

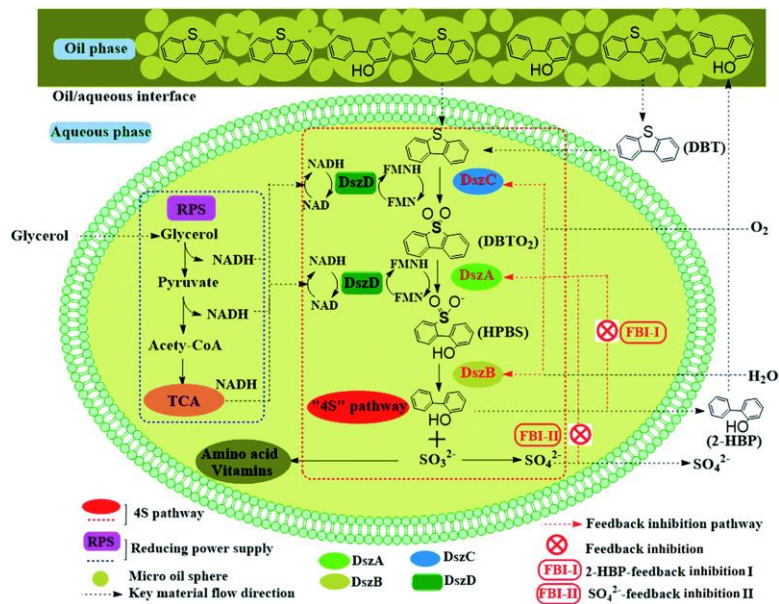


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



## Μικροβιακή αποθείωση κλασμάτων πετρελαίου

Καλογερόπουλος Παναγιώτης

Επιβλέπων καθηγητής: Δημήτρης Κέκος

Καθηγητής Ε.Μ.Π.



# Ευχαριστίες

---

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ε.Μ.Π. Δημήτριου Κέκου. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγητή του Ε.Μ.Π., Δημήτριο Κέκο για την ανάθεση του θέματος και τις γνώσεις που μας μετέδωσε με την διδασκαλία του αυτά τα χρόνια.

Επίσης οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Διομή Μαμμά για την επιστημονική υποστήριξη, την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της, καθ' όλη την διάρκεια πραγματοποίησής της διπλωματικής καθώς και για την υπομονή που έδειξε. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα του Ε.Μ.Π. Κωνσταντίνο Δήμο για τη συνεχή βοήθεια του όλο το διάστημα που ήμουν διπλωματικός στο εργαστήριο. Οι γνώσεις του και η μεταδοτικότητα του έκαναν την πραγματοποίηση και τη συγγραφή αυτής της διπλωματικής ένα πολύ ευκολότερο έργο.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που μου προσέφεραν. Τέλος, θα ήθελα να δώσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, για την στήριξή της, όχι μόνο κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας αλλά καθ' όλη την διάρκεια του κύκλου σπουδών μου.



# Πίνακας περιεχομένων

---

Περίληψη .....	7
Abstract .....	9
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
1. Γενικά για το πετρέλαιο.....	12
1.1 Οι απαιτήσεις για πετρέλαιο .....	12
1.2 Η προέλευση του πετρελαίου .....	15
1.2.1 Θεωρία οργανικής προέλευσης.....	15
1.2.2 Ανόργανη θεωρία προέλευσης.....	16
1.3 Τα εκμεταλλεύσιμα κοιτάσματα υδρογονανθράκων στην Ελλάδα .....	17
1.4 Κατηγοριοποιήσεις του πετρελαίου .....	17
1.5 Η σύσταση του πετρελαίου .....	19
2. Το Θείο στο πετρέλαιο .....	20
2.1 Η προέλευση του Θείου .....	21
2.2 Τα είδη των θειούχων συστατικών στο πετρέλαιο .....	22
2.3 Το πρόβλημα με το Θείο.....	27
2.3.1 Διάβρωση.....	28
2.3.2 Καταλύτες.....	28
2.4 Πρόβλημα με το SO <sub>2</sub> .....	29
2.4.1 Όξινη βροχή.....	30
2.4.2 Τα αποτελέσματα τις όξινης βροχής.....	32
2.5 Πρόβλημα με το H <sub>2</sub> S.....	33
3. Νομοθεσία.....	35
4. Υδρογονοαποθείωση .....	36
5. Υπερ-αποθείωση .....	38
6. Βιοαποθείωση .....	39
6.1 Αναερόβια αποθείωση.....	40
6.2 Αερόβια αποθείωση.....	41
6.2.1 Το μονοπάτι Kodama.....	41
6.2.2 Μονοπάτι 4S .....	42
6.3 Φαινόμενα μεταφοράς μάζας στην βιοαποθείωση.....	45
6.4 Τα προβλήματα σχετικά με την βιοαποθείωση .....	47
7. Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποθείωση .....	47
7.1 Χρονική διάρκεια αποθείωσης (Growing Cells) .....	48
7.2 pH και θερμοκρασία .....	49
7.3 Επίδραση της συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου.....	50
7.4 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας .....	51
7.5 Επίδραση της ηλικίας του βιοκαταλύτη .....	53
7.6 Η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης DBT .....	54

7.7 Η επίδραση του είδους του θειικού μορίου .....	55
7.8 Επίδραση της μεταφοράς μάζας .....	57
7.9 Επίδραση του οργανικού διαλύτη και του λόγου οργανικής προς την υδατική φάση .....	58
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
8. Υλικά .....	61
8.1 Αντιδραστήρια - Διαλύτες .....	61
8.2 Συσκευές και Όργανα .....	61
8.3 Μικροοργανισμοί .....	62
8.4 Θρεπτικά Μέσα ανάπτυξης .....	62
9. Μέθοδοι .....	63
9.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου σε τρυβλία.....	63
9.2 Ανάπτυξη του βακτηρίου σε υγρή καλλιέργεια .....	63
9.2.1 Προκαλλιέργεια.....	63
9.2.2 Καλλιέργεια.....	64
9.3 Βιοαποθείωση DBT από μη αναπτυσσόμενα κύτταρα .....	64
9.3.1 Υδατικά συστήματα .....	64
9.3.2 Διφασικά συστήματα .....	65
9.4 Δειγματοληψία .....	66
9.5 Αναλύσεις .....	66
9.5.1 Ανάλυση ολικού θείου .....	70
9.5.2 Προσδιορισμός κυτταρικής ανάπτυξης .....	70
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	71
10. Απώλεια μάζας .....	72
11. Μελέτη παραμέτρων βιοαποθείωσης .....	74
11.1 Ηλικία Βιοκαταλύτη .....	74
11.1.1 Πείραμα 1.....	74
11.1.2 Πείραμα 2.....	77
11.2 Συγκέντρωση βιομάζας.....	79
11.2.1 Υδατικό Σύστημα.....	79
11.2.2 Διφασικό σύστημα .....	82
11.2.3 Σύγκριση υδατικού – διφασικού συστήματος αποθείωσης.....	85
11.3 Πείραμα συγκεντρώσεων DBT .....	88
11.3.1 Υδατικό σύστημα .....	88
11.3.2 Διφασικό σύστημα .....	91
11.4 Βιοαποθειωτικό Τεστ.....	93
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	105

# Περίληψη

---

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την βιοαποθειωτική ικανότητα του βακτηρίου *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 στη διάσπαση του DBT και τη μετατροπή του σε 2-HBP, σε υδατικά και διφασικά συστήματα μη αναπτυσσόμενων κυττάρων (resting cells).

Μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας του βιοκαταλύτη στην βιοαποθειωτική ικανότητα των κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κύτταρα ηλικίας **64 h** δεν είχαν αποθειωτική δράση, ενώ αυτά των **40 h** εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά και ρυθμούς κατανάλωσης DBT.

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης βιομάζας στην βιοαποθειωτική ικανότητα. Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε υδατικά συστήματα προσδιορίστηκε ο βέλτιστος ρυθμός κατανάλωσης DBT **4.1775 ± 0.3701 μmol/g DCW/h** για συγκέντρωση βιομάζας **2.5 g DCW/L**, ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής 2-HBP προσδιορίστηκε στα **0.5794 μmol/g DCW/h** για **5 gDCW/L**. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μετά από τη συγκέντρωση 7.5 g DCW/L η περεταίρω αύξηση της βιομάζας δεν οδηγεί σε αύξηση της βιοαποθειωτικής ικανότητας. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από τους (Caro et al, 2007) και εικάζεται πως οφείλεται στα φαινόμενα μεταφοράς οξυγόνου και σε παρεμπόδιση που προκαλεί το 2-HBP.

Από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε διφασικά συστήματα προσδιορίστηκε ο βέλτιστος ρυθμός κατανάλωσης DBT **2.4335 ± 1.3502 μmol/g DCW/h** για συγκέντρωση βιομάζας **7.5 g DCW/L**, ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής 2-HBP προσδιορίστηκε **στα 1.2103 ± 0.0340 μmol/g DCW/h** για **10 g DCW/L**. Στα διφασικά συστήματα εκτός από το DBT μετρήθηκε και το ολικό θείο. Προέκυψε πως όλα τα ποσοστά όσον αφορά το 2-HBP, το DBT και το ολικό θείο ήταν γραμμικά συναρτήσει της συγκέντρωσης βιομάζας. Τα μέγιστα ποσοστά αποθείωσης παρατηρήθηκαν για συγκέντρωση βιομάζας **20 g**

**DCW/L** ως εξής: ποσοστό βιοαποθείωσης (XBDS)**20.31 ± 2.95%**, ποσοστό κατανάλωσης DBT **45.33 ± 9.92%**, ποσοστό κατανάλωσης ολικού θείου **47.78 ± 5.27%**.

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης DBT στο σύστημα. Από τα πειράματα που έγιναν στο υδατικό σύστημα για διαφορετικές συγκεντρώσεις DBT προέκυψε ότι ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης DBT στα **1.8426 ± 0.904 μmol/g DCW/h** για αρχική συγκέντρωση DBT **1.5mM**. Σχετικά με τον ρυθμό παραγωγής του 2-HBP, φαίνεται ότι είναι σχετικά σταθερός με μια μέση τιμή **0.6140 ± 0.0428 μmol/gDCW/h**. Η ανάλυση των ποσοστών δείχνει ότι το μέγιστο ποσοστό βιοαποθείωσης (XBDS) παρουσιάστηκε για αρχική συγκέντρωση DBT **0.4mM** ίσο με **22.09 ± 1.43%**, ενώ για αρχική συγκέντρωση DBT **0.8mM** παρατηρήθηκε το μέγιστο ποσοστό κατανάλωσης **38.10 ± 2.60%**. Επίσης παρατηρήθηκε πως η μέγιστη δυνατή συγκέντρωση 2-HBP που μπορεί να επιτευχθεί, είναι λίγο πάνω από τα **100 μM**, αυτό οφείλεται στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας αλλά και στην παρεμπόδιση των ενζύμων που ευθύνονται για την αποθείωση του DBTT από το τελικό προϊόν της αντίδρασης αποθείωσης.

Ο ρυθμός παραγωγής 2-HBP στο διφασικό σύστημα εμφάνισε μέγιστο για αρχική συγκέντρωση DBT **5mM** και βρέθηκε ίσος με **0.9845 ± 0.1702 μmol/gDCW/h**. Πράγμα που δείχνει ότι ο ρυθμός για το διφασικό σύστημα είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο για το υδατικό. Το μέγιστο ποσοστό βιοαποθείωσης (XBDS) βρέθηκε **16.39%** για αρχική συγκέντρωση DBT **10mM**.

Εκτός από τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε βιοαποθειωτικό τεστ στο οποίο έγινε μελέτη της βιοαποθειωτικής ικανότητας συναρτήσεως του χρόνου. Προέκυψε ρυθμός παραγωγής 2-HBP ίσος με **1.0885 μmol/gDCW/h**.

Επιπλέον, μετρήθηκε η βιοαποθειωτική ικανότητα για το πρώτο 2ωρο της αντίδρασης συναρτήσεως της συγκέντρωσης βιομάζας και προέκυψε ρυθμός παραγωγής 2-HBP ίσος με **0,9305 μmol/gDCW/h**.



# Abstract

---

The purpose of this thesis is the study of parameters effecting the desulfurization capability of the bacterial strain *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 to convert DBT to 2-HBP in aquatic and biphasic resting cell systems.

The effect of biocatalyst age on biodesulfurization capability was studied. Results clearly showed that cells taken after **64 h** of cultivation time were not able to desulfurize DBT, whereas, those taken after **40 h** of cultivation exhibited the greater desulfurization rates and percentages.

Moreover, the effect of biomass concentration on biodesulfurization was studied. Experiments conducted on aquatic systems showed highest DBT consumption rate **4.1775 ± 0.3701 μmol/gDCW/h** for biomass concentrations of **2.5 gDCW/L** and highest 2-HBP production rate at **0.5794 μmol/gDCW/h** for **5 gDCW/L** biomass concentrations. Results prove that when biomass concentrations are higher than 7.5 gDCW/L the desulfurization capability of the biocatalyst decreases. This result is also confirmed by Caro et al, (2007) and is suggested that is due to oxygen transfer limitations and 2-HBP inhibition.

Test conducted on biphasic systems exhibited highest DBT consumption rates of **2.4335 ± 1.3502 μmol/gDCW/h** for biomass concentrations of **7.5 gDCW/L** and highest 2-HBP production rates at **1.2103 ± 0.0340 μmol/gDCW/h** for **10 gDCW/L** biomass concentration. In biphasic systems the overall sulfur consumption was also studied. Desulfurization percentages concerning 2-HBP, DBT and total sulfur were linear with biomass concentration. Highest desulfurization percentages were observed for the highest biomass concentration of **20 gDCW/L** as follows: 2-HBP production percentage **20.31 ± 2.95%**, DBT consumption percentage **45.33 ± 9.92%**, total sulfur consumption percentage **47.78 ± 5.27%**.

Furthermore, the effect of initial DBT concentration on desulfurization capability was studied. Experiments on the aquatic system for different initial DBT concentrations showed highest DBT consumption rate at **1.8426 ± 0.904 μmol/gDCW/h** for initial concentration of **1.5mM**. Concerning the 2-HBP rate, it seems constant around a mean value of **0.6140 ± 0.0428 μmol/gDCW/h**. Desulfurization percentages analysis exhibited highest 2-HBP production percentage at **0.4mM** equal to **22.09 ± 1.43%**, whereas highest DBT consumption percentage was found to occur when initial DBT concentration was **0.8mM** equal to **38.10 ± 2.60%**. Also, it was observed that highest possible 2-HBP concentration was just above **100 μM**, which is due to the mass transfer limitations and the toxicity of reaction products towards the cells.

Production rate of 2-HBP on biphasic system showed a peak for initial concentration of DBT **5mM** equal to **0.9845 ± 0.1702 μmol/gDCW/h**. This proves that the rates for biphasic systems are generally higher than the aquatic. Highest 2-HBP percentage was found to be **16.39%** for initial DBT concentration of **10mM**.

Apart from the above, a biodesulfurization test was held, in which the biodesulfurization capability was studied with reaction time. 2-HBP production rate of **1.0885 μmol/gDCW/h** occurred.

Moreover, the effect of biomass concentration on biodesulfurization for the first two hours of reaction was studied and 2-HBP rate of **0,9305 μmol/gDCW/h** occurred.

# **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## **1. Γενικά για το πετρέλαιο**

Παρά τις προσπάθειες για χρήση εναλλακτικών πηγών ενέργειας ακόμα και σήμερα το 83% της παγκόσμιας ενέργειας προέρχεται από ορυκτά καύσιμα, από τα οποία περίπου τα μισά προέρχονται από αργό πετρέλαιο. Η κατάσταση αυτή δεν αναμένεται να αλλάξει άμεσα, έτσι σε συνδυασμό με τα περιβαλλοντικά και τεχνοοικονομικά προβλήματα που συνεπάγεται η εκμετάλλευση του πετρελαίου, η ανάγκη για βελτιστοποίηση των μεθόδων και διεργασιών γύρω από την διύλιση του πετρελαίου κρίνεται απαραίτητη. Στα πλαίσια αυτών των τάσεων κινείται και η παρούσα εργασία που αφορά την απομάκρυνση του θείου από το πετρέλαιο και τα προϊόντα του, με τη χρησιμοποίηση βιολογικών συστημάτων.

### **1.1 Οι απαιτήσεις για πετρέλαιο**

Σύμφωνα με τον OPEC το 2017 ήταν ο τρίτος συνεχόμενος χρόνος που οι παγκόσμιες απαιτήσεις για πετρέλαιο εντάθηκαν σημειώνοντας ετησία αύξηση 1.7% από το προηγούμενο έτος. Κυριότερος λόγος για αυτή την αύξηση είναι η σταθεροποίηση της οικονομίας. Το μεγαλύτερο μέρος της ζήτησης προέρχεται από τον βιομηχανικό τομέα και τον τομέα μεταφορών.

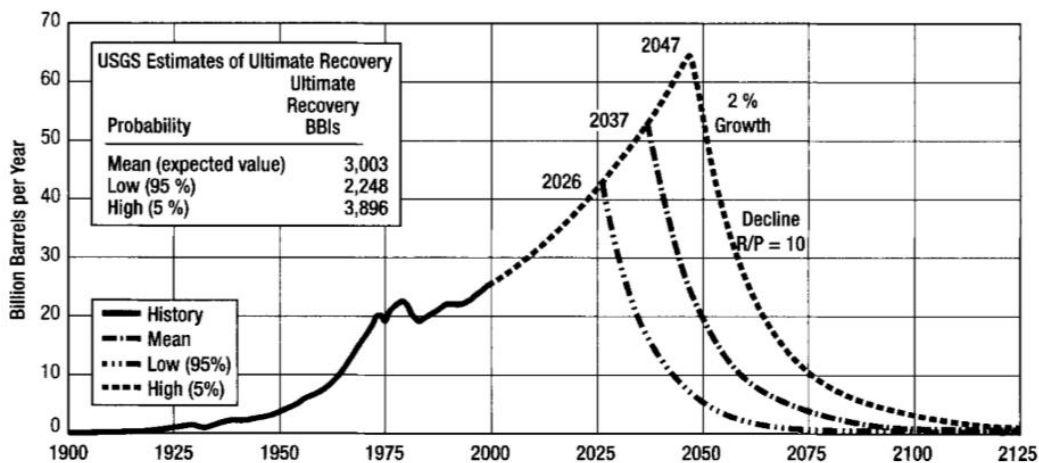
Ταυτόχρονα, η παγκόσμια παροχή πετρελαίου αυξήθηκε κατά 0.71 mb/d σε συνολικά 96.51 mb/d το 2017 (OPEC, 2017).

Πίνακας 1.1: Παγκόσμιες απαιτήσεις και προσφορά σε πετρέλαιο από τις χώρες του OPEC 2014-2017

<b>Παγκόσμια Ζήτηση (mb/d)</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>
<i>OECD</i>	45.8	46.4	46.9	47.4
<i>OECD Αμερικής</i>	24.2	24.6	24.7	25
<i>OECD Ευρώπης</i>	13.5	13.8	14.0	14.2
<i>OECD Ασίας</i>	8.1	8.1	8.1	8.2
<i>DCs</i>	30.1	30.8	31.4	31.9
<i>FSU</i>	4.7	4.6	4.6	4.7
<i>Υπόλοιπη Ευρώπη</i>	0.7	0.7	0.7	0.7
<i>Κίνα</i>	10.8	11.5	11.8	12.3
<i>Συνολική ζήτηση</i>	92.0	94.0	95.7	97.0
<i>Παγκόσμια παροχή</i>	92.6	95.5	95.8	96.6
<i>Ισοζύγιο</i>	0.6	1.5	0.4	-0.5

Η παγκόσμια παραγωγή αργού πετρελαίου αναμένεται να αυξηθεί για να ανταποκριθεί στις όλο και αυξανόμενες απαιτήσεις της αγοράς. Το 75% της παγκόσμιας αύξησης θα προέρχεται από τον Οργανισμό Εξαγωγών Πετρελαιοπαραγωγών Χωρών (OPEC). Η μείωση της παροχής αργού από την Ευρώπη, την ανατολική Ασία και τη Βόρεια Αμερική αναμένεται να αντισταθμιστεί από αύξηση των υποθαλάσσιων κοιτασμάτων της Βραζιλίας.

Σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε το 2003 από το Offshore Magazine η παραγωγή πετρελαίου αναμένεται να φτάσει τη μέγιστη τιμή της ανάμεσα στο 2021 και το 2112 αναλόγως με το ποσοστό αύξησης στη ζήτηση. Ένα πιθανό σενάριο που μελετήθηκε φαίνεται στο διάγραμμα 1. Σε αυτό το σενάριο έχει θεωρηθεί αύξηση στη ζήτηση περίπου 2% κάθε χρόνο. Ένα τέτοιο σενάριο είναι αρκετά πιθανό αν αναλογήσει κανείς την συνεχή αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού σε συνδυασμό με την αδυναμία εύρεσης μιας εναλλακτικής πηγής ενέργειας που να μπορεί να αντικαταστήσει το πετρέλαιο. Έτσι αναμένεται η ζήτηση να φτάσει τα 60 δισεκατομμύρια βαρέλια το χρόνο ως το 2037. Μετά από αυτό το σημείο θα ξεκινήσει η χρήση των αποθεμάτων τα οποία με βάση τις τωρινές μελέτες θα αντέξουν μέχρι το 2125. (Wood, Long, Morehouse, 2003)



Διάγραμμα 1.1: Ενδεχόμενο σενάριο παγκοσμίων αποθεμάτων πετρελαίου ανά έτος μέχρι το 2125.

## 1.2 Η προέλευση του πετρελαίου

### 1.2.1 Θεωρία οργανικής προέλευσης

Η βασικότερη αποδεκτή θεωρία για την προέλευση του πετρελαίου έχει να κάνει με το πλανηκτόν. Συνοπτικά, ένα ποσοστό από το πλανηκτόν που υπάρχει στην θάλασσα βυθίζεται στον πυθμένα των θαλασσών όπου και πεθαίνει λόγω έλλειψης οξυγόνου σχηματίζοντας οργανική ύλη και στη συνέχεια ορυκτά καύσιμα με ένα μηχανισμό τριών σταδίων που περιγράφεται παρακάτω. (Conaway, 1999; Lois et al, 2014).

#### Στάδιο 1 Διαγένεσης – Αναερόβια αποσύνθεση

Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου τα αερόβια βακτήρια δεν μπορούν να αποδομήσουν την οργανική ύλη. Αντίθετα τα αναερόβια βακτήρια ανάγουν τα σουλφίδια και τα νιτρικά σε υδρόθειο και άζωτο αντίστοιχα. Λόγω αυτής της διαδικασίας η οργανική ύλη ξεκινά να διασπάται σε κηρογόνο με υδρόλυση. Οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες υδρολύονται σε απλά σάκχαρα και αμινοξέα. Στη συνέχεια με την βοήθεια των ενζύμων των βακτηρίων αυτά οξειδώνονται με ταχείς ρυθμούς. Τελικά οι μονοσακχαρίτες αποδομούνται σε διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) και μεθάνιο ( $\text{CH}_4$ ). Τα προϊόντα της αναερόβιας αποδόμησης των αμινοξέων, των φαινολών, των μονοσακχαριτών και τον αλδεϋδών συνδυαστικά σχηματίζουν φουλβικά οξέα (Schobert, Harold, 2013; Braun, Burnham, 1993; Georgakopoulos, 2016).

#### Στάδιο 2 Διαγένεσης – Σχηματισμός Κηρογόνου

Σε βάθος μεγαλύτερο των δέκα μέτρων η αναερόβια αποσύνθεση σταματάει καθώς δεν εμφανίζονται βακτήρια. Σε αυτό συμβάλουν και κάποιες φαινολικές ουσίες που δημιουργούνται όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι οποίες λειτουργούν ως αντιβιοτικά. Σε αυτά τα βάθη εμφανίζεται μίγμα που περιέχει φουλβικά οξέα, διάφορα λιπίδια που δεν έχουν αντιδράσει, ελαφρώς τροποποιημένη λιγνίνη, και άλλους υδρογονάνθρακες. Καθώς το μίγμα αυτό καταπλακώνεται από επιπλέον στρώματα εδάφους, αναπτύσσονται έντονες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Έτσι οι ουσίες αυτές συνδυάζονται παράγοντας κηρογόνο με μηχανισμούς οι οποίοι δεν είναι ακόμα

εντελώς κατανοητοί. Η συνολική διαδικασία σχηματισμού κηρογόνου ονομάζεται διαγένεση (Schobert, Harold, 2013; Braun, Burnham, 1993; Georgakopoulos, 2016).

### Στάδιο 3 – Καταγένεση

Ο σχηματισμός του κηρογόνου συνεχίζεται μέχρι και βάθη ενός χιλιομέτρου κάτω από την επιφάνεια του εδάφους, όπου οι θερμοκρασίες φτάνουν τους 50 °C και αποτελεί το ενδιάμεσο σημείο της διαδικασίας μεταξύ οργανικής ύλης και καυσίμων. Το κηρογόνο μπορεί να εκτεθεί σε οξυγόνο, να οξειδωθεί και έτσι να χαθεί ή μπορεί να θαφτεί βαθύτερα κάτω από τον φλοιό της γης και εκεί να υποστεί μετατροπή σε ορυκτό καύσιμο. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των αντιδράσεων ελευθέρων ριζών που προκαλούν επαναδιάταξη του κηρογόνου. Αυτές οι αντιδράσεις χρειάζονται εκατομμύρια χρόνια προκειμένου να πραγματοποιηθούν και δεν παίρνει μέρος κανένα εξωτερικό αντιδρών. Γενικά, το πετρέλαιο δημιουργείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 50 και 160°C, αυτό το διάστημα λέγεται «παράθυρο πετρελαίου» (oil window). Αντίστοιχα, το φυσικό αέριο δημιουργείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 150 και 200°C και το διάστημα ονομάζεται «παράθυρο αερίου» (gas window). Το κηρογόνο αντιδρά προς δύο τύπων προϊόντα, αυτά με χαμηλό λόγο H/C όπως π.χ. το ανθρακένιο και αυτά με υψηλό λόγο H/C όπως π.χ. το μεθάνιο. (Schobert, Harold, 2013; Braun, Burnham, 1993; Georgakopoulos, 2016).

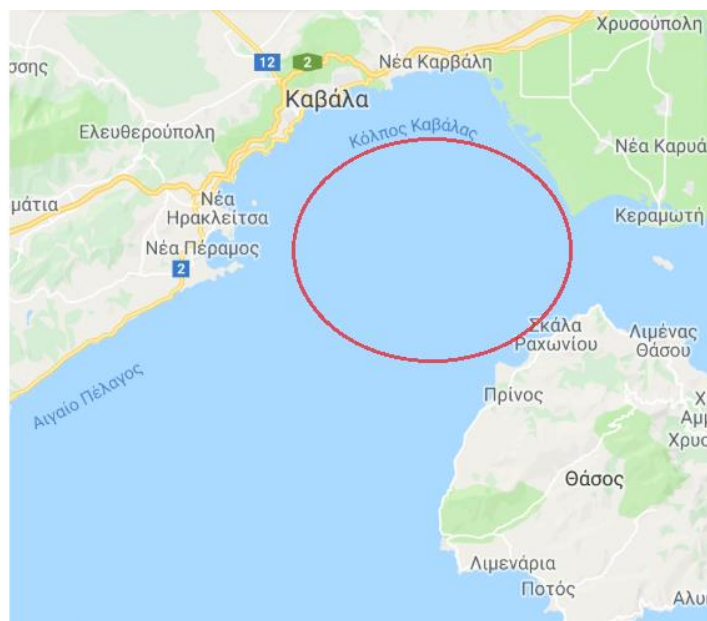
#### 1.2.2 Ανόργανη θεωρία προέλευσης

Μια εναλλακτική θεωρία για την προέλευση του πετρελαίου έχει προταθεί από Ρώσους επιστήμονες τη δεκαετία του 80, πρόκειται για μια θεωρία ανόργανης προέλευσης η οποία όμως αντικρούεται από γεωλογικά και γεωχημικά ευρήματα. Αυτό δεν καταρρίπτει την θεωρία της ύπαρξης πετρελαίου ανόργανης προέλευσης, καθώς έχουν βρεθεί τέτοια κοιτάσματα, όμως θεωρείται ότι αποτελούν ένα μικρό, μη εκμεταλλεύσιμο ποσοστό του συνολικού πετρελαίου (Glasby, Geoffrey, 2006).



### 1.3 Τα εκμεταλλεύσιμα κοιτάσματα υδρογονανθράκων στην Ελλάδα

Τα μοναδικά εκμεταλλεύσιμα κοιτάσματα υδρογονανθράκων στην Ελλάδα, ανακαλύφθηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 70 από Καναδικές και Αμερικανικές εταιρίες. Πρόκειται για το κοιτάσμα φυσικού αερίου της Νοτίου Καβάλας και το κοιτάσμα πετρελαίου του Πρίνου στη γεωλογική λεκάνη Πρίνου – Καβάλας.



*Εικόνα 1.1: Χάρτης της περιοχής μεταξύ Θάσου και Καβάλας, με τον κόκκινο κύκλο φαίνεται η περιοχή των κοιτασμάτων.*

Η αξιοποίηση των κοιτασμάτων ξεκίνησε το 1981 με τη μέγιστη παραγωγή πετρελαίου να επετεύχθη το 1984. Ενεργά πετρελαϊκά συστήματα έχουν εντοπιστεί και σε περιοχές της Δυτικής Ελλάδας τα οποία όμως δεν εκμεταλλεύονται αυτή τη στιγμή (Georgakopoulos, 2016).

### 1.4 Κατηγοριοποιήσεις του πετρελαίου

Η κατηγοριοποίηση του πετρελαίου γίνεται με πολλούς τρόπους.

**Η πρώτη κατηγοριοποίηση** γίνεται με βάση τη γεωγραφική θέση όπου αυτό παράγεται:

West Texas Intermediate (WTI) – Αποτελεί σημείο αναφοράς για τη Βόρειο Αμερική.

Blend Brent – Αποτελείται από 15 τύπους αργού που τα κοιτάσματα τους βρίσκονται στη Βόρεια Θάλασσα. Καθορίζει τις τιμές του πετρελαίου που παράγεται στην Ευρώπη, την Αφρική και τη Μέση Ανατολή.

Dubai Crude – Αποτελεί σημείο αναφοράς για την Μέση Ανατολή.

Tapis Crude – Παράγεται στη Μαλαισία και αποτελεί σημείο αναφοράς για την Ασία και την Αυστραλία.

Minas – Παράγεται στην Ινδονησία

Μείγμα του ΟΠΕΚ – Αποτελεί τον σταθμισμένο μέσο όρο των μειγμάτων πετρελαίου από τις χώρες του ΟΠΕΚ

Midway Sunset Heavy – Καθορίζει τις τιμές των βαρέων πετρελαίων της Καλιφόρνια

**Η δεύτερη κατηγοριοποίηση** του πετρελαίου έχει να κάνει με την μέση πυκνότητα του η οποία μετριέται με τον δείκτη API ο οποίος ορίζεται ως:

$$API = \frac{141.5}{\text{Ειδική βαρύτητα}} - 131.5 \text{ (εξ. 1.1)}$$

Ελαφρύ Αργό Πετρέλαιο – 37° έως 42° API για τις ΗΠΑ και 32° έως 42° εκτός ΗΠΑ

Βαρύ Αργό Πετρέλαιο – Πυκνότητα μικρότερη των 20° API

Πολύ Βαρύ Αργό Πετρέλαιο - Πυκνότητα μικρότερη των 10° API

**Η τρίτη κατηγοριοποίηση** αφορά την περιεκτικότητα σε θείο (S), για χαμηλή περιεκτικότητα σε θείο < 0,5% χαρακτηρίζεται ως «γλυκό – sweet», ενώ για υψηλή περιεκτικότητα > 0,5% χαρακτηρίζεται ως «ξινό – sour» (Wauquier, 1995; Georgakopoulos, 2016)

## 1.5 Η σύσταση του πετρελαίου

Η σύσταση του αργού πετρελαίου μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την τοποθεσία και την ηλικία ή το βάθος ενός κοιτάσματος (Varjani, 2017). Όσον αφορά την στοιχειακή σύσταση του πετρελαίου έχει παρατηρηθεί ότι οι αναλογίες του κάθε στοιχείου που εμφανίζεται, κυμαίνονται σε στενά όρια όπως φαίνεται παρακάτω, παρά τις μεγάλες αποκλίσεις σε φυσικές ιδιότητες μεταξύ ελαφρών και βαρέων κλασμάτων.

