

**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**Διδακτορική Διατριβή**

**Βιοαντιδραστήρες μεμβρανών για την  
επεξεργασία βιομηχανικών λυμάτων**

**Μπαμπατσούλη Παναγιώτα**

**Χημικός Μηχανικός**

**Χανιά, Ιούνιος 2014**

## **Επταμελής επιτροπή**

**Ν. Καλογεράκης, Καθηγητής, ΠΚ, ΜΗΠΕΡ, Επιβλέπων καθηγητής**

**Θ. Μανιός, Επίκουρος Καθηγητής, ΤΕΙ – Κρήτης**

**Δ. Βενιέρη, Επίκουρη Καθηγήτρια, ΠΚ, ΜΗΠΕΡ**

**Δ. Διαμαντόπουλος, Καθηγητής, ΠΚ, ΜΗΠΕΡ**

**Ν. Παρανυχιανάκης, Επίκουρος Καθηγητής, ΠΚ, ΜΗΠΕΡ**

**Π. Γκίκας, Επίκουρος καθηγητής, ΠΚ, ΜΗΠΕΡ**

**Α. Ανδρεαδάκης, Καθηγητής, ΕΜΠ., Πολ. Μηχ.**

## Ευχαριστίες

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.

Πρώτα απ’ όλα, είμαι ευγνώμων στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Καθηγητή του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος κ. Νικόλαο Καλογεράκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Η βοήθειά του και οι συμβουλές του κατά τη διάρκεια της δουλειάς μου υπήρξαν καθοριστικής σημασίας. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ξεχωριστά για την οικονομική υποστήριξη που μου παρείχε, η οποία ήταν απαραίτητη για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης την επίκουρη καθηγήτρια και μέλους της τριμελούς επιτροπής κ. Βενιέρη Δανάη για την εποικοδομητική συνεργασία μας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής κ. Ευάγγελο Διαμαντόπουλο, κ. Πέτρο Γκίκα, κ. Θρασύβουλο Μανιό και κ. Ανδρέα Ανδρεαδάκη για την τιμή που μου έκαναν με την πρόθυμη συμμετοχή τους. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον επίκουρο καθηγητή και μέλος της επταμελούς επιτροπής κ. Νικόλαο Παρανυχιανάκη για την πολύτιμη βοήθειά του στην σύνδεση συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών με την επεξεργασία του αποβλήτου που αναφέρεται στο β μέρος της συγκεκριμένης διατριβής. Τον ευχαριστώ πολύ για τον χρόνο που διέθεσε όποτε τον χρειάστηκα τους τελευταίους μήνες και για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του.

Ευχαριστώ τον Στέλιο Φοδελιανάκη για την συνδρομή του στον χαρακτηρισμό της μικροβιακής κοινότητας με τη μέθοδο του Pyrosequencing. Επίσης τις ευχαριστίες μου οφείλω στον Σταύρο Χριστοφιλόπουλο για την ουσιαστική βοήθειά του σε όποια τεχνικά προβλήματα του αντιδραστήρα προέκυψαν κατά τη διάρκεια της διατριβής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στη συνάδελφο και φίλη μου, Εύη Συρανίδου, η οποία ήταν δίπλα μου όποτε τη χρειάστηκα. Η θετική στάση και οι συμβουλές της τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο υπήρξαν πολύτιμες. Τέλος πρέπει να ευχαριστήσω την Στέλλα Βουτσαδάκη και την Maria- Liliana Saru, των οποίων η

βοήθεια υπήρξε ουσιαστική σε ότι αφορά μεθόδους χημικών αναλύσεων. Να εκφράσω επίσης τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας, καθώς και στα αδέρφια μου, Γιάννη και Κατερίνα για την συμπαράστασή τους. Ονομαστικά θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου Αντωνίου Ελευθερία, Κορκακάκη Εμμανουέλα, Πολίτη Μαρία, Κατσώνη Σίσσυ, Κοτρωνάκη Μανώλη, Τσικνιά Μυρτώ για τις ευχάριστες στιγμές που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο, καθώς και για τη βοήθεια που μου προσέφεραν όταν τη χρειάστηκα.

Πάνω απ' όλους, είμαι ευγνώμων στους γονείς μου, Θανάση και Μαρίτσα για την υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια και στους οποίους οφείλω όλη τη διαδρομή των σπουδών μου μέχρι σήμερα. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ και στον σύζυγό μου, Γιώργο για την αμέριστη συμπαράστασή του και την ηθική του υποστήριξη, καθώς και για τους τόνους θαλασσινού νερού που χρειάστηκε να κουβαλήσει για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής. Για το τελευταίο χρωστάω επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Νίκο Καπετανάκη, τον Στέλιο Φοδελιανάκη και τον Γιάννη Χατά.

**Την εργασία αυτή θέλω να την αφιερώσω στον Γιώργο και στο γιο που περιμένουμε με τόση χαρά..**

## Περιεχόμενα

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ.....	7
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	9
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	11
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ .....	12
ΜΕΡΟΣ Α.....	18
A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	19
A.2 ΣΤΟΧΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ .....	21
A.3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΙΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ..	22
A.3.1 Συστήματα MBR - Αρχή λειτουργίας και διατάξεις .....	22
A.3.2 Μορφές μονάδων μεμβρανών στα συστήματα MBR.....	23
A.3.3 Έμφραξη – Είδη και μηχανισμοί .....	25
A.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την έμφραξη .....	26
A.3.4.1 Χαρακτηριστικά της μεμβράνης .....	27
A.3.4.2 Χαρακτηριστικά της βιομάζας .....	29
A.3.4.3 Λειτουργικές συνθήκες .....	32
A.3.5 Τρόποι αντιμετώπισης της έμφραξης.....	35
A.3.5.1 Υδραυλικός καθαρισμός .....	35
A.3.5.2 Χημικός καθαρισμός .....	36
A.4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	38
A.4.1 Περιγραφή του συστήματος βιοαντιδραστήρα μεμβρανών.....	38
A.4.2 Χαρακτηριστικά της μονάδας μεμβρανών .....	41
A.4.3 Λειτουργία Βιοαντιδραστήρα Μεμβρανών .....	41
A.4.4 Καθαρισμός μεμβρανών .....	42
A.4.5 Δειγματοληψίες –Αναλυτικές μέθοδοι.....	43
A.4.5.1 Προσδιορισμός Ολικών και Πτητικών Αιωρούμενων Στερεών .....	43
A.4.5.2 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD).....	44
A.4.5.3 Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD <sub>5</sub> ) .....	45
A.4.5.4 Αμμωνιακό άζωτο (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N) .....	45
A.4.5.5 Νιτρικό άζωτο (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N) .....	45
A.4.5.6 Ολικό άζωτο (TN) και Ολικός οργανικός άνθρακας .....	46
A.4.5.7 Φώσφορος φωσφορικών ιόντων (P-PO <sub>4</sub> ) .....	46
A.4.5.8 Βαρέα μέταλλα .....	46
A.4.5.9 Μικροβιολογικοί δείκτες .....	47

A.4.5.10 Εκχύλιση των εξωκυτταρικά πολυμερών ενώσεων (EPS) και των διαλυτών μικροβιακών προϊόντων (SMP) .....	49
A.4.5.11 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών .....	50
A.4.5.12 Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων .....	50
A.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	52
A.5.1 Χαρακτηριστικά του βιομηχανικού αποβλήτου .....	52
A.5.2 Αιωρούμενα και πτητικά αιωρούμενα στερεά ανάμικτου υγρού (MLSS-MLVSS) ....	53
A.5.3 Ποιότητα εκροής MBR- Εξέταση της επίδρασης του χρόνου παραμονής των στερεών .....	54
A.5.3.1 Απομάκρυνση COD, TOC και BOD <sub>5</sub> .....	54
A.5.3.2 Νιτροποίηση- απονιτροποίηση και απομάκρυνση ολικού αζώτου .....	56
A.5.3.3 Απομάκρυνση φωσφόρου .....	58
A.5.3.4 Απομάκρυνση αιωρούμενων στερεών .....	59
A.5.3.5 Απομάκρυνση Βαρέων Μετάλλων.....	59
A.5.4 Μετρήσεις θερμοκρασίας ,pH και διαλυμένου οξυγόνου .....	61
A.5.5 Επίδραση του υδραυλικού χρόνου παραμονής στην ποιότητα της εκροής .....	63
A.5.6 Συγκεντρώσεις εξωκυτταρικών πολυμερών ενώσεων (EPS) και διαλυτών μικροβιακών προϊόντων (SMP) – Επίδραση του χρόνου παραμονής της λάσπης και του υδραυλικού χρόνου παραμονής.....	64
A.5.7 Έμφραξη μεμβρανών κατά τη διάρκεια λειτουργίας του πιλοτικού συστήματος....	68
A.6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	70
ΜΕΡΟΣ Β.....	72
B.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	73
B.2 ΣΤΟΧΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ .....	75
B.3 ΒΙΒΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΙΣΗ.....	76
B.3.1 Υδατοκαλλιέργειες .....	76
B.3.2 Συστήματα υδατοκαλλιέργειών με επανακυκλοφορία.....	78
B.3.2.1 Η βιολογική επεξεργασία στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας με επανακυκλοφορία.....	81
B.3.3 Βιολογική επεξεργασία αποβλήτων με χρήση μικροαλγών .....	82
B.3.3.1 Απομάκρυνση αζώτου σε καλλιέργειες μικροαλγών.....	85
B.3.3.2 Απομάκρυνση φωσφόρου σε καλλιέργειες μικροαλγών .....	85
B.3.3.3 Πηγές άνθρακα και ενέργειας στα μικροάλγη.....	86
B.3.3.4 Εφαρμογές μικροαλγών –βακτηρίων στην επεξεργασία αποβλήτων.....	87
B.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	91

B.4.1 Περιγραφή του συστήματος προσκολλημένης βιομάζας.....	91
B.4.2 Πειραματική Διαδικασία.....	93
B.4.3 Αναλυτικές μέθοδοι .....	95
B.4.3.1 Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (Chemical Oxygen Demand- COD).....	95
B.4.3.2 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου .....	95
B.4.3.3 Προσδιορισμός νιτρικού και ολικού αζώτου .....	96
B.4.3.4 Προσδιορισμός φωσφόρου φωσφορικών ιόντων.....	96
B.4.3.5 Προσδιορισμός πυκνοτήτων βακτηρίων και μικροαλγών στο βιοφίλμ .....	96
B.4.3.6 Εκχύλιση γενετικού υλικού από το βιοφίλμ .....	96
B.4.3.7 Πολλαπλασιασμός τμήματος του γενετικού τύπου 16SRNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	98
B.4.3.8 Ανάλυση μέσω ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδα σε διαβάθμιση αποδιατακτικών μέσων (DGGE) .....	99
B.4.3.9 Σύσταση της μικροβιακής κοινότητας .....	101
B.4.3.10 Ποσοτικοποίηση του αριθμού γονιδίων - Real-time PCR.....	102
B.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	104
B.5.1 Χρονική εξέλιξη ανάπτυξης βιοφίλμ.....	104
B.5.2 Σύσταση της μικροβιακής κοινότητας .....	105
B.5.3 Εξέταση σταθερότητας βακτηριακής κοινότητας.....	109
B.5.4 Προσδιορισμός αριθμού κυττάρων στο βιοφίλμ .....	110
B.5.5 Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου λειτουργίας της αντλίας τροφοδοσίας .....	111
B.5.6 Απομάκρυνση COD.....	115
B.5.7 Απομάκρυνση φωσφορικών .....	116
B.5.8 Απομάκρυνση $\text{NH}_4^+$ -N .....	117
B.5.9 Απομάκρυνση $\text{NO}_3^-$ -N και TN .....	119
B.5.10 Ποσοτικοποίηση του αριθμού γονιδίων μέσω της Real time PCR .....	121
B.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	123
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	126

## ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ

Συμβολισμός	Επεξήγηση
<b>MBR</b>	Membrane bioreactor- Βιοαντιδραστήρας μεμβρανών
<b>SRT</b>	Sludge Retention Time -Χρόνος παραμονής της λάσπης
<b>HRT</b>	Hydraulic Retention Time- Υδραυλικός χρόνος παραμονής
<b>EPS</b>	Extracellular Polymeric Substances- Εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις
<b>SMP</b>	Soluble Microbial Products- Διαλυτά μικροβιακά προϊόντα
<b>COD</b>	Chemical Oxygen Demand –Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο
<b>TN</b>	Total Nitrogen – Ολικό άζωτο
<b>N</b>	Nitrogen - Άζωτο
<b>P</b>	Phosphorus - Φώσφορος
<b>C</b>	Carbon - Άνθρακας
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N</b>	Ammonium nitrogen - Αμμωνιακό άζωτο
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N</b>	Nitrate nitrogen - Νιτρικό άζωτο
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P</b>	Phosphate phosphorus - Φώσφορος φωσφορικών
<b>NaOH</b>	Sodium Hydroxide - Υδροξείδιο του νατρίου
<b>MLSS</b>	Mixed Liquor Suspended Solids - Αιωρούμενα στερεά ανάμικτου υγρού
<b>MLVSS</b>	Mixed Liquor Volatile Suspended Solids - Πτητικά αιωρούμενα στερεά ανάμικτου υγρού
<b>DO</b>	Dissolved Oxygen - Διαλυμένο οξυγόνο
<b>TMP</b>	Transmembrane Pressure - Διαμεμβρανική πίεση
<b>F/M</b>	Food per microorganisms ratio - Λόγος τροφής προς μικροοργανισμούς
<b>TSS</b>	Total Suspended Solids - Ολικά αιωρούμενα στερεά
<b>VSS</b>	Volatile Suspended Solids - Πτητικά αιωρούμενα στερεά



<b>BOD<sub>5</sub></b>	Biochemical Oxygen Demand - Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο
<b>TOC</b>	Total Organic Carbon – Ολικός οργανικός άνθρακας
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin – Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης
<b>DGGE</b>	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – Ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη σε διαβάθμιση αποδιατακτικών
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction – Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
<b>AOA</b>	Ammonia Oxidizing Achaea – Οξειδωτές αμμωνίας που ανήκουν στα αρχαία
<b>AOB</b>	Ammonia Oxidizing Bacteria - Οξειδωτές αμμωνίας που ανήκουν στα βακτήρια

## ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα Α.1: Βασικές διατάξεις MBR :α) εμβαπτιζόμενο και β) εξωτερικό MBR. ....	23
Εικόνα Α. 2: Επίπεδες, σωληνοειδείς και κοιλών ινών μονάδες μεμβρανών. ....	23
Εικόνα Α.3: Μηχανισμοί υπεύθυνοι για την έμφραξη των μεμβρανών :α) απόφραξη πόρων β)στένωση πόρων γ)ενδιάμεση κατάσταση δ)δημιουργία κέικ.....	26
Εικόνα Α.4: Παράμετροι που επηρεάζουν την έμφραξη των μεμβρανών .....	27
Εικόνα Α. 5: Διάταξη της μονάδας MBR.....	38
Εικόνα Α.6: Το πιλοτικό σύστημα MBR στο βιολογικό της ΒΙ.ΠΕ Ηρακλείου.....	39
Εικόνα Α. 7: Κυκλώνας στο ρεύμα τροφοδοσίας του συστήματος MBR.....	40
Εικόνα Α.8: Συγκεντρώσεις MLSS και MLVSS στον MBR. ....	53
Εικόνα Α. 9: Ολικό και διαλυτό COD εισόδου και εξόδου. ....	54
Εικόνα Α.10: Απομάκρυνση COD που επιτυγχάνεται από το σύστημα. ....	54
Εικόνα Α.11: Συγκεντρώσεις $\text{NH}_4^+$ -N εισόδου και εξόδου .....	56
Εικόνα Α. 12: Συγκεντρώσεις $\text{PO}_4^{3-}$ -P εισόδου και εξόδου. ....	58
Εικόνα Α.13: Συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών εισόδου και εξόδου. ....	59
Εικόνα Α.14: Συγκεντρώσεις χαλκού στην είσοδο και στην έξοδο. ....	60
Εικόνα Α.15: Συγκεντρώσεις μαγγανίου στην είσοδο και στην έξοδο. ....	60
Εικόνα Α.16: Συγκεντρώσεις βαρίου στην είσοδο και στην έξοδο.....	60
Εικόνα Α.17: Συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου (DO) στον αντιδραστήρα. ....	62
Εικόνα Α. 18: pH ιλύος στον αντιδραστήρα. ....	62
Εικόνα Α.19: Θερμοκρασία (οC) στον αντιδραστήρα. ....	63
Εικόνα Α.20: Συγκεντρώσεις EPS (mg/g VSS) σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε κάθε SRT. ....	65
Εικόνα Α.21: Συγκεντρώσεις των SMP (mg/l) σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε κάθε SRT. ....	65
Εικόνα Α.22: Η οργανική φόρτιση του συστήματος σε διαφορετικούς SRTs και HRTs. ....	66
Εικόνα Α.23: Συγκεντρώσεις των EPS (mg/g VSS) σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε κάθε HRT. ....	67
Εικόνα Α.24: Συγκεντρώσεις των SMP (mg/l) σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε κάθε HRT. ....	67
Εικόνα Α.25: Η διαμεμβρανική πίεση στον αντιδραστήρα.....	69
Εικόνα Β.1: Απλοποιημένο διάγραμμα ροής για ένα σύστημα υδατοκαλλιέργειας με ανακυκλοφορία.....	79
Εικόνα Β.2: Αλληλεπιδράσεις μικροαλγών -βακτηρίων στην επεξεργασία αποβλήτων. ....	83
Εικόνα Β.3: Τεχνητές λίμνες ελίσσόμενου στίβου.....	84
Εικόνα Β.4: Σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες (αριστερά) και φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας (δεξιά). ....	84
Εικόνα Β.5: Χρήσεις βιομάζας που προέρχεται από τις μικτές κοινότητες μικροαλγών - βακτηρίων .....	90
Εικόνα Β.6: Διάγραμμα ροής του συστήματος, ADVANTEX AX-10. ....	92
Εικόνα Β.7: Τρόπος λειτουργίας του συστήματος. ....	93
Εικόνα Β.8: Χρονική εξέλιξη ανάπτυξης βιοφίλμ :τις πρώτες ημέρες λειτουργίας (επάνω αριστερά), μετά από 2 μήνες (επάνω δεξιά) και μετά από 3 μήνες λειτουργίας (κάτω δεξιά) και μετά τον εμβολιασμό μικροαλγών (κάτω αριστερά).....	104

Εικόνα Β.9: Φωτογραφίες από το οπτικό μικροσκόπιο που δείχνουν την ύπαρξη gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, μικροαλγών και μυκήτων στη μικροβιακή κοινότητα.	105
Εικόνα Β.10: Rarefaction καμπύλη για τις βακτηριακές αλληλουχίες.....	105
Εικόνα Β.11: Rarefaction καμπύλη για τις ευκαρυωτικές αλληλουχίες.....	106
Εικόνα Β.12: Δομή της ευκαρυωτικής κοινότητας σε επίπεδο τάξης ,όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του 18S γονιδιακού τόπου. ....	106
Εικόνα Β.13: δομή κοινότητας μυκήτων σε επίπεδο τάξης ,όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του 18S γονιδιακού τόπου. ....	107
Εικόνα Β.14: Δομή βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο τάξης, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του 16S γονιδιακού τόπου. ....	108
Εικόνα Β.15: DGGE προφίλ για τη βακτηριακή κοινότητα (εικόνα αριστερά) και ανάλυση ομαδοποίησης που δείχνει την ομοιότητα του δείκτη BC (εικόνα δεξιά). ....	109
Εικόνα Β.16: Αριθμός κυττάρων βακτηρίων και μικροαλγών ( log 10) ανά μονάδα επιφάνειας βιοφίλμ (cm <sup>2</sup> ) κάτω από τη λάμπα και πλησίον της λάμπας. ....	110
Εικόνα Β.17: Απομάκρυνση NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 600 mg/l. ....	111
Εικόνα Β.18: Απομάκρυνση NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 200mg/l. ....	112
Εικόνα Β.19: Απομάκρυνση NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 100mg/l. ....	112
Εικόνα Β.20: Απομάκρυνση PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 600mg/l.....	113
Εικόνα Β.21: Απομάκρυνση PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 200mg/l. ....	113
Εικόνα Β.22: Απομάκρυνση PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 100mg/l. ....	114
Εικόνα Β.23: Απομάκρυνση COD που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές αρχικές οργανικές φορτίσεις. ....	116
Εικόνα Β.24: Απομάκρυνση PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις.....	117
Εικόνα Β.25: Απομάκρυνση NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (αρχικής συγκέντρωσης 10mg/l) που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις. ....	118
Εικόνα Β.26: Απομάκρυνση NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (αρχικής συγκέντρωσης 100mg/l) που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις. ....	119
Εικόνα Β.27: Απομάκρυνση NO <sub>3</sub> -N που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις.....	120
Εικόνα Β.28: Απομάκρυνση TN που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις.....	121
Εικόνα Β.29: Πλήθος των γονιδιακών τόπων nirK και nosZ (no/ng DNA) στον αντιδραστήρα τροφοδοτούμενο από απόβλητο που περιέχει α)100mg/l NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N και 600mg/l COD και β)100mg/l NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N και 100mg/l COD.....	122

## ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας A.1: Χαρακτηριστικά των μονάδων μεμβρανών στα συστήματα MBR.....	24
Πίνακας A.2: Χαρακτηριστικά των μεμβρανών σε διάφορες διεργασίες .....	24
Πίνακας A.3: Χαρακτηριστικά της μονάδας μεμβρανών του συστήματος MBR.....	41
Πίνακας A.4: Συνθήκες λειτουργίας ICP-MS. ....	47
Πίνακας A.5: Οι κυριότερες παράμετροι που χαρακτηρίζουν το βιομηχανικό απόβλητο.....	52
Πίνακας A.6: Μέσες συγκεντρώσεις MLSS και MLVSS στην μόνιμη κατάσταση για κάθε SRT.....	53
Πίνακας A.7: Μέσες συγκεντρώσεις COD, TOC και BOD5 εισόδου και εξόδου και ποσοστιαίες απομακρύνσεις .....	55
Πίνακας A.8: Μέσες συγκεντρώσεις $\text{NH}_4^+$ -N, $\text{NO}_3^-$ -N και TN εισόδου και εξόδου και ποσοστιαίες απομακρύνσεις .....	57
Πίνακας A.9: Μέσες συγκεντρώσεις $\text{PO}_4^{3-}$ -P εισόδου και εξόδου και ποσοστιαίες απομακρύνσεις .....	58
Πίνακας A.10: Μικροβιολογικές παράμετροι εκροής.....	61
Πίνακας A.11: Μέσες συγκεντρώσεις τυπικών παραμέτρων σε είσοδο και έξοδο σε 2 διαφορετικούς HRTs. ....	64
Πίνακας B.1: Πηγές ενέργειας και άνθρακα σε διαφορετικούς μεταβολισμούς των μικροαλγών.....	87
Πίνακας B.2: Σύσταση συνθετικού αποβλήτου και ιχνοστοιχείων.....	94
Πίνακας B.3: Αλληλουχία βακτηριακών εκκινήτων που επιλέγησαν στην PCR.....	99
Πίνακας B.4: Συνθήκες PCR για τα βακτήρια σύμφωνα με τους Glaucia da P.Lima 2007. ..	99
Πίνακας B.5: Συνθήκες PCR που πραγματοποιήθηκε για τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας.....	102

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Οι βιοαντιδραστήρες μεμβρανών (Membrane Bioreactors – MBR) αποτελούν μια σχετικά σύγχρονη μέθοδο που εφαρμόζεται ευρέως τα τελευταία χρόνια στην επεξεργασία αστικών και βιομηχανικών λυμάτων. Συνδυάζουν την βιολογική επεξεργασία με την διήθηση διαμέσου μεμβρανών για τον διαχωρισμό της τελικής εκροής από την αιωρούμενη βιομάζα. Βασικό τους πλεονέκτημα είναι πως μπορούν να λειτουργήσουν αποδοτικά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις λυμάτων, οι οποίες μπορεί να κυμαίνονται από 5000-20000 mg/l, μειώνοντας έτσι τις συνολικές απαιτήσεις των δεξαμενών σε όγκο. Από την άλλη βασικό μειονέκτημα των συστημάτων αυτών είναι η έμφραξη των μεμβρανών, που έχει επιπτώσεις τόσο σε λειτουργικό όσο και σε οικονομικό επίπεδο.

Στο Α μέρος λοιπόν της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής εξετάστηκε η λειτουργία μιας πιλοτικής μονάδας βιολογικού καθαρισμού με βιοαντιδραστήρα μεμβρανών στην ΒΙ.ΠΕ Ηρακλείου Κρήτης, η οποία επεξεργάζεται τα βιομηχανικά απόβλητα που εισέρχονται στις εγκαταστάσεις του βιολογικού της ΒΙ.ΠΕ χωρίς καμμία προεπεξεργασία, πέραν από αυτή της εσχάρωσης. Το συγκεκριμένο απόβλητο χαρακτηρίζεται κυρίως από το πολύ υψηλό οργανικό φορτίο που περιέχει (μέσο COD=3000 mg/l) και την μεγάλη αναλογία άνθρακα προς άζωτο (COD/TN = 80). Ο αντιδραστήρας βρισκόταν σε λειτουργία για περισσότερες από 600 μέρες και κατά την περίοδο αυτή τρεις διαφορετικοί χρόνοι παραμονής των στερεών (Solid Retention Times – SRTs = 30, 20 & 15 ημέρες) εξετάστηκαν. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν α) την εξέταση της επίδρασης του SRT στην ποιότητα της εκροής β) τον προσδιορισμό των διαλυτών (SMP) και δεσμευμένων εξωκυτταρικών πολυμερών (EPS) που παράγονται στο σύστημα με στόχο την διερεύνηση της επίδρασης του SRT στην έμφραξη των μεμβρανών και γ) την εξέταση της επίδρασης του υδραυλικού χρόνου παραμονής (Hydraulic Retention Time- HRT) τόσο στην ποιότητα εξόδου της εκροής, όσο και στη συσσώρευση των EPS και SMP, σε σταθερό SRT ίσο με 20 ημέρες.

Η αποδοτικότητα του συστήματος, όσον αφορά την απομάκρυνση C, TN και P κυμαινόταν σε πολύ υψηλά επίπεδα παρά την υψηλή αναλογία C/N και τις υψηλές διακυμάνσεις στη σύσταση του τροφοδοτούμενου αποβλήτου σε όλους τους εξεταζόμενους χρόνους παραμονής των στερεών. Οι υψηλότερες απομακρύνσεις COD, TN και P (99.2%, 94.3% και 89.3% αντίστοιχα), καθώς επίσης και μικρές

συγκεντρώσεις EPS και SMP παρατηρήθηκαν για  $SRT=20$  ημέρες. Επίσης σε αυτό τον  $SRT$  περιορίζεται σημαντικά το φαινόμενο της έμφραξης. Ταυτόχρονη νιτροποίηση και απονιτροποίηση επιτεύχθηκε στο σύστημα. Η νιτροποίηση ήταν σχεδόν πλήρης ακόμα και σε μικρά  $SRTs$ , ενώ η απονιτροποίηση ήταν αυξημένη στα υψηλά  $SRTs$ . Η μείωση στον υδραυλικό χρόνο παραμονής είχε αμελητέα επίδραση στην απομάκρυνση οργανικού υλικού και την νιτροποίηση, αλλά μεγάλη επίδραση στην απονιτροποίηση και την απομάκρυνση φωσφόρου. Οι υδατάνθρακες ήταν το κυρίαρχο συστατικό των EPS και SMP κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του πιλοτικού συστήματος. Οι συγκεντρώσεις των EPS και SMP ήταν υψηλότερες για υψηλότερο  $SRT$ , σε αντίθεση με τις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές, υποδηλώνοντας πως τα βακτήρια παράγουν περισσότερα EPS όταν επικρατούν συνθήκες ενδογενούς μεταβολισμού στον αντιδραστήρα. Η παρατηρούμενη αντικρουόμενη συμπεριφορά αντικατοπτρίζει την πολυπλοκότητα της βιολογικής διεργασίας και είναι αποτέλεσμα των πολλών και διαφορετικών ειδών μεμβρανών, του διαφορετικού είδους αποβλήτου, των διαφορετικών λειτουργικών συνθηκών και των διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων που ο κάθε ερευνητής χρησιμοποιεί.

Επιπλέον στα πλαίσια αυτής της διατριβής και στα ευρύτερα πλαίσια του όρου ‘βιοαντιδραστήρες μεμβρανών’ στο μέρος β εξετάστηκε ένας αντιδραστήρας προσκολλημένης βιομάζας, με μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών ένα πατενταρισμένο ύφασμα για την επεξεργασία ενός συνθετικού αποβλήτου που προσομοιώνει το ‘βιομηχανικό’ απόβλητο που προέρχεται από την έξοδο θαλασσινών υδατοκαλλιεργειών. Οι υδατοκαλλιεργείες είναι ένας από τους ταχέως αναπτυσσόμενους τομείς με σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια παραγωγή θαλασσινών, εξαιτίας της συνεχούς εξάντλησης των φυσικών αποθεμάτων. Ο τομέας αυτός έχει εξελιχθεί σε μια νέα βιομηχανία με μείζονα ρόλο στην εθνική και παγκόσμια οικονομία. Όσο όμως η παραγωγή αυξάνεται οι επιπτώσεις στο περιβάλλον γίνονται όλο και πιο δυσμενείς. Οι βιομηχανίες αυτές παράγουν τεράστιες ποσότητες θαλασσινού αποβλήτου με υψηλές συγκεντρώσεις N και P με σοβαρό περιβαλλοντικό αντίκτυπο (ευτροφισμός, τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς). Επομένως το απόβλητο αυτό πριν τη διάθεσή του στα φυσικά υδάτινα οικοσυστήματα πρέπει να υφίσταται την κατάλληλη επεξεργασία. Απώτερος λοιπόν στόχος της συγκεκριμένης έρευνας είναι η επεξεργασία του αποβλήτου που προέρχεται από την τελική έξοδο των υδατοκαλλιεργειών ή και ταυτόχρονα η

βελτιστοποίηση της βιολογικής επεξεργασίας που μπορεί να ενσωματωθεί σε ένα κλειστό κύκλωμα εξυγίανσης οστράκων.

Στο μέρος β λοιπόν και στα πλαίσια του παραπάνω σκοπού ερευνάται για πρώτη φορά ένας αντιδραστήρας προσκολλημένης βιομάζας (Advantex AX-10), τροφοδοτούμενος με θαλασσινό συνθετικό αποβλήτο σε καθημερινή βάση. Με την πάροδο του χρόνου αναπτύχθηκαν βακτήρια πάνω στο ύφασμα του αντιδραστήρα και στη συνέχεια προστέθηκαν μικροάλγη (*Picochlorum sp.*). Είναι γνωστό πως τα μικροάλγη έχουν την ικανότητα να αφομοιώνουν/συσσωρεύουν θρεπτικά όπως το άζωτο και ο φώσφορος, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα σημαντικά στην επεξεργασία αποβλήτων. Επίσης τα μικροάλγη αναπτύσσουν συνεργιστικές σχέσεις με τα βακτήρια, τα οποία οξειδώνουν οργανική ύλη παρέχοντας διοξείδιο του άνθρακα στα μικροάλγη και τα οποία με τη σειρά τους παράγουν οξυγόνο για τα βακτήρια, μειώνοντας έτσι τις απαιτήσεις του συστήματος σε οξυγόνο.

Οι αναλύσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο σύστημα αφορούσαν: α) την εύρεση του βέλτιστου χρόνου λειτουργίας της αντλίας του αντιδραστήρα β) την περιγραφή της μικροβιακής κοινότητας που αποτελούσε το βιοφίλμ γ) την αποδοτικότητα του συστήματος (απομάκρυνση COD,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , TN,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) σε διάφορες αναλογίες C/N του τροφοδοτούμενου αποβλήτου δ) την σύνδεση συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών με την επεξεργασία του αποβλήτου. Μια ποικιλόμορφη κοινότητα με σταθερή δομή στο χρόνο που αποτελείτο από πρωτόζωα, μύκητες, βακτήρια και μικροάλγη παρατηρήθηκε. Υψηλές απομακρύνσεις COD και  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (100%) επιτεύχθηκαν σε υδραυλικό χρόνο παραμονής μόνο λίγων ωρών. Η αναλογία C/N δεν είχε μεγάλη επίδραση στην απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (τουλάχιστον στις μικρές αρχικές συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ). Το ίδιο όμως δεν συνέβαινε και για την απομάκρυνση  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  και  $\text{PO}_4^{3-}$ , η οποία παρουσίαζε ισχυρή εξάρτηση από το COD. Τα αποτελέσματα της έρευνας είναι ενθαρρυντικά για την εφαρμογή του συγκεκριμένου συστήματος στην επεξεργασία ενός αποβλήτου μεγάλης αλατότητας, με υψηλές συγκεντρώσεις N και P.

## ABSTRACT

Membrane bioreactor technology is a relatively modern method that is widely applied in recent years in the treatment of municipal and industrial wastewater. It combines the biological treatment with filtration through membranes for separation of the final effluent from the suspended biomass. Its main advantage is that it can operate efficiently at very high concentrations of sludge, which can range from 5000-20000 mg / l, thereby reducing the overall requirements of the tank volume. On the other hand the main disadvantage of these systems is the clogging of the membranes, which affects on both operational and financial terms.

In the framework of this thesis the operation of a MBR pilot plant treating industrial wastewater at the Heraklion Industrial Park was investigated at part a of this work. The pilot treats industrial wastewater that is primarily characterized by a high COD (average COD = 3000 mg / l) and a high carbon to nitrogen ratio (COD / TN = 80) without any other pre-treatment, other than grit removal. The reactor was in operation for more than 600 days and three different Sludge Retention Times (SRTs = 30, 20 & 15 days) were examined. The analyzes performed were to examine a) the effect of SRT on effluent quality b) the accumulation of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Soluble Microbial Products (SMP) in order to investigate the effect of SRT on clogging of the membranes and c) the effect of Hydraulic Retention Time (HRT) both on effluent quality and on EPS and SMP accumulation, at a constant SRT equal to 20 days.

A very good effluent quality in terms of organic, nitrogen and phosphate concentrations was observed at all three SRTs despite the high C/N ratio and the high fluctuations in the influent quality .Higher removals of COD, TN and P (99.2%, 94.3% and 89.3% respectively), as well as small concentrations of EPS and SMP were observed for SRT equal to 20 days. Also in this SRT the phenomenon of membrane clogging is significantly limited. Simultaneous nitrification and denitrification occurred in the system. Nitrification was almost complete even in small SRTs, while denitrification was increased at high SRTs. The decrease in the hydraulic residence time had a negligible effect on the removal of organic matter and nitrification, but a great effect on the denitrification and phosphorus removal. Carbohydrates were the dominant component of EPS and SMP during the operation of the pilot system. The



concentrations of the EPS and SMP were higher for higher SRT, in contrast to most references, indicating that bacteria produce more EPS when endogenous metabolic conditions prevail in the reactor. The observed contradictory results reflect the complexity of the biological process and is due to the different types of membranes, the different types of wastewater, the different operating conditions and the different analytical methods that are used by each researcher.

Moreover, in part b of this thesis and in the broader context of the term 'membrane bioreactor' an attached growth biomass reactor was examined. This reactor uses a patented textile as a medium for the treatment of a synthetic wastewater that simulates the wastewater from marine aquaculture facilities. Marine aquaculture is one of the most rapidly growing sectors with an important role in the global seafood production, due to the continuous depletion of natural stocks and has developed into a new industry with a national and global importance. But as production continues to rise steadily the detrimental impacts on the environment can be significant. Such industrial facilities produce huge amounts of seawater enriched in inorganic N and P and can cause severe environmental impacts (eutrophication, toxicity to aquatic organisms). In order to conserve and protect our aquatic ecosystems, effluents should be treated prior their disposal into natural water bodies. The main aim of this work is the treatment of wastewater that is produced from aquaculture facilities and/or simultaneously the optimization of the biological treatment procedure that can be incorporated in the loop of a recirculating aquaculture system.

In the framework of the above aim it was first investigated a packed bed bioreactor fed with saline wastewater on a daily basis. Initially, consortia of marine bacteria were developed in the system and they were supplemented with the addition of *Picochlorum* sp. It is known that microalgae have the ability to assimilate/ accumulate nutrients such as N and P for their growth that is beneficial for wastewater treatment. Furthermore microalgae develop synergetic relationships with bacteria oxidizing organic matter and supplying inorganic carbon to microalgae which in turn produce oxygen for bacteria and by this way decrease the need of externally supplied oxygen to the system.

The main objectives of this study were: a) to find the optimal pump operation time of the reactor b) the description of the biofilm community screening c) the treatment

capacity efficiency of the system (removal of COD,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , TN,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) under changes in C/N ratio of the synthetic wastewater d) the description of the link of the treatment with the presence of certain groups microbes. A diverse community consisted of fungi, bacteria and microalgae and with a high stability in bacterial community was observed. High removals of COD and  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (100%) were achieved in a hydraulic residence time of just a few hours. The C / N ratio had not a great effect on the removal of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (at least in small initial concentrations of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) but on the other hand  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  showed a strong dependence on C/N ratio. Based on the results that are presented in this work the system seems to constitute an alternative and effective treatment scheme for the management of saline wastewater with high concentrations of N and P.

## **ΜΕΡΟΣ Α**

## A.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνολογία των βιοαντιδραστήρων μεμβρανών (Membrane Bioreactor – MBR) αποτελεί μια ευρέως αποδεκτή βιολογική μέθοδο επεξεργασίας αστικών και βιομηχανικών υγρών αποβλήτων, η οποία ολοένα και εξελίσσεται τα τελευταία 20 χρόνια. Στο σύστημα MBR λαμβάνουν χώρα δύο κύριες διεργασίες: α) η βιολογική επεξεργασία και β) η διήθηση του ανάμικτου υγρού διαμέσου μεμβρανών, με σκοπό τον διαχωρισμό του από την επεξεργασμένη εκροή. Τα πλεονεκτήματα της παραπάνω τεχνολογίας σε σχέση με τη συμβατική διεργασία ενεργού ιλύος περιλαμβάνουν: δυνατότητα λειτουργίας σε υψηλούς χρόνους παραμονής στερεών και επίτευξη υψηλότερων συγκεντρώσεων αιωρούμενων στερεών ανάμικτου υγρού, μειωμένη παραγωγή λάσπης, μικρές απαιτήσεις σε όγκο του βιολογικού αντιδραστήρα, υψηλή ποιότητα εκροής (Judd 2008). Εφόσον οι MBR μπορούν να λειτουργήσουν σε υψηλούς χρόνους παραμονής των στερεών (Sludge Retention Times - SRTs), η διαδικασία της νιτροποίησης μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική και πλήρης, εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού ανάπτυξης των νιτροποιητικών βακτηρίων. Οι μεγάλοι χρόνοι παραμονής στερεών που εφαρμόζονται στα συστήματα MBR προλαμβάνουν την έκπλυση των νιτροποιητικών βακτηρίων και άλλων αργά αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών από τον βιοαντιδραστήρα, με αποτέλεσμα την αύξηση της βιοποικιλότητας της ενεργού ιλύος (Metcalf & Eddy 2003). Ταυτόχρονη νιτροποίηση και απονιτροποίηση μπορεί επίσης να επιτευχθεί στα συστήματα αυτά, ως αποτέλεσμα των διαβαθμίσεων στις συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου στα μικροβιακά συσσωματώματα ή στο βιοφίλμ (Paetkau & Cicek 2011, Hocaoglu et al. 2011). Ανοξικές μικροζώνες αναπτύσσονται μέσα στα συσσωματώματα/βιοφίλμ, ενώ αερόβιες συνθήκες επικρατούν στα εξωτερικά επιφανειακά στρώματα (Pochana & Keller 1999). Επιπλέον η απομάκρυνση οργανικού υλικού είναι πολύ υψηλή σε ένα σύστημα MBR και υψηλές απομακρύνσεις χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (>90%) έχουν παρατηρηθεί (Wang et al. 2012, Shin et al. 2005). Εξαιτίας όλων των παραπάνω πλεονεκτημάτων τα συστήματα αυτά έχουν μελετηθεί σε ένα πλήθος εφαρμογών, ανάμεσά στις οποίες και η επεξεργασία των βιομηχανικών αποβλήτων (Mutamim et al. 2013, Acharya et al. 2006, Rahman & Al-Malack 2006, Prado et al. 2009, Dvořák et al. 2013).

Από την άλλη πλευρά η έμφραξη των μεμβρανών είναι πιθανότατα το πιο σημαντικό μειονέκτημα αυτής της τεχνολογίας με αρνητικές επιπτώσεις στη λειτουργία των

συστημάτων MBR. Το αυξημένο λειτουργικό κόστος που οφείλεται στις υψηλές απαιτήσεις σε αερισμό (για τον περιορισμό της έμφραξης των μεμβρανών), στην απαιτούμενη αντικατάσταση των μεμβρανών, καθώς και στο υψηλό κόστος τους αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην ευρεία εφαρμογή τους (Le-Clech et al. 2006, Drews 2010). Η έμφραξη των μεμβρανών είναι η αντίσταση που προκαλείται στη ροή του διηθήματος ως αποτέλεσμα της συνεχόμενης εναπόθεσης σωματιδίων στην επιφάνεια και στο εσωτερικό της μεμβράνης. Πολλοί ερευνητές έχουν συσχετίσει την έμφραξη των μεμβρανών με τη συγκέντρωση της βιομάζας και τη συγκέντρωση των εξωκυτταρικών πολυμερών ενώσεων (Extracellular Polymeric Substances-EPS) και των διαλυτών μικροβιακών προϊόντων (Soluble Microbial Products –SMP) του ανάμικτου υγρού (Wang et al. 2012, Meng et al. 2009, Rosenberger et al. 2006, Ji & Zhou 2006).

Τα EPS είναι βιολογικής προέλευσης και θεωρούνται ως το μέσο που επιτρέπει τη συγκράτηση των βακτηριδίων στις βιοκροκίδες. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την συσχέτιση του χρόνου παραμονής των στερεών και της συγκέντρωσης των EPS και των SMP, αλλά αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση του χρόνου παραμονής των στερεών στην έμφραξη των μεμβρανών έχουν αναφερθεί. Αρκετοί ερευνητές έχουν συνδέσει την αύξηση του SRT με μείωση των EPS και SMP, διότι η βιομάζα παραμένει περισσότερο στον βιοαντιδραστήρα παρατείνοντας τη διαδικασία της βιοαποδόμησης. Σε αντίθετη περίπτωση αναφέρουν πως η μείωση του SRT συνεπάγεται αύξηση των EPS και SMP και επομένως και επιδείνωση της έμφραξης (Al-Halbouni et al. 2008, Ahmed et al. 2007a, Liang et al. 2007, Dong & Jiang 2009). Άλλες μελέτες δείχνουν ακριβώς το αντίθετο (Huang et al. 2011, Drews et al. 2008). Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα είναι εξαιτίας της πολυπλοκότητας της βιολογικής επεξεργασίας, των πολλών και διαφορετικών ειδών μεμβρανών, του διαφορετικού είδους αποβλήτου, των διαφορετικών λειτουργικών συνθηκών και των διαφορετικών αναλυτικών μεθόδων που ο κάθε ερευνητής χρησιμοποιεί. Επιπλέον οι περισσότερες μελέτες στη βιβλιογραφία χρησιμοποιούν συνθετικό απόβλητο με εύκολα βιοαποδομήσιμες ενώσεις ως υπόστρωμα και εργαστηριακούς βιοαντιδραστήρες με σταθερή σύσταση εισόδου.

## **A.2 ΣΤΟΧΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ**

Κύριος στόχος αυτού του κεφαλαίου είναι η μελέτη της λειτουργίας ενός βιοαντιδραστήρα με μεμβράνες, που επεξεργάζεται βιομηχανικό απόβλητο στην ΒΙ.ΠΕ του Ηρακλείου. Το απόβλητο αυτό χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλογία χημικά απαιτούμενου οξυγόνου προς άζωτο και υψηλές διακυμάνσεις στη σύστασή του.

Ο αντιδραστήρας βρισκόταν σε λειτουργία για περισσότερες από 600 μέρες και τροφοδοτούταν απευθείας με το απόβλητο της ΒΙ.ΠΕ, χωρίς καμμία προεπεξεργασία πέραν της απομάκρυνσης των στερεών. Κατά την περίοδο αυτή τρεις διαφορετικοί χρόνοι παραμονής των στερεών (SRT=30, 20, 15 ημέρες) εξετάστηκαν και η επίδραση του SRT στην ποιότητα της εκροής (απομάκρυνση άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου) μελετήθηκε. Τα EPS και SMP εκχυλίστηκαν από τη λάσπη και αναλύθηκαν σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε όλους τους SRTs, ώστε να εξεταστεί η επίδραση του SRT στην έμφραξη των μεμβρανών. Επιπλέον η επίδραση του υδραυλικού χρόνου παραμονής (Hydraulic Retention Time- HRT) τόσο στην ποιότητα εξόδου της εκροής, όσο και στη συσσώρευση των EPS και SMP μελετήθηκε, σε σταθερό SRT ίσο με 20 ημέρες.

Από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει προηγούμενη αναφορά μελέτης της λειτουργίας ενός πιλοτικού MBR που τροφοδοτείται με πραγματικό βιομηχανικό απόβλητο με τόση μεγάλη αναλογία άνθρακα προς άζωτο και υψηλές διακυμάνσεις στη σύστασή του, χωρίς καμμία επιπλέον επεξεργασία.

