



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας

«ΒΙΟΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΕΔΑΦΩΝ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΜΟΝΙΟ»

Διπλωματική εργασία

Μονογυιού Σοφία

Τριμελής Επιτροπή

Δανάη Βενιέρη (Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα, Πολυτεχνείο Κρήτης)

Ανέστης Βλυσίδης (Επίκουρος καθηγητής, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο)

Ευδοκία Συρανίδου (Μεταδιδακτορική ερευνήτρια, Πολυτεχνείο Κρήτης)

Χανιά, 2024

<<Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ' ολοκλήρου η τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση , αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναγράφεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς τον συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης.>>

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Βενιέρη Δανάη, επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για την ανάγνωση και αξιολόγηση της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Βλυσίδη Ανέστη, μέλος της τριμελούς επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσε και τη βοήθεια που προσέφερε στην παρουσίαση των πειραμάτων κατά τη διάρκεια διεξαγωγής τους. Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Συρανίδου Ευδοκία για την πολύτιμη βοήθεια της σε οποιαδήποτε απορία στο εργαστήριο.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Καλογεράκη για τις πολύτιμες γνώσεις που μας μετέδιδε σε κάθε συνάντηση του εργαστηρίου και τη βοήθεια του σε κάθε προβληματισμό.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, χρωστάω στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Πετρούλα Σερίδου που ήταν πάντα πρόθυμη και διαθέσιμη να με καθοδηγήσει και να μου λύσει όλες μου τις απορίες κατά την εκπόνηση της εργασίας καθώς και για την άψογη συνεργασία.

Θέλω, επίσης, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης για τη άριστη συνεργασία και την υπέροχη παρέα μας.

Ένα ακόμα ευχαριστώ στους φίλους μου για την εμπύχωση τους σε όλες τις δύσκολες και πιεστικές στιγμές που έπρεπε να ανταπεξέλθω κατά τη διάρκεια των σπουδών καθώς και για τα πιο αξέχαστα φοιτητικά χρόνια.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στους γονείς και την αδερφή μου που με στηρίζουν εξ αποστάσεως όλα τα χρόνια φοίτησης μου προσφέροντας μου τη δυνατότητα να σπουδάσω σε πόλη μακριά από το σπίτι μου καθώς και για την ψυχολογική συμπαράσταση και υπομονή τους.

Περίληψη

Η ρύπανση του εδάφους από βαρέα μέταλλα αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα παγκοσμίως και για αυτό το λόγο η αποκατάσταση των ρυπασμένων εδαφών είναι μείζονος σημασίας. Οι τεχνολογίες της βιοεξυγίανσης και φυτοεξυγίανσης, εφαρμόζονται ευρέως λόγω της συμβολής τους στην αποκατάσταση εδαφών από τοξικούς ρύπους. Αυτές οι μέθοδοι, βασίζονται στη χρήση μικροοργανισμών και φυτών, με απώτερο σκοπό την απομάκρυνση ή μετατροπή των ρύπων σε λιγότερο τοξικές μορφές. Έχει αποδειχθεί, ότι μία ακόμα τεχνολογία, αυτή των νανοφυσολιδών οξυγόνου (O_2NBs), μπορεί να λειτουργήσει ευεργετικά σε συνδυασμό με τις παραπάνω μεθόδους λόγω της αποτελεσματικότερης παροχής οξυγόνου που επιδρά θετικά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών και των φυτών. Στόχος της διπλωματικής εργασίας, είναι η απορρύπανση εδαφών ρυπασμένων με αντιμόνιο, με τις μεθόδους βιοεξυγίανσης και φυτοεξυγίανσης υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

Τα εξεταζόμενα εδάφη στο πείραμα της βιοεξυγίανσης, προέρχονται από τρία διαφορετικά πεδία βολής στην Ελβετία με τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιμονίου (χαμηλή, μεσαία και υψηλή). Τα συγκεκριμένα εδάφη περιέχουν και υψηλές συγκεντρώσεις σιδήρου και μαγγανίου. Εκτελέστηκαν προκαταρκτικά πειράματα για το κάθε χώμα, με και χωρίς την παρουσία βακτηρίων, και με και χωρίς τη χρήση νανοφυσολιδών οξυγόνου, ενώ με τη χρήση βιοαντιδραστήρα μελετήθηκε μόνο το χώμα με την υψηλότερη συγκέντρωση αντιμονίου το οποίο επιλέχθηκε λόγω της αποτελεσματικότερης απομάκρυνσης του αντιμονίου στα προκαταρκτικά πειράματα. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι ο εμβολιασμός με βακτήρια είχε σημαντική επίδραση στην αποκατάσταση του εδάφους καθώς βρέθηκε ότι κινητοποιήθηκε περίπου το 75% του αρχικού αντιμονίου. Οι νανοφυσολίδες οξυγόνου βρέθηκαν ευεργετικές στις περιπτώσεις απουσίας βακτηρίων με το 66,4% του ρύπου να κινητοποιείται. Οι συγκεντρώσεις σιδήρου δεν επηρεάστηκαν σημαντικά, καθώς τα ποσοστά υπολειπόμενου σιδήρου στην υδατική φάση ήταν υψηλότερα στα πειράματα βιοαύξησης. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις μαγγανίου, υπολογίστηκαν ελαφρώς χαμηλότερες κατά τον εμβολιασμό βακτηρίων συνδυαστικά

με τη χρήση των νανοφυσαλίδων οξυγόνου. Τα αποτελέσματα του βιοαντιδραστήρα δεν έδειξαν μεγάλη κινητοποίηση του ρύπου συγκριτικά με τις φλάσκες με το ποσοστό να φτάνει μόνο το 26% στην υδατική φάση.

Στη δεύτερη πειραματική φάση της φυτοεξυγίανσης, χρησιμοποιήθηκε το φυτό πικροδάφνη *Nerium Oleander*. Το χώμα που επιλέχθηκε για αποκατάσταση, συλλέχθηκε από την περιοχή Καμπάνι (Χανιά), και συγκεκριμένα από πεδίο βολής και εμβολιάστηκε με συγκέντρωση αντιμονίου 50 ppm καθώς δεν ανιχνεύτηκε, αρχικώς, επαρκής συγκέντρωση αντιμονίου. Η τεχνολογία των νανοφυσαλίδων χρησιμοποιήθηκε και στο πείραμα της φυτοεξυγίανσης για την μελέτη επίδρασης στην ανάπτυξη των φυτών και επακολούθως στην απομάκρυνση του αντιμονίου. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης οργανικών οξέων στο χώμα κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τα πειραματικά αποτελέσματα από τις αναλύσεις των φυτών, έδειξαν ότι η προσθήκη οργανικών οξέων σε υψηλή συγκέντρωση, έχει σημαντική επίδραση στην κινητοποίηση του ρύπου από το έδαφος στο φυτό ενώ η ταυτόχρονη άρδευση με νανοφυσαλίδες οξυγόνου αυξάνει επιπλέον το ποσοστό βιοσυσσώρευσης στους φυτικούς ιστούς. Συμπερασματικά, η χρήση της *N. oleander* με την εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών στο έδαφος καθιστά το συγκεκριμένο φυτό κατάλληλο για αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών.

Abstract

Heavy metal soil pollution is one of the most important problems worldwide and therefore the remediation of contaminated soils is of major importance. The technologies of bioremediation and phytoremediation are widely applied due to their contribution to the remediation of soils from toxic pollutants. These methods are based on the use of microorganisms and plants, aiming at removing or converting the contaminants into less toxic forms. It has been shown that another technology, oxygen nanobubbles (O_2NBs), can work beneficially in combination with the above methods due to a more efficient supply of oxygen which has a positive effect on the growth of microorganisms and plants. The aim of this thesis is to remove the antimony from antimony-contaminated soils by the methods of bioremediation and phytoremediation under controlled conditions.

The soils tested in the bioremediation experiment collected from three different shooting ranges in Switzerland with three different antimony concentrations (low, medium and high). These soils also contain high concentrations of iron and manganese. Preliminary experiments were performed for each soil, with and without the presence of bacteria, and with and without the use of oxygen nanobubbles, while scaling-up to a bioreactor was performed only for the soil with the highest antimony concentration since the most effective removal of antimony was observed in this soil during the preliminary experiments. The experimental results showed that microbial inoculation had a significant effect on soil remediation as it was found that about 75% of the initial antimony was mobilized. Oxygen nanobubbles were found beneficial in the absence of bacteria with 66.4% of the contaminant mobilized. Iron concentrations were not significantly affected as the residual percentages in the aqueous phase were higher in the bioaugmentation experiments. Regarding manganese concentrations, were calculated slightly lower when inoculating bacteria in combination with the use of oxygen nanobubbles. The results of the bioreactor did not show much mobilization of the pollutant compared to the flasks with the percentage reaching only 26% in the aqueous phase.

In the second experimental phase of phytoremediation, the plant *Nerium oleander* was used. The soil was collected from the area of Kampani (Chania), specifically from a shooting range and inoculated with a concentration of 50 ppm antimony, as insufficient antimony concentration was initially detected. The nanobubble technology was also used in the phytoremediation experiment to study the effect on plant growth and subsequently on antimony removal. In addition, low and high concentration of organic acids were added to the soil during the experiment. The experimental results from the plant analyses showed that the addition of organic acids at high concentration has a significant effect on the mobilization of the contaminant from the soil to the plant, while simultaneous irrigation with oxygen nanobubbles further increases the bioaccumulation rate in plant tissues. In conclusion, the use of *N. oleander* with the application of appropriate soil amendments makes this plant suitable for remediation of contaminated soils.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 2. Θεωρητικό υπόβαθρο	3
2.1 Αντιμόνιο	3
2.1.1 Ιδιότητες αντιμονίου	3
2.1.2 Μορφές αντιμονίου	4
2.1.3 Πηγές αντιμονίου	5
2.2 Τοξικότητα και κινητικότητα αντιμονίου	5
2.3 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία	6
2.4 Αντιμόνιο στο έδαφος.....	7
2.5 Οξειδωτικά βακτήρια για βιοαποδόμηση αντιμονίου	7
2.6 Τεχνικές απομάκρυνσης αντιμονίου	8
2.6.1 Βιοεξυγίανση.....	8
2.6.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοεξυγίανσης	10
2.6.3 Βιοαντιδραστήρας	10
2.6.4 Φυτοεξυγίανση	11
2.6.5 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα φυτοεξυγίανσης	13
2.6.6 Τεχνολογία των νανοφυσαλίδων	14
Κεφάλαιο 3. Πειραματικός Μέρος.....	15
3.1 Υλικά και Μέθοδοι	15

3.1.1. Εξεταζόμενα εδάφη	15
3.1.2 Πικροδάφνη <i>Nerium oleander</i>	16
3.1.3 Ανάλυση ICP-MS	16
3.1.4 Κυτταρομετρία ροής	17
3.1.5 Κοινότητα βακτηρίων	18
3.1.6 Προσδιορισμός DO, pH, ORP	19
3.1.7 Οργανικά οξέα	19
3.1.8 Ανάδευση χώματος με αντιμόνιο	20
3.1.9 Παραγωγή νανοφυσαλίδων οξυγόνου	20
3.2 Πειραματική διαδικασία	21
3.2.1 Πειραματική φάση Ι- Βιοεξυγίανση	21
3.2.1.1 Βιοαντιδραστήρας	24
3.2.2 Πειραματική φάση ΙΙ- Φυτοεξυγίανση	24
Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα	30
4.1 Πειραματική φάση Ι- Βιοεξυγίανση	30
4.1.2 Βιοαντιδραστήρας	40
4.2 Πειραματική φάση ΙΙ- Φυτοεξυγίανση	45
Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα	57
Βιβλιογραφία	59

Εικόνες

Εικόνα 1. Αντιμονίτης	3
Εικόνα 2. Πειραματική διάταξη βιοαντιδραστήρα	11
Εικόνα 3. Διεργασίες απομάκρυνσης των ρύπων μέσω της φυτοεξυγίανσης.....	13
Εικόνα 4. Κυτταρόμετρο Cytoflex.....	18
Εικόνα 5. Πολύμετρο Hach HQ40D.....	19
Εικόνα 6. Η μεθοδολογία της τεχνικής ανάδευσης.....	20
Εικόνα 7. Προκαταρκτικά πειράματα βιοεξυγίανσης	21
Εικόνα 8. Πειραματική διαδικασία των προκαταρκτικών πειραμάτων	232 ₂
Εικόνα 9. Πειραματική διαδικασία της φυτοεξυγίανσης	25
Εικόνα 10. Μέρος της πειραματικής διαδικασίας της φυτοεξυγίανσης.....	26
Εικόνα 11. Μέρος της πειραματικής διαδικασίας την φυτοεξυγίανσης.....	28
Εικόνα 12. Χώνευση των φυτών.....	29

Πίνακες

Πίνακας 1. Ιδιότητες αντιμονίου	4
Πίνακας 2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης	10
Πίνακας 3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της φυτοεξυγίανσης	13
Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις μαγγανίου, σιδήρου και αντιμονίου στα χώματα της βιοεξυγίανσης.....	15
Πίνακας 5. Φυσικοχημικές ιδιότητες του χώματος της φυτοεξυγίανσης.....	16

Πίνακας 6. Σύσταση θρεπτικών CDM-A & LB.....	18
Πίνακας 7. Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες (A, B & C).	33
Πίνακας 8. pH σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες (A, B & C).	34
Πίνακας 9. Δυναμικό οξειδοαναγωγής σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες (A, B & C).	35
Πίνακας 10. Ποσοστό υπολειπόμενων μετάλλων μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe) και αντιμονίου (Sb) στο έδαφος A μετά το πέρας του πειράματος στις φλάσκες.	36
Πίνακας 11. Ποσοστό υπολειπόμενων μετάλλων μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe) και αντιμονίου (Sb) στο έδαφος B μετά το πέρας του πειράματος στις φλάσκες.	37
Πίνακας 12. Ποσοστό υπολειπόμενων μετάλλων μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe) και αντιμονίου (Sb) στο έδαφος C μετά το πέρας του πειράματος.	38
Πίνακας 13. Υπολειπόμενα ποσοστά αντιμονίου στο έδαφος A πριν και μετά την εφαρμογή οργανικών οξέων στον βιοαντιδραστήρα.	44
Πίνακας 14. Μετρήσεις pH πριν και μετά το πείραμα για όλες τις ομάδες.....	45
Πίνακας 15. Συντελεστής βιοσυσσώρευσης Sb (BCF) και παράγοντας μετατόπισης (TF) για όλες τις ομάδες.	54

Διαγράμματα

- Διάγραμμα 1.** Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στη φλάσκα με τις νανοφυσαλίδες οξυγόνου με και χωρίς βιοαύξηση για το έδαφος Α. 31
- Διάγραμμα 2.** Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στη φλάσκα με τις νανοφυσαλίδες οξυγόνου με και χωρίς βιοαύξηση για το έδαφος Β. 32
- Διάγραμμα 3.** Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στη φλάσκα με τις νανοφυσαλίδες οξυγόνου με και χωρίς βιοαύξηση για το έδαφος C. 32
- Διάγραμμα 4.** Βακτηριακή συγκέντρωση σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες για το έδαφος Α. 39
- Διάγραμμα 5.** Βακτηριακή συγκέντρωση σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες για το έδαφος Β. 39
- Διάγραμμα 6.** Βακτηριακή συγκέντρωση σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες για το έδαφος C. 40
- Διάγραμμα 7.** Τελική μάζα μαγγανίου στην υδατική φάση στο πείραμα του εμβολιασμού με βακτήρια του εδάφους Α σε συνδυασμό με νανοφυσαλίδες οξυγόνου..... 41
- Διάγραμμα 8.** Τελική μάζα σιδήρου στην υδατική φάση στο πείραμα του εμβολιασμού με βακτήρια του εδάφους Α σε συνδυασμό με νανοφυσαλίδες οξυγόνου..... 41
- Διάγραμμα 9.** Τελική μάζα αντιμονίου στην υδατική φάση στο πείραμα με του εμβολιασμού με βακτήρια του εδάφους Α σε συνδυασμό με νανοφυσαλίδες οξυγόνου..... 42
- Διάγραμμα 10.** Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στην πειραματική επεξεργασία του εδάφους Α με εμβολιασμό με βακτήρια και προσθήκη νανοφυσαλίδων οξυγόνου. 43

Διάγραμμα 11. pH στην πειραματική επεξεργασία του εδάφους Α με βακτηριακό εμβολισμό και προσθήκη νανοφυσαλίδων οξυγόνου.	43
Διάγραμμα 12. Δυναμικό οξειδοαναγωγής στην πειραματική επεξεργασία του εδάφους Α με εμβολιασμό με βακτήρια και προσθήκη νανοφυσαλίδων οξυγόνου.	44
Διάγραμμα 13. Συγκέντρωση βακτηρίων στον βιοαντιδραστήρα.	45
Διάγραμμα 14. Περιεκτικότητα πρωτεΐνης σε ρίζα για όλες τις ομάδες.	47
Διάγραμμα 15. Περιεκτικότητα πρωτεΐνης σε βλαστούς για όλες τις ομάδες.	48
Διάγραμμα 16. Απώλεια βάρους στο τέλος του πειράματος για όλες τις ομάδες ...	49
Διάγραμμα 17. Ποσοστό περιεκτικότητας σε νερό στο τέλος του πειράματος για όλες τις ομάδες	49
Διάγραμμα 18. Περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη (α,β και ολική) στους φυτικούς ιστούς για όλες τις ομάδες στο τέλος του πειράματος.	50
Διάγραμμα 19. Δραστηριότητα της ειδικής υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης σε φύλλα για όλες τις ομάδες.	51
Διάγραμμα 20. Δραστηριότητα της ειδικής υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης σε ρίζα για όλες τις ομάδες.	52
Διάγραμμα 21. Δραστηριότητα της καταλάσης στις ρίζες για όλες τις ομάδες.....	52
Διάγραμμα 22. Συσσώρευση αντιμονίου σε ρίζες και φύλλα για όλες τις ομάδες. .	53
Διάγραμμα 23. Συγκέντρωση σιδήρου (Fe) στους φυτικούς ιστούς.	55
Διάγραμμα 24. Συγκέντρωση μαγνησίου (Mg) στους φυτικούς ιστούς.....	55
Διάγραμμα 25. Συγκέντρωση μαγγανίου (Mn) στους φυτικούς ιστούς.....	56

Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή

Στις μέρες μας, η έντονη ανθρώπινη δραστηριότητα έχει προκαλέσει μεταβολές στα φυσικά χαρακτηριστικά του εδάφους, του αέρα και των υδάτων. Η ανησυχία εντείνεται λόγω του αντίκτυπου που έχει αυτή η απειλή του περιβάλλοντος στην ανθρώπινη υγεία.

Το αντιμόνιο είναι μεταλλοειδές το οποίο ανήκει στην 15^η ομάδα του περιοδικού πίνακα και έχει αναγνωριστεί ως ένας ρύπος ο οποίος μπορεί να προκαλέσει οξέα περιβαλλοντικά ζητήματα αφού έχει βρεθεί να απελευθερώνεται σε εδάφη και ύδατα από φυσικές διεργασίες και κυρίως από ανθρώπινες δραστηριότητες όπως η εξόρυξη, η καύση άνθρακα και η σκοποβολή. Εκτός από τον περιβαλλοντικό κίνδυνο, το αντιμόνιο θεωρείται επικίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία καθώς είναι καρκινογόνο εξαιτίας της έντονης τοξικότητάς του. Η ρύπανση από αντιμόνιο αυξάνεται ταχύτατα λόγω της εκτεταμένης χρήσης του κυρίως σε ασιατικές χώρες και ειδικότερα στην Κίνα όπου θεωρείται ο κύριος παραγωγός.

Η συγκέντρωση του αντιμονίου στο φλοιό της γης είναι περίπου 0,2 έως 0,3 mg/kg και υπάρχει σε τέσσερις καταστάσεις οξείδωσης. Ωστόσο, συναντάται κυρίως με την τρισθενή Sb (III) και πεντασθενή Sb(V) μορφή του, ενώ έχει βρεθεί πως οι ενώσεις του πρώτου είναι δέκα φορές πιο τοξικές από του δεύτερου. Πιο ειδικά, στα σκοπευτήρια η κύρια μορφή του είναι η πεντασθενής λόγω της γρήγορης οξείδωσης της τρισθενούς, ενώ στις εξορύξεις ανιχνεύεται ως σουλφίδιο αντιμονίτη (Sb_2S_3).

Η απομάκρυνση του ρύπου μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους εξυγίανσης του εδάφους όπως η σταθεροποίηση του εδάφους μέσω ακινητοποίησης του αντιμονίου, η απομόνωση, η μείωση τοξικότητας, η πήξη, η προσρόφηση και η ηλεκτροχημική μέθοδος. Ωστόσο, κάποιες τεχνικές από αυτές είναι είτε οικονομικά ασύμφορες, είτε μερικώς αποτελεσματικές είτε εξαιτίας της χρήσης χημικών και υψηλής κατανάλωσης ενέργειας ενέχει ο κίνδυνος δευτερογενούς ρύπανσης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, είναι η απομάκρυνση του ρύπου μέσω των τεχνολογιών της βιοεξυγίανσης και της φυτοεξυγίανσης. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα φυτά και μικροοργανισμοί είναι ικανά να απορροφήσουν ρύπους από

το έδαφος. Ειδικότερα, τα βακτήρια έχουν φανεί αποτελεσματικά στην αποδόμηση ρύπων, όπως το αντιμόνιο, σε λιγότερο τοξικές μορφές αλλά και στην πλήρη απομάκρυνση τους από το έδαφος. Επίσης, τα φυτά έχουν την ικανότητα να μετατοπίζουν τον ρύπο από τη ρίζα στους βλαστούς τα καθιστά μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική απομάκρυνσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι μπορούν να συσσωρεύσουν τόσο τρισθενές όσο και πεντασθενές αντιμόνιο ωστόσο τείνουν να απορροφούν περισσότερο το τρισθενές.

Κεφάλαιο 2. Θεωρητικό υπόβαθρο

2.1 Αντιμόνιο

Το αντιμόνιο (Sb) είναι ένα μεταλλοειδές το οποίο ανήκει στην ομάδα 15 του περιοδικού πίνακα και υπάρχει σε τέσσερις κύριες καταστάσεις οξείδωσης (-III,0,III και V). Χαρακτηρίζεται ως ένα ψαθυρό στερεό, αργυρώδους γκρίζου χρώματος και τριγωνικού κρυσταλλικού συστήματος (Εικόνα 1) [1]. Πρόκειται για στοιχείο σταθερό στον αέρα που δεν προσβάλλεται από αραιά οξέα και βάσεις. Η ανίχνευση του καθίσταται δύσκολη αφού είναι σχεδόν άγευστο και άοσμο.



Εικόνα 1. Αντιμονίτης

Είναι ένα χημικό στοιχείο γνωστό από την αρχαιότητα με πολλαπλές χρήσεις από τον άνθρωπο. Η ελληνική του ονομασία προέρχεται από τις λέξεις «αντί» + «μόνος», επειδή βρισκόταν πάντα με άλλα στοιχεία όπως το αρσενικό. Ωστόσο, ακόμα μία εξήγηση είναι η προέλευση από την εμφάνιση του στιμπνίτη στα λατινικά «stibium» εξού και ο συμβολισμός του [2]. Κατά τους αρχαίους χρόνους, το αντιμόνιο φέρεται να είχε χρησιμοποιηθεί σε φάρμακα και καλλυντικά ενώ αργότερα από αλχημιστές ως ισχυρό εμετικό με τη μορφή SbOCl .

2.1.1 Ιδιότητες αντιμονίου

Οι πιο σημαντικές ιδιότητες του αντιμονίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1[3].

