



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ - ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Δ.Π.Μ.Σ.)
"ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ"**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αντιδραστήρας θειοαναγωγικών βακτηρίων
για την επεξεργασία υγρών βιομηχανικών
αποβλήτων που περιέχουν μέταλλα**

Κουστένη Βασιλική
(Βιολόγος-Ωκεανογράφος)

Επιβλέπων καθηγητής:
Μ. Τσέζος, Σχολή Μηχ. Μεταλλείων – Μεταλλουργών

Εξεταστική επιτροπή:
Καθηγητής Μ. Τσέζος, Σχολή Μηχ. Μεταλλείων-Μεταλλουργών
Καθηγήτρια Μ. Λοϊζίδου, Σχολή Χημικών Μηχανικών
Καθηγητής Α. Ανδρεαδάκης, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών

**Περιβάλλον
και
Ανάπτυξη**

Αθήνα, Ιούλιος 2009

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

**ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ - ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Δ.Π.Μ.Σ.)
"ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ"**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αντιδραστήρας θειοαναγωγικών βακτηρίων
για την επεξεργασία υγρών βιομηχανικών
αποβλήτων που περιέχουν μέταλλα**

Κουστένη Βασιλική
(Βιολόγος-Ωκεανογράφος)

Επιβλέπων καθηγητής:
Μ. Τσέζος, Σχολή Μηχ. Μεταλλείων – Μεταλλουργών

Εξεταστική επιτροπή:
Καθηγητής Μ. Τσέζος, Σχολή Μηχ. Μεταλλείων-Μεταλλουργών
Καθηγήτρια Μ. Λοϊζίδου, Σχολή Χημικών Μηχανικών
Καθηγητής Α. Ανδρεαδάκης, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών

Αθήνα, Ιούλιος 2009

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας Περιβάλλοντος στη Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών του ΕΜΠ, στο πλαίσιο του Διεπιστημονικού-Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Περιβάλλον και Ανάπτυξη” του ΕΜΠ.

Με την ευκαιρία αυτού του προλόγου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Μάριο Τσέζο, Καθηγητή της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών του ΕΜΠ, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον και πρωτότυπο θέμα, την κ. Εμμανουέλλα Ρεμουντάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια της Σχολής Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών του ΕΜΠ, και τον Δρ. Αρτίν Χατζηκιοσεγιάν για την επίβλεψη και καθοδήγηση στην εκπόνηση του θέματος καθώς και στη συγγραφή του κειμένου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, την κ. Μ. Λοϊζίδου, Καθηγήτρια της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ και τον κ. Α. Ανδρεαδάκη, Καθηγητή της Σχολής Πολιτικών Μηχανικών του ΕΜΠ για τις καίριες παρατηρήσεις τους επί του κειμένου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Παυλίνα Κούση, υποψήφια διδάκτορα Μηχανικό Μεταλλείων – Μεταλλουργών του Ε.Μ.Π., χωρίς τη βοήθεια της οποίας, τόσο στο στήσιμο της πειραματικής διάταξης, στις πειραματικές μετρήσεις όσο και στην επεξεργασία των δειγμάτων και των αποτελεσμάτων δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση αυτής της δουλειάς.

Β.Κ.

Αθήνα,

Ιούλιος 2009

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η λειτουργία ενός βιολογικού αντιδραστήρα θειοαναγωγικών βακτηρίων, εργαστηριακής κλίμακας σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής, προκειμένου να αξιολογηθεί συγκριτικά το θρεπτικό υπόστρωμα μεταξύ δύο πηγών άνθρακα: γαλακτικού και αιθανόλης. Ο αντιδραστήρας λειτούργησε σε κλειστούς διαδοχικούς κύκλους τροφοδοσίας έπειτα από τον εμβολιασμό με μικτή καλλιέργεια θειοαναγωγικών βακτηρίων. Τέθηκε αρχικά σε λειτουργία με διάλυμα που περιείχε γαλακτικό νάτριο, θειικά ιόντα και σίδηρο (100 mg/l). Ακολούθησε η σταδιακή αντικατάσταση του γαλακτικού από αιθανόλη σε διάστημα 30 ημερών. Έπειτα προστέθηκαν τα μέταλλα: Zn, Cu, Ni σε συγκέντρωση 100 mg/l και έγινε η παρακολούθηση της απόδοσης του αντιδραστήρα ως προς την αναγωγή των θεικών ιόντων και την καταβύθιση των μετάλλων Fe, Zn, Cu και Ni. Στη συνέχεια η αιθανόλη ελαττώθηκε στη στοιχειομετρικά απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναγωγή των θεικών ιόντων. Μέσω της παρακολούθησης των παραμέτρων του pH, της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων, των ιόντων του δισθενούς θείου, του συνολικού οργανικού άνθρακα και των διαλυτών μετάλλων (παράμετροι λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα) διαπιστώθηκε η επιτυχής λειτουργία του αντιδραστήρα και η ανοχή του βακτηριακού πληθυσμού στις μεταβολές της σύστασης του διαλύματος τροφοδοσίας. Κύρια συμπεράσματα είναι ότι ο αντιδραστήρας λειτούργησε επιτυχώς καθ' όλη τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων όπως φαίνεται από την παραγωγή αλκαλικότητας, την αναγωγή των θεικών ιόντων, την οξείδωση του οργανικού υποστρώματος και την ποσοτική καταβύθιση των μετάλλων. Τέλος μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων λειτουργίας σε συνάρτηση με το χρόνο ξεκινώντας από καθορισμένες αρχικές συνθήκες (πειράματα κινητικής).

SUMMARY

In the present study, the operation of a laboratory-scale sulphate-reducing reactor, operating in upflow mode, is described under two different carbon sources/electron donors: lactate and ethanol. The bioreactor was operating continuously for 115 days at room temperature. A mixed culture of sulphate-reducing bacteria was added in the bioreactor along with a variation of Postgate's medium, containing lactate, sulphates and iron (Fe, 100 mg/l). Lactate feed was replaced stepwise with ethanol over 30 days. After the replacement of lactate by ethanol, ethanol was inserted in excess to sulphate with iron (Fe, 100 mg/l). In the following days three more heavy metals were inserted in the bioreactor (Zn, Cu and Ni). Finally, ethanol was added stoichiometrically to sulphate. Samples were taken systematically and apart from pH measurement the concentration of sulphates, sulphide, organic matter and soluble metals (operational parameters of the bioreactor) was determined. Out of these measurements it was concluded that the bioreactor was successfully adjusted to the changing medium. In specific as a result of the alkalinity generated during the SRB metabolism, pH reached a value of 7.5-8.5, sulphates were reduced, the organic substrate was oxidized and all metals were quantitatively precipitated. Apart from the experiments on the different carbon source, batch kinetic experiments were also conducted in the bioreactor starting with different conditions each time.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

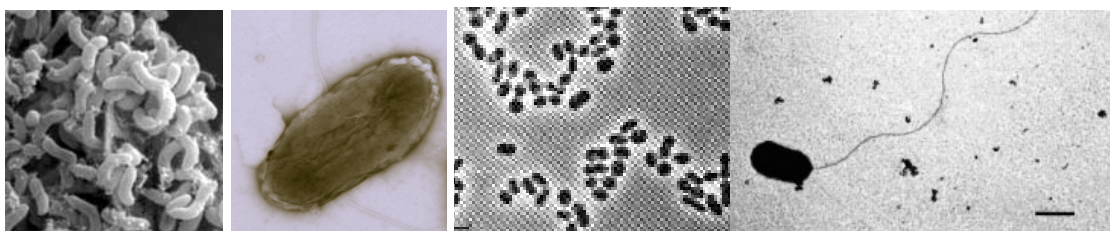
1 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑ	7
1.1. Σχηματισμός βιομεμβρανών στους βιοαντιδραστήρες.....	9
1.2. Σύσταση βιομεμβρανών.....	9
1.3. Παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό βιομεμβρανών.....	11
1.4. Μηχανισμοί ακινητοποίησης μετάλλων στις βιομεμβράνες.....	12
2 ΘΕΙΟΑΝΑΓΩΓΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (Sulphate-Reducing Bacteria, SRB)	14
2.1. Μεταβολισμός θειοαναγωγικών βακτηρίων.....	19
2.1.1. Πηγές άνθρακα.....	19
2.1.2. Πηγές θείου.....	22
2.2. Μεταβολισμός πηγών άνθρακα και ενέργειας από τα θειοαναγωγικά βακτήρια.....	23
2.2.1. Μεταβολισμός οξικού ιόντος.....	23
2.2.2. Μεταβολισμός προπιονικού ιόντος.....	25
2.2.3. Μεταβολισμός υδρογόνου.....	26
2.2.4. Μεταβολισμός αιθανόλης.....	28
2.3. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα θειοαναγωγικά βακτήρια.....	29
2.3.1. Διαλυμένο οξυγόνο.....	29
2.3.2. pH.....	29
2.3.3. Θερμοκρασία.....	31
2.3.4. Ιόντα θείου.....	33
2.3.5. Μέταλλα.....	35
2.4. Ρόλος θειοαναγωγικών βακτηρίων στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από υγρά απόβλητα... ..	35
3 ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ	38
3.1. Περιγραφή βιοαντιδραστήρων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.....	38
3.2. Τύποι βιοαντιδραστήρων.....	39
3.3. Κυκλοφορία θείου στους βιοαντιδραστήρες.....	42
3.4. Ανταγωνισμός μεταξύ διαφορετικών ομάδων βακτηρίων στους βιοαντιδραστήρες.....	44
3.5. Απομάκρυνση μετάλλων με αντιδραστήρες θειοαναγωγικών βακτηρίων.....	46
3.6. Πλεονεκτήματα της θειοαναγωγικής επεξεργασίας σε βιοαντιδραστήρες.....	47
4 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	48
5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
5.1. Περιγραφή πειραματικής διάταξης.....	49
5.2. Αρχικές συνθήκες λειτουργίας.....	50
5.3. Σειρές πειραμάτων-Κύκλοι λειτουργίας αντιδραστήρα σε κλειστό κύκλωμα.....	51
5.4. Παρακολούθηση παραμέτρων λειτουργίας.....	54
5.4.1. pH.....	54
5.4.2. Συγκέντρωση θειικών ιόντων (SO_4^{2-}).....	54
5.4.3. Συγκέντρωση ιόντων του δισθενούς θείου (S^{2-}).....	55
5.4.4. Συγκέντρωση οργανικών συστατικών.....	55
5.4.4.1. Χημικός απαιτούμενου οξυγόνου (Chemical Oxygen Demand, COD).....	56
5.4.4.2. Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (Total Organic Carbon, TOC).....	57
5.4.5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης διαλυτών μετάλλων.....	58

6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
6.1. Μεταβολή του pH.....	60
6.2. Συγκέντρωση των θειικών ιόντων και των ιόντων του δισθενούς θείου.....	65
6.3. Κατανάλωση οργανικού άνθρακα	71
6.4. Καταβύθιση μετάλλων.....	73
6.5. Κινητική μελέτη παραμέτρων.....	78
6.5.1. Μεταβολή του pH.....	78
6.5.2. Αναγωγή των θειικών ιόντων.....	79
6.5.3. Κατανάλωση οργανικού άνθρακα.....	81
6.5.4. Μεταβολή της συγκέντρωσης διαλυτών μετάλλων.....	83
6.5.5. Σειρά καταβύθισης μετάλλων.....	85
7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90

1. ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΜΕΤΑΛΛΑ

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια (Sulphate-Reducing Bacteria, SRB) συνιστούν μια μεγάλη ομάδα ευρέως εξαπλωμένων αναερόβιων οργανισμών που διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο σε αρκετές βιογεωχημικές διαδικασίες (Εικόνα 1). Το ιδιαίτερα υψηλό ενδιαφέρον στη μελέτη τους έγκειται στο ότι, όχι μόνο αποτελούν μια ομάδα από τους πρωταρχικούς οργανισμούς της βιόσφαιρας, αλλά και στο ότι οι μηχανισμοί του μεταβολισμού τους δια φωτίζουν τα όρια της ζωής σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου. Σήμερα, τα θειοαναγωγικά βακτήρια αποτελούν αντικείμενο μελέτης της γενομικής (επιστήμη που μελετά το γονιδίωμα των οργανισμών) που συνεισφέρει στην κατανόηση των βασικών βιοχημικών τους μηχανισμών και στην ανάπτυξη καινοτόμων τεχνικών για την ανάλυση του ρόλου που διαδραματίζουν στο περιβάλλον (Barton & Hamilton, 2007).

Είναι γνωστό, ότι οι μονοκύτταροι οργανισμοί εκτός από τον καθοριστικό ρόλο που διαδραματίζουν στη λειτουργία των οικοσυστημάτων, αποτελούν ένα ισχυρό μέσο, το οποίο χρησιμοποιείται στην Περιβαλλοντική Μηχανική για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων (Τσέζος & Ρεμουντάκη, 2006). Εξαιτίας των πολλών προβλημάτων που εμφανίζουν οι χημικές μέθοδοι (π.χ. υψηλό κόστος λειτουργίας και συντήρησης, παραγωγή μεγάλης ποσότητας ιλύος κ.α.) στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων, έχουν γίνει προσπάθειες να αναπτυχθούν εναλλακτικές βιολογικές μέθοδοι, όπως η κλασσική βιολογική επεξεργασία και η χρήση των θειοαναγωγικών βακτηρίων σε συστήματα βιολογικών αντιδραστήρων (Φίλιππας, 2007).



Desulfovibrio vulgaris *Desulfuromonas acetoxidans* *Desulfosarcina variabilis* *Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum* sp.

Εικόνα 1. Είδη θειοαναγωγικών βακτηρίων (<http://images.google.gr>).

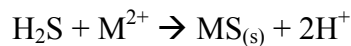
Στην κλασσική βιολογική επεξεργασία των υγρών αποβλήτων τα βακτήρια χρησιμοποιούνται ως ένα είδος «εργατικού δυναμικού», τα οποία μέσω των μεταβολικών τους διεργασιών καταλύουν πολλές αντιδράσεις π.χ. την αναγωγή των θειικών ιόντων σε θειούχα, που διαφορετικά θα πραγματοποιούνταν πολύ αργά ή

καθόλου. Το αποτέλεσμα είναι η οξείδωση του οργανικού φορτίου και η μετατροπή των ρυπογόνων συστατικών σε βιομάζα, η οποία διαχωρίζεται εύκολα από το υγρό, και σε περιβαλλοντικά «ανεκτές» ανόργανες ουσίες όπως CO₂ και αέριο άζωτο (Droste, 1997).

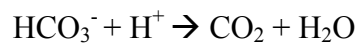
Στα συστήματα βιολογικών αντιδραστήρων, τα θειοαναγωγικά βακτήρια οξειδώνουν απλές οργανικές ενώσεις (π.χ. γαλακτικό οξύ) (Zellner, 1994) κάτω από αναερόβιες συνθήκες και μετατρέπουν τα θειικά ιόντα που είναι παρόντα στα υγρά απόβλητα σε υδρόθειο και διττανθρακικά ιόντα σύμφωνα με την αντίδραση:



Έπειτα το υδρόθειο αντιδρά με δισθενή ιόντα διαλυτών μετάλλων (M: Zn, Fe, Cu, Ni, Pb και Cd), τα οποία καταβυθίζονται ως θειούχα μέταλλα σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση (Kaksonen *et al.*, 2003a; Kaksonen & Puhakka, 2007; Kousi *et al.*, 2007).



Τα διττανθρακικά ιόντα αντιδρούν με τα πρωτόνια για το σχηματισμό CO₂ και νερού, απομακρύνοντας την οξύτητα από το διάλυμα με τη μορφή CO₂ :



Κάποια ποσότητα H₂S διαφεύγει στην ατμόσφαιρα. Το pH των υγρών αποβλήτων, η αρχική συγκέντρωση του διαλυόμενου H₂S και η θερμοκρασία καθορίζουν την ποσότητα του υδρόθειου που θα διαφύγει στην ατμόσφαιρα. Σε pH 7, το H₂S αντιπροσωπεύει το 50% των διαλυόμενων θειούχων ενώσεων στα υγρά απόβλητα. Με την μείωση του pH ή της θερμοκρασίας η συγκέντρωση του διαλυμένου H₂S αυξάνεται (Gerardi, 2006).

Το H₂S και το HCO₃⁻ που σχηματίζονται κατά τη θειοαναγωγή ισοσταθμίζονται σε ένα μίγμα H₂S, HS⁻, S²⁻, CO₂, το οποίο καθιστά το pH ουδέτερο ως ελαφρά αλκαλικό (Dvorak *et al.*, 1992). Η αύξηση του pH του όξινου διαλύματος μπορεί να προκαλέσει την υδρόλυση ορισμένων μετάλλων και την καταβύθισή τους ως αδιάλυτα υδροξείδια ή οξείδια. Με βάση τα παραπάνω είναι εμφανές το πλεονέκτημα της ταυτόχρονης απομάκρυνσης των μετάλλων και των θειικών ιόντων (Kousi *et al.*, 2007). Γενικά, τα θειούχα μέταλλα είναι λιγότερο διαλυτά από τα αντίστοιχα υδροξείδιά τους, γεγονός που επιτρέπει την καταβύθιση των μετάλλων

(Rittmann & McCarty, 2001). Ακόμα, τα θειούχα μέταλλα είναι περισσότερο συμπαγή και καθιζάνουν με μεγαλύτερη ταχύτητα (Hammack *et al.*, 1994).

Για την κατανόηση της λειτουργίας των διεργασιών της αποικοδόμησης οργανικών μορίων καθώς και της λειτουργίας των εγκαταστάσεων βιολογικής επεξεργασίας αποβλήτων είναι απαραίτητη η γνώση του τρόπου με τον οποίο αναπτύσσονται οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών και ιδιαίτερος των βακτηρίων (Τσέζος & Ρεμουντάκη, 2006).

Στην παρούσα εργασία, αρχικά πραγματοποιήθηκε εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση των βασικών χαρακτηριστικών των θειοαναγωγικών βακτηρίων με έμφαση στο μεταβολισμό τους και στους παράγοντες που επιδρούν στην ανάπτυξή τους. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η εφαρμογή τους σε βιολογικό αντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας, σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής, προκειμένου να αξιολογηθεί συγκριτικά το θρεπτικό υπόστρωμα μεταξύ δύο πηγών άνθρακα (γαλακτικού και αιθανόλης) καθώς και η ποσοτική καταβύθιση ιόντων μετάλλων από υγρά απόβλητα πλούσια σε θειικά ιόντα. Σε αυτό το πλαίσιο, διερευνήθηκε η απόδοση και η κινητική της διεργασίας με χρήση αιθανόλης ως αποκλειστικής πηγής άνθρακα και ηλεκτρονίων.

1.1. Σχηματισμός βιομεμβρανών στους βιοαντιδραστήρες

Η απόδοση ενός βιολογικού αντιδραστήρα εξαρτάται από τη δράση των βιομεμβρανών (biofilms) που αναπτύσσονται στο εσωτερικό του, οι οποίες επηρεάζουν την αποκόλληση μέρους της βιομάζας από τα ενεργά βιολογικά καλύμματα, μια διαδικασία που διατηρεί το υπόλοιπο φιλμ σε μια πιο ενεργή κατάσταση, αλλά οδηγεί ακόμα στη συγκέντρωση διαλυμένων αιωρούμενων στερεών στη απορροή, τα οποία θα πρέπει να απομακρυνθούν πριν την τελική απόρριψη του υγρού αποβλήτου στο περιβάλλον (Bishop, 2003).

1.2. Σύσταση βιομεμβρανών

Οι βιομεμβράνες (biofilms) αποτελούνται από μικροοργανισμούς ακινητοποιημένους σε ένα ετερογενές υλικό το οποίο αποτελείται από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (Extracellular Polymeric Substances, EPS), νερό καθώς και ουσίες διάσπαρτες στα ενδιάμεσα κενά. Σε σύγκριση με τις βακτηριακές καλλιέργειες που αναπτύσσονται σε αιωρήματα, οι βιομεμβράνες είναι πιο συμπαγείς και πιο ανθεκτικές σε αφιλόξενα

περιβάλλοντα. Γενικά έξι κατηγορίες συστατικών μπορούν να διακριθούν σε μία βιομεμβράνη (Πίνακας 1) (Hullebusch *et al.*, 2003).

Οι βιομεμβράνες αποτελούνται από κύτταρα μικροβίων και τα προϊόντα τους (εξωκυτταρικά πολυμερή). Έχουν μια εξαιρετικά πορώδη δομή που βρίσκεται σε συμφωνία με την υψηλή ποσότητα νερού (95%) που περιέχουν. Οι βιομεμβράνες απομονώνουν ιχνοστοιχεία, θρεπτικά συστατικά και μέταλλα από την υδατική φάση με την οποία έρχονται σε επαφή. Στη φύση, οι βιομεμβράνες που αποτελούνται από ένα είδος βακτηρίων είναι σχετικά σπάνιες. Κατά συνέπεια, οι περισσότερες βιομεμβράνες αποτελούνται από ένα μίγμα διαφορετικών μικροοργανισμών και μπορούν να περιλαμβάνουν ομάδες από υψηλά τροφικά επίπεδα όπως τα πρωτόζωα (βλεφαριδοφόρα και τροχόζωα) και μετάζωα (σκουλήκια και μύγες) (Hullebusch *et al.*, 2003).

Πίνακας 1. Ολική σύσταση μικροβιακών βιομεμβρανών (Hullebusch *et al.*, 2003).

Σύσταση βιομεμβρανών	
1	Εξωκυτταρικά πολυμερή (EPS) με: <ul style="list-style-type: none"> – κατιονικές ομάδες στους αμινοσακχαρίτες και πρωτεΐνες (π.χ. $-\text{NH}_3^+$) – ανιονικές ομάδες σε ουρονικά οξέα και πρωτεΐνες (π.χ. $-\text{COO}^-$; $-\text{HPO}_4^-$) – απολικές ομάδες από πρωτεΐνες (όπως στα αρωματικά αμινοξέα) – ομάδες με ισχυρό δυναμικό δεσμών με υδρογόνο (όπως οι πολυσακχαρίτες)
	Κυτταρική μεμβράνη
2	Εξωτερική μεμβράνη και: <ul style="list-style-type: none"> – λιποπολυσακχαρίτες των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων με τη λιπιδική τους μεμβράνη – τα λιποτεχονικά οξέα στα κατά Gram θετικά βακτήρια
3	Κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλομουραμικό οξύ, προσφέροντας κατιονικές και ανιονικές περιοχές
4	Κυτοπλασματική μεμβράνη, που προσφέρει μια λιπόφιλη περιοχή
5	Κυτόπλασμα, ως υδάτινη φάση διαχωρισμένη από το περιβάλλον νερό
	Μεταλλεύματα
6	Κατακρημνίσματα (υδροξείδια, θειούχα, φωσφορικά κ.α.) Ελεύθερα και δεσμευμένα μέταλλα

Τα βακτήρια κατατάσσονται στα Gram-θετικά ή Gram-αρνητικά ανάλογα με το αν βάφονται ή όχι από το κρυσταλλικό ιώδες. Αυτή η κατάταξη διαχωρίζει τα βακτήρια σε δύο κύριες ομάδες που διαφέρουν ως προς τα χαρακτηριστικά του κυτταρικού τους τοιχώματος. Και οι δύο τύποι κυτταρικού τοιχώματος διαθέτουν ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης που περιβάλλει πλήρως το κύτταρο και είναι πλούσιο σε

καρβοξυλικές ομάδες. Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης στα κατά Gram-θετικά βακτήρια έχει μεγαλύτερο πάχος (25 nm) από ό,τι στα κατά Gram-αρνητικά βακτήρια (7.5 nm). Ακόμα στα κατά Gram-θετικά βακτήρια το στρώμα πεπτιδογλυκάνης εμπεριέχει δευτερογενή πολυμερή που αυξάνουν την διαδραστική φύση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ στα κατά Gram-αρνητικά βακτήρια, μια μεμβράνη που βρίσκεται εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος, αποτελείται από λιποπολυσακχαρίτες (LPS), πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια (Hullebusch *et al.*, 2003).

Η βιομεμβράνη παρέχει ένα σχεδόν άπειρο εύρος εξωκυτταρικών πολυμερών (EPS). Η σύσταση του βακτηριακού EPS είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας. Τυπικά συστατικά του EPS είναι κυρίως πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες, που συχνά συνοδεύονται από νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια ή χουμικές ενώσεις. Αυτά τα EPS μόρια περιέχουν ιονίζουσες λειτουργικές ομάδες όπως καρβοξυλικές, φωσφορικές ομάδες και αμινομάδες. Το φορτίο που φέρουν αυτές οι λειτουργικές ομάδες καθιστά ικανό το βακτηριακό EPS να απομονώνει ιχνοστοιχεία, θρεπτικά συστατικά και τοξικά μέταλλα (Hullebusch *et al.*, 2003).

Οι βιομεμβράνες διαθέτουν μια πληθώρα φυσικών και χημικών ιδιοτήτων, όπως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου και δυνάμεις διασποράς London, οι οποίες είναι οι κυρίαρχες δυνάμεις μεταξύ των μακρομορίων των βιομεμβρανών. Το EPS των γειτονικών μικροβιακών κυττάρων μπορεί να σχηματίσει ένα διασταυρωμένο δίκτυο με γέφυρες κατιόντων και έτσι να καταστήσει πιο ισχυρή τη δομική ακεραιότητα της βιομεμβράνης. Τα εξωκυτταρικά πολυμερή στις βιομεμβράνες συμβάλλουν στην επιφανειακή προσκόλληση των βακτηρίων και στη δομή της βιομεμβράνης. Η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με άλλους πολυσακχαρίτες, μακρομόρια και κύτταρα, καθώς και με ιόντα και χαμηλού μοριακού βάρους διαλυόμενες ουσίες, προσφέρει μια ποικιλία φυσικών (π.χ. πορώδες) και χημικών μικροπεριβαλλόντων σε μία βιομεμβράνη (Hullebusch *et al.*, 2003).

1.3. Παράγοντες που ευνοούν το σχηματισμό βιομεμβρανών

Στους βιολογικούς αντιδραστήρες, η επιλογή του κατάλληλου υποστρώματος για την ακινητοποίηση της βιομάζας είναι μεγάλης σημασίας για τη διατήρηση σταθερού και ενεργού βιολογικού φιλμ που οδηγεί σε υψηλή αποδοτικότητα του αντιδραστήρα (Oliveira *et al.*, 2003). Το υλικό από το οποίο θα αποτελείται το υπόστρωμα θα πρέπει να ευνοεί τη βακτηριακή προσκόλληση, καθώς και να παρέχει μια μεγάλη

ελεύθερη επιφάνεια. Μια γρήγορη και ομοιόμορφη προσκόλληση των μικροοργανισμών στην επιφάνεια του υποστρώματος μειώνει και τον αρχικό χρόνο εκκίνησης του αντιδραστήρα (Qureshi *et al.*, 2005).

Υλικά με ανώμαλη επιφάνεια προσφέρουν μεγαλύτερη επιφάνεια για την προσκόλληση των βακτηρίων. Ο σχηματισμός βιομεμβράνης ευνοείται και σε πορώδη υλικά. Οι υδραυλικές διατμητικές τάσεις είναι πολύ ασθενείς στο εσωτερικό των πόρων ακόμα και σε συνθήκες υψηλής ροής του ρεύματος τροφοδοσίας, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό για την αποφυγή της έκπλυσης της ακινητοποιημένης βιομάζας εντός του αντιδραστήρα. Οι πόροι παρέχουν ένα «προστατευόμενο» περιβάλλον για την προσκόλληση και ανάπτυξη των βακτηρίων (Oliveira *et al.*, 2003).

Ακόμα, ο σχηματισμός της βιομεμβράνης ευνοείται και με την υδροφοβικότητα της επιφάνειας του υλικού (Qureshi *et al.*, 2005). Στα βιολογικά συστήματα, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι συνήθως πιο δυνατές από όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και μπορούν να οριστούν ως η έλξη ανάμεσα σε μη πολικά ή ελαφρώς πολικά μόρια, σωματίδια ή κύτταρα, όταν αυτά αναπτύσσονται στο νερό (Oliveira *et al.*, 2003). Οι βιομεμβράνες σχηματίζονται πιο γρήγορα στο τεφλόν και σε άλλα πλαστικά από ότι στο γυαλί ή σε μέταλλα (Qureshi *et al.*, 2005).

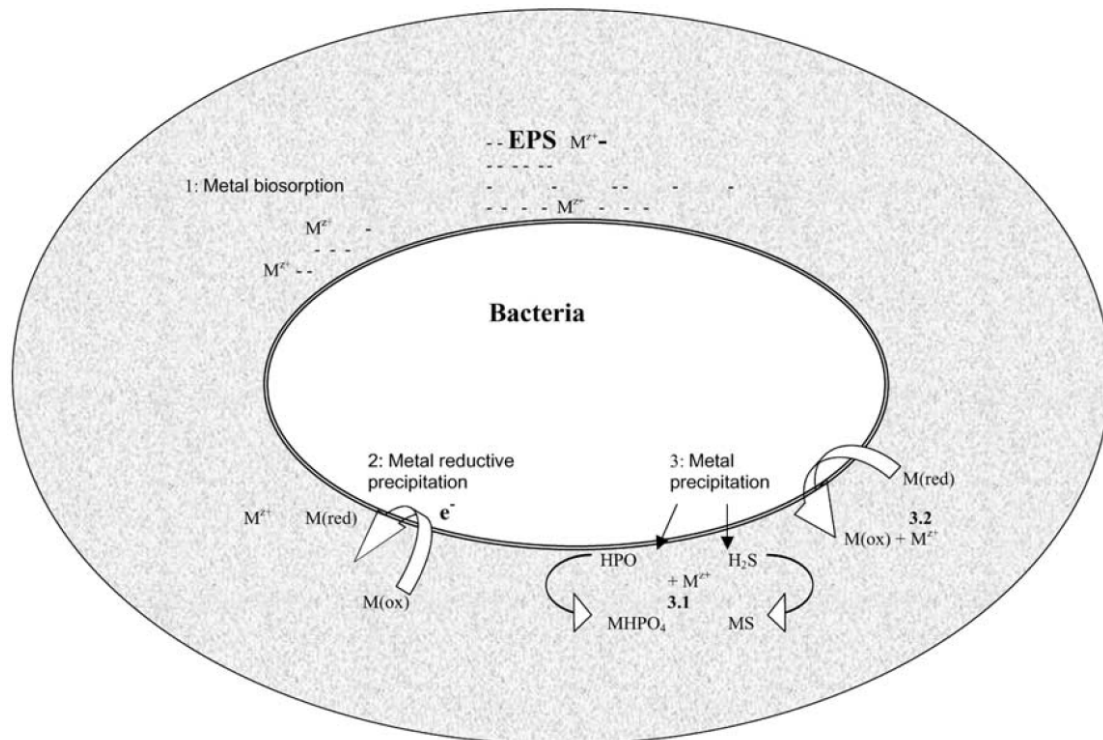
Η ποσότητα και η ποιότητα των θρεπτικών στοιχείων επηρεάζει το ρυθμό βακτηριακής ανάπτυξης (Qureshi *et al.*, 2005). Ακόμα η θερμοκρασία και το pH στο εσωτερικό του αντιδραστήρα επιδρούν στην βακτηριακή ανάπτυξη. Οι ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξής τους είναι θερμοκρασίες μεταξύ 25 και 45°C και ένα εύρος pH 6,3-8,5 (Droste, 1997).

1.4. Μηχανισμοί ακινητοποίησης μετάλλων στις βιομεμβράνες

Στις βιομεμβράνες η απομάκρυνση των μετάλλων λαμβάνει χώρα με μια ποικιλία μηχανισμών οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η βιοαπορρόφηση, η καθίζηση ως θειούχες ή φωσφορικές ενώσεις και η μικροβιακή αναγωγική καθίζηση.

Η βιοαπορρόφηση και βιορόφηση περιλαμβάνει αρκετούς μηχανισμούς οι κυριότεροι από τους οποίους είναι η ιοντοανταλλαγή, ο σχηματισμός χηλικών ενώσεων, η απορρόφηση και η διάχυση στα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες. Η βιοαπορρόφηση περιλαμβάνει εκείνους τους φυσικο-χημικούς μηχανισμούς όπου τα μέταλλα απομακρύνονται από υδατικά διαλύματα. Αυτό το φαινόμενο συχνά αποδίδεται στη δέσμευση των μετάλλων πάνω στη βακτηριακή επιφάνεια. Γενικά τα κατά Gram-θετικά βακτήρια έχουν μεγαλύτερη απορροφητική ικανότητα λόγω του

παχύτερου στρώματος πεπτιδογλυκάνης που διαθέτουν. Γενικά, πιστεύεται ότι το EPS παίζει ουσιαστικό ρόλο στην απορρόφηση και προσρόφηση των ανόργανων ουσιών από τις βιομεμβράνες. Ακόμα έρευνες έδειξαν ότι το EPS παίζει σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση των βαρέων μετάλλων (Εικόνα 2). Οι συγκεντρώσεις των περιοχών με ηλεκτροστατικές δυνάμεις στο EPS μια βιομεμβράνης θειοαναγωγικών βακτηρίων ήταν 20 και 30 φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες περιοχές που βρέθηκαν στην επιφάνεια της βακτηριακής κυτταρικής επιφάνειας (Hullebusch *et al.*, 2003).



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στα μέταλλα και τις βιομεμβράνες. (Hullebusch *et al.*, 2003).

- 1: βιοαπορρόφηση μετάλλων από το βακτηριακό EPS
- 2: Αναγωγική καθίζηση μετάλλων μέσω ενζυματικής μετατροπής
- 3: καθίζηση μετάλλων
 - 3.1: καθίζηση μετάλλων ως θειούχες ή φωσφορικές ενώσεις
 - 3.2: καθίζηση μετάλλων ως οξείδια βιογενούς προέλευσης (σίδηρος και μαγγάνιο) και απορρόφηση μετάλλου από οξείδια βιογενούς προέλευσης.

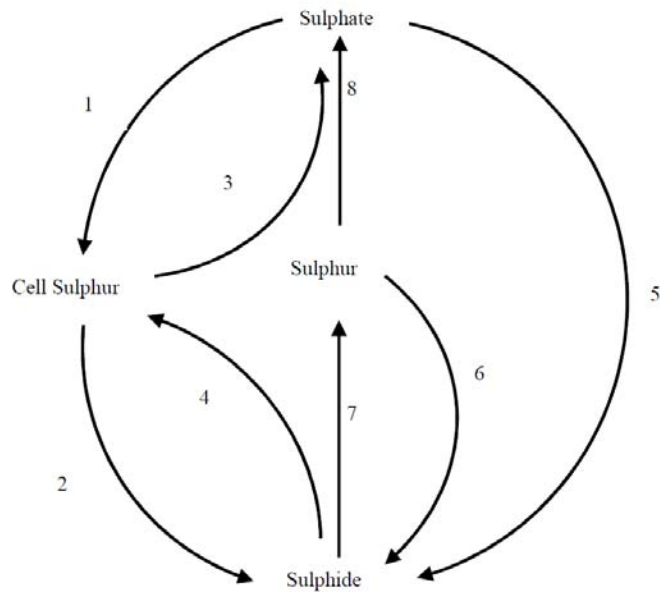
Η απομάκρυνση των μετάλλων μπορεί ακόμα να επιτευχθεί με τη βοήθεια των θειοαναγωγικών βακτηρίων τα οποία μέσω του μεταβολισμού τους, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, παράγουν ιόντα του δισθενούς θείου τα οποία απομακρύνουν ένα πλήθος μετάλλων π.χ. Zn, Cu, Pb, Ni και Cd από τα υγρά απόβλητα με τη μορφή ισχυρά αδιάλυτων θειούχων ενώσεων π.χ. ZnS, CdS, CuS και

FeS. Τα μέταλλα μπορούν ακόμα να απομακρυνθούν ως φωσφορικές ενώσεις (Hullebusch *et al.*, 2003).