### **A.3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΙΣΗ ΓΙΑ ΤΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΩΝ MEMBRANΩΝ**

#### **A.3.1 Συστήματα MBR - Αρχή λειτουργίας και διατάξεις**

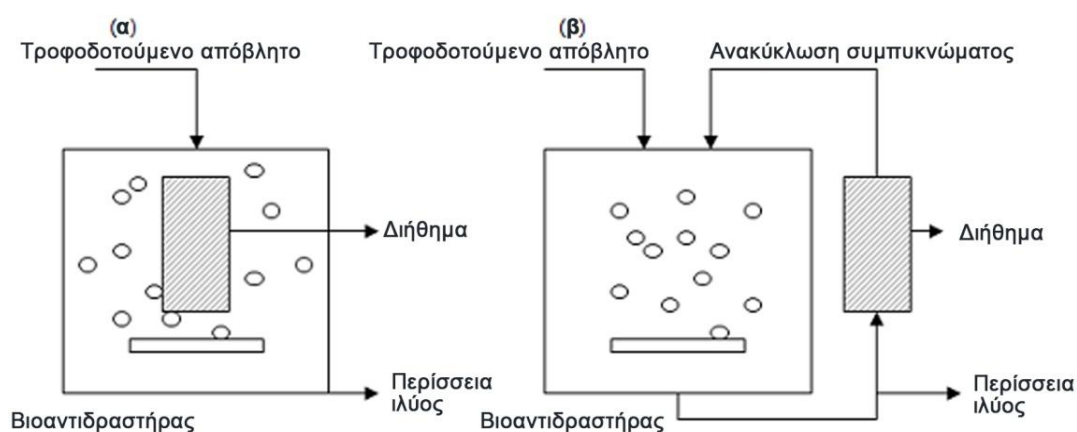
Ένα σύστημα MBR αποτελείται από δυο τμήματα: τον βιοαντιδραστήρα και το τμήμα των μεμβρανών διήθησης. Ο βιοαντιδραστήρας περιλαμβάνει μια δεξαμενή αερισμού, ενώ συνήθως συμπληρώνεται από μια δεξαμενή απονιτροποίησης. Από το τμήμα αυτό αντλείται μικτό υγρό προς τις μεμβράνες διήθησης, ενώ από τις μεμβράνες απομακρύνεται το διήθημα που αποτελεί το επεξεργασμένο νερό, ενώ το υπόλοιπο επιστρέφει στον βιοαντιδραστήρα. Η αρχή λειτουργίας του συστήματος MBR περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Στους αντιδραστήρες πραγματοποιείται κανονικά η βιολογική επεξεργασία των λυμάτων και το ανάμικτο υγρό διηθείται, ώστε να διαχωριστεί το ανακτώμενο υγρό (διήθημα) από την ιλύ (συμπύκνωμα).
2. Η διήθηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο τρόπους :
  - α) Με εφαρμογή πίεσης στο ανάμικτο υγρό του αντιδραστήρα ή
  - β) Με εφαρμογή χαμηλής πίεσης στο διήθημα, ώστε το διήθημα να περάσει από την μεμβράνη, ενώ τα στερεά να συγκρατηθούν από αυτή.
3. Κατακράτηση των σωματιδίων από τις μεμβράνες εξαιτίας του μεγαλύτερου μεγέθους τους σε σχέση με τους πόρους της μεμβράνης.

Στα συστήματα MBR υπάρχουν δυο βασικές διατάξεις :α) το εξωτερικό MBR και β) το εμβαπτισμένο MBR (Εικόνα A.1). Στο εξωτερικό MBR οι μεμβράνες τοποθετούνται εκτός του αντιδραστήρα και χωρίς να έρχονται σε επαφή με αυτόν. Το υγρό τροφοδοτείται υπό πίεση από τον βιοαντιδραστήρα στη μονάδα των μεμβρανών, όπου εκεί πραγματοποιείται η διεργασία της διήθησης. Το προκύπτον διήθημα απομακρύνεται, ενώ παράλληλα γίνεται η επανακυκλοφορία του συμπυκνώματος μέσα στον αντιδραστήρα κατά το μεγαλύτερο ποσοστό, με εξαίρεση ένα μικρό ποσοστό που αφαιρείται ως περίσσεια ιλύς. Η ροή του ρεύματος τροφοδοσίας εφαρμόζεται εφαπτομενικά της επιφάνειας της μονάδας των μεμβρανών και είναι γνωστή ως σταυρωτή ροή (cross-flow filtration). Η σταυρωτή ροή πρέπει να έχει μεγάλη ταχύτητα ( $> 0,5-1 \text{ m/sec}$ ), έτσι ώστε να αναπτύσσεται τυρβώδης ροή στην επιφάνεια της μεμβράνης και να μειώνεται η συσσώρευση σωματιδίων και συνεπώς η έμφραξη των μεμβρανών. Ο αερισμός και η ανάδευση της βιομάζας

πραγματοποιούνται από τα συστήματα αερισμού και ανάδευσης που εφαρμόζονται και στα συστήματα ενεργού ιλύος.

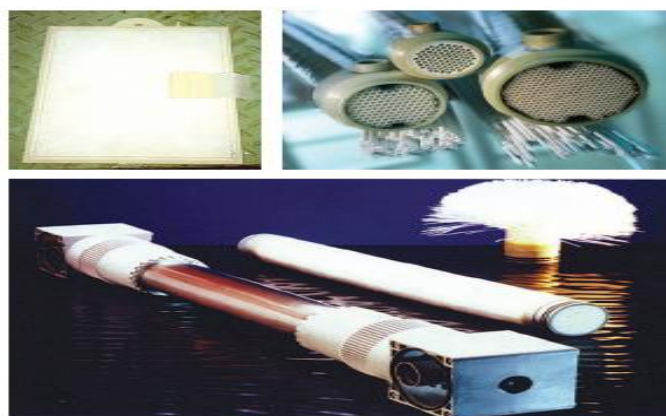
Η πιο συνηθισμένη διάταξη MBR που χρησιμοποιείται στην επεξεργασία αστικών αποβλήτων είναι το εμβαπτισμένο MBR. Η μονάδα των μεμβρανών τοποθετείται μέσα στον βιοαντιδραστήρα, με αποτέλεσμα η διήθηση να πραγματοποιείται στον ίδιο χώρο που πραγματοποιούνται και οι βιολογικές διεργασίες. Η περίσσεια ιλύος αφαιρείται κατευθείαν από την δεξαμενή, όπου είναι τοποθετημένες οι μεμβράνες.



Εικόνα Α.1: Βασικές διατάξεις MBR :α) εμβαπτιζόμενο και β) εξωτερικό MBR.

### A.3.2 Μορφές μονάδων μεμβρανών στα συστήματα MBR

Στα συστήματα MBR οι μονάδες μεμβρανών που χρησιμοποιούνται μπορούν να έχουν μια από τις παρακάτω μορφές :α) Επίπεδες μεμβράνες (flat sheet) β) Μεμβράνες κοιλών ινών (hollow fibre) και γ) Σωληνοειδείς μεμβράνες (tubular).



Εικόνα Α. 2: Επίπεδες, σωληνοειδείς και κοιλών ινών μονάδες μεμβρανών.



Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά των μονάδων μεμβρανών στα συστήματα MBR και σύγκριση κάποιων χαρακτηριστικών τους για κάθε διεργασία (Metcalf & Eddy, 2003).

**Πίνακας Α.1: Χαρακτηριστικά των μονάδων μεμβρανών στα συστήματα MBR.**

Μονάδες μεμβρανών	Κόστος	Ικανότητα δημιουργίας δίνης	Ικανότητα Έκπλυσης (backwashing)	Εφαρμογές
Επίπεδες	Υψηλό	Μέτρια	Όχι	Υπερδιήθηση Αντίστροφη όσμωση
Κοιλών ινών	Πολύ χαμηλό	Χαμηλή	Ναι	Μικροδιήθηση Υπερδιήθηση Αντίστροφη όσμωση
Σωληνοειδείς	Πολύ υψηλό	Πολύ καλή	Ναι	Μικροδιήθηση Υπερδιήθηση Νανοδιήθηση

**Πίνακας Α.2: Χαρακτηριστικά των μεμβρανών σε διάφορες διεργασίες.**

	Μικροδιήθηση	Υπερδιήθηση	Νανοδιήθηση	Αντίστροφη Όσμωση
<b>Μεγέθη απομακρυνόμενων σωματιδίων (μm)</b>	0,08 – 10,0	0,005 – 0,2	0,001-0,01	0,0001-0,001
<b>Υλικό κατασκευής μεμβράνης</b>	Πολυπροπυλένιο, ακρυλονιτρίλιο, νάυλον, τεφλόν	Οξική κυτταρίνη, αρωματικά πολυαμίδια	Οξική κυτταρίνη, αρωματικά πολυαμίδια	Οξική κυτταρίνη, αρωματικά πολυαμίδια
<b>Διάταξη</b>	Σπειροειδής, κοίλων ινών, πλάκα και πλαίσιο, σωληνοειδής	Σπειροειδής, κοίλων ινών, πλάκα και πλαίσιο	Σπειροειδής, κοίλων ινών	Σπειροειδής, κοίλων ινών, σύνθετο λεπτού υμενίου

### A.3.3 Έμφραξη – Είδη και μηχανισμοί

Η αντίσταση που προκαλείται στη ροή του ανάμικτου υγρού διαμέσου της μεμβράνης από διάφορες μορφές σωματιδίων της βιομάζας (σε διαλυμένη ή αιωρούμενη μορφή) που προσροφούνται στην επιφάνεια ή στους πόρους της μεμβράνης είναι γνωστή με τον ευρύτερο όρο έμφραξη (fouling) (Judd 2008). Η έμφραξη των μεμβρανών είναι ίσως το σημαντικότερο πρόβλημα που εμφανίζουν τα συστήματα MBR και επηρεάζει τόσο τη λειτουργία τους όσο και το κόστος τους (Zhang et al. 2006a). Η έμφραξη αυξάνει σημαντικά το λειτουργικό κόστος, εξαιτίας του συχνού καθαρισμού των μεμβρανών και των αυξημένων απαιτήσεων σε αερισμό των μεμβρανών.

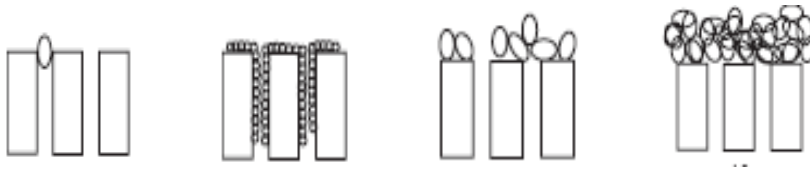
Αποτέλεσμα της συνεχόμενης εναπόθεσης σωματιδίων στην επιφάνεια και στο εσωτερικό της μεμβράνης είναι ο σχηματισμός ενός στρώματος 'κέικ', το οποίο αυξάνει βαθμιαία την αντίσταση στη ροή του διηθήματος. Αποτέλεσμα αυτού είναι η μείωση της παροχής του διηθήματος για δεδομένη πτώση πίεσης ή η εφαρμογή μεγαλύτερης πίεσης για σταθερή παροχή του διηθήματος. Τα σωματίδια τα οποία εναποτίθενται σταδιακά στην μεμβράνη μπορεί να είναι οργανικά στερεά (αιωρούμενα στερεά, κολλοειδή, μακρομόρια), ανόργανα συστατικά (άλατα) και ιζήματα τα οποία περιέχονται στο προς επεξεργασία απόβλητο. Υπάρχουν 2 είδη έμφραξης: η αναστρέψιμη κατά την οποία τα σωματίδια τα οποία σχηματίζουν το στρώμα κέικ μπορούν εύκολα να απομακρυνθούν από τη μεμβράνη με μια απλή διαδικασία φυσικού καθαρισμού και η μη αναστρέψιμη, η οποία μπορεί να απομακρυνθεί μόνο με χημικό καθαρισμό.

Υπάρχουν 3 μηχανισμοί έμφραξης:

- Η στένωση των πόρων της μεμβράνης που οφείλεται στην προσρόφηση ή/και συσσώρευση σωματιδίων με μέγεθος αρκετά μικρότερο από αυτό των πόρων της μεμβράνης. Τα μόρια των διαλυμένων συστατικών του αποβλήτου προσροφώνται εξαιτίας φυσικο-χημικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα από τους πόρους, με αποτέλεσμα το κενό των πόρων να μειώνεται σημαντικά.
- Η απόφραξη των πόρων που συμβαίνει όταν σωματίδια που έχουν περίπου ίδιο μέγεθος παγιδεύονται μέσα στους πόρους. Συνήθως οι πόροι μικρότερου μεγέθους είναι πιο ευάλωτοι σε αυτό το μηχανισμό έμφραξης γιατί υπάρχουν περισσότερα σωματίδια που είναι στο ίδιο ή και μεγαλύτερο μέγεθος από αυτά.

- η δημιουργία ενός ζελατινώδους στρώματος στην επιφάνεια της μεμβράνης, γνωστό ως “cake layer” ή συγκέντρωση πόλωσης. Είναι ένα φαινόμενο παρόμοιο με την έμφραξη, όχι όμως ταυτόσημο. Στη συγκέντρωση πόλωσης η συσσώρευση των ουσιών παρατηρείται στην επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ στην έμφραξη η κατακράτηση γίνεται κυρίως στο εσωτερικό της μεμβράνης.

Η έμφραξη είναι κυρίως μια μη αναστρέψιμη διεργασία, ενώ η συγκέντρωση πόλωσης είναι σε μεγάλο βαθμό αναστρέψιμη μέσω υδροδυναμικών και μηχανικών διαταραχών όπως η αντίστροφη πλύση και η παύση της διήθησης. Αυτό σημαίνει ότι με αποδοτικό καθαρισμό το πρόβλημα της συγκέντρωσης πόλωσης μπορεί να ελαχιστοποιηθεί, όμως η έμφραξη σε βάθος χρόνου είναι αναπόφευκτη.

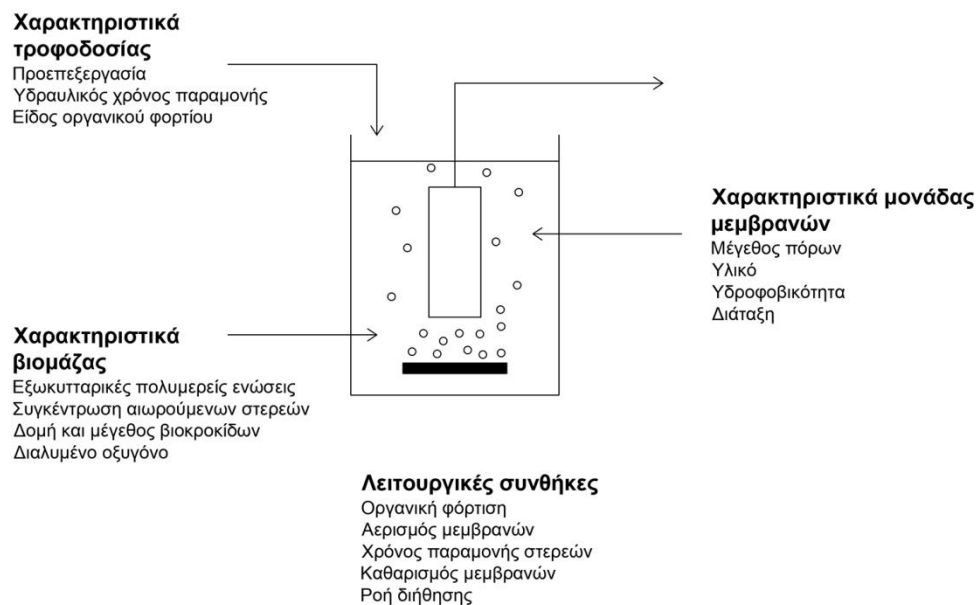


**Εικόνα Α.3: Μηχανισμοί υπεύθυνοι για την έμφραξη των μεμβρανών :α) απόφραξη πόρων β)στένωση πόρων γ)ενδιάμεση κατάσταση δ)δημιουργία κέικ**

#### **A.3.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την έμφραξη**

Οι σημαντικότεροι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την έμφραξη (Le-Clech et al. 2006) φαίνονται στην εικόνα Α.4 και είναι οι εξής:

- Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της μονάδας των μεμβρανών (διάταξη, μέγεθος πόρων, υλικό, υδροφοβικότητα).
- Τα χαρακτηριστικά της τροφοδοσίας (είδος αποβλήτου, προεπεξεργασία, υδραυλικός χρόνος παραμονής) και της βιομάζας (συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών ανάμικτου υγρού, δομή και μέγεθος βιοκροκίδων, διαλυμένα συστατικά, εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις ).
- Οι λειτουργικές συνθήκες που επικρατούν στο σύστημα (διάταξη, τύπος διήθησης, αερισμός, χρόνος παραμονής στερεών, καθαρισμός μεμβρανών).



**Εικόνα Α.4: Παράμετροι που επηρεάζουν την έμφραξη των μεμβρανών**

Τα χαρακτηριστικά των μεμβρανών και οι ιδιότητες της βιομάζας επηρεάζουν άμεσα την έμφραξη, ενώ τα χαρακτηριστικά του αποβλήτου και οι λειτουργικές συνθήκες έχουν έμμεση επιρροή στην έμφραξη, εξαιτίας της επίδρασής τους στα χαρακτηριστικά της βιομάζας (Zhang et al. 2006b). Στις επόμενες υποενότητες πραγματοποιείται περιγραφή της επίδρασης που ασκούν τα περισσότερα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά στην έμφραξη.

#### A.3.4.1 Χαρακτηριστικά της μεμβράνης

##### A.3.4.1.1 Μέγεθος πόρων και κατανομή

Η επίδραση του μεγέθους των πόρων και της κατανομής τους στην έμφραξη των μεμβρανών σχετίζεται στενά με τα χαρακτηριστικά του τροφοδοτούμενου αποβλήτου και την κατανομή του μεγέθους των βιοκροκίδων (Le-Clech et al. 2006). Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση του μεγέθους των πόρων των μεμβρανών στην έμφραξη, γιατί η αλληλεπίδραση μεμβράνης –βιομάζας είναι αυτή που προσδιορίζει το βαθμό έμφραξης και όχι μόνο τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης. Σύμφωνα με τους Le-Clech et al. 2006 υπάρχουν περιπτώσεις όπου το μικρότερο μέγεθος πόρων είναι ιδανικότερο, γιατί οι μεμβράνες με το μεγαλύτερο μέγεθος δεν επιτρέπουν τη διέλευση σε περισσότερα σωματίδια της βιομάζας, με αποτέλεσμα να ευνοείται η δημιουργία στρώματος στερεών στην

επιφάνεια των μεμβρανών. Από την άλλη υπάρχουν περιπτώσεις όπου το μεγαλύτερο μέγεθος πόρων είναι ιδανικότερο, γιατί μειώνεται ο αριθμός των σωματιδίων που εισέρχονται στους πόρους των μεμβρανών και προκαλούν εσωτερική έμφραξη αυτών. Επομένως η σύνθετη σύσταση της ιλύος δεν επιτρέπει την εξαγωγή μιας ξεκάθαρης σχέσης μεταξύ της έμφραξης και του μεγέθους των πόρων της μεμβράνης.

#### A.3.4.1.2 Διάταξη της μονάδας μεμβρανών

Τα εμβαπτιζόμενα συστήματα έχουν επικρατήσει σε σχέση με τα εξωτερικά, εξαιτίας των χαμηλότερων ενεργειακών τους απαιτήσεων. Επίσης το εμβαπτιζόμενο σύστημα παρουσιάζει μικρότερη έμφραξη, λόγω των ιδιαίτερων υδροδυναμικών συνθηκών που επικρατούν στον βιοαντιδραστήρα. Συγκεκριμένα η εφαρμογή αερισμού με χοντρές φυσαλίδες ευνοεί την αποκόλληση σωματιδίων από την επιφάνεια της μεμβράνης (Le-Clech et al. 2006). Στις περισσότερες περιπτώσεις στα εμβαπτιζόμενα συστήματα η μονάδα των μεμβρανών μπορεί να είναι είτε επίπεδη είτε κοίλων ινών. Οι Gunder & Krauth 1999 συμπέραναν καλύτερη υδραυλική συμπεριφορά για τις επίπεδες μεμβράνες σε σχέση με αυτή των κοίλων ινών. Παρόλο που το κόστος των επίπεδων μεμβρανών είναι 20-25 % υψηλότερο οι μεμβράνες κοίλων ινών από την άλλη είναι συνήθως περισσότερο εύαλωτες στην έμφραξη και απαιτούν συχνότερο καθαρισμό. Αντίθετα οι Yu et al. 2008 κατέληξαν στο ακριβώς αντίθετο αποτέλεσμα, πως οι επίπεδες μεμβράνες παρουσιάζουν ελαφρά υψηλότερη έμφραξη. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα οφείλονται πιθανότατα στη διαφορετική φύση αποβλήτου που χρησιμοποιήθηκε στις παραπάνω μελέτες.

#### A.3.4.1.3 Υδροφοβικότητα

Η τάση προσρόφησης των πρωτεϊνών, των διαλυμένων ουσιών και των μικροοργανισμών στις υδρόφοβες επιφάνειες των μεμβρανών είναι μεγαλύτερη από ότι στις υδρόφιλες επιφάνειες, με αποτέλεσμα η έμφραξη στις υδρόφοβες επιφάνειες να είναι σημαντικά μεγαλύτερη (Zhang et al. 2006, Yu et al. 2008). Για τον λόγο αυτό πολλές υδρόφοβες επιφάνειες υπόκεινται σε διάφορες τεχνικές τροποποίησης, ώστε να αποκτήσουν υδρόφιλο χαρακτήρα. Παρόλα αυτά η υδρόφιλη ή υδρόφοβη φύση παίζει ρόλο μόνο στο αρχικό στάδιο της έμφραξης και άρα η παράμετρος αυτή δεν

έχει σημαντική επίδραση στην έμφραξη κατά τη μακροχρόνια λειτουργία ενός συστήματος MBR (Le-Clech et al. 2006).

#### A.3.4.1.4 Υλικό μεμβρανών

Οι κεραμικές μεμβράνες παρουσιάζουν άριστη χημική, θερμική και υδραυλική αντίσταση και έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε διάφορες εφαρμογές συστημάτων MBR, όπως στην επεξεργασία αποβλήτων με υψηλό ρυπαντικό φορτίο (Luonsia et al. 2002) και στην αναερόβια αποδόμηση (Fan et al. 1996). Δεν αποτελούν όμως προτιμητέα επιλογή για εφαρμογές στα συστήματα MBR εξαιτίας του υψηλού τους κόστους και η μεγάλη πλειοψηφία των μεμβρανών που χρησιμοποιούνται είναι οι πολυμερικές. Κάποια από τα πολυμερικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι :η οξική κυτταρίνη, το πολυαμίδιο, η πολυσουλφόνη, η πολυαιθεροσουλφόνη, το πολυαιθυλένιο, το πολυπροπυλένιο, το φθορίδιο του πολυβινυλίου, η αναγεννημένη κυτταρίνη και το πολυακρυλονιτρίλιο. Επειδή όμως τα περισσότερα από τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι υδρόφοβα απαιτείται κατάλληλη προεπεξεργασία, ώστε η επιφάνειά τους να αποκτήσει υδρόφιλα χαρακτηριστικά.

#### A.3.4.2 Χαρακτηριστικά της βιομάζας

##### A.3.4.2.1 Συγκέντρωση του ανάμικτου υγρού

Ενώ από πολλούς θεωρείται πως η συγκέντρωση του ανάμικτου υγρού (MLSS) είναι άμεσα συσχετιζόμενη με την έμφραξη των μεμβρανών, η επίδραση των MLSS στην έμφραξη είναι αμφιλεγόμενη και στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί αντικρουόμενα αποτελέσματα. Εάν τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της βιομάζας δεν ληφθούν υπόψη, η αύξηση στη συγκέντρωση των MLSS φαίνεται να έχει κυρίως αρνητική επίδραση (υψηλότερη διαμεμβρανική πίεση ή μείωση της διηθησιμότητας ) στην υδραυλική συμπεριφορά ενός συστήματος MBR (Chang & Kim 2005). Παρόλα αυτά κάποιοι ερευνητές έχουν συμπεράνει θετική επίδραση στην έμφραξη (Defrance & Jaffrin 1999 , Brookes et al. 2006) και κάποιοι άλλοι αμελητέα (Le-Clech et al. 2003, Hong et al. 2002). Η ύπαρξη ενός ορίου (30g/l) πάνω από το οποίο η συγκέντρωση των MLSS έχει αρνητική επίδραση στην έμφραξη έχει επίσης αναφερθεί (Lubbecke et al. 1995). Οι Rosenberger et al. 2005 παρατήρησαν πως μια αύξηση της συγκέντρωσης των MLSS μειώνει την τάση για έμφραξη για μικρότερες συγκεντρώσεις από 6 g/l.

Αντίθετα μεγαλύτερη τάση για έμφραξη παρατηρείται καθώς η συγκέντρωση των MLSS αυξάνεται πάνω από 15 g/l, ενώ καμία επίδραση δεν σημειώνεται για συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 8 και 12 g/l. Άλλη μελέτη συμπέρανε τη σημαντική επίδραση των MLSS για συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 5 g/l και έδειξε πως τα υδροδυναμικά χαρακτηριστικά περισσότερο από τη συγκέντρωση των MLSS επηρεάζουν την κρίσιμη ροή σε υψηλές συγκεντρώσεις (WERF 2006). Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω η συγκέντρωση του ανάμικτου υγρού επηρεάζει την έμφραξη κυρίως σε πολύ χαμηλές (<3500mg/l) ή σε πολύ υψηλές (>15000mg/l) συγκεντρώσεις. Επίσης διαπιστώνεται πως δεν αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την έμφραξη εξαιτίας της έλλειψης συστηματικής συσχέτισης.

#### A.3.4.2.2 Εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις και διαλυτά μικροβιακά προϊόντα

Οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ενώσεις (Extracellular Polymeric Substances-EPS) αποτελούν συστατικά κατασκευής των μικροβιακών δομών, όπως είναι τα βιοφίλμ και οι βιοκροκίδες, καθώς και κυρίαρχα συστατικά της ενεργού ιλύος. Προέρχονται από μικροβιακή δραστηριότητα, λύση κυττάρων και προϊόντα υδρόλυσης και βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου ή στο εξωτερικό αυτού και άρα είναι παγιδευμένα στο εξωτερικό χώρο των βιοκροκίδων. Οι Laspidou & Rittmann 2002 θεωρούν τα EPS ως το μέσο που επιτρέπει τη συγκράτηση των βακτηριδίων σε βιοκροκίδες και τη συγκράτηση μικροοργανισμών σε αυτές. Διαχωρίζονται στα δεσμευμένα εξωκυτταρικά πολυμερή (EPS) και στα διαλυτά εξωκυτταρικά πολυμερή (ή διαλυτά μικροβιακά προϊόντα-SMP) ανάλογα με το αν βρίσκονται παγιδευμένα στις βιοκροκίδες ή ελεύθερα στο ανάμικτο υγρό. Τα EPS και SMP περιέχουν υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις και παρουσιάζουν υψηλές προσροφητικές και προσκολλητικές ιδιότητες. Αποτελούνται κυρίως από πρωτεΐνες και υδατάνθρακες και σε μικρότερες ποσότητες από χουμικά οξέα, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα. Για αυτό και η ποσοτικοποίησή τους γίνεται συνήθως σε όρους ολικών πρωτεϊνών και υδατανθράκων ή σε όρους ολικού οργανικού άνθρακα.

Τα EPS, είτε είναι σε διαλυτή είτε σε δεσμευμένη μορφή θεωρούνται ως η κυριότερη ιδιότητα της βιομάζας που σχετίζεται άμεσα με την έμφραξη. Πολυάριθμες είναι οι έρευνες που έχουν γίνει σχετικά με την επίδρασή τους στην έμφραξη, των οποίων όμως τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά μεταξύ τους. Αρκετοί είναι οι ερευνητές που

έχουν συνδέσει την αύξηση της συγκέντρωσης των EPS με αύξηση της έμφραξης. Οι Ahmed et al. 2007b παρατήρησαν σημαντική αύξηση της διαμεμβρανικής πίεσης με αύξηση της συγκέντρωσης των EPS. Οι Al-Halbouni et al. 2008 παρατήρησαν αύξηση του στρώματος των στερεών που δημιουργείται στην επιφάνεια της μεμβράνης με αύξηση των EPS, η οποία παρατηρείται σε μικρούς SRTs. Οι Janga et al. 2007 συμπέραναν πως με αύξηση της οργανικής φόρτισης αυξήθηκε η συγκέντρωση των EPS και επίσης η έμφραξη των μεμβρανών. Οι Liang et al. 2007 λειτούργησαν έναν εργαστηριακό αντιδραστήρα σε 3 διαφορετικούς SRTs (10, 20, 40 ημέρες) και διαπίστωσαν αύξηση της συσσώρευσης των SMP και παράλληλα αύξηση της έμφραξης για μικρούς SRTs. Επιπλέον συμπέραναν πως οι υδατάνθρακες αποτελούσαν το βασικό συστατικό των SMP, που ήταν υπεύθυνο για την έμφραξη. Μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων των υδατανθράκων και της έμφραξης έχει αναφερθεί (Rosenberger et al. 2006).

Από την άλλη υπάρχουν και ερευνητές που καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα EPS και SMP δεν σχετίζονται με την έμφραξη των μεμβρανών. Οι Drews et al. 2008 εξετάζοντας τρία συστήματα MBR διαφορετικής κλίμακας το καθένα δεν διαπίστωσαν καμία συσχέτιση μεταξύ των SMP και της έμφραξης. Επίσης οι μη μόνιμες συνθήκες που επικρατούν σε αντιδραστήρες MBR, όπως η διακοπόμενη τροφοδοσία, η μη τακτική απώλεια λάσπης, οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου έχουν προσδιοριστεί ως παράγοντες που οδηγούν σε αύξηση των SMP και σε αλλαγή στη συσχέτιση των συγκεντρώσεών τους με την έμφραξη (Drews et al. 2006). Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα είναι εξαιτίας της πολυπλοκότητας της βιολογικής επεξεργασίας, των πολλών και διαφορετικών ειδών μεμβρανών, του διαφορετικού είδους αποβλήτου, των διαφορετικών λειτουργικών συνθηκών και του διαφορετικού τρόπου με τον οποίο γίνεται η ποσοτικοποίηση της έμφραξης.

#### A.3.4.2.3 Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου

Η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (DO) σε έναν βιοαντιδραστήρα ελέγχεται από την παροχή του αερισμού που εφαρμόζεται στα εμβαπτιζόμενα συστήματα MBR και έχει τριπλό σκοπό : α) παρέχει οξυγόνο στη βιομάζα β) διατηρεί τη βιομάζα υπό αιώρηση και γ) μειώνει την έμφραξη απομακρύνοντας σωματίδια που



συσσωρεύονται συνεχώς στη μεμβράνη. Η επίδραση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου στην έμφραξη έχει πολλές συνιστώσες και περιλαμβάνει αλλαγές στη δομή του βιοφίλμ που σχηματίζεται στην επιφάνεια της μεμβράνης, στις συγκεντρώσεις των EPS και SMP, καθώς και στη δομή των συσσωματωμάτων (Le-Clech et al. 2006). Συνήθως υψηλότερες συγκεντρώσεις DO οδηγούν σε καλύτερη διηθησιμότητα ιλύος και χαμηλότερους ρυθμούς έμφραξης (Kang et al. 2003, Yoon Kim et al. 2006). Αυτό συμβαίνει γιατί το βιοφίλμ που σχηματίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις DO αποτελείται από μεγαλύτερα σωματίδια με μεγαλύτερο πορώδες σε σχέση με το βιοφίλμ που σχηματίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις DO. Το μικρότερο πορώδες του βιοφίλμ έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη έμφραξη των μεμβρανών. Επιπλέον η μεταβολή της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου έχει μεγάλη επίδραση στη σύσταση των EPS. Η λειτουργία ενός MBR σε υψηλές συγκεντρώσεις DO συντελεί στην χαμηλότερη παραγωγή EPS με αποτέλεσμα το χαμηλότερο ρυθμό έμφραξης (Drews et al. 2006, Jin et al. 2006).

#### A.3.4.3 Λειτουργικές συνθήκες

##### 3.4.3.1 Χρόνος παραμονής των στερεών

Ο χρόνος παραμονής των στερεών (Solids Retention Time-SRT) ορίζεται ως ο λόγος των στερεών του αντιδραστήρα προς τα στερεά που αφαιρούνται από αυτόν. Η εξίσωση υπολογισμού του SRT σε σύστημα MBR, που θεωρείται πως η εκροή δεν περιέχει καθόλου αιωρούμενα στερεά είναι η ακόλουθη:

$$SRT = V/W, \text{ όπου:}$$

V: ο ενεργός όγκος του αντιδραστήρα (l)

W: η παροχή περίσσειας ιλύος (l/d)

Ο χρόνος παραμονής των στερεών είναι πιθανότατα η πιο σημαντική λειτουργική παράμετρος που επιδρά στην έμφραξη των μεμβρανών. Η μεταβολή του SRT επιδρά σημαντικά σε ιδιότητες της βιομάζας, όπως η συγκέντρωση των MLSS, το μέγεθος των βιοκροκίδων, καθώς και η συγκέντρωση των EPS και SMP. Οι πολύ χαμηλοί SRTs (<2 ημέρες) ευνοούν την έμφραξη. Οι Trussell et al. 2006 παρατήρησαν πως ο ρυθμός έμφραξης αυξήθηκε σχεδόν 10 φορές όταν το SRT μειώθηκε από τις 10 στις 2 ημέρες. Εφόσον όμως βασικό πλεονέκτημα των MBR είναι η λειτουργία σε μεγάλους SRTs (>15 ημέρες) οι περισσότερες έρευνες έχουν στραφεί σε τέτοιους χρόνους, με

σκοπό την ελαχιστοποίηση της περίσσειας ιλύος. Από την άλλη οι μελέτες που αναφέρουν λειτουργία συστήματος MBR σε άπειρο SRT (χωρίς απόρριψη ιλύος) είναι συνήθως εργαστηριακής κλίμακας, χρησιμοποιούν συνθετικό απόβλητο (ή προεπεξεργασμένο απόβλητο) (Gao et al. 2004, Liu et al. 2005) και ως εκ τούτου δεν λαμβάνουν υπόψη τη συσσώρευση αδρανούς υλικού στον αντιδραστήρα. Η συνεχής συσσώρευση στον MBR μη βιοδιασπώμενου υλικού, αναμφισβήτητα οδηγεί σε έμφραξη της μονάδας των μεμβρανών. Επιπλέον σε πολύ υψηλούς SRT αυξάνεται το ιξώδες και έτσι δυσχεραίνεται ο αερισμός της βιομάζας. Οι Huang et al. 2011 λειτούργησαν τρεις αναερόβιους MBR σε SRTs 30, 60, 100 ημέρες και συμπέραναν αύξηση του ρυθμού έμφραξης σε μεγάλους SRTs, εξαιτίας αύξησης της παραγωγής των SMP. Οι Han et al. 2005 αύξησαν τον SRT από 30 σε 100 μέρες με αποτέλεσμα η έμφραξη να διπλασιαστεί, παρόλο που ταυτόχρονα αύξησαν την παροχή αερισμού από 15 σε 25 l/min. Από την άλλη πλευρά οι πολύ υψηλοί χρόνοι παραμονής μειώνουν τη δραστηριότητα των μικροοργανισμών, καθώς το μεγαλύτερο μέρος του υποστρώματος χρησιμοποιείται για τις ανάγκες συντήρησης και άρα οδηγούν σε μείωση των EPS, πράγμα ευνοϊκό για την έμφραξη. Οι Van den Broeck et al. 2012 λειτούργησαν έναν πιλοτικής κλίμακας MBR για περισσότερο από 2 χρόνια σε 3 διαφορετικούς SRTs (10, 30 και 50 ημέρες) και κατέληξαν πως η έμφραξη μειώνεται σε υψηλότερους SRTs. Οι Ahmed et al. 2007b λειτούργησαν 4 διαφορετικούς MBR σε 4 διαφορετικούς SRTs (20, 40, 60, 100 ημέρες) και κατέληξαν πως ο ρυθμός αύξησης της διαμεμβρανικής πίεσης, άρα και κατά επέκταση της έμφραξης ήταν μεγαλύτερος στους μικρούς SRTs. Ο προσδιορισμός λοιπόν ενός βέλτιστου SRT είναι δύσκολος, εξαιτίας των διαφορετικών συνθηκών που χαρακτηρίζουν τη λειτουργία εργαστηριακών και πιλοτικών αντιδραστήρων, καθώς και της διαφορετικής φύσης αποβλήτου που χρησιμοποιείται στην κάθε έρευνα.

#### A.3.4.3.2 Οργανική φόρτιση

Η οργανική φόρτιση του συστήματος (F/M), ορίζεται ως ο λόγος της παρεχόμενης τροφής προς τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στο σύστημα.

$$F/M = \text{COD}_{\text{in}} * Q / \text{MLVSS} * V$$

Όπου :

F/M: λόγος τροφής προς μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στο σύστημα (g COD/g VSS d)

COD in: το COD του εισερχόμενου στον αντιδραστήρα αποβλήτου (mg/l)

Q: η παροχή του αποβλήτου (l/d)

MLVSS: τα πτητικά αιωρούμενα στερεά του ανάμικτου υγρού (mg/l)

V: όγκος του αντιδραστήρα (l)

Η λειτουργία των συστημάτων MBR συνήθως χαρακτηρίζεται από πολύ χαμηλές τιμές οργανικής φόρτισης ( $F/M < 0,4$ ), κάτι που συμβαίνει γιατί τα MBR συνήθως λειτουργούν σε υψηλές συγκεντρώσεις ανάμικτου υγρού στον αντιδραστήρα ( $MLSS > 4.000 \text{ mg/l}$ ). Η επίδραση της οργανικής φόρτισης στην έμφραξη ταυτίζεται με την επίδραση που έχει ο χρόνος παραμονής της λάσπης (SRT) στην έμφραξη. Χαμηλός SRT σημαίνει αυξημένη τροφή προς τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται στο σύστημα, δηλαδή αυξημένη οργανική φόρτιση, ενώ ένας υψηλός SRT συνεπάγεται χαμηλή οργανική φόρτιση.

#### A.3.4.3.3 Υδραυλικός χρόνος παραμονής

Ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (Hydraulic Retention Time-HRT) αποτελεί το χρόνο παραμονής των λυμάτων στον αντιδραστήρα και ορίζεται ως εξής:

$$HRT = V/Q \cdot 24$$

Όπου:

V: όγκος του αντιδραστήρα (l)

Q: η παροχή αποβλήτου στον αντιδραστήρα (l/d)

Ο HRT αποτελεί μια λειτουργική παράμετρο που πρέπει να επιλέγεται κατάλληλα, ώστε να υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ του κόστους και της αποδοτικότητας που επιτυγχάνει ένα σύστημα MBR.

Η πλειοψηφία των ερευνητικών αναφορών καταλήγει στο συμπέρασμα πως η μείωση του HRT οδηγεί σε αύξηση της έμφραξης των μεμβρανών. Οι Gao et al. 2012 λειτούργησαν έναν εργαστηριακής κλίμακας MBR τροφοδοτούμενο με αστικό απόβλητο σε 4 διαφορετικά HRTs (8 h, 4h, 6h, 2,5 h) και συμπέραναν αύξηση της αντίστασης στη διήθηση 3 φορές όταν ο HRT μειώθηκε από 8 h στις 2,5 h και

μεγαλύτερο ρυθμό έμφραξης στα μικρά HRTs. Οι Hong et al. 2012 λειτούργησαν έναν εργαστηριακό εμβαπτιζόμενο αντιδραστήρα κοιλών ινών σε 4 διαφορετικούς HRTs (4 h, 2 h, 1,3h, 1 h) και συμπέραναν πως ο χαμηλότερος HRT οδήγησε σε μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης της διαμεμβρανικής πίεσης και συνεπώς αύξηση της έμφραξης. Οι Chae et al. 2006 λειτούργησαν έναν MBR πιλοτικής κλίμακας σε διαφορετικούς HRTs και συμπέραναν πως όταν ο HRT μειώθηκε από τις 10 στις 4 h, παρατηρήθηκε αύξηση των EPS και αύξηση της έμφραξης. Οι Viero et al. 2007 χρησιμοποίησαν έναν εμβαπτιζόμενο MBR τροφοδοτούμενο με συνθετικό απόβλητο και εξέτασαν την επίδραση διαφορετικών HRTs (2-5h) στην αποδοτικότητα του αντιδραστήρα. Κατέληξαν πως η λειτουργία σε χαμηλούς HRTs δεν έχει καμμία επίδραση στην απομάκρυνση οργανικού υλικού και στη γενικότερη αποδοτικότητα του αντιδραστήρα. Όμως τα συνθετικά απόβλητα περιέχουν εύκολα βιοαποδομήσιμες ενώσεις, με αποτέλεσμα ο HRT να μην παίζει σημαντικό ρόλο στην αποδοτικότητα του συστήματος. Όταν το ίδιο σύστημα MBR χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία ενός πιο σύνθετου αποβλήτου (π.χ. από δυλιστήριο πετρελαίου), ακόμη και μια μικρή αλλαγή στον HRT επηρεάζει την αποδοτικότητα του συστήματος (Viero & Sant'anna 2008). Τέτοια συστήματα απαιτούν συνήθως υψηλούς HRT, ώστε να μεγιστοποιηθεί η αποδοτικότητά τους.

### **A.3.5 Τρόποι αντιμετώπισης της έμφραξης**

Με σκοπό την επιμήκυνση της ζωής των μεμβρανών, αλλά και την μείωση της έμφραξής τους εφαρμόζεται η διαδικασία του καθαρισμού των μεμβρανών. Οι πιο συνηθισμένες κατηγορίες καθαρισμών που μπορούν να εφαρμοστούν είναι α) ο υδραυλικός καθαρισμός και β) ο χημικός καθαρισμός.

#### A.3.5.1 Υδραυλικός καθαρισμός

Ο υδραυλικός καθαρισμός περιλαμβάνει μια σειρά από μεθόδους που δεν καθαρίζουν πλήρως τις μεμβράνες, αλλά παρατείνουν την διάρκεια λειτουργίας τους με αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής τους. Οι μέθοδοι αυτοί είναι οι παρακάτω:

- **Η πλύση των μεμβρανών με αντιστροφή της ροής του διηθήματος (backwashing)** που πραγματοποιείται μόνο στις διεργασίες μικροδιήθησης και υπερδιήθησης, κυρίως για διατάξεις κοίλων ινών, σωληνοειδείς, καθώς και για διατάξεις στις οποίες χρησιμοποιούνται κεραμικές μεμβράνες. Η αντίστροφη

πλύση στα συστήματα MBR πραγματοποιείται μέσα στο σύστημα και κατά τη διάρκεια της λειτουργίας των μεμβρανών με την παύση της διεργασίας της διήθησης και με την αντιστροφή της πτώσης πίεσης. Το νερό κινείται προς την αντίθετη κατεύθυνση έτσι ώστε τα συσσωρευμένα σωματίδια να μεταφέρονται έξω από τη μονάδα των μεμβρανών, είτε κατευθείαν στο ανάμικτο υγρό (εμβυθιζόμενο MBR), είτε στο εισερχόμενο ρεύμα (εξωτερικό MBR). Αποτελεί μια πολύ αποτελεσματική μέθοδο για τον καθαρισμό κυρίως της επιφάνειας της μεμβράνης και χρησιμοποιείται κυρίως στα συστήματα MBR με μονάδες κοίλων ινών.

- **Η περιοδική αποσυμπίεση (relaxation) του συστήματος των μεμβρανών**, η οποία συντελείται με τη παύση της διαδικασίας της διήθησης για ένα μικρό χρονικό διάστημα. Δηλαδή εφαρμόζεται διακοπτόμενη λειτουργία διήθησης στο σύστημα. Η μέθοδος αυτή μειώνει μόνο την επιφανειακή έμφραξη, με την επαναιώρηση στο ανάμικτο υγρό των σωματιδίων που είχαν επικαθίσει στην επιφάνεια της μεμβράνης, αλλά δεν συμβάλει στη μείωση της έμφραξης στο εσωτερικό της μεμβράνης.
- **Η στιγμιαία αντιστροφή της ροής** αποτελεί μια πιο πρόσφατη παραλλαγή του κλασικού συστήματος πλύσης κατά την οποία η αντίστροφη πλύση είναι στιγμιαία (διαρκεί λιγότερο από 1 sec), αλλά πραγματοποιείται με μεγάλη συχνότητα (περίπου κάθε 10-30 sec) κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του συστήματος .

#### A.3.5.2 Χημικός καθαρισμός

Ο χημικός καθαρισμός αποτελεί την πιο αποτελεσματική μέθοδο καθαρισμού των μεμβρανών στα συστήματα MBR. Τα χημικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση αυτή μπορεί να είναι όξινα (υδροχλωρικό, θειικό, νιτρικό οξύ), αλκαλικά, επιφανειοδραστικά και ενζυμικά. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις χρησιμοποιείται το υποχλωριώδες νάτριο για οργανικές ουσίες έμφραξης και το κιτρικό οξύ για ανόργανες. Το υποχλωριώδες νάτριο έχει την ιδιότητα να υδρολύει τα οργανικά μόρια και με αυτό τον τρόπο να αποκολλά τα σωματίδια και το βιοφίλμ που είναι προσκολλημένα στην μεμβράνη. Υπάρχουν δύο είδη χημικού καθαρισμού που εφαρμόζονται στα MBR: α) ο περιοδικός καθαρισμός και β) ο εντατικός καθαρισμός.

Ο περιοδικός καθαρισμός πραγματοποιείται για προληπτικούς λόγους, ώστε να μην υπάρξει κάποια απότομη αύξηση της αντίστασης στη ροή του διηθήματος και πραγματοποιείται ανά τακτά χρονικά διαστήματα (σε εβδομαδιαία βάση). Πραγματοποιείται με χορήγηση αραιών χημικών διαλυμάτων στους σωλήνες εξόδου του διηθήματος και με αντιστροφή της ροής. Ο χρόνος επαφής των διαλυμάτων με τις μεμβράνες είναι μικρός (μέχρι 1 ώρα).

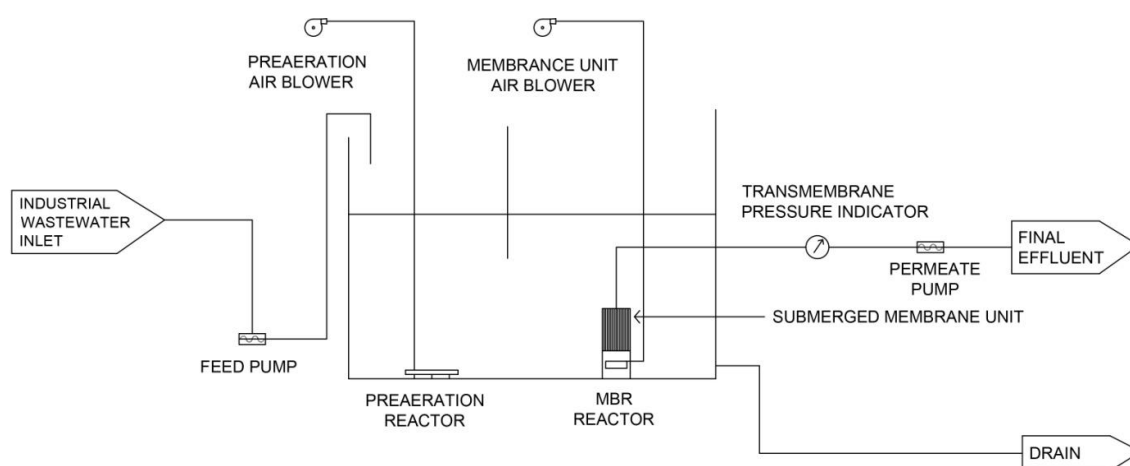
Ο εντατικός καθαρισμός πραγματοποιείται πιο σπάνια με στόχο τη μείωση της έμφραξης και την αποκατάσταση της ροής (ή της διαμεμβρανικής πίεσης) στα αρχικά επίπεδα. Σε αυτού του είδους τον καθαρισμό χρησιμοποιούνται πιο πυκνά διαλύματα που έρχονται σε επαφή με τις μεμβράνες για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Ο εντατικός καθαρισμός πολλές φορές μπορεί να πραγματοποιηθεί με αφαίρεση της μονάδας των μεμβρανών εκτός αντιδραστήρα.