Πίνακας 1. Ιδιότητες αντιμονίου

Ηλεκτρονιακή δομή	[Kr]4d ¹⁰ 5s ² 5p ³
Ατομικό βάρος	121,75
Ειδικό βάρος	6,69 g/cm ³
Ηλεκτραρνητικότητα Pauli	1,90
Θερμοκρασία βρασμού	1635°C
Θερμοκρασία τήξης	631°C
Ενθαλπία τήξης	19,79 kJ/mol
Ενθαλπία εξάτμισης	193,43 kJ/mol
Θερμοχωρητικότητα	25,23 J/mol*K (25°C)

Το αντιμόνιο παρουσιάζει παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά με το χημικό στοιχείο αρσενικό. Ωστόσο, αυτό που το διακρίνει είναι η ικανότητα του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με τα τρυγικά ιόντα. Η συγκέντρωση στο φυσικό περιβάλλον είναι μόνο 0,2 mg/kg και η μέγιστη επιτρεπόμενη σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) ορίζεται ως 36 mg/kg [4].

2.1.2 Μορφές αντιμονίου

Το συγκεκριμένο χημικό στοιχείο, υπάρχει με πολλές αλλοτροπικές μορφές αλλά δε βρίσκεται σχεδόν ποτέ σε ελεύθερη μεταλλική μορφή. Τα κυρίαρχα είδη στο περιβάλλον είναι το τρισθενές αντιμόνιο Sb(III) και το πεντασθενές Sb(V) με το πρώτο να είναι δέκα φορές τοξικότερο από το δεύτερο. Υπό όξινες συνθήκες, συναντώνται κυρίως οξυανιόντα Sb(V) ενώ υπό ανοξικές πρωταγωνιστούν οι τρισθενείς μορφές.

Η πιο συνήθης μορφή του αντιμονίου στα ορυκτά, είναι ο αντιμονίτης Sb₂S₃. Ωστόσο, αποτελεί συστατικό διαφόρων μεταλλευμάτων όπως ο κερμεσίτης (2Sb₂S₃·Sb₂O₃), ο βαλεντινίτης (Sb₂O₃), ο κερβανίτης (Sb₂O₄) ενώ σχηματίζει και άλλα θειούχα ορυκτά

όπως ο τετραεδρίτης ($\text{Cu}_{12}\text{Sb}_4\text{S}_{13}$) και ο βουλανζερίτης ($\text{Pb}_5\text{Sb}_4\text{S}_{11}$). Με τη μεταλλική μορφή του χρησιμοποιείται ως αντισκωριακό σε πυρομαχικά και σε μπαταρίες μολύβδου οξέος. Επίσης, με τη μορφή του ως οξείδιο του αντιμονίου έχει ποικίλες χρήσεις όπως καταλύτη, επιβραδυντικό φλόγας, χρωστική ουσία, αντιδραβρωτικό κ.α. [5].

2.1.3 Πηγές αντιμονίου

Η απελευθέρωση του αντιμονίου στο περιβάλλον μπορεί να προέρχεται τόσο από φυσικές πηγές όσο και από ανθρώπινες δραστηριότητες με τις δεύτερες να έχουν κυρίαρχο ρόλο. Στις φυσικές πηγές υπάγονται οι ηφαιστειακές εκρήξεις και οι πυρκαγιές με μέσο μεταφοράς τον άνεμο. Οι ανθρωπογενείς πηγές αφορά κυρίως εξορύξεις και επεξεργασία μεταλλευμάτων αντιμονίου, παραγωγή κραμάτων και μεταλλικού αντιμονίου καθώς και την ανακύκλωση και καύση προϊόντων που περιέχουν το συγκεκριμένο στοιχείο [6].

Λόγω της παρουσίας του σε ορυκτά, έχουν βρεθεί κοιτάσματα αντιμονίου σχεδόν σε όλες τις βιομηχανικά εκμεταλλευόμενες χώρες του κόσμου ανάμεσα τους και η Ελλάδα. Επιβεβαιωμένα κοιτάσματα έχουν βρεθεί στην Κίνα, στη Βολιβία, στον Καναδά, στην Ιαπωνία, στο Μεξικό, στη Ρωσία, στη Νότια Αφρική, στο Τατζικιστάν και στην Τουρκία καθώς και σε Ευρωπαϊκές χώρες όπως η Γαλλία, η Γερμανία, η Σουηδία, η Φινλανδία, η Σλοβακία και όπως προαναφέρθηκε η Ελλάδα [7].

Σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αντιμονίου διαδραματίζουν ασιατικές και αφρικανικές χώρες με κύριο παραγωγό την Κίνα ενώ σε συνδυασμό με τη Βολιβία, τη Δημοκρατία της Νότιας Αφρικής, το Τατζικιστάν και τη Ρωσία αντιπροσωπεύουν πάνω από το 95 % της παγκόσμιας παραγωγής.

2.2 Τοξικότητα και κινητικότητα αντιμονίου

Η τοξικότητα του αντιμονίου προκύπτει από τη σύνδεση του με ένζυμα που περιέχουν θειόλη και εξαρτάται από τη διαλυτότητα του στο νερό και την οξειδωτική του κατάσταση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το χημικό στοιχείο είναι αρκετά τοξικό ειδικά σε συγκεκριμένες μορφές του, όπως αυτή της τρισθενούς. Έχει θεωρηθεί ως

ρύπος υψίστης σημασίας από την United States Environmental Protection Agency (USEPA), η οποία έχει καθορίσει το ανώτατο όριο ποσιμότητας αντιμονίου στα 6 $\mu\text{g/l}$ και την Ευρωπαϊκή ένωση στα 5 $\mu\text{g/l}$ [8]. Στον ανθρώπινο οργανισμό, οι συγκεντρώσεις είναι μικρότερες από 1 $\mu\text{g/g}$ [9].

Στη διασπορά του ρύπου συμβάλλει σημαντικά ο αέρας ο οποίος αποτελεί μέσο μεταφοράς του. Κατά τις εξορύξεις και την καύση μεταλλευμάτων που περιέχουν αντιμόνιο, αυξάνεται η περιεκτικότητα των αιωρούμενων σωματιδίων αντιμονίου στην ατμόσφαιρα. Επίσης, μέσω του νερού μπορεί να γίνει η μεταφορά του ρύπου στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα και πιο συγκεκριμένα μέσω των απορροών βιομηχανικών εγκαταστάσεων εκμετάλλευσης αντιμονίου [9]. Αξίζει να αναφερθεί, ότι αυξημένη συγκέντρωση αντιμονίου μπορεί να βρεθεί σε εμφιαλωμένο νερό λόγω της μακράς διάρκειας, εσφαλμένης αποθήκευσης όπως και φυσικά είτε σε τρόφιμα καλλιεργημένα σε εδάφη ρυπασμένα είτε σε τροφές που προέρχονται από επιμολυσμένα νερά [10].

2.3 Επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία

Η τοξικότητα του αντιμονίου έχει άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης επηρεάζεται, από το αντιμόνιο μειώνοντας τα επίπεδα ελεύθερης γλουταθειόνης και αφήνοντας τα επιρρεπή σε οξειδωτικό στρες. Καθώς, το αντιμόνιο δημιουργεί σύμπλοκα με ομάδεςθειόλης, όπως προαναφέρθηκε, σχηματίζοντας θειοαντιμονίτες, εικάζεται ότι τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) έχουν εξαντληθεί γεγονός που συμβαίνει και με το αρσενικό. Έχει αποδειχθεί ότι το αντιμόνιο και το αρσενικό είναι άμεσοι αναστολείς της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης του βασικού ρυθμιστικού ενζύμου που καθορίζει τον τρόπο οξείδωσης της γλυκόζης στον οργανισμό. Η συνεχής έκθεση των κυττάρων στο ρύπο αυτό, οδηγεί σε πτώση τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) με αποτέλεσμα την αναστολή πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης και άρα σε αναερόβια γλυκόλυση και μικρότερη παραγωγή ATP. Με λίγα λόγια, οργανισμοί που εκθέτονται για μεγάλη διάρκεια σε αντιμόνιο έχουν μεγάλες πιθανότητες εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη.

Επιπλέον, η τρισθενής μορφή του αντιμονίου θεωρείται δυνητικά καρκινογόνος και έχει συνδεθεί με έναν αιμολυτικό μηχανισμό. Αξίζει να σημειωθεί, ότι μπορεί να υπάρξει και μετάλλαξη του DNA που οδηγεί σε μη φυσιολογικούς γονότυπους στους απογόνους. Στις εγκυμονούσες, συχνό φαινόμενο είναι η εμφάνιση διαβήτη και υπέρτασης.

Η κύριες οδοί πρόσληψης αντιμονίου είναι μέσω εισπνοής, στοματικής κοιλότητας και κατάποσης και επαφής. Ο ρύπος είναι ικανός να προκαλέσει προβλήματα στο αναπνευστικό σύστημα, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στο μυοκάρδιο, στο δέρμα καθώς και αλλαγές στη σύνθεση του μικροβιώματος του σάλιου [11].

2.4 Αντιμόνιο στο έδαφος

Το αντιμόνιο έχει εκτιμώμενη αφθονία 0,2-0,3 mg/kg στο φλοιό της γης και συγκεντρώσεις υποβάθρου μικρότερες του 0,3-8,4 mg/kg αλλά τείνει να συγκεντρώνεται στα επιφανειακά εδάφη [12]. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις συνδέονται με ανθρωπογενείς δραστηριότητες κυρίως λόγω εκμετάλλευσης μεταλλευμάτων. Έχουν βρεθεί, επίσης αυξημένες συγκεντρώσεις σε απόνερα βιομηχανιών και σε εκροές λυμάτων κοντά σε περιοχές που χρησιμοποιούνται λιπάσματα [13]. Θεωρείται πιθανό, μεγάλο ποσοστό του αντιμονίου να παραμένει με τη μορφή οξειδίων κατά την απόθεση του. Σε σουλφιδικά κοιτάσματα, οι υψηλές συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου στοιχείου συνδέονται με υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού και εξαιτίας της χαλκόφιλης φύσης τους, φανερώνουν πιθανότητα ύπαρξης χρυσού [14].

2.5 Οξειδωτικά βακτήρια για βιοαποδόμηση αντιμονίου

Η οξείδωση του τρισθενούς αντιμονίου Sb(III) έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του σε πεντασθενές Sb(V), το οποίο είναι πολύ σημαντικό για την περιβαλλοντική βιοαποκατάσταση του αντιμονίου. Αυτή η οξείδωση είναι εξαιρετικά αργή υπό συνθήκες περιβάλλοντος χρησιμοποιώντας το οξυγόνο (O₂) ως δέκτη ηλεκτρονίων [15].

Τα οξειδωτικά βακτήρια επηρεάζουν τους περιβαλλοντικούς κύκλους του αντιμονίου και συμμετέχουν εκτενώς στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής του. Το αντιμόνιο μπορεί να οξειδωθεί αερόβια από τρισθενές σε πεντασθενές, όπως προαναφέρθηκε και το πεντασθενές μπορεί να αναχθεί σε τρισθενές αναερόβια [16].

2.6 Τεχνικές απομάκρυνσης αντιμονίου

Ως ρύπος υψίστης σημασίας, έχει προχωρήσει η έρευνα του και έχουν δοκιμαστεί αρκετοί τρόποι απομάκρυνσης του, κάποιοι από τους οποίους είναι οι εξής [17]:

- Σταθεροποίηση του εδάφους μέσω ακινητοποίησης του αντιμονίου
- Προσρόφηση
- Πήξη/Κροκίδωση
- Διαχωρισμός μεμβράνης
- Απομόνωση
- Μείωση τοξικότητας
- Βιοεξυγίανση
- Φυτοεξυγίανση

Τα πειράματα που διεξήχθησαν και παρουσιάζονται στη συγκεκριμένη διπλωματική αφορούν τις δύο τελευταίες μεθόδους.

2.6.1 Βιοεξυγίανση

Η τεχνολογία βιοαποκάστασης χρησιμοποιεί μικροβιακό μεταβολισμό για τη μείωση, εξάλειψη, μετατροπή ρύπων σε μη τοξικούς ή λιγότερο που υπάρχουν σε εδάφη και νερό. Η τεχνική αυτή, περιλαμβάνει της την παραγωγή ενέργειας σε μία αντίδραση οξειδοαναγωγής στα μικροβιακά κύτταρα. Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν την αναπνοή και της βιολογικές λειτουργίες που απαιτούνται για τη συντήρηση και την αναπαραγωγή. Ένα σύστημα παράδοσης που παρέχει ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω είναι απαιτούμενα: μια πηγή ενέργειας, ένα ηλεκτρόνιο δέκτη και θρεπτικά συστατικά. Διαφορετικοί τύποι μικροβίων μπορούν να συμμετέχουν σε

βιοαποκάσταση με δέκτες ηλεκτρονίων οξυγόνο, νιτρικά, μαγγάνιο, σίδηρος, θειϊκό ή διοξείδιο του άνθρακα.

Σε πειραματικό επίπεδο η επιλογή της συγκεκριμένου μεθόδου προϋποθέτει βέλτιστες περιβαλλοντικές συνθήκες, εξαρτάται, δηλαδή, από την τοποθεσία, τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα μικροοργανισμών και θρεπτικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα:

- Οι συγκεντρώσεις των ρύπων έχουν άμεση επίδραση στη μικροβιακή δραστηριότητα. Όταν οι συγκεντρώσεις είναι πολύ υψηλές, μπορεί να υπάρχουν τοξικές επιδράσεις στα βακτήρια. Απ' την άλλη πλευρά, η χαμηλή συγκέντρωση ρύπων μπορεί να αποτρέψει την επαγωγή ενζύμων βακτηριακής αποδόμησης.
- Η βιοδιαθεσιμότητα των ρύπων εξαρτάται από το βαθμό στα οποία προσροφούνται σε στερεά ή απομονώνονται από μόρια σε μολυσμένα μέσα και διαχέονται σε μακροπόρους του εδάφους.
- Τα χαρακτηριστικά της τοποθεσίας επηρεάζουν σημαντικά οποιαδήποτε εφαρμογή βιοαποκατάστασης. Κάποια από αυτά είναι το pH με βέλτιστη περιοχή 6-8, η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε νερό, η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και το δυναμικό οξειδοαναγωγής.
- Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό και η περιεκτικότητα σε οξυγόνο χαρακτηρίζουν την οξείδωση ή την αναγωγή. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής επηρεάζεται, όπως προαναφέρθηκε, στην παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων.
- Τα θρεπτικά συστατικά απαιτούνται για την ανάπτυξη των μικροβιακών κυττάρων και τη διαίρεση της. Συνήθως, υπάρχουν κατάλληλες ποσότητες αλλά μπορούν να προστεθούν ή μέσω οργανικής τροποποίησης υποστρώματος.
- Η περιεκτικότητα σε υγρασία κρίνεται, ως σημαντικός παράγοντας μικροβιακής ανάπτυξης και έχει βρεθεί ότι η βέλτιστη ανάπτυξη επιτυγχάνεται με 12-25 % υγρασία.
- Η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας ο οποίος επηρεάζει άμεσα τον ρυθμό της μικροβιακής δράσης μεταβολισμού και κατά συνέπεια της μικροβιακής

δραστηριότητας στο περιβάλλον. Ο ρυθμός της βιοαποδόμησης αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας και επιβραδύνεται με τη μείωση της [18].

2.6.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα βιοεξυγίανσης

Κάθε μέθοδος που χρησιμοποιείται στην επίλυση περιβαλλοντικών θεμάτων έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Της συγκεκριμένης μεθόδου, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 [19], [20].

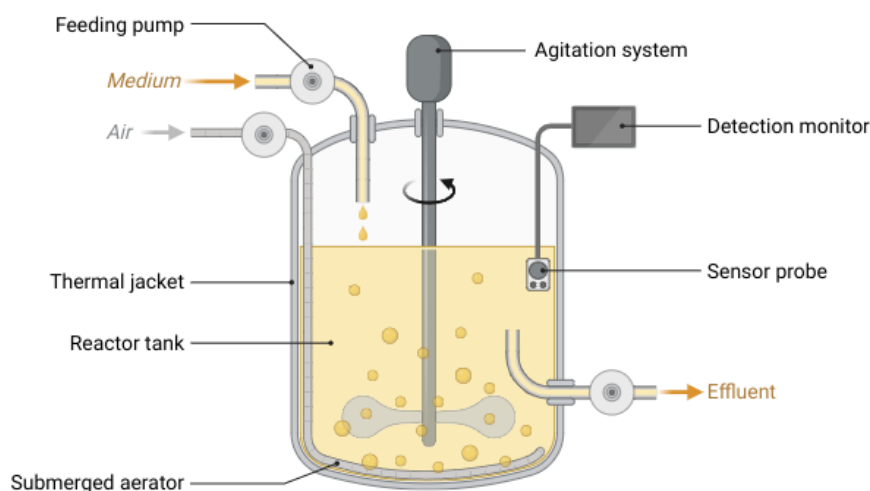
Πίνακας 2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοεξυγίανσης

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Φυσική διαδικασία που χρειάζεται λίγο χρόνο για ρυπασμένο έδαφος	Πολλοί περιορισμοί όσον αφορά της κατάλληλες συνθήκες διεξαγωγής
Τα τελικά προϊόντα της μεθόδου είναι συνήθως ακίνδυνα	Δύσκολη παρέκταση από μελέτες μικρής κλίμακας σε πραγματικό πεδίο
Πολύ καλή αποτελεσματικότητα με πλήρη καταστροφή ρύπων ή μετατροπή της σε αβλαβείς	Χρονοβόρα διαδικασία εύρεσης κατάλληλου εδάφους για έναρξη του πειράματος
Δε χρησιμοποιούνται επικίνδυνα χημικά για την εφαρμογή της μεθόδου	Περιορίζεται της βιοαποδομήσιμες ενώσεις

2.6.3 Βιοαντιδραστήρας

Η χρήση του μηχανισμού της βιοαντιδραστήρα (Εικόνα 2) αποσκοπεί κυρίως στην μεταφορά της διεργασίας σε μεγαλύτερη κλίμακα υπό συνεχή ανάδευση του διαλύματος καθώς και συνεχή αερισμό. Κατά τη διάρκεια μιας αερόβιας βιοδιεργασίας, το οξυγόνο μεταφέρεται από μία ανερχόμενη φυσαλίδα οξυγόνου σε

μία υγρή φάση και τελικά στη θέση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μέσα στο κύτταρο. Έχει αποδειχθεί ότι η διαρκής ανάμιξη και η παροχή οξυγόνου βοηθάει στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών δίνοντας πολλές φορές το επιθυμητό αποτέλεσμα του εκάστοτε πειράματος [21]. Είναι μια τεχνική που μπορεί να συνδυαστεί και με της της αυτή των νανοφουσαλίδων οξυγόνου για τη βέλτιστη επίδραση στην εξεταζόμενη δοκιμή.



Εικόνα 2. Πειραματική διάταξη βιοαντιδραστήρα

2.6.4 Φυτοεξυγίανση

Φυτοαποκατάσταση αποκαλείται η τεχνολογία κατά την οποία γίνεται χρήση φυτών και σχετικών μικροβίων με σκοπό την περιβαλλοντική εξυγίανση. Έχει αποδειχθεί, ότι συγκεκριμένα είδη φυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σταθεροποίηση ρύπων, εξόρυξη, αποικοδόμηση ή εξάτμιση [22]. Πρόκειται για μία οικονομικά αποδοτική φυτική προσέγγιση επωφελούμενη από την ικανότητα φυτών να μεταβολίζουν διάφορα μόρια στους ιστούς της. Τα τοξικά βαρέα μέταλλα, και το αντιμόνιο σε αυτή την περίπτωση, και οι οργανικοί ρύποι είναι οι κύριοι στόχοι της τεχνικής. Κάθε τεχνολογία που χρησιμοποιείται, έτσι και αυτή, έχει μια σειρά περιορισμών οι οποίοι σχετίζονται με [23] :

- Επιλογή ικανού φυτού να απορροφήσει, μετακινήσει και αποδομήσει το ρύπο
- Ύπαρξη κατάλληλης ποσότητας νερού
- Απαραίτητο βάθος και χώρος για την ορθή τοποθέτηση των φυτών.

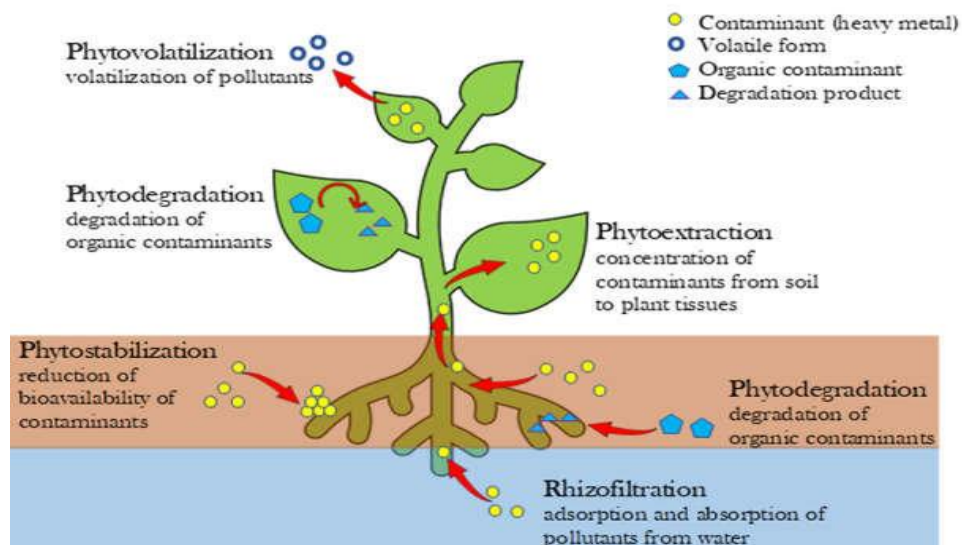
- Επαρκή ποσότητα θρεπτικών
- Κατάλληλες ατμοσφαιρικές συνθήκες

Στην εφαρμογή της μεθόδου πειραματικά, προετοιμάζεται το μολυσμένο έδαφος κατάλληλα ώστε να γίνει η φύτευση. Σε βάθος χρόνου ανάλογα το πείραμα και τον ρύπο, ποτίζοντας τα φυτά κατάλληλα με σκοπό το βέλτιστο επανορθωτικό αποτέλεσμα, μελετάται η άμεση και έμμεση απορρόφηση, δέσμευση και αποικοδόμηση του ρύπου από αυτά [24].

Το αντιμόνιο είναι ένας ρύπος που οξειδώνεται εύκολα από την τρισθενή στην πενταθενή του μορφή και έχει αποδειχθεί ότι τα φυτά μπορούν να συσσωρεύσουν τόσο τρισθενές Sb(III) όσο και πεντασθενές Sb(V) με υψηλότερη προτίμηση στο πρώτο [4].

Οι βασικές διεργασίες φυτοαποκάστασης είναι, σύμφωνα με την εικόνα (Εικόνα 3), οι εξής [25]:

- Φυτοσταθεροποίηση: αποσκοπεί στη μείωση κινητικότητας των ρύπων και στην πρόληψη μετακίνησης τους στο βαθύτερο έδαφος.
- Ριζοαποδόμηση: αποσκοπεί στην αποικοδόμηση ή ανοργανοποίηση των ρύπων της ρίζης.
- Φυτοσυσσώρευση ή φυτοεξαγωγή: αποσκοπεί στην εξαγωγή μετάλλων ή οργανικών ουσιών μέσω των ριζών των φυτών από ρυπασμένο έδαφος και νερό για τη μετατόπιση της της βλαστούς.
- Φυτοαποικοδόμηση: αποσκοπεί στη διάσπαση των ρύπων στο υπέργειο τμήμα του φυτού.
- Φυτοεξάτμιση: πρόκειται για την εξάτμιση πτητικών χημικών ουσιών που λαμβάνονται από τα φυτά. Μόλις εξατμιστούν αυτές οι ενώσεις μπορεί να αποικοδομηθούν από ρίζες υδροξυλίου στην ατμόσφαιρα ή να παραμείνουν ατμοσφαιρικοί ρύποι.