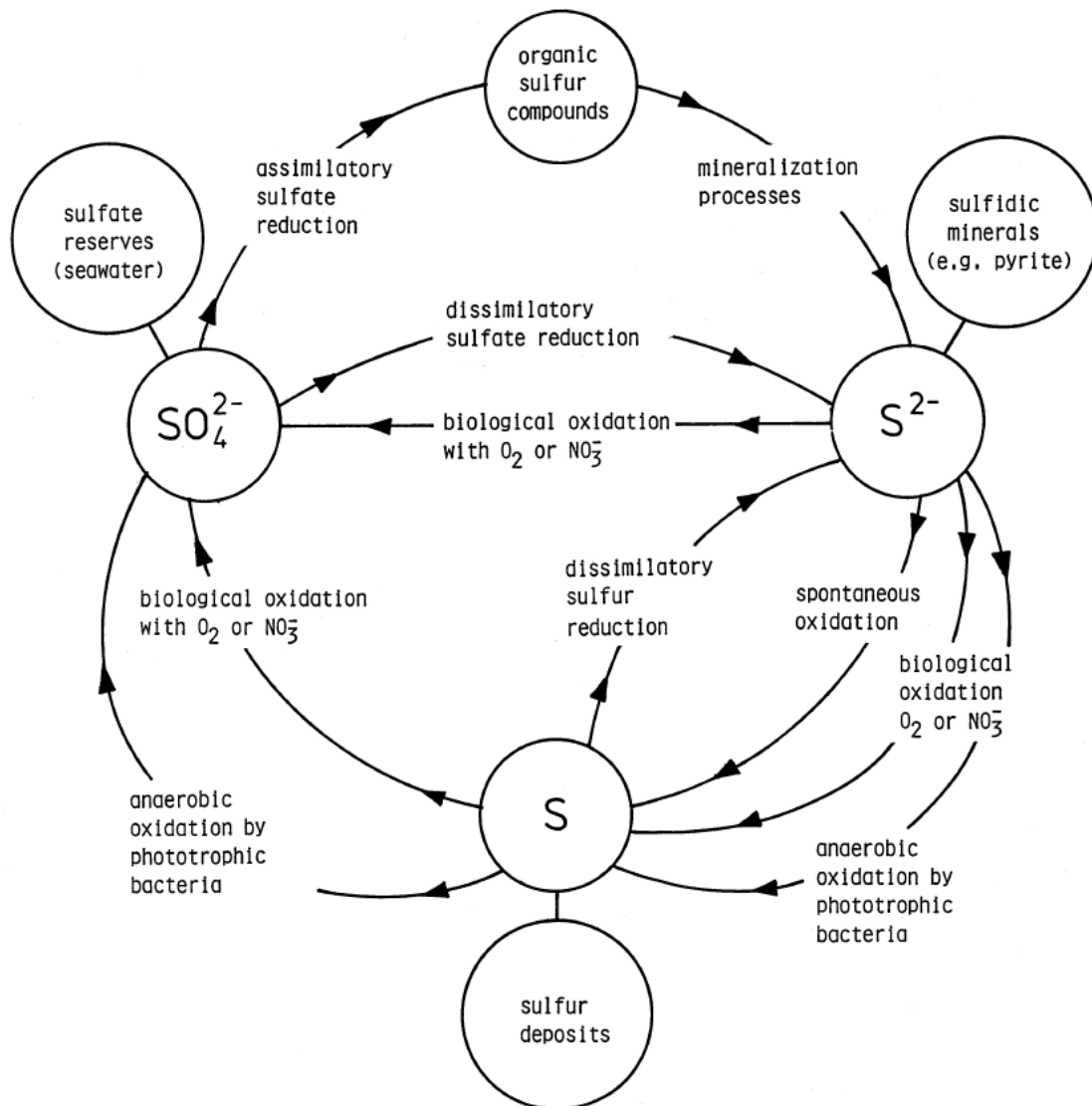
Τέλος ορισμένα βαρέα μέταλλα (π.χ. Cr, Mo, Se, U, Pd και Au) μπορούν να ακινητοποιηθούν στις βιομεμβράνες μέσω της ενζυμικής αναγωγής τους σε μια αδιάλυτη κατάσταση χαμηλότερου δυναμικού οξειδοαναγωγής. Η κινητικότητα των περισσότερων από τα παραπάνω μέταλλα στο περιβάλλον εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κατάσταση της χημικής τους οξείδωσης. Σε οξειδωτικές συνθήκες, απαντούν με τη μορφή ισχυρά διαλυτών ιόντων ενώ σε αναγωγικές συνθήκες συνήθως είναι αδιάλυτα. Ένας δότης ηλεκτρονίων όπως το γαλακτικό ιόν ή το υδρογόνο χρειάζεται για την αναγωγή των μετάλλων Cr(VI), Mo(VI), Se(VI) και U(VI). Έρευνες έδειξαν ακόμα, ότι αυτά τα μέταλλα ακινητοποιούνται ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά ανάλογα στους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αναγωγή. Για παράδειγμα, μελέτες έδειξαν ότι η καθίζηση του Pd γίνεται στο περίπλασμα, ενώ η καθίζηση του Mo γίνεται εξωκυτταρικά (Hullebusch *et al.*, 2003).

2. ΘΕΙΟΑΝΑΓΩΓΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (Sulphate-Reducing Bacteria, SRB)

Η θειοαναγωγή συνιστά ένα κομμάτι του βιολογικού κύκλου του θείου στο περιβάλλον (Εικόνα 3). Τα πράσινα φυτά και ορισμένοι μικροοργανισμοί καταναλώνουν το θείο με τη μορφή των θειικών ιόντων (SO_4^{2-}) με σκοπό τη σύνθεση αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και ποικίλων συνενζύμων που περιέχουν θείο. Τα αμινοξέα χρησιμοποιούνται από τα φυτά για τη σύνθεση πρωτεϊνών (Postgate, 1984) και όταν με τη σειρά τους καταναλώνονται από τα ζώα, το θείο που υπάρχει στις πρωτεΐνες επιστρέφει στο περιβάλλον υπό την ανηγμένη μορφή του (S^-) μέσω των ζωικών εκκρίσεων και της βακτηριακής αποσύνθεσης της νεκρής οργανικής ύλης (αναβολική αναγωγή SO_4^{2-}). Τα θειοαναγωγικά βακτήρια (Sulphate-Reducing Bacteria, SRB), συνιστούν μια σημαντική ομάδα αναερόβιων μικροοργανισμών και ανάγουν τα θειικά ιόντα (SO_4^{2-}) σε ιόντα του δισθενούς θείου (S^-) παρουσία μιας πηγής άνθρακα (π.χ. οξικό, γαλακτικό ιόν κ.α.), τα οποία στη συνέχεια οξειδώνονται σε θειικά ιόντα μέσω των θείο-οξειδωτικών βακτηρίων (Sulphate-Oxidising Bacteria, SOB) παρουσία αέρα ή νιτρικών ιόντων (καταβολική θειοαναγωγή) (Barton & Tomei, 1995).



1. Αναβολική αναγωγή SO_4^{2-} από βακτήρια, μύκητες κ.α.
2. Βακτηριακή αποσύνθεση οργανισμών
3. Απέκκριση θείου από τους οργανισμούς
4. Πρόσληψη $\text{S}^=$ από βακτήρια
5. Καταβολική θειοαναγωγή
6. Καταβολική αναγωγή στοιχειακού θείου
7. Οξείδωση $\text{S}^=$ (χημειότροφα και φωτότροφα)
8. Οξείδωση θείου (χημειότροφα και φωτότροφα)



Εικόνα 3. Βιολογικός κύκλος του θείου (πάνω Barton & Tomei, 1995; κάτω Lens & Kuenen, 2001).

Αν και η μελέτη σχετικά με τα βακτήρια που συμμετέχουν στον κύκλο του θείου ξεκίνησε από τη δεκαετία του 80 από τους διάσημους μικροβιολόγους Winogradsky και Beijerinck, σήμερα αναμένονται να γίνουν πολλές νέες ανακαλύψεις σχετικά με το μεταβολισμό, τη φυλογένεση και την οικολογική συμπεριφορά τους. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας για το βιολογικό κύκλο του θείου είναι ιδιαίτερα μεγάλο, εξαιτίας της ανακάλυψης πολλών οργανισμών που ζουν τόσο στα βαθιά νερά και σε άλλα περιβάλλοντα με ακραίες συνθήκες (π.χ. μεγάλη αλατότητα, χαμηλό/υψηλό pH ή χαμηλή/υψηλή θερμοκρασία) όσο και σε περιβάλλοντα βιοαντιδραστήρων (Lens & Kuenen, 2001).

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια ανήκουν σε μία από τις 5 κυριότερες ομάδες βακτηρίων που αλληλεπιδρούν με ενώσεις του θείου (Πίνακας 2). Συχνά αναπτύσσονται παρουσία και άλλων βακτηρίων, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον εντοπισμό τους με τη βοήθεια μικροσκοπίου. Εκτός από συγκεκριμένα περιβάλλοντα, όπως οι αναερόβιοι αντιδραστήρες, όπου κυριαρχούν, σε άλλα περιβάλλοντα υπερνικούνται από άλλες ομάδες βακτηρίων (Gerardi, 2006).

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια συνιστούν μια ομάδα μεταβολικά ευέλικτων μικροοργανισμών που ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες και γένη. Πρόκειται για υποχρεωτικά αναερόβιους οργανισμούς που χρησιμοποιούν θειικά ιόντα ή άλλες οξειδωμένες ενώσεις του θείου ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων (Lens & Kuenen, 2001). Τα κύρια θειοαναγωγικά βακτήρια ανήκουν στα γένη *Desulfovibrio* (Gram-αρνητικό βακτήριο) και *Desulfotomaculum* (Gram-θετικό βακτήριο) (Gerardi, 2006).

Τυπικές πηγές άνθρακα και ενέργειας (δότες ηλεκτρονίων) που χρησιμοποιούν είναι το γαλακτικό ιόν, η αιθανόλη, το προπιονικό ιόν και το H_2 (Πίνακας 3). Επειδή το θειικό ιόν είναι ένα αρκετά σταθερό μόριο, πρέπει αρχικά να ενεργοποιηθεί με την κατανάλωση 2 μορίων ATP ανά μόριο θειικών ιόντων. Έτσι προκύπτουν τα αδενόσινο 5'-φωσφοθειικά ιόντα (Adenosine 5'-phosphosulfate, APS) τα οποία, στην περίπτωση της καταβολικής θειοαναγωγής, ανάγονται απευθείας σε θειώδη ιόντα και περαιτέρω σε H_2S . Το H_2S συνιστά πάντα το τελικό προϊόν και μέχρι στιγμής δεν έχει αναφερθεί η ατελής αναγωγή των θειικών ιόντων σε S^0 . Ένας πιθανός βιοχημικός λόγος είναι ότι, το ενδοκυτταρικό τελικό προϊόν, διαλυμένο HS^- , εκκρίνεται εύκολα από το κύτταρο ενώ η έκκριση του στερεού S^0 μπορεί να προκαλέσει κάποιο βιοχημικό πρόβλημα στα κύτταρα. Συνεπώς, δεν μπορεί να γίνει ο σχηματισμός του S^0 σε ένα αναερόβιο αντιδραστήρα. Ένα πρακτικό μειονέκτημα της

παραγωγής θείου υπό αναερόβιες συνθήκες είναι ότι το θείο αντιδρά με τα ιόντα του δισθενούς θείου δίνοντας πολύ τοξικά πολυθειούχα ιόντα. (Lens & Kuenen, 2001).

Για την περιβαλλοντική βιοτεχνολογία, είναι αναγκαίο να γίνει ο διαχωρισμός ανάμεσα στα ετερότροφα και αυτότροφα θειοαναγωγικά βακτήρια. Τα ετερότροφα θειοαναγωγικά βακτήρια χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα τις οργανικές ενώσεις ενώ τα αυτότροφα χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα το CO₂ ενώ τα ηλεκτρόνια προέρχονται από την οξείδωση του H₂. Σε ένα σύστημα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, αυτό το H₂ μπορεί άμεσα να προστεθεί στον αντιδραστήρα ή μπορεί να δημιουργηθεί από ποικίλους δότες ηλεκτρονίων των υγρών αποβλήτων όπως η γλυκόζη ή το προπιονικό ιόν. Ένας ακόμα παράγοντας είναι ότι τα θειοαναγωγικά βακτήρια μπορούν να προσλάβουν ενέργεια τόσο από τη θειοαναγωγή όσο και από τη ζύμωση της οργανικής ύλης όταν απουσιάζουν τα θειικά ιόντα, γεγονός που τους επιτρέπει να επιβιώνουν υπό αναερόβιες συνθήκες όταν στερούνται τα θειικά ιόντα (Lens & Kuenen, 2001).

Όσο αφορά την οικολογία τους, τα θειοαναγωγικά βακτήρια είναι ευρέως εξαπλωμένα στο αποχετευτικό δίκτυο και στους σταθμούς επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Στις αποχετεύσεις συνήθως είναι παρόντα σε στρώματα λάσπης (EPA, 1985; Holder, 1986) και σε ιζήματα (Mori *et al.*, 1991). Η θειοαναγωγή αυξάνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης των αιωρούμενων στερεών π.χ. ο ρυθμός θειοαναγωγής εξαπλασιάζεται με μία αύξηση των αιωρούμενων στερεών από 250 σε 1500 mg/l (Attal *et al.*, 1992). Εξαιτίας του χαμηλού ρυθμού αύξησης και της προτίμησής τους σε άνθρακα, συνήθως άλλοι τύποι μικροβίων υπερτερούν έναντι των θειοαναγωγικών βακτηρίων. Σε αναερόβιους χωνευτές λάσπης, τα θειοαναγωγικά βακτήρια ανταγωνίζονται με τα μεθανογόνα βακτήρια για τα διαθέσιμα οργανικά υποστρώματα. Γενικά, παράγοντες όπως η συγκέντρωση των ιόντων θείου, ο τύπος των οργανικών, οι αναλογίες COD/SO₄²⁻ και ο τύπος και η συγκέντρωση άλλων παρεμποδιστικών ουσιών επηρεάζουν τη σχετική επικράτηση και εξάπλωση των βακτηριακών τύπων. Παρά τις αυστηρά αναερόβιες απαιτήσεις τους, τα θειοαναγωγικά βακτήρια έχουν εντοπιστεί σε πολλά αερόβια περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων της επεξεργασμένης λάσπης και του αερόβιου βιολογικού φιλμ (Gibson, 1990).

Πίνακας 2. Κυριότερες ομάδες θειοβακτηρίων (Gerardi, 2006).

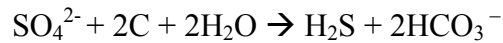
Ομάδες θειοβακτηρίων	
1. Θειοαναγωγικά βακτήρια	3. Άχρωμα θειοβακτήρια
<i>Desulfobacter</i>	<i>Beggiatoa</i>
<i>Desulfobacterium</i>	<i>Thiothrix</i>
<i>Desulfococcus</i>	<i>Type 021N</i>
<i>Desulfomonas</i>	4. Θειο-οξειδωτικά φωτοσυνθετικά πράσινα βακτήρια
<i>Desulfonema</i>	<i>Anacalochloris</i>
<i>Desulfosarcina</i>	<i>Chlorobium</i>
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Pelodictyon</i>
<i>Desulfovibrio</i>	5. Θειο-οξειδωτικά φωτοσυνθετικά ροζ βακτήρια
<i>Desulfuromonas</i>	<i>Amoebobacter</i>
<i>Thermodesulfobacterium</i>	<i>Chromatium</i>
2. Θειο-οξειδωτικά βακτήρια	<i>Ectothiorhodospira</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Lamprobacter</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Lamprocystis</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Thiocapsa</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Thiobacillus</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Thiospirillopsis</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Thiovulum</i>	<i>Thiospirillum</i>

Πίνακας 3. Πηγές άνθρακα θειοαναγωγικών βακτηρίων (Gerardi, 2006).

Όνομασία	Χημικός τύπος
Οξικό οξύ	CH_3COOH
Αιθανόλη	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
Φουμαρικό	HOOCCHCOOH
Γαλακτικό οξύ	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$
Προπανόλη	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
Προπανικό οξύ	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$
Πυροσταφυλικό οξύ	$\text{CH}_3\text{COCO OH}$
Σουκινικό οξύ	$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

2.1. Μεταβολισμός θειοαναγωγικών βακτηρίων

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια είναι υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια που εξασφαλίζουν την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξή τους από την οξείδωση του οργανικού υποστρώματος και χρησιμοποιούν τα θειικά ιόντα ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων σύμφωνα με την ακόλουθη χημική αντίδραση:



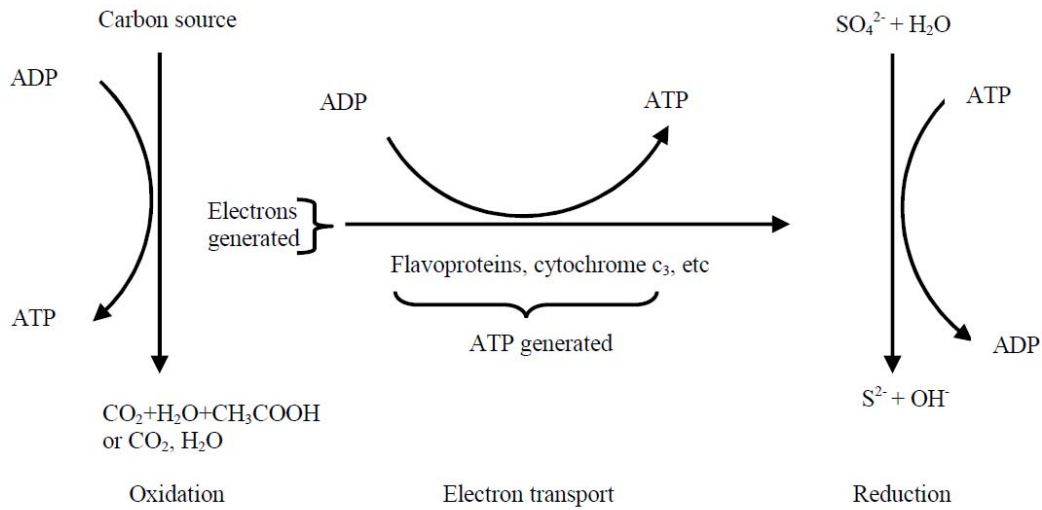
Η παραπάνω χημική εξίσωση μοιάζει με την αναγωγή των νιτρικών ιόντων, όπου παράγεται αλκαλικότητα και υπάρχει μια στοιχειομετρική αναλογία ανάμεσα στα mg του οργανικού που χρειάζεται για κάθε mg SO_4^{2-} που ανάγεται. Ωστόσο, σε αντίθεση με τους απονιτροποιητές, οι οποίοι προτιμούν αερόβιες συνθήκες και είναι προαιρετικά ετερότροφοι οργανισμοί (χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα) μετατρέποντας τα νιτρικά ιόντα σε αέριο άζωτο απουσία οξυγόνου, οι οργανισμοί που ανάγουν τα θειικά ιόντα χρησιμοποιούν μόνο θειικά ιόντα απουσία οξυγόνου ή νιτρικών ιόντων (Baskaran, 2005).

2.1.1. Πηγές άνθρακα

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια χρησιμοποιούν μια ποικιλία ανθρακικών ενώσεων για τις μεταβολικές τους δραστηριότητες (Lens *et al.*, 1998). Ο άνθρακας παρέχει την ενέργεια για την ανάπτυξη και τη διατήρησή τους. Η θειοαναγωγή βασίζεται στην ακόλουθη αντίδραση (Herlihy *et al.*, 1987):



Στην παραπάνω αντίδραση τα ηλεκτρόνια που χρειάζονται για την θειοαναγωγή προέρχονται από την οξείδωση του άνθρακα και ενεργειακών πηγών (γαλακτικό, οξικό, προπιονικό ιόν κ.α.). Στην Εικόνα 4, αναπαρίσταται η θειοαναγωγή και η χρήση του άνθρακα. Το παραγόμενο ATP χρησιμοποιείται για την αναγωγή των θειικών ιόντων σε ιόντα του δισθενούς θείου. Στα περισσότερα παραδείγματα ο δότης ηλεκτρονίων και η πηγή άνθρακα είναι η ίδια ένωση. Μόνο όταν το υδρογόνο χρησιμοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων, το CO_2 χρησιμοποιείται ως πηγή άνθρακα (Baskaran, 2005).



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της θειοαναγωγής συνδυασμένης με τη χρήση μιας οργανικής ένωσης (Postgate, 1984).

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια προτιμούν για πηγές άνθρακα οργανικές χημικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους όπως οργανικά οξέα (π.χ. γαλακτικό οξύ), λιπαρά οξέα (π.χ. οξικό) και αλκοόλες (π.χ. αιθανόλη, προπανόλη, μεθανόλη και βουτανόλη). Όλες σχεδόν αυτές οι χημικές ενώσεις προέρχονται από την αναερόβια διάσπαση υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπιδίων. Συνεπώς, τα θειοαναγωγικά βακτήρια είναι οι τελικοί αποικοδομητές και έχουν αντίστοιχο ρόλο με τα μεθανογόνα βακτήρια, τα οποία παράγουν μεθάνιο και CO_2 ως τελικά προϊόντα. Ο ρυθμός παραγωγής θειούχων στα αποχετευτικά δίκτυα έχει συσχετιστεί με τους διαλυτούς υδατάνθρακες και τα πτητικά λιπαρά οξέα (Nilsen *et al.*, 1996).

Το γαλακτικό συνιστά ένα καλό οργανικό υπόστρωμα για τα περισσότερα θειοαναγωγικά βακτήρια. Ωστόσο η χρήση του στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων είναι πολυδάπανη. Η χρήση του γαλακτικού μπορεί να επιταχύνει την έναρξη της διαδικασίας εξαιτίας του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης που παρουσιάζουν τα θειοαναγωγικά βακτήρια παρουσία του. Ένα μη δαπανηρό οργανικό υπόστρωμα, όπως η αιθανόλη, χρειάζεται για μεγάλης κλίμακας εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Kaksonen *et al.*, 2003a).

Το πολύ γνωστό γένος *Desulfonivbri* δεν χρησιμοποιεί οξικό ιόν, αλλά διασπά το γαλακτικό σε οξικό ιόν ενώ άλλα βακτήρια του γένους *Desulfotomaculum* χρησιμοποιούν οξικό ιόν (Postgate, 1984; Widde, 1988; Brock & Madigan, 1991). Λίγα είδη θειοαναγωγικών βακτηρίων αναπτύσσονται αυτότροφα, χρησιμοποιώντας

το CO₂ ως μοναδική πηγή άνθρακα (Hao, 2003). Ορισμένα είδη βακτηρίων του γένους *Desulfotomaculum* μπορούν να χρησιμοποιούν γλυκόζη, γεγονός που σπανίζει γενικά στα θειοαναγωγικά βακτήρια. Η διάσπαση αρωματικών και κορεσμένων κυκλικών οργανικών ενώσεων καθώς και μακρών αλυσίδων n-αλκανίων έχει αναφερθεί σε μερικά θειοαναγωγικά βακτήρια (Widdel, 1988; Caldwell *et al.*, 1998; Häggblom, 1998). Το είδος *Desulfotomaculum thermocisternum* (Nilsen *et al.*, 1996) έχει αναφερθεί να χρησιμοποιεί το υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων κατά τη θειοαναγωγή, ενώ είδη του γένους *Desulfobacterium* διασπών λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας, αιθανόλη και γαλακτικό ιόν εκτός από το οξικό ιόν (Widdel, 1992).

Ο Postgate (1984) έδειξε ότι το γαλακτικό ιόν χρησιμοποιείται ευρέως ως πηγή άνθρακα από τα περισσότερα είδη θειοαναγωγικών βακτηρίων. Ωστόσο παρουσιάζει ένα μειονέκτημα δεδομένου ότι τα περισσότερα θειοαναγωγικά βακτήρια που χρησιμοποιούν το γαλακτικό ιόν το οξειδώνουν μερικώς σε οξικό ιόν και CO₂. Για αυτό χρειάζεται μεγάλη ποσότητα γαλακτικού ιόντος για την αναγωγή των θειικών ιόντων, γεγονός που μπορεί να μην είναι εφικτό. Επιπρόσθετα, εξαιτίας της απελευθέρωσης του οξικού οξέος, το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD) της απορροής αυξάνεται. Η ατελής οξείδωση των ανθρακικών ενώσεων σε οξικό ιόν μπορεί να αποδοθεί στην χαμηλότερη τιμή της ελεύθερης ενέργειας για την οξείδωση του οξικού ιόντος σε CO₂, γεγονός που εμποδίζει την περαιτέρω οξείδωση του οξικού ιόντος σε CO₂ (Postgate, 1984). Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται διαφορετικές πηγές άνθρακα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα θειοαναγωγικά βακτήρια.

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια διακρίνονται σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν οξειδώνουν τέλεια την οργανική ένωση σε CO₂ ή ατελώς σε οξικό ιόν και CO₂. Ορισμένα είδη των γενών *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfobacterium*, *Desulfoarculus*, *Desulfomonile* και *Desulfonema* ανήκουν στην πρώτη ομάδα, η οποία περιλαμβάνει ακόμα και μερικά είδη όπως τα *Desulfotomaculum acetoxidans*, *Desulfotomaculum sapomandens* και *Desulfovibrio baarsii* (Postgate, 1984; Colleran *et al.*, 1995). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τα είδη *Desulfovibrio thermophilus*, *Desulfovibrio sapovarans*, *Desulfomas pigra*, *Thermodesulfobacterium commune* και την πλειοψηφία των ειδών των γενών *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas* και *Desulfobulbus* (Colleran *et al.*, 1995). Στον Πίνακα 5 φαίνεται η ελεύθερη ενέργεια που παράγεται από την οξείδωση διαφορετικών οργανικών ενώσεων.

Πίνακας 4. Πηγές άνθρακα και ενέργειας που χρησιμοποιούνται από τα θειοαναγωγικά βακτήρια (Baskaran, 2005).

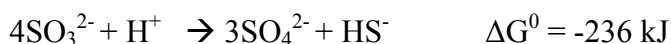
Κατηγορία χημικών ενώσεων	Πηγές άνθρακα και ενέργειας
Ανόργανες	Υδρογόνο, διοξείδιο του άνθρακα
Μονοκαρβοξυλικά οξέα	Φορμικό, οξικό, γαλακτικό, προπιονικό, ισοβουτυρικό, 2- και 3- μεθυλο-βουτυρικό οξύ, υψηλά λιπαρά οξέα μέχρι C ₂₀ .
Δικαρβοξυλικά οξέα	Σουκινικό, φουμαρικό, οξαλικό, μαλικό, γλουταρικό ιόν.
Αλκοόλες	Μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, βουτανόλη, 1, 2- και 1.3-προπανοδιόλη, γλυκερόλη.
Αμινοξέα	Λυσίνη, σερίνη, κυστεΐνη, θρεονίνη, βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, ασπαρτικό & γλουταμινικό οξύ, φαινυλαλανίνη.
Διάφορες ενώσεις	Χολίνη, φρουκτόζη, νικοτινικό οξύ, ινδόλη, φαινόλη κ.α.

Πίνακας 5. Θερμοδυναμικά δεδομένα από την οξειδωση διαφορετικών πηγών άνθρακα και ενέργειας κατά τη βιολογική θειοαναγωγή (Postgate, 1984).

Χημική αντίδραση	ΔG^0 (Kcal/reaction ; Kcal/mol SO ₄ ²⁻)	Τύπος οξειδωσης
4H ₂ (υδρογόνο) + SO ₄ ²⁻ → 4H ₂ O + S ²⁻	-29,66	
CH ₃ COO ⁻ (οξικό ιόν) + SO ₄ ²⁻ → H ₂ O + CO ₂ + HCO ₃ ⁻ + S ²⁻	-2.97	Τέλεια
4HCOO ⁻ (φορμικό ιόν) + SO ₄ ²⁻ → 4HCO ₃ ⁻ + S ²⁻	-43.70	
4CH ₃ COCOO ⁻ (πυροσταφυλικό ιόν) + SO ₄ ²⁻ → 4CH ₃ COO ⁻ + 4CO ₂ + S ²⁻	-79.20	
2CH ₃ COCOO ⁻ (γαλακτικό ιόν) + SO ₄ ²⁻ → 2CH ₃ COO ⁻ + 2CO ₂ + 2H ₂ O + S ²⁻	-33.60	
2C ₄ H ₄ O ₅ ²⁻ (μαλικό ιόν) + SO ₄ ²⁻ → 2CH ₃ COO ⁻ + 2CO ₂ + 2HCO ₃ ⁻ + S ²⁻	-43.30	Ατελής
2C ₄ H ₂ O ₄ ²⁻ (φουμαρικό ιόν) + 2H ₂ O + SO ₄ ²⁻ → 2CH ₃ COO ⁻ + 2CO ₂ + 2HCO ₃ ⁻ + S ²⁻	-45.50	
4C ₄ H ₄ O ₄ ²⁻ (σουκινικό ιόν) + 3SO ₄ ²⁻ → 24CH ₃ COO ⁻ + 4CO ₂ + 4HCO ₃ ⁻ + 3S ²⁻	-36.00	

2.1.2. Πηγές θείου

Παρουσία οργανικών δοτών ηλεκτρονίων και θειοθειικών ή θειωδών ιόντων, τα θειοαναγωγικά βακτήρια μπορούν να διασπάσουν πρώτα τα θειοθειικά ή θειώδη ιόντα σε θειικά (σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις) και μετά να οξειδώσουν τα οργανικά υποστρώματα με τα νέα θειικά ιόντα (Widdel, 1988):



Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να παρέχουν ενέργεια για την κυτταρική σύνθεση (Bak & Pfennig, 1987; Brock & Madigan, 1991). Ορισμένα θειοαναγωγικά βακτήρια

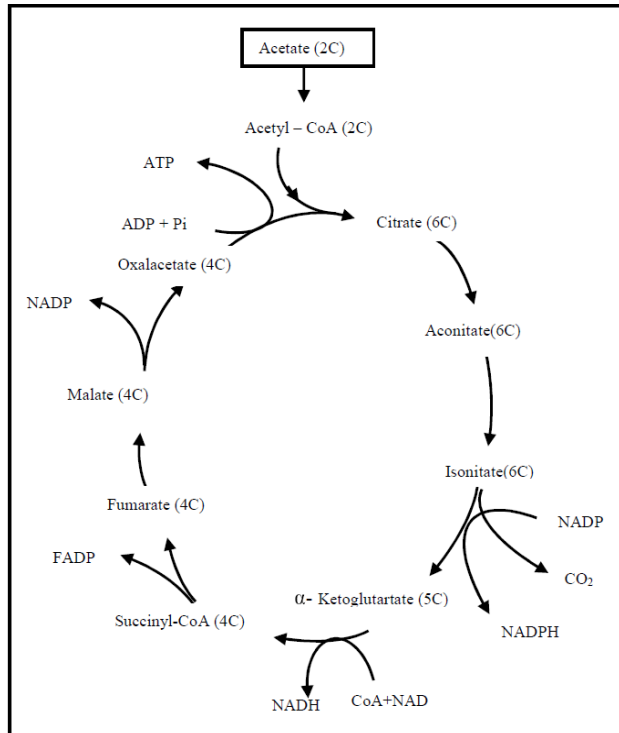
προτιμούν θειοθειικά αντί για θειικά ιόντα. Ο ρυθμός παραγωγής ιόντων θείου (S^{2-}) από θειοθειικά και θειώδη ιόντα βρέθηκε σημαντικά μεγαλύτερος από τον ρυθμό παραγωγής τους από τα θειικά ιόντα (Nielsen, 1987). Συμπεραίνεται ότι τα θειικά ιόντα θα μπορούσαν να δρουν ως περιοριστικός παράγοντας για την παραγωγή των ιόντων θείου στα περισσότερα υγρά απόβλητα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20 mg/l (EPA, 1974).

2.2. Μεταβολισμός πηγών άνθρακα και ενέργειας από τα θειοαναγωγικά βακτήρια

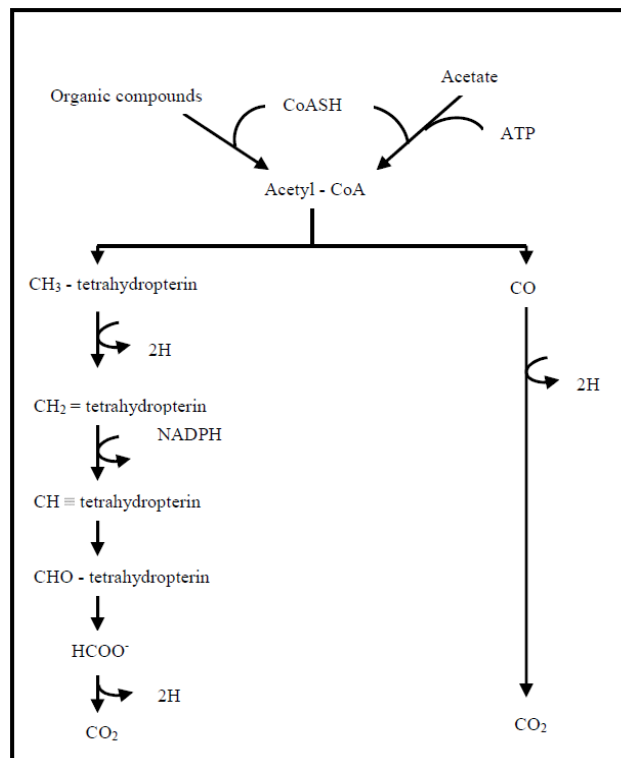
2.2.1. Μεταβολισμός οξικού ιόντος

Το οξικό ιόν συνιστά μια από τις κύριες οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούν τα θειοαναγωγικά βακτήρια ως πηγή άνθρακα. Ορισμένα είδη του γένους *Desulfobacter* χρησιμοποιούν το οξικό ιόν ως τη μοναδική πηγή άνθρακα, ενώ κάποια άλλα είδη του ίδιου γένους χρησιμοποιούν υδρογόνο και/ή αιθανόλη (Widdel & Pfennig, 1977; Colleran *et al.*, 1995). Κατά την ατελή οξειδωση οι οργανικές ενώσεις μετατρέπονται σε οξικό ιόν, το οποίο για αυτό το λόγο συνιστά ένα σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν κατά την βιολογική θειοαναγωγή. Το γένος *Desulfobacter* μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος οξειδώνει το οξικό ιόν. Στο κύκλο του κιτρικού οξέος το συνένζυμο A (CoA) μεταφέρεται από το σουκινικό-CoA στο ακέτυλο-CoA. Σε αυτή τη διαδικασία σχηματίζεται ATP από τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος, το οποίο χρησιμοποιείται από τα βακτήρια για την θειοαναγωγή. Ο κύκλος του κιτρικού οξέος για το είδος *Desulfobacter postgatei* φαίνεται στην Εικόνα 5 (Colleran *et al.*, 1994).

Το είδος *Desulfovibrio baarsi* και μερικά είδη που ανήκουν στα γένη *Desulfotomaculum*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* και *Desulfobacterium* οξειδώνουν πλήρως το οξικό ιόν σε CO₂. Έχει αναφερθεί ότι το γένος *Desulfotomaculum* που αναπτύσσεται αποκλειστικά παρουσία οξικού ιόντος παρουσιάζει χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης (χρόνος διπλασιασμού: 30 ώρες) ενώ το γένος *Desulfobacter* παρουσιάζει χρόνο διπλασιασμού 15-20 ημέρες (Colleran *et al.*, 1995). Βακτήρια του γένους *Desulfotomaculum* εκτελούν ένα μη-κυκλικό μονοπάτι κατά το οποίο οι οργανικές ενώσεις CH₃-tetrahydropterin και το CO οξειδώνονται σε CO₂ (Εικόνα 6). Αυτή η διαδικασία δεν περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος, αντίθετα καταναλώνει ενέργεια με τη μορφή ATP, γεγονός που ερμηνεύει τη μικρή ανάπτυξη σε σχέση με τα είδη του γένους *Desulfobacter* (Colleran *et al.*, 1995).



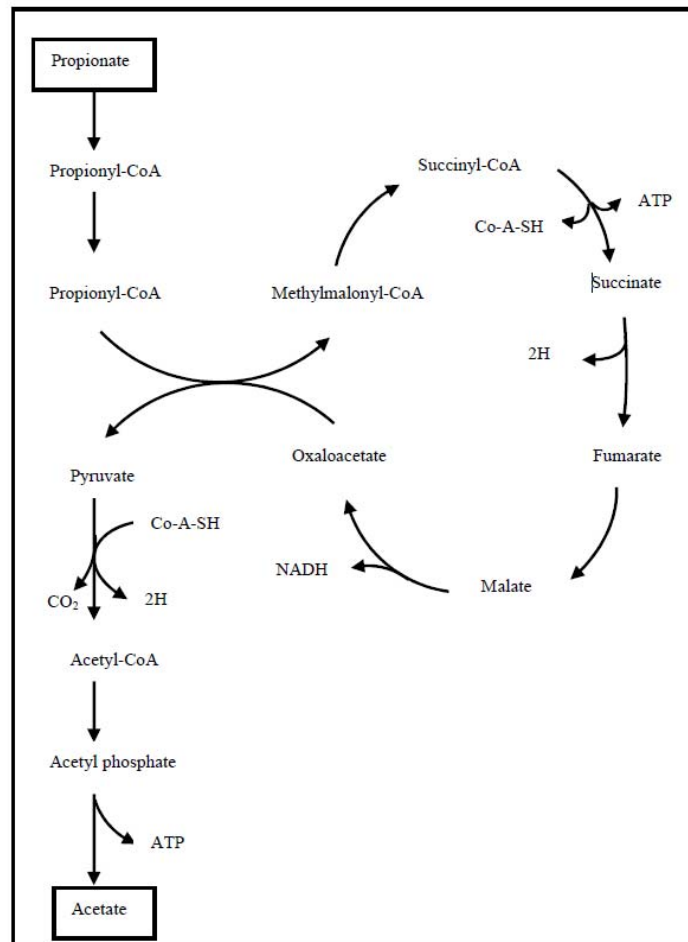
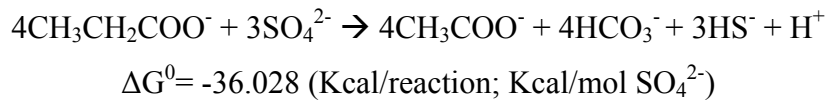
Εικόνα 5. Μονοπάτι οξείδωσης του οξικού ιόντος μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος για το είδος *Desulfobacter postgatei* (Colleran *et al.*, 1994). NADP: φωσφορικό νικοτινάμινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο; ADP: διφωσφορική αδενοσίνη; ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη; CoA: συνένζυμο A; FADP: φωσφορικό φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο; Pi: φωσφορικό ιόν.



Εικόνα 6. Μη-κυκλικό μονοπάτι οξείδωσης ακετυλ-ομάδων από το είδος *Desulfotomaculum acetoxidans* και άλλα βακτήρια που οξειδώνουν πλήρως το οργανικό υπόστρωμα (Colleran *et al.*, 1994).

2.2.2. Μεταβολισμός προπιονικού ιόντος

Ενώ τα είδη του γένους *Desulfobacter* χρησιμοποιούν οξικό ιόν, το γένος *Desulfobulbus* που δεν οξειδώνει τέλεια το οργανικό υπόστρωμα, αναπτύσσεται αποκλειστικά παρουσία προπιονικού ιόντος (Gibson, 1990). Το σχηματιζόμενο οξικό ιόν μετατρέπεται περεταίρω σε CO₂ από τα βακτήρια που χρησιμοποιούν οξικό ιόν. Το προπιονικό ιόν, μαζί με το οξικό, συνιστά ένα σημαντικό ενδιάμεσο προϊόν κατά τη βιολογική θειοαναγωγή (Colleran *et al.*, 1995). Ο μηχανισμός οξείδωσης του προπιονικού ιόντος από το γένος *Desulfobulbus* φαίνεται στην Εικόνα 7 και περιλαμβάνει την καρβοξυλίωση του προπιονυλου-CoA σε μέθυλομαλονυλ-CoA που ακολουθείται από τον ισομερισμό του σουκινικού CoA καθώς και την φωσφορυλίωση του υποστρώματος που παράγει ATP. Θερμοδυναμικά η οξείδωση του προπιονικού οξέος μέσω αυτού του μονοπατιού ευνοείται (Colleran *et al.*, 1995).



