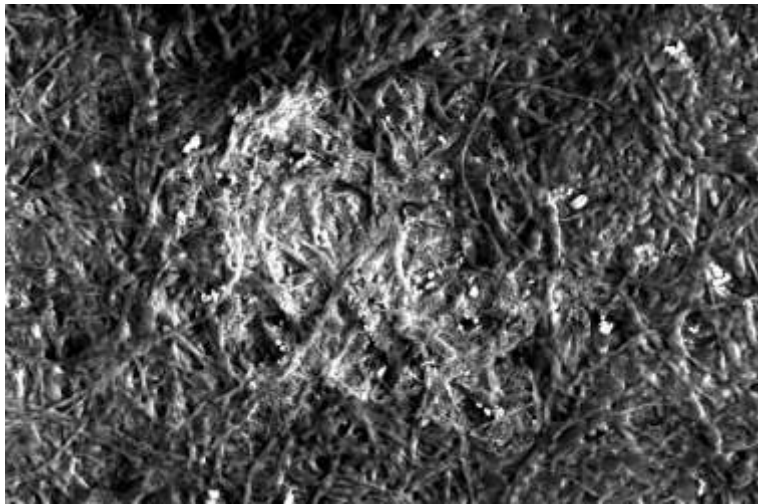




**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΜΕΤΑΛΛΕΙΩΝ-ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΣΤΗ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ



**Η βιοκαταβύθιση ως μέθοδος παραγωγής νανοσωματιδίων μεταλλικών  
ενώσεων**

Διπλωματική Εργασία  
Ευδοκία Δάβου

**ΑΘΗΝΑ 2013**



**Για την μητέρα μου και τον πατέρα μου  
που μου άνοιξαν τις κατάλληλες πόρτες...**



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα από αυτή τη θέση να ευχαριστήσω όλους όσους με τη βοήθεια, τη συμβολή και συμβουλή βοήθησαν στην διεξαγωγή της εργασίας αυτής, και ιδιαίτερα:

Τον Λέκτορα της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. κο. Ευάγγελο Τόπακα, ο οποίος μας παραχώρησε το στέλεχος του μύκητα *Fusarium oxysporum*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα επαφής, καθώς χωρίς τη συμβολή του δεν θα μπορούσε να διεξαχθεί η εργασία αυτή.

Την επιβλέπουσα Καθηγήτρια κα. Εμμανουέλλα Ρεμουντάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών Ε.Μ.Π. για τις συμβουλές, την αμέριστη συμπαράσταση, υποστήριξη και βοήθεια κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας, καθώς και για την εμπιστοσύνη της σε εμένα.

Τον Διδάκτορα της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών Ε.Μ.Π. κο. Αρτίν Χατζηκιοσεγιάν καθώς και την Υποψήφια Διδάκτορα της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών κα. Παυλίνα Κούση για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της εργασίας αυτής και τις πάντα εύστοχες παρατηρήσεις τους για την βελτίωση της εργασίας. Επίσης, τον Διδάκτορα της Σχολής των Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών κο. Πέτρο Τσακιρίδη για την πολύτιμη βοήθεια του στην ανάλυση των δειγμάτων της βιομάζας με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (TEM).

Τα δύο άλλα μέλη της τριμελούς επιστημονικής επιτροπής αξιολόγησης , κο. Τσέζο Καθηγητή της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών Ε.Μ.Π. και Διευθυντή του Εργαστηρίου Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας του Περιβάλλοντος στη Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών και τον κο. Ευάγγελο Χριστοφόρου Καθηγητή της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών Ε.Μ.Π., για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή και συνέβαλαν με τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους στην τελική διαμόρφωση του κειμένου.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική, αποτελεί μία προκαταρκτική εργασία βασισμένη στα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα και σε προκαταρκτικά πειραματικά δεδομένα που στόχο έχει τη διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής νανοσωματιδίων από καθαρά διαλύματα διαλυτών ειδών μετάλλων τα οποία είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των μετάλλων αυτών με μικροβιακή βιομάζα.

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας επιλέχθηκαν το παλλάδιο και το ζirkόνιο, τα νανοσωματίδια των οποίων χρησιμοποιούνται σε πλήθος σημαντικών τεχνολογικών εφαρμογών, ενώ ως μικροβιακή βιομάζα χρησιμοποιήθηκε στέλεχος του φυτοπαθογενή μύκητα *Fusarium oxysporum* ο οποίος αναφέρεται εκτενέστατα στη βιβλιογραφία ως μικροοργανισμός που συμβάλλει στη σύνθεση νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων.

Μετά την ανάπτυξη της μικροβιακής βιομάζας με τη χρήση του θρεπτικού υποστρώματος Czapek Dox και την παρασκευή κατάλληλων διαλυμάτων επαφής παλλαδίου και ζirkονίου, ακολούθησε η επαφή βιομάζας και διαλυμάτων και στη συνέχεια διαχωρίστηκε η στερεή από την υγρή φάση. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν προσδιορισμοί και στις δύο φάσεις: με ICP-OES για την υγρή φάση και SEM-EDS και TEM για τις στερεές φάσεις.

Στην περίπτωση του παλλαδίου, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σχηματίζονται στερεές φάσεις που συγκρατούνται από τη μικροβιακή βιομάζα σε σημαντική ποσότητα η οποία εξαρτάται από τη σύσταση του διαλύματος και κυρίως από το pH και την τιμή των χλωριόντων.

Στην περίπτωση του ζirkονίου, τα πειραματικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι οι στερεές φάσεις των ειδών του ζirkονίου δεν συγκρατούνται σε σημαντική ποσότητα από τη μικροβιακή βιομάζα όπως παρατηρήθηκε ξεκάθαρα στην περίπτωση του παλλαδίου. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η φόρτιση της μικροβιακής βιομάζας σε ζirkόνιο είναι της τάξης των 10 mg/g ενώ τα αποτελέσματα του SEM-EDS επιβεβαίωσαν την ύπαρξη ζirkονίου στη στερεή μικροβιακή βιομάζα. Προκαταρκτική παρατήρηση δείγματος στερεής φάσης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης μετά από την επαφή του με διάλυμα ζirkονίου, έδειξε την παρουσία νανοσωματιδίων των οποίων θα πρέπει να διερευνηθεί η χημική σύσταση.

Και για τα δύο μέταλλα θα πρέπει να επισημανθεί ότι είναι πιθανή η ύπαρξη νανοσωματιδίων και στην υγρή φάση, πράγμα το οποίο δεν μπορέσαμε να το διαπιστώσουμε πειραματικά λόγω της δυσκολίας διαχωρισμού τους από την υδατική φάση.



## ABSTRACT

The present diploma thesis is a preliminary study on the potential synthesis of metal and metal oxide nanoparticles from pure solutions of soluble species of metals due to their interactions with microbial biomass. After a thorough bibliographic review, preliminary experimental data are presented and discussed. The metals palladium and zirconium were chosen since their nanoparticles have various important technological applications. The choice of the fungus *Fusarium oxysporum* was decided for the present experimental study because it appears in literature as a promising microbial biomass for the synthesis of metal and metal oxide nanoparticles.

Czapek Dox has been selected as growth medium for the microbial biomass. Solutions of soluble palladium and zirconium species have been prepared at appropriate initial concentrations and the biomass-soluble metals species contact solutions were put in the orbital shaker for 24 hours to reach equilibrium. Following the separation of the solid from the liquid phase, determinations of the metals have been carried out by ICP-OES in the liquid phase while samples of the solid phase-biomass have been examined by SEM-EDS before and after the contacts with the metals species.

Concerning palladium, the results showed the formation of solids adsorpted on the biomass. Palladium loading of the biomass seems to be dependent on pH value and chloride ions concentration.

Although the biomass presented lower loading with zirconium than that observed for palladium, the results from the SEM-EDS analysis confirmed the presence of zirconium on the solid samples of microbial biomass. Furthermore, upon preliminary observation of one microbial biomass sample using the transmission electron microscope, after its contact with the zirconium solutions, our results indicate the presence of nanoparticles whose chemical composition needs to be further examined. Finally, palladium and zirconium nanoparticles may also be present in the liquid phase a hypothesis we weren't able to verify experimentally due to the difficulty of their separation from the aqueous phase.



# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ABSTRACT.....	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	vii
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	ix
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xiii
1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	1
1.1 Είδη αλληλεπιδράσεων και μηχανισμοί.....	1
1.1.1 Βιοεκχύλιση (Bioleaching).....	4
1.1.2 Βιορόφηση (Biosorption) – Βιοσυσσώρευση (Bioaccumulation).....	6
1.1.3 Βιοκαταβύθιση (Bioprecipitation).....	8
1.1.4 Βιολογική οξειδοαναγωγή – Βιομεθυλίωση – Βιοχημικοί μηχανισμοί μετασχηματισμού μετάλλων από μικροβιακή μάζα.....	9
1.1.4.1 Βακτηριακή αναγωγή τριθενούς Σιδήρου – Βακτήρια που ανάγουν τον Fe(III).....	9
1.1.4.2 Βακτηριακή αναγωγή Μαγγανίου (Mn).....	11
1.1.4.3 Βακτηριακή αναγωγή Κοβαλτίου (Co), Χρωμίου (Cr) και Παλλαδίου (Pd).....	13
1.1.4.4 Βακτηριακή αναγωγή Υδραργύρου (Hg).....	13
1.2 Εφαρμογές στην Υδρομεταλλουργία και την Περιβαλλοντική Τεχνολογία.....	13
1.2.1 Εφαρμογές στην Υδρομεταλλουργία.....	14
1.2.2 Εφαρμογές στην Περιβαλλοντική Τεχνολογία.....	17
1.2.3 Εφαρμογές στη Νανοτεχνολογία.....	31
1.2.3.1 Σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων με τη χρήση βακτηρίων.....	35
1.2.3.2 Σύνθεση νανοσωματιδίων οξειδίων και σουλφιδίων του Fe με χρήση βακτηρίων.....	37
1.2.3.3 Σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων με χρήση ζυμών.....	38
1.2.3.4 Σύνθεση νανοσωματιδίων με μύκητες.....	38
1.2.4 Πρωτόκολλο διεξαγωγής πειραμάτων επαφής μικροβιακής βιομάζας-μετάλλων.....	47
2 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ.....	49
3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51

3.1 Υλικά και τεχνικές .....	52
3.1.1 Μικροοργανισμός .....	52
3.1.2 Ανάπτυξη μικροβιακής βιομάζας .....	52
3.1.3 Υγρά θρεπτικά υποστρώματα .....	53
3.1.4 Ανάπτυξη του μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> με τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα .....	53
3.2 Πειράματα επαφής <i>Fusarium oxysporum</i> - μετάλλου .....	57
3.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων Ζιρκονίου .....	58
3.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων Παλλαδίου .....	58
3.3 Αναλυτικές μέθοδοι-Τεχνικές προσδιορισμού .....	58
3.3.1 Ανάλυση με τη μέθοδο της Ατομικής Φασματομετρίας Επαγωγικού Πλάσματος (ICP-OES) .....	59
3.3.2 Ανάλυση με τη χρήση του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM- EDS) .....	62
3.3.3 Ανάλυση με τη χρήση του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης (TEM).....	65
4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	69
4.1 Αποτελέσματα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση <i>Fusarium oxysporum</i> με διαλυτά είδη παλλαδίου .....	69
4.1.1 Φόρτιση μικροβιακής βιομάζας με παλλάδιο – Έμμεσος προσδιορισμός .....	69
4.1.2 Φόρτιση μικροβιακή βιομάζας με παλλάδιο – Άμεσος προσδιορισμός.....	73
4.1.2.1 Αποτελέσματα SEM-EDS .....	73
4.2 Αποτελέσματα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση <i>Fusarium oxysporum</i> με διαλυτά είδη ζιρκονίου .....	78
4.2.1 Φόρτιση μικροβιακής βιομάζας με ζιρκόνιο – Έμμεσος προσδιορισμός.....	78
4.2.2 Φόρτιση μικροβιακής βιομάζας με ζιρκόνιο-Άμεσος προσδιορισμός.....	80
4.2.2.1 Αποτελέσματα SEM-EDS .....	80
4.2.2.2 Αποτελέσματα TEM .....	83
5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ .....	87
6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	91

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Βασικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μετάλλου-βακτηριακού κυττάρου (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).....	2
Εικόνα 1.2: <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (Meach <i>et al.</i> , 2013).....	3
Εικόνα 1.3: Περιοχή που έχει πληγεί από την όξινη απορροή μεταλλείων (Ρεμουντάκη, 2012)	18
Εικόνα 1.4: Ο υδροφόρος ορίζοντας συχνά πλήττεται πολύ σοβαρά από το φαινόμενο της OAM (Ρεμουντάκη, 2012) .....	19
Εικόνα 1.5: Διάταξη θειοαναγωγικού αντιδραστήρα σταθερής κλίνης (Ρεμουντάκη, 2012) .....	23
Εικόνα 1.6: Πληρωτικό υλικό της σταθερής κλίνης του θειοαναγωγικού αντιδραστήρα, πριν και μετά την ανάπτυξη της μικροβιακής βιοστοιβάδας. Το μαύρο χρώμα οφείλεται στα ιζήματα των θειούχων ενώσεων των μετάλλων (Ρεμουντάκη, 2012).....	24
Εικόνα 1.7: Το βακτήριο <i>Desulfubrio vulgaris</i> (Yarris, 2011).....	26
Εικόνα 1.8: Το βακτήριο <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (ORNL, 2011) .....	37
Εικόνα 1.9: Μικρογραφίες TEM όπου διακρίνονται νανοσωματίδια SiO <sub>2</sub> , σε διαφορετικές μεγεθύνσεις, που συντέθηκαν από την επαφή άμμου με το μύκητα <i>Fusarium oxysporum</i> . (A-B): Πριν την πύρωση στους 400 °C για 2 h, (C-D): Μετά την πύρωση. Οι ένθετες εικόνες απεικονίζουν διατάξεις SAED αντιπροσωπευτικών νανοσωματιδίων (Bansal <i>et al.</i> , 2005) .....	43
Εικόνα 1.10: (A-B) Μικρογραφίες TEM φωτεινού και σκοτεινού πεδίου, νανοσωματιδίων ZrO <sub>2</sub> που συντέθηκαν χρησιμοποιώντας τον <i>Fusarium oxysporum</i> , πριν την πύρωση. (C) Μικρογραφία TEM φωτεινού πεδίου, βιογενών νανοσωματιδίων ZrO <sub>2</sub> , μετά από πύρωση στους 600 °C για 3 h. Οι ένθετες εικόνες αποτελούν διατάξεις SAED. (D) Ιστόγραμμα κατανομής μεγέθους των σωματιδίων που συντέθηκαν πριν την πύρωση (Bansal <i>et al.</i> , 2004).....	43
Εικόνα 1.11: Πιθανός μηχανισμός σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου (Duran <i>et al.</i> , 2005). ...	44
Εικόνα 1.12: Μακροκονίδια (A-B) και μικροκονίδια (C-D) <i>Fusarium oxysporum</i> (Leslie <i>et al.</i> , 2006) .....	45

Εικόνα 1.13: Ρίζα γλυκοπατάτας η οποία έχει προσβληθεί από τον <i>Fusarium oxysporum</i> . Ο μύκητας αυτός προκαλεί αγγειακές παθήσεις σε πολλά είδη φυτών (USDA, 2003). .....	46
Εικόνα 1.14: Διάφορα στάδια μόλυνσης του φυτού της ντοματιάς με το πρώτο από τα αριστερά φυτό να είναι εντελώς υγιές και τελευταίο νεκρό (Pietro <i>et al.</i> , 2003). .....	46
Εικόνα 3.1: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.....	51
Εικόνα 3.2: Συνθετικό διάλυμα γλυκόζης-αλάτων πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα.....	54
Εικόνα 3.3: Συνθετικό διάλυμα γλυκόζης-αλάτων ενισχυμένο με Yeast Extract πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα .....	54
Εικόνα 3.4: Διάλυμα Czapek Dox πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα .....	55
Εικόνα 3.5: Διάλυμα Standard I Nutrient Broth πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα .....	55
Εικόνα 3.6: Διάλυμα Billay-Joffee πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα .....	56
Εικόνα 3.7: Όργανο μεθόδου ανάλυσης ICP-OES (Leeman-Labs, 2012) .....	62
Εικόνα 3.8: Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM JEOL JSM 6380 LV) (Χατζηθεοδωρίδης <i>et al.</i> , 2011).....	65
Εικόνα 3.9: Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM JEOL 2100 HR) (Τσακίριδης <i>et al.</i> , 2011).....	67
Εικόνα 4.1: Μικρογραφία του SEM που απεικονίζει τη μικροβιακή βιομάζα του <i>Fusarium oxysporum</i> πριν την επαφή της με διάλυμα μετάλλου, με χαρακτηριστική για το είδος του μύκητα νηματοειδή μορφή.....	73
Εικόνα 4.2: Το φάσμα της μικροβιακής βιομάζας που προέκυψε από τη στοιχειακή ανάλυση με το EDS, επιβεβαιώνει την απουσία μετάλλου σε αυτή.....	74
Εικόνα 4.3: Μικρογραφία SEM που απεικονίζει τη μικροβιακή βιομάζα του <i>Fusarium oxysporum</i> μετά την επαφή της με διάλυμα Pd. Οι φωτεινές περιοχές καταδεικνύουν την παρουσία συσσώρευσης μετάλλου .....	75
Εικόνα 4.4: Το φάσμα που προέκυψε από το EDS, δείχνει την ύπαρξη παλλαδίου στη μικροβιακή βιομάζα.....	75

Εικόνα 4.5: Μικρογραφία SEM της μικροβιακής βιομάζας, μετά την επαφή της με διάλυμα Pd + KCl, όπου φαίνεται ξεκάθαρα η ύπαρξη φωτεινής περιοχής στην οποία υπάρχει συσσώρευση παλλαδίου .....	76
Εικόνα 4.6: Η στοιχειακή ανάλυση του δείγματος της βιομάζας με τη μέθοδο του EDS δείχνει ξεκάθαρα την ύπαρξη παλλαδίου καθώς και την ύπαρξη καλίου λόγω της σύστασης του διαλύματος επαφής .....	76
Εικόνα 4.7: Μικρογραφία SEM όπου απεικονίζεται η μικροβιακή βιομάζα του <i>Fusarium oxysporum</i> πριν την επαφή της με τα διαλύματα ζirkονίου .....	80
Εικόνα 4.8: Φάσμα στοιχειακής ανάλυσης EDS της βιομάζας πριν την επαφή, όπου φαίνεται η έλλειψη ζirkονίου .....	81
Εικόνα 4.9: Μικρογραφία SEM που απεικονίζει τη μικροβιακή βιομάζα μετά την επαφή της με διάλυμα $K_2ZrF_6$ .....	81
Εικόνα 4.10: Η στοιχειακή ανάλυση που προκύπτει από τη ανάλυση της βιομάζας με EDS μετά την επαφή με $K_2ZrF_6$ καταδεικνύει την ύπαρξη ζirkονίου στο διάλυμα καθώς και την ύπαρξη καλίου .....	82
Εικόνα 4.11: Μικρογραφία SEM που απεικονίζει τη μικροβιακή βιομάζα του <i>Fusarium oxysporum</i> μετά την επαφή της με διάλυμα $ZrCl_4$ .....	82
Εικόνα 4.12: Το φάσμα που προέκυψε από τη στοιχειακή ανάλυση με το EDS δείχνει την παρουσία ζirkονίου στη μικροβιακή βιομάζα μετά από την επαφή της με διάλυμα $ZrCl_4$ .....	83
Εικόνα 4.13: Μικρογραφία TEM όπου φαίνεται ξεκάθαρα η ύπαρξη στερεών σωματιδίων στη μικροβιακή βιομάζα.....	84
Εικόνα 4.14: Μικρογραφία TEM της μικροβιακής βιομάζας <i>Fusarium oxysporum</i> , όπου απεικονίζονται στερεά σωματίδια διακριτά και σε συσσωματώματα μεγέθους νανομέτρων....	84
Εικόνα 4.15: Μικρογραφία TEM της μικροβιακής βιομάζας όπου απεικονίζονται στερεά νανοσωματίδια σε μορφή που θυμίζει σπόρους .....	85





## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη διεργασία της βιοεκχύλισης (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).....	4
Πίνακας 1.2: Βιομηχανικές μονάδες βακτηριακής οξείδωσης χρυσοφόρων μεταλλευμάτων (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004) .....	15
Πίνακας 1.3: Παραδείγματα μικροβιακής βιομάζας που χρησιμοποιείται στην παραγωγή νανοσωματιδίων (Mohanpuria <i>et al.</i> , 2008) .....	33
Πίνακας 1.4: Λίστα των διαφορετικών νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων που συνθέτονται με τη χρήση μικροοργανισμών (Bansal <i>et al.</i> , 2012).....	42
Πίνακας 3.1: Απόδοση νωπής βιομάζας σε σχέση με το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα .....	56
Πίνακας 3.2: Τιμές pH των διηθημάτων των διαλυμάτων ζirkονίου.....	57
Πίνακας 4.1: Φόρτιση βιομάζας σε μέταλλο των διαλυμάτων του Pd.....	70
Πίνακας 4.2: Κατανομή διαλυτών ειδών Pd σε διάλυμα με αρχική συγκέντρωση 100 mg/l, τιμή pH 3 χωρίς προσθήκη KCl 0,1 M / με προσθήκη KCl 0,1 M.....	71
Πίνακας 4.3: Φόρτιση βιομάζας σε μέταλλο των διαλυμάτων του Zr .....	78
Πίνακας 4.4: Κατανομή διαλυτών ειδών Zr σε διαλύματα $K_2ZrF_6$ και $ZrCl_4$ με συγκεντρώσεις 94 mg/l και 86,7 mg/l και αντίστοιχες τιμές pH 4,185 και 2,536.....	79

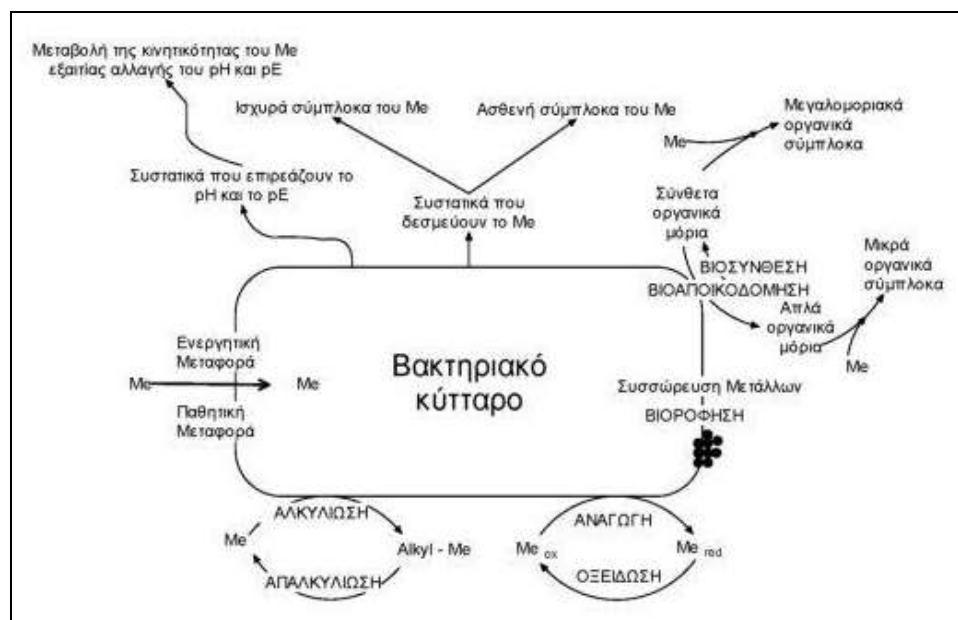


# 1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑ

## 1.1 Είδη αλληλεπιδράσεων και μηχανισμοί

Όλα τα είδη των μικροοργανισμών και ιδιαίτερα τα βακτήρια, έχουν τη δυνατότητα να λειτουργούν ως ιδανικό μέσο σχηματισμού μεταλλικών αποθέσεων στην επιφάνεια τους κι αυτό γιατί παρουσιάζουν ορισμένα χαρακτηριστικά, όπως το πολύ μικρό τους μέγεθος, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα με φτωχά θρεπτικά συστατικά. Έτσι, η αναλογία επιφάνειας προς όγκου η οποία για τα βακτήρια είναι υψηλότερη σε σχέση με τους άλλους οργανισμούς, σε συνδυασμό με την ύπαρξη φορτισμένων χημικών ομάδων στην επιφάνεια τους, τα καθιστά εν δυνάμει πυρήνες σχηματισμού μεταλλικών αποθέσεων (Beveridge *et al.*, 1997). Να σημειωθεί εδώ, ότι ο βιολογικά επαγόμενος σχηματισμός φάσεων που περιέχουν μέταλλα είναι μια συνήθης διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο περιβάλλον και συνδέεται άμεσα με τις εκάστοτε φυσικοχημικές ιδιότητες του περιβάλλοντος στο οποία αναπτύσσονται τα κύτταρα .

Επιπροσθέτως, η πιθανή παρουσία άλλων συστατικών στο περιβάλλον όπως για παράδειγμα αιωρούμενων σωματιδίων, ανόργανων κατιόντων, ανταγωνιστικών κατιόντων κ.λπ. έχουν επίδραση στις διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροοργανισμών και μετάλλων. Έτσι λοιπόν, υπάρχει περίπτωση το μέταλλο να βρίσκεται σε ενυδατωμένη ή συμπλοκοποιημένη μορφή για παράδειγμα, συνθήκη η οποία το καθιστά λιγότερο επιρρεπές σε πιθανές αλληλεπιδράσεις με μικροβιακή βιομάζα. Επίσης, το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί συμμετέχουν σε μεταβολικές διεργασίες σχηματισμού προϊόντων άνθρακα, μπορεί δυνητικά να επηρεάσει την κινητικότητα των μετάλλων καθώς αυτά σχηματίζουν οργανομεταλλικά σύμπλοκα με οργανικές ενώσεις. Τα χαρακτηριστικά των ενώσεων αυτών καθορίζουν το βαθμό βιοχημικής προσβολής του οργανικού τους τμήματος από τη μικροβιακή βιομάζα, το οποίο έμμεσα καθορίζει το βαθμό διαλυτότητας των μεταλλικών ιόντων τα οποία είναι χημικά συνδεδεμένα με αυτές. Διαφορετικοί μηχανισμοί που αναπτύσσονται από τα βακτήρια οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα, όπως για παράδειγμα την ενδοκυτταρική ή εξωκυτταρική δέσμευση των μετάλλων, ή στο χημικό μετασχηματισμό αυτών μέσω αντιδράσεων οξειδωσης ή αναγωγής μεταξύ άλλων (Εικόνα 1.1) (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).



**Εικόνα 1.1: Βασικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μετάλλου-βακτηριακού κυττάρου (Χατζηκιοσεγιάν, 2008)**

Υπάρχουν μηχανισμοί αλληλεπίδρασης οι οποίοι προκαλούν τη μείωση της κινητικότητας και την ακινητοποίηση των μετάλλων, υπάρχουν όμως και βιολογικοί μηχανισμοί οι οποίοι προκαλούν την αύξηση της κινητικότητας των μετάλλων. Η διαλυτοποίηση των μεταλλευμάτων από τους μικροοργανισμούς είναι υψίστης σημασίας για το γεωπεριβάλλον καθώς αποτελεί το μέσο μεταφοράς των στοιχείων στα φυτά, στους ανώτερους οργανισμούς, αλλά και στο υδάτινο περιβάλλον. Η βιολογική εκχύλιση στο περιβάλλον γίνεται από αυτότροφους αλλά και ετερότροφους οργανισμούς οι οποίοι παράγουν μεταβολίτες και συμπλοκοποιητικά μέσα και συμβάλλουν στους χημικούς μετασχηματισμούς των στοιχείων της φύσης. Πιο συγκεκριμένα:

Οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί εκχυλίζουν τα μέταλλα κυρίως μέσω της οξειδωσης θειούχων μεταλλευμάτων υπό αερόβιες συνθήκες. Τον ρόλο του καταλύτη σε αυτή τη διεργασία παίζουν οι θειοβάκιλλοι όπως ο *Thiobacillus ferrooxidans* (Εικόνα 1.2) και η διεργασία αυτή χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανική κλίμακα για την εκχύλιση μετάλλων.

Οι ετερότροφοι οργανισμοί όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, εκχυλίζουν τα μέταλλα μέσω της παραγωγής πρωτονίων, οργανικών οξέων και συμπλοκοποιητικών μέσων. Τα

οργανικά οξέα τα οποία παράγονται από το μικροβιακό μεταβολισμό, όπως το οξαλικό, το γαλακτικό κ.ά. αποτελούν τα εκχυλιστικά και συμπλοκοποιητικά μέσα που αυξάνουν την κινητικότητα του εκάστοτε μετάλλου στο περιβάλλον. Ένα παράδειγμα τέτοιου μύκητα είναι ο *Aspergillus niger*, ο οποίος μπορεί να διαλυτοποιεί τα μέταλλα με την παραγωγή κιτρικού οξέος, ή να τα ακινητοποιεί μέσω του σχηματισμού δυσδιάλυτων ενώσεων του οξαλικού οξέος (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).



**Εικόνα 1.2:** *Thiobacillus ferrooxidans* (Meach *et al.*, 2013)

Πριν αναφερθούμε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στο μηχανισμό της βιοεκχύλισης, αξίζει να αναφέρουμε τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς που διασπούν τα μεταλλεύματα και ιδιαίτερα τα θειούχα. Αυτοί είναι τα χημολιθότροφα βακτήρια που οξειδώνουν το σίδηρο και το θείο και αναπτύσσονται αυτότροφα, δεσμεύοντας διοξείδιο του άνθρακα από την ατμόσφαιρα. Την ενέργεια που χρειάζονται την λαμβάνουν από το δισθενή σίδηρο ή/και ανηγμένες μορφές ανόργανων θειούχων ενώσεων που λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων και το οξυγόνο που δρα ως αποδέκτης. Καθώς παράγεται θειικό οξύ κατά την οξείδωση των ανόργανων θειούχων ενώσεων οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να αναπτύσσονται σε πολύ χαμηλό pH, εξ' ου και οι τιμές του pH στο οποίο λαμβάνουν χώρα οι περισσότερες βιομεταλλουργικές οξειδωτικές δράσεις είναι 1.4-1.6. Ακολουθεί ο πίνακας με τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη διεργασία της βιοξείδωσης, καθώς και τις θερμοκρασίες στις οποίες συμμετέχει ο κάθε μικροοργανισμός (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).

**Πίνακας 1.1: Μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στη διεργασία της βιοεκχύλισης (Χατζηκιοσεγιάν, 2008)**

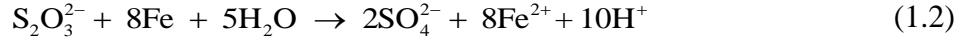
Μικροοργανισμός	Θερμοκρασία (°C)
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> (Gram αρνητικό βακτήριο)	< 40
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> (Gram αρνητικό βακτήριο)	< 40
<i>Leptospirillum</i> (Gram αρνητικό βακτήριο)	< 40
<i>At. Caldus</i>	> 50
<i>Sulfobacillus</i>	> 50
<i>Acidimicrobium</i>	> 50
<i>Sulfolobus</i>	> 70
<i>Metallosphaera</i>	> 70

### 1.1.1 Βιοεκχύλιση (Bioleaching)

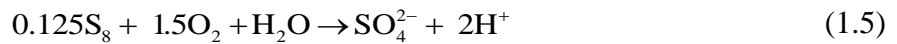
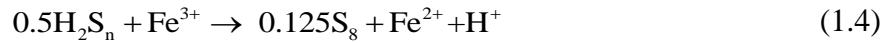
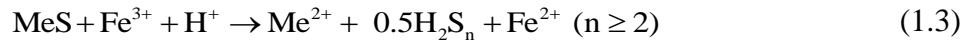
Ο μηχανισμός της βιοεκχύλισης παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σαν βιομηχανική μέθοδος ανάκτησης μετάλλων έναντι των παραδοσιακών φυσικοχημικών μεθόδων όπως οι πυρομεταλλουργικές, καθώς οι βιοχημικές της δράσεις είναι φιλικότερες προς το περιβάλλον αφού δεν χρησιμοποιούν μεγάλες ποσότητες ενέργειας και δεν παράγουν επικίνδυνες εκπομπές αερίων όπως το διοξείδιο του θείου. Επιπλέον, τα υπολείμματα (tailings) και απορρίμματα (wastes) που προκύπτουν από τη βιοεκχύλιση είναι λιγότερο χημικά ενεργά από αυτά των φυσικοχημικών διεργασιών, ενώ οι βιολογικές διεργασίες που θα μπορούσαν να τα επηρεάσουν είναι μειωμένες λόγω της ήδη βιολογικής εκχύλισης που έχουν υποστεί (Rawlings, 2002).

