

ΒΙΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΖΥΘΟΠΟΙΑΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΝΗΜΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *LEPTOLYNGBYA* SP.

Κ.Π. Παπαδόπουλος¹, Ε. Κοτρώνη¹, Ε. Βάση¹, Χ.Ν. Οικονόμου¹, Μ. Μουστάκα-Γκούνη², Α.Γ. Τεκερλεκοπούλου³, Γ. Αγγελής⁴, Δ.Β. Βαγενάς^{1,5*}

¹Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, 26504, Ελλάδα

²Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πανεπιστημιούπολη 54124, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

³Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων, Πανεπιστήμιο Πατρών, Γ. Σεφέρη 2, Αγρίνιο, 30100, Ελλάδα

⁴Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Πατρών, Ρίο, 26504, Ελλάδα

⁵Ιδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΤΕ/ΙΕΧΜΗ), Οδός Σταδίου, Πλατάνι 26504, Πάτρα, Ελλάδα

(*dvagenas@chemeng.upatras.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καλλιέργεια φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών (μικροφύκη/κυανοβακτήρια) αποτελεί μια διεργασία βιομετατροπής θρεπτικών συστατικών σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας^[1]. Παρά το τεράστιο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, το κόστος των θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξη των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών αποτελεί έναν περιοριστικό παράγοντα για την καλλιέργειά τους σε βιομηχανική κλίμακα^[2,3]. Τα υγρά απόβλητα ζυθοποιίας, τα οποία παράγονται από τη διαδικασία παρασκευής ζύθου σε μεγάλες ποσότητες (4-8 m³/m³ παραγόμενης μύρας), θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική λύση χαμηλού κόστους, καθώς εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό φορτίο και υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου και φωσφόρου^[4]. Παρόλο που οι περισσότερες τεχνολογίες βιολογικής επεξεργασίας περιλαμβάνουν τη χρήση βακτηρίων, τα κυανοβακτήρια αποτελούν ελκυστικά μέσα για την αειφόρο επεξεργασία υγρών αποβλήτων, καθώς παράγουν υψηλή συγκέντρωση βιομάζας, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή ποικίλων προϊόντων (π.χ. βιοκαύσιμα, βιολιπάσματα, βιοπολυμερή, συμπληρώματα διατροφής και ζωοτροφών κ.ά.)^[5]. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ικανότητα της καλλιέργειας του νηματοειδούς κυανοβακτηρίου *Leptolyngbya* sp. για την απομάκρυνση οργανικών και ανόργανων θρεπτικών συστατικών από τα υγρά απόβλητα ζυθοποιίας σε συνδυασμό με τον πλήρη χαρακτηρισμό της παραγόμενης βιομάζας. Τα πειράματα διεξήχθησαν υπό μη-ασηπτικές συνθήκες σε φωτοβιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου εργαστηριακής κλίμακας. Τα ποσοστά απομάκρυνσης των νιτρικών ιόντων, των αμμωνιακών ιόντων, των ορθοφωσφορικών ιόντων, του ολικού φωσφόρου και του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) ήταν 49%, 100%, 48%, 52% και 24% αντίστοιχα. Η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας ανήλθε στα 350 mg/L, ενώ αποτελούνταν από 60% υδατάνθρακες, 20% πρωτεΐνες και 11% λιπίδια. Επομένως, η επεξεργασία των αποβλήτων ζυθοποιίας χρησιμοποιώντας μικτότροφα είδη κυανοβακτηρίων κρίνεται αποτελεσματική, ενώ η παραγόμενη βιομάζα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα εφαρμογών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μικροφύκη και τα κυανοβακτήρια αποτελούν μία ευρεία κατηγορία μονοκύτταρων, φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών που ευδοκούν σε υδάτινα περιβάλλοντα, χρησιμοποιώντας το αέριο CO₂ ως κύρια πηγή άνθρακα και ανόργανες πηγές αζώτου, φωσφόρου από το υδατικό

μέσο καλλιέργειάς τους^[7,8]. Η ικανότητα τους να συσσωρεύουν υψηλές ποσότητες λιπιδίων, υδατανθράκων και πρωτεϊνών συγκεντρώνει έντονο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον^[1].

