



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΣΧΟΛΗ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**FACULTY OF CIVIL
ENGINEERING**

**ΤΟΜΕΑΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ
ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**DEPARTMENT OF WATER
RESOURCES AND
ENVIRONMENTAL
ENGINEERING**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΙ ΤΟΠΟΥ
ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΥΠΟΓΕΙΩΝ ΥΔΑΤΩΝ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ
ΜΕ ΕΞΑΣΘΕΝΕΣ ΧΡΩΜΙΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΑΛΑΝΗ ΑΝΔΡΙΑΝΗ

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2^{ος} Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Αθήνα, 2023



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS

**ΣΧΟΛΗ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**

**FACULTY OF CIVIL
ENGINEERING**

**ΤΟΜΕΑΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ
ΠΟΡΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**DEPARTMENT OF WATER
RESOURCES AND
ENVIRONMENTAL
ENGINEERING**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΙ ΤΟΠΟΥ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ
ΥΠΟΓΕΙΩΝ ΥΔΑΤΩΝ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΕΞΑΣΘΕΝΕΣ ΧΡΩΜΙΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΑΛΑΝΗ ΑΝΔΡΙΑΝΗ

Συμβουλευτική επιτροπή:

1. Δανιήλ Μαμάης, Καθηγητής ΕΜΠ
(Επιβλέπων)
2. Κωνσταντίνος Νουτσόπουλος,
Καθηγητής ΕΜΠ
3. Συμεών-Αλέξανδρος Μαλαμής, Αν.
Καθηγητής ΕΜΠ

Εξεταστική επιτροπή:

1. Δανιήλ Μαμάης, Καθηγητής ΕΜΠ
(Επιβλέπων)
2. Κωνσταντίνος Νουτσόπουλος,
Καθηγητής ΕΜΠ
3. Συμεών-Αλέξανδρος Μαλαμής, Αν.
Καθηγητής ΕΜΠ
4. Δημήτριος Δερματάς, Καθηγητής ΕΜΠ
5. Νυμφοδώρα Παπασιώπη, Καθηγήτρια
ΕΜΠ
6. Νικόλαος Νικολαΐδης, Καθηγητής
Πολυτεχνείου Κρήτης
7. Δημήτριος Βαγενάς, Καθηγητής
Πανεπιστημίου Πατρών

Αθήνα, 2023

Copyright © Γαλάνη Ανδριανή, 2023.

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας αυτή την εργασία, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου, στον επιβλέποντα μου κ. Δανιήλ Μαμάη, Καθηγητή του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη του, για την προθυμία επίλυσης κάθε απορίας μου, καθώς και για τη συνεχή θεωρητική και πρακτική του καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Νουτσόπουλο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Συμεών Μαλαμή, για τη στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και στα υπόλοιπα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής, τους Καθηγητές Δ. Δερματά, Ν. Νικολαΐδη, Δ. Βαγενά και την Καθηγήτρια Ν. Παπασιώπη, για το χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη αυτής της διδακτορικής διατριβής και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ επίσης όλους τους εργαζόμενους και Υποψήφιους Διδάκτορες στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας για το άριστο κλίμα συνεργασίας καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης αυτής της πειραματικής εργασίας. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και τους φοιτητές Κιόρραϊ Ρ., Αποστόλου Μ., Βαρουξάκη Α. και Αναστοπούλου Π. για τη συμβολή τους στη διενέργεια των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη συνεχή και ουσιαστική στήριξη που μου παρείχαν όλο αυτό το διάστημα.

Περίληψη

Κύριο αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου (Cr^{+6}) σε τρισθενές (Cr^{+3}) μέσω της βιολογικής δράσης μικροβιακών κοινοτήτων, ως τρόπος επί τόπου αποκατάστασης υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο. Οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να απομακρύνουν πολλούς ρυπαντές από το περιβάλλον με ποικίλες ενζυματικές διεργασίες. Στο περιβάλλον, η αναγωγή του Cr(VI) στο λιγότερο τοξικό Cr(III) βασίζεται στην κινητική της αντίδρασης ανταγωνιστικών μικροβιακών και χημικών αντιδράσεων. Στους κοινούς χημικούς αναγωγείς του Cr(VI) περιλαμβάνονται σουλφίδια, οργανικές ενώσεις, διαλυτός Fe(II) και ορυκτά που περιέχουν Fe(II) . Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν δείξει την ικανότητα της άμεσης αναγωγής του Cr(VI) σε Cr(III) είτε αερόβια είτε αναερόβια. Ωστόσο, λίγες μελέτες έχουν μελετήσει τη δυνατότητα της επιτόπιας μικροβιακής αναγωγής σε υδροφόρους ορίζοντες. Υπό συνθήκες απουσίας οξυγόνου, τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν κατευθείαν το Cr(VI) ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων ή να το ανάγουν στον περιπλασματικό χώρο. Επιπλέον, η αναγωγή του Cr(VI) μπορεί να πραγματοποιηθεί και έμμεσα από τη βακτηριακή δραστηριότητα, μέσω μεταβολικών τους παραπροϊόντων. Παράλληλα, μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ρυπασμένης περιοχής - pH, θερμοκρασία, άλλες τοξικές ουσίες ή διαφορετικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων (νιτρικό άζωτο, θειικά ιόντα)- μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της μικροβιακής αναγωγής.

Με βάση τα ανωτέρω, στην παρούσα διατριβή τέθηκαν οι ακόλουθοι στόχοι: i) η διερεύνηση της επίδρασης του αποδέκτη ηλεκτρονίων στις μικροβιακές κοινότητες που ανάγουν το Cr(VI) υπό ανοξικές, αναερόβιες και διαφορετικές θεικοαναγωγικές συνθήκες, ii) η αξιολόγηση της επίδρασης συνδυασμού δοτών ηλεκτρονίων (πηγών οργανικού άνθρακα και σιδήρου) στην πλήρως αναερόβια ή ανοξική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου με παράλληλη αναγωγή νιτρικών ιόντων, καθώς και στην αναγωγή του Cr(VI) παρουσία θειικών ιόντων και iii) η διερεύνηση των σχετικών με την αναγωγή του Cr(VI) χημικών και βιοχημικών διεργασιών που επικρατούν σε έναν υπόγειο υδροφόρο, λαμβάνοντας υπόψη την κίνηση και μεταφορά του ρύπου μέσα στους πόρους του υπεδάφους.

Πραγματοποιήθηκαν δύο είδη πειραμάτων, πειράματα μικρόκοσμου (ή πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας, batch) και εδαφικών στηλών (ή πειράματα συνεχούς ροής), με στόχο την πληρέστερη προσομοίωση των συνθηκών που επικρατούν σε ένα υπόγειο υδροφορέα. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μικρόκοσμου, αναπτύχθηκαν οι κατάλληλες βιοκοινότητες με ικανότητα αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου. Συνολικά, αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο τέσσερις (4) μητρικές καλλιέργειες που τροφοδότησαν τους μικρόκοσμους με βιομάζα, έδαφος και υπόγειο νερό, σύμφωνα με τις τέσσερις (4) οξειδοαναγωγικές συνθήκες που μελετήθηκαν (πλήρως αναερόβιες, παρουσία νιτρικών και δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων θειικών ιόντων). Οι καλλιέργειες δημιουργήθηκαν σε γυάλινους περιέκτες, που έκλειναν αεροστεγώς. Σε αυτούς προστέθηκαν 1600 mL νερό γεώτρησης και 400 g ξηρό έδαφος (αναλογία 1:4). Ο εμπλουτισμός κάθε καλλιέργειας με βιομάζα έγινε στην αρχή της περιόδου εγκλιματισμού με την προσθήκη 30 mgTSS/L ενεργού ιλύος από αναερόβιο αντιδραστήρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, όλες οι καλλιέργειες εκτέθηκαν σε χαμηλή συγκέντρωση εξασθενούς χρωμίου (0.5 mg/L) και διαφορετικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων (κανέναν, 10 mg/L NO₃-N, 100 mg/L SO₄²⁻ και 400 mg/L SO₄²⁻). Μετά το πέρας της περιόδου εγκλιματισμού, ελάχιστης διάρκειας 4.5 μηνών, βιομάζα από τις μητρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα batch, όπου διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών τρόπων βιοδιέγερσης με την προσθήκη οργανικών ή ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων ή και συνδυασμό αυτών.

Τα πειράματα στηλών πραγματοποιήθηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες, χρησιμοποιώντας δύο (2) στήλες από plexiglass, οι οποίες πληρώθηκαν με εδαφικό υλικό. Οι στήλες του εδάφους λειτουργούσαν υπό κορεσμένες συνθήκες με τους πόρους τους γεμάτους με νερό και τροφοδοτήθηκαν με διάλυμα Cr(VI) που παρασκευάστηκε με διηθημένο υπόγειο νερό και διχρωμικό κάλιο (K₂Cr₂O₇). Η έξοδος κάθε στήλης ανακυκλοφορούσε στο δοχείο τροφοδοσίας, προκειμένου να προσομοιώσει καλύτερα τις συνθήκες σε έναν υπόγειο υδροφορέα και την ταχύτητα ροής του. Μελετήθηκαν: i) η φυσική αναγωγική ικανότητα του εδάφους χωρίς την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων, ii) η αβιοτική αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση δισθενούς σιδήρου, iii) η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση πηγών οργανικού άνθρακα και iv) η συζευγμένη αβιοτική-βιοτική αναγωγή του Cr(VI) μέσω πιθανής αναγέννησης Fe(II) λόγω προσθήκης οργανικών πηγών άνθρακα.

Δείγματα συλλέγονταν περιοδικά από τις μητρικές καλλιέργειες, τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας και τα πειράματα στηλών, για τη διεξαγωγή αναλύσεων που οδήγησαν σε σαφείς απαντήσεις στα ερευνητικά ερωτήματα που τέθηκαν ανωτέρω. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν κινητικά μοντέλα για την ποσοτική περιγραφή των διαφορετικών περιπτώσεων αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου που εξετάστηκαν.

Τα αποτελέσματα από τα πειράματα μικρόκοσμου κατέδειξαν ότι οι διάφορες περιπτώσεις αναγωγής του Cr(VI) περιγράφονται ικανοποιητικά βάσει του μοντέλου κινητικής ψευδός-πρώτης τάξης. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η βιοδιέγερση των μικροοργανισμών με την προσθήκη ενός οργανικού δότη ηλεκτρονίων μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI) έως και έξι φορές σε σύγκριση με τη φυσική αναγωγική ικανότητα του εδάφους. Επιπλέον, συνδυασμός οργανικού δότη ηλεκτρονίων και πηγής σιδήρου μπορεί να αυξήσει περαιτέρω τον ρυθμό απομάκρυνσης του εξασθενούς χρωμίου μέσω βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών. Η αναγωγή του Cr(VI) είναι επίσης εφικτή παρουσία νιτρικών ιόντων και, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων, πραγματοποιείται σχεδόν ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση, όταν υπάρχουν διαθέσιμοι δότες ηλεκτρονίων. Οι μικροοργανισμοί που έχουν εγκλιματιστεί υπό ανοξικές συνθήκες μπορούν να «καθαρίσουν» πλήρως το νερό που περιέχει συγκεντρώσεις Cr(VI) και NO₃-N, ίσες με 3 mg/L και 20 mg/L, αντίστοιχα, μέσω βιοδιέγερσης, χρησιμοποιώντας είτε οργανικούς είτε συνδυασμό οργανικών και ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων. Η παρουσία θεικών ιόντων σε υδροφόρο ορίζοντα ρυπασμένο με Cr(VI) βελτιώνει σημαντικά τη βιοχημική αναγωγή του Cr(VI), ακόμη και χωρίς την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων. Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις θεικών (400 mg/L), η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) είναι ελαφρώς μειωμένη σε σύγκριση με χαμηλότερες συγκεντρώσεις θεικών (100 mg/L) λόγω της ταχύτερης κατανάλωσης του οργανικού δότη ηλεκτρονίων. Οι ρυθμοί που προέκυψαν από τα πειράματα μικρόκοσμου συσχετίστηκαν μεταξύ τους με μαθηματικές σχέσεις.

Για την περιγραφή των ανωτέρω φαινομένων που μελετήθηκαν στα πειράματα εδαφικών στηλών, χρησιμοποιήθηκε κατάλληλα τροποποιημένο μοντέλο κινητικής 1^{ης} τάξης. Παράλληλα, αναπτύχθηκε κατάλληλη μαθηματική σχέση για την περιγραφή της αναγωγής του Cr(VI) σε κορεσμένους υδροφορείς, λαμβάνοντας υπόψη το πορώδες της περιοχής αποκατάστασης. Μέσω των πειραμάτων εδαφικών στηλών αποδείχτηκε ότι η φυσική

αναγωγική ικανότητα του εδάφους είναι πολύ χαμηλή και δεν επαρκεί για την πλήρη απορρύπανση υδροφορέων με υψηλή περιεκτικότητα σε εξασθενές χρώμιο. Η προσθήκη οργανικών δοτών ηλεκτρονίων μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI) έως και 20 φορές σε σύγκριση με τους φυσικούς ρυθμούς αναγωγής Cr(VI) του εδάφους. Επιπλέον, φάνηκε ότι ο δισθενής σίδηρος έχει χαμηλή κινητικότητα σε έδαφος και υπόγεια ύδατα με pH κοντά στο 8 και παθητικοποιείται γρήγορα, οδηγώντας σε μικρή απομάκρυνση του Cr(VI). Η συνδυασμένη βιοτική-αβιοτική απομάκρυνση Cr(VI) είχε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής στην αποκατάσταση των ρυπασμένων με Cr(VI) υπόγειων υδάτων σε σύγκριση με τη βιοτική διεργασία.

Συνολικά, τα ευρήματα αυτής της μελέτης μπορούν να παράσχουν μια σημαντική βάση για τη βιολογική αποκατάσταση των υπόγειων υδάτων που έχουν ρυπανθεί με Cr(VI) υπό διαφορετικά οξειδοαναγωγικά περιβάλλοντα, σημαντικές πληροφορίες για την επιτόπια βιοαποκατάσταση ελλείψει οξυγόνου μέσω βιοδιέγερσης των μικροοργανισμών, καθώς και δεδομένα για τη μακροζωία της διαδικασίας όταν ο δότης ηλεκτρονίων είναι περιοριστικός παράγοντας.

Extended Abstract

High hexavalent chromium [Cr(VI)] concentrations found in the environment during the last decades have raised public concern, owing to its bio-accumulative, carcinogenic, mutagenic, and toxic nature. Multiple health and environmental protection agencies consider Cr(VI) a priority pollutant and have set strict limits for its concentration in the aquatic environment. Throughout the years, various pump and treat physicochemical technologies have been employed to remediate Cr(VI) polluted soil and groundwater (chemical precipitation, adsorption, membrane filtration, ion exchange, etc.). However, these technologies present certain disadvantages, such as secondary pollution, high operational and maintenance cost, and low effectiveness. In contrast, microbial mediated Cr(VI) reduction is an environmentally friendly and cost-effective method that takes advantage of microbial metabolic processes to reduce Cr(VI) to trivalent chromium [Cr(III)], a stable form of Cr that has been found to be less soluble in water, exists mainly as precipitate and is less toxic for organisms.

Biological Cr(VI) reduction can occur under both aerobic and anaerobic conditions and is mediated by a variety of enzymes, being cited extracellularly, intracellularly, or in the cytoplasmic membrane. A reduction can also be induced by metabolic byproducts, such as bio-generated Fe(II), hydrogen, and/or sulfides. One significant advantage of bioremediation is that it can be performed *in situ* without causing the destruction of the site and that it allows for a continuous Cr(VI) reduction process through the addition of electron donors. However, the effectiveness of Cr(VI) microbial reduction can be affected by the specific physicochemical characteristics of the contaminated area, including pH, temperature, other toxic substances, or different electron acceptors. In many cases, Cr(VI) coexists with other harmful pollutants for public health and the environment. Nitrate (NO_3^-) is one of the most abundant pollutants in groundwater originating mainly from agricultural activities, i.e., excessive use of nitrogenous fertilizers, as well as discharge of not properly treated urban and industrial wastewater. Sulfate (SO_4^{2-}) is another ubiquitous pollutant in groundwater, originating both from natural and anthropogenic sources, such as weathering of sulfide-containing minerals, volcanic activities, rainfall, seawater intrusion, fertilizers, urban and industrial wastes, and wastewater.

In view of the above, the main objective of this PhD thesis is to study the *in situ* reduction of hexavalent chromium (Cr^{+6}) to trivalent (Cr^{+3}) through the biological action of microbial communities, as a way of restoring underground aquifers contaminated with hexavalent chromium. Within the context of this thesis, the following objectives were set: i) the investigation of the effect of electron acceptor on Cr(VI)-reducing microbial communities under anoxic, anaerobic, and different sulfate-reducing conditions, ii) the evaluation of the effect of a combination of electron donors, including simple and complex organic carbon and iron, on anaerobic or anoxic Cr(VI) reduction and denitrification and on Cr(VI) reduction in the presence of sulfates and iii) the investigation of the chemical and biochemical processes related to the reduction of Cr(VI) that prevail in an underground aquifer, taking into account the flow and transport of the contaminant within the subsurface pores.

Two types of experiments, microcosm experiments (or batch experiments) and soil column experiments (or continuous flow experiments) were carried out, with the aim of better simulating conditions representative of the real field conditions occurring in an underground aquifer. The soil microcosm experiments were carried out under four (4) different reducing conditions—anaerobic, anoxic, low and high sulfate concentration—with soil and groundwater collected from a deep Cr(VI) contaminated aquifer in the Asopos River basin. Biomass, soil, and liquid amendments for the batch experiments were provided by four (4) parent cultures—according to the four (4) redox conditions studied— that were developed and maintained in the laboratory. All were exposed to low hexavalent chromium levels (0.5 mg/L) and to different electron acceptors (10 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$, 100 mg/L SO_4^{2-} , 400 mg/L SO_4^{2-} or none). The cultures were developed in two-liter bottles that were sealed with gray butyl rubber stopper and aluminum crimp. They contained a slurry of subsurface material and groundwater (1:4 dry soil to water volume ratio) and 30 mg TSS/L (TSS: total suspended solids) of activated sludge from an anaerobic reactor as inoculum. The parent cultures were acclimatized for a period of at least 135 days prior to providing biomass for the batch experiments. After the acclimatization period, biomass from the parent cultures was used for the batch experiments, where the effect of different ways of biostimulation with the addition of organic or inorganic electron donors or their combination, was investigated.

The column experiments were carried out under anaerobic conditions, using two (2) plexiglass columns filled with soil. The soil columns were operated under saturated conditions with their pores filled with water and each was fed with a Cr(VI) solution prepared with filtered groundwater and potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$). Cr(VI) solutions were kept in two (2) anaerobic containers under an inert nitrogen atmosphere and a two head peristaltic pump was used to connect the reactors with the columns. The effluent of each column was recirculated into the container, in order to better simulate the conditions of an aquifer and its flow velocity. Flow was set at 1 L per day resulting to an average pore velocity of approximately 0.91 m/day. The following were studied: i) the natural reducing capacity of the soil without the addition of an electron donor, ii) the abiotic reduction of Cr(VI) using ferrous iron, iii) the biological reduction of Cr(VI) using organic carbon sources and iv) the coupled abiotic-biotic reduction of Cr(VI) via possible regeneration of Fe(II) due to the addition of organic carbon sources.

Samples were extracted periodically from the parent cultures, batch experiments and column experiments, to conduct analyses that led to clear answers to the research questions posed above. Within the context of the thesis, the following analyses were utilised: i) Hexavalent and total chromium, ii) Chemical oxygen demand, iii) Nitrate and nitrite, iv) Sulfate and sulfides, v) Divalent iron, vi) Volatile fatty acids and vii) Fluorescent in-situ hybridization. Also, kinetic models were used to quantitatively describe the studied hexavalent chromium reduction cases.

The results of the microcosm experiments can be summarized in the following conclusions. The reduction kinetics of hexavalent chromium can be quantitatively described by the pseudo-first-order kinetic model. Biostimulation by the addition of an organic electron donor can increase the rate of Cr(VI) reduction up to six times in comparison to the natural soil capacity rates under anaerobic conditions. Furthermore, a combination of organic carbon and iron electron donors can further increase the removal rate of hexavalent chromium through biotic and abiotic processes. Cr(VI) reduction is also feasible in the presence of nitrate ions and, according to the microcosm results, is carried out almost simultaneously with denitrification when electron donors are available. Microbes that have been acclimatized under anoxic conditions can completely mitigate water containing Cr(VI) and NO_3-N concentrations, equal to 3 mg/L and 20 mg/L, respectively, through biostimulation, employing either an organic or a combination of organic and inorganic electron donors. Sulfate presence in a Cr(VI)-

contaminated aquifer significantly improves microbially induced Cr(VI) reduction, even without the addition of an electron donor. However, at high sulfate concentrations (400 mg/L), Cr(VI) bioreduction is slightly impaired compared to lower sulfate concentrations (100 mg/l) due to the faster consumption of the organic electron donor. These results have been better elucidated with the use of mathematical equations.

In order to describe the different cases of Cr(VI) reduction studied in the soil column experiments, the 1st order kinetic model with a modification was used. At the same time, an equation was constructed which can describe the reduction of Cr(VI) in saturated aquifers, taking into account the porosity of the polluted area. By conducting the soil column experiments it was proven that natural soil attenuation in the studied Cr-contaminated aquifer was low and was significantly exceeded by the amount of Cr(VI) in contaminated groundwater. Addition of organic electron donors can increase the Cr(VI) reduction rate up to 20 times in comparison to the natural soil capacity rates. Ferrous iron has low mobility in soil and groundwater with a pH close to 8 and is rendered passive quickly, leading to insignificant Cr(VI) removal. Combined biotic-abiotic Cr(VI) removal exhibited a longer-life span in the remediation of Cr(VI)-contaminated groundwater in comparison to biotic processes.

Since anaerobic, anoxic, and sulfate-reducing conditions are quite common in groundwater aquifers, the findings of this study provide significant information on Cr(VI) bioreduction under these redox conditions through biostimulation and could be used as a basis for a possible larger-scale application for bioremediation purposes.

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	iii
Περίληψη	iv
Extended Abstract	viii
Κατάλογος πινάκων	xix
Κατάλογος σχημάτων	xxii
1. Εισαγωγή	1
2. Θεωρητικό υπόβαθρο	6
2.1 Γενικά χαρακτηριστικά και χημεία του χρωμίου	6
2.2 Πηγές χρωμίου	11
2.3 Επιπτώσεις του χρωμίου	15
2.4 Νομοθετικό πλαίσιο	20
2.4.1 Παγκόσμιοι οργανισμοί	20
2.4.2 Ευρώπη και Ευρωπαϊκή Ένωση	21
2.4.2.1 Ελλάδα	21
2.4.3 Αμερική.....	23

2.4.4	Υπόλοιπες ήπειροι (Ασία, Αφρική, Ωκεανία)	24
2.5	Μέθοδοι αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου και τεχνολογίες αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών.....	25
2.5.1	Εισαγωγή	25
2.5.2	Φυσικοχημικές μέθοδοι	30
2.5.2.1	Χημική αναγωγή και κατακρήμνιση	30
2.5.2.2	Φωτοκατάλυση.....	32
2.5.2.3	Διήθηση με μεμβράνες.....	32
2.5.2.4	Ιοντοανταλλαγή.....	34
2.5.2.5	Προσρόφηση/Ρόφηση	35
2.5.2.6	Ηλεκτροχημικές μέθοδοι αποκατάστασης.....	36
2.5.3	Βιολογικές μέθοδοι αποκατάστασης	37
2.5.3.1	Φυτοαποκατάσταση	38
2.5.3.2	Βιοχημική αναγωγή Cr(VI) (Βιοαποκατάσταση)	39
2.5.4	Μηχανισμοί βιοχημικής αναγωγής Cr(VI)	43
2.5.4.1	Αλληλεπίδραση του Cr(VI) με την κυτταρική επιφάνεια	44
2.5.4.2	Βιοπροσρόφηση και βιοσυσσώρευση	47

2.5.4.3	Ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική αναγωγή Cr(VI)	49
2.6	Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI)	54
2.6.1	Αρχικό pH.....	54
2.6.2	Θερμοκρασία	57
2.6.3	Δότης ηλεκτρονίων	59
2.6.4	Συγκέντρωση βιομάζας.....	62
2.6.5	Συγκέντρωση εξασθενούς χρωμίου	63
2.6.6	Οξειδοαναγωγικές συνθήκες	66
2.6.7	Παρουσία άλλων ανιόντων	68
2.6.8	Παρουσία άλλων μεταλλικών ιόντων	70
2.6.9	Άλλοι παράγοντες	72
2.7	Στόχοι της έρευνας.....	74
3.	Μεθοδολογία – Πειραματικό πρωτόκολλο	77
3.1	Πειράματα μικρόκοσμου.....	77
3.1.1	Πρωτόκολλο ανάπτυξης και συντήρησης μητρικών καλλιιεργειών.....	78
3.1.2	Πρωτόκολλο πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (πειράματα batch)	82

3.2	Πειραματικό πρωτόκολλο πειραμάτων στήλης	86
3.2.1	Περιγραφή συστήματος στηλών	86
3.2.2	Πρωτόκολλο εκκίνησης των στηλών.....	89
3.2.3	Πείραμα control	90
3.2.4	Πείραμα βιοδιέγερσης (biostimulation) των μικροοργανισμών	90
3.2.5	Πείραμα βιοτικής-αβιοτικής αναγωγής Cr(VI)	90
3.3	Περιγραφή υλικών	91
3.3.1	Χαρακτηριστικά εδαφικού υλικού.....	91
3.3.2	Χαρακτηριστικά υπογείου νερού πειραμάτων.....	92
3.3.3	Δότες ηλεκτρονίων	93
3.4	Εργαστηριακές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ποιοτικών παραμέτρων	95
3.4.1	Εισαγωγή	95
3.4.2	Προσδιορισμός ολικού και εξασθενούς χρωμίου	96
3.4.2.1	Εισαγωγή στις μεθόδους προσδιορισμού Cr.....	96
3.4.2.2	Περιγραφή εργαστηριακής ανάλυσης.....	97
3.4.3	Προσδιορισμός χημικώς απαιτούμενου οξυγόνου (COD)	99

3.4.4	Προσδιορισμός νιτρικού (NO ₃ -N) και νιτρώδους (NO ₂ -N) αζώτου	100
3.4.5	Προσδιορισμός θειικών ιόντων (SO ₄ ²⁻) και θειούχων ενώσεων (S ²⁻).....	100
3.4.6	Προσδιορισμός δισθενούς σιδήρου (Fe ²⁺).....	101
3.4.7	Προσδιορισμός πτητικών λιπαρών οξέων (Volatile Fatty Acids; VFAs)	101
3.4.8	Πρωτόκολλο μικροσκοπικής μεθόδου φθορίζουσας επιτόπου υβριδοποίησης (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH)	102
3.4.9	Προσδιορισμός DO, ORP, EC, pH και θερμοκρασίας	107
3.4.10	Δοκιμή διαπερατότητας εδάφους (υδραυλική αγωγιμότητα)	108
3.4.11	Δοκιμή ιχνηθέτησης (Tracer Test).....	109
4.	Διερεύνηση της μικροβιακής αναγωγής εξασθενούς χρωμίου σε πειράματα μικρόκοσμων.....	111
4.1	Εισαγωγή.....	111
4.2	Αποτελέσματα μητρικών καλλιεργειών	113
4.3	Μοντέλο κινητικής αναγωγής Cr(VI) στα πειράματα μικρόκοσμου	118
4.4	Μελέτη της αναγωγής του Cr(VI) υπό πλήρως αναερόβιες συνθήκες	120
4.5	Μελέτη της αναγωγής του Cr(VI) σε ανοξικές συνθήκες.....	124
4.6	Μελέτη της αναγωγής του Cr(VI) υπό διαφορετικές θεικοαναγωγικές συνθήκες	130

4.7	Σύγκριση ρυθμών αναγωγής χρωμίου υπό διαφορετικές αναγωγικές συνθήκες....	135
4.8	Συμπεράσματα πειραμάτων μικρόκοσμου.....	137
5.	Μελέτη μικροβιακής αναγωγής εξασθενούς χρωμίου σε πειράματα εδαφικών στηλών.....	140
5.1	Εισαγωγή.....	140
5.2	Κινητικές εξισώσεις αναγωγής Cr(VI) στα πειράματα στήλης	140
5.3	Μελέτη της φυσικής αναγωγικής ικανότητας του εδάφους (πείραμα control).....	142
5.4	Επίδραση του οργανικού δότη ηλεκτρονίων στη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) (Βιοτικό πείραμα).....	145
5.5	Μελέτη της συζευγμένης Βιοτικής – Αβιοτικής απομάκρυνσης Cr(VI)	149
5.5.1	Αβιοτική απομάκρυνση Cr(VI)	149
5.5.2	Συζευγμένη βιοτική – αβιοτική απομάκρυνση Cr(VI) (Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα).....	153
5.6	Σύγκριση μεταξύ βιοτικού και αβιοτικού – βιοτικού πειράματος	158
5.7	Συναξιολόγηση.....	162
6.	Συμπεράσματα – Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.....	164
6.1	Εισαγωγή.....	164
6.2	Κύρια ευρήματα πειραμάτων μικρόκοσμου	164

6.3	Κύρια ευρήματα πειραμάτων εδαφικών στηλών	167
6.4	Σύνοψη ερευνητικής συμβολής της παρούσας διατριβής.....	168
6.5	Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.....	169
	Βιβλιογραφικές αναφορές.....	172
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	219
A.	Γραφήματα πειραμάτων στήλης.....	219
	A.1 Γραφήματα προσδιορισμού σταθεράς k διαφορετικών περιπτώσεων αναγωγής Cr(VI) στα πειράματα της Στήλης I.....	219
	A.2 Γραφήματα προσδιορισμού σταθεράς k διαφορετικών περιπτώσεων αναγωγής Cr(VI) στα πειράματα της Στήλης II.....	223
	A.3 Χρονική διακύμανση Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο των στηλών.....	227
B.	Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά και διεθνή συνέδρια με κρίση	229

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά του Cr.....	6
Πίνακας 2.2 Χρήσεις χρωμίου και ενώσεις του στη βιομηχανία (Mishra & Bharagava, 2016b).	14
Πίνακας 2.3 Όρια αναφοράς χρωμίου στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελλάδα.....	22
Πίνακας 2.4 Συνοπτική παρουσίαση μεθόδων εξυγίανσης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με Cr(VI).....	28
Πίνακας 2.5 Παραδείγματα μικροοργανισμών που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βιολογική απομάκρυνση του Cr(VI) μαζί με την αρχική συγκέντρωση Cr(VI) και το βαθμό απομάκρυνσης που επιτεύχθηκε.	41
Πίνακας 2.6 Παραδείγματα μικροοργανισμών και της ικανότητας απομάκρυνσης Cr(VI) σε σχέση με το αρχικό pH του διαλύματος.	56
Πίνακας 2.7 Παραδείγματα επίδρασης της θερμοκρασίας στο βαθμό απομάκρυνσης του Cr(VI) μέσω μικροοργανισμών.	58
Πίνακας 2.8 Επίδραση είδους δότη ηλεκτρονίων στην μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI).....	61
Πίνακας 2.9 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης Cr(VI) στο βαθμό απομάκρυνσης του ρύπου.....	65
Πίνακας 3.1 Χαρακτηριστικά τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.	79
Πίνακας 3.2 Σύσταση αναερόβιου θρεπτικού μέσου (RAMM).	80
Πίνακας 3.3 Διάλυμα μετάλλων τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.	81

Πίνακας 3.4 Διάλυμα βιταμινών τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.	81
Πίνακας 3.5 Διάλυμα σεληνίου - βολφραμίου τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.....	81
Πίνακας 3.6 Πειραματικές συνθήκες αναερόβιων και ανοξικών μικρόκοσμων.	85
Πίνακας 3.7 Πειραματικές συνθήκες θεικοαναγωγικών μικρόκοσμων.	86
Πίνακας 3.8 Χαρακτηριστικά συστήματος στηλών.	87
Πίνακας 3.9 Χαρακτηριστικά εδαφικού υλικού πειραμάτων.	92
Πίνακας 3.10 Χαρακτηριστικά υπογείου νερού που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των μητρικών καλλιεργειών και για την διενέργεια των πειραμάτων με εδαφικές στήλες.....	93
Πίνακας 3.11 Χαρακτηριστικά οργανικών δοτών ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.....	95
Πίνακας 3.12 Ιχνηλάτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.....	103
Πίνακας 3.13 Συγκέντρωση φορμαμιδίου στο διάλυμα υβριδοποίησης, σύμφωνα με τον εξεταζόμενο ιχνηλάτη (probe).	105
Πίνακας 3.14 Συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl) και EDTA στο διάλυμα έκπλυσης, σύμφωνα με τον εξεταζόμενο ιχνηλάτη (probe).....	105
Πίνακας 4.1 Πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν στα πειράματα μικρόκοσμου.....	112
Πίνακας 4.2 Αποτελέσματα της απόδοσης των μητρικών καλλιεργειών κατά τη διάρκεια εγκλιματισμού (Μέσος όρος εβδομαδιαίων μετρήσεων.....	116

Πίνακας 4.3 Μέσες τιμές συγκέντρωσης σουλφιδίων στους μικρόκοσμους υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες.	133
Πίνακας 5.1 Αποτελέσματα Βιοτικού πειράματος.	147
Πίνακας 5.2 Αποτελέσματα Αβιοτικού πειράματος.	150
Πίνακας 5.3 Πειραματικά αποτελέσματα Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος.	156

Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 2.1 Διάγραμμα απεικόνισης δυναμικού οξειδοαναγωγής χρωμίου (Avudainayagam et al., 2003).	8
Σχήμα 2.2 Διάγραμμα Pourbaix μορφών χρωμίου (Palmer & Wittbrodt, 1991).....	9
Σχήμα 2.3 Ο κύκλος του Χρωμίου στο περιβάλλον (Προσαρμογή από US EPA, 2000).	10
Σχήμα 2.4 Συνοπτική παρουσίαση κύριων πηγών Cr(VI) στο περιβάλλον.	14
Σχήμα 2.5 Μηχανισμοί εισόδου Cr(VI) σε κύτταρα οργανισμών και γενετοξικότητα (Προσαρμογή από DesMarias and Costa, 2019 και Tumolo et al., 2020).....	18
Σχήμα 2.6 Συγκεντρωτική παρουσίαση των επιπτώσεων πρόσληψης Cr (κυρίως Cr(VI)) στα φυτά, τους υδρόβιους οργανισμούς και τον άνθρωπο.	20
Σχήμα 2.7 Συνοπτική παρουσίαση μηχανισμών βιοχημικής αναγωγής Cr(VI).	44
Σχήμα 2.8 Μηχανισμός αναγωγής Cr(VI) στην κυτταρική μεμβράνη Gram-αρνητικών βακτηριακών κυττάρων (Προσαρμογή από Chirwa & Molokwane (2011)).....	46
Σχήμα 2.9 Μηχανισμός αναγωγής Cr(VI) με σίδηρο και θειικά ιόντα.	52
Σχήμα 2.10 Μηχανισμός αναγωγής εξασθενούς χρωμίου σε βακτηριακά κύτταρα ενδοκυτταρικά, υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Προσαρμογή από Pradhan et al., 2017).	53
Σχήμα 3.1 Μπουκάλια serum στα οποία έχουν κατασκευαστεί μικρόκοσμοι. Απεικονίζονται επίσης σύριγγες δειγματοληψίας και φίλτρα σύριγγας για διήθηση των δειγμάτων.	85

Σχήμα 3.2 Σχηματική απεικόνιση του συστήματος εδαφικών στηλών. (1) Δοχείο τροφοδοσίας/ανακυκλοφορίας Cr(VI), (2) Εδαφική στήλη, (3) Περισταλτική αντλία.....	88
Σχήμα 3.3 Πειραματική διάταξη συστήματος εδαφικών στηλών.....	89
Σχήμα 3.4 Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης για τη μέθοδο ανάλυσης του Cr(VI).	99
Σχήμα 3.5 Παράδειγμα απεικόνισης μικροοργανισμών με φίλτρο DAPI (α) και φίλτρο Cy3 (β).....	107
Σχήμα 3.6 Σχηματική απεικόνιση εργαστηριακής διάταξης της δοκιμής διαπερατότητας...	109
Σχήμα 4.1 Κατασκευασμένοι μικρόκοσμοι σε μπουκάλια serum.	113
Σχήμα 4.2 Αποτελέσματα μητρικών καλλιεργειών ANAER, ANOX, S100 και S400 κατά την περίοδο εγκλιματισμού. (Μέσος όρος ημερολογιακών μηνιαίων μετρήσεων)	115
Σχήμα 4.3 Αποτελέσματα ανάλυσης FISH στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού των μητρικών καλλιεργειών.	117
Σχήμα 4.4 Αποτελέσματα αναγωγής Cr(VI) τη 2 ^η πειραματική ημέρα στο μικρόκοσμο ANAER-M (α) και κατασκευή διαγράμματος της μορφής $\ln(C/C_0)$ ως προς το χρόνο (ώρες) (β).....	119
Σχήμα 4.5 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (k) των μικρόκοσμων ANAER-B, ANAER-M και ANAER-E κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης των 60 ημερών (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).	122
Σχήμα 4.6 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (k) των μικρόκοσμων με την προσθήκη (α) μελάσας και συνδυασμού μελάσας και Fe(II) και (β) EVO και συνδυασμού EVO και Fe(II), κατά τη διάρκεια των αναερόβιων batch πειραμάτων (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).....	124

Σχήμα 4.7 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (α) και νιτρικού αζώτου (β) των μικρόκοσμων ANOX-B, ANOX-M και ANOX-E κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης των 60 ημερών (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).....	126
Σχήμα 4.8 Σύγκριση των ρυθμών απομάκρυνσης (α) Cr(VI) και (β) νιτρικού αζώτου μεταξύ των μικρόκοσμών που περιείχαν μελάσα και συνδυασμό μελάσας και Fe(II) (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).	128
Σχήμα 4.9 Σύγκριση των ρυθμών απομάκρυνσης (α) Cr(VI) και (β) νιτρικού αζώτου μεταξύ των μικρόκοσμών που περιείχαν EVO και συνδυασμό EVO και Fe(II) (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).	129
Σχήμα 4.10 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (κ) των βιοτικών control και των μικρόκοσμων που περιείχαν μελάσα και EVO στα πειράματα (α) S100 και (β) S400 κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης των 60 ημερών (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).....	131
Σχήμα 4.11 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (κ) των μικρόκοσμων με την προσθήκη μελάσας και συνδυασμού μελάσας και Fe(II) στα πειράματα (α) S100 και (β) S400 (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).	134
Σχήμα 4.12 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (κ) των μικρόκοσμων με την προσθήκη EVO και συνδυασμού EVO και Fe(II) στα πειράματα (α) S100 και (β) S400 (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).	135
Σχήμα 5.1 Προφίλ Cr(VI) στην είσοδο της στήλης I και II κατά τη διάρκεια του πειράματος control.	143
Σχήμα 5.2 Συγκεντρώσεις χλωριόντων (Cl^{-1}) στις εξόδους των δύο στηλών κατά τη διάρκεια του tracer test πριν την έναρξη των πειραμάτων. Οι γραμμές με την ένδειξη “Fitted” έχουν προκύψει μέσω προσομοίωσης με το λογισμικό STANMOD.	145

Σχήμα 5.3 Προφίλ Cr(VI) στην είσοδο της στήλης I (α) και II (β) κατά τη διάρκεια του πειράματος control και του βιοτικού πειράματος.	148
Σχήμα 5.4 Συγκεντρώσεις χλωριόντων (Cl^{-1}) στις εξόδους των δύο στηλών κατά τη διάρκεια του tracer test αμέσως μετά τη λήξη του Βιοτικού πειράματος. Οι γραμμές με την ένδειξη “Fitted” έχουν προκύψει μέσω προσομοίωσης με το λογισμικό STANMOD.	149
Σχήμα 5.5 Προφίλ Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της στήλης I (α) και II (β) μετά την προσθήκη δισθενούς σιδήρου.	152
Σχήμα 5.6 Φωτογραφίες από την είσοδο των στηλών όπου φαίνεται ο σχηματισμός του στερεού μετά την προσθήκη διαλύματος $FeSO_4$	153
Σχήμα 5.7 Προφίλ Cr(VI) στην είσοδο της στήλης I (α) και II (β) κατά τη διάρκεια του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος μετά την προσθήκη των πηγών οργανικού άνθρακα.	155
Σχήμα 5.8 Αποτελέσματα ανάλυσης FISH σε φυσικό έδαφος και μετά την προσθήκη των αναγωγικών παραγόντων (μελάσα, EVO και $FeSO_4$).	157
Σχήμα 5.9 Συγκεντρώσεις χλωριόντων (Cl^{-1}) στις εξόδους των δύο στηλών κατά τη διάρκεια του tracer test μετά τη λήξη του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος. Οι γραμμές με την ένδειξη “Fitted” έχουν προκύψει μέσω προσομοίωσης με το λογισμικό STANMOD.	158
Σχήμα 5.10 Διάγραμμα μεταβολής των ρυθμών απομάκρυνσης του Cr(VI) σε σχέση με τον πειραματικό κύκλο στο Βιοτικό και Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα.	161
Σχήμα 5.11 Σύγκριση μαζών που απομακρύνθηκαν στα διαφορετικά πειράματα.	161
Σχήμα A.1 Χρονικό προφίλ Cr(VI) στη Στήλη I κατά τη διάρκεια του πειράματος Control για την εύρεση της σταθεράς k.	219

Σχήμα A.2 Χρονικό προφίλ Cr(VI) στη Στήλη I κατά τη διάρκεια του αβιοτικού πειράματος (προσθήκη FeSO ₄) για την εύρεση της σταθεράς k.....	219
Σχήμα A.3 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη I κατά τη διάρκεια του βιοτικού πειράματος για την εύρεση της σταθεράς k.....	220
Σχήμα A.4 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη I κατά τη διάρκεια του βιοτικού-αβιοτικού πειράματος (κύκλοι 1-10) για την εύρεση της σταθεράς k.....	221
Σχήμα A.5 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη I κατά τη διάρκεια του βιοτικού-αβιοτικού πειράματος (κύκλοι 11-20) για την εύρεση της σταθεράς k.....	222
Σχήμα A.6 Χρονικό προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του πειράματος Control για την εύρεση της σταθεράς k.....	223
Σχήμα A.7 Χρονικό προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του αβιοτικού πειράματος (προσθήκη FeSO ₄) για την εύρεση της σταθεράς k.....	223
Σχήμα A.8 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του βιοτικού πειράματος για την εύρεση της σταθεράς k.....	224
Σχήμα A.9 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του βιοτικού-αβιοτικού πειράματος (κύκλοι 1-10) για την εύρεση της σταθεράς k.....	225
Σχήμα A.10 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του βιοτικού-αβιοτικού πειράματος (κύκλοι 11-16) για την εύρεση της σταθεράς k.....	226
Σχήμα A.11 Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της Στήλης I στο Βιοτικό πείραμα.....	227
Σχήμα A.12 Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της Στήλης II στο Βιοτικό πείραμα.....	227

Σχήμα A.13 Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της Στήλης I στο Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα.228

Σχήμα A.14 Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της Στήλης II στο Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα.228

1. Εισαγωγή

Τα υπόγεια ύδατα αποτελούν τη μεγαλύτερη πηγή γλυκού νερού στον πλανήτη και χρησιμοποιούνται για πόση και την άρδευση καλλιεργειών από δισεκατομμύρια ανθρώπους (Bierkens & Wada, 2019). Ωστόσο, τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται εκτεταμένη ρύπανση των υπογείων υδάτων εξαιτίας ανθρωπογενών δραστηριοτήτων, όπως η γεωργία, η βιομηχανία και η διάθεση αποβλήτων, απειλώντας την ποιότητα τους (Currell et al., 2022). Τα υπόγεια νερά χαρακτηρίζονται από αργή κίνηση στο υπέδαφος και μεγάλους χρόνους παραμονής, γεγονός που καθιστά την αποκατάστασή τους δύσκολη και σε ορισμένες περιπτώσεις, αδύνατη (Siegel, 2014)

Ένας από τους ρύπους που συναντάται συχνά στους υπόγειους υδροφορείς είναι το χρώμιο (Cr). Το χρώμιο ανήκει στα βαρέα μέταλλα και εμφανίζεται στα εδάφη, τα ιζήματα και τα υπόγεια ύδατα μέσω φυσικών και ανθρωπογενών πηγών. Η κύρια φυσική πηγή του Cr στο περιβάλλον είναι τα οφιολιθικά πετρώματα, καθώς και τα προϊόντα της διάβρωσής τους (Kazakis et al., 2018; Perraki et al., 2021). Το ανθρωπογενές Cr σχετίζεται κυρίως με βιομηχανικές δραστηριότητες, όπως η παραγωγή ενέργειας, η βυρσοδεψία, οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας μεταλλευμάτων, η βιομηχανική επεξεργασία μετάλλων, η συντήρηση του ξύλου και σε μικρότερο βαθμό οι γεωργικές δραστηριότητες (Dhal et al., 2013; Jones et al., 2019; Perraki et al., 2021; Tumolo et al., 2020; Wei et al., 2021; Yang et al., 2020). Οι ενώσεις του χρωμίου απαντώνται συνήθως στο περιβάλλον σε δύο σταθερές καταστάσεις οξειδωσης, το τρισθενές και το εξασθενές χρώμιο, με διαφορετικές ιδιότητες. Το τρισθενές χρώμιο (Cr^{+3}) είναι ένα μικροθρεπτικό συστατικό που χρησιμοποιείται σε ορισμένες περιπτώσεις ως συμπλήρωμα διατροφής (Nussbaumerova et al., 2018; Racek et al., 2006; Sheikhsossein et al., 2020; Vithanage et al., 2019) και μια σταθερή μορφή Cr, που έχει σχετικά χαμηλή τοξικότητα, σχηματίζει αδιάλυτες ουσίες και δεν μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες (Wang et al., 2017). Αντίθετα, το εξασθενές χρώμιο (CrO_4^{2-} , $Cr_2O_7^{2-}$) είναι εξαιρετικά διαλυτό, τοξικό και γνωστό καρκινογόνο (Mishra & Bharagava, 2016; Palma et al., 2015).

Προκειμένου να καταπολεμηθεί η ρύπανση των υπογείων υδροφορέων από χρώμιο, η USEPA το έχει χαρακτηρίσει ως μία από τις δεκαεπτά χημικές ουσίες που αποτελούν τη μεγαλύτερη

απειλή για την ανθρώπινη υγεία (EPA, 2009). Ομοίως, ο Καναδάς συμπεριέλαβε το Cr και τις ενώσεις του στη λίστα του με τους ρύπους προτεραιότητας (CEPA, 1988). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει θέσει ως όριο για το ολικό Cr στο πόσιμο νερό τα 50 µg/L (WHO, 2004). Ωστόσο, σε πολλά μέρη του κόσμου οι αναφερθείσες τιμές για το Cr(VI) φυσικής προέλευσης στους υδροφορείς μπορεί να υπερβούν αυτό το όριο κατά μερικά µg/L, ενώ οι ανθρωπογενείς συγκεντρώσεις Cr(VI) μπορεί ακόμη και να ξεπεράσουν τα 10,000 µg/L, όπως στη λεκάνη απορροής του ποταμού Ασωπού στην Ελλάδα (Dermatas et al., 2017; Economou-Eliopoulos et al., 2011; Eliopoulos et al., 2021; Oze et al., 2007; Paternoster et al., 2021). Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να καθιερωθούν επαρκείς μέθοδοι επεξεργασίας για την ταχεία αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III) σε ρυπασμένους υδροφορείς, προκειμένου να προστατευθεί το περιβάλλον και η δημόσια υγεία.

Οι παραδοσιακές τεχνολογίες για την απομάκρυνση του χρωμίου από τα υπόγεια ύδατα, όπως η προσρόφηση, η χημική αναγωγή και η καθίζηση, οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι και η ιοντοανταλλαγή, είναι γρήγορες, αποτελεσματικές και εφαρμόζονται σε τοποθεσίες όπου ο ρύπος εμφανίζεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (Barrera-Díaz et al., 2012; Mishra et al., 2018). Ωστόσο, αυτές οι τεχνικές απαιτούν συνήθως μεγάλες ποσότητες χημικών ουσιών και ενέργειας και συχνά έχουν ως αποτέλεσμα απαγορευτικά δαπανηρές και μεγάλης κλίμακας εφαρμογές σε ρυπασμένες περιοχές, καθώς και παραγωγή επικίνδυνων παραπροϊόντων (Dhal et al., 2013; Elahi & Rehman, 2019; Jobby et al., 2018; Pushkar et al., 2021). Η ικανότητα αρκετών μικροβιακών ομάδων να ανάγουν το Cr(VI) σε Cr(III), έχει θεωρηθεί πολύ ενδιαφέρουσα για την απορρύπανση του εδάφους και των υπογείων υδάτων, καθώς η βιολογική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου είναι μια οικονομικά αποδοτική, φιλική προς το περιβάλλον και βιώσιμη μέθοδος αποκατάστασης των ρυπασμένων υπόγειων υδάτων που μπορεί να εφαρμοστεί *ex situ* και *in situ*. Στην *in situ* (επί τόπου) βιοαποκατάσταση, οι γηγενείς μικροβιακοί πληθυσμοί των εδαφών ή/και των υπογείων υδάτων τονώνονται μέσω της προσθήκης διαφόρων οργανικών και ανόργανων πηγών ηλεκτρονίων (βιοδιέγερση) (Das et al., 2021; Pushkar et al., 2021; Song et al., 2021). Μια άλλη μέθοδος *in situ* βιοαποκατάστασης είναι η εισαγωγή εξωγενών μικροοργανισμών με την ικανότητα απομάκρυνσης Cr(VI) (Carlos et al., 2016).

Η βιοδιέγερση (biostimulation) των μικροοργανισμών έχει διπλή θετική επίδραση στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της βιοαποκατάστασης. Η προσθήκη άνθρακα προκαλεί αύξηση των ρυθμών ανάπτυξης των αυτόχθονων βακτηρίων που είναι σε θέση να ανάγουν άμεσα το Cr(VI) βιολογικά, μέσω της παραγωγής χρωμικής ρεδουκτάσης (Ma et al., 2019; Opperman et al., 2008; Park et al., 2000; Pei et al., 2020) και της ανάπτυξης αναερόβιων συνθηκών που έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή δισθενούς σιδήρου (Fe^{+2}) από βακτήρια που ανάγουν το σίδηρο, ο οποίος ανάγει χημικά το Cr(VI) σε Cr(III) (Bishop et al., 2019; Fernández et al., 2018; Wielinga et al., 2001). Συνεπώς, ανακυκλώνοντας μικρές ποσότητες σιδήρου, μια σημαντική ποσότητα Cr(VI) θα μπορούσε ενδεχομένως να αναχθεί σε Cr(III) (Arias & Tebo, 2003; Fendorf et al., 2000; Jiang et al., 2021; Nevin & Lovley, 2002). Ως εκ τούτου, η διέγερση των αναερόβιων διεργασιών επί τόπου μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική εναλλακτική θεραπεία για τα ρυπασμένα με Cr(VI) ύδατα και έχει τη δυνατότητα ευρείας εφαρμογής. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της βιοαποκατάστασης εξαρτάται και επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά από τα συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της περιοχής αποκατάστασης, όπως το pH, τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες, τη θερμοκρασία, τη σύσταση του εδάφους, καθώς και την παρουσία άλλων τοξικών ουσιών ή αποδεκτών ηλεκτρονίων (πχ. NO_3-N , SO_4^{2-}) (Bonilla et al., 2016; Chovanec et al., 2012; Song et al., 2021).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, ως βασικός στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής τέθηκε η διερεύνηση της ικανότητας των μικροοργανισμών να ανάγουν το εξασθενές χρώμιο σε τρισθενές και η ανάπτυξη πρωτοποριακών και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών επεξεργασίας για την επιτόπου βιοαποκατάσταση του εδάφους και των υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με Cr(VI). Οι επιμέρους στόχοι της διατριβής είναι οι εξής:

- 1) η διερεύνηση της επίδρασης του αποδέκτη ηλεκτρονίων στις μικροβιακές κοινότητες που ανάγουν το Cr(VI) υπό ανοξικές, αναερόβιες και θεικοαναγωγικές συνθήκες
- 2) η αξιολόγηση της επίδρασης συνδυασμού δοτών ηλεκτρονίων (πηγών οργανικού άνθρακα και σιδήρου) στην πλήρως αναερόβια ή ανοξική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου με παράλληλη αναγωγή νιτρικών ιόντων, καθώς και στην αναγωγή του Cr(VI) παρουσία θεικών ιόντων

- 3) η διερεύνηση των σχετικών με την αναγωγή του Cr(VI) χημικών και βιοχημικών διεργασιών που επικρατούν σε έναν υπόγειο υδροφόρο, λαμβάνοντας υπόψη την κίνηση και μεταφορά του ρύπου μέσα στους πόρους του υπεδάφους.

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων πραγματοποιήθηκαν δύο είδη πειραμάτων, πειράματα μικρόκοσμου (ή πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας, batch) και εδαφικών στηλών (ή πειράματα συνεχούς ροής) με έδαφος και νερό που είχε συλλεχθεί από την περιοχή των Οινοφύτων, με στόχο την καλύτερη προσομοίωση των συνθηκών που επικρατούν σε έναν ρυπασμένο υπόγειο υδροφόρο. Στο πλαίσιο της διατριβής έγινε η εκμάθηση αναλυτικών μεθόδων για τη διεξαγωγή αναλύσεων που οδήγησαν σε σαφείς απαντήσεις στα ερευνητικά ερωτήματα που τέθηκαν ανωτέρω. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν και κατασκευάστηκαν μαθηματικές εξισώσεις για την ποσοτική περιγραφή των διαφορετικών περιπτώσεων αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου που εξετάστηκαν. Οι αναλύσεις, όπως και τα πειράματα, πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας της Σχολής Πολιτικών Μηχανικών ΕΜΠ.

Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει τα παρακάτω κεφάλαια :

1. Το παρόν κεφάλαιο, στο οποίο γίνεται εισαγωγή στο αντικείμενο της διατριβής, στους ερευνητικούς της στόχους και στη διάρθρωση της.
2. Το κεφάλαιο 2, στο οποίο γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τα χαρακτηριστικά του χρωμίου, τις πηγές του, τις επιπτώσεις του, το νομοθετικό πλαίσιο, καθώς και τις μεθόδους αποκατάστασης ρυπασμένων τόπων, με έμφαση στις βιολογικές μεθόδους εξυγίανσης.
3. Το κεφάλαιο 3, στο οποίο περιγράφονται τα πειράματα που σχεδιάστηκαν με βάση τους ερευνητικούς στόχους, ο τρόπος παρασκευής-συντήρησης των πειραμάτων και οι εργαστηριακές αναλύσεις που χρησιμοποιήθηκαν.
4. Το κεφάλαιο 4, που περιλαμβάνει όλα τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικροκόσμου.
5. Το κεφάλαιο 5, στο οποίο γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων στήλης.

6. Το κεφάλαιο 6, που συνοψίζει τα συμπεράσματα της έρευνας που υλοποιήθηκε και περιλαμβάνει προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.

2. Θεωρητικό υπόβαθρο

Στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιείται βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τα χαρακτηριστικά του χρωμίου, τις πηγές του στο περιβάλλον, την επίδραση του στους έμβιους οργανισμούς και τον άνθρωπο, καθώς και στους μηχανισμούς και τις μεθόδους αποκατάστασης ρυπασμένων τόπων.

2.1 Γενικά χαρακτηριστικά και χημεία του χρωμίου

Το χρώμιο Cr είναι ένα φυσικά σχηματιζόμενο μέταλλο, με μεγάλη σκληρότητα και αντίσταση στη διάβρωση, που ανήκει στην ομάδα των βαρέων μετάλλων, μετάλλων δηλαδή με πυκνότητα μεγαλύτερη από 5 g/cm^3 (Wilbur et al., 2012). Ανακαλύφθηκε το 1797 ως συστατικό ενός κρυσταλλικού κόκκινου ορυκτού, του κροκοΐτη (PbCrO_4). Είναι το πρώτο στοιχείο της 6^{th} ομάδας στον περιοδικό πίνακα και μπορεί να εμφανίσει αριθμούς οξείδωσης από -2 έως 6 (Motzer, 2005). Το φυσικά σχηματιζόμενο χρώμιο αποτελείται από τρία (3) σταθερά ισότοπα : ^{52}Cr , ^{53}Cr και ^{54}Cr , με το ^{52}Cr να είναι το πιο άφθονο (83.789% φυσική αφθονία) (Ayele & Godeto, 2021). Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται συνοπτικά κάποια από τα βασικά χαρακτηριστικά του Cr.

Πίνακας 2.1 Χαρακτηριστικά του Cr.

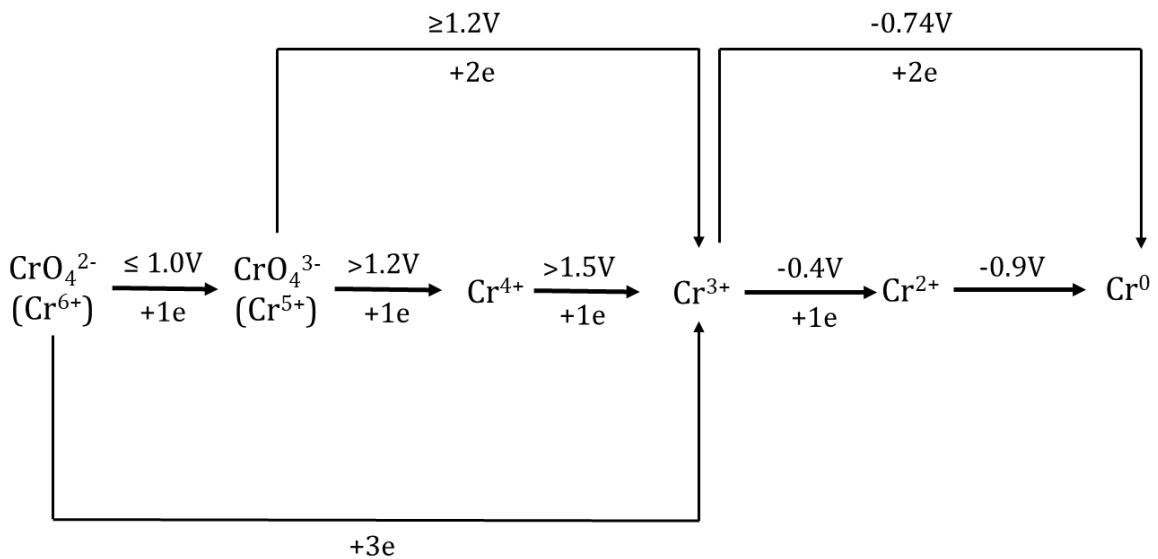
Παράμετρος	Τιμή
Ατομικός αριθμός	24
Ατομική μάζα	51.996 g/mol
Αριθμοί οξείδωσης	6, 5, 4, 3, 2, 1, 0, -1, -2
Ηλεκτροαρνητικότητα	1.66
Πυκνότητα	7.19 g/cm^3 (στους 20°C)
Σημείο τήξης	1907°C
Σημείο βρασμού	2671°C
Ειδική ηλεκτρική αντίσταση	$125 \text{ n}\Omega\cdot\text{m}$ (στους 20°C)

Είναι το 21^ο πιο άφθονο στοιχείο στο φλοιό της γης (μέση συγκέντρωση 100 mg/kg), ως οξείδια και πυριτικά ορυκτά (Barnhart, 1997; Kazakis et al., 2015; Oze et al., 2007). Απαντάται συνήθως στο περιβάλλον σε τρεις (3) κύριες οξειδωτικές καταστάσεις διαφορετικής

σταθερότητας: i) στοιχειακό μεταλλικό χρώμιο Cr(0), ii) τρισθενές χρώμιο Cr(III) και iii) εξασθενές χρώμιο Cr(VI).

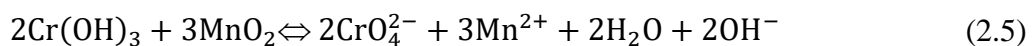
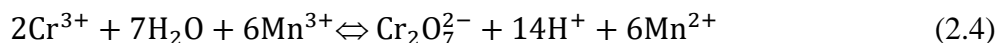
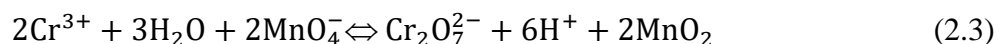
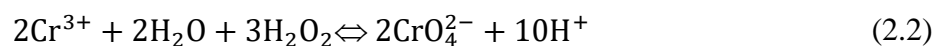
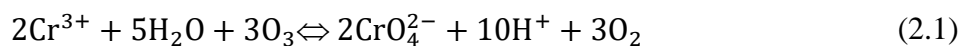
Το Cr(0) εμφανίζεται ως χρωμίτης (FeCr_2O_4), ένα ορυκτό οξείδιο του χρωμίου και του σιδήρου. Η πλειονότητα των κοιτασμάτων του έχουν σχηματιστεί από τεκτονικές διεργασίες και γι' αυτό το λόγο εντοπίζεται συνήθως σε συμπλέγματα υπερβασικών μαγματικών πετρωμάτων (Prasad et al., 2021).

Το Cr(III) έχει την ικανότητα να σχηματίζει ενώσεις με διάφορες υδροξυλικές ομάδες και κολλοειδή στερεά του εδάφους, οι οποίες έχουν εξαιρετικά χαμηλή διαλυτότητα, γεγονός που εμποδίζει την έκπλυση του σε υπόγεια νερά και την απορρόφησή του από τα φυτά (Xia et al., 2019). Επιπλέον, είναι σύμφωνα με το διάγραμμα δυναμικού οξειδοαναγωγής που απεικονίζεται στο Σχήμα 2.1, το πιο θερμοδυναμικά σταθερό είδος χρωμίου σε διαλύματα, καθώς σημαντικά ποσά ενέργειας θα απαιτούνταν για την μετατροπή του σε χαμηλότερες ή υψηλότερες οξειδωτικές καταστάσεις (Avudainayagam et al., 2003). Φαίνεται, συνεπώς ότι η οξείδωση του Cr(III) δεν ευνοείται συνήθως λόγω της υψηλής τιμής E° του οξειδοαναγωγικού ζεύγους Cr(III)/Cr(VI), ωστόσο, παραμένει εφικτή σε φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα παρουσία συγκεκριμένων οξειδωτικών μέσων, όπως οξειδίων του μαγγανίου (MnO_2), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και διαλυμένου και αέριου οξυγόνου (O_2) (Apte et al., 2005; Peng et al., 2019; Zhang et al., 2014). Επίσης, στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί και μερικά ακόμα οξειδοαναγωγικά ζεύγη ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, $\text{S}^{2-}/\text{SO}_4^{2-}$, $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, CH_4/CO_2) που μπορούν να συνεισφέρουν στην οξείδωση του Cr(III) (Papazotos et al., 2020; Varadharajan et al., 2017; Vasileiou et al., 2019). Παρόλα αυτά, τα οξειδωτικά αυτά μέσα θα πρέπει να βρίσκονται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις για να πραγματοποιηθεί η οξείδωση του Cr(III) σε Cr(VI), κάτι το οποίο δεν είναι ιδιαίτερα συχνό φαινόμενο στο περιβάλλον (Kimbrough et al., 1999).



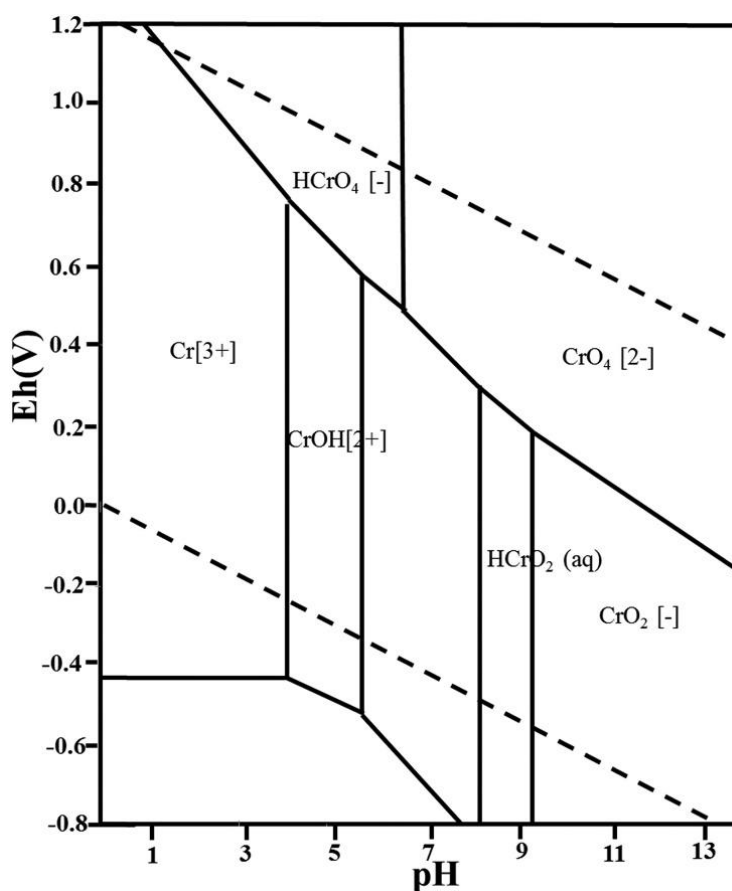
Σχήμα 2.1 Διάγραμμα απεικόνισης δυναμικού οξειδοαναγωγής χρωμίου (Avudainayagam et al., 2003).

Στις Εξισώσεις 2.1-2.5 παρουσιάζεται η στοιχειομετρία ορισμένων πιθανών αντιδράσεων οξείδωσης του τρισθενούς χρωμίου σε εξασθενές σε φυσικά υδάτινα περιβάλλοντα (Kimbrough et al., 1999).



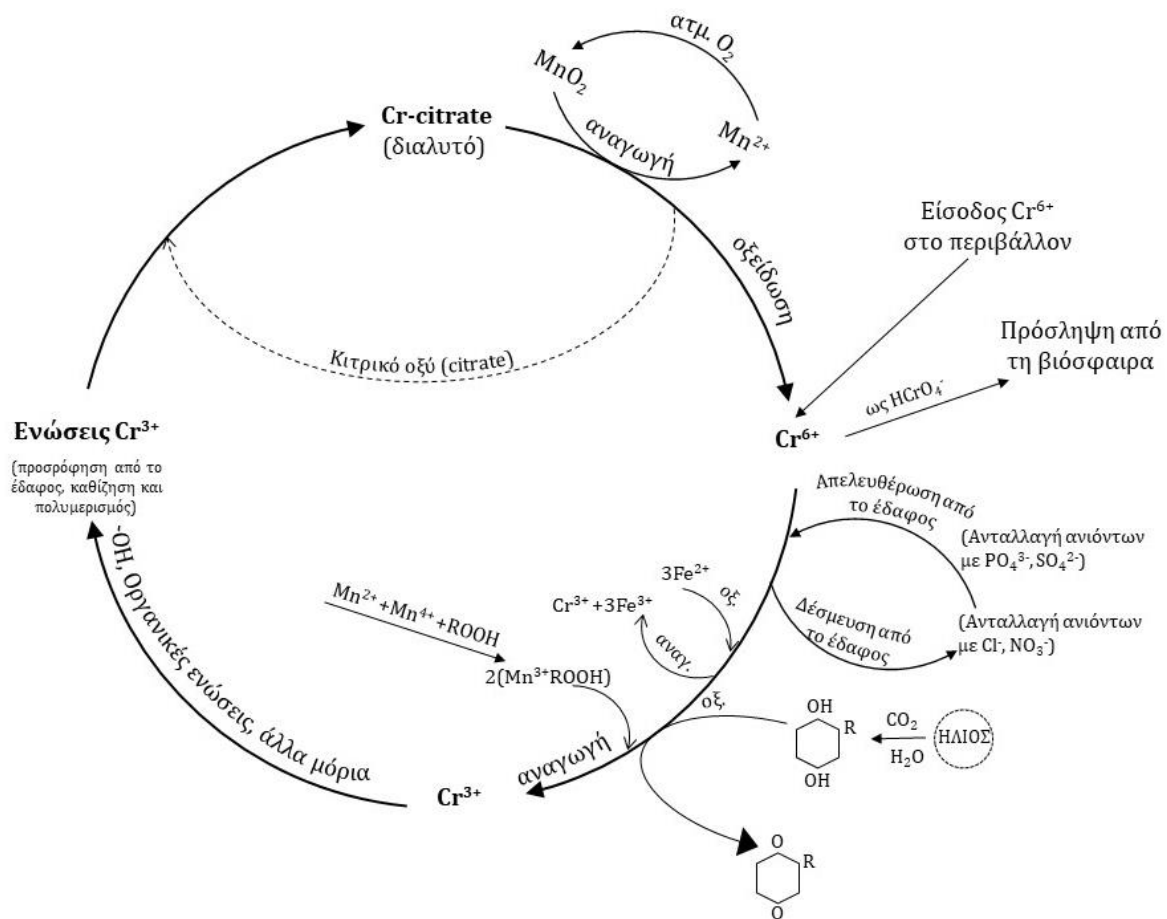
Το Cr(VI) εμφανίζεται σε διάφορες ενώσεις (CrO_4^{2-} , HCrO_4^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), οι οποίες έχουν υψηλή διαλυτότητα και κινητικότητα στο έδαφος και τα υπόγεια νερά (Xia et al., 2019). Μαζί με το τρισθενές χρώμιο αποτελούν τις πιο σταθερές μορφές χρωμίου στο περιβάλλον. Η μορφή του εξασθενούς χρωμίου στα νερά και τα εδάφη εξαρτάται από τις συνθήκες της κάθε περιοχής

και συγκεκριμένα από το pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh) και τα χημικά χαρακτηριστικά της (Saha et al., 2011). Σύμφωνα με το Σχήμα 2.2 (Διάγραμμα Pourbaix), υπό συνθήκες $\text{pH} > 6$, η κύρια μορφή του Cr(VI) στο νερό είναι το χρωμικό ανιόν (CrO_4^{2-}), ενώ οι ασθενώς όξιμες συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό ενώσεων όπως τα ανιόντα HCrO_4^- , CrO_4^{2-} (Palmer & Wittbrodt, 1991). Σύμφωνα με τους Xing et al. (2022), σε έντονα όξιμες συνθήκες κυριαρχεί το H_2CrO_4 , ενώ σε βασικές (εύρος pH από 8.5-9.5) σχηματίζεται $\text{Cr}(\text{OH})_3$, το οποίο είναι αδιάλυτο σε υδατικά διαλύματα. Επιπλέον, η αφθονία αυτών των μορφών φαίνεται ότι εξαρτάται και από τη συγκέντρωση του χρωμίου και σε πολύ έντονα όξιμες συνθήκες έχουν εντοπιστεί δύο (2) ακόμα μορφές Cr, $\text{Cr}_3\text{O}_{10}^{2-}$ και $\text{Cr}_4\text{O}_{13}^{2-}$ (Shupack, 1991). Η αναγωγή του Cr(VI) σε υδατικά και εδαφικά συστήματα είναι συνήθως αποτέλεσμα της αντίδρασης με οργανικά υλικά (πχ. χουμικά ($\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_6$) και φουλβικά οξέα ($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_8$)), δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) σε διαλυτή μορφή και σε ορυκτά, καθώς και ενώσεις που περιέχουν θείο (Fendorf, 1995).



Σχήμα 2.2 Διάγραμμα Pourbaix μορφών χρωμίου (Palmer & Wittbrodt, 1991).

Στο Σχήμα 2.3 παρουσιάζεται ο «κύκλος του Χρωμίου», στον οποίο περιγράφονται περιληπτικά οι πιο σημαντικές αντιδράσεις του χρωμίου σε εδαφικά και υδατικά περιβάλλοντα. Το Cr(III) μπορεί να ενωθεί με μικρά συνδετικά μόρια (ligands), όπως το κιτρικό οξύ, γεγονός που του προσδίδει μεγαλύτερη κινητικότητα και επιτρέπει την οξειδωσή του από οξειδία του μαγγανίου. Το Cr(VI) (ως HCrO_4^- ή/και CrO_4^{2-}) στα εδαφικά συστήματα, κάτω από ευνοϊκές συνθήκες pH και υγρασίας, μπορεί να προσροφηθεί, να κατακρημνιστεί, να προσληφθεί από τα φυτά και να εκπλυθεί σε κατώτερες εδαφικές στρώσεις. Επιπλέον, δύναται να αναχθεί σε Cr(III) μέσω αντίδρασης με ενώσεις άνθρακα, σιδήρου ή και μαγγανίου (Saha et al., 2011; US EPA, 2000).



Σχήμα 2.3 Ο κύκλος του Χρωμίου στο περιβάλλον (Προσαρμογή από US EPA, 2000).

Η συγκέντρωση των οξειδοαναγωγικών μέσων αποτελεί σημαντικό παράγοντα επίδρασης της οξείδωσης/αναγωγής του χρωμίου στο περιβάλλον. Σύμφωνα με τους Kimbrough et al. (1999), ενώ υπάρχουν πολλές ουσίες με την ικανότητα οξείδωσης του Cr(III) σε Cr(VI), μόνο λίγες υπάρχουν στο περιβάλλον σε επαρκώς υψηλές συγκεντρώσεις για την οξείδωση του τρισθενούς χρωμίου. Αντιθέτως, υπάρχουν πολλοί αναγωγικοί παράγοντες για τους οποίους η αναγωγή του Cr(VI) ευνοείται λιγότερο θερμοδυναμικά, αλλά επειδή η συγκέντρωσή τους είναι πολύ υψηλή, συμμετέχουν στην αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III).

2.2 Πηγές χρωμίου

Το χρώμιο (Cr) εμφανίζεται στην ατμόσφαιρα, το νερό, το έδαφος και σε γεωλογικούς σχηματισμούς σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στις δύο σταθερές μορφές του τρισθενούς και του εξασθενούς χρωμίου και η προέλευσή του μπορεί να είναι απόρροια φυσικών διεργασιών ή αποτέλεσμα ανθρωπογενών δράσεων. Στην ατμόσφαιρα, ανάλογα με το αν η περιοχή είναι απομακρυσμένη (πχ. Ανταρκτική, Γροιλανδία), αγροτική, αστική ή βιομηχανική, η μέση συγκέντρωση του Cr μπορεί να πάρει τιμές από 5.0×10^{-6} - 1.2×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 0.9-12 ng/m^3 , 4.1-17.2 ng/m^3 και 25-57 ng/m^3 αντίστοιχα (Ao et al., 2022; Shanker et al., 2005). Στα επιφανειακά ύδατα, εμφανίζεται σε ένα εύρος από 0-117 $\mu\text{g}/\text{L}$ (μέση τιμή 9.7 $\mu\text{g}/\text{L}$) και στο θαλασσίνο νερό από 0-0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Shanker et al., 2005). Στα υπόγεια ύδατα, οι τιμές του Cr(VI) κυμαίνονται από μερικά $\mu\text{g}/\text{L}$ (π.χ. 36 $\mu\text{g}/\text{L}$ στην Καλιφόρνια, 41 $\mu\text{g}/\text{L}$ στην Ιταλία και 120 $\mu\text{g}/\text{L}$ στην Ελλάδα) (Ball & Izbicki, 2004; Sacchi et al., 2021; Vasileiou et al., 2019) και μπορεί να ξεπεράσουν τα 10,000 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Οινόφυτα, Λεκάνη Ασωπού) (Dermatas et al., 2017) ή ακόμα και να φτάσουν τα 12,000 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Κίνα) (Ma et al., 2019).

Στα πετρώματα, η μέση συγκέντρωση χρωμίου είναι περίπου 100 mg/kg , ωστόσο η συγκέντρωση αυτή μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος του πετρώματος και κυμαίνεται από 10 mg/kg (ασβεστολιθικά πετρώματα) έως 60,000 mg/kg (υπερμαφικά πετρώματα) (Ma & Hooda, 2010; Perraki et al., 2021). Στα εδάφη, η μέση συγκέντρωση χρωμίου κυμαίνεται από 10-100 mg/kg , αλλά ποικίλει αρκετά (1-1,500 mg/kg) και εξαρτάται κυρίως από το είδος του πετρώματός από το οποίο προέρχονται. Η ανθρωπογενής δραστηριότητα μπορεί να

μεταβάλλει τις συγκεντρώσεις αυτές και έχουν καταγραφεί τιμές που ξεπερνούν τα 328,000 mg/kg (Lukina et al., 2016; Ma & Hooda, 2010) .

Η παρουσία του Cr στο υδάτινο περιβάλλον σε υψηλές συγκεντρώσεις έχει υπάρξει στενά συνδεδεμένη με βιομηχανικές ή μεταλλουργικές δραστηριότητες, ωστόσο πλήθος μελετών υποστηρίζει ότι μπορεί να είναι και αποτέλεσμα φυσικών αιτιών και να σχετίζεται με την ύπαρξη μαφικών και υπερμαφικών πετρωμάτων (Perraki et al., 2021). Στα πετρώματα αυτά (περοδοτίτης, πυροξενίτης), καθώς και στους σερπεντινίτες, τα οποία βρίσκονται σε πυκνούς σχηματισμούς στις άκρες τεκτονικών πλακών, η συγκέντρωση χρωμίου (κυρίως τρισθενούς) μπορεί να φτάσει συγκεντρώσεις έως 60,000 mg/kg (Oze et al., 2004). Τα προϊόντα της διάβρωσης αυτών των πετρωμάτων, οδηγούν σε αύξηση της συγκέντρωσης του ολικού χρωμίου στα υπόγεια ύδατα, ενώ η αλληλεπίδραση πετρωμάτων-υδάτων οδηγεί και σε αύξηση της συγκέντρωσης του Cr(VI) στα υδάτινα σώματα. Εκτός από τα αναφερθέντα πετρώματα, υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI) έχουν βρεθεί και σε υπόγειους υδροφορείς από ψαμμιτικά πετρώματα (Bertolo et al., 2011). Οι ακριβείς διεργασίες με τις οποίες παράγεται Cr(VI) από φυσικές μορφές Cr(III) δεν είναι ακόμα σαφείς, ωστόσο από τη βιβλιογραφία, φαίνεται ότι υπάρχει ισχυρή σύνδεση με το pH της περιοχής, το διαλυμένο οξυγόνο, το πάχος της ακόρεστης ζώνης και την παρουσία ορυκτών μαγγανίου (Hausladen et al., 2018). Επιπλέον, σύμφωνα με μελέτες των Papazotos et al. (2019, 2020), η απελευθέρωση και οξειδωση του Cr στα υπόγεια ύδατα μπορεί να προκληθεί και από την παρουσία αζώτου και φωσφόρου ανθρωπογενούς προέλευσης.

Σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις Cr(VI) (30-130 µg/L) που δεν οφείλονται σε ανθρωπογενή δράση έχουν καταγραφεί ήδη από τη δεκαετία του '70 (Robertson, 1975) σε διάφορα μέρη του κόσμου, όπως στην Ευρώπη (Ιταλία, Ελλάδα, Γαλλία, Σερβία, Πολωνία), την Αμερική (ΗΠΑ, Καναδάς, Βραζιλία, Μεξικό), την Ωκεανία (Νέα Καληδονία), την Αφρική (Καμερούν) και την Ασία (Ταϊβάν) (Armienta-Hernandez & Rodriguez-Castillo, 1995; Ball & Izbicki, 2004; Becquer et al., 2006; Bulmer & Lavkulich, 1994; Chrysochoou et al., 2016; Dermatas et al., 2015; Dokou et al., 2016; Dzemua et al., 2011; Fantoni et al., 2002; Garnier et al., 2006; Hseu, 2006; Kierczak et al., 2007). Για παράδειγμα, οι Vasileiou et al. (2019) μέτρησαν σε δείγματα νερού από μια φυσική πηγή, η οποία δεν είχε επηρεαστεί καθόλου από ανθρώπινη

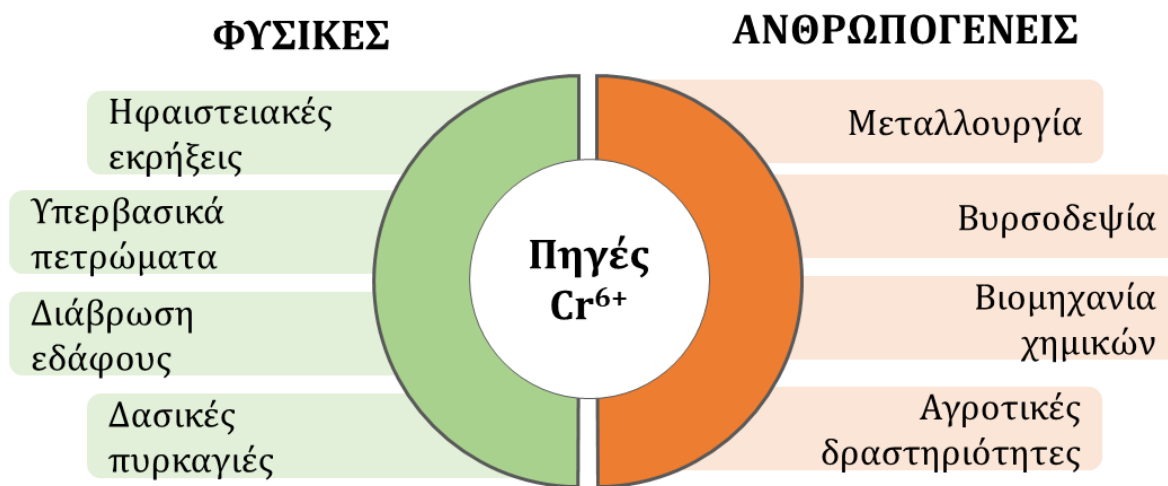
δραστηριότητα, συγκεντρώσεις Cr και Cr(VI) ίσες με 130 μg/L και 120 μg/L αντίστοιχα. Επιπλέον, σημειώνεται ότι το χρώμιο απελευθερώνεται στο περιβάλλον και μέσω άλλων φυσικών διεργασιών, όπως οι ηφαιστειακές εκρήξεις και οι δασικές πυρκαγιές (Burton et al., 2019; Saha et al., 2011).

Παράλληλα, το χρώμιο είναι ένα μέταλλο που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιομηχανικές εφαρμογές, όπως επιμετάλλωση, εξόρυξη, επεξεργασία μετάλλων, παρασκευή τσιμέντου, βυρσοδεψία, κλωστοϋφαντουργία, παραγωγή χρωστικών και συντήρηση ξύλου (GracePavithra et al., 2019; Li et al., 2022; Meng et al., 2022). Το 90% του χρωμίου που εξορύσσεται χρησιμοποιείται στη μεταλλουργία για την παραγωγή χάλυβα και άλλων κραμάτων μετάλλου. Το υπόλοιπο 10% ισομοιράζεται στις βιομηχανίες παραγωγής πυρίμαχων υλικών και χημικών ενώσεων (Dhal et al., 2013). Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζονται οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες ενώσεις του χρωμίου. Όπως φαίνεται, οι ενώσεις αυτές στην πλειονότητα τους είναι ενώσεις του Cr(VI), καθώς αποτελούν ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες. Οι ενώσεις του Cr(III) χρησιμοποιούνται λιγότερο, συχνά στη μορφή αλάτων, για τη βαφή υφασμάτων, την παραγωγή μυκητοκτόνων, καθώς και για την παραγωγή κεραμικών και γυαλιού (Lazaridis & Charalambous, 2005). Σύμφωνα με τα παραπάνω, γίνεται σαφές ότι κυρίως η περιβαλλοντική ρύπανση από χρώμιο αναφέρεται στη μορφή του εξασθενούς χρωμίου, ενώ η ρύπανση αυτή δεν οφείλεται μόνο στη χρήση αυτών των ενώσεων, αλλά και στην απόρριψη μη επαρκώς επεξεργασμένων βιομηχανικών λυμάτων σε φυσικές καταβόθρες (Bhunia et al., 2022). Σημαντικό μέρος της ανθρωπογενούς ρύπανσης αποδίδεται και στην εκσκαφή και την επεξεργασία μεταλλευμάτων που περιέχουν χρώμιο, καθώς και αυτές οι διεργασίες απελευθερώνουν Cr στο περιβάλλον, ρυπαίνοντας και υποβαθμίζοντας την ποιότητα των εδαφών και των υδάτων (Losi et al., 1994). Επιπλέον, παρατηρείται συχνά ανεπαρκής επεξεργασία λυμάτων βυρσοδεψίας, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση χρωμικών αλάτων στο περιβάλλον (Laxmi & Kaushik, 2020; Mishra & Bharagava, 2016b). Εκτός από αυτές τις βασικές ανθρωπογενείς πηγές ρύπανσης, χρώμιο μπορεί να περιέχεται σε λιπάσματα, ιπτάμενη τέφρα, αεροζόλ και λυματολάσπη (Kimbrough et al., 1999; Perraki et al., 2021; Saha et al., 2011). Αξίζει να σημειωθεί επίσης, ότι στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το 83% των εκπομπών Cr στα υδάτινα σώματα οφείλεται στον τομέα παραγωγής ενέργειας (Tumolo et al., 2020).

Στο Σχήμα 2.4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι φυσικές και ανθρωπογενείς πηγές του εξασθενούς χρωμίου στο περιβάλλον.

Πίνακας 2.2 Χρήσεις χρωμίου και ενώσεις του στη βιομηχανία (Mishra & Bharagava, 2016b).

Χρήση	Χημικές ενώσεις
Χρωστικές για βαφές, μελάνια και πλαστικά	Χρωμικό βάριο (BaCrO_4), Χρωμικό ασβέστιο (CaCrO_4), Χρωμικός μόλυβδος (PbCrO_4), Χρωμικός ψευδάργυρος (ZnCrO_4), Διχρωμικό κάλιο ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Χρωμικό νάτριο (CrNa_2O_4)
Χαλυβουργεία	Χρωμικό κάλιο (KCrO_4), Χρωμικό νάτριο (CrNa_2O_4), Διχρωμικό αμμώνιο $[(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7]$, Διχρωμικό κάλιο ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)
Επεξεργασία δερμάτινων προϊόντων	Διχρωμικό αμμώνιο $[(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7]$, Χρωμικός μόλυβδος (PbCrO_4)
Συντηρητικά ξύλου	Τριοξείδιο του χρωμίου (CrO_3)
Καταλύτες	Καρβονύλιο του χρωμίου $[\text{Cr}(\text{CO})_6]$, Θεϊκό τρισθενές χρώμιο $[\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x(\text{H}_2\text{O})]$
Αντιδιαβρωτική (chrome, spray coatings)	Χρωμικό βάριο (BaCrO_4), Χρωμικό ασβέστιο (CaCrO_4), Χρωμικός ψευδάργυρος (ZnCrO_4), Χρωμικό στρόντιο (SrCrO_4), Χρωμικό νάτριο (CrNaO_4)



Σχήμα 2.4 Συνοπτική παρουσίαση κύριων πηγών Cr(VI) στο περιβάλλον.

2.3 Επιπτώσεις του χρωμίου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 2.1, το χρώμιο Cr εμφανίζεται σε διάφορες οξειδωτικές καταστάσεις. Οι πιο σταθερές μορφές είναι η τρισθενής (Cr^{3+}) και η εξασθενής (Cr^{6+}) μορφή, οι οποίες έχουν διαφορετικά χημικά χαρακτηριστικά και συνεπώς, επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στους έμβιους οργανισμούς.

Το Cr(III) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ορισμένες μεταβολικές διεργασίες στα ζώα και στον άνθρωπο και αποτελεί συστατικό πολλών πολυβιταμινών και συμπληρωμάτων διατροφής, αλλά και τροφίμων (Shanker, 2019). Στις ενώσεις του Cr(III) που χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής περιλαμβάνονται ενώσεις, όπως $\text{Cr}(\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2)_3$ (chromium picolinate) και $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{CrN}_9\text{O}_6$ (chromium histidinate) (DesMarias & Costa, 2019). Έχει αποδειχτεί σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες ότι το Cr(III) διαπερνά τη μεμβράνη των κυττάρων δύσκολα. Παρ'όλα αυτά δύναται, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, να εισέλθει στα ανθρώπινα κύτταρα μέσω φαγοκυτταρικών μηχανισμών ή μέσω μη ειδικών μηχανισμών διάχυσης, αφού σχηματίζει σύμπλοκες ενώσεις με μικρά συνδεδετικά μόρια (ligands) (Ray, 2016). Ως ιχνοστοιχείο, φαίνεται ότι έχει θετική επίδραση στη διατήρηση και τη μείωση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα, μειώνει τα επίπεδα χοληστερίνης ελέγχοντας τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (Low-Density Lipoproteins, LDLs) και έχει θετική επίδραση στη μείωση των φλεγμονών στον οργανισμό. Επιπλέον, το Cr(III) φαίνεται ότι βοηθάει και στην αύξηση της μυϊκής μάζας (Asbaghi et al., 2020; Morvaridzadeh et al., 2022; Sheikhhossein et al., 2020; Tao, 2019; Zhang et al., 2021). Ωστόσο τα αποτελέσματα των ερευνών σχετικά με την επίδραση του Cr(III) στον ανθρώπινο οργανισμό δεν καταλήγουν σε κάποιο ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με την αναγκαιότητα πρόσληψης του, καθώς και την συνιστώμενη ημερήσια δόση του (Morvaridzadeh et al., 2022), με κάποιες *in vitro* μελέτες να υποστηρίζουν πιθανή τοξικότητα του σε υψηλές συγκεντρώσεις (Herburn et al., 2003). Σύμφωνα με διάφορους φορείς σχετικούς με την προστασία της ανθρώπινης υγείας, η επαρκής πρόσληψη Cr(III) ορίζεται στα 25 $\mu\text{g}/\text{ημέρα}$ για τις γυναίκες και στα 35 $\mu\text{g}/\text{ημέρα}$ για τους άνδρες (National Academy of Sciences), η εκτιμώμενη ασφαλή ημερήσια δόση στα 50-200 mg/L (FDA), ενώ η δόση αναφοράς στα 1.47 mg/kg (USEPA) (Monga et al., 2022; Trumbo et al., 2001). Όμως η πρόσληψη μέσω της τροφής μπορεί να φτάσει και ακόμα και να ξεπεράσει

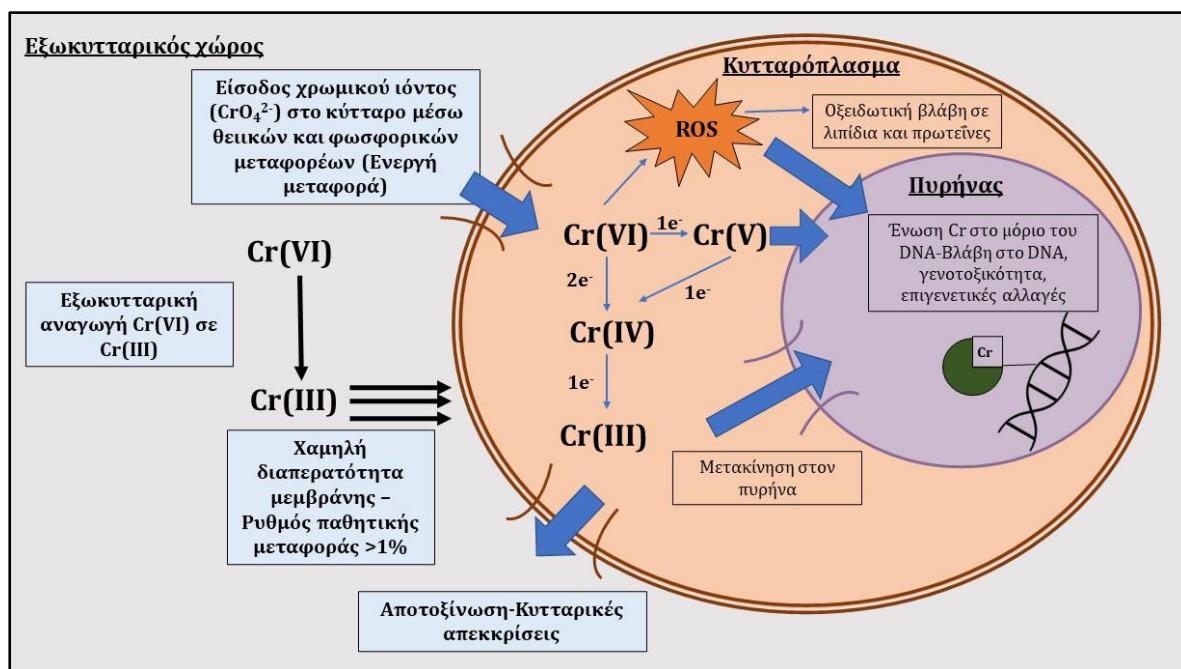
αυτά τα όρια (Alvarez et al., 2021). Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το Cr(III) δεν είναι ιδιαίτερα τοξικό για τον άνθρωπο, ωστόσο υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με την αναγκαιότητα χορήγησής του ως συμπλήρωμα διατροφής.

Αντιθέτως, το εξασθενές χρώμιο είναι μια άκρως τοξική ουσία που μπορεί άμεσα ή έμμεσα να προκαλέσει σημαντικές βλάβες στους έμβιους οργανισμούς. Είναι εξαιρετικά διαλυτή και λόγω της δομικής της ομοιότητας με το θειικό (SO_4^{2-}) και το φωσφορικό ιόν (PO_4^{2-}) έχει την ικανότητα να εισέρχεται στα κύτταρα μέσω των οδών εισόδου αυτών των ιόντων. Αυτή η ενεργή μεταφορά μέσω των προαναφερθέντων οδών έχει αποδειχθεί σε κύτταρα του μύκητα *Neurospora crassa* (Saha et al., 2011). Μετά την είσοδο του στα κύτταρα, το εξασθενές χρώμιο ανάγεται στα ασταθή Cr(V) και Cr(IV), έως ότου καταλήξει στη σταθερή μορφή του τρισθενούς χρωμίου. Σημειώνεται ότι ένα ποσοστό από τις ενδιάμεσες ασταθείς μορφές του Cr μπορεί να προσδεθεί σε ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, όπως η αιμογλοβίνη. Το σύμπλοκο χρωμίου-αιμογλοβίνης είναι πολύ σταθερό και παραμένει στο εσωτερικό του κυττάρου καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του (Ray, 2016).

Στην ενδοκυτταρική αναγωγή του Cr(VI) συμμετέχουν ενζυματικά και μη-ενζυματικά αντιοξειδωτικά, όπως το κυτόχρωμα P450, μιτοχονδριακά σύμπλοκα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το ασκορβικό οξύ (Asc), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και η κυστεΐνη (Cys) (Tumolo et al., 2020). Η αναγωγή του Cr(VI) από αυτές τις ουσίες περιλαμβάνει τη μεταφορά ενός ή δύο ηλεκτρονίων και οδηγεί στη γένεση ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS), συμπεριλαμβανομένων O , O_2^- , H_2O_2 και OH , που ενώνονται εύκολα με σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών (Joutey et al., 2015). Συνεπώς, φαίνεται ότι το Cr(VI) δεν είναι άμεσα υπεύθυνο για την γενετοξικότητα που συνδέεται με την παρουσία του (θραύση αλυσίδων, τροποποίηση βάσεων), καθώς δεν αλληλοεπιδρά άμεσα με το DNA, αλλά συνδέεται με την εσωκυτταρική του αναγωγή σε Cr(III) μέσω της δημιουργίας ενδιάμεσων προϊόντων με υψηλή αντιδραστικότητα. Οι βλάβες κατηγοριοποιούνται σε δύο (2) βασικές ομάδες: i) οξειδωτική βλάβη στο DNA λόγω ROS και ii) βλάβες λόγω σύμπλοκων Cr(III)-DNA (Sobol & Schiestl, 2012). Το εσωκυτταρικό Cr(III) αλληλοεπιδρά ηλεκτροστατικά με φωσφορικές ομάδες του DNA, επηρεάζοντας δυνητικά την αντιγραφή, τη μεταγραφή και προκαλώντας μεταλλαξιγένεση. Επιπλέον, το Cr(III) παρεμβαίνει στην αντιγραφή του DNA παράγοντας

αυξημένο αριθμό μεταγραφικών σφαλμάτων στο DNA του κυττάρου. Ακόμη, μπορεί να αλλάξει τη δομή και τη δραστηριότητα ενζύμων αντιδρώντας με τις καρβοξυλικές και θειολικές τους ομάδες (Cervantes et al., 2001). Σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις το Cr(III) αντιδρά και με οργανικές ενώσεις, εμποδίζοντας τη δράση μεταλλοενζύμων και προκαλώντας διάφορα προβλήματα υγείας, όπως καρκίνο στους πνευμόνων, και βλάβες στο αναπαραγωγικό σύστημα (Fernández et al., 2018). Στο Σχήμα 2.5 συνοψίζονται οι μηχανισμοί εισόδου του Cr(VI) σε ζώντα κύτταρα, καθώς και οι επιπτώσεις του σε αυτά.

Στους φυτικούς οργανισμούς το Cr(VI) μπορεί να προκαλέσει σειρά από δυσμενείς μορφολογικές και βιοχημικές αλλαγές. Τα φυτά προσλαμβάνουν το Cr(VI) από τις ρίζες μέσω μιας οδού που απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας και διευκολύνεται από την παρουσία οργανικών οξέων, ενώ βιοσυσσωρεύεται κυρίως στις ρίζες των φυτών. Υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου στο έδαφος και το νερό οδηγούν σε μειωμένη πρόσληψη απαραίτητων για τη σωστή λειτουργία του φυτού ιόντων, καθώς και σε διαταραχές σε αντιοξειδωτικά ένζυμα και αμινοξέα, όπως υπεροξειδική δισμουτάση (Superoxide dismutase, SOD), καταλάση (Catalase, CAT), ασκορβική υπεροξειδάση (Ascorbate peroxidase, APX), ρεντουκτάση της γλουταθειόνης (Glutathione reductase, GR) και καρνοσίνη (Carnosine, CAR) (Stambulska et al., 2018). Οι διαταραχές σε αντιοξειδωτικά οδηγούν στην παραγωγή ενώσεων οξυγόνου που έχουν ως αποτέλεσμα βλάβες στο DNA και στην έκφραση γονιδίων, απενεργοποίηση ορισμένων ενζύμων και αλλοιώσεις σε πρωτεΐνες, μειωμένη σύνθεση χρωστικών ουσιών και συνεπώς, ελάττωση της φωτοσυνθετικής ικανότητας του φυτού, οξείδωση στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης με συνέπεια τη φθορά της, αναχαίτιση της φυσιολογικής ανάπτυξης του φυτού, λόγω καταστολής της κυτταρικής διαίρεσης και νέκρωσης κυττάρων, καθώς και μεταλλαξιογενέσεις (Karpur et al., 2022; Oliveira, 2012).



Σχήμα 2.5 Μηχανισμοί εισόδου Cr(VI) σε κύτταρα οργανισμών και γενotoxicότητα (Προσαρμογή από DesMarias and Costa, 2019 και Tumolo et al., 2020).

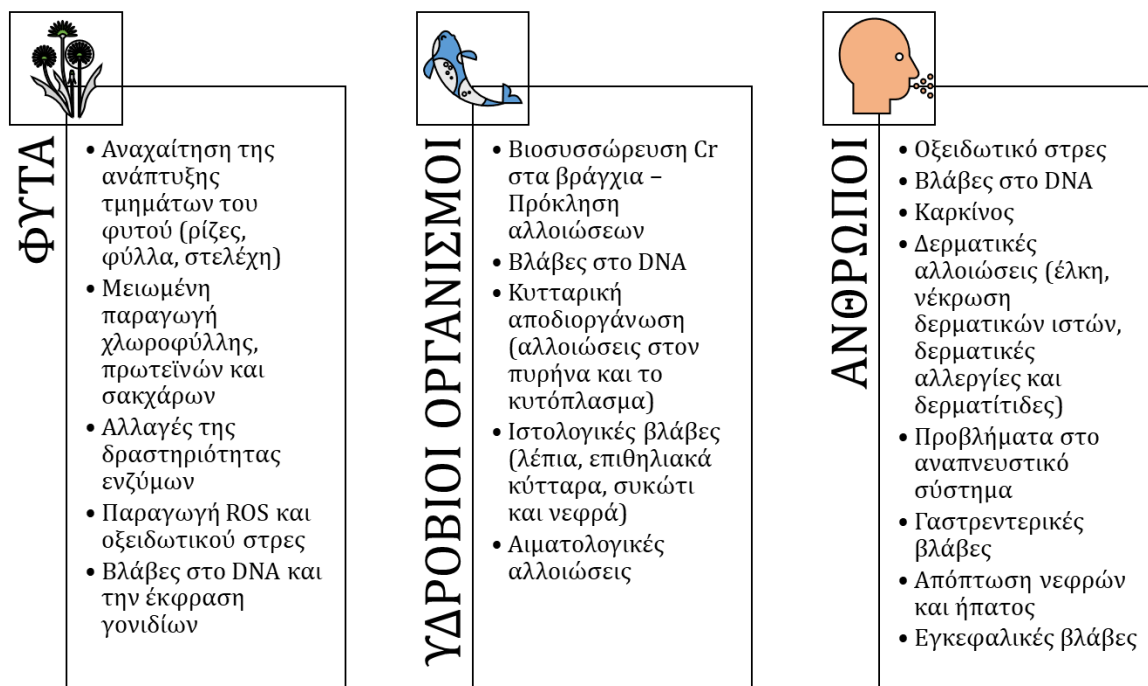
Επιπροσθέτως, το Cr(VI) είναι μια ουσία που παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα στα υδατικά οικοσυστήματα και βιοσυσσωρεύεται στα άλγη, στα υδρόβια φυτά, στους ασπόνδυλους οργανισμούς και τα ψάρια, προκαλώντας αρνητικές συνέπειες στην ανάπτυξη τους. Η πρόσληψή του επηρεάζεται από το είδος του υδρόβιου οργανισμού, το μέγεθος του, το στάδιο ανάπτυξης του, καθώς και τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος, όπως το pH, η αλατότητα, η αλκαλικότητα, η θερμοκρασία και άλλοι ρύποι (Prasad et al., 2021). Στα ψάρια, το Cr(VI) εισέρχεται συνήθως από τα βράγχια, προκαλώντας ιστολογικές και αιματολογικές βλάβες (αλλοιώσεις στα βράγχια, συκώτι, νεφρά, λέπια και επιθηλιακά κύτταρα, μείωση στα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης), καθώς και βλάβες στο DNA (Bakshi & Panigrahi, 2018).

Οι άνθρωποι εκτίθενται στο χρώμιο μέσω τριών (3) βασικών οδών: κατάποσης μολυσμένου νερού και τροφίμων, δερματικής επαφής και εισπνοής σωματιδίων που περιέχουν χρώμιο (NIOSH, 2013). Οι δύο τελευταίες οδοί αφορούν κυρίως την έκθεση στο χώρο της εργασίας. Η απορρόφηση του χρωμίου από τον ανθρώπινο οργανισμό επηρεάζεται κυρίως από την οξειδωτική κατάσταση του μετάλλου και από τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της ένωσης,

με τις ενώσεις του Cr(VI) να διαπερνούν το δέρμα πιο εύκολα σε σχέση με αυτές που περιέχουν Cr(III) (Iyer et al., 2006). Ανάλογα με τη διάρκεια της έκθεσης στο Cr(VI), αυτή μπορεί να χαρακτηριστεί ως οξεία (14 ημέρες), μέση (75-364 ημέρες) και χρόνια (365 ή περισσότερες ημέρες) (Sjekhawati, 2015) και προκαλεί αντίστοιχα διαφορετικές επιπτώσεις.

Στις επιπτώσεις μετά από σύντομη έκθεση σε Cr(VI) έχουν καταγραφεί εμετός, διάρροια, έντονη αιμορραγία και απώλεια αίματος στον γαστρεντερικό σωλήνα, που μπορεί να οδηγήσει σε καρδιαγγειακό σοκ (καταπληξία), δερματικές αλλεργίες και δερματίτιδες και φλεγμονή της ρινικής μεμβράνης (Iyer et al., 2006). Χρόνια έκθεση σε εξασθενές χρώμιο δια της αναπνευστικής οδού έχει ως επιπτώσεις διάτρηση του ρινικού διαφράγματος, διάτρηση και εξέλκωση του διαφράγματος, χρόνιες παθήσεις των πνευμόνων, όπως βρογχίτιδα, ρινίτιδα, άσθμα και χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, φλεγμονή του λάρυγγα, και αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου των πνευμόνων, εγκεφαλικών βλαβών ή/και εγκεφαλοπάθειας (Alvarez et al., 2021; Iyer et al., 2006; Saha et al., 2011). Η ανάπτυξη καρκίνου συνδέεται άμεσα με την παρουσία του Cr(V) (ως προϊόν της αναγωγής του Cr(VI)), το οποίο είναι γνωστό καρκινογόνο που προσκολλάται στους ιστούς δημιουργώντας καρκινικούς όγκους (DesMarias & Costa, 2019; Saha et al., 2011). Παράλληλα, η χρόνια έκθεση σε υψηλά επίπεδα είτε μέσω της αναπνευστικής είτε της γαστρεντερικής οδού επιδρά δυσμενώς στο ήπαρ, τα νεφρά, το γαστρεντερικό και το ανοσοποιητικό σύστημα, και πιθανώς στο αίμα. Όσον αφορά το δέρμα, το εξασθενές χρώμιο μπορεί να προκαλέσει έλκη και νέκρωση των δερματικών ιστών. Η είσοδος του χρωμίου στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της δερματικής οδού (απορρόφηση) διευκολύνεται από προϋπάρχουσες πληγές στο δέρμα ή δερματίτιδες, καθώς και από το pH της ουσίας που περιέχει το Cr(VI) (Monga et al., 2022). Σημειώνεται επίσης ότι με τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι στιγμής δεν είναι σαφείς οι πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη γονιμότητα ή την προγεννητική ανάπτυξη (Hessel et al., 2021).

Στο Σχήμα 2.6 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι πιθανές αρνητικές επιπτώσεις της πρόσληψης χρωμίου στα φυτά, τους υδρόβιους οργανισμούς και τους ανθρώπους.



Σχήμα 2.6 Συγκεντρωτική παρουσίαση των επιπτώσεων πρόσληψης Cr (κυρίως Cr(VI)) στα φυτά, τους υδρόβιους οργανισμούς και τον άνθρωπο.

2.4 Νομοθετικό πλαίσιο

Η εκτεταμένη βιομηχανική χρήση του χρωμίου και οι δυσμενείς επιπτώσεις του στην ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον, επιβάλλουν τη θέσπιση κανονισμών για την προστασία τους. Στις επόμενες παραγράφους γίνεται παρουσίαση της νομοθεσίας σε παγκόσμιο επίπεδο σχετικά με τα επιτρεπόμενα όρια ολικού, τρισθενούς και εξασθενούς χρωμίου στα υδάτινα σώματα, με έμφαση στη νομοθεσία της Ελλάδας.

2.4.1 Παγκόσμιοι οργανισμοί

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), έχοντας ως στόχο την προστασία της δημόσιας υγείας, ήδη από τη δεκαετία του '50 και λαμβάνοντας υπόψη ιατρικές μελέτες, συστήνει ως μέγιστη τιμή Cr(VI) στο πόσιμο νερό τα 0.05 mg/L. Ωστόσο, λόγω περιορισμών στις

αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού της συγκέντρωσης Cr, καθώς και της ύπαρξης διαφορετικών οξειδωτικών καταστάσεων του μετάλλου στο υδάτινο περιβάλλον, όρισε τελικά ως οριακή τιμή για το ολικό χρώμιο στο πόσιμο νερό τα 50 µg/L (World Health Organization, 2020).

