



# Πολυτεχνείο Κρήτης Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος

Συνεισφορά της μικροβιακής κοινότητας του *J. acutus* σε τεχνητό υδροβιότοπο επεξεργασίας αστικών λυμάτων στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων

Διπλωματική εργασία  
Της Μπουρκουτσόγλου Ιωάννας



ΧΑΝΙΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2019

" Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το 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".



Πολυτεχνείο Κρήτης  
Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος

Συνεισφορά της μικροβιακής κοινότητας του *J. acutus* σε τεχνητό υδροβιότοπο  
επεξεργασίας αστικών λυμάτων στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων

Διπλωματική εργασία  
Της Μπουρκουτσόγλου Ιωάννας

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Καλογεράκης Νικόλαος, Καθηγητής (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)  
Βενιέρη Δανάη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια  
Δρ. Συρανίδου Ευδοκία

## Περίληψη

Πρωταγωνιστικό ρόλο στη φυτοεξυγίανση έχουν τα φυτά και οι σχετιζόμενοι με αυτούς μικροοργανισμοί. Το σύστημα φυτό-μικροοργανισμοί συντελούν στην αποδόμηση τοξικών οργανικών ουσιών και στην απομάκρυνση μετάλλων από το έδαφος και το νερό. Ειδικότερα τόσο τα βακτήρια της ριζόσφαιρας όσο και τα ενδοφυτικά βακτήρια μπορεί να έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον ξενιστή τους και να βελτιώσουν το αποτέλεσμα της φυτοεξυγίανσης. Στην παρούσα μελέτη διερευνάται η ικανότητα της μικροβιακής κοινότητας της ριζόσφαιρας και της ενδοφυτικής κοινότητας της ρίζας του ελόφυτου *Juncus* να απομακρύνουν βαρέα μέταλλα (Zn, Ni και Cd ξεχωριστά και ως μείγμα). Το ελόφυτο από το οποίο απομονώθηκαν οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιείται ήδη ως μέσο φυτοεξυγίανσης σε ένα τεχνητό υδροβιότοπο επεξεργασίας αστικών λυμάτων. Πιο συγκεκριμένα, η ριζοσφαιρική κοινότητα καλλιεργήθηκε σε δύο διαφορετικά μέσα, σε πλούσιο θρεπτικό κατά τον Α κύκλο των πειραμάτων και σε απόβλητο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας κατά τον Β κύκλο πειραμάτων στο οποίο προστέθηκαν Zn, Ni και Cd ξεχωριστά και ως μείγμα. Η ενδοφυτική κοινότητα καλλιεργήθηκε μόνο σε πλούσιο θρεπτικό στο οποίο προστέθηκαν Zn, Ni και Cd ξεχωριστά και ως μείγμα κατά τον Α κύκλο των πειραμάτων. Στον πρώτο κύκλο οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν με δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις μετάλλων προκειμένου να διεξαχθούν συμπεράσματα για την ικανότητα απομάκρυνσης σε διαφορετικά επίπεδα ρύπανσης. Κατά την δεύτερη πειραματική φάση στόχος είναι η καλύτερη και πιο ρεαλιστική προσομοίωση των συνθηκών του τεχνητού υδροβιότοπου από τον οποίο απομονώθηκαν τα βούρλα. Για τον σκοπό αυτό οι μικροοργανισμοί έχουν σαν μόνη πηγή οργανικών ουσιών το απόβλητο από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας που ρέει στον τεχνητό υδροβιότοπο και τεχνητό διάλυμα με σύσταση παρόμοια με εκείνη των ριζικών εκκρίσεων του βούρλου. Συμπερασματικά αυτή η μελέτη επιβεβαιώνει τη συμβολή της μικροβιακής κοινότητας του *Juncus acutus* στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων σε τεχνητούς υδροβιότοπους. Τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι πολύ ικανοποιητικά όσον αφορά το κάδμιο και τον ψευδάργυρο, με το κάδμιο να εμφανίζει τις υψηλότερες απομακρύνσεις. Ενώ στην περίπτωση του νικελίου οι απομακρύνσεις είναι μικρές έως ελάχιστες. Σε γενικές γραμμές όμως μας καθιστούν ιδιαίτερα αισιόδοξους σχετικά με την δυνατότητα εκμετάλλευσης του μικροβιακού πληθυσμού που σχετίζεται με το ελόφυτο *Juncus acutus*.

## Abstract

Plants and their associated microorganisms play a leading role in phytoremediation. The plant-micro-organism system contributes to the degradation of toxic organic substances as well as the removal of metals from soil and water. In particular, both the rhizosphere and the endophytic bacteria can have beneficial effects on their host and improve the effect of phytoremediation. This study investigates the ability of the microbial community of the rhizosphere and the root endophytic community of *Juncus* to remove heavy metals (Zn, Ni and Cd separately and as a mixture). The helophyte from which both communities have been isolated is already used as a phyto-oxygenating agent in a constructed wetland for urban wastewater treatment. In particular, rhizospheric community was cultivated in two different media, in a rich medium during the first round of experiments and in secondary treated urban wastewater during the second cycle of experiments, to which Zn, Ni and Cd were added separately and as a mixture. The endophytic community was cultivated in a rich medium to which Zn, Ni and Cd were added separately and as a mixture, during the first round of experiments. In the first cycle microorganisms were cultured with two different concentrations of metals in order to explore their removal capability at different levels of pollution. In the second experimental phase, the aim is to provide a better and more realistic simulation of the conditions within the wetland from which the *Juncus acutus* was isolated. For this purpose, micro-organisms used as sole source the organic substances in the effluent of the secondary treatment flowing into the constructed wetland and an artificial solution comprised with the root exudates of *Juncus acutus*. In conclusion, this study confirms the contribution of the microbial community associated with *Juncus acutus* to heavy metals removal in constructed wetlands; the communities were more efficient in removing cadmium and zinc while they showed low ability to removal nickel.

## Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Νικόλαο Καλογεράκη, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας, την υπομονή αλλά και την αμέριστη κατανόηση που έδειξε στον ενθουσιασμό μου για το αντικείμενο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Δανάη Βενιέρη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, επειδή δεν μου κράτησε κακία που τελικά δεν πραγματοποίησα την διπλωματική μου εργασία στα πλαίσια του εργαστηρίου της, παρόλο που είχαμε δώσει υπόσχεση από το πρώτο έτος. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω και για την ανάγνωση και αξιολόγηση της διπλωματικής μου εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Συρανίδου Ευδοκία, αρχικά για την ανταπόκριση της όταν έψαχνα απελπισμένα να ασχοληθώ με την φυτοεξυγίανση, όπως επίσης και για την καθοδήγηση της κατά την διάρκεια του πειράματος αλλά και της συγγραφής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας του Πολυτεχνείου Κρήτης, αλλά πιο συγκεκριμένα, τόσο εγώ όσο και τα μικροβιάκια μου χρωστάμε ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Γεωργία Χαραλάμπους. Ευχαριστώ ακόμα την πολύ γλυκιά Maria-Liliana Saru για τις μετρήσεις των μετάλλων στο ICP-MS που πάντα πραγματοποιούσε με μεγάλη συνέπεια.

Μιας και η διπλωματική μου αποτελεί το κλείσιμο αυτού του υπέροχου κύκλου της ζωής μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους για τον ιδιαίτερο ρόλο που έπαιξε ο καθένας στη ζωή μου όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την Κωνσταντίνα και την Δέσποινα οι οποίες ήταν για μένα από δυο καλές φίλες και συμφοιτήτριες μέχρι και μια εξαιρετική παρέα για καλοκαιρινές αποδράσεις. Ήταν επίσης συναγωνίστριες και συμπαραστάτες στις πιο δύσκολες αλλά και πιο όμορφες στιγμές μου, αλλά και πάντα εκεί να με ανέχονται ακούγοντας με, με τις ώρες (Ίσως για το τελευταίο βέβαια να πρέπει να ευχαριστήσω προκαταβολικά και όλους τους υπόλοιπους φίλους μου). Τις ευχαριστώ επίσης για το πιο σπουδαίο πράγμα που έμαθα από την παρέα μαζί τους "ότι όποιος ντρέπεται κακά ζει". Θα ήθελα επίσης να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Λητώ που ήρθε για να μείνει στη ζωή μου, για ότι πλούσια είχε να μου προσφέρει από καρδιάς και που είναι για μένα φίλη αλλά και αδερφή αφού με μια ματιά μόνο μπορούμε να κάνουμε ολόκληρο διάλογο. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τετερίτσα και την Ευανθία που αποτέλεσαν το άλλο μισό γκέτο και ό,τι σημαίνει αυτό, το Συντυχάκη και το Λαζαράκο, το Γιαννούλη και τον Αλέξη, τον Βαγγέλη και τον Αχιλλέα αλλά και όλους τους άλλους που ήταν εκεί με ένα γλυκό χαμόγελο και μια ζεστή αγκαλιά όποτε τη χρειαζόμουν.

Ένα ευχαριστώ θα ήταν λίγο για να ανταποδώσω την βοήθεια του φίλου και αδερφού μου Χάρη, για την έμπειρη του γνώμη που δεν δίστασε μέχρι και Κυριακές μεσημέρια να μοιραστεί μαζί μου, για το χαμόγελο κατανόησης και συμπάραστασης που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια και για όλες εκείνες τις βροχερές μέρες της εξεταστικής που ήταν ένας από τους σοφέρ μου, όταν η μετακίνηση με το ποδήλατο ήταν αδύνατη. Ένα τεράστιο ευχαριστώ αναλογεί επίσης

στην γλυκιά μου Μαλαμούλα για όσα έμαθα από εκείνη, την Σοφία την Μάρακα και την Κατερίνα την Μαυράκη γιατί ήταν όλες μανούλες για μένα στα Χανιά.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου Ευγενία και Νάντια οι οποίες αν και τόσο μακριά, ήταν πάντα τόσο κοντά μου και που με την στάση τους δεν έπαψαν να με στηρίζουν και να φροντίζουν η σχέση μας να παραμένει αναλλοίωτη παρόλη την απόσταση μας.

Ένα ακόμη ευχαριστώ στους αγαπημένους μου γείτονες που έπαιξαν τον ρόλο φύλακα άγγελου και άμεσα ή έμμεσα τους οφείλω μέχρι και την επιβίωση μου και ιδιαίτερα στο Χριστινάκι μου που εκτός από την πολύτιμη αγάπη της που απέδειξε έμπρακτα, ουδέποτε δεν παραπονέθηκε για την φασαρία που κάναμε.

Τίποτα από αυτά όμως δεν θα είχε συμβεί χωρίς την στήριξη του πιο γλυκού μπαμπά και της πιο γλυκιάς μαμάς του κόσμου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μπαμπά μου Νίκο και στην μητέρα μου Πελαγία για την υπομονή και κατανόηση τους στις φρίκες μου και γιατί παρόλο που τις περισσότερες φορές δεν είχαν ιδέα για τι πράγμα τους μιλάω ήταν πάντα εκεί να με ενθαρρύνουν και να με επιβραβεύουν στον κόπο μου.

Όμως κανείς από τους παραπάνω, δυστυχώς για μένα, ευτυχώς για εκείνους, δεν ήταν παρόν κατά την ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής....παρά μόνο ο Αλέξανδρος. Ότι και να πω δεν μπορεί να εκφράσει την ευγνωμοσύνη μου για εκείνον, ο οποίος καταρχάς με ανέχτηκε και με στήριξε με όλη τη του την καρδιά όλο αυτό το διάστημα, δεν έπαψε ούτε λεπτό να πιστεύει σε μένα και έμαθε τόσο πολλά για τα βακτήρια παρόλο που κατά βάση καταπιάνεται με τα σίδερα και τη μηχανολογία. Τον ευχαριστώ επίσης για την απελπισμένη αλλά και ειλικρινή του προσπάθεια να με πείσει κάπως να διαβάσω αλλά και για όλα αυτά τα πιάτα που έπλυνε όλο αυτό το διάστημα και που εύχομαι με την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας να μην πάψει να πλένει.

## Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή</b>	11
1.1 Βαρέα Μέταλλα	14
1.2 Φυτοεξυγίανση	16
1.3 Τεχνητοί υδροβιότοποι	19
1.4 Αλόφυτα	19
1.4.1 Το ελόφυτο <i>Juncus acutus</i>	19
1.5 Συνεισφορά των βακτηρίων στην Φυτοεξυγίανση	20
1.5.1 Ενδοφυτικά Βακτήρια	21
1.5.2 Βακτήρια Ριζόσφαιρας	22
1.5.3 Ριζικές εκκρίσεις και η συμβολή τους	22
1.6 Σκοπός διπλωματικής εργασίας	23
<b>2. Μεθοδολογία</b>	24
2.1 Υλικά	24
2.2 Πειραματική διαδικασία	25
2.2.1 Συλλογή δειγμάτων και απομόνωση μικροοργανισμών	26
2.2.2 Κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης	32
2.2.3 Α' κύκλος πειραμάτων-	33
Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l και συγκέντρωσης καδμίου 0,8mg/l	33
2.2.4 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l και συγκέντρωσης καδμίου 0,8mg/l	35
2.2.5 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία συγκέντρωσης ψευδαργύρου 80mg/l & 140mg/l	35
2.2.6 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία συγκέντρωσης ψευδαργύρου 80mg/l & 140mg/l	35
2.2.7 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία συγκέντρωσης νικελίου 8mg/l & 20mg/l	36
2.2.9 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων	36
	37
2.2.10 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων	37
2.2.11 Β' Κύκλος Πειραμάτων – Πειραματική διαδικασία και διαφοροποιήσεις	38



2.2.12 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης καδμίου 0,02mg/l .....	40
2.2.13 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης νικελίου 0,4mg/l.....	41
2.2.14 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης ψευδαργύρου 4mg/l .....	41
2.2.15 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης καδμίου 0,02mg/l, νικελίου 0,4mg/l και ψευδαργύρου 4mg/l.....	42
2.2.16. Προετοιμασία δειγμάτων & Προσδιορισμός συγκεντρώσεων Cd, Ni Zn.....	43
<b>3. Αποτελέσματα.....</b>	<b>45</b>
3.1 Α' Κύκλος- Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία καδμίου και αντίστοιχη απομάκρυνση .....	45
3.1.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας .....	45
3.1.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων.....	47
3.2 Α' Κύκλος- Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία ψευδαργύρου και αντίστοιχη απομάκρυνση .....	49
3.2.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας .....	49
3.2.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων.....	51
3.3 Α 'Κύκλος- Ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρουσία νικελίου και την αντίστοιχη απομάκρυνση του .....	53
3.3.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας .....	53
3.3.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων.....	55
3.4 Α 'Κύκλος- Ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρουσία των τριών μετάλλων και την αντίστοιχη απομάκρυνση του .....	57
3.4.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας .....	57
3.4.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων.....	63
3.5 Β' Κύκλος- Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης καδμίου 0,02mg/l .....	69
3.6 Β' Κύκλος- Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης ψευδαργύρου 4mg/l .....	69
3.7 Β' Κύκλος- Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης νικελίου 0,4mg/l .....	69
3.8 Β' Κύκλος- Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και παρουσία τριών μετάλλων στις συνθήκες του υδροβιότοπου .....	70
3.9 Ποσοστά απομάκρυνσης μετάλλων μετά το πέρας κάθε πειραματικής φάσης .....	70
<b>4. Συζήτηση .....</b>	<b>73</b>

4.1 Συλλογή δειγμάτων και απομόνωση μικροοργανισμών .....	73
4.2 Αποτελέσματα ανθεκτικότητας βακτηρίων .....	74
4.3 Αποτελέσματα απομακρύνσεων στον Α' κύκλο .....	74
4.3.1 Σύγκριση αποτελεσμάτων για χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις .....	75
4.3.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων για ενδοφυτικά βακτήρια και βακτήρια ριζόσφαιρας .....	77
4.3.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων παρουσία των τριών μετάλλων και καθενός ξεχωριστά.....	78
4.4 Αποτελέσματα απομακρύνσεων στον Β' κύκλο .....	80
4.4.1 Σύγκριση συνθηκών και ρυθμού ανάπτυξης Α' και Β' κύκλων .....	80
4.4.2 Αποτελέσματα Β' κύκλου.....	81
4.5 Σύγκριση με αποτελέσματα απομακρύνσεων τεχνητού υδροβιότοπου.....	82
4.6 Προτάσεις για περαιτέρω αξιοποίηση αποτελεσμάτων .....	82
4.7 Μεθοδολογικές αδυναμίες της έρευνας .....	82
<b>5. Συμπεράσματα .....</b>	<b>83</b>
<b>6. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>84</b>
7.1 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων των controls για κάθε συγκέντρωση .....	91
7.1.1 Α κύκλος .....	91
7.1.2 Β κύκλος .....	92

## Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. 1 Οριακές τιμές συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στο έδαφος -παράρτημα ΙΑ της υπουργικής απόφασης: 80568/4225/91 Μέθοδοι, όροι και περιορισμοί για την χρησιμοποίηση στη γεωργία της ιλύος που προέρχεται από επεξεργασία οικιακών και αστικών λυμάτων (ΦΕΚ 641).....	16
Πίνακας 1. 2 Μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις μετάλλων στην ιλύ για εδαφική εφαρμογή- Παράρτημα Ι της ΚΥΑ με θέμα: «Μέτρα, όροι και διαδικασίες για τη χρησιμοποίηση της ιλύος που προέρχεται από επεξεργασία οικιακών και αστικών λυμάτων καθώς και ορισμένων υγρών αποβλήτων, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 86/278/ΕΟΚ του Συμβουλίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Αντικατάσταση της 80568/4225/1991 (Β'641) κοινής Υπουργικής απόφασης.»(Duque-escobar 2011).....	16
Πίνακας 2. 1 Συλλογή δειγμάτων.....	26
Πίνακας 2. 2 Σύσταση των "root exudates" .....	39
Πίνακας 2. 3 Συγκεντρωτικός πίνακας επί μέρους πειραμάτων .....	43
Πίνακας 3. 1 Αποτελέσματα απομακρύνσεων μετάλλων- Α κύκλος.....	71
Πίνακας 3. 2 Αποτελέσματα απομακρύνσεων μετάλλων- Β' κύκλος.....	71
Πίνακας 4. 1 Αποτελέσματα απομακρύνσεων των βαρέων μετάλλων από τον τεχνητό υδροβιότοπο .....	82
Πίνακας 7. 1 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου + 869 .....	91
Πίνακας 7. 2 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control υψηλής συγκέντρωσης καδμίου + 869 .....	91
Πίνακας 7. 3 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control χαμηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου +869.....	91
Πίνακας 7. 4 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου +869.....	91
Πίνακας 7. 5 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου + 869 .....	91
Πίνακας 7. 6 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control υψηλής συγκέντρωσης νικελίου + 869 .....	92
Πίνακας 7. 7 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από controls χαμηλών συγκεντρώσεων μίξης των τριών μετάλλων + 869 .....	92
Πίνακας 7. 8 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από controls υψηλών συγκεντρώσεων μίξης των τριών μετάλλων + 869 .....	92
Πίνακας 7. 9 Αποτελέσματα από control με συγκέντρωση καδμίου ίση με του υδροβιότοπου + (s.e+R.E) .....	92
Πίνακας 7. 10 Αποτελέσματα από control με συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με του υδροβιότοπου + (s.e+ R.E) .....	93
Πίνακας 7. 11 Αποτελέσματα από control με συγκέντρωση νικελίου ίση με του υδροβιότοπου + (s.e + R.E) .....	93
Πίνακας 7. 12 Αποτελέσματα από controls με συγκεντρώσεις μετάλλων ίσες με του υδροβιότοπου + (s.e +R.E) .....	93

## Κατάλογος Διαγραμμάτων

[illegible]

Διάγραμμα 3. 23 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του ψευδαργύρου .....	67
Διάγραμμα 3. 24 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του νικελίου.....	68

## Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. 1 Μηχανισμοί Φυτοεξυγίανσης ( Σημειώσεις, Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος, Καλογεράκης 2013) .....	18
Εικόνα 2. 1 Αλόφυτο <i>Juncus acutus</i> .....	27
Εικόνα 2. 2 Σύστημα τεχνητού υδροβιότοπου .....	28
Εικόνα 2. 3 Δείγμα ριζικού τμήματος Α.....	28
Εικόνα 2. 4 Δείγμα ριζικού τμήματος Β.....	29
Εικόνα 2. 5 Διαδικασία απομόνωσης ενδοφυτικών βακτηρίων .....	30
Εικόνα 2. 6 Αποστειρωμένες ρίζες, έτοιμες για απομόνωση των ενδοφυτικών βακτηρίων .....	30
Εικόνα 2. 7 Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών .....	32
Εικόνα 2. 8 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων .....	33
Εικόνα 2. 9 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων.....	37
Εικόνα 2. 10 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων.....	37
Εικόνα 2. 11 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων.....	38
Εικόνα 2. 12 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία ψευδαργύρου -Β' Κύκλος .....	42
Εικόνα 2. 13 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία και των τριών μετάλλων -Β' Κύκλος .....	42

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Βαρέα Μέταλλα

Φυσική πηγή μετάλλων αποτελεί το ίδιο το έδαφος. Τα μέταλλα στην πλειονότητά τους καθίστανται ιδιαίτερα χρήσιμα και αξιοποιήσιμα. Έχοντας ως αφετηρία το έδαφος ανακατανέμονται στα διάφορα περιβαλλοντικά διαμερίσματα με τους γεωχημικούς κύκλους και ανθρωπογενείς επεμβάσεις. Μεταξύ αυτών όμως συναντώνται και κάποια ιδιαίτερα επικίνδυνα, τα αποκαλούμενα βαρέα μέταλλα. Σε αυτά ανήκουν το βηρύλλιο, ο μόλυβδος, ο υδράργυρος, ο άργυρος, ο χρυσός, το χρώμιο και ο χαλκός, μεταξύ των οποίων και τα τρία που εξετάζονται (κάδμιο, νικέλιο, ψευδάργυρος). Σημαντική πηγή βαρέων μετάλλων είναι η χρήση τους στη βιομηχανία, την τεχνολογία και τη γεωργία. Όπως για παράδειγμα βιομηχανίες παραγωγής χρωμάτων, φωτογραφικών υλικών, ηλεκτρονικού υλικού, παρασιτοκτόνων, συσσωρευτών, πυρομαχικών, μεταλλουργεία χρησιμοποιούν σε διάφορες ποσότητες ενώσεις που περιέχουν βαρέα μέταλλα είτε σαν πρώτη ύλη είτε σαν καταλύτες. Ιδιαίτερα επιβλαβής είναι και η καύση στερεών καυσίμων μέσω της εκπομπής μετάλλων στην ατμόσφαιρα που τελικά εναποτίθενται στο έδαφος και τα νερά.

Τα βαρέα μέταλλα συγκαταλέγονται στους επικίνδυνους ρύπους του περιβάλλοντος, επειδή σε αντίθεση με τις οργανικές τοξικές ουσίες η αποικοδόμηση τους μέσω βιολογικών, χημικών ή φυσικών διεργασιών είναι αδύνατη. Αντίθετα παραμένουν ή συσσωρεύονται στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Loukidou *et al.*, 2003). Είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα επειδή το σενάριο να εισέλθουν σε μικρούς ή μεγάλους βιο-γεωχημικούς κύκλους και τελικά να καταλήξουν στον ανθρώπινο οργανισμό είναι πολύ πιθανό. Απαντώνται στο έδαφος με διάφορες μορφές.

Όσον αφορά τα υπό εξέταση μέταλλα, προκειμένου να γίνει κατανοητό το πόσο επιζήμια αποδεικνύονται τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον ίδιο τον άνθρωπο, παρατίθενται οι επιπτώσεις που έχουν στα παραπάνω. Τα οξειδία του καδμίου έχουν κατηγορηθεί ως πιθανή καρκινογόνος ουσία. Η χρόνια έκθεση στο κάδμιο μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη βλάβη των νεφρών και των οστών (Ke *et al.*, 2015; Wallin *et al.*, 2016). Έχει αποδειχθεί ότι το κάδμιο μπορεί να μειώσει τη γονιμότητα των ανδρών και να αυξήσει τον κίνδυνο διαταραχών της εγκυμοσύνης προκαλώντας μέχρι και τερατογενέσεις (Kirppler *et al.*, 2012). Τα απαέρια από την καύση του καδμίου ή από το οξειδίο καδμίου μπορεί να αποδειχθούν τοξικά για το αναπνευστικό σύστημα. Η έκθεση στο κάδμιο αποτελεί επιπλέον παράγοντα κινδύνου για τον καρκίνο του προστάτη, του μαστού, των ωοθηκών ή του ενδομήτριου (Adams *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016).

Οι επαναλαμβανόμενες χαμηλές εκθέσεις μπορούν να προκαλέσουν τη μόνιμη ζημιά των νεφρών. Προβλήματα στον πνεύμονα μπορεί να εμφανιστούν από βραχεία υψηλή έκθεση ή επαναλαμβανόμενες χαμηλές εκθέσεις. Μακροχρόνια μπορεί επίσης να προκαλέσει αναιμία, κούραση και απώλεια της αίσθησης της μυρωδιάς. Στα αρνητικά χαρακτηριστικά του καδμίου περιλαμβάνονται επίσης η υψηλή κινητικότητα του στο περιβάλλον και η βιοδιαθεσιμότητα στο σύστημα εδάφους-φυτού (Dziubanek *et al.*, 2017), που αντιπροσωπεύει σημαντικά υψηλότερες τιμές του παράγοντα βιοσυγκέντρωσης (BCF) σε σύγκριση με άλλα βαρέα μέταλλα που απαντώνται συχνότερα στο περιβάλλον (Chang *et al.* 2014).

Το κατά πόσο επικίνδυνο είναι για την υγεία το νικέλιο εξαρτάται από την ποσότητα και το χρονικό διάστημα έκθεσης, τη φύση του νικελίου και της τρέχουσας κατάστασης της υγείας αυτού που εκτίθεται. Έχει ενοχοποιηθεί ότι σχετίζεται με διαταραχές του δέρματος, των νεφρών και των καρδιαγγειακών και αναπνευστικών συστημάτων (Shi 1994). Σε τρωκτικά, το νικέλιο έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί τοξικότητα στον πνεύμονα, προκαλώντας ανεπιθύμητες ενέργειες όπως φλεγμονή στους πνεύμονες, πνευμονική κυψελιδική πρωτεϊνώση και όγκους στους πνεύμονες (Hobbs *et al.*, 1995). Η έκθεση στα άλατα νικελίου μπορεί να προκαλέσει «nickel itch», το οποίο προκαλεί κάψιμο και φαγούρα στα χέρια και ακολούθως ανώμαλη ερυθρότητα του δέρματος και κονδυλώδη έκρηξη στον ιστό των δαχτύλων, των καρπών και των αντιβραχίων. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αναφέρει αυξημένο κίνδυνο για τους πνεύμονες καθώς και αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης ρινικού καρκίνου στους εργαζόμενους στην εξόρυξη νικελίου και των εργαζομένων στο διυλιστήριο (Zambelli *et al.*, 2016). Οι επιμεταλλωτές νικελίου που εκτίθενται στο θειικό άλας νικελίου και οι οξυγονοκολλητές που εκτίθενται στα οξείδια νικελίου έχουν συνδεθεί με το άσθμα. Δεν υπάρχουν ασφαλή στοιχεία για υπαιτιότητα του νικελίου ή άλλων ενώσεων του σε καρκινογενέσεις, αλλά αδιάλυτες σκόνες των οξειδίων νικελίου και διαλυτά αερολύματα του θειικού άλατος νικελίου, του νιτρικού άλατος και του χλωριδίου έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανές καρκινογόνες ουσίες.

Όσον αφορά τον ψευδάργυρο πέρα από την χρησιμότητα που εμφανίζει συμμετέχοντας σε περίπου διακόσια ενζυμικά συστήματα του ανθρώπινου σώματος, μεγάλες ποσότητες ψευδαργύρου μπορεί να είναι επιβλαβείς για τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς φαίνεται να είναι εξαιρετικά τοξικός για αυτόν. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρόλα αυτά είναι ένα από τα πλέον σημαντικά μεταλλικά στοιχεία του εγκεφάλου γι' αυτό η έλλειψή του συχνά εκδηλώνεται με διαλείψεις μνήμης.

Η υπερβολική απορρόφηση του ψευδαργύρου όμως, μπορεί επίσης να καταστείλει την απορρόφηση χαλκού και σιδήρου στον οργανισμό. Επίσης, σύμφωνα με πειραματικά δεδομένα έχει καρκινογόνο επίδραση και τοξική δράση στη καρδιά και στο αίμα και μπορεί να προκαλέσει βαρύτατη αιμολυτική αναιμία, πάντα αν απορροφηθούν μεγάλες ποσότητες (Muyssen *et al.*, 2006). Επιπλέον, η μακροχρόνια αποθήκευση σκουριάς ψευδαργύρου επιβαρύνει το σύστημα ύδρευσης, επηρεάζοντας περαιτέρω την ανθρώπινη υγεία (El Dessouky *et al.* 2008). Σημειώνεται ότι η επεξεργασία και η ανάκτηση του ψευδαργύρου θα προστατεύσει σημαντικά τους φυσικούς πόρους και θα μειώσει τις επιπτώσεις στο περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία (Broadley *et al.* 2007).

Προκειμένου να γίνουν πιο κατανοητά τα όρια της επικινδυνότητας των παραπάνω μετάλλων παρατίθενται οι οριακές τιμές συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στο έδαφος (Πίνακας 1. 1) και οι μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις μετάλλων στην ιλύ για εδαφική εφαρμογή (Πίνακας 1. 2).

