



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

Τομέας II: Τομέας Ανάλυσης, Σχεδιασμού και  
Ανάπτυξης Διεργασιών και Συστημάτων

---

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΕΞΑΣΘΕΝΟΥΣ ΧΡΩΜΙΟΥ  
ΣΕ ΕΝΑΝ ΚΑΙΝΟΤΟΜΟ ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ**

ΑΡΓΥΡΟΠΟΥΛΟΥ ΔΑΦΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΡΑΣΙΜΟΣ ΛΥΜΠΕΡΑΤΟΣ



ΑΘΗΝΑ 2016

## Περίληψη

Το χρώμιο αποτελεί ένα από τα φυσικά συστατικά του φλοιού της γης και με την αποσάθρωση των πετρωμάτων εμφανίζεται περιορισμένα στα εδάφη και στα ύδατα. Με την ανάπτυξη της βιομηχανικής δραστηριότητας, οι συγκεντρώσεις του στα φυσικά συστήματα έχουν αυξηθεί αισθητά, καθιστώντας τη ρύπανση από χρώμιο σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα. Το χρώμιο εισάγεται στα ύδατα μέσω της απόρριψης των βιομηχανικών αποβλήτων στον υδροφόρο ορίζοντα και στην ατμόσφαιρα σε σωματιδιακή μορφή, από βιομηχανίες που κάνουν χρήση χρωμιούχων ενώσεων, όπως μεταλλουργίες, μονάδες επιχρωμιώσεων, βυρσοδεψίες κλπ .

Το χρώμιο στο περιβάλλον απαντάται στην τρισθενή (Cr[III]) και την εξασθενή μορφή (Cr[VI]). Το τρισθενές χρώμιο αποτελεί φυσικό ιχνοστοιχείο των οργανισμών και είναι αβλαβές· το εξασθενές χρώμιο αντίθετα είναι ιδιαίτερα τοξικό και έχει χαρακτηριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και την Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA) ως καρκινογόνο. Αυστηρή νομοθεσία έχει θεσπιστεί στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες για τον έλεγχο της συγκέντρωσης του χρωμίου σε πόσιμο νερό και βιομηχανικά απόβλητα.

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την εξυγίανση αποβλήτων με χρώμιο (πχ. χημική αναγωγή, προσρόφηση κ.ά.)· οι βιολογικές τεχνικές συγκεντρώνουν τελευταία το ενδιαφέρον λόγω χαμηλού κόστους, υψηλών αποδόσεων και οικολογικής προσέγγισης στο πρόβλημα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε σύστημα βιολογικής απομάκρυνσης Cr[VI] από υγρό απόβλητο με υψηλή συγκέντρωση εξασθενούς χρωμίου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Χημικής Τεχνολογίας του τμήματος Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Στόχος ήταν η διερεύνηση του μηχανισμού αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου σε αναερόβιο βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου περιοδικής λειτουργίας (SBR) που απομάκρυνε αποτελεσματικά Cr[VI] μέσω αναγωγής του σε Cr[III].

Συγκεκριμένα, τα πειράματα αποτελούνται από τρία μέρη. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αναλυτικά πειράματα, με τη βοήθεια φασματοφωτομετρίας UV-Vis και υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, και αναζητήθηκαν τα συστατικά που παίζουν ρόλο στην αναγωγή του Cr[VI] στο βιοαντιδραστήρα. Το γαλακτικό οξύ ήταν ο κύριος παράγοντας της αναγωγής. Έπειτα, με πειράματα γενετικής ταυτοποίησης προσδιορίστηκε το είδος των μικροοργανισμών του βιοαντιδραστήρα. Βρέθηκε ότι ανήκουν στο γένος *Pediococcus*, είναι δηλαδή βακτήρια που πραγματοποιούν ομογαλακτική ζύμωση. Τέλος, μοντελοποιήθηκε η διεργασία με το λογισμικό Aquasim 2.0, θεωρώντας κινητική Monod για την κυτταρική ανάπτυξη.

Τα αποτελέσματα ήταν θετικά, καθώς το σύστημα είχε την ικανότητα να απομακρύνει υψηλές συγκεντρώσεις εξασθενούς χρωμίου (550 ppm) μέσα σε 48 ώρες, και ο μικροβιακός πληθυσμός ήταν πλήρως εγκλιματισμένος. Το γαλακτικό οξύ που παράγεται σαν προϊόν μεταβολισμού των *Pediococci*, συνδέεται με την αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου και την παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος ως παραπροϊόν, όμως ο ακριβής μηχανισμός και η κινητική της αντίδρασης δεν έχει εξακριβωθεί.

## Abstract

Chromium is one of the natural components of earth's crust and with the weathering of rocks it presents a limited occurrence in soils and water. With the growth of industrial activity, chromium's concentration at natural systems has increased significantly, rendering chromium pollution an important environmental issue. Chromium enters waters through disposal of industrial waste and the atmosphere in particulate form, from industries that use chromium compounds, such as metallurgies, chrome plating and leather tanning units, etc.

Chromium in the environment occurs in the trivalent state (Cr[III]) and the hexavalent state (Cr[VI]). Trivalent chromium constitutes a natural mineral in organisms and is harmless; hexavalent chromium on the other hand is particularly toxic and has been characterized by the World Health Organization (WHO) and the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) as a carcinogen. Strict regulation has been established in Europe and the United States for controlling chromium concentration in drinking water and industrial waste.

A variety of methods have been developed for the remediation of chromium-containing waste (i.e. chemical reduction, adsorption etc.); biological techniques lately gather interest due to their low cost, high efficacies and ecological approach to the matter. In the present thesis a system for the biological removal of Cr[VI] from a liquid waste with high concentration of hexavalent chromium is studied. The experiments were carried at the lab of Organic Chemical Technology in the department of Chemical Engineering NTUA. The aim was the examination of the mechanism of the reduction reaction of hexavalent chromium in an anaerobic sequence batch bioreactor (SBR) that efficiently removed Cr[VI] through its reduction to Cr[III].

Specifically, the experiments consisted of three parts. Initially, analytical experiments were carried, with the aid of UV-Vis spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC), and the components that participate in the reduction of Cr[VI] in the reactor were sought. Then, the species of the reactor's microorganisms was determined with genetic identification experiments. They were found to belong in the *Pediococcus* genus, which means they are bacteria that perform homolactic fermentation. Finally, the process was modeled with the Aquasim 2.0 computer program, considering Monod kinetics for cell growth.

The results were positive, since the system had the ability to remove high concentrations of hexavalent chromium (550 ppm) within 48 hours, and the microbial population was fully acclimatized. Lactic acid that was observed as a metabolic product of *Pediococci*, is connected with hexavalent chromium reduction and production of pyruvic acid as a byproduct, but the exact mechanism and kinetics of the reaction have not been ascertained.

# Περιεχόμενα

---

Περίληψη.....	2
Abstract .....	3
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....</b>	<b>7</b>
1.1. Γενικά στοιχεία χρωμίου .....	7
1.1.1. Ιστορικό .....	8
1.1.2. Φυσικές ιδιότητες .....	9
1.1.3. Ισότοπα χρωμίου .....	9
1.2. Χημεία χρωμίου .....	10
1.2.1. Οξειδωτικές καταστάσεις χρωμίου .....	11
1.2.2. Ενώσεις χρωμίου .....	12
1.2.3. Το χρώμιο στην Οργανική Χημεία .....	18
1.3. Παραγωγή και χρήσεις χρωμίου .....	20
1.3.1. Βιομηχανική παραγωγή χρωμίου .....	20
1.3.2. Βιομηχανικές χρήσεις χρωμίου .....	21
1.4. Το χρώμιο στο περιβάλλον .....	24
1.4.1. Προέλευση χρωμίου στο περιβάλλον .....	24
1.4.2. Το χρώμιο στην ατμόσφαιρα .....	25
1.4.3. Το χρώμιο στα εδάφη.....	27
1.4.4. Το χρώμιο στα ύδατα .....	30
1.4.5. Μεταφορά χρωμίου στο περιβάλλον .....	34
1.5. Το χρώμιο στον οργανισμό .....	36
1.5.1. Τρόποι έκθεσης στο χρώμιο .....	36
1.5.2. Πορεία χρωμίου στον οργανισμό .....	38
1.5.3. Επιπτώσεις χρωμίου στην υγεία .....	39
1.5.4. Μηχανισμός τοξικότητας .....	40
1.5.5. Καρκινογόνος δράση χρωμίου .....	40
1.6. Εκπομπές & Νομοθεσία .....	41
1.6.1. Εκπομπές χρωμίου στην Ευρωπαϊκή Ένωση.....	41
1.6.2. Νομοθεσία.....	43
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....</b>	<b>46</b>
<b>ΜΕΡΟΣ 1° : Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του Cr.....</b>	<b>46</b>
<b>ΜΕΡΟΣ 2° : Τεχνολογίες επεξεργασίας Cr[VI] σε υγρά απόβλητα .....</b>	<b>49</b>

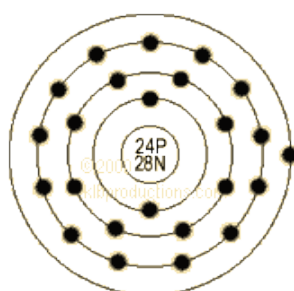
2.1.	Συμβατικές τεχνολογίες επεξεργασίας Cr[VI] .....	49
2.1.1.	Τεχνολογίες μείωσης τοξικότητας Cr[VI] .....	49
2.1.2.	Τεχνολογίες απομάκρυνσης Cr[VI].....	51
2.1.3.	Τεχνολογίες περιορισμού Cr[VI] .....	55
2.1.4.	Αξιολόγηση συμβατικών τεχνικών απομάκρυνσης Cr[VI] .....	56
2.2.	Βιολογικές τεχνολογίες επεξεργασίας Cr[VI] .....	57
2.2.1.	Βιολογική αναγωγή .....	58
2.2.2.	Αερόβια βιολογική αναγωγή.....	59
2.2.3.	Αναερόβια βιολογική αναγωγή.....	60
2.2.4.	Βιοσυσσώρευση .....	62
2.2.5.	Βιορόφηση.....	62
2.2.6.	Παράγοντες που επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες .....	63
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....</b>		<b>64</b>
<b>ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup> : Βιοαντιδραστήρες απομάκρυνσης Cr[VI].....</b>		<b>64</b>
3.1.	Διφασικά συστήματα βιολογικής απομάκρυνσης Cr[VI] - (Two-Phase Partitioning Bioreactors, TPPBs) .....	64
3.1.1.	Βιοαντιδραστήρας δύο φάσεων υγρού-υγρού (Two-Phase Liquid-Liquid Bioreactor, TPLL) .....	65
3.1.2.	Βιοαντιδραστήρας δύο φάσεων στερεού-υγρού (Two-Phase Solid-Liquid Bioreactor, TPSLB) .....	66
3.1.3.	Βιοαντιδραστήρας μιας υγρής φάσης .....	67
<b>ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup> : Η αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου στο βιοαντιδραστήρα μιας υγρής φάσης</b>		<b>69</b>
3.2.	Γαλακτικό και πυροσταφυλικό οξύ .....	69
3.3.	Ανασκόπηση βιβλιογραφίας για γαλακτικό οξύ και εξασθενές χρώμιο .....	71
3.3.1.	Τρεις μελέτες για το μηχανισμό και την κινητική αναγωγής Cr[VI] από γαλακτικό οξύ.....	71
3.3.2.	Συμπεράσματα βιβλιογραφικής ανασκόπησης .....	78
3.4.	Βακτηριακό γένος <i>Pediococcus</i> .....	79
3.5.	Κινητική μικροβιακής ανάπτυξης.....	84
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>		<b>87</b>
4.1.	Θεωρία πειραματικών μεθόδων .....	87
4.1.1.	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	87
4.1.2.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	91
4.1.3.	Ηλεκτροφόρηση DNA .....	93
4.1.4.	Προετοιμασία διαλυμάτων Cr[VI] .....	96

4.2.	Αναλυτικά και κινητικά πειράματα.....	96
4.2.1.	Διερεύνηση μηχανισμού αναγωγής Cr[VI] στο βιοαντιδραστήρα .....	96
4.2.2.	Ανάλυση δειγμάτων με HPLC.....	99
4.2.3.	Μελέτη της αναγωγής Cr[VI] από γαλακτικό οξύ .....	102
4.2.4.	Απομόνωση μικροοργανισμών από τη μικτή καλλιέργεια του βιοαντιδραστήρα .....	104
4.3.	Πειράματα γενετικής ταυτοποίησης.....	108
4.3.1.	Καλλιέργεια κυττάρων βιοαντιδραστήρα που προορίζονται για απομόνωση γονιδιωματικού DNA.....	108
4.3.2.	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με διάλυμα CTAB .....	108
4.3.3.	Πολλαπλασιασμός γονιδιωματικού DNA με PCR .....	110
4.3.4.	Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA .....	112
4.3.5.	Καθαρισμός DNA.....	114
4.3.6.	Ταυτοποίηση γονιδιωματικού DNA με αλληλούχιση .....	114
4.3.7.	Έλεγχος με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM).....	114
4.4.	Μοντελοποίηση βιοαντιδραστήρα μιας υγρής φάσης με το λογισμικό AQUASIM	
2.0	114	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>		<b>120</b>
5.1.	Αναλυτικά και κινητικά πειράματα.....	120
5.1.1.	Διερεύνηση μηχανισμού αναγωγής Cr[VI] στο βιοαντιδραστήρα .....	120
5.1.2.	Ανάλυση δειγμάτων με HPLC.....	122
5.1.3.	Μελέτη της αναγωγής Cr[VI] από γαλακτικό οξύ .....	137
5.1.4.	Απομόνωση μικροοργανισμών από τη μικτή καλλιέργεια του βιοαντιδραστήρα .....	139
5.2.	Πειράματα γενετικής ταυτοποίησης.....	143
5.2.1.	Απομόνωση DNA <i>E.coli</i> και <i>S. cerevisiae</i> .....	143
5.2.2.	Ανίχνευση DNA με ηλεκτροφόρηση.....	143
5.2.3.	Αλληλούχιση DNA και ταυτοποίηση μικροοργανισμού .....	145
5.2.4.	Έλεγχος αποτελέσματος με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) ....	150
5.3.	Μοντελοποίηση βιοαντιδραστήρα μιας υγρής φάσης με το λογισμικό AQUASIM	
2.0	152	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΈΡΕΥΝΑ .....</b>		<b>156</b>
6.1.	Συμπεράσματα .....	156
6.2.	Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	158
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>		<b>159</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ .....</b>		<b>166</b>

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## 1.1. Γενικά στοιχεία χρωμίου

Το χρώμιο (Cr) είναι το χημικό στοιχείο που ανήκει στην πρώτη περίοδο της 6<sup>ης</sup> ομάδας του περιοδικού πίνακα και έχει ατομικό αριθμό 24. Βρίσκεται στον τομέα d, μεταξύ του βανάδιου και του μαγγανίου. Όπως τα υπόλοιπα στοιχεία αυτού του τομέα είναι μέταλλο μετάπτωσης, έχει δηλαδή ηλεκτρόνια σθένους στην υποστιβάδα d. Το χρώμιο είναι το 21<sup>ο</sup> στοιχείο σε αφθονία στο φλοιό της γης, με μέση συγκέντρωση 100 ppm. (1), (2)



Εικόνα 1.1. Ηλεκτρονιακή δόμηση ατόμου Cr.

Τα γενικά χαρακτηριστικά του στοιχειακού χρωμίου παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1.

Σύμβολο	Cr
Ατομικός αριθμός	24
Μαζικός αριθμός	52
Ατομική μάζα	51.9961
CAS no.	7440-47-3
<b>Φυσικές Ιδιότητες</b>	
Ατομική ακτίνα (nm)	0.185
Μήκος δεσμού Cr-Cr (nm)	0.250
Κρυσταλλική δομή	Κυβικό χωροκεντρωμένο σύστημα (bcc)
Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> στους 293K)	7.19
Σκληρότητα (Mohs)	8.5
<b>Ηλεκτρικές Ιδιότητες</b>	
Ηλεκτρική αγωγιμότητα	0.0774×10 <sup>6</sup>
Ηλεκτραρνητικότητα (κλίμακα Pauling)	1.66
Ηλεκτρονιακή δομή	1s <sup>2</sup> 2s <sup>2</sup> 2p <sup>6</sup> 3s <sup>2</sup> 3p <sup>6</sup> 3d <sup>5</sup> 4s <sup>1</sup>
Οξειδωτικές Καταστάσεις	-2 ως +6
<b>Θερμικές Ιδιότητες</b>	

Σημείο βρασμού	2944 K, 2671°C
Σημείο τήξης	2180 K, 1907 °C
Ειδική θερμοχωρητικότητα	0.451 (J/g·K)
Θερμική αγωγιμότητα (W/cm·K)	0.937

*Πίνακας 1.1. Ιδιότητες μεταλλικού χρωμίου*

### 1.1.1. Ιστορικό

Η πρώτη αναφορά σε ένωση χρωμίου γίνεται το 1761, όταν ο Johann Lehmann περιέγραψε το ερυθρό-πορτοκαλί ορυκτό που ανακαλύφθηκε στα Ουράλια Όρη, δίνοντάς του την ονομασία «Σιβηρικός ερυθρός μόλυβδος». Το ορυκτό αυτό ήταν χρωμικός μόλυβδος ή κροκοΐτης ( $PbCrO_4$ ) και αξιοποιήθηκε στη βιομηχανία χρωμάτων, για την παραγωγή κίτρινου χρώματος. Το 1799, ο γάλλος χημικός Louis-Nicolas Vauquelin μετά από πειραματισμούς ανακάλυψε ότι ο κροκοΐτης βρισκόταν σε συνδυασμό με ένα οξείδιο κάποιου άγνωστου μετάλλου. Οι χημικοί Fourcroy και René Just Haüy ονόμασαν το νέο μέταλλο χρώμιο, από τη λέξη «χρώμα», λόγω των ποικίλων έντονων χρωματισμών των ενώσεών του. Ο Vauquelin στη συνέχεια έδειξε πως το χρώμιο περιέχεται τόσο στο σμαράγδι όσο και στο ρουμπίνι, και ευθύνεται για το χαρακτηριστικό χρώμα των πετρωμάτων.

Στη συνέχεια, το Cr ταυτοποιήθηκε ως συστατικό του ορυκτού χρωμίτη ( $FeCr_2O_4$ ), ο οποίος αποτελεί την κύρια εμπορική πηγή χρωμίου. Η εξόρυξη χρωμίτη αρχικά γινόταν στα Ουράλια της Ρωσίας και απευθυνόταν στη χημική βιομηχανία και τη βιομηχανία πιγμέντων. Από το 1827, με την ανακάλυψη χρωμίτη στις πολιτείες Maryland, Pennsylvania και Virginia, οι ΗΠΑ έγιναν ο μεγαλύτερος προμηθευτής του ορυκτού παγκοσμίως. Το 1906 άρχισε η εξόρυξη χρωμίτη στην Ινδία και Νότια Αφρική. Στην πορεία ανακαλύφθηκαν νέες βιομηχανικές εφαρμογές για το χρώμιο, όπως η χρήση διχρωμικών αλάτων στη βυρσοδεψία (1820) και η παραγωγή πυρίμαχων υλικών (1886). Η πρώτη πατέντα για την προσθήκη Cr σε χάλυβα εκδόθηκε το 1865, όμως δεν αξιοποιήθηκε ευρέως μέχρι να αναπτυχθεί η αλουμινοθερμική διεργασία στις αρχές του 1900. Έκτοτε, η χρήση ανοξείδωτου χάλυβα έχει εξαπλωθεί από τις βιομηχανίες μέχρι τις οικιακές συσκευές. Παράλληλα αναπτύχθηκε και η διεργασία της ηλεκτρολυτικής επιμετάλλωσης με χρώμιο, η οποία έπειτα έγινε τυπική απαίτηση για μηχανικό εξοπλισμό.

Το χρώμιο δε βρίσκεται ελεύθερο στη φύση, αλλά ενωμένο με άλλα στοιχεία, όπως το οξυγόνο. Αν και η τρισθενής μορφή του,  $Cr(III)$ , είναι αβλαβής, η εξασθενής μορφή,  $Cr(VI)$  η οποία βρίσκεται στα χρωμικά και διχρωμικά άλατα, είναι τοξική και επικίνδυνη για τους οργανισμούς. Το 1998 με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 98/83/EC θεσπίστηκαν ανώτατα όρια για το χρώμιο στο πόσιμο νερό. Το 1988 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας χαρακτήρισε το  $Cr(VI)$  ως πιθανό καρκινογόνο ενώ αργότερα, το 2003, εκδόθηκε η Ευρωπαϊκή Οδηγία Περιορισμού Επικίνδυνων Ουσιών που έθεσε περιορισμούς στη βιομηχανική χρήση του εξασθενούς χρωμίου.



### 1.1.2. Φυσικές ιδιότητες

Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C), το μεταλλικό χρώμιο είναι στερεό, χρώματος αργυρού σαν ασάλι με κυανίζουσα λάμψη, πολύ σκληρό αλλά και εύθραυστο, αν και η ευθραυστότητά του πιθανώς οφείλεται σε προσμείξεις.



Εικόνα 1.2. Μεταλλικό χρώμιο

Στην πραγματικότητα, είναι σχεδόν αδύνατο να υπάρξει χρώμιο σε στοιχειακή μορφή σε κανονικές συνθήκες, καθώς η επιφάνειά του αντιδρά πολύ εύκολα με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Μπορεί να θεωρηθεί τόσο βαρύ μέταλλο, λόγω της πυκνότητάς του που είναι μεγαλύτερη από 5 g/l, όσο και ιχνοστοιχείο, καθώς η μαζική του συγκέντρωση στο έδαφος συνήθως είναι μικρότερη από 100 ppm. Είναι εξαιρετικά ανθεκτικό στη διάβρωση, γι' αυτό και χρησιμοποιείται ως υλικό επιμετάλλωσης. Το χρώμιο έχει υψηλά σημεία τήξης και βρασμού, 1907°C και 2671°C αντίστοιχα.(3) Κρυσταλλώνεται στο κυβικό χωροκεντρωμένο σύστημα (bcc), με κρυσταλλικούς άξονες στα 291 pm (4).

Το χρώμιο ξεχωρίζει για τη μαγνητική του συμπεριφορά. Η ασυμπλήρωτη 3d στιβάδα του προκαλεί την αντισηδηρομαγνητική συμπεριφορά του και το μέταλλο παραμένει μακροσκοπικά αμαγνήτιστο σε θερμοκρασία δωματίου. Σε θερμοκρασία όμως μεγαλύτερη των 37,3°C εμφανίζει παραμαγνητικές ιδιότητες. (5)

### 1.1.3. Ισότοπα χρωμίου

Υπάρχουν 26 γνωστά ισότοπα χρωμίου. Από αυτά, τέσσερα μόνο είναι σταθερά (μη ραδιενεργά) και απαντώνται στη φύση, τα εξής:  $^{50}\text{Cr}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{53}\text{Cr}$ ,  $^{54}\text{Cr}$ , σε αφθονία 4,35%, 83,79%, 9,51% και 2,47% αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα ισότοπα έχουν παραχθεί τεχνητά, και συνήθως εμφανίζουν μικρούς χρόνους ημιζωής ( $t_{1/2}$ ).

Τα ισότοπα του χρωμίου και οι χρόνοι ημιζωής τους παρουσιάζονται στον πίνακα 1.2.:

Ισότοπα Cr	Χρόνος ημιζωής ( $t_{1/2}$ )	Ισότοπα Cr	Χρόνος ημιζωής ( $t_{1/2}$ )
$^{42}\text{Cr}$	-	$^{54}\text{Cr}$	σταθερό
$^{43}\text{Cr}$	0,021 s	$^{55}\text{Cr}$	3,497 min
$^{43}\text{Cr}$ (meta state)	0,021 s	$^{56}\text{Cr}$	5,94 min
$^{43}\text{Cr}$ (meta state 0.00 MeV)	0,021 s	$^{57}\text{Cr}$	21,1 s
$^{44}\text{Cr}$	0,53 s	$^{58}\text{Cr}$	7,0 s
$^{45}\text{Cr}$	0,05 s	$^{59}\text{Cr}$	0,74 s
$^{46}\text{Cr}$	0,26 s	$^{60}\text{Cr}$	0,57 s
$^{47}\text{Cr}$	0,51 s	$^{61}\text{Cr}$	0,27 s
$^{48}\text{Cr}$	21,56 h	$^{62}\text{Cr}$	0,19 s
$^{49}\text{Cr}$	42,3 min	$^{63}\text{Cr}$	0,19 s
$^{50}\text{Cr}$	$1,8 \times 10^{17}$ yr	$^{64}\text{Cr}$	0,11 s
$^{51}\text{Cr}$	27,7025 d	$^{65}\text{Cr}$	-
$^{52}\text{Cr}$	σταθερό	$^{66}\text{Cr}$	-
$^{53}\text{Cr}$	σταθερό	$^{67}\text{Cr}$	-

Πίνακας 1.2. Σταθερά και ραδιενεργά ισότοπα χρωμίου, χρόνοι ημιζωής (3)

Τα σταθερά ισότοπα χρωμίου κλασματώνονται, δηλαδή, αλλάζει η σχετική αναλογία των διάφορων ισοτόπων λόγω της διαφοράς της μάζας τους. Αυτό συμβαίνει όταν μια χημική αντίδραση ή μια διαδικασία προκαλεί μεταβολή των σταθερών ισοτοπικών λόγων των αντιδρώντων. Για παράδειγμα, η μεταβολή της ισοτοπικής σύστασης ενός σώματος κατά την αλλαγή φάσης από υγρό σε αέριο. Τέτοιες διεργασίες στη φύση μπορεί να είναι οι αντιδράσεις εναλλαγής των ισοτόπων, η εξάτμιση, η συμπύκνωση, η προσρόφηση και η εκρόφηση, η τήξη και η κρυστάλλωση πετρωμάτων, η διάχυση μάζας και η προτίμηση κάποιων οργανισμών να συγκεντρώνουν ελαφρά αντί για βαριά ισότοπα. (3)

## 1.2. Χημεία χρωμίου

Η μεταλλική λάμψη του χρωμίου και η μεγάλη του ανθεκτικότητα στη διάβρωση προκύπτει από την οξειδωσή του. Συγκεκριμένα, όταν η επιφάνεια του μετάλλου αντιδράσει με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας σχηματίζει ένα στρώμα οξειδίου του τρισθενούς χρωμίου ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ). Το λεπτό αυτό στρώμα είναι σκληρό, πυκνό και μη-πορώδες. Έτσι ο κύριος όγκος του μετάλλου αδρανοποιείται και αποτρέπεται περαιτέρω αντίδραση με το οξυγόνο.

Το χρώμιο αντιδρά με τα αλογόνα, όπως το φθόριο, σε υψηλές θερμοκρασίες ( $400^\circ\text{C}$ ) και πιέσεις (200 με 300 atm). Κατά την αντίδρασή του με χλώριο, βρώμιο και ιώδιο σχηματίζει ενώσεις με έντονα χρώματα. Το μεταλλικό χρώμιο διαλυτοποιείται σε διαλύματα υδροχλωρικού και θεικού οξέος. Παρ' όλα αυτά, δεν αντιδρά με το νιτρικό οξύ, πιθανώς λόγω παθητικοποίησης της επιφάνειάς του από χρωμικά οξείδια.

### 1.2.1. Οξειδωτικές καταστάσεις χρωμίου

Οι γνωστές οξειδωτικές καταστάσεις του χρωμίου κυμαίνονται από -2 ως +6. Οι διαφορετικές καταστάσεις οξείδωσης σχετίζονται άμεσα με τα είδη των ενώσεων που σχηματίζει το χρώμιο στο περιβάλλον. Οι οξειδωτικές καταστάσεις -2, -1, 0 και +1 απαντώνται συνήθως σε συνθετικές ενώσεις χρωμίου με οργανικά μόρια, όπως για παράδειγμα χρωμικά καρβονύλια και οργανομεταλλικά σύμπλοκα.

Τρεις είναι οι οξειδωτικές καταστάσεις του χρωμίου που εντοπίζονται στη φύση:

- i. Cr[0] ή μεταλλικό χρώμιο. Αν και σε κανονικές συνθήκες δεν απαντάται καθώς οξειδώνεται πολύ γρήγορα στην ατμόσφαιρα, έχει αναφερθεί η ύπαρξη στοιχειακού χρωμίου σε διαμάντια και μετεωρίτες.
- ii. Cr[III], τρισθενές χρώμιο και
- iii. Cr[VI], εξασθενές χρώμιο (3)

Οξειδωτική Κατάσταση	Όνομα-Παράδειγμα	Χημικός Τύπος
-2	Καρβονύλιο του χρωμικού (-II) νατρίου	Na <sub>2</sub> [Cr(CO) <sub>5</sub> ]
-1	Καρβονύλιο του χρωμικού(-I) νατρίου	Na <sub>2</sub> [Cr <sub>2</sub> (CO) <sub>10</sub> ]
0	Στοιχειακό Χρώμιο	Cr <sup>0</sup>
+1	Καρβονύλιο του χρωμίου (0) Διπυριδικό χρώμιο (=L)	Cr(CO) <sub>6</sub> [Cr(L) <sub>3</sub> ]
+2	Οξείδιο του χρωμίου (II)	CrO
	Φθοριούχο χρώμιο (II)	CrF <sub>2</sub>
	Χλωριούχο χρώμιο (II)	CrCl <sub>2</sub>
+3	Θειούχο χρώμιο (II)	CrS
	Οξείδιο του χρωμίου (III)	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	Φθοριούχο χρώμιο (III)	CrF <sub>3</sub>
+4	Χλωριούχο χρώμιο (III)	CrCl <sub>3</sub>
	Υδροξείδιο του χρωμίου(III)	Cr(OH) <sub>3</sub>
	Οξείδιο του χρωμίου (IV)	CrO <sub>2</sub>
+5	Φθοριούχο χρώμιο (IV)	CrF <sub>4</sub>
	Χρωμικό βάριο	BaCrO <sub>4</sub>
+6	Πενταφθοριούχο χρώμιο	CrF <sub>5</sub>
	Χρωμικό βάριο	BaCrO <sub>4</sub>
	Χρωμικό ανιόν	CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>

Διχρωμικό νάτριο

$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Διχρωμικό ανιόν

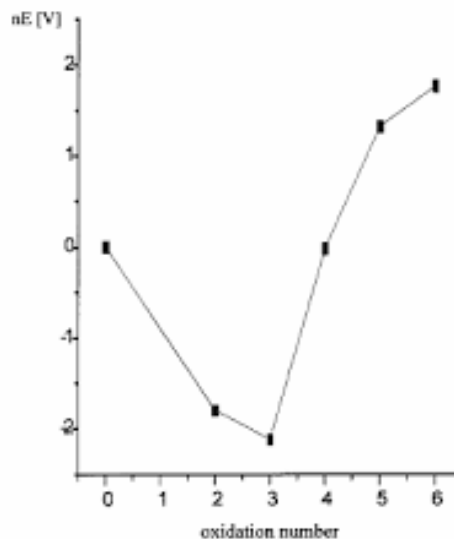
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$

Πίνακας 1.3. Καταστάσεις οξειδωσης χρωμίου. (2)

Το τρισθενές χρώμιο είναι η μορφή που επικρατεί στη φύση, καθώς είναι η σταθερότερη. Οι άλλες μορφές χρωμίου έχουν την τάση να μετατρέπονται σε τρισθενές χρώμιο όταν έρχονται σε επαφή με το φυσικό περιβάλλον. Επιπλέον, ακόμη και σε περιβάλλοντα όπου δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερό, το οξείδιο του τρισθενούς χρωμίου αντιδρά με πολύ μικρές ταχύτητες. (1)

Το τετρασθενές και το πενταθενές χρώμιο ( $\text{Cr}[\text{IV}]$  και  $\text{Cr}[\text{V}]$ ) σχηματίζουν μόνο ασταθή ενδιάμεσα σε αντιδράσεις του τρισθενούς και του εξασθενούς χρωμίου με οξειδωτικούς και αναγωγικούς παράγοντες, αντίστοιχα. Το εξασθενές χρώμιο συνιστά τη δεύτερη πιο σταθερή μορφή χρωμίου μετά το  $\text{Cr}[\text{III}]$ .

Στο διάγραμμα 1.1. παρουσιάζονται τα δυναμικά οξειδοαναγωγής του χρωμίου σε όξινο περιβάλλον. Το αρνητικό πρότυπο δυναμικό ( $E^\circ$ ) του ζεύγους ιόντων  $\text{Cr}[\text{II}]/\text{Cr}[\text{III}]$  υποδεικνύει ότι το  $\text{Cr}[\text{II}]$  οξειδώνεται εύκολα σε  $\text{Cr}[\text{III}]$ , και ότι το  $\text{Cr}[\text{II}]$  είναι σταθερό μόνο απουσία οποιουδήποτε οξειδωτικού (δηλ. σε αναερόβιες συνθήκες). Το  $\text{Cr}[\text{VI}]$  σε όξινο διάλυμα έχει πολύ υψηλό θετικό δυναμικό οξειδοαναγωγής, που σημαίνει ότι είναι ισχυρό οξειδωτικό και ασταθές παρουσία δοτών ηλεκτρονίων. (6)



Διάγραμμα 1.1. Διάγραμμα Frost χρωμίου σε όξινες συνθήκες

### 1.2.2. Ενώσεις χρωμίου

Πολλά αμέταλλα σχηματίζουν ενώσεις με το χρώμιο, όπως το οξυγόνο, το φθόριο, το χλώριο. Πολυατομικά ιόντα, όπως το νιτρικό και το θειικό ιόν, σχηματίζουν σχετικά σταθερές, διαλυτές ή μη ενώσεις. Στη βιομηχανία το διχρωμικό νάτριο είναι η κύρια πηγή χρωμίου, από το οποίο προέρχονται το χρωμικό οξύ, το οξείδιο του χρωμίου και το διχρωμικό κάλιο. Οι περισσότερες ενώσεις χρωμίου έχουν έντονο χρώμα, κάτι που

αντανακλάται στις ονομασίες τους, για παράδειγμα ο χρωμικός μόλυβδος είναι γνωστός ως κίτρινο του χρωμίου. Οι ενώσεις του χρωμίου έχουν σημαντικά υψηλότερες πυκνότητες από αυτή του νερού, με αποτέλεσμα την τάση τους για καταβύθιση στα υπόγεια ύδατα. (3)

Το χρώμιο σχηματίζει τρία διαδεδομένα είδη ενώσεων:

- 1) Ενώσεις του δισθενούς χρωμίου, Cr[II]. Πχ. το οξείδιο του χρωμίου (CrO)
- 2) Ενώσεις του τρισθενούς χρωμίου, Cr[III]. Πχ. το Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, που είναι ασθενώς βασικό.
- 3) Ενώσεις του εξασθενούς χρωμίου, Cr[VI]. Το τριοξείδιο του χρωμίου (CrO<sub>3</sub>) που είναι ισχυρά όξινο, σχηματίζει διάφορους χρωμίτες.

Πέρα από αυτές τις διαδεδομένες ενώσεις, έχουν αναφερθεί και ενώσεις μονοσθενούς, τετρασθενούς και πεντασθενούς χρωμίου. (7)

#### ➤ **Ενώσεις του δισθενούς χρωμίου, Cr<sup>2+</sup>**

Το δισθενές χρώμιο είναι ισχυρό αναγωγικό και είναι πολύ ασταθές παρουσία οξυγόνου, όπου σχηματίζει CrO (i). Το CrO βρίσκεται σε μορφή αδιάλυτης μαύρης σκόνης και είναι μέτρια βασικό. (7), (8)

Το μεταλλικό χρώμιο, απουσία οξυγόνου, διαλύεται σε οξέα προς σχηματισμό δισθενούς χρωμίου με καθόλου ή ελάχιστο τρισθενές χρώμιο. Διαλύματα Cr[II] μπορούν επίσης να ληφθούν με ηλεκτρολυτική αναγωγή του Cr[III].

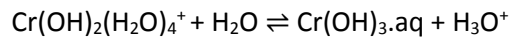
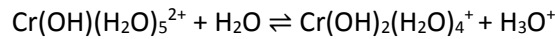
Το δισθενές χρώμιο σχηματίζει άνυδρα άλατα, όπως τα CrCl<sub>2</sub>, CrF<sub>2</sub>, CrBr<sub>2</sub> και CrI<sub>2</sub>. Επίσης σχηματίζει ένυδρα άλατα, όπως CrSO<sub>4</sub>·n(H<sub>2</sub>O) , CrX<sub>2</sub>·n(H<sub>2</sub>O) (όπου X=Br, Cl, I, ClO<sub>4</sub>), CrC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O κ.ά. Σύμπλοκα δισθενούς χρωμίου με φθόριο αποτελούν τα NH<sub>4</sub>[CrF<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O], Na<sub>2</sub>[CrF<sub>4</sub>], K[CrF<sub>3</sub>].

Τα διαλύματα και τα άλατα του Cr[II] είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στο οξυγόνο λόγω της ισχυρής αναγωγικής φύσης του δισθενούς χρωμίου. Η πιο σταθερή και λιγότερο διαλυτή ένωση δισθενούς χρωμίου είναι το οξικό χρώμιο, Cr<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O στην ένυδρη μορφή του, το οποίο χρησιμοποιείται και σαν πρώτη ύλη για παρασκευή άλλων ενώσεων του δισθενούς χρωμίου. (9)

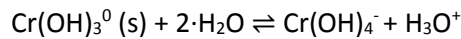
#### ➤ **Ενώσεις του τρισθενούς χρωμίου, Cr<sup>3+</sup>**

Το τρισθενές χρώμιο αποτελεί την πιο διαδεδομένη και σταθερή μορφή χρωμίου. Αποτελεί ένα ισχυρό οξύ κατά Lewis με τάση να αντιδρά αργά σχηματίζοντας σύμπλοκα με έξι υποκαταστάτες σε οκταεδρική γεωμετρία. Συνηθισμένοι υποκαταστάτες είναι το νερό, η αμμωνία, η ουρία, η αιθυλενοδιαμίνη και άλλοι οργανικοί συμπλοκοποιητές που περιέχουν οξυγόνο, άζωτο και άτομα που είναι δότες θείου. Η παρουσία του στη φύση εξαρτάται από μια πληθώρα φυσικοχημικών διεργασιών, όπως η υδρόλυση, η συμπλοκοποίηση, οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και η προσρόφηση.

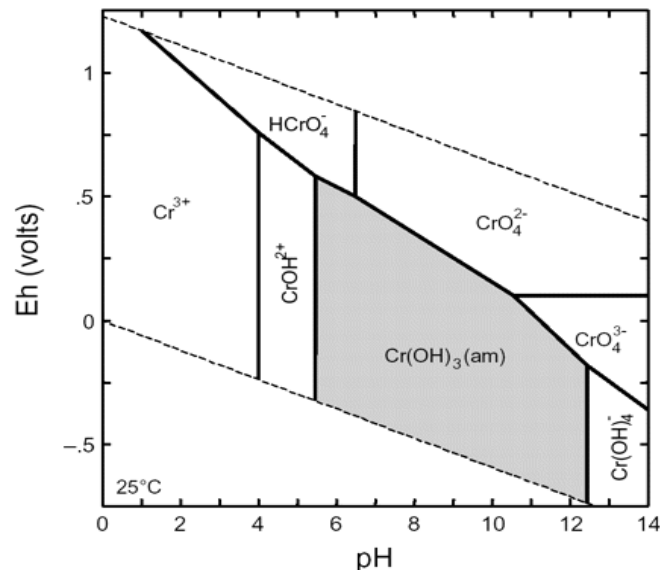
Για παράδειγμα, στο νερό και απουσία άλλων παραγόντων συμπλοκοποίησης εκτός από H<sub>2</sub>O ή OH<sup>-</sup> το Cr[III] απαντάται στη μορφή του μετρίως ισχυρού οξέος Cr(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> (pK≈4), η υδρόλυση του οποίου ελέγχεται από τις εξής αντιδράσεις:



Οι αποπρωτονιωμένες μορφές της δεξιάς πλευράς ( $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ , και  $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$  για συντομία) κυριαρχούν σε pH 4-10. Μάλιστα, το  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$  είναι ελάχιστα διαλυτό στο pH των φυσικών νερών, επομένως τα σύμπλοκα  $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$  και  $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$  είναι οι επικρατέστερες μορφές Cr[III] στο περιβάλλον. Το  $\text{Cr}(\text{OH})_3^0$  εμφανίζει αμφοτερίζουσα συμπεριφορά και σε υψηλότερα pH μετασχηματίζεται στο ευδιάλυτο  $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$  μέσω της αντίδρασης:



Σε πιο πυκνά διαλύματα Cr[III] ( $C > 10^{-6} \text{ M}$ ) εμφανίζονται είδη όπως  $\text{Cr}_2(\text{OH})_2^{4+}$ ,  $\text{Cr}_3(\text{OH})_4^{5+}$  και  $\text{Cr}_4(\text{OH})_6^{6+}$ . (6)



Διάγραμμα 1.2. Επικρατέστερες μορφές χρωμίου σε σχέση με το pH σε υδατικό διάλυμα στους 25°C και συνολική συγκέντρωση Cr 1μM (Διάγραμμα Pourbaix)

Το οξείδιο του τρισθενούς χρωμίου  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  είναι ένα από τα βασικότερα οξείδια του χρωμίου με εφαρμογή στη βιομηχανία πιγμέντων. Μπορεί να προκύψει από την οξείδωση ή και την πυρόλυση μιας πληθώρας ενώσεων του χρωμίου, πχ. του ένυδρου οξειδίου του χρωμίου ( $\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), του νιτρικού του άλατος [ $\text{Cr}(\text{NH}_3)_6(\text{NO}_3)_3$ ], και πολλών άλλων.

Το τρισθενές χρώμιο σχηματίζει αλογονίδια  $\text{CrX}_3$  με χαρακτηριστικά χρώματα, όπως το πράσινο  $\text{CrF}_3$ , το ερυθροϊώδες  $\text{CrCl}_3$ , το πράσινο  $\text{CrBr}_3$ , το μαύρο  $\text{CrI}_3$ . Η γεωμετρία των αλογονιδίων αυτών είναι οχταεδρική και τα άτομα συνδέονται κυρίως με ομοιοπολικούς δεσμούς. Τα άνυδρα αλογονίδια του Cr[III] είναι αδιάλυτα στο νερό και αποτελούν καλή πρώτη ύλη για τη σύνθεση οργανομεταλλικών ενώσεων του χρωμίου. Το  $\text{CrCl}_3$  αντιδρά με τετραϋδροφουράνιο (THF) παρουσία Zn και σχηματίζει το σταθερό σύμπλοκο  $\text{CrCl}_3 \cdot 3\text{THF}$ . Επίσης αντιδρά με διαμίνες σχηματίζοντας αμιδικά σύμπλοκα.

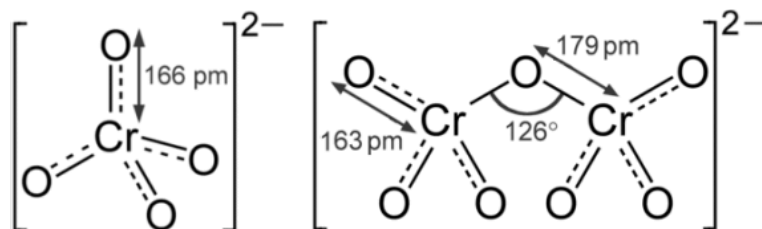
Το Cr[III] σχηματίζει επίσης και κάποια περίπλοκα ιόντα αλογονιδίων του τύπου:

$[\text{CrX}_6]^{3-}$  όπου  $\text{X}=\text{F}, \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ ,  $[\text{CrX}_5\text{H}_2\text{O}]^{2-}$  όπου  $\text{X}=\text{F}, \text{Cl}$ ,  $[\text{Cr}_2\text{X}_9]^{3-}$  όπου  $\text{X}=\text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ , καθώς και  $[\text{Cr}_3\text{F}_{14}]^{5-}$ . Συνήθως αποτελούν αλκαλικά άλατα και παρασκευάζονται με χρήση κάποιου αλκαλικού μετάλλου όπως το κάλιο. (7)

Το δυναμικό οξειδοαναγωγής του ζεύγους  $\text{Cr}[\text{VI}]/\text{Cr}[\text{III}]$  είναι αρκετά υψηλό ώστε πολύ λίγα οξειδωτικά στα φυσικά συστήματα να μπορούν να οξειδώσουν το  $\text{Cr}[\text{III}]$  προς  $\text{Cr}[\text{VI}]$ . (6) Έτσι, η οξύτητα του στομάχου είναι αρκετή ώστε να αποτρέπει την μετατροπή του τρισθενούς στο βλαβερό εξασθενές χρώμιο. (2) Επιπλέον, η οξείδωση του  $\text{Cr}[\text{III}]$  από διαλυμένο οξυγόνο δεν είναι σημαντική, καθώς η ταχύτητα της οξείδωσης είναι μικρή και επικρατούν άλλες ταχύτερες αντιδράσεις, όπως η προσρόφηση ή η ιζηματοποίηση, εκτός από την περίπτωση που διαμεσολαβούν οξείδια του μαγγανίου. (3), (9)

### ➤ Ενώσεις του εξασθενούς χρωμίου, $\text{Cr}^{6+}$

Αν και το χρώμιο απαντάται κυρίως στην τρισθενή μορφή, υπάρχουν κάποιες ενώσεις εξασθενούς χρωμίου, κυρίως χρωμικά και διχρωμικά άλατα.



Εικόνα 1.3. Δομή χρωμικού και διχρωμικού ανιόντος

Γενικά, οι ενώσεις του  $\text{Cr}[\text{VI}]$  μπορούν να διακριθούν σε υδατοδιαλυτές, όπως το χρωμικό και διχρωμικό νάτριο ( $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  και  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), το χρωμικό και το διχρωμικό κάλιο ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$  και  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), και αδιάλυτες στο νερό, όπως χρωμικό βάριο ( $\text{BaCrO}_4$ ) και χρωμικός μόλυβδος ( $\text{PbCrO}_4$ ). Οι ενώσεις του  $\text{Cr}[\text{VI}]$  συνήθως έχουν από κίτρινο ως πορτοκαλί και βαθύ κόκκινο χρώμα, είναι στερεές και βρίσκονται υπό μορφή σκόνης.



Εικόνα 1.4. (Αριστερά) Κροκοΐτης ή χρωμικός μόλυβδος ( $\text{PbCrO}_4$ ), σπάνιο ορυκτό εξασθενούς χρωμίου. (Δεξιά) Χρωμικό κάλιο ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ )

Η ισορροπία χρωμικών-διχρωμικών ιόντων είναι μια χαρακτηριστική αντίδραση του  $\text{Cr}[\text{VI}]$ , κατά την οποία τα κίτρινα χρωμικά ιόντα με οξύτιση μετατρέπονται αντιστρεπτά σε πορτοκαλόχρωμα διχρωμικά ιόντα:



Μια άλλη αντίδραση των διχρωμικών ιόντων είναι με υπεροξείδιο του υδρογόνου σε όξινο διάλυμα, όπου παράγεται μια έντονα κυανή υπεροξειδική ένωση του χρωμίου με πιθανό τύπο  $\text{CrO}(\text{O}_2)_2$ . Η αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται για την ποιοτική ανίχνευση τόσο των διχρωμικών ιόντων, όσο και του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε πολύ αραιά υδατικά διαλύματα. (10), (11)

Διάφορα είδη του εξασθενούς χρωμίου είναι γνωστά, τα επικρατέστερα όμως στο περιβάλλον είναι τα  $\text{HCrO}_4^-$  και  $\text{CrO}_4^{2-}$ , καθώς ευνοούνται από το pH των φυσικών υδάτων (βλ. διάγραμμα 1.3.). Το χρωμικό οξύ  $\text{H}_2\text{CrO}_4$  αποτελεί ένα ισχυρό οξύ που συμμετέχει στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής:



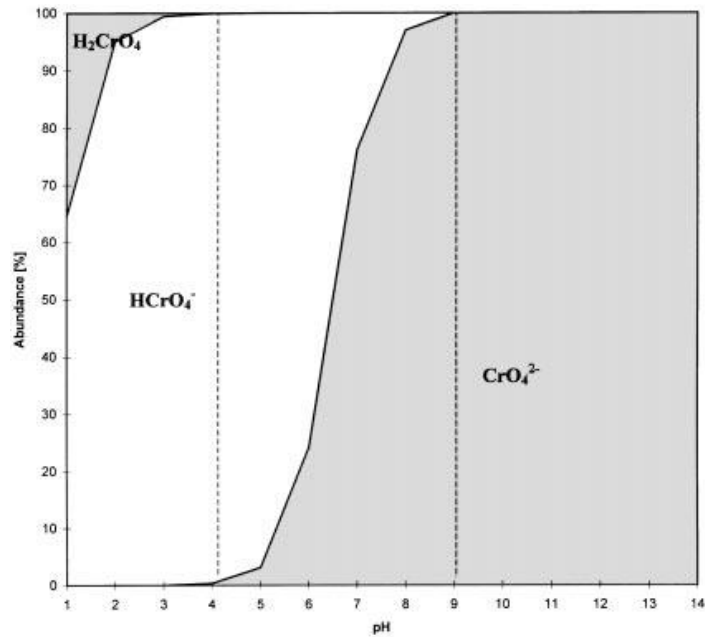
Σε  $\text{pH}>1$  κυριαρχούν οι αποπρωτονιωμένες μορφές, σε pH 7 το μόνο διαλυτό ιόν που εντοπίζεται είναι  $\text{CrO}_4^{2-}$  και σε pH μεταξύ 1 και 6 επικρατεί η μορφή  $\text{HCrO}_4^-$  μέχρι συγκεντρώσεως  $10^{-2}$  M όπου και αρχίζει να συμπυκνώνεται στο ερυθρό-πορτοκαλί διχρωμικό ιόν (βλ. ισορροπία χρωμικών-διχρωμικών ιόντων). Οι μορφές  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{HCrO}_4^-$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  που είναι και οι πιο συνηθισμένες συνίστανται από μια πληθώρα ευδιάλυτων ενώσεων με μεγάλη κινητικότητα στο περιβάλλον. (6), (12)

Το χρωμικό οξύ προκύπτει εύκολα από τη διάλυση στο νερό του τριοξειδίου του χρωμίου ( $\text{CrO}_3$ ), που αποκαλείται και ανυδρίτης του χρωμικού οξέος. Το  $\text{CrO}_3$  αποτελεί μια πολύ οξειδωτική ένωση του Cr[VI].

Η μοναδική υγρή ένωση που σχηματίζει το Cr[VI] είναι το χλωριούχο χρωμύλιο ( $\text{CrO}_2\text{Cl}_2$ ), χρώματος σκούρου κόκκινου, μεγάλης πτητικότητας και πολύ επικίνδυνο. Αν έρθει σε επαφή με το νερό αποσυντίθεται γρήγορα παράγοντας χρωμικά ιόντα και αέριο HCl. (10), (11)

Το εξασθενές χρώμιο είναι ισχυρό οξειδωτικό μέσο, σταθερό μόνο σε υψηλά οξειδοαναγωγικά δυναμικά, και αντιδρά ταχέως με πολλούς αναγωγικούς παράγοντες που υπάρχουν στο περιβάλλον. Ανάγεται εύκολα στην τρισθενή μορφή του από οργανική ύλη καθώς και ανόργανους παράγοντες που βρίσκονται στο έδαφος, τα νερά και την ατμόσφαιρα, για παράδειγμα από ιόντα σιδήρου και πυριτικά ορυκτά. Έτσι, το Cr[VI] έχει την τάση να μετατρέπεται σε Cr[III] σε πολλά φυσικά περιβάλλοντα. (6), (12)

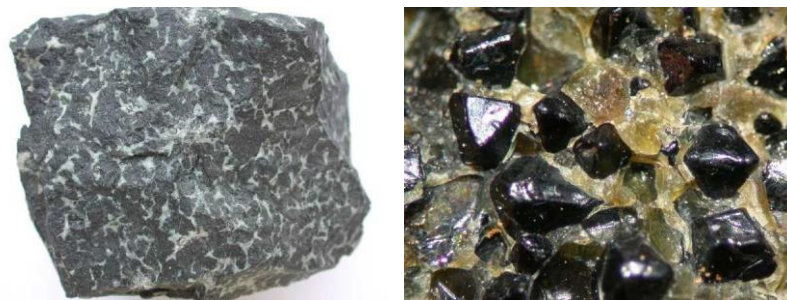




Διάγραμμα 1.3. Σχετική αφθονία ειδών του Cr(VI) σε υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης συνολικού χρωμίου  $10^{-6}$  Μ και pH 1-14. Οι κάθετες διακεκομμένες αναπαριστούν το εύρος pH στα φυσικά νερά.

### ➤ Ορυκτά χρωμίου

Ο χρωμίτης, ένα οξείδιο του δισθενούς σιδήρου και του τρισθενούς χρωμίου είναι το κύριο ορυκτό χρωμίου. Έχει ως βασικό χημικό τύπο το  $\text{FeCr}_2\text{O}_4$  ή  $\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$  αλλά συχνά εμφανίζεται με τους τύπους ολόκληρης της σειράς χρωμιτών και μαγνησιοχρωμιτών:  $(\text{Fe},\text{Mg})\text{Cr}_2\text{O}_4$ ,  $(\text{Mg},\text{Fe})\text{Cr}_2\text{O}_4$ ,  $\text{MgCr}_2\text{O}_4$ . Ο χρωμίτης βρίσκεται σε βασικά και υπερβασικά πετρώματα ως κρύσταλλο που δημιουργήθηκε κατά την κρυσταλλοποίηση μάγματος και σχηματίζεται μέσα στον περιδοτική πλουτωνικών πετρωμάτων (εικόνα 1.5.) είτε σε σερπεντίνες ή σε άλλα εκρηξιγενή πετρώματα. Ο χρωμίτης είναι ασθενώς μαγνητικό ορυκτό, χρώματος που ποικίλλει από μαύρο/ καφέ μέχρι ασημί και λευκό. Η σκληρότητά του στην κλίμακα Mohs είναι 5.5 και το ειδικό του βάρος 4.3-5. Κρυσταλλώνεται στο κυβικό σύστημα και σε σπάνιες περιπτώσεις εμφανίζεται μακροσκοπικά σε οκταεδρικούς κρυστάλλους (εικόνα 1.5.). Ανήκει στην ομάδα των σπινελίων της κατηγορίας των οξειδίων.



Εικόνα 1.5. (Αριστερά) Χρωμίτης σε περιδοτική, μορφή λεοπάρδαλης. (Δεξιά) Οκτάεδρα χρωμίτη

Οι βασικές χώρες εξόρυξης χρωμίτη είναι η Νότια Αφρική (48%), το Καζακστάν (16%), η Ρωσία, η Τουρκία και η Ζιμπάμπουε με 9% έκαστη. Τα παγκόσμια αποθέματα χρωμίτη ξεπερνούν τους 11 δισεκατομμύρια τόνους, ενώ η παραγωγή ορυχείων σε χρωμίτη εκτιμήθηκε στα 13 εκατομμύρια τόνους το 2002. Στις ΗΠΑ έχει σταματήσει η εξόρυξη χρωμίτη, αν και υπάρχουν σημαντικά κοιτάσματα στην Καλιφόρνια, τη Μοντάνα, το Τέξας κλπ. Στην Ελλάδα, κοιτάσματα χρωμίτη συναντώνται στην Πίνδο, στην Υποπελαγονική, Πελαγονική και στη ζώνη Αξιού. Τρία κοιτάσματα φαίνεται να μπορούν να αποτελούν μονάδες αυτοτελούς μεταλλευτικής δραστηριότητας: στο Τσαγκλί, το Ξερολίβαδο και τη Δομοκό. (3), (13), (14)

Μια παραλλαγή του χρωμίτη είναι ο μαγνησιοχρωμίτης ( $MgCr_2O_4$ ), ορυκτό οξείδιο του μαγνησίου και του τρισθενούς χρωμίου. Σπανιότερο ορυκτό του εξασθενούς χρωμίου είναι ο κροκοϊτης. Τέλος, ο λοπεζίτης είναι ένα κόκκινο χρωμικό ορυκτό με το χημικό τύπο του διχρωμικού καλίου ( $K_2Cr_2O_7$ ), που απαντάται σπάνια και το προς πώληση ορυκτό παράγεται τεχνητά. (3), (15)

Σε μικρότερες ποσότητες, το χρώμιο στην τρισθενή του μορφή βρίσκεται και σε άλλα ορυκτά, αντικαθιστώντας το  $Fe^{3+}$  ή το  $Al^{3+}$ , παραδείγματος χάριν στις τουρμαλίνες, στο γρανάτη, στις μαρμαρυγίες, και στους χλωρίτες. Το σμαράγδι είναι μια μορφή βηρυλλίου ( $Be_3Al_2Si_6O_{18}$ ) που οφείλει το βαθυπράσινο χρώμα του στην ενσωμάτωση μικρής ποσότητας χρωμίου στη θέση του αργιλίου. Το κόκκινο χρώμα του ρουμπινιού επίσης προκύπτει από ίχνη οξειδίου του τρισθενούς χρωμίου, το οποίο ξεχωρίζει τον πολύτιμο λίθο από το απλό κρυσταλλικό κορούνδιο (οξείδιο του αργιλίου). (9)

### 1.2.3. Το χρώμιο στην Οργανική Χημεία

Το εξασθενές χρώμιο και οι ενώσεις του αποτελούν πολύ ευέλικτα αντιδραστήρια στην Οργανική Χημεία, ικανά να οξειδώσουν σχεδόν κάθε οργανική λειτουργική ομάδα που μπορεί να υποστεί οξείδωση, από αλκάνια μέχρι αλκοόλες, κετόνες και αρωματικές ενώσεις. Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί αρκετές νέες ενώσεις  $Cr(VI)$  σε συνδυασμό με ειδικές συνθήκες αντίδρασης που βελτιώνουν την επιλεκτικότητα των αντιδράσεων οξείδωσης, για τη διαχείριση περίπλοκων και ευαίσθητων ουσιών. Η πλειοψηφία των οξειδώσεων με  $Cr(VI)$  λαμβάνει χώρα υπό όξινες υδατικές συνθήκες, με χρήση των αντιδραστηρίων  $CrO_3$ ,  $K_2Cr_2O_7$ ,  $Na_2Cr_2O_7$ . Οι ρυθμοί των αντιδράσεων είναι σχετικά υψηλοί σε χαμηλά pH. Η οξείδωση των ενώσεων του χρωμίου αξιοποιείται και στην οργανική σύνθεση, καθώς μπορεί να ελεγχθεί ώστε να δώσει σε περίσσεια ένα μοναδικό προϊόν. Κατά την αντίδραση του εξασθενούς χρωμίου με οργανικές ενώσεις παρατηρείται ο σχηματισμός συμπλόκων ενώσεων. (16)

#### ➤ Οργανομεταλλικά σύμπλοκα χρωμίου

Ο όρος οργανομεταλλικό σύμπλοκο αναφέρεται σε μια ένωση που περιέχει ένα τουλάχιστον δεσμό μεταξύ ενός άνθρακα κάποιας οργανικής ένωσης, κι ενός μετάλλου· οι ενώσεις αυτές μελετώνται από τον ιδιαίτερο κλάδο της Οργανομεταλλικής Χημείας.

Το χρώμιο έχει την ιδιότητα να σχηματίζει δεσμούς με άνθρακες οργανικών ενώσεων σχηματίζοντας σύμπλοκα. Ο σχηματισμός τέτοιων συμπλόκων είναι

χαρακτηριστικό των μετάλλων μετάπτωσης του τομέα d. Σύμφωνα με τη θεωρία των Μοριακών Τροχιακών, σχηματίζονται π σύμπλοκα στα οποία οι υποκαταστάτες δίνουν ή δέχονται ηλεκτρόνια στα π μοριακά τους τροχιακά, ενώ το μέταλλο στα d μοριακά τροχιακά. Συγκεκριμένα, η υποκατάσταση μετάλλων μετάπτωσης με ακόρεστους υδρογονάνθρακες παρουσιάζει δύο περιπτώσεις: α) δωρεά σ ηλεκτρονίου από πληρωμένο δεσμικό μοριακό τροχιακό του υποκαταστάτη σε άδειο μοριακό τροχιακό του μετάλλου, που οδηγεί σε σ συμμετρία ή β) αλληλεπίδραση π τροχιακών, όπου οι υποκαταστάτες μπορεί να δίνουν ή να παίρνουν ηλεκτρόνια ανάλογα με το αν τα τροχιακά τους είναι πληρωμένα ή μερικώς πληρωμένα.

Η πρώτη οργανομεταλλική ένωση χρωμίου απομονώθηκε το 1919 μέσω αντίδρασης άνυδρου  $\text{CrCl}_3$  με φαίνυλο μαγνήσιο βρωμίδιο σε αιθέρα, και ήταν ένα πολυφαινυλικό σύμπλοκο χρωμίου. Άλλα παραδείγματα ενώσεων με τις οποίες το χρώμιο μπορεί να σχηματίσει δεσμό είναι το αιθυλένιο (όπου προσφέρονται 2 ηλεκτρόνια), η π-αλλυλική ομάδα (3 ηλεκτρόνια), το κυκλοβουταδιένιο και το βουταδιένιο (4 ηλεκτρόνια), το π-κυκλοπενταδιένιο (5 ηλεκτρόνια), το βενζένιο και το κυκλοεπτατριένιο (6 ηλεκτρόνια), το κυκλοοκτατετραένιο (8 ηλεκτρόνια). Τα π-κυκλοπενταδιενικά σύμπλοκα συνιστούν μία σημαντική κατηγορία οργανοχρωμικών ενώσεων. Η π-κυκλοπενταδιενική ομάδα έχει την ιδιότητα να σταθεροποιεί σύμπλοκες ενώσεις του χρωμίου που είναι δύσκολο να επιτευχθούν διαφορετικά, για παράδειγμα υδρίδια χρωμίου όπως το  $\text{C}_5\text{H}_5\text{Cr}(\text{CO})_3\text{H}$ .

Η χημεία των οργανομεταλλικών ενώσεων χρωμίου αποτελεί έναν πολύ ενεργό τομέα έρευνας, καθώς νέες ενώσεις καταγράφονται συνεχώς. Στον πίνακα 1.4. παρουσιάζονται μερικά παραδείγματα των ενώσεων αυτών. (9)

Type	Compound <sup>a</sup>
Allyl <sup>b</sup>	$\text{Cr}(\text{C}_3\text{H}_5)_3$ $\text{CH}_3(\text{C}_3\text{H}_4)\text{CrCp}(\text{CO})_2$ $\text{CplCrCp}(\text{CO})_2$
Cyclopentadienyl <sup>c</sup>	$\text{Cp}_2\text{Cr}$ $\text{CpCrX}_2$ (X = Cl, Br, I) $\text{CpCrBracac}$ $\text{CpCr}(\text{CO})_3\text{H}$ $\text{CpCr}(\text{CO})_2(\text{NO})$ $\text{CpCr}(\text{NO})_2\text{X}$ (X = F, Cl, Br, I, CN, SCN) $\text{CpCr}(\text{NO})_2\text{R}$ (R = $\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2\text{Cl}$ , $\text{C}_5\text{H}_5$ , $\text{C}_2\text{H}_5$ , $\text{C}_6\text{H}_5$ ) $[\text{CpCr}(\text{CO})_4]\text{BF}_3$ $[\text{CpCr}(\text{NO})_2\text{CO}]\text{PF}_6$
Arene <sup>c</sup>	$\text{CpCrC}_6\text{H}_6$
Arene carbonyl <sup>d</sup>	$\text{C}_6\text{H}_6\text{Cr}(\text{CO})_2\text{py}$ <i>p</i> - $\text{F}_2\phi\text{Cr}(\text{CO})_3$ <i>p</i> - $\text{Cl}_2\phi\text{Cr}(\text{CO})_3$ $\text{MtlCr}(\text{CO})_2\text{py}$ $\text{MtlCr}(\text{CO})_2\text{C}_2\text{H}_4$ $\text{NaphthaleneCr}(\text{CO})_3$ $\text{AnthraceneCr}(\text{CO})_3$ $\text{PhenanthreneCr}(\text{CO})_3$ $\text{ChryseneCr}(\text{CO})_3$ $\text{PyreneCr}(\text{CO})_3$
Binuclear <sup>e</sup>	$[\text{CpCr}(\text{CO})_3]_2$ $[\text{Cp}_2\text{Cr}][\text{CpCr}(\text{CO})_3]$ $[\text{Cp}_2\text{Cr}][\text{CpCrCl}_3]$ $[\text{Cp}_2\text{Cr}(\text{CO})_3]_2\text{Hg}$

<sup>a</sup> Cp, cyclopentadienyl; Cpl, cyclopentenyl;  
acac, acetylacetonate; φ, phenyl; py, pyridine;  
Mtl, mesitylene.

Πίνακας 1.4. Διάφοροι τύποι οργανομεταλλικών συμπλόκων χρωμίου.

Χαρακτηριστική είναι η εμφάνιση οργανομεταλλικών συμπλόκων χρωμίου σε βιολογικά συστήματα απομάκρυνσης Cr[VI]. Στα διαλύματα που βρίσκονται υπό επεξεργασία σε βιοαντιδραστήρες το χρώμιο συχνά συνυπάρχει με οργανικές ενώσεις που έχουν τρεις πιθανές πηγές προέλευσης: (i) οργανικές ουσίες που προέρχονται από τα λύματα, όπως πχ. στα απόβλητα βυρσοδεψίας, (ii) οργανικές ενώσεις που αποτελούν τα μεταβολικά προϊόντα των μικροοργανισμών του συστήματος ή (iii) η περίσσεια των θρεπτικών που προστίθενται στο σύστημα με στόχο τη μικροβιακή ανάπτυξη. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι στην περίπτωση που η συγκέντρωση των οργανικών ενώσεων είναι σε περίσσεια σε σχέση με αυτή του χρωμίου, σχηματίζονται οργανομεταλλικά σύμπλοκα Cr[III], που μεταβάλλουν τη διαλυτότητα του Cr[III]. (17)

### 1.3. Παραγωγή και χρήσεις χρωμίου

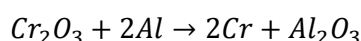
#### 1.3.1. Βιομηχανική παραγωγή χρωμίου

Το χρώμιο και οι ενώσεις του στη βιομηχανία προέρχονται από το κύριο ορυκτό του χρωμίου, το χρωμίτη, και παράγονται αρχικά σε δυο μορφές: σιδηροχρώμιο (κράμα σιδήρου με χρώμιο, FeCr) και μεταλλικό χρώμιο. Η περιεκτικότητα του χρωμίτη σε Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> κυμαίνεται στο 40-60%, ενώ ως όριο εκμεταλλευσιμότητας είναι η περιεκτικότητα σε χρώμιο να ανέρχεται στο 30%. Καλή αρχική ύλη θεωρούνται οι χρωμίτες υψηλής περιεκτικότητας σε FeCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 62-82%.

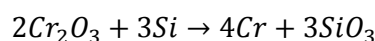
Το σιδηροχρώμιο παράγεται με την αναγωγή του FeCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> σε κάμινο ηλεκτρικού τόξου. Το σύνηθες αναγωγικό είναι πετρελαϊκό κωκ (ως πηγή άνθρακα), αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σιδηροπυρίτης για παραγωγή σιδηροχρωμίου χαμηλής περιεκτικότητας σε άνθρακα, ένα κράμα που προστίθεται απευθείας στους ανοξειδωτους χάλυβες.

Η παραγωγή μεταλλικού χρωμίου ακολουθεί διαφορετική οδό, με την αναγωγή οξειδίου του χρωμίου. Το Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> παραλαμβάνεται με οξείδωση του FeCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> σε τηγμένο αλκάλιο που παράγει διχρωμικό νάτριο (Na<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>), το οποίο στη συνέχεια εκπλένεται με νερό, κατακρημνίζεται και ανάγεται σε οξείδιο του Cr[III] με χρήση άνθρακα.

Το μεταλλικό χρώμιο έπειτα παρασκευάζεται με αναγωγή Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> με αργίλιο, πυρίτιο ή άνθρακα. Η αλουμινοθερμική διεργασία περιγράφεται από την αντίδραση:



ή, αν χρησιμοποιηθεί πυρίτιο ως αναγωγικό:



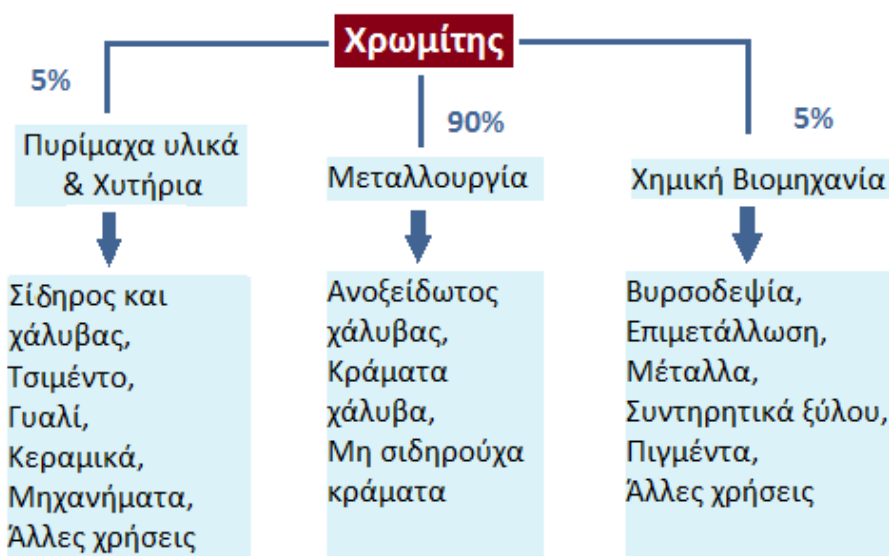
Το χρώμιο που λαμβάνεται από αυτές τις αντιδράσεις είναι 97-99% καθαρό και οι κύριες προσμίξεις είναι το αργίλιο και το πυρίτιο. Το διχρωμικό νάτριο που παράγεται σε αυτή τη διεργασία αποτελεί την αρχική ύλη για την παρασκευή όλων των χημικών ενώσεων χρωμίου στη βιομηχανία.

