

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΚΑΙ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:
«ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**«ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΟΥ
ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟΥ ΜΕ
ΒΑΣΗ ΤΟΥΣ ΜΥΚΗΤΕΣ ΛΕΥΚΗΣ ΣΗΨΗΣ»**

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΙΔΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

Τριμελής Επιτροπή: Λυμπεράτος Γεράσιμος
Στεφάνου Ευρυπίδης
Περγαντής Σπύρος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ-ΙΟΥΛΙΟΣ 2006

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ολοκληρώνοντας αισίως την μεταπτυχιακή μου διατριβή και ανατρέχοντας στα δύομιση τελευταία και δημιουργικά χρόνια της ζωής μου, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά όλους τους ανθρώπους που βρέθηκαν δίπλα μου και με στήριξαν, σε αυτά τα χρόνια σκληρής δουλειάς.

Θεωρώ τον εαυτό μου ιδιαίτερα τυχερό για την ευκαιρία που μου δόθηκε να συνεργαστώ με καθηγητές αξιόλογους, με μακρόχρονη και ουσιαστική πείρα. Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Γεράσιμο Λυμπεράτο (Επιβλέπων Καθηγητής, καθηγητής Βιοχημικής Μηχανικής) του οποίου η πολύχρονη εμπειρία ήταν ιδιαίτερα καθοριστική για την πορεία και την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής. Θέλω ακόμα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κ. Ευριπίδη Στεφάνου (Καθηγητής Περιβαλλοντικής Οργανικής Χημείας και Πρόεδρος του Μεταπτυχιακού Προγράμματος) και τον κ. Σπύρο Περγαντή (Βοηθός Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας), για την όμορφη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Χημείας του Ηρακλείου Κρήτης.

Ιδιαίτερα σημαντική και ξεχωριστή για εμένα ήταν η συνεργασία που είχα όλο αυτό το διάστημα με τη μεταδιδακτορικό συνεργάτη Κατερίνα Σταματελάτου, της οποίας η βοήθεια αποδείχτηκε πολύτιμη για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μιχάλη Κορνάρο (Λέκτορας) για τις ουσιαστικές υποδείξεις του κατά την περίοδο της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλους τους σπουδαστές του Εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του τμήματος Χημικών Μηχανικών της Πάτρας, με μερικούς από τους οποίους ανέπτυξα μια όμορφη φιλία, για την ζεστή φιλοξενία και για το ενδιαφέρον που έδειξαν σε αυτή την

προσπάθειά μου. Επίσης, μια όμορφη φιλία ανέπτυξα και με την συμφοιτήριά μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Επιστήμες και Μηχανική Περιβάλλοντος», Βάσω Ατσάρου την οποία θέλω να την ευχαριστήσω θερμά.

Ξεχωριστά θέλω να ευχαριστήσω τον Μπάμπη Κάλφα (Υποψήφιο Διδάκτορα του τμήματος Χημικών Μηχανικών), έναν άνθρωπο σημαντικό για μένα με τον οποίο ανέπτυξα μια ιδιαίτερη σχέση, που στάθηκε δίπλα μου και με υποστήριξε τόσο ηθικά όσο και επιστημονικά στις δύσκολες στιγμές της μεταπτυχιακής μου πορείας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της οικογένειάς μου για τη δική τους ξεχωριστή και αμέριστη συμπαράσταση, που πραγματικά αποδείχτηκε ουσιαστική στην περάτωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Γενικά	1
1.2	Επεξεργασία ελαιόλαδου-Τύποι ελαιουργείων	2
1.3	Υγρά απόβλητα ελαιουργείου	8
1.4	Περιβαλλοντικά προβλήματα από την ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων των ελαιουργείων	10
1.5	Μέθοδοι διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων	14
1.6	Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής	21
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	24

2.1	Εισαγωγή	24
2.2	Αναλυτικές μέθοδοι	24
2.2.1	Γενικά	24
2.2.2	Μέτρηση pH	25
2.2.3	Προσδιορισμός ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών	25
2.2.4	Προσδιορισμός ολικού και διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ)	26
2.2.5	Μέτρηση συγκέντρωσης φαινολικών	27
2.2.6	Μέτρηση παραγωγής και σύστασης βιοαερίου	28
2.2.6.1	Ογκομετρική παραγωγή βιοαερίου	28
2.2.6.2	Σύσταση βιοαερίου	28
2.3	Χαρακτηρισμός του υγρού αποβλήτου ελαιουργείου	30
2.3.1	Γενικά	30
2.3.2	Πειραματική διαδικασία	30
2.3.3	Αποτελέσματα	31
2.3.4	Συμπέρασμα	32
2.4	Διαδικασία για την εκτέλεση του πειράματος για τον προσδιορισμό του Βιοχημικά Μεθανογόνου Δυναμικού (Biochemical Methane Potential, BMP)	33
2.4.1	Γενικά	33
2.4.2	Πειραματική διαδικασία	33
3.	ΧΡΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΛΕΥΚΗΣ ΣΗΨΗΣ ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ	36
3.1	Εισαγωγή	36
3.2	Οι μύκητες ως συντελεστές αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων	37
3.2.1	Γενικά	37
3.2.2	Κατηγορίες ανώτερων βασιδιομυκήτων	37
3.2.3	Η δομή της λιγνίνης	39

3.2.4	Συνθήκες δράσης λιγνινολυτικών μυκήτων	41
3.2.5	Λιγνινολυτικά ένζυμα και μηχανισμοί λιγνινόλυσης	42
3.2.5.1	Λιγνινάσες (Lignin peroxidases, LiPs)	42
3.2.5.2	Υπεροξειδάσες του μαγγανίου (Manganese peroxidases, MnPs)	44
3.2.5.3	Λακκάσες (Laccases)	45
3.2.6	Ένζυμα που παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	46
3.2.7	Αξιολόγηση των μυκήτων λευκής σήψης στην βιοαποδόμηση φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα ελαιουργείων	47
3.3	Συγκριτική αξιολόγηση μυκήτων λευκής σήψης	48
3.3.1	Γενικά	48
3.3.2	Πειραματική διάταξη και διαδικασία για τις καλλιέργειες των μυκήτων στο υγρό απόβλητο των ελαιουργείων	49
3.3.2.1	Γενικά	49
3.3.2.2	Προετοιμασία υποστρώματος	49
3.3.2.3	Πορεία για τις στερεές καλλιέργειες μυκήτων	49
3.3.2.4	Πορεία για τις υγρές καλλιέργειες μυκήτων	51
3.3.2.5	Στελέχη μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν	52
3.3.3	Αποτελέσματα συγκριτικής αξιολόγησης μυκήτων	52
3.3.3.1	Καλλιέργειες στο στερεοποιημένο απόβλητο ελαιουργείου	52
3.3.3.2	Καλλιέργειες στο υγρό απόβλητο ελαιουργείου	54
3.3.4	Ανάλυση αποτελεσμάτων	57
3.4	Διάταξη διαδοχικών δίσκων	57
3.4.1	Αντιδραστήρας διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία	57
3.4.1.1	Εισαγωγή	57
3.4.1.2	Πειραματική διάταξη	58
3.4.1.3	Πειραματική διαδικασία	60
3.4.1.4	Αποτελέσματα και συμπεράσματα	62
3.4.2	Αντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας	64
3.4.2.1	Εισαγωγή	64
3.4.2.2	Πειραματική διάταξη	64
3.4.2.3	Πειραματική διαδικασία	66
3.4.2.4	Αποτελέσματα και συμπεράσματα	66

3.5	Ακίνητοποίηση (immobilization) του μύκητα PO 22 μέσω παγίδευσης	69
3.5.1	Ακίνητοποίηση του μύκητα <i>Pleurotus ostreatus</i> , PO 22, σε πολυμερές πολυουρεθάνη	69
3.5.1.1	Γενικά	69
3.5.1.2	Υλικά και μέθοδοι	70
3.5.1.3	Πειραματική διάταξη και διαδικασία	71
3.5.1.4	Αποτελέσματα	73
3.5.1.5	Συμπεράσματα	73
3.5.2	Αντιδραστήρες τύπου κλίνης με διάφορες ροές καθοδικής ανακυκλοφορίας	74
3.5.2.1	Εισαγωγή	74
3.5.2.2	Πειραματική διάταξη	75
3.5.2.3	Πειραματική διαδικασία	77
3.5.2.4	Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	80
3.5.3	Πείραμα διαλείποντος έργου για τη μελέτη του φαινομένου της προσρόφησης	87
3.5.3.1	Εισαγωγή	87
3.5.3.2	Πειραματική διάταξη και διαδικασία	88
3.5.3.3	Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	88
3.5.4	Σύγκριση δύο διαφορετικών ροών ανακυκλοφορίας (10 ml/min και 2.5 ml/min) σε αντιδραστήρα τύπου κλίνης	90
3.5.4.1	Εισαγωγή	90
3.5.4.2	Πειραματική διάταξη και διαδικασία	90
3.5.4.3	Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	92
3.5.5	Σύγκριση δύο διαφορετικών ροών ανακυκλοφορίας (10 ml/min και 2.5 ml/min) σε αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης (trickling flow)	94
3.5.5.1	Εισαγωγή	94
3.5.5.2	Πειραματική διάταξη	94
3.5.5.3	Πειραματική διαδικασία	96
3.5.5.4	Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	98
3.5.6	Επαναλειτουργία αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με τροφοδοσία υγρό απόβλητο ελαιουργείου	101

3.5.6.1	Εισαγωγή	101
3.5.6.2	Πειραματική διάταξη	102
3.5.6.3	Πειραματική διαδικασία	102
3.5.6.4	Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	103
3.6	Ακίνητοποίηση του μύκητα ΡΟ 22 σε τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού	107
3.6.1	Πείραμα διαλείποντος έργου για τον έλεγχο της ακίνητοποίησης	107
3.6.1.1	Εισαγωγή	107
3.6.1.2	Μέθοδοι και υλικά	108
3.6.1.3	Πειραματική διάταξη και διαδικασία	108
3.6.1.4	Αποτελέσματα	111
3.6.2	Εύρεση βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας ενός αντιδραστήρα με ανακυκλοφορία, τύπου διαβρεχόμενης κλίνης	112
3.6.2.1	Εισαγωγή	112
3.6.2.2	Πειραματική διάταξη	113
3.6.2.3	Πειραματική διαδικασία	115
3.6.2.4	Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	120
3.6.3	Επαναλειτουργία αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με τροφοδοσία υγρό απόβλητο ελαιουργείου	127
3.6.3.1	Εισαγωγή	127
3.6.3.2	Πειραματική διάταξη	127
3.6.3.3	Πειραματική διαδικασία	128
3.6.3.4	Αποτελέσματα	130
3.6.4	Αντιδραστήρας τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με λειτουργία πλήρωσης-εκκένωσης (draw+fill) και ανακυκλοφορία	132
3.6.4.1	Εισαγωγή	132
3.6.4.2	Πειραματική διάταξη	133
3.6.4.3	Πειραματική διαδικασία	136
3.6.4.4	Αποτελέσματα-Συμπεράσματα	138
4.	ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟΥ	143

4.1	Γενικά	143
4.2	Αναερόβια Χώνευση	145
4.2.1	Εισαγωγή	145
4.2.2	Μικροβιολογία και κινητική της αναερόβιας χώνευσης	150
4.2.3	Αναερόβιος μεταβολισμός της οργανικής ύλης	152
4.2.3.1	Υδρόλυση βιοπολυμερών στην αναερόβια χώνευση	153
4.2.3.2	Οξεογένεση στην αναερόβια χώνευση	153
4.2.3.3	Οξικογένεση στην αναερόβια χώνευση	153
4.2.3.4	Μεθανογένεση στην αναερόβια χώνευση	155
4.2.4	Παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης	157
4.2.4.1	Θερμοκρασία	157
4.2.4.2	pH	158
4.2.4.3	Χημική σύσταση της τροφοδοσίας	159
4.2.4.4	Τοξικές ουσίες	160
4.2.4.5	Οργανική φόρτιση και υδραυλικός χρόνος παραμονής αναερόβιων συστημάτων επεξεργασίας	163
4.2.4.6	Εγκλιματισμός αναερόβιας βιομάζας	163
4.2.5	Συστήματα αναερόβιας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων	164
4.2.5.1	Γενικά	164
4.2.5.2	Συμβατικές διατάξεις αναερόβιας χώνευσης	165
4.2.5.3	Ταχύρρυθμες διατάξεις αναερόβιας χώνευσης	166
4.3	Βιοχημικό Δυναμικό Μεθανίου (Biochemical Methane Potential, BMP)	170
4.4	Προετοιμασία για την εκτέλεση του πειράματος BMP	173
4.4.1	Εισαγωγή	173
4.4.2	Υγρές καλλιέργειες μυκήτων	173
4.4.3	Εγκλιματισμός της αναερόβιας μαγιάς	174
4.4.3.1	Γενικά	174
4.4.3.2	Πειραματική διάταξη εγκλιματισμού αναερόβιας καλλιέργειας	174
4.4.3.3	Πειραματική διαδικασία εγκλιματισμού αναερόβιας καλλιέργειας	176
4.4.3.4	Πορεία εγκλιματισμού αναερόβιων καλλιεργείων σε διάλυμα γλυκόζης	177
4.4.3.5	Παρατηρήσεις και συμπεράσματα	184

4.4.4	Πείραμα διαλείποντος έργου για την επιλογή κατάλληλης ουσίας για την αύξηση της αλκαλικότητας	185
4.4.4.1	Γενικά	185
4.4.4.2	Πειράματα διαλείποντος έργου	185
4.5	Πειραματική διάταξη και διαδικασία του πειράματος BMP	188
4.6	Αποτελέσματα	190
4.6.1	Αρχικές συνθήκες πειράματος	190
4.6.2	Πορεία παραγωγής του μεθανίου	193
4.6.3	Μαθηματική προσομοίωση της παραγωγής μεθανίου	196
4.6.4	Χαρακτηριστικά των δειγμάτων μετά την αναερόβια επεξεργασία	207
4.6.5	Απόδοση της αναερόβιας διεργασίας - Συμπεράσματα	215
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ	218
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	223

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ

Γράφημα 3.1	Πορεία ανάπτυξης των μυκήτων στις στερεές καλλιέργειες	54
Γράφημα 3.2	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (διάταξη διαδοχικών δίσκων)	63
Γράφημα 3.3	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στον αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (διάταξη διαδοχικών δίσκων)	67
Γράφημα 3.4	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στην κλίνη K1, σύμφωνα με της συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.6	81
Γράφημα 3.5	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στην κλίνη K2, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.6	83
Γράφημα 3.6	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών στο πείραμα ελέγχου του φαινομένου της προσρόφησης στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης	89
Γράφημα 3.7	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στις κλίνες K3 και K4, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.10	93
Γράφημα 3.8	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στις διαβρεχόμενες κλίνες K5 και K6, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.12	99
Γράφημα 3.9	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών και του pH που επιτυγχάνεται στη διαβρεχόμενη κλίνη K7, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.14	104

Γράφημα 3.10	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στους επτά πρώτους κύκλους τροφοδοσίας των δύο διαβρεχόμενων κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.17	121
Γράφημα 3.11	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στους οκτώ κύκλους τροφοδοσίας των διαβρεχόμενων κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.17	125
Γράφημα 3.12	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στη διαβρεχόμενη κλίνη ΚΠ3, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.19	131
Γράφημα 3.13	Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών και pH που επιτυγχάνεται στη διαβρεχόμενη κλίνη πλήρωσης-εκκένωσης, ΚΠ4, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.21	139
Γράφημα 3.14	Προφίλ της συγκέντρωσης του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου που επιτυγχάνεται στη διαβρεχόμενη κλίνη πλήρωσης-εκκένωσης, ΚΠ4, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.21	140
Γράφημα 4.1	Το pH της τροφοδοσίας των και των αναερόβιων χωνευτήρων Χ1	178
Γράφημα 4.2	Το pH της τροφοδοσίας των και των αναερόβιων χωνευτήρων Χ2	178
Γράφημα 4.3	Το διαλυτό ΧΑΟ της τροφοδοσίας των και των αναερόβιων χωνευτήρων Χ1	179
Γράφημα 4.4	Το διαλυτό ΧΑΟ της τροφοδοσίας των και των αναερόβιων χωνευτήρων Χ2	179
Γράφημα 4.5	Παραγόμενος όγκος μεθανίου και βιοαερίου των	179

	αναερόβιων χωνευτήρων Χ1	
Γράφημα 4.6	Παραγόμενος όγκος μεθανίου και βιοαερίου των αναερόβιων χωνευτήρων Χ2	179
Γράφημα 4.7	Προφίλ παραγωγής μεθανίου για τα οκτώ δείγματα του πειράματος BMP (βλ. πίνακα 4.10 για το συμβολισμό των δειγμάτων)	194
Γράφημα 4.8	Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα ΡΟ 69 (πείραμα BMP)	200
Γράφημα 4.9	Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα ΡΟ 850412 (πείραμα BMP)	200
Γράφημα 4.10	Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα ΡΟ ρ15 (πείραμα BMP)	201
Γράφημα 4.11	Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα ΡΡ ρ5 (πείραμα BMP)	201
Γράφημα 4.12	Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα ΡΟ 22 (πείραμα BMP)	201
Γράφημα 4.13	Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα του αποβλήτου ελαιουργείου (πείραμα BMP)	201
Γράφημα 4.14	Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα του αποστειρωμένου αποβλήτου ελαιουργείου (πείραμα BMP)	201

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.1	Σύγκριση ορισμένων χαρακτηριστικών των αποβλήτων από τις διάφορες επεξεργασίες παραγωγής ελαιόλαδου	7
Πίνακας 1.2	Μέση σύσταση των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων	9
Πίνακας 2.1	Μέθοδοι υπολογισμού	31
Πίνακας 2.2	Χαρακτηριστικά υγρού αποβλήτου ελαιουργείου	32
Πίνακας 3.1	Χαρακτηριστικά του κάθε υποστρώματος μετά το τέλος του πειράματος	56
Πίνακας 3.2	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας (αποστειρωμένο απόβλητο) του αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (διάταξη διαδοχικών δίσκων)	62
Πίνακας 3.3	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας (αποστειρωμένο απόβλητο) του αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (διάταξη διαδοχικών δίσκων)	66
Πίνακας 3.4	Συστατικά του συνθετικού μέσου CYM	72
Πίνακας 3.5	Συστατικά του μέσου του συριγγικού οξέος	78
Πίνακας 3.6	Συνθήκες λειτουργίας των κλινών K1 και K2, για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας	80
Πίνακας 3.7	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας για την κλίνη K1	81
Πίνακας 3.8	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας για την κλίνη K2	83
Πίνακας 3.9	Αρχικά χαρακτηριστικά του θρεπτικού μέσου (διάλυμα συριγγικού οξέος) που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ελέγχου του φαινομένου της προσρόφησης στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης	89
Πίνακας 3.10	Συνθήκες λειτουργίας των κλινών K3 και K4, για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας	91
Πίνακας 3.11	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας των κλινών K3 και K4	92

Πίνακας 3.12	Συνθήκες λειτουργίας των διαβρεχόμενων κλινών Κ5 και Κ6, για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας	97
Πίνακας 3.13	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας των διαβρεχόμενων κλινών Κ5 και Κ6	98
Πίνακας 3.14	Συνθήκες λειτουργίας της διαβρεχόμενης κλίνης Κ7 για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας	103
Πίνακας 3.15	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας της διαβρεχόμενης κλίνης Κ7	104
Πίνακας 3.16	Χαρακτηριστικές ιδιότητες ενός τεμαχιδίου, σχήματος κυλινδρικού σωλήνα, από πυροσυσσωματωμένο γυαλί	108
Πίνακας 3.17	Συνθήκες λειτουργίας των διαβρεχόμενων κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2 για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας	118
Πίνακας 3.18	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας των διαβρεχόμενων κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2	120
Πίνακας 3.19	Συνθήκες λειτουργίας της διαβρεχόμενης κλίνης ΚΠ3 για τους δύο κύκλους τροφοδοσίας	129
Πίνακας 3.20	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας της διαβρεχόμενης κλίνης ΚΠ3	130
Πίνακας 3.21	Συνθήκες λειτουργίας της διαβρεχόμενης κλίνης πλήρωσης-εκκένωσης, ΚΠ4	137
Πίνακας 3.22	Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας της διαβρεχόμενης κλίνης πλήρωσης-εκκένωσης, ΚΠ4	138
Πίνακας 4.1	Κατάταξη των μικροοργανισμών με κριτήριο τη σχέση της κυτταρικής τους λειτουργίας με το οξυγόνο	152
Πίνακας 4.2	Αντιδράσεις οξικογόνων αφυδρογονώσεων	154
Πίνακας 4.3	Αντιδράσεις παραγωγής μεθανίου και οι αντίστοιχες μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας	156
Πίνακας 4.4	Συστατικά της τροφοδοσίας των αναερόβιων χωνευτήρων Χ1 και Χ2	177
Πίνακας 4.5	Χαρακτηριστικά του συστήματος (Χ1) σε κάθε περίοδο λειτουργίας	180
Πίνακας 4.6	Χαρακτηριστικά του συστήματος (Χ2) στην κάθε περίοδο	182

	λειτουργίας	
Πίνακας 4.7	Χαρακτηριστικά των συστημάτων (X1 και X2) την τελευταία ημέρα λειτουργίας τους	183
Πίνακας 4.8	Το μέσο αύξησης της αλκαλικότητας που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα	186
Πίνακας 4.9	Τα υποστρώματα για τα οποία εφαρμόστηκε το πείραμα BMP	189
Πίνακας 4.10	Αρχικά χαρακτηριστικά των μειγμάτων πριν την αναερόβια επεξεργασία	191
Πίνακας 4.11	Προβλεπόμενες τιμές από το μοντέλο για το μετατρέψιμο ολ. ΧΑΟ και του ποσοστού του αρ. ολ. ΧΑΟ που μετατράπηκε και απέδωσε CH ₄ για τα δείγματα μετά την αναερόβια επεξεργασία	203
Πίνακας 4.12	Τελικά χαρακτηριστικά των μειγμάτων μετά την αναερόβια επεξεργασία του πειράματος BMP	208

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Ραβδόγραμμα 4.1	Απεινόνιση του pH του υγρού μείγματος πριν και μετά τη λήξη των πειραμάτων (Π1, Π2, Π3)	187
Ραβδόγραμμα 4.2	Συνολικός παραγόμενος όγκος μεθανίου στα δεκαοκτώ δείγματα του πειράματος BMP	196
Ραβδόγραμμα 4.3	Προβλεπόμενο από το μοντέλο και πειραματικά μετρούμενο ποσοστό του ολικού ΧΑΟ που μετετράπηκε και απέδωσε μεθάνιο, για τα υπό μελέτη δείγματα του πειράματος BMP	203
Ραβδόγραμμα 4.4	Προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές των σταθερών km για κάθε δείγμα	204
Ραβδόγραμμα 4.5	Προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές των σταθερών Ks για κάθε δείγμα	204
Ραβδόγραμμα 4.6	Συγκέντρωση του ολικού ΧΑΟ στην εκροή χωνευτήρα συνεχούς λειτουργίας (gΧΑΟ/l) για τρεις διαφορετικούς χρόνους παραμονής, με βάση τη σχέση 4.11	206
Ραβδόγραμμα 4.9	Μεταβολή του pH για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP	210
Ραβδόγραμμα 4.10	Μεταβολή του διαλυτού ΧΑΟ (g/100ml δείγματος) για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP	210
Ραβδόγραμμα 4.11	Μεταβολή του ολικού ΧΑΟ (g/100ml δείγματος) για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP	211
Ραβδόγραμμα 4.12	Μεταβολή των ολικών αιωρούμενων στερεών, ΟΑΣ (g/100ml δείγματος), για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP	212
Ραβδόγραμμα 4.13	Μεταβολή των πτητικών αιωρούμενων στερεών, ΠΑΣ (g/100ml δείγματος), για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP	213
Ραβδόγραμμα 4.14	Μεταβολή του ποσοστού ΠΑΣ/ΟΑΣ% για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP	213

Ραβδόγραμμα 4.15	Μεταβολή των φαινολικών ουσιών (g/100ml δείγματος) για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP	214
Ραβδόγραμμα 4.16	Μέση απόδοση (παραγόμενο μεθάνιο, ml/g μετατρεπόμενου ολικού ΧΑΟ) του κάθε δείγματος του πειράματος BMP	215
Ραβδόγραμμα 4.17	Μέση απόδοση (παραγόμενο μεθάνιο, ml/g αρχικού ΧΑΟ) του κάθε δείγματος του πειράματος BMP	216

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΑ

Σχήμα 1.1	Παραγωγή του ελαιόλαδου σε τόννους	1
Σχήμα 1.2	Οι κυριότερες παραγωγικές χώρες σε ελαιόλαδο ανά τον κόσμο για το έτος 2003	2
Σχήμα 1.3	Διάγραμμα ροής των τριών διαφορετικών διαδικασιών παραγωγής ελαιόλαδου 1) Παραδοσιακή 2) τριών φάσεων 3) δύο φάσεων	6
Σχήμα 2.1	Βασικά χαρακτηριστικά αέριας χρωματογραφίας (Pecsok et al., 1980)	29
Σχήμα 3.1	Οι τρεις πρόδρομες ενώσεις που συνθέτουν το μόριο της λιγνίνης	39
Σχήμα 3.2	Η δομή του μορίου της λιγνίνης	40
Σχήμα 3.3	Διάσπαση του μορίου της λιγνίνης, (α) από το ένζυμο LiP (υπεροξειδάση της λιγνίνης) και (β) από το ένζυμο MnP (υπεροξειδάση του μαγγανίου)	43
Σχήμα 3.4	Παραγωγή εξωκυτταρικού υπεροξειδίου του υδρογόνου από (α) το ένζυμο glyoxal oxidase (γλυοξαλική οξειδάση) και (β) το ένζυμο aryl alcohol oxidase (άρυλ-αλκοόλ οξειδάση)	46
Σχήμα 3.5	Η διάταξη του τρυβλίου	50
Σχήμα 3.6	Αντιδραστήρας διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία (διάταξη δίσκων)	59
Σχήμα 3.7	Αντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας (διάταξη διαδοχικών δίσκων)	65
Σχήμα 3.8	Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης του αντιδραστήρα τύπου κλίνης (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πολυουρεθάνης)	77
Σχήμα 3.9	Διαδικασία κατασκευής τεμαχιδίων πολυουρεθάνης με	79

	τον ενσωματωμένο μύκητα	
Σχήμα 3.10	Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης του αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πολυουρεθάνης)	95
Σχήμα 3.11	Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης του αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλίου)	114
Σχήμα 3.12	Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης του αεριζόμενου αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλίου)	115
Σχήμα 3.13	Πειραματική διάταξη του αεριζόμενου αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης πλήρωσης-εκκένωσης με ανακυκλοφορία (ΚΠ4)	135
Σχήμα 4.1	Σύσταση του παραγόμενου βιοαερίου συναρτήσει της οξειδωτικής κατάστασης του άνθρακα του υποστρώματος (Gujer και Zehnder, 1983)	147
Σχήμα 4.2	Μετατροπή οργανικού υλικού κατά τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης	148
Σχήμα 4.3	Δομή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)	150
Σχήμα 4.4	α) Συμβατικός αναερόβιος χωνευτήρας χωρίς ανακυκλοφορία β) Συμβατικός αναερόβιος χωνευτήρας με ανακυκλοφορία	166
Σχήμα 4.5	α) Αναερόβιος αντιδραστήρας ανοδικής ροής μέσω στρώματος ιλύος β) Αναερόβιος αντιδραστήρας με ανακλαστήρες	167
Σχήμα 4.6	α) Αναερόβια φίλτρα ανοδικής ροής β) Αναερόβια φίλτρα καθοδικής ροής	168
Σχήμα 4.7	Παράλληλη διεργασία αναερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων	169
Σχήμα 4.8	Διεργασία δύο σταδίων	170

Σχήμα 4.9	Διεργασία δύο φάσεων	170
Σχήμα 4.10	Πειραματική διάταξη για τη συντήρηση της αναερόβιας μαγιάς	176
Σχήμα 4.11	Monod εξάρτηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης	197

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1.1	Διάθεση υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου σε υδάτινους φορείς	11
Εικόνα 1.2	Διάθεση υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου στο έδαφος	12
Εικόνα 1.3	Διοχέτευση υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου σε λεκάνες εξατμισοδιαπνοής	13

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΕΣ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ

Φωτογραφία 2.1	Πειραματική διάταξη της επώασης των αντιδραστήρων διαλείποντος έργου	35
Φωτογραφία 3.1	Καλλιέργειες μυκήτων λευκής σήψης σε στερεοποιημένο απόβλητο ελαιουργείου	53
Φωτογραφία 3.2	Καλλιέργεια μύκητα λευκής σήψης στο υγρό απόβλητο ελαιουργείου	55
Φωτογραφία 3.3	Εξωτερική όψη του αντιδραστήρα διαλείποντος έργου	60
Φωτογραφία 3.4	Εξάπλωση της μόλυνσης στην ελεύθερη επιφάνεια των δίσκων	68
Φωτογραφία 3.5	Γυάλινη κλίνη	75
Φωτογραφία 3.6	Αντιδραστήρας τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με ρεύμα καθοδικής ανακυκλοφορίας (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πολυουρεθάνης)	96
Φωτογραφία 3.7	Μόλυνση του ενσωματωμένου στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης, μύκητα (Κλίνη K7)	106
Φωτογραφία 3.8	Οριζόντια τοποθέτηση των τεσσάρων κυλινδρικών σωλήνων πυροσυσσωματωμένου γυαλιού στη φιάλη	110
Φωτογραφία 3.9	Ακινητοποίηση του μύκητα στα πυροσυσσωμένα τεμαχίδια γυαλιού	112
Φωτογραφία 3.10	Πληρωτικό υλικό της κλίνης (τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού) λίγο πριν εισαχθεί στην κλίνη	116
Φωτογραφία 3.11	Πληρωμένη διαβρεχόμενη κλίνη με πυροσυσσωμένα γυαλάκια με ακινητοποιημένο μύκητα	119
Φωτογραφία 3.12	Μολυσμένοι, ακινητοποιημένοι στα τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού, μύκητες	126
Φωτογραφία 3.13	Έναρξη διαβρεχόμενης κλίνης, ΚΠ3 (πρώτος κύκλος τροφοδοσίας)	129

Φωτογραφία 3.14	Πειραματική διάταξη της διαβρεχόμενης κλίνης ΚΠ4 πλήρωσης-εκκένωσης	136
Φωτογραφία 3.15	Ίχνη μόλυνσης του ακινητοποιημένου μύκητα ΡΟ 22 της κλίνης ΚΠ4	141
Φωτογραφία 4.1	Πειραματική διάταξη εγκλιματισμού των αναερόβιων καλλιεργειών	175

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την επεξεργασία του ελαιοκάρπου στα ελαιουργεία, ειδικά αυτά των τριών φάσεων, παράγονται μεγάλες ποσότητες υγρών αποβλήτων, τα οποία διατίθενται σε εδαφικούς και υδάτινους αποδέκτες προκαλώντας σημαντικά περιβαλλοντικά προβλήματα. Τα απόβλητα αυτά είναι βεβαρημένα από πλευράς ρυπαντικού φορτίου και παρουσιάζουν φυτοτοξική δράση. Το φαινολικό τους φορτίο είναι η κύρια ρυπαντική παράμετρος, ενώ έχει διαπιστωθεί ότι προκαλεί τοξική δράση στα μεθανογόνα βακτήρια κατά την βιολογική διεργασία της αναερόβιας χώνευσης.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η βιολογική μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου με τη χρήση μυκήτων λευκής σήψης (Βασιδιομύκητες) με σκοπό την αποτοξικοποίησή τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του αποτελεσματικού μεταβολισμού πολυφαινολικών συστατικών. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή γίνεται μια προσέγγιση του πρόβληματος επεξεργασίας και αποτοξικοποίησης του κασίγαρου με τη χρήση πέντε στελεχών μυκήτων του γένους *Pleurotus*. Αυτό αποτελεί ένα μέρος ενός γενικότερου σχεδίου συνδυασμένης δράσης ενός συστήματος βιοεπεξεργασίας του αποβλήτου, όπου το πρώτο στάδιο θα περιλαμβάνει την αερόβια ζύμωση με μύκητες λευκής σήψης και το δεύτερο την αναερόβια επεξεργασία του κασίγαρου που προηγουμένως έχει υποστεί επεξεργασία με τη χρήση μυκήτων.

Μετά την επιλογή του αποδοτικότερου στελέχους (PO 22) και εφόσον έχει προηγηθεί ο χαρακτηρισμός του αποβλήτου, ακολουθεί η αριστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας καινοτόμων βιοαντιδραστήρων, κατάλληλων για τη βέλτιστη ανάπτυξη του επιλεγμένου μικροοργανισμού σε αιωρούμενη ή σε ακινητοποιημένη μορφή. Ακολούθως γίνεται ένα πείραμα διαλείποντος έργου (πείραμα BMP) όπου ερευνάται εάν το απόβλητο που προηγουμένως έχει βιοεπεξεργαστεί με μύκητες λευκής σήψης και συγκεκριμένα στελέχη του

γένους *Pleurotus* για την απομάκρυνση του φαινολικού φορτίου επιδεικνύει καλύτερη συμπεριφορά στην αναερόβια επεξεργασία εν συγκρίσει με το μη επεξεργασμένο απόβλητο.

ABSTRACT

During olive processing, especially three phase processing, large volumes of wastewaters (olive mill wastewaters, OMW) are generated and usually discarded to soils and water receptors constituting a major environmental concern. The OMW have a high pollution concentration and they show toxic effect. Their phenolic concentration presents the main environmental concern, and it has been ascertained that it has a toxic effect on the methanogens during anaerobic digestion.

Over the last years the biological method of treating olive mill wastewaters presents great interest and white rot fungi (Basidiomycetes) are used in order to detoxicate the wastewaters. This is achieved through the effective metabolism of polyphenolics. This work approaches the problem of treating and detoxicating OMW by using five strains of fungi of the *Pleurotus* species. This constitutes a part of a wider plan of a combined system involving the bio-treatment of the waste, where the first stage (pre-treatment) shall include the aerobic fermentation with the use of white rot fungi and the second stage shall involve the anaerobic treatment of the OMW which has previously undergone treatment with fungi.

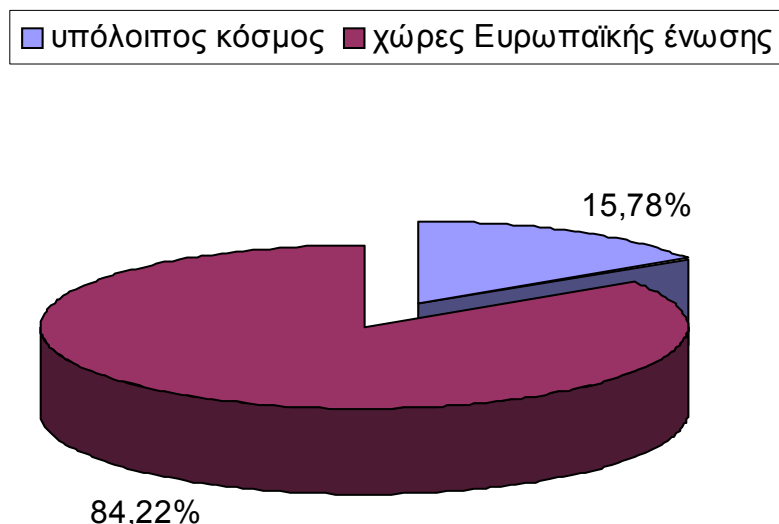
Once the OMW has been characterised the most efficient strain (PO 22) is chosen. Then the operation conditions of the innovative bioreactors which are suitable for optimum growth of micro organisms in a floating or immobilised form shall be optimised. Then a batch experiment (BMP experiment) shall be carried out to find out whether the waste which has been previously bio-treated with strains of the *Pleurotus* species for the removal of phenolics exhibits a better anaerobic-ally treatment as opposed to the non treated waste.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

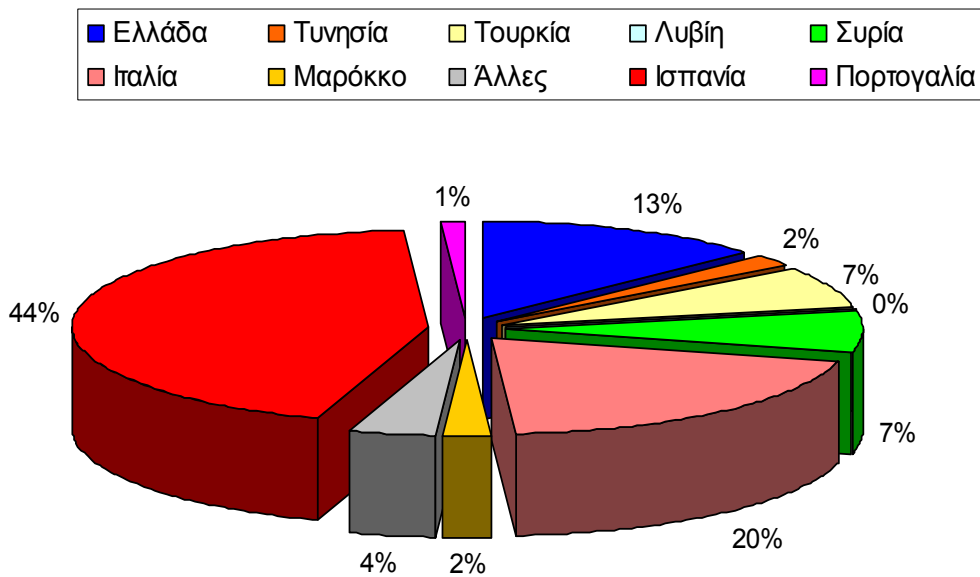
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Ο ελαιοπαραγωγικός κλάδος αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους τομείς της γεωργικής παραγωγής της χώρας μας. Η παραγωγή του ελαιόλαδου εντοπίζεται κυρίως στις χώρες της Ευρώπης όπου παράγεται σχεδόν το 85 % της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου (περίπου 2.5 εκατομμύρια τόνοι ανά χρόνο) (Σχήμα 1.1). Η μεγαλύτερη Ευρωπαϊκή παραγωγή συγκεντρώνεται στη λεκάνη της Μεσογείου. Η Ελλάδα είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα σε παγκόσμιο επίπεδο, μετά την Ισπανία και την Ιταλία με ποσοστό παραγωγής ελιάς 13 % για το έτος 2003 σε διεθνές επίπεδο (Σχήμα 1.2). Η ποιότητα του ελληνικού ελαιόλαδου εκτιμάται ως ανώτερη των λοιπών ελαιοπαραγωγικών χωρών και η μέση ετήσια παραγωγή ελαιόλαδου ανέρχεται στους 430.000 tn (Gendebien et al., 2001).



Σχήμα 1.1: Παραγωγή του ελαιόλαδου σε τόννους



Σχήμα 1.2: Οι κυριότερες παραγωγικές χώρες σε ελαιόλαδο ανά τον κόσμο για το έτος 2003

Ο κλάδος της παραγωγής ελαιόλαδου από τον ελαιοκαρπτό αποτελείται σε εθνικό επίπεδο από 3.500 ελαιουργεία που λειτουργούν διασκορπισμένα κυρίως σε επαρχίες της Κρήτης, της Πελοποννήσου, των Ιόνιων νησιών και της Λέσβου. Η γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών των ελαιουργείων εξαρτάται από τη γεωγραφική κατανομή των πληθυσμών ελαιόδεντρων. Η λειτουργία των ελαιουργείων είναι εποχιακή, από το Νοέμβριο ως το Μάρτιο και κάποιες φορές ως τον Ιούνιο.

Η καλλιέργεια της ελιάς στη Ελλάδα είναι σημαντική όχι μόνο σε οικονομικό, αλλά και κοινωνικό επίπεδο, αν αναλογιστεί κανείς ότι 450.000 περίπου οικογένειες ασχολούνται με την καλλιέργεια της ελιάς.

1.2 Επεξεργασία ελαιόλαδου-Τύποι ελαιουργείων

Σήμερα δύο διαφορετικές διαδικασίες εξαγωγής ελαιόλαδου χρησιμοποιούνται ευρέως οι οποίες βασίζονται στη φυγοκέντριση. Τα φυγοκεντρικά συστήματα, διακρίνονται σε τριών και δύο φάσεων, ανάλογα με τα προϊόντα που δίνουν

στο τέλος της επεξεργασίας. Επιπλέον εφαρμόζεται η «παραδοσιακή διαδικασία», κατά την οποία το ελαιόλαδο εξάγεται με πίεση σε υδραυλικό πιεστήριο. Τα τρία συστήματα διαφέρουν σημαντικά ως προς το ποσό των υγρών αποβλήτων και των άλλων υποπροϊόντων που παράγουν.

Η επεξεργασία του ελαιόλαδου αποτελείται από επτά βήματα:

1. Παραλαβή του καρπού

Μετά τη συγκομιδή οι ελιές παραδίδονται στις μεταποιητικές μονάδες για επεξεργασία το ταχύτερο δυνατόν. Η μεταφορά τους γίνεται σε πλαστικά τελάρα (κλούβες) με οπές αερισμού ή πλαστικούς σάκους. Σε περίπτωση που χρειάζεται να αποθηκευτεί ο καρπός θα πρέπει να είναι για μικρό χρονικό διάστημα σε χώρο με καλό αερισμό.

2. Πλύσιμο

Οι ελιές τοποθετούνται αρχικά σε χοάνη παραλαβής ελαιόκαρπου και στη συνέχεια με μεταφορική ταινία οδηγούνται στο αποφυλλωτήριο, όπου απομακρύνονται τα φύλλα και άλλα φερτά υλικά. Ακολουθεί πλύσιμο για την απομάκρυνση ξένων υλών (σκόνη, χώμα, κ.λ.π.). Το νερό μπορεί να ανακυκλωθεί μετά από κατακρήμνιση ή διήθηση των στερεών συστατικών του. Απαιτούνται περίπου 100-120 l νερού για την πλύση 1000 kg ελαιοκάρπου. Μετά το πλύσιμο ακολουθεί η άλεση του καρπού σε ελαιόμυλο ή σπαστήρα.

3. Σπάσιμο-άλεση ελαιόκαρπου

Στα παραδοσιακά ελαιοτριβεία η άλεση του καρπού γίνεται με κυλινδρικές μυλόπετρες. Στις σύγχρονες μονάδες χρησιμοποιούνται μεταλλικοί μύλοι, σφυρόμυλοι και σπαστήρες με οδοντωτούς δίσκους. Εάν οι ελιές που

υποβάλλονται σε επεξεργασία είναι παγωμένες ή πολύ ξηρές, προστίθεται μια μικρή ποσότητα νερού (100-150 l ανά 1000 kg καρπού).

4. Μάλαξη

Μετά την άλεση, η ελαιοζύμη αναμειγνύεται στο μαλακτήρα μετά την προσθήκη ζεστού νερού. Η μάλαξη αποτελεί βασικό στάδιο της επεξεργασίας και συντελεί στη συνένωση των μικρών ελαιοσταγονιδίων με μεγαλύτερες σταγόνες λαδιού. Για τη διευκόλυνση της διαδικασίας η ελαιοζύμη θερμαίνεται στους 28-30 °C. Στο μαλακτήρα προστίθεται νερό μέχρι και 100 % της ποσότητας της ελαιοζύμης, πριν την εξαγωγή του ελαιόλαδου σε διφασικό ή τριφασικό φυγοκεντρικό σύστημα.

5. Παραλαβή του ελαιόλαδου

Η παραδοσιακή μέθοδος της πίεσης και η διαδικασία των τριών φάσεων παράγουν το παρθένο ελαιόλαδο και δύο τύπους αποβλήτων: τα υγρά απόβλητα (κασιίγαρος) και τα στερεά απόβλητα (ελαιοπυρήνας). Η παραδοσιακή μέθοδος (Σχήμα 1.3.1) είναι μια ασυνεχής διαδικασία (batch type process) που διαφοροποιείται σε δύο φάσεις με την πίεση των αλεσμένων καρπών. Η υγρή φάση (μείγμα νερού/λαδιού) διαχωρίζεται αργότερα προκειμένου να ληφθεί το ελαιόλαδο. Υπολογίζεται ότι από 1.000 kg καρπού παράγονται περίπου 350 kg ελαιοπυρήνα (περιεκτικότητα σε υγρασία 25 %) και περίπου 450 kg υγρά απόβλητα (απόνερα). Εντούτοις, αν και είναι πιο οικολογική, η τεχνική αυτή είναι ασυνεχής, γεγονός που αποτελεί μειονέκτημα για τη σύγχρονη βιομηχανία.

Η **τριφασική διαδικασία** (Σχήμα 1.3.2) είναι μια συνεχής διαδικασία (continuous process) που έχει αντικαταστήσει την παραδοσιακή μέθοδο. Χρονολογείται από την δεκαετία του 1970-1980. Οι αλεσμένες ελιές τοποθετούνται σε ένα τριφασικό φυγοκεντρικό διαχωριστήρα (decanter) όπου τα διαφορετικά μέρη (ελαιόλαδο, απόνερα, ελαιοπυρήνας) διαχωρίζονται με

την επίδραση της φυγοκέντρου δυνάμεως. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι οι μεγάλες ποσότητες ύδατος που απαιτούνται και συνεπώς η παραγωγή σημαντικού όγκου υγρών αποβλήτων που προκαλούν ρύπανση. Υπολογίζεται ότι από 1.000 kg καρπό, παράγονται 500 kg ελαιοπυρήνα (περιεκτικότητα σε υγρασία 50 %) και 1.200 kg υγρά απόβλητα.

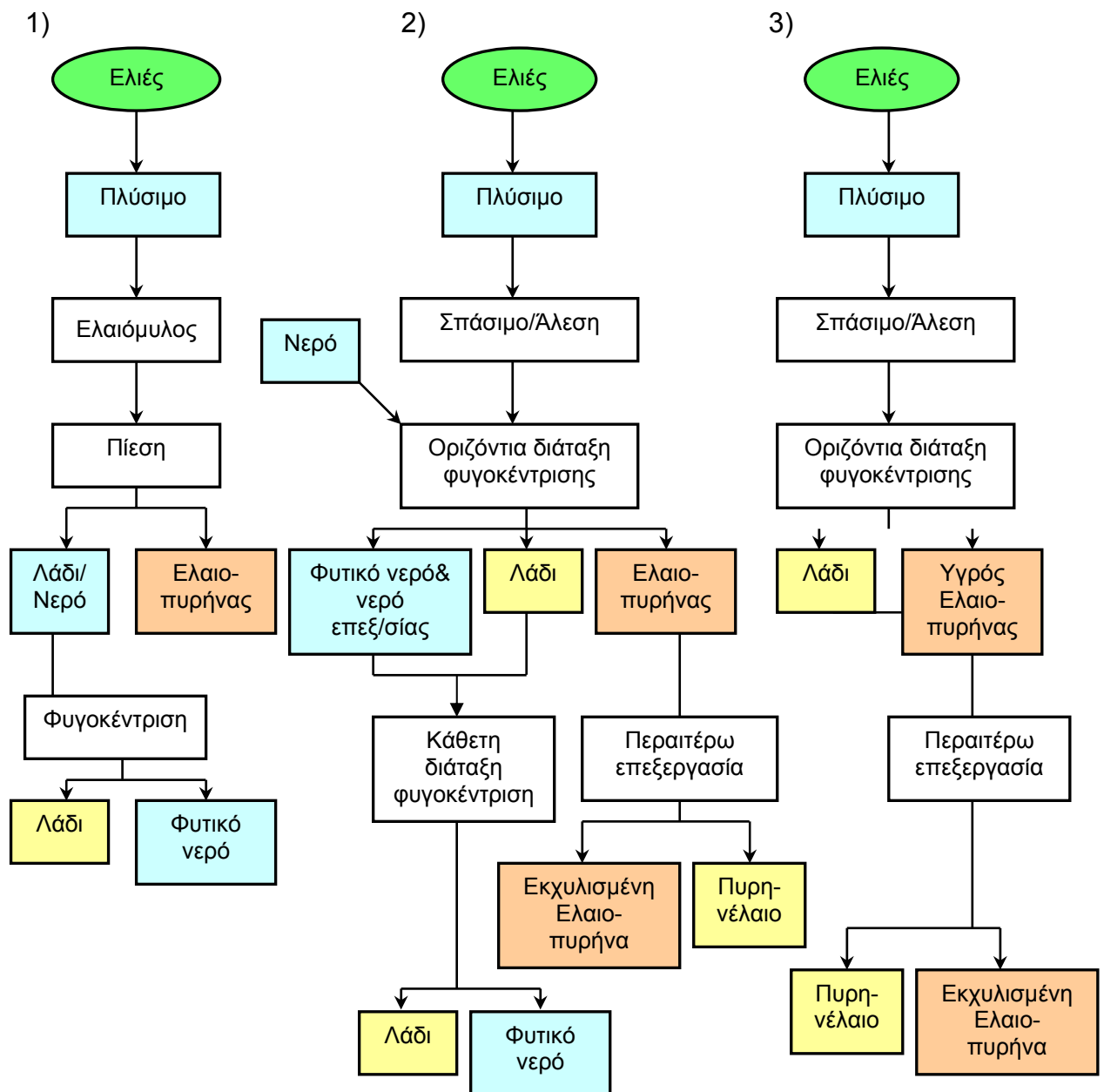
Πριν μερικά χρόνια ένα νέο σύστημα εμφανίστηκε στην αγορά, το **διφασικό σύστημα** (αποκαλούμενο και «οικολογικό σύστημα») (Σχήμα 1.3.3). Σε αυτή τη διαδικασία, τα τελικά προϊόντα είναι το ελαιόλαδο και ο ελαιοπυρήνας στον οποίο ενσωματώνονται τα απόνερα. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του συστήματος είναι η μειωμένη κατανάλωση νερού και η έλλειψη υγρών αποβλήτων. Υπολογίζεται ότι κατά την επεξεργασία 1.000 kg καρπού παράγονται 800 kg περίπου υγρής ελαιοπυρήνας. Σοβαρό όμως μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η ελαιοπυρήνα που προκύπτει έχει αυξημένη υγρασία και είναι δύσκολη στο χειρισμό, στη μεταφορά και την επεξεργασία. Επιπλέον, ξηραίνεται με αργό ρυθμό και έχει υψηλό ρυπαντικό φορτίο.

6. Καθαρισμός του ελαιόλαδου

Τα στερεά σωματίδια (τεμαχίδια σάρκας, φλοιού, θρύμματα πυρηνόξυλου, κ.λ.π.) που βρίσκονται διαλυμένα στην υγρή φάση απομακρύνονται με τη χρήση παλινδρομικά κινούμενων κοσκίνων (κόσκινα απολάσπωσης). Σημειώνεται ότι το βάρος των στερεών σωματιδίων υπολογίζεται σε ποσοστό 0.5-1 % επί του συνολικού βάρους της υγρής φάσης,

7. Τελικός διαχωρισμός

Ο τελικός διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά γίνεται με τη χρήση φυγοκεντρικών ελαιοδιαχωριστήρων.



Σχήμα 1.3: Διάγραμμα ροής των τριών διαφορετικών διαδικασιών παραγωγής ελαιόλαδου
 1) Παραδοσιακή 2) τριών φάσεων 3) δύο φάσεων

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι τρεις διαφορετικές επεξεργασίες παραλαβής ελαιόλαδου (παραδοσιακή, τριφασική και διφασική) διαφέρουν σημαντικά στον όγκο και τη σύνθεση των αποβλήτων που παράγουν. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των τριών διαδικασιών:

Πίνακας 1.1: Σύγκριση ορισμένων χαρακτηριστικών των αποβλήτων από τις διάφορες επεξεργασίες παραγωγής ελαιόλαδου

	<i>Παραδοσιακή</i>	<i>3 Φάσεων</i>	<i>2 Φάσεων</i>
Στερεό υπόλειμμα (kg/tn καρπού)	330	500	800
Υγρά απόβλητα (l/tn καρπού)]	600	1200	250
Φυτικό νερό των υγρών αποβλήτων (%)	94	90	99
BOD ₅ υγρών αποβλήτων (g/l)	100	80	10
Πολυφαινόλες στα υγρά απόβλητα (mg/l)	203	164	200
Δείκτης Πικρότητας	1.4	0.5	-

Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι το διφασικό σύστημα δημιουργεί μεγαλύτερο όγκο στερεού υπολείμματος, παράγει όμως μικρότερα ποσά υγρών αποβλήτων και χαμηλότερες τιμές του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου πέντε ημερών (BAO₅). Είναι επίσης χαρακτηριστικό ότι η περιεκτικότητα του ελαιόλαδου σε πολυφαινόλες είναι μικρότερη στο τριφασικό σύστημα λόγω των υψηλών ποσών προστιθέμενου νερού. Τέλος το ελαιόλαδο που προκύπτει από τη διφασική επεξεργασία είναι υψηλής ποιότητας και σταθερό στην οξείδωση.

Οι μέθοδοι εξαγωγής του ελαιόλαδου διαφέρουν ανάλογα με τη χώρα και την περιοχή. Στην Ισπανία και ειδικότερα στις νότιες περιοχές όπου η παραγωγή προέρχεται αποκλειστικά από μεσαίου και μεγάλου μεγέθους συνεταιρισμούς, η διφασική μέθοδος εξαγωγής ελαιόλαδου χρησιμοποιείται σε ποσοστό 95%. Στην Ιταλία χρησιμοποιείται ευρύτατα το τριφασικό σύστημα.

Η πλειονότητα των ελαιουργείων που λειτουργούν στην Ελλάδα είναι φυγοκεντρικά τριών φάσεων. Διατηρούνται επίσης μερικά πιεστικά παλαιού τύπου. Τα ελαιουργεία δύο φάσεων δεν έχουν διαδοθεί πολύ στη χώρα μας κυρίως λόγω του ημιστερεού αποβλήτου που παράγουν, το οποίο δεν είναι επεξεργάσιμο στα πυρηνελαιουργεία.

Η κύρια περιβαλλοντική παράμετρος που συνδέεται με τη λειτουργία των ελαιουργείων στην Ελλάδα, είναι τα παραγόμενα υγρά απόβλητα (κατσίγαρος). Ο κατσίγαρος παράγεται από ελαιουργεία που χρησιμοποιούν φυγοκεντρικούς διαχωριστήρες τριών φάσεων, τα οποία είναι και τα πολυπληθέστερα στον Ελλαδικό χώρο. Το στερεό υπόλειμμα (πυρηνόξυλο) της συγκεκριμένης παραγωγικής διαδικασίας μπορεί να εκληφθεί ως χρήσιμο παραπροϊόν αφού αποτελεί την πρώτη ύλη των πυρηνελαιουργείων.

1.3 Υγρά απόβλητα ελαιουργείου

Τα υγρά απόβλητα ελαιουργείων, αν και υποπροϊόντα επεξεργασίας του ελαιόκαρπου, συγκαταλέγονται στα κατ' εξοχήν βεβαρημένα από πλευράς ρυπαντικού φορτίου γεωργικά βιομηχανικά απόβλητα. Συγκεκριμένα, ένα μεσαίου μεγέθους ελαιοτριβείο παράγει περίπου 1.000 tn απόβλητα ανά περίοδο συγκομιδής ελαιόκαρπου με οργανικό φορτίο το οποίο ισοδυναμεί με τα ετήσια απόβλητα μιας πόλης 30.000 κατοίκων.

Σχετικά με τη σύσταση και την παραγωγή του κατσίγαρου έχουν γίνει μελέτες σε διαφορετικές περιοχές και συνθήκες λειτουργίας. Οι μελέτες αυτές συμφωνούν ως προς τα γενικά χαρακτηριστικά, όπως την υψηλή τοξικότητα και οργανικό φορτίο, τις εμπειριεχόμενες ουσίες και το μέγεθος της παραγωγής. Παρουσιάζουν όμως κάποιες, όχι μεγάλες, διαφορές στα ποσοτικά αποτελέσματα. Μέρος των διαφορών αυτών οφείλεται στους εναλλακτικούς τρόπους επεξεργασίας του ελαιόκαρπου (π.χ. κλασσικό ή φυγοκεντρικό ελαιουργείο). Επιπλέον, η σύστασή τους ποικίλει ανάλογα με τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες, την ποικιλία των ελαιόκαρπων, το στάδιο ωρίμανσης του καρπού, τη χρήση παρασιτοκτόνων και λιπασμάτων, τον τρόπο συγκομιδής και αποθήκευσης του (Cabrera et al., 1996). Επίσης, οι μετρούμενες διαφορές ίσως να οφείλονται στις διαφορετικές συνθήκες δειγματοληψίας του κατσίγαρου, π.χ. αμέσως μετά την παραγωγή ή αφού περάσουν κάποιες ημέρες, από ανοιχτή ή κλειστή δεξαμενή απόθεσης, δείγμα επιφανειακό ή βάθους. Στον πίνακα 1.2 φαίνονται τα γενικά χαρακτηριστικά

των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων τριών φάσεων, όπως ανέκυψαν από διάφορες ερευνητικές εργασίες:

Πίνακας 1.2: Μέση σύσταση των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων

<i>Παράμετρος</i>	<i>Τιμή</i>
pH	4.7-5.2
ΒΑΟ (Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο)	30.000-40.000 ppm
ΧΑΟ (Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο)	45.000-60.000 ppm
Στερεά αιωρούμενα	0.9
Στερεά ολικά	4.0 %
Στερεά οργανικά	3.5 %
Στερεά ανόργανα	0.5 %

<i>Οργανικές ουσίες</i>	
Ολικά σάκχαρα	1 %
Αζωτούχες ενώσεις	0.28 %
Οργανικά οξέα	0.3 %
Πολυαλκοόλες	1.1 %
Πολυπηκτίνες, τανίνες κλπ	1.37 %
Πολυφαινόλες	0.5 %

<i>Ανόργανα στοιχεία</i>	
P	96 ppm
K	1200 ppm
Ca	120 ppm
Mg	48 ppm
Na	245 ppm
Fe	16 ppm

Από τα συστατικά του κασίγαρου, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φαινόλες, οι οποίες ως αντιοξειδωτικές ουσίες εμποδίζουν τη διάσπαση των λιπαρών οξέων και βοηθούν στη διατήρηση του λαδιού (Tsimidou et al., 1992; Ryan and Robards et al., 1998). Είναι όμως η κύρια ρυπαντική παράμετρος, η οποία ευθύνεται για τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων.

1.4 Περιβαλλοντικά προβλήματα από την ανεξέλεγκτη διάθεση των αποβλήτων των ελαιουργείων

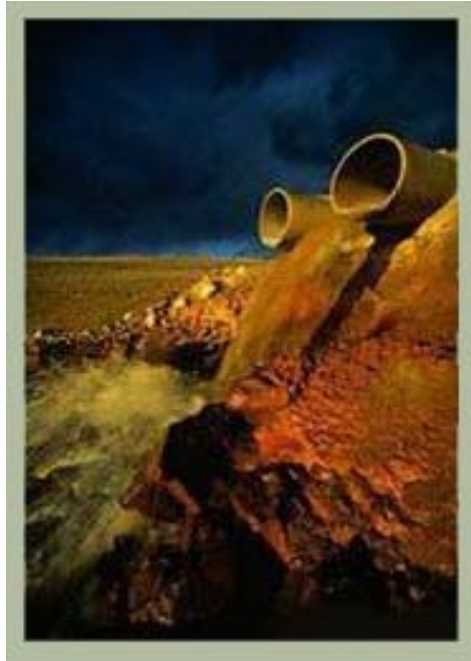
Τα υγρά απόβλητα του ελαιουργείου συγκαταλέγονται στα ιδιαίτερα τοξικά, από άποψη ρυπαντικού φορτίου, αγροτοβιομηχανικά απόβλητα. Δεδομένου ότι κάθε μεσαίου μεγέθους ελαιοτριβείο παράγει περίπου 1.000 tn απόβλητα ανά περίοδο συγκομιδής ελαιόκαρπου, είναι φανερό ότι η ρύπανση από τον κασίγαρο αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα περιβαλλοντικά προβλήματα στις χώρες της Μεσογείου. Μερικά από αυτά είναι η καταστροφή των υδάτινων συστημάτων, η ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων καθώς και η γενικότερη υποβάθμιση του περιβάλλοντος γύρω από τα ελαιοτριβεία.

Τα λύματα αυτά όπως προκύπτουν από τα ελαιοτριβεία, εκχύνονται αρκετές φορές, μέχρι και σήμερα, σε κοντινούς στα ελαιουργεία υδάτινους αποδέκτες όπως ρεματιές, ποτάμια, λίμνες και θάλασσες (Εικόνα 1.1). Στις περιπτώσεις αυτές δημιουργούνται τεράστια προβλήματα μόλυνσης των υπογείων υδάτων λόγω της τοξικότητας των αποβλήτων. Επιπλέον, παρατηρούνται φαινόμενα έλλειψης οξυγόνου, το οποίο καταναλώνεται για την οξειδωση των οργανικών ουσιών, από ομάδες μικροοργανισμών που αναπτύσσονται και επικρατούν στα σημεία απόρριψης των αποβλήτων αυτών. Κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες, το ισοζύγιο οξυγόνου του υδάτινου περιβάλλοντος διαταράσσεται προκαλώντας τοξικά φαινόμενα στην υδρόβια πανίδα και καταστροφή του Ενωάλιου πλούτου.



Εικόνα 1.1: Διάθεση υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου σε υδάτινους φορείς

Η μη ελεγχόμενη διάθεση του κασιόγαρου στο έδαφος ή στα ελαιοχώραφα είναι μια άλλη εφαρμοζόμενη τακτική (Εικόνα 1.2). Στην περίπτωση αυτή, δημιουργούνται προβλήματα φυτοτοξικότητας στις αγροτικές καλλιέργειες λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων αλάτων, της μεγάλης οξύτητας και της υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων, στις οποίες έχουν αποδοθεί φυτοτοξικές ιδιότητες. Ακόμη, η διάθεση των αποβλήτων αυτών στο έδαφος προκαλεί φραγή των πόρων των πετρωμάτων αφού το συγκεκριμένο απόβλητο περιέχει μη αποικοδομήσιμες ύλες όπως φαινόλες, αλδεΐδες, τανίνες, εστέρες κ.λ.π.. Επιπλέον, συμβάλλει στη μεταβολή των καιρικών φαινομένων επειδή συμπεριφέρεται ως «μονωτικό υλικό» το οποίο δεν επιτρέπει τη συγκέντρωση νερών λόγω βροχοπτώσεων (εξαιτίας της εξουδετέρωσης του ηλεκτρικού φορτίου του γαιωειδούς που προκαλεί, με συνέπεια τη βαθμιαία ξηρασία των ζωνών όπου απαντάται).



Εικόνα 1.2: Διάθεση υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου στο έδαφος

Το θεσμικό και νομικό πλαίσιο απαγορεύει πλέον την ανεξέλεγκτη διοχέτευση του κασίγαρου στη φύση. Σήμερα η κύρια πρακτική που ακολουθείται από την πλειονότητα των ελαιουργείων όσον αφορά τη διαχείριση του κασίγαρου είναι η διοχέτευση και η αποθήκευση του σε λεκάνες εξατμισοδιαπνοής για μερική αποικοδόμηση και εξάτμιση. Οι λεκάνες (δεξαμενές) αυτές είναι τεχνητές κοιλότητες, σκαμμένες μέσα στο έδαφος, συχνά χωρίς μόνωση και χωρίς να γίνει σωστός υπολογισμός του μεγέθους τους. Ο κασίγαρος σε περιπτώσεις απουσίας σχετικών υποδομών διατίθεται αυτούσιος στο περιβάλλον με όλες τις γνωστές συνέπειες.



Εικόνα 1.3: Διοχέτευση υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου σε λεκάνες εξατμισοδιαπνοής

Παρόλα αυτά η εφαρμογή των λεκανών εξατμισοδιαπνοής δεν αποτελεί την ενδεδειγμένη λύση όσον αφορά τη διαχείριση του κασιγάρου με κύριο κριτήριο την προστασία του φυσικού περιβάλλοντος. Ένα από τα σημαντικά προβλήματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της συγκεκριμένης πρακτικής είναι η αλλοίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών των υπόγειων υδάτων λόγω κατείσδυσης του κασιγάρου στις περιπτώσεις όπου δεν έχει πραγματοποιηθεί στεγανοποίηση του πυθμένα των λεκανών. Επιπλέον, η μειωμένη ηλιοφάνεια που επικρατεί κατά την περίοδο παραγωγής του κασιγάρου δεν ευνοεί τη συμπύκνωση του, ενώ οι αυξημένες βροχοπτώσεις αραιώνουν και συμπαρασύρουν τον κασιγάρο στα υδάτινα αποθέματα στα οποία προκαλείται εκτεταμένη ρύπανση. Τέλος δημιουργούνται διαμαρτυρίες από τους κατοίκους σε σημαντική ακτίνα περιμετρικά των λεκανών εξατμισοδιαπνοής λόγω της έκλυσης έντονα δυσάρεστων οσμών και αισθητική υποβάθμιση της ευρύτερης της λεκάνης περιοχής. Από τα πιο πάνω προβλήματα, τα δύο τελευταία είναι ιδιαίτερης σημασίας σε περιοχές όπου υπάρχει σημαντική τουριστική δραστηριότητα.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι ο βασικός λόγος για την εφαρμογή των προαναφερθέντων πρακτικών ήταν η έως σήμερα απουσία μεθόδων διαχείρισης του κασιγάρου, οι οποίες θα μπορούσαν να εγγραφούν ταυτόχρονα:

- Την αποτελεσματική επεξεργασία των συγκεκριμένων υγρών αποβλήτων, και,
- Τη βιωσιμότητα της σχετικής επένδυσης ή έστω το χαμηλό κόστος της (κατασκευαστικό και λειτουργικό) ώστε να μην επιβαρυνθεί τελικά το κόστος παραγωγής του ελαιόλαδου.

1.5 Μέθοδοι διαχείρισης των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων

Ο βιοτοξικός χαρακτήρας των φαινολών που συναντώνται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στον παραγόμενο κασίγαρο αποτελεί σημαντικότερο ανασταλτικό παράγοντα των βιολογικών δράσεων που λαμβάνουν χώρα στις συμβατικές μεθόδους επεξεργασίας αποβλήτων. Αυτός είναι ο κυριότερος λόγος για τον οποίο οι κλασικές μέθοδοι βιολογικής επεξεργασίας αποβλήτων δεν αποδίδουν στον επιθυμητό βαθμό όταν εφαρμόζονται για την επεξεργασία κασίγαρου.

Για την επεξεργασία και μετέπειτα διάθεση των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων έχουν εκπονηθεί πλήθος ερευνητικών προγραμμάτων τα τελευταία είκοσι χρόνια στην Ελλάδα και στο εξωτερικό, και διάφορες βιολογικές ή φυσικοχημικές μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί σε εργαστηριακή κλίμακα για την εξουδετέρωση του ρυπαντικού φορτίου. Οι μέθοδοι αυτές απαιτούν ιδιαίτερα υψηλό κόστος για την προμήθεια του αναγκαίου εξοπλισμού, κόστος το οποίο είναι δυσβάστακτο για το οικονομικό μέγεθος της πλειονότητας των ελαιουργείων του Ελλαδικού χώρου. Επίσης, οι μέθοδοι αυτές απαιτούν υψηλό λειτουργικό κόστος συντήρησης των συστημάτων επεξεργασίας, γεγονός το οποίο σε συνδυασμό με την παραγωγή παραπροϊόντων χαμηλής ή μέσης εμπορικής αξίας καθιστά τη λειτουργία των συστημάτων αυτών ασύμφορη και μη βιώσιμη.

Οι μέθοδοι επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων περιλαμβάνουν φυσικοχημικές μεθόδους που αποσκοπούν στην

απομάκρυνση του οργανικού φορτίου από την υγρή φάση. Αυτό συνήθως γίνεται με μεθόδους όπως είναι η κατανομή των αποβλήτων σε αγροτικά εδάφη σαν οργανικό λίπασμα (π.χ. στους ελαιώνες) (Paredes et al., 2001; Ramos et al., 1995). Παρά το ότι η εφαρμογή του κασίγαρου στο έδαφος γίνεται εύκολα και άμεσα, προκαλείται έντονο πρόβλημα δυσοσμίας, ρύπανσης υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα και ζημιάς στα ελαιόλενδρα (κυρίως στις ρίζες).

Μια άλλη φυσικοχημική μέθοδος των αποβλήτων αυτών αποτελεί η καθίζηση η οποία έχει ως αποτέλεσμα 40% μείωση του οργανικού φορτίου αλλά οδηγεί σε μεγάλη παραγωγή λάσπης. Ακόμη μια μέθοδος που συγκαταλέγεται στην κατηγορία των φυσικοχημικών, είναι η διαδικασία της κατακρήμνισης. Μειονέκτημα αυτής, αποτελεί το γεγονός ότι τα απόβλητα και η χημική-οργανική λάσπη που παράγονται στο τέλος, έχουν όλη την τοξικότητα του αρχικού φυτικού νερού προκαλώντας σοβαρά προβλήματα διάθεσης (Fiestas and Borja, 1992).

Η εναπόθεση των υγρών αποβλήτων σε δεξαμενές είναι η μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου με την οποία αντιμετωπίζεται προς το παρόν το πρόβλημα αυτό. Είναι μια φυσική μέθοδος που αποσκοπεί στην εξάτμιση του ύδατος από το απόβλητο αφού πολύ μικρή βιολογική αποδόμηση λαμβάνει χώρα (Fiestas and Borja, 1992). Αντιμετωπίζει όμως το μειονέκτημα του υψηλού κόστους που οφείλεται στις υψηλές απαιτήσεις γης και της ανάγκης λήψης ειδικών μέτρων για την ασφάλεια της δημόσιας υγείας (Marinos et al., 1991).

Η αποτέφρωση του αποβλήτου είναι μια αξιόπιστη μέθοδος επεξεργασίας αλλά ακριβή, που χαρακτηρίζεται από την υψηλή απαίτηση της σε ενέργεια και την εκπομπή ρυπαντικών ουσιών στην ατμόσφαιρα. Η επίπλευση για την απομάκρυνση αιωρούμενων στερεών (Fiestas Ros de Ursinos et al., 1981), η φυγοκέντριση, η προσρόφηση με ενεργό άνθρακα, και πιο πρόσφατα ο διαχωρισμός μέσω μεμβρανών (π.χ. αντίστροφη ώσμωση και υπερδιήθηση) (Reimers et al., 1983; Borja et al., 1998), έχουν σοβαρά μειονεκτήματα όπως το υψηλό κόστος επένδυσης και συντήρησης το οποίο συγκρούεται με τον

εποχιακό χαρακτήρα της εξαγωγής του ελαιόλαδου. Συγκεκριμένα, με την αντίστροφη ώσμωση μπορεί να επιτευχθεί 90 % αποτελεσματικότητα στην απομάκρυνση του οργανικού φορτίου, αλλά η μέθοδος αυτή αντιμετωπίζει προβλήματα υψηλού λειτουργικού κόστους και απαλλαγής της παραγόμενης λάσπης (Fiestas and Borja, 1992).

Τα τελευταία χρόνια προηγμένες μέθοδοι οξειδωσης έχουν μελετηθεί όσο αφορά την αποτελεσματικότητά τους στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων. Διεργασίες όπως είναι η ηλεκτροχημική οξειδωση, οξειδωση με το αντιδραστήριο Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$), οξειδωση με χρήση όζοντος (ozonation) και φωτοκατάλυση μπορούν μόνο να επιτύχουν μερική απολύμανση, ακόμη και μετά από πολλές φορές εφαρμογής.

Η ηλεκτροχημική οξειδωση με τη χρήση NaCl προσφέρει ενδεχομένως μια επικερδή μέθοδο επεξεργασίας δεδομένου ότι τα υγρά απόβλητα μπορούν να καταστραφούν μέσω του συνδυασμού της άμεσης και έμμεσης ανοδικής οξειδωσης. Μειονέκτημα που συσχετίζεται με τη χρήση του NaCl ως ηλεκτρολύτη, αποτελεί ο σχηματισμός τοξικών οργανοχλωριωμένων παραπροϊόντων που απαιτείται να αφαιρεθούν πριν την τελική διάθεση του αποβλήτου (Giannes et al., 2003; Israilides et al., 1997).

Μια άλλη ηλεκτροχημική οξειδωση μπορεί να συνδεθεί με ακόμη μια προηγμένη μέθοδο οξειδωσης όπως με το αντιδραστήριο Fenton να βελτιώνει το ρυθμό απομάκρυνσης. Επειδή τα εργοστάσια παραγωγής ελαιόλαδου είναι συνήθως μικρές μονάδες με μικρή εποχιακή παροχή αποβλήτων, μια μικρή μονάδα Fenton είναι αρκετή για να αντεπεξέλθει αποτελεσματικά με τα παραγόμενα απόβλητα (Rivas et al., 2001a).

Η φωτοκατάλυση με τη χρήση ηλιακής ενέργειας είναι μια υποσχόμενη μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου δεδομένου ότι οι μεγαλύτερες πόλεις παραγωγής του ελαιόλαδου επωφελούνται από την υψηλή ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Την αποτελεσματικότητα της μεθόδου έδειξε πρόσφατη έρευνα (Gernjak et al.,

2003a), όπου το απόβλητο επεξεργάστηκε σε διάφορους, πιλοτικής κλίμακας φωτο-αντιδραστήρες.

Το όζον, αν και ισχυρό οξειδωτικό δεν είναι ικανό για επεξεργασία υψηλής συγκέντρωσης υγρού αποβλήτου. Πολλές έρευνες (Benitez et al., 1997, 1999; Beltran-Heredia et al., 2001; Andreozzi et al., 1998) έδειξαν ότι το ποσοστό απομάκρυνσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου που επιτυγχάνεται κατά τη διάρκεια της χρήσης όζοντος στις ευνοϊκότερες συνθήκες είναι μόλις 20-30 %.