Άνθρακας, 83.0–87.0%

Υδρογόνο, 10.0–14.0%

Άζωτο, 0.1–2.0%

Οξυγόνο, 0.05–1.5%

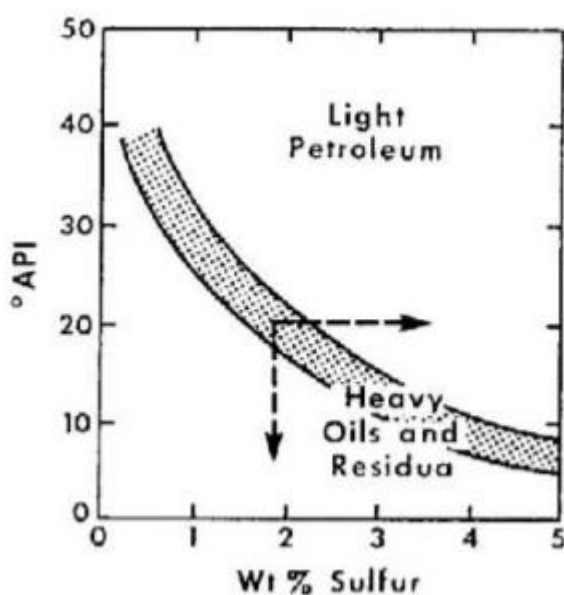
Θείο 0.05–6.0%

Μέταλλα (κυρίως Ni and V) 1000 ppm

Από ένα κοιτάσμα πετρελαίου το εξαγόμενο προϊόν αποτελείται κατά βάση από υδρογονάνθρακες με μοριακό βάρος κυμαινόμενο από το μεθάνιο μέχρι τα βαριά στερεά μόρια που περιέχουν περισσότερα από 80 άτομα άνθρακα ανά μόριο. Το μεγαλύτερο ποσοστό όμως από αυτό που θεωρείται αργό πετρέλαιο είναι υδρογονάνθρακες με αλυσίδα από  $C_5H_{12}$  ως  $C_{18}H_{38}$ . Τα ελαφρύτερα κλάσματα κατατάσσονται ως φυσικό αέριο, ενώ τα βαρύτερα ως παραφίνες. Εκτός αυτών περιέχει ενώσεις οξυγόνου, θείου, αζώτου και ελάχιστες ποσότητες μεταλλικών ενώσεων και νερού. Οι υδρογονάνθρακες που περιέχονται στο πετρέλαιο είναι οι παραφινικοί, οι ισοπαραφινικοί, κυκλοπαραφινικοί ή ναφθανικοί καθώς και οι αρωματικοί. (Speight, 1999; Lois et al, 2014)

## 2. Το Θείο στο πετρέλαιο

Το θείο είναι το τρίτο πιο άφθονο ετεροάτομο στο αργό πετρέλαιο και μπορεί να βρεθεί σε συγκεντρώσεις από 0.04% w/w έως 5% w/w. Στο αργό πετρέλαιο μπορεί να συναντηθούν πολλών ειδών διαφορετικές ουσίες που περιέχουν θείο. Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι όσο μικρότερος ο δείκτης API τόσο υψηλότερο το ποσοστό σε θείο που περιέχεται στο πετρέλαιο όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα (Spreight, 1999; Blumberg et al., 2003).



Διάγραμμα 2.1: Κατηγοριοποίηση του πετρελαίου με βάση τον δείκτη API και την περιεκτικότητα σε θείο (Spreight, 1999).

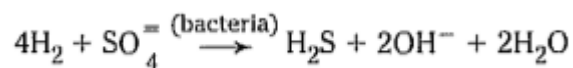
Το αργό πετρέλαιο περιέχει πληθώρα από οργανοθειικά συστατικά και μερικές φορές και ατομικό θείο. Στον παρακάτω πίνακα, φαίνεται η περιεκτικότητα διαφόρων τύπων αργού πετρελαίου προερχόμενου από διαφορετικές περιοχές.

Πίνακας 2.1: Τύποι αργών πετρελαίων, χώρες προέλευσης τους και περιεκτικότητα σε θείο (Wauquier, 1995)

Όνομα Αργού	Χώρα προέλευσης	Περιεκτικότητα σε θείο %
<i>Bu Attifel</i>	Λιβύη	0.10
<i>Arjuna</i>	Ινδονησία	0.12
<i>Bonny Light</i>	Νιγηρία	0.13
<i>Hassi Massaoud</i>	Αλγερία	0.14
<i>Ekofisk</i>	Βόρεια θάλασσα (Νορβηγία)	0.18
<i>Arabian Light</i>	Σαουδική Αραβία	1.80
<i>Kirkuk</i>	Ιράκ	1.95
<i>Kuwait</i>	Κουβέιτ	2.50
<i>Cyrus</i>	Ιράν	3.48
<i>Boscan</i>	Βενεζουέλα	5.40

## 2.1 Η προέλευση του Θείου

Το θείο προέρχεται κυρίως από αποσύνθεση οργανικής ύλης. Όπως φαίνεται, με το πέρασμα του χρόνου και την σταδιακή εναπόθεση ύλης σε στρώματα, το αργό πετρέλαιο ελευθερώνει το θείο με τη μορφή H<sub>2</sub>S που εκλύεται σαν αέριο. Μια άλλη πιθανή πηγή H<sub>2</sub>S είναι η αναγωγή σουλφιδίων με υδρογόνο από βακτήρια σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:



Το υδρογόνο προέρχεται από πετρέλαιο ενώ τα θειικά ιόντα βρίσκονται στο βράχο. Το δημιουργημένο υδρόθειο μπορεί να αντιδράσει με τα σουλφίδια ή με το βράχο για να δημιουργήσει στοιχειακό θείο όπως συμβαίνει παραδείγματος χάριν στο αργό του Goldsmith, Texas, USA. Σε ορισμένες συνθήκες πίεσης θερμοκρασίας και χρόνο



Ελεύθερο θείο συναντάται σπάνια στο αργό πετρέλαιο αλλά μπορεί να βρεθεί διαλυμένο στο υγρό. Ο πιθανότερος τρόπος σχηματισμού του είναι με αναγωγή θείου των βράχων. Η ανάλυση του στοιχειακού θείου γίνεται με τη χρήση πολυρογραφικών μεθόδων. Σε πολλές περιπτώσεις το στοιχειακό θείο μετατρέπεται σε υδρόθειο. (Eccleston, X. Morrison, H. M. Smith, 1952; Wauquier, 1995)

#### β. Υδρόθειο - $H_2S$

Το  $H_2S$  εντοπίζεται σε αέρια του κοιτάσματος και διαλυμένο στο αργό (<50ppm κατά βάρος), αλλά σχηματίζεται και σε διάφορες διεργασίες διύλισης, όπως η καταλυτική πυρόλυση, η Υδρογονοαποθείωση, η θερμική πυρόλυση και η θερμική αποσύνθεση υδρογονανθράκων που περιέχουν θείο κατά την απόσταξη.

Από τη δεκαετία του 1950 το αργό πετρέλαιο χωριζόταν σε διαβρωτικό (όξινο) και μη-διαβρωτικό (γλυκό). Τα κλάσματα που περιείχαν περισσότερο από 6ppm διαλυμένου  $H_2S$  κατηγοριοποιούνταν ως όξινα επειδή σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από αυτές ήταν εμφανής η διάβρωση στα τοιχώματα των δεξαμενών αποθήκευσης, λόγω του σχηματισμού πυροφορικών σιδεροσουλφιδίων. Σήμερα οποιοδήποτε πετρέλαιο που περιέχει πάνω από 1% θείο, θεωρείται διαβρωτικό.

#### γ. Θειόλες

Θειόλες ονομάζονται οι ενώσεις της μορφής  $R - S - H$ , με το R να αναπαριστά μια αλιφατική ή κυκλική ρίζα. Οι θειόλες, γνωστές και ως μερκαπτάνες έχουν όξινο χαρακτήρα λόγω της δραστικής ομάδας  $S - H$ , είναι διαβρωτικές και δύσοσμες. Η συγκέντρωσή τους στο αργό πετρέλαιο είναι πολύ χαμηλή, σχεδόν μηδενική. Όμως δημιουργούνται από άλλα θειούχα συστατικά κατά τις διεργασίες διύλισης και εμφανίζονται στα ελαφριά κλάσματα όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.2: Είδη κλασμάτων πετρελαίου και τε περιεχόμενο τους σε θείο, και μερκαπτάνες (Wauquier, 1995).

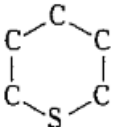
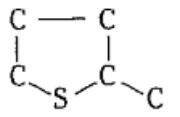
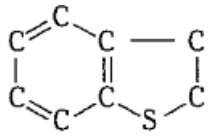
Είδος κλάσματος	Θείο μερκαπτανών	Συνολικό θείο %	A/B %
	(A)	(B)	
Αργό πετρέλαιο	0.0110	1.8	0.6
Βουτάνιο	0.0228	0.0228	100
Ελαφριά βενζίνη	0.0196	0.0240	82
Βαριά βενζίνη	0.0162	0.026	62
Νάφθα	0.0084	0.059	14
Κηροζίνη	0.0015	0.17	0.9
Γκαζόιλ	0.0010	1.40	<0.1
Μαζούτ	0	3.17	0

#### δ. Σουλφίδια

Τα σουλφίδια είναι χημικά ουδέτερα, μπορεί να είναι γραμμικά ή κυκλικά. Για μόρια με ίσο αριθμό ατόμων άνθρακα, τα σημεία βρασμού τους είναι υψηλότερα από των μερκαπτανών. Αποτελούν την πλειοψηφία των θειούχων υδρογονανθράκων στα μέσα κλάσματα (Κηροζίνη και Γκαζόιλ).



Πίνακας 2.3: Χημικοί τύποι σουλφιδίων και σημεία βρασμού τους (Wauquier, 1995)

Όνομα	Χημικός τύπος	Σημείο βρασμού	Κλάσμα
3 θειοπεντάνιο	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$	92	Βενζίνη
2 Μέθυλ - 3 θειοπεντάνιο	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	108	Βενζίνη
θειοκυκλοεξάνιο		141.8	Βενζίνη
2 - Μεθυλθειοκυκλοπεντάνιο		133	Κηροζίνη
Θειονδένιο		235.6	Κηροζίνη

#### ε. Δισουλφίδια

Οι ενώσεις αυτές είναι δύσκολο να διαχωριστούν και συνεπώς λίγα έχουν ταυτοποιηθεί:

- Διμεθυλ - δυσουλφίδιο (2,3 δυθειοβουτάνιο)  $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_3$
- Διαιθυλ - δυσουλφίδιο ( 2,3 διθειοεξάνιο)  $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$

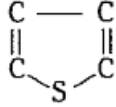
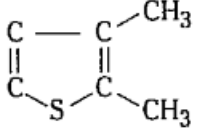
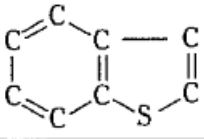
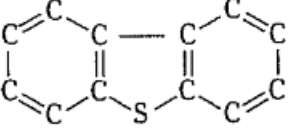
Μόνο τελευταία έχει επιτευχθεί η ταυτοποίηση πιο περίπλοκων ουσιών.

#### στ. Θειοφένιο και παράγωγα

Η ύπαρξη θειοφενίου και παραγώγων του στο αργό πετρέλαιο έγινε αντιληπτή το 1899, αλλά μέχρι το 1953 θεωρούταν ότι προέρχονται από αποδόμηση σουλφιδίων κατά τις διεργασίες διύλισης. Η παρουσία τους σταμάτησε να αμφισβητείται ολοκληρωτικά με

την ταυτοποίηση του βενζοθειοφένιο και των παραγώγων του και τελευταία και του ναφθenoβενζοθειοφενίου στα βαρέα κλάσματα.

Πίνακας 5: Το θειοφένιο και τα παράγωγά του (Wauquier, 1995; Karchmer, 2014).

Όνομα	Χημικός τύπος	Σημείο Βρασμού	Κλάσμα
Θειοφένιο		84	Βενζίνη
Διμεθυλ- θειοφένιο		141.6	Βενζίνη και Κηροζίνη
Βενζοθειοφένιο		219.9	Κηροζίνη
Διβενζοθειοφένιο		300	Γκαζόιλ

Το μεγαλύτερο μέρος του θείου που περιέχεται στο αργό πετρέλαιο βρίσκεται στο βαρέα κλάσματα και στο πετρελαϊκό υπόλειμμα με τη μορφή θειούχων μορίων όπως αυτά του τύπου ναφθenoανθρακένιο ή με τη μορφή βενζοθειοφενίων. Αυτά είναι μόρια που έχουν μία ή περισσότερες ναφθανικές και αρωματικές αλυσίδες που συνήθως περιέχουν αν μόνο άτομο θείου (Wauquier, 1995; Karchmer, 2014).

Πίνακας 2.5: Η περιεκτικότητα σε θείο και ορισμένες άλλες ιδιότητες σε διάφορα κλάσματα του πετρελαίου (Wauquier, 1995; Karchmer, 2014).

<i>Κλάσμα</i>	<b>Ελαφριά βενζίνη</b>	<b>Βαριά βενζίνη</b>	<b>Κηροζίνη</b>	<b>Γκαζόιλ</b>	<b>Μαζούτ</b>	<b>Αργό</b>
<i>Θερμοκρασιακό διάστημα °C</i>	20-70	70-180	180-260	260-370	370+	
<i>Ειδικό βάρος</i>	0.648	0.741	0.801	0.856	0.957	
<i>Μέσο μοριακό βάρος</i>	75	117	175	255	400	
<i>Συνολικό θείο % κατά βάρος</i>	0.024	0.032	0.202	1.436	3.167	1.80
<i>Μολ Σουλφιδίων/ συνολικά μολ</i>	1/1800	1/855	1/90	1/9	1/2.5	

## 2.3 Το πρόβλημα με το Θείο

Η εξάντληση των χερσαίων αποθεμάτων αργού πετρελαίου έχει ωθήσει στην εκμετάλλευση των βαθύτερων ταμιευτήρων, οι οποίοι περιέχουν πετρέλαιο πλούσιο σε πολυκυκλικά αρωματικά θειούχα ετεροκυκλικά μόρια (PASH) και άλλα μη συνηθισμένα αποθέματα όπως heavy oil, extra heavy oil, oil sands και άσφαλτο, τα οποία αποτελούν το 70% των παγκόσμιων αποθεμάτων σε πετρέλαιο ( El – Gendy, Nassar, 2018)

Οι θεικές ενώσεις αποφεύγονται εξαιτίας πολλών αρνητικών ιδιοτήτων τους, της δυσάρεστης οσμής τους, του καταστροφικών αποτελεσμάτων στην σταθερότητα χρωμάτων, την δυσμενή τους επίδραση στα αντικροτικά και οξειδωτικά τους χαρακτηριστικά. Αυξάνουν το ιξώδες του αργού πετρελαίου καθιστώντας το μη-διορθώσιμο από τις διεργασίες διύλισης (Chauhan, 2015).

### 2.3.1 Διάβρωση

Προκαλούν διάβρωση σε σωλήνες, αντλίες και στον εξοπλισμό διύλισης με αποτέλεσμα να επιφέρουν ζημία αξίας της τάξεως το 3% του παγκοσμίου ακαθάριστου εγχώριου προϊόντος δηλαδή 2.2 τρισεκατομμυρίων δολαρίων (Hays, 2013). Πιο αναλυτικά το υδρόθειο όταν διαλυθεί στο νερό γίνεται ασθενές οξύ και συνεπώς είναι διαβρωτικό. Αν δεν γίνει χρήση ρυθμιστικών ιόντων νερό εξισορροπημένο με 1atm υδρόθειο έχει pH περίπου 4. Όμως κάτω από υψηλές πιέσεις η τιμή του pH μπορεί να φτάσει και το 3. Επιπλέον, το H<sub>2</sub>S μπορεί να παίζει και άλλους ρόλους στην διάβρωση κατά την παραγωγή πετρελαίου και αερίου. (Henry, Scott, 1994)

Σε συνθήκες χαμηλής πίεσης λειτουργεί σαν καταλύτης που προωθεί την προσρόφηση στο ατσάλι του ατομικού υδρογόνου που δημιουργείται λόγω καθοδικής αναγωγής ιόντων υδρογόνου. Η διάβρωση ατσάλινου εξοπλισμού από H<sub>2</sub>S σχηματίζει μια λεπτή μαύρη ταινία που είναι εμφανής σχεδόν σε όλα τα εξαρτήματα που χρησιμοποιούνται στην διύλιση. Το υδρόθειο είναι το βασικό συστατικό και των όξινων νερών που οδηγεί σε σοβαρά προβλήματα διάβρωσης σε διάφορα κομμάτια της διύλισης. (Henry & Scott, 1994)

Σε συνθήκες υψηλής πίεσης παρατηρείται διάβρωση από διάφορες θειικές ενώσεις σε θερμοκρασίες μεταξύ 260 και 540 °C, η οποία αποτελεί σύνηθες πρόβλημα σε πολλές διεργασίες διύλισης και μερικές φορές και σε πετροχημικές διεργασίες. Οι θειούχες ενώσεις εκτός των θειοφενίων αντιδρούν με τις μεταλλικές επιφάνειες σε υψηλές θερμοκρασίες και σχηματίζουν μεταλλοσουλφίδια, κάποια οργανικά μόρια και υδρόθειο. (Henry & Scott, 1994)

### 2.3.2 Καταλύτες

Το θείο στα καύσιμα των αυτοκινήτων παρεμποδίζει τον έλεγχο των εκπομπών καυσαερίων από τον καταλύτη δρώντας ανταγωνιστικά με τους ρύπους των καυσαερίων στο ενεργό κέντρο του καταλύτη. Έτσι σε αντίθεση με τον μόλυβδο δεν δηλητηριάζει τον καταλύτη αλλά μειώνει την ικανότητά του. Με την καύση το θείο στο καύσιμο οξειδώνεται σε οξείδια του θείου, κυρίως διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>) και σε μικρότερο

ποσοστό σε τριοξείδιο του θείου ( $\text{SO}_3$ ). Οι δύο αυτές ενώσεις είναι γνωστό ότι παρεμποδίζουν την καταλυτική λειτουργία. Το μέγεθος της παρεμπόδισης ποικίλει ανάλογα με την ποσότητα θείου στο καύσιμο, την δομή του καταλύτη, την λειτουργία του, τα διαφορετικά προϊόντα καύσης εξαιτίας των διάφορων λόγων αέρα/καυσίμου και το θερμοκρασιακό εύρος της εξάτμισης (MECA,1998)

Η καταλυτική παρεμπόδιση οφείλεται στην χημειοπροσρόφηση των θειούχων ενώσεων ( $\text{SO}_2$  και  $\text{H}_2\text{S}$ ) στο ενεργό κέντρο του καταλύτη το οποίο δεν είναι πλέον διαθέσιμο για τις προτιμώμενες αντιδράσεις οδηγώντας έτσι σε μικρότερη καταλυτική ενεργότητα. Ένα άλλο ανεπιθύμητο αποτέλεσμα του θείου στην βενζίνη είναι ότι ο καταλύτης οξειδώνει το σε το οποίο μπορεί εύκολα να σχηματίσει είτε σουλφίδια με αλκαλικά οξείδια μετάλλων είτε θειικό οξύ αντιδρώντας με νερό (MECA,1998).

## **2.4 Πρόβλημα με το $\text{SO}_2$**

Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 73% του παγκόσμιου  $\text{SO}_2$  παράγεται από ανθρώπινες δραστηριότητες εξαιτίας της καύσης του πετρελαίου και των προϊόντων του (Aparicio,2013). Αυτό, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το  $\text{SO}_2$  μεταφέρεται με τα αέρια ρεύματα και άρα μπορεί να παραχθεί σε ένα σημείο αλλά να εμφανίσει τα δυσμενή συμπτώματά του χιλιάδες χιλιόμετρα μακριά (Soleimani, 2007). Μακροχρόνια έκθεση στο διοξείδιο του θείου μπορεί να προκαλέσει αναπνευστικά προβλήματα, όπως άσθμα, να τροποποιήσει τον αμυντικό μηχανισμό των πνευμόνων, να επιδεινώσει τυχόν υπάρχουσες καρδιαγγειακές παθήσεις ακόμα και να οδηγήσει σε καρκίνο των πνευμόνων. Άτομα με καρδιαγγειακές, χρόνιες πνευμονολογικές παθήσεις καθώς και μικρά παιδιά και ηλικιωμένοι είναι ιδιαίτερα ευπαθή σε τέτοιες συνθήκες. Υψηλές συγκεντρώσεις διοξειδίου του θείου στην ατμόσφαιρα συμβάλλουν επίσης στη μείωση της ορατότητας, στην αύξηση της οξύτητας των λιμνών και των ποταμών και προκαλούν αλλοιώσεις στη βλάστηση και στα μέταλλα. (Mohebbali and Ball, 2008 – Ζάνης ,2014)

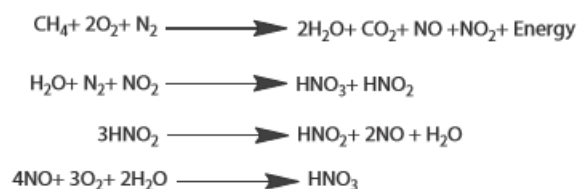
#### 2.4.1 Όξινη βροχή

Όξινη βροχή είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο ποσότητες κυρίως θειικού και νιτρικού οξέος φτάνουν στο έδαφος σε υγρή μορφή, μεταφερόμενες με τη βροχή, το χιόνι, την ομίχλη, το χαλάζι κ.λπ., με καταστρεπτικές επιπτώσεις στη χλωρίδα και την πανίδα, καθώς και σε κτίρια και μνημεία. Ο όρος "όξινη βροχή" χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά για να περιγράψει τη ρυπασμένη βροχή στο Μάντσεστερ της Βρετανίας στη διάρκεια της βιομηχανικής επανάστασης τον 19ο αιώνα και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται παρά το ότι θεωρείται σωστότερος ο όρος "όξινη εναπόθεση" (Ζάνης, 2014). Όμως τα παράπονα όσον αφορά την περιβόητη μόλυνση της ατμόσφαιρας του Λονδίνου, λόγω του διοξειδίου του θείου και των αεροσόλ, είναι γνωστά από τον 13 αιώνα (Brimblecombe, 1987).

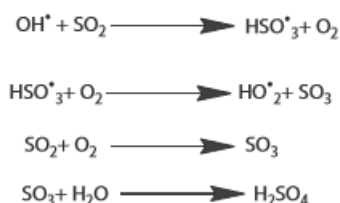
Υπεύθυνες για την αύξηση της οξύτητας είναι κυρίως οι εκπομπές διοξειδίου του θείου ( $\text{SO}_2$ ) και οξειδίων του αζώτου ( $\text{NO}_x$ ). Το πρώτο προέρχεται από την καύση των ορυκτών καυσίμων είτε στην βιομηχανία είτε στις μεταφορές, από εργοστάσια επεξεργασίας μεταλλευμάτων και από άλλες στατικές πηγές της βιομηχανίας, επίσης και τα οξείδια του αζώτου κατά βάση προέρχονται από παρόμοιες πηγές με το ποσοστό τους από μεταφορές όμως να είναι μεγαλύτερο. Τα εκπεμπόμενα αέρια διαλύονται στην υγρασία της ατμόσφαιρας ή στα ατμοσφαιρικά κατακρημνίσματα, σχηματίζοντας τα αντίστοιχα οξέα (θειικό και νιτρικό οξύ), με αποτέλεσμα να αυξάνουν την οξύτητά τους. Το νερό της βροχής φυσιολογικά έχει pH 6,5 έως 5,6 και είναι ελαφρώς όξινο λόγω της διάλυσης σε αυτό του διοξειδίου του άνθρακα που υπάρχει στην ατμόσφαιρα. Ωστόσο, από την αρχή της βιομηχανικής επανάστασης, τα επίπεδα του pH της βροχής έχουν σημειώσει σημαντική πτώση (μείωση της τιμής του pH αντιστοιχεί σε αύξηση της οξύτητας του νερού - για μεταβολή του pH κατά μία μονάδα σημειώνεται δεκαπλάσια μεταβολή στην οξύτητα). Το pH της όξινης βροχής κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 3,5 - 5 ενώ κατά καιρούς μετριούνται και πιο ακραίες τιμές του pH έως και 2,4 (Menz & Seip, 2004)

Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις παραγωγής των προαναφερθέντων οξέων φαίνονται παρακάτω.

Για το Άζωτο:



Για το Θείο:



Σύμφωνα με έρευνες των επιστημόνων κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1980, αποδείχτηκε ότι η ομίχλη, λόγω των πολλών μικρών σταγονιδίων από τα οποία αποτελείται, προσφέρει τελικά μεγαλύτερη επιφάνεια προσρόφησης στα  $\text{SO}_2$  και  $\text{NO}_x$  και γι' αυτό περιέχει συνήθως πολλαπλάσιες ποσότητες θειικού και νιτρικού οξέος από ότι άλλες μορφές όξινης κατακρήμνισης (J. H. Seinfeld & S. N. Pandis, 1997; Ζάνης, 2014). Το  $\text{SO}_2$  και τα  $\text{NO}_x$  μπορούν να μεταφερθούν σε μεγάλες αποστάσεις με τη βοήθεια των ανέμων και να δημιουργήσουν όξινη βροχή χιλιόμετρα μακριά από τον τόπο εκπομπής τους. Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που συνοδεύουν την όξινη βροχή είναι η υπέρβαση των εθνικών συνόρων. Συχνά, οι χώρες που υφίστανται τις επιπτώσεις της όξινης βροχής δεν είναι εκείνες που παρήγαγαν την αρχική ρύπανση. Χαρακτηριστικά, αναφέρουμε ότι, το 95% των ποσοτήτων του θείου και του αζώτου που ρυπαίνει τα Νορβηγικά οικοσυστήματα προέρχεται από άλλες χώρες, κυρίως από τη Μεγάλη Βρετανία και τη Γερμανία (Seinfeld & Pandis, 1997; Ζάνης, 2014).

Υψηλές συγκεντρώσεις όξινης εναπόθεσης μπορούν να καταστρέψουν τα χερσαία και τα υδάτινα οικοσυστήματα αλλά και να προκαλέσουν σημαντικές φθορές στα υλικά.

Το πρόβλημα της όξινης βροχής άρχισε να γίνεται ιδιαίτερα έντονο από τη δεκαετία του 1970 και μετά. Παρόλα αυτά έχουν γίνει σημαντικοί περιορισμοί στις εκπομπές  $\text{SO}_2$  στην Ευρώπη και την Βόρεια Αμερική κατά τη διάρκεια των τελευταίων δύο ετών. Πιο

συγκεκριμένα σημειώθηκε μείωση της τάξεως του 65% στην Ευρώπη και του 40 % στις Η.Π.Α τις δεκαετίες του 1980 και 1990. Όσον αφορά τα ΝΟx, οι εκπομπές τους αυξήθηκαν την δεκαετία του 1980 αλλά στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μείωση σε ποσοστό 30% μέχρι το 2001 (Vestreng, 2003).

#### 2.4.2 Τα αποτελέσματα της όξινης βροχής

Ιδιαίτερα καταστρεπτική έχει θεωρηθεί η επίδρασή της στα φυτά και ειδικότερα στα δέντρα, που λόγω της μεγάλης διάρκειας ζωής τους εκτίθενται μακροχρόνια σε αυτήν. Παρόλα αυτά η ποσοτικοποίηση των σχέσεων μεταξύ των βασικών ρίπων και της ζημιάς στα δάση είναι δύσκολο να εξαχθεί. Ζημιές στην χλωρίδα μπορεί να προκληθούν από άμεση έκθεση στους αέριους και τους στοιχειακούς ρύπους ή έμμεσα μέσω όξυνσης του εδάφους (Menz & Seip, 2004)

Τα φύλλα ή οι βελόνες των δέντρων κιτρινίζουν και πέφτουν, ο μεταβολισμός τους διαταράσσεται και το ριζικό σύστημα υφίσταται βλάβες, με αποτέλεσμα να προσλαμβάνονται μικρότερες ποσότητες θρεπτικών αλάτων και νερού.

Επιπλέον, το ίδιο το έδαφος υποβαθμίζεται, γιατί τα οξέα που φτάνουν σ' αυτό σε μεγάλη ποσότητα καταστρέφουν τους ωφέλιμους μικροοργανισμούς, διαλύουν μεγάλες ποσότητες θρεπτικών αλάτων που κατόπιν απομακρύνονται με το νερό της βροχής και απελευθερώνουν τοξικά για τα φυτά βαρέα μέταλλα (κυρίως ιόντα αργιλίου και μαγγανίου). Ως συνέπεια όλων αυτών είναι, βέβαια, η εξασθένηση των δέντρων, που γίνονται ευάλωτα σε βακτήρια, ασθένειες κ.λπ. και τελικά πεθαίνουν. Σύμφωνα με έκθεση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, το 1991 το 22% των δασών στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης είχε προσβληθεί από την όξινη βροχή, ενώ αν υπολογιστούν και οι ανατολικοευρωπαϊκές χώρες, το ποσοστό αυξάνεται σε 38%. Οι χώρες όπου διαπιστώθηκαν οι σοβαρότερες επιπτώσεις είναι η Βρετανία, η Πολωνία και η Τσεχία. Εξίσου έντονο είναι το πρόβλημα και σε δάση των βορειοανατολικών Η.Π.Α. και του ανατολικού Καναδά (Likens, Driscoll, Buso, 1996; Ζάνης, 2014).

Καταστρεπτικές είναι οι επιδράσεις της όξινης βροχής και στα επιφανειακά νερά, κυρίως λίμνες και μικρά ποτάμια, καθώς η αυξημένη συγκέντρωση οξέων καταστρέφει το



πλανγκτόν, την υδάτινη χλωρίδα και τα αβγά αμφιβίων και ψαριών. Κατά καιρούς η όξινη βροχή έχει θεωρηθεί υπεύθυνη και για μαζικούς θανάτους ψαριών, όπως συνέβη σε σκανδιναβικές λίμνες στις αρχές της δεκαετίας του 1970 και σε μικρά ποτάμια της Γερμανίας στα τέλη της δεκαετίας του 1980. Επίσης, ιδιαίτερα αυξημένη ποσότητα όξινης βροχής δέχονται λίμνες και ποταμάκια κατά την άνοιξη με την τήξη των πάγων. Η όξινη βροχή καταστρέφει κτίρια, μνημεία και αγάλματα κατασκευασμένα από ορυκτό υλικό, που είναι συνήθως ανθρακικό ασβέστιο (CaCO<sub>3</sub>), όπως ασβεστόλιθος, μάρμαρο κ.λπ. Το θειικό οξύ που περιέχεται στην όξινη βροχή ενώνεται με το ασβέστιο και δίνει γύψο (CaSO<sub>4</sub>), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Έτσι, το ανθρακικό ασβέστιο μετατρέπεται σε γύψο, ο οποίος στη συνέχεια ενώνεται με τους υδρατμούς της ατμόσφαιρας ή το νερό της βροχής, φουσκώνει και σκάει, με τελικό αποτέλεσμα τη διάβρωση ή την αποσάθρωση του υλικού. Το θειικό οξύ επιδρά επίσης και στις εξωτερικές υαλογραφίες των κτιρίων, καθώς αποχρωματίζει και θαμπώνει το γυαλί. Καταστροφές μνημείων εξαιτίας της όξινης βροχής έχουν σημειωθεί σε πάρα πολλές χώρες σε όλο τον κόσμο.