2.4.2 Ευρώπη και Ευρωπαϊκή Ένωση

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, έχει εκδοθεί ένας σημαντικός αριθμός κανονισμών που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τα όρια εκπομπής του χρωμίου στο περιβάλλον. Η ΟΔΗΓΙΑ 98/83/ΕΚ (Ευρωπαϊκό Συμβούλιο, 1998) ορίζει ως ανώτατο όριο ολικού χρωμίου στο πόσιμο νερό τα 50 µg/L. Η παραμετρική αυτή τιμή θα παραμείνει σε ισχύ μέχρι τις 12 Ιανουαρίου 2036, όπου το όριο μεταβάλλεται υποχρεωτικά στα 25 µg/L, σύμφωνα με την Οδηγία (ΕΕ) 2020/2184. Ωστόσο, δεν έχουν καθοριστεί ακόμα ενιαία όρια που να αφορούν τις εκπομπές Cr(III) και Cr(VI) στα ύδατα, εκτός από την υποχρέωση να αναφέρονται περιπτώσεις όπου η συγκέντρωση του ολικού χρωμίου σε λύματα οποιασδήποτε βιομηχανίας που απορρίπτονται σε υδάτινους αποδέκτες ξεπερνά τα 50 kg/έτος (Απόφαση 2000/479/ΕΚ) (Ευρωπαϊκή Επιτροπή, 2000). Κάθε χώρα έχει ορίσει τα δικά της όρια για τις εκπομπές χρωμίου ανάλογα με τον υδάτινο αποδέκτη, οι οποίες κυμαίνονται από 0.05-2 mg/L για το Cr(VI) και φτάνουν τα 5 mg/L για το ολικό χρώμιο (Tumolo et al., 2020; Vaioroulou & Gikas, 2020). Αξίζει να προστεθεί ότι στην Ιταλία έχει θεσπιστεί ως μέγιστο όριο στο πόσιμο νερό για το Cr(VI) τα 5 µg/L (Chrysochoou et al., 2016), όριο αρκετά πιο αυστηρό από αυτό που ορίζεται από τη νομοθεσία της ΕΕ.

2.4.2.1 Ελλάδα

Η νομοθεσία της Ελλάδας (ΚΥΑ Γ1(δ)/ ΓΠ οικ.67322/2017) που ορίζει τη συγκέντρωση του ολικού χρωμίου στο νερό που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση συμπίπτει με την αντίστοιχη των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (50 µg/L). Επιπροσθέτως, στην ίδια ΚΥΑ, ορίζεται και η συχνότητα παρακολούθησης του χρωμίου στο πόσιμο νερό, η οποία είναι 5 αναλύσεις ανά έτος, για ημερήσια παραγωγή ή διανομή νερού όγκου 8,000-10,000 m³. Στην Ελλάδα, με σκοπό την υποβοήθηση του προσδιορισμού της οικολογικής κατάστασης, έχουν

καθοριστεί τα Πρότυπα Ποιότητας Περιβάλλοντος (ΠΠΠ) των συγκεντρώσεων ορισμένων ρύπων και ουσιών προτεραιότητας στα συστήματα επιφανειακών υδάτων. Ο όρος επιφανειακά ύδατα αναφέρεται σε ποταμούς και λίμνες και τα συναφή τεχνητά ή ιδιαίτερος τροποποιημένα υδατικά συστήματα (ΚΥΑ 51354/2641/Ε103/2010-ΦΕΚ 1909/Β/8.12.2010). Με βάση την ΚΥΑ για τα επιφανειακά νερά, η μέση ετήσια ανώτατη επιτρεπτή τιμή για το Cr(VI) είναι 3 μg/L και για το ολικό Cr κυμαίνεται μεταξύ 23 – 50 μg/l ανάλογα με την περιεκτικότητα του νερού σε ανθρακικό ασβέστιο. Στα υπόγεια νερά τα προτεινόμενα όρια είναι για το ολικό χρώμιο στα 50 μg/L, όπως και στο πόσιμο νερό, χωρίς να γίνεται διαχωρισμός μεταξύ ολικού και εξασθενούς χρωμίου (Υ.Α. οικ. 1811/2011). Προκειμένου να επιτευχθούν τα όρια εκπομπών χρωμίου στο περιβάλλον, έχουν θεσπιστεί όρια για την επιτρεπόμενη συγκέντρωση χρωμίου στα βιομηχανικά απόβλητα. Οι μέσες επιτρεπόμενες τιμές χρωμίου στα βιομηχανικά απόβλητα, ανάλογα με τον τύπο του αποδέκτη, παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3 (ΚΥΑ 145116/02-02-2011). Μέγιστη συγκέντρωση χρωμίου έχει θεσπιστεί και για την επαναχρησιμοποίηση υγρών αποβλήτων. Το όριο της μέγιστης συγκέντρωσης ολικού χρωμίου σε λύματα προς επαναχρησιμοποίηση έχει οριστεί στα 0.1 mg/L (ΦΕΚ 354/Β' 8.3.2011).

Πίνακας 2.3 Όρια αναφοράς χρωμίου στην Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελλάδα.

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ-ΧΩΡΑ	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ -ΟΔΗΓΙΑ	ΠΕΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΟΡΙΑ
Ευρωπαϊκή Ένωση	ΟΔΗΓΙΑ (ΕΕ) 2020/2184	Πόσιμο νερό	25 μg/L για το ολικό χρώμιο
	ΚΥΑ Γ1(δ)/ ΓΠ οικ.67322/2017	Πόσιμο νερό	50 μg/L για το ολικό χρώμιο
	Απόφαση 2000/479/ΕΚ	Όριο απόρριψης χρωμίου στα ύδατα	50 kg/έτος
Ελλάδα	ΚΥΑ 51354/2641/Ε103 /2010	Πρότυπα Ποιότητας Περιβάλλοντος για τα εσωτερικά επιφανειακά ύδατα	Μέση ετήσια συγκέντρωση Cr(VI)= 3 μg/L Ολικό Cr 23 (<40 mgCaCO ₃ /L) 42 (40-50 mgCaCO ₃ /L) 50(>50 mgCaCO ₃ /L)

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ-ΧΩΡΑ	ΚΥΑ-ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ-ΟΔΗΓΙΑ	ΠΕΛΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	ΟΡΙΑ
Ελλάδα	ΚΥΑ 4859/726 (ΦΕΚ 253/9.3.2001)	Πρότυπα αποβολής βιομηχανικών αποβλήτων σε λίμνες, ποτάμια και παράκτια ύδατα (για το ολικό Cr)	Λίμνες: 0.6 mg/L-μήνας
			1.2 mg/L-ημέρα
			Ποτάμια: 1.0 mg/L-μήνας
			2.0 mg/L-ημέρα
			Παράκτια ύδατα: 1.5 mg/L-μήνας
			3.0 mg/L-ημέρα
	ΚΥΑ 50388/2704/Ε103/2003 (ΦΕΚ 1866/Β/03)	Ποιοτικός στόχος για τα επιφανειακά νερά	<50 μg/L για το ολικό Cr
	Υ.Α. οικ. 1811/2011 (ΦΕΚ 3322/Β' 30.12.2011)	Ανώτερες αποδεκτές τιμές σε υπόγεια ύδατα	50 μg/L για το ολικό χρώμιο
	ΚΥΑ 145116/02-02-2011 (ΦΕΚ Β' 354/2011)	Επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων	0.1 mg/L για το ολικό Cr

2.4.3 Αμερική

Στις ΗΠΑ, ο Οργανισμός Προστασίας Περιβάλλοντος των Ηνωμένων Πολιτειών (U.S. EPA, 2003) και η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έχουν θεσπίσει ως ανώτατο όριο για το ολικό χρώμιο στο πόσιμο νερό τα 100 μg/L. Στην πολιτεία της Καλιφόρνια, τα όρια χρωμίου είναι αρκετά πιο αυστηρά. Η Υπηρεσία Δημόσιας Υγείας της Καλιφόρνια (CDPH), όρισε ως ανώτερο όριο για το ολικό χρώμιο το 1977 συγκέντρωση 50 μg/L και το 2014 ως ανώτατο όριο για το εξασθενές χρώμιο στο πόσιμο νερό τα 10 μg/L. Ωστόσο, το όριο για το Cr(VI) καταργήθηκε το 2017 (California Water Boards, 2022). Παρόλα αυτά, συνεχίζεται σε εθνικό επίπεδο η συζήτηση για την αυστηροποίηση των ορίων για την προστασία της δημόσιας υγείας (Homan et al., 2018), με την πολιτεία της Βόρειας Καρολίνας να έχει θέσει ως όριο τα 10 μg/L για το Cr(VI) και ως συστηνόμενο επίπεδο τα 7 μg/L (Guo et al., 2020).

Ο Καναδάς ακολουθεί τη σύσταση του ΠΟΥ για τη συγκέντρωση ολικού χρωμίου στο πόσιμο νερό (50 µg/L), ενώ παράλληλα γίνεται διευκρίνηση ότι το όριο αυτό αφορά την προστασία της ανθρώπινης υγείας από τις δυσμενείς επιπτώσεις του Cr(VI) (Reid, 2017).

Στο Μεξικό, το θεσπισμένο όριο για την απόρριψη λυμάτων που περιέχουν εξασθενές χρώμιο σε υδάτινα σώματα είναι 0.5 mg/L (Norma Oficial Mexicana, 1998), ενώ στη Χιλή, η συγκέντρωση μεταβάλλεται ανάλογα με τον υδάτινο αποδέκτη (0.05 - 0.2 mg/L) (Chilean Ministry of Public Works, 1998). Στη Βραζιλία (0.1 mg Cr(VI)/L και 1.0 mg Cr(III)/L) και την Αργεντινή (0.2 mg Cr(VI)/L και 2.0 mg Cr(III)/L), τα όρια απόρριψης έχουν οριστεί με βάση το είδος του χρωμίου. Επιπλέον, όσον αφορά το πόσιμο νερό, η Αργεντινή ακολουθεί τη σύσταση του ΠΟΥ (Vaioroulou & Gikas, 2020).

2.4.4 Υπόλοιπες ήπειροι (Ασία, Αφρική, Ωκεανία)

Στην Ασία δεν υπάρχει κοινός κανονισμός για τα επιτρεπόμενα επίπεδα χρωμίου στα ύδατα. Ωστόσο, οι περισσότερες χώρες ακολουθούν τους διεθνείς κανονισμούς, όπως η Σιγκαπούρη που ακολουθεί τη σύσταση του ΠΟΥ για το πόσιμο νερό (ολικό Cr = 0.05 mg/L) (Singapore Drinking Water Quality, 2019). Όσον αφορά τη συγκέντρωση του εξασθενούς χρωμίου στα υπόγεια ύδατα, το όριο στην Ιαπωνία άλλαξε τον Οκτώβριο του 2021 από 0.05 mg/L σε 0.02 mg/L (Υπουργείο Περιβάλλοντος της Ιαπωνίας, 2021).

Στη Νότια Αφρική το όριο για το εξασθενές χρώμιο στο πόσιμο νερό είναι 0.05 mg/L (ICDA, 2007). Στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία η συγκέντρωση ολικού Cr στο πόσιμο νερό δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 50 µg/L, ενώ σε περίπτωση που είναι μεγαλύτερη, πρέπει να ελέγχεται η συγκέντρωση του Cr(VI), που επίσης πρέπει να είναι μικρότερη από 50 µg/L (Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality, 2000).

2.5 Μέθοδοι αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου και τεχνολογίες αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών

2.5.1 Εισαγωγή

Τα υπόγεια ύδατα αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες και πιο σημαντικές πηγές γλυκού νερού, ωστόσο η ταχεία εκβιομηχάνιση και αστικοποίηση έχουν οδηγήσει σε αυξημένη ρύπανσή τους (Mahlknecht & Mora, 2022). Στην Ευρώπη, έχει υπολογιστεί ότι υπάρχουν 0.5 εκατομμύρια ρυπασμένοι χώροι (υπόγεια ύδατα και έδαφος) και 3.5 εκατομμύρια δυνητικά ρυπασμένοι (Majone et al., 2015), ενώ στην Κίνα, το 90% των υπογείων υδάτων είναι ρυπασμένα, με το 60% αυτών να χαρακτηρίζεται ως εξαιρετικά ρυπασμένα (Wang et al., 2022). Ένας από τους πιο διαδεδομένους ρύπους είναι και το Cr(VI), το οποίο, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι άκρως τοξικό και καρκινογόνο στην εισπνοή και συναντάται στο υδάτινο περιβάλλον σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από τα επιτρεπόμενα όρια για την ασφάλεια της ανθρώπινης υγείας. Για παράδειγμα, στις ΗΠΑ υπάρχουν περίπου 1,300 καταγεγραμμένες ρυπασμένες με Cr(VI) περιοχές (Fruchter, 2002). Η εκτεταμένη ρύπανση των υπογείων υδάτων αποτελεί εν μέρει και συνέπεια της υποτίμησης της ρύπανσης για δεκαετίες και αντιμετώπισής της με υστέρηση, καθώς και της θέσπισης διεθνούς νομοθεσίας με ολιγωρία (Mahlknecht & Mora, 2022; Πανταζίδου, 2019).

Η επιλογή της τεχνολογίας εξυγίανσης ρυπασμένων χώρων αποτελεί συνιστώσα αρκετών παραγόντων, όπως το είδος του ρύπου, το εύρος της ρύπανσης, τη γεωλογία της περιοχής αποκατάστασης, τις περιβαλλοντικές συνθήκες (πχ. pH, θερμοκρασία, κλπ.), τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες και την παρουσία άλλων ρύπων (Majone et al., 2015), και αποσκοπεί σε έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους στόχους (Πανταζίδου, 2019): i) τη μείωση συγκέντρωσης του ρύπου σε νομοθετημένα όρια, ii) τη μείωση μάζας του ρύπου και iii) τη μείωση πιθανότητας εμφάνισης αρνητικής επίπτωσης (μείωση διακινδύνευσης).

Οι τεχνολογίες αποκατάστασης ανάλογα με το βαθμό επέμβασης κατηγοριοποιούνται στη φυσική εξασθένηση, σε αυτές που εγκιβωτίζουν/αδρανοποιούν το ρύπο και σε αυτές στις οποίες γίνεται επεξεργασία του ρυπασμένου μέσου. Παράλληλα, ανάλογα με το πεδίο

εφαρμογής της τεχνολογίας, κατηγοριοποιούνται σε μη-επιτόπιες (*ex situ*) και σε επιτόπιες (*in situ*) (Πανταζίδου, 2019). Η εφαρμογή μεθόδων απορρύπανσης *ex situ* περιλαμβάνει την απομάκρυνση του ρύπου - είτε με άντληση για ρυπασμένα υπόγεια ύδατα είτε με εκσκαφή για ρυπασμένο έδαφος - και την επεξεργασία τους στην επιφάνεια του εδάφους (Speight, 2020). Υπάρχουν διάφορες *ex situ* τεχνολογίες για την εξυγίανση ρυπασμένων υδάτων, ωστόσο για την απομάκρυνση του Cr(VI) η τεχνολογία που χρησιμοποιείται κυρίως είναι η μέθοδος του pump & treat (P&T). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, τα ρυπασμένα ύδατα αντλούνται από πηγάδια και ο ρύπος απομακρύνεται σε συστήματα στην επιφάνεια του εδάφους (US EPA, 2013). Ωστόσο, αν και έχει εφαρμοστεί σε πολλούς ρυπασμένους χώρους, τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι η μέθοδος είναι αποτελεσματική στα αρχικά στάδια της εφαρμογής, αλλά η απόδοσή της μειώνεται με την πάροδο του χρόνου (Speight, 2020).

Αντίθετα, στις *in situ* μεθόδους, η επεξεργασία του ρυπασμένου μέσου (ύδατα ή έδαφος) πραγματοποιείται επιτόπου (Fruchter, 2002). Οι επιτόπιες μέθοδοι αναπτύχθηκαν κυρίως ως εναλλακτικές μέθοδοι στα μέσα της δεκαετίας του 1980, λόγω της χαμηλής απόδοσης των P&T συστημάτων (US EPA, 2000). Χαρακτηριστικό των τεχνολογιών αυτών είναι ότι προκαλούν μικρότερη διατάραξη του χώρου αποκατάστασης, είναι περισσότερο προσανατολισμένες στην εξάλειψη του ρύπου και έχουν μικρότερες απαιτήσεις σε ενέργεια, γεγονός που τις καθιστά πιο οικονομικά συμφέρουσες και βιώσιμες (Majone et al., 2015). Γι' αυτούς τους λόγους, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αυξανόμενη τάση στην επιλογή *in situ* μεθόδων αποκατάστασης (Majone et al., 2015; US EPA, 2013). Στις επιτόπιες τεχνολογίες που εφαρμόζονται για την αποκατάσταση ρυπασμένων με Cr(VI) ανήκουν η γεωχημική σταθεροποίηση (Geochemical Fixation), η φυσική εξασθένηση (Natural Attenuation), η βιοαποκατάσταση (Bioremediation), τα ενεργά διαπερατά διαφράγματα (Permeable Reactive Barriers, PRBs) και η έκπλυση εδάφους (Soil Washing) (US EPA, 2013).

Επιπλέον, οι μέθοδοι εξυγίανσης διακρίνονται, σύμφωνα με τον μηχανισμό αναγωγής του Cr(VI), σε δύο κύριες κατηγορίες, τις φυσικοχημικές και τις βιολογικές. Στις φυσικοχημικές ανήκουν μέθοδοι, όπως η χημική αναγωγή, η ιοντοανταλλαγή, η προσρόφηση και η χρήση μεμβρανών, ενώ οι βιολογικές περιλαμβάνουν τη χρήση φυτών και μικροοργανισμών για τον καθαρισμό της ρυπασμένης περιοχής (Barrera-Díaz et al., 2012; Kurniawan et al., 2006).

Σημειώνεται ότι οι τεχνολογίες αποκατάστασης που αναπτύχθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο μπορεί να συνδυάζουν παραπάνω από έναν από τους μηχανισμούς αναγωγής του Cr(VI). Για παράδειγμα, τα PRBs μπορεί να περιέχουν ανόργανα υλικά, όπως σίδηρο, αλλά και υλικά οργανικής προέλευσης (US EPA, 2000).

Στον Πίνακα 2.4 παρουσιάζονται συνοπτικά οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μέθοδοι απορρύπανσης ρυπασμένων υδάτων και περιγράφονται αναλυτικότερα στις επόμενες ενότητες του κεφαλαίου.

Πίνακας 2.4 Συνοπτική παρουσίαση μεθόδων εξυγίανσης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με Cr(VI).

Μηχανισμός απορρύπανσης	Μέθοδος απορρύπανσης	Τοποθεσία απορρύπανσης		Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα	Αναφορές
		<i>in situ</i>	<i>ex situ</i>			
Φυσικοχημικές	Χημική αναγωγή και κατακρήμνιση	x	x	Απλή και αποτελεσματική μέθοδος	Παραγωγή τοξικής ιλύος	(Fu et al., 2021; Krishna & Philip, 2005)
	Φωτοκατάλυση		x	Μικρή κατανάλωση χημικών υλικών χωρίς την παραγωγή ιλύος, ταχεία απομάκρυνση του ρύπου	Ύπαρξη τεχνικών περιορισμών για την εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα, υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια, σχηματισμός παραπροϊόντων, απόδοση εξαρτώμενη από το pH	(Wang et al., 2016)
	Μεμβράνες		x	Απλή και γρήγορη λειτουργία, μικρός απαιτούμενος χώρος, υψηλή απόδοση, μεγάλη ποικιλία μεμβρανών, υψηλής ποιότητας επεξεργασμένα λύματα ή νερό	Υψηλό κόστος κεφαλαίου, συντήρησης και λειτουργίας, υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις, γρήγορη έμφραξη των πόρων της μεμβράνης	(Kaya et al., 2016; Wei et al., 2019)
	Ιοντοανταλλαγή		x	Οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος, που μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα σε	Κατάλληλη κυρίως για χαμηλές συγκεντρώσεις χρωμίου, η αποτελεσματικότητα της εξαρτάται από το	(Han et al., 2020)

Διερεύνηση της βιολογικής επί τόπου αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο

				συνδυασμό με άλλες μεθόδους	pH, προβλήματα έμφραξης των πόρων του υλικού	
	Προσρόφηση/Ρόφηση		x	Υψηλή απόδοση σε μεγάλο εύρος pH, απλή λειτουργία, γρήγορη κινητική απομάκρυνσης, μεγάλο εύρος υλικών	Σχετικά υψηλή επένδυση, απαίτηση για αναγέννηση του υλικού, ανάγκη για υβριδοποίηση του υλικού για βελτιστοποίηση της προσροφητικής του ικανότητας	(Rajapaksha et al., 2022)
	Ηλεκτροχημικές		x	Υψηλή απόδοση και προσαρμοστικότητα σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων ρύπου	Υψηλό κόστος επένδυσης, παραγωγή χημικής ύλης, απαίτηση για post treatment της εκροής και της παραγόμενης ύλης	(Jin et al., 2016; Kabdasli & Tünay, 2023)
Βιολογικές	Φυτοαποκατάσταση	x		Χαμηλό κόστος, περιβαλλοντικά φιλική	Κατάλληλη για μικρά βάθη και χαμηλές συγκεντρώσεις Cr(VI)	(Kafle et al., 2022; Patra et al., 2020)
	Μικροοργανισμοί	x	x	Απλή εφαρμογή, υψηλή απόδοση, συνήθως χαμηλό λειτουργικό κόστος, περιβαλλοντικά φιλική	Αργή μέθοδος, υψηλό αρχικό κόστος κεφαλαίου, παραγωγή βιολογικής ύλης και πιθανά προβλήματα με sludge bulking (σε <i>ex situ</i> εφαρμογές)	(Fernández et al., 2018; Jobby et al., 2018)

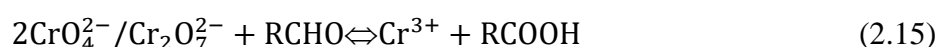
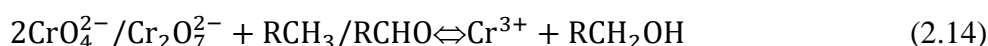
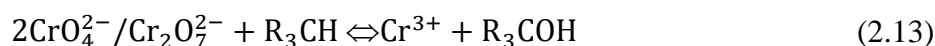
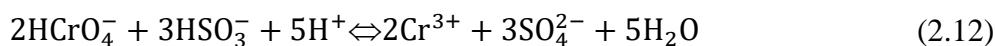
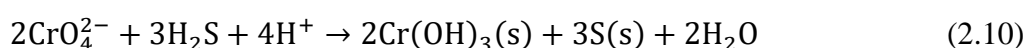
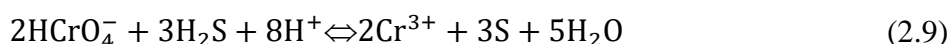
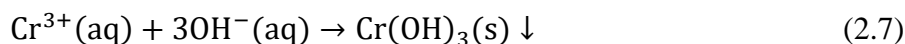
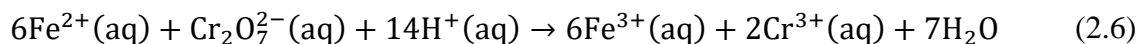
2.5.2 Φυσικοχημικές μέθοδοι

Στις παραγράφους 2.5.2.1-2.5.2.6 γίνεται παρουσίαση των βασικών και πιο συχνά χρησιμοποιούμενων μηχανισμών αποκατάστασης χώρων που έχουν ρυπανθεί με εξασθενές χρώμιο.

2.5.2.1 Χημική αναγωγή και κατακρήμνιση

Η χημική αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III) είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους απορρύπανσης υπόγειων υδροφορέων και εδαφών λόγω της υψηλής της προσαρμοστικότητας και αποδοτικότητας. Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως αναγωγικά μέσα μπορούν να χωριστούν σε τρεις (3) μεγάλες κατηγορίες. Στην 1^η κατηγορία ανήκουν ενώσεις που περιέχουν σίδηρο, είτε σε διαλυτή μορφή είτε ως ορυκτά που περιέχουν Fe(II). Στις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αναγωγικές ενώσεις περιλαμβάνονται: θειικός σίδηρος (FeSO₄) (Qin et al., 2005), χλωριούχος σίδηρος (FeCl₂) (Homan et al., 2018), στοιχειακός σίδηρος και νανοσίδηρος (Fang et al., 2021; Mystrioti et al., 2018), αιματίτης (Fe₂O₃) (Chen et al., 2022), μαγνητίτης (Fe²⁺Fe³⁺₂O₄) (Chang et al., 2021) και βιοτίτης [K(Mg,Fe)₃(AlSi₃)O₁₀(OH)₂] (Chon et al., 2006). Η αντίδραση του Cr(VI) με ενώσεις του σιδήρου οδηγεί στην παραγωγή σύμπλοκων ενώσεων με γενική μορφή Fe_(1-x)Cr_x(OH)₃, που έχουν την ικανότητα να καθιζάνουν (Papassiopi et al., 2014; Rai et al., 1989). Στη 2^η κατηγορία ανήκουν ενώσεις με βάση το θείο, όπως υδρόθειο (H₂S) (Kim et al., 2001), πολυθειούχο ασβέστιο (CaS₅,CPS) (Zhang et al., 2020), διθειονικό νάτριο (Na₂S₂O₄) (Telfeyan et al., 2021), θειούχος σίδηρος (FeS) (Patterson et al., 1997) και σιδηροπυρίτης (FeS₂) (Gheju & Balcu, 2011). Επιπλέον, ορισμένες ουσίες οργανικής προέλευσης (3^η κατηγορία) έχουν την ικανότητα να ανάγουν χημικά/αβιοτικά το Cr(VI). Η άμεση αυτή αναγωγή πραγματοποιείται κυρίως μέσω φαινολών (C₆H₅OH), υδροξυλίων (OH), θειολών (RSH), καρβοξυλίων (RCOOH) και αλδευδών (RCHO), οι οποίες είναι ομάδες πλούσιες σε ηλεκτρόνια που μπορούν να λειτουργήσουν ως δότες ηλεκτρονίων για την αναγωγή του Cr(VI) (Aldmour et al., 2019; Rivero-Huguet & Marshall, 2009; Yurkow et al., 2002). Στις ουσίες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγωγή του Cr περιλαμβάνονται η μεθανόλη (Headlam & Lay, 2001), η χέννα (Huang et al., 2016), η μελάσα σε όξινο pH (Yang et al., 2021), η κυστεΐνη (Rivero-Huguet & Marshall, 2009), η γλυκερόλη (Yurkow et al., 2002) και το ασκορβικό οξύ (Xu et al., 2004).

Στις εξισώσεις 2.6-2.15 παρουσιάζονται πιθανές εξισώσεις αναγωγής του Cr(VI) σε Cr(III) με τη χρήση διαφορετικών αναγωγικών μέσων που αναφέρθηκαν παραπάνω.



Η μέθοδος της χημικής αναγωγής έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την απορρύπανση/εξυγίανση υπογείων υδάτων (Fruchter et al., 2000; Istok et al., 1999; Puls et al., 1999). Ωστόσο, είναι μια ακριβή μέθοδος, καθώς περιλαμβάνει την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων αναγωγικού μέσου, ενώ παράλληλα επιβαρύνει σημαντικά το περιβάλλον, καθώς οδηγεί στη δημιουργία τοξικής ιλύος. Επίσης, κάποιες ουσίες είναι αναποτελεσματικές (Fe^{2+} και γλυκερόλη) σε αλκαλικά εδάφη (Xu et al., 2004). Επιπλέον, η μακροπρόθεσμη σταθερότητα της μεθόδου προκαλεί ανησυχία, αφού αλλαγές στη χημεία του εδάφους και του νερού μπορεί να δημιουργήσουν συνθήκες που να ευνοούν την επαναοξειδωση του Cr(III) σε Cr(VI) και άλλων τοξικών ουσιών και την απελευθέρωσή τους ξανά στο περιβάλλον (Moon et al., 2007; Chirwa & Molokwane, 2011; Pan & Giammar, 2020; Su & Ludwig, 2005; Varadharajan et al., 2017).

2.5.2.2 Φωτοκατάλυση

Η φωτοκατάλυση ανήκει στις προηγμένες διεργασίες οξειδωσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγωγή οργανικών και ανόργανων ουσιών, όπως το Cr(VI). Ορίζεται ως η προαγωγή μιας φωτοαντίδρασης παρουσία ενός καταλύτη, πραγματοποιείται δηλαδή σε υδατικά διαλύματα ημιαγωγών παρουσία υπεριώδους, ηλιακής και ορατής ακτινοβολίας. Σε αρκετές περιπτώσεις προτιμάται σε σχέση με τις χημικές μεθόδους, καθώς δεν γίνεται χρήση τοξικών υλικών ως καταλύτες (Cheng et al., 2015). Ως καταλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα τα ακόλουθα υλικά: TiO₂, WO₃, Ag₂S, SnS₂, CdS, CuS και μεταλλο-οργανικά πλέγματα (Metal-Organic Frameworks, MOFs) (Karimi-Maleh et al., 2021).

Η αναγωγή του Cr(VI) μέσω φωτοκατάλυσης με ημιαγωγούς περιλαμβάνει τα ακόλουθα βασικά βήματα (Barrera-Díaz et al., 2012; Cheng et al., 2015): i) προσρόφηση πρωτονίων με υψηλότερη ενέργεια από το ενεργειακό χάσμα (bandgap energy, E_g) του ημιαγωγού, τα οποία οδηγούν στη δημιουργία ζευγών e⁻ - h⁺ στον ημιαγωγό, ii) διαχωρισμός φορτίου και μεταφορά των παραγόμενων φωτο-μεταφορέων στον ημιαγωγό, iii) χημικές αντιδράσεις στην επιφάνεια και iv) μεταφορά παραγόμενων προϊόντων από την περιοχή διεπαφής στο διάλυμα.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου ανήκουν ο απλός σχεδιασμός, η υψηλή απόδοση απομάκρυνσης του ρύπου, η σταθερότητα της μεθόδου και το χαμηλό κόστος λειτουργίας. Ωστόσο, η μέθοδος έχει περιορισμένη εφαρμογή και η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται από το pH του προς επεξεργασία διαλύματος (Abinaya et al., 2020; Li et al., 2017).

2.5.2.3 Διήθηση με μεμβράνες

Η μέθοδος της διήθησης μέσω μεμβρανών χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση οργανικών και ανόργανων ουσιών από υδατικά διαλύματα, όπως τα βαρέα μέταλλα. Ανάλογα με το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης και της πίεσης που ασκείται, οι μεμβράνες διακρίνονται σε μεμβράνες υπερδιήθησης (Ultrafiltration, UF) (Muthumareeswaran et al., 2017), νανοδιήθησης (Nanofiltration, NF) (Wei et al., 2019), αντίστροφης ώσμωσης (Reverse

osmosis, RO) (Mnif et al., 2017), καθώς και οι υγρές μεμβράνες (Liquid membranes, LMs) (Othman et al., 2021). Στα πλεονεκτήματα των μεμβρανών ανήκουν η μεγάλη ποικιλία υλικών και τύπων μεμβρανών, η υψηλή απόδοση στην απομάκρυνση του ρύπου, καθώς και η απλή και αυτοματοποιημένη λειτουργία. Στα μειονεκτήματα περιλαμβάνονται το υψηλό κόστος κεφαλαίου, συντήρησης και λειτουργίας, οι υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια και προβλήματα έμφραξης των πόρων της μεμβράνης (Kaya et al., 2016; Wei et al., 2019).

Η διήθηση με μεμβράνες υπερδιήθησης είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως στην επεξεργασία του νερού λόγω του χαμηλού κόστους, της απλής εφαρμογής και αυτοματοποιημένης λειτουργίας (Liu et al., 2019). Στη μέθοδο αυτή γίνεται εφαρμογή χαμηλής πίεσης (1,000-100,000 Da) για τον διαχωρισμό μακρομορίων, αιωρούμενων στερεών και βαρέων μετάλλων από διαλύματα ανόργανης σύστασης. Οι μεμβράνες αυτές επιτρέπουν τη διόδο του νερού και των διαλυτών ουσιών μικρού μοριακού βάρους, ενώ παράλληλα συγκρατούν τις ουσίες με μεγαλύτερο μοριακό βάρος από αυτό των πόρων της μεμβράνης (5-20 nm) (Kurniawan et al., 2006). Τα ποσοστά απομάκρυνσης εξασθενούς χρωμίου που επιτυγχάνονται ξεπερνούν το 90% (Muthumareeswaran et al., 2017) και μπορούν να φτάσουν ακόμα και το 95% (Aliane et al., 2001).

Στην αντίστροφη ώσμωση, το νερό περνάει μέσα από τη μεμβράνη με την εφαρμογή υψηλής πίεσης, ενώ το χρώμιο συγκρατείται από τους πόρους της, οι οποίοι μπορεί να έχουν πολύ μικρό μέγεθος (0.5-1.5 nm) (Qasem et al., 2021). Στη μέθοδο της αντίστροφης ώσμωσης, ασκείται υψηλή πίεση, 20-70 bar μεγαλύτερη της οσμωτικής, με στόχο το διαχωρισμό κατιονικών ενώσεων (Cr^{+6}) από το ρυπασμένο υδατικό διάλυμα, παράγοντας διαλύματα υψηλής καθαρότητας (απομάκρυνση ρύπου $\geq 95\%$) (George et al., 2015; Ozaki et al., 2002). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή έχει υψηλό ενεργειακό κόστος (Karimi-Maleh et al., 2021).

Η νανοδιήθηση έχει ιδιότητες ανάμεσα στις μεμβράνες υπερδιήθησης και αντίστροφης ώσμωσης, καθώς διαχωρίζει συστατικά στην ενδιάμεση περιοχή επεξεργασίας των UF και RO και είναι χρήσιμη όταν η UF δεν προσφέρει ικανοποιητική απομάκρυνση και η RO δεν συμφέρει οικονομικά (Fu & Wang, 2011). Απομακρύνει διαλυτές ουσίες των οποίων το μέγεθος κυμαίνεται μεταξύ 0.0005-0.007 μm και το μοριακό βάρος είναι μεγαλύτερο από 200

Da (Wang et al., 2011). Ο διαχωρισμός γίνεται κυρίως λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τη χρήση πολυμερικών μεμβρανών (Wei et al., 2019).

Οι υγρές μεμβράνες αναφέρονται σε μια ειδική κατηγορία μεμβρανών στις οποίες ο διαχωρισμός των ουσιών γίνεται μέσω ενός υγρού φράγματος μεταξύ φάσεων. Χρησιμοποιούνται σε δύο (2) διατάξεις: τα γαλακτώματα και τις υποστηριζόμενες υγρές μεμβράνες (Othman et al., 2021). Οι υγρές μεμβράνες έχουν υψηλή επιλεκτικότητα, σχετική επάρκεια και μπορούν να επιτύχουν αναγνώριση συγκεκριμένων μορίων. Ωστόσο, η σταθερότητά τους σε μακράς διάρκειας εφαρμογές είναι χαμηλή (Qasem et al., 2021)

2.5.2.4 Ιοντοανταλλαγή

Μεταξύ των δημοφιλών φυσικοχημικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν για την απομάκρυνση χρωμίου, αλλά και άλλων βαρέων μετάλλων από λύματα και νερά, περιλαμβάνεται και η ιοντοανταλλαγή. Σε αυτή τη μέθοδο, δημιουργείται μια αναστρέψιμη ανταλλαγή ιόντων μεταξύ υγρής και στερεής φάσης. Συγκεκριμένα, μία στερεή ουσία (ρητίνη) αφαιρεί ιόντα από ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα και απελευθερώνει άλλα ιόντα παρόμοιου φορτίου σε χημικά ισοδύναμη ποσότητα, χωρίς να προκαλούνται δομικές αλλαγές στη ρητίνη (Rengaraj et al., 2003). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση μετάλλων από λύματα ανόργανης σύστασης. Επιπλέον, είναι μια απλή και οικονομική μέθοδος, καθώς δεν εμφανίζει προβλήματα δευτερογενούς ρύπανσης ή απόρριψης ιλύος και η ρητίνη μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί μετά από αναγέννησής της. Παράλληλα, μπορεί να γίνει επεξεργασία υψηλών ποσοτήτων ρυπασμένων υδατικών διαλυμάτων (Xing et al., 2022). Ωστόσο, βασικοί περιορισμοί της μεθόδου είναι ότι απαιτείται προεπεξεργασία των λυμάτων πριν την εφαρμογή της και η αποτελεσματικότητά της είναι συνάρτηση του pH των λυμάτων. Σύμφωνα με μελέτες, η ανταλλαγή ιόντων λειτουργεί αποτελεσματικότερα σε όξινα pH μεταξύ 2 και 6 (Cavaco et al., 2007). Επιπλέον, η μέθοδος μπορεί να έχει υψηλό κόστος εφαρμογής λόγω συχνής εξάντλησης της ιοντοανταλλακτικής ικανότητας της ρητίνης, ενώ ένα ακόμα μειονέκτημα είναι και η εύρεση της κατάλληλης μεθόδου για την αναγέννησή της (Korak et al., 2017).

2.5.2.5 Προσρόφηση/Ρόφηση

Η προσρόφηση ή ρόφηση είναι μια μέθοδος κατά την οποία ένα στερεό υλικό χρησιμοποιείται λόγω συγκεκριμένων ιδιοτήτων του για να δεσμεύσει στην επιφάνειά του μια διαλυτή ουσία (Kurniawan et al., 2006). Η προσρόφηση επηρεάζεται από το pH των προς επεξεργασία λυμάτων, τη θερμοκρασία, την αρχική συγκέντρωση του ρύπου, τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες, την ειδική επιφάνεια του προσροφητικού υλικού, καθώς και τον χρόνο επαφής του ρύπου με αυτό (Artioli, 2008; Xing et al., 2022). Μερικά από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος, η μεγάλη ποικιλία σε προσροφητικά υλικά, η σχετική ευκολία εφαρμογής της μεθόδου και η υψηλή επίδοση της στην απομάκρυνση του Cr(VI). Ωστόσο, μετά από κάποιο διάστημα χρήσης, τα υλικά χάνουν την προσροφητική τους ικανότητα και απαιτείται αναγέννηση τους (Mohan & Pittman, 2006).

Ανάλογα με τον τύπο των δυνάμεων που συγκρατούν τα μόρια του ρύπου στην επιφάνεια του προσροφητικού μέσου, η προσρόφηση μπορεί να χαρακτηριστεί ως φυσική ή χημική. Στη φυσική ρόφηση ο ρύπος συγκρατείται στην επιφάνεια με δυνάμεις τύπου van der Waals, ενώ στη χημική ρόφηση δημιουργούνται ισχυροί χημικοί δεσμοί με την επιφάνεια του προσροφητικού υλικού (Artioli, 2008). Οι πιο συνηθισμένες εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της προσρόφησης είναι οι ισόθερμες Langmuir, Temkin και Freundlich, καθώς και τα κινητικά μοντέλα ψευδο- 1^{ης} και 2^{ης} τάξης (Xing et al., 2022; Yusuff et al., 2022). Οι βασικοί μηχανισμοί αλληλεπίδρασης του Cr(VI) με το προσροφητικό υλικό είναι: α) ρόφηση μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων ανάμεσα στις ανιονικές ενώσεις του Cr(VI) και θετικά φορτισμένων λειτουργικών ομάδων του προσροφητικού υλικού, β) ρόφηση του Cr(VI) στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και πλήρης αναγωγή του σε Cr(III), γ) ρόφηση μέρους του Cr(VI) στην επιφάνεια του υλικού και αναγωγή της υπόλοιπης ποσότητας σε Cr(III), που στη συνέχεια προσροφάται και δ) ρόφηση κλάσματος του Cr(VI) και μετατροπή της υπόλοιπης ποσότητας σε Cr(III), που ακολουθείται από την απελευθέρωση τους στο διάλυμα. Η απευθείας μετατροπή του Cr(VI) σε Cr(III) πραγματοποιείται από τη «δωρεά» ηλεκτρονίων (O, S και N), ενώ τα ιόντα Cr(VI) προσδένονται σε θέσεις προσρόφησης (Karimi-Maleh et al., 2021).

Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση Cr(VI) διακρίνονται σε τέσσερις (4) βασικές κατηγορίες, ανάλογα με την προέλευση τους (Xing et al., 2022). Στην 1η κατηγορία ανήκουν υλικά, όπως αργιλικά ορυκτά, ιπτάμενη τέφρα, στρωματοποιημένα διπλά υδροξείδια (LHD), silica κλπ. Τα υλικά αυτά έχουν ανόργανη σύσταση, συγκεκριμένη δομή πόρων και μεγάλη ειδική επιφάνεια (Acharya & Parida, 2020; Jang et al., 2020). Στη 2η κατηγορία τοποθετούνται υλικά οργανικής σύστασης, όπως ρητίνες, κυτταρίνη και χιτοζάνη. Η προέλευση των υλικών αυτών μπορεί να είναι από πληθώρα φυτών, γεγονός που τα καθιστά μη τοξικά και βιοδιασπάσιμα (Awang et al., 2019; Aydin & Aksoy, 2009; Matouq et al., 2021). Στην 3η κατηγορία ανήκουν προσροφητικά υλικά ενώσεων άνθρακα. Τα υλικά αυτά έχουν μεγάλη ειδική επιφάνεια, εξαιρετική ικανότητα απομάκρυνσης χρωμίου και ευκολία χρήσης (Marques Neto et al., 2019; Mohan & Pittman, 2006). Στην 4η κατηγορία ανήκουν τα πορώδη υλικά κελύφους (Porous Framework Materials), όπως ομοιοπολικά οργανικά πλαίσια (Covalent Organic Frameworks, COFs) και μεταλλο-οργανικά πλέγματα (Metal-Organic Frameworks, MOFs). Στα πλεονεκτήματα αυτών των υλικών ανήκουν η μεγάλη ειδική επιφάνεια και πορώδες, καθώς και η τροποποιήσιμη επιφάνεια και μέγεθος πόρων (Herath et al., 2022; Noraee et al., 2019; Xiao et al., 2021).

2.5.2.6 Ηλεκτροχημικές μέθοδοι αποκατάστασης

Οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι αποκατάστασης έχουν τραβήξει τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των ερευνητών ως εναλλακτικές μέθοδοι επεξεργασίας ρυπασμένων υδάτων λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν, όπως οικονομική και ενεργειακή αποδοτικότητα, προσαρμοστικότητα, περιβαλλοντική συμβατότητα και ασφάλεια, καθώς το βασικό αντιδραστήριο στις μεθόδους αυτές είναι το ηλεκτρόνιο, το οποίο είναι ένα «καθαρό αντιδραστήριο» (Barrera-Díaz et al., 2012). Στις ηλεκτροχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται συχνότερα περιλαμβάνονται η ηλεκτροδιαπίδυση (electrodialysis) και η ηλεκτροκροκίδωση (electrocoagulation) (Jin et al., 2016). Η απόδοση των τεχνικών αυτών εξαρτάται από το υλικό του ηλεκτροδίου (Vasudevan et al., 2011), το pH των προς επεξεργασία λυμάτων (Pan et al., 2016), τη συγκέντρωση του εξασθενούς χρωμίου (Dos Santos et al., 2019), καθώς και την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος που θα εφαρμοστεί

(Bhatti et al., 2011). Ως υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ο σίδηρος, το αλουμίνιο, ο χρυσός, ο χαλκός, άνθρακας και γραφίτης και πολυμερικά υλικά (GracePavithra et al., 2019).

Η ηλεκτροδιαπίδυση ή ηλεκτροδιάλυση (electrodialysis) είναι μια τεχνική στην οποία χρησιμοποιούνται μεμβράνες (Hosseini et al., 2019). Σύμφωνα με τη μέθοδο, πραγματοποιείται μεταφορά/διαχωρισμός ιόντων μέσω της μεμβράνης με τη βοήθεια ηλεκτρικού δυναμικού. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται είναι ιοντικές και όχι πορώδεις, ενώ η οδηγούσα δύναμη είναι η βαθμίδα του ηλεκτρικού δυναμικού. Χρησιμοποιούνται επίπεδες διατάξεις που δημιουργούνται από την εναλλάξ τοποθέτηση εκατοντάδων ανιονικών και κατιονικών μεμβρανών για τη δημιουργία ενός ορθογώνιου ηλεκτρικού πεδίου (Al-Amshawee et al., 2020; Hosseini et al., 2019). Στην ηλεκτροκροκκίδωση (electrocoagulation), το ηλεκτρικό ρεύμα εφαρμόζεται για να αποσταθεροποιήσει τα αιωρούμενα σωματίδια και να ουδετεροποιήσει το ηλεκτρικό φορτίο του ρύπου. Χρησιμοποιούνται σχετικά μικροί αντιδραστήρες που περιέχουν δύο (2) ηλεκτρόδια, την άνοδο και την κάθοδο (Vasudevan et al., 2011). Σύμφωνα με τιμές από τη βιβλιογραφία, η μέθοδος μπορεί να επιτύχει απομάκρυνση Cr από υδατικά διαλύματα ή υγρά λύματα μεγαλύτερη από 91%, που μπορεί να αγγίξει ακόμα και 99.8%, με την εφαρμογή διαφόρων συνδυασμών ηλεκτροδίων, όπως Fe-Fe, SS-SS και Fe-Al και σε εύρος pH 3.5-11 (Shahedi et al., 2020). Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η δημιουργία ιλύος που απαιτεί περαιτέρω επεξεργασία, όμως η ποσότητα της ιλύος που παράγεται είναι πολύ μικρότερη σε σύγκριση με την ποσότητα που παράγεται στη μέθοδο της χημικής αναγωγής (Kabdasli & Tünay, 2023).

2.5.3 Βιολογικές μέθοδοι αποκατάστασης

Λαμβάνοντας υπόψη όσα αναπτύχθηκαν στην ενότητα 2.5.2, γίνεται σαφές ότι η χρήση συμβατικών φυσικοχημικών μεθόδων για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών ή την επεξεργασία λυμάτων συνοδεύεται από σημαντικά μειονεκτήματα, όπως τη χρήση μεγάλων ποσοτήτων χημικών ουσιών και ενέργειας, που συχνά οδηγούν σε απαγορευτικά δαπανηρές εφαρμογές και παραγωγή χημικής ιλύος (Elahi & Rehman, 2019; Gonzalez et al., 2003; Jobby et al., 2018; Park et al., 2000). Τις τελευταίες δεκαετίες το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει τραβήξει η εφαρμογή βιολογικών μεθόδων για τον καθαρισμό ρυπασμένων με Cr(VI)

υπογείων υδάτων, καθώς είναι οικονομικές, απλές και φιλικές προς το περιβάλλον και δεν προκαλούν το σχηματισμό τοξικών και επικίνδυνων παραπροϊόντων (Kanmani et al., 2012). Η βιολογική αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών γίνεται με τη χρήση βακτηρίων, μυκήτων, αλγών, φυτών και υλικών βιολογικής προέλευσης (Plestenjak et al., 2022) και περιλαμβάνει διεργασίες, όπως η βιοπροσρόφηση (biosorption), η βιοαναγωγή (bioreduction), η βιοσυσσωρευση (bioaccumulation), καθώς και διεργασίες στον εξωκυτταρικό χώρο, με τον κάθε μικροοργανισμό να συμμετέχει με διαφορετικό τρόπο (Dhal et al., 2013; Joutey et al., 2015). Για παράδειγμα, ο βασικός μηχανισμός που χρησιμοποιούν κυρίως τα βακτήρια για την απομάκρυνση του Cr(VI) είναι η βιοαναγωγή, ενώ οι μύκητες και τα άλγη χρησιμοποιούν κυρίως το μηχανισμό της βιοπροσρόφησης. Επίσης, υπό αερόβιες συνθήκες, η αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου σε τρισθενές χρώμιο πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση μιας διαλυτής κυτοσολικής χρωμικής αναγωγάσης, ενώ υπό αναερόβιες, μέσω μιας προσδεμένης στην κυτταρική μεμβράνη χρωμικής αναγωγάσης, με το χρωμικό ιόν να λειτουργεί ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων (Camargo et al., 2004; Elangovan et al., 2006). Επιπλέον, μια μεγάλη ποικιλία από ενώσεις (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, υδρογόνο, NAD(P)H και ενδογενή αποθέματα ηλεκτρονίων) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δότες ηλεκτρονίων για τη διαδικασία της αναγωγής (Kanmani et al., 2012). Στις παραγράφους 2.5.3.1 και 2.5.3.2 περιγράφονται οι μέθοδοι με τις οποίες οι μικροοργανισμοί και τα φυτά ανάγουν το εξασθενές χρώμιο και αποκαθιστούν τις ρυπασμένες περιοχές.

2.5.3.1 Φυτοαποκατάσταση

Η φυτοαποκατάσταση είναι μία περιβαλλοντικά φιλική μέθοδος αποκατάστασης εδαφών και υδάτων ρυπασμένων με Cr(VI), η οποία βασίζεται στη χρήση φυτών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Στη φυτοαποκατάσταση χρησιμοποιούνται φυτά και οι αντίστοιχοι ριζοσφαιρικοί μικροοργανισμοί για να απομακρύνουν τον ρύπο από τα υπόγεια νερά. Ο ρύπος προσλαμβάνεται από τα φυτά μέσω των οδών πρόσληψης νερού, συσσωρεύεται στα διάφορα μέρη του φυτού (ρίζες, μίσχος, φύλλα, λουλούδια, καρποί) και στη συνέχεια μεταβολίζεται, ανοργανοποιείται ή απομακρύνεται λόγω διαπνοής (Shah & Daverey, 2020). Τα φυτά που χρησιμοποιούνται κυρίως στη φυτοαποκατάσταση ονομάζονται φυτά υπερσυσσωρευτές (hyperaccumulator plants). Τα φυτά αυτά έχουν την ικανότητα να συσσωρεύουν μεγάλες

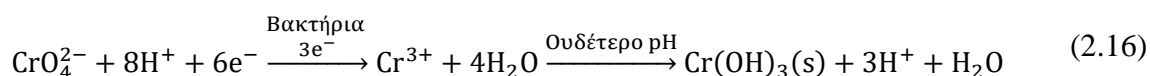
ποσότητες βαρέων μετάλλων στις ρίζες και τους στήμονες (50-500 φορές σε σχέση με τα συνήθη φυτά) χωρίς να υφίστανται σημαντικές μορφολογικές και αναπτυξιακές επιπτώσεις (Patra et al., 2020). Επιπλέον, επιθυμητό είναι να παράγουν μεγάλη ποσότητα βιομάζας και να έχουν υψηλό ρυθμό ανάπτυξης (Odoemelam & Ukre, 2008).

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου ανήκουν το χαμηλό κόστος εφαρμογής και συντήρησης, το μεγάλο εύρος εφαρμογής της, η αποτροπή της διάβρωσης του εδάφους και της έκπλυσης του Cr(VI) και συνεπώς εξάπλωσης του ρύπου, καθώς και η βελτίωση της γονιμότητας του εδάφους μέσω της απελευθέρωσης ποικίλων οργανικών ουσιών στο έδαφος (Shen et al., 2022; Yan et al., 2020). Στα αρνητικά της μεθόδου ανήκουν ο μεγάλος χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη των φυτών και συνεπώς για την απομάκρυνση του ρύπου, η εξάρτηση από το κλίμα της περιοχής αποκατάστασης, καθώς και η μικρή απόδοση της μεθόδου σε σύγκριση με άλλες τεχνικές. Ακόμη, η ικανότητα βιοσυσσώρευσης των φυτών μπορεί να είναι περιορισμένη λόγω παρασίτων, ενώ η εισαγωγή νέων φυτών σε ρυπασμένα μέρη μπορεί να επηρεάσει την τοπική βιοποικιλότητα. Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί και η εύρεση σωστού τρόπου απόρριψης της ρυπασμένης βιομάζας των φυτών. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι η φυτοαποκατάσταση μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε μέρη με χαμηλά έως μέτρια επίπεδα ρύπανσης και σε ρηχά υπόγεια ύδατα (Patra et al., 2020). Κάποια από τα προβλήματα αυτά μπορούν να λυθούν σε ένα βαθμό με την επιλογή των κατάλληλων φυτών και την προσθήκη οργανικών ή/και χημικών ουσιών και μικροοργανισμών. Η χρήση πρόσθετων ουσιών βελτιώνει το μηχανισμό της αποκατάστασης, αυξάνοντας την πρόσληψη νερού και θρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, η προσθήκη μικροβιακών πληθυσμών στις ρίζες αυξάνει τις επιφάνειες προσρόφησης των ριζών, και συνεπώς βελτιώνει την πρόσληψη του ρύπου. Τέλος, τα γενετικά τροποποιημένα φυτά έχουν αυξημένες δυνατότητες φυτοαποκατάστασης λόγω υψηλότερου ρυθμού ανάπτυξης του φυτού και της υπερέκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζουν την πρόσληψη και μεταφορά του μετάλλου (Kafle et al., 2022).