## A.4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### A.4.1 Περιγραφή του συστήματος βιοαντιδραστήα μεμβρανών

Το πιλοτικό σύστημα του MBR είναι εμβαπτιζόμενης διάταξης και κατασκευάστηκε από την εταιρεία Euromarket Ltd, που εδρεύει στη Λεμεσό της Κύπρου. Εγκαταστάθηκε στη ΒΙ.ΠΕ Ηρακλείου τον Δεκέμβριο του 2011 (εικόνα Α.6) και λειτούργησε σε συνεχή βάση από τον Ιανουάριο του 2012 έως τον Σεπτέμβριο του 2013, εκτός από τους μήνες Ιούλιο-Αύγουστο 2012 κατά τους οποίους προέκυψε ηλεκτρολογικό πρόβλημα στον φυσητήρα αέρα και τέθηκε εκτός λειτουργίας.

Η μονάδα αποτελείται από 2 διαμερίσματα, τα οποία επικοινωνούν μεταξύ τους : α) το διαμέρισμα στο οποίο γίνεται η νιτροποίηση (προ-αερισμός) και β) το διαμέρισμα στο οποίο βρίσκεται η μονάδα μεμβρανών. Οι διαστάσεις του πιλοτικού συστήματος είναι 2,3μ μήκος, 1,4μ πλάτος και 2,55μ ύψος. Αρχικά το απόβλητο εισέρχεται στην δεξαμενή προ-αερισμού (ή νιτροποίησης), που αποτελεί το αρχικό στάδιο επεξεργασίας και στο οποίο παρέχεται αέρας με σκοπό την ανάμειξη των υγρών αποβλήτων και την οξείδωση των οργανικών και αζωτούχων ενώσεων. Ο αερισμός παρέχεται μέσω ενός φυσητήρα αέρα που περιλαμβάνει 5 διαχυτήρες δυναμικότητας 2-12 m<sup>3</sup>/h αέρα ο καθένας και οι οποίοι βρίσκονται εγκατεστημένοι στον πυθμένα της δεξαμενής. Οι διαχυτήρες αυτοί εξασφαλίζουν τον απαραίτητο αερισμό λεπτών φυσαλίδων, ώστε να μεγιστοποιείται η διάχυση του οξυγόνου στις βιοκροκίδες.



Εικόνα Α. 5: Διάταξη της μονάδας MBR

Ο βιοαντιδραστήρας μεμβρανών αποτελεί και τη κύρια μονάδα της βιολογικής διεργασίας. Στο διαμέρισμα αυτό βρίσκεται εμβαπτιζόμενη η μονάδα μεμβρανών, διαμέσου της οποίας γίνεται ο διαχωρισμός της επεξεργασμένης εκροής από το ανάμικτο υγρό. Ένα δεύτερο σύστημα αερισμού βρίσκεται κάτω από τη μονάδα αυτή και το οποίο παρέχει απευθείας στη μονάδα χονδρόκοκκες φυσαλίδες με σκοπό τον περιορισμό της έμφραξης των μεμβρανών. Ο αέρας εξέρχεται από το σύστημα αερισμού και εισάγει διατμητικές τάσεις στην επιφάνεια των μεμβρανών, ώστε να μεγιστοποιείται η αποκόλληση των σωματιδίων και να μειώνεται η έμφραξη.

Η πιλοτική μονάδα διαθέτει κεντρικό πίνακα ελέγχου από τον οποίο ρυθμίζεται η λειτουργία της διήθησης και του αερισμού των μεμβρανών. Στο σύστημα υπάρχουν δύο αντλίες τύπου κοχλία, από τις οποίες η μία τροφοδοτεί το απόβλητο στον αντιδραστήρα και η άλλη αντλεί το διήθημα διαμέσου της μονάδας των μεμβρανών. Οι αντλίες λειτουργούν παράλληλα με αισθητήρες ηλεκτροδίων, που είναι τοποθετημένοι μέσα στον αντιδραστήρα, ώστε να διακόπτεται η αντλία τροφοδοσίας του συστήματος όταν η στάθμη φτάσει ένα ανώτατο όριο και να ξεκινά η λειτουργία της αντλίας διηθήματος και το αντίστροφο. Με αυτό τον τρόπο προστατεύεται ο ηλεκρομηχανολογικός εξοπλισμός, αλλά και οι μεμβράνες οι οποίες δεν πρέπει να εκτίθενται στην ατμόσφαιρα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η διήθηση λαμβάνει χώρα σε επαναλαμβανόμενους κύκλους των 10 λεπτών. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου πραγματοποιείται 9 λεπτά διήθηση και 1 λεπτό διακοπή της αντλίας διήθησης, αποτρέποντας με αυτό τον τρόπο το σύντομο φράξιμο των μεμβρανών.



**Εικόνα Α.6:** Το πιλοτικό σύστημα MBR στο βιολογικό της ΒΙ.ΠΕ Ηρακλείου



Επίσης πρέπει να αναφερθεί πως το τροφοδοτούμενο στον αντιδραστήρα απόβλητο περιέχει μεγάλη ποσότητα μικροπλαστικών (με διαστάσεις 0,1-2 mm). Αυτό συμβαίνει γιατί τα Πλαστικά Κρήτης, μια από τις μεγαλύτερες ελληνικές βιομηχανίες παραγωγής πλαστικών, βρίσκεται εγκαταστημένη στη ΒΙ.ΠΕ Ηρακλείου. Τα πλαστικά αυτά αποτελούσαν σχεδόν το 30% της ενεργού ιλύος και για να έχουμε μια ακριβέστερη εικόνα συγκέντρωσης της βιομάζας, στο σύστημα τοποθετήθηκε ένας κυκλώνας. Ο κύκλωνας αυτός εγκαταστάθηκε στο ρεύμα τροφοδοσίας, πριν το απόβλητο εισέλθει στη μονάδα, με αποτέλεσμα ένας μεγάλος όγκος μικροπλαστικών να απομακρύνεται. Ο κυκλώνας ρεύμα της τροφοδοσίας φαίνεται στην παρακάτω εικόνα Α.7.



**Εικόνα Α. 7: Κυκλώνας στο ρεύμα τροφοδοσίας του συστήματος MBR**

#### A.4.2 Χαρακτηριστικά της μονάδας μεμβρανών

Η μονάδα των μεμβρανών με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός της εκροής από το ανάμικτο υγρό έχει κατασκευαστεί στην Ιαπωνία από την Kubota και είναι εμβαπτιζόμενη στο ανάμικτο υγρό του βιολογικού αντιδραστήρα. Είναι επίπεδη και αποτελείται από 25 μεμβράνες με συνολικό ενεργό εμβαδόν ίσο με 20 m<sup>2</sup>. Το υλικό κατασκευής της είναι το χλωριωμένο πολυαιθυλένιο και το ονομαστικό μέγεθος των πόρων της είναι 0,4μm. Στον παρακάτω πίνακα A.3 συνοψίζονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης μονάδας μεμβρανών.

**Πίνακας A.3: Χαρακτηριστικά της μονάδας μεμβρανών του συστήματος MBR.**

<b>Χαρακτηριστικό</b>	<b>Μονάδα μεμβρανών μικροδιήθησης</b>
Κατασκευαστής	Kubota
Προέλευση	Ιαπωνία
Τύπος μονάδας μεμβρανών	FF25
Υλικό	χλωριωμένο πολυαιθυλένιο
Διάταξη μονάδας μεμβρανών	επίπεδη
Ονομαστική διάμετρος πόρων (μm)	0,4
Συνολικό εμβαδόν επιφάνειας μεμβρανών (m <sup>2</sup> )	20
Προτεινόμενη συγκέντρωση διαλύματος NaOCl για καθαρισμό (%)	0,5
Μέγιστη παροχή αέρα (m <sup>3</sup> /min)	0,5
Εύρος pH λειτουργίας	5-10
Θερμοκρασία λειτουργίας (°C)	5-40

#### A.4.3 Λειτουργία Βιοαντιδραστήρα Μεμβρανών

Ο MBR λειτούργησε για περισσότερες από 600 ημέρες στην εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων της ΒΙ.ΠΕ Ηρακλείου με τροφοδοσία ένα μέρος του αποβλήτου που συγκεντρωνόταν στο βιολογικό, χωρίς καμία προεπεξεργασία πέραν της απομάκρυνσης των στερεών. Η ενεργός ιλύς που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στον MBR ήταν από τη δεξαμενή αερισμού της εγκατάστασης, έχοντας αρχική συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών 3-4 g/L. Τρεις διαφορετικοί χρόνοι παραμονής της λάσπης (SRT) εφαρμόστηκαν στο σύστημα i) SRT= 30 ημέρες (1<sup>η</sup> -196<sup>η</sup> ημέρα)

ii) SRT=15 ημέρες (264<sup>η</sup> -384<sup>η</sup> ημέρα) και iii) SRT=20 ημέρες (384<sup>η</sup> -628<sup>η</sup> ημέρα). Η βασική διαφοροποίηση ανάμεσα σε αυτούς τους χρόνους είναι η ποσότητα της περίσσειας ιλύος που αφαιρείται κάθε φορά από τον βιολογικό αντιδραστήρα. Η ενεργός ιλύς αφαιρείται μία φορά την εβδομάδα από τον αντιδραστήρα και επομένως οι SRT είναι εβδομαδιαίοι μέσοι όροι. Πρέπει να σημειωθεί πως ο MBR τέθηκε εκτός λειτουργίας για ένα διάστημα 2 μηνών περίπου (200<sup>η</sup> -264<sup>η</sup> ημέρα), εξαιτίας ενός ηλεκτρολογικού προβλήματος στον φυσητήρα αέρα που παρέχει χοντρές φυσαλίδες στη μεμβράνη. Επίσης κατά τη διάρκεια της μεγαλύτερης χρονικής περιόδου του πειράματος (1<sup>η</sup> -530<sup>η</sup> ημέρα) ο MBR λειτούργησε σε υδραυλικό χρόνο παραμονής (HRT) 24 ώρες. Επιπλέον ένας μικρότερος HRT ίσος με 19 ώρες εξετάστηκε, ώστε να μελετηθεί η επίδραση του HRT στη λειτουργία του αντιδραστήρα. Ο HRT διαμορφώθηκε ρυθμίζοντας κάθε φορά τον ρυθμό παροχής της αντλίας εξόδου.

#### **A.4.4 Καθαρισμός μεμβρανών**

Κατά τη διάρκεια της λειτουργίας του MBR, οι μεμβράνες υφίστανται σταδιακή έμφραξη από οργανικές και ανόργανες ουσίες. Η μέθοδος καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε στο συγκεκριμένο πιλοτικό σύστημα είναι ο χημικός καθαρισμός με υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl). Η έκπλυση των μεμβρανών (backwashing) δεν εφαρμόστηκε στο σύστημα, αλλά η διακοπτόμενη λειτουργία διήθησης. Κάθε 10 λεπτά λειτουργίας της η αντλίας διήθησης σταματά για 1 λεπτό, για να 'ξεκουραστούν' οι μεμβράνες, αποτρέποντας έτσι το σύντομο φράξιμό τους.

Κατά την διάρκεια λειτουργίας του συστήματος πραγματοποιήθηκαν δύο φορές χημικοί καθαρισμοί κατά τις ημέρες 196 και 398 όταν η διαμεμβρανική πίεση είχε φτάσει σε υψηλά επίπεδα (>40 KPa). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: 1) Το σύστημα τίθεται προσωρινά εκτός λειτουργίας. 2) Εισάγεται στη μονάδα μεμβρανών διάλυμα NaOCl (5%). Δοχείο που περιέχει το διάλυμα τοποθετείται ψηλά και εισάγεται στη μονάδα μεμβρανών με την επίδραση της βαρύτητας. 3) Το διάλυμα αφήνεται να δράσει σε επαφή με τις μεμβράνες για 2-3 ώρες. Σαν γενικός κανόνας απαιτούνται συνήθως 2 ώρες για τον καθαρισμό των οργανικών ενώσεων και 1 ώρα για τον καθαρισμό των ανόργανων.

#### **A.4.5 Δειγματοληψίες –Αναλυτικές μέθοδοι**

Τα δείγματα συλλέγονταν 1 φορά την εβδομάδα από τα εξής σημεία του πιλοτικού συστήματος: α) την είσοδο β) το ανάμικτο υγρό που περιβάλλει τις μεμβράνες (η δειγματοληψία γινόταν ανοίγοντας βάνες που ήταν τοποθετημένη στη μέση του ύψους του ανάμικτου υγρού) και γ) την έξοδο του συστήματος. Μετά τη συλλογή τους τα δείγματα τοποθετούνταν απευθείας σε ψυγείο και στέλνονταν στα Χανιά προς επεξεργασία.

Οι παράμετροι που προσδιορίστηκαν στα δείγματα της εισόδου και της εξόδου είναι οι εξής: ολικά και πτητικά αιωρούμενα στερεά (Total and Volatile Suspended solids- TSS and VSS), χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand –COD), βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand –BOD<sub>5</sub>), ολικός οργανικός άνθρακας (Total Organic Carbon –TOC), αμμωνιακό άζωτο (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N), νιτρικό άζωτο (NO<sub>3</sub>-N), ολικό άζωτο (TN) φώσφορος φωσφορικών (PO<sub>4</sub> - P). Επίσης πραγματοποιήθηκαν τακτικές μικροβιολογικές αναλύσεις στην έξοδο του συστήματος (ολικά και κοπρανώδη κολοβακτηρίδια, εντερόκοκκος). Στο ανάμικτο υγρό προσδιορίστηκαν τα ολικά και πτητικά αιωρούμενα στερεά (Mixed Liquor Suspended and Volatile Suspended Solids- MLSS and MLVSS). Επίσης γινόταν εκχύλιση των εξωκυτταρικών πολυμερών ενώσεων (Extracellular Polymeric Substances- EPS) και των διαλυτών μικροβιακών προϊόντων (Soluble Microbial Products-SMP) και το εκχύλισμα αναλυόταν σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων.

Ο προσδιορισμός όλων των παραπάνω παραμέτρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με πρότυπες μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί για την ανάλυση νερού και λυμάτων (APHA, 1998) και παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

##### A.4.5.1 Προσδιορισμός Ολικών και Πτητικών Αιωρούμενων Στερεών

Ο προσδιορισμός των ολικών αιωρούμενων στερεών (MLSS) και των πτητικών αιωρούμενων στερεών (MLVSS) πραγματοποιείται σύμφωνα με τις μεθόδους 2540 D και 2540 E των Standard methods (APHA, 1998).

1. Αρχικά τα καθαρά φίλτρα (Sartorius, μέγεθος πόρων 1,2 μm) τοποθετούνται σε πυραντήριο στους 550°C για 20 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί η υγρασία και τυχόν πτητικές ενώσεις.

2. Τα φίλτρα τοποθετούνται σε αφυγραντή για να επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έπειτα ζυγίζονται ώστε να βρεθεί η μάζα του καθαρού φίλτρου.
3. Έπειτα συγκεκριμένος όγκος υγρών αποβλήτων (30 ml για είσοδο, 10-20 ml για δεξαμενή αερισμού και 200 ml για έξοδο) διηθείται κάθε φορά μέσω του χωρίς υγρασία φίλτρου και
4. Τα φίλτρα ξηραίνονται σε φούρνο για 2 περίπου ώρες στους 105° C, τοποθετούνται σε αφυγραντή για να επανέλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια ζυγίζονται. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των στερεών γίνεται βάσει της ακόλουθης σχέσης:

$$MLSS = (A-B) / V$$

Όπου:

A είναι η μάζα του φίλτρου μετά τη ξήρανση στο φούρνο των 103° -105°C (g)

B είναι η μάζα του καθαρού φίλτρου (g)

V είναι ο όγκος του δείγματος (ml)

Για τον υπολογισμό των πτητικών αιωρούμενων στερεών (MLVSS) τα ίδια φίλτρα τοποθετούνται σε πυραντήριο για 20 λεπτά στους 550±10°C και στη συνέχεια τοποθετούνται πάλι σε αφυγραντή και μετά ζυγίζονται. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πτητικών στερεών γίνεται βάσει της σχέσης:

$$MLVSS = (B-\Gamma) / V$$

Όπου:

Γ: Είναι η μάζα του φίλτρου μετά τους 550°C (g)

#### A.4.5.2 Χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (COD)

Ο προσδιορισμός του πραγματοποιείται με έτοιμα αντιδραστήρια της Analab με εύρος συγκεντρώσεων 0-150 mg/l για τα δείγματα της εξόδου και 0-1500 mg/l για τα δείγματα της εισόδου. Η μέθοδος στην οποία στηρίζονται είναι η μέθοδος οξείδωσης οργανικών και ανόργανων ενώσεων παρουσία διχρωμικού καλίου (μέθοδος 5220 D των πρότυπων μεθόδων - Apha,1998). Όταν αναφερόμαστε στο διαλυτό COD η μέτρηση πραγματοποιείται στο διήθημα που συλλέγεται μετά από διήθηση με μεμβράνες μεγέθους πόρων 0,45 μm.

#### A.4.5.3 Βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (BOD<sub>5</sub>)

Ο προσδιορισμός του βασίζεται στην μανομετρική μέθοδο. Συγκεκριμένος όγκος δείγματος (432 ml για την έξοδο και 43,5-164 ml για την είσοδο) τοποθετείται σε ειδικές για την μέτρηση, σκουρόχρωμες φιάλες. Σε κάθε φιάλη τοποθετείται και ένας μαγνητικός αναδευτήρας και σε ειδική υποδοχή του πάματος των φιαλών τοποθετείται μικρή ποσότητα πυκνού διαλύματος υδροξειδίου του καλίου KOH (2 χαπάκια). Στην συνέχεια οι φιάλες τοποθετούνται στην μανομετρική συσκευή B.O.D Oxitor της WTW και στον επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 20°C για 5 ημέρες. Στο τέλος της 5<sup>ης</sup> ημέρας μας δίνεται η τελική συγκέντρωση του BOD<sub>5</sub>.

#### A.4.5.4 Αμμωνιακό άζωτο (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)

Η μέτρηση του NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Nessler της Hach με εύρος συγκεντρώσεων από 0,02- 2,50 mg/l NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Γεμίζεται ένας διαβαθμισμένος κύλινδρος των 25 ml με το δείγμα το οποίο έχει διηθηθεί από μεμβράνη 0,45 μm και έχει αραιωθεί κατάλληλα με απιονισμένο νερό.
2. Προστίθενται 3 σταγόνες mineral stabilizer και το μείγμα ανακινείται.
3. Προστίθενται 3 σταγόνες Polyvinyl Alcohol και το μείγμα ανακινείται.
4. Προστίθεται 1 ml αντιδραστήριο Nessler.
5. Μετά από 1 λεπτό αντίδρασης η συγκέντρωση NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N μετράται στο φασματοφωτόμετρο της Hach DR/2800.

#### A.4.5.5 Νιτρικό άζωτο (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)

Η ανάλυση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό του NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N πραγματοποιήθηκε σε τριχοειδή στήλη με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης, μέσω της εφαρμογής τάσης στα άκρα της στήλης ώστε να παραχθεί σταθερό ρεύμα 30μΑ (Capillary Zone Electrophoresis with G1601BA of Agilent, DAD detector). Για την επίτευξη του παραπάνω, η εισαγωγή του δείγματος έγινε με άσκηση πίεσης για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σε στήλη γεμάτη με ρυθμιστικό διάλυμα με pH 12.1, ενώ ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (DAD) χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και

ποσοτική ανίχνευση του εκάστοτε αναλύτη. Το μήκος κύματος ανίχνευσης ήταν τα 350 nm με αναφορά στα 250 nm.

#### A.4.5.6 Ολικό άζωτο (TN) και Ολικός οργανικός άνθρακας

Η ανάλυση των δειγμάτων ως προς ολικό άνθρακα και ολικό άζωτο πραγματοποιήθηκε μέσω καύσης στους 950°C παρουσία καταλύτη Pt (Combustion at Analytik Jena's "multi N/C 2100S" with NDIR detection of CO<sub>2</sub>). Η ποσοτικοποίηση του άνθρακα έγινε με ανιχνευτή NDIR (ο άνθρακας οξειδώνεται σε CO<sub>2</sub>), ενώ η αντίστοιχη ποσοτικοποίηση του αζώτου έγινε με ανιχνευτή CLD (Chemiluminescence Detector - μετατροπή αζώτου σε NO). Ο ανόργανος άνθρακας προσδιορίστηκε μέσω έγχυσης του διαλύματος σε διάλυμα 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (μετατροπή ανθρακικών αλάτων σε CO<sub>2</sub>), ενώ ο οργανικός άνθρακας από τη διαφορά του ανόργανου από τον ολικό.

#### A.4.5.7 Φώσφορος φωσφορικών ιόντων (P-PO<sub>4</sub>)

Ο προσδιορισμός των φωσφορικών έγινε με τη μέθοδο PhosVer 3 (8048) της Hach με εύρος συγκεντρώσεων από 0,02 έως 2,50 mg/l PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Το δείγμα διηθείται από μεμβράνη 0,45 μm (Sartorius). Ένα μικρό μπουκαλάκι των 25 ml γεμίζεται με 10 ml δείγμα (ή αραιωμένο με απιονισμένο νερό) και προστίθεται σε αυτό το περιεχόμενο ενός PhosVer 3 phosphate Powder Pillow. Το μπουκάλι καπακώνεται και αναδεύεται για 30 δευτερόλεπτα, ώστε να αναμιχθεί το περιεχόμενό του και αφήνεται για άλλα 2 λεπτά να γίνει η αντίδραση. Η συγκέντρωση P-PO<sub>4</sub> μετράται στο φασματοφωτόμετρο της Hach DR/2800.

#### A.4.5.8 Βαρέα μέταλλα

Η ανάλυση των δειγμάτων για μέταλλα (Cr, Cu, Zn, Pb, Cd, As κλπ.) έγινε με τη χρήση του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με φασματομετρία μαζών (ICP-MS 7500cx coupled with Autosampler Series 3000 - Agilent Technologies). Κατά την ανάλυση των μετάλλων με το ICP-MS αξιοποιήθηκε η δυνατότητα του οργάνου να λειτουργεί σε collision (He) ή/και reaction (H<sub>2</sub>) mode με στόχο την παραγωγή ακόμα πιο αξιόπιστων αποτελεσμάτων λόγω του περιορισμού των ισοβαρών παρεμποδίσεων

(π.χ., παρεμπόδιση του  $40\text{Ar}12\text{C}$  στην ανάλυση του  $52\text{Cr}$ ). Η ανάλυση με το ICP-MS πλεονεκτεί των άλλων τεχνικών (ατομική απορρόφηση, φασματοφωτομετρία, σταθμικός προσδιορισμός κλπ.) ως προς τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, το μεγαλύτερο εύρος γραμμικότητας, την ταυτόχρονη πολυστοιχειακή ανάλυση και την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε σειρά σε σύντομο χρόνο (batch analysis). Οι συνθήκες λειτουργίας του ICP-MS ήταν οι ακόλουθες:

**Πίνακας Α.4: Συνθήκες λειτουργίας ICP-MS.**

RF power (W)	1500	Collision gas	He
Plasma gas flow (L/min)	0,82	Collision gas flow (mL/min)	4,5
Auxiliary gas flow (L/min)	0,26	Reaction gas	H <sub>2</sub>
Sampling/Skimmer cone	Ni	Reaction gas flow (mL/min)	3,5
Nebulizer type	MicroMist	Solution uptake (uL/min)	160
S/C temperature	2° C	Integration time (sec per mass)	0,30
Replicates	3		

Γενικά, η έκφραση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση εξωτερικής καμπύλης βαθμονόμησης (5 τουλάχιστον επίπεδα συγκέντρωσης, με συντελεστή συσχέτισης (r) της τάξης του 0,99 για κάθε στοιχείο) χρησιμοποιώντας πρότυπες ενώσεις κατάλληλης καθαρότητας της εταιρείας Merck. Τα όρια ανίχνευσης προέκυψαν από τις καμπύλες βαθμονόμησης με κατάλληλους μαθηματικούς υπολογισμούς (Chemstation Software by Agilent).

#### A.4.5.9 Μικροβιολογικοί δείκτες

Οι μικροβιολογικές παράμετροι που εξετάστηκαν στα δείγματα της εξόδου είναι: α) τα ολικά κολοβακτηριοειδή β) τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και γ) οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (εντερόκοκκοι).



Τα Ολικά κολοβακτηριοειδή περιλαμβάνουν όλα τα gram-αρνητικά αερόβια και δυνητικά αναερόβια βακτήρια που είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση. Η διαδικασία που ακολουθείται για την μέτρησή τους είναι :

- Διήθηση 100 mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Τοποθέτηση της μεμβράνης στο θρεπτικό υλικό m-Les Endo Agar.
- Επώαση στους  $36 \pm 2$  °C για  $21 \pm 3$  ώρες.
- Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (στο θρεπτικό υλικό m-Les Endo Agar, τα κολοβακτηριοειδή εμφανίζουν αποικίες σκούρου κόκκινου χρώματος με χρυσοπράσινη μεταλλική χροιά).

Τα Κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (*Escherichia coli*) που βρίσκονται κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων και αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Το συχνότερο και πιο αντιπροσωπευτικό μέλος αυτής της ομάδας βακτηρίων είναι η *Escherichia coli* (*E. coli*). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την μέτρησή τους είναι:

- Διήθηση 100 mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Τοποθέτηση της μεμβράνης στο θρεπτικό υλικό HiCrome *E.coli* Agar.
- Επώαση στους 37 °C για 24 ώρες.
- Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών (στο θρεπτικό υλικό HiCrome *E.coli* Agar, οι τυπικές αποικίες της *E. coli* είναι πράσινου-μπλε χρώματος).

Οι Κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (εντερόκοκκοι), που αποτελούν μια ομάδα βακτηρίων που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα θερμόαιμων ζώων και ανθρώπων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την μέτρησή τους είναι:

- Διήθηση 100 mL δείγματος νερού υπό κενό από μεμβράνη με μέγεθος πόρων 0.45  $\mu\text{m}$ .
- Τοποθέτηση της μεμβράνης στο θρεπτικό υλικό Slanetz and Bartley Medium.
- Επώαση στους  $36 \pm 2$  °C για  $44 \pm 4$  ώρες.

- Μετά την επώαση και εφόσον έχουν αναπτυχθεί τυπικές αποικίες (καφέ, κόκκινου ή ροζ χρώματος), η μεμβράνη διήθησης μεταφέρεται στο θρεπτικό υλικό Bile Aesculin Agar που έχει προθερμανθεί στους  $44 \pm 0.5$  °C.
- Επώαση στους  $44 \pm 0.5$  °C για 2 ώρες.
- Καταμέτρηση των αποικιών που εμφανίζουν μαύρο χρώμα στο θρεπτικό υλικό (οι αποικίες αυτές λαμβάνονται ως κοπρανώδεις εντερόκοκκοι).

#### A.4.5.10 Εκχύλιση των εξωκυτταρικά πολυμερών ενώσεων (EPS) και των διαλυτών μικροβιακών προϊόντων (SMP)

Στο ανάμικτο υγρό που συλλέγεται από τον αντιδραστήρα μεμβρανών πραγματοποιείται εκχύλιση των EPS και SMP με μια διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά από τους Chabalina 2007. Η εκχύλιση των EPS από τη βιομάζα γίνεται με την προσθήκη κατιονικής ρητίνης (Cation Exchange Resin- CER) με τύπο Dowex Marathon C της Fluka.

Συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθείται είναι η παρακάτω:

1. Αρχικά υπολογίζονται τα πτητικά στερεά (VSS) του δείγματος που έχει συλλεχθεί και στη συνέχεια 100 ml ανάμικτου υγρού φυγοκεντρούνται στα 5000g για 15 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C.
2. Μετά τη φυγοκέντριση ακολουθεί διήθηση της βιομάζας διαμέσου φίλτρου 0,45 μm και το τελικό διήθημα φυλάσσεται στην κατάψυξη, ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των SMP σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων.
3. Η βιομάζα μετά τη φυγοκέντριση ξανααιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα (phosphate buffer saline) τελικού όγκου 100ml.
4. Στο μίγμα ιλύος-ρυθμιστικού διαλύματος προστίθενται 70g κατιονικής ρητίνης ανά 1g VSS και στη συνέχεια το μίγμα αναδεύεται στα 900rpm για 16 ώρες με μηχανικό αναδευτήρα της Heidolph σε θάλαμο στους 4°C.
5. Στο τέλος της ανάδευσης το μίγμα φυγοκεντρείται στα 5000g για 5 λεπτά και στους 4°C και το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης φυγοκεντρείται για 15 λεπτά στα 20000g στους 4°C.
6. Το υπερκείμενο υγρό διηθείται από μεμβράνη 0,45 μm και το διήθημα αντιπροσωπεύει το ολικό EPS, το οποίο φυλάσσεται στην κατάψυξη για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων.

#### A.4.5.11 Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών πραγματοποιείται φασματομετρικά με τη μέθοδο του Lowry, που αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο μέτρησης πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

##### A) Προετοιμασία των διαλυμάτων

- Διάλυμα Α (V= 500 ml) :2,8598g NaOH +14,3084g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Διάλυμα Β (V=100ml):1,4232 g CuSO<sub>4</sub>.5(H<sub>2</sub>O)
- Διάλυμα Γ (V=100ml):2,85299 g Na<sub>2</sub>Tartrate.2(H<sub>2</sub>O)
- Διάλυμα Lowry: Διάλυμα Α+ Διάλυμα Β+ Διάλυμα Γ σε αναλογία 100:1:1
- Διάλυμα Folin: 5 ml 2N Folin+6 ml απιονισμένο νερό

##### B) Διαδικασία

Σε κενά φιαλίδια τοποθετούνται: 0,5 ml δείγματος και 0,7 ml διαλύματος Lowry. Τα φιαλίδια βιδώνονται με πώμα και αναμιγνύονται καλά. Στη συνέχεια αφήνονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τα τελευταία 5 λεπτά ετοιμάζεται το διάλυμα Folin. Με το πέρασμα των 20 λεπτών προστίθενται στα δείγματα 0,1 ml Folin. Αναμιγνύονται καλά και αφήνονται ξανά για 30 λεπτά ή και περισσότερο σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι. Τα φιαλίδια αναπτύσσουν μπλε χρώμα και η συγκέντρωση των πρωτεϊνών προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 750 nm. Επίσης δημιουργείται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα αλβουμίνης (Bovine serum albumin – BSA, 0,05 g BSA διαλυμένα σε 500ml απιονισμένο νερό έχουν τελική συγκέντρωση 100mg BSA/L).

#### A.4.5.12 Προσδιορισμός ολικών υδατανθράκων

Ο προσδιορισμός των ολικών υδατανθράκων πραγματοποιείται φασματομετρικά με τη μέθοδο της ανθρακενόνης, σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:

##### A) Προετοιμασία των διαλυμάτων

- Προετοιμασία διαλύματος θειικού οξέος 75%, 1 ημέρα πριν το πείραμα.
- Προετοιμασία του διαλύματος της ανθρακενόνης την ημέρα της μέτρησης. Ζυγίζεται 0,5 g ανθρακενόνη και διαλύεται σε 10 ml αιθανόλη. Στη συνέχεια η

ποσότητα αυτή τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη και συμπληρώνεται μέχρι τελικού όγκου 250 ml με το διάλυμα θειικού οξέος 75%.

#### B) Διαδικασία

Τα προς ανάλυση δείγματα μεταφέρονται από την κατάψυξη και αφήνονται να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε κενά φιαλίδια προστίθενται: 1ml δείγματος, 2 ml θειικού οξέος (75%) και 4 ml διαλύματος ανθρακενόνης.

Τα φιαλίδια σφραγίζονται με πώμα και έπειτα ανακινούνται και τοποθετούνται σε ειδικό φούρνο στους 100 °C για 15 λεπτά. Τα φιαλίδια αναπτύσσουν πρασινωπό χρώμα και η συγκέντρωση των υδατανθράκων προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά στα 578 nm. Επίσης δημιουργείται καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα γλυκόζης (0,05 g γλυκόζη διαλυμένα σε 500ml απιονισμένο νερό έχουν τελική συγκέντρωση 100mg γλυκόζη/l).

## A.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### A.5.1 Χαρακτηριστικά του βιομηχανικού αποβλήτου

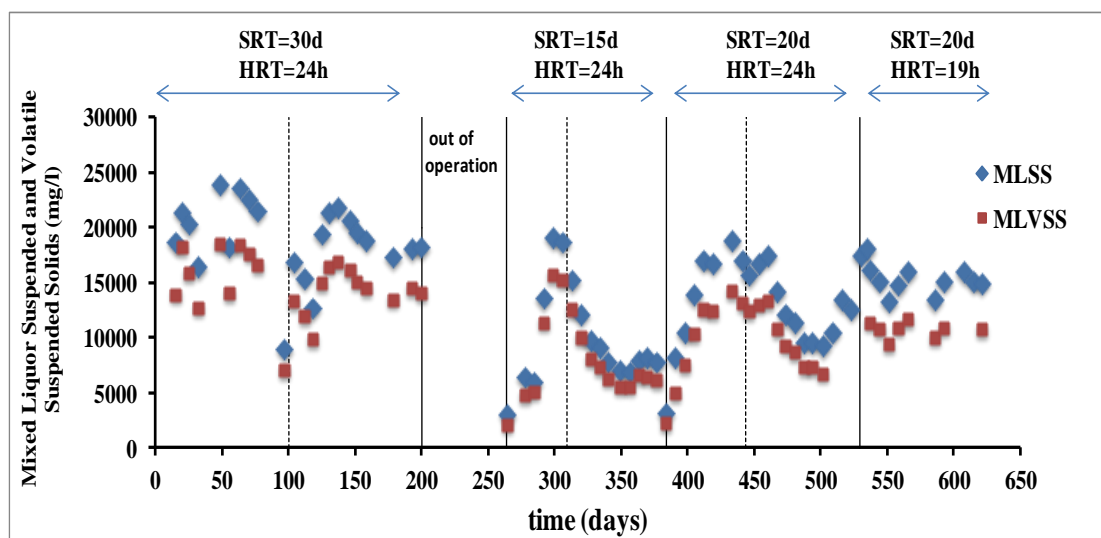
Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του βιομηχανικού αποβλήτου που χρησιμοποιήθηκε ως τροφοδοσία στον πιλοτικό MBR παρουσιάζονται στον πίνακα A.5. Όπως είναι εμφανές από τον πίνακα το απόβλητο χαρακτηρίζεται από υψηλές διακυμάνσεις όσον αφορά τις περισσότερες παραμέτρους που το χαρακτηρίζουν. Χαρακτηριστικό είναι για παράδειγμα πως το COD παρουσιάζει μια ελάχιστη τιμή ίση με 730 mg/l και μια μέγιστη τιμή ίση με 7600 mg/l με μια μέση συγκέντρωση  $2440 \pm 1288$  mg/l. Από την άλλη πλευρά το ολικό άζωτο (TN) παρουσιάζει μια ελάχιστη τιμή ίση με 8,86 mg/l και μια μέγιστη ίση με 72,9 mg/l με μια μέση τιμή συγκέντρωσης  $30 \pm 13,7$  mg/l. Είναι εμφανές από τα παραπάνω πως το συγκεκριμένο απόβλητο χαρακτηρίζεται από μια πολύ υψηλή αναλογία C/N (ίση περίπου με 80 σε όρους ολικού COD ανά ολικού αζώτου). Πρέπει επιπλέον να σημειωθεί πως στο συγκεκριμένο βιομηχανικό πάρκο λειτουργούν κυρίως βιομηχανίες τροφίμων και όχι βαριές βιομηχανίες, επομένως το απόβλητο δεν χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, χλωριωμένων ενώσεων και υδρογονανθράκων.

Πίνακας A.5: Οι κυριότερες παράμετροι που χαρακτηρίζουν το βιομηχανικό απόβλητο.

Παράμετρος (mg/l)	Αριθμός μετρήσεων	Μέση τιμή $\pm$ τυπ. απόκλιση	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
COD total	69	$2440 \pm 1288$	730	7600
COD dissolved	69	$1796 \pm 1028$	480	5400
BOD <sub>5</sub>	31	$1289 \pm 530$	600	2400
TOC	37	$554 \pm 333$	145.6	1487.4
TSS	62	$936 \pm 634$	390	3604
VSS	58	$570 \pm 380$	25.62	2205
TN	37	$30 \pm 13.7$	8.86	72.91
NH <sub>4</sub> -N	50	$13.1 \pm 8.7$	0.2	41.65
NO <sub>3</sub> -N	50	$2.03 \pm 2.38$	0.0	12.3
PO <sub>4</sub> -P	50	$10.7 \pm 12.7$	0.184	54.2

### A.5.2 Αιωρούμενα και πτητικά αιωρούμενα στερεά ανάμικτου υγρού (MLSS-MLVSS)

Η συγκέντρωση των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών του ανάμικτου υγρού στον αντιδραστήρα παρουσιάζεται στην εικόνα A.8, για 3 διαφορετικούς χρόνους παραμονής των στερεών (SRTs) που εφαρμόστηκαν στο σύστημα. Όλα τα δείγματα βιομάζας συλλέχθηκαν πριν την απόρριψη ιλύος από το σύστημα. Μετά από ένα χρόνο προσαρμογής της ιλύος περίπου 3 φορές τον SRT της κάθε περιόδου, οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν την έναρξη μιας μόνιμης κατάστασης. Η μέση τιμή συγκέντρωσης των MLSS στη μόνιμη κατάσταση μειώθηκε από 18.3 g/l για SRT=30d στα 9.2 g/l για SRT=15d και αυξήθηκε στα 12.7 g/l για SRT=20d (πίνακας 6). Είναι επομένως εμφανής η μείωση της συγκέντρωσης της βιομάζας σε μικρότερους SRTs. Επιπλέον από το διάγραμμα αυτό φαίνονται οι πολύ υψηλές τιμές MLSS που μπορούν να επιτευχθούν στα συστήματα MBR σε σχέση με τα κλασσικά συστήματα ενεργού ιλύος που συνήθως κυμαίνονται σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 1.5-3.5 g/l.



Εικόνα A.8: Συγκεντρώσεις MLSS και MLVSS στον MBR.

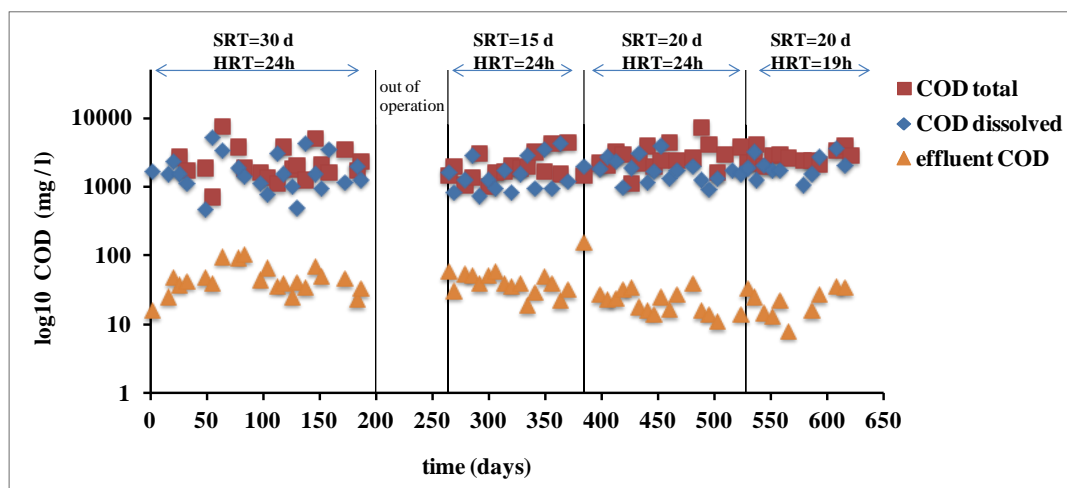
Πίνακας A.6: Μέσες συγκεντρώσεις MLSS και MLVSS στην μόνιμη κατάσταση για κάθε SRT.

SRT (days)	MLSS (mg/l)	MLVSS (mg/l)
15	9183±2634	7473±2205
20	12718±2845	9890±2571
30	18344±2552	14242±1958

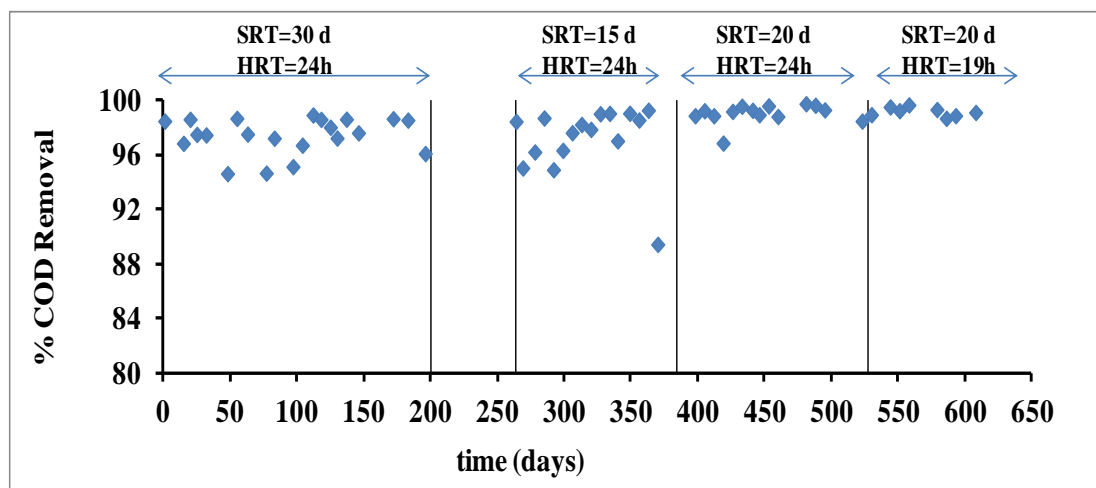
### A.5.3 Ποιότητα εκροής MBR- Εξέταση της επίδρασης του χρόνου παραμονής των στερεών

#### A.5.3.1 Απομάκρυνση COD, TOC και BOD<sub>5</sub>

Στην εικόνα A.9 παρουσιάζεται το ολικό και διαλυτό COD του τροφοδοτούμενου αποβλήτου και το COD της εκροής κατά τη διάρκεια του πειράματος, ενώ η απομάκρυνση του COD παρουσιάζεται στην εικόνα A.10. Παρατηρείται πως το COD της εκροής σπάνια ξεπερνά τα 50 mg/l (εικόνα A.9). Την 384<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση οργανικού υλικού στην έξοδο, εξαιτίας έντονης κακοκαιρίας που είχε ως αποτέλεσμα κλαδιά να εισχωρήσουν στον αντιδραστήρα και να σκιστούν 4 από τις 25 μεμβράνες. Οι μεμβράνες αυτές απομακρύνθηκαν και για τον υπόλοιπο καιρό το σύστημα λειτουργούσε με τις υπόλοιπες 21.



Εικόνα A. 9: Ολικό και διαλυτό COD εισόδου και εξόδου.



Εικόνα A.10: Απομάκρυνση COD που επιτυγχάνεται από το σύστημα.

Στον πίνακα Α.7 φαίνονται οι απομακρύνσεις του COD, αλλά και του TOC (Total Organic Carbon- TOC) που επιτυγχάνονται σε κάθε SRT και για σταθερό HRT ίσο με 24 ώρες. Επειδή η σύσταση του τροφοδοτούμενου αποβλήτου παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις, δίνεται επιπλέον η σύσταση του αποβλήτου κατά τη διάρκεια της κάθε περιόδου.

**Πίνακας Α.7: Μέσες συγκεντρώσεις COD, TOC και BOD<sub>5</sub> εισόδου και εξόδου και ποσοστιαίες απομακρύνσεις.**

Παράμετρος (mg/l)	SRT					
	30		15		20	
	Είσοδος	Έξοδος	Είσοδος	Έξοδος	Είσοδος	Έξοδος
COD	2415±1621	53 ± 30	2036±1065	41±13	3087±1460	22.1 ±8.5
Απομάκρυνση COD (%)	97.8		97.9		99.2	
TOC	483±281	16.2±9.8	623±443	17.4±6.6	607±255	9.9±2.3
Απομάκρυνση TOC (%)	96.6		97.2		98.4	
BOD <sub>5</sub>	1321±530	<5	1317±811	<5	1355±461	<5
Απομάκρυνση BOD <sub>5</sub>	>99 %		>99 %		>99 %	

Η απομάκρυνση του COD κυμαίνεται σε πολύ υψηλά επίπεδα, ανεξάρτητα από το COD της εισόδου, όπως φαίνεται στην εικόνα Α.10 και στον πίνακα Α.7. Σχεδόν πλήρης απομάκρυνση του οργανικού υλικού (99.2%) παρατηρείται για SRT ίσο με 20 ημέρες, παρά τις υψηλές τιμές στο COD της τροφοδοσίας εκείνη την περίοδο. Αλλά και στους υπόλοιπους SRTs η απομάκρυνση είναι υψηλή (97.8% και 97.9% για SRT =20 και 30 ημέρες αντιστοίχως). Παρόμοια αποτελέσματα λαμβάνονται και για το TOC, με απομακρύνσεις μεγαλύτερες από 96% και την μεγαλύτερη απομάκρυνση να παρατηρείται για SRT ίσο με 20 ημέρες. Τέλος, το BOD<sub>5</sub> της εκροής ήταν πάντα πολύ μικρότερο από τα όρια που θέτει η νομοθεσία (<25 mg/l).

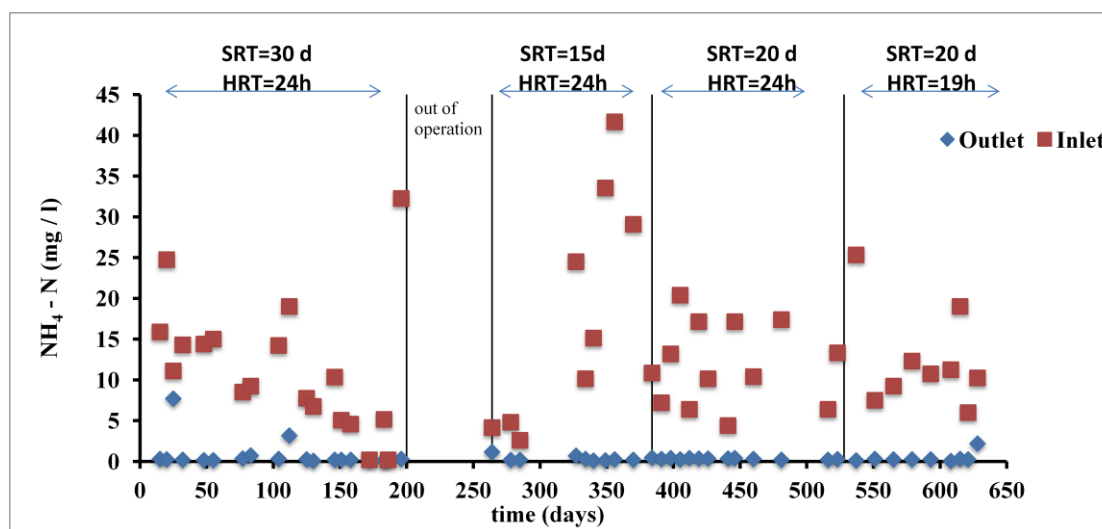
Συμπεραίνεται λοιπόν πως ο MBR επιτύγχανε άριστης ποιότητας εκροή, όσον αφορά την απομάκρυνση του οργανικού υλικού, που σπάνια ξεπερνούσε τα 50 mg/l COD και πληρούσε πάντα τα όρια που θέτει η νομοθεσία (<125 mg/l σύμφωνα με την ΚΥΑ 5673), παρά τις πολύ υψηλές διακυμάνσεις του τροφοδοτούμενου αποβλήτου. Η υψηλή μείωση του οργανικού φορτίου που επιτυγχάνεται σε ένα σύστημα MBR, οφείλεται στην βιολογική επεξεργασία που λαμβάνει χώρα στον αντιδραστήρα, αλλά



σημαντικό ρόλο παίζει και η κατακράτηση των κολλοειδών και αιωρούμενων σωματιδίων από τις μεμβράνες.