Το μεταλλικό χρώμιο μπορεί επιπλέον να παρασκευαστεί με ηλεκτρόλυση διαλύματος CrO<sub>3</sub> ή KCr(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Ο ηλεκτρολύτης για την ηλεκτρόλυση προέρχεται από

διαλυμένο σιδηροχρώμιο και η καθαρότητα του τελικού χρωμίου είναι ως και 99.8%, με κύρια πρόσμιξη το σίδηρο. (3), (9), (14)

### 1.3.2. Βιομηχανικές χρήσεις χρωμίου

Ιστορικά, η αρχική πηγή χρωμίου στη βιομηχανία από το 1880, ήταν ο χρωμίτης και η κύρια χρήση του ήταν ως συστατικό σε κράματα, σε πυρίμαχα υλικά αλλά και χημικές ουσίες. Από το 1900 η κατανάλωση χρωμίτη στη χημική και στη μεταλλουργική βιομηχανία αυξήθηκε, ενώ μετά το '60 μειώθηκε η χρήση του στα πυρίμαχα υλικά λόγω περιβαλλοντικών προβληματισμών. Πλέον στις Ηνωμένες Πολιτείες τα χρωμιούχα κράματα σιδήρου έχουν αντικαταστήσει το χρωμίτη ως πρωτεύουσα πηγή χρωμίου, τα οποία κατά κύριο λόγο είναι εισαγόμενα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του παραγόμενου χρωμίου καταναλώνεται από τη μεταλλουργική βιομηχανία σε ανοξείδωτο χάλυβα. Το υπόλοιπο καταναλώνεται προς παραγωγή κραμάτων χάλυβα, χρωμιούχων χημικών, πυρίμαχων υλικών κ.ά. (εικόνα 1.6.). (18), (19)



Εικόνα 1.6. Χρήσεις χρωμίου (20)

#### A. Μεταλλουργία

Η χρήση χρωμίου στην παραγωγή ανοξείδωτου χάλυβα αποτελεί και την πιο σημαντική εφαρμογή του, σε ποσοστό περίπου 75% της συνολικής κατανάλωσης χρωμίτη (στοιχεία 2002). Η προσθήκη χρωμίου είναι αυτή που καθιστά το χάλυβα «ανοξείδωτο». Με τις ιδιαίτερες φυσικές ιδιότητές του το χρώμιο προσδίδει στο κράμα αντοχή στην οξείδωση, ανθεκτικότητα στη διάβρωση και μεγάλη σκληρότητα.

Η επίδραση του χρωμίου στο χάλυβα είναι περίπου ανάλογη με την ποσότητα που προστίθεται. Οι χάλυβες χαμηλής περιεκτικότητας σε χρώμιο (<3%) χρησιμοποιούνται εκτενώς σε μηχανολογικά υλικά στις βιομηχανίες. Μαζί με άλλα μέταλλα (μολυβδαίνιο, νικέλιο, μαγγάνιο και βανάδιο) το χρώμιο προστίθεται σε κράματα που προορίζονται για εφαρμογές υψηλής αντοχής, όπως ράβες, ελατήρια κι έδρανα μηχανών. Το ποσοστό

χρωμίου για συνήθεις χρήσεις δεν ξεπερνά το 6%, και τα εργαλεία αυτά παρουσιάζουν εξαιρετική αντοχή στη φθορά.

Ως ανοξειδωτοι χάλυβες χαρακτηρίζονται χάλυβες υψηλής περιεκτικότητας σε Cr (>10%). Οι μη σκληρυμένοι χάλυβες περιέχουν 0.08-0.20% άνθρακα και 11.5-27% χρώμιο και χρησιμοποιούνται σε κτήρια, οχήματα, εξοπλισμό επεξεργασίας νιτρικού οξέος κ.ά. Οι τυπικοί σκληρυμένοι χάλυβες περιέχουν 11.5-18% χρώμιο και 0,15-1.25% άνθρακα. Οι ωστενικοί σκληρυμένοι χάλυβες περιέχουν 16-26% χρώμιο και 3.5-22% νικέλιο, το οποίο προσδίδει βελτιωμένες ιδιότητες. Το νικέλιο αυξάνει την αντοχή στη διάβρωση, αλλά συνήθως μεγαλώνει και το κόστος, γι' αυτό συνήθως επιλέγονται οι απλοί χρωμιούχοι χάλυβες.

Το χρώμιο επίσης βελτιώνει σημαντικά την αντοχή στον εφελκυσμό, την αντοχή σε θερμικές διεργασίες και σε μικρότερο βαθμό την ελατότητα και την ελαστικότητα, ενώ μειώνει τη δυνατότητα επεξεργασίας του χάλυβα. Η αντοχή στην οξείδωση οφείλεται στο σχηματισμό οξειδίων του χρωμίου στον ανοξειδωτο χάλυβα, τα οποία εμποδίζουν την περαιτέρω διάβρωση. Η αύξηση της σκληρότητας σε σιδηρούχα κράματα χάλυβα οφείλεται στο σχηματισμό καρβιδίων τύπου  $(Fe,Cr)_3C$ ,  $(Cr,Fe)_7C_3$  και  $(Cr,Fe)_{28}C_6$ . Το χρώμιο σε περιεκτικότητα 1-5% σε χάλυβα με άνθρακα 0,8-1,2% δίνει βρωμιούχα καρβίδια που προκαλούν αύξηση της σκληρότητας και της αντοχής του χάλυβα στη φθορά λόγω τριβής.

Πολλά μη σιδηρούχα κράματα περιέχουν χρώμιο, όπως τα ανθεκτικά στη διάβρωση και την οξείδωση κράματα του Cr και Ni που χρησιμοποιούνται συχνά σε θερμαντικά στοιχεία και σε εξοπλισμό για υψηλές θερμοκρασίες. Κράματα Cr-Fe-Ni χρησιμοποιούνται σε πετρελαϊκό εξοπλισμό, ενώ κράματα Cr-Mo-W-Fe-Ni χρησιμοποιούνται σε διεργασίες που περιλαμβάνουν HCl και άλλα έντονα οξειδωτικά οξέα. (1), (9), (18)

## **B. Χημική βιομηχανία**

### **• Χρωμικά και διχρωμικά άλατα**

Το χρωμικό και το διχρωμικό νάτριο αποτελούν τη χημική πρώτη ύλη την παραγωγή των υπόλοιπων ουσιών χρωμίου. Το άλας αυτό παράγεται με την ανάμιξη κονιοποιημένου χρωμίτη με  $Na_2CO_3$  και διαλύτη CaO. Με έψηση του μίγματος σε περιστροφική κάμινο και έκπλυση παράγεται μια ουσία που περιέχει χρωμικό νάτριο, το οποίο μπορεί να απομονωθεί με κρυσταλλοποίηση του διαλύματος ή να οξινοσθεί προς παραγωγή διχρωμικού νατρίου. Το ένυδρο διχρωμικό νάτριο ( $Na_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$ ) είναι το πρωταρχικό χημικό που παράγεται από την επεξεργασία του χρωμίτη και αυτό με τη μεγαλύτερη εμπορική σημασία. (9), (10), (18)

### **• Επιχρωμίωση**

Το χρώμιο χρησιμοποιείται για την επίστρωση μεταλλικών επιφανειών για διακοσμητικούς σκοπούς (προσδίδει λάμψη στις επιφάνειες) ή για την αύξηση της αντοχής και της ανθεκτικότητας στη διάβρωση της επιφάνειας. Η διακοσμητική επιχρωμίωση αποτελεί μια πολύ λεπτή και πορώδη στρώση, γι' αυτό και ο χάλυβας καλύπτεται πρώτα με χαλκό ή νικέλιο, πάνω στο οποίο επιστρώνεται το χρώμιο. Οι επιστρώσεις χρωμίου για λειτουργικούς σκοπούς επίσης έχουν ρωγμές, αλλά καλύπτονται καθώς η επίστρωση

γίνεται παχύτερη. Η επίστρωση πραγματοποιείται με χημικό ή ηλεκτροχημικό τρόπο (ηλεκτρόλυση). Ο ηλεκτρολύτης που χρησιμοποιείται είναι ένα διάλυμα  $\text{CrO}_3$  σε  $\text{H}_2\text{SO}_4$  αναλογία περίπου 100:1 (το οποίο δίνει χρωμικό οξύ). Έτσι σχηματίζεται ένα προστατευτικό στρώμα  $\text{CrO}_3$  πάνω στην επιφάνεια. Σε επιφάνειες ψευδαργύρου ή καδμίου χαρακτηριστική είναι η διεργασία Cronak. (9), (10), (18)

- **Βυρσοδεψία**

Το θειικό άλας του χρωμίου [ $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 12(\text{H}_2\text{O})$ ] χρησιμοποιείται στη βυρσοδεψία, για την κατεργασία δερμάτων με σκοπό την αύξηση της ελαστικότητας και της ανθεκτικότητάς τους. Η συνήθης πρακτική, χρησιμοποιεί μία διαλυτή ένωση τρισθενούς χρωμίου και έναν παράγοντα συγκάλυψης που επιτρέπει στο χρώμιο να διεισδύει αποτελεσματικά στο δέρμα. Το χρώμιο συμπλοκοποιείται με τις πρωτεΐνες του δέρματος, οπότε επιβραδύνεται ο τελικός μετασχηματισμός σε χρωμικό οξύ. Η χρήση του στη βυρσοδεψία συνδέεται με σημαντικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. (9), (18)

- **Συντήρηση ξύλου**

Ενώσεις του  $\text{Cr}[\text{VI}]$  χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά ξύλου. Το 1996, το 52% της παραγωγής των ενώσεων  $\text{Cr}$  στις ΗΠΑ χρησιμοποιούνταν στην παρασκευή ενός συντηρητικού ξύλου, του χρωμιωμένου αρσενικού χαλκού (Chromated Copper Arsenate, CCA). Το CCA είναι μίγμα χρωμικών αλάτων, οξειδίου του χαλκού και οξειδίου του αρσενικού ( $\text{As}_2\text{O}_5$ ). Τα χρωμικά αντιδρούν με τα χημικά στερεωτικά μέσα (chemical fixing) του χαλκού και αρσενικού, τα οποία έχουν βακτηριοκτόνα και εντομοκτόνα δράση και εμποδίζουν την αποσύνθεση του ξύλου. Η χρήση του εξασθενούς χρωμίου σε συντηρητικά ξύλου αυξήθηκε πολύ από το 1970 – 2000. Από το 2002 σταδιακά σταμάτησε η χρήση του CCA σε συντηρητικά ξύλου που χρησιμοποιείται για κατοικίες, μετά από σχετική απαγόρευση της EPA (Environmental Protection Agency) λόγω της τοξικότητας του εξασθενούς χρωμίου. (9), (18)

- **Πιγμέντα**

Η χρήση ενώσεων του χρωμίου ως πιγμέντα είναι πολύ διαδεδομένη. Το χρωμικό άλας του μολύβδου ή κίτρινο του χρωμίου ( $\text{PbCrO}_4$ ) χρησιμοποιείται σε δρόμους και λεωφόρους για τον έλεγχο της κυκλοφορίας· το χρωμιούχο πιγμέντο του χαλκού χρησιμοποιείται σε ψησταριές και ξυλόσομπες ως μαύρη επικάλυψη· το οξύ του τρισθενούς χρωμίου είναι ένα πράσινο πιγμέντο που χρησιμοποιείται για καμουφλάζ επειδή μπορεί να αντανάκλα την υπέρυθη ακτινοβολία. Τα πιγμέντα του χρωμίου είναι σημαντικά καθώς, πέρα από χρώμα, προσδίδουν και αντοχή στη διάβρωση. Άλλα σημαντικά πιγμέντα είναι τα  $\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$  (πράσινο του Guignet),  $\text{K}_2\text{O} \cdot 4\text{ZnO} \cdot 4\text{CrO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (κίτρινο του ψευδάργυρου),  $4\text{ZnO} \cdot \text{CrO}_3 \cdot \text{XH}_2\text{O}$  (αντιδιαβρωτικό),  $\text{PbCrO}_4$  (πορτοκαλοκίτρινο), κλπ. (9), (18)

- **Άλλες χρήσεις**



Άλλες εφαρμογές του χρωμίου στη χημική βιομηχανία αφορούν τη χρήση του ως καταλύτη ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$  μαζί με άλλα οξείδια) πχ. στην αφυδρογόνωση ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) και στην παρασκευή συνθετική μεθανόλης [ $\text{Zn}(\text{CrO}_2)_2$ ], ως παρεμποδιστές διάβρωσης ( $\text{BaCrO}_4$  και  $\text{Li}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), ως μυκητοκτόνα ( $4\text{CuO}\cdot\text{CrO}_3\cdot\text{XH}_2\text{O}$ ), κλπ. (9), (18)

### **C. Πυρίμαχα υλικά**

Ο χρωμίτης χρησιμοποιείται απευθείας στη βιομηχανία πυρίμαχων υλικών γιατί είναι ανθεκτικός στη θερμική αποικοδόμηση. Το οξείδιο του χρωμίου βρίσκει επίσης εφαρμογή ως πυρίμαχο υλικό. Τα βασικά πυρίμαχα είναι είδος πυρίμαχων υλικών που δεν αποτελούνται από πηλό και συμπεριφέρονται χημικά ως βάσεις. Αυτά τα υλικά καταλήγουν συχνά στις βιομηχανίες τσιμέντου, γυαλιού, χάλυβα. Το χρώμιο σε μορφή μιγμάτων χρωμίτη και μαγνησίτη, χρησιμοποιείται για την κατασκευή υψικάμινων, τσιμεντοκλιβάνων, καλουπιών για ψήσιμο τούβλων κλπ. (18)

## **1.4. Το χρώμιο στο περιβάλλον**

Το χρώμιο εντοπίζεται στο έδαφος, στα νερά και στον αέρα ως προϊόν ανθρώπινης δραστηριότητας ή φυσικής προέλευσης, καθώς και στους οργανισμούς, ζώα ή φυτά, ως ιχνοστοιχείο. Το τρισθενές χρώμιο στο νερό και στα τρόφιμα θεωρείται αβλαβές, σε αντίθεση με το εξαθενές χρώμιο που έχει αποδεδειγμένη τοξικότητα. Το χρώμιο απαντάται σε μεγάλο ποσοστό στο φλοιό της γης, με μέση περιεκτικότητα 100 ppm, αν και η συγκέντρωση μεταβάλλεται σημαντικά με την τοποθεσία.

Σήμερα, η ρύπανση του οικοσυστήματος με χρώμιο αποτελεί σοβαρό περιβαλλοντικό πρόβλημα. Συγκρινόμενες με τη ρύπανση από την βιομηχανική δραστηριότητα, οι συγκεντρώσεις του φυσικά προερχόμενου χρωμίου είναι σχετικά χαμηλές. Παρ' όλα αυτά, έχουν παρατηρηθεί και σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου φυσικής προέλευσης, συνήθως λόγω των πολύ διαλυτών χρωμικών ιόντων ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ). Οι διεργασίες που ελέγχουν τη χημεία του χρωμίου στο περιβάλλον είναι οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, η διαλυτοποίηση/καθίζηση και η προσρόφηση/εκρόφηση. Παρακάτω αναφέρονται οι κύριες πηγές προέλευσης χρωμίου και περιγράφεται η πορεία του χρωμίου στα εδάφη, τα νερά και την ατμόσφαιρα.

### **1.4.1. Προέλευση χρωμίου στο περιβάλλον**

Το χρώμιο στο περιβάλλον προκύπτει φυσικά με τη μορφή των ορυκτών του, κυρίως του χρωμίτη. Η συγκέντρωση Cr στα φυσικά συστήματα εξαρτάται από τη σύσταση των βραχωδών επιφανειών· η αποσάθρωσή τους οδηγεί στην εναπόθεση χρωμίου στο έδαφος και το νερό. Κατά συνέπεια, η συγκέντρωση Cr στο περιβάλλον διαφέρει σημαντικά από περιοχή σε περιοχή και κυμαίνεται από 0.02  $\mu\text{mol/g}$  ως 58  $\mu\text{mol/g}$  εδάφους. Η διάβρωση εδαφών που προέρχονται από υπερβασικά ιζηματογενή πετρώματα, σχιστόλιθους και άργιλους από νερό και αέρα οδηγεί σε υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου στην ατμόσφαιρα και το υδατικό σύστημα, σε σχέση με τη διάβρωση εδαφών που



προέρχονται από γρανιτικά ιζηματογενή πετρώματα, ασβεστόλιθους και ψαμμίτες. Τέλος, υπάρχουν και οι αμελητέες ποσότητες χρωμίου που προέρχονται από μετεωρίτες.

Ανθρωπογενείς πηγές χρωμίου αποτελούν η εξόρυξη χρωμίτη, που οδηγεί σε ατμοσφαιρική ρύπανση, η μεταλλουργική βιομηχανία (παραγωγή κραμάτων και ανοξείδωτου χάλυβα), η χημική βιομηχανία (πιγμέντα, επιχρωμιώσεις, παραγωγή χαρτοπολτού, συντήρηση ξύλου, βυρσοδεψία κλπ.), καθώς και οι βιομηχανίες που χρησιμοποιούν γαιάνθρακα για παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Το χρώμιο εναποτίθεται στο περιβάλλον μέσω των αποβλήτων των διεργασιών που περιλαμβάνουν χρώμιο. Τέτοια απόβλητα περιέχουν Cr[III] και Cr[VI] σε διάφορες διαλυτότητες. Ο γαιάνθρακας περιέχει 7-20 ppm χρωμίου και η τέφρα του μπορεί να περιέχει ως και 3300 ppm χρωμίου, ενώ αναμένεται ο σχηματισμός Cr[VI] σε ισχυρά βασική τέφρα.

Το εξασθενές χρώμιο κυριαρχεί στα απόβλητα της μεταλλουργικής βιομηχανίας, της βιομηχανίας επιχρωμιώσεων, πυρίμαχων υλικών και πιγμένων, λόγω της χρήσης αντιδραστηρίων του Cr[VI] όπως το χρωμικό οξύ ( $H_2CrO_4$ ). Το τρισθενές χρώμιο βρίσκεται κυρίως σε απόβλητα βυρσοδεψίας, κλωστούφαντουργίας και διακοσμητικών επιχρωμιώσεων. Παρ' όλα αυτά παρατηρούνται συχνά αποκλίσεις από τις αναμενόμενες τιμές λόγω της μεταβλητότητας του Cr[III] σε Cr[VI] μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται στην ιλύ των αποβλήτων. (21), (22), (23)

#### 1.4.2. Το χρώμιο στην ατμόσφαιρα

Το χρώμιο δεν υπάρχει στη φύση σε αέρια μορφή, αν και έχει παρατηρηθεί πειραματικά. Στην ατμόσφαιρα βρίσκεται κυρίως στη στερεή και την υγρή φάση, με τη μορφή αιωρούμενων σωματιδίων και σταγονιδίων (αερόλυμα). Η ανθρώπινη δραστηριότητα ευθύνεται για το 60-70% του χρωμίου στην ατμόσφαιρα και οι φυσικές πηγές για το υπόλοιπο.

Οι κύριες ανθρωπογενείς πηγές είναι η μεταλλουργική βιομηχανία, η παραγωγή πυρίμαχων υλικών, η ηλεκτρολυτική επιμετάλλωση, η χρήση καυσίμων και η χημική βιομηχανία παραγωγής ουσιών με βάση το χρώμιο, όπως χρωμικά και διχρωμικά άλατα, πιγμέντα κλπ. Οι σημαντικότερες φυσικές πηγές χρωμίου είναι η ηφαιστειακή δραστηριότητα και η διάβρωση βράχων και εδαφών. Στην τελευταία περίπτωση, σωματίδια του εδάφους που περιέχουν χρώμιο (διαμέτρου <math><50\ \mu\text{m}</math>) εισάγονται ή επανεισάγονται στην ατμόσφαιρα με τη βοήθεια του αέρα, που παρέχει την απαραίτητη μηχανική ενέργεια για να αιωρηθούν και να διασκορπιστούν.

Το μέγεθος των σωματιδίων είναι βασικής σημασίας, καθώς τα σωματίδια διαμέτρου 0.2-10  $\mu\text{m}$  είναι εισπνεύσιμα και η κατακράτησή τους στους πνεύμονες μπορεί να έχει τοξικές και καρκινογενετικές επιπτώσεις. Αερολύματα χρωμίου με μέση αεροδυναμική διάμετρο μικρότερη από 10  $\mu\text{m}$  έχουν αρκετά μεγάλο χρόνο ημιζωής στην ατμόσφαιρα (7-10 ημέρες) και κατά συνέπεια έχουν την ικανότητα να απομακρύνονται σημαντικά από την πηγή μέσω του αέρα. Σωματίδια μεγαλύτερης διαμέτρου αποτίθενται τοπικά και μεταφέρονται με διάφορα περιβαλλοντικά μέσα. Εκπομπές αερολυμάτων χρωμίου με διάμετρο σωματιδίων μικρότερη των 10  $\mu\text{m}$  παρατηρούνται σε χημικές ή θερμικές διεργασίες όπως η σύντηξη μετάλλων, πχ. σιδηροχρωμίου, στην επεξεργασία

χρωμίτη όπου παράγεται «σκόνη» χρωμίτη, και στις διεργασίες ηλεκτρολυτικής επιμετάλλωσης λόγω της θέρμανσης των ηλεκτρολυτικών λουτρών. (6), (21), (22)

Οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις ατμοσφαιρικού χρωμίου έχουν παρατηρηθεί στο Νότιο Πόλο ( $5-13 \cdot 10^{-3}$  ng/m<sup>3</sup>) και τον Ατλαντικό Ωκεανό (0.007-1.1 ng/m<sup>3</sup>). Γενικά, σε αγροτικές περιοχές οι συγκεντρώσεις βρίσκονται κοντά στο 1 ng/m<sup>3</sup>, ενώ σε μολυσμένες αστικές περιοχές μπορεί να φτάσουν και τα 10 ng/m<sup>3</sup>. Η συγκέντρωση ατμοσφαιρικού χρωμίου σε μια περιοχή εξαρτάται από το είδος και την ένταση της βιομηχανικής δραστηριότητας, την εγγύτητα στην πηγή και από μετεωρολογικούς παράγοντες. (6), (21)

Χώρα/ Ήπειρος	Μέση συγκέντρωση ατμοσφαιρικού χρωμίου (ng/m <sup>3</sup> )
Νορβηγία	0.7
Καναδάς	0.6
Ευρώπη	1-140
Νότια Αμερική	1-300
Ιαπωνία	20-70
Χαβάη	45-67

Πίνακας 1.5. Συγκεντρώσεις ατμοσφαιρικού χρωμίου σε διάφορες περιοχές (στοιχεία 1979)

Το χρώμιο εισέρχεται στα εδάφη και τα νερά μέσω της ατμόσφαιρας με ξηρή ή υγρή εναπόθεση. Η κατανομή του χρωμίου στη σωματιδιακή φάση, η διάμετρος των σωματιδίων και οι μετεωρολογικές συνθήκες είναι οι παράγοντες-κλειδιά σε αυτές τις διεργασίες και καθορίζουν την ταχύτητα της απόθεσης. Στην ξηρή απόθεση, τα σωματίδια κατακάθονται στα εδάφη και τα επιφανειακά νερά λόγω βαρυτικής καθίζησης ή πρόσκρουσης. Κατά την υγρή απόθεση τα σωματίδια χρωμίου συμπαρασύρονται από τη βροχή, το χιόνι ή την ομίχλη. (22)

Όπως και στο νερό, στην ατμόσφαιρα οι δύο σταθερές καταστάσεις οξειδωσης του χρωμίου είναι το τρισθενές και το εξασθενές χρώμιο. Παρότι η χημεία του ατμοσφαιρικού χρωμίου συνδέεται με σωματίδια και σταγονίδια, τα τελευταία δεν συμβάλλουν στις χημικές αντιδράσεις που ελέγχουν την εμφάνιση και την αναλογία αυτών των μορφών χρωμίου. Η χημεία του χρωμίου στην ατμόσφαιρα προσομοιάζει αυτήν των υδατινών συστημάτων και οι αντιδράσεις καταβύθισης, συμπλοκοποίησης και οξειδωσης επηρεάζουν την αφθονία και την αναλογία των μορφών χρωμίου.

Η μόνη διαφορά σε σχέση με τα φυσικά νερά, έχει να κάνει με το pH το οποίο είναι πιο όξινο (pH~1) για τα χαρακτηριστικά ατμοσφαιρικά αερολύματα, ενώ είναι συγκρίσιμο (pH~5) για τα χαρακτηριστικά σύννεφα και τα σταγονίδια. Στις χαμηλότερες τιμές pH, οι κυρίαρχες μορφές του τρισθενούς χρωμίου είναι τα Cr(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>3+</sup> και CrOH<sup>2+</sup> ενώ το εξασθενές χρώμιο εμφανίζεται κυρίως ως HCrO<sup>4-</sup> και Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>. Το ποσό του ατμοσφαιρικού εξασθενούς χρωμίου στα σταγονίδια μπορεί να μειωθεί από το σχηματισμό δυσδιάλυτων χρωμικών αλάτων με ορισμένα ιόντα μετάλλων όπως Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> και Zn<sup>2+</sup>. Σε σταγονίδια με υψηλότερες τιμές pH, καταβυθίζεται το Cr(OH)<sub>3</sub> (aq)· με παρούσες ενώσεις σιδήρου σχηματίζονται μικτά υδροξείδια, όπως (Cr,Fe)(OH)<sub>3</sub>. Παρουσία χλωρίου ή φθορίου σχηματίζονται μικτά χλώρο- και φθόρο- σύμπλοκα του χρωμίου τα οποία αυξάνουν τη διαλυτότητα του. (6)

### 1.4.3. Το χρώμιο στα εδάφη

Η συγκέντρωση χρωμίου στα εδάφη ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη φυσική σύσταση των πετρωμάτων και των ιζημάτων που περιέχουν. Η μέση περιεκτικότητα χρωμίου στα εδάφη εξαρτάται από την αποσάθρωση και κυμαίνεται στα 0.02-58 μmol/g. Τα επίπεδα χρωμίου όμως στο έδαφος μπορεί να αυξηθούν σημαντικά εξαιτίας της ανθρώπινης δραστηριότητας, κυρίως μέσω της ατμοσφαιρικής απόθεσης, αλλά και της απόρριψης χρωμιούχων αποβλήτων και απορριμμάτων, πχ. σκωρία σιδηροχρωμίου και λουτρά επιχρωμίωσης. Από εκεί και πέρα, το χρώμιο μπορεί να λάβει οποιαδήποτε αναλογία Cr[III]/Cr[VI] σε διάφορες διαλυτότητες, ανάλογα με το pH, το είδος και το βαθμό συμπλοκοποίησης. Μόλις εισχωρήσει στα εδάφη, μπορεί να υποστεί ποικίλους μετασχηματισμούς, μέσω οξειδωσης, αναγωγής, ρόφησης, ιζηματοποίησης και διαλυτοποίησης, όπως και υδατικά συστήματα. (21), (22)

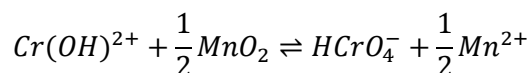
Στα εδάφη το χρώμιο απαντάται επί το πλείστον ως αδιάλυτο  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  (aq) ή ως Cr[III] προσροφημένο στα συστατικά του εδάφους, γεγονός που εμποδίζει τη διήθηση του χρωμίου στα υπόγεια ύδατα ή την πρόσληψη του από τα φυτά. Σε όξινα εδάφη ( $\text{pH} < 4$ ) κυριαρχεί το  $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  ενώ σε πιο ουδέτερα εδάφη ( $\text{pH} < 5.5$ ) κυρίαρχη μορφή είναι τα προϊόντα της υδρόλυσης και κυρίως το  $\text{CrOH}^{2+}$  (aq). Και οι δυο αυτές μορφές προσροφούνται εύκολα σε μακρομοριακά αργιλικά ορυκτά. Η διαδικασία αυτή ενισχύεται από την αύξηση του pH, γεγονός που αποδίδεται είτε στην αύξηση του αρνητικού φορτίου του αργιλικού ορυκτού είτε στην αποπρωτονίωση των ομάδων υποκατάστασης των αργίλων. Τα χουμικά οξέα κατατάσσονται μεταξύ των ενώσεων που διαθέτουν ομάδες δότες ηλεκτρονίων σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα τρισθενούς χρωμίου, και ειδικά στην περίπτωση που σχηματίζονται χηλικά σύμπλοκα. Η προσρόφηση τρισθενούς χρωμίου στα χουμικά οξέα το ακινητοποιεί και το καθιστά αδιάλυτο και αδρανές. Αυτή η διεργασία είναι αποτελεσματική σε pH εντός του εύρους 2.7 – 4.5. Αντίθετα, ευκίνητοι υποκαταστάτες όπως το κιτρικό οξύ, το διαιθυλενοτριαμινοπενταοξικό οξύ (DTPA) και τα φουλβικά οξέα σχηματίζουν με το τρισθενές χρώμιο διαλυτά σύμπλοκα που διαμεσολαβούν στη μετακίνηση και την οξειδωση του σε εξασθενές χρώμιο. Σε πιο αλκαλικά διαλύματα ( $\text{pH} = 7-10$ ), η ιζηματοποίηση του  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  (aq) ανταγωνίζεται αποτελεσματικά με τις αντιδράσεις συμπλοκοποίησης.

Τα ιόντα  $\text{CrO}_4^{2-}$  και  $\text{HCrO}_4^-$  είναι οι μορφές του χρωμίου με τη μεγαλύτερη κινητικότητα στο έδαφος, καθώς εύκολα προσλαμβάνονται από τα φυτά και μπορούν να εκχυλίζονται στα βαθύτερα εδαφολογικά στρώματα προκαλώντας έτσι ρύπανση των επιφανειακών και υπογείων υδάτων. Μικρές ποσότητες του εξασθενούς χρωμίου δεσμεύονται στο έδαφος, φαινόμενο που εξαρτάται από την ορυκτολογική σύσταση και το pH του εδάφους. Τα ιόντα  $\text{CrO}_4^{2-}$  προσροφούνται από  $\text{FeO}(\text{OH})$ , οξειδία του αργιλίου και άλλα κολλοειδή του εδάφους με θετικά φορτισμένη επιφάνεια. (6)

Γενικά, η οξειδοαναγωγική μετατροπή του ζεύγους Cr[III]/ Cr[VI] είναι συνηθισμένο φαινόμενο στα εδάφη. Η αναγωγή όμως του εξασθενούς χρωμίου σε τρισθενές μπορεί να ακολουθήσει πολλές περισσότερες οδούς από ότι η αντίστροφη διεργασία. Παρ' όλα αυτά, υψηλές συγκεντρώσεις Cr[VI] μπορούν να εξαντλήσουν την αναγωγική ικανότητα του εδάφους και η περίσσεια Cr[VI] να παραμείνει για χρόνια στον τόπο της ρύπανσης. Το εξασθενές χρώμιο είναι πιο σταθερό και έχει μεγαλύτερη κινητικότητα σε αμμώδη εδάφη και σε εδάφη με μικρό οργανικό φορτίο. (22)

- Οξείδωση Cr[III]

Λίγα μόνο οξειδωτικά στο έδαφος και στα πετρώματα μπορούν να οξειδώσουν το Cr[III] σε Cr[VI], συγκεκριμένα το διοξείδιο του μαγγανίου (MnO<sub>2</sub>) που προέρχεται από την αντίδραση της κατάστασης οξείδωσης Mn[III] από το οξυγόνο της ατμόσφαιρας, καθώς και το διαλυμένο οξυγόνο. Η οξείδωση του Cr[III] προς Cr[VI] από MnO<sub>2</sub> μπορεί να λάβει χώρα σε εδάφη και πετρώματα που προσεγγίζει το οξυγόνο, αλλά όχι σε ανοξικές συνθήκες. Η αντίδραση οξείδωσης του Cr[III] με υπόστρωμα MnO<sub>2</sub> (σε pH περίπου 5) είναι:



Αυτή η οδός οξείδωσης Cr[III] σε Cr[VI] στη φύση είναι η πιο συχνή αλλά και σημαντική, καθώς οδηγεί στη μετατροπή ενός σχετικά αβλαβούς είδους σε τοξικό. Ακόμη και η πιο κρυσταλλική μορφή MnO<sub>2</sub> με το χαμηλότερο δυναμικό επιφανειακής ρόφησης, ο πυρολουσίτης, έχει τη δυνατότητα να ανάγει το Cr[III], αν και με μικρότερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα. Σε pH < 4 η αντίδραση πραγματοποιείται ταχέως από τα ορυκτά (Na<sub>0.3</sub>Ca<sub>0.1</sub>K<sub>0.1</sub>)(Mn<sup>4+</sup>, Mn<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·1.5H<sub>2</sub>O και Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, ενώ σε μεγαλύτερα pH ο ρυθμός μειώνεται σημαντικά.

Από την άλλη πλευρά, η οξείδωση του Cr[III] από διαλυμένο O<sub>2</sub> θεωρείται αμελητέα σε σχέση με το MnO<sub>2</sub>. Έτσι, αν αποθεθεί μια ποσότητα διαλυτού Cr[III] στο έδαφος, ένα ποσοστό της θα οξειδωθεί άμεσα σε Cr[VI] από MnO<sub>2</sub>. Το υπόλοιπο, ως σταθερότερη μορφή χρωμίου, θα παραμείνει ως έχει για μεγάλο χρονικό διάστημα ακόμη και παρουσία οξειδίων μαγγανίου, πιθανώς επειδή το Cr[III] μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκα με μικρά οργανικά μόρια. Παρ' όλα αυτά, θα οξειδωθεί όταν οι συνθήκες είναι κατάλληλες.

Παράγοντες που μπορούν να αναστείλουν την παραγωγή Cr[VI] στο έδαφος είναι κάποια ιζήματα ένυδρων μεταλλικών οξειδίων, όπως Fe(OH)<sub>3</sub> και Al(OH)<sub>3</sub>, που περικλείουν τις επιφάνειες των οξειδίων του μαγγανίου και δεν επιτρέπουν να πραγματοποιηθεί η αντίδραση οξείδωσης. (24)

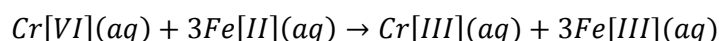
- Αναγωγή Cr[VI]

Η αναγωγή του Cr[VI] σε Cr[III], αντίθετα με την οξείδωση, μπορεί να πραγματοποιηθεί από μια πληθώρα χημικών ουσιών στα εδάφη, και να καταστήσει ακίνδυνο αυτό το τοξικό είδος. Οργανική ύλη, σουλφίδια, βανάδιο και δισθενής σίδηρος μπορούν να ανάγουν το Cr[VI]. Παρ' όλα αυτά, το Cr[VI] δεν μετατρέπεται πάντα σε Cr[III] όταν βρεθεί σε αναγωγικές συνθήκες, λόγω πιθανών κινητικών περιορισμών που σταθεροποιούν τις υπάρχουσες μορφές χρωμίου. Γενικά, η αναγωγική ικανότητα των εδαφών για το Cr[VI] αυξάνεται με μείωση του pH.

Το Cr[VI] στα εδάφη μπορεί να οξειδώσει και να αναχθεί το ίδιο από ζωντανούς ιστούς και οργανική ύλη, διαλυτή ή αδιάλυτη. Μάλιστα, εδάφη με υψηλό οργανικό φορτίο έχουν βρεθεί πολύ αποτελεσματικά στην αναγωγή Cr[VI], ανεξαρτήτως pH. Σε αναερόβιες συνθήκες, εδάφη με ζωντανή φυτική ύλη έχουν σημαντική αναγωγική ικανότητα. Διαλυτά οργανικά μόρια, όπως ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και γαλλικό οξύ (φυσική πολυφαινόλη

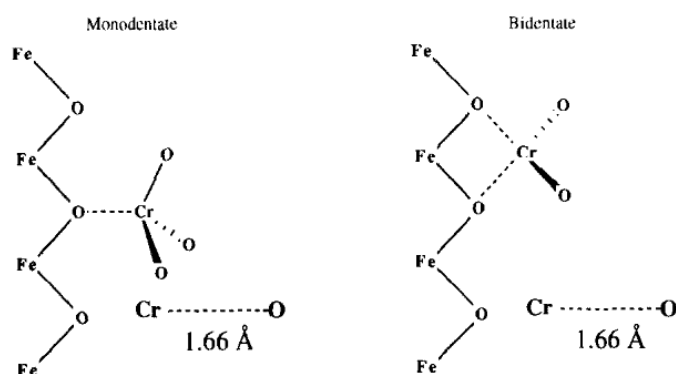
των φυτών) έχει αποδειχθεί ότι ανάγουν το Cr[VI]. Ωστόσο, η οξείδωση οργανικών ουσιών από Cr[VI] οδηγεί σε οργανικό προϊόν, το οποίο μπορεί να αποτελεί κάποιο ευδιάλυτο σύμπλοκο Cr[III]. Επιπλέον, αν το σύμπλοκο είναι σταθερό μπορεί τελικά να ενωθεί με οξειδία του μαγγανίου. Τελικά, είναι πιθανή η επανεμφάνιση του Cr[VI] στο περιβάλλον.

Από την άλλη, ο δισθενής σίδηρος αποτελεί τον πιο ικανό παράγοντα αναγωγής στα εδάφη, καθώς όχι μόνο ανάγει Cr[VI] αλλά αποτρέπει και την επανεμφάνισή του μέσω σχηματισμού σταθερών, αδιάλυτων στερεών Fe,Cr(OH)<sub>3</sub>. Γι' αυτό το λόγο ο Fe[II] αποτελεί ένα από τα κύρια αναγωγικά που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικά απόβλητα που περιέχουν Cr[VI]. Η αντίδραση αναγωγής είναι:

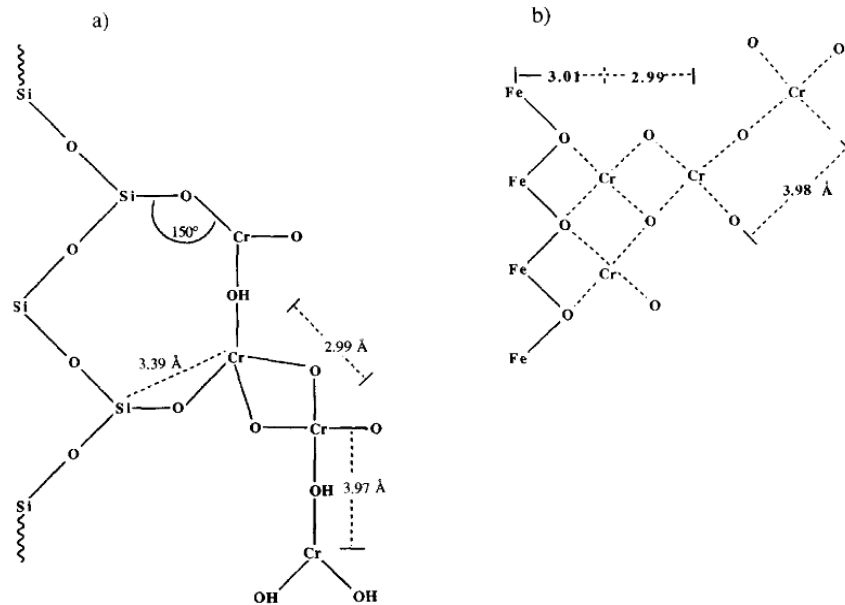


- Προσρόφηση Cr[III] και Cr[VI]

Τα χρωμικά και διχρωμικά άλατα εξασθενούς χρωμίου μπορούν να προσροφηθούν από οξειδία του σιδήρου και του αργιλίου, υδροξειδία και άλλα συστατικά του εδάφους χωρίς να αναχθούν (εικόνα 1.7.) Επιπλέον, η ίδια τάση του Cr[III] να σχηματίζει σταθερά επιφανειακά σύμπλοκα με συστατικά του εδάφους, όπως με το SiO<sub>2</sub>, με FeO(OH) ή με σμηκτική άργιλο, έχει ως αποτέλεσμα την κατακράτησή του και την αποτροπή της οξείδωσης (εικόνα 1.8.). Τελικά, η αναλογία των ειδών Cr[III]/Cr[VI] στο έδαφος εξαρτάται από τα πετρώματα και τα ιζήματα που περιέχει, το pH και το οργανικό φορτίο. (21), (22), (24)

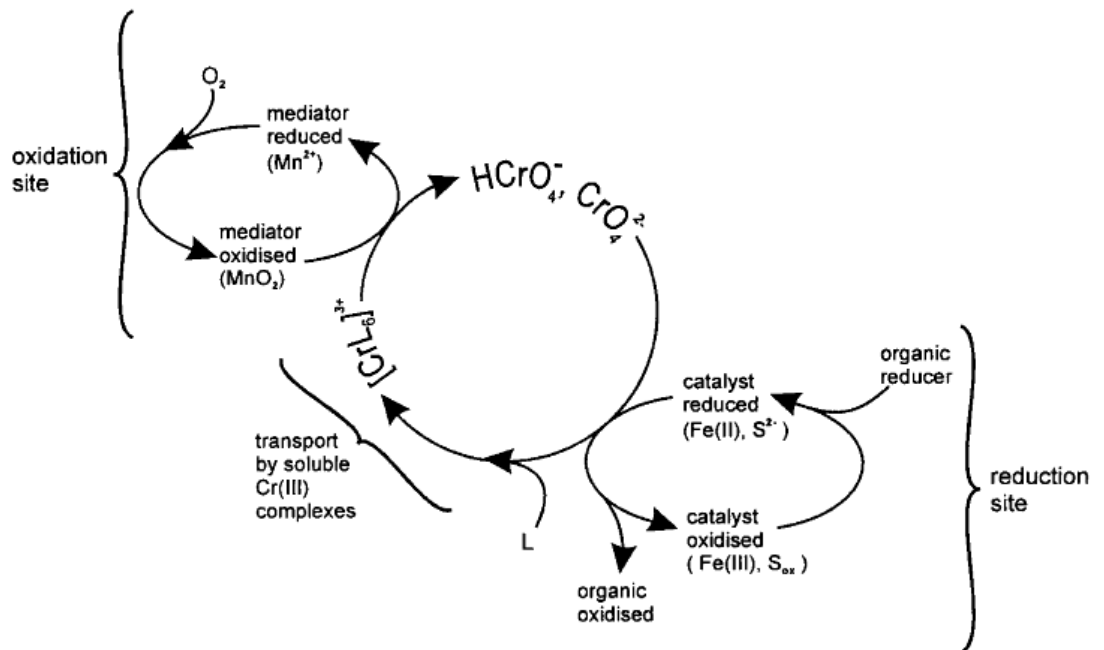


Εικόνα 1.7. Συμπλοκοποίηση Cr[VI] με FeO(OH) και μήκη δεσμών



Εικόνα 1.8. Σύμπλοκα Cr[III] σε a) SiO<sub>2</sub> και b) σε FeO(OH) (επιφανειακή ρόφηση και αδρανοποίηση Cr[III]).

Μια συνολική απεικόνιση των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και της συμπλοκοποίησης του κύκλου του Cr στα εδάφη παρουσιάζεται στην εικόνα 1.9.

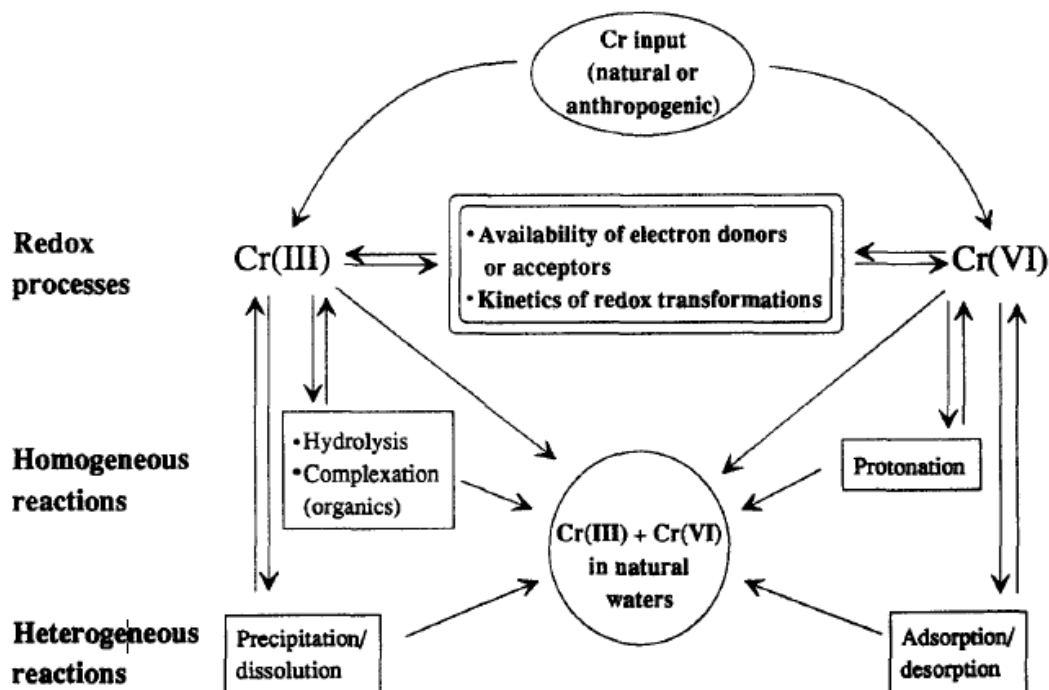


Εικόνα 1.9. Κύκλος του Cr στα εδάφη.

#### 1.4.4. Το χρώμιο στα ύδατα

Όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, η διαλυτότητα του χρωμίου εξαρτάται σθεναρά από την κατάσταση οξείδωσης. Πέρα από τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες, άλλοι

παράγοντες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του χρωμίου στα υδατικά συστήματα είναι το pH του νερού, ανταγωνιστικά ιόντα, συμπλοκοποιητικοί παράγοντες και φυσικά στερεά που δρουν ως προσροφητικά. (εικόνα 1.10) (25)



Εικόνα 1.10. Υδάτινη γεωχημεία χρωμίου (25)

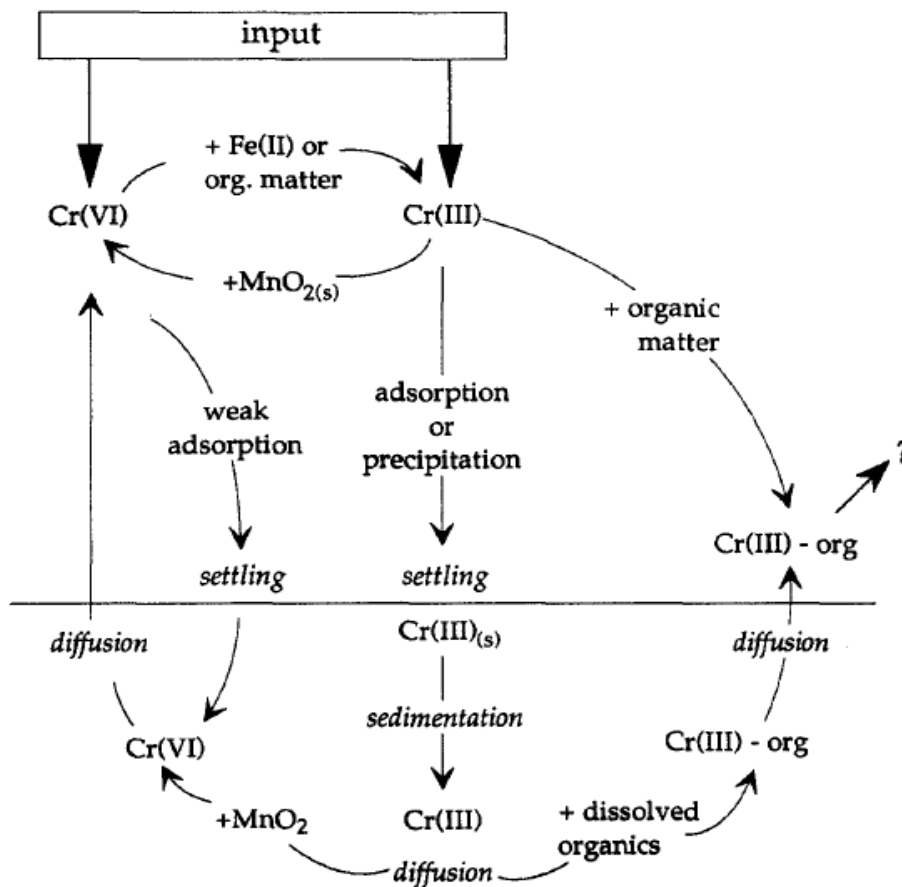
Το χρώμιο στα ύδατα προέρχεται από φυσικές πηγές, όπως η αποσάθρωση των πετρωμάτων, οι ατμοσφαιρικές συμπυκνώσεις και η ξηρή απόθεση από την ατμόσφαιρα, καθώς και οι απορροές από το έδαφος. Η τοπική αύξηση της συγκέντρωσης χρωμίου προκαλείται από ανθρώπινη δραστηριότητα, όπως η άμεση απόρριψη βιομηχανικών αποβλήτων στα νερά από μεταλλουργίες, βυρσοδεψίες, κλωστοϋφαντουργίες, επιχρωμιώσεις κλπ. Η συγκέντρωση του χρωμίου στα ποτάμια και στις λίμνες είναι συνήθως περιορισμένη στα 0.5-100 nM, ενώ στα θαλάσσια ύδατα, οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται από 0.1-16 nM. Η συγκέντρωση του χρωμίου σε ρυπασμένες περιοχές μπορεί να είναι σημαντικά υψηλότερη.

Δύο είναι οι σταθερές καταστάσεις οξειδωσης του χρωμίου στα φυσικά ύδατα: Cr[III] και Cr[VI]. Η παρουσία και η αναλογία των δύο αυτών μορφών επηρεάζεται από παράγοντες όπως η χημική και φωτοχημική οξειδοαναγωγική μετατροπή, η διαλυτοποίηση/ιζηματοποίηση και η προσρόφηση/εκρόφηση. (6)

Η εξάρτηση της συγκέντρωσης του χρωμίου από το pH λειτουργεί ως εξής: σε ουδέτερες ή βασικές συνθήκες ( $pH \geq 7$ ) η κύρια οξειδωτική κατάσταση είναι Cr[VI], συνήθως με τη μορφή ιόντων  $CrO_4^{2-}$ . Όταν μάλιστα ο βαθμός συμπλοκοποίησης του Cr[III] είναι αμελητέος, σε αυτό το εύρος pH σχηματίζει ενώσεις που καταβυθίζονται [πχ.  $Cr(OH)_3$  (s),  $FeCr_2O_4$  (s),  $Fe_{1-x}Cr_x(OH)_3$  (s)] και έτσι απομακρύνεται από την υδατική φάση. Σε ουδέτερο προς ελαφρά όξινο pH (φυσικά νερά) το Cr[III] έχει την τάση να απομακρύνεται από το νερό με προσρόφηση. Σε όξινες συνθήκες ( $pH \leq 6$ ) και οξυγονωμένα νερά το Cr[III] είναι η θερμοδυναμικά σταθερή μορφή και η συγκέντρωσή του μπορεί να αποβεί αρκετά υψηλή.

Γενικά, σε ενδιάμεσες τιμές pH η αναλογία Cr[III]/Cr[VI] εξαρτάται από τη συγκέντρωση διαλυμένου O<sub>2</sub>. Σε επιφανειακά νερά με διαλυμένο οξυγόνο κι άλλοι παράγοντες παίζουν ρόλο (φύση και συγκέντρωση αναγωγικών ουσιών, οξειδωτικών μεσολαβητών, συμπλοκοποιητικών παραγόντων). Σε αναερόβιες ή υποξικές συνθήκες το Cr[III] αναμένεται να είναι το μοναδικό είδος. (6), (25)

Η κινητικότητα του Cr[VI] στο περιβάλλον θεωρείται ότι ελέγχεται από δυο βασικούς μηχανισμούς: την αναγωγή του Cr[VI] σε Cr[III] το οποίο έπειτα καταβυθίζεται ή προσροφάται ταχέως, και την προσρόφηση (εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11. Κύκλος του χρωμίου στα υδατικά συστήματα και το έδαφος με το οποίο συνορεύουν. (25)

Για την αναγωγή του Cr[VI] στα ύδατα έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί, σε αντιστοιχία με το έδαφος: αναγωγή με Fe[II], υπεροξείδιο του υδρογόνου, διαλυμένη οργανική ύλη, ακόμη και φωτοχημική αναγωγή. Όπως και στα εδάφη, σε τέτοια περιβάλλοντα η πιο πιθανή οδός είναι η αναγωγή του Cr[VI], και η τελική συγκέντρωση Cr[III] ελέγχεται από τη διαλυτότητα των ενώσεων που σχηματίζει. Το Cr[VI] τότε δε θα έχει μεγάλη κινητικότητα και η συνολική περιεκτικότητα χρωμίου του νερού θα κινείται σε ασφαλή όρια. (25), (22)

Οι ακτίνες του ήλιου φαίνεται να επηρεάζουν τη οξείδωση και αναγωγή του χρωμίου· το ηλιακό φως αποσυνθέτει το οργανικά δεσμευμένο χρώμιο, παράγοντας



ανόργανο χρώμιο. Επιπλέον, υποβοηθά έμμεσα την αναγωγή από το σίδηρο, το σχηματισμό υπεροξειδίων του υδρογόνου και την οξείδωση του μαγγανίου.

Όπως στα εδάφη, και σε αντίθεση με την ατμόσφαιρα, σε πολλά υδατικά συστήματα υπάρχουν οξειδωτικοί παράγοντες όπως  $MnO_2$  και  $Mn^{3+}$  σε ποσότητες ικανές ώστε να παραχθεί αρκετό  $Cr[VI]$ . Παρ' όλα αυτά η οξείδωση μπορεί να παρεμποδίζεται από άλλους παράγοντες, όπως κινητικούς περιορισμούς, τοπική ετερογένεια, τοπικές καταλυτικές επιδράσεις των οργανισμών, έτσι ώστε οξειδοαναγωγικές συνθήκες και τελική κατάσταση να μην μπορούν να προβλεφθούν με ακρίβεια. (22)

Η ανάλυση των χημικών μορφών (speciation) του τρισθενούς χρωμίου στα φυσικά ύδατα δείχνει ότι τα υδατο/υδροξυ σύμπλοκα κυριαρχούν στις συνθήκες που επικρατούν στα φυσικά ύδατα, αν και το τρισθενές χρώμιο παρουσιάζει την τάση να σχηματίζει πολλά διαφορετικά σύμπλοκα με φυσικές οργανικές ύλες, όπως τα αμινοξέα, φουλβικά, τα χουμικά και άλλα οξέα. Η συμπλοκοποίηση του τρισθενούς χρωμίου μειώνει την καταβύθιση του  $Cr(OH)_3.aq$  που είναι αναμενόμενη στις συνθήκες pH που επικρατούν στα φυσικά νερά, όμως στα περισσότερα από αυτά τα σύμπλοκα, το τρισθενές χρώμιο ακινητοποιείται από τις μακρομοριακές ενώσεις και απομακρύνεται έτσι από το διάλυμα. Επιπλέον, τα υδατο/υδροξυ σύμπλοκα του τρισθενούς χρωμίου έχουν ισχυρή τάση για προσρόφηση σε φυσικά στερεά, κάτι που συμβάλλει στη μείωση της κινητικότητας και της βιοδιαθεσιμότητας του τρισθενούς χρωμίου στα ύδατα.

Τα σύμπλοκα που σχηματίζει το τρισθενές χρώμιο με οργανικούς υποκαταστάτες δεν οξειδώνονται τόσο εύκολα, όπως τα υδατο/υδροξυ σύμπλοκα του, που σημαίνει ότι το τρισθενές χρώμιο σταθεροποιείται καλύτερα από άλλους υποκατάστατες πέρα από το  $H_2O$  και το  $OH^-$ . Σε αντίθεση με τα σύμπλοκα του  $Cr[III]$ , τα χημικά είδη του εξασθενούς χρωμίου προσροφώνται ασθενώς από τις ανόργανες επιφάνειες και αποτελούν τις μορφές χρωμίου με τη μεγαλύτερη κινητικότητα στο περιβάλλον.

Η φύση και η συμπεριφορά των διαφόρων μορφών χρωμίου που βρίσκονται στα υγρά απόβλητα μπορεί να είναι αρκετά διαφορετική από αυτή που παρουσιάζεται στα φυσικά νερά, εξαιτίας των διαφορετικών φυσικοχημικών συνθηκών στα απόβλητα που προέρχονται από διάφορες βιομηχανικές πηγές. Η παρουσία και η συγκέντρωση των μορφών χρωμίου σε απορριπτόμενα υγρά απόβλητα εξαρτώνται κυρίως από τις ενώσεις του χρωμίου που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογική διεργασία, στο pH και στα οργανικά ή ανόργανα απόβλητα της διεργασίας. Το εξασθενές χρώμιο απαντάται κυρίως σε απόβλητα μεταλλουργικών βιομηχανιών, βιομηχανιών επεξεργασίας μεταλλικών επιφανειών (επιμετάλλωση χρωμίου με σκληρό περίβλημα), βιομηχανιών παραγωγής πυρίμαχων και βιομηχανιών εφαρμογής και παραγωγής αντιδιαβρωτικών χρωστικών ουσιών. Το τρισθενές χρώμιο,  $Cr[III]$  απαντάται κυρίως σε απόβλητα από βυρσοδεψεία, κλωστοϋφαντουργίες και βιομηχανίες διακοσμητικών επιμεταλλώσεων.

Η παρουσία των διαφόρων ανόργανων και οργανικών υποκαταστατών, καθώς και η τιμή του pH στα απόβλητα καθορίζει τις μορφές του χρωμίου, επηρεάζοντας έτσι τη διαλυτότητα, τη ρόφηση και τις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Για παράδειγμα στα απόβλητα των βυρσοδεψείων αν και η πιο αναμενόμενη μορφή χρωμίου, είναι το τρισθενές χρώμιο, οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, που συμβαίνουν στην ιλύ μπορεί να αυξήσουν την συγκέντρωση του εξασθενούς χρωμίου. Υπό συνθήκες ελαφρώς όξινου ή ουδέτερου pH σε αυτόν τον τύπο αποβλήτων το δυσδιάλυτο  $Cr(OH)_3.aq$  θα πρέπει να είναι η επικρατούσα μορφή. Όμως ένα υψηλό περιεχόμενο οργανικής ύλης που μπορεί να

προέρχεται από την επεξεργασία της πρώτης ύλης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαλυτών οργανικών συμπλόκων τρισθενούς χρωμίου. (6)

Μετρήσεις συγκέντρωσης ολικού διαλυμένου χρωμίου στις θάλασσες έδωσαν 2-2.6 nmol/l, με τις μικρότερες τιμές στην επιφάνεια και τις μεγαλύτερες στο βυθό (>1000m), πιθανώς λόγω απελευθέρωσης Cr από τα ιζήματα. Αν και η απόθεση χρωμίου στους ωκεανούς έχει πολλές πηγές, τα αιωρούμενα σωματίδια που παρασέρνονται από τους βορειοανατολικούς ανέμους στον Ατλαντικό είναι από τις κυριότερες. Η Μεσόγειος είναι κατά 40% πιο πλούσια σε χρώμιο σε σχέση με τον Ατλαντικό, λόγω χρωμιούχων ιζημάτων στην ίδια τη μεσογειακή λεκάνη. (25)

Είδος υδάτων	Συγκέντρωση χρωμίου (nmol/l)	
	Τυπική	Εύρος
Νερό θάλασσας	3	0.1-16
Ενδιάμεσα ύδατα (θαλάσσια ιζήματα)	-	1-6.6
Ποτάμια	10	0-2200
Λίμνες	-	<2-33
Υπόγεια ύδατα	<20	10-4000
Ρυπασμένο νερό	-	960-27000
Νερό βρύσης	8	0-700

Πίνακας 1.6. Συγκεντρώσεις χρωμίου σε φυσικά και επεξεργασμένα νερά

#### 1.4.5. Μεταφορά χρωμίου στο περιβάλλον

Η ατμόσφαιρα έχει αναδειχθεί σημαντική οδός για τη μεταφορά του χρωμίου σε μεγάλες αποστάσεις, στα διάφορα οικοσυστήματα. Σωματίδια του ατμοσφαιρικού αέρα που περιέχουν χρώμιο μεταφέρονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον άνεμο, πριν αποθεθούν ή παρασυρθούν από τον αέρα σε χερσαίες και υδάτινες επιφάνειες. Οι αποστάσεις εξαρτώνται από τις μετεωρολογικές συνθήκες, την τοπογραφία και τη βλάστηση. Η υγρή και η ξηρά απόθεση χρωμίου από την ατμόσφαιρα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος των σωματιδίων, ενώ η χημική του μορφή έχει μικρότερη σημασία.

Αντίθετα, η μετακίνησή του μέσα στα χερσαία και υδάτινα συστήματα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το χημικό είδος του χρωμίου: οι χημικές μορφές του χρωμίου και η σχέση τους με χημικούς και φωτοχημικούς οξειδοαναγωγικούς μετασχηματισμούς, με διεργασίες καταβύθισης/ διαλυτοποίησης και ρόφησης/ εκρόφησης που συμβαίνουν στα επιμέρους συστήματα του περιβάλλοντος καθορίζουν το βιολογικό και γεωχημικό κύκλο αυτού του στοιχείου.

Η αποτελεσματική προσρόφηση των μετάλλων από τα εδάφη τείνει να περιορίσει την εισαγωγή του χρωμίου από την ατμόσφαιρα. Η απόρριψη όμως των βιομηχανικών αποβλήτων αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση του χρωμίου στο έδαφος και συνήθως συνοδεύεται από τη ρύπανση των υπογείων υδάτων. Όπως προαναφέρθηκε, το εξασθενές χρώμιο είναι η μορφή του με τη μεγαλύτερη κινητικότητα στα χερσαία και υδάτινα συστήματα, ενώ το τρισθενές χρώμιο γενικά δεν μετακινείται σε μεγάλες αποστάσεις, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς του και της τάσης να προσροφάται σε τιμές pH οι οποίες είναι χαρακτηριστικές στα εδάφη και στα νερά στη φύση. Η οξειδοαναγωγική μετατροπή του

τρισθενούς χρωμίου σε εξασθενές χρώμιο μπορεί να αυξήσει τη μεταφορά του χρωμίου από το έδαφος στα υδάτινα συστήματα. Υπάρχουν δυο βασικοί τρόποι με τους οποίους το χρώμιο κινείται από τα επίγεια συστήματα προς τα υδάτινα συστήματα: η επιφανειακή απορροή και η μεταφορά του μέσω του εδάφους στα υπόγεια ύδατα. Εκτός από το Cr[VI], το διαλυτό Cr[III] συμπλοκοποιείται με οργανικούς υποκαταστάτες και μεταφέρεται στα υπόγεια ύδατα ή και μεταξύ υδατικών συστημάτων.

Σε ό, τι αφορά το μηχανισμό μεταφοράς του Cr στα φυσικά ύδατα διακρίνονται τρία υποσυστήματα: ποταμοί, λίμνες, θάλασσες. Οι οδοί μεταφοράς καθορίζονται από τις επικρατούσες συνθήκες σε αυτά τα υποσυστήματα, δηλαδή θερμοκρασία, βάθος, βαθμός ανάμιξης, οξειδωτικές συνθήκες και ποσότητα οργανικού υλικού.

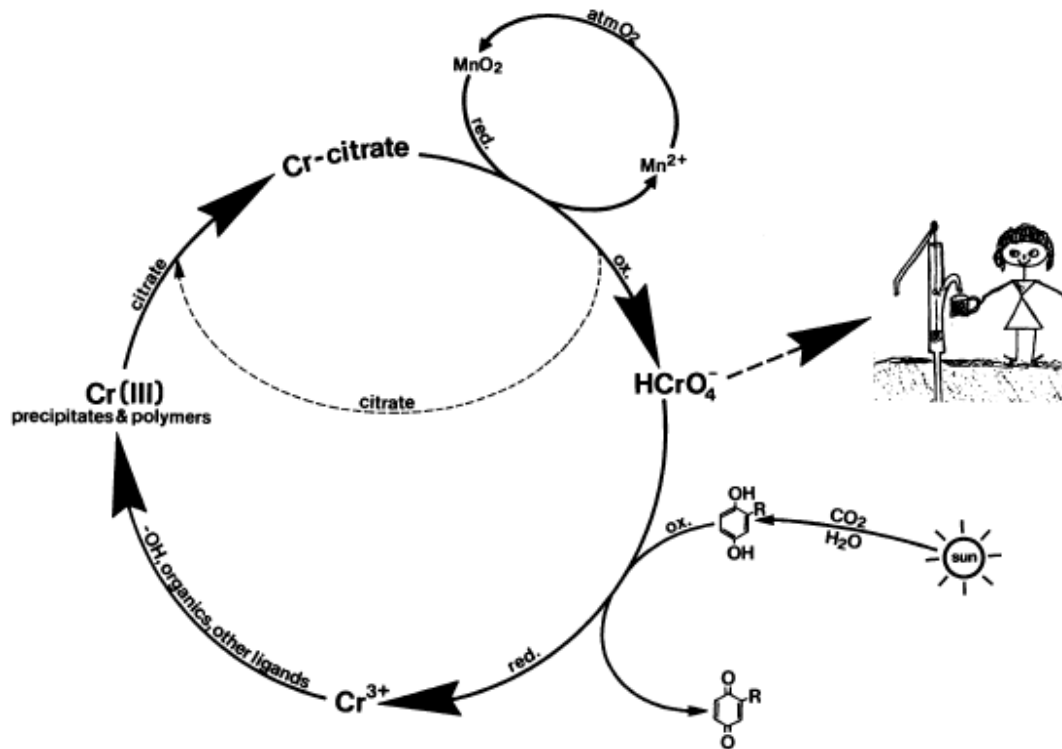
Οι μηχανισμοί μεταφοράς μετάλλων στα ποτάμια συνδέονται με τα αιωρούμενα σωματίδια. Το πόσο του διαλυμένου χρωμίου στο νερό του ποταμού μειώνεται κατά τη διέλευσή του μέσω των θολών παράκτιων περιοχών. Το χρώμιο εισέρχεται στο νερό των ωκεανών με δυο βασικούς τρόπους: από τους ποταμούς και ατμοσφαιρικά. Οι δυο τρόποι εισόδου ενώ είναι ποσοτικά συγκρίσιμοι, οδηγούν όμως σε διαφορετικές κατανομές χρωμίου. Οι ατμοσφαιρικές εισροές εξαπλώνονται πιο ομοιόμορφα ενώ οι εισροές ποταμών εξαρτώνται τόσο από τις διεργασίες απομάκρυνσης χρωμίου στις εκβολές όσο και από την κυκλοφορία των ωκεάνιων υδάτων.

Στις θαλάσσιες και ωκεάνιες μάζες, το διαλυμένο και το καταβυθισμένο Cr βρίσκονται σε ισορροπία. Το διαλυμένο Cr ενσωματώνεται στη βιολογική ύλη, κυρίως πυριτικούς και ανθρακούχους σκελετούς, ή απορροφάται από ιζηματικά σωματίδια. Επαναδιαλυτοποίηση του ενσωματωμένου Cr λαμβάνει χώρα τόσο στη υδάτινη μάζα, όσο και στη διεπιφάνεια νερού-ιζήματος, οδηγώντας σε εμπλουτισμό του βυθού και των βαθέν στρωμάτων σε διαλυμένο Cr. Αναγωγή του εξασθενούς Cr συμβαίνει σε ανοξικές λεκάνες και υδατικές ζώνες χωρίς οξυγόνο. Σε αυτές τις περιπτώσεις το τρισθενές Cr που προκύπτει απορροφάται εύκολα από τα ιζήματα του βυθού οδηγώντας σε μείωση των συγκεντρώσεων διαλυμένου Cr. Η οξείδωση του Cr[III] κυρίως μέσω οξειδίων του μαγνησίου, αυξάνει και πάλι την κινητικότητα του Cr.

Σε αντίθεση με τους ωκεανούς, οι λίμνες χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλότερη βιολογική δραστηριότητα, μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια ιζημάτων ανά όγκο νερού και διαφορετικές συνθήκες ανάμιξης. Ως αποτέλεσμα του πλούσιου οργανικού υλικού δημιουργούνται αναγωγικές συνθήκες που ευνοούν την αναγωγή του Cr[VI] σε Cr[III], το οποίο ταχέως καθιζάνει ή απορροφάται από ιζηματικά ορυκτά. Από εκεί μπορεί να ξαναγίνει διαθέσιμο στα περιβάλλοντα ύδατα μέσω οξείδωσης ή διαλυτοποίησης. Σε καλά αεριζόμενες λίμνες (DO=6 mg/L) δεν υπάρχουν διαλυμένα οξείδια του μαγγανίου και το χρώμιο απαντάται κυρίως στη μορφή χρωμικών. Σε εποχιακά ανοξικές λίμνες που σχηματίζονται κατά τους θερινούς μήνες λόγω έντονης ανάπτυξης της βιολογικής ύλης, η ειδοταυτοποίηση (speciation) του Cr διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με το βάθος και την εποχή. Αρχικά, γενική μείωση της συγκέντρωσης του διαλυμένου Cr εμφανίζεται τους θερινούς μήνες. Τα στρώματα όπου επικρατεί κάθε είδος Cr[III] και Cr[VI] γίνονται διακριτά στα βαθιά στρώματα και την επιφάνεια αντίστοιχα.