Πίνακας 1. 3 Οριακές τιμές συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στο έδαφος - (Παράρτημα ΙΑ της υπουργικής απόφασης: 80568/4225/91 Μέθοδοι, όροι και περιορισμοί για την χρησιμοποίηση στη γεωργία της ιλύος που προέρχεται από επεξεργασία οικιακών και αστικών λυμάτων (ΦΕΚ 641/Β/7-08-1991) Burroughs 1991)

Παράμετροι	Οριακές τιμές (mg/kg)
Κάδμιο	1 έως 3
Χαλκός	50 έως 140
Νικέλιο	30 έως 75
Μόλυβδος	50 έως 300
Ψευδάργυρος	150 έως 300
Υδράργυρος	1 έως 1,5
Χρώμιο	-

Πίνακας 1. 4 Μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις μετάλλων στην ιλύ για εδαφική εφαρμογή- Παράρτημα Ι της ΚΥΑ με θέμα: «Μέτρα, όροι και διαδικασίες για τη χρησιμοποίηση της ιλύος που προέρχεται από επεξεργασία οικιακών και αστικών λυμάτων καθώς και ορισμένων υγρών αποβλήτων, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 86/278/ΕΟΚ του Συμβουλίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Αντικατάσταση της 80568/4225/1991 (Β'641) κοινής Υπουργικής απόφασης.»(Duque-escobar 2011)

Μέταλλο	Μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση (mg/kg ξηράς ουσίας)
Cd	5
Cr	500
Cu	800
Hg	5
Ni	200
Pb	500
Zn	2500

## 1.2 Φυτοεξυγίανση

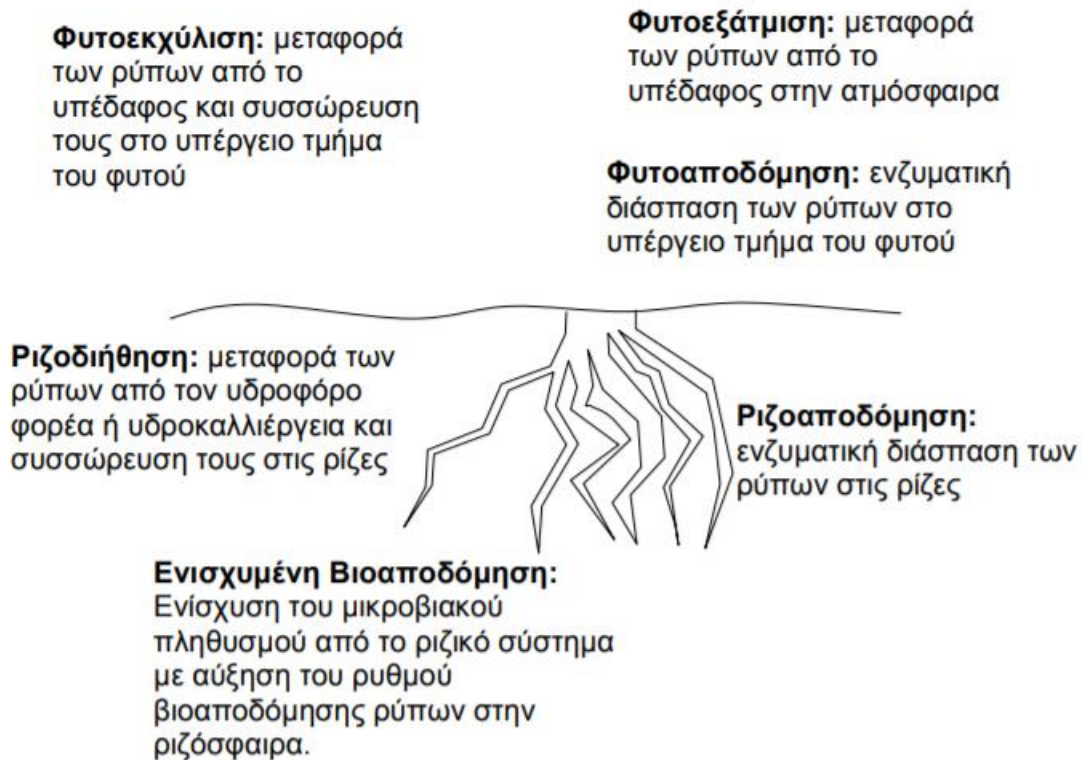
Η βιοαποκατάσταση (bioremediation) εξασφαλίζει τη δυνατότητα απομάκρυνσης επιβλαβών ουσιών, έχοντας ως πρωταγωνιστές μικροοργανισμούς, ένζυμα ή φυτά. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η μετατροπή τοξικών ουσιών σε λιγότερο τοξικές (Vidalí 2001). Η φυτοεξυγίανση είναι μια μέθοδος κατά την οποία οργανικοί και ανόργανοι ρύποι απομακρύνονται ή μετατρέπονται σε ακίνδυνες ή λιγότερο επικίνδυνες ενώσεις με τη χρήση φυτών σε συνεργασία με τους ενδογενείς μικροοργανισμούς τους. Είναι μια *in-situ* και χαμηλού κόστους διεργασία που περικλείει ένα σύνολο μηχανισμών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η μείωση της συγκέντρωσης του ρύπου στα επιθυμητά επίπεδα στο έδαφος,



το νερό και τον αέρα και περιλαμβάνει έναν αριθμό από επιμέρους τεχνικές, οι οποίες εφαρμόζονται για την απομάκρυνση, τη διάσπαση ή και την σταθεροποίηση των οργανικών (υδρογονάνθρακες πετρελαίου, διαλύτες, εντομοκτόνα) και ανόργανων ρύπων (βαρέα μέταλλα) (Μανουσάκη 2008). Κατά τη διαδικασία της μελέτης της τεχνικής της φυτοεξυγίανσης διαπιστώθηκαν διάφοροι μηχανισμοί (Εικόνα 1. 1) με τους οποίους το φυτό καταφέρνει τόσο να επιβιώνει όσο και να απομακρύνει τους ρύπους. Ένας βασικός και άμεσος μηχανισμός είναι η ενίσχυση των μικροβιακών πληθυσμών στη ριζόσφαιρα (Rhizodegradation). Βακτήρια και μύκητες συμβιώνουν αρμονικά με τα φυτά και δημιουργούν σχέσεις αλληλεπίδρασης. Έτσι τα βακτήρια είναι απαραίτητα για τα φυτά. Το φυτό με τις ρίζες του προσφέρει αερισμό και επομένως το απαιτούμενο οξυγόνο για να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί γύρω από τη ριζόσφαιρα ενώ την ίδια στιγμή οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε ένα πρώτο στάδιο διασπούν τις οργανικές ενώσεις και ύστερα τα φυτά είναι ικανά να τις απορροφήσουν. Η συμβίωση αυτή οδηγεί στην αποκατάσταση του εδάφους από οργανικούς ρύπους. Ένας δεύτερος μηχανισμός είναι η φυτοσυσσώρευση, κατά την οποία πραγματοποιείται συσσώρευση ρύπων όπως για παράδειγμα βαρέων μετάλλων, στις ρίζες και στο υπέργειο τμήμα του φυτού. Έχει αποδειχθεί ότι τα φυτά είναι ικανά να συσσωρεύουν διάφορα μέταλλα στα διάφορα φυτικά τους μέρη (Anjum *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2013).

Περαιτέρω επεξεργασία των ρύπων επιτυγχάνεται με τη συλλογή ή ξερίζωμα των φυτών και στη συνέχεια κατάλληλη και ασφαλή απόθεση, καταστροφή ή ακόμη και επαναχρησιμοποίηση. Ένας παραπλήσιος μηχανισμός είναι η ριζοδιήθηση (rhizofiltration), όπου τα φυτά δεν καλλιεργούνται σε έδαφος αλλά οι ρίζες τους αναπτύσσονται εκτεθειμένες σε ρυπασμένα ύδατα και στη συνέχεια παροχετεύονται τα υγρά απόβλητα από τα οποία ρύποι όπως τα βαρέα μέταλλα δεσμεύονται από τις ρίζες και εν συνεχεία μεταφέρονται στους ιστούς, από τους οποίους υπάρχει και δυνατότητα κατακράτησης. Μια ακόμη μέθοδος είναι η φυτοαποδόμηση όπου τα ένζυμα του φυτού είναι ικανά να διασπάσουν ένα ευρύ φάσμα τοξικών και επικίνδυνων οργανικών ενώσεων. Αυτός ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν συνεισφέρει στην απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων μιας και είναι αδύνατο να αποδομηθούν. Επίσης αξίζει να αναφερθεί και ο μηχανισμός της οικολογικής άντλησης των ρύπων από το φυτό ή αλλιώς της φυτοεξάτμισης (Phytovolatilization). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ενέργεια και βασίζεται στην μεταφορά του ρύπου που συμπαρασύρεται μέσα στο φυτό μαζί με το νερό που καταναλώνει από τις ρίζες και πηγαίνει στα φύλλα και εκεί ένα μεγάλο ποσοστό εξατμίζεται στην ατμόσφαιρα (Σημειώσεις, Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος, Καλογεράκης 2013). Η βιοδιαθεσιμότητα του μεταλλικού ή οργανικού ρύπου είναι ένας κρίσιμος παράγοντας, και παίζει σπουδαίο ρόλο στην έκβαση της απομάκρυνσης του (Gerhardt *et al.*, 2009).

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΦΥΤΟΑΠΟΡΡΥΠΑΝΣΗΣ



## ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΦΥΤΟΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ



Εικόνα 1. 2 Μηχανισμοί Φυτοεξυγίανσης ( Σημειώσεις, Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος, Καλογεράκης 2013)

### 1.3 Τεχνητοί υδροβιότοποι

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι (CWs) είναι αποτελεσματικά συστήματα που αξιοποιούνται για την αποκατάσταση διάφορων ρυπαντών (Wu *et al.*, 2014). Είναι συστήματα τα οποία είναι ικανά να αξιοποιούν τις δυνατότητες τόσο των φυτών όσο και των συνεργών μικροοργανισμών τους προκειμένου να απομακρύνουν διάφορους οργανικούς ρύπους και μέταλλα από το νερό αλλά και από τα απόβλητα. Επομένως, έχει κριθεί ως μια επιλογή άξια εκμετάλλευσης αφού προσφέρει βιώσιμη αποκατάσταση ακόμη και στην περίπτωση αστικών μονάδων επεξεργασίας λυμάτων, οι οποίες είναι οι κύριες πηγές για την απελευθέρωση αρκετών αναδυόμενων ρύπων στο περιβάλλον (Syranidou *et al.*, 2017).

Έχει βρεθεί πως πολλά φυτά σε συνεργασία με τα βακτήρια εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου, ενώ ταυτόχρονα κάποια από αυτά μπορούμε να τα εκμεταλλευτούμε και ως υπερσυσσωρευτές καδμίου, αφού έχουν την δυνατότητα να συσσωρεύουν κάδμιο στους εσωτερικούς τους ιστούς (Boominathan and Doran 2003; Qiu *et al.*, 2008).

### 1.4 Αλόφυτα

Ως αλόφυτα χαρακτηρίζονται τα φυτά που όχι απλά εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αλατούχα εδάφη αλλά που μάλιστα ευδοκιμούν στα περιβάλλοντα αυτά. Τα ίδια φυτά εμφανίζουν μεγάλη ανοχή στους στρεσογόνους περιβαλλοντικούς παράγοντες και σε διάφορες καταπονήσεις συμπεριλαμβανομένων των βαρέων μετάλλων και των ξενοβιοτικών. Για αυτό το λόγο είναι ευρέως αξιοποιήσιμα σε περιπτώσεις αποκατάστασης με τη χρήση φυτών (Manousaki *et al.*, 2011). Προκειμένου να είναι αποδοτικό το εγχείρημα της φυτοεξυγίανσης, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας είναι η επιτυχής επιλογή του φυτικού είδους, καθώς αυτό απαιτείται να έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως υψηλή βιομάζα και ταχύ ρυθμό ανάπτυξης (Guillon-Philippe *et al.*, 2014; H. Wu *et al.*, 2015). Παρόλου που έχουν βρεθεί πολλά είδη που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα βαρέα μέταλλα και είναι ικανά να τα συσσωρεύουν στους ιστούς τους, δεν μπορούν όλα να χρησιμοποιηθούν σε ευρεία κλίμακα για τις διάφορες μεθόδους εξυγίανσης επειδή δεν πληρούν τις απαιτήσεις για ικανοποιητική βιομάζα και υψηλό ρυθμό ανάπτυξης (Vangronsveld *et al.*, 2009). Τα αλόφυτα σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά μπορούν να επιβιώσουν σε υδάτινες συνθήκες, αφού μέσα στο φυτό επιτρέπεται η ροή του αέρα από τα φύλλα στις ρίζες λόγω εσωτερικής πίεσης (Philippot *et al.*, 2013).

#### 1.4.1 Το ελόφυτο *Juncus acutus*

Το *Juncus acutus* είναι ένα ελόφυτο που χρησιμοποιείται πολύ συχνά σε τεχνητούς υδροβιότοπους στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (Vymazal 2013). Το *J. acutus* είναι ένα φυτό που από την φύση του επιβιώνει σε αλατούχα εδάφη και ταυτόχρονα έχει εκδηλώσει την δυνατότητα να συσσωρεύει μέταλλα στους υπόγειους ιστούς του (Almeida *et al.*, 2006). Πέρα από τα παραπάνω πλεονεκτήματα έχει αποδειχθεί ότι το φυτό φιλοξενεί μια μικροβιακή κοινότητα απαρτισμένη από στελέχη ικανά να αποδομούν οργανικές ενώσεις όπως είναι η δισφαινόλη Α (BPA), τα αντιβιοτικά σουλφαμεθοξαζόλη (SMX) και σιπροφλοξασίνη (CIP) και να επιβιώνουν σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων όπως το κάδμιο, ο ψευδάργυρος και το νικέλιο, ενώ ταυτόχρονα προσδίδουν στο φυτό ιδιότητες που ενισχύουν την ανάπτυξη του (Syranidou *et al.*, 2017). Επίσης έχει μελετηθεί για την υψηλή αντοχή που εμφανίζει παρουσία ψευδαργύρου αλλά και την συσσώρευση του (Mateos-naranjo *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014a). Σε άλλες μελέτες πάλι, έχει βρεθεί ότι τα είδη που ανήκουν στο γένος *Juncus* είναι ικανά να συσσωρεύουν τόσο το κάδμιο όσο το νικέλιο και τον ψευδάργυρο κυρίως στους

υπόγειους ιστούς τους (Christofilopoulos *et al.*, 2016; Ladislas *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2015).

### 1.5 Συνεισφορά των βακτηρίων στην Φυτοεξυγίανση

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικά κύτταρα με απλή δομή. Το γενετικό τους υλικό δεν περιβάλλεται από κάποιο πυρήνα αλλά συχνά συναντάται σε μια συγκεκριμένη περιοχή, που ονομάζεται πυρηνική περιοχή. Η πλασματική ή αλλιώς κυτταρική τους αποτελείται από ημικυτταρίνες ή πηκτινοειδείς ουσίες και περιβάλλεται από κυτταρικό τοίχωμα. Τα βακτήρια είναι ικανά να απομακρύνουν τα βαρέα μέταλλα με την βοήθεια συγκεκριμένων ομάδων στα κυτταρικά τους τοιχώματα. Κατά βάση έχει μελετηθεί η απομάκρυνση μεμονωμένων μετάλλων ιόντων από υδατικά διαλύματα, παρόλο που στην φύση, είτε από φυσικού της είτε ύστερα από κάποια αιτία ρύπανσης, δεν συναντώνται μεμονωμένα αλλά σε ποικιλία διαφορετικών κατιόντων. Οι μικροοργανισμοί προκειμένου να επιβιώσουν σε περιβάλλοντα ρυπασμένα με μέταλλα έχουν αναπτύξει έξυπνους μηχανισμούς αντοχής και αποτοξίνωσης των μετάλλων. Κάποιους από τους μηχανισμούς αυτούς τους θέτουν σε εφαρμογή με την βοήθεια πλασμιδίων και συνήθως είναι εξειδικευμένοι σε συγκεκριμένα μέταλλα. Υπάρχουν όμως και μηχανισμοί που προσδίδουν αντίσταση σε παραπάνω από ένα μέταλλο (Gomathy and Sabarinathan 2010; Σημειώσεις, Βιολογικές Μέθοδοι Εξυγίανσης Περιβάλλοντος, Καλογεράκης 2013).

Η βιοαπορρόφηση μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το εάν ο μεταβολισμός του κυττάρου έχει καθοριστικό ρόλο σε αυτήν. Τα μέταλλα που μεταφέρονται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης προκαλούν την ενδοκυτταρική συσσώρευση η οποία εξαρτάται από το μεταβολισμό του κυττάρου. Εξαιτίας της φύσης τους και της σύνθεσης των πολυ-στοιβαδών τους δηλαδή των μεμβρανών του κυτταρικού τοιχώματος και του πολυ-σακχαρώδους περιβλήματος που συναντάται σε συγκεκριμένα βακτήρια, τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να προσροφούν μέταλλα.

Οι μικροοργανισμοί διαθέτουν ένα αμυντικό προστατευτικό σύστημα το οποίο ανταποκρίνεται καταλλήλως παρουσία στρεσογόνων παραγόντων όπως τα τοξικά μέταλλα. Στη δεύτερη περίπτωση της απορρόφησης που δεν εξαρτάται από το μεταβολισμό, η διαδικασία της απορρόφησης των μετάλλων διεκπεραιώνεται μέσω της φυσικοχημικής αλληλεπίδρασης που συμβαίνει ανάμεσα στα μέταλλα και τις επιφανειακές λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στην επιφάνεια των μικροβιακών κυττάρων και είναι βασισμένη στη φυσική προσρόφηση, την ανταλλαγή ιόντων και τη χημική προσρόφηση, η οποία δεν εξαρτάται από το μεταβολισμό των κυττάρων. Τα κυτταρικά τοιχώματα της μικροβιακής βιομάζας, που αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και λιπίδια, έχουν άφθονες ομάδες σύνδεσης με μέταλλα όπως καρβοξυλικές, θειικές, φωσφορικές και αμινομάδες. Αυτός ο τύπος βιοσυσσωμάτωσης, δηλαδή, εξαρτώμενος από το μεταβολισμό, είναι σχετικά γρήγορος και μπορεί να είναι αναστρέψιμος (Kuyucak *et al.*, 1988). Τα βακτήρια είναι ικανά να δεσμεύουν ισχυρά τα μέταλλα και να ελέγχουν την κινητικότητα των τοξικών μετάλλων, έχοντας μέχρι και την δυνατότητα ακινητοποίησης τους. Στις επιφάνειες των βακτηρίων συναντώνται πολωμένες ομάδες, οι οποίες αλληλοεπιδρώντας με διάφορα κατιόντα, προσδίδουν στα υλικά αυτά την ικανότητα της αμφίδρομης δέσμευσης των βαρέων μετάλλων. Ταχύτερη απομάκρυνση επιτυγχάνεται στην περίπτωση που πραγματοποιείται απορρόφηση στα βακτηριακά τοιχώματα και όχι συσσώρευση στα κύτταρα (Limcharoensuk *et al.*, 2015).

Έχουν βρεθεί στελέχη ικανά να ενισχύσουν την πρόσληψη μετάλλων από τα φυτά ή ακόμη και να προωθούν την μετατόπιση των μετάλλων στους επιφανειακούς ιστούς (Syranidou *et al.*, 2017). Όσον αφορά τον ψευδάργυρο, αποτελεί ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τους μικροοργανισμούς. Παρόλα αυτά όταν συναντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αποδειχθεί επιβλαβής για τα βακτήρια. Έχουν όμως σε διάφορες μελέτες βρεθεί και απομονωθεί τόσο από το έδαφος, όσο και μέσα από λάσπη λυμάτων, στελέχη βακτηρίων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στον ψευδάργυρο (He *et al.*, 2010; Misra *et al.*, 2012). Σχετικά με τον ψευδάργυρο γνωρίζουμε ότι η συσσώρευση του δεν γίνεται μέσα στο εσωτερικό των κυττάρων αλλά γίνεται με την βοήθεια προσρόφησης στα κυτταρικά τοιχώματα (Limcharoensuk *et al.*, 2015).

Σημαντικό ρόλο παίζουν τόσο τα βακτήρια της ριζόσφαιρας, όσο και η ενδοφυτική κοινότητα της ρίζας. Οι δύο αυτές ξεχωριστές κοινότητες διαφοροποιούνται μεταξύ τους με τον παρακάτω τρόπο. Οι συνθήκες του εδάφους είναι αυτές που διαμορφώνουν τους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας ενώ ταυτόχρονα ό,τι εναποθέτουν οι ρίζες μεταβάλλει τις συνθήκες του εδάφους. Όσον αφορά τα ενδοφυτικά βακτήρια της ρίζας, αυτά εξαρτώνται και καθορίζονται από τις συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό του ξενιστή (Bulgarelli *et al.*, 2013).

### 1.5.1 Ενδοφυτικά Βακτήρια

Τα ενδοφυτικά βακτήρια είναι εκείνα που βρίσκονται στο εσωτερικό του φυτού και συμβιώνουν με αυτό χωρίς να του προκαλούν καμία αρνητική επίπτωση (Doty, 2008). Τα ενδοφυτικά βακτήρια είναι ιδιαίτερα αξιοποιήσιμα γιατί αναβαθμίζουν την τεχνική της φυτοεξυγίανσης και παρέχουν τη δυνατότητα αποτοξίνωσης των διάφορων τοξικών ρύπων (Weyens *et al.*, 2009). Τα ενδοφυτικά βακτήρια προσδίδουν αρκετές ευεργετικές ιδιότητες στο φυτό ξενιστή, όπως η αύξηση της αντοχής του στους διάφορους στρεσογόνους παράγοντες. Έχει βρεθεί επίσης ότι είναι ικανά να προωθήσουν την ανάπτυξη των ξενιστών τους με διάφορους μηχανισμούς, αλλά και να συνεισφέρουν στην εξυγίανση ρύπων του νερού ή του εδάφους. Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν δείξει την αποδοτικότητα τους στην περίπτωση τοξικών μετάλλων αλλά και οργανικών ουσιών. Οι ρίζες των φυτών αποτελούν τη δίοδο μέσα από την οποία εισέρχονται τα ενδοφυτικά βακτήρια

στο φυτό ξενιστή. Το αν θα καταφέρουν να εγκατασταθούν στο φυτό και να πολλαπλασιαστούν εξαρτάται από την ικανότητά τους να αποικίσουν το φυτό αυτό. Το πως θα διαμορφωθεί η κοινότητα των βακτηρίων μέσα στο φυτό εξαρτάται από το γονότυπο και την ηλικία του φυτού, από την συγκέντρωση της ουσίας στο εσωτερικό του και από άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Afzal *et al.*, 2014; Truyens *et al.*, 2015). Έχοντας εισέλθει στο φυτό, τα βακτήρια είναι ικανά να απομακρύνουν από το φυτό διάφορες επικίνδυνες οργανικές ουσίες αποδομώντας τις, να μεταβάλλουν το βαθμό απορρόφησης του φυτού με μηχανισμούς όπως είναι η έκκριση μεταβολιτών και να ενισχύσουν την κινητικότητα του μετάλλου και τη μετατόπισή του στους ιστούς των φυτών. Έχουν βρεθεί να είναι επίσης αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση μικτής ρύπανσης, όπως για παράδειγμα παρουσία τοξικών μετάλλων αλλά και οργανικών ενώσεων (Babu *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2016a; Visioli, 2015). Συγκεκριμένα για τον ψευδάργυρο, βρέθηκε ότι τα ενδοφυτικά βακτήρια διεγείρουν το φυτό να απορροφήσει τον ψευδάργυρο στο εσωτερικό του (He *et al.*, 2013; Ma, 2016b; Ma *et al.*, 2015c). Μια ακόμη έρευνα σχετικά με την συνεισφορά των ενδοφυτικών βακτηρίων στην εξυγίανση των βαρέων μετάλλων, αφορά στελέχη ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το ελόφυτο *J. acutus*, τα οποία εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου(VI) αλλά και την ικανότητα να το μετατρέψουν στο λιγότερο τοξικό χρώμιο(III) σε μικρό χρονικό διάστημα (Dimitroula *et al.*, 2015).



### 1.5.2 Βακτήρια Ριζόσφαιρας

Τα φυτά όταν εκτεθούν σε ρυπασμένα περιβάλλοντα επιστρατεύουν όλες τους τις δυνάμεις προκειμένου να επιβιώσουν. Για αυτόν τον σκοπό τους είναι απαραίτητοι μικροοργανισμοί εξοπλισμένοι με καταβολικά γονίδια. Η διαμόρφωση της ριζοσφαιρικής μικροβιακής κοινότητας καθορίζεται τόσο από αβιοτικούς όσο και από βιοτικούς παράγοντες. Το ίδιο το έδαφος με τα φυσικοχημικά του χαρακτηριστικά είναι αυτό που καθορίζει την κοινότητα και την ανάπτυξη της γύρω από τις ρίζες (Bulgarelli *et al.*, 2013 ; De Ridder-Duine *et al.*, 2005). Το σύστημα των ριζών εκκρίνει ουσίες οι οποίες προσελκύουν και τροφοδοτούν διάφορα είδη βακτηρίων, αφού αυτές αποτελούν θρεπτικά συστατικά. Έχουν βρεθεί μικροοργανισμοί που στην αλληλεπίδραση τους με τα φυτά, προωθούν την ανάπτυξη των ίδιων των φυτών (PGPRs) και αποκαθιστούν τα εδάφη τόσο από μέταλλα όσο και από οργανικές ουσίες. Υπάρχουν πολλές έρευνες που ασχολούνται με το ρόλο των PGPRs στη φυτοεξυγίανση βαρέων μετάλλων από το έδαφος (Glick, 2010; Ma *et al.*, 2011). Έχουν διαπιστωθεί διάφοροι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα βακτήρια είτε της ριζόσφαιρας είτε τα ενδοφυτικά, ενισχύουν την ανάπτυξη των φυτών. Μερικοί από αυτούς συγκαταλέγονται στους άμεσους μηχανισμούς και είναι η σταθεροποίηση του αζώτου, η διαλυτοποίηση διάφορων θρεπτικών ουσιών όπως ο σίδηρος και ο φώσφορος, η παραγωγή φυτοορμονών και η σύνθεση ενζύμων. Όσον αφορά την κατηγορία των έμμεσων μηχανισμών, σε αυτήν περιλαμβάνονται η παραγωγή αντιβιοτικών κατά των παθογόνων, η παραγωγή λυτικών ενζύμων, ο ανταγωνισμός για τις θέσεις πρόσδεσης και η αύξηση της αντοχής του ξενιστή (Glick, 2010; Jha *et al.*, 2012). Ένας άλλος μηχανισμός των μικροοργανισμών είναι η σύνθεση ενώσεων που φέρουν σίδηρο. Οι μικροοργανισμοί εκκρίνουν τις ενώσεις αυτές με σκοπό κυρίως να απομονώσουν το σίδηρο. Τα βακτήρια που παράγουν σιδηρόφορα συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του φυτού σε περιοχές με τοξικά μέταλλα, απαλύνοντας σημαντικά το στρες του φυτικού οργανισμού και τροφοδοτώντας το φυτό με απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, ιδιαίτερα τον σίδηρο (Rajkumar *et al.*, 2010). Πέρα από το σίδηρο, η έκκριση των παραπάνω ενώσεων έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας μετάλλων (Schalk *et al.*, 2011). Σε κάποια βακτήρια και μύκητες, η παρουσία και άλλων μετάλλων εκτός του σιδήρου είναι γνωστό ότι διεγείρει επίσης τον σχηματισμό των ίδιων ενώσεων (Huyer and Page 1988; Tiibingen 1973). Εκτός από το αλουμίνιο, η έκθεση σε χαλκό, χρώμιο, κάδμιο και ψευδάργυρο αυξάνει επίσης την παραγωγή σιδεροφόρων ενώσεων στο *B. megaterium* (Byers *et al.*, 1967; Davis *et al.*, 1971).

### 1.5.3 Ριζικές εκκρίσεις και η συμβολή τους

Παράλληλα με τα ενδοφυτικά βακτήρια, το φυτό μπορεί να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά την ικανότητα των βακτηρίων της ριζόσφαιρας να αποδοθούν ρύπους μέσω της έκκρισης διαφόρων ενώσεων. Επομένως τα φυτά χρησιμοποιούν και το ριζικό τους σύστημα ως μέσο ανταπόκρισης στους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος για να προσαρμοστούν στις συνθήκες του εδάφους, στην παρουσία μικροβίων ακόμη και σε διάφορες τοξικές και επιβλαβείς ουσίες. Αυτές οι εκκρινόμενες ουσίες είναι χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, όπως για παράδειγμα τα σάκχαρα, διάφορα οργανικά οξέα αλλά και δευτερογενείς μεταβολίτες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τόσο το περιβάλλον της ριζόσφαιρας, όσο και τους μικροοργανισμούς που ζουν σε αυτήν με ποικίλους τρόπους (Bais *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2012). Μερικοί μηχανισμοί συνεισφοράς των ριζικών εκκρίσεων, είναι η κινητοποίηση μεταλλικών μικροθρεπτικών συστατικών, ο ανταγωνισμός για θέσεις πρόσδεσης και η χρησιμοποίησή τους ως υπόστρωμα για συμμεταβολισμό και αποδόμηση οργανικών ρύπων (Wenzel 2009).

## 1.6 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της συνεισφοράς της μικροβιακής κοινότητας της ριζόσφαιρας και της ενδοφυτικής κοινότητας της ρίζας που συνδέονται με το ελόφυτο *Juncus acutus* στην απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων. Τα εν λόγω βακτήρια απομονώθηκαν από ελόφυτο που συμμετέχει στην επεξεργασία αποβλήτων δευτεροβάθμιας επεξεργασίας σε τεχνητό υδροβιότοπο.

## 2. Μεθοδολογία

Στο παρόν κεφάλαιο θα γίνει η αναφορά των υλικών και των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα καθώς και όλης της πειραματικής διαδικασίας που έλαβε χώρα.

### 2.1 Υλικά

#### **Εργαστηριακά Υλικά**

Αποστειρωμένα τρυβλία Petri

Κωνικές φιάλες των 250 ml

#### **Συσκευές και όργανα**

Κλίβανος υγρής αποστείρωσης

Φυγόκεντρος

Μετρητής αποικιών

Φασματοφωτόμετρο

#### **Βαρέα Μέταλλα**

Cd με τη μορφή του άλατος "Cadmium nitrate Tetrahydrate "

Ni με τη μορφή του άλατος "Nickel (II) chloride Hexahydrate"

Zn με τη μορφή του άλατος "Zinc sulfate Heptahydrate"

#### **Θρεπτικά υλικά και διαλύματα**

Σύσταση του 869 medium:

1. Tryptone 10g
2. Yeast extract 5g
3. NaCl 5g
4. D(+) Glucose 1.0g
5.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,345g
6. Distilled water 1000.0ml

Ενώ προστίθεται επίσης άγαρ συγκέντρωσης 15g/ στην περίπτωση καλλιέργειας σε τρυβλία.



## 2.2 Πειραματική διαδικασία

Κατά την εκκίνηση της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάστηκε θρεπτικό υλικό με σύσταση, η οποία αναφέρεται παραπάνω, ώστε να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί (Syranidou *et al.*, 2017).

Να σημειωθεί ότι κάθε φορά μετά την παρασκευή του το θρεπτικό αποστειρώνεται πλήρως στο αυτόκαυστο και στη διάρκεια των πειραματικών διεργασιών ανοίγεται μονάχα μέσα στον απαγωγό για να μην προκύψει κάποια επιμόλυνση.

Παρασκευάστηκαν επίσης διαλύματα των βαρέων μετάλλων εκατονταπλάσιας συγκέντρωσης (100X) από εκείνη που αργότερα θα προστεθεί στις κωνικές φιάλες για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών παρουσία των βαρέων μετάλλων. Από τα αντίστοιχα άλατα των μετάλλων παρασκευάστηκαν διαλύματα των επιθυμητών συγκεντρώσεων ως εξής:

- Για το κάδμιο:

C<sub>2</sub> (Επιθυμητή συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα στην κωνική φιάλη) = 0,4mg/l

V<sub>2</sub> (Τελικός επιθυμητός όγκος στην κωνική φιάλη) = 100ml

C<sub>1</sub> (Επιθυμητή συγκέντρωση στο αρχικό διάλυμα (stock)) = 40mg/l

Για να προκύψει τελική συγκέντρωση 40mg/l στα 100ml του διαλύματος του stock θα πρέπει να προστεθεί αντίστοιχη μάζα από την ένωση του αλάτος του καδμίου ίση με:

*Εξίσωση 2. 1*

$$m_{\text{comp.}} = 4 \times \frac{MB_{\text{comp}}}{MBCd} = 4 \times \frac{308,47}{112,4} \text{ mg} = 10,98 \text{ mg}$$

- Για το νικέλιο:

C<sub>2</sub> (Επιθυμητή συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα στην κωνική φιάλη) = 8mg/l

V<sub>2</sub> (Τελικός επιθυμητός όγκος στην κωνική φιάλη) = 100ml

C<sub>1</sub> (Επιθυμητή συγκέντρωση στο αρχικό διάλυμα (stock)) = 800mg/l

Για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 800mg/l στα 100ml του διαλύματος του stock θα πρέπει να προστεθεί αντίστοιχη μάζα από την ένωση του αλάτος του νικελίου ίση με:

$$m_{\text{comp.}} = 80 \times \frac{MB_{\text{comp}}}{MBNi} = 80 \times \frac{237,71}{58,7} \text{ mg} = 323,9 \text{ mg}$$

*Εξίσωση 2. 2*

- Για τον ψευδάργυρο :

$C_2$  (Επιθυμητή συγκέντρωση στο τελικό διάλυμα στην κωνική φιάλη) = 80mg/l

$V_2$  (Τελικός επιθυμητός όγκος στην κωνική φιάλη) = 100ml

$C_1$  (Επιθυμητή συγκέντρωση στο αρχικό διάλυμα (stock)) = 8000mg/l

Για να προκύψει τελική συγκέντρωση 8000mg/l στα 100ml του διαλύματος του stock θα πρέπει να προστεθεί αντίστοιχη μάζα από την ένωση του άλατος του ψευδαργύρου ίση με:

$$m_{\text{comp.}} = 800 \times \frac{MB_{\text{comp}}}{MB_{Ni}} = 800 \times \frac{287,54}{65,38} \text{mg} = 3.518,4 \text{ mg}$$

Εξίσωση 2. 3

Μετά την παρασκευής τους πραγματοποιήθηκε μετάγγιση τους με την χρήση σύριγγας με αποστειρωμένο φίλτρο διαμέτρου Whatman 0,45μm, σε νέα αποστειρωμένα φιαλίδια.