#### A.5.3.2 Νιτροποίηση- απονιτροποίηση και απομάκρυνση ολικού αζώτου

Στην εικόνα A.11 δίνεται η συγκέντρωση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  κατά τις ημέρες λειτουργίας του συστήματος για την εισροή και την εκροή. Η απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , όπως φαίνεται στον πίνακα A.8 ήταν σχεδόν πλήρης, ανεξάρτητα από τη διακύμανση της συγκέντρωσης του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  των εισερχόμενων λυμάτων. Ακόμη και στους μικρούς SRTs παρατηρείται ένα μεγάλο ποσοστό νιτροποίησης (97.9% και 97.3 % για SRT=15 και 20 ημέρες αντίστοιχα), κάτι που οφείλεται στην αποτελεσματική συγκράτηση των νιτροποιητών (που έχουν μικρό ρυθμό ανάπτυξης) από τη μεμβράνη. Η χαμηλότερη τιμή  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (93%) παρατηρήθηκε όταν ο SRT ήταν 30 ημέρες, πιθανότατα εξαιτίας των υπερβολικά χαμηλών συγκεντρώσεων διαλυμένου οξυγόνου ( $\text{DO} < 1 \text{ mg/l}$ ) που επικρατούσαν στον αντιδραστήρα για μια μεγάλη χρονική περίοδο σε αυτό τον SRT. Η νιτροποίηση λοιπόν ήταν πολύ πιθανό να παρεμποδίστηκε, λόγω της μειωμένης διαθεσιμότητας του διαλυμένου οξυγόνου στους νιτροποιητές εκείνη την περίοδο.



Εικόνα A.11: Συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  εισόδου και εξόδου

Όπως φαίνεται στον πίνακα A.8 δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  στον αντιδραστήρα, κάτι που δείχνει την ύπαρξη ταυτόχρονης νιτροποίησης και απονιτροποίησης. Η ταυτόχρονη νιτροποίηση και απονιτροποίηση είναι ένα φυσικό

φαινόμενο που οφείλεται σε ανοξικές μικροζώνες που σχηματίζονται μέσα στις βιοκροκίδες, διεγείροντας την ανάπτυξη των απονιτροποιητών. Οι Li et al. 2008 συμπέραναν διαβάθμιση της κατανομής του διαλυμένου οξυγόνου στα συσσωματώματα της ενεργού ιλύος σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών, με αποτέλεσμα την υψηλή απομάκρυνση N, εξαιτίας της ταυτόχρονης νιτροποίησης και απονιτροποίησης. Επιπλέον η διαδικασία αυτή εκτός από τις συγκεντρώσεις των αιωρούμενων στερεών επηρεάζεται και από τον διαθέσιμο άνθρακα. Οι He et al. 2009 συμπέραναν πως η υψηλή αναλογία C/N έχει θετικές επιδράσεις στην ταυτόχρονη νιτροποίηση και απονιτροποίηση. Η πολύ υψηλή αναλογία C/N έχει πιθανότατα ως αποτέλεσμα ένα μέρος του COD που δεν καταναλώνεται να βοηθά στην απονιτροποίηση.

**Πίνακας Α.8: Μέσες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  και TN εισόδου και εξόδου και ποσοστιαίες απομακρύνσεις.**

Παράμετρος (mg/l)	SRT					
	30		15		20	
	Είσοδος	Έξοδος	Είσοδος	Έξοδος	Είσοδος	Έξοδος
$\text{NH}_4\text{-N}$	11.51±8	0.8±1.8	17.7±13.7	0.37±0.33	11.96±5.3	0.31±0.07
Απομάκρυνση $\text{NH}_4\text{-N}$ (%)	93		97.9		97.3	
$\text{NO}_3\text{-N}$	1.86±3.2	0.27±0.36	0.97±1	3.8±7.5	2.29±1.91	0.28±0.19
Απομάκρυνση $\text{NO}_3\text{-N}$ (%)	97.9		79		98.2	
TN	29.1±11.1	1.61±1.83	32.8±18.4	4.1±4.9	27.4±10.5	1.54±0.7
Απομάκρυνση TN (%)	94.5		87.5		94.3	

Το ποσοστό απονιτροποίησης ορίζεται ως το άζωτο που απομακρύνεται από το οξειδωμένο αμμωνιακό άζωτο και υπολογίζεται από τη σχέση:

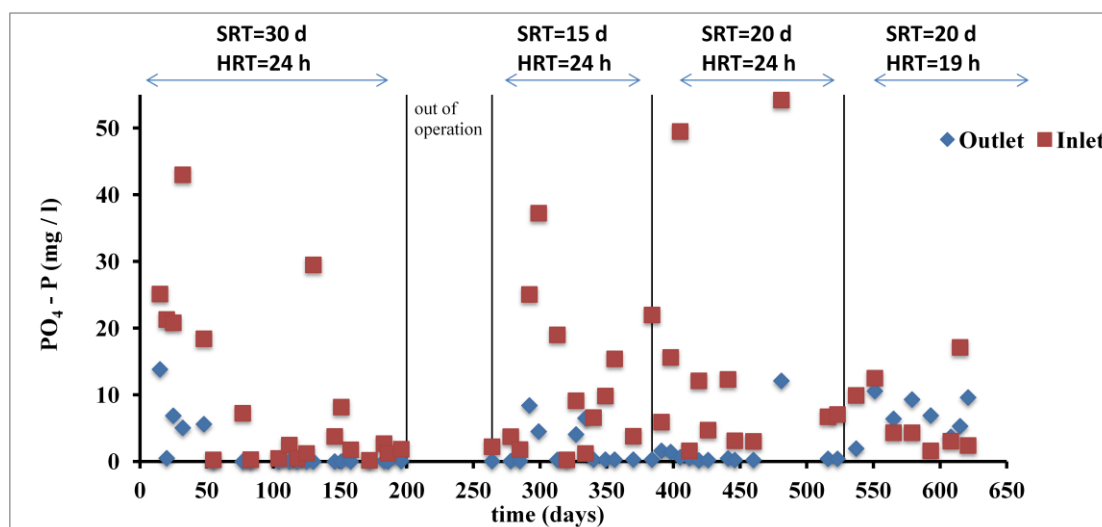
$$\frac{\text{NH}_4\text{-N in} - \text{NH}_4\text{-N out} - \text{NO}_3\text{-N out}}{\text{NH}_4\text{-N in} - \text{NH}_4\text{-N out}} * 100$$

Το ποσοστό της απονιτροποίησης ήταν 97.9 και 98.2% για SRT=30 και 20 ημέρες αντιστοίχως, ενώ μειώθηκε στο 79% όταν ο SRT ήταν 15 ημέρες. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών ανάμικτου υγρού που επιτυγχάνονται στον αντιδραστήρα αυτό το διάστημα. Αντιστοίχως η απομάκρυνση του ολικού αζώτου μειώθηκε στο 87.5% όταν ο SRT ήταν 15 ημέρες, εξαιτίας της μείωσης στο ποσοστό της απονιτροποίησης, ενώ το υπόλοιπο διάστημα

ξεπερνούσε το 94%. Παρά την μείωση αυτή, το ολικό άζωτο της εξόδου ήταν πάντα μικρότερο από τα όρια ( $TN < 15 \text{ mg/l}$ ) που θέτει η νομοθεσία κατά τη διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα (ΚΥΑ 5673).

#### A.5.3.3 Απομάκρυνση φωσφόρου

Στην εικόνα A.12 φαίνονται οι συγκεντρώσεις του  $PO_4^{3-}\text{-P}$  στην είσοδο και στην έξοδο του συστήματος. Η απομάκρυνση του  $PO_4^{3-}\text{-P}$  ήταν πάνω από 80% τον περισσότερο καιρό που ο MBR ήταν σε λειτουργία και ο  $PO_4^{3-}\text{-P}$  της εκροής ήταν πάντα μικρότερος από τα όρια ( $< 2 \text{ mg/l P}$ ) που θέτει η νομοθεσία (ΚΥΑ 5673) (πίνακας A.9). Αυτή η υψηλή απομάκρυνση φωσφόρου πιθανότατα οφείλεται στους υπερσυσσωρευτές πολυφωσφορικών (PAOS- polyphosphate accumulating organisms), των οποίων η ανάπτυξη ευνοείται στα συστήματα MBR (Yilmaz et al. 2007). Οι PAOs αποθηκεύουν φώσφορο με τη μορφή πολυφωσφορικών, κάτι που επιτυγχάνεται με ανακυκλοφορία της ενεργού ιλύος μεταξύ αερόβιων και αναερόβιων συνθηκών. Ως εκ τούτου, αναερόβιες μικροζώνες που σχηματίζονται πολλές φορές στα συστήματα MBR με υψηλές συγκεντρώσεις στερεών ευνοούν την ανάπτυξη τέτοιων μικροοργανισμών (Silva et al. 2012).



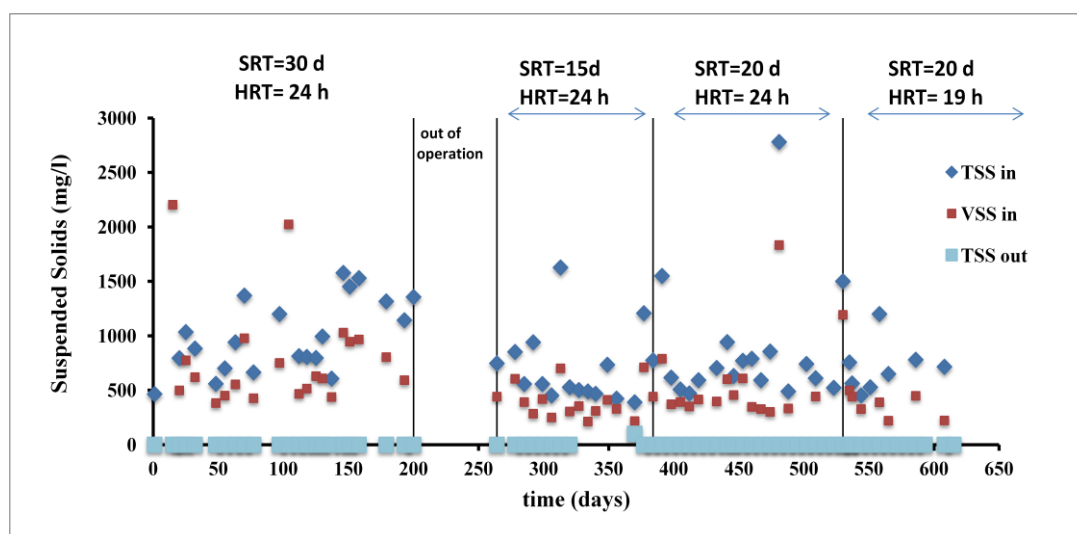
Εικόνα A. 12: Συγκεντρώσεις  $PO_4^{3-}\text{-P}$  εισόδου και εξόδου.

Πίνακας A.9: Μέσες συγκεντρώσεις  $PO_4^{3-}\text{-P}$  εισόδου και εξόδου και ποσοστιαίες απομακρύνσεις.

Παράμετρος (mg/l)	SRT					
	30		15		20	
	Είσοδος	Έξοδος	Είσοδος	Έξοδος	Είσοδος	Έξοδος
$PO_4^{3-}\text{-P}$	9.5±12.4	1.69±3.5	11.2±11	1.82±2.8	16.2±19.4	1.74±3.6

#### A.5.3.4 Απομάκρυνση αιωρούμενων στερεών

Στην εικόνα A.13 φαίνεται η διακύμανση των TSS και VSS εισόδου, καθώς και των TSS εξόδου. Η κατακράτηση των αιωρούμενων στερεών από τη μεμβράνη είναι πλήρης. Η συγκέντρωση των TSS εξόδου είναι πάντοτε κάτω από το όριο ανίχνευσης, εκτός της ημέρα 384, που συνέβη το σκίσιμο των μεμβρανών. Η επίτευξη εκροής με πολύ χαμηλή συγκέντρωση οργανικού υλικού, αζώτου και φωσφόρου είναι αποτέλεσμα και της κατακράτησης σωματιδιακού υλικού από τη μεμβράνη.

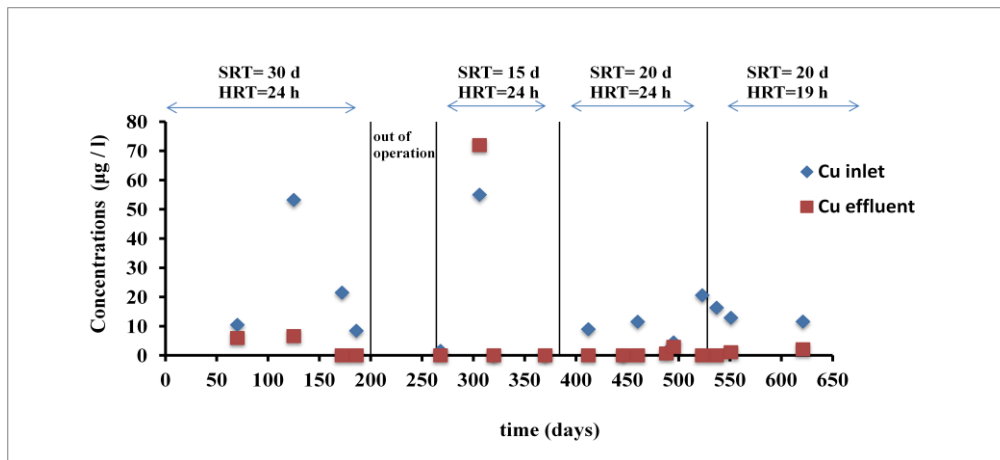


Εικόνα A.13: Συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών εισόδου και εξόδου.

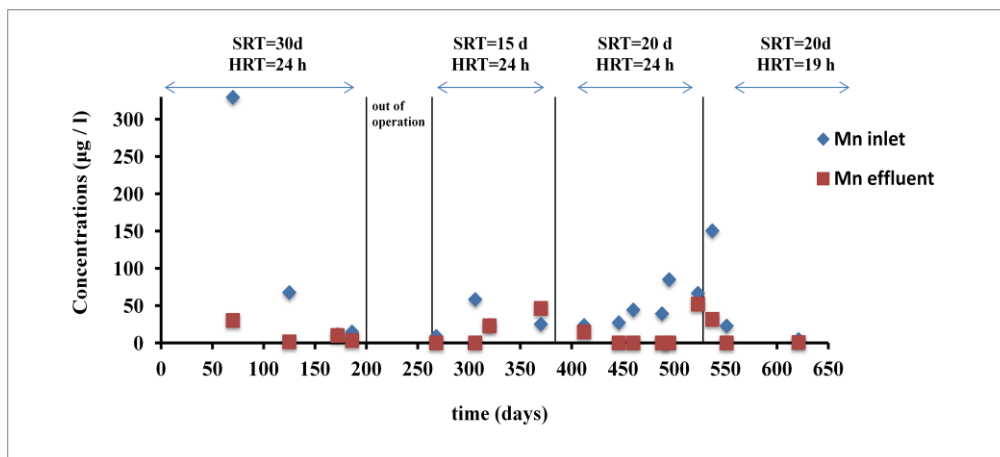
#### A.5.3.5 Απομάκρυνση Βαρέων Μετάλλων

Στο βιομηχανικό απόβλητο και στην εκροή από το σύστημα MBR πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις για τον προσδιορισμό βαρέων μετάλλων (Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Pb, U). Όμως, όπως διαπιστώθηκε, το συγκεκριμένο βιομηχανικό απόβλητο δεν χαρακτηρίζεται από υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων, εξαιτίας του τύπου των βιομηχανιών που βρίσκονται στη ΒΙ.ΠΕ, που είναι κατά κύριο λόγο βιομηχανίες τροφίμων. Τα περισσότερα βαρέα μέταλλα είτε δεν ανιχνεύθηκαν στην εισροή και στην εκροή του συστήματος είτε βρίσκονταν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτά που βρέθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι τα: μαγγάνιο (Mn), βάριο (Ba), χαλκός (Cu), των οποίων τα διαγράμματα δίνονται παρακάτω (εικόνες A.14-A.16). Από τις εικόνες παρατηρείται απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων, κυρίως στους υψηλούς χρόνους παραμονής των

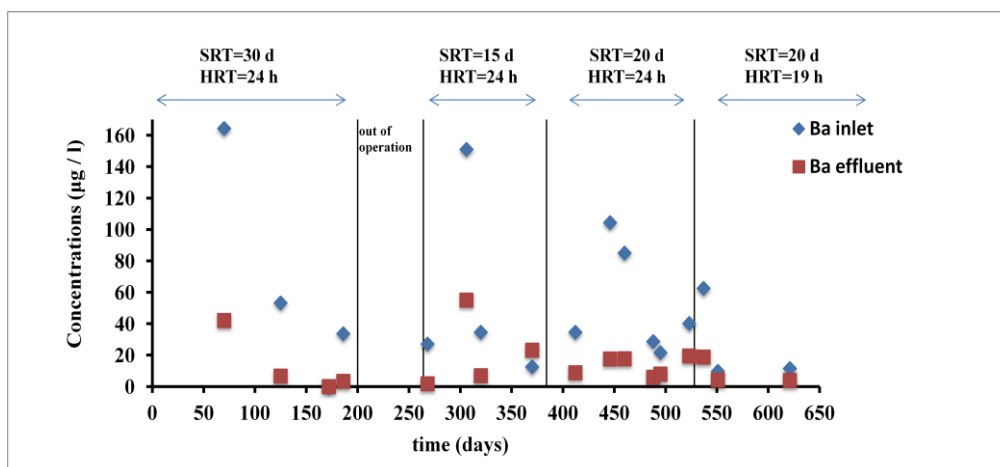
στερεών. Η μέση απομάκρυνση του χαλκού φτάνει το 82.6% του μαγγανίου το 70% και του βαρίου το 84% για SRT 30 ημέρες.



Εικόνα Α.14: Συγκεντρώσεις χαλκού στην είσοδο και στην έξοδο.



Εικόνα Α.15: Συγκεντρώσεις μαγγανίου στην είσοδο και στην έξοδο.



Εικόνα Α.16: Συγκεντρώσεις βαρίου στην είσοδο και στην έξοδο.

#### A.5.3.6 Μικροβιολογική ποιότητα εξόδου

Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων στα δείγματα της εκροής παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα Α.10. Τα όρια που προβλέπει η νομοθεσία για επεξεργασία αποβλήτων στους εξεταζόμενους μικροβιολογικούς δείκτες είναι τα παρακάτω: Ολικά κολοβακτηριοειδή CFUs/100ml <1000, κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή CFUs/100ml <200.

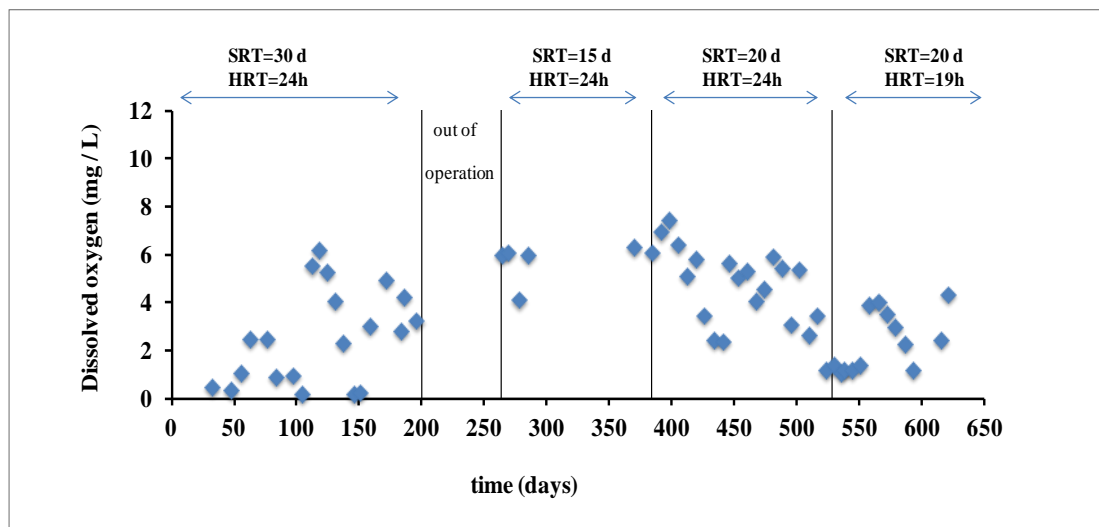
**Πίνακας Α.10: Μικροβιολογικές παράμετροι εκροής.**

Σύνολο δειγμάτων: 33	Εξεταζόμενες μικροβιολογικές παράμετροι					
	Ολικά κολοβακτηρίδια		Κοπρανώδη κολοβακτηρίδια		Εντερόκοκκοι	
	Εντός ορίων	Εκτός Ορίων	Εντός ορίων	Εκτός Ορίων	≤2CFUs/100ml	>2CFUs/100ml
Αριθμός δειγμάτων	29	4	31	2	30	3
Ποσοστό (%)	88%	12%	94%	6%	91%	9%

Από τον παραπάνω πίνακα συμπεραίνεται πως επιτυγχάνεται άριστη ποιότητα εκροής, όσον αφορά τους εξεταζόμενους μικροβιολογικούς δείκτες.

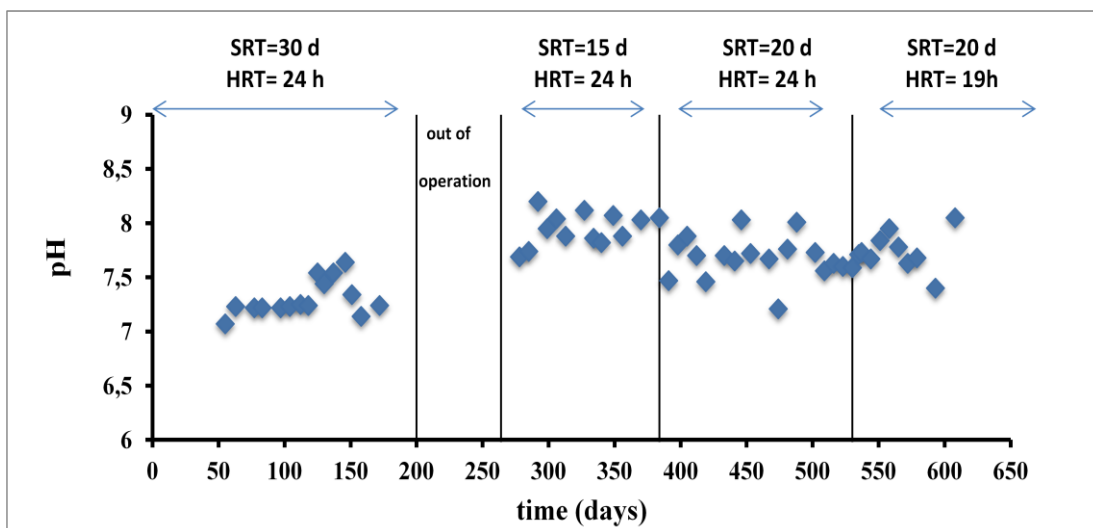
#### A.5.4 Μετρήσεις θερμοκρασίας, pH και διαλυμένου οξυγόνου

Στην εικόνα Α.17 φαίνεται η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (DO) στο πιλοτικό σύστημα MBR. Κατά την έναρξη λειτουργίας του συστήματος και μέχρι την 50<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται πως η συγκέντρωση του DO είναι σχεδόν μηδενική, εξαιτίας της πολύ υψηλής συγκέντρωσης της βιομάζας. Για τον λόγο αυτό αυξήθηκε η παροχή του αερισμού, έτσι ώστε η συγκέντρωση του DO να είναι μεγαλύτερη από 2 mg/l. Κατά τις ημέρες 104, 151 και 158 σημειώθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις, εξαιτίας προβλημάτων στο σύστημα αερισμού παροχής λεπτών φυσαλίδων. Επίσης τις ημέρες 523-551 παρατηρήθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις DO (1-1.5 mg/l), πιθανότατα εξαιτίας των πολύ υψηλών θερμοκρασιών που σημειώθηκαν εκείνη την περίοδο με αποτέλεσμα να δυσχεραίνουν την διάχυση του οξυγόνου.

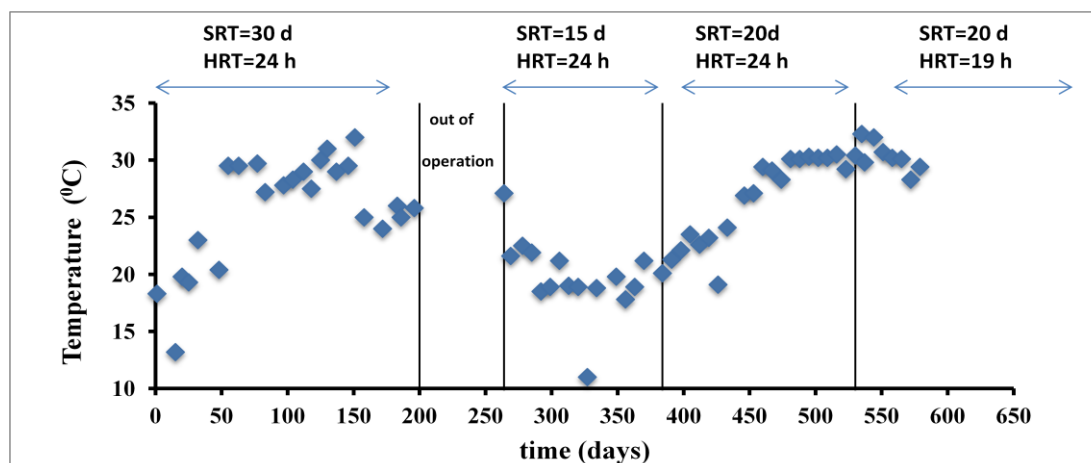


Εικόνα Α.17: Συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου (DO) στον αντιδραστήρα.

Στην εικόνα Α.18 φαίνεται το pH της ιλύος στο πιλοτικό σύστημα MBR, που κυμαίνεται μεταξύ 7.07 και 8.2, δηλαδή σε ικανοποιητικά επίπεδα για τη δράση των μικροοργανισμών. Η θερμοκρασία στο πιλοτικό σύστημα MBR κυμαίνεται μεταξύ 11<sup>0</sup>C και 32.3 <sup>0</sup>C, με μέσες τιμές πάνω από 18<sup>0</sup>C να επικρατούν κατά το περισσότερο χρόνο λειτουργίας, όπως χαρακτηριστικά φαίνεται στην εικόνα Α.19.



Εικόνα Α. 18: pH ιλύος στον αντιδραστήρα.



Εικόνα Α.19: Θερμοκρασία (οC) στον αντιδραστήρα.

#### Α.5.5 Επίδραση του υδραυλικού χρόνου παραμονής στην ποιότητα της εκροής

Η επίδραση του υδραυλικού χρόνου παραμονής (HRT) στην λειτουργία του MBR μελετήθηκε, λειτουργώντας τον αντιδραστήρα σε δύο διαφορετικούς HRTs (24 και 19 ώρες) και σταθερό SRT ίσο 20 ημέρες. Ο μικρότερος HRT προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας, όπως φαίνεται στην εικόνα Α.8 και στον πίνακα Α.11. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις στερεών ανάμικτου υγρού σε μικρότερο HRT αποδίδεται στην αύξηση της οργανικής φόρτισης που συνεπάγεται την αύξηση της διαθέσιμης τροφής για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ο πίνακας Α.10 δείχνει επιπλέον την ποιότητα της εξόδου σε αυτούς τους διαφορετικούς HRTs. Το COD της εκροής αυξήθηκε ελάχιστα από  $22.1 \pm 8.5$  mg/l που παρατηρήθηκε για HRT ίσο με 24 ώρες σε  $29.1 \pm 14.7$  mg/l για HRT 19 ώρες, ενώ το μέσο COD της εισόδου δεν είχε σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια αυτών των περιόδων. Φαίνεται λοιπόν πως ο HRT έχει πολύ μικρή επίδραση στην απομάκρυνση άνθρακα, συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουν και άλλοι ερευνητές (Gao et al. 2012, Fallah et al. 2010, Guadie et al. 2013).

Η απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  ήταν σταθερή και συνεχώς πάνω από 96%, υποδηλώνοντας πως και η διαδικασία της νιτροποίησης δεν επηρεάστηκε από την αλλαγή αυτή στον HRT.

Από την άλλη πλευρά, το ποσοστό απονιτροποίησης μειώθηκε με μείωση του HRT στις 19 ώρες, παρά τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών που επιτεύχθηκαν στον αντιδραστήρα εκείνη την περίοδο. Επιπροσθέτως, η απομάκρυνση



του φωσφόρου μειώθηκε δραματικά και η εκροή χαρακτηριζόταν από υψηλές συγκεντρώσεις φωσφόρου (πίνακας Α.11). Η αύξηση αυτή στις συγκεντρώσεις φωσφόρου στην εκροή συνδέεται με απελευθέρωση φωσφόρου από τα κύτταρα, που πιθανότατα συνέβη στον χαμηλότερο HRT. Αυτό μας δείχνει πως ο χρόνος επαφής μεταξύ του τροφοδοτούμενου αποβλήτου και των απονιτροποιητών καθώς και των υπερσυσσωρευτών φωσφόρου δεν ήταν επαρκής. Οι μεγάλοι χρόνοι παραμονής είναι προφανώς απαραίτητοι για αποτελεσματική απομάκρυνση  $\text{NO}_3^-$ -N και  $\text{PO}_4^{3-}$ -P, γιατί βοηθούν τους μικροοργανισμούς στον ανταγωνισμό τους για υπόστρωμα.

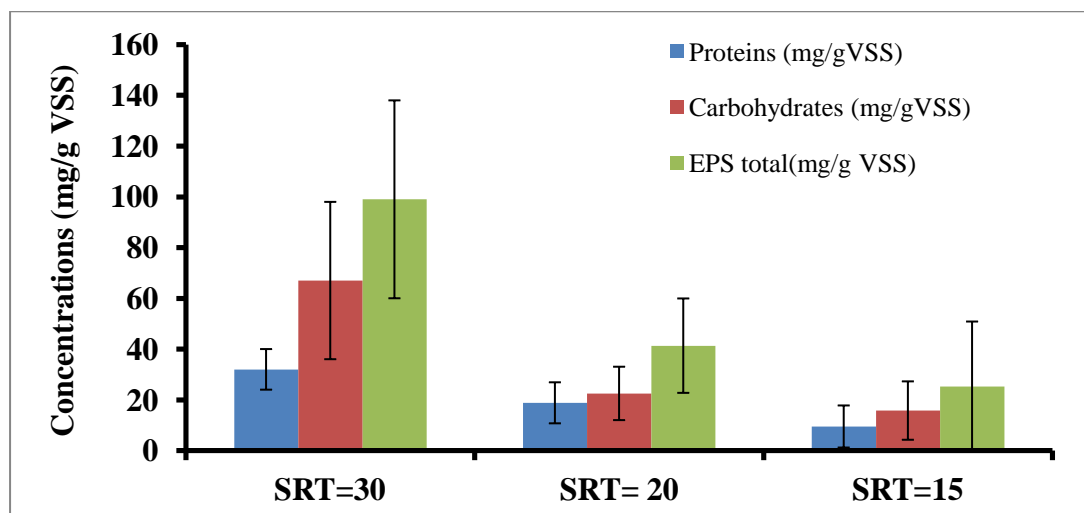
**Πίνακας Α.11: Μέσες συγκεντρώσεις τυπικών παραμέτρων σε είσοδο και έξοδο σε 2 διαφορετικούς HRTs.**

Παράμετρος (mg/l)	HRT=24		HRT=19	
	Είσοδος	Έξοδος	Είσοδος	Έξοδος
COD	3087±1460	22.1 ±8.5	2920±703	29.1±14.7
$\text{NH}_4^+$ -N	11.96±5.3	0.31±0.07	12.4±6.1	0.33±0.34
$\text{NO}_3^-$ -N	2.29±1.91	0.28±0.19	3.1±1.64	2.7±2.3
$\text{PO}_4^{3-}$ -P	16.2±19.4	1.74±3.6	6.9±5.6	6.7±3
MLSS	13355±3135		15824 ±1615	
MLVSS	10288±2435		10745±755	

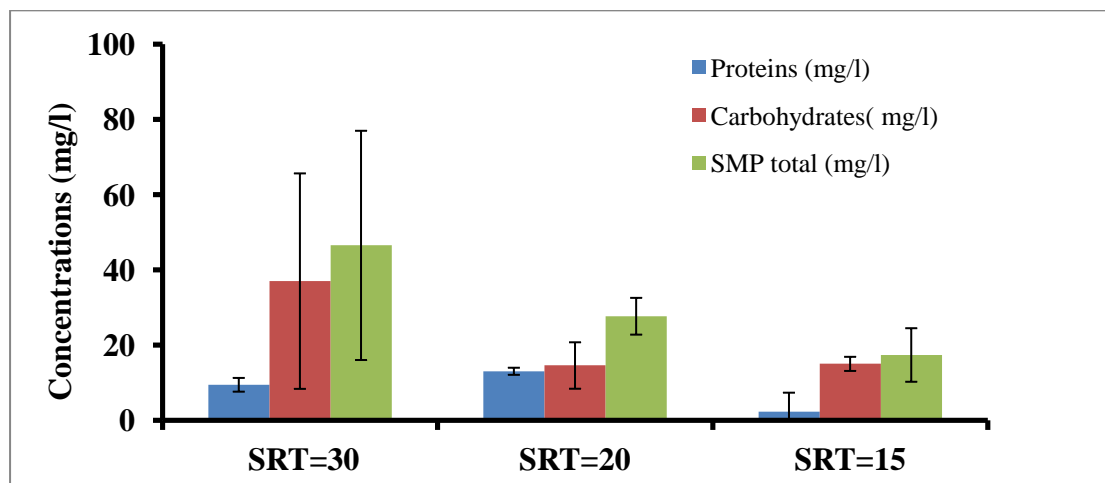
#### **Α.5.6 Συγκεντρώσεις εξωκυτταρικών πολυμερών ενώσεων (EPS) και διαλυτών μικροβιακών προϊόντων (SMP) – Επίδραση του χρόνου παραμονής της λάσπης και του υδραυλικού χρόνου παραμονής.**

Στις εικόνες Α.20 και Α.21 φαίνονται οι συγκεντρώσεις των EPS και SMP, οι οποίες μετρήθηκαν ως άθροισμα των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων στη μόνιμη κατάσταση του κάθε χρόνου παραμονής της λάσπης. Από τις εικόνες φαίνεται πως οι υδατάνθρακες είναι το κυρίαρχο συστατικό τόσο των EPS όσο και των SMP. Πολλοί ερευνητές έχουν παρατηρήσει τις πρωτεΐνες ως το κυρίαρχο συστατικό των EPS και SMP και τους υδατάνθρακες ως το δεύτερο σε αναλογία συστατικό (Ying & Ping 2006, X.- F.Li et al.2008). Οι Ye et al. 2011 συμπέραναν πως σε υψηλή αναλογία C/N το ποσοστό των EPS σε υδατάνθρακες αυξήθηκε, ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε το ποσοστό των πρωτεϊνών. Οι Durmaz & Sanin 2003 πως καθώς η αναλογία C/N του αποβλήτου που τροφοδοτούσε έναν MBR αυξήθηκε από το 5 στο 40 οι μικροοργανισμοί παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες υδατανθράκων σε σχέση με τις πρωτεΐνες. Σε υψηλή αναλογία C/N οι

μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τον περισσευούμενο άνθρακα για τη σύνθεση νέων κυττάρων και για παραγωγή εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών. Επιπλέον ένας ακόμη σημαντικός λόγος που συνεισφέρει στην παραγωγή υψηλών ποσοτήτων υδατανθράκων είναι η παρουσία πολλών βιομηχανικών τροφίμων που βρίσκονται εγκατεστημένες στη ΒΙ.ΠΕ Ηρακλείου. Μετρήσεις που έγιναν στο απόβλητο έδειξαν πως χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλές ποσότητες υδατανθράκων που συχνά ξεπερνούν τα 2 g/l, κυρίως κατά την καλοκαιρινή περίοδο.



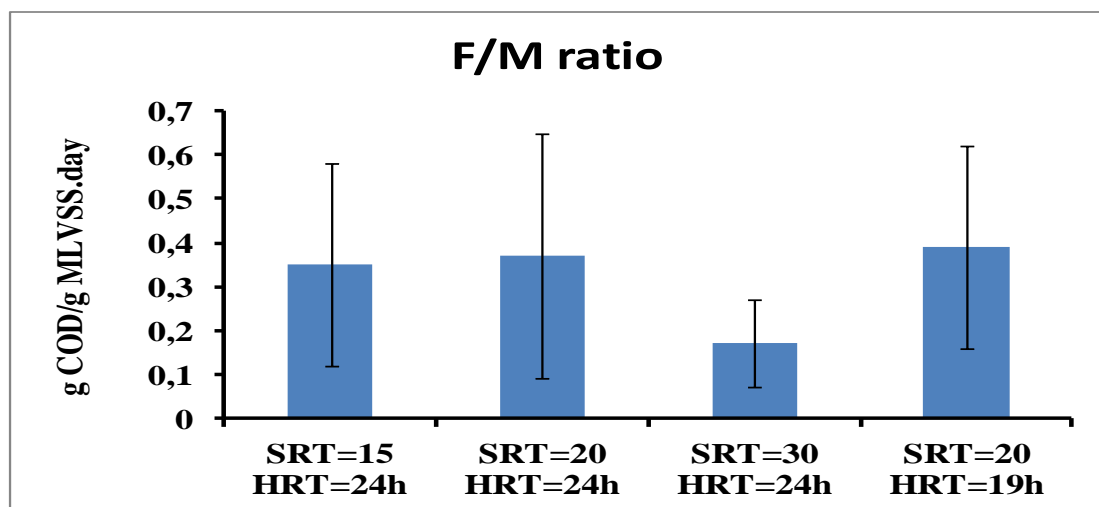
Εικόνα Α.20: Συγκεντρώσεις EPS (mg/g VSS) σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε κάθε SRT.



Εικόνα Α.21: Συγκεντρώσεις των SMP (mg/l) σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε κάθε SRT.

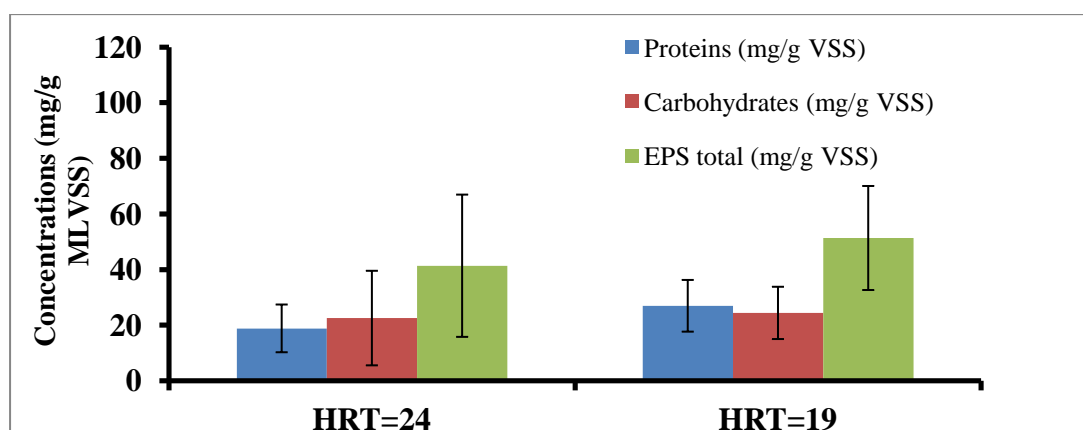
Από τις παραπάνω εικόνες είναι φανερό πως οι συγκεντρώσεις των EPS είναι υψηλότερες σε υψηλότερους SRTs. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, όταν ο SRT αυξάνεται από τις 15 στις 20 ημέρες, αυξάνονται και οι συνολικές συγκεντρώσεις των EPS και SMP, εξαιτίας της αύξησης των επιμέρους συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών

και των υδατανθράκων. Η οργανική φόρτιση (F/M) είναι περίπου η ίδια (εικόνα A.22) και στους δύο παραπάνω χρόνους λαμβάνοντας υπόψη και την μεγάλη διακύμανση που παρατηρείται, εξαιτίας υψηλότερων συγκεντρώσεων οργανικού υλικού που παρατηρήθηκαν σε SRT ίσο με 20 ημέρες (πίνακας A.7). Κατά συνέπεια διαπιστώνεται πως όταν η οργανική φόρτιση παραμένει σταθερή, τα EPS και SMP αυξάνονται σε υψηλότερους SRTs. Από την άλλη σε υψηλότερο SRT ίσο με 30 ημέρες, η οργανική φόρτιση μειώνεται, ενώ οι συγκεντρώσεις των EPS και SMP αυξάνονται σε αντίθεση με την βιβλιογραφία. Σύμφωνα με τη θεωρία των Laspidou & Rittmann 2002 ο σχηματισμός των EPS σχετίζεται με την ανάπτυξη της βιομάζας και παράγεται ανάλογα με το ρυθμό κατανάλωσης του υποστρώματος, που είναι υψηλότερος σε μικρότερους SRTs. Τα αντικρουόμενα αυτά αποτελέσματα δηλώνουν πως τα βακτήρια παράγουν περισσότερα EPS, όταν συνθήκες ενδογενούς μεταβολισμού επικρατούν στον βιοαντιδραστήρα σε πολύ υψηλούς SRTs. Σε υψηλό SRT η βιομάζα είναι στην ενδογενή ανάπτυξη που σημαίνει πως έχει χαμηλούς ρυθμούς μεταβολισμού και επομένως μικρότερη πρόσληψη τροφής και άρα παρατηρείται μικρότερη βιοαποδόμηση. Οι Huang et al. 2011 συμπέραναν πως οι υψηλότεροι SRTs που εφαρμόζονται στα συστήματα MBR προκαλούν μεγαλύτερη παραγωγή SMP. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν οι Sesay et al. 2006 που διαπίστωσαν αύξηση της παραγωγής των EPS για αυξανόμενο SRT από τις 4 στις 20 ημέρες. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν την σύνθετη σχέση μεταξύ του SRT και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της λάσπης στα συστήματα MBR.

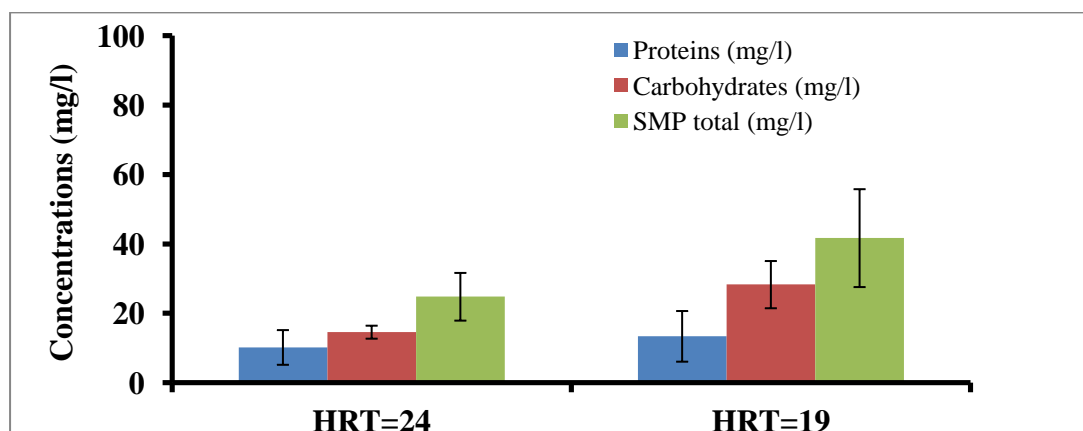


Εικόνα A.22: Η οργανική φόρτιση του συστήματος σε διαφορετικούς SRTs και HRTs.

Η επίδραση του HRT στην παραγωγή των EPS και SMP παρουσιάζεται στις εικόνες A.23 και A.24. Είναι φανερό πως μια μείωση στον HRT από τις 24 στις 19 h έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεων των EPS και SMP. Προφανώς εφόσον η χαμηλότερη τιμή HRT σε σταθερό SRT οδηγεί σε μεγαλύτερη οργανική φόρτιση του συστήματος, η βιομάζα έχει διαθέσιμο περισσότερο υπόστρωμα, κάτι που ευνοεί την παραγωγή περισσότερων EPS και SMP. Άλλες μελέτες που σχετίζονται με την επίδραση του HRT στην παραγωγή των EPS και SMP καταλήγουν σε παρόμοια συμπεράσματα. Οι Chae et al. 2006 διαπίστωσαν αύξηση των EPS με μείωση του HRT από τις 10 στις 4h. Οι Meng et al. 2007 συμπέραναν αύξηση των EPS σε χαμηλούς HRTs, εξαιτίας της υπερβολικής ανάπτυξης των νηματοειδών μικροοργανισμών στους χρόνους αυτούς.



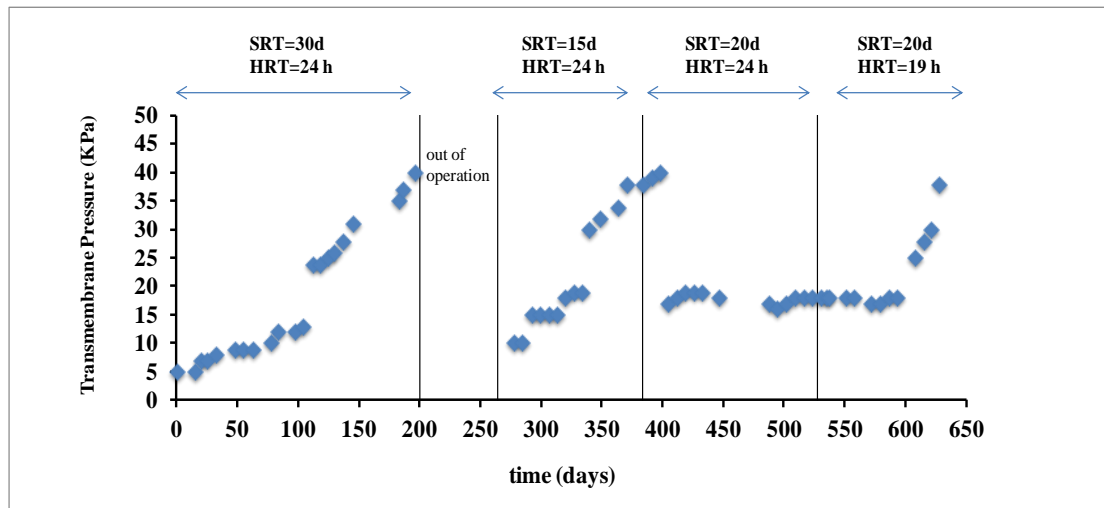
Εικόνα A.23: Συγκεντρώσεις των EPS (mg/g VSS) σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε κάθε HRT.