Τέλος, οι ζωντανοί οργανισμοί παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στον κύκλο του μεταλλικού στοιχείου στο περιβάλλον. Το πλαγκτόν των παράκτιων περιοχών έχει μετρήσιμη επιρροή στη μεταφορά Cr στις θαλάσσιες μάζες. Το ζωοπλαγκτόν και φυτοπλαγκτόν επίσης απορροφούν ένα μέρος του μετάλλου. Επίσης, το Cr μπορεί να

κροκιδώνεται με νεκρή οργανική ύλη και να ενσωματώνεται σε ιζήματα. Από την άλλη, το Cr μετακινείται σε μετρήσιμο βαθμό μέσω της τροφικής αλυσίδας. (6), (26)



Εικόνα 1.12. Συνολικός κύκλος χρωμίου στο περιβάλλον. (26)

## 1.5. Το χρώμιο στον οργανισμό

### 1.5.1. Τρόποι έκθεσης στο χρώμιο

Ο άνθρωπος έρχεται καθημερινά σε επαφή με το χρώμιο (κυρίως την τρισθενή μορφή του) μέσω των τροφών, του πόσιμου νερού και του αέρα που αναπνέει. Η μέση ημερήσια πρόσληψη υπολογίζεται ότι είναι μικρότερη από 0.2-0.4  $\mu\text{g}$  από τον αέρα, 2  $\mu\text{g}$  από το νερό και 60  $\mu\text{g}$  από την τροφή. (27) Η συγκέντρωση του χρωμίου στα πόσιμα νερά κινείται σε πολύ χαμηλές τιμές, 2-5  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου, πάνω από 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  μπορεί να οφείλονται εκτός από ανθρώπινη δραστηριότητα και σε φυσική ρύπανση από τα πετρώματα. (28) Ο γενικός πληθυσμός που εργάζεται ή κατοικεί κοντά σε ανθρωπογενείς πηγές χρωμίου μπορεί να εκτίθεται σε μεγαλύτερες τιμές. (11)

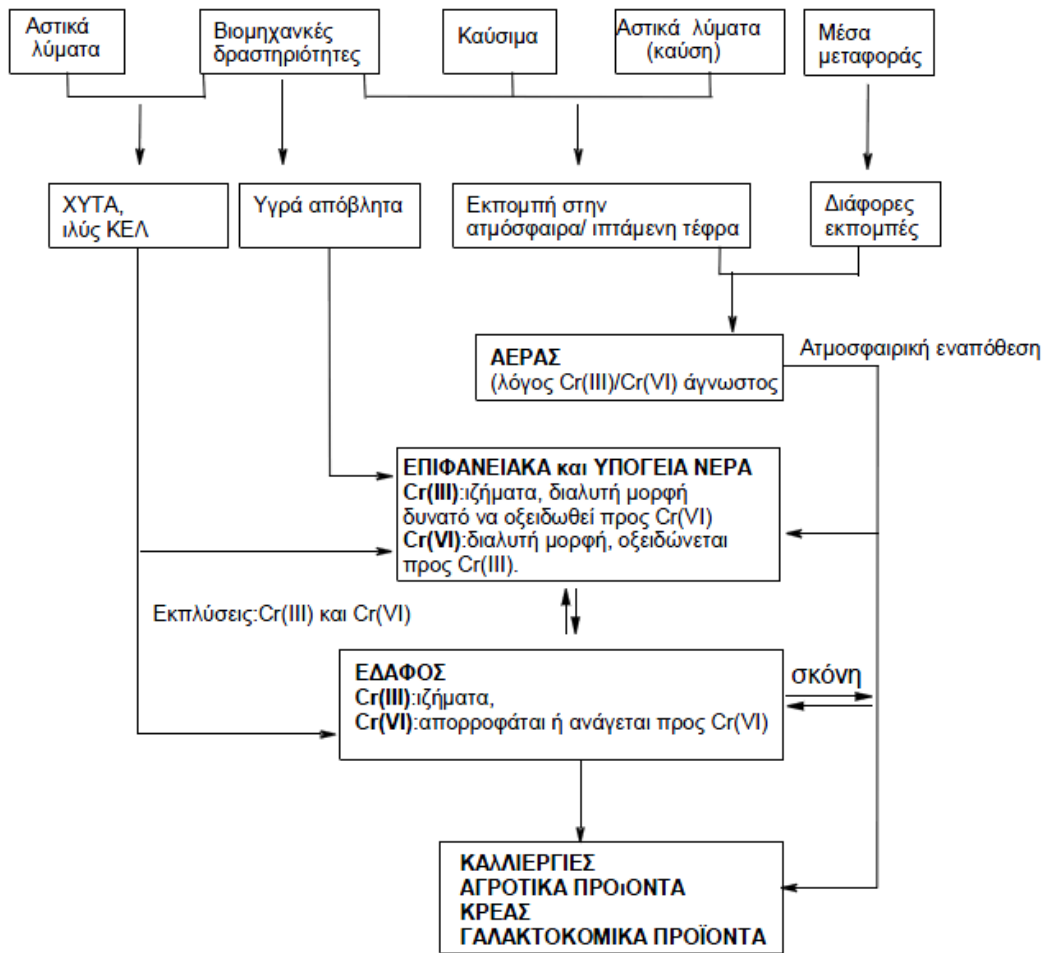
Οι περισσότεροι άνθρωποι εκτίθενται μόνο στο Cr[III] από τα τρόφιμα και σε μικρότερο βαθμό από το νερό. Ο αέρας έχει μια σχετικά μικρή συμβολή, εκτός από τον αέρα που υπάρχει κοντά σε ορισμένα εργοστάσια. Η χαρακτηριστική καθημερινή λήψη χρωμίου σε έναν ενήλικα κυμαίνεται από 0.03 σε 0.1 mg, το 90% της οποίας προέρχεται από τα τρόφιμα. Το Cr[III] είναι απαραίτητο για την υγεία των ανθρώπων και όλες οι τυπικές εκθέσεις θεωρούνται ότι είναι ασφαλείς. Μάλιστα συνίσταται για τους ενήλικες

ημερήσια κατανάλωση 50-200  $\mu\text{g Cr[III]}$ , καθώς παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ινσουλίνης στο αίμα και στο φυσιολογικό μεταβολισμό της γλυκόζης (GTF - Glucose Tolerance Factor), του λίπους και των πρωτεϊνών. Η έλλειψη χρωμίου έχει συνδεθεί με καρδιαγγειακές παθήσεις, αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους, μειωμένη γονιμότητα, εξασθενημένη ανοχή στη γλυκόζη, κ.ά. Πηγές Cr[III] στα τρόφιμα είναι μεταξύ άλλων το ψωμί, τα δημητριακά, τα ψάρια, τα φρέσκα λαχανικά και τα μπαχαρικά. (29), (30)

Συγκέντρωση χρωμίου ( $\mu\text{g/kg}$ υγρού βάρους)		
ΤΡΟΦΙΜΟ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΕΥΡΟΣ
Αλεύρι	<20	
Βρώμη	50	
Κρέας	-	10 - 60
Φρέσκο ψάρι	-	<10
Λαχανικά	-	5 - 30
Ξηροί καρποί	140	
Κρόκος αυγού	200	

Πίνακας 1.7. Τυπικές τιμές χρωμίου σε ορισμένα τρόφιμα. (31)

Οι οδοί έκθεσης του ανθρώπινου σώματος στο χρώμιο είναι η εισπνοή, η κατάποση και η δερματική επαφή. Το χρώμιο εισέρχεται στον οργανισμό μέσω του νερού, της τροφής, του αέρα, της επαφής με χρωμιούχες ουσίες, ακόμη και με το κάπνισμα. Δερματική επαφή μπορεί να προκύψει κατά τη χρήση προϊόντων όπως ξύλου επεξεργασμένο με διχρωμικά, δέρματος επεξεργασμένου με θειικό χρώμιο κλπ. Μια γραφική αναπαράσταση του τρόπου που καταλήγει το χρώμιο στα τρόφιμα φαίνεται στην εικόνα 1.13. Η εργασιακή έκθεση σε χρώμιο μπορεί να είναι έως και δυο τάξεις μεγαλύτερη από αυτή του γενικού πληθυσμού, ενώ και οι κάτοικοι περιοχών με βιομηχανίες που επεξεργάζονται χρώμιο έχουν μεγαλύτερη έκθεση τόσο σε Cr[III] όσο και Cr[VI]. (27), (11), (30)



Εικόνα 1.13. Πορεία χρωμίου από την ανθρώπινη δραστηριότητα στα θρώσιμα αγαθά. (28)

### 1.5.2. Πορεία χρωμίου στον οργανισμό

Μόλις το σώμα εκτεθεί στο χρώμιο, απορροφάται από τους πνεύμονες, τη γαστρεντερική οδό και το δέρμα και έπειτα εισέρχεται στις μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού. Το Cr[VI] απορροφάται ευκολότερα από το Cr[III]. Ειδικότερα, οι σύμπλοκες ενώσεις του Cr[III] δε διαπερνούν εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες των ερυθροκύτταρων λόγω του όγκου και της δυσδιαλυτότητάς τους. Συνδέονται όμως με μια πρωτεΐνη του πλάσματος, την τρανσφερίνη. Αντίθετα, το Cr[VI] μπορεί να εισέρχεται στα κύτταρα μέσω της κυτταρική μεμβράνης χρησιμοποιώντας το φυσιολογικό σύστημα διακίνησης ιόντων, καθώς τα χρωμικά ιόντα έχουν δομικές ομοιότητες με τα θειικά και φωσφορικά ιόντα. Το Cr[VI] ανάγεται σε Cr[III] στο εσωτερικό των κυττάρων χρησιμοποιώντας διάφορους δότες ηλεκτρονίων, όπως το ασκορβικό οξύ και η γλουταθειόνη.

Αφότου γίνει η αναγωγή, το Cr[VI] παραμένει ουσιαστικά παγιδευμένο στο εσωτερικό του κυττάρου, αφού δεν μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Εν τέλει, η διάχυση του Cr[VI], η αναγωγή του Cr[III] και η συμπλοκοποίηση με νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες του κυττάρου, έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της συγκέντρωσης

ισορροπίας Cr[VI]/Cr[III]. Η μεγαλύτερες συγκεντρώσεις Cr[III] στον οργανισμό βρίσκονται στο μυελό των οστών, τους πνεύμονες, τους λεμφαδένες, το συκώτι και τα νεφρά.

Όσον αφορά τις μεταβολικές οδούς, η πρώτη άμυνα του οργανισμού μετά από κατάποση χρωμίου είναι η αναγωγή του Cr[VI] σε Cr[III] στο γαστρικό περιβάλλον. Όταν το εξασθενές χρώμιο προσλαμβάνεται με το νερό μετατρέπεται σε μεγάλο ποσοστό σε τρισθενές στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, γεγονός που δεν επιτρέπει τη περαιτέρω απορρόφηση του Cr από τον οργανισμό, και αυξάνοντας το ποσοστό της απέκκρισης με τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού (ούρα, απεκκρίματα). Το Cr[VI] μπορεί επίσης να αναχθεί σε Cr[III] στο υγρό των επιθηλίων των πνευμόνων. Ο καθαρισμός από το πλάσμα είναι σχετικά γρήγορος, ενώ η απομάκρυνση από τους ιστούς είναι πιο αργή. (27), (30)

### 1.5.3. Επιπτώσεις χρωμίου στην υγεία

Το Cr[VI] και οι ενώσεις του θεωρούνται υπεύθυνες για τις περισσότερες επιπτώσεις του χρωμίου. Το εξασθενές χρώμιο μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο ήπαρ και στα νεφρά, εσωτερική αιμορραγία, δερματίτιδα, βλάβη του αναπνευστικού συστήματος και καρκίνο των πνευμόνων. Οι μακροχρόνιες εκθέσεις του αναπνευστικού συστήματος και του δέρματος μπορεί να προκαλέσουν έλκος του ρινικού διαφράγματος, φλεγμονή των ρινικών διόδων και δερματικά έλκη. Αυτές οι επιπτώσεις εμφανίζονται μετά από βιομηχανικές εκθέσεις. Όμως, ακόμη και η έκθεση στο χρώμιο μέσω διαφόρων υλικών, όπως η μαγιά μύρας, τα συντηρητικά ξύλου, το τσιμέντο, η κόλλα και οι χρωστικές ουσίες, μπορεί να προκαλέσουν αλλεργική αντίδραση του δέρματος. Κάποιοι άνθρωποι μάλιστα είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι (αλλεργικοί) στο Cr[III] ή το Cr[VI].

Περιστατικά που έχουν καταγραφεί σε εργαζομένους στις βιομηχανίες χημικών χρωμίου στις ΗΠΑ, τη Μεγάλη Βρετανία, την πρώην Δυτική Γερμανία και την Ιαπωνία αποδεικνύουν τη σχέση μεταξύ της έκθεσης σε χρώμιο και του καρκίνου των πνευμόνων. Τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών έχουν επιβεβαιωθεί και σε πειραματόζωα. Υπάρχουν αρκετά πειραματικά δεδομένα ότι ενώσεις του Cr[VI] καταστρέφουν το DNA και προκαλούν μεταλλάξεις (εμβρυικές δυσμορφίες). Άλλες μελέτες, σε πειραματόζωα δείχνουν ότι αυτή η μορφή χρωμίου μπορεί να προκαλέσει και προβλήματα αναπαραγωγής.

Το εξασθενές χρώμιο έχει καταταχθεί από πολλές μελέτες και στατιστικά δεδομένα στην κατηγορία ενώσεων που προκαλούν καρκίνο με βάση επιδημιολογικά δεδομένα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) ορίζει το Cr[VI] καρκινογόνο για τον άνθρωπο, ενώ η Διεύθυνση Υγείας και Ανθρωπίνων Υπηρεσιών των ΗΠΑ (DHHS) έχει κατατάξει ορισμένες ενώσεις του Cr[VI] ως καρκινογόνες. Η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (EPA) τοποθετεί το Cr[VI] στην πρώτη από τις τέσσερις κατηγορίες καρκινογόνων ουσιών και το ταξινομεί στην ομάδα A, κάτι που σημαίνει ότι υπάρχουν επαρκή στοιχεία που αποδεικνύουν ότι είναι καρκινογόνο για τον άνθρωπο. Αντίθετα με την αποδεδειγμένη καρκινογόνο δράση του Cr[VI] στον αέρα, ανάλογη δράση στο νερό δεν έχει άμεσα αποδειχθεί λόγω της δυσκολίας που παρουσιάζει η σχετική μελέτη. (28), (29)

#### 1.5.4. Μηχανισμός τοξικότητας

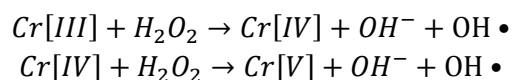
Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την τοξικότητα των ενώσεων χρωμίου είναι η κατάσταση οξειδωσης και η διαλυτότητα. Οι ενώσεις του εξασθενούς χρωμίου, ως ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες, είναι ερεθιστικές και διαβρωτικές, σε αντίθεση με τις ενώσεις Cr[III]. Η επίδραση της αναγωγής του Cr[VI] μόλις αυτό εισέλθει στον οργανισμό εξαρτάται από τον τόπο της αναγωγής: η αναγωγή Cr[VI] μέσα ή κοντά στον πυρήνα του κυττάρου ή στα ζωτικά όργανα, μπορεί να ενεργοποιήσει τις τοξικές ή γενετοξικές συνέπειες· μακριά από αυτά τα σημεία, λειτουργεί ως διεργασία αποτοξίνωσης. Εάν δηλαδή, η αναγωγή γίνει εξωκυτταρικά, το στοιχείο δε μεταφέρεται στα κύτταρα, αφού το Cr[III] δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, και έτσι δεν παρατηρείται τοξικότητα.

Το Cr[VI] εισβάλλει σε διαφόρων ειδών κύτταρα και μέσα στον οργανισμό μπορεί να αναχθεί από υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), γλουταθειόνη (GSH), κυστεΐνη και ασκορβικό οξύ. Πριν σχηματίσει το θερμοδυναμικά σταθερό Cr[III] περνάει από αρκετά στάδια, μη-ενζυμικά, στα οποία πραγματοποιείται ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ του Cr[VI] και των αναγωγικών. Της παραγωγής Cr[III] προηγείται ο σχηματισμός Cr[IV], Cr[V], οργανικών ελευθέρων ριζών, υδροξυλικών ελευθέρων ριζών. Τα είδη αυτά, όντας πολύ δραστικά, μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια των μεμβρανών διαταράσσοντας τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου. (11), (30)

#### 1.5.5. Καρκινογόνος δράση χρωμίου

Επιδημιολογικές μελέτες σε εργάτες βιομηχανιών χρωμίου έχουν αποδείξει ότι η εισπνοή χρωμίου στον αέρα είναι αιτία καρκινογένεσης στον άνθρωπο, με έμφαση στον καρκίνο των πνευμόνων, αλλά και της μύτης και των ιγμόρειων. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι ενώσεις Cr[VI] προκαλούν καρκίνο, ενώ ενώσεις Cr[III] όχι. Η EPA έχει κατατάξει το Cr[VI] ως ανθρώπινο καρκινογόνο.

Ο ακριβής μηχανισμός της καρκινογόνου δράσης του Cr[VI] δεν είναι πλήρως γνωστός. Παρ' όλα αυτά, η τοξική του δράση είναι συνδεδεμένη με βλάβες στο γενετικό υλικό των κυττάρων, οι οποίες συμβαίνουν λόγω της παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την αναγωγή του Cr[VI] σε Cr[III], για παράδειγμα ριζών υδροξυλίου (OH•). Το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> αποτελεί, σε μικρές συγκεντρώσεις, φυσικό συστατικό του κυτταροπλάσματος και παρουσία Cr[III], Cr[V] και Cr[IV] δημιουργεί υδροξυλικές ρίζες με αντιδράσεις τύπου Fenton:



Δομικές βλάβες που προκαλούνται στο DNA από το Cr[VI] περιλαμβάνουν ρήξη των νουκλεοτιδικών αλυσίδων, μοριακές συνδέσεις DNA-πρωτεϊνών, ενώσεις DNA-DNA μεταξύ των αλυσίδων, σχηματισμό συμπλόκων DNA-χρωμίου και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Λειτουργικές βλάβες αφορούν την παρεμπόδιση της δράσης της DNA και της RNA πολυμεράσης, μεταλλάξεις και μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση. Κατά συνέπεια, ο



πολλαπλασιασμός και η μεταγραφή του DNA διαταράσσεται. Η σχάση της δίκλωνης αλυσίδας του DNA θεωρείται υπεύθυνη για κυτταρογενετικές μεταβολές που προκύπτουν παρουσία Cr[VI], οι οποίες έχουν επιβεβαιωθεί in vivo και in vitro. (27), (11), (10)

## 1.6. Εκπομπές & Νομοθεσία

### 1.6.1. Εκπομπές χρωμίου στην Ευρωπαϊκή Ένωση

Σε έκθεση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τις εκπομπές ρυπαντών στην Ευρώπη παρουσιάζονται στοιχεία που αφορούν τις εκπομπές χρωμίου στον αέρα και στα ύδατα, ανά χώρα (για τις 10 χώρες που αποτελούν τους μεγαλύτερους ρυπαντές) και ανά βιομηχανική δραστηριότητα.

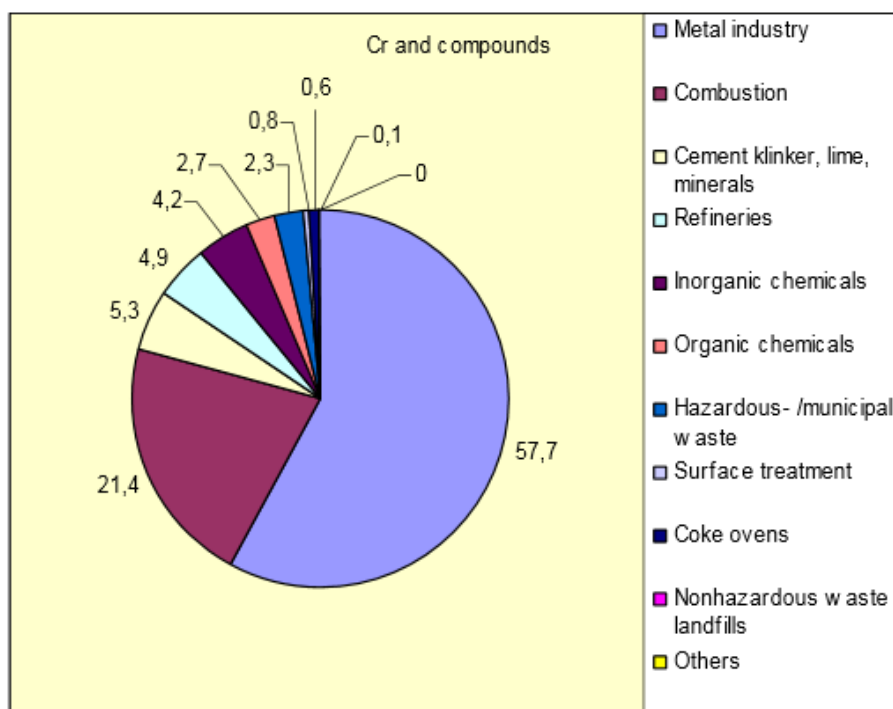
Χώρα	Ποσοστό εκπομπών Cr και ενώσεων Cr στον αέρα (%)	Χώρα	Ποσοστό εκπομπών Cr και ενώσεων Cr στα ύδατα (%)
Ισπανία	36	Ιταλία	46.9
Γερμανία	11.5	Ηνωμένο Βασίλειο	40.0
Ιταλία	9.9	Γαλλία	7.2
Ηνωμένο Βασίλειο	9.8	Ισπανία	2.0
Βέλγιο	7.1	Γερμανία	1.9
Γαλλία	7.0	Ουγγαρία	1.4
Φινλανδία	5.3	Βέλγιο	0.4
Πορτογαλία	4.9	Πορτογαλία	0.1
Ελλάδα	2.7	Αυστρία	0.1
Σουηδία	2.5	Ελλάδα	0
Σύνολο	96.7	Σύνολο	100.0
<b>Συνολικές εκπομπές (τόνοι)</b>	<b>223</b>	<b>Συνολικές εκπομπές (τόνοι)</b>	<b>252</b>

Πίνακας 1.8. Ποσοστά εκπομπών από χώρες της Ε.Ε. στην ατμόσφαιρα και στα ύδατα (32)

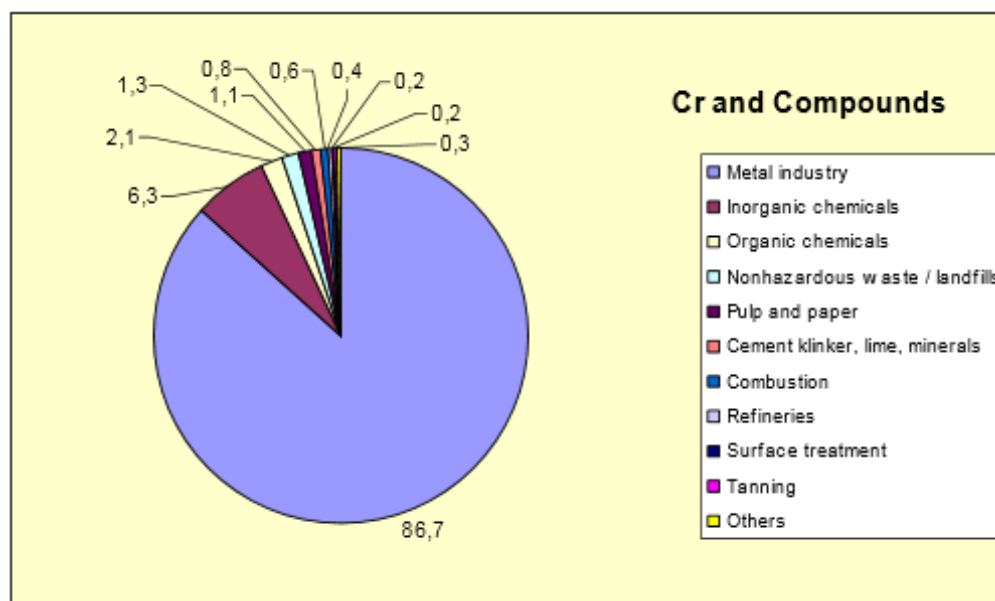
Δραστηριότητα	Ποσοστό εκπομπών Cr και ενώσεών Cr στον αέρα (%)	Δραστηριότητα	Ποσοστό εκπομπών Cr και ενώσεών Cr στα ύδατα (%)
Μεταλλουργία	57.7	Βυρσοδεψία	72.4
Καύση	21.4	Ακίνδυνα Απόβλητα/ ΧΥΤΑ	12.3
Χαλυβουργία	5.3	Μεταλλουργία	6.7
Διυλιστήρια	4.9	Οργανικά Χημικά	3.7
Ανόργανα Χημικά	4.2	Επικίνδυνα/ Αστικά Απόβλητα	2.6
Οργανικά Χημικά	2.7	Κλωστοϋφαντουργία	0.5
Επικίνδυνα/ Αστικά Απόβλητα	2.3	Επιμετάλλωση	0.4
Επιμεταλλώσεις	0.8	Βιομηχανία Χαρτοπολτού/ Χαρτιού	0.4
Κάμινοι κωκ	0.6	Σφαγεία/ Γαλακτοκομεία	0.4
Βιομηχανία Χαρτοπολτού/ Χαρτιού	0.1	Φαρμακευτικά	0.4
Σύνολο	100.0	Σύνολο	99.9
<b>Συνολικές εκπομπές (τόνοι)</b>	<b>223</b>	<b>Συνολικές εκπομπές (τόνοι)</b>	<b>252</b>

Πίνακας 1.9. Εκπομπές χρωμίου ανά βιομηχανία στην Ε.Ε. προς την ατμόσφαιρα και τα ύδατα  
(32)

Τα στοιχεία συνοψίζονται και στα παρακάτω διαγράμματα (εικόνες 1.14, 1.15). Για τις χώρες που είναι από τις πρώτες σε ατμοσφαιρική ρύπανση και ρύπανση των υδάτων, οι υψηλότερες εκπομπές προέρχονται από βιομηχανίες ανοξείδωτου χάλυβα (Ισπανία) και παραγωγής αλουμινίου (Γαλλία), αντίστοιχα. (32), (33)



Εικόνα 1.14. Διάγραμμα συνεισφοράς των βιομηχανιών στις εκπομπές χρωμίου από την Ε.Ε., στην ατμόσφαιρα. (32)



Εικόνα 1.15. Διάγραμμα συνεισφοράς των βιομηχανιών στις εκπομπές χρωμίου από την Ε.Ε., στα ύδατα. (32)

## 1.6.2. Νομοθεσία

### Πόσιμο νερό

Σύμφωνα με την Κοινή Υπουργική Απόφαση (Υγειονομική Διάταξη) αρ. Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ 892/11.7.2001 τ. Β΄) περί: «Ποιότητας του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης», όπως αυτή

τροποποιήθηκε με την όμοια αρ. ΔΥΓ<sub>2</sub>/Γ.Π.οικ 38295/2007 (ΦΕΚ 630/26.4.2007 τ. Β') και η οποία εκδόθηκε σε συμμόρφωση προς την Οδηγία 98/83 ΕΚ του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης της 3<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 1998, προκύπτει ότι η ανώτατη επιτρεπόμενη τιμή Cr (χρωμίου) στο πόσιμο νερό και γενικότερα στο νερό για ανθρώπινη κατανάλωση, εξαιρουμένων των φυσικών μεταλλικών νερών και των θεραπευτικών νερών, ανέρχεται σε 50 µg/l. (34), (35) Στα 50 µg/l ορίζει τη μέγιστη τιμή ολικού χρωμίου στο πόσιμο νερό και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), σύμφωνα με την οδηγία WHO/SDE/WSH/03.04/4. (36) Στις ΗΠΑ, η EPA (Environmental Protection Agency) έχει θεσπίσει ως ανώτατο όριο ολικού χρωμίου στο πόσιμο νερό τα 100 µg/l. Τον Ιούλιο του 2014 θεσπίστηκε από την Πολιτεία της Καλιφόρνια για πρώτη φορά όριο για το εξασθενές χρώμιο στο πόσιμο νερό. Το όριο αυτό ανέρχεται στα 10 µg/l. (37)

### Έδαφος

Όρια για το έδαφος δεν έχουν θεσπιστεί ακόμα ούτε στην Ευρώπη, ούτε στην Αμερική.

### Βιομηχανικά απόβλητα

Σύμφωνα με την Κοινή Υπουργική Απόφαση 4859/726 (ΦΕΚ 253 Β' 01, 9 Μαρτίου 2001), περί: «Μέτρων και περιορισμών για την προστασία του υδατικού περιβάλλοντος από απορρίψεις και ειδικότερα καθορισμού οριακών τιμών ορισμένων επικίνδυνων ουσιών που υπάγονται στον Κατάλογο II της Οδηγίας 76/464/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 4<sup>ης</sup> Μαΐου 1976», προκύπτουν οι οριακές τιμές των προτύπων αποβολής του χρωμίου από βιομηχανικές εγκαταστάσεις με πεδίο εφαρμογής εσωτερικά επιφανειακά νερά και τα εσωτερικά παράκτια νερά.

	Τύπος μέσης τιμής	Συγκέντρωση (mg/L)	Πρέπει να τηρούνται από την
<b>Λίμνες</b>	Μήνας	0,6	01.01.2004
	Ημέρα	1,2	01.01.2004
<b>Ποτάμια</b>	Μήνας	1,0	01.01.2004
	Ημέρα	2,0	01.01.2004
<b>Παράκτια</b>	Μήνας	1,5	01.01.2004
<b>Ύδατα</b>	Ημέρα	3,0	01.01.2004

*Πίνακας 1.10. Οριακές τιμές των προτύπων αποβολής του χρωμίου*

### Περίπτωση του ποταμού Ασωπού

Η ρύπανση του ποταμού Ασωπού ξεκίνησε τη δεκαετία του '70, με την εγκατάσταση βιομηχανιών στην περιοχή των Οινοφύτων και τη ρίψη των αποβλήτων τους, που επετράπη με Διοργανιστική Απόφαση, στα ύδατα του ποταμού. Στις επόμενες δεκαετίες η ρύπανση προχώρησε τόσο ώστε να εμφανιστούν νεκρά ψάρια και υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου στο πόσιμο νερό, ωστόσο δεν λήφθηκε κάποια επίσημη απόφαση μέχρι το 2010.

Στις 31 Μαΐου 2010 εκδόθηκε Κοινή Υπουργική Απόφαση για την προστασία και αποκατάσταση του Ασωπού ποταμού. Συγκεκριμένα, η Κοινή Υπουργική Απόφαση 20488 (ΦΕΚ 749 Β' 01, 31 Μαΐου 2010), όπως έχει τροποποιηθεί με την με αριθμό 100079/2015 όμοιά της, (ΦΕΚ 135/Β/22.1.2105), για τον: «Καθορισμό Ποιοτικών Περιβαλλοντικών Προτύπων στον ποταμό Ασωπό και Οριακών Τιμών εκπομπών υγρών βιομηχανικών αποβλήτων στη λεκάνη απορροής του Ασωπού», είχε ως στόχο την προστασία, αναβάθμιση και αποκατάσταση της καλής κατάστασης, οικολογικής και χημικής, των υδάτων του ποταμού Ασωπού, των παραποτάμων του και των ρευμάτων που βρίσκονται στην υδρογεωλογική λεκάνη του Ασωπού ποταμού, ώστε η ποιότητα των υδάτων να είναι κατάλληλη για κάθε χρήση πλην της παραγωγής νερού για πόση και κολύμβηση. Με τη συγκεκριμένη ΚΥΑ θεσπίστηκαν Οριακές Τιμές Εκπομπών για τις ουσίες προτεραιότητας και ορισμένους άλλους ρύπους, καθώς και λοιπές ουσίες και φυσικοχημικές παραμέτρους που αφορούν στα υγρά απόβλητα που προέρχονται από βιομηχανίες και λοιπές δραστηριότητες που αναπτύσσονται εντός της λεκάνης απορροής του ποταμού Ασωπού. Τα Ποιοτικά Περιβαλλοντικά Πρότυπα (ΠΠΠ) και οι Οριακές Τιμές Εκπομπής για το χρώμιο παρουσιάζονται παρακάτω (38) :

Ουσία	Μονάδες	ΠΠΠ-Μέση ετήσια συγκέντρωση	ΠΠΠ-Μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση
<b>Χρώμιο VI</b>	μg/L	3	11
<b>Χρώμιο ολικό</b>	μg/L	23 (<40 mgCaCO <sub>3</sub> /L) 42 (40-50 mgCaCO <sub>3</sub> /L) 50 (>50 mgCaCO <sub>3</sub> /L)	110

Πίνακας 1.11. Ποιοτικά Περιβαλλοντικά Πρότυπα (ΠΠΠ) για το χρώμιο.

Ουσία	Μονάδες	Οριακές Τιμές Εκπομπών
<b>Χρώμιο VI</b>	μg/L	30
<b>Χρώμιο ολικό</b>	μg/L	200

Πίνακας 1.12. Οριακές Τιμές Εκπομπών για το χρώμιο.

#### Εργασιακοί χώροι και καταναλωτικά προϊόντα

Ο OSHA (Occupational Safety & Health Administration) ορίζει το ανώτατο επιτρεπτό όριο έκθεσης (PEL) των εργαζομένων στο εξασθενές χρώμιο εντός εργασιακών χώρων στα 5 μg/m<sup>3</sup> αέρα για μέση σταθμισμένη 8ωρη εργασία. Το επίπεδο δράσης ορίζεται στα 2,5 μg/m<sup>3</sup> αέρα για μέση σταθμισμένη 8ωρη εργασία. Από τον οργανισμό καθορίστηκε και η περιοδικότητα ελέγχων με σκοπό τον επανέλεγχο της αρχικής έκθεσης των εργαζομένων, κάθε έξι μήνες αν η έκθεση βρίσκεται στο ή άνω του επιπέδου δράσης, και κάθε τρεις μήνες αν η έκθεση βρίσκεται άνω του PEL. Ακόμη, ορίζεται απαίτηση για προμήθεια κατάλληλης προσωπικής ένδυση και εξοπλισμού για αποφυγή δερματικής ή αναπνευστικής έκθεσης σε εξασθενές χρώμιο. Τέλος, ο οργανισμός προβλέπει περιοδικές ιατρικές εξετάσεις στους εργαζομένους. (39)

Σύμφωνα με την Οδηγία 2002/05/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου της 27<sup>ης</sup> Ιανουαρίου 2003 σχετικά με τον περιορισμό της χρήσης ορισμένων επικίνδυνων ουσιών σε είδη ηλεκτρικού και ηλεκτρονικού εξοπλισμού, τα Κράτη Μέλη εξασφαλίζουν ότι, από την 1<sup>η</sup>

Ιουλίου 2006, ο νέος ηλεκτρικός και ηλεκτρονικός εξοπλισμός που διατίθεται στην αγορά δεν περιέχει μόλυβδο, υδράργυρο, κάδμιο, εξασθενές χρώμιο, πολυβρωμοδιφαινύλια (PBV) ή πολυβρωμοδιφαινυλαιθέρες (PBDE). Εφαρμογή του εξασθενούς χρωμίου που εξαιρείται από τις απαιτήσεις του σχετικού άρθρου είναι η χρήση του ως αντιδιαβρωτικό ψυκτικού συστήματος από ανθρακούχο χάλυβα στα ψυγεία απορρόφησης. Το ελληνικό κράτος συμμορφώθηκε στην ανώτερη Οδηγία με το Προεδρικό Διάταγμα 117/2004 (ΦΕΚ 82/τ. Α'/05.03.2004), το οποίο τροποποιήθηκε με το ΠΔ 15/2006 (ΦΕΚ 12/τ. Α'/03.02.2004). Σύμφωνα με την Οδηγία 2011/65/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 8<sup>ης</sup> Ιουνίου 2011 η απαγόρευση των παραπάνω ουσιών επεκτείνεται σε ένα πολύ ευρύτερο φάσμα προϊόντων. Η μέγιστη ανεκτή συγκέντρωση εξασθενούς χρωμίου σε οικιακές συσκευές, είδη φωτισμού, παιχνίδια και άλλα προϊόντα τίθεται στο 0.1% κατά βάρος ομοιογενούς υλικού. (40), (41)

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup> : Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του Cr

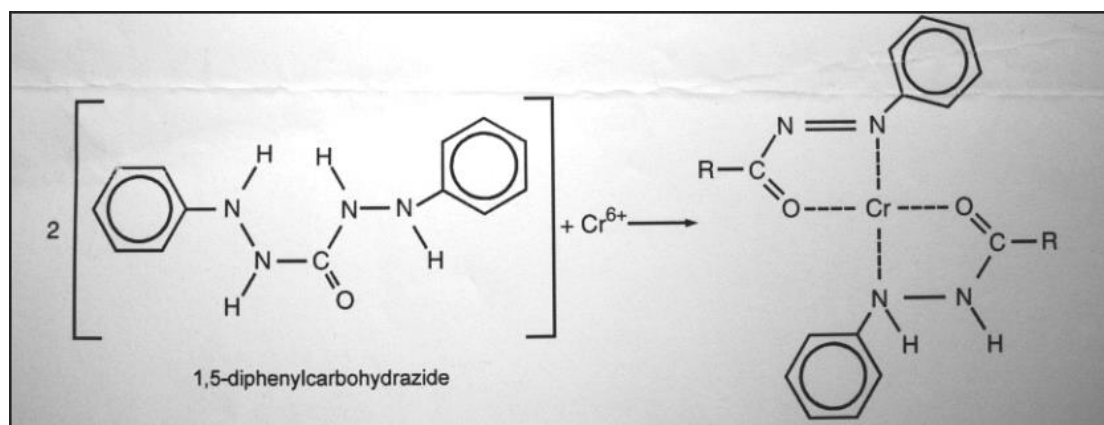
Παρακάτω παρατίθενται οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού του ολικού και εξασθενούς χρωμίου σε νερά, υδατικά απόβλητα και άλλες υδατικές μάζες.

#### ➤ Χρωματομετρική μέθοδος

Η χρωματομετρία είναι χρήσιμη για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εξασθενούς χρωμίου, Cr(VI), σε φυσικά ή επεξεργασμένα νερά σε εύρος συγκέντρωσης 100-1000 µg/L. Ορίζεται ως πρότυπη μέθοδος από το "Standard Methods", 3500-Cr B.

Το εξασθενές χρώμιο προσδιορίζεται χρωματομετρικά με αντίδραση με diphenylcarbazide σε όξινες συνθήκες. Παράγεται ένα βιολετί σύμπλοκο, του οποίου η απορρόφηση μετράται με φασματοφωτόμετρο στα 540 nm. Για τον προσδιορισμό του ολικού χρωμίου, το χρώμιο οξειδώνεται προς εξασθενές, μέσω χώνευσης με μίγμα θειϊκού-νιτρικού οξέος και οξείδωση με υπερμαγγανικό κάλιο, πριν αντιδράσει με το diphenylcarbazide. Πριν τη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος απαιτείται ρύθμιση pH σε όξινες συνθήκες με χρήση H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ή H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και προσαρμογή pH=1±0,3, ώστε να προκύψει το βιολετί χρώμα. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως βέλτιστο εύρος pH για την ανάπτυξη του χρώματος είναι 1,6-2,2.

Παρεμβολές στη μέθοδο μπορούν να προκύψουν παρουσία μολυβδενίου και υδραργύρου για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 200 mg Mo ή Hg/L. Παρεμβολές προκύπτουν και για συγκεντρώσεις βαναδίου κατά 10 φορές μεγαλύτερες από του χρωμίου, ενώ και τα ιόντα τρισθενούς σιδήρου για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 1 mg/L προσδίδουν κίτρινο χρώμα στο δείγμα. (42)



Εικόνα 2.1. Χημική ένωση εξασθενούς χρωμίου με diphenylcarbazide.

Η χρήση της χρωματομετρίας με 1,5-diphenylcarbazide για ποσοτικό προσδιορισμό του Cr[VI], προβλέπεται και από το διεθνές πρότυπο ISO 11083:1994, με δυνατότητα προσδιορισμού 0,05-3 mg Cr[VI]/L.

#### ➤ Ιοντική χρωματογραφία (IC)

Η μέθοδος της ιοντικής χρωματογραφίας με φωτομετρική ανίχνευση, 3500-Cr C-“Standard Methods”, είναι κατάλληλη για προσδιορισμό του διαλυμένου εξασθενούς χρωμίου σε πόσιμο νερό, υπόγεια νερά και βιομηχανικά υγρά απόβλητα.

Το υδατικό διάλυμα διηθείται και το pH του ρυθμίζεται σε τιμές 9-9,5 με ρυθμιστικό διάλυμα. Στο pH αυτό μειώνεται η διαλυτότητα του τρισθενούς χρωμίου. Το δείγμα εισάγεται στα υγρά έκλυσης θειούχου αμμωνίου και υδροξειδίου του αμμωνίου. Το τρισθενές χρώμο του διαλύματος διαχωρίζεται από το εξασθενές στη στήλη. Μετά το διαχωρισμό, το εξασθενές χρώμο αντιδρά με αζίδιο που του προσδίδει χρώμα και πραγματοποιείται μέτρηση στα 530 nm. Το εξασθενές χρώμο ταυτοποιείται βάσει του χρόνου ανάσχεσης.

Το ελάχιστο όριο ανίχνευσης για πόσιμο νερό, υπόγειο νερό, πρωτογενή ρεύματα εκροής υδατικών αποβλήτων και απόβλητα ηλεκτρολυτικών επιμεταλλώσεων είναι 0,3 µg/L. (42)

#### ➤ Φασματομετρία Ατομικής Απορρόφησης (AAS)

Το ολικό χρώμο μπορεί να προσδιοριστεί με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης είτε με τεχνική ατομοποίησης με φλόγα (FAAS) (3111 B και C-“Standard Methods”), είτε με τεχνική ηλεκτροθερμικής ατομοποίησης (ETAAS) (3113 B-“Standard Methods”).

Στη φασματομετρία ατομικής απορρόφησης φλόγας, το δείγμα εισάγεται στη φλόγα και ατομοποιείται. Η εκπεμπόμενη από την πηγή ακτινοβολία (λυχνία κοίλης καθόδου) σχάζεται από περιστρεφόμενο κατοπτρικό τεμαχιστή, ώστε να διακρίνεται από τη συνεχή εκπεμπόμενη ακτινοβολία της φλόγας. Στη οργανολογία ακολουθεί μονοχρωμάτορας και ανιχνευτής που μετρά την ποσότητα της ακτινοβολίας που απορροφήθηκε από άτομα του στοιχείου στη φλόγα. Επειδή κάθε στοιχείο έχει το δικό του χαρακτηριστικό μήκος κύματος, ξεχωριστή πηγή ακτινοβολίας απαιτείται για κάθε μετρούμενο μεταλλικό στοιχείο. Χρησιμοποιώντας τη

φασματομετρία ατομικής απορρόφησης φλόγας ο προσδιορισμός χρωμίου μπορεί να γίνει είτε με άμεση αναρρόφηση σε φλόγα αέρα-ακετυλενίου, είτε με μέθοδο που συνδυάζει αποσιδήρωση μεδιθειοκαρβαμιδικής πυρρολιδίνης αμμωνίου (APDC), απομάκρυνση μετάλλου σε μεθυλο-ισοβουτυλο-κετόνη (MIBK) ακολουθούμενες από αναρρόφηση σε φλόγα αέρα ακετυλενίου. Στη δεύτερη περίπτωση, μπορεί να γίνει προσδιορισμός χαμηλών συγκεντρώσεων εξασθενούς χρωμίου, καθώς το MIBK απομακρύνει μόνο το εξασθενές χρώμιο, το οποίο συγκρατείται στην οργανική φάση που τελικά διασπείρεται μέσα στη φλόγα. Ωστόσο, για τον προσδιορισμό του ολικού χρωμίου, το τρισθενές μπορεί να οξειδωθεί προς εξασθενές με υπερμαγγανικό κάλιο και να μετρηθεί έπειτα σε αυτή την οξειδωτική κατάσταση.

Η ηλεκτροθερμική φασματομετρία ατομικής απορρόφησης βασίζεται στις ίδιες αρχές με την FAAS, με τη διαφορά ότι ένας ηλεκτρικά θερμαινόμενος ατομοποιητής ή φούρνος γραφίτη αντικαθιστά την κεφαλή του καυστήρα. Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να προσδιοριστούν συγκεντρώσεις ολικού χρωμίου μικρότερες από 50 µg/L σε νερά και υδατικά απόβλητα. (42)

Η χρήση της φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης, AAS, για ποσοτικό προσδιορισμό του ολικού χρωμίου, προβλέπεται και από το διεθνές πρότυπο ISO 9174:1998, με δυνατότητα προσδιορισμού 0,5-20 mg Cr/L με την FAAS και 5-100 µg/L με την EAAS.

➤ Φασματομετρία επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος

Στα πρότυπα του “Standard Methods” περιγράφεται η χρήση τόσο φασματομετρίας ατομικής εκπομπής (3120), όσο και φασματομετρίας μάζας (3125) με πηγή επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, για τον προσδιορισμό ολικού χρωμίου συγκεντρώσεων της τάξης των mg/L. (42)

Οι μέθοδοι αυτοί προτείνονται και από την EPA (Environmental Protection Agency), όπως φαίνονται στον Πίνακα 2.1.

Χημικό είδος	No. αναλυτικής μεθόδου	Χρήση	Οργανολογία	Όριο ανίχνευσης	Μονάδες
Cr ολικό	EPA 200.7	Προσδιορισμός διαλυμένων στοιχείων σε υπόγεια νερά και πόσιμο νερό. Προσδιορισμός συνολικών συγκεντρώσεων ανακλήσιμων στοιχείων σε υγρά απόβλητα, ιλύ και στερεά δείγματα.	Φασματομετρία ατομικής εκπομπής με πηγή επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, ICP-AES	4,0	µg/L
Cr ολικό	EPA 200.8	Προσδιορισμός διαλυμένων στοιχείων σε υπόγεια, επιφανειακά νερά και πόσιμο νερό. Προσδιορισμός συνολικών συγκεντρώσεων ανακλήσιμων στοιχείων σε υγρά απόβλητα, ιλύ και στερεά δείγματα.	Φασματομετρία μάζας με πηγή επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος, ICP-MS	0,9	µg/L
Cr[VI]	EPA 218.6	Προσδιορισμός Cr[VI] σε πόσιμο	Ιοντική	0,2	µg/L



		νερό με IC-PDC			χρωματογραφία για την αγωγιμομετρική ανίχνευση διαχωρισθέντων ιόντων (post-column derivatization), IC-PDC
Cr ολικό	EPA 6010B	Ανάλυση ιχνών στοιχείων σε υδάτινες μήτρες	ICP-AES	4,7	μg/L
Cr ολικό	EPA 6020	Ανάλυση στοιχείων σε υδάτινες μήτρες	ICP-MS	0,02	μg/L
Cr[VI]	EPA 7196A water	Προσδιορισμός συγκέντρωσης διαλυμένου Cr[VI] σε εκχυλίσματα και υπόγεια νερά. Προσδιορισμός σε οικιακά και βιομηχανικά απόβλητα απουσίας παρεμποδιστικών ουσιών.	Φασματοφωτόμετρο	50	μg/L

Πίνακας 2.1. Προτεινόμενες από την EPA αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού χρωμίου.

## ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup> : Τεχνολογίες επεξεργασίας Cr[VI] σε υγρά απόβλητα

Η κατανόηση τόσο των βιογεωχημικών ιδιοτήτων του χρωμίου όσο και του μέσου που έχει υποστεί τη ρύπανση είναι σημαντική για την επιτυχία της εξυγίανσης. Η μέγιστη απομάκρυνση του Cr[VI] μπορεί να επιτευχθεί όταν μελετηθεί η συμπεριφορά του στο ρυπασμένο περιβάλλον, ώστε να γίνει η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής. Οι περισσότερες τεχνολογίες επεξεργασίας απαιτούν γνώση των ειδικών συνθηκών της ρυπασμένης περιοχής και ευελιξία στο σχεδιασμό τους. Οι τεχνολογίες επεξεργασίας διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τις τεχνολογίες μείωσης τοξικότητας, τις τεχνολογίες απομάκρυνσης και τις τεχνολογίες περιορισμού. Μπορούν επίσης να διακριθούν σε συμβατικές και βιολογικές τεχνολογίες, οι οποίες στην παρούσα εργασία αναλύονται ξεχωριστά καθώς γίνεται εστίαση στις βιολογικές μεθόδους.

### 2.1. Συμβατικές τεχνολογίες επεξεργασίας Cr[VI]

#### 2.1.1. Τεχνολογίες μείωσης τοξικότητας Cr[VI]

Οι τεχνολογίες μείωσης τοξικότητας στοχεύουν στην αναγωγή του Cr[VI] στο μη τοξικό Cr[III], καθιστώντας το χρώμιο μη βιοδιαθέσιμο και αβλαβές για τον οργανισμό. Αυτό επιτυγχάνεται με τον έλεγχο των περιβαλλοντικών συνθηκών ώστε να ενεργοποιηθούν συγκεκριμένες βιολογικές και γεωχημικές διεργασίες. Η αναγωγή μπορεί επιπλέον να πραγματοποιηθεί με χρήση χημικών, όπως σιδηρούχων ενώσεων.

i. Χημική αναγωγή

Αναφέρεται στην in-situ ή ex-situ αβιοτική αναγωγή με κάποιο δότη ηλεκτρονίων, όπως S, Fe[II] και Fe[0]. Το Cr[VI] ανάγεται σε Cr[III], το οποίο και καταβυθίζεται. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται μείωση της τοξικότητας του χρωμίου, αλλά και ταυτόχρονη απομάκρυνση του μετάλλου λόγω καταβύθισης. Η χημική αναγωγή προκύπτει και με φυσικό τρόπο στο περιβάλλον μέσω των στερεών οξειδίων και του οργανικού υλικού που υπάρχει σε αυτό.

Η τεχνητή χημική αναγωγή γίνεται με προσθήκη κάποιου δότη ηλεκτρονίων: H<sub>2</sub>S, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, NaHSO<sub>3</sub>, CaHSO<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CaS<sub>5</sub>, Fe[II], Fe[0] και SnCl<sub>2</sub>. Το pH ρυθμίζεται ώστε να βελτιστοποιηθούν οι αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής επιφάνειας μεταξύ των ιόντων Cr[VI] και των δοτών e<sup>-</sup>. Για υψηλές συγκεντρώσεις Cr[VI], όπως συμβαίνει στα βιομηχανικά απόβλητα, το pH αυξάνεται ώστε το Cr[III] να σχηματίσει ιζήματα OH<sup>-</sup> ή S<sup>2-</sup> και να καταβυθιστεί. Σημειώνεται πως τα μεταλλικά σουλφίδια είναι πολύ λιγότερο διαλυτά από τα μεταλλικά υδροξείδια.

Μελέτες έχουν δείξει ότι ο μερικώς οξειδωμένος σίδηρος επιτυγχάνει καλύτερα αποτελέσματα από το ανοξείδωτο Fe[0]. Ακόμη, η επιφάνεια του σιδήρου επιδρά σημαντικά στην αναγωγή, καθώς όταν ο σίδηρος βρίσκεται σε μορφή νανοσωματιδίων η κινητική της αναγωγής είναι έως και 21 φορές ταχύτερη. Τέλος, χρήση του διθειονώδους νατρίου, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, απευθείας στον υδροφόρο ορίζοντα μείωσε τη συγκέντρωση CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> από 900 μg/L σε 8 μg/L.

Η in-situ χημική αναγωγή του Cr[VI] εξαρτάται άμεσα από τις επικρατούσες φυσικοχημικές συνθήκες της περιοχής, όπως pH, συγκεντρώσεις άλλων μετάλλων, είδη πετρωμάτων, βάθος υδάτων, αλκαλικότητα κλπ. Το κύριο μειονέκτημα της χημικής αναγωγής είναι η παραγωγή ιλύος μεγάλων συγκεντρώσεων χρωμίου, οπότε το πρόβλημα μετατίθεται στην επεξεργασία του στερεού υπολείμματος. (43)

ii. Βιολογική αναγωγή

Οι μέθοδοι βιολογικής αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου αναπτύσσονται στην ενότητα 2.2.

iii. Φυτοαποκατάσταση

Τα φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εξυγίανση περιοχών ρυπασμένων με χρώμιο, αν και η έρευνα της μεθόδου βρίσκεται σε πιλοτικό επίπεδο και δεν θεωρείται συμβατική. Η φυτοαποκατάσταση μπορεί να είναι ταυτόχρονα τεχνική αναγωγής και απομάκρυνσης χρωμίου. Τα φυτά συσσωρεύουν το χρώμιο μετατρέποντάς το στο λιγότερο ευκίνητο Cr[III] (φυτοσταθεροποίηση) και έτσι μειώνουν την τοξικότητά του. Αν τα φυτά θεριστούν μπορεί να απομονωθεί το χρώμιο που περιέχουν (φυτοεκχύλιση και ριζοδιήθηση).

Η πιο συνηθισμένη τεχνική είναι η φυτοσυσσώρευση, όπου το Cr από τα υπόγεια ύδατα μεταφέρεται στις ρίζες και τελικά στα υπέργεια μέρη του φυτού. Κάποια φυτά μπορούν να συσσωρεύσουν μεγάλες ποσότητες του μετάλλου· το φυτό *Leptospermum scorarium* περιέχει διαλυτό τρισθενές χρώμιο στον ιστό των φύλλων, στη μορφή (Cr(Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>)<sup>3-</sup>. Αν και διάφορα είδη γρασιδιού έχουν χρησιμοποιηθεί για φυτοσταθεροποίηση μετάλλων (Cu, Pb, Zn) κανένα δεν έχει εφαρμοστεί για χρώμιο. Συγκεκριμένα είδη υδρόβιων φυτών έχουν ανοχή στο χρώμιο: *Eichhornia crassipes*, *Herniaria hirsuta*, κουνουπίδι, λάχανο.

Οι μηχανισμοί πρόσληψης του χρωμίου από τα φυτά δεν είναι ακόμη ξεκάθαροι και απαιτείται αρκετή ακόμη έρευνα για την εφαρμογή αυτής της μεθόδου σε ρυπασμένες περιοχές.

### 2.1.2. Τεχνολογίες απομάκρυνσης Cr[VI]

Οι τεχνολογίες απομάκρυνσης οδηγούν στη μείωση του ολικού χρωμίου, και αφορούν κυρίως την επεξεργασία υγρών βιομηχανικών αποβλήτων υψηλής συγκέντρωσης Cr[VI].

#### i. Ιοντοεναλλαγή

Η ιοντοεναλλαγή αποτελεί φυσική διεργασία κατά την οποία ιόντα υψηλής συγγένειας με το υλικό εναλλαγής (ρητίνη) της στήλης ιοντοεναλλαγής αντικαθιστούν ιόντα χαμηλότερης συγγένειας που είναι ήδη συνδεδεμένα με τη ρητίνη. Καθώς το νερό ρέει διαμέσου της στήλης, τα διαλυμένα ιόντα χρωμίου συνδέονται με τη ρητίνη παίρνοντας τη θέση ιόντων, όπως τα  $\text{Cl}^-$  και  $\text{OH}^-$ , που ήταν προηγουμένως συνδεδεμένα στο υλικό εναλλαγής. Ως υλικά εναλλαγής χρησιμοποιούνται συνήθως τροποποιημένοι φυσικοί ζεόλιθοι ή συνθετικές ρητίνες με ισχυρά ή ασθενή ιόντα εναλλαγής. Οι ρητίνες αφού συσσωρεύσουν Cr στις περισσότερες ελεύθερες θέσεις εναλλαγής, χρειάζεται να αναγεννηθούν. Η αναγέννηση γίνεται συνήθως με χρήση NaOH και αλκαλικών διαλυμάτων.

Οι ρητίνες ιοντοεναλλαγής είναι ικανές να ανάγουν το Cr[VI] σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης. Τα υλικά εναλλαγής συνήθως λειτουργούν αποτελεσματικότερα σε χαμηλές τιμές pH, όπου το Cr[VI] βρίσκεται με τη μορφή ιόντων  $\text{HCrO}_4^-$  και  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$  και όχι  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Ο λόγος ιόντων προς θέσεις εναλλαγής είναι 1:1. Όταν χρωμικά ιόντα,  $\text{CrO}_4^{2-}$ , περιέχονται στο υδατικό διάλυμα, απαιτούνται δύο θέσεις εναλλαγής για κάθε ιόν χρωμίου. Η ανταγωνιστικότητα από άλλα ιόντα ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ) δεν αποτελεί περιορισμό στη μέθοδο, καθώς το χρώμιο εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγγένεια με τα πολυμερικά υλικά εναλλαγής.

Η ιοντοεναλλαγή εφαρμόζεται εμπορικά για την απομάκρυνση Cr από υδατικά απόβλητα και έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές τοποθεσίες με πρόβλημα ρύπανσης από χρώμιο.

#### ii. Προσρόφηση

Η προσρόφηση είναι η διεργασία κατά την οποία μόρια ρευστών συγκεντρώνονται στην επιφάνεια στερεών προσροφητικών υλικών (adsorbents). Τα μόρια της ρευστής φάσης προσροφώνται στους πόρους στερεών μέσων. Η προσρόφηση δεν πρέπει να συγχέεται με την απορρόφηση, που δε συγκεντρώνει μόρια μόνο στην επιφάνεια, αλλά σε ολόκληρη τη μάζα του σώματος. Ο μηχανισμός της προσρόφησης λειτουργεί όταν τα μόρια του διαλύματος βρεθούν πολύ κοντά στην επιφάνεια του προσροφητικού, οπότε δρουν οι ελκτικές δυνάμεις και τα μόρια συγκρατούνται στην επιφάνεια με φυσικούς και χημικούς δεσμούς. Για σταθερή θερμοκρασία η ποσότητα που προσροφάται ανά μονάδα βάρους στερεού είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης της ουσίας στο διάλυμα και η αντίστοιχη εξίσωση παριστά την «ισόθερμη προσρόφησης».

Η προσρόφηση προσφέρει πλεονεκτήματα κόστους, αποδοτικότητας και εύκολης λειτουργίας σε σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους (ιοντοεναλλαγή ή μεμβράνες διήθησης) και κρίνεται φιλική από οικονομικής και περιβαλλοντικής πλευράς.

Τα φυσικά και συνθετικά υλικά που χρησιμοποιούνται ως προσροφητικά μέσα για απομάκρυνση εξασθενούς χρωμίου είναι: ενεργός άνθρακας, βιολογικά υλικά, ζεόλιθοι, χιτοζάνη και βιομηχανικά απόβλητα.

- Ενεργός άνθρακας

Ο ενεργός άνθρακας (activated carbon) αποτελεί μια εφαρμοσμένη τεχνολογία απομάκρυνσης οργανικών από υγρά απόβλητα, ενώ μπορεί να απομακρύνει και βαρέα μέταλλα όπως το Cr. Ο ενεργός άνθρακας έχει υψηλή τιμή ειδικής επιφάνειας, 1000 m<sup>2</sup>/g, ανεπτυγμένη εσωτερική μικροσκοπική δομή και ευρύ φάσμα επιφανειακών λειτουργικών ομάδων, όπως καρβοξυλομάδες.

Η ενεργοποίηση του ενεργού άνθρακα συνήθως πραγματοποιείται με ατμό σε υψηλή θερμοκρασία (900-1100°C). Ο ατμός διαχέεται στη μάζα του άνθρακα και δημιουργεί πορώδη δομή με πολύ μεγάλο ανάπτυγμα εσωτερικής επιφάνειας. Ανάλογα με το μέγεθος και το σχήμα του ο ενεργός άνθρακας κατηγοριοποιείται σε: σκόνη ενεργού άνθρακα (PAC), κοκκώδη ενεργό άνθρακα (GAC), ινώδη ενεργό άνθρακα (ACF) και ύφασμα ενεργού άνθρακα (ACC). Λόγω της διαφορετικής πηγής πρώτης ύλης, της διαδικασίας ενεργοποίησης και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών, κάθε τύπος ενεργού άνθρακα διαθέτει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που καθορίζουν τις εφαρμογές του. Ως μέγιστες απομακρύνσεις χρωμίου για τους διαφορετικούς τύπους ενεργού άνθρακα έχουν καταγραφεί, PAC: 390mgCr[VI]/g σε pH=2, GAC: 53,19mgCr[VI]/g σε pH=2 και ACF: 40mgCr[VI]/g.

Το Cr[III] προσροφάται ελάχιστα στον ενεργό άνθρακα. Το Cr[VI] απομακρύνεται με δυο διαφορετικούς μηχανισμούς: ηλεκτροστατική προσρόφηση στην επιφάνεια του ενεργού άνθρακα και αναγωγή σε Cr[III]. Η προσρόφηση του Cr[VI] εξαρτάται ισχυρά από το pH, λόγω ηλεκτροστατικών επιφανειακών επιδράσεων. Για αυτό το λόγο δεν προτιμάται γενικά για απομάκρυνση χρωμίου, καθώς απαιτείται η προεπεξεργασία του αποβλήτου με χημικά για την πτώση του pH.

- Βιοπροσροφητικά υλικά

Η βιοπροσρόφηση είναι μία νέα διεργασία απομάκρυνσης ρυπαντών από υδατικά απόβλητα. Αναπτύσσονται μηχανισμοί όπως χημειορόφηση, συμπλοκοποίηση, προσρόφηση-συμπλοκοποίηση στην επιφάνεια και τους πόρους του υλικού, ιοντοεναλλαγή, καταβύθιση. Ως προσροφητικά υλικά χρησιμοποιούνται χαμηλού κόστους γεωργικά απόβλητα τα οποία επιτυχώς απομακρύνουν τα ιόντα χρωμίου από υγρά απόβλητα. Αυτό είναι και το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της βιοπροσρόφησης και συνοδεύεται από υψηλή αποδοτικότητα, ελαχιστοποίηση της χημικής ή βιολογικής αναγέννησης του μέσου και δυνατότητα ανάκτησης του μετάλλου. Συνήθως, ως πρώτες ύλες των βιοπροσροφητικών υλικών αξιοποιούνται φλοιοί φουντουκίων και αμυγδάλων, πευκοβελόνες, ελαιοπυρήνας, πριονίδι κ.α.

- Τροποποιημένα προσροφητικά μέσα

Συχνά τροποποιητικές τεχνικές χρησιμοποιούνται για να αυξήσουν την επιφάνεια προσρόφησης, την ικανότητα απομάκρυνσης και την εκλεκτικότητα των προσροφητικών μέσων. Η τροποποίηση του ενεργού άνθρακα μπορεί να αφορά χημικά, φυσικά και βιολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η τροποποίηση σχετίζεται με την ειδική επιφάνεια, την κατανομή μεγέθους πόρων, τον όγκο των πόρων και την παρουσία επιφανειακά λειτουργικών ομάδων. Καθώς η ικανότητα του ενεργού άνθρακα να απομακρύνει το εξασθενές χρώμιο αποδίδεται κυρίως στη συμπλοκοποίηση των μεταλλικών ιόντων με τις επιφανειακές λειτουργικές ομάδες, οι τροποποιητικές τεχνικές στοχεύουν σε αυτές τις ομάδες με όξινες, βασικές κατεργασίες και εμποτισμό ξένων υλικών. Ταυτόχρονα, και πολλά βιοπροσροφητικά μέσα υπόκεινται τροποποίηση, καθώς ενώ προσφέρουν το πλεονέκτημα του χαμηλού κόστους, συχνά οδηγούν σε υψηλές τιμές COD, BOD και TOC στα προς επεξεργασία νερά που εν συνεχεία έχουν αρνητικές συνέπειες για την υδρόβια ζωή.

- Βιομηχανικά απόβλητα ως προσροφητικά μέσα.

Συχνά, βιομηχανικά απόβλητα χρησιμοποιούνται ως προσροφητικά μέσα χαμηλού κόστους. Το υδροξείδιο του τρισθενούς σιδήρου είναι απόβλητο των βιομηχανικών λιπασμάτων και βασικό προσροφητικό μέσο για ρυπαντές όπως φωσφορικά, αρσενικά και χρωμικά ιόντα στα υδάτινα συστήματα. Έχει καταγραφεί η ικανότητά του να απομακρύνει κατά μέγιστο 0,47 mg Cr[VI]/g σε pH=5,6. Άλλα βιομηχανικά απόβλητα με ικανότητα προσρόφησης Cr[VI] είναι η σκωρία υψικαμίνων (παραπροϊόν χαλυβουργιών) και η ερυθρά ιλύς (παραπροϊόν βιομηχανιών αλούμινας). (43), (44), (45)

### iii. Μεμβράνες διήθησης

Ημιπερατές μεμβράνες χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στην επεξεργασία νερού προκειμένου να απομακρύνουν διαλυτά ιόντα από το υδάτινο μέσο, μεταξύ των οποίων και τα  $\text{HCrO}_4^-$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ . Η ροή του νερού διαμέσου της μεμβράνης είναι συνάρτηση της εφαρμοζόμενης πίεσης. Οι μεμβράνες κατηγοριοποιούνται με βάση το μέγεθος των πόρων τους σε μεμβράνες: μικροδιήθησης (μεγαλύτερο μέγεθος πόρων), υπερδιήθησης (ultrafiltration, UF), νανοδιήθησης (nanofiltration, NF) και αντίστροφης όσμωσης (reverse osmosis, RO) (μικρότερο μέγεθος πόρων).

Με χρήση της αντίστροφης όσμωσης επιτυγχάνεται η μέγιστη καθαρότητα του επεξεργασμένου διαλύματος, ωστόσο η απαίτηση υψηλών πιέσεων λειτουργίας την καθιστά αντικοινομική. Η τεχνολογία της νανοδιήθησης συγκεντρώνει ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Τα αποτελέσματα της απομάκρυνσης χρωμίου με χρήση μεμβρανών νανοδιήθησης είναι υποσχόμενα. Λόγω της επιφανειακής αρνητικής φόρτισής τους οι μεμβράνες αυτές απωθούν τα ιόντα χρωμίου. Η απομάκρυνση των ιόντων γίνεται αποτελεσματικότερη με αύξηση του pH. Τέλος, τα ιόντα του εξασθενούς χρωμίου λόγω των μικρών διαστάσεών τους δεν ενδείκνυται να απομακρυνθούν με μικροδιήθηση ή υπερδιήθηση, αν δεν πραγματοποιηθεί προηγουμένως επεξεργασία και συμπλοκοποίησή τους με άλλα μεγαλύτερα μόρια. (43)

iv. Ηλεκτροχημικές μέθοδοι

Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι επεξεργασίας αποτελούν εναλλακτικές τεχνολογίες διαχείρισης των υγρών αποβλήτων. Κυρίως, περιλαμβάνουν:

- Μεμβράνες ηλεκτροδιάλυσης.

Πρόκειται για τεχνολογία που χρησιμοποιείται στην απομάκρυνση Cr[VI] από υγρά απόβλητα. Είναι χημική διεργασία με κινητήρια δύναμη ένα ηλεκτρικό δυναμικό. Το υδατικό διάλυμα εκτίθεται σε ηλεκτρικό πεδίο και τα κατιόντα κινούνται προς την κάθοδο, ενώ τα ανιόντα προς την άνοδο. Μεταξύ των ηλεκτροδίων υπάρχουν μεμβράνες, μισές εκ των οποίων διαπερατές σε ανιόντα και οι λοιπές διαπερατές σε κατιόντα. Οι μεμβράνες αυτές δημιουργούν διαφορετικά διαμερίσματα με μεγαλύτερη και μικρότερη συγκέντρωση ιόντων. Οι κάθοδοι που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι είτε συμβατικές μεταλλικές κάθοδοι, είτε κάθοδοι μεγάλης επιφάνειας. Η απομάκρυνση των ιόντων χρωμίου αυξάνει, καθώς μειώνεται το pH. Ταυτόχρονα, όσο η πυκνότητα ρεύματος αυξάνει, τόσο μειώνεται ο χρόνος επεξεργασίας και οι συνολικές ενεργειακές ανάγκες.

- Ηλεκτροχημική καταβύθιση.

Με χρήση ηλεκτρικού δυναμικού μπορεί να τροποποιηθεί η συμβατική μέθοδος καταβύθισης. Η διεργασία πραγματοποιείται σε ηλεκτρολυτικό κελί με δύο πλάκες σιδήρου για άνοδο και κάθοδο. Έχουν επιτευχθεί απομακρύνσεις της τάξης του 82% Cr[VI] από υγρά απόβλητα αρχικής συγκέντρωσης 2100 mg/L. (44)

Τεχνολογία	Μέθοδος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Προσρόφηση	Ενεργός άνθρακας	Το πιο αποδοτικό προσροφητικό με υψηλή τιμή ειδικής επιφάνειας, υψηλή χωρητικότητα και ρυθμός προσρόφησης, γρήγορη κινητική	Υψηλό κόστος, η απόδοση εξαρτάται από το είδος του ενεργού άνθρακα, υψηλό κόστος αναγέννησης
	Χιτοζάνη	Χαμηλό κόστος προσροφητικού, περιβαλλοντικά φιλικό, υψηλή απόδοση και εκλεκτικότητα, άριστες ιδιότητες διάχυσης, εύκολη αναγέννηση	Μη πορώδες υλικό, οι ροφητικές ικανότητες εξαρτώνται από την προέλευση του υλικού, απόδοση εξαρτώμενη από το pH

	Βιοπροσροφητικά	Χαμηλό κόστος, ελάχιστη παραγωγή ιλύος, εύκολη αναγέννηση, δυνατότητα για ανάκτηση μετάλλου, μη απαίτηση για προσθήκη θρεπτικών	Απόδοση εξαρτώμενη έντονα από το pH, ευαισθησία στην παρουσία οργανικής ή ανόργανης ύλης, ανάγκη μεγάλης ποσότητα βιοπροσροφητικού
<b>Μεμβράνες</b>	Ανόργανες μεμβράνες	Χημική και θερμική σταθερότητα, μικρή απαίτηση χώρου	Υψηλό κόστος, μικρή επιφάνεια
	Πολυμερικές μεμβράνες	Μικρή απαίτηση χώρου	Χαμηλή χημική και θερμική σταθερότητα, φράξιμο μεμβράνης
	Υγρές μεμβράνες	Υψηλή εκλεκτικότητα και ρυθμός διάχυσης	Αστάθεια
	Γενικά	Μη παραγωγή ιλύος, μειωμένοι χρόνοι διεργασίας, χαμηλές ενεργειακές ανάγκες	Υψηλό κεφάλαιο επένδυσης, απαίτηση για ελεγχόμενη λειτουργία, ανάγκη για έλεγχο της τροφοδοτούμενης συγκέντρωσης
<b>Ιοντοεναλλαγή</b>		Ενεργειακή απόδοση	Απαίτηση παρακολούθησης συγκεντρώσεων διαλύματος, αύξηση απόδοσης με θέρμανση
<b>Ηλεκτροχημική κατεργασία</b>	Ηλεκτροχημική καταβύθιση	Μη απαίτηση για χημικά αντιδραστήρια, υψηλή εκλεκτικότητα, χαμηλό κόστος, δυνατότητα ανάκτησης μετάλλου	Παραγωγή ιλύος

Πίνακας 2.2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τεχνικών απομάκρυνσης Cr[VI]. (44)

### 2.1.3. Τεχνολογίες περιορισμού Cr[VI]

Οι τεχνολογίες περιορισμού εμποδίζουν την εξάπλωση της ρύπανσης σε περιοχές μεγαλύτερης έκτασης. Περιλαμβάνουν τεχνολογίες σταθεροποίησης ή στερεοποίησης, υαλοποίησης εδάφους, φραγμάτων. Αυτές οι τεχνικές στοχεύουν είτε στην απομόνωση των ρύπων, είτε στην ακινητοποίηση τους σε συγκεκριμένη περιοχή (*in situ*), ώστε να μην εξαπλώνονται σε περαιτέρω ζώνες του υδροφόρου ορίζοντα. Παθητική εξυγίανση μπορεί να συμβεί καθώς τα υπόγεια ύδατα διαφεύγουν από την ζώνη περιορισμού, όπως στην περίπτωση των διαπερατών αντιδρώντων φραγμάτων. Μέσα στη ζώνη περιορισμού δεν προβλέπεται κάποια προσπάθεια μείωσης του Cr[VI].

#### i. Τεχνολογία φραγμάτων

Φυσικά φράγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον περιορισμό και την «απομόνωση» ρύπων όπως το Cr[VI] κυρίως στα υπόγεια νερά. Είναι μία τεχνολογία *in situ*. Τα φυσικά φράγματα κατασκευάζονται από υλικά χαμηλής διαπερατότητας όπως τσιμεντολάσπη, ενέματα (πηλός ασβέστου ή τσιμέντου) και συνθετικά υλικά (π.χ. πολυαιθυλένιο). Ωστόσο, επειδή στην περίπτωση των φυσικών φραγμάτων πάντοτε υπάρχει ο κίνδυνος κάποιων διαρροών, χημικά τεχνητά φράγματα έχουν αναπτυχθεί ως εναλλακτικές λύσεις. Τα χημικά φράγματα είναι διαπερατά και επιτρέπουν τη ροή των υπόγειων νερών, περιορίζουν, όμως, την κινητικότητα του ρύπου. Κατασκευάζονται από Fe(O), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CaS, όποτε και δρουν ανάγοντας το Cr[VI] σε ακίνδυνο Cr[III]. Ακόμη, συχνά για την κατασκευή τους χρησιμοποιούνται ζεόλιθοι, πολυμερή ή GAC (κοκκώδης ενεργός άνθρακας) που έχουν προσροφητικές ιδιότητες. Οι τεχνολογίες φραγμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνο σε περιπτώσεις όπου το υπόγειο φορτίο παραμένει σταθερό, χωρίς εποχικές αυξομειώσεις στη ροή.

