on the inhibition of gas production by anaerobic sludges. Batch studies. *Water research* 32 (12): 3795-3798.
- Veeken AHM and Hamelers BVM, 1999. Effect of temperature on hydrolysis rates of selected biowaste components. *Bioresource Technol.* 69 (3): 249-254.
- Mousa L and Forster CF, 1999. The use of glucose as a growth factor to counteract inhibition in anaerobic digestion. *Process Safety And Environmental Protection* 77 (B4): 193-198.
- Robles A, Lucas R, Alvarez de Cienfuegos G Galvez A, 2000. Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewaters disposal ponds. *Bioresource Technology* 74: 217-221.
- Mata-Alvarez J, Mace S and Labres P, 2000. Anaerobic digestion of organic solid

wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology* 74: 3-16.

Evans GM and Furlong JC, 2003. *Environmental biotechnology. Theory and Application*. Wiley.

Manios T., 2004. The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete. *Environment International*, 29 (8): 1079-1089.

Tchobanoglous G, Theisen H, Vigil SA, *Integrated Solid Waste Management*. MC Craw Hill 3.