Για την αντιμετώπιση της όξινης βροχής, καθίσταται αναγκαίος ο περιορισμός του διοξειδίου του θείου και των οξειδίων του αζώτου. Τα σημαντικότερα μέτρα προς την κατεύθυνση αυτή περιλαμβάνουν την αποθείωση των καυσαερίων των εργοστασίων και την εφαρμογή καταλύτη καυσαερίων στο αυτοκίνητο (Likens et al, 1996; Ζάνης, 2014).

## 2.5 Πρόβλημα με το H<sub>2</sub>S

Το υδρόθειο είναι ένα πολύ τοξικό αέριο που επηρεάζει το νευρικό και το αναπνευστικό σύστημα. Το H<sub>2</sub>S εισπνέεται και εισέρχεται στο κυκλοφορικό σύστημα όπου και διασπάται δημιουργώντας το σουλφιδικό ιόν, HS<sup>-</sup>. Αυτό το κλάσμα αλλά και ολόκληρα τα υπολείμματα του H<sub>2</sub>S στο αίμα αντιδρούν με μεταλλοπρωτεΐνες, πρωτεΐνες που περιέχουν δισουλφίδια και την θειο-μεθυλ τρανσφεράση, δημιουργώντας μεθυλικά σουλφίδια. Τα σουλφίδια αλληλεπιδρούν με αρκετά ένζυμα και άλλα μακρομόρια,

συμπεριλαμβανομένης της αιμογλοβίνης και της επίσης τα περισσότερα μακρομόρια συγκρατούνται από δυσουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι εύκολα διασπώνται από υδατικά σουλφίδια. Ο τρόπος δράσης του μοιάζει με του υδροκυάνιου που παρεμποδίζει την οξειδάση του κυτοσώματος, η οποία είναι απαραίτητη για την αναπνοή. Ο βασικός παράγοντας τοξικότητας είναι η συγκέντρωση του υδρόθειου παρά η διάρκεια έκθεσης σε αυτό. Έτσι σε υψηλές συγκεντρώσεις δεν υπάρχουν πολλά περιθώρια ασφάλειας. Επιπλέον, η υπερβολική έκθεση προκαλεί απώλεια αισθήσεων και δυσκολεύει πολύ την πιθανότητα διαφυγής με το ρίσκο να αυξάνεται για άτομα που εκτίθενται σε συγκεντρώσεις πάνω από το επιτρεπτό όριο των 10ppm και σε περίπτωση που φτάσει τα 1000 με 2000 ppm μπορεί σκοτώσει τον εκτιθέμενο σε 10 δευτερόλεπτα. Σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλεί συμπτώματα πονοκεφάλου και ζαλάδας. Ευτυχώς, τα σουλφίδια είναι διαβόητα για την μυρωδιά τους, η οποία αποτελεί προειδοποίηση (Guidotti, 1996).

*Πίνακας 2.6: Συμπτώματα έκθεσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υδρόθειου (Guidotti, 1996).*

Χαμηλή	Μεσαία	Υψηλή
Βήχας	Λιποθυμία	Πνιγμός
Αίσθηση καψίματος	Ωχρότητα	Διαστολή κορών
Τσούξιμο στα μάτια	Κράμπες	Απώλεια παλμών
Υπνηλία	Διακοπές στην αναπνοή	Απώλεια αναπνοής

Στα προϊόντα υγρού πετρελαίου, οι θειούχες ενώσεις ευνοούν τον σχηματισμό κολλοειδών αποθέσεων οι οποίες βουλώνουν τα φίλτρα των συστημάτων που κυκλοφορούν τα καύσιμα μηχανών.

### 3. Νομοθεσία

Για όλους τους λόγους που έχουν προαναφερθεί γίνεται κατανοητό ότι θα ήταν ιδανικό στις μηχανές εσωτερικής καύσης να έχουμε καύσιμα μηδενικού θείου. Βέβαια, ποσότητες θείου εντοπίζονται ακόμα και στα πιο έντονα αποθειωμένα καύσιμα.

Το 2006, ο οργανισμός για την προστασία του περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (US EPA) έθεσε το μέγιστο επίπεδο θείου στα 15 mg/kg στο πετρέλαιο diesel. Την αντίστοιχη περίοδο οι κανονισμοί στην Ευρώπη ήταν πιο αυστηροί θέτοντας το επίπεδο του θείου στα 10mg/kg. Όσον αφορά το diesel και την βενζίνη ως καύσιμα μεταφορών οι ΗΠΑ και ο Καναδάς έθεσαν τα όρια στα 15mg/kg και 30mg/kg αντίστοιχα. Από εκείνη τη στιγμή και έπειτα τα διυλιστήρια άρχισαν να αντιμετωπίζουν αυξανόμενες προκλήσεις ώστε να φτάσουν τα παραπάνω στάνταρ θείου στα υγρά καύσιμα. (Al-Degs, 2016)

Όσον αφορά τα καύσιμα κινητήρων εσωτερικής καύσιμα ορίστηκε το επίπεδο του θείου στο 0.10% σύμφωνα με το «ΦΕΚ 9 Δεκεμβρίου 2016 ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ Αρ. Φύλλου 3958 Εναρμόνιση της Ελληνικής Νομοθεσίας προς την Οδηγία (ΕΕ) 2016/802 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 11ης Μαΐου 2016 σχετικά με τη μείωση της περιεκτικότητας ορισμένων υγρών καυσίμων σε θείο».

#### Στα ναυτιλιακά καύσιμα

Το 2008 αποφασίστηκαν τα όρια του θείου στα καύσιμα των πλοίων τα οποία αναμένεται αν ισχύσουν από την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου του 2020. Αρχικά, εξεταζόταν το ενδεχόμενο τα όρια αυτά να μην εφαρμοστούν μέχρι και την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου του 2025, όμως μετά από μελέτη που έγινε τον Οκτώβριο του 2016 λήφθηκε η απόφαση να θεσμοθετηθεί το όριο του 0.50% από την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου του 2020 το οποίο αποτελεί σοβαρή μείωση σε σχέση με το 3.50% που ίσχυε από την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου του 2012.

Τα όρια που έχουν τεθεί διαφέρουν για τις “Emission Control Areas (ECA)” και για τις υπόλοιπες περιοχές. Ως ECA ορίζονται οι περιοχές που ελέγχεται η εκπομπή οξειδίων του θείου και σωματιδίων και είναι οι εξής:

1. Η περιοχή της βαλτικής θάλασσας – Αφορά μόνο τα οξείδια του θείου
2. Η περιοχή της Βόρειας Θάλασσας - Αφορά μόνο τα οξείδια του θείου
3. Η περιοχή της βορίου Αμερικής (εισήχθη τη 1<sup>η</sup> Αυγούστου του 2012) – Αφορά τα οξείδια του θείου, του αζώτου και των εκπεμπόμενων σωματιδίων.
4. Η περιοχή των Η.Π.Α και της Καραϊβικής θάλασσας (εισήχθη την 1<sup>η</sup> Ιανουαρίου του 2014) - Αφορά τα οξείδια του θείου, του αζώτου και των εκπεμπόμενων σωματιδίων.

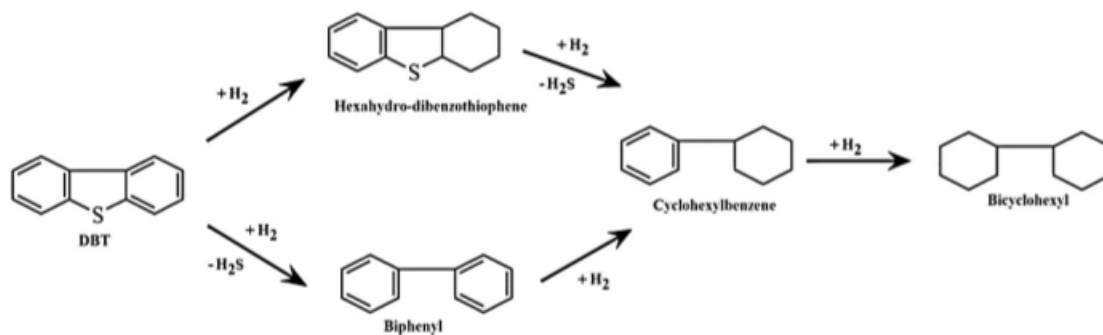
Πίνακας 3.1: Μέγιστες περιεκτικότητες ναυτιλιακών καυσίμων για περιοχές ECA και μη (IMO).

Όρια εκπομπών σε περιοχές εκτός ECA όσον αφορά τα οξείδια του θείου και τα εκπεμπόμενα σωματίδια.	Όρια εκπομπών εντός ECA όσον αφορά τα οξείδια του θείου και τα εκπεμπόμενα σωματίδια.
4.50% κατά μάζα πριν την 1 <sup>η</sup> Ιανουαρίου 2012	1.50% κατά μάζα πριν την 1 <sup>η</sup> Ιουλίου 2010
3.50% κατά μάζα μετά την 1 <sup>η</sup> Ιανουαρίου 2012	1.00% κατά μάζα μετά την 1 <sup>η</sup> Ιουλίου 2010
0.50% κατά μάζα από την 1 <sup>η</sup> Ιανουαρίου 2020	0.10% κατά μάζα από την 1 <sup>η</sup> Ιανουαρίου 2015

#### 4. Υδρογονοαποθείωση

Η Υδρογονοαποθείωση (HDS) χρησιμοποιείται σε μεγάλο αριθμό των εμπορικών εφαρμογών, αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να είναι η πλέον υιοθετημένη μέθοδος αποθείωσης τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Κατά την HDS τα περισσότερα OSCs υδρογονώνονται, κάτι το οποίο παράγει H<sub>2</sub>S, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια. Οι απλέςθειόλες, τα σουλφίδια και τα δισουλφίδια καταστρέφονται τελειωτικά από την HDS. Όμως, η δραστηριότητα της HDS όσον αφορά μεγάλα αρωματικά μόρια που

περιέχουν θείο όπως τα DMBDTs είναι αρκετά περιορισμένη. Συγκεκριμένα οι ολοκληρωτική απομάκρυνση του DBT και των παραγώγων του με υδρογονοαποθείωση παρότι εφικτή, προϋποθέτει την λειτουργία σε εξαιρετικά υψηλές συνθήκες, όπως υψηλές θερμοκρασίες, υψηλές πιέσεις και μεγάλη κατανάλωση H<sub>2</sub>. Συγκεκριμένα, η διεργασία της υδρογόνωσης συνήθως διεκπεραιώνεται σε θερμοκρασίες στο εύρος από των 300 έως 450 °C και σε πιέσεις υδρογόνου μεταξύ 3 και 5MPa σε παρουσία ενός καταλύτη CoMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ή NiMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Al-Degs et al, 2016) και παρόλα αυτά δεν μπορεί εύκολα να επιτευχθεί αποθείωση που οδηγεί σε περιεκτικότητα 50 ppmwS. Επιπλέον, η συμβατική υδρογονοαποθείωση (HDS) δεν μπορεί να δώσει αποτελέσματα στα επίπεδα σχεδόν μηδενικού θείου που απαιτούνται, με ταυτόχρονη διατήρηση των απαιτήσεων του καυσίμου στο περιεχόμενο οξυγόνο, την τάση ατμών, το περιεχόμενο σε βενζίνη, το συνολικό περιεχόμενο σε αρωματικά, το εύρος βρασμού, το περιεχόμενο σε ολεφίνες στη βενζίνη, τον αριθμό κετανίου, την πυκνότητα και την απαίτηση για 95% απόσταξη στο diesel (Babich and Moulijn,2003). Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η αποθείωση του DBT υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας. Όπως φαίνεται η τελική κατάληξη του DBT είναι το bicyclohexyl το οποίο παραμένει στο τελικό ρεύμα, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία (Al-Degs et al, 2016). Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα της υδρογονοαποθείωσης είναι η ικανότητα της να επεξεργάζεται διαφορετικά κλάσματα (π.χ βενζίνη, diesel, κηροζίνη) με πολύ μεγάλα επίπεδα οργανοθειικών ενώσεων (OSCs). Για παράδειγμα η αποθείωση καυσίμου που περιέχει 21 900 ppmw μπορεί να επιτευχθεί με απόδοση 57%.

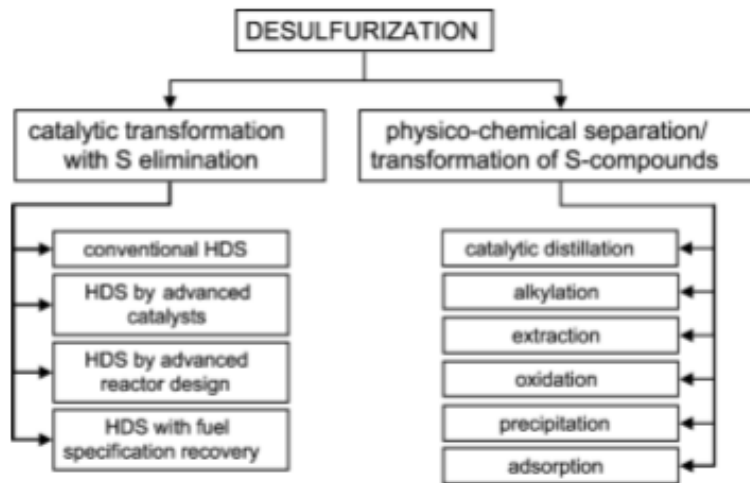


Εικόνα 4.1: Μηχανισμός διάσπασης του DBT με υδρογονοαποθείωση (Al-Degs et al, 2016).

Η άμεση αποθείωση καυσίμων υπερβολικά πλούσιων σε θείο από άλλες μη καταλυτικές μεθόδους πιθανώς δεν είναι δυνατή. Συνεπώς, συχνά προτείνεται οι νέες τεχνικές να εφαρμόζονται με σκοπό την να συμπληρώνουν την υδρογονοαποθείωση, οδηγώντας έτσι σε θεμιτά επίπεδα θείου. Η μοναδικότητα της έγκειται στο γεγονός ότι δεν υπάρχει άλλη διεργασία που να μπορεί να καθαρίσει καύσιμα πλούσια σε θείο, της τάξης των 1000ppm και να επιτύχει τελική συγκέντρωση 100ppm σε ένα μόνο βήμα (Al-Degs, 2016). Γενικά θεωρείται πως η κατάλυση που σχετίζεται με την διύλιση του πετρελαίου, και συγκεκριμένα η διεργασία της υδρογονοαποθείωσης (HDS), θεωρούνται τεχνολογίες ώριμες και συχνά αναφέρεται ότι δεν αναμένεται να υπάρξουν νέες ανακαλύψεις. (Babich, Moulijn, 2003)

## 5. Υπερ-αποθείωση

Η βαθιά αποθείωση είναι η διεργασία απομάκρυνσης θείου σε τελικές συγκεντρώσεις κάτω των 15ppm για τα καύσιμα diesel. Αυτό δεν είναι εφικτό να συμβεί με την διαδεδομένη τεχνική της υδρογονοαποθείωσης λόγω της δυσκολίας να αντιδράσουν κάποιες οργανοθειικές ενώσεις. Η δραστηριότητα των θειούχων ουσιών στην υδρογονοαποθείωση είναι κατά σειρά: Θειοφένιο (TH)>αλκυλιωμένο TH>BT>αλκυλιωμένο BT>DBT> αλκυλιωμένο DBT (Babich and Moulijn, 2003). Η μετάβαση από την υδρογονοαποθείωση σε άλλες μεθόδους αποθείωσης είναι ένα δύσκολο πρόβλημα και οι τεχνικές που δοκιμάζονται είναι πολλές. Κάποιες από τις εναλλακτικές τεχνικές που δοκιμάζονται είναι: η Βιοαποθείωση, η οξειδωτική αποθείωση, η προσροφητική αποθείωση και οι αποθείωση μέσω εκχύλισης με ιοντικά υγρά (El – Gendy and Nassar, 2018)



Διάγραμμα 5.1: Κατηγοριοποίηση των τεχνικών αποθείωσης με βάση την βασική διεργασία τους (Babich and Moulijn, 2003).

## 6. Βιοαποθείωση

Την προηγούμενη δεκαετία 10 με 15 δισεκατομμύρια δολάρια επενδύθηκαν σε ευρωπαϊκά διυλιστήρια λόγω των αλλαγών στις περιβαλλοντικές νομοθεσίες. (Babich, Moulijn, 2003) Ένας από τους κύριους παραλήπτες όσον αφορά την έρευνα νέων τεχνικών αποθείωσης είναι η μικροβιακή αποθείωση ή αλλιώς βιοαποθείωση. Η βιοαποθείωση (BDS) μελετάται σαν μια συμπληρωματική στην υδρογονοαποθείωση τεχνολογία που έχει την ικανότητα να φτάνει ένα καύσιμο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις θείου με χαμηλά κόστη κεφαλαίου και λειτουργίας. (Mohebalı and Ball, 2016). Αυτό που καθιστά την βιοαποθείωση ιδανική στο να δρα συμπληρωματικά στην υδρογονοαποθείωση είναι το γεγονός ότι τα αλκυλικά μόρια DBT η αντίδραση των οποίων είναι στερεοχημικά παρεμποδισμένη κατά την υδρογονοαποθείωση είναι τα πλέον προτιμώμενα αντιδρώντα στην βιοαποθείωση. Έτσι το βέλτιστο μοντέλο θεωρείται ο συνδυασμός της συμβατικής HDS και της BDS. (Monticello, 1996; Grossman et al., 2001).

Ένα μεγάλο μέρος της έρευνας σχετικά με την βιοαποθείωση είναι προσανατολισμένο στην διάσπαση του Θειοφενίου (TH), του βενζοθειοφενίου (BT) και του διβενζοθειοφενίου (DBT). Οι ενώσεις αυτές είναι εξαιρετικά επίμονες και δύσκολες στις

αποδόμηση τους στη βιόσφαιρα και ελευθερώνονται στο περιβάλλον μέσω βιομηχανικών διεργασιών, όπως η αεριοποίηση και η υγροποίηση γαιανθράκων, η διύλιση του αργού πετρελαίου και μέσω ατυχημάτων όπου χύνεται πετρέλαιο στο περιβάλλον. Από όλα τα οργανοθειικά μόρια τα πιο δύσκολο να αποθειωθούν φέρεται να είναι τα αλκυλο υποκατεστημένα DBTs ακόμα και με πολύ έντονες συνθήκες υδρογονοαποθείωσης. Ταυτόχρονα, το DBT θεωρείται πως είναι η ουσία που μπορεί να χρησιμοποιηθεί καλύτερα για τη μοντελοποίηση της αποθείωσης των θειοφενικών θειούχων μορίων που υπάρχουν στα ορυκτά. Αυτό συμβαίνει γιατί το DBT και τα προϊόντα του υπολογίζεται ότι αποτελούν έως και το 70 wt% του περιεχόμενου θείου στο αργό του West Texas και ως 40 wt% του συνολικού θείου σε κάποιων αργών πετρελαίων της μέσης Ανατολής αλλά και επειδή το DBT είναι εμπορικά διαθέσιμη ουσία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο μόριο στην εξέλιξη τεχνικών αποθείωσης (El-Gendy and Speight, 2016).

## 6.1 Αναερόβια αποθείωση

Οι αναερόβιες αντιδράσεις προχωρούν πολύ πιο αργά από τις αερόβιες αλλά παράγουν τα ίδια προϊόντα με την συμβατική υδρογονοαποθείωση, υδρόθειο και αποθειωμένο καύσιμο. Οι πρώτοι μηχανισμοί αποθείωσης των βακτηρίων που ανάγουν το θείο με χρήση του ενζύμου υδρογενάση ανακαλυφθήκαν το 1935. Το 1953, προτάθηκε η αποθείωση αργού πετρελαίου με υδρογόνωση παρουσία ενός βακτηρίου, του *Desulfovibrio desulfuricans* (El-Gendy and Nassar, 2018). Παρόλα αυτά η πρώτη αναλυτική μελέτη της αναερόβιας αποθείωσης θειούχων υδρογονανθράκων εκδόθηκε το 1971 (Kurita et al., 1971). Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργούν οι αναερόβιες καλλιέργειες μελετήθηκε. Απομονώθηκαν αναερόβιες καλλιέργειες από περιοχές που συναντάται λιμνάζον πετρέλαιο, οι οποίες αναφέρθηκε ότι μπορούσαν να καταλύσουν την μετατροπή σε υδρόθειο από βενζοθειοφένιο και θειοφένιο. Αργότερα, μια μεικτή καλλιέργεια αποτελούμενη από διάφορα στελέχη *Desulfovibrio* και με παροχή υδρογόνου και γαλακτικού φάνηκε να μπορεί να σπάσει τους δεσμούς άνθρακα – θείου σε ένα μεγάλο εύρος θειούχων υδρογονανθράκων με αναγωγική αντίδραση



καταλυόμενη από την υδρογενάση (El-Gendy and Nassar, 2018). Η αποθείωση του πετρελαίου με αναερόβιες μεθόδους θεωρείται μια ελκυστική τεχνική καθώς αποφεύγονται όλα τα κόστη αερισμού αλλά και έχει το πλεονέκτημα της απελευθέρωσης θείου σε αέρια μορφή και όχι με τη μορφή σουλφιδίων τα οποία χρειάζονται περαιτέρω επεξεργασία (Ohshiro and Izumi, 1999). Δυστυχώς όμως, εξαιτίας θεμάτων σχετικών με την ασφάλεια, το κόστος, τους χαμηλούς ρυθμούς αντίδρασης και την αδυναμία ταυτοποίησης των ειδικών ενζύμων και γονιδίων υπεύθυνων για την αναερόβια αποθείωση στους αναερόβιους μικροοργανισμούς καμία αποτελεσματική τεχνική δεν έχει αναπτυχθεί. Συνεπώς το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας στρέφεται στην αερόβια βιοαποθείωση (Le Borgne and Quintero, 2003).

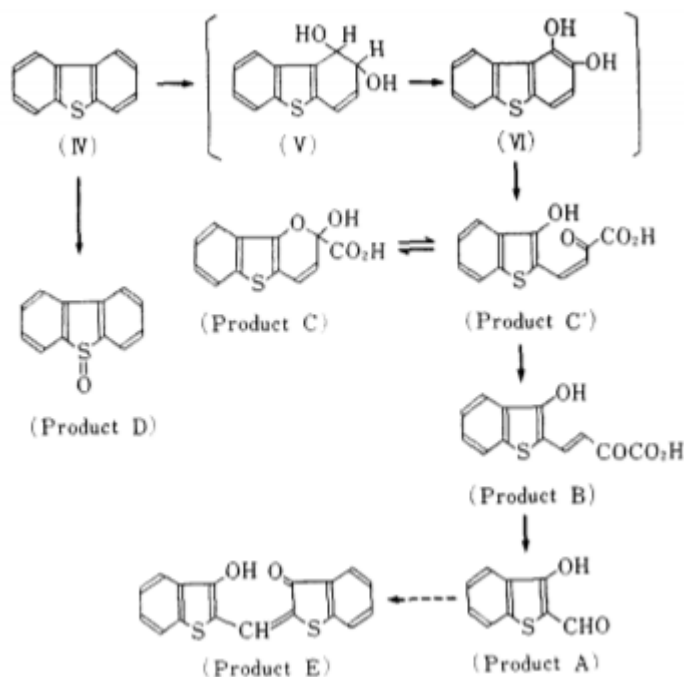
## 6.2 Αερόβια αποθείωση

Έχουν μελετηθεί τρία βασικά μονοπάτια αερόβιας αποθείωσης του DBT. Το πρώτο είναι ένα εντελώς καταστροφικό μονοπάτι, κατά το οποίο το DBT μετατρέπεται σε διοξείδιο του άνθρακα, θειούχα και νερό. Το δεύτερο είναι ένα μονοπάτι στο οποίο ο δακτύλιος καταστρέφεται και το μόριο μερικώς διασπάται με το θείο όμως να παραμένει στον οργανικό σκελετό. Το τρίτο είναι ένα μη καταστρεπτικό μονοπάτι στο οποίο μόνο το θείο αφαιρείται από το DBT χωρίς να συμβεί σπάσιμο της ανθρακικής αλυσίδας (El-Gendy and Nassar, 2018).

### 6.2.1 Το μονοπάτι Kodama

Το μονοπάτι Kodama είναι ένα οξειδωτικό μονοπάτι κατά το οποίο προκαλείται σπάσιμο στους δεσμούς άνθρακα – άνθρακα και αποτελείται από τρία κυρίως βήματα, αρχικά γίνεται πλευρική αποξυγόνωση ενός από τους ομοκυκλικούς δακτυλίους, στη συνέχεια σπάει η κυκλική αλυσίδα και τέλος γίνεται υδρόλυση παράγοντας υδροξυ – φορμυλ - βενζοθειοφένιο σαν το τελικό προϊόν. Η παραπάνω διαδικασία γίνεται συνήθως με την τοποθέτηση ενός πλασμιδίου σε διάφορα στελέχη *Pseudomonas*. Έχει παρατηρηθεί ότι σε περιβάλλον στο οποίο το θείο δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα, το μονοπάτι

Kodama είναι η πιο συνήθης μέθοδος μικροβιακής αποδόμησης του DBT (Bressler and Fedorak, 2001a,b). Οι μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχουν εννέα γονίδια που ελέγχουν τη μεταβολικό μονοπάτι. Το τελικό προϊόν του μονοπατιού είναι το υδρόξυ – φορμύλ – βενζοθειοφένιο το οποίο όμως είναι δυνατόν να μεταβολιστεί περαιτέρω από μικτές βακτηριακές καλλιέργειες. (Kodama,1970;1973).



Εικόνα 6.1: Μηχανισμός διάσπασης του DBT με το μεταβολικό μονοπάτι Kodama (Kodama, 1970).

Σε αυτό το μονοπάτι, εξαιτίας διάσπασης των δεσμών άνθρακα – άνθρακα, η θερμαντική αξία μειώνεται, πράγμα που καθιστά τη χρήση του για εμπορικούς σκοπούς αποθείωσης, μη θεμιτή.

### 6.2.2 Μονοπάτι 4S

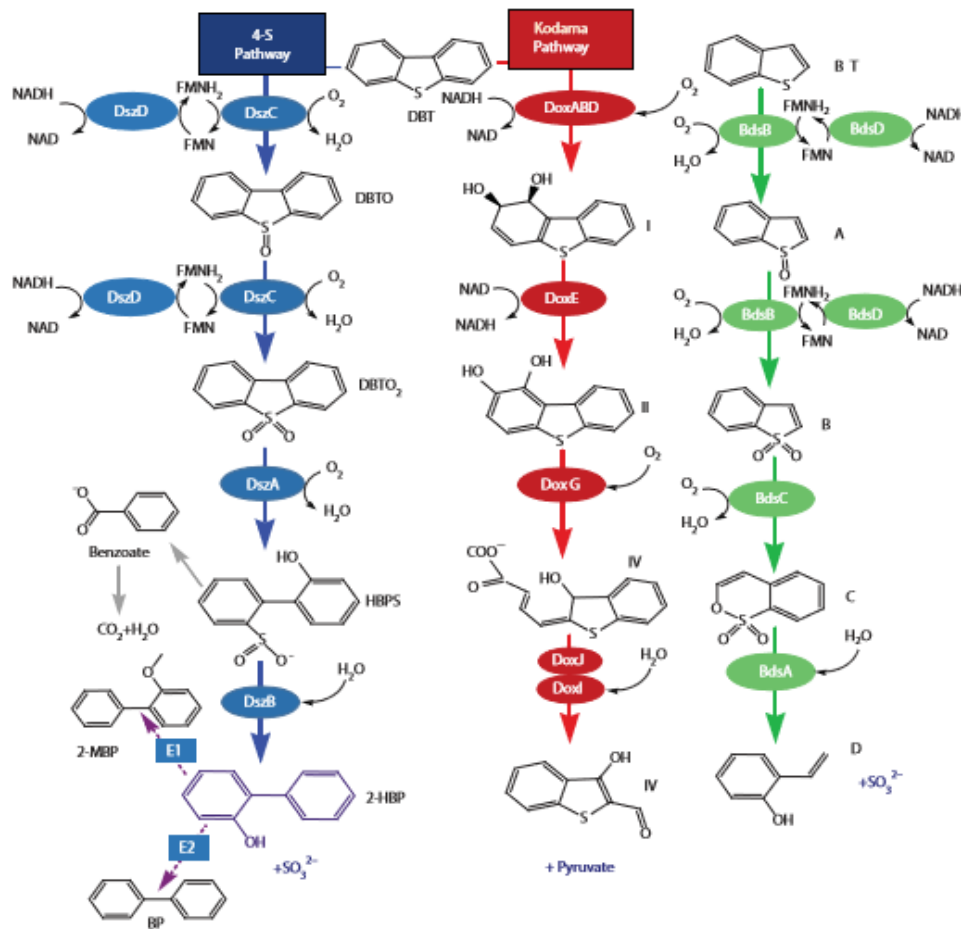
Μετά από 40 χρόνια ερευνών επετεύχθη από τον Kilbane, στο Ινστιτούτο τεχνολογίας καυσίμων των ΗΠΑ, το 1990, η απομόνωση ενός κατάλληλου βακτηρίου, ικανού να παρέχει ένα αποθειωτικό μονοπάτι εξειδικευμένο στην απομάκρυνση του θείου από το DBT. Το στέλεχος αυτό είναι το *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 από το οποίο και

απομονώθηκε ένα γραμμικό πλασμίδιο, το οποίο περιέχει το κομμάτι του DNA που ευθύνεται για την έκφραση των ενζύμων τα οποία καταλύουν την οξειδωση του DBT. Από τότε πολλοί ερευνητές κατάφεραν να απομονώσουν διαφορετικά είδη βακτηρίων ικανών να αποθιώσουν το DBT και τα αλκυλιωμένες του μορφές με ένα μονοπάτι εξειδικευμένο στην απομάκρυνση του θείου. (Kilbane, 1992; El – Gendi and Nassar, 2008) Το βιοχημικό μονοπάτι της εκλεκτικής απομάκρυνσης θείου από το DBT έχει ονομαστεί «μονοπάτι 4S» ή «μονοπάτι dsZ» εξαιτίας της οξειδωσης του θείου που συμβαίνει σε 4 βήματα όπως φαίνεται και στο σχήμα. Μέσω αυτού του μονοπατιού το DBT μετατρέπεται από τα τρία ένζυμα DszA, DszB, and DszC που βρίσκονται κωδικοποιημένα στο οπερόνιο του πλασμιδίου.

Αρχικά, το γονίδιο dszC εκφράζει την μονοοξειδάση του DBT (dszC) η οποία καταλύει την οξειδωση του DBT σε DBT-sulfoxide και στη συνέχεια σε DBT sulfone. Έπειτα το γονίδιο dszA κωδικοποιεί την μονοοξειδάση της DBT - σουλφόνης η οποία καταλύει της οξειδωση DBT – σουλφόνης σε 2-hydroxybiphenyl-2-sulfinat (2-HBPS). Τελικά, το γονίδιο dszB κωδικοποιεί την σουλφινουάση του 2-HBPS (desulfinase) η οποία καταλύει την μετατροπή του 2-HBPS σε 2-hydroxybiphenyl (22-HBP) και sulfite. Όμως και ένα ακόμη ένζυμο το οποίο κωδικοποιείται απο το γονίδιο dszD απαιτείται σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι, το οποίο είναι υπεύθυνο για την έκφραση της οξειδοαναγωγής του NADH-FMN (DszD) που επιτρέπει την αναδόμηση του FMNH<sub>2</sub> cofactor που απαιτείται για τις αντιδράσεις που καταλύουν τα DszC και DszA (Gray et al., 2003; Kilbane et al, 2006, El – Gendi and Nassar, 2008).

Παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι τα dsz γονίδια είναι επαγώγημα, είναι έντονα παρεμποδισμένα από θειικά και θειούχα αμινοξείδια. Το σημείο όπου αρχίζει η μεταγραφή του οπερονίου του γονιδίου το dszABC έχει χαρτογραφηθεί και έχουν βρεθεί 46 νουκλεοτίδια. Έχουν βρεθεί τουλάχιστον τρεις περιοχές που επηρεάζουν το την έκφραση του dsz. Η πρώτη (-263 to -244) μειώνει την παρεμπόδιση του dsz αλλά με τη διαγραφή της δεν επηρεάστηκε η παρεμπόδιση ή η έκφραση, στη δεύτερη περιοχή (-146 to -121) πιθανώς μπορεί να προσδεθεί ένας απαγωγέας και η

τρίτη περιοχή (-98 to -57) θα μπορούσε να είναι σημείο πρόσδεσης παρεμποδιστή (Li et al., 1996).



Εικόνα 6.2: Συγκριτικό σχεδιάγραμμα των μεταβολικών μονοπατιών 4S και Kodama

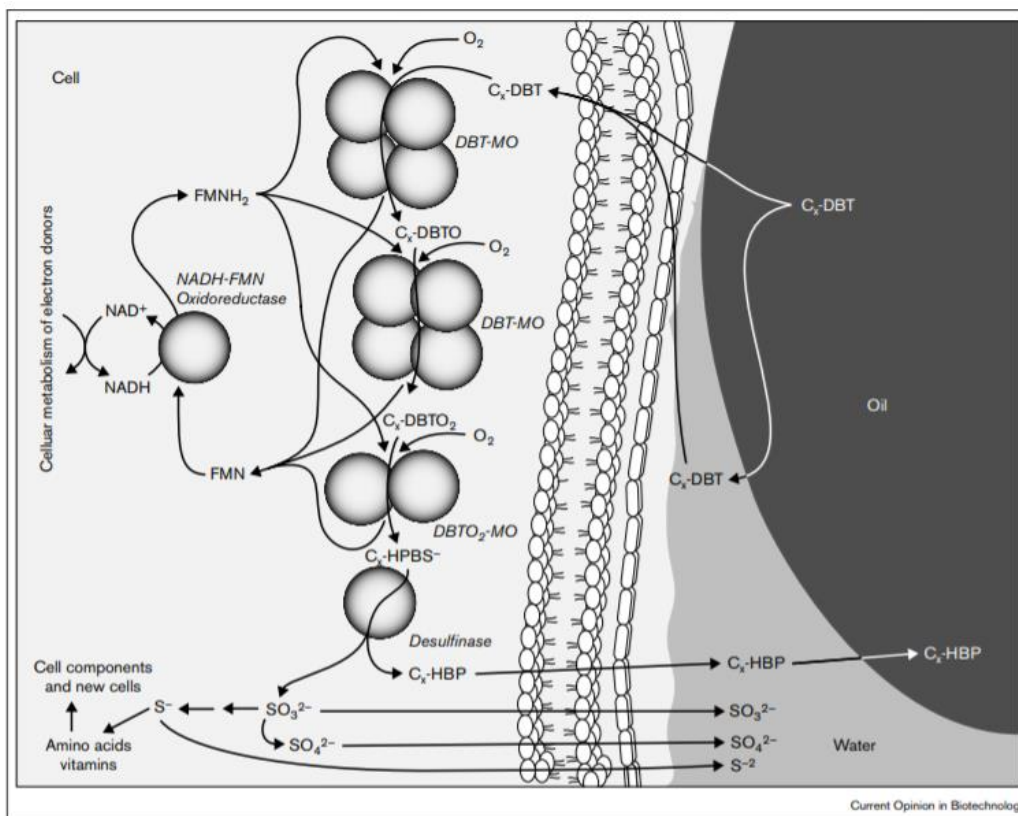
Η ικανότητα αποθείωσης είναι γενικά διασκορπισμένη μεταξύ μεσόφιλων μικροοργανισμών και μια ποικιλίας και βακτηριακών στελεχών στα οποία έχει παρατηρηθεί ένα παρεμφερές οπερόνιο με του dsz (Gray et al., 2003; Kilbane, 2006). Κανονικά το τελικό προϊόν του μεταβολικού μονοπατιού είναι το 2 – 2-HBP, όμως έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη ενός εκτεταμένου 4S μονοπατιού που έχει βρεθεί σε κάποια θερμόφιλα στελέχη του γένους *Mycobacterium*. Σε αυτό το μονοπάτι, το τελικό προϊόν του κανονικού 4S, το 22-HBP, μεθοξυλιώνεται σε 2 μεθοξιδιφενυλ εξαιτίας της δράσης μιας O-μεθιλτρασφοράσης (Xu et al., 2006).

Πολλά είδη βακτηρίων έχει αναφερθεί ότι μπορούν να πραγματοποιήσουν επιλεκτική αποθείωση του DBT και των παραγώγων του ή γενικότερα ότι μπορούν να αποθειώσουν οργανοθειικές ενώσεις από διάφορα κλάσματα του πετρελαίου μέσω του μονοπατιού 4S. Με ανάλυση των διαθέσιμων γενομικών αρχείων ταυτοποιήθηκαν 13 νέοι μικροοργανισμοί ικανοί να αποθειώσουν το DBT. Αυτοί είναι οι : *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Brevibacillus*, *Corynebacterium*, *Desulfobacterium*, *Desulfovibrio*, *Gordonia*, *Lysinibacillus*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Shewanella*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas* (Mohebbali and Ball, 2016).

### **6.3 Φαινόμενα μεταφοράς μάζας στην βιοαποθείωση**

Έχει παρατηρηθεί ότι η μεταφορά μάζας του αντιδρώντος είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό αποθείωσης (Kobayashi et al., 2001). Γενικότερα, οι περισσότερες μετατροπές υδρογονανθράκων που πραγματοποιούνται από βακτήρια επηρεάζονται σημαντικά από το σχεδιασμό της διεργασίας. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έγινε χρήση ενός σύστημα *Pseudomonas* στα πρότυπα του μονοπατιού Kodama για να μελετήσουν το πρόβλημα της μεταφοράς του DBT από την οργανική φάση στην υδατική και στη συνέχεια στα κύτταρα σαν παράγοντα περιορισμού του μεταβολισμού του DBT (Setti et al. 2003). Τα πειράματα έδειξαν ότι στα στελέχη *Pseudomonas* υπήρξε αντίστοιχη παρεμπόδιση ακόμα και όταν τους είχαν τοποθετηθεί τα *dsz* γονίδια. Αυτό θεωρείται πως συμβαίνει λόγω της υδροφοβικής φύσης των βακτηρίων όπως ο *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 σε σχέση αυτά τύπου *Pseudomonas*. Σε ένα διφασικό σύστημα με οργανική και υδατική φάση, τα βακτήρια *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 προσκολλώνται στην διεπιφάνεια των δύο φάσεων. Για παράδειγμα όταν το σύστημα αφήνεται σε ηρεμία τα βακτήρια βρίσκονται κοντά στις σταγόνες της οργανικής φάσης και η υδατική φάση είναι καθαρή. Αντίθετα, στα

συστήματα *Pseudomonas*, τα κύτταρα παραμένουν διαλυμένα στην υδατική φάση. Έτσι προκύπτει η απλή εξήγηση πως η διαφορά στον ρυθμό μεταφοράς μάζας για τους δύο μικροοργανισμούς, οφείλεται στο γεγονός ότι ο *Rhodococcus* «πίνει από την οργανική φάση» καθώς έχει πρόσβαση στο DBT κατευθείαν, ενώ ο *Pseudomonas* «πίνει από το νερό» αφού έχει πρόσβαση στο DBT που διαλύεται στην υδατική φάση, το οποίο βέβαια είναι σε πολύ μικρότερη συγκέντρωση. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται πως ένα κύτταρο που βρίσκεται στη διεπιφάνεια οργανικής και υδατικής φάσης μεταβολίζει το DBT (Monticello, 2000; Mohebbali and Ball, 2016)



Εικόνα 6.4: Ένα συγκεντρωτικό διάγραμμα ορισμένων βημάτων της αποθείωσης του πετρελαίου. Δεν είναι ακόμα επιβεβαιωμένο το πόσα διαφορετικά βήματα παίρνουν μέρος στη μεταφορά των μορίων Cx-DBT από το πετρέλαιο στο πρώτο ένζυμο. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η μεταφορά μάζας δεν παρεμποδίζεται από ένα ενδιάμεσο στάδιο μεταφοράς Cx-DBT από το πετρέλαιο στο νερό και από το νερό στο κύτταρο. Δεν έχει γίνει ξεκάθαρο το πώς τα μόρια Cx-2-HBP ή Cx-HPBS εξέρχονται των κυττάρων (Monticello, 2000).

DBTO: dibenzothiophene sulfoxide; DBTO<sub>2</sub>: dibenzothiophene sulfone; DBT-MO: dibenzothiophene monooxygenase

## 6.4 Τα προβλήματα σχετικά με την βιοαποθείωση

Κατά τη διάρκεια των χρόνων, έχουν βρεθεί αρκετά προβλήματα σε σχέση με την βιομηχανική εφαρμογή της βιοαποθείωσης παρότι έχει μελετηθεί σαν συμπληρωματική στην υδρογονοαποθείωση τεχνική. Ένα από τα σοβαρότερα ζητήματα που εμποδίζουν μια χρηστική εφαρμογή της βιοαποθείωσης στη βιομηχανία είναι τα υψηλά κόστη ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε θρεπτικά μέσα. Υπό αυτό το πρίσμα, έχει μελετηθεί η χρήση πηγών άνθρακα προερχόμενων από γεωργικά βιομηχανικά προϊόντα ώστε να μειωθούν τα κόστη κεφαλαίου. Για παράδειγμα ερευνήθηκε η χρήση μιας πηγής άνθρακα υψηλής σε φρουκτόζη με το στέλεχος *G.alkanivorans* 1B προς αποθείωση ετεροκυκλικών θειούχων ενώσεων σε καύσιμα κίνησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλότερη βιοαποθιωτική ικανότητα όσον αφορά το BT και το DBT συγκρινόμενα με στελέχη *Rhodococcus erythropolis* (Alves and Paixão, 2014; Paixão et al, 2016). Ένα άλλο εμπόδιο αποτελεί το κόστος του μικροοργανισμού στη βιομηχανία βιοαποθείωσης. Μία τεχνική που έχει προταθεί προκειμένου να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα είναι η ακινητοποίηση των κυττάρων (Chang et al, 2000). Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα προβλήματα που συνδέονται με τα φαινόμενα μεταφοράς των οργανικών ενώσεων από την οργανική φάση στα κύτταρα είναι ένα ακόμη θέμα που δυσχεραίνει την ανάπτυξη της διεργασίας σε βιομηχανική κλίμακα. Οι Goubin et al. δημιούργησαν assembled γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> νανοροφητές τους οποίους και πρόσδεσαν σε στελέχη *Pseudomonas delafieldii* R-8. Παρατηρήθηκε αυξημένος ρυθμός προσρόφησης σε σχέση με την κλασική βιοαποθείωση καθώς ενισχύθηκε η μεταφορά του DBT από την οργανική φάση στην επιφάνεια των βακτηρίων.

## 7. Παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποθείωση

Αναφέρεται συχνά στη βιβλιογραφία πως υπάρχει μια πληθώρα παραγόντων που επηρεάζουν τους ρυθμούς και την απόδοση της βιοαποθείωσης: προβλήματα στη διάχυση του αντιδρώντος, η ύπαρξη φαινομένων παρεμπόδισης και άλλοι

φυσικοχημικοί παράγοντες. Υπάρχουν όμως και παράγοντες που δεν είναι φυσικοχημικής φύσεως, όπως για παράδειγμα το ότι τα resting cells είναι προτιμότερα από τα growing cells. (Chang et al., 2000). Επίσης, προτιμότερη θεωρείται η χρήση διφασικών συστημάτων καθώς αυξάνουν την διαλυτότητα και την διαθεσιμότητα των υδρόφοβων ουσιών στον βιοκαταλύτη και μειώνουν την παρεμπόδιση που υφίσταται λόγω της συγκέντρωσης του 2-HBP. Παρόλα αυτά η διάρκεια ζωής των κυττάρων επηρεάζεται από την τοξικότητα του διαλύτη και τη μεταφορά μάζας και οξυγόνου. Το pH, η θερμοκρασία της διεργασίας, η συγκέντρωση βιομάζας, η αναλογία οργανικής με υδατική φάση και η αρχική συγκέντρωση του θείου είναι άλλοι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την βιοαποθείωση (El-Gendy and Nassar, 2017).

## 7.1 Χρονική διάρκεια αποθείωσης (Growing Cells)

Είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε σε πια χρονική στιγμή ο βιοκαταλύτης δίνει την υψηλότερη απόδοση βιοαποθείωσης. Όσο πιο σύντομο είναι αυτό το χρονικό διάστημα τόσο μεγαλύτερος ο ρυθμός της βιοαποθείωσης και τόσο καλύτερη θα είναι η βιομηχανική εφαρμογή και εμπορευματοποίηση της μεθόδου βιοαποθείωσης.

Οι del Olmo et al. (2005a) έχουν αναφέρει πως ο *R. erythropolis* IGTS8 παρουσίασε μέγιστη ικανότητα αποθείωσης του DBT σε καλλιέργειες σε αναδεδυόμενες φιάλες στο τέλος της εκθετικής της ανάπτυξης των κυττάρων, το οποίο προσδιορίστηκε μεταξύ 15 και 25 h ανάπτυξης. Όμως, μια άλλη έρευνα έδειξε πως αν τα κύτταρα καλλιεργηθούν για μεγαλύτερους χρόνους αλλά με την συγκέντρωση του οξυγόνου να διατηρείται σταθερή και ίση με το 10% της συγκέντρωσης κορεσμού μπορούν να δώσουν υψηλές τιμές βιοαποθιωτικής ικανότητας.

Άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει πως δεν είναι αναγκαίο ο χρόνος κατά τον οποίο έχουμε μέγιστη απώλεια DBT να συμπίπτει με τον χρόνο μέγιστης παραγωγής 2-HBP και μέγιστης κυτταρικής. Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται κυρίως με την παρεμπόδιση των από τα τελικά προϊόντα της βιοαποθείωσης. Έτσι είναι σημαντικό κατά την βελτιστοποίηση μια βιοαποθιωτικής διεργασίας να είναι γνωστός ο χρόνος επώασης



που θα δώσει την κατάλληλη μικροβιακή ανάπτυξη με μέγιστη ενζυματική ενεργότητα και βιοαποθειωτική απόδοση. Έχει επίσης αναφερθεί πως η μοντελοποίηση των φαινομένων που σχετίζονται με τη λογαριθμική φάση φαίνεται να είναι το σημαντικότερο κομμάτι των βιοαποθειωτικών πειραμάτων αφού εκεί εμφανίζονται οι μεγαλύτεροι ρυθμοί διάσπασης DBT και παραγωγής 2-HBP (Gomez et al, 2006a).

## 7.2 pH και θερμοκρασία

Πολλές αναφορές έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τις επιπτώσεις του pH και της θερμοκρασίας. Τα ένζυμα έχει αναφερθεί ότι επηρεάζονται από τις μεταβολές στο pH του συστήματος λόγω της εξάρτησης της τρισδιάστατης δομής τους από αυτό. Ένας επιπλέον λόγος είναι και η μεταβολές στις ιδιότητες που σχετίζονται με το ηλεκτρικό φορτίο του αντιδρώντος καθιστώντας το μη ικανό να προσδεθεί στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αναφέρεται πως η μεταβολές στο pH έχουν μεγάλες επιπτώσεις στον μεταβολισμό των μικροβίων όπως και στην διαλυτότητα και προσροφητικότητα των ιόντων και των υδρογονανθράκων που πρόκειται να μεταβολιστούν. Τέτοιες αλλαγές στο pH μπορεί να συμβούν εξαιτίας της παραγωγής μεταβολιτών. Έτσι προτείνεται η ρύθμιση του pH με διάλυμα NaOH, ώστε να αποφευχθεί η μείωση του pH. Οι πιο συνηθισμένες τιμές pH βρίσκονται μεταξύ 6.5 και 7.5 (Berg et al., 2002; Setti et al., 1999).

Οι μικροοργανισμοί που μεταβολίζουν DBT χρησιμοποιώντας το μονοπάτι 4S είναι μεσόφιλοι, ελαφρά θερμοφιλοι και υπερθερμοφιλοι. Οι περισσότερες όμως βιοαποθειωτικές διεργασίες λειτουργούν στους 30 °C. Έχει αναφερθεί ότι το πρώτο και το τρίτο ένζυμο του μονοπατιού 4S (DSZC and DSZB) είναι τα πιο ευαίσθητα σε μεταβολές της θερμοκρασίας σε σχέση με άλλα ένζυμα. Τα περισσότερα στελέχη *Rhodococcus* που ακολουθούν βιοαποθειωτικές διεργασίες διάσπασης του DBT έχει προσδιοριστεί ότι είναι μεσόφιλα, ένα από αυτά είναι και ο *R. erythropolis* IGTS8 (El-Gendy and Nassar, 2017; Li et al., 1996).

### 7.3 Επίδραση της συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου

Η βιοαποθειωτική ικανότητα και οι ενεργότητες των ενδοκυτταρικών ενζύμων επηρεάζονται έντονα από την συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο θρεπτικό μέσο. Το βιοαποθειωτικό μονοπάτι 4S επηρεάζεται έντονα από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου κάτω από συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου. Οι Del Olmo et al. (2005b) ανέφεραν ότι η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου μπορεί να ελεγχθεί από την ταχύτητα περιστροφής. Οι αναδυόμενες φυσαλίδες όμως έχουν αρνητική επιρροή στην απόδοση των κυττάρων. Έτσι οι ρυθμοί ανάμιξης και μεταφοράς οξυγόνου σε έναν βιοαντιδραστήρα εξαρτώνται από την ισχύ που καταναλώνεται λόγω της ανάδευσης και του αερισμού. Αν η ταχύτητα ανάδευσης περιοριστεί για να αποφευχθούν τα διατμητικά φαινόμενα, η ανάμιξη ή η μεταφορά μάζας θα περιορίζουν την απόδοση της καλλιέργειας, από την άλλη αν η ανάδευση ξεπεράσει ένα συγκεκριμένο όριο, οι υδροδυναμικές δυνάμεις μπορεί να επηρεάσουν τα κύτταρα. Συνεπώς η βέλτιστη κατάσταση είναι αυτή κατά την οποία οι ρυθμοί ανάδευσης και μεταφοράς μάζας ικανοποιούν τους ρυθμούς πρόσληψης οξυγόνου και θρεπτικών και η διεργασία διέπεται από τον κυτταρικό μεταβολισμό.

Είναι σημαντική η σωστή κατανόηση του ρόλου των ρυθμών μεταφοράς και πρόσληψης οξυγόνου στην αερόβια βιοαποθειωτική διεργασία καθώς αποτελεί βασική παράμετρο στον σχεδιασμό, την λειτουργία και την αύξηση της κλίμακας των βιοαντιδραστήρων. Στην έρευνα που πραγματοποίησαν οι del Olmo et al. (2005b) με το στέλεχος *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης και η μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας προέκυψαν από καλλιέργειες στους 30 °C και pH 6.5 το οποίο ελέγχεται με προσθήκη NaOH και με συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε τιμή ίση με το 20% του κορεσμού. Υπό αυτές τις συνθήκες, εμφανίστηκε και η βέλτιστη βιοαποθειωτική ικανότητα.

Έχει αναφερθεί πως η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου είναι παράγοντας κλειδί στη ροή της πηγής άνθρακα για την ανάπτυξη των κυττάρων και την βιοαποθειωτική ικανότητα του *R. erythropolis* IGTS8. Αυτό δεν επηρεάζει μόνο τον ρυθμό ανάπτυξης αλλά και τα ένζυμα που παράγονται από τα κύτταρα και τα οποία στη συνέχεια

χρησιμοποιούνται στην βιοαποθείωση κατά τη διαδικασία των resting cells. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με τον *R. erythropolis* IGTS8, παρατηρήθηκε ότι η καμπύλη ανάπτυξης με DBT σε διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης, η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου μειώθηκε σε μια ελάχιστη τιμή που αντιστοιχεί σε ένα σημείο της εκθετικής φάσης όπου η απαίτηση για οξυγόνο των κυττάρων είναι η μέγιστη. Επιπλέον, κάτω από πολύ χαμηλές συνθήκες ανάδευσης (100–150 rpm), η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου έφτασε το 0% λίγες μόλις ώρες ανάπτυξης (μεταξύ 12 and 15 h). Κάτω από αυτές τις συνθήκες η καλλιέργεια βρίσκεται υπό περιορισμένο οξυγόνο και ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου ελέγχει τον συνολικό ρυθμό της διεργασίας και συνεπώς ο ρυθμός ανάπτυξης αυξάνεται με αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης. Ο ιδικός ρυθμός ανάπτυξης και η μέγιστη ανάπτυξη των κυττάρων είναι χαμηλές για συνθήκες ανάδευσης < 250 rpm. Αυτό οφείλεται στις συνθήκες της δυναμικής του ρευστού στον βιοαντιδραστήρα υπό αυτές τις συνθήκες, έχοντας σαν αποτέλεσμα ο ρυθμός μεταφοράς οξυγόνου να μην είναι επαρκής (χαμηλότερος από τον ρυθμό πρόσληψης) και η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου να γίνεται το παρεμποδιστικό στοιχείο. Από την άλλη, για ταχύτητες ανάδευσης 250 – 450 rpm αυξήθηκε ο ιδικός ρυθμός ανάπτυξης και η μέγιστη ανάπτυξη των κυττάρων φτάνοντας τιμές  $0.26 \text{ h}^{-1}$  and  $1.8 \text{ g/L}$ , αντίστοιχα. Τέλος και οι δύο μειώθηκαν για μεγαλύτερες ταχύτητες ανάδευσης φτάνοντας τιμές  $0.146 \text{ h}^{-1}$  and  $1.018 \text{ g/L}$  στα 700 rpm. Αφού τα κύτταρα επηρεάστηκαν έντονα από την μηχανική ανάδευση, αποδείχτηκε ότι οι υδροδυναμικές δυνάμεις ή το επίπεδο του οξυγόνου επηρεάζουν τον κυτταρικό μεταβολισμό, το οποίο μπορεί να φανερωθεί από την μείωση του ειδικού ρυθμού πρόσληψης οξυγόνου (El-Gendy and Nassar, 2017).

#### **7.4 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας**

Η επίδραση της συγκέντρωσης αρχικής βιομάζας (20–120 g DCW/L) των resting cells του στελέχους *Rhodococcus sp* P32C1 (το οποίο μέχρι πρότινος είχε ταυτοποιηθεί ως *Corynebacterium sp.*) σε μια βιοαποθειωτική διεργασία σε διφασικό σύστημα με την οργανική φάση να περιέχει 24 mM DBT σε n-δεκαεξάνιο και αναλογία 50 vol.% οργανική

προς υδατική φάση. (Maghsoudi et al., 2001). Οι ρυθμοί παραγωγής 2 – HBP σε υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων είναι πιο χαμηλές, λόγω παρεμπόδισης μεταφοράς μάζας, ειδικότερα μεταφοράς οξυγόνου που απαιτείται για την οξείδωση της αντίδρασης του DBT, όμως οι μέγιστες τιμές μετατροπής του DBT ήταν υψηλότερες.

Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής βιομάζας του κατά Gram αρνητικού στελέχους *P. delafieldii* R-8 σε ένα διφασικό σύστημα αποθείωσης με λόγο οργανικής προς υδατική φάση 1:1 και 1mM DBT διαλυμένο σε δωδεκάνιο, ο ρυθμός μειώνεται με αύξηση της κυτταρικής συγκέντρωσης, λόγω αντίστασης μεταφοράς μάζας, το οποίο είναι το βήμα ελέγχου. Επίσης, σε υψηλές συγκεντρώσεις βιομάζας ο διαχωρισμός μετά την διεργασία βιοαποθείωσης είναι δύσκολη και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αρκετά κύτταρα βρίσκονταν στην διεπιφάνεια οργανικής – υδατικής φάσης κατά τον διαχωρισμό με φυγοκέντρωση της υδατικής με την οργανική φάση όταν οι συγκεντρώσεις των κυττάρων ήταν μεγαλύτερες 20 g/L. Εκτός αυτού, παρατηρήθηκε πως παρότι το ένα μέρος των κυττάρων παρέμενε στην διεπιφάνεια, ένα σοβαρό ποσοστό τους έπεφτε στον πυθμένα, πράγμα που υποδηλώνει ότι πιθανώς να μην μπορούσαν αυτά τα κύτταρα να έρθουν σε επαφή σωστά με την οργανική φάση και άρα να αντιδράσουν με το DBT. Από αυτά τα φαινόμενα, πιθανολογείται πως η αποθειωτική διεργασία μπορεί να παρεμποδίζεται από τον ρυθμό ανανέωσης επιφάνειας καθώς ο βιοκαταλύτης αλληλεπιδρά με τη διεπιφάνεια ώστε να προσλάβει το DBT (Kaufman et al. 1998).

Ένα άλλο σύστημα στο οποίο μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης βιομάζας σε batch βιοαποθειωτική διεργασία ήταν αυτό με χρήση του μικροοργανισμού *Corynebacterium sp.* ZD-1 σε υδατικό σύστημα με 0.5 mM DBT διαλυμένο σε αιθανόλη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο ρυθμός παραγωγής 2-HBP ήταν υψηλότερος σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις βιομάζας και έφτασε σε μέγιστη τιμή 0.067 mmol/L στα 9.2 g DCW/L. Αυτό αποδόθηκε στην παρεμπόδιση λόγω φαινομένων μεταφοράς μάζας σε υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων, ειδικότερα την μεταφορά του οξυγόνου που είναι αναγκαία για την οξείδωση του DBT (Wang et al., 2004).

Οι Caro et al. (2007a) ανέφεραν πως σε μια μελέτη υδατικού συστήματος με αρχική συγκέντρωση DBT στα 54.27  $\mu\text{M}$ , παρουσιάστηκε μέγιστος ειδικός ρυθμός παραγωγής 2 – HBP ίσος 6.3  $\mu\text{mol HBP/g DCW/h}$  με 70% μείωση στο DBT από το στέλεχος *P. putida* CECT 5279 σε αρχική συγκέντρωση βιομάζας 8 g/L. Ο ρυθμός παρουσίασε μείωση για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιομάζας είτε λόγω παρεμπόδισης από τη μεταφορά μάζας του οξυγόνου είτε από την ανασταλτική λειτουργία του 2-HBP. Αντίστοιχα το στέλεχος *R. erythropolis* εμφάνισε σταθερό μέγιστο ειδικό ρυθμό παραγωγής 2-HBP, ίσο με 5  $\mu\text{mol /g DCW/h}$  για αρχικές συγκεντρώσεις βιομάζας από 2 έως 16 g/L.

## 7.5 Επίδραση της ηλικίας του βιοκαταλύτη

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που χρειάζονται προσοχή είναι η ηλικία του βιοκαταλύτη. Ο παρακάτω πίνακας περιέχει δεδομένα για διάφορα βακτηριακά στελέχη και την επιλεγμένη ηλικία resting cells.

Η μέγιστη μετατροπή DBT με χρήση του στελέχους *P. putida* CECT5279 έχει αναφερθεί ότι προκύπτει από κύτταρα συλλεγμένα μετά από 9 ώρες ανάπτυξης.

Πίνακας 7.1: Βέλτιστες ηλικίες βιοκαταλύτη και οι ρυθμοί αποθείωσης για διάφορους μικροοργανισμούς (El-Gendy and Nassar, 2017).

<b>Μικροοργανισμός</b>	<b>Πηγή άνθρακα</b>	<b>Βέλτιστη ηλικία βιοκαταλύτη (h)</b>	<b>Ρυθμός κατανάλωσης DBT (mmol/g/h)</b>
<i>R. erythropolis</i> IGTS 8	111mM glucose	24	0.008
RIPI-22	13.9mM benzoate	30	0.002
<i>Rhodococcus sp.</i> P32C1	54mM Glycerol	35-50	0.03
<i>P. putida</i> CECT5279	136 mM glutaminic acid	9	0.008
	104 mM citrate	12	0.004
	11 mM glucose	8	0.006
<i>Ralstonia eutropha</i>	111 mM glucose	5	0.017

Οι Del Olmo et al. (2005a) ανέφεραν ότι η μέγιστη βιοαποθειωτική δράση του *R. erythropolis* IGTS8 επιτυγχάνεται στο τέλος της εκθετικής φάσης, μεταξύ 15 και 25 ωρών ανάπτυξης.

## 7.6 Η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης DBT

Είναι γνωστό πως καθώς οι διαλυτότητα στο νερό των ουσιών αυξάνεται η παρεμποδιστική επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων και την ενζυμική ενεργότητα αυξάνεται. Πέρα από αυτό η εξαιρετικά χαμηλή διαλυτότητα του DBT στο νερό (περίπου 0.005 mM) γίνεται ίζημα μόλις μπει σε υδατικό μέσο. Το DBT βρίσκεται σε στερεή κατάσταση στο μέσο και έτσι δεν έχει κανένα σημαντικό θετικό αποτέλεσμα στην βιοαποθειωτική δράση και την ανάπτυξη των κυττάρων. Επιπλέον, το DBT είναι εγγενώς

ξενοβιοτική ένωση και έχουν γίνει πολλαπλές αναφορές που δείχνουν μάλιστα ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις DBT έχει παρεμποδιστική δράση στη βιοαποθείωση και την ανάπτυξη των κυττάρων (El-Gendy and Nassar, 2017).

Οι διαφορετικοί μικροοργανισμοί που έχουν αναφερθεί, έχουν διαφορετικά βέλτιστα όσον αφορά τις συγκεντρώσεις DBT και της περιόδου επώασης. Για παράδειγμα για το στελέχος *Gordonia alkanivorans* 1B αναφέρεται μετατροπή 64.8% σε 0.5 mM DBT μετά από 120 h, για το *Microbacterium* ZD-M2 αναφέρθηκε μετατροπή 100% σε 0.2 mM DBT μετά από 58 h, για το *Rhodococcus erythropolis* R1 αναφέρθηκε μετατροπή 100% σε 0.3 mM DBT μετά από 72 h, για το *Microbacterium* sp. NISOC-06 αναφέρθηκε μετατροπή 90.6% σε 1 mM DBT μετά από 120 h, για το *Stenotrophomonas* sp. NISOC-04 αναφέρθηκε μετατροπή 82% σε 0.8 mM DBT μετά από 48 h.

Η βακτηριακή ανάπτυξη του στελέχους *Rhodococcus* sp. P32C1 σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις DBT από 0.05 έως 0.5 mM ήταν γενικώς η ίδια. Όμως τα resting cells που συλλέχθηκαν από το τέλος της εκθετική φάσης έδειξαν μέγιστη βιοαποθειωτική ικανότητα στα 0.5 mM DBT η οποία ήταν 30  $\mu\text{mol}$  2-HBP/g DCW/h. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε με οργανική φάση ν – δεκαεξάνιο η βιοαποθειωτική ικανότητα των resting cells του στελέχους *Starphylococcus* sp. S3/C αυξήθηκε με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης DBT, φτάνοντας ένα μέγιστο ποσοστό αποθείωσης 57% σε συγκέντρωση 463 mg/L. Η περεταίρω αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης θείου 800 mg/L οδήγησε σε μείωση στο 32% κάτι το οποίο οφείλεται στην παρεμπόδιση του οξυγόνου στο διφασικό σύστημα. Όμως φαίνεται να υπάρχει μια βέλτιστη συγκέντρωση DBT πέρα από την οποία δεν υπάρχει καμία επίδραση στην βιοαποθειωτική ικανότητα (El-Gendy and Nassar, 2017).