#### ii. Υαλοποίηση

Η υαλοποίηση είναι μέθοδος απευθείας εφαρμογής στο πεδίο ρύπανσης. Χρησιμοποιείται μία διάταξη ηλεκτροδίων στο έδαφος. Το ηλεκτρικό ρεύμα λιώνει και εγκλωβίζει τα μέταλλα σε ένα υαλώδες μίγμα. Η τεχνολογία αυτή εφαρμόζεται σε περιπτώσεις ρύπανσης που δε μπορούν να αντιμετωπιστούν διαφορετικά λόγω βάθους. Ωστόσο, το υψηλό κόστος εφαρμογής της την καθιστά μη συμφέρουσα τις περισσότερες φορές, ενώ επιπλέον μειονέκτημα αποτελεί και το εναπομείναν στερεοποιημένο υαλώδες υλικό.

#### iii. Στερεοποίηση/Σταθεροποίηση

Κατά τη στερεοποίηση το χρώμιο εγκλωβίζεται σε στερεό μίγμα με χρήση προσθέτων, όπως το τσιμέντο. η πάροδος του χρόνου, αλλά και η αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών, μπορούν να οδηγήσουν σε διαρροές χρωμίου στα υπόγεια ύδατα. Για το λόγο αυτό πριν τη στερεοποίηση, πραγματοποιείται αναγωγή σε Cr[III]. Η τεχνολογία αυτή εφαρμόζεται σε χαμηλού βάθους ρύπανση στο έδαφος με αρκετά υψηλό κόστος. (43)

### 2.1.4. Αξιολόγηση συμβατικών τεχνικών απομάκρυνσης Cr[VI]

Οι συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας εμφανίζουν περιορισμούς-μειονεκτήματα:

- Αντιοικονομικότητα των συμβατικών τεχνολογιών όταν οι συγκεντρώσεις χρωμίου στο προς επεξεργασία απόβλητο είναι χαμηλές (1-100 mg/l).
- Παραγωγή υλούς επιβεβαρημένης με συμπλοκοποιημένο χρώμιο από τη χημική καθίζηση.
- Υδατικά απόβλητα έκπλυσης στοιχείων ιοντοεναλλαγής επιβεβαρυμένα με χρώμιο.
- Απαιτήση προεπεξεργασίας για την εφαρμογή ιοντοεναλλαγής που ανεβάζει το κόστος.
- Υψηλό λειτουργικό κόστος μεμβρανών.



Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει στροφή στη μελέτη βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων που περιέχουν εξασθενές χρώμιο.

## 2.2. Βιολογικές τεχνολογίες επεξεργασίας Cr[VI]

Ο στόχος της βιολογικής επεξεργασίας υγρών αποβλήτων είναι να μετατρέψει διαλυμένα και σωματιδιακά συστατικά σε αποδεκτά τελικά προϊόντα, με χρήση αιρούμενης βιομάζας, προσκολλημένης βιομάζας ή συνδυασμού τους. Στην περίπτωση του εξασθενούς χρωμίου, απαιτείται η αναγωγή του από τους μικροοργανισμούς στη μη τοξική και σταθερή θερμοδυναμικά μορφή του, το Cr[III].

Η απομάκρυνση μετάλλων με βιολογική επεξεργασία γίνεται κυρίως με προσρόφηση και συμπλοκοποίηση των μετάλλων στους μικροοργανισμούς. Είναι πιθανό να υπάρχουν και μηχανισμοί που οδηγούν στο μετασχηματισμό και την κατακρήμνιση των μετάλλων. Οι μικροοργανισμοί συνδέονται με τα μέταλλα και τα προσροφούν στην κυτταρική τους επιφάνεια, ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα ιόντα των μετάλλων και στις αρνητικά φορτισμένες επιφάνειες των μικροβίων. Μέταλλα μπορούν επίσης να συμπλοκοποιηθούν με καρβοξυλικές ομάδες που βρίσκονται στους πολυσακχαρίτες και άλλα πολυμερή των μικροβίων ή να προσροφηθούν από πρωτεΐνες στα βιολογικά κύτταρα.

Η απομάκρυνση σημαντικής ποσότητας διαλυτών μετάλλων έχει παρατηρηθεί στις βιολογικές διεργασίες, με ποσοστά που ποικίλλουν από 50-98%, ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση των μετάλλων, τη συγκέντρωση των στερεών στο βιολογικό αντιδραστήρα και το χρόνο παραμονής του συστήματος. Σημαντική παράμετρος είναι η επιλογή της κατάλληλης βιομάζας, καθώς στην περίπτωση τοξικών ουσιών και βαρέων μετάλλων δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να επιβιώσουν και να επεξεργαστούν το ζητούμενο ρύπο.

Τόσο ευκαριωτικά όσο και προκαρυωτικά κύτταρα μπορούν να μεταφέρουν Cr[VI] διαμέσου της κυτταρικής τους μεμβράνης. Ανάμεσα στους μικροοργανισμούς που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως ικανοί να ανάγουν Cr[VI] είναι τα: *Escherichia coli* ATCC 33456, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas fluorescens* LB 300, *Pseudomonas anbigua* G-1, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Achromobacter*, *Desulfomamaculum*. Για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας είναι απαραίτητη η παρουσία θρεπτικών ουσιών (άζωτο, φώσφορος, θείο κλπ.) και η ρύθμιση του pH και της θερμοκρασίας σε κατάλληλες τιμές. Τα μικρόβια συχνά χρειάζονται μια περίοδο εγκλιματισμού στις συνθήκες τοξικού περιβάλλοντος, ώστε να αναπτύξουν ανθεκτικότητα. Η αναγωγή του Cr[VI] σε τέτοια συστήματα συνίσταται στην λήψη ηλεκτρονίων που απελευθερώνονται σε κάποιο στάδιο της διεργασίας από τους δότες e<sup>-</sup> του συστήματος.

Είναι χαρακτηριστικό ότι η ύπαρξη εξασθενούς χρωμίου στο περιβάλλον και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις σε ορισμένα συστήματα (βιομηχανικά απόβλητα, περιοχές κοντά σε βιομηχανίες χρωμίου), έχει καταστήσει διάφορους μικροοργανισμούς ικανούς να αναπτύσσονται παρουσία Cr[VI] και να το ανάγουν σε Cr[III]. Συχνά μάλιστα οι μικροοργανισμοί που δοκιμάζονται ερευνητικά για την ικανότητά τους να επεξεργάζονται Cr[VI] προέρχονται από δειγματοληψίες σε τέτοια συστήματα.

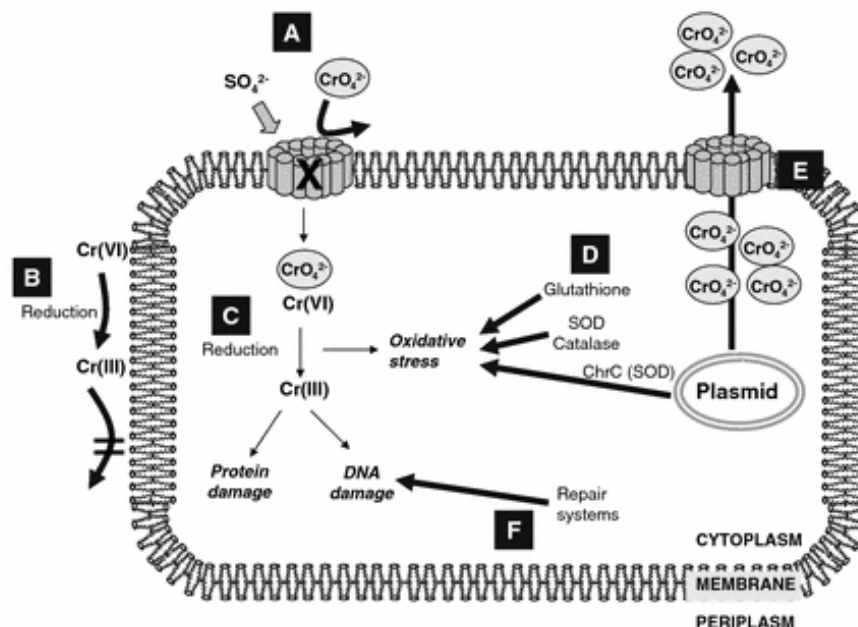
Η βιολογική απομάκρυνση μετάλλων από υγρά απόβλητα συγκεντρώνει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, καθώς προσφέρει τα πλεονεκτήματα χαμηλότερου κόστους, υψηλής απόδοσης και αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία. (43), (46), (47), (48)

### 2.2.1. Βιολογική αναγωγή

Η βιολογική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου μπορεί να πραγματοποιηθεί από αερόβια, αναερόβια και από προαιρετικά αναερόβια βακτήρια. Από μελέτες σε μικροοργανισμούς έχει καταγραφεί ότι η μικροβιακή απομάκρυνση του εξασθενούς χρωμίου από διαλύματα περιλαμβάνει τυπικά τα ακόλουθα στάδια (49):

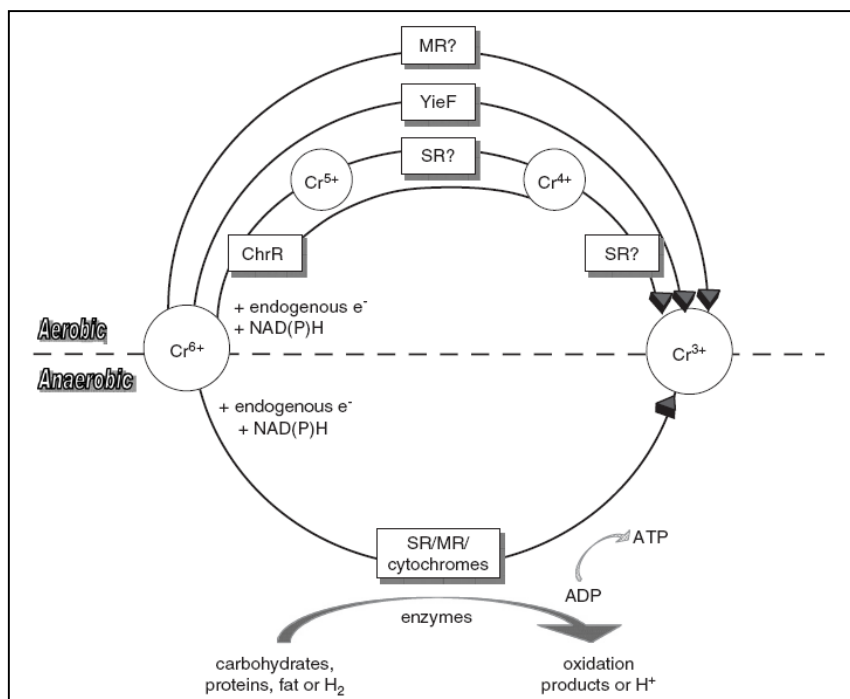
1. Δέσμευση του χρωμίου στην κυτταρική μεμβράνη
2. Μεταφορά του χρωμίου εντός του κυττάρου
3. Αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου σε τρισθενές (στις κροκίδες της ιλύος)

Οι μηχανισμοί αυτοί αποτελούν ουσιαστικά μηχανισμούς προστασίας ενάντια στις τοξικές επιδράσεις του χρωμίου, όπως φαίνεται στην εικόνα 1.18:



Εικόνα 2.2. Μηχανισμοί μεταφοράς, τοξικότητας και προστασίας ενάντια στο Cr[VI] στα βακτηριακά κύτταρα. Οι μηχανισμοί βλάβης και προστασίας υποδεικνύονται με λεπτά και παχιά βέλη, αντίστοιχα. (A) A) Είσοδος μετάλλου μέσω αντλιών θείου, B) Ενδοκυτταρική αναγωγή μετάλλου, Γ) Εξωκυτταρική αναγωγή μετάλλου, Δ) Ενεργοποίηση μηχανισμών οξειδωτικής καταπόνησης, E) Μεταφορά ιόντων μετάλλου έξω από το κύτταρο, Η) Ενεργοποίηση μηχανισμών επιδιόρθωσης βλαβών DNA. (50)

Εργαστηριακές έρευνες έχουν αποδείξει ότι η βιολογική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το διαλυμένο οξυγόνο, η συγκέντρωση οργανικού άνθρακα, το pH, η αρχική συγκέντρωση του εξασθενούς χρωμίου κ.α.



Εικόνα 2.3. Μηχανισμός ενζυμικής αναγωγής Cr[VI] υπό αερόβιες (άνω μέρος) και αναερόβιες (κάτω μέρος) συνθήκες. (51)

### 2.2.2. Αερόβια βιολογική αναγωγή

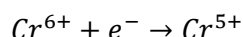
Η αναγωγή του Cr[VI] παρουσία οξυγόνου πραγματοποιείται σε δύο ή τρία στάδια, κατά τα οποία παράγονται τα ενδιάμεσα ασταθή προϊόντα Cr[V] και Cr[IV], πριν καταλήξει στο σταθερό θερμοδυναμικά είδος Cr[III]. Στην αερόβια μικροβιακή αναγωγή, η διεργασία της αναγωγής οφείλεται σε διαλυτές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή στο διαλυτό κλάσμα του κυττάρου, οι οποίες αξιοποιούν μόρια NADH ως δότες ηλεκτρονίων. Οι ρεντουκτάσες CgrR, Tkw3 και YieF, ανάγουν Cr[VI] μεταφέροντας ηλεκτρόνια ώστε να σχηματιστεί Cr[III] έχουν προσδιοριστεί σε κύτταρα των *Pseudomonas putida MK1* και *Escherichia coli*, αντίστοιχα.

Η αναγωγή εξασθενούς χρωμίου, ChrR, ανάγει το Cr[VI] σε Cr[V] με προσφορά ενός ηλεκτρονίου, μία αντίδραση που ακολουθείται από προσφορά δύο ηλεκτρονίων και αναγωγή σε Cr[III]. Αν και ένα ποσοστό του παραγόμενου ενδιάμεσου Cr(V) αυθόρμητα επαναοξειδώνεται προς σχηματισμό δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS), το μεγαλύτερο ποσοστό ανάγεται μέσω του ChrR προς τρισθενές χρώμιο, περιορίζοντας το σχηματισμό επιβλαβών ελευθέρων ριζών. Το ένζυμο YieF, που έχει βρεθεί στην *E. coli*, είναι το μοναδικό που καταλύει απευθείας αναγωγή από Cr[VI] σε Cr[III] με μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων, τρία εκ των οποίων καταναλώνονται για την αναγωγή και ένα μεταφέρεται σε

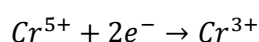
οξυγόνο. Η YieF θεωρείται η πιο αποδοτική αναγωγάση για την αναγωγή Cr[VI], αν και η κινητική της αναγωγής δεν έχει εξακριβωθεί. (51)

Οι δότες ηλεκτρονίων κατά την αναγωγή του Cr[VI] είναι τα NADH, NADPH και ηλεκτρόνια του ενδογενούς μεταβολισμού. Το παραγόμενο Cr[III] έχει τη μορφή του δυσδιάλυτου Cr(OH). Η αντίδραση της αναγωγής μπορεί να διεξαχθεί με τα εξής ενδιάμεσα στάδια:

α) Το εξασθενές χρώμιο δέχεται ένα μόριο NADH και παράγεται πεντασθενές χρώμιο σαν ενδιάμεσο προϊόν:



β) Το πεντασθενές χρώμιο δέχεται δύο ηλεκτρόνια και σχηματίζει τρισθενές χρώμιο:



Μικροοργανισμοί αερόβιας αναγωγής χρωμίου
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Pseudomonas synxantha</i>
<i>Bacillus spp.</i>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 33456
<i>Shewanella</i> Lac alga
<i>Pseudomonas maltophilia</i> O-2
<i>Bacillus megaterium</i> TKW3

Πίνακας 2.3. Μικροοργανισμοί με ικανότητα αναγωγής Cr[VI] υπό αερόβιες συνθήκες. (51)

### 2.2.3. Αναερόβια βιολογική αναγωγή

Απουσία οξυγόνου, τόσο διαλυτά ένζυμα, όσο και ένζυμα της κυτταρικής μεμβράνης μεσολαβούν στη διαδικασία αναγωγής του Cr[VI]. Οι δραστηριότητες αναγωγής Cr[VI] στους αναερόβιους μικροοργανισμούς σχετίζεται άμεσα με το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ των αναπνευστικών αλυσίδων. Οι ομάδες κυτοχρωμάτων (όπως κυτόχρωμα b και c) φαίνεται να εμπλέκονται στην ενζυμική αναερόβια αναγωγή Cr[VI]. Φυσικοί μεταβολίτες των αναερόβιων μικροοργανισμών, όπως το H<sub>2</sub>S που παράγουν αναγωγικά βακτήρια θειικών ιόντων (Sulfate-Reducing Bacteria-SRB), αποτελούν αποτελεσματικά αναγωγικά χημικά μέσα εξασθενούς χρωμίου σε ανοξικά περιβάλλοντα.

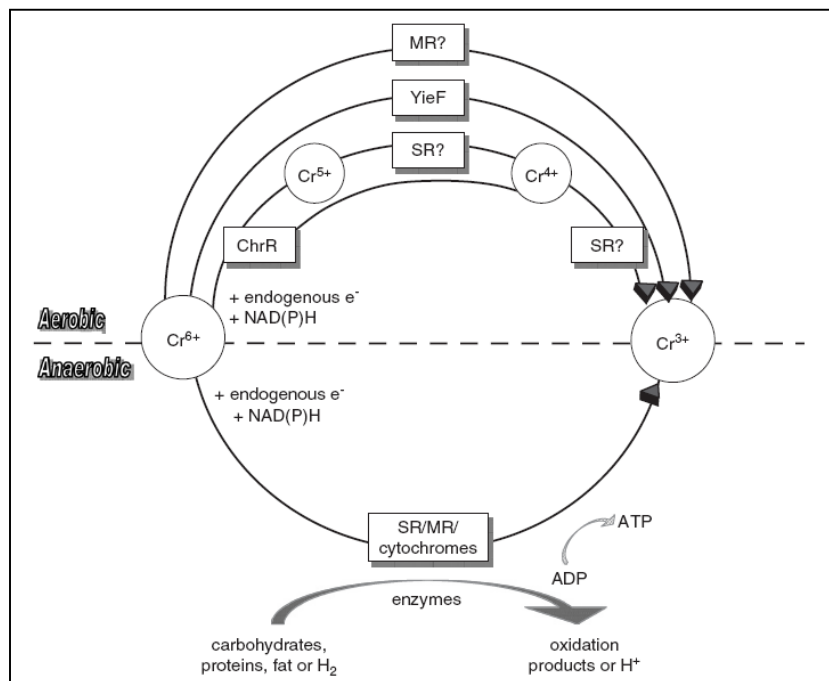
Στο παρελθόν, η αναερόβια αναγωγή θεωρούνταν τυχαία διεργασία που δεν παρείχε ενέργεια για μικροβιακή ανάπτυξη. Ωστόσο, η απομόνωση ενός SRB επέτρεψε την εξαγωγή του συμπεράσματος πως για την ανάπτυξη του χρησιμοποιεί την ενέργεια που παράγεται από την αναερόβια αναγωγή. Απουσία οξυγόνου, το Cr[VI] λειτουργεί ως ο τελικός αποδέκτης

ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα για μια σειρά ηλεκτρονιοδοτών, όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, υδρογόνο, NAD(P)H και ενδογενείς δότες. Η αναερόβια αναγωγή χρωμίου αποτελεί σημαντικό πιθανό εργαλείο για επί τόπου βιοαποκατάσταση ρυπασμένων με Cr[VI] εδαφών και ιζημάτων, που απαιτεί μόνο την τροφοδοσία θρεπτικών και τη ρύθμιση των φυσικών παραμέτρων που θα ευνοήσουν την αντίδραση. (51)

Μικροοργανισμοί αναερόβιας αναγωγής χρωμίου	
<i>Pseudomonas dechromaticans</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Pseudomonas chromatophilia</i>	<i>Achromobacter Eurydice</i>
<i>Aeromonas dechromatica</i>	<i>Micrococcus roseus</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
<i>Pseudomonas ambigua</i>	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Desulfotomaculum reducens</i>
<i>Microbacterium sp. MP30</i>	<i>Shewanella putrefaciens MR-1</i>
<i>Geobacter metallireducens</i>	<i>Pantoea agglomerans SP-1</i>
<i>Agrobacterium radiobacter EPS-916</i>	<i>Deinococcus radiodurans R1</i>
<i>Pyrobaculum inslandicum</i>	

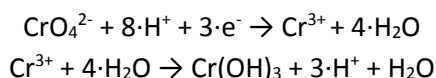
Πίνακας 2.4. Μικροοργανισμοί με ικανότητα αναγωγής Cr[VI] υπό αναερόβιες συνθήκες. (51)

Τα μικροβιακά είδη που παρατίθενται στους πίνακες 2.3. και 2.4. δεν εμφανίζουν την ίδια ανοχή στις διάφορες συγκεντρώσεις Cr[VI], αλλά ούτε και την ίδια αναγωγική ικανότητα. Πολλά ανάγουν το Cr[VI] μόνο σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και με αργούς ρυθμούς, ενώ ορισμένα μπορούν να αναπτύσσονται τόσο σε αερόβια, όσο και σε αναερόβια περιβάλλοντα, αλλά ανάγουν το Cr[VI] μόνο σε μία από τις δύο συνθήκες.



Εικόνα 2.4. Μηχανισμός ενζυμικής αναγωγής Cr[VI] υπό αερόβιες (άνω μέρος) και αναερόβιες (κάτω μέρος) συνθήκες. (51)

Γενικά, η συνολική βιο-αναγωγή του Cr[VI] και η καταβύθιση του παραγόμενου Cr[III] ως Cr(OH)<sub>3</sub>, μπορεί να περιγραφεί ως εξής (52):



#### 2.2.4. Βιοσυσσώρευση

Η βιοσυσσώρευση βαρέων μετάλλων αποτελείται από δύο φάσεις. Ξεκινά με μία γρήγορη φάση, που περιλαμβάνει φυσική προσρόφηση ή ανταλλαγή ιόντων στην κυτταρική επιφάνεια και ακολουθεί μία αργή δεύτερη φάση, που περιλαμβάνει την ενεργή και μεταβολικά εξαρτώμενη μεταφορά του μετάλλου μέσα στα μικροβιακά κύτταρα. Κατά τη βιοσυσσώρευση πραγματοποιούνται τόσο επιφανειακές αντιδράσεις για την πρόσδεση του μετάλλου, όσο και εσω- ή εξω-κυτταρική κατακρήμνιση και εσω- ή εξω-κυτταρικές αντιδράσεις συμπλοκοποίησης. Η βιοσυσσώρευση, συνεπώς, συνοδεύεται από ποικιλία μηχανισμών ικανών να τροποποιήσουν γενετικά τα κύτταρα και να επιφέρουν αλλαγές στα μορφολογικά και φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά. (53)

Σε έρευνα τους, οι T.Srinath et al. (2001), ταυτοποίησαν δύο βακτηριακά στελέχη, τα *Bacillus circulans* και *Bacillus megaterium*, με ικανότητα βιοσυσσώρευσης 34,5 και 32 mg Cr[VI]/g ξηρού βάρους αντίστοιχα. Τα συγκεκριμένα βακτήρια κατόρθωσαν να απομακρύνουν Cr[VI] από υδατικά απόβλητα αρχικής συγκέντρωσης 50 mg Cr[VI]/L σε 24 h. (53)

Σε έρευνα των B .Preetha, T. Viruthagiri (2006), μελετήθηκε το βακτήριο *Rhizopus arrhizus*, ως προς την ικανότητα να βιοσυσσωρεύει Cr[VI]. Καταγράφηκε μέγιστη ικανότητα 93,84% κατακράτησης από απόβλητο συγκέντρωσης 25 mg Cr[VI]/L. Ωστόσο, όταν η αρχική συγκέντρωση μεταβλήθηκε στα 100 mg Cr[VI]/L το ποσοστό βιοσυσσώρευσης Cr[VI] άγγιξε μόλις το 35%. Ακόμη, η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του μετάλλου, οδήγησε σε αύξηση της λανθάνουσας περιόδου, κατά την οποία ο βακτηριακός πληθυσμός προσαρμόζει τη βιοχημεία του στο νέο περιβάλλον. Συνολικά, από τη συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε πως όσο η συγκέντρωση του εξασθενούς χρωμίου αυξάνει μέσα στο κύτταρο, ο ρυθμός ανάπτυξης του μειώνεται και συνεπώς η ελεύθερη επιφάνεια που διατίθεται προς πρόσληψη-ρόφηση του χρωμίου περιορίζεται, περιορίζοντας τελικά την απομάκρυνση χρωμίου μέσω βιοσυσσώρευσης. Αντίθετα, σε χαμηλές συγκεντρώσεις Cr[VI], ο λόγος της ελεύθερης επιφάνειας προς τα συνολικά μεταλλικά ιόντα είναι υψηλός και η δυνατότητα απομάκρυνσης μέσω βιοσυσσώρευσης μεγάλη. (54)

#### 2.2.5. Βιορόφηση

Η βιορόφηση αποτελεί ένα ενεργειακά αυτόνομο σύστημα σύνδεσης μετάλλων στο κυτταρικό τοίχωμα ζωντανών, νεκρών, ακινητοποιημένων ή χημικά προεπεξεργασμένων μικροοργανισμών. Πραγματοποιείται σε τρία βήματα: (α) Πρόσδεση-ρόφηση των ιόντων Cr[VI] σε θετικά φορτισμένες ομάδες στην επιφάνεια της βιομάζας, (β) Αναγωγή Cr[VI] σε Cr[III] μέσω γειτονικών ομάδων ηλεκτρονιοδοτών, (γ) Απελευθέρωση των τρισθενών ιόντων στην υδατική

φάση λόγω είτε απωθητικών δυνάμεων με θετικά φορτισμένες ομάδες, είτε συμπλοκοποίησης με γειτονικές ομάδες. Πρόκειται δηλαδή για μηχανισμό βιορόφησης συζευγμένης με αναγωγή.

Ζωντανοί και νεκροί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοροφητικά για την απομάκρυνση εξασθενούς χρωμίου. Η χρήση νεκρών κυττάρων προσφέρει πλεονεκτήματα, καθώς αποφεύγονται περιορισμοί τοξικότητας των μικροοργανισμών, δεν υπάρχει απαίτηση για θρεπτικά συστατικά, το ροφημένο μέταλλο μπορεί να απελευθερωθεί εύκολα και η βιομάζα να χρησιμοποιηθεί εκ νέου και τέλος η ρόφηση σε νεκρή βιομάζα μπορεί να προσομοιωθεί με συμβατικά μοντέλα προσρόφησης.

Στην ερευνητική δουλειά των R.Sanghi et al. (2009) μελετήθηκε ο νεκρός πληθυσμός του μύκητα *Coriolus versicolor* ως βιοροφητικό μέσο. Στο μύκητα αυτό προσδιορίστηκαν λειτουργικές βιοροφητικές ομάδες, όπως αμινομάδες, καρβοξυλομάδες και φωσφορικές ομάδες. Από τη μελέτη επίδρασης ποικίλων παραμέτρων στην βιορόφηση προέκυψε πως την πιο καθοριστική παράμετρο αποτελεί το pH, καθώς επηρεάζει τις επιφανειακές ιδιότητες της βιομάζας. Η βιοροφητική ικανότητα της βιομάζας μειώνεται με αύξηση του pH και φθάνει σε ελάχιστο για pH=6. Συγκεκριμένα, σε χαμηλά pH τα διαθέσιμα ενεργά κέντρα είναι θετικά φορτισμένα με αποτέλεσμα να αυξάνει η βιορόφηση των αρνητικά φορτισμένων χρωμικών ιόντων. Αύξηση του pH καθιστά ουδέτερη την επιφάνεια και περιορίζει τις βιοροφητικές της ικανότητες. (55) Σε μεγάλο βαθμό για τις βιοροφητικές του ιδιότητες έχει μελετηθεί και ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae*. (56)

Βιοροφητικό είδος	q <sub>max</sub> (mg Cr[VI]/l)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
<i>Zooglea ramigera</i>	3
<i>Rhizopus arrhizus</i>	8,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	3,5
<i>Bacillus licheniformis</i>	62
<i>Bacillus Lacterosporus</i>	72,6

Πίνακας 2.5. Ικανότητα απομάκρυνσης Cr[VI] βιοροφητικών μικροοργανισμών (57)

### 2.2.6. Παράγοντες που επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες

Οι παράγοντες που επιδρούν στην απόδοση ενός μικροβιακού συστήματος κατά την αναγωγή Cr[VI] σε Cr[III] είναι:

- Η θερμοκρασία. Ο ρυθμός ανάπτυξης και δράσης των μικροοργανισμών επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Σε χαμηλές θερμοκρασίες (<5-10°C) οι μικροοργανισμοί αδρανοποιούνται χωρίς όμως να καταστρέφονται, ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες (>60°C) καταστρέφονται. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες συνήθως κυμαίνονται από 20 ως 37°C.
- Το pH. Αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους παράγοντες καθώς επηρεάζει τη χημεία των διαλυμένων μετάλλων, τη δραστηριότητα των λειτουργικών ομάδων στη βιομάζα και την ανταγωνιστικότητα των μεταλλικών ιόντων.
- Η επιλογή κατάλληλου υποστρώματος.



- Η συγκέντρωση της βιομάζας στο διάλυμα. Αυξημένες συγκεντρώσεις βιομάζας οδηγούν σε υψηλότερη απομάκρυνση Cr[VI], αν και αύξηση της συγκέντρωσης βιομάζας κρίνεται συνήθως αντικοινωνική.
- Η παρουσία άλλων μεταλλικών ιόντων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

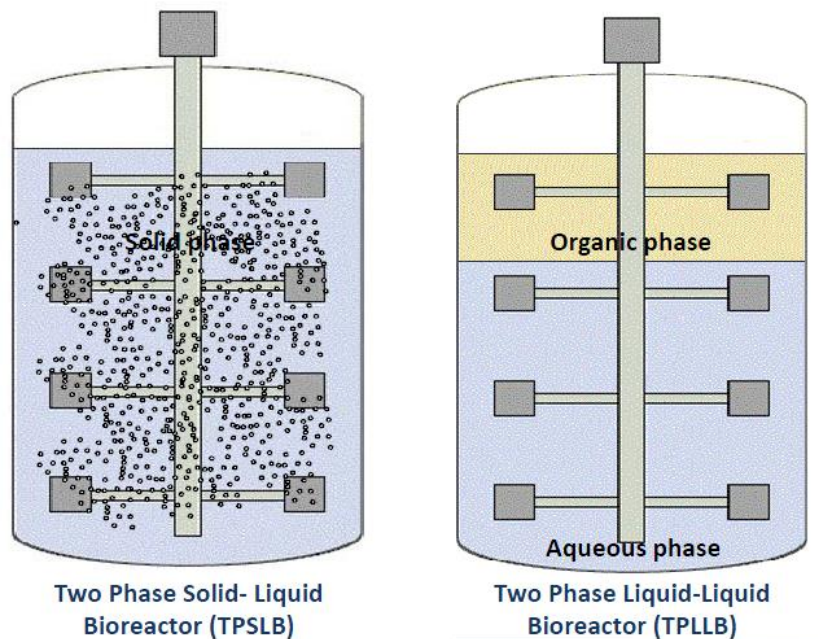
### ΜΕΡΟΣ 1<sup>ο</sup> : Βιοαντιδραστήρες απομάκρυνσης Cr[VI]

#### 3.1. Διφασικά συστήματα βιολογικής απομάκρυνσης Cr[VI] - (Two-Phase Partitioning Bioreactors, TPPBs)

Οι διφασικοί αντιδραστήρες (TPPBs) αναπτύχθηκαν με σκοπό τη ρύθμιση της συγκέντρωσης του ρύπου στο απόβλητο που επεξεργάζεται η βιομάζα στον αντιδραστήρα. Κάθε είδος μικροοργανισμών διαθέτει ένα όριο αντοχής για τον εκάστοτε ρύπο, που αν ξεπεραστεί αποβαίνει τοξικό και παρεμποδίζει τη δράση τους ή οδηγεί σε θάνατο του μικροβιακού πληθυσμού. Οι TPPBs, με την επιλογή των κατάλληλων παραμέτρων, μπορούν να καταστήσουν εφικτή την επεξεργασία του ρύπου σε ικανοποιητικούς χρόνους με διατήρηση της βιομάζας. Τα συστήματα TPPBs έχουν μέχρι σήμερα δοκιμαστεί στη βιοτεχνολογική επεξεργασία τοξικών υδρόφοβων οργανικών ενώσεων (ξеноβιοτικών ουσιών), όπως βενζένιο, τολουένιο, φαινόλες, ξυλένιο, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (polycyclic aromatic hydrocarbons-PAHs), υδρόθειο, μεθάνιο, πενταχλωροφαινόλες κ.α. από υδατικές μάζες. (58)

Τα διφασικά συστήματα υγρού-υγρού (Two-Phase Liquid-Liquid Bioreactor, TPLL) στηρίζονται στη χρήση ενός βιοσυμβατού οργανικού διαλύτη μη αναμίξιμου με το νερό, ο οποίος δημιουργεί μια διακριτή φάση πάνω από την υδατική φάση στην οποία αναπτύσσονται οι μικροβιακοί πληθυσμοί. Ένας οργανικός διαλύτης ελέγχει τη συγκράτηση κάποιου ποσοστού του ρύπου, με βάση το συντελεστή κατανομής μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης. Στα διφασικά συστήματα στερεού-υγρού (Two-Phase Solid-Liquid Bioreactor, TPSLB) το ρόλο του διαλύτη αποκτά ένα στερεό προσροφητικό, το οποίο απορροφά αντιστρεπτά το ρύπο. (59)





Εικόνα 3.1. (Αριστερά) Διφασικός βιοαντιδραστήρας στερεού-υγρού, (Δεξιά) Διφασικός βιοαντιδραστήρας υγρού-υγρού

Με στόχο την απομάκρυνση εξασθενούς χρωμίου από υδατικό απόβλητο με βιολογικές μεθόδους, έχουν εξεταστεί δυο ειδών βιοαντιδραστήρες: βιοαντιδραστήρας δύο φάσεων υγρού-υγρού και βιοαντιδραστήρας δύο φάσεων στερεού-υγρού. Ο αντιδραστήρας σε κάθε περίπτωση τροφοδοτήθηκε με αρχική συγκέντρωση Cr[VI] στο απόβλητο ίση με 1000 ppm και λειτούργησε σε αναερόβιες συνθήκες. Οι μικροοργανισμοί που προστέθηκαν προέρχονται από αναερόβια λάσπη από τον αναερόβιο χωνευτήρα του βιολογικού καθαρισμού Λυκόβρηνης, θρεπτικό με πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. (60), (61)

### 3.1.1. Βιοαντιδραστήρας δύο φάσεων υγρού-υγρού (Two-Phase Liquid-Liquid Bioreactor, TPLL)

Η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία για προσπάθεια χρήσης διφασικού βιοαντιδραστήρα με σκοπό την αναγωγή εξασθενούς χρωμίου (Lytras and Lyberatos, 2013) (60) αφορά βιοαντιδραστήρα υγρού-υγρού, όπου η υδατική φάση περιέχει το ρύπο προς απομάκρυνση (Cr[VI]) και η οργανική περιέχει το διαλύτη, ένα συμπλοκοποιητή και ένα σταθεροποιητή της οργανικής φάσης.

Ως οργανικοί διαλύτες δοκιμάστηκαν, σε σχέση με την τοξικότητά τους σε εγκλιματισμένη αναερόβια μικτή καλλιέργεια, τα αντιδραστήρια: εξάνιο, επτάνιο, χλωροφόρμιο και οξικός αιθυλεστέρας. Οι μικροοργανισμοί επέδειξαν ανθεκτικότητα παρουσία κηροζίνης και επτανίου, ενώ παρουσία εξανίου, χλωροφορμίου και οξικού αιθυλεστέρα η μικροβιακή ανάπτυξη παρεμποδίστηκε πλήρως.

Για τη μεταφορά των χρωμικών ιόντων από την υδατική στην οργανική φάση, ήταν απαραίτητη η χρήση συμπλοκοποιητή. Χωρίς το συμπλοκοποιητή τα χρωμικά ιόντα δε

μεταφέρονται στην οργανική φάση. Για τη συμπλοκοποιητική τους ικανότητα σε συνδυασμό με την κηροζίνη και το επτάνιο δοκιμάστηκαν τα: Aliquat 336 (*N*-Methyl-*N,N*-dioctyl-octan-1-ammonium chloride), TOPO (Tri-*n*-octylphosphine oxide) και TBP (Tri-*n*-butyl phosphate), σε αναλογία οργανικής/υδατικής φάσης 1:1.

Οι συνδυασμοί κηροζίνη/Aliquat 336 και επτάνιο/Aliquat 336 ήταν οι πιο αποτελεσματικοί για την εκχύλιση Cr[VI] από υδατικό διάλυμα, όμως και στις δυο περιπτώσεις σχηματίστηκε μεσόφαση (γαλάκτωμα) με την υδατική φάση. Για να αποφευχθεί ο σχηματισμός μεσόφασης στο συνδυασμό κηροζίνης/Aliquat 336 προστέθηκαν 10% v/v 1-εξανόλης ως σταθεροποιητή και επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός των φάσεων. Το μίγμα κηροζίνη/Aliquat/1-εξανόλης (οργανική φάση στο εξής) οδηγεί στη στιγμιαία εκχύλιση Cr[VI] από υδατικό διάλυμα χωρίς σχηματισμό μεσόφασης.

Ο πειραματικός βιοαντιδραστήρας TPLLB (2L) τροφοδοτήθηκε με την οργανική φάση (1L) και το υδατικό απόβλητο (0.8L) που περιείχε 1000 ppm Cr[VI] καθώς και το μικροβιακό πληθυσμό. Λειτουργήσε υπό αναερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 35°C. Η λειτουργία του αντιδραστήρα δεν οδήγησε σε μείωση της συγκέντρωσης του Cr[VI] και τη 2<sup>η</sup> ημέρα η θνησιμότητα των μικροοργανισμών έφτασε το 100%. Αποδείχθηκε ότι ο συμπλοκοποιητής των χρωμικών ιόντων στην οργανική φάση, το Aliquat 336 ήταν τοξικός για τους μικροοργανισμούς και αυτό οδήγησε στην αποτυχία λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα.

Η προσπάθεια εύρεσης ενός μη τοξικού συμπλοκοποιητή με ικανοποιητική λειτουργία σε pH 5-7 επίσης απέτυχε και, καθώς το σύστημα δε μπορεί να λειτουργήσει απουσία συμπλοκοποιητή. Επομένως, έγινε εμφανής η αδυναμία ανάπτυξης ενός διφασικού βιοαντιδραστήρα δύο υγρών φάσεων για την βιολογική απομάκρυνση του Cr[VI].

### **3.1.2. Βιοαντιδραστήρας δύο φάσεων στερεού-υγρού (Two-Phase Solid-Liquid Bioreactor, TPSLB)**

Προκειμένου να παρακαμφθεί το πρόβλημα της τοξικότητας της οργανικής υγρής φάσης, αναπτύχθηκε διφασικός βιοαντιδραστήρας δυο φάσεων στερεού-υγρού. Το προσροφητικό επιλέχθηκε έτσι ώστε: (α) να προσροφά υψηλές συγκεντρώσεις Cr[VI], (β) η προσρόφηση να είναι αντιστρεπτή, (γ) να μην είναι τοξικό για την εγκλιματισμένη βιομάζα και (δ) να μην είναι βιοδιασπώμενο. Η σημασία της αντιστρεπτής προσρόφησης συνίσταται στο γεγονός ότι καθώς οι μικροοργανισμοί απομακρύνουν την εναπομείνουσα ποσότητα του Cr[VI] που παραμένει στο υδατικό διάλυμα έπειτα από την προσρόφηση, χρωμικά ιόντα μεταφέρονται από το στερεό προσροφητικό στο υδατικό διάλυμα για την εκ νέου αποκατάσταση της θερμοδυναμικής ισορροπίας.

Τα στερεά προσροφητικά που δοκιμάστηκαν ήταν η ρητίνη Dowex™ 1X8-100 ACROS Organics™, το Cloisite® NA+, το Cloisite® 30B και φυσικά προσροφητικά υλικά όπως η τέφρα, ο ασβεστόλιθος, ο φλοιός ρυζιού, το πυρηνόξυλο (έπειτα από κατεργασία στους 550°C, το οξείδιο του αργιλίου, ο ασβεστόλιθος, ο ζεόλιθος και ο μπετονίτης. Το μοναδικό προσροφητικό υλικό που πληρούσε τις προϋποθέσεις για χρήση στο διφασικό βιοαντιδραστήρα ήταν ένα τεχνητό υλικό, το Cloisite® 30B.

Το νέο σύστημα αποβλήτου-στερεού προσροφητικού-μικροοργανισμών δοκιμάστηκε σε πειραματικό αναερόβιο διφασικό βιοαντιδραστήρα στερεού-υγρού (TPSLB), όγκου 3L. Η

συνεχής λειτουργία του αντιδραστήρα δεν ήταν δυνατή καθώς θα χρειαζόταν η διαρκής αναπλήρωση του προσροφητικού. Σε κάθε κύκλο τροφοδοσίας μέρος του προσροφητικού θα απομακρυνόταν μαζί με την απορροή του αντιδραστήρα και η συγκέντρωσή του θα μειωνόταν συνεχώς, μέχρι να μηδενιστεί.

Προκειμένου να αποφευχθεί η απόρριψη του στερεού προσροφητικού σε κάθε κύκλο τροφοδοσίας, ο αντιδραστήρας λειτούργησε ως βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου περιοδικής λειτουργίας (SBR). Σε κάθε κύκλο ακολουθήθηκαν τα ακόλουθα στάδια:

- Τροφοδοσία 1.25 L. Η τροφοδοσία περιείχε 5 g/L γλυκόζη, 2.5 g/L εκχύλιση ζύμης, 5 g/L πεπτόνη και 1000 ppm Cr[VI]. Στην τροφοδοσία δεν πραγματοποιούνταν εκτοπισμός της αρχικής αέριας φάσης.
- Αντίδραση.
- Καθίζηση για 3 ώρες.
- Εκροή υπερκείμενου υγρού με  $(Cr[VI]) < 1 \text{ ppm} - 1.25 \text{ L}$ .

Κατά τη διάρκεια της καθίζησης καθίζανε τόσο η βιομάζα όσο και το στερεό προσροφητικό. Το υπερκείμενο υγρό απομακρυνόταν με περισταλτική αντλία της οποίας η είσοδος δεν έφθανε στον πυθμένα του αντιδραστήρα με αποτέλεσμα να μην γίνεται σημαντική απομάκρυνση του στερεού προσροφητικού σε κάθε κύκλο λειτουργίας.

Η λειτουργία του βιοαντιδραστήρα ήταν βέλτιστη σε θερμοκρασίες άνω των 25°C καθώς η εγκλιματισμένη καλλιέργεια προήλθε από αναερόβια λάσπη, η οποία απαρτίζεται κυρίως από μεσόφιλους μικροοργανισμούς. Επομένως ρυθμίστηκε στους 35°C. Ο κύκλος τροφοδοσίας είχε διάρκεια 48 ωρών και ο υδραυλικός χρόνος παραμονής ήταν περίπου 4 ημέρες. Το pH του αντιδραστήρα κυμαινόταν από 5.8 ως 4.3, ανάλογα με το χρόνο επεξεργασίας. Μέσω της λειτουργίας του αντιδραστήρα επιτεύχθηκε 99.9% απομάκρυνση του Cr[VI] με ρυθμό αναγωγής ίσο με  $\sim 8.6 \text{ ppm Cr[VI]}/\text{ώρα}$ . (60), (61)

### 3.1.3. Βιοαντιδραστήρας μιας υγρής φάσης

Ο αντιδραστήρας που περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα χρησιμοποιήθηκε και κατά τη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για τη λειτουργία του διφασικού βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιήθηκε το στερεό προσροφητικό Cloisite 30B. Σε κάθε κύκλο λειτουργίας του διφασικού βιοαντιδραστήρα η κατακράτηση του στερεού προσροφητικού λόγω της καθίζησης ήταν της τάξεως του 80%. Επομένως, σε κάθε κύκλο απομακρυνόταν ένα ποσοστό του στερεού προσροφητικού. Παρά τη μείωση της ποσότητας του στερεού προσροφητικού η ικανότητα αναγωγής των χρωμικών ιόντων από τη βιομάζα του αντιδραστήρα δεν επηρεαζόταν. Ακόμα και όταν το στερεό προσροφητικό εξαντλήθηκε στο σύνολό του η ικανότητα αναγωγής των ιόντων του Cr[VI] σε Cr[III] παρέμεινε σταθερή. Επομένως, κατέστη φανερό ότι η χρήση του στερεού προσροφητικού είναι αναγκαία αποκλειστικά και μόνο κατά την εκκίνηση (start-up) του αντιδραστήρα.

Το σύστημα που θα περιγραφεί στην παρούσα διπλωματική εργασία αποτελείται από έναν βιοαντιδραστήρα υγρής φάσης, που περιέχει το εξασθενές χρώμιο, το θρεπτικό υλικό, τους μικροοργανισμούς και τα προϊόντα μεταβολισμού τους. Οι μικροοργανισμοί ταυτοποιήθηκαν και βρέθηκε ότι ανήκουν στο γένος *Pediococcus*, με πιθανότερα είδη τα *Pediococcus acidilactici*

και *Pediococcus pentosaceus*. Τα βασικότερα προϊόντα που παράγονται κατά τη διεργασία βρέθηκαν να είναι το γαλακτικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ) και το πυροσταφυλικό οξύ ( $\text{CH}_3\text{COCOOH}$ ). Ο τρόπος λειτουργίας του αντιδραστήρα παρέμεινε ίδιος με αυτόν του αντιδραστήρα δυο φάσεων στερεού-υγρού, συνέχισε επομένως να λειτουργεί ως αντιδραστήρας διαλείποντος έργου περιοδικής τροφοδοσίας (SBR).

Τα στάδια σε κάθε κύκλο του αντιδραστήρα ήταν:

- Τροφοδοσία 1.25 L. (10 g/L γλυκόζη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 10 g/L πεπτόνη και 1350 ppm Cr[VI]. Στην τροφοδοσία δεν πραγματοποιούνταν εκτοπισμός της αρχικής αέριας φάσης.
- Αντίδραση.
- Καθίζηση για 6 ώρες.
- Εκροή υπερκείμενου υγρού με  $(\text{Cr[VI]}) < 1\text{ppm}$  - 1.25L.

Ο αντιδραστήρας λειτούργησε σε θερμοκρασία  $35^\circ\text{C}$ , το pH κυμαινόταν από 4.3-5.8 και η απομάκρυνση Cr[VI] έφτανε το 99.9%.

Όπως αναφέρθηκε, μετά από αναλύσεις της υγρής φάσης του βιοαντιδραστήρα, βρέθηκε γαλακτικό οξύ σε συγκέντρωση  $\sim 5\text{ g/l}$ , που δεν παρατηρείται στο θρεπτικό υλικό. Το γαλακτικό οξύ προφανώς παράγεται ως προϊόν μεταβολισμού των μικροοργανισμών, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος και πραγματοποιούν ομογαλακτική ζύμωση. Από περαιτέρω πειράματα συσχετίστηκε η ύπαρξη γαλακτικού οξέος με την αναγωγή εξασθενούς χρωμίου. (62)

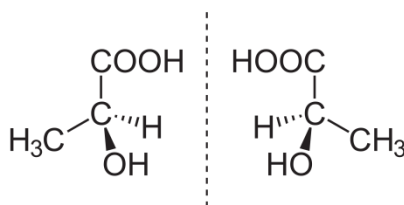


Εικόνα 3.2. Εργαστηριακός αναερόβιος βιοαντιδραστήρας αναγωγής Cr[VI]

## ΜΕΡΟΣ 2<sup>ο</sup> : Η αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου στο βιοαντιδραστήρα μιας υγρής φάσης

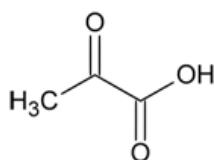
### 3.2. Γαλακτικό και πυροσταφυλικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ είναι ένα καρβοξυλικό οξύ με χημικό τύπο  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ . Επειδή η υδροξυλική ομάδα συνδέεται με τον κοντινότερο άνθρακα στην καρβοξυλική ομάδα, θεωρείται α-καρβοξυλικό οξύ. Παράγεται τόσο συνθετικά όσο και φυσικά και έχει ιδιαίτερη σημασία στα βιολογικά συστήματα. Βρίσκεται σε στερεή ή υγρή μορφή και είναι υγροσκοπικό μόριο. Το γαλακτικό οξύ είναι ένα οπτικά ενεργό, χειρόμορφο μόριο με δυο ισομερή: (R)-(-)-Γαλακτικό οξύ και (S)-(+)-Γαλακτικό οξύ. Όταν βρεθεί σε διάλυμα, το πρωτόνιο της καρβοξυλικής ομάδας μπορεί να υποστεί διάσπαση, παράγοντας το γαλακτικό ανιόν  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COO}^-$ .



Εικόνα 3.3. Αριστερά:(R)-(-)-Γαλακτικό οξύ. Δεξιά: (S)-(+)-Γαλακτικό οξύ.

Το πυροσταφυλικό οξύ είναι ένα α-κετο οξύ με χημικό τύπο  $\text{CH}_3\text{COCOOH}$ . Η συζυγής βάση του  $\text{CH}_3\text{COCOO}^-$  είναι σημαντικό ενδιάμεσο σε αρκετές μεταβολικές διεργασίες. Όπως και το γαλακτικό οξύ, έχει σημαντικό ρόλο στους οργανισμούς, συμμετέχοντας στη διεργασία της γλυκόλυσης και του κύκλου του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs). Τα δυο μόρια είναι στενά συνδεδεμένα στις αναερόβιες διεργασίες μεταβολισμού.



Εικόνα 3.4. Πυροσταφυλικό οξύ.

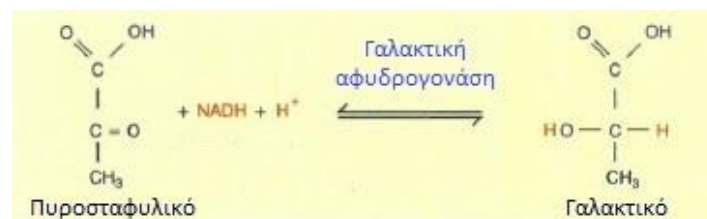
Αναερόβιες μεταβολικές διεργασίες παραγωγής ενέργειας στα κύτταρα παρατηρούνται συχνά σε μικροοργανισμούς και ονομάζονται ζυμώσεις. Κατά τη ζύμωση παράγονται μόρια ATP (τριφωσφορικής αδενοσίνης, η «αποθήκη ενέργειας» του κυττάρου), τα οποία χρησιμοποιούνται για την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι ζυμώσεις χαρακτηρίζονται από το τελικό προϊόν που παράγεται στη μεταβολική αυτή πορεία (π.χ. αλκοολική ζύμωση, γαλακτική ζύμωση, προπιονική ζύμωση κ.ά.). Το αρχικό υπόστρωμα στις περισσότερες ζυμώσεις είναι η γλυκόζη.

Η πορεία της γλυκόλυσης είναι παρόμοια σε όλους τους οργανισμούς και τα είδη των κυττάρων. Η γλυκόζη διασπάται και αποδίδει πυροσταφυλικό οξύ και ATP (πίνακας 3.1.).

Αντίδραση	Ανάλωση (-) ή παραγωγή (+) ATP ανά μόριο γλυκόζης
Γλυκόζη → 6 - Φωσφορική γλυκόζη	-1
6 - Φωσφορική φρουκτόζη → 1,6 - Διφωσφορική φρουκτόζη	-1
2x1,3 διφωσφογλυκερινικό → 2x3 φωσφογλυκερινικό	+2
2 x Φωσφοενολοπυροσταφυλικό → 2 x πυροσταφυλικό	+2
	Καθαρή παραγωγή +2

Πίνακας 3.1. Αντιδράσεις και παραγωγή ATP κατά τη γλυκόλυση.

Η μετέπειτα τύχη του πυροσταφυλικού οξέος ποικίλλει και εξαρτάται από την παρουσία ή απουσία οξυγόνου (αερόβιος ή αναερόβιος μεταβολισμός). Η γαλακτική ζύμωση είναι ένα είδος αναερόβιας διεργασίας μεταβολισμού κατά την οποία βακτήρια παράγουν γαλακτικό οξύ. Η αντίδραση μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό καταλύεται από τη γαλακτική αφυδρογονάση και οδηγεί στην επανοξείδωση του NADH σε NAD<sup>+</sup> προκειμένου αυτό να αναγεννηθεί και να είναι διαθέσιμο στο κύτταρο για την ομαλή διεξαγωγή της γλυκολυτικής πορείας. Έτσι, τα τελικά προϊόντα της γλυκόλυσης στη γαλακτική ζύμωση είναι το γαλακτικό οξύ, 2 μόρια ATP και μόρια νερού. (63)



Εικόνα 3.5. Αλληλομετατροπή πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό οξύ καταλυόμενη από γαλακτική αφυδρογονάση



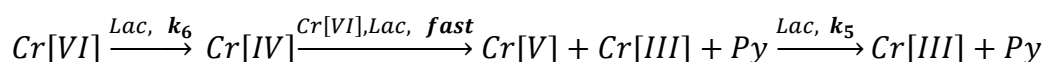
### 3.3. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας για γαλακτικό οξύ και εξασθενές χρώμιο

Οι Hasan and Rocek (1974), μελετώντας την οξείδωση της κυκλοβουτανόλης από Cr[VI] παρουσία οξικού οξέος, πρότειναν ένα μηχανισμό οξείδωσης ανταλλαγής τριών ηλεκτρονίων. Η οξείδωση της κυκλοβουτανόλης σε κυκλοβουτανόνη πραγματοποιείται ουσιαστικά από το Cr[V], με μηχανισμό ανάλογο της οξείδωσης αλκοολών από Cr[VI], και περιλαμβάνει αντιστρεπτό σχηματισμό ενός εστερικού ενδιάμεσου και σχάση του δεσμού C-H στο στάδιο της αντίδρασης που είναι καθοριστικό του ρυθμού. (64)

Σε υψηλές συγκεντρώσεις Cr[VI] και ισχυρά όξινο μέσο λειτουργεί ένας μηχανισμός ενός σταδίου ανταλλαγής δυο ηλεκτρονίων, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις Cr[VI] και λιγότερο όξινο μέσο κυριαρχεί μηχανισμός ενός σταδίου ανταλλαγής τριών ηλεκτρονίων. (65) Οι μετέπειτα έρευνες για την αναγωγή Cr[VI] από γαλακτικό οξύ αναφέρονται συχνά σε αυτή τη θεωρία.

#### 3.3.1. Τρεις μελέτες για το μηχανισμό και την κινητική αναγωγής Cr[VI] από γαλακτικό οξύ

1. Οι Haight et al. (1984) (66) για πρώτη φορά πρότειναν ένα μηχανισμό δυο σταδίων για την αναγωγή Cr[VI] από γαλακτικό οξύ. Και τα δυο στάδια δίνουν ως κύριο προϊόν το πυροσταφυλικό οξύ. Η σειρά των αντιδράσεων οξειδοαναγωγής που λαμβάνουν χώρα είναι:



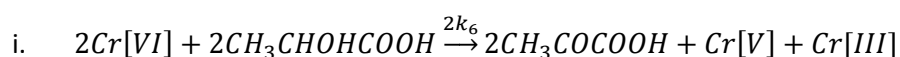
όπου Lac = Lactic Acid,  $CH_3CHOHCOOH$

Py = Pyruvic Acid,  $CH_3COCOORH$

$k_6 = 2.6 \cdot 10^{-4} s^{-1}$

$k_5 = 4.5 \cdot 10^{-4} s^{-1}$

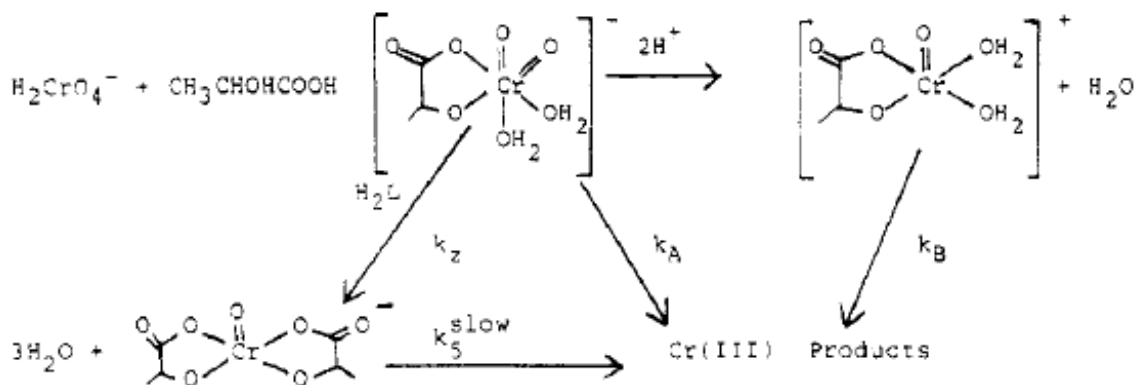
Οι δυο αργές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι:



Με χρήση φασματοφωτόμετρου κατασκευάστηκαν οι καμπύλες απορρόφησης των Cr[VI] και Cr[V] παρουσία γαλακτικού οξέος, στους 298K. Το Cr[V] απορροφά στα 750 nm (τρίγωνα) και το Cr[VI] στα 350 nm (κύκλοι) (διάγραμμα 3.1.). Οι ερευνητές





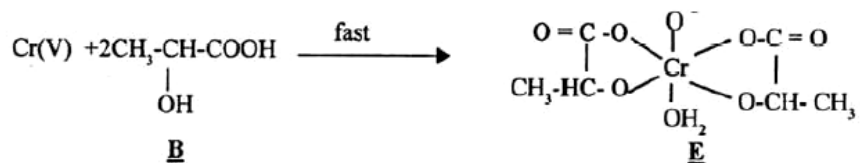


Εικόνα 3.7. Αντίδραση παραγωγής Cr[III] και πυροσταφυλικού οξέος από Cr[VI] και γαλακτικό οξύ, κατά Haight et al.

2. Ο Z. Khan (2000) (65) εστίασε στη μελέτη του σχηματισμού ενδιάμεσου συμπλόκου Cr[V]-γαλακτικού οξέος κατά την οξείδωση του τελευταίου σε διάλυμα χρωμικού οξέος. Υπογραμμίζει ότι η έρευνα για την πορεία της αναγωγής του Cr[VI] από βιολογικά αναγωγικά είναι ιδιαίτερα σημαντική, λόγω της συμμετοχής του Cr[V] στο μηχανισμό καρκινογένεσης.

Η πορεία της αντίδρασης του εξασθενούς χρωμίου με το γαλακτικό οξύ ακολουθήθηκε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου, σε θερμοκρασία 25°C και μήκος κύματος 750 nm, όπου το Cr[V] είναι το μόνο είδος του χρωμίου που απορροφά ακτινοβολία. Το γαλακτικό οξύ και το διχρωμικό κάλλιο αναμίχθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>K<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-HCl.

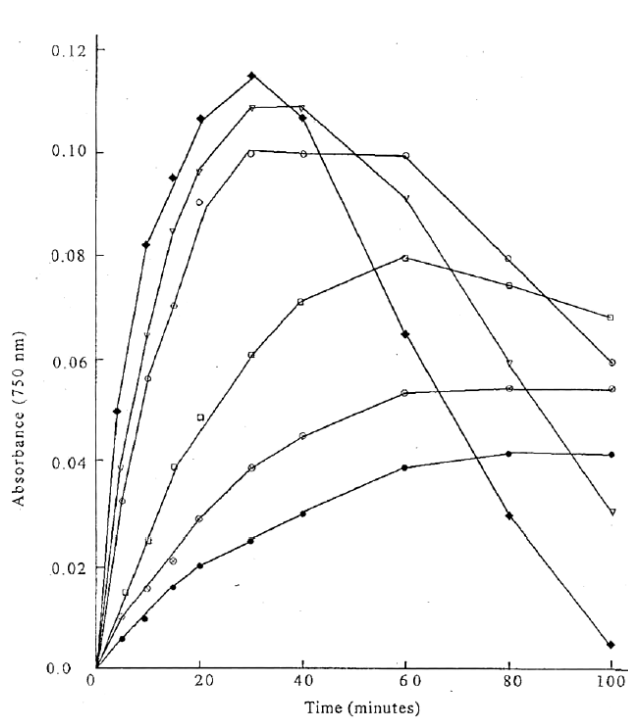
Η αντίδραση θεωρήθηκε ότι προχωρά σε δυο στάδια: το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει το σχηματισμό Cr[III] και ενός ασυνήθιστα σταθερού ενδιάμεσου συμπλόκου Cr[V], ενώ το δεύτερο στάδιο αφορά στην αναγωγή του τελευταίου σε Cr[III] ως τελικό προϊόν. Η αντίδραση θεωρήθηκε ότι είναι δεύτερης τάξης ως προς το γαλακτικό οξύ. Λόγω υψηλών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος (Lac στο εξής) που χρησιμοποιήθηκαν (συγκεκριμένα: [Lac] ≥ 16[Cr(VI)]), θεωρήθηκε κινητική ψευδοπρώτης τάξης και αναζητήθηκε η k<sub>obs</sub> της αντίδρασης.



Εικόνα 3.8. Μορφή συμπλόκου Cr[V]-CH<sub>3</sub>CHOHCOOH (E) κατά Z. Khan.

Το σύμπλοκο Cr[V]-Lac που σχηματίστηκε κατά την αντίδραση οξειδοαναγωγής είχε σχετικά μεγάλο χρόνο ζωής και ισχυρή εξάρτηση από τη [Lac]. Για σταθερή

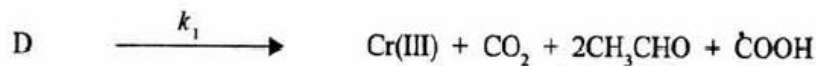
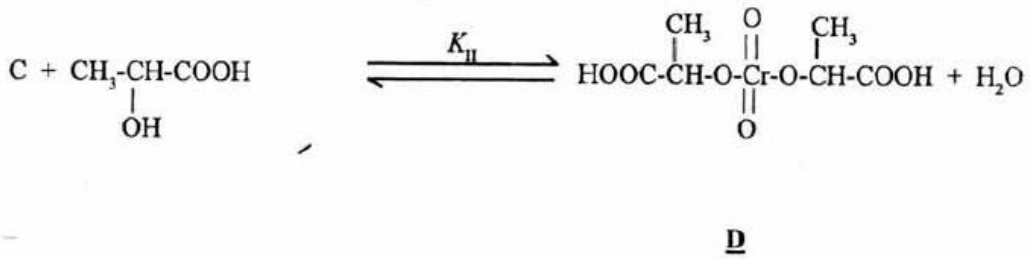
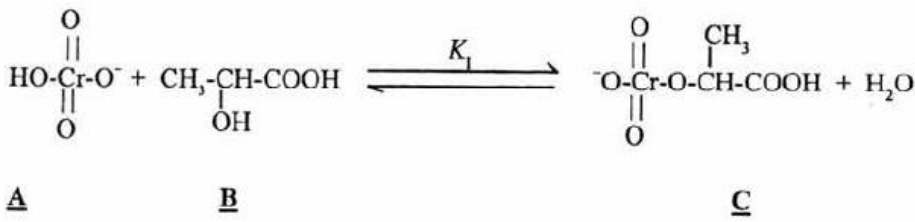
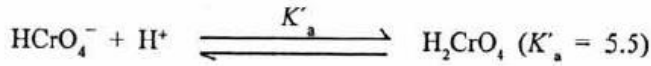
συγκέντρωση Cr[VI] και αυξανόμενη συγκέντρωση Lac, η απορρόφηση λόγω του Cr[V] αυξανόταν.



Διάγραμμα 3.2. Απορρόφηση του συμπλόκου Lac-Cr[V] συναρτήσει του χρόνου, στα 750nm:  $[Cr(V)]=8.3 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ,  $[Lac]=0.14, 0.21, 0.28, 0.43, 0.50, 0.57 \text{ mol/dm}^3$  από την κάτω προς την πάνω καμπύλη,  $25^\circ C$  και  $pH=2.2$ .

Ο ερευνητής αναφέρει ότι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Kumroic M., Rocek, 1979) η οξείδωση α-καρβοξυλικών οξέων από Cr[VI] συμπεριλαμβάνει ένα ενδιάμεσο στάδιο σχηματισμού ενός κυκλικού εστέρα. Επομένως η παρουσία του ανιόντος του γαλακτικού οξέος ( $CH_3CHOHCOO^-$ ) είναι απαραίτητη. Επιπλέον, αναφέρει ότι για να πραγματοποιηθεί η οξειδοαναγωγική αντίδραση οι συνθήκες pH πρέπει να είναι τέτοιες ώστε το γαλακτικό οξύ να παρέχει στο Cr[VI] ένα πρωτόνιο.

Συμπερασματικά, ο μηχανισμός αναγωγής Cr[VI] εξαρτάται από τη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος και το pH. Ο μηχανισμός που προτάθηκε από τον Khan φαίνεται παρακάτω (εικόνα 3.8). Παρατηρείται σε αυτό το μηχανισμό η παραγωγή αέριου  $CO_2$  κατά την αναγωγή του Cr[V] σε Cr[III].



Εικόνα 3.9. Μηχανισμός αναγωγής Cr[VI] σε Cr[III] με σχηματισμό ενδιάμεσου συμπλόκου Cr[V]-γαλακτικού οξέος, κατά Z.Khan.

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα, ο ερευνητής προτείνει την εξής μορφή της παρατηρούμενης σταθεράς ψευδοπρώτης τάξης,  $k_{\text{obs}}$ :

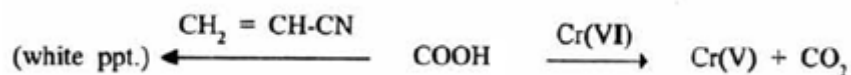
$$k_{\text{obs}} = k_1 K_I K_{II} K'_a \frac{[\text{lactic acid}]^2}{1 + K'_a [\text{H}^+]}$$

Δίδονται μάλιστα οι εξής τιμές της  $k_{\text{obs}}$  συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος σε διάφορες τιμές pH:

[lactic acid] <sup>a</sup> / mol dm <sup>-3</sup>	10 <sup>4</sup> k <sub>obs</sub> /s <sup>-1</sup>	
	pH	
	2.2	3.2
0.14	2.4	1.5
0.21	6.0	3.3
0.28	9.7	6.1
0.35	13.0	9.9
0.42	19.2	13.2
0.50	—	18.0

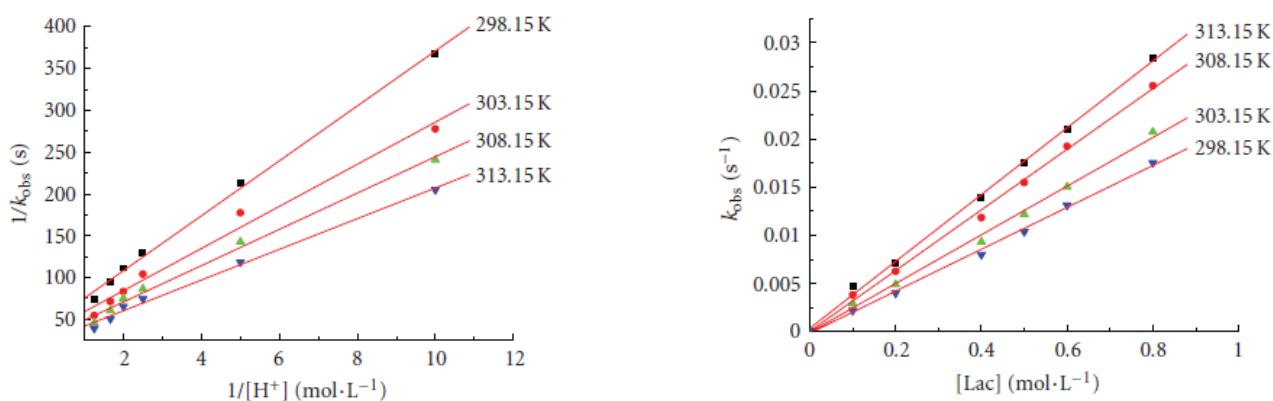
Πίνακας 3.2. Παρατηρούμενη σταθερά ψευδοπρώτης τάξης για την αναγωγή Cr[VI] από γαλακτικό οξύ συναρτήσει της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος σε pH=2.2 και pH=3.2.

Τέλος, παρατηρήθηκε κατά την αντίδραση ο σχηματισμός συμπλόκου Cr[III] με το νερό (απορρόφηση στα μήκη κύματος 410 και 575 nm λόγω μεταπτώσεων d-d), αλλά και συμπλοκοποίηση του Cr[III] με οργανικά οξέα (όπου η απορρόφηση μετατοπίζεται σε χαμηλότερα μήκη κύματος). Επιπλέον, προσθήκη ακρυλονιτριλίου στο μίγμα οδήγησε στο σχηματισμό πολυμερούς (ίζημα), κάτι που υποδεικνύει την ύπαρξη ελευθέρων ριζών κατά την αντίδραση:



3. Οι J. Shan et. al. (2008) (67) μελέτησαν επίσης φωτομετρικά την αναγωγή του Cr[VI] από Lac σε υδατικό όξινο μέσο, στους 298.15K - 313.15K. Σε συνθήκες ψευδοπρώτης τάξης μελετήθηκε η παρατηρούμενη σταθερά ρυθμού ( $k_{\text{obs}}$ ), η εξάρτησή της από τη συγκέντρωση Lac και  $\text{H}^+$  καθώς και ο πιθανός μηχανισμός της αντίδρασης. Δε μελετήθηκε ο σχηματισμός Cr[V] και συμπλόκων του.

Στο διάλυμα των Cr[VI] και Lac προστέθηκαν  $\text{NaClO}_4$  και  $\text{HClO}_4$  ως ρυθμιστές pH και ιονικής ισχύος και DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ). Έγινε παρακολούθηση της αντίδρασης, συγκεκριμένα της μείωσης απορρόφησης του Cr[VI], στα 350 nm. Τα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν ως Cr[III] και πυροσταφυλικό οξύ. Η εξάρτηση της  $k_{\text{obs}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) από την οξύτητα του διαλύματος και τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος σε διάφορες θερμοκρασίες φαίνεται στην εικόνα 3.9.