Εικόνα A.24: Συγκεντρώσεις των SMP (mg/l) σε όρους πρωτεϊνών και υδατανθράκων σε κάθε HRT.

### **A.5.7 Έμφραξη μεμβρανών κατά τη διάρκεια λειτουργίας του πιλοτικού συστήματος**

Κατά τη διάρκεια λειτουργίας του πιλοτικού συστήματος η έμφραξη στις μεμβράνες ελεγχόταν μέσω της μέτρησης της διαμεμβρανικής πίεσης (Transmembrane Pressure-TMP). Στην εικόνα A.25 παρουσιάζεται η αύξηση της διαμεμβρανικής πίεσης με τον χρόνο στους τρεις διαφορετικούς SRTs που εφαρμόστηκαν. Αρχικά για SRT ίσο με 30 ημέρες, ένας μικρός ρυθμός αύξησης της διαμεμβρανικής πίεσεως (0.07 KPa/ημέρα) παρατηρείται μέχρι την 100<sup>η</sup> ημέρα λειτουργίας του αντιδραστήρα, ακολουθούμενος από έναν μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης (0.28 KPa/ημέρα) μετά την 100<sup>η</sup> ημέρα, έχοντας ως αποτέλεσμα έναν συνολικό ρυθμό αύξησης ίσο με 0.175 KPa/ημέρα κατά τη διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα σε αυτό τον SRT και για σταθερό HRT. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρείται όταν ο SRT μειώνεται στις 15 ημέρες. Ο χημικός καθαρισμός των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε δύο φορές κατά τη διάρκεια του πειράματος κατά τις ημέρες 196 και 398, χρησιμοποιώντας αραιό διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (5% κ.ο). Την περίοδο που ο SRT ρυθμίστηκε στις 20 ημέρες και μετά τον δεύτερο καθαρισμό των μεμβρανών, μια παρατεταμένη και σχεδόν σταθερή διαμεμβρανική πίεση (0.011 KPa/ημέρα) παρατηρείται μέχρι την 586<sup>η</sup> ημέρα, μετά την οποία αυξήθηκε απότομα (0.57 KPa /ημέρα). Αυτή η έντονη αύξηση της διαμεμβρανικής πίεσεως οφείλεται πιθανότατα στη μείωση του υδραυλικού χρόνου παραμονής, η οποία οδήγησε σε μεγαλύτερη ροή του διηθήματος και μεγαλύτερο ρυθμό έμφραξης. Αντιθέτως, ο μικρότερος SRT (15 ημέρες) οδήγησε σε πιο γρήγορη αύξηση (0.22 KPa/day) της διαμεμβρανικής πίεσεως συνολικά, παρά τις μικρότερες συγκεντρώσεις EPS και SMP που παρατηρήθηκαν εκείνη την περίοδο. Από τα παραπάνω είναι εμφανές πως η συσσώρευση των EPS και SMP στον αντιδραστήρα στα διαφορετικά SRTs δεν σχετίζονται καλά με τη δυναμική της διαμεμβρανικής πίεσεως, κυρίως σε χαμηλό SRT. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει γιατί η έμφραξη των μεμβρανών δεν επηρεάζεται μόνο από την παραγωγή των EPS και SMP, αλλά από άλλους παράγοντες όπως είναι τα χαρακτηριστικά του ανάμικτου υγρού (παρουσία νηματοειδών μικροοργανισμών, σύσταση αποβλήτου, ιξώδες, συκέντρωση αιωρούμενων στερεών) αλλά και οι λειτουργικές συνθήκες που επικρατούν στον αντιδραστήρα (SRT, HRT, DO).



Εικόνα Α.25: Η διαμεμβρανική πίεση στον αντιδραστήρα.

## A.6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Μια άριστη ποιότητα εκροής επιτεύχθηκε, όσον αφορά τις συγκεντρώσεις C,N,P σε όλους τους χρόνους παραμονής της λάσπης παρά την υψηλή αναλογία C/N και τις υψηλές διακυμάνσεις στη σύσταση του τροφοδοτούμενου αποβλήτου.
- Υψηλότερη απομάκρυνση COD παρατηρήθηκε σε SRT ίσο με 20 ημέρες, παρά τις υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού υλικού στο τροφοδοτούμενο απόβλητο εκείνη την περίοδο.
- Η απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ήταν σχεδόν πλήρης ακόμη και σε μικρούς SRTs.
- Δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  στον αντιδραστήρα, αποδεικνύοντας την ταυτόχρονη νιτροποίηση και απονιτροποίηση που συνέβαινε στον αντιδραστήρα, εξαιτίας τόσο των υψηλών συγκεντρώσεων αιωρούμενων στερεών του ανάμικτου υγρού, που οδηγούν σε διαβάθμιση της κατανομής του διαλυμένου οξυγόνου στα συσσωματώματα, όσο και στην υψηλή αναλογία C/N του βιομηχανικού αποβλήτου.
- Η απονιτροποίηση ήταν υψηλότερη στους υψηλότερους SRTs, εξαιτίας των υψηλότερων συγκεντρώσεων αιωρούμενων στερεών που παρατηρήθηκαν.
- Η απομάκρυνση φωσφόρου ήταν πάνω από 80%, το περισσότερο διάστημα που ο MBR ήταν σε λειτουργία.
- Η αλλαγή στον υδραυλικό χρόνο παραμονής δεν είχε επίδραση στην απομάκρυνση COD και  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , αλλά είχε ισχυρή επίδραση στην απονιτροποίηση και την απομάκρυνση φωσφόρου. Όταν ο HRT μειώθηκε από τις 24 στις 19 ώρες η απονιτροποίηση και η απομάκρυνση φωσφόρου μειώθηκαν επίσης, δείχνοντας πως ο χρόνος επαφής του αποβλήτου με τους μικροοργανισμούς δεν ήταν αρκετός.
- Οι υδατάνθρακες αποτελούσαν το βασικό συστατικό των EPS και SMP, εξαιτίας της μεγάλης αναλογίας C/N που χαρακτηρίζει το απόβλητο καθώς και των πολλών βιομηχανικών τροφίμων που είναι εγκατεστημένες στη ΒΙ.ΠΕ Ηρακλείου.
- Οι συγκεντρώσεις των EPS και SMP είναι υψηλότερες σε υψηλότερους SRTs σε αντίθεση με πολλές μελέτες της βιβλιογραφίας, δείχνοντας πως τα

βακτήρια παράγουν περισσότερα EPS όταν συνθήκες ενδογενούς μεταβολισμού επικρατούν στον MBR σε υψηλό SRT.

- Η μείωση στον HRT από τις 24 στις 19 h είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των συνολικών EPS και SMP συγκεντρώσεων.
- Δεν υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού αύξησης της διαμεμβρανικής πίεσης και των συγκεντρώσεων των EPS και SMP, κυρίως σε χαμηλό SRT, αντικατοπτρίζοντας την πολυπλοκότητα της βιολογικής διεργασίας.
- Τα αντιφατικά αποτελέσματα της βιβλιογραφίας είναι απόρροια των διαφόρων μεθόδων εκχύλισης των EPS και SMP που χρησιμοποιούνται από τον κάθε ερευνητή, του διαφορετικού αποβλήτου, των διαφορετικών διατάξεων αντιδραστήρων μεμβρανών, των διαφορετικών τύπων μεμβρανών και των διαφορετικών λειτουργικών συνθηκών που επικρατούν στον αντιδραστήρα.



## **ΜΕΡΟΣ Β**

## B.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι θαλασσινές υδατοκαλλιέργειες αποτελούν έναν τομέα ταχέως αναπτυσσόμενο (FAO 2008, NOAA Fisheries), ο οποίος έχει εξελιχθεί σε μια βαριά βιομηχανία με εθνική και παγκόσμια σημασία. Οι θαλασσινές υδατοκαλλιέργειες κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παγκόσμια παραγωγή φαγητού, εξαιτίας της συνεχόμενης αύξησης του πληθυσμού της Γης και της ταυτόχρονης εξάντλησης των φυσικών αποθεμάτων. Οι ανάγκες λοιπόν για καλλιέργεια θαλασσινών ολοένα και αυξάνονται.

Όσο όμως οι μονάδες υδατοκαλλιέργειών συνεχίζουν και αυξάνονται, οι επιδράσεις τους στο περιβάλλον γίνονται ολοένα και πιο ανησυχητικές. Οι μονάδες υδατοκαλλιέργειών παράγουν τεράστιες ποσότητες θαλασσινού νερού, εμπλουτισμένου με υψηλές συγκεντρώσεις αζώτου και φωσφόρου και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα, όπως ευτροφισμό και τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς (Thomas et al. 2010, Herbeck et al. 2013, Smayda 2008, Read & Fernandes 2003, Sarà et al. 2011). Για να προστατευτούν λοιπόν και να διατηρηθούν τα φυσικά υδάτινα οικοσυστήματά μας, είναι άμεση η ανάγκη για επεξεργασία των αποβλήτων που προέρχονται από αυτές τις εγκαταστάσεις πριν την τελική τους διάθεση.

Τα συστήματα υδατοκαλλιέργειών με επανακυκλοφορία (Recirculating Aquaculture Systems - RAS) περιλαμβάνουν σύστημα ανακύκλωσης του νερού μεταξύ του καλλιεργούμενου είδους και των σταδίων επεξεργασίας του παραγόμενου αποβλήτου (Martins et al. 2010, van Rijn 2013). Η ανάπτυξη τέτοιων χερσαίων συστημάτων έχει διπλό όφελος: μειώνει τη χρήση του νερού και ταυτόχρονα προσφέρει τη δυνατότητα για επεξεργασία του αποβλήτου πριν τη διάθεσή του στους υδάτινους αποδέκτες (Tal et al. 2009). Με τα συστήματα αυτά περιορίζονται σημαντικά οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις σε σύγκριση με τα συστήματα απευθείας διάθεσης των αποβλήτων στους υδάτινους αποδέκτες (flow through systems) (Martins et al. 2010). Ως εκ τούτου είναι σημαντικό να αναπτυχθούν κατάλληλες μονάδες επεξεργασίας αυτών των αποβλήτων, λαμβάνοντας υπόψη τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους, όπως η αυξημένη τους αλατότητα (κοντά στις συγκεντρώσεις του θαλασσινού νερού), όταν πρόκειται για καλλιέργεια θαλασσινών ειδών.

Από την άλλη πλευρά τα οστρακοειδή απαιτείται συχνά να μεταφέρονται σε εξυγιαντήρες κλειστού βρόχου πριν την τελική τους διάθεση στην αγορά. Μάλιστα σε

κάποιες περιπτώσεις συνίσταται να παραμένουν στους εξυγιαντήρες αυτούς για περισσότερο από μια εβδομάδα. Σε τέτοιες περιπτώσεις απαιτείται η προσθήκη θρεπτικών συστατικών στο κύκλωμα για την διατήρηση της ποιότητάς του, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση ενώσεων αζώτου και φωσφόρου στο ρεύμα εξόδου.

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει για την επεξεργασία αποβλήτων από υδατοκαλλιέργειες βασίζονται στη χρήση υγροβιοτόπων, που έχουν φυτευτεί με αλόφυτα, δηλαδή φυτά με μεγάλη ανθεκτικότητα στην αλατότητα (Lymbery et al. 2013, Webb et al. 2012).

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε για πρώτη φορά ένας βιοαντιδραστήρας με το εμπορικό όνομα 'Advantex', που χρησιμοποιεί ένα συνθετικό ύφασμα ως μέσο επεξεργασίας και ανάπτυξης των μικροοργανισμών και στηρίζεται στην αρχή της προσκολλημένης βιομάζας. Αρχικά μικτές κοινότητες βακτηρίων αναπτύχθηκαν στο σύστημα και κατόπιν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με μικροάλγη (*Picochlorum sp*). Το συγκεκριμένο γένος μικροαλγών έχει εφαρμοστεί αποτελεσματικά στην βιοεξυγίανση αποβλήτων με μεγάλη αλατότητα (von Alvensleben et al. 2013).

Βασικό χαρακτηριστικό των μικροαλγών είναι η ικανότητά τους να αφομοιώνουν/συσσωρεύουν θρεπτικά όπως το άζωτο και ο φώσφορος (Subashchandrabose et al. 2011). Για τον λόγο αυτό τα τελευταία χρόνια τα μικροάλγη εφαρμόζονται ευρέως στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων και η μελέτη της ικανότητάς τους αυτής για απομάκρυνση θρεπτικών πραγματοποιείται κυρίως σε βιοαντιδραστήρες αιωρούμενης βιομάζας. Η απομάκρυνση των θρεπτικών πραγματοποιείται διαμέσου της παραγωγής βιομάζας, ενώ σε ένα επόμενο στάδιο η βιομάζα αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή βιοκαυσίμων (Ruiz-Martinez et al. 2012, de Godos et al. 2010, Wu et al. 2012). Τα μικροάλγη αναπτύσσουν συνεργιστικές σχέσεις με τα βακτήρια, τα οποία οξειδώνουν οργανική ύλη και παρέχουν ανόργανο άνθρακα στα μικροάλγη, τα οποία με τη σειρά τους παράγουν οξυγόνο για τα βακτήρια, μειώνοντας έτσι τις συνολικές απαιτήσεις του συστήματος σε αερισμό (van der Ha et al. 2011). Συνεπώς η βιοεξυγίανση με χρήση μικροαλγών αποτελεί μια ελκυστική λύση στην επεξεργασία αποβλήτων. Από όσο γνωρίζουμε δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία στην χρήση τους σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας.

## **B.2 ΣΤΟΧΟΣ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ**

Οι αναλύσεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο σύστημα αφορούσαν:

- την εύρεση του βέλτιστου χρόνου λειτουργίας της αντλίας τροφοδοσίας του συστήματος.
- την περιγραφή της δομής της μικροβιακής κοινότητας που αποτελούσε το βιοφίλμ.
- την αποδοτικότητα του συστήματος (απομάκρυνση COD,  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ , TN,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) σε διάφορες αναλογίες C/N του τροφοδοτούμενου αποβλήτου.
- την σύνδεση συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών με την επεξεργασία του αποβλήτου.

Απώτερος λοιπόν στόχος της συγκεκριμένης έρευνας είναι η επεξεργασία του αποβλήτου που προέρχεται από την τελική έξοδο των υδατοκαλλιεργειών ή και ταυτόχρονα η βελτιστοποίηση της βιολογικής επεξεργασίας που μπορεί να ενσωματωθεί σε ένα κλειστό κύκλωμα εξυγίανσης οστράκων.

## **B.3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΙΣΗ**

### **B.3.1 Υδατοκαλλιέργειες**

Ο τομέας των υδατοκαλλιεργειών παρουσίασε σημαντική ανάπτυξη παγκοσμίως κατά τα τελευταία 50 χρόνια. Ενώ στη δεκαετία του 50 η παραγωγή δεν ξεπερνούσε το 1.000.000 τόνους, το 2006 είχε φτάσει τους 51.700.000 τόνους και σήμερα εξακολουθεί και αναπτύσσεται ταχύτερα από οποιονδήποτε άλλο τομέα παραγωγής τροφίμων ζωικής προέλευσης (FAO 2009). Ενώ η ζήτηση για τα προϊόντα αλιείας ολοένα και αυξάνεται, η προσφορά ψαριών από αλιεία βρίσκεται σε αδιέξοδο. Η κατανάλωση έχει υπερδιπλασιαστεί από το 1973 με αποτέλεσμα την ανάπτυξη της Ευρωπαϊκής υδατοκαλλιέργειας. Η συμβολή της υδατοκαλλιέργειας στην προμήθεια των ψαριών έχει αυξηθεί σημαντικά φτάνοντας το ιστορικό ρεκόρ του 47% το 2006, σε σύγκριση με 6% το 1970. Το ποσοστό αυτό αναμένεται να φτάσει το 60% το 2020 (FAO 2009).

Στην πραγματικότητα, τα υψηλά ποσοστά της ζήτησης που μέχρι τώρα υποστηρίζονταν από την αλιεία, έχουν οδηγήσει αναπόφευκτα στη μείωση των άγριων θαλάσσιων αποθεμάτων. Συνολικά, περίπου το 80% των παγκόσμιων αποθεμάτων, για το οποίο υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία, έχει αναφερθεί ως πλήρους εκμετάλλευσης ή υπερεκμετάλλευσης (FAO 2009). Το γεγονός αυτό δείχνει πως η απουσία μιας αποτελεσματικής και προληπτικής διαχείρισης της αλιείας από τη μία, και ο εκσυγχρονισμός του αλιευτικού στόλου από την άλλη (πιο ισχυροί κινητήρες, πιο αποτελεσματικά αλιευτικά εργαλεία, εργαλεία για τον εντοπισμό των αποθεμάτων ιχθύων κλπ.), έχουν οδηγήσει στην επίτευξη της μέγιστης δυνατής εκμετάλλευσης των αποθεμάτων από τους ωκεανούς παγκοσμίως.

Η ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών εντατικής παραγωγής ή υπερπαραγωγής, τόσο στην ξηρά (on-shore) όσο και στη θάλασσα (off-shore), ως απάντηση στην αυξανόμενη ζήτηση για αλιευτικά προϊόντα, έχει οδηγήσει σε πολύ υψηλούς ρυθμούς παραγωγής από τη μία, αλλά σε σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα από την άλλη, όπως ευτροφισμό και τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς (Thomas et al. 2010, Herbeck et al. 2013, Smayda 2008, Read & Fernandes 2003, Sarà et al. 2011). Στην πραγματικότητα, οι καλλιέργειες αυτές παράγουν μεγάλες ποσότητες λυμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις αιωρούμενων στερεών (απόβλητα του κύκλου μεταβολισμού των ψαριών και μη καταναλισκόμενη τροφή) και μικροθρεπτικά συστατικά, όπως

αμμωνιακό άζωτο και ανόργανες φωσφορικές ενώσεις, καθώς και αύξηση της θολότητας του νερού που μπορεί συχνά να δημιουργήσει αναερόβιες συνθήκες (Michaud et al. 2006).

Στις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες οι κλωβοί τοποθετούνται απευθείας στη θάλασσα και παρέχεται τροφή στα καλλιεργούμενα είδη μέχρι να φτάσουν στο κατάλληλο εμπορεύσιμο μέγεθος και βάρος. Ωστόσο, αν και η υδατοκαλλιέργεια σε κλωβούς παρουσιάζει εξαιρετική σχέση κόστους -οφέλους, απέχει πολύ από το να είναι βιώσιμη από οικολογική άποψη. Στα off-shore ιχθυοτροφεία σολομού, για παράδειγμα, τα απόβλητα που παράγονται επηρεάζουν το υδάτινο περιβάλλον που περιβάλλει τις μονάδες και αν αυτές βρίσκονται πολύ κοντά στην ακτή ή σε κλειστούς όρμους, συχνά οδηγούν σε ανοξικές συνθήκες. Σε ακραίες περιπτώσεις, ο μεγάλος αριθμός των εκτρεφόμενων ψαριών μπορεί να παράγει επαρκείς ποσότητες αποβλήτων ώστε να προκαλέσει την κατάρρευση των ελάχιστων επιπέδων οξυγόνου που είναι αναγκαία για τη ζωή του υδάτινου οικοσυστήματος. Ακόμη και μία αποτελεσματική και προσεκτική διαχείριση μπορεί να προκαλέσει επιδράσεις που αποφέρουν σημαντική μείωση της βιοποικιλότητας γύρω από τα κλουβιά (Allsopp et al. 2008).

Τα χερσαία συστήματα (on shore) υδατοκαλλιέργειών μπορούν να ταξινομηθούν σε 2 κατηγορίες: τα 'ανοικτά' και τα συστήματα με επανακυκλοφορία 'ή κλειστά' (van Rijn 2013). Και τα δύο αποτελούνται από δεξαμενές που διαφέρουν στο σχήμα και το υλικό, βρίσκονται τοποθετημένα στο έδαφος και συνδέονται με τους υδάτινους πόρους χρησιμοποιώντας συστήματα άντλησης.

Τα 'ανοικτά' συστήματα είναι συνήθως σχεδιασμένα για την παραγωγή γλυκών, υφάλμυρων και θαλασσινών ειδών (van Rijn 2013). Η ποσότητα και η ποιότητα των διαθέσιμων υδάτων αποτελούν τους κύριους παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγικότητα αυτών των συστημάτων. Τα 'ανοικτά' συστήματα εκμεταλλεύονται σημαντικά τους διαθέσιμους υδάτινους πόρους, δεδομένου ότι απαιτούν μεγάλες ποσότητες νερού για τον εφοδιασμό τους. Επιπλέον, η εξάρτησή τους αυτή περιορίζει το σχεδιασμό τους στο έδαφος, εξαιτίας της απαιτούμενης γειτνιάσής τους με τον εκμεταλλεύσιμο υδάτινο πόρο. Από την άλλη πλευρά, η υψηλή βιομάζα που επιτυγχάνεται στις δεξαμενές εκτροφής (20-40 kg/m<sup>3</sup>) οδηγεί στο σχηματισμό υψηλής συγκέντρωσης λυμάτων σε όρους σωματιδιακής και διαλυτής οργανικής ύλης

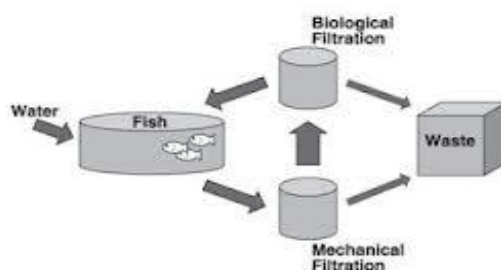
(POM και DOM), αμμωνιακού αζώτου και φωσφορικών ενώσεων (Michaud et al. 2006).

Σε αυτά τα συστήματα, προκειμένου να περιοριστούν οι επιπτώσεις στο υδάτινο οικοσύστημα, έχουν υιοθετηθεί διάφορες λύσεις, οι οποίες συνίστανται στην αφαίρεση των εναποθέσεων από τον πυθμένα των δεξαμενών με μηχανικές μεθόδους και φυτοεξυγίανση των υγρών αποβλήτων σε κατάλληλους ταμιευτήρες. Παρά το γεγονός ότι οι λύσεις αυτές είναι αρκετά αποτελεσματικές, δεν είναι καθοριστικής σημασίας, διότι από μόνες τους παράγουν επιπλέον απόβλητα (ενεργού ιλύος). Επιπλέον, τα κλασικά συστήματα εκτροφής εξακολουθούν και αποθηκεύουν τα απόβλητά τους και τα μεταφέρουν σε ειδικούς σταθμούς επεξεργασίας, ώστε η σύσταση των λυμάτων να βρίσκεται κάτω των ορίων που προβλέπονται από το νόμο. Είναι πλέον προφανές πως η βιωσιμότητα του τομέα της υδατοκαλλιέργειας, εξαρτάται σημαντικά από την ικανότητα των ιχθυοτρόφων να συνδυάζουν τις βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή των ψαριών με ταυτόχρονη μείωση του κινδύνου και των συνεπειών των δραστηριοτήτων αυτών στο περιβάλλον (Tal et al. 2009).

### **B.3.2 Συστήματα υδατοκαλλιιεργειών με επανακυκλοφορία**

Τα συστήματα υδατοκαλλιιεργειών με επανακυκλοφορία (Recirculating Aquaculture Systems- RAS) αποτελούν μια βιώσιμη μέθοδο για την εντατική εκτροφή των θαλάσσιων και γλυκού νερού ψαριών. Η δυνατότητα, χάρη σε αυτά τα συστήματα, για χειρισμό, αποθήκευση και επεξεργασία των αποβλήτων που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ειδών αποτελεί βασικό παράγοντα για την ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον συστημάτων παραγωγής προϊόντων υδατοκαλλιιεργειας (Piedrahita 2003, van Rijn 1996). Επομένως τα συστήματα αυτά αποτελούν μία εναλλακτική λύση στα παραδοσιακά συστήματα υδατοκαλλιιεργειας και έχουν αναπτυχθεί ως αποτέλεσμα της ολοένα και πιο αυστηρής νομοθεσίας κυρίως σε χώρες με περιορισμένα υδατικά αποθέματα. Τα συστήματα αυτά υιοθετούν ένα κλειστό σύστημα εκτροφής (ή επανακυκλοφορίας), που επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση ύδατος χάρη σε μια σειρά από διηθήσεις, περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό όχι μόνο τη χρήση των φυσικών υδάτινων αποθεμάτων, αλλά και τις

επιπτώσεις στο περιβάλλον, μειώνοντας τον όγκο των παραγόμενων αποβλήτων (Buono 2005, Lahav et al, 2009).



**Εικόνα Β.26: Απλοποιημένο διάγραμμα ροής για ένα σύστημα υδατοκαλλιέργειας με επανακυκλοφορία.**

Τα πλεονεκτήματα αυτών των συστημάτων είναι πολλά σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνολογίες. Τα σημαντικότερα από αυτά είναι η μειωμένη κατανάλωση νερού, η διαχείριση του αποβλήτου που παράγεται, η ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών (Piedrahita 2003) και οι καλύτερες συνθήκες υγιεινής και η διαχείριση των ασθενειών (Summerfelt et al 2009, Tal et al. 2009). Τα συστήματα αυτά πολλές φορές αναφέρονται ως ‘εσωτερικού’ ή ‘αστικού’ τύπου, δείχνοντας την ανεξαρτησία τους από επιφανειακά νερά για την παραγωγή του καλλιεργούμενου είδους. Επιπλέον, η χρήση της τεχνολογίας αυτής δίνει την δυνατότητα παραγωγής μιας ευρείας ποικιλίας θαλάσσιων ειδών κοντά στις αγορές (Masser 1999, Schneider 2007), μειώνοντας ως εκ τούτου τις εκπομπές CO<sub>2</sub> που σχετίζονται με την μεταφορά τους. Παρά τα παραπάνω πλεονεκτήματα και τον αυξανόμενο αριθμό Ευρωπαϊκών χωρών που ολοένα και υιοθετούν τα συστήματα αυτά, η συνεισφορά τους στην παραγωγή παραμένει ακόμη μικρή εξαιτίας του υψηλού κόστους κεφαλαίου που απαιτείται για την εφαρμογή τους (Schneider 2007).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η επεξεργασία των λυμάτων διεξάγεται απευθείας μέσα στο σύστημα, στο οποίο λαμβάνουν χώρα πολλές διεργασίες διήθησης, ώστε το νερό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και πάλι για καλλιέργεια και περιλαμβάνονται μηχανικές, χημικές και βιολογικές μέθοδοι επεξεργασίας. Επίσης, ένα τέτοιο σύστημα μπορεί να γίνει πιο αποτελεσματικό με την προσθήκη διαφόρων μονάδων, όπως για τη διαχείριση του όζοντος, για την απολύμανση των λυμάτων και την απομάκρυνση των οργανικών αποβλήτων, για απαερίωση, για την αφαίρεση του



διοξειδίου του άνθρακα καθώς και διάφορα συστήματα ελέγχου (Michaud et al. 2006).

Η συγκέντρωση των αιωρούμενων στερεών στο απόβλητο που προέρχεται από μια δεξαμενή εκτροφής είναι συχνά πολύ υψηλή, προκαλώντας σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας των υδάτων. Με τον όρο αιωρούμενα στερεά εννοείται όλη η σωματιδιακή ύλη που κατακάθεται στον πυθμένα της δεξαμενής του καλλιεργούμενου είδους και δεν μπορεί να αφαιρεθεί εύκολα στις συμβατικές δεξαμενές καθίζησης. Αν δεν αφαιρεθεί μπορεί να περιοριστεί σημαντικά η ποσότητα των ψαριών που μπορούν να εκτρέφονται στο σύστημα και επιπλέον μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό στα βράγχια του ψαριού (Losordo et al. 1998). Επιπλέον τα σωματίδια αυτά μπορούν να προκαλέσουν αυξημένη θολότητα στα λύματα, η οποία μπορεί γρήγορα να οδηγήσει σε δραστική μείωση της περιεκτικότητάς τους σε διαλυμένο οξυγόνο. Τα αιωρούμενα στερεά απομακρύνονται κυρίως με μηχανική διήθηση: οι δύο τύποι που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι τα φίλτρα περιστρεφόμενου τυμπάνου και τα αμμόφιλτρα (Losordo et al. 1998).

Η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) ή/και ο οζονισμός αποτελούν αποτελεσματικές λύσεις για την απολύμανση του νερού, πριν την είσοδό του στις δεξαμενές εκτροφής (Summerfelt et al. 2009). Χωρίς μια εσωτερική διαδικασία απολύμανσης, παθογόνοι μικροοργανισμοί συσσωρεύονται στις καλλιέργειες που επεξεργάζονται και επαναχρησιμοποιούν το νερό προκαλώντας την εξάπλωση ασθενειών και πολλές φορές το θάνατο των εκτρεφόμενων πληθυσμών. Γενικά προτείνεται η απολύμανση του θαλασσινού νερού για χρήση σε τέτοια συστήματα, ώστε να περιοριστεί η είσοδος μικροοργανισμών πιθανά βλαβερών για το καλλιεργούμενο είδος. Η χρήση UV αδρανοποιεί τους μικροοργανισμούς (Farkas et al. 1986, Zhu et al. 2002, Sharer et al. 2005) περιορίζοντας την είσοδο των παθογόνων.

Οι ανόργανες αζωτούχες ενώσεις (αμμωνία, νιτρώδη και νιτρικά) θεωρούνται ως οι κύριοι ρυπαντές στο απόβλητο που παράγεται από τις υδατοκαλλιέργειες (Qin et al. 2005). Η αμμωνία είναι το κυρίαρχο συστατικό αυτών των αποβλήτων και παράγεται από το μεταβολισμό των ψαριών. Η οξεία έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίας, μπορεί να προκαλέσει υπερδιέγερση, απώλεια ισορροπίας, σπασμούς, ακόμα και θάνατο (Smart 1978, Thurston et al. 1981). Από την άλλη, η χρόνια έκθεση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις αμμωνίας αποτελεί αιτία για βλάβη των ιστών,

μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα, μειωμένη ανάπτυξη, αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες (Thurston et al. 1984, Thurston et al. 1986) και ακόμη και θάνατο (Randall & Wright 1987). Προκειμένου να μειωθούν ή / και να εξαλειφθούν τα επιβλαβή προϊόντα που προκύπτουν από το μεταβολισμό των ψαριών, χρησιμοποιούνται διάφορα είδη βιολογικών φίλτρων, τα οποία είναι προσαρμοσμένα στις απαιτήσεις των εκάστοτε εκτρεφόμενων ειδών ψαριών (Schreier et al. 2010).

#### B.3.2.1 Η βιολογική επεξεργασία στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας με επανακυκλοφορία

Ένα από τα βασικά σημεία της αρχιτεκτονικής ενός συστήματος υδατοκαλλιέργειας με επανακυκλοφορία είναι η βιολογική επεξεργασία μέσω της χρήσης βιολογικών φίλτρων (επίσης γνωστά ως βιόφιλτρα). Συνήθως αποτελούνται από έναν κυλινδρικό βιοαντιδραστήρα που περιέχει υποστρώματα από διαφορετικά υλικά (μέσα), κατασκευασμένα ώστε να έχουν τη μέγιστη δυνατή επιφάνεια επαφής για την ανάπτυξη της βακτηριακής κοινότητας μέσω της δημιουργίας των βιοφίλμ (Avnimelech 2006, Gutierrez-Wing & Malone 2006). Ανεξάρτητα από τον τύπο του συστήματος (θαλασσινού ή γλυκού νερού, μικρά ενυδρεία ή μεγάλα συστήματα παραγωγής), το βιόφιλτρο περιλαμβάνει αερόβιες και αναερόβιες μικροβιακές διεργασίες για την απομάκρυνση των αζωτούχων ενώσεων που εκκρίνονται από τα ψάρια, καθώς και του άνθρακα που προέρχεται από την μη καταναλισκόμενη τροφή (Schreier et al. 2010).

Σήμερα διατίθενται στην αγορά μια ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων: πέτρες, κοχύλια, άμμος, διογκωμένη άργιλος ή πλαστικό, υλικά που χρησιμοποιούνται κυρίως για την υποστήριξη βακτηριακών μεμβρανών (Malone & Pfeiffer 2006). Η επιλογή ενός κατάλληλου βιολογικού φίλτρου επηρεάζει το κόστος κεφαλαίου και τα λειτουργικά έξοδα σε ένα τέτοιο σύστημα, την ποιότητα του νερού και φυσικά την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας του νερού (Summerfelt 2006).

Ένα τέλειο βιόφιλτρο θα αφαιρούσε όλη την αμμωνία από την εκροή, δεν θα παρήγαγε νιτρώδη ιόντα, θα υποστήριζε πυκνούς πληθυσμούς βακτηρίων νιτροποίησης, θα απαιτούσε για την υλοποίησή του φθηνά υλικά και χαμηλό κόστος συντήρησης. Δυστυχώς, δεν υπάρχει έως τώρα βιολογικό φίλτρο να έχει όλα αυτά χαρακτηριστικά, αλλά κάθε είδος έχει τα δικά του πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (Rusten et al. 2006).

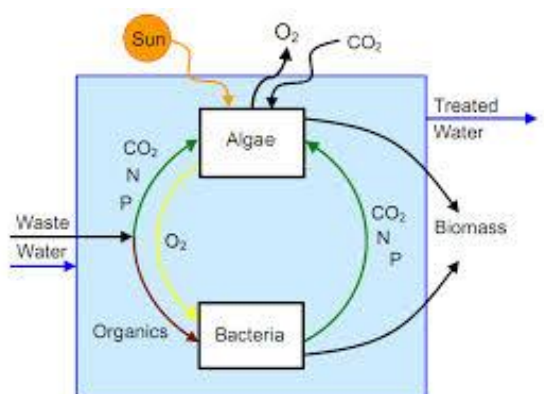
Υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί τύποι βιολογικών φίλτρων: τα διασταλλαγματικά φίλτρα, οι περιστρεφόμενοι βιολογικοί δίσκοι, τα βιόφιλτρα σταθερής και τα βιόφιλτρα κινητής κλίνης. Ειδικότερα, τα βιόφιλτρα σταθερής κλίνης υποστηρίζουν τεράστιους όγκους νερού με υψηλά ποσοστά καθαρισμού, αλλά απαιτούν συχνή συντήρηση (συχνό καθαρισμό εξαιτίας της απόφραξης που προκαλείται, περιοδικό πλύσιμο του εσωτερικού υλικού), ενώ τα φίλτρα κινητής κλίνης χρειάζονται πολύ λίγη συντήρηση, αλλά απαιτούν περισσότερο χρόνο για την οργάνωση της βακτηριακής κοινότητας.

Σε ένα σύστημα υδατοκαλλιέργειας το νερό περιλαμβάνει την παρουσία μεγάλων πληθυσμών που αποτελούνται από βακτήρια, πρωτόζωα και μικροάλγη (Michaud et al. 2006). Ορισμένοι από αυτούς τους μικροοργανισμούς εμπλέκονται στην αποδόμηση της σωματιδιακής οργανικής ύλης που υπάρχει στο απόβλητο και άλλοι στην αποδόμηση διαλυτών οργανικών ενώσεων και διαλυτών αζωτούχων ενώσεων (Sharrer et al. 2005). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να βρίσκονται είτε ελεύθεροι στη ροή του νερού, είτε προσκολλημένοι σε πολύπλοκα συσσωματώματα, που χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας προστατευτικής και συγκολλητικής μήτρας: το βιοφίλμ. Ωστόσο, επειδή η μικροβιακή δραστηριότητα συνδέεται κυρίως με την επαφή με επιφάνειες, η πλειοψηφία των μικροοργανισμών είναι οργανωμένη σε συσσωματώματα, τα οποία προσκολλώνται εύκολα σε οποιοδήποτε στερεό υπόστρωμα, οργανικό ή ανόργανο, που βρίσκεται σε επαφή με το νερό, δημιουργώντας το βιοφίλμ (MacDonald & Brözel 2000, Møller et al. 1998) .

### **B.3.3 Βιολογική επεξεργασία αποβλήτων με χρήση μικροαλγών**

Τα μικροάλγη είναι μικροσκοπικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί που απατώνται κυρίως σε υδάτινα περιβάλλοντα. Η ιδέα της χρησιμοποίησης των μικροαλγών για την επεξεργασία λυμάτων αναπτύχθηκε αρχικά στη δεκαετία του 1950 στην Καλιφόρνια από τον William Oswald (Oswald & Gotaas 1957, Oswald 1963). Ο ρόλος των μικροαλγών στην επεξεργασία αποβλήτων είναι διπλός: αφομοιώνουν θρεπτικά συστατικά από τη μια, όπως το άζωτο και ο φώσφορος και παρέχουν οξυγόνο στα βακτήρια από την άλλη, μειώνοντας τις απαιτήσεις του εκάστοτε συστήματος για αερισμό. Τα βακτήρια, με τη σειρά τους, συμμετέχουν στην αποδόμηση οργανικού υλικού στα λύματα και παρέχουν το απαιτούμενο διοξείδιο του άνθρακα στα μικροάλγη (εικόνα B.2). Επιπλέον η χρήση μικροαλγών για την

επεξεργασία των λυμάτων είναι περιβαλλοντικά πιο αποδεκτή και βιώσιμη καθώς δεν παράγει επιπλέον ρύπους όπως είναι τα παρα-προϊόντα της λυματολάσσης και παρέχει τη δυνατότητα για αποτελεσματική ανακύκλωση των θρεπτικών στοιχείων. Για παράδειγμα, η ανακτώμενη βιομάζα που προέρχεται από μικροάλγη αφενός είναι πλούσια σε άζωτο και φώσφορο και αφετέρου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως λίπασμα χαμηλού κόστους ή ως ζωοτροφή.



**Εικόνα B.27:** Αλληλεπιδράσεις μικροαλγών -βακτηρίων στην επεξεργασία αποβλήτων.

Ο τρόπος αυτός επεξεργασίας με χρήση μικροαλγών αναπτύχθηκε αρχικά σε ανοιχτά συστήματα που αποτελούνται από μία ή περισσότερες αβαθείς λίμνες (με βάθος μικρότερο από 1 μέτρο) που εκτίθενται στην ατμόσφαιρα εξωτερικά (χωρίς κάλυμμα) είτε βρίσκονται στεγασμένες σε θερμοκήπια. Οι λίμνες αυτές είναι γνωστές, ως λίμνες αλγών υψηλής απομάκρυνσης (High Rate Algal Ponds) και σε αυτές επικρατούν αερόβιες συνθήκες σε όλο τον όγκο τους σε σχέση με άλλες λίμνες, όπου ανοξικές συνθήκες επικρατούν κοντά στον πυθμένα. Έχουν διάφορα σχήματα όπως κυκλικές, λιμνοθάλασσας ή τεχνητών καναλιών ελισσόμενου στίβου που είναι και τα πιο συχνά εφαρμοζόμενα για την καλλιέργεια μικροαλγών (εικόνα B.3). Στις τεχνητές λίμνες ελισσόμενου στίβου το νερό κυκλοφορεί εντός της τεχνητής λίμνης μέσω ενός τροχού, ο οποίος εξασφαλίζει την επαρκή ανάμειξη των θρεπτικών στοιχείων του νερού αλλά και την αποφυγή της καθίζησης. Οι λίμνες αυτές εάν είναι σωστά σχεδιασμένες μπορούν να απομακρύνουν περισσότερο από το 90% του BOD και έως το 80 % του αζώτου και φωσφόρου.



**Εικόνα Β.28:** Τεχνητές λίμνες ελίσσόμενου στίβου.

Εκτός από τις ανοικτές λίμνες, μικροφύκη μπορούν επίσης να καλλιεργούνται σε κλειστούς σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες ή φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας (εικόνα Β.4) (Richmond et al.1990, Borowitzka 1996, Grima et al. 1999). Αυτοί παρουσιάζουν συνήθως καλύτερη διεισδυτική ικανότητα φωτός, χαρακτηριστικό που καθιστά δυνατή την ανάπτυξη υψηλότερων συγκεντρώσεων βιομάζας και την μεγαλύτερη παραγωγικότητα σε μικρότερο υδραυλικό χρόνο παραμονής (HRT) από ό, τι είναι δυνατό στις ανοικτές λίμνες (Borowitzka 1998). Ωστόσο, οι κλειστοί βιοαντιδραστήρες είναι συχνά πιο εξελιγμένοι και πολύπλοκοι και επομένως παρουσιάζουν μεγαλύτερες λειτουργικές απαιτήσεις από ότι οι λίμνες, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούνται σε μεγαλύτερο ποσοστό για την εμπορική παραγωγή μικροφυκών παρά για την επεξεργασία λυμάτων.



**Εικόνα Β.29:** Σωληνοειδείς φωτοβιοαντιδραστήρες (αριστερά) και φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας (δεξιά).

### B.3.3.1 Απομάκρυνση αζώτου σε καλλιέργειες μικροαλγών

Η απομάκρυνση αζώτου (N) στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων με μικροάλγη επιτυγχάνεται με αφομοίωση του N στα κύτταρα των αλγών. Το N είναι το δεύτερο πιο σημαντικό θρεπτικό συστατικό μετά τον άνθρακα (C), και αντιστοιχεί σε περισσότερο από το 10% της βιομάζας τους (Becker 1994). Το N υπάρχει σε πολλές μορφές και οι πιο κοινές αζωτούχες ενώσεις που αφομοιώνονται από τα μικροάλγη είναι το αμμωνιακό άζωτο ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ) και το νιτρικό άζωτο ( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ) (Oliver & Ganf, 2000). Η προτιμώμενη πηγή N για τα μικροάλγη είναι το  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  και όταν αυτό είναι διαθέσιμο, δεν αφομοιώνονται άλλες πηγές N (Bhaya et al. 2000). Εκτός του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  και του  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  η ουρία ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) και το νιτρώδες άζωτο ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) μπορούν επιπλέον να χρησιμοποιηθούν ως πηγές N από τα άλγη. Ωστόσο, η τοξικότητα των νιτρώδων ιόντων σε υψηλές συγκεντρώσεις τα καθιστά λιγότερο κατάλληλα (Becker 1994). Τα κυανοβακτήρια μπορούν επίσης να αφομοιώσουν τα αμινοξέα αργινίνη, γλουταμίνη και ασπαραγίνη και μερικά είδη κυανοβακτηρίων μπορούν να δεσμεύσουν το αέριο άζωτο ( $\text{N}_2$ ) (Bhaya et al. 2000). Από όλες τις πηγές αζώτου, η δέσμευση αυτή είναι η πιο απαιτητική από άποψη ενέργειας και μπορεί να συμβεί μόνο σε ορισμένα κυανοβακτήρια όταν δεν υπάρχουν άλλες αζωτούχες ενώσεις διαθέσιμες ή σε επαρκείς ποσότητες (Benemann 1979).

Πολλά μικροάλγη μπορούν να προσλάβουν N σε μεγαλύτερες ποσότητες από τις ανάγκες τους, το οποίο μπορούν να χρησιμοποιήσουν σε περιπτώσεις έλλειψης N. Στην επεξεργασία αποβλήτων η αφομοίωση του N μπορεί να βελτιστοποιηθεί μεγιστοποιώντας το ρυθμό ανάπτυξης των αλγών. Ωστόσο, εκτός από την αφομοίωση του αζώτου, η αμμωνία μπορεί επίσης να εξατμίζεται (air stripping), ως αποτέλεσμα των αυξημένων τιμών pH που απαιτώνται συχνά σε καλλιέργειες μικροαλγών (Nunez et al. 2001).

### B.3.3.2 Απομάκρυνση φωσφόρου σε καλλιέργειες μικροαλγών

Τα μικροάλγη, όπως και όλοι οι οργανισμοί, χρειάζονται φώσφορο για να αναπτυχθούν. Ο φώσφορος (P) χρησιμοποιείται στα κύτταρα κυρίως για την παραγωγή των φωσφολιπιδίων, τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) και νουκλεϊκών οξέων. Τα μικροάλγη αφομοιώνουν τον P κυρίως με τη μορφή ανόργανων ορθοφωσφορικών ενώσεων και η διεργασία πρόσληψης είναι ενεργοβόρα, δηλαδή απαιτεί ενέργεια (Becker 1994). Τα μικροάλγη έχουν τη δυνατότητα να αφομοιώνουν

P σε περίσσεια (luxury uptake), που είναι αποθηκευμένος εντός των κυττάρων υπό τη μορφή πολυφωσφορικών ενώσεων. Τα αποθέματα αυτά μπορεί να είναι επαρκή για την παρατεταμένη ανάπτυξη ελλείψει διαθέσιμων μορφών φωσφόρου (Fogg 1975, Oliver & Ganf 2000).

Κατά μέσο όρο, ένα κύτταρο μικροαλγών περιέχει 13 mg P ανά γραμμάριο ξηρού βάρους (Oswald 1988). Όταν τα μικροάλγη χρησιμοποιούνται στα υγρά απόβλητα, τα οποία έχουν συνήθως μια συγκέντρωση μεταξύ 10 και 20 mg P /l, πιθανότατα αφομοιώνουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες P από αυτές που απαιτούνται για την ανάπτυξή τους. Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η αφομοίωση P, είναι σημαντικό να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες ανάπτυξης για τα μικροάλγη, δεδομένου ότι η αφομοίωση του P εξαρτάται γενικά από την αφομοίωση του άνθρακα και ως εκ τούτου την ανάπτυξη. Από τη στιγμή που μικροάλγη που παρουσιάζουν έλλειψη σε θρεπτικά συστατικά καταλαμβάνουν P πολύ γρηγορότερα από ό, τι τα μικροάλγη με περίσσεια θρεπτικών, υπάρχει επίσης η δυνατότητα χρησιμοποίησης μιας στρατηγικής, όπου 'πεινασμένα' μικροάλγη προστίθενται στα συστήματα επεξεργασίας για ταχεία αφομοίωση των θρεπτικών.