Συγκεκριμένα, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, η βιομάζα των μικροφυκών / κυανοβακτηρίων μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμα για την παραγωγή προϊόντων υψηλής εμπορικής αξίας (όπως βιοντίζελ, βιοαιθανόλης, βιοπλαστικών, χρωστικών, φαρμακευτικών ουσιών, συμπληρωμάτων διατροφής, ζωοτροφών κ.α.), αλλά και ενέργειας^[5]. Αυτή η δυνατότητα γεννά την ιδέα του βιο-δυλιστηρίου, την μεγάλης κλίμακας δηλαδή βιομετατροπή ρευμάτων θρεπτικών ουσιών στα παραπάνω προϊόντα, καλλιεργώντας μικροοργανισμούς^[1].

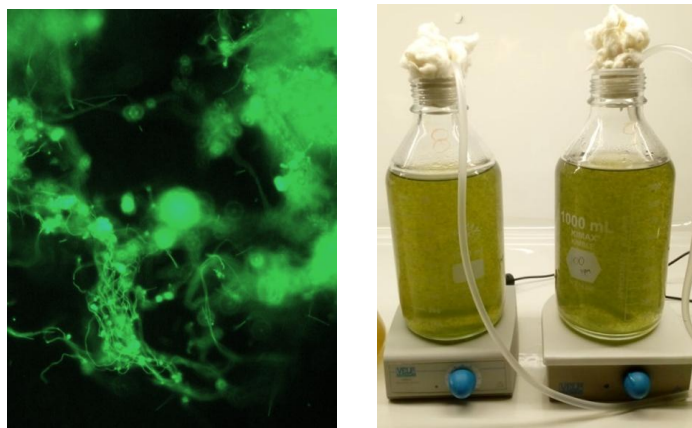
Ένας από τους σημαντικότερους περιοριστικούς παράγοντες στην εφαρμογή μιας τέτοιας ιδέας είναι το υψηλό κόστος των ανόργανων θρεπτικών που είναι απαραίτητα για την καλλιέργεια των μικροφυκών και των κυανοβακτηρίων^[2,3]. Ένας τρόπος για να ξεπερασθεί αυτό το εμπόδιο είναι η αξιοποίηση ρευμάτων υγρών αποβλήτων, πλούσιων σε θρεπτικά, πριν την απόρριψή τους στο περιβάλλον, μειώνοντας έτσι και κόστος καλλιέργειας και τις περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Τα απόβλητα ζυθοποιίας, που παράγονται σε πολύ υψηλές ποσότητες ($4-8 \text{ m}^3/\text{m}^3$ παραγόμενου ζύθου)^[4] και χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα οργανικών και ανόργανων θρεπτικών, εύκολη βιο-αποικοδόμηση, και αμελητέα περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα^[8,9] θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα πιθανό υπόστρωμα για την καλλιέργεια μικροαλγών.

Η πλέον διαδεδομένη υφιστάμενη μέθοδος επεξεργασίας των συγκεκριμένων αποβλήτων είναι η αερόβια βιολογική επεξεργασία^[9], που όμως παρουσιάζει αυξημένο κόστος και καμία ανάκτηση προϊόντων προστιθέμενης αξίας. Συνεπώς, η καλλιέργεια μικροαλγών αποτελεί μία ελκυστική επιλογή για την αειφόρο επεξεργασία των αποβλήτων ζυθοποιίας.