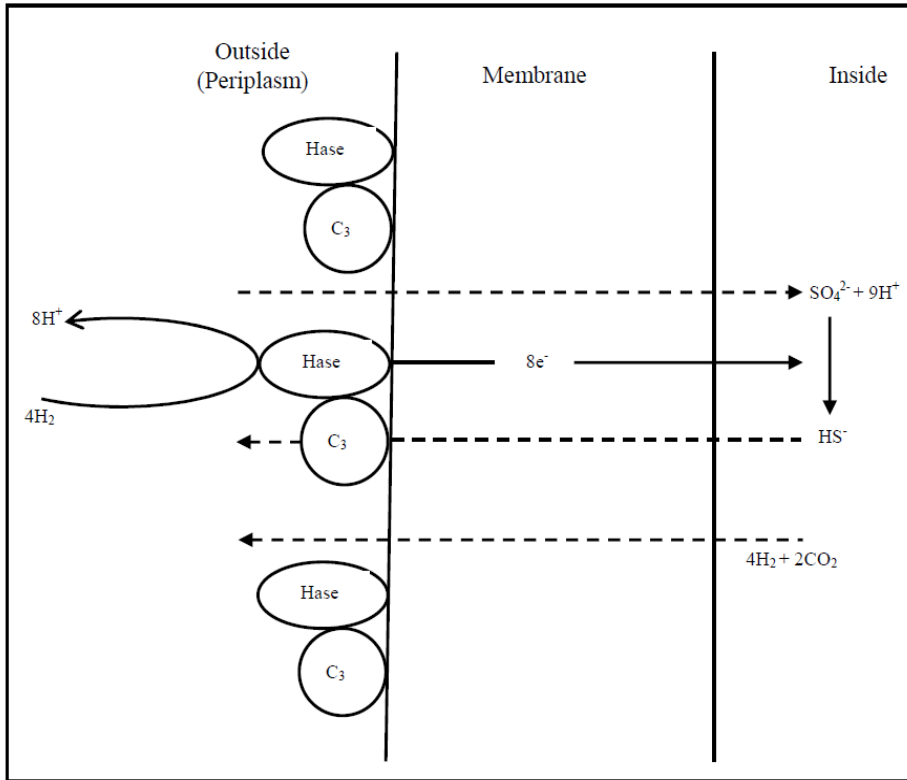
Εικόνα 7. Μονοπάτι ατελούς οξείδωσης του προπιονικού ιόντος σε οξικό ιόν από το είδος *Desulfobulbus propionicus* (Colleran *et al.*, 1995).

2.2.3. Μεταβολισμός υδρογόνου

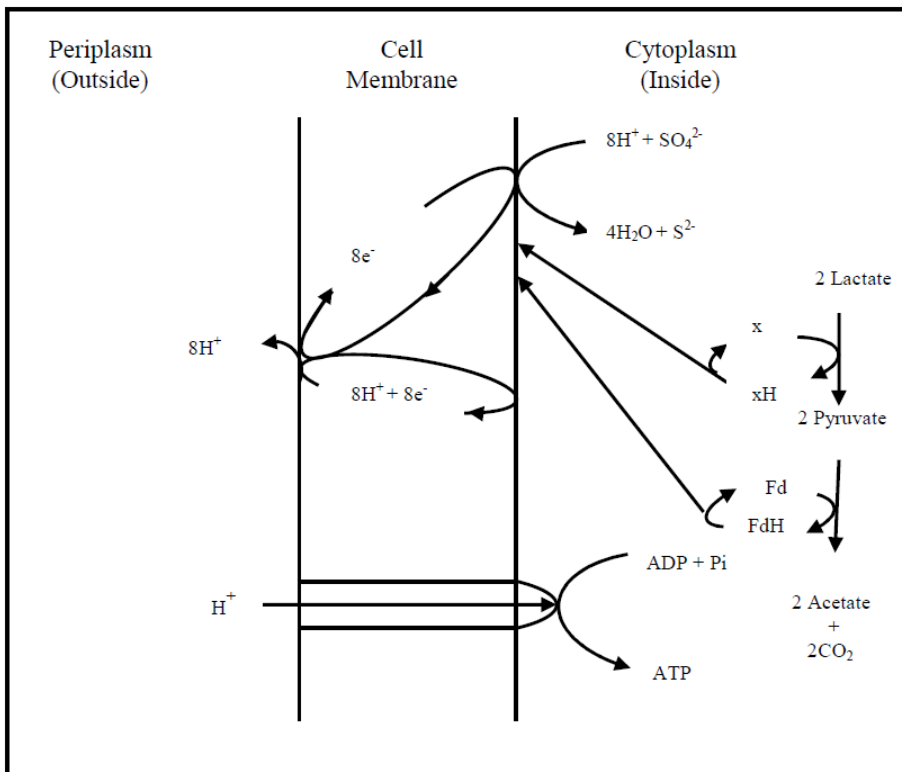
Τα είδη του γένους *Desulfovibrio* μπορούν να χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας το υδρογόνο. Είδη που εκτελούν τέλεια οξειδωση όπως τα *Desulfosarcina variabilis*, *Desulfonema limicola*, *Desulfococcus niacini* και το *Desulfobacterium autotrophicum* αναπτύσσονται αργά σε σχέση με τα είδη του γένους *Desulfovibrio* που εκτελούν ατελή οξειδωση. Επιπρόσθετα μόνο τα είδη που κάνουν τέλεια οξειδωση μπορούν να αναπτύσσονται αυτότροφα παρουσία υδρογόνου. Το γένος *Desulfovibrio* χρειάζεται οξικό ιόν μαζί με το υδρογόνο για την κυτταρική σύνθεση (Widdel, 1988). Η ελεύθερη ενέργεια που απαιτείται για την οξειδωση του υδρογόνου είναι -29.66 kcal, που αν συγκριθεί με το οξικό ιόν το υδρογόνο αποτελεί μια σχετικά ευνοούμενη πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων (Colleran *et al.*, 1995).

Δύο μοντέλα έχουν προταθεί για το μεταβολισμό του υδρογόνου. Στο πρώτο μοντέλο (Εικόνα 8) ο μεταβολισμός του υδρογόνου ακολουθεί ένα χημειοστατικό κύκλο που περιλαμβάνει το ένζυμο υδρογονάση, το οποίο υπάρχει στο περίπλασμα (το περίπλασμα είναι ο χώρος που υπάρχει ανάμεσα στην εσωτερική κυττοπλασματική μεμβράνη και την εξωτερική μεμβράνη στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, ή ο αντίστοιχος χώρος ανάμεσα στην κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα στα θετικά κατά Gram βακτήρια) (Peck & Legall, 1982). Έχει αναφερθεί ότι τα περισσότερα θειοαναγωγικά βακτήρια που οξειδώνουν το υδρογόνο διαθέτουν ένα κυτόχρωμα (C_3) και μια υδρογονάση. Το κυτόχρωμα διαθέτει ένα μηχανισμό αυτό-οξειδωσης που οξειδώνει το διαθέσιμο υδρογόνο σε πρωτόνια. Τα 2 ηλεκτρόνια που προέρχονται από αυτή την οξειδωση μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα όπου και χρησιμοποιούνται για την θειοαναγωγή. Τα παραγόμενα πρωτόνια παραμένουν στο περίπλασμα. Το υδρογόνο που παράγεται από τη θειοαναγωγή οξειδώνεται πάλι για την παραγωγή πρωτονίων και ο κύκλος συνεχίζεται. Σε αυτό το μοντέλο δεν γίνεται φωσφορυλίωση του υποστρώματος για την παραγωγή ATP (Peck & Legall, 1982).

Το δεύτερο μοντέλο παρουσιάζεται στη Εικόνα 9. Η υδρογονάση που βρίσκεται στο περίπλασμα ελέγχει τα δυναμικά οξειδοαναγωγής της φερεδοξίνης και της φλαβοδοξίνης και κατά συνέπεια ελέγχει τη μεταφορά των ηλεκτρονίων και των πρωτονίων (Legall & Fauque, 1988).



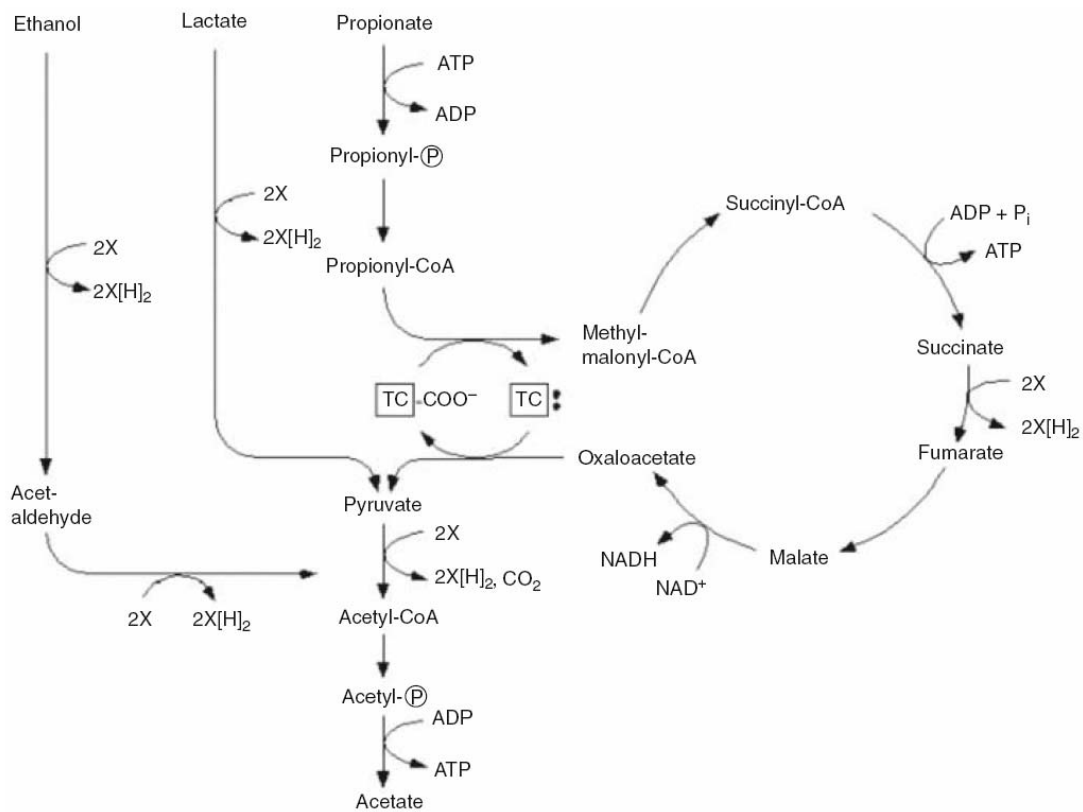
Εικόνα 8. Κύκλος του υδρογόνου κατά τη θειοαναγωγή-1^ο μοντέλο (Peck & Legall, 1982). C₃: κυτόχρωμα C₃; Hase: υδρογονάση.



Εικόνα 9. Κύκλος του υδρογόνου κατά τη θειοαναγωγή-2^ο μοντέλο (Legall & Fauque, 1988). Fd: φερρεδοξίνη.

2.2.4. Μεταβολισμός αιθανόλης

Η αιθανόλη αποτελεί ένα πολύ κοινό δότη ηλεκτρονίων και πηγή άνθρακα για τα βακτήρια που ανάγουν (τέλεια ή ατελώς) τα θειικά ιόντα. Η αιθανόλη οξειδώνεται μέσω της ακεταλδεύδης σε οξικό ιόν, το οποίο μπορεί να οξειδωθεί περαιτέρω. Μερικά είδη του γένους *Desulfonivbri* μπορούν να οξειδώνουν την χολίνη σε οξικό ιόν και τριμεθυλαμίνη. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις ότι η ακεταλδεύδη που σχηματίζεται ως πρώτο ενδιάμεσο προϊόν από την αποικοδόμηση της χολίνης οξειδώνεται σε οξικό ιόν μέσω του ακετύλο-CoA. Με τις πρωτεύουσες αλκοόλες ως δότες ηλεκτρονίων, μερικά θειοαναγωγικά βακτήρια παράγουν οσμηρά παραπροϊόντα (Rabus *et al.*, 2006).



Εικόνα 10. Οξείδωση της αιθανόλης, του γαλακτικού και του προπιονικού ιόντος σε οξικό ιόν στο είδος *Desulfobulbus propionicus*. Από την καρβοξυλίωση του προπιονυλ-CoA με το CO₂ σχηματίζεται το μεθυλομαλονυλ-CoA. “X”: ο άγνωστος μεταφορέας ηλεκτρονίου ή υδρογόνου (Rabus *et al.*, 2006).

2.3. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα θειοαναγωγικά βακτήρια

Η γνώση των ποικίλων παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων είναι χρήσιμη για τον έλεγχο των μικροβιακών τους αλληλεπιδράσεων σε περιβάλλοντα υγρών αποβλήτων (Hao, 2003). Παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των ιόντων θείου κ.α. επηρεάζουν την ανάπτυξη και τη δράση των θειοαναγωγικών βακτηρίων τα οποία είναι αυστηρά αναερόβια (Baskaran, 2005).

2.3.1. Διαλυμένο οξυγόνο

Αν και τα θειοαναγωγικά βακτήρια είναι υποχρεωτικά αναερόβια μπορούν να επιβιώσουν σε παροδική έκθεση σε οξυγόνο και να δραστηριοποιηθούν ξανά κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Εξαιτίας της μεταφοράς του οξυγόνου, η κρίσιμη συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στα υγρά απόβλητα κάτω από την οποία ανάγονται τα θειικά ιόντα είναι 0.1–1.0 mg/l (EPA, 1985). Αν τα αερόβια ιζήματα ή νερά είναι πλούσια σε οργανικά σωματίδια, τα θειοαναγωγικά βακτήρια μπορούν να είναι δραστήρια σε αναερόβια μικροπεριβάλλοντα παρά το αερόβιο περιβάλλον μέσο (Widdel, 1988). Αρκετά θειοαναγωγικά βακτήρια, περιλαμβανομένων των γενών *Desulfonivibrio* και *Desulfobacter*, μπορούν να εμπλουτιστούν από αερόβια ενεργή λάσπη (λύματα που έχουν υποστεί βιολογικό καθαρισμό) (Dilling & Cypionka, 1990). Γενικά, οι πάνω από συγκεκριμένα επίπεδα συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου εμποδίζουν τα θειοαναγωγικά βακτήρια. Συνεπώς συνιστάται η διατήρηση σχετικά χαμηλών επιπέδων διαλυμένου οξυγόνου στο σχεδιασμό και τη λειτουργία αποχετευτικών συστημάτων για την αποφυγή προβλημάτων δυσοσμίας (Hao, 2003).

2.3.2. pH

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια προτιμούν περιβάλλοντα με pH περίπου 7 και συνήθως παρεμποδίζονται σε τιμές pH κάτω από 5.5 ή πάνω από 9 (EPA, 1974). Μια καλλιέργεια του γένους *Desulfonivibrio* εμβολιάστηκε με ιόντα γαλακτικού και θειικού οξέος σε τιμές pH από 5.8 έως 7.0 και τόσο ο συντελεστής απόδοσης της ανάπτυξης (Y) όσο και ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max}) αυξανόταν με την αύξηση του pH. Οι μέγιστες τιμές των 0.15 g cell/g SO_4^{-2} παρατηρήθηκαν σε pH 6.6 (Reis *et al.*, 1992). Η αλλαγή του pH των αποβλήτων (με οξύ ή βάση) έχει προταθεί με σκοπό την ελάττωση της θειοαναγωγής σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις (Hao, 2003).

Παρόλα αυτά, η θειοαναγωγή έχει παρατηρηθεί ακόμα και σε τιμές pH από 3 έως 4. Τα θειοαναγωγικά βακτήρια που απομονώθηκαν από αυτά τα περιβάλλοντα παρεμποδίζονταν σε pH κάτω από 6. Συνεπώς, πιθανολογείται ότι τα θειοαναγωγικά βακτήρια σε όξινα περιβάλλοντα ήταν παρόντα σε μικροπεριβάλλοντα, όπου υψηλότερες και πιο ευνοϊκές συνθήκες pH μπορούν να υφίστανται (Hao, 2003).

Σε έρευνα αμιγείς καλλιέργειες θειοαναγωγικών βακτηρίων απομονώθηκαν από νερόλακους με pH 3.38 (Tuttle *et al.*, 1969) και από ένα εγκαταλελειμμένο ορυχείο με ελαφρά οξειδωτικές και όξινες συνθήκες. Όταν αυτά τα βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε εργαστηριακές συνθήκες, δεν παρουσίαζαν σημαντική ανάπτυξη σε pH κάτω από 5.5 και στις δύο περιπτώσεις. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα θειοαναγωγικά βακτήρια που προέρχονται από οξειδωτικές συνθήκες καθιστούν το περιβάλλον πιο ευνοϊκό μέσω της αναγωγής των θεικών ιόντων σε ιόντα του δισθενούς θείου, γεγονός που τους παρέχει ένα αλκαλικό περιβάλλον κατάλληλο για τη δράση τους (Fortin *et al.*, 1996).

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας είναι εμφανές ότι τα θειοαναγωγικά βακτήρια δεν είναι οξεόφιλα, ωστόσο ορισμένα είδη έχουν αναγνωριστεί ως ανεκτικά σε όξινες συνθήκες (Baskaran, 2005). Για παράδειγμα, ένα είδος του γένους *Desulfotomaculum* έχει αναφερθεί να αναπτύσσεται σε περιβάλλον με pH 2.9 και έχει χαρακτηριστεί ως είδος ανεκτικό σε όξινες συνθήκες παρά ως οξεόφιλο (Johnson *et al.*, 1993). Επιπρόσθετα, άλλες έρευνες έδειξαν ότι δύο απομονωμένες αποικίες θειοαναγωγικών βακτηρίων μπορούν να αναπτύσσονται ακόμα και σε pH 4.5 (Hard *et al.*, 1997) και μπορούν να ανάγουν τα θειικά ιόντα και να παράγουν αλκαλικότητα σε τόσο χαμηλές τιμές pH όσο 3.3 (Elliott *et al.*, 1998). Η επίδραση του χαμηλού pH θα μπορούσε να ελαχιστοποιηθεί σε θειοαναγωγικά συστήματα, αφού η θειοαναγωγή παράγει πρόσθετη διττανθρακική αλκαλικότητα (Hao, 2003).

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι μικτές καλλιέργειες θειοαναγωγικών βακτηρίων είναι περισσότερο ανεκτικές σε ακραίες συνθήκες (π.χ. pH 3.0) σε σχέση με τις αμιγείς καλλιέργειες (Postgate, 1984; Kolmert & Johnson, 2001).

2.3.3. Θερμοκρασία

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια διακρίνονται ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους σε μεσόφιλα ($T < 40^{\circ}\text{C}$), μέτρια θερμοφιλα ($T: 40-60^{\circ}\text{C}$) και ισχυρά θερμοφιλα ($T > 60^{\circ}\text{C}$). Ο ρυθμός αναγωγής των θεικών ιόντων επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Πιλοτικά πειράματα έδειξαν ότι η θειοαναγωγή αυξάνεται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από 20 σε 32°C σε μια καλλιέργεια μεσόφιλων θειοαναγωγικών βακτηρίων (Weijma *et al.*, 2000).

Γενικά, η αναγωγή των θεικών ιόντων αυξάνεται 2 με 4 φορές για κάθε αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10°C (Nielsen, 1987; Widdel, 1988). Η βέλτιστη θερμοκρασία για τις πιο καθαρές καλλιέργειες των θειοαναγωγικών βακτηρίων κυμαίνεται μεταξύ 28 και 32°C . Η χαμηλότερη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης έχει παρατηρηθεί σε ορισμένες αποικίες του γένους *Desulfobacterium* και σε μια αποικία *Desulfobacter* στους $24-28^{\circ}\text{C}$ και η υψηλότερη είναι περίπου 70°C για το γένος *Thermodesulfobacterium*. Τα περισσότερα είδη θειοαναγωγικών βακτηρίων θανατώνονται ταχύτατα σε θερμοκρασίες άνω 45°C (Postgate, 1984; Widdel, 1988).

Σύμφωνα με τους Okabe και Characklis (1992) ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (μ_{\max}) για το είδος *Desulfonivibrio desulphuricans* κυμαινόταν μεταξύ 0.38 και $0.55/\text{h}$ στους 25°C και στους 43°C αντίστοιχα, και η δυσοσμία μειωνόταν δραματικά εκτός αυτού του θερμοκρασιακού εύρους. Ένα θερμοκρασιακό σοκ στους 45°C που υπέστη ένας μεσόφιλος (30°C) ανοδικής ροής αντιδραστήρας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων με θειικά ιόντα, δεν τον επηρέασε αρνητικά. Ωστόσο, θερμοκρασιακά σοκ στους 50 και 65°C , μείωσαν σημαντικά την αποτελεσματικότητα του αντιδραστήρα (Visser *et al.*, 1993).

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται το εύρος και η βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας και pH για ορισμένα είδη θερμοφίλων θειοαναγωγικών βακτηρίων, ενώ στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται ακόμα και η πηγή άνθρακα και ενέργειας εκτός από τα παραπάνω στοιχεία σε ορισμένα γένη.

Πίνακας 6. Εύρος και βέλτιστη τιμή θερμοκρασίας και pH για ορισμένα είδη θερμοφίλων θειοαναγωγικών βακτηρίων (Baskaran, 2005).

Είδος	Θερμοκρασία (°C)		pH		Αναφορά
	Βέλτιστη	Εύρος	Βέλτιστο	Εύρος	
<i>Thermodesulforhabdus norvegicus</i>	60	44-74	6.9	6.1-7.7	Beeder <i>et al.</i> , 1995
<i>Desulfotomaculum luciae</i>	-	50-70	-	-	Liu <i>et al.</i> , 1997
<i>Desulfotomaculum solfataricum</i>	60	48-65	7.3	6.4-7.9	Goorissen <i>et al.</i> , 2003
<i>Desulfotomaculum thermobenzoicum</i> *	55	45-62	7.0-7.5	6.0-8.0	Plugge <i>et al.</i> , 2002
<i>Desulfotomaculum thermocisternum</i>	62	41-75	6.7	6.2-8.9	Nilsen <i>et al.</i> , 1996
<i>Desulfotomaculum thermosapovorans</i>	50	35-60	7.2-7.5	-	Fardeau <i>et al.</i> , 1995
<i>Desulfacinum infernum</i>	64	-	7.1-7.5	-	Rees <i>et al.</i> , 1995

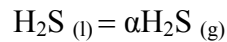
*subsp. *thermosyntrophicum*.

Πίνακας 7. Πηγή άνθρακα και ενέργειας, εύρος θερμοκρασίας και pH για ορισμένα γένη θειοαναγωγικών βακτηρίων (Widdel, 1988).

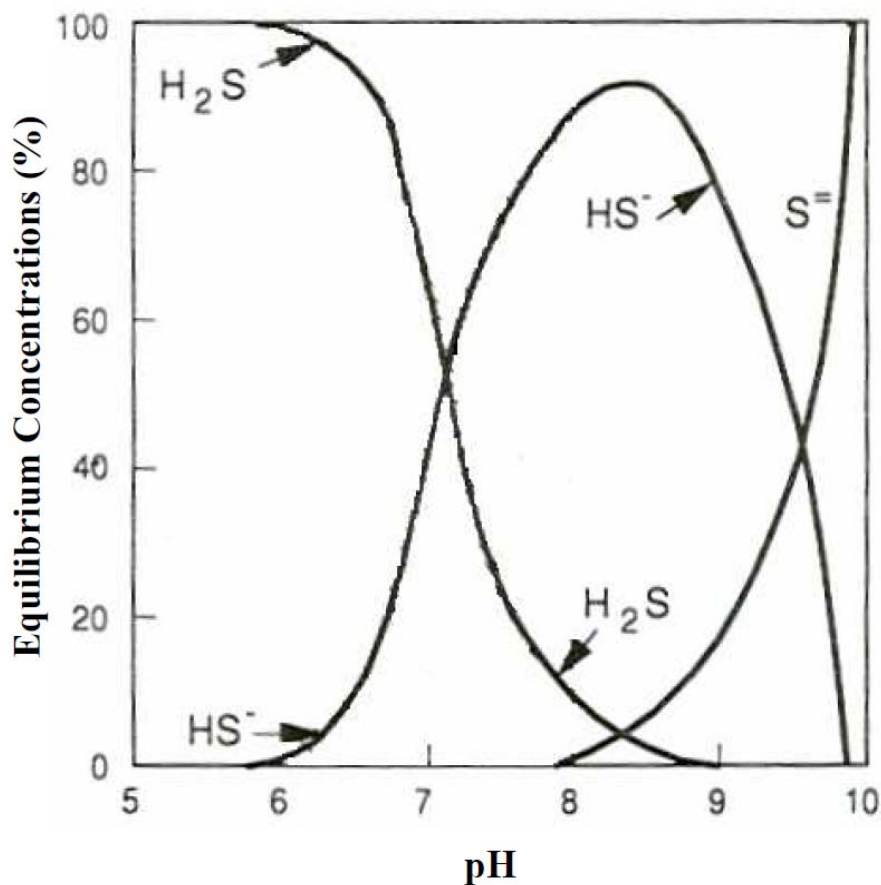
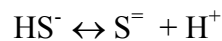
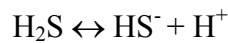
Γένος	Πηγή άνθρακα και ενέργειας	Θερμοκρασία (°C)		pH	
		Εύρος	Βέλτιστο	Εύρος	Εύρος
<i>Desulfobacter</i>	Οξικό ιόν	28-32	7.3	6.2-8.5	
<i>Desulfobulbus</i>	Προπιονικό, γαλακτικό, pyruvate ιόν, αιθανόλη, προπανόλη	28-39	7.2	6.0-8.6	
<i>Desulfococcus</i>	φορμικό, οξικό, γαλακτικό, butyrate, pyruvate ιόν	30-36	-	-	
<i>Desulfotomaculum</i>	γαλακτικό, pyruvate, οξικό ιόν, αιθανόλη, υδρογόνο	-	-	-	
<i>Desulfomonas</i>	-	30	7.2	6.5-8.5	
<i>Desulfonema</i>	οξικό, malate, benzoate, pyruvate	-	-	-	
<i>Desulfosarcina</i>	φορμικό, οξικό, butyrate, προπιονικό ιόν	33-38	7.4	6.9-7.0	
<i>Desulfovibrio</i>	γαλακτικό ιόν	25-35	-	7.5	

2.3.4. Ιόντα θείου

Όταν τα θεικά ιόντα ανάγονται σε ιόντα του δισθενούς θείου, το pH παίζει σημαντικό ρόλο στη μορφή με την οποία θα υπάρξουν τα ιόντα του δισθενούς θείου, τα οποία μπορούν να υπάρξουν σε διαφορετικές μορφές όπως H_2S (στην υγρή και αέρια φάση), S^- και $\text{S}^{=}$. Σε pH 7.0 η πλειοψηφία των ιόντων θείου βρίσκεται με τη μορφή H_2S . Η αναλογία ανάμεσα στο H_2S της υγρής και αέριας φάσης δίνεται από τη σχέση:



όπου στους 30°C ο συντελεστής α είναι ίσος με 1.99 (Lens *et al.*, 1998). Στην Εικόνα 11 απεικονίζεται η επίδραση του pH στις διάφορες μορφές των ιόντων του δισθενούς θείου. Σε χαμηλό pH επικρατεί η μορφή H_2S , το οποίο με την αύξηση του pH διασπάται σε HS^- και $\text{S}^{=}$ σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Εικόνα 11. Επίδραση του pH στις διάφορες μορφές των ιόντων του δισθενούς θείου (Lens *et al.*, 1998).

Είναι γνωστό ότι η παρουσία του δισθενούς θείου παρεμποδίζει τα θειοαναγωγικά βακτήρια. Πιθανά αυτή η παρεμπόδιση γίνεται όταν οποιαδήποτε από τις ενώσεις του δισθενούς θείου (H_2S , HS^- ή S^{2-}) αντιδράσει με το σίδηρο της φερρεδοξίνης, τα κυττοχρώματα ή άλλα κυτταρικά συστατικά που περιέχουν σίδηρο, αναστέλλοντας τη δραστηριότητα των συστημάτων μεταφοράς ηλεκτρονίων (Okabe *et al.*, 1992). Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παρεμποδιστική δράση των ιόντων του θείου ποικίλει ανάλογα με τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. pH, θερμοκρασία), τα χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων (π.χ. παρουσία ιόντων αλάτων και ενός είδους πηγής άνθρακα) και τα συστήματα αντιδραστήρα (Hao, 2003).

Γενικά, δεν υπάρχει επαρκής και σαφής πληροφορία σχετικά με την τοξικότητα που προκαλούν τα ιόντα θείου στα βακτηριακά κύτταρα. Έχει αναφερθεί ότι τα ιόντα θείου απορροφώνται από τα κύτταρα, καταστρέφουν τις πρωτεΐνες και τα καθιστούν ανενεργά (Postgate, 1984). Αν ισχύει αυτό, τα βακτήρια δεν θα μπορούν να επαναρχίσουν τη δράση τους έπειτα από την ολική απομάκρυνση των ιόντων θείου. Αντίθετα, οι Reis *et al.* (1992) έδειξαν ότι η παρεμπόδιση των βακτηριακών κυττάρων από τα ιόντα θείου είναι αναστρέψιμη στους βιοαντιδραστήρες των θειοαναγωγικών βακτηρίων. Σύμφωνα με τους Bharathi *et al.* (1990) η κατακρήμνιση των μετάλλων (υπό τη μορφή MeS), τα οποία είναι απαραίτητα για τη βακτηριακή ανάπτυξη, αποτελεί την αιτία για τη μειωμένη βακτηριακή δράση.

Ακόμα υπάρχουν διαφορετικές επιστημονικές απόψεις σχετικά με το βαθμό βακτηριακής τοξικότητας των διαφορετικών μορφών των ιόντων θείου. Ενώ κάποιιοι ερευνητές αναφέρουν το σύνολο των ιόντων θείου ως υπαίτιο για φαινόμενα τοξικότητας (Cord-Ruwisch *et al.*, 1988), κάποιο άλλοι θεωρούν ότι το H_2S είναι τοξικό (McCartney & Oleskiewicz, 1991; McCartney & Oleskiewicz, 1993), δεδομένου ότι είναι το μόνο που μπορεί να εισέρχεται στα κύτταρα (Speece, 1983). Σε άλλη έρευνα αποδείχθηκε ότι η τοξικότητα προκαλείται τόσο από το σύνολο των ιόντων θείου όσο και από το H_2S , και εξαρτάται από το pH. Σε pH μικρότερο από 7.2 το H_2S δρα ανασταλτικά και σε pH πάνω από 7.2 η τοξικότητα ευθύνεται στο σύνολο των θειικών ιόντων. Ακόμα, όσο αυξάνεται το pH τόσο λιγότερη συγκέντρωση H_2S χρειάζεται για την παρεμπόδιση της βακτηριακής αύξησης κατά 50 % (O’Flaherty & Colleran, 1998).

2.3.5. Μέταλλα

Τα μέταλλα μπορούν να προκαλέσουν τοξικότητα όχι μόνο σε διαλυτή αλλά και σε αδιάλυτη μορφή. Τα αδιάλυτα θειούχα μέταλλα που κατακρημνίζονται δεν επιδρούν τοξικά άμεσα στα βακτήρια αλλά εμποδίζουν την πρόσβασή τους στα θρεπτικά συστατικά του περιβάλλοντος μέσου (Utgikar *et al.*, 2001).

Εξαιτίας των πολύπλοκων βιολογικών διαδικασιών κάποια μέταλλα μπορεί να καταβυθίζονται και/ή να παγιδεύονται στη βιομάζα. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις των υπόλοιπων διαλυτών μετάλλων θα πρέπει να προσδιοριστούν για την εκτίμηση του παρατηρούμενου φαινομένου τοξικότητας. Επιπρόσθετα, τα μέταλλα που βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, και όχι σε ενώσεις εξαιτίας των φυσικών και βιολογικά σχηματιζόμενων τασιενεργών ουσιών, παρουσιάζουν τοξικές επιδράσεις και διαφορετικές μορφές μετάλλων (π.χ. As(V) έναντι As(III)) μπορεί να επιδράσουν με διαφορετικό τρόπο. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις διαλυτών ειδών μετάλλων μπορεί να μην δράσουν ανασταλτικά στα αναερόβια θειοαναγωγικά συστήματα που δημιουργούν βιολογικά τασιενεργές ουσίες καθιστώντας τα μέταλλα λιγότερο τοξικά (Hao, 2003).

2.4. Ρόλος θειοαναγωγικών βακτηρίων στην απομάκρυνση βαρέων μετάλλων από υγρά απόβλητα

Ο ρόλος των ιόντων του θείου για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων υπό αναερόβιες συνθήκες έχει αναγνωριστεί από παλιά (Lawrence & McCarty, 1965). Το αδιάλυτο θειώδες μέταλλο κατακρημνίζεται εξαιτίας των ιόντων θείου που παράγονται *in situ*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ακινητοποίηση των βαρέων μετάλλων στα φυσικά περιβάλλοντα ιζημάτων και στα μηχανικά συστήματα. Η αντίδραση που ακολουθείται είναι η ακόλουθη: $Me^{2+} + S^{-} \rightarrow MeS$ (Barnes *et al.*, 1991).

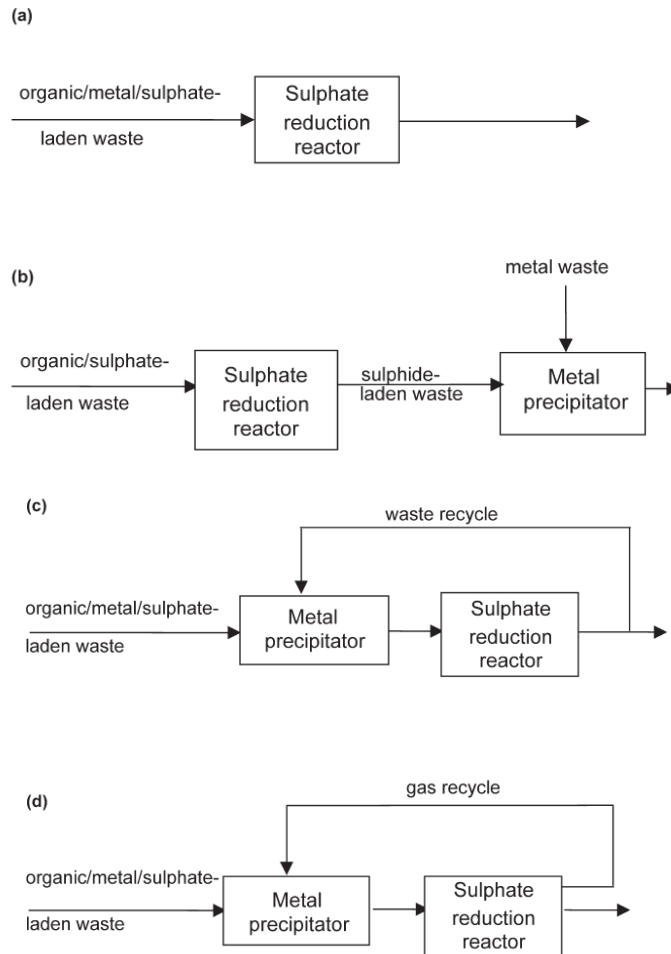
Η εξωτερική προσθήκη αλάτων σιδήρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατακρήμνιση των ιόντων θείου με σκοπό τον έλεγχο της δυσοσμίας και τη μείωση της τοξικότητας μετάλλου/S⁻ (Edwards *et al.*, 1997), τη μείωση του αερίου H₂S σε αναερόβιους χωνευτές (Dezham *et al.*, 1988), και τον έλεγχο των διαλυμένων ιόντων θείου στις αποχετεύσεις (Padival *et al.*, 1995). Οι Jin *et al.* (1998) πρόσθεσαν ιόντα θείου σε ένα σύστημα με μεθανογόνα βακτήρια για να μειώσουν την επίδραση της τοξικότητας του χαλκού. Στα υγρά απόβλητα, αν είναι παρόντα άλατα σιδήρου σε μεγάλες ποσότητες, καταβυθίζεται ο θειούχος σίδηρος (FeS). Το μαύρο χρώμα των

ιζημάτων τόσο στην πρωταρχική όσο και στη χωνεμένη λάσπη, όπου η λαμβάνει χώρα η θειοαναγωγή, οφείλεται στην συσσώρευση του FeS (Barnes *et al.*, 1991).

Η χρήση των θειοαναγωγικών βακτηρίων για την απομάκρυνση των μετάλλων έχει εφαρμοστεί σε διαφορετικά βιομηχανικά απόβλητα όπως μολυσμένα υπόγεια ύδατα (Barnes *et al.*, 1991), στραγγίσματα ταφής απορριμμάτων (DeWalle *et al.*, 1979), απόβλητα επιμεταλλώσεων (Bewtra *et al.*, 1995), διηθήματα από μολυσμένα εδάφη (White *et al.*, 1998) και απορροές μεταλλείων (Maree *et al.*, 1987), σε ποικίλες διαδικασίες που περιλαμβάνουν αναερόβια φίλτρα, κλειστούς αντιδραστήρες λυμάτων κ.α. (Barnes *et al.*, 1991).

Οι διαφορετικοί τρόποι απομάκρυνσης μετάλλων με τη βοήθεια των θειοαναγωγικών βακτηρίων φαίνονται στην Εικόνα 12. Ουσιαστικά, απόβλητα που περιέχουν διαλυτά είδη μετάλλων εμπλουτίζονται με οργανικά και άλλα θρεπτικά συστατικά για να παρέχουν επαρκείς αναλογίες θεικών/COD. Ευνοϊκές συνθήκες όπως π.χ. ο μεγάλος υδραυλικός χρόνος παραμονής και το ουδέτερο pH, ευνοούν την ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων. Όταν τα ιόντα θείου παραχθούν *in situ*, αντιδρούν άμεσα με τα μέταλλα για το σχηματισμό του ιζήματος MeS. Γενικά μπορούν να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις απομάκρυνσης μετάλλων. Για παράδειγμα, ένας κλειστός αντιδραστήρας ανοδικής ροής με λάσπη εγκαταστάθηκε κοντά σε μία περιοχή εξευγενισμού ψευδαργύρου στην Ολλανδία για την επεξεργασία υπόγειου ύδατος επιβαρυσμένου με μέταλλα. Με εξωτερική προσθήκη αιθανόλης και θρεπτικών συστατικών (N και P) το σύστημα μείωσε τις συγκεντρώσεις του ψευδαργύρου από 107-1.070 mg/l σε επίπεδα κάτω από 1 mg/l (Barnes *et al.*, 1991).