Οι μέθοδοι επεξεργασίας της υψηλής θερμοκρασίας και της υψηλής πίεσης όπως υγρή οξείδωση μπορούν να επιτύχουν υψηλό ποσοστό απομάκρυνσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου σε σχετικά μικρό χρόνο επεξεργασίας. Μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί το υψηλό κόστος εγκατάστασης και λειτουργίας εξαιτίας των αυστηρών συνθηκών που απαιτούνται. Το υψηλό κόστος κεφαλαίου και λειτουργίας συνδέεται με την υψηλή πίεση που εφαρμόζεται και με τη χρήση κατασκευαστικών υλικών που πρέπει να είναι ανθεκτικά στους υψηλούς ρυθμούς διάβρωσης που εμφανίζονται υπό τις συνθήκες αυτές (Rivas et al., 2001b, 2001c).

Λίγες αμφιβολίες υπάρχουν ότι οι βιολογικές διεργασίες είναι οι πιο συμβατές για το περιβάλλον και οι λιγότερο δαπανηρές μέθοδοι επεξεργασίας αποβλήτων. Επιπλέον, όσον αφορά τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου έχουν σίγουρα πλεονεκτήματα λόγω της ενδεχόμενης αξιοποίησης των παραπροϊόντων (κομπόστ για βιοαποκατάσταση, βιοαέριο για παραγωγή ενέργειας, φυσικές χρωστικές ουσίες, πρωτεΐνες για εμπλουτισμό στις ζωοτροφές). Η παραγωγή πρωτεϊνών για πρόσθετο στις ζωοτροφές έχει χαμηλό πάγιο κόστος αλλά απαιτεί επιπρόσθετες μεθόδους επεξεργασίας λόγω της χαμηλής αρχικής απομάκρυνσης του οργανικού φορτίου (50 %). Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η πικρή γεύση που έχει και η χαμηλή περιεκτικότητα σε κυτταρίνη (Clemente et al., 1997; Haddadin et al., 1999). Η κομποστοποίηση είναι μια κατάλληλη μέθοδος από περιβαλλοντική σκοπιά αφού το τελικό προϊόν είναι πλούσιο σε άζωτο. Επιπλέον, έχει χαμηλό πάγιο κόστος και το τελικό προϊόν μπορεί να αξιοποιηθεί εμπορικά ως υψηλής

ποιότητας ρυθμιστικό του χύματος Παρόλ' αυτά το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μεγάλη περίοδος ωρίμανσης και τα μέτρα που απαιτούνται για την αποφυγή της δυσσομίας (Carter et al., 2001).

Η αναερόβια χώνευση είναι συνήθως η πιο βασική βιολογική μέθοδος επεξεργασίας για τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου εφόσον έχει πιο πολλά πλεονεκτήματα εν συγκρίσει με τις αερόβιες μεθόδους. Οι αναερόβιες διεργασίες απαιτούν λιγότερη ενέργεια και παράγουν λιγότερη χωνευμένη λάσπη απ' ότι οι αερόβιες διεργασίες αφού υπερέχουν στην παραγωγή ενέργειας σε μορφή βιοαερίου. Μπορούν επιπλέον να αντεπεξεχθούν στην εποχιακή παραγωγή των αποβλήτων αφού οι αναερόβιοι χωνευτήρες μπορούν εύκολα να επαναλειτουργήσουν ακόμη και μετά από πολλούς μήνες διακοπή. Από την άλλη μεριά, οι αναερόβιες διεργασίες έχουν μελετηθεί από πολλούς ερευνητές (Fiestas et al., 1982; Rozzi et al., 1989; Martin et al., 1991) αλλά δεν μπορούν να αντεπεξεχθούν στο υψηλό οργανικό φορτίο των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων αν αυτά δεν υποστούν αραίωση πολλές φορές πριν τη βιολογική επεξεργασία, κάτι που επιφέρει σοβαρές επιπτώσεις στο κόστος. Η παρουσία κάποιων παρεμποδιστών και/ή τοξικών ενώσεων για τα μεθανογόνα βακτήρια, όπως πολυφαινόλες και λιπίδια καθιστούν τα υγρά απόβλητα ελαιουργείου ακατάλληλα για απευθείας αναερόβια επεξεργασία.

Ένα στάδιο αερόβιας προεπεξεργασίας των υγρών αποβλήτων του ελαιουργείου μπορεί να είναι ευνοϊκό για τη βελτίωση της αναερόβιας χώνευσης, μειώνοντας τη ποσότητα των συνολικών φαινολικών ενώσεων που συνδέονται με την τοξικότητα του αποβλήτου. Ο Borja et al. (1998), μελέτησε την επίδραση αερόβιας προεπεξεργασίας με τη χρήση τριών διαφορετικών καλλιεργείων (*Aspergillus terreus*, *Azotobacter chroococcum*, *Geotrichum candidum*) στην επακόλουθη αναερόβια χώνευση του αποβλήτου και ανακάλυψε ότι ο ρυθμός της αποδόμησης ήταν 2.5-4.5 φορές μεγαλύτερος (εξαρτάται από την καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε) από την αναερόβια αποδόμηση χωρίς προεπεξεργασία. Αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι η προεπεξεργασία ήταν ικανή για τη μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου και της συγκέντρωσης των ολικών φαινολών καθώς και της τοξικότητας σε ποσοστό 63-75 %, 65-95 % και 59-87 %, αντίστοιχα για τις διάφορες

καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν. Άλλες μελέτες, π.χ. Fountoulakis et al., (2002), έδειξαν ότι η προεπεξεργασία θερμικά επεξεργασμένου υγρού αποβλήτου του ελαιουργείου με τον *Pleurotus ostreatus* ήταν ικανή για να βελτιώσει την απόδοση της επακόλουθης αναερόβιας χώνευσης. Αερόβια επεξεργασία διάρκειας 21 ημερών κατάφερε να απομακρύνει το 65 % του φαινολικού φορτίου, ποσοστό αρκετό ώστε να μην παρεμποδίζονται τα μεθανογόνα βακτήρια.

Αρκετές άλλες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την αποτελεσματικότητα της αερόβιας αποδόμησης του φαινολικού φορτίου και την αποτοξικοποίηση. Κάποιες από τις αντιπροσωπευτικές βιβλιογραφίες αποτελούν οι: Aggelis et al., 2003 (*Pleurotus ostreatus*), Tsioulpas et al., 2002 (διάφορα στελέχη *Pleurotus*), Blaquez et al., 2002 (*Phanerochaete flavido-alba*), Garcia Garcia et al., 2000 (*Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Geotrichum candidum*), Robles et al., 2000 (various strains of *Penicillium*), D'Annidale et al., 1998-1999 (*Lentinula edodes*), Ehaliotis et al., 1999 (*Azotobacter vinelandii*) και Yesilada et al., 1998 (*Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*).

Ο συνδυασμός και η συγχώνευση του κασίγαρου με άλλα απόβλητα προσφέρει πλεονεκτήματα όπως είναι η μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου της τροφοδοσίας και της συνολικής συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων. Επιπλέον, αν ο κασίγαρος αναμειχθεί με απόβλητα πλούσια σε θρεπτικά (π.χ. άζωτο και φωσφόρο) τότε δεν είναι απαραίτητη επιπλέον προσθήκη αυτών. Τέλος, η πιθανότητα περιοδική λειτουργίας μονάδας επεξεργασίας βασίζεται στη συγχώνευση εποχιακά παραγόμενων αποβλήτων. Η ιδέα αυτή, εκφράστηκε σε πρόσφατες μελέτες από τον Marques et al. (2001) που μελέτησε τη συγχώνευση του κασίγαρου με απόβλητα χοιροστασίου (ακατέργαστα ή ήδη αναερόβια χωνευμένα) σε αναερόβια φίλτρα. Η διαδικασία ήταν ικανή για την απομάκρυνση 70-80 % του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου και 50-70 % των φαινολικών με τροφοδοσία στην οποία η αναλογία του κασίγαρου προς τα απόβλητα του χοιροστασίου κατά όγκο ήταν πάνω από 83 %. Σε άλλη μελέτη, (Gavala et al., 1996, 1999) αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο για τη συγχώνευση αποβλήτων

χοιροστασίου, ελαιουργείου και καθημερινών αποβλήτων που προβλέπει την απόκριση του χωνευτήρα που υποβάλλεται σε διακυμάνσεις της εποχιακής τροφοδοσίας.

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι προηγμένες μέθοδοι οξειδωσης συνδυασμένες με βιολογικές επεξεργασίες αποβλήτων. Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων από μια σειρά χημικών και βιολογικών διαδικασιών έχει μελετηθεί σε πρόσφατες μελέτες. Ενδεικτικά αναφέρονται: Beltran-Heredia et al., 2001 (Fenton οξειδωση-αεριζόμενους μικροοργανισμούς), Benitez et al., 1999 (χρήση όζοντος-εγκλιματισμός σε ενεργή ιλύ), Andreozzi et al., 1998 (χρήση όζοντος-αναερόβια χώνευση με μεικτή εγκλιματισμένη και μη εγκλιματισμένη λάσπη) και Benitez et al., 1997 (χρήση όζοντος-αναερόβια χώνευση με ακινητοποιημένη εγκλιματισμένη βιομάζα).

Κατά γενικό κανόνα, η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων βελτιώνεται με τις συνδυασμένες διαδικασίες. Όμως, σε κάποιες περιπτώσεις, μπορεί να παρατηρηθούν αντίθετες επιπτώσεις αφού το στάδιο της χημικής οξειδωσης πιθανόν να οδηγήσει στο σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων, με αποτέλεσμα το απόβλητο να γίνει πιο τοξικό απ' ότι ήταν στην αρχή. Αυτό μπορεί κάποιες φορές να ξεπεραστεί αν προηγηθεί ένα βιολογικό στάδιο το οποίο θα ακολουθείται με επιπλέον χημική οξειδωση (π.χ. βιολογικό→χημικό ή βιολογικό→χημικό→βιολογικό).

Παρά τις πολλές έρευνες που έγιναν τις δύο τελευταίες δεκατίες, η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων παραμένει ένα σύνθετο και δυσεπίλυτο περιβαλλοντικό πρόβλημα το οποίο δεν έχει επιλυθεί ικανοποιητικά κυρίως εξαιτίας κοινωνικοοικονομικών παρά τεχνολογικών λόγων. Οι βασικότεροι περιορισμοί των πιο πάνω μεθόδων επεξεργασίας οφείλονται στο γεγονός ότι η παραγωγή των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα από πολλές μικρές σχετικά μονάδες διάσπαρτες σε μεγάλη έκταση της χώρας. Επιπλέον, η συγκέντρωση και η σύνθεση των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων είναι τέτοια που καθιστά πολλές από τις πιο πάνω μεθόδους επεξεργασίας μη αποδοτικές ή

και μη φιλικές προς το περιβάλλον. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η επεξεργασία των αποβλήτων αυτών να γίνεται τις περισσότερες φορές χρησιμοποιώντας την πρακτική της καθίζησης ή της εξάτμισης σε δεξαμενές, διαδικασίες σχετικά φθηνές αλλά όχι ιδιαίτερα φιλικές προς το περιβάλλον.

1.6 Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής

Παρά τα ικανοποιητικά αποτελέσματα που παρουσίασαν κάποιες φυσικοχημικές μέθοδοι οξειδωσης, περιορίστηκαν σε εργαστηριακή ή σε ελάχιστες περιπτώσεις σε πιλοτική κλίμακα. Αυτό οφειλόταν στο τεράστιο κόστος για την προμήθεια του αναγκαίου εξοπλισμού και το υψηλό λειτουργικό κόστος συντήρησης των συστημάτων επεξεργασίας με αποτέλεσμα η γενικότερη λειτουργία των συστημάτων αυτών να καθίσταται ασύμφορη και μη βιώσιμη.

Τα τελευταία χρόνια μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η βιολογική μέθοδος επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων ελαιουργείου με τη χρήση μυκήτων λευκής σήψης (Βασιδιομύκητες) με σκοπό την αποτοξικοποίησή τους. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του αποτελεσματικού μεταβολισμού πολυφαινολικών συστατικών, αποχρωματισμού του αποβλήτου και μείωση του οργανικού φορτίου. Στόχος λοιπόν, της παρούσας έρευνας είναι να προσεγγίσουμε το πρόβλημα επεξεργασίας και αποτοξικοποίησης του κασιόγαρου με τη χρήση στελεχών μυκήτων του γένους *Pleurotus*. Μελετάται η συνδυασμένη δράση ενός συστήματος βιοεπεξεργασίας του αποβλήτου, όπου το πρώτο στάδιο θα περιλαμβάνει την αερόβια ζύμωση με μύκητες λευκής σήψης και το δεύτερο την αναερόβια επεξεργασία του κασιόγαρου που προηγουμένως έχει υποστεί επεξεργασία με τη χρήση μυκήτων.

Η δομή της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έχει ως εξής:

Στο κεφάλαιο 2 περιγράφονται οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής και

επιπλέον, γίνεται ένας πρώτος χαρακτηρισμός του υγρού αποβλήτου ελαιουργείου τριών φάσεων με το οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πειράματά μας.

Το κεφάλαιο 3 περιλαμβάνει το πρώτο στάδιο της έρευνας αυτής. Στην αρχή, γίνεται μια συγκριτική αξιολόγηση πέντε στελεχών των μυκήτων λευκής σήψης του γένους *Pleurotus* (τέσσερα του είδους *Pleurotus ostreatus* και ένα του είδους *Pleurotus pulmonarius*). Μετά την επιλογή του αποδοτικότερου στελέχους με κυριότερο κριτήριο την αποδόμηση του φαινολικού φορτίου του αποβλήτου, ακολουθεί ο σχεδιασμός, η λειτουργία και η αριστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας καινοτόμων βιοαντιδραστήρων, κατάλληλων για τη βέλτιστη ανάπτυξη του επιλεγμένου μικροοργανισμού σε αιωρούμενη ή σε ακινητοποιημένη μορφή. Σε κάποια πειράματα, η αριστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας των αντιδραστήρων έγινε με τη χρήση ενός εύκολα βιοαποδομήσιμου μέσου για το μύκητα, σε σχέση με το υγρό απόβλητο ελαιουργείου, προκειμένου να δημιουργηθούν στο σύστημα οι ευνοϊκότερες συνθήκες.

Το κεφάλαιο 4 αποτελεί το δεύτερο μέρος της διατριβής αυτής. Εδώ ερευνάται εάν το απόβλητο που προηγουμένως έχει βιοεπεξεργαστεί με μύκητες λευκής σήψης και συγκεκριμένα στελέχη του γένους *Pleurotus* για την απομάκρυνση του φαινολικού φορτίου επιδεικνύει καλύτερη συμπεριφορά στην αναερόβια επεξεργασία εν συγκρίσει με το μη επεξεργασμένο απόβλητο. Αυτό πραγματοποιείται διεξάγοντας πείραμα όπου μετράται το κλάσμα του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου του αποβλήτου που απομακρύνεται αναερόβια και του όγκου μεθανίου που μπορεί να παραχθεί από την απομάκρυνση αυτή (πείραμα BMP). Πριν την τέλεση του πειράματος έγιναν κάποιες διαδικασίες ώστε να εξασφαλιστεί η σωστή και επιτυχή διεξαγωγή του. Στις διαδικασίες αυτές περιλαμβάνονται η ανάπτυξη των μυκήτων στο υγρό απόβλητο, ο εγκλιματισμός δύο ειδών αναερόβιας λάσπης ώστε να επιλεγθεί αυτή που θα χρησιμοποιηθεί, καθώς και η επιλογή του ρυθμιστικού παράγοντα του πειράματος.

Τέλος, στο κεφάλαιο 5 αναφέρονται τα κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής και γίνονται προτάσεις για μελλοντική εργασία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται λεπτομερώς όλες οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής. Επιπλέον γίνεται η περιγραφή του χαρακτηρισμού του αποβλήτου ελαιουργείου που προμηθευτήκαμε για την εκτέλεση των πειραμάτων και τέλος περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθείται για την διεξαγωγή του πειράματος για τον προσδιορισμό του βιοχημικού δυναμικού μεθανίου (Biochemical Methane Potential, BMP).

2.2 Αναλυτικές μέθοδοι

2.2.1 Γενικά

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων έγιναν χημικοί προσδιορισμοί ολικού και διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ), συγκέντρωσης φαινολικών ενώσεων (φωτομετρικά με αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu) και συγκέντρωσης ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών. Παραγματοποιήθηκαν ακόμη μετρήσεις ογκομετρικής παραγωγής και σύστασης βιοαερίου σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα, ενώ οι μετρήσεις του pH συμπληρώνουν τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου και της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών

γίνονταν στο διήθημα του υπερκείμενου της φυγοκέντρισης των δειγμάτων. Η φυγοκέντρωση γινόταν σε 3000 rpm για 10 λεπτά, ενώ η διήθηση γινόταν υπό κενό μέσω ηθμών ινών υάλου (Whatman GF/C, με διάμετρο πόρων 1.2 μm). Στη συνέχεια ακολουθεί η περιγραφή της κάθε μεθόδου ξεχωριστά.

2.2.2 Μέτρηση pH

Η μέτρηση του pH γινόταν σε όγκο δείγματος περίπου 10 ml και αμέσως μετά τη συλλογή του εξαιτίας της μεταβολής της τιμής του pH με τη θερμοκρασία. Η μέτρηση γινόταν με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του φορητού πεχαμέτρου τύπου pH 211 της Hanna στο προς ανάλυση δείγμα. Πριν και μετά τη μέτρηση γινόταν βαθμονόμηση και έλεγχος, αντίστοιχα, του οργάνου με δύο πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα (pH 4 και pH 7).

2.2.3 Προσδιορισμός ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών

Ο προσδιορισμός των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών γινόταν σύμφωνα με τις μεθόδους που περιγράφονται στο εγχειρίδιο «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater», (1995).

Ως ολικά αιωρούμενα στερεά (ΟΑΣ) χαρακτηρίζονται τα μη διηθούμενα στερεά. Για τον προσδιορισμό τους, γνωστή ποσότητα καλώς αναμειγμένου δείγματος (τουλάχιστον 10 ml) διηθείται υπό κενό σε προζυγισμένο ηθμό ινών υάλου. Το υλικό που κατακρατείται στον ηθμό ξηραίνεται μέχρι σταθερού βάρους σε φούρνο στους 103-105 °C. Η αύξηση του βάρους του ηθμού αντιπροσωπεύει τα ολικά αιωρούμενα στερεά.

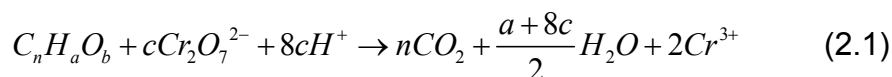
Τα πτητικά αιωρούμενα στερεά (ΠΑΣ) αποτελούν το κλάσμα των ολικών αιωρούμενων στερεών, το οποίο εξαερώνεται στους 550 °C. Για τον προσδιορισμό τους, ο ηθμός στον οποίο έχουν κατακρατηθεί τα ολικά αιωρούμενα στερεά πυρακτώνεται, μέχρι σταθερού βάρους σε θερμοκρασία

ίση με 550 °C. Η μείωση του βάρους του ηθμού αντιστοιχεί στα πτητικά αιωρούμενα στερεά.

2.2.4 Προσδιορισμός ολικού και διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ)

Ως χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (ΧΑΟ) ορίζεται η ισοδύναμη ποσότητα οξυγόνου που απαιτείται για την οξειδωση των συστατικών ενός δείγματος από ισχυρά οξειδωτικό μέσο. Ο προσδιορισμός του ΧΑΟ βασίζεται στο γεγονός ότι όλες οι οργανικές ενώσεις, με ελάχιστες εξαιρέσεις, μπορούν να οξειδωθούν από ισχυρά οξειδωτικά. Η οξειδωση του οργανικού υλικού ενός διαλύματος γίνεται από περίσσεια διχρωμικού καλίου ($K_2Cr_2O_7$) με θέρμανση και σε ισχυρά όξινες συνθήκες. Ως καταλύτης για την οξειδωση των αλειφατικών ενώσεων χρησιμοποιείται θειικός άργυρος ($AgSO_4$). Για την αποφυγή της δέσμευσης των ιόντων αργύρου από χλωριούχα, βρωμιούχα και ιωδιούχα ιόντα τα οποία συνήθως υπάρχουν στα απόβλητα, γίνεται προσθήκη ιόντων υδραργύρου με τη μορφή θειικού υδραργύρου ($HgSO_4$) τα οποία συμπλοκοποιούνται με τα ανιόντα αλογόνων, προκαλώντας τους ιζηματοποίησηση.

Η αντίδραση οξειδωσης του οργανικού από τα διχρωμικά ιόντα περιγράφεται γενικά από την εξίσωση 2.1 (Sawyer and McCarty, 1987a):



Όπου: $c = \frac{2}{3}n + \frac{a}{6} - \frac{b}{3}$

Ο προσδιορισμός του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου γίνεται με τη μέθοδο κλειστής επαναρροής με φωτομέτρηση στα 600 nm σε ηλεκτρονικό φωτόμετρο τύπου Hach DR/2010, όπως περιγράφεται στο Standard Methods.

Η μέθοδος κλειστής επαναρροής βασίζεται στην φωτομέτρηση των ιόντων Cr^{3+} τα οποία προέκυπταν έπειτα από την οξείδωση του οργανικού υλικού.

Ο προσδιορισμός του ολικού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, με τη μέθοδο της ανοικτής επαναρροής βασίζεται στην τιτλοδότηση των ιόντων Cr^{3+} με διάλυμα FAS (standard ferrous ammonium sulfate titrant), 0.25 M, παρουσία δείκτη (Ferroin indicator solution), όπως αναφέρεται στο Standard Methods. Η συσκευή με την οποία μετρείται το ολικό ΧΑΟ αποτελείται από έξι εστίες θέρμανσης στις οποίες τοποθετούνται οι φλάσκες με τα προς ανάλυση δείγματα, και από έξι συμπυκνωτήρες οι οποίοι συνδέονται με νερό βρύσης.

2.2.5 Μέτρηση συγκέντρωσης φαινολικών

Για τον προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Folin & Ciocalteu (Waterman, 1994). Η μέθοδος αυτή ανιχνεύει το σύνολο των ύδροξυ-φαινολομάδων (phenolic hydroxyl groups) που υπάρχει σε ένα δείγμα χωρίς όμως να τις διαχωρίζει. Βασίζεται στην ικανότητα των φαινολικών ενώσεων να ανάγουν τις ενώσεις του φωσφομολυβδαινικού οξέος (phosphomolybdic acid) και του φωσφοβολφραμικού οξέος (phosphotungstic acid) που περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin & Ciocalteu, δημιουργώντας χρωμοφόρες ενώσεις (μπλε χρώματος). Από την τιμή της απορρόφησης των χρωμοφόρων αυτών ενώσεων σε φωτόμετρο (τύπου Milton Roy Spectronic 601) στα 760 nm, προσδιορίζεται η συγκέντρωση των φαινολικών.

Επειδή η αναγωγική δράση (μεταφορά ηλεκτρονίων) των φαινολικών ενώσεων προάγεται σε αλκαλικό περιβάλλον, γίνεται προσθήκη διαλύματος ανθρακικού νατρίου κατά την εφαρμογή της μεθόδου. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των φαινολικών γίνεται από την πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης έναντι απορρόφησης για μια συγκεκριμένη φαινολική ένωση. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε το συριγγικό οξύ (syringic acid) και η τιμή της συγκέντρωσης των φαινολικών κάθε δείγματος εκφραζόταν σε ισοδύναμο συριγγικό οξύ.

2.2.6 Μέτρηση παραγωγής και σύστασης βιοαερίου

2.2.6.1 Ογκομετρική παραγωγή βιοαερίου

Μεγάλος όγκος παραγόμενου βιοαερίου (>0.5 l) προσδιοριζόταν από τη διοχέτευση του σε μεγάλη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας ίση με 5 l η οποία ήταν γεμάτη με οξυνισμένο υδατικό διάλυμα (pH<3) και πωματισμένη αεροστεγώς με ελαστικό πώμα το οποίο έφερε δύο ανοίγματα, ένα για το εισερχόμενο βιοαέριο και ένα για το εκτοπιζόμενο υγρό. Ο όγκος του παραγόμενου βιοαερίου ήταν ίσος με τον όγκο του εκτοπιζόμενου υδατικού διαλύματος. Το υδατικό διάλυμα είχε χαμηλό pH, έτσι ώστε να εμποδίζεται η διάχυση του παραγόμενου διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) στο νερό (H₂O + CO₂ ↔ H₂CO₃ ↔ HCO₃⁻ + H⁺ ↔ CO₃⁻² + 2H⁺).

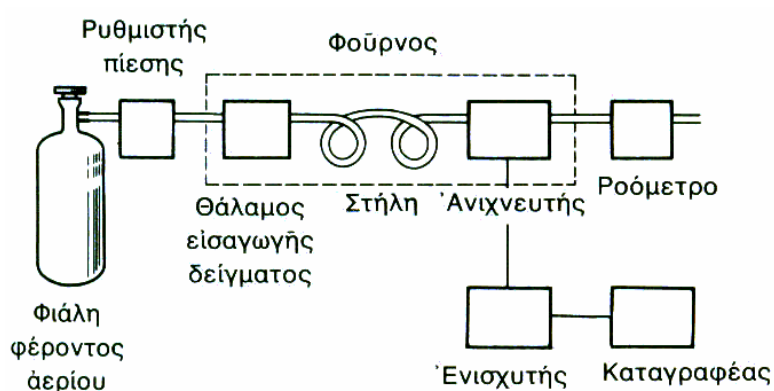
Για μικρούς όγκους παραγόμενου βιοαερίου (<0.5 l) γινόταν χρήση πλαστικών συριγγών χωρητικότητας ίση με 25 ml ή μεγαλύτερης. Το βιοαέριο διοχετευόταν σε αυτές μέσω της βελόνας τους η οποία εφαρμοζόταν στο ελαστικό πώμα των φιαλιδίων. Ο όγκος του παραγόμενου βιοαερίου προσδιοριζόταν εύκολα σύμφωνα με τη βαθμονόμηση των συριγγών.

2.2.6.2 Σύσταση βιοαερίου

Το βιοαέριο που παράγεται κατά την αναερόβια χώνευση υγρών αποβλήτων περιέχει κυρίως μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα, αλλά και ίχνη άλλων αερίων όπως υδρογόνου, υδρόθειου, αζώτου. Κάτω από συνθήκες ομαλής λειτουργίας μπορούμε να θεωρήσουμε χωρίς σημαντικό σφάλμα ότι το βιοαέριο αποτελείται μόνο από μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα. Με αυτή λοιπόν τη θεώρηση αρκεί να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα του βιοαερίου σε ένα από τα δύο αυτά αέρια για να γνωρίζουμε τη σύσταση του.

Η σύσταση του βιοαερίου προσδιοριζόταν σε αέριο χρωματογράφο. Γενικά, τα βασικά συστατικά ενός αερίου χρωματογράφου φαίνονται στο σχήμα 2.1. Το

φέρων αέριο περιέχεται σε χαλύβδινους κυλίνδρους με μεγάλη πίεση και παρέχεται στη συσκευή με έναν ή περισσότερους ρυθμιστές πίεσης που ρυθμίζουν την ταχύτητα της ροής. Το δείγμα εισάγεται σε ένα θερμαινόμενο θάλαμο είτε με μια σύριγγα που τρυπάει ένα λεπτό ελαστικό δίσκο, είτε με μια ειδική βαλβίδα. Το φέρον αέριο μεταφέρει τα συστατικά του δείγματος μέσα στην στήλη όπου διαχωρίζονται το ένα από το άλλο, και διέρχονται από τον ανιχνευτή που στέλνει σήμα στον καταγραφέα. Η στήλη βρίσκεται σε θερμοστατούμενο φούρνο, ενώ και το σύστημα εισαγωγής του δείγματος και ο ανιχνευτής μπορούν να θερμανθούν ξεχωριστά (Pecsok et al., 1980).



Σχήμα 2.1: Βασικά χαρακτηριστικά αέριας χρωματογραφίας (Pecsok et al., 1980)

Τα συνηθισμένα φέροντα αέρια που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία είναι το ήλιο, το υδρογόνο, το άζωτο και το αργό. Υπάρχουν δυο διαφορετικά είδη στηλών που χρησιμοποιούνται συνήθως, οι γεμισμένες και οι τριχοειδείς, ενώ οι κυριότεροι τύποι ανιχνευτών είναι: α) ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID), β) ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και, γ) ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

Κατά την εκπόνηση των πειραμάτων μας, η σύσταση του βιοαερίου μετριόταν με αέριο χρωματογράφο Varian (Star 3600) που ήταν εξοπλισμένος με γεμισμένη στήλη (Poropak Q, 80/100-mesh) και η ανίχνευση γινόταν με μέτρηση της θερμικής αγωγιμότητας (TCD). Το φέρον αέριο της μεθόδου ήταν άζωτο υψηλής καθαρότητας. Επίσης, για τη μέτρηση της σύστασης του

βιοαερίου χρησιμοποιήθηκε ισοθερμοκρασιακό πρόγραμμα στους 80 °C, ενώ η θερμοκρασία στον ανιχνευτή ήταν 180 °C.

2.3 Χαρακτηρισμός του υγρού αποβλήτου ελαιουργείου

2.3.1 Γενικά

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων μας προμηθευτήκαμε απόβλητο από ελαιουργείο τριών φάσεων (Αφοί Καϊμακά) που βρίσκεται εγκατεστημένο στο Δήμο Πατρών του Νομού Αχαΐας. Κατά τη διάρκεια της έρευνάς μας έγινε χρήση μόνο του συγκεκριμένου αποβλήτου. Μέχρι την εκτέλεση όλων των πειραμάτων, το απόβλητο αυτό, φυλασσόταν σε επτά, μεγάλα δοχεία χωρητικότητας 15 l το κάθε ένα, τα οποία συντηρούνταν σε ψυγείο που βρισκόταν στους 4 °C.

2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών του αποβλήτου έγινε με τη χρήση των γνωστών αναλυτικών μεθόδων (Πίνακας 2.1), για τις οποίες έγινε αναλυτική περιγραφή στην παράγραφο 2.2. Προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά του αποβλήτου για κάθε δοχείο ξεχωριστά, λαμβάνοντας τρία δείγματα από το καθένα, έτσι ώστε να γνωρίζουμε τις ιδιότητες του κασιόγαρου που χρησιμοποιούμε κάθε φορά.

Πίνακας 2.1: Μέθοδοι υπολογισμού

	<i>Μέθοδοι υπολογισμού</i>
ρΗ	ρΗ 211 (Hanna)
Διαλυτό ΧΑΟ	Closed Reflux, Colorimetric Method
Ολικό ΧΑΟ	Open Reflux Method
ΟΑΣ	Standard Methods 2540 D
ΠΑΣ	Standard Methods 2540 E
Φαινολικά	Folin-Ciocalteu Method

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

ΟΑΣ: Ολικά αιωρούμενα στερεά

ΠΑΣ: Πτητικά αιωρούμενα στερεά

Ένας αντιπροσωπευτικός χαρακτηρισμός δίνεται στον πίνακα 2.2 ο οποίος αντιστοιχεί σε μείγμα κασιόγαρου, συνολικού όγκου 1.5 l, που προκύπτει λαμβάνοντας ίσες περίπου ποσότητες από τα επτά δοχεία. Για τον χαρακτηρισμό του μείγματος αυτού, λήφθησαν τρία δείγματα. Για τον προσδιορισμό της κάθε παραμέτρου πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις τόσο για να έχουμε έναν αντιπροσωπευτικό μέσο όρο στις μετρήσεις μας, όσο και για να μπορούμε να μη συμπεριλάβουμε κάποια από αυτή σε ενδεχόμενη αποτυχία.

2.3.3 Αποτελέσματα

Οι τιμές που προέκυψαν μετά τον χαρακτηρισμό του υγρού αποβλήτου ελαιουργείου που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων φαίνονται στον πίνακα 2.2. Η τυπική απόκλιση που αναγράφεται αντιστοιχεί στα τρία δείγματα που λήφθησαν από το μείγμα.

Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά υγρού αποβλήτου ελαιουργείου

	<i>Τιμές</i>
pH	5.27 ± 0.08
διαλυτό ΧΑΟ (g/l)	54.92 ± 1.68
ολικό ΧΑΟ (g/l)	107.4 ± 2.14
ΟΑΣ (g/l)	35.59 ± 0.35
ΠΑΣ (g/l)	33.93 ± 0.56
φαινολικά (g/l)	8.31 ± 0.09

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

ΟΑΣ: Ολικά αιωρούμενα στερεά

ΠΑΣ: Πτητικά αιωρούμενα στερεά

2.3.4 Συμπέρασμα

Εκτιμώντας τις τιμές των βασικότερων παραμέτρων του αποβλήτου που μετρήθηκαν, είναι φανερό πως πρόκειται για ένα πολύ ισχυρό απόβλητο, με υψηλό οργανικό φορτίο, μεγάλη συγκέντρωση φαινολικών ενώσεων και υψηλή συγκέντρωση στερεών που σε συνδυασμό με το σκούρο χρώμα του, το καθιστούν ιδιαίτερα τοξικό και συνεπώς ακατάλληλο για διάθεση σε περιβαλλοντικούς αποδέκτες.

2.4 Διαδικασία για την εκτέλεση του πειράματος για τον προσδιορισμό του Βιοχημικού Δυναμικού Μεθανίου (Biochemical Methane Potential, BMP)

2.4.1 Γενικά

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκτέλεση των πειραμάτων διαλείποντος έργου βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Βιοχημικού Δυναμικού Μεθανίου (BMP) Owen et al., (1979).

2.4.2 Πειραματική διαδικασία

Για κάθε υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε προηγήθηκε η ρύθμιση του pH έτσι ώστε να κυμαίνεται στα επιθυμητά για την αναερόβια διεργασία όρια. Η ρύθμιση αυτή έγινε με αύξηση της αλκαλικότητας του υποστρώματος, προσθέτοντας κατάλληλη ουσία (βοηθητικό μέσο). Συνεπώς, όγκος ίσος περίπου με 200 ml του κάθε υποστρώματος τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως χωρητικότητας 250 ml. Υπό συνθήκες έντονης ανάδευσης (με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα) γινόταν προσθήκη του μέσου αυτού, μετρώντας ταυτόχρονα την τιμή του pH. Η προσθήκη αυτή σταμάτησε όταν η τιμή του έφτασε στη βέλτιστη περιοχή τιμών pH, δηλαδή 7.4-7.5.

Τα πειράματα διαλείποντος έργου έλαβαν χώρα σε φιαλίδια (serum bottles) χωρητικότητας 160 ml. Η αναλογία του υποστρώματος με την αναερόβια «μαγιά» ήταν 1:5 και ο ενεργός όγκος των αντιδραστήρων ισούταν με 100 ml. Συνεπώς, το κάθε φιαλίδιο (serum bottle) περιείχε 20 ml υποστρώματος του οποίου προηγουμένως είχε ρυθμιστεί το pH, και 80 ml αναερόβιας «μαγιάς». Το δείγμα του μάρτυρα αποτελείτο μόνο από 80 ml μικροβιακής καλλιέργειας.

Μετά τη ρύθμιση του pH ακολούθησε η λήψη 20 ml ομογενοποιημένου υποστρώματος τα οποία οδηγήθηκαν στο φιαλίδιο (serum bottle). Αυτό πραγματοποιήθηκε και για όλα τα διαφορετικά υποστρώματα. Θα πρέπει να

αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP διεξήχθησαν δύο επαναλήψεις.

Σειρά είχε η λήψη της αναερόβιας μικροβιακής καλλιέργειας από τον αναερόβιο χωνευτήρα, η οποία έγινε με την βοήθεια μιας πλαστικής σύριγγας των 100 ml και η μετάγγιση της στα φιαλίδια γινόταν κάτω από αυστηρά αναερόβιες συνθήκες. Αυτό επιτεύχθηκε με τη συνεχή παροχή αέριου μείγματος N_2/CO_2 (70/30) πάνω από τα δείγματα

Τα φιαλίδια (serum bottles) σφραγίστηκαν αεροστεγώς με κατάλληλο ελαστικό πώμα με τη βοήθεια ειδικού οργάνου. Η περίσσεια του αέριου μείγματος N_2/CO_2 (70/30) αφαιρέθηκε, εφαρμόζοντας στο πώμα του κάθε φιαλιδίου πλαστική σύριγγα των 20 ml για πέντε περίπου δευτερόλεπτα. Με τον τρόπο αυτό, διοχετεύτηκε στη σύριγγα η περίσσεια του αέριου μείγματος, πιέζοντας το έμβολο της σύριγγας προς τα πάνω. Στη συνέχεια ακολούθησε, η αφαίρεση της σύριγγας και η εκτόπιση της παγιδευμένης αέριας φάσης.

Όλα τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν μέσα σε λουτρό ύδατος σταθερής θερμοκρασίας ίσης με $35\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 0.2\text{ }^\circ\text{C}$). Στο κάθε φιαλίδιο εφαρμόστηκε πλαστική σύριγγα των 60 ml για τη συλλογή και μέτρηση του όγκου του παραγόμενου βιοαερίου (μέθοδος των συριγγών του Nottingham and Hungate, 1969). Μία φορά τη μέρα και ενώ βρίσκονταν στο υδατόλουτρο, τα φιαλίδια αναδεύονταν στις 100 rpm για πέντε περίπου λεπτά.



Φωτογραφία 2.1: Πειραματική διάταξη της επώασης των αντιδραστών διαλείποντος έργου

Τα φιαλίδια (serum bottles) παρέμειναν στο υδατόλουτρο όσες ημέρες διήρκεσε η παραγωγή βιοαερίου. Στο χρονικό αυτό διάστημα γινόταν μέτρηση της ποσοστιαίας σύστασης του παραγόμενου αέριου μείγματος, κάθε φορά που αυτό έφτανε σε όγκο, τη χωρητικότητα της πλαστικής σύριγγας. Η μέτρηση της σύστασης του βιοαερίου γινόταν στον αέριο χρωματογράφο, με τη λήψη αέριου δείγματος κατ' ευθείαν από το φιαλίδιο.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι πριν την έναρξη του πειράματος πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις τόσο στο κάθε υπόστρωμα όσο και στην αναερόβια μαγιά που χρησιμοποιήθηκε. Έτσι, είμασταν σε θέση να υπολογίσουμε τις αρχικές συνθήκες του συνολικού μείγματος σε κάθε φιαλίδιο. Οι ίδιες αναλύσεις επαναλήφθηκαν στο συνολικό όγκο του κάθε δείγματος, μετά τη λήξη του πειράματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΧΡΗΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΛΕΥΚΗΣ ΣΗΨΗΣ ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Ο ρόλος των μυκήτων στην αντιμετώπιση του σημαντικού προβλήματος της αποτοξικοποίησης των αποβλήτων των ελαιουργείων, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η ικανότητά τους να βιομετατρέπουν τα υγρά απόβλητα, μπορεί να αξιοποιηθεί προς δύο κατευθύνσεις: α) μέσω της παραγωγής ενός ενδιάμεσου προϊόντος επιδεκτικού σε περαιτέρω φυσικοχημικούς και βιολογικούς χειρισμούς και, β) στην παραγωγή ενός χρήσιμου τελικού προϊόντος.

Διάφορα είδη ζυμών όπως οι *Torulopsis utilis*, *Saccharomyces lipolitica* και *Geotrichum candidum*, έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την παραγωγή της μονοκυτταρικής πρωτεΐνης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο ζωοτροφών, ενώ παράλληλα μειώνουν σημαντικά το οργανικό φορτίο του αποβλήτου των ελαιουργείων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η ζύμη *Yarrowia lipolytica* χρησιμοποιήθηκε για παραγωγή βιομάζας ενώ μείωσε το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο του αποβλήτου κατά 80 %. Η εμπορική αξιοποίηση της παραγόμενης βιομάζας αποτελεί έναν από τους μελλοντικούς στόχους των ερευνητών. Επίσης, ο μύκητας *Aspergillus niger* ήταν ιδιαίτερα αποδοτικός στη μείωση του οργανικού φορτίου του αποβλήτου κατά 72 %, το οποίο και αποχρωμάτισε μερικώς, μειώνοντας το φαινολικό φορτίο κατά 76 % (Garcia et al., 1999). Επίσης οι Sayadi et al., (1993) παρατήρησαν ότι ο *Aspergillus niger* δεν επέδρασε στις μεγάλου μοριακού βάρους πολυφαινολικές ενώσεις, παρ' ότι αποδόμησε μεγάλη ποσότητα τανινών και άλλων αρωματικών ενώσεων.

Η αποτελεσματικότητα της χρήσης ορισμένων μυκήτων στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων ελαιουργείων, οφείλεται στην ικανότητα τους, να παράγουν εξωκυτταρικά ένζυμα, μεταβολίζοντας φαινολικές ενώσεις, τανίνες και άλλες ενώσεις παρεμφερών δομών. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντική είναι η συσχέτιση της μείωσης της συγκέντρωσης των τανινών και των αρωματικών ενώσεων, με την αποτελεσματικότερη δράση των αναερόβιων μεθανογόνων βακτηρίων, αφού μειώνεται η παρεμποδιστική δράση του αποβλήτου ως προς αυτά (Sierra-Alvarez and Lettinga, 1990; Beccari et al., 1999; Hamdi and Moctar, 1992). Ο *Aspergillus terreus* χρησιμοποιήθηκε επίσης για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων (Garcia et al., 1999), επιτυγχάνοντας μείωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ) κατά 63 % και των φαινολικών ουσιών κατά 64 %.

3.2 Οι μύκητες ως συντελεστές αποδόμησης των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων

3.2.1 Γενικά

Αρκετές από τις αρωματικές ενώσεις της ομάδας των φαινολών που έχουν χαρακτηριστεί ως υπεύθυνες για την τοξικότητα των αποβλήτων των ελαιουργείων και το μαύρο χρώμα τους, έχουν δομικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά της λιγνίνης. Οι μυκηλιακοί μύκητες είναι κυρίως υπεύθυνοι μικροοργανισμοί για την αποδόμηση της λιγνίνης στη φύση, ενώ οι πιο αποδοτικοί αποδομητές της ομάδας αυτής είναι οι βασιδιομύκητες (Kirk and Farrell, 1987).

3.2.2 Κατηγορίες ανώτερων βασιδιομυκήτων

Υπάρχουν τρεις συγκεκριμένοι τύποι μυκήτων οι οποίοι αναπτύσσονται σαπροτροφικά στο νεκρό (σάπιο) ξύλο και αποδομούν επιλεκτικά ένα ή

περισσότερα από τα συστατικά του: οι μύκητες φαιάς σήψης (brown rot), μαλακής σήψης (soft rot) και οι μύκητες λευκής σήψης (white rot).

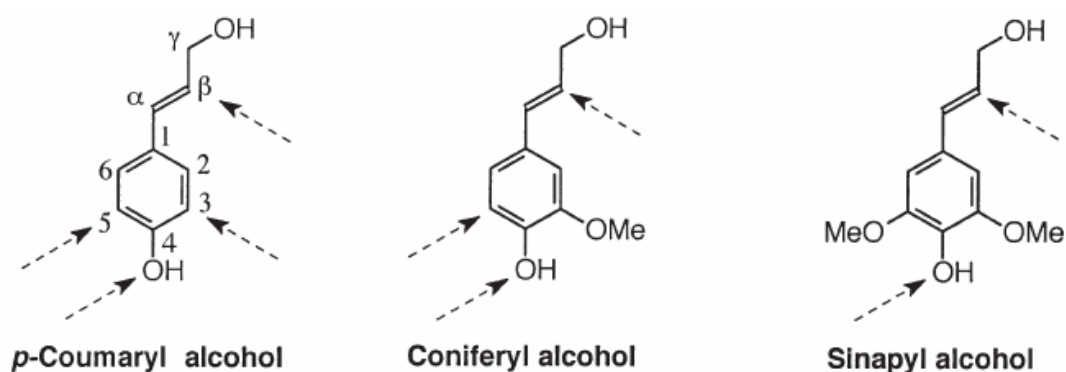
Οι μύκητες *φαιάς σήψης*, αποτελούν μια σχετικά μικρή ομάδα βασιδιομυκήτων, οι οποίοι αποσυνθέτουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του ξύλου, παρακάμπτοντας τη λιγνίνη. Παρ' όλο που οι μύκητες αυτοί διασπούν τις κυτταρίνες και τις ημικυτταρίνες, τα ένζυμα που παράγουν είναι αρκετά μεγάλα, ώστε να μπορέσουν να διαπεράσουν το υλικό του κυτταρικού τοιχώματος του ξύλου, κάτι που καθιστά απαραίτητη τη συνύπαρξή τους μαζί με άλλα ενζυμικά συστήματα για αποτελεσματική αποδόμηση. Το βιοχημικό σύστημα που επιτρέπει στους μύκητες αυτούς να δρουν κατ'αυτόν τον τρόπο δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί.

Οι μύκητες *μαλακής σήψης* (Ασκομύκητες και Δευτερομύκητες), είναι πιο αργοί και λιγότερο αποτελεσματικοί αποδομητές από τις άλλες δύο κατηγορίες μυκήτων και συνεπώς είναι μικρότερης σημασίας από ποσοτική άποψη. Αποδομούν επιλεκτικά τους πολυσακχαρίτες του ξύλου και εμφανίζουν μερική ικανότητα αποδόμησης της λιγνίνης (Dix and Webster, 1995). Ελάχιστη έρευνα έχει γίνει επάνω στους μύκητες μαλακής σήψης και γι' αυτό οι μηχανισμοί αποδόμησης που χρησιμοποιούν παραμένουν άγνωστοι.

Οι μύκητες *λευκής σήψης* είναι οι πιο συχνά απαντώμενοι και οι αποδοτικοί αποδομητές στη φύση, οι οποίοι αποδομούν την κυτταρίνη και τη λιγνίνη. Οι μύκητες αυτοί αποσυνθέτουν πρώτα τη λιγνίνη, ώστε να είναι πιο εύκολη η πρόσβασή τους στην κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες που προστατεύονται από αυτή. Οι ιδιαίτερες ιδιότητες του ενζυμικού συστήματος των μυκήτων λευκής σήψης, που τους καθιστούν τόσο αποδοτικούς αποδομητές φαιολικής φύσης, συσχετίζονται άμεσα με τη δομή της λιγνίνης. Πολλά είδη μυκήτων λευκής σήψης, διαφόρων γενών, που βρίσκονται σε δασικά οικοσυστήματα, έχουν ήδη ταξινομηθεί και περιγραφεί (Rayner and Boddy, 1998; Boddy, 1992; Dix and Webster, 1995).

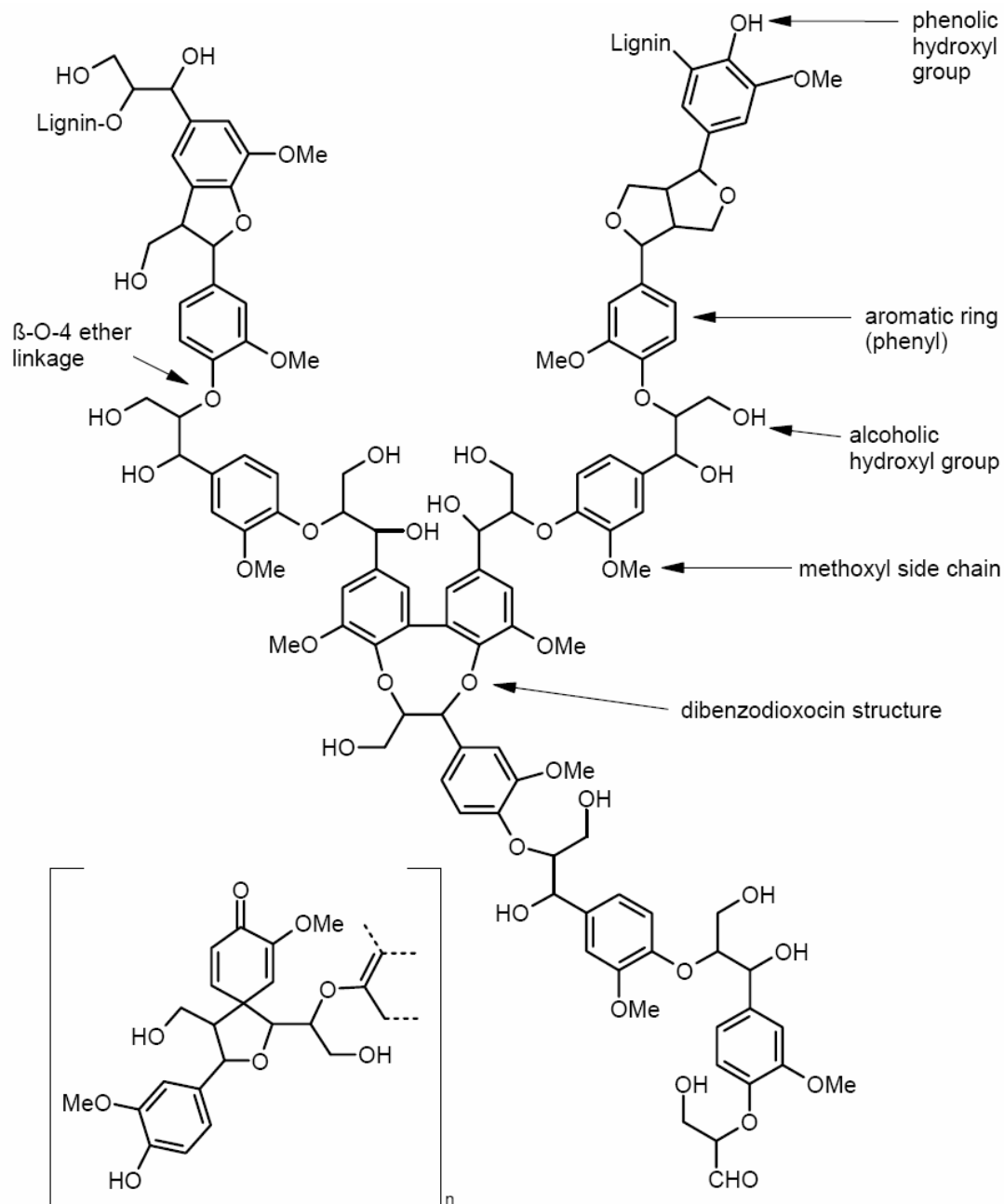
3.2.3 Η δομή της λιγνίνης

Το μόριο της λιγνίνης είναι ένα αρωματικό πολυμερές, το οποίο σχηματίζεται από την επανάληψη βασικών πρόδρομων μονομερών μονάδων. Υπάρχουν τρεις τέτοιες πρόδρομες μονάδες, με κοινή τη δομή τύπου φαινυλ-προπανίου και διαφέρουν στον αριθμό των μεθοξυλομάδων του αρωματικού δακτυλίου (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Οι τρεις πρόδρομες ενώσεις που συνθέτουν το μόριο της λιγνίνης

Οι βασικές αυτές μονάδες (p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol και sinapyl alcohol) συνδέονται μεταξύ τους με σταθερούς ανθρακικούς και αιθερικούς δεσμούς, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς (μεταξύ δύο βενζολικών δακτυλίων, δύο πλάγιων προπανοϊκών αλυσίδων, πλάγιας αλυσίδας και δακτυλίου, κ.λ.π.), δημιουργώντας έτσι το ιδιαίτερα πολύπλοκο και πολύ σταθερό μόριο της λιγνίνης (Σχήμα 3.2).



Σχήμα 3.2: Η δομή του μορίου της λιγνίνης

Από τη δομή του μορίου της λιγνίνης γίνεται φανερό, ότι οι μύκητες που την αποδομούν έρχονται αντιμέτωποι με διάφορα προβλήματα, στην προσπάθειά τους να την αποδομήσουν. Αφού το πολυμερές είναι ιδιαίτερα μεγάλο και έντονα διακλαδιζόμενο, οι λιγνινολυτικοί μηχανισμοί που ενεργοποιούν οι μύκητες, πρέπει να είναι εξωκυτταρικοί. Και εφόσον, οι πρόδρομες δομικές μονάδες συνδέονται μεταξύ τους με σταθερούς ανθρακικούς και αιθερικούς δεμούς, αυτοί οι μηχανισμοί πρέπει να είναι περισσότερο οξειδωτικοί παρά

υδρολυτικοί. Επίσης, αφού η λιγνίνη αποτελείται από ένα σύνολο στερεοϊσομερών μονάδων, τα λιγνινολυτικά ένζυμα των μυκήτων, πρέπει να είναι όσο το δυνατόν λιγότερο εξειδικευμένα (επιλεκτικά), από τους συνήθεις βιολογικούς καταλύτες. Τελικά η μη διαλυτότητα της λιγνίνης στο νερό, έχει ως αποτέλεσμα να περιορίζεται η βιοδιαθεσιμότητά της (η βιοαποδομησιμότητά της) σε αποτελεσματικά λιγνινολυτικά συστήματα και αυτό εξηγεί το γιατί η λιγνινόλυση είναι γενικά αργή διεργασία.

3.2.4 Συνθήκες δράσης λιγνινολυτικών μυκήτων

Τόσο η απουσία εξειδίκευσης, που χαρακτηρίζει τα ένζυμα που παράγονται από αυτές τις συγκεκριμένες κατηγορίες μυκήτων, όσο και οι δομικές σχέσεις πολλών αρωματικών ρύπων με τα φυσικά υποστρώματα αυτών των ενζύμων, υπέδειξαν τη χρήση των λιγνινολυτικών αυτών μικροοργανισμών στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων. Οι λιγνινολυτικοί μύκητες δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τη λιγνίνη, ως μοναδική πηγή ενέργειας και άνθρακα. Αντίθετα εξαρτώνται από τα πιο ευαφομοίωτα πολυσακχαρίδια που υπάρχουν στα λιγνινοκυτταρινούχα υποστρώματα.

Στους περισσότερους από τους μύκητες που έχουν μελετηθεί, η λιγνινόλυση λαμβάνει χώρα κατά το δευτερογενή μεταβολισμό, κάτω από συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Το περιοριστικό θρεπτικό συστατικό για την παραγωγή των λιγνινολυτικών ενζύμων είναι στις περισσότερες περιπτώσεις το άζωτο, γι' αυτό και οι έρευνες για τους λιγνινολυτικούς μύκητες εστιάζονται στην καλλιέργειά τους σε φτωχά, σε άζωτο, υποστρώματα. Με δεδομένο το γεγονός ότι η λιγνίνη αποτελεί ένα δύσκολα αποδομήσιμο πολυμερές, είναι προφανές ότι οι μύκητες επιστρατεύουν ασυνήθιστους μηχανισμούς για να την αποδομήσουν. Αρκετές έρευνες έχουν μελετήσει τους μηχανισμούς αυτούς και όλοι παρουσιάζουν ένα θεμελιώδες χαρακτηριστικό: έχουν ως βάση τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, προερχόμενων από τη λιγνίνη, όπου στη συνέχεια (εξαιτίας της αστάθειάς τους), λαμβάνουν μέρος σε μια σειρά αυθόρμητων αντιδράσεων διάσπασης.

3.2.5 Λιγνινολυτικά ένζυμα και μηχανισμοί λιγνινόλυσης

Πολλά από τα ένζυμα των μυκήτων λευκής σήψης, που αποδομούν τη λιγνίνη σε πολύ μεγάλο βαθμό, δεν έχουν ακόμα χαρακτηρισθεί. Ωστόσο, τρία οξειδωτικά ένζυμα είναι γνωστό ότι λαμβάνουν μέρος στην αποδόμηση της λιγνίνης και τα οποία παράγονται από τους μύκητες λευκής σήψης. Πρόκληση για την επιστήμη αποτελεί, η συλλογή σίγουρων πληροφοριών, όσον αφορά το ρόλο και τον τρόπο με τον οποίο δρουν τα ένζυμα αυτά, πληροφορίες που είναι απαραίτητες για την περιγραφή ενός ολοκληρωμένου λιγνινολυτικού ενζυμικού συστήματος. Αυτό πάντως που είναι ξεκάθαρο, είναι πως διάφοροι συνδυασμοί ενζύμων, παράγονται από τα διάφορα είδη των λιγνινολυτικών ενζύμων (Hatakka et al., 1994), καταλήγοντας έτσι στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν περισσότερες από μία «στρατηγικές» για την επιτυχή αποδόμηση της λιγνίνης.

3.2.5.1. Λιγνινάσες (Lignin peroxidases, LiPs)

Από τα πρώτα λιγνινολυτικά ένζυμα των μυκήτων που ανακαλύφθηκαν, είναι οι λιγνινάσες (LiPs) (Glenn et al., 1983; Tien and Kirk, 1983), που ανήκουν στην ομάδα των υπεροξειδασών. Η παρουσία τους έχει ανιχνευθεί σε μύκητες λευκής σήψης όπως οι, *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk and Farrell, 1987), *Trametes versicolor* (Kaal et al., 1993), κ.α, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σε άλλα είδη όπως οι *Dichomitus squalens* (Perie and Gold, 1991), *Pleurotus ostreatus* (Ruttimann-Johnson et al., 1993) και *Geriporiopsis subvermispora* (Kerem et al., 1992).

Οι λιγνινάσες οξειδώνονται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και η ενδιάμεση (οξειδωμένη) μορφή τους επανέρχεται στην αρχική της κατάσταση, προσλαμβάνοντας τα δύο ηλεκτρόνια που της λείπουν από τον αρωματικό δακτύλιο του υποστρώματος (δότης), μέσω δύο οξειδωτικών αντιδράσεων. Οι λιγνινάσες είναι πολύ ισχυροί οξειδωτές, μια και οξειδώνουν όχι μόνο τα συνηθισμένα υποστρώματα δράσης των υπεροξειδασών (πολυφαινόλες), αλλά και πολλές μη φαινολικές δομές λιγνίνης και αρωματικών αιθέρων, που

μοιάζουν με τη βασική μονάδα αυτής. Η οξείδωση της βερατρυλ-αλκοόλης (3,4-διμέθοξυβενζυλ-αλκοόλη) σε βερατραλδεΐδη, από το υπεροξειδίο του υδρογόνου, αποτελεί μια από τις βασικότερες μεθόδους ανίχνευσης της LiP, σε διάφορες καλλιέργειες μυκήτων (Kirk et al., 1990).

Με βάση το μηχανισμό των οξειδωτικών αντιδράσεων, οι λιγνινάσες (LiPs) οδηγούν στον αποπολυμερισμό των λιγνινοκυτταρινούχων υποστρωμάτων, με ενδιάμεσο στάδιο τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, που αντιδρούν σε μια σειρά μετενζυμικών αντιδράσεων. Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3α, η LiP επιδρά στο σπάσιμο του δεσμού (α-β), που αποτελεί την κύρια διαδικασία λιγνινόλυσης σε πολλούς μύκητες λευκής σήψης (Kirk and Farrell, 1987).

Σχήμα 3.3: Διάσπαση του μορίου της λιγνίνης, (α) από το ένζυμο LiP (υπεροξειδάση της λιγνίνης) και (β) από το ένζυμο MnP (υπεροξειδάση του μαγγανίου)

Ωστόσο, ένα πρόβλημα που παραμένει άλυτο στην υπόθεση ότι η LiP καταλύει την λιγνινόλυση, είναι το μέγεθος του ενζύμου, που είναι πολύ μεγάλο για να μπορεί να διεισδύει στους πόρους του ξύλου (Srebotnik et al., 1988). Εάν λοιπόν το ένζυμο ξεκινάει άμεσα τη λιγνινόλυση, θα πρέπει να δρα στην επιφάνεια του δευτερεύοντος κυτταρικού τοιχώματος. Αυτή η δράση έχει

διαπιστωθεί για ορισμένα είδη μυκήτων ενώ, από παρατηρήσεις που έχουν γίνει σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, υποδεικνύεται ότι οι μύκητες λευκής σήψης μπορούν επίσης να «μετακινούν» τη λιγνίνη από το εσωτερικό του κυτταρικού τοιχώματος, πριν την αποδομήσουν αρκετά, έτσι ώστε τα ένζυμα να μπορούν να διεισδύσουν.

Βέβαια, υπάρχει και μια υπόθεση για έμμεση δράση της LiP, η οποία παρακάμπτει το πρόβλημα της διείσδυσης. Αυτό συμβαίνει, οξειδώνοντας μικρού μοριακού βάρους υποστρώματα που μπορούν να διεισδύσουν στο λιγνινοκυτταρικό υλικό και να δράσουν τα ίδια ως οξειδωτές, σε απόσταση από το ένζυμο (Harvey et al., 1986), αν και ακόμα δεν έχουν ταυτοποιηθεί ενώσεις που να παίζουν τέτοιο ρόλο.

Αυτό που αξίζει να επισημάνουμε, είναι ότι η LiP παραμένει το μόνο γνωστό οξειδωτικό μέσο των μυκήτων, που μπορεί να μιμηθεί *in vitro* την αντίδραση διάσπασης του δεσμού C_α-C_β. Η αντίδραση αυτή αποτελεί και το χαρακτηριστικό της λιγνινόλυσης από το μύκητα *Phanerochaete chrysosporium*. Έτσι λοιπόν, η LiP μπορεί να θεωρηθεί ως πολύ σημαντικός παράγοντας στη διεργασία της λιγνινόλυσης, που όμως δρα σε συμφωνία με άλλους μικρότερους «οξειδωτές», ικανούς να διεισδύσουν και να διανοίξουν το κυτταρικό τοίχωμα.

3.2.5.2 Υπεροξειδάσες του μαγγανίου (Manganese peroxidases, MnPs)

Οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnPs), είναι από τα ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα των υπεροξειδασών και παράγεται από τους μύκητες λευκής σήψης. Είναι οι καταλύτες, από τη δράση των οποίων μπορεί να παρέχονται τα μικρού μοριακού βάρους οξειδωτικά μέσα, στα οποία αναφερθήκαμε παραπάνω. Ο μηχανισμός οξειδωσης που ακολουθούν παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3β.

Η διαφορά της MnP από τις συμβατικές υπεροξειδάσες, είναι ότι το Mn²⁺ είναι ο υποχρεωτικός δότης, που δίνει στο ένζυμο το ένα ηλεκτρόνιο που του

λείπει, για να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση και ταυτόχρονα μετατρέπεται σε Mn^{3+} . Η αντίδραση αυτή απαιτεί την παρουσία χηλικών οργανικών οξέων, όπως το οξαλικό, που σταθεροποιούν το Mn^{3+} και προάγουν την ελευθέρωσή του από το ένζυμο. Δεν αποτελούν ισχυρά οξειδωτικά μέσα, πράγμα που τα καθιστά ανίκανα να δράσουν στις πολύπλοκες μη φαινολικές δομές, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 10 % του μορίου της λιγνίνης. Μια ενδιαφέρουσα άποψη υποστηρίζει ότι το Mn^{3+} , που προέρχεται από την MnP, μπορεί να αποδομεί φαινολικές δομές της λιγνίνης και έτσι να κάνει δυνατή αργότερα την επίδραση της περισσότερο ισχυρής LiP. Πρέπει, ωστόσο, να παρατηρήσουμε ότι οι αντιδράσεις που καταλύονται από τις λιγνινάσες (LiPs) και τις υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnPs), δεν αποτελούν το μόνο δρόμο που ακολουθούν οι μύκητες για τη διάσπαση της λιγνίνης και παρεμφερών δομών, αφού υπάρχουν και μύκητες που χρησιμοποιούν άλλους μηχανισμούς (Srebotnik et al., 1994).

3.2.5.3 Λακκάσες (Laccases)

Οι λακκάσες είναι μια άλλη ομάδα λιγνινολυτικών ενζύμων, που ανήκουν στην ομάδα των φαινολοξειδάσων και παρουσιάζουν μικρή εκλεκτικότητα στα υποστρώματα που καταλύουν. Πολλά είδη λιγνινολυτικών μυκήτων παράγουν λακκάσες, ενώ σημαντική εξαίρεση αποτελεί το είδος *Phanerochaete chrysosporium*. Πρόκειται για ένζυμα, τα οποία περιέχουν πολλαπλά άτομα χαλκού και τα οποία ανάγονται, οξειδώνοντας ταυτόχρονα τα υποστρώματα πάνω στα οποία δρουν. Μετά από τη λήψη τεσσάρων ηλεκτρονίων από ένα μόριο λακκάσης, το μόριο ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε νερό και επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση. Η παρουσία κάποιων τεχνητών βοηθητικών υποστρωμάτων, μπορεί να επιτείνει τη δράση της λακκάσης, ώστε να οξειδώνει και μη φαινολικές ενώσεις, που πιθανόν δεν θα οξειδωνε υπό διαφορετικές συνθήκες. Όμως δεν είναι γνωστό κατά πόσο, φυσικές παραλλαγές τέτοιων βοηθητικών υποστρωμάτων, δρουν *in vivo* στην βιοαποδόμηση της λιγνίνης (Bourbonnais and Paice, 1992).

3.2.6 Ένζυμα που παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂)

Για να είναι δυνατή η δράση των ανώτερων υπεροξειδάσων, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη λιγνινόλυση, οι μύκητες λευκής σήψης χρειάζονται πηγές εξωκυτταρικού H₂O₂. Η ανάγκη αυτή καλύπτεται από τις εξωκυτταρικές οξειδάσες, που ανάγουν το μοριακό οξυγόνο σε υπεροξειδίο με συνεπακόλουθη την οξειδωση του υποστρώματος (Σχήμα 3.4α). Ένα τέτοιο ένζυμο είναι η γλυοξαλική οξειδάση (glyoxal oxidase, GLOX) (Kersten, 1990) που έχει ανιχνευθεί σε πολλούς μύκητες λευκής σήψης. Η GLOX γίνεται δέκτης ηλεκτρονίων (ανάγεται) από πολλές (1-3) αλδεΐδες. Οι αρυλ-αλκοοξειδάσες (AOOS, Σχήμα 3.4β) παρέχουν ένα άλλο τρόπο παραγωγής H₂O₂ σε ορισμένους μύκητες λευκής σήψης. Έτσι σε ορισμένα είδη που παράγουν LiP, εκκρίνονται χλωριωμένες ανισιλ-αλκοόλες σαν εξωκυτταρικοί μεταβολίτες και μετά ανάγονται από συγκεκριμένες αρυλ-αλκοοξειδάσες προς H₂O₂ (de Jong et al., 1994).

Σχήμα 3.4: Παραγωγή εξωκυτταρικού υπεροξειδίου του υδρογόνου από (α) το ένζυμο glyoxal oxidase (γλυοξαλική οξειδάση) και (β) το ένζυμο aryl alcohol oxidase (άρυλ-αλκοόλ οξειδάση)

Μια διαφορετική πορεία ακολουθείται από τους μύκητες οι οποίοι στερούνται την ύπαρξη LiP (π.χ. *Pleurotus*). Αυτοί παράγουν και οξειδώνουν ένα μείγμα από βενζυλ-αλκοόλες, συμπεριλαμβανομένης και της ανισουλ-αλκοόλης, για να διατηρούν παροχή H_2O_2 (Guillen et al., 1992). Σε άλλους μύκητες, εσωκυτταρικές οξειδάσες πιθανόν να ευθύνονται για την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (Kirk and Farrell, 1987).

3.2.7 Αξιολόγηση των μυκήτων λευκής σήψης στην βιοαποδόμηση φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα υγρά απόβλητα ελαιουργείων

Μύκητες που ανήκουν στην ομάδα λευκής σήψης όπως οι *Phanerocheate chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Dichomitus squalens*, κ.α., έχουν κατά καιρούς αξιολογηθεί, ως προς την ικανότητά τους να βιομετατρέπουν υγρά απόβλητα ελαιουργείων. Η σημαντική ικανότητα αποχρωματισμού που υπέδειξε ο μύκητας *Phanerocheate chrysosporium* (Sayadi and Ellouz, 1992), συσχετίστηκε με την ταχύτητα και την ικανότητά του να αποδομεί αρωματικές ενώσεις μεγάλου και μικρού μοριακού βάρους. Ο ιδιαίτερα υψηλός βαθμός αποχρωματισμού που παρατηρείται σε ορισμένους από τους μύκητες αυτούς, συσχετίζεται με τη δράση των ενζύμων LiP και MnP.

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα των Grappeli et al., (1991), όπου διαπιστώθηκε η ικανότητα του μύκητα *Lentinula edodes* να μειώνει το φαινολικό φορτίο των υγρών αποβλήτων των ελαιουργείων, παράγοντας ταυτόχρονα σημαντική ποσότητα μυκηλιακής βιομάζας. Ο μύκητας αυτός είναι επιλεκτικός αποδομητής της λιγνίνης, αποδομώντας την σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα (Leatham and Kirk, 1983)

Οι μύκητες του γένους *Pleurotus*, είναι από τους πιο αποδοτικούς, όσον αφορά την παραγωγή κυτταρινολυτικών και λιγνινολυτικών ενζύμων. Στο γένος αυτό, τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη διάσπαση της λιγνίνης, είναι οι λακκάσες, ενώ πρόσφατα ανιχνεύτηκε η LiP (Burla et al., 1992). Ενδεικτικά αναφέρουμε, ότι κατά την καλλιέργεια τεσσάρων ειδών του γένους *Pleurotus*,

σε υγρά απόβλητα ελαιουργείου διαπιστώθηκε ότι τα είδη αυτά που παρήγαγαν περισσότερη λακκάση, αποδομούσαν τις φαινολικές ενώσεις ταχύτερα και πληρέστερα (Sanjust et al., 1991). Επίσης διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της βιομάζας προκαλεί ταυτόχρονη αύξηση παραγωγής ενζύμου (Tomati et al., 1991; Kerem et al., 1992). Άρα γίνεται φανερό ότι, η λειτουργία του ενζυμικού συστήματος βιοαποδόμησης των μυκήτων του γένους *Pleurotus*, ενεργοποιείται από μια σειρά ενώσεων που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα ελαιουργείων όπως οι πολυφαινόλες, οι αρωματικές αμίνες, οι διμέθυλο-τριμέθυλοφαινόλες κ.α., έχοντας ως τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της τοξικότητας των αποβλήτων (Martirani et al., 1996).

Επίσης, ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα που προκύπτει, από πολλές ερευνητικές εργασίες, είναι ότι οι μύκητες λευκής σήψης, ανάλογα με το είδος και το γένος που ανήκουν, παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις, όσον αφορά την ικανότητα αποχρωματισμού και μείωσης φαινολικών ουσιών των αποβλήτων των ελαιουργείων.

3.3 Συγκριτική αξιολόγηση μυκήτων λευκής σήψης

3.3.1 Γενικά

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα θετικά αποτελέσματα που επιφέρει η δράση των μυκήτων λευκής σήψης στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων, τόσο όσον αφορά τον αποχρωματισμό, τη μείωση των πολυφαινόλων και την αποτοξικοποίησή τους, λήφθησαν πέντε διαφορετικά στελέχη και πραγματοποιήθηκε σε αυτή τη φάση μια συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ τους. Η συγκριτική αξιολόγηση των μυκήτων, ίσως να αποτελεί το στάδιο της ερευνητικής μας εργασίας με την ύψιστη σημασία. Σε αυτή τη φάση εκτιμείται ο αποδοτικότερος μύκητας που θα χρησιμοποιηθεί στα ακόλουθα πειράματα λαμβάνοντας υπ' όψιν το ρυθμό ανάπτυξής του στο απόβλητο, την αποδόμηση των φαινολικών ουσιών που προκαλεί, την πυκνότητα των υφών

του και γενικότερα τη συμβολή του στη μείωση της τοξικότητας του αποβλήτου.

3.3.2 Πειραματική διάταξη και διαδικασία για τις καλλιέργειες των μυκήτων στο υγρό απόβλητο των ελαιουργείων

3.3.2.1 Γενικά

Για την πρώτη συγκριτική αξιολόγηση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα διαλείποντος έργου, δημιουργώντας τις βέλτιστες συνθήκες για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων μικροοργανισμών.

3.3.2.2 Προετοιμασία υποστρώματος

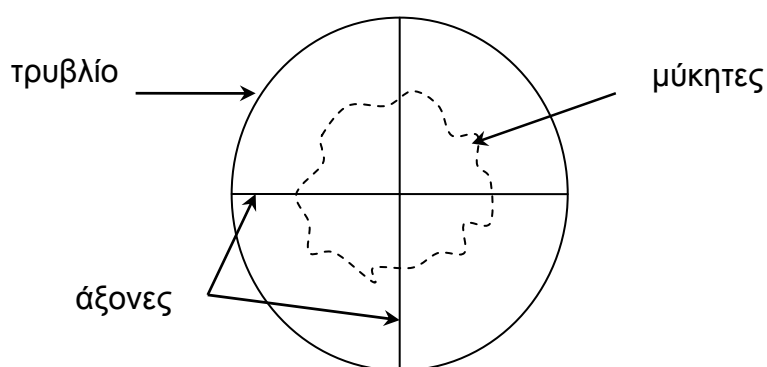
Η διαδικασία των πειραμάτων αυτών περιελάμβανε αποστείρωση του αποβλήτου, κάτι που είχε ως στόχο να εξασφαλίσει την καθαρή καλλιέργεια του υπό μελέτη μικροοργανισμού, χωρίς την παράλληλη ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών, οι οποίοι θα αλληλεπιδρούσαν και πιθανόν να σταματούσαν εντελώς την ανάπτυξή του. Ένας πρόσθετος λόγος για την αποστείρωση ήταν να καταστεί βέβαιο πως η οποιαδήποτε επερχόμενη μεταβολή των χαρακτηριστικών του αποβλήτου, είναι αποτέλεσμα της δράσης του μύκητα που μελετείται και όχι κάποιου άλλου μικροοργανισμού.