Σε ό,τι αφορά τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στη διαδικασία της βιοεκχύλισης, αυτές εξαρτώνται από τον τύπο του μεταλλεύματος που υφίσταται βιολογική εκχύλιση. Πιο συγκεκριμένα, για μεταλλεύματα όπως ο σιδηροπυρίτης ( $\text{FeS}_2$ ) ή ο μολυβδενίτης ( $\text{MoS}_2$ ) όπου το μέταλλο είναι αδιάλυτο από τα οξέα, ο μηχανισμός λαμβάνει χώρα μέσω ενδιάμεσων θειοθειικών προϊόντων (Χατζηκιοσεγιάν, 2008):

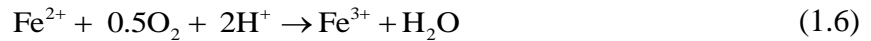




Για μεταλλεύματα όπως ο σφαλερίτης (ZnS) ή ο χαλκοπυρίτης (Cu<sub>2</sub>S) τα οποία είναι διαλυτά σε οξέα, ο μηχανισμός της διαλυτοποίησης γίνεται μέσω προσβολής του τρισθενούς σιδήρου και των πρωτονίων, με το στοιχειακό θείο να δρα ως ενδιάμεσο προϊόν. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Ο δισθενής σίδηρος που παράγεται έχει τη δυνατότητα να οξειδωθεί προς τρισθενή από μικροοργανισμούς που διασπών το σίδηρο:



Από τις παραπάνω αντιδράσεις μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο ρόλος των μικροοργανισμών στη διαλυτοποίηση του είδους αυτού των μεταλλευμάτων, γίνεται με την παραγωγή θεικού οξέος (1.5) και τη διατήρηση του σιδήρου στη μορφή του τρισθενούς ιόντος (1.6).

Να σημειωθεί τέλος, ότι ο παράγοντας της θερμοκρασίας επηρεάζει το μηχανισμό της βιολογικής εκχύλισης με δύο τρόπους (Χατζηκιοσεγιάν, 2008):

1. Η ταχύτητα των χημικών αντιδράσεων διπλασιάζεται με κάθε αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10 °C, κάτι το οποίο είναι θεμιτό για διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε θερμοκρασίες άνω των 70 °C όπως η εκχύλιση του χαλκοπυρίτη. Κι αυτό γιατί με την αύξηση της θερμοκρασίας βελτιώνεται η απόδοση ανάκτησης του χαλκού, λόγω της μείωσης της ποσότητας του θείου και άλλων προϊόντων οξείδωσης τα οποία παθητικοποιούν το μέταλλευμα.
2. Προκαλείται αλλαγή στα είδη μικροοργανισμών που επικρατούν στη διαδικασία της διάσπασης των μεταλλευμάτων.

### 1.1.2 Βιορόφηση (Biosorption) – Βιοσυσσώρευση (Bioaccumulation)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν ορισμένοι βιολογικοί μηχανισμοί οι οποίοι προκαλούν την μείωση της κινητικότητας των μετάλλων με τα οποία αλληλεπιδρούν. Δύο από τους μηχανισμούς που εμπίπτουν στην παραπάνω κατηγορία και αφορούν στην συσσώρευση μετάλλων από μικροβιακή βιομάζα είναι η βιορόφηση και η βιοσυσσώρευση.

Ως βιορόφηση (biosorption) ορίζουμε την παθητική δέσμευση μετάλλων ή ραδιονουκλιδίων από την επιφάνεια της μικροβιακής βιομάζας με φυσικοχημικούς μηχανισμούς όπως για παράδειγμα η προσρόφηση. Οι μηχανισμοί αυτοί ανάλογα με το αν εξαρτώνται από το μεταβολισμό του κυττάρου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτούς που εξαρτώνται και σε αυτούς που δεν εξαρτώνται από το κυτταρικό μεταβολισμό, ενώ ανάλογα με τη θέση του μετάλλου το οποίο θα απομακρυνθεί από το διάλυμα, οι μηχανισμοί χωρίζονται σε εξωκυτταρική συσσώρευση/καταβύθιση, σε κυτταρική ρόφηση/ καταβύθιση και σε ενδοκυτταρική συσσώρευση (Ahalya *et al.*, 2003).

Σε περιβάλλον όπου το pH είναι σχεδόν ουδέτερο, η κυτταρική επιφάνεια είναι αρνητικά φορτισμένη και γι' αυτό το λόγο δεσμεύει κατιόντα μετάλλων από το περιβάλλον. Σε ό,τι αφορά τους μύκητες, τα δομικά συστατικά των κυτταρικών τους τοιχωμάτων χιτίνη (chitin) και χιτοσίνη (chitosan), αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στη βιορόφηση μετάλλων και ραδιονουκλιδίων. Να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι για να λάβει χώρα ο μηχανισμός της βιορόφησης δεν είναι απαραίτητο να είναι τα κύτταρα ζωντανά καθώς έχει αποδειχθεί ότι η κυτταρική αποικοδόμηση που συμβαίνει στα νεκρά κύτταρα, αυξάνει τον αριθμό των δραστικών ομάδων που μπορούν να δεσμεύσουν κατιόντα μετάλλων οπότε βιορόφηση μπορεί να συμβεί ακόμη και με νεκρά κύτταρα (Χατζηκιοσειγιάν, 2008).

Ο μηχανισμός της βιοσυσσώρευσης σχετίζεται με την επιλεκτική ενδοκυτταρική δέσμευση ορισμένων μετάλλων όπως το μαγγάνιο (Mn), το κοβάλτιο (Co) ή ο ψευδάργυρος (Zn) μεταξύ άλλων, μετά από μεταφορά τους στο εσωτερικό προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών κυττάρων με εξειδικευμένους και μη μηχανισμούς. Διαφορές εντοπίζονται στην κινητικότητα των μετάλλων ανάλογα με το μηχανισμό συσσώρευσης τους, καθιστώντας τα ευκίνητα ή ακινητοποιημένα.

Ο μηχανισμός συσσώρευσης των μετάλλων από την κυτταρική μάζα επηρεάζει την κινητικότητα του μετάλλου στο περιβάλλον και συνδέεται άμεσα με τον τρόπο ανάπτυξής τους.



Για παράδειγμα κύτταρα που αναπτύσσονται σε ελεύθερη πλανκτονική μορφή, έστω και αν έχουν ροφηθεί στη μάζα τους μεταλλικά ιόντα παραμένουν ευκίνητα. Αντίθετα κύτταρα που αναπτύσσονται υπό μορφή ακινητοποιημένης βιομάζας και συσσωρεύουν μεταλλικά ιόντα στη μάζα τους, τα καθιστούν ακινητοποιημένα (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).

Σε ό,τι αφορά το μηχανισμό της συσσώρευσης των ιόντων των μετάλλων από βακτήρια τα στάδια είναι τα εξής (Χατζηκιοσεγιάν, 2008):

1. Αντίδραση του μεταλλοκατιόντος με τις χημικά ενεργές θέσεις του κυτταρικού τοιχώματος, όπως για παράδειγμα καρβοξυλικές ομάδες, σε στοιχειομετρική αναλογία λόγω της παρουσίας ηλεκτροστατικής συμπληρωματικότητας μεταξύ των φορτισμένων ομάδων των πολυμερικών κυττάρων και των μεταλλοκατιόντων.
2. Έναρξη της συμπλοκοποίησης και έπειτα περαιτέρω αύξηση της απόθεσης της ποσότητας του μετάλλου, καθώς η παρουσία του δεσμευμένου μετάλλου στην κυτταρική επιφάνεια μειώνει την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος κάνοντας δυνατή την περαιτέρω ρόφηση διαλυτών μεταλλικών ιόντων. Οι μεταλλικές αποθέσεις βέβαια περιορίζονται από άποψη μεγέθους λόγω της ύπαρξης των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.
3. Στο στάδιο αυτό, που αποτελεί και το τελικό στάδιο του μηχανισμού, ο ρυθμός των χημικών αντιδράσεων καθώς και το μέγεθος των αποθέσεων εξαρτώνται από την αφθονία των ανιονικών θέσεων του κυτταρικού τοιχώματος και τη συγκέντρωση του ιόντος του μετάλλου στο περιβάλλον του κυττάρου.

Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η μέθοδος της βιοσυσσώρευσης είναι τα εξής (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004):

- I. Το σύστημα θεωρείται αυτοαναπληρούμενο.
- II. Η χημική μορφή του μετάλλου που αποτίθεται είναι διαφορετική από αυτή με την οποία υπάρχει στο διάλυμα, γεγονός που το καθιστά λιγότερο ευαίσθητο στην αυθόρμητη εκρόφηση.
- III. Η μεταβολική δράση μπορεί να αποτελεί το μόνο τρόπο ώστε να επιτευχθούν επιθυμητές αλλαγές στην κατάσταση σθένους ενός μετάλλου ή να επιτευχθεί αποικοδόμηση οργανομεταλλικών ενώσεων.
- IV. Είναι δυνατή η απομόνωση μεταλλακτικών στοιχείων ή η γενετική τροποποίηση για τη βελτίωση τους.

V. Είναι δυνατή η χρήση δύο ή περισσότερων οργανισμών με συνεργιστικό τρόπο.

Στα μειονεκτήματα του μηχανισμού συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων τα παρακάτω (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004):

- I. Η πιθανή τοξικότητα του προς ρόφηση μετάλλου για τον μικροοργανισμό.
- II. Η απαίτηση σε θρεπτικά ανάπτυξης.
- III. Η πιθανότητα σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ μετάλλου και προϊόντων μεταβολισμού το οποίο δεν είναι επιθυμητό.
- IV. Η δύσκολη μαθηματική προσομοίωση ενός μη ορισμένου συστήματος.
- V. Η περιορισμένη δυνατότητα εκρόφησης για την ανάκτηση του μετάλλου.

### 1.1.3 Βιοκαταβύθιση (Bioprecipitation)

Ο μηχανισμός αυτός αφορά στο σχηματισμό αδιάλυτων μεταλλικών αποθέσεων που προκύπτουν από την αντίδραση των μετάλλων με τα προϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού. Τα σημαντικότερα ανιόντα που παράγονται είναι οι θειούχες ενώσεις, οι οποίες προκύπτουν από τη δράση θειοαναγωγικών βακτηρίων κάτω από ανοξικές συνθήκες και σε περιβάλλον που περιέχει αφθονία σε θειικά ιόντα και σε οργανικά υλικά που αποικοδομούνται εύκολα. Τα θειούχα ανιόντα που παράγονται από τη διεργασία αυτή, καθιστούν αδιάλυτα τα μεταλλικά ιόντα του περιβάλλοντος. Ένα άλλο παράδειγμα αποτελεί η καθίζηση μεταλλικών ιόντων από  $\text{HPO}_4^{2-}$ , ιόντα τα οποία παράγονται μέσω ενζύμων, διαδικασία η οποία έχει γίνει με τη χρήση βακτηρίων τα οποία ανήκουν στο γένος *Citrobacter*.

Διαλυτοποίηση ιόντων μετάλλων προκαλείται επίσης και από παρουσία νιτρικού οξέος αλλά και θειικού, τα οποία παράγονται από νιτροποιητικά και θειοοξειδωτικά βακτήρια αντίστοιχα (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).

Σε ό,τι αφορά τις οργανικές συμπλοκοποιητικές ενώσεις που παράγονται, αυτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

- I. Τα απλά οργανικά μόρια ή μεγαλομόρια, τα οποία αποτελούν παραπροϊόντα του μικροβιακού μεταβολισμού όπως τα φουλβικά οξέα
- II. Τα προϊόντα μικροβιακής προέλευσης, όπως οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν τοξικά μέταλλα ή σίδηρο και που παράγονται από κύτταρα τα οποία έχουν εκτεθεί σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση μετάλλων.

Τα βακτήρια και οι μύκητες έχουν τη δυνατότητα να παράγουν τις λεγόμενες σιδηροφόρες (siderophores) ενώσεις, οι οποίες συσσωρεύουν το σίδηρο στο περιβάλλον του κυττάρου (Völker *et al.*, 1999).

#### **1.1.4 Βιολογική οξειδοαναγωγή – Βιομεθυλίωση – Βιοχημικοί μηχανισμοί μετασχηματισμού μετάλλων από μικροβιακή μάζα**

Το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί πολλές φορές μπορεί να περιέχει συστατικά τα οποία πιθανόν να είναι τοξικά για αυτούς. Για το λόγο αυτό οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει ορισμένους μηχανισμούς «άμυνας» των κυττάρων τους ώστε να προστατευθούν από τα τοξικά αυτά συστατικά και σε ορισμένες περιπτώσεις να τα απομακρύνουν κιόλας από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Τέτοιοι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μικροοργανισμών-μετάλλων είναι βιοχημικοί μηχανισμοί μετασχηματισμού των μετάλλων όπως η μεθυλίωση, η απαλκυλίωση ή οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Ένα παράδειγμα τέτοιου μηχανισμού αποτελεί η απαλκυλίωση του υδραργύρου, ο οποίος είναι τοξικός για τους οργανισμούς, διεργασία η οποία οδηγεί στη δημιουργία πτητικών προϊόντων (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).

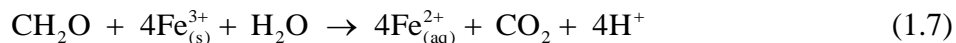
Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ της μη αφομοιωτικής αναγωγής στοιχείων (dissimilatory reduction) και των ενζυμικών αναγωγικών αντιδράσεων των μετάλλων (assimilatory reduction). Η διαφορά των δύο έγκειται στο αν οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας ως δέκτη ηλεκτρονίων την ένωση ή το στοιχείο που ανάγουν ή όχι.

Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένα παραδείγματα αλληλεπίδρασης βακτηρίων και διαφόρων μετάλλων μέσω μηχανισμών μετασχηματισμού.

##### **1.1.4.1 Βακτηριακή αναγωγή τρισθενούς Σιδήρου – Βακτήρια που ανάγουν τον Fe(III)**

Ο τρισθενής σίδηρος αποτελεί την αφθονότερη εναλλακτική πηγή αναερόβιας αναπνοής στο περιβάλλον, ενώ πολλά βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο σε αναερόβιες συνθήκες, συνδέοντας έτσι την αντίδραση της αναγωγής με αντιδράσεις οξείδωσης του οργανικού άνθρακα ή ακόμη και του υδρογόνου στο φυσικό υποεπιφανειακό περιβάλλον.

Ακολουθεί η αντίδραση οξειδοαναγωγής του τρισθενούς σιδήρου:



Ορισμένοι από τους μικροοργανισμούς οι οποίοι ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο και έχουν μελετηθεί περισσότερο είναι γένη όπως *Geobacter*, *Shewanella* καθώς και στελέχη που έχουν ομοιότητες με το *G. Metallireducens*. Επίσης, υπερθερμόφιλοι μικροοργανισμοί όπως το βακτήριο *Thermotoga maritime* χρησιμοποιώντας το  $\text{H}_2$  ως δότη ηλεκτρονίων, έχουν τη δυνατότητα να ανάγουν τον Fe(III). Να σημειωθεί εδώ ότι οι μικροοργανισμοί που ανάγουν τον τρισθενή σίδηρο έχουν πολύ μεγάλη σημασία για την παρουσία των μετάλλων στο περιβάλλον καθώς μπορούν να αντικαταστήσουν το σίδηρο με την αναγωγή άλλου μετάλλου.

Ο μηχανισμός της αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου διαφέρει από άλλες αναγωγικές δράσεις με διαλυτές μορφές αποδεκτών ηλεκτρονίων λόγω της αδιαλυτότητας των οξειδίων του στις τιμές pH των φυσικών νερών. Έτσι, η ποσότητα του βιολογικά διαθέσιμου σιδήρου για βιολογική αναγωγή και χρήση του από τα βακτήρια ως δέκτη ηλεκτρονίων, είναι πολύ μικρή και εξαρτάται από παράγοντες όπως η ειδική επιφάνεια του στερεού, η κρυσταλλική μορφή του σιδήρου, ο χρόνος έκθεσης κ.ά. Υπάρχουν διάφορες θεωρίες για το μηχανισμό της αναγωγής του Fe (III), και μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι πιθανώς για να λάβει χώρα η αναγωγή δεν είναι απαραίτητη η άμεση επαφή μικροοργανισμού-σιδήρου καθώς τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το βακτήριο υπό μελέτη παράγει ένα χαμηλού μοριακού βάρους κυτόχρωμα (cytochrome) το οποίο δρα ως μεταφορέας ηλεκτρονίων μεταξύ βακτηρίου και οξειδίου του τρισθενούς σιδήρου. Παρ' ό,τι καμία από τις προτεινόμενες θεωρίες δεν έχουν επιβεβαιωθεί με σιγουριά, αυτό για το οποίο μπορούν οι επιστήμονες να είναι σίγουροι, είναι ότι τα βακτήρια που ανάγουν τον Fe (III) δεν παράγουν κάποιο συμπλοκοποιητικό μέσο το οποίο να έχει τη δυνατότητα να τον διαλυτοποιεί και να τον φέρνει πιο κοντά στο περιβάλλον του κυττάρου (Lovley, 1997).

Να σημειωθεί ότι η προσθήκη ενός ισχυρού συμπλοκοποιητικού μέσου του τρισθενούς σιδήρου όπως το νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA), το EDTA ή τα πολυφωσφορικά ιόντα μεταξύ άλλων, μπορεί να επιφέρει την αύξηση του ρυθμού αναγωγής του αλλά και την αύξηση του ρυθμού οξειδωσης των οργανικών ενώσεων από τα βακτήρια που τον ανάγουν (Lovley *et al.*, 2000a; Lovley *et al.*, 2000b).

Ένα από τα πλεονεκτήματα της ικανότητας του τρισθενούς σιδήρου να οξειδώνει οργανικές ενώσεις σε υποεπιφανειακά περιβάλλοντα είναι ότι θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος βιοαποκατάστασης ρυπασμένων εδαφών. Βέβαια πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι λόγω

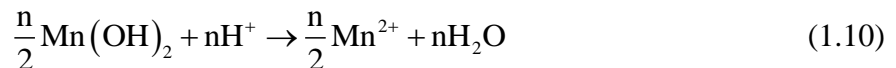
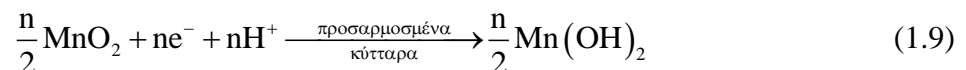
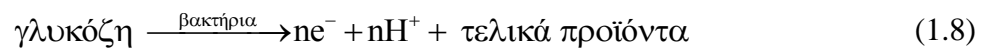
του ότι κατά την αναγωγή του δυσδιάλυτου Fe (III) ο σίδηρος γίνεται πιο διαλυτός και περνάει στον υπόγειο υδροφόρο ορίζοντα όταν μετά αντλείται, επανοξειδώνεται και προκαλεί προβλήματα χρωματισμού του νερού και αποθέσεων (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).

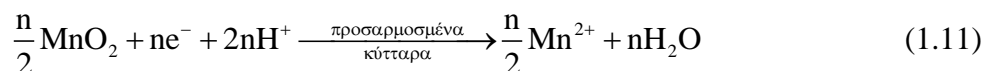
#### 1.1.4.2 Βακτηριακή αναγωγή Μαγγανίου (Mn)

Η αλληλεπίδραση μικροοργανισμών και μαγγανίου αφορά στην οξειδωσή του από  $Mn^{2+}$  σε  $Mn^{4+}$  σθένος το οποίο απαντάται τις περισσότερες φορές ως  $MnO_2$ . Το μαγγάνιο είναι διαλυτό σε περιβάλλοντα με χαμηλό pH και αναγωγικές συνθήκες, ενώ αντίθετα σε οξειδωτικές συνθήκες και παρουσία υψηλού pH καταβυθίζεται γρήγορα. Έκτος από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται, παράγοντες όπως η ρόφησή του από οργανικές ή ανόργανες ενώσεις και ο σχηματισμός συμπλόκων επηρεάζουν την κατανομή του.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται ορισμένοι μικροοργανισμοί που οξειδώνουν το μαγγάνιο, όπως στελέχη από τα *Leptothrix* και *Arthrobacter* μεταξύ άλλων. Σε ό,τι αφορά όμως τους μηχανισμούς αναγωγής του μαγγανίου, αυτοί είναι δύο: Η άμεση ή ενζυμική και η έμμεση ή μη ενζυμική αναγωγή.

Τα βακτήρια που ευθύνονται για την άμεση αναγωγή του μαγγανίου και για τα οποία υπάρχουν αναφορές είναι κάποια θαλάσσια ετερότροφα βακτήρια τα οποία ανήκουν στα γένη *Bacillus*, *Micrococcus* και *Pseudomonas*. Έχει αναφερθεί η απομόνωση ενζύμων τα οποία ανάγουν το μαγγάνιο από εκχυλίσματα τα οποία δεν περιείχαν ζώντα κύτταρα (cell-free extracts) και τα οποία παράγονται από τους μικροοργανισμούς παρουσία  $MnO_2$ . Την ενέργεια που χρειάζονται την αντλούν από την οξειδωση οργανικών υποστρωμάτων όπως η γλυκόζη. Αν και δεν έχει αποκωδικοποιηθεί ακόμη ο μηχανισμός αναγωγής του μαγγανίου ο μηχανισμός που έχει προταθεί είναι ο εξής (Ehrlich, 1971; Ghiorse *et al.*, 1974; Trimble *et al.*, 1970):





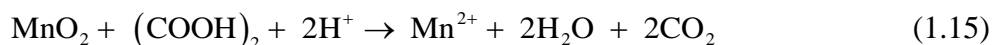
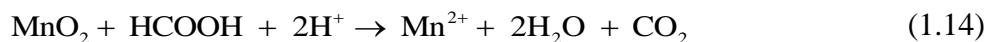
Έχει επίσης διατυπωθεί η υπόθεση ότι ο *Thiobacillus thiooxidans*, μέσω της οξειδωσης του θείου σε αερόβιες συνθήκες και ο *Thiobacillus ferrooxidans*, σε αναερόβιες συνθήκες, έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν το  $\text{MnO}_2$  ως αποδέκτη ηλεκτρονίων (Karavaiko, 1988; Zajic, 1969).

Βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρουν ότι σε ό,τι αφορά την έμμεση αναγωγή του μαγγανίου οι θειοβάκιλλοι μπορούν να ανάγουν το μαγγάνιο έμμεσα, σχηματίζοντας ενδιάμεσα προϊόντα μεταβολισμού και ανάλογα με το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται (στοιχειακό θείο ή/και άλλο θειούχο ορυκτό) παράγονται  $\text{H}_2\text{SO}_3$  και  $\text{H}_2\text{S}$ , αντιστοίχως, ως ενδιάμεσα προϊόντα. Οι αντιδράσεις που ακολουθούν δείχνουν το μηχανισμό της έμμεσης αναγωγής (Imai, 1978):



Ας σημειωθεί επίσης ότι θειοβάκιλλοι, κατά την διεργασία της οξειδωσης του θείου, εισάγουν οργανικές ουσίες στο διάλυμα όπως για παράδειγμα λιπίδια ή οργανικά οξέα, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να ανάγουν το  $\text{Mn}^{4+}$  σχηματίζοντας με αυτό τον τρόπο οργανομεταλλικά σύμπλοκα με το  $\text{Mn}^{2+}$ . Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι και ο παραπάνω μηχανισμός αποτελεί μηχανισμό διαλυτοποίησης του  $\text{MnO}_2$ .

Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο οι μύκητες ανάγουν το μαγγάνιο αποτελεί και η βιολογική αναγωγή μέσω των προϊόντων του μεταβολισμού τους, δηλαδή το μεθαλικό και το οξαλικό οξύ. Ακολουθούν οι αντιδράσεις αναγωγής (Abbruzzese *et al.*, 1990):



#### 1.1.4.3 Βακτηριακή αναγωγή Κοβαλτίου (Co), Χρωμίου (Cr) και Παλλαδίου (Pd)

Υπάρχουν στη φύση ορισμένοι μικροοργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να ανάγουν επικίνδυνα μέταλλα όπως για παράδειγμα το κοβάλτιο ή το ουράνιο σε περιβάλλοντα επιβαρυμένα από τα μέταλλα αυτά και μέσω της διεργασίας αυτής παράγουν την απαιτούμενη ενέργεια για την ανάπτυξή τους. Πιο συγκεκριμένα ο μικροοργανισμός *Shewanella alga* ανάγει το ραδιενεργό Co(III) συμπλοκοποιημένο με EDTA προς Co(II), ο *Shewanella sacharifilia* ανάγει το Cr(VI) σε Cr(III) ενώ ο *Desulfolibrio desulfiricans* ανάγει και καθιζάνει το Pd (II) προς Pd (0) (Χατζηκιοσεγιάν, 2008).

#### 1.1.4.4 Βακτηριακή αναγωγή Υδραργύρου (Hg)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, η αναγωγή του υδραργύρου από Hg(II) σε Hg(0) αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς «άμυνας» των μικροοργανισμών απέναντι σε μέταλλα που θεωρούνται τοξικά για αυτούς. Εδώ η αναγωγή γίνεται για τη μείωση της τοξικότητας του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί και υπεύθυνο για την αντίδραση αυτή είναι το ένζυμο οξειδωαναγωγή του υδραργύρου (mercury oxidoreductase MR), το οποίο είναι συνδεδεμένο με το σύστημα NADPH και κωδικοποιείται από το γονίδιο *merA*. Η αντίσταση που παρουσιάζουν τα κύτταρα στις οργανομεταλλικές ενώσεις του Hg οφείλεται σε ένα άλλο γονίδιο, το *merB*. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί ένα άλλο ένζυμο, το organomercury lyase OL το οποίο καταλύει το δεσμό μεταξύ άνθρακα και Hg και παράγει Hg(0). Η έκφραση των γονιδίων *merA* και *merB* αποτελεί μία νέα και ελπιδοφόρα τεχνική για τη χρήση της στην βιοαποκατάσταση ρυπασμένων αποδεκτών από υδράργυρο (Barkay *et al.*, 2001; Lloyd *et al.*, 2001).

## 1.2 Εφαρμογές στην Υδρομεταλλουργία και την Περιβαλλοντική Τεχνολογία

Τα είδη των αλληλεπιδράσεων και οι μηχανισμοί που περιγράφηκαν παραπάνω έχουν βρει εφαρμογή σε τομείς της βιομηχανίας όπως η υδρομεταλλουργία, κυρίως ως μέθοδοι ανάκτησης μετάλλων, αλλά και στην περιβαλλοντική τεχνολογία ως μηχανισμοί βιοαποκατάστασης εδαφών, επεξεργασίας υγρών αποβλήτων και γενικότερα προστασίας του περιβάλλοντος. Στη συνέχεια ακολουθούν αναφορές σε εφαρμογές των μηχανισμών που ήδη αναλύθηκαν στους δύο προαναφερθέντες τομείς.

### 1.2.1 Εφαρμογές στην Υδρομεταλλουργία

Στη βιομηχανία της υδρομεταλλουργίας τα μεταλλεύματα πολύτιμων λίθων συνήθως ανακτώνται με τη μέθοδο της κυάνωσης, η οποία είναι η πιο αποδοτική μέθοδος και ιδιαίτερα η εκχύλιση σε σωρούς, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία για την ανάκτηση χρυσού και αργύρου.

Όμως κάποια από τα μεταλλεύματα προς ανάκτηση λόγω της ορυκτολογικής τους φύσης (κυρίως λόγω της ύπαρξης ανθρακικών ή θειούχων συστατικών), θεωρούνται δυσκατέργαστα και η μέθοδος της κυάνωσης επιφέρει μικρό ποσοστό ανάκτησης.

Εφαρμόζονται λοιπόν ορισμένες τεχνικές μεταξύ των οποίων και η βιοξείδωση, ως μέθοδος προκατεργασίας του μεταλλεύματος ώστε να επιτευχθεί αύξηση του ποσοστού ανάκτησης του μετάλλου.

Η βιοξείδωση δρα βελτιωτικά στη δυνατότητα του κυανίου να διεισδύει στο μέταλλο του χρυσού παρουσία θειούχων συστατικών σε αυτό, αλλά και παρουσία δυσκατέργαστων ανθρακικών συστατικών. Κατά τη διεργασία της οξειδωτικής βιοεκχύλισης συμβαίνουν αντιδράσεις άμεσης και έμμεσης εκχύλισης οι οποίες μπορούν να επιταχυνθούν όταν παράλληλα λαμβάνουν χώρα ηλεκτροχημικά φαινόμενα (galvanic effect) τα οποία έχουν παρατηρηθεί στην περίπτωση μεταλλευμάτων πυρίτη-αρσενοπυρίτη. Αν και η μέθοδος της βιοεκχύλισης αποτελεί μια καλή θεωρητικά μέθοδο, το γεγονός ότι η παρουσία τοξικών για τα βακτήρια που συμμετέχουν σε αυτή μετάλλων όπως π.χ. αντιμόνιο, κάδμιο κ.ά. δεν την καθιστά εφαρμόσιμη σε μεγάλη κλίμακα παρά μόνο σε τεχνικές εκχύλισης εντός αναδεδυμένων δοχείων, τεχνική η οποία δεν συνίσταται πρακτική για την αξιοποίηση μεγάλων κοιτασμάτων χρυσού με χαμηλή περιεκτικότητα στο μέταλλο (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004).

Αξίζει βέβαια εδώ να σημειωθεί, ότι έχουν γίνει πολλές ερευνητικές προσπάθειες για τη βελτίωση της κινητικής της βιοξείδωσης σε σωρούς με διάφορες μεθόδους, όπως η χρήση καταλυτών, η επιλογή βακτηρίων ανθεκτικών στα τοξικά μέταλλα, καθώς και άλλες τεχνικές οι οποίες έχουν καταφέρει να καταστήσουν τη μέθοδο αποδοτική ως μέθοδο προκατεργασίας δυσκατέργαστων μετάλλων. Έτσι, σε παγκόσμια κλίμακα η βιοξείδωση χρησιμοποιείται στο 20% των εργοστασίων επεξεργασίας δυσκατέργαστων μεταλλευμάτων χρυσού. Επιπλέον στη Β. Αμερική βρίσκονται σε λειτουργία αρκετές εγκαταστάσεις pilot-plant στις οποίες έχει επιτευχθεί ικανοποιητικό ποσοστό ανάκτησης. Στον παρακάτω πίνακα, αναφέρονται ενδεικτικά ορισμένες



από τις νεότερες εγκαταστάσεις επεξεργασίας δυσκατέργαστων μεταλλευμάτων παγκόσμια (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004).

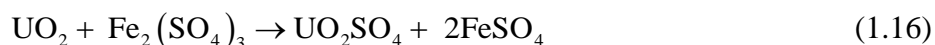
**Πίνακας 1.2: Βιομηχανικές μονάδες βακτηριακής οξείδωσης χρυσοφόρων μεταλλευμάτων (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004)**

Τοποθεσία	Εταιρεία/Μέθοδος	Δυναμ/τα (t/d)	Τροφοδοσία	Οξείδωση S/Ανάκτηση Au (%)
1)Sao Bento (Βραζιλία)	GENCOR Biox	150	Συμπύκνωμα Αρσеноπυρίτη (18-19% S, 25g/t Au)	-/-
2)Carlin Trend (Η.Π.Α.)	NEWMONT MINING Heap Bioleaching	Σωροί 600 t	Ανθρακούχο μετάλλευμα (1% S, 8g/t, Au)	-/74
3)Fairview Mine (Ν.Αφρική)	GENCOR Biox	35	Συμπύκνωμα Αρσеноπυρίτη (29% S, 145g/t Au)	85/92-97
4)Vaal Reefs (Ν.Αφρική)	ANGLOAMERICAN	20	Συμπύκνωμα Πυρίτη	-/-
5)Wiluna (Αυστραλία)	ASARCO Biox	115 (συμπ/μα) 2500 (μετ/μα)	Μετάλλευμα οξειδίων(60%/πυριτών(40%)	-/90-95

Η διεργασία της βιοεκχύλισης στην υδρομεταλλουργία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ανάκτηση του χαλκού (Cu) από θειούχα και οξειδωμένα ορυκτά και οι περισσότερες βιομηχανικές εγκαταστάσεις ανάκτησης χαλκού διαθέτουν σωρούς θειούχων μεταλλευμάτων όπου εφαρμόζεται βιολογική εκχύλιση σε σωρούς. Στη Β. Αμερική για παράδειγμα πάνω από το 10 % της παραγωγής χαλκού προέρχεται από τη διεργασία της εκχύλισης σε σωρούς δηλαδή το 12.8 % της παγκόσμιας παραγωγής στο Δυτικό Κόσμο το οποίο αντιστοιχεί σε 1.000.000 t/d (1994). Ενδεικτικά, αναφέρονται περιπτώσεις εργοστασίων στη Χιλή όπου εφαρμόζεται μια παραλλαγή της κλασικής μεθόδου εκχύλισης σε σωρούς, η «Βακτηριακή Εκχύλιση σε Λεπτό

Στρώμα» (Thin Layer Bacterial Leaching), όπου το ύψος των σωρών είναι χαμηλότερο (2-8 m) και το μέταλλευμα είναι λεπτομερέστερο και πλουσιότερο απ' αυτό της κλασικής τεχνικής. Οι εγκαταστάσεις που χρησιμοποιούν τη μέθοδο αυτή είναι το μεταλλείο Lo Aguirre με ετήσια παραγωγή 14.000 t καθοδικού χαλκού, η Quebrada Blanca με επεξεργασία 15.000 t/d για την παραγωγή 75.000 t/y και το Cerro Colorado με δυναμικότητα 10.000 t/d, με 1.4 % περιεκτικότητα σε χαλκό και ετήσια παραγωγή 40.000 t. Η ανάκτηση στα εργοστάσια αυτά κυμαίνεται μεταξύ 80-90 % του περιεχόμενου στο θειούχο διάλυμα σε μικρό χρόνο εκχύλισης (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004).