Οι Haas και Polprasert (1993) χρησιμοποίησαν τον ανακυκλώμενο ατμό που περιείχε βιο-σχηματιζόμενα ιόντα θείου με σκοπό την απομάκρυνση του χαλκού σύμφωνα με το τρίτο διάγραμμα της Εικόνας 12. Το σύστημα παράγαγε μια απορροή με χαμηλά επίπεδα COD και μετάλλου. Οι Hammack *et al.* (1994) χρησιμοποίησαν ένα παρόμοιο σύστημα (Εικόνα 12.d) για την επεξεργασία αποβλήτων ορυχείου, με ένα αντιδραστήρα εξουδετέρωσης ασβεστολίθου ανάμεσα στον αντιδραστήρα καταβύθισης μετάλλων και τον αντιδραστήρα της θειοαναγωγής, ο οποίος αύξησε το pH στην τιμή 6. Η εισαγωγή γαλακτικού νατρίου γινόταν απευθείας στον αντιδραστήρα της θειοαναγωγής. Μέσω αυτής της διαδικασίας απομακρύνθηκε πάνω από το 99% των αρχικών συγκεντρώσεων των μετάλλων Fe (620 mg/l), Cu (178 mg/l), Zn (530 mg/l) και Al (278 mg/l).



Εικόνα 12. Τρόποι απομάκρυνσης βαρέων μετάλλων με θειοαναγωγικά βακτήρια (Barnes *et al.*, 1991).

Από τη δεκαετία του 80' έχει παρουσιαστεί η δυνατότητα χρήσης των θειοαναγωγικών βακτηρίων για την απομάκρυνση των θειικών ιόντων και μετάλλων από τις όξινες απορροές μεταλλείων (Acid Mine Drainage, AMD) (Tuttle *et al.*, 1969; Wakao *et al.*, 1979). Γενικά, η ποσότητα και το είδος των οργανικών που προστίθενται, καθώς και η προσαρμογή του pH συνιστούν κρίσιμους παράγοντες για την απομάκρυνση των μετάλλων. Τα περισσότερα μέταλλα καταβυθίζονται με τη μορφή MeS, αν και μερικά διατηρούνται ως υδροξείδια ή ανθρακικά μέταλλα. Επειδή η θειοαναγωγή μπορεί να είναι σημαντική για τους τεχνητούς ή φυσικούς υγροτόπους, υπάρχει κάποιο ενδιαφέρον για τη χρήση των υγροτόπων με σκοπό την επεξεργασία της όξινης απορροής μεταλλείων εξαιτίας του χαμηλού κόστους και τις χαμηλές απαιτήσεις συντήρησης (Webb *et al.*, 1998). Στις Η.Π.Α. κατασκευάστηκαν 142 υγρότοποι ειδικά για την επεξεργασία της όξινης απορροής μεταλλείων. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα αυτών των υγροτόπων ποικίλει και μπορεί να έχει απρόβλεπτες συνέπειες (Wieder, 1989).

3. ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ

3.1. Περιγραφή βιοαντιδραστών επεξεργασίας υγρών αποβλήτων

Για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων χρησιμοποιούνται οι αντιδραστές ακινητοποιημένης ενεργής βιομάζας, όπου τα βακτηριακά κύτταρα προσκολλώνται σε ένα μεγάλης ειδικής επιφάνειας αδρανές υλικό το οποίο περιέχεται στο εσωτερικό του αντιδραστήρα (Qureshi *et al.*, 2005). Αυτό το υλικό μπορεί να είναι άμμος, διάφορα πορώδη σφαιρίδια από γυαλί, χαλαζία ή οργανικά πολυμερή, όπως πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλέλιο, PVC κ.α. Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται πάνω στο υπόστρωμα ένα λεπτό βιολογικό φιλμ (biofilm) (Shuler & Kargi, 2002). Ο σχηματισμός του βιολογικού φιλμ ή βιομεμβράνης είναι μια φυσική διεργασία καθώς τα βακτήρια προσκολλώνται στο αδρανές υλικό πλήρωσης του αντιδραστήρα χωρίς τη χρήση χημικών, σχηματίζοντας στοιβάδες από κύτταρα (Qureshi *et al.*, 2005). Η βιομάζα αναπτύσσεται γύρω από όλη την επιφάνεια των πορωδών σωματιδίων και το μέγεθος των βιολογικών φιλμ φτάνει τα μερικά χιλιοστά σε πάχος (Shuler & Kargi, 2002).

Στους αντιδραστές σχηματισμού βιολογικά ενεργών στρωμάτων μπορούν να επιτευχθούν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων, με αποτέλεσμα οι αντιδραστές να έχουν τη δυνατότητα να αναπτύξουν υψηλή παραγωγικότητα. Για την μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας, θα πρέπει να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των βακτηρίων (pH, θερμοκρασία, θρεπτικό μέσο) με στόχο να εξασφαλιστεί η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνεια αλληλεπίδρασης βιολογικού φιλμ και υγρού απόβλητου. Η απόδοση του αντιδραστήρα εξαρτάται κύρια από τη διατήρηση ικανού και ενεργού βιολογικού φιλμ κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του αποβλήτου καθώς και από τις συνθήκες που εξασφαλίζουν την αποφυγή τοξικών σοκ κατά τη λειτουργία του. Η διαδικασία της ακινητοποίησης και του σχηματισμού του βιολογικού φιλμ είναι αρκετά οικονομική, γιατί εκτός του ότι είναι μια φυσική διεργασία, υπάρχουν διαθέσιμα πολλά και φθηνά υλικά προσρόφησης. Ακόμα, αυτοί οι αντιδραστές είναι απλοί στην κατασκευή και την λειτουργία τους (Qureshi *et al.*, 2005).

3.2. Τύποι βιοαντιδραστήρων

Πολλοί και διαφορετικοί τύποι βιολογικών αντιδραστήρων έχουν χρησιμοποιηθεί σε εργαστηριακή κλίμακα με σοβαρές προοπτικές να εφαρμοστούν και στη βιομηχανία. Βασική τους αρχή είναι ότι οι βιολογικές διεργασίες λαμβάνουν χώρα εντός μιας βιομάζας. Τα θρεπτικά στοιχεία διαχέονται μέσα στη βιομάζα για να φτάσουν στα βακτήρια και τα προϊόντα των βιολογικών διεργασιών διαχέονται έξω από αυτή (Harremoës, 2003).

Ως προς τον τρόπο λειτουργίας τους οι βιοαντιδραστήρες διακρίνονται σε εκείνους όπου το μέσο πάνω στο οποίο αναπτύσσονται τα βακτήρια και σχηματίζουν στοιβάδες είναι στατικό και σε εκείνους όπου αυτό το μέσο βρίσκεται σε κίνηση διαμέσου μηχανικών ή υδραυλικών δυνάμεων. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους αντιδραστήρες σταθερής κλίνης (Packed Bed Reactors, PBR), τους αντιδραστήρες διαβροχής (Trickling Bed Reactors, TBR) και τους αντιδραστήρες αναερόβιας ύψους ανοδικής ροής (Upflow Anaerobic Sludge Blanket, UASB). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τους αντιδραστήρες ρευστοποιημένης κλίνης (Fluidized Bed Reactors, FBR), τους αντιδραστήρες με ρεύμα αέρα (Air Lift Reactors, ALR) και τους αντιδραστήρες πλήρους ανάμιξης (Continuous Stirred Tank Reactors, CSTR) (Qureshi *et al.*, 2005). Στην Εικόνα 13 παρουσιάζονται ποικίλοι βιοαντιδραστήρες συνεχόμενης ροής που χρησιμοποιούνται στην αναερόβια επεξεργασία υγρών αποβλήτων (Kaksonen & Puhakka, 2007).

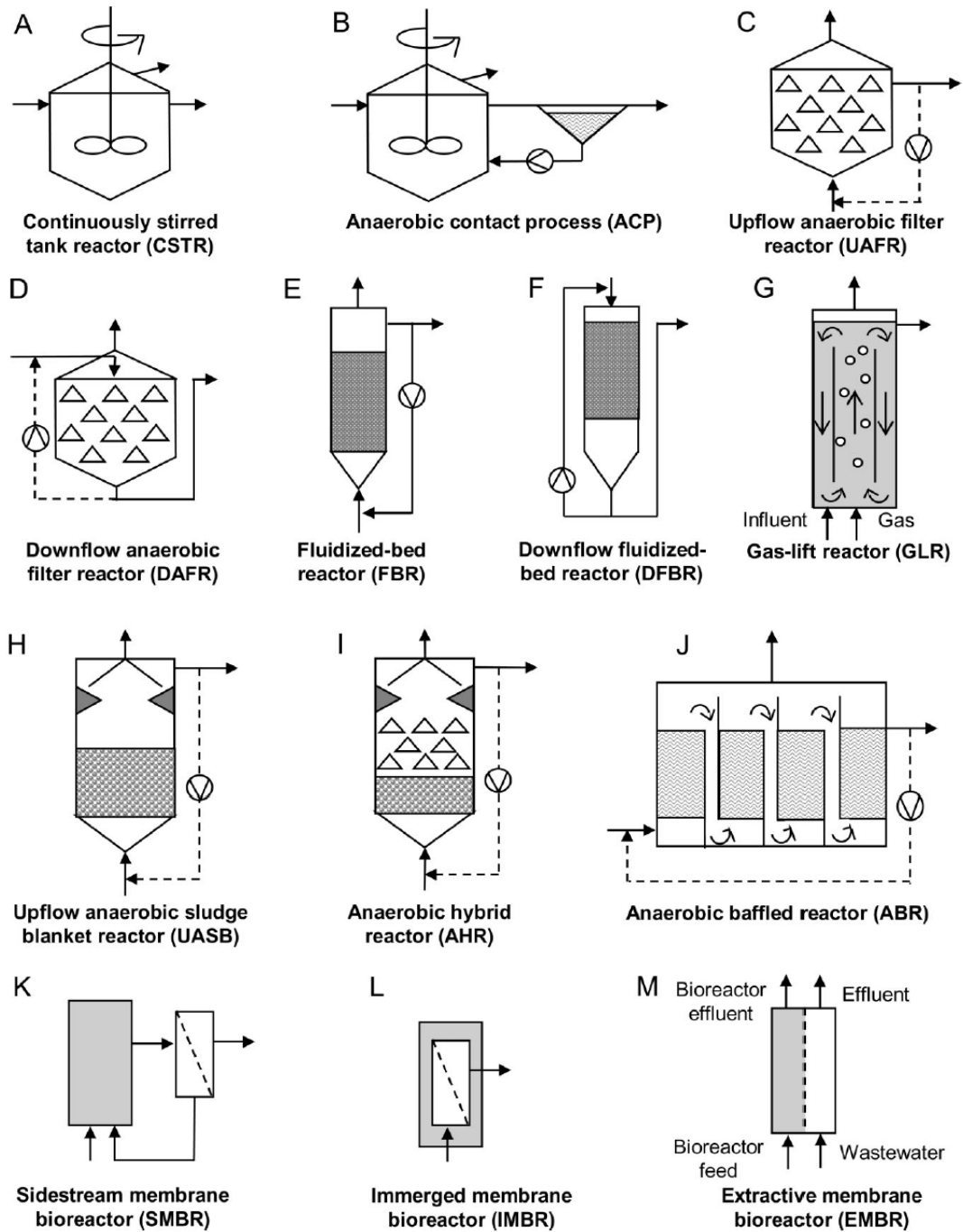
Καθένας από τους αντιδραστήρες μπορεί να έχει ασυνεχή ή συνεχή λειτουργία. Σε ένα βιοαντιδραστήρα ασυνεχούς λειτουργίας, είναι δύσκολο να διατηρηθεί ένας σταθερός ρυθμός ανάπτυξης της καλλιέργειας των βακτηρίων καθώς πολλά βακτήρια πεθαίνουν λόγω έλλειψης τροφής κατά το άδειασμα και ξαναγέμισμα του αντιδραστήρα και εξαιτίας του χρόνου που απαιτείται για να γίνει αυτό, η απόδοση του αντιδραστήρα αναμένεται να είναι μειωμένη (Qureshi *et al.*, 2005). Συνεπώς οι αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας δεν είναι πρακτικοί για την ανάπτυξη βιολογικών φιλμ και για αυτό προτιμάται η λειτουργία τους να είναι συνεχής (Droste, 1997).

Οι αντιδραστήρες σταθερής κλίνης πληρώνονται με κατάλληλο αδρανές υπόστρωμα και εμβολιάζονται με βακτηριακή καλλιέργεια για το σχηματισμό του βιολογικού φιλμ. Το αδρανές υπόστρωμα είναι το μέσο πάνω στο οποίο θα προσκολληθούν και θα αναπτυχθούν τα βακτήρια καθώς τους παρέχει μεγάλη ελεύθερη επιφάνεια. Ιδανικά υλικά-φορείς των βακτηρίων χαρακτηρίζονται από

μεγάλη επιφάνεια και υψηλό πορώδες που επιτρέπουν τη συσσώρευση περισσότερης βιομάζας (Droste, 1997).

Ο αντιδραστήρας τροφοδοτείται με κατάλληλη παροχή η οποία είναι επαρκής σε θρεπτικά συστατικά. Ανάλογα με τον τύπο της βακτηριακής καλλιέργειας, την ποσότητα των θρεπτικών συστατικών και το είδος του υποστρώματος, ο σχηματισμός των βιολογικών στρωμάτων μπορεί να διαρκέσει από λίγες έως και αρκετές μέρες. (Qureshi *et al.*, 2005). Από τη στιγμή όμως, που αναπτυχθεί η βακτηριακή καλλιέργεια, αυτοί οι αντιδραστήρες μπορούν να προσαρμοστούν σε αλλαγές που αφορούν στην παροχή και τη σύνθεση του παρεχόμενου θρεπτικού μέσου. Τέτοιου τύπου αντιδραστήρες τροφοδοτούνται συνήθως από τη βάση τους και συνεπώς το επεξεργασμένο υγρό απόβλητο εξέρχεται από την κορυφή του αντιδραστήρα (αντιδραστήρες ανοδικής ροής) (Droste, 1997).

Τα βακτήρια τείνουν να σχηματίζουν μια συμπαγή μάζα στη βάση του αντιδραστήρα με αποτέλεσμα, στο σημείο που γίνεται η τροφοδοσία, η πυκνότητά τους είναι αρκετά μεγαλύτερη από ό,τι στο υπόλοιπο τμήμα του αντιδραστήρα. Για το λόγο αυτό, το πρόβλημα που παρουσιάζουν συνήθως οι αντιδραστήρες σταθερής κλίνης είναι η έμφραξή τους στο τμήμα της εισροής του τροφοδοτούμενου μέσου. Η υπερβολική βακτηριακή ανάπτυξη στην είσοδο του αντιδραστήρα μπορεί να εξηγηθεί κυρίως λόγω της μεταβαλλόμενης συγκέντρωσης των θρεπτικών κατά μήκος του άξονα του αντιδραστήρα. Στην είσοδο το υγρό επιβραδύνεται και ανακατανέμεται έντονα σε αντίθεση με την έξοδο όπου επιταχύνεται και ομογενοποιείται. Η πιθανότητα προσκόλλησης των βακτηρίων στη είσοδο του αντιδραστήρα είναι αρκετά μεγαλύτερη από την πιθανότητα προσκόλλησης στη έξοδο, εξαιτίας του μεγαλύτερου χρόνου παραμονής και της επιβράδυνσης του υγρού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μικροβιακή μετατροπή του θρεπτικού υποστρώματος να λαμβάνει χώρα στα κατώτερα βακτηριακά στρώματα και οι μικροοργανισμοί στην έξοδο να λαμβάνουν περιορισμένη ποσότητα θρεπτικών (Esterl *et al.*, 2003).

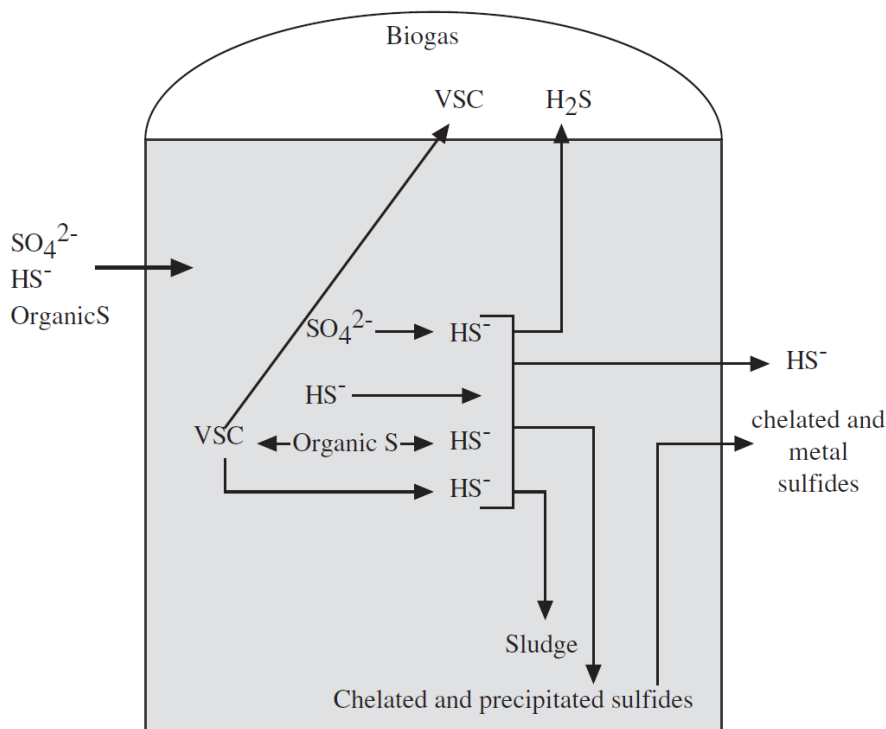


Εικόνα 13. Βιοαντιδραστήρες συνεχόμενης ροής αναερόβιας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Kaksonen & Puhakka, 2007).

3.3. Κυκλοφορία θείου στους βιοαντιδραστήρες

Οι ενώσεις του θείου που μεταφέρονται σε ένα αναερόβιο αντιδραστήρα υφίσταται μια σειρά από φυσικές και χημικές μεταβολές (Εικόνα 14). Τα ιόντα του δισθενούς θείου (S^{2-}) που εισέρχονται στον αντιδραστήρα ή παράγονται από τα θειοαναγωγικά βακτήρια με την αναερόβια διάσπαση ενώσεων που περιέχουν θείο ή μέσω της καταβολικής θειοαναγωγής, μπορεί:

- 1 να απομακρυνθούν από την υδάτινη φάση με τη δράση των θειοαναγωγικών βακτηρίων τα οποία τα καταναλώνουν
- 2 να δεσμευτούν από διαλυτά μέταλλα και να καθιζάνουν
- 3 να κατακρατηθούν από λιπαρά οξέα, τα οποία παράγονται στον αντιδραστήρα μέσω ζυμωτικών διεργασιών, ή να
- 4 να απελευθερωθούν ως αέριο υδρόθειο (H_2S) (Gerardi, 2006).



Εικόνα 14. «Κυκλοφορία» του θείου σε ένα αναερόβιο αντιδραστήρα. Θειούχες ενώσεις εισέρχονται στον αντιδραστήρα, ως SO_4^- , HS^- και θειούχων οργανικών ενώσεων. Η αναερόβια διάσπαση των θειούχων οργανικών ενώσεων απελευθερώνει S^- και πτητικές θειούχες ενώσεις (Volatile Sulfur Compounds, VSC). Μερικές από τις πτητικές θειούχες ενώσεις διασπώνται ενώ κάποιες άλλες συγκεντρώνονται στο βιοαέριο. Τα S^- χρησιμοποιούνται ως πηγή θείου από τα αναερόβια βακτήρια σχηματίζοντας αυξημένη λάσπη, ή ενώνονται με διαλυτά μέταλλα καταβυθίζοντάς τα. Τα θειοαναγωγικά βακτήρια ανάγουν τα θειικά ιόντα σε θειώδη (Gerardi, 2006).

Οι οργανικές θειούχες ενώσεις (αμινοξέα και πρωτεΐνες) αποικοδομούνται μέσω της αναερόβιας δράσης, δημιουργώντας θειο-ομάδες που έχουν την ίδια τύχη όπως και τα ιόντα του δισθενούς θείου. Τα θειικά ιόντα ανάγονται σε θειώδη μέσω της θειοαναγωγής των βακτηρίων. Ωστόσο, η περίσσεια θειικών ιόντων μπορεί να προκαλέσει :

- 1 αύξηση του δυναμικού οξειδοαναγωγής
- 2 παραγωγή του τοξικού υδρόθειου
- 3 μείωση του διαθέσιμου υποστρώματος για τα μεθανογόνα βακτήρια

Η παρουσία των θειικών ιόντων σε ένα αναερόβιο αντιδραστήρα αυξάνει το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Oxidation–Reduction Potential, ORP) της λάσπης. Με την αύξηση του δυναμικού οξειδοαναγωγής, τα μεθανογόνα βακτήρια γίνονται λιγότερο δραστήρια και ένα από τα πρωταρχικά τους υποστρώματα, τα λιπαρά οξέα, αυξάνεται. Από την άλλη πλευρά, τα βακτήρια ζύμωσης και τα θειοαναγωγικά βακτήρια δε μειώνουν τη δράση τους και συνεχίζουν να παράγουν λιπαρά οξέα. Τα συνεχώς αυξανόμενα λιπαρά οξέα καταστρέφουν την αλκαλικότητα και μειώνουν το pH, με αποτέλεσμα να επικρατούν όξινες συνθήκες στον αντιδραστήρα (Gerardi, 2006).

Αν και ο λόγος H_2S/HS^- σε χαμηλές συγκεντρώσεις ευνοεί ένα αναερόβιο αντιδραστήρα δεδομένου ότι συνιστά μια πηγή θείου για τα αναερόβια βακτήρια (και για τα μεθανογόνα), σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικός. Με την αύξηση της ποσότητας των ιόντων S^{2-} εξαιτίας της αναερόβιας δραστηριότητας και της μείωσης του pH (<7), σχηματίζεται το τοξικό H_2S (Gerardi, 2006).

Τα θειοαναγωγικά και τα μεθανογόνα βακτήρια έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά. Και οι δύο ομάδες βακτηρίων δρουν κάτω από αυστηρά αναερόβιες συνθήκες σε παρόμοιο εύρος pH και θερμοκρασίας. Όπως και τα μεθανογόνα βακτήρια, μερικά θειοαναγωγικά μπορούν να οξειδώσουν το υδρογόνο (H_2) και το οξικό οξύ (CH_3COOH), με αποτέλεσμα να ανταγωνίζονται μεταξύ τους. Αυτός ο ανταγωνισμός οδηγεί στην κατανάλωση του υποστρώματος από τα μεθανογόνα βακτήρια (Gerardi, 2006).

Στο επόμενο κεφάλαιο δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στον ανταγωνισμό μεταξύ διαφορετικών βακτηρίων σε ένα αναερόβιο βιοαντιδραστήρα.

3.4. Ανταγωνισμός μεταξύ διαφορετικών ομάδων βακτηρίων στους βιοαντιδραστήρες

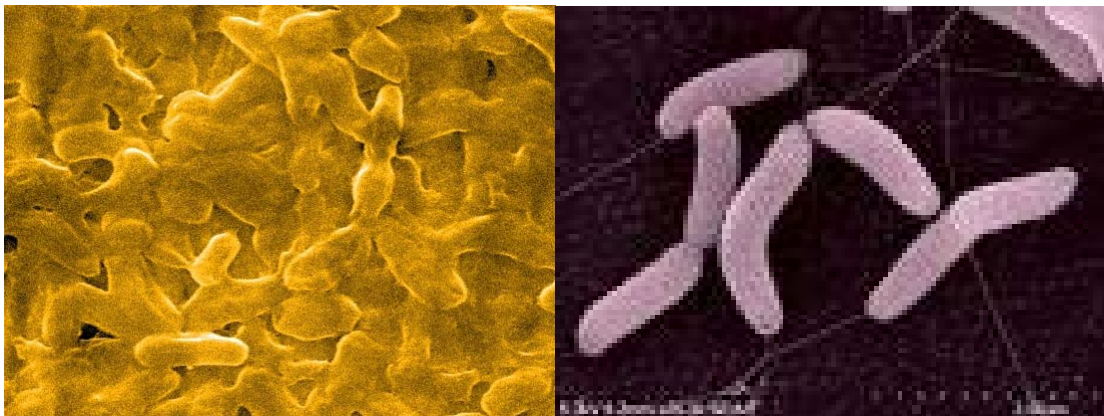
Τα θειοαναγωγικά βακτήρια πολλαπλασιάζονται στους βιοαντιδραστήρες επεξεργασίας, πλούσιων σε οργανικά συστατικά, υγρών αποβλήτων, ενώ παράλληλα ανταγωνίζονται με βακτήρια που χρησιμοποιούν οξικό ιόν (Acetate Bacteria, AB) και με μεθανογόνα βακτήρια (Methanogenic Bacteria, MB) για τα ενδιάμεσα προϊόντα της αναερόβιας διαδικασίας. Συνήθως, κατά την αναερόβια επεξεργασία υγρών αποβλήτων, ο πρώτος στόχος είναι η απομάκρυνση του άνθρακα με αποτέλεσμα να ευνοείται η παραγωγή μεθανίου. Έτσι, οι συνθήκες θα πρέπει να ευνοούν την ανάπτυξη των μεθανογόνων βακτηρίων και να εμποδίζουν όσο το δυνατό την ανάπτυξη και το μεταβολισμό των θειοαναγωγικών βακτηρίων. Αυτό ισχύει περισσότερο για τα υγρά απόβλητα με χαμηλό λόγο COD/SO₄⁻ (υψηλή συγκέντρωση SO₄⁻), όπου υψηλές συγκεντρώσεις S⁼ μπορούν να οδηγήσουν το σύστημα σε αστοχία. Αντίθετα, η μεθανογένεση στα υγρά απόβλητα με υψηλό λόγο COD/SO₄⁻ (χαμηλή συγκέντρωση SO₄⁻) δεν προκαλεί κανένα πρόβλημα, αν και ο περιορισμός των S⁼ στο παραγόμενο υγρό και βιοαέριο μπορεί να χρειαστεί. Οι βιοαντιδραστήρες απομάκρυνσης των θειικών ιόντων έχουν σχεδιαστεί πρόσφατα και έχουν σκοπό το ακριβώς αντίθετο: τη μέγιστη θειοαναγωγή συνδυασμένη με την πλήρη παρεμπόδιση της μεθανογένεσης (Lens & Kuenen, 2001).

Εκτεταμένες έρευνες έχουν γίνει για την κατανόηση των βασικών αρχών του ανταγωνισμού ανάμεσα στους διαφορετικούς μεταβολικούς τύπους βακτηρίων. Αν οι απαιτήσεις μια ομάδας βακτηρίων είναι γνωστές, τότε μπορούν να εξασφαλιστούν ειδικές συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξη της επιθυμητής ομάδας βακτηρίων. Ωστόσο, δεδομένου ότι ο ανταγωνισμός μεταξύ των ποικίλων ομάδων βακτηρίων επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, δεν είναι εφικτό να κατευθυνθεί ο ανταγωνισμός μεταξύ τους και να ευνοηθεί η μια ομάδα έναντι της άλλης (Lens & Kuenen, 2001).

Η αναζήτηση των κατάλληλων συνθηκών που ευνοούν τη μία ομάδα βακτηρίων έναντι της άλλης μπορεί να γίνει εμπειρικά όπως για παράδειγμα μεταβάλλοντας τις συνθήκες κατά τη διάρκεια πειραμάτων. Για παράδειγμα, ο ανταγωνισμός ανάμεσα στα θειοαναγωγικά και τα μεθανογόνα βακτήρια, μπορεί να κατευθυνθεί βάσει των διαφορών της φυσιολογίας τους. Αυτή η ιδέα έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για να ευνοηθεί η θειοαναγωγή με H₂ και μεθανόλη σε αναερόβιους αντιδραστήρες. Το «κατώφλι» ή κάτω όριο του απαιτούμενου H₂ που καταναλώνουν

τα θειοαναγωγικά είναι μικρότερο από το αντίστοιχο που καταναλώνουν τα μεθανογόνα βακτήρια. Συνεπώς, όταν προστίθεται υδρογόνο σε λάσπη με χαμηλές συγκεντρώσεις H_2 (και σε περίσσεια SO_4^-), τα θειοαναγωγικά βακτήρια που καταναλώνουν H_2 , θα το καταναλώσουν σε μία συγκέντρωση αρκετά χαμηλή για να επιτρέψει στα μεθανογόνα βακτήρια που καταναλώνουν H_2 να είναι ενεργά. Συνεπώς, σε αυτούς τους αντιδραστήρες τα μεθανογόνα βακτήρια βγαίνουν εκτός συναγωνισμού και αναπτύσσονται λύματα των οποίων η επεξεργασία βασίζεται πλήρως στη θειοαναγωγή. Τα θερμοφιλά θειοαναγωγικά βακτήρια που χρησιμοποιούν μεθανόλη αναπτύσσονται στους $65^\circ C$, ενώ τα αντίστοιχα μεθανογόνα δεν αναπτύσσονται καθόλου σε αυτή τη θερμοκρασία. Έτσι, τα μεθανογόνα βακτήρια θα μπορούσαν να αποκλειστούν τελείως από αντιδραστήρες με θερμοκρασία λειτουργίας τους $65^\circ C$ (Lens & Kuenen, 2001).

Για παράδειγμα μελέτη του είδους *Desulfovibrio desulfuricans* (Εικόνα 15) έδειξε, ότι παρουσία θειικών ιόντων σε ένα βιοαντιδραστήρα το συγκεκριμένο είδος ευνοείται και πολλαπλασιάζεται και χρησιμοποιώντας το υδρογόνο ανάγει τα θειικά ιόντα σε υδρόθειο. Το υδρογόνο χρησιμοποιείται ακόμα και από τα μεθανογόνα βακτήρια για να σχηματίζουν μεθάνιο, με αποτέλεσμα σε ένα αναερόβιο αντιδραστήρα να υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ αυτών των δύο ομάδων. Ωστόσο, τα μεθανογόνα βακτήρια χρησιμοποιούν λιγότερο υπόστρωμα και παράγουν λιγότερο μεθάνιο καθώς παρεμποδίζονται από το H_2S που παράγεται από τα θειοαναγωγικά βακτήρια. Ακόμα, όταν τα θειοαναγωγικά βακτήρια χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα αιθανόλη, παράγουν οξικό οξύ και δρουν ανταγωνιστικά για την αιθανόλη με τα μεθανογόνα βακτήρια ενώ παράλληλα παράγουν ένα υπόστρωμα για τα μεθανογόνα βακτήρια (Lens & Kuenen, 2001).



Εικόνα 15. *Desulfovibrio desulfuricans*, θειοαναγωγικό κατά Gram-αρνητικό βακτήριο. (http://images.google.gr/images?hl=el&rlz=1W1ITVA_&um=1&q=Desulfovibrio+desulfuricans&sa=N&start=0&ndsp=18)

Απουσία θειικών ιόντων πολλά θειοαναγωγικά βακτήρια, μπορούν και προσαρμόζονται και συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Μερικά αναπτύσσονται μαζί με τα μεθανογόνα βακτήρια που καταναλώνουν υδρογόνο. Σε αυτή την περίπτωση, τα θειοαναγωγικά βακτήρια παράγουν υποστρώματα όπως είναι το οξικό οξύ και το υδρογόνο, που χρησιμοποιούνται από τα μεθανογόνα βακτήρια (Gerardi, 2006).

Αν κάποιος επιθυμεί να ελέγξει τον ανταγωνισμό μεταξύ θειοαναγωγικών και μεθανογόνων βακτηρίων, θα πρέπει να λάβει υπόψη ότι και οι δύο ομάδες βακτηρίων έχουν παρόμοιες κινητικές σταθερές και αυξητικές παραμέτρους. Συνεπώς η χρονοκλίμακα για τον ανταγωνισμό και την επιλογή της μιας ομάδας βακτηρίων έναντι της άλλης αναμένεται να είναι μεγάλη (Lens & Kuenen, 2001). Οι Omil *et al.* (1998) έδειξαν σε επεξεργασμένα λύματα με 103 θειοαναγωγικά και 109 μεθανογόνα βακτηριακά κύτταρα που χρησιμοποιούν οξικό ιόν, ότι χρειάζονται περισσότερο από 1.000 ημέρες για να φτάσουν οι δύο πληθυσμοί στο ίδιο μέγεθος. Για το συγκεκριμένο υπόστρωμα τόσο τα θειοαναγωγικά όσο και τα μεθανογόνα παρουσιάζουν παραπλήσιες κινητικές παραμέτρους, με αποτέλεσμα να χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να ανακαλυφθούν μέθοδοι που ευνοούν την ανάπτυξη της μιας ομάδας έναντι της άλλης σε επεξεργασμένα λύματα (Lens & Kuenen, 2001).

3.5. Απομάκρυνση μετάλλων με αντιδραστήρες θειοαναγωγικών βακτηρίων

Στη φύση τρία προϊόντα αποθήκευσης θείου έχουν αναγνωριστεί: ο γύψος (CaSO_4), τα θειούχα μέταλλα, και το στοιχειακό θείο (S^0). Οι αυξανόμενες ανθρωπογενείς δραστηριότητες ωστόσο, έχουν διαταράξει τον βιολογικό κύκλο του θείου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολλών τύπων ρύπανσης και περιβαλλοντικών προβλημάτων όπως οχλήσεις από οσμές, διάβρωση, τοξικότητα, όξινη βροχή (παραγωγή θειικού οξέος από εκπομπές SO_x) καθώς και απελευθέρωση βαρέων μετάλλων από τα μεταλλεύματα και τα εδάφη. Η περιβαλλοντική τεχνολογία που βασίζεται στον βιολογικό κύκλο του θείου στηρίζεται στο σχηματισμό αδιάλυτων ενδιάμεσων ενώσεων, που μπορούν να διαχωριστούν από την υδατινή φάση. Είναι αναμενόμενο ότι τα ίδια στερεά που χρησιμοποιούνται στη φύση (CaSO_4 , θειούχα μέταλλα και S^0) χρησιμοποιούνται και στην περιβαλλοντική τεχνολογία. Δεδομένου ότι όλες οι θειούχες αέριες ενώσεις (H_2S και μερκαπτάνες) είναι τοξικές, διαβρωτικές και δύσσομες, η μετατροπή σε αέρια τελικά προϊόντα δεν μπορεί να εφαρμοστεί για τον περιορισμό του θείου. Κατά την παλαιότερη μέθοδο απομάκρυνσης του θείου (τη μέθοδο με ασβεστόλιθο και γύψο), οι οξειδωμένες θειούχες ενώσεις απομακρύνονταν

από την αέρια φάση ερχόμενες σε επαφή με ένα διαποτισμένο με νερό ασβεστολιθικό μίγμα, γεγονός που προκαλούσε το σχηματισμό γύψου. Αν και ο γύψος μπορεί να χρησιμοποιηθεί στις κατασκευές, η ρύπανση με βαρέα μέταλλα που προκαλεί, περιορίζει σημαντικά τις εφαρμογές του. Συνεπώς, σχηματίζονται μεγάλοι όγκοι αποβλήτων που πρέπει να απομακρυνθούν (Lens & Kuenen, 2001).

Η χρήση των ιόντων του δισθενούς θείου για την κατακρήμνιση αδιάλυτων θειούχων μετάλλων συνιστά μια πραγματική επιτυχία για την επεξεργασία ρυπασμένων υδάτων με βαρέα μέταλλα. Τα ιόντα θείου μπορούν να προστεθούν με χημικό τρόπο ή να παραχθούν από έναν αντιδραστήρα θειοαναγωγικών βακτηρίων. Οι θειούχες μεταλλικές ενώσεις πρέπει να διαχωριστούν από της υδάτινη φάση για περαιτέρω επεξεργασία. Μια πλήρης βιολογική διεργασία απομάκρυνσης του θείου από τις υγρές απορροές αποβλήτων βασίζεται στο σχηματισμό του στερεού S^0 , όπου σε ένα αντιδραστήρα θειοαναγωγικών βακτηρίων τα ιόντα θείου παράγονται από την οξείδωση θειούχων ενώσεων. Σε ένα δεύτερο αντιδραστήρα τα ιόντα του θείου μετατρέπονται σε στοιχειακό θείο μέσω μερικής βιολογικής οξείδωσης. Το S^0 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή οξέων ή ως λίπασμα (Lens & Kuenen, 2001).

3.6. Πλεονεκτήματα της θειοαναγωγικής επεξεργασίας σε βιοαντιδραστήρες

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων στους θειοαναγωγικούς αντιδραστήρες είναι η ταυτόχρονη απομάκρυνση των διαλυτών μετάλλων, των θειικών ιόντων και της οξύτητας από το απόβλητο και ο σχηματισμός μικρού όγκου ιλύος (Hammack *et al.*, 1994). Στην παραγόμενη ιλύ περιέχονται μέταλλα με τη μορφή θειούχων μεταλλικών ενώσεων, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αρκετά χαμηλότερη διαλυτότητα από αυτή των υδροξειδίων των μετάλλων που σχηματίζονται κατά τις συμβατικές χημικές μεθόδους. Ακόμα, οι θειούχες μεταλλικές ενώσεις είναι περισσότερο συμπαγείς, έχουν μεγαλύτερες ταχύτητες καταβύθισης και η ιλύς που σχηματίζουν πυκνώνεται και ξηραίνεται πιο εύκολα από τους αντίστοιχους πολφούς των υδροξειδίων των μετάλλων. Ένα ακόμα πλεονέκτημα είναι ότι το μέταλλο που παραμένει στην υδάτινη φάση σε ισορροπία με το στερεό θειούχο ίζημα του μετάλλου, βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Τέλος, ο διαχωρισμός των μετάλλων από την υδάτινη φάση παρέχει τόσο δυνατότητα ποσοτικής απομάκρυνσής τους από το υγρό απόβλητο, όσο και πιθανή δυνατότητα ανάκτησής τους από την ιλύ, εφόσον έχουν εμπορική αξία (π.χ. ιόντα χρυσού, αργύρου κ.α.) (Hammack *et al.*, 1994).

4. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η πειραματική μελέτη της απόδοσης ενός θειοαναγωγικού αντιδραστήρα σταθερής κλίνης-ανοδικής ροής εργαστηριακής κλίμακας, ως προς την αναγωγή των θειικών ιόντων και την καταβύθιση διαλυτών μετάλλων που περιέχονται σε αρχικό όξινο διάλυμα τροφοδοσίας. Οι επιμέρους στόχοι της παρούσας εργασίας είναι οι ακόλουθοι:

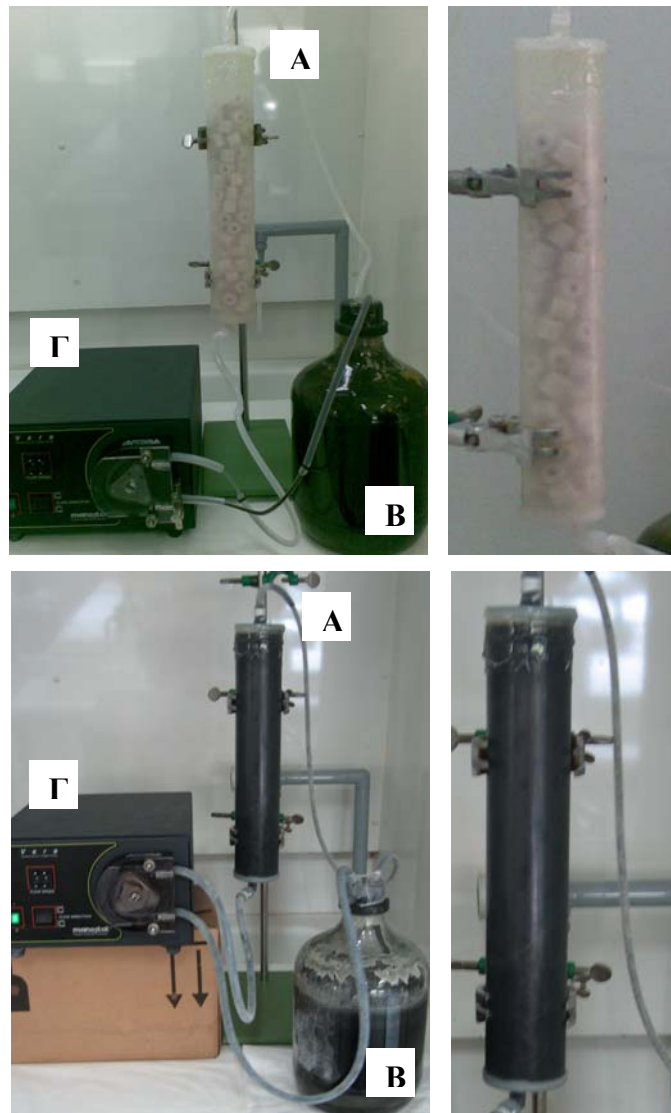
- 1 η εξασφάλιση ενός βιολογικού φιλμ στο εσωτερικό του αντιδραστήρα με αρχική πηγή άνθρακα το γαλακτικό νάτριο και εκχύλισμα ζύμης.
- 2 η σταδιακή αντικατάσταση του γαλακτικού από την αιθανόλη δεδομένου ότι η αιθανόλη συνιστά ένα φθινό οργανικό υπόστρωμα σε σχέση με το γαλακτικό (Kaksonen *et al.*, 2003a).
- 3 η ελάττωση της τροφοδοτούμενης ποσότητας της αιθανόλης αποβλέποντας στην ελαχιστοποίηση αφενός των προστιθέμενων αντιδραστηρίων για λόγους εξοικονόμησης των υλικών και αφετέρου των υπολειμματικών οργανικών συστατικών στην απορροή του αντιδραστήρα για την ασφαλέστερη διάθεση του επεξεργασμένου αποβλήτου.
- 4 η μελέτη της συμπεριφοράς του μικροβιακού πληθυσμού στην αλλαγή του οργανικού υποστρώματος μέσω της μέτρησης του pH, της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων, των ιόντων του δισθενούς θείου, του συνολικού οργανικού άνθρακα και των διαλυτών μετάλλων (παράμετροι λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα).
- 5 η παρακολούθηση της μεταβολής των παραπάνω παραμέτρων λειτουργίας σε συνάρτηση με το χρόνο ξεκινώντας από καθορισμένες αρχικές συνθήκες (πειράματα κινητικής).

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1. Περιγραφή πειραματικής διάταξης

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιείται αντιδραστήρας σταθερής κλίνης ανοδικής ροής εργαστηριακής κλίμακας. Στην Εικόνα 16 απεικονίζεται η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε η οποία είναι απλή και αποτελείται από:

- 1 μία πλαστική στήλη (Α) με διάμετρο 5 cm και ύψος 30 cm. Η στήλη διαθέτει ένα σημείο εισόδου στη βάση και ένα σημείο εξόδου στην κορυφή
- 2 ένα δοχείο (Β) που περιέχει το διάλυμα τροφοδοσίας και
- 3 μία περισταλτική αντλία (Γ), με την οποία εξασφαλίζεται η τροφοδοσία της στήλης με το μίγμα θρεπτικού μέσου-θεικών ιόντων-διαλυτών μετάλλων, για την ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων.



Εικόνα 16. Πειραματική διάταξη (πριν από τον εμβολιασμό (πάνω) και μετά από την ανάπτυξη της καλλιέργειας (κάτω).

Η κλίνη του αντιδραστήρα πληρώνεται με αδρανή πορώδη σφαιρίδια (SintoMec®), διαμέτρου 1 cm, πάχους τοιχώματος 5 mm και ειδικής επιφάνειας 1200 m²/l (Εικόνα 17), πάνω στα οποία ακινητοποιείται η αναπτυσσόμενη βιομάζα και λαμβάνει χώρα η υπό μελέτη διεργασία. Η κλίνη πληρώνεται με τα σφαιρίδια έως τα 26 cm.



Εικόνα 17. Πορώδη σφαιρίδια SintoMec®.

5.2. Αρχικές συνθήκες λειτουργίας

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων η λειτουργία του βιοαντιδραστήρα είναι συνεχής και γίνεται σε κλειστό κύκλωμα.. Ο αντιδραστήρας αρχικά εμβολιάζεται με χωνεμένη ιλύ από το βιολογικό καθαρισμό λυμάτων της Μεταμόρφωσης και τροφοδοτείται με κατάλληλο θρεπτικό μέσο, το οποίο χρησιμοποιείται τυπικά για τις καλλιέργειες των θειοαναγωγικών βακτηρίων (DSMZ, *Desulfonivibrio* medium, Medium 63) (Postgate, 1965). Στον Πίνακα 8 παρουσιάζεται η σύσταση του θρεπτικού μέσου, όπου ο κύριος δότης ηλεκτρονίων είναι το γαλακτικό ιόν. Το θρεπτικό μέσο περιέχει θειικά ιόντα (1,5-1,8 g/l) και σίδηρο (100 mg/l). Το γαλακτικό συνιστά ένα καλό οργανικό υπόστρωμα για τα περισσότερα θειοαναγωγικά βακτήρια, τα οποία παρουσία του εμφανίζουν υψηλό ρυθμό ανάπτυξης (Kaksonen *et al.*, 2003a). Για τον εμπλουτισμό και την ανάπτυξη της βακτηριακής καλλιέργειας εκτός από το γαλακτικό χρησιμοποιείται αρχικά και εκχύλισμα ζύμης.

Πίνακας 8. Σύσταση θρεπτικού μέσου κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας..

Χημικό συστατικό	Συγκέντρωση (g/l)
Γαλακτικό νάτριο (50%)	4
Εκχύλισμα ζύμης	1
Na ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
NH ₄ Cl	1
K ₂ HPO ₄	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1
Θειογλυκολικό νάτριο	0.1
Ασκορβικό οξύ	0.1
Resazurin	0.001

5.3. Σειρές πειραμάτων-Κύκλοι λειτουργίας αντιδραστήρα σε κλειστό κύκλωμα

Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται συνοπτική περιγραφή των σειρών πειραμάτων που πραγματοποιούνται. Κάθε μία σειρά πειραμάτων περιλαμβάνει διαφορετικούς κύκλους τροφοδοσίας του αντιδραστήρα. Κάθε περίοδος από τη στιγμή τροφοδοσίας του βιοαντιδραστήρα με νέο διάλυμα τροφοδοσίας μέχρι την ανανέωσή του συνιστά ένα κύκλο λειτουργίας, ο οποίος χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη σύσταση του διαλύματος τροφοδοσίας και διαρκεί συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Το διάλυμα τροφοδοσίας ανανεώνεται όταν διαπιστωθεί από τον προσδιορισμό των παραμέτρων παρακολούθησης (π.χ. pH, συγκέντρωση των θεικών ιόντων, συγκέντρωση των οργανικών συστατικών κ.α.) ότι ο βακτηριακός πληθυσμός έχει οξειδώσει το οργανικό υπόστρωμα και έχουν αναχθεί τα θειικά ιόντα. Δείγματα λαμβάνονται τόσο από το αρχικό διάλυμα τροφοδοσίας όσο και κατά τη διάρκεια του κύκλου μέχρι το τέλος του. Η χρονική στιγμή της ολοκλήρωσης του εκάστοτε κύκλου καθορίζεται από τη μηδενική συγκέντρωση των θεικών ιόντων.

1^η σειρά: Για την ανάπτυξη της μικτής καλλιέργειας θειοαναγωγικών βακτηρίων, ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται αρχικά το γαλακτικό νάτριο με εκχύλισμα ζύμης. Το εκχύλισμα της ζύμης χρησιμοποιείται μόνο στην πρώτη σειρά πειραμάτων με σκοπό την ενίσχυση της βακτηριακής ανάπτυξης. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η ανάπτυξη βιολογικού φιλμ στο υπόστρωμα της κλίνης στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την πρώτη σειρά πειραμάτων μέχρι και την πλήρη αντικατάσταση του γαλακτικού από την αιθανόλη (τέταρτη σειρά πειραμάτων) αποφεύγεται η προσθήκη μετάλλων εκτός από το σίδηρο με σκοπό να αποφευχθεί η πιθανή ανασχεση της ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού. Κατά τη διάρκεια της πρώτης περιόδου λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα η οποία διαρκεί συνολικά 35 ημέρες (Πίνακας 9) πραγματοποιείται συστηματική παρακολούθηση των παραμέτρων λειτουργίας. Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται από την έξοδο του αντιδραστήρα. Τόσο στα συλλεχθέντα δείγματα από την έξοδο όσο και στα δείγματα του αρχικού διαλύματος τροφοδοσίας του αντιδραστήρα, αφού προσδιοριστεί το pH, ακολουθεί ο προσδιορισμός των ακόλουθων παραμέτρων λειτουργίας:

1. η συγκέντρωση των θεικών ιόντων (SO_4^{2-}).
2. η συγκέντρωση των ιόντων του δισθενούς θείου (S^{2-}).

3. η συγκέντρωση των οργανικών συστατικών (μετρούμενη παράμετρος: χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD) ή ολικός οργανικός άνθρακας (TOC)).
4. η συγκέντρωση του διαλυτού σιδήρου.

Οι συγκεκριμένες παράμετροι λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα προσδιορίζονται σε δείγματα που συλλέγονται κατά τη διάρκεια κάθε σειράς πειραμάτων.

2^η σειρά: Κατά τη δεύτερη χρονική περίοδο (χρονική διάρκεια: 13 ημέρες) ο αντιδραστήρας λειτουργεί με το γαλακτικό ως αποκλειστική πηγή άνθρακα/ηλεκτρονίων και απουσία ζύμης (Πίνακας 9) και προσδιορίζονται οι προαναφερθείσες παράμετροι λειτουργίας στα δείγματα που συλλέγονται.

3^η σειρά: Έπειτα από την ανάπτυξη επαρκούς πληθυσμού θειοαναγωγικών βακτηρίων παρουσία γαλακτικού, γεγονός που διαπιστώνεται έμμεσα από την παρατηρούμενη αναγωγή των θεικών και το μαύρο χρώμα του εσωτερικού της κλίνης που αποδίδεται στο σχηματισμό FeS, γίνεται η αντικατάστασή του από αιθανόλη, ώστε το COD του διαλύματος τροφοδοσίας να παραμένει σταθερό. Η αντικατάσταση του γαλακτικού από την αιθανόλη πραγματοποιείται σταδιακά (χρονική διάρκεια: 30 ημέρες) προκειμένου να μην «καταπονηθεί» ο βακτηριακός πληθυσμός και να εξασφαλιστεί η επιτυχής λειτουργία του βιοαντιδραστήρα (Πίνακας 9). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι σύμφωνα με τους Kaksonen *et al.*, (2003a), η χρονική περίοδος της σταδιακής αντικατάστασης του γαλακτικού από την αιθανόλη σε ένας ανοδικής ροής αναερόβιο βιοαντιδραστήρα θειοαναγωγικών βακτηρίων (Upflow Anaerobic Sludge Blanket reactor, UASB) διήρκησε 50 ημέρες.

4^η σειρά: Κατά τη διάρκεια της τέταρτης σειράς πειραμάτων (χρονική διάρκεια: 21 ημέρες) η διατήρηση της βακτηριακής καλλιέργειας βασίζεται αποκλειστικά (100%) στην αιθανόλη ως τη μοναδική πηγή άνθρακα/ηλεκτρονίων. Η αιθανόλη προστίθεται σε περίσσεια. Από την παρακολούθηση των παραμέτρων λειτουργίας μελετάται η απόδοση του βιοαντιδραστήρα στις υπό μελέτη συνθήκες λειτουργίας (Πίνακας 9).

5^η σειρά: Κατά τη διάρκεια της πέμπτης σειράς πειραμάτων (χρονική διάρκεια: 9 ημέρες) η αιθανόλη εξακολουθεί να προστίθεται σε περίσσεια και παράλληλα προστίθενται τρία επιπλέον μέταλλα (Πίνακας 9). Συγκεκριμένα προστίθεται Ψευδάργυρος ως $ZnCl_2$, Χαλκός ως $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ και Νικέλιο ως $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ σε συγκέντρωση 100mg/l το καθένα και διερευνάται ο βαθμός απομάκρυνσης των ιόντων των τεσσάρων μετάλλων (Fe, Zn, Cu, Ni) από το υγρό απόβλητο.

6^η σειρά: Κατά τη διάρκεια της έκτης σειράς πειραμάτων (χρονική διάρκεια: 7 ημέρες) η ποσότητα της προστιθέμενης αιθανόλης ελαττώνεται στη στοιχειομετρικά απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναγωγή των θεικών ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα που τροφοδοτείται στον αντιδραστήρα και διερευνάται εκ νέου η επίδραση του νέου λόγου COD/SO_4^{2-} στην απόδοση του αντιδραστήρα. Επίσης και σε αυτή τη χρονική περίοδο μελετάται ο βαθμός απομάκρυνσης των ιόντων των τεσσάρων μετάλλων (Fe, Zn, Cu, Ni) από το υγρό απόβλητο.

Πίνακας 9. Συνθήκες μελέτης της απόδοσης του βιοαντιδραστήρα.

Κωδ	Χρονική διάρκεια			Αρχικές συνθήκες			
	Από	Έως	Ημέρες	Δότης ηλεκτρονίων & Πηγή άνθρακα	pH	Λόγος COD/SO_4^{2-}	Μέταλλα (100 ppm)
α	10-Φεβ-09	17-Μαρ-09	35	Γαλακτικό & ζύμη	6,3-6,9	-	Fe
β	17-Μαρ-09	30-Μαρ-09	13	Γαλακτικό	5,1-5,2	1,11	Fe
γ	30-Μαρ-09	29-Απρ-09	30	Γαλακτικό & Αιθανόλη	4,5-5,1	1,11	Fe
δ	29-Απρ-09	20-Μαΐ-09	21	Αιθανόλη	3,9-4,2	1,11	Fe
ε	20-Μαΐ-09	29-Μαΐ-09	9	Αιθανόλη	3,0-3,6	1,11	Fe, Zn, Cu & Ni
στ	29-Μαΐ-09	5-Ιουν-09	7	Αιθανόλη	3,3-3,6	0,67	Fe, Zn, Cu & Ni

Κινητική μελέτη παραμέτρων λειτουργίας: Ταυτόχρονα με τα πειράματα πάνω στη σύνθεση του τροφοδοτούμενου θρεπτικού μέσου, γίνεται η μελέτη των παραμέτρων λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα σε συνάρτηση με το χρονικό διάστημα ξεκινώντας από καθορισμένες αρχικές συνθήκες. Συγκεκριμένα λαμβάνονται δείγματα σε τακτά χρονικά διαστήματα με σκοπό τη μέτρηση του pH και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων, των ιόντων του δισθενούς θείου, των οργανικών συστατικών και των διαλυτών μετάλλων (Fe, Zn, Cu, Ni). Οι τέσσερις διαφορετικές αρχικές συνθήκες των πειραμάτων της κινητικής φαίνονται στο Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα σε 4 πειράματα κινητικής.

Αριθ.	Χρονική διάρκεια			Δότης ηλεκτρονίων & Πηγή άνθρακα	Λόγος COD/SO ₄ ²⁻	Μέταλλα (100 ppm)
	Από	Έως	Ημέρες			
(i)	23-Μαρ-09	30-Μαρ-09	6.92	Γαλακτικό	1,11	Fe
(ii)	18-Μαΐ-09	20-Μαΐ-09	2.00	Αιθανόλη	1,11	Fe
(iii)	27-Μαΐ-09	29-Μαΐ-09	2.02	Αιθανόλη	1,11	Fe, Zn, Cu & Ni
(iv)	04-Ιουν-09	05-Ιουν-09	1.14	Αιθανόλη	0,67	Fe, Zn, Cu & Ni

5.4. Παρακολούθηση παραμέτρων λειτουργίας

Η συλλογή των δειγμάτων γινόταν από την έξοδο απορροής του αντιδραστήρα. Έπειτα από την μέτρηση του pH σε κάθε δείγμα ακολούθησε η υπό κενό διήθησή τους, από φίλτρο με άνοιγμα πόρων 0,45 μm και ο προσδιορισμός των ακόλουθων παραμέτρων:

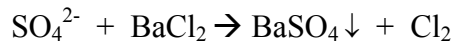
1. η συγκέντρωση των θεικών ιόντων (SO₄²⁻), με στόχο τη διερεύνηση της ποσοτικής αναγωγής τους.
2. η συγκέντρωση των ιόντων του δισθενούς θείου (S²⁻).
3. η συγκέντρωση των οργανικών συστατικών (μετρούμενη παράμετρος: χημικός απαιτούμενο οξυγόνο (COD) ή ολικός οργανικός άνθρακας (TOC)), με στόχο τη διερεύνηση του βαθμού διάσπασης του οργανικού υποστρώματος.
4. η συγκέντρωση των διαλυτών μετάλλων, με στόχο τη διερεύνηση της ποσοτικής καταβύθισής τους.

5.4.1. pH

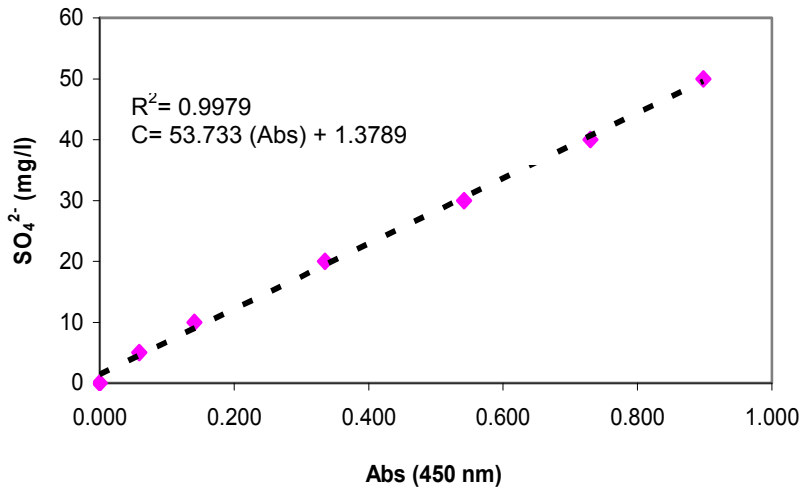
Οι μετρήσεις του pH πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου με το ηλεκτρονικό pH-μετρο sension4 (HACH). Η βαθμονόμηση του οργάνου γίνεται με δύο ρυθμιστικά διαλύματα (pH: 4 και 7).

5.4.2. Συγκέντρωση θεικών ιόντων (SO₄²⁻)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο HACH DR/2000 και εφαρμόζεται η μέθοδος 8051, η οποία βασίζεται στην ακόλουθη αρχή: το θεικό ιόν καταβυθίζεται σε ένα μέσο οξικού οξέος με χλωριούχο βάριο (BaCl₂) για να σχηματιστούν κρύσταλλοι θεικού βαρίου (BaSO₄) ομοιόμορφου μεγέθους σύμφωνα με την αντίδραση:



Η παραγόμενη θολερότητα μετριέται ως απορρόφηση στα 450 nm και αντιστοιχείται σε συγκέντρωση θεικών ιόντων στο διάλυμα σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς που δημιουργείται έπειτα από τη μέτρηση προτύπων διαλυμάτων θεικών ιόντων (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Καμπύλη αναφοράς.

5.4.3. Συγκέντρωση ιόντων του δισθενούς θείου (S²⁻)

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ιόντων του δισθενούς θείου (S²⁻) χρησιμοποιείται το φασματοφωτόμετρο HACH DR/2000 (Μέθοδος 8131), όπου το μήκος κύματος ρυθμίζεται στα 665 nm. Κάθε αραιωμένο δείγμα τοποθετείται σε μία κυψελίδα μέχρι τη χαραγή των 25 ml. Ακολουθεί η προσθήκη δύο αντιδραστηρίων (από 1 ml το καθένα) ανάδευση και αναμονή για 5 λεπτά. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι ακόλουθες: το H₂S και τα διαλυτά MeS σε όξινες συνθήκες αντιδρούν με την οξαλική N,N-διμέθυλο-p-φαινυλ-διαμίνη για το σχηματισμό του μπλε του μεθυλενίου. Όσο πιο έντονο είναι το μπλε του μεθυλενίου τόσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του δείγματος σε S²⁻. Η συγκέντρωση μετράται σε mg/l. Ένα δείγμα τυφλού με απιονισμένο νερό προετοιμάζεται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

5.4.4. Συγκέντρωση οργανικών συστατικών

Υπάρχουν πολλοί τρόποι που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μέτρηση του οξυγόνου που απαιτείται για την βιοαποικοδόμηση των οργανικών συστατικών. Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για τη χημική οξείδωση των αποβλήτων ενώ το

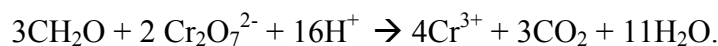
βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand, BOD) είναι η ποσότητα του οξυγόνου που απαιτείται για τη βιολογική αποικοδόμηση των αποβλήτων από τους μικροοργανισμούς. Οι μετρήσεις των μη βιοαποικοδομήσιμων οργανικών γίνονται συνήθως με τη δοκιμή COD, ενώ μπορούν επίσης να υπολογισθούν από την ανάλυση του ολικού οργανικού άνθρακα (Total Organic Carbon, TOC) (Τσέζος & Ρεμουντάκη, 2006).

Το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο, COD, είναι μια μετρούμενη ποσότητα που δεν εξαρτάται ούτε από την ικανότητα των μικροοργανισμών να αποικοδομούν τα απόβλητα ούτε από τη γνώση των συγκεκριμένων ουσιών που περιέχονται στο απόβλητο. Σε μια δοκιμή COD, χρησιμοποιείται ένα ισχυρό οξειδωτικό μέσο για την οξείδωση των οργανικών αντί των μικροοργανισμών. Η δοκιμή COD είναι πολύ ταχύτερη από τη δοκιμή BOD και διαρκεί μόνο λίγες ώρες. Ωστόσο, δεν γίνεται διάκριση μεταξύ του απαιτούμενου οξυγόνου που θα παρατηρηθεί σε ένα φυσικό περιβάλλον λόγω βιοαποικοδόμησης και της χημικής οξείδωσης της μη βιοαποικοδομήσιμης οργανικής ύλης. Ούτε δίνει καμιά πληροφορία για το ρυθμό προόδου της βιοαποικοδόμησης. Η μετρούμενη τιμή του COD είναι υψηλότερη από το BOD, ωστόσο για εύκολα αποικοδομήσιμη ύλη οι δυο τιμές θα είναι αρκετά παρόμοιες (Τσέζος & Ρεμουντάκη, 2006). Στην παρούσα εργασία προσδιορίζεται το COD και σε ορισμένα δείγματα το TOC. Ακολουθεί η περιγραφή των δύο μεθόδων.

5.4.4.1. Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand, COD)

Το χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο ή COD προσδιορίζεται σε mg καταναλισκόμενου οξυγόνου ανά λίτρο (l) δείγματος, σύμφωνα με τη χρωματομετρική-φασματοφωτομετρική μέθοδο, η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1^ο Στάδιο-Οξείδωση της οργανικής ύλης: Για την πλήρη οξείδωση των οργανικών ουσιών που περιέχονται στο δείγμα, χρησιμοποιείται ένα ισχυρά οξειδωτικό αντιδραστήριο: το διχρωμικό κάλιο. Τα οξειδώσιμα οργανικά συστατικά του δείγματος αντιδρούν, ανάγοντας το διχρωμικό ιόν ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) σε χρωμικό (Cr^{3+}). Εάν παρασταθεί η απλούστερη οξειδώσιμη ένωση με CH_2O τότε γίνεται η ακόλουθη αντίδραση:



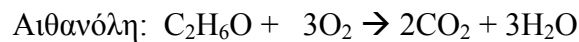
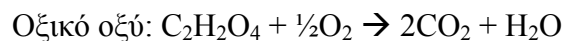
Η οξείδωση γίνεται υπό θέρμανση (σε κατάλληλη συσκευή στους 150 °C για δύο ώρες), παρουσία θειικού οξέος, καταλύτη συνήθως αργύρου και θειικού

υδραργύρου. Η προσθήκη θεικού υδραργύρου δεσμεύει τα χλωριόντα που τυχόν υπάρχουν στο δείγμα και παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό.

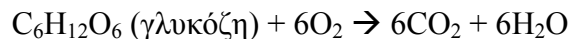
2^ο Στάδιο-Προσδιορισμός COD με τη χρωματομετρική-φασματοφωτομετρική μέθοδο: εδώ προσδιορίζεται η ποσότητα των ιόντων Cr⁶⁺ που απομένουν στο διάλυμα μετά την οξείδωση της οργανικής ύλης, φασματοφωτομετρικά (HACH DR/2000) σε μήκος κύματος 420 nm. Το φασματοφωτόμετρο είναι προβαθμονομημένο ώστε να παρέχει απευθείας ανάγνωση της ποσότητας του COD του δείγματος. Άρα, η ποσότητα του COD που αντιστοιχεί σε κάθε δείγμα, δίνεται από την απευθείας ανάγνωση στο φασματοφωτόμετρο (Τσέζος, 2005).

5.4.4.2. Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (Total Organic Carbon, TOC)

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ολικού οργανικού άνθρακα γίνεται φασματοφωτομετρικά (HACH DR/2500). Το TOC παρέχει μια πιο άμεση έκφραση του οργανικού χημικού περιεχομένου του νερού σε σχέση με το BOD ή το COD, αλλά δεν παρέχει τις ίδιες πληροφορίες γιατί είναι ανεξάρτητο από το βαθμό οξείδωσης του οργανικού υλικού. Για παράδειγμα το οξικό οξύ (C₂H₂O₄) έχει το ίδιο TOC με την αιθανόλη (C₂H₆O) επειδή έχουν τον ίδιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Το COD αποτελεί μια έμμεση μέτρηση του οργανικού άνθρακα που βασίζεται στην κατανάλωση οξυγόνου και είναι το άθροισμα όλων των χημικώς οξειδώσιμων ουσιών. Έτσι η αιθανόλη θα έχει υψηλότερο COD από ό,τι το οξικό οξύ καθώς απαιτείται περισσότερο οξυγόνο για να διασπαστεί (Φίλιππας, 2007).



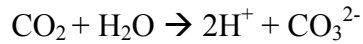
Συσχέτιση ανάμεσα σε μετρήσεις του COD, BOD & TOC



όπου, O₂: καταγράφεται από την ανάλυση COD & BOD, CO₂: καταγράφεται από την ανάλυση TOC
Ο οργανικός άνθρακας που περιέχεται στο δείγμα οξειδώνεται σε CO₂ με προσθήκη του αντιδραστηρίου υπερθεικών με θέρμανση στους 103-105°C για δύο ώρες σύμφωνα με την αντίδραση:



Έπειτα, το CO₂ διαχέεται και «παγιδεύεται» σε ένα υδατικό διάλυμα το οποίο περιέχει ένα δείκτη για τη μέτρηση του pH. Το απορροφημένο CO₂ σχηματίζει ανθρακικό οξύ σύμφωνα με την αντίδραση:



Εξαιτίας της αλλαγής του pH του διαλύματος ο δείκτης αλλάζει χρώμα. Η συγκέντρωση του άνθρακα στο διάλυμα είναι ανάλογη με την αλλαγή του χρώματος του δείκτη (Φίλιππας, 2007).

5.4.5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης διαλυτών μετάλλων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του διαλυτού Σιδήρου, Ψευδαργύρου, Χαλκού και Νικελίου πραγματοποιείται με τη μέθοδο της φασματοφωτομετρίας επαγωγικού πλάσματος. Το σύστημα Leeman Labs Direct Reading Echelle (DRE) αξιοποιεί τη φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής (Atomic Emission Spectroscopy, AES), για τη χημική ανάλυση μετάλλων σε διαλύματα. Στη φασματοσκοπία ατομικής εκπομπής όταν διεγείρεται κάθε στοιχείο εκπέμπει ακτινοβολία σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η ένταση της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας είναι ανάλογη με τον αριθμό των ατόμων που είναι παρόντα.

Το σύστημα DRE χρησιμοποιεί μια πηγή επαγωγικού πλάσματος (Inductively Coupled Plasma, ICP) που παρέχει ενέργεια διέγερσης, η οποία συνδέεται απευθείας σε ένα ανάγνωσης κλίμακας φασματοφωτόμετρο με σκοπό το διαχωρισμό και τη μέτρηση της ακτινοβολίας εξόδου. Η πηγή επαγωγικού πλάσματος λειτουργεί σε θερμοκρασιακό εύρος 7.000-9.000°K, μέσα στο οποίο διεγείρεται η πλειονότητα των στοιχείων. Κάθε στοιχείο μετά από τη διέγερσή του εκπέμπει ακτινοβολία που είναι χαρακτηριστική για αυτό.

Το πλάσμα στο Leeman labs DRE σχηματίζεται με αέριο αργό (Ar), χρησιμοποιώντας ενέργεια που παρέχεται από μία γεννήτρια ραδιοσυχνότητας. Η ισχύς κυμαίνεται από 1.0 έως 1.2 kW σε συχνότητα 40.68 MHz. Αυτή η ενέργεια είναι αρκετή για να ιονίσει ή να απομακρύνει ένα ηλεκτρόνιο από το φυσιολογικά αδρανές άτομο του αργού. Όταν σχηματιστούν τα ιόντα του αργού σε ένα πλάσμα, μπορούν να απορροφήσουν αρκετή ενέργεια από την πηγή RF για να διατηρήσουν τη θερμοκρασία του πλάσματος στο επίπεδο όπου περαιτέρω ιονισμός διατηρεί το πλάσμα απεριόριστα.

Η ακτινοβολία εκπομπής που εκπέμπεται από τα στοιχεία ενισχύεται και ανιχνεύεται κατάλληλα. Η συγκέντρωση κάθε στοιχείου προσδιορίζεται με τη χρήση κατάλληλης καμπύλης βαθμονόμησης. Στο ICP παρέχεται η δυνατότητα σε κάθε δείγμα να εκτελείται ταυτόχρονα προσδιορισμός περισσότερων από ένα στοιχείων (πολυστοιχειακή ανάλυση) (Kenkel, 2003).

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ελήφθησαν καθ’ όλη τη διάρκεια της πειραματικής εργασίας (115 ημέρες) με έμφαση στις επιμέρους παραμέτρους που προσδιορίζονταν καθώς και τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης που πραγματοποιήθηκε στις διάφορες συνθήκες.

6.1. Μεταβολή του pH

Τα βιομηχανικά υγρά απόβλητα που επεξεργάζονται οι αντιδραστήρες αναερόβιας επεξεργασίας με τη χρήση θειοαναγωγικών βακτηρίων που περιέχουν υψηλή συγκέντρωση θειικών ιόντων και διαλυμένων ιόντων μετάλλων, έχουν χαμηλό pH που συνήθως κυμαίνεται από 2,5 έως 4. Εξαιτίας της μεταβολικής δράσης των βακτηρίων αυτή η οξύτητα εξουδετερώνεται με αποτέλεσμα το pH στην απορροή του αντιδραστήρα να κυμαίνεται από 7 έως 9 (Ρεμουντάκη & Τσέζος, 2002).

Στην παρούσα εργασία καθ’ όλη τη διάρκεια της λειτουργίας του αντιδραστήρα, λαμβάνει χώρα σταδιακή εξουδετέρωση της οξύτητας του τροφοδοτούμενου διαλύματος, από τη στιγμή της εισροής του νέου διαλύματος τροφοδοσίας μέχρι την κατανάλωση του οργανικού υποστρώματος. Η αλκαλικότητα που παράγεται από την οξείδωση του οργανικού υποστρώματος έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του pH του διαλύματος μεταξύ 7,5-8,5 πριν την κάθε ανανέωση του τροφοδοτούμενου διαλύματος. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και από προηγούμενες εργασίες, όπου το pH του διαλύματος τροφοδοσίας και το pH στην απορροή είναι 4 και 6,5-7,5 αντίστοιχα (Kaksonen *et al.*, 2003a), 2,5-3 και 7,5-8,5 αντίστοιχα (Kaksonen *et al.*, 2003b), 3-5 και 6,0-8,0 αντίστοιχα (Kousi *et al.*, 2007).

Η αύξηση της αλκαλικότητας στο κυκλοφορούν διάλυμα είναι αναμενόμενη εξαιτίας της μεταβολικής δράσης των θειοαναγωγικών βακτηρίων. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι ανάλογα με το είδος του οργανικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται για την αναγωγή παράγονται και ανάλογα ποσά αλκαλικότητας. Το γαλακτικό αφενός μπορεί να επιταχύνει την εκκίνηση της βιολογικής διεργασίας που λαμβάνει χώρα εντός του αντιδραστήρα, αφετέρου με την πλήρη οξείδωσή του από τα θειοαναγωγικά βακτήρια παράγεται μεγαλύτερη αλκαλικότητα από ότι από την οξείδωση της αιθανόλης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι κατά την οξείδωση του γαλακτικού παράγονται 3 mol HCO_3^- ενώ από την οξείδωση της αιθανόλης 2 mol HCO_3^- (Kaksonen *et al.*, 2003a).

Από τις ακόλουθες αντιδράσεις οξείδωσης του γαλακτικού και της αιθανόλης διαπιστώνεται ότι στην περίπτωση του γαλακτικού παράγεται αλκαλικότητα ακόμα και όταν η οξείδωση δεν είναι πλήρης (1^ο στάδιο). Αντίθετα στην περίπτωση της αιθανόλης απαιτείται πλήρης οξείδωσή της για την παραγωγή αλκαλικότητας (Kaksonen *et al.*, 2003a).

Οξείδωση γαλακτικού:



Οξείδωση αιθανόλης:



Στις Εικόνες 19 και 20 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH από τη στιγμή της τροφοδοσίας του αντιδραστήρα με νέο θρεπτικό μέχρι την οξείδωση του οργανικού υποστρώματος (κύκλος λειτουργίας) σε 6 διαφορετικές καθορισμένες αρχικές συνθήκες (α, β, γ, δ, ε και στ).

Συγκεκριμένα στην Εικόνα 19 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τις ακόλουθες σειρές πειραμάτων:

1. **α:** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται το γαλακτικό νάτριο με εκχύλισμα ζύμης και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και σίδηρο.
2. **β:** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται το γαλακτικό νάτριο και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και σίδηρο.
3. **γ:** όπου πραγματοποιείται σταδιακή αντικατάσταση του γαλακτικού από την αιθανόλη και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και σίδηρο (βλ. Πίνακα 9/σελ.53).

Στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τις ακόλουθες σειρές πειραμάτων:

4. **δ:** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η αιθανόλη και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και σίδηρο.
5. **ε:** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η αιθανόλη και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και τα μέταλλα: Fe, Zn, Cu, και Ni.

6. **στ:** η ποσότητα της προστιθέμενης αιθανόλης ελαττώνεται στη στοιχειομετρικά απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναγωγή των θειικών ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και τα μέταλλα: Fe, Zn, Cu, και Ni (βλ. Πίνακα 9/σελ.53).