## 7.7 Η επίδραση του είδους του θειικού μορίου

Δεν χρησιμοποιούν όλοι οι οργανισμοί το ίδιο μεταβολικό μονοπάτι βιοαποθείωσης των οργανοθειικών ενώσεων. Επίσης ούτε όλα τα μικροβιακά στελέχη χρησιμοποιούν όλα τα ήδη οργανοθειικών ενώσεων και φυσικά δεν έχουν τους ίδιους ρυθμούς και αποδόσεις. Αυτό σχετίζεται με τις διαφορετικές μοριακές δομές των αντιδρώντων, όπως

για παράδειγμα το πόσο υποκατεστημένο είναι το κάθε μόριο (Grossman et al., 2001) και με τα διαφορετικά ένζυμα που χρησιμοποιούνται σε κάθε διαφορετική ένωση θείου. Η επαγωγή του οπερονίου *dsz* από DMSO στο *Rhodococcus* sp. 1AWQ έχει δείξει ομοιότητες με το DBT, επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η παραγωγή του 2-HBP από resting cells ανεπτυγμένων σε DMSO ήταν υψηλότερη από ότι αυτή του DBT. (Mohebbali et al. 2008). Σε μια άλλη έρευνα έχει αναφερθεί ότι ο μικρότερος χρόνος επαγωγής και ο μεγαλύτερος ρυθμός ανάπτυξης για το στέλεχος *Pseudomonas delafieldii* R-8 πραγματοποιήθηκε με DMSO, και όχι με DBT και MgSO<sub>4</sub>. Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως δύο στελέχη, τα *Pseudomonas delafieldii* R-8 and *Nocardia globerula* R-9, μπορούν να χρησιμοποιήσουν ένα μεγάλο εύρος θειικών ενώσεων σαν μοναδική πηγή θείου. Η πιο σημαντική παρατήρηση ήταν η ικανότητα να μπορούν να αποθειώσουν το 4,6-DMDBT σε υψηλότερους ρυθμούς από το DBT, σημειώνοντας ρυθμό βιοαποθείωσης 2.46 και 2.25 mg DMDBT/g DCW/h και 2.26 και 1.98 mg DBT/g DCW/h για τον R-8 και τον R-9, αντίστοιχα. Επίσης έχουν την ικανότητα να βιοαποθειώνουν το BT και το DBS, σημειώνοντας ρυθμούς 1.34 και 1.04 mg BT/g DCW/h και 1.93 και 2.06 mg DBS/g DCW/h, αντίστοιχα.

Αναφέρθηκε ότι το DMSO είναι καλύτερη πηγή θείου από το DBT ή το MgSO<sub>4</sub> για την ανάπτυξη του *Rhodococcus* sp. MP12. Εκτός αυτού, βρέθηκε ότι τα resting cells που έχουν αναπτυχθεί σε θειικό νάτριο δεν παρουσίασαν καθόλου βιοαποθειωτική δράση στο DBT. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την πιθανότητα τα σουλφίδια να μειώνουν την αποθειωτική ικανότητα των ενζύμων των βακτηρίων του γένους *Rhodococcus*. Η μέγιστη βιοαποθειωτική δράση για κύτταρα που καλλιεργούνται σε DBT ή DMSO αναφέρεται πως προκύπτει από καλλιέργειες που βρίσκονται από την μέση και μετά της εκθετικής φάσης και όταν η οπτική πυκνότητα είναι μεταξύ 4 και 6. Η μέγιστη βιοαποθειωτική ικανότητα που παρατηρήθηκε είναι ίση με 10.5 μmol/g DCW/h και πραγματοποιήθηκε με κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί για 48 ώρες με DMSO σαν μοναδική πηγή θείου. Αυτό το νούμερο είναι περισσότερο και από διπλάσιο σε σχέση με κύτταρα μεγαλωμένα σε DBT, τα οποία έδωσαν ρυθμό 4.3 μmol/g DCW/h (Peng and Zhou, 2016).



Πραγματοποιήθηκε μελέτη συστημάτων που περιείχαν πολλά είδη πολυκυκλικών αρωματικών θειούχων υδρογονανθράκων (PASHs) και προέκυψε ότι η ολική απομάκρυνση του συνόλου των PASHs μειώθηκε με την ακόλουθη σειρά: batch σύστημα μίας μόνο ουσίας > batch σύστημα δύο ουσιών > batch σύστημα τριών ουσιών, η σύγκριση έγινε με βάση το μέσο βιοαποθειωτικό ποσοστό τα οποία ήταν 94%, 87% και 75% αντίστοιχα. Αυτό το εύρημα βρίσκεται σε αρμονία με την βακτηριακή ανάπτυξη σε κάθε ένα από τα μελετημένα συστήματα και μπορεί να αποδοθεί στη μεγαλύτερη συνολική συγκέντρωση θείου η οποία πιθανώς να συνεπάγεται μεγαλύτερη τοξικότητα για τα βακτηριακά κύτταρα και άρα να επηρεάζει την τελική βιοαποθειωτική ικανότητα. Ανεξάρτητα από τον τύπο των PASHs και του αν είναι ενός είτε πολλών θειούχων ενώσεων, η βακτηριακή ανάπτυξη σταμάτησε πριν την ολική απομάκρυνση των PASHs. Αυτό οφείλεται στην ίδια την βιοαποθειωτική διαδικασία που παράγει τοξικούς μεταβολίτες. Οι Sahinkaya and Dilek (2007) ανέφεραν ένα σημαντικό στοιχείο, στον υπολογισμό των ρυθμών αποθείωσης χρησιμοποιείται η ολική συγκέντρωση βιομάζας, αλλά μόνο ένα μέρος της ευθύνεται για την διάσπαση μίας συγκεκριμένης ένωσης.

## 7.8 Επίδραση της μεταφοράς μάζας

Μια άλλη σημαντική παράμετρος είναι η επίδραση της μεταφοράς μάζας στο συνολικό ρυθμό αντίδρασης και τη συνολική απόδοση της διεργασίας καθώς η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε ένα σύνθετο σύστημα σε δύο μη αναμίξιμες υγρές φάσης. Η παράμετρος αυτή είναι βασική για την τεχνολογία βιοαποθείωσης στα καύσιμα. Εξαρτάται από την υδροφοβικότητα της ένωσης και τον βαθμό αλκυλίωσης, τη μοριακή δομή και το μοριακό βάρος. Μελέτες έχουν δείξει ότι η μεγαλύτερη αντίσταση στη μεταφορά μάζας των ενώσεων από την οργανική στην υδατική φάση προκαλείται στην υδατική φάση (Marcelis et al. 2003). Αναφέρθηκε η επίδραση της παρεμπόδισης μεταφοράς μάζας σε διφασικό σύστημα με αρχική συγκέντρωση DBT 54.27  $\mu\text{M}$ , με χρήση των στελεχών *R. erythropolis* IGTS8 και *P. putida* CECT 5279, οι οποίες απέδειξαν ότι τα αποτελέσματα της διεργασίας εξαρτώνται από την υδροφοβικότητα του βιοκαταλύτη. Η απόδοση της βιοαποθείωσης αυξήθηκε με αύξηση της αρχικής βιομάζας,

φτάνοντας το 41.4% στα 24 g/L αρχικής συγκέντρωσης βιομάζας CECT 5279, με χαμηλό όμως ρυθμό παραγωγής 2-HBP. Από την άλλη το ποσοστό αποθείωσης για τον IGTS 8 ήταν υψηλότερο φτάνοντας το 80% με αρχική συγκέντρωση βιομάζας 8 g/L (Caro et al. 2007a).

Για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιομάζας το ποσοστό αυτό έμεινε σταθερό λόγω του κορεσμού της διεπιφάνειας από τα κύτταρα του βιοκαταλύτη. Αν αυξηθεί όμως η διεπιφάνεια, παρότι επιτυγχάνεται μεγαλύτερο ποσοστό μετατροπής, ο ειδικός ρυθμός παραγωγής 2-HBP είναι χαμηλός εξαιτίας της παρεμπόδισης και των φαινομένων μεταφοράς μάζας. Αναφέρθηκε επίσης ότι παρά τα χαμηλότερα φαινόμενα παρεμπόδισης στο διφασικό σύστημα, άλλα προϊόντα του μεταβολικού μονοπατιού εισέρχονται στο υδατικό σύστημα μπορεί να είναι υπεύθυνα για την παρεμπόδιση. Αν συνδυαστούν, η επίδραση της οργανικής φάσης, της συγκέντρωσης του υποστρώματος και της κυτταρικής πυκνότητας φαίνεται ότι τα φαινόμενα μεταφοράς είναι ο καθοριστικός παράγοντας (Caro et al., 2007b).

## **7.9 Επίδραση του οργανικού διαλύτη και του λόγου οργανικής προς την υδατική φάση**

Η βενζίνη και το πετρέλαιο diesel αποτελούνται από ένα πλήθος υδρογονανθράκων. Το δεκαεξάνιο αποτελεί περίπου το 40% ορισμένων καυσίμων και για αυτό θεωρείται ο πλέων αντιπροσωπευτικός υδρογονάνθρακας. Όμως τα πράγματα δεν είναι απλά, καθώς η επίδραση της οργανικής φάσης στην διεργασία της βιοαποθείωσης είναι πάρα πολύ σημαντική.

Έχει γίνει χρήση πολλών οργανικών διαλυτών στις μελέτες που αφορούν την βιοαποθείωση. Κάποιοι από τους πιο συνηθισμένους διαλύτες είναι: ο διεθυλεθέρας, η αιθανόλη, το DMSO, το dimethylformamide (DMF), το ν-εξάνιο, το ξυλένιο, το δωδεκάνιο, το ν-δεκατετράνιο και το ν-δεκαεξάνιο. Καθοριστικός παράγοντας για την κατάλληλη επιλογή οργανικού διαλύτη είναι και η τοξικότητα του προς τα κύτταρα.

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε, έγινε σύγκριση των οργανικών φάσεων του ν-εξάνιου, του κυκλοεξάνιου, του επτάνιου, του ν-οκτάνιου, του δωδεκάνιου και του

δεκαεξάνιου σε βιοαποθειωτικές διεργασίες με το στέλεχος *Nocardia globberula* R-9. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ρυθμός της αποθείωσης αυξάνεται με αύξηση των ατόμων άνθρακα μεταξύ του εύρους C6–C16. Τα resting cells του *Nocardia globberula* R-9 έδειξαν προτίμηση στο δεκαεξάνιο και στο δωδεκάνιο και άρα θεωρείται προτιμότερη η χρήση τους για την αποθείωση του πετρελαίου diesel παρά της βενζίνης.

Μια συγκριτική μελέτη πραγματοποιήθηκε από τον Caro et al. (2007b) στα αερόβια, κατά Gram θετικά βακτήρια *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 και σε γενετικά τροποποιημένο στέλεχος *Pseudomonas putida* CECT 5279 για βιοαποθειωτική διεργασία σε υδατικά και σε διφασικά συστήματα με την οργανική φάση να είναι ν δεκαεξάνιο. Γενικά όταν οι κυτταρικές πυκνότητες δεν ήταν πολύ υψηλές και οι δύο βιοκαταλύτες πέτυχαν μεγαλύτερα ποσοστά μετατροπής με υψηλότερες συγκεντρώσεις βιομάζας και μικρότερα κλάσματα οργανικής φάσης και χαμηλότερες συγκεντρώσεις DBT.

# **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---

## 8. Υλικά

### 8.1 Αντιδραστήρια - Διαλύτες

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, προϊόντα της εταιρείας Sigma (Η.Π.Α.). Σαν υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε

Διβενζοθειοφένιο (DBT)

Διμεθυλ-οξειδίο του θείου (DMSO), Sigma

Hepes buffer, Sigma

Δωδεκάνιο, Sigma

Αιθανόλη, HPLC, ≥99,8% Sigma

Γλυκερόλη, ≥99% Sigma

Διάλυμα Ringer

Ακετονιτρίλιο για HPLC, Sigma

### 8.2 Συσκευές και Όργανα

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία) Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer της BOECO (Γερμανία)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάρθρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorvall® RC28S, DuPont (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Zentrifuge Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Ζυγοί Mark 2060, Mark 4065 (BEL Engineering) και Abs 120-4 (KERN )
- Συσκευή φωτομέτρησης microplate reader Spectra Max 250 (Molecular Devices)
- Συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης HPLC SHIMADZU LC20AD

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες, δοκιμαστικοί σωλήνες, erpendorf tubes, falcon tubes, πιπέτες, ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικοί κύλινδροι, μπουκάλια αποστείρωσης.

### 8.3 Μικροοργανισμοί

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι ο *Rhodococcus Rhodochrous IGTS 8*.

### 8.4 Θρεπτικά Μέσα ανάπτυξης

Η σύσταση των θρεπτικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του βακτηρίου παρουσιάζονται στους Πίνακες που ακολουθούν

Πίνακας 8.1. Σύσταση μέσου Luria – Bertani (LB)

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
Tryptone	10
NaCl	10
Yeast extract	5

Ρύθμιση του pH στην τιμή 7.0

Πίνακας 8.2. Σύσταση βασικού μέσου αλάτων (Basal Salt Medium, BSM) (del Olmo et al., 2005)

Συστατικό	Συγκέντρωση (g/L)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	4.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3H <sub>2</sub> O	4.0
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.0245
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.001
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.001
NH <sub>4</sub> Cl	2

## 9. Μέθοδοι

### 9.1 Ανάπτυξη του βακτηρίου σε τρυβλία

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τη δημιουργία στερεών καλλιεργειών ήταν η εξής: Το προαναφερθέν θρεπτικό μέσο LB διαλυτοποιείται σε ποτήρι ζέσεως με προσθήκη 15g/L άγαρ. Ακολουθεί αποστείρωση στο αυτόκλειστο για 20 λεπτά στους 121 °C και υπό πίεση 0.1MPa.

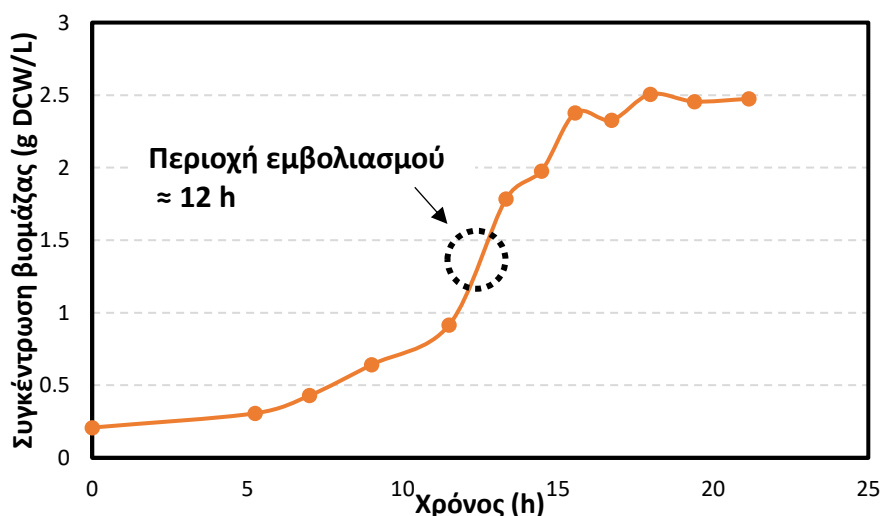
Το θρεπτικό εκχύνεται σε τρυβλία petri κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Αφού το περιεχόμενο των τρυβλίων κρυώσει και στερεοποιηθεί, γίνεται επίστρωση του μικροοργανισμού από απόθεμα που συντηρείται σε γλυκερόλη στους -80 °C.

Τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστήρα στους 30°C ώστε να αναπτυχθεί το βακτήριο και μετά μεταφέρονται στο ψυγείο (4°C) ώστε να συντηρηθούν.

### 9.2 Ανάπτυξη του βακτηρίου σε υγρή καλλιέργεια

#### 9.2.1 Προκαλλιέργεια

Η προκαλλιέργεια του βακτηρίου πραγματοποιούταν σε θρεπτικό μέσο LB σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer. Η προκαλλιέργεια εμβολιαζόταν με κυτταρικό αιώρημα προερχόμενο από τρυβλία ηλικίας 2 ημερών. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα σε θερμοκρασία 30 °C και ταχύτητα περιστροφής 180 rpm για 12 ώρες.



Διάγραμμα 9.1: Ανάπτυξη του IGTS8 σε προκαλλιέργεια LB.

### 9.2.2 Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιείται στο θρεπτικό μέσο BSM σε κωνικές φιάλες τύπου Erlenmeyer. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται γλυκόζη σε συγκέντρωση 20g/L και ως πηγή θείου DMSO σε συγκέντρωση 1,3mM. Το θρεπτικό εμβολιάζεται με 10% (ο/ο) της προκαλλιέργειας. Οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον επωαστήρα σε θερμοκρασία 30 °C και ταχύτητα περιστροφής 180 rpm.

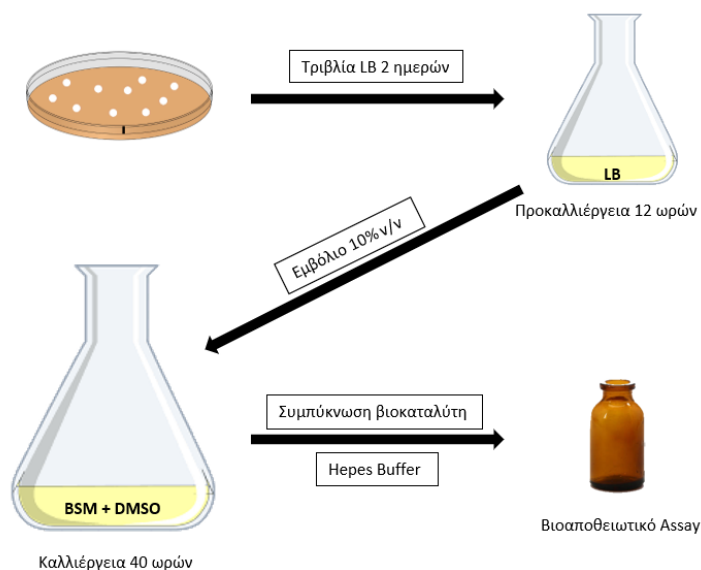
### 9.3 Βιοαποθείωση DBT από μη αναπτυσσόμενα κύτταρα

Χρησιμοποιήθηκε μη αναπτυσσόμενα κύτταρα (Resting Cells) στα πειράματα βιοαποθείωσης του DBT. Κύτταρα συλλέγονταν από την καλλιέργεια φυγοκεντρώντας (15 λεπτά στα 5000 rpm) και μετά την απόχυση του υπερκειμένου τα κύτταρα εκπλένονταν δύο φορές με διάλυμα Ringer. Τέλος, τα κύτταρα επαναιωρούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM pH=8.0 στην επιθυμητή συγκέντρωση. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε τόσο σε υδατικό όσο και σε διφασικό σύστημα αποθείωσης. Και στις δύο περιπτώσεις το υπόστρωμα για τη μελέτη της βιοαποθειωτικής ικανότητας των κυττάρων ήταν το DBT.

#### 9.3.1 Υδατικά συστήματα

Στα υδατικά συστήματα η βιομάζα επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM pH=8.0 και μοιράστηκε σε γυάλινα φιαλίδια τα οποία περιείχαν 2ml βιομάζας και 100μL διαλύματος DBT σε αιθανόλη. Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα και μετρούνταν η μείωση του DBT και η παραγωγή του 2-HBP.





Σχήμα 9.1: Η διαδικασία ανάπτυξης βιομάζας για χρήση σε βιοαποθειωτικό assay.

### 9.3.2 Διφασικά συστήματα

Στα διφασικά συστήματα η βιομάζα επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes 50mM pH=8.0 και τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες των 100ml με οργανική φάση δωδεκάνιο και αναλογία υδατικής προς οργανική 50/50 (o/o). Το DBT διαλύθηκε στην οργανική φάση. Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν δείγματα και μετρούνταν η μείωση του DBT και η παραγωγή του 2-HBP.



Εικόνα 9.1 και 9.2: Φιάλες Erlenmeyer για τη πραγματοποίηση βιοαποθειωτικών assay

## 9.4 Δειγματοληψία

Στα διφασικά συστήματα η λήψη των δειγμάτων γίνεται κάτω από ασηπτικές συνθήκες στον ειδικά διαμορφωμένο επαγωγό και από τις δύο φάσεις. Ορισμένη ποσότητα τοποθετείται με χρήση πιπέτας σε Eppendorf flasks και αποθηκεύεται σε κατάψυξη μέχρι την επικείμενη ανάλυση.

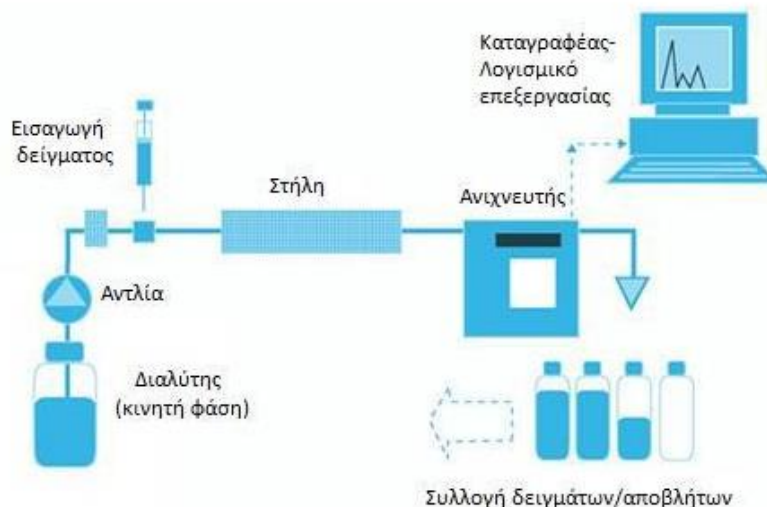
Στα υδατικά συστήματα ολόκληρη η ποσότητα των φιαλίδια διαλύεται με ίσο όγκο ακετονιτριλίου και το δείγμα αναλύεται μετά από φυγοκέντρηση των κυττάρων.

## 9.5 Αναλύσεις

### 1.1.1 Προσδιορισμός DBT και 2-HBP

Η ανάλυση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης τους σε 2-HBP και DBT έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Η βασική αρχή όλων των χρωματογραφικών διαχωρισμών περιλαμβάνει τη διέλευση του δείγματος που βρίσκεται στην κινητή φάση (στο διαλύτη έκλουσης) μέσα από μια στατική φάση (στήλη). Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ο διαχωρισμός των συστατικών της κινητής φάσης επιτυγχάνεται με την κατακράτηση των συστατικών της κινητής φάσης σε διαφορετικούς χρόνους και εξαρτάται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος, σταθερής φάσης και διαλύτη έκλουσης. Η επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης γίνεται με βάση τη δύναμη (solvent strength) και την εκλεκτικότητα (selectivity) του διαλύτη. Όταν η κινητή φάση έχει σταθερή σύσταση η έκλουση είναι ισοκρατική, ενώ όταν μεταβάλλεται βαθμιαία η έκλουση είναι βαθμιδωτή. Η διάταξη μιας συσκευής υγρής χρωματογραφίας αποτελείται από το σύστημα παροχής υγρής φάσης, το σύστημα εισαγωγής δείγματος, τη στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα.



Σχήμα 9.2: Σχηματική απεικόνιση της οργανολογίας συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης όπου φαίνονται τα βασικότερα συστατικά στοιχεία

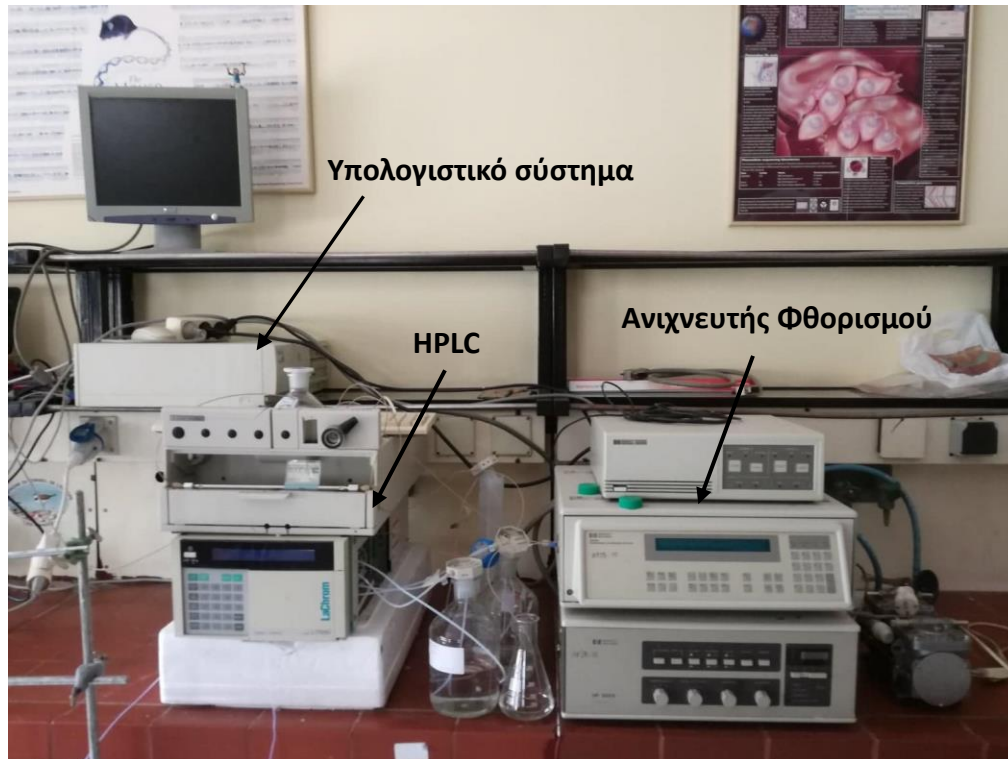
Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο διατάξεις υγρής χρωματογραφίας.

Η μια αποτελείται από σύστημα παροχής διαλύτη Shimadzu LC-20AD, σε συνδυασμό με ανιχνευτή UV – Vis Varian , αυτόματο δειγματολήπτη Shimadzu SIL-20A και σύστημα εισαγωγής δεδομένων στον υπολογιστή LCsolution έκδοση 1.24 SP1, Shimadzu. Η κινητή φάση ήταν μίγμα ακετρονίτριλιου - νερού υψηλής καθαρότητας (Millipore) με αναλογία 80:20 και το πρόγραμμα ισοκρατικό με ροή 1ml/min.

Η δεύτερη ήταν αποτελείται από σύστημα παροχής διαλύτη Hitachi LaCrom L-7100 σε συνδυασμό με ανιχνευτή φθορισμού Hewlett Packard 1046A με το μήκος κύματος διέγερσης στα 245nm και μήκος κύματος εκπομπής στα 347nm.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων είναι η C 18. Η κινητή φάση ήταν διάλυμα ακετονιτριλίου - νερού υψηλής καθαρότητας (Millipore) σε αναλογία όγκων 50:50. Ο λόγος χρήσης του νερού υψηλής καθαρότητας ήταν για την αποφυγή βλάβης στο σύστημα της χρωματογραφίας και για αυτό το λόγο ήταν απαραίτητο το φιλτράρισμα όλων των δειγμάτων μέσα από φίλτρα 0,45 μm (Whatman, Ηνωμένο Βασίλειο Η απομόνωση του DBT παρατηρείται περίπου στο 12<sup>ο</sup> λεπτό

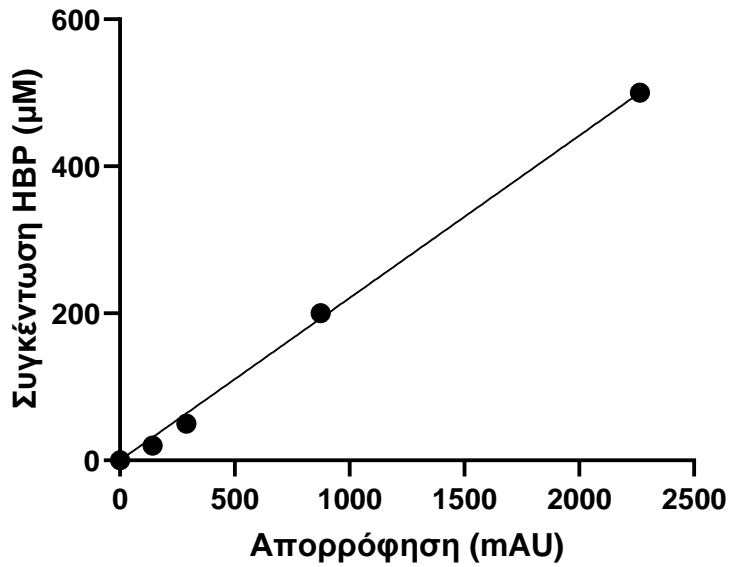
ανάλυσης ενώ του 2-HBP στο 6<sup>ο</sup> λεπτό ανάλυσης οπότε ο χρόνος ανάλυσης για κάθε δείγμα τέθηκε στα 18 min.



*Εικόνα 9.1: Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε με ανιχνευτή φθορισμού.*

Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων καταστρώθηκαν καμπύλες αναφοράς.

### Καμπύλη αναφοράς ΗΒΡ

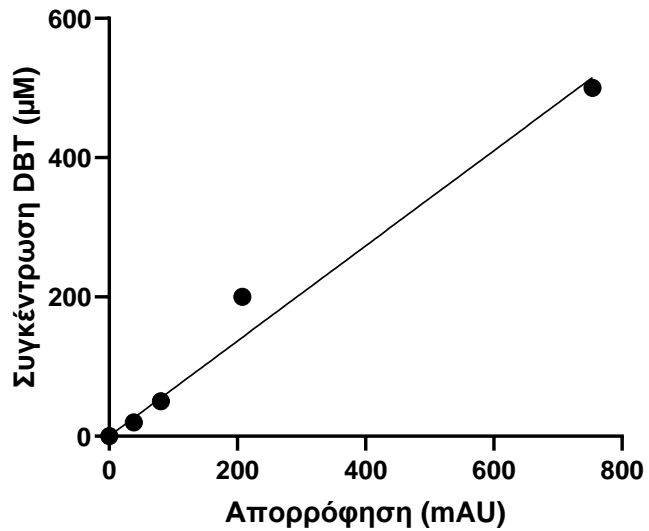


Διάγραμμα 9.2: Καμπύλη αναφοράς 2-HBP για την HPLC

$$y = 0.2208 * x \text{ (εξ. 9.1)}$$

$$R^2=0.9978, P<0.0001$$

### Καμπύλη αναφοράς DBT



Διάγραμμα 9.3: Καμπύλη αναφοράς DBT για την HPLC

$$y = 0.6832 * x \text{ (εξ. 9.2)}$$

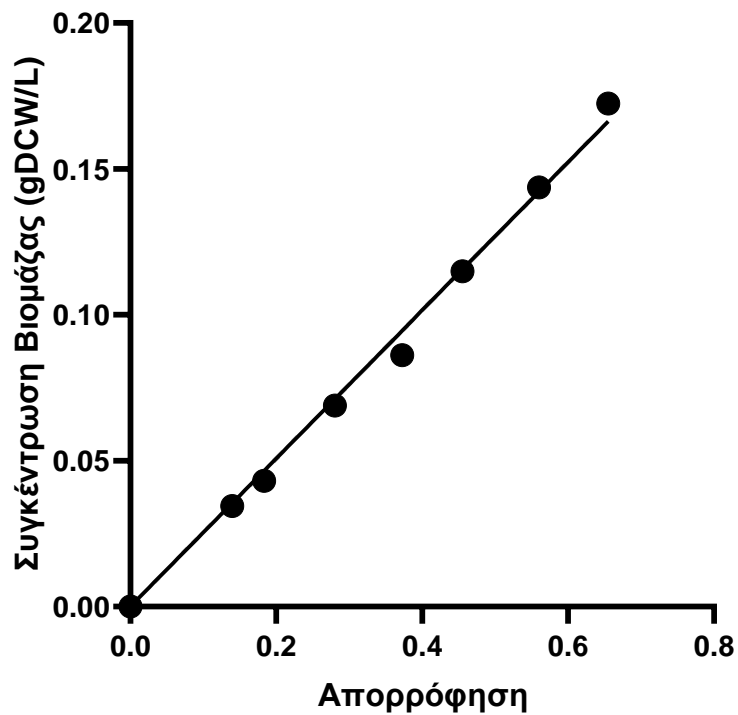
$$R^2=0.9978, P<0.0001$$

### 9.5.1 Ανάλυση ολικού θείου

Πέρα από την ανάλυση του DBT και του 2-HBP έγινε και ανάλυση των δειγμάτων σε ολική συγκέντρωση θείου. Χρησιμοποιήθηκε ο ανιχνευτής θείου.