Ο μηχανισμός της βιοεκχύλισης χρησιμοποιείται επίσης και στην αξιοποίηση μεταλλευμάτων του ουρανίου. Πιο συγκεκριμένα το τετρασθενές ουράνιο μπορεί να οξειδωθεί στη διαλυτή μορφή του από το σιδηροοξειδωτικό βακτήριο *T. Ferrooxidans* μέσω της ακόλουθης αντίδρασης (Lundgren *et al.*, 1980):



Παρατηρεί λοιπόν κανείς, ότι η οξείδωση του ουρανίου γίνεται μέσω του έμμεσου μηχανισμού, όπου ο πυρίτης που βρίσκεται στο μέταλλευμα υπόκειται οξείδωση από τα βακτήρια και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή όξινου διαλύματος τρισθενούς θειικού σιδήρου. Ο θειικός σίδηρος στη συνέχεια οξειδώνει το  $\text{U}^{4+}$  σε  $\text{U}^{6+}$ . Το βακτήριο μπορεί να οξειδώσει και άμεσα τις ενώσεις του ουρανίου  $\text{U}(\text{SO}_4)_2$  και  $\text{UO}_2$  χωρίς τη χρήση του ζεύγους του τρισθενούς και του δισθενούς σιδήρου σαν φορείς ηλεκτρονίων, παρ' όλα αυτά η άμεση οξείδωση δεν παίζει τόσο σημαντικό ρόλο κατά την εκχύλιση (Tuoninen *et al.*, 1974; Tuoninen, 1986).

Έτσι λοιπόν, στα μεταλλεία της περιοχής Elliot Lake υπάρχουν αναφορές προσπάθειας βελτιστοποίησης της βακτηριακής εκχύλισης μεταλλευμάτων ουρανίου. Έχει παρατηρηθεί ότι η προσθήκη αμμωνιακού άλατος ή δισθενούς σιδήρου στο νερό πλύσης του μετώπου είχε θετική επίδραση στη διεργασία, ενώ η ανάπτυξη της τεχνικής της επί τόπου βακτηριακής εκχύλισης θραυσμένου μεταλλεύματος η οποία γίνεται υπογείως (in situ leaching) και αναπτύχθηκε στα μεταλλεία Agnew Lake και Denison Mines στο Ontario του Καναδά, έχει επίσης επιφέρει βελτίωση στην απόδοση της ανάκτησης (Duncan *et al.*, 1971; Marchbank, 1987; McCready *et al.*, 1986; Wadden *et al.*, 1985).

### 1.2.2 Εφαρμογές στην Περιβαλλοντική Τεχνολογία

Ο δευτερογενής τομέας της παραγωγής και ιδιαίτερα η μεταλλευτική και μεταλλουργική βιομηχανία, παράγει απόβλητα σε μεγάλες ποσότητες τα περισσότερα από τα οποία μπορούν να αποβούν δυνητικά επικίνδυνα για το περιβάλλον αν δεν ακολουθηθούν οι σωστές μέθοδοι επεξεργασίας τους. Τα απόβλητα αυτά μπορούν να ρυπάνουν τον αέρα, το νερό, αλλά και το έδαφος με πολύ επιβαρυντικά για το περιβάλλον στοιχεία, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα όπως η ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα, η καταστροφή της χλωρίδας και της πανίδας μιας περιοχής (που προκαλείται από την ανεξέλεγκτη απόθεση των αποβλήτων), την όξινη απορροή των μεταλλείων ή και την επιβάρυνση του αέρα από την εκπομπή επικίνδυνων αερίων. Και δυστυχώς πολλές φορές η λάθος επεξεργασία ή και η παντελής έλλειψη επεξεργασία τους έχει προκαλέσει πολύ σοβαρά προβλήματα στο περιβάλλον.

Η ρύπανση από βαρέα μέταλλα για παράδειγμα, που προκαλείται από τη βιομηχανία, απειλεί τόσο το περιβάλλον όσο και στη δημόσια υγεία λόγω της τοξικότητας, της βιοσυσσωρευσης και της μη βιοαποικοδομησιμότητάς που παρουσιάζει η συγκεκριμένη ομάδα μετάλλων. Ίχνη βαρέων μετάλλων όπως το κάδμιο, ο μόλυβδος ή το εξασθενές χρώμιο ( $\text{Cr}^{6+}$ ), τα οποία συχνά παρατηρούνται σε ρυπασμένα εδάφη, μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη μικροβίων και φυτών, καθώς και να περιορίσουν την δράση ενζύμων. Επιπλέον, η μόνιμη παρουσία καδμίου (Cd) ή εξασθενούς χρωμίου σε μια ρυπασμένη περιοχή μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την υγεία των κατοίκων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα σε ότι αφορά το  $\text{Cr}^{6+}$ , είναι η ρύπανση του ποταμού Ασωπού από την ύπαρξη τοξικής ποσότητας (δηλαδή πολύ παραπάνω της φυσιολογικής) εξασθενούς χρωμίου λόγω της ανεξέλεγκτης και χωρίς επεξεργασία απόθεσης των αποβλήτων βιομηχανιών της περιοχής στον υδροφόρο ορίζοντα.

Ένα άλλο μεγάλο περιβαλλοντικό πρόβλημα που μπορεί να προκύψει από την ύπαρξη μεταλλευτικής μονάδας σε μια περιοχή είναι η όξινη απορροή μεταλλείων (OAM), η οποία προκαλείται από την οξείδωση των θειούχων μεταλλευμάτων και αποβλήτων, όταν αυτά εκτεθούν στη δράση νερού και οξυγόνου. Το πρόβλημα αυτό παρατηρείται στις μεταλλευτικές δραστηριότητες σε κοιτάσματα άνθρακα, λιγνίτη και πολυμεταλλικών θειούχων μεταλλευμάτων όπως ο γαληνίτης ( $\text{PbS}$ ), ο σφαλερίτης ( $\text{ZnS}$ ), ο αρσеноπυρίτης ( $\text{FeAsS}$ ), ο σιδηροπυρίτης ( $\text{FeS}_2$ ) και ο χαλκοπυρίτης ( $\text{CuFeS}$ ) μεταξύ άλλων.

Οι κύριες πηγές της όξινης απορροής, είναι οι επιφανειακές και υπόγειες μεταλλευτικές δραστηριότητες, οι σωροί των υπερκειμένων και των στείρων, αλλά και τα τέλματα εμπλουτισμού. Οι τιμές του pH που επικρατούν στην όξινη απορροή είναι πολύ χαμηλές και κυμαίνονται από 1,5 έως 3,5 ενώ υπάρχει και υψηλή συγκέντρωση τοξικών ιόντων. Τα δύο παραπάνω στοιχεία προκαλούν σημαντική περιβαλλοντική επιβάρυνση σε περίπτωση που η όξινη απορροή έρθει σε επαφή με τον υδροφόρο ορίζοντα αλλά και τα εδάφη (Εικόνα 1.3,Εικόνα 1.4). Συν τοις άλλοις, οι αντιδράσεις δημιουργίας της ΟΑΜ είναι αυτοκαταλυόμενες, το οποίο σημαίνει όταν αρχίσουν είναι πολύ δύσκολο να αντιστραφούν. Η όξινη απορροή μπορεί τέλος να επιβαρύνει σημαντικά και την υγεία ανθρώπων και ζώων σε περιπτώσεις έκθεσής τους σε τοξικά συστατικά μέσω της τροφής, της αναπνοής, της κατανάλωσης νερού ή αγροτικών προϊόντων και κρέατος ακόμη και από τη δερματική επαφή (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004).



**Εικόνα 1.3: Περιοχή που έχει πληγεί από την όξινη απορροή μεταλλείων (Ρεμουντάκη, 2012)**



**Εικόνα 1.4: Ο υδροφόρος ορίζοντας συχνά πλήττεται πολύ σοβαρά από το φαινόμενο της ΟΑΜ (Ρεμουντάκη, 2012)**

Η ανάγκη για την προστασία των υδάτινων πόρων έχει οδηγήσει την Ευρωπαϊκή Ένωση να εκδώσει αρκετές οδηγίες για την αποτελεσματική προστασία τους, όπως για παράδειγμα την New Water Framework Directive η οποία θέτει πολύ αυστηρά όρια στη συγκέντρωση βαρέων και τοξικών μετάλλων στα νερά (υπό-ppm) (Remoudaki *et al.*, 2003). Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων αλλά και τη συμμόρφωση με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές φυσικοχημικές μέθοδοι που στοχεύουν στην απομάκρυνση των βαρέων αυτών μετάλλων από ρυπασμένα νερά ή εδάφη (χημική κατακρήμνιση, αντίστροφη ώσμωση και ιοντική εναλλαγή μεταξύ άλλων), οι περισσότερες όμως από αυτές, έχουν αποδειχθεί αρκετά ακριβές, με χαμηλή απόδοση και μη επιλεκτικές κατά τη διάρκεια της εφαρμογής τους (Guo *et al.*, 2010).

Έτσι λοιπόν, η επιστήμη της περιβαλλοντικής τεχνολογίας έχει στραφεί στη χρήση μικροοργανισμών αξιοποιώντας τις διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μυκήτων, βακτηρίων και άλλων βιολογικών παραγόντων και μετάλλων και οι οποίες έχουν ήδη αναφερθεί παραπάνω. Στόχος της χρήσης των διαφόρων μικροοργανισμών είναι η ακινητοποίηση των εκάστοτε μετάλλων που βρίσκονται σε διαλυτή μορφή σε υγρά απόβλητα καθώς και η μετέπειτα απομάκρυνση τους. Η ακινητοποίηση αυτή που επιτυγχάνεται κάνει πιο εύκολη και πιο

αποτελεσματική την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών προβλημάτων για τα οποία ευθύνονται τα βαρέα και τοξικά μέταλλα καθώς όχι μόνο η επεξεργασία τους σε στερεή μορφή είναι πιο εύκολη απ' ό,τι σε διαλυτή μορφή αλλά επιτυγχάνονται και μικρότερες συγκεντρώσεις στα τελικά υγρά απ' ό,τι με τη χρήση φυσικοχημικών μεθόδων.

Η απομόνωση των μετάλλων μπορεί να γίνει με ζωντανή αλλά και με νεκρή βιομάζα και οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ βιομάζας και μετάλλου αφορούν στη βιοσυσώρευση (με ζωντανή βιομάζα), τη βιορόφηση (με νεκρή βιομάζα ή μεταβολικά ενεργή βιομάζα) καθώς και τη βιοκαταβύθιση. Να σημειωθεί εδώ, ότι ένα από τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η χρήση νεκρής βιομάζας είναι το γεγονός ότι δεν επηρεάζεται η βιοροφητική της ικανότητα από την τοξικότητα του μετάλλου με το οποίο αλληλεπιδρά. Η βιοροφητική ικανότητα της βιομάζας εξαρτάται από τον ίδιο τον τύπο της, δηλαδή τα γενετικά, βιοχημικά και κυτταρικά χαρακτηριστικά της, αλλά και από τη σύνθεση και το pH του διαλύματος το οποίο περιέχει το μέταλλο με το οποίο θα αλληλεπιδράσει καθώς τα δύο αυτά χαρακτηριστικά επηρεάζουν την υδρολυσιμότητα των εκάστοτε μετάλλων. Ένα άλλο πλεονέκτημα που παρουσιάζει η χρήση ενεργών βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης απομάκρυνσης του οργανικού φορτίου των αποβλήτων σε περίπτωση που οι συγκεντρώσεις των μετάλλων σε αυτά βρίσκονται στην περιοχή των 10 ppm (Remoudaki *et al.*, 2003; Tsezos *et al.*, 1997).

Πιο συγκεκριμένα, σε ό,τι αφορά την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων της μεταλλευτικής και μεταλλουργικής βιομηχανίας, τα οποία όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω περιέχουν θειούχες ενώσεις και διαλυτά μέταλλα όπως ο ψευδάργυρος (Zn), ο σίδηρος (Fe), χαλκός (Cu) ή το κάδμιο (Cd) μεταξύ άλλων, αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση θειοαναγωγικών αντιδραστήρων. Τα θειοαναγωγικά βακτήρια (Sulphate Reducing Bacteria, SRB) τα οποία χρησιμοποιούνται στους αντιδραστήρες αυτούς (π.χ. *Desulfobacter*, *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*), είναι αυστηρά αναερόβια βακτήρια τα οποία οξειδώνουν απλά οργανικά μόρια (όπως το γαλακτικό οξύ) υπό αναερόβιες συνθήκες, μετατρέποντας τα θειικά ιόντα σε υδρόθειο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Έπειτα το υδρόθειο αντιδρά με τα δισθενή ιόντα των μετάλλων που υπάρχουν στο υγρό απόβλητο, τα οποία καταβυθίζονται στη συνέχεια σαν αδιάλυτες θειούχες ενώσεις μετάλλων (Remoudaki *et al.*, 2008; Ρεμουντάκη, 2012):



όπου Me είναι μέταλλα όπως αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Τα διττανθρακικά ιόντα αντιδρούν με τα πρωτόνια σχηματίζοντας  $\text{CO}_2$  και νερό, απαλλάσσοντας με τον τρόπο αυτό το προς επεξεργασία υγρό ρεύμα από την οξύτητα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση :



Τα σχηματιζόμενα  $\text{H}_2\text{S}$  και  $\text{HCO}_3^-$ , κατά τη διάρκεια της θειοαναγωγής, ισορροπούν σε ένα μείγμα από  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  και  $\text{CO}_3^{2-}$ . Αυτό το μείγμα ρυθμίζει το pH του διαλύματος σε ουδέτερες προς ελαφρά αλκαλικές τιμές. Η μεταβολή αυτή του pH, προκαλεί επίσης την υδρόλυση και την καταβύθιση τρισθενών μετάλλων όπως Al, Fe και Cr σαν αδιάλυτα υδροξείδια ή οξειδία.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι αντιδραστήρων οι οποίοι λειτουργούν συντηρώντας μεικτούς πληθυσμούς θειοαναγωγικών βακτηρίων όπως αυτοί που έχουν ήδη αναφερθεί. Ένας απλός τύπος τέτοιων αντιδραστήρων είναι οι αντιδραστήρες με στήλες σταθερής κλίνης. Οι στήλες αυτές γεμίζονται με αδρανές υλικό (σταθερή κλίνη) το οποίο μπορεί να είναι σχετικά φτηνό όπως για παράδειγμα η άμμος. Οι προϋποθέσεις για να λειτουργήσει η στήλη ως αντιδραστήρας θειοαναγωγικών βακτηρίων είναι οι εξής (Remoudaki *et al.*, 2008; Ρεμουντάκη, 2012):

1. Ο αποκλεισμός πηγής οξυγόνου ο οποίος επιτυγχάνεται συνήθως με διοχέτευση ρεύματος αζώτου.
2. Η εγκατάσταση πληθυσμού θειοαναγωγικών βακτηρίων στην κλίνη το οποίο αναπτύσσεται στις περισσότερες περιπτώσεις υπό μορφή βιολογικού φιλμ.
3. Η ύπαρξη πηγής απλού οργανικού υποστρώματος (π.χ. γαλακτικό).
4. Η ύπαρξη τρόπου συγκράτησης των στερεών καθιζήσεων των θειούχων ενώσεων των μετάλλων τα οποία συνήθως συγκρατούνται από τη σταθερή κλίνη.

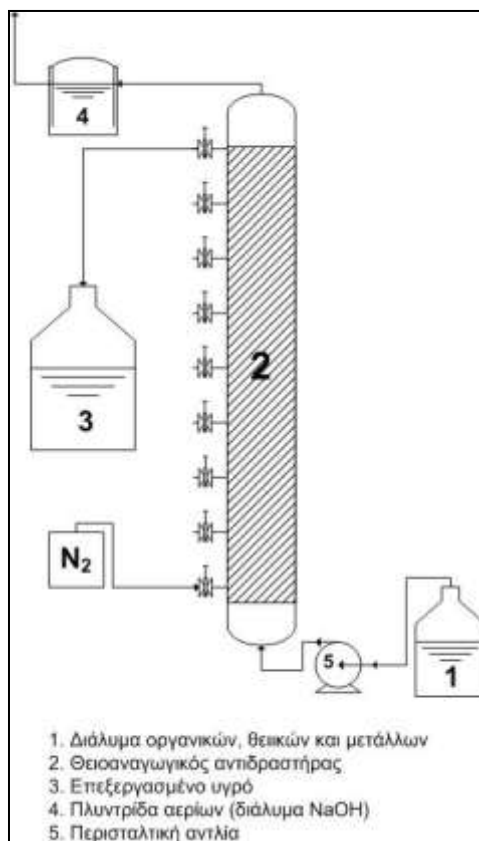
Να σημειωθεί εδώ ότι η αποδοτικότητα του αντιδραστήρα εξαρτάται από την ικανότητα του να απομακρύνει από το υγρό απόβλητο που επεξεργάζεται τα διαλυτά μέταλλα, καθώς και την ικανότητα του να απομακρύνει τα θειικά ιόντα από το υγρό ρεύμα που επεξεργάζεται.

Η σωστή λειτουργία του αντιδραστήρα (η ύπαρξη δηλαδή ικανού βακτηριακού πληθυσμού) μπορεί να ελεγχθεί με τον προσδιορισμό δύο παραμέτρων (Ρεμουντάκη, 2012):

1. Το pH, του οποίου η συνήθης τιμή στο υγρό απόβλητο είναι όξινη (περίπου 3) ενώ στην έξοδο από τον αντιδραστήρα πρέπει να είναι ουδέτερη-ελεφρά αλκαλική.
2. Το συνολικό οργανικό άνθρακα (Total Organic Carbon, TOC), ποσότητα η οποία αντιπροσωπεύει το θρεπτικό οργανικό υπόστρωμα που παρέχεται για την ανάπτυξη και συντήρηση του βακτηριακού πληθυσμού στον αντιδραστήρα.

Η αρχική τιμή του TOC στην είσοδο του αντιδραστήρα είναι γνωστή και είναι τόση, όση να επαρκεί για να τροφοδοτείται ο πληθυσμός των βακτηρίων με την κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού. Αντίθετα, η τελική τιμή πρέπει να είναι αρκετά μειωμένη έτσι ώστε να είμαστε σίγουροι ότι λαμβάνει χώρα η εξίσωση μετατροπής των θεικών ιόντων σε υδρόθειο (1.17). Αν οι τιμές pH που λαμβάνουμε δεν είναι ικανοποιητικές, αυτό σημαίνει ότι κάτι δεν λειτουργεί καλά στον πληθυσμό των βακτηρίων. Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνεται η διάταξη ενός αντιδραστήρα σταθερής κλίνης και η εικόνα ενός αδρανούς υλικού το οποίο χρησιμοποιείται ως στερεό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροβιακής βιοστοιβάδας (Εικόνα 1.5, Εικόνα 1.6). Το μαύρο χρώμα των σφαιριδίων που υλικού, οφείλεται στην καταβύθιση των σουλφιδίων των μετάλλων που βρίσκονται στα υγρά απόβλητα τα οποία υφίστανται επεξεργασία στους αντιδραστήρες. Επάνω στα σφαιρίδια του υλικού μαζί με τις στερεές φάσεις των σουλφιδίων των μετάλλων βρίσκονται και οι βιοστοιβάδες των θειοαναγωγικών βακτηρίων. Αυτές έχουν αναπτυχθεί και ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια και στους πόρους του αδρανούς υλικού (Ρεμουντάκη, 2012).





Εικόνα 1.5: Διάταξη θειοαναγωγικού αντιδραστήρα σταθερής κλίνης (Ρεμουντάκη, 2012)



**Εικόνα 1.6: Πληρωτικό υλικό της σταθερής κλίνης του θειοαναγωγικού αντιδραστήρα, πριν και μετά την ανάπτυξη της μικροβιακής βιοστοιβάδας. Το μαύρο χρώμα οφείλεται στα ιζήματα των θειούχων ενώσεων των μετάλλων (Ρεμουντάκη, 2012)**

Επιπροσθέτως, οξυανιόντα με υψηλή διαλυτότητα όπως σύμπλοκα χρωμίου (chromate), μολύβδου (molybdate), ή ουρανίου και άνθρακα (uranyl-carbonate) μπορούν επίσης να απομακρυνθούν από τα υγρά απόβλητα όταν υποστούν επεξεργασία από θειοαναγωγικούς αντιδραστήρες (Remoudaki *et al.*, 2008)

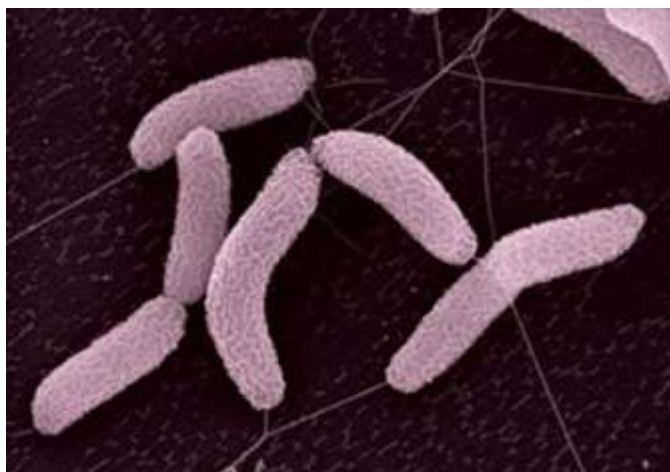
Μια άλλη τεχνολογία, η οποία χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση του προβλήματος της όξινης απορροής μεταλλείων είναι αυτή των τεχνητών υγροτόπων. Ως τεχνητοί υγρότοποι, ορίζονται οι κατάλληλα διαμορφωμένες περιοχές, οι οποίες είναι είτε πλημμυρισμένες είτε κορεσμένες σε νερό (το οποίο μπορεί να είναι επιφανειακό ή και υπόγειο) και οι οποίες αποτελούνται από ένα κατάλληλο υπόστρωμα αλλά και φυτά, στόχος των οποίων είναι η απομάκρυνση των ρυπαντικών συστατικών που περιέχονται στα υγρά απόβλητα. Τα στάδια τα οποία ακολουθούνται για την κατασκευή των τεχνητών υγροτόπων είναι τα παρακάτω (Κόμνιτσας *et al.*, 2001):

- I. Δημιουργείται ένας αδιαπέραστος πυθμένα (εάν απαιτείται).
- II. Κατασκευάζονται υποστρώματα με διαφορετική υδραυλική αγωγιμότητα (π.χ. άμμος, χαλίκια, τύρφη, οργανικό υλικό).

- III. Φυτεύονται κατάλληλα είδη φυτών, που μπορούν να αναπτυχθούν σε υποστρώματα, τα οποία βρίσκονται σε αναερόβιες συνθήκες κορεσμού.
- IV. Εξασφαλίζεται η ροή των υγρών αποβλήτων η οποία μπορεί να είναι είτε επιφανειακή είτε να γίνεται μέσω του υποστρώματος.
- V. Προστίθενται κατάλληλοι σπονδυλωτοί ή ασπόνδυλοι οργανισμοί.
- VI. Προστίθενται μικροοργανισμοί οι οποίοι αναπτύσσονται σε αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες.

Η αντιμετώπιση της όξινης απορροής στους τεχνητούς υγροτόπους γίνεται με την απομάκρυνση των ιόντων των βαρέων μετάλλων και επιτυγχάνεται μέσω των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα με το περιεχόμενο οργανικό υλικό. Το οργανικό αυτό υλικό ή προστίθεται από την αρχή ή μπορεί να προέρχεται από την αποσύνθεση των φυτών που έχουν φυτευτεί. Οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση των μετάλλων από τα διαλύματα είναι μεταξύ άλλων η οξειδωση-υδρόλυση, η βακτηριακή αναγωγή των θειικών ιόντων, η προσρόφηση, η συμπλοκοποίηση με οργανικό υλικό, η βιοσυσσώρευση στον ιστό φυτών και φυκιών κ.λπ.

Σε ό,τι αφορά τον ρόλο των μικροοργανισμών στους τεχνητούς υγροτόπους, αυτοί και συγκεκριμένα τα βακτήρια, είναι υπεύθυνα για την αναγωγή των θειικών ιόντων και την καταβύθιση των θειούχων-ανθρακικών ενώσεων. Έτσι λοιπόν, όταν τα όξινα νερά των μεταλλείων διέλθουν μέσω κάποιου στρώματος που περιέχει οργανικό υλικό και βρίσκεται κάτω υπό αναερόβιες συνθήκες, «αναλαμβάνουν δράση» τα θειοαναγωγικά βακτήρια όπως ο *Desulfovibrio vulgaris* (Εικόνα 1.7), ο *Desulfomonas pigra* και ο *Desulfobacter postgatei* και ανάγουν τα θειικά ιόντα. Ως θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν οργανικά υλικά όπως η ιλύς βιολογικού καθαρισμού, η μεθανόλη, η αιθανόλη, αλλά και ανόργανα αέρια, όπως διοξείδιο του άνθρακα, μονοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο. Οι συνθήκες που πρέπει να επικρατούν για να επιτευχθεί η ανάπτυξη των βακτηρίων αυτών, είναι η ύπαρξη χαμηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής και η ουδέτερη περιοχή pH. Να σημειωθεί ότι για να επιταχυνθεί η αναγωγή αυτή πρέπει το pH να βρίσκεται σε τιμές άνω του 4 και να απουσιάζουν οξειδωτικά μέσα, όπως ιόντα  $O_2$ ,  $Fe^{3+}$  και  $Mn^{4+}$  (Gusek *et al.*, 1995; Hedin *et al.*, 1994).



Εικόνα 1.7: Το βακτήριο *Desulfubrio vulgaris* (Yarris, 2011)

Όπως αναφέρθηκε λοιπόν παραπάνω, η βακτηριακή αναγωγή είναι μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση της όξινης απορροής των μεταλλείων. Ένας άλλος μηχανισμός αλληλεπίδρασης μικροοργανισμού-μετάλλου που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση του παραπάνω φαινομένου είναι αυτός της βιορόφησης. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η διεργασία της βιορόφησης από φύκη και κυανοβακτήρια, λαμβάνει χώρα σε φυσικούς ή τεχνητούς υδροβιότοπους/έλη και σε συνδυασμό με την καταβύθιση από αερόβια και αναερόβια βακτήρια, επιτυγχάνεται απομάκρυνση του μαγγανίου με απόδοση 69-90%, και απομάκρυνση του σιδήρου με απόδοση 60% σε χρόνο 4 μηνών (Αγατζίνη-Λεονάρδου, 2004).

Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί και ορισμένα βιοροφητικά υλικά τα οποία έχουν στόχο την απομάκρυνση διαφόρων βαρέων μετάλλων. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται η εφαρμογή του βιοροφητικού από κοκκοποιημένα κύτταρα του γένους *Bacillus*, το οποίο αναπτύχθηκε από την Advanced Mineral Technologies (Η.Π.Α.), με το όνομα **BIOCLAIM™**. Το συγκεκριμένο υλικό έχει τη δυνατότητα να απομακρύνει πολλά διαφορετικά βαρέα μέταλλα, όπως το ουράνιο, ο μόλυβδος και το κάδμιο μεταξύ άλλων. Δίνει πολύ χαμηλές τελικές συγκεντρώσεις μετάλλων στην εκροή (10-50 ppb) και ένα μεγάλο πλεονέκτημα που παρουσιάζει είναι ότι δεν επηρεάζεται από τη σκληρότητα του νερού.

Τέλος, βιοροφητικό υλικό παράγεται με την ίδια μέθοδο της ακινητοποίησης από βιομάζα φυκών ακινητοποιημένα σε ζελατινώδες υπόστρωμα SiO<sub>2</sub> (AlgaSORB), το οποίο απομακρύνει αποδοτικά από υδατικό τους διάλυμα πολλά μεταλλοκατιόντα, όπως αυτά του

χρυσού ( $\text{Au}^+$ ), του αργύρου ( $\text{Ag}^+$ ), της πλατίνας ( $\text{Pt}^+$ ), του κοβαλτίου ( $\text{Co}^{2+}$ ) κ.ά. (Brierley, 1990; Brierley *et al.*, 1986).

Με δεδομένες τις γνώσεις περί των αλληλεπιδράσεων μικροβιακής βιομάζας και μετάλλων αλλά και τα πλεονεκτήματα που αυτές μπορούν να έχουν στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων, στο εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας του Περιβάλλοντος της Σχολής των Μεταλλειολόγων έχει διεξαχθεί συστηματική έρευνα μέσω της πειραματικής μελέτης μικροβιακών μαζών μετά από επαφή με διαλύματα μετάλλων με τη χρήση διαφόρων οργάνων όπως το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM), το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (TEM) αλλά και η Energy Dispersive X-Ray Microanalysis (EDAX) (Remoudaki *et al.*, 2003; Remoudaki *et al.*, 2008; Tsezos *et al.*, 1997). Για παράδειγμα, μελετήθηκαν στελέχη των βακτηρίων *Arthrobacter*, *Alkaligenes eutrophus* καθώς και *Pseudomonas mendocina* για την ικανότητα βιορόφησης από διαλύματα που περιείχαν παλλάδιο, άργυρο, ύτριο και νικέλιο και ακολούθησαν αναλύσεις των δειγμάτων των βιομαζών με τη χρήση του TEM και της EDAX. Οι αναλύσεις αυτές, έδειξαν ότι όντως υπάρχει παρουσία των παραπάνω μετάλλων με τη μορφή στερεών αποθέσεων στη βιομάζα σε διάφορα σημεία, δηλαδή άλλα βρίσκονται στην επιφάνεια και άλλα εσωτερικά. Επιπλέον ήταν φανερό ότι τα μεγέθη των σωματιδίων αυτών είναι της τάξης του μικρομέτρου ή και μικρότερα (Remoudaki *et al.*, 2003).

Επιπλέον, έχει μελετηθεί η χρήση στελεχών διαφόρων βακτηρίων που έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε υγρά απόβλητα παρουσία βαρέων μετάλλων, αλλά και να απομονώνουν τα μέταλλα αυτά μέσω των διεργασιών της βιοσυσσώρευσης και της βιορόφησης. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε πειραματικά η ικανότητά στελεχών συγκεκριμένων βακτηρίων (*Alcaligenes eutrophus* CH34, *A. eutrophus* ER121, *Pseudomonas mendocina* AS302 και *P. stutzeri* EM77) να αναπτύσσονται σε υγρά απόβλητα παρουσία οξικού ιόντος ως οργανικού υποβάθρου, καθώς και η αλληλεπίδρασή τους με διαλυτά είδη βαρέων μετάλλων με στόχο τον σχηματισμό στερεών φάσεων και την επακόλουθη απαλλαγή του υγρού ρεύματος από τα διαλυτά είδη των μετάλλων. Να σημειωθεί εδώ, ότι το οργανικό υπόβαθρο που χρησιμοποιείται στην εκάστοτε επεξεργασία υγρών αποβλήτων με μικροοργανισμούς είναι σημαντικό όχι μόνο να είναι φθινό και εύκολα διαθέσιμο, αλλά και να έχει καλή απόδοση στην ανάπτυξη της μικροβιακής βιομάζας, συνδυασμός ο οποίος δεν είναι πάντα εφικτός εξ' ου και γίνονται συνεχώς προσπάθειες ώστε η βιολογική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων να είναι μεν

αποδοτική αλλά όχι απαγορευτική από άποψη κόστους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το οργανικό υπόβαθρο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το οξικό ιόν (acetate) (Remoudaki *et al.*, 2003).