2.5.3.2 Βιοχημική αναγωγή Cr(VI) (Βιοαποκατάσταση)

Η ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να ανάγουν το τοξικό Cr(VI) στο λιγότερο τοξικό τρισθενές αποτελεί έναν μηχανισμό επιβίωσης που έχει ως στόχο τη μείωση της τοξικότητας

γύρω από το κύτταρο του μικροοργανισμού, ενώ σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να λειτουργήσει και ως τρόπος παραγωγής μεταβολικής ενέργειας για την κυτταρική ανάπτυξη (Mtumunye et al., 2017). Η βιοχημική αναγωγή του Cr(VI) στο περιβάλλον μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό διάφορες οξειδοαναγωγικές συνθήκες (αερόβια και αναερόβια), εξωκυτταρικά, στην κυτταρική μεμβράνη και ενδοκυτταρικά. Σύμφωνα με τους Chirwa & Molokwane (2011), η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) περιγράφεται με την παρακάτω γενική εξίσωση:



Η αναγωγή του Cr(VI) μπορεί να πραγματοποιηθεί από μεγάλη ποικιλία μικροβιακών γενών, όπως *Acinetobacter* (Narayani & Shetty, 2012), *Arthrobacter* (Hlihor et al., 2017), *Bacillus* (Upadhyay et al., 2017), *Pseudomonas* (Dogan et al., 2011), *Brucella* (Thacker et al., 2007), *E. Coli* (Mohamed et al., 2020), *Halomonas* (Mabrouk et al., 2014), *Ochrobactrum* (Morais et al., 2011), *Sphaerotilus* (Caravelli et al., 2008), *Methylococcus* (Enbaia et al., 2021), *Desulfovibrio spp.* (Franco et al., 2018), *Pannonibacter* (Xu et al., 2011), *Mesorhizobium* (Wani et al., 2008), *Spirogyra spp.* (Gupta et al., 2001), *Paenibacillus* (Wani et al., 2020), *Saccharomyces* (Zetic et al., 2001) και *Stenotrophomonas* (Baldiris et al., 2018). Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι παραπάνω μικροοργανισμοί μπορούν να ανάγουν το Cr(VI) είναι ποικίλοι και εξαρτώνται από το είδος τους. Κάποια είδη χρησιμοποιούν το Cr(VI) ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, ενώ άλλα, συγκεκριμένα διαλυτά ένζυμα. Η βιοαποκατάσταση αποτελεί επίσης περίπλοκη διαδικασία ως συνέπεια των περιβαλλοντικών συνθηκών (pH, θερμοκρασία, κ.ά.). Παράλληλα, η αποτελεσματικότητα αποκατάστασης με τη χρήση μικροοργανισμών έχει άμεση συσχέτιση και με τη συγκέντρωση του ρύπου, καθώς σε υψηλές συγκεντρώσεις το Cr(VI) είναι τοξικό για τους μικροοργανισμούς (Bhunia et al., 2022). Στον Πίνακα 2.5 παρουσιάζονται ορισμένοι μικροοργανισμοί που έχουν χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές απομάκρυνσης Cr(VI) από λύματα ή ρυπασμένα ύδατα, καθώς και ο βαθμός απομάκρυνσης που μπορούσαν να επιτύχουν ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση του ρύπου. Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση αποδεικνύεται ότι η βιοαποκατάσταση είναι μια βιώσιμη λύση,

καθώς ο βαθμός της απομάκρυνσης μπορεί να φτάσει και το 100% για συγκεντρώσεις Cr(VI) που ξεπερνούν τις μετρημένες τιμές στο περιβάλλον.

Πίνακας 2.5 Παραδείγματα μικροοργανισμών που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βιολογική απομάκρυνση του Cr(VI) μαζί με την αρχική συγκέντρωση Cr(VI) και το βαθμό απομάκρυνσης που επιτεύχθηκε.

Μικροοργανισμός	Συγκέντρωση Cr(VI) (mg/L)	Βαθμός απομάκρυνσης (%)	Αναφορά
<i>Acinetobacter sp.</i>	200	100	(Narayani & Shetty, 2012)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	100	99	(Sathishkumar et al., 2017)
	500	90	
	1000	84	
<i>Arthrobacter viscosus</i>	100	100	(Hlihor et al., 2017)
<i>Bacillus cohnii</i>	100	94	(Sarankumar et al., 2020)
	550	82	
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	95	(Upadhyay et al., 2017)
	550	90	
<i>Bacillus subtilis</i>	50	74	(Thacker et al., 2007)
	50	100	
	100	94.1	
	150	93.2	
<i>Brucella sp.</i>	200	66.9	(Han et al., 2007)
	100	65	
<i>Chlorella miniata</i>	100	65	(Al-Homaidan et al., 2018)
<i>Cladophora glomerata</i>	20	66.6	(Komori et al., 1990)
<i>Enterobacter cloacae</i>	208	90	(Mabrouk et al., 2014)
<i>Halomonas sp.</i>	50	82	(Wani et al., 2008)
<i>Mesorhizobium</i>	500	90	(Wani et al., 2020)
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	100-300	100	(Sathishkumar et al., 2017)
	100	97	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	500	77	(Gupta et al., 2001)
	1000	40	
<i>Spirogyra</i>	5	96	(Baldiris et al., 2018)
	10-70	100	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	80-300	98-99	(Baldiris et al., 2018)
	500	92	

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της βιοαποκατάστασης ρυπασμένων υδάτων είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί *ex situ* και *in situ*. Στις *ex situ* εφαρμογές (pump & treat), τα ρυπασμένα ύδατα αντλούνται και η επεξεργασία γίνεται σε βιοαντιδραστήρες στην επιφάνεια του εδάφους. Τα επεξεργασμένα ύδατα επαναεκχέονται στη συνέχεια στον υδροφόρα (Paul et al., 2021). Για

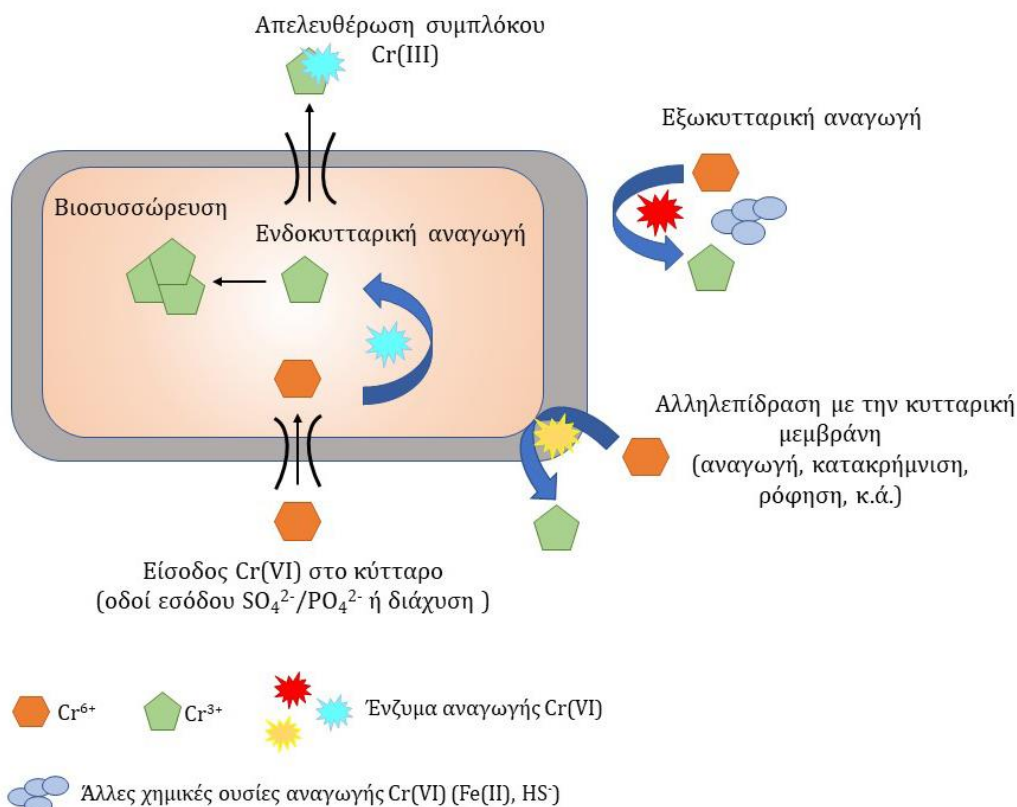
την επεξεργασία των ρυπασμένων υδάτων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι τύποι βιοαντιδραστήρων, όπως ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch), διαλείποντος έργου (sequencing batch), πολλαπλών σταδίων (multistage) και συνεχούς τροφοδοσίας (continuous) (Harkness & Fisher, 2013; Kathiravan et al., 2011; Mamais et al., 2016; Panousi et al., 2016; Qian et al., 2016). Ένα από τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι το περιβάλλον της βιοαποκατάστασης είναι εύκολα ελεγχόμενο, με ρύθμιση όλων των παραμέτρων (τύπος μικροοργανισμού, θερμοκρασία, pH, συγκέντρωση βιομάζας και υποστρώματος, ρυθμός αερισμού, ταχύτητα ανάδευσης) για τη βελτιστοποίηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και τη μεγιστοποίηση της διαδικασίας της αναγωγής (Narayani & Shetty, 2013; Paul et al., 2021). Επιπλέον, η απομάκρυνση του ρύπου μπορεί να γίνει γρήγορα. Ωστόσο, οι *ex situ* μέθοδοι είναι πιο περίπλοκες και πιο ακριβές σε σχέση με τις *in situ* μεθόδους. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις η νομοθεσία είναι αρκετά αυστηρή όσον αφορά την επανέγχυση των επεξεργασμένων υδάτων στους υδροφορείς, με αποτέλεσμα αρκετά συχνά να καταλήγουν σε επιφανειακά ύδατα ή υπονόμους, όπου τα όρια απελευθέρωσης είναι λιγότερα αυστηρά (Majone et al., 2015).

Αντιθέτως, η παρέμβαση στην *in situ* βιοαποκατάσταση πραγματοποιείται στο χώρο που έχει ρυπανθεί και ως βιοαντιδραστήρας για την απομάκρυνση του ρύπου χρησιμοποιείται ο ίδιος ο υδροφορέας, είτε υπό φυσικές είτε υπό βελτιωμένες συνθήκες. Η βελτιωμένη *in situ* βιοαποκατάσταση βασίζεται στη χειραγώγηση των περιβαλλοντικών συνθηκών στον ρυπασμένο υδροφορέα για την αύξηση της μικροβιακής δράσης της αυτόχθονης μικροβιακής κοινότητας, μέσω της προσθήκης θρεπτικών συστατικών ή δοτών και αποδεκτών ηλεκτρονίων (βιοδιέγερση, biostimulation) ή μέσω της εισαγωγής εξωγενών μικροοργανισμών με την ικανότητα απομάκρυνσης Cr(VI) (βιοαύξηση, bioaugmentation) (Majone et al., 2015). Μια σημαντική πρόκληση στον τομέα της *in situ* βιοδιέγερσης είναι η αποτελεσματική προσθήκη θρεπτικών ουσιών/δοτών ηλεκτρονίων/αποδεκτών ηλεκτρονίων στο ετερογενές υπόγειο περιβάλλον (Pradhan et al., 2017). Συνεπώς, σημαντικό ρόλο για την βιοαποκατάσταση παίζει επίσης και ο σωστός γεωλογικός, γεωχημικός και υδρολογικός χαρακτηρισμός της περιοχής αποκατάστασης, καθώς και ο σωστός χαρακτηρισμός της διασποράς του ρύπου (Fruchter, 2002).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι, η *in situ* βιοαποκατάσταση είναι μια οικονομικά αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, που προσφέρει τα ακόλουθα σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους επεξεργασίας (Fruchter, 2002; Lin et al., 2020a): i) μπορεί να πραγματοποιηθεί επί τόπου χωρίς την ανάγκη εκσκαφής του μολυσμένου εδάφους ή άντλησης του μολυσμένου νερού, ii) μπορεί να εφαρμοστεί σε περιοχές με υψηλό υδροφόρο ορίζοντα, iii) επιτρέπει μια συνεχή διαδικασία αναγωγής του Cr(VI) και iv) δεν καταστρέφει το χώρο που πρέπει να υποστεί επεξεργασία.

2.5.4 Μηχανισμοί βιοχημικής αναγωγής Cr(VI)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να προσροφούν, να συσσωρεύουν και να ανάγουν το Cr(VI). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.7, στο οποίο παρουσιάζονται συνοπτικά οι πιθανοί τρόποι βιοχημικής αναγωγής του Cr(VI), το Cr(VI) μπορεί να αναχθεί στον εξωκυτταρικό χώρο μέσω πληθώρας ενζύμων που εξάγονται από τα μικροβιακά κύτταρα ή μέσω βιοπαραγόμενων ουσιών (Fe^{2+} , HS^- , κ.ά). Επιπλέον, το Cr(VI) μπορεί να προσκολληθεί στην κυτταρική επιφάνεια μέσω της δημιουργίας χημικών δεσμών του μεταλλικού ιόντος και λειτουργικών ομάδων της επιφάνειας. Εκεί είτε δημιουργεί σύμπλοκες ενώσεις και κατακρημνίζεται ή ανάγεται σε Cr(III). Παράλληλα μπορεί να μεταφερθεί και στο εσωτερικό του κυττάρου με ενεργητική μεταφορά μέσω μη ειδικών θειικών/φωσφορικών μεταφορέων ή παθητικά μέσω διάχυσης. Στο εσωτερικό του κυττάρου, το Cr(VI) ανάγεται σε Cr(III) και βιοσυσσωρεύεται ή απελευθερώνεται ως σύμπλοκες ενώσεις. Επίσης, τα κύτταρα έχουν και έναν μηχανισμό απελευθέρωσης του πλεονάζοντος χρωμίου (Jobby et al., 2018; Pushkar et al., 2021). Στις ενότητες 2.5.4.1-2.5.4.3 οι μηχανισμοί αυτοί αναπτύσσονται λεπτομερώς.



Σχήμα 2.7 Συνοπτική παρουσίαση μηχανισμών βιοχημικής αναγωγής Cr(VI).

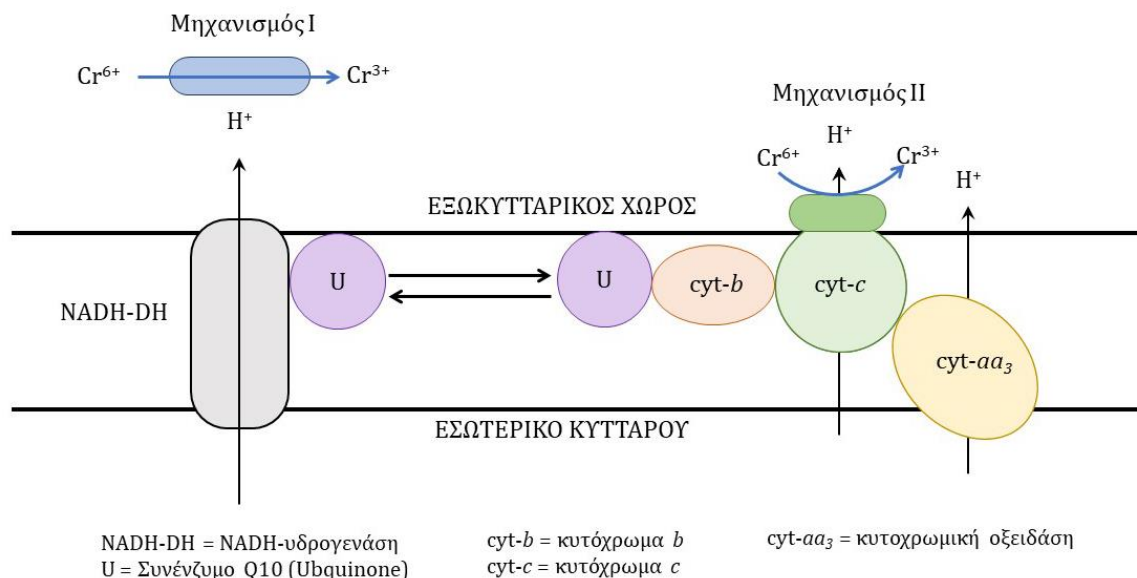
2.5.4.1 Αλληλεπίδραση του Cr(VI) με την κυτταρική επιφάνεια

Η επιφάνεια των κυττάρων αποτελεί την πρώτη «γραμμή άμυνας» των κυττάρων για την προστασία τους από το εξωτερικό περιβάλλον. Η επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων περιλαμβάνει διάφορα μόρια, όπως ανιονικούς λιποπολυσακχαρίτες (anionic lipopolysaccharides, LPS), φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες. Επιπλέον, μπορεί να περιλαμβάνει διάφορες λειτουργικές ομάδες όπως καρβοξύλια, αλκένια, αμίνες και αμίδια, υδροξύλια, φωσφονικά και σουλφονικά οξέα, καρβονύλια, ιμιδαζόλια και φωσφοδιεστέρες, που είναι υπεύθυνες για τη βιολογική προσρόφιση των μετάλλων (Mangaiyarkarasi et al., 2011). Τα βαρέα μέταλλα μπορούν να τροποποιήσουν την κυτταρική δομή των βακτηρίων μεταβάλλοντας τις λειτουργικές αυτές ομάδες της κυτταρικής επιφάνειάς τους (Karthik et al., 2017). Η τιμή του pH επηρεάζει τον τρόπο με τον οποίο το χρώμιο αλληλοεπιδρά με αυτές τις

ομάδες. Σύμφωνα με τους Li et al. (2019), το Cr(VI) δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με λειτουργικές ομάδες όπως N-H, -CONH- και C-NH₂ σε pH=9, καθώς αυτές οι ομάδες είναι ηλεκτροστατικά ουδέτερες σε αλκαλικό pH, αλλά αντιδρά με ομάδες όπως -COOH και -OH, που είναι αρνητικά φορτισμένες σε αυτές τις τιμές pH. Παράλληλα, οι Yaashikaa et al. (2019) έχουν παρατηρήσει σε κύτταρα του *Pseudomonas stutzeri* ότι η μέγιστη αλληλεπίδραση του Cr(VI) με την κυτταρική επιφάνεια πραγματοποιείται σε όξινο pH (pH=2), καθώς η πρωτονίωση της κυτταρικής επιφάνειας είναι εφικτή σε αυτό το pH με την απόθεση H⁺ ιόντων που βοηθούν στην ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ του Cr(VI) (ως HCrO₄⁻) και της φορτισμένης κυτταρικής επιφάνειας. Αύξηση του pH οδηγεί σε μετατροπή του HCrO₄⁻ σε άλλες μορφές χρωμίου (CrO₄²⁻ και Cr₂O₇²⁻) και η πρωτονίωση της επιφάνειας του κυττάρου απενεργοποιείται με την παρουσία των ιόντων OH⁻, γεγονός που μειώνει την ικανότητα απορρόφησης του Cr(VI) σε pH > 7. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και από μελέτη των Şahin & Öztürk (2005) σε κύτταρα *Bacillus thuringiensis*.

Επιπλέον, τα Gram-αρνητικά βακτήρια διαθέτουν και μια λεπτή στρώση από πεπτιδογλυκάνη κάτω από τη στρώση των LPS. Τα LPS βοηθούν στη χηλιοποίηση των μεταλλικών μορίων προσδένοντας το χρώμιο στην κυτταρική επιφάνεια. Τα βαρέα μέταλλα προκαλούν αύξηση της έκκρισης λιποπολυσακχαριτών στο εξωτερικό μέρος της κυτταρικής επιφάνειας ευνοώντας την πρόσδεση των μορίων χρωμίου (Pushkar et al., 2021). Η αναγωγή του Cr(VI) στην κυτταρική μεμβράνη στα Gram-αρνητικά βακτήρια μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί και με δύο (2) ακόμη μηχανισμούς. Σύμφωνα με τον 1ο μηχανισμό, η αναγωγή πραγματοποιείται από μια διαλυτή ρεδοκτάση με μόρια NADH να λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων, είτε από ανάγκη είτε για τη μεγιστοποίηση της δραστηριότητας του κυττάρου. Ο μηχανισμός αυτός επικρατεί κυρίως υπό αερόβιες συνθήκες. Στο 2ο μηχανισμό, το εξασθενές χρώμιο λειτουργεί ως αποδέκτης ηλεκτρονίων σε μια διαδικασία που πραγματοποιείται από ένζυμα (κυτοχρώματα b και c και κυτοχρωμική οξειδάση) που βρίσκονται προσδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη (Chirwa & Molokwane, 2011). Το αποτέλεσμα της αναγωγής στην κυτταρική επιφάνεια έχει αποδειχτεί από τους Mclean & Beveridge (2001), οι οποίοι έχουν παρατηρήσει τη δημιουργία ιζημάτων διαφόρων μεγεθών στην επιφάνεια κυττάρων *Pseudomonas*, τα οποία ήταν πιθανότατα άμορφο Cr(OH)₃. Στο

Σχήμα 2.8 παρουσιάζονται οι δύο μηχανισμοί που περιγράφηκαν παραπάνω σχετικά με την αναγωγή του Cr(VI) στην κυτταρική μεμβράνη.



Σχήμα 2.8 Μηχανισμός αναγωγής Cr(VI) στην κυτταρική μεμβράνη Gram-αρνητικών βακτηριακών κυττάρων (Προσαρμογή από Chirwa & Molokwane (2011)).

Τα Gram-θετικά βακτήρια διαθέτουν μόνο μια παχιά στρώση πεπτιδογλυκάνης στην κυτταρική τους μεμβράνη. Τα βακτήρια αυτά επιτυγχάνουν τη ρόφηση του Cr(VI) στην επιφάνεια τους λόγω της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης ανιονικών πολυμερών που αποτελούνται κυρίως από τειχοϊκά και λιποτειχοϊκά οξέα. Επίσης, στην πρόσδεση του χρωμίου συμμετέχουν και άλλες ομάδες, όπως PO₃, SO₃²⁻, RNH₂, R₂NH, COO⁻ και OH, με την υδροξυλομάδα να συμμετέχει μόνο σε pH από 1 έως 4 (Prabhakaran & Subramanian, 2017; Şahin & Öztürk, 2005).

Στους μύκητες, η αναγωγή του Cr(VI) στην κυτταρική επιφάνεια ακολουθεί τρεις (3) βασικούς μηχανισμούς (Viti et al., 2014):

- i. το χρωμικό ιόν προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια μέσω ανιονικής προσρόφησης, ανάγεται σε Cr(III) από παρακείμενο δότη ηλεκτρονίων και απελευθερώνεται μέσω ηλεκτροστατικής απόθησης,
- ii. άμεση αναγωγή μέσω επαφής με δότη ηλεκτρονίων και απελευθέρωση λόγω ηλεκτροστατικής απόθησης και,
- iii. αναγωγή μέσω της δραστηριότητας ενζύμων του μικροβιακού κυττάρου και απελευθέρωση μέσω ηλεκτροστατικής απόθησης.

2.5.4.2 Βιοπροσρόφηση και βιοσυσώρευση

Στη βιοπροσρόφηση (biosorption), τα βακτήρια απομακρύνουν το χρώμιο μέσω των προσροφητικών ιδιοτήτων της κυτταρικής τους επιφάνειας (Gadd, 1990). Είναι μια παθητική διαδικασία που επηρεάζεται από τα ιδιαίτερα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού και του περιβάλλοντος, όπως την ειδική επιφάνεια του μικροοργανισμού, την ποσότητα της βιομάζας, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του διαλύματος Cr(VI) (θερμοκρασία, pH, αρχική συγκέντρωση ρύπου, κλπ), καθώς και από την παρουσία άλλων μεταλλικών ιόντων (Gadd, 1990; Pushkar et al., 2021; Srinath et al., 2002).

Η βιοπροσρόφηση αποτελείται από δύο (2) φάσεις. Η 1^η φάση είναι η παθητική φυσική ρόφηση που πραγματοποιείται στην κυτταρική επιφάνεια και περιλαμβάνει διάφορες διεργασίες (ρόφηση, συμπλοκοποίηση, ιοντοανταλλαγή, χηλικοποίηση, μικρό-κατακρήμνιση, κλπ). Οι παραπάνω διεργασίες της βιοπροσρόφησης μπορεί να λειτουργούν συνεργιστικά ή ανεξάρτητα, ανάλογα με τον μικροοργανισμό και το περιβάλλον. Επιπλέον, είναι ανεξάρτητη του μεταβολισμού του μικροοργανισμού και συνεπώς, μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από ζώντα ή/και νεκρά κύτταρα (Pushkar et al., 2021; Ramachandran et al., 2022; Zouboulis et al., 2004). Η χρήση νεκρής βιομάζας έχει ορισμένα πλεονεκτήματα σε σχέση με τη χρήση ζωντανών κυττάρων (Fernández et al., 2018): i) δεν υπάρχει ανάγκη για την προσθήκη θρεπτικών συστατικών, ii) έχουν ανοσία στην τοξικότητα του χρωμίου ή σε αλλαγές των λειτουργικών συνθηκών, iii) επιτρέπουν την ανάκτηση του μετάλλου μέσω μεθόδων που οδηγούν στην παράλληλη αναγέννηση της βιομάζας και iv) η απόκτηση νεκρής βιομάζας κοστίζει λιγότερο.

Η 2^η φάση της βιοπροσρόφησης περιλαμβάνει την ενεργή μεταφορά του Cr(VI) στο εσωτερικό του κυττάρου και τη βιοσυσσώρευση (bioaccumulation) του. Είναι μια σχετικά αργή διαδικασία που πραγματοποιείται μόνο από ζώντα κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν υψηλή αντίσταση/ανοχή στο Cr(VI) και απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας για τη μεταφορά του Cr στο εσωτερικό του κυττάρου (Gadd, 1990; Srinath et al., 2002). Η μεταφορά των ιόντων Cr στο εσωτερικό των κυττάρων αναχαιτίζεται από χαμηλές θερμοκρασίες, μεταβολικούς αναχαιτιστές και την απουσία πηγής ενέργειας. Οι περισσότεροι μηχανισμοί μεταφοράς μετάλλων στα βακτήρια φαίνεται ότι βασίζονται στην ηλεκτροχημική βαθμίδα πρωτονίων της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ σε άλλους μικροοργανισμούς η ενδοκυτταρική μεταφορά βασίζεται σε μηχανισμούς διάχυσης. Στο εσωτερικό του κυττάρου, τα ιόντα χρωμίου εντοπίζονται στο εσωτερικό συγκεκριμένων οργανιδίων ή/και προσδεδεμένα σε πρωτεΐνες (Gadd, 1990).

Εξαιρετική ικανότητα βιοπροσρόφησης και βιοσυσσώρευσης χρωμίου έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα των βακτηρίων *B. circulans* (34.5 mg Cr/g ξηρού βάρους), *B. megaterium* (32.0 mg Cr/g ξηρού βάρους) και *B. coagulans* (39.9 mg Cr/g ξηρού βάρους) από τους Srinath et al. (2002). Επιπλέον, σε σύγκριση της προσροφητικής ικανότητας μεταξύ ζώντων και νεκρών κυττάρων των *B. megaterium* και *B. coagulans*, παρατηρήθηκε ότι τα νεκρά κύτταρα ήταν πιο αποτελεσματικά για την προσρόφηση χρωμίου. Η καλύτερη απόδοση των ανενεργών/νεκρών κυττάρων σε σύγκριση με τα ζώντα κύτταρα οφείλεται στην ευαισθησία των δεύτερων στις τοξικές επιπτώσεις του χρωμίου, που μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο. Έχει βρεθεί ότι η εφαρμογή βιοπροσρόφησης για την αποκατάσταση ρυπασμένων τόπων μπορεί να μειώσει το κόστος κεφαλαίου κατά 20%, τα λειτουργικά κόστη κατά 36% και τα συνολικά κόστη κατά 28%, σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ιοντοανταλλαγής (Zouboulis et al., 2004).

Η βιοπροσρόφηση αποτελεί και το βασικό μηχανισμό με τον οποίο οι μύκητες απομακρύνουν το Cr(VI). Οι Vankar & Bajrai (2008) απέδειξαν ότι κύτταρα του μικροοργανισμού *Trichoderma* sp. μπορούν να επιτύχουν απομάκρυνση Cr(VI) που αγγίζει το 97.39% με αρχική συγκέντρωση Cr 4.00 mg/L. Παρόμοια ποσοστά απομάκρυνσης (96.3%) έχει επιτύχει και ο Sivakumar (2016) για αρχική συγκέντρωση Cr(VI) 18.125 mg/L σε κύτταρα του *Aspergillus*

niger. Παράλληλα, έχουν αναπτυχθεί βιοπροσροφητικά υλικά χρησιμοποιώντας διάφορα γένη μυκήτων και έχει μελετηθεί η προσροφητική τους ικανότητα (Jobby et al., 2018). Η βιοπροσρόφηση αποτελεί και το βασικό μηχανισμό απομάκρυνσης του Cr(VI) και για τα άλγη. Η κυτταρική επιφάνεια των αλγών διαθέτει διάφορες λειτουργικές ομάδες (COO^- , NH_2^- , SO_4^{2-} , OH^-), οι οποίες αλληλοεπιδρούν με τα ιόντα του εξασθενούς χρωμίου, με αντίστοιχο τρόπο που περιγράφηκε και στην ενότητα 2.5.4.1. Μετά την πρόσδεση του Cr στην κυτταρική επιφάνεια, κάποια άλγη έχουν την ικανότητα να το μεταφέρουν και να το βιοσυσσωρεύουν στο εσωτερικό τους (Al-Homaidan et al., 2018). Σε εφαρμογές απομάκρυνσης Cr(VI), στις οποίες έχουν επιτευχθεί υψηλά ποσοστά απομάκρυνσης ($> 83.55\%$), έχουν χρησιμοποιηθεί κύτταρα αλγών του γένους *Sargassum* sp. (Esmaeili et al., 2012), *Turbinaria ornata* (Kumaraguru et al., 2021), *Pachymeniopsis* sp. (Lee et al., 2000), *Chlorella sorokiniana* (Husien et al., 2019), *Cladophora glomerata*, *Enteromorpha intestinalis* και *Microspora amoena* (Al-Homaidan et al., 2018).

2.5.4.3 Ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική αναγωγή Cr(VI)

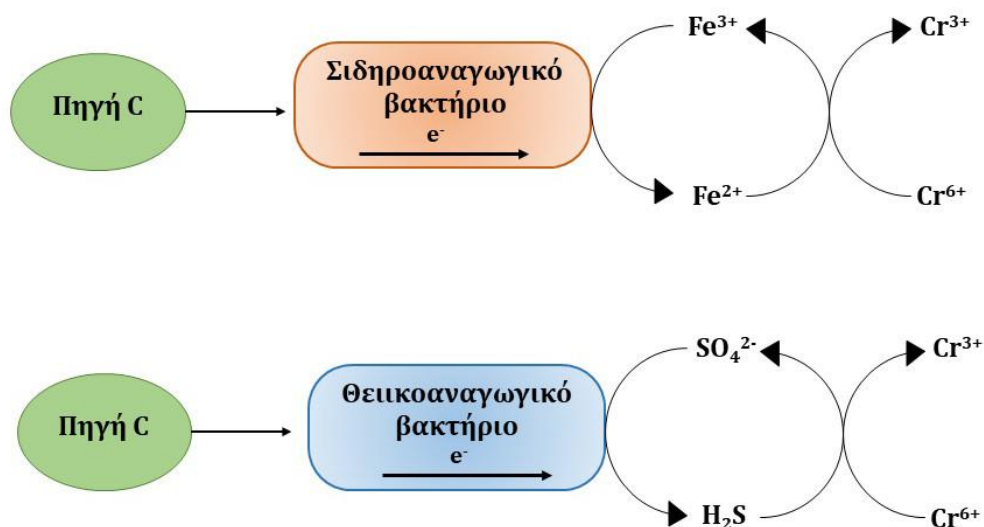
Ένας από τους βασικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης του Cr(VI) που χρησιμοποιούν οι μικροοργανισμοί είναι η βιοαναγωγή (bioreduction). Πολλοί μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει βιοχημικές οδούς για να ανάγουν το Cr(VI) στο λιγότερο τοξικό Cr(III) υπό αερόβιες είτε υπό αναερόβιες συνθήκες. Η αερόβια βιοαποκατάσταση περιλαμβάνει αντιδράσεις που απαιτούν οξυγόνο για να πραγματοποιηθούν. Τα βακτήρια χρησιμοποιούν κάποια πηγή άνθρακα ως δότη ηλεκτρονίων και το οξυγόνο ως τον αποδέκτη ηλεκτρονίων. Η αναγωγή υπό αερόβιες συνθήκες είναι μια διεργασία συμμεταβολισμού, όπου οι μικροοργανισμοί δεν κερδίζουν ενέργεια από την αποδόμηση του ρύπου, αλλά ο ρύπος απομακρύνεται μέσω μιας δευτερεύουσας αντίδρασης. Η αναερόβια αποκατάσταση περιλαμβάνει την πραγματοποίηση μικροβιακών αντιδράσεων απουσία οξυγόνου, όπως ζύμωση, μεθανογένεση, θεικοαναγωγή και απονιτροποίηση. Στον αναερόβιο μεταβολισμό, τα θειικά ιόντα, τα νιτρικά ιόντα, το διοξείδιο του άνθρακα, οξειδωμένα υλικά ή οργανικές ενώσεις μπορούν να αντικαταστήσουν το οξυγόνο ως αποδέκτες ηλεκτρονίων. Επιπλέον, πολλοί από τους μικροοργανισμούς που καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις υπό

αναερόβιες συνθήκες, έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν μέταλλα ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων (Thatoi et al., 2014)

Εξωκυτταρικά, η αναγωγή του Cr(VI) ρυθμίζεται μέσω διαλυτών κυτταροπλασματικών ουσιών που εξάγονται στον εξωκυτταρικό χώρο, μέσω μιας διαδικασίας με υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις. Αυτός ο μηχανισμός χρησιμοποιείται για να προστατεύσει τους μικροοργανισμούς από τις βλαβερές επιπτώσεις του Cr(VI) ελαττώνοντας την ενεργή ενδοκυτταρική μεταφορά (Rahman & Thomas, 2021). Οι ουσίες αυτές ονομάζονται εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες (extracellular polymeric substances, EPS). Έχουν υψηλό μοριακό βάρος και περιέχουν κυρίως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, εξωκυτταρικό DNA και λιπίδια. Μπορεί επίσης να είναι και προϊόν της κυτταρικής λύσης και υδρόλυσης μακρομορίων (Harish et al., 2012; Long et al., 2019). Οι EPS φέρουν μια πληθώρα αρνητικά φορτισμένων λειτουργικών ομάδων (υδροξύλια, καρβοξύλια, φαινόλες και θειόλες), που μπορούν να αντιδράσουν με βαρέα μέταλλα, όπως το χρώμιο, και γι' αυτό το λόγο χαρακτηρίζονται ως βιοκροκιδωτικά και βιοπροσροφητές, καθώς η ανιονική τους φύση τους επιτρέπει να αντιδρούν ηλεκτροστατικά με τα μόρια χρωμίου (Harish et al., 2012; Long et al., 2019). Η αποτελεσματικότητα των EPS στην αναγωγή του Cr(VI) έχει αποδειχτεί σε διάφορες μελέτες. Οι Long et al. (2019) απέδειξαν ότι οι εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες που παράγονται από το βακτήριο *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10 μπορούν να απομακρύνουν έως και 81.5% Cr(VI) αρχικής συγκέντρωσης 5.2 mg/L. Οι Yan et al. (2020) μελέτησαν τις EPS που παράγονται από το θεικοαναγωγικό βακτήριο *Enterococcus avium* strain BY7 και παρατήρησαν ότι αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και χουμικές ενώσεις και μπορούν να οδηγήσουν σε απομάκρυνση Cr(VI) περίπου 51% (αρχική συγκέντρωση Cr(VI) = 50 mg/L). Παράλληλα, υπάρχουν και ορισμένες έρευνες που έχουν επικεντρωθεί στον τρόπο με τον οποίο η παρουσία Cr(VI) επηρεάζει την έκκριση αυτών των ουσιών. Σύμφωνα με τους Wang et al. (2021), η αύξηση της συγκέντρωσης Cr(VI) από 0-200 mg/L οδήγησε σε βαθμιαία αύξηση έκκρισης EPS στο βακτηριακό στέλεχος *Pannonibacter phragmitetus* BB. Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις χρωμίου (> 200 mg/L) παρατηρήθηκε αναχαίτιση της έκκρισης και μειωμένη συγκέντρωση EPS. Οι Wang et al. (2014) διερεύνησαν, επίσης, την επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης εξασθενούς χρωμίου από 0-30 mg/L στη σύνθεση των EPS σε κοκκώδη ιλύ αερόβιου αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (SBR). Παρατήρησαν ότι αύξηση της

συγκέντρωσης Cr(VI) οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών που συνθέτουν τις EPS, με τη μεγαλύτερη αύξηση να εντοπίζεται στις πρωτεΐνες.

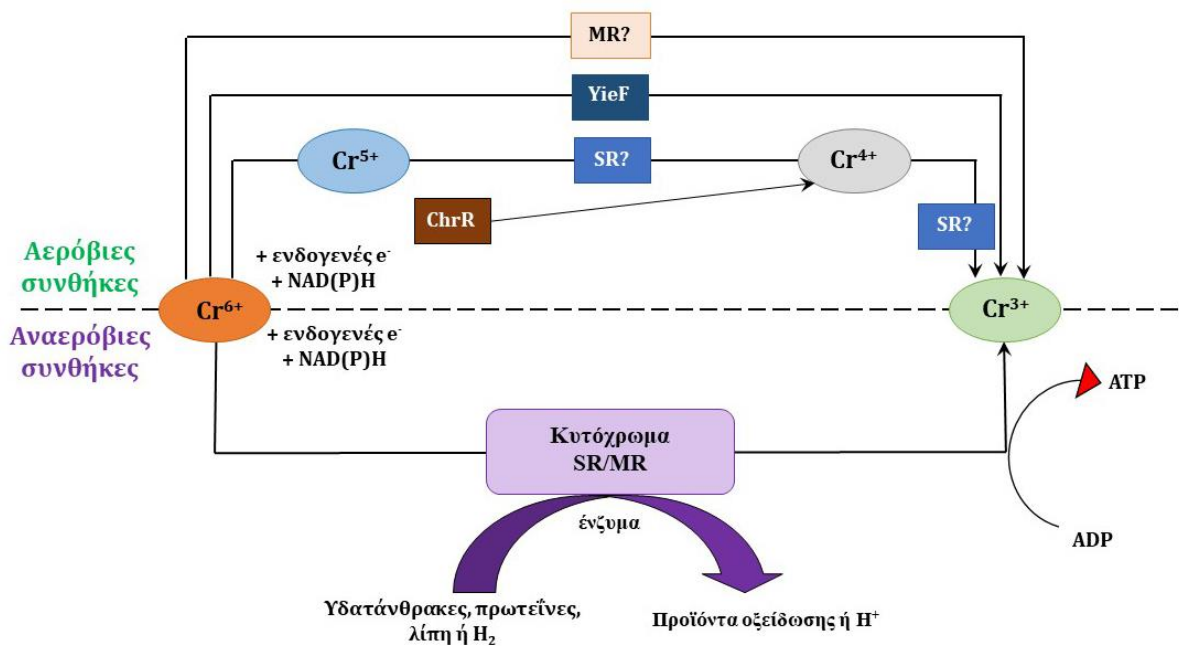
Παράλληλα, το Cr(VI) μπορεί να αναχθεί εξωκυτταρικά και από ουσίες που παράγονται κατά τη διάρκεια μεταβολικών διεργασιών του μικροοργανισμού και εκκρίνονται στη συνέχεια στον εξωκυτταρικό χώρο. Οι Lytras et al. (2017) παρατήρησαν ότι η αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III) από βακτήρια του γένους *Pediococcus acidilactici* πραγματοποιείται εξωκυτταρικά έπειτα από αντίδραση με το γαλακτικό οξύ που παράγεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της γλυκόλυσης. Υπό αναερόβιες συνθήκες, στις ουσίες που ανάγουν το Cr(VI) εξωκυτταρικά, περιλαμβάνονται και τα Fe(II) και HS⁻, τα μεταβολικά τελικά προϊόντα των βακτηρίων που ανάγουν σίδηρο και θείο (Arias & Tebo, 2003; Fendorf et al., 2000; Wielinga et al., 2001). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.9, η διεργασία αυτή έχει το πλεονέκτημα ότι η αναγωγή του Fe(II) που παράγεται από σιδηροαναγωγικά βακτήρια (Iron-Reducing Bacteria, IRB) καταλήγει πίσω σε Fe(III) με την αβιοτική αναγωγή του Cr(VI). Αυτή η βιοαναμόχλευση (bioturbation) μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο, διότι επιτρέπει τη μη διακοπτόμενη αναγέννηση του Fe(III), τελικού δέκτη ηλεκτρονίων σε αναερόβιες συνθήκες (Borch et al., 2010; Lu et al., 2020; Nevin & Lovley, 2002; Zhang et al., 2021). Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα αναερόβια βακτήρια οξειδώνουν τον Fe(II) δεν είναι ακόμα σαφείς, αλλά φαίνεται ότι διαφέρουν ανάλογα με το είδος του βακτηρίου (Bryce et al., 2018). Σύμφωνα με τους Gan et al. (2018), η δράση του βακτηρίου *Acidithiobacillus ferrooxidans* επιταχύνει τη διάλυση πυριτικών ορυκτών (FeS₂), ευνοώντας τη διάσπαση των δεσμών δισουλφιδίου και την οξείδωση S_n²⁻ και S⁰ σε θειικά. Παράλληλα, σημαντικός μηχανισμός για την απομάκρυνση του εξασθενούς χρωμίου από το περιβάλλον είναι και η αναγωγή του Cr(VI) από σουλφίδια που παράγονται από θεικοαναγωγικά βακτήρια (Sulfate-Reducing Bacteria, SRB), όπως σε εδάφη και υδροφορείς πλούσιους σε θείο, όταν επικρατούν αναερόβιες συνθήκες (Pettine et al., 1994; Wang et al., 2019). Επιπλέον, ως χημικοί αναγωγείς του Cr(VI) έχουν καταγραφεί το υδρογόνο (H₂) και το μεθάνιο (CH₄), δύο αέρια ευρέως διαδεδομένα σε υπόγειους υδροφορείς, που αποτελούν προϊόν μεταβολικών δραστηριοτήτων αναερόβιων μικροοργανισμών (He et al., 2020).



Σχήμα 2.9 Μηχανισμός αναγωγής Cr(VI) με σίδηρο και θειικά ιόντα.

Συνήθως ο μηχανισμός της ενδοκυτταρικής αναγωγής του Cr(VI) ακολουθεί τρία (3) βασικά βήματα (Cheung & Gu, 2007): i) δέσμευση του χρωμίου στην κυτταρική επιφάνεια, ii) μεταφορά του στο εσωτερικό του κυττάρου και iii) αναγωγή του σε τρισθενές χρώμιο. Υπό την παρουσία οξυγόνου, η αναγωγή του Cr(VI) είναι μια διαδικασία που συντελείται σε δύο με τρία βήματα. Αρχικά, το Cr(VI) ανάγεται σε πεντασθενές [Cr(V)] και/ή τετρασθενές χρώμιο [Cr(IV)] (ενδιάμεσα προϊόντα με μικρή διάρκεια ζωής), και στη συνέχεια σε τρισθενές. Η διαδικασία αυτή δεν είναι συνήθως αυτόματη και περιλαμβάνει τη συμμετοχή NADH, NADPH και ενδογενών ηλεκτρονίων από τα «αποθέματα» του κυττάρου, ως δότες ηλεκτρονίων, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.10. Το ένζυμο ChrR, που απομονώθηκε από το βακτήριο *Pseudomonas putida* και είναι από τα καλύτερα μελετημένα ένζυμα που ανάγουν το Cr(VI), ανάγει το Cr(VI) σε Cr(V) με τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου, διαδικασία που ακολουθείται από τη μεταφορά δύο (2) ηλεκτρονίων για την παραγωγή Cr(III) (Park et al., 2000). Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ανάγεται όλο το Cr(V) σε Cr(III), αλλά ένα μέρος του επαναοξειδώνεται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS). Αντιθέτως, το ένζυμο YieF καταλύει την άμεση αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III) μέσω της μεταφοράς τεσσάρων (4) ηλεκτρονίων, από τα οποία τα τρία (3) χρησιμοποιούνται για την αναγωγή σε Cr(III) και το ένα (1) μεταφέρεται στο οξυγόνο (Pradhan et al., 2017).

Έχουν απομονωθεί διάφοροι μικροοργανισμοί που μπορούν να ανάγουν το Cr(VI) υπό συνθήκες απουσίας οξυγόνου, όπως *Achromobacter eurydice*, *B. cereus*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *D. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *E. coli* και *Micrococcus roseus* (Cheung & Gu, 2007). Υπό αναερόβιες συνθήκες (Σχήμα 2.10), η διαδικασία της αναγωγής πραγματοποιείται μέσω διαλυτών ενζύμων (SR) και ενζύμων της κυτταρικής μεμβράνης (MR), έναν συνδυασμό SR και MR ενζύμων, καθώς και κυτόχρωμα *b*, *c* και *d* (Wang & Shen, 1995). Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η αναγωγή του Cr(VI) στο βακτήριο *D. vulgaris* πραγματοποιείται από ένα διαλυτό κυτόχρωμα *c₃* (Lovley & Phillips, 1994). Το Cr(VI) μπορεί να λειτουργήσει επίσης ως τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων στην αλυσίδα της αναπνοής του κυττάρου για μεγάλο αριθμό δοτών ηλεκτρονίων, όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, υδρογόνο, NAD(P)H και ενδογενών ηλεκτρονίων από τα αποθέματα του κυττάρου (Ramírez-Díaz et al., 2008), όπως το βακτήριο *Desulfotomaculum reducens* (Tebo & Obraztsova, 1998).



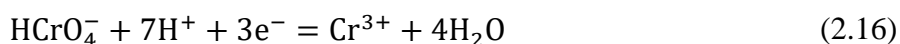
Σχήμα 2.10 Μηχανισμός αναγωγής εξασθενούς χρωμίου σε βακτηριακά κύτταρα ενδοκυτταρικά, υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Προσαρμογή από Pradhan et al., 2017).

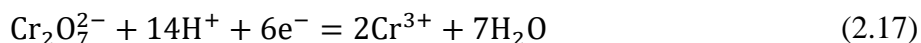
2.6 Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αναγωγή του Cr(VI) μέσω μικροοργανισμών μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες μέσω πληθώρας ενζύμων, εξωκυτταρικά, ενδοκυτταρικά ή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Huang et al., 2021; Rahman & Thomas, 2021). Αναγωγή μπορεί επίσης να προκληθεί από μεταβολικά υποπροϊόντα των μικροοργανισμών, όπως ο βιοπαραγόμενος Fe(II), το υδρογόνο και/ή τα σουλφίδια (Brookshaw et al., 2014; Faybishenko et al., 2008; Li et al., 2019). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της βιοαποκατάστασης είναι ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί επί τόπου (*in situ*) χωρίς να προκαλέσει την καταστροφή της θέσης και ότι επιτρέπει μια συνεχή διαδικασία αναγωγής του Cr(VI) μέσω της προσθήκης δοτών ηλεκτρονίων (Fernández et al., 2018). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της μικροβιακής αναγωγής του Cr(VI) μπορεί να επηρεαστεί από τα συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του ρυπασμένου νερού ή/και της ρυπασμένης περιοχής, συμπεριλαμβανομένου του pH, της θερμοκρασίας, άλλων τοξικών ουσιών ή διαφορετικών αποδεκτών ηλεκτρονίων (Song et al., 2021). Στις επόμενες ενότητες αναλύονται οι βασικότερες παράμετροι που επηρεάζουν τη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III), ενώ έμφαση δίνεται στην επιτόπια βιοαποκατάσταση.

2.6.1 Αρχικό pH

Το pH αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα στη διαδικασία της μικροβιακής αναγωγής του Cr(VI), καθώς καθορίζει την οξειδωτική κατάσταση του χρωμίου. Ανάλογα με την τιμή του pH, το εξασθενές και το τρισθενές χρώμιο μπορούν να πάρουν διάφορες μορφές, όπως CrO_4^{2-} , HCrO_4^- ή $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ και $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, $\text{Cr}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ ή $\text{Cr}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4^+$, αντίστοιχα (Narayani & Shetty, 2013). Το pH μπορεί ακόμη να επηρεάσει την αβιοτική αναγωγή του Cr(VI) μέσω διαφόρων οργανικών και ανόργανων ουσιών. Έχει αποδειχτεί ότι μείωση του pH οδηγεί σε αύξηση των ρυθμών αναγωγής Cr(VI) μέσω φαινολικών ουσιών και ορυκτών που περιέχουν Fe(II) (Xiao et al., 2012). Η αναγωγή του Cr(VI) είναι αντίδραση κατανάλωσης πρωτονίων, όπως φαίνεται και από τις ακόλουθες εξισώσεις (2.16-2.17) (Hlihor et al., 2017):





Παράλληλα η τιμή του pH μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και τη δραστηριότητα ενζύμων, τον ρυθμό μεταφοράς ιόντων του ρύπου και τις θέσεις στις οποίες δεσμεύεται το χρώμιο στην επιφάνεια των κυττάρων. Η βιοαποκατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεγάλο εύρος τιμών pH, με πιο ευνοϊκές τις τιμές από 6.5-8.5, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.6. Υπό αλκαλικές συνθήκες, η ικανότητα αναγωγής του Cr(VI) μειώνεται με την αύξηση της τιμής του pH. Οι Zhu et al. (2008) παρατήρησαν ότι σε καλλιέργειες του *Achromobacter sp.* (strain Ch1) υπό αναερόβιες συνθήκες, η απομάκρυνση του Cr(VI) βελτιωνόταν με αύξηση του pH από 7 σε 9 (βέλτιστη τιμή το 9), αλλά επιπλέον αύξηση - από 9 σε 11- προκαλούσε αναχαίτιση της διαδικασίας. Επιπλέον, η αναγωγή του Cr(VI) επηρεάζεται και υπό έντονα όξινες συνθήκες. Αύξηση της συγκέντρωσης πρωτονίων (ιόντων υδρογόνου, H⁺) στο περιβάλλον λόγω της παρουσίας οξέων προκαλεί βλάβες στην κυτταρική δομή ορισμένων μικροοργανισμών, και κατά συνέπεια, επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη και το μεταβολισμό τους (Jobby et al., 2018; Lund et al., 2020). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση του *Bacillus sp.* CRB-B1, όπου σε pH = 4 – 5, η ικανότητα απομάκρυνσης Cr του μικροοργανισμού ήταν περίπου 20%, με τη βέλτιστη απομάκρυνση (100%) να καταγράφεται σε εύρος pH από 6-8 (Tan et al., 2020).

Ωστόσο, στην περίπτωση της βιοπροσρόφησης, ο ρυθμός απομάκρυνσης αυξάνεται με τη μείωση του pH. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα του μικροοργανισμού *Arthrobacter viscosus* παρατηρήθηκε ότι οι βέλτιστες συνθήκες pH ήταν στο εύρος από 1-2 (100% απομάκρυνση), ενώ αύξηση του pH στο 3 ή 4 οδηγούσε σε εξαιρετικά χαμηλές απομακρύνσεις (15.76% μέγιστη απομάκρυνση) (Hlihor et al., 2017). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και σε άλλες μελέτες (Wu et al., 2010; Zhang et al., 2015), ενώ σημειώνεται ότι η επίδραση του pH όσον αφορά το ρυθμό βιοπροσρόφησης Cr(VI), δε διέφερε μεταξύ ζώντων και νεκρών κυττάρων.

Πίνακας 2.6 Παραδείγματα μικροοργανισμών και της ικανότητας απομάκρυνσης Cr(VI) σε σχέση με το αρχικό pH του διαλύματος.

Μικροοργανισμός	pH	Βαθμός απομάκρυνσης (%)	Αναφορά
<i>Acinetobacter baumannii</i> L2	5	73	(Sathishkumar et al., 2017)
	6	67	
	7	97	
	8	65	
	9	67	
	10	18	
<i>Bacillus cohnii</i>	8	77	(Sarankumar et al., 2020)
	9	94	
	10	79	
<i>Bacillus licheniformis</i>	8	79	(Mangaiyarkarasi et al., 2011)
	9	95	
	10	65	
<i>Bacillus subtilis</i>	6	32	(Mangaiyarkarasi et al., 2011)
	7	63	
	8	82	
	9	96	
<i>Bacillus sp.</i> CRB-B1	4	~ 20	(Tan et al., 2020)
	5	~ 20	
	6	100	
	7	100	
	8	100	
	9	93.71	
10	~ 25		
<i>Cellulosimicrobium funkei</i> AR8	5	56.70	(Karthik et al., 2017)
	6	76.77	
	7	100	
	8	86.67	
	9	60.40	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5	95	(Sathishkumar et al., 2017)
	6	92	
	7	99.45	
	8	99.58	
	9	89	
	10	76	
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> WY601	4	~ 48	(Liu et al., 2019)
	5	~ 52	
	6	~ 60	
	7	~ 58	
	8	~ 55	
	9	< 10	
10	< 10		

2.6.2 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ένας ακόμη παράγοντας που επιδρά στη διαδικασία της βιοαποκατάστασης, καθώς επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των βακτηριακών κυττάρων και τα χαρακτηριστικά της φυσιολογίας τους. Αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει αύξηση του ρυθμού της βιοαποκατάστασης, ενώ μείωση μπορεί ακόμη και να σταματήσει τη διαδικασία της αποκατάστασης (Sharma et al., 2022). Σύμφωνα με τους Das et al. (2014) σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη του βακτηρίου *Bacillus amyloliquefaciens*, η εφαρμογή ακραίων θερμοκρασιών για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, μείωσε δραστικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την αναγωγή του Cr(VI), εξαιτίας της απώλειας της βιωσιμότητας και της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τη βέλτιστη, παρατηρήθηκε απώλεια λειτουργίας του ενζύμου της χρωμικής αναγωγής (chromate reductase), αλλαγές στη δομή της κυτταρικής μεμβράνης ή απενεργοποίηση του μηχανισμού σύνθεσης πρωτεϊνών. Αύξηση της θερμοκρασίας στους 30-40 °C, ευνοεί τη μικροβιακή αναγωγή των τοξικών μετάλλων. Αντίθετα, υπό χαμηλές θερμοκρασίες, η ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης μειώνεται, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς αναστέλλεται η αποτελεσματικότητα του συστήματος μεταφοράς των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την ανάπτυξή τους (Narayani & Shetty, 2013). Για παράδειγμα, σε στελέχη του βακτηρίου *Bacillus* sp. QH-1 μείωση της θερμοκρασίας στους 4 °C προκαλούσε σημαντικά μειωμένη αναγωγή Cr(VI) (συνολική απομάκρυνση 25%) (Xu et al., 2014). Αναχαίτιση της διαδικασίας της αναγωγής παρατήρησαν και οι Ekenberg et al. (2005) σε έναν αναερόβιο βιοαντιδραστήρα, όταν η θερμοκρασία μειώθηκε κάτω από τους 10 °C. Παράλληλα, οι Mamais et al. (2016) απέδειξαν ότι η θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού βιοαναγωγής του Cr(VI) μπορεί να περιγραφεί ικανοποιητικά μέσω της εξίσωσης Arrhenius και ότι στο θερμοκρασιακό εύρος 12 °C - 33 °C, πτώση 10 °C οδηγεί σε σημαντική μείωση του μέγιστου ρυθμού αναγωγής Cr(VI) (1.9 φορές).