### 9.5.2 Προσδιορισμός κυτταρικής ανάπτυξης

Η ανάπτυξη του βακτηρίου παρακολουθήθηκε με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 600 nm χρησιμοποιώντας ένα UV / ορατού φασματοφωτόμετρο.



Διάγραμμα 9.4: Καμπύλη αναφοράς συγκέντρωσης κυτταρικής βιομάζας με απορρόφηση.

$$y = 0.2538 * x \text{ (εξ.9.3)}$$

$$R^2=0.9946, P<0.0001$$

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

## 10. Απώλεια μάζας

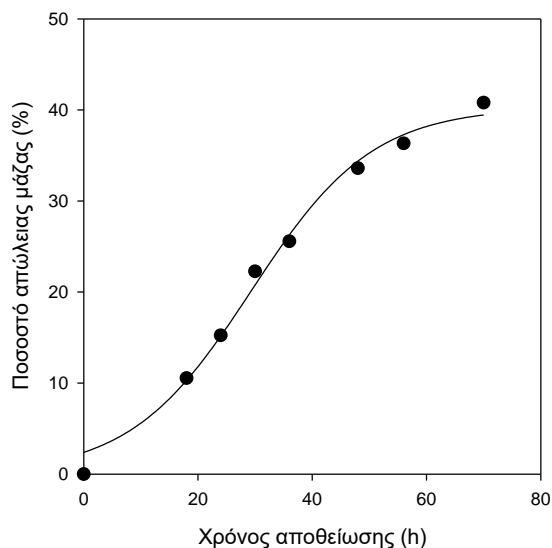
Μετρήθηκε η απώλεια μάζας λόγω εξάτμισης του νερού από τα γυάλινα φιαλίδια στα οποία πραγματοποιήθηκε η αποθείωση του DBT, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Μέθοδοι & Υλικά (§9.3.1). Έγιναν μετρήσεις σε τακτά χρονικά διαστήματα και προέκυψαν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

*Πίνακας 10.1: Απώλεια μάζας λόγω εξάτμισης του νερού από τα γυάλινα φιαλίδια κατά την αποθείωση του DBT.*

Χρόνος (h)	Απώλειας μάζας (%)
18	10.54
24	15.24
30	22.26
36	25.56
48	33.60
56	36.31
70	40.79

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, καταστρώθηκε το παρακάτω διάγραμμα ποσοστού εξάτμισης συναρτήσει με τον χρόνο και έγινε προσαρμογή της σιγμοειδούς καμπύλης (Εξ. 10.1) στα δεδομένα





Διάγραμμα 10.1: Το ποσοστό εξάτμισης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 30°C και 180 rpm από γυάλινα φιαλίδια με 2ml υδατικού αιωρήματος κυττάρων.

$$y = \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{t-t_0}{b}\right)}} \quad (\text{Εξ. 10.1})$$

όπου, γ η ποσοστιαία απώλειας μάζας (%), α μέγιστη απώλεια μάζας (%), t χρόνος αποθείωσης (h),  $t_0$  ο χρόνος (h) που απαιτείται για τη μείωση κατά 50% της μέγιστης απώλειας μάζας,  $\frac{1}{b}$  η κλίση της ευθείας στην περιοχή γραμμικότητας.

Οι τιμές των συντελεστών της σιγμοειδούς εξίσωσης όπως προέκυψαν από την προσαρμογή παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.1

Πίνακας 10.1: Στατιστική ανάλυση των παραμέτρων της εξίσωσης 10.1

	Τιμή	Std. Error	p
A	40.3038	1.6269	<0.0001
$t_0$	29.3446	1.4082	<0.0001
B	10.6101	1.3465	0.0005
R <sup>2</sup> =0.9913, Standard Error of Estimate = 1.5377			p<0.0001

Από το  $R^2 = 0.9913$  συμπεραίνουμε ότι το 99% της διακύμανσης της μεταβλητής Y (ποσοστό απώλειας μάζας) εξηγείται από την X (χρόνος).

Από τις τιμές του  $r$  βλέπουμε ότι τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά.

Έτσι πραγματοποιήθηκε διόρθωση των τιμών των συγκεντρώσεων DBT και HBP όλες με την χρήση αυτής της εξίσωσης.

## 11. Μελέτη παραμέτρων βιοαποθείωσης

### 11.1 Ηλικία Βιοκαταλύτη

#### 11.1.1 Πείραμα 1

Μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας του βιοκαταλύτη στην αποθείωση του DBT. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα του βακτηρίου που είχαν αναπτυχθεί για 24, 40 και 62 ώρες. Η βιοαποθειωτική διαδικασία διήρκησε 96 ώρες, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις DBT και 2-HBP και υπολογίστηκαν οι αντιστοιχοι ρυθμοί και ποσοστά.

Το ποσοστό αποθείωσης του DBT εκφρασμένο ως μετατροπή σε προϊόν (2-HBP) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 11.1 (del Olmo et al., 2005)

$$X_{BDS} = \frac{C_{2-HBP_t}}{C_{DBT_0}} \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 11.1})$$

Όπου

$X_{BDS}$  ποσοστό βιοαποθείωσης (%)

$C_{2-HBP_t}$  η συγκέντρωση του παραχθέντος 2-HBP ( $\mu\text{M}$ ) σε χρόνο  $t$

$C_{DBT_0}$  η συγκέντρωση του DBT ( $\mu\text{M}$ ) σε χρόνο 0

Το ποσοστό μείωσης του DBT υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 11.2 (del Olmo et al., 2005)

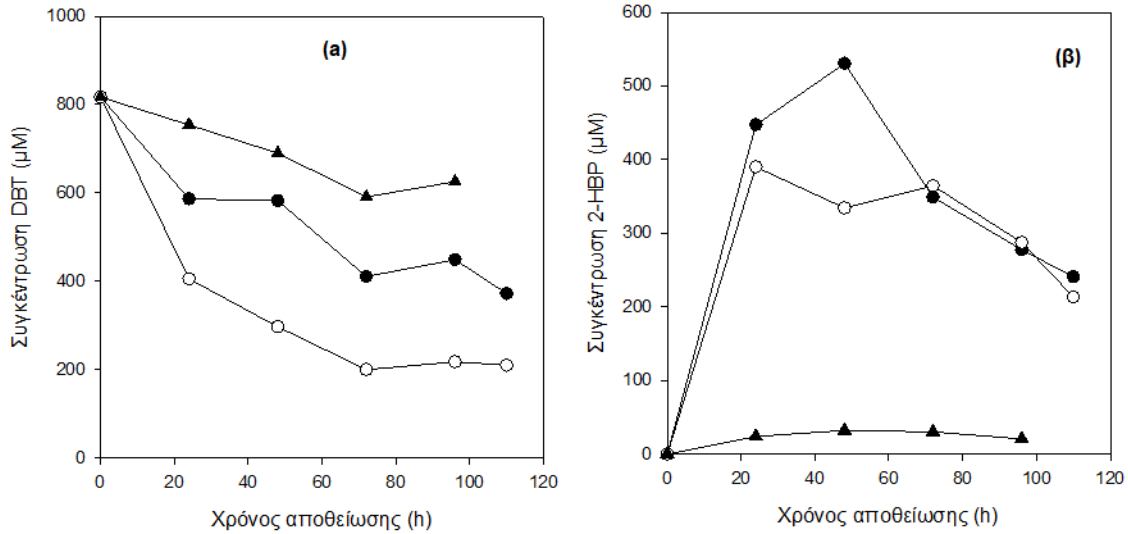
$$X_{DBT} = \frac{C_{DBT_0} - C_{DBT_t}}{C_{DBT_0}} \cdot 100 \quad (\text{Εξ. 11.2})$$

Όπου

$X_{DBT}$  ποσοστό μείωσης του DBT (%)

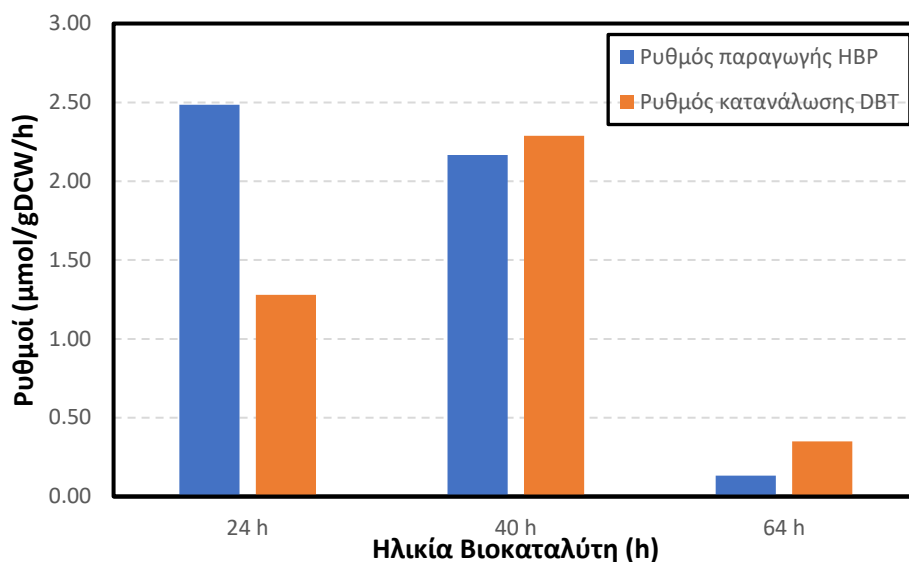
$C_{DBT_t}$  η συγκέντρωση του DBT (μM) σε χρόνο t

$C_{DBT_0}$  η συγκέντρωση του DBT (μM) σε χρόνο 0

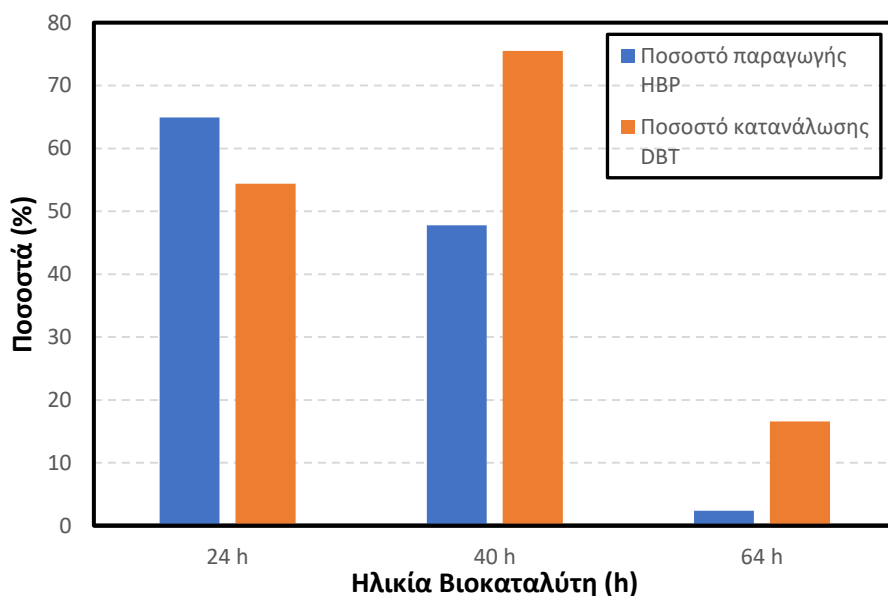


Διάγραμμα 11.1 (α) και 11.1 (β): Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης (α) του DBT και (β) του 2-HBP. Συνθήκες:  $C_X = 7.5 \text{ g DCW/L}$ ,  $T=30^\circ\text{C}$ . Σύμβολα: ηλικία εμβολίου (○) 24 h, (●) 40 h, (▲) 64 h

Το διάγραμμα 11.1 δείχνει ξεκάθαρα πως κύτταρα που είχαν συλλεχθεί μετά από 64 ώρες καλλιέργειας παρουσίασαν ελάχιστη βιοαποθειωτική δράση, αυτό φαίνεται από τις χαμηλές τιμές συγκεντρώσεων 2-HBP που παρήχθησαν και από την πολύ μικρή μείωση στη συγκέντρωση του DBT. Το ποσοστό αποθείωσης του DBT εκφρασμένο ως μετατροπή σε προϊόν (2-HBP) ( $X_{DBS}$  %) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 11.1 και το ποσοστό μείωσης του DBT ( $X_{DBT}$  %) σύμφωνα με την εξίσωση 11.2 (del Olmo et al., 2005). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 11.3.



Διάγραμμα 11.2: Ρυθμοί παραγωγής 2-HBP και μείωσης DBT για τις διαφορετικές ηλικίες βιοκαταλύτη.



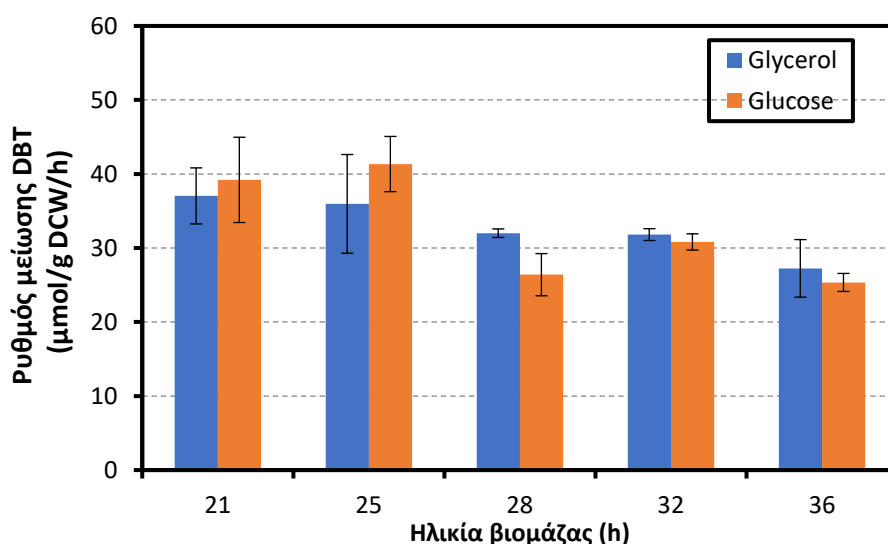
Διάγραμμα 11.3: Ποσοστά κατανάλωσης DBT και παραγωγής 2-HBP για τις διάφορες ηλικίες βιοκαταλύτη.

Τα διαγράμματα 11.2 και 11.3 επιβεβαιώνουν επίσης την ανικανότητα του βιοκαταλύτη ηλικίας 64 ωρών να πραγματοποιήσει τη βιοαποθειωτική διεργασία. Όσον αφορά τους βιοκαταλύτες με ηλικίες 24 και 40 ώρες παρατηρούμε πως αμφότεροι έχουν

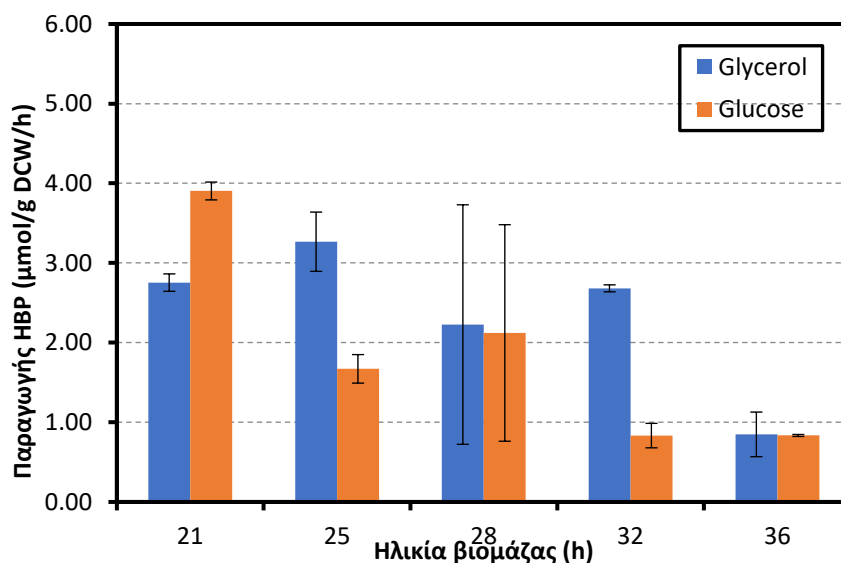
βιοαποθειωτική δράση, με τα κύτταρα των 24 ωρών να εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά και ρυθμούς παραγωγής 2-HBP ενώ αυτά των 40 ωρών να εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά και ρυθμούς κατανάλωσης DBT. Βιβλιογραφικά αναφέρεται (πίνακας 7.1) πως η βέλτιστη ηλικία βιοκαταλύτη για τον *R. Erythropolis* IGTS8 είναι 24 ώρες καλλιέργειας και μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης DBT που επετεύχθη είναι 8  $\mu\text{mol/gDCW/L}$  (del Olmo et al, 2005b). Στη παρούσα εργασία ο μέγιστος ρυθμός που σημειώθηκε ήταν αρκετά μικρότερος, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται σε διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά την συγκέντρωση βιομάζας και την αρχική συγκέντρωση DBT.

#### 11.1.2 Πείραμα 2

Επιπλέον έγινε πείραμα αναλυτικότερης μελέτης της ηλικίας του βιοκαταλύτη μεταξύ των 21h και 36h ωρών καλλιέργειας, σαν αρχική συγκέντρωση DBT επιλέχθηκε το 0.5mM, η συγκέντρωση βιομάζας ρυθμίστηκε στα 5 g DCW/L και μετρήθηκαν οι ρυθμοί μείωσης DBT και παραγωγής 2-HBP. Σε αντίθεση με το προηγούμενο πείραμα η βιοαποθειωτική διεργασία διήρκησε 2 ώρες καθώς ο στόχος δεν ήταν η μέτρηση των μέγιστων δυνατών τιμών αλλά ο εντοπισμός της βέλτιστης ηλικίας βιοκαταλύτη.



Διάγραμμα 11.4: Ρυθμός κατανάλωσης DBT ανά ηλικία βιοκαταλύτη για καλλιέργειες γλυκόζης και γλυκερόλης.



Διάγραμμα 11.5: Ρυθμός παραγωγής 2-HBP ανά ηλικία βιοκαταλύτη για καλλιέργειες γλυκόζης και γλυκερόλης.

Από τα διαγράμματα Χ και Χ φαίνεται πως οι μεγαλύτεροι ρυθμοί  $\mu\text{mol/gDCW/L}$  επιτυγχάνονται από κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί για 21 έως 25 ώρες. Αυτό επιβεβαιώνεται από έρευνες των del Olmo et al, 2005b και Gomez et al, 2015a. Επίσης όσον αφορά την σύγκριση γλυκερόλης και γλυκόζης ως πηγές άνθρακα, παρατηρείται πως η γλυκόζη παρουσιάζονται ελαφρά μεγαλύτεροι ρυθμοί και ποσοστά όπως φαίνεται στον πίνακα Χ.

Πίνακας 11.1: Συγκριτικές τιμές γλυκερόλης -γλυκόζης

Μέγιστες τιμές	Γλυκερόλη	Γλυκόζη
Ρυθμός παραγωγής 2-HBP	3.27	3.90
Ρυθμός κατανάλωσης DBT	37.03	41.34
Ποσοστό κατανάλωσης DBT ( $\chi_{DBT}$ )	64.70	72.23
Ποσοστό αποθείωσης ( $\chi_{BDS}$ )	5.71	6.82

## 11.2 Συγκέντρωση βιομάζας

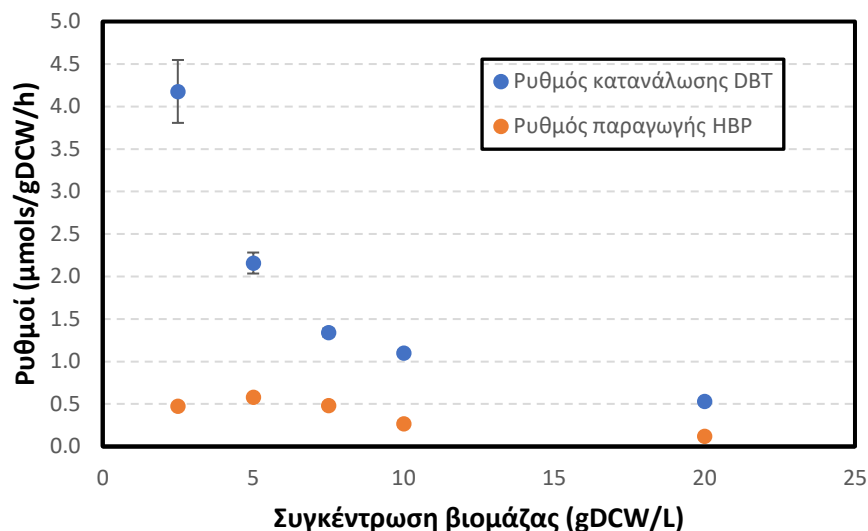
### 11.2.1 Υδατικό Σύστημα

Πραγματοποιήθηκε πείραμα με διαφορετικές συγκεντρώσεις βιομάζας 2.5, 5, 7.5, 10 και 20 gDCW/L. Στο κάθε φιαλίδιο προστέθηκε DBT διαλυμένο σε αιθανόλη. Η αιθανόλη προστέθηκε σε ποσοστό 5% κατά όγκο και η τελική συγκέντρωση DBT ρυθμίστηκε στα 1.5 mM.

Στον πίνακα 11.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος τις πρώτες 24 ώρες.

*Πίνακας 11.2: Ρυθμός μείωσης DBT και ρυθμός παραγωγής 2-HBP για διαφορετικές συγκεντρώσεις βιομάζας 2.5, 5, 7.5, 10 και 20 g DCW/L.*

Συγκέντρωση βιομάζας g DCW/L	Ρυθμός μείωσης DBT μmols/g DCW/h	Ρυθμός παραγωγής 2-HBP μmols/g DCW/h
2.5	4.1775 ± 0.3701	0.4748 ± 0.014
5	2.1587 ± 0.1235	0.5794 ± 0
7.5	1.3411 ± 0.0485	0.4833 ± 0
10	1.1012 ± 0.0342	0.2670 ± 0.036
20	0.5308 ± 0.0124	0.1205 ± 0.055



Διάγραμμα 11.6: Γραφική αναπαράσταση του ρυθμού μείωσης DBT και του ρυθμού παραγωγής 2-HBP συναρτήσει της συγκέντρωσης βιομάζας.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα ο ρυθμός με τον οποίο παράγεται το προϊόν της αντίδρασης 2-HBP είναι πολύ μικρότερος από τον ρυθμό με τον οποίο καταναλώνεται το αντιδρών DBT. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η αντίδραση δεν είναι στοιχειομετρική. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις περισσότερες δημοσιευμένες έρευνες όπου αποδεικνύεται ότι η σχέση μεταξύ της κατανάλωσης του DBT και της παραγωγής του 2-HBP δεν είναι στοιχειομετρική, κάτι που πιθανώς οφείλεται στην συγκέντρωση του 2-HBP και άλλων ενδιάμεσων προϊόντων μέσα και άνω στην επιφάνεια του κυττάρου (Alves et al., 2005; Derikvand et al., 2015b). Από την άλλη όμως οι Wang and Krawiec (1994) πρότειναν ότι η διαφορά αυτή μπορεί να έγκειται στα πτητικά χαρακτηριστικά του 2-HBP.

Επιπλέον ο ρυθμός κατανάλωσης DBT φαίνεται να επηρεάζεται έντονα από τη συγκέντρωση της βιομάζας, ειδικότερα για μικρές τιμές της. Αντίθετα ο ρυθμός παραγωγής του προϊόντος παραμένει σχετικά σταθερός.

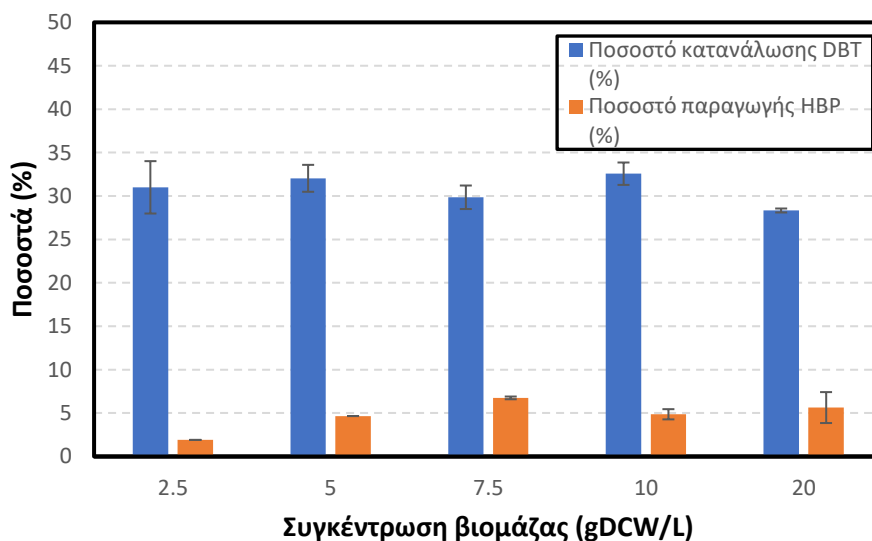
Το ποσοστό αποθείωσης του DBT εκφρασμένο ως μετατροπή σε προϊόν (2-HBP) ( $X_{BDS}$  %) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 11.1 και το ποσοστό μείωσης του DBT ( $X_{DBT}$



) σύμφωνα με την εξίσωση 11.2 (del Olmo et al., 2005). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.2.

Πίνακας 11.3: Ποσοστό βιοαποθείωσης ( $X_{DBS}$ )(%) και ποσοστό κατανάλωσης DBT ( $X_{DBT}$ ) (%) για διαφορετικές συγκεντρώσεις κυττάρων

Συγκέντρωση Βιομάζας (gDCW/L)	$X_{DBS}$ (%)	$X_{DBT}$ (%)
2.5	1.91 ± 0.00	31.00 ± 3.02
5	4.66 ± 0.00	32.04 ± 1.55
7.5	6.75 ± 0.16	29.86 ± 1.35
10	4.86 ± 0.59	32.57 ± 1.29
20	5.63 ± 1.78	28.33 ± 0.23



Διάγραμμα 11.7: Γραφική αναπαράσταση των ποσοστών κατανάλωσης DBT (%) και παραγωγής HBP (%) για κάθε διαφορετική συγκέντρωση βιομάζας.

Από το διάγραμμα φαίνεται ότι το ποσοστό μείωσης του DBT παραμένει σχετικά σταθερό στο 30% για κάθε συγκέντρωση βιομάζας που εξετάστηκε, αντίθετα το ποσοστό παραγωγής του προϊόντος είναι πολύ μικρότερο, φτάνοντας τις μέγιστες τιμές στο 7%.

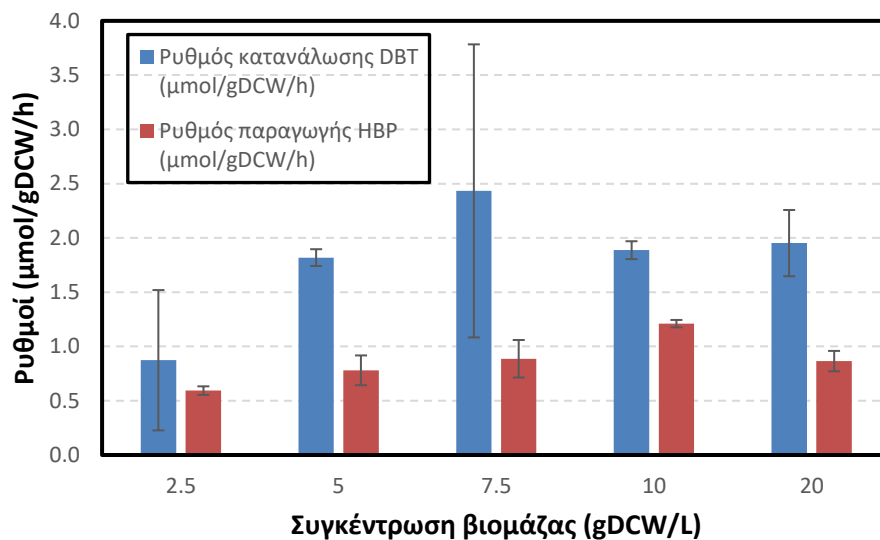
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μετά από τη συγκέντρωση βιομάζας 7.5 gDCW/L η αύξηση της βιομάζας δεν οδηγεί σε αύξηση της βιοαποθειωτικής ικανότητας. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από τους (Caro et al, 2007) και εικάζεται πως οφείλεται στα φαινόμενα μεταφοράς οξυγόνου και σε παρεμπόδιση που προκαλεί το 2-HBP.

#### 11.2.2 Διφασικό σύστημα

Επιπροσθέτως, μετρήθηκε η αποθειωτική ικανότητα διαφορετικών συγκεντρώσεων βιομάζας σε διφασικό σύστημα. Εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις 2.5, 5, 7.5, 10, 20 g DCW/L και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

*Πίνακας 11.4: Ρυθμός μείωσης DBT και ρυθμός παραγωγής 2-HBP για διάφορες συγκεντρώσεις βιομάζας*

Συγκέντρωση Βιομάζας (gDCW/L)	Ρυθμός μείωσης DBT ( $\mu\text{mol/gDCW/h}$ )	Ρυθμός παραγωγής 2-HBP ( $\mu\text{mol/gDCW/h}$ )
2.5	0.8731 $\pm$ 0.6462	0.5932 $\pm$ 0.0395
5	1.8188 $\pm$ 0.0773	0.7804 $\pm$ 0.1372
7.5	2.4335 $\pm$ 1.3502	0.8867 $\pm$ 0.1726
10	1.8871 $\pm$ 0.0825	1.2103 $\pm$ 0.0340
20	1.9523 $\pm$ 0.3052	0.8652 $\pm$ 0.0938

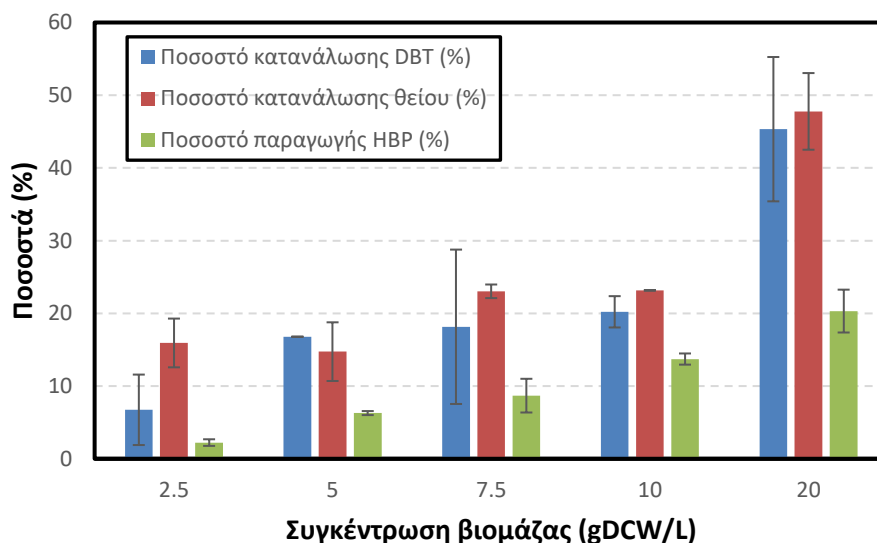


Διάγραμμα 11.8: Συγκριτικό διάγραμμα μεταξύ ρυθμών παραγωγής DBT και ρυθμού κατανάλωσης HBP

Στο διφασικό σύστημα επίσης παρατηρούνται μεγαλύτεροι ρυθμοί μείωσης DBT σε σχέση με τους ρυθμούς παραγωγής 2-HBP. Εκτός από τη μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας των 2.5 g DCW/L που παρουσιάζονται και οι μικρότεροι ρυθμοί αποθείωσης, όλες υπόλοιπες συγκεντρώσεις φαίνεται να μην επηρεάζουν ιδιαίτερα τους ρυθμούς. Το ποσοστό αποθείωσης του DBT εκφρασμένο ως μετατροπή σε προϊόν (2-HBP) ( $X_{BDS}$  %) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 11.1 και το ποσοστό μείωσης του DBT ( $X_{DBT}$  %) σύμφωνα με την εξίσωση 11.2 (del Olmo et al., 2005). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.5 όπου παρουσιάζεται επίσης και η ποσοστιαία μείωση του ολικού θείου.