Στην παρούσα μελέτη, μελετάται μία μικτοτροφική καλλιέργεια βακτηρίων - κυανοβακτηρίων, βασιζόμενη στο νηματοειδές κυανοβακτήριο *Leptolyngbya* sp. Ο *Leptolyngbya* sp. είναι ένας νηματοειδής, φωτοαυτότροφος, αλκαλικόφιλος, εύκολα αναπτυσσόμενος μικροοργανισμός^[10]. Γι' αυτό το λόγο, έχει χρησιμοποιηθεί για ποικίλες βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπως είναι η απορρύπανση νερού και αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων και η παραγωγή βιοκαυσίμων, βιοντίζελ και βιοηλεκτρισμού^[11-13]. Στόχος της εργασίας είναι η αξιολόγηση της καλλιέργειας του κυανοβακτηρίου *Leptolyngbya* sp ως μέσο επεξεργασίας αποβλήτων ζυθοποιίας, και η διερεύνηση πιθανών εφαρμογών αξιοποίησης της παραγόμενης βιομάζας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγμα μικροοργανισμών λήφθηκε από μία τοπική μονάδα επεξεργασίας αστικών αποβλήτων, και καλλιεργήθηκε αυτοτροφικά σε μέσο θρεπτικών αποτελούμενο από (g L^{-1}) KNO_3 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05, K_2HPO_4 0.108, και KH_2PO_4 0.056 σε pH 7–7.5. Έπειτα από 30 ημέρες καλλιέργειας κάτω από συνεχή φωτισμό $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, σε θερμοκρασία $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ και ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις CO_2 η μικροβιακή κοινοπραξία της καλλιέργειας εξετάστηκε σε φιαλίδια καθίζησης (2 mL) με ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Nikon Eclipse TE 2000-S) υπό φθορισμό. Αναγνωρίστηκε με τη μέθοδο της ανεστραμμένης μικροσκοπίας^[14] σε ποσοστό >90% επί του συνόλου του μικροβιακού πληθυσμού το κυανοβακτήριο *Leptolyngbya* sp., ενώ σε μικρότερους αριθμούς εντοπίστηκαν ετερότροφα βακτήρια και πρωτόζωα. Στη συνέχεια, η συγκεκριμένη καλλιέργεια διατηρήθηκε σε φωτοβιοαντιδραστήρες, όγκου 4 L, χρησιμοποιώντας απόβλητο ζυθοποιίας (Πίνακας 1) ως μέσο ανάπτυξης με εβδομαδιαίες ανανεώσεις. Διαπιστώθηκε σταθεροποίηση της σύστασης του μικροβιακού πληθυσμού.



Σχήμα 1. (αριστερά) Φωτογραφία των νημάτων του *Leptolyngbya sp.* με χρήση μικροσκοπίας φθορισμού και (δεξιά) οι φωτοβιοαντιδραστήρες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Τα πειράματα της παρούσας μελέτης διεξήχθησαν υπό μη-ασηπτικές συνθήκες σε αναδευόμενους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, όγκου 1 L (Σχήμα 1), κάτω από συνεχή φωτισμό $120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, σε θερμοκρασία $23 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$, χωρίς ρύθμιση pH και ατμοσφαιρικές συγκεντρώσεις CO_2 . Στην αρχή κάθε πειράματος προστέθηκε εμβόλιο μικροοργανισμών 10% επί του συνολικού όγκου της καλλιέργειας (από τη δεξαμενή ανακαλλιέργειας), σε μέσο υγρών αποβλήτων ζυθοποιίας. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων (που διήρκεσαν 8 ημέρες), λαμβάνονταν ημερησίως δείγματα όγκου 10 mL. Έπειτα από διήθηση και ξήρανση στους $100 \text{ }^\circ\text{C}$, προσδιοριζόταν η συνολική ποσότητα των αιωρούμενων στερεών, και κατ' επέκταση η ποσότητα της ξηρής βιομάζας. Το υπερκείμενο υγρό εξετάσθηκε ως προς το περιεχόμενό τους σε αμμωνιακό άζωτο ($\text{NH}_4\text{-N}$), νιτρικό άζωτο ($\text{NO}_3\text{-N}$), ορθοφωσφορικά ιόντα ($\text{OP}/\text{PO}_4^{3-}$), ολικό φωσφόρο (TP)^[15]. Επιπλέον, προσδιορίσθηκε η ποσότητα των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών στην ξηρή βιομάζα^[16,17] και πραγματοποιήθηκε εκχύλιση και προσδιορισμός των λιπιδίων από την ξηρή βιομάζα^[18].