3.3.2.3 Πορεία για τις στερεές καλλιέργειες μυκήτων

Απαραίτητο για τις στερεές καλλιέργειες ήταν η προσθήκη στερεοποιητικού υλικού (άγαρ, 16 g/l) στο απόβλητο. Μετά από ικανοποιητική ανάμειξη του μείγματος, αποστειρωνόταν στους 121 °C για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης και αφού η θερμοκρασία του υλικού έπεφτε στους 45 °C περίπου (ώστε ακόμα να βρίσκεται σε ρευστή κατάσταση), προστείθετο από

25 ml περίπου σε κάθε πλαστικό τρυβλίο Petri (διαμέτρου 9 cm), υπό ασηπτικές συνθήκες. Η διαδικασία εμβολιασμού με τους μύκητες ξεκινούσε μετά από μία περίπου ώρα, όταν το υλικό είχε πλέον στερεοποιηθεί. Το εμβόλιο προερχόταν από την περιφέρεια της αποικίας των στελεχών, που είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί σε κάποιο άλλο θρεπτικό υλικό και είχε διάμετρο 6 mm και πάχος 2-3 mm. Μετά τον εμβολιασμό, τα τρυβλία σφραγίζονταν με λεπτές λωρίδες τεφλόν έτσι ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις και τέλος, τοποθετούνταν για επώαση στους 28 °C.

Οι στερεές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερις επαναλήψεις για το κάθε στέλεχος. Η μέτρηση της γραμμικής αύξησης των στελεχών των μυκήτων γινόταν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους στο στερεοποιημένο απόβλητο ελαιουργείου, η οποία διήρκεσε περίπου 25 ημέρες. Κάθε 24 ώρες, λαμβάνονταν μετρήσεις της διαμέτρου της αποικίας κατά μήκος δύο κάθετων μεταξύ τους γραμμών που περνούσαν από το κέντρο του εμβολίου. Μετά το τέλος της επώασης κατασκευάστηκε διάγραμμα της αύξησης του μέσου όρου της διαμέτρου της αποικίας συναρτήσει του χρόνου και προέκυπτε καμπύλη (ευθεία), από την κλίση της οποίας υπολογιζόταν ο ρυθμός γραμμικής αύξησης των μυκήτων. Στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.5) απεικονίζεται η διάταξη του τρυβλίου και ο καθορισμός των δύο κάθετων αξόνων με τη βοήθεια των οποίων μετρήσαν η ανάπτυξη της ακτίνας των μυκήτων.



Σχήμα 3.5: Η διάταξη του τρυβλίου

Τέλος, σε όλα τα τρυβλία έγινε οπτική παρατήρηση της πυκνότητας των υφών των αναπτυγμένων μυκήτων και του αποχρωματισμού που προκάλεσε ο κάθε ένας στο στερεοποιημένο απόβλητο ελαιουργείου.

3.3.2.4 Πορεία για τις υγρές καλλιέργειες μυκήτων

Για τα πειράματα διαλείποντος έργου ανάπτυξης μυκήτων, ακολουθήθηκε η ίδια με την πιο πάνω διαδικασία, με την διαφορά ότι δεν γινόταν προσθήκη στερεοποιητικού παράγοντα (άγαρ) στο προς μελέτη υλικό. Τα πειράματα αυτά έλαβαν χώρα σε φιάλες των 250 ml (Erlenmeyer) οι οποίες προηγουμένως είχαν αποστειρωθεί σε κλίβανο στους 121 °C και 1 atm. Μετά το τέλος της αποστείρωσης του υγρού αποβλήτου, και εφόσον αυτό επανήλθε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, τοποθετήθηκαν από 100 ml υλικού σε κάθε φιάλη. Στη συνέχεια, έγινε ο εμβολιασμός, με εμβόλιο που προερχόταν από τις ενεργές (ακραίες) υφές των μυκήτων, οι οποίοι είχαν προηγουμένως αναπτυχθεί σε στερεοποιημένο μέσο και σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος 3.3.2.3). Στο τέλος, οι φιάλες πωματίστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι, έτσι ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης (28 °C) απ' όπου έγινε η παρακολούθηση της πορείας ανάπτυξης του κάθε μύκητα.

Τα πειράματα διαλείποντος έργου (υγρές καλλιέργειες) πραγματοποιήθηκαν σε δύο επαναλήψεις για το κάθε στέλεχος, και είχαν διάρκεια 40 περίπου ημέρες. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο πείραμα υπήρχαν και δύο μάρτυρες, δηλαδή δύο φιάλες στις οποίες ακολουθήθηκε η πιο πάνω διαδικασία εκτός του στάδιο του εμβολιασμού. Στο τέλος της ανάπτυξης των μυκήτων μετρήθηκε η συγκέντρωση των φαινολικών στο βιοεπεξεργασμένο υπόστρωμα και υπολογίστηκε η τελική αποδόμηση που επιτυγχάνει το κάθε στέλεχος σε αυτό, υπό τις πιο πάνω συνθήκες ανάπτυξης. Επιπλέον έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου και του pH του υποστρώματος. Τέλος, σε όλες τις φιάλες παρατηρήθηκε οπτικά η πυκνότητα των υφών των αναπτυγμένων μυκήτων και του αποχρωματισμού που προκαλεί ο κάθε ένας στο απόβλητο.

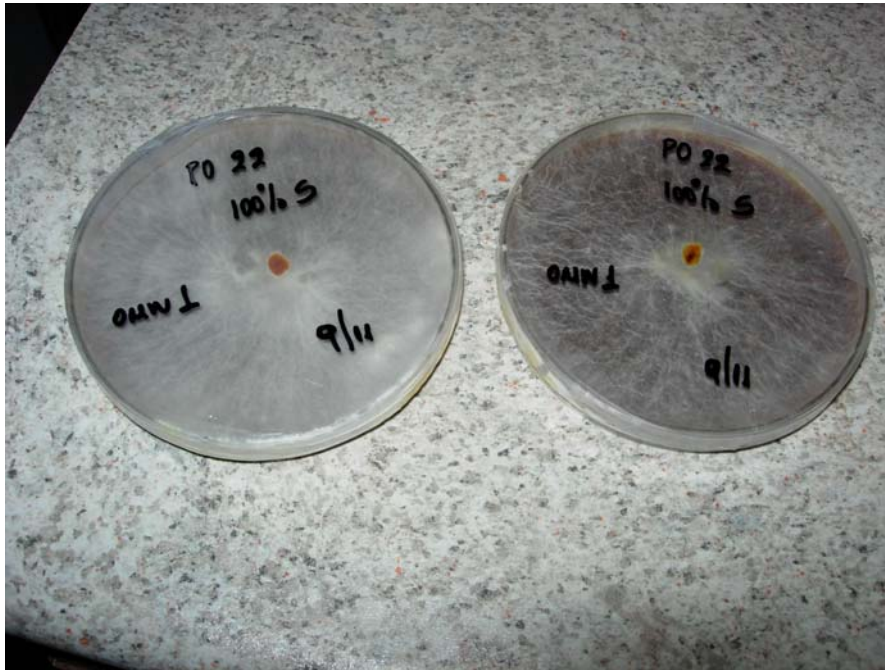
3.3.2.5 Στελέχη μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν

Τα στελέχη των μυκήτων που χρησιμοποιήθηκαν ανήκαν και τα πέντε στο γένος *Pleurotus*. Τέσσερα από αυτά συγκαταλέγονταν στο είδος *Ostreatus* και ήταν τα εξής: PO 22, PO 69, PO 850412 και PO p15. Το πέμπτο στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε, PP p5, ανήκε στο είδος *Pulmonarius*. Όλα τα στελέχη μυκήτων προέρχονταν από το Ινστιτούτο Ελαίας και Οπωροκηπευτικών της Καλαμάτας (Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε), με το οποίο συνεργαστήκαμε κατά τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας.

3.3.3 Αποτελέσματα συγκριτικής αξιολόγησης μυκήτων

3.3.3.1. Καλλιέργειες στο στερεοποιημένο απόβλητο ελαιουργείου

Κατά τη διάρκεια της επώασης των στελεχών, έως ότου γίνει πλήρης αποικισμός του υποστρώματος (Φωτογραφία 3.1), παρατηρήθηκε αποχρωματισμός του αποβλήτου, προσδίδοντας σε αυτό ένα σκούρο καφέ χρώμα (σχεδόν μαύρο χρώμα) αντί του αρχικού που ήταν έντονα ανοιχτό καστανό. Τα τέσσερα στελέχη του είδους *Ostreatus* αποχρωμάτισαν πλήρως το υπόστρωμα ενώ το στέλεχος του είδους *Pulmonarius* προκάλεσε ικανοποιητικό αποχρωματισμό στο απόβλητο.



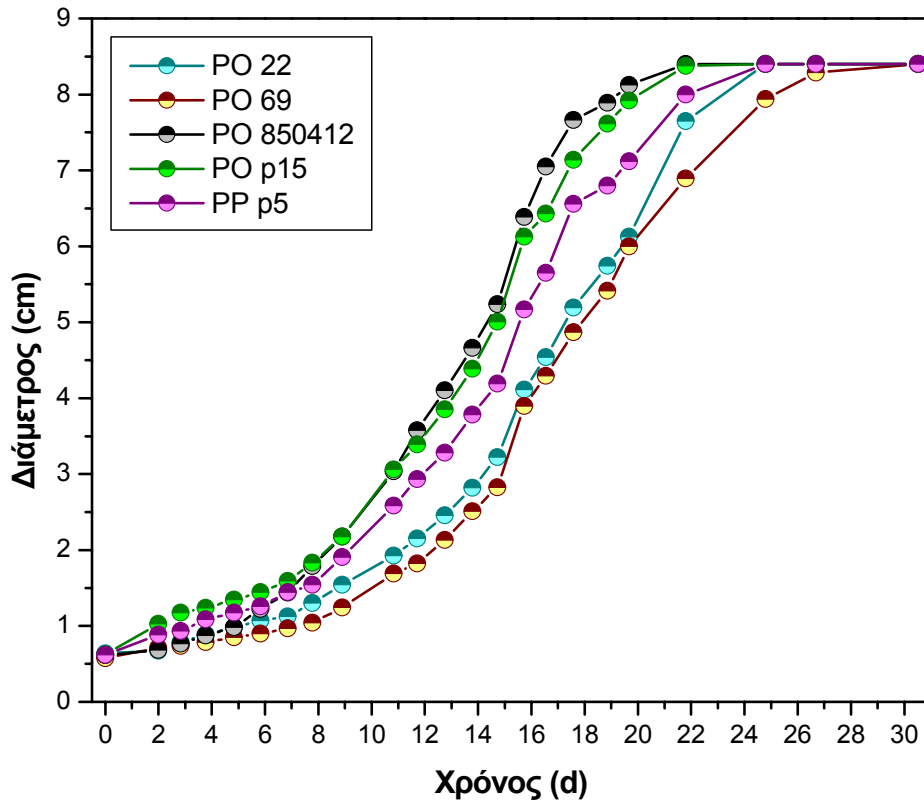
Φωτογραφία 3.1: Καλλιέργειες μυκήτων λευκής σήψης σε στερεοποιημένο απόβλητο ελαιουργείου

Η πυκνότητα των υφών των τεσσάρων στελεχών του είδους *Ostreatus* ήταν αρκετά μεγαλύτερη απ' αυτή του στελέχους του είδους *Pulmonarius*. Αυτό παρατηρήθηκε από την αρχή της ανάπτυξης των πέντε μυκήτων και διατηρήθηκε έως ότου οι μύκητες αποίκισαν πλήρως την επιφάνεια του τρυβλίου.

Και τα πέντε στελέχη που μελετήθηκαν αναπτύχθηκαν παρουσιάζοντας μια φάση υστέρησης (lag phase), ενώ αποίκισαν σχεδόν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου σε διάστημα 25-26 ημερών (Γράφημα 3.1). Η φάση υστέρησης είχε μέση διάρκεια επτά ημέρες με μικροδιαφορές μεταξύ των στελεχών.

Το στέλεχος PO 850412 έδειξε μια ταχεία ανάπτυξη, μεγαλύτερη των άλλων στελεχών, από την αρχή του εμβολιασμού. Αυτό διατηρήθηκε μέχρι ο μύκητας να αναπτυχθεί πλήρως. Ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και από το στέλεχος PO p15 με μια μικρή καθυστέρηση, έναντι του πρωτοπόρου, προς το τέλος της ανάπτυξης. Ακολούθησε το στέλεχος PP p5, το στέλεχος PO 22 και το PO 69. Τα δύο τελευταία στελέχη, παρουσίασαν από τις πρώτες κιόλας

μετρήσεις μια μεγάλη καθυστέρηση στον ρυθμό ανάπτυξής τους σε σχέση με τους άλλους τρεις μύκητες.



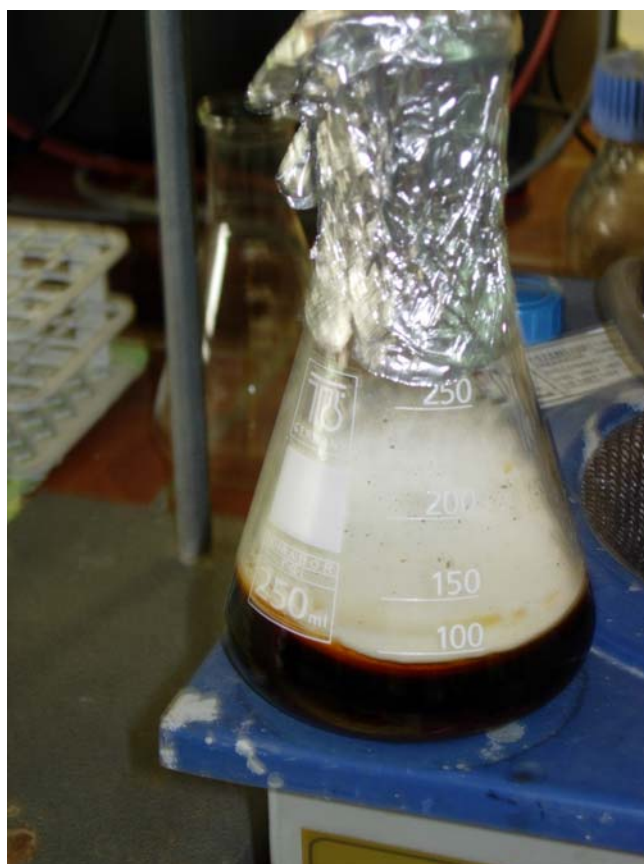
Γράφημα 3.1: Πορεία ανάπτυξης των μυκήτων στις στερεές καλλιέργειες

3.3.3.2 Καλλιέργειες στο υγρό απόβλητο ελαιουργείου

Όπως και στις στερεές, έτσι και στις υγρές καλλιέργειες παρατηρήθηκε οπτικά ότι τα στελέχη PO 850412 και PO p15, αναπτύχθηκαν πιο γρήγορα από τα υπόλοιπα στελέχη. Ακολούθησε ο μύκητας του είδους *Pulmonarius*, PP p5. Τέλος, τα στελέχη του είδους *Ostreatus*, PO 22 και PO 69 επέδειξαν ένα καθυστερημένο ρυθμό ανάπτυξης, έναντι των υπολοίπων, από τις πρώτες κιόλας μέρες.

Η οπτική παρατήρηση που έγινε στις στερεές καλλιέργειες, ότι δηλαδή η πυκνότητα των υφών των τεσσάρων στελεχών του είδους *Ostreatus* ήταν

αρκετά μεγαλύτερη από αυτή του στελέχους του είδους *Pulmonarius*, επαληθεύτηκε με τις υγρές καλλιέργειες. Αυτό παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση, από την αρχή της ανάπτυξης των πέντε μυκήτων και διατηρήθηκε έως ότου οι μύκητες αποικίσουν πλήρως την ελεύθερη επιφάνεια της φιάλης, (Φωτογραφία 3.2).



Φωτογραφία 3.2: Καλλιέργεια μύκητα λευκής σήψης στο υγρό απόβλητο ελαιουργείου

Στα πειράματα διαλείποντος έργου, όπως και στις στερεές καλλιέργειες, το απόβλητο υπέστη κάποιο αποχρωματισμό, από ανοιχτό καστανό σε σκούρο καφέ-μαύρο, χρώμα μετά την βιοεπεξεργασία του με τους μύκητες λευκής σήψης. Ο αποχρωματισμός του υποστρώματος από τα τέσσερα στελέχη του είδους *Ostreatus* ήταν ελαφρώς εντονότερος από αυτό του είδους *Pulmonarius*.

Τα αποτελέσματα που έδωσαν οι υγρές καλλιέργειες των μυκήτων, δηλαδή τα τελικά χαρακτηριστικά του βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου από το κάθε

στέλεχος όσον αφορά τη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ) και της παραμέτρου του pH, παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1: Χαρακτηριστικά του κάθε υποστρώματος μετά το τέλος του πειράματος

	<i>pH</i>	<i>Φαινολικά (g/l)</i>	<i>Διαλυτό ΧΑΟ (g/l)</i>
Μάρτυρας	5.1 ± 0.0	8.1 ± 0.6	71.2 ± 0.3
PO 22	5.5 ± 0.0	1.4 ± 0.1	68.8 ± 0.4
PO 850412	5.4 ± 0.0	1.8 ± 0.1	72.0 ± 0.3
PO p15	5.4 ± 0.1	2.0 ± 0.0	76.8 ± 0.6
PO 69	5.5 ± 0.0	1.5 ± 0.1	83.2 ± 2.4
PP p5	5.4 ± 0.0	1.7 ± 0.0	80.8 ± 1.1

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

Μετά τη λήξη του πειράματος μετρήθηκε το pH στο βιοεπεξεργασμένο απόβλητο και παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση εν συγκρίσει με το pH του μάρτυρα. Οι μεταξύ των πέντε μυκήτων διαφορές της παραμέτρου ήταν αμελητέες.

Υψηλότερο ποσοστό αποδόμησης φαινολικών ενώσεων παρατηρήθηκε στο υγρό απόβλητο που επεξεργάστηκε με το στέλεχος του είδους *Ostreatus*, PO 22. Η αποδόμηση αυτή ανήλθε στα 82.7 % έναντι της αμέσως επόμενης (81.5 %) η οποία προήλθε από την επεξεργασία με τον μύκητα του ίδιου είδους, PO 69. Ακολούθησαν το στέλεχος του είδους *Pulmonarius*, PP p5, και τα στελέχη του είδους *Ostreatus*, PO 850412 και PO p15, επιτυγχάνοντας αποδόμηση ίση με 79.0 %, 77.8 % και 75.3 %, αντίστοιχα.

Με το πέρας του πειράματος μετρήθηκε το διαλυτό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο στο βιοεπεξεργασμένου αποβλήτου. Η επεξεργασία με κανένα μύκητα δεν επέφερε κάποια αξιοσημείωτη μείωση στην παράμετρο αυτή.

3.3.4 Ανάλυση αποτελεσμάτων

Λαμβάνοντας υπ' όψιν μόνο τα αποτελέσματα και τις παρατηρήσεις των στερεών καλλιιεργειών, καταλληλότερος για τη διεξαγωγή των επόμενων πειραμάτων κρίνεται το στέλεχος PO 850412 που δείχνει μια ταχεία ανάπτυξη. Ο μύκητας αυτός ανήκει στο είδος *Pleurotus Ostreatus*, το οποίο παρουσίασε μεγάλη πυκνότητα υφών και αποχρωμάτισε πλήρως το απόβλητο.

Θα πρέπει όμως να ληφθούν υπ' όψιν και τα αποτελέσματα των υγρών καλλιιεργειών. Παρόλο που τα πέντε στελέχη που μελετήθηκαν, παρουσίασαν μικροδιαφορές στην ικανότητα τους να αποδομούν τις φαινολικές ενώσεις του αποβλήτου, αποδοτικότερος κρίθηκε το στέλεχος PO 22 και αμέσως μετά το PO 69. Και οι δύο ανήκουν στο είδος *Pleurotus Ostreatus* και συνεπώς έχουν τα πλεονεκτήματα που προαναφέρθηκαν. Όμως, οι δύο αυτοί μύκητες χαρακτηρίστηκαν ως οι βραδύτεροι ως προς τον ρυθμό ανάπτυξής τους. Ελαφρύ προβάδισμα είχε το στέλεχος PO 22.

Εκτιμώντας όλους τους πιο πάνω παράγοντες, επιλέχθηκε ο μύκητας του είδους ***Pleurotus Ostreatus***, στέλεχος **PO 22**, ως ο καταλληλότερος (αποδοτικότερος) για να χρησιμοποιηθεί στα ακόλουθα πειράματα.

3.4 Διάταξη διαδοχικών δίσκων

3.4.1 Αντιδραστήρας διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία

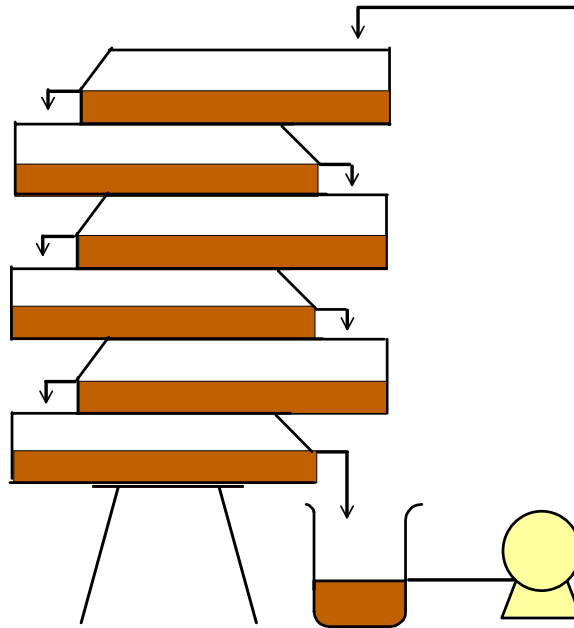
3.4.1.1 Εισαγωγή

Μετά την επιλογή του στελέχους PO 22, του είδους *Pleurotus Ostreatus*, ως του πιο αποδοτικού μύκητα λευκής σήψης απ' αυτούς που διέθετε η συλλογή

μας, έπειτα από συγκριτική αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε (παράγραφος 3.3), σειρά είχε ο σχεδιασμός και η λειτουργία ενός κατάλληλου αερόβιου αντιδραστήρα για την ανάπτυξη του μύκητα αυτού. Ο απώτερος σκοπός ήταν να σχεδιαστεί ένα σύστημα συνεχούς λειτουργίας στο οποίο ο μύκητας να συγκρατείται και να αναπτύσσεται. Στον εργαστηριακής κλίμακας αντιδραστήρα έγινε επεξεργασία μεγάλου όγκου υγρού αποβλήτου ελαιουργείου ενώ ο μύκητας αναπτυσσόταν υπό μη ασηπτικές συνθήκες προκειμένου να μελετηθεί αν μπορεί να επιβιώσει κάτω απ' αυτές τις συνθήκες. Παρόλα αυτά, το απόβλητο και τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αποστειρωθεί πριν την έναρξη του πειράματος για να επιβραδυνθεί το φαινόμενο της μόλυνσης, ενώ ο αντιδραστήρας στην αρχή μελετήθηκε ως διαλείπωντος έργου με ανακυκλοφορία.

3.4.1.2 Πειραματική διάταξη

Η διάταξη η οποία χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του αντιδραστήρα αποτελείτο από έξι πλαστικούς διαδοχικούς δίσκους (trays). Οι διαστάσεις του καθενός ήταν 24 cm x 3 cm x 31 cm και η χωρητικότητα του ίση με 0.63 l υγρού αποβλήτου ελαιουργείου. Ο κάθε δίσκος ήταν τοποθετημένος πάνω στον άλλο με τέτοιο τρόπο, ώστε με την έναρξη της ροής του αποβλήτου, αυτό να «ρέει» από τον ένα δίσκο στον άλλο λόγω υπερχειλίσης (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6: Αντιδραστήρας διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία (διάταξη δίσκων)

Ο αντιδραστήρας βρισκόταν μέσα στον κενό χώρο που δημιουργούσαν δύο πλαστικά κιβώτια. Όπως φαίνεται στη φωτογραφία 3.3, το ένα κιβώτιο ήταν τοποθετημένο ανάποδα πάνω στο άλλο. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι δίσκοι και τα κιβώτια λόγω του υλικού που ήταν φτιαγμένα δεν ήταν εφικτό να υποστούν θερμική αποστείρωση και γι' αυτό το λόγο απλώς απολυμάνθηκαν.



Φωτογραφία 3.3: Εξωτερική όψη του αντιδραστήρα διαλείποντος έργου

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.5, το υγρό απόβλητο του τελευταίου δίσκου (απαριθμώντας από πάνω προς τα κάτω), καταλήγει σε γυάλινο δοχείο χωρητικότητας 250 ml, από το οποίο (με τη βοήθεια ακροφυσίου) ξεκινά καθοδική ανακυκλοφορία. Η ανακυκλοφορία πραγματοποιείται με περισταλτική αντλία (τύπου Masterflex Cole-Parmer Instrument Company Chicago, Illinois 60648). Τα σωληνάρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μεγάλης διαμέτρου προκειμένου να μην υπάρξει πρόβλημα κατά τη ροή του αποβλήτου λόγω των στερεών σωματιδίων του. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν σωληνάρια τύπου masterflex για να είναι δυνατή η ξηρή αποστείρωση πριν την έναρξη του πειράματος, μαζί με το γυάλινο δοχείο συλλογής.

3.4.1.3 Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη λειτουργίας του αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκαν δώδεκα υγρές καλλιέργειες του στελέχους PO 22 σε υγρό αποστειρωμένο απόβλητο ελαιουργείου αραιωμένο (1:1). Σε κάθε πλαστικό δίσκο (tray) αντιστοιχούσε μια υγρή καλλιέργεια ενώ οι υπόλοιπες έξι πραγματοποιήθηκαν σε περίπτωση

που οι πρώτες δεν αναπτυχθούν λόγω καταστροφής του εμβολίου του μύκητα ή προσβολής του από ξένους μικροοργανισμούς. Η προετοιμασία του υποστρώματος έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.2 ενώ η πορεία που ακολουθήσαμε για τις υγρές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.4. Η έναρξη της λειτουργίας του αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε όταν οι μύκητες αναπτύχθηκαν πλήρως, κάλυψαν δηλαδή όλη την ελεύθερη επιφάνεια των φιαλών των 250 ml (Erlenmeyer).

Το υγρό απόβλητο που χρησιμοποιήθηκε, υπέστη πριν την είσοδο του στον αντιδραστήρα, υγρή αποστείρωση (ατμούς) σε θερμοκρασία 121 °C για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης και αφού το υλικό απέκτησε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 0.63 l αυτού οδηγήθηκαν με προσοχή στον τελευταίο δίσκο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσεκτική αφαίρεση του ήδη ανεπτυγμένου μύκητα από τη φιάλη των 250 ml (Erlenmeyer) για τον εμβολιασμό του αποβλήτου που βρισκόταν στον δίσκο. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε για όλους τους δίσκους. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι το απόβλητο εμβολιάστηκε με ήδη ανεπτυγμένο μύκητα και όχι με μικρά μυκήλια, γιατί όπως είδαμε στο γράφημα 3.1, η ανάπτυξη του στελέχους PO 22 παρουσιάζει μια φάση υστέρησης επτά ημερών, διάστημα αρκετά μεγάλο για πιθανή μόλυνση, αφού η διάταξη δεν βρίσκεται υπό ασηπτικές συνθήκες.

Η ροή ανακυκλοφορίας ήταν ίση με 5 ml/min και εφαρμόστηκε σε συνολικό όγκο υγρού αποστειρωμένου αποβλήτου ίσο με 3.8 l. Ο αντιδραστήρας ήταν διαλείποντος έργου (batch) και όπως προαναφέρθηκε λειτουργούσε με καθοδική ανακυκλοφορία. Με την έναρξη της λειτουργίας του πραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος ώστε να γίνουν διάφορες αναλύσεις σ' αυτό, ενώ οι υπόλοιπες δειγματοληψίες (μια φορά τη μέρα) περιελάμβαναν μετρήσεις της συγκέντρωσης των φαινολικών, του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, της θερμοκρασίας και του pH του αποβλήτου.

3.4.1.4 Αποτελέσματα και συμπεράσματα

Τα χαρακτηριστικά του αποστειρωμένου αποβλήτου που χρησιμοποιήσαμε ως υπόστρωμα, όπως ελήφθησαν από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, φαίνονται στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας (αποστειρωμένο απόβλητο) του αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (διάταξη διαδοχικών δίσκων)

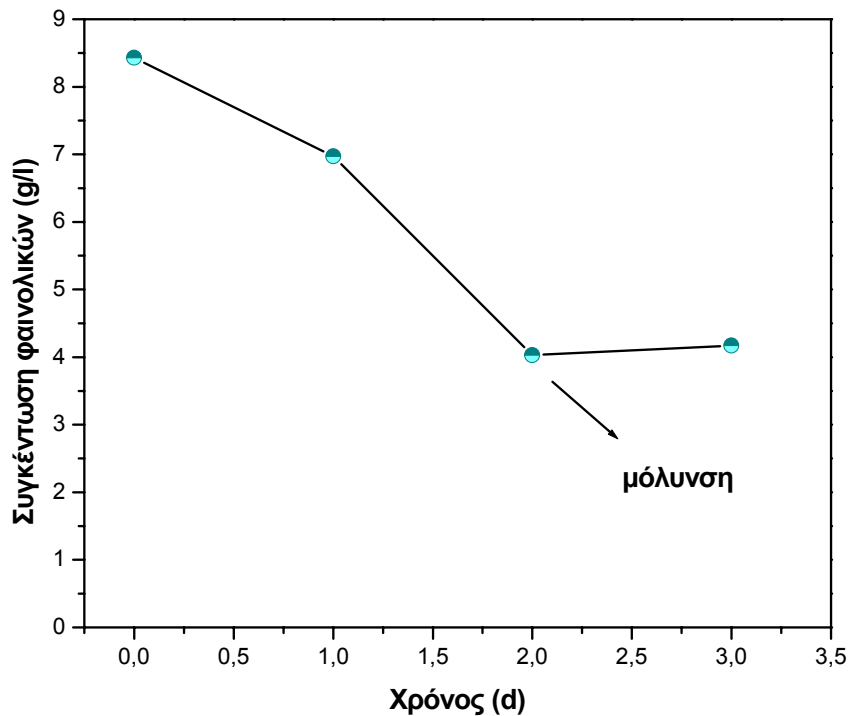
<i>pH</i>	<i>Θερμοκρασία (°C)</i>	<i>Διαλυτό ΧΑΟ (g/l)</i>	<i>Ολικό ΧΑΟ (g/l)</i>	<i>ΟΑΣ (g/l)</i>	<i>ΠΑΣ (g/l)</i>	<i>Φαινολικά (g/l)</i>
5.28	22	70.3±1.4	113.2±3.5	35.6	33.9	8.43±0.3

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

ΟΑΣ: Ολικά αιωρούμενα στερεά

ΠΑΣ: Πτητικά αιωρούμενα στερεά

Στο γράφημα 3.2 φαίνεται το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών με την πάροδο των ημερών. Έπειτα από καθημερινές μετρήσεις διαπιστώθηκε ότι το διαλυτό οργανικό φορτίο, το pH και η θερμοκρασία του υγρού αποβλήτου κυμάνθηκαν στα ίδια με τα αρχικά επίπεδα.



Γράφημα 3.2: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (διάταξη διαδοχικών δίσκων)

Από την πρώτη κιόλας ημέρα άρχισαν να αναπτύσσονται καινούργιες υφές του μύκητα ενώ μέχρι και την δεύτερη ημέρα διαπιστώθηκε μια αξιόλογη μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών με συνολικό ποσοστό αποδόμησης ίσο με 51.2 %. Την ίδια ημέρα όμως, έγιναν εμφανή στο υγρό απόβλητο ίχνη μόλυνσης από ξένους μικροοργανισμούς. Οι εστίες μόλυνσης παρουσιάστηκαν κυρίως στις δύο γωνίες του κάθε δίσκου (νεκροί όγκοι), όπου το απόβλητο ήταν «στάσιμο». Το γεγονός αυτό οδήγησε στην υποψία ότι η μόλυνση παρουσιάστηκε τόσο γρήγορα εξαιτίας του ότι ο αντιδραστήρας λειτουργούσε ως διαλείποντος έργου με αποτέλεσμα το υγρό μέσο (απόβλητο) να μην ανανεώνεται με «φρέσκο αποστειρωμένο».

Τις επόμενες ημέρες η μόλυνση από τα ξένα βακτήρια εξαπλώθηκε με εντυπωσιακούς ρυθμούς σε όλη την ελεύθερη επιφάνεια του αποβλήτου του κάθε δίσκου, με αποτέλεσμα η περαιτέρω ανάπτυξη του μύκητα ΡΟ 22 να

καταστεί αδύνατη. Αυτό οδήγησε στον αναγκαστικό τερματισμό της λειτουργίας του αντιδραστήρα.

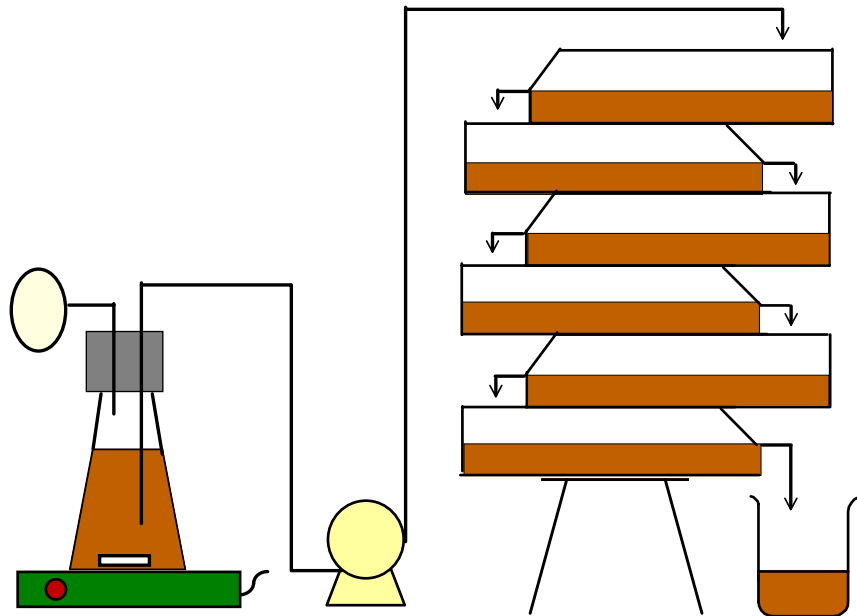
3.4.2 Αντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας

3.4.2.1 Εισαγωγή

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη γρήγορη και υψηλή αποδόμηση των φαινολικών ουσιών που επιτεύχθηκε με τον αντιδραστήρα των διαδοχικών δίσκων θελήσαμε να επιμείνουμε σ' αυτήν τη διάταξη προσπαθώντας να αντιμετωπίσουμε το πρόβλημα της μόλυνσης που προέκυψε κατά τη διάρκεια του προηγούμενου πειράματος (παράγραφος 3.4.1). Για το σκοπό αυτό, το σύστημα μετατράπηκε από αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία, σε αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας με χρόνο παραμονής μικρότερο από το χρονικό διάστημα που πέρασε για να κάνει την εμφάνισή της η μόλυνση στον πρώτο αντιδραστήρα .

3.4.2.2 Πειραματική διάταξη

Η διάταξη του νέου αντιδραστήρα ήταν πανομοιότυπη με τη διάταξη για την οποία έγινε εκτενής αναφορά στην παράγραφο 3.4.1.2. Η διαφορά στην περίπτωση αυτή, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.7, είναι ότι το υγρό απόβλητο, με την υπερχείλιση του τελευταίου δίσκου (απαριθμώντας από πάνω προς τα κάτω), καταλήγει στο δοχείο απορροής (γυάλινο δοχείο χωρητικότητας 2 l).



Σχήμα 3.7: Αντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας (διάταξη διαδοχικών δίσκων)

Το δοχείο της τροφοδοσίας ήταν μια κωνική φιάλη συνολικού όγκου 3 l. Η φιάλη πωματιζόταν αεροστεγώς με ελαστικό πώμα, μέσα από το οποίο ήταν περασμένα δύο μεταλλικά σωληνάκια διαμέτρου 7 mm. Το ένα είχε μήκος 30 cm (το μεγαλύτερο μέρος του οποίου ήταν στην εσωτερική μεριά της φιάλης), και το άλλο μόλις 7 cm (το μεγαλύτερο μέρος του οποίου βρισκόταν στην εξωτερική μεριά). Στο μικρού μήκους, σωληνάριο ήταν προσαρμοσμένο ένα λαστιχένιο σωληνάριο της ίδιας διαμέτρου το οποίο με τη σειρά του συνδεόταν με ένα αποστειρωμένο φίλτρο. Μέσω αυτού γινόταν η είσοδος αέρα κατά τη λειτουργία της αντλίας. Το μεγάλου μήκους σωληνάριο χρησίμευε για την τροφοδοσία. Στο εξωτερικό άκρο του ήταν προσαρμοσμένο σωληνάριο τύπου masterflex, το άλλο άκρο του οποίου ήταν συνδεδεμένο με την περισταλτική αντλία (τύπου Masterflex Cole-Parmer Instrument Company Chicago, illinois 60648).

Η τροφοδοσία βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προκειμένου να έχουμε ομοιογένεια στο απόβλητο κατά την τροφοδοσία. Να σημειωθεί ότι τα μεταλλικά και λαστιχένια σωληνάκια, το φίλτρο, ο μαγνήτης, το δοχείο τροφοδοσίας και απορροής καθώς και το

ελαστικό πώμα είχαν υποστεί ξηρή αποστείρωση (σε κλίβανο) στους 121 °C πριν την έναρξη της λειτουργίας του αντιδραστήρα.

3.4.2.3 Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία η οποία ακολουθήσαμε ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 3.4.1.3. Η διαφορά, όπως προαναφέρθηκε, ήταν ότι ο συγκεκριμένος αντιδραστήρας λειτούργησε ως συνεχής με ενεργό όγκο 3.8 l υγρού αποστειρωμένου αποβλήτου. Η ροή της τροφοδοσίας ήταν ίση με 5 ml/min, συνεπώς, ο χρόνος παραμονής του αντιδραστήρα ήταν σχεδόν 13 ώρες. Με την έναρξη της λειτουργίας του, λήφθηκε δείγμα για αναλύσεις, ενώ οι υπόλοιπες δειγματοληψίες (μια φορά τη μέρα) περιελάμβαναν μετρήσεις της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών, του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, της θερμοκρασίας και του pH.

3.4.2.4 Αποτελέσματα και συμπεράσματα

Τα αρχικά χαρακτηριστικά του αποστειρωμένου αποβλήτου που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα, φαίνονται στον πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας (αποστειρωμένο απόβλητο) του αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (διάταξη διαδοχικών δίσκων)

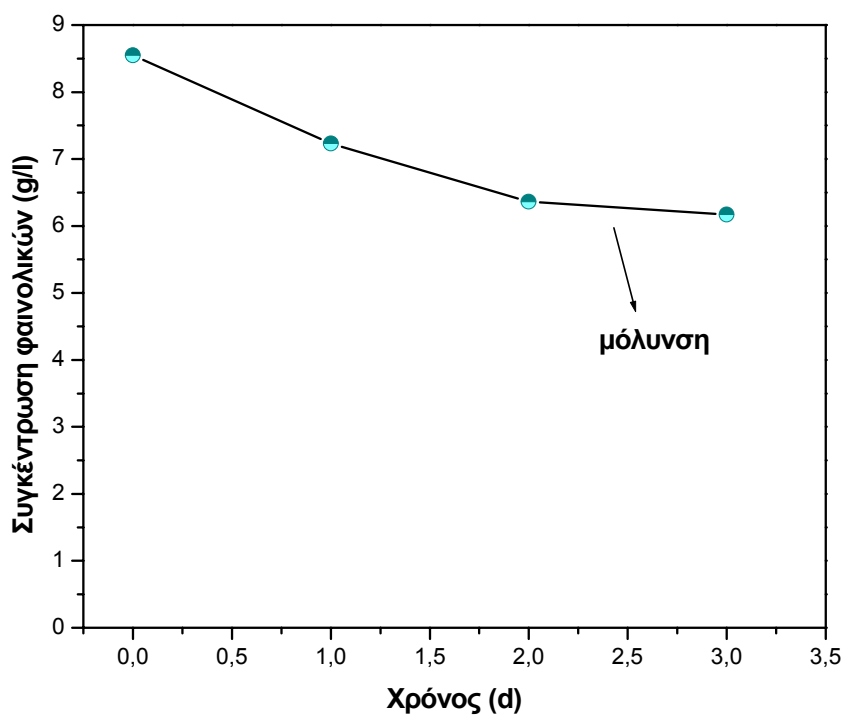
<i>pH</i>	<i>Θερμοκρασία (°C)</i>	<i>Διαλυτό ΧΑΟ (g/l)</i>	<i>Ολικό ΧΑΟ (g/l)</i>	<i>ΟΑΣ (g/l)</i>	<i>ΠΑΣ (g/l)</i>	<i>Φαινολικά (g/l)</i>
5.25	22	64.32±1.75	127.3±2.7	36.26	32.98	8.55±0.26

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

ΟΑΣ: Ολικά αιωρούμενα στερεά

ΠΑΣ: Πτητικά αιωρούμενα στερεά

Το γράφημα 3.3 απεικονίζει το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών με την πάροδο των ημερών. Έπειτα από καθημερινές μετρήσεις, διαπιστώθηκε ότι οι υπόλοιπες παράμετροι που μελετήθηκαν κυμάνθηκαν στα ίδια με τα αρχικά επίπεδα.



Γράφημα 3.3: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στον αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (διάταξη διαδοχικών δίσκων)

Και σ' αυτόν τον αντιδραστήρα, από την πρώτη κιόλας ημέρα άρχισε η ανάπτυξη καινούργιων υφών του μύκητα. Το ποσοστό αποδόμησης των φαινολικών που μετρήθηκε την δεύτερη ημέρα ήταν ίσο με 26.8 %, σαφώς μικρότερο από αυτό που επιτεύχθηκε την ίδια χρονική στιγμή με τον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία.

Μεταξύ του χρονικού διαστήματος της δεύτερης και τρίτης ημέρας, παρατηρήθηκαν στο υγρό απόβλητο ίχνη μόλυνσης από ξένους μικροοργανισμούς. Οι πρώτες εστίες μόλυνσης παρουσιάστηκαν και πάλι στις δύο γωνίες του κάθε δίσκου όπου το υγρό μέσο ήταν στάσιμο, παρόλο που ο αντιδραστήρας λειτουργούσε με συνεχή τρόπο. Τις επόμενες ημέρες η

μόλυνση από τα ξένα βακτήρια εξαπλώθηκε με εντυπωσιακούς ρυθμούς σε όλη την ελεύθερη επιφάνεια του αποβλήτου του κάθε δίσκου (Φωτογραφία 3.4), με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η περαιτέρω ανάπτυξη του μύκητα μας. Αυτό οδήγησε στον αναγκαστικό τερματισμό της λειτουργίας του αντιδραστήρα.



Φωτογραφία 3.4: Εξάπλωση της μόλυνσης στην ελεύθερη επιφάνεια των δίσκων

Συγκρίνοντας τη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτεύχθηκε με τους δύο αντιδραστήρες της διάταξης των διαδοχικών δίσκων, αντιλαμβανόμαστε την αναγκαιότητα της ανακυκλοφορίας σε τέτοιου είδους συστήματα. Στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία πραγματοποιήθηκε διπλάσιο ποσοστό αποδόμησης φαινολικών απ' ό,τι στον αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας.

Η μόλυνση παρουσιάστηκε αρκετά γρήγορα, με καθυστέρηση μόλις 12 ώρες σε σύγκριση με τη μόλυνση του πρώτου αντιδραστήρα (παράγραφος 3.4.1), παρόλο που ο δεύτερος αντιδραστήρας ήταν συνεχούς λειτουργίας και το υγρό μέσο (απόβλητο) ανανεωνόταν συνεχώς με «φρέσκο αποστειρωμένο». Καταλήξαμε λοιπόν, στο συμπέρασμα ότι εξαιτίας της μεγάλης ευαισθησίας

της συγκεκριμένης κατηγορίας μυκήτων, η μόλυνση από ξένους μικροοργανισμούς είναι αδύνατον να αποφευχθεί υπό συνθήκες μη ασηπτικές, ακόμη κι αν όλα τα μέσα που χρησιμοποιούνται έχουν προηγουμένως αποστειρωθεί ή απολυμανθεί.

3.5 Ακίνητοποίηση (immobilization) του μύκητα PO 22 μέσω παγίδευσης

3.5.1 Ακίνητοποίηση του μύκητα *Pleurotus ostreatus*, PO 22, σε πολυμερές πολυουρεθάνη

3.5.1.1 Γενικά

Στα προηγούμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και αφορούσαν την ανάπτυξη του μύκητα σε υγρό απόβλητο ελαιουργείου (πειράματα διαλείποντος έργου της συγκριτικής αξιολόγησης των μυκήτων και διάταξη των διαδοχικών δίσκων), ο μύκητας αναπτυσσόταν «αιωρούμενος» (suspended) στην επιφάνεια του αποβλήτου. Η μορφή αυτής της ανάπτυξης του μπορεί να παρομοιαστεί σαν μία ενιαία γέλη (gel), η οποία αποτελείται από υφές και μεγαλώνει ακτινικά προς όλες τις κατευθύνσεις της ελεύθερης επιφάνειας του υποστρώματος. Το μυκήλιο είναι αρκετά «συνεκτικό» και οι υφές του μπορούν να διασπαστούν και να αποτελέσουν πυρήνες δημιουργίας νέων κυττάρων, μόνο κατόπιν ισχυρής ανάδευσης.

Καθώς οι μύκητες αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν τέτοια μορφή ανάπτυξης, σημαντικό ρόλο παίζει η διαθέσιμη επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται. Πρώτα θα πλαισιώσουν (αποικίσουν) όλη την επιφάνεια ανάπτυξης του υλικού και κατόπιν (όταν αρχίσουν να περιορίζονται, π.χ. από τα τοιχώματα του αντιδραστήρα) προχωρούν προς το εσωτερικό του υλικού.

Έτσι λοιπόν, στην περίπτωση που η επεξεργασία του αποβλήτου με το μύκητα θα αποτελούσε ένα σημαντικό τμήμα της ερευνητικής εργασίας μας, και με δεδομένο ότι θα έπρεπε να αναπτύσσεται εντός αντιδραστήρα, ο οποίος θα επεξεργάζεται μεγάλες ποσότητες αποβλήτου, κρίθηκε αναγκαίο να εξεταστεί η ανάπτυξη του μύκητα επάνω σε σωματίδια (υποστηρικτές) μικρού μεγέθους, τα οποία θα έπαιζαν το ρόλο του πληρωτικού υλικού κατά την εφαρμογή τους σε αντιδραστήρες.

Το όλο αυτό σκεπτικό βασιζόταν στο να μπορέσει ο μύκητας να «αποικίσει» (colonized) τους υποστηρικτές αυτούς, πραγματοποιώντας ταυτόχρονα ένα είδος ακινητοποίησης. Τα σωματίδια με τον ακινητοποιημένο μύκητα θα μπορούσαν να κινούνται στο εσωτερικό ενός αντιδραστήρα χωρίς να συμπαρασύρονται από την ροή του υγρού μέσου.

Οι νέοι αυτοί «πυρήνες» (pellets μυκηλίου), θα αποτελούσαν πλέον τα ενεργά κέντρα του μικροοργανισμού, από τον οποίο θα παράγονταν τα απαραίτητα, για την οξειδωση του υποστρώματος, ένζυμα και τα οποία θα διαχέονταν ευκολότερα, προς όλες τις κατευθύνσεις, στο εσωτερικό του υγρού μέσου.

Ενώ η ακινητοποίηση των βακτηρίων αποτελεί τεχνική που έχει προχωρήσει σημαντικά σε ερευνητικό και εφαρμοσμένο επίπεδο, δεν συμβαίνει το ίδιο και στην περίπτωση των μυκήτων. Η ακινητοποίηση αυτού του είδους των μυκήτων αποτελεί μια νέα τεχνολογία, όπου ελάχιστα πράγματα έχουν γίνει και σε λίγα εργαστήρια.

3.5.1.2 Υλικά και μέθοδοι

Από τις λίγες αυτές εργασίες που έχουν γίνει για την ακινητοποίηση των μυκήτων λευκής σήψης, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι υποστηρικτές όπως πολυμερές πολυουρεθάνη, πορώδη κεραμικά, πλέγμα από νάυλον (nylon web), πολυπροπυλένιο, αγαρόζη (agarose), σφαιρικά τεμαχίδια από άγαρ (agar gel beads), κ.α. (Kirkpatrick and Palmer, 1987, Ruckenstein and Wang, 1994). Για το δικό μας πείραμα επιλέξαμε την κοινή πολυουρεθάνη

(polyurethane foam) του εμπορίου, την οποία μπορούσαμε πολύ εύκολα να προμηθευτούμε και χωρίς μεγάλο κόστος. Όταν ο αφρός της πολυουρεθάνης ερχόταν σε επαφή με την ατμόσφαιρα, διογκωνόταν (λόγω έκλυσης διοξειδίου του άνθρακα, CO₂) και αποκτούσε στερεή (σπογγώδη) μορφή μετά από κάποιες ώρες παραμονής. Το διογκωμένο πλέον υλικό, έφερε λεία εξωτερική επιφάνεια και μπορούσε πολύ εύκολα να τεμαχιστεί. Το εσωτερικό του πολυμερούς ήταν σπογγώδες με διάμετρο πόρων 0.4-0.6 mm.

3.5.1.3 Πειραματική διάταξη και διαδικασία

Πριν την έναρξη του κύριου πειράματος πραγματοποιήθηκαν δύο στερεές καλλιέργειες του στελέχους PO 22 στο αποστειρωμένο ημισυνθετικό μέσο CYM (Complete Yeast Medium), αραιωμένο (1:1). Τα συστατικά του μέσου και η συγκέντρωση αυτών, δίνονται στον πίνακα 3.4. Η πορεία που ακολουθήσαμε για τις στερεές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.3. Η έναρξη του κύριου πειράματος πραγματοποιήθηκε όταν οι μύκητες αναπτύχθηκαν πλήρως, κάλυψαν δηλαδή όλη την ελεύθερη επιφάνεια του τρυβλίου.

Πραγματοποιήθηκε αφαίρεση της λείας εξωτερικής επιφάνειας της πολυουρεθάνης, και εν συνεχεία το πολυμερές κόπηκε σε μικρά τεμαχίδια (κύβους 0.5-1.0 cm), τα οποία ήταν πορώδη σε όλες τις πλευρές τους. Έπειτα διαβράχθηκαν και εκπλύθηκαν για δύο-τρεις φορές με απεσταγμένο νερό και τέλος αποστειρώθηκαν στον κλίβανο στους 121 °C.

Προκειμένου να δούμε εάν ο μύκητας μπορεί να αναπτυχθεί και να «αποικίσει» το πολυμερές, κρίθηκε σκόπιμο να μη χρησιμοποιήσουμε κατ' ευθείαν απόβλητο ελαιουργείου, αλλά να γίνει μία πρώτη δοκιμή, χρησιμοποιώντας το συμβατικό για τους μύκητες υλικό CYM (Complete Yeast Medium).

Πίνακας 3.4: Συστατικά του συνθετικού μέσου CYM

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/l)
Γλυκόζη	20.0
Πεπτόνη	2.0
Εκχύλισμα ζύμης	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	0.6
K ₂ HPO ₄	1.0
άγαρ *	16.0

*: μόνο για τις στερεές καλλιέργειες

Σε τρεις φιάλες των 250 ml εισήχθησαν δέκα τεμαχίδια πολυουρεθάνης, διαμέτρου 0.5-1.0 cm και ένας μικρός μαγνήτης, με προοπτική όταν ο μύκητας αρχίσει να αναπτύσσεται, να μπορέσουμε να διασπάσουμε τις υφές του με ισχυρή ανάδευση, ώστε να δημιουργηθούν περισσότερες εστίες ανάπτυξης, που θα οδηγήσουν σε γρηγορότερο αποικισμό των κύβων της πολυουρεθάνης. Στη συνέχεια οι φιάλες αποστειρώθηκαν παράλληλα με το υγρό υλικό CYM στις συνήθεις συνθήκες (121 °C για 20 λεπτά).

Μετά το τέλος της αποστείρωσης, 100 ml υλικού CYM προστέθηκαν στις φιάλες και αφού αυτό απέκτησε θερμοκρασία περιβάλλοντος, εμβολιάστηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, με εμβόλιο (πάχους 3 mm και διαμέτρου 6 mm) που προερχόταν από τις ενεργές υφές του μύκητα, ο οποίος είχε προηγουμένως αναπτυχθεί σε στερεοποιημένο υλικό CYM. Η πορεία που ακολουθήσαμε για τις υγρές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.4. Κατόπιν αυτού οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε θάλαμο επώασης, στους 28 °C.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι η επιλογή του αριθμού των τεμαχιδίων του πολυμερούς σε αυτό τον όγκο του υγρού μέσου, βασίστηκε σε δεδομένα βιβλιογραφίας, (Ruckenstein and Wang, 1994).

3.5.1.4 Αποτελέσματα

Το εμβόλιο του μύκητα άρχισε να αναπτύσσεται πολύ γρήγορα (εντός 2-3 ημερών) και να δημιουργεί υφές μεταξύ των τεμαχιδίων της πολυουρεθάνης. Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε ισχυρή ανάδευση (μέσω μαγνητικού αναδευτήρα) και για διάρκεια 30 δευτερολέπτων περίπου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των υφών του μύκητα και τη διάχυση αυτών προς όλες τις κατευθύνσεις, μεταξύ του κύριου όγκου του υγρού μέσου και του πολυμερούς. Στη συνέχεια οι φιάλες επανήλθαν στο θάλαμο επώασης όπου και συνεχίστηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου.

Αυτό που παρατηρήθηκε στη συνέχεια και μάλιστα μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, ήταν ιδιαίτερα σημαντικό. Σχεδόν όλα τα τεμαχίδια της πολυουρεθάνης είχαν αποικιστεί από το μυκήλιο. Οι δυνάμεις «συνάφειας» μεταξύ του μύκητα και του πολυμερούς, ήταν πολύ έντονες, αφού και κατόπιν ισχυρής ανάδευσης το μυκήλιο παρέμεινε ακινητοποιημένο (προσκολλημένο) στην επιφάνεια του πολυμερούς.

3.5.1.5 Συμπεράσματα

Ο εύκολος και γρήγορος αποικισμός του μύκητα σε όλη την ελεύθερη επιφάνεια του υποστρώματος εν συγκρίσει με την αιωρούμενης μορφής ανάπτυξη του μύκητα, αποτέλεσε μία πολύ θετική βάση για τα προσεχή πειράματα. Συνεπώς, ο σχεδιασμός και η αριστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας ενός αντιδραστήρα που να μπορεί να υποστηρίξει τη διαδικασία της ακινητοποίησης του μύκητα, ήταν το αμέσως επόμενο βήμα.

3.5.2 Αντιδραστήρες τύπου κλίνης με διάφορες ροές καθοδικής ανακυκλοφορίας

3.5.2.1 Εισαγωγή

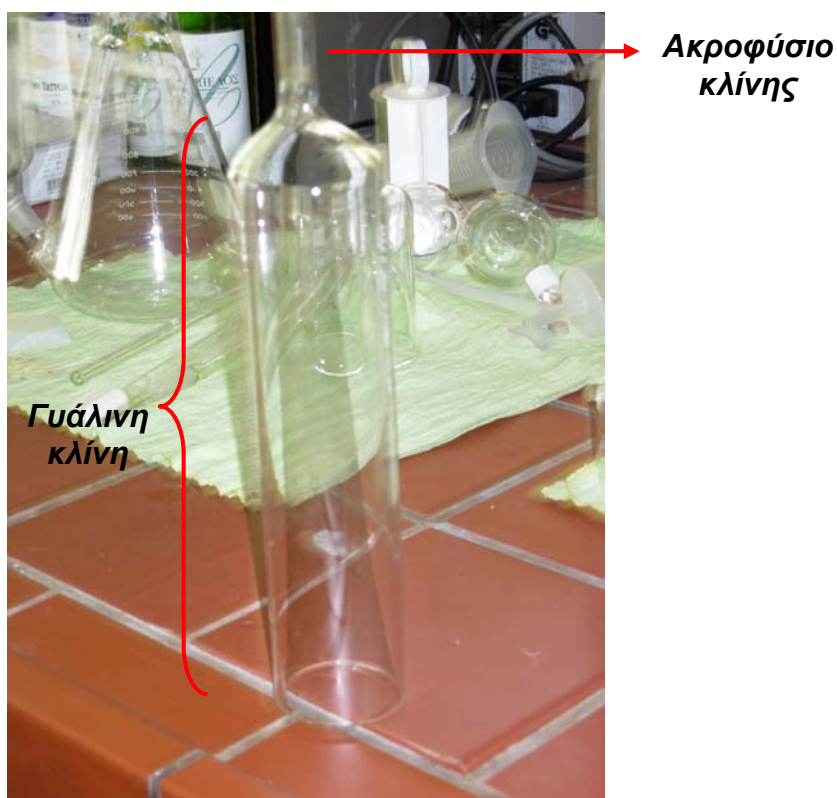
Σε περίπτωση που αποδείξουμε στη συνέχεια της έρευνάς μας, ότι η επεξεργασία με μύκητα λευκής σήψης αποτελεί ένα στάδιο που θα συνεισφέρει στην ολοκληρωμένη και αποτελεσματική επεξεργασία του αποβλήτου ελαιουργείου, η μορφή της «αιωρούμενης» ανάπτυξης του μύκητα, δεν είναι και τόσο κατάλληλη για εφαρμογή στους συνήθεις τύπους αντιδραστήρων. Συνεπώς γίνεται φανερό, ότι θα πρέπει να κατασκευαστεί ένας ιδιαίτερος τύπος αντιδραστήρα, που να εξυπηρετεί αυτό το είδος ανάπτυξης, ή ότι ο μύκητας θα πρέπει να αναπτύσσεται με ένα διαφορετικό τρόπο που να μη δημιουργεί αυτή την ενιαία γέλη, η οποία συχνά οδηγεί σε φαινόμενα «φραξίματος» και συνεπώς περιορίζει την ομαλή ροή του προς επεξεργασία αποβλήτου στο εσωτερικό αυτών των αντιδραστήρων.

Λαμβάνοντας λοιπόν υπ' όψιν τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα του πειράματος διαλείποντος έργου, δηλαδή, του γρήγορου και εύκολου αποικισμού του μύκητα *Pleurotus Ostreatus* 22 στο υλικό της πολυουρεθάνης καθώς και της συνεκτικότητας των υφών του (παράγραφος 3.5.1.4), επόμενο βήμα ήταν να πραγματοποιήσουμε ανάλογη διαδικασία, σε ένα άλλου είδους αντιδραστήρα.

Η διάταξη του καινούργιου αντιδραστήρα βρισκόταν υπό ασηπτικές συνθήκες αφού όπως προέκυψε από το πείραμα της παραγράφου 3.4, μια και εξαιτίας της μεγάλης ευαισθησίας της συγκεκριμένης κατηγορίας μυκήτων, η μόλυνση από ξένους μικροοργανισμούς είναι αδύνατον να αποφευχθεί υπό συνθήκες μη ασηπτικές. Συνεπώς, οτιδήποτε χρησιμοποιήθηκε στην πειραματική διαδικασία είχε προηγουμένως αποστειρωθεί ή τουλάχιστον απολυμανθεί.

3.5.2.2 Πειραματική διάταξη

Η διάταξη η οποία χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από δύο όμοιες, γυάλινες, κυλινδρικές κλίνες (**K1** και **K2**) (Φωτογραφία 3.5), εσωτερικής διαμέτρου 4.5 cm, ύψους 21 cm και χωρητικότητας 190 ml η κάθε μια. Στο κάτω μέρος των κλινών υπήρχε ακροφύσιο διαμέτρου 1 cm και ύψους 6 cm. Στο κάθε ακροφύσιο ήταν προσαρμοσμένο σιλικονούχο σωληνάριο, το οποίο στη συνέχεια συνδεόταν με το σωληνάριο τύπου masterflex της περισταλτικής αντλίας (τύπου Masterflex Cole-Parmer Instrument Company Chicago, illinois 60648) που αντιστοιχούσε στην κάθε κλίνη, αποτελώντας έτσι την «είσοδο» για την ανακυκλοφορία της.

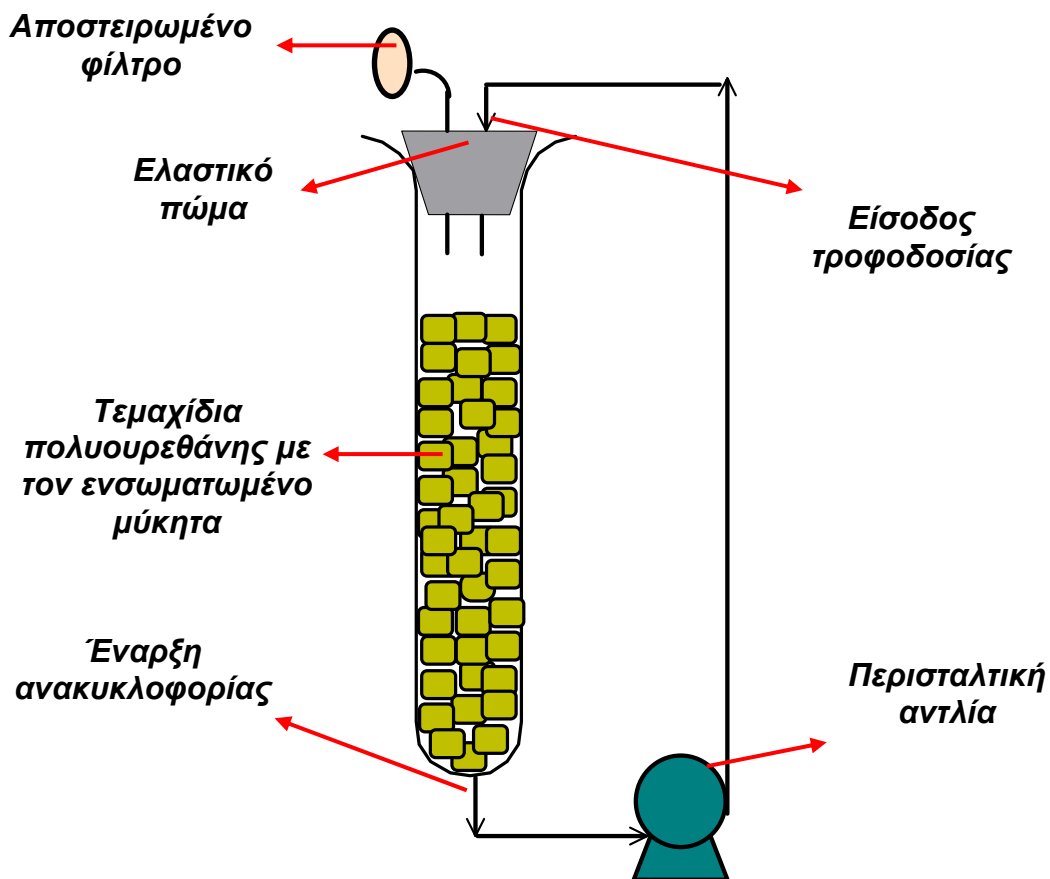


Φωτογραφία 3.5: Γυάλινη κλίνη

Οι γυάλινες κλίνες πωματίζονταν αεροστεγώς με ελαστικό πώμα, μέσα από το οποίο ήταν περασμένα δύο μεταλλικά σωληνάκια διαμέτρου 7 mm και ύψους 5 cm. Το μεγαλύτερο ύψος αυτών ήταν προς την εξωτερική πλευρά. Στο ένα εκ των δύο μεταλλικών σωληναρίων της κάθε κλίνης, ήταν προσαρμοσμένο

ένα λαστιχένιο σωληνάριο της ίδιας διαμέτρου, το οποίο με τη σειρά του συνδεόταν με ένα αποστειρωμένο φίλτρο. Μέσω αυτού γινόταν η είσοδος αέρα κατά τη λειτουργία της κάθε αντλίας. Το δεύτερο σωληνάριο εξυπηρετούσε την ανακυκλοφορία του υγρού μέσου. Στο εξωτερικό άκρο του ήταν προσαρμοσμένο σιλικονούχο σωληνάριο το άλλο άκρο του οποίου ήταν συνδεδεμένο με το σωληνάριο «εξόδου» τύπου masterflex της κάθε περισταλτικής αντλίας (Σχήμα 3.8).

Το πληρωτικό υλικό των δύο κλινών ήταν τεμαχίδια πολυουρεθάνης (κύβοι 1 cm^3). Στο εσωτερικό αυτών των τεμαχιδίων ήταν «ενσωματωμένος» ο μύκητας PO 22. Ολόκληρη η διάταξη βρισκόταν τοποθετημένη στο laminaar (συσκευή που λειτουργεί με υπεριώδη ακτινοβολία, UV, προκειμένου να εξασφαλίσει ασηπτικές συνθήκες στον περιβάλλοντα χώρο που περικλείει η συσκευή και όχι στις επιφάνειές της), με τη βοήθεια μιας μεταλλικής βάσης (στατό) ύψους 60 cm, η οποία, πριν την έναρξη του πειράματος, είχε απολυμανθεί. Να σημειωθεί ότι τα μεταλλικά και σιλικονούχα σωληνάρια, τα φίλτρα, οι δύο γυάλινες κλίνες καθώς και τα ελαστικά πώματα αποστειρώθηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία ίση με $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, πριν χρησιμοποιηθούν.



Σχήμα 3.8: Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης του αντιδραστήρα τύπου κλίνης (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πολυουρεθάνης)

3.5.2.3 Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη του πειράματος πραγματοποιήθηκαν δύο στερεές καλλιέργειες του στελέχους PO 22 σε αποστειρωμένο διάλυμα συριγγικού οξέος, αραιωμένο (1:1). Τα συστατικά του μέσου αυτού δίνονται στον πίνακα 3.5 και δίπλα αναγράφεται η συγκέντρωσή τους. Η πορεία που ακολουθήσαμε για τις στερεές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.3. Όταν ο μύκητας κάλυψε όλη την ελεύθερη επιφάνεια του στερεοποιημένου μέσου πραγματοποιήθηκαν δέκα υγρές καλλιέργειες του στελέχους PO 22 σε υγρό αποστειρωμένο διάλυμα συριγγικού οξέος (1:1). Για το πληρωτικό υλικό της κάθε κλίνης, απαιτούνταν τέσσερις υγρές καλλιέργειες. Οι υπόλοιπες δύο πραγματοποιήθηκαν σε περίπτωση που οι πρώτες δεν αναπτυχθούν λόγω καταβύθισης του μυκηλίου του μύκητα ή προσβολής του από ξένους

μικροοργανισμούς. Η πορεία που ακολουθήσαμε για τις υγρές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.4.

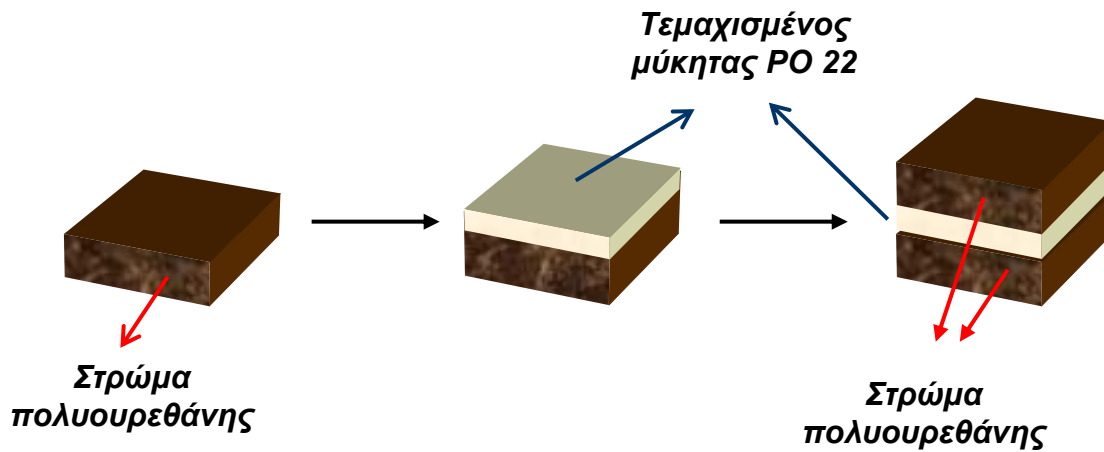
Πίνακας 3.5: Συστατικά του μέσου του συριγγικού οξέος

Συστατικά	Συγκέντρωση (g/l)
Συριγγικό οξύ	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	0.6
K ₂ HPO ₄	1.0
άγαρ *	16.0

*: μόνο για τις στερεές καλλιέργειες

Στο εσωτερικό των τεμαχιδίων της πολυουρεθάνης (πληρωτικό υλικό κλίνης) ήταν «ενσωματωμένος» ο μύκητας ΡΟ 22. Τα τεμαχίδια αυτά αποτελούνταν από τρία «στρώματα», τα δύο εξωτερικά στρώματα της διογκωμένης πλέον πολυουρεθάνης και το εσωτερικό στρώμα του μύκητα. Η διαδικασία κατασκευής του πληρωτικού αυτού υλικού περιγράφεται στη συνέχεια.

Όταν οι μύκητες είχαν αναπτυχθεί πλήρως, κάλυψαν δηλαδή όλη την ελεύθερη επιφάνεια του υγρού μέσου, αφαιρούνταν προσεχτικά από τις φιάλες ώστε μην καταβυθιστούν. Στη συνέχεια, οι ανεπτυγμένοι μύκητες τεμαχίζονταν σε μικρά, ίσα μεταξύ τους, κομμάτια. Το κάθε κομμάτι του μύκητα τοποθετούνταν προσεκτικά πάνω στο πρώτο στρώμα του πολυμερούς πριν ακόμη αυτό στερεοποιηθεί και διογκωθεί. Αμέσως μετά, ψεκαζόταν (πάνω από το μύκητα) και η δεύτερη στρώση του πολυμερούς. Τρεις περίπου ώρες αργότερα, αφού πλέον το πολυμερές της πολυουρεθάνης είχε στερεοποιηθεί και διογκωθεί και τα τρία στρώματα είχαν «ενοποιηθεί» μεταξύ τους, το υλικό κοβόταν σε κύβους, περίπου 1 cm³ (Σχήμα 3.9). Βασικό μέλημα ήταν οι κύβοι να κοπούν με τέτοιο τρόπο ώστε ο «τεμαχισμένος μύκητας» να μπορεί να έρχεται σε επαφή με το θρεπτικό μέσο. Στην κλίνη εισάγονταν περίπου 150 τεμαχίδια πολυουρεθάνης.



Σχήμα 3.9: Διαδικασία κατασκευής τεμαχιδίων πολυουρεθάνης με τον ενσωματωμένο μύκητα

Το διάλυμα συριγγικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία στις κλίνες, υπέστη πριν την είσοδο του σ' αυτές, υγρή αποστείρωση (ατμούς) σε θερμοκρασία 121 °C για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης και αφού το υλικό απέκτησε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 180 ml αυτού εισήχθησαν σε κάθε κλίνη. Θεωρήθηκε πιο σωστό το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιηθεί στο πρώτο στάδιο («στάδιο δοκιμής») της τεχνικής ακινητοποίησης μέσω παγίδευσης, να είναι ένα πιο εύκολα βιοαποδομήσιμο μέσο απ' ότι το υγρό απόβλητο ελαιουργείου προκειμένου να μελετηθεί η νέα αυτή διάταξη σε ένα πιο προσιτό, για το μύκητα, μέσο παρά κατ' ευθείαν στο απόβλητο του ελαιουργείου που περιέχει πολύπλοκες φαινολικές ενώσεις.

Οι κλίνες λειτούργησαν ως διαλείποντος έργου με καθοδική ανακυκλορία. Η κλίνη K1 λειτούργησε τους τρεις πρώτους κύκλους τροφοδοσίας με ροή ανακυκλοφορίας ίση με 0.3 ml/min ενώ τον τέταρτο, ίση με 20.0 ml/min. Παράλληλα με τον τρίτο κύκλο της κλίνης K1, ξεκίνησε η λειτουργία της κλίνης K2 με ροή ανακυκλοφορίας ίση με 2.5 ml/min ενώ με το τέλος του κύκλου ρυθμίστηκε κι' αυτή στα 20.0 ml/min.

Στον πίνακα 3.6 φαίνονται οι συνθήκες λειτουργίας των κλινών K1 και K2 για τον κάθε κύκλο τροφοδοσίας.

Πίνακας 3.6: Συνθήκες λειτουργίας των κλινών K1 και K2, για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας

Χρονική περίοδος	Κλίνη K1	Κλίνη K2
I: 0-6 d	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 0.3 ml/min	
II: 6-9 d	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 0.3 ml/min	
III: 9-14 d	3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 0.3 ml/min	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 2.5 ml/min
IV: 14-17 d	4 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 20.0 ml/min	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 20.0 ml/min

Πριν την είσοδο του διαλύματος στις κλίνες (σε κάθε κύκλο τροφοδοσίας), πραγματοποιούνταν λήψη δείγματος για διάφορες αναλύσεις ώστε να προσδιοριστούν οι αρχικές συνθήκες, ενώ στις υπόλοιπες δειγματοληψίες η κύρια μέτρηση ήταν αυτή της συγκέντρωσης των φαιολικών ουσιών. Όταν δεν παρατηρούνταν πλέον περαιτέρω απομάκρυνση φαιολών, τότε οι κλίνες εκκενώνονταν από το ήδη υπάρχον υγρό μέσο και τροφοδοτούνταν εκ νέου.