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.7, η ιδανική θερμοκρασία για την αναγωγή του Cr(VI) βασίζεται κυρίως στο είδος του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, τα βακτηριακά γένη *Bacillus* sp. και *Acinetobacter baumannii* έχουν ως βέλτιστη θερμοκρασία αναγωγής τους 37 °C, ενώ το βακτήριο *Enterobacter* sp. SL τους 45 °C. Γενικά, τα περισσότερα βακτήρια που

μπορούν να ανάγουν το Cr(VI) έχουν ως βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος τους 30-37 °C (Losi et al., 1994). Ωστόσο, υπάρχουν και ορισμένοι θερμοφιλοί μικροοργανισμοί (κυρίως βακτήρια), όπου η αναγωγή του Cr(VI) μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ιδιαίτερα υψηλές θερμοκρασίες, όπως ο μεθανογόνος μικροοργανισμός *Methanothermobacter thermautotrophicus* που μπορεί να ανάγει το Cr(VI) με ικανοποιητικά αποτελέσματα σε θερμοκρασία ίση περίπου με 70 °C (Singh et al., 2015). Οι θερμοκρασιακές εναλλαγές φαίνεται ότι δεν επηρεάζουν σημαντικά τη διαδικασία της βιοπροσρόφησης (Tang et al., 2021), ακόμα και σε αύξηση της θερμοκρασίας από 26 °C σε 50 °C (Hlihor et al., 2017), πιθανότατα λόγω του γεγονότος ότι η βιοπροσρόφηση είναι μια φυσική διεργασία που απαιτεί χαμηλή ενέργεια ενεργοποίησης, ακόμα και μετά από πιθανή βλάβη του μικροβιακού κυττάρου λόγω της υψηλής θερμοκρασίας (Özdemir et al., 2009).

Πίνακας 2.7 Παραδείγματα επίδρασης της θερμοκρασίας στο βαθμό απομάκρυνσης του Cr(VI) μέσω μικροοργανισμών.

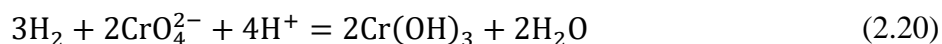
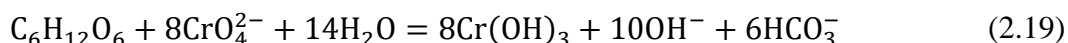
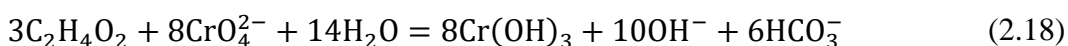
Μικροοργανισμός	Θερμοκρασία (°C)	Βαθμός απομάκρυνσης (%)	Αναφορά
<i>Acinetobacter baumannii</i>	27	93	(Sathishkumar et al., 2017)
	37	97	
	60	85	
<i>Bacillus</i> sp. CRB-B1	25	44.91	(Tan et al., 2020)
	29	82.36	
	33	100	
	37	100	
	41	89.76	
<i>Bacillus</i> sp. QH-1	4	25	(Xu et al., 2014)
	15	57	
	25	~83	
	37	~100	
<i>Cellulosimicrobium funkei</i> AR8	25	53.13	(Karthik et al., 2017)
	30	80.45	
	35	100	
	40	91.72	
	45	57.41	
<i>Enterobacter</i> sp. SL	25	~60	(Sun et al., 2020)
	35	~80	
	45	~100	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	27	94	(Sathishkumar et al., 2017)
	37	99	
	60	92	

Μικροοργανισμός	Θερμοκρασία (°C)	Βαθμός απομάκρυνσης (%)	Αναφορά
<i>Stenotrophomonas ravanii</i> WY601	20	< 10	(Liu et al., 2019)
	25	< 10	
	28	~10	
	35	~25	
	37	~60	
	39	~60	
	50	~20	

2.6.3 Δότης ηλεκτρονίων

Η προσθήκη δότη ηλεκτρονίων επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία της βιοχημικής αναγωγής του Cr(VI) και η μη διαθεσιμότητα τους μπορεί να περιορίσει την βιοαποκατάσταση. Ως δότες ηλεκτρονίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν μια πληθώρα οργανικών και ανόργανων ουσιών, όπως η λακτόζη, η γλυκόζη, η φρουκτόζη, το οξικό οξύ, ο σίδηρος, το υδρόθειο, το υδρογόνο, κ.ά. (Dey et al., 2014). Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται για την αβιοτική και βιοτική διέγερση των μικροοργανισμών και η προσθήκη τους (συγκέντρωση και είδος ουσίας), ευνοεί τη βιοαναγωγή του Cr(VI). Σύμφωνα με τους Brodie et al. (2011), η προσθήκη ενώσεων πολυμερισμένου γαλακτικού οξέος μπορεί να οδηγήσει σε έως και 100 φορές αύξηση της μικροβιακής μάζας και δραστηριότητας μεικτών αναερόβιων καλλιεργειών.

Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.8, η γλυκόζη είναι μια ουσία που χρησιμοποιείται συχνά ως δότης ηλεκτρονίων σε εφαρμογές βιολογικής αναγωγής Cr(VI) με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Το οξικό οξύ, που ανήκει στα πτητικά λιπαρά οξέα και αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν στη διαδικασία της αναερόβιας αποικοδόμησης οργανικών ενώσεων, είναι ένας ακόμη δότης e⁻ που χρησιμοποιείται συχνά και σύμφωνα με τους Lin et al. (2015), σε *ex situ* εφαρμογή με τη χρήση του βακτηρίου *Escherichia coli* 33456, μπορεί να επιτύχει έως και 92% απομάκρυνση Cr(VI), που προστίθεντο στον αντιδραστήρα με ρυθμό 11.3 g/[m³·ημέρα]. Σε υπόγειους υδροφορείς, το υδρογόνο εντοπίζεται συχνά (He et al., 2020) και έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δότης ηλεκτρονίων από διάφορα είδη μικροοργανισμών (Rahman & Thomas, 2021). Η αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση οξικού οξέος, γλυκόζης και υδρογόνου ως δότες ηλεκτρονίων περιγράφεται στις εξισώσεις 2.18 - 2.20 (Zheng et al., 2019).



Πολύ καλά ποσοστά απομάκρυνσης εξασθενούς χρωμίου μπορούν να επιτευχθούν και με τη χρήση μελάσας (Πίνακας 2.8), ένα παραπροϊόν που προέρχεται από την επεξεργασία του ζαχαρότευτλου. Οι Lin et al. (2020) παρατήρησαν ότι υπό αναερόβιες συνθήκες, μικτές μικροβιακές καλλιέργειες είχαν την ικανότητα να ανάγουν πλήρως το Cr(VI) όταν ως δότης e^- προστέθηκε μελάσα, ενώ μόνο 83% και 59%, όταν δότης ηλεκτρονίων ήταν γαλακτοποιημένα πολυκκολλοειδή υποστρώματα και nutrient broth. Σε μελέτη των Yang et al. (2022) προσθήκη μελάσας μπορούσε να επιτύχει πλήρη απομάκρυνση του Cr(VI) ακόμα και σε συγκεντρώσεις 25 mg/L, σε αντίθεση με τη γλυκόζη και το γαλακτωματοποιημένο φυτικό έλαιο, όπου η επιτυχία ήταν μόνο 20%. Σύμφωνα με την Πανούση (2018), ο μέγιστος ρυθμός απομάκρυνσης του Cr(VI) υπό αναερόβιες συνθήκες με χρήση ζάχαρης ως κύριο οργανικό υπόστρωμα ήταν κατά μέσο όρο 263 $\mu\text{g Cr(VI)}/\text{gVSS}/\text{h}$, ενώ με χρήση γάλακτος και τυρόγαλου ήταν 100 $\mu\text{g Cr(VI)}/\text{gVSS}/\text{h}$ και 179 $\mu\text{g Cr(VI)}/\text{gVSS}/\text{h}$, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι εύκολα βιοαποικοδομήσιμα υποστρώματα, όπως η ζάχαρη, υποστηρίζουν υψηλότερα ποσοστά απομάκρυνσης Cr(VI) σε σχέση με πιο πολύπλοκα ζυμώσιμα υποστρώματα, όπως το γάλα και το τυρόγαλο.

Σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της μικροβιακής αναγωγής του Cr(VI) παίζει και η συγκέντρωση του δότη ηλεκτρονίων. Σε πειράματα των Zhu et al. (2008) για τη μελέτη της αναερόβιας αναγωγής του Cr(VI) με χρήση βακτηριακών κυττάρων *Achromobacter* sp. Ch1 και γαλακτικού οξέος ως δότη ηλεκτρονίων, παρατηρήθηκε εμφανής και σημαντική αύξηση του ρυθμού αναγωγής με την αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος. Οι Panousi et al. (2019) μελέτησαν την επίδραση της δόσης του δότη ηλεκτρονίων (200, 150 και 100 mg COD/L) σε έναν αντιδραστήρα SRB υπό ανοξικές συνθήκες (15 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$). Παρατήρησαν ότι μόνο με την προσθήκη της μέγιστης δόσης επετεύχθη πλήρης αναγωγή 200 $\mu\text{g/L Cr(VI)}$, ενώ με τις μικρότερες, το ποσοστό απομάκρυνσης ήταν μεταξύ 68-89%. Παράλληλα, οι Philip et al. (1998) απέδειξαν ότι υπάρχει θετική συσχέτιση στην αύξηση της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων και της συνολικής απομάκρυνσης Cr(VI). Παρατήρησαν ότι 200 mg/L μηλικού

οξέος οδηγούσαν σε περίπου 50% απομάκρυνση Cr(VI) αρχικής συγκέντρωσης 104 mg/L, 400 mg/L σε 75% απομάκρυνση, ενώ για την πλήρη απομάκρυνση έπρεπε να προστεθούν 5,000 mg/L.

Πίνακας 2.8 Επίδραση είδους δότη ηλεκτρονίων στην μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI).

Μικροοργανισμός	Δότης ηλεκτρονίων	Βαθμός απομάκρυνσης (%)	Αναφορά
<i>Aspergillus niger</i>	γλυκόζη	98.75	(Shugaba et al., 2010)
	οξικό οξύ	92.5	
	ταννικό οξύ	85	
<i>Aspergillus parasiticus</i>	γλυκόζη	90	
	οξικό οξύ	83.5	
	ταννικό οξύ	68.8	
<i>Bacillus sp.</i> CRB-B1	γλυκόζη	76.64	(Tan et al., 2020)
	φρουκτόζη	89.54	
	σουκρόζη	13.50	
	μανιτόλη	5.07	
	οξικό οξύ	4.08	
	λακτόζη	10.86	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	γλυκόζη	14.6	(Das et al., 2014)
	φρουκτόζη	12.6	
	λακτόζη	10.1	
	σουκρόζη	7.7	
	οξικό οξύ	4.3	
Μεικτή αναερόβια καλλιέργεια	πεπτόνη	~100	(Krishna & Philip, 2005)
	μελάσα	~100	
	δεξτρόζη	~70	
	λύματα	~60	
	οξικό οξύ	~60	
Μεικτή αναερόβια καλλιέργεια	μελάσα	99.9	(Yang et al., 2022)
	γλυκόζη	20.9	
	EVO	20.3	
Μεικτή αναερόβια καλλιέργεια	H ₂	90.5	(He et al., 2020)
	CH ₄	79.9	
Μεικτή αναερόβια καλλιέργεια	μελάσα	100	(Lin et al., 2020)
	γαλακτοποιημένα πολυκολλοειδή υποστρώματα	83	
	nutrient broth	59	
<i>Enterobacter sp.</i> SL	γλυκόζη	91.89	(Sun et al., 2020)
	σουκρόζη	36.68	
	οξικό αμμώνιο	30.78	
	βαγάσση	33.52	
	μη οργανική πηγή	33.46	

Μικροοργανισμός	Δότης ηλεκτρονίων	Βαθμός απομάκρυνσης (%)	Αναφορά
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> WY601	γαλακτικό οξύ	~72	(Liu et al., 2019)
	φρουκτόζη	~68	
	γλυκόζη	~80	
	κιτρικό οξύ	~20	
	μυρμηκικό οξύ	~25	
	λακτόζη	~32	
	NADH	~60	
	NADPH	~55	
	άμυλο	~35	

2.6.4 Συγκέντρωση βιομάζας

Μελέτες έχουν δείξει ότι η βιοχημική αναγωγή του Cr(VI) επηρεάζεται και από τη συγκέντρωση της μικροβιακής βιομάζας και φαίνεται ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της αρχικής συγκέντρωσης και της ταχύτητας απομάκρυνσης (rate of removal) του Cr(VI), με αύξηση των βακτηριακών κυττάρων να οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού αναγωγής (Wang et al., 1989; Zhu et al., 2008). Σύμφωνα με τους Pal & Paul (2004), ο ρυθμός της αναγωγής του Cr(VI) υπό αερόβιες συνθήκες με κύτταρα του βακτηριακού στελέχους *B. sphaericus* AND303 αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης της βιομάζας σε εύρος από 10^7 - 10^{10} κύτταρα/ml. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν επίσης και από μελέτη των Pattanapipitpaisal et al. (2001) σε κύτταρα του *Microbacterium* sp. MP30. Για αρχική συγκέντρωση Cr(VI) = 100 μ M και αρχική συγκέντρωση κυτταρικής βιομάζας 2.7×10^6 κύτταρα/ml, ο ρυθμός αναγωγής ήταν 2.2 nmol/ώρα, ενώ για αρχική συγκέντρωση κυτταρικής βιομάζας 2.4×10^9 κύτταρα/ml, ο ρυθμός αναγωγής αυξανόταν σε 3.9 nmol/ώρα.

Η συγκέντρωση της βιομάζας επηρεάζει και την απομάκρυνση του Cr(VI) μέσω του μηχανισμού της βιοσυσσώρευσης (bioaccumulation). Όπως αναλύθηκε και στην ενότητα 2.5.4, η βιοσυσσώρευση αποτελείται κυρίως από δύο (2) βασικά στάδια: την 1^η φάση, η οποία είναι γρήγορη και περιλαμβάνει φυσική προσρόφηση ή ιοντοανταλλαγή στην κυτταρική επιφάνεια και τη 2^η φάση, η οποία είναι πιο αργή και περιλαμβάνει την μεταφορά του ρύπου στο εσωτερικό του κυττάρου και την αναγωγή του μέσω μεταβολικών δραστηριοτήτων (Srinath et al., 2002; Wu et al., 2010). Συνεπώς, η αύξηση της συγκέντρωσης των μικροβιακών

κυττάρων είναι σημαντική για την αποτελεσματική απορρύπανση της ρυπασμένης περιοχής μέσω του μηχανισμού της βιοσυσσώρευσης.

2.6.5 Συγκέντρωση εξασθενούς χρωμίου

Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, αύξηση της συγκέντρωσης του εξασθενούς χρωμίου οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό και βαθμό αναγωγής. Για παράδειγμα, σε μελέτη των Ohtake et al. (1990) παρατηρήθηκε ότι αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης CrO_4^{2-} από 0.5 mM σε 10 mM σε καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Enterobacter cloacae* HO1 οδηγούσε σε μείωση των ρυθμών αναγωγής κατά 14 φορές. Το Cr(VI) είναι μια ιδιαίτερα τοξική ουσία που προκαλεί πληθώρα βλαβών στα κύτταρα των έμβιων οργανισμών και στους μικροοργανισμούς. Στον Πίνακα 2.9 παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης Cr(VI) στο βαθμό απομάκρυνσης του ρύπου. Σε μικροβιακές καλλιέργειες, στις οποίες η αρχική συγκέντρωση Cr(VI) ξεπερνούσε ένα συγκεκριμένο όριο - το οποίο μεταβάλλεται ανάλογα με το μικροοργανισμό και τις εκάστοτε συνθήκες (pH, παρουσία O_2 , θερμοκρασία, δότης ηλεκτρονίων) - τα κύτταρα υφίσταντο σημαντικές μορφολογικές βλάβες και περιορισμούς στην ανάπτυξη, με αποτέλεσμα η αναγωγή να σταματά πλήρως. Οι Liu et al. (2012) παρατήρησαν σε κύτταρα του μικροοργανισμού *Microbacterium* sp. ότι η ανάπτυξη του μικροοργανισμού μειωνόταν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του Cr(VI) που προστίθεντο στο μέσο ανάπτυξης. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από μελέτη των Karthik et al. (2017) σε κύτταρα του βακτηρίου *Cellulosimicrobium funkei* AR8. Σύμφωνα με τους τελευταίους, η παραγωγή μειωμένης ποσότητας βιομάζας λόγω αύξησης της συγκέντρωσης του Cr(VI) οφείλεται πιθανότατα στο γεγονός ότι μεγάλο μέρος των ηλεκτρονίων που παράγονται από την οξείδωση των οργανικών πηγών άνθρακα και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση κυτταρικών συστατικών, χρησιμοποιούνται για την αναγωγική αποτοξίνωση του Cr(VI), με αποτέλεσμα να μειώνεται η ταχύτητα ανάπτυξης της βιομάζας. Οι Panousi et al. (2016) κατέδειξαν επίσης ότι η τοξικότητα του Cr(VI) στη μικροβιακή ανάπτυξη είναι συνάρτηση και της παρουσίας ή απουσίας άλλων αποδεκτών ηλεκτρονίων. Σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με μεικτές καλλιέργειες σε αντιδραστήρες SBR, παρατήρησαν ότι υπό αναερόβιες συνθήκες, αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης Cr(VI) πάνω από 2,000 $\mu\text{g/L}$ προκαλούσε σημαντική αναχαίτιση της ανάπτυξης

των μικροοργανισμών και είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη απομάκρυνση Cr(VI). Ωστόσο, βιομάζα που είχε αναπτυχθεί υπό ανοξικές συνθήκες, παρουσίασε υψηλότερη ανοχή στο Cr(VI). Συγκεκριμένα, για αρχική συγκέντρωση Cr(VI) = 3,000 µg/L, η αναχαίτιση της ανάπτυξης ήταν μικρότερη από 45%, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η ικανότητα απομάκρυνσης Cr(VI), που παρέμενε μεγαλύτερη από 98%. Σημαντική αναχαίτιση, μεγαλύτερη από 75%, παρατηρήθηκε σε εύρος συγκεντρώσεων Cr(VI) 10,000 – 15,000 µg/L.

Ανάλυση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βακτηριακών κυττάρων του στελέχους *Bacillus* sp. QH-1 σε πειράματα των Xu et al. (2014) απέδειξε ότι η παρουσία Cr(VI) είχε επίσης σημαντική επίδραση και στη μορφολογία των κυττάρων. Χωρίς Cr, τα κύτταρα είχαν σχετικά κανονικά ραβδοειδή σχήματα με λείες επιφάνειες. Προσθήκη 25 mg/L Cr(VI) προκαλούσε ρυτίδωση της επιφάνειας του κυττάρου, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (100-200 mg/L), το κυτταρικό τοίχωμα εμφάνιζε διαιρέσεις και παραμορφώσεις. Επιπλέον, οι Yang et al. (2007) παρατήρησαν σε κύτταρα του βακτηρίου *Enterobacter cloacae* ότι αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης Cr(VI) όχι μόνο προκαλούσε δομικές αλλαγές στην επιφάνεια των κυττάρων, αλλά και αύξηση του μεγέθους του κυττάρου, η οποία ήταν ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης Cr. Ωστόσο, οι Kalsoom et al. (2023) σε πειράματα με κύτταρα του βακτηρίου *Enterobacter cloacae* UT25 παρατήρησαν και αυτοί λύση του βακτηριακού κυττάρου, όμως μείωση του μεγέθους παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων Cr(VI).

Σε ορισμένες μελέτες έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο, όπου αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης Cr(VI), να αυξάνει και την αρχική ταχύτητα απομάκρυνσης του. Σύμφωνα με τους Narayani & Shetty (2013), αύξηση των μεταλλικών ιόντων Cr(VI) στο διάλυμα, οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού σύγκρουσης (collision rate) αυτών στα ενεργά κέντρα της κυτταρικής επιφάνειας του μικροοργανισμού και μεγαλώνει η πιθανότητα ενεργών συγκρούσεων. Παράλληλα, όταν μεγαλώνει ο αριθμός των ενεργών συγκρούσεων, το Cr(VI) καταλαμβάνει περισσότερα ενεργά κέντρα ενζύμων. Συνεπώς, επειδή η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) πραγματοποιείται μέσω ενζύμων, παρατηρείται αύξηση του ρυθμού πραγματοποίησης αυτής της ενζυματικής αντίδρασης. Η αύξηση της ενζυματικής δραστηριότητας συνεχίζεται μέχρι τα ένζυμα να κορεστούν από το Cr(VI). Ο μηχανισμός αυτός λαμβάνει χώρα μόνο όταν η συγκέντρωση του Cr(VI) είναι μικρότερη από το όριο αναχαίτισης του μικροοργανισμού. Το

φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε αρκετές μελέτες. Οι Nguema & Luo (2012) παρατήρησαν σε κύτταρα του μικροοργανισμού *Clostridium* sp. SS1 ότι ο ρυθμός αναγωγής του Cr(VI) ήταν ταχύτερος στα πρώτα στάδια (2 ώρες) της διαδικασίας και σταδιακά μειώθηκε. Οι Pal & Paul (2004) κατέγραψαν παρόμοια αποτελέσματα σε κύτταρα του μικροοργανισμού *B. sphaericus* AND303. Ο ρυθμός αναγωγής αυξανόταν με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης Cr(VI) (έως 100 mg/L) και ήταν υψηλότερος (1.42 mg Cr(VI)/L/h) κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών της διαδικασίας. Στη συνέχεια, με την πάροδο του χρόνου οι ρυθμοί μειώνονταν, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση Cr(VI).

Πίνακας 2.9 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης Cr(VI) στο βαθμό απομάκρυνσης του ρύπου.

Μικροοργανισμός	Συγκέντρωση Cr(VI) (mg/L)	Βαθμός απομάκρυνσης (%)	Αναφορά
<i>Acinetobacter baumannii</i>	100	99	(Sathishkumar et al., 2017)
	500	90	
	1000	84	
<i>Bacillus cohnii</i>	100	94	(Sarankumar et al., 2020)
	550	82	
<i>Bacillus licheniformis</i>	100	95	
	550	90	
<i>Bacillus subtilis</i>	50	100	(Mangaiyarkarasi et al., 2011)
	100	71	
	150	62	
	200	27	
<i>Bacillus</i> sp.	20	90	(Elangovan et al., 2006)
	40	80	
	80	50	
<i>Bacillus</i> sp. QH-1	25	99.48	(Xu et al., 2014)
	50	65.99	
	100	23.22	
	200	6.99	
<i>Providencia</i> sp.	100	100	(Thacker et al., 2006)
	200	100	
	300	100	
	400	99.31	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	97	(Sathishkumar et al., 2017)
	500	77	
	1000	40	
<i>Stenotrophomonas pavanii</i> WY601	300	~90	(Liu et al., 2019)
	500	67.14	
	1000	41.88	
	2000	31.42	
	2500	27.62	

Μικροοργανισμός	Συγκέντρωση Cr(VI) (mg/L)	Βαθμός απομάκρυνσης (%)	Αναφορά
	50	~100	
Μεικτή καλλιέργεια	100	99.8	(Yang et al., 2021)
	150	87.3	
	200	66.3	

2.6.6 Οξειδοαναγωγικές συνθήκες

Σημαντικό ρόλο στην αναγωγή του Cr(VI) μέσω μικροβιακών διεργασιών παίζει και η παρουσία ή απουσία οξυγόνου (O₂). Πολλοί μικροοργανισμοί ανάγουν το Cr(VI) καλύτερα υπό αερόβιες συνθήκες απ' ό τι υπό αναερόβιες. Οι Krishna & Philip (2005) έδειξαν ότι υπό αερόβιες συνθήκες επιτυγχάνονται υψηλότεροι ρυθμοί αναγωγής Cr(VI) σε σχέση με τις αναερόβιες συνθήκες. Αυτό μπορεί να συμβαίνει γιατί οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί είναι πιο ευαίσθητοι σε τοξικές ουσίες όπως τα βαρέα μέταλλα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από μελέτη των Jeyasingh & Philip (2005). Οι Ishibashi et al. (1990) παρατήρησαν επίσης ότι η αναγωγή του Cr(VI) με κύτταρα *Pseudomonas putida* PRS2000 είναι ταχύτερη υπό αερόβιες συνθήκες σε σύγκριση με τις αναερόβιες. Επιπλέον, η παρουσία οξυγόνου μπορεί να επηρεάσει και το ρυθμό αναγωγής ακόμα και αν η αναγωγή πραγματοποιείται από το ίδιο ένζυμο υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, όπως στην περίπτωση των μικροοργανισμών *Pseudomonas ambigua* G-1 και *P.putida* PRS2000, οι οποίοι διαθέτουν μια διαλυτή αναγωγάση που μπορεί να ανάγει το χρωμικό ιόν παρουσία και απουσία O₂, με τον υψηλότερο ρυθμό αναγωγής να παρατηρείται υπό αερόβιες συνθήκες (Mclean & Beveridge, 2001).

Ωστόσο, σύμφωνα με τους Chen & Gu (2005), σύγκριση συστημάτων ενεργού ιλύος με την ίδια αρχική συγκέντρωση MLVSS, κατέδειξε ότι οι αναερόβιες συνθήκες οδηγούν σε υψηλότερη απομάκρυνση Cr(VI) τις πρώτες 16 ημέρες λειτουργίας του συστήματος, ωστόσο μετά την 20^η ημέρα, οι αερόβιες συνθήκες οδήγησαν σε μεγαλύτερη απομάκρυνση Cr(VI). Οι Mamais et al. (2016) έδειξαν επίσης σε συστήματα ενεργού ιλύος ότι παρουσία οξυγόνου η απομάκρυνση Cr(VI) ήταν αμελητέα, σε αντίθεση με τα αναερόβια συστήματα που εξετάστηκαν, όπου οι απομακρύνσεις μπορούσαν να φτάσουν κατά μέσο όρο σε ποσοστό

98.6%. Οι Wani et al. (2007) παρατήρησαν επίσης ότι υπό αναερόβιες συνθήκες το βακτήριο *Burkholderia cepacia* MCMB-821 μπορούσε να ανάγει πλήρως 75 mg/L Cr(VI), ενώ υπό αερόβιες, το ποσοστό έπεφτε στο 97%. Επίσης, υπάρχουν και μικροοργανισμοί, όπως το βακτήριο *Microbacterium* sp. MP30 που μελέτησαν οι Pattanapitpaisal et al. (2001), το οποίο μπορεί και αναπτύσσεται υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες παρουσία Cr(VI), ωστόσο δεν έχει τη δυνατότητα να ανάγει το Cr(VI) υπό αερόβιες συνθήκες. Φαίνεται λοιπόν ότι παρουσία οξυγόνου, ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν χαμηλότερη ικανότητα αναγωγής Cr(VI). Μια πιθανή εξήγηση για το φαινόμενο αυτό δίνεται από τους Wang & Shen (1995), σύμφωνα με τους οποίους, από θερμοδυναμικής πλευράς, το οξυγόνο είναι προτιμότερος τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων σε σχέση με το Cr(VI), αφού τα κύτταρα θα λάβουν μεγαλύτερα ποσά ενέργειας μέσω του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιλαμβάνει το κυτόχρωμα.

Η παρουσία ή απουσία O₂ επηρεάζει και τον μηχανισμό με τον οποίο πραγματοποιείται η απομάκρυνση του Cr(VI), ακόμα και στον ίδιο μικροοργανισμό. Για παράδειγμα, οι Huang et al. (2021) παρατήρησαν σε στελέχη του μικροοργανισμού *Sporosarcina saromensis* W5, ότι υπό αερόβιες συνθήκες, το Cr(VI) εισέρχονταν στα βακτηριακά κύτταρα και αναγόταν σταδιακά από την αναγωγή στο κυτόπλασμα. Στη συνέχεια, το Cr που είχε αναχθεί ενδοκυτταρικά ενωνόταν με μικρά οργανικά μόρια ή μεταφερόταν στον εξωκυτταρικό χώρο. Συνεπώς, πάρα πολύ μικρές ποσότητες παρέμεναν στο εσωτερικό του κυττάρου, ενώ το μεγαλύτερο μέρος απελευθερωνόταν στο μέσο με τη μορφή διαλυτών συμπλόκων Cr(III) με οργανικές ενώσεις. Αντιθέτως, υπό αναερόβιες συνθήκες, η αναγωγή του Cr(VI) πραγματοποιούνταν ταυτόχρονα στο κυτόπλασμα (με χρήση της χρωμικής αναγωγής) και την κυτταρική μεμβράνη (με χρήση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων). Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η παρουσία ή απουσία οξυγόνου επηρεάζει σημαντικά το ποιος μηχανισμός του εκάστοτε μικροοργανισμού θα ενεργοποιηθεί για την αναγωγή του Cr(VI) και οδηγεί σε διαφορετικούς ρυθμούς αναγωγής και ανοχής σε συγκεντρώσεις.

2.6.7 Παρουσία άλλων ανιόντων

Οι υπόγειοι υδροφορείς είναι περίπλοκα συστήματα στα οποία συνυπάρχουν πληθώρα ρύπων και ιόντων. Η βιομετατροπή του Cr(VI) σε Cr(III) στα υπόγεια ύδατα μπορεί να επηρεαστεί με τρεις τρόπους: i) αναστολή της μετατροπής λόγω ανταγωνισμού με άλλους αποδέκτες ηλεκτρονίων, ii) συν-μεταβολισμός με άλλες ουσίες, δηλαδή ταυτόχρονη αναγωγή ή μετατροπή τους και iii) επαγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών και οδών που εμπλέκονται σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής (Chovanec et al., 2012). Τα πιο συχνά ανιόντα στα υπόγεια ύδατα παρουσιάζονται παρακάτω μαζί με τους πιθανούς μηχανισμούς επίδρασης στη βιολογική αναγωγή του χρωμίου.

Το θειικό ιόν (SO_4^{2-}) είναι ένας ρύπος που υπάρχει σε αφθονία στα υπόγεια ύδατα, με προέλευση τόσο από φυσικές όσο και από ανθρωπογενείς πηγές, όπως η διάβρωση ορυκτών που περιέχουν ενώσεις του θείου, ηφαιστειακές δραστηριότητες, βροχοπτώσεις, διείδυση θαλασσινού νερού, λιπάσματα, αστικά και βιομηχανικά απόβλητα και λύματα (Chang & Kim, 2007; Sadeghalvad et al., 2021; Samborska et al., 2013; Torres-Martínez et al., 2020). Απουσία οξυγόνου, το θειικό ιόν μπορεί να αναχθεί σε σουλφίδια από βακτήρια που ανάγουν τα θειικά ιόντα (Sulfate Reducing Bacteria, SRB), που χρησιμοποιούν δηλαδή τα θειικά ιόντα ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 2.5.4, τα παραγόμενα σουλφίδια έχουν την ικανότητα να ανάγουν άμεσα και αβιοτικά το Cr(VI) σε Cr(III) (Márquez-Reyes et al., 2013), ενώ ορισμένα θεικοαναγωγικά βακτηριακά γένη έχουν την ικανότητα να ανάγουν ενζυματικά το Cr(VI) (Goulhen et al., 2006; Qian et al., 2016). Ωστόσο, η παρουσία SO_4^{2-} θα μπορούσε ενδεχομένως να έχει ανασταλτική επίδραση στην αναγωγή του Cr(VI) λόγω ανταγωνισμού ως αποδέκτες ηλεκτρονίων και λόγω χρήσης των ίδιων οδών εισόδου στα μικροβιακά κύτταρα (Lv et al., 2018). Σύμφωνα όμως με τους Krishna & Philip (2005), σε αναερόβιες μεικτές καλλιέργειες, η παρουσία θεικών ιόντων ακόμα και σε συγκεντρώσεις που φτάνουν τα 400 mg/L δεν επηρεάζουν τη διαδικασία της αναγωγής. Επιπλέον, φαίνεται ότι η αναγωγή του Cr(VI) μπορεί να πραγματοποιηθεί από το βακτηριακό στέλεχος *Bacillus coagulans* υπό αναερόβιες συνθήκες και παρουσία SO_4^{2-} συγκέντρωσης 1000 mg/L, χωρίς σημαντική επίδραση (Philip et al., 1998). Ωστόσο, υπάρχει ένα κενό στη βιβλιογραφία, το

οποίο απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση σχετικά με την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων SO_4^{2-} στην κινητική απομάκρυνσης του Cr(VI).

Το νιτρικό άζωτο ($\text{NO}_3\text{-N}$) είναι ένας ακόμα συνηθισμένος ρύπος στα υπόγεια ύδατα που προέρχεται κυρίως από γεωργικές δραστηριότητες, δηλαδή από την υπερβολική χρήση αζωτούχων λιπασμάτων, καθώς και από την απόρριψη μη κατάλληλα επεξεργασμένων αστικών και βιομηχανικών λυμάτων (Abascal et al., 2022). Τα τελευταία χρόνια, η ταυτόχρονη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) και του NO_3^- έχουν αποτελέσει το επίκεντρο διαφόρων μελετών, καθώς οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών των δύο χημικών ειδών είναι αρκετά περίπλοκοι, με τα νιτρικά να ενισχύουν ή να παρεμβαίνουν στην αναγωγή του Cr(VI) στα υπόγεια ύδατα (Hausladen et al., 2018). Αρχικά, τόσο το χρώμιο όσο και τα νιτρικά ανταγωνίζονται για την παροχή δότη ηλεκτρονίων και μπορεί να επηρεαστούν από την παρουσία άλλων ανταγωνιστικών δεκτών ηλεκτρονίων (Middleton et al., 2003). Υπό αερόβιες συνθήκες, οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η αναγωγή τόσο του νιτρικού αζώτου όσο και του Cr(VI) μπορούν να πραγματοποιηθούν παράλληλα, με τους ρυθμούς απομάκρυνσης του Cr(VI) να μην επηρεάζονται από την παρουσία νιτρικών, ακόμα και σε συγκεντρώσεις $\text{NO}_3^- = 1,000 \text{ mg/L}$ (Philip et al., 1998), αλλά η συγκέντρωση του Cr(VI) να επηρεάζει και, σε ορισμένες περιπτώσεις, να αναστέλλει σημαντικά την απονιτροποίηση (He et al., 2015; Jin et al., 2017), αν και οι αναφερόμενες συγκεντρώσεις Cr(VI) ήταν μάλλον αντιφατικές (κυμαινόμενες από 7.5 mg/L έως 30 mg/L). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες, οι υψηλές συγκεντρώσεις εξασθενούς χρωμίου δεν επηρέασαν δυσμενώς την ετεροτροφική απονιτροποίηση (Krishna & Philip, 2005; Miao et al., 2015; Sahinkaya & Kilic, 2014; X. Yu et al., 2016). Από την άλλη πλευρά, έχει αναφερθεί ότι υπό υψηλή συγκέντρωση νιτρικών, η αναγωγή του Cr(VI) αναστέλλεται μη αναστρέψιμα (Zhong et al., 2017). Ωστόσο, η πλειονότητα αυτών των μελετών έχει επικεντρωθεί σε εφαρμογές *ex situ* και, σε ορισμένες περιπτώσεις, διεξήχθη με πολύ συγκεκριμένα μικροβιακά στελέχη. Φαίνεται συνεπώς ότι υπάρχουν αντικρουόμενα δεδομένα σχετικά με τον ακριβή τρόπο με τον οποίο το νιτρικό άζωτο επιδρά στη βιοαναγωγή του χρωμίου.

Στα υπόγεια ύδατα συναντώνται και άλλα είδη ανιόντων. Η παρουσία ανιόντων CO_3^{2-} φαίνεται ότι αναχαιτίζει την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων του γένους *Enterobacter sp.* SL,

οδηγώντας σε μειωμένους ρυθμούς αναγωγής Cr(VI) (Sun et al., 2020). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Abo-Alkasem et al. (2022), δε φαίνεται να επηρεάζει την αερόβια αναγωγή Cr(VI) σε κύτταρα *Salipaludibacillus agaradhaerens* NRC-R. Οι ίδιοι απέδειξαν επίσης, ότι ούτε η παρουσία HPO_4^- επιδρά αρνητικά στη διαδικασία της αναγωγής. Σύμφωνα με τους Ma et al. (2019) σε πειράματα με μεικτή αναερόβια καλλιέργεια, 50 mg/L HCO_3^- δεν επιδρούν στην αναγωγή Cr(VI). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Ishibashi et al. (1990) η διαδικασία της αναγωγής σε κύτταρα *Pseudomonas putida* PRS2000 προχωρούσε ανεμπόδιστα παρουσία ανιόντων SO_3^{2-} , MoO_4^{2-} , VO_4^{2-} και PO_4^{3-} συγκέντρωσης 200 μM . Cl^- και CO_3^{2-} δεν είχαν επίσης καμία επίδραση στην αναγωγή του χρωμίου με *Streptomyces griseus* (Poopal & Laxman, 2009).

2.6.8 Παρουσία άλλων μεταλλικών ιόντων

Συνήθως τα φυσικά περιβάλλοντα χαρακτηρίζονται από τη συνύπαρξη μεγάλου αριθμού τοξικών και μη τοξικών κατιόντων, όπως χαλκός (Cu), νικέλιο (Ni), σίδηρος (Fe), ψευδάργυρος (Zn), μόλυβδος (Pb), κάδμιο (Cd), κοβάλτιο (Co), υδράργυρος (Hg), άργυρος (Ag) και μαγγάνιο (Mn).

Οι Wang et al. (2022) παρατήρησαν ότι η αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση του βακτηριακού είδους *Escherichia sp.* TH-1 ευνοούνταν παρουσία Cu^{2+} , Ni^{2+} και Fe^{3+} , ενώ παρουσία Cd^{2+} αναχαιτιζόταν. Το *Corynebacterium paurometabolum* SKPD 1204 παρουσίαζε μειωμένη αναγωγική ικανότητα παρουσία Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} και Ni^{2+} , αλλά δεν επηρεαζόταν από ανιόντα Mn^{2+} (Dey & Paul, 2016). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τη μελέτη των Hora & Shetty (2014) σε βακτήρια του γένους *Acinetobacter sp.* Cr-B2, όπου η παρουσία Ni^{2+} , Zn^{2+} και Cd^{2+} οδηγούσε σε μειωμένους ρυθμούς αναγωγής Cr(VI), ενώ Cu^{2+} και Fe^{3+} ευνοούσαν τη διαδικασία. Το γεγονός ότι ιόντα Cu^{2+} , ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις (100 mg/L), ευνοούν τους ρυθμούς αναγωγής του Cr(VI) έχει αποδειχτεί και σε άλλες μελέτες (Tan et al., 2020; Xu et al., 2015). Ο χαλκός (Cu) είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η καταλάση και η υπεροξειδική δισμουτάση. Επιπλέον, αποτελεί απαραίτητο κομμάτι του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων του κυττάρου του μικροοργανισμού. Συνεπώς, μπορεί να βελτιώσει την ανοχή των βακτηρίων στο Cr(VI) και

την αποδοτικότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων, ενισχύοντας έτσι τη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) (Tan et al., 2020). Οι Li et al. (2019) μελέτησαν την επίδραση κατιόντων Pb^{2+} , Zn^{2+} και Cd^{2+} στην αναγωγή του Cr(VI) σε καλλιέργεια στελέχους του βακτηριακού γένους *Desulfonivibrio*. Παρατήρησαν ότι και τα τρία μέταλλα είχαν αναχαιτιστική επίδραση στη διαδικασία αναγωγής, ακολουθώντας την εξής σειρά (μεγαλύτερη αναχαιτίση προς μικρότερη): $Cd^{2+} > Zn^{2+} > Pb^{2+}$. Το κάδμιο είναι ένα εξαιρετικά τοξικό μέταλλο που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από βακτήρια. Σε συγκεντρώσεις $Cd^{2+} > 20$ mg/L ήταν εμφανής η ισχυρή αναστολή της αναγωγής του Cr(VI) από βακτήρια, πιθανότατα λόγω απενεργοποίησης ποικίλων ενζύμων του μικροοργανισμού. Σε συγκεντρώσεις $Zn^{2+} > 20$ mg/L μειωνόταν επίσης σημαντικά ο ρυθμός απομάκρυνσης του Cr(VI). Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο για τους ζώντες οργανισμούς και μπορεί να συμμετάσχει και να ευνοήσει διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις, ωστόσο, αν η συγκέντρωσή του υπερβαίνει ένα συγκεκριμένο όριο, τα ιόντα Zn^{2+} είναι τοξικά για τα βακτηριακά κύτταρα και τα αδρανοποιούν, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός απομάκρυνσης του χρωμίου. Ο μόλυβδος είχε μικρή επίδραση στην αναγωγή του Cr(VI) από το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, πιθανότατα λόγω μειωμένης επίδρασης στη ρεδοκτάση του στελέχους. Οι Pooral & Laxman (2009) βρήκαν ότι Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} και Ni^{2+} αναχαιτίζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Streptomyces griseus*, καθώς και την αναγωγή του Cr. Οι Pal & Paul (2004) παρατήρησαν ότι η παρουσία Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} και Pb^{2+} αναχαιτίζει την αερόβια αναγωγή του Cr(VI) με το βακτηριακό γένος *B. sphaericus* AND303. Σημειώνεται, ότι το νικέλιο, το οποίο συναντάται συχνά σε σερπεντινικά εδάφη, ήταν ιδιαίτερα τοξικό για το συγκεκριμένο βακτήριο. Κατιόντα Hg^{2+} και Ag^{+} συγκέντρωσης 20 μ M προκαλούσαν ισχυρή αναχαιτίση στην αναγωγή με κύτταρα *Pseudomonas putida* PRS2000 (Ishibashi et al., 1990).

Όπως αναπτύχθηκε και στην ενότητα 2.5.4, διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία ορυκτών που περιέχουν Fe ευνοεί την αναγωγή μέσω βακτηρίων. Υπό αναερόβιες συνθήκες, οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν διαλυτό και δομικό δισθενή σίδηρο, όπως βιοτίτη, μοντμοριλλονίτη, πράσινες σκουριές, καολινίτη, χλωρίτη, για να ανάγουν και να αδρανοποιήσουν το Cr(VI) (Bishop et al., 2019).

Συνοπτικά, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο σίδηρος και ο χαλκός έχουν θετική επίδραση στη διαδικασία της αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου μέσω μικροοργανισμών, ενώ τα υπόλοιπα μέταλλα που μελετήθηκαν επιδρούν αρνητικά και σε πολλές περιπτώσεις και πάνω από συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, αναχαιτίζουν τη διαδικασία.

2.6.9 Άλλοι παράγοντες

Σε *ex situ* εφαρμογές για την απορρύπανση λυμάτων ή υδάτων σε βιοαντιδραστήρες, σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της αναγωγής έχει ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (Hydraulic Retention Time, HRT). Οι Qian et al. (2016) παρατήρησαν σε έναν αντιδραστήρα UASB ότι όταν ο αντιδραστήρας λειτουργούσε με HRT = 24 ώρες, η συγκέντρωση Cr(VI) στην έξοδο του αντιδραστήρα ήταν μη ανιχνεύσιμη, ενώ με μείωση στις 12 ώρες, η αναγωγή δεν ήταν τόσο αποτελεσματική. Οι Lee et al. (2017) εφάρμοσαν τέσσερεις (4) διαφορετικούς χρόνους παραμονής (3, 4, 6 και 8 ημέρες) για να μελετήσουν την επίδραση της παραμέτρου στην αναγωγή του Cr(VI) με κύτταρα του αυτοτροφικού μικροοργανισμού *Chlorella vulgaris* σε έναν φωτοαντιδραστήρα. Παρατήρησαν ότι για την πλήρη αναγωγή 10 mg/L Cr(VI) απαιτούνταν HRT = 4 ημέρες, ενώ στις 3 ημέρες συσσωρευόταν εξασθενές χρώμιο στην έξοδο. Οι Panousi et al. (2019) δοκίμασαν επίσης τρεις (3) διαφορετικούς υδραυλικούς χρόνους παραμονής, χωρίς να παρατηρηθεί κάποια ιδιαίτερη επίδραση στην ικανότητα αναγωγής του συστήματος. Ωστόσο, μείωση του HRT οδήγησε σε σχεδόν αναλογική αύξηση στη συγκέντρωση σωματιδιακού Cr(III) στη βιομάζα.

Εκτός από τα ανιόντα και κατιόντα μετάλλων που εξετάστηκαν ως πιθανοί αναστολείς της διαδικασίας της βιοαναγωγής του χρωμίου, έχουν μελετηθεί και άλλες ενώσεις. Οι Soni et al. (2013) μελέτησαν την επίδραση ουρίας και θιουρίας στην αναγωγή του Cr(VI) σε κύτταρα *Bacillus* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus thuringiensis* και *Bacillus subtilis* και κατέγραψαν αναστολή της διαδικασίας για όλα τα στελέχη μεταξύ 78%-94%. Οι Dey et al. (2014) μελέτησαν την επίδραση γνωστών αναχαιτιστών βιολογικών διεργασιών σε κύτταρα *Arthrobacter* SUK 1201, όπως sodium azide (NaN₃), sodium fluoride (NaF), 2,4-dinitrophenol (DNP), carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) και N,N-Di cyclohexyl carbodiimide (DCCD). Παρατήρησαν ότι η ένωση DNP αύξησε την ικανότητα αναγωγής

Cr(VI) του μικροοργανισμού, όμως οι υπόλοιπες ενώσεις την αναχαιτίζουν σε ποσοστό μεταξύ 30%-50% περίπου. Στις ενώσεις που δυνητικά μπορεί να επηρεάσουν τη μικροβιακή αναγωγή του χρωμίου έχουν εξεταστεί και ορισμένες βαφές (Remazol Blue, Reactive Black B και Reactive Red RB) που συνυπάρχουν σε βιομηχανικά λύματα μαζί με το χρώμιο, χωρίς ωστόσο να επιδρούν αρνητικά στην αναγωγή του Cr(VI) με θεικοαναγωγικά βακτήρια (Çetin et al., 2008).

Μια ακόμη παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI) είναι και η αλατότητα (Mishra et al., 2012; Pettine, 2000), καθώς υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων οδηγούν σε λύση της κυτταρικής μεμβράνης και συνεπώς χαμηλότερη συγκέντρωση βιομάζας (Malaviya & Singh, 2014). Σε πειράματα των Çetin et al. (2008), αύξηση της συγκέντρωσης NaCl από 0%-4% είχε σημαντική επίδραση στην αναγωγή 50 mg/L Cr(VI) από SRB βακτήρια, με τα ποσοστά αναγωγής να μειώνονται με αύξηση της συγκέντρωσης NaCl. Ωστόσο, έχουν απομονωθεί ορισμένα βακτήρια, όπως *Salipaludibacillus agaradhaerens* NRC-R (Abo-Alkasem et al., 2022), *Halomonas* sp. M-Cr (Mabrouk et al., 2014) και *Burkholderia cepacia* MCMB-821 (Wani et al., 2007), που εμφανίζουν υψηλή ανοχή σε αυξημένες συγκεντρώσεις NaCl.

Σε *in situ* εφαρμογές σημαντική επίδραση στη διαδικασία της αποκατάστασης έχουν και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του εδάφους. Οι Xiao et al. (2012) μελέτησαν διαφορετικά είδη εδαφών και παρατήρησαν ότι υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση ανάμεσα στην αναγωγή του Cr(VI) και το διαλυτό οργανικό υλικό. Η παρουσία οργανικών ουσιών στο έδαφος, όπως χουμικά οξέα και κινόνες, συμβάλλουν στην αναγωγή του Cr(VI), αυξάνοντας την ταχύτητα της, καθώς λειτουργούν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων. Συγκεκριμένα, οι ουσίες αυτές έχουν την ικανότητα να μειώνουν την ανάγκη για την άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων από μικροοργανισμούς σε αποδέκτες ηλεκτρονίων, όπως το Cr(VI). Αναφέρονται και ως μεσολαβητές οξειδοαναγωγής, καθώς αυξάνουν αντιδράσεις μειώνοντας την ταχύτητα ενεργοποίησης της συνολικής αντίδρασης ή δρώντας ως καταλύτες (He et al., 2019).

2.7 Στόχοι της έρευνας

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση της ικανότητας των μικροοργανισμών να ανάγουν το εξασθενές χρώμιο στο λιγότερο τοξικό τρισθενές, καθώς και η ανάπτυξη πρωτοποριακών και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών επεξεργασίας για την επιτόπου βιοαποκατάσταση του εδάφους και των υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με Cr(VI) κάτω από αναγωγικές συνθήκες απουσίας οξυγόνου. Η βιβλιογραφική ανασκόπηση που προηγήθηκε έδειξε ότι οι παραδοσιακές τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση υπόγειων υδάτων ρυπασμένων με Cr(VI) και βασίζονται σε φυσικές και χημικές μεθόδους, απαιτούν μεγάλες ποσότητες χημικών ουσιών και ενέργειας και συχνά έχουν ως αποτέλεσμα απαγορευτικά δαπανηρές, μεγάλης κλίμακας εφαρμογές σε ρυπασμένες περιοχές και παραγωγή επικίνδυνων παραπροϊόντων. Παράλληλα, μελέτες έχουν δείξει ότι ορισμένοι ρυπαντές μπορούν να απομακρυνθούν από το περιβάλλον από τους μικροοργανισμούς με ποικίλες διεργασίες, οι οποίες επιτρέπουν μια συνεχή διαδικασία αναγωγής του Cr(VI) χωρίς την παράλληλη διατάραξη του χώρου που πρέπει να αποκατασταθεί. Συνεπώς, η επιτόπου βιοαποκατάσταση προσφέρει σημαντικές ευκαιρίες για την ανάπτυξη τεχνολογιών που αποκαθιστούν τα ρυπασμένα με Cr(VI) εδάφη και υπόγεια ύδατα. Ωστόσο, η μικροβιακή αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου επηρεάζεται από τα συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ρυπασμένης περιοχής, όπως το pH, τη θερμοκρασία, διαφορετικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων (π.χ. O₂, NO₃⁻ και SO₄²⁻), καθώς και άλλες τοξικές ουσίες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, πρώτος στόχος της έρευνας ήταν η μελέτη του ρυθμού αναγωγής του Cr(VI) σε υπόγεια ύδατα μέσω βιοδιέγερσης (biostimulation) των αυτόχθονων μικροοργανισμών σε τρεις διαφορετικές αναγωγικές συνθήκες: 1) πλήρως αναερόβιες συνθήκες, 2) θεικοαναγωγικές συνθήκες και 3) ανοξικές συνθήκες (παρουσία νιτρικών ιόντων) όταν ο δότης ηλεκτρονίων σε κάθε περίπτωση αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εδαφικών μικρόκοσμων και πειράματα εδαφικών στηλών.

Τα πειράματα μικρόκοσμων εκτελέστηκαν σε τέσσερις (4) διαφορετικές αναγωγικές συνθήκες - αναερόβιες, ανοξικές, υπό την παρουσία χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης θεικών ιόντων - με έδαφος και υπόγεια ύδατα που είχαν συλλεχθεί από το ρυπασμένο με Cr(VI) υδροφόρο ορίζοντα της περιοχής των Οινοφύτων στη λεκάνη του Ασωπού. Προκειμένου να ληφθούν αποτελέσματα που να αντιπροσωπεύουν τις πραγματικές συνθήκες πεδίου, αναπτύχθηκαν μητρικές καλλιέργειες υπό κάθε αναγωγικό περιβάλλον παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων Cr(VI) και οργανικού δότη ηλεκτρονίων, προκειμένου να παράσχουν βιομάζα για τα πειράματα μικρόκοσμου. Επιπλέον, αξιολογήθηκαν οργανικοί και ανόργανοι δότες ηλεκτρονίων για την ικανότητά τους να διεγείρουν τις μικροβιακές κοινότητες. Έμφαση δόθηκε: i) στη διερεύνηση της επίδρασης του αποδέκτη ηλεκτρονίων στις μικροβιακές κοινότητες που ανάγουν το Cr(VI) υπό ανοξικές, αναερόβιες και διαφορετικές θεικοαναγωγικές συνθήκες και ii) στην αξιολόγηση της επίδρασης συνδυασμού δοτών ηλεκτρονίων (πηγών οργανικού άνθρακα και σιδήρου) στην πλήρως αναερόβια ή ανοξική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου με παράλληλη αναγωγή νιτρικών ιόντων, καθώς και στην αναγωγή του Cr(VI) παρουσία θεικών ιόντων.

Για τη βελτιστοποίηση της στρατηγικής αποκατάστασης που θα εφαρμοστεί σε έναν ρυπασμένο χώρο, κρίθηκε σκόπιμη η επιπλέον διερεύνηση των χημικών και βιοχημικών διεργασιών που επικρατούν σε έναν υπόγειο υδροφορέα, σε συνδυασμό με φαινόμενα μεταφοράς του ρύπου. Για τον λόγο αυτό ο δεύτερος στόχος της διατριβής ήταν η διενέργεια πειραμάτων σε εδαφικές στήλες (πειράματα συνεχούς τροφοδοσίας), οι οποίες προσομοιώνουν με μεγαλύτερη ακρίβεια την αναγωγή του Cr(VI) σε έναν υπόγειο υδροφορέα. Στα πειράματα αυτά μελετήθηκε i) η φυσική αναγωγική ικανότητα του εδάφους χωρίς την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων, ii) η αβιοτική αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση δισθενούς σιδήρου, iii) η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση πηγών οργανικού άνθρακα και iv) η συζευγμένη αβιοτική-βιοτική αναγωγή του Cr(VI) μέσω πιθανής αναγέννησης Fe(II) λόγω προσθήκης οργανικών πηγών άνθρακα.