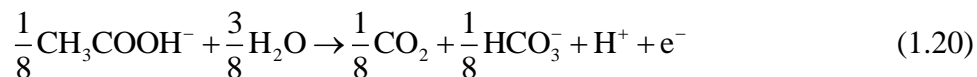
Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παραπάνω μελέτη ήταν τα εξής:

1. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε όλα τα στελέχη των βακτηρίων το οποίο σημαίνει ότι μπορούν να εγκλιματιστούν σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν διαλυτά είδη μετάλλων.
2. Παρατηρήθηκε αύξηση του pH από ουδέτερο (7) σε αλκαλικό (10) και η αλκαλικότητα αυτή οδήγησε σε σχηματισμό αδιάλυτων ειδών μετάλλων. Η αλκαλικότητα αυτή που προέκυψε, εξηγείται μέσω του μεταβολισμού του ανιόντος του οξικού οξέος από τη μικροβιακή βιομάζα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες δεκτών ηλεκτρονίων.

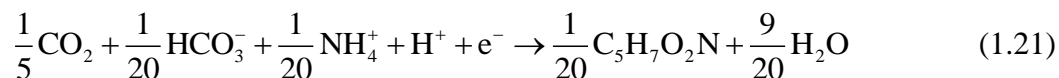
Πιο συγκεκριμένα, σε ό,τι αφορά το δεύτερο συμπέρασμα περί αλκαλικότητας, η παραπάνω προσέγγιση βασίστηκε στη σύνθεση των ολικών αντιδράσεων του μεταβολισμού, οι οποίες φαίνονται στη στοιχειομετρία του μικροβιακού μεταβολισμού, που βασίζεται στο συνδυασμό τριών ημιαντιδράσεων (Grady Jr *et al.*, 1980; Remoudaki *et al.*, 2003):

- i. Για την οξείδωση του οργανικού υποστρώματος.
- ii. Για τη σύνθεση του κυτταρικού υλικού.
- iii. Για την αναγωγή του δέκτη ηλεκτρονίων, με βάση διάφορους δέκτες ηλεκτρονίων.

Η ημιαντίδραση του δότη ηλεκτρονίων για την οξείδωση του οξικού ιόντος είναι η παρακάτω:



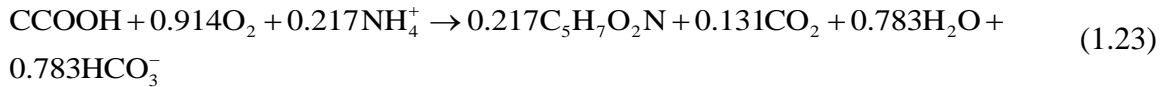
Η αντίδραση της κυτταρικής σύνθεσης υποθέτοντας ότι η  $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$  είναι μια τυπική φόρμουλα για την κυτταρική βιομάζα και ότι το αμμώνιο χρησιμοποιείται ως πηγή αζώτου, περιγράφεται στην παρακάτω εξίσωση:



Για την περίπτωση της αεροβικής ανάπτυξης, η ημιαντίδραση για την αναγωγή του οξυγόνου δίνεται παρακάτω:

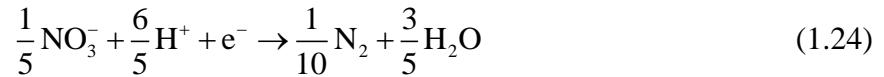


Έτσι για μία ενδεικτική τιμή απόδοσης βιομάζας  $Y_{x/s}=0,42$  g βιομάζας/g οξικού ιόντος, η συνολική αντίδραση του μεταβολισμού είναι η εξής:

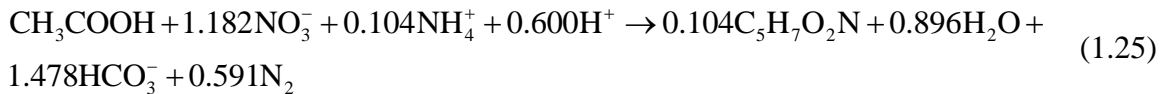


Με βάση τις παραπάνω αντιδράσεις, εξάγεται το συμπέρασμα ότι για κάθε mol οξικού που μεταβολίζεται παράγονται 0,783 mol  $\text{HCO}_3^-$ . Επομένως το pH του διαλύματος αυξάνεται καθώς προχωρά ο μεταβολισμός.

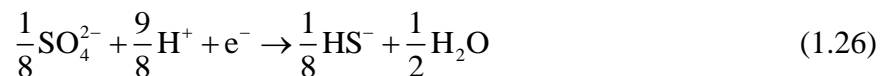
Σε περίπτωση ανοξικής ανάπτυξης με τη χρήση  $\text{NO}_3^-$  ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, η αντίδραση δέσμευσης ηλεκτρονίων είναι η εξής:



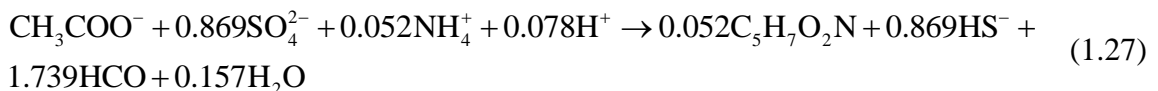
Η συνολική αντίδραση του μεταβολισμού σε αυτή την περίπτωση είναι (υποθέτοντας ενδεικτική τιμή απόδοσης βιομάζας με 0,2 g βιομάζας/g οξικού):



Όταν τώρα τα νιτρικά ιόντα καταναλωθούν, αναπτύσσονται θειοαναγωγικές συνθήκες και τα σουλφίδια πλέον δρουν ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων παράγοντας  $\text{HS}^-$  σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Υποθέτοντας ενδεικτική τιμή απόδοσης βιομάζας ίση με 0,1 g βιομάζας/g οξικού, η ολική αντίδραση του μεταβολισμού είναι η εξής:



Το συμπέρασμα που εξάγεται από τις παραπάνω αντιδράσεις σε σχέση με την αλκαλικότητα, είναι ότι όντως είναι αναμενόμενη η αύξησή της καθώς και στις τρεις παραπάνω περιπτώσεις το pH του διαλύματος αυξάνεται λόγω της κατανάλωσης των  $H^+$ .

Επιπλέον, στους θειοαναγωγικούς αντιδραστήρες που αναπτύχθηκαν και μελετήθηκαν στο Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας του Περιβάλλοντος της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών, είναι φανερό ότι οι στερεές φάσεις που σχηματίζονται είναι κυρίως άμορφες ή μικροκρυσταλλικές (Kousi *et al.*, 2007; Kousi *et al.*, 2011; Remoudaki *et al.*, 2008).

Από όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι σαφές ότι η μικροβιακή βιομάζα έχει τη δυνατότητα να δημιουργεί, είτε απουσία της μεταβολικής διεργασίας (βιορόφηση) είτε παρουσία της μεταβολικής διεργασίας, συνθήκες που ευνοούν το σχηματισμό στερεών φάσεων και οι στερεές αυτές φάσεις είναι πολύ συχνά σωματίδια πολύ μικρού μεγέθους κοντά στην περιοχή του μικρομέτρου ή και μικρότερα, οπότε μπορούμε εδώ να μιλάμε για δημιουργία νανοσωματιδίων. Δημιουργείται συνεπώς μια ακόμη δυνατότητα αξιοποίησης των αλληλεπιδράσεων της μικροβιακής βιομάζας με διαλυτά είδη των μετάλλων με στόχο αυτή τη φορά όχι την απαλλαγή υγρών ρευμάτων από διαλυτά είδη των μετάλλων αλλά, την παραγωγή νανοσωματιδίων από καθαρά πλέον επιλεγμένα συνθετικά διαλύματα.

Επιπλέον, η δυνατότητα αυτή προσφέρει όπως θα δούμε αναλυτικότερα παρακάτω μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική στις ήδη υπάρχουσες τεχνολογίες παραγωγής νανοσωματιδίων με δύο κύρια πλεονεκτήματα:

1. Η χρήση της μικροβιακής βιομάζας αποδεικνύεται αρκετά επιλεκτική χωρίς την κατανάλωση σημαντικών ποσοτήτων υλικών και ενέργειας, οπότε μπορεί να είναι ενδιαφέρουσα εναλλακτική λόγω χαμηλότερου κόστους.
2. Λόγω του παραπάνω πλεονεκτήματος, η τεχνολογία μπορεί να χαρακτηρίζεται ως περιβαλλοντικά φιλικότερη.



### 1.2.3 Εφαρμογές στη Νανοτεχνολογία

Η επιστήμη της νανοτεχνολογίας εξελίσσεται με ταχύτατους ρυθμούς τα τελευταία χρόνια καθώς η χρήση νανοϋλικών στην βιομηχανία γνωρίζει μία τεράστια άνθηση.

Αυτό συμβαίνει διότι οι ιδιότητες τις οποίες παρουσιάζουν τα υλικά αυτά τα καθιστούν χρήσιμα και σε ορισμένες περιπτώσεις απαραίτητα, σε πολλούς τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας. Σε τομείς όπως η βιοϊατρική, η γεωργία, η αεροναυπηγική αλλά και σε εφαρμογές στην ηλεκτρονική και την οπτική, η χρήση νανოსωματιδίων, και ιδιαίτερα αυτών που προέρχονται από μέταλλα και μεταλλικά οξειδία, έχει φέρει πολύ σημαντικά θετικά αποτελέσματα στην παραγωγή.

Ο λόγος για τον οποίο η επιστημονική έρευνα έχει στραφεί στα νανοςωματίδια μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων είναι οι εξαιρετικές φυσικοχημικές και ηλεκτρικές ιδιότητες που παρουσιάζουν, όπως μεταξύ άλλων, η πολύ μεγάλη αντίσταση στη διάβρωση. Για παράδειγμα έρευνες έχουν δείξει ότι τα νανοςωματίδια του αργύρου παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα και έχουν χρησιμοποιηθεί ήδη σε νοσοκομειακά αναλώσιμα όπως οι γάζες, καθώς και στην παραγωγή τροφίμων, ενώ νανοςωματίδια οξειδίου του αντιμονίου ( $SbO_3$ ) αποτελούν εξαιρετικό καταλύτη για την παραγωγή πλαστικού PET το οποίο χρησιμοποιείται στην παραγωγή πλαστικών μπουκαλιών (Jha *et al.*, 2009). Επίσης μεγάλο ενδιαφέρον έχει η χρήση των νανοςωματιδίων του μαγνητίτη ( $Fe_3O_4$ ) σε συσκευές αποθήκευσης μεγέθους πολλών terabytes, σε ferrofluids αλλά και σαν επιβληθτικούς παράγοντες σε μαγνητικές τομογραφίες (MRI) (Bharde *et al.*, 2005).

Πιο συγκεκριμένα, σε ό,τι αφορά τα νανοςωματίδια των μετάλλων που μελετήθηκαν στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής εργασίας, αξίζει να αναφέρουμε ότι νανοςωματίδια ζirkονίου χρησιμοποιούνται μεταξύ άλλων σε λειτουργικά κεραμικά, σαν χρωστικές ουσίες σε κεραμικά, σε πυκνωτές υψηλής χωρητικότητας, ως στοιχεία αποθήκευσης και εκπομπής εικόνων κ.ά.(USRN, 2013), ενώ τα νανοςωματίδια παλλαδίου αποτελούν εξαιρετικούς καταλύτες σε πολλές αναγωγικές αντιδράσεις μεταξύ άλλων (Hennebel *et al.*, 2011)

Αξίζει εδώ να σημειωθεί, για καλύτερη κατανόηση, ότι αυτές οι εξαιρετικές φυσικοχημικές, ηλεκτρικές ή και μηχανικές ιδιότητες που παρουσιάζουν τα νανοςωματίδια μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων παρατηρούνται σε μικρότερο βαθμό ή και καθόλου σε

μεγαλύτερη κλίμακα, εξ' ου και γίνεται τόσο μεγάλη προσπάθεια εκμετάλλευσης των υλικών αυτών σε νανοσωματιδιακή μορφή.

Οι συνήθεις μέθοδοι παραγωγής των σωματιδίων αυτών είναι χημικές και φυσικές. Παρ' όλα αυτά οι μέθοδοι αυτές είναι ενεργειακά απαιτητικές, απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες και χρησιμοποιούν τοξικές χημικές ουσίες όπως για παράδειγμα  $\text{NaBH}_4$ . Επιπλέον, απαιτούν πολυμερή, ηλεκτρολύτες και ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των θειολών μεταξύ άλλων για την σταθεροποίηση των νανοσωματιδίων τα οποία είναι επιβαρυντικά για το περιβάλλον (Syed *et al.*, 2012). Η Ευρωπαϊκή Ένωση εξέδωσε πρόσφατα μια νομοθεσία που αφορά στα ηλεκτρονικά και ηλεκτρικά απόβλητα (WEEE) καθώς και μία διάταξη για τις επικίνδυνες ουσίες (RoHS), το οποίο σημαίνει ότι και η παραγωγή νανοσωματιδίων πρέπει να στραφεί σε μια πιο «πράσινη» κατεύθυνση η οποία δεν θα χρησιμοποιεί τοξικές ουσίες και δεν θα επιβαρύνει το περιβάλλον, αλλά ταυτόχρονα θα είναι και φθηνή καθώς και αποτελεσματική (Jha *et al.*, 2009).

Για αυτό το λόγο λοιπόν η επιστήμη της νανοτεχνολογίας, «εμπνεόμενη» από τη χρήση μικροοργανισμών στην επιστήμη της περιβαλλοντικής τεχνολογίας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει στραφεί τα τελευταία χρόνια στην χρήση μικροοργανισμών για την παραγωγή νανοσωματιδίων. Στόχος της, η παραγωγή νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων εκμεταλλευόμενη τις διάφορες αλληλεπιδράσεις βιολογικών παραγόντων όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, τα φύκη ακόμη και ορισμένων φυτών και ανόργανων χημικών ενώσεων και στοιχείων με μία πλειάδα μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων (Πίνακας 1.3) (Mohanpuria *et al.*, 2008). Έτσι, η χρήση βιολογικών μεθόδων παραγωγής νανοσωματιδίων είναι μία από τις πολλά υποσχόμενες περιοχές έρευνας της νανοτεχνολογίας καθώς θα επιτρέψει μία πιο «πράσινη» παραγωγή νανοσωματιδίων αλλά ταυτόχρονα θα επιτύχει υψηλότερη παραγωγή και λιγότερο κόστος από τις φυσικοχημικές μεθόδους.

Πίνακας 1.3: Παραδείγματα μικροβιακής βιομάζας που χρησιμοποιείται στην παραγωγή νανοσωματιδίων (Mohanpuria *et al.*, 2008)

Βιολογικός Παράγοντας	Νανοσωματίδια που σχηματίζονται	Μέγεθος	Εξωκυτταρική/Ενδοκυτταρική σύνθεση
<i>Plectonema boryanum</i> UTEX 485 (βακτήριο)	Οκταεδρικά πλακίδια Au	6μm-10nm	Στο κυτταρικό τοίχωμα
<i>Desulfubrio desulfuricans</i> (βακτήριο)	Pd	-	-
Μαγνητοτακτικά βακτήρια	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub>	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (βακτήριο)	Au	Έως 200nm	
<i>Fusarium oxysporum/Verticillium</i> (μύκητες)	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	20-50nm	Εξωκυτταρική
<i>Fusarium oxysporum</i> (μύκητας)	Ag	5-15nm	Εξωκυτταρική
<i>Fusarium oxysporum</i> (μύκητας)	Au	20-40nm	Εξωκυτταρική
<i>Fusarium oxysporum</i> (μύκητας)	ZrO <sub>2</sub>	3-5nm	Εξωκυτταρική
<i>Fusarium oxysporum</i> (μύκητας)	CdS	5-20nm	Εξωκυτταρική

Βιολογικός Παράγοντας	Νανοδομημένα που σχηματίζονται	Μέγεθος	Εξωκυτταρική/Ενδοκυτταρική σύνθεση
<i>Fusarium oxysporum</i> (μύκητας)	BaTiO <sub>3</sub>	4-5nm	Εξωκυτταρική
<i>Verticillium</i> (μύκητας)	Au	20nm	Ενδοκυτταρική
<i>Verticillium</i> (μύκητας)	Ag	25±12nm	Ενδοκυτταρική
<i>Trichothesium sp</i> (μύκητας)	Au	-	Εξωκυτταρική και Ενδοκυτταρική
<i>Cinnamomum camphora</i> (φυτό)	Au/Ag	55-80nm	Εξωκυτταρική
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (ζύμη)	CdS	1-1,5nm	Ενδοκυτταρική

Να τονιστεί εδώ βέβαια, ότι οι μηχανισμοί αυτοί της παραγωγής μεταλλικών νανοδομημάτων καθώς και νανοδομημάτων μεταλλικών οξειδίων από μικροοργανισμούς ή φυτά, δεν έχουν πλήρως διαλευκανθεί και περιγραφεί και οι ερευνητικές προσπάθειες συνεχίζονται καθώς η πλήρης κατανόηση των μηχανισμών αυτών θα οδηγήσει και στον έλεγχο των διεργασιών προς τις επιθυμητές κατευθύνσεις, όπως για παράδειγμα παραγωγή συγκεκριμένων ιδιοτήτων νανοδομημάτων (ως προς το μέγεθος και το εύρος της κατανομής του μεγέθους). Έχουν γίνει παρόλα αυτά αρκετές επιστημονικές προτάσεις για πιθανούς μηχανισμούς (Duran *et al.*, 2011; Faramarzi *et al.*, 2013). Στην πιο πρόσφατη βιβλιογραφική ανασκόπηση των Faramarzi και Sadighi, γίνεται μία εκτενέστατη παρουσίαση των προτεινόμενων μηχανισμών για τα «μαλακά» μέταλλα (άργυρος, χρυσός), όπου δίνεται εντυπωσιακά σημαντικός αριθμός από βιβλιογραφικές αναφορές σχετικές με το σχηματισμό μεταλλικών νανοδομημάτων σε ανηγμένη μορφή μετά από την αλληλεπίδραση διαλυμάτων των

μετάλλων αργύρου και χρυσού με μία εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία διαφόρων ειδών μικροβιακής βιομάζας. Στην ίδια εργασία, επίσης προτείνεται και πιθανός μηχανισμός για σχηματισμό νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων, όπως παραδείγματος χάρη  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Faramarzi *et al.*, 2013).

Η σύνθεση νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων με τη χρήση μυκήτων, μικροβίων και λοιπών βιολογικών παραγόντων, αν και σχετικά πρόσφατη, έχει να δείξει σημαντικά αποτελέσματα. Σε ότι αφορά τους μύκητες, στους οποίους ανήκει και ο *Fusarium oxysporum* ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτής της διπλωματικής εργασίας, υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές. Παρακάτω ακολουθούν ορισμένα παραδείγματα εργασιών με στόχο την σύνθεση νανοσωματιδίων στοιχειακών μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων με τη χρήση στελεχών βακτηρίων και μυκήτων, αλλά και πιο συγκεκριμένα ερευνητικά αποτελέσματα πειραματικών διεργασιών στα οποία χρησιμοποιήθηκαν στελέχη του *Fusarium oxysporum*.

#### **1.2.3.1 Σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων με τη χρήση βακτηρίων**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν εξαιρετική αντιμικροβιακή δραστηριότητα ενάντια σε βακτήρια. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο προσβάλλουν τα βακτήρια είναι μερικώς κατανοητός, ένας μηχανισμός που έχει προταθεί αναφέρει ότι τα ιόντα του αργύρου αλληλεπιδρούν με ενώσεις που ανήκουν στην ομάδα των θειολών σε ζωτικά ένζυμα των βακτηρίων και τα απενεργοποιούν (Morones *et al.*, 2005). Εκτός από τη μέχρι τώρα χρήση των νανοσωματιδίων αργύρου σε ιατρικά αναλώσιμα, γίνονται έρευνες τα τελευταία χρόνια και για την πιθανή χρήση τους σε συνδυασμό με αντιβιοτικά ώστε να αυξηθεί η δράση τους (Fayaz *et al.*, 2010).

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ερευνητικά αύξηση της δραστηριότητας των αντιβιοτικών penicillin G, amoxicillin, erythromycin, clindamicyn και vancomycin εναντίον των βακτηρίων *S. aureus* και *E. coli* με τη μέθοδο διάχυσης δίσκων, παρουσία νανοσωματιδίων αργύρου τα οποία είχαν παραχθεί μετά από αλληλεπίδραση διαλύματος  $\text{AgNO}_3$  με συγκέντρωση  $10^{-3}$  M με καλλιέργεια υπερκείμενου *K. Pneumoniae* (Shahverdi *et al.*, 2007). Σε άλλη αναφορά πειραματικής διεργασίας, αναφέρεται επίσης η εξοκωτταρική βιοσύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου μετά από αλληλεπίδραση διαλύματος  $\text{AgNO}_3$  και του μύκητα *Trichoderma viride*. Παρατηρήθηκε ότι τα υδατικά θετικά ιόντα του αργύρου με την επαφή τους με τον μύκητα

υπέστησαν αναγωγή, το οποίο οδήγησε στην παραγωγή πολύ σταθερών και πολυδιασκορπισμένων νανοσωματιδίων 5-40 nm τα οποία παρουσιάζουν μέγιστη απορρόφηση στα 420 nm στο υπεριώδες-ορατό φάσμα.

Στα πλαίσια και αυτής της εργασίας, μελετήθηκε η συμπεριφορά τους σε συνδυασμό με αντιβιοτικά (ampicillin, kanamycin, erythromycin και chloramphenicol) παρουσία gram-positive και gram-negative βακτηρίων και η μεγαλύτερη βοηθητική επίδραση παρατηρήθηκε στην ampicillin. (Shahverdi *et al.*, 2007). Επίσης, χρήση του *Pseudomonas stutzeri*, το οποίο συναντάται σε μεταλλεία αργύρου, έχει παρατηρηθεί ότι οδηγεί σε σύνθεση νανοσωματιδίων του αργύρου μετά από επαφή του με διάλυμα που περιέχει άργυρο (Πίνακας 1.3) (Nair *et al.*, 2002).

Αναφορές πειραματικών διεργασιών όμως υπάρχουν και για τη βιολογική σύνθεση νανοσωματιδίων του παλλαδίου τα οποία χρησιμοποιούνται ως καταλύτες σε αντιδράσεις αναγωγής όπως αυτή του  $\text{CrO}_4^{2-}$  ή στην απαλογοποίηση PCBs (printed circuit boards) και PBDEs (polybrominate diphenyl ethers). Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν αναφορές για την χρήση διαφόρων βακτηρίων όπως τα *Desulfovibrio desulfuricans* (Εικόνα 1.8), *Shewanella oneidensis*, *E.coli* και *Clostridium pasteurianum*, για την σύνθεση bio-Pd σε νανοσωματιδιακή μορφή (Πίνακας 1.3). Ο μηχανισμός που έχει προταθεί ως υπεύθυνος για την αναγωγή του Pd (II) αφορά στη δράση υδρογονασών του κυτοχρώματος c3 σε ό,τι αφορά τα δύο πρώτα βακτήρια, ενώ για την *E. Coli*, ο αναγωγικός μηχανισμός που έχει προταθεί αφορά στη δράση τριών υδρογονασών οι οποίες φαίνεται να είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό «σπόρων» Pd (0) οι οποίες στη συνέχεια προωθούν την αυτοκαταλυτική αναγωγή του Pd (II) και τη σύνθεση νανοσωματιδίων Pd (0) (Hennebel *et al.*, 2011).

Σε ό,τι αφορά τη χρήση βακτηρίων για την σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων χρυσού αναφερόμαστε στο πείραμα που διεξήχθη από τους Lengke *et al*, όπου μετά από επαφή στελέχους του κυανοβακτηρίου *Plectonema boryanum* UTEX 485 με υδατικά διαλύματα  $\text{Au}(\text{S}_2\text{O}_3)_2^{3-}$  καθώς και με  $\text{AuCl}_4$  στους 25-100 °C για ένα μήνα και στους 200 °C για μία μέρα, παρατηρήθηκε καταβύθιση κυβικών νανοσωματιδίων χρυσού και οκταεδρικών πλακίδια χρυσού αντίστοιχα (Πίνακας 1.3). Έχει καταγραφεί, ότι σε ό,τι αφορά το μηχανισμό που προκαλεί αυτή τη βιοσυσσώρευση χρυσού από διαλύματα χρυσού (III) και χλωρίου, αρχικά γίνεται καταβύθιση άμορφου σουλφιδίων χρυσού (I) στα κυτταρικά τοιχώματα και στη συνέχεια αποτίθενται τα

πλακίδια κοντά στην κυτταρική επιφάνεια, καθώς και στα διαλύματα (Lengke *et al.*, 2006). Επιπροσθέτως, οι Nair και Pradeep αναφέρουν ότι η παρουσία στελεχών του βακτηρίου *Lactobacillus*, βοηθά στην σύνθεση και ανάπτυξη μικροσκοπικών κρυστάλλων χρυσού και αργύρου καθώς και κραμάτων χρυσού-αργύρου πολύ καθαρά ορισμένων (Nair *et al.*, 2002).



**Εικόνα 1.8:** Το βακτήριο *Desulfovibrio desulfuricans* (ORNL, 2011)

### 1.2.3.2 Σύνθεση νανοσωματιδίων οξειδίων και σουλφιδίων του Fe με χρήση βακτηρίων

Επιστημονικές αναφορές υπάρχουν και για τη σύνθεση νανοσωματιδίων κυρίως μαγνητίτη ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (Πίνακας 1.3, Πίνακας 1.4) αλλά και γρειγίτη ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) (Πίνακας 1.3) με τη χρήση μαγνητοτακτικών βακτηρίων (Roh *et al.*, 2001), όπως η σύνθεση νανοσωματιδίων των δύο παραπάνω από ένα μαγνητοτακτικό αργοκίνητο βακτήριο σε σχήμα ράβδου (Bazyliniski *et al.*, 1995). Επίσης, αναφέρουμε τη σύνθεση νανοσωματιδίων  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ή/και  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  από στελέχη του βακτηρίου *Magnetospirillum magneticum* (Mohanpuria *et al.*, 2008), καθώς και την εξωκυτταρική σύνθεση νανοσωματιδίων του  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (με εξαιρετικές μαγνητικές ιδιότητες) με τη χρήση του βακτηρίου *Actinobacter* spp μετά από την επαφή του με διάλυμα  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  κάτω από αερόβιες συνθήκες. (Bharde *et al.*, 2005). Επίσης υπάρχει αναφορά και για την (πολύ αργή) σύνθεση νανοσωματιδίων μαγνητίτη από σιδηροαναγωγικά βακτήρια όπως το *Geobacter metallireducens* κάτω από αερόβιες συνθήκες (Bansal *et al.*, 2012).

### 1.2.3.3 Σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων με χρήση ζυμών

Εκτός από τη χρήση βακτηρίων, έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειράματα σύνθεσης μεταλλικών νανοσωματιδίων και διάφορα είδη ζυμών. Πιο συγκεκριμένα, ο *Schizosaccharomyces pombe* χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά στη βιολογική σύνθεση νανοκρυστάλλων θειούχου καδμίου (CdS), οι οποίοι χρησιμοποιούνται τώρα σε κβαντικούς ημιαγωγούς. Σε διάφορα πειράματα που έγιναν ώστε να βελτιωθεί η παραγωγή των κρυσταλλικών ημιαγωγών CdS, παρατηρήθηκε ότι η εμφάνιση κυττάρων του *Schizosaccharomyces pombe* σε 1 mM Cd στο στάδιο της ημικηθετικής φάσης ανάπτυξης του, παράχθηκε η μέγιστη ποσότητα νανοκρυστάλλων (Πίνακας 1.3). Η έρευνα αυτή έδειξε ότι η σύνθεση των νανοκρυστάλλων εξαρτάται από την φάση ανάπτυξης της ζύμης. Δηλαδή όταν προστέθηκε κάδμιο στην σταθερή φάση ανάπτυξης η παραγωγή των CdS μειώθηκε ή σταμάτησε ενώ η προσθήκη καδμίου στην αρχική εκθετική φάση παρατηρήθηκε μεν παραγωγή αλλά επηρεάστηκε ο μεταβολισμός των κυττάρων και αυτό είχε ως αποτέλεσμα την αποβολή του καδμίου από τα κύτταρα (Mohanpuria *et al.*, 2008).

Επιπροσθέτως, αναφέρεται η μελέτη που έγινε για το σχηματισμό νανοσωματιδίων χρυσού, με τη χρήση της κοινής τροπικής υδρόβιας ζύμης *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589, σε διάφορα pH μετά από εμφάνιση της σε διάλυμα H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>. Τα νανοσωματίδια που προέκυψαν συντέθηκαν εξωκυτταρικά. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων που συντέθηκαν μειωνόταν όσο η τιμή του pH αυξανόταν από 2 έως 9, λόγω του χαμηλότερου ρυθμού αναγωγής του μεταλλικού άλατος σε υψηλές τιμές pH, κάτι το οποίο αποτρέπει τη συσσωμάτωση σωματιδίων χρυσού (Faramarzi *et al.*, 2013).

### 1.2.3.4 Σύνθεση νανοσωματιδίων με μύκητες

Ένα άλλο είδος βιολογικών παραγόντων που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων καθώς και νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων και έχει βρει πολλές εφαρμογές στη νανοτεχνολογία, είναι οι μύκητες. Στελέχη μυκήτων όπως ο *Verticillium* sp., ο *Trichothesium* ή ο *Fusarium oxysporum*, οι αλληλεπιδράσεις του οποίου με μέταλλα αποτελούν το αντικείμενο μελέτης αυτής της διπλωματικής, έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλά πειράματα σύνθεσης νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων. Υπάρχουν αναφορές όπου σημειώνεται το ότι σε σχέση με τη σύνθεση νανοσωματιδίων με τη χρήση βακτηρίων, η χρήση μυκήτων έχει ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη παραγωγή νανοσωματιδίων. Αυτή η



υψηλότερη ικανότητα παραγωγής οφείλεται στο γεγονός ότι οι μύκητες έχουν μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεϊνών στο εσωτερικό τους, και αυτό παίζει μεγάλο ρόλο στην σύνθεση των μεταλλικών νανοσωματιδίων και νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων (Mohanpuria *et al.*, 2008).

Πιο συγκεκριμένα, με την επαφή του μύκητα *Verticillium sp.* με υδατικά ιόντα  $\text{AuCl}_4^-$  (aq), σημειώθηκε βιοαναγωγή η οποία είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή νανοσωματιδίων χρυσού με σχετικά καλά ορισμένες διαστάσεις. Έχει σημειωθεί ότι η δέσμευση των ιόντων στην επιφάνεια των κυττάρων του μύκητα πιθανόν να οφείλεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση θετικά φορτισμένων ομάδων στα ένζυμα τα οποία βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκηλίων. Εκεί τα ιόντα του χρυσού ανάγονται μέσα στο κυτταρικό τοίχωμα, διαδικασία η οποία οδηγεί στη σύνθεση των νανοσωματιδίων (Mukherjee *et al.*, 2001).

Να τονιστεί εδώ, ότι όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ο μηχανισμός σύνθεσης νανοσωματιδίων από μύκητες καθώς και από άλλους βιολογικούς παράγοντες δεν είναι πλήρως γνωστός και έτσι οι περισσότεροι μηχανισμοί σύνθεσης που αναφέρονται στην βιβλιογραφία αναφέρονται ως «πιθανοί» μηχανισμοί.

Ένας άλλος μύκητας ο οποίος επίσης συναντάται στη βιβλιογραφία είναι ο *Trichothesium sp.* του οποίου η βιομάζα σε επαφή με ιόντα χρυσού κάτω από σταθερές συνθήκες είχε σαν αποτέλεσμα την εξωκυτταρική σύνθεση νανοσωματιδίων. Αντίθετα, η επαφή της μικροβιακής βιομάζας του με ιόντα χρυσού κάτω από συνθήκες ανακίνησης οδήγησε σε ενδοκυτταρική σύνθεση. Ο πιθανότερος λόγος για την αντίθεση αυτή, είναι ότι οι πρωτεΐνες οι οποίες πιθανόν συμμετέχουν στη σύνθεση εκκρίθηκαν κάτω από σταθερές συνθήκες, ενώ κάτω από ανακίνηση δεν εκκρίθηκαν καθόλου. Αυτό οδήγησε τους επιστήμονες στο συμπέρασμα ότι οι συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται η ανάπτυξη και η επαφή επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την σύνθεση των νανοσωματιδίων (Ahmad *et al.*, 2005).

Για την σύνθεση μεταλλικών νανοσωματιδίων, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και στέλεχος του μύκητα *Fusarium solani*, όπου αναφέρεται η παραγωγή νανοσωματιδίων αργύρου που επετεύχθη με την επαφή του παραπάνω μύκητα με διάλυμα 1 mM  $\text{AgNO}_3$  (Ingle *et al.*, 2009).