3.5.2.4 Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

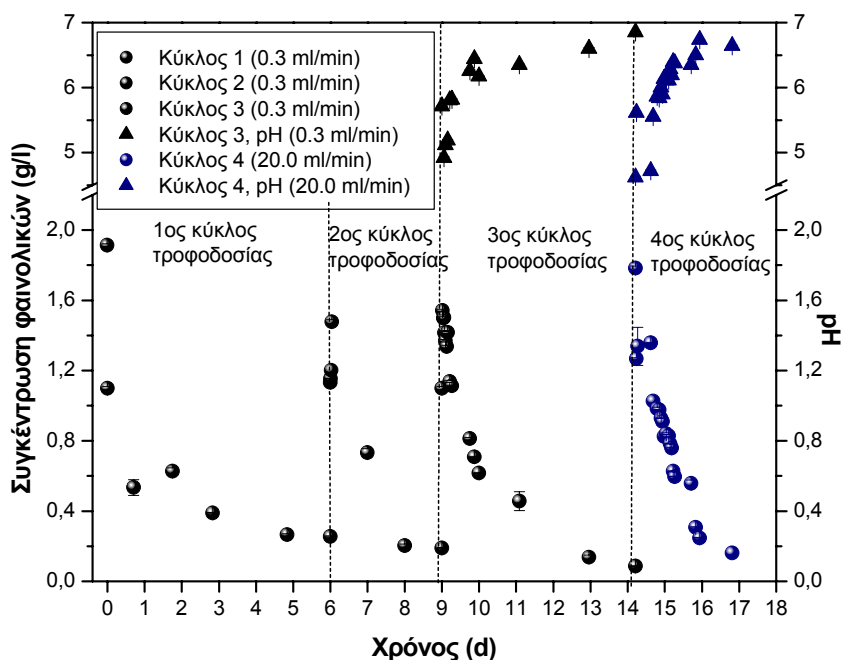
Τα χαρακτηριστικά του αποστειρωμένου διαλύματος συριγγικού οξέος που χρησιμοποιήσαμε ως τροφοδοσία στην κλίνη K1, όπως προέκυψαν από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν πριν την είσοδο του στους τέσσερις κύκλους τροφοδοσίας, φαίνονται στον πίνακα 3.7.

Πίνακας 3.7: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας για την κλίνη K1

	<i>pH</i>	<i>Θερμοκρασία</i> (°C)	<i>Διαλυτό ΧΑΟ</i> (mg/l)	<i>Φαινολικά</i> (g/l)
1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.41	22	3982.7±289.5	1.914±0.008
2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.40	22.5	-----	1.902±0.027
3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.42	22.5	-----	1.881±0.018
4 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.62	23	-----	1.783±0.013

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

Στο γράφημα 3.4 φαίνεται το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών για τους τέσσερις κύκλους τροφοδοσίας της κλίνης K1.



Γράφημα 3.4: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στην κλίνη K1, σύμφωνα με της συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.6

Παρατηρώντας το γράφημα 3.4 βλέπουμε ότι, παρόλο που η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στο θρεπτικό μέσο πριν την είσοδο του στην κλίνη είναι κοντά στα 2 g/l (πίνακας 3.7), στην πρώτη δειγματοληψία (χρονική στιγμή $t=0$) του κάθε κύκλου τροφοδοσίας, υφίσταται μια πολύ σημαντική μείωση. Αυτό οφείλεται στην αραίωση του θρεπτικού που λαμβάνει χώρα λόγω του ποσοστού υγρασίας που περιέχει ο μύκητας, του οποίου η συγκέντρωση των φαινολικών είναι μικρότερη (από την αρχική) ή μηδενική (στην περίπτωση του πρώτου κύκλου).

Στον πρώτο κύκλο τροφοδοσίας λαμβάνεται σχεδόν καθημερινά δείγμα και η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών επιτυγχάνεται την πέμπτη ημέρα, όταν η συγκέντρωσή τους γίνεται ίση με 0.265 ± 0.006 g/l. Στο δεύτερο κύκλο η μέγιστη απομάκρυνση επιτυγχάνεται τη δεύτερη ημέρα (8η συνολικά) με την τελική συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών να ισούται με 0.190 ± 0.002 g/l, ελαφρώς μικρότερη απ' αυτή του πρώτου κύκλου τροφοδοσίας. Αυτό οφείλεται στην ανάπτυξη των μυκήτων και στη δημιουργία νέων υφών διαμέσου των πόρων των τεμαχιδίων της πολυουρεθάνης. Στην ανάπτυξη των μυκήτων αποδίδεται και το γεγονός ότι με τη νέα αυτή τροφοδοσία η αποδόμηση του συριγγικού οξέος επιτυγχάνεται γρηγορότερα απ' ότι η αποδόμηση της πρώτης τροφοδοσίας.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι παράλληλα με τον τρίτο κύκλο τροφοδοσίας της κλίνης K1, ξεκίνησε η λειτουργία της κλίνης K2 με μικρότερη ροή καθοδικής ανακυκλοφορίας (2.5 ml/min), προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση των δύο και να επιλεγεί η αποδοτικότερη. Επιπλέον, κρίθηκε σκόπιμο στις ακόλουθες δειγματοληψίες των δύο κλινών, εκτός από τη μέτρηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών να μελετηθεί και το pH του κάθε συστήματος.

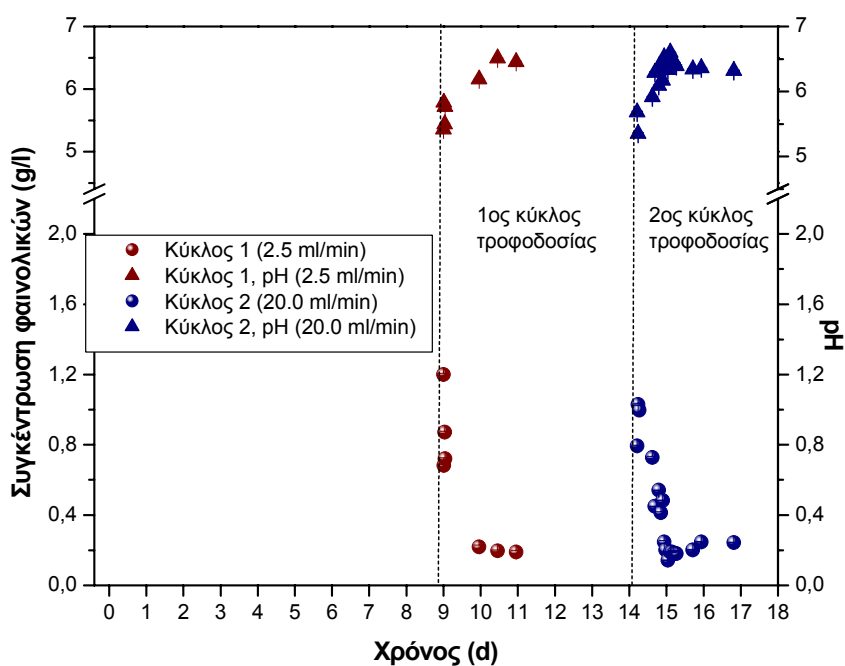
Στον πίνακα 3.8 αναγράφονται τα χαρακτηριστικά του αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου (τροφοδοσία) για τον κάθε κύκλο της κλίνης K2.

Πίνακας 3.8: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας για την κλίνη K2

	pH	Θερμοκρασία (°C)	Διαλυτό ΧΑΟ (mg/l)	Φαινολικά (g/l)
1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.42	22	3972.5±155.5	1.881±0.018
2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.62	23	-----	1.783±0.013

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

Στο γράφημα 3.5 φαίνεται το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών για τους δύο κύκλους τροφοδοσίας που πραγματοποιήθηκαν στην κλίνη K2.



Γράφημα 3.5: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στην κλίνη K2, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.6

Βλέποντας τα γραφήματα 3.4 και 3.5, είναι φανερό ότι η τιμή του pH αυξάνεται καθώς μειώνεται η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών. Αυτό είναι αναμενόμενο αφού το μεγαλύτερο ποσοστό των ουσιών αυτών αποτελείται

από το συριγγικό οξύ το οποίο, ως οξύ, συμβάλλει στη μείωση του pH του διαλύματος. Καθώς λοιπόν αυτό αποδομείται, επόμενο είναι να αυξάνεται και η τιμή της παραμέτρου του pH. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι παρόλο που το pH του θρεπτικού μέσου στην έναρξη της κάθε τροφοδοσίας των δύο κλινών, δεν ανήκει στη βέλτιστη περιοχή ανάπτυξης των μυκήτων λευκής σήψης (είναι μικρότερο), το στέλεχος PO 22 αναπτύσσεται κανονικά χωρίς καμία απολύτως καθυστέρηση.

Στον τρίτο κύκλο τροφοδοσίας της κλίνης K1, η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών επιτυγχάνεται την πέμπτη ημέρα, με τη συγκέντρωση τους να ισούται με 0.087 ± 0.001 g/l και το pH του συστήματος με 6.86 ± 0.01 . Η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών (ποσοστό ίσο με 83.67 %) στην περίπτωση του πρώτου κύκλου τροφοδοσίας της κλίνης K2, επιτυγχάνεται με την πάροδο μιάμιση ημέρας, από την έναρξη της λειτουργίας της ανακυκλοφορίας, φτάνοντας η συγκέντρωση τους στην τιμή των 0.196 ± 0.005 g/l και του pH στην τιμή των 6.495 ± 0.007 .

Δεν μπορεί να γίνει απόλυτη σύγκριση της συμπεριφοράς που επέδειξε το σύστημα της κλίνης K2 όπου εφαρμόστηκε η ροή των 2.5 ml/min (πρώτος κύκλος), με εκείνο της κλίνης K1 που λειτούργησε με ροή ανακυκλοφορίας ίση με 0.3 ml/min (τρίτος κύκλος). Αυτό οφείλεται γενικά σε τρεις παράγοντες: α) στη χρονική διαφορά «κατασκευής» του πληρωτικού υλικού των δύο κλινών και πιο συγκεκριμένα στο χρονικό διάστημα προηγούμενης χρήσης του (στην περίπτωση της κλίνης K1), β) οι ενσωματωμένοι μύκητες προέρχονται από καλλιέργειες με διαφορετική «ηλικία» και, γ) ότι οι δύο κλίνες (K1 και K2) είναι πληρωμένες με διαφορετικό, τυχαίο τρόπο. Συνεπώς, μπορεί απλά να γίνει μια εκτίμηση, από την οποία φαίνεται ότι ο ρυθμός αποδόμησης που επιτυγχάνεται με τη μεγαλύτερη ροή ανακυκλοφορίας είναι γρηγορότερος, χωρίς όμως καμιά αξιοσημείωτη διαφορά στο συνολικό ποσοστό αποδόμησης που επιτυγχάνεται.

Ο τέταρτος και δεύτερος κύκλος τροφοδοσίας της κλίνης K1 και K2, αντίστοιχα, λειτούργησαν με διαφορετική από τις δύο προηγούμενες, ροή ανακυκλοφορίας. Η τρίτη, υπό μελέτη, ροή ήταν ίση με 20 ml/min και

εφαρμόστηκε και στις δύο κλίνες (K1 και K2), προκειμένου να εκτιμηθεί η καλύτερη εκ των τριών, συγκρίνοντας την με τη ροή των 0.3 ml/min και με αυτή των 2.5 ml/min. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση της συμπεριφοράς που επέδειξε η ροή των 20 ml/min στο ένα σύστημα (K1) και στο άλλο (K2), προκειμένου να μελετηθεί η επαναληψιμότητα που επιδεικνύει το σύστημα της κλίνης, γενικότερα.

Από τα γραφήματα 3.4 και 3.5, χάρη στις συχνές δειγματοληψίες που ελήφθησαν στον κύκλο τροφοδοσίας της κάθε κλίνης που λειτούργησε με ροή ίση με 20 ml/min, είμαστε σε θέση να διακρίνουμε κάποιες «αυξομειώσεις» στην τιμή της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων και του pH στο χρονικό διάστημα της πρώτης ώρας. Αυτό συμβαίνει έως ότου αποκατασταθεί η ισορροπία στο σύστημα.

Το χρονικό διάστημα που πέρασε μέχρι να επιτευχθεί η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών στο σύστημα της κλίνης K1 (τέταρτος κύκλος τροφοδοσίας), ήταν λιγότερο από δύο ημέρες, με τη συγκέντρωσή τους να ισούται με 0.162 ± 0.000 g/l και το pH με 6.645 ± 0.007 . Το προφίλ του κύκλου αυτού θα συγκριθεί με αυτό του τρίτου κύκλου τροφοδοσίας της ίδιας κλίνης (0.3 ml/min), έτσι ώστε να μη διαφέρει κατά πολύ το χρονικό διάστημα προηγούμενης χρήσης του πληρωτικού υλικού στους δύο αυτούς κύκλους. Παρατηρώντας τον τρίτο κύκλο ανακυκλοφορίας (γράφημα 3.4) μπορούμε να δούμε ότι η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών επέρχεται με την πάροδο τεσσάρων-πέντε ημερών, χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των δύο ημερών. Παρόλ' αυτά δεν παρατηρείται κάποια αξιόλογη διαφορά στο ποσοστό αποδόμησης που επιτυγχάνεται στον κάθε κύκλο. Εκτιμάται λοιπόν, ότι η ροή ανακυκλοφορίας των 20 ml/min είναι αποδοτικότερη απ' αυτή των 0.3 ml/min.

Η μέγιστη αποδόμηση των φαινολικών στο σύστημα της κλίνης K2 (δεύτερος κύκλος τροφοδοσίας) επιτεύχθηκε πολύ νωρίς, πριν το πέρας της μίας μέρας, με τη συγκέντρωσή τους να φτάνει στην τιμή των 0.189 ± 0.003 g/l και του pH στην τιμή των 6.585 ± 0.007 . Το προφίλ του συστήματος θα συγκριθεί με αυτό που επέδειξε ο πρώτος κύκλος τροφοδοσίας της ίδιας κλίνης (2.5 ml/min), για το λόγο που προαναφέρθηκε. Βλέποντας όμως το γράφημα 3.5 φαίνεται ότι

και με τη ροή των 2.5 ml/min η μέγιστη αποδόμηση των φαινολών επέρχεται επίσης γρήγορα, χωρίς να παρατηρείται κάποια αξιολογη διαφορά στο ποσοστό αποδόμησης που επιτυγχάνεται στους δύο αυτούς κύκλους. Εκτιμείται, λοιπόν, ότι οι δύο ροές ανακυκλοφορίας επιφέρουν παρόμοια συμπεριφορά.

Στο σημείο αυτό μπορεί να γίνει μια αξιολόγηση της επαναληψιμότητας που επιδεικνύει το σύστημα της κλίνης, συγκρίνοντας τη συμπεριφορά για ροή των 20 ml/min στα δύο συστήματα (K1 και K2). Με αυτό τον τρόπο θα εξεταστεί πόσο σημαντικός είναι ο παράγοντας του χρόνου προηγούμενης χρήσης του πληρωτικού υλικού των δύο πειραμάτων.

Η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών στην περίπτωση της κλίνης K1, επιτυγχάνεται με καθυστέρηση μιας ημέρας σχεδόν, εν συγκρίσει με το σύστημα της κλίνης K2. Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι το πληρωτικό υλικό της δεύτερης (τεμαχίδια πολυουρεθάνης με τους ενσωματωμένους μύκητες) είχε χρησιμοποιηθεί μόνο σε άλλο ένα κύκλο τροφοδοσίας ο οποίος διήρκησε μόλις δύο ημέρες. Έτσι λοιπόν, στο χρονικό διάστημα του δεύτερου κύκλου τροφοδοσίας της κλίνης, οι ενσωματωμένοι μύκητες βρίσκονταν υπό ανάπτυξη και δημιουργία νέων υφών. Στην ανάπτυξη των μυκήτων λοιπόν, αποδίδεται η γρηγορότερη αποδόμηση των φαινολικών.

Στο χρονικό διάστημα έναρξης της λειτουργίας της ροής των 20 ml/min στην κλίνη K1, το πληρωτικό της υλικό, είχε προηγουμένως χρησιμοποιηθεί σε άλλους τρεις κύκλους τροφοδοσίας. Έτσι, την ημέρα έναρξης του τέταρτου κύκλου είχαν ήδη περάσει δεκαπέντε ημέρες από την ημέρα «κατασκευής» του. Συνεπώς, ο καθυστερημένος ρυθμός αποδόμησης των φαινολικών (εν συγκρίσει το ρυθμό που παρουσίασε το σύστημα της κλίνης K2) είναι δικαιολογημένος αφού τα, αποικισμένα με το μύκητα, τεμαχίδια πολυουρεθάνης έχουν δείξει ότι επιφέρουν στο σύστημα μια συγκεκριμένη συμπεριφορά: ο ρυθμός αποδόμησης των φαινολικών (δράση μυκήτων), μετά το μέγιστο που παρουσιάζει κατά την ανάπτυξη των μυκήτων, ακολουθεί μια «πτωτική» πορεία. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι το υλικό και πιο συγκεκριμένα οι υφές των μυκήτων, με την πάροδο των ημερών που

χρησιμοποιούνται «μουςκεύουν», σαν να ήταν βυθισμένες στο διάλυμα του συριγγικού οξέος, με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η επιπλέον ανάπτυξή τους και συνεπώς η απόδοση της δράσης τους.

Είναι ξεκάθαρο λοιπόν, ότι η συμπεριφορά του κάθε συστήματος εξαρτάται πολύ από το χρονικό διάστημα που έχει μεσολαβήσει από την «κατασκευή» του πληρωτικού υλικού μέχρι τη διεξαγωγή του πειράματος. Ένας άλλος τρόπος λοιπόν, για να εκτιμηθεί η καλύτερη ως προς το ρυθμό αποδόμησης των φαινολικών, μεταξύ δύο ρών είναι να εξαλειφτεί εντελώς η διαφορετικότητα στον παράγοντα αυτό.

Ο γρήγορος ρυθμός αποδόμησης των φαινολικών ουσιών καθώς και η μεγάλη μείωση στη συγκέντρωσή τους που επιτυγχάνεται αποτελούν αισιόδοξα αποτελέσματα. Επιπλέον, η αρχική ιδέα του να μπορέσει ο μύκητας να «αποικίσει» (colonized) τους υποστηρικτές αυτούς, πραγματοποιώντας ταυτόχρονα ένα είδος ακινητοποίησης, επιτεύχθηκε, δημιουργώντας έτσι πολλές εστίες ανάπτυξης.

3.5.3 Πείραμα διαλείποντος έργου για τη μελέτη του φαινομένου της προσρόφησης

3.5.3.1 Εισαγωγή

Στο σημείο αυτό κρίθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθεί ένα πείραμα διαλείποντος έργου το οποίο θα αποτελούσε ένα είδος «μάρτυρα» των προηγούμενων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στις κλίνες. Αναγκαίο ήταν να ξεκαθαρίσει αν η γρήγορη μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών οφείλεται στο φαινόμενο της προσρόφησης του υγρού μέσου στο υλικό της πολυουρεθάνης ή στη δράση του μύκητα λευκής σήψης, PO 22.

3.5.3.2 Πειραματική διάταξη και διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία κατασκευής των τεμαχιδίων πολυουρεθάνης ήταν η ίδια με αυτή του προηγούμενου πειραμάτος (παράγραφος 3.5.2.3) χωρίς όμως τον εγκλωβισμό των μυκήτων, καθώς η ιδέα ήταν να μελετηθεί η πιθανότητα προσρόφησης των φαινολικών στο υλικό πλήρωσης. Όταν δηλαδή ο αφρός της πολυουρεθάνης διογκώθηκε και απέκτησε στερεή μορφή, τεμαχίστηκε σε μικρούς κύβους (1.0 cm³). Έπειτα, τα τεμαχίδια διαβράχθηκαν και εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, ενώ στη συνέχεια αποστειρώθηκαν σε κλίβανο στους 121 °C.

Σε κωνική φιάλη των 250 ml, που περιείχε 180 ml αποστειρωμένου θρεπτικού διαλύματος συριγγικού οξέος, προστέθηκαν 150 τεμαχίδια πολυουρεθάνης προκειμένου να προσεγγίσουμε τις συνθήκες του πειράματος που προηγήθηκε στις κλίνες. Τα συστατικά του μέσου του συριγγικού οξέος, δίνονται στον πίνακα 3.5. Τα τεμαχίδια πολυουρεθάνης εισήχθησαν στη φιάλη με τέτοιο τρόπο ώστε να μην επιπλέουν στο υγρό διάλυμα κατά τη διάρκεια του πειράματος, αλλά να είναι «βυθισμένα» σ' αυτό. Κατόπιν, η φιάλη τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας ίσης με 25 °C που αναδεύονταν στις 100 rpm.

Πραγματοποιήθηκε συχνή λήψη δειγμάτων στο χρονικό διάστημα της πρώτης ώρας από την έναρξη του πειράματος, αφού το φαινόμενο της προσρόφησης λαμβάνει χώρα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Στις δειγματοληψίες, η κύρια μέτρηση ήταν αυτή της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών.

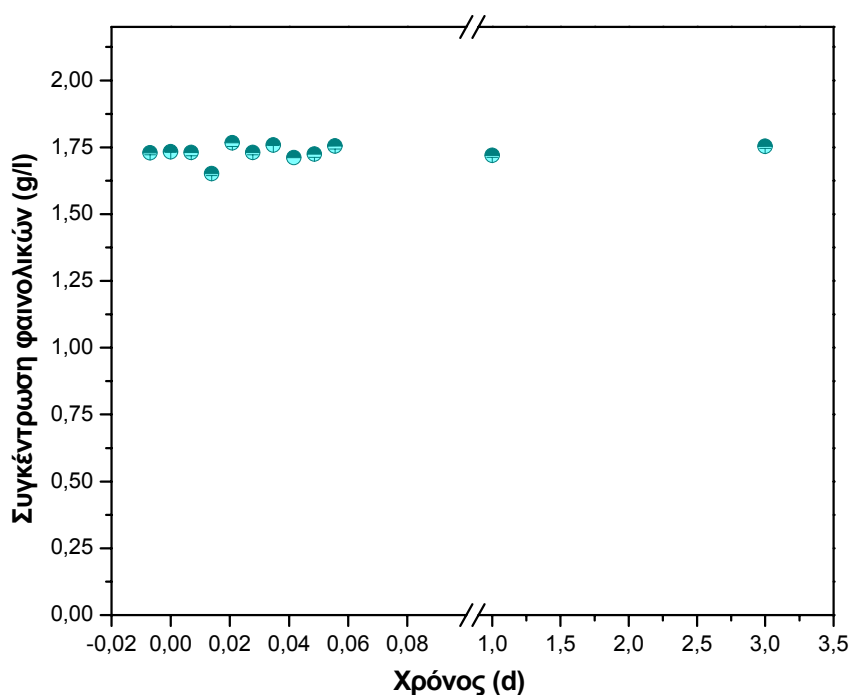
3.5.3.3 Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Τα χαρακτηριστικά που φαίνονται στον πίνακα 3.9 αντιστοιχούν στο αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα, όπως προέκυψαν από τις αναλύσεις που διεξήχθησαν πριν την έναρξη του πειράματος.

Πίνακας 3.9: Αρχικά χαρακτηριστικά του θρεπτικού μέσου (διάλυμα συριγγικού οξέος) που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ελέγχου του φαινομένου της προσρόφησης στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης

<i>pH</i>	Θερμοκρασία (°C)	Φαινολικά (g/l)
4.52±0.007	24	1.729±0.007

Το γράφημα 3.6 απεικονίζει το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών.



Γράφημα 3.6: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών στο πείραμα ελέγχου του φαινομένου της προσρόφησης στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης

Παρατηρώντας το γράφημα δεν βλέπουμε κάποια μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών ούτε βραχυπρόθεσμα, ούτε με την πάροδο κάποιων ημερών. Επιπλέον, στο διάλυμα του συριγγικού οξέος δεν υφίσταται αραίωση αφού τα τεμαχίδια πολυουρεθάνης δεν είναι αποικισμένα με μύκητα, γεγονός

που επιβεβαιώνει την αιτία του φαινομένου αυτού στο πείραμα της κλίνης. Το υλικό λοιπόν της πολυουρεθάνης, δεν προσροφά το διάλυμα του συριγγικού οξέος, άρα η γρήγορη μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών οφείλεται κατ' εξοχήν στην αποδόμηση των ενώσεων αυτών από το μύκητα λευκής σήψης, PO 22, γεγονός που ενθαρρύνει τη συνέχιση των πειραμάτων.

3.5.4 Σύγκριση δύο διαφορετικών ροών ανακυκλοφορίας (10 ml/min και 2.5 ml/min) σε αντιδραστήρα τύπου κλίνης

3.5.4.1 Εισαγωγή

Το πείραμα της παραγράφου 3.5.2 επέδειξε τη σημαντικότητα του χρονικού διαστήματος προηγούμενης χρήσης του πληρωτικού υλικού της κλίνης (τεμαχίδια πολυουρεθάνης με ενσωματωμένο μύκητα) στη δράση των παγιδευμένων μυκήτων. Προκειμένου να συγκριθούν δύο διαφορετικές ροές ανακυκλοφορίας εξαλείφοντας εντελώς τη διαφορετικότητα στον παράγοντα αυτό, πραγματοποιήθηκε το ακόλουθο πείραμα. Οι δύο ροές (10 ml/min και 2.5 ml/min) εφαρμόστηκαν παράλληλα, σε διαφορετικές κλίνες. Στην επιλογή των δύο αυτών ροών ανακυκλοφορίας οδήγησαν τα αποτελέσματα του πειράματος της παραγράφου 3.5.2.

3.5.4.2 Πειραματική διάταξη και διαδικασία

Η διάταξη η οποία χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή των δύο αντιδραστήρων ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.2.2. Χρησιμοποιήθηκαν δύο κλίνες (**K3** και **K4**) όμοιες μεταξύ τους και ίδιων διαστάσεων με τις κλίνες K1 και K2. Οι όποιες διαφορές της πειραματικής διάταξης των κλινών K3 και K4 οφείλονται στην τυχαιότητα πλήρωσης τους και στους εφαρμοζόμενους ρυθμούς ανακυκλοφορίας των οποίων η επίδραση μελετάται.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή του υλικού πλήρωσής τους (τεμαχίδια πολυουρεθάνης με παγιδευμένο μύκητα) περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.2.3. Οι κλίνες τροφοδοτήθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα συριγγικού οξέος, τα συστατικά του οποίου δίνονται στον πίνακα 3.5. Οι δύο κλίνες λειτούργησαν ως διαλείποντος έργου με καθοδική ανακυκλορία. Στην κλίνη K3 εφαρμόστηκε η ροή των 10 ml/min και στην κλίνη K4 η ροή των 2.5 ml/min. Στον πίνακα 3.10 φαίνονται οι συνθήκες λειτουργίας των κλινών για τον κάθε κύκλο τροφοδοσίας.

Πίνακας 3.10: Συνθήκες λειτουργίας των κλινών K3 και K4, για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας

Χρονική περίοδος	K3	K4
I: 0-2 d	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 2.5 ml/min
II: 2-6 d	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 2.5 ml/min
III: 6-10 d	3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min	3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 2.5 ml/min

Πριν την είσοδο του θρεπτικού μέσου στις κλίνες πραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος για διάφορες αναλύσεις. Η κύρια μέτρηση στις υπόλοιπες δειγματοληψίες ήταν αυτή της συγκέντρωσης των φαινολικών. Όταν δεν παρατηρούνταν πλέον περαιτέρω απομάκρυνση τους, τότε ο αντιδραστήρας εκκενωνόταν από το ήδη υπάρχον μέσο και το σύστημα τροφοδοτούνταν εκ' νέου.

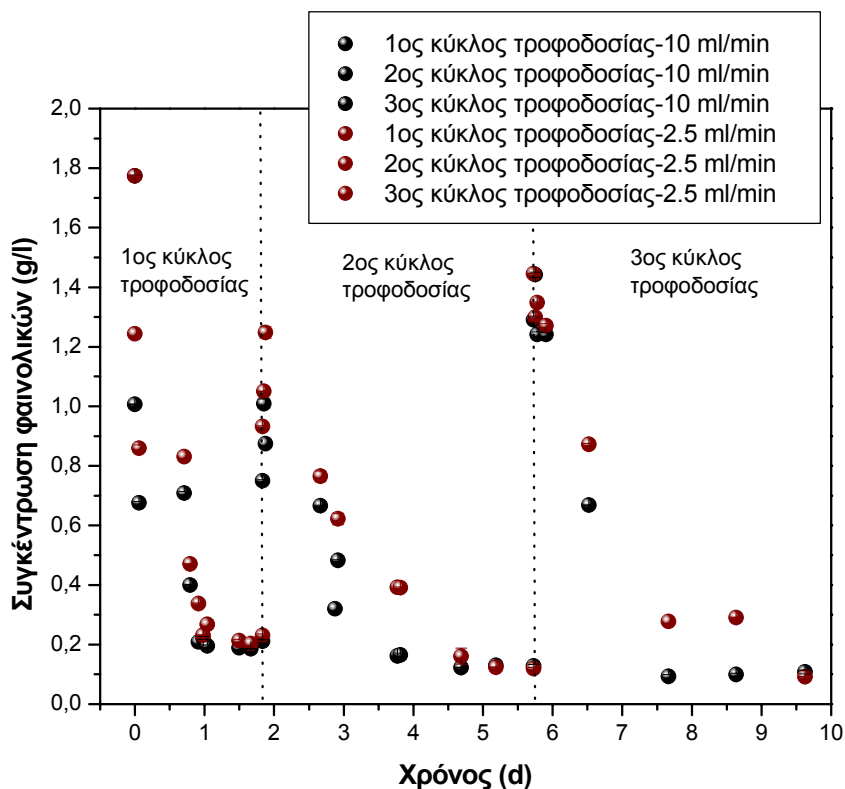
3.5.4.3 Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Τα αρχικά χαρακτηριστικά του αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιήσαμε ως τροφοδοσία, φαίνονται στον πίνακα 3.11.

Πίνακας 3.11: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας των κλινών K3 και K4

	<i>pH</i>	<i>Θερμοκρασία</i> (°C)	<i>Φαινολικά</i> (g/l)
1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.590±0.007	23	1.774±0.002
2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.55±0.007	23	1.817±0.014
3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.610±0.014	22.5	1.785±0.006

Στο γράφημα 3.7 που ακολουθεί, φαίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών στις δύο κλίνες K3 και K4, για τους τρεις κύκλους τροφοδοσίας.



Γράφημα 3.7: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στις κλίνες K3 και K4, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.10

Το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών που επιφέρει η ανακυκλοφορία με τις δύο ροές είναι πανομοιότυπο και στους τρεις κύκλους τροφοδοσίας, ειδικά στον πρώτο κύκλο, με αποτέλεσμα να μην είναι ξεκάθαρο ποια από τις δύο είναι η πιο αποδοτική. Για το λόγο αυτό, το πείραμα συνεχίστηκε τροφοδοτώντας τις κλίνες για δεύτερη και τρίτη φορά. Από το γράφημα γίνεται εμφανές, ότι στους επόμενους κύκλους ανακυκλοφορίας, ο ρυθμός αποδόμησης που επιτυγχάνεται με τη ροή των 10 ml/min (K3), είναι μεγαλύτερος απ' αυτή των 2.5ml/min (K4). Συνεπώς, η μεγαλύτερη επιλέγεται ως η βέλτιστη εκ' των δύο για ένα σύστημα τέτοιου είδους.

Παρατηρείται από το γράφημα ότι υπάρχει διαφορά στο προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών μεταξύ των τριών κύκλων τροφοδοσίας του κάθε συστήματος, ανεξάρτητα της ροής ανακυκλοφορίας που εφαρμόζεται. Αυτό είναι αναμενόμενο αφού όπως προέκυψε από το πείραμα της

παραγράφου 3.5.2, το προφίλ της συγκέντρωσης τους, εξαρτάται από το χρονικό διάστημα προηγούμενης χρήσης του πληρωτικού υλικού που χρησιμοποιείται, κάτι που σε κάθε κύκλο τροφοδοσίας είναι διαφορετικό.

3.5.5 Σύγκριση δύο διαφορετικών ροών ανακυκλοφορίας (10 ml/min και 2.5 ml/min) σε αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης (trickling flow)

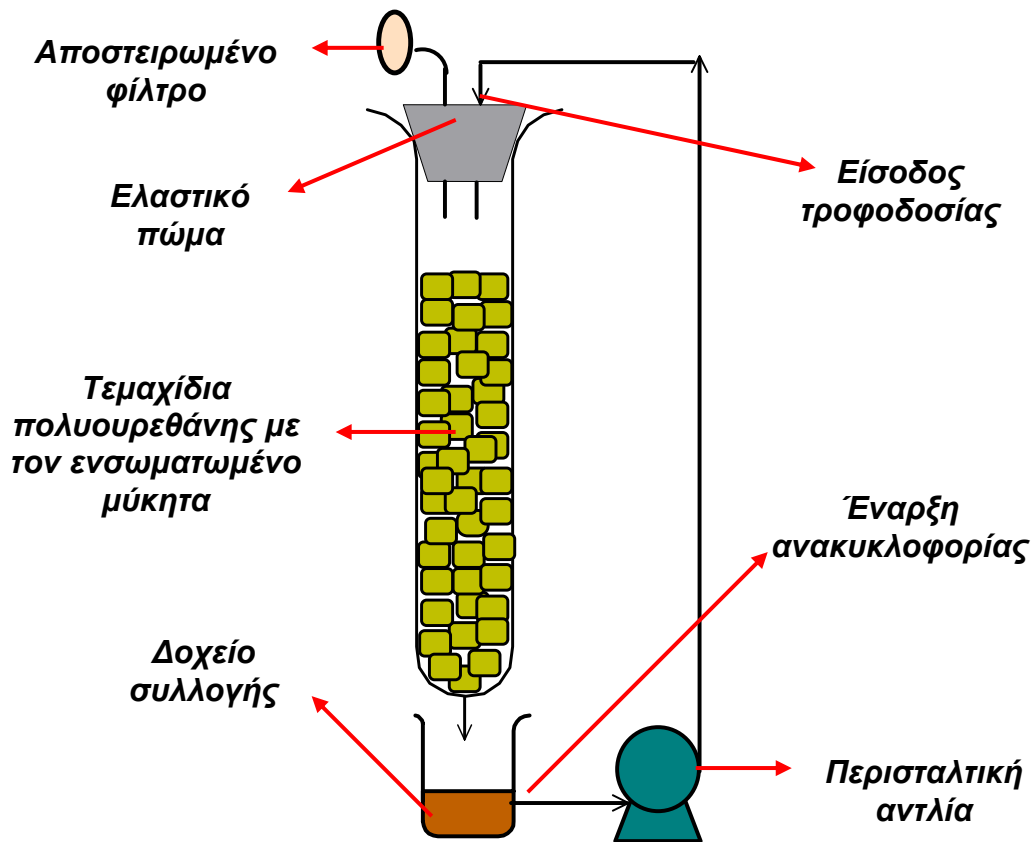
3.5.5.1 Εισαγωγή

Στο σημείο αυτό γίνεται μια προσπάθεια για να αυξηθεί ο χρόνος χρήσης και ικανοποιητικής δράσης του ενσωματωμένου στο πληρωτικό υλικό, μύκητα. Έτσι η πειραματική διάταξη των προηγούμενων πειραμάτων (παραγράφος 3.5.2.2) διαφοροποιείται, με τρόπο ώστε το πληρωτικό υλικό να μη βρίσκεται, πλέον, σε συνεχή επαφή με το υγρό μέσο που χρησιμοποιείται ως τροφοδοσία (γεγονός που προκαλεί ταχύτατο «μούσκεμα»).

3.5.5.2 Πειραματική διάταξη

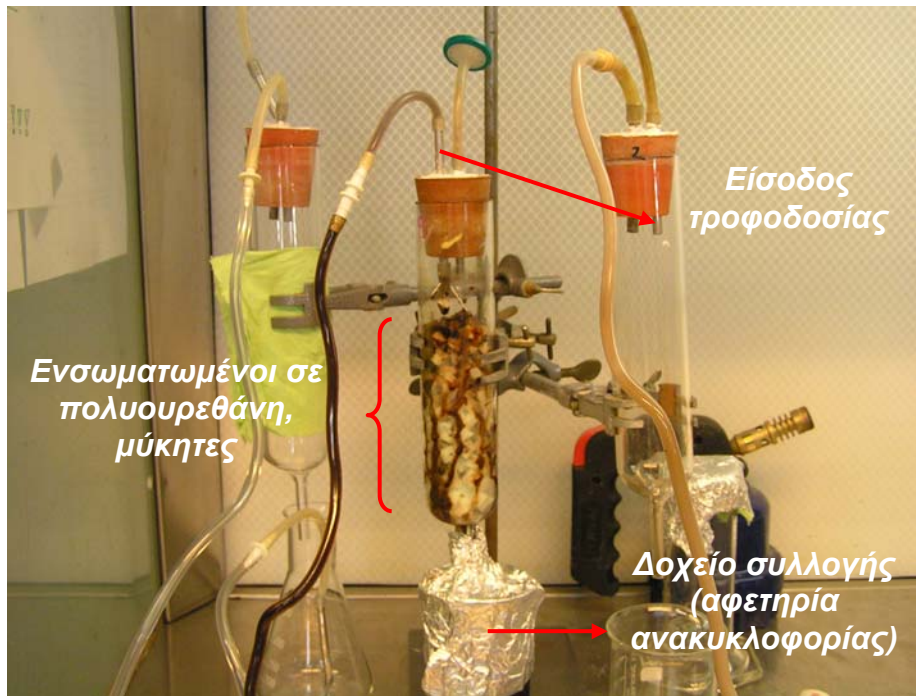
Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα αυτό, αποτελείτο από δύο κυλινδρικές κλίνες, **K5** και **K6**, (Φωτογραφία 3.5) των οποίων η περιγραφή γίνεται στην παράγραφο 3.5.2.2. Στο συγκεκριμένο πείραμα, η ανακυκλοφορία δεν ξεκινούσε από το ακροφύσιο της κάθε κλίνης αλλά από ένα κυλινδρικό δοχείο χωρητικότητας 250 ml όπου συλλεγόταν το υγρό μέσο. Το δοχείο συλλογής ήταν γυάλινο προκειμένου να μπορεί να αποστειρωθεί σε υψηλές θερμοκρασίες και βρισκόταν κάτω από τη γυάλινη κλίνη. Στο κάτω μέρος του δοχείου υπήρχε ένα οριζόντιο ακροφύσιο διαμέτρου 1 cm και μήκους 6 cm. Στο ακροφύσιο ήταν προσαρμοσμένο σιλικονούχο σωληνάριο το οποίο στη συνέχεια συνδεόταν με το σωληνάριο τύπου masterflex της αντίστοιχης περισταλτικής αντλίας τύπου (τύπου Masterflex Cole-Parmer Instrument

Company Chicago, Illinois 60648), τροφοδοτώντας έτσι το ρεύμα ανακυκλοφορίας του υγρού (Σχήμα 3.10).



Σχήμα 3.10: Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης του αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πολυουρεθάνης)

Τα υπόλοιπα στοιχεία της πειραματικής διάταξης ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στην παράγραφο 3.5.2.2 (Φωτογραφία 3.6). Οι κλίνες συγκρατούνταν από μια μεταλλική, απολυμασμένη βάση, και όλο το σύστημα βρισκόταν τοποθετημένο στο laminar, υπό ασηπτικές συνθήκες. Επιπλέον, όλα τα «υλικά μέσα» που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διάταξη (π.χ. γυάλινες κλίνες, μεταλλικά και σιλικονούχα σωληνάρια, φίλτρα, δοχεία συλλογής κ.λ.π) είχαν προηγουμένως υποστεί ξηρή αποστείρωση (κλίβανο) σε θερμοκρασία ίση με 121 °C.



Φωτογραφία 3.6: Αντιδραστήρας τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με ρεύμα καθοδικής ανακυκλοφορίας (ακίνητοποίηση σε τεμαχίδια πολυουρεθάνης)

3.5.5.3 Πειραματική διαδικασία

Για την κατασκευή του πληρωτικού υλικού της κάθε κλίνης (τεμαχίδια πολυουρεθάνης με παγιδευμένο μύκητα), ακολουθήσαμε την πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.2.3. Όπως και στο προηγούμενο πείραμα, έτσι και εδώ, εξαλείφεται η διαφορά στο χρονικό διάστημα προηγούμενης χρήσης του πληρωτικού υλικού της κάθε κλίνης. Παράλληλα, εξαλείφεται η διαφορά στην ηλικία της καλλιέργειας από την οποία προέρχονται οι ενσωματωμένοι στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης, μύκητες της κάθε κλίνης.

Στις κλίνες, K5 και K6, εφαρμόστηκαν διαφορετικές ροές ανακυκλοφορίας, ίσες με 10 ml/min και 2.5 ml/min, αντίστοιχα. Οι ροές αυτές ήταν κοινές με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα 3.5.4, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί σύγκριση των συμπεριφορών που επέδειξε η κάθε ροή ανακυκλοφορίας στα δύο, βασιζόμενα σε διαφορετική διάταξη, συστήματα. Οι

δύο κλίνες ξεκίνησαν τη λειτουργία τους ταυτόχρονα, ενώ η κλίνη K5 τροφοδοτήθηκε ένα κύκλο περισσότερο απ' ό τι η κλίνη K6 (τρίτος κύκλος τροφοδοσίας). Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε στους δύο (πρώτους για την περίπτωση της κλίνης K5) κύκλους τροφοδοσίας ήταν αποστειρωμένο διάλυμα συριγγικού οξέος, τα συστατικά του οποίου δίνονται στον πίνακα 3.5. Η κλίνη K5 στον τρίτο κύκλο, τροφοδοτήθηκε με υγρό απόβλητο ελαιουργείου.

Στον πίνακα 3.12 φαίνονται οι συνθήκες λειτουργίας των κλινών K5 και K6 για τον κάθε κύκλο τροφοδοσίας.

Πίνακας 3.12: Συνθήκες λειτουργίας των διαβρεχόμενων κλινών K5 και K6, για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας

Χρονική περίοδος	K5	K6
I: 0-4 d	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 2.5 ml/min
II: 4-9 d	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 2.5 ml/min
III: 9-21 d	3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (απόβλητο ελαιουργείου) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min	

Το απόβλητο ελαιουργείου, πριν την είσοδο του στην κλίνη K5 είχε υποστεί κάποια προεπεξεργασία προκειμένου να απομακρυνθούν τα «μεγάλα, στερεά σωματίδια» του, που πιθανόν να δημιουργούσαν τεχνικό πρόβλημα κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, π.χ. φράξιμο των πόρων των τεμαχιδίων της πολυουρεθάνης. Η απομάκρυνση των στερεών πραγματοποιήθηκε μέσω διήθησης υπό κενό. Προηγουμένως όμως η τροφοδοσία είχε υποστεί υγρή αποστείρωση (ατμούς) σε θερμοκρασία 121 °C για 20 λεπτά. Με την

αποστείρωση, τα στερεά σωματίδια του αποβλήτου συσσωματώνονταν όσο το μείγμα διατηρούνταν σε υψηλή θερμοκρασία, με αποτέλεσμα η διήθηση που αμέσως ακολούθησε να πραγματοποιηθεί ευκολότερα. Μετά τη διήθηση το υγρό απόβλητο ελαιουργείου υπόκειντο και πάλι υγρή αποστείρωση (ατμοί).

Οι δύο κλίνες λειτούργησαν ως διαλείποντος έργου με καθοδική ανακυκλοφορία. Πριν την είσοδο της τροφοδοσίας στις κλίνες λήφθηκε δείγμα για τη διεξαγωγή αναλύσεων. Στις υπόλοιπες δειγματοληψίες μελετούνταν κυρίως η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών. Όταν δεν παρατηρούνταν πλέον περαιτέρω μείωση στη συγκέντρωσή τους, τότε οι κλίνες εκκενώνονταν και τροφοδοτούνταν εκ νέου.

3.5.5.4 Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

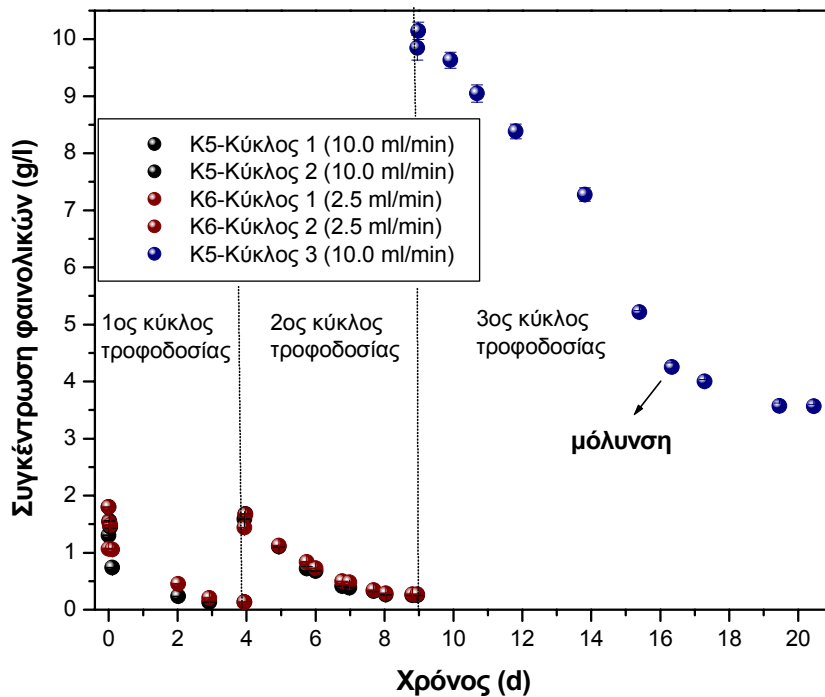
Στον πίνακα 3.13 δίνονται τα χαρακτηριστικά του υγρού μέσου που χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία σε κάθε κύκλο για τις δύο κλίνες.

Πίνακας 3.13: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας των διαβρεχόμενων κλινών K5 και K6

	<i>pH</i>	Θερμοκρασία (°C)	Φαινολικά (g/l)
1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.590±0.007	23	1.797±0.003
2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.55±0.007	23	1.817±0.014
3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας*	5.05±0.01	23.5	10.406±0.055

*: Ο τρίτος κύκλος τροφοδοσίας αναφέρεται μόνο για την περίπτωση της κλίνης K5

Στο γράφημα 3.8 φαίνεται το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας των κλινών K5 και K6.



Γράφημα 3.8: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στις διαβρεχόμενες κλίνες K5 και K6, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.12

Από το γράφημα είναι φανερό ότι το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών που επιτυγχάνεται με τις διαφορετικές ροές ανακυκλοφορίας στους δύο πρώτους κύκλους τροφοδοσίας των κλινών (διάλυμα συριγγικού οξέος), είναι πανομοιότυπο. Αν όμως θεωρήσουμε ότι η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών επέρχεται ελαφρώς νωρίτερα στην περίπτωση της κλίνης K5 (10 ml/min), επιβεβαιώνεται ότι η ροή των 10 ml/min είναι αποδοτικότερη έναντι αυτής των 2.5 ml/min, γεγονός που αποδείχτηκε στο πείραμα της παραγράφου 3.5.4, όπου το πληρωτικό υλικό βρισκόταν σε συνεχή επαφή με το υγρό μέσο.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση μεταξύ των προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών που επιτεύχθηκε με τη διάταξη αυτή και με εκείνη του προηγούμενου πειράματος. Η σύγκριση (για τη κάθε ροή ανακυκλοφορίας) πραγματοποιήθηκε ανάμεσα στον πρώτο κύκλο

τροφοδοσίας του κάθε πειράματος (παράγραφος 3.5.4 και 3.5.5) προκειμένου να μην υπάρχει διαφορά ανάμεσα στο χρονικό διάστημα προηγούμενης χρήσης του πληρωτικού υλικού των κλινών των δύο πειραμάτων.

Είναι εμφανές ότι η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών στο σύστημα του προηγούμενου πειράματος επέρχεται νωρίτερα απ' ό τι στο σύστημα της διαβρεχόμενης κλίνης (trickling flow). Αυτό ισχύει και για τις δύο ροές ανακυκλοφορίας που εφαρμόστηκαν, γεγονός αναμενόμενο, αφού στη διάταξη της πρώτης περίπτωσης, το πληρωτικό υλικό (τεμαχίδια πολυουρεθάνης με ενσωματωμένο μύκητα) βρισκόταν σε συνεχή επαφή με το υγρό μέσο, σε αντίθεση με τη δεύτερη (το ρεύμα ανακυκλοφορίας ξεκινούσε από το δοχείο συλλογής). Βλέπουμε λοιπόν, ότι η διάταξη της διαβρεχόμενης κλίνης (trickling flow) μειονεκτεί στο ρυθμό που επιτυγχάνεται η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών. Παρόλ' αυτά προτιμείται, προκειμένου να αποφευχθεί η συνεχής δημιουργία νέου υλικού πλήρωσης και χρήσης καινούργιων μυκήτων PO 22.

Στο σημείο αυτό, έχοντας επιλέξει τη βέλτιστη ροή ανακυκλοφορίας και μετατρέψει το σύστημα της κλίνης σε διαβρεχόμενη, προκειμένου να αριστοποιήσουμε τις συνθήκες λειτουργίας και να βελτιώσουμε την απόδοση του συστήματος ακινητοποίησης του μύκητα PO 22 μέσω παγίδευσης, κρίθηκε ως κατάλληλη στιγμή να χρησιμοποιηθεί το υγρό απόβλητο ελαιουργείου, αντί του διαλύματος συριγγικού οξέος, ως τροφοδοσία. Αυτό εφαρμόστηκε μόνο για την περίπτωση της κλίνης K5 (τρίτος κύκλος τροφοδοσίας).

Βλέποντας το γράφημα 3.8, είναι φανερό ότι από την πρώτη κιόλας ημέρα, παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών του αποβλήτου. Η μέγιστη αποδόμηση φαινολικών (ποσοστό ίσο με 63.79 %) επιτεύχθηκε με την πάροδο δέκα ημερών, όταν η τιμή τους έφτασε τα 3.568 ± 0.054 g/l.

Την έβδομη ημέρα λειτουργίας του τρίτου κύκλου (δέκατη έκτη συνολικά), όταν η συγκέντρωση των φαινολικών ήταν ίση με 4.254 ± 0.076 g/l,

παρουσιάστηκαν ίχνη μόλυνσης από ξένους μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα, τα ξένα βακτήρια εντοπίστηκαν στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης με τον ενσωματωμένο μύκητα. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των εστιών μόλυνσης στους παγιδευμένους μύκητες των γειτονικών τεμαχιδίων της κλίνης ήταν ταχύτατος. Εντούτοις, συνεχίστηκε η δειγματοληψία άλλες τρεις φορές. Εντύπωση προκάλεσε η περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών που παρατηρήθηκε. Στη συνέχεια, ακολούθησε αναγκαστικός τερματισμός της λειτουργίας της ανακυκλοφορίας εξαιτίας της ολοκληρωτικής κάλυψης της μόλυνσης σε όλο το σύστημα, γεγονός που εμπόδιζε τη ροή του αποβλήτου διαμέσου του πληρωτικού υλικού.

Τα πρώτα αποτελέσματα της αποδόμησης των φαινολικών ενώσεων του υγρού αποβλήτου ελαιουργείου που προέκυψαν εφαρμόζοντας το σύστημα της ακινητοποίησης του μύκητα ΡΟ 22 μέσω παγίδευσης στα τεμαχίδια της πολυουρεθάνης, κρίθηκαν ενθαρρυντικά. Παρόλ' αυτά, η αιτία της μόλυνσης που προκλήθηκε στο υλικό πλήρωσης της κλίνης όταν χρησιμοποιήθηκε το συγκεκριμένο απόβλητο ως τροφοδοσία, παρέμενε, μέχρι τότε, ανεξήγητη. Γι' αυτό το λόγο, κρίθηκε σωστό να επαναληφθεί το πείραμα με τροφοδοσία απόβλητο ελαιουργείου, χρησιμοποιώντας κλίνη με καινούργιο εμβολιασμό και πλήρωση.

3.5.6 Επαναλειτουργία αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με τροφοδοσία υγρό απόβλητο ελαιουργείου

3.5.6.1 Εισαγωγή

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τη γρήγορη και ικανοποιητική αποδόμηση των φαινολικών ουσιών του υγρού αποβλήτου ελαιουργείου που επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας το σύστημα της ακινητοποίησης του μύκητα μέσω παγίδευσης, θελήσαμε να επιμείνουμε σ' αυτό, προσπαθώντας να μελετήσουμε περαιτέρω το πρόβλημα της μόλυνσης που παρουσιάστηκε κατά τη διάρκεια του πειράματος της παραγράφου 3.5.5. Για το σκοπό αυτό, το προηγούμενο

πείραμα επαναλήφθηκε με καινούργιο εμβολιασμό και πλήρωση της κλίνης προκειμένου να εξακριβωθεί η αιτία της μόλυνσης.

3.5.6.2 Πειραματική διάταξη

Η διάταξη η οποία χρησιμοποιήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.5.2. Η κλίνη (**K7**) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιδίων διαστάσεων με αυτή που περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.2.2.

3.5.6.3 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την «κατασκευή» του πληρωτικού υλικού της κλίνης (τεμαχίδια πολυουρεθάνης με παγιδευμένο μύκητα) δεν διέφερε και πολύ από εκείνη που πραγματοποιήθηκε και περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.2.3. Εφόσον όμως η κλίνη θα τροφοδοτούνταν με υγρό απόβλητο ελαιουργείου, οι παγιδευμένοι μύκητες θα έπρεπε να προέρχονταν από καλλιέργειες (στερεές και υγρές) σε αποστειρωμένο απόβλητο ελαιουργείου.

Πριν την έναρξη λοιπόν του πειράματος πραγματοποιήθηκαν δύο στερεές καλλιέργειες του στελέχους ΡΟ 22 σε απόβλητο ελαιουργείου, αραιωμένο (1:1). Η πορεία που ακολουθήσαμε για τις στερεές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.3. Όταν ο μύκητας κάλυψε όλη την ελεύθερη επιφάνεια του στερεοποιημένου μέσου πραγματοποιήθηκαν έξι υγρές καλλιέργειες του ίδιου στελέχους σε υγρό αποστειρωμένο απόβλητο (1:1). Η πορεία που ακολουθήσαμε για τις υγρές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.4.

Και σ' αυτή την περίπτωση, όπως και στο πείραμα 3.5.5, η τροφοδοσία (υγρό απόβλητο ελαιουργείου) είχε υποστεί προεπεξεργασία προκειμένου να αφαιρεθούν τα «μεγάλα στερεά σωματίδια», πριν την είσοδο της στην κλίνη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.5.3.

Η κλίνη (K7) λειτούργησε ως διαλείπωντος έργου με καθοδική ανακυκλορία ίση με 10 ml/min. Στον πίνακα 3.14 φαίνονται οι συνθήκες λειτουργίας της κλίνης για τον κάθε κύκλο τροφοδοσίας.

Πίνακας 3.14: Συνθήκες λειτουργίας της διαβρεχόμενης κλίνης K7 για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας

Χρονική περίοδος	K7
I: 0-4.5 d	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (απόβλητο ελαιουργείου) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min
II: 4.5-7.5 d	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (απόβλητο ελαιουργείου) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min

Πριν την είσοδο του προεπεξεργασμένου αποβλήτου στην κλίνη λήφθηκε δείγμα για αναλύσεις, ενώ η κύρια μέτρηση των υπόλοιπων δειγματοληψιών του, ήταν αυτή της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών και του pH. Όταν επιτεύχθηκε η μέγιστη απομάκρυνση φαινολομάδων στον πρώτο κύκλο, η κλίνη εκκενώθηκε και σ' αυτήν εισήχθησε νέα τροφοδοσία (δεύτερος κύκλος).

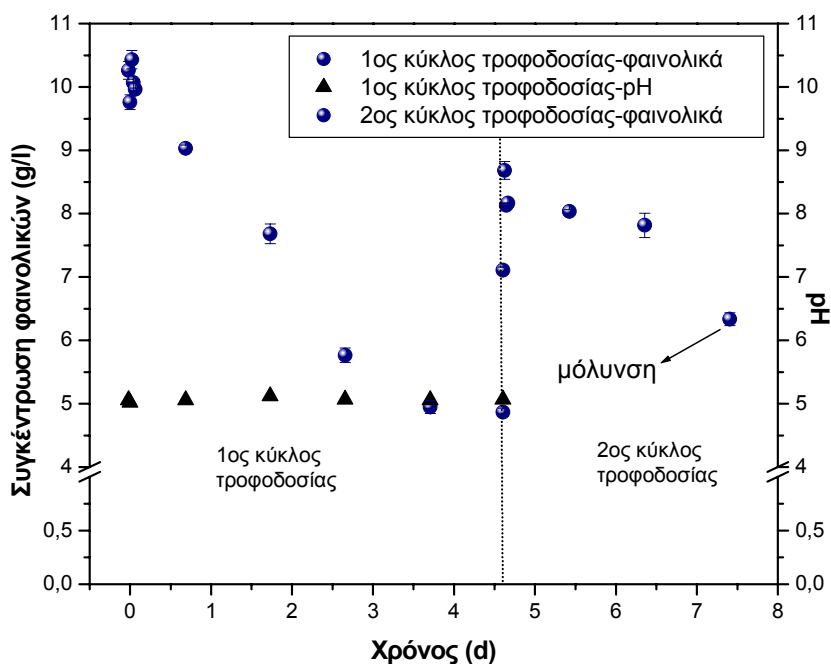
3.5.6.4 Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Στον πίνακα 3.15 φαίνονται τα χαρακτηριστικά του προεπεξεργασμένου υγρού αποβλήτου ελαιουργείου πριν την είσοδο του στην κλίνη, για κάθε κύκλο τροφοδοσίας.

Πίνακας 3.15: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας της διαβρεχόμενης κλίνης K7

	pH	Θερμοκρασία ($^{\circ}C$)	Φαινολικά (g/l)
1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	5.06	22	10.262±0.140
2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	5.07	23	10.164±0.127

Στο γράφημα 3.9 που ακολουθεί, φαίνεται το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών και του pH στο σύστημα της κλίνης K7.



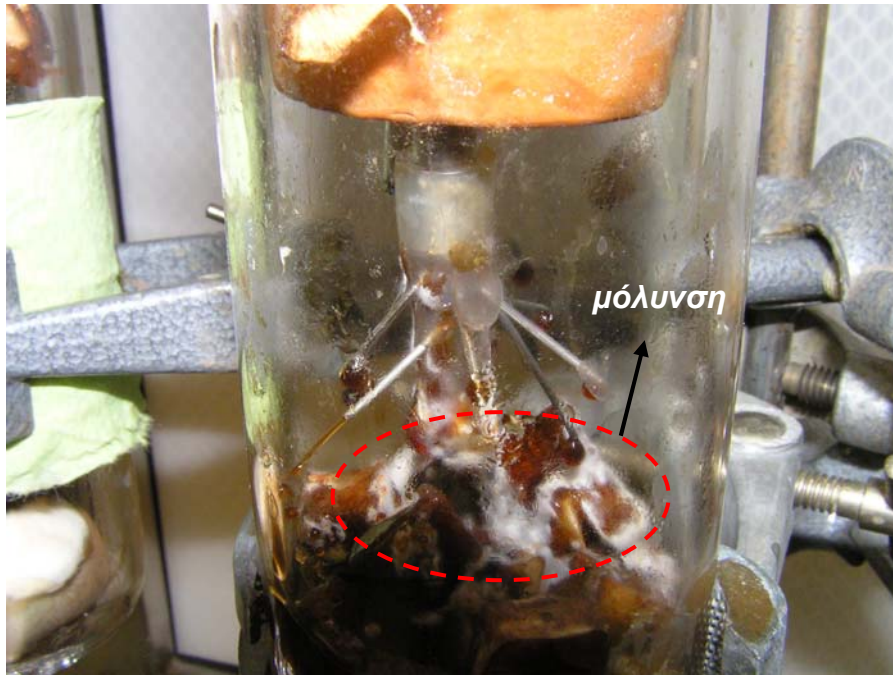
Γράφημα 3.9: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών και του pH που επιτυγχάνεται στη διαβρεχόμενη κλίση K7, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.14

Από το γράφημα είναι φανερό ότι το σύστημα της κλίνης K7 για τον πρώτο κύκλο παρουσιάζει ίδια συμπεριφορά με εκείνη του τρίτου κύκλου τροφοδοσίας της κλίνης K5 (γράφημα 3.8).

Από την πρώτη κιόλας ημέρα του πρώτου κύκλου τροφοδοσίας, οι ενσωματωμένοι μύκητες προκάλεσαν μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών του αποβλήτου. Η μέγιστη απομάκρυνση αυτών (ποσοστό αποδόμησης ίσο με 51.79 %) επιτεύχθηκε πριν την πάροδο τεσσάρων ημερών, όταν η τιμή της συγκέντρωσης τους έφτασε στα 4.947 ± 0.102 g/l. Η τιμή του pH έδειξε να παραμένει σταθερή και ίση με 5.066 ± 0.029 .

Συγκρίνοντας το ρυθμό αποδόμησης τους που επιτυγχάνεται στον πρώτο κύκλο της κλίνης K7, με αυτόν του τρίτου κύκλου τροφοδοσίας της κλίνης K5, είναι φανερό ότι ο δεύτερος είναι κατά πολύ πιο αργός, με τη μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών να επιτυγχάνεται τη δέκατη ημέρα. Αυτό, κυρίως, έγκειται στο γεγονός ότι τα τεμαχίδια πολυουρεθάνης με τον ενσωματωμένο μύκητα του προηγούμενου πειράματος (κλίνη K5) είχαν χρησιμοποιηθεί ξανά για χρονική περίοδο δέκα ημερών. Συνεπώς, τα δύο πειράματα διαφέρουν ως προς τη χρονική περίοδο προηγούμενης χρήσης του πληρωτικού τους υλικού (δράσης του ενσωματωμένου μύκητα).

Με την πάροδο τριών ημερών από την επανατροφοδότηση της κλίνης K7, όταν η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών είχε φτάσει στα 6.332 ± 0.102 g/l, παρατηρήθηκαν στο σύστημα ίχνη μόλυνσης. Συγκεκριμένα, οι ξένοι μικροοργανισμοί βρίσκονταν στα σημεία εκείνα των τεμαχιδίων όπου ήταν ενσωματωμένοι οι μύκητες (Φωτογραφία 3.7). Τις δύο επόμενες ημέρες οι εστίες μόλυνσης πολλαπλασιάστηκαν, και τα ξένα βακτήρια εξαπλώθηκαν με εντυπωσιακούς ρυθμούς σε όλα τα τεμαχίδια της κλίνης με αποτέλεσμα, να καταστεί αδύνατη η ροή του αποβλήτου διαμέσου τους. Αυτό οδήγησε στον αναγκαστικό τερματισμό της λειτουργίας του αντιδραστήρα.



Φωτογραφία 3.7: Μόλυνση του ενσωματωμένου στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης, μύκητα (Κλίνη K7)

Αξιοσημείωτο είναι ότι και στις δύο περιπτώσεις, οι ξένοι μικροοργανισμοί έγιναν εμφανείς με γυμνό μάτι, μετά την πάροδο επτά περίπου ημερών επαφής του πληρωτικού υλικού (τεμαχίδια πολυουρεθάνης με παγιδευμένο μύκητα) με το υγρό απόβλητο ελαιουργείου. Το χρονικό αυτό διάστημα μπορεί, ενδεχομένως, να δηλώνει το «χρόνο ζωής» του ενσωματωμένου στην πολυουρεθάνη, μύκητα όταν ως τροφοδοσία χρησιμοποιείται ο κασίγαρος.

Παρά το γεγονός ότι η διάταξη των πιο πάνω πειραμάτων βρισκόταν υπό ασηπτικές συνθήκες και τα «υλικά μέσα» που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί, θα πρέπει να υπενθυμίσουμε ότι το μοναδικό υλικό που δεν είχε υποστεί τη διαδικασία της υγρής ή ξηρής αποστείρωσης ήταν τα τεμαχίδια πολυουρεθάνης. Η διαδικασία «κατασκευής» των τεμαχιδίων ήταν τέτοια που η αποστείρωσή τους θα μπορούσε να λάβει χώρα μόνο στο τέλος της, όταν πλέον ο μύκητας ήταν ενσωματωμένος σ' αυτά. Όμως, η υψηλή θερμοκρασία της διαδικασίας της αποστείρωσης πιθανόν να επηρέαζαν τη λειτουργική δράση του μύκητα.

Η ιδέα της ακινητοποίησης του μύκητα σε ένα σύστημα όπου θα αναπτύσσεται αποικισμένος στο πληρωτικό υλικό, παραμένει. Παρόλο που η μεγάλη ευαισθησία των μυκήτων λευκής σήψης στις μολύνσεις δεν έχει ακόμη αντιμετωπιστεί, τα πιο πάνω πειράματα (υποκεφάλαιο 3.5) αποτέλεσαν μια γερή βάση για τα επόμενα του υποκεφαλαίου 3.6.

3.6 Ακινητοποίηση του μύκητα PO 22 σε τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού

3.6.1 Πείραμα διαλείποντος έργου για τον έλεγχο της ακινητοποίησης

3.6.1.1 Εισαγωγή

Με βάση τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της γρήγορης αποδόμησης των φαινολικών ενώσεων που προέκυψαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ακινητοποίησης του μύκητα *Pleurotus Ostreatus* 22 σε τεμαχίδια πολυουρεθάνης, επόμενο στόχο αποτέλεσε ο σχεδιασμός και η λειτουργία ενός παρόμοιου συστήματος του οποίου το πληρωτικό υλικό θα μπορούσε να υποστεί θερμική (ξηρή ή υγρή) αποστείρωση. Όπως πρέκυψε από τα πειράματα του κεφαλαίου 3.5, οι μύκητες λευκής σήψης είναι πολύ ευαίσθητοι στις μολύνσεις. Συνεπώς, θα πρέπει ολόκληρος ο αντιδραστήρας, όπως και το πληρωτικό υλικό που χρησιμοποιείται, να έχει προηγουμένως αποστειρωθεί.

Απαραίτητη κρίθηκε η εύρεση ενός πληρωτικού υλικού, που θα μπορούσε να υποστεί τη διαδικασία της θερμικής αποστείρωσης πριν ο μύκητας αποικίσει την επιφάνεια του. Ένα τέτοιο υλικό αποτελεί το πυροσυσσωματωμένο γυαλί. Αναγκαία ήταν η εξέταση της ανάπτυξης του μύκητα επάνω σε πυροσυσσωματωμένα γυαλιάκια μικρού μεγέθους, τα οποία θα έπαιζαν το ρόλο του πληρωτικού υλικού κατά την εφαρμογή τους σε αντιδραστήρες. Ο

σκοπός ήταν να μπορέσει ο μύκητας να τα «αποικίσει» γρήγορα και εύκολα, πραγματοποιώντας ένα είδος ακινητοποίησης. Οι νέοι αυτοί «πυρήνες» (pellets μυκηλίου), θα αποτελούσαν πλέον τα ενεργά κέντρα του μικροοργανισμού, από τον οποίο θα παράγονταν τα απαραίτητα για την οξειδωση του υποστρώματος, ένζυμα.

3.6.1.2 Μέθοδοι και υλικά

Διάφοροι είναι οι υποστηρικτές οι οποίοι μπορούν να υποστούν τη διαδικασία της αποστείρωσης πριν ο μύκητας τα αποικίσει. Για το δικό μας πείραμα επιλέξαμε τεμαχίδια σχήματος κυλινδρικού σωλήνα από πυροσυσσωματωμένο γυαλί. Το κάθε τεμαχίδιο είχε εξωτερική διάμετρο 2.5 cm, εσωτερική διάμετρο 2.0 cm και ύψος 2.5 cm. Οι ιδιότητες του τεμαχιδίου αυτού δίνονται στον πίνακα 3.16.

Πίνακας 3.16: Χαρακτηριστικές ιδιότητες ενός τεμαχιδίου, σχήματος κυλινδρικού σωλήνα, από πυροσυσσωματωμένο γυαλί

Διάμετρος (mm)	Όγκος πόρων (%)	Διάμετρος πόρων (μm)	Φαινομενική πυκνότητα (g/l)	Ειδική επιφάνεια
1-2	55-60	60-300	570	0.15 m ² /g 87m ² /l

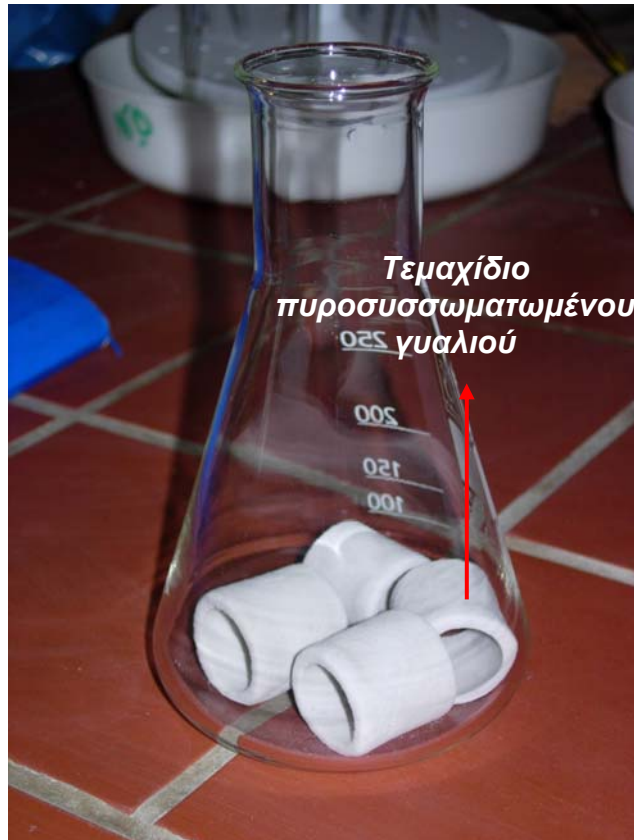
3.6.1.3 Πειραματική διάταξη και διαδικασία

Πριν την έναρξη του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν δύο στερεές καλλιέργειες του στελέχους PO 22 σε αποστειρωμένο ημισυνθετικό μέσο CYM (Complete Yeast Medium), αραιωμένο (1:1). Τα συστατικά του μέσου αυτού δίνονται στον πίνακα 3.4. Η πορεία που ακολουθήσαμε για τις στερεές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.3. Η έναρξη του πειράματος

πραγματοποιήθηκε όταν οι μύκητες αναπτύχθηκαν πλήρως, κάλυψαν δηλαδή όλη την ελεύθερη επιφάνεια του τρυβλίου.

Προκειμένου να δούμε εάν ο μύκητας μπορεί να αναπτυχθεί και να «αποικίσει» το υλικό του γυαλιού, κρίθηκε σκόπιμο, όπως και στην περίπτωση της πολυουρεθάνης, να μη χρησιμοποιήσουμε κατ' ευθείαν υγρό απόβλητο ελαιουργείου, αλλά να γίνει μια πρώτη δοκιμή, χρησιμοποιώντας το συμβατικό για τους μύκητες υλικό CYM (Complete Yeast Medium).

Για το πείραμα αυτό χρειάστηκαν τρεις κωνικές φιάλες των 250 ml και δώδεκα κυλινδρικά τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού. Τα τεμαχίδια αυτά διαβράχθηκαν και εκπλύθηκαν για δύο-τρεις φορές με απεσταγμένο νερό. Σε κάθε φιάλη τοποθετήθηκαν οριζόντια τέσσερα κυλινδρικά τεμαχίδια, το ένα δίπλα στο άλλο (Φωτογραφία 3.8). Στις φιάλες είχαν τοποθετηθεί μαγνήτες, με προοπτική, όταν ο μύκητας αρχίσει να αναπτύσσεται, να μπορέσουμε να διασπάσουμε τις υφές του με ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, ώστε να δημιουργηθούν περισσότερες εστίες ανάπτυξης που θα οδηγούσαν σε γρηγορότερο αποικισμό των τεμαχιδίων. Εν συνεχεία, οι τρεις φιάλες οδηγήθηκαν σε ξηρή αποστείρωση (κλίβανο) στους 121 °C. Παράλληλα, το υγρό θρεπτικό μέσο CYM αποστειρωνόταν υγρά (ατμοί) στους 121 °C για 20 λεπτά.



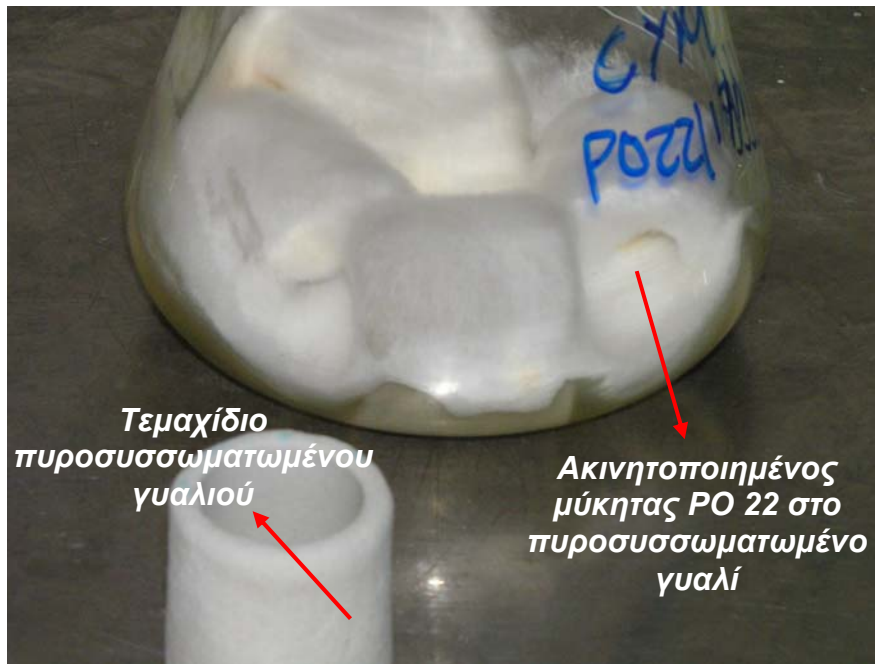
Φωτογραφία 3.8: Οριζόντια τοποθέτηση των τεσσάρων κυλινδρικών σωλήνων πυροσυσσωματωμένου γυαλιού στη φιάλη

Μετά το τέλος της αποστείρωσης του υγρού διαλύματος και αφού το υλικό απέκτησε θερμοκρασία περιβάλλοντος, οδηγήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες 50 ml θρεπτικού μέσου σε κάθε κωνική φιάλη. Έπειτα, οι φιάλες εμβολιάστηκαν με εμβόλιο (πάχους 3 mm και διαμέτρου 6 mm) που προερχόταν από τις ενεργές υφές του μύκητα PO 22, ο οποίος είχε προηγουμένως αναπτυχθεί σε στερεοποιημένο υλικό CYM. Η πορεία που ακολουθήσαμε για τις υγρές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.4. Κατόπιν αυτού, οι φιάλες τοποθετήθηκαν για ανάπτυξη σε θάλαμο επώασης στους 28 °C αφού προηγουμένως πωματίστηκαν με υδρόφοβο βαμβάκι, έτσι ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μολύνσεις.