Η μελέτη αυτή έρχεται να καλύψει κενό που υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με τη διερεύνηση της βιοτικής και αβιοτικής αναγωγής του Cr(VI), διεξάγοντας πειράματα με φυσικό έδαφος και εφαρμόζοντας βιοδιέγερση για την τροποποίηση των υπαρχόντων

αυτόχθονων βακτηρίων. Υπάρχουν κάποιες μελέτες (Lu et al., 2020; Somasundaram et al., 2011; Wen et al., 2017), στις οποίες έχει μελετηθεί η απομάκρυνση του Cr(VI) σε συστήματα στηλών, ωστόσο αυτές οι μελέτες διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας στήλες άμμου και με την προσθήκη συγκεκριμένων γενών μικροοργανισμών. Θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι η αποδοχή της εισαγωγής εξωγενών μικροοργανισμών σε έναν ρυπασμένο τόπο διαφορετικών από τους αυτόχθονες (bioaugmentation) είναι χαμηλή τουλάχιστον στην Ευρώπη, λόγω χρονοβόρων αδειών και κανονισμών που απαιτούν λεπτομερείς μελέτες εκτίμησης κινδύνου για την πρόληψη σημαντικών διαταραχών στο περιβάλλον και μόλυνσης της μικροβιακής κοινότητας στην προς αποκατάσταση τοποθεσία (Stroo & Leeson, 2012).

Συνολικά, τα ευρήματα αυτής της μελέτης μπορούν να παράσχουν μια σημαντική βάση για τη βιολογική αποκατάσταση των υπόγειων υδάτων που έχουν ρυπανθεί με Cr(VI) κάτω από διαφορετικά οξειδοαναγωγικά περιβάλλοντα, σημαντικές πληροφορίες για την επιτόπια (*in situ*) βιοαποκατάσταση ελλείψει οξυγόνου μέσω βιοδιέγερσης (biostimulation) των μικροοργανισμών, καθώς και δεδομένα για τη μακροζωία της διαδικασίας όταν ο δότης ηλεκτρονίων είναι περιοριστικός παράγοντας.

3. Μεθοδολογία – Πειραματικό πρωτόκολλο

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται λεπτομερώς τα πειραματικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μικρόκοσμου και στηλών, καθώς και των εργαστηριακών μεθόδων για τον προσδιορισμό συγκεκριμένων παραμέτρων. Όλα τα πειράματα και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας της Σχολής Πολιτικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

3.1 Πειράματα μικρόκοσμου

Στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν πειράματα μικρόκοσμου για τη μελέτη της επίδρασης τεσσάρων (4) οξειδοαναγωγικών συνθηκών (πλήρως αναερόβιες, παρουσία νιτρικών και δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων θειικών ιόντων) στην αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III). Για την καλύτερη προσομοίωση των συνθηκών που επικρατούν σε έναν υδροφορέα αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο τέσσερις (4) μητρικές καλλιέργειες που τροφοδότησαν τους μικρόκοσμους με βιομάζα, έδαφος και υπόγειο νερό. Παράλληλα, μελετήθηκε και η επίδραση δύο διαφορετικών οργανικών δοτών ηλεκτρονίων (μελάσα και γαλακτωματοποιημένο φυτικό έλαιο), ενός ανόργανου (Fe(II), στη μορφή FeSO₄), καθώς και συνδυασμού αυτών στην αναγωγή του Cr(VI).

Τα πειράματα μικρόκοσμου πραγματοποιήθηκαν σε δύο φάσεις για κάθε μία από τις τέσσερις οξειδοαναγωγικές συνθήκες που μελετήθηκαν. Κατά την 1^η φάση, η οποία είχε διάρκεια περίπου 4 – 5 μηνών, αναπτύχθηκε στις συγκεκριμένες οξειδοαναγωγικές συνθήκες βιομάζα. Η βιομάζα αυτή αποτελούσε την μητρική καλλιέργεια, η οποία προσομοίωνε την βιοκοινότητα των αυτόχθονων μικροοργανισμών που αναμένεται να αναπτυχθεί στις συγκεκριμένες οξειδοαναγωγικές συνθήκες στο πεδίο, σε ένα ρυπασμένο με Cr(VI) υπόγειο υδροφορέα. Στη συνέχεια, κατά τη 2^η φάση των πειραμάτων, βιομάζα από την μητρική καλλιέργεια χρησιμοποιούταν για πειράματα διακοπτόμενης ροής (batch), όπου διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών τρόπων βιοδιέγερσης με την προσθήκη οργανικών ή ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων ή και συνδυασμό αυτών.

Στη συνέχεια της παραγράφου περιγράφονται αναλυτικά τα πειραματικά πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την ανάπτυξη των μητρικών καλλιέργειών και την εκτέλεση των batch πειραμάτων βιοδιέγερσης.

3.1.1 Πρωτόκολλο ανάπτυξης και συντήρησης μητρικών καλλιέργειών

Στις μητρικές καλλιέργειες που δημιουργήθηκαν για την τροφοδοσία των πειραμάτων μικρόκοσμου, εξετάστηκαν τέσσερις (4) οξειδοαναγωγικές συνθήκες: 1) πλήρως αναερόβιες (ANAER), 2) ανοξικές (ANOX), 3) υπό την παρουσία χαμηλής (100 mg/L) (S100) και 4) υψηλής συγκέντρωσης θεικών ιόντων (400 mg/L) (S400). Οι καλλιέργειες δημιουργήθηκαν σε γυάλινους περιέκτες των 2L, που έκλειναν αεροστεγώς με πώματα βουτυλίου επενδεδυμένων με Teflon (Wheaton) και αλουμινένιων αποσπώμενων σφραγισμάτων (Wheaton). Σε αυτούς προστέθηκαν 1,600 mL νερό γεώτρησης και 400 g ξηρό έδαφος (αναλογία 1:4). Ο εμπλουτισμός κάθε καλλιέργειας με βιομάζα έγινε στην αρχή της περιόδου εγκλιματισμού με την προσθήκη 30 mgTSS/L ενεργού ιλύος από αναερόβιο αντιδραστήρα. Ο χρόνος παραμονής στερεών ήταν $\theta = 45$ ημέρες και ο εγκλιματισμός της κάθε καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε για χρόνο μεγαλύτερο από 3 θ (> 135 ημέρες). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, όλες οι καλλιέργειες εκτέθηκαν σε χαμηλή συγκέντρωση εξασθενούς χρωμίου (0.5 mg/L) και διαφορετικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων (κανέναν, 10 mg/L NO₃-N, 100 mg/L SO₄²⁻ και 400 mg/L SO₄²⁻). Τονίζεται ότι πριν την έναρξη της περιόδου εγκλιματισμού, όλες οι καλλιέργειες πέρασαν από ένα στάδιο εξισορρόπησης δύο (2) περίπου εβδομάδων, για την εξάντληση των αποδεκτών ηλεκτρονίων που προϋπήρχαν στο υπόγειο νερό που χρησιμοποιήθηκε (πχ. NO₃-N and SO₄²⁻).

Η τροφοδοσία κάθε καλλιέργειας πραγματοποιούνταν μία (1) φορά την εβδομάδα με ένα διάλυμα αναερόβιου θρεπτικού μέσου (Reduced Anaerobic Mineral Medium-RAMM), διάλυμα σεληνίου-βολφραμίου (S-T), διάλυμα βιταμινών (Vitamin solution), εκχύλισμα μαγιάς (Yeast extract) και 30 mg/L βουτυρικού οξέος (Butyrate), το οποίο αποτελούσε τον δότη ηλεκτρονίων. Στην ανοξική και τις δύο θεικοαναγωγικές καλλιέργειες προστίθεντο επιπλέον ποσότητες ώστε οι συγκεντρώσεις νιτρικών και θεικών ως αποδέκτες ηλεκτρονίων να διατηρούνται σταθερές και ίσες με 10 mg/L NO₃-N, 100 mg/L SO₄²⁻ και 400 mg/L SO₄²⁻.

αντίστοιχα. Σε αυτό το σημείο πρέπει να προστεθεί ότι όλα τα διαλύματα παρασκευάζονταν με αποστειρωμένο νερό για την αποφυγή επιμολύνσεων των καλλιεργειών με άλλους μικροοργανισμούς. Στο τέλος κάθε κύκλου τροφοδοσίας, μέρος της υγρής φάσης των καλλιεργειών αντικαθίσταντο με φρέσκο θρεπτικό μέσο για την επίτευξη χρόνου παραμονής στερεών 45 ημερών, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Επιπλέον, στο τέλος κάθε εβδομαδιαίου κύκλου, πραγματοποιούνταν μέτρηση εξασθενούς χρωμίου, νιτρικού αζώτου και θεικών, με στόχο οι συγκεντρώσεις να αναπληρωθούν και να φτάσουν τις αρχικές. Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται οι ποσότητες των θρεπτικών συστατικών, καθώς και οι αρχικές συγκεντρώσεις του Cr(VI) και των αποδεκτών ηλεκτρονίων σε κάθε μητρική καλλιέργεια.

Πίνακας 3.1 Χαρακτηριστικά τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.

Συστατικό	Μητρική καλλιέργεια			
	ANAER	ANOX	S100	S400
RAMM (mL)	236	236	236	236
S-T (μL)	235	235	235	235
Vit (mL)	2.35	2.35	2.35	2.35
Yeast (μL)	81	81	81	81
Butyrate (mg/L)	30	30	30	30
Cr ⁶⁺ (mg/L)	0.5	0.5	0.5	0.5
NO ₃ -N (mg/L)	-	10	-	-
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	-	-	100	400

Το θρεπτικό αναερόβιο υλικό αναπλήρωσης (RAMM) χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία με μικρές διαφοροποιήσεις για την ανάπτυξη και συντήρηση μικτών αναερόβιων καλλιεργειών (Somasundaram et al., 2009). Η παρασκευή του γινόταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από τους Tandoi et al. (1994) και εφαρμόστηκε και σε προηγούμενες διδακτορικές διατριβές στο EYT (Αντωνίου, 2019; Παναγιωτάκης, 2010). Τα συστατικά του παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Σύσταση αναερόβιου θρεπτικού μέσου (RAMM).

Συστατικά	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό (mL)	2000
Διάλυμα μετάλλων (mL)	20
NH ₄ Cl (mg)	1000
K ₂ HPO ₄ (mg)	800
CaCl ₂ ·6H ₂ O (mg)	100
MgCl ₂ ·6H ₂ O (mg)	200
Διάλυμα 8% w/v NaHCO ₃ (mL)	50
Διάλυμα 5% w/v Na ₂ S·9H ₂ O (mL)	10

Η ετοιμασία του θρεπτικού μέσου γινόταν σε μπουκάλια serum χωρητικότητας 2L, τα οποία σφραγίζονταν με πώματα βουτυλίου, με στόχο την αποφυγή εισροής οξυγόνου και τη διατήρηση αναερόβιων συνθηκών. Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη διαλύματος μετάλλων, χλωριούχου αμμωνίου (NH₄Cl), όξινου φωσφορικού καλίου (K₂HPO₄), χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) και χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂) σε απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό, μείγμα αερίων N₂/CO₂ (70%/30%) διοχετευόταν για 30 λεπτά με σκοπό την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών. Στη συνέχεια, 60 mL εξάγονταν από το διάλυμα και αντικαθίσταντο με διαλύματα διττανθρακικού νατρίου (NaHCO₃) και θειούχου νατρίου (Na₂S). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, το τελικό στάδιο της παρασκευής είναι η εισαγωγή μιας ουσίας-δείκτη (resazurin), η οποία θα χρωμάτιζε το διάλυμα ροζ, αν υπήρχε παγιδευμένο οξυγόνο. Ωστόσο, το βήμα αυτό παραλήφθηκε, καθώς η μέτρηση του Cr(VI) στις μητρικές καλλιέργειες και στα πειράματα batch γινόταν φασματοφωτομετρικά και η ύπαρξη οποιουδήποτε χρώματος στο διάλυμα θα δημιουργούσε παρεμβολές στην ανάλυση. Για την εύρεση του απαραίτητου χρόνου που απαιτούνταν να διοχετευθεί το μείγμα αερίων N₂/CO₂ για την απομάκρυνση του παγιδευμένου O₂, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε άλλο διάλυμα RAMM, που είχε παρασκευαστεί γι' αυτόν ειδικά το σκοπό.

Το διάλυμα μετάλλων παρασκευαζόταν χρησιμοποιώντας ένα παραλλαγμένο πρωτόκολλο του Zeikus J. (1977) που περιγράφεται στους Tandoi et al. (1995) σύμφωνα με τον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3 Διάλυμα μετάλλων τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.

Συστατικά	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό (mL)	1000
Nitrilotriacetic acid (NTA) (mg)	4500
FeSO ₄ ·7H ₂ O (mg)	556
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (mg)	210
CoCl ₂ ·6H ₂ O (mg)	170
MnSO ₄ ·H ₂ O (mg)	86
NiCl ₂ (mg)	20
H ₃ BO ₃ (mg)	19
NaMoO ₄ (mg)	10
KOH 10M	

Το διάλυμα βιταμινών (Vitamins solution) παρασκευαζόταν σύμφωνα με τους Balch et al. (1979) με μικρές τροποποιήσεις (Παναγιωτάκης, 2010) (Πίνακας 3.4), ενώ το διάλυμα σεληνίου-βολφραμίου σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο του Widdel (1988) (Πίνακας 3.5). Και τα δύο διαλύματα εκχέονταν απευθείας στις μητρικές καλλιέργειες με τη χρήση σύριγγας.

Πίνακας 3.4 Διάλυμα βιταμινών τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.

Συστατικά	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό (mL)	1000
Υδροχλωρική θειαμίνη B1 (mg)	50
Ριβοφλαβίνη B2 (mg)	50
Νικοτινικό οξύ B3 (mg)	50
DL- παντοθενικό ασβέστιο B5 (mg)	50
Υδροχλωρική πυριδοξίνη B6 (mg)	100
Βιοτίνη B7 (mg)	20
Φολικό οξύ B9 (mg)	20
p-αμινοβενζοϊκό οξύ B10 (mg)	50
Κυανοκοβαλαμίνη B12 (mg)	5

Πίνακας 3.5 Διάλυμα σεληνίου - βολφραμίου τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.

Συστατικά	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό (mL)	1000
Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O (mg)	6
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O (mg)	8
NaOH (mg)	4000

3.1.2 Πρωτόκολλο πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (πειράματα batch)

Τα πειράματα διεξήχθησαν σύμφωνα με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο των κατευθυντήριων οδηγιών της Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (USEPA, 1998) σχετικά με τον αναερόβιο βιολογικό μετασχηματισμό ρύπων στο υπέδαφος. Οι μεμονωμένοι μικρόκοσμοι κατασκευάστηκαν σε μπουκάλια serum των 160 mL, στους οποίους τοποθετήθηκαν έδαφος και νερό γεώτρησης με αναλογία όγκου 1:4. Η ποσότητα του εδάφους σε ξηρό βάρος ανά περιέκτη ήταν περίπου 20 g, ενώ του υπογείου νερού 80 mL. Το έδαφος και το νερό προήλθαν από τις μητρικές καλλιέργειες. Μετά την κατασκευή του, κάθε περιέκτης σφραγίστηκε αεροστεγώς με πώμα βουτυλίου και αλουμινίου, ενώ το παγιδευμένο οξυγόνο στην αέρια και υγρή φάση απομακρύνθηκε (purging) με την παροχή μείγματος N_2/CO_2 (70%/30%). Οι μικρόκοσμοι επώαστηκαν στο σκοτάδι στους $22^\circ C \pm 2$ χωρίς ανακίνηση.

Στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, ως δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκαν μελάσα, γαλακτωματοποιημένο φυτικό έλαιο (EVO) και θειικός σίδηρος ($FeSO_4$), ανεξάρτητα και ως συνδυασμοί. Οι οργανικοί δότες ηλεκτρονίων επιλέχθηκαν για τις διαφορετικές ιδιότητές τους και περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 3.3. Μελετήθηκαν πέντε (5) διαφορετικές περιπτώσεις βιολογικής αναγωγής του Cr(VI) για κάθε οξειδοαναγωγική κατάσταση (πλήρως αναερόβια, ανοξική, χαμηλής και υψηλής συγκέντρωσης θεικών ιόντων), ενώ κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Μετά την προετοιμασία, κάθε περιέκτης τροφοδοτήθηκε με τον επιλεγμένο δότη ηλεκτρονίων (δηλαδή, μελάσα, γαλακτωματοποιημένο φυτικό έλαιο (EVO), θεικό σίδηρο, συνδυασμό πηγής άνθρακα και σιδήρου, ή κανέναν). Οι πειραματικές συνθήκες παρουσιάζονται στους Πίνακες 3.6 και 3.7. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τροφοδοσία αυτή πραγματοποιήθηκε μόνο μία φορά στην αρχή του πειράματος, καθώς ένα από τα ερωτήματα της έρευνας ήταν η διάρκεια ζωής της βιοδιέγερσης που προκαλούσε αύξηση του ρυθμού αναγωγής του Cr(VI) σε Cr(III) όταν ο δότης ηλεκτρονίων δεν προστίθεται συνεχώς.

Οι μη βιολογικές διεργασίες (π.χ. προσρόφηση) που συμμετέχουν στην απομάκρυνση του Cr(VI) μελετήθηκαν με τη διεξαγωγή πειραμάτων υπό στείρες συνθήκες και χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε δότη ηλεκτρονίων, καθώς οι εδαφικοί μικρόκοσμοι είναι πολύπλοκα συστήματα (Kourtev et al., 2009). Επιπλέον, υπό στείρες συνθήκες, μελετήθηκε και η χημική

αναγωγή του Cr(VI), με τη διενέργεια πειραμάτων στα οποία προστέθηκε FeSO₄. Έδαφος και νερό από τις μητρικές καλλιέργειες αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο (DIXONS Vario 3028) δύο φορές με διαφορά 24 ωρών, στους 121°C για 20 λεπτά, για να ανασταλεί πλήρως όλη η βιολογική δραστηριότητα. Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν εις διπλούν για όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν (αναερόβιες, ανοξικές και θεικοαναγωγικές), ενώ στους αποστειρωμένους μικρόκοσμους προστέθηκαν Cr(VI) και οι αποδέκτες ηλεκτρονίων (NO₃-N και SO₄²⁻) σύμφωνα με τους Πίνακες 3.6 και 3.7.

Συνολικά, για κάθε οξειδοαναγωγικό περιβάλλον μελετήθηκαν οι ακόλουθοι μηχανισμοί αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου, ενώ αναγράφεται και ο συνολικός αριθμός των περιεκτών που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη κάθε μηχανισμού:

1. Αβιοτικές διεργασίες (πχ. προσρόφηση): περιέκτες που περιείχαν αποστειρωμένο έδαφος και νερό γεώτρησης (8 περιέκτες).
2. Χημική αναγωγή του Cr(VI): περιέκτες που περιείχαν αποστειρωμένο έδαφος και νερό γεώτρησης στους οποίους προστέθηκε διάλυμα Fe(II) (8 περιέκτες).
3. Φυσική ικανότητα μικροοργανισμών να ανάγουν το Cr(VI): περιέκτες που περιείχαν έδαφος και υπόγειο νερό από τις μητρικές καλλιέργειες χωρίς την προσθήκη κανενός αναγωγικού μέσου (8 περιέκτες).
4. Βιολογική διέγερση μικροβιακής κοινότητας: περιέκτες που περιείχαν έδαφος και υπόγειο νερό από τις μητρικές καλλιέργειες στους οποίους προστέθηκαν μελάσα ή EVO (32 περιέκτες).
5. Συζευγμένη βιολογική και αβιοτική αναγωγή Cr(VI): περιέκτες που περιείχαν έδαφος και υπόγειο νερό από τις μητρικές καλλιέργειες στους οποίους προστέθηκαν ένας οργανικός δότης ηλεκτρονίων (μελάσα ή EVO) σε συνδυασμό με θειικό σίδηρο (32 περιέκτες).

Το πείραμα συνεχίστηκε με την προσθήκη Cr(VI) στους περιέκτες κάθε 2-3 ημέρες χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε αναγωγικού παράγοντα. Οι αρχικές συγκεντρώσεις Cr(VI) επιλέχθηκαν μεταξύ 2,000-3,000 μg/L, οι οποίες βρίσκονται εντός του αναφερόμενου εύρους ρύπανσης (μερικά μg/L έως περισσότερο από 10,000 mg/L) στην περιοχή των Οινοφύτων (Perraki et al., 2021), και με στόχο την αξιόπιστη διερεύνηση των αναγωγικών ικανοτήτων

κάθε μικροβιακής κοινότητας. Στους αναερόβιους μικρόκοσμους, η αρχική συγκέντρωση Cr(VI) επιλέχθηκε στα 2,000 μg/L, καθώς προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι σε πλήρως αναερόβιες συνθήκες, το εξασθενές χρώμιο είναι τοξικό για τους μικροοργανισμούς σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 2,500 μg/L (Panousi et al., 2016). Για το ανοξικό πείραμα, οι αρχικές συγκεντρώσεις Cr(VI) και NO₃-N ήταν 2,000 μg/L και 10,000 μg/L αντίστοιχα, για τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος. Για το επόμενο πειραματικό διάστημα (ημέρες 10-60), αυτές οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν σε 3,000 μg/L και 20,000 μg/L, προκειμένου να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της αναγωγικής μικροβιακής κοινότητας σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ρύπων. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι σε ανοξικές συνθήκες, το εξασθενές χρώμιο είναι τοξικό για τους μικροοργανισμούς σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10,000 μg/L (Panousi et al., 2016). Στα θεικοαναγωγικά πειράματα (S100 και S400), η αρχική συγκέντρωση Cr(VI) ήταν 2,000 μg/L για τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος και 3,000 μg/L για τα υπόλοιπες, ενώ οι συγκεντρώσεις SO₄²⁻ διατηρήθηκαν στα 100 mg/L και 400 mg/L αντίστοιχα, καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος. Την ημέρα προσθήκης του Cr(VI) (πείραμα batch), λαμβάνονταν δείγματα από την υγρή φάση κάθε περιέκτη σε προκαθορισμένες χρονικές στιγμές με στόχο να βρεθεί ο ρυθμός απομάκρυνσης του Cr(VI) σε κάθε περίπτωση που μελετήθηκε. Τα δείγματα αυτά εξάγονταν με σύριγγα, διηθούνταν μέσω φίλτρων σύριγγας με μέγεθος πόρων 0.45 μm και αναλύονταν για Cr(VI), NO₃-N και SO₄²⁻. Cr(VI), νιτρικό άζωτο και θειικά προστίθεντο αναλόγως για να επιτευχθούν οι αρχικές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, μετά το τέλος κάθε batch πειράματος, γινόταν αναπλήρωση της υγρής φάσης που είχε αφαιρεθεί με RAMM, καθώς και απομάκρυνση (purging) του O₂ που μπορεί να είχε εισέλθει στους περιέκτες λόγω της δειγματοληψίας.



Σχήμα 3.1 Μπουκάλια serum στα οποία έχουν κατασκευαστεί μικρόκοσμοι. Απεικονίζονται επίσης σύριγγες δειγματοληψίας και φίλτρα σύριγγας για διήθηση των δειγμάτων.

Πίνακας 3.6 Πειραματικές συνθήκες αναερόβιων και ανοξικών μικρόκοσμων.

Πειραματικό σύστημα	Πείραμα batch	Cr(VI) mg/L	NO ₃ -N mg/L	Μελάσα mg/L CODt	EVO mg/L CODt	Fe ²⁺ mg/L
Αναερόβιο	ANAER-S ¹		-	-	-	-
	ANAER-S ¹ +Fe		-	-	-	8
	ANAER-B ²		-	-	-	-
	ANAER-M	2	-	100	-	-
	ANAER-M+Fe		-	100	-	8
	ANAER-E		-	-	100	-
	ANAER-E+Fe		-	-	100	8
Ανοξικό	ANOX-S ¹		-	-	-	-
	ANOX-S ¹ +Fe		-	-	-	8
	ANOX-B ²		-	-	-	-
	ANOX-M	2 (ημέρες 0–10)	10 (ημέρες 0–10)	100	-	-
	ANOX-M+Fe	3 (ημέρες 10–60)	20 (ημέρες 10–60)	100	-	8
	ANOX-E		-	-	100	-
	ANOX-E+Fe		-	-	100	8

¹ : Αποστειρωμένος μικρόκοσμος (Sterile), ² : Βιοτικό control

Πίνακας 3.7 Πειραματικές συνθήκες θεικοαναγωγικών μικρόκοσμων.

Πειραματικό σύστημα	Πείραμα batch	Cr(VI) mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	Μελάσα mg/L CODt	EVO mg/L CODt	Fe ²⁺ mg/L
Χαμηλή συγκέντρωση θεικών	S100-S ¹			-	-	-
	S100-S ¹ +Fe			-	-	8
	S100-B ²			-	-	-
	S100-M	2 (ημέρες 0–10)	100	100	-	-
	S100-M+Fe	3 (ημέρες 10–60)		100	-	8
	S100-E			-	100	-
Υψηλή συγκέντρωση θεικών	S100-E+Fe			-	100	8
	S400-S ¹			-	-	-
	S400-S ¹ +Fe			-	-	8
	S400-B ²			-	-	-
	S400-M	2 (ημέρες 0–10)	400	100	-	-
	S400-M+Fe	3 (ημέρες 10–60)		100	-	8
	S400-E			-	100	-
	S400-E+Fe			-	100	8

¹ : Αποστειρωμένος μικρόκοσμος (Sterile), ² : Βιοτικό control

3.2 Πειραματικό πρωτόκολλο πειραμάτων στήλης

Στόχος των πειραμάτων εδαφικών στηλών που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο αυτής της διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη των ρυθμών αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου σε πειράματα συνεχούς ροής. Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν εδαφικές στήλες, οι οποίες τροφοδοτήθηκαν με διάλυμα Cr(VI) και οργανικούς και ανόργανους δότες ηλεκτρονίων. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν τέσσερεις (4) πειραματικοί κύκλοι (παράγραφοι 3.2.3-3.2.5), στους οποίους αξιολογήθηκε i) η φυσική αναγωγική ικανότητα του εδάφους χωρίς την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων, ii) η αβιοτική αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση δισθενούς σιδήρου, iii) η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση πηγών οργανικού άνθρακα και iv) η συζευγμένη αβιοτική-βιοτική αναγωγή του Cr(VI) μέσω πιθανής αναγέννησης Fe(II) λόγω προσθήκης οργανικών πηγών άνθρακα.

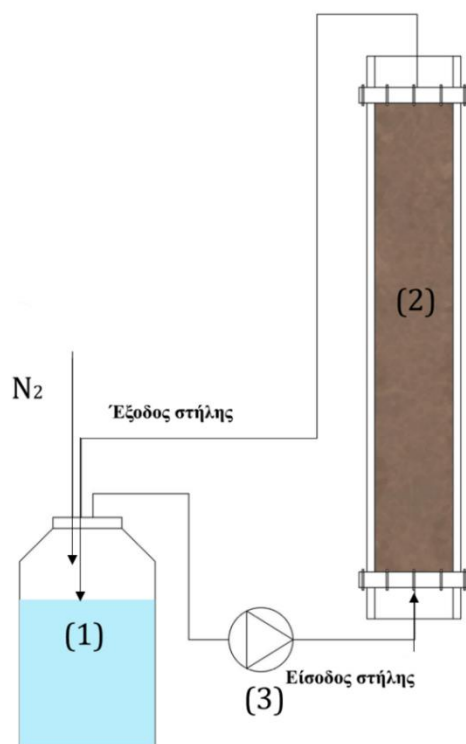
3.2.1 Περιγραφή συστήματος στηλών

Τα πειράματα στηλών πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας δύο (2) στήλες από plexiglass, οι οποίες πληρώθηκαν με εδαφικό υλικό, τα χαρακτηριστικά του οποίου περιγράφονται στην

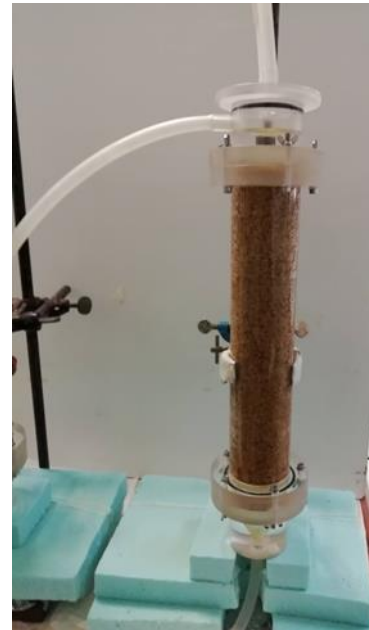
παράγραφο 3.3.1. Η εσωτερική διάμετρος κάθε στήλης ήταν 50 mm και το μήκος 300 mm. Τα διαλύματα Cr(VI) διατηρήθηκαν σε δύο δοχεία των 5 L κάτω από ατμόσφαιρα αδρανούς αζώτου, ενώ μια περισταλτική αντλία δύο κεφαλών (Shenchen LabM6) χρησιμοποιήθηκε για τη σύνδεση τους με τις στήλες (Σχήματα 3.2 και 3.3). Οι στήλες του εδάφους λειτουργούσαν υπό κορεσμένες συνθήκες με τους πόρους τους γεμάτους με νερό. Οι στήλες τροφοδοτήθηκαν με διάλυμα Cr(VI) που παρασκευάστηκε με διηθημένο υπόγειο νερό και διχρωμικό κάλιο ($K_2Cr_2O_7$). Η αρχική συγκέντρωση Cr(VI) ήταν 1,000-2,000 $\mu\text{g/L}$. Όλα τα υπόγεια ύδατα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των στηλών προήλθαν από το δίκτυο ύδρευσης του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου που τροφοδοτείται από γεώτρηση του Ε.Μ.Π.. Η έξοδος κάθε στήλης ανακυκλοφορούσε στο δοχείο, προκειμένου να προσομοιώσει καλύτερα τις συνθήκες σε έναν υπόγειο υδροφορέα και την ταχύτητα ροής του. Η ροή ρυθμίστηκε στο 1 L ανά ημέρα με αποτέλεσμα μια μέση ταχύτητα πόρων περίπου 0.91 m/day, που ανήκει στο εύρος των ταχυτήτων ροής των υπογείων υδάτων (0.1-10 m/day) που έχει παρατηρηθεί στο πεδίο (O'Carroll et al., 2013) . Προκειμένου να αποφευχθεί η ανάπτυξη αλγών, οι στήλες και τα δοχεία τυλίχθηκαν με αλουμινόχαρτο για να αποφευχθεί η έκθεση στο φως του ήλιου. Θα πρέπει να υπογραμμιστεί ότι οι δύο στήλες λειτουργούσαν υπό ίδιες συνθήκες. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά των στηλών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.8.

Πίνακας 3.8 Χαρακτηριστικά συστήματος στηλών.

Παράμετρος	Εδαφική στήλη	
	I	II
Βάρος εδάφους, M (g)	649	670
Εσωτερική διάμετρος στήλης, d (mm)	50	50
Ύψος στήλης, L (mm)	300	300
Bed Volume, BV (cm^3)	589	589
Dry bulk density, ρ_p (g/cm^3)	1.102	1.137
Πορώδες, θ	0.568	0.554
Όγκος κενών πόρων, V_{pn} (cm^3)	334.54	326.30
Φίλτρο	Υαλοβάμβακας	Υαλοβάμβακας



Σχήμα 3.2 Σχηματική απεικόνιση του συστήματος εδαφικών στηλών. (1) Δοχείο τροφοδοσίας/ανακυκλοφορίας Cr(VI), (2) Εδαφική στήλη, (3) Περισταλτική αντλία.



Σχήμα 3.3 Πειραματική διάταξη συστήματος εδαφικών στηλών.

3.2.2 Πρωτόκολλο εκκίνησης των στηλών

Προκειμένου να επιτευχθεί ο εμπλουτισμός του εδάφους με φυσικούς μικροοργανισμούς, κάθε στήλη κορέστηκε με αφιλτράριστο υπόγειο νερό από το δίκτυο παροχής νερού του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και επώαστηκε υπό αναερόβιες συνθήκες για 14 ημέρες.

3.2.3 Πείραμα control

Στο πείραμα ελέγχου (control) μελετήθηκε η φυσική ικανότητα του εδάφους να απομακρύνει το εξασθενές χρώμιο χωρίς την προσθήκη οργανικών ή ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων. Μετά το πέρας της περιόδου εκκίνησης, οι δύο στήλες τροφοδοτήθηκαν για δύο εβδομάδες με διάλυμα Cr(VI) αρχικής συγκέντρωσης 1,000 μg/L. Δείγματα λαμβάνονταν σε συχνά χρονικά διαστήματα από την είσοδο και έξοδο κάθε στήλης.

3.2.4 Πείραμα βιοδιέγερσης (biostimulation) των μικροοργανισμών

Για την αξιολόγηση της βιολογικώς επαγόμενης απομάκρυνσης Cr(VI), κάθε στήλη τροφοδοτήθηκε για δύο (2) ημέρες μέσω ανακυκλοφορίας με ένα υδατικό διάλυμα που περιείχε το απαραίτητο οργανικό φορτίο για τη βιοδιέγερση των μικροοργανισμών. Το διάλυμα οργανικού φορτίου παρασκευάστηκε διαλύοντας 0.2 g συμπυκνωμένης μελάσας και 0.8 g συμπυκνωμένου γαλακτωματοποιημένου φυτικού ελαίου (EVO) σε 1 L διηθημένου υπόγειου νερού. Το πείραμα στη συνέχεια προχώρησε σε συνεχή ανακύκλωση διαλύματος Cr(VI) χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε αναγωγικού παράγοντα, που είχε αρχικό όγκο 4 L και αρχική συγκέντρωση Cr(VI) 1,000 μg/L. Αυτό το μέρος του πειράματος συνεχίστηκε έως ότου μειώθηκε σημαντικά η ικανότητα απομάκρυνσης Cr(VI) των στηλών. Δείγματα από την είσοδο και την έξοδο των στηλών αναλύονταν συχνά και τα αποτελέσματα καταγράφηκαν για περαιτέρω επεξεργασία.

3.2.5 Πείραμα βιοτικής-αβιοτικής αναγωγής Cr(VI)

Ο στόχος αυτού του πειράματος ήταν η μελέτη της πιθανής αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου [Fe(III)] σε δισθενή [Fe(II)] (αναγέννηση Fe(II)) μέσω της προσθήκης πηγών οργανικού άνθρακα, καθώς και η μελέτη μιας συζευγμένης βιολογικής και χημικής οδού αναγωγής του Cr(VI). Το πείραμα χωρίστηκε σε 2 στάδια. Αρχικά, κάθε στήλη τροφοδοτήθηκε με 1 L διαλύματος θεικού σιδήρου για μία ημέρα, χωρίς να γίνεται ανακυκλοφορία. Για την παρασκευή του διαλύματος δισθενούς σιδήρου (Fe²⁺), 312 mg επταένυδρου θεικού σιδήρου (FeSO₄·7H₂O) διαλύθηκαν σε 1 L απιονισμένου νερού, από το οποίο είχε αφαιρεθεί το

διαλυμένο οξυγόνο (purging) με την προσθήκη μείγματος N_2/CO_2 (70%/30%) για να αποφευχθεί η οξειδωσή του σε τρισθενή σίδηρο (Fe^{3+}) μέσα στο δοχείο τροφοδοσίας. Μετά το πέρας της μίας ημέρας, οι στήλες τροφοδοτήθηκαν με διάλυμα Cr(VI) με αρχική συγκέντρωση 1,000 $\mu g/L$. Το διάλυμα αυτό ανακυκλοφορήθηκε συνεχώς, έως ότου δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω απομάκρυνση Cr(VI). Σκοπός αυτού του πρώτου σταδίου του πειράματος ήταν η μελέτη της χημικής αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου με την προσθήκη ενός ανόργανου δότη ηλεκτρονίων. Στο επόμενο στάδιο του πειράματος, οι στήλες τροφοδοτήθηκαν με το μείγμα οργανικού φορτίου, ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.4. Στη συνέχεια, το πείραμα συνεχίστηκε επανακυκλοφορώντας διάλυμα 4 L συγκέντρωσης εξασθενούς χρωμίου 1,000 – 2,000 $\mu g/L$. Η αναγωγική ικανότητα και των δύο στηλών επανεκτιμήθηκε με τη συχνή συλλογή δειγμάτων από την είσοδο και την έξοδο των στηλών.

3.3 Περιγραφή υλικών

3.3.1 Χαρακτηριστικά εδαφικού υλικού

Το εδαφικό υλικό που επιλέχθηκε για την διενέργεια των πειραμάτων προήλθε από τον βαθύτερο υδροφορέα (28-33.0 m) στην περιοχή των Οινοφύτων στον Ασωπό. Στην περιοχή αυτή πραγματοποιείται περίπου το 20% της συνολικής εθνικής βιομηχανικής παραγωγής, με αποτέλεσμα ο υδροφόρος ορίζοντας της περιοχής να δέχεται ισχυρές πιέσεις λόγω ρύπανσης, καθώς και μείωσης της στάθμης των υδάτων. Τα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα της λεκάνης του Ασωπού εμφανίζουν υψηλές συγκεντρώσεις εξασθενούς χρωμίου, γεγονός που έχει προκαλέσει σημαντικό ενδιαφέρον. Οι κύριες ιδιότητες και τα συστατικά του εδαφικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα, προσδιορίστηκαν με ανάλυση XRF και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.9. Το έδαφος αποτελούνταν από 58.8% άμμο, 15.5% ιλύ και 25.8% πηλό, ενώ τα κύρια συστατικά του ήταν CaO (30.03%) και SiO_2 (19.04%). Το χρώμιο (Cr) και το νικέλιο (Ni) ήταν τα κύρια μέταλλα που υπήρχαν (2,195 mg/kg και 1,082 mg/kg αντίστοιχα), κάτι που αναμενόταν, λόγω της έντονης βιομηχανικής δραστηριότητας στην περιοχή. Το pH του εδάφους ήταν 8.31.

Μετά τη συλλογή του, το έδαφος μεταφέρθηκε στο εργαστήριο και αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Πριν από την έναρξη των πειραμάτων, ξηράνθηκε φυσικά στον αέρα και ακολούθησε θραύση

των συσσωματωμάτων του με σφυρί και κοσκίνισμα. Το κλάσμα του εδάφους που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα ήταν < 2 mm.

Πίνακας 3.9 Χαρακτηριστικά εδαφικού υλικού πειραμάτων.

Βασικές Γεωχημικές Ιδιότητες	
Υφή	58.8% Άμμος (Sand) 15.5% Ιλύς (Silt) 25.8% Πηλός (Clay)
Πυκνότητα σωματιδίων (ρ_p , g/cm ³)	2.55
Ειδική επιφάνεια (m ² /g)	42.08
pH	8.31
ORP (mV)	214.7
NP ¹ (g CaCO ₃ /kg)	583.4
NP ¹ (mol CaCO ₃ /kg)	5.83
Απώλεια κατά την ανάφλεξη (%)	26.72
Ολικός άνθρακας C (%)	7.02
Οργανικός άνθρακας C (%)	0.16
Βασικά Συστατικά (%)	
CaO	30.03
SiO ₂	19.04
MgO	9.50
Fe ₂ O ₃	5.08
Al ₂ O ₃	1.20
Na ₂ O	0.64
MnO	0.13
Ιχνοστοιχεία (mg/kg)	
Cr	2,195
Ni	1,082
Co	118
Ba	45
Cu	21.1
Cd	3.1
Hg	2.5
As	<20
Pb	<9

¹Δυναμικό εξουδετέρωσης -Neutralizing potential

3.3.2 Χαρακτηριστικά υπογείου νερού πειραμάτων

Για την ανάπτυξη των μητρικών καλλιεργειών, χρησιμοποιήθηκε υπόγειο νερό το οποίο προήλθε από τα ίδιο σημείο συλλογής του εδαφικού υλικού. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων των στηλών χρησιμοποιήθηκε υπόγειο νερό από το δίκτυο παροχής νερού του

ΕΜΠ, λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας νερού που απαιτήθηκε για τη διενέργεια τους. Τα βασικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον πίνακα 3.10. Το pH τους ήταν περίπου 8, ενώ οι συγκεντρώσεις του νιτρώδους αζώτου και των θεικών ιόντων ήταν σχετικά χαμηλές.

Πίνακας 3.10 Χαρακτηριστικά υπογείου νερού που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των μητρικών καλλιεργειών και για την διενέργεια των πειραμάτων με εδαφικές στήλες.

Παράμετρος	Τιμή	
	Οινόφυτα	ΕΜΠ
pH	7.98	8.04
ORP, mV	76.50	201.00
EC, $\mu\text{S}/\text{cm}$	1,865.00	968.00
$\text{NO}_3\text{-N}$, mg/L	11.20	7.66
$\text{NO}_2\text{-N}$, mg/L	0.14	0.01
SO_4^{2-} , mg/L	51.00	22.00
Cl^- , mg/L	342.00	79.00
Cr^{6+} , mg/L	<0.03	<0.03
CODs^1 , mg/L	<15.00	<15.00
Ca, mg/L	68.00	72.00
Mg, mg/L	155.00	21.00
K, mg/L	1.40	1.70
Σκληρότητα, mg CaCO_3/L	805.50	376
Αλκαλικότητα, mg CaCO_3/L	382.00	

¹CODs: διαλυτό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο

3.3.3 Δότες ηλεκτρονίων

Στο πλαίσιο των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο (2) οργανικοί δότες ηλεκτρονίων και ένας (1) ανόργανος. Ως οργανικοί δότες e^- επιλέχθηκαν η μελάσα (molasses) (Thermo Fischer Scientific) και το γαλακτοποιημένο φυτικό έλαιο (emulsified vegetable oil – EVO) (JRW Bioremediation, L.L.C.). Η μελάσα και το EVO είναι δύο οργανικά υποστρώματα με διαφορετικές ιδιότητες, που πρόσφατα έχουν κερδίσει έδαφος ως μέσα για την αποκατάσταση ρυπασμένων υδροφορέων *in situ*.

Η μελάσα είναι ένα παραπροϊόν επεξεργασίας του ζαχαροκάλαμου που περιέχει κυρίως σάκχαρα (σακχαρόζη, γλυκόζη και φρουκτόζη) και μικρές ποσότητες πολυφαινόλων και βιταμινών (Mortensen & Larsen, 2012). Είναι μια ουσία χαμηλού κόστους που σε όξινο pH ανάγει χημικά το Cr(VI) σε Cr(III) μέσω αντίδρασης με τις υδροξυλικές και καρβονυλικές

ομάδες που περιέχει, αλλά σε βασικό και αλκαλικό pH δρα ως άμεσα διαθέσιμη πηγή οργανικού άνθρακα και ενέργειας για τους μικροοργανισμούς, λόγω της υψηλής της συγκέντρωσης σε σάκχαρα (Chen et al., 2015; Sun et al., 2020). Ο τρόπος με τον οποίο η μελάσα απομακρύνει το Cr (ολικό και εξασθενές) έχει μελετηθεί σε κύτταρα *Enterobacter* sp. SL και *Acinetobacter* sp. SL-1 και έχουν καταγραφεί τέσσερις (4) βασικές οδοί (Sun et al., 2020): i) βιοπροσρόφηση στα βακτηριακά κύτταρα, ii) απομάκρυνση μέσω δημιουργίας υδροξειδίων λόγω αύξησης του pH από τη μικροβιακή δραστηριότητα, iii) οι μικροοργανισμοί παράγουν ουσίες παρόμοιες με χουμικά και φουλβικά οξέα, που αντιδρούν με το Cr και παράγουν νέες ενώσεις και iv) αβιοτική ρόφηση από τη μελάσα. Ένα σημαντικό μειονέκτημα είναι ότι βιοδιασπάται γρήγορα, απαιτώντας συνεπώς συχνές εγχύσεις στους υδροφόρους ορίζοντες και αυξάνοντας σημαντικά το κόστος της απορρύπανσης (Jeyasingh & Philip, 2005; Tokunaga et al., 2003).

Το γαλακτοποιημένο φυτικό έλαιο (EVO) είναι ένα μείγμα φυτικών ελαίων και νερού, που συνδυάζει τα πλεονεκτήματα και των δύο συστατικών από τα οποία αποτελείται. Τα φυτικά έλαια είναι αργά βιοδιασπώμενα υποστρώματα, που παρέχουν μεγάλη διάρκεια ζωής στη διαδικασία της αποκατάστασης. Ωστόσο, η κολλοειδής φύση τους επηρεάζει την κινητικότητά τους σε πορώδη υλικά (Borden, 2007b; Dong et al., 2018), με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει απευθείας έγχυση τους στον ρυπασμένο υδροφορέα. Συνεπώς, επιλέγονται να χρησιμοποιηθούν ως μείγματα με νερό (γαλακτώματα) για τη βελτίωση της κινητικότητας και αποτελεσματικότερης κατανομής στους στα πορώδη υλικά του υδροφορέα. Αποτέλεσμα της αναερόβιας ζύμωσης τους είναι το οξικό οξύ και το υδρογόνο (Tang et al., 2013). Υποστρώματα EVO έχουν χρησιμοποιηθεί με πολύ καλά αποτελέσματα στην αποκατάσταση υπογείων υδάτων ρυπασμένων με διάφορους ρύπους, όπως χλωριωμένους αλειφατικούς υδρογονάνθρακες, ουράνιο, νιτρικά, εκρηκτικές ύλες και νιτροβενζόλιο (Borden, 2007a; Dong et al., 2019, 2021; Harkness & Fisher, 2013). Ωστόσο, εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία του EVO μειώνει τον μικροβιακό πλούτο και την ποικιλομορφία (Wen et al., 2017). Στον Πίνακα 3.11 παρουσιάζονται ορισμένα βασικά χαρακτηριστικά των δύο αυτών υποστρωμάτων.

Πίνακας 3.11 Χαρακτηριστικά οργανικών δοτών ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα.

Ιδιότητες	Μελάσα	Γαλακτοματοποιημένο φυτικό έλαιο (EVO)
Μοριακός τύπος	C ₆ H ₁₂ NNaO ₃ S	CH ₃ -CHOH-COONa
Εμφάνιση/Κατάσταση	Σκούρο καφέ υγρό	Άχρωμο προς ελαφρύ κίτρινο υγρό
Σύσταση	-	60% Γαλακτικό οξύ/40% Νερό
Πυκνότητα	1.4 g/mL	-
Ιξώδες	-	100cP (στους 20 °C)
Μοριακό βάρος	201.22 g/mol	112.07 g/mol
pH	5.1	6.0–8.5

Ως ανόργανος δότης ηλεκτρονίων επιλέχθηκε ο δισθενής σίδηρος (Fe²⁺) ως επταένυδρος θειικός σίδηρος (FeSO₄·7H₂O). Ο θειικός σίδηρος είναι μια διαλυτή μορφή του Fe(II), που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την αποκατάσταση ρυπασμένων με Cr(VI) εδαφών, λόγω του σχετικά χαμηλού του κόστους και της υψηλής του αποτελεσματικότητας (Yang et al., 2021).

3.4 Εργαστηριακές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των ποιοτικών παραμέτρων

3.4.1 Εισαγωγή

Για την εξαγωγή σαφών αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων σχετικά με τις διεργασίες που διέπουν την βιολογική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου, πραγματοποιήθηκαν επιλεγμένες αναλύσεις σε δείγματα υπογείου νερού από τις μητρικές καλλιέργειες, τα πειράματα μικροκόσμου και το σύστημα των στηλών. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούν τις ακόλουθες παραμέτρους :

- Ολικό (Cr) και εξασθενές χρώμιο (Cr⁶⁺)
- Ολικό (CODt) και διαλυτό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (CODs)
- Νιτρικό (NO₃-N) και νιτρώδες (NO₂-N) άζωτο
- Θεικά ιόντα (SO₄²⁻) και σουλφίδια (S²⁻)
- Δισθενής σίδηρος (Fe²⁺)
- Πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs)
- Φθορίζουσα επί τόπου υβριδοποίηση (FISH)

- Διαλυμένο οξυγόνο (DO)
- pH
- Δυναμικό οξειδοαναγωγής (Redox potential)
- Θερμοκρασία
- Ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC)
- Χλωριόντα (Cl⁻)
- Υδραυλική αγωγιμότητα εδάφους (k)
- Δοκιμή ιχνηθέτησης (tracer test)

Η συχνότητα των αναλύσεων βασίστηκε στο είδος του πειράματος, τη διάρκειά του και τον στόχο του. Στις επόμενες παραγράφους (3.4.2-3.4.11) περιγράφονται συνοπτικά οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν, η οργανολογία τους, καθώς και ο στόχος της ανάλυσης.

3.4.2 Προσδιορισμός ολικού και εξασθενούς χρωμίου

3.4.2.1 Εισαγωγή στις μεθόδους προσδιορισμού Cr

Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων χρωμίου στο περιβάλλον (αέρας, νερό, έδαφος), υπάρχουν δύο (2) διαφορετικά είδη αναλύσεων που χρησιμοποιούνται (Kimbrough et al., 1999): i) αναλύσεις για τον προσδιορισμό του ολικού Cr, με συνεκτίμηση της οξειδωτικής του κατάστασης και ii) αναλύσεις για τον προσδιορισμό του Cr(VI). Το Cr(III) προκύπτει συνήθως από τη διαφορά των δύο άλλων αναλύσεων, αν και υπάρχουν κάποιες μέθοδοι για τον άμεσο προσδιορισμό του (Guerrero et al., 2012).

Συνήθως οι αναλύσεις για τον προσδιορισμό του ολικού Cr είναι λιγότερο περίπλοκες από αυτές που χρησιμοποιούνται για την εύρεση των συγκεντρώσεων του Cr(VI). Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη περιλαμβάνει τη χρήση οξέων σε υψηλή θερμοκρασία για τη διάσπαση των χημικών και φυσικών δεσμών μεταξύ του χρωμίου και τη μήτρας του δείγματος και τη μετατροπή του χρωμίου σε υδατοδιαλυτές μορφές. Όσον αφορά το Cr(VI), οι περισσότερες τυποποιημένες διαδικασίες για την ανάλυση του πραγματοποιούνται σε υδατικά διαλύματα. Η

μέτρηση του Cr(VI) στο νερό απαιτεί δύο βήματα (δειγματοληψία και ανάλυση), ενώ η μέτρηση του σε άλλες μήτρες (αέρας, έδαφος, ιζήματα) ακολουθεί τρία στάδια: δειγματοληψία, εκχύλιση του Cr(VI) σε υδατικό διάλυμα και ανάλυση. Στα υδατικά διαλύματα, το χρώμιο μπορεί να διαχωριστεί από άλλες ουσίες που μπορεί να δημιουργήσουν παρεμβολές μέσω κατακρήμνισης, χηλιοποίησης ή ιοντικής χρωματογραφίας (Kimbrough et al., 1999). Στη συνέχεια, το Cr(VI) ποσοτικοποιείται μέσω διαφόρων ενόργανων οπτικών, χρωματογραφικών και ηλεκτροχημικών τεχνικών, όπως φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (Atomic Absorption Spectrometry, AAS), επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (ICP) με φασματόμετρο μάζας (MS) (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS), φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-VIS) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Tumolo et al., 2020; Wilbur et al., 2012).

Ωστόσο, κάποιες από αυτές τις αναλυτικές μεθόδους έχουν ορισμένους περιορισμούς στην εφαρμογή τους που μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένο προσδιορισμό των συγκεντρώσεων Cr(VI). Ένα βασικό ζήτημα είναι ότι η αλληλομετατροπή των καταστάσεων οξειδωσης του Cr που συμβαίνει στο περιβάλλον (αναγωγή και οξείδωση) παρατηρείται και κατά τη διάρκεια αναλυτικών διαδικασιών, καθώς τα δείγματα είναι πιθανόν να περιέχουν αναγωγικούς και οξειδωτικούς παράγοντες (Kimbrough et al., 1999). Επίσης, προβληματική μπορεί να είναι και η εξαγωγή/εκχύλιση του Cr(VI) σε υδατικά διαλύματα. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η εξαγωγή του Cr(VI) μέσω της μεθόδου της αλκαλικής χώνευσης (alkaline digestion) από εδαφικά υλικά που έχουν εξυγιανθεί με τη χρήση Fe, μπορεί να οδηγήσει σε υποτιμημένες συγκεντρώσεις Cr(VI) λόγω αντίδρασης και αναγωγής του με τον Fe(II). Το πρόβλημα αυτό έχει παρατηρηθεί εδώ και αρκετά χρόνια (Chrysochoou et al., 2009; Dermatas et al., 2006) και μόλις πρόσφατα βρέθηκε λύση (Yu et al., 2023).