Σε ό,τι αφορά τον φυτοπαθογενή μύκητα *Fusarium oxysporum* (Εικόνα 1.12, Εικόνα 1.13, Εικόνα 1.14), οι Bansal *et. al.*, έχουν υπάρξει πρωτοπόροι στη σύνθεση ενός μεγάλου εύρους νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων με τη χρήση του μύκητα αυτού, μεταξύ των

οποίων νανοσωματίδια  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  και  $\text{BaTiO}_3$  (Bansal *et al.*, 2004; Bansal *et al.*, 2005; Bharde *et al.*, 2006) (Πίνακας 1.4). Η επιλογή αυτού του μύκητα βασίστηκε στο ότι οι φυτοπαθογενείς μύκητες παράγουν ένα μεγάλο εύρος εξωκυτταρικών υδρολασών προκειμένου να υποβαθμίσουν τα φυτά-ξενιστές τους στο φυσικό τους περιβάλλον, και οι υδρολάσες αυτές μπορούν να μελετηθούν *in silico* για να υδρολύσουν οξειδωτικούς προδρόμους ώστε να σχηματιστούν τα αντίστοιχα νανοσωματίδια οξειδίων σε υδατικό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου. Επιπλέον, οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τον μύκητα πιστεύεται ότι αποτελούν ένα υδρολυτικό και περιοριστικό πρότυπο για τη σύνθεση σωματιδίων μεταλλικών οξειδίων σε ναοκλίμακα (συνήθως κάτω από 10 nm). Έρευνες έδειξαν υπάρχει δυνατότητα σύνθεσης νανοσωματιδίων  $\text{SiO}_2$  μετά από επαφή του *Fusarium oxysporum* με υδατικό ανιονικό  $\text{SiF}_6^{2-}$  (Εικόνα 1.9) καθώς και νανοσωματιδίων  $\text{ZrO}_2$  (Εικόνα 1.10) (Bansal *et al.*, 2005). Η εξωκυτταρική υδρόλυση του ανιονικού συμπλόκου από κατιονικές πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες εκκρίθηκαν από το μύκητα, είχε ως αποτέλεσμα την εξωκυτταρική σύνθεση κρυσταλλικών νανοσωματιδίων  $\text{SiO}_2$ .

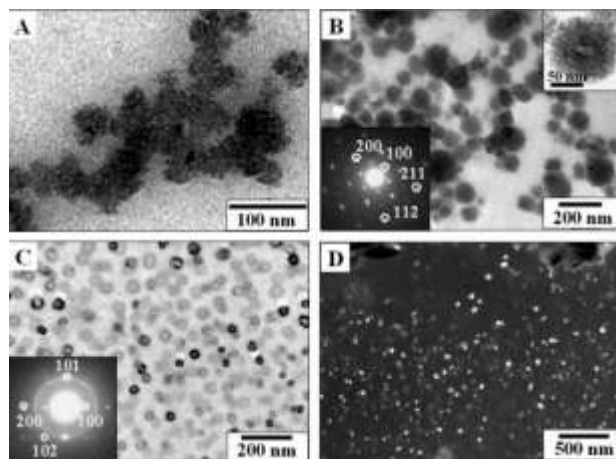
Να σημειωθεί στο σημείο αυτό, ότι ο *Fusarium oxysporum* δεν έρχεται συνήθως με επαφή με τέτοια ιόντα στη διάρκεια του κύκλου ζωής του, και το γεγονός ότι μπορεί να εκκρίνει πρωτεΐνες οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν σύμπλοκα  $\text{SiF}_6^{2-}$  είναι απρόσμενο αλλά ταυτόχρονα έχει σημαντική δυνατότητα για περαιτέρω ανάπτυξη και μελέτη (Bansal *et al.*, 2012). Παρατηρήθηκε επίσης ότι ο συγκεκριμένος μύκητας έχει τη δυνατότητα να υδρολύει και άλλα δισθενή μεταλλικά οξείδια καθώς βρέθηκε ότι παράγει τουλάχιστον δύο κατιονικές πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες υδρολύουν υδατικά ανιονικά σύμπλοκα (ιόντα  $\text{SiF}_6^{2-}$ ,  $\text{TiF}_6^{2-}$  και  $\text{ZrF}_6^{2-}$ ) για τη σύνθεση των αντίστοιχων νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$ ) εξωκυτταρικά και σε θερμοκρασία δωματίου. Εξαιρετικά ευχάριστο ήταν το γεγονός ότι παρατηρήθηκε πως ο συγκεκριμένος μύκητας έχει τη δυνατότητα να υδρολύει πρόδρομες αλογονούχες ενώσεις σκληρών μετάλλων κάτω από όξινες συνθήκες. Παρ' ότι αυτές οι υδρολυτικές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τον *Fusarium oxysporum* έχουν ακόμη μελετηθεί ως προς την αλληλουχία τους και ως προς το ρόλο τους στις μεταβολικές και εξελικτικές οδούς του μύκητα οι έρευνες έχουν δείξει ότι οι πρόκειται για κατιονικές πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους γύρω στα 20-30 kDa το οποίο σημαίνει ότι μοιάζουν με την σιλικατεΐνη (Bansal *et al.*, 2012).

Επιπροσθέτως, υπάρχει αναφορά για τη χρήση των μυκήτων *Fusarium oxysporum* και *Verticillium* sp, για τη σύνθεση νανοσωματιδίων μαγνητίτη σε θερμοκρασία δωματίου. Τα νανοσωματίδια που συντέθηκαν με τη χρήση του πρώτου είχαν διάμετρο μεγέθους 20-40 nm, ενώ με τη χρήση του *Verticillium* sp. παρατηρήθηκε υπερσυσσώρευση μικρότερων νανοσωματιδίων του μαγνητίτη σε κυβικές δομές με μήκος κορυφής 100-400 nm δομές οι οποίες έδειξαν υπερπαραμαγνητικές και αντισιδηρομαγνητικές αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής. Βιοχημική ανάλυση της σύνθεσης νανοσωματιδίων μαγνητίτη στο *Verticillium* sp., έδειξε ότι στον σχηματισμό τους εμπλέκεται το ένζυμο κυανικής υδρατάσης, παρ' όλα αυτά δεν θα πρέπει να αποκλειστεί η πιθανή εμπλοκή και άλλων πρωτεϊνών (Πίνακας 1.4) (Bansal *et al.*, 2012).

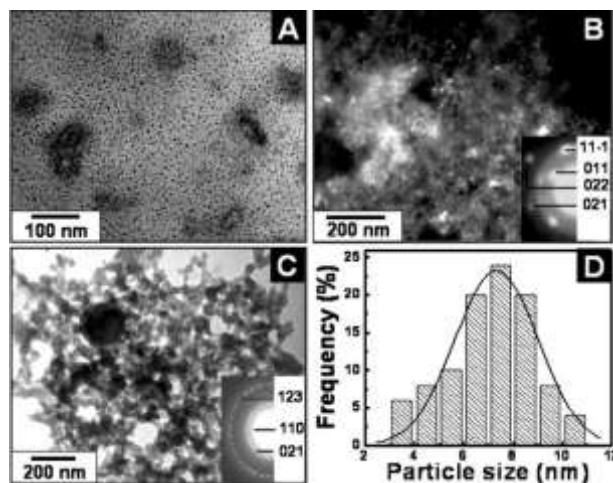
Το γεγονός ότι τα βιολογικά συστήματα έχουν τη δυνατότητα να αναγεννώνται, σε συνδυασμό με τα ευρήματα για το ότι και ο *Fusarium oxysporum* και ο *Verticillium* sp. Μπορούν να υδρολύουν μεταλλικά σύμπλοκα τα οποία μάλιστα δεν συναντούν γενικά στον κύκλο ζωής τους δίνει πολύ σημαντικές υποσχέσεις για ανάπτυξη ιδιαίτερα για την παραγωγή νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων σε μεγάλη κλίμακα (Bansal *et al.*, 2012).

Πίνακας 1.4: Λίστα των διαφορετικών νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων που συνθέτονται με τη χρήση μικροοργανισμών (Bansal *et al.*, 2012)

Μικροοργανισμός	Οξείδιο
<b><u>Μύκητες</u></b>	
<i>Fusarium oxysporum</i>	SiO <sub>2</sub>
<i>Fusarium oxysporum</i>	TiO <sub>2</sub>
<i>Fusarium oxysporum</i>	ZrO <sub>2</sub>
<i>Fusarium oxysporum</i>	BaTiO <sub>3</sub>
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
<i>Verticillium sp.</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
<b><u>Βακτήρια</u></b>	
<i>Geobacter metallireducens</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Μαγνητοτακτικά βακτήρια	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
Βακτήρια με αντίσταση στο κοβάλτιο	Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>

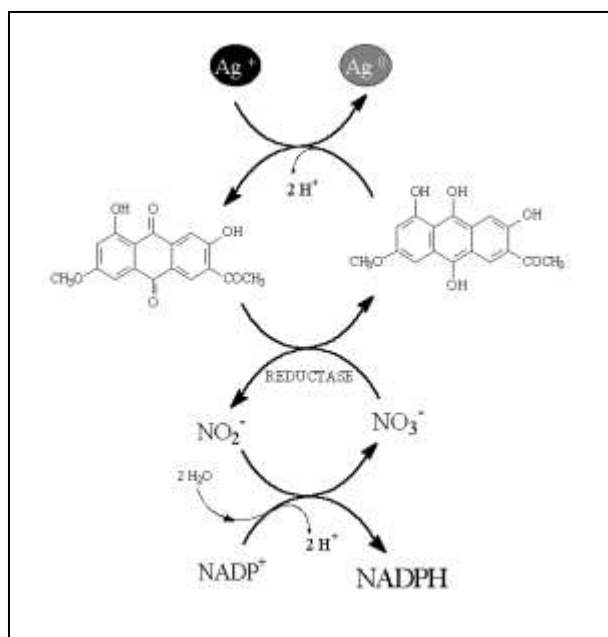


**Εικόνα 1.9:** Μικρογραφίες TEM όπου διακρίνονται νανοσωματίδια  $\text{SiO}_2$ , σε διαφορετικές μεγεθύνσεις, που συντέθηκαν από την επαφή άμμου με το μύκητα *Fusarium oxysporum*. (A-B): Πριν την πύρωση στους  $400\text{ }^\circ\text{C}$  για 2 h, (C-D): Μετά την πύρωση. Οι ένθετες εικόνες απεικονίζουν διατάξεις SAED αντιπροσωπευτικών νανοσωματιδίων (Bansal *et al.*, 2005)



**Εικόνα 1.10:** (A-B) Μικρογραφίες TEM φωτεινού και σκοτεινού πεδίου, νανοσωματιδίων  $\text{ZrO}_2$  που συντέθηκαν χρησιμοποιώντας τον *Fusarium oxysporum*, πριν την πύρωση. (C) Μικρογραφία TEM φωτεινού πεδίου, βιογενών νανοσωματιδίων  $\text{ZrO}_2$ , μετά από πύρωση στους  $600\text{ }^\circ\text{C}$  για 3 h. Οι ένθετες εικόνες αποτελούν διατάξεις SAED. (D) Ιστόγραμμα κατανομής μεγέθους των σωματιδίων που συντέθηκαν πριν την πύρωση (Bansal *et al.*, 2004)

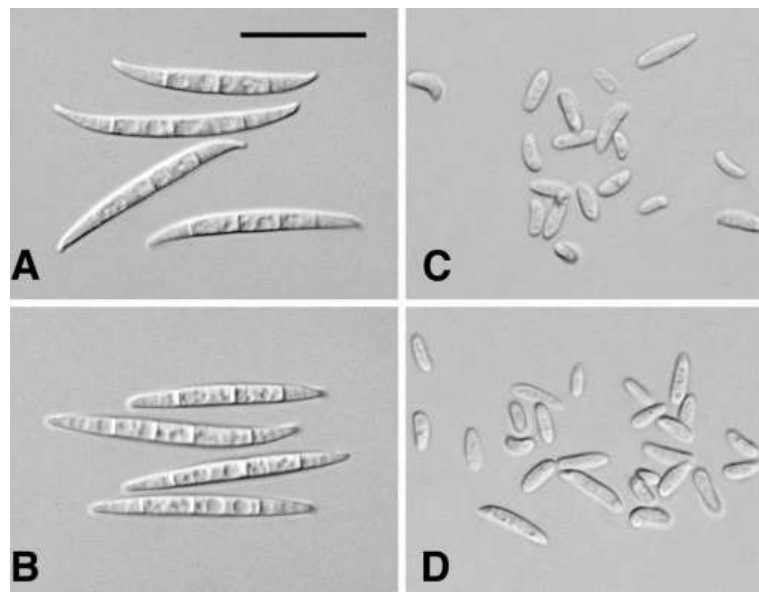
Σε ό,τι αφορά τους πιθανούς μηχανισμούς σύνθεσης νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων με τη χρήση του *Fusarium oxysporum*, υπάρχει αναφορά για την ύπαρξη μιας αναγωγάσης που εξαρτάται από το  $\text{NO}_3^-$ , καθώς και μιας κινόνης από ορισμένα στελέχη του μύκητα οι οποίες παρατηρήθηκε ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξωκυτταρική σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου, ενώ στην προσπάθεια περαιτέρω αποσαφήνισης των μηχανισμών σύνθεσης νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων, υπάρχει αναφορά για την παραγωγή *in vitro* νανοσωματιδίων αργύρου μετά από επαφή του μετάλλου με μία  $\alpha$ -NADPH-dependent νιτρική αναγωγάση η οποία είχε απομονωθεί από τον *Fusarium oxysporum* (Εικόνα 1.11) (Bharde *et al.*, 2006; Duran *et al.*, 2005).



**Εικόνα 1.11:** Πιθανός μηχανισμός σύνθεσης νανοσωματιδίων αργύρου (Duran *et al.*, 2005).

Επιπροσθέτως υπάρχουν αναφορές που αφορούν στην ενδοκυτταρική σύνθεση νανοσωματιδίων αργύρου μετά από επαφή μικροβιακής βιομάζας του *Fusarium oxysporum* με διάλυμα  $\text{AgNO}_3$  (Mohanpuria *et al.*, 2008; Mukherjee *et al.*, 2001), καθώς και στην εξωκυτταρική σύνθεση νανοσωματιδίων πλατίνας μεγέθους 5-30 nm μετά από αλληλεπίδραση στελεχών του μύκητα με διάλυμα  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  και παρουσία πρωτεϊνών (γλυκόζη, πεπτόζη κ.ά.) σε αυτό για 96 h με ανάδευση στις 200 rpm και σε θερμοκρασία δωματίου (Syed *et al.*, 2012).

Εκτός των παραπάνω, υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά για τη σύνθεση νανοσωματιδίων θειούχου καδμίου (CdS) με τη χρήση του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, βιομάζα του *Fusarium oxysporum* αντέδρασε με: (1) υδατικό διάλυμα CdNO<sub>3</sub> και (2) ένα υδατικό διάλυμα που περιείχε τα άλατα CdCl<sub>2</sub> και Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και τα δύο σε συγκέντρωση 10<sup>-3</sup> M, και παρατηρήθηκε εξωκυτταρική σύνθεση πολύ σταθερών νανοσωματιδίων. Σύμφωνα με την αναφορά, ο μηχανισμός σύνθεσης τους είχε σίγουρα να κάνει με την απελευθέρωση ενζύμων αναγωγασών στο διάλυμα, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό των νανοσωματιδίων από τα ιόντα Cd<sup>+2</sup> και SO<sub>4</sub><sup>-2</sup> μηχανισμός ο οποίος έχει αναφερθεί και παραπάνω ως ο πιο πιθανός για την σύνθεση νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων από μύκητες γενικά και τον *Fusarium oxysporum* ειδικά (Ahmad *et al.*, 2002). Τέλος, σημειώνεται η εξωκυτταρική σύνθεση νανοσωματιδίων χρυσού με μέγιστη απορρόφηση στα 545 nm μετά από επαφή βιομάζας του *Fusarium oxysporum* με υδατικά ιόντα AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>. Να σημειωθεί ότι μετρήσεις UV/Vis και fluorescence του υδατικού διαλύματος για 72 h έδειξαν καθαρά την ύπαρξη πρωτεϊνών, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο μύκητας απελευθέρωσε αναγωγικούς παράγοντες στο διάλυμα, επομένως και στο πείραμα αυτό ο πιο ευρέως αποδεκτός πιθανός μηχανισμός σύνθεσης νανοσωματιδίων ευθύνεται για τον σχηματισμό τους (Mukherjee *et al.*, 2002).



**Εικόνα 1.12:** Μακροκονίδια (A-B) και μικροκονίδια (C-D) *Fusarium oxysporum* (Leslie *et al.*, 2006)



**Εικόνα 1.13:** Ρίζα γλυκοπατάτας η οποία έχει προσβληθεί από τον *Fusarium oxysporum*. Ο μύκητας αυτός προκαλεί αγγειακές παθήσεις σε πολλά είδη φυτών (USDA, 2003).



**Εικόνα 1.14:** Διάφορα στάδια μόλυνσης του φυτού της ντοματιάς με το πρώτο από τα αριστερά φυτό να είναι εντελώς υγιές και τελευταίο νεκρό (Pietro *et al.*, 2003).



Με βάση όλες τις παραπάνω αναφορές, εξάγεται εύκολα το συμπέρασμα ότι η χρήση μικροοργανισμών για τη σύνθεση νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων είναι μία μέθοδος σύνθεσης πολύ ελπιδοφόρα, καθώς παρατηρεί κανείς ότι είναι πολύ μεγάλο το εύρος των διαλυτών μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων τα οποία μετά από την επαφή τους με μικροβιακή βιομάζα δίνουν σωματίδια σε νανοκλίμακα. Επιπλέον, μέσα από τον προσδιορισμό των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών τους με μία σειρά αναλυτικών μεθόδων και τεχνικών (TEM, SEM-EDS, ICP-OES, EDAX), είναι φανερό ότι τα νανοσωματίδια που παράγονται παρουσιάζουν πολλά επιθυμητά χαρακτηριστικά και αυτό είναι πολύ ελπιδοφόρο για την μελλοντική παραγωγή βιογενών νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών νανοσωματιδίων. Κι αυτό γιατί όπως έχει ήδη αναφερθεί η χρήση βιολογικών μεθόδων παραγωγής νανοσωματιδίων παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους παραγωγής που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα (Bansal *et al.*, 2012; Nair *et al.*, 2002).

#### **1.2.4 Πρωτόκολλο διεξαγωγής πειραμάτων επαφής μικροβιακής βιομάζας-μετάλλων**

Όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως, τα πειράματα που διεξάγονται με τη χρήση μικροβιακής βιομάζας η οποία αλληλεπιδρά με κάποιο μέταλλο γίνονται βάση κάποιου πρωτοκόλλου. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν ορισμένα συγκεκριμένα βήματα τα οποία πρέπει να ακολουθηθούν στην προετοιμασία τόσο της βιομάζας όσο και του μετάλλου με το οποίο θα έρθει σε επαφή, ώστε να εξασφαλισθεί το καλύτερο και σωστότερο δυνατό αποτέλεσμα.

Έτσι λοιπόν, διαδικασίες όπως η κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος του μύκητα ή του θρεπτικού υποστρώματος ή των διαλυμάτων επαφής, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην επιτυχία ή μη του εκάστοτε πειράματος καθώς και στην εξαγωγή των σωστών συμπερασμάτων.

Από τις βιβλιογραφικές αναφορές που ήδη έχουν αναφερθεί και αφορούν στη χρήση μικροβιακής βιομάζας γενικά, αλλά και βιομάζας του *Fusarium oxysporum* πιο συγκεκριμένα για τη σύνθεση νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων, μπορεί κανείς να παρατηρήσει ότι υπάρχει μια συγκεκριμένη διαδικασία η οποία ακολουθείται κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων ώστε να προκύψουν τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα. Τα βήματα που ακολουθούνται είναι κλασικά βήματα πειραμάτων διαλείποντος έργου όπως αυτά περιγράφονται στους προσδιορισμούς βιοροφητικής ικανότητας μικροβιακής βιομάζας-μετάλλων (Remoudaki *et al.*, 2003; Remoudaki *et al.*, 2008). Τα βήματα αυτά έχουν πολλές

ομοιότητες με τις πειραματικές διαδικασίες-πρωτόκολλα που ακολουθούνται και στις εργασίες όπου διερευνάται η δυνατότητα παραγωγής νανοσωματιδίων (Bansal *et al.*, 2004; Bansal *et al.*, 2005; Duran *et al.*, 2005; Lengke *et al.*, 2006; Remoudaki *et al.*, 2003; Remoudaki *et al.*, 2008; Syed *et al.*, 2012).

1. Ανάπτυξη της βιομάζας, όπου στελέχη από έτοιμη καλλιέργεια του μύκητα αφήνονται να επώασουν σε κατάλληλο θρεπτικό υπόβαθρο.
2. Διαχωρισμός της βιομάζας που έχει συντεθεί μετά την πάροδο κατάλληλου χρόνου από το θρεπτικό, μέσω διήθησης.
3. Ζύγιση κατάλληλης ποσότητας βιομάζας η οποία θα έρθει σε επαφή με τα διαλυτά μέταλλα.
4. Κατασκευή κατάλληλων διαλυμάτων επαφής των διαλυτών μετάλλων.
5. Επαφή μικροβιακής βιομάζας-με διαλυτά είδη μετάλλων.
6. Διαχωρισμός βιομάζας-διαλυμάτων.
7. Κατάλληλες ποιοτικές και ποσοτικές αναλύσεις (SEM, TEM, ICP-OES κ.λπ.).

Να σημειωθεί ότι εκτός των βασικών βημάτων που προαναφέρθηκαν, υπάρχουν και άλλα ενδιάμεσα βήματα τα οποία ακολουθούνται κατά κανόνα κατά την διεξαγωγή πειραμάτων για τη σύνθεση νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων, όπως για παράδειγμα οι εκπλύσεις της βιομάζας, ή η φυγοκέντρηση της μετά το στάδιο της διήθησης (Bansal *et al.*, 2004; Syed *et al.*, 2012).

## 2 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής είναι να γίνει μία πειραματική διερεύνηση της δυνατότητας παραγωγής νανοσωματιδίων του οξειδίου του ζirkονίου και του παλλαδίου με τη χρήση μικροβιακής βιομάζας του μύκητα *Fusarium oxysporum*.

Όσον αφορά στην επιλογή του συγκεκριμένου μύκητα για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, δύο ήταν οι λόγοι για τους οποίους προτιμήθηκε ο *Fusarium oxysporum*.

Ο πιο σημαντικός, ήταν ότι υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές για τη χρήση του μύκητα στην παραγωγή νανοσωματιδίων μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων, το οποίο φυσικά μας βοήθησε και στην επιλογή των πειραματικών συνθηκών (Ahmad *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2003; Bansal *et al.*, 2004; Bansal *et al.*, 2012; Bharde *et al.*, 2006; Duran *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007; Mukherjee *et al.*, 2002; Syed *et al.*, 2012).

Ο δεύτερος λόγος, ήταν ότι υπήρχε δυνατότητα να προμηθευτούμε στελέχη του μύκητα. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα επαφής το προμηθευτήκαμε από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π

Σε ό,τι αφορά τα δύο μέταλλα που επιλέχθηκαν, και εδώ ο βασικός λόγος της επιλογής ήταν η μεγάλη βιβλιογραφία η οποία υπάρχει γύρω από την παραγωγή νανοσωματιδίων οξειδίου του ζirkονίου και παλλαδίου με τη χρήση μικροοργανισμών και την χρήση τους σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές.

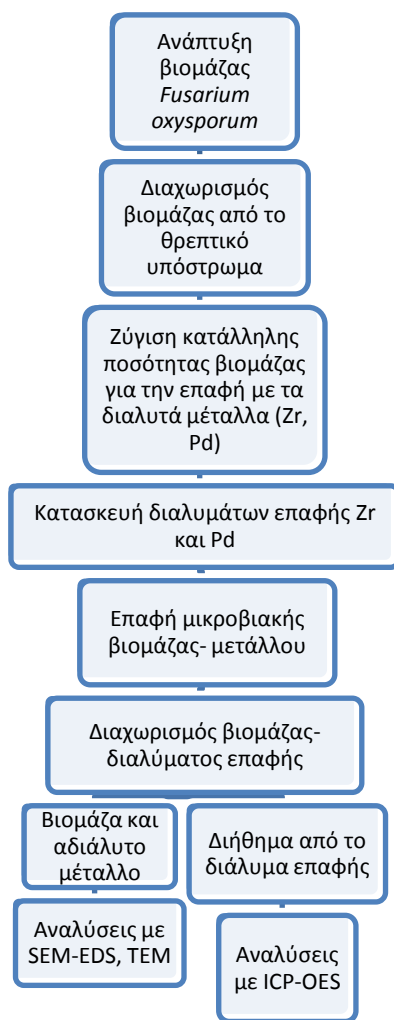
Πιο συγκεκριμένα τα νανοσωματίδια του παλλαδίου που έχουν προκύψει από βιολογική σύνθεση έχουν χρησιμοποιηθεί ως καταλύτες σε πολλές αναγωγικές αντιδράσεις και όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω, υπάρχουν αρκετές αναφορές για τη σύνθεση τους από στελέχη διαφόρων βακτηρίων όπως *Desulfovibrio desulfuricans*, *Shewanella oneidensis*, *Clostridium butyricum* και *E.Coli* μεταξύ άλλων (Hennebel *et al.*, 2011).

Αλλά και για το ζirkόνιο υπάρχουν αρκετές αναφορές σε πειράματα για την βιολογική σύνθεση νανοσωματιδίων του οξειδίου του, όπως για παράδειγμα η σύνθεση νανοσωματιδίων οξειδίου του ζirkονίου με τη χρήση του *Fusarium oxysporum* (Bansal *et al.*, 2004; Bansal *et al.*, 2012).



### 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ – ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πειράματα που διεξήχθησαν στο πλαίσιο της διπλωματικής αυτής εργασίας, ακολούθησαν μια συγκεκριμένη διαδικασία και μεθοδολογία η οποία υπακούει στο επιστημονικό πρωτόκολλο που ακολουθείται στην διεξαγωγή πειραμάτων επαφής μικροβιακής βιομάζας και διαλυτών ειδών μετάλλων, και το οποίο περιγράφεται σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές όπως έχει ήδη αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο. Ακολουθεί το διάγραμμα ροής της πειραματικής διαδικασίας.



Εικόνα 3.1: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

## 3.1 Υλικά και τεχνικές

### 3.1.1 Μικροοργανισμός

Για το πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας, επιλέχθηκε ο μύκητας *Fusarium oxysporum*, ώστε να χρησιμοποιηθεί στα πειράματα επαφής βιομάζας–μετάλλου. Ο συγκεκριμένος μύκητας όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, προτείνεται και από τη βιβλιογραφία λόγω της ικανότητάς του να σχηματίζει νανοσωματίδια στην επαφή του με διαλύματα ζirkονίου (Bansal *et al.*, 2004), και έχει χρησιμοποιηθεί και ως ροφητικό μέσο σε πειράματα βιορόφησης (Mishra *et al.*, 2013). Το στέλεχος του μύκητα μας παραχωρήθηκε από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. και έχει χρησιμοποιηθεί συστηματικά στο παρελθόν για την παραγωγή διαφόρων ενζύμων (Moukoulis *et al.*, 2008; Topakas *et al.*, 2003; Topakas *et al.*, 2004). Η αρχική καλλιέργεια του μύκητα ήταν επί κεκλιμένου στερεού υποστρώματος θρεπτικού μέσου όπως αυτό περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Topakas *et al.*, 2004).

### 3.1.2 Ανάπτυξη μικροβιακής βιομάζας

Η μεταφορά της αρχικής καλλιέργειας σε στερεό υπόστρωμα, έγινε στο θρεπτικό Potato Dextrose Agar (PDA), της εταιρείας BIOKAR DIAGNOSTICS, το οποίο σε συγκέντρωση 39 g/l νερού έχει σύνθεση (σε g/l) 20 γλυκόζη, 15 agar και 4 εκχύλισμα πατάτας. Για την διάλυση του θρεπτικού απαιτείται ελαφρά θέρμανση του διαλύματος, ενώ για τη ρύθμιση της οξύτητάς του χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 10% w/v ταρταρικού οξέος προκειμένου το pH του διαλύματος να είναι στην περιοχή 3.5-4.5 πριν την αποστείρωση. Το θρεπτικό PDA αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 min σε κατακόρυφο αυτόκαυστο της εταιρείας HELLENIC LABWARE και στη συνέχεια κατά την ψύξη του και πριν την στερεοποίησή του, αποχύθηκε σε τριβλία petri και σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε κεκλιμένη θέση προκειμένου να στερεοποιηθεί. Μετά την ψύξη και την στερεοποίησή τους, τα στερεά υποστρώματα εμβολιάστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες με τις νηματοειδείς μορφές του μύκητα, και τοποθετήθηκαν σε θερμοστατούμενο θάλαμο επώασης της εταιρείας LAB-LINE INSTRUMENTS INC., στους 30 +/- 1 °C για 4 ημέρες, μέχρι να παρατηρηθεί οπτικά η ανάπτυξη των χαρακτηριστικών λευκών νηματοειδών μορφών του μύκητα.

### 3.1.3 Υγρά θρεπτικά υποστρώματα

Για την επιλογή του κατάλληλου μέσου ανάπτυξης του *Fusarium oxysporum* σε υγρές καλλιέργειες επιλέχθηκαν αρχικά τα ακόλουθα θρεπτικά μέσα:

1. Συνθετικό διάλυμα γλυκόζης–αλάτων σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Torakas *et al.*, 2004) το οποίο είχε την ακόλουθη σύσταση (όλες οι ποσότητες σε g/l): 10, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> ; 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,3, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,3, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 6,94, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 9,52, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 10, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Εικόνα 3.2).
2. Το προηγούμενο διάλυμα ενισχυμένο με την προσθήκη 1 g/l εκχυλίσματος ζύμης (Yeast Extract) της εταιρείας MERCK (Εικόνα 3.3).
3. Czapek Dox Modified της εταιρείας OXOID η διάλυση του οποίου σε συγκέντρωση 33,4 g/l αποδίδει ένα διάλυμα με την ακόλουθη σύσταση (όλες οι ποσότητες σε g/l): 2, NaNO<sub>3</sub> ; 0,5, KCl ; 0,5, MgC<sub>3</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>P (Magnesium glycerophosphate) ; 0,01, FeSO<sub>4</sub> ; 0,35, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 30, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> (Εικόνα 3.4).
4. Standard I Nutrient Broth της εταιρείας MERCK η διάλυση του οποίου σε συγκέντρωση 25 g/l αποδίδει ένα διάλυμα με την ακόλουθη σύσταση (όλες οι ποσότητες σε g/l): 15, Peptones ; 3, Yeast Extract ; 6, NaCl ; 1, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (Εικόνα 3.5).
5. Θρεπτικό Billay – Joffe το οποίο είχε την ακόλουθη σύσταση (όλες οι ποσότητες σε g/l): 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1, KNO<sub>3</sub> ; 0,5, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ; 0,5 KCl ; 0,2 άμυλο ; 0,2 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> ; 0,2 C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub> (Εικόνα 3.6) (Booth, 1971).

### 3.1.4 Ανάπτυξη του μύκητα *Fusarium oxysporum* με τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα

Σκοπός της δοκιμής των θρεπτικών μέσων ήταν η επιλογή του καταλληλότερου, εκείνου δηλαδή που μεγιστοποιεί την απόδοση σε παραγωγή μικροβιακής βιομάζας, ώστε να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιομάζας για τα πειράματα επαφής βιομάζας-μετάλλου. Για τον σκοπό αυτό έγιναν πέντε πειράματα σε δύο επαναλήψεις για το κάθε ένα θρεπτικό μέσο εμβολιάζοντας 150 ml διαλύματος με περίπου 4 ml αιωρήματος της καλλιέργειας του μύκητα *Fusarium oxysporum* που παρασκευάστηκε από την ανάπτυξη του στα στερεά υποστρώματα των δοκιμαστικών σωλήνων. Τα εμβολιασμένα θρεπτικά επώασθησαν για 96 h στους 30 +/-1 °C, σε θερμοστατούμενο περιστροφικό αναδευτήρα κωνικών φιαλών πολλαπλών θέσεων με ρύθμιση επιθυμητής θερμοκρασίας και ρυθμού ανάδευσης της εταιρείας LAB-LINE

INSTRUMENTS INC., στις 250 rpm. Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται τα διαλύματα των πέντε θρεπτικών πριν έρθουν σε επαφή με τη βιομάζα:



**Εικόνα 3.2: Συνθετικό διάλυμα γλυκόζης-αλάτων πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα**



**Εικόνα 3.3: Συνθετικό διάλυμα γλυκόζης-αλάτων ενισχυμένο με Yeast Extract πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα**





**Εικόνα 3.4: Διάλυμα Czapek Dox πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα**



**Εικόνα 3.5: Διάλυμα Standard I Nutrient Broth πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα**



**Εικόνα 3.6: Διάλυμα Billay-Joffee πριν την επαφή με μικροβιακή βιομάζα**

Μετά τη διήθηση των διαλυμάτων ζυγίστηκε η νωπή βιομάζα προκειμένου να υπολογιστεί η απόδοση των αντίστοιχων θρεπτικών μέσων (Πίνακας 3.1). Προέκυψε ότι το Czapek Dox και το Standard I Nutrient Broth είχαν τη μεγαλύτερη απόδοση για αυτό και χρησιμοποιήθηκαν σε προκαταρκτικά πειράματα επαφής με διαλύματα  $K_2ZrF_6$  και  $ZrCl_4$  συγκέντρωσης 0,1 M. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών επιλέχθηκε το Czapek Dox για την ανάπτυξη βιομάζας ώστε να πραγματοποιηθούν τα πειράματα επαφής κυτταρικής βιομάζας με διαλύματα ζιρκονίου και παλλαδίου.