3.6.1.4 Αποτελέσματα

Με την πάροδο πολύ μικρού χρονικού διαστήματος (2-3 ημέρες), άρχισε η ανάπτυξη του εμβολίου του μύκητα και η δημιουργία υφών μεταξύ των τεμαχιδίων του πυροσυσσωματωμένου γυαλιού. Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε ισχυρή ανάδευση (μέσω μαγνητικού αναδευτήρα) και για διάρκεια 30 δευτερολέπτων περίπου. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των υφών του μύκητα και τη διάχυση αυτών προς όλες τις κατευθύνσεις, μεταξύ του κύριου όγκου του υγρού μέσου και των τεμαχιδίων. Στη συνέχεια οι φιάλες επανήλθαν στο θάλαμο επώασης όπου και συνεχίστηκε η ανάπτυξη του μυκηλίου.

Αυτό που παρατηρήθηκε στη συνέχεια και μάλιστα μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, ήταν ιδιαίτερα σημαντικό. Όλα τα τεμαχίδια του γυαλιού είχαν αποικιστεί από το μυκήλιο εξαιτίας της ικανότητας του υλικού αυτού να απορροφά το υγρό μέσο. Οι δυνάμεις «συνάφειας» μεταξύ του μύκητα και του υποστηρικτή, ήταν πολύ έντονες, αφού και κατόπιν ισχυρής ανάδευσης το μυκήλιο παράμεινε ακινητοποιημένο (προσκολλημένο) στην επιφάνεια των κυλινδρικών σωλήνων πυροσυσσωματωμένου γυαλιού. Εξίσου σημαντικό ήταν το γεγονός ότι πέρα από την εξωτερική επιφάνεια, το μυκήλιο μέσα σε γρήγορο χρονικό διάστημα, είχε αποικίσει και την εσωτερική επιφάνεια του κυλινδρικού σωλήνα (Φωτογραφία 3.9).



Φωτογραφία 3.9: Ακίνητοποίηση του μύκητα στα πυροσυσσωμένα τεμαχίδια γυαλιού

Το πείραμα αυτό αποτέλεσε μια πολύ θετική βάση για τα προσεχή πειράματα αφού, όπως αποδείχτηκε, η ακίνητοποίηση του μύκητα σε έναν υποστηρικτή τέτοιου είδους που μπορεί να αποστειρωθεί, είναι εφικτή. Ως επόμενο βήμα κρίθηκε η διεξαγωγή ανάλογης διαδικασίας, σε ένα άλλου είδους αντιδραστήρα.

3.6.2. Εύρεση βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας ενός αντιδραστήρα με ανακυκλοφορία, τύπου διαβρεχόμενης κλίνης

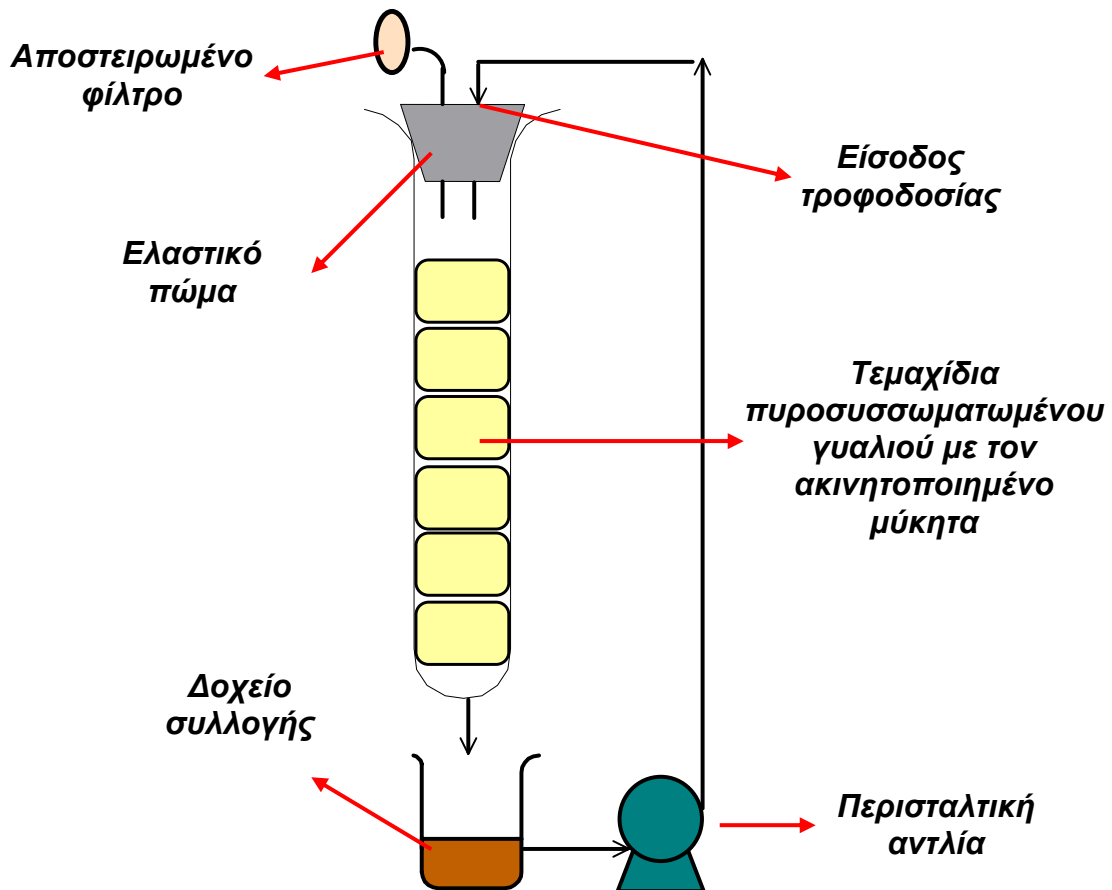
3.6.2.1 Εισαγωγή

Μετά το πείραμα διαλείποντος έργου που προηγήθηκε και τα αισιόδοξα αποτελέσματα που προέκυψαν, δηλαδή ο γρήγορος και εύκολος αποικισμός του μύκητα *Pleurotus Ostreatus* 22 στο θερμικά αποστειρωμένο υλικό του πυροσυσσωματωμένου γυαλιού καθώς και η συνεκτικότητα των υφών του, κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθεί ανάλογη διαδικασία, σε ένα άλλου είδους αντιδραστήρα συγκεκριμένα συνεχούς αντιδραστήρα τύπου

διαβρεχόμενης κλίνης. Συνεπώς ο σχεδιασμός και η αριστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας ενός αντιδραστήρα που να μπορεί να υποστηρίξει τη διαδικασία της ακινητοποίησης του μύκητα ήταν ο αμέσως επόμενος στόχος.

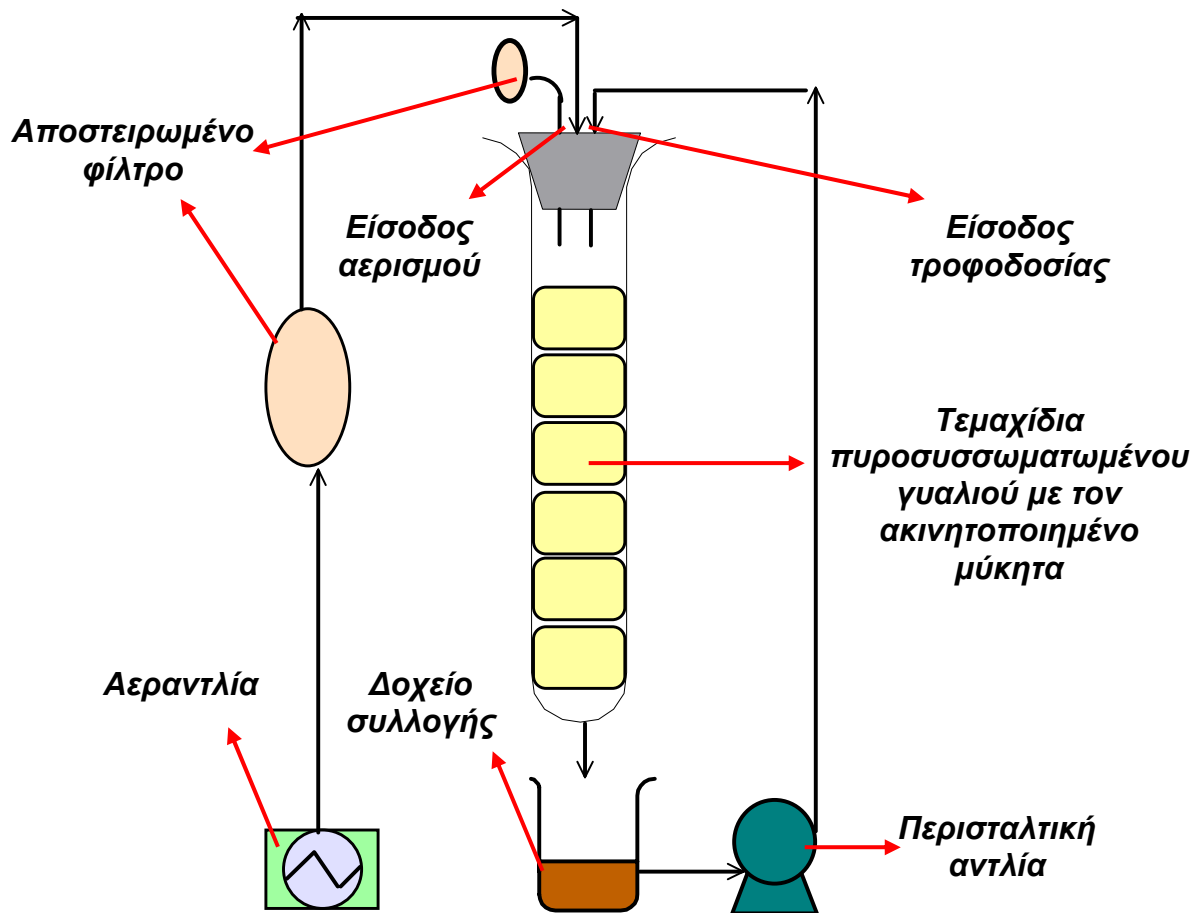
3.6.2.2 Πειραματική διάταξη

Η διάταξη η οποία χρησιμοποιήθηκε αποτελείτο από δύο γυάλινες, κυλινδρικές κλίνες, **ΚΠ1** και **ΚΠ2**, (Φωτογραφία 3.5), όμοιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στο υποκεφάλαιο 3.5 και περιγράφονται στην παράγραφο 3.5.2.2. Κάτω από την κάθε κλίνη ήταν τοποθετημένο ένα γυάλινο, κυλινδρικό δοχείο, χωρητικότητας 250 ml όπου συλλεγόταν το υγρό μέσο κατά την έξοδο του από την κλίνη και παράλληλα τροφοδοτούνταν το ρεύμα ανακυκλοφορίας του υγρού μέσου. Η υπόλοιπη διάταξη ήταν η ίδια με εκείνη που περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.2.2. Η διαφορά εντοπιζόταν στο υλικό πλήρωσης των κλινών. Στην περίπτωση αυτή το πληρωτικό υλικό των κλινών ήταν έξι τεμαχίδια (σχήματος κυλινδρικού σωλήνα) πυροσυσσωματωμένου γυαλιού στην ελεύθερη επιφάνεια των οποίων ήταν αποικισμένος ο μύκητας ΡΟ 22 (Σχήμα 3.11).



Σχήμα 3.11: Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης του αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού)

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μικρή παροχή αερισμού που εφαρμόστηκε στις κλίνες από ένα χρονικό διάστημα και έπειτα, έγινε με τη βοήθεια μιας αεραντλίας (τύπου Power 550). Ο αέρας, μέσω ενός σιλικονούχου σωληναρίου διαμέτρου 5 cm, οδηγείτο σε αποστειρωμένο φίλτρο, η έξοδος του οποίου αποτελούσε την είσοδο του αέρα στην κλίνη. Συγκεκριμένα, ο αερισμός εισαγόταν στην κλίνη διαμέσου ενός τρίτου μεταλλικού σωληναρίου που τοποθετήθηκε στο ελαστικό πώμα της κάθε κλίνης, διαμέτρου 7 mm και ύψους 5 cm. Το μεγαλύτερο ύψος αυτού βρισκόταν στην εξωτερική πλευρά. Στο μεταλλικό σωληνάριο ήταν προσαρμοσμένο ένα λαστιχένιο σωληνάριο της ίδιας διαμέτρου το οποίο με τη σειρά του συνδεόταν με το αποστειρωμένο φίλτρο (Σχήμα 3.12).



Σχήμα 3.12: Απεικόνιση της πειραματικής διάταξης του αεριζόμενου αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης (ακινητοποίηση σε τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού)

Ολόκληρη η διάταξη βρισκόταν τοποθετημένη σε κουβούκλιο στρωτής ροής, υπό ασηπτικές συνθήκες και οι κλίνες στηρίζονταν με τη βοήθεια μιας μεταλλικής, απολυμασμένης βάσης. Να σημειωθεί ότι όλα τα «υλικά μέσα» (π.χ. τα μεταλλικά και σιλικονούχα σωληνάκια, τα φίλτρα, οι γυάλινες κλίνες) είχαν αποστειρωθεί στον κλίβανο σε θερμοκρασία 121 °C, πριν την έναρξη του πειράματος.

3.6.2.3 Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη της λειτουργίας του αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκαν δύο στερεές καλλιέργειες του στελέχους PO 22 σε αποστειρωμένο διάλυμα CYM (Complete Yeast Medium), (1:1). Τα συστατικά του μέσου αυτού δίνονται στον

πίνακα 3.4. Η πορεία που ακολουθήθηκε για τις στερεές καλλιέργειες περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.3. Όταν ο μύκητας κάλυψε όλη την ελεύθερη επιφάνεια του στερεοποιημένου μέσου, πραγματοποιήθηκαν έξι υγρές καλλιέργειες με τέσσερα τεμαχίδια γυαλιού να ανιστοιχούν στην κάθε μια, σε υγρό αποστειρωμένο διάλυμα CYM (1:1) με βάση τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 3.6.1.3. Για το πληρωτικό υλικό της κάθε κλίνης, απαιτούνταν έξι τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού και κατά συνέπεια, δύο υγρές καλλιέργειες. Πραγματοποιήθηκαν περισσότερες προσπάθειες αποικισμού σε περίπτωση που στις πρώτες δεν αναπτύχθηκε ο μύκητας λόγω καταστροφής του μυκηλίου ή προσβολής του από ξένους μικροοργανισμούς.

Όταν τα τεμαχίδια του γυαλιού είχαν αποικιστεί πλήρως από τον μύκητα PO 22, αφαιρέθηκαν από τις φιάλες με τρόπο προσεκτικό ώστε μην καταβυθιστούν (Φωτογραφία 3.10). Στη συνέχεια, το κάθε τεμαχίδιο εισήχθηκε στην κλίνη οριζόντια, το ένα πάνω στο άλλο και με τρόπο τέτοιο ώστε η τροφοδοσία να έρχεται σε επαφή με όλα τα ενεργά κέντρα των πυροσυσσωματωμένων γυαλιών.



*Ακίνητοποιημένος
μύκητας PO 22 στο
πυροσυσσωματωμένο
γυαλί*

Φωτογραφία 3.10: Πληρωτικό υλικό της κλίνης (τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού) λίγο πριν εισαχθεί στην κλίνη

Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκαν συνολικά οκτώ κύκλοι τροφοδοσίας. Στους επτά πρώτους κύκλους οι κλίνες τροφοδοτήθηκαν με διάλυμα συριγγικού οξέος. Κρίθηκε πιο σωστό στην αρχή, έως ότου μελετηθεί το νέο αυτό υλικό πλήρωσης του συστήματος της κλίνης και να αριστοποιηθούν οι συνθήκες λειτουργίας του, να χρησιμοποιηθεί ως τροφοδοσία ένα εύκολα βιοαποδομήσιμο μέσο. Στον όγδοο κύκλο, οι κλίνες τροφοδοτήθηκαν με υγρό απόβλητο ελαιουργείου το οποίο είχε υποστεί την προεπεξεργασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.5.3. Και τα δύο είδη τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ και απόβλητο), πριν την είσοδο τους στις κλίνες αποστειρώνονταν (ατμούς) σε θερμοκρασία 121 °C για 20 λεπτά. Μετά το τέλος της θερμικής προεπεξεργασίας τους, και αφού το κάθε υλικό αποκτούσε θερμοκρασία περιβάλλοντος, 180 ml εισάγονταν στο κάθε δοχείο συλλογής απ' όπου ξεκινούσε η ανακυκλοφορία.

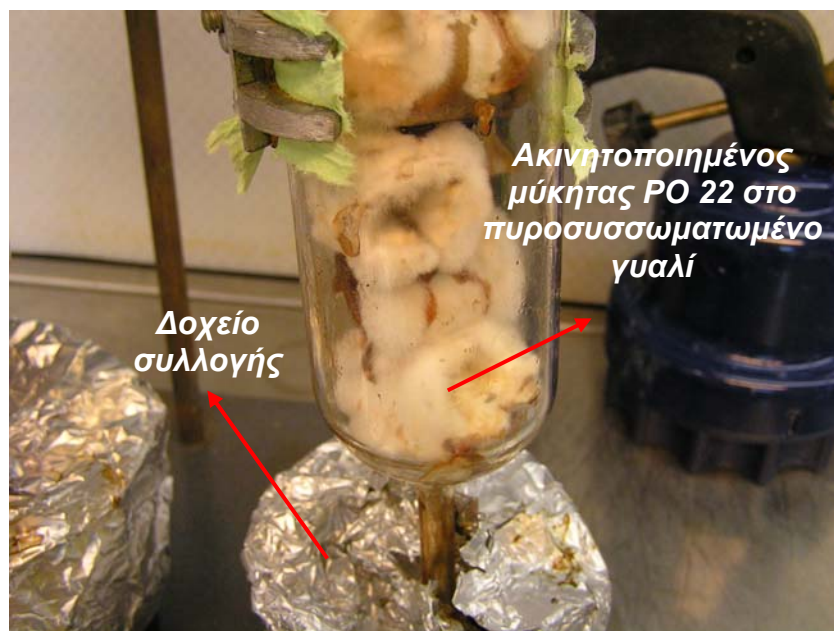
Οι δύο κλίνες λειτούργησαν ως αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, με διάφορες ροές ανακυκλοφορίας και συνθήκες, ώστε να αριστοποιηθεί η απόδοση του συστήματος πριν σ' αυτό εισαχθεί το απόβλητο ελαιουργείου.

Πίνακας 3.17: Συνθήκες λειτουργίας των διαβρεχόμενων κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2 για τους διάφορους κύκλους τροφοδοσίας

Χρονική περίοδος	Κλίνη Κ1	Κλίνη Κ2
I: 0-2,8 d	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 20 ml/min
II: 2,8-6,1 d	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 20 ml/min
III: 6,1-8 d	3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 20 ml/min	3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 20 ml/min
IV: 8-9,25 d	4 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min	4 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min
V: 9,25-13,66 d	4 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min Παροχή αερισμού	4 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min
VI: 13,66-20,3 d	5 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min Παροχή αερισμού	5 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min
VII: 20,3-23,4 d	6 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min Παροχή αερισμού	6 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min Παροχή αερισμού
VIII: 23,4-30 d	7 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min Παροχή αερισμού	7 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (συριγγικό οξύ) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min Παροχή αερισμού

IVV: 30-45 d	8 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (απόβλητο ελαιουργείου) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min Παροχή αερισμού	8 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (απόβλητο ελαιουργείου) Ροή ανακυκλοφορίας: 10 ml/min Παροχή αερισμού
---------------------	--	--

Πριν την είσοδο της τροφοδοσίας στις κλίνες σε κάθε κύκλο, πραγματοποιούταν λήψη δείγματος για διάφορες αναλύσεις, ενώ στις υπόλοιπες δειγματοληψίες η κύρια μέτρηση ήταν αυτή της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών. Όταν δεν παρατηρούταν πλέον περαιτέρω απομάκρυνση φαινολών, οι δύο κλίνες εκκενώνονταν από το ήδη υπάρχον μέσο και τροφοδοτούνταν εκ νέου. Στη φωτογραφία 3.11 φαίνεται η κλίνη πληρωμένη με τα αποικισμένα τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού.



Φωτογραφία 3.11: Πληρωμένη διαβρεχόμενη κλίνη με πυροσυσσωμένα γυαλάκια με ακίνητοποιημένο μύκητα

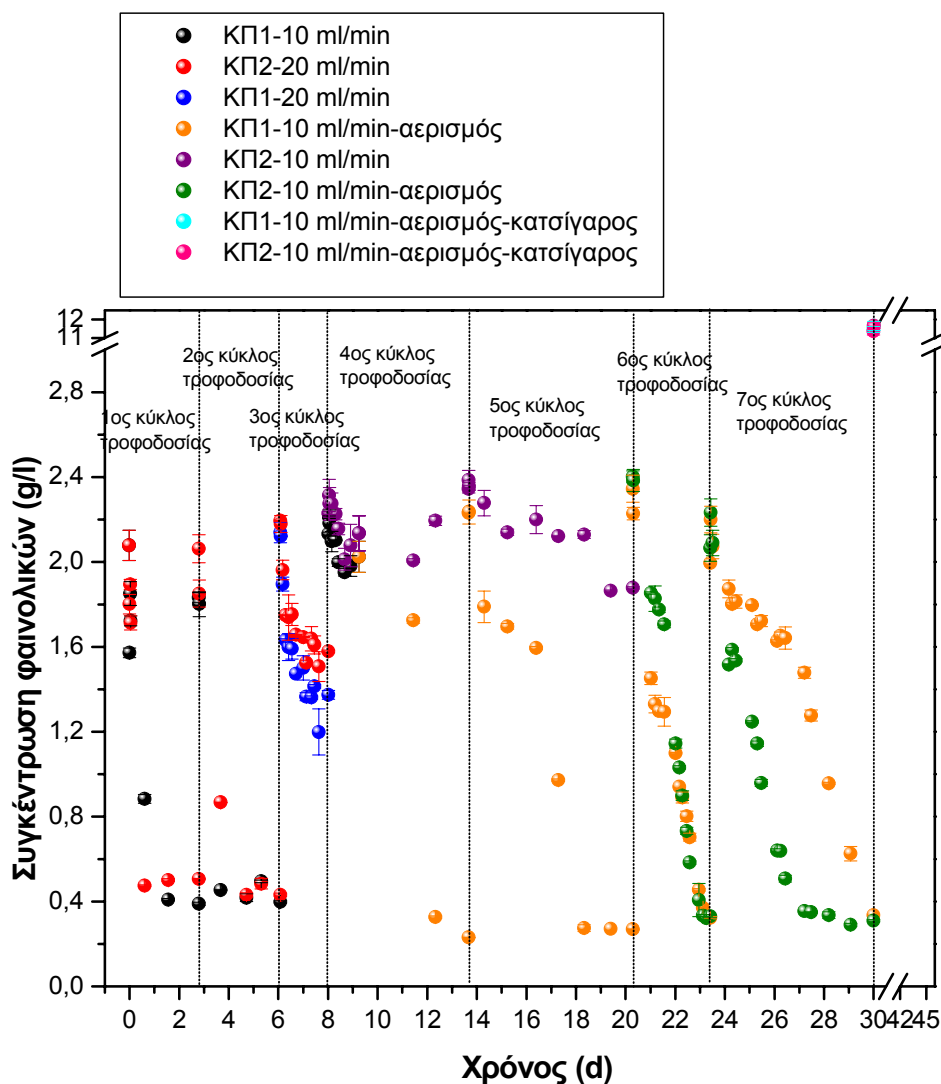
3.6.2.4 Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

Τα αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας πριν την είσοδο της στις κλίνες για τον κάθε κύκλο ξεχωριστά, φαίνονται στον πίνακα 3.18.

Πίνακας 3.18: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας των διαβρεχόμενων κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2

	<i>pH</i>	<i>Θερμοκρασία (°C)</i>	<i>Φαινολικά (g/l)</i>
1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.334±0.014	23	2.078±0.071
2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.102±0.007	22.5	2.310±0.033
3 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.310±0.014	23	2.276±0.016
4 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.310±0.014	23	2.271±0.009
5 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.200±0.007	22.5	2.285±0.064
6 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.220±0.014	22.5	2.459±0.012
7 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	4.305±0.007	23.5	2.317±0.040
8 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	5.05±0.007	22	11.996±0.012

Το γράφημα 3.10 που ακολουθεί, εστιάζει στους επτά πρώτους κύκλους οι οποίοι τροφοδοτήθηκαν με διάλυμα συριγγικού οξέος. Στους δύο πρώτους κύκλους τροφοδοσίας, η ροή του ρεύματος ανακυκλοφορίας της κλίνης ΚΠ1 ήταν ίση με 10 ml/min ενώ της κλίνης ΚΠ2 ήταν 20 ml/min. Ο σκοπός ήταν να συγκριθούν, και να επιλεγεί η βέλτιστη ροή για να εφαρμοστεί στους επόμενους κύκλους.



Γράφημα 3.10: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στους επτά πρώτους κύκλους τροφοδοσίας των δύο διαβρεχόμενων κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.17

Όπως και στα πειράματα του υποκεφαλαίου 3.5 με τα αποικισμένα με το μύκητα ΡΟ 22, τεμαχίδια πολυουρεθάνης ως το υλικό πλήρωσης, έτσι και εδώ παρατηρείται το φαινόμενο της αραίωσης. Με δεδομένες τις τιμές της συγκέντρωσης των φαινολικών της τροφοδοσίας πριν αυτή εισαχθεί στις κλίνες (πίνακας 3.16), είναι φανερό ότι υφίσταται μια μείωση σ' αυτές μετά την είσοδο της, ανεξάρτητα της ροής ανακυκλοφορίας της. Η αραίωση προέρχεται από το ποσοστό υγρασίας που περιέχει ο μύκητας και αυτού που έχει απορροφηθεί από το υλικό του πυροσυσσωματωμένου γυαλιού, του οποίου η

συγκέντρωση των φαινολικών είναι μικρότερη (από την αρχική) ή μηδενική (στην περίπτωση του πρώτου κύκλου).

Παρατηρώντας το γράφημα είμαστε σε θέση να διακρίνουμε κάποιες «αυξομειώσεις» στην τιμή της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων, στο χρονικό διάστημα της πρώτης ώρας από την είσοδο της τροφοδοσίας στην κλίνη. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε και στην περίπτωση όπου το πληρωτικό υλικό της κλίνης ήταν τα τεμαχίδια πολυουρεθάνης με τους παγιδευμένους μύκητες, και λαμβάνει χώρα μέχρι να αποκατασταθεί η ισορροπία στο σύστημα.

Το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών που επιτεύχθηκε με τις δύο ροές ανακυκλοφορίας είναι πανομοιότυπο. Στην περίπτωση όμως του πρώτου κύκλου η μέγιστη απομάκρυνση φαινολομάδων επιτυγχάνεται πιο γρήγορα στην κλίνη ΚΠ2 (20 ml/min) απ' ό τι στην κλίνη ΚΠ1. Το αντίθετο συμβαίνει για τον δεύτερο κύκλο τροφοδοσίας, χωρίς να διαφέρει ιδιαίτερα το τελικό ποσοστό αποδόμησης που επιτυγχάνεται με τις δύο ροές για κανένα από τους δύο κύκλους. Η ασυμφωνία της συγκριτικής αξιολόγησης των δύο ροών ανακυκλοφορίας (όσον αφορά το ρυθμό αποδόμησης) που διεξάγεται για τον κάθε κύκλο τροφοδοσίας, οφείλεται πιθανότατα στην πιο γρήγορη ανάπτυξη των μυκήτων του συστήματος της κλίνης ΚΠ1. Η ανάπτυξη των μυκήτων αυτών ίσως έλαβε χώρα μετά τη δεύτερη ημέρα, γεγονός που είχε άμεση επιρροή στο δεύτερο κύκλο τροφοδοσίας, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων της τροφοδοσίας να μειωθεί γρηγορότερα σε σύγκριση με τον πρώτο κύκλο. Ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε και στους μύκητες των τεμαχιδίων της κλίνης ΚΠ2, η οποία όμως έλαβε χώρα μετά την πάροδο της τέταρτης ημέρας, όταν πλέον είχε επιτευχθεί η μέγιστη απομάκρυνση στο σύστημα της κλίνης ΚΠ1.

Οι πιο πάνω παρατηρήσεις μας οδήγησαν στην «επιφυλακτική» επιλογή της ροής ανακυκλοφορίας των 20 ml/min ως της αποτελεσματικότερη εκ' των δύο για την εφαρμογή της στους επόμενους κύκλους τροφοδοσίας. Κατά συνέπεια στον τρίτο κύκλο, οι κλίνες ΚΠ1 και ΚΠ2 λειτούργησαν με ροή ανακυκλοφορίας ίση με 20 ml/min. Όμως, με την πάροδο δύο ημερών, σε

καμμία από τις δύο κλίνες δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιόλογη μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών. Το γεγονός αυτό αποτέλεσε έκπληξη λαμβάνοντας υπ' όψιν τους δύο προηγούμενους κύκλους τροφοδοσίας. Ως μια πιθανή αιτία θεωρήθηκε η σχετικά, μεγάλη ροή ανακυκλοφορίας του υγρού μέσου, γεγονός που προκάλεσε γρήγορη «ύγρανση» των υφών του μύκητα με την πάροδο των ημερών. Παρατηρήθηκε ότι με τη ροή αυτή, ο μύκητας που ήταν προσκολλημένος στα τεμαχίδια του πυροσυσσωματωμένου γυαλιού δεν είχε πλέον «στεγνές» υφές, γεγονός που δεν επέτρεπε την επιπλέον ανάπτυξή του. Έτσι και στις δύο κλίνες η ροή ρυθμίστηκε στα 10 ml/min, εισάγοντας καινούργια τροφοδοσία (τέταρτος κύκλος).

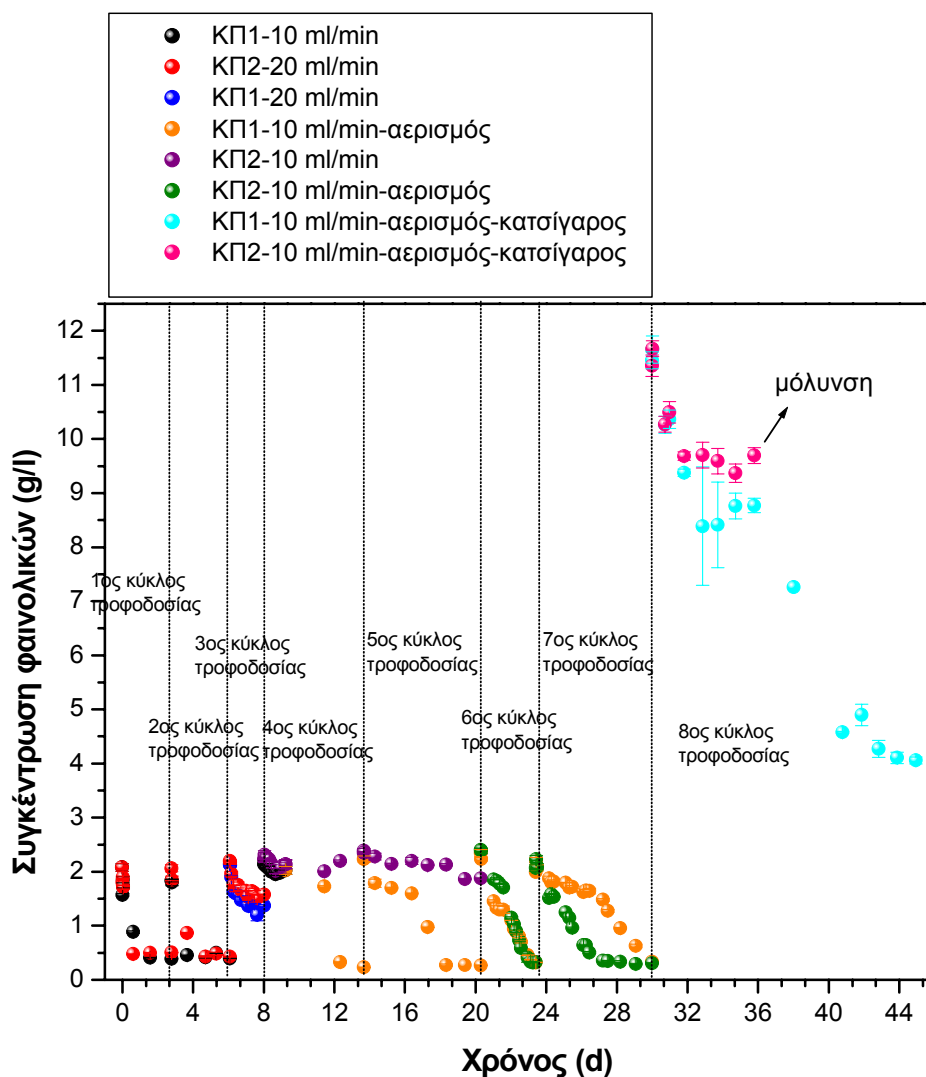
Από το γράφημα 3.10 είναι φανερό ότι ούτε και με την αλλαγή της ροής ανακυκλοφορίας παρατηρήθηκε κάποια μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων του διαλύματος. Συνεπώς η κύρια αιτία έπρεπε να αναζητηθεί σε κάποιο «παρεμποδιστικό» παράγοντα που δεν επέτρεπε ή δε βοηθούσε το μύκητα ΡΟ 22 να αναπτυχθεί. Έτσι, η έλλειψη επαρκούς αερισμού του μύκητα κρίθηκε ότι δρα περιοριστικά. Εφαρμόστηκε λοιπόν, παροχή αερισμού μόνο στη μια κλίνη (ΚΠ1) για να ελεγχθεί αν αυτό αποτελεί την αιτία της μη αποδοτικής αποδόμησης των φαινολικών. Δεν έγινε αλλαγή στην τροφοδοσία ώστε να είναι βέβαιο ότι οποιαδήποτε αλλαγή συμπεριφοράς παρατηρηθεί στην κλίνη ΚΠ1, οφείλεται στην παροχή αερισμού και όχι στην αλλαγή της τροφοδοσίας.

Είναι ξεκάθαρο από το γράφημα ότι στην αεριζόμενη κλίνη επιτεύχθηκε μια αξιόλογη μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων της τροφοδοσίας, σε αντίθεση με την κλίνη ΚΠ2 όπου παρέμεινε αμετάβλητη. Αυτό επιβεβαιώνεται και στον πέμπτο κύκλο τροφοδοσίας όπου οι συνθήκες λειτουργίας των δύο κλινών παρέμειναν διαφορετικές μεταξύ τους και ίδιες με αυτές του τέταρτου μισού κύκλου τροφοδοσίας. Αναφέρεται, ότι η μέγιστη απομάκρυνση φαινολομάδων στην κλίνη ΚΠ1 στον πέμπτο κύκλο τροφοδοσίας επιτεύχθηκε την πέμπτη ημέρα (δέκατη όγδοη συνολικά).

Στο σημείο αυτό του πειράματος έγιναν ξεκάθαρες οι απαραίτητες συνθήκες λειτουργίας ενός αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης που είναι πληρωμένος με πυροσυσσωματωμένα τεμαχίδια γυαλιού με αποικισμένο μύκητα *Pleurotus Ostreatus* 22, προκειμένου να έχουμε ικανοποιητική και γρήγορη αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων της τροφοδοσίας. Συνεπώς στους δύο επόμενους κύκλους τροφοδοσίας (διάλυμα συριγγικού οξέος) εφαρμόστηκε η ροή ανακυκλοφορίας των 10 ml/min και έγινε παροχή αερισμού αφού όπως αποδείχτηκε, ο διαθέσιμος αέρας στο σύστημα των κλινών, και πιο συγκεκριμένα στο εσωτερικό των κυλινδρικών τεμαχιδίων όπου είναι ανεπτυγμένος ο μύκητας, είναι περιορισμένος, γεγονός που επιβραδύνει την ανάπτυξη του μύκητα.

Από το γράφημα 3.10 φαίνεται ότι υπάρχει μεγάλη επαναληψιμότητα μεταξύ των δύο κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2 όσον αφορά τον έκτο κύκλο τροφοδοσίας. Και στα δύο συστήματα η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών επέρχεται πριν την πάροδο τριών ημερών. Στην περίπτωση όμως του έβδομου κύκλου, η επαναληψιμότητα είναι περιορισμένη. Η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών επιτυγχάνεται σαφώς νωρίτερα στην κλίνη ΚΠ2 απ' ό τι στην ΚΠ1 με τρεις ημέρες διαφορά. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι οι συνθήκες υπό τις οποίες λειτούργησαν οι δύο κλίνες στους προηγούμενους κύκλους ήταν διαφορετικές. Η παροχή αερισμού στην κλίνη ΚΠ2 εφαρμόζεται για πρώτη φορά στον έβδομο κύκλο. Έτσι, η επίδραση που έχει στο ρυθμό αποδόμησης των φαινολικών της τροφοδοσίας είναι εντονότερη, απ' ό τι στην κλίνη ΚΠ1 όπου ο αερισμός παρέχεται ήδη από τον τέταρτο κύκλο τροφοδοσίας.

Έχοντας λοιπόν ως βάση το γρήγορο ρυθμό αποδόμησης των φαινολικών του διαλύματος του συριγγικού οξέος, και εφαρμόζοντας ακινητοποίηση του μύκητα *PO 22* σε τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού, χρησιμοποιήθηκε ως επόμενη τροφοδοσία στις κλίνες (όγδοος κύκλος), υγρό απόβλητο ελαιουργείου. Οι δύο κλίνες (ΚΠ1 και ΚΠ2) λειτούργησαν υπό τις προαναφερθείσες βέλτιστες συνθήκες. Το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών του αποβλήτου, στα δύο συστήματα ΚΠ1 και ΚΠ2 φαίνεται στο γράφημα 3.11 που απεικονίζονται συγκεντρωτικά και οι οκτώ κύκλοι τροφοδοσίας.



Γράφημα 3.11: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στους οκτώ κύκλους τροφοδοσίας των διαβρεχόμενων κλινών ΚΠ1 και ΚΠ2, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.17

Από τις πρώτες ημέρες παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών του αποβλητού, χωρίς όμως να επιτευχθεί κάποια αξιόλογη αποδόμηση, ειδικά στην περίπτωση του συστήματος ΚΠ2. Στην περίπτωση της κλίνης ΚΠ1 αυτό, διήρκεσε μέχρι την έκτη ημέρα, ενώ μετά η συγκέντρωση άρχισε να μειώνεται αισθητά. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη δέκατη τρίτη ημέρα να επιτευχθεί η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών (ποσοστό ίσο με 62.70 %) με τη συγκέντρωσής τους να ισούται με 4.273 ± 0.158 g/l.

Το χρονικό διάστημα των δεκατριών ημερών (διάστημα που πέρασε ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών στην κλίνη ΚΠ1) είναι αρκετά μεγάλο. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι οι ακινητοποιημένοι στα τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού, μύκητες ήταν για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα προσαρμοσμένοι σε διάλυμα συριγγικού οξέος με τη μέγιστη συγκέντρωση να ισούται με 2 g/l. Είναι αναμενόμενο λοιπόν, να απαιτείται κάποιο χρονικό διάστημα για να εγκλιματιστούν στο υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών υγρό απόβλητο ελαιουργείου.

Την πέμπτη ημέρα του όγδοου κύκλου της κλίνης ΚΠ2, πριν ακόμα παρατηρηθεί κάποια αξιόλογη μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, έγιναν εμφανείς ξένοι μικροοργανισμοί σε κάποιους αποικισμένους μύκητες. Την επόμενη ημέρα, οι εστίες μόλυνσης πολλαπλασιάστηκαν στο σύστημα και τα ξένα βακτήρια εξαπλώθηκαν με εντυπωσιακούς ρυθμούς και στα έξι τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού της κλίνης (Φωτογραφία 3.12), με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η ροή του αποβλήτου διαμέσου τους. Αυτό οδήγησε στον αναγκαστικό τερματισμό της λειτουργίας της κλίνης ΚΠ2.



Φωτογραφία 3.12: Μολυσμένοι, ακινητοποιημένοι στα τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού, μύκητες

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής του υγρού αποβλήτου του ελαιουργείου ως τροφοδοσία στο σύστημα της κλίνης ΚΠ1, κρίθηκαν αρκετά ενθαρρυντικά. Δεν ισχύει το ίδιο και για την περίπτωση του συστήματος της κλίνης ΚΠ2 εξαιτίας της μόλυνσης που προκλήθηκε στον αποικισμένο μύκητα. Για να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη και αντιπροσωπευτική άποψη, κρίθηκε σωστό να εφαρμοστεί το υγρό απόβλητο ελαιουργείου ως τροφοδοσία σε μια κλίνη της οποίας τα πυροσυσσωματωμένα γυαλάκια με τον ακινητοποιημένο μύκητα να χρησιμοποιούνταν για πρώτη φορά (καινούργια πλήρωση και εμβόλιο).

3.6.3 Επαναλειτουργία αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με τροφοδοσία υγρό απόβλητο ελαιουργείου

3.6.3.1 Εισαγωγή

Το πείραμα αυτό, είχε σκοπό να εξακριβώσει την αιτία που προκάλεσε το φαινόμενο της μόλυνσης που παρουσιάστηκε κατά τη διάρκεια του τελευταίου κύκλου τροφοδοσίας του προηγούμενου πειράματος στην κλίνη ΚΠ2. Για το σκοπό αυτό, κρίθηκε σωστό ο όγδοος κύκλος του πείραμα της παραγράφου 3.6.2 να επαναληφθεί σε μια καινούργια κλίνη η οποία θα ήταν πληρωμένη με τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού με αποικισμένο μύκητα που θα χρησιμοποιούνταν για πρώτη φορά.

3.6.3.2 Πειραματική διάταξη

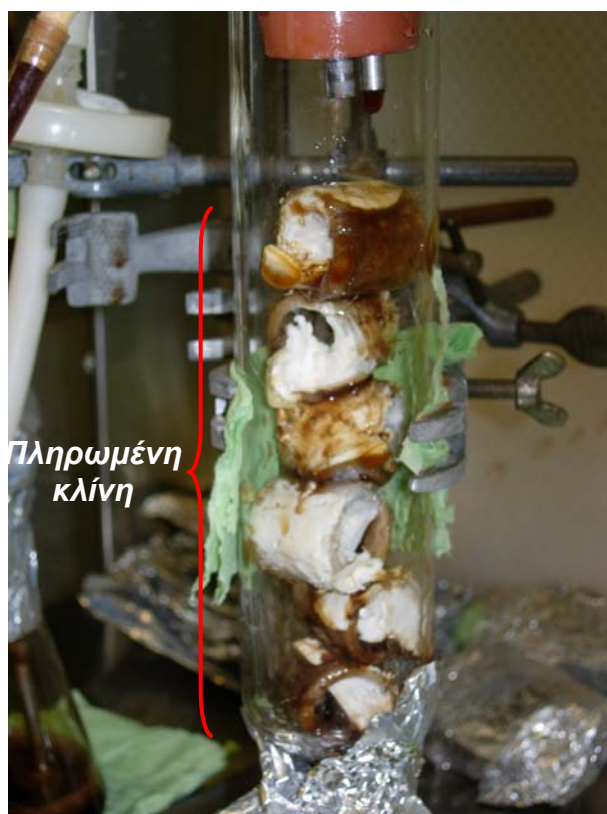
Χρησιμοποιήθηκε μια τρίτη κλίνη (**ΚΠ3**) ιδίων όμως διαστάσεων με τις κλίνες του προηγούμενου πειράματος. Η κλίνη ήταν πληρωμένη με τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού με ακινητοποιημένο μύκητα ΡΟ 22. Γενικότερη περιγραφή της διάταξης που χρησιμοποιήθηκε γίνεται στην παράγραφο 3.6.2.2.

3.6.3.3 Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη της λειτουργίας της κλίνης ΚΠ3 πραγματοποιήθηκαν δύο στερεές καλλιέργειες του στελέχους ΡΟ 22 σε αποστειρωμένο διάλυμα CYM, (Complete Yeast Medium) αραιωμένο (1:1) με βάση τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.3. Όταν ο μύκητας κάλυψε όλη την ελεύθερη επιφάνεια του στερεοποιημένου μέσου πραγματοποιήθηκαν τρεις υγρές καλλιέργειες του ίδιου στελέχους σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 250 ml που η κάθε μία περιείχε 50 ml υγρού αποστειρωμένου διαλύματος CYM (πίνακας 3.4), και τέσσερα πυροσυσσωματωμένα τεμαχίδια γυαλιού. Αναλυτική περιγραφή της διαδικασίας που ακολουθήθηκε, γίνεται στην παράγραφο 3.6.1.3.

Παρά το γεγονός ότι η κλίνη τροφοδοτήθηκε με υγρό απόβλητο ελαιουργείου, ως υπόστρωμα στις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε διάλυμα CYM. Αυτό οφείλεται στα στερεά σωματίδια του αποβλήτου που πιθανόν να προκαλούσαν φραγή των πόρων των πυροσυσσωματωμένων γυαλιών (πληρωτικό υλικό), με αποτέλεσμα, να καταστεί αδύνατη η ροή της τροφοδοσίας διαμέσου τους. Το γεγονός ότι ο μύκητας ΡΟ 22 αναπτύχθηκε σε διάλυμα CYM, είναι λογικό να επιφέρει μια καθυστέρηση έως ότου να πραγματοποιηθεί αξιόλογη αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου. Η καθυστέρηση αυτή οφείλεται στον εγκλιματισμό του μύκητα στο πολύνθετο αυτό υπόστρωμα.

Όταν η ελεύθερη επιφάνεια των τεμαχιδίων του γυαλιού είχε καλυφθεί πλήρως από τον μύκητα ΡΟ 22 ακολουθήθηκε η πλήρωση της κλίνης με βάση τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.6.2.3. Επιπλέον, το απόβλητο του ελαιουργείου πριν την είσοδο του στην κλίνη, υπέστη την προεπεξεργασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.5.3. Μετά την τελική αποστείρωσή του, 180 ml αυτού εισήχθησαν στο δοχείο συλλογής της κλίνης, απ' όπου ξεκίνησε η ανακυκλοφορία (Φωτογραφία 3.13).



Φωτογραφία 3.13: Έναρξη διαβρεχόμενης κλίνης, ΚΠ3 (πρώτος κύκλος τροφοδοσίας)

Η κλίνη λειτούργησε ως διαλείπωντος έργου με καθοδική ανακυκλορία ίση με 10 ml/min και με μικρή παροχή αερισμού. Στο πείραμα πραγματοποιήθηκαν δύο κύκλοι τροφοδοσίας. Οι λειτουργικές συνθήκες της κλίνης ΚΠ3 αναγράφονται στον πίνακα 3.19.

Πίνακας 3.19: Συνθήκες λειτουργίας της διαβρεχόμενης κλίνης ΚΠ3 για τους δύο κύκλους τροφοδοσίας

Χρονική περίοδος	Κλίνη ΚΠ3
I: 0-13 d	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (απόβλητο ελαιουργείου) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min Παροχή αερισμού
II: 13-23 d	2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (απόβλητο ελαιουργείου) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min Παροχή αερισμού

Πριν την είσοδο του προεπεξεργασμένου αποβλήτου στην κλίνη (έναρξη των κύκλων τροφοδοσίας) λήφθηκε δείγμα για αναλύσεις, ενώ στις υπόλοιπες δειγματοληψίες του πειράματος, η κύρια μέτρηση ήταν αυτή της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών.

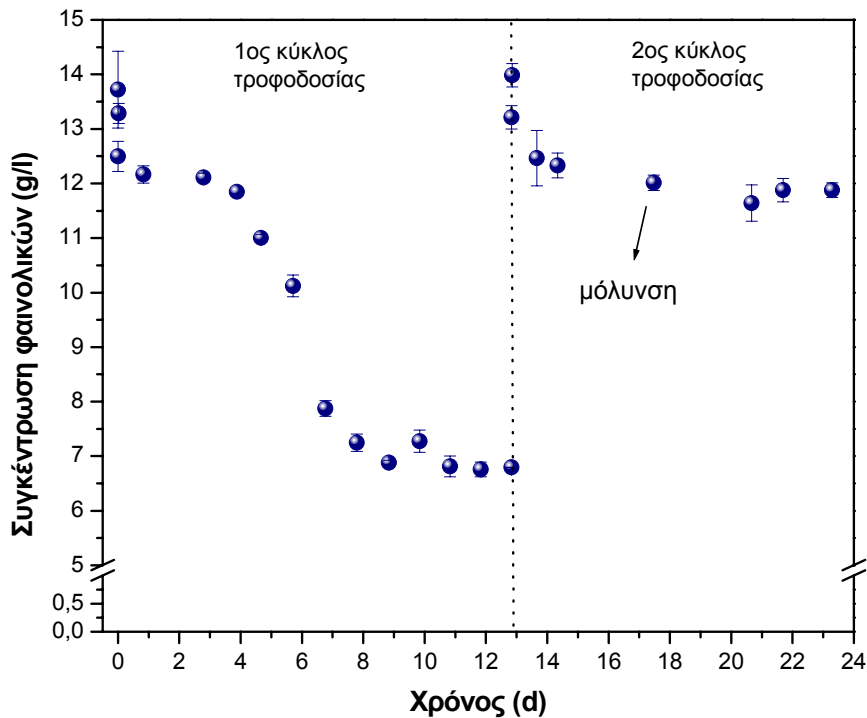
3.6.3.4 Αποτελέσματα

Στον πίνακα 3.20 φαίνονται τα αρχικά χαρακτηριστικά του προεπεξεργασμένου αποβλήτου ελαιουργείου για τους δύο κύκλους τροφοδοσίας.

Πίνακας 3.20: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας της διαβρεχόμενης κλίνης ΚΠ3

	<i>pH</i>	<i>Θερμοκρασία (°C)</i>	<i>Φαινολικά (g/l)</i>
1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	5.09	22.5	13.719±0.705
2 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας	5.07	23	13.906±0.086

Στο γράφημα 3.12 που ακολουθεί, φαίνεται το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών για τους δύο κύκλους τροφοδοσίας που πραγματοποιήθηκαν.



Γράφημα 3.12: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών που επιτυγχάνεται στη διαβρεχόμενη κλίνη ΚΠ3, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.19

Είναι φανερό ότι με την είσοδο της τροφοδοσίας στην κλίνη, υφίσταται μια πολύ μικρή αραίωση εξαιτίας του ποσοστού υγρασίας που περιέχουν οι μύκητες και αυτού που έχουν απορροφηθεί από τα τεμαχίδια του πυροσυσσωματωμένου γυαλιού.

Όπως και στον όγδοο κύκλο του προηγούμενου πείραμα (παράγραφος 3.6.2), μετά την τέταρτη ημέρα του πρώτου κύκλου τροφοδοσίας επιτεύχθηκε αξιόλογη μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου. Οι τέσσερις ημέρες αντιπροσωπεύουν το χρονικό διάστημα που χρειάστηκαν οι ακινητοποιημένοι μύκητες PO 22 να εγκλιματιστούν στο, υψηλής συγκέντρωσης φαινολικών, υγρό απόβλητο ελαιουργείου.

Η μέγιστη απομάκρυνση φαινολικών στο σύστημα ΚΠ3 (ποσοστό ίσο με 44.93 %), επιτεύχθηκε την ένατη ημέρα του πρώτου κύκλου τροφοδοσίας.

Έπειτα η κλίνη επανατροφοδοτήθηκε. Με την πάροδο όμως πέντε ημερών του δεύτερου κύκλου τροφοδοσίας, πριν ακόμα παρατηρηθεί αξιοσημείωτη αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων, εντοπίστηκαν στα πυροσυσσωματωμένα τεμαχίδια γυαλιού όπου ήταν αποικισμένος ο μύκητας ΡΟ 22, ίχνη μόλυνσης από ξένους μικροοργανισμούς. Τις επόμενες ημέρες, οι εστίες μόλυνσης πολλαπλασιάστηκαν ταχύτατα. Εντούτοις, με δυσκολία συνεχίστηκε η δειγματοληψία ακόμη τρεις φορές χωρίς όμως να μετρηθεί κάποια μεταβολή στη συγκέντρωση των φαινολικών. Όταν τα ξένα βακτήρια εξαπλώθηκαν και στα έξι τεμαχίδια, η λειτουργία της κλίνης τερματίστηκε επειδή η ροή του αποβλήτου διαμέσου τους είχε καταστεί ανέφικτη.

Βλέπουμε λοιπόν ότι το φαινόμενο της μόλυνσης επαναλήφθηκε έστω κι αν έγινε χρήση αποστειρωμένου υλικού πλήρωσης. Αυτό όμως που διαφέρει είναι το χρονικό διάστημα του «χρόνου ζωής» του ακινητοποιημένου μύκητα όταν ως τροφοδοσία χρησιμοποιείται ο κασίγαρος. Στην περίπτωση αυτή είναι σαφώς μεγαλύτερο από τις επτά ημέρες που ήταν στην περίπτωση της μη αποστειρωμένης πολυουρεθάνης (υποκεφάλαιο 3.5).

3.6.4 Αντιδραστήρας τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με λειτουργία πλήρωσης-εκκένωσης (draw+fill) και ανακυκλοφορία

3.6.4.1 Εισαγωγή

Στη συνέχεια, το σύστημα της κλίνης, από διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία μετατράπηκε σε αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης πλήρωσης-εκκένωσης (draw+fill) με ανακυκλοφορία και χρόνο παραμονής 7.2 ημέρες. Η μετατροπή της λειτουργίας της κλίνης, εξυπηρετούσε στην καθημερινή αναένωση όγκου τροφοδοσίας με «φρέσκο» αποστειρωμένο απόβλητο.

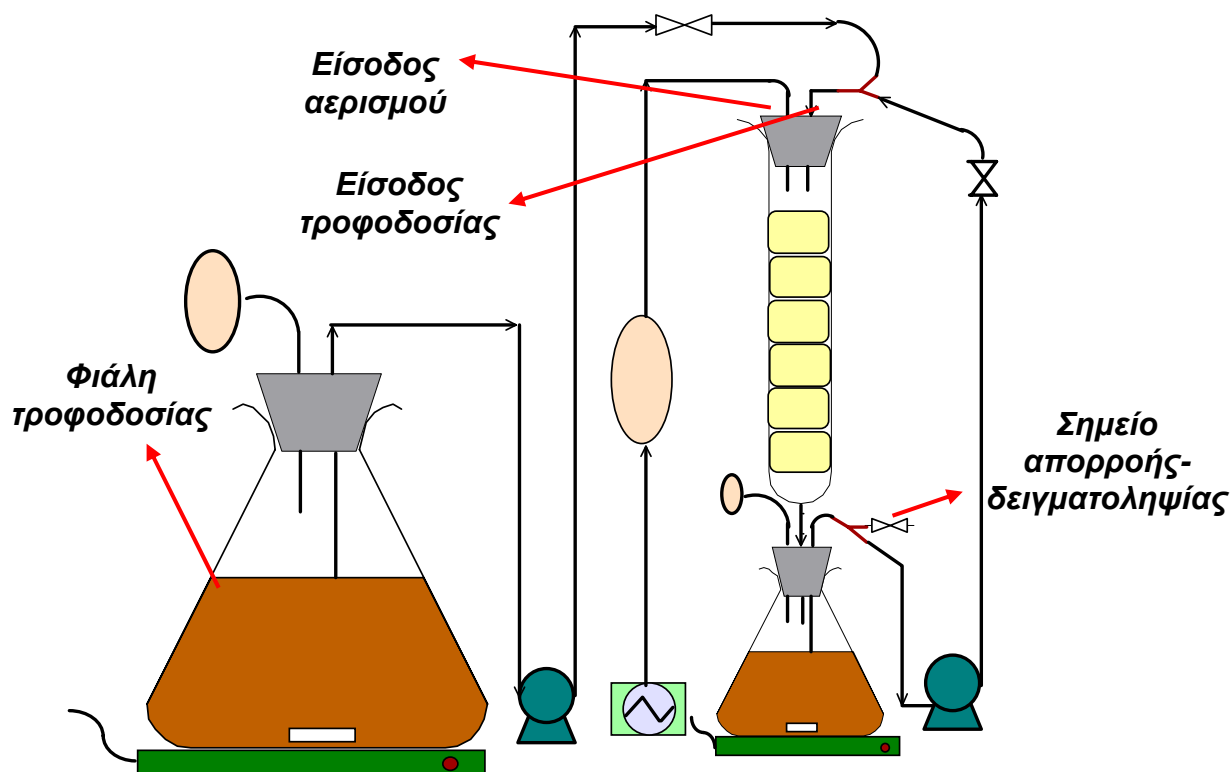
3.6.4.2 Πειραματική διάταξη

Χρησιμοποιήθηκε μια τέταρτη κυλινδρική κλίνη (**ΚΠ4**) (Φωτογραφία 3.5), όμοια με εκείνες των προηγούμενων πειραμάτων. Στο ακροφύσιο της (διαμέτρου 1 cm και ύψους 6 cm), ήταν προσαρμοσμένο ένα σιλικονούχο σωληνάριο ιδίων διαστάσεων, το οποίο με τη σειρά του προσαρμοζόταν σε ένα άλλο μεταλλικό, ίδιας διαμέτρου με το ακροφύσιο. Το μεταλλικό σωληνάριο ήταν περασμένο μαζί με άλλα δύο ίδιας διαμέτρου σε ένα ελαστικό πώμα με το οποίο ήταν πωματισμένη αεροστεγώς μια γυάλινη κωνική φιάλη των 250 ml. Η φιάλη αυτή εξυπηρετούσε ως «δοχείο συλλογής» του αποβλήτου και απ' εκεί γινόταν η απορροή και η δειγματοληψία. Στη φιάλη υπήρχε μονίμως ένας μικρός μαγνήτης προκειμένου να μπορεί το περιεχόμενο να αναδευτεί, με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Η φιάλη αυτή αποτελούσε ταυτόχρονα το σημείο έναρξης της ανακυκλοφορίας. Το πρώτο μεταλλικό σωληνάριο είχε συνολικό ύψος 7 cm και εξυπηρετούσε στην είσοδο του αποβλήτου στην κωνική φιάλη κατά την έξοδο του από την κλίνη. Στο δεύτερο μεταλλικό σωληνάριο ήταν προσαρμοσμένο ένα λαστιχένιο σωληνάριο της ίδιας διαμέτρου το οποίο με τη σειρά του συνδεόταν με ένα αποστειρωμένο φίλτρο. Μέσω αυτού γινόταν η είσοδος αέρα κατά τη λειτουργία της αντλίας. Το λαστιχένιο σωληνάριο που ήταν προσαρμοσμένο στο τρίτο μεταλλικό σωληνάριο ύψους 15 cm, συνδεόταν με ένα πλαστικό συνδετήρα σχήματος (Y) με το οποίο συνδέονταν δύο λαστιχένια σωληνάρια. Στην ελεύθερη άκρη του ενός ήταν προσαρμοσμένη μια τρίοδη στρόφιγγα, η δεύτερη και τρίτη δίοδος της οποίας ήταν κλειστές. Η ελεύθερη άκρη του άλλου, ύψους 1 m, συνδεόταν με σωληνάριο «είσοδου» τύπου masterflex της πρώτης περισταλτικής αντλίας (τύπου Masterflex Cole-Parmer Instrument Company Chicago, Illinois 60648). Το σωληνάριο «εξόδου» της αντλίας συνδεόταν με σιλικονούχο σωληνάριο το οποίο προσαρμοζόταν σε μια δεύτερη τρίοδη στρόφιγγα. Η δεύτερη δίοδος αυτής ήταν κλειστή και στην τρίτη συνδεόταν λαστιχένιο σωληνάριο που ήταν προσαρμοσμένο σε πλαστικό συνδετήρα τύπου (Y) με το οποίο συνδέονταν δύο σωληνάρια. Η ελεύθερη άκρη του ενός ήταν προσαρμοσμένη σε μια τρίτη τρίοδη στρόφιγγα και του άλλου στο μεταλλικό σωληνάριο που ήταν περασμένο στο ελαστικό πώμα της κλίνης αποτελώντας έτσι την «έξοδο» της ανακυκλοφορίας.

Όπως και στα προηγούμενα πειράματα, έτσι και εδώ, η γυάλινη κλίνη πωματιζόταν αεροστεγώς με ελαστικό πώμα, μέσα από το οποίο ήταν περασμένα δύο μεταλλικά σωληνάκια διαμέτρου 7 mm και ύψους 5 cm. Όπως προαναφέρθηκε, το ένα αποτελούσε την είσοδο της κλίνης διαμέσου της οποίας γινόταν η ανακυκλοφορία και μια φορά την ημέρα η τροφοδοσία. Διαμέσου του δεύτερου μεταλλικού σωληναρίου γινόταν παροχή αερισμού στην κλίνη. Η παροχή του αέρα γινόταν με τη βοήθεια μιας αεραντλίας (τύπου Power 550). Ο αέρας, μέσω ενός σιλικονούχου σωληναρίου διαμέτρου 2 cm, οδηγούνταν σε αποστειρωμένο φίλτρο η έξοδος του οποίου ήταν συνδεδεμένη με σιλικονούχο σωληνάριο το οποίο με τη σειρά του ήταν προσαρμοσμένο στο δεύτερο μεταλλικό σωληνάριο αποτελώντας έτσι την είσοδο του αερισμού στην κλίνη.

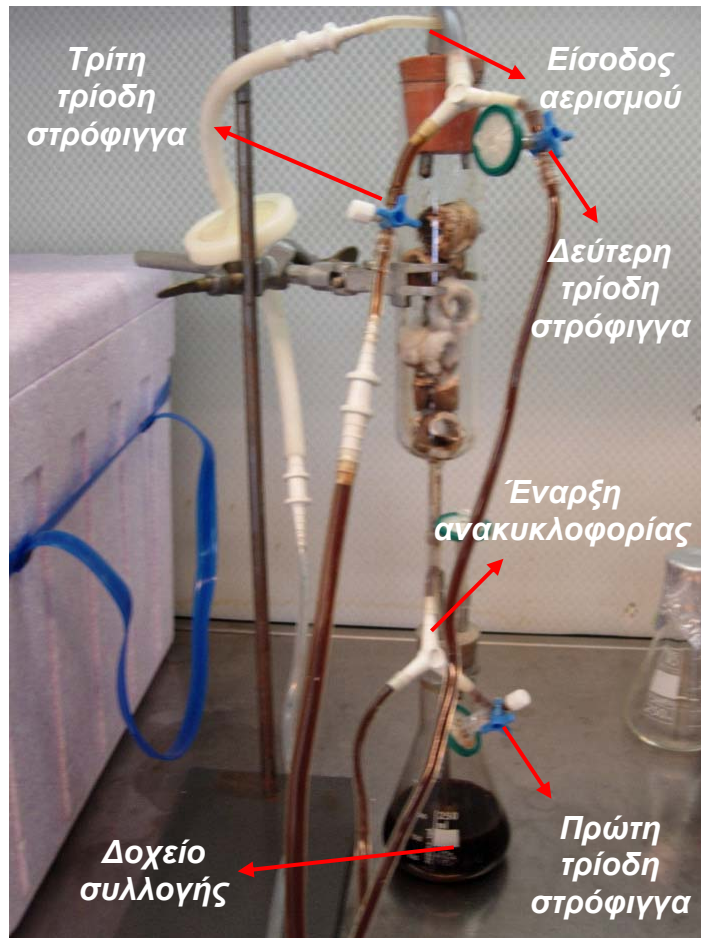
Το μέσο τροφοδοσίας βρισκόταν σε μια μεγάλη, γυάλινη κωνική φιάλη χωρητικότητας 2 l η οποία φυλασσόταν σε ειδικό ψυγείο προκειμένου να συντηρείται σε χαμηλή θερμοκρασία με τη βοήθεια πλαστικών παγοκουστών. Το ψυγείο αυτό, ύψους 40 cm, πλάτους 40 cm και μήκους 60 cm, βρισκόταν δίπλα από την κλίνη προκειμένου να αποφεύγεται η μεταφορά του υλικού τροφοδοσίας από το κουβούκλιο στρωτής ροής, αφού αυτό θα αύξανε την πιθανότητα για μόλυνση. Στη φιάλη υπήρχε μονίμως ένας μαγνήτης προκειμένου το απόβλητο να μπορεί να αναδευτεί με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της τροφοδοσίας. Η φιάλη πωματιζόταν αεροστεγώς με ελαστικό πώμα, μέσα από το οποίο ήταν περασμένα δύο μεταλλικά σωληνάκια διαμέτρου 7 mm. Το ένα είχε ύψος 30 cm (το μεγαλύτερο ύψος του βρισκόταν στο εσωτερικό της φιάλης) και το ύψος του άλλου ήταν 10 cm. Το μεγαλύτερο σωληνάριο χρησίμευε για την τροφοδοσία του αντιδραστήρα και στο εξωτερικό άκρο του ήταν προσαρμοσμένο σιλικονούχο σωληνάριο το οποίο με τη σειρά του ήταν συνδεδεμένο με σωληνάριο «είσοδου» τύπου masterflex της δεύτερης περισταλτικής αντλίας, ίδιου τύπου με την πρώτη. Στο μικρότερο μεταλλικό σωληνάριο ήταν προσαρμοσμένο ένα λαστιχένιο σωληνάριο της ίδιας διαμέτρου το οποίο με τη σειρά του συνδεόταν με ένα αποστειρωμένο φίλτρο. Μέσω αυτού γινόταν η είσοδος αέρα κατά τη λειτουργία της αντλίας.

Η άλλη άκρη του σωληναρίου τύπου masterflex συνδεόταν μέσω ενός πλαστικού συνδετήρα με ένα σιλικονούχο σωληνάριο ύψους 1 m. Η ελεύθερη άκρη του ήταν προσαρμοσμένη στην τρίτη τρίοδη στρόφιγγα για την οποία έγινε αναφορά προηγουμένως. Στο σχήμα 3.13 γίνεται πιο κατανοητή η όλη διάταξη, ενώ στη φωτογραφία 3.14 φαίνεται το κυριότερο μέρος της πειραματικής διάταξης.



Σχήμα 3.13: Πειραματική διάταξη του αεριζόμενου αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης πλήρωσης-εκκένωσης με ανακυκλοφορία (ΚΠ4)

Το πληρωτικό υλικό της κλίνης ήταν έξι αποικισμένα από το μύκητα ΡΟ 22, κυλινδρικά τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού. Η διάταξη βρισκόταν τοποθετημένη στο lamina, υπό ασηπτικές συνθήκες ενώ όλα τα «υλικά μέσα» που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν στον κλίβανο σε θερμοκρασία 121 °C, πριν την έναρξη του πειράματος.



Φωτογραφία 3.14: Πειραματική διάταξη της διαβρεχόμενης κλίνης ΚΠ4 πλήρωσης-εκκένωσης

3.6.4.3 Πειραματική διαδικασία

Πριν την έναρξη της λειτουργίας της κλίνης πραγματοποιήθηκαν δύο στερεές καλλιέργειες του στελέχους PO 22 σε αποστειρωμένο διάλυμα CYM (Complete Yeast Medium), αραιωμένο (1:1), με βάση την πορεία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.2.3. Μετά την ανάπτυξη του μύκητα σε όλη την ελεύθερη επιφάνεια του στερεοποιημένου μέσου, πραγματοποιήθηκαν τρεις υγρές καλλιέργειες του ίδιου στελέχους σε 50 ml υγρού αποστειρωμένου διαλύματος CYM (πίνακας 3.4), με βάση τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.6.1.3. Η πλήρωση της κλίνης έγινε βάσει του τρόπου που περιγράφεται στην παράγραφο 3.6.2.3.

Πριν την τροφοδοσία, το υγρό απόβλητο ελαιουργείου είχε υποστεί την προεπεξεργασία που περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.5.3. Μετά την τελική αποστείρωσή του, 180 ml αυτού εισήχθησαν στην κωνική φιάλη των 250 ml ενώ ο υπόλοιπος όγκος εισήχθηκε στην κωνική φιάλη τροφοδοσίας η οποία με τη σειρά της τοποθετήθηκε στο ψυγείο.

Η καθοδική ανακυκλοφορία ήταν ίση με 10 ml/min. Μία φορά την ημέρα η κλίνη τροφοδοτούνταν με 25 ml αποβλήτου αφού προηγουμένως είχε αφαιρεθεί ίσος όγκος. Η απορροή και εν συνεχεία η τροφοδοσία, γινόταν με τον εξής τρόπο: για την απορροή, το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης των 250 ml τίθετο υπό ανάδευση και η λειτουργία της πρώτης περισταλτικής αντλίας που εξυπηρετούσε στην ανακυκλοφορία σταματούσε. Εν συνεχεία, με τη βοήθεια πλαστικής, αποστειρωμένης σύριγγας των 20 ml, που τοποθετείτο στην πρώτη τρίοδη στρόφιγγα, αφαιρούνταν με σιφωνισμό 25 ml αποβλήτου. Μέρος του όγκου αυτού αποτελούσε το καθημερινό δείγμα. Για την τροφοδοσία, ο συνολικός όγκος του αποβλήτου που βρισκόταν στην μεγάλη κωνική φιάλη τίθετο υπό ανάδευση και η λειτουργία της πρώτης περισταλτικής αντλίας που εξυπηρετούσε στην ανακυκλοφορία παρέμενε ανενεργή. Εν συνεχεία, αφού η δεύτερη τρίοδη στρόφιγγα έκλεινε και η τρίτη τρίοδη άνοιγε, τίθετο σε λειτουργία η δεύτερη περισταλτική αντλία σε ροή 10 ml/min η οποία σταματούσε μετά την είσοδο 25 ml αποβλήτου στην κλίνη. Μαζί με την αντλία, έκλεινε και η τρίτη τρίοδη, άνοιγε η δεύτερη τρίοδη και ξεκινούσε η λειτουργία της πρώτης περισταλτικής αντλίας. Οι λειτουργικές συνθήκες της κλίνης ΚΠ4 αναγράφονται στον πίνακα 3.21.

Πίνακας 3.21: Συνθήκες λειτουργίας της διαβρεχόμενης κλίνης πλήρωσης-εκκένωσης, ΚΠ4

Χρονική περίοδος	Κλίνη ΚΠ4
I: 0-10 d	1 ^{ος} κύκλος τροφοδοσίας (απόβλητο ελαιουργείου) Ροή ανακυκλοφορίας: 10.0 ml/min Ροή τροφοδοσίας: 10.0 ml/min Παροχή αερισμού Χρόνος παραμονής: 7.2 d

Πριν η κλίνη τεθεί σε λειτουργία πραγματοποιήθηκε λήψη δείγματος από το προεπεξεργασμένο απόβλητο για διάφορες αναλύσεις. Στις υπόλοιπες δειγματοληψίες του πειράματος γίνονταν μετρήσεις των παραμέτρων της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών, του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου και του pH.

3.6.4.4 Αποτελέσματα-Συμπεράσματα

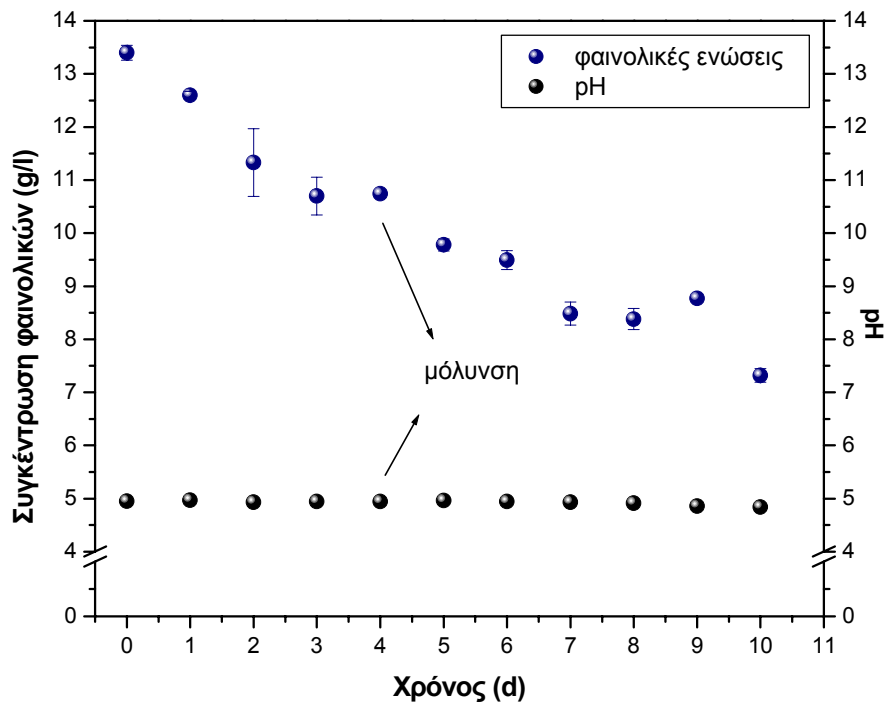
Στον πίνακα 3.22 φαίνονται τα αρχικά χαρακτηριστικά του προεπεξεργασμένου αποβλήτου ελαιουργείου πριν αυτό εισαχθεί στην κλίνη.