3.4.2.2 Περιγραφή εργαστηριακής ανάλυσης

Στο πλαίσιο της παρούσας πειραματικής έρευνας, ο προσδιορισμός του εξασθενούς χρωμίου έγινε βάσει της μεθόδου της USEPA 7196a, στην οποία γίνεται χρήση του συμπλεκτικού αντιδραστηρίου 1,5 διφαινυλοκαρβαζίδιο (1,5 diphenylcarbazide, DPC). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, το Cr(VI) αντιδρά με το DPC σχηματίζοντας, υπό όξινης συνθήκες, μια

κόκκινη-μωβ ένωση. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του Cr(VI) πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά (HACH DR2800) σε μήκος κύματος $\lambda=543$ nm, με τον προσδιορισμό του χρώματος του προϊόντος της αντίδρασης. Οι όξινες συνθήκες επιτυγχάνονται μέσω προσθήκης θειικού οξέος (H_2SO_4) συγκέντρωσης 1M. Παράλληλα, προστίθεται και διάλυμα δισόξινου φωσφορικού νατρίου (NaH_2PO_4) συγκέντρωσης 4M για την απομάκρυνση της θολότητας από το δείγμα. Σημειώνεται ότι παρεμβολές στη συγκεκριμένη μέθοδο μπορεί να προκύψουν από την παρουσία μολυβδαίνιου και υδραργύρου σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 200 mg/L, πολύ υψηλές συγκεντρώσεις βαναδίου, καθώς και συγκεντρώσεις σιδήρου μεγαλύτερες από 1 mg/L. Καμία από αυτές τις ουσίες δεν βρέθηκε στα δείγματα που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη, ακόμα και στα πειράματα που είχε προστεθεί Fe(II), καθώς όπως αναφέρεται και στη συνέχεια, οι συγκεντρώσεις του ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (< 0.2 mg/L).

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης Cr(VI), κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης με χρήση πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης εξασθενούς χρωμίου. Σε κάθε πρότυπο διάλυμα αντιστοιχήθηκε μια τιμή απορρόφησης με χρήση του φασματοφωτόμετρου. Με αυτό τον τρόπο προσδιορίστηκε η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του εξασθενούς χρωμίου και της απορρόφησης, σύμφωνα με την εξίσωση 3.1 :

$$Cr(VI) = \frac{1}{a} \cdot Abs \quad (3.1)$$

όπου, Abs = αναγραφόμενη απορρόφηση του εκάστοτε δείγματος στο φασματοφωτόμετρο, a = αδιάστατος συντελεστής με εύρος τιμών 0.0023-0.0026 και Cr(VI) σε $\mu\text{g/L}$ (ppb).

Το εύρος συγκεντρώσεων για το οποίο παρουσιάζει γραμμικότητα η καμπύλη ήταν 25-300 ppb Cr(VI) (συντελεστής συσχέτισης $R^2 \geq 0.998$). Καμπύλη βαθμονόμησης κατασκευαζόταν κάθε 4-6 μήνες για την εξασφάλιση της ακρίβειας της μεθόδου.



Σχήμα 3.4 Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης για τη μέθοδο ανάλυσης του Cr(VI).

Σε δείγματα που ελήφθησαν από το σύστημα των στηλών πραγματοποιήθηκε ανάλυση ολικού χρωμίου για τον προσδιορισμό του είδους του χρωμίου στην έξοδο των στηλών. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της HACH (LCK 313), τα οποία βασίζονται στη μέθοδο του 1,5 diphenylcarbazide. Μέρος της μεθόδου αποτελεί η χώνευση των δειγμάτων. Η ανάλυση ολικού χρωμίου πραγματοποιήθηκε με συχνότητα 1φορά/3μηνο σε δείγματα εξόδου της κάθε στήλης.

3.4.3 Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD)

Το ολικό και διαλυτό χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (CODt και CODs) προσδιορίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο 5220 D (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2012). Στόχος της ανάλυσης ήταν η εύρεση της συγκέντρωσης του οργανικού δότη ηλεκτρονίων που ήταν διαθέσιμη στους μικροοργανισμούς. Βάσει της μεθόδου, οι οργανικές ενώσεις οξειδώνονται σε έντονα όξινο περιβάλλον παρουσία διχρωμικού ανιόντος Cr(VI) και θειικού αργύρου (Ag_2SO_4), το οποίο δρα ως καταλύτης. Η ποσοτικοποίηση του COD γίνεται φασματοφωτομετρικά και βασίζεται στην αναγωγή του Cr^{6+} σε Cr^{3+} και στην αλλαγή του χρώματος του δείγματος από πορτοκαλί σε πράσινο. Χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα αντιδραστήρια (LCK 314 και LCK 114) της εταιρίας HACH, η μέτρηση των οποίων γίνεται αυτόματα με την τοποθέτησή τους σε φασματοφωτόμετρο.

3.4.4 Προσδιορισμός νιτρικού (NO₃-N) και νιτρώδους (NO₂-N) αζώτου

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του νιτρικού αζώτου (NO₃-N) έγινε με τη μέθοδο της 2,6-διμεθυλφαινόλης (πρότυπο DIN 38405 D9-2). Στόχος της ανάλυσης ήταν η μελέτη του ρυθμού απονιτροποίησης στην ανοξική μητρική καλλιέργεια (ANOX) και στους αντίστοιχους μικρόκοσμους. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μέθοδο, τα νιτρικά ιόντα αντιδρούν με τη 2,6-διμεθυλφαινόλη σχηματίζοντας 4-νιτρο-2,6-διμεθυλφαινόλη, σε διάλυμα που περιέχει θειικό και φωσφορικό οξύ. Οι μετρήσεις έγιναν φασματοφωτομετρικά με έτοιμα φιαλίδια της HACH (LCK 339) με εύρος συγκεντρώσεων 0.23-13.50 mg/L NO₃-N και μήκος κύματος 345 nm. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός της συγκέντρωσης νιτρώδους αζώτου (NO₂-N) με τη μέθοδο 8507 Nitrite της HACH, κατά την οποία τα νιτρώδη που περιέχονται στο δείγμα αντιδρούν με το σουλφανιλικό οξύ του αντιδραστήριου και σχηματίζουν ένα διαζονικό άλας. Το ενδιάμεσο αυτό προϊόν αντιδρά με χρωμοτροπικό οξύ και παράγεται ένα σύμπλοκο ροζ χρώματος, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του NO₂-N στο δείγμα. Στο φασματοφωτόμετρο επιλέγεται μήκος κύματος 507 nm για εύρος συγκεντρώσεων 0.002-0.300 mg/L. Η ποσοτικοποίηση του νιτρώδους αζώτου πραγματοποιήθηκε για να εξακριβωθεί αν υπάρχει συσσώρευση του στην ανοξική μητρική καλλιέργεια και μικρόκοσμους, ως εμμέσως τρόπος ελέγχου της διαδικασίας της απονιτροποίησης.

3.4.5 Προσδιορισμός θειικών ιόντων (SO₄²⁻) και θειούχων ενώσεων (S²⁻)

Η συγκέντρωση των θειικών ιόντων προσδιορίστηκε σε υγρά δείγματα των πειραμάτων S100 και S400. Βασικός στόχος της ανάλυσης ήταν η διατήρηση των SO₄²⁻ στις αρχικές τους συγκεντρώσεις (100 mg/L και 400 mg/L αντίστοιχα). Η ποσοτικοποίηση έγινε φασματοφωτομετρικά με τη μέθοδο SulfaVer 4 της HACH σε μήκος κύματος 450 nm, στην οποία τα θειικά ιόντα του δείγματος αντιδρούν με το βάριο που περιέχεται στο αντιδραστήριο και σχηματίζουν ένα ίζημα θειικού βαρίου (BaSO₄). Η ένταση της παραγόμενης θολότητας στο δείγμα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων.

Οι θειούχες ενώσεις προσδιορίστηκαν καθώς αποτελούν προϊόν της αναγωγής των θειικών ιόντων και μπορούν να ανάγουν χημικά το Cr^{6+} σε Cr^{3+} . Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του κυανού του μεθυλενίου (Methylene Blue method) (Standard Method 4500-S²⁻-D). Η ένταση του παραγόμενου μπλε χρώματος του δείγματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των S^{2-} . Η ανάλυση έγινε σε μήκος κύματος 665 nm σε φασματοφωτόμετρο (HACH DR2800).

3.4.6 Προσδιορισμός δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+})

Ο δισθενής σίδηρος προσδιορίστηκε με τη μέθοδο της 1,10-φαινανθρολίνης, κατά την οποία τα ιόντα Fe(II) αντιδρούν με την 1,10-φαινανθρολίνη και σχηματίζουν μια πορτοκαλί κοκκινωπή ένωση. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δισθενούς σιδήρου χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα φιαλίδια (HACH LCK320), τα οποία εισάγονταν σε φασματοφωτόμετρο.

3.4.7 Προσδιορισμός πτητικών λιπαρών οξέων (Volatile Fatty Acids; VFAs)

Τα πτητικά λιπαρά οξέα (Volatile Fatty Acids; VFAs) είναι ουσίες που παράγονται υπό συνθήκες πλήρους απουσίας οξυγόνου ως ενδιάμεσο προϊόν της αναερόβιας αποικοδόμησης οργανικών ενώσεων. Δείγματα εξάγονταν από την υγρή φάση των πειραματικών διατάξεων με στόχο i) τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος στις μητρικές καλλιέργειες και να ελεγχθεί αν η ποσότητα που προστίθετο ως οργανικός δότης ηλεκτρονίων καταναλωνόταν από τους μικροοργανισμούς και ii) τον προσδιορισμό της συνολικής συγκέντρωσης VFAs που παρήχθησαν στα πειράματα μικρόκοσμου και στηλών. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση αέριου χρωματογράφου εξοπλισμένου με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Στα πλαίσια της μελέτης εξετάστηκαν οι συγκεντρώσεις τεσσάρων (4) πτητικών λιπαρών οξέων: οξικό (Acetic acid), βουτυρικό (Butyric acid), προπιονικό (Propionic acid) και ισοβουτυρικό (Isobutyric acid). Πριν από την ανάλυση, μερικά mL δείγματος διηθούνταν μέσω μεμβράνης με διάμετρο πόρων 0.45 μm . Το διηθημένο δείγμα θεωρείται πλήρως διαλυτό και αποθηκευόταν στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$, έως ότου πραγματοποιούνταν η μέτρηση. Πριν την ανάλυση, τα δείγματα τήκονταν και οξινίζονταν με την προσθήκη 2% v/v HCl (2N). Στη συνέχεια, τοποθετούνταν σε ειδικά δοχεία για να γίνει η έγχυση 0.5 μL στο όργανο, μέσω ενός

αυτοματοποιημένου συστήματος δειγματοληψίας (Autosampler XL PerkinElmer) με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης. Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονταν από το φέρον αέριο (He) κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονταν. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονταν στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονταν από καταγραφικό και εξάγονταν με τη μορφή διαγραμμάτων σε υπολογιστή. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν 220 °C, ενώ η στήλη (Nukol; 15 m, 0.53 mm; της εταιρείας Supelco) ρυθμιζόταν στους 90 °C.

3.4.8 Πρωτόκολλο μικροσκοπικής μεθόδου φθορίζουσας επιτόπου υβριδοποίησης (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH)

Για τις ανάγκες της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις μικροσκοπίου που είχαν ως στόχο την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που συνθέτουν τις μικροβιακές κοινότητες των μητρικών καλλιεργειών που αναπτύχθηκαν υπό διαφορετικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού της κάθε καλλιέργειας σε υγρά δείγματα που ελήφθησαν από αυτές. Ανάλυση μικροσκοπίου πραγματοποιήθηκε και στα πειράματα στήλης, για τη διερεύνηση της μεταβολής της μικροβιακής κοινότητας λόγω της προσθήκης αναγωγικών μέσων, στην αρχή του πειράματος, αμέσως μετά την περίοδο start-up, καθώς και στο τέλος του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος.

Η μέθοδος της φθορίζουσας επιτόπου υβριδοποίησης (FISH) είναι μια τεχνική χρώσης που επιτρέπει τη φυλογενετική ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε μικτές καλλιέργειες άγνωστης σύστασης. Η μέθοδος εφαρμόστηκε με τη χρήση κλώνων ριβοσωμικού ριβονουκλεϊκού οξέος (16S rRNA), τα οποία περιείχαν συγκεκριμένη φθορίζουσα χρωστική ουσία. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίζεται σε πρωτόκολλα των Pernthaler et al. (2001) και Μαρνέρη (2010), ενώ οι μικροοργανισμοί-στόχοι που επιλέχθηκαν για την ανάλυση φαίνονται στον Πίνακα 3.12.

Πίνακας 3.12 Ιχνηλάτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

Ιχνηλάτης	Ομάδα - Στόχος	Ακολουθία (5' to 3')	Αναφορά
EUB338	Περισσότερα βακτήρια	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	(Amann et al., 1990)
ARCH915	Αρχαία	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	(Stahl and Amann, 1991)
MSMX860	Methanosarcina & Methanosaeta spp.	GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT	(Raskin et al., 1994)
GAM42a	γ-Πρωτεοβακτήρια	GCC TTC CCA CAT CGT TT	(Manz et al., 1992)
DELTA495a	δ-Πρωτεοβακτήρια	AGT TAG CCG GTG CTT CCT	(Loy et al., 2002)
DSBAC357	Desulfobacteraceae & Syntrophobacteraceae	CCA TTG CGC AAA ATT CCT CAC	(Lücker et al., 2007)
AW	Acetobacterium spp	GGC TAT TCC TTT CCA TAG GG	(Küsel et al., 1999)
GEO3A	Geobacter spp.	CCG CAA CAC CTA GTA CTC ATC	(Holmes et al., 2013)
SRB687	Desulfovibrio spp.	TAC GGA TTT CAC TCC T	(Nielsen et al., 2002)

Τα βήματα της ανάλυσης έχουν ως εξής:

1) Προετοιμασία δειγμάτων

Υδατικά δείγματα όγκου 100 mL συλλέχθηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες και φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 rpm για 5 min με στόχο την αύξηση συγκέντρωσης της βιομάζας μέσω της συμπύκνωσης του δείγματος. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και δείγματα όγκου 0.4 mL συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια (eppendorf tubes) των 1.5 mL. Στα πειράματα στήλης συλλέχθηκε μεγαλύτερος όγκος δείγματος (περίπου 300 mL) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία συμπύκνωσης δείγματος. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν κυρίως Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί, η σταθεροποίηση των οποίων για την επίτευξη βέλτιστου φθορισμού, πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 0.8 mL διαλύματος παραφορμαλδεΰδης και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (4% w/v PFA/PBS). Για τη μελέτη Gram θετικών μικροοργανισμών, γινόταν συλλογή δείγματος όγκου 0.6 mL και σταθεροποίηση με την προσθήκη 0.6 mL καθαρής αιθανόλης (98%). Στη συνέχεια τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 4 °C για 4 έως 16 ώρες. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 10 min και αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό. Για την επαναιώρηση των δειγμάτων, προστέθηκαν 1.2 mL ρυθμιστικού

διαλύματος φωσφορικού άλατος PBS (1 M) και επαναλήφθηκαν οι διαδικασίες της φυγοκέντρωσης και της αφαίρεσης υπερκείμενου υγρού, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 1.2 mL μείγματος αναλογίας 50%/50% κατ'όγκο 1M PBS/αιθανόλης και φυλάχθηκαν στους -20 °C, με μέγιστο χρόνο διατήρησης έως και 3 μήνες. Το διάλυμα 4% w/v παραφορμαλδεΐδης / φωσφορικού άλατος (PFA/PBS) παρασκευάστηκε σε 80 mL υπερκάθαρου νερού, στα οποία προστέθηκαν 4 g παραφορμαλδεΐδης (PFA). Το διάλυμα θερμάνθηκε στους 60°C για περίπου 10 min και στη συνέχεια έγινε προσθήκη 3 σταγόνων NaOH (1M). Αφού το διάλυμα απέκτησε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστέθηκαν 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (PBS) (10 M), το pH ρυθμίστηκε στο 7.2 με προσθήκη H₂SO₄ (5 M) και συμπληρώθηκε υπερκάθαρο νερό μέχρις όγκου 100 mL.

2) Τοποθέτηση σε πλακίδια

Μετά την απόψυξη των δειγμάτων και την επαναφορά τους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν και όγκος 10 μL τοποθετήθηκε με τη χρήση μικροπιπέτας έτσι ώστε να καλύψει όλη την επιφάνεια μιας θέσης στο πλακίδιο. Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν στη συνέχεια για ξήρανση στο φούρνο σε θερμοκρασία 46 °C.

3) Αφυδάτωση

Το επόμενο στάδιο είναι η αφυδάτωση των δειγμάτων με τη διαδοχική τοποθέτηση των πλακιδιών σε διαλύματα αιθανόλης διαδοχικά αυξανόμενης συγκέντρωσης. Αναλυτικότερα, τα πλακίδια τοποθετήθηκαν κάθετα για 3 min θέση σε ειδικό δοχείο (Coplin jar), το οποίο περιείχε διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 50% v/v, έτσι ώστε τα δείγματα πάνω στο πλακίδιο να είναι πλήρως καλυμμένα. Στη συνέχεια, τα ίδια πλακίδια μεταφέρθηκαν διαδοχικά σε δεύτερο και τρίτο δοχείο με διαλύματα αιθανόλης (συγκέντρωσης 80% v/v και 98% v/v, αντίστοιχα) για 3 min στο καθένα και αφέθηκαν να στεγνώσουν.

4) Υβριδοποίηση

Το διάλυμα υβριδοποίησης παρασκευάστηκε σε φιαλίδια (eppendorf tubes) των 2 mL υπό συνθήκες απουσίας φωτός, προσθέτοντας 360 μL NaCl (5 M), 40 μL Tris-HCl (1 M), 2 μL SDS (10% v/v) και φορμαμίδιο, ανάλογα με τον ιχνηλάτη που θα χρησιμοποιηθεί, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.13. Σε κάθε θέση του πλακιδίου προστέθηκαν 8 μL διαλύματος υβριδοποίησης, 1 μL ιχνηλάτη και 1 μL 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Τέλος, τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε υγρό και σκοτεινό θάλαμο για 2 ώρες στους 46 °C.

Πίνακας 3.13 Συγκέντρωση φορμαμιδίου στο διάλυμα υβριδοποίησης, σύμφωνα με τον εξεταζόμενο ιχνηλάτη (probe).

Ιχνηλάτης	% v/v Φορμαμίδιο	Φορμαμίδιο (μL)	Υπερκάθαρο νερό (μL)
EUB338	35	700	900
ARCH915	35	700	900
MSMX860	45	900	700
GAM42a	35	700	900
DELTA495a	35	700	900
DSBAC357	35	700	900
AW	30	600	1000
GEO3A	30	600	1000
SRB687	15	300	1300

5) Έκπλυση

Σε φιαλίδια των 50 mL (corning tubes) προστέθηκαν 1 mL Tris-HCl (1 M), καθώς και NaCl και EDTA σύμφωνα με τη συγκέντρωση φορμαμιδίου που εισήχθη στο βήμα της υβριδοποίησης όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.14. Έπειτα έγινε συμπλήρωση με υπερκάθαρο νερό μέχρις όγκου 50 mL και προστέθηκαν επίσης 50 μL SDS (10%). Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε θερμαινόμενο λουτρό για 20 min στους 48°C.

Πίνακας 3.14 Συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl) και EDTA στο διάλυμα έκπλυσης, σύμφωνα με τον εξεταζόμενο ιχνηλάτη (probe).

Ιχνηλάτης	% v/v Φορμαμίδιο	NaCl (mM)	5 M NaCl (μL)	EDTA (μL)*
EUB338	35	80	800	500
ARCH915	35	80	800	500

Διερεύνηση της βιολογικής επί τόπου αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο

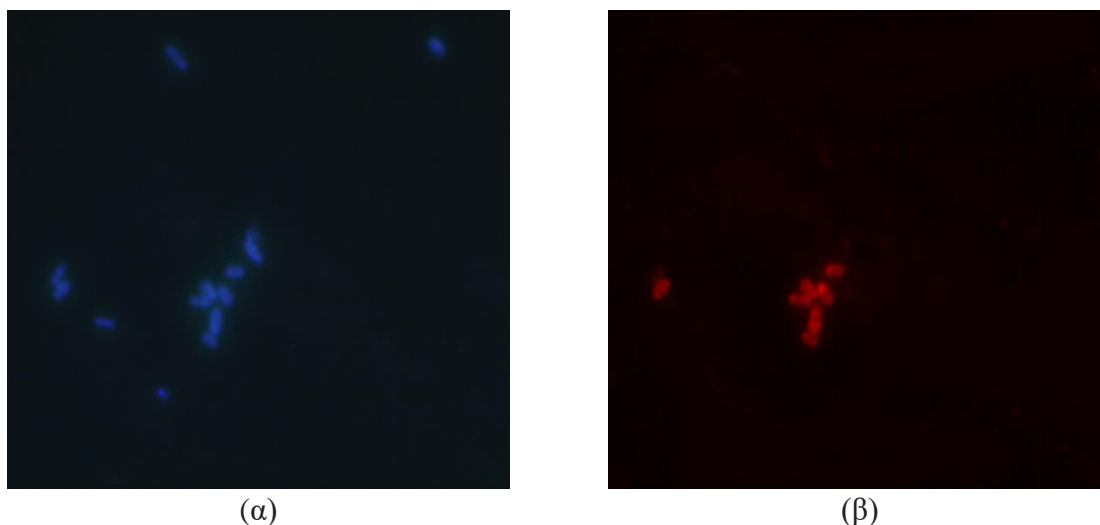
Ιχνηλάτης	% v/v Φορμαμίδιο	NaCl (mM)	5 M NaCl (μL)	EDTA (μL)*
MSMX860	45	40	400	500
GAM42a	35	80	800	500
DELTA495a	35	80	800	500
DSBAC357	35	80	800	500
AW	30	112	1120	500
GEO3A	30	112	1120	500
SRB687	15	318	3180	-

6) Αποθήκευση πλακιδίων

Μετά το στάδιο της έκπλυσης, τα πλακίδια αφέθηκαν να στεγνώσουν υπό σκότος. Στη συνέχεια, στα στεγνά πλακίδια προστέθηκαν 2-3 σταγόνες αντι-αποχρωστικής ουσίας (Citifluor), καλύφθηκαν με γυάλινες καλυπτρίδες και φυλάχθηκαν στους -20 °C μέχρι την παρατήρηση-καταμέτρηση.

7) Παρατήρηση-Καταμέτρηση

Η παρατήρηση των πλακιδίων έγινε σε μικροσκόπιο Nikon E50i υπό φθορισμό με το κατάλληλο φίλτρο (Cy3), το οποίο είναι συμβατό με τη φθοροφόρο ουσία του ιχνηλάτη, για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων στοχευόντων μικροοργανισμών, και έπειτα χρησιμοποιήθηκε το φίλτρο DAPI για την εύρεση του συνόλου των μικροοργανισμών. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 20 ζεύγη φωτογραφιών (Cy3-DAPI) για την καταμέτρηση του ποσοστού του γένους ή της κλάσης που εξετάζεται (target) προς το σύνολο των μικροοργανισμών (target/DAPI) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Image-Pro. Στο Σχήμα 3.5 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα από ζεύγος φωτογραφιών από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα της μητρικής καλλιέργειας ANOX.



Σχήμα 3.5 Παράδειγμα απεικόνισης μικροοργανισμών με φίλτρο DAPI (α) και φίλτρο Cy3 (β).

3.4.9 Προσδιορισμός DO, ORP, EC, pH και θερμοκρασίας

Οι τιμές των παραμέτρων DO, ORP και EC προσδιορίστηκαν μέσω του Φορητού Ψηφιακού Πολύμετρου WTW™ MultiLine™ 3410, ενώ για τη μέτρηση του pH, χρησιμοποιήθηκε το WTW™ pH 296. Ηλεκτρόδια για κάθε παράμετρο βυθίζονταν στο προς ανάλυση δείγμα και η μέτρηση λαμβάνονταν υπό ανάδευση. Το διαλυμένο οξυγόνο (DO) και το δυναμικό οξειδοαναγωγής (ORP) προσδιορίζονταν στο σύστημα των στηλών για τον έλεγχο των αναερόβιων συνθηκών. Ο προσδιορισμός του pH γινόταν σε όλες τις πειραματικές διατάξεις, καθώς υπό αναερόβιες συνθήκες παράγονται πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs), η αύξηση της συγκέντρωσης των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε πτώση του pH και διακοπή συγκεκριμένων διεργασιών των μικροοργανισμών (πχ. μεθανογένεση). Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι το pH παρέμενε σχεδόν σταθερό (περίπου 8.1) σε όλα τα πειράματα λόγω της σύστασης του εδάφους. Μέτρηση της θερμοκρασίας γινόταν στο δοχείο ανακυκλοφορίας Cr(VI) των πειραμάτων στήλης, για την καταγραφή των μεταβολών της, καθώς η θερμοκρασία περιβάλλοντος δεν ήταν σταθερή. Αντιθέτως, τα πειράματα μικρόκοσμου πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία (22 ± 2 °C).

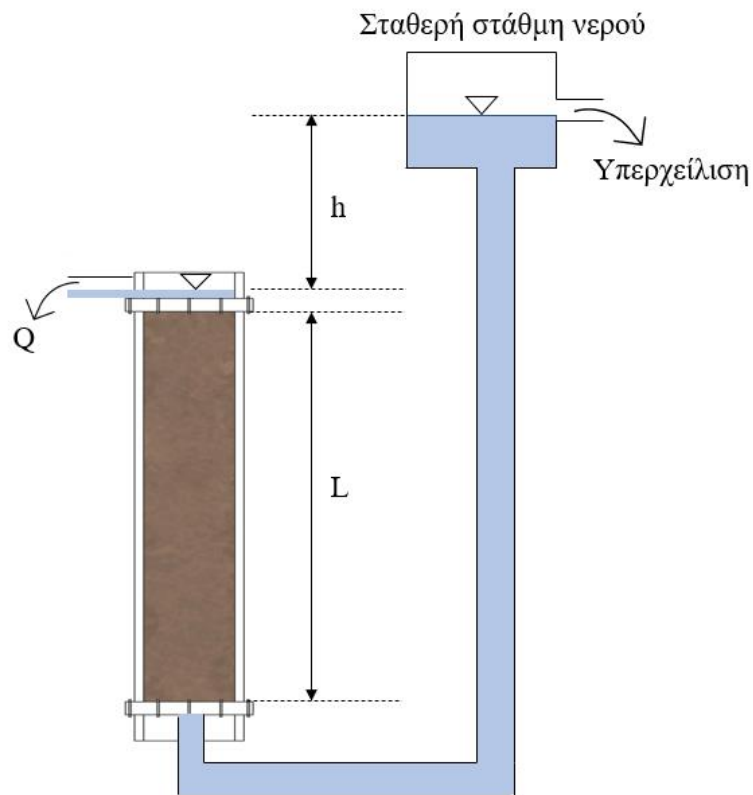
3.4.10 Δοκιμή διαπερατότητας εδάφους (υδραυλική αγωγιμότητα)

Στο πλαίσιο των εργαστηριακών πειραμάτων, πραγματοποιήθηκαν και δοκιμές διαπερατότητας, με σκοπό την εκτίμηση του συντελεστή διαπερατότητας (k) του εδάφους των δύο στηλών. Οι δοκιμές διαπερατότητας πραγματοποιήθηκαν στην αρχή και το πέρας κάθε πειραματικού κύκλου, για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια αλλαγή στην υδραυλική αγωγιμότητα του εδάφους λόγω ανάπτυξης της βιομάζας, της προσθήκης των αναγωγικών μέσων, καθώς και λόγω συγκράτησης του παραγόμενου τρισθενούς χρωμίου (Cr^{3+}) στους πόρους του εδάφους.

Η διαπερατότητα του εδάφους μετρήθηκε μέσω της δοκιμής διαπερατότητας σταθερού υδραυλικού φορτίου. Η συγκεκριμένη δοκιμή περιλαμβάνει τη ροή νερού μέσα από ένα εδαφικό δείγμα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μια στήλη νερού που παρέχει την απαιτούμενη διαφορά υδραυλικού φορτίου και τη συλλογή συγκεκριμένου όγκου νερού V από το πάνω μέρος της στήλης, σύμφωνα με τη διάταξη που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.6. Πριν τη μέτρηση της παροχής, οι πόροι του εδάφους κορέστηκαν με νερό, ενώ παράλληλα η στήλη του νερού πληρώθηκε μέχρι μια συγκεκριμένη στάθμη, η οποία διατηρήθηκε σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια της δοκιμής με τη βοήθεια αντλίας. Η υδραυλική αγωγιμότητα του εδαφικού δείγματος υπολογίζεται με βάση την Εξίσωση 3.2, σύμφωνα με το νόμο του Darcy:

$$k = \frac{V \cdot L}{A \cdot h \cdot t} \quad (3.2)$$

όπου, k : συντελεστής διαπερατότητας/ υδραυλική αγωγιμότητα (cm/s), V : συλλεγόμενος όγκος νερού (mL), h : διαφορά υδραυλικού φορτίου (cm), L : ύψος εδαφικού δείγματος (cm), t : απαιτούμενος χρόνος για τη συλλογή όγκου V (s), A : κάθετη στο δείγμα επιφάνεια (cm²).



Σχήμα 3.6 Σχηματική απεικόνιση εργαστηριακής διάταξης της δοκιμής διαπερατότητας.

Η δοκιμή διαπερατότητας πραγματοποιήθηκε σε εδαφικό δείγμα με κάθετη επιφάνεια $A=19.63 \text{ cm}^2$, ύψος $L= 30 \text{ cm}$ (με φαινόμενη ξηρή πυκνότητα ίση με 2.55 g/cm^3), $V=100 \text{ mL}$ και $h=104.5 \text{ cm}$. Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

3.4.11 Δοκιμή ιχνηθέτησης (Tracer Test)

Στο πλαίσιο των πειραμάτων εδαφικών στηλών, πραγματοποιήθηκαν και δοκιμές ιχνηθέτησης (tracer test) για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών της ροής του νερού μέσω των πόρων του εδάφους.

Για την υλοποίηση των tracer test χρησιμοποιούνται ιχνηθέτες (tracers). Ως ιχνηθέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ουσίες ή μορφές ενέργειας, όπως ιοντικές ενώσεις (Br^- , Cl^- , Li^+ , K^+), οργανικές βαφές ή θερμική ενέργεια, και μπορούν να δώσουν πληροφορίες σχετικές με τα χαρακτηριστικά της ροής του νερού, όπως τη διεύθυνση και την ταχύτητα ροής του. Επιπλέον, οι ιχνηθέτες μπορούν να συμβάλλουν στον προσδιορισμό της υδραυλικής αγωγιμότητας και του πορώδους του υδροφορέα, καθώς και της διασποράς μιας πιθανής ρυπαντικής ουσίας (Davis et al., 1980).

Ο ιδανικός ιχνηθέτης είναι μη τοξικός, οικονομικός, χημικά σταθερός, δεν αντιδράει δηλαδή χημικά με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και δεν προσροφάται στα ιζήματα, δεν αλλάζει τη φυσική κατεύθυνση ροής του νερού και δεν υπάρχει σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε αυτό (Davis et al., 1980). Στην παρούσα πειραματική δοκιμή, χρησιμοποιήθηκε ως ιχνηθέτης το χλωριούχο νάτριο (NaCl), ένα άλας που χρησιμοποιείται συχνά σε τέτοιου είδους εφαρμογές, το οποίο, όταν διαλυθεί σε νερό, ιοντίζεται πλήρως σε ιόντα Na^+ και Cl^- , αυξάνοντας έτσι και την αγωγιμότητα του νερού. Για την εκτέλεση του tracer test, παρασκευάστηκε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl), διαλύοντας 3g NaCl σε 1L απιονισμένο νερό. Κάθε στήλη τροφοδοτήθηκε με αυτό το διάλυμα με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας (Shenchen LabM6), ενώ η εκροή συλλέγονταν σε ξεχωριστό δοχείο. Κατά τη διάρκεια της δοκιμής έγινε προσδιορισμός της ηλεκτρικής αγωγιμότητας (EC) και της συγκέντρωσης των ιόντων Cl^- σε δείγματα που συλλέγονταν κάθε 30 min. Η συγκέντρωση των ιόντων χλωρίου προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με έτοιμα φιαλίδια της HACH LCK311. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τη δοκιμή χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τον προσδιορισμό του συντελεστή διασποράς D και της ταχύτητας των πόρων v , σύμφωνα με τη μονοδιάστατη εξίσωση συναγωγής διασποράς (1-D Convection Dispersion Equation) (Εξίσωση 3.3). Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον κώδικα CXTFIT του λογισμικού STANMOD (Šimůnek et al., 2003).

$$R \frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - v \frac{\partial c}{\partial z} \quad (3.3)$$

4. Διερεύνηση της μικροβιακής αναγωγής εξασθενούς χρωμίου σε πειράματα μικρόκοσμων

4.1 Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της *in situ* βιολογικής αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, η απουσία οξυγόνου βιολογική αναγωγή του Cr(VI) επηρεάζεται από τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες (αναερόβιες, ανοξικές, θεικοαναγωγικές) που επικρατούν στην υπό αποκατάσταση περιοχή, ωστόσο δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως η επίδραση των διαφορετικών αποδεκτών ηλεκτρονίων στο ρυθμό αναγωγής του Cr(VI)

Οι επιμέρους ερευνητικοί στόχοι που τέθηκαν ήταν οι εξής :

- i. Η διερεύνηση της επίδρασης του αποδέκτη ηλεκτρονίων στις μικροβιακές κοινότητες που ανάγουν το Cr(VI).
- ii. Η διερεύνηση της επίδρασης συνδυασμού δοτών ηλεκτρονίων (πηγών οργανικού άνθρακα και δισθενούς σιδήρου) στην αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου υπό διαφορετικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες.

Για την υλοποίηση αυτών των ερευνητικών στόχων αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο μητρικές καλλιέργειες, που ήταν εγκλιματισμένες σε χαμηλή συγκέντρωση Cr(VI) (0.5 mg/L) και διαφορετικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.1. Συγκεκριμένα αναπτύχθηκαν τέσσερις (4) καλλιέργειες με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: i) πλήρως αναερόβια (ANAER), ii) παρουσία νιτρικού αζώτου συγκέντρωσης 10 mg/L (ANOX), iii) παρουσία θεικών ιόντων συγκέντρωσης 100 mg/L (S100) και iv) παρουσία θεικών ιόντων συγκέντρωσης 400 mg/L (S400).

Τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας ή μικρόκοσμου (batch) διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας ως μέσο τις μητρικές καλλιέργειες. Στα πειράματα αυτά διερευνήθηκε η επίδραση

διαφορετικών τρόπων βιοδιέγερσης με την προσθήκη οργανικών ή ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων ή και συνδυασμό αυτών. Συγκεκριμένα, οι μηχανισμοί που μελετήθηκαν ήταν: i) αβιοτικές διεργασίες (πχ. προσρόφηση), ii) η χημική αναγωγή του Cr(VI) μέσω προσθήκης Fe(II), iii) η φυσική ικανότητα των μικροοργανισμών να ανάγουν το Cr(VI), iv) η βιολογική διέγερση των μικροβιακών κοινοτήτων με την προσθήκη οργανικών δοτών ηλεκτρονίων (μελάσα και EVO) και v) η συζευγμένη βιολογική και αβιοτική αναγωγή Cr(VI) με την προσθήκη οργανικού δότη ηλεκτρονίων και πηγής Fe(II).

Η ονομασία κάθε πειράματος μικρόκοσμου (batch) αποτελείται από δύο (2) σκέλη με τη μορφή X-Y, όπου X: ονομασία της μητρικής καλλιέργειας (ANAER, ANOX, S100 ή S400) και Y: οι πειραματικές συνθήκες, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1. Συνεπώς, το πείραμα batch με την ονομασία ANAER-B αντιστοιχεί σε περιέκτη που προέρχεται από την αναερόβια μητρική καλλιέργεια, στον οποίο μελετήθηκε η φυσική ικανότητα των μικροοργανισμών να ανάγουν το Cr(VI), χωρίς την προσθήκη κάποιου δότη ηλεκτρονίων. Στο Σχήμα 4.1 παρουσιάζονται κάποιοι από τους μικρόκοσμους που κατασκευάστηκαν στα μπουκάλια serum.

Πίνακας 4.1 Πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν στα πειράματα μικρόκοσμου.

Πείραμα batch	Πειραματικές συνθήκες
S	→ Αποστειρωμένο έδαφος και νερό (Sterile control)
S+Fe	→ Αποστειρωμένο έδαφος και νερό + 8 mg Fe ²⁺ /L
B	→ Βιοτικό control
M	→ Μελάσα 100 mg CODt/L
M+Fe	→ Μελάσα 100 mg CODt/L + 8 mg Fe ²⁺ /L
E	→ EVO 100 mg CODt/L
E+Fe	→ EVO 100 mg CODt/L + 8 mg Fe ²⁺ /L



Σχήμα 4.1 Κατασκευασμένοι μικρόκοσμοι σε μπουκάλια serum.

4.2 Αποτελέσματα μητρικών καλλιιεργειών

Κάθε μητρική καλλιέργεια εγκλιματίστηκε στις ανάλογες συνθήκες για διάστημα τουλάχιστον 4.5 μηνών, όπως φαίνεται στο διάγραμμα τύπου Gantt, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.2. Κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού των μητρικών καλλιιεργειών, Cr(VI), CODs, pH, NO₃-N, NO₂-N, SO₄²⁻ και S²⁻ παρακολουθούνταν και τροφοδοτούνταν εβδομαδιαία, ενώ η ανάλυση για ποσοτικοποίηση των VFAs πραγματοποιήθηκε λιγότερο συχνά. Στον Πίνακα 4.2, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που γίνονταν στο τέλος κάθε εβδομάδας κατά την περίοδο εγκλιματισμού των καλλιιεργειών. Φαίνεται ότι οι μικροβιακές κοινότητες που αναπτύχθηκαν είχαν την ικανότητα να ανάγουν πλήρως το εξασθενές χρώμιο, καθώς και το νιτρικό και νιτρώδες άζωτο σε διάστημα μιας εβδομάδας. Στη θεικοαναγωγική μητρική καλλιέργεια S400 αναγόταν μόνο το 30% της αρχικής συγκέντρωσης θεικών, ενώ στην S100 περίπου το 41% των αρχικών SO₄²⁻, αν και στη δεύτερη, η ικανότητα αναγωγής παρουσίαζε διακυμάνσεις καθ'όλη τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού. Οι μετρημένες συγκεντρώσεις σουλφιδίων σε υγρά δείγματα των καλλιιεργειών έδειξαν ότι η παραγωγή τους ήταν υψηλότερη στην καλλιέργεια S400 (13.2 ± 7.1 mg/L) σε σύγκριση με την καλλιέργεια S100 (3.1 ± 2.1 mg/L), καθώς, σύμφωνα με δημοσιεύσεις, υψηλότερες συγκεντρώσεις θεικών

ιόντων οδηγούν σε μεγαλύτερη παραγωγή σουλφιδίων (Lin et al., 2022). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις σουλφιδίων που μετρήθηκαν και αντιστοιχούσαν στα σουλφίδια στην υγρή φάση των καλλιεργειών, ήταν μικρότερες από τη θεωρητικά παραγόμενη ποσότητα λόγω αναγωγής των SO_4^{2-} , πιθανώς λόγω της κατακρήμνισης των σουλφιδίων με ιόντα μετάλλων που υπήρχαν στο έδαφος και στο νερό. Οπτική παρατήρηση και των δύο θεικοαναγωγικών καλλιεργειών υποστηρίζει αυτόν τον μηχανισμό, καθώς έδειξε ότι είχαν αποκτήσει ένα σκούρο, σχεδόν μαύρο χρώμα, λόγω του σχηματισμού στερεών με σκούρα απόχρωση (Chang & Kim, 2007). Το pH κυμαινόταν από 8.15-8.30 σε όλες τις καλλιέργειες καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού χωρίς διακυμάνσεις, λόγω της σύνθεσης του εδάφους, στο οποίο υπήρχαν υψηλές συγκεντρώσεις CaO (30.03%). Η ανάλυση με τον αέριο χρωματογράφο (GC) έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις VFAs στην ανοξική (ANOX) και στις θεικοαναγωγικές καλλιέργειες (S100 και S400) ήταν πιο περιορισμένες σε σύγκριση με την πλήρως αναερόβια (ANAER). Επιπροσθέτως, από τα τέσσερα πτητικά λιπαρά οξέα που εξετάστηκαν, μόνο το οξικό και το βουτυρικό οξύ βρέθηκαν στα δείγματα, με τη συγκέντρωση του δεύτερου να είναι μικρότερη από το 15% της συνολικής συγκέντρωσης των VFAs, που δείχνει ότι το μεγαλύτερο μέρος του βουτυρικού οξέος που προστέθηκε χρησιμοποιήθηκε ως δότης ηλεκτρονίων από τους μικροοργανισμούς και δεν συσσωρεύτηκε.

Διερεύνηση της βιολογικής επί τόπου αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο

		ΜΗΝΑΣ														
		Οκτ-19	Νοε-19	Δεκ-19	Ιαν-20	Φεβ-20	Μαρ-20	Απρ-20	Μαϊ-20	Ιουν-20	Ιουλ-20	Αυγ-20	Σεπ-20	Οκτ-20	Νοε-20	
ΜΗΤΡΙΚΗ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ	ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ	Cr(VI) (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND						
		pH	8.1	8.3	8.3	8.3	8.4	8.3	8.2	8.3						
		CODs (mg/L)	<15	50	46	103	82	90	102	86						
		VFAs (mg/L)	-	-	21.63	35.32	19.1	-	-	33.9						
	ΑΝΟΞΙΚΗ	Cr(VI) (mg/L)									ND	ND	ND	ND	ND	ND
		pH									8.1	8.4	8.3	8.3	8.4	8.3
		CODs (mg/L)									51	54	54	49	43	44
		VFAs (mg/L)									-	-	9.82	16.02	7.96	18.64
		NO ₃ -N (mg/L)									<0.23	<0.23	<0.23	<0.23	<0.23	<0.23
		NO ₂ -N (mg/L)									<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
	S100	Cr(VI) (mg/L)				ND	ND	ND	ND	ND	ND					
		pH				8.0	8.2	8.4	8.3	8.4	8.2					
		CODs (mg/L)				<15	62	63	47	56	57					
		VFAs (mg/L)				-	-	14.3	9.6	9.69	11.04					
		SO ₄ ²⁻ (mg/L)				100	75	67	70	<10	44					
		S ²⁻ (mg/L)				0.8	2.6	1.8	3.5	5.7	2.3					
	S400	Cr(VI) (mg/L)						ND	ND	ND	ND	ND				
		pH						8.0	8.0	8.1	8.2	8.4				
		CODs (mg/L)						35	46	45	60	55				
		VFAs (mg/L)						-	10.7	8.6	10	10.4				
		SO ₄ ²⁻ (mg/L)						278	287	265	256	311				
		S ²⁻ (mg/L)						4.9	11.9	10.6	19.5	15.8				

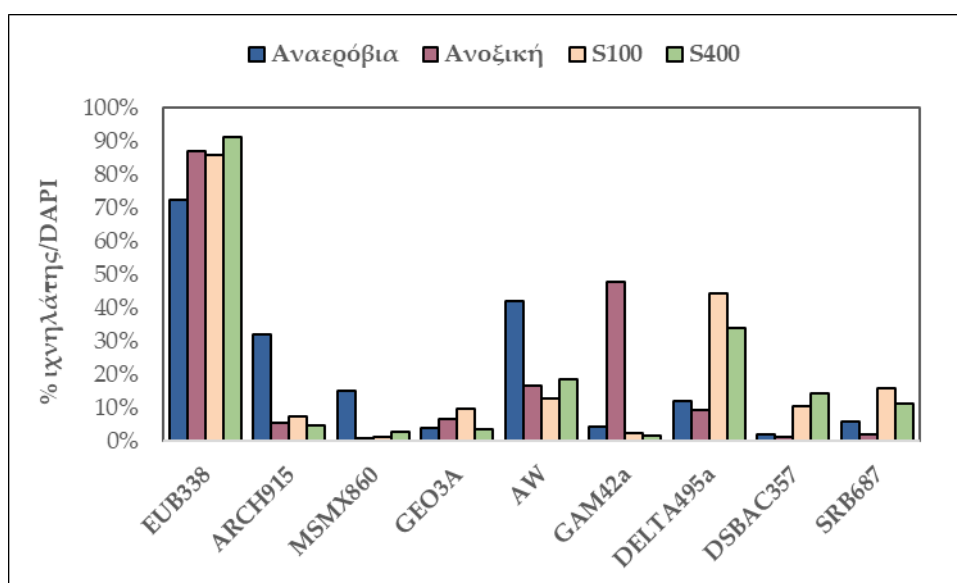
Σχήμα 4.2 Αποτελέσματα μητρικών καλλιεργειών ANAER, ANOX, S100 και S400 κατά την περίοδο εγκλιματισμού. (Μέσος όρος ημερολογιακών μηνιαίων μετρήσεων)

Πίνακας 4.2 Αποτελέσματα της απόδοσης των μητρικών καλλιέργειών κατά τη διάρκεια εγκλιματισμού (Μέσος όρος εβδομαδιαίων μετρήσεων).

Παράμετρος	Μητρική καλλιέργεια			
	ANAER	ANOX	S100	S400
CODs (mg/L)	86.8 ± 20.1	48.0 ± 8.3	57.3 ± 18.1	49.3 ± 16.5
VFAs (mg CODs/L)	27.5 ± 8.3	13.1 ± 5.0	11.2 ± 2.0	9.9 ± 0.9
pH	8.28 ± 0.16	8.30 ± 0.13	8.23 ± 0.12	8.15 ± 0.22
Cr(VI) (μg/L)	ND	ND	ND	ND
NO ₃ -N (mg/L)	-	<0.23	-	-
NO ₂ -N (mg/L)	-	<0.01	-	-
Εναπομείνουσα συγκέντρωση SO ₄ ²⁻ (mg/L)	-	-	58.6 ± 45.3	280.0 ± 58.0
S ²⁻ (mg/L)	-	-	3.1 ± 2.1	13.2 ± 7.1
Διάστημα εγκλιματισμού (ημέρες)	210	168	168	147

Στο τέλος της κάθε περιόδου εγκλιματισμού, πραγματοποιήθηκε ανάλυση FISH σε υγρά δείγματα από κάθε μητρική καλλιέργεια (Σχήμα 4.3), στα οποία εξετάστηκαν οι μικροοργανισμοί που περιγράφηκαν στην ενότητα 3.4.8. Σε όλες τις καλλιέργειες, τα βακτήρια (EUB338) ήταν οι μικροοργανισμοί που υπερίσχυσαν. Στην πλήρως αναερόβια καλλιέργεια, η συγκέντρωση των αρχαίων (ARCH915) ήταν περίπου 32,2%, ενώ μικρή ανάπτυξη (περίπου 14,9%) παρουσίασαν και τα γένη *Methanosarcina* και *Methanosaeta* (MSMX860), στα οποία ανήκουν ορισμένοι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί. Επιπλέον, στην ANAER καλλιέργεια, το γένος *Acetobacterium* spp. (AW) εντοπίστηκε σε ποσοστό 42,1%. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός ανήκει στην κατηγορία των οξικογόνων μικροοργανισμών και έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται αυτοτροφικά χρησιμοποιώντας ανόργανους δότες ηλεκτρονίων όπως H₂ και CO₂ ή ετεροτροφικά, χρησιμοποιώντας πληθώρα οργανικών πηγών άνθρακα, όπως σάκχαρα, οξέα και αλκοόλες (Bertsch & Müller, 2015; Hess et al., 2015). Αντίθετα, στην ανοξική μητρική καλλιέργεια, η παρουσία των αρχαίων (ARCH915) και των μεθανογόνων (MSMX860) ήταν αμελητέα όπως αναμενόταν, ενώ η ομοταξία των Gammaproteobacteria (GAM42a), στην οποία περιλαμβάνονται ορισμένα απονιτροποιητικά βακτήρια, έφτασε το 47,9% και πιθανότατα έπαιξε σημαντικό ρόλο στην αναγωγή του νιτρικού αζώτου (Qu et al., 2022). Οι υπόλοιποι ιχνηθέτες που εξετάστηκαν (GEO3A, DELTA495a, DSBAC357, SRB687) εμφάνισαν χαμηλά σήματα (κάτω από 10%), γεγονός που είναι

ενδεικτικό της μικρής παρουσίας των *Geobacter* spp., των οικογενειών *Desulfobacteraceae* και *Syntrophobacteraceae* και των σιδηροαναγωγικών βακτηρίων. Στις θεικοαναγωγικές μικροβιακές κοινότητες, η κυρίαρχη βακτηριακή ομάδα ήταν τα *Deltaproteobacteria* (DELTA 495a) - 44,3% για την καλλιέργεια S100 και 33,9% για την S400 – στην οποία ανήκουν αναερόβια βακτήρια που ανάγουν τα θειικά ιόντα (*Sulfate Reducing Bacteria* (SRB)), χρησιμοποιώντας το SO_4^{2-} ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των αρχαίων (ARCH915) και των μεθανογόνων (MSMX860) ήταν αμελητέες, καθώς τα SRB ήταν πιο ανταγωνιστικά και πιθανόν η παρουσία των θειούχων ενώσεων που παρήχθησαν ως αποτέλεσμα της αναγωγής των SO_4^{2-} ανέστειλαν την ανάπτυξή τους, με αποτέλεσμα τα θεικοαναγωγικά βακτήρια να υπερισχύσουν των μεθανογόνων μικροοργανισμών (Chen et al., 2008; Dar et al., 2008; Vavilin et al., 1994). Για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ στις θεικοαναγωγικές μικροβιακές αποικίες.



Σχήμα 4.3 Αποτελέσματα ανάλυσης FISH στο τέλος της περιόδου εγκλιματισμού των μητρικών καλλιεργειών.

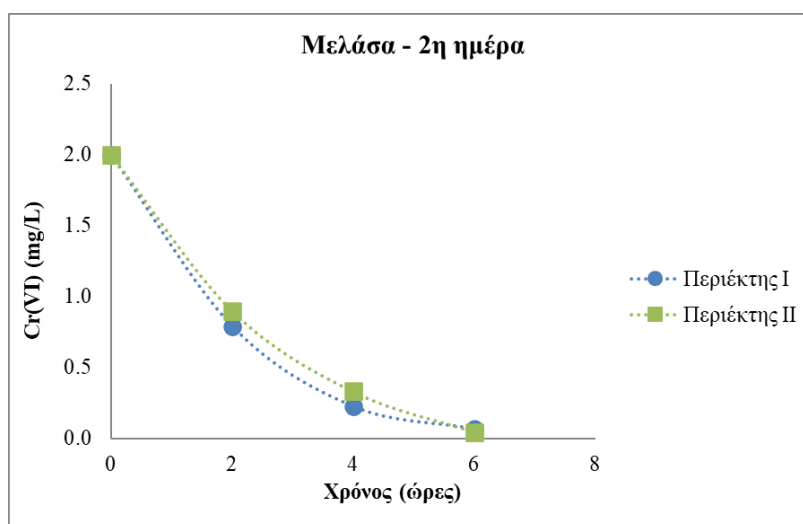
4.3 Μοντέλο κινητικής αναγωγής Cr(VI) στα πειράματα μικρόκοσμου

Για την ποσοτική περιγραφή των διαφορετικών περιπτώσεων αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου που εξετάστηκαν, καθώς και των ρυθμών απονιτροποίησης, χρησιμοποιήθηκαν εξισώσεις κινητικής ψευδο-πρώτης τάξης. Οι σταθερές ρυθμού πρώτης τάξης (k) υπολογίστηκαν με προσαρμογή της ακόλουθης εξίσωσης (Εξίσωση (4.1)) έως ότου επιτεύχθηκε απομάκρυνση της υπό εξέταση ουσίας τουλάχιστον κατά 90%:

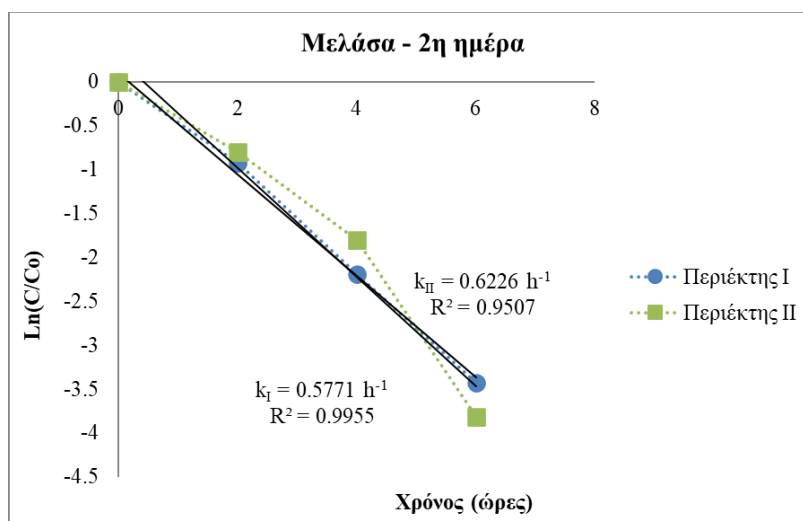
$$C = C_0 \cdot e^{(-kt)} \quad (4.1)$$

Όπου, C_0 : αρχική συγκέντρωση ουσίας (Cr(VI) ή $\text{NO}_3\text{-N}$) και C : συγκέντρωση ουσίας τη χρονική στιγμή t .

Τα χρονικά προφίλ κάθε διπλότυπου των πειραμάτων μικρόκοσμου κατασκευάστηκαν σε διαγράμματα της μορφής $\ln(C/C_0)$ ως προς το χρόνο (ώρες). Η κλίση της γραμμής τάσης είναι η σταθερά (k). Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζονται ως παράδειγμα, τα αποτελέσματα του πειράματος ANAER-M τη 2^η πειραματική ημέρα.



(α)



(β)

Σχήμα 4.4 Αποτελέσματα αναγωγής Cr(VI) τη 2^η πειραματική ημέρα στο μικρόκοσμο ANAER-M (α) και κατασκευή διαγράμματος της μορφής $\ln(C/C_0)$ ως προς το χρόνο (ώρες) (β).