Πίνακας 11.5: Ποσοστά μείωσης DBT και θείου και ποσοστό παραγωγής 2-HBP

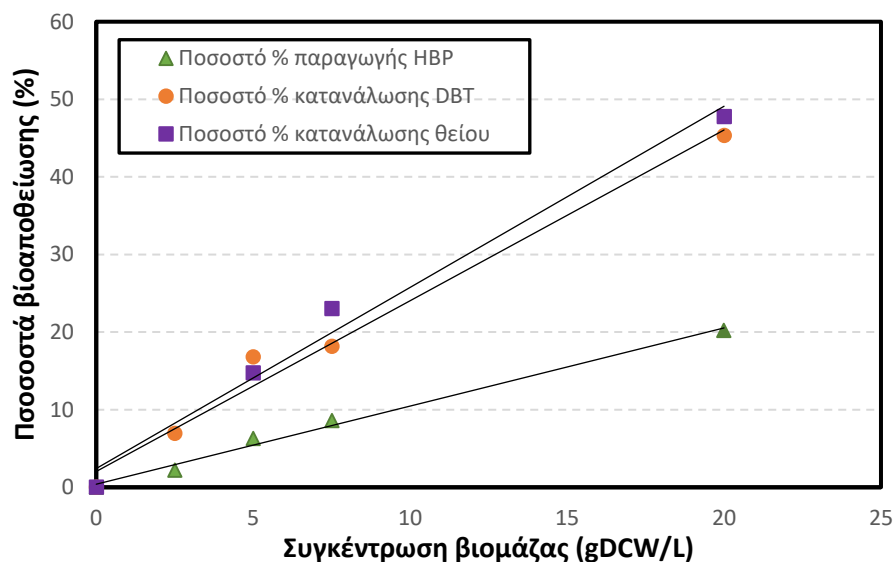
Συγκέντρωση Βιομάζας (gDCW/L)	$X_{BDS}$ (%)	$X_{DBT}$ (%)	Ποσοστό κατανάλωσης θείου (%)
2.5	2.23 ± 0.45	6.73 ± 4.84	15.93 ± 3.35
5	6.29 ± 0.28	16.79 ± 0.03	14.73 ± 4.03
7.5	8.68 ± 2.32	18.15 ± 10.62	23.03 ± 0.94
10	13.72 ± 0.77	20.21 ± 2.15	23.16 ± 0.04
20	20.31 ± 2.95	45.33 ± 9.92	47.78 ± 5.27



Διάγραμμα 11.9: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστών κατανάλωσης DBT και θείου και παραγωγής 2-HBP.

Φαίνεται από το διάγραμμα 11.9 πως τα ποσοστά ολικού θείου και DBT που έχουν καταναλωθεί βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, όπως και αναμενόταν αφού το σύστημα έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε το DBT να είναι η μοναδική πηγή θείου. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν το θείο που αποσπάται κατά τη διάσπαση του DBT για να αναπτυχθούν

και αν η ποσότητα του θείου περισσεύει τα κύτταρα μπορούν να την αποθηκεύσουν για μελλοντική χρήση (Kilbane 1990).



Διάγραμμα 11.10: Ποσοστά κατανάλωσης ολικού θείου και DBT και ποσοστό βιοαποθείωσης (XBDS) συναρτήσει της συγκέντρωσης βιομάζας.

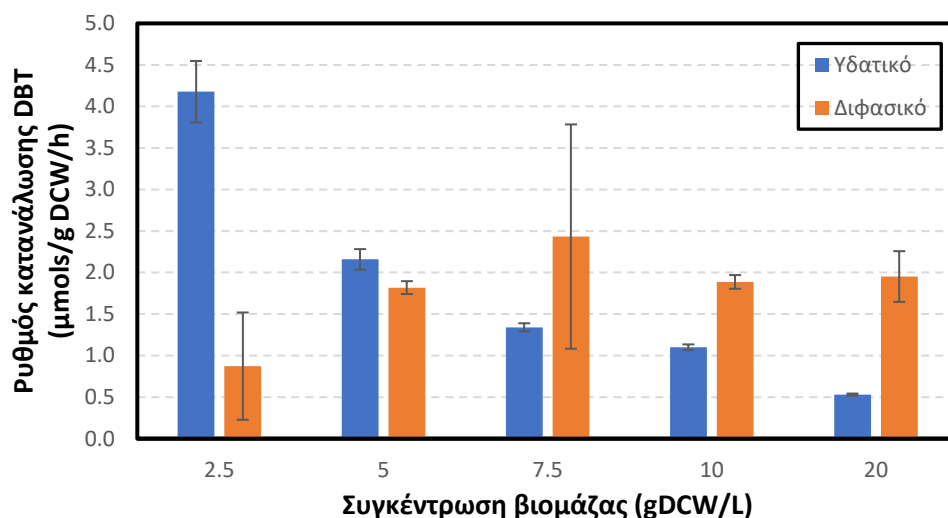
Σε αυτό το διάγραμμα έχει προσαρμογή γραμμικών εξισώσεων και στατιστική ανάλυση τους. Όλες οι ευθείες είναι της μορφής  $y = a * x$

Πίνακας 11.6: Κλίσεις και στατιστικά αποτελέσματα της εφαρμογής γραμμικών εξισώσεων στο διάγραμμα 11.10

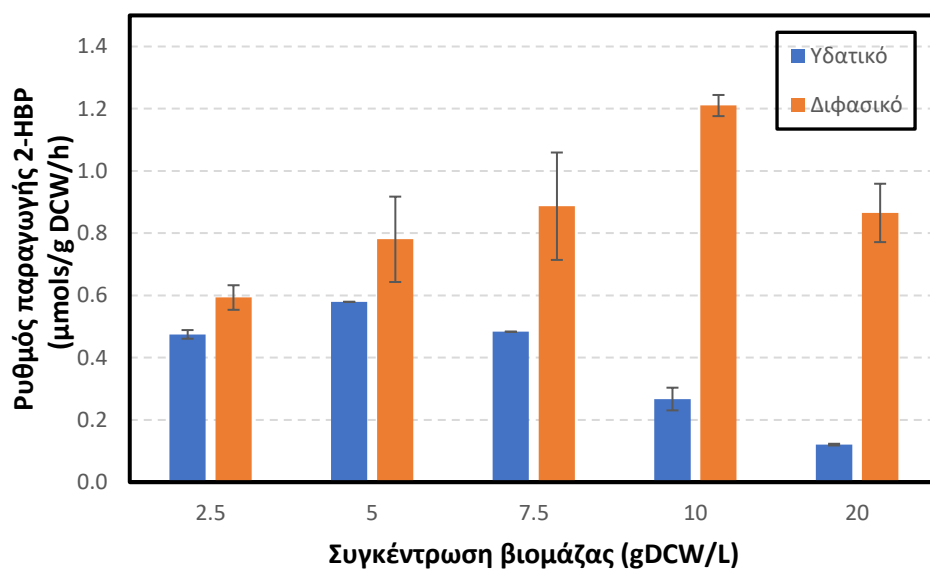
	Τιμή	Std. Error	P	R <sup>2</sup>
$a_S$	2.498	0.1474	<0.0001	0.9765
$a_{DBT}$	2.346	0.2452	<0.0001	0.9752
$a_{HBP}$	1.043	0.06165	<0.0001	0.9908

### 11.2.3 Σύγκριση υδατικού – διφασικού συστήματος αποθείωσης

Έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ υδατικού και διφασικού συστήματος όσον αφορά τους ρυθμούς παραγωγής και κατανάλωσης 2-HBP και DBT και τα αντίστοιχα ποσοστά βιοαποθείωσης.



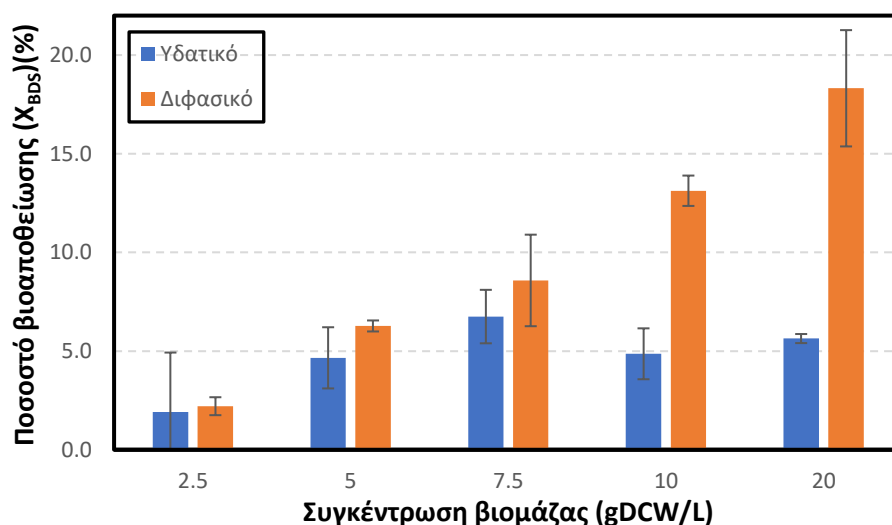
Διάγραμμα 11.11: Συγκριτικό διάγραμμα των ρυθμών κατανάλωσης για το υδατικό και το διφασικό σύστημα.



Διάγραμμα 11.12: Συγκριτικό διάγραμμα των ρυθμών παραγωγής 2-HBP για το υδατικό και διφασικό σύστημα.

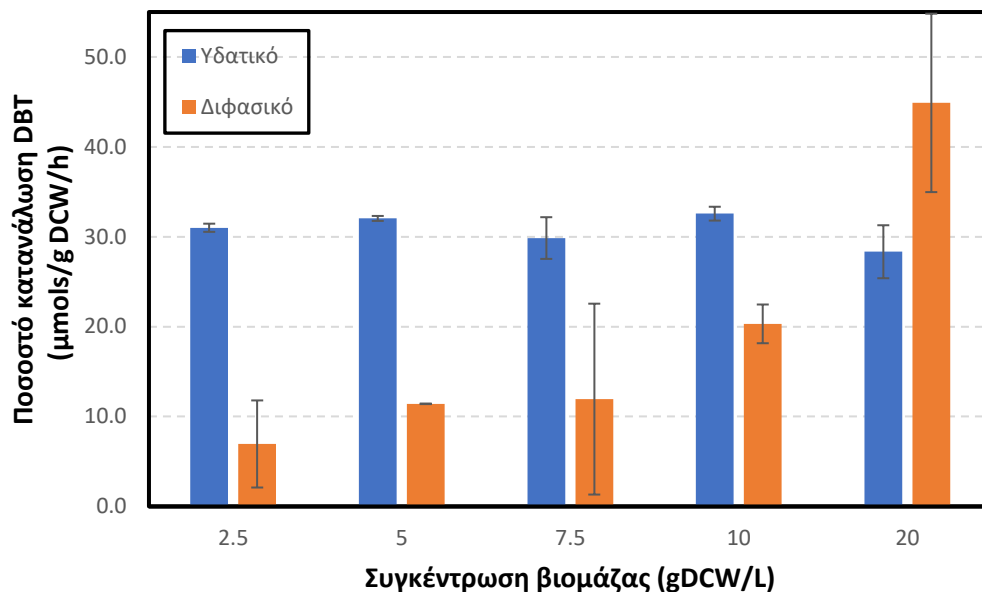
Από τα δύο διαγράμματα σύγκρισης των ρυθμών για το υδατικό και το διφασικό σύστημα φαίνεται ότι μόνο ο ρυθμός κατανάλωσης DBT για συγκέντρωση 2.5 gDCW/L είναι ψηλότερος στο υδατικό σύστημα, σε όλες τις άλλες περιπτώσεις το διφασικό

σύστημα εμφανίζει μεγαλύτερους ρυθμούς αποθείωσης. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με όσα έχουν αναφέρει οι Davoodi-Dehaghani et al, (2010). Οι Guobin et al.,(2006), επιβεβαιώνουν αυτό το αποτέλεσμα και ισχυρίζονται πως οφείλεται στο γεγονός ότι το 2-HBP συγκεντρώνεται στην οργανική φάση και δεν βλάπτει τα κύτταρα. Επιπλέον και μια άλλη έρευνα επιβεβαιώνει τα παραπάνω, προτείνοντας σαν ακόμα έναν παράγοντα, την καλύτερη διάλυση του DBT στην οργανική φάση αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες να έρθει σε επαφή με τα κύτταρα (Santos et al., 2006).



Διάγραμμα 11.13: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστών παραγωγής 2-HBP (%) για το υδατικό και το διφασικό σύστημα.

Από το διάγραμμα φαίνεται πως το ποσοστό παραγωγής του 2-HBP για το διφασικό σύστημα αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης βιομάζας, σε αντίθεση με το υδατικό όπου οι μεγάλες συγκεντρώσεις φαίνεται να λειτουργούν παρεμποδιστικά μετά τα 7.5 gDCW/L. Αυτό συνάδει με τις βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες τονίζεται η ύπαρξη παρεμπόδισης στα υδατικά συστήματα είτε εξαιτίας προβλημάτων στη μεταφορά μάζας του οξυγόνου είτε εξαιτίας της ανασταλτικής λειτουργίας του 2-HBP όταν οι συγκεντρώσεις βιομάζας γίνονται μεγάλες (Θεωρητικό μέρος §7.4), (Caro et al. 2007a; Wang et al., 2004).



Διάγραμμα 11.14: Συγκριτικό διάγραμμα ποσοστών κατανάλωσης DBT (%) για το υδατικό και διφασικό σύστημα.

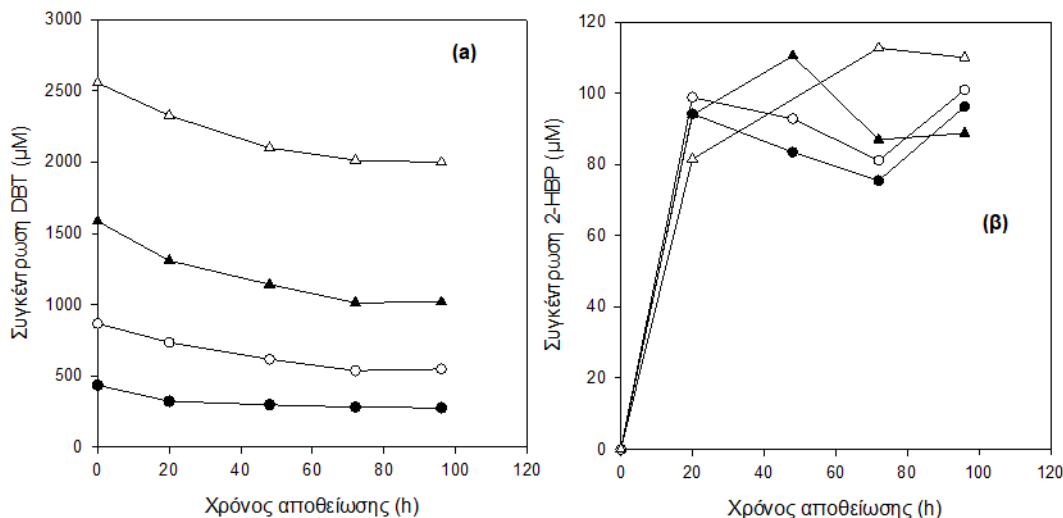
Φαίνεται από το διάγραμμα 11.14 ότι ενώ το ποσοστό κατανάλωσης DBT στο υδατικό σύστημα παραμένει σχετικά σταθερό περίπου στο 30% για όλες τις συγκεντρώσεις βιομάζας, στο διφασικό σύστημα το ποσοστό αυτό αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης βιομάζας.

### 11.3 Πείραμα συγκεντρώσεων DBT

#### 11.3.1 Υδατικό σύστημα

Μετρήθηκε η αποθιωτική ικανότητα μη αναπτυσσόμενων κυττάρων του βακτηρίου *R. erythropolis* IGTS 8 για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις DBT 0.4mM, 0.8mM, 1.5mM και 2.5mM (Μέθοδοι & Υλικά, §9.3.1) σε υδατικό σύστημα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες και τα Διαγράμματα που ακολουθούν





Διάγραμμα 11.15. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης (α) του DBT και (β) του 2-HBP

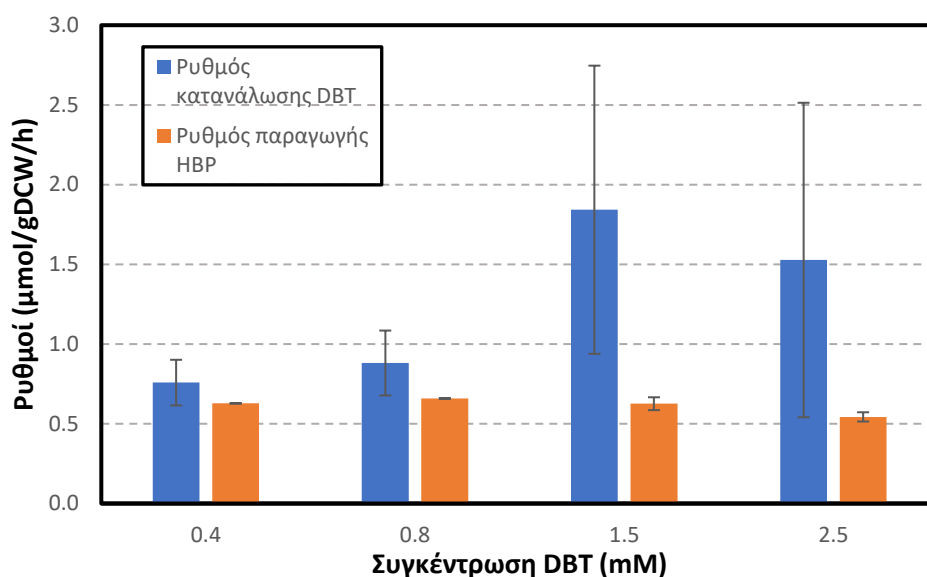
Συνθήκες:  $C_X = 7.5 \text{ g DCW/L}$ , ηλικία βιοκαταλύτη 40 h,  $T=30^\circ\text{C}$

Πίνακας 11.7 Μέγιστος ρυθμός μείωσης του DBT και παραγωγής 2-HBP για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις DBT

Συνθήκες:  $C_X = 7.5 \text{ g DCW/L}$ , ηλικία βιοκαταλύτη 40 h,  $T=30^\circ\text{C}$

Αρχική συγκέντρωση DBT ( $\mu\text{M}$ )	Ρυθμός μείωσης DBT ( $\mu\text{mol/g DCW/h}$ )	Ρυθμός παραγωγής 2-HBP ( $\mu\text{mol/g DCW/h}$ )
400	$0.7585 \pm 0.143$	$0.6280 \pm 0.002$
800	$0.8813 \pm 0.204$	$0.6587 \pm 0.001$
1500	$1.8426 \pm 0.904$	$0.6260 \pm 0.040$
2500	$1.5272 \pm 0.986$	$0.5434 \pm 0.029$

Από τον πίνακα 11.7 και το διάγραμμα 11.16 φαίνεται πως ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος (2-HBP) παραμένει σχετικά σταθερός για κάθε διαφορετική αρχική συγκέντρωση DBT. Ο μέσος ρυθμός παραγωγής 2-HBP βρέθηκε  $0.6140 \pm 0.0428$  ( $\mu\text{mol/gDCW/h}$ ). Το αποτέλεσμα αυτό είναι μικρότερο συγκριτικά με αυτό που βρήκαν οι Davoodi-Dehaghani et al, (2010).



Διάγραμμα 11.16: Ρυθμοί μείωσης DBT και παραγωγής 2-HBP για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις DBT.

Το ποσοστό αποθείωσης του DBT εκφρασμένο ως μετατροπή σε προϊόν (2-HBP) ( $X_{BDS}$  %) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 11.1 και το ποσοστό μείωσης του DBT ( $X_{DBT}$  %) σύμφωνα με την εξίσωση 11.2 (del Olmo et al., 2005). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.8.

Πίνακας 11.8

Συνθήκες:  $C_X = 7.5 \text{ g DCW/L}$ , ηλικία βιοκαταλύτη 40 h (διάγραμμα 11.14),  $T=30^\circ\text{C}$

Αρχική συγκέντρωση DBT ( $\mu\text{M}$ )	$X_{DBT}$ (%)	$X_{BDS}$ (%)
400	$36.44 \pm 3.37$	$22.09 \pm 1.43$
800	$38.10 \pm 2.60$	$11.63 \pm 0.46$
1500	$36.08 \pm 3.48$	$6.97 \pm 0.37$
2500	$21.20 \pm 3.35$	$4.41 \pm 0.09$

Όσον αφορά το 2-HBP, φαίνεται ότι το ποσοστό παραγωγής του αυξάνεται όσο μικραίνει η αρχική συγκέντρωση του DBT κάτι το οποίο οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση του 2-

HBP φτάνει σε μία μέγιστη συγκέντρωση λίγο πάνω από τα 100mM, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 11.15(β), την οποίο δεν μπορεί να ξεπεράσει. Αυτό οφείλεται στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας αλλά και στην τοξικότητα των προϊόντων της αντίδρασης προς τα κύτταρα (Θεωρητικό μέρος §7.4), (Caro et al, 2007). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Alves et al. (2005) οι οποίοι αναφέρουν ότι μέγιστη δυνατή εξωκυτταρική συγκέντρωση 2-HBP είναι 120  $\mu$ M.

### 11.3.2 Διφασικό σύστημα

Μετρήθηκε η αποθειωτική ικανότητα βιοκαταλύτη για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις DBT 1mM, 5mM, 7.5mM και 10mM σε διφασικό σύστημα.

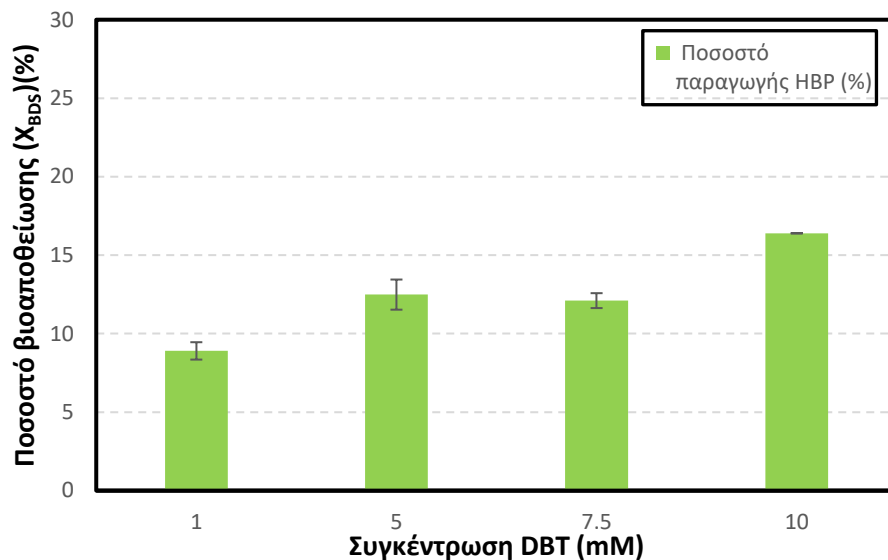
Πίνακας 11.9: Ρυθμοί παραγωγής 2-HBP για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις DBT

Αρχική συγκέντρωση DBT ( $\mu$ M)	Ρυθμός παραγωγής 2-HBP ( $\mu$ mol/gDCW/h)
1000	0.6728 $\pm$ 0.0000
5000	0.9845 $\pm$ 0.1702
7500	0.9237 $\pm$ 0.0000
10000	0.7601 $\pm$ 0.0000

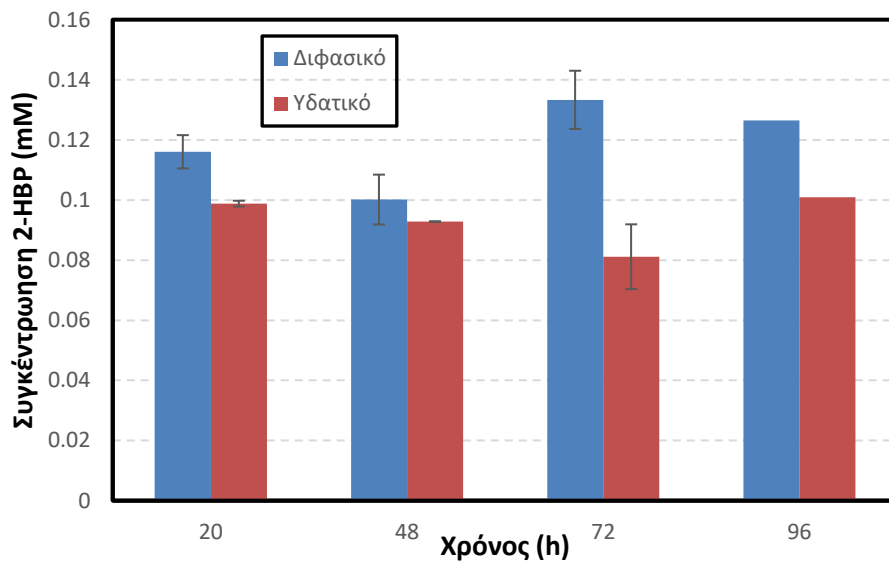
Το ποσοστό αποθείωσης του DBT εκφρασμένο ως μετατροπή σε προϊόν (2-HBP) ( $X_{DBS}$  %) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 11.1 (del Olmo et al., 2005). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.10.

Πίνακας 11.10: Ποσοστό βιοαποθείωσης ( $X_{BDS}$ ) για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις DBT

Αρχική συγκέντρωση DBT ( $\mu$ M)	$X_{BDS}$ (%)
1000	8.90 $\pm$ 0.55
5000	12.49 $\pm$ 0.96
7500	12.11 $\pm$ 0.48
10000	16.39 $\pm$ 0.00



Διάγραμμα 11.17: Ποσοστό βιοαποθείωσης ( $X_{BDS}$ ) για τις διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις DBT.



Διάγραμμα 11.18: Συγκέντρωσης 2-HBP σε ορισμένους χρόνους για διφασικό και υδατικό σύστημα.

Από τα δεδομένα του διαγράμματος 11.18 φαίνεται πως στο διφασικό σύστημα δεν εμφανίζεται παρεμπόδιση στα 0.1mM 2-HBP. Γενικά οι ρυθμοί αλλά και οι ποσότητες

που σχετίζονται με την παραγωγή του προϊόντος φαίνεται να είναι υψηλότερες στο διφασικό από ότι στο υδατικό σύστημα.

#### 11.4 Βιοαποθειωτικό Τεστ

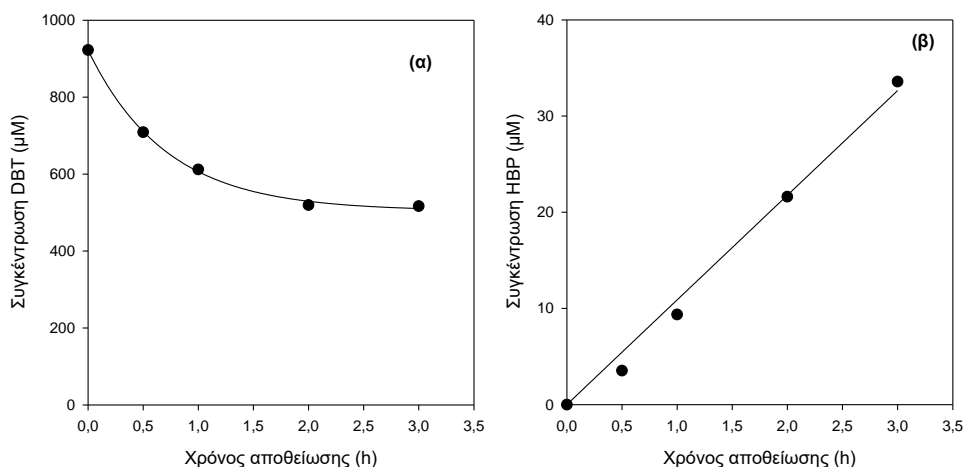
Μετρήθηκε η αποθειωτική ικανότητα μη αναπτυσσόμενων κυττάρων (resting cells) του βακτηρίου *R. erythropolis* IGTS 8 (Μέθοδοι & Υλικά, §9.3.1).

Στον Πίνακα 11.11 και το διάγραμμα 11.19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος.

Πίνακας 11.11: Συγκέντρωση DBT και 2-HBP σε  $\mu\text{M}$  μετά από διαφορετικούς χρόνους αποθείωσης.

Συνθήκες:  $C_{DBT_0} = 922 \mu\text{mol/L}$ ,  $C_X = 10 \text{ g DCW/L}$ , ηλικία βιοκαταλύτη 40 h,  $T=30^\circ\text{C}$

Χρόνος (h)	Συγκέντρωση DBT ( $\mu\text{M}$ )	Συγκέντρωση 2-HBP ( $\mu\text{M}$ )
0	922,45	0,00
0,5	708,87	3,53
1	612,17	9,36
2	519,42	21,61
3	516,61	33,59



Διάγραμμα 11.19. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης (α) του DBT και (β) του 2-HBP

Συνθήκες:  $C_{DBT_0} = 922 \mu\text{mol/L}$ ,  $C_X = 10 \text{ g DCW/L}$ , ηλικία βιοκαταλύτη 40,  $T=30^\circ\text{C}$

Από τα διαγράμματα 11.19 (α) και (β) φαίνεται ότι η συγκέντρωση του DBT μειώνεται μέχρι τις 2 ώρες και ακολούθως παραμένει σταθερή, σε αντίθεση με την συγκέντρωση του HBP που αυξάνεται γραμμικά σε όλο το χρονικό εύρος. Με βάση τα διαγράμματα έγινε προσαρμογή των εξισώσεων 11.3 και 11.4 για τη μεταβολή της συγκέντρωσης του DBT και 2-HBP αντίστοιχα:

$$y = y_0 + \alpha_1 \cdot e^{-b \cdot t} \text{ (Εξ. 11.3)}$$

$$y = \alpha_2 \cdot t \text{ (Εξ. 11.4)}$$

Πίνακας 11.12: Στατιστική ανάλυση των παραμέτρων της εξίσωσης 11.3

	Τιμές	Std. Error	p
$y_0$	504.48	8.9052	0.0003
$a_1$	417.89	11.9226	0.0008
b	1.41	0.1018	0.0002
R <sup>2</sup> =0.9985, Standard Error of Estimate = 9.2841			p = 0.0015

Από το  $R^2 = 0.9985$  συμπεραίνουμε ότι το 99.85% της διακύμανσης της μεταβλητής Y (συγκέντρωση DBT) εξηγείται από την X (χρόνος αποθείωσης).

Από τις τιμές του p βλέπουμε ότι τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά όσον αφορά το γενικότερο μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε αλλά και την κάθε παράμετρο ξεχωριστά.