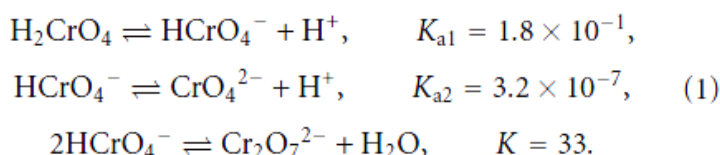


Εικόνα 3.10. (Αριστερά) Διάγραμμα της  $1/k_{\text{obs}}$  συναρτήσεως της  $1/[\text{H}^+]$ , με  $[\text{Lac}] = 0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . (Δεξιά) Διάγραμμα της  $k_{\text{obs}}$  συναρτήσεως της  $[\text{Lac}]$ . Και στις δυο περιπτώσεις:  $[\text{Cr(VI)}] = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{DMSO}] = 0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , ιονική ισχύς  $I = 1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Η σταθερά του ρυθμού  $k_{\text{obs}}$  επομένως αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης πρωτονίων  $[\text{H}^+]$  και γαλακτικού οξέος, καθώς και με την αύξηση της θερμοκρασίας. Ο διαλύτης DMSO επιταχύνει επίσης την αντίδραση, ενώ η αύξηση της ιονικής ισχύος δεν

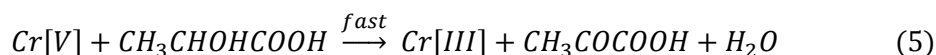
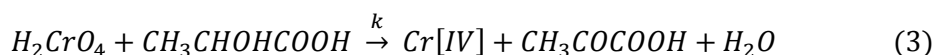
έχει επίδραση στο ρυθμό, υποδεικνύοντας ότι δε σχηματίζεται κάποιο άλας. Με βάση τα παραπάνω θεωρήθηκε πως το γαλακτικό οξύ συμμετέχει στο στάδιο που είναι καθοριστικό για το ρυθμό της αντίδρασης. Έτσι προτάθηκε από τους ερευνητές ο παρακάτω μηχανισμός:

- Η ισορροπία οξέος-βάσης του χρωμικού οξέος με τις αντίστοιχες σταθερές:



Στις όξινες συνθήκες του πειράματος κυριαρχεί η μορφή  $\text{HCrO}_4^-$ .

- Ο μηχανισμός αναγωγής  $\text{Cr}[\text{VI}]$  από  $\text{Lac}$  με τις αντίστοιχες σταθερές:



- Η αντίδραση (3) αποτελεί μια οξειδοαναγωγική απόσπαση ενός μορίου νερού με μεταφορά δυο ηλεκτρονίων κατά τη σχάση δεσμού C-H. Το προϊόν της είναι το πυροσταφυλικό οξύ. Παρατηρείται ότι με βάση αυτό το μηχανισμό, δεν υπάρχει παραγωγή αερίου. Η αντίδραση (3) είναι καθοριστική του ρυθμού, ενώ οι (4) και (5) πραγματοποιούνται ταχέως. Η έκφραση του ρυθμού που εξάγεται είναι:

$$-\frac{d[\text{Cr}(\text{VI})]_T}{dt} = k[\text{H}_2\text{CrO}_4][\text{Lac}] \quad (6)$$

$$\frac{d[\text{Cr}(\text{VI})]_T}{dt} = k_{\text{obs}} \cdot [\text{Cr}(\text{VI})]_T \quad (7)$$

όπου:

$$\left. \begin{aligned} k_{\text{obs}} &= \frac{kK_b[\text{H}^+]}{1+K_b[\text{H}^+]} [\text{Lac}] & (8) \\ K_b &= \frac{1}{K_{a1}} \end{aligned} \right\} \Rightarrow k_{\text{obs}} = \frac{k[\text{H}^+]}{K_{a1}+[\text{H}^+]} [\text{Lac}] \quad (9)$$

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{K_{a1}}{k[Lac]} \cdot \frac{1}{[H^+]} + \frac{1}{k[Lac]} \quad (10)$$

Οι τιμές της σταθεράς  $k$  της καθοριστικής αντίδρασης (3) και των θερμοδυναμικών μεγεθών για διάφορες θερμοκρασίες φαίνονται στον πίνακα 3.3.:

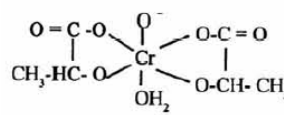
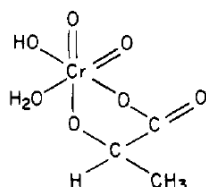
T (K)	k (L/mol·s)	Θερμοδυναμικά μεγέθη ενεργοποίησης (298.15 K)
298.15	0.0474	
303.15	0.0593	$E_a=30.98 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
308.15	0.0735	$\Delta S^\ddagger=-174.6 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$
313.15	0.0858	$\Delta H^\ddagger=28.50 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

Πίνακας 3.3. Οι τιμές της σταθεράς και των ενεργειών ενεργοποίησης της αναγωγής Cr[VI] από γαλακτικό οξύ, κατά J. Shan et al.

### 3.3.2. Συμπεράσματα βιβλιογραφικής ανασκόπησης

Από την ανασκόπηση των ερευνών για την αναγωγή Cr[VI] από γαλακτικό οξύ προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- ❖ Η αναγωγή εξασθενούς χρωμίου από γαλακτικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι δίνει ως προϊόντα πυροσταφυλικό οξύ και τρισθενές χρώμιο.
- ❖ Η παραγωγή πεντασθενούς χρωμίου ως ενδιάμεσο στάδιο της αναγωγής έχει αποδειχθεί με παρακολούθηση της αντίδρασης φασματοφωτομετρικά στα 750 nm, όπου το Cr[V] είναι το μόνο είδος χρωμίου που απορροφά ακτινοβολία.
- ❖ Θεωρείται πως το Cr[V] σχηματίζει σύμπλοκη ένωση με το γαλακτικό οξύ, αν και η δομή αυτής της ένωσης δεν έχει διασαφηνισθεί. Έχουν προταθεί ορισμένες μορφές συμπλόκου Cr[V]-Lac:



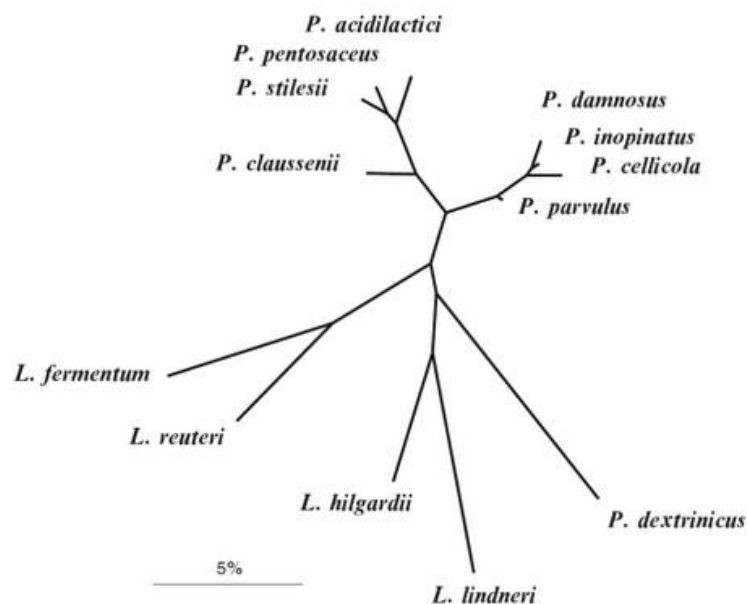
- ❖ Η αναγωγή του Cr[VI] συμβαίνει παράλληλα με την παραγωγή και την αναγωγή του Cr[V]. Συγκεκριμένα, θεωρείται πως η αντίδραση  $\text{Cr[VI]} + \text{Cr[IV]} \rightarrow 2\text{Cr[V]}$  πραγματοποιείται ταχέως, ενώ η αντίδραση  $\text{Cr[VI]} + \text{Lac} \rightarrow \text{Cr[IV]}$  συμβαίνει αργά και ενδεχομένως είναι καθοριστική του ρυθμού. Η κατανάλωση του Cr[V] συμβαίνει στο τελικό στάδιο όπου το χρώμιο ανάγεται στη τελική τρισθενή μορφή του.

- ❖ Έχουν προταθεί διαφορετικοί μηχανισμοί για τη συνολική αναγωγή του Cr[VI], ενός ή δυο σταδίων, 1<sup>ης</sup> ή 2<sup>ης</sup> τάξης ως προς τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος και, κατά συνέπεια, διαφορετικές μορφές της παρατηρούμενης σταθεράς ρυθμού,  $k_{obs}$  και των κινητικών εξισώσεων.
- ❖ Η  $k_{obs}$  και επομένως ο ρυθμός της αναγωγής έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται από τη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος και τη συγκέντρωση πρωτονίων  $H^+$ .

### 3.4. Βακτηριακό γένος *Pediococcus*

Οι μικροοργανισμοί του γένους των *Pediococci* είναι βακτήρια του γαλακτικού οξέος και ανήκουν στην τάξη των *Lactobacillales* και την οικογένεια των Γαλακτοβάκιλλων (*Lactobacillaceae*). Απαντώνται συχνά σε γαλακτοκομικά προϊόντα, παστά λαχανικά, φυτά και στο κρέας. Αναπτύσσονται μαζί με άλλα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που σχετίζονται με φυτική οργανική ύλη και εμφανίζονται χαρακτηριστικά κατά τη διαδικασία της ζύμωσης φυτικών προϊόντων (για την παραγωγή παστών λαχανικών, ζωοτροφών-σιλού κ.ά.), αλλά μπορεί να εμφανιστούν και κατά τη ζύμωση της μπύρας, του κρασιού και του κρέατος, στα οποία θεωρούνται ανεπιθύμητα. Είναι τυπική η ύπαρξή τους στο γάλα, το βούτυρο, το γιαούρτι και τα τυριά, σε ορισμένα από τα οποία χρησιμοποιούνται για να δώσουν χαρακτηριστική γεύση. Ο ρόλος τους στα παστά τρόφιμα είναι διπλός: αποτρέπουν την ανάπτυξη βλαβερών για τον άνθρωπο βακτηρίων με ουσίες που εκκρίνουν και με μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος, ενώ συμβάλλουν στη γεύση και στην υφή.

Η οικογένεια των Γαλακτοβάκιλλων περιλαμβάνει τα γένη *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* και *Pediococcus*. Το γένος *Pediococcus* δαιρείται με τον ίδιο τρόπο με τα γένη *Aerococcus* και *Tetragenococcus* που ανήκουν στην ίδια τάξη (*Lactobacillales*) αλλά σε διαφορετική οικογένεια.



Εικόνα 3.11. Φυλογενετική ταξινόμηση με βάση το 16S rRNA των ειδών του γένους *Pediococcus* μαζί με επιλεγμένα είδη του γένους *Lactobacillus*

Γενικά, επειδή τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος λαμβάνουν ενέργεια μόνο από το μεταβολισμό σακχάρων, περιορίζονται σε περιβάλλοντα που υπάρχουν σάκχαρα, και έχουν μειωμένη βιοσυνθετική ικανότητα. Για να αναπτυχθούν χρειάζονται πλούσια υποστρώματα που ικανοποιούν τις διατροφικές τους ανάγκες σε αμινοξέα, βιταμίνες, πουρίνες και πυριμιδίνες. Τα περισσότερα αναπτύσσονται ανεξάρτητα από άλλους οργανισμούς ή συμβιώνουν με αυτούς αβλαβώς, αλλά κάποια είναι δυνητικά παθογόνα (πχ. το γένος *Streptococcus*). Αποτελούν φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπινου οργανισμού, στο στόμα, την εντερική οδό και τον κόλπο, όπου έχουν ευεργετικό ρόλο. Συνήθως αναπτύσσονται βέλτιστα σε μεσόφιλες θερμοκρασίες, μέχρι 40°C. (68), (69), (70), (71)

Τα βακτήρια του γένους *Pediococcus* είναι θετικά κατά Gram<sup>1</sup>, κοκκοειδή (διαφορετικής μορφολογίας από τους βακίλους του γένους *Lactobacillus*) και οξυγαλακτικά. Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι κατά τη ζύμωση καταναλώνουν γλυκόζη και παράγουν γαλακτικό οξύ ως το βασικό παραπροϊόν του μεταβολισμού (ομοιοζυμωτικά), σε αντίθεση με βακτήρια που εκτός από γαλακτικό οξύ, παράγουν και αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα ως παραπροϊόντα (ετεροζυμωτικά). (69), (72)

Η τελευταία έκδοση του εγχειριδίου Bergey<sup>2</sup> (2015) αναγνωρίζει 9 είδη στο γένος *Pediococcus* (73), τα:

- *Pediococcus acidilactici*
- *Pediococcus claussenii*
- *Pediococcus cellicola*
- *Pediococcus damnosus*
- *Pediococcus dextrinicus*
- *Pediococcus inopinatus*
- *Pediococcus parvulus*
- *Pediococcus pentosaceus*, με τα υποείδη *Pediococcus pentosaceus* subsp. *pentosaceus* και *Pediococcus pentosaceus* subsp. *intermedius*
- *Pediococcus stilesii*

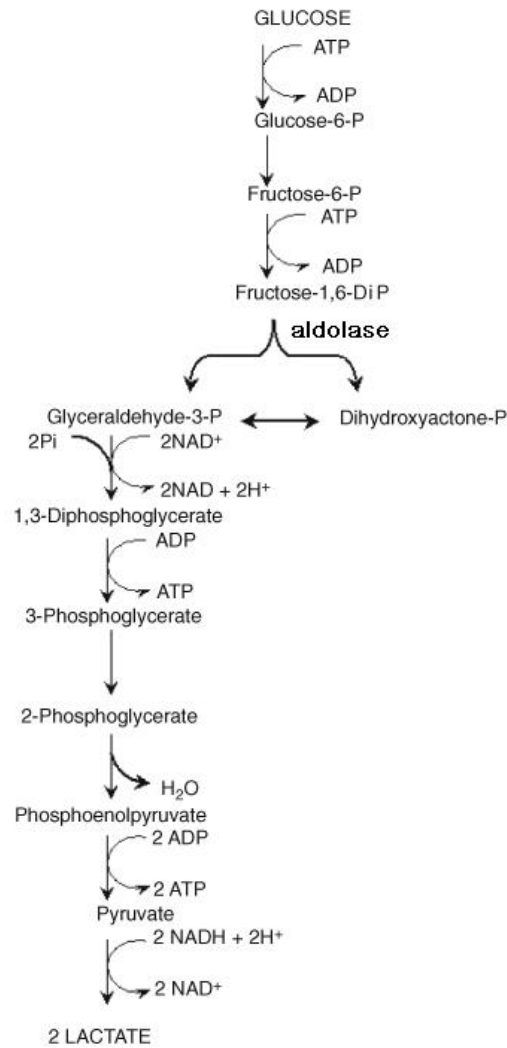
Οι *Pediococci* συνήθως εμφανίζονται σε τετράδες ή δυάδες και διαιρούνται σε δυο επίπεδα συμμετρίας. Τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται υπό περίσσεια γλυκόζης και αναερόβιες συνθήκες ή παρουσία περιορισμένου οξυγόνου. Αν και δε διαθέτουν καταλάση, το ένζυμο που μετατρέπει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, επεξεργάζονται το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με υπεροξειδική δισμουτάση και άλλα ένζυμα. (69), (70) Η γλυκόζη μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ ομοιοζυμωτικά, πιθανώς μέσω της μεταβολικής οδού Embden-Meyerhof:

---

<sup>1</sup> Θετικά κατά Gram θεωρούνται τα βακτήρια που κατά τη χρώση κατά Gram αποκτούν μπλε-ιώδες χρώμα, κάτι που οφείλεται στην ύπαρξη πεπτιδογλυκάνης στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων αυτών.

<sup>2</sup> Το “Bergeys Manual of Systematic Bacteriology” αποτελεί την κύρια πηγή εξακρίβωσης της ταυτότητας προκαρυωτικών οργανισμών.





Εικόνα 3.12. Η οδός παραγωγής γαλακτικού οξέος (*Embden-Meyerhof*) σε ομοιοζυμωτικά βακτήρια του γαλακτικού οξέος. (70)

Τα δυο βασικά είδη του γένους *Pediosoccus* είναι τα *Pediosoccus acidilactici* και *Pediosoccus pentosaceus*. Όσον αφορά στη μορφολογία, τη φυσιολογία και τις ιδιότητες των καλλιεργειών, τα δυο αυτά είδη δεν είναι εύκολα διαχωρίσιμα. Αν και η διάκρισή τους κάποιες φορές είναι δύσκολη με τις συνηθισμένες τεχνικές, η μέθοδος DNA-DNA υβριδισμού που μετρά το βαθμό της ομοιότητας μεταξύ αλληλουχιών DNA, αποκαλύπτει μόνο 5-35% ομολογία DNA, δικαιολογώντας το διαχωρισμό των δυο ειδών. Μορφολογικά, τα κύτταρά τους έχουν διάμετρο 0.6-1.0 μm, και εμφανίζονται μονά, σε ζευγάρια, τετράδες ή ακανόνιστες συστάδες. Και τα δυο είδη καταναλώνουν γλυκόζη και παράγουν ένα ρακεμικό μίγμα D(-) και L(+)-γαλακτικού οξέος. (69), (74)

	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
ρΗ	Ανάπτυξη σε ρΗ 4.2 και 8. Κάποιες φορές και σε ρΗ 8.5.	Βέλτιστο ρΗ 6-6.5. Αναπτύσσονται και σε ρΗ 8 και κάποιες φορές 9.
Τελικό ρΗ στο θρεπτικό υλικό	3.5-3.8	<4
Θερμοκρασία	Βέλτιστη θερμοκρασία 40°C. Μέγιστη ανάπτυξη στους 50-53°C. Όλα τα στελέχη αναπτύσσονται σε 50°C.	Βέλτιστη θερμοκρασία 28-32°C. Άνω όριο 39-45°C.
Απαιτούμενη συγκέντρωση NaCl	9-10% (w/v)	9-10% (w/v)
Θερμοαντοχή	Θερμοανθεκτικά κύτταρα, αλλά πεθαίνουν μετά από 10 min στους 70°C. Κάποια στελέχη είναι ακόμη πιο ανθεκτικά.	Λιγότερο θερμοανθεκτικό από το <i>Pediococcus acidilactici</i> , πεθαίνει μετά από 8 min στους 65°C.
Ζύμωση μαλτόζης	Όχι	Ναι
Υδρόλυση του αμινοξέος αργινίνη	Ναι	Ναι
Συνθήκες οξυγόνου	Προαιρετικά αναερόβιο	Προαιρετικά αναερόβιο
Βακτηριοσίνες	Πεδιοσίνη PA-1/AcH	Πεδιοσίνη PA-1 Πεδιοσίνη ST18 Πεδιοσίνη -A Πεδιοσίνη ACCEL
Περιεκτικότητα DNA σε G+C (mol%)	38-44	35-39

Πίνακας 3.4. Σύγκριση ειδών *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus*. (69), (74)

Ο *Pediococcus acidilactici* σε κάποιες μελέτες έχει συνδεθεί με προβιοτική<sup>3</sup> δράση, το οποίο δεν είναι ασυνήθιστο για βακτήρια του γαλακτικού οξέος· τα είδη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* είναι γνωστά προβιοτικά, ενώ επίσης χρησιμοποιούνται *Lactococci* και κάποιοι *Enterococci* και *Streptococci*. Ο *Pediococcus acidilactici* επιδεικνύει in vitro εξαιρετική ικανότητα επιβίωσης σε όξινο περιβάλλον, αλλά και σε συνθήκες αλάτων της χολής. Το στέλεχος MA18/5M (PA) έχει αναδειχθεί σε προβιοτικό με θετική επίδραση στην υγεία του γαστρεντερικού συστήματος που βελτιώνει την ανάπτυξη στα αυγά και τα κοτόπουλα παραγωγής. (75), (70)

Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικές ενώσεις που παράγονται από βακτήρια για να εμποδίσουν την ανάπτυξη συγγενικών στελεχών. Η μελέτη τους έχει εξαπλωθεί ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες λόγω της αντιβακτηριακής και ενδεχομένως αντικαρκινικής τους ικανότητας σε συνδυασμό με το γεγονός ότι προέρχονται από μη παθογόνα βακτήρια που

<sup>3</sup> Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μη παθογόνοι μικροοργανισμοί που θεωρούνται επωφελείς για την ανθρώπινη υγεία, και εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της διατροφής. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα που αναφέρονται είναι η ρύθμιση της ισορροπίας της χλωρίδας του εντέρου, η τόνωση του ανοσοποιητικού συστήματος και η βελτίωση της επιδερμίδας. Παρ' όλα αυτά δεν έχει τεκμηριωθεί επαρκώς η δράση τους.

βρίσκονται φυσικά στο ανθρώπινο σώμα. Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από βακτήρια του γαλακτικού οξέος αποτελούν αντικείμενο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και χωρίζονται ανάλογα με τις πιθανές δομές τους και το μηχανισμό δράσης τους.

Τα είδη *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* παράγουν βακτηριοσίνες που είναι αποτελεσματικές ενάντια στα περισσότερα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αλλά και σε ένα πλήθος παθογόνων, θετικών κατά Gram βακτηρίων. Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα βακτήρια του γένους *Pediococcus* ονομάζονται πεδιοσίνες (pediocins). Το εύρος της αντιμικροβιακής τους δράσης έχει προκαλέσει εκτενή έρευνα για την πρακτική εφαρμογή τους. Κάποιες από τις πεδιοσίνες περιγράφονται παρακάτω:

- Πεδιοσίνη Α

Η παραγωγή βακτηριοσίνων στους *Pediococci* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1975 όταν ένας παράγοντας διαφορετικός από οξύ ή υπεροξειδίο του υδρογόνου ήταν υπεύθυνος για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του βακτηρίου *Lb. plantarum* σε μικτές καλλιέργειες. Στη συνέχεια βρέθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 3 στελέχη *P. pentosaceus* που παρήγαγαν έναν παρόμοιο πρωτεϊνικό παρεμποδιστή. Ο παρεμποδιστής αυτός ήταν η πεδιοσίνη Α, η οποία επεδείξε ένα εκτενές φάσμα βακτηριοκτόνου δράσης που περιλάμβανε τα περισσότερα θετικά κατά Gram βακτήρια του γαλακτικού οξέος καθώς και των παθογόνων βακτηρίων που προέρχονταν από τρόφιμα. Η πρωτεϊνική αυτή ένωση ήταν σταθερή μετά από 60 min στους 100°C. Η παραγωγή της πεδιοσίνης Α στο *P. pentosaceus* κωδικοποιείται σε πλασμίδιο. Λόγω του εύρους της δράσης της έχει δυναμικά σημαντική πρακτική εφαρμογή σε τρόφιμα.

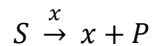
- Πεδιοσίνη PA-1/AcH

Η πεδιοσίνη PA-1/AcH παράγεται από το είδος *P. acidilactici* και έχει σε πολύ μεγάλο βαθμό παρόμοιες γενετικές ιδιότητες με τις υπόλοιπες πεδιοσίνες, εκτός από την πεδιοσίνη SJ-1 που είναι μοναδική λόγω της απενεργοποίησής της από α-αμυλάση. Είναι θερμοσταθερή (60 min σε 100°C) και ενεργή ενάντια σε πολλά βακτήρια του γαλακτικού οξέος και στο *Ls. monocytogenes*, αλλά δε δρα ανταγωνιστικά προς τα: *Lactococci*, *staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Streptococcus thermophilus*, *Lb. acidophilus* και *Lb. delbrueckii*. Κωδικοποιείται επίσης σε πλασμίδιο. Με την ανακάλυψη αρχικών καλλιεργειών *P. acidilactici* που παράγουν βακτηριοσίνες ενεργές εναντίον του *Ls. monocytogenes* άνοιξε το ενδιαφέρον για την πρακτική χρήση τέτοιων καλλιεργειών σε προϊόντα επεξεργασμένου κρέατος (λουκάνικα). (76)

Παρόλο που οι *Pediococci* θεωρούνται κατά βάση ακίνδυνοι μικροοργανισμοί, έχει προταθεί η σύνδεσή τους με ασθένεια στον άνθρωπο, συγκεκριμένα με κάποιες περιπτώσεις βακτηριαμίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι το γένος *Pediococcus* είναι ανθεκτικό στο αντιβιοτικό βανκομυκίνη. Αν και έχει αναφερθεί η σύνδεση του βακτηριακού αυτού γένους με ανθρώπινες μολύνσεις, η ταυτοποίηση στα κλινικά εργαστήρια μπορεί να είναι λανθασμένη εν μέρει λόγω της δυσκολίας διάκρισής τους από βακτήρια με παρόμοια φυσιολογία. (68), (77)

### 3.5. Κινητική μικροβιακής ανάπτυξης

Υπάρχουν πολλά μοντέλα διαφορετικής περιπλοκότητας που περιγράφουν την κινητική της μικροβιακής ανάπτυξης μιας καλλιέργειας. Οι κινητικές αυτές εκφράσεις συνδέουν τη συγκέντρωση του θρεπτικού υλικού (υποστρώματος) με την ανάπτυξη της βιομάζας. Με το κατάλληλο θρεπτικό υλικό (S), οι μικροοργανισμοί (x) αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται, παράγοντας κάποιο προϊόν (P) του μεταβολισμού τους. Το προϊόν μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε κάποιες περιπτώσεις (δηλητηρίαση).



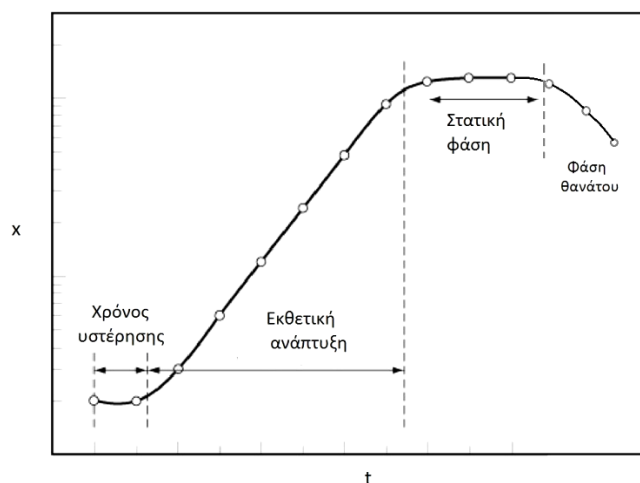
Οι βασικές σχέσεις για την περιγραφή της βιολογικής ανάπτυξης είναι:

- ο ρυθμός ανάπτυξης βιομάζας  $r_x = \frac{dx}{dt}$  και
- ο ρυθμός κατανάλωσης του περιοριστικού υποστρώματος  $r_S = \frac{dS}{dt}$
- ο ρυθμός παραγωγής προϊόντος  $r_P = \frac{dP}{dt}$ .

#### Ποιοτική περιγραφή μικροβιακής ανάπτυξης

Όταν μια ποσότητα μικροοργανισμών εισαχθεί σε ένα περιβάλλον με κατάλληλο υπόστρωμα με συγκέντρωση S, αρχικά απαιτείται κάποιος χρόνος προσαρμογής στο νέο περιβάλλον (εγκλιματισμός). Στη συνέχεια, αρχίζουν να αναπτύσσονται εκθετικά. Η καμπύλη της ανάπτυξης ακολουθεί διαφορετική πορεία αν οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε ασυνεχή αντιδραστήρα ή αντιδραστήρα με ανάμιξη.

Συγκεκριμένα, σε έναν ασυνεχή αντιδραστήρα η σύσταση του υποστρώματος αλλάζει και η συγκέντρωση του προϊόντος αυξάνεται. Όταν φτάσει μια συγκεκριμένη τιμή, μπορεί να αποβεί τοξικό για τα κύτταρα. Οι φάσεις της ανάπτυξης διακρίνονται: στην περίοδο προσαρμογής (χρόνος υστέρησης), στην περίοδο ανάπτυξης, στη στατική φάση και τέλος στο θάνατο των κυττάρων. Σε ένα ασυνεχές σύστημα, όπως ο αντιδραστήρας διαλείποντος έργου το μέσο αλλάζει κι έτσι μεταβάλλεται ο ρυθμός της ανάπτυξης στη φάση της ανάπτυξης και στη στατική φάση. Η μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης οφείλεται είτε στην εξάντληση του υποστρώματος είτε στη συσσώρευση τοξικών για το κύτταρο ουσιών. Ως περιοριστικό υπόστρωμα ορίζεται το συστατικό που εκλείπει πρώτο, αν η ανάπτυξη της βιομάζας προχωρήσει ως το τέλος.



Διάγραμμα 3.3. Φάσεις κυτταρικής ανάπτυξης

Σε έναν αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης, τα κύτταρα βρίσκονται σε ομοιόμορφο περιβάλλον, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων προχωρά με σταθερή ταχύτητα και δεν απαιτείται το στάδιο της προσαρμογής των κυττάρων.

#### Ρυθμός μικροβιακής ανάπτυξης

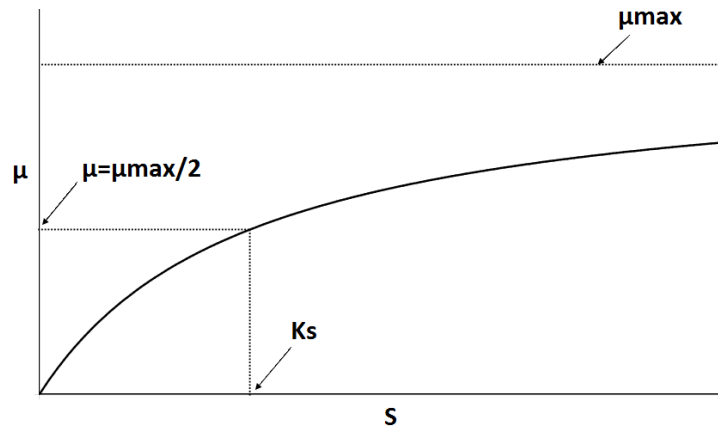
Στη συγκεκριμένη ενότητα θα αναλυθεί η κινητική Monod για τη μικροβιακή ανάπτυξη, μιας και χρησιμοποιήθηκε στη μοντελοποίηση της διεργασίας με το λογισμικό Aquasim. Η εξίσωση Monod δίνει την ταχύτητα ανάπτυξης των κυττάρων στη φάση της ανάπτυξης:

$$r_x = \mu_{max} \cdot \frac{S}{S + K_S} \cdot x$$

όπου:  $\mu_{max}$  : ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ( $t^{-1}$ ), ο οποίος εξαρτάται από παράγοντες όπως θερμοκρασία, παρουσία ιχνοστοιχείων, τοξικές ουσίες, ένταση φωτός κλπ.

$K_S$  : η σταθερά κορεσμού, δηλαδή η συγκέντρωση του περιοριστικού υποστρώματος όπου τα κύτταρα αναπαράγονται με το  $\frac{1}{2}$  της μέγιστης ταχύτητας ( $\frac{\mu}{\mu_{max}} = 0.5$ ).

Το μέγεθος  $\mu_{max} \frac{S}{S+K_S}$  αποτελεί τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών  $\mu$ , ο οποίος μεταβάλλεται καθώς καταναλώνεται το υπόστρωμα.



Διάγραμμα 3.4. Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης  $\mu$  συναρτήσει της συγκέντρωσης περιοριστικού υποστρώματος  $S$ .

### Συντελεστές απόδοσης

Κάθε ομάδα μικροοργανισμών κάτω από τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης και για το ίδιο υπόστρωμα χαρακτηρίζεται από κάποιους σταθερούς στοιχειομετρικούς συντελεστές, το συντελεστή απόδοσης βιομάζας  $Y_{x/S}$  και το συντελεστή απόδοσης προϊόντος  $Y_{p/S}$ , που ορίζονται ως εξής:

$$Y_{x/S} = \frac{\Delta x}{\Delta S}$$

$$Y_{p/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Ισχύει ότι  $Y_{S/x} = \frac{1}{Y_{x/S}}$  και οι ρυθμοί ανάπτυξης των κυττάρων και κατανάλωσης θρεπτικού μπορούν να γραφούν ως εξής:

$$r_x = (-r_S) \cdot Y_{x/S}$$

$$r_S = \left( -\frac{1}{Y_{x/S}} \right) \cdot (r_x) = \left( -\frac{1}{Y_{x/S}} \right) \cdot \frac{\mu_{max} S}{S + K_S} \cdot x$$

Ο θάνατος των μικροοργανισμών μειώνει τη συγκέντρωσή τους και δεν προβλέπεται από το μοντέλο Monod. Το τροποποιημένο μοντέλο Monod λαμβάνει υπόψη του το θάνατο των μικροοργανισμών και δίνεται από την εξίσωση:

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu_{max} \cdot \frac{S}{S + K_S} \cdot x - b \cdot x$$

όπου  $b$  = ο ειδικός ρυθμός του θανάτου των μικροοργανισμών ( $t^{-1}$ ).

Για την περίπτωση της δηλητηρίασης της βιομάζας από τοξικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού, έχουν αναπτυχθεί διάφορες σχέσεις που τροποποιούν την εξίσωση Monod ώστε να περιγράφει την επίδραση των παρεμποδιστικών παραγόντων. Μια απλή μορφή αυτής σχέσης είναι:

$$(\mu_{max})_{obs} = \mu_{max} \left(1 - \frac{I}{I^*}\right)^n$$

όπου:

$I$  = η συγκέντρωση του παρεμποδιστή

$I^*$  = η συγκέντρωση του παρεμποδιστή όπου αναστέλλεται όλη η δραστηριότητα του κυττάρου και η  $(\mu_{max})_{obs}$  γίνεται ίση με το μηδέν

$\mu_{max}$  = η σταθερά της ταχύτητας απουσία επιβλαβών προϊόντων

$n$  = η τάξη δηλητηρίασης των προϊόντων

Άλλες τροποποιημένες εκφράσεις Monod για δηλητηρίαση της βιομάζας, που χρησιμοποιούνται στην αναερόβια χώνευση, είναι η παρεμπόδιση τύπου Andrews (παρεμπόδιση υποστρώματος) και η μη ανταγωνιστική παρεμπόδιση.

Εξίσωση Andrews: 
$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} \cdot \frac{I}{I + \left(\frac{S}{K_I}\right)}$$

Εξίσωση Ierusalimsky: 
$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} \cdot \frac{K_I}{I + K_I}$$

όπου  $K_I$  = η σταθερά παρεμπόδισης. (78), (79), (80)

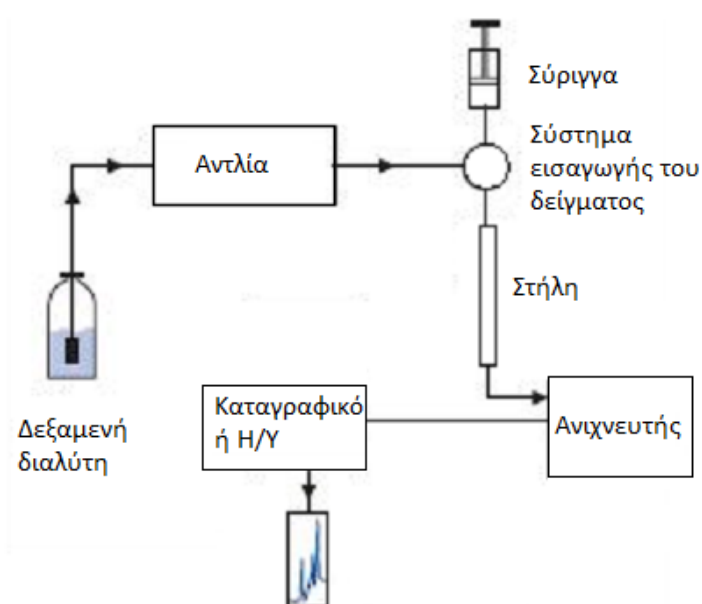
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1. Θεωρία πειραματικών μεθόδων

#### 4.1.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Οι διάφορες μέθοδοι χρωματογραφίας (Gas Chromatography, Liquid Chromatography, Supercritical Fluid Chromatography) αποτελούν αναλυτικές τεχνικές χρήσιμες για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση συστατικών ενός μίγματος. Είναι ικανές τόσο για ποιοτική όσο και ποσοτική ανάλυση και έχουν ένα ευρύ πεδίο εφαρμογής, όπως οι περιβαλλοντικές αναλύσεις, αναλύσεις αμινοξέων, πρωτεϊνών, φαρμάκων, εντομοκτόνων και πολυμερών. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) από την δεκαετία του '80 όπου αυτοματοποιήθηκε με τη χρήση Η/Υ αποτελεί μία από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους ενόργανης ανάλυσης στην Οργανική Χημεία.

Η HPLC βασίζεται στη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης (ως 6000 psi ή 400 bar) που εξασφαλίζουν σταθερή παροχή χωρίς διακυμάνσεις στη ροή, καθώς το μικρό μέγεθος στήλης προκαλεί αυξημένη αντίσταση στη ροή. Η στήλη πληρώνεται με κατάλληλο υλικό (πχ. σίλικα, αλούμινα, ρητίνες ή πολυμερή) του οποίου το είδος και το μέγεθος των σωματιδίων εξαρτάται από το διαχωριζόμενο μίγμα. Ένας διαλύτης (κινητή φάση) που ρέει συνεχώς προωθεί το δείγμα μέσα στη στήλη με το πληρωτικό υλικό (στατική φάση). Το μίγμα κατανέμεται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης και μετακινείται με ρυθμό που εξαρτάται από τη σχετική αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με τις δυο φάσεις. Έτσι κάθε συστατικό μεταναστεύει με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στήλης. Ο χρόνος που απαιτείται ώστε να διανύσει ένα συστατικό μια καθορισμένη απόσταση είναι η βάση του ποιοτικού προσδιορισμού του μίγματος (81). Τα μέρη της διάταξης ενός συστήματος HPLC φαίνονται στην εικόνα 4.1.:



Εικόνα 4.1. Διάταξη HPLC

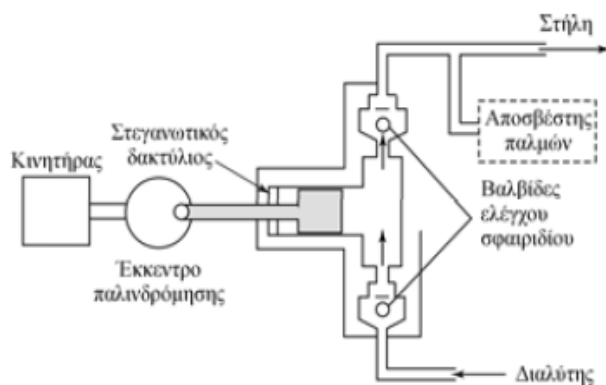
### Πειραματική διάταξη

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία παρουσιάζεται παρακάτω:

- Αντλία

Ισοκρατική αντλία LC1120 GBC. Η γενική διάταξη μιας τέτοιας αντλίας φαίνεται στην εικόνα 4.2.

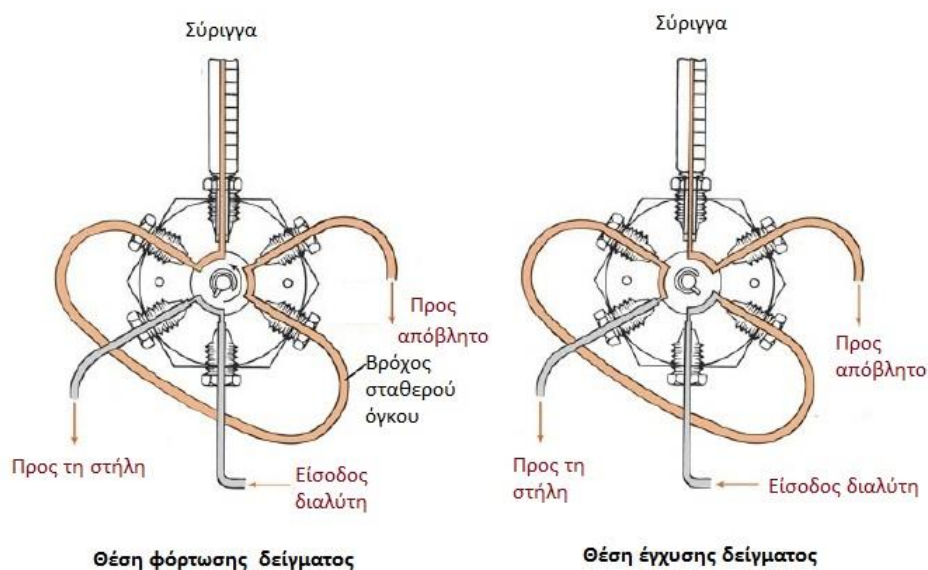




Εικόνα 4.2. Αντλία σταθερής ροής (82)

- Σύστημα εισαγωγής δείγματος σταθερού όγκου

Το σύστημα εισαγωγής αποτελείται από την υποδοχή της σύριγγας, του διαλύτη και το βρόχο που ρυθμίζει τον όγκο του δείματός μας στα 20 μl.



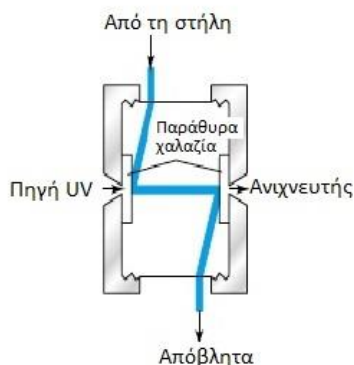
Εικόνα 4.3. Φόρτωση και έγχυση του δείγματος (82)

- Στήλη Aminex HPX-87H

Πληρωμένη στήλη διαστάσεων 30 × 0,78 cm, διάμετρος πληρωτικών σωματιδίων 9 μm, εύρος τιμών pH 1-3. Κατάλληλη για ανάλυση υδρογονανθράκων, καρβοξυλικών οξέων, πτητικών λιπαρών οξέων, αλκοολών, κετονών κá.

- Ανιχνευτής UV-Vis

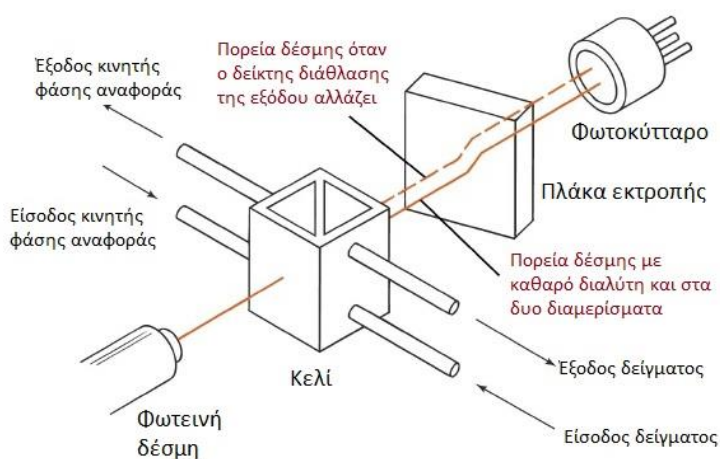
Ανιχνευτής μονής δέσμης UV-Vis LC1200 πολλαπλού μήκους κύματος. Το μήκος κύματος ρυθμίζεται ανάλογα με τη μέθοδο και η απορρόφηση μηδενίζεται με καθαρό διαλύτη. Η διάταξη φαίνεται στην εικόνα 4.4.



Εικόνα 4.4. Ανιχνευτής UV-Vis (82)

- Ανιχνευτής RI (Refractive Index Detector) ή Διαθλασίμετρο

Ανιχνευτής ιδιότητας διαλύματος, μοντέλο LC1120. Μετρά τη διαφορά του δείκτη διάθλασης μεταξύ της κινητής φάσης και της εξόδου της στήλης (που περιέχει την κινητή φάση και την εκλουόμενη ουσία).

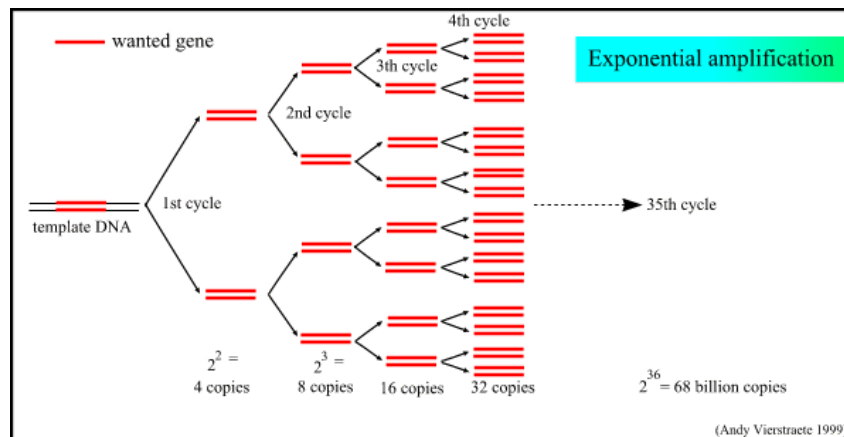


Εικόνα 4.5. Διάταξη διαθλασίμετρου (82)

- Ηλεκτρονικός Υπολογιστής και πρόγραμμα λήψης δεδομένων Clarity™ Lite

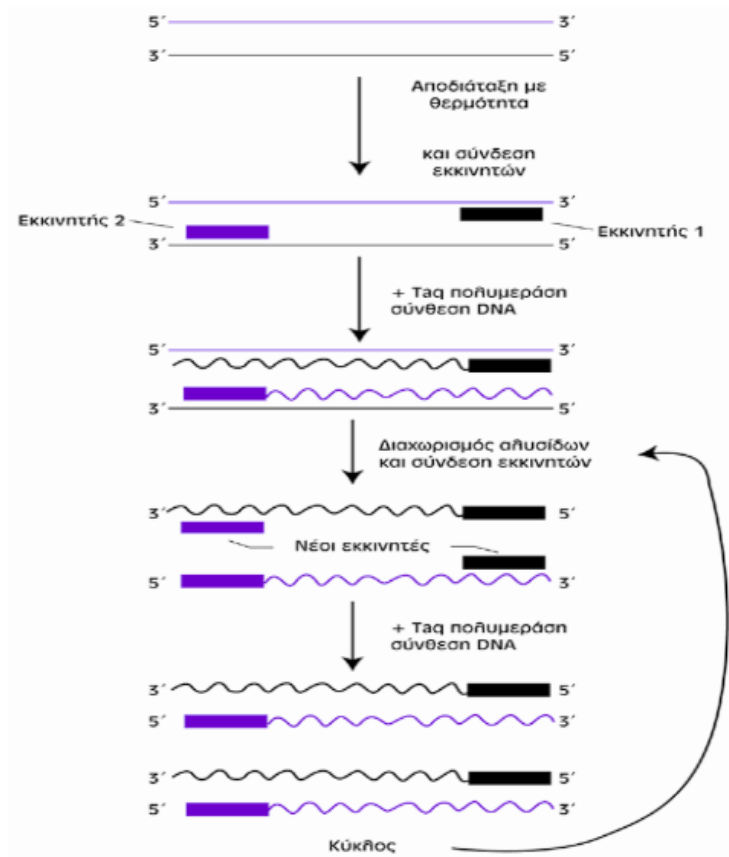
#### 4.1.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μια τεχνική ενζυμικού πολλαπλασιασμού του ζητούμενου DNA. Μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων του DNA αντιγράφεται και πολλαπλασιάζεται σε τέτοια ποσότητα, ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί και να ταυτοποιηθεί εύκολα. Αυτό που προκύπτει από την αντίδραση είναι πιστό αντίγραφο του DNA-στόχου.



Εικόνα 4.6. Διαδικασία πολλαπλασιασμού γονιδίου-στόχου στην PCR

Η PCR λειτουργεί με επαναλαμβανόμενους θερμικούς κύκλους, που προκαλούν αποδιάταξη των νουκλεοτιδικών αλυσίδων του DNA, σύνδεσή τους με τους εκκινητές, και σύνθεση νέου DNA. Οι εκκινητές αποτελούν μονόκλινα ή ολιγόκλινα τμήματα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικά για τα δυο άκρα της αλληλουχίας του γονιδίου-στόχου (forward και reverse primer). Με την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA, προσδένονται στα άκρα της αλληλουχίας στόχου. Έπειτα το ένζυμο DNA πολυμεράση (Taq polymerase) επιμηκύνει τα υβρίδια μονόκλωνης αλυσίδας DNA-εκκινητή, κινούμενη σε κατεύθυνση 5'→3', συνθέτοντας μια συμπληρωματική αλυσίδα. Η επανάληψη αυτής της διαδικασίας οδηγεί σε εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου.



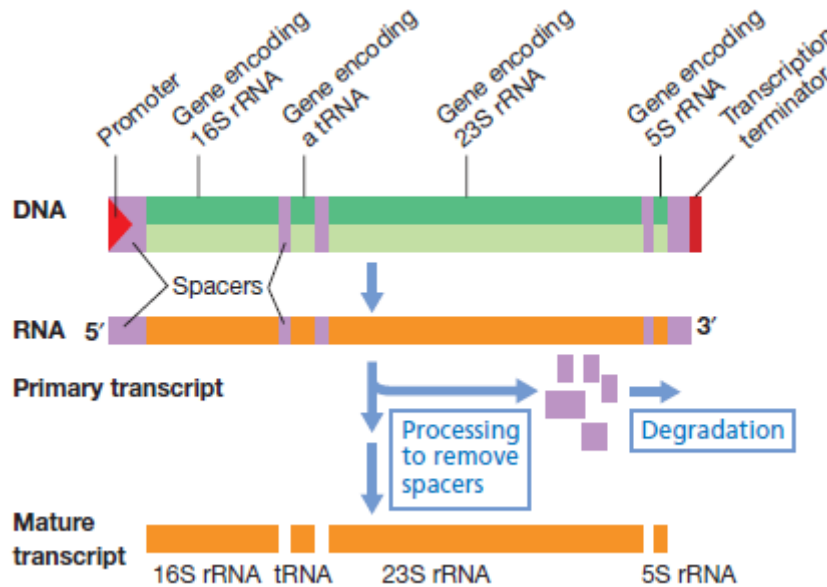
Εικόνα 4.7. Θερμικοί κύκλοι PCR (83)

Κατά την προετοιμασία της αντίδρασης χρησιμοποιούνται διάφορα αντιδραστήρια που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση DNA, πέρα από τους εκκινητές και την Ταq πολυμεράση. Ιόντα  $Mg^{2+}$  δρουν ως μεταλλικοί συμπαράγοντες της πολυμεράσης και επιδρούν στην ειδικότητα και την ποσότητα του τελικού προϊόντος. Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια ή dNTP's αποτελούν τις δομικές μονάδες για τις νέες αλυσίδες DNA, και τέλος το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί το κατάλληλο pH για τη δράση του ενζύμου. (83), (84)

### Σημασία του γονιδίου 16S rRNA στην PCR

Η επιτυχία των μεθόδων ταυτοποίησης DNA βακτηρίων βασίζεται στην επιλογή κατάλληλων εκκινητών κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού. Οι εκκινητές κατασκευάζονται για περιοχές του γονιδιώματος που έχουν διατηρηθεί σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών. Μια τέτοια περιοχή είναι το γονίδιο 16S ριβοσωμικού RNA, το οποίο χρησιμοποιείται πιο συχνά πειραματικά.

Το ριβοσωμικό RNA (rRNA) είναι ένα από τα τρία είδη RNA που συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση και αποτελεί δομικό και καταλυτικό συστατικό των ριβοσωμάτων, των πρωτεϊνικών παραγωγών του κυττάρου. Λόγω της πιθανής αρχέγονης προέλευσης των ριβοσωμάτων, τα μόρια rRNA χρησιμοποιούνται για την εξακρίβωση εξελικτικών σχέσεων ανάμεσα στα είδη. Το γονίδιο του 16S rRNA απαντάται σε προκαρυωτικούς και ευκαριωτικούς οργανισμούς και η λειτουργία του είναι συντηρημένη.

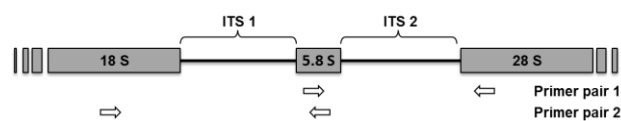


Εικόνα 4.8. Το 16S rRNA γονίδιο

Το 16S rRNA διαθέτει υψηλά διατηρημένες περιοχές, όσο και περιοχές που εμφανίζουν διαφορές μεταξύ των οργανισμών. Αυτό το καθιστά κλειδί για τη φυλογενετική ταξινόμηση των βακτηρίων. Εξετάζοντας το βαθμό ομοιότητας των αλληλουχιών του γονιδίου αυτού σε δυο βακτήρια, δίνεται μια ένδειξη για την εξελικτική απόσταση μεταξύ τους.

Εφόσον η αλληλουχία του 16S rRNA είναι γνωστή και όμοια ανά περιοχές στα διάφορα είδη βακτηρίων, κατασκευάζονται εκκινητές που προσδένονται σε αυτές τις περιοχές του γονιδίου.

Οι περιοχές στο DNA των μυκήτων που χρησιμοποιούνται κατά την PCR βρίσκονται ανάμεσα στα γονίδια 18S και 28S που χωρίζονται από το γονίδιο 5.8S rRNA, και αποτελούν περιοχές που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (spacer ITS 1 και ITS 2). (85), (86)



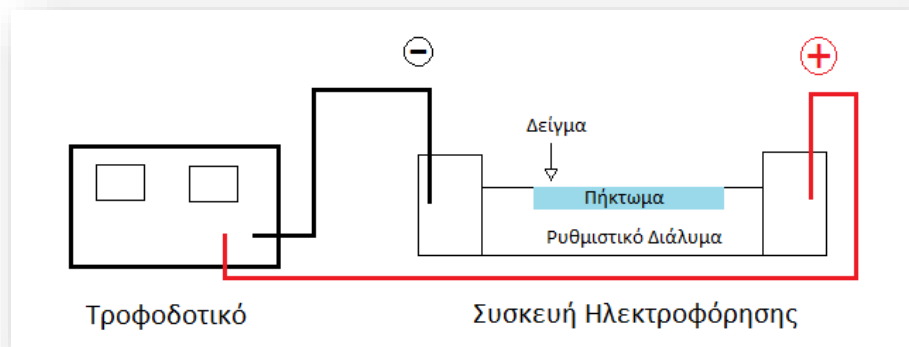
Εικόνα 4.9. Spacers ITS 1, ITS 2

#### 4.1.3. Ηλεκτροφόρηση DNA

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική κατά την οποία φορτισμένα μόρια κινούνται υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο χρήσιμη για τον καθαρισμό, το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση βιομορίων μεγάλου μεγέθους, όπως DNA, RNA και πρωτεϊνών.

Το δείγμα τοποθετείται στο μέσο της ηλεκτροφόρησης, κάποιο πορώδες υλικό (πχ. πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου) το οποίο διαθέτει ειδικές θέσεις φόρτωσης (πηγάδια). Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρώνεται με

ρυθμιστικό διάλυμα. Στα άκρα της συσκευής υπάρχουν ηλεκτρόδια, και ανάμεσά τους βρίσκεται το πήκτωμα έτσι ώστε να διαρρέεται από ηλεκτρικό ρεύμα.



Εικόνα 4.10. Βασική συνδεσμολογία ηλεκτροφόρησης

Η ικανότητα μετακίνησης των βιομορίων κατά την ηλεκτροφόρηση προκύπτει από το φορτίο που εμφανίζουν αν ιονιστούν. Έτσι τα μόρια, μέσα σ' ένα υγρό υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, κινούνται προς τον αντίθετα φορτισμένο πόλο. Κατά την κίνηση διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθος και το φορτίο τους. (87)

Το DNA αποτελείται από ένα σκελετό σακχάρου-φωσφορικής ομάδας. Οι φωσφορικές ομάδες φέρουν φυσικά ένα αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα τα νουκλεϊκά οξέα να κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο κατά την ηλεκτροφόρηση. Η ταχύτητα με την οποία θα κινηθούν εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ( $E$ ), το ολικό φορτίο του μορίου ( $q$ ) καθώς και από μια δύναμη τριβής που παρεμποδίζει την κίνηση του φορτίου:

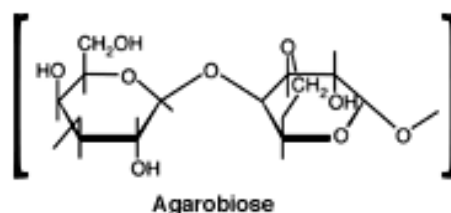
$$v = \frac{E \cdot q}{f}$$

Ο συντελεστής  $f$  αφορά την τριβή και στα διαλύματα δίνεται από το νόμο του Stoke:

$$f = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta$$

όπου  $r$  η ακτίνα του μορίου και  $\eta$  το ιξώδες του μέσου. (88), (89)

Το πήκτωμα αγαρόζης είναι ένα σύννηθες μέσο για την ηλεκτροφόρηση DNA. Η αγαρόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από άλγη (είδη *Gelidium* και *Gracilaria*). Συνίσταται από επαναλαμβανόμενες μονάδες αγαροβιόζης, που αποτελείται από εναλλασόμενες μονάδες D- και L-γαλακτόζης (1,3-linked b-D-galactopyranose και 1,4-linked 3,6-anhydro-a-L-galactopyranose). (90), (91)

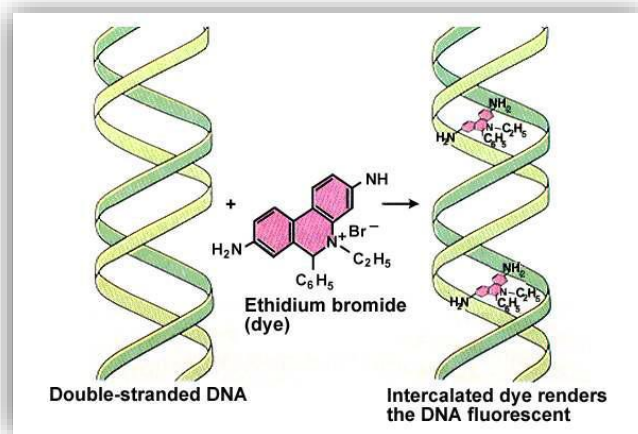


Εικόνα 4.11. Αγαροβιόζη: Δομική μονάδα αγαρόζης.

Το διάλυμα της αγαρόζης σε θερμοκρασία 100°C σχηματίζει ένα κολλοειδές, το οποίο πήζει κάτω από τους 45°C. Με τη δημιουργία πηκτής, το πολυμερές της αγαροβιόζης σχηματίζει ένα τρισδιάστατο πλέγμα με πορώδη δομή. Το μέγεθος των πόρων καθορίζει και την ικανότητα «μοριακού κοσκινίσματος» του τζελ. Μεγαλύτεροι πόροι οδηγούν σε μεγαλύτερη κινητικότητα μορίων και το αντίστροφο. Το μέγεθος των πόρων ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη.

Με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού, τα μόρια του DNA μετακινούνται μέσω των πόρων στο τζελ. Επειδή το DNA έχει ομοιόμορφη αναλογία μάζας/φορτίου, τα μόρια του DNA διαχωρίζονται κατά μέγεθος. Τα μικρά μόρια κινούνται γρηγορότερα, λόγω μικρότερης συνισταμένης δύναμης τριβής. Τα μεγάλα μόρια εμφανίζουν περισσότερη καθυστέρηση, λόγω δυσκολίας στη διέλευση μέσα από τους πόρους του πηκτώματος. Συγκεκριμένα, η απόσταση που διανύουν τα μόρια είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Έτσι διαφορετικά μόρια DNA θα διανύσουν διαφορετικές αποστάσεις στο τζελ με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους, ενώ τα όμοια μόρια θα μετακινηθούν ως ενιαίες ζώνες (μπάντες). Αυτό που προκύπτει είναι η δημιουργία διακριτών ζωνών στο τζελ που αποτελούνται από τμήματα DNA ίδιου μεγέθους. (90), (89), (92)

Στο πήκτωμα προστίθεται μια ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων της νουκλεοτιδικής αλυσίδας σχηματίζοντας δεσμούς Van der Waals. Το EtBr όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία εκπέμπει φως πορτοκαλί απόχρωσης (μήκος κύματος 590 nm). Έτσι το DNA με το δεσμευμένο αιθίδιο καθίσταται ορατό. Αναφέρεται μάλιστα ότι ο φθορισμός που προκύπτει από το σύμπλοκο EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου EtBr. (88)



Εικόνα 4.12. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται στην έλικα του DNA

Τα πιο συνηθισμένα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι το TAE (Tris/Acetate/EDTA) που απαιτεί τάση 80-100V και το TBE (Tris/Borate/EDTA) που εμφανίζει καλύτερο διαχωρισμό σε τάση μεγαλύτερη των 150V. Ο ρόλος των ρυθμιστικών διαλυμάτων είναι η διατήρηση του pH σε σταθερές τιμές καθώς και η παροχή των απαραίτητων ιόντων για τη μεταφορά ρεύματος. (88)

Στο δείγμα DNA που ηλεκτροφορεύεται προστίθεται μια ποσότητα χρωστικής. Αυτό εξυπηρετεί τρεις σκοπούς: να προστεθεί μάζα στο δείγμα ώστε να «καθίσει» στο πηγάδι του τζελ· να χρωματιστεί το δείγμα ώστε να διευκολυνθεί η λεπτή διαδικασία της φόρτωσης στο

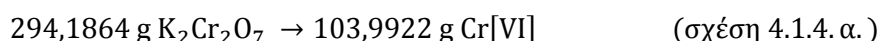
τζελ· τέλος να δίνεται μια εκτίμηση για την απόσταση που έχει διανύσει το DNA στο τζελ, αφού η χρωστική μετακινείται με σταθερή ταχύτητα. (92)

Τελικά, το μέγεθος των τμημάτων του DNA που περιέχει το δείγμα προσδιορίζονται με χρήση ενός μάρτυρα (DNA ladder). Ο ladder περιέχει ένα μίγμα τμημάτων DNA γνωστού μεγέθους. Συγκρίνοντας την απόσταση που διένυσε το δείγμα με τις μπάντες του ladder προκύπτει το μέγεθος του άγνωστου τμήματος DNA.

Με αυτή τη μέθοδο διαπιστώνεται: (α) αν υπάρχει DNA στο δείγμα και (β) αν το DNA ανήκει σε βακτήριο ή μύκητα.

#### 4.1.4. Προετοιμασία διαλυμάτων Cr[VI]

Στα διάφορα διαλύματα που προετοιμάζονται κατά την πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιείται διχρωμικό κάλιο ως πηγή Cr[VI]. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων ρυθμίστηκε με τη βοήθεια πρότυπου διαλύματος  $K_2Cr_2O_7$  και βασίστηκε στην αντιστοιχία:



Τα απαιτούμενα g  $K_2Cr_2O_7$  για τη ζητούμενη συγκέντρωση Cr[VI] (σε mg/l ή ppm) υπολογίζονται από τη σχέση:

$$\text{Απαιτούμενα g } K_2Cr_2O_7 = \frac{\text{mg/L Cr[VI]}}{1000} \cdot \frac{294,1846}{103,9922} \cdot \frac{\text{mL Διαλύματος}}{1000} \quad (\text{σχέση 4.1.4. β.})$$

## 4.2. Αναλυτικά και κινητικά πειράματα

### 4.2.1. Διερεύνηση μηχανισμού αναγωγής Cr[VI] στο βιοαντιδραστήρα

#### Σκοπός

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου στον βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται εξωκυτταρικά (πχ. από εκκρινόμενες αναγωγάσες ή προϊόντα του μεταβολισμού), εσωκυτταρικά (πχ. από εσωκυτταρικές αναγωγάσες ή το αναγωγικό περιβάλλον του κυτταροπλάσματος), με βιορόφηση ή βιοσυσσώρευση, δείγματα του βιοαντιδραστήρα με διαφορετική επεξεργασία το καθένα παρέμειναν με Cr[VI] για χρονικό διάστημα 48 ωρών και ελέγχθηκε η αναγωγική τους ικανότητα.

#### Αντιδραστήρια

- YMAX
- $K_2Cr_2O_7$
- 1,5-diphenylcarbazide
- π. $H_2SO_4$



## Όργανα

- Χύτρα αποστείρωσης
- Αποστειρωμένες σύριγγες
- Φίλτρα 0.22 μm Nylon
- Φασματοφωτόμετρο ορατού

## Διαδικασία

### α) Προετοιμασία δειγμάτων

Προετοιμάζονται πέντε (5) δοκίμια που περιέχουν υδατικό διάλυμα χρωμίου και δείγματα από το εσωτερικό του αντιδραστήρα τα οποία έχουν υποστεί διαφορετική κατεργασία.

Σε γυάλινο φιαλίδιο τοποθετούνται 10 ml υδατικού διαλύματος με 1100ppm Cr[VI] και 10 ml δείγματος. Το δείγμα που προστέθηκε σε κάθε ένα από τα δοκίμια αποτελούνταν από το περιεχόμενο του αντιδραστήρα είτε (i) αυτούσιο από τον αντιδραστήρα (B), είτε (ii) έπειτα από διήθηση με χρήση φίλτρου σύριγγας με πορώδες 0.22μm (FB), είτε (iii) έπειτα από αποστείρωση (SB), είτε (iv) έπειτα από διήθηση με χρήση φίλτρου σύριγγας με πορώδες 0.22μm και αποστείρωση (FSB). Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε φιαλίδιο που περιείχε υδατικό διάλυμα με 1100ppm Cr[VI] και αποστειρωμένο YMAX ώστε να ερευνηθεί αν συμμετέχει το θρεπτικό υλικό στην αναγωγή του χρωμίου. Οι σκοπιμότητα των παραπάνω παρουσιάζεται στον πίνακα 4.1.

Δείγμα	Σκοπός
Βιοαντιδραστήρα (B)	Θετικό control, επιβεβαιώνεται ότι πραγματοποιείται αναγωγή στα δοκίμια.
Διηθημένο βιοαντιδραστήρα (FB)	Οι μικροοργανισμοί συγκρατούνται από το φίλτρο, οπότε ελέγχεται αν η αναγωγή συμβαίνει στο εξωκυτταρικό υγρό ή εσωκυτταρικά.
Διηθημένο και αποστειρωμένο βιοαντιδραστήρα (FSB)	Εάν η αναγωγή γίνεται στο εξωκυτταρικό υγρό, ελέγχεται το αν πραγματοποιείται μέσω ενζυμικής αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και παύουν να είναι δραστικές λόγω των υψηλών θερμοκρασιών.
Αποστειρωμένο βιοαντιδραστήρα (SB)	Ελέγχεται το ενδεχόμενο απομάκρυνσης με βιορόφηση ή βιοσυσσώρευση.
Αποστειρωμένο YMAX	Αρνητικό control, ελέγχεται αν η αναγωγή πραγματοποιείται από το θρεπτικό υλικό.

Πίνακας 4.1. Δοκίμια για τον έλεγχο της τοποθεσίας αναγωγής του Cr[VI]

Η αποστείρωση πραγματοποιείται σε χύτρα, όπου τα δοκίμια αφήνονται για 20 min σε θερμοκρασία 120°C.

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε Cr[VI] μετράται στην αρχή του πειράματος (0 h), στις 24 h και στις 48 h, προκειμένου να διαπιστωθεί η πορεία της αναγωγής. Οι μετρήσεις γίνονται σε φασματοφωτόμετρο ορατού, με τη μέθοδο περιγράφεται στο επόμενο υποκεφάλαιο.

## β) Μετρήσεις

Η συγκέντρωση του Cr[VI] προσδιορίζεται με την «3500-Cr B. Colometric method», σύμφωνα με το Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Η μέθοδος βασίζεται στο ότι σε όξινο διάλυμα το 1,5-diphenylcarbazine δίνει με το εξασθενές χρώμιο ένα ευδιάλυτο και χρωματισμένο ροζ/μωβ σύμπλοκο. Η φασματοφωτομετρική μέτρηση ακολουθεί την παρακάτω μεθοδολογία.

Αρχικά, πραγματοποιείται η αραιώση του δείγματος, ώστε η συγκέντρωση μετά αραιώσης να κυμαίνεται μεταξύ 0-1,5 mg Cr[VI]/l. Ο τελικός όγκος του δείγματος είναι 50 ml. Στο δείγμα προστίθεται 1 ml διαλύματος diphenylcarbazine και 2-3 σταγόνες πυκνόθειικό οξύ (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Το δείγμα καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και αναδεύεται για 5 min για την ανάπτυξη και διαμόρφωση του χρώματος. Η φασματοφωτομετρική μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος γίνεται στα 540 nm. Το φωτόμετρο έχει προηγουμένως μηδενιστεί με τυφλό διάλυμα, αντί διαλύματος Cr[VI].

Η συγκέντρωση του δείγματος προκύπτει από τη σχέση:

$$C \text{ (mg/l)} = \text{Απορρόφηση} \cdot \text{Αραιώση} \cdot \text{Κλίση καμπύλης αναφοράς} \quad (\text{σχέση 4.1.})$$

### Παρασκευή διαλύματος diphenylcarbazine

Για την παρασκευή αντιδραστήριου diphenylcarbazine έγινε διαλυτοποίηση 0,25 g από σκόνη diphenylcarbazine σε 50 ml καθαρής ακετόνης. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε αδιαφανές μπουκάλι, υπό ψύξη (4°C) για 4 ημέρες.

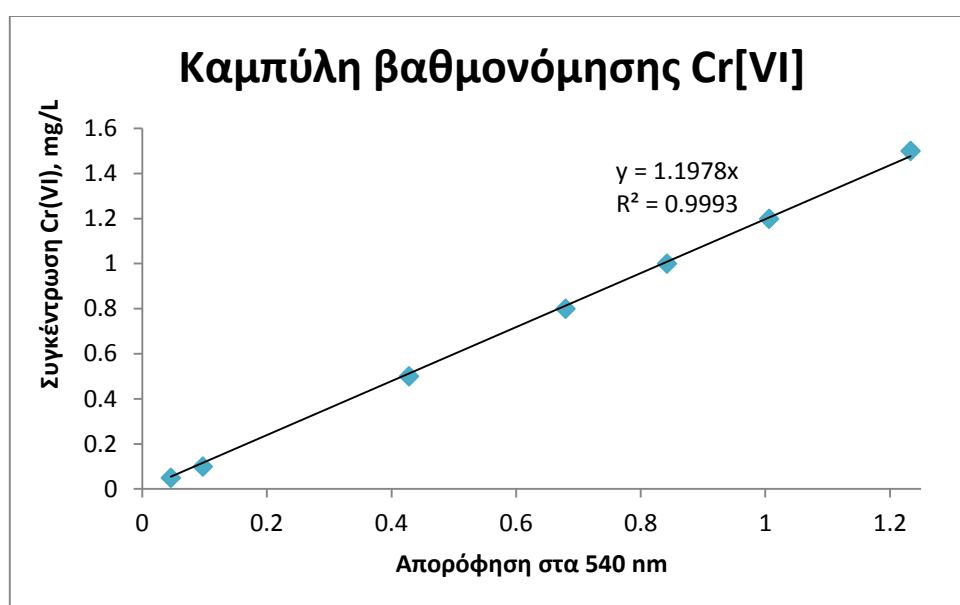
### Βαθμονόμηση φασματοφωτόμετρο ορατού-Καμπύλη αναφοράς για μέτρηση Cr[VI]

Η βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρο ορατού για μέτρηση Cr[VI] και η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Παρασκευάστηκε διάλυμα 50 mg/l Cr[VI], με διαλυτοποίηση κατάλληλης ποσότητας 0,1414 g K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> σε 1 L απιονισμένο νερό.
- Στη συνέχεια, με κατάλληλες αραιώσεις παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των συγκεντρώσεων που παρατίθενται στον πίνακα 4.2. και όγκου 50 ml.
- Προστέθηκε σε κάθε διάλυμα 1 ml διαλύματος diphenylcarbazine και 2-3 σταγόνες πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- Τα δείγματα τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο και αναδεύτηκαν για 5 min για την ανάπτυξη του χρώματος. Έγινε μέτρηση με φασματοφωτόμετρο ορατού στα 540 nm.