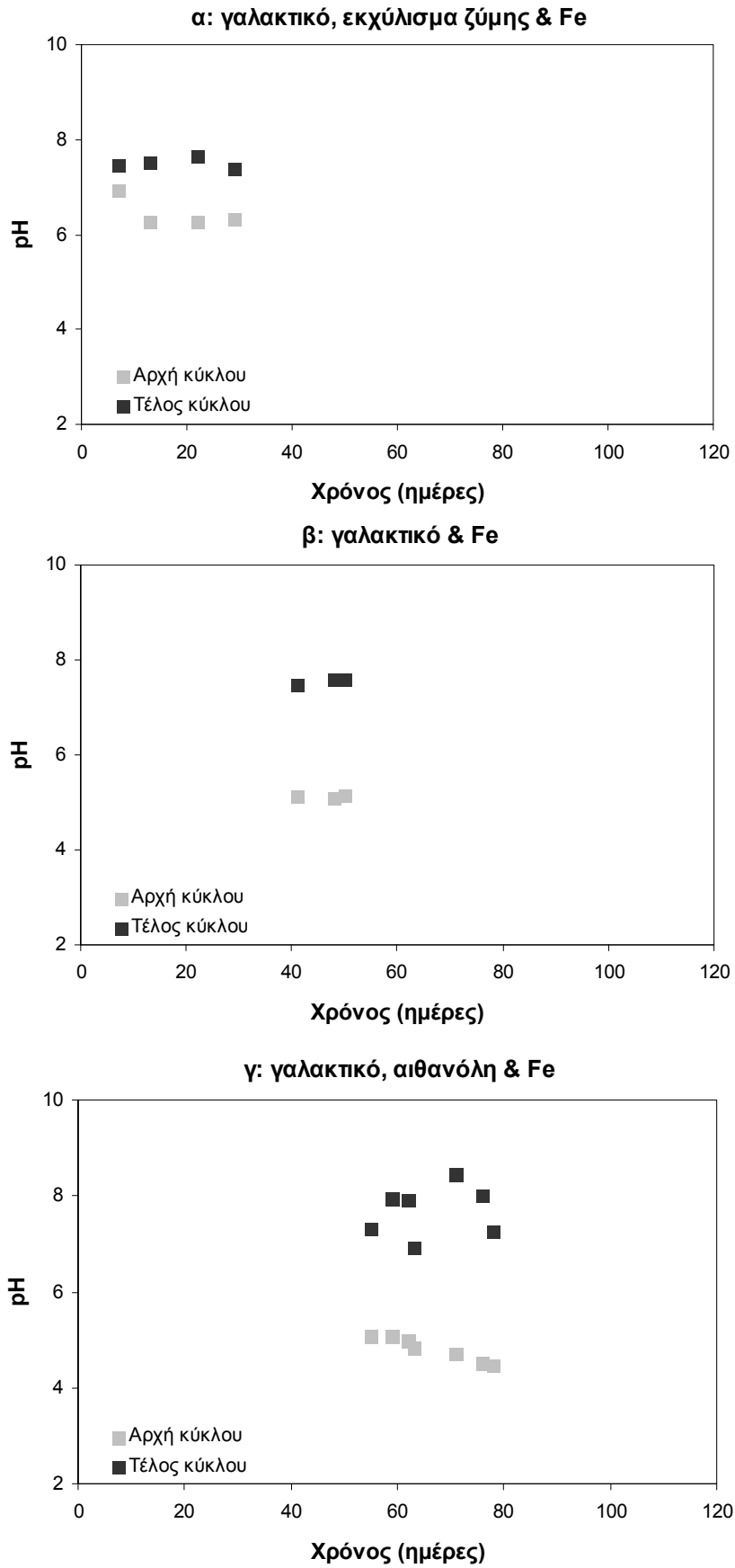
Διαπιστώνεται ότι και στις έξι σειρές πειραμάτων λαμβάνει χώρα σταδιακή εξουδετέρωση της οξύτητας του τροφοδοτούμενου διαλύματος και η σταδιακή αλλαγή της σύστασης του διαλύματος τροφοδοσίας δεν παρεμποδίζει τη δράση των θειοαναγωγικών βακτηρίων.

Είναι εμφανές ότι από τη χρονική στιγμή που άρχισε η σταδιακή αντικατάσταση του γαλακτικού με αιθανόλη (55^η ημέρα, γ σειρά πειραμάτων), μέχρι και το τέλος των δειγματοληψιών (115^η ημέρα, στ σειρά πειραμάτων), όπου η ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων στηρίζεται αποκλειστικά σε αιθανόλη, παρατηρείται μείωση του pH του νέου διαλύματος τροφοδοσίας του αντιδραστήρα (αρχή εκάστοτε κύκλου).

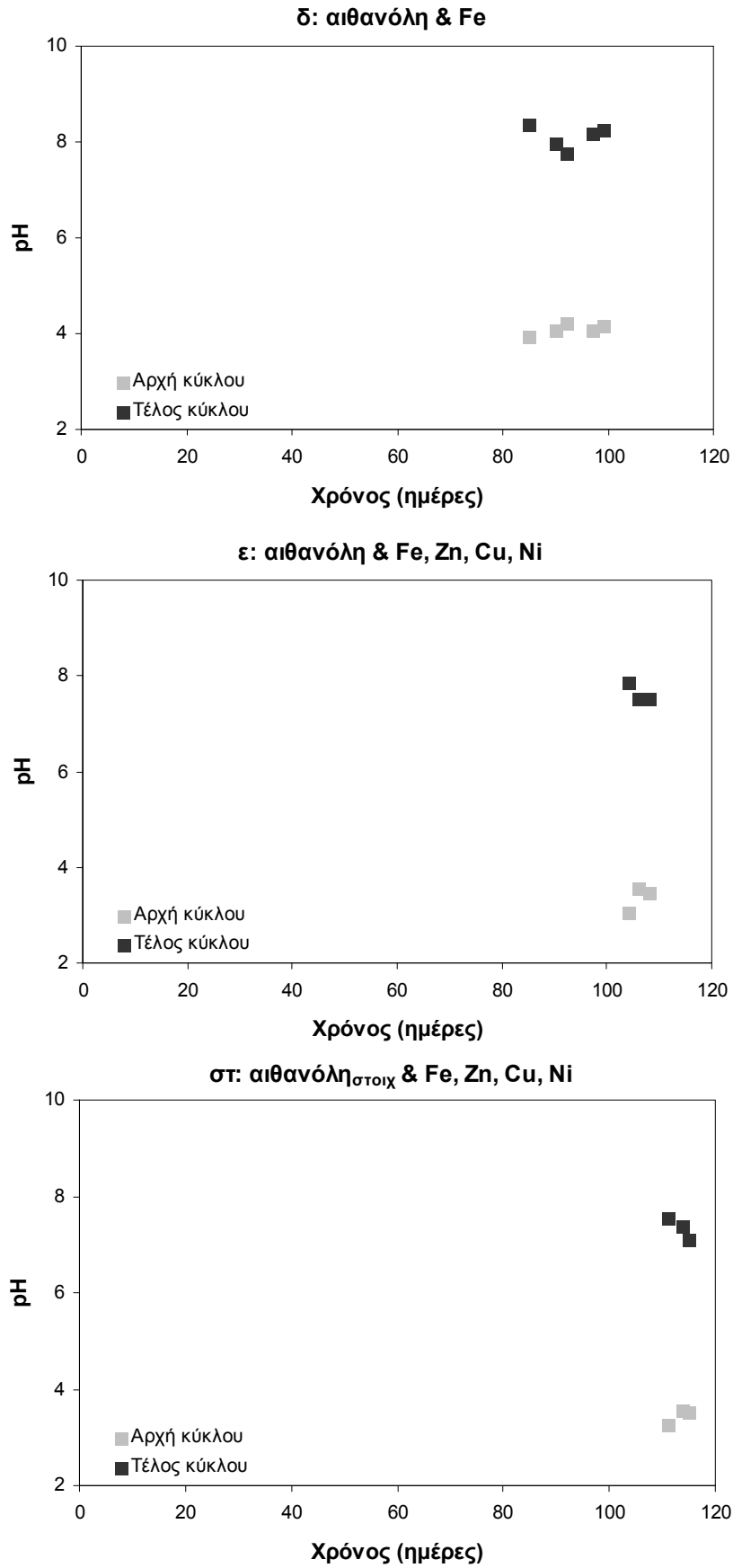
Η μείωση του pH του αρχικού διαλύματος όταν προστίθεται αιθανόλη ως αποκλειστικός δότης ηλεκτρονίων διαπιστώθηκε πειραματικά χρησιμοποιώντας το λογισμικό Visual Minteq, ένα πρόγραμμα προσομοίωσης της χημικής ισορροπίας υδατικών διαλυμάτων. Στην παρούσα εργασία με τη βοήθεια αυτού του λογισμικού βρίσκεται η % ολική συγκέντρωση κάθε ιόντος στοιχείου σε αυτό όπως και προσδιορίζονται οι πιθανές ιοντικές ενώσεις στο σχηματισμό των οποίων μπορούν να συμμετέχουν.

Με την εφαρμογή του λογισμικού διαπιστώνεται ότι όταν χρησιμοποιείται αιθανόλη ως αποκλειστικός δότης ηλεκτρονίων τα μέταλλα υδρολύονται και απελευθερώνονται ιόντα υδρογόνου (H^+). Λόγω της απουσίας του γαλακτικού, το οποίο αντισταθμίζει το φαινόμενο της υδρόλυσης των μετάλλων, στα πειράματα με αιθανόλη παρατηρείται χαμηλότερη τιμή pH στο αρχικό διάλυμα.

Αντίθετα στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το γαλακτικό ως αποκλειστικός δότης ηλεκτρονίων αφενός λόγω του βασικού του χαρακτήρα, αφετέρου λόγω της συμπλοκοποίησης των μετάλλων σε μεγάλο ποσοστό, το φαινόμενο της υδρόλυσης εξασθενεί.



Εικόνα 19. Μεταβολή του pH κατά τις σειρές πειραμάτων: α, β, και γ.

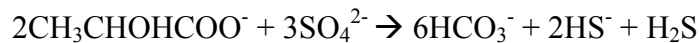


Εικόνα 20. Μεταβολή του pH κατά τις σειρές πειραμάτων: δ, ε και στ.

6.2. Συγκέντρωση τωνθειικών ιόντων και των ιόντων του δισθενούς θείου

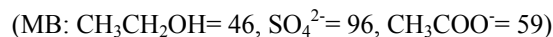
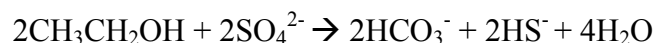
Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης τωνθειικών ιόντων γίνεται με σκοπό την καταγραφή της απόδοσης της αναγωγής τωνθειικών ιόντων και επομένως της απόδοσης του αντιδραστήρα όσο αφορά την επεξεργασία αποβλήτων πλούσιων σεθειικά ιόντα. Η παρακολούθηση της θειοαναγωγής δίνει σημαντικές πληροφορίες για την ανάπτυξη των βακτηρίων πάνω στην κλίνη. Ο ολοένα αυξανόμενος πληθυσμός των βακτηρίων διαπιστώνεται με την ολοένα αυξανόμενη ποσότητα των αναχθέντων ιόντων.

Αρχικά στη στήλη τροφοδοτείται γαλακτικό νάτριο. Η συνολική αντίδραση της αναγωγής τωνθειικών ιόντων με το γαλακτικό ιόν είναι η ακόλουθη:



Σύμφωνα με την παραπάνω αντίδραση η στοιχειομετρική αναλογία των mol [γαλακτικού ιόντος]/[θειικών ιόντων] είναι 0,67. Η συγκέντρωση τωνθειικών ιόντων (SO_4^{2-}) στην τροφοδοσία του αντιδραστήρα είναι περίπου 1.800 mg/l. Συνεπώς, για την πλήρη αναγωγή των 1.800 mg/l SO_4^{2-} θεωρητικά απαιτούνται με βάση τη στοιχειομετρία της αντίδρασης [(1.800 x 0.67(89/96))]= 1.118 mg/l γαλακτικού οξέος. Στην τροφοδοσία του αντιδραστήρα, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος είναι 1.590 mg/l, η οποία υπερκαλύπτει στοιχειομετρικά την ποσότητα τωνθειικών ιόντων (1800 mg/l SO_4^{2-}).

Η συνολική αντίδραση της αναγωγής τωνθειικών ιόντων με την αιθανόλη είναι η ακόλουθη:



Στην τροφοδοσία του αντιδραστήρα η συγκέντρωση της αιθανόλης είναι 960 mg/l και όπως προαναφέρθηκε η συγκέντρωση τωνθειικών ιόντων είναι 1.800 mg/l. Κατά την οξείδωση των 960mg/l της αιθανόλης, ανάγονται [(960x96)/2x46]= 1.001,74 mg/lθειικών ιόντων (1^ο στάδιο) και τα υπόλοιπα 800 mg/lθειικών ανάγονται με την οξείδωση [(800x59)/96]= 491,67 mg/l οξικού (2^ο στάδιο).

Στις Εικόνες 21 και 22 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης τωνθειικών ιόντων από τη στιγμή της τροφοδοσίας του αντιδραστήρα με νέο διάλυμα

τροφοδοσίας μέχρι την οξείδωση του οργανικού υποστρώματος (κύκλος λειτουργίας) σε 6 διαφορετικές καθορισμένες αρχικές συνθήκες (α, β, γ, δ, ε και στ).

Συγκεκριμένα στην Εικόνα 19 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων κατά τις ακόλουθες σειρές πειραμάτων:

1. **α:** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται το γαλακτικό νάτριο με εκχύλισμα ζύμης και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και σίδηρο.
2. **β:** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται το γαλακτικό νάτριο και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και σίδηρο.
3. **γ:** όπου πραγματοποιείται σταδιακή αντικατάσταση του γαλακτικού από την αιθανόλη και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και σίδηρο (βλ. Πίνακα 9/σελ.53).

Στην Εικόνα 20 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων κατά τις ακόλουθες σειρές πειραμάτων:

4. **δ:** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η αιθανόλη και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και σίδηρο.
5. **ε:** όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η αιθανόλη και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και τα μέταλλα: Fe, Zn, Cu, και Ni.
6. **στ:** η ποσότητα της προστιθέμενης αιθανόλης ελαττώνεται στη στοιχειομετρικά απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναγωγή των θεικών ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και τα μέταλλα: Fe, Zn, Cu, και Ni (βλ. Πίνακα 9/σελ.53).

Είναι εμφανές ότι ο πληθυσμός των θειοαναγωγικών βακτηρίων ανταποκρίνεται επιτυχώς τόσο στην αλλαγή του οργανικού υποστρώματος (από γαλακτικό σε αιθανόλη) όσο και στην περαιτέρω επιβάρυνση του διαλύματος τροφοδοσίας με τα τρία επιπλέον μέταλλα (Zn, Cu και Ni).

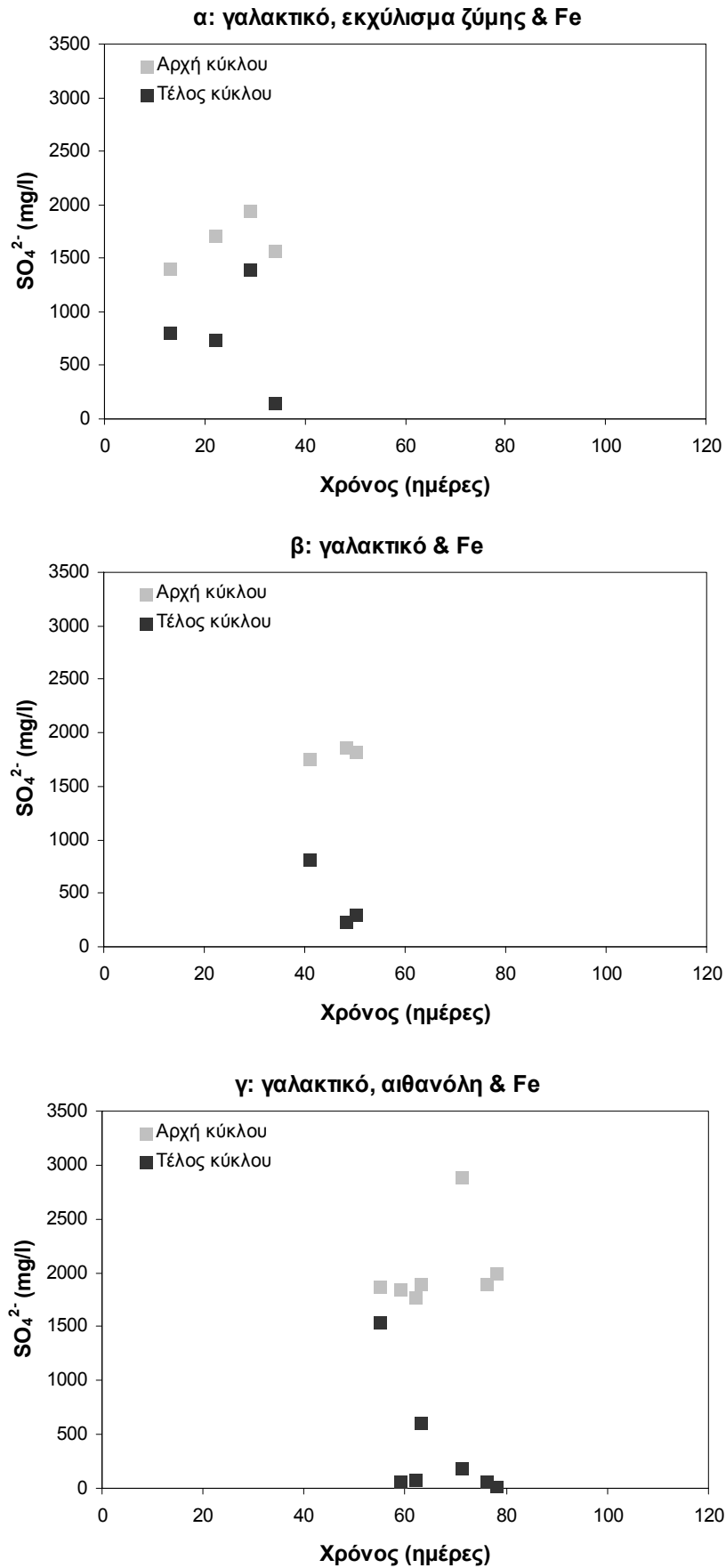
Από τις Εικόνες 21 και 22 διαπιστώνεται η μερική αναγωγή των θεικών ιόντων κατά το πρώτο διάστημα προσαρμογής του αντιδραστήρα (α και β σειρά πειραμάτων) και κατά το διάστημα που χορηγείται η αιθανόλη στη στοιχειομετρικά απαιτούμενη ποσότητα που χρειάζεται για την αναγωγή των θεικών (στ σειρά πειραμάτων). Η μερική αναγωγή των θεικών ιόντων που παρατηρείται τη χρονική περίοδο κατά την οποία ο αντιδραστήρας λειτουργεί σε στοιχειομετρική αναλογία

αιθανόλης/θεικών ιόντων (Εικόνα 22), αναφέρεται και σε άλλες εργασίες (Velasco *et al.*, 2008).

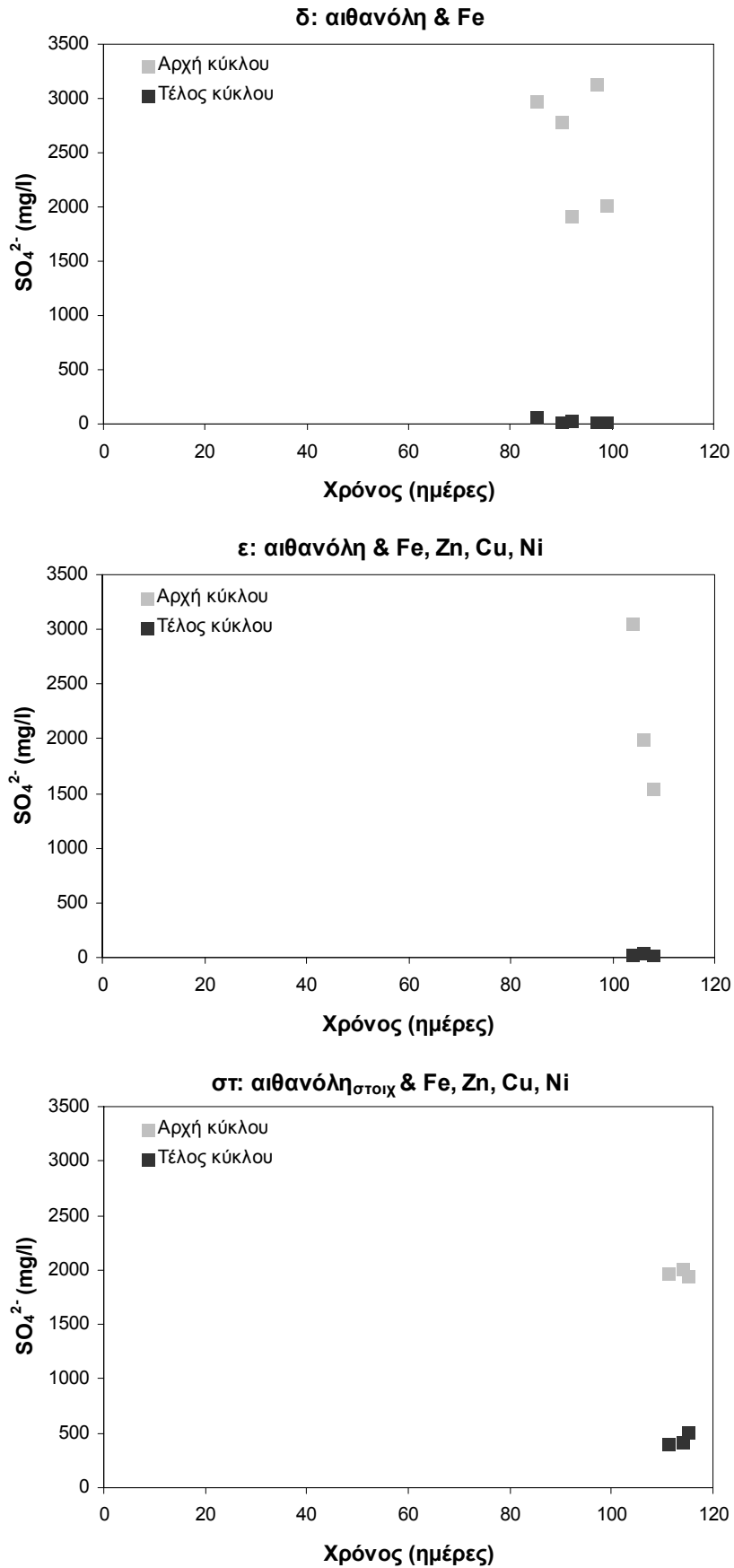
Ακόμα παρατηρούνται διακυμάνσεις στη συγκέντρωση των θεικών ιόντων που αντιστοιχούν στο τέλος κάθε κύκλου από την έναρξη λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα (α σειρά πειραμάτων) μέχρι περίπου και την ημέρα την ολοκλήρωσης της σταδιακής αντικατάστασης του γαλακτικού από την αιθανόλη (γ σειρά πειραμάτων). Αυτό το γεγονός πιθανά αποδίδεται στην προσπάθεια των θειοαναγωγικών βακτηρίων να προσαρμοστούν στις εκάστοτε συνθήκες και να αναπτυχθούν.

Από την Εικόνα 22 φαίνεται ότι καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, από τη χρονική στιγμή που άρχισε να χρησιμοποιείται η αιθανόλη ως αποκλειστικός δότης ηλεκτρονίων (δ σειρά πειραμάτων), η αναγωγή των θεικών ιόντων ήταν πλήρης, έως τη χρονική στιγμή αντικατάστασης του τροφοδοτούμενου διαλύματος σε κάθε κύκλο. Εξαιρέση αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, η χρονική περίοδος κατά την οποία ο αντιδραστήρας λειτούργησε σε στοιχειομετρική αναλογία αιθανόλης/θεικών ιόντων (στ σειρά πειραμάτων), και παρέμενε συστηματικά το 25% των αρχικά τροφοδοτούμενων θεικών ιόντων. Ωστόσο, η ποσοτική αναγωγή των θεικών ιόντων από τα θειοαναγωγικά βακτήρια επιβεβαιώνει την επιτυχή λειτουργία του βιοαντιδραστήρα και την θετική ανταπόκριση του βακτηριακού πληθυσμού στις υφιστάμενες μεταβολές της σύστασης του διαλύματος τροφοδοσίας.

Είναι εμφανές ότι η παρακολούθηση της αναγωγής των θεικών ιόντων από τα θειοαναγωγικά βακτήρια παρέχει μία καλή εικόνα για την κινητική ανάπτυξης του πληθυσμού τους. Με τον τρόπο αυτό διαπιστώνεται η επιτυχής λειτουργία του βιοαντιδραστήρα καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.



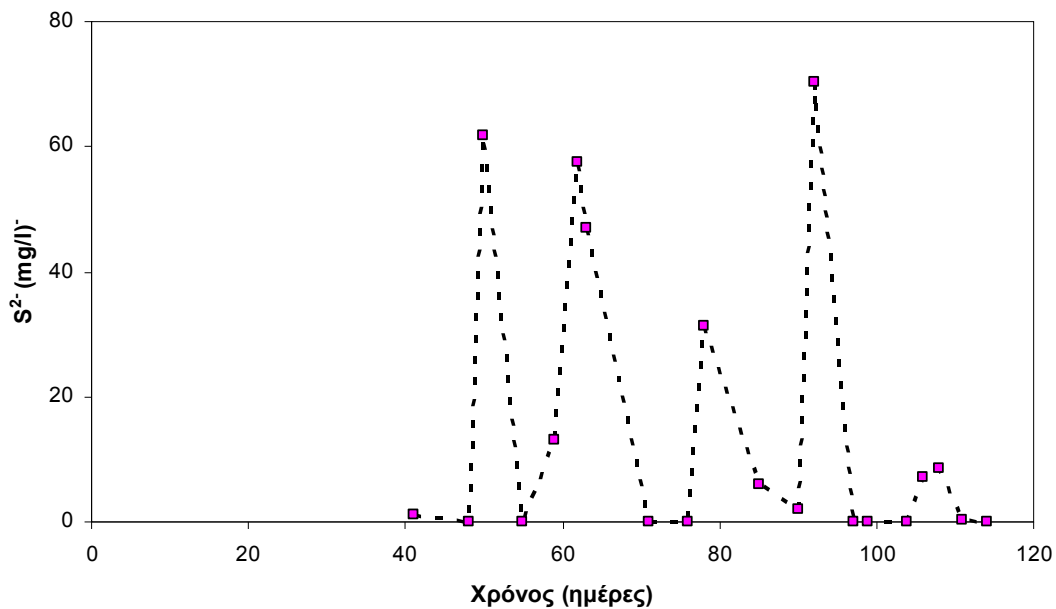
Εικόνα 21. Αναγωγή θεικών ιόντων κατά τις σειρές πειραμάτων: α, β, και γ.



Εικόνα 22. Αναγωγή θεικών ιόντων κατά τις σειρές πειραμάτων: δ, ε και στ.

Στην Εικόνα 23 αναπαρίσταται η μεταβολή της συγκέντρωσης των θειούχων ιόντων των δειγμάτων στο τέλος κάθε κύκλου τροφοδοσίας καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Από την καμπύλη μεταβολής των διαλυτών θειούχων κατά την περίοδο των πειραμάτων, παρατηρείται ότι η μέγιστη τιμή (περίπου 80 mg/l) εμφανίζεται πριν την προσθήκη των μετάλλων Zn, Cu, Ni στο διάλυμα τροφοδοσίας (104^η ημέρα). Η ελάττωση της συγκέντρωσης των θειούχων ιόντων που ακολουθεί έπειτα από την προσθήκη των μετάλλων είναι αναμενόμενη. Με τον τρόπο αυτό τα μέταλλα δεσμεύονται από τα ελεύθερα S²⁻ και καταβυθίζονται ποσοτικά.



Εικόνα 23. Μεταβολή της συγκέντρωσης των θειούχων ιόντων καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

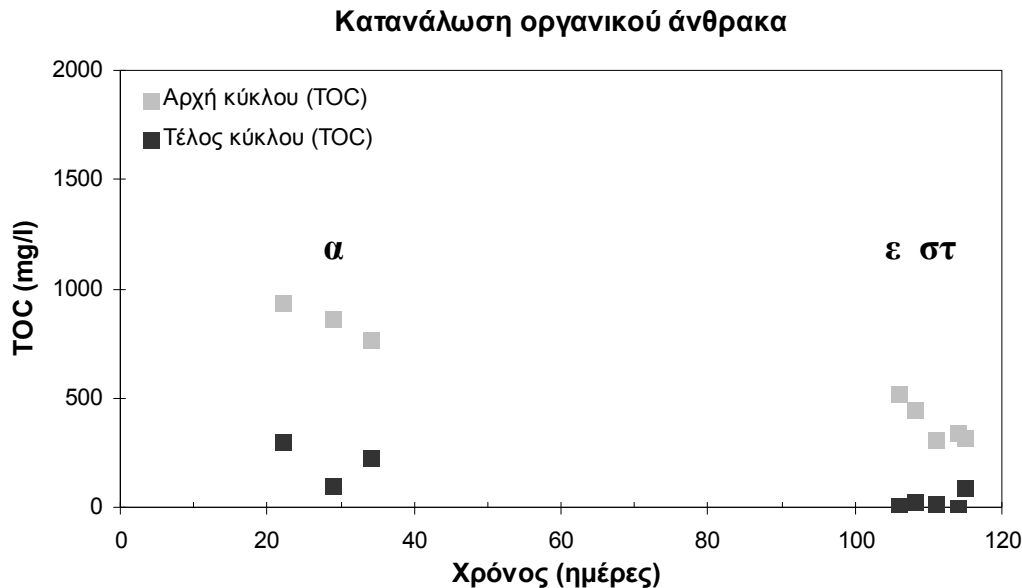
6.3. Κατανάλωση οργανικού άνθρακα

Στην Εικόνα 24 φαίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των οργανικών συστατικών (ολικός οργανικός άνθρακας) από την έναρξη κάθε κύκλου τροφοδοσίας μέχρι την ανατροφοδοσία για την έναρξη του επόμενου κύκλου σε δύο χρονικές περιόδους.

Κατά την πρώτη περίοδο (22^η έως 34^η ημέρα, α σειρά πειραμάτων) το διάλυμα τροφοδοσίας περιλαμβάνει το γαλακτικό και το εκχύλισμα ζύμης. Από την 106^η έως την 115^η ημέρα (ε και στ σειρά πειραμάτων), στο διάλυμα τροφοδοσίας περιλαμβάνεται η αιθανόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα και το σύνολο των μετάλλων Fe, Zn, Cu και Ni.

Διαπιστώνεται ότι και στις τρεις περιπτώσεις πραγματοποιείται η οξείδωση του οργανικού υποστρώματος και τα θειοαναγωγικά βακτήρια καταφέρνουν να επιβιώσουν τόσο παρουσία γαλακτικού όσο και παρουσία αιθανόλης μαζί με ιόντα τεσσάρων διαλυτών μετάλλων.

Η μείωση της συγκέντρωσής των οργανικών συστατικών είναι αναμενόμενη και επιθυμητή δεδομένου ότι οργανικός άνθρακας χρησιμοποιείται για τις μεταβολικές ανάγκες των θειοαναγωγικών βακτηρίων. Παράλληλα συνιστά ένα ακόμα γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή λειτουργία του θειοαναγωγικού αντιδραστήρα.

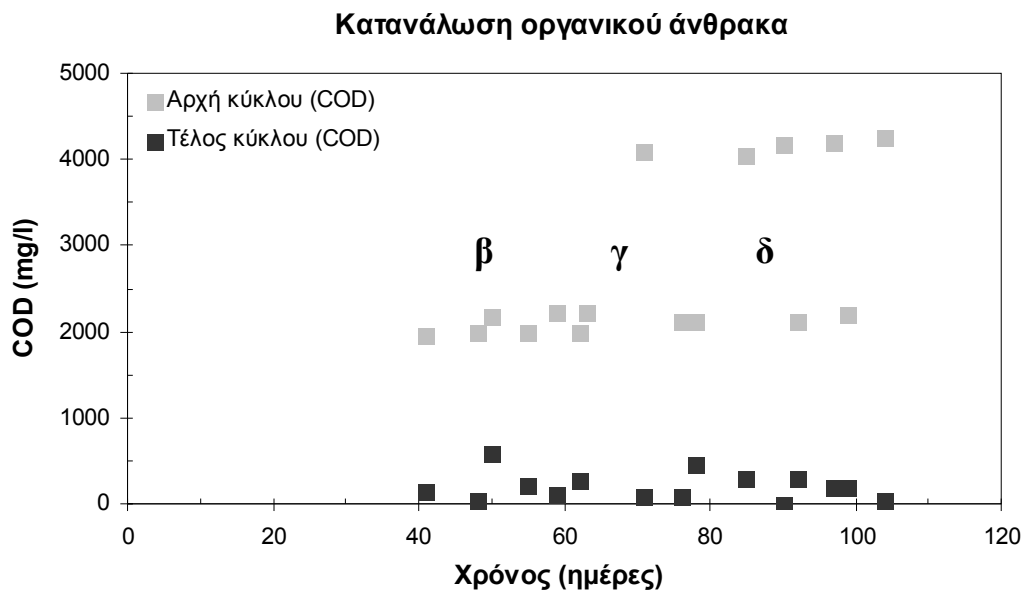


Εικόνα 24. Κατανάλωση του οργανικού άνθρακα.

Στην Εικόνα 25 φαίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου από την έναρξη κάθε κύκλου τροφοδοσίας μέχρι την ανατροφοδοσία για την έναρξη του επόμενου κύκλου σε τρεις χρονικές περιόδους.

Κατά την β σειρά πειραμάτων (41^η έως 55^η ημέρα) ως αποκλειστική πηγή άνθρακα είναι το γαλακτικό χωρίς το εκχύλισμα ζύμης. Η γ σειρά πειραμάτων (55^η έως την 85^η ημέρα) αντιστοιχεί στο στάδιο της σταδιακής αντικατάστασης του γαλακτικού από την αιθανόλη. Τέλος κατά τη δ σειρά πειραμάτων (85^η έως 104^η ημέρα) ο βακτηριακός πληθυσμός χρησιμοποιεί αποκλειστικά την αιθανόλη ως πηγή άνθρακα και δότη ηλεκτρονίων.

Διαπιστώνεται ότι και στις τρεις περιπτώσεις γίνεται επιτυχώς η οξείδωση του οργανικού υποστρώματος και τα θειοαναγωγικά βακτήρια καταφέρνουν να επιβιώσουν τόσο παρουσία γαλακτικού όσο και παρουσία αιθανόλης μαζί με ιόντα τεσσάρων διαλυτών μετάλλων.

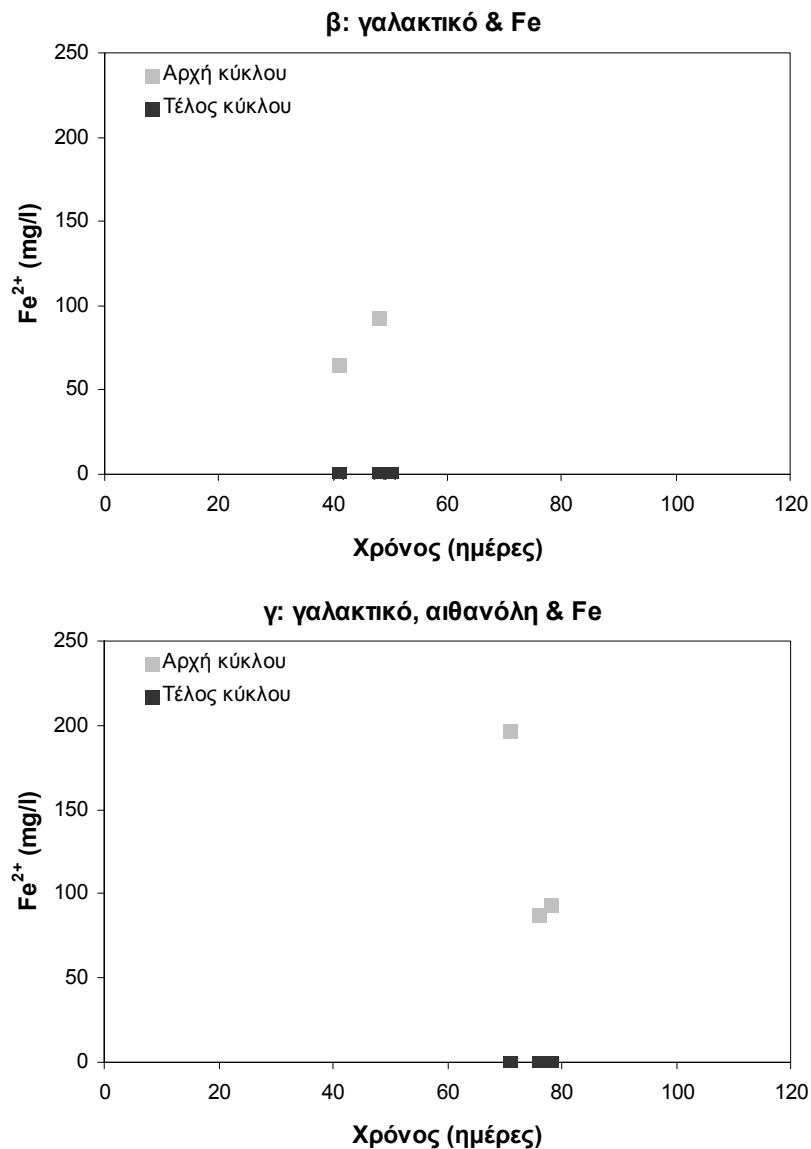


Εικόνα 25. Κατανάλωση του οργανικού άνθρακα.