**Πίνακας 3.1: Απόδοση νωπής βιομάζας σε σχέση με το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα**

<b>Θρεπτικό Υπόστρωμα</b>	<b>Απόδοση νωπής βιομάζας (g/l)</b>
<b>Σύνθετο διάλυμα γλυκόζης-αλάτων</b>	5,0
<b>Czapek Dox</b>	24,0
<b>Standard I Nutrient Broth</b>	17,5
<b>Billay - Joffee</b>	< 0,2

Σημειώνεται στο σημείο αυτό, ότι ο διαχωρισμός της βιομάζας από το μητρικό υγρό ανάπτυξης γινόταν με την χρήση συστήματος διήθησης υπό κενό με χρήση χάρτινου διηθητικού ηθμού. Προκαταρκτικές δοκιμές με χρήση φίλτρου διαμέτρου οπών 0.45 μm (Whatman) έδειξαν ότι οι πόροι του φίλτρου φράζουν γρήγορα με αποτέλεσμα η διήθηση να μην είναι εφικτή. Η διηθημένη βιομάζα ξεπλενόταν με 100 ml νερού δύο φορές προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα του θρεπτικού ανάπτυξης από την επιφάνεια των κυττάρων. Η ξήρανση της διηθημένης μικροβιακής βιομάζας γινόταν υπό ήπιες συνθήκες σε θερμοκρασία 30°C για 24 h προκειμένου να μην υπάρχουν θερμικές αλλοιώσεις της δομής των κυττάρων.

### 3.2 Πειράματα επαφής *Fusarium oxysporum* - μετάλλου

Η συγκέντρωση της βιομάζας που αναπτύχθηκε με τη χρήση του Czapek Dox ως θρεπτικού μέσου και χρησιμοποιήθηκε για την επαφή με τα διαλύματα μετάλλου, ήταν 0,1 g/l. Τα διαλύματα των μετάλλων παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στις επόμενες παραγράφους.

Τα διαλύματα που προέκυψαν από την επαφή αναδεύτηκαν στις 300 rpm για 24 h και στη συνέχεια διηθήθηκαν υπό κενό με μεμβράνες 0,45 μm. Αμέσως μετά τη διήθηση, μετρήθηκε το pH των διηθημάτων τα οποία φυλάχθηκαν σε πλαστικές φιάλες στους 4 °C μέχρι την ανάλυση τους στο ICP-OES. Τα φίλτρα, φυλάχθηκαν σε αεροστεγή τριβλία petri στους 4 °C μέχρι την παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο. Στον πίνακα που ακολουθεί παρατίθενται οι τιμές pH των διηθημάτων των διαλυμάτων ζirkονίου.

Να σημειωθεί ότι τα πειράματα επαφής πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

**Πίνακας 3.2: Τιμές pH των διηθημάτων των διαλυμάτων ζirkονίου**

Διήθημα διάλυματος μετάλλου	Τιμή pH
$K_2ZrF_6$ (1 <sup>η</sup> επανάληψη)	4,754
$K_2ZrF_6$ (2 <sup>η</sup> επανάληψη)	4,591
$ZrCl_4$ (1 <sup>η</sup> επανάληψη)	2,552
$ZrCl_4$ (2 <sup>η</sup> επανάληψη)	2,523

### 3.2.1 Παρασκευή διαλυμάτων Ζιρκονίου

Για την παρασκευή των διαλυμάτων του ζιρκονίου για την επαφή με τη μικροβιακή βιομάζα, χρησιμοποιήθηκαν δύο άλατα ζιρκονίου. Αυτά ήταν: (α) Μετά καλίου άλας εξαφθοριούχου ζιρκονίου (Potassium Hexafluorozirconate,  $K_2ZrF_6$ ) της εταιρείας SIGMA-ALDRICH και (β) Τετραχλωριούχο ζιρκόνιο (Zirconium(IV) Chloride,  $ZrCl_4$ ) της εταιρείας SIGMA-ALDRICH καθαρότητας 99,9% . Τα διαλύματα ζιρκονίου είχαν συγκέντρωση 10 mM σε Zr και παρασκευάστηκαν με ζύγιση 1,4182 g  $K_2ZrF_6$  και 1,1652 g  $ZrCl_4$  και αραιώσή τους σε 500 ml δις απιονισμένου νερού αντίστοιχα. Οι τιμές pH των διαλυμάτων αυτών ήταν 4,473 και 1,925 αντίστοιχα εξαιτίας της υδρόλυσης των χημικών ειδών. Τα αραιωμένα διαλύματα ζιρκονίου  $K_2ZrF_6$  και  $ZrCl_4$  που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα επαφής με τη μικροβιακή βιομάζα, είχαν συγκέντρωση 94 mg/l και 86,7 mg/l αντίστοιχα και τιμή pH 4,185 και 2,536 αντίστοιχα.

### 3.2.2 Παρασκευή διαλυμάτων Παλλαδίου

Για την παρασκευή των διαλυμάτων του παλλαδίου χρησιμοποιήθηκε στερεό χλωριούχο παλλάδιο (Palladium Chloride,  $PdCl_2$ ) της εταιρείας ALFA AESAR καθαρότητας 99.9% (metals basis). Με ζύγιση της κατάλληλης ποσότητας του άλατος (0.834 g / 500 ml) παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα 1000 mg/l σε  $Pd^{2+}$  από το οποίο ακολούθως παρασκευάστηκε το διάλυμα επαφής των 100 mg/l και τα πρότυπα διαλύματα  $Pd^{2+}$  συγκεντρώσεων 1, 5, 10, 50 και 100 mg/l με κατάλληλες αραιώσεις. Στο διάλυμα προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα HCl 0,1 M ώστε το pH του να προσεγγίσει την τιμή 3. Παρασκευάστηκαν δύο είδη διαλυμάτων χλωριούχου παλλαδίου χωρίς και μετά από προσθήκη KCl ώστε να λάβουμε τελικά διαλύματα συγκέντρωσης 0,1 M KCl.

## 3.3 Αναλυτικές μέθοδοι-Τεχνικές προσδιορισμού

Μετά το πέρας κάθε σειράς πειραμάτων έγιναν δύο σειρές προσδιορισμών:

1. Προσδιορισμοί της διαλυτής ποσότητας μετάλλου στα διαλύματα πριν και μετά την επαφή με τη μικροβιακή βιομάζα με τη μέθοδο Φασματομετρίας Επαγωγικού Πλάσματος (Inductive Coupled Plasma, ICP) με όργανο της εταιρείας LEEMAN LABS INC. Αυτοί οι προσδιορισμοί είναι απαραίτητοι για να γνωρίζουμε την

μάζα του μετάλλου που έχει αποθεθεί πάνω στη βιομάζα ανά γραμμάριο μικροβιακής βιομάζας.

2. Παρατήρηση-προσδιορισμός με το μικροσκόπιο SEM-EDS (JEOL 6380 LV) δειγμάτων μικροβιακής βιομάζας πριν και μετά την επαφή της με τα διαλύματα των μετάλλων. Οι προσδιορισμοί αυτοί είχαν σκοπό αφ' ενός να γίνει παρατήρηση της μορφολογίας της βιομάζας και αφ' ετέρου να εντοπιστούν σ' αυτήν τα σωματίδια των μετάλλων και μεταλλικών οξειδίων και να αντληθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες για τη μορφολογία και τα μεγέθη των σωματιδίων αυτών. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε βοηθητικά και πληροφορία από παρατήρηση των δειγμάτων των στερεών στο μικροσκόπιο TEM (JEOL 2100F HR, 200 kV). Αν και δεν παρέχεται ακόμη η δυνατότητα ταυτόχρονης χημικής ανάλυσης για τον προσδιορισμό των μετάλλων στα σωματίδια, θεωρήσαμε ότι οι πληροφορίες για τα σωματίδια που παρατηρούνται ως προς τα μεγέθη τους και την κρυσταλλικότητά τους ήταν σ' αυτό το στάδιο πολύτιμες.

### **3.3.1 Ανάλυση με τη μέθοδο της Ατομικής Φασματομετρίας Επαγωγικού Πλάσματος (ICP-OES)**

Η Φασματομετρία Ατομικής Εκπομπής, αποτελεί μια κατηγορία αναλυτικών τεχνικών που βασίζονται στην εκπομπή ακτινοβολίας από διεγερμένα άτομα ή ιόντα και στην αποτύπωση αυτής της ακτινοβολίας σε μορφή φασματικών γραμμών ορισμένου μήκους κύματος και διαφορετικής έντασης.

Η διέγερση των ατόμων σε ένα δείγμα μπορεί να πραγματοποιηθεί από διάφορες πηγές όπως φλόγα, ηλεκτρικό τόξο, σπινθήρας και επαγωγικό πλάσμα (ICP). Το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα σαν πηγή διέγερσης ατόμων εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των άλλων πηγών μεταξύ των οποίων και τα παρακάτω (Βογιατζής, 2010):

- Καλύτερη ατομοποίηση των στοιχείων στο δείγμα.
- Χαμηλά όρια ανίχνευσης (1-100 ppb).
- Καλή επαναληψιμότητα.
- Πολυστοιχειακή ανάλυση σε πολλά δείγματα.
- Προσδιορισμός μικρών συγκεντρώσεων στοιχείων που διεγείρονται και ιονίζονται δύσκολα, όπως Al, V, Pt, Ti, λανθανίδες κ.λπ.

- Ελαχιστοποίηση χημικών παρεμβολών ή παρεμβολών ιονισμού λόγω της σύστασης του δείγματος.

Να σημειωθεί εδώ, ότι με τον όρο «ατομοποίηση» εννοούμε την λύση όλων των διατομικών δεσμών, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ατομικών στοιχείων στη βασική ενεργειακή τους κατάσταση.

Σε ό,τι αφορά τώρα τους μηχανισμούς με τους οποίους διεγείρονται τα άτομα και τα ιόντα, οι τρεις βασικοί είναι (Βογιατζής, 2010):

1. Θερμικός ιονισμός και διέγερση, που προκαλούνται από την ενέργεια που ανταλλάσσουν μεταξύ τους τα άτομα, ιόντα και ηλεκτρόνια λόγω της μεταξύ τους σύγκρουσης.
2. Ιονισμός και διέγερση, που προκαλούνται από συγκρούσεις μεταξύ ατόμων του στοιχείου στη βασική κατάσταση και μετασταθούς αργού (το κύριο αέριο του επαγωγικού πλάσματος).
3. Ιονισμός και διέγερση, που προκαλούνται από τη μεταφορά φορτίου μεταξύ ιόντων και ατόμων.

Τα ηλεκτρόνια παραμένουν στην διεγερμένη κατάσταση για μικρό χρονικό διάστημα ( $10^{-8}$ s) και ακολουθεί η εκπομπή ακτινοβολίας λόγω της μετάπτωσης τους, η οποία έχει μήκος κύματος στην περιοχή του υπεριώδους και του ορατού φάσματος. Οι χαρακτηριστικές γραμμές που αποτελούν το φάσμα εκπομπής προέρχονται από αυτές τις ακτινοβολίες. Αυτή την εκπομπή ακτινοβολίας εκμεταλλεύεται η ICP-OES, καθώς λόγω του ότι κάθε στοιχείο εκπέμπει ακτινοβολία σε συγκεκριμένα μήκη κύματος χαρακτηριστικά για το συγκεκριμένο στοιχείο, και δεδομένου ότι η ένταση της ενέργειας που εκπέμπεται στο συγκεκριμένο μήκος κύματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου στοιχείου στο δείγμα, προσδιορίζοντας τα μήκη κύματος που είναι παρόντα στο δείγμα και προσδιορίζοντας και την ένταση ποσοτικοποιείται η σύσταση του δείγματος.

Σε ό,τι αφορά την οργανολογία του ICP-OES μια τυπική διάταξη αποτελείται από (Εικόνα 3.7) (Βογιατζής, 2010):

1. Την πηγή αερίων για το πλάσμα και τους ρυθμιστές παροχών.

2. Τη γεννήτρια ραδιοσυχνότητας, η οποία παρέχει ενέργεια για τη δημιουργία και συντήρηση του πλάσματος μέσω μαγνητικού πεδίου.
3. Τον πυρσό, μέσα στον οποίο δημιουργείται το πλάσμα, από της σύγκρουσης ατόμων αργού και ελεύθερων ηλεκτρονίων που σχηματίζονται μέσω ηλεκτρικής εκκένωσης (σπινθήρας).
4. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος, το οποίο προωθεί το υγρό δείγμα στο πλάσμα αφού πρώτα το έχει μετατρέψει σε αεροζόλ-αερόλυμα μέσω των εκνεφωτών.
5. Το οπτικό σύστημα μέσω του οποίου ανιχνεύονται οι ακτινοβολίες, καθώς διαχωρίζει τις φασματικές γραμμές των στοιχείων και ανιχνεύει την έντασή τους. Ο διαχωρισμός γίνεται είτε μέσω του μονοχρωμάτορα (διαχωρισμός και απομόνωση μίας φασματικής γραμμής τη φορά) ή του πολυχρωμάτορα (ανάλυση πολλών φασματικών γραμμών συγχρόνως).
6. Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή, για την διαχείριση και αποτίμηση των αποτελεσμάτων.

Για ποιοτική ανάλυση δείγματος, γίνεται σάρωση της φασματικής περιοχής από 178-780 nm και τα μήκη κύματος όπου λαμβάνονται παλμοί εντάσεως τριπλάσιας ή μεγαλύτερης του υποστρώματος, συγκρίνονται με φασματικές γραμμές που ήδη υπάρχουν αποθηκευμένες στο μηχάνημα ώστε να ταυτοποιηθούν τα στοιχεία που υπάρχουν στο δείγμα.

Για την ποσοτική ανάλυση, γίνεται διέγερση του δείγματος, εισαγωγή των ακτινοβολιών στο οπτικό σύστημα και διαχωρισμός της κάθε φασματικής γραμμής. Έπειτα, επιλέγεται η βέλτιστη φασματική γραμμή για κάθε στοιχείο και βαθμονομείται η θέση του στοιχείου στο φάσμα με βάση μια πρότυπη φασματική γραμμή. Στη συνέχεια, βελτιστοποιούνται ορισμένες παράμετροι λειτουργίας του οργάνου ανάλογα με τη φασματική γραμμή, βαθμονομείται η ένταση της γραμμής με πρότυπα διαλύματα και δημιουργείται μια καμπύλη αναφοράς έντασης της ακτινοβολίας έναντι της συγκέντρωσης του στοιχείου στα πρότυπα διαλύματα.

Η ICP-OES αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για την πολυστοιχειακή ανάλυση σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων καθώς καλύπτει περίπου 70 στοιχεία του περιοδικού πίνακα, ενώ αποτελεί πολύ καλή επιλογή για αναλύσεις γεωλογικών δειγμάτων, περιβαλλοντικές αναλύσεις, αναλύσεις τροφίμων, αναλύσεις μετάλλων κ.λπ. (Βογιατζής, 2010).



**Εικόνα 3.7: Όργανο μεθόδου ανάλυσης ICP-OES (Leeman-Labs, 2012)**

### **3.3.2 Ανάλυση με τη χρήση του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης (SEM-EDS)**

Μία άλλη μέθοδος ανάλυσης των δειγμάτων της μικροβιακής βιομάζας, που χρησιμοποιήθηκε, ήταν η ανάλυση με το Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscope) (Εικόνα 3.8), όπου εξετάζεται η μικροδομή τους, ώστε όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, να εξαχθούν όσο το δυνατόν περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με τη μορφολογία τους. Με αυτή τη μέθοδο επιτυγχάνεται παρατήρηση και προσδιορισμός των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νανοσωματιδίων που πιθανώς βρίσκονται στην μικροβιακή βιομάζα.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιεί μια δέσμη ηλεκτρονίων για την ανάλυση αντικειμένων με πολύ μεγάλη λεπτομέρεια και χρησιμοποιείται για την εξέταση της μικροδομής στερεών δειγμάτων. Η λεπτομερής αυτή ανάλυση επιτυγχάνεται μέσω της σάρωσης του εκάστοτε δείγματος από την δέσμη ηλεκτρονίων. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει σαν όργανο είναι η δυνατότητα μεγάλης εστίασης και μεγέθυνσης, η ελάχιστη προετοιμασία που χρειάζεται το δείγμα προς εξέταση, καθώς και η δυνατότητα παραγωγής τρισδιάστατων διαγραμμάτων που βοηθούν σε μεγάλο βαθμό την εξαγωγή μεγάλου αριθμού πληροφοριών για την μικροδομή και τη γεωμετρία του δείγματος.

Η αρχή λειτουργίας του SEM βασίζεται στην καταγραφή των αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μεταξύ της δέσμης ηλεκτρονίων και του δείγματος και πιο συγκεκριμένα της ελαστικής και μη ελαστικής σκέδασης. Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει την επιφάνεια του



δείγματος με το οποίο αλληλεπιδρά και λόγω των φαινομένων της σκέδασης, από τα άτομα εκπέμπονται κυρίως δευτερογενή (μη ελαστική σκέδαση) και οπισθοσκεδαζόμενα (ελαστική σκέδαση) ηλεκτρόνια. Έτσι λοιπόν, επειδή το ποσοστό των οπισθοσκεδαζόμενων ηλεκτρονίων που εκπέμπονται εξαρτάται από τον ατομικό αριθμό του στοιχείου του δείγματος και επειδή διαφορετικά ποσοστά δίνουν διαφοροποιήσεις στην εικόνα που παρατηρούμε (οι βαρύτερες φάσεις φαίνονται λαμπρότερες από τις ελαφρύτερες), μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες για τη σύσταση του δείγματος. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα δευτερογενή ηλεκτρόνια εκπέμπονται κοντά στην επιφάνεια του δείγματος, μας χρησιμεύει στην απεικόνιση του δείγματος (Κουή *et al.*).

Για το κομμάτι της στοιχειακής ανάλυσης του δείγματος, αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αναλυτικής τεχνικής EDS την οποία διαθέτει το SEM, η οποία χρησιμοποιεί το φάσμα των ακτινών X το οποίο εκπέμπεται από ένα στερεό δείγμα όταν αυτό βομβαρδίζεται με μία δέσμη ηλεκτρονίων, για να πετύχει χημική ανάλυση μίας συγκεκριμένης περιοχής του δείγματος. Η ποιοτική ανάλυση αφορά στην ταυτοποίηση των φασματικών γραμμών σε σχέση με τα στοιχεία που περιέχεται στο δείγμα, ενώ η ποσοτική ανάλυση (ο υπολογισμός δηλαδή των συγκεντρώσεων των στοιχείων που υπάρχουν στο δείγμα) συνεπάγεται τον υπολογισμό των εντάσεων των φασματικών γραμμών για κάθε στοιχείο στο δείγμα, και για τα ίδια στοιχεία, σε βαθμονομημένα standards γνωστής σύστασης.

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης λοιπόν, χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή ηλεκτρονικών εικόνων (μικρογραφίες), αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στοιχειακή χαρτογράφηση, με την επιπλέον ύπαρξη ενός φασματόμετρου ακτινών X. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι οι λειτουργίες των δύο αυτών οργάνων αλληλεπικαλύπτονται σε ένα βαθμό (UCR, 2013).

Ο βαθμός της διείσδυσης των ηλεκτρονίων της δέσμης στο εκάστοτε δείγμα εξαρτάται από ορισμένες παραμέτρους. Πιο συγκεκριμένα, από την ποσότητα των ηλεκτρονίων στη δέσμη, τη διάμετρο της δέσμης, αλλά κυρίως την ταχύτητα με την οποία προσπίπτουν τα ηλεκτρόνια στο δείγμα, καθώς και την ενέργεια τους, και τέλος το είδος του δείγματος προς ανάλυση.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του δείγματος και της δέσμης ηλεκτρονίων, είναι αυτές που επιτρέπουν την τόσο λεπτομερή ανάλυση του οποιουδήποτε δείγματος.

Σε ό,τι αφορά την οργανολογία του SEM, οι βασικές διατάξεις που το αποτελούν είναι (Κουή *et al.*):

1. Το σύστημα παραγωγής της δέσμης των ηλεκτρονίων. Δηλαδή ένα νήμα βολφραμίου συνήθως (κάθοδος), από το οποίο περνάει ρεύμα του οποίου η αύξηση, έχει ως αποτέλεσμα την εκπομπή ηλεκτρονίων τα οποία κατευθύνονται προς την άνοδο στην οποία εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 1-30 kV.
2. Το σύστημα κατεύθυνσης της δέσμης. Το σύστημα αυτό αποτελείται από μια σειρά μεταλλικών ανοιγμάτων, ηλεκτρομαγνητικών φακών αλλά και πηνίων σάρωσης, προκειμένου να επιτευχθεί η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη εστίαση της δέσμης στο δείγμα για την καλύτερη δυνατή σάρωση.
3. Το σύστημα πληροφοριών.

Το σύστημα κενού που αποτελείται από δύο αντλίες που εξασφαλίζουν την ύπαρξη κενού της τάξης των  $2 \cdot 10^{-3}$  Pa καθώς τα ηλεκτρόνια δεν μπορούν να μετακινηθούν σε συνθήκες μη κενού γιατί συγκρούονται με τα μόρια του αέρα και απορροφώνται.

Να σημειωθεί ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ δέσμης και δείγματος καταγράφονται από τους ανιχνευτές που υπάρχουν ενσωματωμένοι στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και μετατρέπονται σε εικόνα.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση μίας μεγάλης ποικιλίας δειγμάτων, όπως για παράδειγμα βιολογικά υλικά, μεμβράνες, φίλτρα, ίνες, ρητίνες, χρώματα κ.λπ. (Κουή *et al.*).



**Εικόνα 3.8:** Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM JEOL JSM 6380 LV) (Χατζηθεοδοφρίδης *et al.*, 2011)

### **3.3.3 Ανάλυση με τη χρήση του Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διέλευσης (TEM)**

Η τρίτη τεχνική προσδιορισμού που εφαρμόστηκε στα δείγματα της μικροβιακής βιομάζας μετά από την επαφή τους με τα διαλυτά μέταλλα, ήταν η μέθοδος Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM).

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης (Εικόνα 3.9), το είδωλο του δείγματος δημιουργείται από μία δέσμη ηλεκτρονίων η οποία το διαπερνά και καταλήγει σε μία φθορίζουσα οθόνη, όπου και προβάλλει την εικόνα του δείγματος. Τα ηλεκτρόνια της δέσμης αλληλεπιδρούν με το δείγμα μέσω της ελαστικής σκέδασής τους, το οποίο οδηγεί σε περίθλασή τους σε συγκεκριμένες κατευθύνσεις. Η περίθλαση αυτή δίνει πολύ σημαντικές πληροφορίες για την περιοδική διάταξη των ατόμων στο εσωτερικό του δείγματος. Λόγω του ότι τα δείγματα που αναλύονται στο TEM είναι λεπτά, τα ηλεκτρόνια της δέσμης σκεδάζονται ελαστικά ή και καθόλου επιτρέποντας τον σχηματισμό του «ειδώλου» του δείγματος στη φθορίζουσα οθόνη. Να σημειωθεί εδώ, ότι για δείγματα από βιολογικά υλικά τα ηλεκτρόνια της δέσμης δεν υφίστανται μεγάλες εκτροπές. Τα δείγματα τοποθετούνται σε μικρά πλέγματα (grids) και παρεμβάλλονται στην πορεία της δέσμης των ηλεκτρονίων. Με βάση τα παραπάνω και μετρώντας τις γωνίες σκέδασης των ηλεκτρονίων με τη βοήθεια του νόμου του Bragg ( $2d\sin\theta=n\lambda$ ), μπορούν να

υπολογιστούν οι πλεγματικές αποστάσεις  $d$  των επιπέδων του υλικού. Έτσι, μπορεί να προσδιοριστεί η κρυσταλλική δομή μιας περιοχής ενός δείγματος με διαστάσεις μερικά nm ενός υλικού (Τσουκαλάς, 2013).

Με αυτό τον τρόπο, έγινε και η παρατήρηση των δειγμάτων της μικροβιακής βιομάζας του *Fusarium oxysporum*, όπου λεπτές τομές της βιομάζας παρατηρήθηκαν στο μικροσκόπιο προκειμένου να προσδιοριστεί η ύπαρξη ή μη κρυσταλλικών δομών στο δείγμα και πιο συγκεκριμένα αν οι πλεγματικές αποστάσεις που υπολογίζονται αντιστοιχούν στα μέταλλα με τα οποία ήρθαν σε επαφή.

Σε ό,τι αφορά τη διάταξη του μικροσκοπίου διέλευσης, η πιο διαδεδομένη είναι η εξής (Φασσέας, 2013):

1. Ηλεκτρονικό κανόνι, για την παραγωγή της δέσμης ηλεκτρονίων και το οποίο βασίζεται στη θερμοϊονική εκπομπή ενός θερμαινόμενου νήματος βολφραμίου (ή ακίδα  $\text{LaB}_6$ ). Το κανόνι αυτό, μετά την πυράκτωσή του (όταν δηλαδή διέλθει από αυτό ηλεκτρικό ρεύμα) εκπέμπει ηλεκτρόνια. Να σημειωθεί εδώ, ότι το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης της σχολής των Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών εφαρμόζει διαφορά δυναμικού μεταξύ νήματος (κάθοδος) και ανόδου ίση με 200 kV.
2. Ηλεκτρομαγνητικοί φακοί, οι οποίοι ρυθμίζουν την πορεία των ηλεκτρονίων. Η οποιαδήποτε μεταβολή στην ένταση του ρεύματος που τους διαπερνά, προκαλεί μεταβολή στην ένταση του μαγνητικού τους πεδίου, η οποία με τη σειρά της μεταβάλλει την εστιακή τους απόσταση. Αυτό επιτρέπει στον παρατηρητή να εστιάζει τη δέσμη των ηλεκτρονίων στο εκάστοτε δείγμα.
3. Συγκεντρωτικός φακός (condenser lens), ο οποίος εστιάζει τη δέσμη στο δείγμα.
4. Αντικειμενικός φακός (objective lens), ο οποίος εξασφαλίζει την εστίαση της εικόνας στην οθόνη.
5. Ενδιάμεσος φακός (intermediate, projector lens), ο οποίος ρυθμίζει την μεγέθυνση.

Τα σύγχρονα ηλεκτρονικά μικροσκόπια διέλευσης, αποτελούνται από μία δέσμη ηλεκτρονίων ύψους περίπου 2,5 m και διαμέτρου 30 cm και είναι σε θέση να επιτύχουν ανάλυση της τάξης των  $2 \text{ \AA}$ . Επιπλέον, διαθέτουν και ψηφιακή φωτογραφική μηχανή για την απεικόνιση των εικόνων που προκύπτουν από την παρατήρηση του δείγματος.

Τέλος, σε ό,τι αφορά τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούν τα δείγματα προς εξέταση, να αναφέρουμε ότι πρέπει να αντέχουν σε υψηλό κενό, να είναι αρκετά λεπτά ώστε να μπορεί να τα διαπερνά η δέσμη των ηλεκτρονίων, και να επιτρέπουν την ελαστική σκέδαση τους. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι τα δείγματα προς παρατήρηση πρέπει να είναι αφυδατωμένα, μονιμοποιημένα (νεκρά), ή κομμένα σε πολύ λεπτές τομές, αλλά και να έχουν «χρωματιστεί» με ουσίες όπως το ουράνιο ή ο μόλυβδος.



**Εικόνα 3.9:** Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM JEOL 2100 HR) (Τσακίριδης *et al.*, 2011)



## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Αποτελέσματα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση *Fusarium oxysporum* με διαλυτά είδη παλλαδίου

#### 4.1.1 Φόρτιση μικροβιακής βιομάζας με παλλάδιο – Έμμεσος προσδιορισμός

Η φόρτιση της βιομάζας σε μέταλλο ( $q$ ), υπολογίστηκε έμμεσα από τα αποτελέσματα των προσδιορισμών των συγκεντρώσεων του διαλυτού παλλαδίου με ICP-OES πριν και μετά την επαφή και το διαχωρισμό της βιομάζας από το διάλυμα, δηλαδή μετά από επαφή 24 h, όπου θεωρούμε ότι έχει επέλθει ισορροπία και η φόρτιση είναι η μέγιστη δυνατή.

Η φόρτιση αυτή λοιπόν, δηλαδή η ποσότητα μετάλλου που συγκρατείται από τη βιομάζα ανά γραμμάριο βιομάζας, υπολογίστηκε μέσω της διαφοράς συγκέντρωσης, με βάση την εξίσωση:

$$q = \frac{(C_i - C_e)V}{W} \quad (4.1)$$

Όπου  $q$  είναι η φόρτιση της βιομάζας σε μέταλλο (mg μετάλλου /g βιομάζας),  $C_i$  και  $C_e$  είναι οι συγκεντρώσεις του μετάλλου στο διάλυμα πριν και μετά την επαφή με τη βιομάζα (mg/l),  $V$  είναι ο όγκος της υδατικής φάσης (l) και  $W$  είναι η ποσότητα του προσροφητικού μέσου-βιομάζας (g).

Με βάση τα παραπάνω, για τη φόρτιση του παλλαδίου προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα :

**Πίνακας 4.1: Φόρτιση βιομάζας σε μέταλλο των διαλυμάτων του Pd**

Διαλύματα PdCl <sub>2</sub>	V(l)	C <sub>i</sub> (mg/l)	C <sub>e</sub> (mg/l)	ΔC (mg/l)	W (g)	q (mg Pd/g βιομάζας)
<b>Pd</b> (1 <sup>η</sup> επανάληψη)	0,1	100	53,58	46,42	0,1	46,42
<b>Pd</b> (2 <sup>η</sup> επανάληψη)	0,1	100	57,29	42,71	0,1	42,71
<b>Pd + KCl</b> (1 <sup>η</sup> επανάληψη)	0,1	100	79,36	20,64	0,1	20,64
<b>Pd + KCl</b> (2 <sup>η</sup> επανάληψη)	0,1	100	71,12	28,88	0,1	28,88

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα, δείχνουν μια αρκετά ικανοποιητική, υψηλή θα λέγαμε, φόρτιση της βιομάζας με παλλάδιο γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προγενέστερα αποτελέσματα που αφορούν στη φόρτιση βακτηριακής μικροβιακής βιομάζας σε παλλάδιο (Remoudaki *et al.*, 1999). Όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία, η φόρτιση αυτή είναι πιθανόν να σημαίνει το σχηματισμό στοιχειακού παλλαδίου, δηλαδή να οφείλεται σε έναν τελικό μηχανισμό αναγωγής του παλλαδίου ο οποίος συναντάται συχνά στις περιπτώσεις των αλληλεπιδράσεων μικροβιακής βιομάζας με τα «μαλακά» ή ευγενή μέταλλα όπως είναι το παλλάδιο, ο άργυρος ή ο χρυσός (Hennebel *et al.*, 2011; Lengke *et al.*, 2006; Remoudaki *et al.*, 1999).

Από τα διαγράμματα των ειδών του παλλαδίου (Baes *et al.*, 1976) είναι φανερό ότι δύο παράμετροι επηρεάζουν την κατανομή των χλωριούχων συμπλόκων-ειδών: η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου και το pH. Στο επίπεδο των αρχικών μας συγκεντρώσεων των 100 mg/l, τα διαλυτά είδη παλλαδίου υπερισχύουν σε όξινα pH. Στα διαλύματα επαφής, το αρχικό pH είναι ίσο με 3 όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 4.2), προκειμένου να εξασφαλίσουμε μόνο την ύπαρξη διαλυτών ειδών. Σχετικά με τη συγκέντρωση των χλωριόντων, τα διαγράμματα δείχνουν ότι σε συγκέντρωση χλωριόντων μεγαλύτερη από 0,1 M, έχουμε



αποκλειστική παρουσία  $\text{PdCl}_4^{2-}$  ενώ σε συγκέντρωση μικρότερη από 0,1 M, έχουμε και την παρουσία προϊόντων υδρόλυσης όπως πχ  $\text{PdOHCl}$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ .