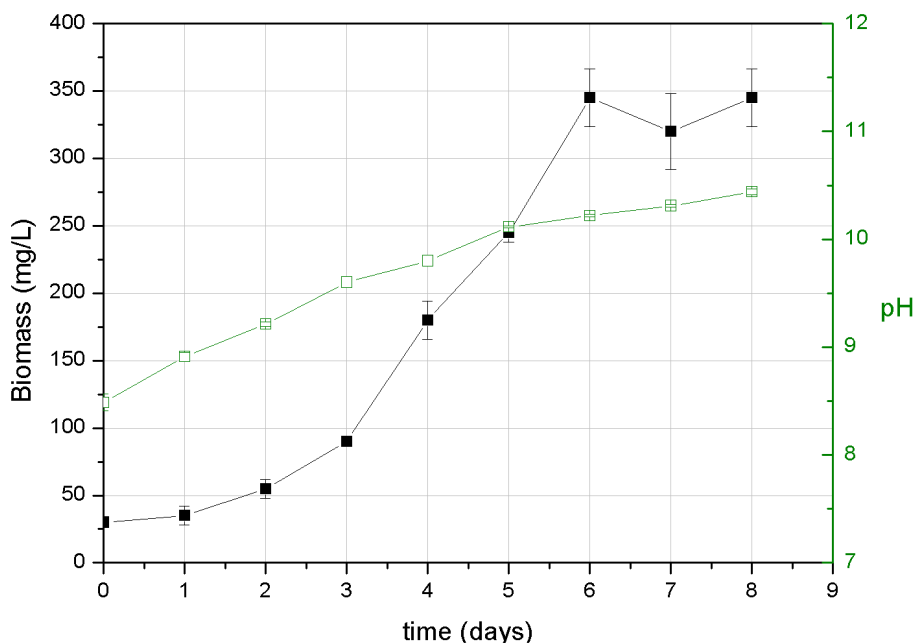
Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά υγρών αποβλήτων ζυθοποιίας.

Ρύπος	Συγκέντρωση (mg L^{-1})
$\text{NO}_3^-\text{(N)}$	12.3
$\text{NH}_4^+\text{(N)}$	4.6
OP	6.2
TP	6.5
COD	175

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εξέλιξη της συγκέντρωσης της παραγόμενης βιομάζας παρίσταται στο Σχήμα 2. Έπειτα από μία υστέρηση διάρκειας 1-2 ημερών, παρατηρείται εκθετική αύξηση της ποσότητάς της, με μέγιστο ρυθμό αύξησης της τάξεως των $87 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Έπειτα από διάστημα 6 περίπου ημερών, παρατηρείται σταθεροποίηση της βιομάζας σε συγκέντρωση 350 mg L^{-1} , συνδεδεμένη άμεσα με τη σταδιακή εξάντληση των ανόργανων θρεπτικών.

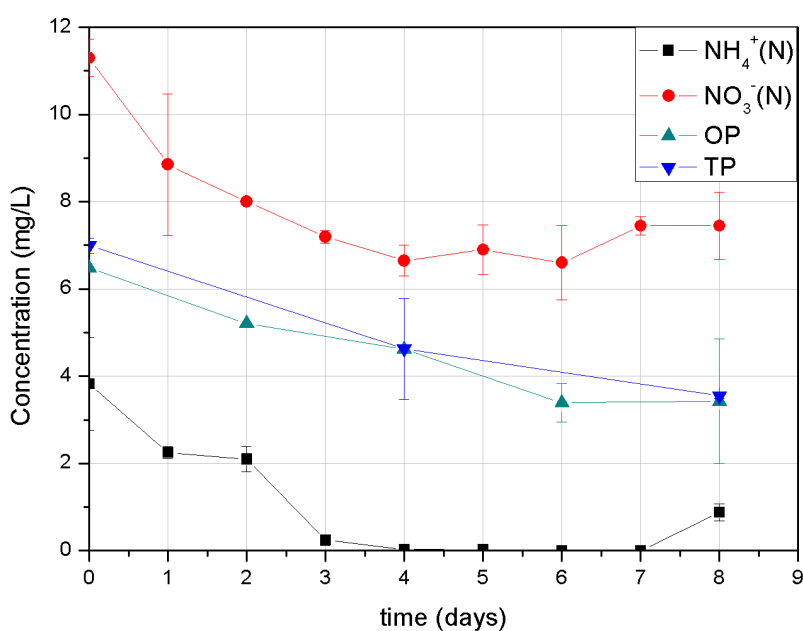
Αξίζει να σημειωθεί ότι, με την εξέλιξη της καλλιέργειας και την αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός μεγάλων συσσωματωμάτων από τις νηματώδεις δομές των κυττάρων του κυανοβακτηρίου. Αυτά, έχουν την τάση να καθιζάνουν εντός ολίγων λεπτών μετά την παύση της ανάδευσης, ιδιότητα που θα μπορούσε να διευκολύνει σε μεγάλο βαθμό το διαχωρισμό της βιομάζας από το υδατικό μέσο καλλιέργειας.