Συγκέντρωση Cr[VI], mg/l	Απορρόφηση
0.05	0.046
0.1	0.097
0.5	0.428
0.8	0.679
1	0.842
1.2	1.006
1.5	1.233

Πίνακας 4.2. Δεδομένα καμπύλης αναφοράς για τη βαθμονόμηση φασματοφωτόμετρου ορατού



Διάγραμμα 4.1. Καμπύλη βαθμονόμησης φασματοφωτόμετρου ορατού για μέτρηση Cr[VI].

#### 4.2.2. Ανάλυση δειγμάτων με HPLC

##### Σκοπός

Εφόσον η πιθανότητα απομάκρυνσης του Cr[VI] από κάποια πρωτεΐνη ή ένζυμο αποκλείστηκε, χρησιμοποιήθηκε η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) για να ερευνηθεί η πιθανότητα ύπαρξης κάποιου μεταβολικού προϊόντος που σχετίζεται με την αναγωγή του Cr[VI]. Ένα από τα μεταβολικά προϊόντα που παράγεται σε κάθε κύκλο του αντιδραστήρα είναι το γαλακτικό οξύ. Η ποσότητα του γαλακτικού οξέος στο τέλος του κύκλου αντιστοιχεί σε 5.6 g/l. Το γαλακτικό οξύ έχει δείχθει και στο παρελθόν ότι μπορεί να λειτουργήσει ως αναγωγικός παράγοντας για την αναγωγή του Cr[VI]. (65), (66), (67)



Εικόνα 4.13. Πειραματική διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.

### Διάταξη

- Στήλη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης Aminex HPX-87H

### Αντιδραστήρια

- L-γαλακτικό οξύ,  $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$
- Οξικό οξύ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- Ηλεκτρικό οξύ,  $(\text{CH}_2)_2(\text{COOH})_2$
- Πυροσταφυλικό οξύ,  $\text{CH}_3\text{COCOOH}$
- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

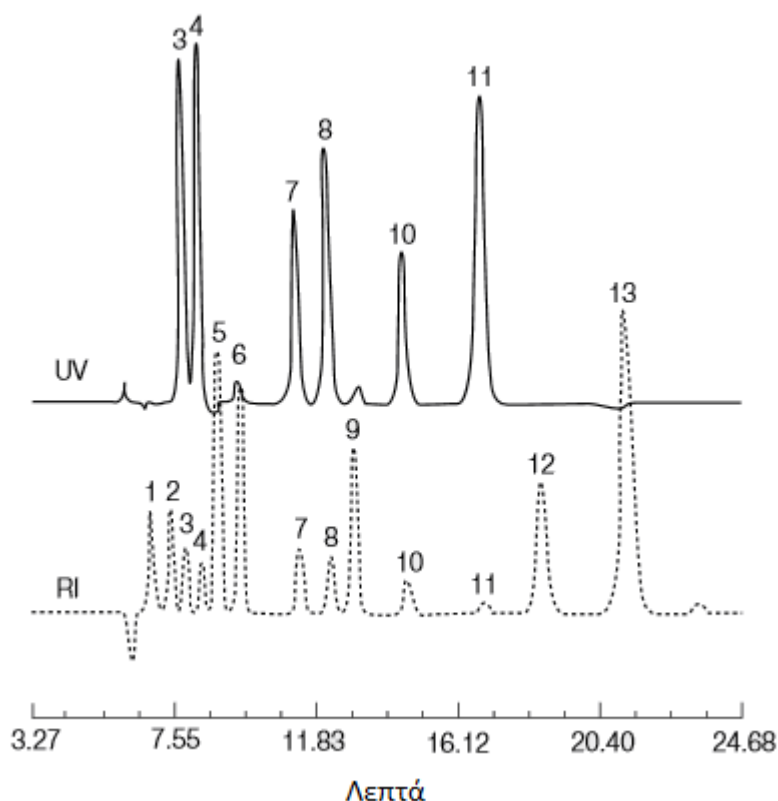
### Πειραματική μέθοδος

Κινητή φάση:	5 mM θειικό οξύ
Ρυθμός παροχής:	0.60 ml/min
Θερμοκρασία:	50°C
Ανίχνευση:	UV 210 nm, RI

Οι κορυφές και οι χρόνοι που εμφανίζονται με χρήση αυτής της μεθόδου φαίνονται παρακάτω:

### Κορυφές:

1. Μαλτοτριόζη
2. Μαλτόζη
3. Κιτρικό οξύ
4. Ταρταρικό οξύ
5. Γλυκόζη
6. Φρουκτόζη
7. Ηλεκτρικό οξύ
8. **Γαλακτικό οξύ**
9. Γλυκερόλη
10. Οξικό οξύ
11. Πυρογλουταμικό οξύ
12. Μεθανόλη
13. Αιθανόλη



Εικόνα 4.14. Κορυφές σε πρότυπο ζύμης διαχωρισμένες σε στήλη *Atipex HPX-87H* με χρήση ανιχνευτών UV-Vis και διαθλασίμετρου (RI)

### Νεκρός χρόνος στήλης

Ο νεκρός χρόνος είναι ο όγκος της πληρωμένης στήλης διαιρεμένος με το ρυθμό παροχής. Αντιστοιχεί στον κενό όγκο της στήλης, ή, το χρόνο που θα απαιτούνταν από την κινητή φάση να εξέλθει από τη στήλη αν δεν ήταν πληρωμένη. Στον χρόνο αυτό εξέρχονται συστατικά που δεν κατακρατούνται από το πληρωτικό υλικό της στήλης και στα συγκεκριμένα πειράματα είναι ίσος με 6.20 ως 6.33 min.

### **Πειραματική διαδικασία**

1. Ταυτοποίηση κορυφών και βαθμονόμηση

Περάστηκαν στη στήλη διάφορα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων οργανικών οξέων και αλκοολών για την αντιστοίχιση των κορυφών του μίγματος από το εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα και την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης.

2. Μέτρηση δείγματος θρεπτικού

Το θρεπτικό  $\gamma_{max}$  μετρήθηκε στη στήλη HPLC. Το χρωματογράφημά του συγκρίθηκε με αυτό του δείγματος βιοαντιδραστήρα ώστε να διαπιστωθεί ποιες κορυφές οφείλονταν

σε συστατικά του θρεπτικού και ποιες όχι, καθώς και να φανούν οι μεταβολές των συστατικών στο θρεπτικό λόγω της κατανάλωσής του από τους μικροοργανισμούς.

### 3. Μέτρηση δείγματος βιοαντιδραστήρα

Λήφθηκαν δείγματα από το εσωτερικό τους αντιδραστήρα σε 3 φάσεις: 1 ώρα, 18 ώρες και 48 ώρες μετά την τροφοδοσία (τέλος κύκλου). Έγινε ένεση των δειγμάτων στην HPLC και τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τις πρότυπες κορυφές. Έτσι ήταν δυνατός ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός ορισμένων ουσιών στα δείγματα και η διερεύνηση του μηχανισμού της αντίδρασης αναγωγής.

### 4. Μέτρηση δοκιμίου με 2.5 g/l γαλακτικό οξύ και 620 ppm Cr[VI]

Υποθέσαμε ότι τα στοιχεία του συστήματος που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική αντίδραση είναι: γαλακτικό οξύ και Cr[VI]. Στόχος ήταν η επιβεβαίωση της οξείδωσης του γαλακτικού οξέος από το Cr[VI], η εύρεση των προϊόντων της αντίδρασης και τέλος η σύγκριση με τα προϊόντα στον αντιδραστήρα.

Δημιουργήθηκε δοκίμιο που περιείχε περίπου 2.5 g/l γαλακτικό οξύ σε υδατικό διάλυμα 620 ppm Cr[VI] και περάστηκε στη στήλη. Συγκεκριμένα:

- Σε 100 ml που υδατικού διαλύματος γαλακτικού οξέος συγκέντρωσης 5.33 g/l προστέθηκαν 100ml με 1216.95 ppm Cr[VI]
- Το δοκίμιο παρέμεινε υπό ανάδευση στους 35°C
- Το δοκίμιο μετρήθηκε στην HPLC στην αρχή του πειράματος και στις 24 ώρες.

#### 4.2.3. Μελέτη της αναγωγής Cr[VI] από γαλακτικό οξύ

##### Σκοπός

Το συγκεκριμένο πείραμα εκτελέστηκε συμπληρωματικά στο χρωματογραφικό πείραμα 4 της ενότητας 4.2.2. Το δοκίμιο υπό μέτρηση περιείχε γαλακτικό οξύ σε υδατικό διάλυμα εξασθενούς χρωμίου και μετρήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα (i) για περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ, (ii) για περιεκτικότητα σε Cr[VI] και (iii) για την τιμή pH. Στόχος των μετρήσεων ήταν να επιβεβαιωθεί ότι πράγματι το γαλακτικό λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας για τη μετατροπή του Cr[VI] σε Cr[III].

##### Όργανα

- Ογκομετρικές φιάλες 50 ml και 100ml
- Πιπέττες των 20 ml, 200ml και 1 ml
- Τιπς για τις πιπέττες
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας (METTLER TOLEDO, AB20K)

- Χρονόμετρο
- Φασματοφωτόμετρο στα 540 nm και τα 340 nm
- Συσκευή στροβιλισμού (Vortex)
- Χάρτινα φίλτρα Whatman No.1 (9 cm)
- Πεχάμετρο (HACH, HQ440d multi)

### Αντιδραστήρια

- $K_2Cr_2O_7$
- L-lactic acid

### Πειραματική διαδικασία

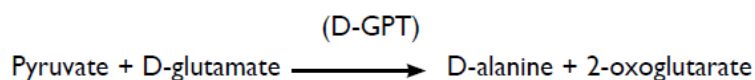
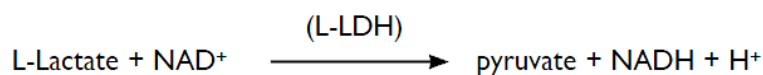
Το δοκίμιο περιείχε 2.5 g/l L-γαλακτικό οξύ σε υδατικό διάλυμα 620 ppm Cr[VI] και τοποθετήθηκε υπό ανάδευση στους 35°C για χρονικό διάστημα 68 ωρών. Πραγματοποιούνταν δειγματοληψία ανά τακτά χρονικά διαστήματα και έγιναν οι ακόλουθες μετρήσεις:

#### i. Μέτρηση Cr[VI]

Οι μετρήσεις Cr[VI] πραγματοποιήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο UV-Vis με τη μέθοδο που αναλύθηκε στο κεφάλαιο 4.2.1.

#### ii. Μέτρηση γαλακτικού οξέος

Οι μετρήσεις του γαλακτικού οξέος πραγματοποιήθηκαν με ειδικό κιτ [D-Lactic Acid (D-Lactate) (Rapid) and L-Lactic Acid (L-Lactate) Assay Procedures, Megazyme]. Όπως αναφέρεται, η μέτρηση του L-γαλακτικού οξέος γίνεται έμμεσα, με μέτρηση νικοτιναμιδο-αδενινουκλεοτιδίου (NADH). Συγκεκριμένα, απαιτούνται δυο ενζυμικές αντιδράσεις που καταλύονται η πρώτη από τη γαλακτική αφυδρογονάση (L-LDH) και η δεύτερη από μια τρανσαμινάση (D-glutamate-pyruvate transaminase, D-GPT):



Η ποσότητα του NADH που σχηματίζεται είναι σε στοιχειομετρική αναλογία με το ποσό του L-γαλακτικού οξέος, και είναι το NADH που μετράται στο φωτόμετρο στα 340 nm.

#### iii. Μέτρηση pH στο πεχάμετρο.

#### 4.2.4. Απομόνωση μικροοργανισμών από τη μικτή καλλιέργεια του βιοαντιδραστήρα

##### Σκοπός

- Προκειμένου να απομονωθούν μικροοργανισμοί από το βιοαντιδραστήρα, λήφθηκε δείγμα από το εσωτερικό του το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό τρυβλίων Petri. Σκοπός ήταν η οπτική παρατήρηση της μορφολογίας των μοναδιαίων αποικιών που αναπτύσσονται από τα διαφορετικά είδη των μικροοργανισμών που περιέχονται στον αντιδραστήρα.
- Εμβολιασμός υγρών καλλιεργειών με μοναδιαίες αποικίες που προκύπτουν από τα διαφορετικά είδη μικροοργανισμών σε Υmax με Cr[VI]. Σκοπός ήταν η εύρεση των μικροοργανισμών εκείνων που συμμετέχουν στην αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου.
- Εμβολιασμός τρυβλίων petri από τις υγρές καλλιέργειες και έλεγχος για επιμολύνσεις. Σκοπός ήταν η επιβεβαίωση ότι αποκλειστικά και μόνο ένα είδος μικροοργανισμών εμπεριέχεται στην υγρή καλλιέργεια και είναι υπεύθυνο για την αναγωγή.

##### Αντιδραστήρια

- Γλυκόζη
- Εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)
- Πεπτόνη
- Άγαρ
- $K_2Cr_2O_7$

##### Όργανα

- Λύχνος Bunsen
- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Ποτήρι ζέσης των 500 ml
- Αποστειρωμένα τρυβλία petri
- Γυάλινη ράβδος
- Αναπτήρας
- Κωνικές φιάλες
- Χύτρα αποστείρωσης
- Φίλτρο 0.22  $\mu m$
- Αναδευτήρας με θέρμανση
- Φωτόμετρο
- HPLC



## Διαδικασία

- **Προετοιμασία τρυβλίων Petri**

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό (Ymax) που χρησιμοποιήθηκε και για την τροφοδοσία του αντιδραστήρα. Έχει περιεκτικότητες:

- 10 g/l σε γλυκόζη
- 5 g/l σε yeast extract
- 10 g/l σε πεπτόνη
- 110 ppm ή 550 ppm Cr[VI]

Σε Ymax που δεν περιείχε Cr[VI] προστέθηκε agar σε αναλογία 20g/l προκειμένου να στερεοποιηθεί. Το Ymax με το agar αποστειρώθηκαν και στην συνέχεια προστέθηκε διάλυμα K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> το οποίο είχε προηγουμένως αποστειρωθεί μέσω διήθησης. Τα τρυβλία περιείχαν είτε 110ppm Cr[VI] είτε 550ppm.

- **Εμβολιασμός των τρυβλίων**

Για τον εμβολιασμό των τρυβλίων με μικροοργανισμούς από τον αντιδραστήρα λαμβάνεται δείγμα από το εσωτερικό του αντιδραστήρα με τη χρήση αποστειρωμένης σύριγγας. Στο δείγμα γίνεται αραιώση  $\frac{1}{100}$ . Η αραιώση είναι απαραίτητη γιατί διαφορετικά οι αποικίες που αναπτύσσονται στο τρυβλίο είναι πολύ πυκνές για να απομονωθούν μοναδιαίες αποικίες. Απλώνεται στα τρυβλία η κατάλληλη ποσότητα δείγματος, με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου που έχει προηγουμένως αποστειρωθεί στη φωτιά. Συνολικά εμβολιάστηκαν 6 διαφορετικά τρυβλία:

Τρυβλίο	Συγκέντρωση Cr[VI] (ppm)	Όγκος δείγματος (μl)
1	110	100
2	110	150
3	110	150
4	550	100
5	550	150
6 (control)	550	-

Πίνακας 4.3. Περιεκτικότητα τρυβλίων σε Cr[VI] και όγκος δείγματος από την 1/100 αραιώση του περιεχομένου του αντιδραστήρα που προστέθηκε στο καθένα από τα έξι.

Τα τρυβλία επωάζονται για 2 μέρες στους 35°C.

- **Εμβολιασμός υγρών καλλιιεργειών με μοναδιαίες αποικίες**

Έπειτα από τη διήμερη επώαση των τρυβλίων επιλέγονται μοναδιαίες αποικίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό υγρών καλλιιεργειών σε δοκιμαστικού σωλήνες.

Εμβολιάστηκαν συνολικά 6 υγρές καλλιέργειες από αυτές τις αποικίες, σε υγρό θρεπτικό που περιέχει εξασθενές χρώμιο. Στόχος είναι να μετρηθούν στο φωτόμετρο και στην HPLC το Cr[VI] και το γαλακτικό οξύ αντίστοιχα, ώστε να εντοπιστούν οι μικροοργανισμοί που παίζουν ρόλο στην αναγωγή του Cr[VI].

Οι υγρές καλλιέργειες παρασκευάζονται ως εξής:

- ✓ Με τη βοήθεια αποστειρωμένης ράβδου απομονώνονται 6 μοναδιαίες αποικίες: 3 από τα τρυβλία των 110 ppm Cr[VI] και 3 από τα τρυβλία των 550 ppm Cr[VI].
- ✓ Η καθεμία μεταφέρεται σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα που περιέχει 10 ml θρεπτικού. Οι αποικίες που προέρχονται από τρυβλία των 110 ppm Cr[VI] τοποθετούνται σε θρεπτικό με συγκέντρωση 110 ppm Cr[VI] και οι αποικίες που προέρχονται από τρυβλία των 550 ppm Cr[VI] τοποθετούνται σε θρεπτικό με συγκέντρωση 550 ppm Cr[VI]. Παρασκευάζονται επίσης δυο control για τις δυο συγκεντρώσεις Cr[VI] στα οποία δεν εμβολιάζονται μικροοργανισμοί ώστε να διαπιστωθεί αν το θρεπτικό από μόνο του έχει κάποιο ρόλο στην αναγωγή του χρωμίου.
- ✓ Οι υγρές καλλιέργειες τοποθετούνται στους 35°C υπό ανακίνηση.

Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται ως εξής:

- ✓ **Μέτρηση Cr[VI].** Έπειτα από 24 ώρες, μετράται με φωτόμετρο η συγκέντρωση των υγρών καλλιεργειών σε εξασθενές χρώμιο, με τη μέθοδο που έχει αναλυθεί στην ενότητα 4.2.1.β. Στις καλλιέργειες των 110 ppm Cr[VI] έγινε αραιώση  $\frac{1}{200}$ , ενώ στις καλλιέργειες των 550 ppm Cr[VI] έγινε αραιώση  $\frac{1}{1250}$ . Πραγματοποιήθηκαν δυο μετρήσεις για κάθε δείγμα και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των απορροφήσεων. Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε Cr[VI] προκύπτει από τη σχέση:

$$C \text{ (mg/l)} = \text{Απορρόφηση} \cdot \text{Αραιώση} \cdot \text{Κλίση καμπύλης αναφοράς}$$

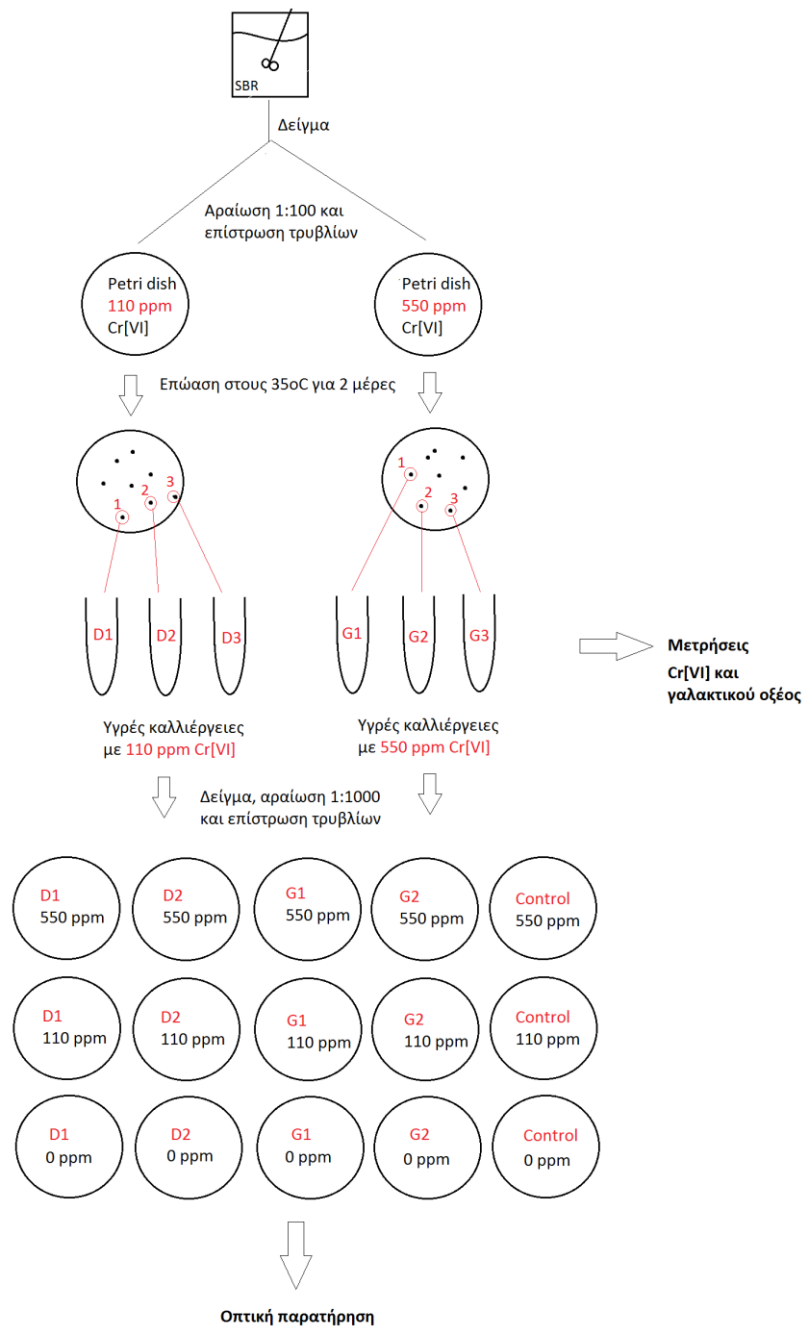
- ✓ **Μέτρηση γαλακτικού οξέος.** Για να μελετηθούν περαιτέρω οι διεργασίες στις υγρές καλλιέργειες γίνεται ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με τη μέθοδο που περιγράφηκε στην ενότητα 4.2.2. Ανιχνεύονται έτσι τα συστατικά που εμπλέκονται στην αναγωγή του Cr[VI] στις καλλιέργειες και συγκρίνονται με τα χρωματογραφήματα του βιοαντιδραστήρα.

#### • Έλεγχος υγρών καλλιεργειών

Με στόχο να εξακριβωθεί αν οι αποικίες που σηκώθηκαν από τα τρυβλία ήταν όντως μοναδιαίες, μικρή ποσότητα των υγρών καλλιεργειών απλώνεται ξανά σε τρυβλία. Έπειτα ελέγχεται δια οφθαλμού αλλά και σε μικροσκόπιο η μορφολογία των αποικιών που αναπτύσσονται.

Συγκεκριμένα, προετοιμάζονται 15 τρυβλία και λαμβάνεται δείγμα σε 4 από τις υγρές καλλιέργειες. Στο κάθε δείγμα γίνεται αραιώση  $\frac{1}{1000}$ , λαμβάνονται 150 μl και απλώνονται σε τρυβλία που περιέχουν Υmax με συγκεντρώσεις Cr[VI]: (α) 0 ppm, (β) 110 ppm, (γ) 550 ppm. Παρασκευάζεται και ένα control χωρίς δείγμα για κάθε συγκέντρωση Cr[VI]. Συνολικά ετοιμάζονται 15 τρυβλία. Οι καλλιέργειες χωρίς Cr[VI] δημιουργούνται ως επιπλέον έλεγχος για τα control, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποιος μικροοργανισμός που δεν επιβιώνει σε περιβάλλον με Cr[VI]. Η αραιώση είναι απαραίτητη για να μην αναπτυχθούν εξαιρετικά πυκνές αποικίες που θα είναι δύσκολο να παρατηρηθούν.

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία απεικονίζεται στο σύνολό της στην εικόνα 4.15:



Εικόνα 4.15. Απομόνωση μικροοργανισμών από τη μικτή καλλιέργεια του αντιδραστήρα για οπτική παρατήρηση και αναλυτικές μετρήσεις Cr[VI] και γαλακτικού οξέος.

## 4.3. Πειράματα γενετικής ταυτοποίησης

### 4.3.1. Καλλιέργεια κυττάρων βιοαντιδραστήρα που προορίζονται για απομόνωση γονιδιωματικού DNA

#### Σκοπός

Η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που περιέχονται στο βιοαντιδραστήρα, δεν είναι εφικτή χρησιμοποιώντας δείγμα απευθείας από το εσωτερικό του. Πιθανολογούνται δυο αιτίες. Είτε ότι το τελικό προϊόν που λαμβάνεται δεν περιέχει αρκετό γενετικό υλικό, ενδεχομένως λόγω της επίδρασης του Cr[VI] στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, είτε επειδή το Cr[VI] επηρεάζει το ένζυμο της PCR (93), (94). Για κάθε ενδεχόμενο, παρασκευάζονται υγρές καλλιέργειες με θρεπτικό υλικό Ymax χωρίς Cr[VI] στο οποίο θα αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί που προορίζονται για ταυτοποίηση. Αυτοί προέρχονται από μοναδιαίες αποικίες που αναπτύχθηκαν στην πειραματική διαδικασία της ενότητας 4.2.4.

#### Διαδικασία

Σε αποστειρωμένους γυάλινους σωλήνες των 15 ml τοποθετούνται από:

- 14 ml θρεπτικού Ymax
- 1 ml υγρής καλλιέργειας από μοναδιαία αποικία

Οι σωλήνες έπειτα αφήνονται υπό ανάδευση στους 35°C για 24 ώρες.

### 4.3.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA με διάλυμα CTAB

#### Σκοπός

Σε αυτό το στάδιο απαιτείται η λύση των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε υγρή καλλιέργεια και η απομόνωση του γενετικού τους υλικού. Χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο χημικής κατεργασίας της κυτταρικής μεμβράνης με επιφανειοδραστική ουσία (CTAB) και το ένζυμο πρωτεΐνάση K. Η πρωτεΐνάση K απομακρύνει περιττές πρωτεΐνες και νουκλεάσες (ένζυμα που καταστρέφουν νουκλεϊκά οξέα).

#### Αντιδραστήρια

- Cetrimonium bromide ((C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>)N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Br, cetyltrimethylammonium bromide, hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB). 1% CTAB: 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA pH 8, 0.7M NaCl.
- Πρωτεΐνάση K (0.1 mg/ml)
- Χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24:1)

- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 96%
- Αποστειρωμένο νερό

### Όργανα

- Σωλήνες Eppendorf 1.5 ml
- Συσκευή φυγοκέντρησης
- Συσκευή στροβιλισμού (Vortex)
- Πιπέτες των 10μl και των 1000μl
- Υδατόλουτρο

### Διαδικασία

Το πειραματικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- 15 ml υγρής καλλιέργειας φυγοκεντρώνται στα 4000 rpm για 30 min. Αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό.
- Προστίθενται 15 ml αποστειρωμένου νερού για ξέπλυμα των κυττάρων, και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 20 min.
- 1400 μl δείγματος καλλιέργειας κυττάρων μεταφέρονται σε αποστειρωμένο σωλήνα (eppendorf).
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στα 13000 rpm.
- Στο δείγμα προστίθενται 600 μl θερμού διαλύματος (65°C) 1% CTAB και επαναδιαλυτοποιούνται τα κύτταρα με πιπέτα.
- Προστίθενται 6 μl πρωτεϊνάση K, και το διάλυμα αναδεύεται με χρήση μηχανήματος στροβιλισμού (Vortex).
- Το δείγμα τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 65°C για 1 ώρα, ενώ παράλληλα ανακινείται κάθε 10 λεπτά με το χέρι για την πλήρη λύση των κυττάρων και την αποφυγή συσσωματωμάτων.
- Γίνεται προσθήκη ίσου όγκου (606 μl) χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1) και το διάλυμα αναδεύεται στο Vortex για 20 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στα 14000 rpm.
- Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε νέο σωλήνα και προστίθεται ξανά ίση ποσότητα (606 μl) χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης. Φυγοκεντρείται ακολουθώντας την προηγούμενη διαδικασία.
- Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης, αναμιγνύεται με 1 ml ισοπροπανόλης (4°C) και αφήνεται στους 20°C για 1 ώρα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 14000 rpm. Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό με πιπέτα και γίνεται έκπλυση του ιζήματος με 0,5 ml από 96% καθαρή αιθανόλη (χρησιμοποιήθηκαν: 960 μl 100% καθαρή αιθανόλη και 40 μl αποσταγμένο νερό).
- Το δείγμα φυγοκεντρείται για 6 λεπτά στα 8000 rpm.

- Η υπερκείμενη φάση απομακρύνεται με πιπέτα και ο σωλήνας αφήνεται με ανοιχτό καπάκι για 5 λεπτά για να απομακρυνθεί στο σύνολο της η αιθανόλη μέσω εξάτμισης.
- Προστίθενται 50 μl αποστειρωμένου νερού και το δείγμα αφήνεται μέχρι να επαναδιαλυθεί το DNA.

Για να ελεγχθεί αν η παραπάνω τεχνική είναι κατάλληλη τόσο για κύτταρα βακτηρίων όσο και μυκήτων, χρησιμοποιήθηκαν θετικά control. Ως θετικό control για τα βακτήρια χρησιμοποιήθηκε *E. coli* και για τους μύκητες *S. cerevisiae*.

#### 4.3.3. Πολλαπλασιασμός γονιδιωματικού DNA με PCR

Το DNA που λαμβάνεται με τη λύση των κυττάρων του αντιδραστήρα τοποθετείται σε συσκευή PCR με σκοπό τη διευκόλυνση της μετέπειτα ταυτοποίησής του.

##### Όργανα

- Θερμικός κυκλοποιητής (PCR)
- Πιπέτα 2-20 μl
- Πιπέτα 0.5-10 μl
- Αποστειρωμένα tips
- Αποστειρωμένα Eppendorf PCR tubes 0.2 ml
- Συσκευή στροβιλισμού (Vortex)
- Συσκευή φυγοκέντρησης



Εικόνα 4.16. Θερμικός κυκλοποιητής (PCR) και θέσεις φόρτωσης δειγμάτων (δεξιά).

##### Αντιδραστήρια

- PCR-grade water

- 5x KAPA HiFi Buffer (Fidelity)
- 10mM KAPA dNTP Mix
- 10μM Forward Primer (515F)
- 10μM Reverse Primer (806R)
- 1 U/μl KAPA HiFi HotStart DNA polymerase
- Δείγμα DNA (Template)

### Διαδικασία

- Ανάμιξη αντιδραστηρίων σε σωληνάρια Eppendorf των 0.2 ml. Οι όγκοι των αντιδραστηρίων που αναμίχθηκαν φαίνονται στον πίνακα 4.4. Η αντίδραση μπορεί επίσης να γίνει με ημίσιες ποσότητες, σε σύνολο 25 μl, ή ακόμη και να αλλάξει η ποσότητα του template DNA, ανάλογα με τις συνθήκες. Στην τελευταία περίπτωση δε μεταβάλλονται οι όγκοι όλων των αντιδραστηρίων, αλλά μόνο του νερού, ώστε ο τελικός όγκος να παραμένει σταθερός στα 50 μl.

Αντιδραστήριο	Όγκος (μl)
5x KAPA HiFi Buffer (Fidelity)	10
10 mM KAPA dNTP Mix	1,5
10 μM Forward Primer	2
10 μM Reverse Primer	2
Template DNA	5
KAPA HiFi HotStart DNA polymerase	1
PCR-grade water	28,5
<b>Total Volume</b>	<b>50</b>

Πίνακας 4.4. Όγκοι αντιδραστηρίων PCR

- Σύντομη ανάδευση στο Vortex
- Στιγμιαία φυγοκέντρηση για 2-3 δευτερόλεπτα
- Τοποθέτηση στο θερμικό κυκλοποιητή για την έναρξη της διαδικασίας αντίδρασης της πολυμεράσης

Οι θερμικοί κύκλοι της αντίδρασης όπως ρυθμίστηκαν για βέλτιστη απόδοση:

Στάδιο του κύκλου	Θερμοκρασία & χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αρχική μετουσίωση	3 min στους 95°C	1
Μετουσίωση	20 sec στους 98°C	30
Αναδιάταξη	15 sec στους 55°C	
Επιμήκυνση	15 sec στους 72°C	
Τελική επιμήκυνση	1 min στους 72°C	1

Πίνακας 4.5. Θερμικοί κύκλοι αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης KAPA HiFi HotStart DNA

Σημειώνεται ότι η χρήση της προηγμένης πολυμεράσης Kara HiFi HotStart έχει το πλεονέκτημα της επιμήκυνσης μόνο του τμήματος DNA-στόχου καθώς αποφεύγει την παραγωγή μη ειδικού προϊόντος, ενώ ο χρόνος της αντίδρασης μειώνεται σημαντικά.

Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση τα προϊόντα των αντιδράσεων τοποθετούνται για ηλεκτροφόρηση ώστε να ελεγχθούν τα αποτελέσματα.

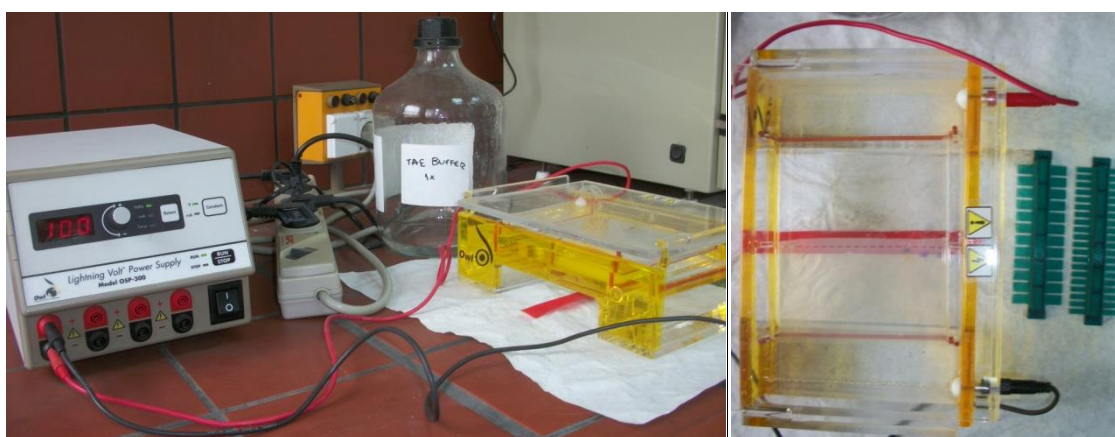
#### 4.3.4. Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA

##### Σκοπός

Το DNA των μικροοργανισμών του αντιδραστήρα, αφού απομονωθεί και πολλαπλασιαστεί με τις μεθόδους που αναλύθηκαν παραπάνω, αναμιγνύεται με χρωστική ουσία και τοποθετείται σε πήκτωμα αγαρόζης για ηλεκτροφόρηση. Με την ηλεκτροφόρηση θα εξακριβωθεί αν το τμήμα του DNA που έχει πολλαπλασιαστεί έχει το αναμενόμενο μήκος και άρα δεν υπάρχει κάποια μόλυνση στα αντιδραστήρια μας. Επιπλέον επειδή χρησιμοποιούνται εκκινητές οι οποίοι υβριδίζονται αποκλειστικά και μόνο στο DNA είτε βακτηριακών κυττάρων είτε κυττάρων μυκήτων μπορούμε να κάνουμε μία πρώτη εκτίμηση για το είδος των μικροοργανισμών.

##### Όργανα

- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Owl EasyCast, Model B2
- Συσκευή απεικόνισης με UV ακτινοβολία
- Μαγνητικός αναδευτήρας με θέρμανση
- Συσκευή στροβιλισμού (Vortex)



Εικόνα 4.17. Τράπεζα ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστή τάσης και χτένες δημιουργίας σχισμών.

##### Αντιδραστήρια

- 1x TAE Buffer (Tris-acetate-EDTA)
- Αγαρόζη (Agarose)
- Βρωμιούχο Αιθίδιο (EtBr), 10 mg/ml
- 100 bp DNA ladder H3 RTU



- Χρωστική: 5x Loading Buffer Blue
- dH<sub>2</sub>O

## Διαδικασία

### α) Προετοιμασία πηκτής

Το TAE Buffer είναι ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει τρία συστατικά: 2-αμινο-2-υδροξυμεθυλο-προπανο-1,3-διόλη (Tris base), οξικό οξύ και αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA).

Για την παρασκευή 1l 50x TAE χρησιμοποιήθηκαν:

- 242g Tris base (MW=121.1)
- 57.1 ml οξικού οξέος
- 100 ml 0.5M EDTA

Για την παρασκευή 1x TAE από 50x TAE, 20 ml 50x TAE αραιώνονται σε ογκομετρικό κύλινδρο με νερό 1D μέχρι το 1l. Από αυτά χρησιμοποιούνται 120 ml για την παρασκευή του τζελ αγαρόζης και τα υπόλοιπα για να γεμίσει το δοχείο ηλεκτροφόρησης.

Παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης 1% w/v ως εξής: 1.2 g αγαρόζης σε σκόνη αναμιγνύονται με 120 ml 1x TAE και η φιάλη τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα με θέρμανση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίηση. Είναι σημαντικό το διάλυμα να είναι πλήρως διάφανο και απαλλαγμένο από συσσωματώματα και ακαθαρσίες, ώστε να μην επηρεαστεί η λειτουργία του τελικού πηκτώματος.

Αφού κρυώσει λίγο (~50°C) προστίθενται 5,6 ml EtBr (τελική συγκέντρωση 0,47 μg/ml δ/τος) και το διάλυμα αναδεύεται για λίγο. Έπειτα αποχύνεται στην τράπεζα ηλεκτροφόρησης και αφήνεται να πήξει μαζί με τις χτένες δημιουργίας σχισμών. Όταν πήξει το διάλυμα οι χτένες αφαιρούνται προσεκτικά. Οι σχισμές που έχουν δημιουργηθεί στο τζελ (σε δυο διαφορετικά μεγέθη) αποτελούν τις θέσεις φόρτωσης του DNA.

Αφού το τζελ καλυφθεί με TAE Buffer μέχρι τη γραμμή πλήρωσης, τα δείγματα τοποθετούνται με τη βοήθεια πιπέτας στις μεγάλες θέσεις φόρτωσης. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης ρυθμίζεται στα 100V μέχρι η χρωστική να καλύψει περίπου το 40% της απόστασης στο τζελ. Έπειτα μειώνεται στα 80V μέχρι να καλυφθεί το 75-80% της απόστασης (διάρκεια περίπου 1 ώρα).

Το τζελ τελικά αναλύεται σε συσκευή απεικόνισης με UV ακτινοβολία.

### β) Προετοιμασία δειγμάτων

Προετοιμάζονται συνολικά 15 μl δείγματος που αποτελούνται από χρωστική 5x και DNA. Στόχος είναι η χρωστική 5x στο τελικό μίγμα να αραιωθεί σε 1x, οπότε σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_{ολ} \Rightarrow V_1 = \frac{1 \cdot 15 \mu l}{5} \Rightarrow V_1 = 3 \mu l$$

Επομένως χρησιμοποιούνται 3 μl χρωστικής 5x και 12 μl DNA. Το δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα errendorf, ο οποίος αναδεύεται και φυγοκεντρείται για μερικά δευτερόλεπτα.

#### 4.3.5. Καθαρισμός DNA

Εφόσον ληφθεί ξεκάθαρη μάντα DNA στην ηλεκτροφόρηση μπορούμε να προχωρήσουμε στο επόμενο βήμα της ταυτοποίησης του μικροοργανισμού. Το δείγμα DNA καθαρίζεται με ειδικό κιτ (Nucleospin® Gel and PCR Clean-up) για την απομάκρυνση υπολειμμάτων, εκκινητών και DNTPs, που μπορεί να παρεμβάλλονται κατά την αλληλούχιση του DNA. Πραγματοποιείται με τη βοήθεια ρυθμιστικών διαλυμάτων, φίλτρων και διαδοχικών φυγοκεντρήσεων. Έτσι το τελικό προϊόν αποτελείται μόνο από το DNA-στόχο, χωρίς την ύπαρξη μικρότερων, μη ειδικών τμημάτων DNA.

#### 4.3.6. Ταυτοποίηση γονιδιωματικού DNA με αλληλούχιση

Το δείγμα DNA που απομονώθηκε εστάλη για αλληλούχιση (DNA Sequencing) στην εταιρεία Eurofins Genomics. Η αλληλούχιση του DNA επιτρέπει την εύρεση της ακριβούς αλληλουχίας βάσεων σε ένα μόριο DNA με χρήση φθορίζουσών χρωστικών διαφορετικού χρώματος για κάθε βάση, οι οποίες διαβάζονται έπειτα με Η/Υ. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση είτε του εμπρόσθιου εκκινητή (forward primer) 515F είτε του ανάστροφου εκκινητή (reverse primer) 806R που είχαν χρησιμοποιηθεί και στην PCR.

Έπειτα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα BLAST® (95) για να βρεθεί σε ποιο βακτήριο ανήκει η αλληλουχία. Το BLAST® (Basic Alignment Search Tool) αποτελεί μια online βάση δεδομένων για διάφορα είδη DNA (θηλαστικών, εντόμων, μικροβίων). Λειτουργεί συγκρίνοντας τις αποθηκευμένες αλληλουχίες με τις νουκλεοτιδικές ή πρωτεϊνικές αλληλουχίες που δίνει ο χρήστης και βρίσκοντας παρόμοιες περιοχές, με ταυτόχρονο υπολογισμό στατιστικού λάθους.

#### 4.3.7. Έλεγχος με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Το τελευταίο βήμα της πειραματικής διαδικασίας ήταν η σύγκριση φωτογραφιών ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (Scanning Electron Microscope-SEM) ενός δείγματος από το βιοαντιδραστήρα με φωτογραφίες του βακτηρίου που ταυτοποιήθηκε, οι οποίες βρέθηκαν στη βιβλιογραφία. Η μορφολογική ομοιότητα αποτέλεσε μια ακόμη επιβεβαίωση της ορθής ταυτοποίησης του μικροοργανισμού που αναπτύσσεται στον αντιδραστήρα.

### 4.4. Μοντελοποίηση βιοαντιδραστήρα μιας υγρής φάσης με το λογισμικό AQUASIM 2.0

Επιχειρήθηκε η μοντελοποίηση του συστήματος αναγωγής Cr[VI] σε βιοαντιδραστήρα μιας υγρής φάσης με το λογισμικό Aquasim 2.0. Η διαδικασία ακολούθησε τρία στάδια:

- i. **1<sup>ο</sup> Βήμα.** Η μοντελοποίηση της διεργασίας αναγωγής εξασθενούς χρωμίου από γαλακτικό οξύ. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν τα πειραματικά αποτελέσματα της ενότητας 5.1.2., όπου καταγράφηκε η μεταβολή της συγκέντρωσης Cr[VI] σε δοκίμιο που περιείχε 2.5g/L L-γαλακτικό οξύ σε υδατικό διάλυμα 620 ppm Cr[VI]. Παρακάτω παρουσιάζονται τα στοιχεία που δόθηκαν στο λογισμικό για την πραγματοποίηση της προσομοίωσης:

#### Μεταβλητές

Ως μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν οι:

- συγκεντρώσεις εξ. χρωμίου και γαλακτικού οξέος **chrom** και **lac**, οι οποίες ορίζονται State Variables (mg/L)
- πειραματικές τιμές συγκέντρωσης εξ. χρωμίου και γαλ. οξέος, οι οποίες ορίζονται Real list variables (mg/L)
- αρχικές συγκεντρώσεις εξ. χρωμίου και γαλ. οξέος, οι οποίες ορίζονται Constant variables (mg/L)
- σταθερά του ρυθμού **kcr** ( $L/mg \cdot h$ ) ως Constant variable
- στοιχειομετρικός συντελεστής του γαλακτικού οξέος στην αντίδραση **n1** ως Constant variable
- χρόνος (h) ως Program variable

Κινητική εξίσωση  $r_1 = kcr \cdot chrom \cdot lac$

Συνοπτικά η δομή του μοντέλου:

Διεργασία	Συστατικά		Ρυθμός (mg/L)/hour
	chrom [Cr(VI)] (mg/L)	lac [lac] (mg/L)	
Αναγωγή	-1	-n1	kcr*chrom*lac

#### Διαμέρισμα

Θεωρήθηκε ότι η διεργασία λαμβάνει χώρα σε αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης (Mixed Reactor Compartment).

- ii. **2<sup>ο</sup> Βήμα.** Η μοντελοποίηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και της παραγωγής γαλακτικού οξέος. Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής πειραματικά αποτελέσματα μετρήσεων για την κατανάλωση γλυκόζης και την παραγωγή βιομάζας (εκφρασμένη σε VSS<sup>4</sup>) και γαλακτικού οξέος:

<sup>4</sup> VSS: Volatile Suspended Solids, πτητικά αιωρούμενα στερεά. Στο συγκεκριμένο σύστημα εφόσον έχουμε μία μόνο υγρή φάση, θεωρείται ότι ολόκληρη η ποσότητα των VSS αναφέρεται στη βιομάζα.

Ώρα	Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/L)	VSS (mg/L)	Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (mg/L)
0	6400	379	730
24	4720	514	1790
48	220	743	2040
72	220	782	2050

Πίνακας 4.6. Δεδομένα για την κατανάλωση γλυκόζης και την παραγωγή βιομάζας και γαλακτικού οξέος για το μοντέλο μικροβιακής ανάπτυξης

Το δοκίμιο περιείχε βιομάζα από το βιοαντιδραστήρα και  $Y_{max}$  σε αναλογία 1:1, παρέμεινε υπό ανάδευση στους 35°C για χρονικό διάστημα 48 ωρών και πραγματοποιούνταν δειγματοληψία κάθε 24 ώρες.

Προκειμένου να μοντελοποιηθεί η διεργασία θεωρήθηκε ότι μέσα στο δοκίμιο λαμβάνουν χώρα δύο διαφορετικές διεργασίες που οδηγούν στην παραγωγή γαλακτικού και βιομάζας, μία εξαρτώμενη από τη γλυκόζη και μία ανεξάρτητη αυτής κατά την οποία χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα κάποια από τα συστατικά του εκχυλίσματος της ζύμης και της πεπτόνης. Θεωρήθηκε ότι τα δύο υποστρώματα είναι πλήρως αντικαταστάσιμα και ανταγωνιστικά.

#### Μεταβλητές

- State variables:** συγκέντρωση: γλυκόζης (**glu**), υποστρώματος ανταγωνιστικού της γλυκόζης (**s**), γαλακτικού οξέος (**lac**) και βιομάζας (**x**) σε mg/L
- Real list variables:** πειραματικές τιμές συγκέντρωσης των παραπάνω συστατικών (mg/L)
- Program variable:** χρόνος (h)
- Constant variables:**
  - οι αρχικές τιμές συγκέντρωσης των παραπάνω συστατικών (mg/L)
  - $Y_{glu}$  (mg βιομάζας/mg γλυκόζης): συντελεστής απόδοσης βιομάζας για την εξαρτώμενη από τη γλυκόζη ανάπτυξη
  - $Y_s$  (mg βιομάζας/mg γλυκόζης): συντελεστής απόδοσης βιομάζας για την ανεξάρτητη από γλυκόζη ανάπτυξη
  - $\mu_{max(glu)}$  ( $h^{-1}$ ): μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την κατανάλωση γλυκόζης
  - $\mu_{max(s)}$  ( $h^{-1}$ ): μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την κατανάλωση του υποστρώματος s
  - $K_{s(glu)}$  (mg/L): σταθερά κορεσμού για την εξαρτώμενη από γλυκόζη ανάπτυξη (είναι ίση με την συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία ο ειδικός ρυθμός ισούται με το μισό του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης)

- $K_{s(s)}$  (mg/L): σταθερά κορεσμού για την εξαρτώμενη από το υπόστρωμα  $s$  ανάπτυξη (είναι ίση με την συγκέντρωση υποστρώματος στην οποία ο ειδικός ρυθμός ισούται με το μισό του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης)
- **alpha**: σταθερά εξάρτησης της παραγωγής γαλακτικού οξέως από τη συγκέντρωση της γλυκόζης
- **beta**: σταθερά εξάρτησης της παραγωγής γαλακτικού οξέως από τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $s$
- **k1**: σταθερά αντικατάστασης της κατανάλωσης γλυκόζης από το υπόστρωμα  $s$
- **k2**: σταθερά αντικατάστασης της κατανάλωσης του υποστρώματος  $s$  από τη γλυκόζη

### Κινητικές εξισώσεις

Χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Monod (υποκεφάλαιο 3.5) για την περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης και της κατανάλωσης υποστρώματος. Καταστρώθηκαν οι εξής εξισώσεις για κινητική ανταγωνιστικής παρεμπόδισης από το υπόστρωμα:

$$r_{glu} = \frac{\mu_{\max}(glu)glu}{K_{s(gluc)} + glu + k1 \cdot s} \cdot x$$

$$r_s = \frac{\mu_{\max}(s)s}{K_{s(s)} + s + k2 \cdot glu} \cdot x$$

Επομένως η δομή του μοντέλου ήταν:

Διεργασία	Συστατικά				Ρυθμός (mg/L)/hour
	x (mg/L)	glu (mg/L)	lac (mg/L)	s (mg/L)	
Ανάπτυξη εξαρτώμενη από τη γλυκόζη	1	-1/Y <sub>glu</sub>	alpha*glu		$x \cdot \mu_{\max}(glu) \cdot glu / (K_{s(gluc)} + glu + k1 \cdot s)$
Ανάπτυξη ανεξάρτητη από τη γλυκόζη	1		beta*s	-1/Y <sub>s</sub>	$x \cdot \mu_{\max}(s) \cdot s / (K_{s(s)} + s + k2 \cdot glu)$

### Διαμέρισμα

Η διεργασία μοντελοποιήθηκε σε αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης (Mixed Reactor Compartment).

iii. **3<sup>ο</sup> Βήμα.** Τελικά, για να μοντελοποιηθεί η συνολική διεργασία ενοποιήθηκαν τα δυο παραπάνω μοντέλα και έγινε προσαρμογή του συστήματος ώστε να προσομοιάζει τη λειτουργία ενός αντιδραστήρα διαλείποντος έργου περιοδικής λειτουργίας (SBR).

Χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές των σταθερών που προέκυψαν από τη μοντελοποίηση των επιμέρους διεργασιών, με εξαίρεση τους συντελεστές alpha και beta, καθώς θεωρήθηκε πως η παραγωγή του γαλακτικού επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του Cr[VI], και συγκεκριμένα αυξάνεται. Επομένως οι σταθερές εξάρτησης της παραγωγής γαλακτικού οξέος από το κάθε υπόστρωμα πήραν τη μορφή:

$$\alpha_{Cr} = \alpha + k_{Cr} \cdot \text{chrom}$$

$$\beta_{Cr} = \beta + k_{Cr} \cdot \text{chrom}$$

Η μοντελοποίηση ενός SBR συστήματος στο Aquasim δεν είναι δυνατή απευθείας, καθώς κάθε νέα τροφοδοσία αποτελεί κλάσμα του συνολικού όγκου του υγρού με αποτέλεσμα να μεταβάλλονται με αραίωση περιοδικά οι συγκεντρώσεις των συστατικών. Επομένως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί η παραδοχή του αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι το σύστημα αποτελείται από δύο διαμερίσματα, το διαμέρισμα του αντιδραστήρα και το διαμέρισμα της εξόδου, έτσι ώστε από την απορροή του αντιδραστήρα ένα μέρος να επιστρέφει σ' αυτόν με ανακυκλοφορία κι ένα μέρος να αποτελεί το εξυγιασμένο υγρό της εξόδου.

Ο αντιδραστήρας ορίστηκε ως Advective Reactor (αντιδραστήρας εμβολικής ροής) και οι ογκομετρικές παροχές εισόδου και ανακυκλοφορίας ορίστηκαν ως Constant Variables. Επειδή στο σύστημα SBR γίνεται κάθε 48 ώρες τροφοδοσία 1.25L και απόρριψη 1.75L του υγρού του αντιδραστήρα, οι τιμές παροχών εισόδου και ανακυκλοφορίας στο μοντέλο τέθηκαν αντίστοιχα:

$$Q_{in} \text{ (L/h)} = 1.25\text{L}/48 \text{ h} = 0.0260 \text{ L/h}$$

$$Q_R \text{ (L/h)} = 1.75\text{L}/48 \text{ h} = 0.0365 \text{ L/h}$$

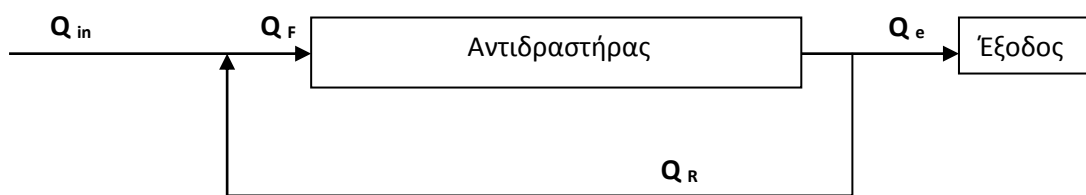
Δηλαδή το υγρό που παραμένει στο SBR μετά την απόρριψη (1.75L), στο μοντέλο θεωρείται πως επιστρέφει με ανακυκλοφορία στον αντιδραστήρα.

Επιπλέον, εισάγεται ένας συντελεστής καθίζησης της βιομάζας, ώστε κατά το μεγαλύτερο ποσοστό της να επανέρχεται στο σύστημα. Ο συντελεστής καθίζησης ορίστηκε ως:

$$\text{retention} = 0.75$$

Επομένως, σύμφωνα με τα προηγούμενα η διεργασία συνοψίζεται ως εξής:

Διεργασία	Συστατικά					Ρυθμός (mg/L)/hour
	x (mg/L)	glu (mg/L)	lac (mg/L)	s (mg/L)	Cr[VI] (mg/L)	
Ανάπτυξη εξαρτώμενη από τη γλυκόζη	1	$-1/Y_{glu}$	$\alpha_{cr} * glu$			$x * \mu_{\max(glu)} * glu / (K_{s(glu)} + glu + k1 * s)$
Ανάπτυξη ανεξάρτητη από τη γλυκόζη	1		$\beta_{cr} * s$	$-1/Y_s$		$x * \mu_{\max(s)} * s / (K_{s(s)} + s + k2 * glu)$
Αναγωγή			n1		-1	$kcr * chrom * lac$



$$m_{lac,R} : Q_R * lac$$

$$m_{glu,R} : Q_R * glu$$

$$m_{chr,R} : Q_R * chr$$

$$m_{s,R} : Q_R * s$$

$$m_{x,R} : retention * (Q_{in} + Q_R) * x$$

Εικόνα 4.18. Διάγραμμα ροής και μαζικές παροχές (σε mg/h) των συστατικών της διεργασίας.

Τα πειραματικά δεδομένα του βιοαντιδραστήρα ήταν:

Ώρα	Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/L)	Συγκέντρωση Cr[VI] (mg/L)	Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (mg/L)
0	4167	562,6	2723
18	3600	8,96	-
38	1000	0	5558

Πίνακας 4.7. Δεδομένα για την κατανάλωση γλυκόζης, την αναγωγή του Cr[VI] και την παραγωγή γαλακτικού οξέος για το μοντέλο που προσομοιάζει τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1. Αναλυτικά και κινητικά πειράματα

#### 5.1.1. Διερεύνηση μηχανισμού αναγωγής Cr[VI] στο βιοαντιδραστήρα

Παρακάτω παρουσιάζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης Cr[VI] σε δοκίμια που περιείχαν είτε κυτταρική βιομάζα και εξωκυττάριο υγρό, είτε αποκλειστικά εξωκυττάριο υγρό αποστειρωμένο ή μη, είτε Υ<sub>max</sub> σε ίσο όγκο με υδατικό διάλυμα 1100ppm Cr[VI], τα οποία παρέμειναν υπό ανάδευση στους 35°C για χρονικό διάστημα 48 ωρών.

	Δείγμα	Απορρόφηση Cr[VI]	Αραίωση	Μέση απορρόφηση Cr[VI]	[Cr(VI)]	% Μείωση σε σχέση με τις 0 h
0 hours	Βιοαντιδραστήρα	0,175	1:2500	0,176	525,18	-
		0,176				
	Διηθημένο βιοαντιδραστήρα	0,169	1:2500	0,169	504,24	-
		0,168				
	Διηθημένο αποστειρωμένο βιοαντιδραστήρα	0,172	1:2500	0,173	516,21	-
		0,173				
	Αποστειρωμένο βιοαντιδραστήρα	0,171	1:2500	0,171	510,22	-
		0,17				
	Υ <sub>max</sub>	0,18	1:2500	0,180	538,65	-
		0,18				
24 hours	Βιοαντιδραστήρα	0,137	1:250	0,136	40,70	92,25
		0,135				
	Διηθημένο βιοαντιδραστήρα	0,162	1:250	0,163	48,78	90,33
		0,164				
	Διηθημένο αποστειρωμένο βιοαντιδραστήρα	0,162	1:250	0,163	48,78	90,55
		0,164				
	Αποστειρωμένο βιοαντιδραστήρα	0,149	1:250	0,148	44,29	91,32
		0,147				
	Υ <sub>max</sub>	0,173	1:2500	0,174	519,20	3,61



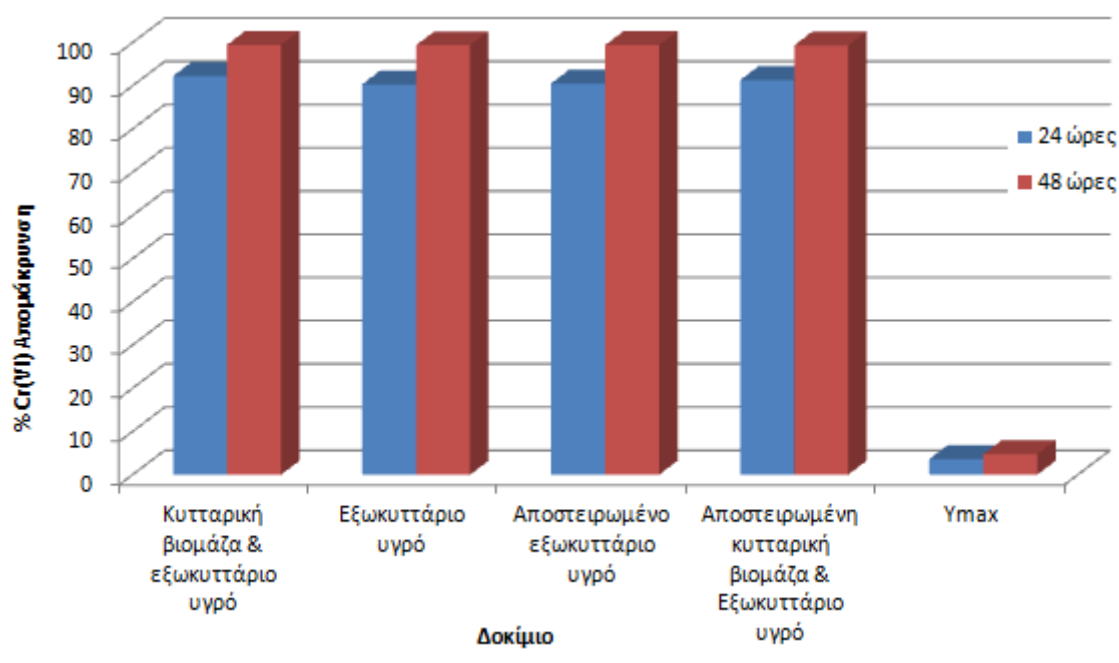
48 hours		0,128				
	Βιοαντιδραστήρα	0,045	1:100	0,046	2,72	99,48
		0,046				
	Διηθημένο βιοαντιδραστήρα	0,05	1:100	0,052	3,11	99,38
		0,054				
	Διηθημένο και αποστειρωμένο βιοαντιδραστήρα	0,049	1:100	0,051	3,02	99,41
		0,052				
	Αποστειρωμένο βιοαντιδραστήρα	0,055	1:100	0,056	3,32	99,35
		0,056				
	Y <sub>max</sub>	0,172	1:2500	0,172	513,21	4,72
		0,171				

Πίνακας 5.1. Μετρήσεις [Cr(VI)] σε δείγματα από το βιοαντιδραστήρα με διαφορετική επεξεργασία έκαστο.

Σύμφωνα με τον πίνακα 5.1. και τον πίνακα 4.1. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος στον πίνακα 5.2. και το διάγραμμα 5.1.:

		Κυτταρική βιομάζα & εξωκυττάριο υγρό	Εξωκυττάριο υγρό	Αποστειρωμένο εξωκυττάριο υγρό	Αποστειρωμένη κυτταρική βιομάζα & εξωκυττάριο υγρό	Y <sub>max</sub>
0 hours	Συγκέντρωση Cr[VI] <sub>aq</sub> (ppm)	528,18	504,24	516,21	510,22	538,65
24 hours	Συγκέντρωση Cr[VI] <sub>aq</sub> (mg/L)	40,70	48,78	48,78	44,29	519,20
	% Συνολική Απομάκρυνση	92,25	90,33	90,55	91,32	3,61
48 hours	Συγκέντρωση Cr[VI] <sub>aq</sub> (mg/L)	2,72	3,11	3,02	3,32	513,21
	% Συνολική Απομάκρυνση	99,48	99,38	99,41	95,35	4,72

Πίνακας 5.2. Μεταβολή της συγκέντρωσης Cr[VI] σε δοκίμια που περιείχαν είτε κυτταρική βιομάζα και εξωκυττάριο υγρό, είτε αποκλειστικά εξωκυττάριο υγρό αποστειρωμένο ή μη, είτε Y<sub>max</sub> σε ίσο όγκο με υδατικό διάλυμα 1100 ppm Cr[VI].



Διάγραμμα 5.1. Ποσοστιαία απομάκρυνση της συγκέντρωσης Cr[VI] σε δοκίμια που περιείχαν είτε κυτταρική βιομάζα και εξωκυττάριο υγρό, είτε αποκλειστικά εξωκυττάριο υγρό αποστερωμένο ή μη, είτε Υmax σε ίσο όγκο με υδατικό διάλυμα 1100 ppm Cr[VI].

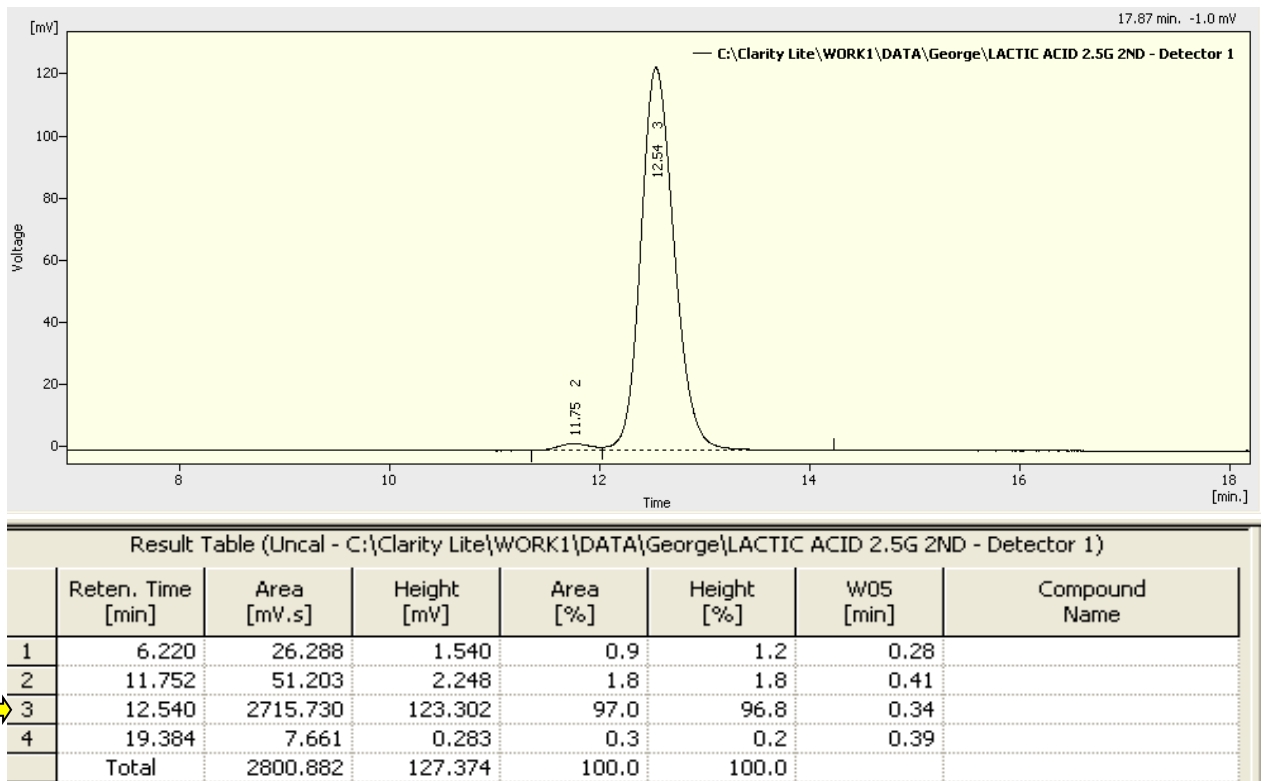
Φαίνεται λοιπόν ότι σε κάθε περίπτωση, πλην του δοκιμίου με το θρεπτικό, ότι η ποσοστιαία απομάκρυνση εξασθενούς χρωμίου είναι περίπου η ίδια. Επομένως αποκλείεται η απομάκρυνση του Cr[VI] από ένζυμα στο εξωκυττάριο υγρό, ή με βιοπροσρόφηση/βιοσυσσώρευση και καταλήγουμε πως η αναγωγή πραγματοποιείται εξωκυτταρικά, από κάποιο μόριο που δεν είναι θερμοευαίσθητο, πιθανώς κάποιο μεταβολικό προϊόν των μικροοργανισμών.