#### B.3.3.3 Πηγές άνθρακα και ενέργειας στα μικροάλγη

Οι πηγές άνθρακα και ενέργειας για τα μικροάλγη πολλές φορές διαφέρουν και συνοψίζονται στον πίνακα B.1 (Chojnacka Katarzyna 2004). Τα μικροάλγη έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν το μεταβολικό τους μηχανισμό ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Ο μεταβολισμός των μικροαλγών μπορεί να είναι αυτοτροφικός, ετεροτροφικός, μικτοτροφικός ή φωτοετεροτροφικός. Για παράδειγμα κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν:

1. Φωτοαυτοτροφικά χρησιμοποιώντας το φως ως μοναδική πηγή ενέργειας, που μετατρέπεται σε χημική ενέργεια με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης.
2. Χημειοετεροτροφικά όπου πηγή άνθρακα και ενέργειας είναι μόνο οργανικές ενώσεις. Στην περίπτωση αυτή οι απαιτήσεις για φως εξαλείφονται. Οι κυριότερες πηγές άνθρακα που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση αυτή είναι η γλυκόζη, η πεπτόνη και το οξικό οξύ.
3. Μικτοτροφικά όπου η κύρια πηγή ενέργειας προέρχεται από τη φωτοσύνθεση αλλά μπορούν να χρησιμοποιούν και οργανικές ενώσεις. Σε αυτή τη κατηγορία βρίσκονται και οι αμφιτροφικοί μικροοργανισμοί όπου συμπεριφέρονται

φωτοαυτοτροφικά δηλαδή φωτοσυνθέτουν όταν υπάρχει διαθέσιμο φως, ή συμπεριφέρονται ετεροτροφικά ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των οργανικών ουσιών που διαθέσιμες. Σύμφωνα με άλλον ορισμό μικτότροφος είναι ένας οργανισμός που μπορεί να αφομοιώνει οργανικές ενώσεις ως πηγές άνθρακα, ενώ ταυτόχρονα να χρησιμοποιεί ανόργανες ενώσεις, ως δότες ηλεκτρονίων. Σε μια μικτότροφη καλλιέργεια ταυτόχρονη πρόσληψη οργανικών ενώσεων και CO<sub>2</sub> λαμβάνει χώρα για τη σύνθεση κυττάρων και εν συνεχεία CO<sub>2</sub> απελευθερώνεται μέσω της διαδικασίας της αναπνοής, που γρήγορα δεσμεύεται και επαναχρησιμοποιείται κάτω από κατάλληλες συνθήκες έντασης φωτός. Επομένως τα μικτότροφα κύτταρα αποκτούν την απαιτούμενη ενέργεια καταβολίζοντας οργανικές ενώσεις, μέσω της αναπνοής και μετατρέποντας τη φωτεινή ενέργεια σε χημική μέσω της φωτοσύνθεσης (Hata 2000).

4. Φωτοετεροτροφικά (Φωτο-οργανοτροφικά) όπου το φως είναι αναγκαίο για την αφομοίωση των οργανικών ουσιών ως πηγή άνθρακα. Η διαφορά στο μεταβολισμό μεταξύ των φωτοετεροτροφικών και των μικτοτροφικών μικροφυκών είναι λεπτή. Το βασικό σημείο διαφοροποίησης είναι κυρίως η πηγή ενέργειας που χρησιμοποιούν για την παραγωγή των μεταβολικών τους προϊόντων.

**Πίνακας Β.1: Πηγές ενέργειας και άνθρακα σε διαφορετικούς μεταβολισμούς των μικροαλγών.**

Όνομα	Πηγή ενέργειας	Πηγή άνθρακα	Παράδειγμα
Φωτοαυτότροφα	φως	ανόργανη	Κυανοβακτήρια
(Χημειο)ετερότροφα	οργανική	οργανική	E coli
Φωτοετερότροφα	φως	οργανική	Μωβ και πράσινα φωτοσυνθετικά βακτήρια
Μεικτότροφα	φως και οργανική	ανόργανη και οργανική	Chlorella

#### Β.3.3.4 Εφαρμογές μικροαλγών –βακτηρίων στην επεξεργασία αποβλήτων

Οι συμβατικές διεργασίες επεξεργασίας αποβλήτων (διεργασία ενεργού ιλύος) παράγουν τεράστιες ποσότητες λάσπης, η διαχείριση και επεξεργασία της οποίας αποτελεί το μεγαλύτερο οικονομικό πρόβλημα στις εγκαταστάσεις αυτές. Επίσης οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις καθιστούν πολλές από αυτές τις διεργασίες μη



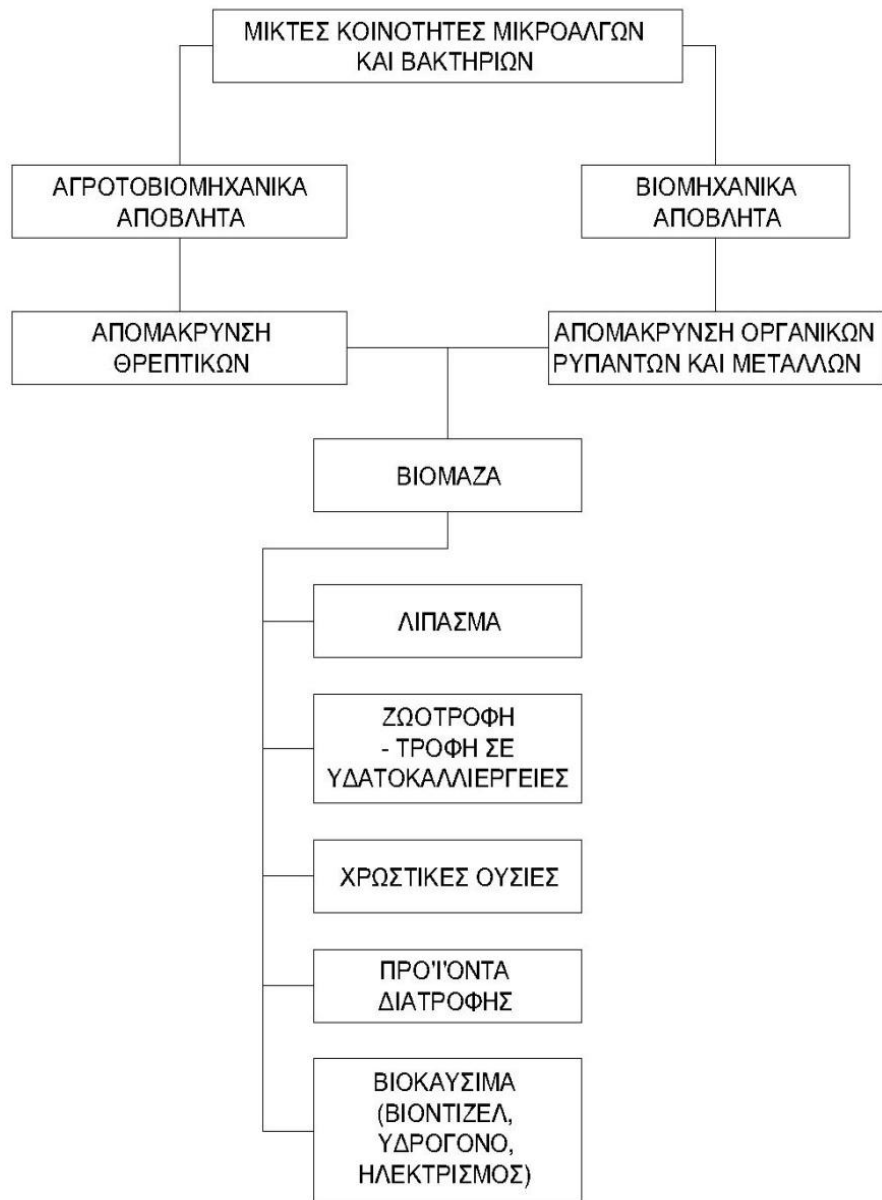
βιώσιμες σε χώρες με χαμηλή κατά κεφαλήν κατανάλωση ενέργειας. Από την άλλη, η βιοεξυγίανση με χρήση μικροαλγών –βακτηρίων λαμβάνει ολοένα και περισσότερη προσοχή τα τελευταία χρόνια, ιδιαίτερα στις υποτροπικές και τροπικές περιοχές, ως εναλλακτική μέθοδος επεξεργασίας αστικών και βιομηχανικών λυμάτων. Η χρήση των μικροαλγών στην επεξεργασία αποβλήτων έχει αποδειχτεί μια ιδιαίτερα οικονομική μέθοδος στην απομάκρυνση BOD, P, N και παθογόνων μικροοργανισμών σε σύγκριση με τη διεργασία ενεργού ιλύος. Παρουσιάζει χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις και μειωμένη παραγωγή λάσπης. Επιπλέον, η βιομάζα μικροαλγών που παράγεται κατά την επεξεργασία των λυμάτων θεωρείται ως ένας βιώσιμος βιολογικός πόρος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή βιοκαυσίμων, γεωργικών λιπασμάτων ή ζωοτροφών.

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την ανάλυση της ικανότητας μιας μικροβιακής κοινότητας που αποτελείται από μικροάλγη-βακτήρια για απομάκρυνση θρεπτικών από τα απόβλητα. Η συνεργιστική δράση της *Chlorella sp.* και των βακτηρίων της ενεργού ιλύος βελτίωσε την επεξεργασία των αποβλήτων σε αβαθείς λίμνες σταθεροποίησης, την απομάκρυνση της οργανικής ύλης, των θρεπτικών και των παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς και τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου, χωρίς την ανάγκη για παροχή αερισμού (Medina&Neis 2007). Οι Su et al. 2011 εμβολίασαν μια μικτή κοινότητα βακτηρίων - μικροαλγών για την επεξεργασία αστικών αποβλήτων σε εργαστηριακό φωτο-βιοαντιδραστήρα και παρατήρησαν μέσες απομακρύνσεις χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, ολικού αζώτου και φωσφορικών  $98.2 \pm 1.3\%$ ,  $88.3 \pm 1.6\%$  και  $64.8 \pm 1\%$  μέσα σε 8 ημέρες αντιστοίχως. Η συσσώρευση των θρεπτικών στη βιομάζα προσδιορίστηκε ως ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης N και P. Οι He et al. 2013 εξέτασαν την επίδραση της *Chlorella Vulgaris* σε συνεργασία με βακτήρια στην απομάκρυνση N, P και οργανικής ύλης από αστικό απόβλητο. Διαπιστώθηκε πως η *Chlorella* έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην απομάκρυνση N και P, ενώ τα βακτήρια απομάκρυναν κυρίως την οργανική ύλη από τα απόβλητα. Οι απομακρύνσεις που επιτεύχθηκαν ήταν 97% για το  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , 98% για το P και 26% για τον διαλυτό οργανικό άνθρακα. Οι Ruiz-Martinez et al. 2012 μελέτησαν την απομάκρυνση N και P από την έξοδο ενός αναερόβιου MBR σε εργαστηριακό φωτοβιοαντιδραστήρα χρησιμοποιώντας μικροάλγη μικτής καλλιέργειας και συμπέραναν 67.2 % και 97.8% απομάκρυνση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  και  $\text{PO}_4^{3-}\text{P}$  αντίστοιχα.

Επίσης πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας μικτές καλλιέργειες μικροαλγών-βακτηρίων στην επεξεργασία αποβλήτων που προέρχονται από χοιροστάσια. Οι Gonzalez Fernandez et al. 2011 μελέτησαν την ικανότητα απομάκρυνσης μιας τέτοιας καλλιέργειας σε αβαθείς λίμνες και διαπίστωσαν ικανότητα απομάκρυνσης N περίπου 26 mg N/ l.day με κυριότερους μηχανισμούς απομάκρυνσης την νιτροποίηση ακολουθούμενη από αφομοίωση στη βιομάζα και απονιτροποίηση. Επίσης οι Gonzalez et al. 2008 εμβολίασαν *Chlorella* και βακτήρια από ενεργό ιλύ σε σωληνοειδή φωτο-βιοαντιδραστήρα και συμπέραναν μεγάλες απομακρύνσεις στο N και τον P που έφταναν το 99% και 86% αντίστοιχα. Οι de Godos et al. 2009 ομοίως συμπέραναν απομάκρυνση 58.7% COD και 78% TN σε λίμνες ελυσσόμενου στύβου με χρήση μικτών καλλιεργειών βακτηρίων –μικροαλγών.

Στην επεξεργασία αποβλήτων από υδατοκαλλιέργειες έχει επίσης αναφερθεί η χρήση μικτών καλλιεργειών βακτηρίων- μικροαλγών κυρίως σε λίμνες ελυσσόμενου στύβου, οι οποίες έχουν ενσωματωθεί σε συστήματα RAS, ώστε να μειωθεί η περιεκτικότητα της εξόδου των συστημάτων αυτών σε N και P (Deviller et al.2004, Metaxa et al. 2006).

Συμπερασματικά η χρήση των μικτών κοινοτήτων μικροαλγών- βακτηρίων αποτελεί μια ελκυστική πρόταση στην επεξεργασία των αποβλήτων, που προσεγγίζει ολοένα και περισσότερο το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Οι μικτές καλλιέργειες μπορούν να επιτύχουν απομακρύνσεις που είναι δύσκολες ή πολλές φορές ακατόρθωτες για ένα είδος μόνο του. Επιπλέον οι μικτές κοινότητες παρέχουν ανθεκτικότητα στις μεταβολές του περιβάλλοντος, σταθερότητα στη μικροβιακή κοινότητα, δυνατότητα στα συνυπάρχοντα είδη να μοιράζονται προϊόντα του μεταβολισμού τους και αυξημένη αντίσταση στην είσοδο ξένων μικροοργανισμών (Subashchandrabose et al. 2011). Πολλές είναι οι έρευνες που συνδυάζουν την επεξεργασία των αποβλήτων με ταυτόχρονη αφαίρεση της παραγόμενης βιομάζας για την παραγωγή κυρίως βιοκαυσίμων αλλά και άλλων χρήσιμων προϊόντων (εικόνα B.5) (Maity et al.2014, Efremento et al. 2012, Guo et al. 2013, Mc Ginn et al. 2011).



**Εικόνα Β.30:** Χρήσεις βιομάζας που προέρχεται από τις μικτές κοινότητες μικροαλγών - βακτηρίων .

## **B.4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **B.4.1 Περιγραφή του συστήματος προσκολλημένης βιομάζας**

Ο αντιδραστήρας ‘Advantex’ περιγράφεται ως μια εξελισσόμενη μορφή ενός αντιδραστήρα σταθερής κλίνης (Packed Bed Reactor). Παραδοσιακά ένας τέτοιος αντιδραστήρας διαθέτει ως μέσο βιολογικής επεξεργασίας χώμα ή λεπτό χαλίκι, από το οποίο διέρχεται περιοδικά το προς επεξεργασία απόβλητο. Η μοντέρνα εκδοχή αυτής της τεχνολογίας περιλαμβάνει επανακυκλοφορία, συχνότερη δοσολογία αποβλήτου, ομοιόμορφη κατανομή και αντικατάσταση του κοκκώδους μέσου από ένα ύφασμα. Το ύφασμα αυτό αποτελείται από συνθετικές ίνες πολυπροπυλενίου και είναι ανθεκτικό στη βιοαποδόμηση. Τα πλεονεκτήματα του υφάσματος αυτού σε σχέση με τα υπόλοιπα κοκκώδη μέσα επεξεργασίας είναι:

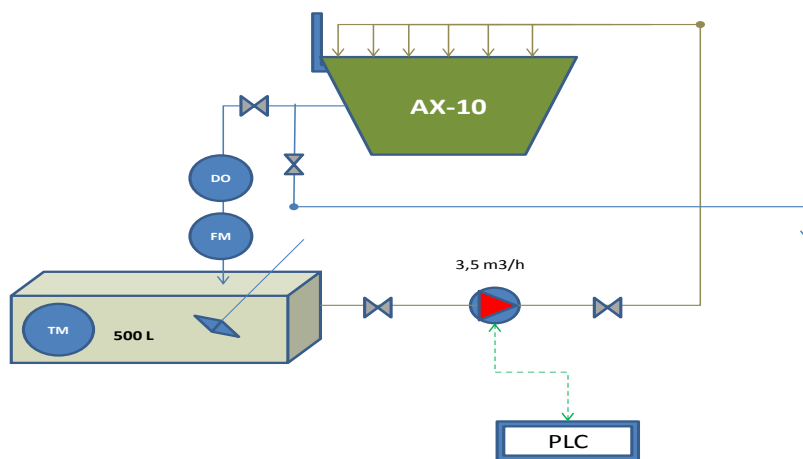
- **Μεγάλο πορώδες:** Το πορώδες του υφάσματος είναι πολύ μεγαλύτερο από των υπολοίπων μέσων και όσο μεγαλύτερο είναι το πορώδες ενός μέσου τόσο μεγαλύτερη είναι η ικανότητά του για συσσώρευση στερεών και ανάπτυξη της βιομάζας.
- **Μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας ανά μονάδα όγκου ( $m^2/m^3$ ):** Η μεγάλη επιφάνεια παρέχει μεγαλύτερη ικανότητα επαφής του οξυγόνου και του αποβλήτου με τη βιομάζα.
- **Μεγάλη δυνατότητα συγκράτησης νερού:** Η μεγαλύτερη συγκράτηση νερού ρυθμίζει τον χρόνο κατακράτησης του αποβλήτου στο φίλτρο και έχει επομένως επίπτωση στην καλύτερη ποιότητα της εξόδου.

### **Η πιλοτική μονάδα: Advantex AX-10**

Το πιλοτικό σύστημα του οποίου το διάγραμμα ροής παρουσιάζεται στην εικόνα B.6 αποτελείται από:

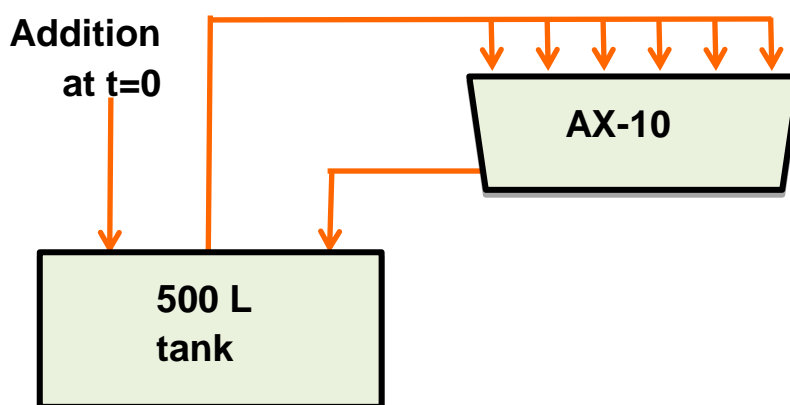
- Τον αντιδραστήρα (Bed reactor) με το συνθετικό ύφασμα πολυπροπυλενίου ως μέσο ανάπτυξης των μικροοργανισμών.
- Μια δεξαμενή τροφοδοσίας – επανακυκλοφορίας συνολικού όγκου 500 L.
- Μια αντλία τροφοδοσίας.
- Έναν κεντρικό πίνακα ελέγχου.
- Μια λάμπα φθορισμού, η οποία προστέθηκε κατόπιν στο σύστημα για την ανάπτυξη των αυτότροφων μικροοργανισμών.

- Μια παγίδα ενεργού άνθρακα δέσμευσης οσμών ,από την οποία εισέρχεται ο αέρας στο σύστημα με εφελκυσμό.
- Ένα φίλτρο πολυπροπυλενίου μεγέθους πόρων 10 μm τοποθετημένο πριν την αντλία τροφοδοσίας, ώστε να την προστατεύει από τη βιομάζα που αφαιρείται από το βιοφίλμ.



**Εικόνα B.31: Διάγραμμα ροής του συστήματος, ADVANTECH AX-10.**

Το απόβλητο τροφοδοτείται στην δεξαμενή τροφοδοσίας – επανακυκλοφορίας και ψεκάζεται στο ύφασμα μέσω αντλίας η οποία λειτουργεί διακοπτόμενα για κάποιες ώρες την ημέρα και ο χρόνος λειτουργίας της ρυθμίζεται από τον πίνακα ελέγχου. Κάθε φορά που το φίλτρο ψεκάζεται, το απόβλητο διεισδύει μέσα από τα ‘φύλα’ του υφάσματος (και μεταξύ αυτών), όπου έρχεται σε επαφή με την αναπτυχθείσα βιομάζα. Εφόσον το επεξεργασμένο απόβλητο περάσει το φίλτρο επιστρέφει και πάλι στην δεξαμενή τροφοδοσίας - επανακυκλοφορίας. Σχηματικά η λειτουργία του συστήματος παρουσιάζεται στην εικόνα B.7.



Εικόνα B.32: Τρόπος λειτουργίας του συστήματος.

#### B.4.2 Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά στην δεξαμενή τροφοδοσίας του συστήματος προστέθηκε θαλασσινό νερό και καθημερινά πραγματοποιούνταν προσθήκη συνθετικού αποβλήτου, το οποίο προσομοίωνε την έξοδο των υδατοκαλλιεργειών, ώστε να αναπτυχθεί η απαιτούμενη μικροβιακή κοινότητα. Μετά από μια περίοδο 3 μηνών περίπου ένα λεπτό στρώμα βιοφίλμ (καφετί χρώματος) αναπτύχθηκε πάνω στο συνθετικό μέσο και κατόπιν συμπληρώθηκε με μικροάλγη του γένους *Picochlorum*. Το *Picochlorum* ανήκει στην οικογένεια των *Trebouxiophyceae* (φύλο *Chlorophyta*) και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατότητας, ενώ αμέσως μετά τον εμβολιασμό του και σε ένα σύντομο διάστημα περίπου 20 ημερών ένα πράσινο στρώμα παρατηρήθηκε στο μέσο του αντιδραστήρα και κυρίως κάτω από την λάμπα.

Το συνθετικό απόβλητο περιείχε: ζάχαρη (του εμπορίου) ως τη μοναδική πηγή άνθρακα, θειικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) και νιτρικό νάτριο ( $\text{NaNO}_3$ ) ως ανόργανες πηγές αζώτου και διβασικό φωσφορικό κάλιο ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) και δισόξινο φωσφορικό κάλιο ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ως ανόργανες πηγές φωσφόρου. Επίσης ιχνοστοιχεία μετάλλων προστίθεντο στο σύστημα σε μηνιαία βάση. Η σύσταση του συνθετικού αποβλήτου και οι τελικές συγκεντρώσεις των θρεπτικών φαίνονται στον πίνακα 2. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί πως δεν υπήρξε εξωτερική προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα στο σύστημα. Η περίοδος φωτισμού ήταν 16 ώρες το φως ανοιχτό και 8 ώρες κλειστό. Το pH διατηρήθηκε μεταξύ 6.5-7.5, με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου

(NaOH). Το θαλασσινό νερό στην δεξαμενή τροφοδοσίας ανανεωνόταν κάθε 15-20 ημέρες.

Η λειτουργία του αντιδραστήρα εξετάστηκε χρησιμοποιώντας 3 τύπους συνθετικού αποβλήτου που διέφεραν μεταξύ τους στην οργανική τους φόρτιση: ένα υψηλής (COD=600 mg/l), ένα μεσαίας (COD=200 mg/l) και ένα χαμηλής (COD=100 mg/l) οργανικής φόρτισης. Κάθε μία από τις παραπάνω οργανικές φορτίσεις εξετάστηκε με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ , μια χαμηλή (10 mg/l) και μία υψηλή συκέντρωση (100mg/l), ενώ η συκέντρωση των  $\text{PO}_4^{3-}$  διατηρήθηκε σταθερή στα 5 mg/l. Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα δείγματα λαμβάνονταν από τον αντιδραστήρα κάθε 1 ώρα και φυλάσσονταν στο ψυγείο μέχρι την ανάλυσή τους μετά από διήθησή τους από φίλτρο 0,45  $\mu\text{m}$ . Επίσης σε μηνιαία βάση λαμβάνονταν δείγματα από το βιοφίλμ του αντιδραστήρα με σκοπό τον προσδιορισμό της σύστασης, αλλά και της σταθερότητας της μικροβιακής κοινότητας.

**Πίνακας Β.2: Σύσταση συνθετικού αποβλήτου και ιχνοστοιχείων.**

<b>Synthetic wastewater (mg/l)</b>	<b>Trace metals (mg/l)</b>
COD :100 /200 /600	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :75
$\text{NH}_3\text{-N}$ : 10/100	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ :25
$\text{NO}_3\text{-N}$ :10	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 4,98
$\text{PO}_4$ :5	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : 0,181
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ :0,222
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ :0,079
	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : 0,0494

### **B.4.3 Αναλυτικές μέθοδοι**

#### **B.4.3.1 Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (Chemical Oxygen Demand-COD)**

Οι μετρήσεις έγιναν σύμφωνα με τους Vyrives & Stuckey 2009. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η παρακάτω:

1. Προετοιμασία διαλύματος χώνευσης: Σε 500 ml διαλύματος προστίθενται: 3 g διχρωμικού καλίου ( $K_2Cr_2O_7$ ), τα οποία προηγουμένως έχουν ξηρανθεί για 2h στους  $103^{\circ}C$ , 167 ml συμπυκνωμένου θεικού οξέος ( $H_2SO_4$ ) και 33.3 g θεικού υδραργύρου ( $Hg_2SO_4$ ). Το διάλυμα αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου και αραιώνεται έως τα 1000 ml.
2. Δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης με όξινο φθαλικό κάλιο (Potassium hydrogen phthalate - KHP). 425 mg KHP διαλύονται σε θαλασσινό νερό σε τελικό όγκο 1000 ml αφού έχουν ξηρανθεί στους  $110^{\circ}C$ , ώστε το διάλυμα που προκύπτει να έχει θεωρητικό COD ίσο με 500 mg/l. Από το διάλυμα αυτό ετοιμάζονται οι ακόλουθες συγκεντρώσεις: 20, 50, 90, 140, 190 και 230 mg/l, για την δημιουργία της καμπύλης βαθμονόμησης.
3. Σε 3 ml δείγματος προστίθενται 1,1 g θεικού υδραργύρου ( $20:1 Hg_2SO_4:Cl^{-1}$ ) και το μείγμα αναδεύεται με σκοπό την καταβύθιση των χλωριόντων.
4. Μετά την καταβύθιση του χλωριούχου υδραργύρου ( $HgCl_2$ ) σε γιάλινα φιαλίδια προστίθενται: 2 ml από το υπερκείμενο δείγμα, 1,2 ml διαλύματος χώνευσης και 2,8 ml αντιδραστήριο θεικού οξέος που περιέχει θεικό άργυρο ( $6,6 g Ag_2SO_4/1000 ml H_2SO_4$ ). Τα φιαλίδια αναδεύονται και τοποθετούνται σε ειδικό φούρνο στους  $150^{\circ}C$  για 2h.

#### **B.4.3.2 Προσδιορισμός αμμωνιακού αζώτου**

Η μέτρηση του  $NH_4^{+}-N$  πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Nessler της Hach με εύρος συγκεντρώσεων από 0.02- 2.50 mg/l  $NH_4^{+}-N$ . Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Τοποθετείται σε ένα διαβαθμισμένο κύλινδρο των 25 ml το δείγμα το οποίο έχει διηθηθεί από μεμβράνη  $0.45 \mu m$  και έχει αραιωθεί κατάλληλα με θαλασσινό νερό.
2. Προστίθενται 27 σταγόνες mineral stabilizer και το μείγμα ανακινείται.
3. Προστίθενται 3 σταγόνες Polyvinyl Alcohol και το μείγμα ανακινείται.



4. Προστίθεται 1 ml αντιδραστήριο Nessler.
5. Μετά από 1 λεπτό αντίδρασης η συγκέντρωση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  μετράται στο φασματοφωτόμετρο της Hach DR/2800.

#### B.4.3.3 Προσδιορισμός νιτρικού και ολικού αζώτου

Το νιτρικό  $\text{NO}_3\text{-N}$  και ολικό άζωτο TN προσδιορίστηκαν με έτοιμα αντιδραστήρια της Hach, στα οποία προστίθετο κάθε φορά το προς ανάλυση δείγμα στην κατάλληλη αραίωση με απιονισμένο νερό. Τα συγκεκριμένα αντιδραστήρια έχουν όριο ανίχνευσης 0.23-13.50 mg/l  $\text{NO}_3\text{-N}$  και 5-40 mg/l TN αντίστοιχα.

#### B.4.3.4 Προσδιορισμός φωσφόρου φωσφορικών ιόντων

Ο προσδιορισμός των φωσφορικών ιόντων ( $\text{P-PO}_4$ ) έγινε με τη μέθοδο PhosVer 3 (8048) της Hach με εύρος συγκεντρώσεων από 0.02 έως 2.50 mg/l  $\text{PO}_4^{3-}$  με μια διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στη σελίδα 47 στο α μέρος.

#### B.4.3.5 Προσδιορισμός πυκνοτήτων βακτηρίων και μικροαλγών στο βιοφίλμ

Για τον προσδιορισμό των πληθυσμών των μικροαλγών *Picochlorum sp.* και *Stichococcus sp.* ομογενοποιημένα δείγματα βιοφίλμ βάφτηκαν με τη χρωστική Nile Red (τελικής συγκέντρωσης 1  $\mu\text{g/ml}$ ) και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού (μεγέθυνση 400X) σε έντονη κυανή ακτινοβολία. Τα συγκεκριμένα γένη προσδιορίστηκαν με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά και οι αριθμοί τους μετρήθηκαν σε 100 οπτικά πεδία.

Ο αριθμός των συνολικών κυττάρων των μικροαλγών και των βακτηρίων ανά τετραγωνικό εκατοστό βιοφίλμ εκτιμήθηκε με βάση τον αλγόριθμο του πιο πιθανού αριθμού (Most Probable Number- MPN) σύμφωνα με τους Pepper and Gerba 2004 και με βάση το λογισμικό πρόγραμμα υπολογισμού MPN του οργανισμού περιβαλλοντικής προστασίας των ΗΠΑ (EPA).

#### B.4.3.6 Εκχύλιση γενετικού υλικού από το βιοφίλμ

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού από το βιοφίλμ πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Moore et al. 2004. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

1. Αφαίρεση μικρής ποσότητας βιοφίλμ από το ύφασμα του αντιδραστήρα με χρήση αποστειρωμένης σπάτουλας και μετακίνηση της ποσότητας αυτής σε 800  $\mu\text{l}$  διαλύματος PBS (Phosphate Buffer Saline).

2. Φυγοκέντρωση του μείγματος στα 15000 g για 15' και απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού.
3. Προσθήκη 562  $\mu$ l TE Buffer – Ανακίνηση
4. Προσθήκη 6  $\mu$ l lysozyme – Ανακίνηση
5. Επώαση στους 37° C για 45'
6. 18  $\mu$ l Proteinase K και 30  $\mu$ l SDS – Ανακίνηση – Επώαση στους 37° C μέχρι το μείγμα να γίνει διαυγές και παχύρρευστο (περίπου 1 ώρα)
7. 100  $\mu$ l NaCl (5 M) – Ανακίνηση – Επώαση στους 65° C για 2'
8. 80  $\mu$ l CTAB/NaCl (το διάλυμα πρέπει να έχει προθερμανθεί) – Ανακίνηση – Επώαση στους 65° C για 10'
9. Προσθήκη 800  $\mu$ l Chloroform/Isoamyl – Φυγοκέντρωση στα 10.000g για 5'
10. Μετακίνηση της πάνω φάσης του διαλύματος σε νέο Eppendorf σωλήνα και προσθήκη 800  $\mu$ l Phenol-Chloroform-Isoamyl – Φυγοκέντρωση στα 15.000g για 5'
11. Μετακίνηση της επάνω φάσης του υδατικού διαλύματος σε νέο Eppendorf και προσθήκη 800  $\mu$ l Chloroform/Isoamyl – Φυγοκέντρωση στα 10.000g για 5'
12. Μετακίνηση της επάνω φάσης σε νέο σωλήνα και προσθήκη 560  $\mu$ l Isopropanol – Ανακίνηση
13. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15'
14. Φυγοκέντρωση στα 15.000g για 15'
15. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού προσεκτικά – Το απομονωμένο DNA έχει δημιουργήσει στερεή πελλέτα
16. Προσθήκη 500  $\mu$ l αιθανόλης – Ανακίνηση
17. Φυγοκέντρωση στα 15.000g για 15'
18. Αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού προσεκτικά
19. Ξήρανση σε χωνευτήρα (dry bath)
20. Προσθήκη 50  $\mu$ l TE buffer – Επώαση στους 37° C για 15'

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά, μετά από αραίωση 1:70 σε υπερκάθαρο νερό. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση υπολογίστηκε βάσει της τιμής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm, ενώ η καθαρότητα βάσει του λόγου των τιμών απορρόφησης στα 260 nm προς τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης στα 280 nm.

#### B.4.3.7 Πολλαπλασιασμός τμήματος του γενετικού τόπου 16SRNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μετά από την επιβεβαίωση της ύπαρξης καλής ποιότητας και συγκέντρωσης γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR). Η PCR αποτελεί μία απλή, ταχεία και εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδο πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού, η οποία πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου πολυμεράση και μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων τριών σταδίων. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική θερμοκρασία, με τη βοήθεια του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Το πρώτο στάδιο που λαμβάνει χώρα κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA (denaturation). Σε αυτό το στάδιο το γενετικό υλικό υποβάλλεται σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως 94° C), προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου γενετικού υλικού. Ακολουθεί το δεύτερο στάδιο, η υβριδοποίηση των εκκινητών (primer annealing), στο οποίο επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του γενετικού υλικού σε κάθε αλυσίδα (η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 50 και 60° C). Τέλος, κατά το τρίτο στάδιο, την επιμήκυνση (extension), η θερμοκρασία της διεργασίας αυξάνεται στους 72° C και πραγματοποιείται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων με τη βοήθεια της πολυμεράσης, η οποία προσθέτει νουκλεοτίδια (dNTPs) στο 3' άκρο των εκκινητών. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται πάντα με την DNA πολυμεράση με κατεύθυνση από το άκρο 5' προς 3'.

#### **Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε:**

Οι βακτηριακοί εκκινητές που επιλέχθηκαν είναι οι 341f GC και 534r με αλληλουχία που παρουσιάζεται στον πίνακα Β.3. Η αντίδραση έγινε σύμφωνα με τους Gláucia da P. Lima 2007, αποτελούταν από 35 κύκλους και οι συνθήκες της φαίνονται στον πίνακα 4. Από τους 35 αυτούς κύκλους στους πρώτους 20 η θερμοκρασία υβριδοποίησης ρυθμίστηκε, ώστε να μειώνεται 0,5° C ανά κύκλο (από τους 65° C στους 55° C), ενώ στους υπόλοιπους 15 η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 55° C. Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 50μl και περιείχε 18,8 pmol από τους αντίστοιχους εκκινητές, 10-20ng από DNA μήτρα, 1 × Green GoTaq Flexi buffer (Promega), 100 nmole MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (Promega) και 15 nmole dNTPs.

**Πίνακας Β.3: Αλληλουχία βακτηριακών εκκινητών που επιλέγησαν στην PCR.**

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
341f GC	5'-cgcccgccgcgcgcggcgggcgggcgggggcacggggggcctacgggaggcagcag-3'
534 r	5'-attaccgcggtgctgg-3'

**Πίνακας Β.4: Συνθήκες PCR για τα βακτήρια σύμφωνα με τους Glaucia da P.Lima 2007.**

Βήμα	Τ(°C)	Χρόνος
1.Αποδιάταξη 1	94	5 min
2.Αποδιάταξη 2	94	1 min
3.Υβριδοποίηση εκκινητών	65-55	1 min
4. Επιμήκυνση	72	2 min
5.Τελική επιμήκυνση	72	5 min

**Β.4.3.8 Ανάλυση μέσω ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδη σε διαβάθμιση αποδιατακτικών μέσων (DGGE)**

Η ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδη σε διαβάθμιση αποδιατακτικών (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ή DGGE), είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική στη Μοριακή Βιολογία και ειδικότερα στη Μικροβιακή Οικολογία, χρησιμοποιούμενη κατά κόρον για τον χαρακτηρισμό των μικροβιακών κοινοτήτων και τη δυναμική αυτών (Muyzer et al., 1993). Η ποσότητα όμως της γενετικής πληροφορίας που μπορεί να ανακτηθεί είναι περιορισμένη, αφού το μήκος των προϊόντων που ηλεκτροφορούνται δεν ξεπερνά συνήθως τα 500-600 ζεύγη βάσεων.

Η ανάλυση μέσω DGGE χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό δίκλωνων μορίων DNA, τα οποία μπορεί να είναι πανομοιότυπα σε μήκος αλλά διαφέρουν σε αλληλουχία. Στην πράξη, αυτό αναφέρεται στο διαχωρισμό προϊόντων PCR, μέσω ηλεκτροφόρησης σε gel πολυακρυλαμίδης στο οποίο υπάρχει κατά μήκος διαβάθμιση συγκέντρωσης δυο αποδιατακτικών μέσων: της ουρίας και του φορμαμίδιου. Ο διαχωρισμός στο DGGE βασίζεται στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μερικώς

αποδιατεταγμένου μορίου DNA σε ένα gel πολυακρυλαμίδης, η οποία είναι ελαττωμένη σε σχέση με αυτήν ενός μορίου που βρίσκεται σε εντελώς ελικοειδή μορφή. Η αποδιάταξη των μορίων συντελείται σε διακριτά τμήματα, τα οποία αποκαλούνται «αποδιατακτικά τμήματα» (melting domains).

Τα τμήματα αυτά αποτελούνται από αλληλουχίες ζευγών βάσεων με πανομοιότυπες ενέργειες αποδιάταξης. Όταν κατά την ηλεκτροφόρηση το melting domain με τη μικρότερη ενέργεια αποδιάταξης βρεθεί σε ένα σημείο στο gel όπου η ενέργεια αυτή επιτευχθεί μέσω της δράσης των αποδιατακτικών παραγόντων, συντελείται μετάβαση από την ελικοειδή μορφή στη μερικώς αποδιατεταγμένη. Το αποτέλεσμα της μετάβασης αυτής είναι πρακτικά το μόριο να σταματήσει στο σημείο αυτό. Όταν οι αλληλουχίες δυο μορίων DNA διαφέρουν σε τέτοιου είδους τμήματα, διαφέρουν και οι ενέργειες αποδιάταξης των τμημάτων αυτών. Επομένως, μόρια DNA τα οποία διαφέρουν σε αλληλουχία θα σταματήσουν σε διαφορετικό σημείο κατά μήκος του διαβαθμισμένου σε αποδιατακτικά μέσα gel, με αποτέλεσμα να μπορούν να διαχωριστούν επιτυχώς από το DGGE. Για καλύτερο διαχωρισμό των μορίων μέσα σε ένα gel, εκκινητές με GC-πλούσιες 5' περιοχές μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τον πολλαπλασιασμό μέσω PCR, έτσι ώστε να γίνει ομαλότερη η αποδιατακτική συμπεριφορά των μορίων.

#### **Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε:**

Η DGGE πραγματοποιήθηκε με σκοπό την εξέταση της σταθερότητας της βακτηριακής κοινότητας χρησιμοποιώντας τη συσκευή ηλεκτροφόρησης Vertical Electrophoresis System VS20-DGGE της εταιρίας Durviz. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

- πυκνό διάλυμα 8% ακρυλαμίδης 37.5:1, ουρίας/φορμαμίδιου (55% ως προς πρότυπο διάλυμα 7M ουρίας και 40%v/v φορμαμίδιου)
- αραιό διάλυμα 8% ακρυλαμίδης 37.5:1, ουρίας/φορμαμίδιου (35% ως προς πρότυπο διάλυμα 7M ουρίας και 40%v/v φορμαμίδιου)
- Ammonium peroxisulfide (APS) 10% w/v
- TEMED (N,N,N',N' -tetramethylenediamine) 1% w/v

Τα σχηματιζόμενα gel παρατηρούνταν σε σύστημα απεικόνισης με υπεριώδη ακτινοβολία. Η ανάλυση ομαδοποίησης, η οποία βασίστηκε στα DGGE προφίλ

πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα v6. Η μήτρα ομοιότητας σχηματίστηκε χρησιμοποιώντας το Bray- Curtis (BC) δείκτη με βάση την παρουσία ή απουσία ζωνών.

#### B.4.3.9 Σύσταση της μικροβιακής κοινότητας

Η σύσταση της μικροβιακής κοινότητας προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του Pyrosequencing από το MrDNA εργαστήριο στο Τέξας ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com), Shallowater, Texas, USA). Το Pyrosequencing είναι μια νέα τεχνική που δίνει πολύ μεγάλο αριθμό αλληλουχιών σε πολύ μικρό χρόνο. Οι ευκαρυωτικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να πολλαπλασιάσουν κομμάτι 700 περίπου ζευγών βάσεων του 18S rRNA είναι οι Euk528F (5'-CCGCGGTAATTCCAGCTC-3') και EukR18R (5'-CGTTATCGGAATTAACCAGAC-3'). Οι εκκινητές αυτοί επιλέχθηκαν, γιατί πολλαπλασιάζουν τους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (>93%), αλλά όχι τις οικογένειες του *Stichococcus* και του *Picochlorum*. Οι αλληλουχίες των παραπάνω οικογενειών αποκλείστηκαν με αυτό τον τρόπο, γιατί σε αντίθετη περίπτωση θα κατέκλυζαν την γονιδιωματική βιβλιοθήκη, αφού θα αποτελούσαν το μεγαλύτερο ποσοστό αλληλουχιών και θα επικάλυπταν τις υπόλοιπες. Τα μικροάλγη αυτά απομονώθηκαν ξεχωριστά και οι πυκνότητες των κυττάρων τους προσδιορίστηκαν μικροσκοπικά. Για τον πολλαπλασιασμό του βακτηριακού τύπου 16S, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') και 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Οι εκκινητές αυτοί επιλέχθηκαν γιατί πολλαπλασιάζουν το ίδιο καλά το βακτηριακό τύπο 16S για όλες τις ταξινομικές ομάδες βακτηρίων και αρχαίων (Kuczynski et al. 2012).

Μια απλή PCR που αποτελούταν από 30 κύκλους πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) υπό τις συνθήκες που φαίνονται στον πίνακα B.5. Μετά την PCR όλα τα προϊόντα καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας σφαιρίδια Agencourt Ampure (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA) και αλληλουχήθηκαν χρησιμοποιώντας το Roche 454 FLX titanium όργανο σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η in Silico ανάλυση και ο καθαρισμός των αλληλουχιών έγινε στο QIIME v1.8. Τα βακτηριακά <<είδη>> καθορίστηκαν ως ομάδες όμοιων αλληλουχιών με ποσοστό 97% και άνω και η φυλογενετική τους ταξινόμηση έγινε με τον 'αφελή' αλγόριθμο της βάσης δεδομένων RDP (Caporaso et al. 2010). Η γραφική απεικόνιση των rarefaction

καμπυλών έγινε στο Past με βάση τον παρατηρούμενο αριθμό ειδών αυξανόμενου του αριθμού αλληλουχιών ανά 100.

**Πίνακας Β.5: Συνθήκες PCR που πραγματοποιήθηκε για τη σύσταση της μικροβιακής κοινότητας.**

Βήμα	Τ(°C)	Χρόνος
1.Αποδιάταξη 1	94	3 λεπτά
2.Αποδιάταξη 2	94	30 δευτερόλεπτα
3.Υβριδοποίηση εκκινητών	53	40 δευτερόλεπτα
4. Επιμήκυνση	72	1 λεπτό
5.Τελική επιμήκυνση	72	5 λεπτά

#### B.4.3.10 Ποσοτικοποίηση του αριθμού γονιδίων - Real-time PCR

Η Real-time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Συχνά αναφέρεται και ως quantitative Real-time PCR (q-PCR). Η αρχή λειτουργίας της είναι παρόμοια με αυτή της συμβατικής PCR, με τη διαφορά ότι η ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος μετριέται σε κάθε κύκλο, ενώ στη συμβατική PCR η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας-στόχου λαμβάνει χώρα μετά την ολοκλήρωση του τελευταίου κύκλου.

Η ποσοτικοποίηση του αριθμού γονιδίων πραγματοποιήθηκε με την Real-Time PCR (Applied Biosystems) σε αντιδράσεις τελικού όγκου 20 µl χρησιμοποιώντας το KAPA SYBR Fast Master Mix (2×) qRT-PCR Kit (KAPA Biosystems) και 1 µl από αραιωμένο 1/20 DNA. Ο πολλαπλασιασμός των οξειδωτών αμμωνίας για τα αρχαία (AOA- ammonia oxidizing archaeal) και τα βακτήρια (AOB- ammonia Oxidizing Bacteria) (γονίδιο amoA) διεξήχθη χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών amoAF/amoAR και amoA-1F/amoA-2R αντίστοιχα συγκέντρωσης 200 nM. Οι συνθήκες της PCR για τον πολλαπλασιασμό των παραπάνω γονιδίων ήταν: 3 λεπτά στους 95<sup>0</sup>C και ακολουθούσαν 35 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων στους 95<sup>0</sup>C και 35 δευτερολέπτων στους 55<sup>0</sup>C (57.5 °C για AOB) και τέλος το στάδιο απόκτησης δεδομένων στους 81 και 84<sup>0</sup>C, αντίστοιχα για 15 δευτερόλεπτα.

Ο πολλαπλασιασμός των γονιδίων απονιτροποίησης *nirK*, *nirS*, and *nosZ* πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών *nirK876/nirK1040* (Henry *et al.*, 2004), *nirSCd3aF/nirSR3cd* (Throbäck *et al.*, 2004), και *nosZ2F/nosZ2F* (Henry *et al.*, 2006), αντίστοιχα σε συγκέντρωση 500-nM. Το πρωτόκολλο για πολλαπλασιασμό των παραπάνω γονιδίων περιλάμβανε: 3 λεπτά στους 95 °C και 35 κύκλους των 15 δευτερολέπτων στους 95°C και των 60 δευτερολέπτων στους 60 °C ακολουθούμενοι από το στάδιο απόκτησης δεδομένων στους 87.5 °C και 84.5°C, αντίστοιχα για 15 δευτερόλεπτα.

Όλες οι αντιδράσεις ολοκληρώθηκαν με μια σιγμοειδή καμπύλη τήξης που ξεκινούσε από τους 60°C και έφτανε μέχρι τους 95 °C (με αύξηση 0.5°C), ώστε να επιβεβαιώσει την ομοιομορφία στην αλληλουχία του προϊόντος PCR. Οι πρότυπες καμπύλες προέκυψαν από διαδοχικές αραιώσεις  $10^3$ - $10^8$  για τους οξειδωτές αμμωνίας και  $10^2$ - $10^7$  για τους απονιτροποιητές, των γραμμικών πλασμιδίων (pGEM-T, Promega) που περιέχουν τα κλωνοποιημένα *amoA*, *nirK*, *nirS*, and *nosZ* γονίδια (Paranychianakis *et al.* 2013). Οι αποδοτικότητες του πολλαπλασιασμού ήταν 86% για τα AOB, 94% για τα AOA, 87% για τα *nirK*, 82% για τα *nirS*, and 104% για τα *nosZ*. Οι τιμές του  $R^2$  των πρότυπων καμπυλών ήταν από 0.995-0.998.