Πίνακας 11.13: Στατιστική ανάλυση των παραμέτρων της εξίσωσης 11.4

	Τιμή	Std. Error	P
$a_2$	10.885	0.3469	<0.0001
R <sup>2</sup> =0.9911, Standard Error of Estimate = 1.3094			P<0.0001

Από το  $R^2 = 0.9911$  συμπεραίνουμε ότι το 99.11% της διακύμανσης της μεταβλητής  $Y$  (συγκέντρωση 2-HBP) εξηγείται από την  $X$  (χρόνος αποθείωσης).

Από τις τιμές του  $r$  βλέπουμε ότι τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά.

Από κλίση της εξίσωσης 11.4  $\alpha_2 = 10,885 \mu\text{M}/\text{h}$ , προσδιορίστηκε η ταχύτητα παραγωγής 2-HBP ανά γραμμάριο κυττάρων

$$v_{2-HBP} = 1,0885 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g DCW} \cdot \text{h}}$$

Στον Πίνακα 11.14 συνοψίζονται τα αποτελέσματα

Πίνακας 11.14: Συνοπτικά αποτελέσματα, ρυθμός παραγωγής 2-HBP ( $v_{2-HBP}$ ), ποσοστό βιοαποθείωσης ( $X_{DBS}$ ) και ποσοστό κατανάλωσης DBT ( $X_{DBT}$ ).

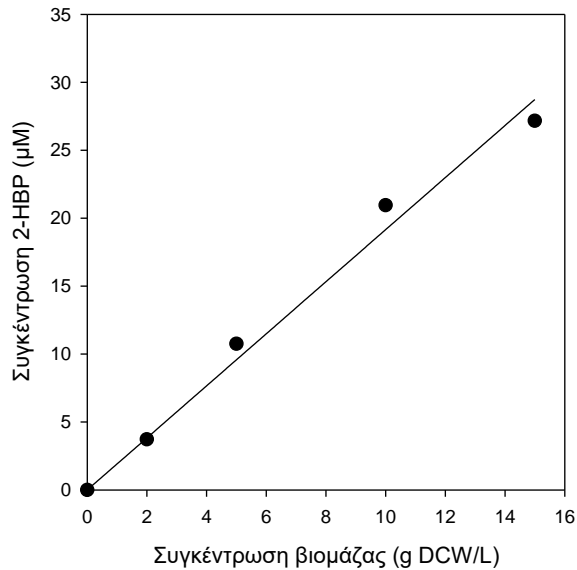
$v_{2-HBP}$	$1,0885 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g DCW} \cdot \text{h}}$
$X_{DBS}$	3.64 %
$X_{DBT}$	44%

### Συγκέντρωση βιομάζας

Πίνακας 11.15: Οι συγκεντρώσεις DBT και 2-HBP συναρτήσει της συγκέντρωσης βιομάζας.

Συνθήκες:  $C_{DBT_0} = 922 \mu\text{mol}/\text{L}$ ,  $t=2 \text{ h}$ , ηλικία βιοκαταλύτη 40 h,  $T=30^\circ\text{C}$

Συγκέντρωση βιομάζας (g DCW/L)	Συγκέντρωση DBT ( $\mu\text{M}$ )	Συγκέντρωση 2-HBP ( $\mu\text{M}$ )
2	161,24	3,72
5	222,08	10,75
10	228,23	20,95
15	260,07	27,17



Διάγραμμα 11.20: Μεταβολή της συγκέντρωσης του 2-HBP συναρτήσει της συγκέντρωσης της βιομάζας.

Συνθήκες:  $C_{DBT_0} = 922 \mu\text{mol/L}$ ,  $t=2 \text{ h}$ , ηλικία βιοκαταλύτη 40 h,  $T=30^\circ\text{C}$

Με βάση το διάγραμμα 11.20 έγινε προσαρμογή γραμμικής εξίσωσης  $y = a_2 * x$  (εξ. 11.5) για τη μεταβολή της συγκέντρωσης του 2-HBP και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.16:

Πίνακας 11.16: Στατιστική ανάλυση της παραμέτρου της εξίσωσης 11.5

	Τιμή	Std. Error	P
$a_2$	1.9158	0.0706	<0.0001
$R^2=0.9865$ , Standard Error of Estimate = 1.3291 P<0.0001			

Από το  $R^2 = 0.9865$  συμπεραίνουμε ότι το 98.65% της διακύμανσης της μεταβλητής Y (συγκέντρωση 2-HBP) εξηγείται από την X (χρόνος αποθείωσης).

Από τις τιμές του p βλέπουμε ότι τα αποτελέσματα είναι στατιστικά σημαντικά.

Από κλίση της εξίσωσης 11.5  $a_2 = 1.9158 \pm 0.0706 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g DCW}}$ , προσδιορίζεται η ταχύτητα παραγωγής 2-HBP

$$v_{2-HBP} = 0,9305 \frac{\mu\text{mol}}{\text{g DCW} \cdot \text{h}}$$

Στον Πίνακα 11.17 συνοψίζονται τα αποτελέσματα



Πίνακας 11.17: Τα ποσοστά αποθείωσης του πειράματος,  $X_{DBT}$  (%) το ποσοστό κατανάλωσης DBT και  $X_{BDS}$  (%) το ποσοστό βιοαποθείωσης.

Συγκέντρωση βιομάζας (g DCW/L)	$X_{DBT}$ (%)	$X_{BDS}$ (%)
2	81,47	0,43
5	74,48	1,24
10	73,77	2,41
15	70,11	3,12

# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

## Συμπεράσματα

Αρχικά μετρήθηκε η βιοαποθειωτική ικανότητα βιοκαταλυτών διαφορετικής ηλικίας. Τα αποτελέσματα δείχνουν ξεκάθαρα πως κύτταρα που είχαν συλλεχθεί μετά από 64 ώρες καλλιέργειας παρουσίασαν ελάχιστη βιοαποθειωτική δράση, αυτό φαίνεται από τις χαμηλές τιμές συγκεντρώσεων 2-HBP που παρήχθησαν και από την πολύ μικρή μείωση στη συγκέντρωση του DBT.

Όσον αφορά τους βιοκαταλύτες με ηλικίες 24 και 40 ώρες παρατηρούμε πως αμφότεροι έχουν βιοαποθειωτική δράση, με τα κύτταρα των 24 ωρών να εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά και ρυθμούς παραγωγής 2-HBP ενώ αυτά των 40 ωρών να εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά και ρυθμούς κατανάλωσης DBT.

Επιπλέον έγινε πείραμα αναλυτικότερης μελέτης της ηλικίας του βιοκαταλύτη μεταξύ των 21h και 36h ωρών καλλιέργειας, σαν αρχική συγκέντρωση DBT επιλέχθηκε το 0.5mM, η συγκέντρωση βιομάζας ρυθμίστηκε στα 5gDCW/L και μετρήθηκαν οι ρυθμοί μείωσης DBT και παραγωγής 2-HBP. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μεγαλύτεροι ρυθμοί ανά ώρα και ανά γραμμάριο βιομάζας επιτυγχάνονται από κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί για 21 έως 25 ώρες. Βιβλιογραφικά αναφέρεται (πίνακας 7.1) πως η βέλτιστη ηλικία βιοκαταλύτη για τον *R. Erythropolis* IGTS8 είναι 24 ώρες καλλιέργειας και μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης DBT που επετεύχθη είναι 8  $\mu\text{mol/gDCW/L}$  (deI Olmo et al, 2005b). Στη παρούσα εργασία ο μέγιστος ρυθμός που σημειώθηκε ήταν αρκετά μικρότερος, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται σε διαφορετικές συνθήκες όσον αφορά την συγκέντρωση βιομάζας και την αρχική συγκέντρωση DBT. Επιπλέον, συγκρίθηκε η βιοαποθειωτική ικανότητα των κυττάρων όσον αφορά την την πηγή άνθρακα (γλυκερόλη – γλυκόζη). Οι βιοκαταλύτες που προέρχονταν από την γλυκόζη παρουσίασαν μεγαλύτερους ρυθμούς και μεγαλύτερα ποσοστά από της γλυκερόλη.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης βιομάζας στην βιοαποθειωτική ικανότητα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε υδατικά συστήματα με τις εξής συνθήκες: Ηλικία βιοκαταλύτη 40h, θερμοκρασία 30°C και ταχύτητα ανάδευσης 180rpm. Οι συγκεντρώσεις βιομάζας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι 2.5, 5, 7.5, 10 και 20 gDCW/L.

Προσδιορίστηκε ο βέλτιστος ρυθμός κατανάλωσης DBT  $4.1775 \pm 0.3701$   $\mu\text{mol/gDCW/h}$  για συγκέντρωση βιομάζας  $2.5$   $\text{gDCW/L}$ , ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής 2-HBP προσδιορίστηκε στα  $0.5794 \pm 0$   $\mu\text{mol/gDCW/h}$  στα  $5$   $\text{gDCW/L}$ . Γενικότερα παρατηρήθηκαν μεγαλύτεροι ρυθμοί αντίδρασης στις μικρές συγκεντρώσεις βιομάζας το πρώτο εικοσιτετράωρο της βιοαποθείωσης. Αντίθετα, καμία συγκέντρωση βιομάζας δεν παρουσιάζει μέγιστο στο ποσοστό κατανάλωσης DBT, όλες οι συγκεντρώσεις παρουσιάζουν τελικό ποσοστό μείωσης περίπου στο 30%. Όσον αφορά το ποσοστό βιοαποθείωσης (XBDS) εμφανίζεται μέγιστο στα  $7.5$   $\text{gDCW/L}$  ίσο με  $6.75 \pm 0.16\%$ . Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μετά από τη συγκέντρωση βιομάζας  $7.5$   $\text{gDCW/L}$  η αύξηση της βιομάζας δεν οδηγεί σε αύξηση της βιοαποθειωτικής ικανότητας. Αυτό το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται και από τους (Caro et al, 2007) και εικάζεται πως οφείλεται στα φαινόμενα μεταφοράς οξυγόνου και σε παρεμπόδιση που προκαλεί το 2-HBP.

Ακόμα, πραγματοποιήθηκαν σε διφασικά συστήματα με τις εξής συνθήκες: Ηλικία βιοκαταλύτη 40h, θερμοκρασία  $30^\circ\text{C}$  και ταχύτητα ανάδευσης 180rpm και αναλογία οργανικής προς υδατική φάση 1:1. Οι συγκεντρώσεις βιομάζας που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι  $2.5$ ,  $5$ ,  $7.5$ ,  $10$  και  $20$   $\text{gDCW/L}$ . Προσδιορίστηκε ο βέλτιστος ρυθμός κατανάλωσης DBT  $2.4335 \pm 1.3502$   $\mu\text{mol/gDCW/h}$  για συγκέντρωση βιομάζας  $7.5$   $\text{gDCW/L}$ , ο μέγιστος ρυθμός παραγωγής 2-HBP προσδιορίστηκε στα  $1.2103 \pm 0.0340$   $\mu\text{mol/gDCW/h}$  στα  $10$   $\text{gDCW/L}$ . Στο διφασικό σύστημα επίσης παρατηρούνται μεγαλύτεροι ρυθμοί μείωσης DBT σε σχέση με τους ρυθμούς παραγωγής 2-HBP. Εκτός από τη μικρότερη συγκέντρωση βιομάζας των  $2.5$   $\text{g DCW/L}$  που παρουσιάζονται και οι μικρότεροι ρυθμοί αποθείωσης, όλες υπόλοιπες συγκεντρώσεις φαίνεται να μην επηρεάζουν ιδιαίτερα τους ρυθμούς. Στα διφασικά συστήματα εκτός από το DBT μετρήθηκε και η κατανάλωση ολικού θείου. Προέκυψε πως όλα τα ποσοστά όσον αφορά το 2-HBP, το DBT και το ολικό θείο ήταν γραμμικά συναρτήσει της συγκέντρωσης βιομάζας.

Τα μέγιστα ποσοστά προσδιορίστηκαν ως εξής: ποσοστό παραγωγής  $20.31 \pm 2.95\%$ , ποσοστό κατανάλωσης DBT  $45.33 \pm 9.92\%$ , ποσοστό κατανάλωσης ολικού θείου  $47.78 \pm 5.27$ , τα οποία προφανώς ισχύουν για τη μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας  $20$   $\text{gDCW/L}$ .

Φαίνεται από το διάγραμμα 11.7 πως τα ποσοστά ολικού θείου και DBT που έχουν καταναλωθεί βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους, όπως και αναμενόταν αφού το σύστημα έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε το DBT να είναι η μοναδική πηγή θείου. Τα κύτταρα χρησιμοποιούν το θείο που αποσπάται κατά τη διάσπαση του DBT για να αναπτυχθούν και αν η ποσότητα του θείου περισσεύει, τα κύτταρα μπορούν να την αποθηκεύσουν για μελλοντική χρήση (Kilbane 1990).

Από τα συγκριτικά αποτελέσματα των ρυθμών για το υδατικό και το διφασικό σύστημα φαίνεται ότι μόνο ο ρυθμός κατανάλωσης DBT για συγκέντρωση 2.5 gDCW/L είναι ψηλότερος στο υδατικό σύστημα, σε όλες τις άλλες περιπτώσεις το διφασικό σύστημα εμφανίζει μεγαλύτερους ρυθμούς αποθείωσης. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με όσα έχουν αναφέρει οι Davoodi-Dehaghani et al, (2010). Οι Guobin et al.,(2006), επιβεβαιώνουν αυτό το αποτέλεσμα και ισχυρίζονται πως οφείλεται στο γεγονός ότι το 2-HBP συγκεντρώνεται στην οργανική φάση και δεν βλάπτει τα κύτταρα. Επιπλέον και μια άλλη έρευνα επιβεβαιώνει τα παραπάνω, προτείνοντας σαν ακόμα έναν παράγοντα, την καλύτερη διάλυση του DBT στην οργανική φάση αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες να έρθει σε επαφή με τα κύτταρα (Santos et al., 2006).

Από τα δεδομένα φαίνεται πως το ποσοστό βιοαποθείωσης ( $X_{BDS}$ ) για το διφασικό σύστημα αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης βιομάζας, σε αντίθεση με το υδατικό όπου οι μεγάλες συγκεντρώσεις φαίνεται να λειτουργούν παρεμποδιστικά μετά τα 7.5 gDCW/L. Αυτό συνάδει με τις βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες τονίζεται η ύπαρξη παρεμπόδισης στα υδατικά συστήματα είτε εξαιτίας προβλημάτων στη μεταφορά μάζας του οξυγόνου είτε εξαιτίας της ανασταλτικής λειτουργίας του 2-HBP όταν οι συγκεντρώσεις βιομάζας γίνονται μεγάλες (Θεωρητικό μέρος §7.4), (Caro et al. 2007a; Wang et al., 2004).

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης DBT στο σύστημα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε υδατικά συστήματα με τις εξής συνθήκες: Ηλικία βιοκαταλύτη 40h, θερμοκρασία 30°C και ταχύτητα ανάδευσης 180rpm, συγκέντρωση κυττάρων 7.5 gDCW/L. Από τα πειράματα που έγιναν στο υδατικό σύστημα για διαφορετικές συγκεντρώσεις DBT προέκυψε ότι ο μέγιστος ρυθμός κατανάλωσης DBT

στα  $1.8426 \pm 0.904$  ( $\mu\text{mol/gDCW/h}$ ) για αρχική συγκέντρωση DBT 1.5mM. Σχετικά με τον ρυθμό παραγωγής του 2-HBP, φαίνεται ότι είναι σχετικά σταθερός με μια μέση τιμή  $0.6140 \pm 0.0428$  ( $\mu\text{mol/gDCW/h}$ ).

Η ανάλυση των ποσοστών δείχνει ότι το μέγιστο ποσοστό βιοαποθείωσης ( $X_{\text{BDS}}$ ) παρουσιάστηκε για αρχική συγκέντρωση 0.4mM ίσο με  $22.09 \pm 1.43\%$ , ενώ για αρχική συγκέντρωση DBT 0.8mM παρατηρήθηκε το μέγιστο ποσοστό κατανάλωσης  $38.10 \pm 2.60\%$ . Από τον πίνακα και το διάγραμμα φαίνεται πως ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος 2-HBP παραμένει σχετικά σταθερός για κάθε διαφορετική αρχική συγκέντρωση DBT. Το αποτέλεσμα αυτό είναι μικρότερο συγκριτικά με αυτό που βρήκαν οι Davoodi-Dehaghani et al, (2010).

Το ποσοστό αποθείωσης φαίνεται να αυξάνεται όσο μικραίνει η αρχική συγκέντρωση του DBT κάτι το οποίο οφείλεται στο ότι η συγκέντρωση του 2-HBP φτάνει σε μία μέγιστη συγκέντρωση λίγο πάνω από τα 100mM, στην οποία και μένει σταθερή. Αυτό οφείλεται στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας αλλά και στην τοξικότητα των προϊόντων της αντίδρασης προς τα κύτταρα (Θεωρητικό μέρος §7.4), (Caro et al, 2007). Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Alves et al. (2005) οι οποίοι αναφέρουν ότι μέγιστη δυνατή εξωκυτταρική συγκέντρωση 2-HBP είναι 120  $\mu\text{M}$ .

Ακόμα, πραγματοποιήθηκε πείραμα μελέτης της επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης DBT σε διφασικά συστήματα με τις εξής συνθήκες: Ηλικία βιοκαταλύτη 40h, θερμοκρασία 30°C, ταχύτητα ανάδευσης 180rpm, αναλογία οργανικής προς υδατική φάση 1:1 και συγκέντρωση βιομάζας 7.5 gDCW/L. Από τα αποτελέσματα για το διφασικό σύστημα παρατηρείται ότι δεν εμφανίζεται παρεμπόδιση στα 100 $\mu\text{M}$  2-HBP. Γενικά οι ρυθμοί αλλά και οι ποσότητες που σχετίζονται με την παραγωγή του προϊόντος φαίνεται να είναι υψηλότερες στο διφασικό από ότι στο υδατικό σύστημα. Ο ρυθμός παραγωγής 2-HBP στο διφασικό σύστημα εμφάνισε μέγιστο για αρχική συγκέντρωση DBT 5mM και βρέθηκε ίσος με  $0.9845 \pm 0.1702$  ( $\mu\text{mol/gDCW/h}$ ). Πράγμα που δείχνει ότι ο ρυθμός για το διφασικό σύστημα είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο για το υδατικό. Το μέγιστο ποσοστό βιοαποθείωσης ( $X_{\text{BDS}}$ ) βρέθηκε  $16.39 \pm 0.00\%$  για αρχική συγκέντρωση DBT 10mM.

Εκτός από τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε βιοαποθειωτικό τεστ στο οποίο έγινε μελέτη της βιοαποθειωτικής ικανότητας συναρτήσει του χρόνου για συγκέντρωση βιομάζας 10 gDCW/L και συγκέντρωση DBT 922μM στους 30 °C και με ηλικία βιοκαταλύτη. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η συγκέντρωση του DBT μειώνεται μέχρι τις 2 ώρες και ακολούθως παραμένει σταθερή, σε αντίθεση με την συγκέντρωση του HBP που αυξάνεται γραμμικά σε όλο το χρονικό εύρος

Από κλίση της εξίσωσης 11.4  $\alpha_2 = 10,885 \mu M/h$ , προσδιορίστηκε η ταχύτητα παραγωγής 2-HBP ανά γραμμάριο κυττάρων

$$v_{2-HBP} = 1,0885 \frac{\mu mol}{g DCW \cdot h}$$

Ο οποίος είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο για το πρώτο 24ωρο της αντίδρασης.

Επιπλέον, μετρήθηκε η βιοαποθειωτική ικανότητα για το πρώτο 2ωρο της αντίδρασης για συνθήκες:  $C_{DBT_0} = 922 \mu mol/L$ ,  $t=2$  h, ηλικία βιοκαταλύτη 40 h και  $T=30^{\circ}C$  συναρτήσει την συγκέντρωσης βιομάζας. Οι συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν ήταν 2, 5, 10, 15 gDCW/L.

Τα αποτελέσματα έδειξαν γραμμική συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού παραγωγής 2-HBP και της συγκέντρωσης βιομάζας. Αυτό βρίσκεται σε αντιδιαστολή με τα αποτελέσματα για μεγάλους χρόνους βιοαποθείωσης. Έτσι μπορούμε να συμπεράνουμε πως τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας δεν επηρεάζουν σημαντικά την αποθείωση για τις πρώτες 2 ώρες.

Από κλίση της εξίσωσης 11.5  $\alpha_2 = 1.9158 \pm 0.0706 \mu mol/g DCW$ , προσδιορίζεται η ταχύτητα παραγωγής 2-HBP

$$v_{2-HBP} = 0,9305 \frac{\mu mol}{g DCW \cdot h}$$

Ο ρυθμός αυτός παρότι λίγο μικρότερος, πλησιάζει την τιμή 1,0885 που υπολογίστηκε στο πείραμα για συγκέντρωση βιομάζας 10gDCW/L συναρτήσει του χρόνου.





# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

- Alves, L., & Paixão, S. M. (2014). Enhancement of dibenzothiophene desulfurization by *Gordonia alkanivorans* strain 1B using sugar beet molasses as alternative carbon source. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6), 3297-3305.
- Alves, L., Salgueiro, R., Rodrigues, C., Mesquita, E., Matos, J., Gírio, F.M. (2005) Desulfurization of dibenzothiophene, benzothiophene, and other thiophene analogs by a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* Strain 1B. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 120: 199–208.
- Aparicio, F., Camú, E., Villarroel, M., Escalona, N., Baeza, P. (2013). Deep desulfurization by adsorption of 4,6-dimethyldibenzothiophene, study of adsorption on different transition metal oxides and supports. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 58(4): 2057–2060.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002). *Biochemistry*. 5th edition. W. H. Freeman and Company. New York, USA.
- Braun, R.L., Burnham, A.K. (1993). Chemical reaction model for oil and gas generation from type 1 and type 2 kerogen. United States: N. p.,. Web. doi:10.2172/10169154.
- Brimblecombe, P. (1987). *The Big Smoke (Routledge Revivals)*. London: Routledge
- Caro, A., Boltes, K., Leton, P., Garcia-Calvo, E. (2008) Description of by-product inhibition effects on biodesulfurization of dibenzothiophene in biphasic media. *Biodegradation*. 19: 599–611.
- Caro, A., Boltes, K., Letón, P., García-Calvo, E. (2007b) Dibenzothiophene biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*. 35:191–197.
- Caro, A., Leton, P., Garcia-Calvo, E., Setti, L. (2007a). Enhancement of the dibenzothiophene biodesulfurization by using  $\beta$ -cyclodextrins in oil-to-water media. *Fuel*. 86: 2632–2636
- Chang, J.H., Chang, Y.K., Cho, K.S., Chang, H.N. (2000) Desulfurization of model and diesel oils by resting cells of *Gordonia* sp. *Biotechnology Letters*. 22: 193–196.

- Chauhan, A.K., Ahmad, A., Singh, S.P., Kumar, A. (2015) Biodesulfurization of benzonaphthothiophene by an isolated *Gordonia* sp. IITR100. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 104: 105–111.
- Collins, F.M., Lucy, A.R., Sharp, C.J. (1997) Oxidation desulfurization of oils via hydrogen peroxide and heteropolyanion catalysis. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 117: 397–403.
- Conaway, C. F. (1999). *The petroleum industry: a nontechnical guide*. Pennwell Books.
- Davoodi-Dehaghani, F., Vosoughi, M., & Ziaee, A. A. (2010). Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. *Bioresource technology*, 101(3), 1102-1105.
- del Olmo, C.H., Alcon, A., Santos, V.E., Garcia-Ochoa, F. (2005a) Modeling the production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of media composition. *Enzyme and Microbial Technology*. 37: 157–166.
- del Olmo, C.H., Santos, V.E., Alcon, A., Garcia-Ochoa, F. (2005b) Production of a *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 biocatalyst for DBT biodesulfurization: influence of operational conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 22: 229–237.
- Diaz, E., Garcia, J.L. (2010) Genetics engineering for removal of sulfur and nitrogen from fuel heterocycles. In Timmis K.N., McGenity T.J., van der Meer J.R., and de Lorenzo V. (eds.), “*Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*”. Springer-Verlag GmbH, Berlin Heidelberg, Germany. Pp. 2787–2801.
- Duissenov, D. (2013) Production and processing of sour crude and natural gas – challenges due to increasing stringent regulations. Master’s Thesis. Department of Petroleum Engineering and Applied Geophysics, Faculty of Engineering Science and Technology, Norwegian University of Science and Technology. NTNU, Trondheim, Norway.
- Eccleston, B. H., Morrison, M., & Smith, H. M. (1952). Elemental sulfur in crude oil. *Analytical Chemistry*, 24(11), 1745-1748.
- El-Gendy, N. S., & Nassar, H. M. N. (2018). *Biodesulfurization in Petroleum Refining*. John Wiley & Sons.

- Georgakopoulos A., 2016, Ore deposit geology, AUTH publications
- Glasby, G. P. (2006). Abiogenic origin of hydrocarbons: An historical overview. *Resource Geology*, 56(1), 83-96.
- Gomez, E., Santos, V., Alcon, A., Garcia-Ochoa, F. (2006a) Oxygen transport rate on *Rhodococcus erythropolis* cultures: effect on growth and BDS capability. *Chemical Engineering Science*. 61: 4595–4604.
- Grossman, M. J., Lee, M. K., Prince, R. C., Minak-Bernero, V., George, G. N., & Pickering, I. J. (2001). Deep desulfurization of extensively hydrodesulfurized middle distillate oil by *Rhodococcus* sp. strain ECRD-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4), 1949-1952.
- Guobin, S., Huaiying, Z., Jianmin, X., Guo, C., Wangliang, L., Huizhou, L., 2006. Biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil with *Pseudomonas delafieldii* R-8 from high density culture. *Biochem. Eng. J.* 27, 305–309.
- Guobin, S., Huaiying, Z., Weiquan, C., Jianmin, X., & Huizhou, L. (2005). Improvement of biodesulfurization rate by assembling nanosorbents on the surfaces of microbial cells. *Biophysical journal*, 89(6), L58-L60.
- Hays, G. F. (2013). Now is the time. New York: World Corrosion Organization
- Henry, S., & Scott, W. (1994). Corrosion in petrochemical industry. USA: ASM International.
- [http://www.imo.org/en/OurWork/Environment/PollutionPrevention/AirPollution/Pages/Sulphur-oxides-\(SOx\)-%E2%80%93Regulation-14.aspx](http://www.imo.org/en/OurWork/Environment/PollutionPrevention/AirPollution/Pages/Sulphur-oxides-(SOx)-%E2%80%93Regulation-14.aspx)
- Je Hwan Chang a;1, Yong Keun Chang a; \*, Hee Wook Ryu b, Ho Nam Chang, (2000), Desulfurization of light gas oil in immobilized-cell systems of *Gordona* sp. CYKS1 and *Nocardia* sp. CYKS2, *FEMS Microbiology Letters* 182), 309-312
- Karchmer, J. H. (1954). Sulfur compounds from petroleum fractions. *Literature Resources for Chemical Process Industries* (Amer. Chem. Soc.), 398-425.
- Kaufman, E.N., Harkins, J.B., Borole, A.P. (1998) Comparison of batch stirred and electro spray reactors for biodesulfurization of dibenzothiophene in crude oil and hydrocarbon feedstocks. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 73: 127–144.

- Kilbane, J.J. (2006) Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Current Opinion in Biotechnology*. 17: 305–314.
- Kurita, S., Endo, T., Nakamura, H., Yagi, T., Tamuja, N.J. (1971) Decomposition of some organic sulfur compounds in petroleum by anaerobic bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 17: 185–198
- Le Borgne, S., Quintero, R. (2003) Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Processing Technology*. 81(2): 155–169.
- Li ZM, Squires CH, Monticello DJ, Childs JD (1996) Genetic analysis of the dsz promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *J Bacteriol* 178: 6409–6418.
- Likens, G. E., Driscoll, C. T., & Buso, D. C. (1996). Long-term effects of acid rain: response and recovery of a forest ecosystem. *Science*, 272(5259), 244-246.
- Lois E., Zankos F, Karonis D., (2014), *Fuel and Lubricant technology*, NTUA Publications.
- Maghsoudi, S., Vossoughi, M., Kheirloom, A., Tanaka, E., Katoh, S. (2001) Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. strain P32C1. *Biochemical Engineering Journal*. 8:151–156.
- Manufacturers of Emission Controls Association (MECA), (1998), *The Impact of Gasoline Fuel Sulfur on Catalytic Emission Control Systems*.
- Marcelis, C.L.M., Leeuwen, M.V., Polderman, H.G., Janssen, A.J.H., Lettinga, G. (2003) Model description of dibenzothiophene mass transfer in oil/water dispersions with respect to biodesulfurization. *Biochemical Engineering Journal*. 16: 253–264.
- Menz, F. C., & Seip, H. M. (2004). Acid rain in Europe and the United States: an update. *Environmental Science & Policy*, 7(4), 253-265.
- Mohebbi, G., & Ball, A. S. (2016). Biodesulfurization of diesel fuels—past, present and future perspectives. *International biodeterioration & biodegradation*, 110, 163-180.
- Ohshiro T., Izumi, Y. (1999). Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 63(1): 1–9.
- Paixão, S.M.; Silva, T.P.; Arez, B.F.; Alves, K. (2016). *Advances in the Reduction of the Costs Inherent to Fossil Fuels Biodesulfurization towards its Potential Industrial Application*.

- In Applying Nanotechnology to the Desulfurization Process in Petroleum Engineering; IGI Global: Hershey, PA, USA, Chapter 13; pp. 390–425
- Peng, B., Zhou, Z. (2016) Study on growth characteristic and microbial desulfurization activity of the bacterial strain MP12. *Biochemical Engineering Journal*. 112: 202–207.
- Santos, S.C., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Padula, M., Leitao, A.C., Martins, O.B., Ribeiro, C.M., Sasaki, M.Y., Matta, C.P., Bevilaqua, J., Sebastian, G.V., Seldin, L., (2006). Characterization of *Gordonia* sp. strain F.5.25.8 capable of dibenzothiophene desulfurization and carbazole utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 355–362.
- Schobert, Harold H. (2013). *Chemistry of fossil fuels and biofuels*. Cambridge: Cambridge University. ISBN 978-0-521-11400-4.
- Seinfeld, J. H., & Pandis, S. N. (1997). *Atmospheric chemistry and physics/A Wiley-Interscience Publication, Printed in the USA, QC879. 6. S45, 1356.*
- Soleimani, M., Bassi, A., Margaritis, A. (2007) Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology Advances*. 25: 570–596.
- Speight, G., J. (1999). *The chemistry and technology of petroleum* (3rd ed., rev. and expanded ed.). New York: Marcel Dekker. ISBN 978-0-8247-0217-5
- Swartz, M. (2010). HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12), 1130-1150.
- Vestreng, V. (2003). Review and Revision. Emission data reported to CLRTAP. MSC-W Status Report 2003.
- Wang, M. D., Li, W., Wang, D. H., Shi, Y. (2004) Desulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Corynebacterium* sp ZD-1 in aqueous phase. *Journal Environmental Science (China)*. 16: 1011–1015.
- Wauquier, J. P. (1995). *Petroleum refining: crude oil, petroleum products, process flowsheets* (Vol. 1). Editions Technip.
- Wood J. H., Long, G. R., & Morehouse, D. F. (2003). World conventional oil supply expected to peak in 21st century. *Offshore*, 63(4), 90.
- Xu, P., Yu, B., Li, F. L., Cai, X. F., & Ma, C. Q. (2006). Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles. *Trends in microbiology*, 14(9), 398-405.

Zanis P., 2014, Review on the atmospheric pollution and chemistry, AUTH Publications

Μ. Όξενκιουν-Πετροπούλου, Φασματομετρικές Μέθοδοι. Αθήνα: Εκδόσεις Συμμετρία,  
2012. ISBN: 978-960-266-367-7

ΦΕΚ 9 Δεκεμβρίου 2016 ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ Αρ. Φύλλου 3958