### 2.2.1 Συλλογή δειγμάτων και απομόνωση μικροοργανισμών

Η πειραματική διαδικασία ξεκινά με τη δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε κατά το μήνα Αύγουστο του 2018. Συλλέχθηκαν συνολικά 4 τυχαία δείγματα (Πίνακας 2. 1) φαινομενικά υγιών τμημάτων των ριζών που ζύγιζαν έκαστο περίπου 1g. Τα δυο πρώτα (A & B) (Εικόνα 2. 1 & Εικόνα 2. 2) αποσκοπούσαν στην απομόνωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας του *Juncus acutus* και τα δυο επόμενα (A & B) στην απομόνωση των ενδοφυτικών βακτηρίων.

Πίνακας 2. 2 Συλλογή δειγμάτων

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	ΒΑΡΟΣ( g)	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΡΙΖΟΣΦΑΙΡΑΣ	1,022	A RHIZO
	0,985	B RHIZO
ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	0,999	A ENDO
	0,772	B ENDO

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από το ριζικό σύστημα του αλόφυτου *Juncus acutus* (Εικόνα 2. 3) σε τεχνητό υδροβιότοπο οριζόντιας ροής που επεξεργάζεται αστικά λύματα (Εικόνα 2. 4). Ο τεχνητός υδροβιότοπος ήταν εγκατεστημένος στον Βιολογικό Καθαρισμό των Χανίων και αποσκοπούσε στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων Cd, Ni και Zn, από δευτερογενώς επεξεργασμένα λύματα. Στην είσοδο του υδροβιότοπου οι συγκεντρώσεις των μετάλλων ήταν 0,02mg/l Cd, 0,4 mg/l Ni και 4 mg/l Zn.



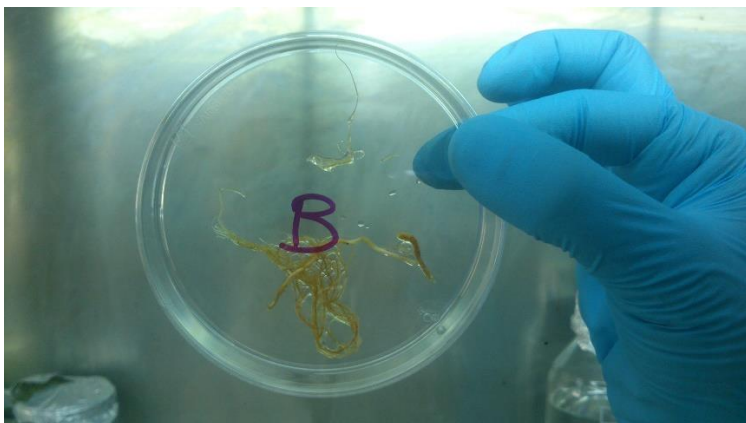
Εικόνα 2. 5 Αλόφυτο *Juncus acutus*



Εικόνα 2. 6 Σύστημα τεχνητού υδροβιότοπου



Εικόνα 2. 7 Δείγμα ριζικού τμήματος Α



Εικόνα 2. 8 Δείγμα ριζικού τμήματος Β

Για την απομόνωση και πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών στα συγκεκριμένα βαρέα μέταλλα βακτηρίων της ριζόσφαιρας οι συλλεγμένες ρίζες πλύθηκαν σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό με την βοήθεια μιας αποστειρωμένης λαβίδας για την απομάκρυνση των σωματιδίων και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό παρουσία των τριών μετάλλων. Οι τελικές συγκεντρώσεις αυτών ήταν:

- 0,4 mg/l Cd
- 8 mg/l Ni
- 80 mg/l Zn

Μέσω της καλλιέργειας των μικροοργανισμών παρουσία των μετάλλων επιτυγχάνεται ο πολλαπλασιασμός κυρίως αυτών που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα συγκεκριμένα βαρέα μέταλλα. Πραγματοποιήθηκε ανακαλλιέργεια για τον εγκλιματισμό της κοινότητας.

Για την απομόνωση και καλλιέργεια των ενδοφυτικών βακτηρίων ακολουθήθηκε διαδικασία που αποσκοπεί στον πολλαπλασιασμό μόνο των βακτηρίων που ζουν εσωτερικά του φλοιού των ριζών (Εικόνα 2. 9). Αρχικά οι ρίζες εμβαπτίζονται σε αιθανόλη συγκέντρωσης 100% και ανακινούνται για ένα λεπτό. Στη συνέχεια εμβαπτίζονται σε χλωρίνη συγκέντρωσης 5% και ανακινούνται για πέντε λεπτά ακόμη (Εικόνα 2. 10). Ακολουθούν πλύσεις με απιονισμένο νερό ενώ από την τελευταία πλύση συλλέχθηκε δείγμα για να επιβεβαιωθεί η αποστείρωση της εξωτερικής επιφάνειας των ριζών. Για το σκοπό αυτό το δείγμα καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό υλικό.





Εικόνα 2. 11 Διαδικασία απομόνωσης ενδοφυτικών βακτηρίων



Εικόνα 2. 12 Αποστειρωμένες ρίζες, έτοιμες για απομόνωση των ενδοφυτικών βακτηρίων

Οι αποστειρωμένες ρίζες πολτοποιούνται μαζί με 10ml αποστειρωμένο νερό σε ένα αποστειρωμένο γουδί μέχρι να διαλυθούν. Στη συνέχεια ακολουθείται η ίδια διαδικασία με εκείνη της καλλιέργειας των βακτηρίων της ριζόσφαιρας που περιεγράφηκε. Ομοίως, οι ενδοφυτικές κοινότητες καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό με προσθήκη μετάλλων σε συγκεντρώσεις:

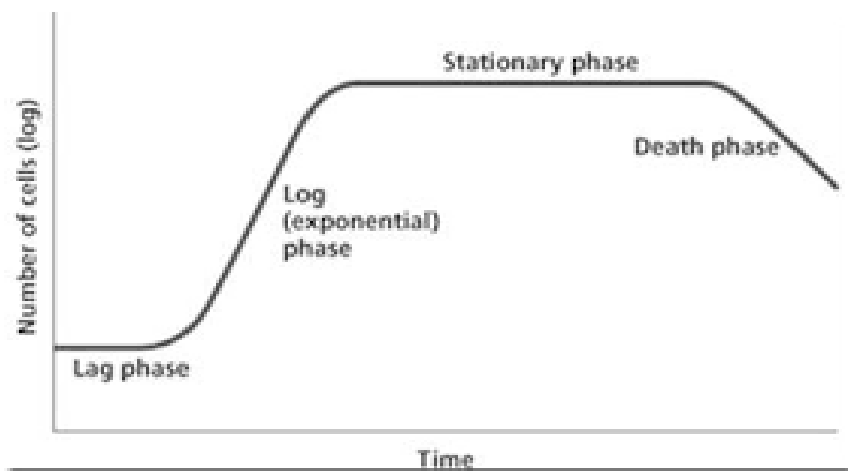
- 0,4 mg/l Cd
- 8 mg/l Ni
- 80 mg/l Zn

Παρασκευάστηκε επίσης ένα δείγμα ελέγχου (control) που αποτελούνταν από το ίδιο θρεπτικό υλικό, και τις ίδιες συγκεντρώσεις μετάλλων με την διαφορά ότι δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός μικροοργανισμών. Ακολούθησαν οι απαραίτητες ανακαλλιέργειες των ενδοφυτικών και βακτηρίων της ριζόσφαιρας της ομάδας B, σε νέες αποστειρωμένες φλάσκες, με τις ίδιες συγκεντρώσεις μετάλλων, για περεταίρω προσαρμογή και πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών.

Από τις καλλιέργειες συλλέχθηκε δείγμα 10ml από το οποίο, ύστερα από φυγοκέντρηση 20 λεπτών σε 3.500 στροφές το λεπτό, συλλέχθηκε και η κοινότητα των μικροοργανισμών. Αυτή διαφυλάχθηκε αναμειγμένη με διάλυμα γλυκερόλης στην κατάψυξη. Να σημειωθεί ότι η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε τόσο για να ενδοφυτικά όσο και για τα βακτήρια της ριζόσφαιρας. Αυτό είχε ως απώτερο σκοπό να διαφυλαχθεί αυτούσια η αρχική κοινότητα των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα βούρλα πριν επέλθει σε δοκιμές ανθεκτικότητας και απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων.

### 2.2.2 Κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης

Στόχος είναι η κατασκευή ενός διαγράμματος το οποίο θα δίνει στοιχεία για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και άμεση συσχέτιση της ανάπτυξης αυτής με την θολότητα του διαλύματος, γνωρίζοντας έτσι την αντιστοιχία συγκεντρώσεων και θολότητας θα επιτυγχάνεται η επιθυμητή συγκέντρωση ανάλογα με την θολότητα του διαλύματος κάθε χρονική στιγμή (Εικόνα 2. 13).



Εικόνα 2. 14 Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών

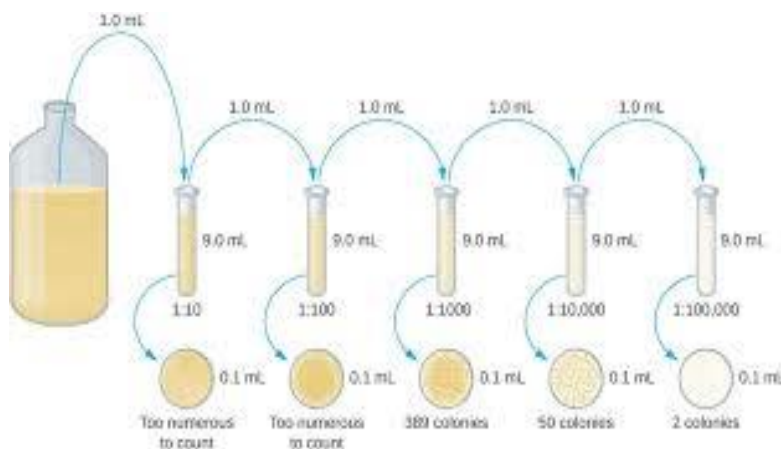
Τα στάδια της καμπύλης ανάπτυξης είναι κατά σειρά η φάση προσαρμογής, η φάση εκθετικής ανάπτυξης, η φάση στασιμότητας και η φάση θανάτου. Η φάση προσαρμογής (Lag phase) είναι το στάδιο κατά το οποίο δεν επέρχεται επιπλέον πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών, εκείνοι προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες του περιβάλλοντος που βρίσκονται και η διάρκειά της εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν στο νέο περιβάλλον. Κατά τη φάση αυτή οι μικροοργανισμοί συνθέτουν νέα συστατικά όπως ένζυμα που χρειάζονται για τον μεταβολισμό των στοιχείων που τους παρέχονται. Έπειτα κατά τη φάση της εκθετικής ανάπτυξης (Exponential phase) τα κύτταρα έχοντας προσαρμοστεί πλήρως αναπτύσσονται εκθετικά με μέγιστο και σταθερό ρυθμό ανάπτυξης. Ακολουθεί η φάση στασιμότητας (Stationary phase) στην οποία έχοντας εξαντληθεί το υπόστρωμα και παρατηρώντας συσσώρευση τοξικών μεταβολικών προϊόντων, όσοι μικροοργανισμοί πολλαπλασιάζονται άλλοι τόσοι πεθαίνουν και ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι μηδενικός. Τελικά στη φάση θανάτου οι μικροοργανισμοί οδηγούνται στο θάνατο και προκύπτει η αρνητική κλίση του διαγράμματος.

Για τον προσδιορισμό της καμπύλης που θα περιγράφει την ανάπτυξη των υπό εξέταση μικροοργανισμών παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα με αρχική συγκέντρωση μετάλλων 0,4 mg/l Cd, 8 mg/l Ni και 80 mg/l Zn, το ένα εμβολιάστηκε με την κοινότητα των ενδοφυτικών βακτηρίων και το άλλο με την κοινότητα των βακτηρίων της ριζόσφαιρας τα οποία παρέμεναν σε τράπεζα ανάδευσης η οποία λειτουργούσε τις 80 rpm και σε θερμοκρασία 25 °C. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα υπολογίζονταν η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου UV-VIS στα 600nm. Σκοπός της κατασκευής της καμπύλης είναι τελικά



ο προσδιορισμός του επιθυμητού εκείνου σημείου και της αντίστοιχης χρονικής στιγμής όπου η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση έτσι ώστε αργότερα να πραγματοποιείται εμβολιασμός με γνωστή αρχική συγκέντρωση.

Πραγματοποιώντας εποπτεία της καμπύλης μέσω του φασματοφωτόμετρου, για διάφορες γνωστές τιμές της οπτικής απορρόφησης, λαμβάνεται δείγμα της καλλιέργειας και ακολουθείται η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων (Εικόνα 2. 15) με σκοπό να υπολογιστεί η συγκέντρωση του μικροβιακού πληθυσμού. Η μέθοδος αυτή είναι αναγκαία επειδή κάθε καλλιέργεια μπορεί να περιέχει από χίλια έως εκατοντάδες εκατομμύρια βακτηριακά κύτταρα ανά όγκο. Για το σκοπό αυτό το αρχικό δείγμα πρέπει να υποστεί τις απαραίτητες διαδοχικές αραιώσεις και ύστερα κάθε μία από τα δείγματα συγκεκριμένης αραιώσης να επιστρωθούν σε τρυβλία με άγαρ. Προκύπτουν έτσι τρυβλία με τις απαραίτητες τάξεις των αραιώσεων για όλα τα σημεία της καμπύλης με γνωστή οπτική απορρόφηση. Μεταξύ όλων των επιμέρους αραιώσεων, κάθε νέα αραιώση που προκύπτει αναδεύεται ώστε να προκύπτει ομοιογενές διάλυμα από το οποίο λαμβάνεται δείγμα και προκύπτει η επόμενη αραιώση. Πραγματοποιήθηκαν πολλές αραιώσεις, της τάξεως από  $10^{-4}$  έως  $10^{-9}$ . Τελικά η εκτίμηση του πληθυσμού των ενδοφυτικών βακτηρίων και των βακτηρίων της ριζόσφαιρας έγινε εφικτή με την βοήθεια των τρυβλίων όπου ύστερα από μερικές αραιώσεις ήταν εύκολο ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται να καταμετρηθεί με γυμνό οφθαλμό.



Εικόνα 2. 16 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων

### 2.2.3 Α' κύκλος πειραμάτων - Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l και συγκέντρωσης καδμίου 0,8mg/l

Κατά τη διενέργεια της ανάπτυξης των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης καδμίου απαιτήθηκαν 6 κωνικές φλάσκες, 3 για κάθε διαφορετική τιμή συγκέντρωσης αφού πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε μία. Επομένως για κάθε μία από τις 6 φλάσκες που θα αναπτύσσονταν τα βακτήρια προέκυψε διάλυμα συνολικού όγκου 100ml, συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l για τις 3 φλάσκες με την χαμηλή συγκέντρωση

και 0,8mg/l για τις 3 με την υψηλή συγκέντρωση, και αρχικής συγκέντρωσης βακτηρίων  $10^7$  cfu/ml κατά τον παρακάτω τρόπο.

Επιδιώχθηκε μια κοινή αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών κατά τον εμβολιασμό μεταξύ των διαφορετικών επαναλήψεων και των διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου.

Επομένως γνωρίζοντας ότι η τελική επιθυμητή συγκέντρωση εμβολιασμού θα είναι  $C_2=10^7$  cfu/ml, για διάλυμα τελικού όγκου 100ml προκύπτει αρχική συγκέντρωση βακτηρίων στο αρχική διάλυμα που καλλιεργούνται :

$$C_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{V_1} = \frac{10^7 \text{ cfu/ml} \cdot 100 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 10^9 \text{ cfu/ml}$$

*Εξίσωση 2. 4*

Παρατηρώντας τις καμπύλες ανάπτυξης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι επιθυμητή συγκέντρωση κατά την εκθετική φάση, βρίσκεται όταν η τιμή της απορρόφησης κυμαίνεται γύρω στο 0,7. Έτσι με την βοήθεια των καμπυλών που δίνουν και στοιχεία για το χρόνο πραγματοποιείται έλεγχος και παρακολούθηση της καλλιέργειας αυτής ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Την χρονική στιγμή που η τιμή της απορρόφησης θα φτάσει την τιμή 0,7 συλλέγεται, δείγμα των 10 ml το οποίο φυγοκεντρείται για 20 λεπτά με 3.500 στροφές το λεπτό. Έπειτα, το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η πελέτα διαλύεται ξανά σε 10 ml θρεπτικού υγρού. Η συγκέντρωση του μικροβιακού φορτίου στην φάση αυτή είναι προσεγγιστικά  $10^9$  cfu/ml.

Μετά το πέρας της προετοιμασίας των έξι κωνικών φλασκών και αφού αναδευτούν καλά, πάντα υπό αποστειρωμένες συνθήκες λαμβάνονται τα έξι πρώτα δείγματα για το χρόνο μηδέν και τοποθετούνται σε κυψελίδες, για να φωτομετρηθούν στα 600nm. Το ίδιο το περιεχόμενο των κυψελίδων μεταγγίζεται σε σωληνάκια και αποθηκεύεται στην κατάψυξη. Αμέσως μετά οι 6 φλάσκες τοποθετούνται στην τράπεζα ανάδευσης η οποία λειτουργεί στις 80 rpm και σε θερμοκρασία 25 °C. Πραγματοποιείται εποπτεία, δηλαδή φωτομέτρηση καθώς και συλλογή και αποθήκευση των αντίστοιχων δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Παράλληλα με την ανάπτυξη των βακτηρίων παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης του μετάλλου κατασκευάζονται και δύο δείγματα control όγκου 50ml έκαστο, που περιέχουν μόνο θρεπτικό υλικό και ίσες συγκεντρώσεις καδμίου με αυτές που περιέχονται στις φλάσκες. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται εάν κατά το χρονικό διάστημα ανάπτυξης των μικροοργανισμών, το ίδιο το θρεπτικό χωρίς την επίδραση των μικροοργανισμών, είναι ικανό να απομακρύνει το υπό εξέταση μέταλλο. Επιπλέον με την βοήθεια των control επιβεβαιώνεται ή όχι κάποια πιθανή επιμόλυνση στο θρεπτικό.

#### 2.2.4 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l και συγκέντρωσης καδμίου 0,8mg/l

Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης καδμίου απαιτήθηκαν επίσης 6 κωνικές φλάσκες, 3 για κάθε διαφορετική τιμή συγκέντρωσης. Για κάθε μία από τις 6 φλάσκες που θα αναπτύσσονταν τα βακτήρια προέκυψε διάλυμα συνολικού όγκου 100ml, συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l για τις 3 φλάσκες με την χαμηλή συγκέντρωση και 0,8mg/l για τις 3 με την υψηλή συγκέντρωση 0,8mg/l και βακτηριακής συγκέντρωσης  $10^7 \text{ cfu/ml}$ , στηριζόμενοι στην ίδια σχέση:

Εξίσωση 2. 5

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{10^7 \text{ cfu/ml} \cdot 100 \text{ ml}}{10^9 \text{ cfu/ml}} = 1 \text{ ml}$$

με επιθυμητή αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών  $10^7 \text{ cfu/ml}$ .

Από αυτές επίσης λαμβάνονται τα έξι πρώτα δείγματα για το χρόνο μηδέν και αφού φωτομετρηθούν αποθηκεύονται στην κατάψυξη. Αμέσως μετά οι 6 φλάσκες τοποθετούνται στην τράπεζα ανάδευσης η οποία λειτουργεί στις 80 rpm και σε θερμοκρασία 25 °C. Κατά τη διάρκεια συλλέγονται και αποθηκεύονται δείγματα για διάφορες τιμές απορροφήσεων τα οποία προορίζονται για τον υπολογισμό της απομάκρυνσης του μετάλλου. Κατασκευάζονται και δύο δείγματα control, συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l και 0,8mg/l.

#### 2.2.5 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία συγκέντρωσης ψευδαργύρου 80mg/l & 140mg/l

Στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης καδμίου ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία της παρασκευής των διαλυμάτων, της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και δειγματοληψίας με αυτή που περιεγράφηκε παραπάνω. Προκύπτει όμως διάλυμα συνολικού όγκου 100ml, με συγκέντρωση μικροοργανισμών  $10^7 \text{ cfu/ml}$  και συγκέντρωσης ψευδαργύρου 80mg/l για την χαμηλή συγκέντρωση και 140mg/l για την υψηλή συγκέντρωση.

Κατασκευάζονται τώρα δύο διαφορετικά δείγματα control, όγκου 20ml με συγκέντρωση ψευδαργύρου 80mg/l το ένα και 140mg/l το άλλο.

#### 2.2.6 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία συγκέντρωσης ψευδαργύρου 80mg/l & 140mg/l

Στην περίπτωση αυτή ακολουθείται πανομοιότυπα η ίδια διαδικασία με την παραπάνω με την βασική διαφορά ότι καλλιεργούνται τα ενδοφυτικά βακτήρια παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου.

### 2.2.7 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία συγκέντρωσης νικελίου 8mg/l & 20mg/l

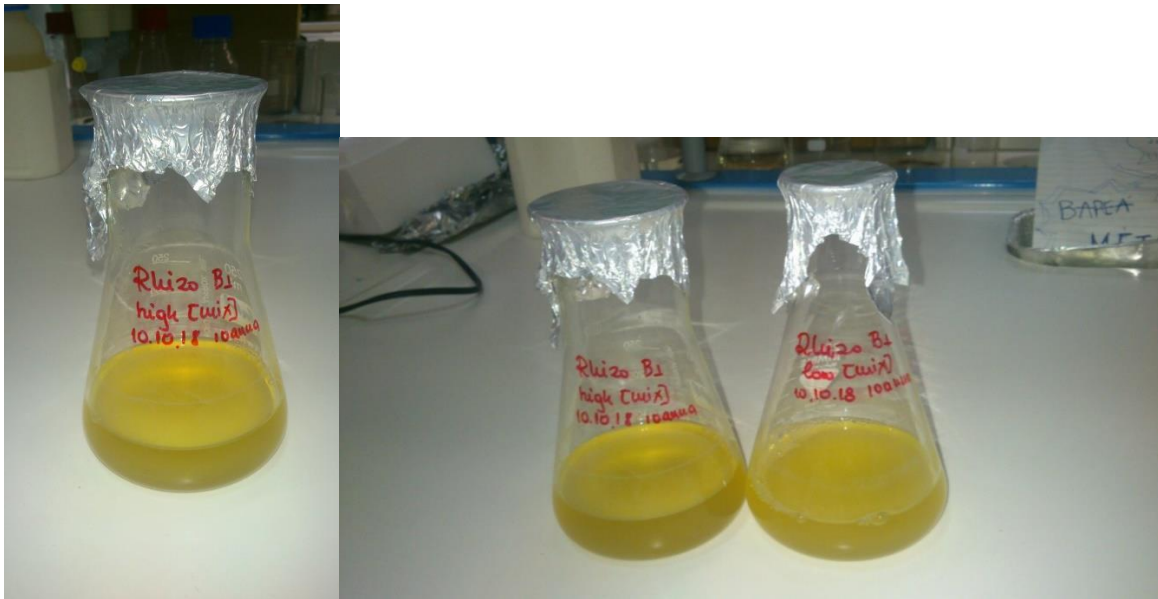
Ακολουθώντας την ίδια πρακτική, για τις 3 πρώτες φλάσκες προέκυψε διάλυμα συνολικού όγκου 100ml, συγκέντρωσης μικροοργανισμών  $10^7$  cfu/ml και συγκέντρωσης νικελίου 8 mg/l για τις επαναλήψεις με την χαμηλή συγκέντρωση και 20mg/l για τις επαναλήψεις με την υψηλή συγκέντρωση.

### 2.2.8 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία συγκέντρωσης νικελίου 8mg/l & 20mg/l

Σε αυτήν την πειραματική φάση ακολουθείται ακριβώς η παραπάνω διαδικασία με την βασική διαφορά ότι καλλιεργούνται, παρατηρούνται και εξετάζονται τα ενδοφυτικά βακτήρια παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης νικελίου.

### 2.2.9 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων

Στην περίπτωση ανάπτυξης των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία και των τριών μετάλλων (Εικόνα 2. 17) η πειραματική διαδικασία είναι επίσης η ίδια καθ' όλη την διάρκεια της. Σε αυτήν την περίπτωση όμως προέκυψε διάλυμα συνολικού όγκου 100ml, συγκέντρωσης μικροοργανισμών  $10^7$  cfu/ml και συγκέντρωσης καδμίου 0,4 mg/l, νικελίου 8 mg/l και ψευδαργύρου 80mg/l για τις 3 επαναλήψεις με τη χαμηλή συγκέντρωση, και συγκέντρωσης καδμίου 0,8mg/l, νικελίου 20mg/l και ψευδαργύρου 140mg/l για τις επόμενες 3 με την υψηλή συγκέντρωση. Τελικά παρασκευάζονται δύο δείγματα control, με συγκέντρωση ψευδαργύρου 80mg/l, καδμίου 0,4 mg/l, νικελίου 8 mg/l το ένα, και συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l, νικελίου 8 mg/l και ψευδαργύρου 140mg/l το άλλο.



Εικόνα 2. 18 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων

#### 2.2.10 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων

Στο σημείο αυτό ακολουθείται ακριβώς η παραπάνω διαδικασία με την βασική διαφορά ότι καλλιεργούνται, παρατηρούνται και εξετάζονται τα ενδοφυτικά βακτήρια κατά την ανάπτυξη τους παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης και των τριών βαρέων μετάλλων (Εικόνα 2. 19 & Εικόνα 2. 20).



Εικόνα 2. 21 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων



Εικόνα 2. 22 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων

### 2.2.11 Β' Κύκλος Πειραμάτων – Πειραματική διαδικασία και διαφοροποιήσεις

Κατά τη δεύτερη πειραματική φάση το απόβλητο συλλέχθηκε από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας αποβλήτων και αποστειρώθηκε. Μια βασική διαφοροποίηση μεταξύ των δυο πειραματικών κύκλων αφορά την πηγή των οργανικών ουσιών που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Σε αυτή τη φάση βασική οργανική πηγή αποτελεί το απόβλητο που συλλέχθηκε και οι ριζικές εκκρίσεις και εξετάζονται μόνο τα βακτήρια της ριζόσφαιρας. Επιπλέον οι συγκεντρώσεις των μετάλλων στις οποίες δοκιμάζεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι όμοιες με τις συγκεντρώσεις των μετάλλων του υδροβιότοπου, δηλαδή συγκέντρωση καδμίου 0,02mg/l, νικελίου 0,4mg/l και ψευδαργύρου 4mg/l.

#### 2.2.11.α Σύσταση και Παρασκευή των "root exudates"

Η επιλογή των οργανικών ενώσεων που θα χρησιμοποιηθούν ως ριζικές εκκρίσεις βασίστηκε στους Jin *et al.*, 2019 (Πίνακας 2. 3). Παρασκευάζεται διάλυμα(stock) των ριζικών εκκρίσεων με επιθυμητή συγκέντρωση εκατονταπλάσια από εκείνη που τελικά θα επιδιωχθεί να βρίσκεται μες τις φλάσκες κατά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Ο τελικός όγκος του διαλύματος θα είναι 50 ml =  $50 \times 10^{-3}$  L

Πίνακας 2. 4 Σύσταση των "root exudates"

Κατηγορία ενώσεων	Ένωση	Συγκέντρωση στο διάλυμα (g/l)
Σάκχαρα	Glucose	1,28
	Fructose	0,28
Αμινοξέα	Glutamic acid	0,084
	Glycine	0,012
	Aspartic acid	0,036
Οργανικά οξέα	Oxalic acid	0,052
	Formic acid	0,014
	Malonic acid	0,012

Υπολογισμός μαζών για την Παρασκευή των διαλυμάτων.

$$m = V \times C \quad \text{Εξίσωση 2. 6}$$

- Για την Glucose:  $m = 50 \times 10^{-3} \text{ L} \times 1,28 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 10^2 = 6,39\text{g}$
- Για την Fructose:  $m = 50 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0,28 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 10^2 = 1,386\text{g}$
- Για το Glutamic acid:  $m = 50 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0,084 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 10^2 = 0,41\text{g}$
- Για την Glycine:  $m = 50 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0,012 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 10^2 = 0,06\text{g}$
- Για το Aspartic acid:  $m = 50 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0,036 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 10^2 = 0,179\text{g}$
- Για το Oxalic acid:  $m = 50 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0,052 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 10^2 = 0,26\text{g}$
- Για το Formic acid:  $m = 50 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0,012 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 10^2 = 0,07\text{g}$
- Για το Malonic acid:  $m = 50 \times 10^{-3} \text{ L} \times 0,014 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times 10^2 = 0,062\text{g}$

Μετά την παρασκευή του παραπάνω διαλύματος όγκου 50ml, το διάλυμα αποστειρώνεται με την βοήθεια σύριγγας και φιλτράρεται μέσα από φίλτρο διαμέτρου 0,2  $\mu\text{m}$ .



### 2.2.12 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης καδμίου 0,02mg/l

Κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας απαιτήθηκαν 3 αποστειρωμένες κωνικές φλάσκες. Για κάθε μία προέκυψε διάλυμα συνολικού όγκου 100ml, συγκέντρωσης μικροοργανισμών  $10^7$  cfu/ml, συγκέντρωσης καδμίου 0,02mg/l, συγκέντρωσης COD στο απόβλητο 9 mg/l, και συγκέντρωσης ριζικών εκκρίσεων σύμφωνα με τον Πίνακα 2. 2 Σύσταση των "root exudates" .

Καθώς επιδιώχθηκε κοινή αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών με τον προηγούμενο κύκλο πειραμάτων, κατά τον εμβολιασμό μεταξύ των διαφορετικών επαναλήψεων και των διαφορετικών μετάλλων η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής: Γνωρίζοντας ότι η τελική επιθυμητή συγκέντρωση εμβολιασμού θα είναι  $C_2=10^7$ cfu/ml και επιδιώκοντας να λαμβάνεται 1ml από το διάλυμα των βακτηρίων ,για διάλυμα τελικού όγκου 100ml προκύπτει αρχική συγκέντρωση βακτηρίων στο αρχική διάλυμα που καλλιεργούνται :

*Εξίσωση 2. 7*

$$C_1 = \frac{C_2 * V_2}{V_1} = \frac{10^7 \text{ cfu/ml} * 100 \text{ ml}}{1 \text{ ml}} = 10^9 \text{ cfu/ml}$$

Για να επιτευχθεί η συγκέντρωση αυτή ,πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια των μικροοργανισμών που κατά την εκκίνηση τις πειραματικής διαδικασίας είχαν αποθηκευτεί στην κατάψυξη, σε θρεπτικό υλικό medium 869. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στο γεγονός ότι δεν είναι σκόπιμο το διάλυμα να επιβαρυνθεί με άλλο οργανικό φορτίο πέρα από τα προαναφερόμενα. Για το σκοπό αυτό, όταν στην καμπύλη της ανάπτυξης η τιμή της απορρόφησης είναι γύρω στο 0,7 συλλέγεται δείγμα 10ml για φυγοκέντρωση 20 λεπτών στις 3.500rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και την θέση του συμπληρώνουν 10 ml αποστειρωμένου αποιονισμένου νερού. Ανακινείται πολύ καλά έως ότου η πελέτα διαλυθεί πάλι και προκύψει διάλυμα εκ νέου. Τότε οδηγείται πάλι για φυγοκέντρωση υπό τις ίδιες συνθήκες. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης επαναλαμβάνεται η διαδικασία της απόρριψης του υπερκείμενου και προσθήκης αποστειρωμένου νερού. Έπειτα συμπληρώνονται 10 ml από το αποστειρωμένο απόβλητο, το διάλυμα ανακινείται καλά και από αυτό λαμβάνεται το δείγμα που προορίζεται για τον εμβολιασμό. Όσον αφορά το διάλυμα των ριζικών εκκρίσεων παρασκευάστηκε έτσι ώστε να έχει εκατονταπλάσια συγκέντρωση από την επιθυμητή της φλάσκας όποτε βάση του νόμου της αραιώσης απαιτείται 1ml από το διάλυμα εκατονταπλάσιας συγκέντρωσης για να εμπλουτίσει τελικό διάλυμα τελικού όγκου 100ml.