## B.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

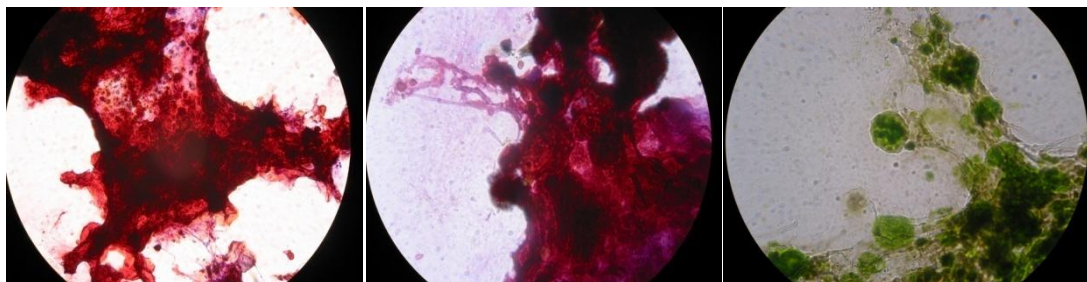
### B.5.1 Χρονική εξέλιξη ανάπτυξης βιοφίλμ

Αρχικά, όπως και περιγράφηκε στο πειραματικό μέρος του κεφαλαίου, προστέθηκε θαλασσινό νερό και συνθετικό απόβλητο στη δεξαμενή τροφοδοσίας του συστήματος. Μετά την πάροδο 2-3 μηνών μια λεπτή στρώση καφέ βιοφίλμ είχε αρχίσει να γίνεται εμφανής στο ύφασμα του βιοαντιδραστήρα (εικόνα B.8). Για αποτελεσματικότερη όμως επεξεργασία του αποβλήτου προστέθηκαν στον αντιδραστήρα μικροάλγη του γένους *Picochlorum*. Η προσθήκη αυτή πραγματοποιήθηκε, γιατί όπως έχει ήδη αναφερθεί πολλές έρευνες έχουν δείξει πως οι μικτές καλλιέργειες μικροαλγών- βακτηρίων είναι επωφελείς στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων (Bashan et al. 2005). Μετά από μόλις 15-20 ημέρες ένα πράσινο στρώμα βιοφίλμ αναπτύχθηκε που ήταν έντονο κυρίως κάτω από τη περιοχή που ήταν τοποθετημένη η λάμπα. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται η σταδιακή ανάπτυξη του βιοφίλμ στο ύφασμα του βιοαντιδραστήρα.



Εικόνα B.33: Χρονική εξέλιξη ανάπτυξης βιοφίλμ: τις πρώτες ημέρες λειτουργίας (επάνω αριστερά), μετά από 2 μήνες (επάνω δεξιά) και μετά από 3 μήνες λειτουργίας (κάτω δεξιά) και μετά τον εμβολιασμό μικροαλγών (κάτω αριστερά).

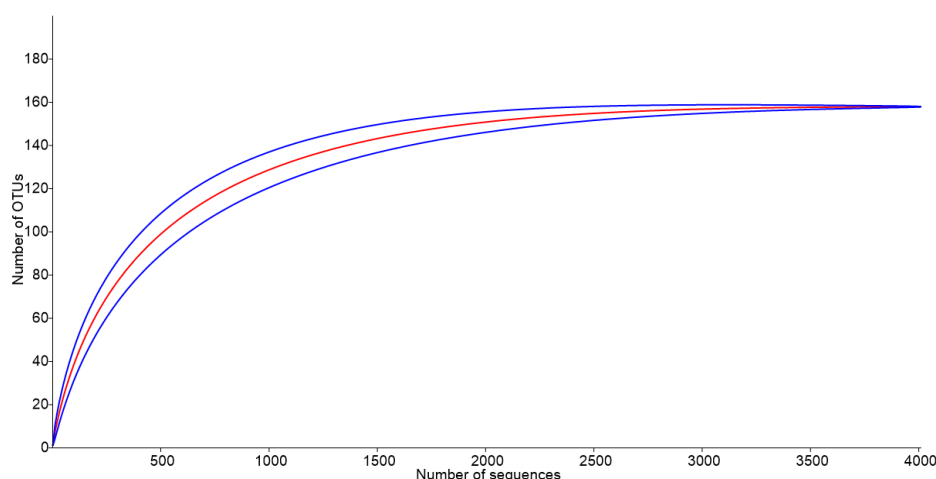
Η παρατήρηση του βιοφίλμ στο οπτικό μικροσκόπιο έδειξε μια σύνθετη μικροβιακή κοινότητα που αποτελείτο από gram θετικά (ιώδες χρώμα) και gram αρνητικά βακτήρια (κόκκινο χρώμα), μύκητες και μικροάλγη (εικόνα 9).



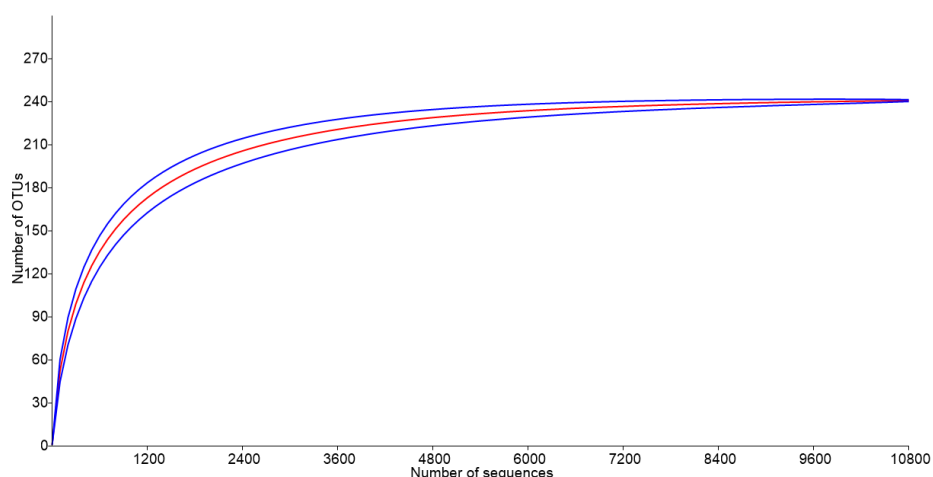
**Εικόνα B.34:** Φωτογραφίες από το οπτικό μικροσκόπιο που δείχνουν την ύπαρξη gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, μικροαλγών και μυκήτων στη μικροβιακή κοινότητα.

### B.5.2 Σύσταση της μικροβιακής κοινότητας

Μετά την απομάκρυνση των ‘θορυβωδών’ και των χειμερινών αλληλουχιών καταλήξαμε σε ένα σύνολο 15.959 ευκαρυωτικές (του 18S rRNA γενετικού τύπου) αλληλουχίες και 4021 (του 16S rRNA γενετικού τύπου) βακτηριακές αλληλουχίες. Οι rarefaction καμπύλες τόσο για τις βακτηριακές (εικόνα B.10) όσο και για τις ευκαρυωτικές (εικόνα B.11) αλληλουχίες πλησίαζαν πολύ τις οριζόντιες ασύμπτωτες δείχνοντας πως η δειγματοληψία ήταν επαρκής για τον χαρακτηρισμό των κοινοτήτων .

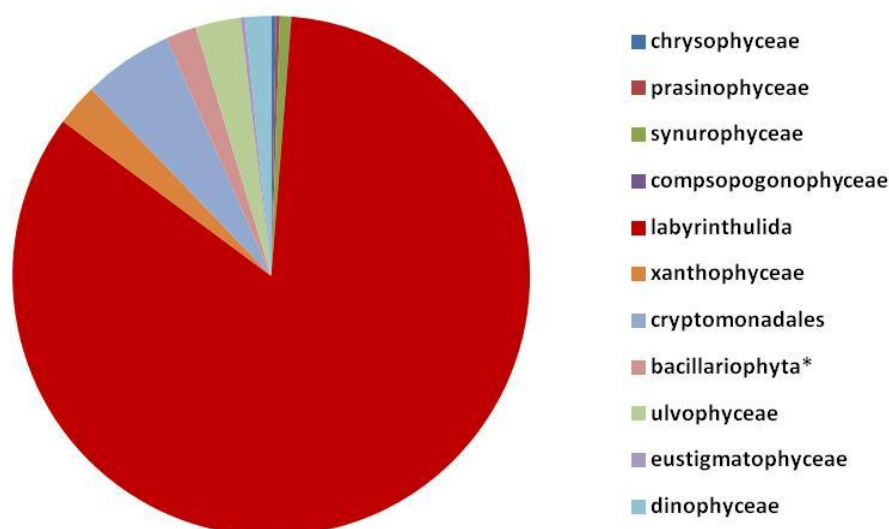


**Εικόνα B.35:** Rarefaction καμπύλη για τις βακτηριακές αλληλουχίες.



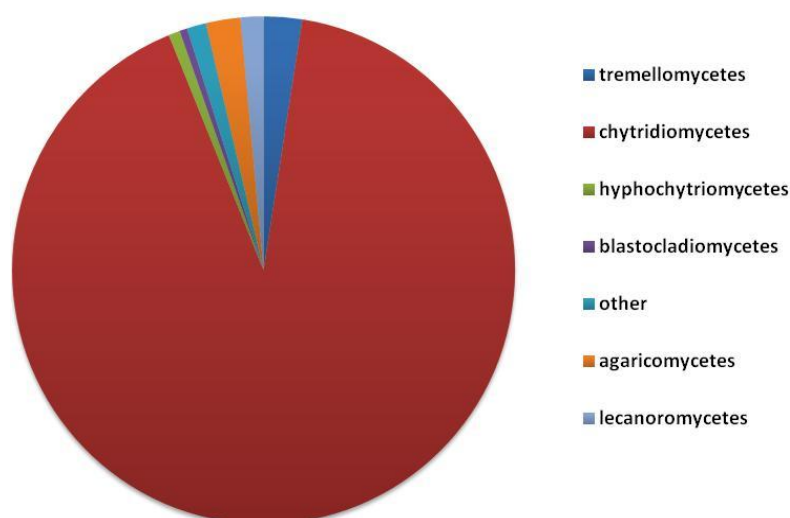
Εικόνα B.36: Rarefaction καμπύλη για τις ευκαρυωτικές αλληλουχίες.

Η ευκαρυωτική κοινότητα αποτελείται από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς και μύκητες. Τα *Picochlorum* *sp.* και *Stichococcus* *sp.* ήταν τα κυρίαρχα είδη των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών και αποτελούσαν περίπου το 90% των συνολικών ευκαρυωτικών κυττάρων. Η δομή της υπόλοιπης φωτοσυνθετικής κοινότητας αποτελείται από *Labyrinthulida* (83.8%) και 10 άλλες τάξεις με μικρή (<5%) αφθονία: *Chrysophyceae*, *Prasinophyceae*, *Synurophyceae*, *Compsopogonophyceae*, *Xanthophyceae*, *Cryptomonadales*, *Bacillariophyta*, *Ulvophyceae*, *Eustigmatophyceae* και *Dinophyceae* (εικόνα B.12).



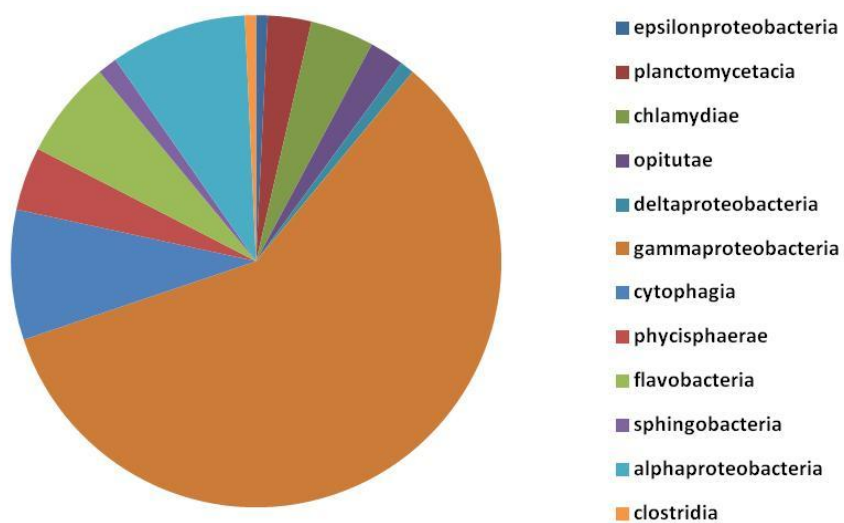
Εικόνα B.37: Δομή της ευκαρυωτικής κοινότητας σε επίπεδο τάξης ,όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του 18S γονιδιακού τόπου.

Οι *Chytridiomycetes* επικρατούσαν της κοινότητας των μυκήτων, αντιπροσωπεύοντας το 91.3% των αλληλουχιών (812 αλληλουχίες). Το υπόλοιπο (8.7%) της κοινότητας των μυκήτων αποτελείτο από λειτουργικές ταξινομικές μονάδες (OTUs- Operational Taxonomic Units) που ταξινομούνται στους *Tremellomycetes*, *Hyphochytriomycetes*, *Blastocladiomycetes*, *Agaricomycetes*, και *Lecanoromycetes* (εικόνα B.13). Ο ρόλος των μυκήτων στην βιοαποδόμηση, χρήση και μετασχηματισμό των οργανικών και ανόργανων υποστρωμάτων είναι σημαντικός. Εμπλέκονται στον κύκλο του C και του N, αλλά επίσης αναπτύσσουν συνεργιστικές σχέσεις με τους φωτότροφους οργανισμούς, όπως είναι τα άλγη και τα κυανοβακτήρια (Gadd 2008). Συγκεκριμένα οι *Chytridiomycetes* που συνιστούν και το μεγαλύτερο ποσοστό της κοινότητας των μυκήτων, αποτελούνται κυρίως από είδη που χαρακτηρίζονται ως παράσιτα των αλγών ή σαπρόφυτα (καταναλώνουν νεκρή οργανική ύλη) (Qin et al., 2014).



Εικόνα B.38: δομή κοινότητας μυκήτων σε επίπεδο τάξης ,όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του 18S γονιδιακού τόπου.

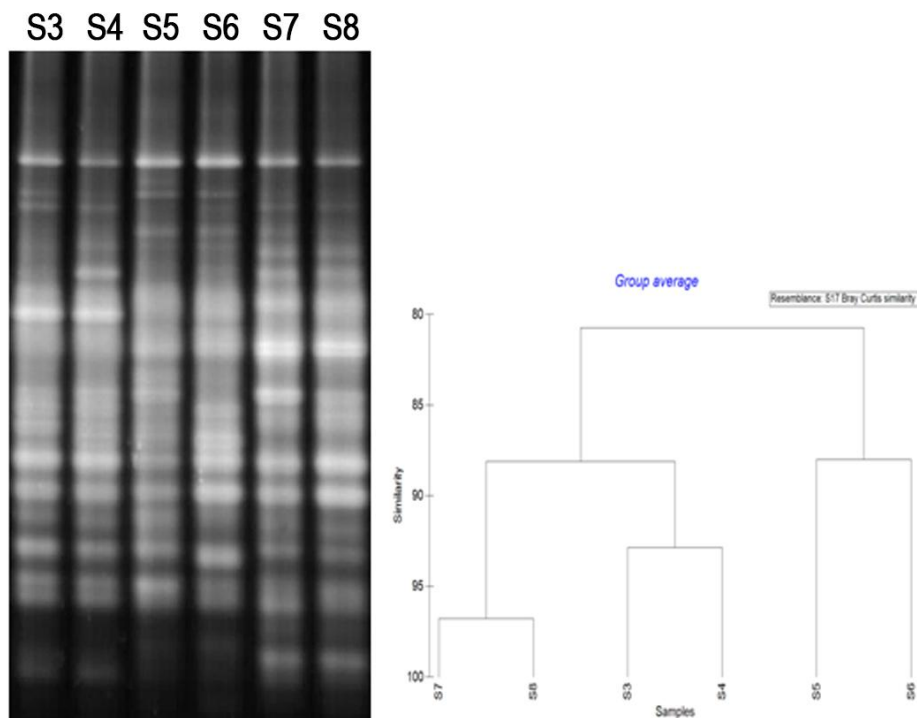
Η βακτηριακή κοινότητα αποτελείτο από OTUs που ανήκουν σε 12 τάξεις: τα *Gammaproteobacteria* (59.59%), *Alphaproteobacteria* (8.82%), *Cytophagia* (8.37%), *Flavobacteria* (6.3%), *Phycisphaerae* (4.1%), *Chlamydiae* (4.08%), *Planctomycetacia* (2.81%), *Opitutae* (2.27%), *Sphingobacteria* (1.27%), *Deltaproteobacteria* (0.92%), *Epsilonproteobacteria* (0.75%) και *Clostridia* (0.72%) (εικόνα 14). Η πλειοψηφία (>95%) των αλληλουχιών της πιο άφθονης τάξης (*Gammaproteobacteria*) ανήκουν στο γένος της *Pseudomonas*, δείχνοντας πως μέλη αυτού του γένους κυριαρχούν της βακτηριακής κοινότητας.



**Εικόνα Β.39:** Δομή βακτηριακής κοινότητας σε επίπεδο τάξης, όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του 16S γονιδιακού τόπου.

### B.5.3 Εξέταση σταθερότητας βακτηριακής κοινότητας

Οι εποχικές διακυμάνσεις στη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας εξετάστηκαν μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πολυακρυλαμίδη σε διαβάθμιση αποδιατακτικών (DGGE). Τα δείγματα τα οποία εξετάστηκαν κάλυπταν μια χρονική περίοδο 8 περίπου μηνών λειτουργίας του αντιδραστήρα. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ομαδοποίησης, η οποία βασίστηκε στα DGGE προφίλ έδειξαν πως ο δείκτης ομοιότητας BC ήταν πολύ υψηλός ανάμεσα σε όλα τα δείγματα (80.8 % μέσος όρος του δείκτη ομοιότητας), δείχνοντας υψηλή σταθερότητα στη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 8 περίπου μηνών που λήφθηκαν τα υπό εξέταση δείγματα (εικόνα B.15). Ωστόσο, τα δείγματα τα οποία είχαν ληφθεί κατά την ίδια χρονική περίοδο (S1-S2,S3-S4 και S5-S6) ομαδοποιήθηκαν μαζί (88.1 -96.8 % ομοιότητα δείκτη BC), υποδεικνύοντας πως οι εποχικές μεταβολές καθώς και η σύνθεση του αποβλήτου επηρέασαν σε ένα μικρό μόνο ποσοστό την βακτηριακή κοινότητα.

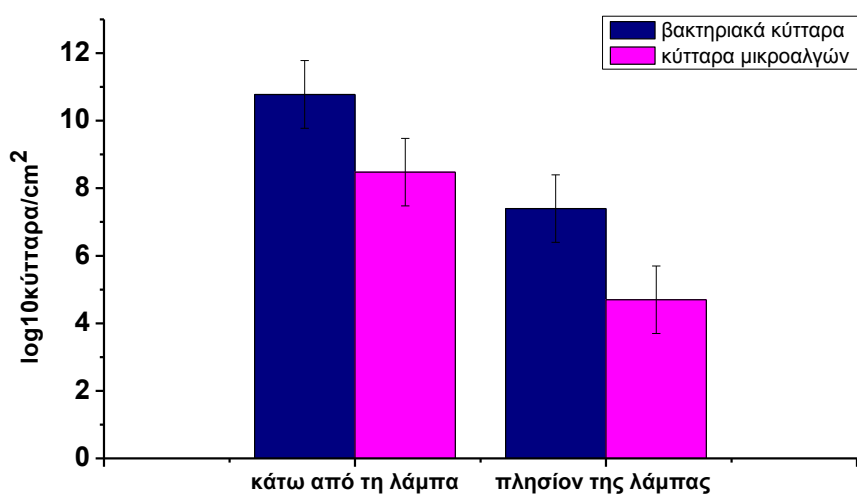


Εικόνα B.40: DGGE προφίλ για τη βακτηριακή κοινότητα (εικόνα αριστερά) και ανάλυση ομαδοποίησης που δείχνει την ομοιότητα του δείκτη BC (εικόνα δεξιά).



#### B.5.4 Προσδιορισμός αριθμού κυττάρων στο βιοφίλμ

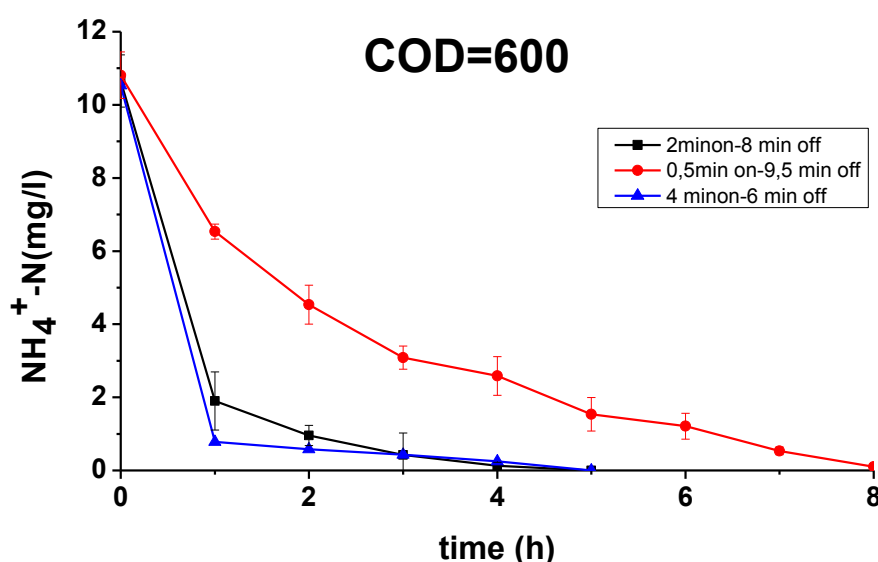
Στην εικόνα B.16 φαίνονται οι πληθυσμοί των κυττάρων των μικροαλγών και των βακτηρίων ανά τετραγωνικό εκατοστό επιφάνειας βιοφίλμ. Η δειγματοληψία έχει πραγματοποιηθεί στο βιοφίλμ που βρίσκεται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια της λάμπας, αλλά και σε περιοχές γύρω από αυτήν. Όπως φαίνεται στην εικόνα ο αριθμός των κυττάρων των βακτηρίων είναι 2-3 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος από τον αριθμό των μικροαλγών. Επίσης ο αριθμός κυττάρων των μικροαλγών είναι 4 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος στη περιοχή κάτω από το φως από τον αριθμό των κυττάρων των μικροαλγών που βρίσκονται σε γειτονικές περιοχές της λάμπας. Το ίδιο συμβαίνει και με τα βακτήρια, των οποίων ο αριθμός είναι 3 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος κάτω από το φως, δείχνοντας τη συνεργιστική σχέση μεταξύ βακτηρίων – μικροαλγών. Μπορούμε λοιπόν να πούμε πως η πυκνότητα τόσο των βακτηρίων όσο και των μικροαλγών αυξάνεται καθώς πλησιάζουμε την περιοχή στην οποία είναι τοποθετημένη η λάμπα. Έχει διαπιστωθεί άλλωστε πως η πυκνότητα των μικροαλγών σε ένα βιοφίλμ αυξάνεται σημαντικά με την συνύπαρξη βακτηρίων. Οι Hodoki et al. 2005 έδειξαν πως ο αριθμός των μικροαλγών σε ένα σύστημα προσκολλημένης βιομάζας αυξήθηκε σημαντικά με την ταυτόχρονη ύπαρξη βακτηρίων στο προς επεξεργασία απόβλητο. Οι Holmes et al. 1986 συμπέραναν πως κατά τη συνύπαρξη μικροαλγών- βακτηρίων ο αριθμός των μικροαλγών ήταν 1-2 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος από αυτόν χωρίς την ύπαρξη των βακτηρίων.



Εικόνα B.41: Αριθμός κυττάρων βακτηρίων και μικροαλγών ( log 10) ανά μονάδα επιφάνειας βιοφίλμ (cm<sup>2</sup>) κάτω από τη λάμπα και πλησίον της λάμπας.

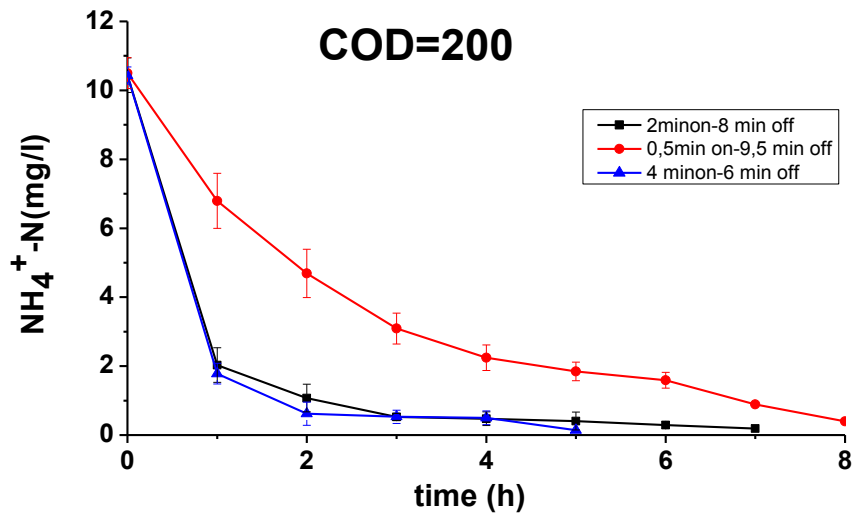
### B.5.5 Προσδιορισμός βέλτιστου χρόνου λειτουργίας της αντλίας τροφοδοσίας

Ο χρόνος λειτουργίας της αντλίας αποτελεί μία βασική παράμετρο που έπρεπε να βελτιστοποιηθεί, ώστε να διατηρείται η μικροβιακή κοινότητα και παράλληλα να επιτυγχάνεται μία άριστη ποιότητας εκροή. Για τον λόγο αυτό εξετάστηκαν 3 τύποι συνθετικού αποβλήτου σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις και οι απομακρύνσεις των  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  και των  $\text{PO}_4^{3-}$  ελέγχθηκαν. Στις εικόνες B.17-B.19 παρουσιάζονται οι δυναμικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις και διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας. Είναι ξεκάθαρο πως όταν η αντλία λειτουργεί για 2 λεπτά και σταματά για 8 λεπτά επιτυγχάνεται μεγαλύτερος ρυθμός απομάκρυνσης  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  σε σύγκριση με τον μικρότερο χρόνο λειτουργίας της (λειτουργεί 0.5 λεπτό και σταματά 9.5 λεπτά). Η απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  είναι πλήρης και στις δύο περιπτώσεις, αλλά στην δεύτερη περίπτωση απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος παραμονής του αποβλήτου στον αντιδραστήρα (περίπου 8 ώρες αντί για 3 ώρες). Από την άλλη πλευρά δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές όταν ο χρόνος λειτουργίας της αντλίας διπλασιάστηκε (λειτουργούσε 4 λεπτά). Επιπλέον φαίνεται πως η επίδραση του χρόνου λειτουργίας της αντλίας υπήρξε η ίδια κάτω από όλες τις υπό εξέταση οργανικές φορτίσεις του συστήματος.

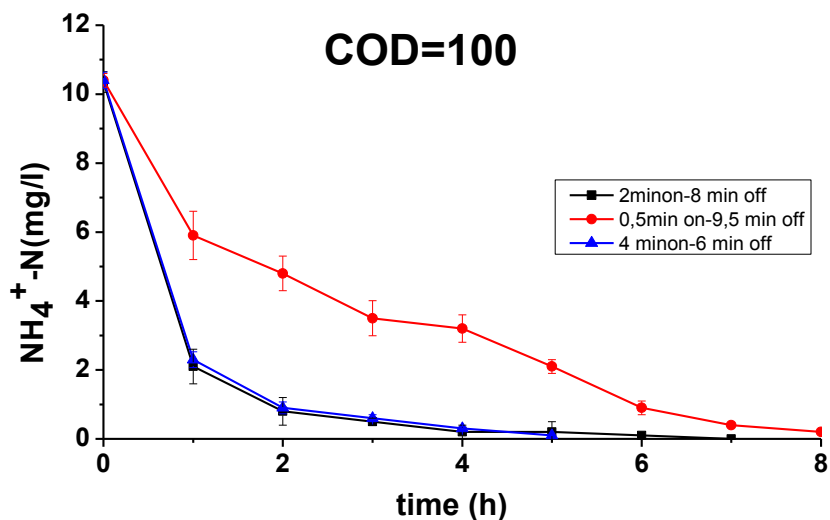


Εικόνα B.42: Απομάκρυνση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 600 mg/l.





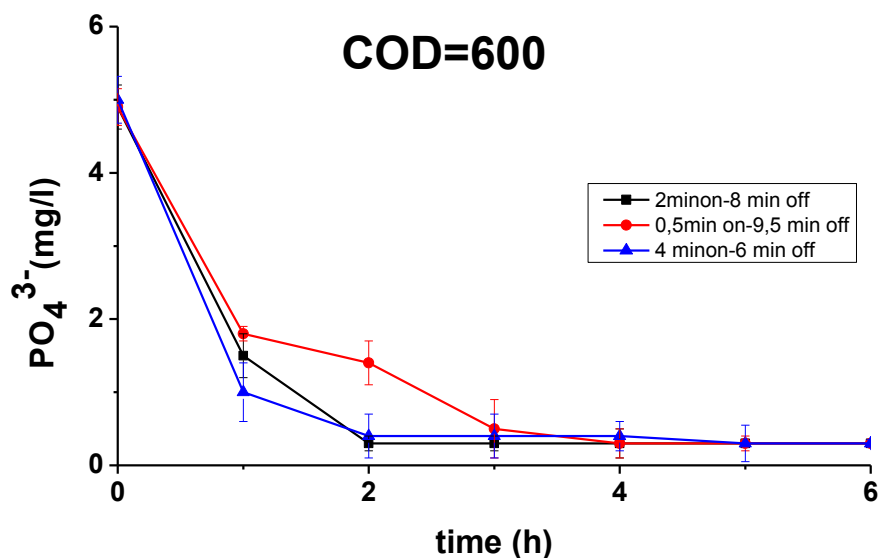
Εικόνα B.43: Απομάκρυνση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 200mg/l.



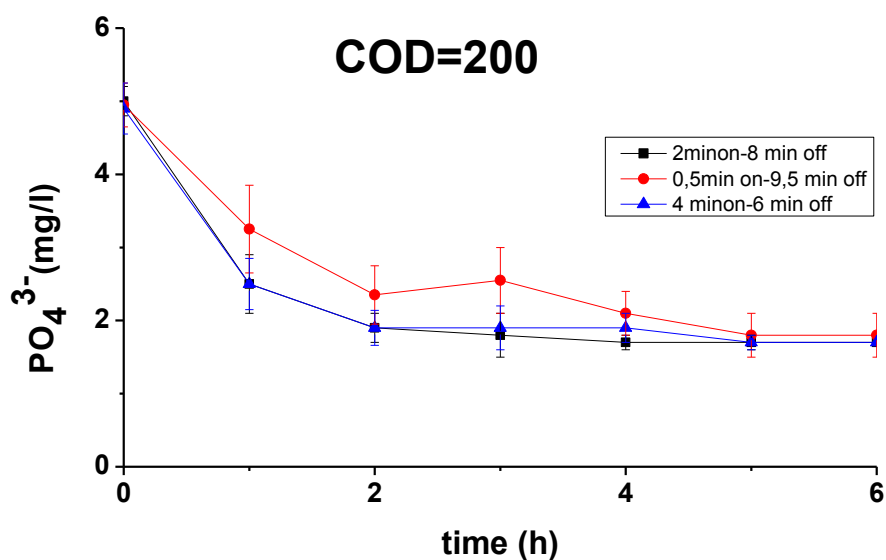
Εικόνα B.44: Απομάκρυνση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 100mg/l.

Στις εικόνες B.20-B.22 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των  $\text{PO}_4^{3-}$  κάτω από διαφορετικές οργανικές φορτίσεις και στους διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας. Για COD=600 mg/l ένας χαμηλότερος ρυθμός απομάκρυνσης  $\text{PO}_4^{3-}$  παρατηρείται όταν η αντλία λειτουργεί για 0.5 λεπτό σε διαστήματα των 10 λεπτών ,αλλά τελικά η ίδια συνολική απομάκρυνση επιτυγχάνεται μετά από 3 ώρες σε όλους

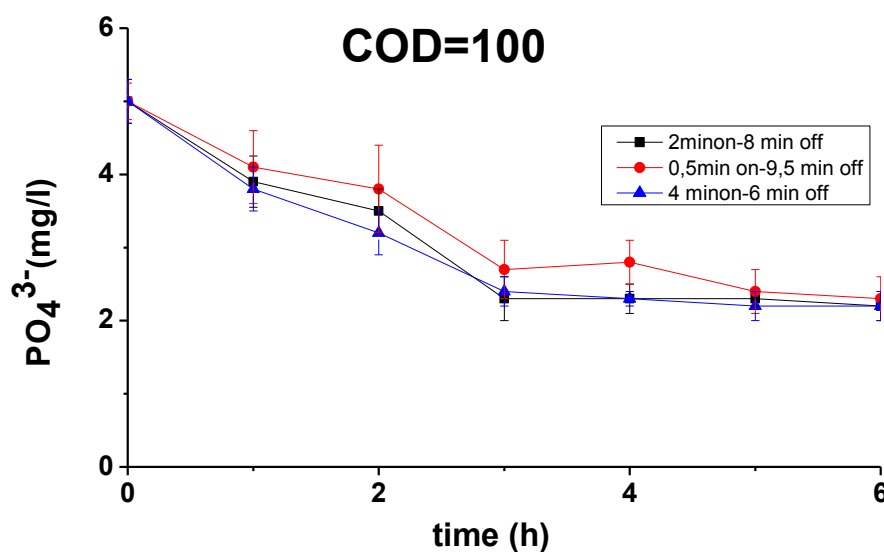
τους χρόνους λειτουργίας της αντλίας (εικόνα B.20). Σε χαμηλότερες οργανικές φορτίσεις (COD=200 και 100 mg/l) παρατηρούνται μικρότεροι ρυθμοί απομάκρυνσης των  $\text{PO}_4^{3-}$  κυρίως στον μικρότερο χρόνο λειτουργίας της αντλίας (εικόνες B.21-B.22).



Εικόνα B.45: Απομάκρυνση  $\text{PO}_4^{3-}$  σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 600mg/l.



Εικόνα B.46: Απομάκρυνση  $\text{PO}_4^{3-}$  σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 200mg/l.



Εικόνα Β.47: Απομάκρυνση  $\text{PO}_4^{3-}$  σε διαφορετικούς χρόνους λειτουργίας της αντλίας για COD αποβλήτου ίσο με 100mg/l.

Επομένως συμπεραίνεται πως ο χρόνος λειτουργίας της αντλίας επηρεάζει τον ρυθμό απομάκρυνσης κυρίως του  $\text{NH}_4^+-\text{N}$ . Αλλά αυτό συμβαίνει μέχρι κάποιο χρόνο λειτουργίας (2 λεπτά), μετά τον οποίο δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες αλλαγές. Κατά συνέπεια ο βέλτιστος χρόνος λειτουργίας της αντλίας είναι τα 2 λεπτά ανά διαστήματα των 10 λεπτών, που σημαίνει έναν συνολικό χρόνο λειτουργίας 4.8 ώρες/ημέρα. Διαπιστώνεται λοιπόν πως ο ημερήσιος χρόνος λειτουργίας της αντλίας είναι πολύ μικρός, υποδηλώνοντας πως οι απαιτήσεις του συγκεκριμένου συστήματος σε ηλεκτρική ενέργεια είναι χαμηλές.

### B.5.6 Απομάκρυνση COD

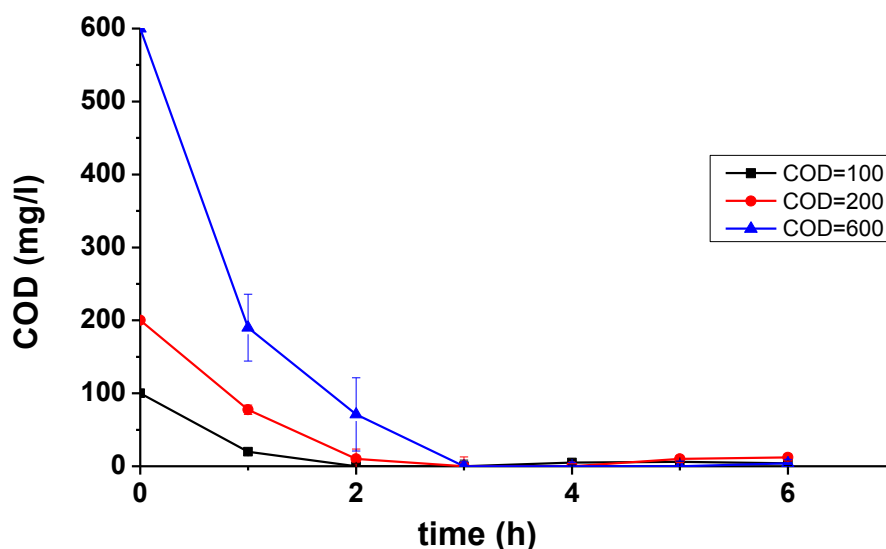
Στην εικόνα B.23 φαίνεται η γρήγορη απομάκρυνση του COD (99%) του αποβλήτου μέσα σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα λίγων ωρών (3h), ανεξαρτήτως της αρχικής συγκέντρωσης τροφοδοσίας της μονάδας επεξεργασίας. Τα ετερότροφα βακτήρια οξειδώνουν τον οργανικό C και απελευθερώνουν ανόργανο C (CO<sub>2</sub>), που με τη σειρά του μπορεί να αφομοιωθεί από τα μικροάλγη. Επιπροσθέτως, πολλά μικροάλγη έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται στις διαφορετικές συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον τους και μπορούν να χρησιμοποιούν τόσο ανόργανες όσο και οργανικές πηγές C (Perez-Garcia et al. 2011).

Στη συγκεκριμένη μελέτη τα *Stichococcus* και *Picochlorum*, τα πιο άφθονα γένη μικροαλγών στο βιοφίλμ, έχουν την ικανότητα να βρίσκονται στην μικτότροφη κατάσταση και επομένως μπορούν να αντλούν ενέργεια τόσο από τη φωτοσύνθεση, όσο και από την ετερότροφη κατάσταση (Ahmad & Hellebust 1986). Επιπλέον, η ταυτόχρονη έκθεση στο φως έχει αναφερθεί πως οδηγεί σε μεγαλύτερη απομάκρυνση του COD από μικτές κοινότητες βακτηρίων-μικροαλγών, ένα αποτέλεσμα που αποδίδεται στον μικτοτροφικό τρόπο ζωής των μικροαλγών αλλά και την καλύτερη οξυγόνωση του αποβλήτου (González et al. 2008).

Κατά συνέπεια αυτή η ταχεία μείωση του COD είναι πιθανόν να οφείλεται στην συνεργιστική σχέση των βακτηρίων και μικροφυκών. Πρέπει να σημειωθεί πως η αποδοτικότητα του συστήματος (όσον αφορά την απομάκρυνση του COD) βελτιώθηκε αισθητά με την προσθήκη των μικροαλγών. Η απομάκρυνση COD κατά τους πρώτους μήνες της λειτουργίας του συστήματος (πριν από τον εμβολιασμό των μικροαλγών), ποτέ δεν ξεπέρασε το 70%.

Πολλοί είναι οι ερευνητές που έχουν εξετάσει την απομάκρυνση οργανικού υλικού από διαφορετικούς τύπους αποβλήτων, εξαιτίας της συνεργιστικής δράσης μικροαλγών- βακτηρίων. Οι Deng et al. 2011 χρησιμοποιώντας μικτές κοινότητες μικροαλγών – βακτηρίων για την επεξεργασία αστικού αποβλήτου παρατήρησαν μείωση του COD από τα 150 mg/l στα 15 mg/l μέσα σε χρόνο παραμονής HRT=12 h. Οι Su et al. 2011 παρατήρησαν 98.2 % απομάκρυνση COD από φωτοβιοαντιδραστήρα που επεξεργαζόταν αστικό απόβλητο. Οι Gonzalez et al.2008 παρατήρησαν απομάκρυνση έως και 75% από απόβλητο χοιροστασίου σε φωτοβιοαντιδραστήρα εμπλουτισμένο με *Chlorella* sp. και ενεργό ιλύ. Οι Acquire et

α). μελέτησαν την επεξεργασία αποβλήτου χοιροστασίων σε τεχνητές λίμνες ελυσσόμενου στύβου και παρατήρησαν απομάκρυνση COD έως και 90%.



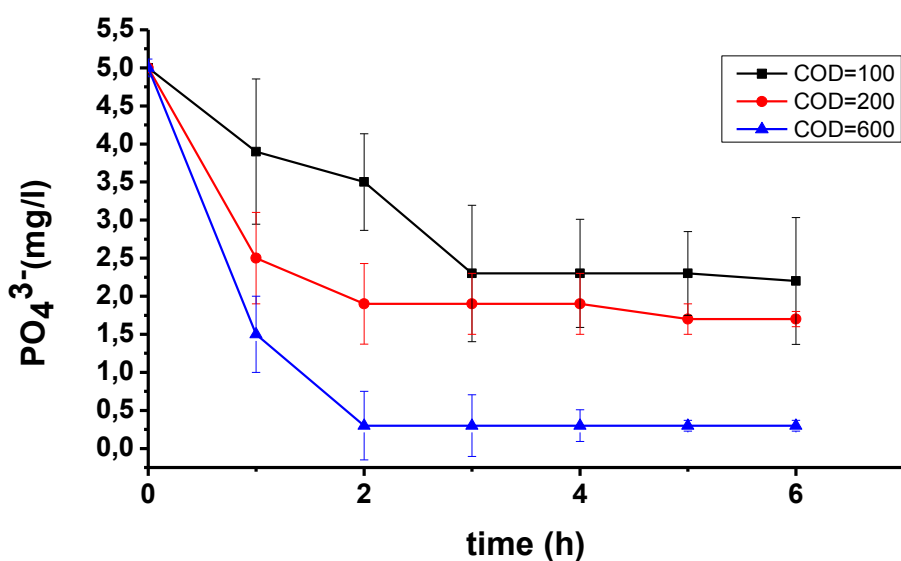
Εικόνα B.48: Απομάκρυνση COD που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές αρχικές οργανικές φορτίσεις.

### B.5.7 Απομάκρυνση φωσφορικών

Όπως φαίνεται στην εικόνα B.24 στο απόβλητο παρατηρείται απομάκρυνση  $\text{PO}_4^{3-}$  που οφείλεται πιθανότατα σε βιολογική απομάκρυνση, εφόσον καμία χημική μέθοδος αφαίρεσης P δεν εφαρμόστηκε στο συγκεκριμένο σύστημα. Ο P είναι απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αφού αποτελεί βασικό συστατικό των φωσφολιπιδίων, των νουκλεοτιδίων και των νουκλειικών οξέων. Επιπροσθέτως υπάρχουν συγκεκριμένες ομάδες μικροοργανισμών, που αφομοιώνουν P στα κύτταρά τους σε ποσοστό πολλαπλάσιο από το απαιτούμενο για τις μεταβολικές τους ανάγκες για ανάπτυξη. Η αφομοίωση αυτή αναφέρεται ως εκτεταμένη δέσμευση P <<luxury uptake>>. Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο τα μικροάλγη παρουσιάζουν τη συγκεκριμένη ικανότητα να συσσωρεύουν σε υψηλά επίπεδα P μέσα στα κύτταρά τους με τη μορφή πολυφωσφορικών ενώσεων (Powell 2008). Πολλοί είναι οι ερευνητές που έχουν επισημάνει μεγάλα ποσοστά απομάκρυνσης P σε διάφορα συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων, εξαιτίας της χρήσης μικροαλγών (Wang et al. 2013, Patel et al. 2012, Larsdotter 2006, Boelle et al. 2011). Είναι

χαρακτηριστικό πως σε ένα συμβατικό σύστημα ενεργού ιλύος το περιεχόμενο της βιομάζας σε P κυμαίνεται περίπου στο 1%, ενώ έρευνες σε συστήματα με μικροάλγη έχουν αναφέρει ποσοστά που ξεπερνούν το 4% (Powell 2011).

Από την B.24 παρατηρείται επιπλέον πως η αφομοίωση του P εξαρτάται ισχυρά από τη συγκέντρωση του διαθέσιμου οργανικού άνθρακα και είναι υψηλότερη στις υψηλές συγκεντρώσεις COD. Σε COD=100 mg/l μια μικρή απομάκρυνση P πραγματοποιήθηκε στο σύστημα που έφτανε το 56% μετά από 6h. Η απομάκρυνση P αυξήθηκε στο 66%, όταν το COD αυξήθηκε στα 200 mg/l, ενώ έφτασε το 95% σε 2 μόλις ώρες σε COD=600mg/l. Αυτό συνέβη πιθανότατα, διότι η διαδικασία πρόσληψης P είναι ενεργή και επομένως απαιτεί ενέργεια. Η αφομοίωσή του εξαρτάται ισχυρά από την αφομοίωση του C από τα μικροάλγη και ως εκ τούτου από την ανάπτυξη των μικροαλγών (Larsdotter 2006).

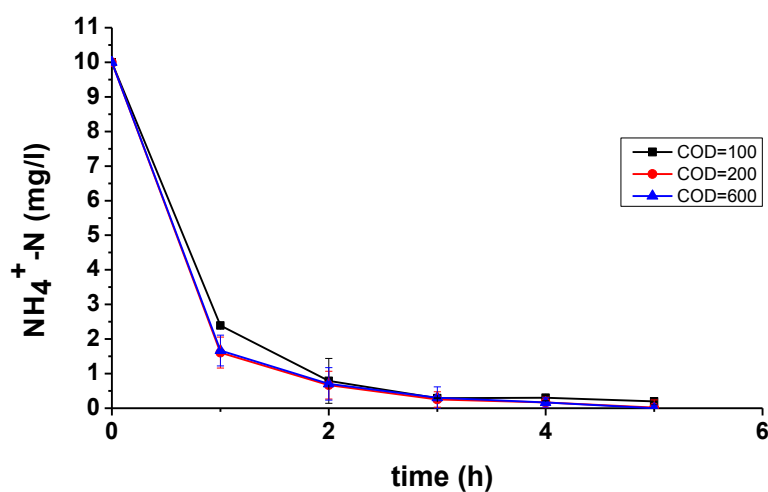


Εικόνα B.49: Απομάκρυνση  $\text{PO}_4^{3-}$  που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις.

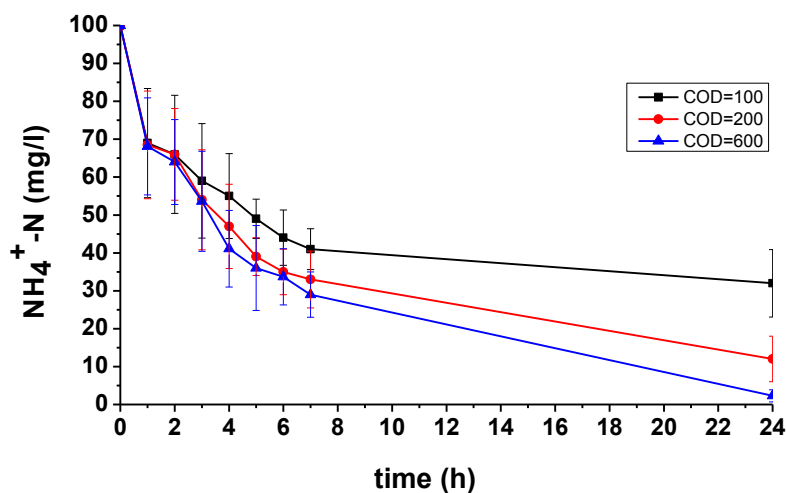
#### B.5.8 Απομάκρυνση $\text{NH}_4^+$ -N

Οι εικόνες B.25 και B.26 δείχνουν την επίδραση του COD στην απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+$ -N για χαμηλές (10mg/l) και υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+$ -N (100 mg/l). Υψηλά ποσοστά απομάκρυνσης του  $\text{NH}_4^+$ -N επιτυγχάνονται, ανεξαρτήτως της

αρχικής του συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα η απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ήταν σχεδόν πλήρης (99%) εντός μόλις 3 h όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν 10 mg/l (εικόνα B.25). Επιπλέον ασήμαντες αλλαγές στην απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  παρατηρήθηκαν στις διαφορετικές οργανικές φορτίσεις του συστήματος. Όταν ωστόσο η αρχική συγκέντρωση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  αυξήθηκε στα 100 mg/l, η απομάκρυνση παρατηρήθηκε να αυξάνεται με αυξανόμενη την οργανική φόρτιση (εικόνα B.26). Η απομάκρυνση ήταν σχεδόν πλήρης (>98%) εντός 24 h όταν το COD ήταν 600 mg/l. Από την άλλη χαμηλότερη απομάκρυνση (88%) παρατηρήθηκε σε χαμηλότερο COD (200 mg/l) και ακόμη χαμηλότερο ποσοστό (68%), όταν το COD μειώθηκε στα 100mg/l.