Εικόνα 3. Διεργασίες απομάκρυνσης των ρύπων μέσω της φυτοεξυγίανσης

2.6.5 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα Φυτοεξυγίανσης

Η φυτοαποκατάσταση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος εξυγίανσης η οποία έχει πολλά πλεονεκτήματα αλλά φυσικά και μειονεκτήματα, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 [26], [27].

Πίνακας 3. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της φυτοεξυγίανσης

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Αποδεδειγμένα υψηλή αποτελεσματικότητα	Πιθανή συσσώρευση ρύπων σε καλλιέργειες
Πράσινη τεχνολογία φιλική της το περιβάλλον	Χρονοβόρα και εποχιακή μέθοδος
Χαμηλό κόστος εφαρμογής	Περιορισμένα είδη αποτελεσματικών φυτών
Αισθητικά αποδεκτή τεχνολογία	Αρκετοί περιορισμοί της συνθήκες διεξαγωγής (πχ κατάλληλη υγρασία εδάφους)
Ποικιλίες οργανικών και ανόργανων ενώσεων	Προϊόντα της πτητικές ενώσεις που μπορεί να ρυπάνουν την ατμόσφαιρα

2.6.6 Τεχνολογία των νανοφυσαλίδων

Οι νανοφυσαλίδες είναι μικροσκοπικές φυσαλίδες αερίου, με διαμέτρους από δεκάδες νανόμετρα έως αρκετές δεκάδες μικρόμετρα. Τα χαρακτηριστικά που της ξεχωρίζουν είναι :

- Η μεγάλη παραμονή της σε υδατικά διαλύματα λόγω της μηδαμινής άνωσης
- Η μεγάλη επιφάνεια διεπαφής αερίου-υγρού
- Η δημιουργία ριζών υδροξυλίου από την κατάρρευση της παρέχοντας μια ικανότητα οξειδωσης η οποία διευκολύνει τη διάλυση

Οι ιδιότητες αυτές είναι υψίστης σημασίας και έτσι η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλή επιφάνεια ανά μονάδα όγκου των νανοφυσαλίδων έχει χρησιμοποιηθεί στην αποδόμηση οργανικών ρύπων έχοντας βέβαια ασταθές αποτέλεσμα. Όσον αφορά της νανοφυσαλίδες, έχουν παρουσιάσει σημαντική σταθερότητα με αποτέλεσμα υψηλούς χρόνους στασιμότητας [28]. Έχει, επίσης, αποδειχθεί, ότι οι νανοφυσαλίδες οξυγόνου παίζουν ευεργετικό ρόλο στην βιοεξυγίανση και φυτοεξυγίανση λόγω του γεγονότος ότι η απόδοση αερισμού μπορεί να αυξηθεί με την παροχή οξυγόνου μέσω των αέριων φυσαλίδων. Στη γεωργία, έχει παρατηρηθεί, ότι η άρδευση με νανοφυσαλίδες οξυγόνου προώθησε υψηλότερους ρυθμούς βλάστησης [29], [30].

Κεφάλαιο 3. Πειραματικός Μέρος

3.1 Υλικά και Μέθοδοι

3.1.1. Εξεταζόμενα εδάφη

Τα χώματα που μελετήθηκαν στο πείραμα της βιοεξυγίανσης έχουν συλλεχθεί από τρία πεδία βολής της Ελβετίας και έχουν κατηγοριοποιηθεί σε Α, Β και C με βάση την αρχική συγκέντρωση του αντιμονίου. Τα αρχικά χαρακτηριστικά του εξεταζόμενου χώματος παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις μαγγανίου, σιδήρου και αντιμονίου στα χώματα της βιοεξυγίανσης

Στοιχείο	Μονάδα	Έδαφος		
		A	B	C
Mn	mg/kg	361,5	668,2	733,8
Fe	mg/kg	22.480,4	26.897,9	14.354,5
Sb	mg/kg	362,5	16,5	3,8

Όσον αφορά το πείραμα της φυτοεξυγίανσης, το χώμα συλλέχθηκε από πεδίο βολής στο Καμπάνι Χανίων και βρέθηκε να έχει αρχική συγκέντρωση αντιμονίου 1,17 ppm. Βάσει πρωτοκόλλου αναδεύτηκε με τριυδρικό τριγυκό αντιμονυλικό κάλιο ($C_8H_4K_2O_{12}Sb_2 \cdot 3H_2O$) για τελική συγκέντρωση αντιμονίου 50 ppm. Το pH του εδάφους μετρήθηκε χρησιμοποιώντας 10 g ξηραμένου, στον αέρα, χώματος προσθέτοντας 25mL χλωριούχου καλίου (KCl) συγκέντρωσης 1M. Το μέγεθος των σωματιδίων μετρήθηκε με χρήση κυλίνδρου Βουγιούκου. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Φυσικοχημικές ιδιότητες του χώματος της φυτοεξυγίανσης

Χαρακτηριστικό	Τιμή
Άμμος(%)	72,53
Πηλός(%)	21,87
Λάσπη(%)	5,6
Υφή	Αμμώδες λασπώδες παχύ
Οργανική ύλη(%)	1,83
Ολικό άζωτο (TKN) (g/kg soil)	0,76
pH	7,42

3.1.2 Πικροδάφνη *Nerium oleander*

Η πικροδάφνη *Nerium oleander* που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα της φυτοεξυγίανσης, είναι ένας αειθαλής θάμνος εγγενής στην περιοχή της Μεσογείου, η οποία καλλιεργείται ως καλλωπιστικό φυτό. Το συγκεκριμένο φυτό είναι ανθεκτικό στο αλάτι, την ξηρασία και ικανό να αντέξει σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων. Διακρίνεται, από την ικανότητα του να συσσωρεύει βαρέα μέταλλα καθιστώντας το κατάλληλο για εφαρμογές φυτοαποκατάστασης [4].

3.1.3 Ανάλυση ICP-MS

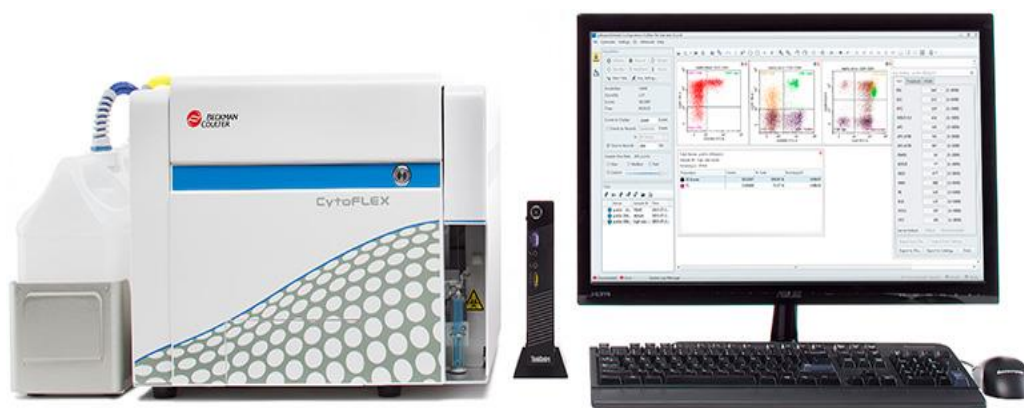
Μία συσκευή ανάλυσης ICP-MS αποτελείται από το σύστημα παραγωγής πλάσματος και το φασματόμετρο μάζας. Ο κύριος λόγος επιλογής της της μεθόδου είναι η ικανότητα της να αναλύει ταυτόχρονα χημικά στοιχεία. Το ICP-MS αποτελεί μία από της πιο σημαντικές αναλυτικές τεχνικές στη στοιχειακή ανάλυση και βασίζεται στην αρχή λειτουργίας φασματομετρίας μάζας ICP. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια λειτουργίας του οργάνου, το δείγμα τροφοδοτείται από περισταλτική αντλία στο θάλαμο ομίχλης με αποτέλεσμα το αεροζόλ να εξατμίζεται, ψεκάζεται και ιονίζεται

σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία περίπου 7000K. Τα ιόντα επιταχύνονται και εστιάζονται στο φασματομέτρο μάζας από τον κώνο δειγματοληψίας και τον κώνο διαχωρισμού και έτσι τα ιόντα με διαφορετικές αναλογίες μάζας της φορτίο διέρχονται επιλεκτικά μέσω του αναλυτή μάζας και ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή ιόντων [31]. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα ανιχνεύσιμα στοιχεία είναι το μαγγάνιο (Mn), ο σίδηρος (Fe) και φυσικά το αντιμόνιο (Sb).

3.1.4 Κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής, είναι μια τεχνική για τη μέτρηση και χαρακτηρισμό μικροσκοπικών σωματιδίων μέσω της ανάλυσης σκέδασης του φωτός καθώς και της εκπομπής φθορισμού από αυτά. Πιο συγκεκριμένα, εισάγεται το δείγμα στο μηχανήμα αφού πρώτα γίνει προσθήκη φθορίζουσας χρωστικής. Η δεσμίδα φωτός που προσπίπτει πάνω στα κύτταρα, προκαλεί εμπρόσθια (FSC) και πλάγια (SSC) σκέδαση κάθε μία από της οποίες παρέχει πληροφορίες για το μέγεθος και την εσωτερική ποικιλομορφία της αντίστοιχα. Ακόμα, ο διαχωρισμός της σε υποπληθυσμούς επιτυγχάνεται εξαιτίας της εκπομπής διαφορετικών μηκών κύματος των κυττάρων, μέσω της διέγερσης των χρωστικών που βρίσκονται στην επιφάνεια της από την ακτίνα laser [32].

Στο συγκεκριμένο πείραμα σε κάθε περίπτωση με βιοενίσχυση, λαμβάνονταν δείγματα, διηθούνταν με φίλτρο 11μm Whatman ώστε να μετρηθούν στο κυτταρόμετρο. Η συσκευή ανάλυσης κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε είναι η CytoFLEX της Beckman Coulter Life Sciences (Εικόνα 4) η οποία αποτελείται από 3 βασικά συστατικά: τα δοχεία ρευστών (Fluid Containers) όπου εισέρχεται η θήκη ρευστών, το κυτταρόμετρο (Cytometer) το οποίο παράγει και συλλέγει τα σήματα και το λογισμικό δεδομένων κυτταρομετρίας (Workstation).



Εικόνα 4. Κυτταρόμετρο Cytotflex

3.1.5 Κοινότητα βακτηρίων

Η κοινότητα βακτηρίων επιλέχθηκε λόγω της ανθεκτικότητας της στο αντιμόνιο με βάση διπλωματική εργασία που εκπονήθηκε στο εργαστήριο βιοχημικής μηχανικής και περιβαλλοντικής βιοτεχνολογίας[34]. Χρησιμοποιήθηκε η κοινότητα B2 η οποία παρουσίασε την υψηλότερη οξείδωση του τρισθενές αντιμονίου και η μείωση έφτασε στο 77%. Η αρχική βακτηριακή συγκέντρωση ήταν ίση με 10^7 cells/mL, εμβολιάστηκε σε κάθε φιάσκα και παρακολουθήθηκε μέσω δειγμάτων κατά τη διάρκεια του πειράματος. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στο αντιμόνιο πριν από την εισαγωγή της, χρησιμοποιήθηκε stock της κοινότητας η οποία μεγάλωνε σε θρεπτικό CDM-A στο οποίο προστέθηκε αντιμόνιο. Η ανακαλλιέργεια της γινόταν σε θρεπτικό LB. Η σύσταση της παρουσιάζεται στον Πίνακας 6.

Πίνακας 6. Σύσταση θρεπτικών CDM-A & LB

Τελικός όγκος 500mL	
CDM-A	LB
1g $MgSO_4$	5g tryptone
0,5g NH_4Cl	5g sodium chloride
0,5g Na_2SO_4	2,5g yeast extraction
6,5mg K_2HPO_4	
33,5mg $CaCl_2$	
2,5g glucose	

458,34mL Dh2O	
41,66mL Sb (III)	

3.1.6 Προσδιορισμός DO, pH, ORP

Οι μετρήσεις των παραμέτρων DO, pH, ORP στο πείραμα της βιοεξυγίανσης γίνονταν καθημερινά με τη χρήση φορητού πολυμέτρου δύο καναλιών Hach HQ40D field case (Εικόνα 5) τοποθετώντας κάθε φορά το κατάλληλο ηλεκτρόδιο και περιμένοντας μέχρι η τιμή να σταθεροποιηθεί.



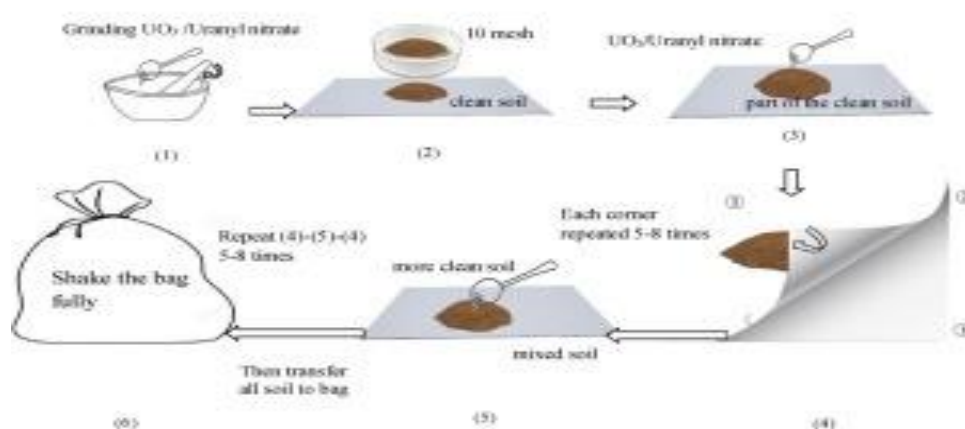
Εικόνα 5. Πολύμετρο Hach HQ40D

3.1.7 Οργανικά οξέα

Η χρήση οργανικών οξέων χαμηλού μοριακού βάρους έχει ως στόχο τη διαλυτοποίηση οξειδίων των μετάλλων στο έδαφος λόγω της βελτίωσης βιοδιαθεσιμότητας των βαρέων μετάλλων. Συμπληρωματικά, εξαιτίας της περιορισμένης έκκρισης οργανικών οξέων από τις ρίζες των φυτών, προσθήκη εξωγενών οργανικών οξέων, ενισχύει την ικανότητα του φυτού να προσλαμβάνει ρύπους από το έδαφος και ως εκ τούτου την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της φυτοαποκατάστασης [4]. Τα οργανικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα είναι το κιτρικό, το ασκορβικό και το οξαλικό οξύ με χαμηλή (7mmol/kg) και υψηλή συγκέντρωση (70 mmol/kg) στη φυτοεξυγίανση.

3.1.8 Ανάδευση χώματος με αντιμόνιο

Η τεχνική ανάδευσης χώματος με μέταλλα, γνωστή με την αγγλική ορολογία ως *spiking soil*, παρέχει μια εύκολη, γρήγορη και ακριβή διαδικασία για την προετοιμασία εδαφών κατάλληλα για εργαστηριακή έρευνα. Στο συγκεκριμένο πείραμα, έγινε ανάδευση του χώματος με τρισθενές αντιμόνιο 50 mg/kg μέσα σε χημικό απαγωγό με της της προφυλάξεις από τον ρύπο. (Εικόνα 6) Το χώμα με τη νέα συγκέντρωση, χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα της φυτοεξυγίανσης [33].



Εικόνα 6. Η μεθοδολογία της τεχνικής ανάδευσης

3.1.9 Παραγωγή νανοφυσαλίδων οξυγόνου

Οι νανοφυσαλίδες οξυγόνου παρασκευάστηκαν από την εμπορικά διαθέσιμη MK1 Nanobubbler TM (Fine Bubble Technologies Pty Ltd., Cape Town, South Africa). Η συσκευή βυθίστηκε σε δεξαμενή νερού 350L και λειτουργούσε για 20 λεπτά με οξυγόνο υψηλής καθαρότητας (99,9%) ως αέριο τροφοδοσίας πριν από κάθε άρδευση. Προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το νερό άρδευσης δεν περιείχε μεγάλες φυσαλίδες, συλλεγόταν 10 λεπτά μετά την ολοκλήρωση της παραγωγής νανοφυσαλίδων ώστε οι τυχόν μεγαλύτερες να ανέβουν στην επιφάνεια και να σπάσουν. Δείγματα από τη δεξαμενή χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη της πυκνότητας νανοφυσαλίδων, χρησιμοποιώντας ανάλυση παρακολούθησης νανοσωματιδίων (NTA) (Nanosight, Malvern, UK) και το μέσο μέγεθος διαμέτρου που συνδυάζει τη δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) (Sald 7500 nano, Shimadzu, Kyoto, Japan). Το μέσο

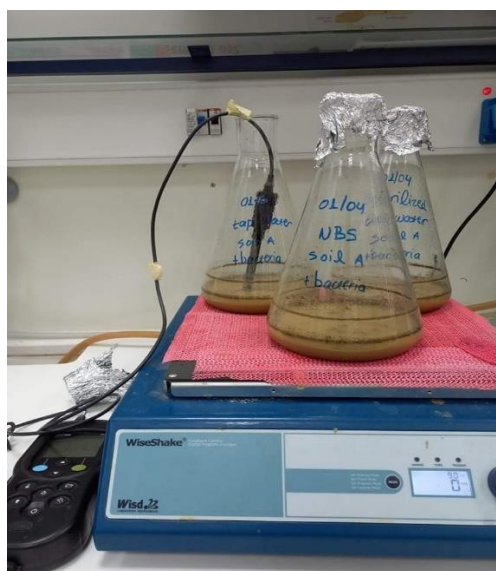
μέγεθος σωματιδίων και η συγκέντρωση βρέθηκαν να είναι 175 ± 17 nm και $2,1 \times 10^7 \pm 6,8 \times 10^6$ σωματίδια ανά mL, αντίστοιχα. Η εκτιμώμενη συγκέντρωση οξυγόνου βρέθηκε να είναι πέντε φορές υψηλότερη από τη διαλυτότητα οξυγόνου σε ισορροπία.

3.2 Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διάταξη της παρούσας διπλωματικής εργασίας χωρίζεται σε δύο φάσεις.

3.2.1 Πειραματική φάση Ι- Βιοεξυγίανση

Η πειραματική διάταξη του πειράματος της βιοεξυγίανσης αποτελείται από τρεις φλάσκες των 2 λίτρων, τρία δείγματα ίδιου χρώματος σε κάθε διαδικασία, νερό βρύσης με και χωρίς νανοφουσαλίδες, αποστειρωμένο νερό βρύσης, ένα πολύμετρο Hatch και ένας αναδευτήρας (Εικόνα 7). Στις περιπτώσεις προσθήκης κυττάρων συμπεριλαμβάνεται και η κατάλληλη ποσότητα τους.



Εικόνα 7. Προκαταρκτικά πειράματα βιοεξυγίανσης

Στην πειραματική διαδικασία της βιοεξυγίανσης εκτελέστηκαν συνολικά επτά κύκλοι. Πιο συγκεκριμένα, δύο για καθένα από τα Α, Β και C χώματα με και χωρίς την παρουσία κοινότητας βακτηρίων με χρήση φλασκών, καθώς και ακόμα της κύκλος του χώματος Α με τη χρήση βιοαντιδραστήρα παρουσία βακτηρίων. Το κριτήριο

επιλογής του χώματος Α για το πείραμα με τον βιοαντιδραστήρα ήταν η μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στα προκαταρκτικά.

Στον πρώτο κύκλο απουσίας μικροοργανισμών, συλλέχθηκε δείγμα 50 γραμμαρίων από το χώμα Α για κάθε φλάσκα. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις αποστειρωμένες φλάσκες και προστέθηκαν 450 mL νερού βρύσης, αποστειρωμένου νερού βρύσης και νερού βρύσης με νανοφυσαλίδες οξυγόνου σε καθεμιά αντίστοιχα καθώς και το ζυγισμένο χώμα. Στη συνέχεια, ξεκίνησε η ανάδευση στα 90 rpm και λαμβάνονταν μετρήσεις, στη φλάσκα με τις νανοφυσαλίδες, για το διαλυμένο οξυγόνο με τη χρήση πολυμέτρου, κάθε 5-10 λεπτά μέχρι να σταθεροποιηθεί η τιμή του διαλυμένου οξυγόνου. Έπειτα, λήφθηκαν μετρήσεις και από τις τρεις φλάσκες για τις παραμέτρους, διαλυμένο οξυγόνο (DO), δυναμικό μείωσης οξειδωσης (ORP) και pH. Κατά τη διάρκεια, κάθε μέρα πραγματοποιούνταν οι προαναφερθείσες μετρήσεις και λαμβάνονταν 15 mL δείγματος από κάθε φλάσκα σε σωληνάρια falcon, καθένα από τα οποία διηθούνταν με 0,45 μm , τα 5 mL από το κάθε δείγμα δίνονταν για ανάλυση ICP-MS και τα υπόλοιπα αποθηκεύονταν στην κατάψυξη. Η πειραματική διάρκεια ανέρχεται στις 6 ημέρες για το χώμα Α. Στο τέλος του πειράματος, χρησιμοποιώντας φίλτρα (250 μm), πραγματοποιήθηκε διήθηση όλου του υπερκείμενου και το συγκρατημένο χώμα ξηράθηκε στο φούρνο για δύο περίπου ημέρες στους 100°C (Εικόνα 8). Ακολούθησε η απομάκρυνση του χώματος από τα φίλτρα, κοσκίνισμα με κόσκινο πλέγματος και αμέσως μετά η χώνευση του. Πιο συγκεκριμένα, αφού ζυγίστηκαν τρία δείγματα των 0,2 γραμμαρίων χώματος σε γυάλινες φλάσκες, από το κάθε είδος, διαλύθηκαν με 1,5 mL κιτρικού και 7,5 mL νιτρικού οξέος σε επωαστήρα για μία ημέρα στους 50°C. Μετά από δύο ημέρες, αραιώθηκε με υπερκάθαρο νερό στα 45 mL και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα για ακόμα μία ημέρα στα 110 rpm. Μετά το πέρας της διαδικασίας, τα δείγματα διηθήθηκαν με 0,45 μm , τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια falcon, τα 5 mL από κάθε ένα δόθηκαν για ICP-MS ανάλυση και τα υπόλοιπα αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους πρώτους κύκλους των χωμάτων Β και C με μόνη διαφορά τη συνολική διάρκεια του πειράματος σε καθένα από αυτά, ανάλογα τις ιδιότητες τους και το χρόνο επίτευξης του επιθυμητού αποτελέσματος. Ειδικότερα, για το χώμα Β χρειάστηκαν 10 ημέρες ενώ για το C, 8 ημέρες.