Η επιβάρυνση του διαλύματος με την επιθυμητή συγκέντρωση καδμίου 0,02mg/l προκύπτει ως εξής:

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1} = \frac{0,02 \text{ mg} * 100 \text{ ml}}{\frac{40 \text{ mg}}{l}} = 0,05 \text{ ml}$$

*Εξίσωση 2. 8*



Οι τρεις φλάσκες αφού αναδευτούν καλά, πάντα υπό αποστειρωμένες συνθήκες λαμβάνονται τα τρία πρώτα δείγματα για το χρόνο μηδέν και τοποθετούνται σε κυψελίδες για να φωτομετρηθούν. Το ίδιο το περιεχόμενο των κυψελίδων μεταγγίζεται σε σωληνάκια και αποθηκεύεται στην κατάψυξη. Αμέσως μετά οι φλάσκες τοποθετούνται στην τράπεζα ανάδευσης η οποία λειτουργεί στις 80 rpm και σε θερμοκρασία 25 °C Πραγματοποιείται εποπτεία, δηλαδή φωτομέτρηση καθώς και συλλογή και αποθήκευση των αντίστοιχων δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα όμως εκείνων του πρώτου κύκλου ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης τους. Επιδιώκεται, τελικά να συμπεριλαμβάνονται όλα τα κύρια σημεία της καμπύλης τους. Παράλληλα με την ανάπτυξη των βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης του καδμίου, κατασκευάζεται και ένα δείγμα control όγκου 20ml που περιέχει αυτή τη φορά το απόβλητο, ίση συγκέντρωση καδμίου αλλά και ριζικών εκκρίσεων, με αυτή που περιέχεται στις φλάσκες.

### 2.2.13 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης νικελίου 0,4mg/l

Σε αυτό το στάδιο ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία με την διαφορά ότι προέκυψε διάλυμα συνολικού όγκου 100ml, συγκέντρωσης μικροοργανισμών  $10^7$  cfu/ml, συγκέντρωσης νικελίου 0,4mg/l και συγκέντρωσης COD στο απόβλητο 9 mg/l. Σε αυτές προστέθηκαν 1 ml από το διάλυμα των ριζικών.

Η επιθυμητή συγκέντρωση του νικελίου προκύπτει ως εξής:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{0,4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}}{\frac{800 \text{ mg}}{l}} = 0,05 \text{ ml} \quad \text{Εξίσωση 2. 9}$$

### 2.2.14 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης ψευδαργύρου 4mg/l

Στο στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται επίσης η ίδια πειραματική διαδικασία και οι φλάσκες όπου αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί περιέχουν διαλύματα τελικού όγκου 100ml, συγκέντρωση μικροοργανισμών  $10^7$  cfu/ml, συγκέντρωση ψευδαργύρου 4mg/l και συγκέντρωση COD στο απόβλητο 9 mg/l (Εικόνα 2. 23).

Η επιθυμητή συγκέντρωση του ψευδαργύρου προκύπτει ως εξής:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{4 \text{ mg} \cdot 100 \text{ ml}}{\frac{8000 \text{ mg}}{l}} = 0,05 \text{ ml} \quad \text{Εξίσωση 2. 10}$$



Εικόνα 2. 24 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία ψευδαργύρου -B' Κύκλος

2.2.15 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης καδμίου 0,02mg/l, νικελίου 0,4mg/l και ψευδαργύρου 4mg/l

Το τελευταίο στάδιο του δεύτερου κύκλου πειραμάτων αφορά τη μελέτη της συμπεριφοράς των βακτηρίων παρουσία και των τριών μετάλλων (Εικόνα 2. 25). Οι φλάσκες αυτή τη φορά έχουν τελικό όγκο 100ml με συγκέντρωση μικροοργανισμών  $10^7$  cfu/ml και περιέχουν κάδμιο συγκέντρωσης 0,02mg/l, νικέλιο συγκέντρωσης 0,4mg/l, ψευδάργυρο συγκέντρωσης 4mg/l και συγκέντρωση COD στο απόβλητο 9 mg/l.



Εικόνα 2. 26 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία και των τριών μετάλλων -B' Κύκλος

Προκειμένου να δοθεί μια ολοκληρωμένη εικόνα παρατίθεται ο Πίνακας 2. 5 όπου συνοψίζει όλη την πειραματική διαδικασία.

Πίνακας 2. 6 Συγκεντρωτικός πίνακας επί μέρους πειραμάτων

Βακτη- ριακή κοινό- τητα	Πλούσιο θρεπτικό								Απόβλητο με προσθήκη ριζικών εκκρίσεων			
	Χαμηλή συγκέντρωση				Υψηλή συγκέντρωση							
	Cd	Ni	Zn	Cd +Ni +Zn	Cd	Ni	Zn	Cd+N i+Zn	Cd	Ni	Zn	Cd+Ni+Zn
Ριζό- σφαιρα	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ενδο- φυτική	x	x	x	x	x	x	x	x				

## 2.2.16. Προετοιμασία δειγμάτων & Προσδιορισμός συγκεντρώσεων Cd, Ni Zn

Η συγκέντρωση των μετάλλων στα διαλύματα stock που παρασκευάστηκαν στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας μετρήθηκε αφού πραγματοποιήθηκαν οι κατάλληλες αραιώσεις. Επιδιώκεται η τελική συγκέντρωση στο δείγμα που πρόκειται να μετρηθεί να μην ξεπερνά τα 0,02mg/l καδμίου, το 1mg/l νικελίου και τα 10 mg/l ψευδαργύρου. Επομένως ο όγκος που λαμβάνεται από το stock διάλυμα του μετάλλου προκειμένου να κατασκευαστεί τελικό διάλυμα όγκου 10ml προκύπτει ως εξής:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{\frac{0,02 \text{ mg}}{\text{l}} \cdot 10 \text{ ml}}{\frac{40 \text{ mg}}{\text{l}}} = 5 \text{ ml καδμίου,} \quad \text{Εξίσωση 2. 11}$$

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{\frac{1 \text{ mg}}{\text{l}} \cdot 10 \text{ ml}}{\frac{800 \text{ mg}}{\text{l}}} = 12,5 \text{ ml νικελίου,} \quad \text{Εξίσωση 2. 12}$$

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{\frac{10 \text{ mg}}{\text{l}} \cdot 10 \text{ ml}}{\frac{8000 \text{ mg}}{\text{l}}} = 12,5 \text{ ml ψευδαργύρου} \quad \text{Εξίσωση 2. 13}$$

Στην συνέχεια προετοιμάζονται όλα τα δείγματα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια και των δύο κύκλων, δηλαδή αραιώνονται κατάλληλα ώστε να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των μετάλλων που περιέχουν και να προσδιοριστεί το ποσοστό της απομάκρυνσης τους. Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω αραιώσεων και με την βοήθεια μιας αντλίας κενού, διηθούνται τα παραπάνω δείγματα σε φίλτρα διαμέτρου 1-2 μm με σκοπό την απομάκρυνση των οργανικών

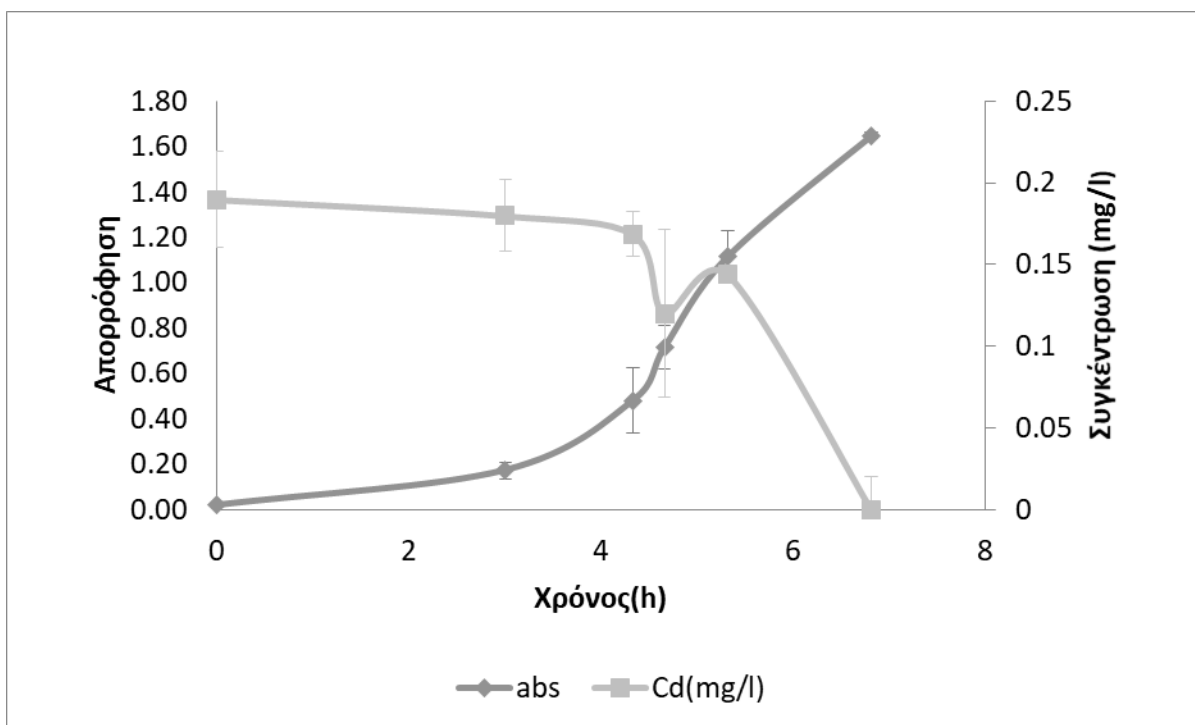
που παρεμποδίζουν την μέτρηση που ακολουθεί. Το διηθημένο δείγμα προορίζεται για την μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης των μετάλλων, καδμίου, νικελίου και ψευδάργυρου, με χρήση φασματομετρίας μάζας με επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS, Agilent Technologies, 7500 series CX coupled by Autosampler ASX-500 series, Japan) σύμφωνα με την μέθοδο 6020A EPA (EPA, 1998). Τελικά το ποσοστό απομάκρυνσης των μετάλλων υπολογίζεται από το πηλίκο της διαφοράς της αρχικής τιμής της συγκέντρωσης μείον την τελική προς την αρχική τιμή της συγκέντρωσης επί τοις εκατό.

### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Α' Κύκλος- Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία καδμίου και αντίστοιχη απομάκρυνση

3.1.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας

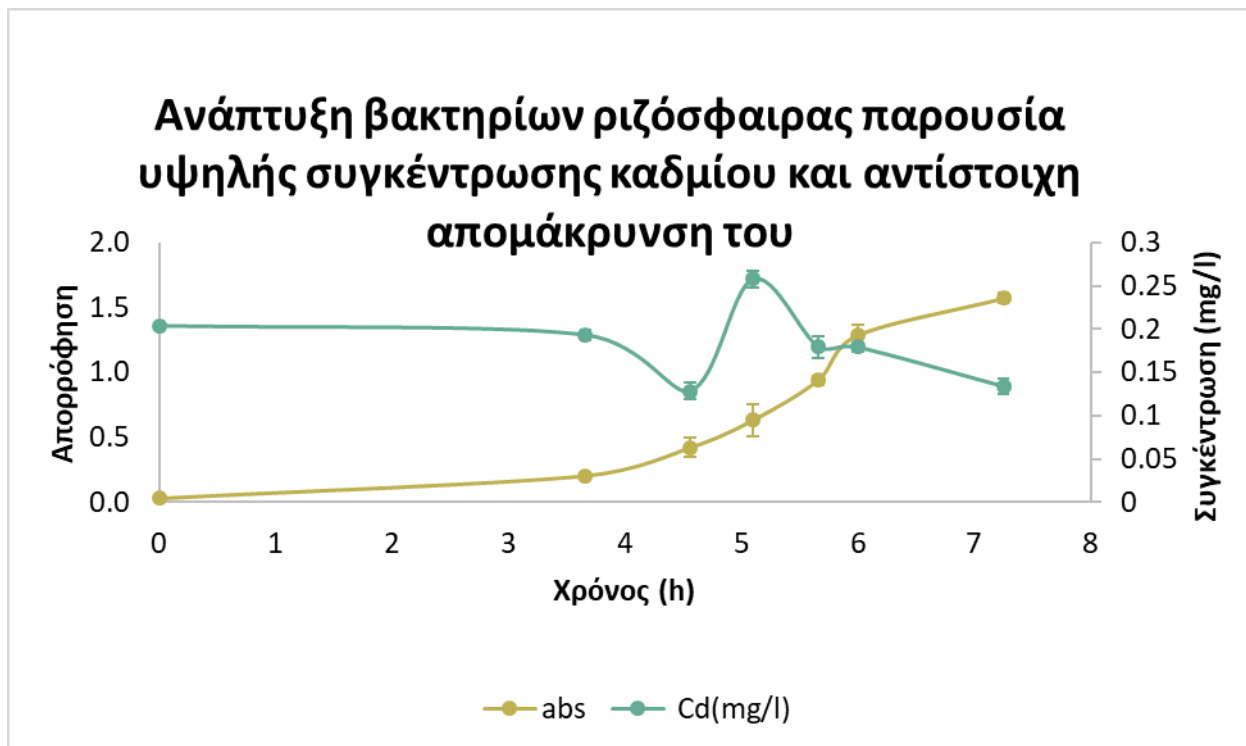
3.1.1.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου



Διάγραμμα 3.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.1 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου 0,4mg/l σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη απομάκρυνση και σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης του. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Σε χρόνο μηδέν παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση καδμίου που είναι ίση με 0,19 mg/l και σε διάρκεια περίπου 7 ωρών η συγκέντρωση έχει μηδενιστεί με ποσοστό απομάκρυνσης 100%.

### 3.1.1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καδμίου

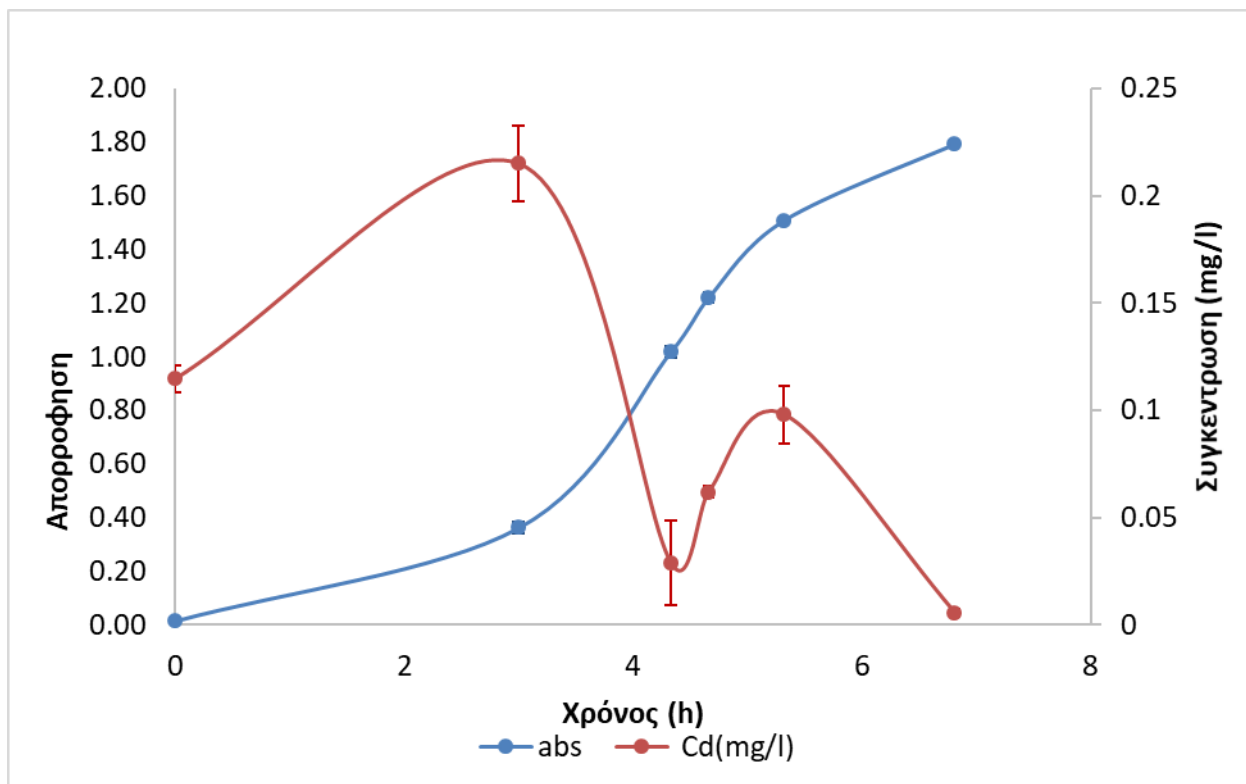


Διάγραμμα 3.2 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καδμίου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.2 παρατηρείται η ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας, και η ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης του καδμίου όταν αυτό βρίσκεται αρχικά σε υψηλή συγκέντρωση ίση με 0,8mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Μετά το πέρασμα σχεδόν 7 ωρών η συγκέντρωση μειώνεται στα 0,13 mg/l, εμφανίζοντας ποσοστό απομάκρυνσης 48%.

### 3.1.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων

#### 3.1.2.1 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου

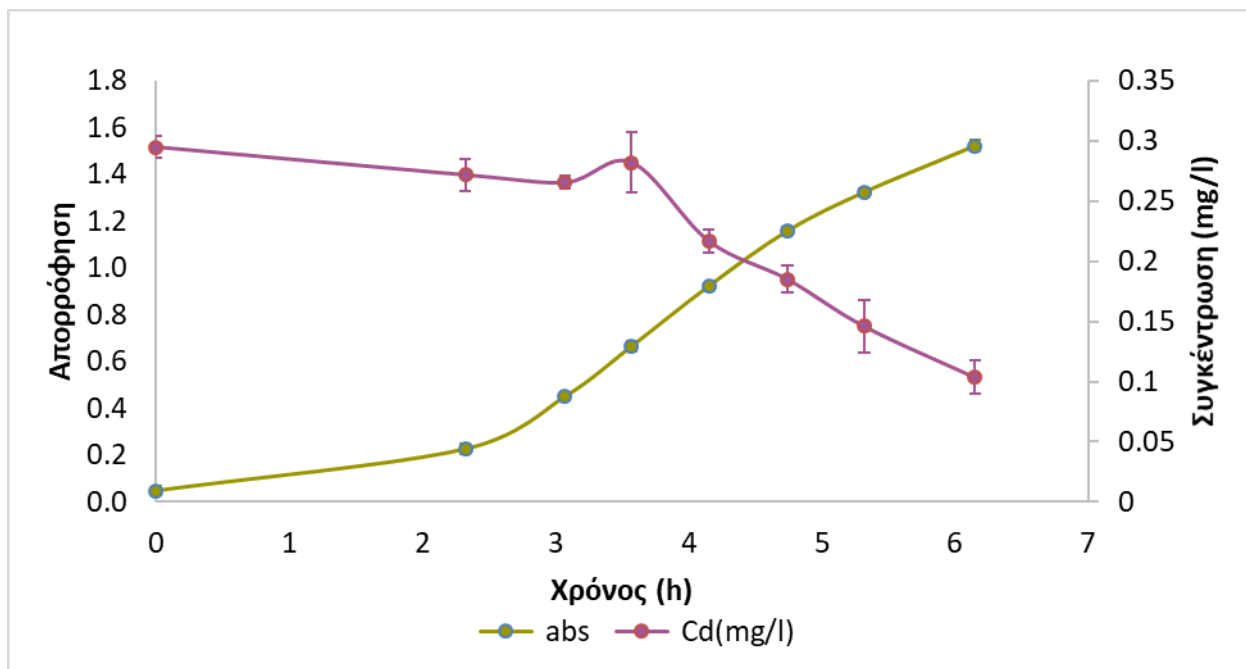


Διάγραμμα 3.3 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.3 παρατηρείται τόσο η ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου όσο και η αντίστοιχη μείωση του συναρτήσεως του χρόνου. Αρχικά η συγκέντρωση καδμίου που επιδιώχθηκε ήταν ίση με 0,4 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Μετά το πέρασμα σχεδόν 7 ωρών η συγκέντρωση έχει οριακά μηδενιστεί και εντοπίζεται με τιμή 0,0056 mg/l ενώ εμφανίζει ποσοστό απομάκρυνσης 97,4%



### 3.1.2.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καδμίου



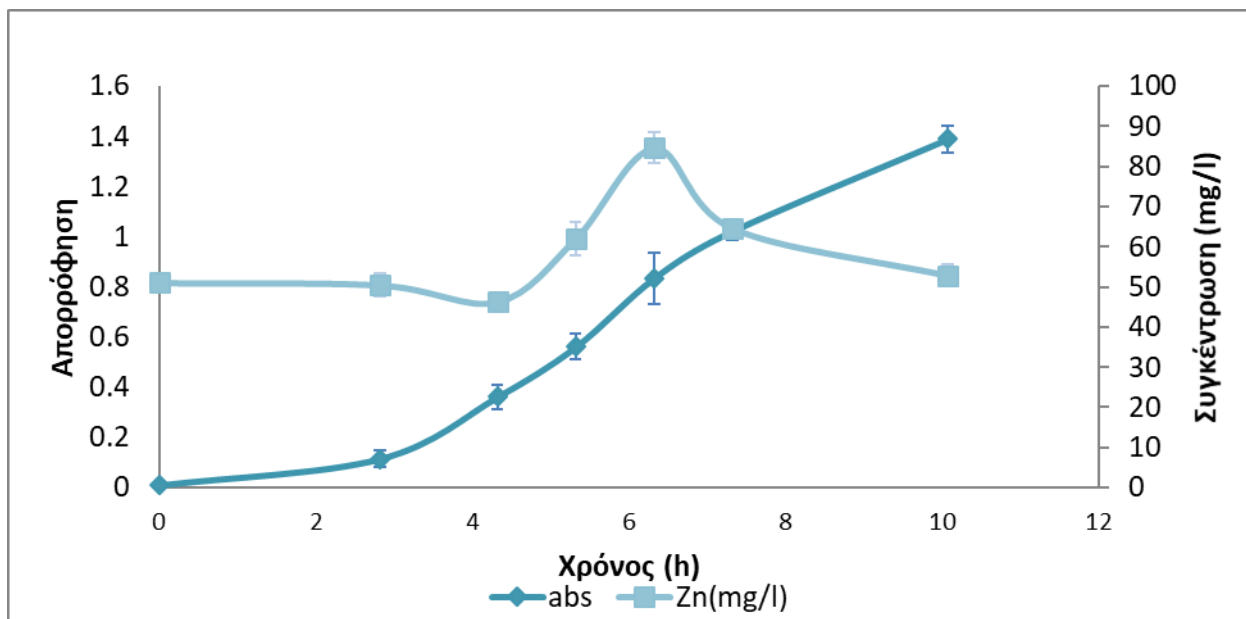
Διάγραμμα 3.4 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καδμίου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.4 παρουσιάζονται η ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καδμίου και η αντίστοιχη απομάκρυνση του συναρτήσει του χρόνου. Αρχικά η συγκέντρωση καδμίου που επιδιώχθηκε ήταν ίση με 0,8 mg/l. Σε χρόνο μηδέν παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση καδμίου που είναι ίση με 0,29 mg/l και σε διάρκεια περίπου 6 ωρών η συγκέντρωση αγγίζει την τιμή 0,10 mg/l με ποσοστό απομάκρυνσης 64,9%.

### 3.2 Α' Κύκλος- Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία ψευδαργύρου και αντίστοιχη απομάκρυνση

#### 3.2.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας

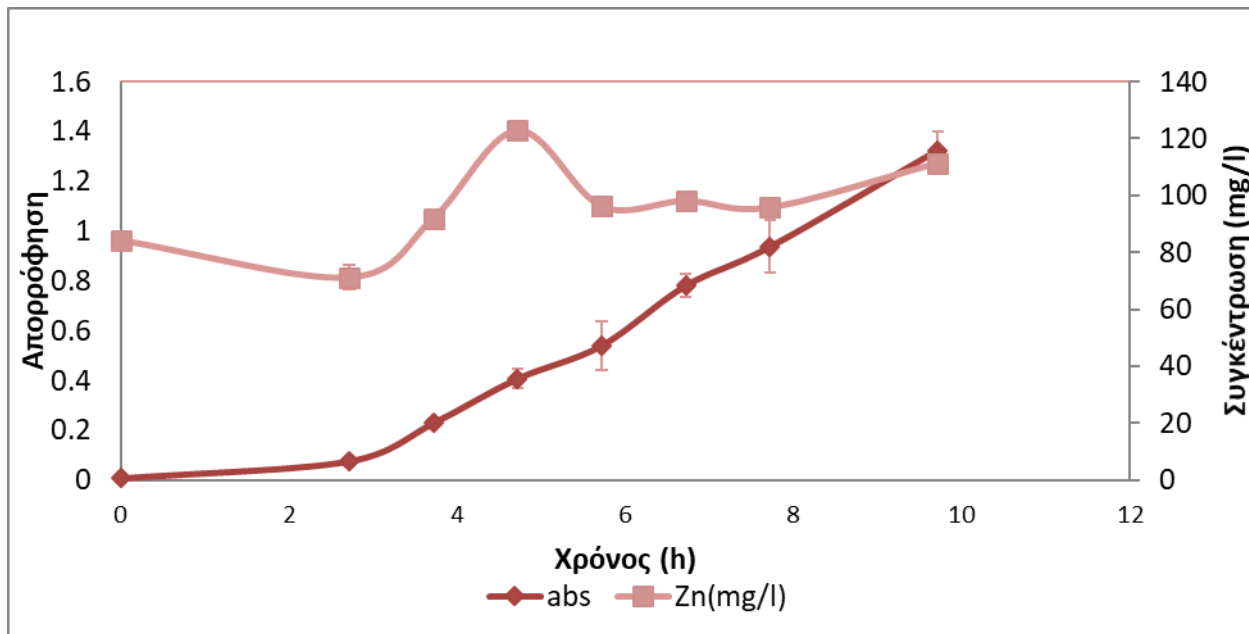
##### 3.2.1.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου



Διάγραμμα 3.5 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Με το διάγραμμα 3.5 δίνεται η δυνατότητα μελέτης της συνεισφοράς των βακτηρίων της ριζόσφαιρας, κατά την ανάπτυξη τους παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου, στην απομάκρυνση του εν λόγω μετάλλου όταν αυτό βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση ίση με 80mg/l. Σε χρόνο μηδέν δεν εντοπίζεται η μέγιστη και ταυτόχρονα επιθυμητή συγκέντρωση προς απομάκρυνση. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Σε διάρκεια 10 περίπου ωρών η συγκέντρωση έχει μειωθεί στην τιμή των 52,8 mg/l με ποσοστό απομάκρυνσης ψευδαργύρου 37,6%.

### 3.2.1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου

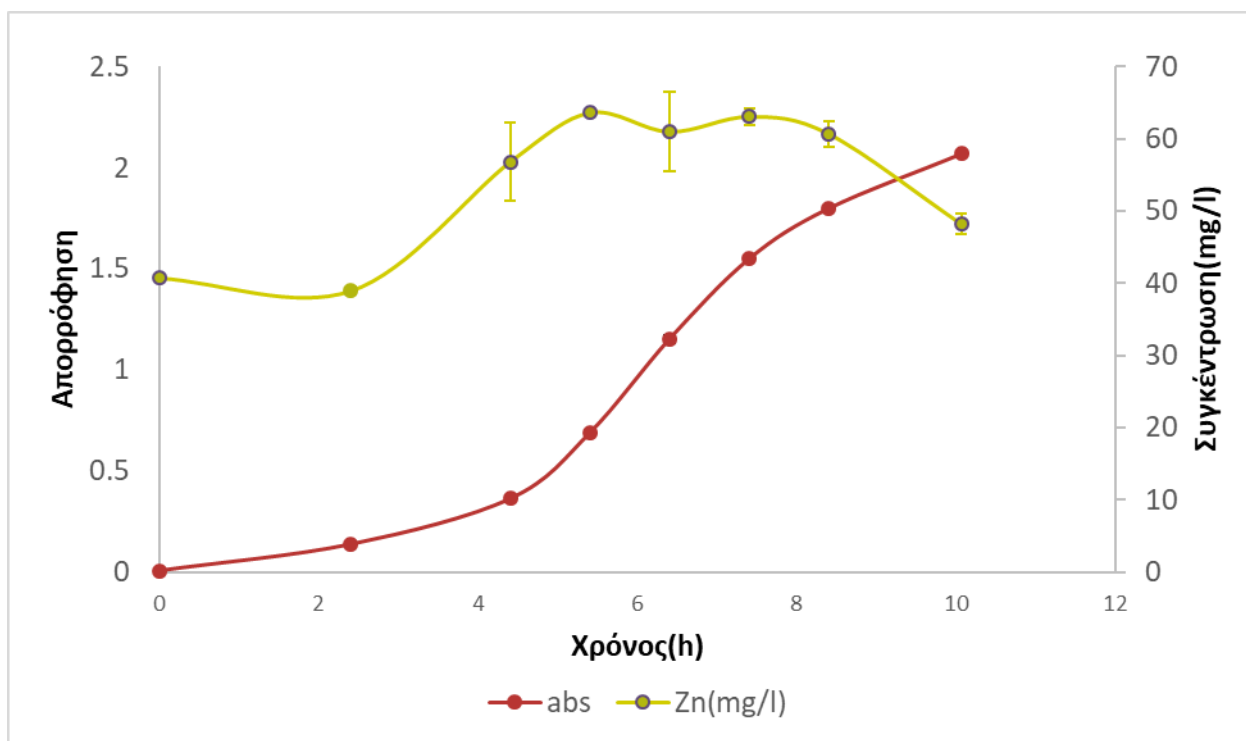


Διάγραμμα 3.6 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.6 απεικονίζονται η ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου και η αντίστοιχη απομάκρυνση του μετάλλου συναρτήσει του χρόνου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση μετάλλου ίση με 140 mg/l . Σε χρόνο μηδέν δεν εντοπίζεται η μέγιστη και ταυτόχρονα επιθυμητή συγκέντρωση προς απομάκρυνση. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Μετά το πέρασμα 10 περίπου ωρών, η συγκέντρωση έχει μειωθεί στην τιμή των 111,38 mg/l με ποσοστό απομάκρυνσης ψευδαργύρου 9,3%.