Πίνακας 3.22: Αρχικά χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας της διαβρεχόμενης κλίνης πλήρωσης-εκκένωσης, ΚΠ4

<i>Φαινολικά (g/l)</i>	<i>Διαλυτό ΧΑΟ (g/l)</i>	<i>pH</i>	<i>Θερμοκρασία (°C)</i>
13.400±0.141	88.870±0.00	4.95	24

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

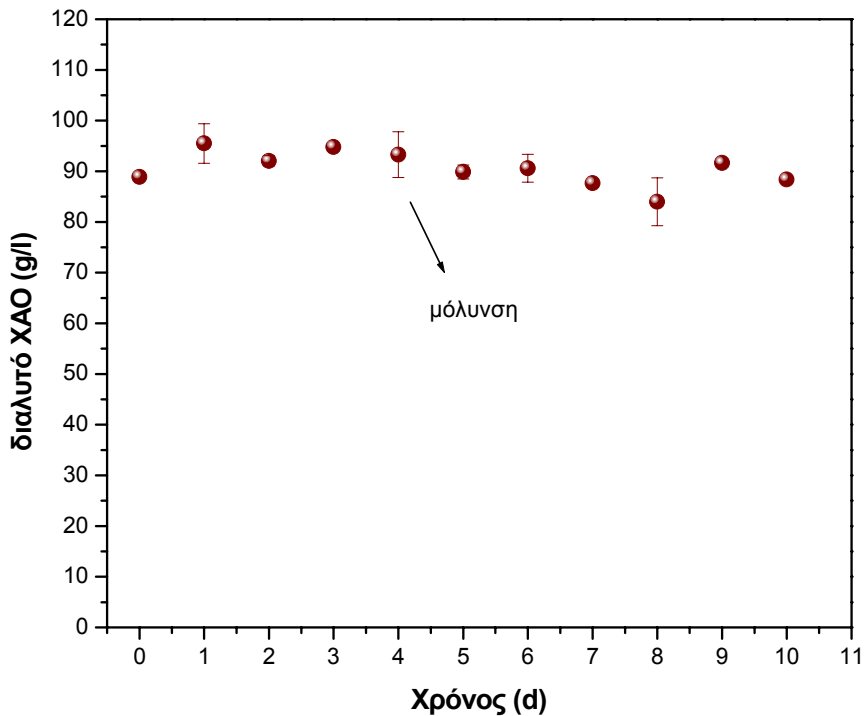
Στο γράφημα 3.13 φαίνεται το προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών και του pH.



Γράφημα 3.13: Προφίλ της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών και pH που επιτυγχάνεται στη διαβρεχόμενη κλίνη πλήρωσης-εκκένωσης, ΚΠ4, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.21

Από την πρώτη κιόλας ημέρα λειτουργίας του αντιδραστήρα παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων του αποβλήτου. Η μείωση αυτή συνεχίστηκε με τον ίδιο ρυθμό και τις επόμενες ημέρες. Αντίθετα, η τιμή του pH του αποβλήτου παρέμεινε αμετάβλητη έχοντας ως μέση την τιμή 4.92 ± 0.04 . Τις δύο όμως τελευταίες ημέρες του πειράματος, παρατηρήθηκε μια ελαφριά μείωση.

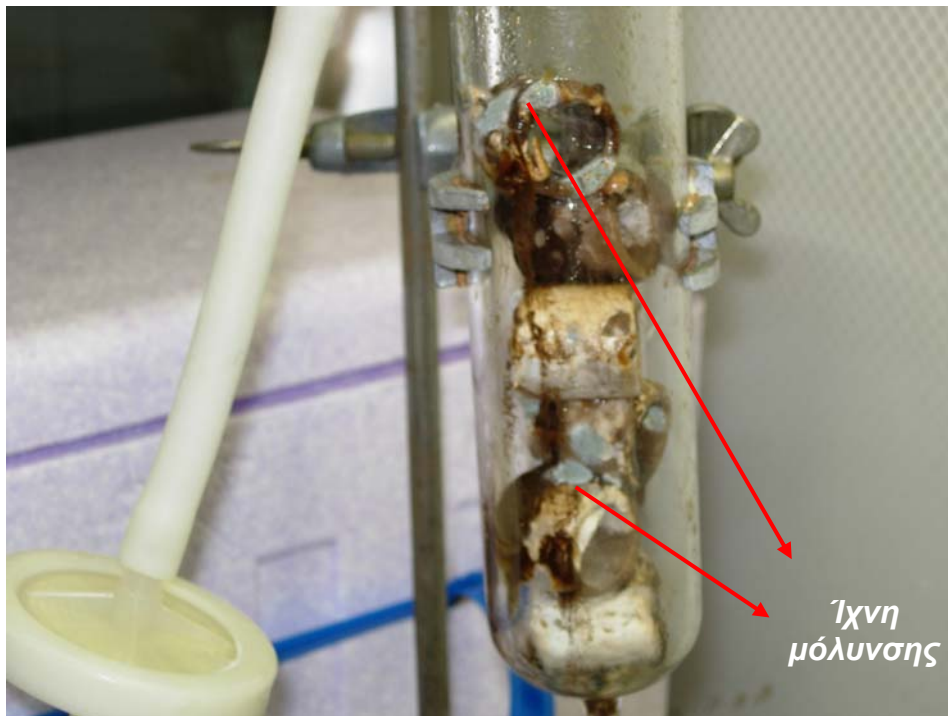
Στο γράφημα 3.14 που ακολουθεί, φαίνεται το προφίλ της συγκέντρωσης του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, όπως μετρήθηκε κατά τις δειγματοληψίες.



Γράφημα 3.14: Προφίλ της συγκέντρωσης του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου που επιτυγχάνεται στη διαβρεχόμενη κλίνη πλήρωσης-εκκένωσης, ΚΠ4, σύμφωνα με τις συνθήκες λειτουργίας που αναγράφονται στον πίνακα 3.21

Από το γράφημα είναι φανερό ότι δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στη συγκέντρωση του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου. Η μέση τιμή της παραμέτρου κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 90.590 ± 3.355 g/l.

Την τέταρτη ημέρα λειτουργίας της κλίνης, παρατηρήθηκαν ίχνη μόλυνσης από ξένους μικροοργανισμούς (Φωτογραφία 3.15). Ο ρυθμός εξάπλωσης των ξένων βακτηρίων ήταν ταχύτατος. Παρ' όλα αυτά η λειτουργία της κλίνης συνεχίστηκε μέχρι τη δέκατη ημέρα, κατά την οποία τερματίστηκε. Και τα έξι τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού με τον ακινητοποιημένο μύκητα είχαν μολυνθεί με αποτέλεσμα η ροή του αποβλήτου διαμέσου τους να καταστεί αδύνατη.



Φωτογραφία 3.15: Ίχνη μόλυνσης του ακινητοποιημένου μύκητα PO 22 της κλίνης ΚΠ4

Όπως φαίνεται από το γράφημα 3.13, η συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων, συνέχισε να μειώνεται και μετά τα πρώτα ίχνη της μόλυνσης. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι τα ξένα βακτήρια δεν είχαν εξαπλωθεί ακόμη σε όλη την επιφάνεια των ακινητοποιημένων μυκήτων με αποτέλεσμα η ανάπτυξη τους να συνεχιστεί, έστω και με μικρότερο ρυθμό. Όπως προαναφέρθηκε, τις τελευταίες ημέρες λειτουργίας της κλίνης μετρήθηκε μια σχετική μείωση στην τιμή του pH του αποβλήτου. Η μείωση αυτή οφείλεται πιθανότατα στην εξάπλωση της μόλυνσης που επιτεύχθηκε τις μέρες εκείνες.

Είναι φανερό λοιπόν, ότι ούτε η μετατροπή του συστήματος της κλίνης από διαλείποντος έργου με ανακυκλοφορία σε αντιδραστήρα πλήρωσης-εκκένωσης (draw+fill) με ανακυκλοφορία, ήταν ικανή να προστατεύσει το σύστημα από τη μόλυνση. Για άλλη μια φορά βλέπουμε ότι με την ακινητοποίηση του μύκητα PO 22 μπορεί να επιτευχθεί μεγάλη και γρήγορη αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων του υγρού αποβλήτου ελαιουργείου. Αυτό όμως που παρατηρείται με τη συγκεκριμένη τροφοδοσία είναι η μόλυνση του μύκητα από ξένα βακτήρια. Όπως αναφέρθηκε και άλλες φορές, αυτό

οφείλεται στη μεγάλη ευαισθησία στις μολύνσεις που έχουν παρουσιάσει οι μύκητες τέτοιου είδους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΑΠΟΒΛΗΤΟΥ ΤΟΥ ΕΛΑΙΟΥΡΓΕΙΟΥ

4.1 Γενικά

Μεγάλος αριθμός ερευνητών που έχουν ασχοληθεί με την επίδραση των πολυφαινολών στη λειτουργία των αναερόβιων μικροοργανισμών, έχουν διαπιστώσει την ύπαρξη παρεμποδιστικής δράσης των ενώσεων αυτών, κυρίως στα μεθανογόνα βακτήρια (Sierra-Alvarez and Lettinga, 1990; Beccari et al., 1999). Εξίσου παρεμποδιστική επίδραση έχει διαπιστωθεί ότι προκαλείται από τις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο απόβλητο που προκύπτει κατά την παραγωγική διαδικασία του ελαιόλαδου (κασιόγαρος) (Borja et al., 1996; Knupp et al., 1996; Hamdi and Moctar, 1992).

Με βάση αυτές τις μελέτες κρίθηκε σκόπιμο να ερευνηθεί εάν και το απόβλητο ελαιουργείου, το οποίο προηγουμένως έχει βιοεπεξεργαστεί με μύκητες λευκής σήψης για την απομάκρυνση του φαινολικού φορτίου, επιδεικνύει κάποια αντίστοιχη συμπεριφορά εν συγκρίσει με το μη επεξεργασμένο απόβλητο. Εάν δηλαδή η απόδοση της αναερόβιας χώνευσης του αποβλήτου του ελαιουργείου είναι περιορισμένη σε σύγκριση με το βιοεπεξεργασμένο απόβλητο από το οποίο έχει αποδομηθεί μεγάλο ποσοστό των φαινολικών ενώσεων.

Εάν τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης επιβεβαίωναν την παρεμπόδιση των φαινολικών ουσιών, θα μπορούσε η χρήση μυκήτων λευκής σήψης για απομάκρυνση αυτών να προηγείται της αναερόβιας χώνευσης. Συνάμα αυτό θα οδηγούσε στην αποτελεσματικότερη διαχείριση του υγρού αποβλήτου. Αυτός ήταν ουσιαστικά και ο λόγος για τον οποίο εφαρμόστηκε η χρήση των

μυκήτων λευκής σήψης στην επεξεργασία του αποβλήτου, λόγω δηλαδή της ιδιαίτερης ικανότητάς τους να αποδομούν ενώσεις φαινολικής φύσεως.

Οι τεχνικές μικρού όγκου (assay techniques) για τον προσδιορισμό της επίδρασης των παρεμποδιστικών ενώσεων αποτελούν μια καλή επιλογή για την περίπτωση της αναερόβιας επεξεργασίας. Τα πλεονεκτήματά τους είναι τα εξής: (1) είναι απλές στην εφαρμογή τους, (2) δεν στοιχίζουν, (3) δεν απαιτούν γνώση του μηχανισμού δράσης των παρεμποδιστικών ουσιών, και (4) μπορούν να διεξαχθούν στο εργαστήριο εύκολα, χωρίς την ανάγκη ιδιαίτερου εξοπλισμού (Owen et al., 1979). Επιπλέον, οι τεχνικές μικρού όγκου προσδιορισμού της βιοαποδομησιμότητας των ενώσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν δεν υπάρχει διαθέσιμη χημική μέθοδος ανάλυσης για το σκοπό αυτό.

Για την εκτίμηση της τοξικότητας και της βιοαποδομησιμότητας, έχουν χρησιμοποιηθεί συνεχείς (ή ημι-συνεχείς) τεχνικές και τεχνικές διαλείποντος έργου. Οι συνεχείς διεργασίες, αν και προσομοιώνουν καλύτερα τις συνθήκες μιας αναερόβιας λειτουργίας πλήρους κλίμακας, έχουν το μειονέκτημα ότι απαιτούν υψηλές δαπάνες για εγκατάσταση, εξοπλισμό και προσωπικό. Εν αντιθέσει, οι τεχνικές βιοαποδομησιμότητας μικρού όγκου, οι οποίες είναι τύπου διαλείποντος έργου, δεν έχουν κανένα από τους πιο πάνω περιορισμούς και επιπλέον προσφέρουν τη δυνατότητα παρακολούθησης πολλών μεταβλητών που επηρεάζουν την αναερόβια διεργασία. Οι τεχνικές διαλείποντος έργου προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες που μπορούν να εφαρμοστούν περαιτέρω στις συνεχείς διεργασίες.

Το αναπνευστόμετρο Warburg (Warburg respirometer) ήταν η πρώτη διεργασία διαλείποντος έργου που εφαρμόστηκε ευρέως για την εκτίμηση της βιοαποδομησιμότητας και της τοξικότητας σε ένα αναερόβιο σύστημα. Στη συνέχεια επιδέχτηκε αρκετές βελτιώσεις (McCarty et al., 1963; Kugelman and McCarty, 1965; Gossett and McCarty, 1976). Στο πέρασμα του χρόνου, η θεωρία και οι διαδικασίες που αναπτύχθηκαν για τα αναερόβια συστήματα συνδυάστηκαν με τεχνικές οι οποίες διεξάγονται σε «φιαλίδια μικρού όγκου» (serum-bottles) για την καλλιέργεια των αναερόβιων οργανισμών, όπως

περιγράφονται από τους Miller and Wollin (1974). Τα «φιαλίδια μικρού όγκου» (serum-bottles) που περιέχουν τα δείγματα, το υπόστρωμα και την αναερόβια «μαγιά», επωάζονται στην επιθυμητή θερμοκρασία. Η αντίστοιχη παραγωγή βιοαερίου ελέγχεται ογκομετρικά με βάση τη μέθοδο των συριγγών του Nottingham and Hungate (1969). Δείγματα από την υγρή και αέρια φάση λαμβάνονται περιοδικά με τη βοήθεια σύριγγας και ακολουθούν σ' αυτά οι επιθυμητές, κάθε φορά, αναλύσεις.

Στο υποκεφάλαιο που ακολουθεί γίνεται λεπτομερής περιγραφή των σταδίων της αναερόβιας χώνευσης, της μικροβιολογίας της, των παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση της επεξεργασίας, και τέλος, γίνεται αναλυτική περιγραφή των συστημάτων αναερόβιας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

4.2 Αναερόβια Χώνευση

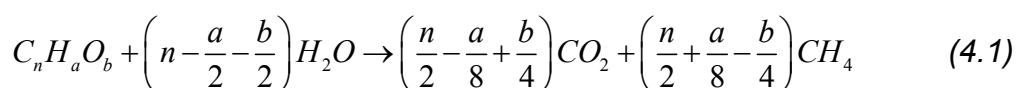
4.2.1 Εισαγωγή

Αναερόβια χώνευση χαρακτηρίζεται η βιολογική διεργασία κατά την οποία παράγεται κυρίως μεθάνιο (CH_4) και διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) από οργανική ύλη, με τη συνδυασμένη δράση μεικτού μικροβιακού πληθυσμού, υπό συνθήκες απουσίας οξυγόνου. Η μέθοδος αυτή προτιμάται για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων υψηλού οργανικού φορτίου, λόγω κυρίως της μικρής παραγωγής βιομάζας συγκριτικά με την αερόβια επεξεργασία.

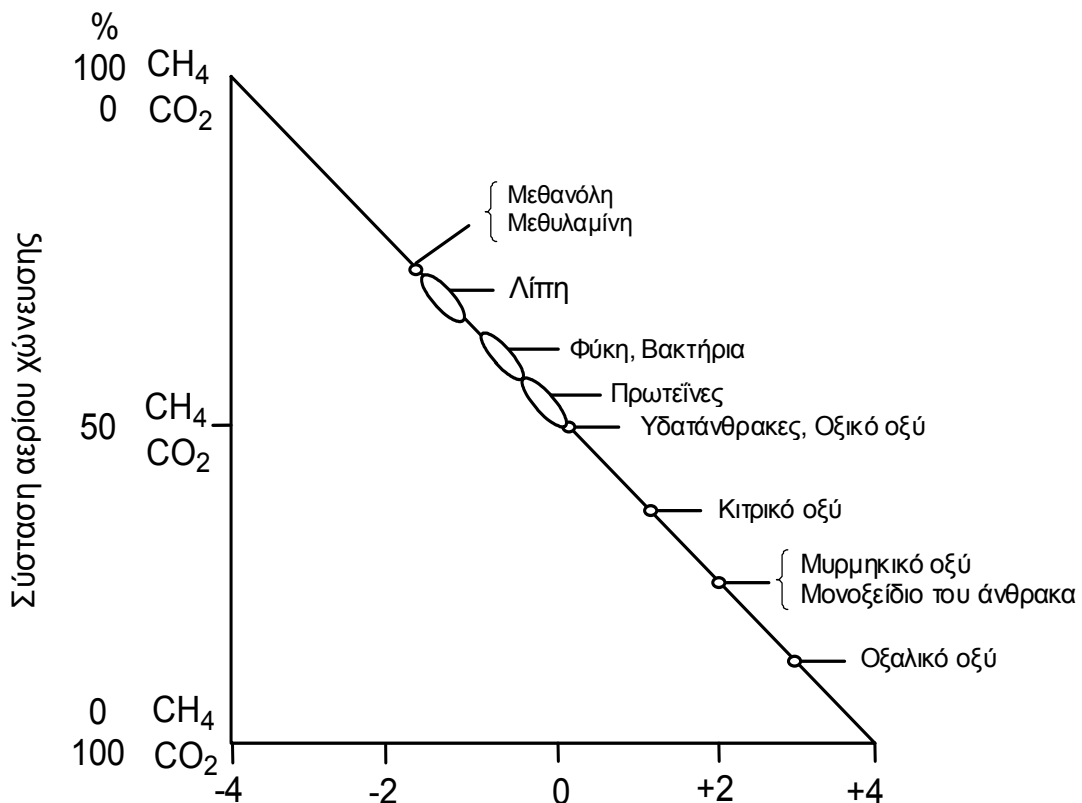
Η παραγωγή μεθανίου στη φύση από βιολογική δραστηριότητα είναι διαπιστωμένη από πολύ παλιά (1776), όταν ο Volta περιέγραψε την έκλυση μεθανίου από θαλάσσιο βούρκο. Η αναερόβια χώνευση είναι μία από τις παλαιότερες διεργασίες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία ιλύος βιολογικού καθαρισμού. Συγκεκριμένα, η αναερόβια χώνευση αστικών λυμάτων (υψηλή συγκέντρωση σε στερεά), αναπτύχθηκε στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα στην πόλη Vesoul της Γαλλίας από τον Louis H.

Mouras, ο οποίος σχεδίασε και κατασκεύασε ζυμωτήρες για την επεξεργασία της ιλύος (Malina and Pohland, 1992b). Πιο πρόσφατα η αναερόβια χώνευση έχει εφαρμοστεί και στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων κυρίως μέσου και υψηλού οργανικού φορτίου (Lawrence and McCarty, 1967). Επίσης τα τελευταία χρόνια διεξάγεται σημαντική έρευνα για τη δυνατότητα παραγωγής ενέργειας από βιομάζα μέσω της διεργασίας της αναερόβιας χώνευσης.

Σε γενικές γραμμές και υπό τον όρο ότι η αναερόβια αποδόμηση του οργανικού υλικού μπορεί να είναι πλήρης (δηλ. ο οργανικός άνθρακας να έχει μετατραπεί πλήρως σε μεθάνιο (CH₄) και διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), Schink, (1988), οι οργανικές ενώσεις μετατρέπονται σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα σύμφωνα με την εξίσωση 4.1 (Symons and Buswell, 1933; Tavrin and Buswell, 1934):



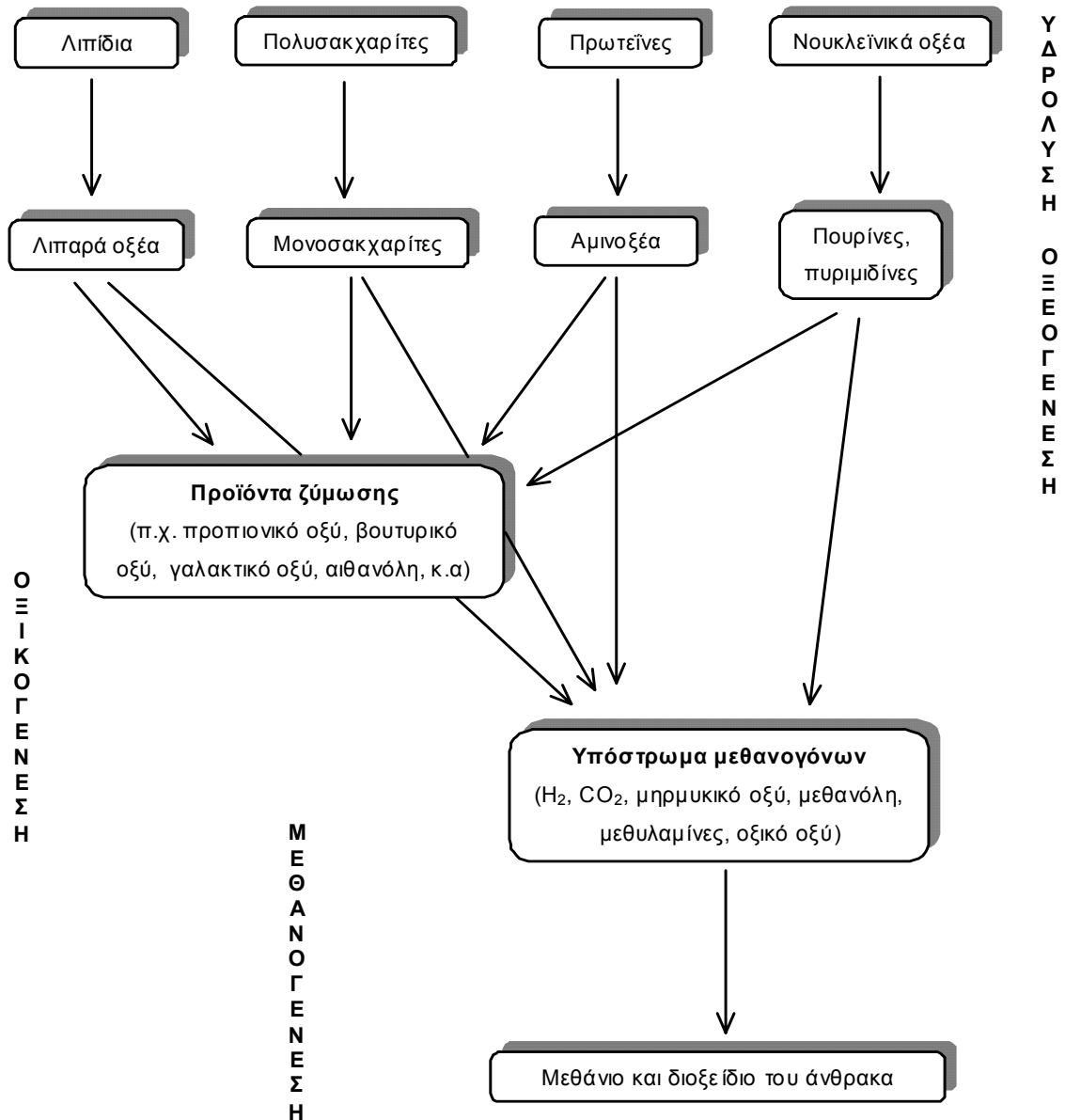
Είναι φανερό ότι η ποσοστιαία σύσταση του παραγόμενου αερίου μείγματος σε μεθάνιο εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση του άνθρακα στο υπόστρωμα. Έτσι, οι υδαάνθρακες μετατρέπονται σε ίσες ποσότητες μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα, η μεθανόλη και τα λιπίδια σε περισσότερο μεθάνιο από διοξείδιο του άνθρακα, το μεθανικό και οξαλικό οξύ δίνουν περισσότερη ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα από μεθάνιο, ενώ δεν παράγεται καθόλου μεθάνιο από την υδρόλυση της ουρίας (Schink et al., 1988). Στο σχήμα 4.1, φαίνεται η σύσταση του παραγόμενου αερίου μείγματος σε μεθάνιο συναρτήσει της οξειδωτικής κατάστασης του άνθρακα στο υπόστρωμα (Gujer and Zehnder, 1983).



Σχήμα 4.1: Σύσταση του παραγόμενου βιοαερίου συναρτήσει της οξειδωτικής κατάστασης του άνθρακα του υποστρώματος (Gujer και Zehnder, 1983)

Η μετατροπή του οργανικού υλικού προς μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα προχωράει όπως φαίνεται στο σχήμα 4.2. Διακρίνουμε τέσσερα στάδια: το στάδιο της **υδρόλυσης** των οργανικών μακρομορίων (πολυμερή όπως λιπίδια, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα) προς αντίστοιχα μονομερή, δηλ. λιπαρά οξέα, μονοσακχαρίτες, αμινοξέα, πουρίνες και πυριμιδίνες. Στη συνέχεια διακρίνουμε το στάδιο της **οξεογένεσης** κατά το οποίο μεταβολίζονται τα μονομερή κυρίως προς πτητικά λιπαρά οξέα αλλά και προς αλκοόλες, αμίνες κ.λ.π., με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Στο τρίτο στάδιο της αναερόβιας χώνευσης (**οξικογένεση**) συντελείται η μετατροπή των ανώτερων πτητικών λιπαρών οξέων καθώς και των αλκοολών σε οξικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου, από τα οξικογόνα βακτήρια. Τέλος, κατά το τέταρτο στάδιο της αναερόβιας χώνευσης, τη **μεθανογένεση**, τα μεθανογόνα βακτήρια παράγουν μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα από οξικό οξύ, καθώς και μεθάνιο από υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Σε επόμενη παράγραφο θα

ασχοληθούμε αναλυτικά με τη μικροβιολογία και την κινητική του κάθε σταδίου της αναερόβιας χώνευσης, όπως έχει προκύψει μέχρι σήμερα από τη διεθνή βιβλιογραφία.



Σχήμα 4.2: Μετατροπή οργανικού υλικού κατά τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης

Τα πλεονεκτήματα της αναερόβιας χώνευσης, έναντι της συμβατικής αερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων (διεργασία ενεργού ιλύος) (Lettinga et al., 1979), είναι τα εξής:

- Είναι δυνατή η σταθεροποίηση υγρών αποβλήτων υψηλού οργανικού φορτίου.
- Παράγεται μικρή ποσότητα σταθεροποιημένης ιλύος.
- Υπάρχουν μικρές απαιτήσεις σε θρεπτικά (άζωτο και φώσφορο).
- Καταναλώνεται ελάχιστη σχετικά ενέργεια, κυρίως για θέρμανση.
- Παράγεται ενέργεια με τη μορφή βιοαερίου.
- Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί μπορούν να διατηρηθούν χωρίς τροφοδοσία για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς σημαντική μείωση της ενεργότητάς τους.
- Παραγωγή εδαφοβελτιωτικού, αφού η χωνευμένη λάσπη περιέχει άζωτο, φώσφορο, άλλα θρεπτικά και οργανική ύλη που βελτιώνει τη γονιμότητα και τη δομή του εδάφους.

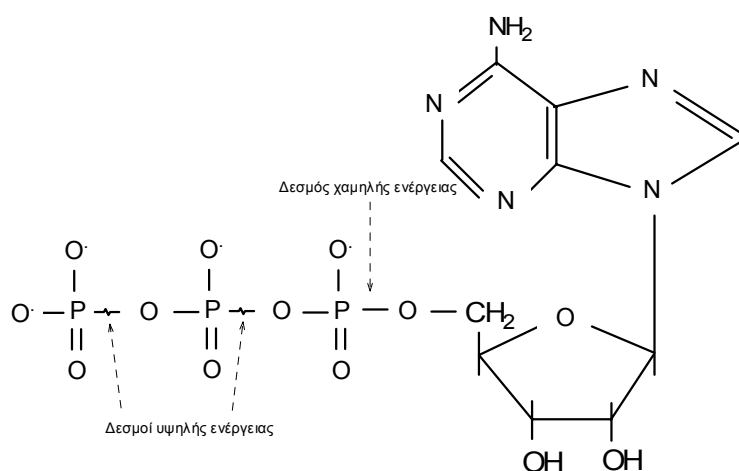
Τα κυριότερα μειονεκτήματα της αναερόβιας χώνευσης σε σχέση με την αερόβια επεξεργασία είναι:

- Η μεγάλη ευαισθησία των μεθανογόνων μικροοργανισμών σε πλήθος τοξικών ενώσεων (Lettinga et al., 1979). Τα τελευταία όμως χρόνια γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης κατάλληλων μεθόδων και βιολογικών συστημάτων ώστε να γίνει δυνατή η βιοαποδόμηση τοξικών ενώσεων κάτω από αναερόβιες συνθήκες (Verstraete and Vandevivere, 1997).
- Η σχετικά χαμηλή ευστάθεια των αναερόβιων συστημάτων επεξεργασίας, που τείνει όμως να εξαλειφθεί με την ολοκληρωμένη γνώση των βασικών αρχών της διεργασίας.
- Απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για την εκκίνηση της, που μπορεί να διαρκέσει από 8 έως 12 εβδομάδες. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται σε ετήσια βάση των μονάδων αναερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων, ώστε να υπάρχουν μεγάλες ποσότητες αναερόβιων μικροοργανισμών που είναι διαθέσιμες να αποτελέσουν τη «μαγιά» σε νέους αντιδραστήρες.

4.2.2 Μικροβιολογία και κινητική της αναερόβιας χώνευσης

Σε ένα ζωντανό κύτταρο λαμβάνει χώρα μεγάλος αριθμός χημικών αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα. Το σύνολο των χημικών δραστηριοτήτων που γίνονται σ' ένα κύτταρο ονομάζεται μεταβολισμός. Οι αντιδράσεις του μεταβολισμού διακρίνονται στις **καταβολικές**, μέσω των οποίων πολύπλοκες οργανικές ενώσεις διασπώνται σε απλούστερες απελευθερώνοντας ενέργεια, και στις **αναβολικές**, μέσω των οποίων συντίθενται νέα κύτταρα από απλές χημικές ενώσεις. Ανάλογα με τη χημική σύσταση ενός περιβάλλοντος, αναπτύσσονται διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, καταναλώνοντας ουσίες που χαρακτηρίζονται σαν υπόστρωμα, παράγοντας ταυτόχρονα μεταβολικά προϊόντα.

Το μεγαλύτερο μέρος των καταβολικών αντιδράσεων οξειδοαναγωγικού τύπου (περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων από το ένα αντιδρόν στο άλλο). Η ενέργεια που απελευθερώνεται ως αποτέλεσμα των οξειδοαναγωγικών αυτών αντιδράσεων χρησιμοποιείται για τις κυτταρικές λειτουργίες. Στους ζωντανούς οργανισμούς η ενέργεια αυτή μεταφέρεται, με τη μορφή δεσμών υψηλής ενέργειας, σε μια ποικιλία φωσφορικών ενώσεων (ενδιάμεσα υψηλής ενέργειας). Η πιο σημαντική ένωση αυτού του είδους είναι η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και αποτελείται από τη ριβονουκλεοσιδική αδενοσίνη, στην οποία είναι συνδεδεμένα τρία φωσφορικά μόρια στη σειρά (Σχήμα 4.3).



Σχήμα 4.3: Δομή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)

Τα κύτταρα χρησιμοποιούν αυτήν την ενέργεια για να διεξάγουν τρεις λειτουργίες: α) τη χημική σύνθεση μεγάλων και σύνθετων μορίων (ανάπτυξη), β) τη μεταφορά ουσιών μέσα ή έξω από το κύτταρο και τα εσωτερικά οργανίδια του και, γ) την παραγωγή μηχανικού έργου που απαιτείται για την κυτταρική διαίρεση (πολλαπλασιασμός) και κίνηση. Όλες οι λειτουργίες αυτές είναι μη αυθόρμητες και συντελούν σε αύξηση της ελεύθερης ενέργειας του κυττάρου. Συνεπώς αυτές οι λειτουργίες συνυπάρχουν με άλλες διεργασίες οι οποίες συντελούν σε αρνητική αλλαγή της ελεύθερης ενέργειας.

Το σύνολο των αντιδράσεων που οδηγούν στην οξείδωση μιας ένωσης ονομάζεται βιοχημικό δίκτυο. Τα δίκτυα για την οξείδωση των οργανικών ενώσεων και τη διατήρηση της ενέργειας σε ATP μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες: τη **ζύμωση**, κατά την οποία οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής συμβαίνουν υπό την απουσία κάποιου ανόργανου τελικού δέκτη ηλεκτρονίων και την **αναπνοή**, κατά την οποία το μοριακό οξυγόνο ή κάποια άλλη οξειδωτική ουσία (NO_3^- , SO_4^{2-}), παίζει το ρόλο του τελικού αποδέκτη ηλεκτρονίων. Επειδή δεν έχουν όλοι οι μικροοργανισμοί την ικανότητα χρήσης του μοριακού οξυγόνου, ένα γενικό κριτήριο κατάταξης των μικροοργανισμών είναι η σχέση της κυτταρικής τους λειτουργίας με το οξυγόνο (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1: Κατάταξη των μικροοργανισμών με κριτήριο τη σχέση της κυτταρικής τους λειτουργίας με το οξυγόνο

<i>Ιδιότητα</i>	<i>Μικροοργανισμοί</i>
Χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο	1. Αερόβιοι (aerobes)
Χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο, αλλά μπορούν να ζήσουν με ζυμωτικό μεταβολισμό και σε αναερόβιες συνθήκες	2. Προαιρετικά αναερόβιοι (facultative anaerobes)
Δεν διαθέτουν την ικανότητα χρήσης του μοριακού οξυγόνου	3. Υποχρεωτικά αναερόβιοι (obligate anaerobes)
Μπορούν να ζήσουν και σε αερόβιες συνθήκες	I. Αδιάφοροι αναερόβιοι (indifferent anaerobes)
Έχουν ένα όριο ανοχής στη συγκέντρωση οξυγόνου στο περιβάλλον τους	II. Ανθεκτικοί στον αέρα αναερόβιοι (aerotolerants anaerobes)
Πεθαίνουν ακόμα και με ίχνη ελεύθερου οξυγόνου στο περιβάλλον τους	III. Αυστηρά αναερόβιοι (strict anaerobes)

4.2.3 Αναερόβιος μεταβολισμός της οργανικής ύλης

Στη συνέχεια γίνεται αναφορά των χαρακτηριστικών κάθε σταδίου της αναερόβιας χώνευσης και της σημασίας που έχει στη συνολική διεργασία, καθώς και των μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε αυτά.

4.2.3.1 Υδρόλυση βιοπολυμερών στην αναερόβια χώνευση

Οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να μεταβολίσουν απ' ευθείας οργανικό υλικό σε μορφή σωματιδίων, καθώς η κυτταρική τους μεμβράνη είναι αδιαπέραστη για τέτοιου είδους υλικά. Πρέπει να προηγηθεί διαλυτοποίηση ή αλλιώς υδρόλυση των οργανικών σωματιδίων προς διαλυτά πολυμερή και στη συνέχεια προς διμερή ή μονομερή τα οποία μπορούν να εισαχθούν στο κύτταρο και να μεταβολιστούν (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991; Gujer and Zehndar, 1983). Η παραδοσιακή σημασία της υδρόλυσης είναι η «χημική αποσύνθεση με την οποία μία ένωση διασπάται σε άλλες ενώσεις με την πρόσληψη στοιχείων του νερού». Η υδρόλυση λαμβάνει χώρα με τη δράση ενζύμων, τις υδρολάσες, τα οποία δρουν είτε εξωκυτταρικά στην περίπτωση των βιοπολυμερών, είτε ενδοκυτταρικά στην περίπτωση μικρών διμερών (π.χ. λακτόζη).

4.2.3.2 Οξεογένεση στην αναερόβια χώνευση

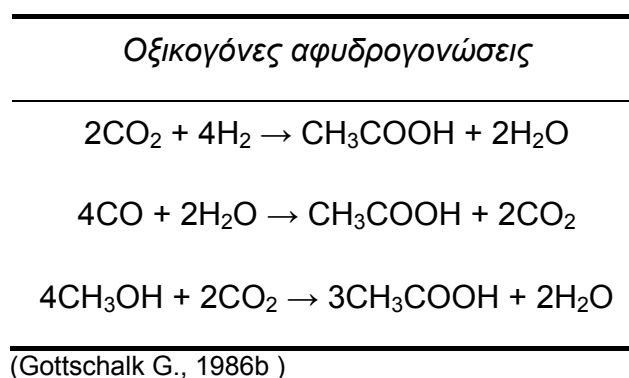
Κατά το στάδιο της οξεογένεσης στην αναερόβια χώνευση, διαλυτό οργανικό υλικό (τα μονομερή που παράγονται από την υδρόλυση των πολυμερών) αποδομείται βιολογικά, κυρίως προς πτητικά λιπαρά οξέα και αλκοόλες, με τη δράση ενός ετερογενούς μικροβιακού πληθυσμού. Το κυρίαρχο είδος των μικροοργανισμών σ' αυτό το στάδιο είναι τα βακτήρια, ενώ έχουν αναφερθεί και μικροί πληθυσμοί πρωτοζώων, μυκήτων και ζυμών (Toerien and Hattingh, 1969). Στο σύνολο του, ο οξεογόνος πληθυσμός, αποτελεί περίπου το 90 % του συνολικού πληθυσμού μικροοργανισμών σε ένα αναερόβιο χωνευτήρα (Zeikus, 1980).

4.2.3.3 Οξικογένεση στην αναερόβια χώνευση

Το οξικό οξύ είναι ένα σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν του αναερόβιου μεταβολισμού των οργανικών ενώσεων, αφού αποτελεί την πρόδρομο ένωση για το σχηματισμό του μεθανίου. Γενικά, μπορούμε να διακρίνουμε δύο

διαφορετικούς τύπους μηχανισμών οι οποίοι καταλήγουν στην παραγωγή οξικού οξέος: (1) τις οξικογόνες υδρογονώσεις (acetogenic hydrogenations) και, (2) τις οξικογόνες αφυδρογονώσεις (acetogenic dehydrogenations). Οι οξικογόνες υδρογονώσεις λαμβάνουν χώρα με την ανάπτυξη δύο ομάδων μικροοργανισμών: (α) των μικροοργανισμών οι οποίοι υποχρεωτικά ανάγουν πρωτόνια ή αλλιώς παράγουν υδρογόνο κατά το μεταβολισμό (obligate proton-reducing or obligate hydrogen-producing) και, (β) αυτών που έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν δέκτες ηλεκτρονίων κατά την αποδόμηση οργανικών υποστρωμάτων. Οι τελευταίοι, ανάλογα με την υψηλή ή όχι συγκέντρωση υδρογόνου στο περιβάλλον τους ρυθμίζουν το μεταβολισμό τους προς την παραγωγή λιγότερο ή περισσότερο οξειδωμένων προϊόντων, αντίστοιχα (facultative proton-reducing). Οι οξικογόνες αφυδρογονώσεις περιλαμβάνουν την παραγωγή οξικού κυρίως από διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο, από μονοξείδιο του άνθρακα και νερό, και από μεθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (Πίνακας 4.2). Συνήθως αυτά τα βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν και με άλλα οργανικά υποστρώματα, όπως σάκχαρα, γαλακτικό οξύ κ.α. (Dolfing, 1988).

Πίνακας 4.2: Αντιδράσεις οξικογόνων αφυδρογονώσεων



Μετρήσεις σε αναερόβια περιβάλλοντα, όπως σε δείγματα βούρκου και λάσπης, έδειξαν ότι ο πληθυσμός των βακτηρίων τα οποία εκτελούν οξικογόνες αφυδρογονώσεις ήταν μικρότερος κατά δύο τάξεις μεγέθους από τον πληθυσμό των μεθανογόνων που ήταν παρόντα στα ίδια δείγματα.

4.2.3.4 Μεθανογένεση στην αναερόβια χώνευση

Τα μεθανογόνα βακτήρια είναι αυστηρά αναερόβιοι μικροοργανισμοί. Ζουν στο στομάχι των μηρυκαστικών αλλά και άλλων ζώων, και γενικά απαντώνται στη φύση σε ανοξικά περιβάλλοντα. Έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους στο εσωτερικό μέρος του κορμού ορισμένων δέντρων (ιδιαίτερα σε ξηρές περιοχές), σε λάσπες αποχετεύσεων και σε ιζήματα λιμνών γλυκού νερού. Έκλυση μεθανίου προερχόμενου από βιολογική πηγή έχει ανιχνευτεί και σε αρκετά υπεραλατούχα περιβάλλοντα. Ακόμα, από θερμόφιλα περιβάλλοντα (θερμές πηγές) έχουν απομονωθεί ενεργά είδη μεθανογόνων βακτηρίων (π.χ. το *Methanothermobacter thermautotrophicus* έχει βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 83 °C) (Oremland, 1988).

Ως πηγή ενέργειας για τα μεθανογόνα βακτήρια χρησιμοποιείται περιορισμένος αριθμός απλών οργανικών ενώσεων. Μέχρι σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι υποστρώματα για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς είναι το διοξείδιο του άνθρακα, το μεθανικό οξύ, το οξικό οξύ, η μεθανόλη, οι μεθυλαμίνες και το διμεθυλσουλφίδιο. Κάποια είδη μεθανογόνων χρησιμοποιούν και το μονοξείδιο του άνθρακα (Oremland, 1988). Στον πίνακα 4.3, παρουσιάζονται οι αντιδράσεις παραγωγής μεθανίου από τις παραπάνω ενώσεις και οι αντίστοιχες μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας (Vogels et al., 1988).

Πίνακας 4.3: Αντιδράσεις παραγωγής μεθανίου και οι αντίστοιχες μεταβολές της ελεύθερης ενέργειας

Αντιδράσεις	ΔG° (KJ/ mol CH ₄)
$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	- 131
$4\text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	- 304
$4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$	- 210
$4\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	- 319
$\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_4\text{Cl}$	- 230
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	- 113
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	- 31

Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η πεποίθηση ότι όλοι οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είχαν την ικανότητα να παράγουν μεθάνιο από υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Διαπιστώθηκε όμως ότι, αν και τα περισσότερα είδη μεθανογόνων έχουν αυτή την ικανότητα, υπάρχουν και κάποια τα οποία χρησιμοποιούν το οξικό οξύ ως υπόστρωμα και έχουν χωριστεί σε δύο κατηγορίες: α) στα «οξικοτροφικά», όπως τα *Methanothrix soehngeni*, *Methanosarcina TM-1*, *Methanosarcina acetivorans* και, β) στα «υποχρεωτικά μεθυλότροφα», όπως τα *Methanolobus tindarus*, *Methanococcoides methylmutens*, *Methanococcus halophilus* τα οποία μεταβολίζουν μόνο τη μεθανόλη, τις μεθυλαμίνες και το διμεθυλσουλφίδιο. Έχει αποδειχθεί ότι και οι οξικότροφοι και οι μεθυλότροφοι μικροοργανισμοί παράγουν μεθάνιο απ' ευθείας από τις μεθυλομάδες (-CH₃) και όχι μέσω διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Μεταξύ των μεθανογόνων χρηστών υδρογόνου υπάρχουν αρκετά είδη τα οποία μεταβολίζουν το μεθανικό οξύ (π.χ. *Methanococcus thermolithotrophicus*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*). Τέλος, κάποια είδη μεθανογόνων μικροοργανισμών είναι ικανά να μεταβολίσουν σχεδόν όλα τα μέχρι τώρα γνωστά υποστρώματα που έχουν αναφερθεί. Για παράδειγμα, τα *Methanosarcina barkeri* και *Methanococcus mazei* χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα όλες τις παραπάνω ενώσεις εκτός του μεθανικού οξέος (Gottschalk, 1986; Oremland, 1988; Vogels et al., 1988).

4.2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης

Η αναερόβια χώνευση περιλαμβάνει πολλές ομάδες μικροοργανισμών, οι οποίοι λόγω της διαφορετικής φυσιολογίας τους είναι ευαίσθητοι σε πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, η σύσταση του οργανικού υποστρώματος της τροφοδοσίας, τα θρεπτικά συστατικά και οι τοξικές ουσίες. Ο έλεγχος των παραγόντων αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την αποτελεσματικότητα της διεργασίας και για το λόγο αυτό περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια.

4.2.4.1 Θερμοκρασία

Η παραγωγή του ενεργειακά χρήσιμου μεθανίου αλλά και η σημαντική μείωση του οργανικού φορτίου που επιτυγχάνεται κατά τη μεθανογένεση καθιστούν αυτήν ως το σπουδαιότερο στάδιο της διεργασίας της αναερόβιας χώνευσης. Τα μεθανογόνα βακτήρια είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε μεταβολές της θερμοκρασίας, συνεπώς οι συνθήκες στις οποίες λαμβάνει χώρα η αναερόβια χώνευση πρέπει να είναι οι βέλτιστες για την ανάπτυξη των μεθανοβακτηρίων.

Γενικά έχει διαπιστωθεί μικροβιακή δραστηριότητα σε θερμοκρασιακά όρια που κυμαίνονται από τους 0 °C έως περίπου τους 100 °C. Το ανώτερο θερμοκρασιακό όριο για ανάπτυξη καθορίζεται από τη θερμική σταθερότητα των συστατικών του κάθε ζωντανού οργανισμού (κυρίως των πρωτεϊνών και των νουκλεϊνικών του οξέων).

Γενικά οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε τρεις κύριες ομάδες, με βάση τη θερμοκρασιακή περιοχή που αναπτύσσονται: θερμόφιλοι (άνω των 50 °C), μεσόφιλοι (30-40 °C) και ψυχρόφιλοι (κάτω των 20 °C). Επίσης υπάρχουν βακτήρια που μπορούν να αναπτυχθούν σε περισσότερες από μία θερμοκρασιακές περιοχές (π.χ. μεσόφιλη και θερμόφιλη).

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή μεθανίου κατά την αναερόβια χώνευση οργανικού υλικού, έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Οι Fair και Moor (1932, 1934, 1937) και οι Maly και Fadrus (1971) αναφέρουν ότι ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου αυξάνει με τη θερμοκρασία (συγκεκριμένα η παραγωγή μεθανίου στους 25 °C είναι κατά 25 % μικρότερη από αυτή που επιτυγχάνεται στους 60 °C). Ακόμα με τη θερμοφιλή αναερόβια χώνευση επιτυγχάνονται αυξημένοι ρυθμοί αντιδράσεων και κατά συνέπεια μεγαλύτερο ποσοστό αποδόμησης των οργανικών στερεών, καλύτερος διαχωρισμός της υγρής-στερεής φάσεως και τέλος καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών. Οι υψηλές όμως ενεργειακές απαιτήσεις σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε τοξικές ενώσεις καθώς και με τη μειωμένη ευστάθεια καθιστούν τη θερμοφιλή αναερόβια χώνευση οικονομικά ασύμφορη και δύσκολα εφαρμόσιμη (Buhr and Andrews, 1977).

Η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας αναερόβιων χωνευτήρων έχει απασχολήσει στο παρελθόν αρκετούς ερευνητές. Γενικά υπάρχουν αντικρουόμενα συμπεράσματα σχετικά με τους ρυθμούς ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε αναερόβιους χωνευτήρες συναρτήσει της θερμοκρασίας. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά είδη μικροοργανισμών τα οποία επικρατούν σε κάθε αναερόβιο χωνευτήρα ανάλογα με το είδος του, τον υδραυλικό χρόνο παραμονής στερεών και την τροφοδοσία την οποία δέχεται.

Αυτό που είναι αξιοσημείωτο και πρέπει να προσεχθεί είναι οι απότομες θερμοκρασιακές μεταβολές, που μπορούν να αποβούν μοιραίες για τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης.

4.2.4.2 pH

Στις περισσότερες περιπτώσεις η μετατροπή του υλικού επιτυγχάνεται σε βέλτιστη περιοχή τιμών pH από 7.0-7.2. Πολλά όμως είδη βακτηρίων μπορούν να αναπτυχθούν ικανοποιητικά σε pH μεταξύ 6 και 9. Δύο παράγοντες που επιδρούν στην τιμή του pH ενός χωνευτήρα είναι, η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων (VFA) καθώς και η αλκαλικότητα

(εκφράζεται ως mgCaCO_3/l). Η αλκαλικότητα οφείλεται κυρίως στα ιόντα HCO_3^- τα οποία προέρχονται από την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) κατά την αποδόμηση οργανικών ενώσεων. Τα λιπαρά οξέα τα οποία παράγονται κατά την οξεογένεση, τείνουν να χαμηλώσουν το pH του βιοαντιδραστήρα. Κάτω από ομαλές συνθήκες αυτή η μείωση του pH ρυθμίζεται από τα ιόντα HCO_3^- , καθώς και από την κατανάλωση των οξέων κατά τα στάδια της οξικογένεσης και μεθανογένεσης. Κάτω από αντίξοες συνθήκες (π.χ. παρεμπόδιση της μεθανογένεσης, απότομη αύξηση των λιπαρών οξέων) η ρυθμιστική ικανότητα του συστήματος μπορεί να ανατραπεί με συνέπεια την πτώση του pH και την τελική αποτυχία της διεργασίας, σε περίπτωση που δεν υπάρχει έγκαιρη επέμβαση στο σύστημα. Μια μέθοδος για να διαφυλάσσεται η τιμή του pH μέσα στα όρια της επιθυμητής περιοχής είναι η αύξηση της αλκαλικότητας του συστήματος προσθέτοντας αμμωνία (NH_3), υδροξείδιο του νατρίου (NaOH), ή όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3) (Bitton, 1994). Αρκετοί ερευνητές, μεταξύ των οποίων οι Mueller et al., 1959, και Rohland (1962) υπογράμμισαν την αναγκαιότητα μιας ισορροπίας μεταξύ της αλκαλικότητας και της συγκέντρωσης των πτητικών λιπαρών οξέων.

4.2.4.3 Χημική σύσταση της τροφοδοσίας

Η χημική σύσταση της τροφοδοσίας του υποστρώματος είναι ένας από τους κυριότερους παράγοντες που διαμορφώνουν τα χαρακτηριστικά ενός αναερόβιου χωνευτήρα. Η φυσική επιλογή των μικροοργανισμών εξαρτάται από τα οργανικά και ανόργανα συστατικά του υποστρώματος και φυσικά οι μικροοργανισμοί εκείνοι που μπορούν να τα μεταβολίσουν υπερτερούν αριθμητικά και επικρατούν. Τα μεταβολικά προϊόντα που σχηματίζονται εμπλουτίζουν περαιτέρω την καλλιέργεια σε βακτήρια τα οποία οδηγούν τη διεργασία σε τελικά προϊόντα, όπως μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα. Κάποια συστατικά πολυσύνθετων υποστρωμάτων μπορεί να είναι μη βιοαποδομήσιμα, οπότε δεν έχουμε πλήρη απομάκρυνση του οργανικού υλικού. Η γνώση λοιπόν των χαρακτηριστικών του υποστρώματος είναι ουσιαστικής σημασίας για την κατανόηση της συμπεριφοράς ενός χωνευτήρα

αλλά και για το σχεδιασμό διεργασιών αναερόβιας χώνευσης (Kotze et al., 1969).

Για την ομαλή και προ παντός για τη βέλτιστη λειτουργία της αναερόβιας χώνευσης, τα βακτήρια εκτός από άνθρακα, χρειάζονται και άλλα στοιχεία προκειμένου να ικανοποιήσουν τις λειτουργικές τους ανάγκες. Τα ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για τα αναερόβια βακτήρια είναι ο σίδηρος, το κοβάλτιο, το μολυβδένιο, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το νάτριο, το βάριο, το σελήνιο και το νικέλιο. Συνήθως, οι παραπάνω θρεπτικές ουσίες υπάρχουν σε επαρκείς συγκεντρώσεις στα περισσότερα απόβλητα.

Κατά τον Sahm (1984), η προτιμώμενη C:N:P αναλογία για τα αναερόβια βακτήρια είναι 700:5:1. Άλλοι επιστήμονες υποστηρίζουν ότι η επαρκής αναλογία C:N είναι 25-30:1, ενώ οι Sanders και Bloodgood (1965) έκριναν απαραίτητη μία αναλογία C:N=16:1. Η εξισορρόπηση ενός αποβλήτου σε άζωτο μπορεί να γίνει με την προσθήκη είτε ουρίας (NH_2CONH_2), είτε ιόντων NH_4^+ , ενώ η εξισορρόπηση σε φώσφορο επιτυγχάνεται κυρίως με την προσθήκη ιόντων PO_4^{3-} .

4.2.4.4 Τοξικές ουσίες

Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί και κυρίως οι μεθανογόνοι, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε αρκετές ουσίες. Η παρεμπόδιση των μεθανογόνων έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή μεθανίου και την αύξηση της συγκέντρωσης των πτητικών οξέων. Μεταξύ των ουσιών που παρεμποδίζουν ή και ακόμα σταματούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι οι εξής:

Οξυγόνο

Οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είναι αυστηρά αναερόβιοι και συνεπώς επηρεάζονται αρνητικά ακόμα και από ίχνη οξυγόνου.

Αμμωνία

Η αμμωνία στη μη ιονισμένη μορφή της (NH_3), είναι πολύ τοξική για τα μεθανογόνα βακτήρια. Παρ' όλα αυτά, μικρή τοξικότητα παρατηρείται σε ουδέτερα pH (το ποσοστό της μη ιονισμένης αμμωνίας είναι μεγαλύτερο σε υψηλότερο pH). Η αμμωνία αρχίζει να δρα παρεμποδιστικά για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς, σε συγκεντρώσεις 1500-3000 mg/l και $\text{pH} > 7.4$, ενώ πάνω από 3000 mg/l είναι τοξική για κάθε τιμή του pH.

Ανώτερα λιπαρά οξέα

Τα ανώτερα λιπαρά οξέα (π.χ. λαουρικό, μυριστικό, ολεϊκό κ.λ.π.) παρεμποδίζουν τη δραστικότητα των οξικοχρηστικών μεθανογόνων βακτηρίων. Οι Hanaki et al., 1981, διεξήγαγαν κινητικά πειράματα διαλείποντος έργου με εγκλιματισμένη σε πλήρες γάλα αναερόβια καλλιέργεια και με υπόστρωμα μείγμα ανώτερων λιπαρών οξέων. Παρατήρησαν ότι έπειτα από την προσθήκη της τροφοδοσίας αναστελλόταν για λίγες ώρες η παραγωγή μεθανίου από οξικό οξύ και μειωνόταν ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου από υδρογόνο, ενώ δεν επηρεαζόταν ο ρυθμός αποδόμησης της γλυκόζης.

Βαρέα μέταλλα

Τα βαρέα μέταλλα (π.χ. Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{6+}) που βρίσκονται σε βιομηχανικά κυρίως απόβλητα, είναι παρεμποδιστικά για την αναερόβια χώνευση. Η ακολουθία των βαρέων μετάλλων ως προς την έκταση της παρεμπόδισης που προκαλούν είναι η εξής: $\text{Ni} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Cr} > \text{Pb}$. Η τοξικότητα αυτών των μετάλλων μειώνεται όταν ακολουθεί αντίδραση με το υδρόθειο (H_2S) η οποία οδηγεί στο σχηματισμό αδιάλυτων θειούχων ιζημάτων. Παρ' όλα αυτά, όπως έχει αναφερθεί, ορισμένα βαρέα μέταλλα (π.χ. Ni, Co και Mo) είναι απαραίτητα σε ίχνη για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες

Οι χλωριωμένοι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες είναι τοξικοί για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς. Ειδικά το χλωροφόρμιο (CH_3Cl) είναι πολύ τοξικό και οδηγεί σε πλήρη παρεμπόδιση του μεταβολισμού των μεθανογόνων βακτηρίων όταν η συγκέντρωσή του υπερβεί το 1 mg/l.

Αρωματικές ενώσεις

Καθαρές καλλιέργειες μεθανογόνων (π.χ. *Methanotrix concilii*, *Methanobacterium espanolae*, *Methanobacterium bryantii*) παρεμποδίζονται από αρωματικές ενώσεις (π.χ. βενζόλιο, τολουόλιο, φαινόλες). Η σχετική τοξικότητα των φαινολικών ενώσεων για τη μεθανογένεση έχει ως εξής: νιτροφαινόλες>χλωροφαινόλες>υδροξυφαινόλες.

Φορμαλδεΐδη

Τα μεθανοβακτήρια παρεμποδίζονται σημαντικά όταν εκτίθενται σε συγκέντρωση φορμαλδεΐδης (HCHO) της τάξεως των 100 mg/l. Παρ' όλα αυτά η λειτουργία τους αποκαθίσταται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις φορμαλδεΐδης.

Θειούχα και θειικά ανιόντα (HS^- , HS^{2-} , SO_4^{2-})

Το υδρόθειο (H_2S) και γενικότερα τα θειούχα ανιόντα (HS^- , S^{2-}) είναι από τους πιο ισχυρούς παρεμποδιστές της αναερόβιας χώνευσης. Επειδή η διάχυση μέσα από την κυτταρική μεμβράνη είναι πιο γρήγορη για τα αδιάστατα μόρια απ' ότι για τα ιονισμένα, η τοξικότητα του υδροθείου εξαρτάται από το pH. Το υδρόθειο είναι τοξικό για τα μεθανογόνα βακτήρια όταν η συγκέντρωσή του είναι μεγαλύτερη από 150-200 mg/l. Τα οξεογόνα βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στο υδρόθειο (H_2S) απ' ότι τα μεθανογόνα.

4.2.4.5 Οργανική φόρτιση και υδραυλικός χρόνος παραμονής αναερόβιων συστημάτων επεξεργασίας

Ο ρυθμός με τον οποίο το οργανικό υλικό παρέχεται σε ένα αναερόβιο χωνευτήρα έχει καθοριστική σημασία όσον αφορά τη διασφάλιση της σταθερότητας στη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης. Επιβολή μεγάλων ρυθμών παροχής οργανικού υλικού μπορεί να επιφέρει συσσώρευση πτητικών λιπαρών οξέων και αποτυχία του συστήματος επεξεργασίας.

Ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT) ενός χωνευτήρα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος, ώστε να επιτρέπει στα αναερόβια βακτήρια να ολοκληρώσουν το μεταβολισμό τους και να πολλαπλασιαστούν. Συνεπώς η τιμή του εξαρτάται κυρίως από τα επιμέρους χαρακτηριστικά του αποβλήτου και από τον τύπο του χωνευτήρα (Bitton, 1994). Οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί οι οποίοι κατ' εξοχήν επηρεάζονται από τον υδραυλικό χρόνο παραμονής είναι τα μεθανογόνα και οξικογόνα βακτήρια (Zhang and Noike, 1994). Σε γενικές γραμμές, τυπικές τιμές υδραυλικού χρόνου παραμονής για χωνευτήρες που η λειτουργία τους βασίζεται σε ανάπτυξη βακτηρίων προσκολλημένων σε κάποιο μέσο είναι 1-10 ημέρες. Οι χωνευτήρες των οποίων η λειτουργία βασίζεται σε ανάπτυξη αιωρούμενων βακτηρίων σε υγρό μέσο λειτουργούν σε μεγαλύτερους υδραυλικούς χρόνους παραμονής (10-60 ημέρες) (Bitton, 1994).

4.2.4.6 Εγκλιματισμός αναερόβιας βιομάζας

Πλήρως εγκλιματισμένη (ή προσαρμοσμένη) σε ένα υπόστρωμα, είτε αυτό είναι συνθετικό είτε πραγματικό απόβλητο, μπορεί να χαρακτηριστεί μία ετερογενής αναερόβια μικροβιακή καλλιέργεια η οποία έχει τροφοδοτηθεί με το συγκεκριμένο υπόστρωμα για διάστημα ίσο και μεγαλύτερο από δώδεκα (12) χρόνους παραμονής (Toerien et al., 1967).

Οι Chynoweth και Mah (1971) επισήμαναν ότι ο εγκλιματισμός μιας ετερογενούς αναερόβιας καλλιέργειας οδηγεί σε φυσική επιλογή και τελικά σε

επικράτηση πληθυσμού μικροοργανισμών διαφορετικού από αυτόν στην αρχική καλλιέργεια.

Οι Breure et al., (1986a, b) μελέτησαν την οξεογένεση της γλυκόζης και της ζελατίνης στους 30 °C και σε διάφορες τιμές pH σε αναερόβιους χημοστάτες ($D=0.12 \text{ h}^{-1}$) οι οποίοι ήταν προσαρμοσμένοι σε ζελατίνη και γλυκόζη αντίστοιχα, αφού είχε προηγηθεί εμβολιασμός τους με ενεργό ιλύ από βιολογικό καθαρισμό. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στον εγκλιματισμένο σε γλυκόζη χημοστάτη, η αποδόμηση της ζελατίνης προχωρούσε μέχρι και 30 % ενώ στον εγκλιματισμένο σε ζελατίνη χημοστάτη η αποδόμηση της γλυκόζης ήταν πλήρης.

Οι Sorensen et al., (1991) ανέφεραν ότι θερμοφιλή αναερόβια λάσπη εγκλιματισμένη σε γαλακτικό οξύ αναπτύσσει μία σαφώς βελτιωμένη ικανότητα για αποδόμησή του σε σχέση με μη προσαρμοσμένη αναερόβια καλλιέργεια. Η εγκλιματισμένη καλλιέργεια προήλθε από χωνευτήρα ο οποίος επεξεργαζόταν λάσπη από πρωτοβάθμια καθίζηση, έπειτα από τροφοδότησή της με συνθετικό μέσο, πλούσιο σε γαλακτικό οξύ, για χρονικό διάστημα 181 ημερών και με υδραυλικό χρόνο παραμονής 13 ημέρες.

4.2.5 Συστήματα αναερόβιας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων

4.2.5.1 Γενικά

Η επιλογή των κατάλληλων διατάξεων και βιοαντιδραστήρων παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική λειτουργία της αναερόβιας διεργασίας. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί διάφοροι τύποι χωνευτήρων και διατάξεων αναερόβιας επεξεργασίας βιολογικής λάσπης και αποβλήτων. Η τελική επιλογή του συστήματος με το οποίο θα γίνει η επεξεργασία ενός συγκεκριμένου αποβλήτου δεν είναι μόνο συνάρτηση οικονομικών παραγόντων (κόστος κατασκευής και λειτουργίας) αλλά εξαρτάται κυρίως από τα χαρακτηριστικά του αποβλήτου (οργανικό φορτίο,

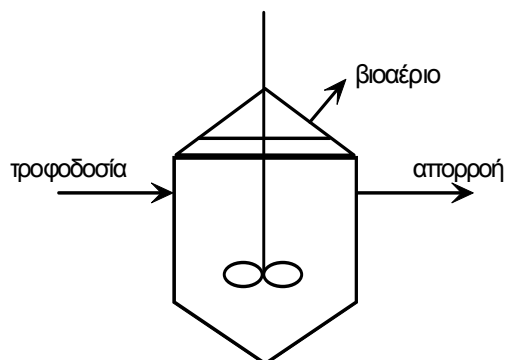
συγκέντρωση στερεών, παρουσία τοξικών ουσιών). Ο Lettinga (1995), προσδιόρισε τις εξής πέντε συνθήκες που πρέπει να πληρεί ένα αποδοτικό αναερόβιο σύστημα:

- Υψηλή κατακράτηση βιομάζας στον αντιδραστήρα κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του.
- Μεγάλη (επαρκή) επαφή μεταξύ βιομάζας και υποστρώματος (αποβλήτου).
- Υψηλοί ρυθμοί αντίδρασης και έλλειψη περιορισμών από φαινόμενα μεταφοράς.
- Ικανότητα εγκλιματισμού της βιομάζας σε διάφορους τύπους αποβλήτων.
- Επικράτηση ευνοϊκών περιβαλλοντικών παραγόντων για όλους τους μικροοργανισμούς στις διάφορες λειτουργικές συνθήκες.

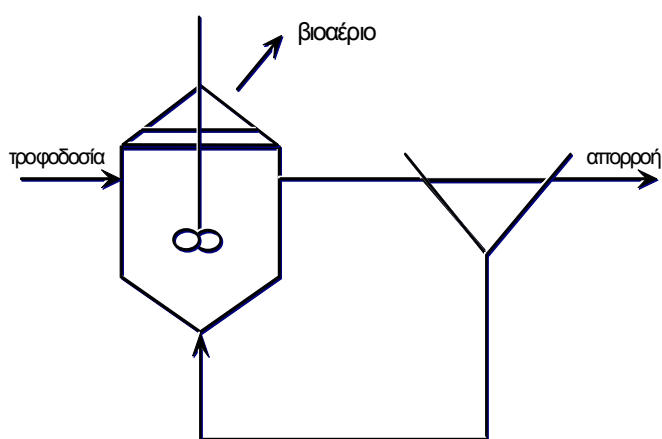
Γενικά υπάρχουν δύο διαδεδομένοι τύποι αναερόβιων χωνευτήρων. Διακρίνουμε τους **συμβατικούς** και τους **ταχύρρυθμους** αναερόβιους χωνευτήρες.

4.2.5.2 Συμβατικές διατάξεις αναερόβιας χώνευσης

Οι συμβατικοί αναερόβιοι χωνευτήρες είναι από κατασκευαστική άποψη οι απλούστεροι τύποι βιοαντιδραστήρων. Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται αιωρούμενοι μέσα στο υγρό μέσο και η ομοιογένεια της υγρής φάσης επιτυγχάνεται με μηχανική ανάδευση (Σχήμα 4.4α). Σε αυτά τα συστήματα ο χρόνος παραμονής στερεών (και κατά συνέπεια μικροοργανισμών) είναι ο ίδιος με τον υδραυλικό χρόνο παραμονής, οπότε δεν υπάρχει δυνατότητα επιβολής υψηλών ρυθμών αραίωσης. Για να μην υπάρχει λοιπόν υψηλή απομάκρυνση βιομάζας από τον αντιδραστήρα, προτάθηκε σύστημα με ανακυκλοφορία αυτής (Σχήμα 4.4β).



Σχήμα 4.4α: Συμβατικός αναερόβιος χωνευτήρας χωρίς ανακυκλοφορία

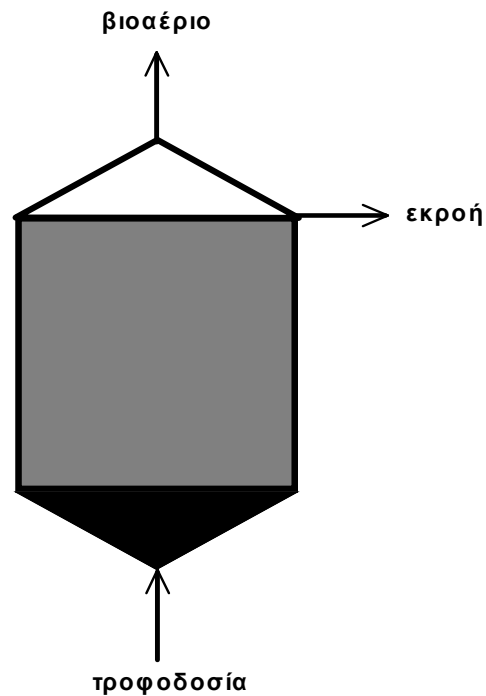


Σχήμα 4.4β: Συμβατικός αναερόβιος χωνευτήρας με ανακυκλοφορία

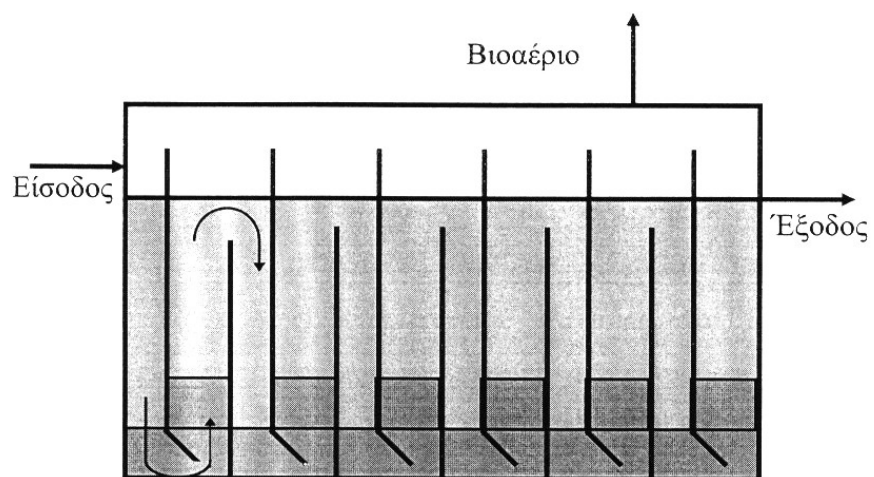
4.2.5.3 Ταχύρρυθμες διατάξεις αναερόβιας χώνευσης

Οι χωνευτήρες ταχύρρυθμης αναερόβιας επεξεργασίας επιτυγχάνουν υψηλό ρυθμό αποδόμησης υποστρώματος ανά μονάδα όγκου. Είναι εφοδιασμένοι με συστήματα κατακράτησης των αιωρούμενων στερεών, ανάδευσης και ανακυκλοφορίας λάσπης. Διακρίνουμε δύο τύπους ταχύρρυθμων αναερόβιων χωνευτήρων: χωνευτήρες, η λειτουργία των οποίων βασίζεται (α) στην ανάπτυξη αιωρούμενων σε υγρό μέσο μικροοργανισμών (υβριδικοί) και (β) στην ανάπτυξη προσκολλημένων σε στερεά επιφάνεια μικροοργανισμών. Αντιπροσωπευτικοί αντιδραστήρες του τύπου (α) είναι ο αντιδραστήρας ανοδικής ροής μέσα από κλίνη λάσπης (UASBR, Σχήμα 4.5α) και ο αντιδραστήρας εναλλασσόμενης καθοδικής και ανοδικής ροής (ABR, Σχήμα

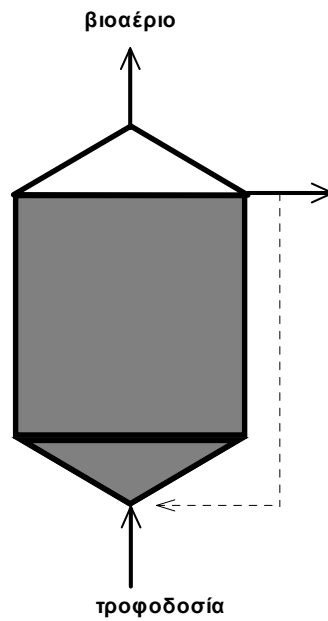
4.5β) ενώ ταχύρρυθμα συστήματα του τύπου (β) είναι το αναερόβιο φίλτρο ανοδικής (Σχήμα 4.6α) και καθοδικής ροής (Σχήμα 4.6β) και η αναερόβια διάταξη ρευστοστερεάς κλίνης.