Εικόνα 8. Πειραματική διαδικασία των προκαταρκτικών πειραμάτων

Όσον αφορά το δεύτερο κύκλο παρουσίας μικροοργανισμών και συγκεκριμένα βακτηρίων, διεξήχθη η διαδικασία που προαναφέρθηκε με κάποιες διαφοροποιήσεις λόγω της προσθήκης των βακτηρίων. Αρχικά, γινόταν η προετοιμασία της κοινότητας των βακτηρίων ώστε να φτάσει στην επιθυμητή συγκέντρωση της τάξης 10^8 . Συγκεκριμένα, η ποσότητα των 40-45mL βακτηρίων τοποθετούνταν σε δύο σωληνάρια falcon και γινόταν φυγοκέντριση για 10 λεπτά στις 3.500 στροφές και έπειτα το υπερκείμενο απομακρυνόταν. Γινόταν δύο φορές έκπλυση με 30 mL χλωριούχου νατρίου κάνοντας vortex κάθε φορά και απομάκρυνση υπερκείμενου. Τελικά, με προσθήκη νερού βρύσης και κατόπιν vortex, μετριοταν η συγκέντρωση στο κυτταρόμετρο. Έτσι λοιπόν, οι ποσότητες που προστέθηκαν της φλάσκες ανέρχονται πλέον σε 445,5 mL σε καθεμία περίπτωση καθώς τα υπόλοιπα 4,5 mL αντιστοιχούν στην ποσότητα των βακτηρίων. Επιπλέον, πέρα από τις μετρήσεις όπου λαμβάνονταν όπως ακριβώς παρουσιάστηκε παραπάνω, από τη δειγματοληψία των 15 mL, εκτός των 5mL που προορίζονταν για ανάλυση ICP-MS, 2 mL εξ αυτών, φιλτράρονταν με 11 μm ώστε να αναλυθεί η κοινότητα στο κυτταρόμετρο. Στο τέλος κάθε πειράματος, κατά τη διήθηση όλου του υπερκείμενου, λαμβάνονταν περίπου 2 γραμμάρια χρώματος από κάθε είδος σε σωλίνες φυγοκέντρισης (erpendorf) και 2 mL υγρό από

το υπερκείμενο, προκειμένου να γίνει εξαγωγή του DNA, η οποία πραγματοποιήθηκε με DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen). Η προαναφερθείσα διαδικασία, ακολουθήθηκε και για τα τρία χώματα με διάρκεια διεξαγωγής 10 ημερών για το χώμα A, 8 ημερών για το B και 9 ημερών για το C, χρησιμοποιώντας την ίδια κοινότητα βακτηρίων.

3.2.1.1 Βιοαντιδραστήρας

Το τελευταίο πείραμα που διεξήχθη με τη χρήση βιοαντιδραστήρα, εκτελέστηκε μόνο για το χώμα A όπου βρέθηκε να είναι πιο αποτελεσματικό από τα υπόλοιπα για συνολική διάρκεια 35 ημερών. Σε αυτή την περίπτωση, προετοιμάστηκαν 150 mL βακτηρίων επαναλαμβάνοντας την παραπάνω διαδικασία, ώστε η συγκέντρωση της να είναι της τάξης 10^9 . Τοποθετήθηκαν 1500 mL νερού βρύσης με νανοφυσαλίδες στον βιοαντιδραστήρα, 150 γραμμάρια χώματος και τέλος τα 150 mL βακτηρίων. Μέσω αντλίας και μικρού ελαστικού σωλήνα, λαμβανόταν καθημερινά 25 mL δείγμα, εκ των οποίων τα 5 mL δίνονταν για ICP-MS ανάλυση, 2 mL για ανάλυση στο κυτταρόμετρο και τα υπόλοιπα 13 mL αποθηκεύονταν στην κατάψυξη. Επίσης, γινόταν μέτρηση με τη χρήση πολυμέτρου των παραμέτρων διαλυμένου οξυγόνου (DO), δυναμικού μείωσης οξείδωσης (ORP) και pH. Εξαιτίας της μείωσης της στάθμης του υγρού μέσα στο βιοαντιδραστήρα και συνεπώς της δυσκολίας στη δειγματοληψία, χρειάστηκε κάποιες ημέρες να προστεθεί νερό βρύσης με νανοφυσαλίδες. Πιο συγκεκριμένα, τη 2^η μέρα προστέθηκαν 750 mL, την 8^η 1500mL, την 12^η 1000 mL, 18^η 600 mL, την 28^η 1000 mL, και την 35^η 300 mL. Την 14^η μέρα του πειράματος προστέθηκαν 9,4 mL οργανικών οξέων συγκέντρωσης 1,6m στα 1500mL μετά από προσθήκη 200mL, εφόσον είχε προηγηθεί η μέτρηση των παραμέτρων αλλά κυρίως του pH ώστε να μελετηθεί η μείωση του. Μετά το πέρας του διεξαγωγής, η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια με τα προηγούμενα πειράματα.

3.2.2 Πειραματική φάση II- Φυτοεξυγίανση

Η πειραματική διάταξη της φυτοεξυγίανσης αποτελείται από 20 γλάστρες με *N. oleander*, οι οποίες φυτεύτηκαν σε ρυπασμένο χώμα με αντιμόνιο (Εικόνα 9). Για τη σωστή αποστράγγιση, τοποθετήθηκαν χαλίκια στον πάτο κάθε γλάστρας. Πιο συγκεκριμένα, στο πείραμα το οποίο είχε διάρκεια 6 εβδομάδες και έλαβε χώρα στο

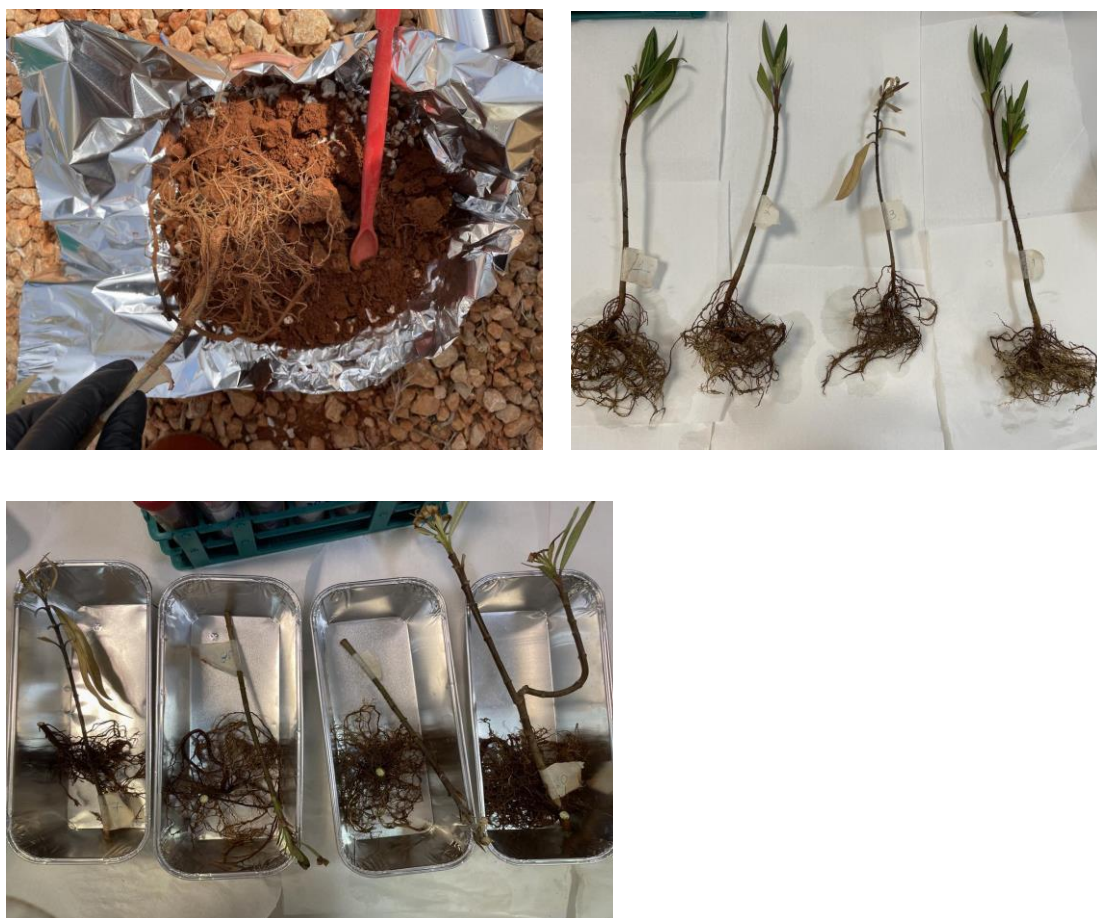
θερμοκήπιο του Πολυτεχνείου Κρήτης, διερευνήθηκε η δυνατότητα φυτοαποκατάστασης της *Nerium oleander* παρουσία 50ppm αντιμονίου σε διάφορες συνθήκες στο έδαφος, υπό ατμοσφαιρικό αέρα και προστασία από τη βροχή. Τα, έξι μηνών, φυτά συλλέχθηκαν από φυτώριο στα Κουνουπιδιανά Χανίων και χωρίστηκαν σε 5 πειραματικές ομάδες Α,Β,С, D και Ε, με παρόμοια συνολική βιομάζα (βάρος και ύψος) κατά σειρά, ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιογένεια μεταξύ των ομάδων. Ειδικότερα, κάθε επεξεργασία είχε τέσσερις επαναλήψεις επομένως, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 20 γλάστρες.



Εικόνα 9. Πειραματική διαδικασία της φυτοεξυγίανσης

Η ανάπτυξη των φυτών παρακολουθήθηκε σε χώμα το οποίο συλλέχθηκε από πεδίο βολής στο Καμπάνι Χανίων, πέρασε από κόσκινο 2 mm και αναδεύτηκε με τρισθενές αντιμόνιο Sb(III), σύμφωνα με οδηγίες πρωτοκόλλου, ώστε η συγκέντρωση να φτάσει τα 50 ppm από περίπου 1,17 ppm που βρέθηκε να έχει στην αρχή. Σε κάθε γλάστρα μετρήθηκαν και προστέθηκαν 685 γραμμάρια ρυπασμένου, με αντιμόνιο, χώματος, εκτός από τις τέσσερις πρώτες όπου χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου Α με χαμηλή συγκέντρωση αντιμονίου, ώστε να διατηρηθούν οι ιδιότητες του εδάφους και όλα τα υπάρχοντα στοιχεία. Κάτω από τις γλάστρες τοποθετήθηκαν πλαστικοί δίσκοι για να αποφευχθεί οποιαδήποτε διαρροή νερού και συνεπώς απώλεια μετάλλου, καθώς ποτίζονταν κάθε 2-3 ημέρες με περίπου 50-100 mL νερού βρύσης, ανάλογα την περιεκτικότητα του εδάφους σε υγρασία εκτός από την περίπτωση D όπου το νερό περιείχε νανοφουσαλίδες. Στις πειραματικές ομάδες C,D,E εξετάστηκε η

επίδραση των οργανικών οξέων που προστέθηκαν και παράλληλα διερευνήθηκε αν, στην ομάδα D, η άρδευση με νανοφυσαλίδες οξυγόνου μπορεί να ενισχύσει την φυτοεξυγίανση του αντιμονίου. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου, τα φυτά αφαιρέθηκαν προσεκτικά από το έδαφος και αφού πλύθηκαν με νερό βρύσης και ξεπλύθηκαν δύο φορές με απιονισμένο νερό, διαχωρίστηκαν σε ρίζες και βλαστούς (Εικόνα 10). Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν τα βάρη τους πριν και μετά την ξήρανση τους σε φούρνο για 48 ώρες της 70°C και ψύξη τους σε θερμοκρασία δωματίου.



Εικόνα 10. Μέρος της πειραματικής διαδικασίας της φυτοεξυγίανσης

Η περιεκτικότητα σε νερό υπολογίστηκε βάσει του τύπου:

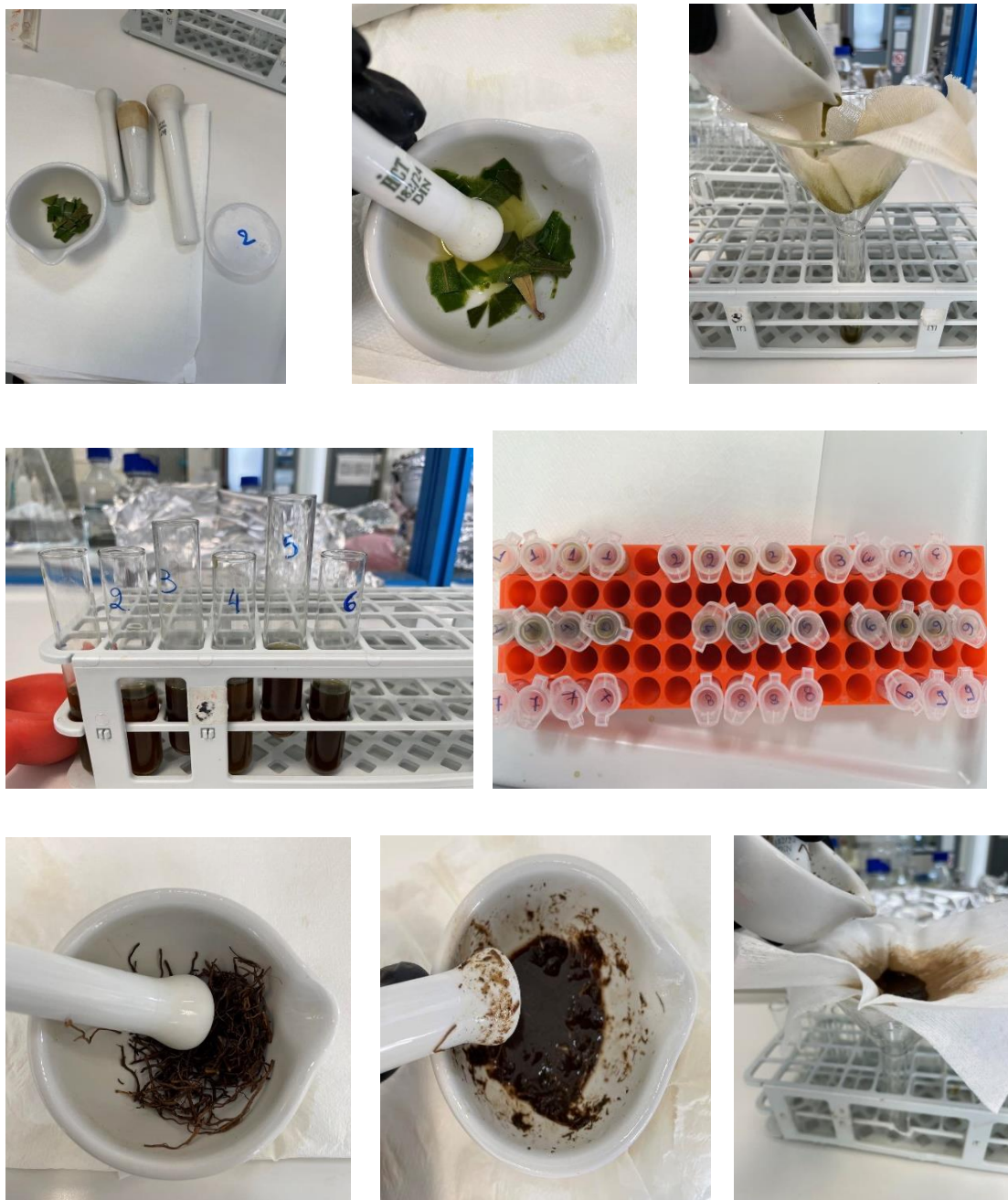
$$\text{Περιεκτικότητα(\%)} = \frac{N_{\text{ωπό βάρος}} - \xi_{\text{ηρό βάρος}}}{N_{\text{ωπό βάρος}}} * 100\%$$

Η συνολική απώλεια βάρους, υπολογίστηκε από το βάρος των φυτών πριν και μετά τη διεξαγωγή του πειράματος βάσει του τύπου:

$$\text{Συνολική απώλεια βάρους} = \frac{\text{αρχικό νωπό βάρος} - \text{τελικό νωπό βάρος}}{\text{αρχικό νωπό βάρος}}$$

Για την πραγματοποίηση μετρήσεων της περιεκτικότητας σε χλωροφύλλη, κατόπιν της παραπάνω διαδικασίας, συλλέχθηκαν δείγματα φύλλων 0,2 γραμμαρίων από κάθε φυτό και αλέστηκαν σε κεραμικό κονίαμα με 10 mL ακετόνης 80%. Η απορρόφηση του υπερκείμενου, για τον προσδιορισμό α,β και ολικής χλωροφύλλης, μετρήθηκε στα 663 και 664 nm, χρησιμοποιώντας φασματόμετρο UV-VIS, έπειτα από φυγοκέντριση.

Για την μέτρηση δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων, συλλέχθηκε 1 γραμμάριο φύλλων και ριζών και ομογενοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 100 mM (pH=7) το οποίο περιέχει 0,1 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) και 1% w/V πολυβινυλική πυρρολιδόνη (PVP). Πραγματοποιήθηκε διήθηση εκχυλίσματος και στη συνέχεια φυγοκέντριση υπερκείμενου στις 16.000 στροφές το λεπτό για 25 λεπτά (Εικόνα 11). Η συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την ανάλυση Bradford. Συγκεκριμένα, η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης προσδιορίστηκε από την παρακολούθηση της αύξησης της απορρόφησης λόγω οξείδωσης της γουαϊακόλης στα 470 nm για 3 λεπτά, χρησιμοποιώντας φασματόμετρο UV-VIS με συντελεστή απορρόφησης $\epsilon=25,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Με λίγα λόγια, παρασκευάστηκε ένα μίγμα αντίδρασης με ρυθμιστικό φωσφορικών (50 mM , pH=5,8), γουαϊακόλη (15 mg/mL), κατάλληλη ποσότητα φυτικού εκχυλίσματος και υπεροξείδιο του υδρογόνου (1% w/V). Η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίστηκε καταγράφοντας τη μείωση της απορρόφησης ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα 240 nm για 3 λεπτά με συντελεστή απορρόφησης $\epsilon=43,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Η μονάδα δραστικότητας των ενζύμων εκφράστηκε ως η μεταβολή της απορρόφησης ανά λεπτό σε μονάδες ανά χιλιοστόγραμμα εκχυλισμένων πρωτεϊνών.



Εικόνα 11. Μέρος της πειραματικής διαδικασίας την φυτοεξγίανσης

Όσον αφορά την ανάλυση μετάλλων, φυτικοί ιστοί ξηράθηκαν για 48 ώρες στους 70°C και υποβλήθηκαν σε χώνευση ώστε να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας αυτών σε μέταλλα. Ειδικότερα, αλεσμένα δείγματα φυτών 0,5 γραμμαρίων, αποτεφρώθηκαν σε κλίβανο σιγαστήρα για 16 ώρες στους 480°C και στη συνέχεια διαλύθηκαν, με 1,5mL κιτρικό οξύ (5M) και 7,5mL νιτρικό οξύ, σε εστία 100°C (Εικόνα 12). Το διάλυμα αραιώθηκε με υπερκάθαρο νερό στα 45mL και

αναδεύτηκε για 24 ώρες ενώ στη συνέχεια τα δείγματα διηθήθηκαν σε φίλτρα 0,45 μm και αναλύθηκαν σε ICP-MS.



Εικόνα 12. Χώνευση των φυτών

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας του εδάφους σε μέταλλα. Συλλέχθηκε η συνολική ποσότητα χώματος από τις γλάστρες, αφέθηκε να στεγνώσει με ατμοσφαιρικό αέρα μέσα σε πλαστικές σακούλες και στη συνέχεια πέρασε άλλη μια φορά από κόσκινο πλέγματος 2mm. Τα δείγματα 0,2 gr από το έδαφος υποβλήθηκαν στη διαδικασία χώνευσης με κιτρικό και νιτρικό οξύ που προαναφέρθηκε.

Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας συσσώρευσης μετάλλου του *N. oleander* αξιολογήθηκε με την εκτίμηση 2 βασικών παραμέτρων:

- Συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BCF) βάσει του τύπου:

$$BCF = \frac{C_{plant}}{C_{soil}}$$

Όπου C_{plant} η συγκέντρωση μετάλλων στο φυτό και C_{soil} η συγκέντρωση μετάλλων στο χώμα μετά από το πείραμα.

- Συντελεστής μετατόπισης (TF) βάσει του τύπου:

$$TF = \frac{C_{shoots}}{C_{root}}$$

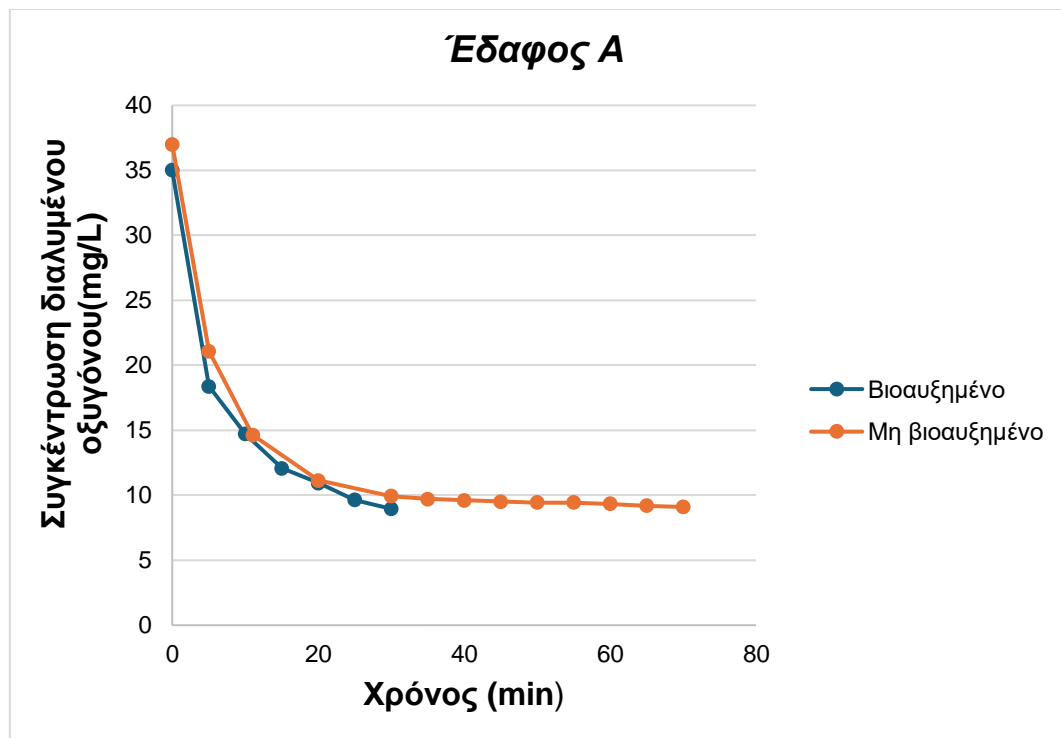
Όπου Cshoots η συγκέντρωση μετάλλων στους βλαστούς και Croots η συγκέντρωση μετάλλων στις ρίζες μετά από το πείραμα.

Μια τιμή BCF υψηλότερη από 1, υποδηλώνει ότι ένα φυτό είναι συσσωρευτής και μια τιμή TF υψηλότερη από 1, είναι ενδεικτική μιας υψηλής ικανότητας μετατόπισης μετάλλων από τις ρίζες στους βλαστούς.