### 3.2.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων

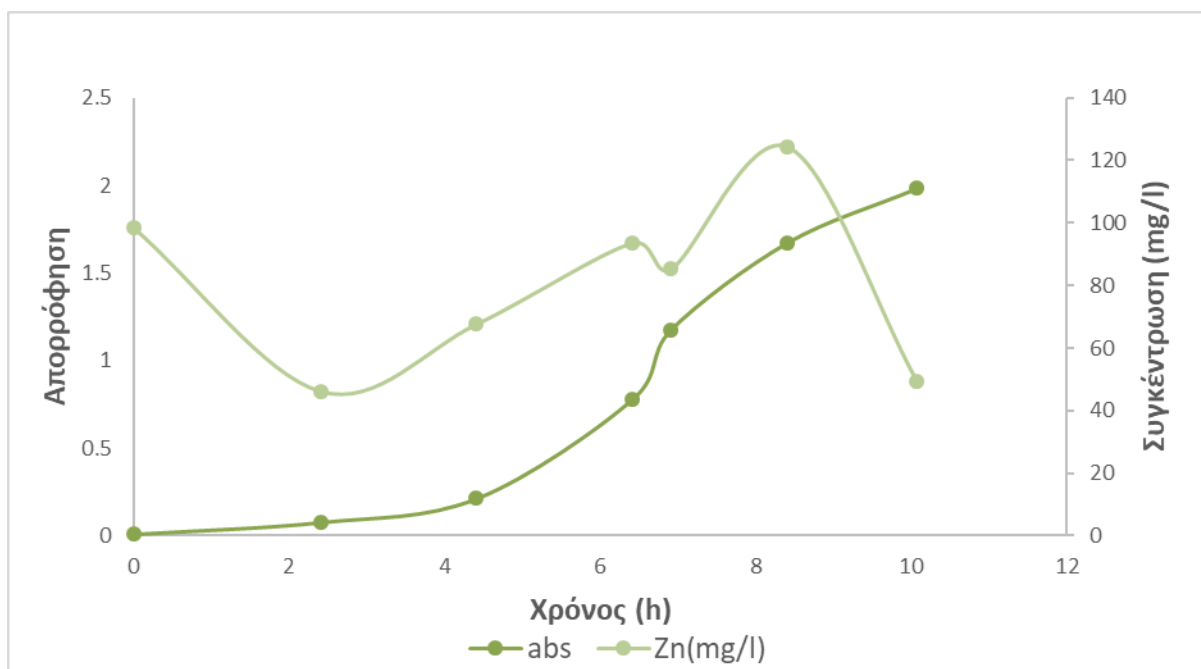
#### 3.2.2.1 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου



Διάγραμμα 3.7 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου και αντίστοιχης απομάκρυνσης του

Στο διάγραμμα 3.7 απεικονίζονται η ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου και η αντίστοιχη απομάκρυνση του μετάλλου συναρτήσει του χρόνου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση μετάλλου ίση με 80 mg/l . Σε χρόνο μηδέν δεν εντοπίζεται η μέγιστη και ταυτόχρονα επιθυμητή συγκέντρωση προς απομάκρυνση. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Σε διάρκεια 10 περίπου ωρών η συγκέντρωση έχει μειωθεί στην τιμή των 48,24 mg/l με ποσοστό απομάκρυνσης 24,1%.

### 3.2.2.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου



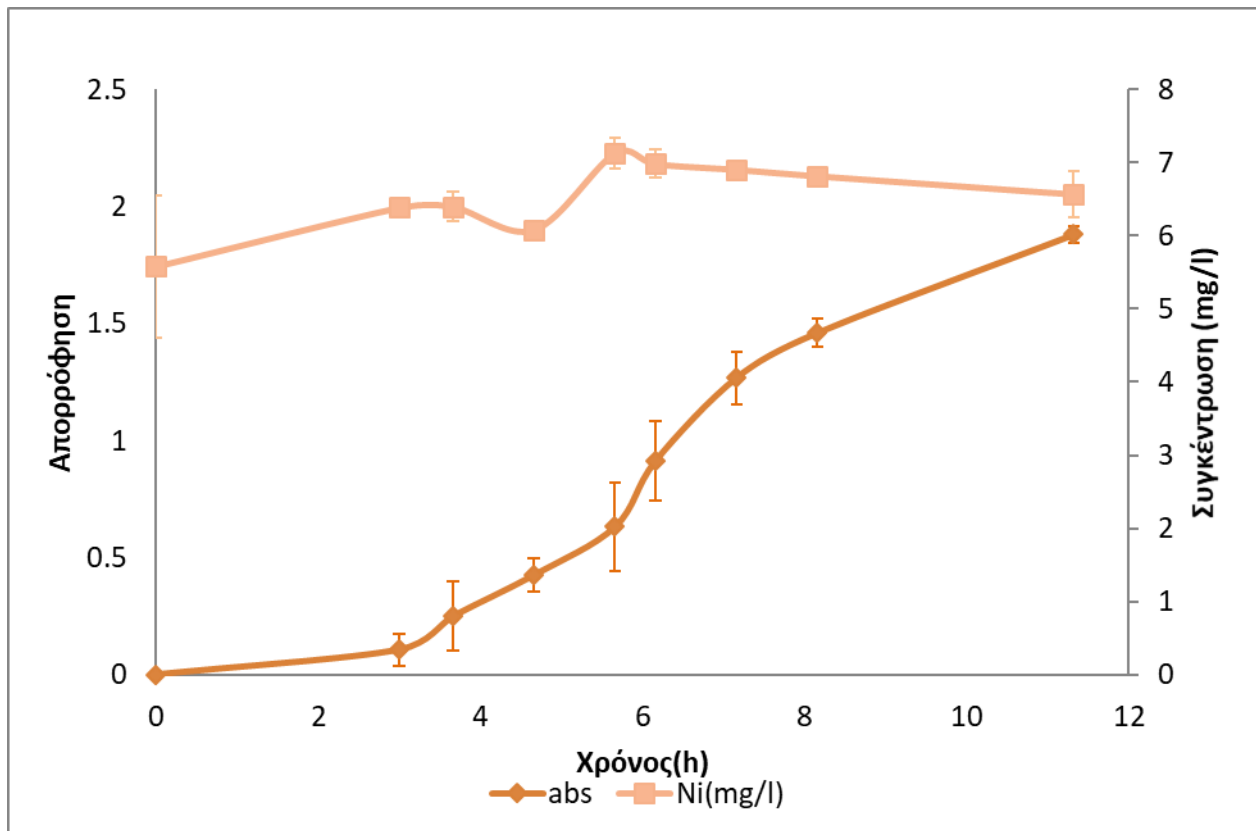
Διάγραμμα 3.8 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου και αντίστοιχης απομάκρυνσής του

Στο διάγραμμα 3.8 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του ψευδαργύρου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 140 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Σε διάστημα 10 περίπου ωρών η συγκέντρωση έχει μειωθεί στην τιμή των 85,32 mg/l με ποσοστό απομάκρυνσης 31,3%.

### 3.3 Α 'Κύκλος- Ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρουσία νικελίου και την αντίστοιχη απομάκρυνση του

#### 3.3.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας

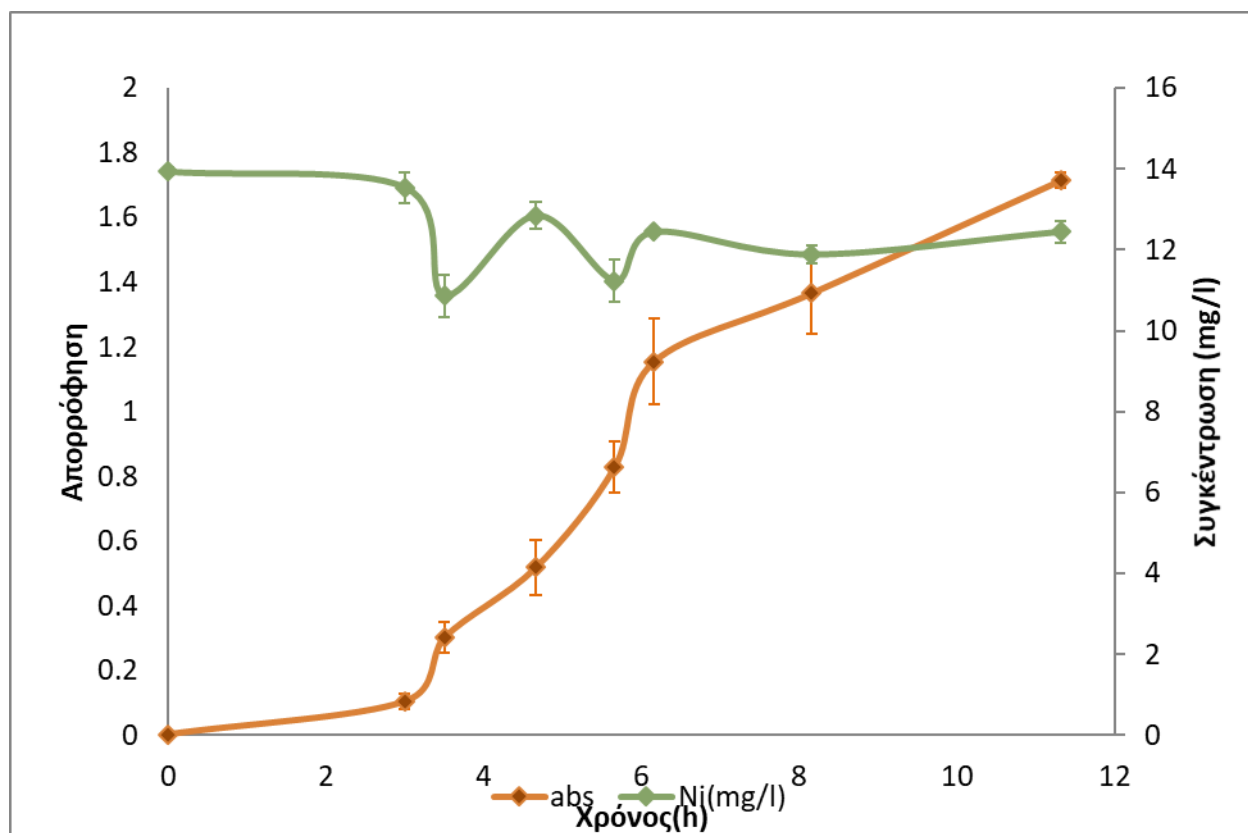
##### 3.3.1.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου



Διάγραμμα 3.9 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.9 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του νικελίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 8 mg/l η οποία φαίνεται να μειώνεται βαθμιαία κατά 7,84% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 11 ωρών συγκέντρωση νικελίου ίση με 6,57 mg/l.

### 3.3.1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου



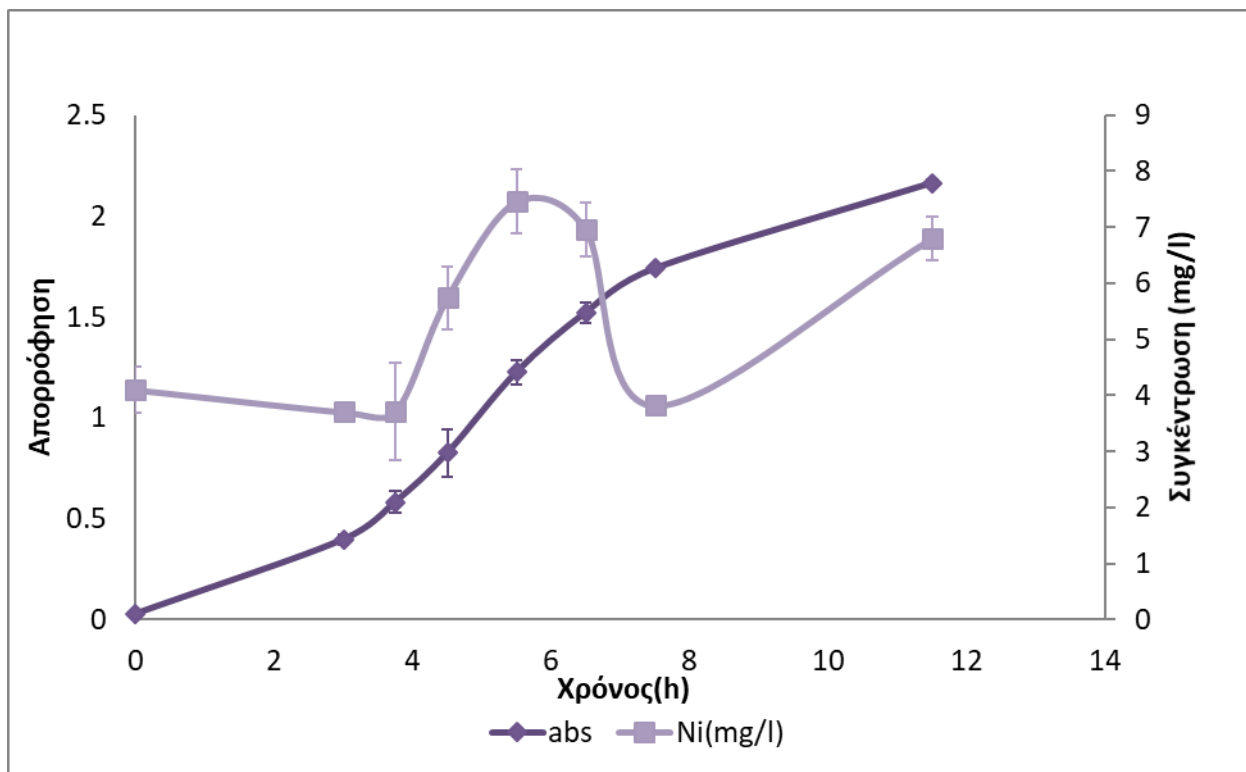
Διάγραμμα 3.10 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.10 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του νικελίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 20 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Σε χρόνο μηδέν παρουσιάζει την μέγιστη συγκέντρωση νικελίου που είναι 13,93mg/l, η οποία φαίνεται να μειώνεται βαθμιαία κατά 10,7% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 11 ωρών συγκέντρωση νικελίου ίση με 12,44 mg/l.



### 3.3.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων

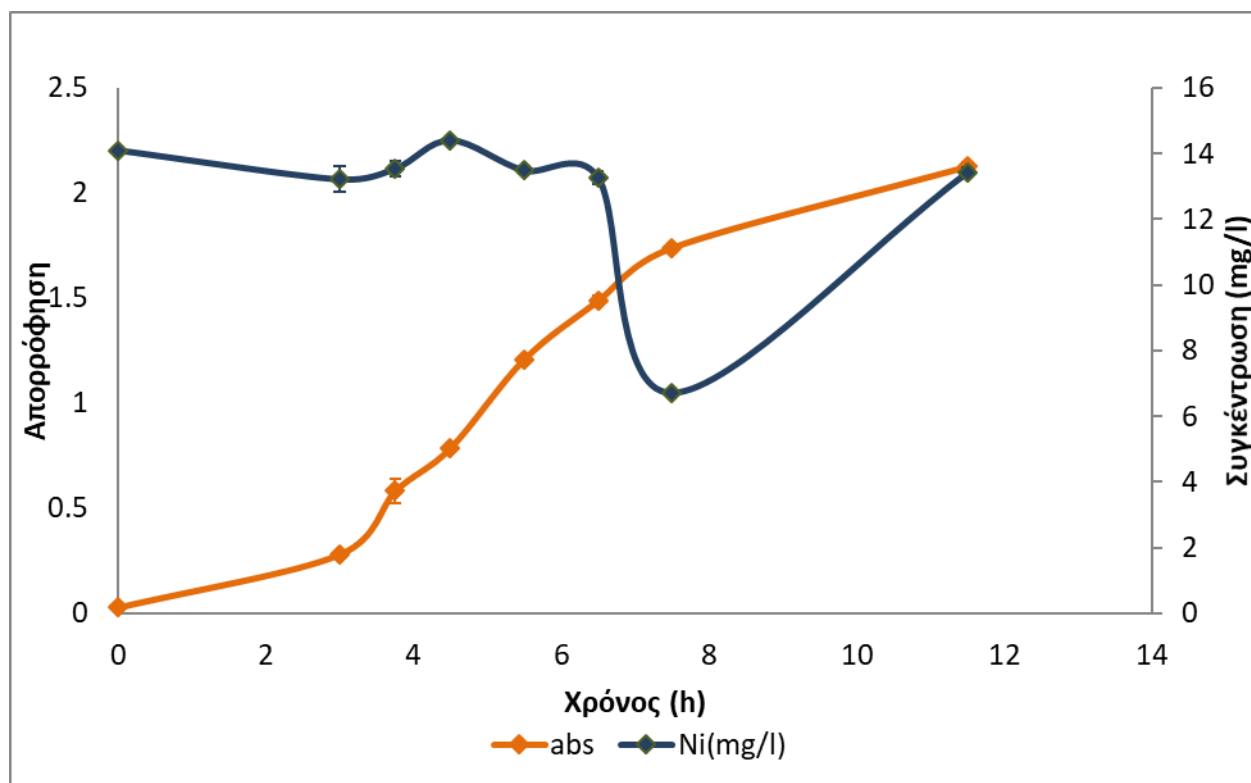
#### 3.3.2.1 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου



Διάγραμμα 3.11 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.11 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του νικελίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 8 mg/l. Η συγκέντρωση μειώνεται βαθμιαία κατά 8,85% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα 11,5 ωρών συγκέντρωση νικελίου ίση με 6,8 mg/l.

### 3.3.2.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου



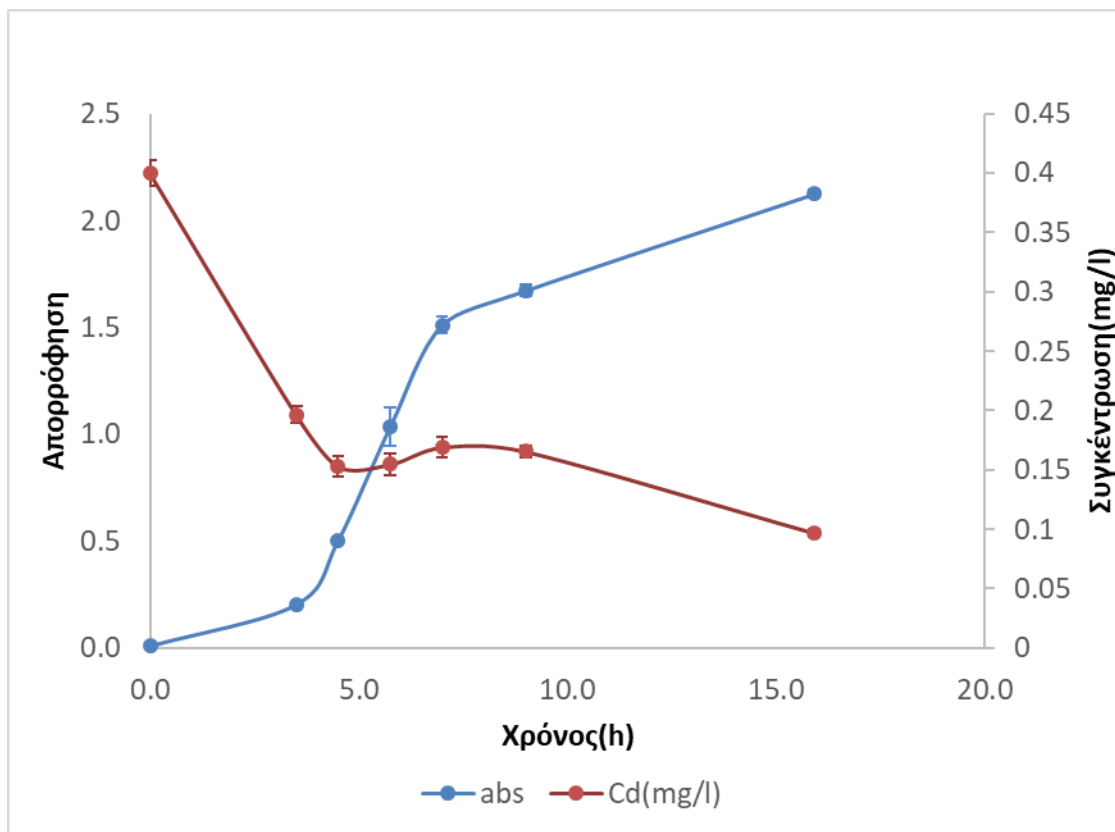
Διάγραμμα 3.12 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου και αντίστοιχη απομάκρυνση του

Στο διάγραμμα 3.12 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του νικελίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 20 mg/l. Σε χρόνο μηδέν δεν εντοπίζεται η μέγιστη και ταυτόχρονα επιθυμητή συγκέντρωση προς απομάκρυνση. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης. Μετά το πέρασμα 11,5 περίπου ωρών, η συγκέντρωση έχει μειωθεί στην τιμή των 13,42 mg/l με ποσοστό απομάκρυνσης 6,9%.

### 3.4 Α 'Κύκλος- Ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρουσία των τριών μετάλλων και την αντίστοιχη απομάκρυνση του

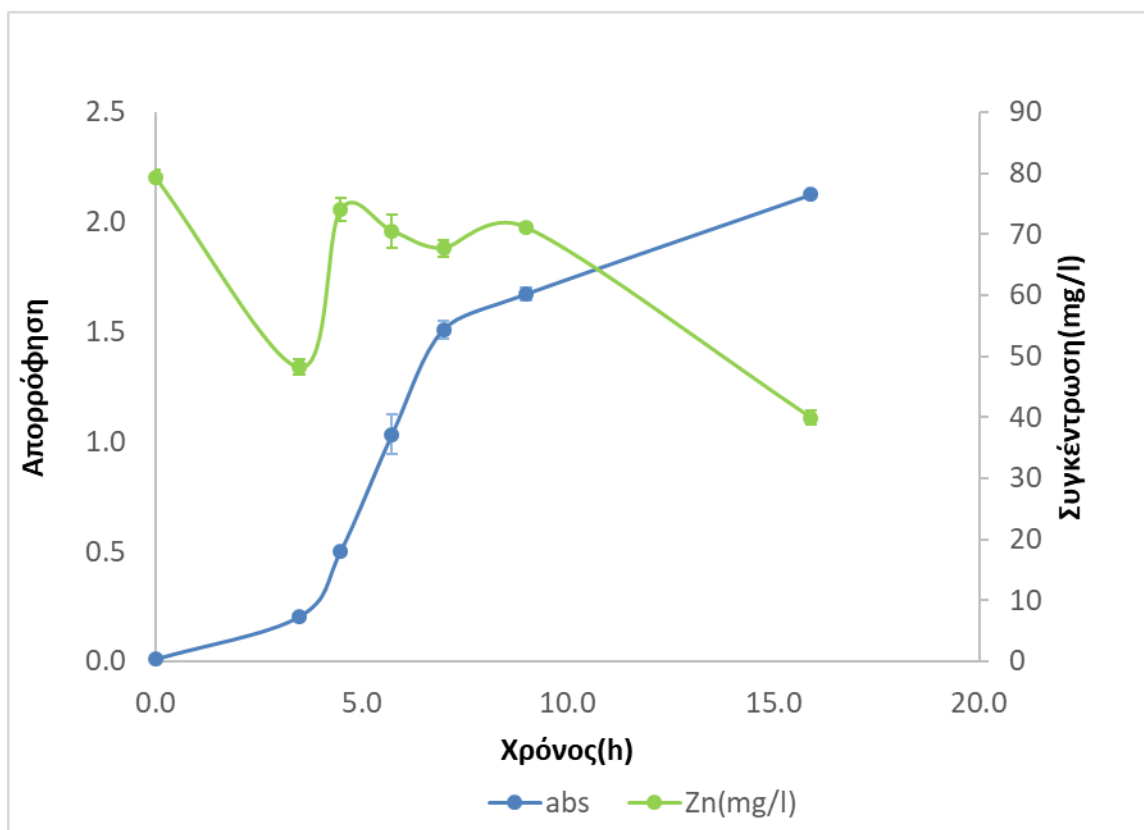
#### 3.4.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας

##### 3.4.1.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων



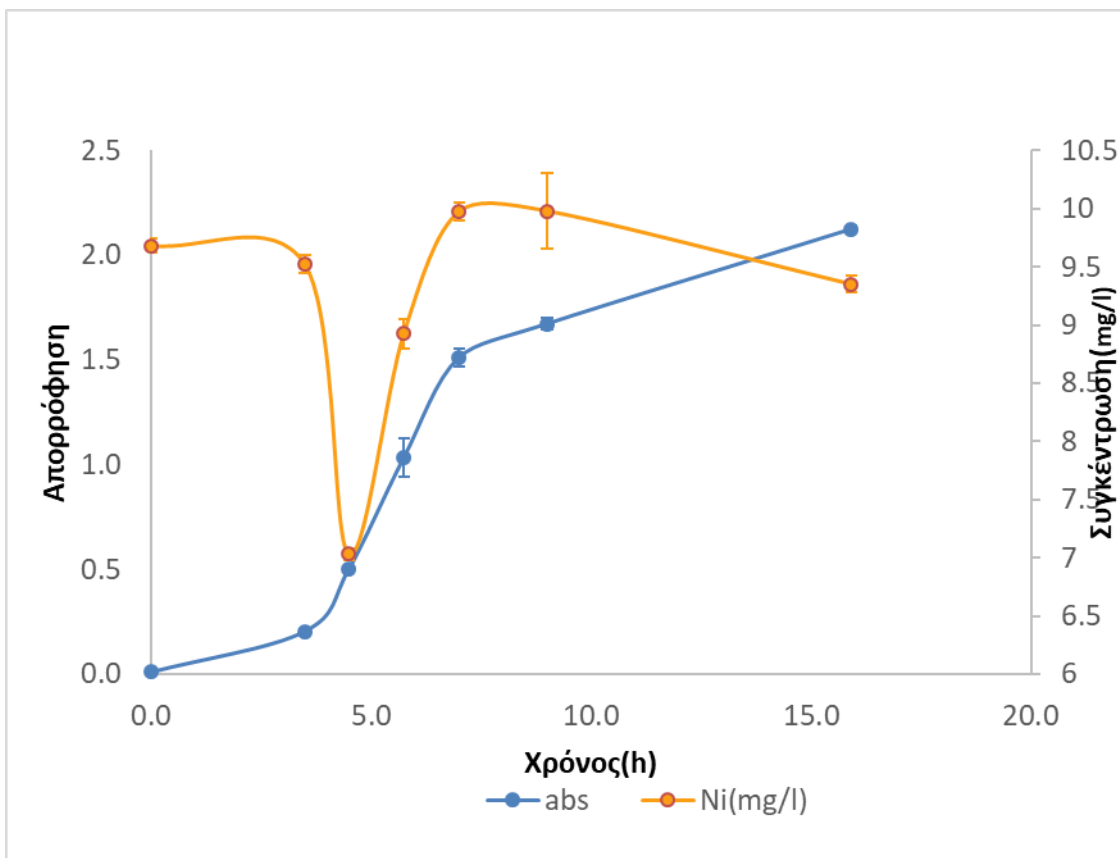
Διάγραμμα 3.13 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του καδμίου

Στο διάγραμμα 3.13 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του καδμίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,4 mg/l. Η οποία σε διάρκεια περίπου 16 ωρών αγγίζει περίπου την τιμή 0,10 mg/l με ποσοστό απομάκρυνσης 75,8%



Διάγραμμα 3.14 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του ψευδαργύρου

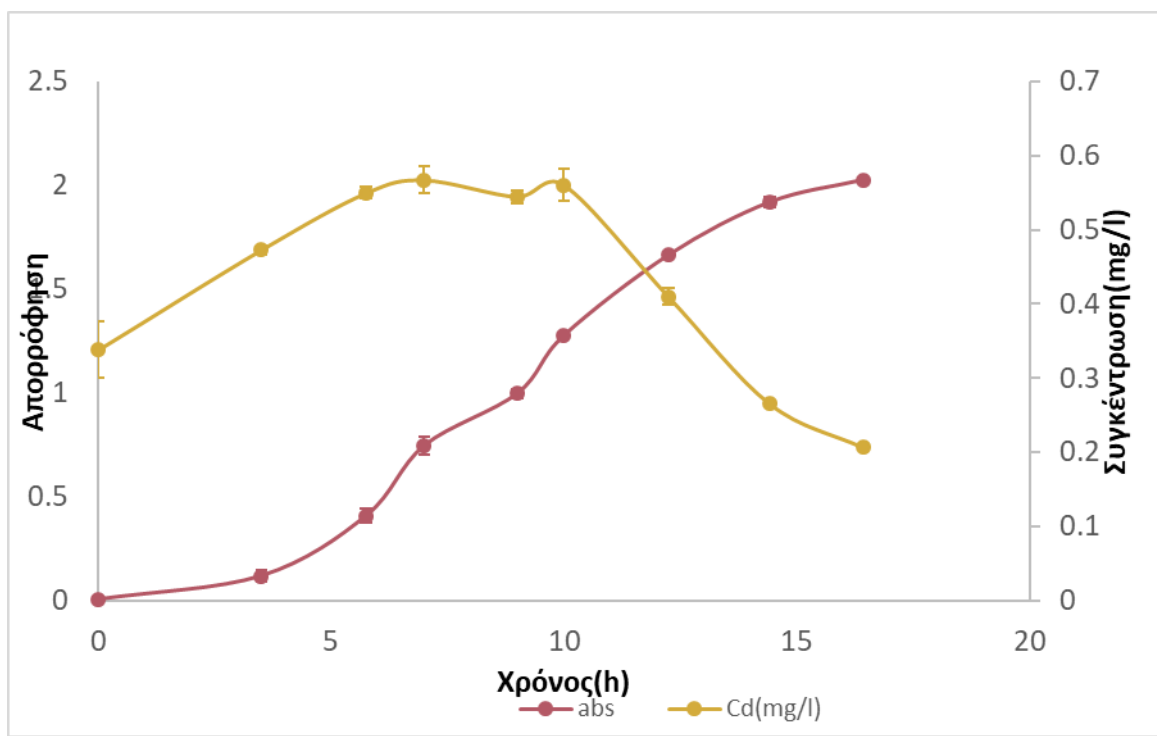
Στο διάγραμμα 3.14 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του ψευδαργύρου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 80 mg/l, η οποία φαίνεται να μειώνεται βαθμιαία κατά 49,6% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 16 ωρών συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 39,9 mg/l.



Διάγραμμα 3.15 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του νικελίου

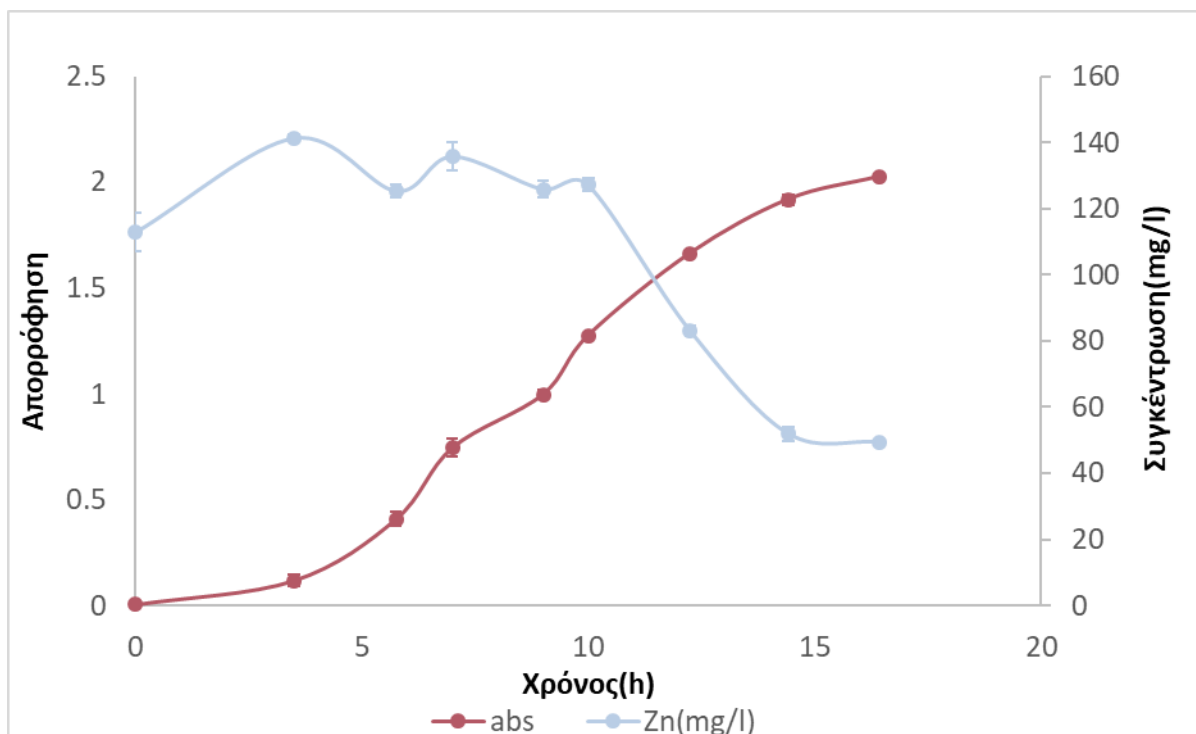
Στο διάγραμμα 3.15 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του νικελίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 8 mg/l, η οποία φαίνεται σε διάστημα περίπου 16 ωρών να μειώνεται κατά 6,3% μέχρι να καταλήξει σε τιμή ίση με 9,35 mg/l.