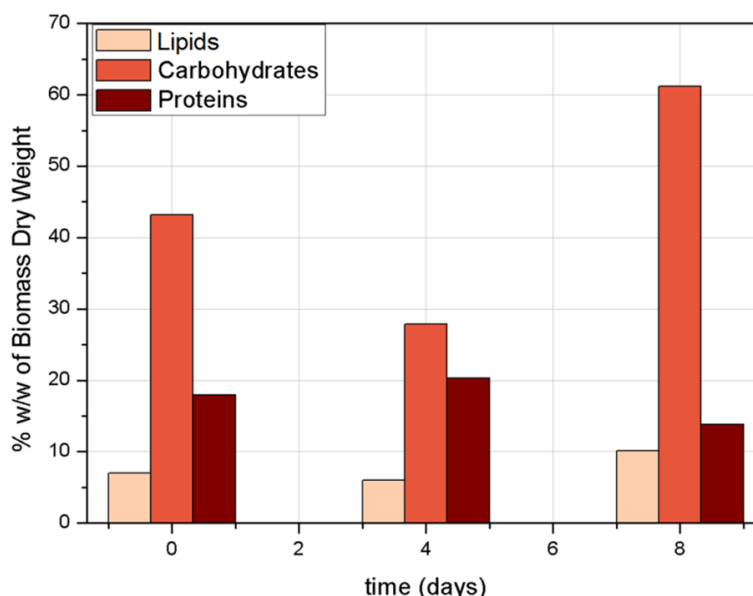
Σχήμα 2. Διάγραμμα εξέλιξης της συγκέντρωσης της ξηρής βιομάζας και του pH με την πάροδο του χρόνου καλλιέργειας

Εκτός από την παραγωγικότητα της βιομάζας, εξετάσθηκε η ικανότητα της καλλιέργειας να καταναλώνει τόσο τους ανόργανους, όσο και τους οργανικούς ρύπους (Σχήμα 3). Παρατηρήθηκε ραγδαία κατανάλωση των αμμωνιακών ιόντων, που οφείλεται εν μέρει στην εξάτμισή τους λόγω των αλκαλικών συνθηκών που επικρατούν και ελαττώνουν την διαλυτότητα της αμμωνίας^[19]. Η συγκέντρωση του νιτρικού αζώτου, από την άλλη, παρουσίασε πιο σταδιακή μείωση, μέχρι συγκέντρωση 6.4 mg L^{-1} . Η συγκέντρωση των ορθοφωσφορικών ιόντων και του ολικού φωσφόρου, μειώθηκαν σε ποσοστό 48% και 52% αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση των διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου πέρα από μία αρχική μείωση της τάξεως του 27%, παρέμεινε σταθερή, πιθανότατα λόγω παραγωγής εξωκυτταρικών οργανικών ουσιών, που λαμβάνει χώρα παράλληλα με την κατανάλωση των οργανικών ρύπων.



Σχήμα 3. Διάγραμμα εξέλιξης της συγκέντρωσης των ανόργανων ρύπων συναρτήσει του χρόνου καλλιέργειας



Σχήμα 4. Εξέλιξη της σύστασης κατά βάρος σύστασης της ξηρής βιομάζας σε πρωτεΐνες, υδατανθρακες και λιπίδια σε 3 στάδια της καλλιέργειας