Πράγματι, μετά από εισαγωγή των αρχικών συγκεντρώσεων παλλαδίου, pH και χλωριούχου καλίου στο πρόγραμμα Visual MINTEQ ver. 3.0, τα αποτελέσματα που πήραμε σχετικά με την κατανομή των διαλυτών ειδών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.2). Από αυτά προκύπτει ότι όταν έχουμε διαλύματα παλλαδίου σε pH με τιμή 3 χωρίς την προσθήκη KCl, έχουμε προϊόντα υδρόλυσης και αυξημένη πιθανότητα σχηματισμού στερεών φάσεων ενώ, όταν στο διάλυμα προστίθεται KCl 0,1 M το παλλάδιο είναι αποκλειστικά υπό τη μορφή διαλυτού  $\text{PdCl}_4^{2-}$ .

**Πίνακας 4.2: Κατανομή διαλυτών ειδών Pd σε διάλυμα με αρχική συγκέντρωση 100 mg/l, τιμή pH 3 χωρίς προσθήκη KCl 0,1 M / με προσθήκη KCl 0,1 M**

Διαλυτά είδη Pd	Διάλυμα Pd χωρίς KCl 0,1 M		Διάλυμα Pd με KCl 0,1 M	
	Συγκέντρωση (mg/l)	Συγκέντρωση %	Συγκέντρωση (mg/l)	Συγκέντρωση %
$\text{Pd}^{2+}$	$4,30 \cdot 10^{-10}$	0,0	$1,06 \cdot 10^{-14}$	0,0
$\text{PdCl}^+$	$1,10 \cdot 10^{-6}$	0,1	$4,88 \cdot 10^{-10}$	0,0
$\text{PdCl}_2$ (aq)	$9,74 \cdot 10^{-5}$	10,4	$1,13 \cdot 10^{-6}$	0,1
$\text{PdCl}_3^-$	$6,01 \cdot 10^{-5}$	6,4	$2,84 \cdot 10^{-5}$	3,0
$\text{PdCl}_4^{2-}$	$3,24 \cdot 10^{-5}$	3,4	$9,10 \cdot 10^{-4}$	96,9
$\text{PdOH}^+$	$6,04 \cdot 10^{-10}$	0,0	$8,22 \cdot 10^{-15}$	0,0
<b>Σύνολο</b>	$1,91 \cdot 10^{-4}$	20,3	$9,40 \cdot 10^{-4}$	100,0

Από τον πίνακα των φορτίσεων (Πίνακας 4.1), μετά από την επαφή των διαλυμάτων με τη βιομάζα, φαίνεται ότι έχουμε υψηλότερη φόρτιση στην περίπτωση των διαλυμάτων στα οποία δεν προστέθηκε KCl ενώ σε αυτά που αντιστοιχούν σε προσθήκη KCl σε συγκέντρωση 0,1 M, η φόρτιση είναι σημαντικά μικρότερη. Αυτό σημαίνει ότι η επιπλέον παρουσία προϊόντων υδρόλυσης ευνοεί το σχηματισμό αδιάλυτων ειδών τα οποία καταλήγουν να αποχωρίζονται από το διάλυμα μαζί με τη βιομάζα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με προγενέστερη ερευνητική εργασία (Remoudaki *et al.*, 1999). Η υψηλή φόρτιση της βιομάζας (σχηματισμού στερεών) στην περίπτωση των διαλυμάτων απουσία KCl, είναι δικαιολογημένη και εξηγείται από τα δεδομένα του πίνακα που παρουσιάζει τα αποτελέσματα της κατανομής των διαλυτών ειδών (Πίνακας 4.2). Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται σε δύο παράλληλα γεγονότα: τα αδιάλυτα είδη που ο σχηματισμός τους ευνοείται λόγω της χημείας του διαλύματος καθιζάνουν ευκολότερα με τη παρουσία της βιομάζας. Τα διαλυτά είδη αλληλεπιδρούν με τη βιομάζα και αυτή η αλληλεπίδραση, είναι πιθανόν να οδηγεί σε σχηματισμό στερεών.

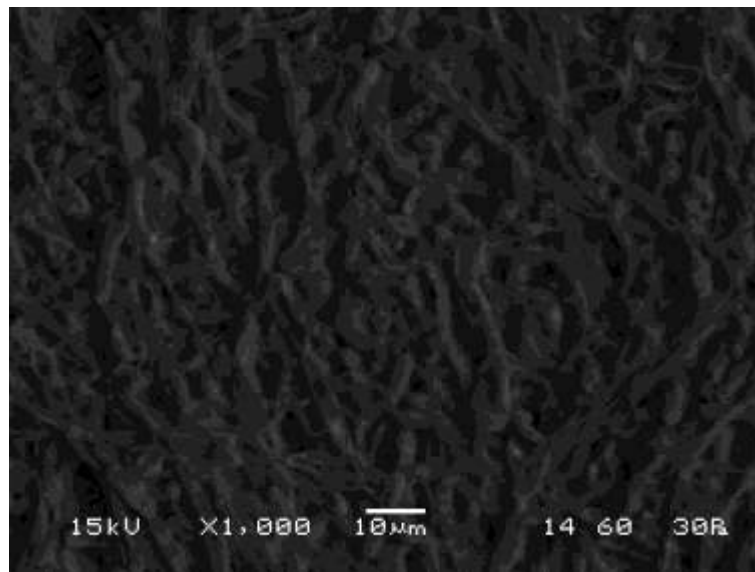
Στην περίπτωση της προσθήκης KCl 0,1 M, το σύνολο του παλλαδίου βρίσκεται με τη μορφή διαλυτού ανιόντος και είναι το μόνο που έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει με τη βιομάζα.

Επιπλέον, θα πρέπει να επισημάνουμε εδώ ότι στο τελικό διάλυμα ισορροπίας όπου προσδιορίζεται το παλλάδιο μετά το διαχωρισμό του από τη στερεή μικροβιακή βιομάζα, είναι πολύ πιθανόν να υπάρχουν και νανοσωματίδια παλλαδίου σε αιώρηση, τα οποία προσδιορίζονται ως διαλυτό παλλάδιο λόγω αδυναμίας αποχωρισμού τους από το διάλυμα. Ενδεχόμενα αν στο διάλυμα αυτό προσδιορίζαμε το παλλάδιο μετά από έναν καλύτερο διαχωρισμό π.χ. με υπερφυγοκέντριση, να είχαμε ορθότερη εικόνα για την ποσότητα των στερεών που σχηματίστηκαν.

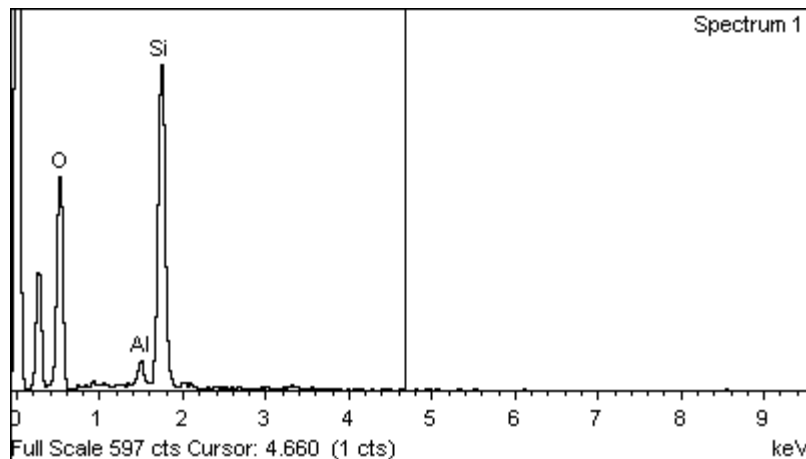
## 4.1.2 Φόρτιση μικροβιακή βιομάζας με παλλάδιο – Άμεσος προσδιορισμός

### 4.1.2.1 Αποτελέσματα SEM-EDS

Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 4.1) φαίνεται ένα δείγμα μικροβιακής βιομάζας αμέσως μετά το διαχωρισμό της από το διάλυμα ανάπτυξης, δηλαδή δείγμα το οποίο δεν έχει έρθει σε επαφή με διάλυμα μετάλλου. Είναι χαρακτηριστική η νηματοειδής μορφή της βιομάζας για το είδος του μύκητα. Από τα αποτελέσματα του EDS φαίνεται επίσης η στοιχειακή ανάλυση σε ορισμένη περιοχή του δείγματος της μικροβιακής βιομάζας η οποία επιβεβαιώνει την καθαρότητά της και την απουσία μετάλλου (Εικόνα 4.2).

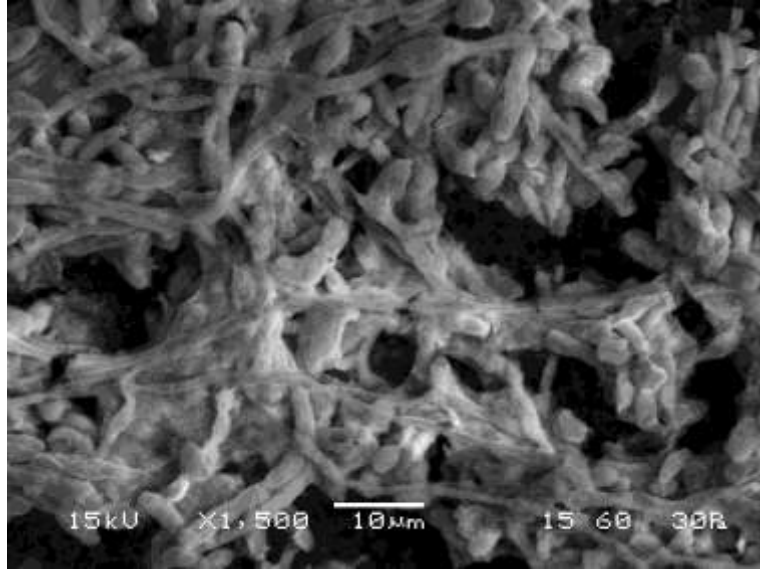


**Εικόνα 4.1:** Μικρογραφία του SEM που απεικονίζει τη μικροβιακή βιομάζα του *Fusarium oxysporum* πριν την επαφή της με διάλυμα μετάλλου, με χαρακτηριστική για το είδος του μύκητα νηματοειδή μορφή

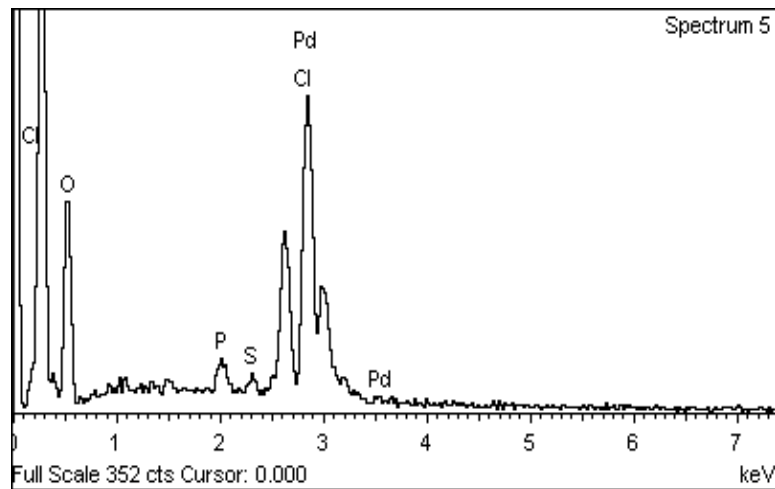


**Εικόνα 4.2: Το φάσμα της μικροβιακής βιομάζας που προέκυψε από τη στοιχειακή ανάλυση με το EDS, επιβεβαιώνει την απουσία μετάλλου σε αυτή**

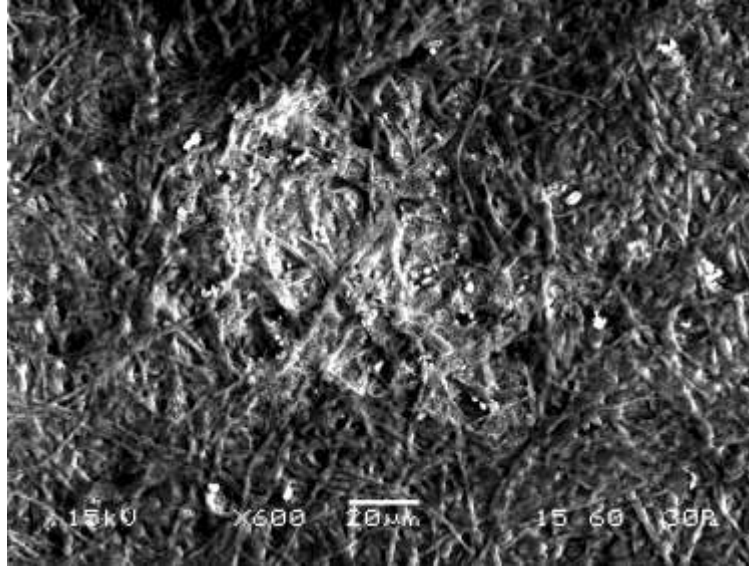
Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνονται τα δείγματα της μικροβιακής βιομάζας μετά από την επαφή τους με τα διαλύματα του παλλαδίου. Στις φωτογραφίες αυτές (Εικόνα 4.3, Εικόνα 4.5), η βιομάζα εμφανίζεται ανοιχτόχρωμη (θα λέγαμε περισσότερο λαμπερή) σε σχέση με την αρχική εικόνα της (Εικόνα 4.1). Όπως εξηγήσαμε και στην παράγραφο όπου περιγράφεται η λειτουργία του SEM, οι περιοχές στις οποίες έχουμε συμπαγέστερα-βαρύτερα υλικά εμφανίζονται ανοιχτόχρωμες, πράγμα που εξηγεί και τις διαφορές στο «χρώμα», δηλαδή πιο σκούρο-μουντό στην περίπτωση της ανέπαφης βιομάζας και αρκετά ανοιχτό-λαμπρότερο στην περίπτωση που η βιομάζα έχει συσσωρεύσει μέταλλο. Στα φάσματα που αντιστοιχούν στις φωτογραφίες είναι προφανής η παρουσία-συσσώρευση του παλλαδίου ενώ στο δεύτερο φάσμα φαίνεται και η παρουσία του καλίου καθώς αυτή αντιστοιχεί στο διάλυμα όπου έχει προστεθεί KCl σε συγκέντρωση 0,1 M (Εικόνα 4.4, Εικόνα 4.6).



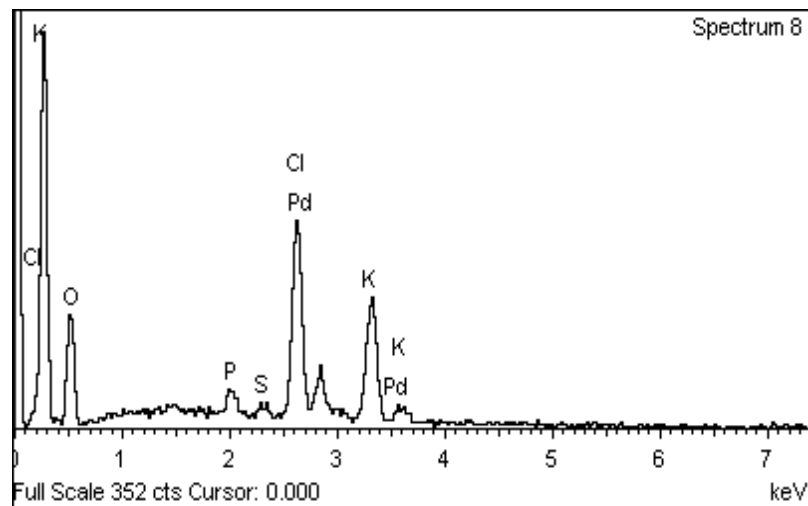
**Εικόνα 4.3:** Μικρογραφία SEM που απεικονίζει τη μικροβιακή βιομάζα του *Fusarium oxysporum* μετά την επαφή της με διάλυμα Pd. Οι φωτεινές περιοχές καταδεικνύουν την παρουσία συσσώρευσης μετάλλου



**Εικόνα 4.4:** Το φάσμα που προέκυψε από το EDS, δείχνει την ύπαρξη παλλαδίου στη μικροβιακή βιομάζα



**Εικόνα 4.5:** Μικρογραφία SEM της μικροβιακής βιομάζας, μετά την επαφή της με διάλυμα Pd + KCl, όπου φαίνεται ξεκάθαρα η ύπαρξη φωτεινής περιοχής στην οποία υπάρχει συσσώρευση παλλαδίου



**Εικόνα 4.6:** Η στοιχειακή ανάλυση του δείγματος της βιομάζας με τη μέθοδο του EDS δείχνει ξεκάθαρα την ύπαρξη παλλαδίου καθώς και την ύπαρξη καλίου λόγω της σύστασης του διαλύματος επαφής

Οι παραπάνω μικρογραφίες, δίνουν επίσης σαφείς ενδείξεις και για τα πιθανά μεγέθη των σωματιδίων του παλλαδίου. Έτσι για παράδειγμα, στην Εικόνα 4.3, όπου φαίνεται ότι η μεγέθυνση είναι 1500 φορές και επισημαίνεται η κλίμακα των 10  $\mu\text{m}$ , μπορούμε να αντιστοιχίσουμε σαφώς μικρότερα σωματίδια που υπάρχουν διάχυτα στη βιομάζα. Φαίνεται λοιπόν, ότι μιλάμε για σχηματισμούς σωματιδίων μεγεθών μικρότερων του 1  $\mu\text{m}$ . Βέβαια, θα ήταν επιθυμητό, να μπορούσαμε να παρατηρήσουμε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης το πραγματικό μέγεθος των σωματιδίων, πράγμα το οποίο δεν έγινε εφικτό στο διαθέσιμο χρονικό διάστημα.

## 4.2 Αποτελέσματα που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση *Fusarium oxysporum* με διαλυτά είδη ζirkονίου

### 4.2.1 Φόρτιση μικροβιακής βιομάζας με ζirkόνιο – Έμμεσος προσδιορισμός

Όπως συνέβη για το παλλάδιο, έτσι και για το ζirkόνιο η φόρτιση της βιομάζας σε μέταλλο (q), υπολογίστηκε έμμεσα από τα αποτελέσματα των προσδιορισμών των συγκεντρώσεων του διαλυτού ζirkονίου με ICP-OES πριν και μετά την επαφή και το διαχωρισμό της βιομάζας από το διάλυμα, δηλαδή μετά από επαφή 24 h, όπου θεωρούμε ότι έχει επέλθει ισορροπία και η φόρτιση είναι η μέγιστη δυνατή.

Με βάση την εξίσωση (4.1), για το ζirkόνιο προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

**Πίνακας 4.3: Φόρτιση βιομάζας σε μέταλλο των διαλυμάτων του Zr**

Διαλύματα Zr	V (l)	C <sub>i</sub> (mg/l)	C <sub>e</sub> (mg/l)	ΔC (mg/l)	W (g)	q (mg Zr/ g βιομάζας)
<b>K<sub>2</sub>ZrF<sub>6</sub></b> (1 <sup>η</sup> επανάληψη)	0,1	94	86,88	7,12	0,1	7,12
<b>K<sub>2</sub>ZrF<sub>6</sub></b> (2 <sup>η</sup> επανάληψη)	0,1	94	84,93	9,07	0,1	9,07
<b>ZrCl<sub>4</sub></b> (1 <sup>η</sup> επανάληψη)	0,1	86,7	74,57	12,13	0,1	12,13
<b>ZrCl<sub>4</sub></b> (2 <sup>η</sup> επανάληψη)	0,1	86,7	80,75	5,95	0,1	6,00

Να σημειωθεί εδώ ότι οι αρχικές τιμές pH για τα διαλύματα ήταν 4,185 για το K<sub>2</sub>ZrF<sub>6</sub> και 2,536 για το ZrCl<sub>4</sub>, ενώ οι τελικές τιμές pH ήταν 4,576 και 4,591 για τα διαλύματα K<sub>2</sub>ZrF<sub>6</sub> και 2,552 και 2,523 για τα διαλύματα ZrCl<sub>4</sub>.

Από τον Πίνακα 4.3, φαίνεται ότι η φόρτιση της βιομάζας σε ζirkόνιο είναι περίπου ίση με 10 mg μετάλλου/g βιομάζας και δεν διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των δύο χημικών ειδών του ζirkονίου που χρησιμοποιήθηκαν στα αρχικά διαλύματα.



Σε ό,τι αφορά την κατανομή των διαλυτών ειδών του ζirkονίου και εδώ όπως και στην περίπτωση του παλλαδίου έγινε εισαγωγή των αρχικών συγκεντρώσεων του ζirkονίου και των τιμών pH στο πρόγραμμα Visual MINTEQ ver. 3.0 και τα αποτελέσματα που πήραμε σχετικά με την κατανομή των διαλυτών ειδών ήταν τα παρακάτω:

**Πίνακας 4.4: Κατανομή διαλυτών ειδών Zr σε διαλύματα  $K_2ZrF_6$  και  $ZrCl_4$  με συγκεντρώσεις 94 mg/l και 86,7 mg/l και αντίστοιχες τιμές pH 4,185 και 2,536**

Διαλυτά είδη Zr	Διάλυμα $K_2ZrF_6$		Διάλυμα $ZrCl_4$	
	Συγκέντρωση (mg/l)	Συγκέντρωση %	Συγκέντρωση (mg/l)	Συγκέντρωση %
$Zr(OH)_4(aq)$	$3,38 \cdot 10^{-5}$	3,4	$3,38 \cdot 10^{-5}$	3,4
$Zr(OH)_5^-$	$1,59 \cdot 10^{-11}$	0,0	$2,32 \cdot 10^{-12}$	0,0
$Zr^{4+}$	$1,95 \cdot 10^{-11}$	0,0	$4,33 \cdot 10^{-8}$	0,0
$ZrOH^{3+}$	$4,51 \cdot 10^{-8}$	0,0	$1,45 \cdot 10^{-5}$	1,5
$ZrF^{3+}$	$2,31 \cdot 10^{-4}$	23,1	-	-
<b>Σύνολο</b>	$2,65 \cdot 10^{-4}$	26,5	$4,84 \cdot 10^{-5}$	4,8

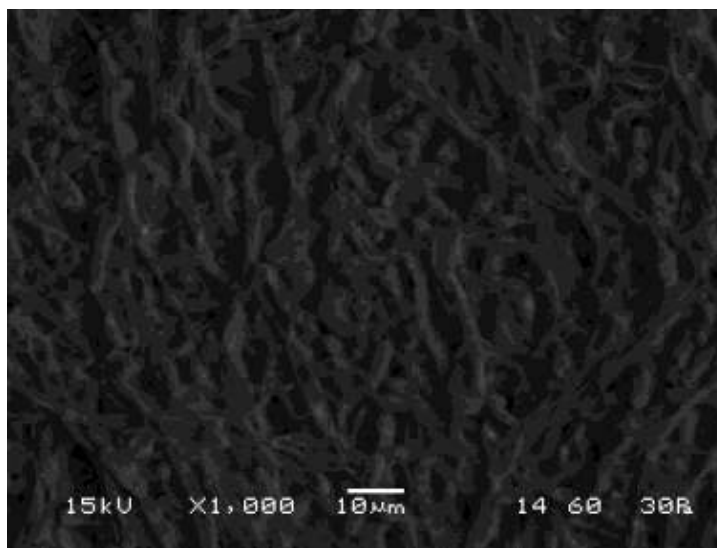
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα εξάγεται το συμπέρασμα ότι η κατανομή των διαλυτών ειδών που αντιστοιχούν στο  $K_2ZrF_6$  δίνει προϊόντα υδρόλυσης με υψηλή τάση καταβύθισης (73,5%) μέσω αρχικά του σχηματισμού  $Zr(OH)_4$  και τελικά την καταβύθιση του  $ZrO_2$ , ενώ το  $ZrCl_4$  δίνει επίσης προϊόντα υδρόλυσης με τάση για καταβύθιση κατά 95%, με κύριο είδος επίσης το  $Zr(OH)_4$ . Παρατηρεί κανείς επίσης, ότι στην περίπτωση του  $K_2ZrF_6$  η τάση καταβύθισης είναι μικρότερη από αυτή του  $ZrCl_4$ .

Θα πρέπει λοιπόν η παρουσία της μικροβιακής βιομάζας να ενισχύει την ήδη σημαντική τάση καταβύθισης για τα είδη του ζirkονίου. Επιπλέον, θα πρέπει να επισημάνουμε κι εδώ ότι η σχετικά χαμηλή φόρτιση της βιομάζας με ζirkόνιο δεν σημαίνει απαραίτητα ότι στο διάλυμα δεν υπάρχουν σε αιώρηση νανοσωματίδια τα οποία δεν μπόρεσαν να απομακρυνθούν από την υδατική φάση και παρέμειναν στο διάλυμα σε αιώρηση.

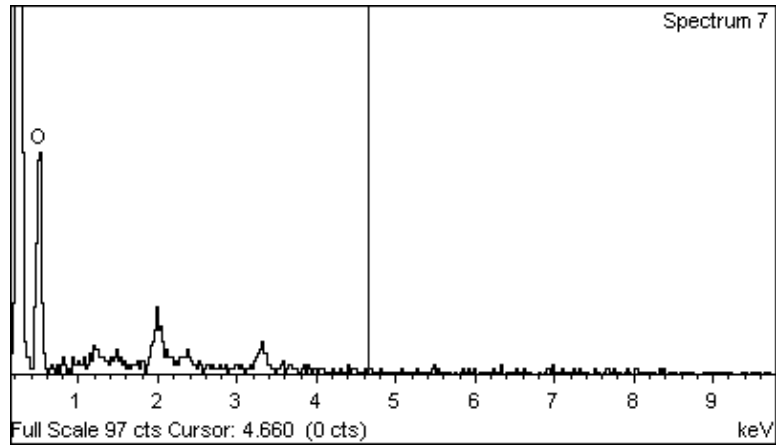
## 4.2.2 Φόρτιση μικροβιακής βιομάζας με ζirkόνιο-Άμεσος προσδιορισμός

### 4.2.2.1 Αποτελέσματα SEM-EDS

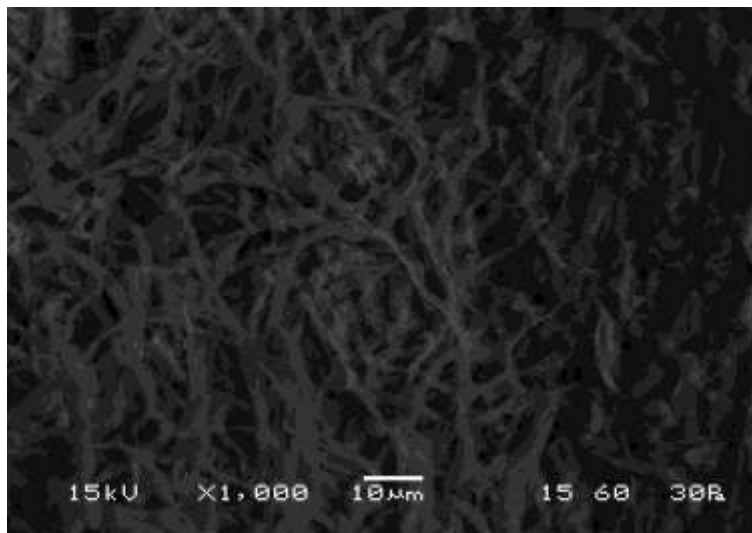
Στις εικόνες που ακολουθούν παρατίθενται μικρογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των δειγμάτων της βιομάζας του *Fusarium oxysporum* πριν την επαφή τους με τα διαλύματα του ζirkονίου καθώς μετά από αυτή. Επιπροσθέτως, παρατίθενται και τα αντίστοιχα φάσματα των περιοχών των δειγμάτων που παρατηρήθηκαν όπου αποτυπώνεται η παρουσία ζirkονίου στις μικρογραφίες που αντιστοιχούν στη μικροβιακή βιομάζα μετά την επαφή της με τα δύο διαλύματα του μετάλλου. Παρ' ό,τι στις μικρογραφίες δεν φαίνονται τόσο ξεκάθαρα όσο στο παλλάδιο οι φωτεινές περιοχές που να επιβεβαιώνουν την ύπαρξη σωματιδίων ζirkονίου, η στοιχειακή ανάλυση μέσω του EDS δείχνει την ύπαρξη ζirkονίου στη μικροβιακή βιομάζα.



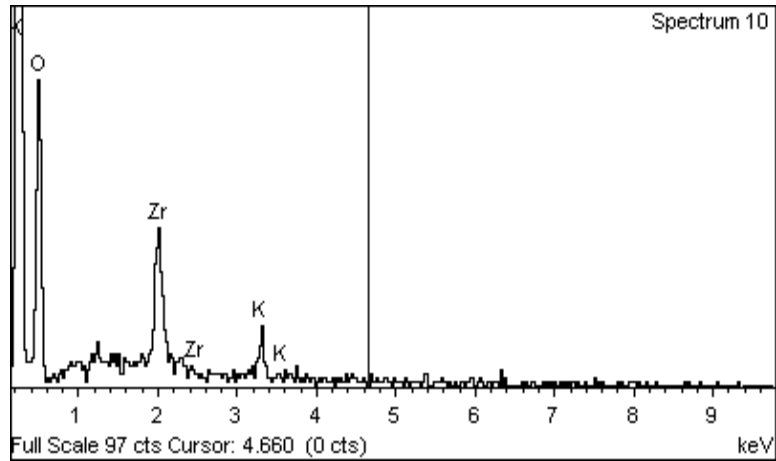
**Εικόνα 4.7:** Μικρογραφία SEM όπου απεικονίζεται η μικροβιακή βιομάζα του *Fusarium oxysporum* πριν την επαφή της με τα διαλύματα ζirkονίου



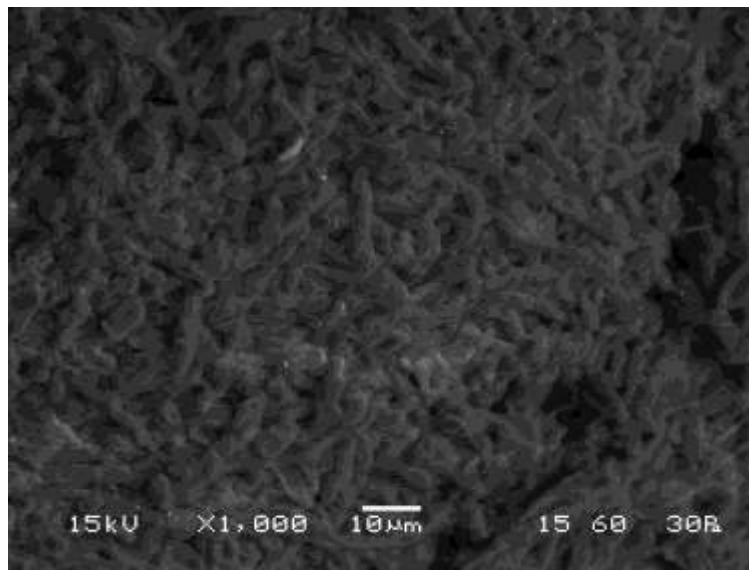
**Εικόνα 4.8:** Φάσμα στοιχειακής ανάλυσης EDS της βιομάζας πριν την επαφή, όπου φαίνεται η έλλειψη ζιρκονίου



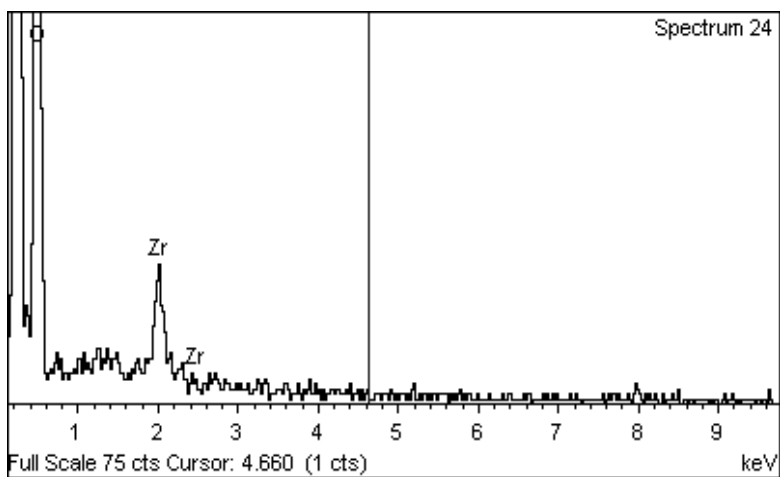
**Εικόνα 4.9:** Μικρογραφία SEM που απεικονίζει τη μικροβιακή βιομάζα μετά την επαφή της με διάλυμα  $K_2ZrF_6$ .