### 3.4.1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων



Διάγραμμα 3.16 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του καδμίου

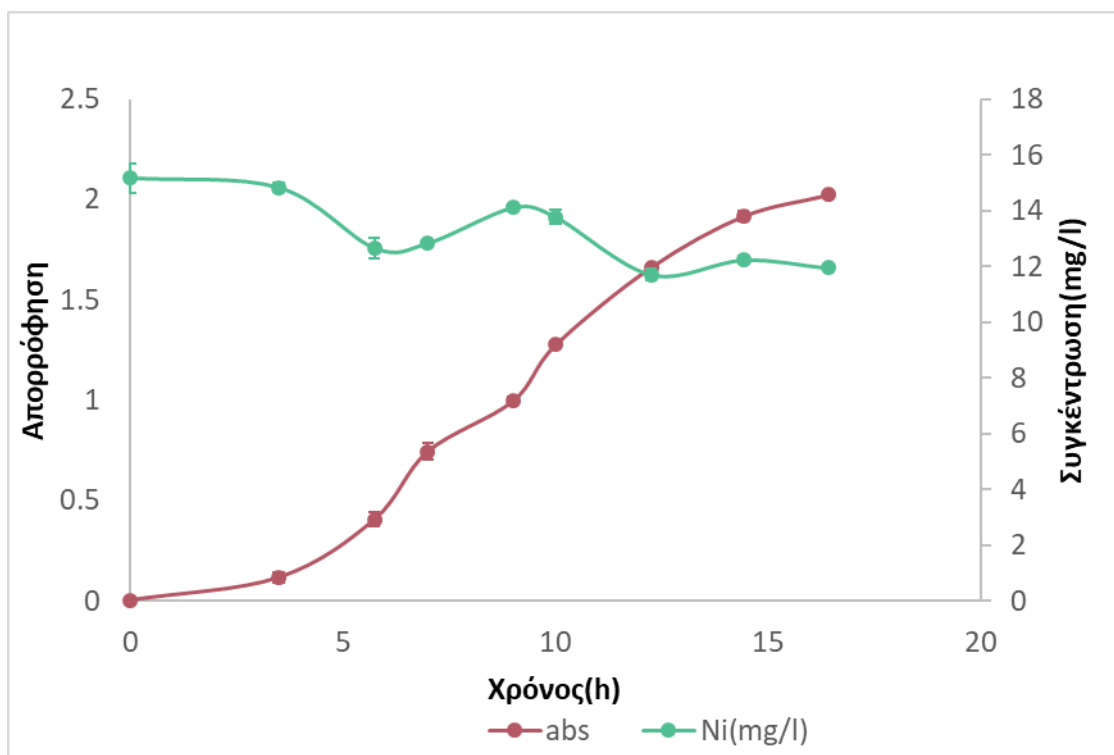
Στο διάγραμμα 3.16 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του καδμίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,8 mg/l, η οποία φαίνεται να μειώνεται κατά 63,6% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 16,5 ωρών συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,21 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης.



Διάγραμμα 3.17 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του ψευδαργύρου

Στο διάγραμμα 3.17 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του ψευδαργύρου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 140 mg/l, η οποία φαίνεται να μειώνεται κατά 65,1% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 16,5 ωρών συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 49,39 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης.



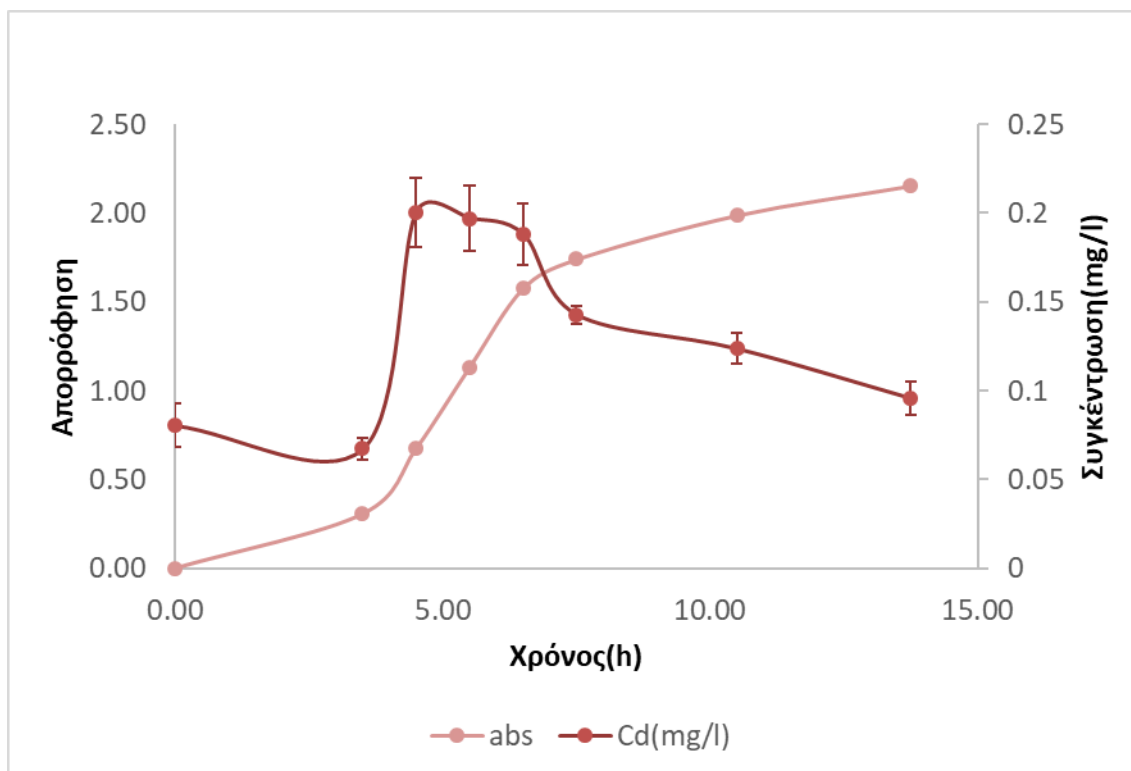


Διάγραμμα 3.18 Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του νικελίου

Στο διάγραμμα 3.18 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του νικελίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 20 mg/l, η οποία σε διάστημα περίπου 16,5 ωρών να μειώνεται κατά 21,2% μέχρι να καταλήξει σε τιμή ίση με 11,94 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης.

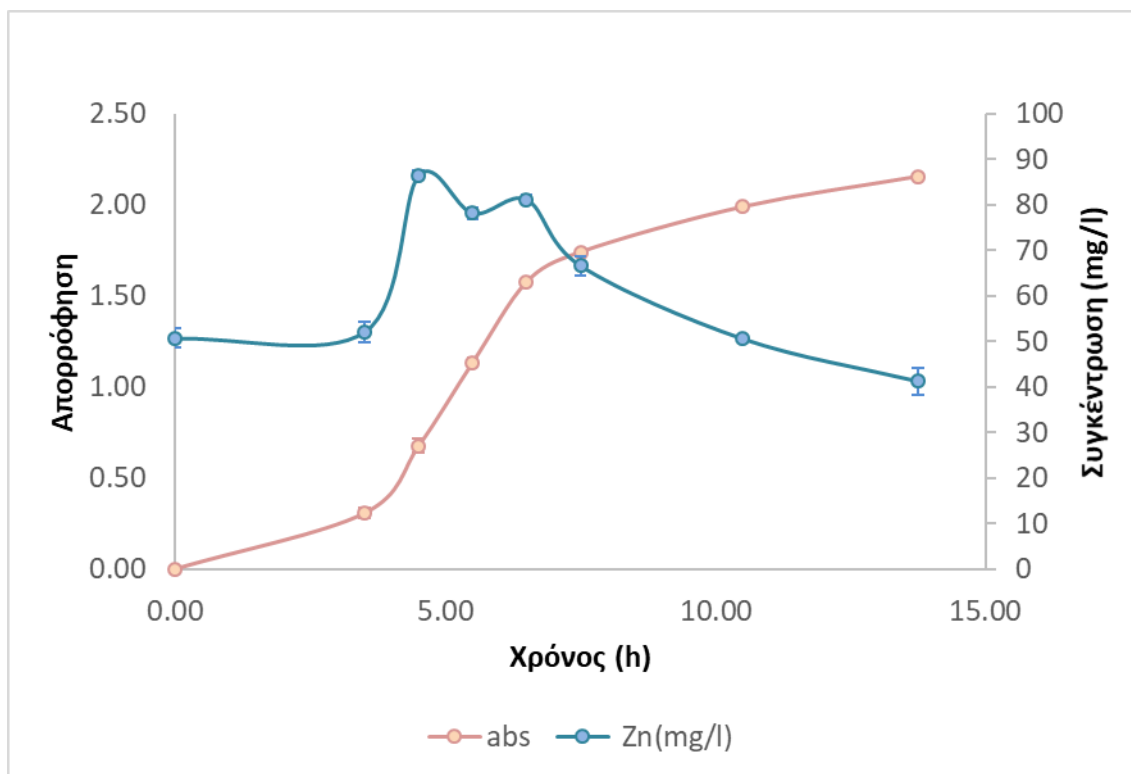
### 3.4.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων

#### 3.4.2.1 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων



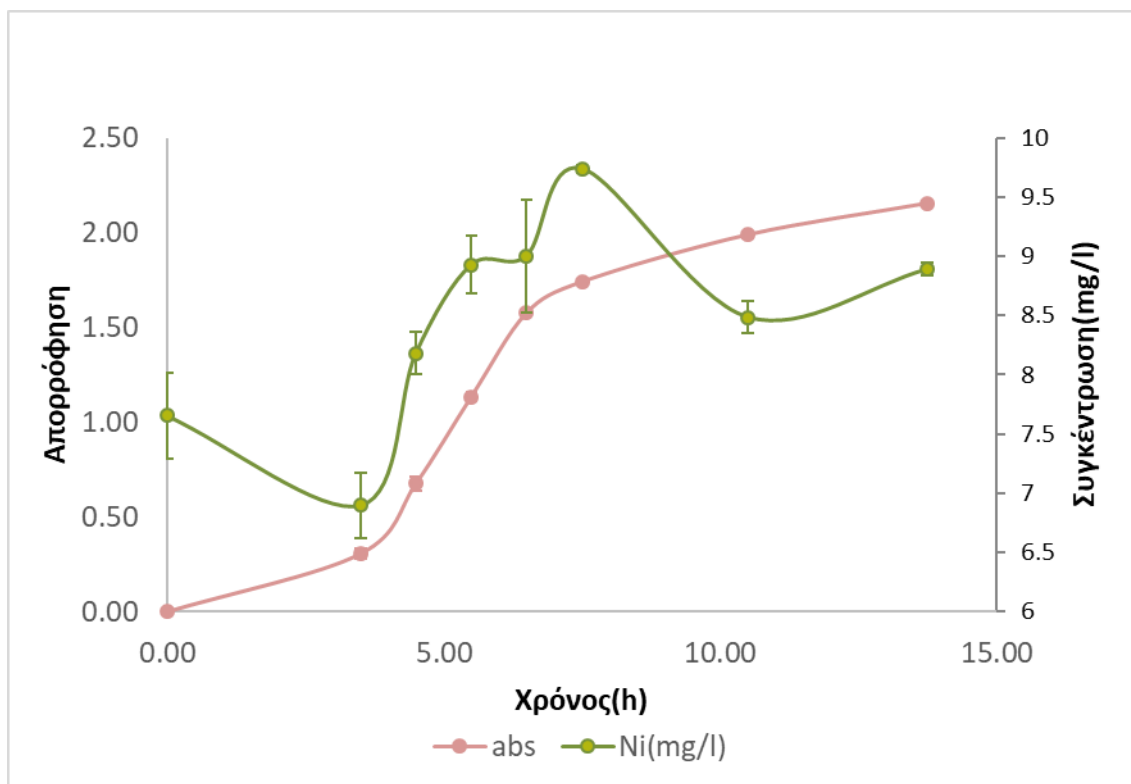
Διάγραμμα 3.19 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του καδμίου

Στο διάγραμμα 3.19 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του καδμίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,4 mg/l, η οποία φαίνεται να μειώνεται κατά 51,3% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 14 ωρών συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,096 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης.



Διάγραμμα 3.20 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του ψευδαργύρου

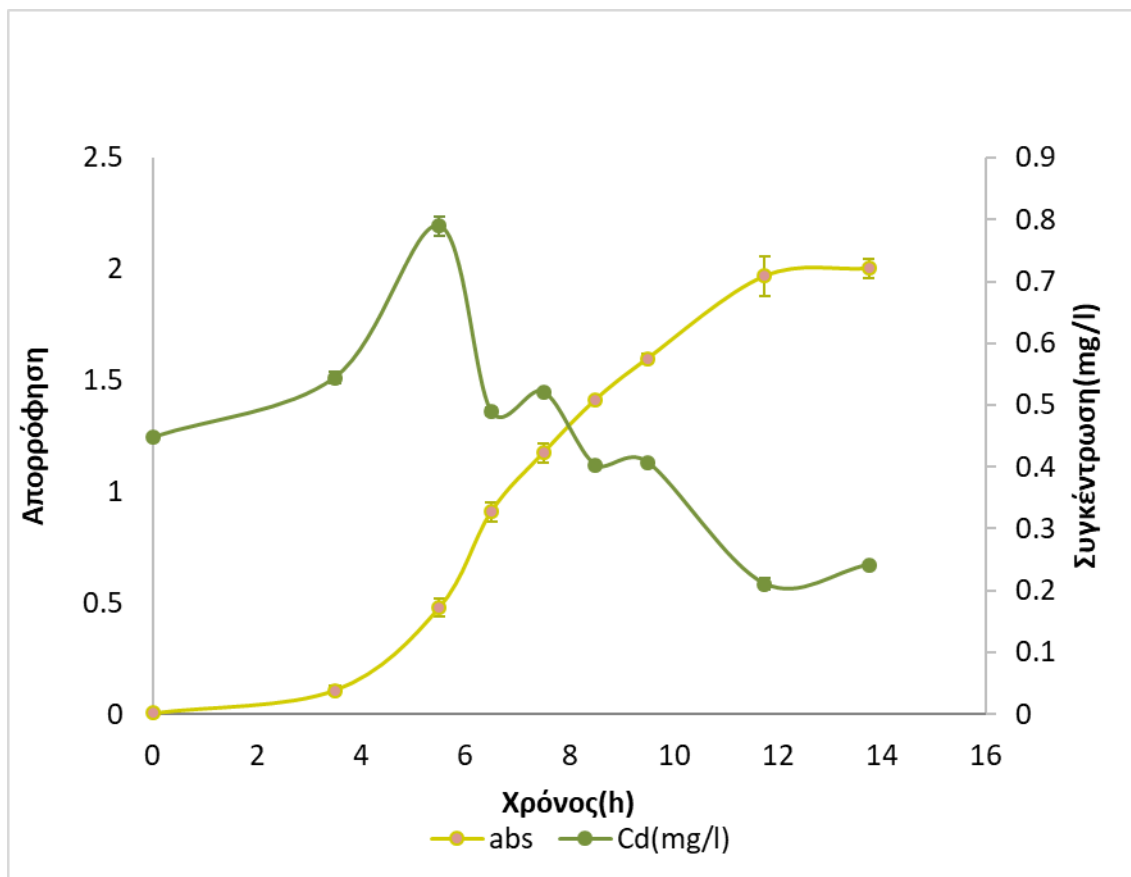
Στο διάγραμμα 3.20 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του ψευδαργύρου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 80 mg/l, η οποία φαίνεται να μειώνεται βαθμιαία κατά 52,3% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 14 ωρών συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 41,30 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης.



Διάγραμμα 3.21 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του νικελίου

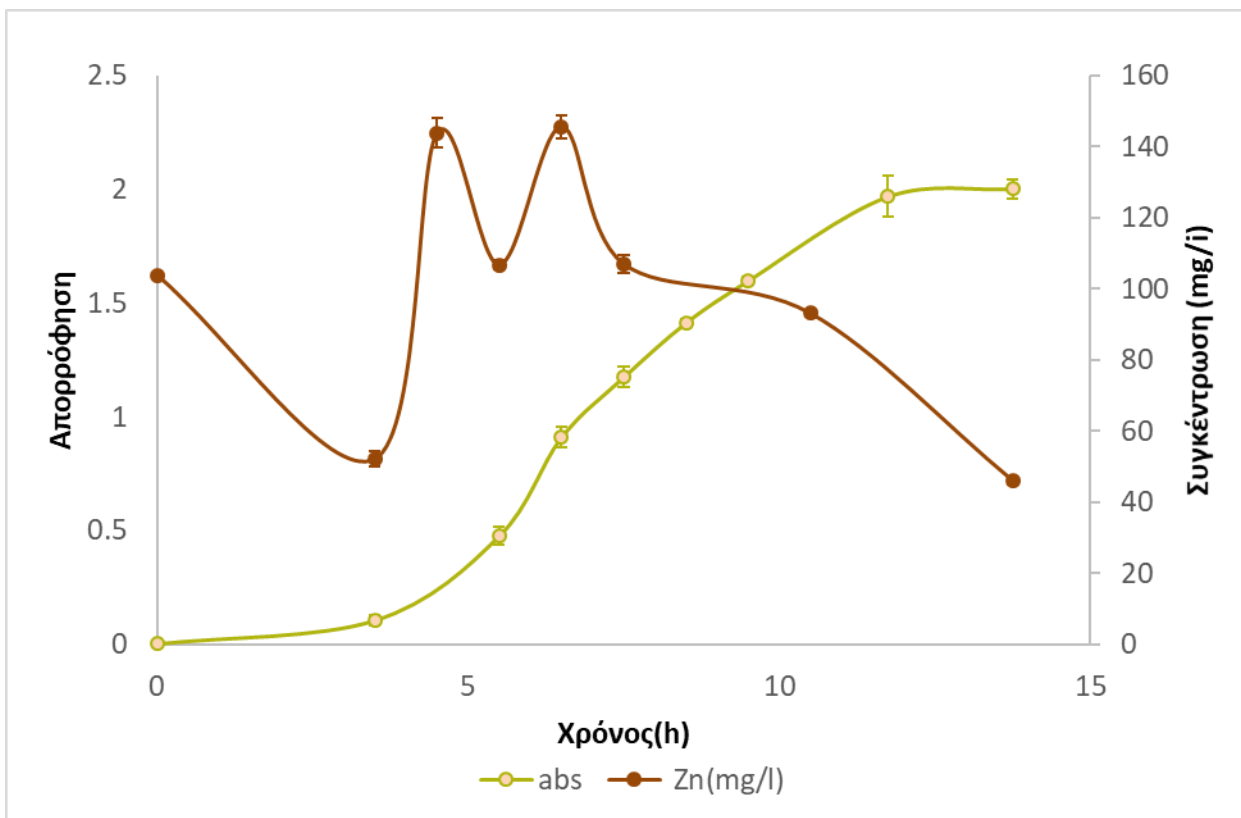
Στο διάγραμμα 3.21 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του νικελίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 8 mg/l. Εμφανίζεται σε διάρκεια 4,5 ωρών και κατά την εξέλιξη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών δεν παρατηρείται καθόλου απομάκρυνση του νικελίου.

### 3.4.2.2 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων



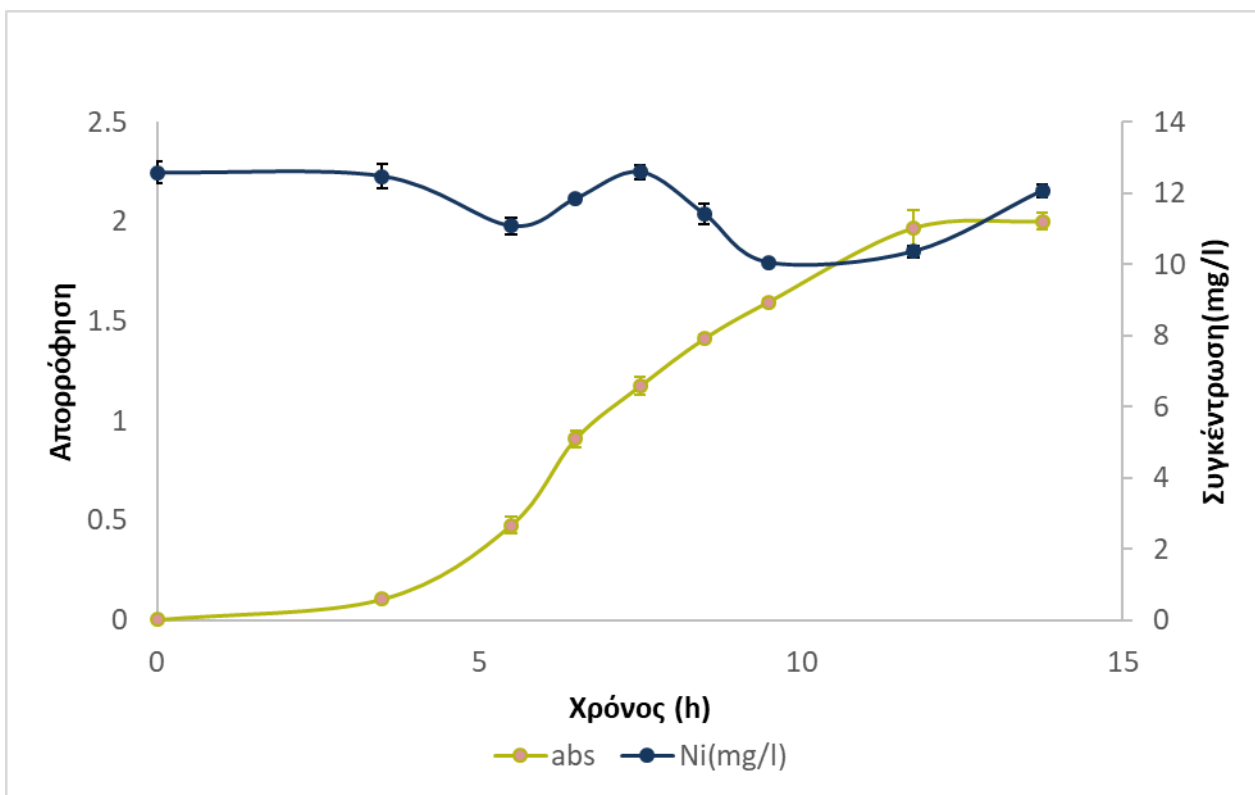
Διάγραμμα 3.22 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του καδμίου

Στο διάγραμμα 3.22 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του καδμίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,8 mg/l, η οποία φαίνεται να μειώνεται κατά 69,4% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 14 ωρών συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,24 mg/l. Παρατηρήθηκε γενικότερα το φαινόμενο, η συγκέντρωση στις πρώτες μετρήσεις να είναι πιο χαμηλή από την επιθυμητή εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης.



Διάγραμμα 3.23 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του ψευδαργύρου

Στο διάγραμμα 3.23 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του ψευδαργύρου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 140 mg/l, η οποία φαίνεται να μειώνεται κατά 59,1% μέχρι να εντοπιστεί τελικά σε διάστημα περίπου 14 ωρών συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 59,45 mg/l.



Διάγραμμα 3.24 Ανάπτυξη ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης των τριών μετάλλων και αντίστοιχη απομάκρυνση του νικελίου

Στο διάγραμμα 3.24 απεικονίζεται η εκθετική ανάπτυξη των ενδοφυτικών βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων σε πλούσιο θρεπτικό υλικό και η αντίστοιχη σταδιακή απομάκρυνση του νικελίου. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 20 mg/l. Παρατηρώντας την εξέλιξη της απομάκρυνσης του νικελίου συμπεραίνουμε ότι η συγκέντρωση του δεν μειώνεται καθόλου όπως και στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης.



### 3.5 Β' Κύκλος - Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης καδμίου 0,02mg/l

Κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης καδμίου 0,02mg/l παρατηρείται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων σε διάστημα 99 ωρών. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,02mg/l, όπως συναντάται και στον υδροβιότοπο από τον οποίο απομονώθηκαν τα βούρλα και κατ' επέκταση τα υπό εξέταση βακτήρια, η οποία σε διάστημα περίπου 83 ωρών δηλαδή τεσσάρων ημερών έχει φτάσει στην τιμή 0,018mg/l, ενώ την Πέμπτη μέρα, σε διάστημα 99 ωρών, στην τιμή 0,0045mg/l παρουσιάζοντας συνολικά 92,72% απομάκρυνση καδμίου.

### 3.6 Β' Κύκλος - Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης ψευδαργύρου 4mg/l

Κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης ψευδαργύρου ίση με 4mg/l παρατηρείται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων σε διάστημα 87 ωρών. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με 4mg/l, όπως συναντάται και στον υδροβιότοπο από τον οποίο απομονώθηκαν τα βούρλα και κατ' επέκταση τα υπό εξέταση βακτήρια, η οποία σε διάστημα περίπου 44 ωρών άγγιξε την τιμή των 1,4 mg/l, σε διάστημα 63 ωρών την τιμή 0,73mg/l και σε διάστημα 87 ωρών την τιμή 0,68mg/l παρουσιάζοντας συνολικά 73,8% απομάκρυνση ψευδαργύρου.

### 3.7 Β' Κύκλος - Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης νικελίου 0,4mg/l

Κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και συγκέντρωσης νικελίου ίση με 0,4mg/l παρατηρείται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων σε διάστημα περίπου 99 ωρών. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση νικελίου ίση με 0,4mg/l, όπως συναντάται και στον υδροβιότοπο από τον οποίο απομονώθηκαν τα βούρλα και κατ' επέκταση τα υπό εξέταση βακτήρια, η οποία σε διάστημα περίπου 83 ωρών, δηλαδή τεσσάρων ημερών άγγιξε την τιμή των 0,35 mg/l, ενώ την πέμπτη μέρα, σε διάστημα 99 ωρών, στην τιμή 0,015mg/l παρουσιάζοντας συνολικά 94,4% απομάκρυνση νικελίου.

### 3.8 Β' Κύκλος - Ανάπτυξη βακτηρίων ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και παρουσία τριών μετάλλων στις συνθήκες του υδροβιότοπου

Κατά την ανάπτυξη των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, ριζικών εκκρίσεων και παρουσία των τριών μετάλλων στις συνθήκες του υδροβιότοπου που αναφέρθηκαν παραπάνω, παρατηρείται η εκθετική ανάπτυξη των βακτηρίων σε διάστημα 87 ωρών. Επιδιώχθηκε αρχική συγκέντρωση καδμίου ίση με 0,02 mg/l, ψευδαργύρου ίση με 4mg/l, και νικελίου ίση με 0,4 mg/l. Οι προαναφερθείσες συγκεντρώσεις σε διάστημα περίπου 44 ωρών αγγίζουν τις τιμές των 0,012 mg/l, 2,05mg/l και 0,22mg/l και σε δεύτερη φάση, σε διάστημα 63 ωρών την τιμή 16,87mg/l, 1,21mg/l και 0,24mg/l αντίστοιχα. Τελικά σε διάστημα 87 ωρών οι τελικές τιμές των συγκεντρώσεων των μετάλλων είναι 0,017mg/l κάδμιο, 1,22mg/l ψευδάργυρος, 0,23mg/l νικέλιο και παρουσιάζουν αντίστοιχα 0,0% , 52,9% και 37,5% απομάκρυνση.

### 3.9 Ποσοστά απομάκρυνσης μετάλλων μετά το πέρας κάθε πειραματικής φάσης

Συνοπτικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τον Α' κύκλο στον παρακάτω συγκεντρωτικό Πίνακα 3.1 και αυτά που προέκυψαν κατά τον Β' κύκλο στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3. 1 Αποτελέσματα απομακρύνσεων μετάλλων- 'Α κύκλος

Βακτηριακή κοινότητα	Πλούσιο θρεπτικό							
	Χαμηλή συγκέντρωση				Υψηλή συγκέντρωση			
	Cd	Ni	Zn	Cd+Ni+Zn	Cd	Ni	Zn	Cd+Ni+Zn
Rhizo	100%	7,84 %	37,6 %	75,8% Cd 49,6% Zn 6,3% Ni	48.0 %	10, 7%	9,3%	63,6% Cd 65,1% Zn 21,2% Ni
Endo	97,4 %	8,85 %	24,1 %	51,3% Cd 52,3% Zn 0,0% Ni	64,9 %	6,9 %	31,3 %	69,4% Cd 59,1% Zn 0% Ni

Πίνακας 3. 2 Αποτελέσματα απομακρύνσεων μετάλλων- Β' κύκλος

Βακτηριακή κοινότητα	Απόβλητο με προσθήκη ριζικών εκκρίσεων			
	Cd	Ni	Zn	Cd+Ni+Zn
Rhizo	92,7%	94,4%	73,8%	37,5% Ni 52,9% Zn 0,0% Cd

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Συλλογή δειγμάτων και απομόνωση μικροοργανισμών

Η βεβαιότητα ότι στο δείγμα μας υπάρχει αρχικά ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο κάδμιο, τον ψευδάργυρο και το νικέλιο απορρέει από το γεγονός ότι τα δείγματα των ριζών λήφθηκαν από τεχνητό υδροβιότοπου που ήδη ρυπαίνονταν με τα εν λόγω βαρέα μέταλλα. Επομένως αναμένεται να συναντηθούν ανθεκτικές και προσαρμοσμένες κοινότητες βακτηρίων στις παραπάνω συνθήκες. Σε σχετική μελέτη βεβαιώνεται ότι η ριζοσφαιρική και ενδοφυτική κοινότητα που απομονώθηκε από τα φυτά αραβοσίτου που δεν αρδεύτηκαν με βιομηχανικά και αστικά λύματα (φυτά ελέγχου), σε αντίθεση με τα άλλα που αρδεύτηκαν ήταν ευαίσθητα σε βαρέα μέταλλα (Abedinzadeh *et al.*, 2019). Στην παρούσα καλλιέργεια οι συγκεντρώσεις των μετάλλων σε σχέση με εκείνες του υδροβιότοπου είναι εικοσαπλάσιες. Στη συνέχεια, κατά τις δοκιμές σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις των μετάλλων, οι μικροοργανισμοί εκτίθενται σε εικοσαπλάσιες και πενήνταπλάσιες συγκεντρώσεις από εκείνες του υδροβιότοπου.

Υποστηρίζεται ότι οι μικροοργανισμοί εξαιτίας της έκθεσης τους σε μέταλλα έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα και αντίσταση στα μέταλλα αυτά. Κάποιοι άλλοι μικροοργανισμοί από την άλλη, θεωρείται ότι κατά την πορεία της εξέλιξης τους αναπτύσσουν αντίσταση στα τοξικά μέταλλα, ως ανταπόκριση στην έκθεση των μετάλλων με την οποία έρχονται αντιμέτωποι τα τελευταία 50 χρόνια (Gomathy *et al.*, 2010).

Κατά την απομόνωση και καλλιέργεια των ενδοφυτικών βακτηρίων βασική μέριμνα ήταν να αποστειρωθεί αποτελεσματικά η εξωτερική επιφάνεια των ριζών, έτσι ώστε να απομονωθούν μόνο τα ενδοφυτικά βακτήρια. Η επιτυχημένη αποστείρωση της εξωτερικής επιφάνειας των ριζών επιβεβαιώνεται μιας και δεν παρατηρήθηκε καθόλου θολότητα στις φλάσκες όταν καλλιεργήθηκε σε πλούσιο θρεπτικό δείγμα από το τελευταίο νερό πλύσης των αποστειρωμένων ριζών, άρα προέκυψε μηδαμινή ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Η παρασκευή του δείγματος ελέγχου (control) που δεν πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός μικροοργανισμών αλλά αποτελούνταν μόνο από το ίδιο θρεπτικό υλικό, και τις ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές των καλλιεργειών, έγινε με σκοπό αργότερα να μπορεί να αποδοθεί όλη η απομάκρυνση του μετάλλου στην δράση των μικροοργανισμών και όχι στη δέσμευση των μετάλλων από το ίδιο το θρεπτικό. Να σημειωθεί ότι δεν παρατηρήθηκε θολότητα στα δείγματα ελέγχου κατά το χρονικό διάστημα της ανάδευσης τους και αυτό σημαίνει ότι το θρεπτικό υλικό είχε αποστειρωθεί σωστά. Συνεπώς οι μόνοι μικροοργανισμοί που αναπτύχθηκαν στις φλάσκες που διεξαγόntonταν τα πειράματα ήταν τα βακτήρια της ριζόσφαιρας και τα ενδοφυτικά αντίστοιχα.