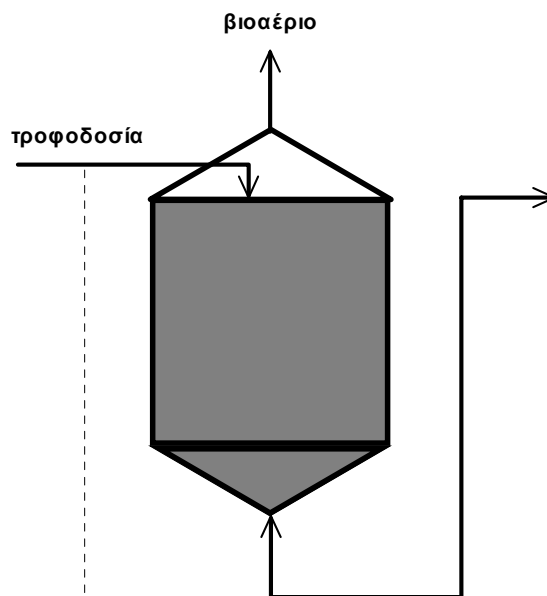
Σχήμα 4.5α: Αναερόβιος αντιδραστήρας ανοδικής ροής μέσω στρώματος ιλύος



Σχήμα 4.5β: Αναερόβιος αντιδραστήρας με ανακλαστήρες



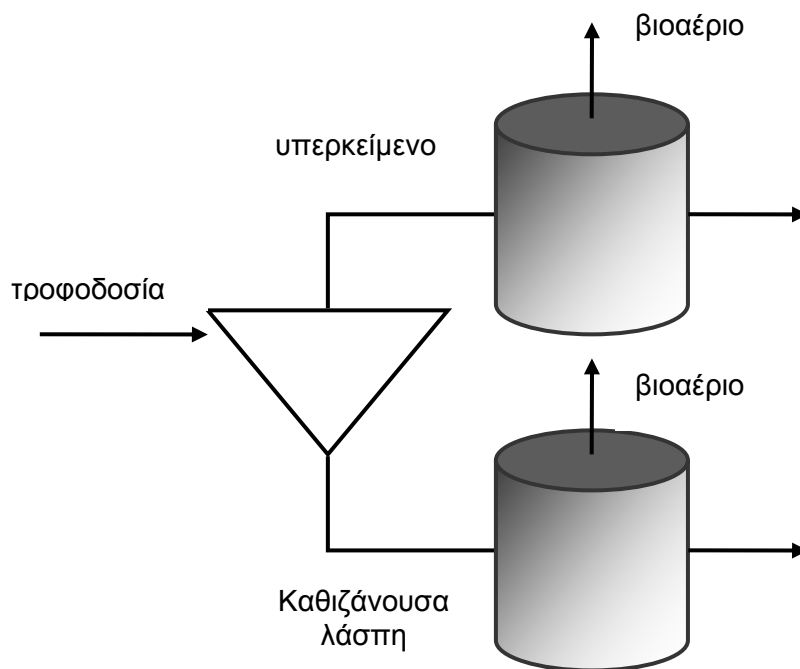
Σχήμα 4.6α: Αναερόβια φίλτρα ανοδικής ροής



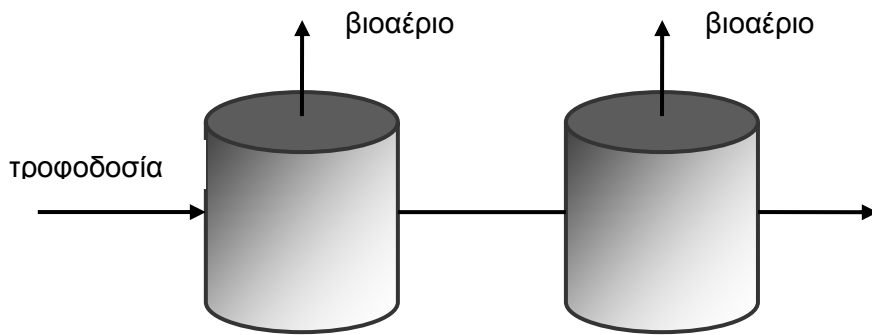
Σχήμα 4.6β: Αναερόβια φίλτρα καθοδικής ροής

Σε μια μονάδα αναερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ένας χωνευτήρας είτε συνδυασμός δύο ή περισσότερων χωνευτήρων. Στη δεύτερη περίπτωση, ανάλογα με τη διάταξη που χρησιμοποιείται, διακρίνουμε τις εξής κατηγορίες διεργασιών (Henze and Harremoës, 1983):

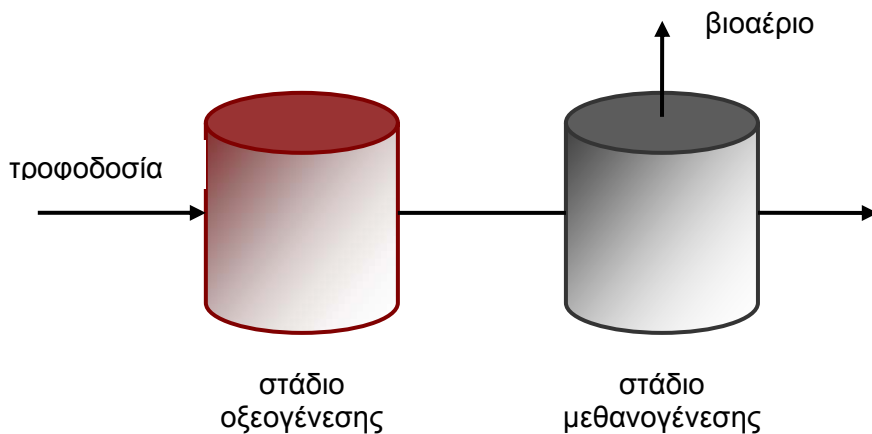
1. τις παράλληλες διεργασίες οι οποίες περιλαμβάνουν δύο ή και περισσότερους αναερόβιους χωνευτήρες οι οποίοι λειτουργούν εν παραλλήλω (Σχήμα 4.7).
2. τις διεργασίες δύο ή περισσότερων σταδίων οι οποίες περιλαμβάνουν δύο ή περισσότερους αναερόβιους χωνευτήρες αντίστοιχα, οι οποίοι είναι διατεταγμένοι σε σειρά (Σχήμα 4.8).
3. τις διεργασίες δύο φάσεων κατά τη διάρκεια των οποίων η οξεογένεση και η μεθανογένεση συντελούνται σε δύο χωριστούς αντιδραστήρες (Σχήμα 4.9). Σε γενικές γραμμές οι διεργασίες δύο φάσεων μειώνουν τον απαιτούμενο συνολικό όγκο αντίδρασης και επιδέχονται καλύτερο έλεγχο.



Σχήμα 4.7: Παράλληλη διεργασία αναερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων



Σχήμα 4.8: Διεργασία δύο σταδίων



Σχήμα 4.9: Διεργασία δύο φάσεων

4.3 Βιοχημικό Δυναμικό Μεθανίου (Biochemical Methane Potential, BMP)

Στο πείραμα προσδιορισμού του βιοχημικού δυναμικού μεθανίου (πείραμα BMP) προσδιορίζεται η δυνατότητα ενός υποστρώματος να αποδώσει βιοαέριο (Owen et al., 1979). Όπως η εκτίμηση του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BAO) προσδιορίζει το οργανικό φορτίο που αποδομείται υπό αερόβιες συνθήκες, έτσι και του βιοχημικού δυναμικού μεθανίου (BMP) προσδιορίζει το κλάσμα του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ) του

αποβλήτου που απομακρύνεται αναερόβια και τον όγκο μεθανίου που παράγεται με την απομάκρυνση αυτή (Speece, 1996).

Η συνεισφορά του υποστρώματος στην παραγωγή μεθανίου ως αποτέλεσμα της αποσύνθεσης του, προσδιορίζεται αφαιρώντας από το συνολικό μεθάνιο που παρήχθη, την τιμή του όγκου του μεθανίου που παρήχθη αποκλειστικά από την αναερόβια καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε (μάρτυρας). Στα «φιαλίδια μικρού όγκου» (serum bottles) προστίθεται ο όγκος του υποστρώματος και γίνεται η μεταφορά της αναερόβιας «μαγιάς» υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες. Αυτό συνήθως πραγματοποιείται σε δύο, τουλάχιστον, επαναλήψεις για κάθε υπόστρωμα που μελετάται.

Ο όγκος του υποστρώματος και η αναλογία της υγρής φάσης με το διαθέσιμο χώρο για την αέρια φάση είναι δύο πολύ σημαντικοί παράμετροι για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, και για το λόγο αυτό επιλέγονται με βάση τις ακόλουθες οδηγίες: (1) να παρέχεται ένα μετρήσιμος, αλλά όχι υπερβολικός όγκος μεθανίου, συνήθως 20-120 ml, (2) να εξασφαλίζεται η παρουσία των θρεπτικών, και (3) να εξαλείφεται η πιθανότητα της τοξικότητας του υποστρώματος. Για οργανικά που αποδομούνται εύκολα και δεν παρουσιάζουν κάποια τοξικότητα, όπως π.χ. η κυτταρίνη, χρησιμοποιείται συνολικός όγκος υγρού υποστρώματος (ή στερεού δείγματος) ίσος με 2-20 ml που περιέχει 150 mg χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (ΧΑΟ), σε συνολικό όγκο υγρού μέσα στο φιαλίδιο των 160 ml. Το εκτιμώμενο αποδομήσιμο ΧΑΟ διατηρείται σε συγκέντρωση μικρότερη των 2 g/l στο υπόστρωμα που μελετάται. Αυτές οι αναλογίες μπορούν να ρυθμιστούν σε περίπτωση που προβλεφθεί υψηλή τοξικότητα ή χαμηλή αποδομησιμότητα, ενώ όταν δεν είναι διαθέσιμη η εκτιμώμενη αποδομησιμότητα πραγματοποιούνται πολλαπλές αραιώσεις. Όταν αναμένεται χαμηλή παραγωγή βιοαερίου τότε μπορεί να αυξηθεί ο συνολικός όγκος της υγρής φάσης, με σκοπό να ελαττωθεί ο όγκος του κενού χώρου και να βελτιωθεί η ακρίβεια του υπολογισμού του μεθανίου.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, μετράται περιοδικά σε κάθε δείγμα ο όγκος του αερίου μείγματος που παράγεται. Κάθε φορά που γίνεται η μέτρηση, εκτονώνεται ο όγκος του βιοαερίου που έχει παραχθεί με σκοπό να

αποφευχθεί οποιαδήποτε ανεπιθύμητη διαρροή εξαιτίας της υπερβολικής πίεσης που αναπτύσσεται, η οποία κατά γενικό κανόνα εμφανίζεται όταν η διαφορά μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής πίεσης είναι μεγαλύτερη από 0.5 atm. Η ποσοστιαία σύσταση του αέριου μείγματος σε μεθάνιο προσδιορίζεται κάθε φορά που μετράται το βιοαέριο που παράγεται. Η αέρια φάση αναλύεται λαμβάνοντας δείγμα με μια, υψηλής ακριβείας, σύριγγα και οδηγείται στον αέριο χρωματογράφο. Με την ολοκλήρωση του πειράματος, η ποσότητα του παραγόμενου μεθανίου που βρίσκεται στο εσωτερικό του φιαλιδίου προστίθεται στο ήδη παραγόμενο μεθάνιο που έχει ελευθερωθεί κατά τη διάρκεια της επώασης και της δειγματοληψίας, και ο συνολικός όγκος αυτού, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του βιοχημικού δυναμικού μεθανίου (BMP).

Η ακρίβεια του πειράματος εξαρτάται από τη συνεισφορά της αναερόβιας καλλιέργειας σε μεθάνιο και το μεταβολισμό του υποστρώματος. Προκειμένου να αποφευχθεί η συνεισφορά σε μεθάνιο από την αναερόβια καλλιέργεια από την οποία προέρχεται η μαγιά των μικροοργανισμών, θα πρέπει αυτή να διατηρείται σε χαμηλό οργανικό φορτίο.

Η επώαση διαρκεί συνήθως τριάντα ημέρες έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η πλήρης αποσύνθεση των βιοαποδομήσιμων οργανικών. Η διαδικασία αυτή, μειώνει την πιθανότητα να υπάρχουν αποκλίσεις που οφείλονται στους διαφορετικούς ρυθμούς του μεταβολισμού. Κάποια οργανικά υποστρώματα, πιθανόν να απαιτούν περισσότερο χρόνο για εγκλιματισμό.

Το βιοχημικό δυναμικό μεθανίου (BMP) εκφράζεται είτε ανά όγκο δείγματος ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{m}^3$ δείγματος), είτε ανά μάζα δείγματος ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg}$ δείγματος), είτε ανά οργανικό φορτίο δείγματος ($\text{m}^3 \text{CH}_4/\text{kg}$ ΧΑΟ). Στην περίπτωση που εκφράζεται ανά οργανικό φορτίο του δείγματος, είναι δυνατή η απευθείας μεταφορά των αποτελεσμάτων στην αναλογία του οργανικού φορτίου που μετατρέπεται σε μεθάνιο, χρησιμοποιώντας το γεγονός ότι θεωρητικά παράγονται $0.350 \text{ m}^3 \text{CH}_4$ από 1 kg ΧΑΟ (McCarty, 1964).

4.4 Προετοιμασία για την εκτέλεση του πειράματος BMP

4.4.1 Εισαγωγή

Στο υποκεφάλαιο αυτό περιγράφονται αναλυτικά οι διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν πριν την τέλεση του πειράματος BMP ώστε να εξασφαλιστεί η σωστή και επιτυχής διεξαγωγή του.

4.4.2 Υγρές καλλιέργειες μυκήτων

Τα επεξεργασμένα με μύκητες λευκής σήψης απόβλητα ελαιουργείου αποτέλεσαν μερικά από τα υποστρώματα που μελετήθηκαν με το πείραμα του BMP. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες των πέντε διαφορετικών στελεχών μύκητα που είχαμε στη διάθεσή μας, δηλαδή των τεσσάρων στελεχών του είδους *Pleurotus Ostreatus* (PO 22, PO 850412, PO 69, PO p15) και του ενός στελέχους του είδους *Pleurotus Pulmonarius* (PP p5). Αναλυτική περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας των υγρών καλλιεργιών γίνεται στην παράγραφο 3.3.2.4.

Η υγρή καλλιέργεια του κάθε διαφορετικού στελέχους έγινε σε δύο επαναλήψεις προκειμένου το δείγμα που προοριζόταν για τη διεξαγωγή του πειράματος να ληφθεί από όσο το δυνατόν μεγαλύτερο όγκο. Έτσι, το υπόστρωμα θα ήταν πιο αντιπροσωπευτικό και θα εξασφαλιζόταν μεγαλύτερη ακρίβεια. Τέλος, να σημειωθεί ότι οι δέκα, στο σύνολο, υγρές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν την ίδια ημέρα και με το ίδιο απόβλητο ελαιουργείου για να είναι δυνατή η σύγκριση στα χαρακτηριστικά του, μετά την επεξεργασία με τον κάθε μύκητα.

4.4.3 Εγκλιματισμός της αναερόβιας μαγιάς

4.4.3.1 Γενικά

Για να μελετήσουμε τη δράση της αναερόβιας βιολογικής διεργασίας στην επεξεργασία του υγρού αποβλήτου του ελαιουργείου προηγήθηκε ο εγκλιματισμός της αναερόβιας μικροβιακής καλλιέργειας σε διάλυμα γλυκόζης. Πραγματοποιήθηκε εγκλιματισμός δύο διαφορετικών πληθυσμών μεικτής αναερόβιας καλλιέργειας έτσι ώστε να επιλεγεί η πιο «ενεργή», για να αποτελέσει τη μαγιά στους νέους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Η μία καλλιέργεια προερχόταν κατ' ευθείαν από αναερόβιο χωνευτήρα του βιολογικού καθαρισμού της Πάτρας, ενώ η άλλη ήταν μείγμα ιλύος από πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια επεξεργασία.

4.4.3.2 Πειραματική διάταξη εγκλιματισμού αναερόβιας καλλιέργειας

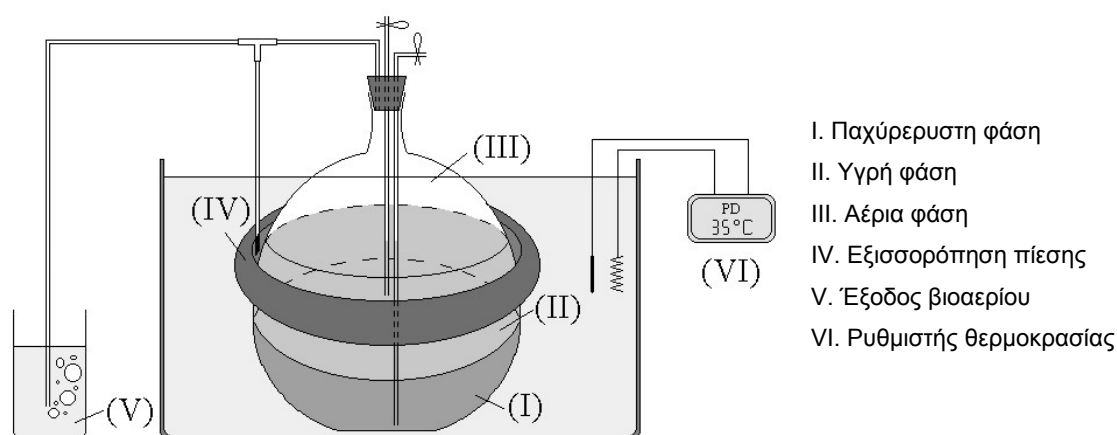
Η διάταξη η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλιματισμό των δύο αναερόβιων καλλιεργείων, αποτελείτο από μια μεταλλική δεξαμενή ορθογώνιου σχήματος (πλάτους 1 m, ύψους 0.5 m και μήκους 1 m), η οποία περιείχε νερό θερμοκρασίας 35 °C, ηλεκτρική αντίσταση (1000 W) και ένα θερμοζεύγος. Η αντίσταση βρισκόταν μόνιμα εμβαπτισμένη στο κέντρο του λουτρού, ενώ η ανάδευση του νερού (για επίτευξη ομοιόμορφης θερμοκρασίας) γινόταν μέσω φυγοκεντρικής αντλίας. Η αντίσταση, το θερμοζεύγος και η αντλία ήταν συνδεδεμένα με ηλεκτρικό κουτί έτσι ώστε σε περίπτωση πτώσης θερμοκρασίας του υδατόλουτρου, ενεργοποιούνταν η αντίσταση και η αντλία, ανεβάζοντας τη θερμοκρασία του λουτρού στους 35 °C. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλιζόταν σταθερή θερμοκρασία στο λουτρό, με ακρίβεια ± 0.2 °C (34.8 °C-35.2 °C).



Φωτογραφία 4.1: Πειραματική διάταξη εγκλιματισμού των αναερόβιων καλλιέργειών

Οι φιάλες στις οποίες πραγματοποιήθηκε ο εγκλιματισμός της αναερόβιας καλλιέργειας ήταν σφαιρικές, συνολικού όγκου 15 l. Ο όγκος της μαγιάς ήταν 8 l και χωριζόταν σε δύο φάσεις: στην παχύρρευστη που αποτελούταν από τον όγκο της μαγιάς που είχε καθιζάνει στον πυθμένα του χωνευτήρα, και στο υπερκείμενο υγρό. Η κάθε φιάλη πωματιζόταν αεροστεγώς με ελαστικό πώμα, μέσα από το οποίο ήταν περασμένα δύο μεταλλικά σωληνάρια διαμέτρου 7 mm. Στο επάνω μέρος αυτών ήταν προσαρμοσμένα λαστιχένια σωληνάρια (από PVC) τα οποία χρησίμευαν για την τροφοδοσία και την απορροή της αναερόβιας καλλιέργειας αλλά και τη διοχέτευση του παραγόμενου βιοαερίου. Το λαστιχένιο σωληνάριο που εξυπηρετούσε τη φυσική ροή του βιοαερίου συνδεόταν με ένα πλαστικό συνδετήρα σχήματος «Υ» και με τον οποίο συνδέονταν δύο σωληνάρια. Η ελεύθερη άκρη του ενός κατέληγε σε δοχείο με νερό, ενώ του δεύτερου συνδεόταν με πλαστική σαμπρέλα. Η σαμπρέλα η οποία αρχικά δεν περιείχε αέρα (είχε αφαιρεθεί υπό κενό), αλλά πολύ γρήγορα γέμιζε με το παραγόμενο βιοαέριο, εξυπηρετούσε διπλό σκοπό: παρείχε ασφάλεια σε περίπτωση ψύξης του λουτρού, καθώς απέτρεπε πιθανή αναρρόφηση του νερού στο εσωτερικό της φιάλης (λόγω δημιουργίας υποπίεσης) και αναπλήρωνε με βιοαέριο τον όγκο του υγρού ο οποίος

απομακρυνόταν συνολικά κατά την καθημερινή τροφοδοσία και τις διάφορες δειγματοληψίες.



Σχήμα 4.10: Πειραματική διάταξη για τη συντήρηση της αναερόβιας μαγιάς

4.4.3.3 Πειραματική διαδικασία εγκλιματισμού αναερόβιας καλλιέργειας

Ποσότητα ίση με 8 l αναερόβιας καλλιέργειας μικροοργανισμών, προερχόμενη από αναερόβιο χωνευτήρα βιολογικού καθαρισμού, μεταφέρθηκε σε φιάλη συνολικού όγκου 15 l (**X1**). Παράλληλα, ποσότητα ίση με 8 l από μείγμα ιλύος προερχόμενη από πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια επεξεργασία, μεταφέρθηκε σε φιάλη συνολικού όγκου 15 l (**X2**). Και οι δύο φιάλες τοποθετήθηκαν σε υδατικό λουτρό σταθερής θερμοκρασίας 35 °C, αφού πρώτα πωματίστηκαν αεροστεγώς και συνδέθηκαν με σαμπρέλα (παράγραφος 4.4.3.2). Η απομάκρυνση του εγκλωβισμένου αέρα έγινε με παροχή (έμφυση) αέριου μείγματος N_2/CO_2 (70/30) στο εσωτερικό μέρος των φιαλών.

Η τροφοδοσία των δύο χωνευτήρων ήταν κοινή και καθημερινή και γινόταν με τον εξής τρόπο: με τη βοήθεια μιας πλαστικής σύριγγας των 100 ml και ενός λαστίχου (από PVC, διαμέτρου 7 mm), απομακρυνόταν με σιφωνισμό όγκος αναερόβιου υγρού ίσος με τον όγκο του προς τροφοδοσία διαλύματος γλυκόζης. Στη συνέχεια, (πάλι με σιφωνισμό) γινόταν η προσθήκη της

τροφοδοσίας. Ο εγκλιματισμός των αναερόβιων μαγιών σε διάλυμα γλυκόζης, άρχισε και για τους δύο χωνευτήρες, με υδραυλικό χρόνο παραμονής 16 ημερών. Στον πίνακα 4.4 δίνονται τα συστατικά της τροφοδοσίας και δίπλα αναγράφεται η συγκέντρωση αυτών.

Πίνακας 4.4: Συστατικά της τροφοδοσίας των αναερόβιων χωνευτήρων X1 και X2

<i>Συστατικά τροφοδοσίας</i>	<i>Συγκέντρωση (g/l ή ml/l)</i>
Γλυκόζη	7.5
Κασεΐνη	1.0
Εκχύλισμα ζύμης	1.0
NaHCO ₃	3.75-5.0
Διάλυμα ιχνοστοιχείων	10
Διάλυμα FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
Διάλυμα (NH ₄) ₂ HPO ₄	10

4.4.3.4 Πορεία εγκλιματισμού αναερόβιων καλλιεργείων σε διάλυμα γλυκόζης

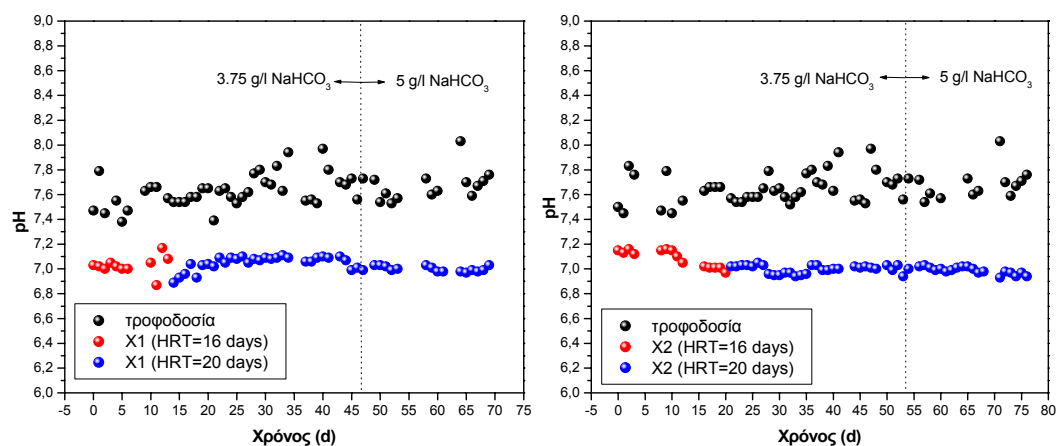
Ο εγκλιματισμός των δύο διαφορετικών καλλιεργείων στο διάλυμα της γλυκόζης, πραγματοποιήθηκε σε αντιδραστήρες των οποίων η λειτουργία ήταν τύπου «εκκένωσης-πλήρωσης» (draw-fill). Καθημερινά αφαιρούνταν από τον κάθε χωνευτήρα ποσότητα αναερόβιας μαγιάς και ίση ποσότητα τροφοδοσίας προσθέτονταν σε αυτούς, ενώ ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση. Η ποσότητα αυτή, εξαρτιόταν κάθε φορά από τον χρόνο παραμονής στον οποίο λειτουργούσε ο χωνευτήρας ενώ τροφοδοσία γινόταν περίπου κάθε 24 ώρες.

Κατά τη διάρκεια της αναερόβιας επεξεργασίας, γινόταν καθημερινή μέτρηση του pH των χωνευτήρων και σχεδόν κάθε ημέρα, γινόταν μέτρηση του

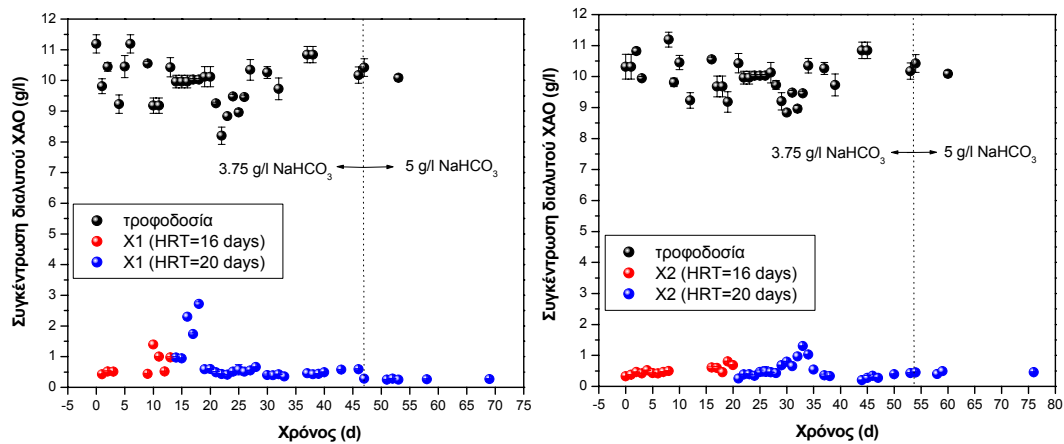
διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ) των απορροών, ώστε να εκτιμάται η πορεία της διεργασίας. Επιπλέον, γίνονταν περιοδικές μετρήσεις του παραγόμενου βιοαερίου και της ποσοστιαίας σύστασης αυτού σε μεθάνιο (CH_4). Η τροφοδοσία χαρακτηριζόταν καθημερινά μετρώντας το pH, και τακτικά, γίνονταν μέτρηση του διαλυτού ΧΑΟ για να συγκρίνεται κάθε φορά η οργανική φόρτιση που προκαλείται στην είσοδο των δύο χωνευτήρων.

Όπως προαναφέρθηκε, η τροφοδοσία των δύο αναερόβιων αντιδραστήρων ήταν κοινή, όσον αφορά τα συστατικά και τη συγκέντρωσή τους. Υπήρχαν, όμως ημέρες για τις οποίες τα χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας του ενός χωνευτήρα διέφεραν ελαφρώς από τα χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας του άλλου. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική ημερομηνία παρασκευής της κάθε τροφοδοσίας.

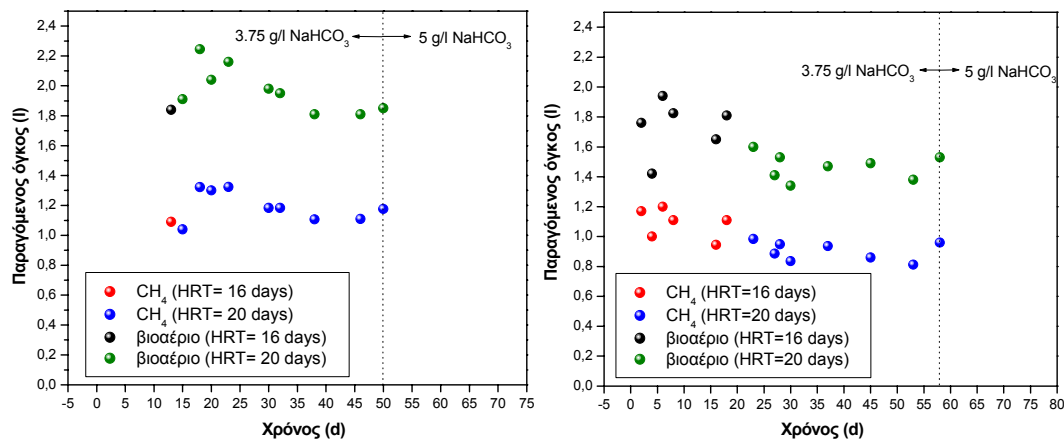
Στα ακόλουθα γραφήματα απεικονίζονται τα χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας και της λειτουργίας των δύο αντιδραστήρων, X1 και X2, κατά τη διάρκεια της αναερόβιας επεξεργασίας.



Γράφημα 4.1 και 4.2: Το pH της τροφοδοσίας των και των αναερόβιων χωνευτήρων X1 και X2, αντίστοιχα



Γράφημα 4.3 και 4.4: Το διαλυτό ΧΑΟ της τροφοδοσίας των και των αναερόβιων χωνευτήρων X1 και X2, αντίστοιχα



Γράφημα 4.5 και 4.6: Παραγόμενος όγκος μεθανίου και βιοαερίου των αναερόβιων χωνευτήρων X1 και X2, αντίστοιχα

Η λειτουργία του αναερόβιου χωνευτήρα X1 διήρκησε συνολικά 69 ημέρες από τις οποίες, τις δύο πρώτες εβδομάδες ο χρόνος παραμονής του ρυθμίστηκε στις 16 ημέρες ενώ τις υπόλοιπες στις 20 ημέρες. Με την έναρξη της επεξεργασίας, το σύστημα παρουσίασε μια σταθερή συμπεριφορά (ΠΛ1) γεγονός αναμενόμενο αφού ως μαγιά χρησιμοποιήθηκε ήδη αναερόβια χωνευμένη λάσπη. Στη συνέχεια όμως, παρουσιάστηκε αστάθεια στην τιμή του pH του χωνευτήρα η οποία συνοδεύτηκε με αύξηση της τιμής της συγκέντρωσης του διαλυτού ΧΑΟ της απορροής.

Στο σημείο αυτό, και για να μην οδηγηθούμε σε αποτυχία του συστήματος αυξήσαμε το χρόνο παραμονής από 16 σε 20 ημέρες, μειώνοντας έτσι την ποσότητα του διαλύματος γλυκόζης (400 ml αντί 500 ml) στην καθημερινή τροφοδοσία του συστήματος. Όπως αναφέρθηκε, ο αντιδραστήρας λειτούργησε με το νέο χρόνο παραμονής μέχρι το πέρας της επεξεργασίας.

Με την επέμβαση αυτή αποκαταστάθηκε ξανά η ευστάθεια στο χωνευτήρα (ΠΛ2). Αυτό όμως πραγματοποιήθηκε με μια μικρή καθυστέρηση η οποία οφείλεται σε πιθανή είσοδο οξυγόνου στον αντιδραστήρα κατά τη διαδικασία της τροφοδοσίας ή της δειγματοληψίας γεγονός που προκάλεσε μείωση στο pH και αύξηση στη συγκέντρωση του διαλυτού ΧΑΟ της απορροής. Η είσοδος οξυγόνου στον αντιδραστήρα προκάλεσε την παρεμπόδιση των μεθανογόνων βακτηρίων που είναι αυστηρά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, και την αναστολή της αναερόβιας επεξεργασίας έως ότου πραγματοποιήθηκε παροχή (έμφυση) αέριου μείγματος N₂/CO₂ (70/30).

Μία νέα όμως διαταραχή παρουσιάστηκε στο σύστημα αφού παρατηρήθηκε κάποια μείωση στην τιμή του pH. Η διαταραχή αυτή αντιμετωπίστηκε με αύξηση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού στην τροφοδοσία, από 3.75 g/l σε 5 g/l. Η αλλαγή αυτή επέφερε τη σταθεροποίηση της παραμέτρου στη βέλτιστη περιοχή τιμών pH, και το σύστημα επανήλθε σε νέα μόνιμη κατάσταση (ΠΛ3) η οποία διήρκησε μέχρι το πέρας της λειτουργίας του χωνευτήρα. Οι συνθήκες και οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν τις τρεις περιόδους λειτουργίας, του συστήματος X1, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.5.

Πίνακας 4.5: Χαρακτηριστικά του συστήματος (X1) σε κάθε περίοδο λειτουργίας (ΠΛ)

	Χρονικό διάστημα (ημέρες)	Χρόνος παραμονής (ημέρες)	ΧΑΟ τροφοδοσίας (g/l)	pH τροφοδοσίας
ΠΛ1	1 ^η – 9 ^η	16	10.41±0.71	7.39±0.28
ΠΛ2	20 ^η – 44 ^η	20	8.95±0.82	7.67±0.14
ΠΛ3	47 ^η – 69 ^η	20	10.25±0.24	7.68±0.12

	Χρόνος παραμονής (ημέρες)	ΧΑΟ απορροής (g/l)	pH απορροής	Όγκος παραγόμενου βιοαερίου (l)	Όγκος παραγόμενου CH ₄ (l)
ΠΛ1	16	0.47±0.05	7.02±0.02		
ΠΛ2	20	0.48±0.08	7.08±0.02	1.99±0.13	1.22±0.09
ΠΛ3	20	0.27±0.01	7.00±0.02	1.85±0.0	1.18±0.0

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

Βλέποντας τον πίνακα, είναι φανερό ότι ο όγκος του παραγόμενου βιοαερίου και η ποσοστιαία σύστασή του σε μεθάνιο (CH₄) διατηρήθηκαν σχετικά σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της αναερόβιας επεξεργασίας του χωνευτήρα.

Ο χωνευτήρας X2 λειτούργησε συνολικά 76 ημέρες αφού ξεκίνησε 7 ημέρες νωρίτερα από τον χωνευτήρα X1. Οι τρεις πρώτες εβδομάδες λειτουργίας είχαν χρόνο παραμονής 16 ημέρες. Στο πρώτο χρονικό διάστημα της αναερόβιας επεξεργασίας (ΠΛ1) το σύστημα υπέδειξε μια σταθερή συμπεριφορά γεγονός αναμενόμενο λόγω του πρότερου εγκλιματισμού του μείγματος σε αναερόβιες συνθήκες. Στη συνέχεια, αισθητή μείωση στο pH, πιθανόν εξαιτίας της συσσώρευσης των πτητικών λιπαρών οξέων στον αντιδραστήρα, παρεμπόδισε τη διεργασία της μεθανογένεσης, προκαλώντας αύξηση στη συγκέντρωση του διαλυτού ΧΑΟ της απορροής.

Στο σημείο αυτό, και για να μην οδηγηθούμε σε αστοχία του συστήματος, αυξήσαμε το χρόνο παραμονής από 16 σε 20 ημέρες, μειώνοντας έτσι την οργανική φόρτιση που δεχόταν καθημερινά ο αντιδραστήρας. Η επέμβαση αυτή βελτίωσε γρήγορα την απόδοση του χωνευτήρα σε αυτή τη νέα περίοδο λειτουργίας (ΠΛ2).

Στις τέσσερις εβδομάδες λειτουργίας του συστήματος παρουσιάστηκε νέα διαταραχή και πιο συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση του διαλυτού ΧΑΟ της απορροής προκαλώντας ταυτόχρονη μείωση στο pH. Η διαταραχή αυτή

προήλθε από πιθανή είσοδο οξυγόνου στον αντιδραστήρα κατά τη διαδικασία της τροφοδοσίας ή της δειγματοληψίας με συνεπακόλουθο την παρεμπόδιση των μεθανοβακτηρίων και την αναστολή της αναερόβιας επεξεργασίας για κάποιο μικρό χρονικό διάστημα. Η σταθερή περίοδος λειτουργίας (ΠΛ3) αποκαταστάθηκε, αφού προηγήθηκε παροχή (έμφυση) αέριου μείγματος N_2/CO_2 (70/30).

Η νέα αυτή ευσταθής περίοδος (ΠΛ3) διατηρήθηκε στο σύστημα έως ότου παρατηρήθηκαν κάποιες διακυμάνσεις κυρίως στις τιμές του pH και της συγκέντρωσης του διαλυτού ΧΑΟ. Για το λόγο αυτό, η συγκέντρωση του $NaHCO_3$ της τροφοδοσίας αυξήθηκε από τα 3.75 g/l στα 5 g/l, προκειμένου να αυξηθεί η αλκαλικότητα του συστήματος διαφυλάσσοντας την τιμή του pH του χωνευτήρα μέσα στα όρια της επιθυμητής περιοχής.

Με την αλλαγή αυτή, νέα σταθερή περίοδος λειτουργίας (ΠΛ4) επήλθε στο σύστημα, η οποία όμως δεν διατηρήθηκε αφού το pH μειώθηκε. μέχρι το τέλος της λειτουργίας του αναερόβιου χωνευτήρα. Τα χαρακτηριστικά του χωνευτήρα στις τέσσερις περιόδους λειτουργίας του, συνοψίζονται στον πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6: Χαρακτηριστικά του συστήματος (X2) στην κάθε περίοδο λειτουργίας (ΠΛ)

	Χρονικό διάστημα (ημέρες)	Χρόνος παραμονής (ημέρες)	ΧΑΟ τροφοδοσίας (g/l)	pH τροφοδοσίας
ΠΛ1	1 ^η – 9 ^η	16	10.42±0.58	7.66±0.18
ΠΛ2	21 ^η – 28 ^η	20	10.04±0.20	7.60±0.08
ΠΛ3	37 ^η – 49 ^η	20	10.42±0.54	7.72±0.16
ΠΛ4	54 ^η – 66 ^η	20	10.25±0.24	7.64±0.08

	Χρόνος παραμονής (ημέρες)	ΧΑΟ απορροής (g/l)	pH απορροής	Όγκος παραγόμενου βιοαερίου (l)	Όγκος παραγόμενου CH ₄ (l)
ΠΛ1	16	0.45±0.05	7.14±0.02	1.74±0.02	1.12±0.09
ΠΛ2	20	0.40±0.07	7.02±0.03	1.51±0.10	0.94±0.05
ΠΛ3	20	0.30±0.06	7.01±0.01	1.48±0.01	0.90±0.05
ΠΛ4	20	0.45±0.05	7.01±0.02	1.53±0.0	0.96±0.0

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

Βλέποντας τον πίνακα, είναι φανερό ότι ο όγκος του παραγόμενου βιοαερίου και η ποσοστιαία σύστασή του σε μεθάνιο (CH₄) διατηρήθηκαν σχετικά σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια της αναερόβιας επεξεργασίας του χωνευτήρα.

Στον πίνακα 4.7 παρουσιάζονται αναλυτικά τα χαρακτηριστικά του αποβλήτου των δύο αναερόβιων αντιδραστήρων, Χ1 και Χ2, την τελευταία ημέρα λειτουργίας του, ημέρα επιλογής της αναερόβιας καλλιέργειας που θα αποτελούσε τη μαγιά στο πείραμα BMP. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι εκείνο το χρονικό διάστημα το σύστημα του χωνευτήρα Χ2 δεν βρισκόταν σε μια σταθεροποιημένη κατάσταση.

Πίνακας 4.7: Χαρακτηριστικά των συστημάτων (Χ1 και Χ2) την τελευταία ημέρα λειτουργίας τους

	Ημέρα λειτουργίας	ΧΑΟ απορροής (g/l)	pH απορροής	ΟΑΣ (g/l)	ΠΑΣ (g/l)	ΟΑΣ/ΠΑΣ (%)
Χ1	69	0.27±0.01	7.03	7.33	4.78	65.52
Χ2	76	0.46±0.02	6.94	1.63	1.38	84.66

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

ΟΑΣ: Ολικά αιωρούμενα στερεά

ΠΑΣ: Πτητικά αιωρούμενα στερεά

4.4.3.5 Παρατηρήσεις και συμπεράσματα

Μετά από 69 και 76 ημέρες χρόνο λειτουργίας των αναερόβιων χωνευτήρων X1 και X2, αντίστοιχα, είχε επιτευχθεί η προσαρμογή των δύο μικροβιακών πληθυσμών σε διάλυμα γλυκόζης. Συνεπώς, έπρεπε να γίνει μία εκτίμηση για το ποια αναερόβια καλλιέργεια ήταν η πιο «ενεργή» και η πιο «σταθερή» σε όλο αυτό το χρονικό διάστημα, για να αποτελέσει τη μαγιά στους νέους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (πείραμα BMP).

Συγκρίνοντας τις δύο μεικτές καλλιέργειες επιλέχτηκε αυτή του χωνευτήρα X1 ως η καταλληλότερη. Στην επιλογή αυτή οδήγησαν οι εξής παράγοντες:

- Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του χωνευτήρα X1, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική αλλαγή όσον αφορά τη συγκέντρωση του διαλυτού ΧΑΟ της απορροής σε αντίθεση με το χωνευτήρα X2.
- Ο δεύτερος αντιδραστήρας (X2) παρουσίαζε μεγάλες διακυμάνσεις στην τιμή του pH αφού για τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα (διάρκειας περισσότερο από τρεις ημέρες), η τιμή του pH ήταν εκτός της επιθυμητής περιοχής για την αναερόβια επεξεργασία.
- Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας των χωνευτήρων, η ημερήσια παραγωγή μεθανίου του αντιδραστήρα X1 κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα έναντι αυτής του X2.
- Η μέτρηση της περιεκτικότητας των δύο χωνευτήρων σε πτητικά αιωρούμενα στερεά (δείκτης για τη βιομάζα του συστήματος) την ημέρα επιλογής της αναερόβιας μαγιάς που θα χρησιμοποιούσαμε (όπως και τις προηγούμενες ημέρες), ήταν μεγαλύτερη στο χωνευτήρα X1 εν συγκρίσει με το X2.
- Η παραγωγή του μεθανίου από το χωνευτήρα X1 ήταν πιο κοντά στα αναμενόμενα επίπεδα με βάση τη μείωση του διαλυτού ΧΑΟ, απ' ό,τι ο χωνευτήρας X2.

Επιλέγοντας την μεικτή καλλιέργεια του χωνευτήρα X1 έναντι αυτής του X2, συνεχίστηκε κανονικά η τροφοδοσία του πρώτου αναερόβιου αντιδραστήρα μέχρι την διεξαγωγή του πειράματος BMP.

4.4.4 Πείραμα διαλείποντος έργου για την επιλογή κατάλληλης ουσίας για την αύξηση της αλκαλικότητας

4.4.4.1 Γενικά

Μετά την επιλογή της αναερόβιας καλλιέργειας που θα αποτελούσε τη «μαγιά» στους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου του πειράματος BMP, σειρά είχε η εύρεση της καταλληλότερης ουσίας (μέσου) για την αύξηση της αλκαλικότητας του υποστρώματος ώστε να ρυθμιστεί το pH στα επιθυμητά για την αναερόβια διεργασία όρια. Όπως προαναφέρθηκε στη θεωρία της αναερόβιας χώνευσης, κατά το στάδιο της οξεογένεσης μεταβολίζονται τα μονομερή, κυρίως προς πτητικά λιπαρά οξέα αλλά και προς αλκοόλες, αμίνες κ.λ.π., με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Τα πτητικά λιπαρά οξέα τα οποία παράγονται κατά την οξεογένεση, τείνουν να χαμηλώσουν το pH του βιοαντιδραστήρα. Κάτω από ομαλές συνθήκες αυτή η μείωση του pH ρυθμίζεται με την αύξηση της αλκαλικότητας του συστήματος. Υπάρχει όμως και το ενδεχόμενο η ρυθμιστική ικανότητα του συστήματος να ανατραπεί με συνέπεια την τελική αποτυχία της διεργασίας. Γι' αυτό ακριβώς το λόγο, η επιλογή του μέσου αυτού αποτελεί ένα σημαντικό βήμα πριν την έναρξη του πειράματος BMP.

4.4.4.2 Πειράματα διαλείποντος έργου

Προκειμένου να επιλεγεί η ουσία που θα χρησιμοποιούσαμε στο πείραμα BMP για την αύξηση της αλκαλικότητας, πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα διαλείποντος έργου (batch) τα οποία διεξήχθησαν παράλληλα και περιγράφονται στη συνέχεια. Τα τρία πειράματα (**Π1**, **Π2**, **Π3**) είχαν κοινό

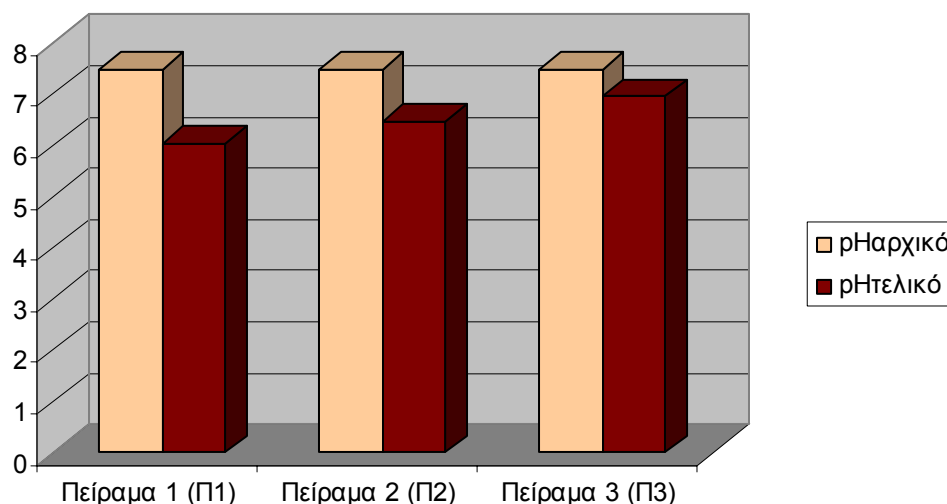
υπόστρωμα ενώ διέφεραν στην ουσία αυτή. Τα πειράματα διάρκεσαν 10 περίπου ημέρες. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται το μέσο αύξησης της αλκαλικότητας που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα.

Πίνακας 4.8: Το μέσο αύξησης της αλκαλικότητας που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα

<i>Πείραμα</i>	<i>Μέσο (ουσία) αύξησης της αλκαλικότητας</i>
Π1	K_2HPO_4
Π2	$NaHCO_3+K_2HPO_4$
Π3	$NaHCO_3$

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.2. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε ακατέργαστο απόβλητο ελαιουργείου ενώ η αναερόβια μικροβιακή καλλιέργεια προερχόταν από τον αναερόβιο χωνευτήρα Χ1 ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε (παράγραφος 4.4.3.4) τροφοδοτούνταν με διάλυμα γλυκόζης για 70 ημέρες περίπου. Στο ξεκίνημα (start-up) των πειραμάτων, η αναερόβια «μαγιά» είχε pH ίσο με 7.07 ενώ το απόβλητο, πριν την προσθήκη των μέσων, είχε pH ίσο με 5.02. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι το απόβλητο είχε προσαρμοστεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αφού προερχόταν από συντήρηση στους 4 °C.

Με το πέρας των δέκα ημερών, και του σταδίου της οξεογένεσης, τα πειράματα έλαβαν τέλος, αφαιρώντας το ελαστικό πώμα. Κατ' ευθείαν, έγινε η μέτρηση του pH του υγρού μείγματος, υπό συνθήκες ανάδευσης με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Το ραβδόγραμμα 4.1 που ακολουθεί αναπαριστά τις τιμές του pH πριν και μετά τη λήξη των πειραμάτων.



Ραβδόγραμμα 4.1: Απεινόνιση του pH του υγρού μείγματος πριν και μετά τη λήξη των πειραμάτων (Π1, Π2, Π3)

Οι πρώτες ημέρες των τριών πειραμάτων, συνοδεύτηκαν από σημαντική παραγωγή υδρογόνου. Αυτό ήταν αναμενόμενο λόγω του σταδίου της οξεογένεσης. Η μεταξύ τους συμπεριφορά άρχισε να διαφέρει μετά την 3η ημέρα.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το K_2HPO_4 (Π1), η τελική τιμή του pH, απέκλινε σημαντικά και στις τρεις επαναλήψεις, από τη βέλτιστη περιοχή. Αυτό επιβεβαιώθηκε από το γεγονός ότι η ποσοστιαία σύσταση σε παραγόμενο υδρογόνο δεν μειώθηκε με την πάροδο των ημερών, και η σύσταση του παραγόμενου μεθανίου παρέμεινε σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Το ίδιο, σε μικρότερο όμως βαθμό, συνέβηκε και στα δείγματα του πειράματος Π2 όπου χρησιμοποιήθηκε K_2HPO_4 και $NaHCO_3$ σε ίσες ποσότητες για τη ρύθμιση του pH. Για όλη τη διάρκεια του πειράματος, η ποσοστιαία σύσταση του παραγόμενου βιοαερίου σε μεθάνιο παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα, ενώ με την πάροδο των ημερών η σύσταση σε υδρογόνο επέδειξε μια σταδιακή μείωση.

Τα δείγματα των οποίων το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε με το NaHCO_3 (Π3), επέδειξαν μια αρκετά καλή συμπεριφορά κατά τη διάρκεια των δέκα ημερών. Η τιμή του pH, δεν απέκλινε, σε καμία επανάληψη, από τη βέλτιστη περιοχή για την αναερόβια διεργασία, γι' αυτό άλλωστε δεν παρεμποδίστηκε η διεργασία. Παράλληλα, με την πάροδο των ημερών, η ποσοστιαία σύσταση σε υδρογόνο μειωνόταν σταδιακά, με ταυτόχρονη αύξηση της ποσοστιαίας σύστασης του παραγόμενου βιοαερίου σε μεθάνιο.

Με βάση τα παραπάνω πειράματα διαλείποντος έργου, είναι φανερό πως η επιλογή του NaHCO_3 για την αύξηση της αλκαλικότητας του υποστρώματος για το πείραμα BMP, είναι η καταλληλότερη. Εξάλλου, θα πρέπει να αναφερθεί ότι και κατά τον εγκλιματισμό της αναερόβιας μικροβιακής καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, είχε γίνει και πάλι η χρήση του NaHCO_3 , αφού είναι το πιο συνηθισμένο μέσο που χρησιμοποιείται για την αύξηση της αλκαλικότητας ενός συστήματος αναερόβιας χώνευσης.

4.5 Πειραματική διάταξη και διαδικασία του πειράματος BMP

Το πείραμα BMP πραγματοποιήθηκε με οκτώ διαφορετικά υποστρώματα, τα οποία αναγράφονται στον πίνακα 4.11.

Πίνακας 4.9: Τα υποστρώματα για τα οποία εφαρμόστηκε το πείραμα BMP

<i>Συμβολισμός</i>	<i>Υποστρώματα</i>
PO 22	Απόβλητο ελαιουργείου επεξεργασμένο με το μύκητα PO 22
PO 850412	Απόβλητο ελαιουργείου επεξεργασμένο με το μύκητα PO 850412
PO 69	Απόβλητο ελαιουργείου επεξεργασμένο με το μύκητα PO 69
PO p15	Απόβλητο ελαιουργείου επεξεργασμένο με το μύκητα PO p15
PP p5	Απόβλητο ελαιουργείου επεξεργασμένο με το μύκητα PP p5
A.E	Ακατέργαστο απόβλητο ελαιουργείου
Αποστ. A.E	Αποστειρωμένο απόβλητο ελαιουργείου
Γλυκόζη	Διάλυμα γλυκόζης γνωστής συγκέντρωσης
Μάρτυρας	Πείραμα μάρτυρα για έλεγχο των παραπάνω

Όπως προαναφέρθηκε στην παράγραφο 4.4.2 πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες με τους αντίστοιχους μύκητες. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν οι καλλιέργειες με τους πιο ανεπτυγμένους μύκητες από τις οποίες απομακρύνθηκαν οι μύκητες με προσεκτικό τρόπο, ώστε να αφαιρεθούν όλες οι υφές τους από το υγρό μέσο (απόβλητο), για να μην προκληθεί αύξηση στη μέτρηση του οργανικού φορτίου. Επιπλέον, κατά την απομάκρυνση του μύκητα δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να αποφευχθεί αφαίρεση των στερεών του υγρού μέσου (αποβλήτου). Το απόβλητο μετά την απομάκρυνση των φαινολικών (υγρό μέσο από τις πέντε καλλιέργειες) αποτέλεσε το υπόστρωμα για να εξεταστεί το βιοχημικό δυναμικό μεθανίου (BMP).

Επιπλέον εξετάστηκε το βιοχημικό δυναμικό μεθανίου του ακατέργαστου αποβλήτου ελαιουργείου και του αποβλήτου ελαιουργείου το οποίο όμως προηγουμένως είχε υποστεί υγρή αποστείρωση (ατμοί) στους 121 °C για 20 λεπτά. Επίσης χρησιμοποιήθηκε γλυκόζη (18 g/l) σε ξεχωριστό πείραμα ως μέσο αναφοράς για τον έλεγχο της ενεργότητας της μαγιάς, αφού η γλυκόζη αποτελεί ένα εύκολα και γρήγορα βιοαποδομήσιμο, μη-τοξικό υπόστρωμα σε αντίθεση με τα υπόλοιπα που αναφέρθηκαν.

Τέλος, ως δείγμα «μάρτυρα» της διεργασίας χρησιμοποιήθηκε η αναερόβια καλλιέργεια που αποτέλεσε τη μαγιά στα προαναφερθέντα δείγματα χωρίς την προσθήκη υποστρώματος. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική αφού χωρίς αυτό δε θα μπορούσαμε να υπολογίσουμε την πραγματική παραγωγή μεθανίου που οφείλεται αποκλειστικά από το εκάστοτε υπόστρωμα.

Η αναερόβια μικροβιακή καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε προερχόταν από τον αναερόβιο χωνευτήρα X1 ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε (παράγραφο 4.4.3.4) ήταν εγκλιματισμένος σε διάλυμα γλυκόζης. Στην εκκίνηση (start – up) του πειράματος, το pH της αναερόβιας μαγιάς ήταν ίσο με 7.26.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 2.4.2. Η ουσία που προστέθηκε στο κάθε υποστρώματος για την αύξηση της αλκαλικότητας ήταν το NaHCO_3 (αυξάνοντας την αλκαλικότητα με τα ιόντα HCO_3^-).

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι πριν την έναρξη του πειράματος πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις τόσο στο κάθε υπόστρωμα όσο και στην αναερόβια μαγιά που χρησιμοποιήθηκε. Έτσι, ήμαστε σε θέση να υπολογίσουμε τις αρχικές συνθήκες του συνολικού μείγματος σε κάθε φιαλίδιο.

4.6 Αποτελέσματα

4.6.1 Αρχικές συνθήκες πειράματος

Οι αρχικές συνθήκες προσδιορίστηκαν πραγματοποιώντας αναλύσεις στο κάθε υπόστρωμα και στην αναερόβια μαγιά που χρησιμοποιήθηκε, που περιελάμβαναν μετρήσεις του pH, των ολικών (ΟΑΣ) και πτητικών (ΠΑΣ) αιωρούμενων στερεών, του διαλυτού και ολικού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ), και της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών.

Επιπλέον, θα πρέπει να αναφερθεί ότι στους πίνακες, στα γραφήματα και τα ραβδογράμματα, θα γίνεται αναφορά στο κάθε μείγμα σύμφωνα σύμφωνα με το συμβολισμό που αναγράφεται στον πίνακα 4.10.

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται τα χαρακτηριστικά του κάθε μείγματος (του υποστρώματος με την αναερόβια μαγιά) συνολικού όγκου 100 ml, πριν την αναερόβια επεξεργασία. Εξάιρεση αποτελεί το δείγμα του μάρτυρα του οποίου ο συνολικός όγκος είναι ίσος με 80 ml.

Πίνακας 4.10: Αρχικά χαρακτηριστικά των μειγμάτων πριν την αναερόβια επεξεργασία

	pH	Διαλυτό ΧΑΟ (g/100ml)	Ολικό ΧΑΟ (g/100ml)	ΟΑΣ (g/100ml)	ΠΑΣ (g/100ml)	Φαινολικά (g/100ml)
PO 69	7.4-7.5	1.919±0.051	3.762±0.132	1.728	1.489	0.058±0.003
PO 850412	7.4-7.5	1.710±0.009	3.882±0.096	1.864	1.563	0.059±0.003
PO p15	7.4-7.5	1.785±0.002	4.158±0.096	1.889	1.596	0.060±0.000
A.E	7.4-7.5	1.383±0.065	3.312±0.09	1.212	1.023	0.185±0.016
Αποστ. A.E	7.4-7.5	1.373±0.037	3.058±0.062	1.212	1.021	0.202±0.017
PP p5	7.4-7.5	1.696±0.044	2.946±0.092	1.320	1.093	0.056±0.006
PO 22	7.4-7.5	1.775±0.002	2.400±0.124	1.000	0.785	0.058±0.001
Μάρτυρας*	7.26	0.087±0.002	0.272±0.008	0.486	0.362	0.002±0.000
Γλυκόζη	7.4-7.5	0.520±0.037	0.705±0.043	0.486	0.362	0.002±0.000

ΠΑΣ: Πτητικά αιωρούμενα στερεά

ΟΑΣ: Ολικά αιωρούμενα στερεά

ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

Μαρτυρας*: οι τιμές των παραμέτρων του δείγματος αυτού που αναγράφονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε όγκο 80 ml.

Το pH των εννέα δειγμάτων κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα και βρίσκεται στην βέλτιστη περιοχή για την αναερόβια επεξεργασία, αφού προηγουμένως ρυθμίστηκε με όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3).

Η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στο δείγμα του ακατέργαστου και αποστειρωμένου αποβλήτου ελαιουργείου βρίσκονται εμφανώς σε υψηλότερα επίπεδα απ' αυτά των βιοεπεξεργασμένων, με μύκητες λευκής σήψης, αποβλήτων. Η συγκέντρωση των φαινολικών στο αποστειρωμένο απόβλητο υπερέχει ελαφρώς έναντι του ακατέργαστου. Αυτό οφείλεται πιθανόν στο μερικό αποπολυμερισμό των ενώσεων αυτών, που έχει σαν αποτέλεσμα να δημιουργούνται περισσότερες οξειδωμένες ρίζες ($\text{OH}\cdot$) που αντιδρούν με το συγκεκριμένο αντιδραστήριο (Folin-Ciocalteu) της μεθόδου προσδιορισμού των φαινολικών (παράγραφος 2.2.5). Ως συνεπακόλουθο μετράται μεγαλύτερη απορρόφηση, αποδίδοντας έτσι υψηλότερη τιμή για τη συγκέντρωση των φαινολικών. Όσον αφορά τα φαινολικά στα απόβλητα που έχουν υποστεί προεπεξεργασία, βλέπουμε ότι κυμαίνονται σχετικά στα ίδια επίπεδα.

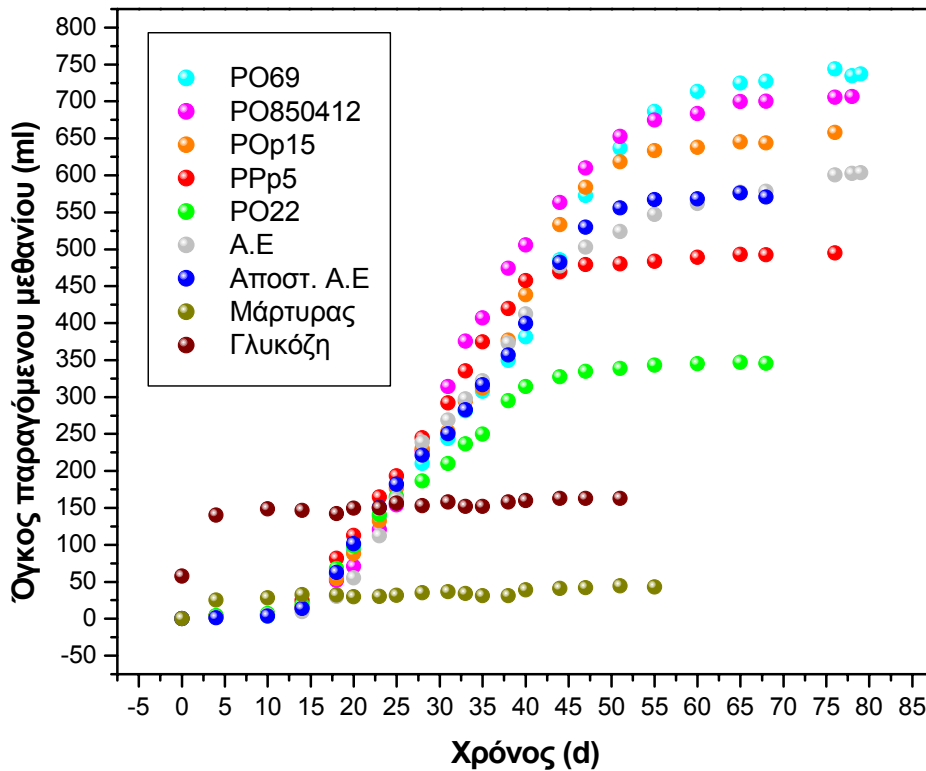
Αξιοσημείωτη είναι η διαφορά που παρουσιάζεται μεταξύ των στερεών (ολικών και πτητικών) των επεξεργασμένων, με μύκητες, αποβλήτων έναντι των μη. Η αύξηση στη συγκέντρωση των στερεών (και συνεπώς του ολικά χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, ΧΑΟ) των βιοεπεξεργασμένων, οφείλεται στην συμπύκνωση που έχουν υποστεί τα υποστρώματα αυτά κατά την ανάπτυξη των μυκήτων. Αυτό παρατηρείται κυρίως στην περίπτωση των αποβλήτων που έχουν επεξεργαστεί με τους μύκητες του είδους *Ostreatus*, PO 69, PO 850412 και PO p15 (όπως αποδείχθηκε στην παράγραφο 3.3, το είδος *Ostreatus* παρουσιάζει μεγαλύτερη πυκνότητα υφών και απορροφά σημαντική ποσότητα υγρού).

Εξαίρεση από την πιο πάνω παρατήρηση αποτελούν η περίπτωση του αποβλήτου που επεξεργάστηκε με το στέλεχος του είδους *Ostreatus*, PO 22, κυρίως, και στη συνέχεια του αποβλήτου που επεξεργάστηκε με το στέλεχος του είδους *Pulmonarius*, PP p5. Παρόλο που το φαινόμενο της συμπύκνωσης του υποστρώματος είναι υπαρκτό κατά την ανάπτυξη των μυκήτων, δεν

παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση στη μέτρηση των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών των αποβλήτων αυτών. Αντίθετα, στην περίπτωση του στελέχους ΡΟ 22 παρατηρήθηκε μείωση. Το γεγονός αυτό επηρέασε και την τιμή του ολικού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ), η οποία είναι μειωμένη σε σύγκριση με τις υπόλοιπες. Η μικρότερη συγκέντρωση των στερεών των αποβλήτων οφείλεται πιθανότατα στην παραγωγή ενζύμων κατά τη διάρκεια της προεπεξεργασίας με τους συγκεκριμένους μύκητες, τα οποία είναι ικανά να υδρολύουν κάποια από τα στερεά του υποστρώματος.

4.6.2 Πορεία παραγωγής του μεθανίου

Στο γράφημα που ακολουθεί φαίνεται η κινητική της παραγωγής του μεθανίου των εννέα διαφορετικών δειγμάτων. Όπως έχει προαναφερθεί στην παράγραφο 4.5, το πείραμα του BMP διεξήχθη σε δύο επαναλήψεις για το κάθε υπό μελέτη υπόστρωμα. Τα σημεία του παραγόμενου όγκου μεθανίου στο γράφημα, αποτελούν τη μέση τιμή των δύο επαναλήψεων.



Γράφημα 4.7: Προφίλ παραγωγής μεθανίου για τα οκτώ δείγματα του πειράματος BMP (βλ. πίνακα 4.10 για το συμβολισμό των δειγμάτων)

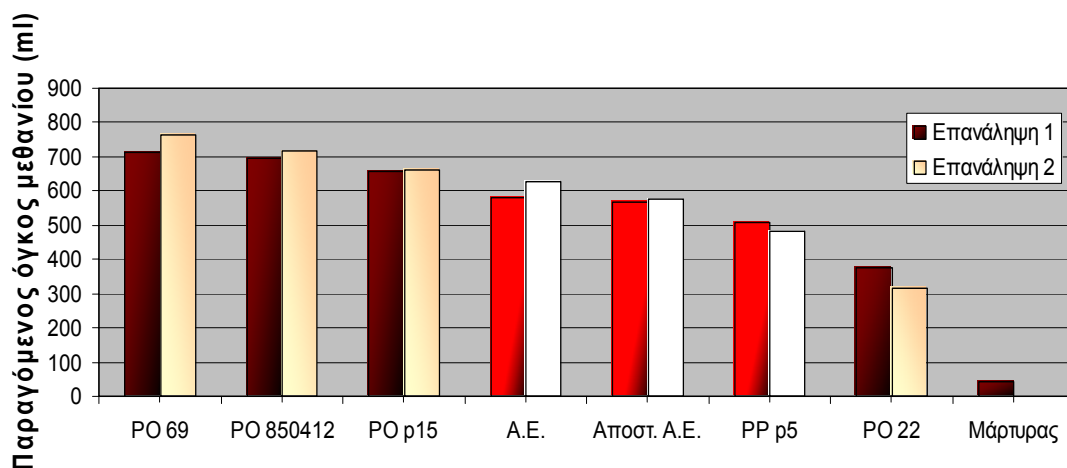
Από το πιο πάνω γράφημα είναι φανερό ότι η κινητική των δειγμάτων διαφέρει όπως και η χρονική διάρκεια της παραγωγής του μεθανίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλα δείγματα η παραγωγή του μεθανίου παρουσιάζει αρκετά καλή επαναληψιμότητα.

Όλες οι περιπτώσεις εκτός της γλυκόζης και του μάρτυρα, εμφανίζουν μια καθυστέρηση (lag phase) στην έναρξη της παραγωγής βιοαερίου, διάρκειας 10-15 ημερών. Το χρονικό αυτό διάστημα αντιστοιχεί στην περίοδο που απαιτείται από την αναερόβια μαγιά να προσαρμοστεί στο σύνθετο υπόστρωμα του αποβλήτου ελαιουργείου. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών στο δείγμα, αυξάνει και η περίοδος εγκλιματισμού. Αυτό αποδίδεται στην παρεμπόδιση που προκαλούν οι ενώσεις αυτές στα μεθανογόνα βακτήρια εξαιτίας της τοξικότητας που παρουσιάζουν.

Άξιο αναφοράς αποτελεί το δείγμα του επεξεργασμένου, με το μήκητα ΡΟ 850412, αποβλήτου, του οποίου ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου παρέμεινε σταθερός και σε υψηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Από το γράφημα 4.7, είναι φανερό ότι ο ρυθμός παραγωγής του ήταν ο μεγαλύτερος εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα. Παρόμοια συμπεριφορά αλλά σε μικρότερο βαθμό, είχε το δείγμα του αποβλήτου που επεξεργάστηκε με το στέλεχος ΡΟ ρ15.

Ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου των δειγμάτων του ακατέργαστου και του αποστειρωμένου αποβλήτου ελαιουργείου είναι σταθερός και κοινός μέχρι την 40η ημέρα, περίπου, όπως φαίνεται στο γράφημα 4.7. Από τη χρονική αυτή στιγμή και έπειτα, παρατηρήθηκε μία μείωση στην περίπτωση του πρώτου ενώ το δεύτερο συνεχίζει την παραγωγή του μεθανίου με τον ίδιο ρυθμό μέχρι το τέλος του πειράματος, δηλαδή, μέχρι και την 50η ημέρα. Το δείγμα του ακατέργαστου αποβλήτου συνεχίζει την παραγωγή με μικρότερο ρυθμό από τον αρχικό μέχρι και την 80η ημέρα. Η διαφορά αυτή οφείλεται προφανώς στη θερμική επεξεργασία που έχει υποστεί το ένα έναντι του άλλου δείγματος. Παρ' όλα αυτά, ο συνολικός παραγόμενος όγκος μεθανίου των δύο αυτών περιπτώσεων κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, με ελαφρύ προβάδισμα στην περίπτωση του μη αποστειρωμένου αποβλήτου.

Ο συνολικός παραγόμενος όγκος μεθανίου φαίνεται καλύτερα στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί (ραβδόγραμμα 4.2), και για τα 18 δείγματα έτσι ώστε να ελεγχθεί η συμφωνία στις δύο επαναλήψεις του κάθε διαφορετικού υποστρώματος.



Ραβδόγραμμα 4.2: Συνολικός παραγόμενος όγκος μεθανίου στα δεκαοκτώ δείγματα του πειράματος BMP

Με βάση το ραβδόγραμμα 4.2, βλέπουμε την πολύ καλή επαναληψιμότητα που έχουμε σε όλα τα δείγματα όσον αφορά το μετρούμενο παραγόμενο μεθάνιο.

Αξιόλογη είναι η παραγωγή μεθανίου του δείγματος με το επεξεργασμένο με το στέλεχος PO 69 του είδους *Ostreatus*, απόβλητο, και του δείγματος του αποβλήτου που επεξεργάστηκε με το στέλεχος του ίδιου είδους, PO 850412. Όπως είδαμε και από το γράφημα 4.7, η παραγωγή του μεθανίου των δειγμάτων του ακατέργαστου και του αποστειρωμένου αποβλήτου, κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα, με ελαφρύ προβάδισμα αυτή του ακατέργαστου αποβλήτου.

4.6.3 Μαθηματική προσομοίωση της παραγωγής μεθανίου

Για την εκτίμηση της κινητικής παραγωγής μεθανίου από τα διαφορετικά υποστρώματα όπως προέκυψαν από την επεξεργασία με διαφορετικό μύκητα και του βιοαποδομήσιμου οργανικού κλάσματος των υποστρωμάτων αυτών, χρησιμοποιήθηκε ένα αρκετά απλό μοντέλο ανάπτυξης μικροβίων με περιορισμό υποστρώματος.

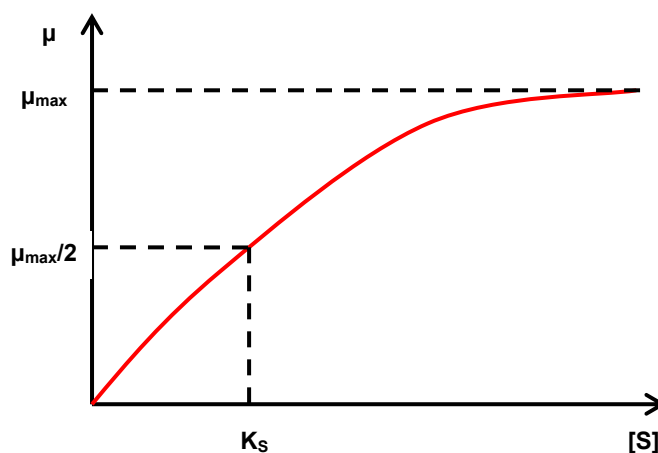
Αναγνωρίζοντας ότι ο ειδικός ρυθμός υποστρώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση του περιοριστικού θρεπτικού συστατικού, του ονομαζόμενου υποστρώματος, υπάρχει μια σειρά από μαθηματικές εκφράσεις του τύπου:

$$r_x = \mu([S], x)x \quad (4.2)$$

Η πιο συνηθισμένη μορφή είναι η μορφή Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} [S]}{K_s + [S]} \quad (4.3)$$

Αν αναλογιστούμε ότι απ' όλες τις καταβολικές και αναβολικές αντιδράσεις υπάρχει μία αντίδραση που καθορίζει και το ρυθμό ανάπτυξης, ότι η αντίδραση αυτή είναι ενζυματική και ότι η συγκέντρωση αυτή της εν λόγω ενζυματικής αντίδρασης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του περιοριστικού θρεπτικού συστατικού, S, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της βιομάζας, x, τότε αν αυτή η αντίδραση χαρακτηρίζεται από ρυθμό τύπου Michaelis-Menten, μπορούμε να συμπεραίνουμε ότι και ο ρυθμός ανάπτυξης του κυττάρου θα δίνεται από μία εξίσωση του τύπου (4.2) όπου $\mu([S], x)$ δίνεται από την σχέση (4.3). Η παράμετρος μ_{\max} ονομάζεται μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και η σταθερά K_s σταθερά κορεσμού. Στο σχήμα 4.11 φαίνεται η εξάρτηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος σύμφωνα με τη σχέση Monod.



Σχήμα 4.11: Monod εξάρτηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης

Γενικά, ο ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος μπορεί να συνδεθεί με τους ρυθμούς σύνθεσης βιομάζας, σύνθεσης εξωκυτταρικών προϊόντων και παροχής της ενέργειας που απαιτείται για σύνθεση και συντήρηση. Η

σύνδεση αυτή γίνεται στοιχειομετρικά αν κάνουμε την παραδοχή της σταθερής στοιχειομετρικής αναλογίας η οποία αντιστοιχεί στην παραδοχή ότι οι πιο πάνω αντιδράσεις μπορούν να θεωρηθούν ως στοιχειώδεις. Στην περίπτωση μας υποθέτουμε αμελητέα χρήση για συντήρηση και ότι όλα τα προϊόντα είναι συσχετιζόμενα με την ανάπτυξη, και έχουμε:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/S}} \quad (4.4)$$

όπου $Y_{x/S}$ είναι ο συντελεστής απόδοσης που συσχετίζει το υπόστρωμα με την κυτταρική μάζα. Με βάση λοιπόν τη σχέση (4.4) καταλήγουμε στο μοντέλο που ακολουθεί που είναι και το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο:

$$r_x = \frac{Y_{x/S} k_m [S]}{K_s + [S]} x \quad (4.5)$$

$$r_s = \frac{-k_m [S]}{K_s + [S]} x \quad (4.6)$$

[S]: η συγκέντρωση του υποστρώματος (εκφρασμένο σε ΧΑΟ)

όπου $k_m = \frac{\mu_{\max}}{Y_{x/S}}$

Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων (k_m και K_s) έγιναν οι εξής παραδοχές:

- 1) Θεωρείται ότι το στάδιο της οξεογένεσης και της οξικογένεσης είναι πάρα πολύ γρήγορα, και τα δύο στάδια που καθορίζουν το ρυθμό παραγωγής μεθανίου είναι της υδρόλυσης και της μεθανογένεσης. Η έκφραση επομένως που προκύπτει για το ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος εμπεριέχει το συνδυασμένο αποτέλεσμα των δύο αυτών σταδίων, καθώς μόνο τα δεδομένα του μεθανίου κατά τη διάρκεια του χρόνου ήταν γνωστά και δεν επέτρεπαν την διάκριση των δύο αυτών σταδίων.
- 2) Ως βιομάζα (X) θεωρείται η συγκέντρωση των μικροοργανισμών που μετατρέπουν το υπόστρωμα (εκφρασμένο σε ΧΑΟ) σε μεθάνιο. Περιλαμβάνει επομένως και τα δύο είδη μεθανογόνων

μικροοργανισμών (υδρογονοχρήστες και οξικοχρήστες). Καθώς στην πραγματικότητα οι δύο αυτοί μικροβιακοί πληθυσμοί έχουν κινητική ανάπτυξης διαφορετικής τάξης μεγέθους (πιο γρήγορα αναπτύσσονται οι υδρογονοχρήστες), ο ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας που χρησιμοποιήθηκε εδώ αντικατοπτρίζει ένα μέσο ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών που ευθύνονται για τη μεθανογένεση.