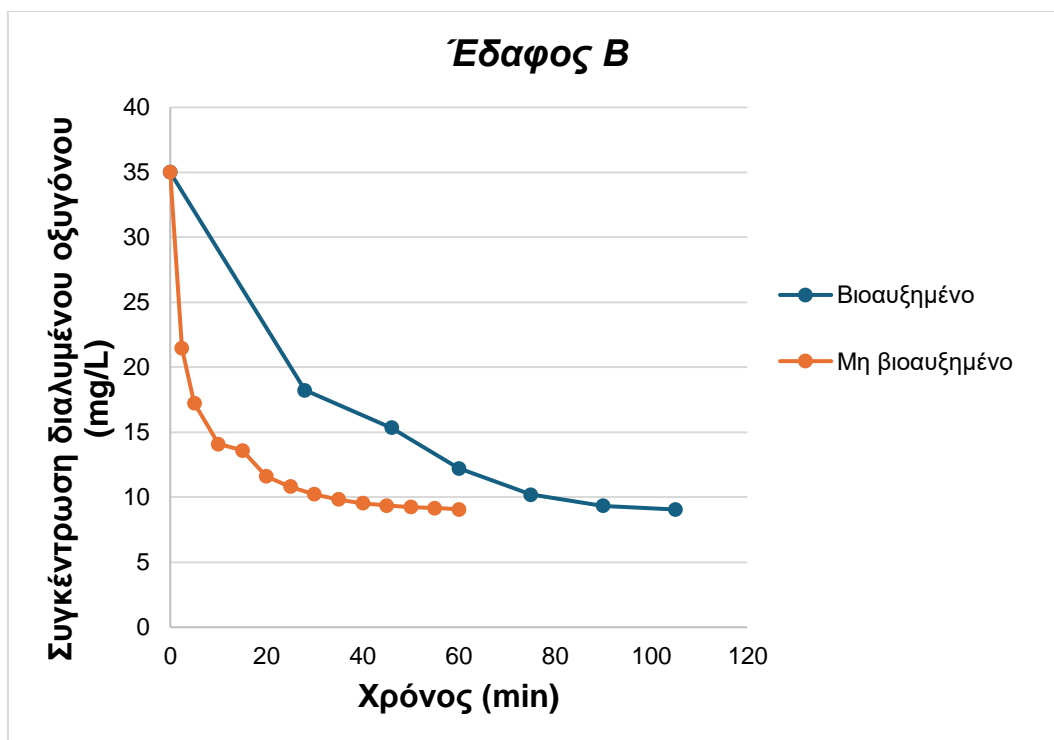
Κεφάλαιο 4. Αποτελέσματα

4.1 Πειραματική φάση Ι- Βιοεξυγίανση

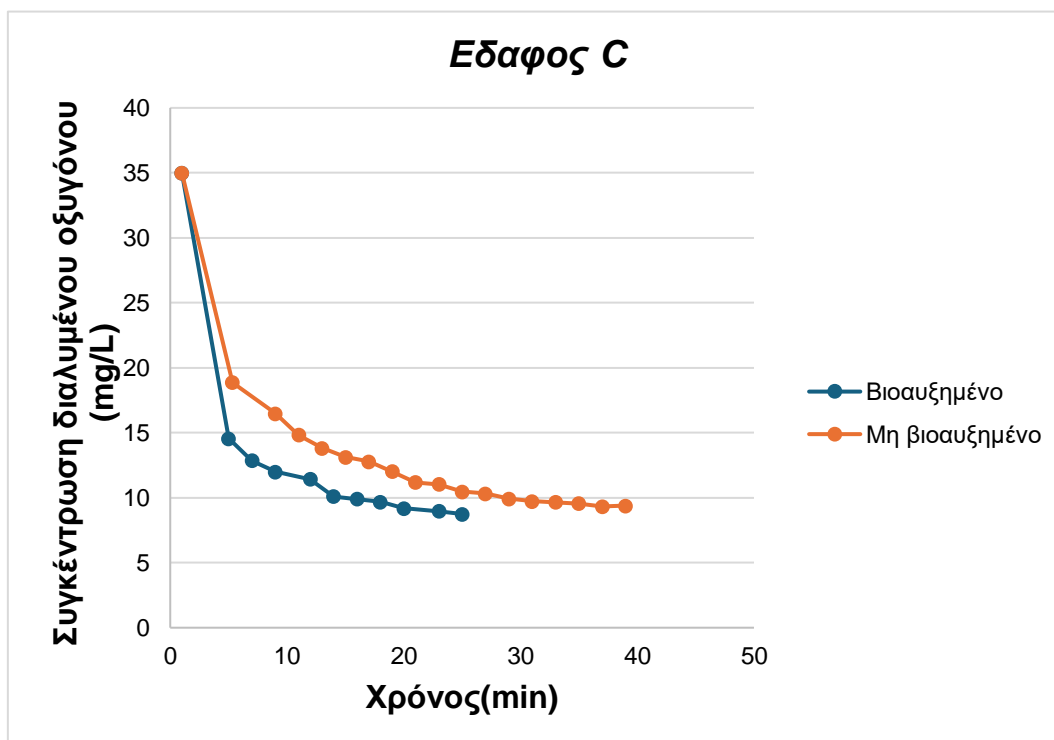
Στα διαγράμματα Διάγραμμα 1, Διάγραμμα 2 Διάγραμμα 3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του διαλυμένου οξυγόνου στη φλάσκα που περιέχει το νερό με τις νανοφυσαλίδες οξυγόνου με και χωρίς βακτήρια. Όπως φαίνεται, μόνο στο έδαφος B στο πείραμα με τον εμβολιασμό με βακτήρια παρατηρείται πιο αργή μείωση του οξυγόνου στην υδατική φάση. Στα υπόλοιπα χρώματα υπάρχει μόνο μια μικρή μείωση στο ενισχυμένο με βακτήρια πείραμα. Η αρχική συγκέντρωση οξυγόνου σε όλες τις φλάσκες υπολογίστηκε περίπου 35 mg/L.



Διάγραμμα 1. Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στη φλάσκα με τις νανοφυσαλίδες οξυγόνου με και χωρίς βιοαύξηση για το έδαφος Α.



Διάγραμμα 2. Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στη φλάσκα με τις νανοφουσαλίδες οξυγόνου με και χωρίς βιοαύξηση για το έδαφος Β.



Διάγραμμα 3. Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στη φλάσκα με τις νανοφουσαλίδες οξυγόνου με και χωρίς βιοαύξηση για το έδαφος C.

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 7, το επίπεδο οξυγόνου είναι χαμηλότερο στα εδάφη Α και Β, όταν προστέθηκαν τα βακτήρια οξειδώσεως αντιμονίου, ενώ ο τύπος του νερού δεν επηρέασε τη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου. Στο έδαφος C, δεν υπάρχει διαφορά στην περιεκτικότητα σε οξυγόνο μεταξύ των δοκιμών.

Πίνακας 7. Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες (Α, Β & C).

Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου (mg/L)				
Πειραματική επεξεργασία		Έδαφος Α	Έδαφος Β	Έδαφος C
Νερό βρύσης	Μη βιοαυξημένο	9,11-10,48	8,25-9,1	7,3-8,36
	Βιοαυξημένο	7,38-7,88	7,04-8,86	6,18-8,43
Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Μη βιοαυξημένο	9,16-10,5	8,3-9	4,44-8,33
	Βιοαυξημένο	7,18-7,88	7,12-8,94	7,04-8,08
Νανοφυσαλίδες οξυγόνου	Μη βιοαυξημένο	9,1-10,54	8,22-9,06	7,32-8,93
	Βιοαυξημένο	7,39-8,96	7,36-9,08	6,69-8,75

Όπως παρουσιάζεται στον Πίνακας 8, όσον αφορά το pH, δεν υπάρχει διαφορά στα πειράματα μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων αντιμονίου στο έδαφος, στις επεξεργασίες με και χωρίς βιοαύξηση καθώς και στις περιπτώσεις με και χωρίς την προσθήκη νανοφυσαλίδων οξυγόνου. Σε όλες τις πειραματικές δοκιμές το pH μέση τιμή είναι περίπου 7,5.

Πίνακας 8. pH σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες (A, B & C).

pH				
Πειραματική επεξεργασία		Έδαφος A	Έδαφος B	Έδαφος C
Νερό βρύσης	Μη βιοαυξημένο	7,41-7,7	7,7-8,37	7,67-8,01
	Βιοαυξημένο	7,13-8,03	7,48-7,73	6,88-7,99
Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Μη βιοαυξημένο	6,93-7,85	7,55-8,4	7,4-7,9
	Βιοαυξημένο	7,05-8,03	7,54-7,93	6,77-7,84
Νανοφυσαλίδες οξυγόνου	Μη βιοαυξημένο	7,37-7,93	7,61-8,73	7,77-7,98
	Βιοαυξημένο	7,63-8,16	7,66-7,94	6,87-7,9

Σύμφωνα με τον Πίνακας 9, κατά την παρακολούθηση του δυναμικού της οξειδοαναγωγής κατά τη διάρκεια του πειράματος, παρατηρούνται κάποιες

διαφορές. Στις δοκιμές με το νερό βρύσης οι τιμές βρέθηκαν να είναι υψηλότερες στα πειράματα χωρίς τον εμβολιασμό βακτηρίων. Αντίθετα, όταν άλλαξε ο τύπος του νερού και χρησιμοποιήθηκε νερό με νανοφυσalıδες οξυγόνου, οι τιμές του δυναμικού οξειδοαναγωγής βρέθηκαν υψηλότερες με την προσθήκη μικροβιακής κοινότητας. Ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στο έδαφος C, ενώ στο B όλες οι τιμές ήταν παρόμοιες εκτός από τη δοκιμή απουσία μικροβιακής κοινότητας κατά τη χρήση της τεχνολογίας νανοφυσalıδων.

Πίνακας 9. Δυναμικό οξειδοαναγωγής σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες (A, B & C).

Δυναμικό οξειδοαναγωγής (mV)				
Πειραματική επεξεργασία		Έδαφος A	Έδαφος B	Έδαφος C
Νερό βρύσης	Μη βιοαυξημένο	265,5-288,8	239,9-278,2	181,7-235,4
	Βιοαυξημένο	216,4-252	220,8-254,5	198,8-246
Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Μη βιοαυξημένο	264,1-285,7	241,1-272,8	198,4-232,1
	Βιοαυξημένο	217,4-271	210,5-235,4	200,9-248,8
Νανοφυσalıδες οξυγόνου	Μη βιοαυξημένο	261,7-286,3	241,5-280,5	195,7-244,1
	Βιοαυξημένο	216,6-267,2	216,7-244,7	199,2-263,9

Στον Πίνακα 10, παρουσιάζεται η συγκέντρωση μετάλλων μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe) και αντιμονίου (Sb) στο χώμα Α με την υψηλότερη συγκέντρωση αντιμονίου μετά το τέλος των πειραμάτων, με και χωρίς την παρουσία βακτηρίων και νανοφυσολιδων οξυγόνου. Σε όλα τα πειράματα, η συγκέντρωση των μετάλλων στο εξεταζόμενο έδαφος είναι χαμηλότερη από εκείνη της αρχικής, συνεπώς υπάρχει απελευθέρωση από το έδαφος στο νερό σε όλα τα μέταλλα. Όσον αφορά το αντιμόνιο, η συγκέντρωση σε πειράματα χωρίς την παρουσία βακτηρίων βρέθηκε χαμηλότερη με την προσθήκη νανοφυσολιδων οξυγόνου. Στα πειράματα παρουσία βακτηρίων, η συγκέντρωση στο έδαφος βρέθηκε χαμηλότερη σε σύγκριση με τα πειράματα απουσίας τους, υποδεικνύοντας έτσι ότι η μικροβιακή κοινότητα ενίσχυσε την απελευθέρωση του αντιμονίου στο νερό.

Πίνακας 10. Ποσοστό υπολειπόμενων μετάλλων μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe) και αντιμονίου (Sb) στο έδαφος Α μετά το πέρας του πειράματος στις φλάσκες.

Ποσοστό επί τοις εκατό (%) στο χώμα από την αρχική μάζα

Έδαφος Α	Μη βιοαυξημένο			Βιοαυξημένο		
Μέταλλο	Νερό βρύσης	Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Νανοφυσαλίδες οξυγόνου	Νερό βρύσης	Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Νανοφυσαλίδες οξυγόνου
Μαγγάνιο	47,5%	78,8%	45,5%	44,8%	39,8%	38,1%
Σίδηρος	45,7%	55,5%	41,3%	61,2%	46,3%	57,1%
Αντιμόνιο	54,4%	42,2%	33,6%	24,4%	23,0%	24,5%

Στον Πίνακα 11, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων του εδάφους Β με χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμονίου. Διαπιστώνεται, ότι η συγκέντρωση

αντιμονίου στο έδαφος μειώθηκε σε μικρότερο βαθμό από ό,τι στο έδαφος Α, καθώς παρατηρήθηκε μείωση περίπου 54% στο έδαφος Β, ενώ στο Α το μέγιστο ποσοστό μείωσης βρέθηκε να είναι περίπου 77%. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά αντιμονίου μεταξύ των, με και χωρίς την προσθήκη βακτηρίων, πειραμάτων καθώς και μεταξύ του νερού της βρύσης και του νερού με νανοφυσαλίδες. Το ίδιο συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί και για τα άλλα δύο μέταλλα. Συνολικά, ο μικροβιακή κοινότητα σε αυτή την περίπτωση και η συμπλήρωση νανοφυσαλίδων οξυγόνου δεν ενίσχυσαν την κινητοποίηση του αντιμονίου.

Πίνακας 11. Ποσοστό υπολειπόμενων μετάλλων μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe) και αντιμονίου (Sb) στο έδαφος Β μετά το πέρας του πειράματος στις φλάσκες.

Ποσοστό επί τοις εκατό (%) στο χώμα από την αρχική μάζα

Έδαφος Β	Μη βιοαυξημένο			Βιοαυξημένο		
Μέταλλο	Νερό βρύσης	Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Νανοφυσαλίδες οξυγόνου	Νερό βρύσης	Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Νανοφυσαλίδες οξυγόνου
Μαγγάνιο	58,6%	58,1%	59,6%	76,7%	73,9%	69,8%
Σίδηρος	65,6%	70,7%	66,3%	70,7%	78,1%	66,1%
Αντιμόνιο	47,7%	48,2%	47,7%	53%	49,9%	49,7%

Τέλος, δοκιμάστηκε το έδαφος C με τη χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμονίου και απεδείχθη ότι και σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης σε μέταλλα. Ωστόσο, σύμφωνα με τον Πίνακας 12, δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στην απελευθέρωση αντιμονίου κατά τη χρήση διαφορετικού τύπου νερού καθώς και του εμβολιασμού με βακτήρια οξείδωσης. Συμπερασματικά, η προσθήκη

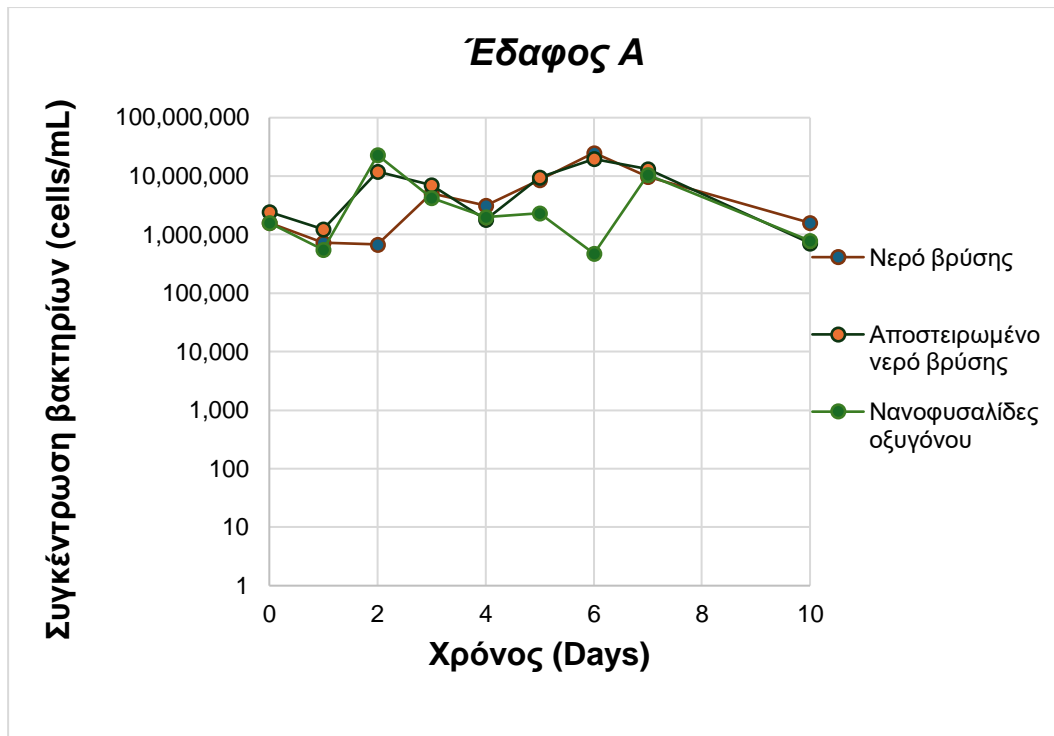
βακτηρίων και νανοφυσαλίδων οξυγόνου δεν ενίσχυσε την κινητικότητα του σιδήρου, του μαγγανίου και του αντιμονίου από το έδαφος στην υδατική φάση.

Πίνακας 12. Ποσοστό υπολειπόμενων μετάλλων μαγγανίου (Mn), σιδήρου (Fe) και αντιμονίου (Sb) στο έδαφος C μετά το πέρας του πειράματος.

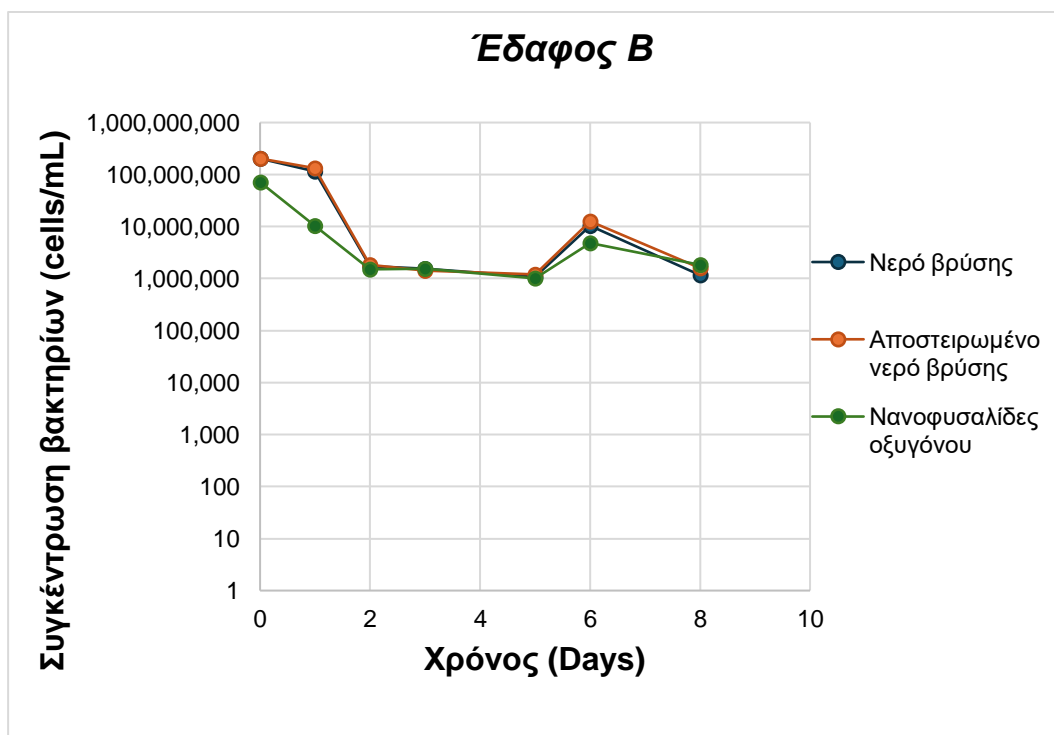
Ποσοστό επί τοις εκατό (%) στο χώμα από την αρχική μάζα

Έδαφος C	Μη βιοαυξημένο			Βιοαυξημένο		
Μέταλλο	Νερό βρύσης	Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Νανοφυσαλίδες οξυγόνου	Νερό βρύσης	Αποστειρωμένο νερό βρύσης	Νανοφυσαλίδες οξυγόνου
Μαγγάνιο	34,7%	54,2%	29,2%	56,8%	58,9%	51,5%
Σίδηρος	41,7%	59,9%	37,9%	60,6%	74,8%	63,4%
Αντιμόνιο	39,4%	46%	46,9%	61%	74,1%	57,6%

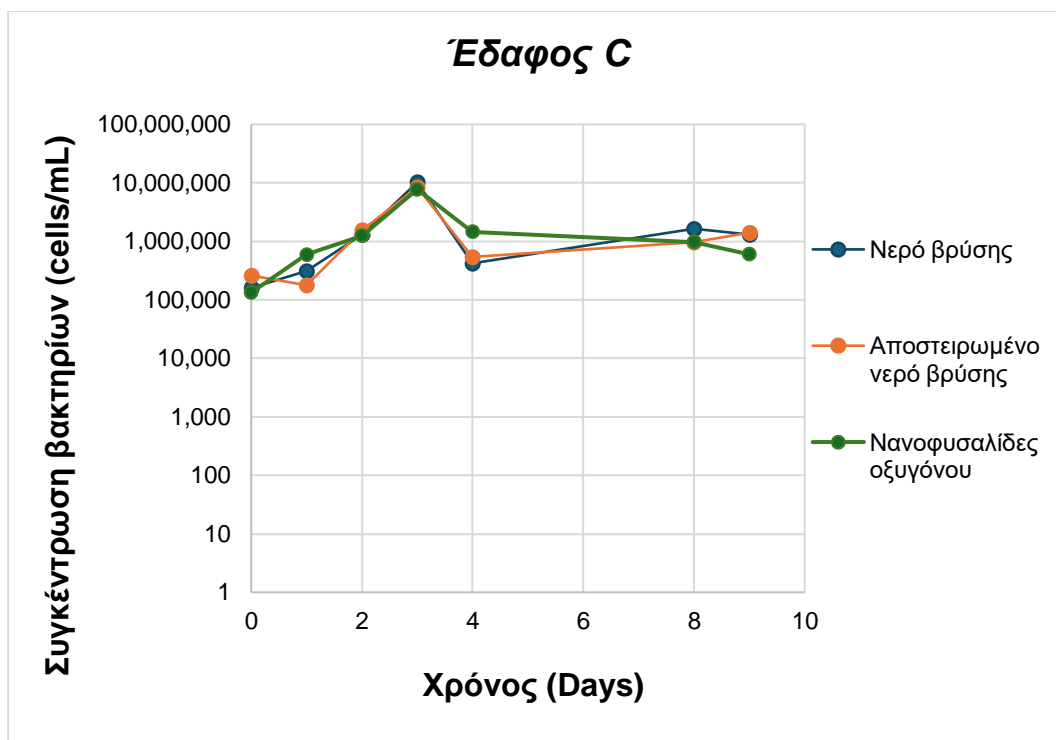
Η μικροβιακή συγκέντρωση στις φλάσκες παρακολουθήθηκε με CytoFLEXFlow Cytometer (Beckman Coulter). Η μικροβιακή συγκέντρωση στα εδάφη A, B, C παρακολουθήθηκε από την ημέρα 0 έως το τέλος του πειράματος. Σε όλα τα εδάφη, η συγκέντρωση των βακτηρίων διατηρήθηκε από 10^6 έως 10^8 cells/ml, όπως φαίνεται στα διαγράμματα Διάγραμμα 4, Διάγραμμα 5 & Διάγραμμα 6. Τέλος, η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους βρέθηκε ότι αποτελείται κυρίως από *Stenotrophomonas* και *Advenella*.



Διάγραμμα 4. Βακτηριακή συγκέντρωση σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες για το έδαφος Α.