Παρατηρώντας τις τιμές των αποτελεσμάτων για τις συγκεντρώσεις των μετάλλων στα δείγματα ελέγχου, σε πολλές περιπτώσεις φαίνεται σαν να υπάρχει αύξηση των συγκεντρώσεων των μετάλλων. Στην πραγματικότητα όμως αυτό δεν είναι δυνατόν να συμβαίνει, αφού τα μέταλλα είναι αδύνατο να πολλαπλασιαστούν. Μέσα από αυτό το

φαινόμενο διαπιστώνεται ότι πιθανόν στην αρχή, οι αρχικές τιμές είναι μικρότερες γιατί απαιτούνταν κάποιες ώρες ανάδευση μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή. Οι αρχικές συγκεντρώσεις που προέκυψαν πιθανότατα ήταν πιο υψηλές από αυτές που μετρήθηκαν. Εξαιτίας της μη καλής ομογενοποίησης του διαλύματος χάθηκαν οι αρχικές αυτές τιμές και εντωμεταξύ είχε ήδη αρχίσει η απομάκρυνση των μετάλλων και για αυτό ούτε στη συνέχεια εντοπίζονται οι πραγματικές αρχικές συγκεντρώσεις.

#### 4.2 Αποτελέσματα ανθεκτικότητας βακτηρίων

Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται η ανθεκτικότητα που εμφανίζουν τα βακτήρια της ριζόσφαιρας και τα ενδοφυτικά βακτήρια που απομονώθηκαν από το ελόφυτο *J. Acutus* στα βαρέα μέταλλα. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν στις καλλιέργειες παρουσία ακόμη και υψηλών συγκεντρώσεων των μετάλλων. Σε σχετική μελέτη έχει βρεθεί ότι το συγκεκριμένο φυτό φιλοξενεί κάποια στελέχη βακτηρίων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου, νικελίου, μόλυβδου και καδμίου (Zn, Ni, Pb, Cd) καθώς και ιδιότητες που προωθούν την ανάπτυξη του φυτού (PGP). Βρέθηκε επίσης ότι ένα ποσοστό της τάξεως του 39% των ενδοφυτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν εμφανίζει ανθεκτικότητα στο κάδμιο, το νικέλιο και τον ψευδάργυρο ενώ ανθεκτικότητα και στα 4 μέταλλα εμφανίζει ένα ποσοστό 18% (Syranidou *et al.*, 2017).

#### 4.3 Αποτελέσματα απομακρύνσεων στον Α' κύκλο

Συγκρίνοντας τα ποσοστά απομάκρυνσης και στα τρία μέταλλα, παρατηρείται ότι το κάδμιο εμφανίζει γενικότερα μεγαλύτερη απομάκρυνση σε σχέση με το νικέλιο ή τον ψευδάργυρο. Σε σχετική έρευνα που μελετά τη συσσώρευση και στις ρίζες αλλά και στα φύλλα έχει βρεθεί ότι το ελόφυτο *Juncus acutus* συσσωρεύσε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Zn στους ιστούς του σε σύγκριση με το Ni και το Cd. Όσον αφορά το νικέλιο, τα ευεργετικά αποτελέσματα του εμβολιασμού στην ικανότητα φυτοεκχύλισης του *J. acutus* ήταν λιγότερο έντονα (Syranidou *et al.*, 2018). Αντίστοιχα, στην παρούσα έρευνα το νικέλιο εμφανίζει κατά κανόνα ελάχιστη έως καθόλου απομάκρυνση. Οι ικανοποιητικές απομακρύνσεις του Zn που παρατηρούνται μπορούν να αποδοθούν στην υψηλή ανθεκτικότητα που έχει προταθεί ως χαρακτηριστικό του *J. acutus* στον ψευδάργυρο ή και στο γεγονός ότι μπορεί να είναι ένας πιθανός υπερσυσσωρευτής του (Mateos-Naranjo *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014). Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση που αναστέλλει πλήρως την ορατή ανάπτυξη μικροοργανισμών (Andrews 2001). Σε άλλη μελέτη παρατηρείται, οι τιμές των MIC του αρσενικού, του κοβαλτίου, του υδραργύρου και του νικελίου, να είναι χαμηλότερες από τιμές MIC για το κάδμιο και τον ψευδάργυρο, αποδεικνύοντας την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών τόσο στο κάδμιο όσο και στον ψευδάργυρο (Limcharoensuk *et al.*, 2015). Η κοινή πορεία που ακολουθούν το κάδμιο και ο ψευδάργυρος επιβεβαιώνονται από το γεγονός ότι έχουν παρόμοια ηλεκτρονική δομή και χημική ομοιότητα (Blencowe and Morby 2003). Επίσης γνωρίζουμε ότι στην *E.coli* διευκολύνεται η ενδοκυτταρική συσσώρευση αρκετών ιόντων δισθενούς μετάλλου με προτίμηση του υποστρώματος περισσότερο σε Mn (II) > Cd (II) > Co (II) > Fe (II) > Zn (II) και λιγότερο σε Ni(II) > Cu (II) (Makui *et al.*, 2000).

#### 4.3.1 Σύγκριση αποτελεσμάτων για χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις

Η βιοδιαθεσιμότητα του μεταλλικού ή οργανικού ρύπου είναι ένας κρίσιμος παράγοντας, και παίζει σπουδαίο ρόλο στο αποτέλεσμα της εξυγίανσης του (Gerhardt *et al.*, 2009). Λόγω των σύνθετων περιβαλλοντικών παραγόντων που λαμβάνουν χώρα στο έδαφος άλλα και στον υδροβιότοπο δεν μπορεί να είναι ξεκάθαρο εάν το εμπόδιο για την εξυγίανση είναι τόσο ο ίδιος ο τύπος της ρύπανσης, δηλαδή το είδος του μετάλλου, ή το επίπεδο της, δηλαδή η τιμή της συγκέντρωσης. Για το λόγο αυτό, στην έρευνα που διεξήχθη προκειμένου να εξακριβωθεί η παραπάνω αβεβαιότητα διεξήχθησαν πειράματα σε δύο διαφορετικές τιμές συγκεντρώσεων, τη χαμηλή και την υψηλή. Σαφώς οι συνθήκες στην χαμηλή συγκέντρωση είναι περισσότερο ευνοϊκές για τους μικροοργανισμούς γιατί τα βακτήρια που εμβολιάζονται κάθε φορά σε κάθε νέα καλλιέργεια προς απομάκρυνση κάποιου μετάλλου, έχουν προηγουμένως καλλιεργηθεί παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων. Επομένως εγκλιματίζονται σε σχέση με εκείνους που εκτίθενται στις υψηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες είναι 2,5 φορές υψηλότερες από τις χαμηλές. Ως επιβεβαίωση σε αυτό έρχεται η άποψη ότι η αυξημένη συγκέντρωση των μετάλλων έχει αρνητικές επιπτώσεις στη μικροβιακή κοινότητα (Khan *et al.*, 2010; Mucha *et al.*, 2013).

Για να συγκριθούν τα αποτελέσματα για χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις θα εξεταστεί πρώτα η περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας.

Ξεκινώντας από το κάδμιο, φαίνεται να εμφανίζει σχεδόν την διπλάσια απομάκρυνση στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης αφού στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης εμφανίζει 100% απομάκρυνση και στην περίπτωση της υψηλής 48%. Αυτή η διαφορά είναι αναμενόμενη αφού όπως έχει αναφερθεί, οι συνθήκες στην χαμηλή συγκέντρωση είναι περισσότερο ευνοϊκές για τους μικροοργανισμούς. Παραπλήσια είναι και η έκβαση στην περίπτωση του ψευδαργύρου, όπου στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης εμφανίζει 37,6% απομάκρυνση και στην περίπτωση της υψηλής μόλις 9,3%. Επίσης προβλεπόμενο, αφού παρατηρούνται μικρές αποκλίσεις στις τιμές της απορρόφησης υπέρ των χαμηλών συγκεντρώσεων και έτσι ο ίδιος σχεδόν αριθμός βακτηριακών κυττάρων καλείται να προσροφήσει μεγαλύτερη ποσότητα του μετάλλου. Όσον αφορά το νικέλιο, σε διάστημα 11 ωρών παρατηρείται ελαφρώς μεγαλύτερη απομάκρυνση στην υψηλή συγκέντρωση με ποσοστό 10,7%, ενώ στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης προκύπτει ποσοστό απομάκρυνσης ίσο με 7,84%.

Αυτό μπορεί πιθανόν να αποδοθεί σε κακή δειγματοληψία που οφείλεται στην πολύ έντονη συσσωματική δράση των μικροοργανισμών. Όταν τα βακτήρια καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων, στην περίπτωση του καδμίου παρατηρείται επίσης μεγαλύτερη απομάκρυνση και ίση με 75,8% κατά την έκθεση τους σε χαμηλή συγκέντρωση. Ενώ στην περίπτωση υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων για το κάδμιο, προκύπτει 63,6% απομάκρυνση. Αντίθετα όσον αφορά τον ψευδάργυρο φαίνεται να απομακρύνεται περισσότερο κατά την καλλιέργεια παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων, με ποσοστό 65,1%, σε αντίθεση με την απομάκρυνση του ψευδαργύρου στην περίπτωση των χαμηλών συγκεντρώσεων που εμφανίζει ποσοστό απομάκρυνσης 49,6%. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων οι τελικές συγκεντρώσεις κυμαίνονται μεταξύ 40 και 50mg/l. Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση που αναστέλλει πλήρως την ορατή ανάπτυξη μικροοργανισμών (Andrews 2001). Η δοκιμή

αντοχής σε βαρέα μέταλλα έδειξε ότι η MIC στην περίπτωση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τη ριζόσφαιρα του αραβόσιτου, για τον ψευδάργυρο έφθασε τα 3mM Zn (Abedinzadeh *et al.*, 2019).

Τέλος, σχετικά με το νικέλιο, εμφανίζει ποσοστό απομάκρυνσης 21,2% κατά την καλλιέργεια των βακτηρίων παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων μεγαλύτερο από το ποσοστό απομάκρυνσης κατά τις χαμηλές συγκεντρώσεις που είναι ίσο με 6,3. Σε παρόμοια μελέτη βρέθηκε ότι σε διάστημα επτά ημερών επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απομάκρυνση νικελίου όταν η αρχική του συγκέντρωση είναι ίση με 10 mg/l σε σχέση με όταν η αρχική συγκέντρωση είναι 20 mg/l , και επίσης καλύτερη απομάκρυνση όταν η αρχική συγκέντρωση είναι 20 αντί για 30 mg/l (Babu *et al.*, 2013).

Κατά δεύτερον εξετάζεται η περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων. Σχετικά με το κάδμιο, αυτό φαίνεται να εμφανίζει υψηλότερο ποσοστό απομάκρυνσης στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης, με τιμή 97,4% και στην περίπτωση της υψηλής συγκέντρωσης 64,9%. Όσο υψηλότερες είναι οι συγκεντρώσεις τόσο μεγαλύτερη τοξικότητα εμφανίζει το κάδμιο, αφού γνωρίζουμε ότι η έκθεση σε 20 ppm (178 μM) Cd παρεμπόδισε την ανάπτυξη των ριζών *N. Tabacum* (Boominathan and Doran 2003).

Στην περίπτωση του ψευδαργύρου όμως, παρατηρείται ποσοστό απομάκρυνσης στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης ίσο με 24,1% μικρότερο από την περίπτωση της υψηλής που είναι ίσο με 31,3%. Σε παρόμοια μελέτη όπου εξετάστηκε η απομάκρυνση του ψευδαργύρου σε τρεις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις 50, 100 και 150 mg/l, φάνηκε πως όσο μικρότερη ήταν η αρχική συγκέντρωση τόσο μεγαλύτερο το ποσοστό απομάκρυνσης. Όσον αφορά το νικέλιο, παρατηρείται ελαφρώς μεγαλύτερη απομάκρυνση στην χαμηλή συγκέντρωση με ποσοστό 8,85%, ενώ στην περίπτωση της υψηλής συγκέντρωσης προκύπτει ποσοστό απομάκρυνσης ίσο με 6,9%. Όταν τα βακτήρια καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων, στην περίπτωση του καδμίου παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση κατά την έκθεσή τους σε υψηλή συγκέντρωση και ίση με 69,4%. Ενώ στην περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων για το κάδμιο, προκύπτει 51,3% απομάκρυνση. Σε παρόμοια μελέτη όπου εξετάστηκε η απομάκρυνση του καδμίου σε τρεις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις 10, 20 και 30 mg/l, η μεγαλύτερη απομάκρυνση εμφανίστηκε όταν αρχικά η συγκέντρωση του καδμίου ήταν 20 mg/l, η αμέσως επόμενη όταν η αρχική συγκέντρωση του καδμίου ήταν ίση με 30 mg/l και μικρότερη όταν η αρχική συγκέντρωση του καδμίου ήταν ίση με 10 mg/l (Babu *et al.*, 2013). Επίσης όσον αφορά τον ψευδάργυρο, φαίνεται να απομακρύνεται περισσότερο κατά την καλλιέργεια παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των τριών μετάλλων, με ποσοστό 59,1%, σε αντίθεση με την απομάκρυνση του ψευδαργύρου στην περίπτωση των χαμηλών συγκεντρώσεων που εμφανίζει ποσοστό απομάκρυνσης 52,3%. Μια σχετική έρευνα με αρχικές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου 200 mg/l για τις χαμηλές συγκεντρώσεις και 400 mg/l ψευδαργύρου για τις υψηλές αποδεικνύει επίσης ότι στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων του *J.acutus* επιτυγχάνονται μικρότερες απομακρύνσεις ψευδαργύρου κατά τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (Syranidou *et al.*, 2016). Τέλος, σχετικά με το νικέλιο παρατηρείται ότι δεν απομακρύνεται καθόλου στις χαμηλές και στις υψηλές συγκεντρώσεις. Παρόμοια έρευνα με αρχικές συγκεντρώσεις νικελίου 20 mg/l για τις χαμηλές συγκεντρώσεις και 40 mg/l για τις υψηλές αποδεικνύει επίσης ότι στην περίπτωση των ενδοφυτικών



βακτηρίων του *J.acutus* επιτυγχάνονται μικρότερες απομακρύνσεις νικελίου κατά τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (Syranidou *et al.*, 2016).

#### 4.3.2 Σύγκριση αποτελεσμάτων για ενδοφυτικά βακτήρια και βακτήρια ριζόσφαιρας

Τα ενδοφυτικά βακτήρια διαφοροποιούνται από τα βακτήρια της ριζόσφαιρας ως προς το περιβάλλον τους και την αλληλεπίδρασή τους με αυτό. Οι συνθήκες του εδάφους είναι αυτές που διαμορφώνουν τους μικροοργανισμούς της ριζόσφαιρας ενώ ταυτόχρονα ό,τι εναποθέτουν οι ρίζες μεταβάλλει τις συνθέσεις του εδάφους. Όσον αφορά τα ενδοφυτικά βακτήρια της ρίζας, αυτά εξαρτώνται και καθορίζονται από τις συνθήκες που επικρατούν στο εσωτερικό του ξενιστή (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Για να συγκριθούν τα αποτελέσματα για τα ενδοφυτικά βακτήρια και τα βακτήρια της ριζόσφαιρας θα εξεταστεί πρώτα η περίπτωση της χαμηλής συγκέντρωσης.

Ξεκινώντας από το κάδμιο, φαίνεται να εμφανίζει μεγάλα ποσοστά απομάκρυνσης τόσο στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας με ολοκληρωτική απομάκρυνση όσο και στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων με ποσοστό απομάκρυνσης 97,4%. Οι παραπλήσιες απομακρύνσεις μπορούν να εξηγηθούν βάσει προηγούμενων μελετών όπου παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια της ριζόσφαιρας μπορεί στην πορεία της ζωής τους να γίνουν ενδοφυτικά (Etesami and Alikhani 2016; Etesami *et al.*, 2014). Είναι γνωστό ότι η είσοδος βακτηρίων στο φυτό μπορεί να γίνει μέσω των ριζών (Rodriguez and Redman 2008). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η διείσδυση των βακτηρίων στο φυτό δεν είναι αναγκαστικά ενεργός μηχανισμός και επομένως όλα τα βακτήρια της ριζόσφαιρας μπορεί να γίνουν ενδοφυτικά σε ένα στάδιο της ζωής τους (Hardoim *et al.*, 2008).

Παραπλήσια είναι και η έκβαση στην περίπτωση του ψευδαργύρου, όπου στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας εμφανίζει 37,6% απομάκρυνση και στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων 24,1%. Γενικότερα οι ελαφρώς μεγαλύτερες απομακρύνσεις που συναντώνται στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας, πιθανόν να προκύπτουν επειδή τα βακτήρια της ριζόσφαιρας, στο περιβάλλον το οποίο βρίσκονται έρχονται εκ φύσεως σε πιο άμεση επαφή με τα μέταλλα (Hallmann *et al.*, 1997). Σε πρόσφατη μελέτη, η αντίσταση που εμφάνιζαν τα βακτήρια της ριζόσφαιρας στα βαρέα μέταλλα ήταν υψηλότερη από εκείνη των ενδοφυτικών βακτηρίων (Abedinzadeh *et al.*, 2019). Όσον αφορά το νικέλιο, παρατηρείται ελαφρώς μεγαλύτερη απομάκρυνση στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων, χωρίς να πρόκειται για αξιοσημείωτη διαφορά. Στην πρώτη περίπτωση εμφανίζει ποσοστό απομάκρυνσης 8,85%, ενώ στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας προκύπτει ποσοστό απομάκρυνσης ίσο με 7,84%. Όταν τα βακτήρια καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων, στην περίπτωση του καδμίου παρατηρείται επίσης μεγαλύτερη απομάκρυνση στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας και ίση με 75,8%. Ενώ στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων, προκύπτει 51,3% απομάκρυνση. Αντίθετα όσον αφορά τον ψευδάργυρο, φαίνεται να απομακρύνεται ελάχιστα περισσότερο από τα ενδοφυτικά βακτήρια με ποσοστό 52,3%, σε σχέση με την απομάκρυνση του από τα βακτήρια της ριζόσφαιρας που ο ψευδάργυρος εμφανίζει απομάκρυνση 49,6%.

Τέλος όσον αφορά το νικέλιο, εμφανίζει μεγαλύτερη απομάκρυνση στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας από ότι στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων, με τιμές 6,3% και 0% αντίστοιχα.

Συνεχίζοντας, θα εξεταστεί η περίπτωση της υψηλής συγκέντρωσης.

Ξεκινώντας από το κάδμιο, φαίνεται να εμφανίζει μεγαλύτερη απομάκρυνση στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων σε σχέση με την περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας, με τιμές 64,9% και 48% αντίστοιχα. Όσον αφορά τον ψευδάργυρο, στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας εμφανίζει 9,3% απομάκρυνση και στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων 31,3%. Όσον αφορά το νικέλιο, παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας. Στην πρώτη περίπτωση εμφανίζει ποσοστό απομάκρυνσης 10,7%, ενώ στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων προκύπτει ποσοστό απομάκρυνσης ίσο με 6,9%.

Όταν τα βακτήρια καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων, στην περίπτωση του καδμίου παρατηρείται ελάχιστα μεγαλύτερη απομάκρυνση στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων και ίση με 69,4%. Ενώ στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας προκύπτει 63,6% απομάκρυνση. Στην πραγματικότητα τα βακτήρια της ριζόσφαιρας και τα ενδοφυτικά οδηγούν σε τελική συγκέντρωση καδμίου 0,20mg/l και 0,24mg/l αντίστοιχα. Αντίθετα όσον αφορά τον ψευδάργυρο και το νικέλιο φαίνεται να απομακρύνονται περισσότερο από τα βακτήρια της ριζόσφαιρας. Στην περίπτωση του ψευδαργύρου εμφανίζονται ποσοστά απομάκρυνσης 65,1% και 59,1% για την περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας και των ενδοφυτικών αντίστοιχα. Ενώ στην περίπτωση του νικελίου εμφανίζονται ποσοστά απομάκρυνσης 21,2% και 0% για την περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας και των ενδοφυτικών αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνονται από πρόσφατη μελέτη, στην οποία η ανθεκτικότητα που εμφάνιζαν τα βακτήρια της ριζόσφαιρας στα βαρέα μέταλλα ήταν υψηλότερη από εκείνη των ενδοφυτικών βακτηρίων (Abedinzadeh *et al.*, 2019).

#### 4.3.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων παρουσία των τριών μετάλλων και καθενός ξεχωριστά

Σε παλαιότερες μελέτες (Zhang *et al.*, 2016) υποστηρίζεται ότι υπάρχουν πιο ευαίσθητα περιβάλλοντα από τα εδάφη. Αναφερόμενες στους τεχνητούς υδροβιότοπους υποστηρίζουν επίσης ότι σε σύγκριση με τα εδάφη, η ρύπανση με περισσότερα από ένα μέταλλο, δηλαδή μίξη μετάλλων είναι ικανή να προκαλέσει αλλαγές στην βακτηριακή κοινότητα (Zhang *et al.*, 2016). Στην παρούσα μελέτη, τα μέταλλα εμφανίζουν διαφορές στις απομακρύνσεις τους όταν οι μικροοργανισμοί έρχονται αντιμέτωποι με το κάθε ένα ξεχωριστά, και όταν καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων, με εξαίρεση το νικέλιο που εμφανίζει κατά κανόνα μικρά ποσοστά απομάκρυνσης.

Για να εξεταστεί η συμπεριφορά των βακτηρίων όταν καλλιεργούνται παρουσία ενός μετάλλου κάθε φορά σε σχέση με όταν καλλιεργούνται παρουσία και των τριών θα συγκριθούν τα αποτελέσματα των απομακρύνσεων για κάθε μέταλλο σε κάθε περίπτωση αντίστοιχα. Αρχικά ξεκινώντας από το κάδμιο, στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας όταν καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης, παρατηρείται

μικρότερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων. Γνωρίζουμε ότι στους μικροοργανισμούς τα τοξικά βαρέα μέταλλα παρεμποδίζουν την πρόσληψη, τη διανομή βασικών θρεπτικών ουσιών και την μετατόπιση των βασικών μετάλλων από τα σημεία φυσιολογικής πρόσδεσης σε βιολογικά μόρια. Πιο συγκεκριμένα γνωρίζουμε ότι το κάδμιο ανταγωνίζεται με τον ψευδάργυρο (Barceló and Poschenrieder 1990; Sharma and Archana 2016). Επομένως είναι λογικό το κάδμιο να εμφανίζει μικρότερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται και παρουσία ψευδαργύρου.

Στην περίπτωση αυτή εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 75,8%, ενώ στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου, χωρίς την παρουσία των άλλων 2 μετάλλων, εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 100%. Σχετικά με τα βακτήρια της ριζόσφαιρας που καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καδμίου, παρατηρείται μικρότερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία μόνο υψηλής συγκέντρωσης καδμίου. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 48%, ενώ στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας καλλιεργούνται παρουσία και των 3 μετάλλων, εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 63,6%. Σε σχετική μελέτη που ερευνά την απομάκρυνση του καδμίου από από το βακτήριο *E. cloacae* που απομονώθηκε από την ριζόσφαιρα του αραβόσιτου φαίνεται η απομάκρυνση του μετάλλου να είναι πιο αποδοτική σε μια σύνθετη κατάσταση από ότι η απομάκρυνση του σε ξεχωριστή κατάσταση (Abedinzadeh *et al.*, 2019).

Στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων όταν καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης, παρατηρείται μικρότερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 51,3%, ενώ στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου, χωρίς την παρουσία των άλλων 2 μετάλλων, εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 97,4%. Για τα ενδοφυτικά βακτήρια, όταν καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καδμίου, παρατηρείται μικρότερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία μόνο υψηλής συγκέντρωσης καδμίου. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 64,9%, ενώ στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης καδμίου, παρουσία και των άλλων 2 μετάλλων, εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 69,4%.

Όσον αφορά τον ψευδάργυρο, σε όλες τις περιπτώσεις εμφανίζει μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης παρουσία και των τριών μετάλλων. Έχει αναφερθεί ότι ο ρυθμός ανάπτυξης και η ποσότητα της παραγωγής βιομάζας σχετίζονται άμεσα με την απορρόφηση του μετάλλου από βακτήρια (Guo *et al.*, 2010). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ανάπτυξη και η βιομάζα των βακτηρίων παρουσία πολλών διαφορετικών μετάλλων είναι υψηλότερη από την ανάπτυξή τους παρουσία αυτών των μετάλλων χωριστά (Yuanhuan *et al.*, 2005). Στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας όταν καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης προκύπτει ποσοστό απομάκρυνσης 37,6% όταν καλλιεργούνται μόνο παρουσία ψευδαργύρου και 49,6% όταν καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων. Όταν πάλι τα ίδια βακτήρια καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης προκύπτει ποσοστό απομάκρυνσης 9,3% όταν καλλιεργούνται μόνο παρουσία

ψευδαργύρου και 65,1% όταν καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων. Στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων, όταν καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης προκύπτει ποσοστό απομάκρυνσης 24,1% όταν καλλιεργούνται μόνο παρουσία ψευδαργύρου και 52,3% όταν καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων. Όταν πάλι τα ίδια βακτήρια καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης προκύπτει ποσοστό απομάκρυνσης 31,3% όταν καλλιεργούνται μόνο παρουσία ψευδαργύρου και 59,1% όταν καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων.

Σχετικά με το νικέλιο, στην περίπτωση των βακτηρίων της ριζόσφαιρας όταν καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης, παρατηρείται μικρότερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 6,3%, ενώ στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου, χωρίς την παρουσία των άλλων 2 μετάλλων, εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 7,84%. Σχετικά με τα βακτήρια της ριζόσφαιρας που καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου, παρατηρείται μικρότερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία μόνο υψηλής συγκέντρωσης νικελίου. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 10,7%, ενώ στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου, παρουσία και των άλλων 2 μετάλλων, εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 21,2%. Στην περίπτωση των ενδοφυτικών βακτηρίων όταν καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης, παρατηρείται μικρότερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων, όπως είναι αναμενόμενο. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζουν μηδενική απομάκρυνση, ενώ στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου, χωρίς την παρουσία των άλλων 2 μετάλλων, εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 8,85%. Σχετικά με τα ενδοφυτικά βακτήρια, όταν καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νικελίου, παρατηρείται μεγαλύτερη απομάκρυνση όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία μόνο υψηλής συγκέντρωσης του ενός μετάλλου. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζουν ποσοστό απομάκρυνσης 6,9%, ενώ στην περίπτωση που οι μικροοργανισμοί της ριζόσφαιρας καλλιεργούνται παρουσία υψηλής συγκέντρωσης και των 3 μετάλλων, εμφανίζουν μηδενικό ποσοστό απομάκρυνσης.

#### 4.4 Αποτελέσματα απομακρύνσεων στον Β' κύκλο

##### 4.4.1 Σύγκριση συνθηκών και ρυθμού ανάπτυξης Α' και Β' κύκλων

Τα φυτά ανταποκρίνονται στους διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες της ριζόσφαιρας με την έκκριση ουσιών από τις ρίζες, οι οποίες είναι χαμηλού μοριακού βάρους οργανικά οξέα και άλλες οργανικές ενώσεις που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τόσο το περιβάλλον της ριζόσφαιρας, όσο και τους μικροοργανισμούς που ζουν σε αυτήν. Κατά τον δεύτερο κύκλο μοναδικές οργανικές πηγές για τους μικροοργανισμούς αποτελούν το απόβλητο από την έξοδο δευτεροβάθμιας επεξεργασίας αστικών αποβλήτων και οι ριζικές εκκρίσεις, σε αντίθεση με τον πρώτο κύκλο όπου οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία πλούσιου θρεπτικού υλικού. Επομένως παρόλο που στον δεύτερο κύκλο τα βακτήρια της ριζόσφαιρας καλλιεργούνται παρουσία πολύ χαμηλότερων συγκεντρώσεων

των μετάλλων, παρατηρείται ιδιαίτερα μειωμένος ρυθμός της ανάπτυξης τους και η καλλιέργεια τους διαρκεί μέρες.

Οι τεχνικές της φυτοεξυγίανσης αντιμετωπίζουν μεγαλύτερη δυσχέρεια σε περιπτώσεις περιοχών με μικτή ρύπανση. Η περίπτωση μιας μικτής ρύπανσης είναι ιδιαίτερα σύνθετη, ιδιαίτερα αν πρόκειται για συνδυασμό τοξικών μετάλλων και ξενοβιοτικών οργανικών ουσιών, διότι μεταξύ τους υπάρχει πιθανότητα αλληλεπίδρασης. Αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται επίσης μεταξύ του μικροβιόκοσμου του εδάφους και του μικροβιακού πληθυσμού της ριζόσφαιρας. Η παρουσία διαφορετικών ρύπων μπορεί επιπλέον να προκαλέσει τοξικότητα εμποδίζοντας τόσο την ανάπτυξη των φυτών όσο και την απόδοση τους στην απομάκρυνση των ρύπων (Chirakkara *et al.*, 2016). Σε παρόμοια έρευνα έχει βρεθεί ότι η συγκέντρωση των μετάλλων στις ρίζες και στα φύλλα του *J. acutus* αυξάνεται στις περιπτώσεις που το φυτό έρχεται αντιμέτωπο με υψηλές συγκεντρώσεις μικτής μόλυνσης (Syranidou *et al.*, 2018).

#### 4.4.2 Αποτελέσματα Β' κύκλου

Κατά την καλλιέργεια των βακτηρίων της ριζόσφαιρας παρουσία αποβλήτου, ριζικών εκκρίσεων και καδμίου, ψευδαργύρου, νικελίου σε συγκεντρώσεις 0,02mg/l, 4mg/l, 0,4mg/l αντίστοιχα παρατηρούνται τα παρακάτω ποσοστά απομάκρυνσης. Στην περίπτωση καλλιέργειας των βακτηρίων παρουσία καδμίου προκύπτει ένα ποσοστό απομάκρυνσης της τάξεως του 92,7% σε διάστημα 5 ημερών, πιο συγκεκριμένα περίπου 99 ωρών. Παρατηρείται επομένως ότι ανεξάρτητα από την πηγή των θρεπτικών οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να απομακρύνουν το κάδμιο. Όσον αφορά τον ψευδάργυρο, η απομάκρυνση του ακολουθεί την εξέλιξη του Α' κύκλου, με τον ψευδάργυρο δηλαδή να εμφανίζει λίγο χαμηλότερη απομάκρυνση από το κάδμιο αλλά και πάλι ικανοποιητική. Σχετικά με την απομάκρυνση του νικελίου, παρατηρείται απροσδόκητα υψηλή απομάκρυνση της τάξεως του 94,4%, η οποία όμως εμφανίζεται ξαφνικά την τελευταία μέρα της καλλιέργειας. Συγκεκριμένα τις πρώτες 82 ώρες η τιμή της συγκέντρωσης εμφάνιζε μηδενική απομάκρυνση και τις τελευταίες 16 ώρες προέκυψε ποσοστό απομάκρυνσης 94,4%. Τέλος κατά την καλλιέργεια παρουσία και των τριών μετάλλων, το κάδμιο, το νικέλιο και ο ψευδάργυρος παρουσιάζουν ποσοστά απομάκρυνσης 0%, 37,5% και 52,9% αντίστοιχα. Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια της ριζόσφαιρας που προωθούν την ανάπτυξη του φυτού έχουν υιοθετήσει αρκετούς μηχανισμούς για να ξεπερνούν το μεταλλικό στρες. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν: μεταφορά μέσω της πλάσματικής μεμβράνης, συσσωμάτωση στο κυτταρικό τοίχωμα τους, εγκλωβισμός μετάλλου στις εξωκυτταρικές κάψουλες, καθίζηση των βαρέων μετάλλων και οξειδωση-αναγωγή (Zubair *et al.*, 2016). Επίσης γνωρίζουμε ότι το κάδμιο ανταγωνίζεται με τον ψευδάργυρο για τις θέσεις πρόσδεσης των μικροοργανισμών (Barceló and Poschenrieder 1990; Sharma and Archana 2016). Επομένως είναι λογικό το να εμφανίζουν μικρότερες απομακρύνσεις όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται παρουσία και των τριών μετάλλων. Το νικέλιο εμφανίζει τη χαμηλότερη απομάκρυνση, αλλά και η κάθε μία από αυτές εμφανίζεται να είναι χαμηλότερη από στην περίπτωση που αντιμετωπίζεται το κάθε ένα μέταλλο μόνο του ξεχωριστά και όχι παρουσία των άλλων δυο.