- 3) Η τιμή του συντελεστή απόδοσης που συσχετίζει το υπόστρωμα με την κυτταρική μάζα ($Y_{x/s}$) θεωρείται ίση με 0.05 (βιβλιογραφία)
- 4) Για τον υπολογισμό του παραγόμενου μεθανίου στο BMP πείραμα (εξίσωση 4.7) αγνοείται η φάση υστέρησης (χρονικό διάστημα κατά το οποίο οι μικροοργανισμοί παράγουν τα κατάλληλα ένζυμα για τη διάσπαση του υποστρώματος) και η προσαρμογή του μοντέλου γίνεται για το χρονικό διάστημα των 14 ημερών μέχρι τις 80 ημέρες.

Κάνοντας τις πιο πάνω παραδοχές είναι φανερό ότι καταλήγουμε σε ένα πολύ απλό μοντέλο.

$$Q = 0.35 \cdot V \cdot \int - \left(\frac{dS}{dt} \right) dt [= ml / day] \quad (4.7)$$

Όπου 0.35 είναι ο όγκος μεθανίου (l) ανά μάζα καταναλισκόμενου ΧΑΟ (g).

Για την εκτίμηση της αρχικής συγκέντρωσης της βιομάζας που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά θεωρήθηκε ότι ο χωνευτήρας X1 από όπου προήλθε, βρισκόταν σε μόνιμη κατάσταση. Για το σκοπό αυτό καταστρώθηκαν ισοζύγια για σύστημα συνεχούς λειτουργίας όπου ισχύει:

$$\text{Είσοδος} - \text{Εξοδος} + \text{Παραγωγή} - \text{Κατανάλωση} = 0$$

Ισοζύγιο υποστρώματος:

$$D(S_o - S_s) - \frac{k_m [S_s]}{K_s + [S_s]} X_s = 0 \quad (4.8)$$

Ισοζύγιο βιομάζας:

$$-D \cdot X_s + \frac{Y_{x/s} k_m [S_s]}{K_s + [S_s]} X_s = 0 \Rightarrow D = \frac{Y_{x/s} k_m [S_s]}{K_s + [S_s]} \quad (4.9)$$

$$\Rightarrow D(S_o - S_s) - \frac{D \cdot X_s}{Y_{x/s}} \rightarrow x = Y_{x/s} (S_o - S_s) \quad (4.10)$$

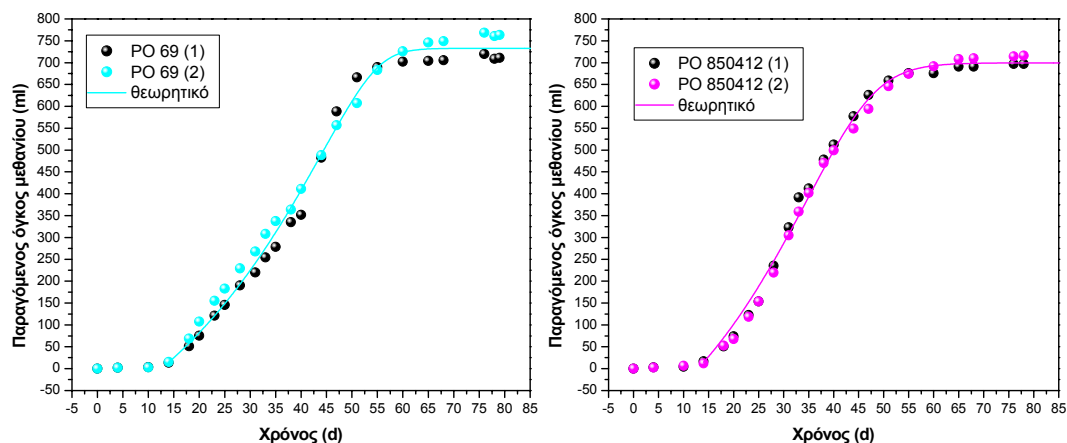
$$S_s = \frac{DK_s}{Y_{x/s} k_m - D} \quad (4.11)$$

Η συγκέντρωση της βιομάζας στην αρχή του πειράματος ήταν ίση με:

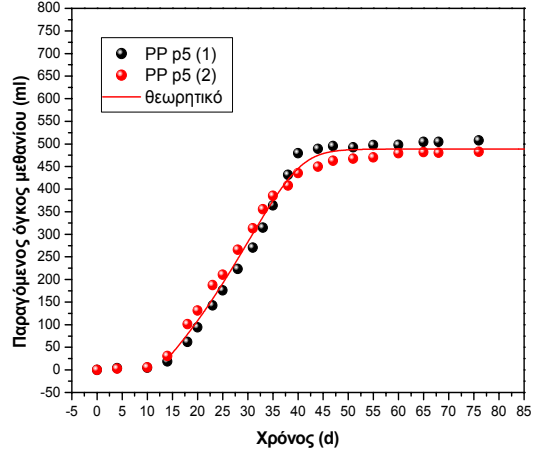
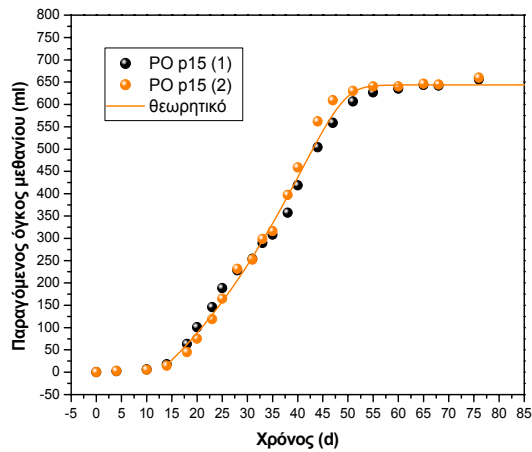
$$X_s = Y_{x/s} (COD_{\text{τροφοδοσίας}} - COD_{\text{εκροη}}) \quad (4.12)$$

$$X_s = Y_{x/s} (10 \text{ g/l} - 1 \text{ g/l}) = 4.5 \text{ g/l}$$

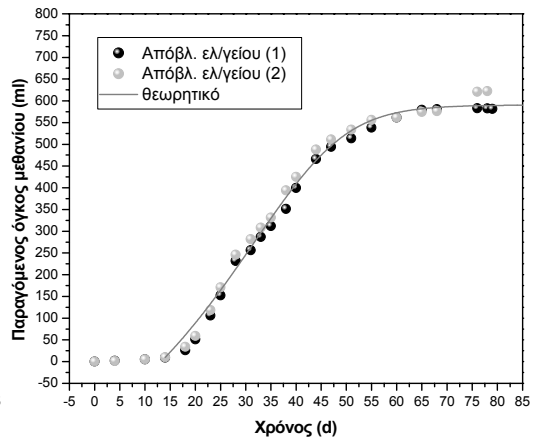
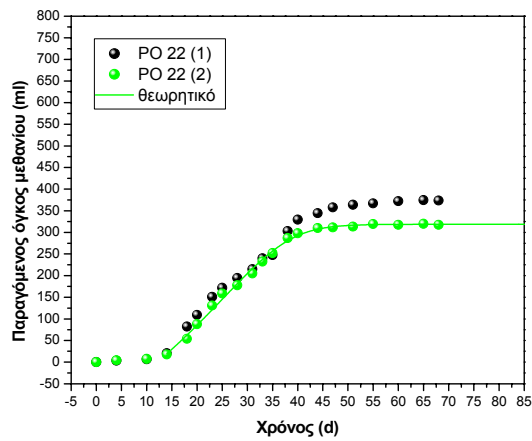
Στα ακόλουθα γραφήματα φαίνεται η πορεία παραγωγής του μεθανίου για τις δύο επαναλήψεις του κάθε δείγματος στο πείραμα BMP και η βέλτιστη πορεία παραγωγής (προσέγγιση των δύο επαναλήψεων) στην οποία βασίζεται το μοντέλο. Εξάιρεση αποτελεί η περίπτωση του υποστρώματος που προκύπτει από την επεξεργασία του αποβλήτου με το μήκητα PO 22 η προσέγγιση έγινε λαμβάνοντας υπόψη μόνο τις πειραματικές μετρήσεις του παραγόμενου μεθανίου της μίας επανάληψης (PO 22 2).



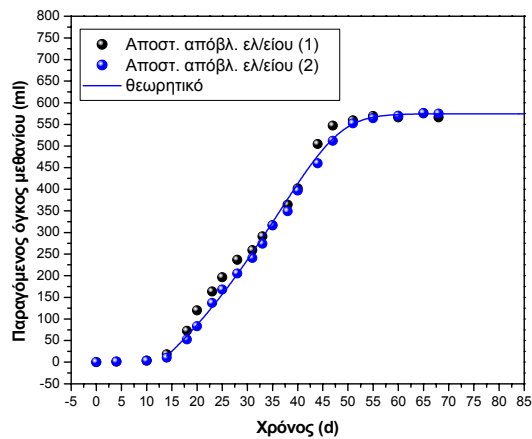
Γράφημα 4.8 και 4.9: Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα PO 69 και για το για το δείγμα PO 850412 (πείραμα BMP)



Γράφημα 4.10 και 4.11: Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα PO p15 και το δείγμα PP p5 (πείραμα BMP)



Γράφημα 4.12-4.13: Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα PO 22 και το δείγμα του αποβλήτου ελαιουργείου (πείραμα BMP)



Γράφημα 4.14: Προφίλ παραγωγής μεθανίου για το δείγμα του αποστειρωμένου αποβλήτου ελαιουργείου (πείραμα BMP)

Με βάση την καμπύλη προσαρμογής («θεωρητική» όπως αναγράφεται στα πιο πάνω γραφήματα) μπορεί να εκτιμηθεί η συγκέντρωση του ΧΑΟ, του προεπεξεργασμένου ήδη αποβλήτου, που μετατράπηκε και στο τέλος απέδωσε μεθάνιο, δηλαδή του βιοδιασπάσιμου ΧΑΟ καθώς μόνο ένα μέρος αυτού μπορεί να διασπαστεί ενώ το υπόλοιπο είναι αδρανές. Αυτό γίνεται λαμβάνοντας υπόψη την τιμή του τελικού παραγόμενου μεθανίου και τη θεωρητική απόδοση (0.35 l CH_4 ανά g ΧΑΟ που μετατρέπεται). Πρέπει να σημειωθεί ότι στις εξισώσεις του μοντέλου, ως υπόστρωμα θεωρούμε το ΧΑΟ του βιοδιασπάσιμου ΧΑΟ του αποβλήτου.

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται οι τιμές της συγκέντρωσης του αρχικού ολικού ΧΑΟ του κάθε δείγματος όπως προκύπτουν από την προεπεξεργασία με τους μύκητες (πριν την έναρξη του πειράματος BMP), καθώς και τιμές της συγκέντρωσης του ολικού ΧΑΟ που μετατράπηκε και στο τέλος και απέδωσε CH_4 , όπως εκτιμήθηκε από το μοντέλο. Με βάση τις δύο αυτές τιμές του κάθε δείγματος υπολογίστηκε το ποσοστό του αρ. ολ. ΧΑΟ που μετατράπηκε και απέδωσε CH_4 . Το ποσοστό αυτό απεικονίζεται και στο ραβδόγραμμα μαζί με το αντίστοιχο μετρούμενο ποσοστό που προέκυψε βάσει την τελική τιμή (μετά την λήξη του πειράματος BMP) του ολ. ΧΑΟ του κάθε δείγματος.

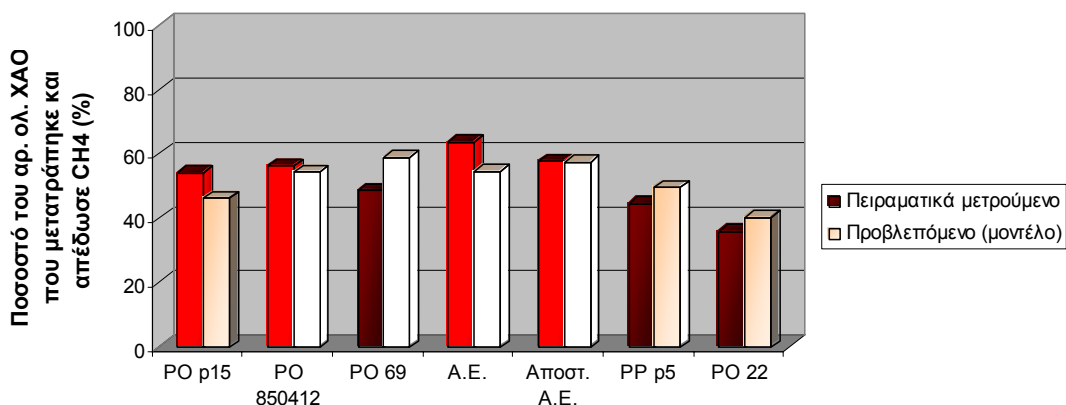
Πίνακας 4.11: Προβλεπόμενες τιμές από το μοντέλο για το μετατρέψιμο ολ. ΧΑΟ και του ποσοστού του αρ. ολ. ΧΑΟ που μετατράπηκε και απέδωσε CH₄ για τα δείγματα μετά την αναερόβια επεξεργασία

	Μετρούμενο αρχικό ολ. ΧΑΟ (g ΧΑΟ/100ml)	Ολ. ΧΑΟ που μετατράπηκε και στο τέλος απέδωσε CH ₄ (g ΧΑΟ/100ml)	Ποσοστό του αρ. ολ. ΧΑΟ που μετατράπηκε και απέδωσε μεθάνιο (%)
PO p15	3.886	1.793±0.035	46.140
PO 22	2.128	0.856±0.019	40.216
PP p5	2.674	1.326±0.031	49.589
PO 69	3.490	2.052±0.046	58.805
PO 850412	3.610	1.957±0.040	54.214
A.E.	3.040	1.660±0.044	54.589
Αποστ. A.E.	2.786	1.601±0.042	57.480

ΧΑΟ Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

A.E: Απόβλητο ελαιουργείου

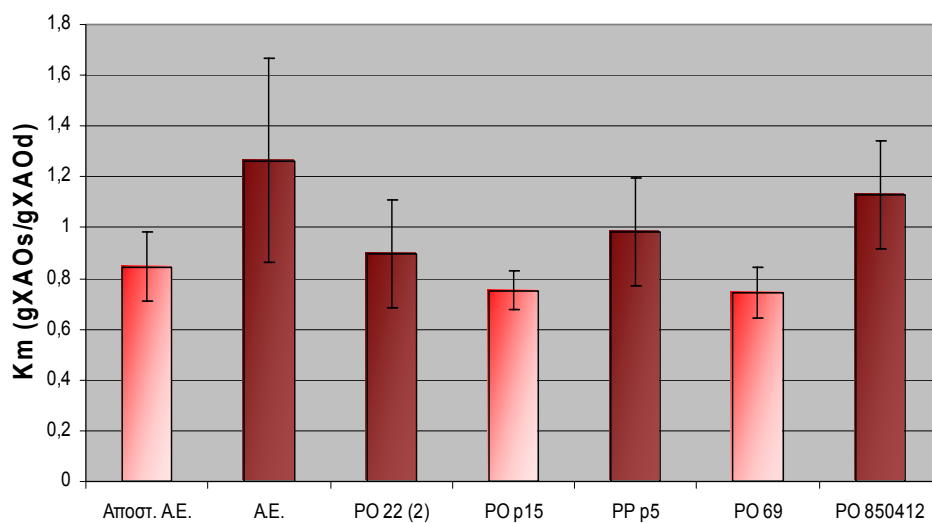
Αποστ. A.E: Αποστειρωμένο απόβλητο ελαιουργείου



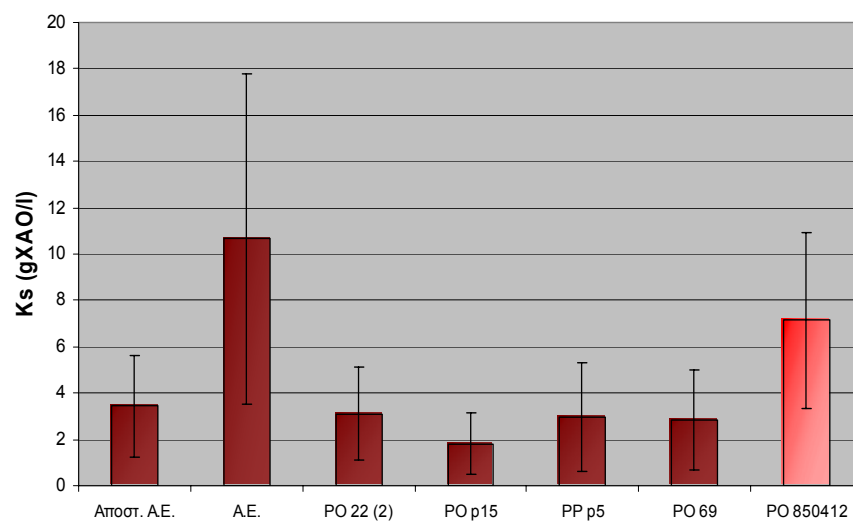
Ραβδόγραμμα 4.3: Προβλεπόμενο από το μοντέλο και πειραματικά μετρούμενο ποσοστό του ολικού ΧΑΟ που μετατράπηκε και απέδωσε μεθάνιο, για τα υπό μελέτη δείγματα του πειράματος BMP

Για τα περισσότερα δείγματα οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές του ποσοστού του ολ. ΧΑΟ που μετατράπηκε και απέδωσε μεθάνιο είναι κοντά στις πειραματικές τιμές. Οι αποκλίσεις που παρουσιάζουν κάποια από τα δείγματα είναι μικρές, της τάξης του 10%.

Τα ραβδογράμματα που ακολουθούν αναπαριστούν με τη σειρά τις κινητικές παραμέτρους k_m και K_s για το κάθε δείγμα ξεχωριστά, που εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Aquasim 2.1, μαζί με το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.



Ραβδόγραμμα 4.4: Προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές των σταθερών k_m για κάθε δείγμα

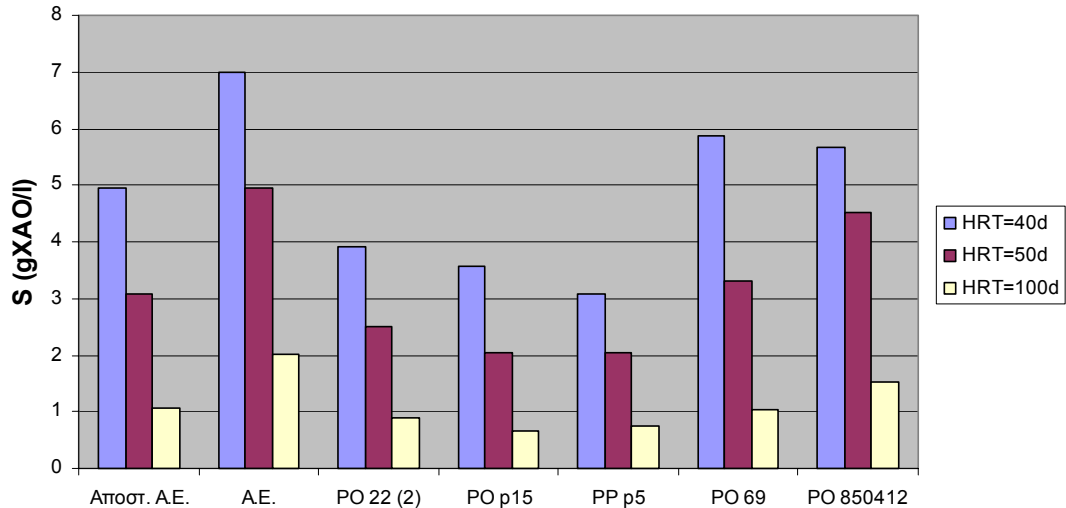


Ραβδόγραμμα 4.5: Προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές των σταθερών K_s για κάθε δείγμα

Είναι φανερό ότι οι τιμές που προβλέπει το μοντέλο για τη σταθερά k_m των δειγμάτων είναι μικρή σε σύγκριση με τις συνηθισμένες τιμές που παίρνει η σταθερά αυτή βάσει της βιβλιογραφίας (με βάση το ADM1-Anaerobic digestion model no.1 έχουμε για τους μεθανογόνους χρήστες του οξικού: $k_m=8$ gXAO/ gXAO/d και $K_s=0.15$ gXAO/l). Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι η αναερόβια μικροβιακή καλλιέργεια ήταν εγκλιματισμένη σε διάλυμα γλυκόζης και όχι στο σύνθετο υπόστρωμα του αποβλήτου του ελαιουργείου με αποτέλεσμα η φάση της υδρόλυσης να είναι εξαιρετικά αργή και να περιορίζει το συνολικό ρυθμό της διεργασίας.

Η τιμή της σταθεράς k_m καθορίζεται κυρίως από τα πρώτα σημεία του γραφήματος που απεικονίζει την παραγωγή του μεθανίου. Τα σημεία εκείνα είναι πολλά σε αριθμό και γι' αυτό το λόγο η τυπική απόκλιση είναι σχετικά μικρή. Αντίθετα, η τιμή της σταθεράς κορεσμού, K_s , προβλέπεται με βάση τα τελευταία σημεία του γραφήματος που αντιπροσωπεύουν το παραγόμενο μεθάνιο των τελευταίων ημερών. Επειδή ο όγκος του μεθανίου που παραγόταν τις μέρες εκείνες ήταν μικρός, η μέτρηση του δεν γινόταν συχνά, με αποτέλεσμα να έχουμε λίγα σημεία για το τελευταίο χρονικό διάστημα. Σε αυτό το λόγο, λοιπόν, αποδίδεται, η μεγάλη τυπική απόκλιση της σταθεράς αυτής.

Για την εκτίμηση της απόδοσης ενός χωνευτήρα συνεχούς λειτουργίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση του ολικού XAO εκροής (gXAO/l) εφαρμόζοντας τη σχέση 4.11 για διάφορους χρόνους παραμονής (40, 50 και 100 ημέρες) χρησιμοποιώντας τις τιμές των κινητικών παραμέτρων που εκτιμήθηκαν από το μοντέλο.



Ραβδόγραμμα 4.6: Συγκέντρωση του ολικού ΧΑΟ στην εκροή χωνευτήρα συνεχούς λειτουργίας (gXAO/l) για τρεις διαφορετικούς χρόνους παραμονής, με βάση τη σχέση 4.11

Παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του ολ. ΧΑΟ του χωνευτήρα είναι σημαντική για χρόνους παραμονής 40 και 50 ημερών, για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν. Μόνο κατά τη λειτουργία σε χρόνο παραμονής 100 ημερών η συγκέντρωση του ολ ΧΑΟ είναι αρκετά μικρή. Μάλιστα, για ορισμένες περιπτώσεις (PO 22(2), PO p15 και PP p5) είναι μικρότερη από 1 g/l. Η απόδοση του συστήματος είναι μικρή και για τους τρεις χρόνους παραμονής. Αυτό οφείλεται στο ότι οι τιμές των κινητικών παραμέτρων που εκτιμήθηκαν αντιστοιχούν σε αργή κινητική (μικρό k_m και μεγάλο K_s) αφού η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μη εγκλιματισμένη στο συγκεκριμένο τύπο αποβλήτου. Έχει όμως σημασία η σύγκριση των προβλέψεων μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων που εξετάστηκαν καθώς όλα τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας την ίδια πηγή βιομάζας.

Μπορούμε να πούμε ότι η αναερόβια χώνευση του υποστρώματος, που προκύπτει από την προεπεξεργασία του αποβλήτου με τους μύκητες PO 69 και PO 850412, μετατρέπει στο λιγότερο βαθμό το ΧΑΟ του χωνευτήρα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην παρεμποδιστική δράση κάποιων ουσιών που παράγονται από τους μύκητες αυτούς με αποτέλεσμα η κινητική κατανάλωσης του υποστρώματος να είναι πιο αργή από τις άλλες περιπτώσεις και το

υπόστρωμα να μην προλαβαίνει να μετατραπεί ικανοποιητικά στο δεδομένο χρόνο παραμονής.

Αντίθετα, η προεπεξεργασία του αποβλήτου με τους μύκητες PO 22, PP p5 και PO p15 οδηγεί σε πιο εκτεταμένη αποδόμηση του ΧΑΟ του αποβλήτου, γεγονός που σημαίνει ότι απάλλαξαν το απόβλητο από τις παρεμποδιστικές ενώσεις (φαινολικές) ενώ δεν παρήγαγαν άλλες τοξικές ενώσεις. Στην επιλογή όμως του μύκητα που θα πρέπει να επιλεγεί για την αποφαινολοποίησή του θα πρέπει να ληφθεί υπόψη αν ο μύκητας καταναλώνει ταυτόχρονα και ΧΑΟ. Αν ο τελικός στόχος είναι η παραγωγή μέγιστου μεθανίου τότε ο μύκητας PO 22 (με τον οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα του κεφαλαίου 3) δεν συνίστανται γιατί το υπόστρωμα που προκύπτει από την προεπεξεργασία με αυτόν, διαθέτει περιορισμένο ΧΑΟ για μετατροπή και παραγωγή μεθανίου.

Ο μύκητας που συνίσταται για την προεπεξεργασία του αποβλήτου ελαιουργείου και στην συνέχεια την αναερόβια χώνευση του υποστρώματος με απώτερο στόχο την παραγωγή μέγιστου βιοαερίου είναι ο μύκητας PO 69, κάτι που θα επιβεβαιωθεί στη συνέχεια. Το υπόστρωμα που προέκυψε από την επεξεργασία με τον μύκητα PO 69 είχε αργή κινητική μετατροπής προς μεθάνιο το οποίο μπορεί να αντιμετωπιστεί με την κατάλληλη προσαρμογή της αναερόβιας βιομάζας. Αν όμως ο στόχος είναι η μείωση του ΧΑΟ χωρίς απαραίτητα την μέγιστη δυνατή παραγωγή του μεθανίου τότε ο μύκητας PO 22 είναι ο κατάλληλος μύκητας αφού επιτυγχάνει αποτοξικοποίηση του αποβλήτου και το υπόστρωμα που προκύπτει έχει γρήγορη κινητική μετατροπής σε μεθάνιο.

4.6.4 Χαρακτηριστικά των δειγμάτων μετά την αναερόβια επεξεργασία

Οι αναλύσεις που έγιναν στην έναρξη του πειράματος για την εύρεση των χαρακτηριστικών των δειγμάτων πριν την αναερόβια επεξεργασία, πραγματοποιήθηκαν και στο τέλος του πειράματος του BMP στα 18 πλέον, δείγματα. Δηλαδή προσδιορίστηκε το pH, τα ολικά (ΟΑΣ) και πτητικά (ΠΑΣ) αιωρούμενα στερεά, το διαλυτό και ολικό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (ΧΑΟ)

και η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών του κάθε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι παράμετροι αυτές αποτελούν τις τελικές συνθήκες του πειράματος, δηλαδή τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων μετά τη λήξη του πειράματος BMP.

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται τα χαρακτηριστικά αυτά που αντιστοιχούν στον ενεργό όγκο του κάθε φιαλιδίου, δηλαδή σε 100 ml.

Πίνακας 4.12: Τελικά χαρακτηριστικά των μειγμάτων μετά την αναερόβια επεξεργασία του πειράματος BMP

	<i>pH</i>	<i>Διαλυτό ΧΑΟ (g/100ml)</i>	<i>Ολικό ΧΑΟ (g/100ml)</i>	<i>ΟΑΣ (g/100ml)</i>	<i>ΠΑΣ (g/100ml)</i>	<i>Φαινολικά (g/100ml)</i>
PO 69 (1)	7.33	1.01±0.01	2.01±0.05	0.91±0.03	7.68±0.16	0.75±0.01
PO 69 (2)	7.37	1.01±0.01	2.00±0.07	0.90±0.02	7.48±0.04	0.76±0.01
PO 850412 (1)	7.54	0.84±0.04	1.77±0.03	0.97±0.05	7.88±0.25	0.67±0.01
PO 850412 (2)	7.49	0.84±0.04	1.79±0.01	0.81±0.01	6.82±0.06	0.68±0.02
PO p15 (1)	7.39	0.83±0.03	1.98±0.02	1.02±0.07	8.51±0.35	0.63±0.01
PO p15 (2)	7.38	0.82±0.03	1.99±0.02	1.02±0.00	8.43±0.01	0.52±0.00
A.E (1)	7.51	0.60±0.02	1.36±0.04	0.61±0.01	5.01±0.02	1.24±0.01
A.E (2)	7.55	0.56±0.06	1.28±0.00	0.64±0.02	5.15±0.11	1.27±0.01
Αποστ. A.E (1)	7.40	0.80±0.03	1.39±0.02	0.63±0.01	5.08±0.08	0.99±0.01
Αποστ. A.E (2)	7.43	0.72±0.06	1.36±0.01	0.63±0.01	4.93±0.04	1.02±0.01
PP p5 (1)	7.50	0.98±0.04	1.66±0.03	0.65±0.01	5.27±0.08	0.44±0.00
PP p5 (2)	7.46	0.97±0.03	1.71±0.04	0.66±0.07	5.36±0.36	0.43±0.01
PO 22 (1)	7.51	0.85±0.02	1.17±0.05	0.51±0.03	3.78±0.15	0.52±0.01
PO 22 (2)	7.47	0.92±0.01	1.56±0.02	0.48±0.05	3.49±0.24	0.58±0.00
Μάρτυρας (1)*	7.22	0.01±0.00	0.16±0.00	0.17±0.00	0.12±0.00	0.00±0.00
Μάρτυρας (2)*						

Γλυκόζη (1)	7.36	0.01±0.00	0.20±0.02	0.24±0.01	1.70±0.00	0.01±0.00
Γλυκόζη (2)	7.35	0.00±0.00	0.19±0.00	0.23±0.00	1.67±0.02	0.01±0.00

ΠΑΣ Πτητικά αιωρούμενα στερεά

ΟΑΣ Ολικά αιωρούμενα στερεά

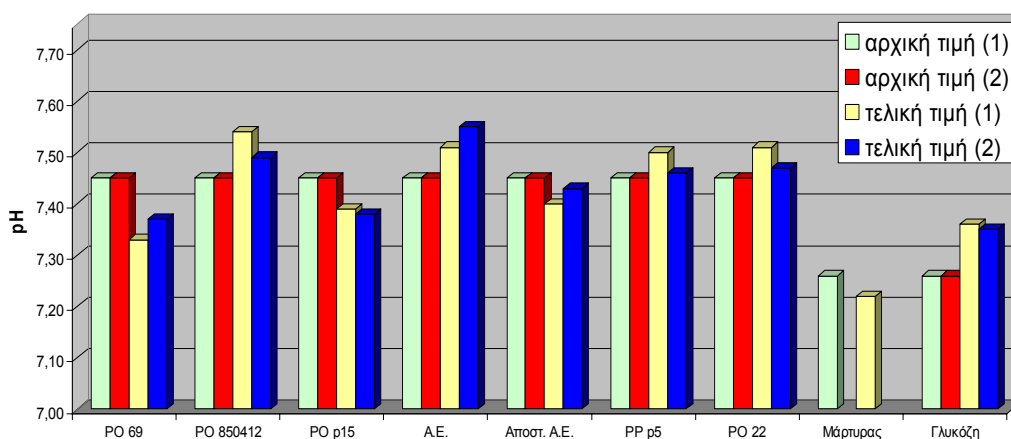
ΧΑΟ: Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

Μάρτυρας*: οι τιμές των παραμέτρων του μάρτυρα που αναγράφονται στον πίνακα αντιστοιχούν σε όγκο 80 ml.

Στον πίνακα, δίπλα από την τιμή της κάθε παραμέτρου, αναγράφεται η τυπική απόκλιση των τριών επαναλήψεων. Βλέποντας τις μέσες τιμές των διαφόρων παραμέτρων για τις δύο επαναλήψεις του κάθε πειράματος, (1) και (2), είναι φανερό ότι κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα.

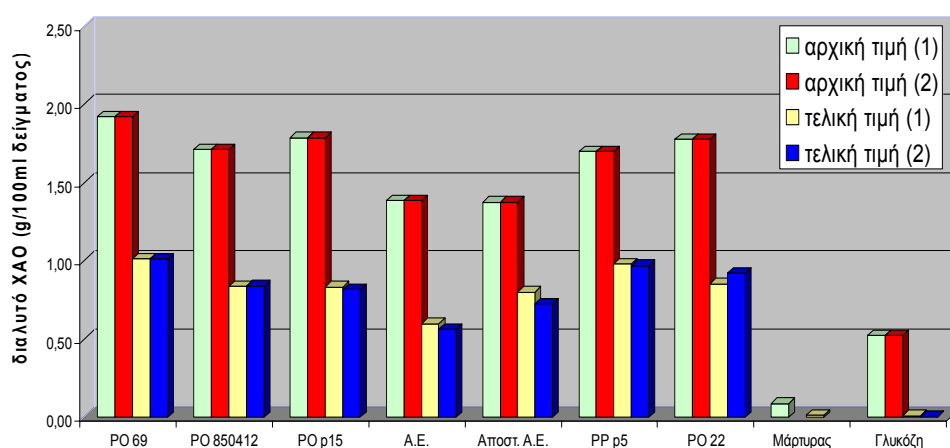
Τα ραβδογράμματα που ακολουθούν αντιστοιχούν στις πέντε παραμέτρους των δεκαοκτώ φιαλιδίων που προσδιορίστηκαν στο ξεκίνημα και στη λήξη του πειράματος του BMP. Με τον τρόπο αυτό, η σύγκριση των αρχικών και των τελικών συνθηκών του κάθε δείγματος, καθώς και η σύγκριση των παραμέτρων για τα διαφορετικά δείγματα γίνεται ευκολότερα.

Το πρώτο ραβδόγραμμα απεικονίζει το pH των δειγμάτων. Το γαλάζιο χρώμα αντιστοιχεί στην αρχική τιμή της παραμέτρου για την επανάληψη (1) του κάθε δείγματος ενώ το κόκκινο χρώμα στην αρχική τιμή για την επανάληψη (2). Η τελική τιμή της παραμέτρου για την επανάληψη (1) αντιπροσωπεύεται με το κίτρινο χρώμα ενώ η τελική τιμή της επανάληψης (2) με το μπλε. Ο συμβολισμός αυτός ισχύει για όλα τα πιο κάτω ραβδογράμματα που απεικονίζουν τις μεταβολές των προαναφερθέντων παραμέτρων των δειγμάτων.



Ραβδόγραμμα 4.9: Μεταβολή του pH για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP

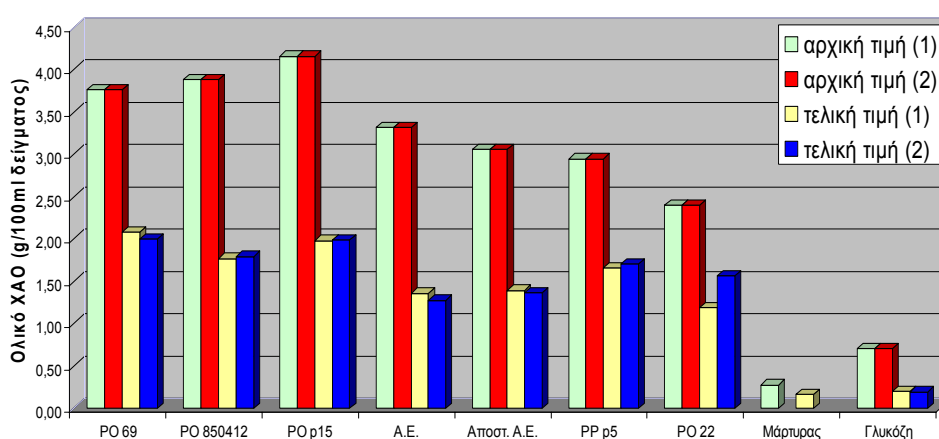
Μετά την αναερόβια επεξεργασία, βλέπουμε ότι το pH παραμένει στα ίδια επίπεδα χωρίς καμία αξιόλογη μεταβολή. Αυτό ισχύει για όλα τα δείγματα, και είναι αναμενόμενο αφού πριν την έναρξη του πειράματος, το pH του κάθε υποστρώματος ρυθμίστηκε με NaHCO_3 αυξάνοντας την αλκαλικότητα με τα ιόντα HCO_3^- . Το δείγμα του μάρτυρα διατήρησε εξίσου το pH του στη βέλτιστη περιοχή, αν και δεν χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό. Αυτό οφείλεται στον εγκλιματισμό της αναερόβιας μικροβιακής καλλιέργειας σε διάλυμα γλυκόζης για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.



Ραβδόγραμμα 4.10: Μεταβολή του διαλυτού ΧΑΟ (g/100ml δείγματος) για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP

Από το ραβδόγραμμα 4.10 είναι φανερό ότι όλα τα δείγματα είχαν υποστεί μια αξιόλογη μείωση στο διαλυτό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο. Βλέποντας την περίπτωση της γλυκόζης όπως και του μάρτυρα φαίνεται ότι το υπόστρωμα έχει βιοαποδομηθεί πλήρως. Αξιοσημείωτη είναι και η μείωση του διαλυτού οργανικού φορτίου του δείγματος του ακατέργαστου έναντι του αποστειρωμένου αποβλήτου του ελαιουργείου. Αν και στην έναρξη της αναερόβιας διεργασίας τα δείγματα αυτά ξεκινούσαν με διαλυτό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο που κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα, η μετατροπή αυτού, ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση του ακατέργαστου αποβλήτου.

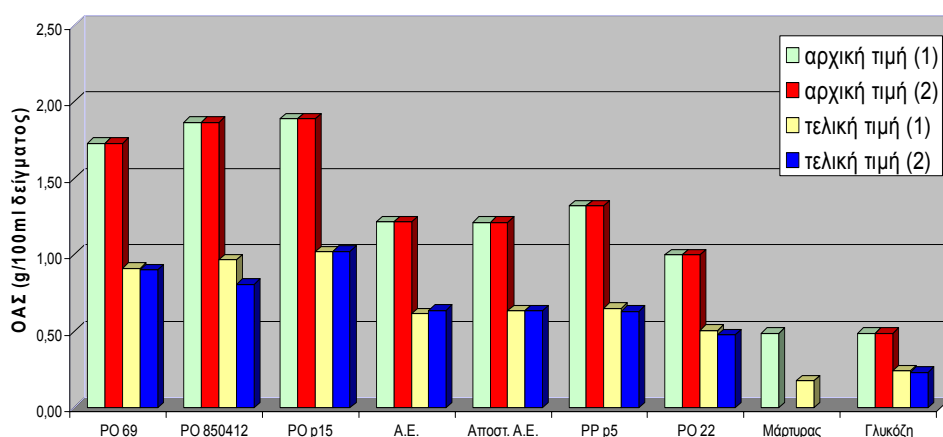
Παρατηρώντας τις αρχικές τιμές του διαλυτού οργανικού φορτίου των δειγμάτων βλέπουμε μια αύξηση στα δείγματα των αποβλήτων που προεπεξεργάστηκαν με μύκητες λευκής σήψης έναντι του ακατέργαστου αποβλήτου. Αν αυτό οφειλόταν στη θερμική επεξεργασία της αποστείρωσης που είχαν υποστεί τα υποστρώματα των δειγμάτων αυτών πριν τη βιοεπεξεργασία θα έπρεπε η αύξηση αυτή να είχε παρατηρηθεί και στην περίπτωση του δείγματος του αποστειρωμένου αποβλήτου, κάτι που δεν έλαβε χώρα. Ένα μικρό ποσοστό της αύξησης αυτής μπορεί να αποδοθεί σε ενδεχόμενη παραγωγή ενώσεων που προκύπτουν από την ενζυμική δράση των μυκήτων.



Ραβδόγραμμα 4.11: Μεταβολή του ολικού ΧΑΟ (g/100ml δείγματος) για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP

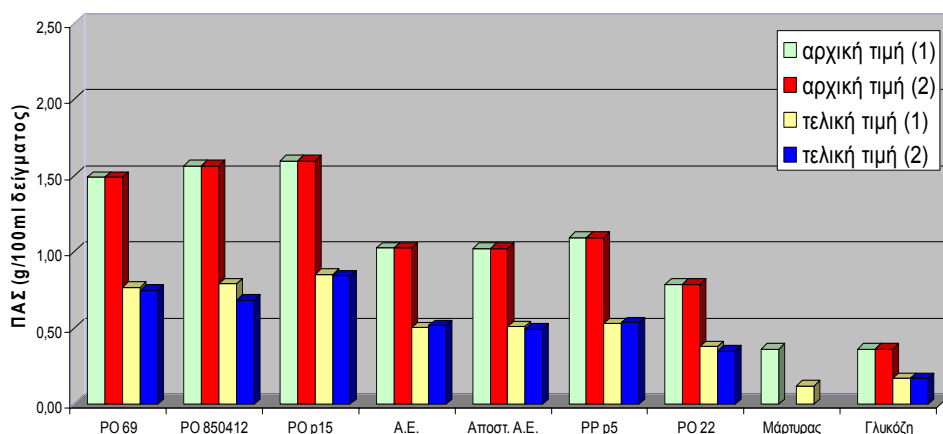
Το ραβδόγραμμα 4.11 απεικονίζει τη μεταβολή του ολικού οργανικού φορτίου των δεκαοκτώ δειγμάτων. Παρά το γεγονός ότι τα δείγματα των αποβλήτων που επεξεργάστηκαν με μύκητες ξεκίνησαν το πείραμα του BMP με μεγάλες διαφορές στην αρχική τιμή του ολικού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, η τιμή της παραμέτρου αυτής με το πέρας του πειράματος, κυμαίνεται σχετικά στα ίδια επίπεδα.

Είναι φανερό ότι στο σύνθετο απόβλητο του ελαιουργείου υπάρχει ένα μη μετατρέψιμο κλάσμα το οποίο δεν υφίσταται καμία μεταβολή με την αναερόβια επεξεργασία. Τέλος, παρά το γεγονός ότι η τιμή του αρχικού ολικού οργανικού φορτίου του ακατέργαστου αποβλήτου ήταν ελαφρώς υψηλότερη απ' αυτή του αποστειρωμένου, μετά την αναερόβια διεργασία η παράμετρος αυτή κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα για τα δύο αυτά δείγματα.



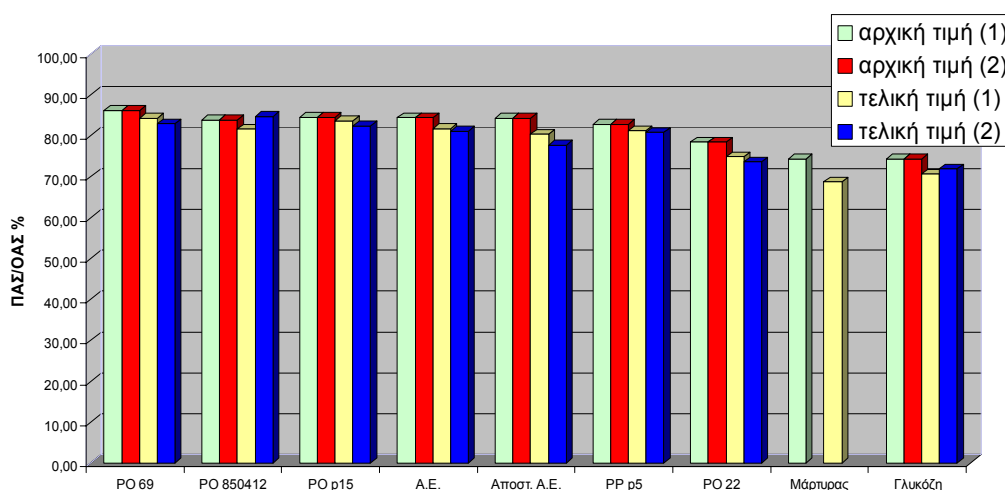
Ραβδόγραμμα 4.12: Μεταβολή των ολικών αιωρούμενων στερεών, ΟΑΣ (g/100ml δείγματος), για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP

Στο ραβδόγραμμα 4.12 απεικονίζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των ολικών αιωρούμενων στερεών που παρατηρήθηκε στα δείγματα με την αναερόβια διεργασία. Σε όλα τα δείγματα είναι φανερή η διαδικασία της υδρόλυσης των στερεών αφού η μείωση στη συγκέντρωσή τους ξεπερνά στις περισσότερες περιπτώσεις το 50%.



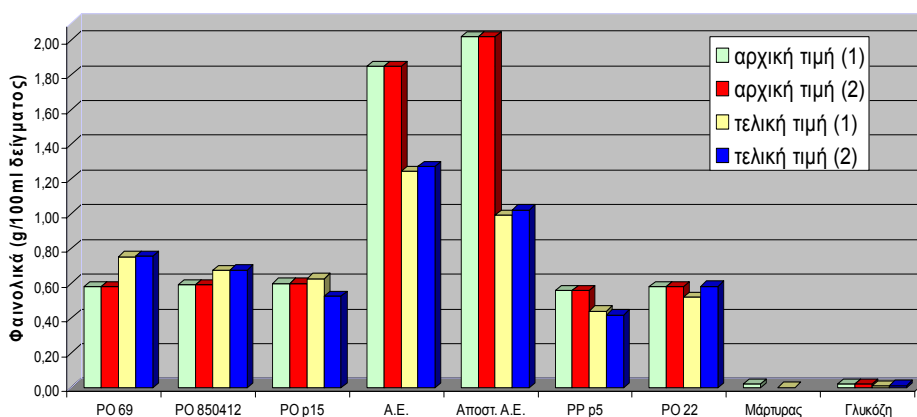
Ραβδόγραμμα 4.13: Μεταβολή των πτητικών αιωρούμενων στερεών, ΠΑΣ (g/100ml δείγματος), για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP

Στο ραβδόγραμμα 4.13 βλέπουμε τη μεταβολή στη συγκέντρωση των πτητικών αιωρούμενων στερεών των δειγμάτων στο πείραμα του BMP. Με αυτό επιβεβαιώνεται η υδρόλυση των στερεών που υφίσταται σε όλα τα δείγματα. Όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα 4.14 τα πτητικά αιωρούμενα στερεά όλων των δειγμάτων αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό των ολικών αιωρούμενων στερεών, της τάξης του 75-85%, το οποίο διατηρείται στα ίδια υψηλά επίπεδα και μετά την αναερόβια διεργασία.



Ραβδόγραμμα 4.14: Μεταβολή του ποσοστού ΠΑΣ/ΟΑΣ% για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP

Στο ραβδόγραμμα 4.15 που ακολουθεί απεικονίζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των φαινολικών ουσιών όλων των δειγμάτων κατά την αναερόβια διεργασία.

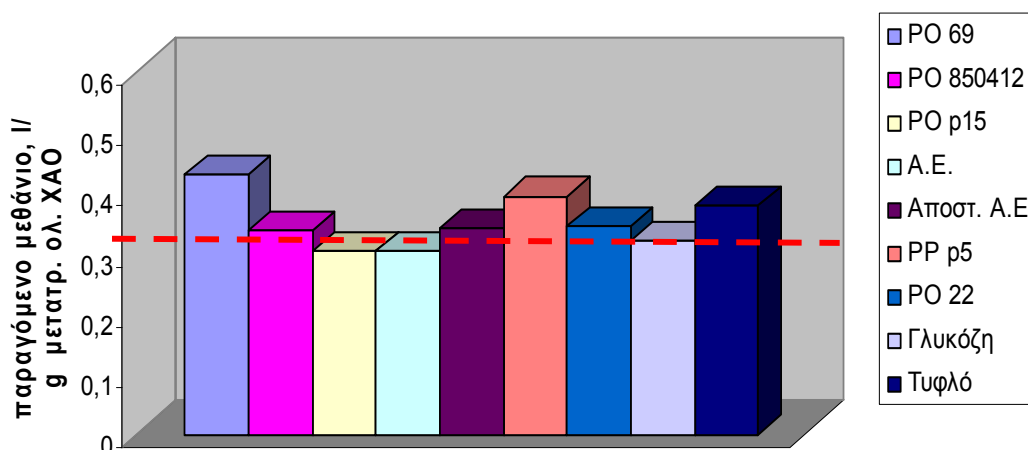


Ραβδόγραμμα 4.15: Μεταβολή των φαινολικών ουσιών (g/100ml δείγματος) για όλα τα δείγματα του πειράματος BMP

Η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών των δειγμάτων των προεπεξεργασμένων, με μύκητες λευκής σήψης, αποβλήτων κυμαίνεται στα ίδια με τα αρχικά επίπεδα και μετά την αναερόβια επεξεργασία του πειράματος BMP. Ελαφρώς αυξημένη τελική συγκέντρωση φαινολικών έναντι της αρχικής, παρουσιάζει το προεπεξεργασμένο, με το μύκητα PO 69, απόβλητο, και σε μικρότερο βαθμό, το απόβλητο που προεπεξεργάστηκε με το μύκητα PO 850412. Αξιοσημείωτη όμως είναι και η μείωση της συγκέντρωσης των φαινολικών που παρατηρείται στην περίπτωση των δειγμάτων του ακατέργαστου και του αποστειρωμένου αποβλήτου, μετά το τέλος του πειράματος. Παρόλο που η αρχική συγκέντρωση του δείγματος του αποστειρωμένου αποβλήτου ήταν μεγαλύτερη πριν την έναρξη του πειράματος απ' ότι του ακατέργαστου, η τελική συγκέντρωση του πρώτου είναι μικρότερη έναντι του δεύτερου.

4.6.5 Απόδοση της αναερόβιας διεργασίας - Συμπεράσματα

Στο ραβδόγραμμα 4.16 απεικονίζεται η μέση απόδοση του πειράματος BMP εκφρασμένη σε όγκο παραγόμενου μεθανίου ανά γραμμάριο μετατρεπόμενου, και για τα εννέα δείγματα.

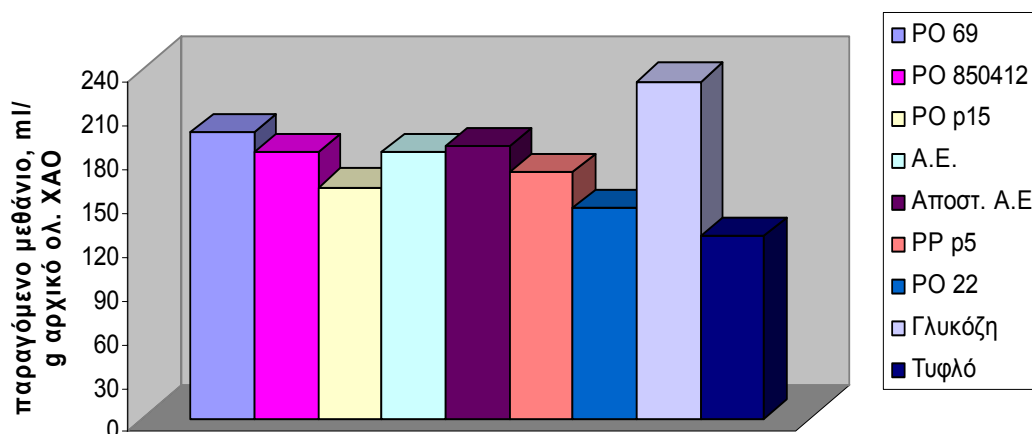


Ραβδόγραμμα 4.16: Μέση απόδοση (παραγόμενο μεθάνιο, l/g μετατρεπόμενου ολικού ΧΑΟ) του κάθε δείγματος του πειράματος BMP

Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στη θεωρητική τιμή του οργανικού φορτίου (στερεή ή υγρή μορφή ΧΑΟ) που μετατρέπεται σε μεθάνιο (αέρια μορφή ΧΑΟ). Δηλαδή, η τιμή 0.35 είναι τα l σε κανονικές συνθήκες που καταλαμβάνει 1 g χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ) σε αέρια μορφή.

Παρατηρούμε ότι όλα τα δείγματα είναι συγκρίσιμα με τη θεωρητική απόδοση. Το δείγμα του αποβλήτου που προεπεξεργάστηκε με το μύκητα του είδους *Ostreatus*, PO 69 παρουσιάζει την καλύτερη απόδοση εκφρασμένη σε παραγόμενο μεθάνιο ανά μάζα μετατρεπόμενου οργανικού φορτίου. Συγκρίνοντας την απόδοση του ακατέργαστου δείγματος με αυτή του αποστειρωμένου, βλέπουμε ότι παρόλο που το πρώτο υπερέιχε στο συνολικό παραγόμενο όγκο μεθανίου, η αυξημένη αρχική τιμή του ολικού οργανικού φορτίου που είχε, οδήγησε στη μείωση της απόδοσής του έναντι του δεύτερου.

Στο επόμενο ραβδόγραμμα απεικονίζεται η απόδοση της αναερόβιας διεργασίας του πειράματος BMP εκφρασμένη με ένα δείκτη ίσο με 1 μεθανίου/g αρχ. ΧΑΟ δείγματος.



Ραβδόγραμμα 4.17: Μέση απόδοση (παραγόμενο μεθάνιο, ml/g αρχικού ΧΑΟ) του κάθε δείγματος του πειράματος BMP

Με βάση το ραβδόγραμμα 4.18 είναι φανερό ότι μετά την προεπεξεργασία του αποβλήτου με τους μύκητες PO 69 και PO 850412 (και ειδικότερα του πρώτου) η αναερόβια επεξεργασία του υλικού (αποβλήτου) που απομένει είναι πιο αποδοτική απ' ό,τι του ακατέργαστου αποβλήτου, έχοντας ως κριτήριο την παραγωγή του μέγιστου μεθανίου από το διαθέσιμο ΧΑΟ υποστρώματος. Το ίδιο ισχύει και για το λιόζουμο το οποίο πριν την αναερόβια επεξεργασία είχε υποστεί την αποστείρωση.

Αυτό όμως δεν ισχύει και για την περίπτωση των PP p5, PO 22 και PO p15, παρά την υψηλή αποδόμηση φαινολικών που επέφερε η δράση τους, ειδικά στην περίπτωση του μύκητα PO 22. Η προεπεξεργασία του αποβλήτου με αυτούς τους τρεις μύκητες οδηγεί σε πιο εκτεταμένη αποδόμηση του ΧΑΟ του αποβλήτου, γεγονός που σημαίνει ότι απάλλαξαν το απόβλητο από τις παρεμποδιστικές ενώσεις (φαινολικές) ενώ δεν παρήγαγαν άλλες τοξικές ενώσεις. Με βάση όμως την απόδοση του πειράματος BMP (εκφρασμένη σε παραγόμενο μεθάνιο/μάζα αρ. ΧΑΟ υποστρώματος) βλέπουμε ότι τα τρία

αυτά υποστρώματα δεν συνίστανται για αναερόβια επεξεργασία αφού διαθέτουν περιορισμένο ΧΑΟ για μετατροπή και παραγωγή μεθανίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Από την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή προέκυψαν αποτελέσματα που οδήγησαν σε χρήσιμα συμπεράσματα για την ολοκληρωμένη διαχείριση του αποβλήτου του ελαιουργείου με χρήση βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας.

Αποδείχτηκε ότι η επεξεργασία του αποβλήτου αυτού με τη χρήση μυκήτων λευκής σήψης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και πως με κατάλληλη βελτιστοποίηση ορισμένων παραμέτρων μπορεί να αποτελέσει ιδανική μέθοδο προεπεξεργασίας του αποβλήτου για την μετέπειτα αναερόβια χώνευσή του.

Αρκετά από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο πρώτο μέρος της ερευνητικής εργασίας, αντιμετώπισαν το πρόβλημα της μεγάλης ευαισθησίας που παρουσιάζουν οι μύκητες λευκής σήψης. Κατά συνέπεια, η μόλυνση τους από ξένους μικροοργανισμούς και η ταχύτατη εξάπλωσή της ήταν αδύνατον να αποφευχθούν υπό συνθήκες μη ασηπτικές έστω και αν το απόβλητο είχε προηγουμένως υποστεί την επεξεργασία της αποστείρωσης. Η θερμική κατεργασία της παστερίωσης του αποβλήτου θα μπορούσε να αποδειχτεί ιδιαίτερα αποτελεσματική για την ανάπτυξη των μυκήτων και ικανή να αντικαταστήσει την διαδικασία της αποστείρωσης η οποία απαιτεί υψηλό κόστος.

Από τα αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης των πέντε μυκήτων λευκής σήψης που είχαμε στη διάθεσή μας, προέκυψε ότι η επεξεργασία του αποβλήτου με τον μύκητα *Pleurotus Ostreatus* 22 όσον αφορά την αποδόμηση των φαινολικών ενώσεων είναι η αποδοτικότερη (82.7%). Επιπλέον, από τα αποτελέσματα της σύγκρισης των στελεχών που ανήκαν σε δύο διαφορετικά γένη προέκυψε το συμπέρασμα ότι οι μύκητες του γένους

Pleurotus Ostreatus έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα υφών και αποχρωματίζουν πλήρως το αποβλητό του ελαιουργείου σε σχέση με του μύκητες του γένους Pleurotus Pulmonarius. Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι όλοι οι μύκητες προκάλεσαν πολύ μικρό ποσοστό αφαίρεσης οργανικού υλικού από το λιόζουμο. Η αξιολόγηση και άλλων ειδών μυκήτων λευκής σήψης, αποτελεί ένα ακόμα ενδιαφέρον θέμα προς έρευνα.

Η ακινητοποίηση (immobilization) των μυκήτων λευκής σήψης επάνω σε στερεούς υποστηρικτές είναι μια νέα τεχνολογία η οποία επίσης επιδέχεται περαιτέρω βελτιστοποίηση. Από τα πειράματα ακινητοποίησης που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, σε πολυμερές πολυουρεθάνης (polyurethane foam) και σε τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλού, ο μύκητας PO 22 ανταποκρίθηκε ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποικίζοντας και τα δύο υλικά με χαρακτηριστική ταχύτητα και ευκολία, ενώ προκάλεσε μεγαλύτερους ρυθμούς και ποσοστά αποδόμησης φαινολικών ενώσεων σε σχέση με την καλλιέργεια του σε αιώρηση.

Το σύστημα του αντιδραστήρα τύπου διαβρεχόμενης κλίνης με ανακυκλοφορία αποδείχτηκε πιο αποτελεσματικό απ' ότι του αντιδραστήρα τύπου κλίνης με ανακυκλοφορία αφού με το πρώτο σύστημα αυξάνεται ο χρόνος χρήσης και ικανοποιητικής δράσης του αποικισμένου στο πληρωτικό υλικό, μύκητα. Η αύξηση των διαστάσεων του πρώτου συστήματος και η μελέτη της συμπεριφοράς του μύκητα σ' αυτό, θα μπορούσε να οδηγήσει σε αρκετά χρήσιμα αποτελέσματα.

Ένα βασικό συμπέρασμα που προέκυψε από τη συμπεριφορά του ακινητοποιημένου μύκητα στο σύστημα της κλίνης (διαβρεχόμενης ή μη) είναι ότι η δράση του εξαρτάται από τρεις παράγοντες: α) το χρονικό διάστημα χρήσης του πληρωτικού υλικού της κλίνης, β) την «ηλικία» της αιωρημένης καλλιέργειας από την οποία προέρχεται ο ακινητοποιημένος μύκητας και, γ) τον τρόπο πλήρωσης της κλίνης. Γι' αυτό ακριβώς το λόγο είναι δύσκολο να γίνει απόλυτη σύγκριση της συμπεριφοράς που επιδεικνύουν δύο συστήματα.

Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων που διεξήχθησαν στις κλίνες πληρωμένες με τα δύο είδη στερεών υποστηρικτών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα έρευνα συμπεραίνουμε ότι ο ρυθμός αποίκησης των μυκήτων στα τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού ήταν μεγαλύτερος απ' ό,τι στα τεμαχίδια πολυουρεθάνης. Αυτό οδήγησε και σε μεγαλύτερο ρυθμό αποδόμησης φαινολικών. Περαιτέρω, με τη χρήση του πυροσυσσωματωμένου γυαλιού καταφέραμε να επιβραδύνουμε το χρόνο εμφάνισης της μόλυνσης (από 7 σε 18 ημέρες) αφού μπορούσε να αποστειρωθεί πριν τη χρήση του. Η μελέτη της συμπεριφοράς των μυκήτων και σε άλλα είδη στερεών υποστηρικτών τα οποία προηγουμένως θα μπορούν να αποστειρωθούν και να προμηθευτούν εύκολα και χωρίς ιδιαίτερα υψηλό κόστος είναι σωστό να μελετηθεί.

Η ιδέα της χρήση του διαλύματος του συριγγικού οξέος συγκέντρωσης 2 g/l ως ενός εύκολα βιοαποδομήσιμου μέσου αποδείχτηκε ιδανική για τα προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν στην περίπτωση της ακινητοποίησης του μύκητα PO 22 στα δύο είδη υποστηρικτών για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας του κάθε συστήματος.

Με τη χρήση του αποβλήτου ελαιουργείου στο σύστημα της διαβρεχόμενης κλίνης πληρωμένης με τεμαχίδια πολυουρεθάνης επιτεύχθηκε απομάκρυνση φαινολικών έως και 63.8 %. Στο ίδιο σύστημα με διαφορά ότι η κλίνη ήταν πληρωμένη με τεμαχίδια πυροσυσσωματωμένου γυαλιού, η αποδόμηση κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα (62.70 %). Στο δεύτερο σύστημα κρίθηκε όμως αναγκαίο να γίνει παροχή αερισμού. Με βάση αυτό καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η έλλειψη επαρκούς αερισμού εμποδίζει τον μύκητα PO 22 να αναπτυχθεί και κατά συνέπεια να δράσει ικανοποιητικά (δρα περιοριστικά).

Το πείραμα για τον προσδιορισμό του βιοχημικού δυναμικού μεθανίου (Biochemical Methane Potential, BMP) πραγματοποιήθηκε με βασικό σκοπό να ερευνηθεί εάν η απόδοση της αναερόβιας χώνευσης του αποβλήτου του ελαιουργείου είναι περιορισμένη σε σύγκριση με το βιοεπεξεργασμένο με μύκητες σήψης απόβλητο, από το οποίο έχει αποδομηθεί μεγάλο ποσοστό των φαινολικών ενώσεων. Στο πείραμα αυτό μελετήθηκαν πέντε διαφορετικοί

μύκητες (PO 69, PO 850412, PO p15, PP p5 και PO 22) και προέκυψαν πολλά και χρήσιμα αποτελέσματα από τα οποία προκύπτουν προτάσεις για μελλοντική εργασία.

Μετά την ενζυματική δράση των μυκήτων PO 69 και PO 850412 στο απόβλητο ελαιουργείου (και ειδικότερα του πρώτου), η αναερόβια επεξεργασία του υλικού (αποβλήτου) που απομένει είναι πιο αποδοτική για την παραγωγή του μέγιστου μεθανίου απ' ότι του ακατέργαστου αποβλήτου. Το ίδιο ισχύει και για το λιόζουμο το οποίο πριν την αναερόβια επεξεργασία είχε υποστεί την αποστείρωση.

Αυτό όμως δεν ισχύει και για την περίπτωση των PP p5, PO 22 και PO p15, παρά την υψηλή αποδόμηση φαινολικών που επέφερε η δράση τους, ειδικά στην περίπτωση του μύκητα PO 22. Η προεπεξεργασία του αποβλήτου με αυτούς τους τρεις μύκητες οδηγεί σε πιο εκτεταμένη αποδόμηση του ΧΑΟ του αποβλήτου, γεγονός που σημαίνει ότι απάλλαξαν το απόβλητο από τις παρεμποδιστικές ενώσεις (φαινολικές) ενώ δεν παρήγαγαν άλλες τοξικές ενώσεις. Με βάση όμως την απόδοση του πειράματος BMP (εκφρασμένη σε παραγόμενο μεθάνιο/μάζα αρ. ΧΑΟ υποστρώματος) βλέπουμε ότι τα τρία αυτά υποστρώματα δεν συνίστανται για αναερόβια επεξεργασία αφού διαθέτουν περιορισμένο ΧΑΟ για μετατροπή και παραγωγή μεθανίου

Δεδομένου ότι όπως αποδείχτηκε, PO 69 δίνει επεξεργασμένο απόβλητο με σημαντικά αυξημένο δυναμικό παραγωγής μεθανίου, είναι σκόπιμο να μελετηθεί η δυνατότητα ακινητοποίησης και αυτού του μύκητα σε πυροσυσσωματωμένο γυαλί και η χρησιμοποίησή του συστήματος αυτού για προεπεξεργασία αποβλήτου ελαιουργείου.

Η αναερόβια συγχώνευση του επεξεργασμένου με μύκητες αποβλήτου μαζί με άλλου τύπου εποχιακά αγροτοβιομηχανικά απόβλητα είναι πιθανόν να βελτιώσει την απόδοση της αναερόβιας επεξεργασίας σε αφαίρεση οργανικού υλικού, αυξάνοντας ταυτόχρονα την παραγωγή βιοαερίου.

Τέλος η αναερόβια επεξεργασία του επεξεργασμένου αποβλήτου στην θερμόφιλη θερμοκρασιακή περιοχή (~55 °C), όπου ενδείκνυται για υψηλές φορτίσεις, έχει ενδιαφέρον να ερευνηθεί. Μια τέτοια επεξεργασία, εκτός από τη μείωση του οργανικού φορτίου, θα καταστρέφει τους παθογόνους μικροοργανισμούς και τα ζωικά παράσιτα οδηγώντας στην ασφαλή διάθεση του αποβλήτου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Εγχειρίδιο Προγράμματος MINOS: Ανάπτυξη διαδικασίας για την Ολοκληρωμένη Διαχείριση Αποβλήτων των Ελαιοτριβείων με Ανάπτυξη Φυσικών Αντιοξειδωτικών και Παραγωγή Οργανικού Λιπάσματος, Απρίλιος 2004

Κ.Ι. Ισραηλίδης. Αξιοποίηση κομποστοποιημένου πυρηνόξυλου και υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείου σαν εδαφοβελτιωτικό. Ινστιτούτο Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων

Κ. Λαζαρίδη και Α. Κυριακού. Βιολιπασματοποίηση των Αποβλήτων της Ελιάς: Η Μέθοδος «Μπαλή» για την Αξιοποίηση των Υγρών Αποβλήτων των Ελαιοτριβείων. Πρακτικά Ημερίδας: Βιώσιμες Μέθοδοι Κατεργασίας και Αξιοποίησης Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου, 17 Δεκεμβρίου 2004

Κ. Χατζουλάκης, Γ. Ψαρράς, Μ. Μουτσοπούλου, Ε. Στεφανουδάκη. Εφαρμογή των υγρών αποβλήτων ελαιουργείων στο έδαφος των ελαιώνων: Μια περιβαλλοντικά αποδεκτή και οικονομικά εφικτή μέθοδος διαχείρισης. Πρακτικά Ημερίδας: Βιώσιμες Μέθοδοι Κατεργασίας και Αξιοποίησης Υγρών Αποβλήτων Ελαιοτριβείου, 17 Δεκεμβρίου 2004

Μ.Γ. Μιχαηλίδης. Διαχείριση υγρών αποβλήτων. Πρακτικά συνεδρίου Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου. 2-5 Σεπτεμβρίου, 1991

Περδικάσης Β., Μανίτσογλου Ε., Σπάρταλη Ν., Μωραΐτης Δ. και Πεντάρη Δ. Συμπεριφορά υγρών αποβλήτων ελαιουργείων σε πετρώματα διαφόρου λιθολογίας. Απρίλιος, 2004. Πρακτικά 10^{ου} Διεθνούς Συνεδρίου, Θεσ/νίκη,

Χριστάκης Παρασκευάς, Πέτρος Κουτσούκος, Ευάγγελος Παπαδάκης, Κώστας Γ. Αγγελόπουλος. Διαχείριση αποβλήτων μετά την επεξεργασία αγροτικών προϊόντων. 13-15 Μαΐου, 2005

Aggelis G., Iconomou D., Christou M., Bokas D., Kotzailias S., Christou G. Et al., Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Res* 2003; 37; 3897-3904

Andreozzi R, Longo G, Majone M, Modesti G. Integrated treatment of olive mill effluents (OME): study of ozonation coupled with anaerobic digestion. *Water Res* 1998; 32; 2357-2364

Anonymous, By-product resusing from olive and olive oil production, www.tdcolive.org [last Access on 29.1.2006]

Anonymous, International Olive Oil Council, www.internationaloliveoil.org [last Access on 22.11.2004]

Anonymous, Processing technology in olive oil and table olive, www.tdcolive.org [last Access on 29.1.2006]

Anonymous, Waste Treatment, www.tdcolive.org [last Access on 29.1.2006]

Batstone D. J., Keller J., Angelidaki I., Kalyuzhni S.V., Pavlostathis S. G., Rozzi A., Sanders W. T. M., Siergist H., Vavilin V. A. (2002). Anaerobic digestion model no. 1 (ADM1). IWA Task Group for Mathematical Modelling of Anaerobic Digestion Processes. London: IWA.

Beccari M., G.Carucci, M. Majone, L. Torisi, 1999. Role of lipids and phenolic compounds in the anaerobic treatment of olive oil mill effluents. *Environ Technol*; 20; 105-110

Blanquez P., Caminal G., Sarra M., Vicent MT., Gabarell X., Olive oil mill waste waters decoloration and detoxification in a bioreactor by the white rot fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. *Biotechnol Prog* 2002; 18; 660-662

Borja R., Martin A., Maestro R., Alba J., Fiestas J.A., 1992 Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewater by the removal of phenolic inhibitors. *Process Biochem.* 27, 231-237

D'Annidale A., Crestini C., Vinciguerra V., Sermanni GG. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by white-rot fungus. *Journal Biotechnol* 1998; 61; 209-218

Dionissios Mantzavinos, Nicolas Kalogerakis. 2005. Treatment of olive mill effluents. Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes-an overview. *Environment International*; 31; 289-295

Ergüder T.H., E. Güven, G.N. Demirer. Anaerobic treatment of olive mill wastes in batch reactors. *Process Biochemistry*, 2000; 36; 243-248

Fiestas Ros De Ursinos J., Lopez Carnino J. 1994 Evaluacion de la experiencia de las plantas prototipo de depuracion de alpechines en la cuenca de rio Guadalquivir. *Πρακτικά Διημερίδας για τη Διαχείριση των Αποβλήτων των Ελαιουργείων* Σητεία 102-124

Fountoulakis MS, Dokianakis SN, Kornaros ME, Aggelis GG, Lyberatos G. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res* 2002; 36; 4735-4744

Garcia Garcia I., Jimenez Pena PR., Bonilla Venceslada JL., Martin Martin A., Martin Santos MA., Gomez Ramos E. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochem* 2000; 35; 751-758

Grappelli A., W. Pietrosanti L., Pasetti, A. Carilli. 1991. Metabolites production during the growth of *Lentinus* species on agricultural waste waters, 717-720. In M. Maher (ed) Science and cultivation of edible fungi. Balkema, Rotterdam.

Iniotakis N., Μιχαηλίδης Π., Διαμαντής Γ., Ισραηλίδης Κ., Παπανικολάου Δ. «Κατσίγαρος: Μια επικερδής διαχείριση υγρών αποβλήτων». Π. Συνέδριο Περιβαλλοντικής Επιστήμης και Τεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μόλυβος-Μυτιλήνη, 2-5 Σεπτεμβρίου 1991. Πρακτικά σ. 37-47

Israilides CJ, Vlyssides AG, Mourafeti VN, Karvouni G. Olive oil wastewater treatment with the use of an electrolysis system. *Bioresour Technol* 1997; 61; 163-170

Hamdi and Moktar (1992) Toxicity and biodegradability of olive oil wastewaters in anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 155-163

Hatakka A., 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev*, 13, 153-188

Kaal E.E.j, de John E., Field J.A. 1993. Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applid and Environmental Microbiology*, 59, 4031-4036

Kerem Z., D. Friesem, Y. Hadar. 1992. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1121-1127

Kirkpatrick N. and Palmer J.M. 1987. Semi-continuous ligninase production using foam-immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 129-133

Leatham F., and T.K. Kirk. 1983. Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 65-67

Marinos E.: Lagooning concentration of olive oil processing wastewaters. Proc. International Conf. on olive oil processing wastewater treatment methods, Hania, Crete, Greece (1991)

Marques IP. Anaerobic digestion treatment of olive-mill wastewater for effluent re-use in irrigation. Desalination 2001; 137; 233-239

Martin A., Borja R., Garcia I., Fiestas J.A., 1991. Kinetics of methane production from olive mill wastewaters. Process Biochem. 26, 101-107

Martirami L., P. Giardina , L. Marzullo, G. Sannia. 1996. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Water Res. 30, 1914-1918

Nottingham P.M. & Hungate R.E. (1969). Methanogenic fermentation of benzoate. J. Bact. 98, 1170-1172

Owen W.F., D.C. Stuckey, J.B. Healy, JR., L.Y. Young and P.L. McCarty. 1979. Bioassay for Monitoring Biochemical Methane Potential and Anaerobic Toxicity. Water Research. 13, 485-492

Owen J.M and D.P Chynoweth. 1993 . Biochemical Methane Potential of municipal solid waste components. Wat. Sci. Tech; 27; 1-14

Robles A., Lucas R., Alvarez de Cienfuegos G., Galvez A., Biomass production and detoxification of wastewaters from the olive oil industry by strains *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. Bioresour Technol 2000; 74; 217-221

Rozzi A., Passino R., Limoni M., 1989. Anaerobic treatment of olive mill effluents in polyurethane foam bed reactor. Process Biochem. 4, 68-74

Ruckenstein E. and Wang X.B. 1994. Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous Poly (Styrene-

Divinylbenzene) carrier and its application to the degrading of 2-chlophenol. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 79-86

Ryan D. & Robards K. 1998, Phenolic compounds in olives, *Analyst*, 123, 31R-44R

Sanjust E., R. Pompei, A. Rescigno, A. Rinaldi and M. Ballero. 1991. Olive milling wastewater as a medium for growth of four *Pleurotus* species. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 31, 223-235

Sayadi S. and R. Ellouz. 1992. Decolourization of olive mill waste-waters by the white-rot fungus *Phanerochaete Chrysosporium*: involvement of the lignin-degrading system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57, 813-817

Sayadi S. and R. Ellouz. 1993. Screening of white-rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 57, 141-146

Srebotnic E., Jensen K.A and Hammel K.E. 1994. Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic lignin structures without lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 91, 12794-12797

Tsioulpas A., Dimou D., Iconomou D, Aggelis G., Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp in respect to their phenol oxidase (lacasse) activity. *Bioresour Technol* 2002; 84; 251-257