**Εικόνα 4.10:** Η στοιχειακή ανάλυση που προκύπτει από τη ανάλυση της βιομάζας με EDS μετά την επαφή με  $K_2ZrF_6$  καταδεικνύει την ύπαρξη ζιρκονίου στο διάλυμα καθώς και την ύπαρξη καλίου



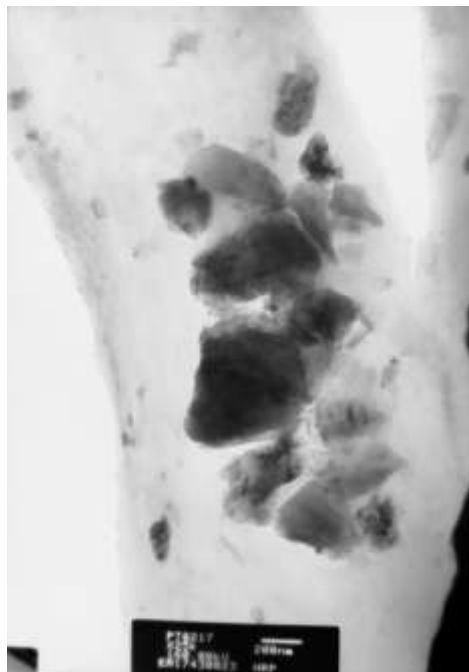
**Εικόνα 4.11:** Μικρογραφία SEM που απεικονίζει τη μικροβιακή βιομάζα του *Fusarium oxysporum* μετά την επαφή της με διάλυμα  $ZrCl_4$ .



**Εικόνα 4.12:** Το φάσμα που προέκυψε από τη στοιχειακή ανάλυση με το EDS δείχνει την παρουσία ζιρκονίου στη μικροβιακή βιομάζα μετά από την επαφή της με διάλυμα  $ZrCl_4$

#### 4.2.2.2 Αποτελέσματα TEM

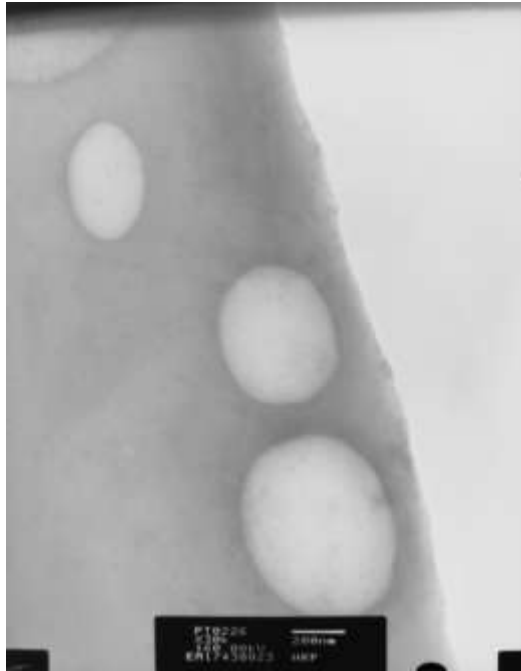
Στις εικόνες που ακολουθούν απεικονίζονται μικρογραφίες του μικροσκοπίου διέλευσης στις οποίες φαίνεται ξεκάθαρα η ύπαρξη στερεών σωματιδίων με μέγεθος νανομέτρων στη βιομάζα τα οποία είναι διακριτά, αλλά και σε συσσωματώματα. Έτσι, αν και μπορούμε να πούμε με σιγουριά ότι υπάρχουν στερεά νανοσωματίδια στο δείγμα της μικροβιακής βιομάζας, δεν μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα ως προς τη σύσταση των σωματιδίων αυτών καθ' ότι το μικροσκόπιο TEM της σχολής των Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών στο οποίο διεξήχθη η ανάλυση δεν διαθέτει ακόμα το σύστημα EDS, έτσι ώστε να μας επιτρέπεται η στοιχειακή ανάλυση των νανοσωματιδίων.



**Εικόνα 4.13:** Μικρογραφία TEM όπου φαίνεται ξεκάθαρα η ύπαρξη στερεών σωματιδίων στη μικροβιακή βιομάζα



**Εικόνα 4.14:** Μικρογραφία TEM της μικροβιακής βιομάζας *Fusarium oxysporum*, όπου απεικονίζονται στερεά σωματίδια διακριτά και σε συσσωματώματα μεγέθους νανομέτρων.



**Εικόνα 4.15: Μικρογραφία TEM της μικροβιακής βιομάζας όπου απεικονίζονται στερεά νανοσωματίδια σε μορφή που θυμίζει σπόρους**





## 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα διπλωματική, αποτέλεσε μια προκαταρκτική εργασία βασισμένη στα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα και σε προκαταρκτικά πειραματικά δεδομένα διερεύνησης της δυνατότητας παραγωγής νανοσωματιδίων από καθαρά διαλύματα διαλυτών ειδών μετάλλων ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους με μικροβιακή βιομάζα.

Η δυνατότητα του σχηματισμού μικροκρυσταλλικών και άμορφων στερεών φάσεων μεταλλικών ειδών μέσω της αλληλεπίδρασης διαλυτών ειδών μετάλλων με μικροβιακή βιομάζα, έχει ήδη διαπιστωθεί και παρουσιάζεται και σε πλήθος δημοσιευμένων εργασιών (σε πολλές περιπτώσεις πειραματικών αποτελεσμάτων) που αφορούν στη μελέτη μηχανισμών αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών με τα μέταλλα με στόχο την εφαρμογή τους στην ανάπτυξη τεχνολογίας επεξεργασίας υγρών βιομηχανικών αποβλήτων για την απαλλαγή τους από τα διαλυτά είδη των μετάλλων. Σε όλες αυτές τις εργασίες διαπιστώνεται ο σχηματισμός αδιάλυτων ειδών των μετάλλων στη στερεή φάση-μικροβιακή βιομάζα που, στις περισσότερες των περιπτώσεων, λαμβάνει χώρα εξωκυτταρικά. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης το οποίο αφορά διάφορα είδη βακτηρίων και μυκήτων, αξιοποιείται για την απομάκρυνση των μετάλλων από υγρά μεταλλουργικά-βιομηχανικά ρεύματα. Τα αδιάλυτα είδη των μετάλλων εμφανίζονται συνήθως σαν συσσωματώματα στο επίπεδο του κυττάρου, το οποίο ιδιαίτερα στην περίπτωση των βακτηρίων, έχει μέγεθος της τάξης του μικρομέτρου.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας και ιδιαίτερα της τελευταίας πενταετίας, εμφανίζεται στη βιβλιογραφία η δυνατότητα παραγωγής νανοσωματιδίων, τα οποία έχουν πολλές αξιόλογες εφαρμογές, με χρήση μικροβιακής βιομάζας ως εναλλακτικής στις υπάρχουσες τεχνολογίες η οποία είναι φιλική προς το περιβάλλον, κυρίως από την άποψη μη κατανάλωσης-σημαντικής εξοικονόμησης ενέργειας και υλικών. Είναι πολύ λογικό να σκεφτεί κανείς ότι οι μηχανισμοί σχηματισμού των στερεών φάσεων των μεταλλικών ειδών από τη μικροβιακή βιομάζα μέσω του μικροβιακού μεταβολισμού ή και παθητικά θα έχουν ομοιότητες με αυτούς που έχουν ήδη περιγραφεί. Επομένως, και στην περίπτωση αυτής της νέας περιοχής που θα μπορούσαμε να αποκαλέσουμε νανοβιοτεχνολογία, η ήδη υπάρχουσα γνώση μπορεί να αξιοποιηθεί αποτελεσματικά.

Το ενδιαφέρον στην παρούσα διπλωματική εργασία εστιάστηκε σε δύο μέταλλα το παλλάδιο και το ζirkόνιο, τα νανοσωματίδια των οποίων χρησιμοποιούνται σε πλήθος σημαντικών τεχνολογικών εφαρμογών. Η εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση που έγινε ανέδειξε την επιλογή ενός μύκητα, του *Fusarium oxysporum* που είναι πολύ γνωστός και κοινός για τις φυτοπαθολογικές του ιδιότητες. Η υλοποίηση του πειραματικού μέρους της διπλωματικής αυτής εργασίας, έγινε δυνατή χάρη στη δυνατότητα προμήθειας του καθαρού στελέχους του μύκητα από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση, μας οδήγησε επίσης στην επιλογή των αρχικών πειραματικών συνθηκών και ανέδειξε τις κυριότερες μεθόδους-τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των στερεών φάσεων των μεταλλικών ειδών. Έτσι, απαραίτητα «εργαλεία» για την διερεύνηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των στερεών φάσεων είναι τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια σάρωσης και διέλευσης που διατίθενται στη Σχολή μας καθώς και τα συστήματα στοιχειακής ανάλυσης των στερεών φάσεων EDS.

Μετά την ανάπτυξη της μικροβιακής βιομάζας με διάφορα θρεπτικά υποστρώματα, καταλήξαμε στην επιλογή του Czapek Dox ως θρεπτικού υποστρώματος διότι έχει το πλεονέκτημα να περιέχει όλα τα απαραίτητα για την ανάπτυξη συστατικά και να οδηγεί σε ικανοποιητική απόδοση βιομάζας. Η μορφολογία της βιομάζας πριν την επαφή της με τα διαλύματα τα βιομάζας παρατηρήθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και οι σχετικές πληροφορίες χρησίμευσαν ως αναφορά για σύγκριση με τα δείγματα της βιομάζας μετά την επαφή τους με τα διαλύματα των μετάλλων.

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα επαφής των διαλυτών ειδών των μετάλλων με τη βιομάζα επιλέγοντας τα διαλυτά είδη που συνιστώνται στη βιβλιογραφία τόσο για το παλλάδιο όσο και για το ζirkόνιο. Η γνώση της κατανομής των ειδών των μετάλλων στα υγρά διαλύματα είναι απαραίτητη προκειμένου να γνωρίζουμε την τάση υδρόλυσης και σχηματισμού στερεών μεταλλικών φάσεων. Αυτό έγινε δυνατό με την εισαγωγή της σύστασης των αρχικών διαλυμάτων σε κατάλληλο λογισμικό.

Μετά το διαχωρισμό της στερεάς από την υγρή φάση, πραγματοποιήθηκαν προσδιορισμοί και στις δύο φάσεις: με ICP-OES για την υγρή φάση και SEM-EDS και TEM για τις στερεές φάσεις.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν έδειξαν ότι έχουμε σχηματισμό στερεών φάσεων και για τα δύο μέταλλα που εξετάστηκαν.

Στην περίπτωση του παλλαδίου, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι σχηματίζονται στερεές φάσεις παλλαδίου που συγκρατούνται από τη μικροβιακή βιομάζα σε σημαντική ποσότητα η οποία κυμαίνεται από 20 έως 40 mg/g περίπου, ανάλογα με την αρχική σύσταση του διαλύματος του PdCl<sub>2</sub> την οποία επηρεάζει η συγκέντρωση του κοινού ιόντος Cl<sup>-</sup> (το οποίο προστίθεται υπό μορφή KCl στα αρχικά διαλύματα). Επίσης, είναι πιθανή η ύπαρξη νανοσωματιδίων και στην υγρή φάση πράγμα το οποίο δεν μπορέσαμε να το διαπιστώσουμε πειραματικά λόγω της δυσκολίας διαχωρισμού τους από την υδατική φάση. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι το παλλάδιο όπως και τα άλλα «μαλακά» μέταλλα, όπως π.χ. ο χρυσός και ο άργυρος, υπάρχει στη στερεή κατάσταση σε στοιχειακή μορφή μετά από ένα μηχανισμό που καταλήγει τελικά σε αναγωγή των ιοντικών ειδών τους. Δυστυχώς, δεν μπορέσαμε να παρατηρήσουμε στο TEM τα στερεά αυτά λόγω τεχνικών δυσκολιών.

Στην περίπτωση του ζirkονίου, τα πειραματικά μας αποτελέσματα έδειξαν ότι τα διαλύματα τόσο του εξαφθοριούχου ιόντος όσο και τα διαλύματα του τετραχλωριούχου ζirkονίου σε αρχικές συγκεντρώσεις 10<sup>-3</sup>M δίνουν όξινα διαλύματα στα οποία το κύριο είδος είναι το Zr(OH)<sub>4</sub>, με αξιόλογη τάση καταβύθισης. Οι στερεές φάσεις των ειδών του ζirkονίου δεν συγκρατούνται σε σημαντική ποσότητα από τη μικροβιακή βιομάζα όπως παρατηρήθηκε ξεκάθαρα στην περίπτωση του παλλαδίου. Από τα πειραματικά μας αποτελέσματα προέκυψε ότι η φόρτιση της μικροβιακής βιομάζας σε ζirkόνιο είναι της τάξης των 10 mg/g ενώ τα αποτελέσματα από το SEM-EDS επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ζirkονίου στη στερεή μικροβιακή βιομάζα. Η βιβλιογραφία αναφέρει ότι ο μύκητας *Fusarium oxysporum* παράγει εξωκυτταρικά υδρολάσες οι οποίες υδρολύουν τις πρόδρομες ενώσεις των οξειδίων, δηλαδή του Zr(OH)<sub>4</sub>, με αποτέλεσμα το σχηματισμό νανοσωματιδίων ZrO<sub>2</sub> σε υδατικό περιβάλλον και θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αυτό έχει παρατηρηθεί όχι μόνο για το ζirkόνιο αλλά και για το πυρίτιο και το τιτάνιο. Και εδώ θα πρέπει να επισημάνουμε ότι είναι πιθανή η ύπαρξη νανοσωματιδίων και στην υγρή φάση πράγμα το οποίο δεν μπορέσαμε να το διαπιστώσουμε πειραματικά λόγω της δυσκολίας διαχωρισμού τους από την υδατική φάση. Προκαταρκτικά αποτελέσματα από την παρατήρηση στο TEM φανερώνουν την ύπαρξη νανοσωματιδίων και συσσωματωμάτων τους. Δυστυχώς, δεν είναι ακόμη εφικτή η πραγματοποίηση χημικής ανάλυσης αυτών των σωματιδίων ώστε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη οξειδίου του ζirkονίου σ' αυτά.

Εν κατακλείδι, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έγινε μια προκαταρκτική διερεύνηση της δυνατότητας που έχει η μικροβιακή βιομάζα να παράγει νανοσωματίδια στερεών φάσεων μετάλλων μετά από την επαφή της με καθαρά διαλύματα συγκεκριμένων ειδών των μετάλλων. Ουσιαστικά στον περιορισμένο χρόνο μιας διπλωματικής έγινε συλλογή της απαραίτητης βιβλιογραφίας και προσπάθεια ανάπτυξης σχετικής πειραματικής μεθοδολογίας σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλλά και την προηγούμενη εμπειρία στο αντικείμενο. Τα αποτελέσματα αν και προκαταρκτικά κρίνονται πολύ ικανοποιητικά διότι είναι κατ' αρχήν σε συμφωνία και με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Οι προοπτικές που δημιουργούνται είναι πολλές, με πρώτες και κύριες την ανάπτυξη της πειραματικής μεθοδολογίας και τη χρήση και άλλων μέσων όπως π.χ. τη χρήση του TEM όταν αυτό θα έχει συμπληρωθεί με το EDS και θα είναι δυνατή η παρατήρηση των δειγμάτων μετά από τον εγκιβωτισμό τους και τη λήψη κατάλληλων τομών. Επειδή τα συστήματα που περιλαμβάνουν τη χρήση της μικροβιακής βιομάζας είναι πολύπλοκα και καθορίζονται από ομάδες παραμέτρων που αφορούν τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες των διαλυμάτων όσο και στις βιολογικές παραμέτρους, η πειραματική διαδικασία θα πρέπει να αναπτυχθεί προς όλες τις κατευθύνσεις για τον καθορισμό του ρόλου των παραμέτρων αυτών ώστε να επιλεγούν οι βέλτιστες τιμές παραμέτρων για κάθε εφαρμογή. Τελικοί κύριοι στόχοι είναι η διερεύνηση των μηχανισμών που οδηγούν στο σχηματισμό των νανοσωματιδίων καθώς και οι κύριοι παράμετροι που τους ελέγχουν προκειμένου να καθοριστούν σε τέτοιες τιμές ώστε να οδηγούν στην παραγωγή προϊόντων με προκαθορισμένα και επιθυμητά χαρακτηριστικά.

## 6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbruzzese, C., Duarte, M.Y., Paponetti, B. & Toro, L. (1990). **Biological and chemical processing of low-grade manganese ores.** *Minerals Engineering* 3: 307-318.
- Ahalya, N., Ramachandra, T.V. & Kanamadi, R.D. (2003). **Biosorption of heavy metals.** *Research Journal Of Chemistry And Environment* 7: 71-79.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Mandal, D., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R. & Sastry, M. (2002). **Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum*.** *Journal of the American Chemical Society* 124(41): 12108-12109.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M.I., Kumar, R. & Sastry, M. (2003). **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 28(4): 313-318.
- Ahmad, A., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R. & Sastry, M. (2005). **Extra-/Intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by an alkalotolerant fungus, *Trichothecium sp*.** *Journal of Biomedical Nanotechnology* 1(1): 47-53.
- Baes, C.F. & Mesmer, R.E. (1976). **The Hydrolysis of Cations.** New York: Wiley.
- Bansal, V., Rautaray, D., Ahmad, A. & Sastry, M. (2004). **Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*.** *Journal of Materials Chemistry* 14(22): 3303-3305.
- Bansal, V., Sanyal, A., Rautaray, D., Ahmad, A. & Sastry, M. (2005). **Bioleaching of sand by the fungus *Fusarium oxysporum* as a means of producing extracellular silica nanoparticles.** *Advanced Materials* 17(7): 889-892.
- Bansal, V., Bharde, A., Ramanathan, R. & Bhargava, S.K. (2012). **Inorganic materials using 'unusual' microorganisms.** *Advances in Colloid and Interface Science* 179-182: 150-68.
- Barkay, T. & Schaefer, J. (2001). **Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials.** *Current Opinion in Microbiology* 4(3): 318-323.
- Bazylinski, D.A., Frankel, R.B., Heywood, B.R., Mann, S., King, J.W., Donaghay, P.L. & Hanson, A.K. (1995). **Controlled biomineralization of magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) and greigite (Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>) in a magnetotactic bacterium.** *Appl Environ Microbiol* 61(9): 3232-3239.
- Beveridge, T.J., Makin, S.A., Kadurugamuwa, J.L. & Li, Z. (1997). **Interactions between biofilms and the environment.** *FEMS Microbiology Reviews* 20(3-4): 291-303.
- Bharde, A., Wani, A., Shouche, Y., Joy, P.A., Prasad, B.L.V. & Sastry, M. (2005). **Bacterial aerobic synthesis of nanocrystalline magnetite.** *Journal of the American Chemical Society* 127(26): 9326-9327.
- Bharde, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A., Sarkar, I., Yusuf, S.M., Sanyal, M. & Sastry, M. (2006). **Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi.** *Small* 2(1): 135-141.
- Booth, C. (1971). **The genus *Fusarium*.** Farnham Royal,: Commonwealth Agricultural Bureaux for the Commonwealth Mycological Institute.
- Brierley, C.L. (1990). **Metal immobilization using bacteria.** New York: McGraw-Hill.

- Brierley, J.A., Goyak, G.M. & Brierley, C.L. (1986). **Fundamental and Applied Biohydrometallurgy**. Amsterdam: Elsevier.
- Duncan, D.W. & Bruynesteyn, A. (1971). **Enhancing bacterial activity in a uranium mine**. *CIM Transactions* 74: 116-120.
- Duran, N., Marcato, P.D., Alves, O.L., Souza, G.I. & Esposito, E. (2005). **Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains**. *Journal of Nanobiotechnology* 3: 8.
- Duran, N., Marcato, P.D., Duran, M., Yadav, A., Gade, A. & Rai, M. (2011). **Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(5): 1609-1624.
- Ehrlich, H.L. (1971). **Bacteriology of manganese nodules. V. Effect of hydrostatic pressure on bacterial oxidation of Mn(II) and reduction of MnO<sub>2</sub>**. *Applied Microbiology* 21(2): 306-310.
- Faramarzi, M.A. & Sadighi, A. (2013). **Insights into biogenic and chemical production of inorganic nanomaterials and nanostructures**. *Advances in Colloid and Interface Science* 189-190: 1-20.
- Fayaz, A.M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P.T. & Venketesan, R. (2010). **Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6(1): 103-109.
- Ghiorse, W.C. & Ehrlich, H.L. (1974). **Effects of seawater cations and temperature on manganese dioxide-reductase activity in a marine *Bacillus***. *Applied Microbiology* 28(5): 785-792.
- Grady Jr, L.C.P. & Lim, H.C. (1980). **Biological Wastewater Treatment, Pollution Engineering and Technology**. New York: Marcel Dekker.
- Guo, H., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., Chen, J. & He, Y. (2010). **Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14**. *Bioresource Technology* 101(22): 8599-8605.
- Gusek, J.J. & Wilderman, T.R. (1995). **Pollution Prevention for Process Engineering: proceedings of Technical Solutions for Pollution Prevention in the Mining and Mineral Processing Industries : an Engineering Foundation conference, January 22-27, 1995, Palm Coast, Florida**. New York: Engineering Foundation.
- Hedin, R.S., Nairn, R.W. & Kleinmann, R.L.P. (1994). **Passive treatment of coal mine drainage**. Washington, DC: U.S. Dept. of the Interior, Bureau of Mines.
- Hennebel, T., Van Nevel, S., Verschuere, S., De Corte, S., De Gussemé, B., Cuvelier, C., Fitts, J.P., van der Lelie, D., Boon, N. & Verstraete, W. (2011). **Palladium nanoparticles produced by fermentatively cultivated bacteria as catalyst for diatrizoate removal with biogenic hydrogen**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 91(5): 1435-1445.
- Imai, K. (1978). **On the mechanism of bacterial leaching**. in: Murr, L.E., Torma, A.E. & Brierley, J.A. (Eds.), *Metallurgical Applications of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena*. New York: Academic Press, pp. 275-282.

- Ingle, A., Rai, M., Gade, A. & Bawaskar, M. (2009). **Fusarium solani: A novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles.** *Journal of Nanoparticle Research* 11(8): 2079-2085.
- Jha, A.K., Prasad, K. & Prasad, K. (2009). **A green low-cost biosynthesis of Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles.** *Biochemical Engineering Journal* 43(3): 303-306.
- Karavaiko, G.I. (1988). **Biogeochemistry of Metals : Manual.** Moscow: Centre for International Projects GKNT.
- Kousi, P., Remoudaki, E., Hatzikioseyan, A. & Tsezos, M. (2007). **A study of the operating parameters of a sulphate-reducing fixed-bed reactor for the treatment of metal-bearing wastewater.** *Advanced Materials Research* 20-21: 230-234.
- Kousi, P., Remoundaki, E., Hatzikioseyan, A., Battaglia-Brunet, F., Joulian, C., Kousteni, V. & Tsezos, M. (2011). **Metal precipitation in an ethanol-fed, fixed-bed sulphate-reducing bioreactor.** *Journal of Hazardous Materials* 189(3): 677-684.
- Kumar, S.A., Ansary, A.A., Ahmad, A. & Khan, M.I. (2007). **Extracellular biosynthesis of CdSe quantum dots by the fungus, *Fusarium oxysporum*.** *Journal of Biomedical Nanotechnology* 3(2): 190-194.
- Leeman-Labs (2012), **Profile Plus ICP-OES (**
- Lengke, M. & Southam, G. (2006). **Bioaccumulation of gold by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of gold(I)-thiosulfate complex.** *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70(14): 3646-3661.
- Leslie, J.F. & Summerell, B. (2006). **The *Fusarium* Laboratory Manual.** Blackwell Publishing.
- Lloyd, J.R. & Lovley, D.R. (2001). **Microbial detoxification of metals and radionuclides.** *Current Opinion in Biotechnology* 12(3): 248-253.
- Lovley, D.R. (1997). **Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments.** *FEMS Microbiology Reviews* 20(3-4): 305-313.
- Lovley, D.R. & Anderson, R.T. (2000a). **Influence of dissimilatory metal reduction on fate of organic and metal contaminants in the subsurface.** *Hydrogeology Journal* 8(1): 77-88.
- Lovley, D.R. & Coates, J.D. (2000b). **Novel forms of anaerobic respiration of environmental relevance.** *Current Opinion in Microbiology* 3(3): 252-256.
- Lundgren, D.G. & Silver, M. (1980). **Ore leaching by bacteria.** *Annual Review of Microbiology* 34: 263-283.
- Marchbank, A. (1987). **Update on uranium leaching at Denison Mines.** in: *Proceedings of the 4th Annual Meeting of BIOMINET*, R.G.L. McCready Editions: pp. 3-18.
- McCready, R.G.L., Wadden, D. & Marchbank, A. (1986). **Nutrient requirements for the in-place leaching of uranium by *Thiobacillus ferrooxidans*.** *Hydrometallurgy* 17(1): 61-71.
- Meach, J.A. & Shuttle, C. (2013), **Natural Born Killers: Bacteriophage and *Thiobacillus ferrooxidans* (**

- Mishra, A. & Malik, A. (2013). **Recent advances in microbial metal bioaccumulation.** *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43(11): 1162-1222.
- Mohanpuria, P., Rana, N.K. & Yadav, S.K. (2008). **Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications.** *Journal of Nanoparticle Research* 10(3): 507-517.
- Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramirez, J.T. & Yacaman, M.J. (2005). **The bactericidal effect of silver nanoparticles.** *Nanotechnology* 16(10): 2346-2353.
- Moukoulis, M., Topakas, E. & Christakopoulos, P. (2008). **Cloning, characterization and functional expression of an alkalitolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 79(2): 245-254.
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S.R., Khan, M.I., Ramani, R., Parischa, R., Ajayakumar, P.V., Alam, M., Sastry, M. & Kumar, R. (2001). **Bioreduction of AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> ions by the fungus *Verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed** *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 40(19): 3585-3588.
- Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Ahmad, A., Khan, M.I., Kumar, R. & Sastry, M. (2002). **Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*.** *ChemBioChem* 3(5): 461-463.
- Nair, B. & Pradeep, T. (2002). **Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains.** *Crystal Growth & Design* 2(4): 293-298.
- ORNL (2011), **Bacterial genome may hold answers to mercury mystery** (
- Pietro, A.D., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. & Roncero, M.I. (2003). ***Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus.** *Molecular Plant Pathology* 4(5): 315-325.
- Rawlings, D.E. (2002). **Heavy metal mining using microbes.** *Annual Review of Microbiology* 56: 65-91.
- Remoudaki, E., Tsezos, M. & Karakoussis, V. (1999). **Mechanism of palladium biosorption by microbial biomass. The effects of metal ionic speciation and solution co-ions.** in: Amils, R. & Ballester, A. (Eds.), *Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st century, Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS 1999*, Madrid, Spain. Elsevier: pp. 449-462.
- Remoudaki, E., Hatzikioseyan, A., Kousi, P. & Tsezos, M. (2003). **The mechanism of metals precipitation by biologically generated alkalinity in biofilm reactors.** *Water Research* 37(16): 3843-3854.
- Remoudaki, E., Kousi, P., Joulain, C., Battaglia-Brunet, F., Hatzikioseyan, A. & Tsezos, M. (2008). **Characterization, morphology and composition of biofilm and precipitates from a sulphate-reducing fixed-bed reactor.** *Journal of Hazardous Materials* 153(1-2): 514-524.



- Roh, Y., Lauf, R.J., McMillan, A.D., Zhang, C., Rawn, C.J., Bai, J. & Phelps, T.J. (2001). **Microbial synthesis and the characterization of metal-substituted magnetites.** *Solid State Communications* 118(10): 529-534.
- Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., Shahverdi, H.R. & Minaian, S. (2007). **Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.** *Nanomedicine* 3(2): 168-171.
- Syed, A. & Ahmad, A. (2012). **Extracellular biosynthesis of platinum nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 97: 27-31.
- Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., Kekos, D., Macris, B.J. & Christakopoulos, P. (2003). **Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures.** *Journal of Biotechnology* 102(1): 33-44.
- Topakas, E. & Christakopoulos, P. (2004). **Production and partial characterization of alkaline feruloyl esterases by *Fusarium oxysporum* during submerged batch cultivation.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(3): 245-250.
- Trimble, R.B. & Ehrlich, H.L. (1970). **Bacteriology of manganese nodules. IV. Induction of an  $MnO_2$  reductase system in a marine bacillus.** *Applied Microbiology* 19(6): 966-972.
- Tsezos, M., Remoudaki, E. & Angelatou, V. (1997). **Biosorption sites of selected metals using electron microscopy.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 118(3): 481-487.
- Tuovinen, O.H. & Kelly, D.P. (1974). **Use of micro-organisms for the recovery of metals.** *International Metallurgical Reviews* 19(1): 21-31.
- Tuovinen, O.H. (1986). **Acid leaching of uranium ore materials with microbial catalysis.** *Biotechnology & Bioengineering Symposium* 16: 65-72.
- UCR (2013). **Introduction to Energy Dispersive X-ray Spectrometry (EDS).** Riverside, California: Central Facility for Advanced Microscopy and Microanalysis, University of California, Riverside.
- USDA (2003), **Fusarium wilt (stem rot)** (
- USRN Houston, Texas: **Zirconium oxide Nanopowder/Nanoparticles (ZrO<sub>2</sub>, 99+%, 40 nm).** <http://www.us-nano.com/inc/sdetail/356>,
- Völker, C. & Wolf-Gladrow, D.A. (1999). **Physical limits on iron uptake mediated by siderophores or surface reductases.** *Marine Chemistry* 65(3-4): 227-244.
- Wadden, D. & Gallant, A. (1985). **The In-Place Leaching of Uranium at Denison Mines.** *Canadian Metallurgical Quarterly* 24(2): 127-134.
- Yarris, L. (2011), ***Desulfovibrio vulgaris* is an anaerobic sulfate-eating microbe that can also consume toxic and radioactive waste, making it a prime candidate for bioremediation of contaminated environments** (
- Zajic, J.E. (1969). **Microbial Biogeochemistry.** Academic Press.
- Αγατζίνη-Λεονάρδου, Σ. (2004). **Ειδικά Θέματα Υδρομεταλλουργίας.** Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

- Βογιατζής, Χ.Θ. (2010). **Διερεύνηση της χρήσης του υτρίου ως εσωτερικού προτύπου για την ανάλυση υδατικών διαλυμάτων υψηλού οργανικού φορτίου με την τεχνική ICP-AES**, Διδακτορική Διατριβή. Θεσσαλονίκη: Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 171 pp.
- Κόμνιτσας, Κ. & Ξενίδης, Α. (2001). **Όξινη Απορροή Μεταλλείων. Δημιουργία - επιπτώσεις και τεχνικές αντιμετώπισης σε μεταλλεία μικτών θειούχων**. *Τεχνικά Χρονικά Επιστημονική Έκδοση ΤΕΕ* V(1&2): 30-31.
- Κουή, Μ. & Λυμπεροπούλου, Θ. **Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με φασματομέτρο ενεργειακής διασποράς ακτίνων-Χ**. in: *Εργαστηριακές Ασκήσεις*. Αθήνα: Σχολή Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., pp. 14.
- Ρεμουντάκη, Ε. (2012). **Μηχανισμοί Κινητικότητας Ρύπων (Μετάλλων)**. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Τσακίριδης, Π., Περράκη, Μ. & Πέππας, Α. (2011). **Βασικές Οδηγίες Χρήσης Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Διερχόμενης Δέσμης JEOL 2100 HR**. Αθήνα: Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών, Ε.Μ.Π.
- Τσουκαλάς, Δ. (2013). **Εργαστηριακές Τεχνικές για Νανοϋλικά: Σημειώσεις Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας**. Αθήνα: Δ.Π.Μ.Σ. "Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις", Ε.Μ.Π.
- Φασσέας, Κ. (2013). **Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια**. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Τομέας Βιολογίας Φυτών, Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας.
- Χατζηθεοδωρίδης, Η., Περράκη, Μ., Τσακίριδης, Π. & Πέππας, Α. (2011). **Βασικές Οδηγίες Χρήσης Συσκευής Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης JEOL JSM 6380-LV**. Αθήνα: Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών, Ε.Μ.Π.
- Χατζηκιοσεγιάν, Α. (2008). **Μαθηματική προσομοίωση αλληλεπίδρασης μετάλλων-μικροοργανισμών σε βιολογικούς αντιδραστήρες πλανκτονικής και ακινητοποιημένης βιομάζας**, Διδακτορική Διατριβή. Αθήνα: Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 755 pp.