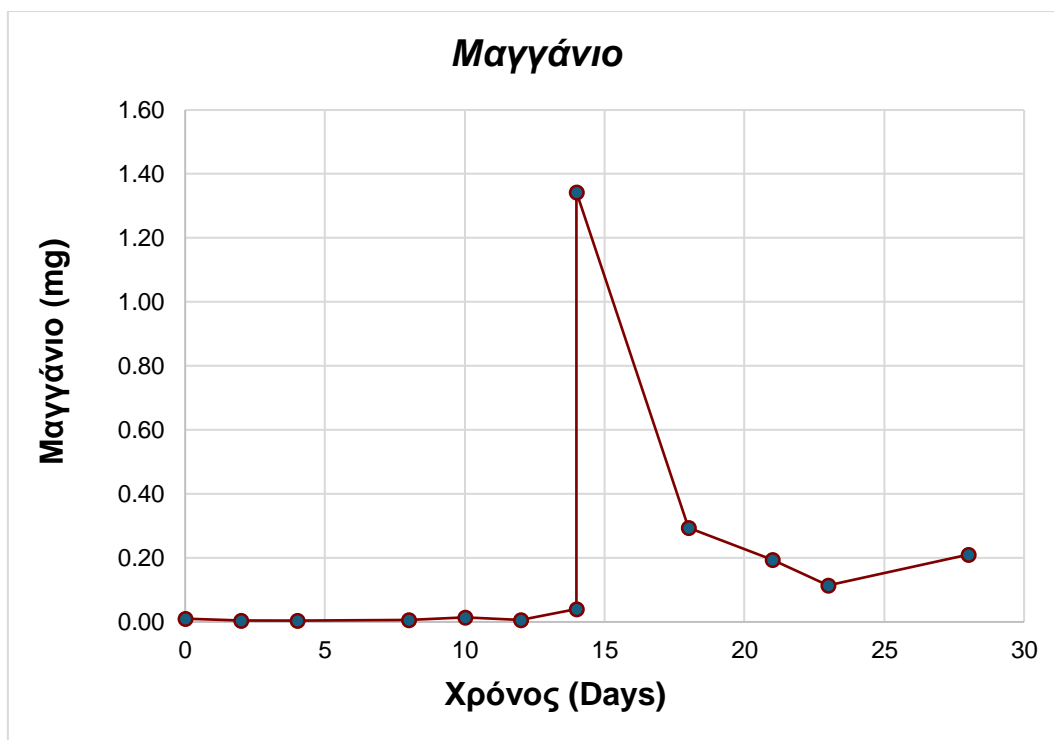
Διάγραμμα 5. Βακτηριακή συγκέντρωση σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλάσκες για το έδαφος Β.



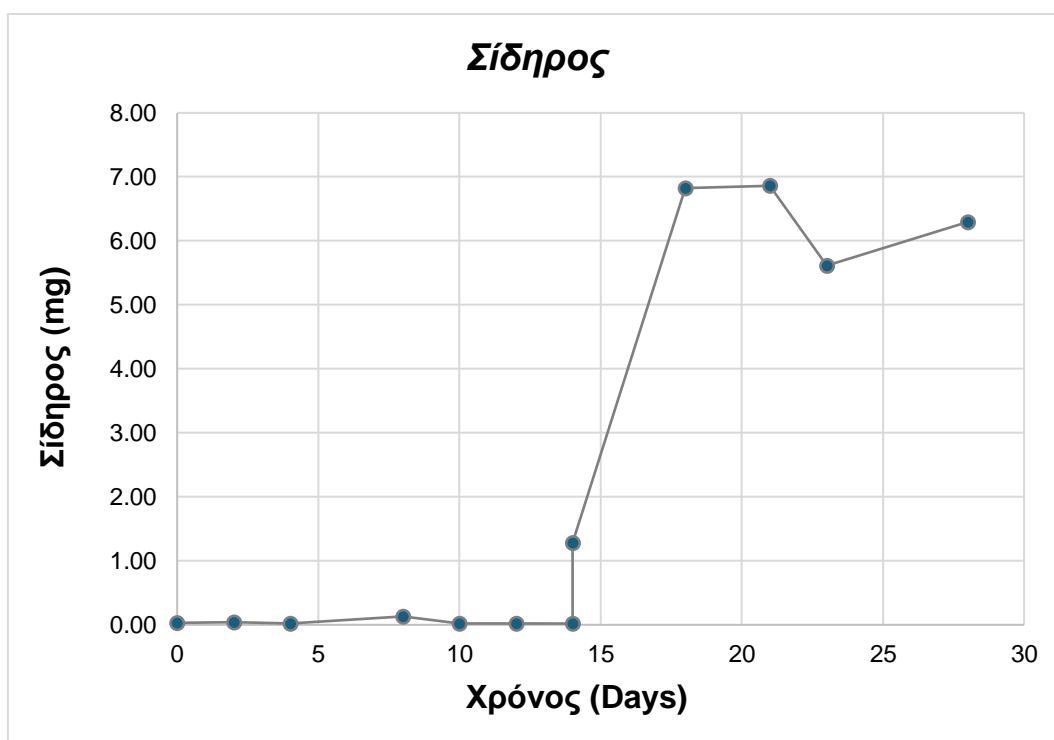
Διάγραμμα 6. Βακτηριακή συγκέντρωση σε όλες τις πειραματικές επεξεργασίες στις φλασκες για το έδαφος C.

4.1.2 Βιοαντιδραστήρας

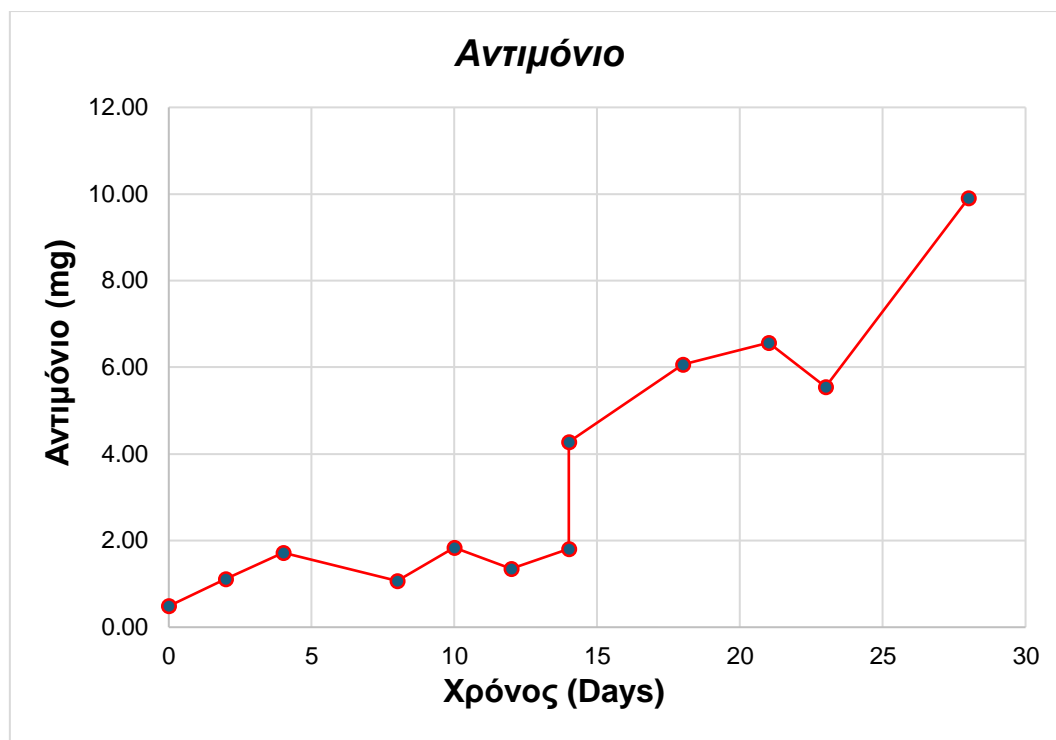
Η διαδικασία εμβολιασμού με βακτήρια του εδάφους A σε συνδυασμό με την τεχνολογία νανοφυσalıδων δοκιμάστηκε και σε βιοαντιδραστήρα. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα **Διάγραμμα 7**, **Διάγραμμα 8**, **Διάγραμμα 9**, μέσα σε 14 ημέρες δεν υπήρξε απελευθέρωση μετάλλων σιδήρου και μαγγανίου από το έδαφος στην υδατική φάση καθώς η μάζα των οποίων ανιχνεύεται στο νερό είναι χαμηλή. Όσον αφορά το αντιμόνιο, παρατηρήθηκε απελευθέρωση αλλά εξακολουθεί να είναι χαμηλή. Την 14^η ημέρα, πραγματοποιήθηκε η προσθήκη χαμηλής συγκεντρώσεως οργανικών οξέων και μπορεί να παρατηρηθεί ότι την ίδια ημέρα ανιχνεύθηκε αύξηση της μάζας σιδήρου και αντιμονίου. Στο μαγγάνιο, έπειτα από την κορύφωση της μάζας παρατηρήθηκε απότομη μείωση τις επόμενες ημέρες. Αντίθετα, η μάζα σιδήρου αυξήθηκε μετά την προσθήκη οργανικών οξέων παρουσιάζοντας το ίδιο μοτίβο και τις επόμενες ημέρες. Απ' την άλλη, η μάζα του αντιμονίου είναι σημαντικά υψηλότερη την 21^η ημέρα απ' ότι πριν την προσθήκη οργανικών οξέων ενώ τις επόμενες μέρες είναι ελαφρώς μειωμένη. Το ποσοστό του αντιμονίου στην υδατική φάση αυξήθηκε από 5% σε 27% στο τέλος του πειράματος.



Διάγραμμα 7. Τελική μάζα μαγγανίου στην υδατική φάση στο πείραμα του εμβολιασμού με βακτήρια του εδάφους Α σε συνδυασμό με νανοφυσαλίδες οξυγόνου

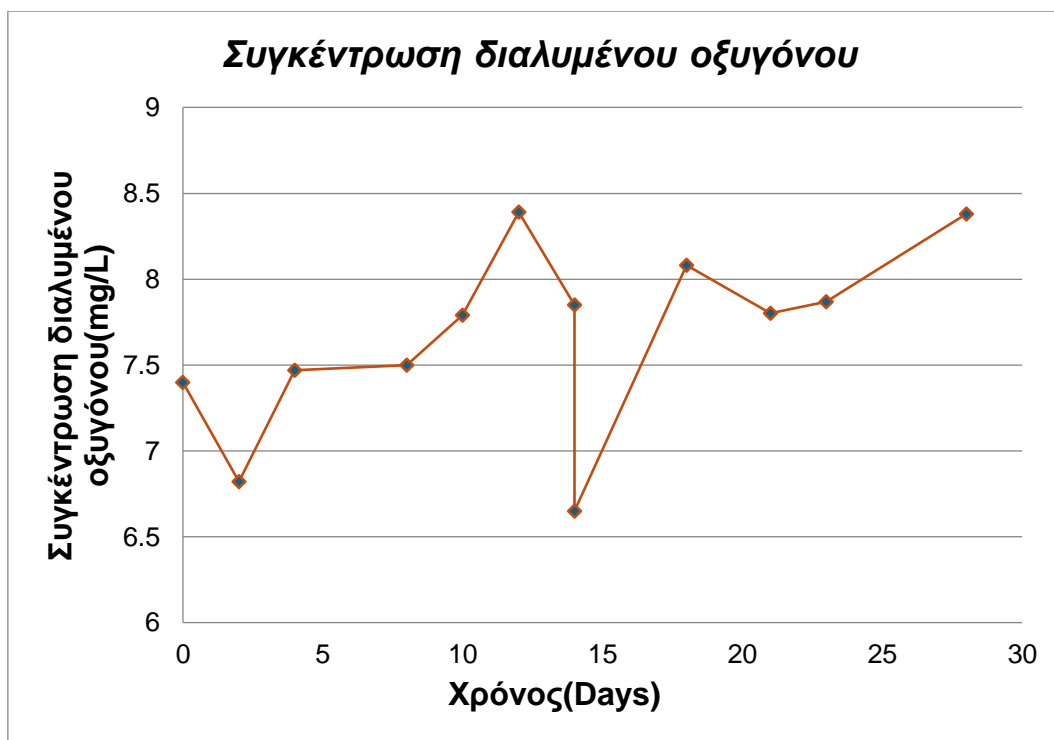


Διάγραμμα 8. Τελική μάζα σιδήρου στην υδατική φάση στο πείραμα του εμβολιασμού με βακτήρια του εδάφους Α σε συνδυασμό με νανοφυσαλίδες οξυγόνου.

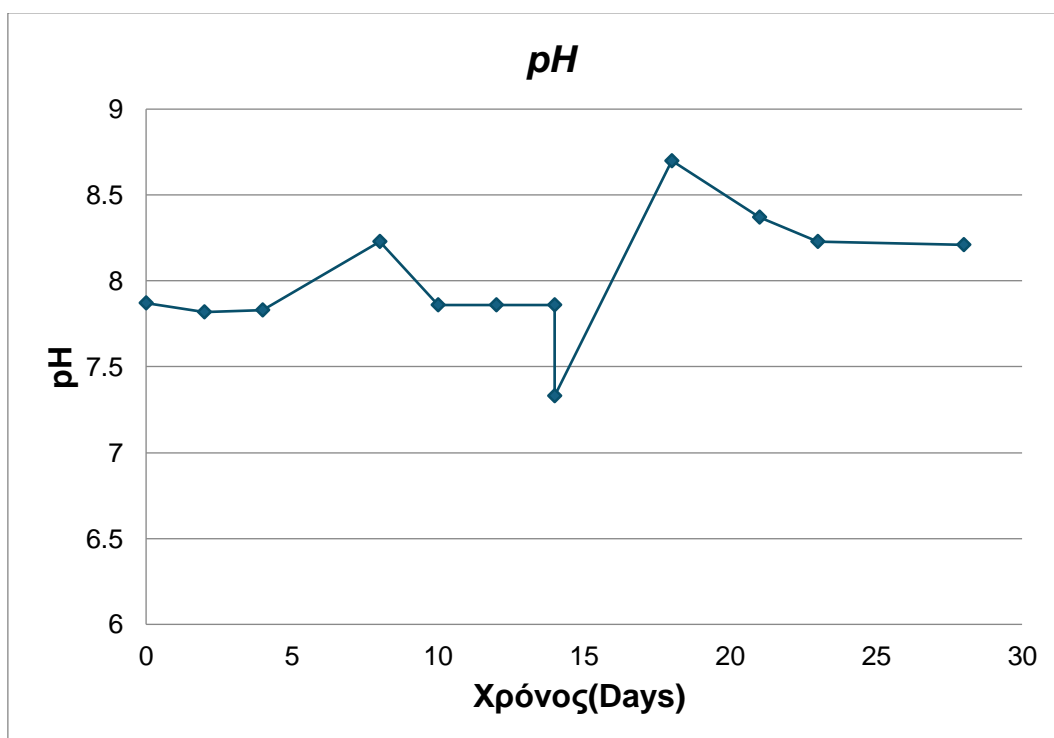


Διάγραμμα 9. Τελική μάζα αντιμονίου στην υδατική φάση στο πείραμα με του εμβολιασμού με βακτήρια του εδάφους Α σε συνδυασμό με νανοφυσαλίδες οξυγόνου.

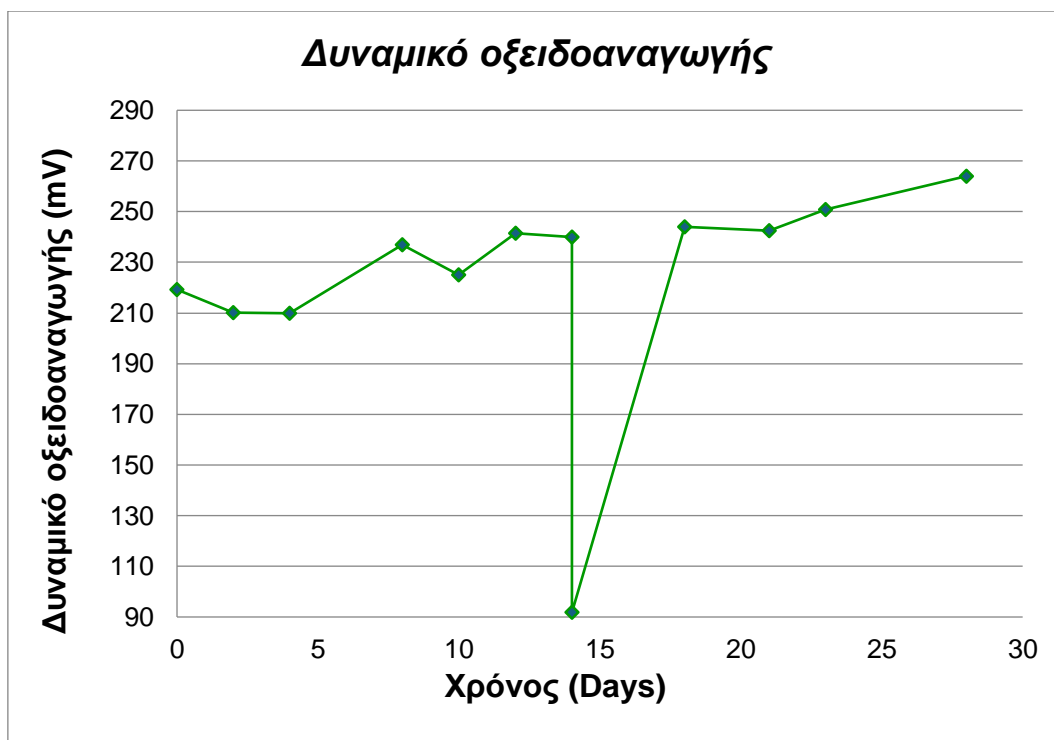
Οι φυσικοχημικές παράμετροι (pH, συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου και δυναμικό οξειδοαναγωγής) παρακολουθήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος. Σύμφωνα με τα διαγράμματα **Διάγραμμα 10**, **Διάγραμμα 11** & **Διάγραμμα 12**, φαίνεται ένα σταθερό μοτίβο εκτός από την 14^η ημέρα, όπου πραγματοποιήθηκε η προσθήκη οργανικών οξέων και παρατηρήθηκε μια απότομη πτώση. Όσον αφορά το pH, οι τιμές είναι σταθερές πριν από τη συμπλήρωση οργανικών οξέων, ενώ μειώθηκε ελαφρώς μετά την προσθήκη τους στον βιοαντιδραστήρα και στη συνέχεια οι τιμές ήταν μετρίως αυξημένες μέχρι το τέλος του πειράματος. Το ίδιο μοτίβο ακολουθήθηκε και στο διαλυμένο οξυγόνο. Η περιεκτικότητα σε οξυγόνο μειώθηκε από 7,85 mg/L σε 6,65 mg/L και στη συνέχεια το διαλυμένο οξυγόνο αυξήθηκε.



Διάγραμμα 10. Συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στην πειραματική επεξεργασία του εδάφους Α με εμβολιασμό με βακτήρια και προσθήκη νανοφυσαλίδων οξυγόνου.



Διάγραμμα 11. pH στην πειραματική επεξεργασία του εδάφους Α με βακτηριακό εμβολιασμό και προσθήκη νανοφυσαλίδων οξυγόνου.



Διάγραμμα 12. Δυναμικό οξειδοαναγωγής στην πειραματική επεξεργασία του εδάφους Α με εμβολιασμό με βακτήρια και προσθήκη νανοφυσαλίδων οξυγόνου.

Η απομάκρυνση του αντιμονίου από το έδαφος Α στον βιοαντιδραστήρα ήταν μόλις 5% πριν την προσθήκη οργανικών οξέων και 23% μετά την προσθήκη τους. Φαίνεται ότι υπάρχει μια μεγαλύτερη κινητοποίηση με την προσθήκη οργανικών, ωστόσο τελικά το 73% του αντιμονίου έμεινε στο έδαφος (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Υπολειπόμενα ποσοστά αντιμονίου στο έδαφος Α πριν και μετά την εφαρμογή οργανικών οξέων στον βιοαντιδραστήρα.

Πριν την προσθήκη οργανικών οξέων	Μετά την προσθήκη οργανικών οξέων
95%	73%

Η μικροβιακή συγκέντρωση στις φλάσκες παρακολουθήθηκε με CytoFLEXFlow Cytometer (Beckman Coulter). Η βακτηριακή συγκέντρωση στα εδάφη Α, Β, C παρακολουθήθηκε από την ημέρα 0 έως το τέλος του πειράματος (28 ημέρες) . Σε όλα τα εδάφη, η συγκέντρωση των βακτηρίων διατηρήθηκε από 10^8 έως 10^9 cells/mL, όπως φαίνεται στο

Διάγραμμα 13. Η προσθήκη οργανικών οξέων δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των βακτηρίων.



Διάγραμμα 13. Συγκέντρωση βακτηρίων στον βιοαντιδραστήρα.

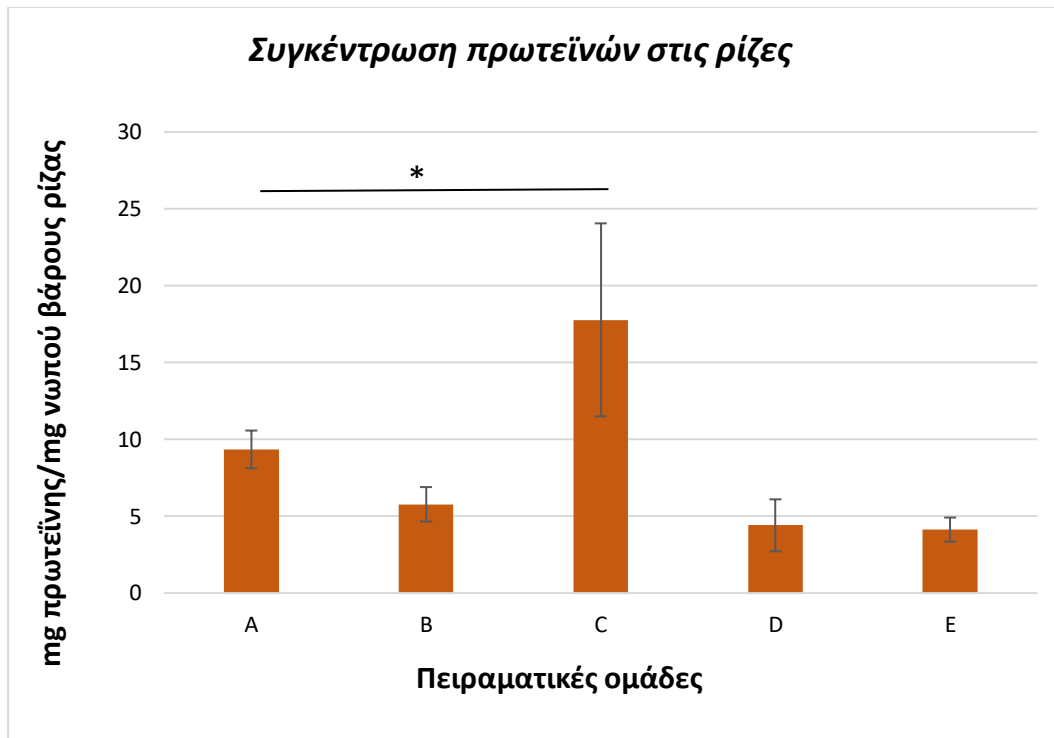
4.2 Πειραματική φάση II- Φυτοεξυγίανση

Το pH του εδάφους μετρήθηκε σε κάθε επεξεργασία πριν και μετά το τέλος της πειραματικής περιόδου. Το αρχικό pH του εδάφους βρέθηκε 7,42. Στην πειραματική ομάδα ελέγχου το pH μειώθηκε στο 7,17 ενώ στο εμπλουτισμένο με αντιμόνιο χώμα το pH αυξήθηκε ελαφρώς στο 7,51. Η προσθήκη οργανικών οξέων οδήγησε σε οξίνιση του εδάφους. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης οργανικών οξέων μείωσε το pH του εδάφους στο 6,61 ενώ η υψηλότερη σε pH 6,04. Μετά το πέρας του πειράματος, το pH αυξήθηκε περίπου στο 7,65 και 7,23 στις ομάδες χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης οργανικών οξέων αντίστοιχα. Οι τιμές παρατίθενται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14. Μετρήσεις pH πριν και μετά το πείραμα για όλες τις ομάδες

Πειραματική ομάδα					
pH	A	B	C	D	E
	(Ελέγχου)	Sb 50 ppm	Sb 50 ppm OAs 7 mmol/kg	Sb 50ppm OAs 7mmol/kg with O ₂ NBs	Sb 50ppm OAs 70 mmol/kg
Πριν	7,42	7,42	6,61	6,61	6,04
Μετά	7,17	7,51	7,65	7,61	7,23

Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εξετάστηκε στη ρίζα και στα φύλλα των φυτών για κάθε πειραματική ομάδα. Όπως φαίνεται στα διαγράμματα Διάγραμμα 14 Διάγραμμα 15, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ της ρίζας της ομάδας C, που εκτέθηκε στο αντιμόνιο με τη χαμηλής συγκέντρωσης των οργανικών οξέων και της ομάδας ελέγχου. Ειδικότερα, βρέθηκαν 9,4 mg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο νωπής ρίζας στον έλεγχο και 17,7 mg πρωτεΐνης ανά γραμμάριο νωπής ρίζας στην ομάδα C. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης των φύλλων είναι σημαντικά υψηλότερη απ' ότι στη ρίζα. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη των φύλλων ήταν σημαντικά διαφορετική στην ομάδα B από την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη βρέθηκε να είναι 23,8 mg/g φρέσκων φύλλων στην ελέγχου και 110,9 mg/g στη B.