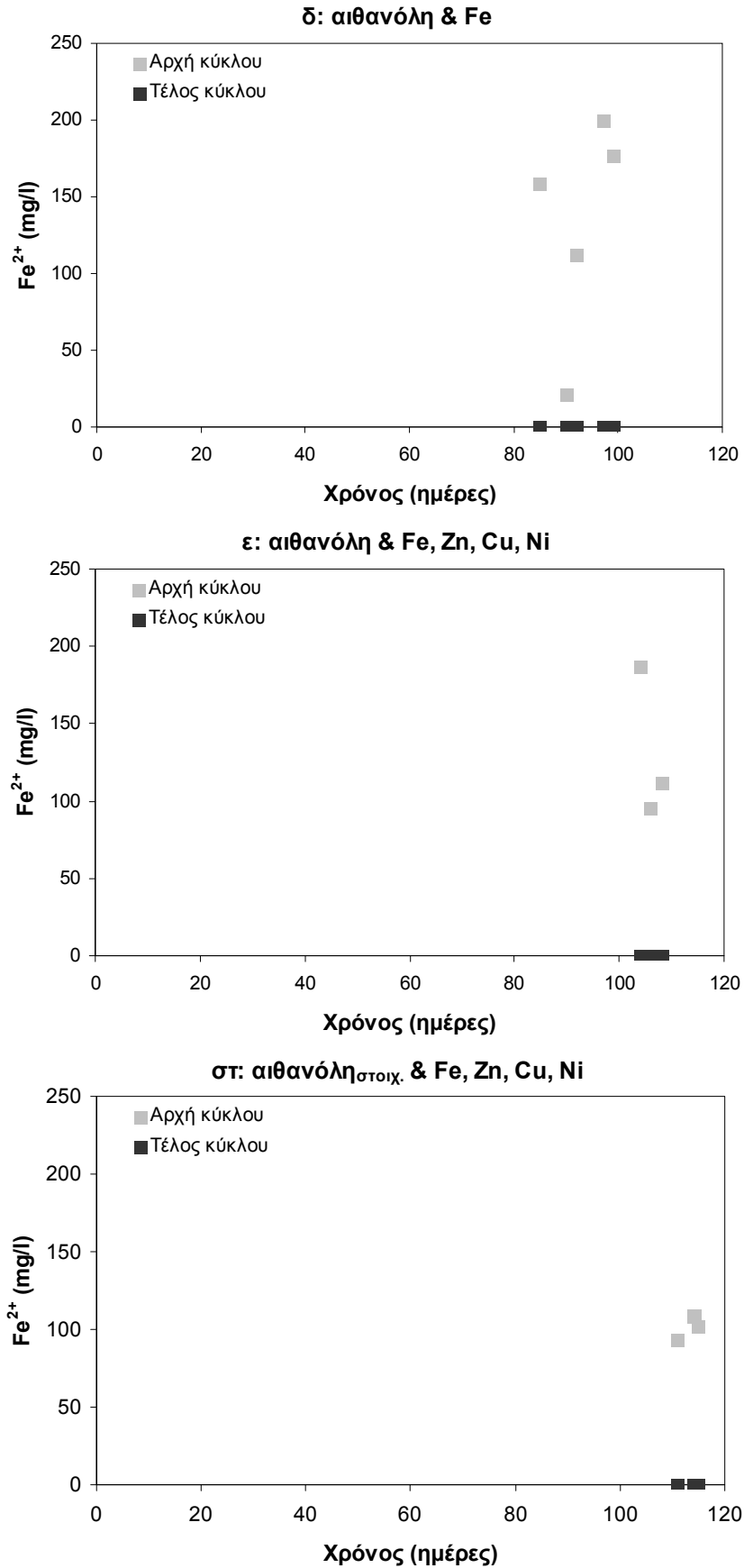
6.4. Καταβύθιση μετάλλων

Εφόσον η αναγωγή των θεικών ιόντων είναι επιτυχημένη και οδηγεί στην παραγωγή H_2S , το επόμενο στάδιο της βιολογικής διεργασίας είναι η καταβύθιση των διαλυμένων ιόντων μετάλλων με τη μορφή θειούχων ενώσεων σύμφωνα με την αντίδραση: $Me^{2+} + H_2S \rightarrow MeS_{(s)} + 2H^+$. Για τη σωστή λειτουργία του βιοαντιδραστήρα θα πρέπει η συγκέντρωση του παραγόμενου H_2S να διατηρείται σε σχετικά υψηλές τιμές για να αποφεύγεται η συσσώρευση διαλυμένων μεταλλικών ιόντων (Kaksonen *et al.*, 2004).

Η μεταβολή της συγκέντρωσης του σιδήρου με το χρόνο κατά τις σειρές πειραμάτων: β και γ φαίνεται στην Εικόνα 26 και κατά τις σειρές πειραμάτων: δ, ε και στ στην Εικόνα 27.



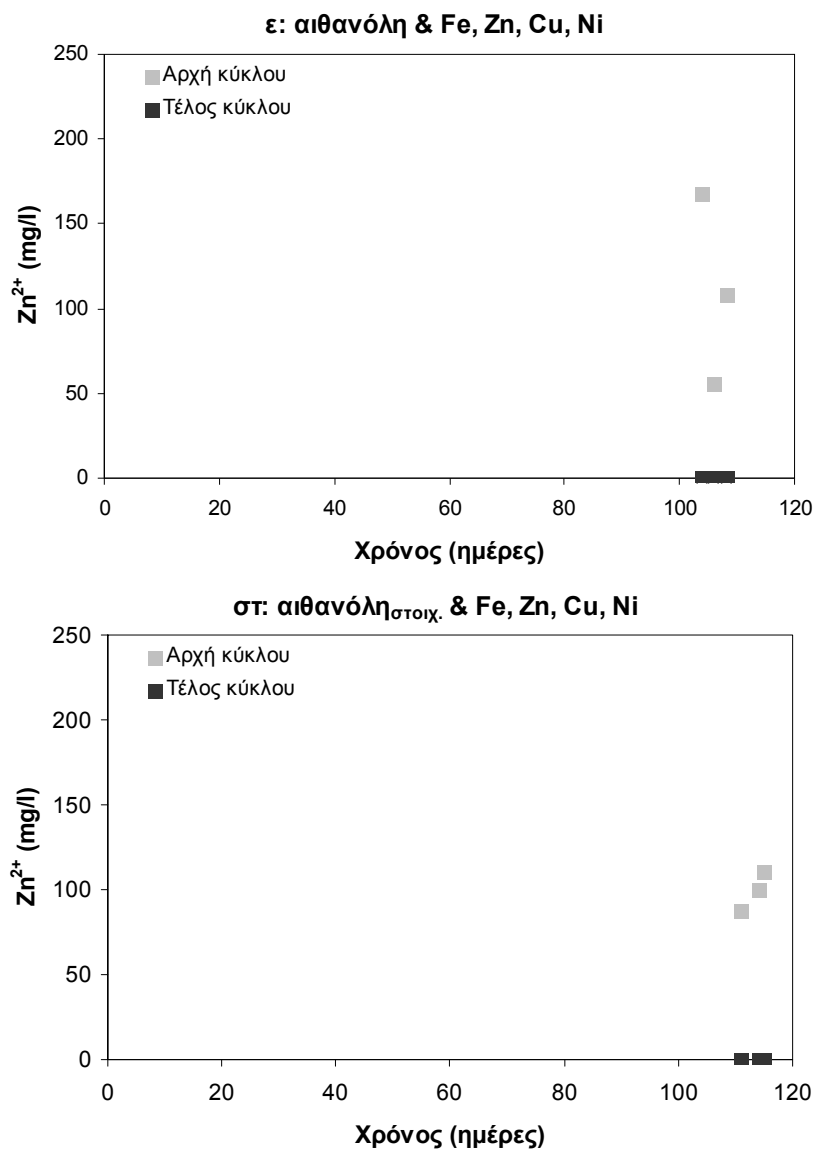
Εικόνα 26. Καταβύθιση Fe κατά τις σειρές πειραμάτων: β, και γ.



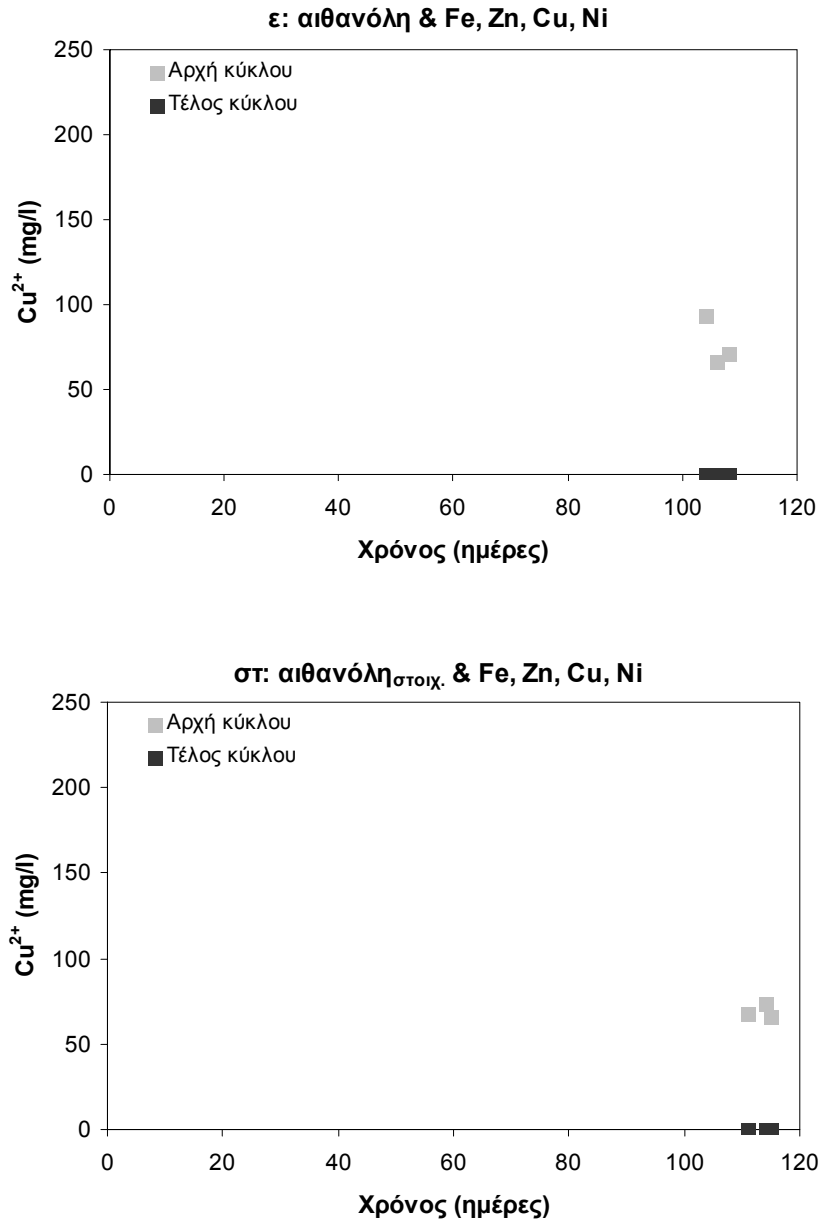
Εικόνα 26. Καταβύθιση Fe κατά τις σειρές πειραμάτων: δ, ε και στ.

Από τις Εικόνες 25 και 26 διαπιστώνεται ότι ο σίδηρος (Fe) καταβυθίζεται ποσοτικά έως τη στιγμή ανανέωσης του διαλύματος τροφοδοσίας. Παρόλο που δεν έγινε χαρακτηρισμός των στερεών κατακρημνίσεων ώστε να διαπιστωθεί πειραματικά η καταβύθιση θειούχων ενώσεων των μετάλλων, αυτή η παραδοχή επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα προσομοίωσης της χημικής ισορροπίας υδατικών διαλυμάτων με το λογισμικό Visual Minteq για τις συνθήκες εκτέλεσης των πειραμάτων καθώς και από άλλες σχετικές ερευνητικές εργασίες (Remoundaki *et al.*, 2008).

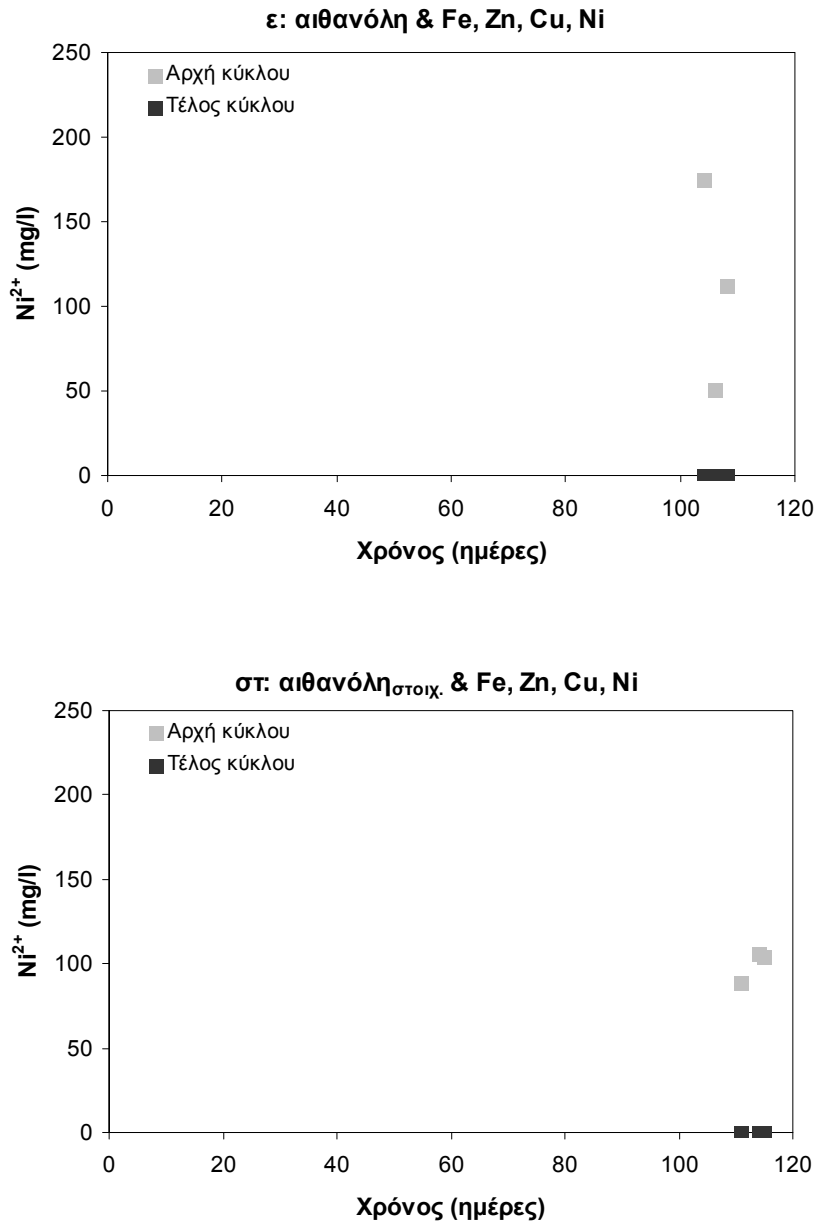
Κατά τις σειρές πειραμάτων: ε και στ, εκτός από την ποσοτική καταβύθιση του Fe μελετήθηκε και η ποσοτική καταβύθιση των μετάλλων: Zn, Cu και Ni. Η καταβύθιση του Zn, Cu και Ni φαίνεται στις Εικόνες 27, 28 και 29 αντίστοιχα.



Εικόνα 27. Καταβύθιση Zn κατά τις σειρές πειραμάτων: ε και στ.



Εικόνα 28. Καταβύθιση Cu κατά τις σειρές πειραμάτων: ε και στ.



Εικόνα 29. Καταβύθιση Νί κατά τις σειρές πειραμάτων: ε και στ.

Από τις Εικόνες 28 και 29 διαπιστώνεται η ποσοτική καταβύθιση τόσο του Cu όσο και του Νί κατά τη διάρκεια της ε σειράς πειραμάτων, όπου ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η αιθανόλη και το διάλυμα τροφοδοσίας περιέχει θειικά ιόντα και τα μέταλλα: Fe, Zn, Cu, και Ni, αλλά και κατά τη διάρκεια της στ σειράς πειραμάτων, όπου η ποσότητα της προστιθέμενης αιθανόλης ελαττώνεται στη στοιχειομετρικά απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναγωγή των θεικών ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα (βλ. Πίνακα 9/σελ.53).

6.5. Κινητική μελέτη παραμέτρων

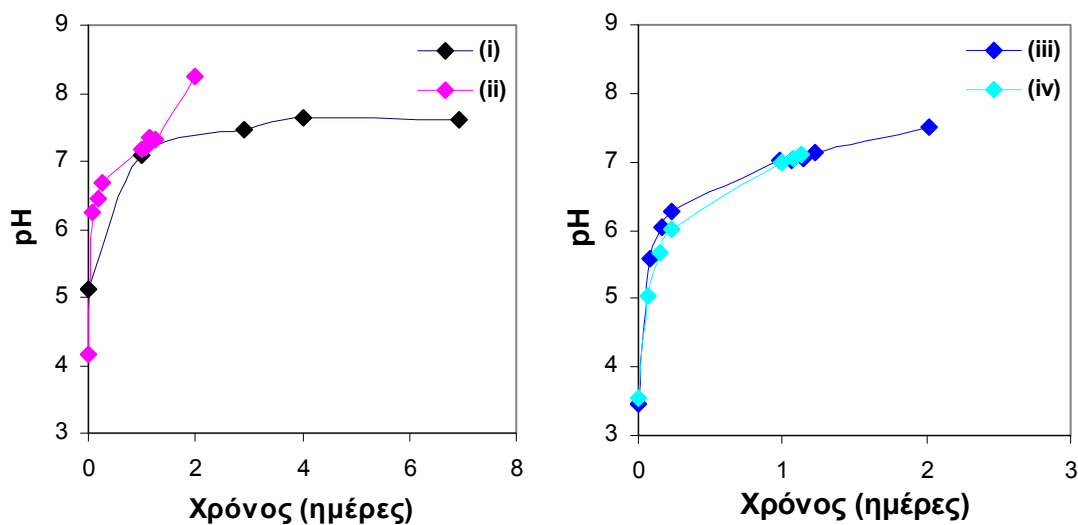
Ακολούθως παρουσιάζεται η μεταβολή του pH, της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων, των οργανικών συστατικών και των διαλυτών μετάλλων κατά την κινητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 4 συνθήκες λειτουργίας (i, ii, iii και iv), των οποίων τα χαρακτηριστικά παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 11. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται συγκριτικά ανά ζεύγος κινητικών.

Πίνακας 11. Συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα σε 4 πειράματα κινητικής.

Αριθ.	Χρονική διάρκεια		Δότης ηλεκτρονίων & Πηγή άνθρακα	Λόγος COD/SO ₄ ²⁻	Βαρέα μέταλλα (100 ppm)
	Έναρξη	Ημέρες			
(i)	23-Μαρ-09	6.92	Γαλακτικό	1,11	Fe
(ii)	18-Μαΐ-09	2.00	Αιθανόλη	1,11	Fe
(iii)	27-Μαΐ-09	2.02	Αιθανόλη	1,11	Fe, Zn, Cu & Ni
(iv)	04-Ιουν-09	1.14	Αιθανόλη στη στοιχειομετρία	0,67	Fe, Zn, Cu & Ni

6.5.1. Μεταβολή του pH

Παρατηρείται αύξηση του pH του τροφοδοτούμενου διαλύματος και στις τέσσερις περιπτώσεις, ενώ η παρουσία των τεσσάρων μετάλλων (κινητικές iii και iv) με αιθανόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα δεν φαίνεται να επηρεάζει το ρυθμό με τον οποίο αυξάνεται το pH (Εικόνα 30). Από τις κινητικές (ii), (iii) και (iv) φαίνεται ότι η τιμή του pH στην αρχή είναι χαμηλότερη από ότι στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το γαλακτικό (i) γεγονός που ερμηνεύεται σε προηγούμενη ενότητα..

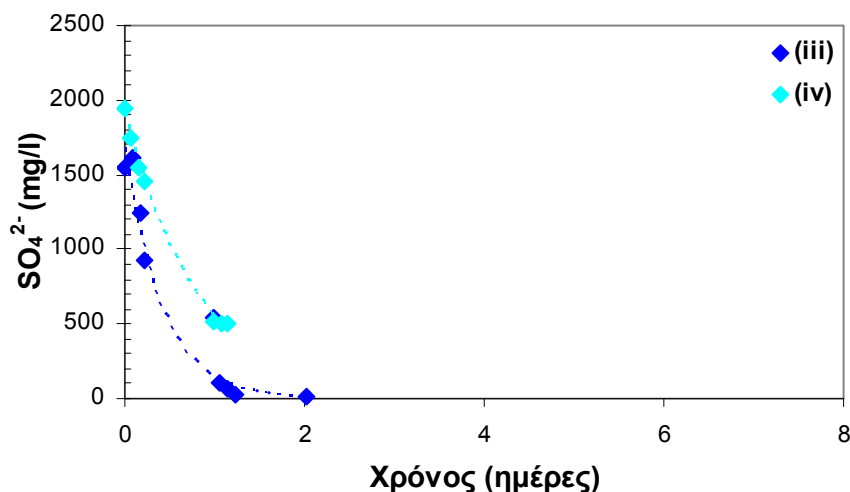
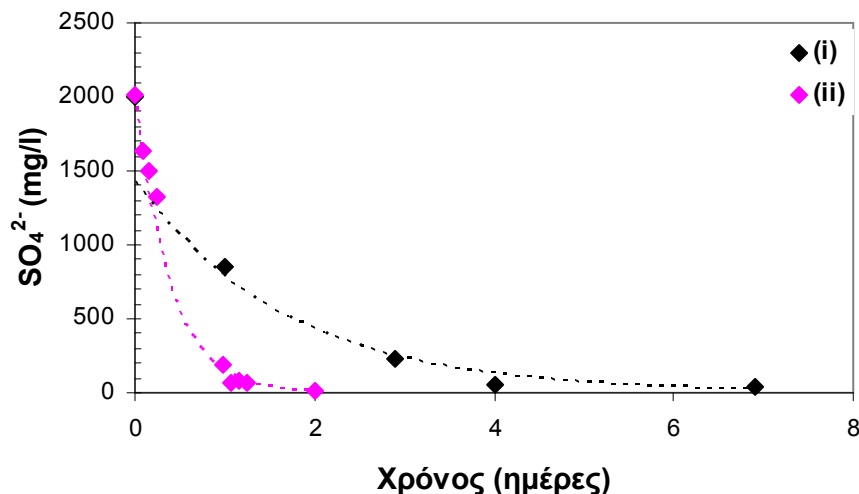


Εικόνα 30. Μεταβολή του pH.

6.5.2. Αναγωγή των θειικών ιόντων

Από την σύγκριση της πρώτης κινητικής (i) (γαλακτικό ως πηγή άνθρακα/δότης ηλεκτρονίων) με την δεύτερη κινητική (ii) (αιθανόλη ως πηγή άνθρακα/δότης ηλεκτρονίων), φαίνεται ότι για να ολοκληρωθεί η αναγωγή των θειικών χρειάζονται 7 ημέρες στην πρώτη περίπτωση και 2 ημέρες στην δεύτερη περίπτωση (Εικόνα 31A). Ωστόσο, αυτό το συμπέρασμα δεν μπορεί να θεωρηθεί ασφαλές γιατί το γαλακτικό χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων και αντικαταστάθηκε σχεδόν δύο μήνες πριν ληφθούν τα δεδομένα της καμπύλης (ii).

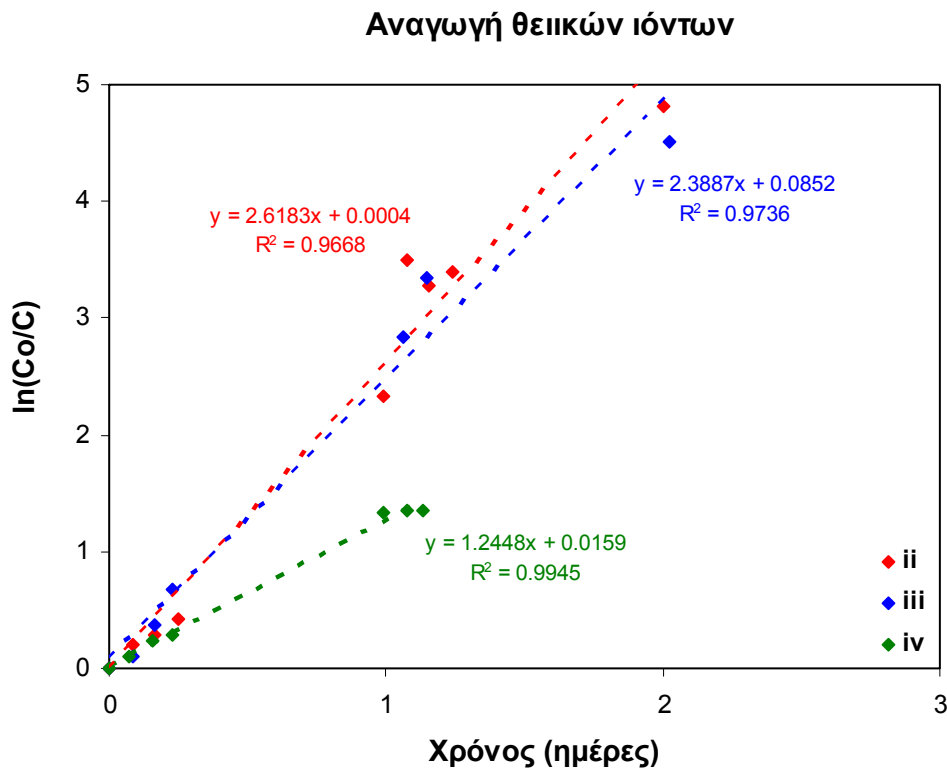
Συνεπώς, είναι πιθανό σε αυτό το διάστημα να άλλαξε η δυναμική του βακτηριακού πληθυσμού με αποτέλεσμα να ανταποκρίνεται πιο γρήγορα στις δεδομένες συνθήκες. Στην Εικόνα 31B φαίνεται ότι η ταχύτητα αναγωγής των θειικών ιόντων μειώνεται στην περίπτωση όπου προστίθεται η στοιχειομετρικά απαιτούμενη ποσότητα αιθανόλης. Αυτό σημαίνει πιθανά ότι για την αποτελεσματική λειτουργία του βιοαντιδραστήρα χρειάζεται η χορήγηση της αιθανόλης σε περίσσεια.



Εικόνα 31. Αναγωγή των θειικών ιόντων.

Με στόχο να ελεγχθεί αν η μεταβολή της συγκέντρωσης των θεικών σε σχέση με το χρόνο ακολουθεί μία εξίσωση πρώτης τάξης κατασκευάζεται το γράφημα της Εικόνας 32, όπου αναπαρίσταται η μεταβολή του λογαριθμισμένου λόγου C_0/C σε συνάρτηση με το χρόνο. Όπου C_0 είναι η συγκέντρωση των θεικών ιόντων κατά την έναρξη της κινητικής και C η συγκέντρωση των θεικών ιόντων σε κάθε δείγμα που λαμβανόταν μέχρι την ολοκλήρωση του κάθε κύκλου.

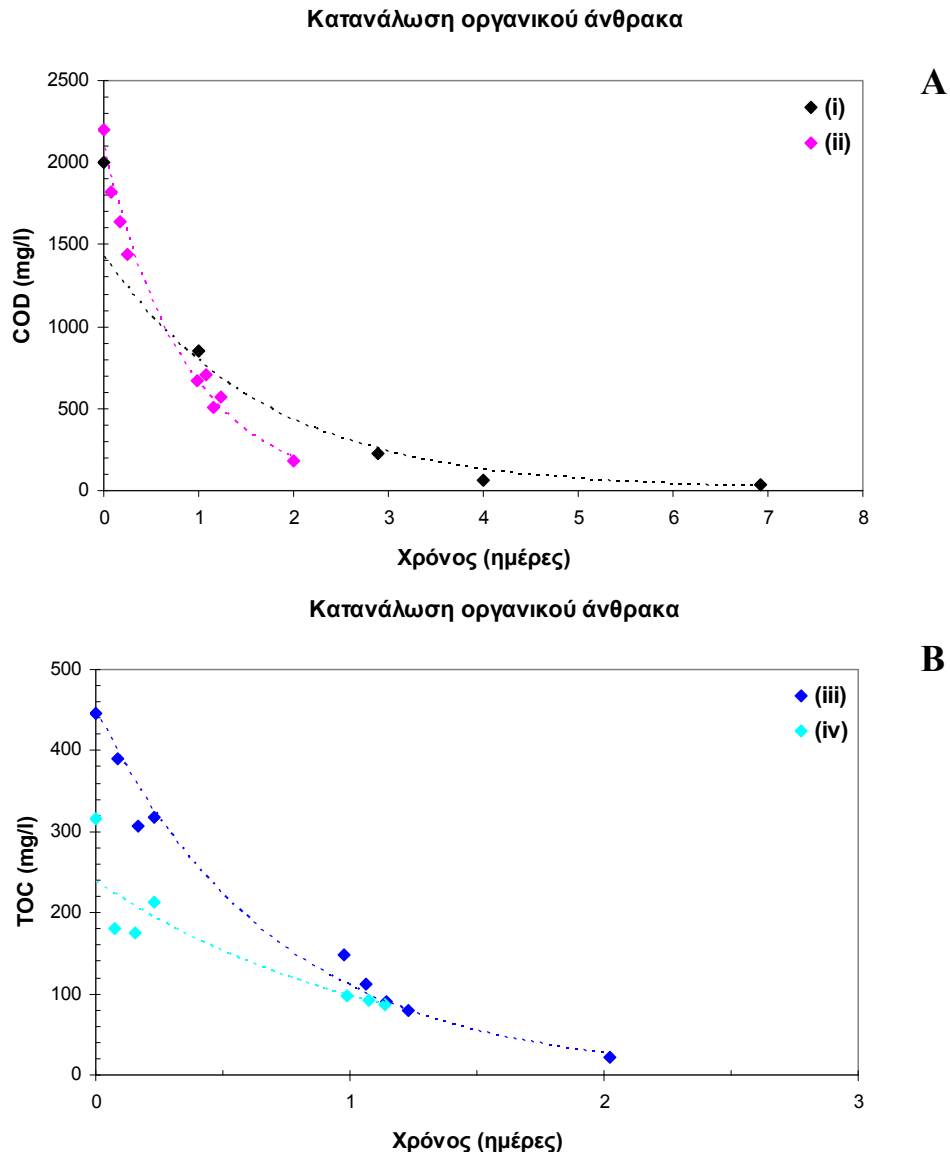
Διαπιστώνεται ότι και στις τρεις υπό μελέτη κινητικές τα πειραματικά δεδομένα ικανοποιούν μία ευθεία με R^2 που προσεγγίζει τη μονάδα. Συνεπώς, η μεταβολή της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων ως προς το χρόνο αντιστοιχεί σε μία εξίσωση πρώτης τάξης.



Εικόνα 32. Αναγωγή των θεικών ιόντων.

6.5.3. Κατανάλωση οργανικού άνθρακα

Στην Εικόνα 33Α φαίνεται η μεταβολή του χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD) κατά την πρώτη (i) και δεύτερη (ii) κινητική, όπου ως αποκλειστική πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται το γαλακτικό και η αιθανόλη αντίστοιχα. Διαπιστώνεται ότι και στις δύο περιπτώσεις γίνεται επιτυχώς η οξείδωση του οργανικού υποστρώματος και τα θειοαναγωγικά βακτήρια καταφέρνουν να επιβιώσουν τόσο παρουσία γαλακτικού όσο και παρουσία αιθανόλης.



Εικόνα 33. Διάσπαση οργανικού υποστρώματος.

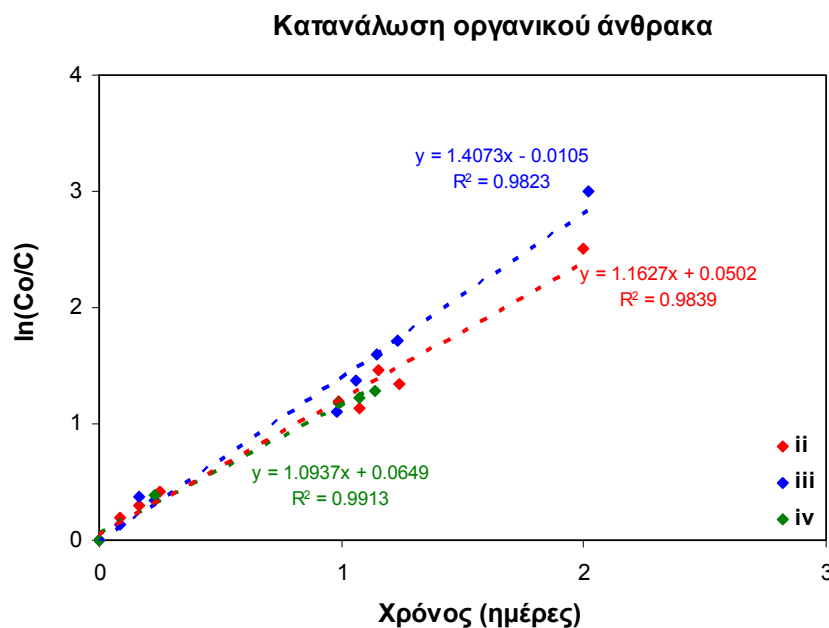
Όπως και στην περίπτωση της μεταβολής της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων (Εικόνα 31Α) φαίνεται ότι για την οξείδωση του οργανικού υποστρώματος χρειάζεται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην πρώτη κινητική (i) από ότι στην δεύτερη (ii). Για τον ίδιο λόγο, ωστόσο, αυτό το συμπέρασμα δεν θεωρείται ασφαλές

δεδομένου ότι το γαλακτικό χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων και αντικαταστάθηκε σχεδόν 2 μήνες πριν ληφθούν τα δεδομένα της καμπύλης (ii).

Στην Εικόνα 33B φαίνεται η μεταβολή του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) κατά την τρίτη (iii) και τέταρτη (iv) κινητική. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιείται η αιθανόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα και χορηγούνται τα τέσσερα μέταλλα (Fe, Zn, Cu, Ni). Η διαφορά μεταξύ τους έγκειται στο ότι στην πρώτη περίπτωση χορηγείται σε περίσσεια ενώ στη δεύτερη στη στοιχειομετρικά απαιτούμενη ποσότητα για την αναγωγή των θεικών.

Η μείωση της συγκέντρωσής των οργανικών συστατικών κατά τη διάρκεια των κινητικών είναι αναμενόμενη και συνιστά ένα ακόμα γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή λειτουργία του θειοαναγωγικού αντιδραστήρα και την προσαρμογή του βακτηριακού πληθυσμού στις μεταβαλλόμενες συνθήκες.

Με στόχο να ελεγχθεί αν η μεταβολή της συγκέντρωσης των οργανικών συστατικών σε σχέση με το χρόνο ακολουθεί μία εξίσωση πρώτης τάξης κατασκευάζεται το γράφημα της Εικόνας 34, όπου αναπαρίσταται η μεταβολή του λογαριθμισμένου λόγου C_0/C σε συνάρτηση με το χρόνο. Όπου C_0 είναι η συγκέντρωση των οργανικών συστατικών κατά την έναρξη της κινητικής και C η συγκέντρωση των οργανικών συστατικών σε κάθε δείγμα που λαμβανόταν μέχρι την ολοκλήρωση του κάθε κύκλου.

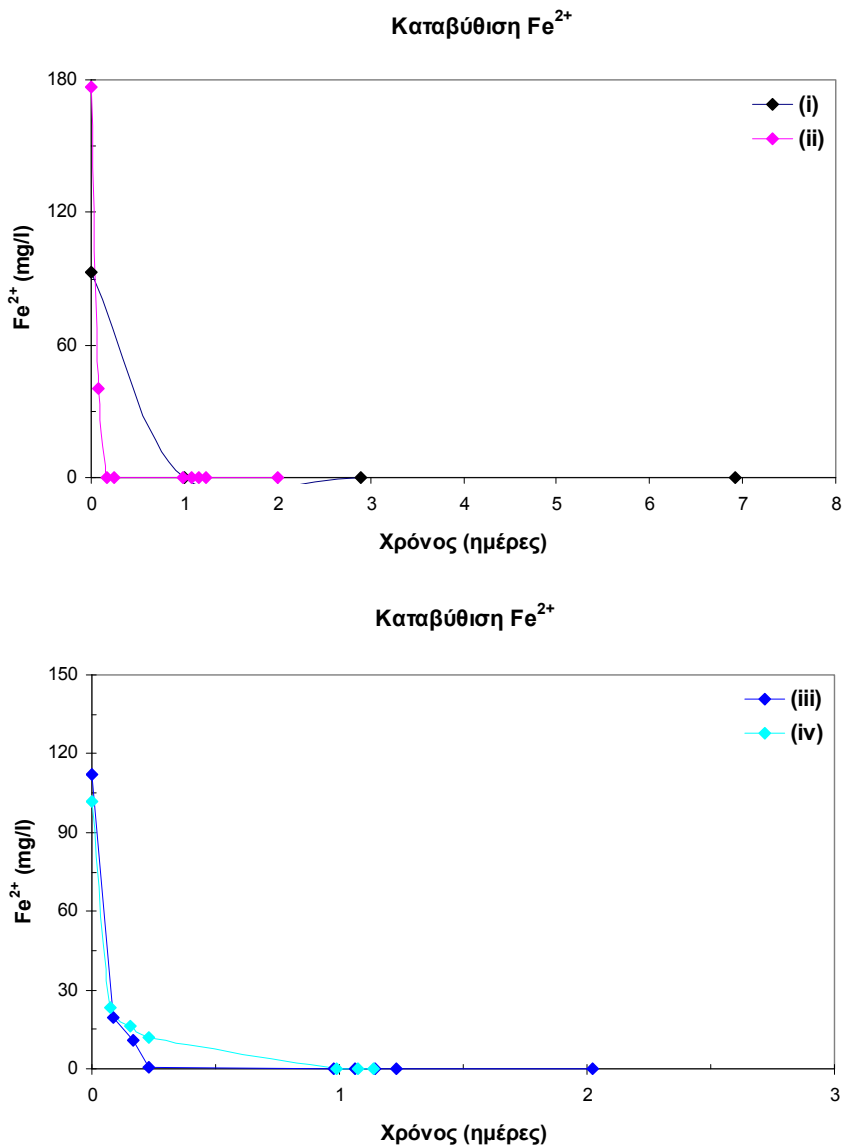


Εικόνα 34. Διάσπαση οργανικού υποστρώματος.