**Εικόνα B.50:** Απομάκρυνση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (αρχικής συγκέντρωσης 10mg/l) που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις.



**Εικόνα B.51:** Απομάκρυνση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  (αρχικής συγκέντρωσης 100mg/l) που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις.

Η απομάκρυνση του N έχει διαπιστωθεί πως αυξάνεται σε συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων, στα οποία χρησιμοποιούνται καλλιέργειες μικροαλγών, όταν αυξάνεται η οργανική τους φόρτιση ή συγκεκριμένες οργανικές ενώσεις. Οι Geider et al. 1989 έδειξαν πως η προσθήκη οργανικού άνθρακα και συγκεκριμένα γλυκόζης επιτρέπει την αφομοίωση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  να συνεχίζεται περαιτέρω, όπως επίσης και η πρωτεϊνσύνθεση. Σε τέτοια συστήματα η απομάκρυνση οφείλεται στην πρόσληψη και αφομοίωση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  από μικροάλγη (Khan and Yoshida 2008). Όμως πρέπει να σημειωθεί πως η ικανότητα των μικροαλγών για απομάκρυνση  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  φτάνει σε συνθήκες κορεσμού, εάν δεν πραγματοποιείται ταυτόχρονη αφαίρεση της παραγόμενης βιομάζας. Παρόλα αυτά η ικανότητα που έχουν τα μικροάλγη να αφομοιώνουν με γρήγορους ρυθμούς το  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  μέσα στα κύτταρά τους αποτελεί μια πολύ σημαντική ιδιότητα των συστημάτων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων που κάνουν χρήση μικτών κοινοτήτων βακτηρίων- μικροαλγών. Η ικανότητα αυτή των μικροαλγών επιτρέπει την αποτελεσματική επεξεργασία αποβλήτων με μεγάλες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ .

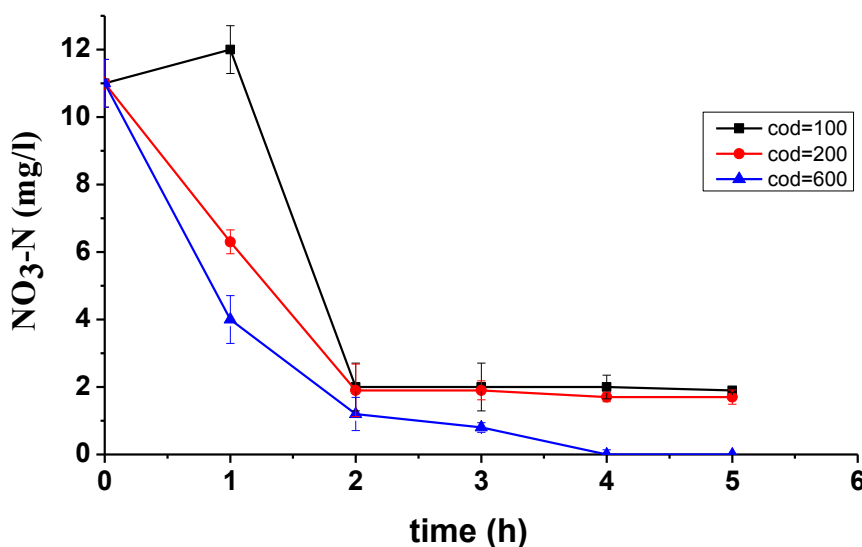
### B.5.9 Απομάκρυνση $\text{NO}_3^-\text{-N}$ και TN

Οι παρακάτω εικόνες B.27 και B.28 παρουσιάζουν την απομάκρυνση του  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  και του TN από το σύστημα στις διαφορετικές οργανικές φορτίσεις που εφαρμόστηκαν.

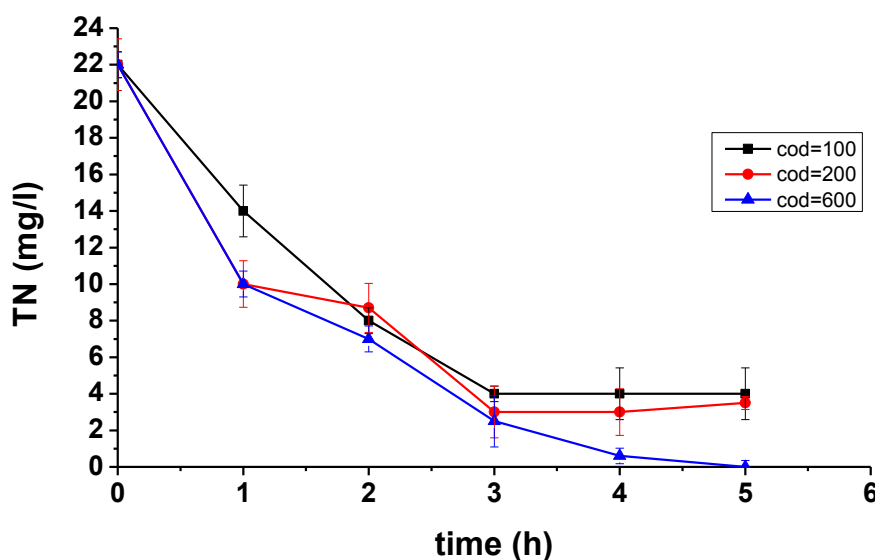


Είναι εμφανές πως στα υψηλότερα COD υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης  $\text{NO}_3^-$ -N και TN επιτεύχθηκαν. Σε  $\text{COD}=600 \text{ mg/l}$ , πλήρης απομάκρυνση του  $\text{NO}_3^-$ -N επιτεύχθηκε μέσα σε μόλις 5h (εικόνα B.27), ενώ σε  $\text{COD}=200 \text{ mg/l}$  και  $\text{COD}=100\text{mg/l}$  παρατηρήθηκαν μικρότερες απομακρύνσεις (85% και 83% αντίστοιχα). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και για την απομάκρυνση του TN (εικόνα B.28). Συγκεκριμένα επιτυγχάνεται πλήρης απομάκρυνση σε  $\text{COD}=600 \text{ mg/l}$ , ενώ επιτυγχάνονται απομακρύνσεις 82% και 83% σε  $\text{COD}=200$  και  $\text{COD}=100 \text{ mg/l}$  αντίστοιχα.

Οι απομακρύνσεις αυτές μπορεί να οφείλονται τόσο στην αφομοίωση  $\text{NO}_3^-$ -N από τα μικροάλγη, αλλά και στην ετερότροφη απονιτροποίηση. Είναι ευρέως γνωστό πως η πηγή C στην ετερότροφη απονιτροποίηση αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες της διεργασίας. Ο λόγος C/N αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την ετερότροφη απονιτροποίηση και καθορίζει το αν υπάρχει πλήρης απομάκρυνση του N και το πόσο γρήγορα θα ολοκληρωθεί η απομάκρυνση αυτή. Αντιθέτως, μια χαμηλή αναλογία C/N οδηγεί σε ατελή απονιτροποίηση.



Εικόνα B.52: Απομάκρυνση  $\text{NO}_3^-$ -N που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις.

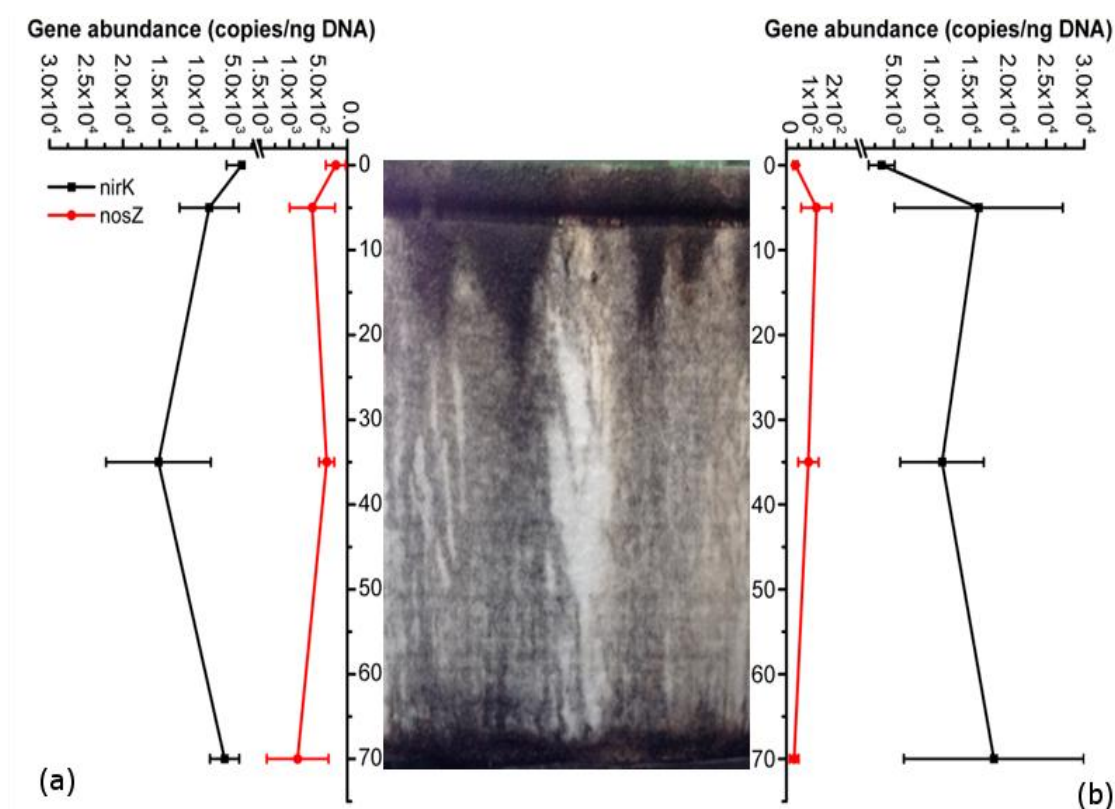


Εικόνα B.53: Απομάκρυνση TN που επιτυγχάνεται από το σύστημα σε διαφορετικές οργανικές φορτίσεις.

#### B.5.10 Ποσοτικοποίηση του αριθμού γονιδίων μέσω της Real time PCR

Η Real time PCR που πραγματοποιήθηκε για τον έλεγχο οξειδωτών αμμωνίας έδειξε πλήρη απουσία του γονιδιακού τόπου *amoA* από τη μικροβιακή κοινότητα, τόσο για τα βακτήρια όσο και για τα αρχαία κάτω από όλες τις οργανικές και αμμωνιακές φορτίσεις που εφαρμόστηκαν στο σύστημα (εικόνα B.29). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από απλή PCR. Λαμβάνοντας υπόψη την δυνατότητα της μονάδας επεξεργασίας για απομάκρυνση του N από τη μία και την πλήρη απουσία οξειδωτών αμμωνίας από την άλλη μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ετερότροφη νιτροποίηση ακολουθούμενη από αερόβια απονιτροποίηση ήταν η κύρια διεργασία που ήταν υπεύθυνη για την απομάκρυνση του N. Η διεργασία αυτή έχει πολλές φορές προσδιοριστεί ως η κύρια διεργασία απομάκρυνσης N σε διάφορα συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων και σε διαφορετικούς τύπους αποβλήτων (Zhang et al. 2011). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από τον αυξανόμενο αριθμό των *nirK* γονιδίων που προσδιορίστηκαν στη μικροβιακή κοινότητα και ταυτόχρονα την απουσία των *nirS* γονιδίων (εικόνα B.29). Παρομοίως μόνο *nirK* γονίδια έχουν προσδιοριστεί στην πλειονότητα των μικροοργανισμών που επιτελούν τη διεργασία της ετερότροφης νιτροποίησης –αερόβιας απονιτροποίησης (Robertson et al. 1989).

Το πλήθος των *nirK* γονιδίων δεν ακολουθεί κάποια συγκεκριμένη τάση κατά μήκος του υφάσματος και η αφθονία τους φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά από τη σύνθεση του εισερχόμενου αποβλήτου (εικόνα B.29). Αυτό ίσως δηλώνει πως η διεργασία ρυθμίστηκε σε επίπεδο μεταγραφής και /ή μετάφρασης ή (και) ότι η ενεργότητα των μικροοργανισμών που κωδικοποιεί τα *nirK* γονίδια ενισχύθηκε με τον αυξανόμενο άνθρακα στο απόβλητο. Το τελευταίο επιβεβαιώνεται και από τις μεγαλύτερες απομακρύνσεις  $\text{NO}_3^-$ -N και TN που αναφέρθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις COD, όπως σημειώθηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Τέλος το πλήθος του γονιδιακού τύπου *nosZ* παρέμεινε σχεδόν δύο τάξεις μεγέθους μικρότερο από το πλήθος του γονιδιακού τύπου *nirK* (εικόνα B.29) κάτι που ίσως δηλώνει αυξημένα ποσοστά εκπομπών  $\text{N}_2\text{O}$ , αλλά δεν έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά.



Εικόνα B.54: Πλήθος των γονιδιακών τύπων *nirK* και *nosZ* (no/ng DNA) στον αντιδραστήρα τροφοδοτούμενο από απόβλητο που περιέχει α)100mg/l  $\text{NH}_4^+$ -N και 600mg/l COD και β)100mg/l  $\text{NH}_4^+$ -N και 100mg/l COD.

## B.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Μια σύνθετη μικροβιακή κοινότητα που δομεί το βιοφίλμ που αποτελείται από βακτήρια, φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς και μύκητες παρατηρήθηκε στο ύφασμα του αντιδραστήρα.
- Τα *Picochlorum* sp. και *Stichococcus* sp ήταν τα κυρίαρχα είδη των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών και αποτελούσαν περίπου το 90% των συνολικών ευκαρυωτικών κυττάρων.
- Η πλειοψηφία (>95%) των αλληλουχιών της πιο άφθονης τάξης των βακτηρίων (*Gammaproteobacteria*) ανήκαν στο γένος της *Pseudomonas*, δείχνοντας πως μέλη αυτού του γένους κυριαρχούσαν της συγκεκριμένης βακτηριακής κοινότητας.
- Οι *Chytridiomycetes* επικρατούσαν της κοινότητας των μυκήτων, αντιπροσωπεύοντας το 91.3% των αλληλουχιών. Οι συγκεκριμένοι μύκητες έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά πως αποτελούνται κυρίως από είδη που χαρακτηρίζονται ως παράσιτα των αλγών ή σαπρόφυτα.
- Ο δείκτης ομοιότητας BC που προέκυψε από τα DGGE προφίλ ήταν πολύ υψηλός ανάμεσα σε όλα τα δείγματα (80.8 % μέσος όρος του δείκτη ομοιότητας), δείχνοντας υψηλή σταθερότητα στη σύνθεση των βακτηριακών κοινοτήτων. Ωστόσο, τα δείγματα τα οποία είχαν ληφθεί κατά την ίδια χρονική περίοδο ομαδοποιήθηκαν μαζί (88.1 - 96.8 % ομοιότητα δείκτη BC), υποδεικνύοντας πως οι εποχικές μεταβολές, αλλά και η σύνθεση του αποβλήτου επηρέασαν σε ένα μικρό μόνο ποσοστό την βακτηριακή κοινότητα.
- Η πυκνότητα τόσο των βακτηρίων όσο και των μικροαλγών αυξάνεται κοντά στην περιοχή στην οποία είναι τοποθετημένη η λάμπα, δείχνοντας τη συνεργιστική σχέση μεταξύ βακτηρίων– μικροαλγών.
- Ο χρόνος λειτουργίας της αντλίας επηρεάζει τον ρυθμό απομάκρυνσης κυρίως του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ . Αλλά αυτό συμβαίνει μέχρι κάποιο χρόνο λειτουργίας (2 λεπτά), μετά τον οποίο δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες αλλαγές. Κατά συνέπεια ο βέλτιστος χρόνος λειτουργίας της αντλίας είναι τα 2 λεπτά ανά διαστήματα των 10 λεπτών, που σημαίνει έναν συνολικό χρόνο λειτουργίας 4.8 ώρες/ ημέρα. Διαπιστώνεται λοιπόν πως ο ημερήσιος χρόνος λειτουργίας της αντλίας είναι πολύ μικρός, υποδηλώνοντας πως οι απαιτήσεις του συγκεκριμένου συστήματος σε ηλεκτρική ενέργεια είναι χαμηλές.

- Γρήγορη απομάκρυνση του COD (99%) του αποβλήτου μέσα σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα λίγων ωρών (3h) παρατηρήθηκε, ανεξαρτήτως της αρχικής συγκέντρωσης τροφοδοσίας της μονάδας επεξεργασίας, που πιθανότατα οφείλεται στην συνεργιστική σχέση των βακτηρίων και μικροφυκών.
- Στο σύστημα παρατηρήθηκε απομάκρυνση  $\text{PO}_4^{3-}$  που οφείλεται σε βιολογική απομάκρυνση. Τα μικροάλγη παρουσιάζουν την ικανότητα να συσσωρεύουν σε υψηλά επίπεδα P μέσα στα κύτταρά τους με τη μορφή πολυφωσφορικών ενώσεων (luxury uptake) και η αφομοίωση του P φαίνεται να εξαρτάται ισχυρά από τη συγκέντρωση του διαθέσιμου οργανικού άνθρακα.
- Υψηλά ποσοστά απομάκρυνσης του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  παρατηρήθηκαν, ανεξαρτήτως της αρχικής του συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα η απομάκρυνση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ήταν σχεδόν πλήρης (99%) εντός μόλις 3 h όταν η αρχική συγκέντρωση ήταν 10 mg/l. Όταν ωστόσο η αρχική συγκέντρωση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  αυξήθηκε στα 100 mg/l, η απομάκρυνση παρατηρήθηκε να αυξάνεται με αυξανόμενη την οργανική φόρτιση.
- Η ικανότητα που έχουν τα μικροάλγη να αφομοιώνουν με γρήγορους ρυθμούς το  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  μέσα στα κύτταρά τους αποτελεί μια πολύ σημαντική ιδιότητα των συστημάτων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων που κάνουν χρήση μικτών κοινοτήτων βακτηρίων-μικροαλγών. Η ικανότητα αυτή των μικροαλγών επιτρέπει την αποτελεσματική επεξεργασία αποβλήτων με μεγάλες διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ .
- Υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης  $\text{NO}_3\text{-N}$  και TN επιτεύχθηκαν στα υψηλότερα COD. Σε COD=600 mg/l, πλήρης απομάκρυνση του  $\text{NO}_3\text{-N}$  επιτεύχθηκε μέσα σε μόλις 5h ενώ σε COD=200 mg/l και COD=100mg/l παρατηρήθηκαν μικρότερες απομακρύνσεις (85% και 83% αντίστοιχα).
- Η Real time PCR έδειξε πλήρη απουσία του γονιδιακού τύπου amoA από τη μικροβιακή κοινότητα, τόσο για τα βακτήρια όσο και για τα αρχαία κάτω από όλες τις οργανικές και αμμωνιακές φορτίσεις που εφαρμόστηκαν στο σύστημα.
- Η ετερότροφη νιτροποίηση ακολουθούμενη από αερόβια απονιτροποίηση ήταν η κύρια διεργασία που ήταν υπεύθυνη για την απομάκρυνση του N, αν λάβει κανείς υπόψη τη δυνατότητα της μονάδας επεξεργασίας για απομάκρυνση του N από τη μία και την πλήρη απουσία οξειδωτών αμμωνίας από την άλλη. Ο ισχυρισμός αυτός ενισχύεται από τον αυξανόμενο αριθμό των nirK γονιδίων που

προσδιορίστηκαν στη μικροβιακή κοινότητα και ταυτόχρονα την απουσία των nirS γονιδίων.

- Το πλήθος των nirK γονιδίων δεν ακολουθεί κάποια συγκεκριμένη τάση κατά μήκος του υφάσματος και η αφθονία τους φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά από τη σύνθεση του εισερχόμενου αποβλήτου.
- Το πλήθος του γονιδιακού τύπου nosZ παρέμεινε σχεδόν δύο τάξεις μεγέθους μικρότερο από το πλήθος του γονιδιακού τύπου nirK, κάτι που ίσως δηλώνει αυξημένα ποσοστά εκπομπών N<sub>2</sub>O, αλλά δεν έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά.
- Το συγκεκριμένο σύστημα φαίνεται πως αποτελεί έναν εναλλακτικό και αποτελεσματικό τρόπο επεξεργασίας αποβλήτων από υδατοκαλλιέργειες, αλλά και πως μπορεί να ενσωματωθεί στη βιολογική επεξεργασία ενός κλειστού κυκλώματος εξυγίανσης οστράκων. Επομένως τα αποτελέσματα της έρευνας είναι ενθαρρυντικά για την εφαρμογή του συγκεκριμένου συστήματος στην επεξεργασία ενός αποβλήτου μεγάλης αλατότητας, με υψηλές συγκεντρώσεις N και P.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acharya, C., Nakhla, G. & Bassi, a, 2006. A novel two-stage MBR denitrification process for the treatment of high strength pet food wastewater. *Journal of hazardous materials*, 129(1-3), pp.194–203.
- Aguirre, P. et al., 2011. Treatment of piggery wastewater in experimental high rate algal ponds. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 2(2).
- Ahmad, I. & Hellebust, J. A., 1986. Pathways of Ammonium Assimilation in the Soil Alga *Stichococcus Bacillaris* Naeg. *New Phytologist*, 103(1), pp.57–68.
- Ahmed, Z. et al., 2007b. Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 287(2), pp.211–218.
- Al-Halbouni, D. et al., 2008. Correlation of EPS content in activated sludge at different sludge retention times with membrane fouling phenomena. *Water research*, 42(6-7), pp.1475–88.
- Allsopp, M. et al., 2008. Challenging the aquaculture industry on sustainability. Greenpeace research laboratories, University of Exeter.
- Von Alvensleben, N. et al., 2013. Salinity tolerance of *Picochlorum atomus* and the use of salinity for contamination control by the freshwater cyanobacterium *Pseudanabaena limnetica*. *PloS one*, 8(5), p.e63569.
- Apha, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16<sup>th</sup> Edition, *American public Health association*, Washington (1985).
- Avnimelech Y. 2006. Bio-filters: the need for a new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering*, 34, pp. 172-178.
- De-Bashan, et.al, 2005. Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS microbiology ecology* 54.2, pp. 197-203.
- Becker, E.W., 1994. Microalgae: Biotechnology and Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Benemann, J.R., 1979. Production of nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing blue-green algae. *Enzyme Microb. Technol.*, 1, pp. 83-90.
- Bhaya, D. et al., 2002. Molecular responses to environmental stress. In *The ecology of cyanobacteria*. Springer Netherlands, pp. 397-442.

- Boelee, N. C., et al., 2011. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. *Water research*, 45.18, pp. 5925-5933.
- Borowitzka, M.A., 1996. Closed algal photobioreactors: Design considerations for large - scale systems. *Journal of Marine Biotechnology*, 4, pp. 185-191.
- Borowitzka, M.A., 1998. Limits to growth. In: Y.-S. Wong and N.F.Y. Tam (Eds), *Wastewater treatment with algae*, Springer Verlag, pp. 203-226.
- Van den Broeck, R. et al., 2012. The influence of solids retention time on activated sludge bioflocculation and membrane fouling in a membrane bioreactor (MBR). *Journal of Membrane Science*, 401-402, pp.48–55.
- Brookes, a. et al., 2006. Sustainable Flux Fouling in a Membrane Bioreactor: Impact of Flux and MLSS. *Separation Science and Technology*, 41(7), pp.1279–1291.
- Buono, S. 2005. Impianti di acquacoltura a circuito chiuso: sistema di allevamento integrato - PhD Dissertation in “*Acquacultura*” (Indirizzo in produzioni marine e dulciacquicole) - University of Napoli —Federico III (Centro Interdipartimentale di Ricerca per l’Acquacoltura - CRIAcq).
- Caporaso JG. et al ,2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* ,7, pp.335-336.
- Chabalina L.D, Rodriguez. M and Prats D, Study of the Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Different Types of Membrane Bioreactor (MBR) Effluents *Water Pollution IX* :491-500(2007).
- Chae, S.-R. et al., 2006. Mitigated membrane fouling in a vertical submerged membrane bioreactor (VSMBR). *Journal of Membrane Science*, 280(1-2), pp.572–581.
- Chang, I.-S. & Kim, S.-N., 2005. Wastewater treatment using membrane filtration—effect of biosolids concentration on cake resistance. *Process Biochemistry*, 40(3-4), pp.1307–1314.
- Chojnacka Katarzyna, M.-R.F.-J., 2004. Energy and carbon metabolism in the culture of microalgae.pdf. *Biotechnology*, 3(1), pp.21–34.
- Defrance, L. & Jaffrin, M.Y., 1999. Reversibility of fouling formed in activated sludge ® ltration. , 157(November 1998), pp.73–84.
- Deng, X. et al., 2011. Simultaneously removal of COD, nitrogen and phosphorus from wastewater by coupling treatment system with immobilized algae-bacteria. *Huan jing ke xue= Huanjing kexue/[bian ji, Zhongguo ke xue yuan huan jing ke xue wei yuan hui" Huan jing ke xue" bian ji wei yuan hui.]*, 32(8), pp. 2311-2316.
- Deviller, G. et al., 2004. High-rate algal pond treatment for water reuse in an integrated marine fish recirculating system: effect on water quality and sea bass growth. *Aquaculture* 235.1, pp. 331-344.



- Dong, B. & Jiang, S., 2009. Characteristics and behaviors of soluble microbial products in sequencing batch membrane bioreactors at various sludge retention times. *Desalination*, 243(1-3), pp.240–250.
- Drews, A. et al., 2008. Does Fouling in MBR Depend on SMP ?. *Desalination*, 231, pp.1–8.
- Drews, A. et al., 2006. Influence of unsteady membrane bioreactor operation on EPS formation and filtration resistance. *Desalination*, 192(1-3), pp.1–9.
- Drews, A., 2010. Membrane fouling in membrane bioreactors—Characterisation, contradictions, cause and cures. *Journal of Membrane Science*, 363(1-2), pp.1–28.
- Durmaz, B. & Sanin, F.D., 2003. Effect of carbon to nitrogen ratio on the physical and chemical properties of activated sludge. *Environmental technology*, 24(11), pp.1331–40.
- Dvořák, L. et al., 2013. Nitrification performance in a membrane bioreactor treating industrial wastewater. *Water research*, 47(13), pp.4412–21.
- Fallah, N. et al., 2010. Long-term operation of submerged membrane bioreactor (MBR) for the treatment of synthetic wastewater containing styrene as volatile organic compound (VOC): Effect of hydraulic retention time (HRT). *Journal of hazardous materials*, 178(1-3), pp.718–24.
- FAN, X. et al., 1996. Nitrification and mass balance with a membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 34.1: 129-136.
- FAO ,2008 . Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farkas, J. et al., 1986. Effect of ultraviolet lamp on the microflora of a closed warm-water recycling system .*Aquaculture Hungary (Szarvas)*, 5, pp. 191–199.
- Fogg, G.E., 1975. Algal cultures and phytoplankton ecology. The University of Wisconsin Press, Wisconsin.
- Francis, C.A. et al., 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,102, pp.14683-14688.
- Gadd, G. M. (2008). Fungi and their role in the biosphere. *Encyclopedia of Ecology*, 1709-1717.
- Gao, D., Tao, Y. & An, R., 2012. Digested sewage treatment using membrane-based process at different hydraulic retention times. *Desalination*, 286, pp.187–192.
- Gao, M. et al., 2004. Nitrification and sludge characteristics in a submerged membrane bioreactor on synthetic inorganic wastewater. *Desalination*, 170(2), pp.177–185.

Geider, J.et. al., 1989. Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. *New Phytologist*, 112(3), pp. 327-341.

Gláucia da P. Lima, B.E.S., 2007. The spatial distribution of eubacteria and archaea in sand-clay columns degrading carbon tetrachloride and methanol. *Journal of contaminant Hydrology*, 94(1-2), pp.34-48.

De Godos, I. et al., 2009. Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates. *Bioresource technology* 100.19, pp. 4332-4339.

De Godos, I. et al., 2010. A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. *Bioresource technology*, 101(14), pp.5150-8.

González, C. et al. 2008. Efficient nutrient removal from swine manure in tubular biofilm photo-bioreactor using algae-bacteria consortia. *Water Science & Technology* 58.1.

González , F.,et al. 2011. Nitrogen transformations under different conditions in open ponds by means of microalgae-bacteria consortium treating pig slurry. *Bioresource technology* 102.2, pp. 960-966.

Grima, E.M et.al., 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J. Biotechnol.*, 70(1-3), pp. 231-247.

Guadie, A. et al., 2013. Simultaneous removal of phosphorus and nitrogen from sewage using a novel combo system of fluidized bed reactor-membrane bioreactor (FBR-MBR). *Bioresource technology*, 149C, pp.276-285.

Gunder, B. & Krauth, K., 1999. replacement of secondary clarification.pdf. *Water Science Technology*, 40(4-5), pp.311-20.

Guo, Z. et al., 2013. Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of Environmental Sciences* 25, pp. S85-S88.

Gutierrez-Wing M.T. & Malone R.F. 2006. Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering*, 34, pp. 163-171.

Van der Ha, D. et al., 2011. A sustainable, carbon neutral methane oxidation by a partnership of methane oxidizing communities and microalgae. *Water research*, 45(9), pp.2845-54.

Hammer Ø.et al.,2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:XIX-XX.

- Hata, Jun-ichi, et al., 2000 .Characterization of energy conversion based on metabolic flux analysis in mixotrophic liverwort cells, *Marchantia polymorpha*. *Biochemical engineering journal* 6.1, pp. 65-74.
- Han, S.-S. et al., 2005. Influence of sludge retention time on membrane fouling and bioactivities in membrane bioreactor system. *Process Biochemistry*, 40(7), pp.2393–2400.
- He, S., Xue, G. & Wang, B., 2009. Factors affecting simultaneous nitrification and de-nitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. *Journal of hazardous materials*, 168(2-3), pp.704–10.
- He, P.J. et al., 2013.The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*, 146, pp. 562-568.
- Henry, S. et al., 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *J. Microbiol. Methods*, 59, pp.327-335.
- Henry, S. et al., 2006. Quantitative Detection of the nosZ Gene, Encoding Nitrous Oxide Reductase, and Comparison of the Abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ Genes in Soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, pp. 5181-5189.
- Herbeck, L.S. et al., 2013. Effluent, nutrient and organic matter export from shrimp and fish ponds causing eutrophication in coastal and back-reef waters of NE Hainan, tropical China. *Continental Shelf Research*, 57, pp.92–104.
- Hernández, D. et al., 2013. Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. *Bioresource technology* 135, pp.598-603.
- Hocaoglu, S.M. et al., 2011. Effect of low dissolved oxygen on simultaneous nitrification and denitrification in a membrane bioreactor treating black water. *Bioresource technology*, 102(6), pp.4333–40.
- Hong, S. et al., 2012. Influence of hydraulic retention time on the nature of foulant organics in a high rate membrane bioreactor. *Desalination*, 287, pp.116–122.
- Hong, S.P. et al., 2002. Fouling control in activated sludge submerged hollow fiber membrane bioreactors. , 143.
- Huang, Z., Ong, S.L. & Ng, H.Y., 2011. Submerged anaerobic membrane bioreactor for low-strength wastewater treatment: effect of HRT and SRT on treatment performance and membrane fouling. *Water research*, 45(2), pp.705–13.

- Hodoki, Y. 2005. Bacteria biofilm encourages algal immigration onto substrata in lotic systems. *Hydrobiologia*, 539(1), pp. 27-34.
- Holmes, P. E. (1986). Bacterial enhancement of vinyl fouling by algae. *Applied and environmental microbiology*, 52(6), 1391-1393.
- James, D. E. (1978). *Culturing algae*. Carolina Biological Supply Company.
- Janga, N. et al., 2007. Characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for water reuse. *Desalination*, 202(1-3), pp.90–98.
- Ji, L. & Zhou, J., 2006. Influence of aeration on microbial polymers and membrane fouling in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*, 276(1-2), pp.168–177.
- Jin, Y.-L. et al., 2006. Effect of DO concentration on biofilm structure and membrane filterability in submerged membrane bioreactor. *Water research*, 40(15), pp.2829–36.
- Judd, S., 2008. The status of membrane bioreactor technology. *Trends in biotechnology*, 26(2), pp.109–16.
- Kang, I.-J., Lee, C.-H. & Kim, K.-J., 2003. Characteristics of microfiltration membranes in a membrane coupled sequencing batch reactor system. *Water research*, 37(5), pp.1192–7.
- Khan, M. & Yoshida, N., 2008. Effect of L-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris* NTM06. *Bioresource technology*, 99(3), pp.575–82
- Kuczynski J. et al., 2012. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature reviews Genetics* ,13, pp.47-58.
- Lahav, O., et al., 2009. Quantification of anammox activity in a denitrification reactor for a recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, 288, pp. 76-82.
- Larsdotter, K., 2006. *Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate. A doctoral thesis from the school of Biotechnology, Stockholm, Sweden.*
- Laspidou, C.S. & Rittmann, B.E., 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water research*, 36(11), pp.2711–20.
- Le-Clech, P., Chen, V. & Fane, T. a. G., 2006. Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, 284(1-2), pp.17–53.
- Le-Clech, P., Jefferson, B. & Judd, S., 2003. Impact of aeration, solids concentration and membrane characteristics on the hydraulic performance of a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, 218(1-2), pp.117–129.

- Li, X.-F. et al., 2008. Correlation between extracellular polymeric substances and aerobic biogranulation in membrane bioreactor. *Separation and Purification Technology*, 59(1), pp.26–33.
- Li, Y.Z. et al., 2008. Simultaneous nitrification-denitrification achieved by an innovative internal-loop airlift MBR: comparative study. *Bioresource technology*, 99(13), pp.5867–72.
- Liang, S., Liu, C. & Song, L., 2007. Soluble microbial products in membrane bioreactor operation: Behaviors, characteristics, and fouling potential. *Water research*, 41(1), pp.95–101.
- Liu, R. et al., 2005. Operational performance of a submerged membrane bioreactor for reclamation of bath wastewater. *Process Biochemistry*, 40(1), pp.125–130.
- Losordo ,T.M., 1998. Recirculating aquaculture tank production systems: an overview of critical considerations - Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 451.
- Lubbecke, S., Vogelpohl, A. & Dewajanin, W., 1995. Wastewater treatment in a b i o l o g i c a l high-performance system with high biomass concentration. *Water research* 29(3), pp.793–802.
- Luonsia, A. et al., 2002. Separation of CTMP mill-activated sludge with ceramic membranes. *Desalination*, 146, pp.399–404.
- Lymbery, A.J. et al., 2013. The potential of a salt-tolerant plant (*Distichlis spicata* cv. NyPa Forage) to treat effluent from inland saline aquaculture and provide livestock feed on salt-affected farmland. *The Science of the total environment*, 445-446, pp.192–201.
- MacDonald R. & Brözel V.S. 2000. Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling–water systems by fluorescent in situ hybridization with rRNA–targeted oligonucleotide probes .*Water Research*, 34, pp. 2439–2446.
- Maity, J.P. et al., 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives–A mini review. *Energy*.
- Malone R.F. & Pfeiffer T.J. 2006. Rating fixed film nitrifying biofilters used in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 34, pp. 389–402.
- Martins, C.I.M. et al., 2010. New developments in recirculating aquaculture systems in Europe: A perspective on environmental sustainability. *Aquacultural Engineering*, 43(3), pp.83–93.
- McGinn, P. J., et al., 2011. Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: opportunities and limitations. *Photosynthesis research* , 109.1-3, pp. 231-247.

Masser, M.P. et al., 1992. Recirculating aquaculture tank production systems: Management of Recirculating Systems - Southern Regional Aquaculture Center Publication No. 452.

Medina, M. & Neis, U. 2007. Symbiotic algal bacterial wastewater treatment: effect of food to microorganism ratio and hydraulic retention time on the process performance. *Water Science & Technology* , 55.11.

Meng, F. et al., 2007. Effect of hydraulic retention time on membrane fouling and biomass characteristics in submerged membrane bioreactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 30(5), pp.359–67.

Meng, F. et al., 2009. Recent advances in membrane bioreactors (MBRs): membrane fouling and membrane material. *Water research*, 43(6), pp.1489–512.

Metcalf and Eddy, Inc., Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. McGraw-Hill, New York (2003).

Metaxa, E. et al., 2006. High rate algal pond treatment for water reuse in a marine fish recirculation system: Water purification and fish health. *Aquaculture*, 252(1), pp. 92-101.

Michaud, L. et al., 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural Engineering*, 34, pp. 224-233.

Møller, S. et al., 1998. In situ gene expression in mixed– culture biofilms: evidence of metabolic interaction between community members. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, pp. 721–732.

Mutamim, N.S.A. et al., 2013. Membrane bioreactor: Applications and limitations in treating high strength industrial wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 225, pp.109–119.

Nunez, V.J. et al., 2001. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresource Technology*, 78(2), pp. 161-164.

Moore, E. R. B., et al. 1999. Simplified protocols for the preparation of genomic DNA from bacterial cultures. *Molecular microbial ecology manual*, 1.1, pp. 1-15.

Oliver, R.L. & Ganf, G.G. 2000. Freshwater blooms. In: B.A. Whitton and M. Potts (Eds), *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, Kluwer, Dordrecht, pp.149-194.

Oswald, W.J., 1963. The high-rate pond in waste disposal. *Dev. Ind. Microbiol.*, 4, pp. 1-119.

Oswald, W.J. & Gotaas, H.B., 1957. Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.*, 122, pp. 73-105.

Paetkau, M. & Cicek, N., 2011. Comparison of nitrogen removal and sludge characteristics between a conventional and a simultaneous nitrification–denitrification membrane bioreactor. *Desalination*, 283, pp.165–168.

Paranychianakis, N.V. et al ,2013. Nitrogen cycling and relationships between ammonia oxidizers and denitrifiers in a clay-loam soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, pp. 5507-5515.

Patel, A. et al., 2012. Microalgae for phosphorus removal and biomass production: a six species screen for dual-purpose organisms. *GCB Bioenergy*, 4(5), pp .485-495.

Pepper, I.L&Gerba,C. 2004. Environmental Microbiology-a Laboratory Manual (second edition). Elsevier , Academic Press.

Perez-Garcia, O. et al., 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), pp.11–36

Piedrahita, R.H. 2003. Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation . *Aquaculture*, 226, pp. 35–44.

Pochana, K. & Keller, J., 1999. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification. *Water Science Technology*, 39(6), pp.61–68.

Powell, N. et al., 2008. Factors influencing luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilization ponds. *Environmental science & technology*, 42.16, pp. 5958-5962.

Powell, N. et al., 2011. Luxury uptake of phosphorus by microalgae in full-scale waste stabilisation ponds. *Water Science & Technology*, 63(4).

Prado, N., Ochoa, J. & Amrane, A., 2009. Zero Nuisance Piggeries: long-term performance of MBR (membrane bioreactor) for dilute swine wastewater treatment using submerged membrane bioreactor in semi-industrial scale. *Water research*, 43(6), pp.1549–58.

Qin, G. et al., 2005. Aquaculture wastewater treatment and reuse by wind-driven reverse osmosis membrane technology: a pilot study on Coconut Island, Hawaii. *Aquacultural Engineering*, 32, pp. 365–378.

Qin, H. et al, 2014. Rapid soil fungal community response to intensive management in a bamboo forest developed from rice paddies. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, pp. 177-s184.

Rahman, M.M. & Al-Malack, M.H., 2006. Performance of a crossflow membrane bioreactor (CF-MBR) when treating refinery wastewater. *Desalination*, 191(1-3), pp.16–26.

- Randall D.J. & Wright P.A., 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3, pp. 107–120.
- Read, P. & Fernandes, T., 2003. Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture*, 226(1-4), pp.139–163.
- Richmond, A., 1990. Large scale microalgal culture and applications. (Eds), Progress in Phycological Research, 7, Biopress Ltd, Bristol, 269-330.
- Van Rijn, J., 1996. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture - A review . *Aquaculture*, 139, pp. 181–201.
- Van Rijn, J., 2013. Waste treatment in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 53, pp.49–56.
- Robertson, L.A. et al, 1989. Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 56, pp. 289-299.
- Rosenberger, S. et al., 2005. The importance of liquid phase analyses to understand fouling in membrane assisted activated sludge processes—six case studies of different European research groups. *Journal of Membrane Science*, 263(1-2), pp.113–126
- Rosenberger, S. et al., 2006. Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water research*, 40(4), pp.710–20.
- Rotthauwe, J.H. et al., 1997. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, pp 4704-4712.
- Ruiz-Martinez. et al., 2012. Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresource technology*, 126, pp.247–53.
- Rusten, B. et al., 2006. Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquaculture Engineering*, 34, pp. 322-331.
- Sarà, G. et al., 2011. Impacts of marine aquaculture at large spatial scales: evidences from N and P catchment loading and phytoplankton biomass. *Marine environmental research*, 71(5), pp.317–24.
- Schreier, H.J. et al., 2010. Microbial diversity of biological filters in recirculating aquaculture systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, pp. 318–325.
- Schneider, O. et al., 2007. HRT and nutrients affect bacterial communities grown on recirculation aquaculture system effluents .*FEMS Microbiology Ecology*, 60, pp. 207-219.



Sesay, M.L., Ozcengiz, G. & Dilek Sanin, F., 2006. Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on biofloculation. *Water research*, 40(7), pp.1359–66.

Sharrer ,M.J. et al., 2005. Inactivation of bacteria using ultraviolet irradiation in a recirculating salmonid culture system. *Aquaculture Engineering*, 33, pp. 135-149.

Shin, J.-H. et al., 2005. Enhanced COD and nitrogen removals for the treatment of swine wastewater by combining submerged membrane bioreactor (MBR) and anaerobic upflow bed filter (AUBF) reactor. *Process Biochemistry*, 40(12), pp.3769–3776.

Silva, A.F. et al., 2012. Microbial population analysis of nutrient removal-related organisms in membrane bioreactors. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(5), pp.2171–80.

Smart, G.R. 1978. Investigation of the toxic mechanisms of ammonia to fish–gas exchange in rainbow trout exposed to acutely lethal concentration .*Journal of Fish Biology*, 12, pp. 93–104.

Smayda, T.J., 2008. Complexity in the eutrophication–harmful algal bloom relationship, with comment on the importance of grazing. *Harmful Algae*, 8(1), pp.140–151.

Su, Y., Mennerich, A. & Urban, B., 2011. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water research*, 45(11), pp.3351–8.

Subashchandrabose, S.R. et al., 2011. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnology advances*, 29(6), pp.896–907.

Summerfelt, S.T. et al., 2009. Process requirements for achieving full-flow disinfection of recirculating water using ozonation and UV irradiation. *Aquacultural Engineering*, 40, pp. 17–27.

Tal, Y. et al., 2009. Environmentally sustainable land-based marine aquaculture. *Aquaculture*, 286(1-2), pp.28–35.

Thomas, Y. et al., 2010. Spatial and temporal extension of eutrophication associated with shrimp farm wastewater discharges in the New Caledonia lagoon. *Marine pollution bulletin*, 61(7-12), pp.387–98.

Thurston, R.V. et al, 1981. Ammonia toxicity to fishes: effect of pH on the toxicity of the un-ionized ammonia species. *Environmental Science and Technology*, 15, pp. 837-840.

Throbäck, I.N. et al., 2004. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* ,49, pp.401-417.

- Thurston, R.V. et al., 1984. Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113, pp. 56–73.
- Trussell, R.S. et al., 2006. The effect of organic loading on process performance and membrane fouling in a submerged membrane bioreactor treating municipal wastewater. *Water research*, 40(14), pp.2675–83.
- Viero, a, Santannajr, G. & Nobrega, R., 2007. The use of polyetherimide hollow fibres in a submerged membrane bioreactor operating with air backwashing. *Journal of Membrane Science*, 302(1-2), pp.127–135.
- Viero, A.F. & Sant'anna, G.L., 2008. Is hydraulic retention time an essential parameter for MBR performance? *Journal of hazardous materials*, 150(1), pp.185–6.
- Vyrides, I. & Stuckey, D.C., 2009. A modified method for the determination of chemical oxygen demand (COD) for samples with high salinity and low organics. *Bioresource technology*, 100(2), pp.979–82.
- Wang, Z. et al., 2012. Removal of COD, phenols and ammonium from Lurgi coal gasification wastewater using A2O-MBR system. *Journal of hazardous materials*, 235-236, pp.78–84.
- Wang, C. et al., 2013. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp. *Journal of Environmental Biology*, 34.
- Webb, J.M. et al., 2012. Halophyte filter beds for treatment of saline wastewater from aquaculture. *Water research*, 46(16), pp.5102–14.
- Wu, L.F. et al., 2012. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource technology*, 113, pp.14–8.
- Ye, F., Ye, Y. & Li, Y., 2011. Effect of C/N ratio on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge flocs. *Journal of hazardous materials*, 188(1-3), pp.37–43.
- Yilmaz, G. et al., 2007. Effectiveness of an alternating aerobic, anoxic/anaerobic strategy for maintaining biomass activity of BNR sludge during long-term starvation. *Water research*, 41(12), pp.2590–8.
- Ying, Z. & Ping, G., 2006. Effect of powdered activated carbon dosage on retarding membrane fouling in MBR. *Separation and Purification Technology*, 52(1), pp.154–160.
- Yoon Kim, H. et al., 2006. Biofilm Structure and Extracellular Polymeric Substances in Low and High Dissolved Oxygen Membrane Bioreactors. *Separation Science and Technology*, 41(7), pp.1213–1230.
- Yu, H.-Y. et al., 2008. Surface modification of polypropylene microporous membrane to improve its antifouling characteristics in an SMBR: Air plasma treatment. *Journal of Membrane Science*, 311(1-2), pp.216–224.

Zhang, J. et al., 2006a. Factors affecting the membrane performance in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*, 284(1-2), pp.54–66.

Zhang, J. et al., 2006b. Factors affecting the membrane performance in submerged membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*, 284(1-2), pp.54–66.

Zhang, J. et al., 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresource technology*, 102(21), pp.9866–9.

Zhu, S. et al., 2002. Evaluation of UV disinfection performance in recirculating systems - *International Journal of Recirculating Aquaculture*, 3, pp. 61–79.