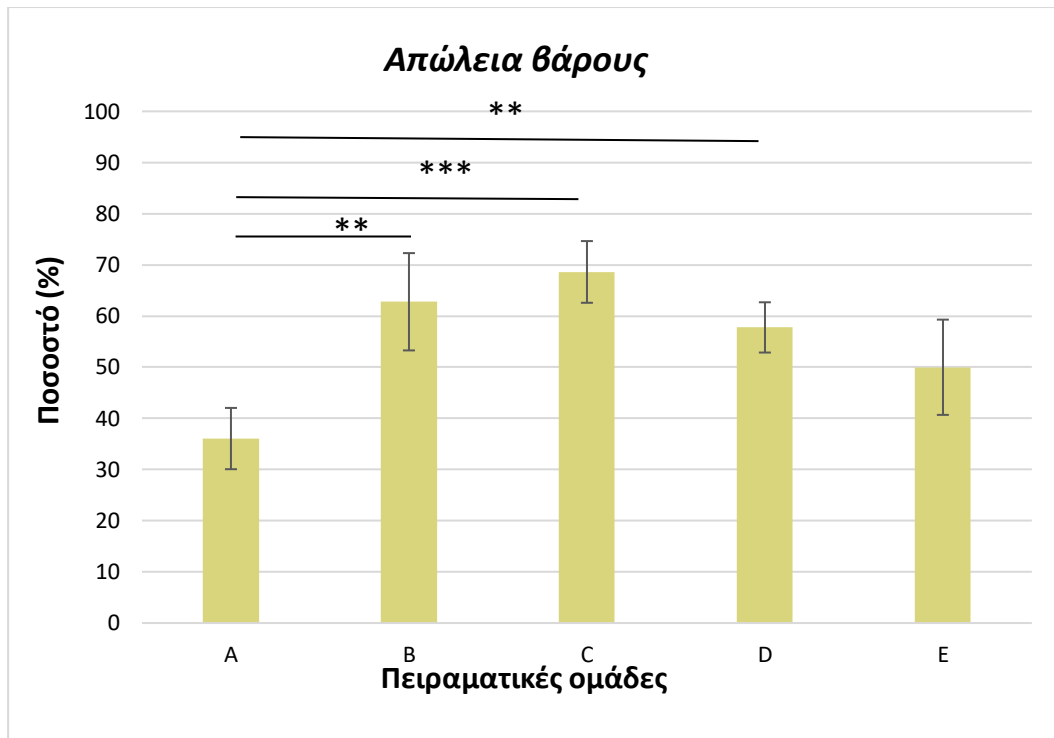


Διάγραμμα 14. Περιεκτικότητα πρωτεΐνης σε ρίζα για όλες τις ομάδες.

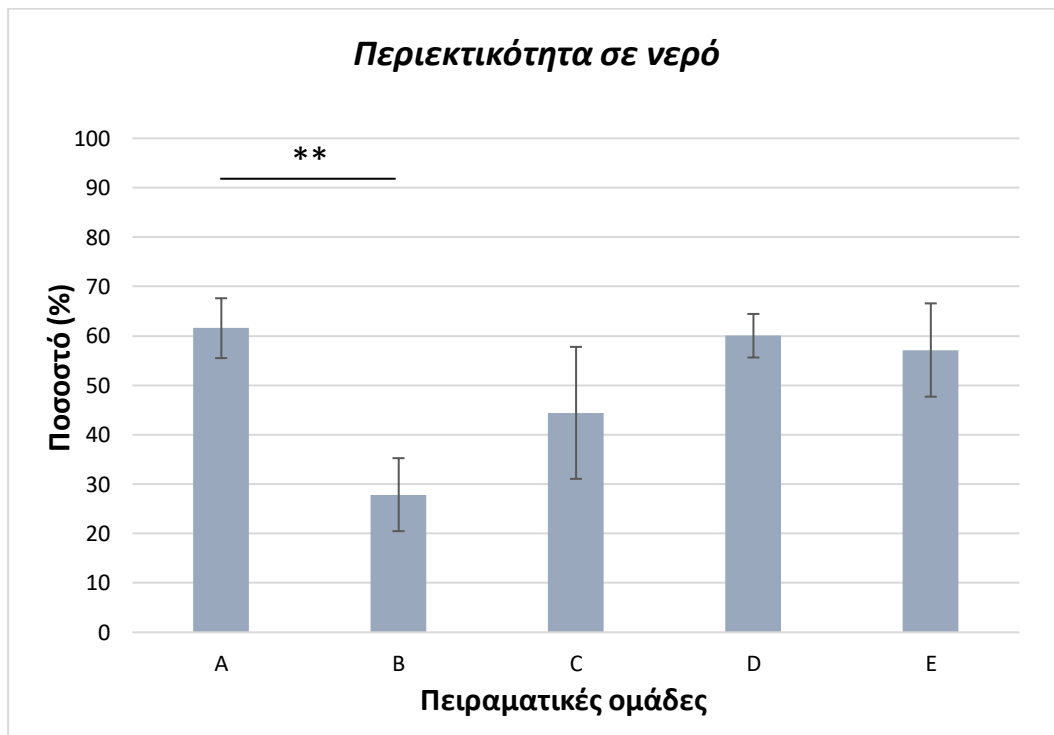


Διάγραμμα 15. Περιεκτικότητα πρωτεΐνης σε βλαστούς για όλες τις ομάδες.

Οι φυσιολογικές αλλαγές στα φυτά αξιολογήθηκαν επίσης με τη μέτρηση απώλειας νωπού βάρους των ριζών και της περιεκτικότητας σε νερό. Παρατηρήθηκε απώλεια, κατόπιν εξέτασης, του βάρους σε όλες τις ομάδες, με το χαμηλότερο ποσοστό να παρατηρείται στην ομάδα ελέγχου Α. Σύμφωνα με τα διαγράμματα Διάγραμμα 16 Διάγραμμα 17, η ανάλυση μεταξύ των ομάδων έδειξε σημαντική μείωση του βάρους στις ομάδες Β, C και D. Στην ομάδα Ε, η απώλεια βάρους ήταν επίσης αυξημένη σε σύγκριση με του ελέγχου, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά. Η περιεκτικότητα του φυτού σε νερό βρέθηκε να επηρεάζεται αρνητικά από τη παρουσία αντιμονίου στην ομάδα Β σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου αφού παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά. Τα φυτά στις άλλες επεξεργασίες που εκτέθηκαν στο αντιμόνιο δεν βρέθηκαν να επηρεάζονται σημαντικά. Στις ομάδες D και E, η περιεκτικότητα σε νερό ήταν πολύ κοντά με το ποσοστό του ελέγχου, ενώ στην ομάδα C, η περιεκτικότητα σε νερό ήταν μειωμένη αλλά όχι σημαντικά.

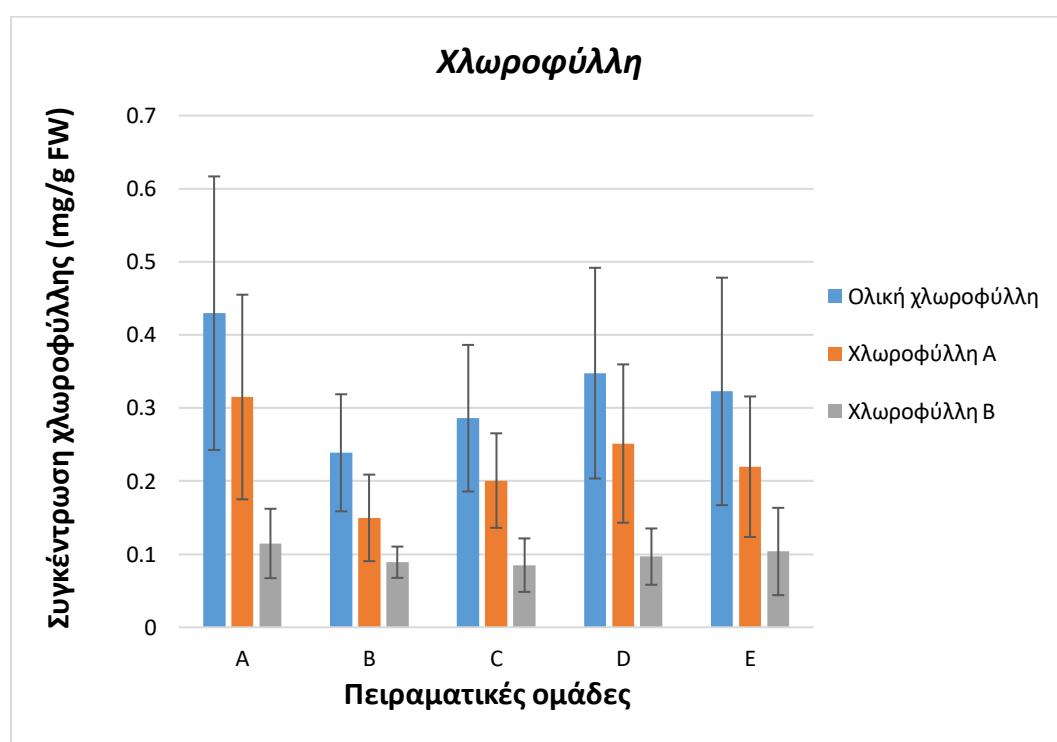


Διάγραμμα 16. Απώλεια βάρους στο τέλος του πειράματος για όλες τις ομάδες



Διάγραμμα 17. Ποσοστό περιεκτικότητας σε νερό στο τέλος του πειράματος για όλες τις ομάδες

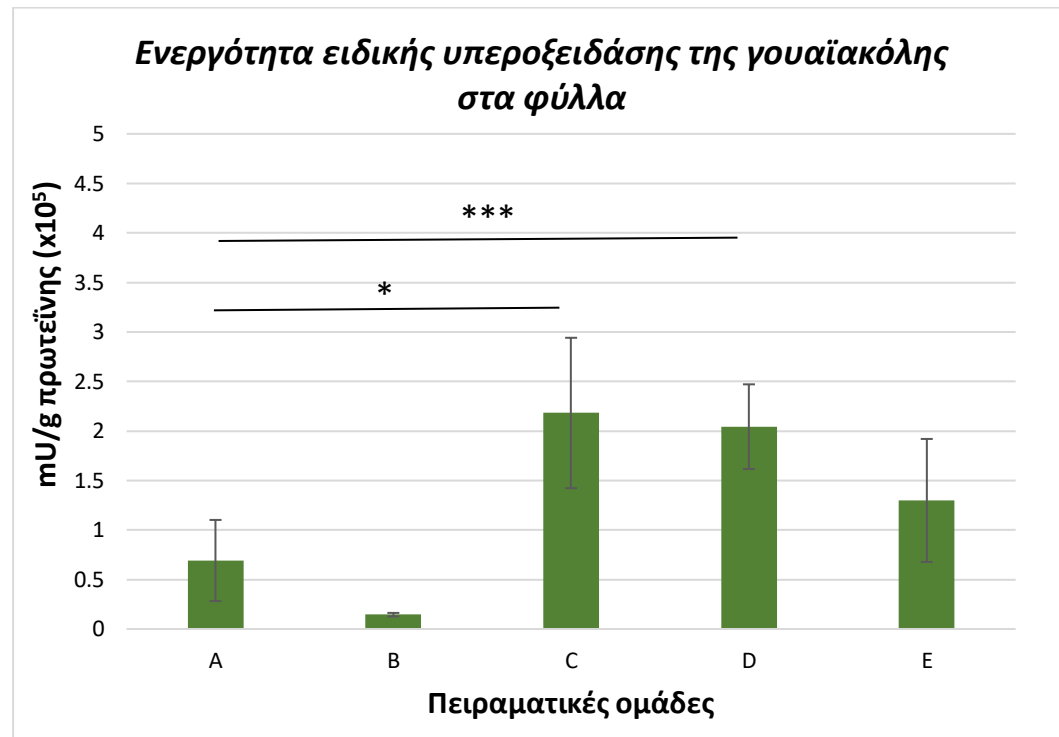
Όσον αφορά την ολική χλωροφύλλη, τη χλωροφύλλη α και τη χλωροφύλλη β, δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με την Α για όλες τις ομάδες. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 18, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη ήταν υψηλότερη στην ομάδα ελέγχου, ενώ χαμηλότερη βρέθηκε στη Β όπου δεν είχαν προστεθεί οργανικά οξέα στο έδαφος. Στην περίπτωση του συνδυασμού οργανικών οξέων και νανοφυσαλίδων οξυγόνου (ομάδα D), η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη βρέθηκε να είναι η υψηλότερη απ' όλες τις ομάδες εκτός αυτής του ελέγχου αν και η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική. Συνολικά, σε όλες τις ομάδες, η περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη δεν είναι στατιστικά διαφορετική.



Διάγραμμα 18. Περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη (α,β και ολική) στους φυτικούς ιστούς για όλες τις ομάδες στο τέλος του πειράματος.

Η δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική άμυνα, προσδιορίστηκε στη ρίζα και στα φύλλα. Ειδικότερα, η δράση της καταλάσης στη ρίζα δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την έκθεση στο αντιμόνιο καθώς δεν παρατηρήθηκε στατιστική διαφορά. Η υπεροξειδάση της γουαϊκόλης στις ρίζες ήταν σημαντικά υψηλότερη στις ομάδες D και E σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η παραγωγή ενζύμου στα φύλλα από τις επεξεργασίες C και D ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τη δραστηριότητα του ενζύμου σε φύλλα του αρχικού χώματος. Το

επίπεδο δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης, ήταν υψηλότερο στις ρίζες παρά στα φύλλα σε όλες τις ομάδες. Η ομάδα D ήταν η μόνη στην οποία καταγράφηκε σημαντική αύξηση στη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης, τόσο στη ρίζα όσο και στους βλαστούς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα

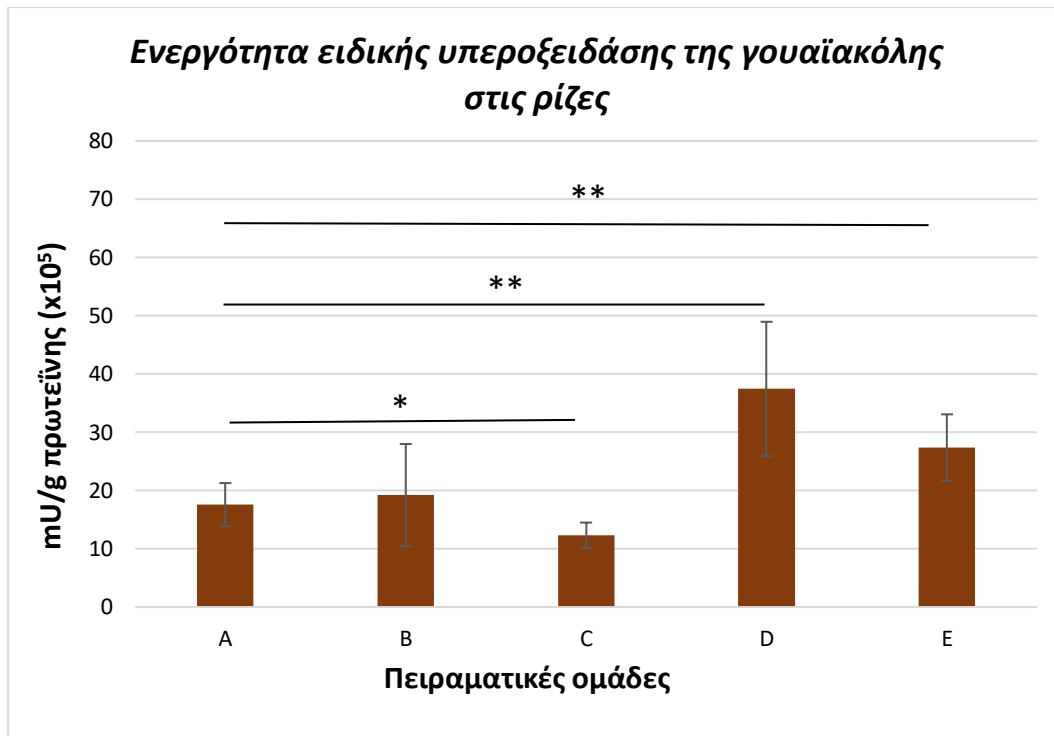


Διάγραμμα 19. Δραστηριότητα της ειδικής υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης σε φύλλα για όλες τις ομάδες.

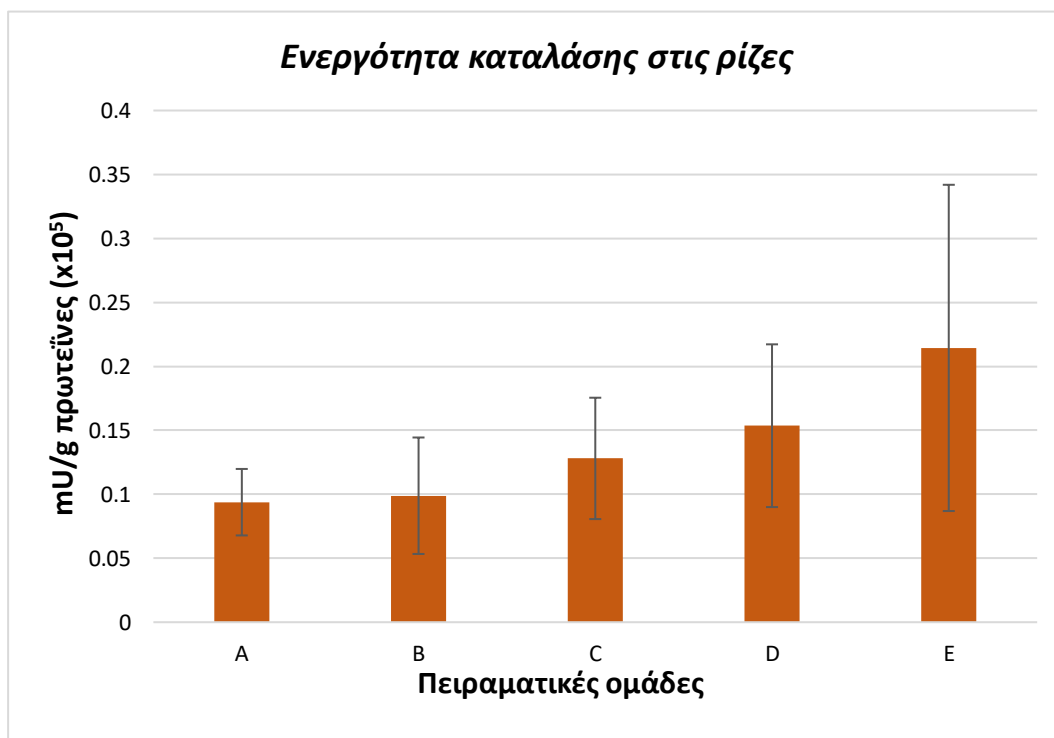
,Διάγραμμα 20 & Διάγραμμα 21.



Διάγραμμα 19. Δραστηριότητα της ειδικής υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης σε φύλλα για όλες τις ομάδες.

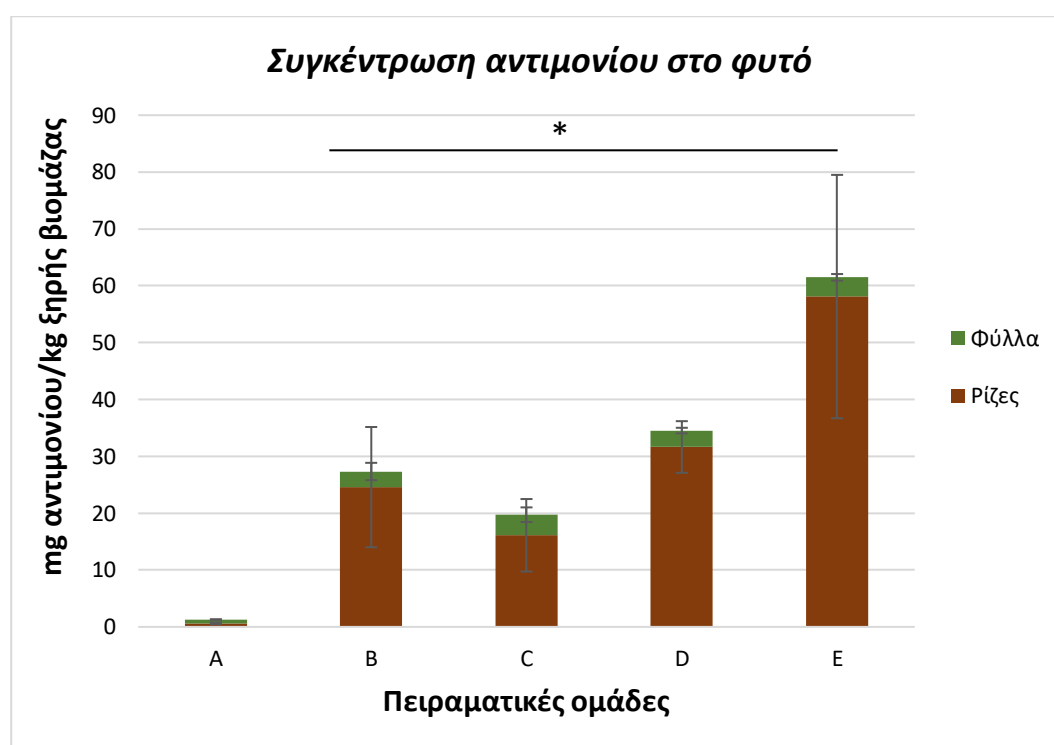


Διάγραμμα 20. Δραστηριότητα της ειδικής υπεροξειδάσης της γουαϊακόλης σε ρίζα για όλες τις ομάδες.



Διάγραμμα 21. Δραστηριότητα της καταλάσης στις ρίζες για όλες τις ομάδες.

Στο Διάγραμμα 22, φαίνεται η περιεκτικότητα σε αντιμόνιο που συσσωρεύεται στις ρίζες και τα φύλλα. Σε ρυπασμένα με αντιμόνιο εδάφη, υψηλότερη περιεκτικότητα ανιχνεύθηκε στην ομάδα E με 58,10 mg/kg βιομάζας ξηρού βάρους στις ρίζες και 3,38 mg/kg βιομάζας ξηρού βάρους στα φύλλα. Αντίθετα, η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιμονίου, βρέθηκε στην ομάδα C όπου και πάλι το μεγαλύτερο ποσοστό του ρύπου παρέμεινε στις ρίζες. Στο πείραμα ελέγχου, η συσσώρευση βρέθηκε να είναι ίση με 0,61 mg/kg βιομάζας ξηρού βάρους στις ρίζες και 0,66 mg/kg βιομάζας ξηρού βάρους στα φύλλα. Ο εκτιμώμενος συντελεστής μετατόπισης ήταν κοντά στη μονάδα, πολύ υψηλότερος σε σύγκριση με όλες τις άλλες επεξεργασίες όπου το αντιμόνιο υπάρχει σε πολύ υψηλότερη συγκέντρωση στο έδαφος.