### 5.1.2. Ανάλυση δειγμάτων με HPLC

#### 1. Πρότυπες κορυφές:

a) L-Γαλακτικό οξύ (L-Lactic acid)

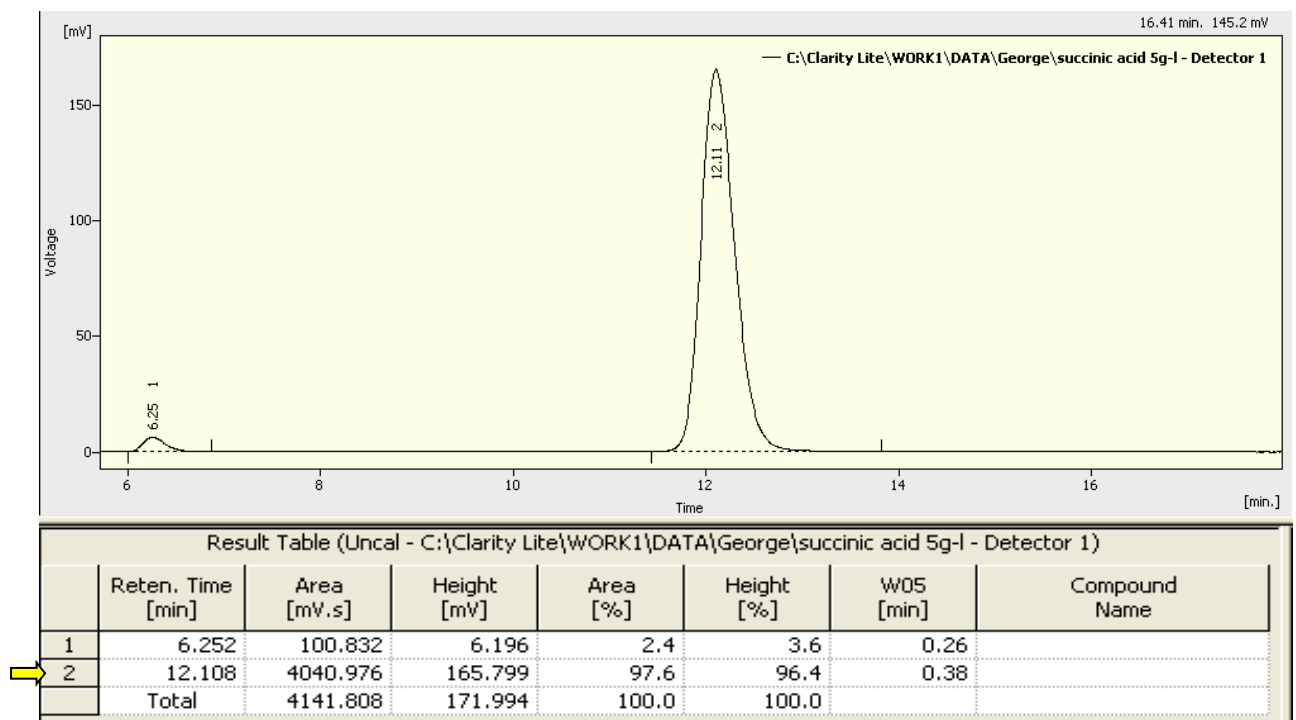
Συγκέντρωση: 2.5 g/l  
 Εμβαδόν κορυφής: 2715.73 mV·s  
 Χρόνος ανάσχεσης: 12.54 min



Εικόνα 5.1. Χρωματογράφημα L-Γαλακτικού οξέος 2.5 g/l

b) Ηλεκτρικό οξύ (Succinic acid)

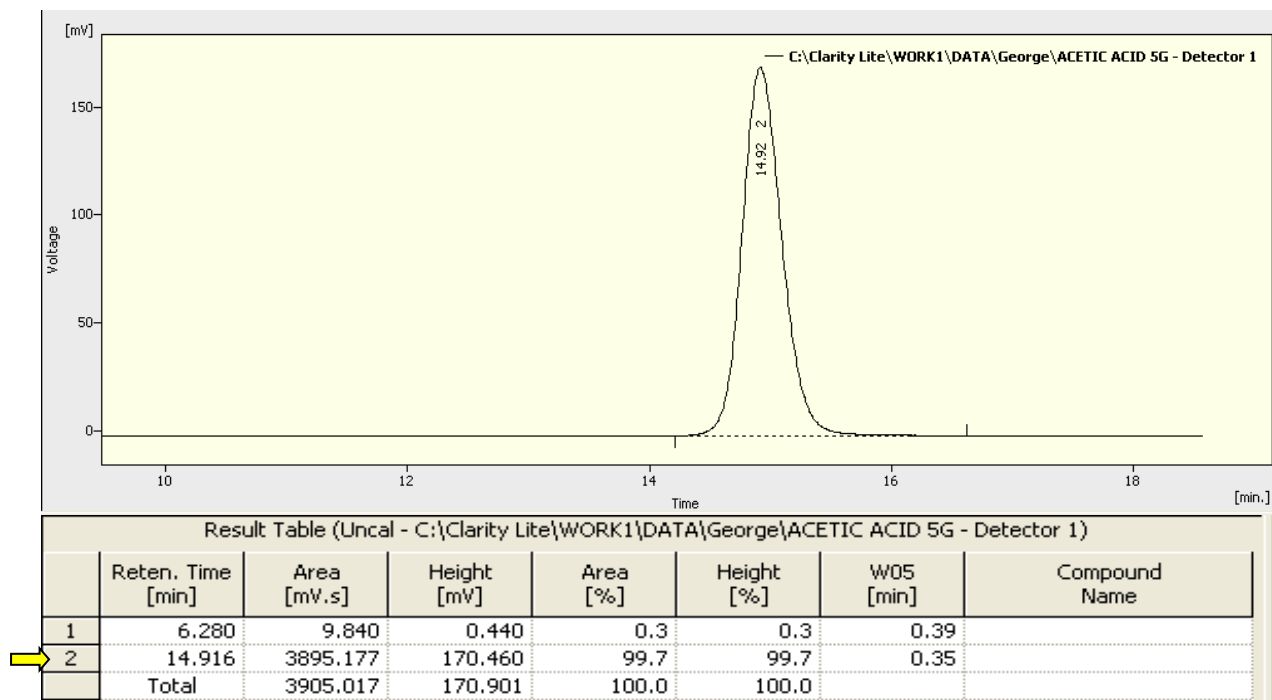
Συγκέντρωση: 5 g/l  
 Εμβαδόν κορυφής: 4040.98 mV.s  
 Χρόνος ανάσχεσης : 12.11 min



Εικόνα 5.2. Χρωματογράφημα ηλεκτρικού οξέος 5 g/l

c) Οξικό οξύ (Acetic acid)

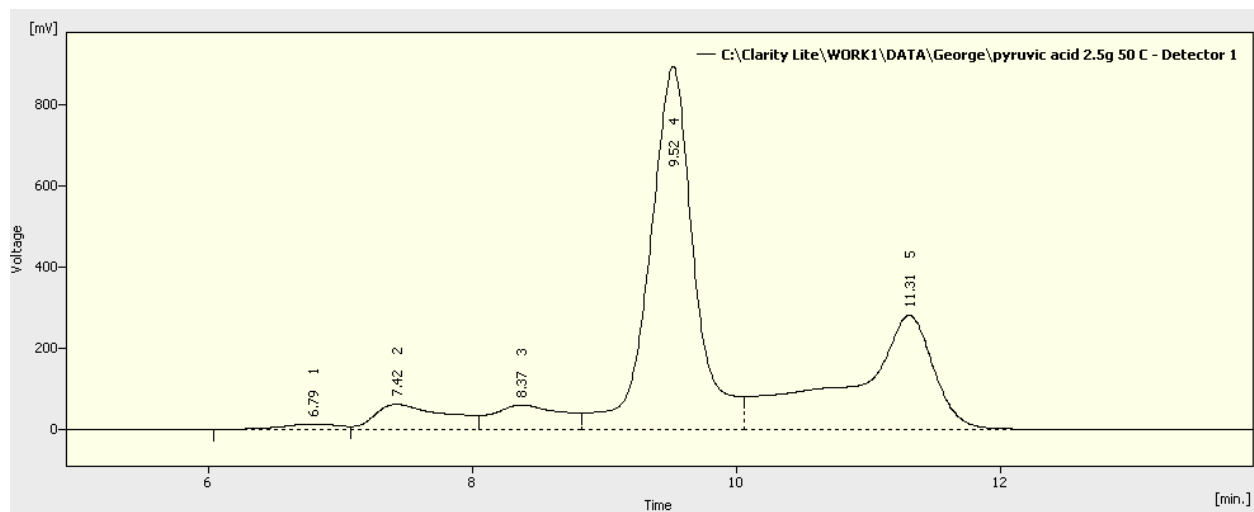
Συγκέντρωση: 5 g/l  
 Εμβαδόν κορυφής: 3895.18 mV·s  
 Χρόνος ανάσχεσης : 14.92 min



Εικόνα 5.3. Χρωματογράφημα οξικού οξέος 5 g/l

d) Πυροσταφυλικό οξύ (Pyruvic acid)

Συγκέντρωση: 2.5 g/l  
 Εμβαδόν κορυφής: 20968.6 mV·s  
 Χρόνος ανάσχεσης : 9.52 min



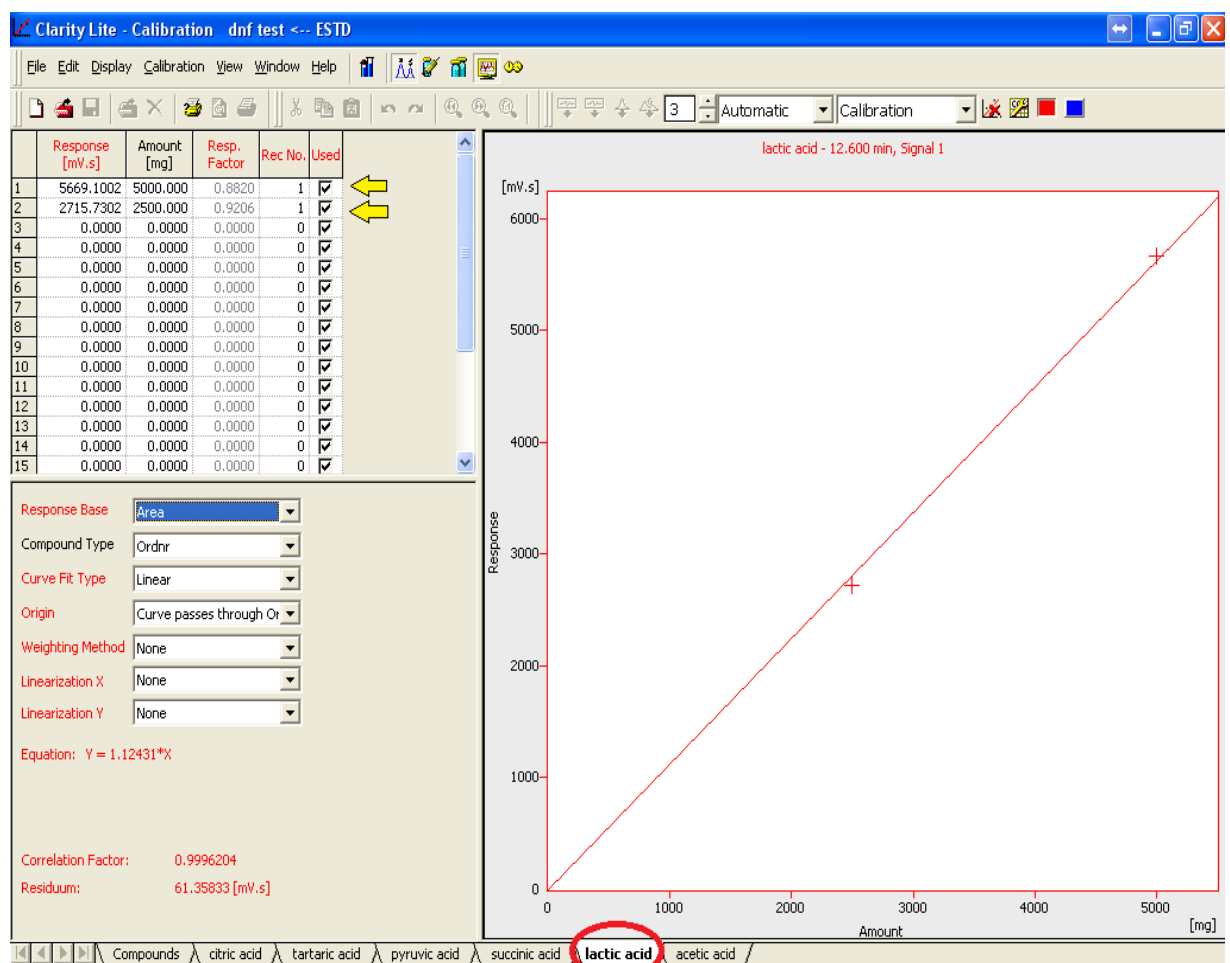
Result Table (Uncal - C:\Clarity Lite\WORK1\DATA\George\pyruvic acid 2.5g 50 C - Detector 1)							
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	6.788	466.701	14.670	1.2	1.1	0.54	
2	7.420	2399.947	62.747	6.2	4.8	0.80	
3	8.368	2265.720	61.501	5.8	4.7	0.78	
4	9.524	20968.574	895.633	53.8	68.0	0.33	
5	11.312	12864.810	281.821	33.0	21.4	0.44	
	Total	38965.751	1316.372	100.0	100.0		

Εικόνα 5.4. Χρωματογράφημα πυροσταφυλικού οξέος 2.5 g/l

## Βαθμονόμηση

Το πρόγραμμα Clarity™ Lite αποθηκεύει για τις επιθυμητές ουσίες το χρόνο ανάσχεσης και την απόκριση σε mV.s (εμβαδόν κορυφής). Η απόκριση αντιστοιχίζεται από το χρήστη στη συγκέντρωση της ουσίας στο πρότυπο διάλυμα και το πρόγραμμα κατασκευάζει την καμπύλη βαθμονόμησης της ουσίας. Έτσι οι κορυφές ενός δείγματος ταυτοποιούνται ποιοτικά με βάση το χρόνο ανάσχεσης αλλά μετρώνται και ποσοτικά με βάση την απόκριση.

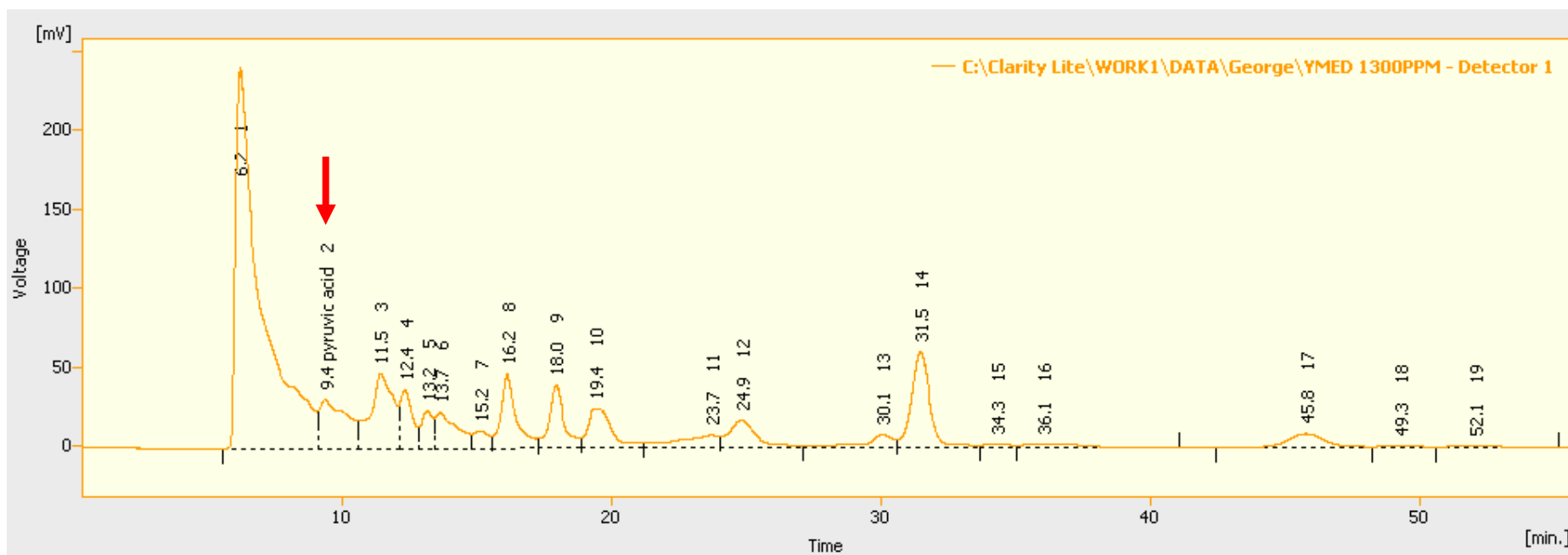
Για παράδειγμα, παρακάτω φαίνεται η καμπύλη βαθμονόμησης του γαλακτικού οξέος, όπου περάστηκαν δυο διαλύματα συγκέντρωσης 2.5 g/l και 5 g/l. Ομοίως κατασκευάστηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης για τα υπόλοιπα οξέα.



Εικόνα 5.5. Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού οξέος στην HPLC κατασκευασμένη από το πρόγραμμα Clarity™ Lite.

## 2. Μέτρηση θρεπτικού υλικού Υmax με 1300 ppm Cr[VI]

Όπως φαίνεται από τις κορυφές του χρωματογραφήματος, το θρεπτικό δεν περιέχει γαλακτικό οξύ, ενώ περιέχει πολύ μικρή ποσότητα πυροσταφυλικού οξέος (κορυφή 2).



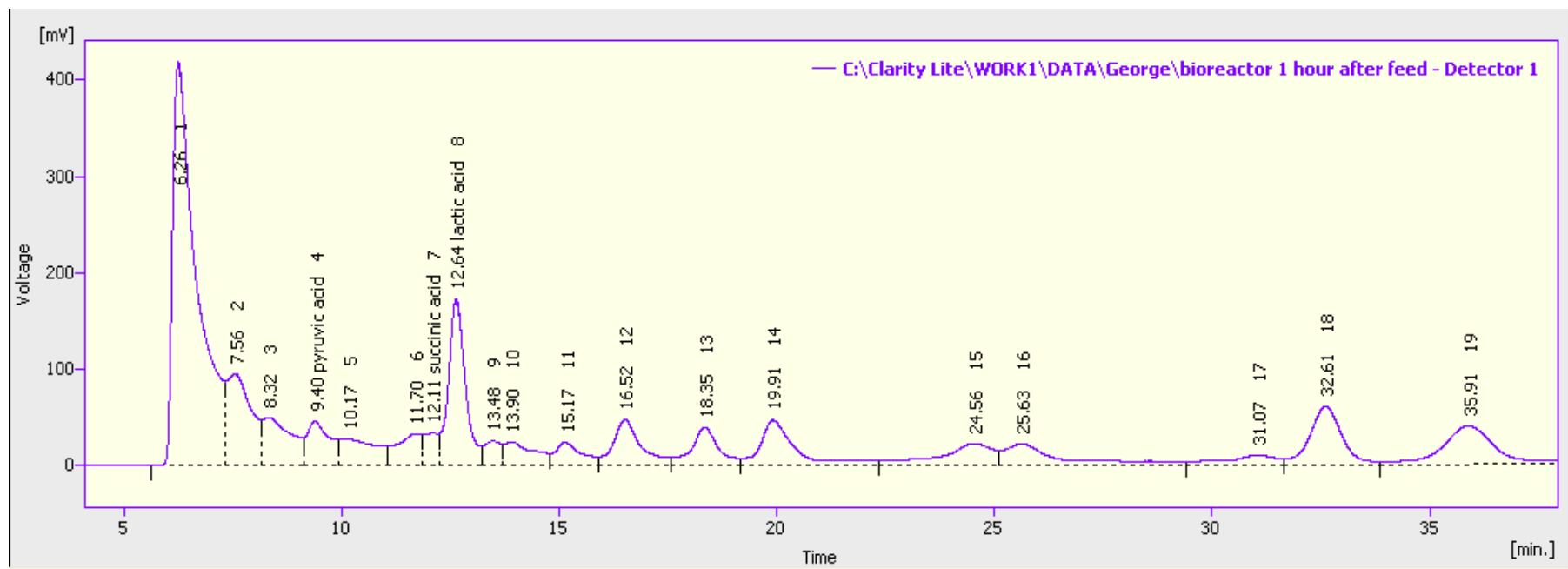
Result Table (ESTD - C:\Clarity Lite\WORK1\DATA\George\YMED 1300PPM - Detector 1)						
	Reten. Time [min]	Response	Amount [mg]	Amount [%]	Peak Type	Compound Name
1	6.244	15551.773	0.000	0.0		
2	9.388	2140.894	287.645	100.0	Ordnr	pyruvic acid
3	11.456	2714.450	0.000	0.0		
4	12.356	1153.516	0.000	0.0		
5	13.192	704.164	0.000	0.0		
6	13.660	1250.704	0.000	0.0		
7	15.152	460.531	0.000	0.0		
8	16.152	1919.648	0.000	0.0		
9	17.960	1551.622	0.000	0.0		
10	19.436	1568.297	0.000	0.0		

Εικόνα 5.6. Χρωματογράφημα θρεπτικού υλικού

### 3. Μέτρηση δείγματος βιοαντιδραστήρα

#### i. Χρωματογράφημα 1 ώρα μετά την τροφοδοσία

Μέσα σε μία ώρα από την τροφοδοσία του αντιδραστήρα με θρεπτικό και Cr[VI], εμφανίζεται μια μεγάλη κορυφή (κορυφή 8) που αντιστοιχεί στο γαλακτικό οξύ, σε ποσότητα 4.1 g/l (εικόνα 5.7.). Συμπεραίνουμε έτσι ότι το γαλακτικό οξύ είναι ένα από τα μεταβολικά προϊόντα του συστήματος και μάλιστα παράγεται άμεσα μετά την τροφοδοσία. Όπως φαίνεται από την εικόνα 5.8. η ποσότητα του πυροσταφυλικού οξέος (κορυφή 4) δε μεταβάλλεται ακόμη σημαντικά σε σχέση με την αρχική τροφοδοσία (θρεπτικό), ενώ εμφανίζεται ελάχιστο ηλεκτρικό οξύ (κορυφή 7).

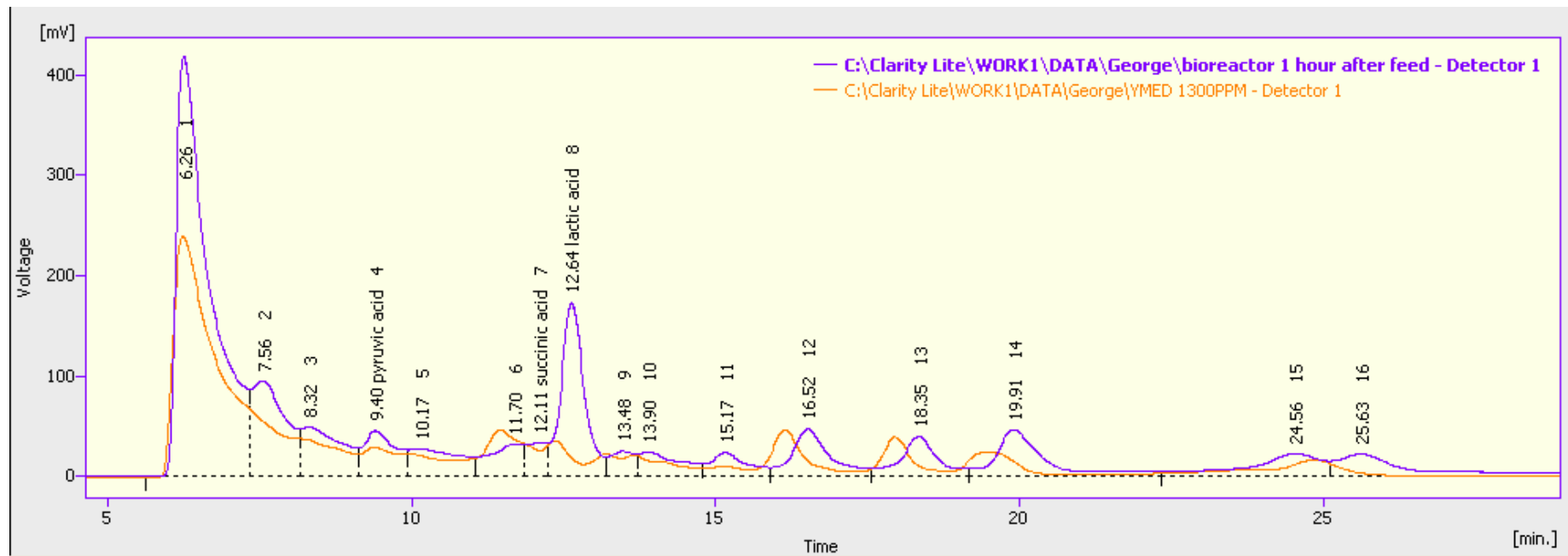


Result Table (ESTD - C:\Clarity Lite\WORK1\DATA\George\bioreactor 1 hour after feed - Detector 1)

	Reten. Time [min]	Response	Amount [mg]	Amount [%]	Peak Type	Compound Name
1	6.256	16077.223	0.000	0.0		
2	7.556	3634.616	0.000	0.0		
3	8.320	2296.163	0.000	0.0		
4	9.404	1674.551	224.988	4.3	Ordnr	pyruvic acid
5	10.168	1574.235	0.000	0.0		
6	11.700	1250.104	0.000	0.0		
7	12.112	742.633	918.878	17.4	Ordnr	succinic acid
8	12.636	4658.366	4143.295	78.4	Ordnr	lactic acid
9	13.476	685.681	0.000	0.0		
10	13.904	1151.400	0.000	0.0		

Εικόνα 5.7. Χρωματογράφημα δείγματος αντιδραστήρα 1 ώρα μετά την τροφοδοσία.

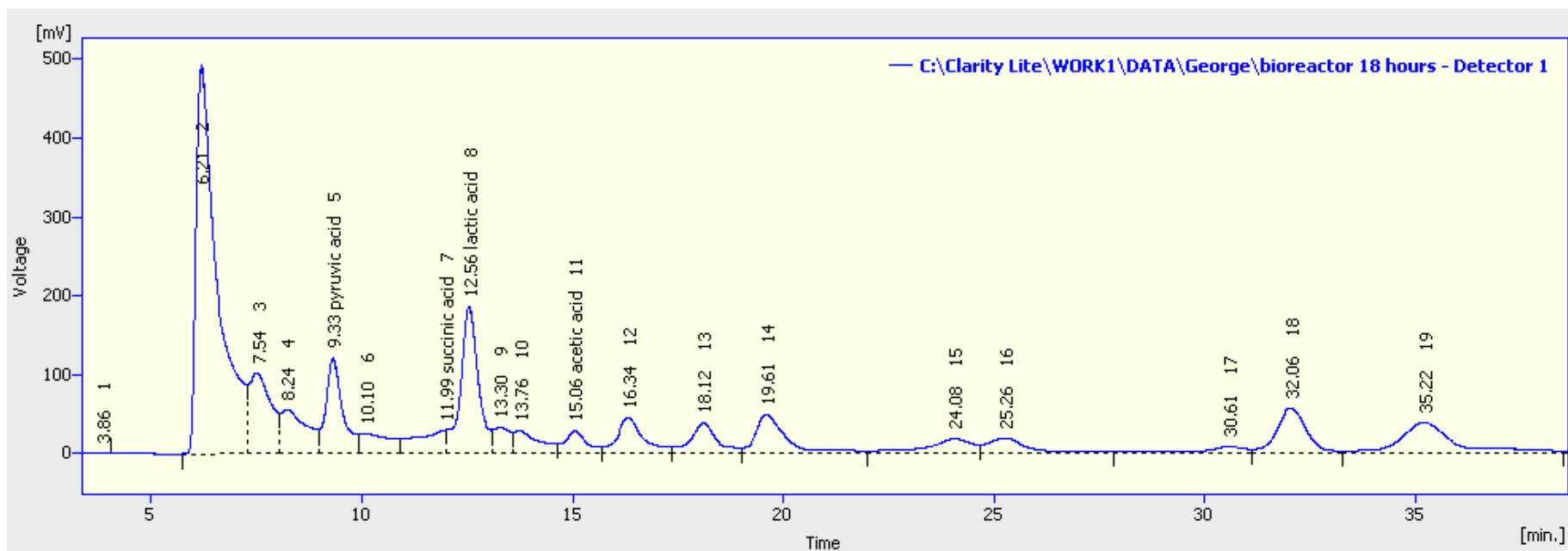




Εικόνα 5.8. Συνδυασμένο χρωματογράφημα βιοαντιδραστήρα 1 ώρα μετά την τροφοδοσία και θρεπτικού υλικού.

ii. Χρωματογράφημα 18 ώρες μετά την τροφοδοσία

Η πιο χαρακτηριστική μεταβολή που παρατηρείται με το πέρασ 18 ωρών μια σημαντική αύξηση της ποσότητας πυροσταφυλικού οξέος (κορυφή 5). Το γαλακτικό οξύ αυξάνεται στα 4,7 g/l. Σημειώνεται επίσης και η εμφάνιση μικρής ποσότητας οξικού οξέος, ενώ το ηλεκτρικό οξύ παραμένει σχεδόν σταθερό.



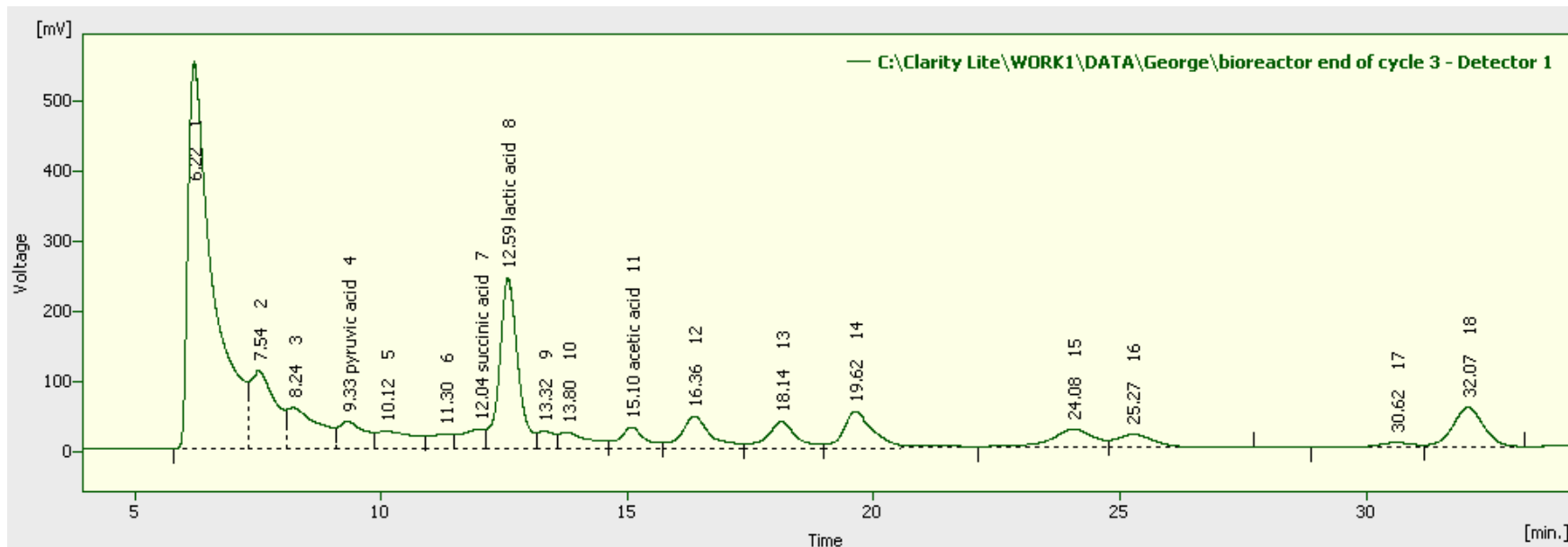
Result Table (ESTD - C:\Clarity Lite\WORK1\DATA\George\bioreactor 18 hours - Detector 1)

	Reten. Time [min]	Response	Amount [mg]	Amount [%]	Peak Type	Compound Name
5	9.332	3238.858	435.164	5.3	Ordnr	pyruvic acid
6	10.100	1282.884	0.000	0.0		
7	11.992	1466.192	1814.156	21.9	Ordnr	succinic acid
8	12.556	5324.622	4735.883	57.2	Ordnr	lactic acid
9	13.300	913.316	0.000	0.0		
10	13.756	1235.457	0.000	0.0		
11	15.060	1003.087	1287.601	15.6	Ordnr	acetic acid
12	16.336	1972.429	0.000	0.0		
13	18.116	1662.335	0.000	0.0		
14	19.612	2468.352	0.000	0.0		

Εικόνα 5.9. Χρωματογράφημα δείγματος αντιδραστήρα 18 ώρες μετά την τροφοδοσία

iii. Χρωματογράφημα 48 ώρες μετά την τροφοδοσία (τέλος του κύκλου)

Στο τέλος του κύκλου το πυροσταφυλικό οξύ έχει καταναλωθεί στο μεγαλύτερο μέρος του, ενώ η ποσότητα γαλακτικού οξέος αυξάνεται στα 5,6 g/l.



Result Table (ESTD - C:\Clarity Lite\WORK1\DATA\George\bioreactor end of cycle 3 - Detector 1)

	Reten. Time [min]	Response	Amount [mg]	Amount [%]	Peak Type	Compound Name
4	9.332	1457.601	195.839	2.4	Ordnr	pyruvic acid
5	10.120	1368.580	0.000	0.0		
6	11.304	671.356	0.000	0.0		
7	12.036	934.933	1156.816	13.9	Ordnr	succinic acid
8	12.588	6302.839	5605.939	67.3	Ordnr	lactic acid
9	13.320	605.201	0.000	0.0		

Εικόνα 5.10. Χρωματογράφημα δείγματος αντιδραστήρα 48 ώρες μετά την τροφοδοσία

iv. Συνδυασμένα χρωματογραφήματα των τριών φάσεων του κύκλου

Στο παρακάτω χρωματογράφημα συνοψίζονται οι μεταβολές των συστατικών κατά τη διάρκεια του κύκλου του αντιδραστήρα. Η ροζ γραμμή αντιστοιχεί στην 1 ώρα, η μπλε στις 18 ώρες και η πράσινη στις 48 ώρες. Στην αρχή του κύκλου υπάρχει μια ποσότητα γαλακτικού οξέος η οποία θεωρείται ότι είναι εναπομείνασα από τον προηγούμενο κύκλο. Αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

όπου:  $C_1$ : η συγκέντρωση του γαλ. οξέος στην αρχή του κύκλου

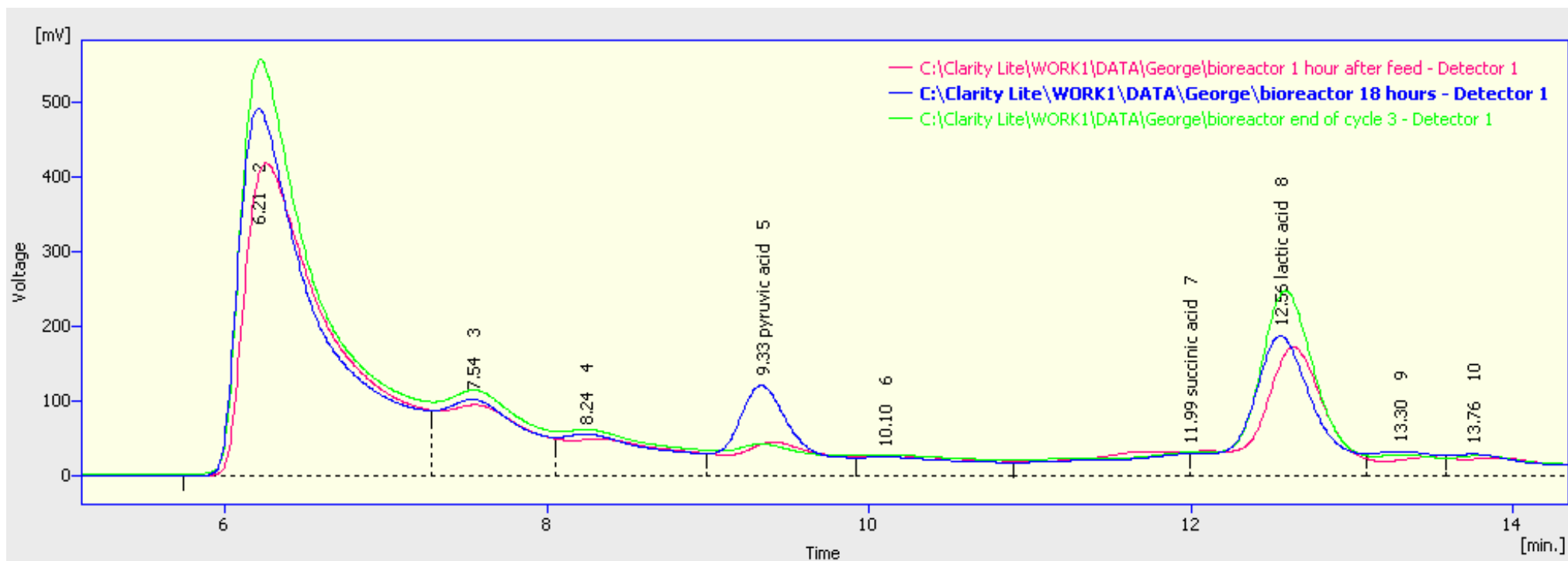
$V_1$ : ο όγκος του υγρού στο βιοαντιδραστήρα στην αρχή του κύκλου = 3l

$C_2$ : η συγκέντρωση του γαλ. οξέος στο τέλος του κύκλου = 5,6 g/l

$V_2$ : ο όγκος του υγρού στο βιοαντιδραστήρα στο τέλος του κύκλου αφού έχουν αφαιρεθεί 1,25l = 1,75l

$$C_1 = \frac{5,6 \cdot 1,75}{3} = 3,3 \text{ mg/l}$$

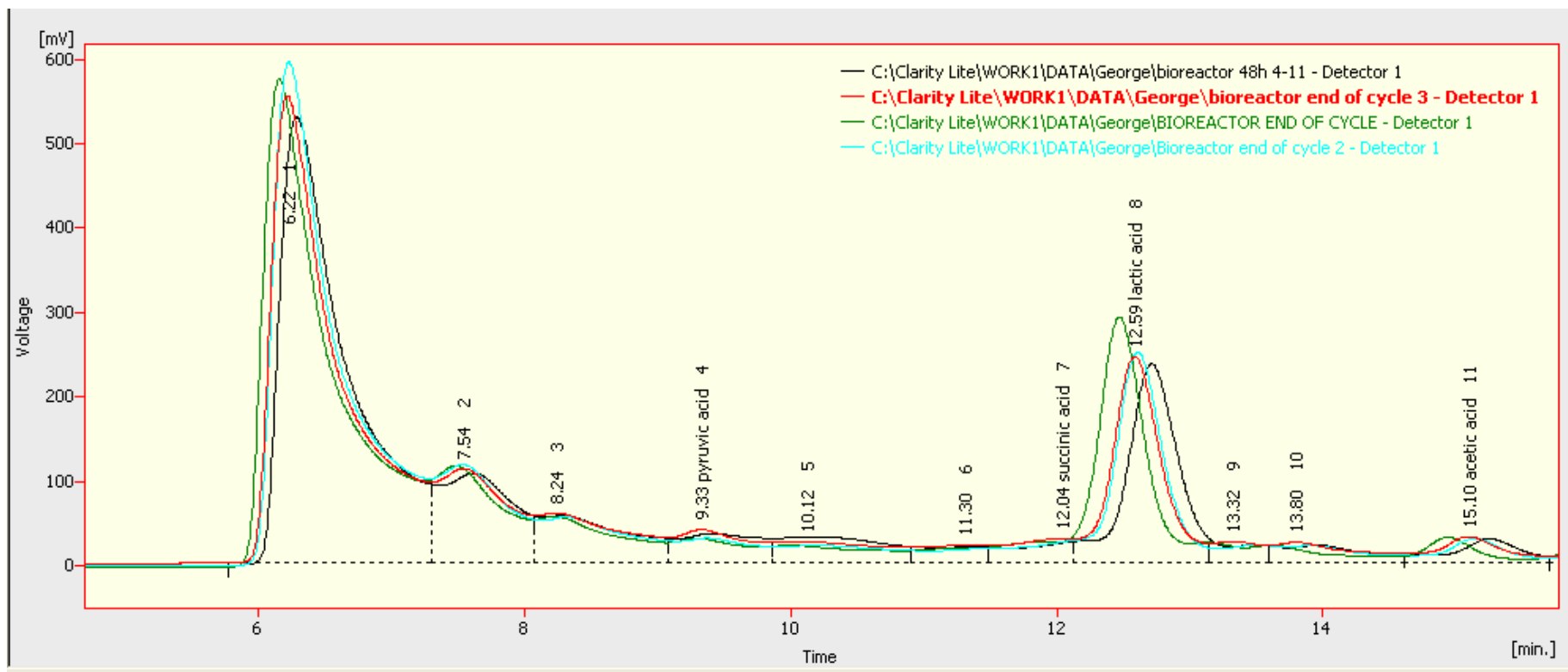
Κατά τη διάρκεια του κύκλου το γαλακτικό οξύ αυξάνεται, μέχρι να φτάσει τα 5,6 g/l. Ενδιάμεσα παράγεται και μια ποσότητα πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο καταναλώνεται μέχρι το τέλος του κύκλου. Είναι λογικό να υποθέσουμε, εφόσον δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές σε άλλες κορυφές, ότι η παραγωγή και η κατανάλωση των δυο αυτών οξέων συνδέονται σε κάποιο στάδιο του μηχανισμού αναγωγής Cr[VI].



Εικόνα 5.11. Συνδυασμένα χρωματογραφήματα των τριών φάσεων του κύκλου: 1h, 18h και 48h

v. Συνδυασμένα χρωματογραφήματα βιοαντιδραστήρα στο τέλος τεσσάρων κύκλων

Προκειμένου να επαληθευτεί η επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην HPLC συγκρίθηκαν 4 χρωματογραφήματα ίδιων φάσεων διαφορετικών κύκλων. Πράγματι, στο τέλος κάθε κύκλου τα χρωματογραφήματα του αντιδραστήρα παρουσιάζουν την ίδια μορφή, επομένως οι μετρήσεις είναι επαναλήψιμες.

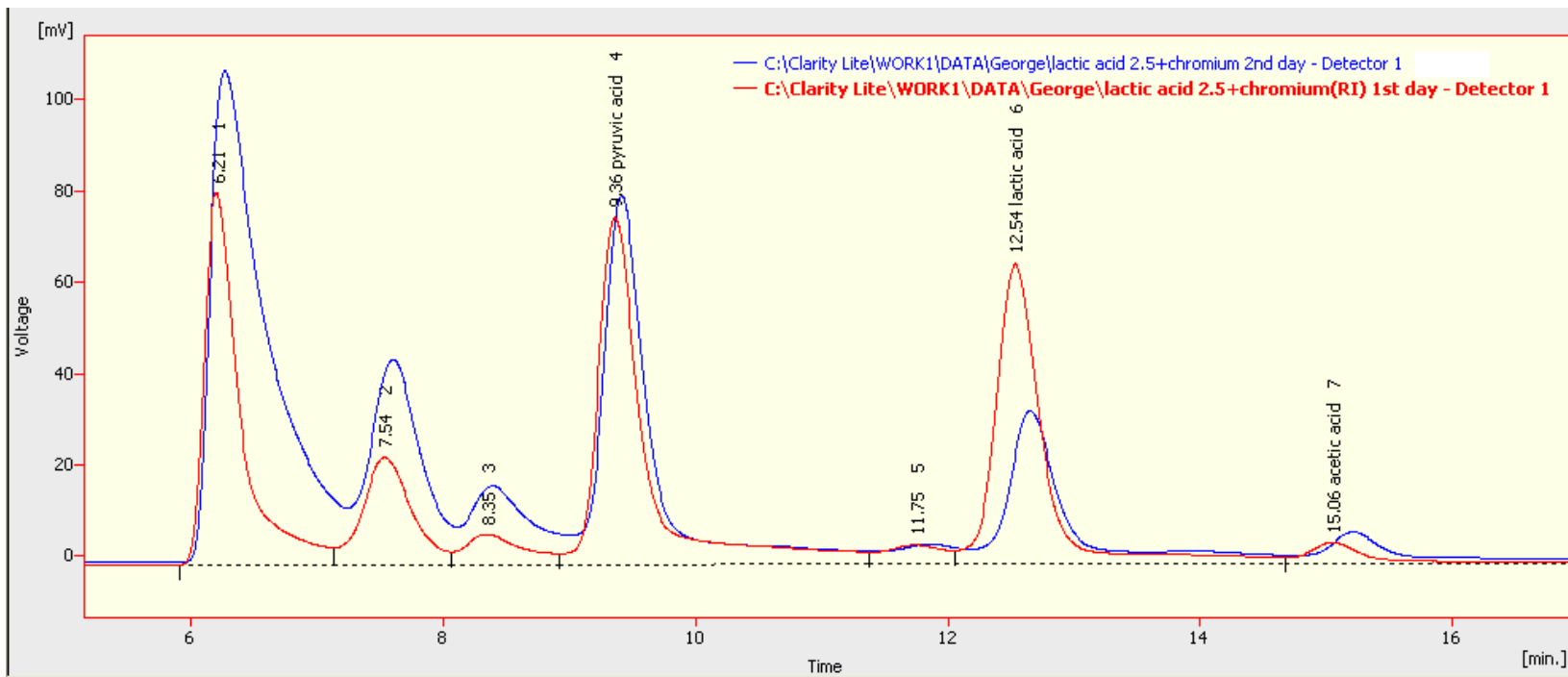


Εικόνα 5.12. Συνδυασμένα χρωματογραφήματα βιοαντιδραστήρα στο τέλος τεσσάρων κύκλων

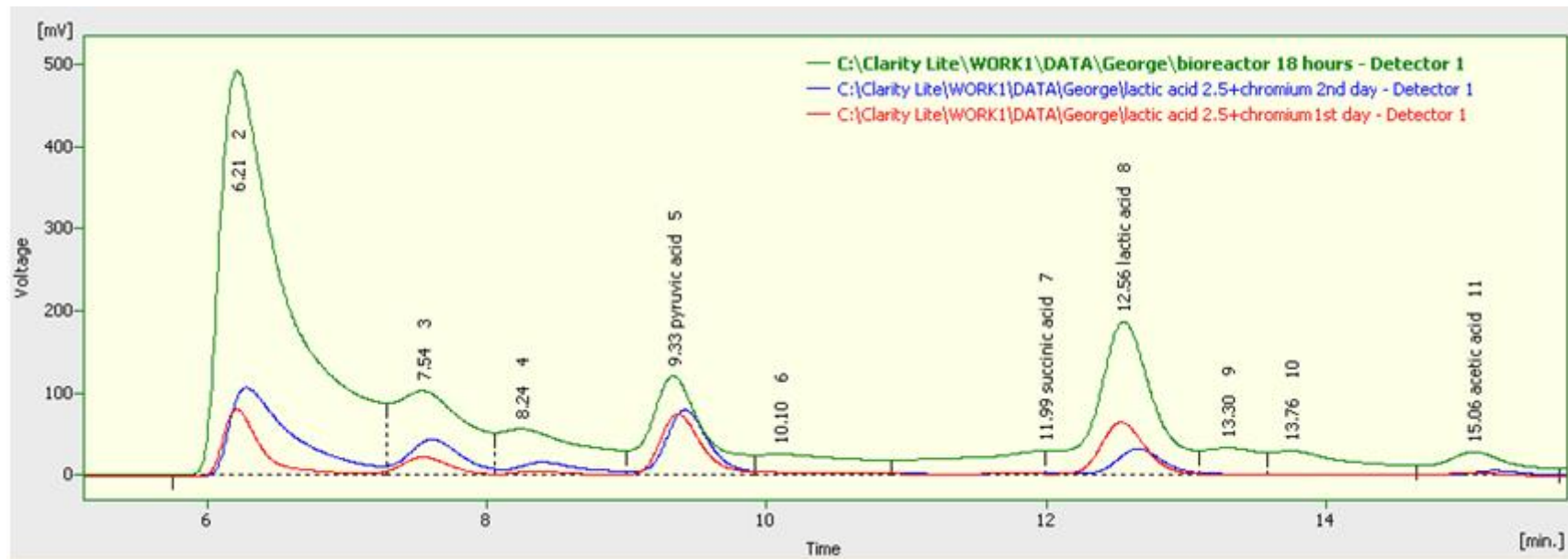
4. Μέτρηση δοκιμίου που περιέχει 2.5g/l γαλακτικό οξύ και 620 ppm Cr[VI]

Συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα του δοκιμίου στα πρώτα δέκα λεπτά από την ανάμιξη (κόκκινη γραμμή) και την επόμενη μέρα (μπλε γραμμή) είναι φανερό ότι το γαλακτικό οξύ οξειδώνεται περίπου κατά το ήμισυ τις πρώτες 24 ώρες από την επαφή του με το εξασθενές χρώμιο (εικόνα 5.13.) και παράγονται προϊόντα που απεικονίζονται στις κορυφές 2, 3, 4 και 7 (ανάμεσά τους και το πυροσταφυλικό οξύ). Οι καμπύλες

μάλιστα του δοκιμίου προσομοιάζουν αυτές του δείγματος βιοαντιδραστήρα (εικόνα 5.14.), κάτι που επιβεβαιώνει την υπόθεσή μας για το μηχανισμό της αντίδρασης στον αντιδραστήρα, ότι δηλαδή το Cr[VI] ανάγεται από το γαλακτικό οξύ.



Εικόνα 5.13. Χρωματογραφήματα δοκιμίου που περιέχει 2.5g/l γαλακτικό οξύ και 620 ppm Cr[VI], στην αρχή του πειράματος και στις 24 ώρες.



Εικόνα 5.14. Συνδυασμένα χρωματογραφήματα δοκιμίου με γαλακτικό οξύ και Cr[VI], και δείγματος βιοαντιδραστήρα

Στο παραπάνω χρωματογράφημα (εικόνα 5.14.) παρατηρείται ότι οι καμπύλες των δοκιμών με Cr[VI] και γαλακτικό οξύ (κόκκινη και μπλε γραμμή) είναι ποιοτικά όμοιες με αυτήν του βιοαντιδραστήρα (πράσινη γραμμή). Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η διεργασία που λαμβάνει χώρα στα δοκίμια προσομοιώνει τη διεργασία στο εσωτερικό του βιοαντιδραστήρα.

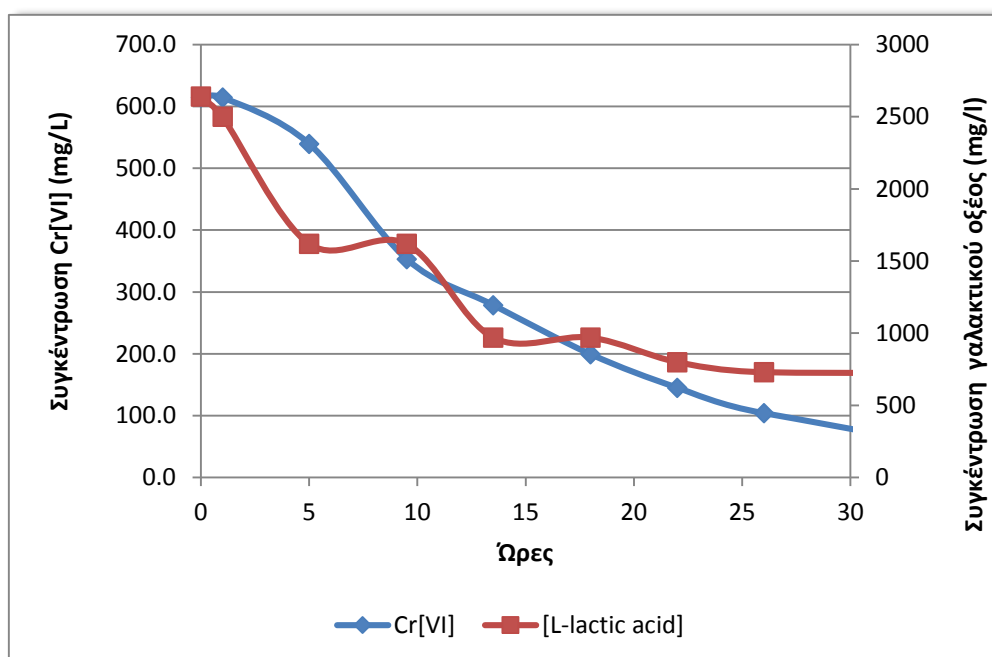


### 5.1.3. Μελέτη της αναγωγής Cr[VI] από γαλακτικό οξύ

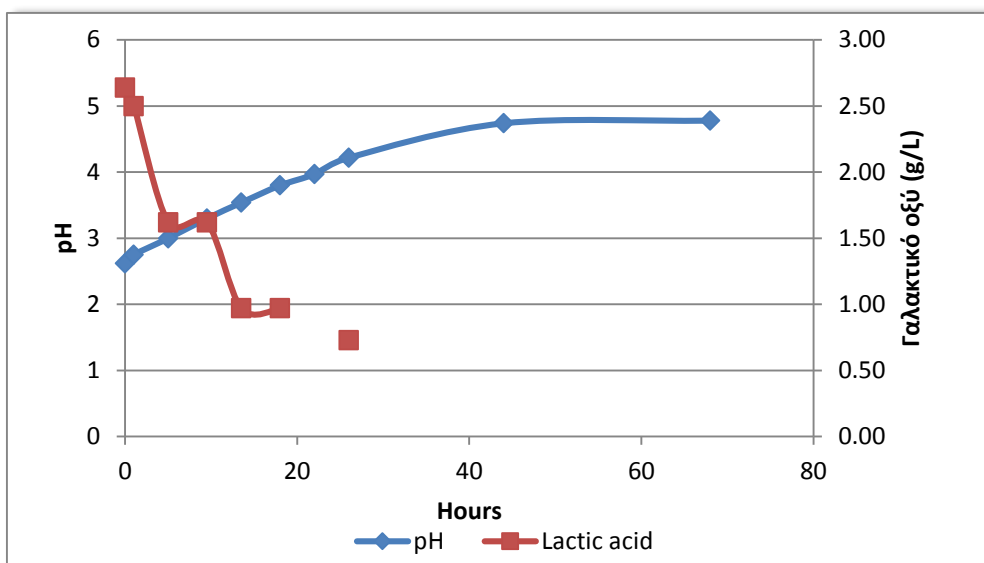
Έγιναν μετρήσεις σε δοκίμιο που περιείχε 2.5 g/l L-γαλακτικό οξύ σε υδατικό διάλυμα 620 ppm Cr[VI]. Η αναγωγή του συνόλου σχεδόν του Cr[VI] πραγματοποιήθηκε μέσα σε 48 ώρες. Το L-γαλακτικό οξύ πράγματι λειτούργησε ως αναγωγικός παράγοντας με αποτέλεσμα την αναγωγή περίπου 510 ppm Cr[VI] στις πρώτες 26 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.3. και τα διαγράμματα 5.2. ως 5.4.

Ώρες	Συγκέντρωση Cr[VI] <sub>aq</sub> (mg/L)	Συγκέντρωση L-γαλακτικού οξέος (mg/L)	pH
0	614.6	2640	2,62
1	614.5	2500	2,75
5	539.7	1620	3
9.5	353.4	1620	3,3
13.5	278.8	970	3,54
18	199.3	970	3,8
22	145.2	800	3,97
26	104.0	730	4,22
44	11.9	730	4,74
68	11.9	730	4,78

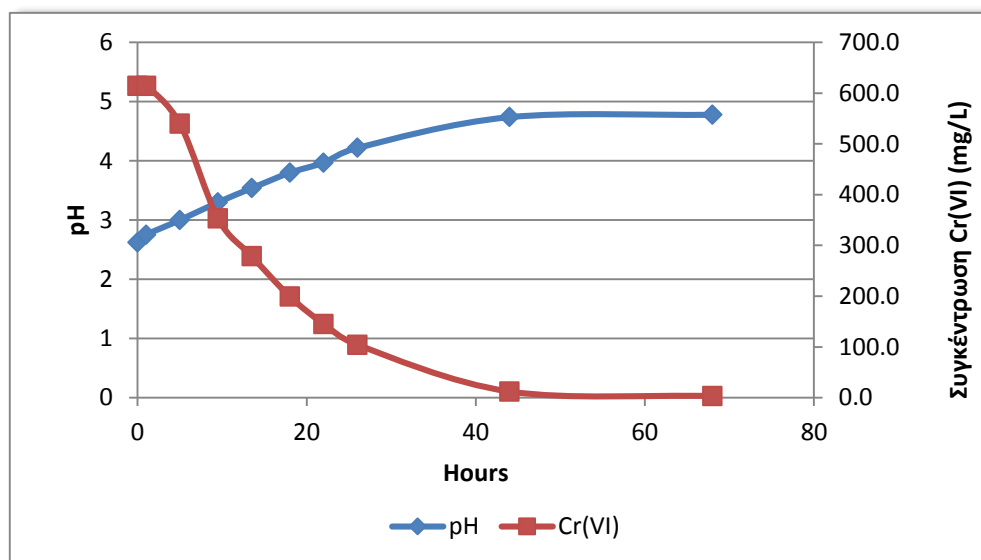
Πίνακας 5.3. Μεταβολή της συγκέντρωσης Cr[VI] σε δοκίμιο που περιέχει 2.5g/L L-γαλακτικό οξύ σε υδατικό διάλυμα 620ppm Cr[VI].



Διάγραμμα 5.2. Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής των συγκεντρώσεων σε δοκίμιο που περιέχει 2.5g/l L-γαλακτικό οξύ σε υδατικό διάλυμα 620ppm Cr[VI].



Διάγραμμα 5.3. Αύξηση pH με την κατανάλωση γαλακτικού οξέος (g/l)



Διάγραμμα 5.4. Μεταβολή τιμών pH και συγκέντρωσης Cr(VI) (mg/l)

Στο διάγραμμα 5.2. φαίνεται η αναμενόμενη μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος, παράλληλα με μείωση της συγκέντρωσης του Cr(VI). Στο επόμενο διάγραμμα (5.3.) απεικονίζεται η αύξηση του pH καθώς μειώνεται η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος. Η αύξηση του pH τις πρώτες 26 ώρες περίπου είναι γρήγορη, διάστημα κατά το οποίο το γαλακτικό οξύ μειώνεται ταχέως, και έπειτα σταθεροποιείται στην τιμή 4,78. Επιπλέον, η συγκέντρωση του Cr(VI) μειώνεται παράλληλα με την αύξηση του pH και οι τιμές των δυο αυτών παραμέτρων σταθεροποιούνται (plateau) σχεδόν ταυτόχρονα (διάγραμμα 5.4.). Η αύξηση του pH κατά την αναγωγή του Cr(VI) ερμηνεύεται ενδεχομένως με τη δέσμευση πρωτονίων του διαλύματος κατά την παραγωγή Cr(III).

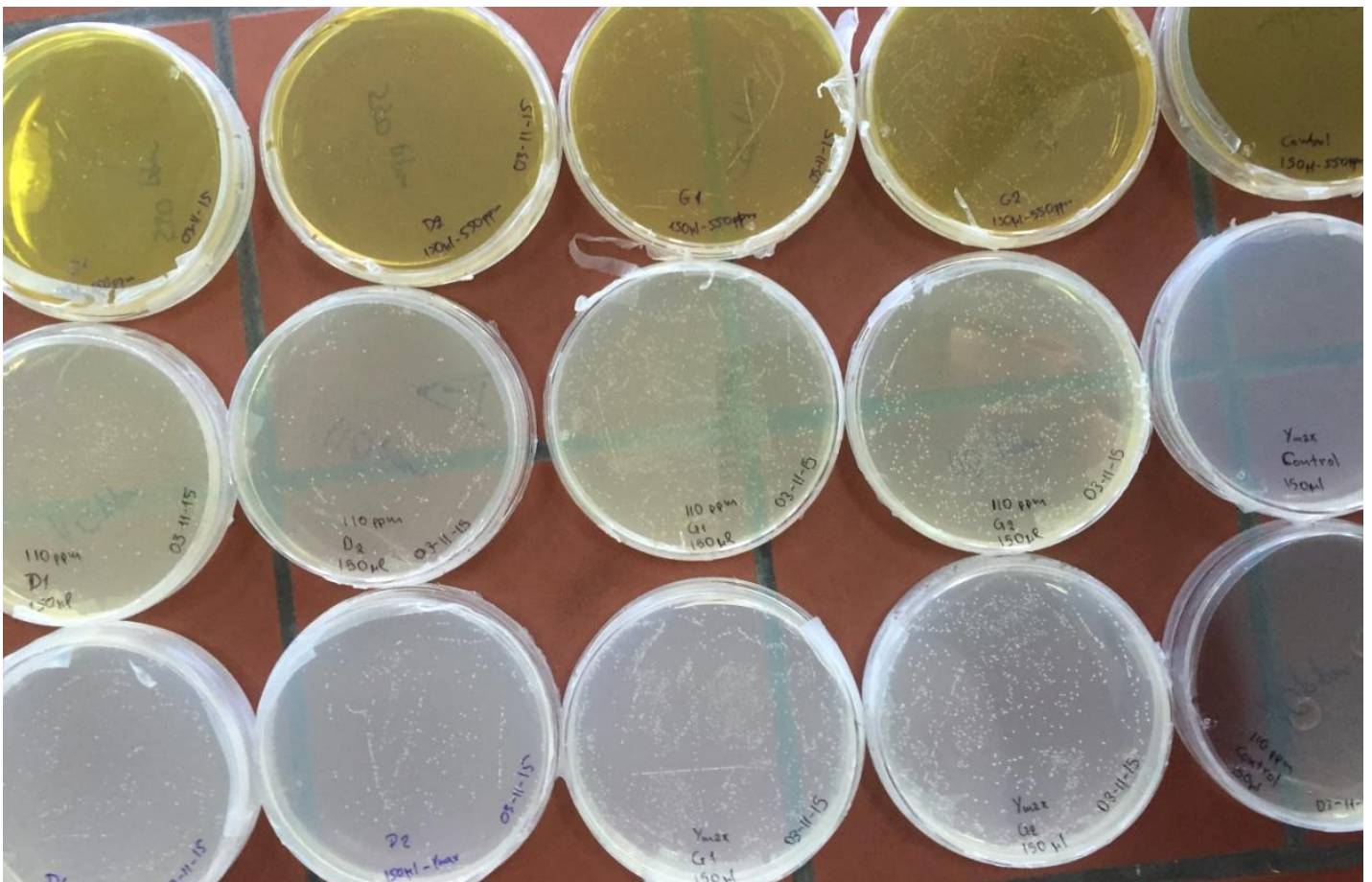
#### 5.1.4. Απομόνωση μικροοργανισμών από τη μικτή καλλιέργεια του βιοαντιδραστήρα

- **Οπτικός έλεγχος καλλιέργειών**

Οι καλλιέργειες που αναπτύσσονται στα τρυβλία Petri εμφανίζουν μακροσκοπικά την ίδια μορφολογία σε ό, τι αφορά στο μέγεθος, το χρώμα και το σχήμα. Είναι μικρές λευκές ημιδιάφανες κουκίδες, που παραπέμπουν μακροσκοπικά σε βακτηριακές αποικίες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι όλες οι αποικίες είχαν ακριβώς την ίδια μορφολογία, γεγονός που δείχνει ότι ο αντιδραστήρας περιέχει ένα μόνο είδος μικροοργανισμού.

Σημειώνεται ότι, εκτός από το γεγονός ότι τα control είναι καθαρά, οι αποικίες επιπλέον που αναπτύσσονται στα τρυβλία που περιέχουν  $\gamma$ max χωρίς Cr[VI] (3<sup>η</sup> σειρά) είναι όμοιες με αυτές που αναπτύσσονται παρουσία Cr[VI] (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> σειρά). Επομένως δεν συμμετέχει κάποιος άλλος μικροοργανισμός στη διαδικασία που δεν επιβιώνει σε περιβάλλον με Cr[VI], και είμαστε πλέον βέβαιοι ότι τα δείγματά μας δεν έχουν μολυνθεί.

Ένα επιπλέον ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι μικροοργανισμοί του ίδιου είδους που προέρχονταν από την υγρή καλλιέργεια που περιείχε 550 ppm Cr[VI] αναπτύχθηκαν κανονικά στα τρυβλία που περιείχαν 550 ppm Cr[VI], κάτι που δε συνέβη με αυτούς που μεγάλωσαν στην υγρή καλλιέργεια με τα 110 ppm Cr[VI].



Εικόνα 5.15. Αποικίες κυττάρων βιοαντιδραστήρα μετά από απομόνωση μοναδιαίων αποικιών και επανακαλλιέργειάς τους σε τρυβλία με διάφορες συγκεντρώσεις Cr[VI].

- **Ενόργανες μετρήσεις υγρών καλλιεργειών**

I. Μετρήσεις Cr[VI]

Υπολογίστηκε το ποσοστό της μείωσης του εξασθενούς χρωμίου στο θρεπτικό υλικό μετά από επώαση των υγρών καλλιεργειών στους 35°C για 24 ώρες, με βάση τη σχέση 4.1. (σχέση απορρόφησης στο φωτόμετρο-συγκέντρωσης). Η ποσοστιαία μείωση με βάση το control υπολογίστηκε από τη σχέση:

$$\% \text{ Μείωση} = \frac{\text{Συγκέντρωση Cr[VI] control} - \text{Συγκέντρωση Cr[VI] δειγματος}}{\text{Συγκέντρωση Cr[VI] control}} \cdot 100\%$$

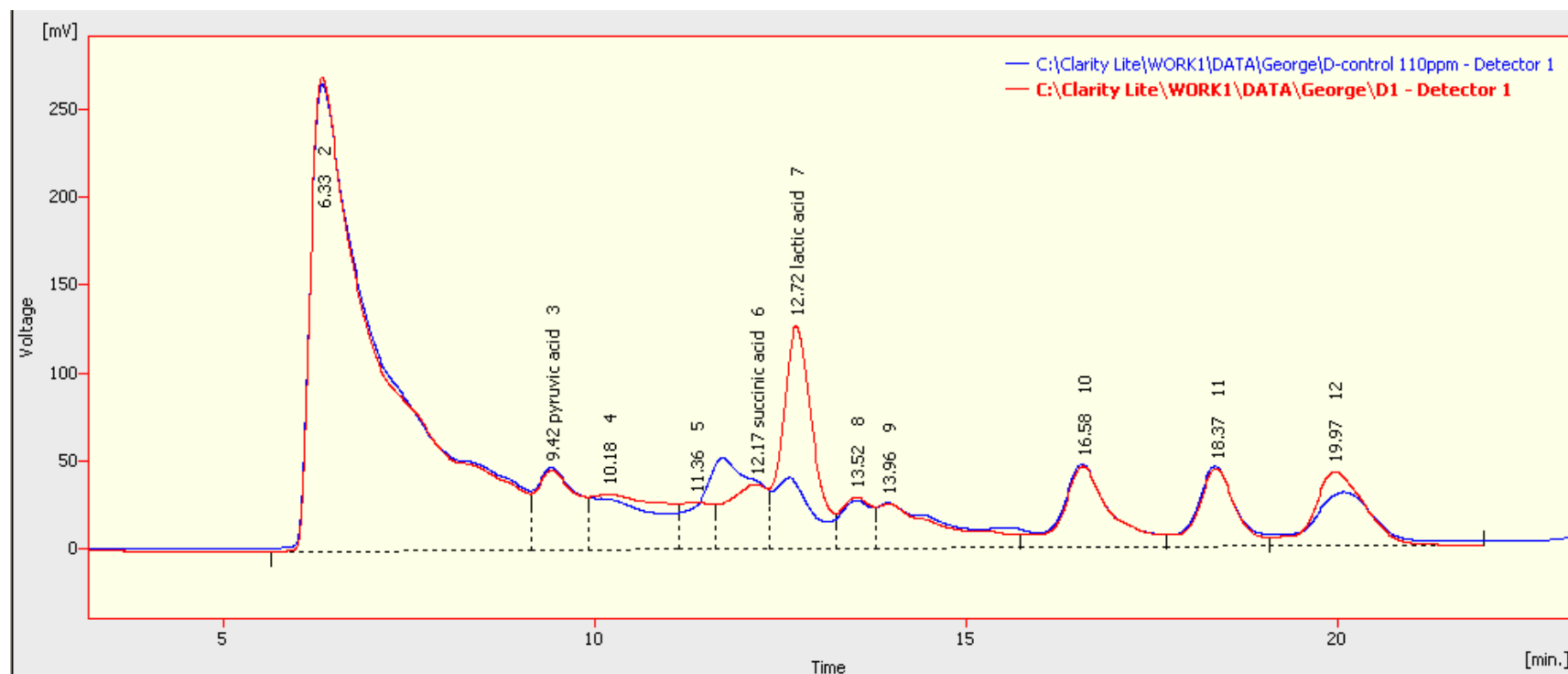
Δείγμα	Απορρόφηση Cr[VI]	Αραίωση	Μέση απορρόφηση Cr[VI]	Συγκέντρωση Cr[VI] μετά από 24h	% Μείωση με βάση το control
Control 110 ppm	0,261	1:200	0,264	63,20	-
	0,267				
Αποικία 1-110 ppm	0,182	1:200	0,183	43,69	<b>30,87</b>
	0,183				
Αποικία 2-110 ppm	0,164	1:200	0,165	39,50	<b>37,50</b>
	0,166				
Αποικία 3-110 ppm	0,122	1:200	0,124	29,57	<b>53,22</b>
	0,125				
Control 550 ppm	0,324	1:1250	0,324	484,04	-
	0,323				
Αποικία 1-550ppm	0,241	1:1250	0,240	358,35	<b>25,97</b>
	0,238				
Αποικία 2-550ppm	0,229	1:1250	0,229	341,89	<b>29,37</b>
	0,228				
Αποικία 3-550ppm	0,230	1:1250	0,231	345,63	<b>28,59</b>
	0,232				

Πίνακας 5.4. Μετρήσεις [Cr(VI)] υγρών καλλιεργειών και ποσοστιαία μείωση [Cr(VI)] στις 24h με βάση το θρεπτικό χωρίς Cr[VI] (control)

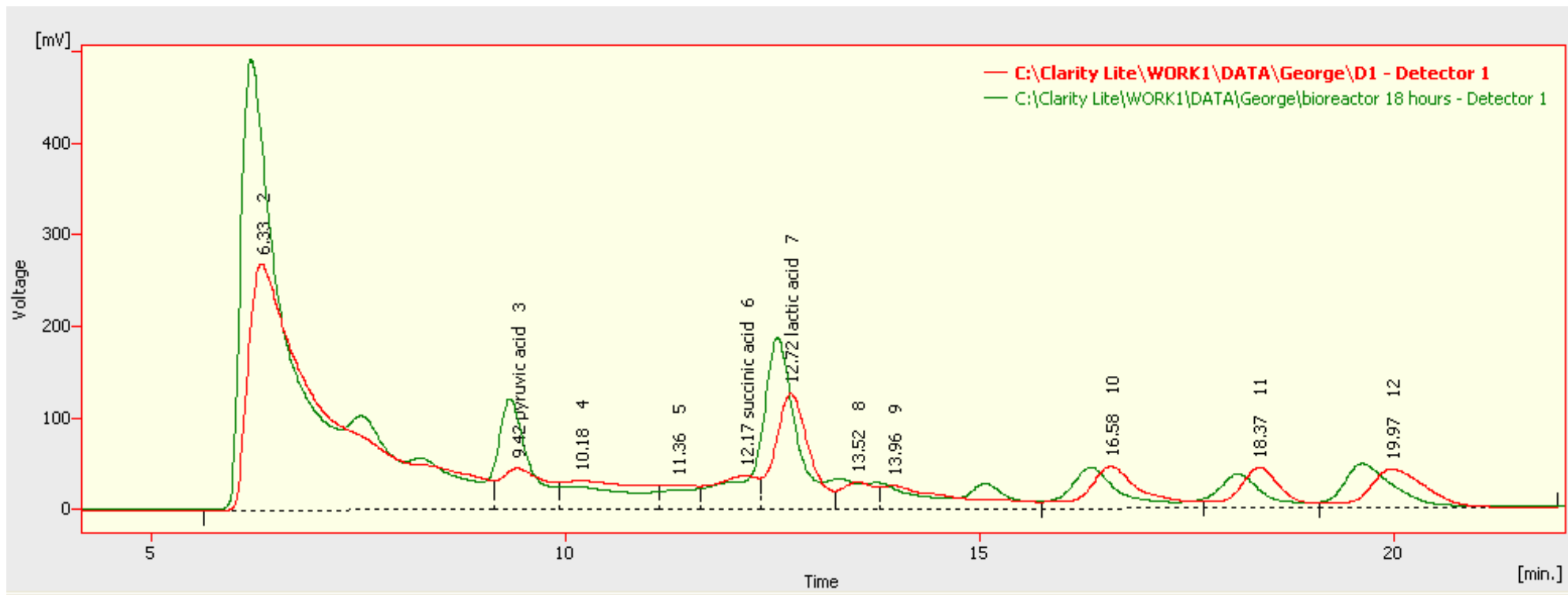
Παρατηρείται ότι στα δυο control που περιέχουν μόνο θρεπτικό και χρώμο, δεν ανάγεται το Cr[VI]. Αυτό επιβεβαιώνει το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί σχετίζονται με την αναγωγή. Η αναγωγή πραγματοποιείται με μεγαλύτερη απόδοση σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις χρωμίου.

## II. Μέτρηση στην HPLC

Μετά από επώαση 24h δείγματα από τις υγρές καλλιέργειες εισήχθησαν στη στήλη HPLC, όπου διαπιστώθηκε η ύπαρξη γαλακτικού, πυροσταφυλικού και ηλεκτρικού οξέος. Παρατίθεται το χρωματογράφημα μίας εκ των υγρών καλλιεργειών που περιείχε 110 ppm Cr[VI] (κόκκινη γραμμή). Η σύγκριση με το control (μπλε γραμμή) αποδεικνύει ότι στην καλλιέργεια γίνεται παραγωγή γαλακτικού οξέος (εικόνα 5.16). Επιπλέον, η σύγκριση του χρωματογραφήματος της καλλιέργειας με αυτό του βιοαντιδραστήρα υποδεικνύει τις ομοιότητες των συστατικών στο δοκίμιο και στον αντιδραστήρα (εικόνα 5.17.).



Εικόνα 5.16. Συνδυασμένα χρωματογραφήματα υγρής καλλιέργειας με 110 ppm Cr[VI] και control.



Εικόνα 5.17. Συνδυασμένα χρωματογραφήματα υγρής καλλιέργειας υγρής καλλιέργειας με 110 ppm Cr(VI) και βιοαντιδραστήρα στις 18h.

## 5.2. Πειράματα γενετικής ταυτοποίησης

### 5.2.1. Απομόνωση DNA *E.coli* και *S. cerevisiae*

Η μέθοδος λύσης των κυττάρων που ακολουθήσαμε αποδείχθηκε κατάλληλη τόσο για βακτήρια όσο και για μύκητες. Στις εικόνες 5.18. και 5.19. φαίνεται το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης DNA *E.coli* και *S.cerevisiae*.