Η σύσταση της παραγόμενης βιομάζας μεταβλήθηκε κατά την εξέλιξη του πειράματος σύμφωνα με το Σχήμα 4. Συγκεκριμένα, με την πάροδο του χρόνου, παρατηρήθηκε συσσώρευση υδατανθράκων και, σε μικρότερο βαθμό λιπιδίων σε ποσοστό επί του βάρους της ξηρής βιομάζας 62.5% και 10.5% αντίστοιχα. Η περιεκτικότητα της βιομάζας σε πρωτεΐνες κυμάνθηκε μεταξύ 14% και 20.3%.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις των ρύπων, συνεπώς η καλλιέργεια της συγκεκριμένης μικροβιακής κοινοπραξίας του *Leptolyngbya* sp έχει τη δυνατότητα να αποτελέσει μία αποτελεσματική, χαμηλού κόστους μέθοδος για την επεξεργασία αποβλήτων ζυθοποιίας. Επιπλέον, η ανάλυση της παραγόμενης βιομάζας υποδεικνύει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μία πληθώρα εφαρμογών (όπως π.χ. ως υπόστρωμα για παραγωγή βιοαιθανόλης αξιοποιώντας τις υψηλές συγκεντρώσεις υδατανθράκων ή ως ζωοτροφή λόγω των περιεχόμενων πρωτεϊνών).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Πράξης «INVALIDOR: Ερευνητική Υποδομή για την Αξιοποίηση Αποβλήτων και Αειφόρου Διαχείρισης Φυσικών Πόρων» (MIS 5002495) που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Chew KW, Yap JY, Show PL, Suan NH, Juan JC, Ling TC, Lee DJ, Chang JS. (2017). *Bioresour. Technol.* 229, 53-62.
- [2] Economou CN, Marinakis N, Moustaka-Gouni M, Kehayias G, Aggelis G, Vayenas DV. (2015). *Ann. Microbiol.* 65(4): 1941-1948.
- [3] Tsolcha ON, Tekerlekopoulou AG, Akratos CS, Antonopoulou G, Aggelis G, Genitsaris S, Moustaka-Gouni M, Vayenas DV. (2018). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25: 17957–17966.
- [4] Kebede TB. (2018). *International Journal of Engineering Development and Research.* 6 (1): 2321-9939.
- [5] Koutra E, Economou CN, Tsafraikidou P, Kornaros M. (2018). *Trends Biotechnol.* 36(8): 819-833.
- [6] Castenholz RW., (2001). Springer-Verlag 1: 539-562.
- [7] Μάρκου Γ., Τζοβενής Ι., Νερατζής Η. (2013). (1): 8
- [8] Raposo M.F., Oliveira S.E., Castro P. M., Bandarra N.M. and Morais R.M. (2010). *J. Inst. Brew.* 116(3), 285–292
- [9] Choi H. (2016). Parametric study of brewery wastewater effluent treatment using *Chlorella vulgaris* microalgae 21(4): 401-408
- [10] Kim J.H., Choi W., Jeon S.-M., Kim T., Park A., Kim J., Heo S.-J., Oh C., Shim W.-B., Kang D.-H. (2015). *J Appl Microbiol.* 119(6):1597-612
- [11] Khemka A. and Saraf M. (2015) *J. of Environmental Science and Water Resources* Vol. 4(4)
- [12] Tsolka O.N., Tekerlekopoulou A.G., Akratos C.S., Aggelis G., Genitsaris S., Moustaka-Gouni M., Vayenas D.V. (2017). *Journal of Cleaner Production* 148: 185-193
- [13] Taton A., Lis E., Adin D.M., Dong G., Cookson S., Kay S.A., Golden S.S., Golden J.W. (2012). *Plos ONE* 7(1): e30901
- [14] Moustaka-Gouni M, Michaloudi E, Sommer U. (2014). *Freshw Biol* 59:1136–1144.
- [15] APHA, AWWA, WPCF. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edn. Washington, DC.
- [16] Bellou S. and Aggelis G. (2013). *J. Biotechnol.* 164(2), 318-329.
- [17] Bradford M.M. (1976). *Anal. Biochem.* 72(1-2), 248-254.
- [18] Economou Ch.N., Marinakis N., Moustaka-Gouni M., Kehayias G., Aggelis G. and Vayenas D.V. (2015). *Ann. Microbiol.* 65(4), 1941-1948.
- [19] Dasgupta K.S., Dong S. (1986). 20(3): 565-570