Διάγραμμα 22. Συσσώρευση αντιμονίου σε ρίζες και φύλλα για όλες τις ομάδες.

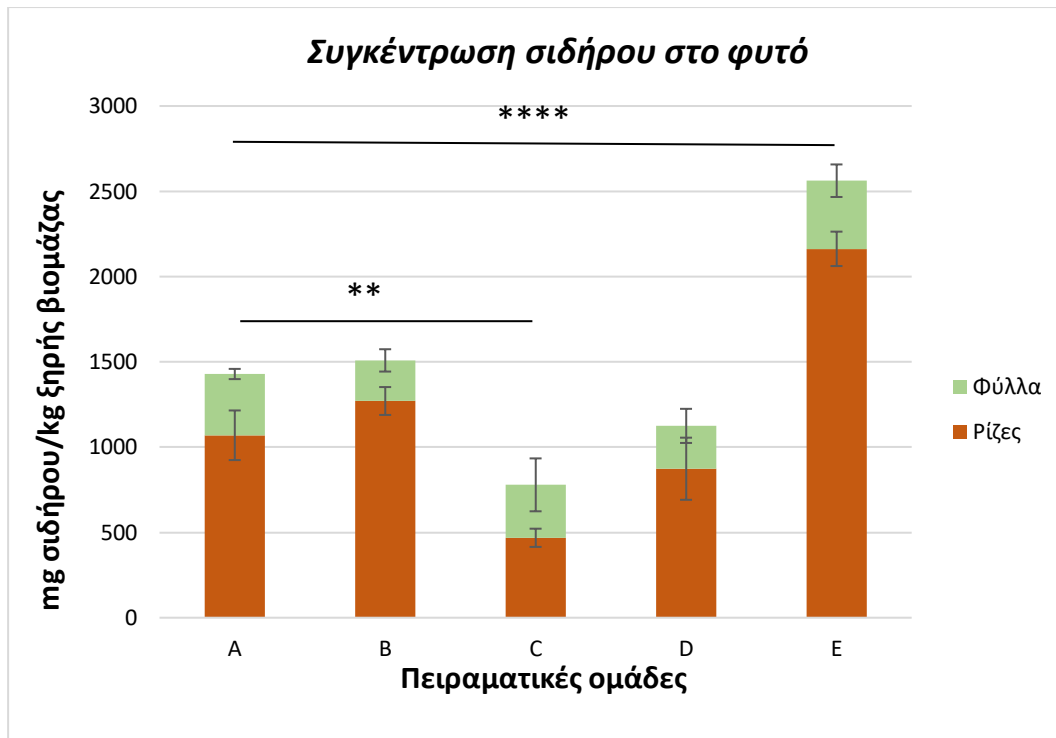
Όπως φαίνεται στον Πίνακα 15, στην ομάδα E ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης (BCF) βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος από 1, υποδεικνύοντας ότι το αντιμόνιο μπορεί να μεταφερθεί από το έδαφος στις ρίζες του φυτού. Σε όλες τις άλλες ομάδες συμπεριλαμβανομένης αυτής του ελέγχου, οι παράγοντες βιοσυσσώρευσης βρέθηκαν να είναι μικρότεροι από 1, υποδηλώνοντας χαμηλή κινητοποίηση του

ρύπου από το έδαφος στο φυτό. Όσον αφορά τον παράγοντα μετατόπισης (TF), οι τιμές σε όλες τις ομάδες βρέθηκαν να είναι σημαντικά χαμηλότερες από ένα, υποδηλώνοντας ότι το αντιμόνιο δεν μπορούσε να μεταφερθεί εύκολα από τις ρίζες στους υπέργειους ιστούς. Ο συντελεστής μετατόπισης στην ομάδα C ήταν αρκετά υψηλότερος σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες (0,23), οι οποίες ήταν χαμηλότερες (<0,1).

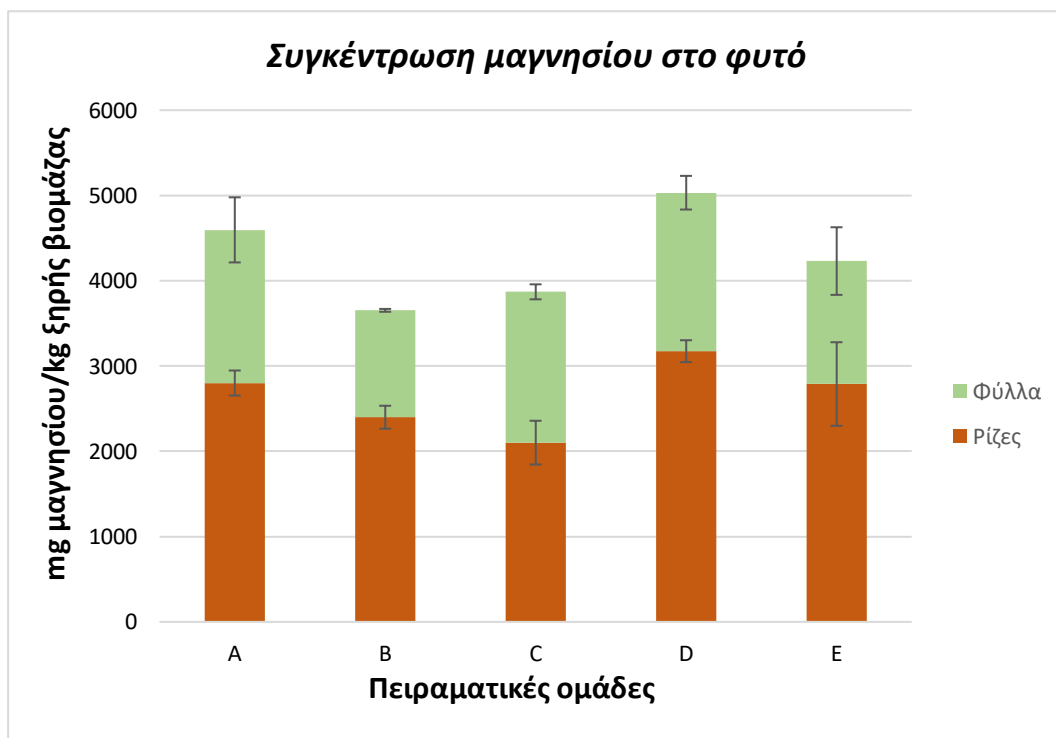
Πίνακας 15. Συντελεστής βιοσυσσώρευσης Sb (BCF) και παράγοντας μετατόπισης (TF) για όλες τις ομάδες.

Συντελεστής	Πειραματική Ομάδα			
	B	C	D	E
BCF	0,78	0,51	0,90	1,72
TF	0,07	0,23	0,09	0,06

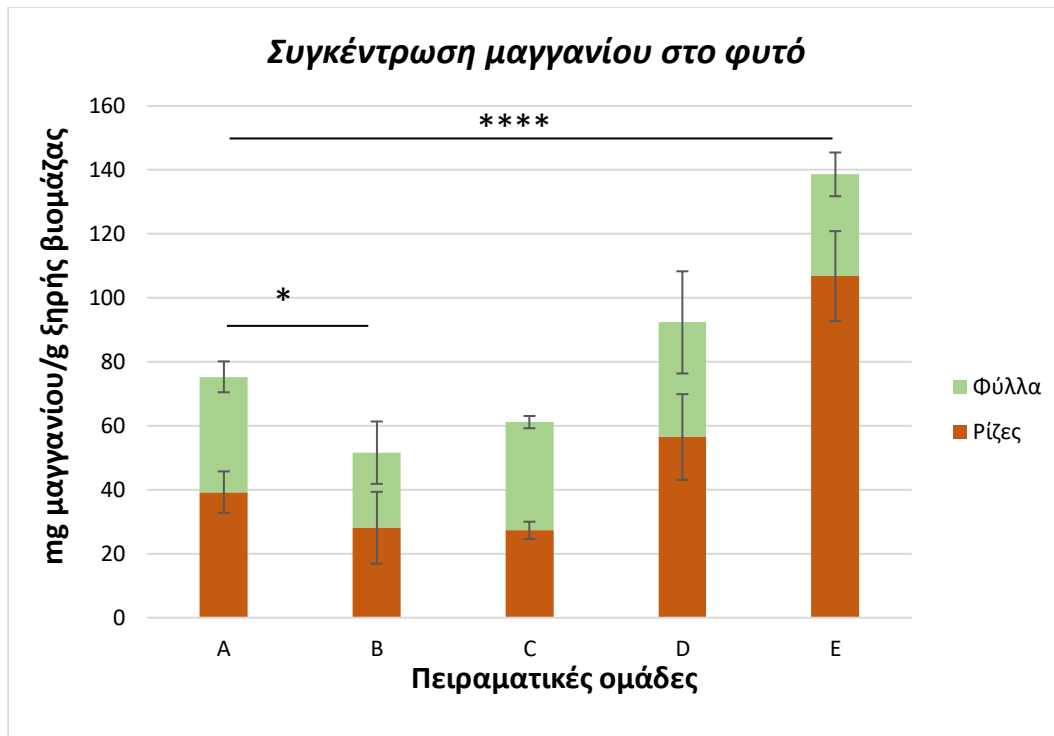
Εκτός από τη συγκέντρωση του αντιμονίου (Sb) στους φυτικούς ιστούς, μετρήθηκε και η πρόσληψη σιδήρου (Fe), μαγνησίου (Mg) και μαγγανίου (Mn) από το *N.oleander*, καθώς αυτά τα στοιχεία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυτών. Όσον αφορά την περιεκτικότητα σε μαγνήσιο, υπάρχει μικρή μείωση στις ομάδες B,C και E, ωστόσο αυτές οι μειώσεις δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Από την άλλη πλευρά, η πρόσληψη σιδήρου και μαγγανίου από το φυτό ενισχύθηκε σημαντικά με την προσθήκη οργανικών οξέων σε υψηλή συγκέντρωση (70 mmol/kg). Στην ομάδα C, η συσσώρευση σιδήρου βρέθηκε στατιστικά χαμηλότερη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Σε γενικές γραμμές, η συγκέντρωση σιδήρου, μαγνησίου και μαγγανίου είναι πολύ υψηλότερη στις ρίζες, υποδηλώνοντας περιορισμένη μετατόπιση από τις ρίζες στους βλαστούς, εκτός από την περιεκτικότητα μαγγανίου στην C. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα Διάγραμμα 23 Διάγραμμα 24 Διάγραμμα 25.



Διάγραμμα 23. Συγκέντρωση σιδήρου (Fe) στους φυτικούς ιστούς.



Διάγραμμα 24. Συγκέντρωση μαγνησίου (Mg) στους φυτικούς ιστούς.



Διάγραμμα 25. Συγκέντρωση μαγγανίου (Mn) στους φυτικούς ιστούς.

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 9. Η διακύμανση των δεδομένων αναλύθηκε με ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (ANOVA) σε σημαντικό επίπεδο $p < 0,05$.

Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα

Η μικροβιακή κοινότητα του εδάφους αποτελείται από *Stenotrophomonas* και *Advenella* τα οποία, βάσει βιβλιογραφίας, θεωρούνται κοινά βακτήρια οξείδωσης αντιμονίου. Από τα αποτελέσματα της πειραματικής χρήσης βακτηρίων οξείδωσης, μπορεί να αναχθεί το συμπέρασμα ότι η κοινότητα ήταν ανθεκτική ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις αντιμονίου και παράλληλα είχε σημαντική επίδραση στην απομάκρυνση του, καθώς το ποσοστό του ρύπου που παρέμεινε στο έδαφος βρέθηκε να είναι χαμηλότερο στο βιοαυξημένο πείραμα με την κινητοποίηση να φτάνει περίπου το 75% του αρχικού αντιμονίου. Το ίδιο ποσοστό αντιμονίου βρέθηκε και στην επεξεργασία με νερό νανοφυσαλίδων και εμβολιασμό βακτηρίων. Η παρουσία νανοφυσαλίδων δεν είχε σημαντική επίδραση στην κινητοποίηση του ρύπου στην περίπτωση της βιοαύξησης. Όταν δεν έγινε εμβολιασμός βακτηρίων, οι νανοφυσαλίδες είχαν αποτέλεσμα στην κινητοποίηση του ρύπου από το έδαφος στο νερό, καθώς από 45,6% αυξήθηκε στο 66,4% του αρχικού αντιμονίου στο έδαφος που ανιχνεύθηκε στο νερό. Όσον αφορά το σίδηρο, η παρουσία βακτηρίων δεν ενίσχυσε την κινητοποίηση του στην υδατική φάση αφού τα ποσοστά των υπολειπόμενων συγκεντρώσεων σιδήρου ήταν υψηλότερα στα πειράματα με βιοαύξηση. Η συγκέντρωση του μαγγανίου υπολογίστηκε ότι ήταν ελαφρώς χαμηλότερη όταν έγινε εμβολιασμός βακτηρίων για τις επεξεργασίες νερού βρύσης και νανοφυσαλίδων.

Στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα, παρατηρήθηκε χαμηλότερη απελευθέρωση αντιμονίου σε σύγκριση με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες. Η προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης οργανικών οξέων ενίσχυσε την κινητοποίηση του ρύπου χωρίς να μειώνει την αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων οξείδωσης αν και η κινητοποίηση που αναφέρεται στις φλάσκες δεν επετεύχθη στον βιοαντιδραστήρα. Συγκεκριμένα, το μέγιστο ποσοστό αντιμονίου που κινητοποιήθηκε από τη φάση του εδάφους στην υδάτινη ήταν 27% ενώ στις φλάσκες ανιχνεύθηκε ίσο με 75%.

Τέλος όσον αφορά την φυτοεξυγίανση, τα πειραματικά αποτελέσματα με το φυτό *N. oleander* έδειξαν ότι η χρήση οργανικών οξέων (OAs) μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη συσσώρευση αντιμονίου (Sb) όταν εφαρμόζεται κατάλληλη συγκέντρωση. Ειδικότερα, η χαμηλή συγκέντρωση οργανικών οξέων (7 mmol/kg) δεν έδειξε σημαντική επίδραση στη συσσώρευση αντιμονίου σε σύγκριση με την ομάδα

ελέγχου. Οι συντελεστές βιοσυσσώρευσης και μετατόπισης εκτιμήθηκαν μικρότεροι της μονάδας, φανερώνοντας ότι δεν υπήρχε υψηλή εκχύλιση από το έδαφος στο φυτό ή μετατόπιση από τις ρίζες στα φύλλα του *N. oleander*, αντίστοιχα. Αντίθετα, στην επεξεργασία με την υψηλότερη συγκέντρωση οργανικών οξέων (70 mmol/kg), ο συντελεστής βιοσυσσώρευσης εκτιμήθηκε ότι ήταν μεγαλύτερος της μονάδας, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η συσσώρευση αντιμονίου από το έδαφος στους φυτικούς ιστούς ενισχύθηκε σημαντικά. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι οι νανοφυσαλίδες οξυγόνου (O_2NBs) μπορούν να αυξήσουν την πρόσληψη αντιμονίου επιπλέον της αυξημένης συσσώρευσης άλλων μετάλλων (Fe, Mg και Mn).

Συνολικά, η χρήση του *N. oleander* σε συνδυασμό με την προσθήκη οργανικών οξέων σε υψηλή συγκέντρωση είχε ως αποτέλεσμα υψηλή βιοσυσσώρευση του ρύπου, κατά προτίμηση στις ρίζες, καθιστώντας αυτό το φυτό κατάλληλο για τη φυτοσταθεροποίηση εδαφών ρυπασμένων με αντιμόνιο.

Βιβλιογραφία

- [1] C. G. Anderson, “The metallurgy of antimony,” *Geochemistry*, vol. 72, pp. 3–8, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.chemer.2012.04.001.
- [2] U. Schwarz-Schampera, “Antimony,” in *Critical Metals Handbook*, 1st ed., G. Gunn, Ed., Wiley, 2014, pp. 70–98. doi: 10.1002/9781118755341.ch4.
- [3] P. Patnaik, *Handbook of inorganic chemicals*. 2003. [Online]. Available: <http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/30291/1/2548.pdf>
- [4] P. Seridou, S. Monogiou, E. Syranidou, and N. Kalogerakis, “Capacity of Nerium oleander to Phytoremediate Sb-Contaminated Soils Assisted by Organic Acids and Oxygen Nanobubbles,” *Plants*, vol. 12, no. 1, p. 91, Dec. 2022, doi: 10.3390/plants12010091.
- [5] Z. Mantha, M. Mitrakas, N. Tzollas, S. Stylianou, I. Katsoyiannis, and A. Zouboulis, “Removal of Antimony Species, Sb(III)/Sb(V), from Water by Using Iron Coagulants,” *Water*, vol. 10, no. 10, p. 1328, Sep. 2018, doi: 10.3390/w10101328.
- [6] J. O. Nriagu and J. M. Pacyna, “Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals,” *Nature*, vol. 333, no. 6169, pp. 134–139, May 1988, doi: 10.1038/333134a0.
- [7] R. I. Mc Callum, “Section of Occupational Medicine.” Jan. 1977.
- [8] U. S. D. of H. and H. S. ATSDR, “Toxicological Profile for Antimony and Compounds”.
- [9] M. Filella, N. Belzile, and Y.-W. Chen, “Antimony in the environment: a review focused on natural waters,” *Earth-Sci. Rev.*, vol. 57, no. 1–2, pp. 125–176, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0012-8252(01)00070-8.
- [10] P. Westerhoff, P. Prapaipong, E. Shock, and A. Hillaireau, “Antimony leaching from polyethylene terephthalate (PET) plastic used for bottled drinking water,” *Water Res.*, vol. 42, no. 3, pp. 551–556, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.watres.2007.07.048.

- [11] A. Periferakis *et al.*, “Availability, Toxicology and Medical Significance of Antimony,” *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, vol. 19, no. 8, p. 4669, Apr. 2022, doi: 10.3390/ijerph19084669.
- [12] W. Hammel, R. Debus, and L. Steubing, “Mobility of antimony in soil and its availability to plants,” *Chemosphere*, vol. 41, no. 11, pp. 1791–1798, Dec. 2000, doi: 10.1016/S0045-6535(00)00037-0.
- [13] G. Papakostidis, A. P. Grimanis, D. Zafiropoulos, G. B. Griggs, and T. S. Hopkins, “Heavy metals in sediments from the Athens sewage outfall area,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 6, no. 9, pp. 136–139, Sep. 1975, doi: 10.1016/0025-326X(75)90170-8.
- [14] W. Hawkes, H.E. J. S., *Geochemistry in Mineral Exploration*. 1963.
- [15] J. Li, Q. Wang, S. Zhang, D. Qin, and G. Wang, “Mylogenetic and genome analyses of antimony-oxidizing bacteria isolated from antimony mined soil,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 76, pp. 76–80, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.ibiod.2012.06.009.
- [16] T. Yu, X. Chen, X.-C. Zeng, and Y. Wang, “Biological oxidation of As(III) and Sb(III) by a novel bacterium with Sb(III) oxidase rather than As(III) oxidase under anaerobic and aerobic conditions,” *Sci. Total Environ.*, vol. 916, p. 169893, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.169893.
- [17] J. Li *et al.*, “Antimony contamination, consequences and removal techniques: A review,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 156, pp. 125–134, Jul. 2018, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.024.
- [18] G. Omokhagbor Adams, P. Tawari Fufeyin, S. Eruke Okoro, and I. Ehinomen, “Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review,” *Int. J. Environ. Bioremediation Biodegrad.*, vol. 3, no. 1, pp. 28–39, Oct. 2020, doi: 10.12691/ijebb-3-1-5.
- [19] Shilpi Sharma, “Bioremediation: Features, Strategies and applications,” 2012, [Online]. Available:

<https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=0952479df98c749b00ce078ad14c41f32fa1b797>

[20] V. MARY KENSA, “BIOREMEDIATION - AN OVERVIEW.” 2011. [Online]. Available: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/87834904/bioremediation-an-overview-161-168-libre.pdf?1655818240=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DBioremediation_an_Overview.pdf&Expires=1709036085&Signature=QIRHIOCYoMQNWT8Qzh0cUKvrQ8S~s30QSaQsLATQvQDlSmnkU-

9ixJqyriiyGxp3rT3UZtUJpxf1ulDYtYpwOGHAARZVnIpc5AwcqE0Pg2snu8qzAerfWTRiSpOsJhKPByDwdtr4TXg7bI43uWqlXKbkvISEzHyg73FvMhlTQC51fiVT7gMns5P~RpbFm~PD0NLRBeBkDJo3DyUEa~pgn3sqB2SYhogb7wbHQ75Urp~sU6ss1AbhdFMDIScrX0dhJTauvAw6KCtKYk6-
wsDwMhUsh8Kc9Ol~Qm9PhIXM6XcROIuRJtygV7Pfs2NWrp~baHfQvBY6xhci0ybs96yZQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

[21] F. Garcia-Ochoa and E. Gomez, “Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 2, pp. 153–176, Mar. 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.

[22] E. Pilon-Smits, “PHYTOREMEDIATION,” *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 56, no. 1, pp. 15–39, Jun. 2005, doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214.

[23] D. E. Salt, R. D. Smith, and I. Raskin, “PHYTOREMEDIATION,” *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 49, no. 1, pp. 643–668, Jun. 1998, doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.643.

[24] D. W. O. Scott D. Cunningham, “Promises and Prospects of Phytoremediation.” 1996.

[25] H. Morikawa and Ö. C. Erkin, “Basic processes in phytoremediation and some applications to air pollution control,” *Chemosphere*, vol. 52, no. 9, pp. 1553–1558, Sep. 2003, doi: 10.1016/S0045-6535(03)00495-8.

[26] N. Q. Z. Hossein Farraji and H. F. Ramlah M. Tajuddin, “Advantages and disadvantages of phytoremediation: A concise review,” 2016, [Online]. Available:

- https://www.researchgate.net/profile/Hossein-Farraji-3/publication/306543535_Advantages_and_disadvantages_of_phytoremediation_A_concise_review/links/5d5b34f092851c37636bc328/Advantages-and-disadvantages-of-phytoremediation-A-concise-review.pdf
- [27] M. J. S. Seyyed Gholamreza Moosavi, "Phytoremediation: A review." 2013. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/profile/Mj-Seghatoleslami/publication/283746120_Phytoremediation_a_review/links/616491a5e7993f536cc7ab5f/Phytoremediation-a-review.pdf
- [28] A. Agarwal, W. J. Ng, and Y. Liu, "Principle and applications of microbubble and nanobubble technology for water treatment," *Chemosphere*, vol. 84, no. 9, pp. 1175–1180, Aug. 2011, doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.05.054.
- [29] J. Wu, K. Zhang, C. Cen, X. Wu, R. Mao, and Y. Zheng, "Role of bulk nanobubbles in removing organic pollutants in wastewater treatment," *AMB Express*, vol. 11, no. 1, p. 96, Dec. 2021, doi: 10.1186/s13568-021-01254-0.
- [30] A. K. A. Ahmed *et al.*, "Influences of Air, Oxygen, Nitrogen, and Carbon Dioxide Nanobubbles on Seed Germination and Plant Growth," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, no. 20, pp. 5117–5124, May 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.8b00333.
- [31] Robert Thomas, "A Beginner's Guide to ICP-MS." 2001. [Online]. Available: <http://scientificsolutions1.com/Beginners%20guide%20to%20ICP-MS.pdf>
- [32] K. M. McKinnon, "Flow Cytometry: An Overview," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. 120, no. 1, Jan. 2018, doi: 10.1002/cpim.40.
- [33] L. Chen *et al.*, "Laboratory spiking process of soil with various uranium and other heavy metals," *MethodsX*, vol. 6, pp. 734–739, 2019, doi: 10.1016/j.mex.2019.03.026.
- [34] Angelopoulou Vaisiliki, "Bioremediation of antimony contaminated soils." 2022. [Online]. Available: <http://purl.tuc.gr/dl/dias/989BD0D0-7EE9-4823-AE5E-C2A4844810A1>