#### 4.5 Σύγκριση με αποτελέσματα απομακρύνσεων τεχνητού υδροβιότοπου

Τα ενδοφυτικά βακτήρια και τα βακτήρια της ριζόσφαιρας απομονώθηκαν από το ελόφυτο *J. acutus* τεχνητού υδροβιότοπου τετράμηνης συνεχούς λειτουργίας που αποτελούσε τριτοβάθμια επεξεργασία για την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από δευτεροβάθμια επεξεργασμένα αστικά λύματα της πόλης των Χανίων. Οι μικροοργανισμοί έχουν σημαντικό ρόλο στην φυτοεξυγίανση αφού επηρεάζουν την απορρόφηση και μετατόπιση των μετάλλων από τα φυτά και αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων (Ying Ma *et al.*, 2016). Επομένως είναι αναμενόμενη μια κοινή πορεία μεταξύ των απομακρύνσεων που βρέθηκαν στο εργαστήριο και αποδίδονται καθαρά και μόνο στην δράση των μικροοργανισμών και στις απομακρύνσεις που παρουσιάστηκαν στον υδροβιότοπο οφείλονται τόσο στην δράση των μικροοργανισμών αλλά και τις τεχνικές που επιστρατεύει το ίδιο το φυτό. Τα αποτελέσματα του τεχνητού υδροβιότοπου παρατίθενται παρακάτω (Πίνακας 4. 1) και φαίνεται να συμβαδίζουν με την γενικότερη εικόνα της έρευνας μας, μιας και ταυτίζονται στα βασικά σημεία, τα οποία αναφέρουν ελάχιστη έως μηδενική απομάκρυνση νικελίου, και χαμηλότερη απομάκρυνση ψευδαργύρου σε σχέση με το κάδμιο.

Πίνακας 4. 2 Αποτελέσματα απομακρύνσεων των βαρέων μετάλλων από τον τεχνητό υδροβιότοπο

Μέταλλο	Μέση συγκέντρωση εισόδου CW (mg/l)	Μέση συγκέντρωση εξόδου CW (mg/l)	Μέση απομάκρυνση (%)
Cd	0,017	0,0054	66,5
Zn	2,26	0,93	56,6
Ni	0,35	0,36	0

#### 4.6 Προτάσεις για περαιτέρω αξιοποίηση αποτελεσμάτων

Ένα από τα αναπάντητα ζητήματα σε ότι αφορά τους μικροοργανισμούς που συμβάλουν στην απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων είναι η ταυτοποίηση των βακτηρίων που πρωταγωνίστησαν στην παρούσα έρευνα. Προτείνεται σύγκριση κοινοτήτων τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά πριν και μετά την έκθεση τους στα βαρέα μέταλλα. Έτσι θα είναι εφικτό να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την ανθεκτικότητα και την αποδοτικότητα κάθε είδους.

#### 4.7 Μεθοδολογικές αδυναμίες της έρευνας

Μια βασική πειραματική αδυναμία που μάλιστα έγινε αισθητή στην παρούσα έρευνα αφορά το χρόνο που απαιτείται για ανάδευση των φλασκών μετά την προσθήκη των μετάλλων ώστε να προκύψουν ομογενοποιημένα δείγματα. Επομένως, η ανομοιογένεια αυτή καθιστά αδύνατη την ορθή δειγματοληψία με σκοπό τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των διαλυμάτων. Προκύπτουν επίσης αρχικές μετρήσεις με συγκεντρώσεις μικρότερες των επιθυμητών συγκεντρώσεων συμφωνά με τις οποίες κατασκευάστηκαν οι φλάσκες.



## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κύρια συμπεράσματα που προέκυψαν από την μελέτη αυτή ήταν:

- Τα ενδοφυτικά βακτήρια και τα βακτήρια της ριζόσφαιρας που απομονώθηκαν από το ελόφυτο *J. Acutus* ευδοκιμούν και εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα τρία μέταλλα, κάδμιο, νικέλιο και ψευδάργυρο.
- Οι δύο βακτηριακές κοινότητες είναι ικανές να απομακρύνουν τα τρία μέταλλα τόσο σε χαμηλής όσο και σε υψηλή συγκέντρωση.
- Τα βακτήρια της ριζόσφαιρας εμφανίζουν ελάχιστα καλύτερη απόδοση σε σχέση με τα ενδοφυτικά ενώ το ποσοστό της απομάκρυνσης δεν φαίνεται να καθορίζεται από την αρχική χαμηλή ή υψηλή συγκέντρωση.
- Οι περιπτώσεις που τα μέταλλα εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης όταν πρέπει να αντιμετωπιστούν το κάθε ένα μόνο του είναι όσες και οι περιπτώσεις που εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης στην περίπτωση της μίξης των μετάλλων. Επομένως η παρουσία περισσότερων από ένα μέταλλο δεν επηρεάζει την ικανότητα απομάκρυνσής τους από τους μικροοργανισμούς.
- Η μεγαλύτερη απομάκρυνση που σημειώθηκε ήταν του καδμίου και στη συνέχεια του ψευδαργύρου, ενώ το νικέλιο εμφανίζει ελάχιστη έως μηδενική απομάκρυνση.
- Παρόλο που στο δεύτερο κύκλο τα βακτήρια της ριζόσφαιρας εμφανίζουν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης, απομακρύνουν με μεγάλο ποσοστό τα τρία μέταλλα.
- Τα ποσοστά των απομακρύνσεων του τεχνητού υδροβιότοπου φαίνεται να επαληθεύουν την γενικότερη εικόνα που έχει αποτυπωθεί από την παραπάνω έρευνα, αφού συμβαδίζουν στα βασικά στοιχεία της που είναι η ελάχιστη έως μηδενική απομάκρυνση νικελίου, και χαμηλότερη απομάκρυνση ψευδαργύρου σε σχέση με το κάδμιο.

Τελικά, η ανοχή που εμφανίζουν τα ενδοφυτικά βακτήρια και τα βακτήρια της ριζόσφαιρας στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να τα απομακρύνουν, καθιστά αυτά και το φυτό με το οποίο σχετίζονται, κατάλληλα για φυτοεξυγίανση σε συστήματα τεχνητών υδροβιότοπων με αστικά και βιομηχανικά λύματα.

### Προβλήματα για μελλοντική έρευνα

Ένα ιδιαίτερα σοβαρό ζήτημα που προκύπτει, αφορά την περαιτέρω διαχείριση των μικροοργανισμών ή ολόκληρων των φυτών (αν πρόκειται για περίπτωση τεχνητού υδροβιότοπου) που προκύπτουν ύστερα από εξυγίανση ρυπασμένου νερού ή εδάφους με βαρέα μέταλλα. Δεδομένου ότι τα βαρέα μέταλλα προσροφούνται από τους μικροοργανισμούς και εκ φύσεως δεν αποδομούνται ώστε να μετατραπούν σε κάποια άλλη ακίνδυνη μορφή, στην ουσία ο επικίνδυνος ρύπος δεν έχει εξαλειφθεί, απλά έχει μεταφερθεί στο εσωτερικό των μικροοργανισμών. Προκύπτει έτσι η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα προκειμένου να διασφαλίσει την ορθή διαχείριση και εναπόθεση ή περαιτέρω επεξεργασία των μικροοργανισμών.

Μια ακόμη απορία που προκύπτει κατά την εκπόνηση της παρούσας έρευνας και αξίζει να διερευνηθεί είναι σε ποιο βαθμό οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να προσροφούν μέταλλα. Επομένως, πέρα από την έκταση της προσρόφησης θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί το αν επέρχεται κορεσμός και σε ποιο σημείο αλλά και αν στο σημείο αυτό υπάρχει πιθανότητα εκρόφησης του ρύπου πάλι πίσω στο περιβάλλον.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abedinzadeh, Motahhareh, Hassan Etesami, and Hossein Ali Alikhani. 2019. "Characterization of Rhizosphere and Endophytic Bacteria from Roots of Maize (*Zea Mays* L.) Plant Irrigated with Wastewater with Biotechnological Potential in Agriculture." *Biotechnology Reports* 21(2018): e00305. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00305>.
- Adams, Scott V. et al. 2014. "Dietary Cadmium Exposure and Risk of Breast, Endometrial, and Ovarian Cancer in the Women's Health Initiative." *Environmental Health Perspectives* 122(6): 594–600.
- Afzal, Muhammad, Qaiser M Khan, and Angela Sessitsch. 2014. "Chemosphere Endophytic Bacteria : Prospects and Applications for the Phytoremediation of Organic Pollutants." *Chemosphere* 117: 232–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.078>.
- Almeida, C. Marisa R., Ana P. Mucha, and M. Teresa S.D. Vasconcelos. 2006. "Variability of Metal Contents in the Sea Rush *Juncus Maritimus*–Estuarine Sediment System through One Year of Plant's Life." *Marine Environmental Research* 61(4): 424–38. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113605000851> (May 28, 2019).
- Andrews, Jennifer M. 2001. "Andrews (2001) Determination of MICs (Definitions)." : 5–16.
- Anjum, Naser A. et al. 2016. "Biophysical and Biochemical Markers of Metal/Metalloid-Impacts in Salt Marsh Halophytes and Their Implications." *Frontiers in Environmental Science* 4(April): 1–13.
- Babu, A Giridhar, Jong-dae Kim, and Byung-taek Oh. 2013. "Enhancement of Heavy Metal Phytoremediation by *Alnus Firma* with Endophytic *Bacillus Thuringiensis* GDB-1." *Journal of Hazardous Materials* 250–251: 477–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.02.014>.
- Bais, Harsh P et al. 2010. "The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms."
- Barceló, J, and Ch. Poschenrieder. 1990. "Plant Water Relations as Affected by Heavy Metal Stress: A Review." *Journal of Plant Nutrition* 13(1): 1–37. <https://doi.org/10.1080/01904169009364057>.
- Blencowe, Dayle K., and Andrew P. Morby. 2003. "Zn(II) Metabolism in Prokaryotes." *FEMS Microbiology Reviews* 27(2–3): 291–311.
- Boominathan, Rengasamy, and Pauline M. Doran. 2003. "Cadmium Tolerance and Antioxidative Defenses in Hairy Roots of the Cadmium Hyperaccumulator, *Thlaspi Caerulescens*." *Biotechnology and Bioengineering* 83(2): 158–67.
- Broadley, Martin R. et al. 2007. "Zinc in Plants." *New Phytologist* 173(4): 677–702.
- Bulgarelli, Davide et al. "Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants."
- Burroughs, William S. 1991. "Παράρτημα ΙΑ της υπουργικής απόφασης: 80568/4225/91, Μέθοδοι, όροι και περιορισμοί για την χρησιμοποίηση στη γεωργία της ιλύος που προέρχεται από επεξεργασία οικιακών και αστικών λυμάτων (ΦΕΚ 641/Β/7-08-1991)" 11.
- Byers, B R, M V Powell, and C E Lankford. 1967. "Iron-Chelating Hydroxamic Acid ( Schizokinen ) Active in Initiation of Cell Division in *Bacillus Megaterium*." 93(1): 286–94.
- Chang, C. Y. et al. 2014. "Accumulation of Heavy Metals in Leaf Vegetables from Agricultural Soils and



- Associated Potential Health Risks in the Pearl River Delta, South China." *Environmental Monitoring and Assessment* 186(3): 1547–60.
- Chirakkara, Reshma A., Claudio Cameselle, and Krishna R. Reddy. 2016. "Assessing the Applicability of Phytoremediation of Soils with Mixed Organic and Heavy Metal Contaminants." *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 15(2): 299–326.
- Christofilopoulos, Stavros et al. 2016. "The Role of Halophyte *Juncus Acutus* L. in the Remediation of Mixed Contamination in a Hydroponic Greenhouse Experiment." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 91(6): 1665–74.
- Davis, W B, M J Mccauley, and B R Byers. 1971. "Iron Requirements and Aluminum Sensitivity of an Hydroxamic Acid-Requiring Strain of *Bacillus Megaterium*." 105(2): 589–94.
- El Dessouky, S. I. et al. 2008. "Solvent Extraction Separation of Zn(II), Fe(II), Fe(III) and Cd(II) Using Tributylphosphate and CYANEX 921 in Kerosene from Chloride Medium." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 47(2): 177–83.
- Dimitroula, Helen et al. 2015. "Mitigation Measures for Chromium-VI Contaminated Groundwater - The Role of Endophytic Bacteria in Rhizofiltration." *Journal of Hazardous Materials* 281: 114–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.005>.
- Doty, Sharon Lafferty. 2008. "Enhancing Phytoremediation through the Use of Transgenics and Endophytes." *New Phytologist* 179(2): 318–33. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02446.x>.
- Duque-escobar, Por Gonzalo. 2011. "Παράρτημα Ι της ΚΥΑ με θέμα: «Μέτρα, όροι και διαδικασίες για τη χρησιμοποίηση της ιλύος που προέρχεται από επεξεργασία οικιακών και αστικών λυμάτων καθώς και ορισμένων υγρών αποβλήτων, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 86/278/ΕΟΚ του Συμβουλίου των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Αντικατάσταση της 80568/4225/1991 (Β' 641) κοινής Υπουργικής απόφασης": 1–25.
- Dziubanek, Grzegorz et al. 2017. "Cadmium in Edible Plants from Silesia, Poland, and Its Implications for Health Risk in Populations." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142: 8–13. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651317301926#bib15> (November 9, 2018).
- Etesami, Hassan, and Hossein Ali Alikhani. 2016. "Rhizosphere and Endorhiza of Oilseed Rape (*Brassica Napus* L.) Plant Harbor Bacteria with Multifaceted Beneficial Effects." *Biological Control* 94: 11–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.003>.
- Etesami, Hassan, Hossein Mirseyed Hosseini, and Hossein Ali Alikhani. 2014. "Bacterial Biosynthesis of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase, a Useful Trait to Elongation and Endophytic Colonization of the Roots of Rice under Constant Flooded Conditions." *Physiology and Molecular Biology of Plants* 20(4): 425–34.
- Gerhardt, Karen E., Xiao-Dong Huang, Bernard R. Glick, and Bruce M. Greenberg. 2009. "Phytoremediation and Rhizoremediation of Organic Soil Contaminants: Potential and Challenges." *Plant Science* 176(1): 20–30. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945208002720> (May 27, 2019).
- Glick, Bernard R. 2010. "Using Soil Bacteria to Facilitate Phytoremediation." *Biotechnology Advances* 28(3): 367–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001>.

- Gomathy, M, and K G Sabarinathan. 2010. "MICROBIAL MECHANISMS OF HEAVY METAL TOLERANCE- A REVIEW." 31(2): 133–38.
- Guillon-Philippe, Anna et al. 2014. "Constructed Wetlands to Reduce Metal Pollution from Industrial Catchments in Aquatic Mediterranean Ecosystems: A Review to Overcome Obstacles and Suggest Potential Solutions." *Environment International* 64: 1–16.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.016>.
- Guo, Hanjun et al. 2010. "Bioremediation of Heavy Metals by Growing Hyperaccumulator Endophytic Bacterium *Bacillus* Sp. L14." *Bioresource Technology* 101(22): 8599–8605.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.085>.
- Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W. F. Mahaffee, and J. W. Kloepper. 1997. "Bacterial Endophytes in Agricultural Crops." *Canadian Journal of Microbiology* 43(10): 895–914.  
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m97-131>.
- Hardoim, Pablo R., Leo S. van Overbeek, and Jan Dirk van Elsas. 2008. "Properties of Bacterial Endophytes and Their Proposed Role in Plant Growth." *Trends in Microbiology* 16(10): 463–71.
- He, Chi Quan et al. 2010. "Effect of Zn-Tolerant Bacterial Strains on Growth and Zn Accumulation In." 44: 1–5.
- He, Huaidong et al. 2013. "Chemosphere Characterization of Endophytic *Rhizobium* Sp. JN6 from *Polygonum Pubescens* and Its Potential in Promoting Growth and Cd, Pb, Zn Uptake by *Brassica Napus*." *Chemosphere* 90(6): 1960–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.057>.
- Ho, Ying-ning, Ju-liang Hsieh, and Chieh-chen Huang. 2013. "Bioresource Technology Construction of a Plant – Microbe Phytoremediation System : Combination of Vetiver Grass with a Functional Endophytic Bacterium, *Achromobacter xylosoxidans* F3B, for Aromatic Pollutants Removal." *Bioresource Technology* 145: 43–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.051>.
- Hobbs, Charles H. et al. 1995. "Comparative Carcinogenic Effects of Nickel Subsulfide, Nickel Oxide, or Nickel Sulfate Hexahydrate Chronic Exposures in the Lung." *Cancer Research* 55(22): 5251–56.  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/55/22/5251.full.pdf>.
- Huyer, Marianne, and William J Page. 1988. "Zn<sup>2+</sup> + Increases Siderophore Production in *Azotobacter Vinelandii*." 54(11): 2625–31.
- Jha, Bhavanath, Iti Gontia, and Anton Hartmann. 2012. "The Roots of the Halophyte *Salicornia Brachiata* Are a Source of New Halotolerant Diazotrophic Bacteria with Plant Growth-Promoting Potential." : 265–77.
- Jin, Jieren et al. 2019. "Effect of Plants and Their Root Exudate on Bacterial Activities during Rhizobacterium–Plant Remediation of Phenol from Water." *Environment International* 127(March): 114–24. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.015>.
- Ke, Shen et al. 2015. "Estimation of the Benchmark Dose of Urinary Cadmium as the Reference Level for Renal Dysfunction: A Large Sample Study in Five Cadmium Polluted Areas in China Environmental Health." *BMC Public Health* 15(1): 1–10.
- Khan, Sardar et al. 2010. "Effects of Cd and Pb on Soil Microbial Community Structure and Activities." *Environmental Science and Pollution Research* 17(2): 288–96.

- Kippler, Maria, Fahmida Tofail, and Renee M Gardner. 2012. "Research | Children's Health Maternal Cadmium Exposure during Pregnancy and Size at Birth :"  
*Children's Health* 284(2): 284–89.
- Kuyucak, N, and B Volesky. 1988. "INDUSTRIAL SOLUTIONS." i(2): 137–42.
- Ladislav, S, C Gérente, and F Chazarenc. 2013. "Performances of Two Macrophytes Species in Floating Treatment Wetlands for Cadmium , Nickel , and Zinc Removal from Urban Stormwater Runoff."
- Limcharoensuk, Tossapol et al. 2015. "Bioaccumulation and Biosorption of Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> by Bacteria Isolated from a Zinc Mine in Thailand." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 322–30.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.08.013>.
- Lin, Jinbo, Fang Zhang, and Yixiong Lei. 2016. "Dietary Intake and Urinary Level of Cadmium and Breast Cancer Risk: A Meta-Analysis." *Cancer Epidemiology* 42: 101–7.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2016.04.002>.
- Loukidou, Maria X., Kostas A. Matis, Anastasios I. Zouboulis, and Maria Liakopoulou-Kyriakidou. 2003. "Removal of As(V) from Wastewaters by Chemically Modified Fungal Biomass." *Water Research* 37(18): 4544–52. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135403004159> (October 31, 2018).
- Lu, Yan, Xinrong Li, Mingzhu He, and Fanjiang Zeng. 2013. "Behavior of Native Species *Arrhenatherum Elatius* (Poaceae) and *Sonchus Transcaspicus* (Asteraceae) Exposed to a Heavy Metal-Polluted Field: Plant Metal Concentration, Phytotoxicity, and Detoxification Responses." *International Journal of Phytoremediation* 15(10): 924–37.
- Ma, Y, M N V Prasad, M Rajkumar, and H Freitas. 2011. "Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Endophytes Accelerate Phytoremediation of Metalliferous Soils Phytoremediation Bioremediation Rhizoremediation." 29: 248–58.
- Ma, Ying et al. 2015. "Serpentine Bacteria Influence Metal Translocation and Bioconcentration of *Brassica Juncea* and *Ricinus Communis* Grown in Multi-Metal Polluted Soils." 5(January): 1–13.
- . 2016. "Bioaugmentation with Endophytic Bacterium E6S Homologous to *Achromobacter Piechaudii* Enhances Metal Rhizoaccumulation in Host *Sedum Plumbizincicola*." 7(February): 1–9.
- Ma, Ying, Mani Rajkumar, Chang Zhang, and Helena Freitas. 2016. "Beneficial Role of Bacterial Endophytes in Heavy Metal Phytoremediation." *Journal of Environmental Management* 174: 14–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047>.
- Makui, Hortence et al. 2000. "Identification of the *Escherichia Coli* K-12 Nramp Orthologue (MntH) as a Selective Divalent Metal Ion Transporter." *Molecular Microbiology* 35(5): 1065–78.
- Manousaki, Eleni, and Nicolas Kalogerakis. 2011. "Halophytes-an Emerging Trend in Phytoremediation." *International Journal of Phytoremediation* 13(10): 959–69.
- Mateos-Naranjo, Enrique, Eloy M. Castellanos, and Alfonso Perez-Martin. 2014. "Zinc Tolerance and Accumulation in the Halophytic Species *Juncus Acutus*." *Environmental and Experimental Botany* 100: 114–21. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847214000033> (May 28, 2019).
- Mateos-naranjo, Enrique, Eloy M Castellanos, and Alfonso Perez-martin. 2014. "Zinc Tolerance and Accumulation in the Halophytic Species *Juncus Acutus*." *Environmental and Experimental Botany*

100: 114–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.12.023>.

Misra, Neha, Garima Gupta, and Prabhat N Jha. 2012. "Assessment of Mineral Phosphate-Solubilizing Properties and Molecular Characterization of Zinc-Tolerant Bacteria." *Journal of Basic Microbiology* 52(5): 549–58. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100257>.

Mucha, Ana P. et al. 2013. "Response of a Salt Marsh Microbial Community to Metal Contamination." *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 130: 81–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2013.01.016>.

Muysen, Brita T A, Karel A C De Schampheleere, and Colin R. Janssen. 2006. "Mechanisms of Chronic Waterborne Zn Toxicity in *Daphnia Magna*." *Aquatic Toxicology* 77(4): 393–401.

Nunes, Marta et al. 2015. "Response of Two Salt Marsh Plants to Short- and Long-Term Contamination of Sediment with Cadmium." : 722–31.

Philippot, Laurent, Jos M Raaijmakers, Philippe Lemanceau, and Wim H van der Putten. 2013. "Going Back to the Roots: The Microbial Ecology of the Rhizosphere." *Nature reviews. Microbiology* 11(11): 789–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24056930>.

Phillips, Lori A, Charles W Greer, Richard E Farrell, and James J Germida. 2012. "Plant Root Exudates Impact the Hydrocarbon Degradation Potential of a Weathered-Hydrocarbon Contaminated Soil." *Applied Soil Ecology* 52: 56–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.009>.

Qiu, Rong-Liang et al. 2008. "Antioxidative Response to Cd in a Newly Discovered Cadmium Hyperaccumulator, *Arabis Paniculata* F." *Chemosphere* 74(1): 6–12. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653508012332?via%3Dihub> (May 27, 2019).

Rajkumar, Mani et al. 2010. "Potential of Siderophore-Producing Bacteria for Improving Heavy Metal Phytoextraction." *Trends in Biotechnology* 28(3): 142–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.002>.

De Ridder-Duine, Annelies S. et al. 2005. "Rhizosphere Bacterial Community Composition in Natural Stands of *Carex Arenaria* (Sand Sedge) Is Determined by Bulk Soil Community Composition." *Soil Biology and Biochemistry* 37(2): 349–57.

Rodriguez, Rusty, and Regina Redman. 2008. "More than 400 Million Years of Evolution and Some Plants Still Can't Make It on Their Own: Plant Stress Tolerance via Fungal Symbiosis." *Journal of Experimental Botany* 59(5): 1109–14.

Santos, D., B. Duarte, and I. Caçador. 2014. "Unveiling Zn Hyperaccumulation in *Juncus Acutus*: Implications on the Electronic Energy Fluxes and on Oxidative Stress with Emphasis on Non-Functional Zn-Chlorophylls." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 140: 228–39. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134414002498?via%3Dihub> (May 28, 2019).

Schalk, Isabelle J, Mélissa Hannauer, and Armelle Braud. 2011. "New Roles for Bacterial Siderophores in Metal Transport and Tolerance." *Environmental Microbiology* 13(11): 2844–54. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x>.

Sharma, Rakesh Kumar, and G. Archana. 2016. "Cadmium Minimization in Food Crops by Cadmium Resistant Plant Growth Promoting Rhizobacteria." *Applied Soil Ecology* 107: 66–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.009>.

- Shi, Zhicheng. 1994. "Nickel Carbonyl: Toxicity and Human Health." *Science of the Total Environment*, The 148(2–3): 293–98.
- Syranidou, Evdokia et al. 2016. "Exploitation of Endophytic Bacteria to Enhance the Phytoremediation Potential of the Wetland Helophyte *Juncus Acutus*." *Frontiers in Microbiology* 7(JUL): 1–15.
- . 2017. "Bisphenol-A Removal by the Halophyte *Juncus Acutus* in a Phytoremediation Pilot: Characterization and Potential Role of the Endophytic Community." *Journal of Hazardous Materials* 323: 350–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.05.034>.
- . 2018. "Responses of the Endophytic Bacterial Communities of *Juncus Acutus* to Pollution With Metals, Emerging Organic Pollutants and to Bioaugmentation With Indigenous Strains." *Frontiers in Plant Science* 9(October): 1–14.
- Tiibingen, Universitttt. 1973. "Stoffwechselprodukte Von Mikroorganismen." 300: 285–300.
- Truyens, Sascha, Nele Weyens, Ann Cuypers, and Jaco Vangronsveld. 2015. "Bacterial Seed Endophytes: Genera, Vertical Transmission and Interaction with Plants." *Environmental Microbiology Reports* 7(1): 40–50. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12181>.
- Vangronsveld, Jaco et al. 2009. "Phytoremediation of Contaminated Soils and Groundwater: Lessons from the Field." *Environmental Science and Pollution Research* 16(7): 765–94.
- Vidali, M. 2001. "Bioremediation . An Overview \*." *Pure and Applied Chemistry* 73(7): 1163–72.
- Visioli, Giovanna. 2015. "Combined Endophytic Inoculants Enhance Nickel Phytoextraction from Serpentine Soil in the Hyperaccumulator *Noccaea Caerulescens*." 6(August).
- Vymazal, Jan. 2013. "The Use of Hybrid Constructed Wetlands for Wastewater Treatment with Special Attention to Nitrogen Removal: A Review of a Recent Development." *Water Research* 47(14): 4795–4811. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135413004375> (May 28, 2019).
- Wallin, Maria et al. 2016. "Low-Level Cadmium Exposure Is Associated with Decreased Bone Mineral Density and Increased Risk of Incident Fractures in Elderly Men: The MrOS Sweden Study." *Journal of Bone and Mineral Research* 31(4): 732–41.
- Wenzel, Walter W. 2009. "Rhizosphere Processes and Management in Plant-Assisted Bioremediation ( Phytoremediation ) of Soils." : 385–408.
- Weyens, Nele, Daniel van der Lelie, Safiyh Taghavi, and Jaco Vangronsveld. 2009. "Phytoremediation: Plant–Endophyte Partnerships Take the Challenge." *Current Opinion in Biotechnology* 20(2): 248–54. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166909000238> (May 20, 2019).
- Wu, Haiming et al. 2015. "A Review on the Sustainability of Constructed Wetlands for Wastewater Treatment: Design and Operation." *Bioresource Technology* 175: 594–601. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.068>.
- Wu, Xiaoqin, Jeremy L Conkle, Frederick Ernst, and Jay Gan. "Treated Wastewater Irrigation: Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Common Vegetables under Field Conditions." : 96.
- Zambelli, Barbara, Vladimir N. Uversky, and Stefano Ciurli. 2016. "Nickel Impact on Human Health: An Intrinsic Disorder Perspective." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1864(12): 1714–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.09.008>.

- Zhang, Chang et al. 2016. "Effects of Heavy Metals and Soil Physicochemical Properties on Wetland Soil Microbial Biomass and Bacterial Community Structure." *Science of the Total Environment* 557–558: 785–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.170>.
- Zubair, Mahrukh et al. 2016. "Rhizobacteria and Phytoremediation of Heavy Metals." *Environmental Technology Reviews* 5(1): 112–19. <http://dx.doi.org/10.1080/21622515.2016.1259358>.
- Μανουσάκη, Ελένη. 2008. "ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΓΙΑ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ Pb ΚΑΙ Cd ΑΠΟ ΡΥΠΑΣΜΕΝΑ ΕΔΑΦΗ."
- Μέθοδοι, Βιολογικές, Εξυγίανσης Περιβάλλοντος, and Μερσ Ιι. 2013. "Σημειώσεις."

## 7. Παραρτήματα

### 7.1 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων των controls για κάθε συγκέντρωση

#### 7.1.1 Ά κύκλος

Πίνακας 7. 1 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control χαμηλής συγκέντρωσης καδμίου + 869

low cd +869	
Time	C (mg/l)
t0	0.25
t11	0.29

Πίνακας 7. 2 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control υψηλής συγκέντρωσης καδμίου + 869

high cd +869	
Time	C (mg/l)
t0	0.53
t10	0.81

Πίνακας 7. 3 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control χαμηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου +869

low Zn +869	
Time	C (mg/l)
t0	40.76
t11	41.04

Πίνακας 7. 4 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου +869

high Zn +869	
Time	C (mg/l)
t0	96.10
t11	118.05

Πίνακας 7. 5 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control χαμηλής συγκέντρωσης νικελίου + 869

low Ni +869	
Time	C (mg/l)
t0	6.40
t14	7.64

Πίνακας 7. 6 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από control υψηλής συγκέντρωσης νικελίου + 869

high Ni +869	
Time	C (mg/l)
t0	14.10
t14	6.47

Πίνακας 7. 7 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από controls χαμηλών συγκεντρώσεων μίξης των τριών μετάλλων + 869

low mix+869			
Time	[Cd] (mg/l)	[Zn] (mg/l)	[Ni] (mg/l)
t0	0.19	101.78	9.44
t14	0.24	84.20	8.90

Πίνακας 7. 8 Αποτελέσματα συγκεντρώσεων από controls υψηλών συγκεντρώσεων μίξης των τριών μετάλλων + 869

low mix+869			
Time	[Cd] (mg/l)	[Zn] (mg/l)	[Ni] (mg/l)
t0	0.04	129.02	16.16
t14	0.04	141.48	13.22

### 7.1.2 'B κύκλος

Πίνακας 7. 9 Αποτελέσματα από control με συγκέντρωση καδμίου ίση με του υδροβιότοπου + (s.e+R.E)

[Cd]=0,02 mg/l (s.e + R.E)	C (mg/l)
t0	0.04
t11	0.01



Πίνακας 7. 10 Αποτελέσματα από control με συγκέντρωση ψευδαργύρου ίση με του υδροβιότοπου + (s.e+ R.E)

Zn=4mg/l (s.e + R.E)	C (mg/l)
t0	1.37
t9	4.61

Πίνακας 7. 11 Αποτελέσματα από control με συγκέντρωση νικελίου ίση με του υδροβιότοπου + (s.e + R.E)

[Ni]=0,4mg/l (s.e + R.E)	C (mg/l)
t0	0.42
t10	0.43

Πίνακας 7. 12 Αποτελέσματα από controls με συγκεντρώσεις μετάλλων ίσες με του υδροβιότοπου + (s.e +R.E)

	mix (s.e + R.E)		
Time	[Cd] (mg/l)	[Zn] (mg/l)	[Ni] (mg/l)
t0	0.02	2.08	0.37
t9	0.02	2.52	0.26