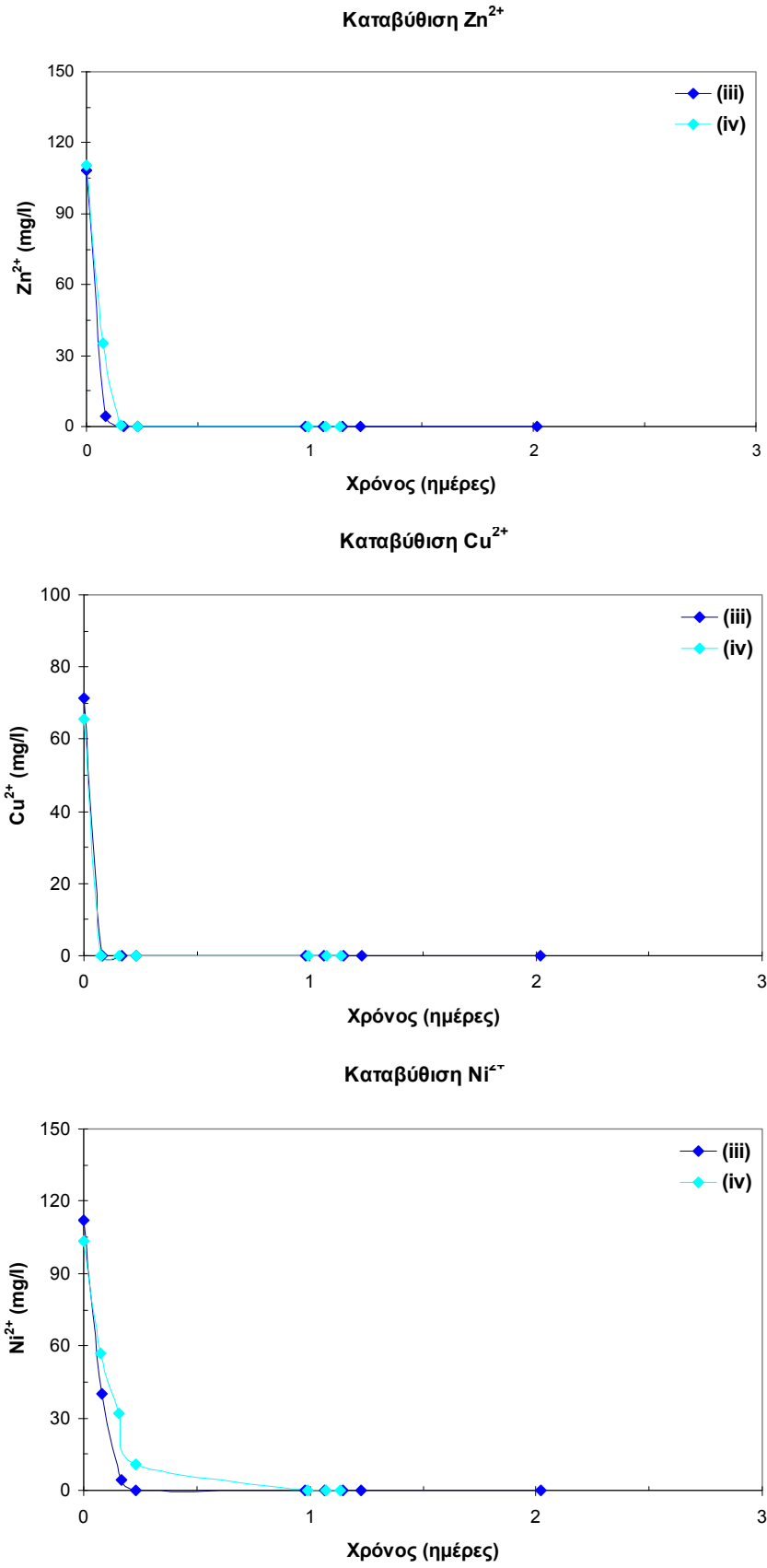
Όπως και στην περίπτωση της αναγωγής των θεικών ιόντων έτσι και στην προκειμένη περίπτωση, τα πειραματικά δεδομένα ικανοποιούν μία ευθεία με R^2 που προσεγγίζει τη μονάδα. Συνεπώς, η μεταβολή της συγκέντρωσης των οργανικών συστατικών ως προς το χρόνο αντιστοιχεί σε μία εξίσωση πρώτης τάξης.

6.5.4. Μεταβολή της συγκέντρωσης των διαλυτών μετάλλων

Από τις Εικόνες 35 και 36, παρατηρείται ποσοτική καταβύθιση των μετάλλων σε όλες τις υπό μελέτη περιπτώσεις πολύ νωρίτερα (στις 2-5 ώρες ανάλογα με το μέταλλο) από την ολοκλήρωση της αναγωγής των θεικών και της οξείδωσης του οργανικού άνθρακα.



Εικόνα 35. Καταβύθιση Fe.

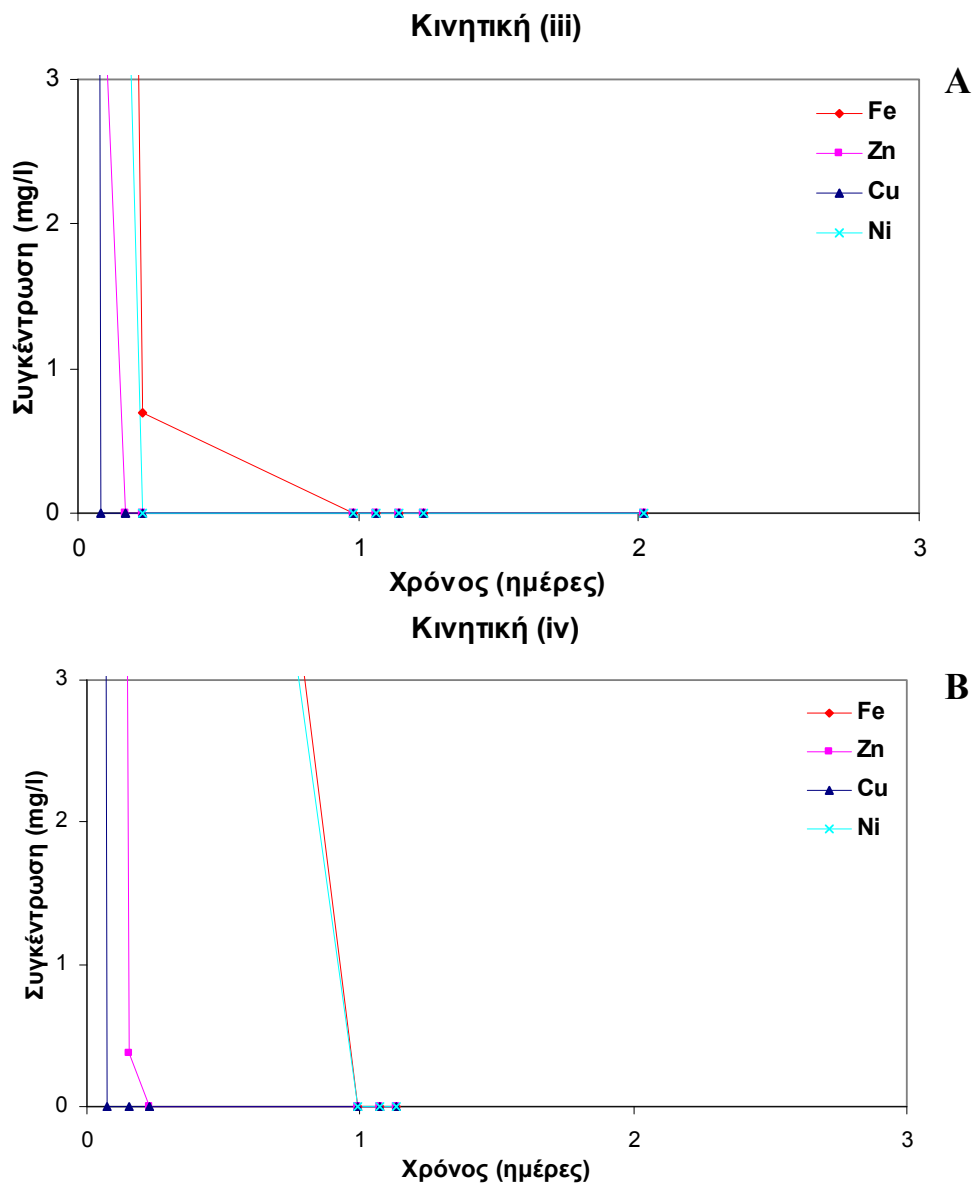


Εικόνα 36. Καταβύθιση Zn, Cu και Ni.

6.5.5. Σειρά καταβύθισης μετάλλων

Σύμφωνα με τη σειρά διαλυτότητας των θειούχων ενώσεων (Dean, 1999), ο θειούχος χαλκός είναι η λιγότερο διαλυτή ένωση και ο θειούχος σίδηρος η περισσότερο διαλυτή ένωση όταν συνυπάρχουν τα τέσσερα μέταλλα του σιδήρου, του ψευδαργύρου, του χαλκού και του νικελίου σε ένα υδατικό διάλυμα ($\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Fe}$).

Με βάση τη σειρά διαλυτότητας των θειούχων ενώσεων των μετάλλων ερμηνεύεται και η Εικόνα 37, όπου φαίνεται η σειρά διαλυτότητας των μετάλλων στις δύο κινητικές που πραγματοποιήθηκαν με την αιθανόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα τόσο σε περίσσεια (iii) όσο και στη στοιχειομετρικά απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναγωγή των θειικών ιόντων που περιέχονται στο διάλυμα (iv).

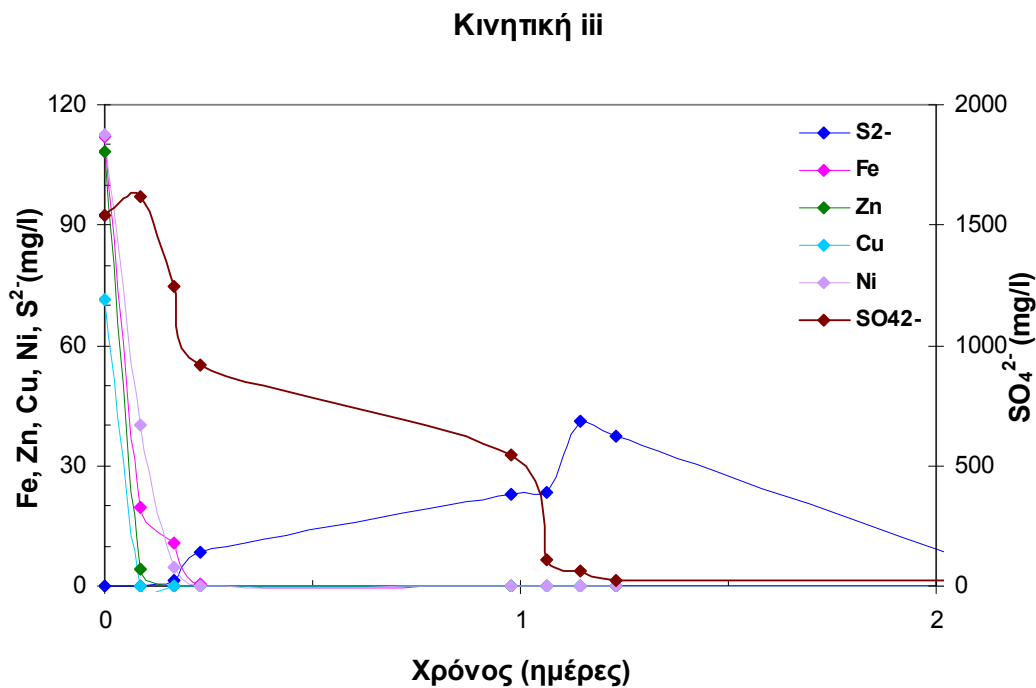


Εικόνα 37. Σειρά καταβύθισης μετάλλων στις κινητικές (iii) και (iv).

Ο παρατηρούμενος μηχανισμός ποσοτικής καταβύθισης των τεσσάρων μετάλλων επιβεβαιώνεται και από την προσομοίωση με κατάλληλο λογισμικό της χημικής ισορροπίας των υδατικών διαλυμάτων κάτω από άλλες πειραματικές συνθήκες (Gustafsson, 2009; Puigdomenech, 2009; Kousi *et al.*, 2009).

Τέλος, στην Εικόνα 38 παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης των τεσσάρων μετάλλων κατά την τρίτη κινητική (iii) σε συνδυασμό με τη μεταβολή της συγκέντρωσης των θειικών και θειούχων ιόντων. Όπως προαναφέρθηκε σε αυτή την περίπτωση η αιθανόλη αποτελεί τη μοναδική πηγή άνθρακα/ηλεκτρονίων και χορηγείται σε περίσσεια.

Είναι εμφανές ότι τη χρονική στιγμή που παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση των θειούχων ιόντων (41 mg/l), η συγκέντρωση των θειικών ιόντων είναι σχεδόν μηδενική, ενώ και τα τέσσερα μέταλλα έχουν ήδη καταβυθιστεί (γεγονός που διαπιστώνεται από τη μηδενική τους συγκέντρωση στο σημείο αυτό).



Εικόνα 38. Μεταβολή της συγκέντρωσης των μετρούμενων παραμέτρων στις κινητικές (iii).

7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα θειοαναγωγικά βακτήρια εκτός από τον καθοριστικό ρόλο που διαδραματίζουν στη λειτουργία των οικοσυστημάτων, εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του μεταβολισμού τους, χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων. Συγκεκριμένα πρόκειται για μια ομάδα μεταβολικά ευέλικτων, υποχρεωτικά αναερόβιων μικροοργανισμών που εξασφαλίζουν την απαραίτητη ενέργεια για την ανάπτυξή τους από την οξείδωση του οργανικού υποστρώματος και χρησιμοποιούν τα θειικά ιόντα ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Το γαλακτικό συνιστά ένα καλό οργανικό υπόστρωμα για τα περισσότερα θειοαναγωγικά βακτήρια. Ωστόσο η χρήση του στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων είναι δαπανηρή, με αποτέλεσμα να αναζητείται η εύρεση ενός πιο οικονομικού οργανικού υποστρώματος, όπως η αιθανόλη, για τις μεγάλης κλίμακας εγκαταστάσεις επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Kaksonen *et al.*, 2003a).

Στην παρούσα εργασία διεξάγεται πειραματική παρακολούθηση των παραμέτρων λειτουργίας (pH, συγκέντρωση θεικών ιόντων, συγκέντρωση ιόντων του δισθενούς θείου, συγκέντρωση συνολικού οργανικού άνθρακα και συγκέντρωση διαλυτών μετάλλων) ενός αντιδραστήρα σταθερής κλίνης-ανοδικής ροής εργαστηριακής κλίμακας ο οποίος έπειτα από τον εμβολιασμό του με μια μικτή καλλιέργεια θειοαναγωγικών βακτηρίων επεξεργάστηκε επιτυχώς ένα συνθετικό μεταλλοφόρο διάλυμα πλούσιο σε θειικά ιόντα, παρουσία τόσο γαλακτικού όσο και αιθανόλης ως αποκλειστικής πηγής άνθρακα/ηλεκτρονίων.

Συγκεκριμένα με αρχική πηγή άνθρακα το γαλακτικό νάτριο και το εκχύλισμα ζύμης εξασφαλίστηκε η ανάπτυξη ενός βιολογικού φιλμ στο εσωτερικό του αντιδραστήρα. Ωστόσο επειδή το γαλακτικό συνιστά ένα ακριβό οργανικό υπόστρωμα έγινε η σταδιακή αντικατάστασή του από την αιθανόλη, χωρίς να επιδράσει παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των θειοαναγωγικών βακτηρίων.

Παρακολουθώντας τη μεταβολή των παραμέτρων λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα διαπιστώθηκε η επιτυχής προσαρμογή του βακτηριακού πληθυσμού στη μεταβολή της σύστασης του διαλύματος τροφοδοσίας. Σε όλη τη διάρκεια της λειτουργίας παρατηρήθηκε η παραγωγή αλκαλικότητας, ως αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης των θειοαναγωγικών βακτηρίων και συνεπώς της οξείδωσης των οργανικών ενώσεων. Επίσης παρατηρήθηκε η ποσοτική αναγωγή των θεικών ιόντων, γεγονός που επιβεβαιώνει την επιτυχή προσαρμογή της βακτηριακής καλλιέργειας τόσο στο γαλακτικό όσο και στην αιθανόλη, αλλά και η ποσοτική καταβύθιση των

διαλυτών μετάλλων. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε προηγούμενες εργασίες (Kaksonen *et al.*, 2003a; Kaksonen *et al.*, 2003b; Kousi *et al.*, 2007). Η μελέτη των παραμέτρων λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα σε συνάρτηση με το χρονικό διάστημα ξεκινώντας από καθορισμένες αρχικές συνθήκες (πειράματα κινητικής) επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα.

Από την αξιολόγηση των πειραματικών αποτελεσμάτων προκύπτει ότι ο αντιδραστήρας όταν λειτουργεί με αιθανόλη ως αποκλειστική πηγή άνθρακα/ηλεκτρονίων λειτουργεί αποδοτικά όσο αφορά την απομάκρυνση των θεικών ιόντων (σε συγκέντρωση 1800 mg/l) και ιόντων μετάλλων (Fe, Zn, Cu, Ni σε συγκέντρωση 100 mg/l το καθένα).

Σε μια προσπάθεια διερεύνησης των βέλτιστων συνθηκών λειτουργίας, επιχειρήθηκε η τροφοδοσία του αντιδραστήρα με τη στοιχειομετρικά απαιτούμενη συγκέντρωση αιθανόλης για την αναγωγή των θεικών ιόντων του διαλύματος. Παρόλο που η καταβύθιση των μετάλλων ήταν ποσοτική και σε αυτή την περίπτωση, παρατηρήθηκε υπολειμματική συγκέντρωση θεικών (περίπου 25% της αρχικής) και οργανικού άνθρακα (περίπου 28% της αρχικής). Η μερική αναγωγή των θεικών ιόντων που παρατηρείται τη χρονική περίοδο κατά την οποία ο αντιδραστήρας λειτουργεί σε στοιχειομετρική αναλογία αιθανόλης/θεικών ιόντων αναφέρεται και σε άλλες εργασίες (Velasco *et al.*, 2008). Αυτό το φαινόμενο μπορεί ενδεχομένως να αποδοθεί στη σύνθεση της μικτής καλλιέργειας θειοαναγωγικών βακτηρίων αλλά χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Ένα ακόμα προς μελέτη θέμα θα μπορούσε να αποτελέσει ο καθορισμός της σύνθεσης των στερεών ιζημάτων που σχηματίζονται κατά την καταβύθιση των μετάλλων. Στην παρούσα εργασία παρατηρείται ποσοτική καταβύθιση όλων των μετάλλων, η οποία επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα προσομοίωσης των συνθηκών εκτέλεσης των πειραμάτων με το λογισμικό Visual Minteq που χρησιμοποιείται για την προσομοίωση της χημικής ισορροπίας υδατικών διαλυμάτων (Gustafsson, 2009). Η καταβύθιση των μετάλλων με τη μορφή θειούχων ενώσεων έχει επιβεβαιωθεί και πειραματικά σε άλλες σχετικές ερευνητικές εργασίες (Kaksonen *et al.*, 2003b; Remoundaki *et al.*, 2008).

Η καταβύθιση των μετάλλων με τη μορφή θειούχων ενώσεων είναι επιθυμητή δεδομένου ότι οι περισσότερες θειούχες ενώσεις είναι λιγότερο διαλυτές από τα αντίστοιχα υδροξείδια ή τις ανθρακικές ενώσεις των μετάλλων. Ακόμα οι πολφοί που

περιέχουν θειούχες μεταλλικές ενώσεις, ξηραίνονται σχετικά εύκολα και τα μέταλλα μπορούν να ανακτηθούν από αυτούς (Kaksonen *et al.*, 2003b).

Με βάση τα παραπάνω θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να γίνει μελλοντικά χαρακτηρισμός των στερεών κατακρημνίσεων ώστε να διαπιστωθεί πειραματικά η καταβύθιση θειούχων ενώσεων των μετάλλων και να γίνει γνωστή η ακριβής χημική σύσταση των στερεών μεταλλικών ενώσεων που παράγονται από τη βιολογική διεργασία.

Οι βιολογικοί αντιδραστήρες θειοαναγωγικών βακτηρίων σταθερής κλίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων επιβαρυσμένων με θειικά ιόντα και διαλυτά μέταλλα, δεδομένου ότι οι βιολογικές στήλες έχουν απλή κατασκευή και χαμηλό κόστος συντήρησης και λειτουργίας (Qureshi *et al.*, 2005). Ωστόσο εξαιτίας του ευέλικτου μεταβολισμού που παρουσιάζουν τα θειοαναγωγικά βακτήρια θεωρείται αναγκαία η περαιτέρω έρευνα σχετικά με τις βέλτιστες συνθήκες που μπορούν να λειτουργήσουν οι βιοαντιδραστήρες, με όσο το δυνατό μικρότερο το κόστος λειτουργίας και συντήρησής τους και όσο το δυνατό καλύτερα αποτελέσματα σχετικά με το βαθμό απομάκρυνσης ρυπαντών από τα υγρά απόβλητα με στόχο την ασφαλή διάθεσή τους στο περιβάλλον.



8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Attal A., Brigodiot M., Camacho P. and Manem J. (1992). Biological mechanisms of H₂S formation in sewer pipes. *Wat. Sci. Technol.* 26: 907-914.
- Bak F. and Pfennig N. (1987). Chemolithotrophic growth of *Desulfovibrio sulfodismutans* sp. nov. by disproportionation of inorganic sulphur compounds. *Arch. Microbiol.* 147: 184-189.
- Barnes L.J., Janssen F.J., Sherren J. *et al.* (1991). A new process for the microbial removal of sulphate and heavy metals from contaminated waters extracted by a geohydrological control system. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 69: 184-186.
- Barton L.L. and Hamilton W.A. (2007). *Sulphate-reducing Bacteria Environmental and Engineered Systems*, Cambridge University Press, UK.
- Barton L.L. and Tomei F.A. (1995). Characteristics of sulphate reducing bacteria. In: Barton L.L. (Editor), *Biotechnology Handbooks: Sulphate Reducing Bacteria*, Plenum Press, New York.
- Baskaran V.K. (2005). Kinetics of anaerobic sulphate reduction in immobilized cell bioreactors. A Thesis Submitted to the College of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the degree of Master of Science in the Department of Chemical Engineering, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.
- Beeder J., Torsvik T. and Lien T. (1995). *Thermodesulforhabdus norvegicus* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic sulfate-reducing bacterium from oil field water. *Archives of Microbiology.* 164: 331-336.
- Bewtra J.K., Biswas N., Henderson W.D. and Nicell J.A. (1995). Recent advances in treatment of selected hazardous wastes. *Wat. Pollut. Res. J. Can.* 30: 115-125.
- Bharathi P.A.L., Sathe V. and Chandramohan D. (1990). Effect of lead, mercury and cadmium on a sulphate-reducing bacterium. *Environmental Pollution.* 67: 361-374.
- Bishop P.L. (2003). The effect of biofilm heterogeneity on metabolic processes. In: *Biofilms in Wastewater Treatment: an interdisciplinary approach*. Edited by Wuertz S., Bishop P.L. and Wilderer P.A. IWA Publishiry: pp.125-146.

- Brock T.D. and Madigan M.T. (1991). *Biology of Microorganisms*, 6th edn. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Caldwell M.E., Garrett R.M., Prince R.C. and Suflita J.M. (1998). Anaerobic biodegradation of long-chain nalkanes under sulphate-reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.* 32: 2191-2195.
- Colleran E., Finnegan S. and Lens P. (1995). Anaerobic treatment of sulphate-containing waste streams. *Antonie van Leeuwenhoek.* 67(1): 29-46.
- Colleran E., Finnegan S. and O’Kefee R.B. (1994) Anaerobic digestion of high sulphate containing waste water from the industrial production of citric acid. *Water Science and Technology.* 30: 263-273.
- Cord-Ruwisch R., Seitz H. and Conrad R. (1988). The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology.* 149: 350-357.
- DeWalle F.B., Chian E.S.K. and Brush J. (1979). Heavy metal removal with completely mixed anaerobic filter. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 51: 22-36.
- Dean J.A., 1999. *Lange's Handbook of Chemistry*. McGraw-Hill Inc.
- Dezham P., Rosenblum F. and Jenkins D. (1988). Digester gas H₂S control using iron salts. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 60: 514-517.
- Dilling W. and Cypionka H. (1990). Aerobic respiration in sulphate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 71: 123-128.
- Droste R.L. (1997). *Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment*. John Wiley & Sons.
- Dvorak D.H., Hedin R.S., Edenborn H.M. and McIntire P.E. (1992). *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 40, p. 609.
- Edwards M., Courtney B., Heppler P.S. and Hernandez M. (1997). Beneficial discharge of iron coagulation sludge to sewers. *J. Environ. Eng.* 123: 1027-1032.
- Elliott P., Ragusa S. and Catcheside D. (1998). Growth of sulphate-reducing bacteria under acidic conditions in an upflow anaerobic bioreactor as a treatment system for acid mine drainage. *Wat. Res.* 32: 3724-3730.
- EPA (1974). *Process Design Manual for Sulfide Control in Sanitary Sewerage Systems*. Center for Environmental Research Information, US Environmental Protection Agency, Cincinnati.

- EPA (1985). Odor and Corrosion Control in Sanitary Sewerage Systems and Treatment Plant. Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Esterl S., Hartmann C. and Delgado A. (2003). On the influence of fluid flow in a packed-bed biofilm reactor. In: Biofilms in Wastewater Treatment: an interdisciplinary approach. Edited by Wuertz S., Bishop P.L. and Wilderer P.A. IWA Publishing: pp.178-210.
- Fardeau M.L., Ollivier B., Patel B.K.C., Dwivedi P., Ragot M. and Garcia J.L. (1995). Isolation and characterization of a thermophilic sulfate-reducing bacterium, *Desulfotomaculum thermosapovorans* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 45(2): 218-221.
- Fortin D., Davis B. and Beveridge T.J. (1996). Role of *Thiobacillus* and sulfate-reducing bacteria in iron biocycling in oxic and acidic mine tailings. FEMS Microbiology Ecology. 21: 11-24.
- Φίλιππας Α. (2007). Διπλωματική εργασία με τίτλο: Καταβύθιση μετάλλων σε αντιδραστήρα θειοαναγωγικών βακτηρίων. Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών, Τομέας Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών. Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας Περιβάλλοντος στη Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Gerardi M.H. (2006). Wastewater Bacteria. John Wiley & Sons, Inc. pp. 40.
- Gibson G.R. (1990). A review: physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. J. Appl. Bact. 69: 769-797.
- Goorissen H.P, Boschker H.T.S, Stams A.J.M. and Hansen T.A. (2003). Isolation of thermophilic *Desulfotomaculum* strains with methanol and sulfite from solfataric mud pools, and characterization of *Desulfotomaculum solfataricum* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53: 1223-1229.
- Gustafsson J.P. (2009). Visual Minteq, KTH, Department of Land and Water Resources Engineering, 2009.
- Haas C.N. and Polprasert C. (1993). Biological sulphide prestripping for metal and COD removal. Wat. Environ. Res. 65: 645-649.
- Häggbloom M.M. (1998). Reductive dechlorination of halogenated phenols by a sulphate-reducing consortium. FEMS Microbiol. Ecol. 26: 35-41.

- Hammack R.W., Edenborn H.M. and Dvorak D.H. (1994). Treatment of water from an open-pit copper mine using biogenic sulphide and limestone: a feasibility study. *Wat. Res.* 28: 2321-2329.
- Hao O.J. (2003). Sulphate-reducing bacteria in: *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Academic Press, London: pp.459-469.
- Hard B.C., Friedrich S. and Babel W. (1997). Bioremediation of acid mine water using facultatively methylotrophic metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Microbiol. Res.* 152: 65-73.
- Harremoes P. (2003). Deduction and induction in design and operation of biofilm reactors. In *Biofilms in Wastewater Treatment: an interdisciplinary approach*. Edited by Wuertz S., Bishop P.L. and Wilderer P.A. IWA Publishiry: pp.178-210.
- Herlihy A.T., Mills A.L., Hornberger G.M. and Bruckner A.E. (1987). The importance of sediment sulphate reduction to the sulphate budget of an impoundment receiving acid mine drainage. *Water Resources Research.* 23(2): 287-292.
- Holder G.A. (1986). Prediction of sulphide build-up in filled sanitary sewers. *J. Environ. Eng.* 112: 199-209.
- Hullebusch E.D., Zandvoort M.H. and Lens P.N.L. (2003). Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology.* 2: 9–33.
- Jin P., Bhattacharya, K., Williams, C.J. and Zhang, H. (1998). Effects of sulphide addition on copper inhibition in methanogenic systems. *Wat. Res.* 32: 977-988.
- Johnson D.B., Ghauri M.A. and McGinness S. (1993) Biogeochemical cycling of iron and sulphur in leaching environments. *FEMS Microbiological Reviews.* 11: 63-70.
- Kaksonen A.H., Franzmann P.D. and Puhakka J.A. (2003a). Performance and ethanol oxidation kinetics of a sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation.* 14: 207–217.
- Kaksonen A.H., Riekkola-Vanhanenc M.L. and Puhakka J.A. (2003b). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Research.* 37: 255–266.

- Kaksonen A.H., Franzmann P.D. and Puhakka J.A. (2004). Effects of Hydraulic Retention Time and Sulfide Toxicity on Ethanol and Acetate Oxidation in Sulfate-Reducing Metal-Precipitating Fluidized-Bed Reactor. *Biotechnology and bioengineering*. 86(3): 332-343.
- Kaksonen A.H. and Puhakka J.A. (2007). Sulfate Reduction Based Bioprocesses for the Treatment of Acid Mine Drainage and the Recovery of Metals. *Eng. Life Sci.* 7(6): 541-564.
- Kenkel J. (2003). *Analytical Chemistry for Technicians*. Third Edition. CRC Presss, LLC.
- Kolmert A. and Johnson D.B. (2001). Remediation of acidic waste waters using immobilised, acidophilic sulphate-reducing bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 76: 836-843.
- Kousi P., Remoudaki E., Hatzikioseyan A. Tsezos M. (2007). A Study of the Operating Parameters of a Sulphate-Reducing Fixed-Bed Reactor for the Treatment of Metal-Bearing Wastewater. *Advanced Materials Research Vols. 20-21*: 230-234.
- Kousi P., Remoudaki E., Hatzikioseyan A. Tsezos M. (2009). Precipitation of metals in a fixed-bed sulphate-reducing reactor under theoretical stoichiometric lactate/sulphate ratio. 3rd AMIREG International Conference: Assessing the Footprint of 1 Resource Utilization and Hazardous Waste Management, Athens, Greece
- Lawrence A.W. and McCarty P.L. (1965). The role of sulphide in preventing heavy metal toxicity in anaerobic treatment. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 37: 392-05.
- Legall J. and Fauque F. (1988) Dissimilatory reduction of sulphur compounds. In: Zehnder A. B. (Editor), *Biology of Anaerobic Microorganisms*, Wiley Publications, New York: pp.587-639.
- Lens P.N.L. and Kuenen J.G. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science and Technology*. 44(8):57–66.
- Lens P.N.L., Visser A., Jansen A.J.H., Hulshoff Pol L.W. and Lettinga G. (1998). Biotechnological treatment of organic sulphate-rich wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 28: 41-88.
- Liu Y., Karnauchow T.M., Jarrell K.F., Balkwill D.L., Drake G.R., Ringelberg D., Clarno R. and Boone D.R. (1997). Description of two new thermophilic

- Desulfotomaculum* spp., *Desulfotomaculum putei* sp. nov., from a deep terrestrial subsurface, and *Desulfotomaculum luciae* sp. nov., from a hot spring. International Journal of Systematic Bacteriology. 47: 615-621.
- Maree J.P., Gerber A. and Hill E. (1987). An integrated process for biological treatment of sulphate-containing industrial effluents. J. Wat. Pollut. Control Fed. 59: 1069-1074.
- McCartney D.M. and Oleszkiewicz J.A. (1991). Sulfide inhibition of anaerobic degradation of lactate and acetate. Water Research. 25: 203-209.
- McCartney D.M. and Oleszkiewicz J.A. (1993). Competition between methanogens and sulphate reducers: effect of COD: Sulphate ratio and acclimation. Water Environment Research. 65: 655-664.
- Mori T., Koga M., Hikosaka Y. *et al.* (1991). Microbial corrosion of concrete sewer pipes, H₂S production from sediments and determination of corrosion rate. Wat. Sci. Technol. 23: 1275-1282.
- Nielsen P.H. (1987). Biofilm dynamics and kinetics during high-rate sulphate reduction under anaerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 53: 27-32.
- Nilsen R.K., Torsvik T. and Lien T. (1996) *Desulfotomaculum thermocisternum* sp. nov., a sulfate reducer isolated from a hot North Sea oil reservoir. International Journal of Systematic Bacteriology. 46: 397-402.
- O’Flaherty V. and Colleran E. (1998). Effect of sulphate addition on volatile fatty acid and ethanol degradation in an anaerobic hybrid reactor. I: process disturbance and remediation. Bioresource Technology. 68: 101-107.
- Okabe S. and Characklis W.G. (1992). Effects of temperature and phosphorus concentration on microbial sulphate reduction by *Desulfovibrio desulphuricans*. Biotechnol. Bioeng. 39: 1031-1042.
- Oliveira R., Azeredo J. and Texeira P. (2003). The importance of physicochemical properties in biofilm formation and activity. In Biofilms in Wastewater Treatment: an interdisciplinary approach. Edited by Wuertz S., Bishop P.L. and Wilderer P.A. IWA Publishing: pp.211-231.
- Omil F., Lens P., Visser A., Hulshoff Pol L.W. and Lettinga, G. (1998). Long term competition between sulfate reducing and methanogenic bacteria in UASB reactors treating volatile fatty acids. Biotech. Bioeng. 57: 676–685.
- Padival N.A., Kimbell W.A. and Redner J.A. (1995). Use of iron salts to control dissolved sulphide in truck sewers. J. Environ. Eng. 121: 824-829.

- Peck H.D. and Legall J. (1982) Biochemistry of dissimilatory sulphate reduction. Philosophical Transactions of the royal society of London, 443-466. London, UK.
- Plugge M.C., Balk M. and Stams A.J.M. (2002). *Desulfotomaculum thermobenzoicum* subsp. thermosyntrophicum subsp. nov., a thermophilic, syntrophic, propionateoxidizing, spore-forming bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 391-399.
- Postgate J.R. (1965). Recent advances in the study of the sulphate-reducing bacteria, Bacteriol. Rev. 29(4): 425-441.
- Postgate J.R. (1984). The Sulphate Reducing Bacteria, 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge: pp.468.
- Puigdomenech I. (2009). Chemical Equilibrium Diagrams HYDRA-MEDUSA, KTH, School of Chemical Science and Engineering, Department of Chemistry.
- Qureshi N., Annous B.A., Ezeji T.C., Karcher P. and Maddox I.S. (2005). Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. Microbial Cell Factories. 4: 24.
- Rabus R., Hansen T.A. and Widdel F. (2006). Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. Prokaryotes: pp.705-707.
- Rees G.N., Grassia G.S., Sheehy A.J., Dwivedi P.P. and Patel B.K.C. (1995) *Desulfacinum infernum* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducing bacterium from a petroleum reservoir. International Journal of Systematic Bacteriology. 45: 85-89.
- Reis M.A.M., Almeida J.S., Lemos P.C. and Carrondo M.J.T. (1992). Effect of hydrogen sulphide on growth of sulphate reducing bacteria. Biotechnol. Bioeng. 40: 593-600.
- Remoudaki E., Kousi P., Jouliau C., Battaglia-Brunet F., Hatzikioseyan A. & Tsezos M. (2008). Characterization, morphology and composition of biofilm and precipitates from a sulphate-reducing fixed-bed reactor. Journal of Hazardous Materials. 153: 514–524.
- Rittmann B.E. and McCarty P.L. (2001). Environmental Biotechnology: Principles and Applications, McGraw Hill.
- Ρεμουντάκη Ε. και Τσέζος Μ. (2002). Σημειώσεις για το μάθημα: Περιβαλλοντική χημεία και μηχανισμοί κινητικότητας ρύπων. Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών, Τομέας Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών.

Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας Περιβάλλοντος στη Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

- Speece R.E. (1983). Anaerobic biotechnology of industrial wastewaters. *Environmental Science and Technology*. 17: 416A-427A.
- Shuler M.L. and Kargi F. (2002). *Bioprocess Engineering, Basic concepts*, second edition, Prentice Hall PTR.
- Tuttle J.H., Dugan P.R. and Randles C.L. (1969). Microbial sulphate reduction and its potential utility as an acid mine water pollution abatement procedure. *Applied Microbiology*. 17 (2): 297-302.
- Τσέζος Μ. και Ρεμουντάκη Ε. (2006). Σημειώσεις για το μάθημα: Περιβάλλον Ι-Εισαγωγή στην Επιστήμη & Τεχνολογία Προστασίας του Περιβάλλοντος. Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών, Τομέας Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών. Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας Περιβάλλοντος στη Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Τσέζος Μ. (2005). Βοηθητικές σημειώσεις εργαστηριακών ασκήσεων για το μάθημα: Περιβάλλον Ι-Εισαγωγή στην Επιστήμη & Τεχνολογία Προστασίας του Περιβάλλοντος. Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων – Μεταλλουργών, Τομέας Μεταλλουργίας και Τεχνολογίας Υλικών. Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας Περιβάλλοντος στη Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Utgikar V.P., Chen B.Y., Chaudhary N., Tabak H.H., Haines J.R. and Govind R. (2001). Acute toxicity of heavy metals to acetate-utilizing mixed cultures of sulfatereducing bacteria: EC100 and EC50. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20(12): 2662-2669.
- Velasco A., Ramírez M., Volke-Sepúlveda T., González-Sánchez A. and Revah S. (2008). Evaluation of feed COD/sulfate ratio as a control criterion for the biological hydrogen sulfide production and lead precipitation. *Journal of Hazardous Materials*. 151: 407-413.
- Visser A., Gao Y. and Lettinga G. (1993). Effects of shortterm temperature increases on the mesophilic anaerobic breakdown of sulphate containing synthetic wastewater. *Wat. Res.* 27: 541-550.
- Wakao N., Takahashi T., Sakurai Y. and Shiota H. (1979). A treatment of acid mine waster using sulfatereducing bacteria. *J. Ferment. Technol.* 57: 445-452.

- Webb J.S., McGinness S. and Lappin-Scott H.M. (1998). Metal removal by sulphate-reducing bacteria from natural and constructed wetlands. *J. Appl. Microbiol.* 84: 240-248.
- Weijma J., Stams A.J.M., Hulshoff Pol L.W. and Lettinga G. (2000). Thermophilic sulphate reduction and methanogenesis with methanol in a high rate anaerobic reactor. *Biotechnology and Bioengineering.* 67(3): 354-363.
- White C., Sharman A.K. and Gadd G.M. (1998). An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. *Nat. Biotechnol.* 16: 572-575.
- Widdel F. (1988). Microbiology and Ecology of Sulphate and Sulphur-Reducing Bacteria. In: A.J.B. Zehnder (ed.) *Biology of Anaerobic Microorganisms.* Wiley, New York.
- Widdel F. (1992). The genus *Desulfotomaculum*. In: Balows A., Trüper H.G., Dworkin M., Harder W. and Schleifer K.-H. (Editors), *The Prokaryotes*, 2nd Edition, Springer Verlag, New York, USA: pp.1793-1799.
- Widdel F. and Pfennig N. (1977) A new anaerobic, sporing, acetate-oxidising, sulphate reducing bacterium, *Desulfotomaculum acetoxidans*. *Archives of Microbiology.* 112: 119-122.
- Wieder R.K. (1989). A survey of constructed wetlands for acid mine drainage treatment in the Eastern US. *Wetlands* 9: 299-315.
- Zellner G., Neudorfer F. and Diekmann H. (1994). Degradation of lactate by an anaerobic mixed culture in a fluidized-bed reactor. *Water Res.* Vol. 28, p. 1337.