Εικόνα 5.18. Γονιδιωματικό DNA *E. coli*

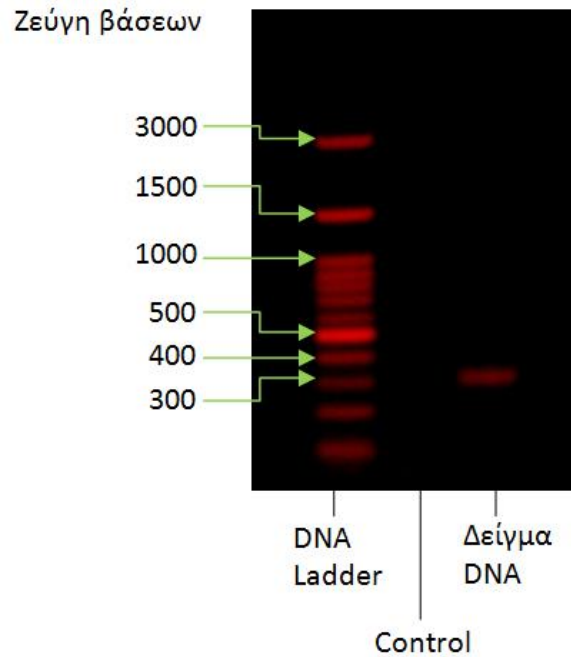


Εικόνα 5.19. Γονιδιωματικό DNA *S. cerevisiae*

### 5.2.2. Ανίχνευση DNA με ηλεκτροφόρηση

#### i. Ανίχνευση βακτηριακού DNA

Το DNA που απομονώθηκε από την υγρή καλλιέργεια που περιγράφηκε προηγουμένως πολλαπλασιάστηκε με τη χρήση εκκινητών για το γονίδιο του 16S rRNA οι οποίοι υβριδίζονται αποκλειστικά και μόνο σε βακτηριακό DNA. Ως αρνητικό control χρησιμοποιήθηκε δείγμα χωρίς DNA. Το αποτέλεσμα φαίνεται στην εικόνα 5.20. Το control δεν εμφανίζει φωτεινή μπάνα, επομένως αποκλείεται το ενδεχόμενο μόλυνσης στα αντιδραστήρια. Αντίθετα, το δείγμα που περιέχει το DNA των λυμένων κυττάρων εμφανίζει χαρακτηριστική μπάνα. Συγκρίνοντας την απόσταση που έχει διανύσει με το μάρτυρα (DNA ladder) προκύπτει ότι το τμήμα DNA του δείγματος έχει περίπου 300 ζεύγη βάσεων. Επομένως, επαληθεύτηκε η αρχική μας υπόθεση ότι οι μικροοργανισμοί που απομονώσαμε ήταν βακτήρια.



Εικόνα 5.20..  
Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης  
PCR προϊόντος με *primers* για  
βακτήρια

## ii. Ανίχνευση DNA μυκήτων

Ελέγχθηκε επίσης το προϊόν της PCR με εκκινητές για τους spacers ITS1 και ITS2 οι οποίοι υβριδίζονται αποκλειστικά στο DNA μυκήτων, καθώς και το αρνητικό control. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.21. , το control και το δείγμα με το DNA των λυμένων κυττάρων εμφανίζουν την ίδια εικόνα κατά την ηλεκτροφόρηση. Η μπάντα υψηλής φωτεινότητας που φαίνεται χαμηλά υποδεικνύει τη συσσώρευση μικρών νουκλεοτιδικών τμημάτων που έχουν διανύσει τη μέγιστη απόσταση στο τζελ. Η μπάντα αυτή αντιπροσωπεύει τα δεοξυριβονουκλεοτίδια (DNTPs) που αποτελούν τις δομικές μονάδες για τη σύνθεση DNA κατά τη θερμική κυκλοποίηση (PCR). Εφόσον δεν υπάρχει DNA μυκήτων στα λυμένα κύτταρα, ούτε στο control, οι εξειδικευμένοι εκκινητές δε βρίσκουν γονίδιο να προσδεθούν, κι έτσι δεν πραγματοποιείται σύνθεση νέου DNA. Ως αποτέλεσμα δεν εμφανίζεται άλλη μπάντα, πέραν των DNTPs, κατά την ηλεκτροφόρηση.





Εικόνα 5.21.  
Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης  
PCR προϊόντος με primers για  
μύκητες

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται στον αντιδραστήρα είναι βακτήρια, αλλά όχι ποια βακτήρια. Εφόσον έχουμε δείξει ότι οι μικροοργανισμοί σχετίζονται με την αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου (βλ. ενότητα 5.1.4.) επόμενο βήμα για την ανάλυση του συστήματος αναγωγής Cr[VI] είναι ο καθορισμός του είδους των βακτηρίων. Για αυτό το σκοπό, το δείγμα DNA που απομονώθηκε καθαρίστηκε (βλ. ενότητα 4.3.5.) και εστάλη στην εταιρεία Eurofins Genomics για ταυτοποίηση.

### 5.2.3. Αλληλούχιση DNA και ταυτοποίηση μικροοργανισμού

#### DNA Sequencing

Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση είτε του εμπρόσθιου εκκινητή (forward primer) 515F είτε του αναστροφου εκκινητή (reverse primer) 806R. Και στις 2 περιπτώσεις η αλληλούχιση έδειξε κοινά αποτελέσματα χωρίς μεγάλες αποκλίσεις, όπως φαίνεται και ακολούθως:

#### 515F:

5'GTAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCA  
TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCRAA  
AGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCGGTAGTCCCAAG-3'

#### 806R:

3'TMGCCTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTCA  
CCGCTACACATGGAGTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGCACTTCTTCGG  
TTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCCTGCGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGG  
ATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACAATG-5'

Σημειώνεται ότι όπου

M: A ή C  
H: A, C, ή T  
V: G, C, ή A  
W: A ή T

## BLAST® database

Αναζητώντας την αλληλουχία που προέκυψε κατά την αλληλούχιση του DNA στη βάση δεδομένων BLAST® καταλήξαμε ότι το βακτήριο που αναπτύσσεται στο βιοαντιδραστήρα ανήκει με ακρίβεια 99% στο γένος *Pediococcus*. Παρότι δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για το είδος του μικροοργανισμού, βάσει των ιδιοτήτων του και των φωτογραφιών του SEM μπορούμε να θεωρήσουμε ότι ο μικροοργανισμός που ταυτοποιήθηκε ανήκει στο είδος *Pediococcus acidilactici*.

Παρακάτω επιδεικνύεται η διαδικασία χρήσης του BLAST® :

- Επιλογή είδους DNA

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST Home

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. [more...](#)

### BLAST Assembled Genomes

Find Genomic BLAST pages:

Enter organism name or id--completions will be suggested

- Human
- Mouse
- Rat
- Cow
- Pig
- Dog
- Rabbit
- Chimp
- Guinea pig
- Fruit fly
- Honey bee
- Chicken
- Zebrafish
- Clawed frog
- Arabidopsis
- Rice
- Yeast
- Microbes

### Basic BLAST

Choose a BLAST program to run.

- [nucleotide blast](#) Search a **nucleotide** database using a **nucleotide** query  
*Algorithms:* blastn, megablast, discontinuous megablast
- [protein blast](#) Search **protein** database using a **protein** query  
*Algorithms:* blastp, psi-blast, phi-blast, delta-blast
- [blastx](#) Search **protein** database using a **translated nucleotide** query
- [tblastn](#) Search **translated nucleotide** database using a **protein** query
- [tblastx](#) Search **translated nucleotide** database using a **translated nucleotide** query

### Specialized BLAST

Choose a type of specialized search (or database name in parentheses.)

Your Recent Results [New](#)

[All Recent results...](#)

### News

#### SmartBLAST

Use SmartBLAST for faster BLASTp results in a graphical view.

Wed, 29 Jul 2015 18:00:00 EST

[More BLAST news...](#)

### Tip of the Day

#### [Using Tree View to Examine Relationships Between Sequences.](#)

The new Tree View option on the NCBI BLAST service presents a dendrogram tree display that clusters sequences according to their distances from the query sequence.

[More tips...](#)

- Εισαγωγή αλληλουχίας που αλληλουχήθηκε με τον 515F primer

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI/BLAST/blastn suite Microbial Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn

Enter Query Sequence BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query, more...

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear Query subrange

From

To

Or, upload file Επιλογή αρχείου Δεν επιλέχθηκε κανένα αρχείο.

Job Title

Επιλογή αρχείου

Enter a descriptive title for your BLAST search

Choose Search Set

Database  Representative genomes only  All genomes

Organism Optional

Enter organism name or id--completions will be suggested Exclude

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Limit to Optional

Sequences from type material

Entrez Query Optional

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for  Highly similar sequences (megablast)  More dissimilar sequences (discontiguous megablast)  Somewhat similar sequences (blastn)

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite Microbial Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn

Enter Query Sequence BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query, more...

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) Clear Query subrange

From

To

Or, upload file Επιλογή αρχείου Δεν επιλέχθηκε κανένα αρχείο.

Job Title

bact1\_515F

Enter a descriptive title for your BLAST search

Choose Search Set

Database  Representative genomes only  All genomes

Organism Optional

Enter organism name or id--completions will be suggested Exclude

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Limit to Optional

Sequences from type material

Entrez Query Optional

Enter an Entrez query to limit search

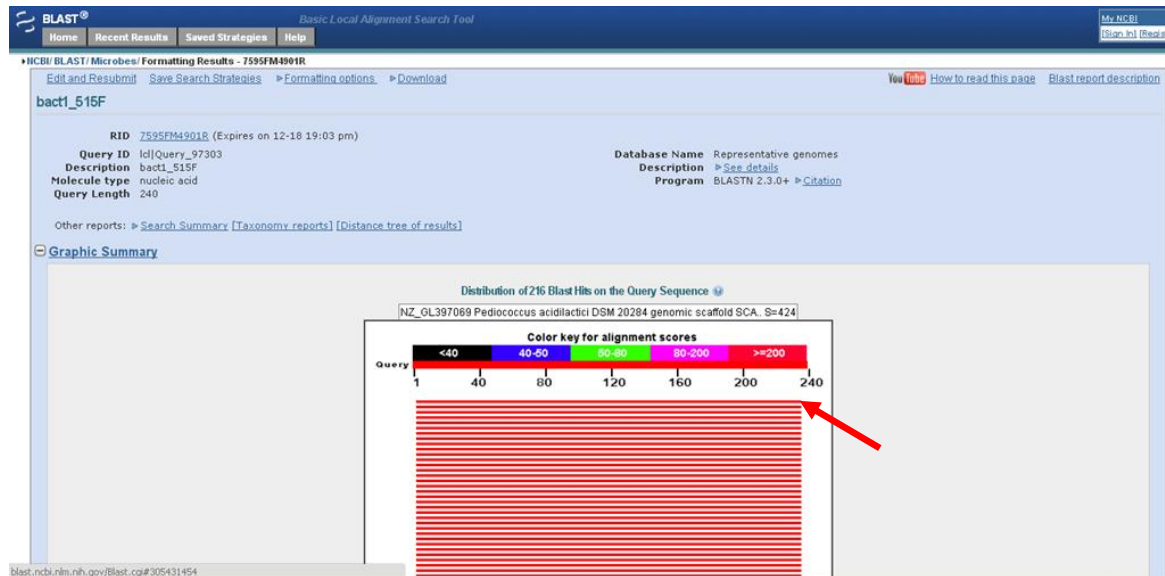
Program Selection

Optimize for  Highly similar sequences (megablast)  More dissimilar sequences (discontiguous megablast)  Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

**BLAST** Search database Representative genomes using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

- Επιλογή αλληλουχίας που έχει το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας με αυτήν που εισάγαμε



- Λήψη αποτελέσματος. Το όνομα του βακτηρίου που εμφανίζεται είναι *Pediococcus acidilactici* και οι περιοχές ομοιότητας περιλαμβάνουν 232 από τις 234 βάσεις που εισάγαμε (ακρίβεια 99%).

Alignments

Download GenBank Graphics

Pediococcus acidilactici DSM 20284 genomic scaffold SCAFFOLD3, whole genome shotgun sequence  
Sequence ID: [ref|NZ\\_GL397069.1](#) Length: 1783 Number of Matches: 1

Range 1: 802 to 1035 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
424 bits (229)	6e-116	232/234(99%)	0/234(0%)	Plus/Minus
Query 3	AAGCGAGCCGAGCCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGT	62		
Sbjct 1035	AAGCGAGCCGAGCCGGTCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGT	976		
Query 63	GCATTGGAAGTGGGAGACTTGCAGTCCAGAAGAGGACAGTCCAACTCCATCTGTAGCGGT	122		
Sbjct 975	GCATTGGAAGTGGGAGACTTGCAGTCCAGAAGAGGACAGTCCAACTCCATCTGTAGCGGT	916		
Query 123	GAAATCGGTAGATATATCGAAGAACACCAGTGGCGAAGCGCGCTGTCTGCTCTCTAACTC	182		
Sbjct 915	GAAATCGGTAGATATATCGAAGAACACCAGTGGCGAAGCGCGCTGTCTGCTCTCTAACTC	856		
Query 183	ACGCTCAGGCTCRAAAGCATGGGTAGCGAAGCAGGATTACATACCCCGGTACTCC	236		
Sbjct 855	ACGCTCAGGCTCRAAAGCATGGGTAGCGAAGCAGGATTACATACCCCGGTACTCC	802		

- Εισαγωγή αλληλουχίας που αλληλουχήθηκε με τον 806R primer, για επιβεβαίωση αποτελέσματος.

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite Microbial Nucleotide BLAST

blastn blastp blastx tblastn

Enter Query Sequence

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query sequence.

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)

Clear Query subrange

From To

Or, upload file

Επιλογή αρχείου Δεν επιλέχθηκε κανένα αρχείο.

Job Title

bact2\_806R

Enter a descriptive title for your BLAST search

Choose Search Set

Database

Organism

Optional

Limit to

Optional

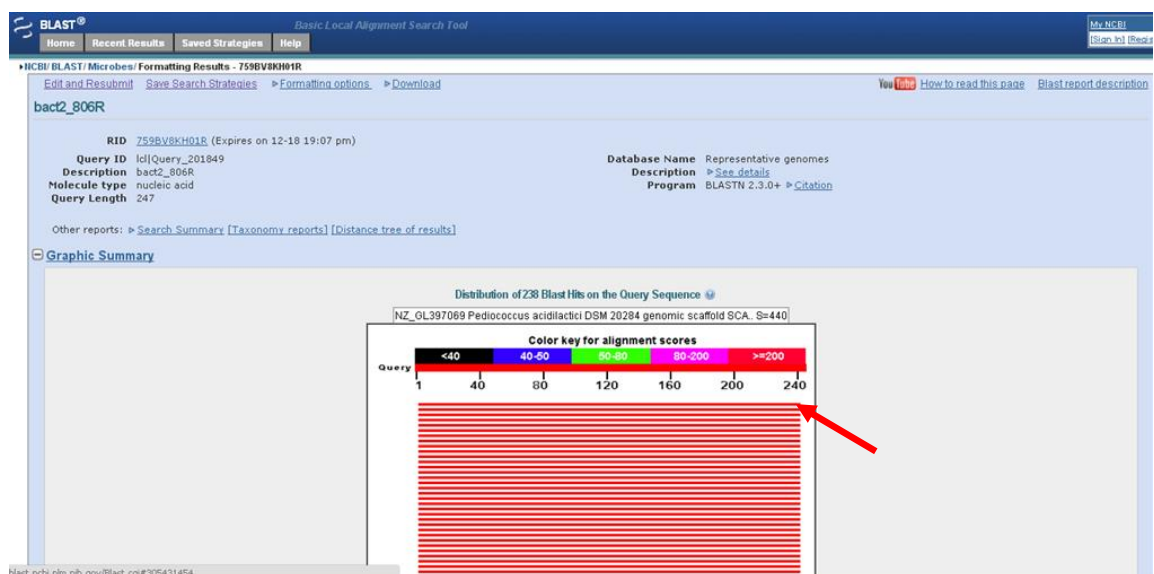
Entrez Query

Optional

Program Selection

Optimize for

- Επιλογή αλληλουχίας που έχει το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας με αυτήν που εισάγαμε



- Λήψη αποτελέσματος. Εμφανίζεται το ίδιο βακτήριο και οι περιοχές ομοιότητας περιλαμβάνουν 241 από τις 242 βάσεις που εισάγαμε (ακρίβεια 99%). Επομένως το αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται.

**Alignments**

Download ▾ GenBank Graphics

Pediosoccus acidilactici DSM 20284 genomic scaffold SCAFFOLD3, whole genome shotgun sequence  
Sequence ID: [ref|NZ\\_GL397069.1](#) Length: 1783 Number of Matches: 1

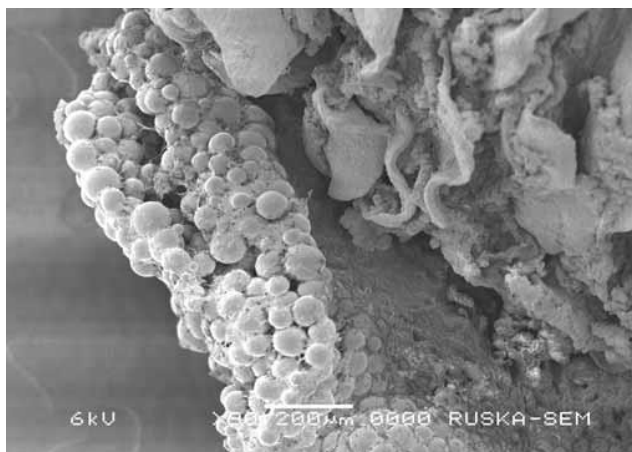
Range 1: 852 to 1093 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
440 bits(238)	6e-121	241/242(99%)	1/242(0%)	Plus/Plus
Query 3	GCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCA	62		
Sbjct 852	GCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCA	911		
Query 63	TTTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAAGTCTCCCAGTTTCCA	122		
Sbjct 912	TTTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAAGTCTCCCAGTTTCCA	971		
Query 123	ATGCACCTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCCTGCGCTC	182		
Sbjct 972	ATGCACCTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAAGACCGCCTGCGCTC	1031		
Query 183	GCTTTACGCCCAATAAAATCCGGATAACGCTTGGCCACCTACGTATTACCGCG-CTGCTGGC	241		
Sbjct 1032	GCTTTACGCCCAATAAAATCCGGATAACGCTTGGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC	1091		
Query 242	AC 243			
Sbjct 1092	AC 1093			

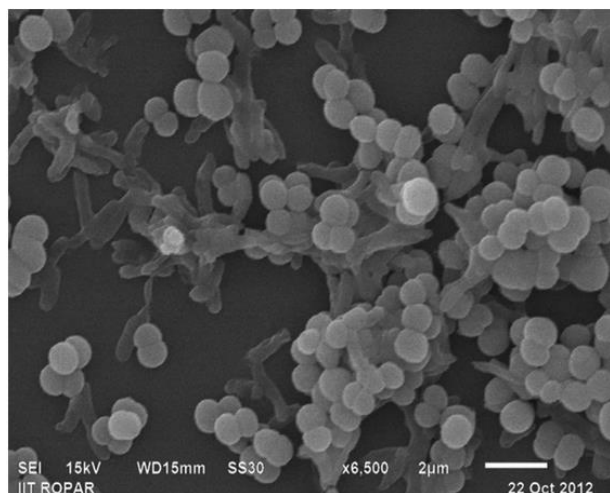
#### 5.2.4. Έλεγχος αποτελέσματος με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)

Η σύγκριση φωτογραφιών ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) από δείγμα βιοαντιδραστήρα με φωτογραφίες του *Pediosoccus* της βιβλιογραφίας ενισχύει το συμπέρασμα ότι το βακτήριο που εξετάζουμε ανήκει σε αυτό το γένος, καθώς σε κάθε περίπτωση απεικονίζεται ως παρόμοιας μορφολογίας σφαιρικά κοκκία.

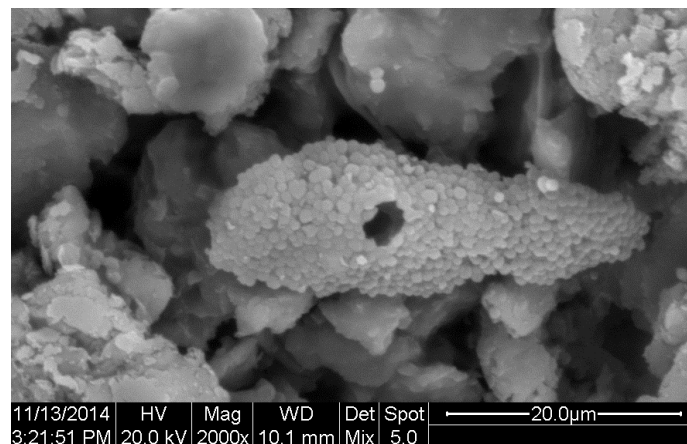




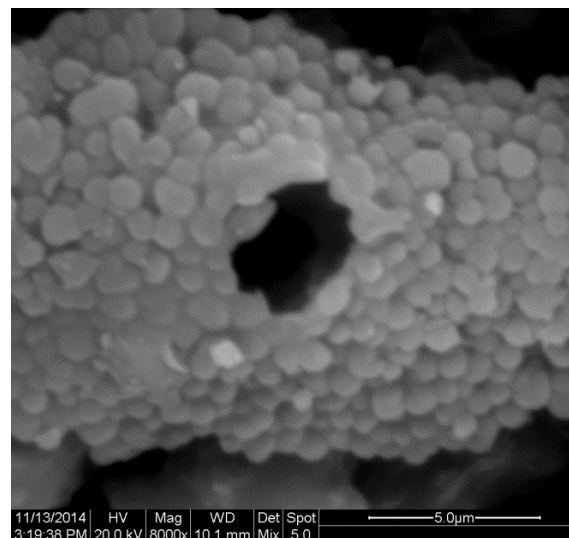
Εικόνα 5.22. Προσκόλληση *P. Acidilactici* στην επιφάνεια γαστρεντερικού τοιχώματος κοτόπουλου. (96)



Εικόνα 5.23. *P. Acidilactici*. (97)



Εικόνα 5.24. Δείγμα βιοαντιδραστήρα.

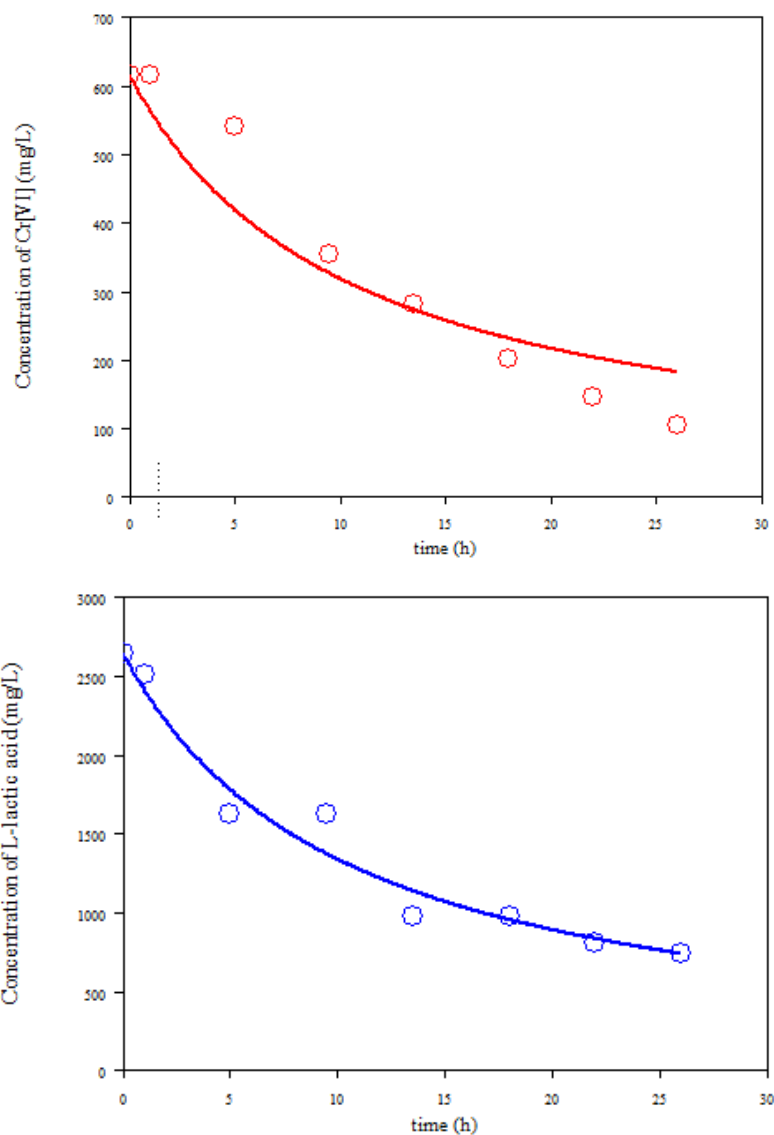


Εικόνα 5.25. Δείγμα βιοαντιδραστήρα σε μεγέθυνση.

### 5.3. Μοντελοποίηση βιοαντιδραστήρα μιας υγρής φάσης με το λογισμικό AQUASIM 2.0

Τα αποτελέσματα της μοντελοποίησης της διεργασίας για κάθε στάδιο της ανάλυσης παρουσιάζονται παρακάτω.

- i. **1<sup>ο</sup> Βήμα.** Αναγωγή Cr[VI] με κατανάλωση γαλακτικού οξέος.



Εικόνα 5.26. Πρόβλεψη του Aquasim (γραμμή) και πειραματικά δεδομένα (κύκλοι) της αναγωγής του Cr[VI] (πάνω) και της κατανάλωσης του L-γαλακτικού οξέος (κάτω) κατά τη διεργασία.

Οι ζητούμενες σταθερές υπολογίστηκαν:

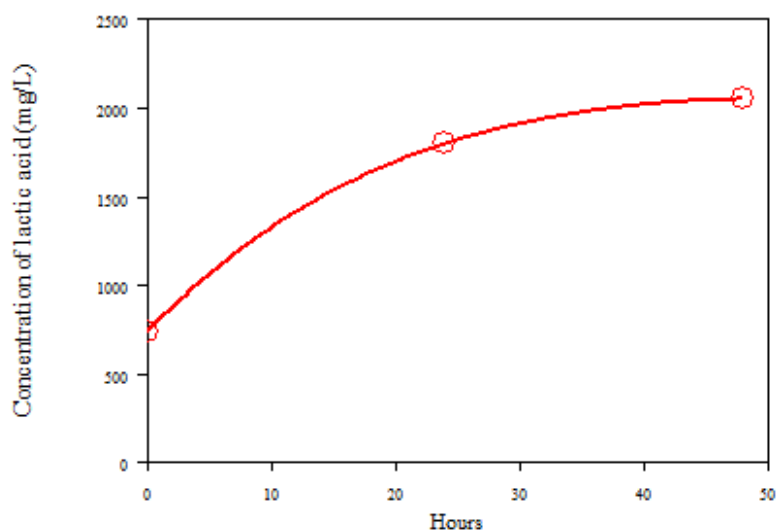
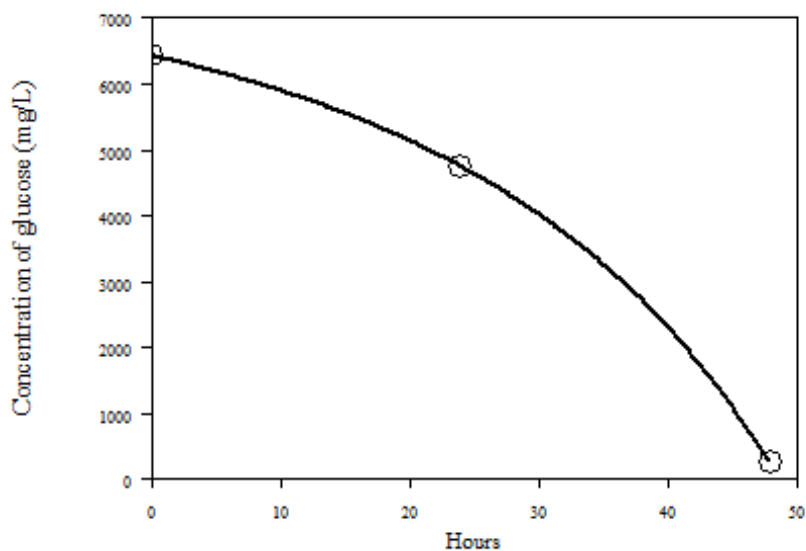
- Σταθερά της αντίδρασης:  $k_{cr} = 3.60726 \cdot 10^{-5}$
- Στοιχειομετρικός συντελεστής κατανάλωσης γαλακτικού οξέος:  $n_1 = 4.40$

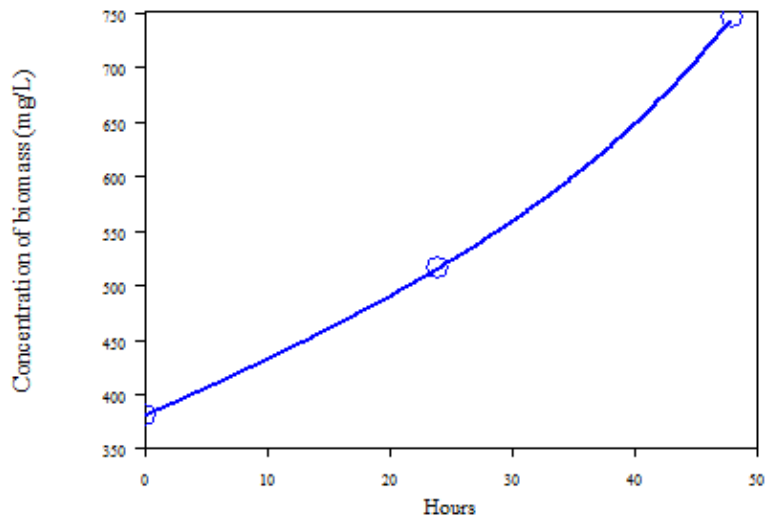


- ii. **2<sup>ο</sup> Βήμα.** Η πρόβλεψη του Aquasim για τις τιμές των σταθερών της μικροβιακής ανάπτυξης με ανταγωνιστική παρεμπόδιση από το υπόστρωμα φαίνεται παρακάτω:

Σταθερά	Τιμή
$\mu_{\max(\text{glu})}$	0.051455028 h <sup>-1</sup>
$\mu_{\max(\text{s})}$	0.53573377 h <sup>-1</sup>
$K_{\text{s}(\text{glu})}$	0.0010558203 mg/L
$K_{\text{s}(\text{s})}$	981.45708 mg/L
$Y_{\text{glu}}$	0.042147342 mg βιομάζας/mg γλυκόζης
$Y_{\text{s}}$	0.15458283 mg βιομάζας/mg υπόστρωμα s
<b>alpha</b>	0.00016432186
<b>beta</b>	0.03316711
<b>k1</b>	89.288866
<b>k2</b>	6.6466925

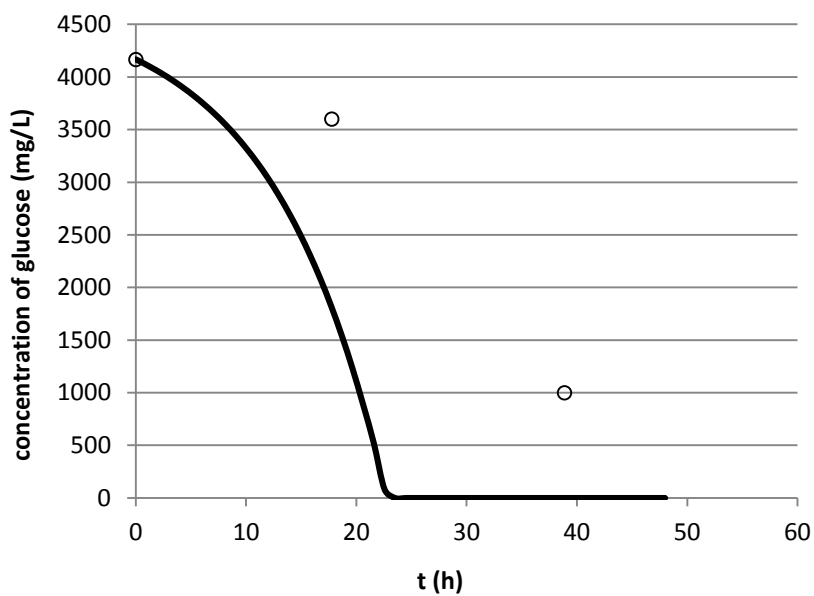
Πίνακας 5.5. Προβλεπόμενες από το Aquasim σταθερές μικροβιακής ανάπτυξης.

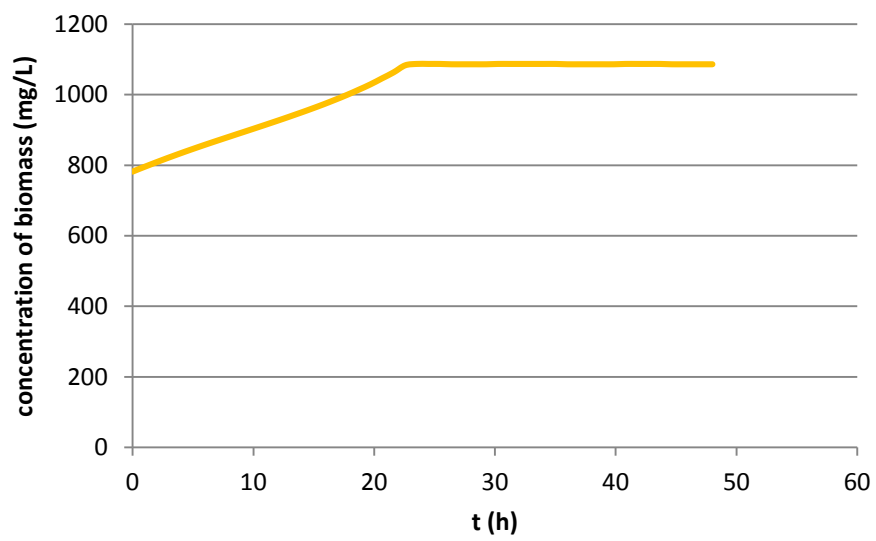
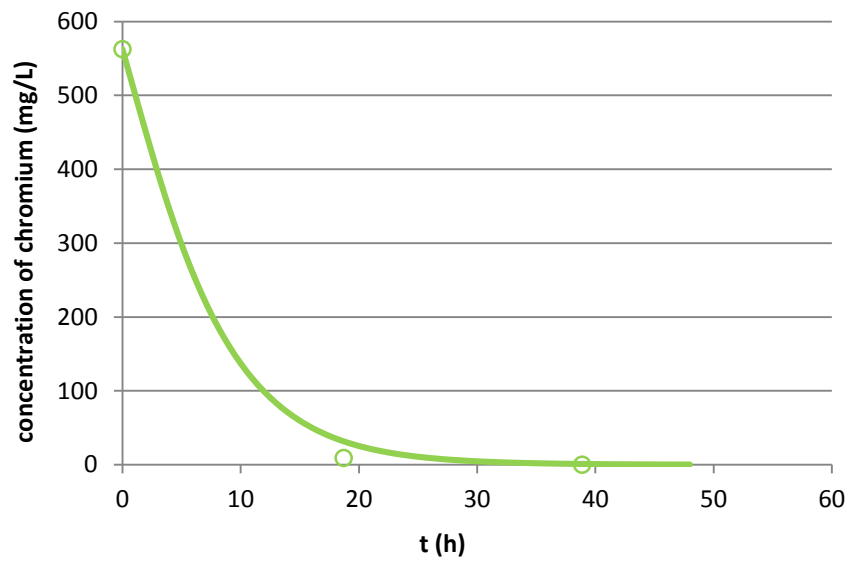
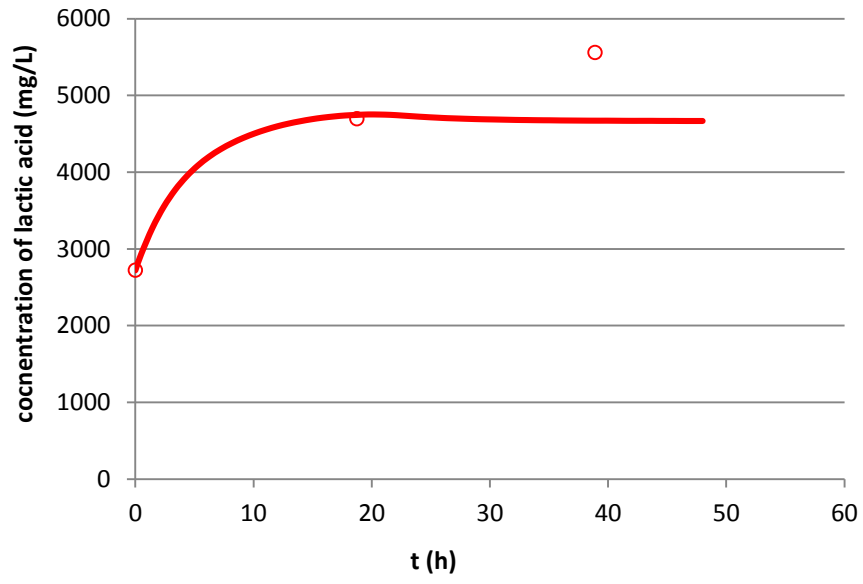




Εικόνα 5.27. Πρόβλεψη του *Aquasim* και πειραματικά δεδομένα της κατανάλωσης της γλυκόζης (επάνω), της παραγωγής του γαλακτικού οξέος (μέση) και της παραγωγή βιομάζας (κάτω) κατά τη μικροβιακή ανάπτυξη.

- iii. **3<sup>ο</sup> Βήμα.** Το τελικό μοντέλο προέκυψε με χρήση των σταθερών που υπολογίστηκαν στα προηγούμενα βήματα, σε αντιδραστήρα εμβολικής ροής, και δίνει τα παρακάτω αποτελέσματα για  $t > 1000$  h, όπου και θεωρείται ότι το σύστημα βρίσκεται σε μόνιμη κατάσταση:





*Εικόνα 5.28. Πρόβλεψη του Aquasim και πειραματικά δεδομένα της κατανάλωσης γλυκόζης, της παραγωγής του γαλακτικού οξέως, της αναγωγής του Cr[VI] και της παραγωγής βιομάζας (από πάνω προς τα κάτω) στο βιοαντιδραστήρα σε μόνιμη κατάσταση.*

#### Αξιολόγηση τελικού μοντέλου Aquasim

Το τελικό μοντέλο Aquasim προσέγγισε τα πειραματικά δεδομένα της λειτουργίας του συστήματος SBR, στο οποίο η αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου πραγματοποιείται από γαλακτικό οξύ που παράγεται από βιομάζα, η οποία τρέφεται και πολλαπλασιάζεται με κινητική Monod. Η γλυκόζη φαίνεται να εξαντλείται μετά από 24 ώρες, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος μετά από 18 ώρες παραμένει σταθερή και η παραγωγή βιομάζας μετά τις 22 ώρες φτάνει σε plateau. Η κατανάλωση του Cr[VI] πλησιάζει περισσότερο τα πειραματικά δεδομένα, έτσι ώστε στην αρχή του κύκλου να καταναλώνεται ταχέως και στο τέλος του κύκλου να είναι πλήρως εξαντλημένο.

Στην πορεία έγιναν οι εξής παραδοχές, οι οποίες αποτυπώθηκαν στους ρυθμούς και τις αποδόσεις της κάθε διεργασίας:

- 1) Η αντίδραση αναγωγής είναι πρώτης τάξης ως προς το Cr[VI] και το γαλακτικό οξύ.
- 2) Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν δύο από τα συστατικά του θρεπτικού Υmax, τη γλυκόζη και ένα υπόστρωμα s, τα οποία είναι πλήρως αντικαταστάσιμα και ανταγωνιστικά μεταξύ τους. Τροποποιήθηκε επομένως αντίστοιχα η κινητική Monod, ώστε να περιγράψει δυο ανταγωνιστικές διεργασίες.
- 3) Η παραγωγή του γαλακτικού οξέος αυξάνεται παρουσία Cr[VI] και οι συντελεστές εξάρτησης παραγωγής γαλ. οξέος από το κάθε υπόστρωμα είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης Cr[VI].

Οι παραδοχές αυτές, αν και απαραίτητες για την πραγματοποίηση του μοντέλου, είναι αυθαίρετες και δεν ήταν δυνατόν να εξακριβωθεί η ευστάθειά τους. Για την μοντελοποίηση επομένως του συστήματος έτσι ώστε να προσεγγίζει την πραγματικότητα, είναι απαραίτητη η γνώση των μηχανισμών των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του αντιδραστήρα.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΈΡΕΥΝΑ**

### **6.1. Συμπεράσματα**

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε σύστημα βιολογικής απομάκρυνσης εξασθενούς χρωμίου από υδατικό απόβλητο, που απομάκρυνε αποτελεσματικά Cr[VI] μέσω αναγωγής του σε Cr[III]. Στόχος ήταν η διερεύνηση του μηχανισμού της αναγωγής ώστε να

είναι εφικτή η πλήρης περιγραφή της λειτουργίας του συστήματος. Τα κύρια συμπεράσματα όπως προέκυψαν από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση και τα πειράματα που έλαβαν χώρα ήταν τα εξής:

- ❖ Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει στροφή στη μελέτη βιολογικών μεθόδων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων που περιέχουν εξασθενές χρώμιο. Μέχρι στιγμής θεωρούνταν απαραίτητη η χρήση διφασικών συστημάτων (TPPBs) για τον έλεγχο της συγκέντρωσης του Cr[VI], ώστε να προστατεύεται η βιομάζα από τις τοξικές επιδράσεις του ρύπου. Για αυτό το σκοπό ερευνήθηκαν συστήματα δυο φάσεων υγρού-υγρού, το οποίο δεν απέδωσε αποτελέσματα, και στερεού-υγρού.
- ❖ Κατά τη λειτουργία διφασικού βιοαντιδραστήρα SBR στερεού-υγρού έγινε φανερό ότι το στερεό προσροφητικό που χρησιμοποιήθηκε για την προσρόφηση μερικής ποσότητας Cr[VI] από το απόβλητο, ήταν αναγκαίο μόνο κατά την εκκίνηση του αντιδραστήρα (start-up). Στη συνέχεια, το εναπομείναν γαλακτικό οξύ από τον προηγούμενο κύκλο αντιδρούσε άμεσα με το προστιθέμενο Cr[VI], μειώνοντας την τοξικότητά του. Έτσι οι μικροοργανισμοί δεν έρχονταν ποτέ σε επαφή με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις εξασθενούς χρωμίου. Πράγματι, μετά από αρκετούς κύκλους θεωρείται ότι το προσροφητικό έχει απομακρυνθεί πλήρως και παρόλα αυτά το σύστημα συνεχίζει να λειτουργεί με την ίδια απόδοση.
- ❖ Το Cr[VI] αντιδρά με το γαλακτικό οξύ σχηματίζοντας οργανομεταλλικό σύμπλοκο και κατά την αντίδραση αυτή ανάγεται σε Cr[III], με ενδιάμεσες οξειδωτικές καταστάσεις τα Cr[V] και Cr[IV]. Από την οξείδωση του γαλακτικού οξέος παράγεται πυροσταφυλικό οξύ.
- ❖ Για πρώτη φορά αποδεικνύεται ότι το γαλακτικό οξύ συμμετέχει στη βιολογική αναγωγή του Cr[VI]. Δηλαδή, ένα προϊόν του μεταβολισμού των οργανισμών πραγματοποιεί την αποτοξικοποίηση του εξασθενούς χρωμίου.
- ❖ Η αναγωγή του Cr[VI] στο βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται εξωκυτταρικά, κάτι που προστατεύει τα κύτταρα, καθώς το Cr[III] δεν είναι ικανό να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών. Έτσι αποφεύγονται οι δυσμενείς συνέπειες της ενδοκυτταρικής αναγωγής του Cr[VI], όπως η παραγωγή των δραστικών ειδών Cr[IV] και Cr[V], οργανικών και υδροξυλικών ελευθέρων ριζών, που έχουν κυτοτοξική δράση.
- ❖ Ο μικροοργανισμός που αναπτύσσεται στο βιοαντιδραστήρα ανήκει στο γένος *Pediococcus* και είναι μη-παθογόνο βακτήριο που ανήκει στην κατηγορία των προβιοτικών. Είναι λοιπόν αξιοσημείωτο ότι ένα προβιοτικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βιοεξυγίανση ενός τοξικού παράγοντα. Σημειώνεται ότι έχει αναφερθεί η δυνατότητα κάποιων προβιοτικών να απομακρύνουν τοξικά μέταλλα από υδατικά διαλύματα *in vitro*, αλλά έχει συσχετιστεί με την ικανότητα βιορόφησης των μετάλλων στην κυτταρική επιφάνεια και όχι με την αντίδρασή τους με προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού. (57), (98), (99), (100)

## 6.2. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Προκειμένου να διαλευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός της αντίδρασης αναγωγής του Cr[VI] σε Cr[III] από τον *Pediococcus acidilactici* είναι απαραίτητο να διεξαχθούν περισσότερα πειράματα. Συγκεκριμένα:

- ❖ Βάσει του μοντέλου που προτείνεται ο ρυθμός παραγωγής γαλακτικού οξέος εξαρτάται από την παρουσία ή μη Cr[VI]. Η επαγωγή του μονοπατιού της ομογαλακτικής ζύμωσης από το Cr[VI] χρήζει περαιτέρω μελέτης.
- ❖ Στη διάρκεια του κύκλου λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα η ποσότητα του πυροσταφυλικού οξέος μεταβάλλεται. Ο τρόπος με τον οποίο το πυροσταφυλικό οξύ συμμετέχει στη διαδικασία της αναγωγής του Cr[VI] αποτελεί επίσης ένα ανοικτό θέμα.
- ❖ Ένα επιπλέον ζήτημα που χρήζει περαιτέρω μελέτης είναι η θεώρηση που έγινε κατά τη διάρκεια της μοντελοποίησης ότι υπάρχει στο  $\Upsilon_{\max}$  κάποιο υπόστρωμα πλήρως αντικαταστάσιμο και ανταγωνιστικό ως προς τη γλυκόζη. Έαν πράγματι αποδειχθεί η θεώρηση που έγινε, πρέπει να εξεταστεί εάν αυτό δρα θετικά ή αρνητικά στην όλη διεργασία.

Πέρα από την περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού αναγωγής του Cr[VI] σε Cr[III], πρέπει να ελεγχθεί η ικανότητα του βιοαντιδραστήρα μιας υγρής φάσης να ανταπεξέλθει σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εξασθενούς χρωμίου. Επιπλέον κρίνεται σκόπιμο να ελεγχθεί η δυνατότητα λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα με πραγματικό απόβλητο από κάποια βιομηχανία επιμεταλλώσεων ή κάποια βυρσοδεψία.

Τέλος, ένα επιπλέον θέμα μελλοντικής έρευνας θα μπορούσε να αποτελέσει ο έλεγχος της δυνατότητας χρήσης εναλλακτικών πηγών άνθρακα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η χρήση κάποιων αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων ως εναλλακτική πηγή άνθρακα θα μπορούσε να αποτελέσει μία ιδανική λύση από τεχνοοικονομικής απόψεως. Συγκεκριμένα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η μελάσα ως υπόστρωμα, η οποία αποτελεί παραπροϊόν της βιομηχανίας ζάχαρης και είναι πλούσια σε υδατάνθρακες και ιχνοστοιχεία.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Barnhart, Joel.** "Occurrence, Uses and Properties of Chromium". *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 1997, vol. 26.
2. **Jacobs, J. και Tesla, s.** "Overview of Chromium(VI) in the Environment: Background and History". [συγγρ. βιβλίου] Jacques Guertin και James A. Jacobs. *Chromium(VI) Handbook*. s.l. : CRC Press, 2004.
3. **Motzer, W. και Todd Engineers.** "Chemistry, Geochemistry and Geology of Chromium and Chromium Compounds". [συγγρ. βιβλίου] Jacques Guertin και James A. Jacobs. *Chromium(VI) Handbook*. s.l. : CRC Press, 2004.
4. Web Elements. [http://www.webelements.com/chromium/crystal\\_structure.html](http://www.webelements.com/chromium/crystal_structure.html). [Ηλεκτρονικό]
5. **E.Fawcett.** "Spin-density-wave antiferromagnetism in chromium". *Reviews in Modern Physics*. 1988, vol. 60.
6. **Kotas, J. και Stasicka, Z.** "Chromium Occurrence in the Environment and Methods of its Speciation". *Environmental Pollution*. 1999, 107.
7. **Udy, M. J.** "Chromium Volume II. Metallurgy of Chromium and its Alloys". New York : Reinhold Publishing Corporation, 1956.
8. ChemWiki.  
[http://chemwiki.ucdavis.edu/Inorganic\\_Chemistry/Descriptive\\_Chemistry/Elements\\_Organized\\_by\\_Block/3\\_d-Block\\_Elements/Group\\_06%3A\\_Transition\\_Metals/Chemistry\\_of\\_Chromium](http://chemwiki.ucdavis.edu/Inorganic_Chemistry/Descriptive_Chemistry/Elements_Organized_by_Block/3_d-Block_Elements/Group_06%3A_Transition_Metals/Chemistry_of_Chromium). [Ηλεκτρονικό]
9. **Rolinson, C. L.** "The Chemistry of Chromium, Molybdenum and Tungsten". *Pergamon Texts in Inorganic Chemistry*. vol. 2.
10. Η Χημική Ένωση του Μήνα: Εξασθενές Χρώμιο.  
[http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_cr6.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_cr6.htm). [Ηλεκτρονικό]
11. **World Health Organization (WHO).** "Chromium(VI) Compounds". *IARC Monographs*. [Ηλεκτρονικό] <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-9.pdf>.
12. **Rai, D., Eary, L. και Zachara, J.** "Environmental Chemistry of Chromium". *The Science of the Total Environment*. 1989, vol. 25.
13. **Τμήμα Γεωλογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.** [Ηλεκτρονικό] [http://www.geo.auth.gr/106/4\\_oxides/chromite.htm](http://www.geo.auth.gr/106/4_oxides/chromite.htm).
14. —. [Ηλεκτρονικό]  
[http://www.geo.auth.gr/courses/gmo/gmo645y/pdf\\_theory/chrom.pdf](http://www.geo.auth.gr/courses/gmo/gmo645y/pdf_theory/chrom.pdf).

15. Web Mineral. *Magnesiochromite*. [Ηλεκτρονικό]  
[http://webmineral.com/data/Magnesiochromite.shtml#.Vn6dmU-\\_qwk](http://webmineral.com/data/Magnesiochromite.shtml#.Vn6dmU-_qwk).
16. **Cainelli, G. και Cardillo, G.** "*Chromium Oxidations in Organic Chemistry*". s.l. : Springer Science & Business , 2012.
17. **Remoudaki, E. και A. Hatzikioseyan, F. Kaltsa, M. Tsezos.** "The role of metal-organic complexes in the treatment of chromium containing effluents in biological reactors". *15th International Biohydrometallurgy Symposium, Σχολή Μηχανικών Μεταλλείων-Μεταλλουργών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο*. 2003.
18. **J. Kogel, N. Trivedi, J. Barker, S. Krukowski.** "*Industrial Mineral and Rocks: Commodities, Markets and Uses*". s.l. : SME, 2006. 7th Edition.
19. **U.S. Geological Survey, John F. Papp.** 2012 Minerals Yearbook: Chromium [Advance Release]. *USGS*. [Ηλεκτρονικό] 2012.  
<http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/chromium/myb1-2012-chrom.pdf>.
20. **ICDA.** [Ηλεκτρονικό]  
[http://icdacr.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=104&Itemid=167&lang=en](http://icdacr.com/index.php?option=com_content&view=article&id=104&Itemid=167&lang=en).
21. **Langard, S.** "*Biological and Environmental Aspects of Chromium*". s.l. : Elsevier Biomedical Press, 1982.
22. **Kimbourgh, D. και et al.** "The Transport and Fate of Chromium [VI] in the Environment". *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 1999.
23. **Stanin, F. και Pirnie, M.** "The Transport and Fate of Chromium [VI] in the Environment". [συγγρ. βιβλίου] James A. Jacobs Jacques Guertin. *Chromium(VI) Handbook*. 2004.
24. **Fendorf, S. E.** "Surface Reactions of Chromium in Soils and Waters". *Geoderma*. 1995, vol. 67.
25. **Richard, F. και Bourg, A.** "Aqueous Geochemistry of Chromium: A review". *Wat. Res.* 1991, vol. 25.
26. **Bartlett, R.** Chromium Recycling in Soils and Water: Links, Gaps and Methods". *Environmetnal Health Perspective*. 1991, vol. 92.
27. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** "Toxicological Profile for Chromium". s.l. : U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, 2012.
28. **Ένωση Ελλήνων Χημικών.** "Θέσεις για την Επικινδυνότητα Παρουσίας Cr(VI) στα Υπόγεια Νερά". s.l. : Επιστημονικό Τμήμα Περιβάλλοντος, Υγείας και Ασφάλειας της Εργασίας, 2007.
29. **Σχολή Χημικών Μηχανικών.** Οδηγός για τα συνιθέστερα συναντούμενα τοξικά. [Ηλεκτρονικό] <http://press.ntua.gr/documents/xromio.pdf>.



30. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** "Chromium Toxicity". *Case Studies in Environmental Medicine (CSEM)*. 2008.
31. **World Health Organization (WHO).** "Environmental Health Criteria 61: Chromium". *International Programme on Chemical Safety (INCHEM)*. 1988.
32. **European Commission.** EPER Review Report. *European Pollutant Emission Register*. [Ηλεκτρονικό] 2004. <http://www.env-edu.gr/Documents/EPER.pdf>.
33. **European Commission.** Press Release Database. [Ηλεκτρονικό] [http://europa.eu/rapid/press-release\\_MEMO-04-234\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-04-234_en.htm).
34. **Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο.** Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. *Οδηγία 98/83/ΕΚ*. [Ηλεκτρονικό] 1998. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=EN>.
35. **Εφημερίδα της Κυβερνήσεως.** ΦΕΚ 630/Β'/26.4.2007, Αριθμός φύλλου 630. [Ηλεκτρονικό] 2007. [http://www.elinyae.gr/el/lib\\_file\\_upload/630b\\_07.1178194061365.pdf](http://www.elinyae.gr/el/lib_file_upload/630b_07.1178194061365.pdf).
36. **World Health Organization (WHO).** Guidelines for Drinking-water Quality, Fourth Edition. *Water Sanitation Health Publications*. [Ηλεκτρονικό] 2003. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2011/9789241548151\\_annex.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548151_annex.pdf).
37. **California Environmental Protection Agency.** State Water Resources Control Board. *Chromium-6 Drinking Water MCL*. [Ηλεκτρονικό] [http://www.waterboards.ca.gov/drinking\\_water/certlic/drinkingwater/Chromium6.shtml](http://www.waterboards.ca.gov/drinking_water/certlic/drinkingwater/Chromium6.shtml).
38. Ελληνικό Ινστιτούτο Υγιεινής και Ασφάλειας της Εργασίας. [Ηλεκτρονικό] [http://www.elinyae.gr/el/item\\_details.jsp?cat\\_id=927&item\\_id=8435](http://www.elinyae.gr/el/item_details.jsp?cat_id=927&item_id=8435).
39. **Occupational Safety and Health Administration (OSHA).** "Hexavalent Chromium". [Ηλεκτρονικό] 2009. <https://www.osha.gov/Publications/OSHA-3373-hexavalent-chromium.pdf>.
40. **Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο.** Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. *Οδηγία 2011/65/ΕΕ*. [Ηλεκτρονικό] 2011. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:174:0088:0110:EL:PDF>.
41. —. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. *Οδηγία 2002/95/ΕΚ*. [Ηλεκτρονικό] 2002. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:037:0019:0023:EN:PDF>.
42. **APHA-AWWA-WPCF.** *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. 1999. 20.

43. **Hawley, E. L., R. Deeb, M. Kavanaugh και Jacobs, J.** "Treatment Technologies for Chromium(VI)". [συγγρ. βιβλίου] James A. Jacobs, Cynthia P. Avakian Jacques Guertin. *Chromium(VI) Handbook*. s.l. : CRC Press, 2004.
44. **Mojdeh Owland, Mohamed Kheireddine Aroua, Wan Ashri Wan Daud, Saeid Baroutian.** "Removal of hexavalent chromium-Contaminated water and wastewater: A review". *Water Air Soil Pollution*. 2008, DOI 10.1007.
45. **Γ., Μαρκαντωνάτος.** *Επεξεργασία και διάθεση υγρών αποβλήτων*. Αθήνα : s.n., 1990.
46. **Metcalf και Eddy.** *Μηχανική Υγρών Αποβλήτων. Επεξεργασία και Επαναχρησιμοποίηση*. s.l. : ΤΖΙΟΛΑ, 2006.
47. **Wang, Y. και Shen, H.** "Modelling Cr(VI) Reduction by Pure Bacterial Cultures". *Water Research*. 1997, Τόμ. 31, 4.
48. **Carmago, F., και συν.** "Diversity of chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate". *Applied Soil Ecology*. 2005, Τόμ. 29, 2.
49. **R., Singh, και συν.** "Removal of sulphate, COD and Cr(VI) in simulated and real wastewater by sulphate reducing bacteria enrichment in small bioreactor and FTIR study". *Bioresource Technology*. 2011, Τόμ. 102.
50. **Ramírez-Díaz, Martha I., και συν.** "Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds". *BioMetals*. 2008, Τόμ. 21, 3.
51. **K.H.Cheng, Ji-Dong Gu.** "Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review". *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2007, Vol.59, Issue 1.
52. **Yinguang Chen, Guowei Gu.** "Preliminary studies on continuous chromium(VI) biological removal from wastewater by anaerobic-aerobic activated sludge process". *Bioresource Technology*. 2005, 96.
53. **T.Srinath, T.Verna, P.W.Ramteke, S.K.Garg.** "Chromium(VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria". *Chemosphere*. 2002, Vol. 48.
54. **B.Preetha, T. Viruthagiri.** "Bioaccumilation of chromium(VI), copper(II) and nickel(II) ions by growing *Rhizopus arrhizus*". *Biochemical Engineering Journal*. 2007, Vol. 34.
55. **Rashmi Sanghi, Nalini Sankararamakrishnan, Bakul C. Dave.** "Fungal bioremediation of chromates: Conformational changes of biomass during sequestration, binding and reduction of hexavalent chromium ions". *Journal of Hazardous Materials*. 2009, Vol.164.
56. **Can Chen, Jianlong Wang.** "Influence of metal ionic characteristics on their biosorption capacity by *Saccharomyces cerevisiae*". *Environmental Biotechnology*. 2007, Vol.74.
57. **A.I. Zouboulis, M.X. Loukidou, K.A. Matis.** "Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils". *Process Biochemistry*. 2004, Vol.39.

58. **Tareq Abu Hamed, Emine Bayraktar, Ulku Mehmetoglu, Tanju Mehmetoglu.** "The biodegradation of benzene, toluene and phenol in a two-phase system". *Biochemical Engineering Journal*. 2004, Vol. 19.
59. **Daugulis, Andrew J.** "Two-phase partitioning bioreactors: a new technology platform for destroying xenobiotics". *TRENDS in Biotechnology*. 2001, Vol.19, No.11.
60. **Lytras, G. και Lyberatos, G.** "Two-Phase Microbial Removal of Hexavalent Chromium". *Poster*. s.l. : School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens; Institute of Chemical Engineering Sciences, Foundation of Research and Technology (ICEHT/FORTH), 2013.
61. **Lytras, G., και συν.** "A novel Two Phase Solid: Liquid Bioreactor (TPSLB) for microbial Cr[VO] removal from wastewaters". *IWA Balkan Young Water Professionals 2015*. Thessaloniki : School of Chemical Engineering, National Technical University of Athens; Institute of Chemical Engineering Sciences, Foundation of Research and Technology (ICEHT/FORTH), 10-12 May 2015.
62. **Lytras, G. et al.** (In press). 2016.
63. **Γιαλούρης, Π., Μποσινάκου, Κ. και Σιδέρης, Δ.** *Βιοχημεία Τεχνολογικής Κατεύθυνσης Γ' Λυκείου*. Αθήνα : Οργανισμός Εκδόσεως Διδακτικών Βιβλίων.
64. **Fariza Hasan, Jan Rocek.** "Three-electron oxidations. VI. Chromic acid cooxidation of cyclobutanol and oxalic acid. Chromium(V) oxidation of cyclobutanol". *J. Am. Chem. Soc.* 1974, Τόμ. 96, 2.
65. **Khan, Z.** "Formation of chromium(V)-lactic acid complex in the chromic acid oxidation of lactic acid". *Indian Journal of Chemistry*. 2000, Τόμ. 40, A.
66. **Haight, G. P., και συν.** "Kinetics and Mechanisms of Oxidation of Lactic Acid by Chromium(VI) and Chromium(V)". *Inorganic Chemistry*. 1985, Τόμ. 24.
67. **Shan, J., και συν.** "Kinetic and Mechanistic Study of the Reduction of Chromium[VI] by Lactic Acid". *Research Letters in Inorganic Chemistry*. Hindawi Publishing Corporation, 2008, Τόμ. 2008.
68. **Barros, Rosana R., και συν.** "Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pediococcus* Strains Isolated from Human Clinical Sources". *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, Vol. 39.
69. **Vos, Paul, και συν.** "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*". s.l. : Springer Science & Business Media, 2011.
70. **Kenneth Todar.** "Todar's Online Textbook of Bacteriology". *Lactic Acid Bacteria*. [Ηλεκτρονικό] <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html>.
71. **Cai, Yimin, και συν.** "Characterization and Identification of *Pediococcus* Species Isolated from Forage Crops and Their Application for Silage Preparation". *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, Vol. 65.

72. **Department of Food Sciences of Ithaca; Cornell University.** Food Safety (Dairy Foods, Science Notes). [Ηλεκτρονικό] 2008.  
<https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/documents/CU-DFScience-Notes-Dairy-Cultures-HomoHeteroferm-10-08.pdf>.
73. **Wiley.** Wiley Online Library. "*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*". [Ηλεκτρονικό] 2015.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm00606/abstract>.
74. **Holzappel, W.H.N και Wood, Brian J.B.** "*The Genera of Lactic Acid Bacteria*". Glasgow, UK : Springer-Science\_Business Media Dordecht, 1995.
75. **Mikulski, D., και συν.** "Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens". *Oxford Journals: Poultry Science*. 2012, Τόμ. 91, Issue 10.
76. **Klaenhammer, Todd. R.** "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria". *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*. Elsevier, 1993, Τόμ. 12.
77. **Mastro, Timothy D., και συν.** "Vancomycin-Resistant *Pediococcus acidilactici*: Nine Cases of Bacteremia ". *The Journal of Infectious Disease*. Oxford University Press, 1990, Τόμ. 5, 161.
78. **Λυμπεράτος, Γ. και Παύλου, Σ.** "*Εισαγωγή στη Βιοχημική Μηχανική*". Θεσσαλονίκη : ΤΖΙΟΛΑ, 2011.
79. **Levenspiel, O.** "*Μηχανική Χημικών Διεργασιών*". s.l. : Κωσταράκη, 2011.
80. **Καλφας, Χ.** "*Παραγωγή Βιοαερίου από Αναερόβια Χώνευση Προεπεξεργασμένου και Μη Χαρτοπολτού*", *Διδακτορική Διατριβή*. s.l. : Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2007.
81. **Παππά, Α.** «*Φυσικές μέθοδοι ανάλυσης*», *Σημειώσεις Μαθήματος*. Ε.Μ.Π. s.l. : Ε.Μ.Π.
82. **Bhavsar, Kaumil.** [Ηλεκτρονικό] <http://www.slideshare.net/kaumilbhavsar/kaumil-hplc-presentation>.
83. **Λιανίδου, Ε.** PCR-Quantitative PCR (qPCR). [Ηλεκτρονικό]  
[http://www.chem.uoa.gr/courses/bioanalytical/Lianidou\\_Moriakes\\_Texnikes.pdf](http://www.chem.uoa.gr/courses/bioanalytical/Lianidou_Moriakes_Texnikes.pdf).
84. **Κανινή, Γ.** Θεωρία Τεχνικών PCR και DGGE. [Ηλεκτρονικό] <http://m-biotech.biol.uoa.gr/MATHIMATAPMS/M1/WORKSHOP/MasterW1a.pdf>.
85. **Ξεγάκης, Κ.** «*Μικροβιακή ποικιλομορφία κατά την κομποστοποίηση υπολειμμάτων εκκοκκισμού βάμβακος*», *Μεταπτυχιακή Διατριβή*. s.l. : Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012.
86. **Madigan, Michael T., και συν.** "*Brock Biology of Microorganisms*" 13th Edition. s.l. : Pearson, 2012.

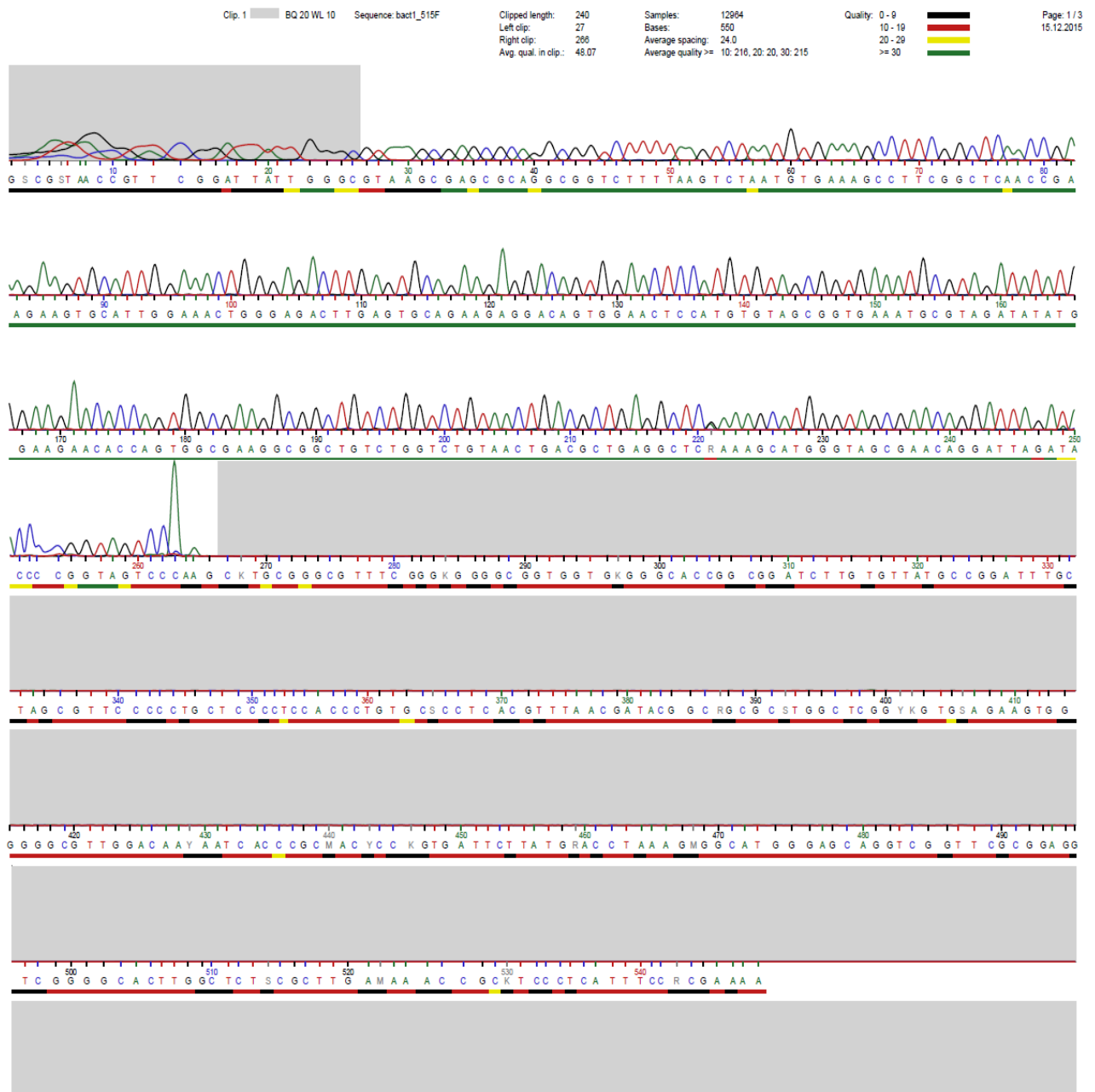
87. **Λιανίδου, Ε.** Ηλεκτροφορητικές Τεχνικές. [Ηλεκτρονικό]  
[http://www.chem.uoa.gr/courses/Separations/Lianidou\\_electrophoresis.pdf](http://www.chem.uoa.gr/courses/Separations/Lianidou_electrophoresis.pdf).
88. Ηλεκτροφορητικές Μέθοδοι Διαχωρισμού . [Ηλεκτρονικό]  
<http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/SEYC188/%CE%97%CE%BB%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%BF%CF%81%CE%B7%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AD%CF%82%20%CE%9C%CE%AD%CE%B8%CE%BF%CE%B4%CE%BF%CE%B9%20%CE%94%CE%B9%CE%B1%CF%87%CF%89%CF%81%CE%B9%CF%83%>.
89. [Ηλεκτρονικό]  
<https://eclass.teiath.gr/modules/document/file.php/TTT103/%CE%98%CE%95%CE%A9%CE%A1%CE%97%CE%A4%CE%99%CE%9A%CE%9F%20%CE%A5%CE%A0%CE%9F%CE%92%CE%91%CE%98%CE%A1%CE%9F%20%CE%95%CE%A1%CE%93%CE%91%CE%A3%CE%A4%CE%97%CE%A1%CE%99%CE%91%CE%9A%CE%A9%CE%9D%20%CE%91%CE>.
90. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας. [Ηλεκτρονικό]  
<http://eclass.uth.gr/eclass/modules/document/file.php/DIB198/PAROYSIASH%203%20%CE%A4%CE%95%CE%A7%CE%9D%CE%99%CE%9A%CE%95%CE%A3%20%CE%9C%CE%9F%CE%A1%CE%99%CE%91%CE%9A%CE%97%CE%A3%20%CE%92%CE%99%CE%9F%CE%9B%CE%9F%CE%93%CE%99%CE%91%CE%A3.pdf>.
91. Electrophoresis. *National Diagnostics*. [Ηλεκτρονικό]  
<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/agarose-matrix>.
92. **Lee, Pei Yun, και συν.** "Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments". *Jove*. 2012.
93. **T, O'Brien, J, Xu και SR, Patierno.** "Effects of Glutathione on Chromium-Induced DNA Crosslinking and DNA Polymerase Arrest". *Mol. Cell. Biochem*. 2001, Τόμ. 222.
94. **Snow, Elizabeth T.** "Effects of Chromium on DNA Replication In Vitro". *Environmental Health Perspectives*.
95. BLAST® - Basic Local Alignment Search Tool. [Ηλεκτρονικό]  
[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).
96. **al., Y. Satheesh et.** "Effect of feeding *Pediococcus acidilactici* on performance of broiler chicken". *Indian Journal of Poultry Science*. Τόμ. 47, 3.
97. **al., P. Balgir et.** "In Vitro and In Vivo Survival and Colonic Adhesion of *Pediococcus acidilactici* MTCC5101 in Human Gut". *BioMed Research International*. Τόμ. 2103.
98. **Halttunen, T., και συν.** "Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution.". *Letters in Applied Microbiology*. 2007.
99. **Rayes, Amnah A.H.** "Field studies on the removal of lead, cadmium and copper by the use of probiotic lactic acid bacteria from the water for culturing marine tilapia *T.spilurus*". *New York Science Journal*. 2012, Τόμ. 5, 11.

100. Zoghia, Alaleh, Khosravi-Darani, Kianoush και Sohravandib, Sara. "Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics". *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2014, Τόμ. 14.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αποτελέσματα DNA Sequencing όπως στάλθηκαν από την εταιρεία Eurofins Genomics:

- Η αλληλουχία που αλληλουχήθηκε με τον 515F primer



- Η αλληλουχία που αλληλουχήθηκε με τον 806R primer