Για την εύρεση των ρυθμών αναγωγής του Cr(VI) και του νιτρικού αζώτου επιλέχθηκε το μοντέλο κινητικής πρώτης ($1^{ηs}$) τάξης, καθώς εμφάνισε την καλύτερη προσαρμογή με τα πειραματικά αποτελέσματα, με τον αντίστοιχο συντελεστή συσχέτισης γραμμικής παλινδρόμησης R^2 να είναι $\geq 92\%$ στην πλειονότητα των περιπτώσεων. Επιπλέον, σχετικές έρευνες έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί να περιγράψει ικανοποιητικά τη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) σε πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (Das et al., 2014; Kathiravan et al., 2011), σε αντίθεση με άλλα μοντέλα, όπως το μοντέλο κινητικής $2^{ηs}$ τάξης, το οποίο προσομοιώνει με μικρότερη ακρίβεια βιολογικές διεργασίες και υιοθετείται ως επί το πλείστον για τη μοντελοποίηση της προσρόφησης χρωμίου και/ή της βιοπροσρόφησης (Badessa et al., 2020).

Όλοι οι ρυθμοί απομάκρυνσης που αναφέρονται στις παραγράφους 4.4-4.6 είναι μέσες τιμές των διπλότυπων όλων των πειραμάτων μικρόκοσμου που πραγματοποιήθηκαν για τα επιλεγμένα χρονικά διαστήματα (δηλαδή, 0–10 ημέρες, 10–20 ημέρες, 20–30 ημέρες, 30–40 ημέρες και 40–60 ημέρες), συνοδευόμενοι από τυπική απόκλιση.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα, οι διεργασίες που μελετήθηκαν ήταν αβιοτικές διεργασίες, η χημική αναγωγή του Cr(VI) μέσω προσθήκης Fe(II), η φυσική ικανότητα μικροοργανισμών να ανάγουν το Cr(VI), η βιοδιέγερση των μικροοργανισμών με

την προσθήκη πηγών άνθρακα και η συζευγμένη βιολογική και αβιοτική αναγωγή Cr(VI) με την προσθήκη οργανικού δότη ηλεκτρονίων και πηγής Fe(II). Οι ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) που παρουσιάζονται στα διαγράμματα των Ενοτήτων 4.4-4.6 είναι οι $k_{Cr(VI), total}$, οι οποίοι εμπεριέχουν τους ρυθμούς απομάκρυνσης Cr(VI) διαφορετικών διεργασιών, σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση (Εξίσωση 4.2):

$$k_{Cr(VI),total} = k_{Cr(VI),abiotic} + k_{Cr(VI),biotic} + k_{Cr(VI),enhanced} \quad (4.2)$$

Όπου, $k_{Cr(VI),abiotic}$: ο ρυθμός αναγωγής του Cr(VI) μέσω αβιοτικών διεργασιών του εδάφους, $k_{Cr(VI),biotic}$: ο ρυθμός αναγωγής του Cr(VI) λόγω της φυσικής ικανότητας των μικροοργανισμών να ανάγουν το Cr(VI) και $k_{Cr(VI),enhanced}$: ο ρυθμός αναγωγής του Cr(VI) λόγω διέγερσης των μικροοργανισμών μέσω της προσθήκης οργανικών ή/και ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων.

4.4 Μελέτη της αναγωγής του Cr(VI) υπό πλήρως αναερόβιες συνθήκες

Οι ρυθμοί αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου αξιολογήθηκαν υπό πλήρως αναερόβιες συνθήκες για μια περίοδο 60 ημερών, κατά την οποία γινόταν προσθήκη Cr(VI) στους περιέκτες κάθε 2-3 ημέρες, ενώ η αρχική συγκέντρωση του Cr(VI) ήταν 2,000 μg/L. Στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζεται η μεταβολή των ρυθμών απομάκρυνσης κινητικής ψευδο-πρώτης τάξης του Cr(VI) (k) ως προς το χρόνο (ημέρες) για δύο από τις συνθήκες που μελετήθηκαν: α) τη φυσική αναγωγική ικανότητα του εδάφους και της μικροβιακής κοινότητας (ANAER-B) και β) τη βιολογική διέγερση των μικροοργανισμών (biostimulation) με την προσθήκη πηγής άνθρακα μελάσα (M) ή EVO (E), αντίστοιχα (ANAER-M και ANAER-E). Θα πρέπει επίσης να υπογραμμιστεί ότι στους αποστειρωμένους μικρόκοσμους (sterile (S)) χωρίς την προσθήκη Fe(II), ο ρυθμός απομάκρυνσης του Cr(VI) ήταν $k_{ANAER-S} = 0.051 \text{ h}^{-1} \pm 0.013$ ($k_{Cr(VI),abiotic} \approx 13\% k_{Cr(VI),total}$), γεγονός που δείχνει ότι οι μη βιολογικές διεργασίες συνέβαλαν πολύ λίγο στη συνολική απομάκρυνση του Cr(VI) στους μικρόκοσμους όπου προστέθηκαν δότες ηλεκτρονίων.

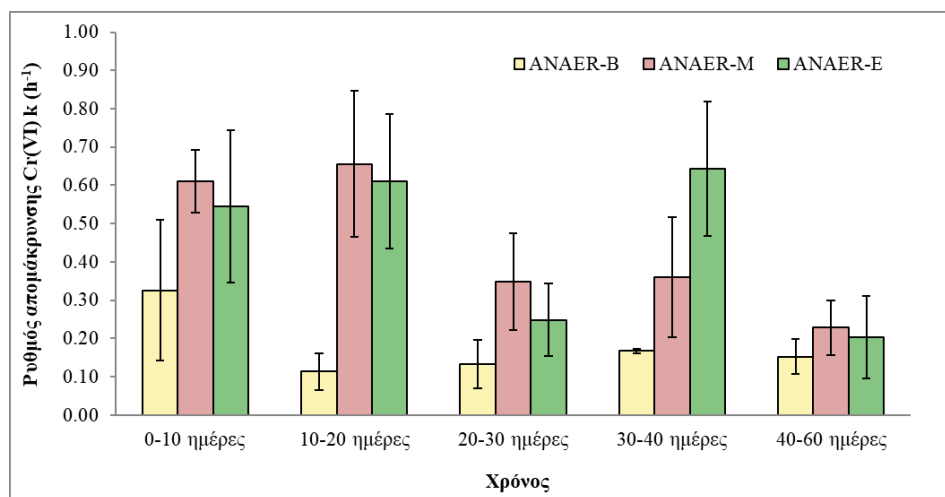
Από το πείραμα ANAER-B παρατηρείται ότι η αναγωγή του Cr(VI) είναι εφικτή ακόμη και χωρίς την προσθήκη κάποιου αναγωγικού παράγοντα, μέσω κατανάλωσης προϊόντων φθοράς της βιομάζας (ενδογενής αναπνοή). Ωστόσο, σε σύγκριση με τους περιέκτες στους οποίους προστέθηκε οργανικός δότης ηλεκτρονίων, οι ρυθμοί απομάκρυνσης είναι 2-6 φορές πιο αργοί, γεγονός που υποδηλώνει ότι επιτεύχθηκε η βιοδιέγερση της μικροβιακής κοινότητας.

Στους μικρόκοσμους με πηγή άνθρακα τη μελάσα (ANAER-M), οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) εμφανίζουν ένα μοτίβο ταχείας μείωσης, όπως αναμενόταν, καθώς η μελάσα είναι ένας άμεσα διαθέσιμος οργανικός δότης ηλεκτρονίων που εξαντλείται γρήγορα (Jeyasingh & Philip, 2005; Michailides et al., 2015). Ως αποτέλεσμα, η μελάσα εξαντλείται εντός 20 ημερών και στη συνέχεια η αναγωγή του Cr(VI) πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού της ενδογενούς αναπνοής, με χαμηλότερο ρυθμό απομάκρυνσης. Αντίθετα, στους περιέκτες όπου προστέθηκε το EVO (ANAER-E), τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, παρόλο που, κατά τις πρώτες 30 ημέρες του πειράματος, οι διαφορές μεταξύ του KANAER-M και του KANAER-E είναι αμελητέες, την επόμενη χρονική περίοδο (30-40 ημέρες), ο ρυθμός KANAER-E αυξήθηκε κατά 78% και στη συνέχεια (40-60 ημέρες) ελαττώθηκε απότομα. Αυτό το εύρημα συμφωνεί με την αναμενόμενη επίδραση του EVO στους μικροοργανισμούς ως αργά βιοδιασπώμενο υπόστρωμα (Dong et al., 2018). Ανάλυση του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (CODs) στους περιέκτες που είχαν προστεθεί οι οργανικοί δότες ηλεκτρονίων έδειξε ότι στο τέλος της 1^{ης} εβδομάδας του πειράματος:

- i. στους περιέκτες με μελάσα, η συγκέντρωση CODs είχε μειωθεί περίπου κατά 65% στο διάλυμα και από την ποσότητα που παρέμενε, το 27% ήταν πτητικά λιπαρά οξέα, και
- ii. στους περιέκτες με EVO, η συγκέντρωση CODs είχε μειωθεί περίπου κατά 79% στο διάλυμα και από την ποσότητα που παρέμενε, το 29% ήταν πτητικά λιπαρά οξέα.

Η μείωση αυτή στο υπερκείμενο διάλυμα οφείλεται κυρίως στην κατανάλωση του δότη ηλεκτρονίων από τους μικροοργανισμούς για την πραγματοποίηση των μεταβολικών διεργασιών τους και στην περίπτωση του EVO, και σε προσρόφησή του από το έδαφος.

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι οι μικρόκοσμοι μπόρεσαν να απομακρύνουν το Cr(VI) σε επίπεδα κάτω των 50 $\mu\text{g/L}$. Σύμφωνα με διαθέσιμες μελέτες σχετικά με το είδος του χρωμίου στα υπόγεια ύδατα, το Cr(VI) είναι η επικρατέστερη διαλυτή μορφή Cr και αντιπροσωπεύει περίπου το 70%-99% του ολικού χρωμίου στο νερό (Ball & Izbicki, 2004; Izbicki et al., 2015; Kumar & Riyazuddin, 2011).



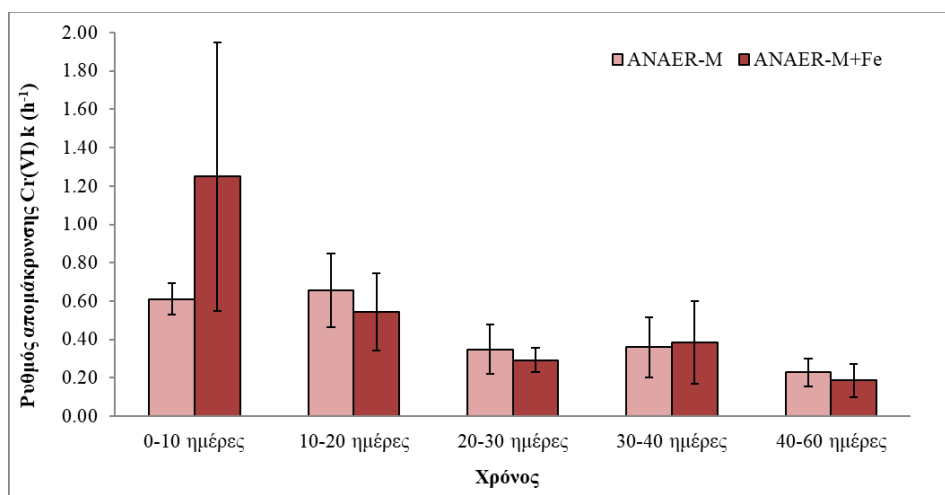
Σχήμα 4.5 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (k) των μικρόκοσμων ANAER-B, ANAER-M και ANAER-E κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης των 60 ημερών (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).

Στο Σχήμα 4.6 (α) και (β) απεικονίζονται τα αποτελέσματα της συνδυασμένης βιολογικής και χημικής απομάκρυνσης του Cr(VI). Παρατηρείται ότι η προσθήκη Fe^{2+} και μιας πηγής άνθρακα μπορούσε να διπλασιάσει το ρυθμό απομάκρυνσης του Cr(VI) κατά τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος. Οι ρυθμοί που ελήφθησαν με την προσθήκη Fe^{2+} ήταν $k_{\text{ANAER-M+Fe}} = 1.5 \text{ h}^{-1} \pm 0.70$ σε σύγκριση με $k_{\text{ANAER-M}} = 0.61 \text{ h}^{-1} \pm 0.08$ με τη μελάσα ως πηγή άνθρακα, ενώ με το EVO ήταν $k_{\text{ANAER-E+Fe}} = 0.92 \text{ h}^{-1} \pm 0.38$ και $k_{\text{ANAER-E}} = 0.54 \text{ h}^{-1} \pm 0.20$. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με δημοσιευμένα δεδομένα, στα οποία έχει αποδειχτεί ότι η χημική αναγωγή του Cr(VI) με δισθενή σίδηρο είναι συμπληρωματική της μικροβιακής αναγωγής (Fendorf et al., 2000; Wielinga et al., 2001).

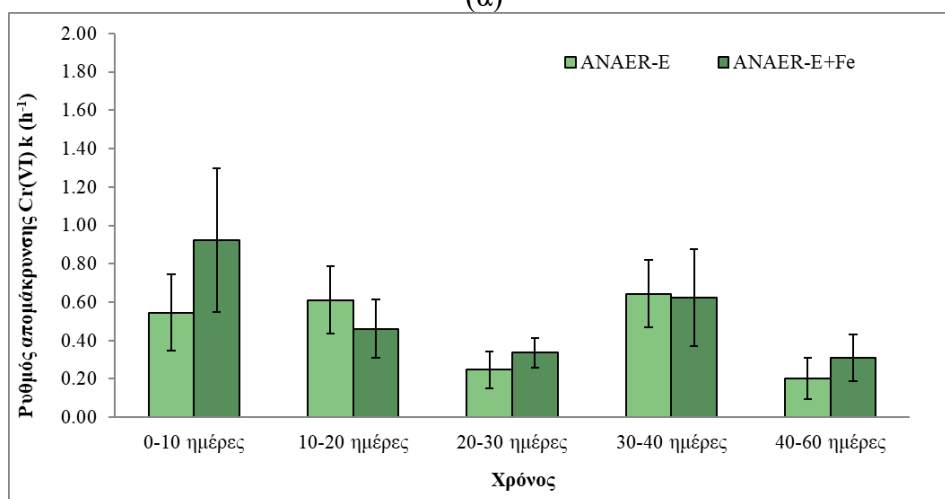
Το εξασθενές χρώμιο και ο δισθενής σίδηρος αντιδρούν σε στοιχειομετρική αναλογία mol Cr(VI)/mol Fe(II) ίση με 1/3, παράγοντας ένα μη τοξικό στερεό προϊόν, με τον ακόλουθο γενικό μοριακό τύπο: $\text{Fe}_{(1-x)}\text{Cr}_x(\text{OH})_3$ (Papassiopi et al., 2014). Λαμβάνοντας υπόψη τη

θεωρητική αναλογία, το μεγαλύτερο μέρος του Fe(II) ήταν διαθέσιμο για την αναγωγή του Cr(VI), αν και είναι πιθανό ότι μια μικρή ποσότητα θα μπορούσε να είχε παθητικοποιηθεί λόγω του αλκαλικού pH του εδάφους και των υπόγειων υδάτων. Επιπλέον, η πραγματοποίηση ανάλυσης Fe(II) σε δείγματα από την υγρή φάση των περιεκτών στους οποίους είχε προστεθεί FeSO₄ (ANAER-M+Fe και ANAER-E+Fe) μεταξύ της 1ης και της 10ης ημέρας του πειράματος, έδειξε ότι ο δισθενής σίδηρος ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Ωστόσο, σε αναερόβια εδάφη υπό την παρουσία μικροοργανισμών και με την προσθήκη οργανικών δοτών ηλεκτρονίων, ο τρισθενής σίδηρος Fe³⁺ μπορεί να αναχθεί σε δισθενή Fe²⁺ και να οδηγήσει στο σχηματισμό ορυκτών που περιέχουν Fe(II), όπως ο μαγνητίτης, ο σιδερίτης και οι πράσινες σκουριές. Τα ορυκτά αυτά έχουν την ικανότητα να αντιδράσουν με το Cr(VI) και μπορούν να λειτουργήσουν ως αναγωγικά μέσα για την αβιοτική απομάκρυνση του (Borch et al., 2010; Bryce et al., 2018; Cundy et al., 2008; Génin et al., 2002; Gheju & Balcu, 2011; Usman et al., 2018). Το γεγονός αυτό, δηλαδή ότι η προσθήκη οργανικού δότη ηλεκτρονίων ευνοεί και προάγει την αναγέννηση του Fe(II), υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα του μικρόκοσμου ANAER-S+Fe, σύμφωνα με τα οποία ο ρυθμός της χημικής αναγωγής του Cr(VI) σε σύγκριση με τον ρυθμό $k_{ANAER-S}$ της αποστειρωμένης καλλιέργειας, ήταν αυξημένος μόνο κατά τις 2 πρώτες πειραματικές ημέρες, ενώ για το υπόλοιπο πείραμα παρατηρήθηκε ότι $k_{ANAER-S} \approx k_{ANAER-S+Fe}$.

Μεταξύ της 10^{ης} και της 60^{ης} ημέρας του πειράματος, οι κινητικοί ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) των περιεκτών που δέχτηκαν πηγή άνθρακα και Fe(II) ήταν παρόμοιοι με εκείνους που περιείχαν μόνο την αντίστοιχη πηγή άνθρακα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι αυτός ο μηχανισμός δεν είχε σημαντική επίδραση στην απομάκρυνση του Cr(VI).



(α)



(β)

Σχήμα 4.6 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (k) των μικρόκοσμων με την προσθήκη (α) μελάσας και συνδυασμού μελάσας και Fe(II) και (β) EVO και συνδυασμού EVO και Fe(II), κατά τη διάρκεια των αναερόβιων batch πειραμάτων (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).

4.5 Μελέτη της αναγωγής του Cr(VI) σε ανοξικές συνθήκες

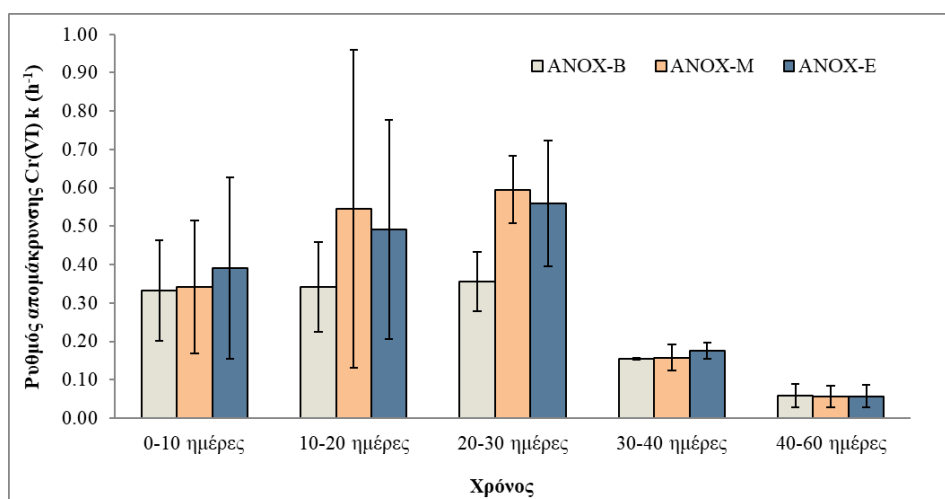
Στο πείραμα μικρόκοσμου υπό την παρουσία νιτρικού αζώτου, η απομάκρυνση του Cr(VI) και του $\text{NO}_3\text{-N}$ αξιολογήθηκαν για περίοδο 60 ημερών. Οι αρχικές συγκεντρώσεις Cr(VI) και $\text{NO}_3\text{-N}$ ήταν 2,000 $\mu\text{g/L}$ και 10,000 $\mu\text{g/L}$ αντίστοιχα, για τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος, ενώ για τις υπόλοιπες, αυτές οι συγκεντρώσεις αυξήθηκαν στα 3,000 $\mu\text{g/L}$ και 20,000 $\mu\text{g/L}$ αντίστοιχα. Στους περιέκτες γινόταν προσθήκη Cr(VI) και νιτρικού αζώτου κάθε 2-3 ημέρες.

Στα Σχήματα 4.7 (α) και (β) παρουσιάζεται η επίδραση της προσθήκης διαφορετικών οργανικών δοτών ηλεκτρονίων στους ρυθμούς απομάκρυνσης του εξασθενούς χρωμίου και του νιτρικού αζώτου. Οι αποστειρωμένοι μικρόκοσμοι έδειξαν ότι τα ποσοστά απομάκρυνσης του Cr(VI) ήταν $k_{\text{ANOX-S}} = 0.024 \text{ h}^{-1} \pm 0.01$, γεγονός που δείχνει ότι η απομάκρυνση του Cr(VI) από μη βιολογικές διεργασίες ήταν μικρότερη από 16% σε όλους τους βιοτικούς μικρόκοσμους κατά τις πρώτες 40 ημέρες του πειράματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, φαίνεται ότι η βιοδιέγερση των μικροοργανισμών μέσω κάποιου δότη ηλεκτρονίων μπορεί να ενισχύσει και τους δύο υπό εξέταση μηχανισμούς, δηλαδή τη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) και την απονιτροποίηση υπό ανοξικές συνθήκες.

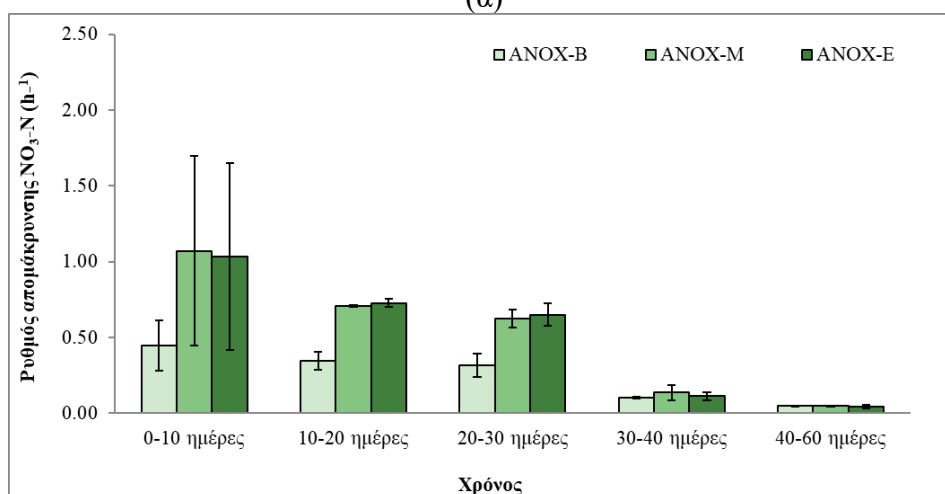
Αναλυτικότερα, στο Σχήμα 4.7 (α) και (β) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το πείραμα βιοτικού ελέγχου (ANOX-B). Για τις πρώτες 30 ημέρες του πειράματος, ο ρυθμός αναγωγής του Cr(VI) ήταν κατά μέσο όρο $0.34 \text{ h}^{-1} \pm 0.01$, ενώ ο ρυθμός απονιτροποίησης περίπου $0.37 \text{ h}^{-1} \pm 0.07$. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι και οι δύο διεργασίες (αναγωγή Cr(VI) και απονιτροποίηση) ήταν εφικτές χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε εξωτερικού αναγωγικού παράγοντα και πραγματοποιούνταν σχεδόν ταυτόχρονα.

Συγκρίνοντας τους ρυθμούς $k_{\text{Cr(VI)}}$ στο πείραμα ANOX-B και στους περιέκτες όπου προστέθηκαν οργανικοί δότες ηλεκτρονίων (μελάσα και EVO) (Σχήμα 4.7 (α)), παρατηρείται ότι επιτεύχθηκε μια αύξηση των ρυθμών $k_{\text{Cr(VI)}}$ στους μικρόκοσμους ANOX-M και ANOX-E μεταξύ της 10ης και της 30ης ημέρας του πειράματος. Κατά τις πρώτες 10 ημέρες, οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) ήταν παρόμοιοι και στις τρεις συνθήκες που μελετήθηκαν (περίπου 0.35 h^{-1}). Αντίθετα, η απονιτροποίηση κατά το πρώτο χρονικό διάστημα (0–10 ημέρες) ήταν 2.6–3.0 φορές ταχύτερη από τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI). Οι ρυθμοί αναγωγής του νιτρικού αζώτου στο πείραμα ANOX-M ήταν $1.07 \text{ h}^{-1} \pm 0.63$ και στο ANOX-E $1.03 \text{ h}^{-1} \pm 0.62$ (Σχήμα 4.7 (β)). Η διαπίστωση ότι ο ρυθμός απονιτροποίησης είναι υψηλότερος από τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI) συμφωνεί με δημοσιευμένα δεδομένα (Hu et al., 2022). Ωστόσο, για το υπόλοιπο του πειράματος, αυτή η διαφορά στους ρυθμούς αναγωγής μειώθηκε, με τις δύο αντιδράσεις οξειδοαναγωγής να λαμβάνουν χώρα σχεδόν ταυτόχρονα, αν και η απομάκρυνση των νιτρικών ήταν στην πλειονότητα των περιπτώσεων ελαφρώς ταχύτερη. Παρόμοια αποτελέσματα, δηλαδή ότι η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) και του $\text{NO}_3\text{-N}$ μπορούν να

πραγματοποιηθούν παράλληλα παρουσία του ίδιου δότη ηλεκτρονίων, έχουν επίσης παρατηρηθεί και από τους Hu et al., 2022. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι μετά τη 10η ημέρα, η συγκέντρωση $\text{NO}_3\text{-N}$ αυξήθηκε από τα 10 mg/L στα 20 mg/L και έχει αναφερθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις και μέχρι ενός σημείου, η υψηλότερη συγκέντρωση νιτρικών λόγω αυξημένης προσθήκης νιτρικών θα μπορούσε να έχει θετική επίδραση στην αναγωγή του Cr(VI) (Ding et al., 2021; He et al., 2020; Kourtev et al., 2009). Ωστόσο, η παράλληλη προσθήκη νιτρικών οδηγεί σε ταχύτερη κατανάλωση της διαθέσιμης ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγωγή του Cr(VI) και συνεπώς, σε μειωμένη διάρκεια ζωής της διαδικασίας βιοαναγωγής.



(α)

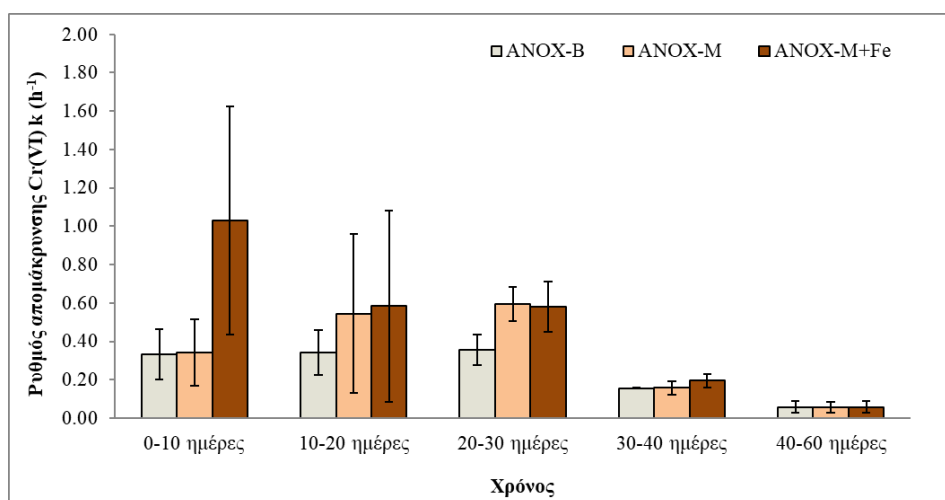


(β)

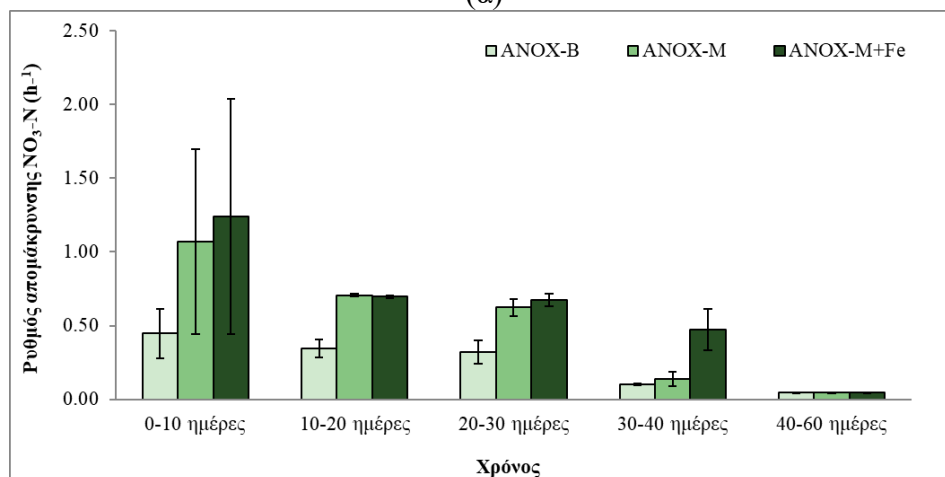
Σχήμα 4.7 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (α) και νιτρικού αζώτου (β) των μικρόκοσμων ANOX-B, ANOX-M και ANOX-E κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης των 60 ημερών (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).

Στα Σχήματα 4.8 και 4.9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της συζευγμένης βιολογικής και χημικής απομάκρυνσης Cr(VI) και νιτρικού αζώτου. Στην περίπτωση της αναγωγής του Cr, η ταυτόχρονη προσθήκη Fe²⁺ και πηγής άνθρακα αυξάνει το ρυθμό απομάκρυνσης κατά 2.5–3.0 φορές τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος. Οι ρυθμοί που προέκυψαν με την προσθήκη Fe²⁺ ήταν $1.03 \text{ h}^{-1} \pm 0.59$ (ANOX-M+Fe) σε σύγκριση με $0.34 \text{ h}^{-1} \pm 0.17$ (ANOX-M) με τη μελάσα ως πηγή άνθρακα (Σχήμα 4.8(α)) και $0.99 \text{ h}^{-1} \pm 0.48$ (ANOX-E+Fe) σε σύγκριση με $0.39 \text{ h}^{-1} \pm 0.24$ (ANOX-E) με το EVO ως πηγή άνθρακα (Σχήμα 4.9(α)). Μεταξύ της 10ης και της 60ης ημέρας των πειραμάτων, οι κινητικές απομάκρυνσης του Cr(VI) στους περιέκτες που προστέθηκε πηγή άνθρακα και Fe²⁺ ήταν παρόμοιοι με εκείνους που περιείχαν μόνο την αντίστοιχη οργανική πηγή ενέργειας, όπως συνέβη και στο αναερόβιο πείραμα. Επιπλέον, ο ρυθμός της χημικής αναγωγής του Cr(VI) ($k_{\text{ANOX-S+Fe}}$) σε σύγκριση με τον ρυθμό ($k_{\text{ANOX-S}}$) της αποστειρωμένης καλλιέργειας είναι περίπου ίσοι ($k_{\text{ANOX-S}} \approx k_{\text{ANOX-S+Fe}}$). Ωστόσο, στους 2 πρώτους πειραματικούς κύκλους, ο ρυθμός της χημικής αναγωγής ήταν σημαντικά ταχύτερος και κατά μέσο όρο $k_{\text{ANOX-S+Fe}} \approx 29 \cdot k_{\text{ANOX-S}}$, καθώς όλος σχεδόν ο προστιθέμενος σίδηρος ήταν διαθέσιμος και μπορούσε να αντιδράσει αβιοτικά και άμεσα με το Cr(VI).

Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 4.4, οι συνθήκες οξειδοαναγωγής ευνοούν τον σχηματισμό ορυκτών που περιέχουν Fe(II) και μπορούν να αντιδράσουν με το Cr(VI), οδηγώντας στην αναγωγή του. Αρκετές μελέτες έχουν προτείνει ότι ο δισθενής σίδηρος στα υπόγεια ύδατα (σε διαλυτή μορφή ή σε ορυκτά που περιέχουν σίδηρο) θα μπορούσε να προάγει την αναγωγή του νιτρικού και νιτρώδους αζώτου σε ρυπασμένους υδροφορείς με τα NO₃-N και NO₂-N να λειτουργούν ως πιθανοί αποδέκτες ηλεκτρονίων για την οξείδωση του Fe(II) (Margalef-Marti et al., 2020; Smith et al., 2017; Zhu & Getting, 2012). Οι ρυθμοί απονιτροποίησης με την προσθήκη πηγής σιδήρου (Σχήματα 4.8(β) και 4.9(β)) ήταν ελαφρώς υψηλότεροι σε σχέση με τους περιέκτες όπου είχε προστεθεί μόνο ο αντίστοιχος οργανικός δότης e⁻, αν και η διαφορά ήταν ασήμαντη, με εξαίρεση τους ρυθμούς απομάκρυνσης μεταξύ της 30ης και της 40ης ημέρας. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια των πρώτων 10 ημερών του πειράματος, η πλειονότητα του Fe(II) χρησιμοποιήθηκε για την αναγωγή του Cr(VI), ενώ για την υπόλοιπη διάρκεια του πειράματος, σύμπλοκες ενώσεις που περιείχαν Fe(II) προήγαγαν την αναγωγή του νιτρικού αζώτου.

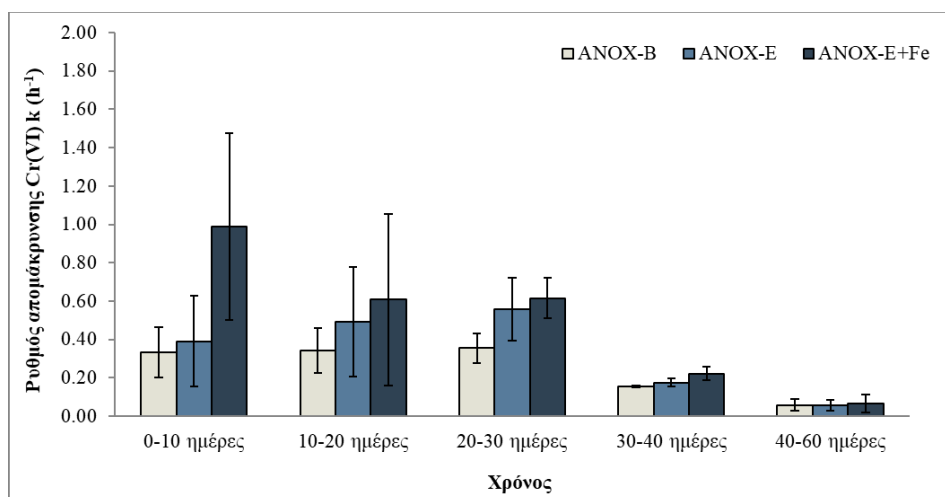


(α)

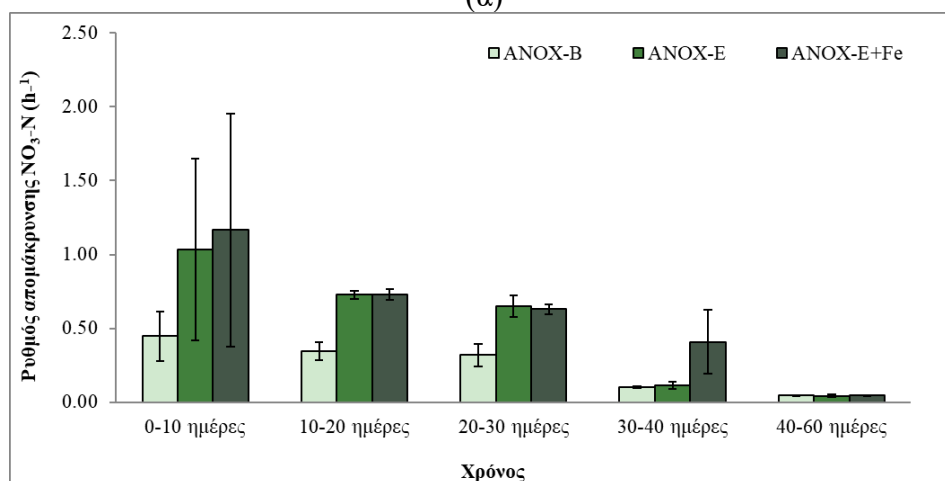


(β)

Σχήμα 4.8 Σύγκριση των ρυθμών απομάκρυνσης (α) Cr(VI) και (β) νιτρικού αζώτου μεταξύ των μικρόκοσμών που περιείχαν μελάσα και συνδυασμό μελάσας και Fe(II) (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).



(α)



(β)

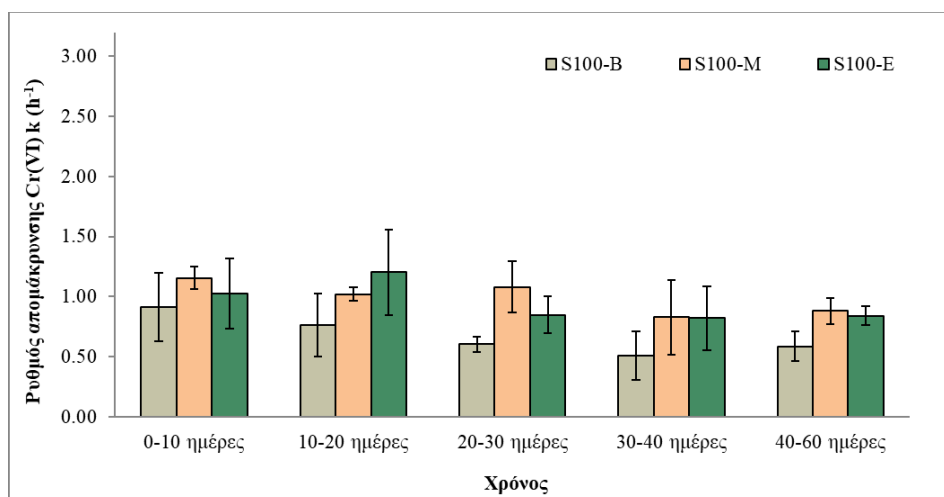
Σχήμα 4.9 Σύγκριση των ρυθμών απομάκρυνσης (α) Cr(VI) και (β) νιτρικού αζώτου μεταξύ των μικρόκοσμών που περιείχαν EVO και συνδυασμό EVO και Fe(II) (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).

Ανάλυση νιτρώδους αζώτου ($\text{NO}_2\text{-N}$) έδειξε ότι τις πρώτες 30 ημέρες του πειράματος η συγκέντρωση του $\text{NO}_2\text{-N}$ ήταν σε όλους τους βιοτικούς περιέκτες κάτω από το όριο ανίχνευσης, υποδεικνύοντας ότι τα νιτρώδη ήταν απλώς ένα ενδιάμεσο προϊόν και γινόταν πλήρης απονιτροποίηση. Ωστόσο, μετά την 40η ημέρα του πειράματος και μέχρι τη λήξη του, η συγκέντρωση $\text{NO}_2\text{-N}$ μετρήθηκε μεταξύ 1.0-6.0 mg/L. Η παρουσία νιτρωδών σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις έδειξε ότι η αναγωγή του $\text{NO}_2\text{-N}$ δεν μπορούσε να ολοκληρωθεί, πιθανώς λόγω έλλειψης δότη ηλεκτρονίων (Liu et al., 2021). Μετά την 30η ημέρα, και οι δύο διεργασίες ήταν σημαντικά πιο αργές (αναγωγή Cr(VI) και $\text{NO}_3\text{-N}$) και πραγματοποιήθηκαν μέσω του μηχανισμού της ενδογενούς αναπνοής, όπως φαίνεται και στα Σχήματα 4.7-4.9.

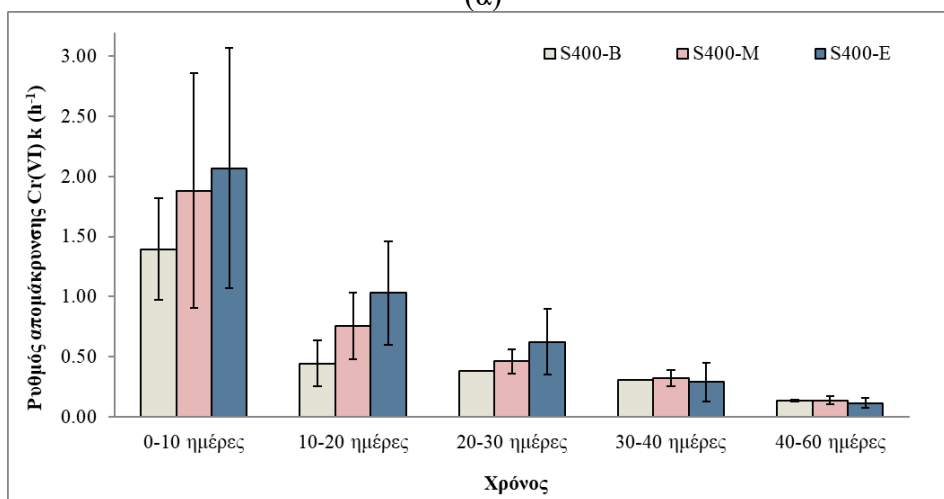
4.6 Μελέτη της αναγωγής του Cr(VI) υπό διαφορετικές θεικοαναγωγικές συνθήκες

Οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) αξιολογήθηκαν υπό την παρουσία χαμηλών (100 mg/L) και υψηλών (400 mg/L) συγκεντρώσεων θεικών ιόντων για μια περίοδο 60 ημερών. Η αρχική συγκέντρωση Cr(VI) ήταν 2,000 μg/L για τις πρώτες 10 ημέρες του πειράματος και 3,000 μg/L για τις υπόλοιπες. Στους περιέκτες γινόταν προσθήκη εξασθενούς χρωμίου κάθε 2-3 ημέρες, ενώ η συγκέντρωση θεικών ιόντων μετρούνταν και διατηρούνταν στα 100 mg/L (S100) και 400 mg/L (S400) στα αντίστοιχα πειράματα. Στους αποστειρωμένους περιέκτες οι ρυθμοί απομάκρυνσης του Cr(VI) ήταν $k_{\text{STERILE, S100}} = 0.071 \text{ h}^{-1} \pm 0.03$ και $k_{\text{STERILE, S400}} = 0.076 \text{ h}^{-1} \pm 0.02$. Οι τιμές αυτές δείχνουν ότι η απομάκρυνση του Cr(VI) από μη βιολογικές διεργασίες ήταν μικρότερη από 11% για όλη τη διάρκεια των 60 ημερών στους S100 μικρόκοσμους στους οποίους είχε γίνει προσθήκη δότη ηλεκτρονίων, ενώ στο πείραμα S400 η συνεισφορά των διεργασιών αυτών ήταν μικρότερη από 16% κατά τις πρώτες 30 πειραματικές ημέρες.

Στο Σχήμα 4.10 (α) και (β) παρουσιάζονται οι ρυθμοί απομάκρυνσης του Cr(VI) στο πείραμα βιοτικού ελέγχου (S100-B και S400-B), καθώς και στους περιέκτες που περιείχαν μελάσα και EVO και για τις δύο συγκεντρώσεις θεικών ιόντων. Οι ρυθμοί απομάκρυνσης του Cr(VI) χωρίς την προσθήκη οργανικού δότη ηλεκτρονίων ήταν $k_{\text{S100-B}} = 0.91 \text{ h}^{-1} \pm 0.03$ και $k_{\text{S400-B}} = 1.39 \text{ h}^{-1} \pm 0.03$ κατά τις πρώτες 10 πειραματικές ημέρες. Κατά την επόμενη περίοδο (ημέρες 10–60), και οι δύο ρυθμοί αναγωγής ήταν πιο αργοί. Στο πείραμα S100, το $k_{\text{S100-B}}$ μειώθηκε κατά 48% και ήταν κατά μέσο όρο $0.61 \text{ h}^{-1} \pm 0.11$ σε όλο το πείραμα χωρίς σημαντικές διακυμάνσεις. Αντίθετα, στο πείραμα S400, το $k_{\text{S400-B}}$ ήταν $0.31 \text{ h}^{-1} \pm 0.13$, το οποίο υποδεικνύει μείωση του ρυθμού αναγωγής σε σχέση με το 1^ο χρονικό διάστημα κατά 343%. Παρόλα αυτά, η αναγωγή του Cr(VI) συνέχιζε να είναι εφικτή και στις δύο περιπτώσεις μέσω α) ενδογενούς αναπνοής και β) άμεσης αναγωγής από τα παραγόμενα σουλφίδια από την αναγωγή των θεικών ιόντων. Η προσθήκη ενός οργανικού δότη ηλεκτρονίων (μελάσας ή EVO) αύξησε το ρυθμό αναγωγής του Cr(VI) κατά 1.2–2.3 φορές και στις δύο θεικοαναγωγικές συνθήκες. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους ρυθμούς αναγωγής των μικρόκοσμων, στους οποίους είχε προστεθεί μελάσα ή EVO.



(α)



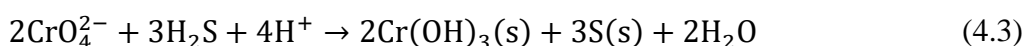
(β)

Σχήμα 4.10 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (k) των βιοτικών control και των μικρόκοσμων που περιείχαν μελάσα και EVO στα πειράματα (α) S100 και (β) S400 κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης των 60 ημερών (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).

Συγκρίνοντας τους ρυθμούς απομάκρυνσης του Cr(VI) που ελήφθησαν από τα πειράματα S100 και S400, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στην εξέλιξή τους. Στο πείραμα S100 (Σχήμα 4.10 (α)), οι ρυθμοί είναι σχεδόν σταθεροί σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ωστόσο, στο πείραμα S400 (Σχήμα 4.10 (β)), υπάρχει μια απότομη πτώση των ρυθμών ανάμεσα στο 1^ο και 2^ο χρονικό πειραματικό διάστημα (0-10 ημέρες και 10-20 ημέρες αντίστοιχα), ενώ στο υπόλοιπο πείραμα, η μείωση των ρυθμών είναι λιγότερο έντονη. Επιπλέον, οι ρυθμοί απομάκρυνσης k_{S400} τις ημέρες 0-10 ήταν περίπου 150% υψηλότεροι από τους αντίστοιχους στο πείραμα S100, ενώ για τις επόμενες 30 ημέρες (χρονικό διάστημα 10-40 ημέρες), οι ρυθμοί k_{S400} ήταν 10-70% χαμηλότεροι από το k_{S100} . Η προσθήκη ενός δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα

S400 προώθησε την πραγματοποίηση των μικροβιακών μεταβολικών διεργασιών με υψηλό ρυθμό, συμπεριλαμβανομένης της αναγωγής των θεικών και του Cr(VI), γεγονός που οδήγησε, ωστόσο, στην κατανάλωση των δοτών ηλεκτρονίων με ταχύτερο ρυθμό. Η παρατήρηση των ρυθμών απομάκρυνσης στο πείραμα S100 πέραν της περιόδου των 60 ημερών έδειξε ότι η αναγωγή του Cr(VI) μέσω της οδού της ενδογενούς αναπνοής και της κατανάλωσης των σουλφιδίων συνέβη 80 ημέρες μετά την προσθήκη του δότη ηλεκτρονίων. Αντίθετα, στο πείραμα S400, η αναγωγή του Cr(VI) μέσω της συγκεκριμένης οδού παρατηρήθηκε αρκετά ταχύτερα, σε περίπου μόλις 40 ημέρες. Φαίνεται λοιπόν ότι συνολικά η αναγωγή του Cr(VI) συνεχίστηκε με ελαφρώς υψηλότερο ρυθμό στο πείραμα S100.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων 10 ημερών των πειραμάτων, οι μετρούμενες συγκεντρώσεις σουλφιδίων (Πίνακας 4.3) στο πείραμα S400 κυμαίνονταν από 12.2 mg/L έως 19.0 mg/L στους περιέκτες όπου προστέθηκε οργανικός δότης ηλεκτρονίων και στη συνέχεια, η συγκέντρωση των σουλφιδίων μειώθηκε σύμφωνα με το μοτίβο που περιγράφηκε παραπάνω. Στα πειράματα S100-M, S100-M+Fe, S100-E και S100-E+Fe οι συγκεντρώσεις S^{2-} ήταν κατά μέσο όρο 7.7 mg/L το πρώτο χρονικό διάστημα (ημέρες 0-10), 4.7 mg/L το επόμενο (ημέρες 10-20) και 3.3 mg/L το τελευταίο (ημέρες 20-60). Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει μείωση στις συγκεντρώσεις των σουλφιδίων με την πάροδο του πειράματος, η οποία είναι πιθανότατα μεγαλύτερη από την παρατηρούμενη. Συγκρίνοντας τις συγκεντρώσεις σουλφιδίων στους περιέκτες όπου προστέθηκαν δότες ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια του πρώτου χρονικού διαστήματος (ημέρες 0-10), οι συγκεντρώσεις τους στο πείραμα S400 ήταν, κατά μέσο όρο, δύο φορές υψηλότερες από εκείνες στο S100. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα σουλφίδια μπορούν να ανάγουν χημικά το Cr(VI) σε Cr(III), σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:



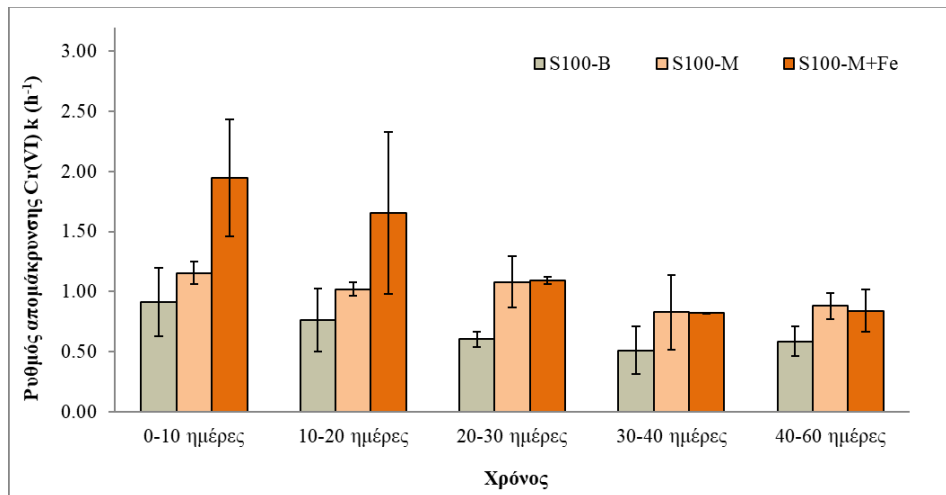
Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται ακόμα και στην τιμή του pH (περίπου 8.3), στην οποία διενεργήθηκαν τα πειράματα μικροκόσμου. Όπως αναφέρουν και οι Kim et al. (2001), η χημική αυτή αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα σε pH υψηλότερο από 8, ενώ ο ρυθμός αναγωγής

του Cr(VI) εμφανίζει θετική συσχέτιση με την αρχική συγκέντρωση σουλφιδίων. Επομένως, η πιθανότητα αβιοτικής αναγωγής του Cr(VI) υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες, όπου τα σουλφίδια δρουν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων, δεν θα πρέπει να αποκλειστεί.

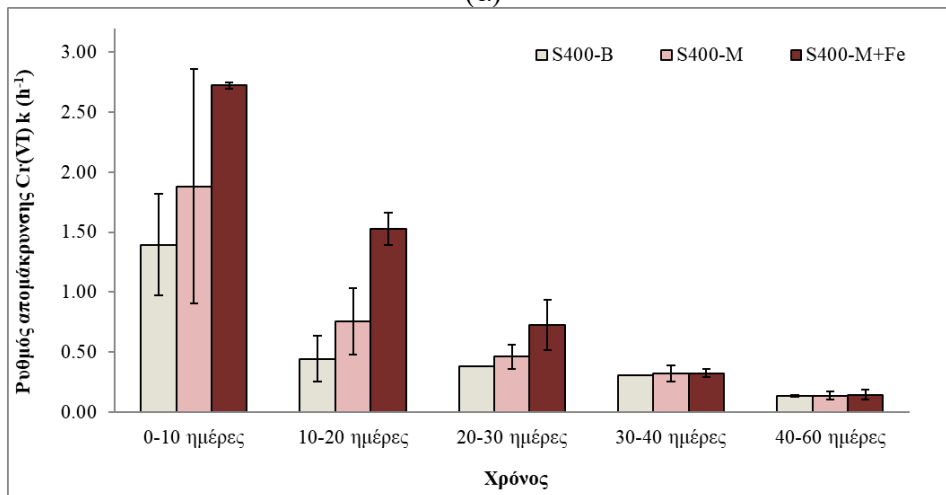
Πίνακας 4.3 Μέσες τιμές συγκέντρωσης σουλφιδίων στους μικρόκοσμους υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες.

Πείραμα	Συγκέντρωση σουλφιδίων (mg/L)		
	Ημέρες 0–10	Ημέρες 10–20	Ημέρες 20–60
S100-B	4.6 ± 0.0	3.1 ± 0.1	1.6 ± 1.1
S100-M	7.1 ± 0.2	4.3 ± 0.8	3.7 ± 0.8
S100-E	7.5 ± 0.5	3.1 ± 1.5	3.0 ± 1.1
S100-M + Fe	7.1 ± 0.6	5.4 ± 1.4	3.2 ± 1.6
S100-E + Fe	9.1 ± 1.2	5.8 ± 0.8	3.3 ± 2.2
S400-B	2.1 ± 0.1	1.7 ± 0.6	1.0 ± 0.5
S400-M	19.0 ± 1.8	6.9 ± 3.9	2.3 ± 1.0
S400-E	12.2 ± 2.8	7.0 ± 5.1	1.9 ± 1.0
S400-M + Fe	16.2 ± 5.3	3.6 ± 2.8	2.0 ± 0.7
S400-E + Fe	13.3 ± 2.6	5.3 ± 0.5	3.9 ± 2.7

Οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) με την προσθήκη θεικού σιδήρου παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.11 και 4.12. Η προσθήκη μιας πηγής σιδήρου μπορεί να αυξήσει τους ρυθμούς αναγωγής του Cr(VI) κατά 41%–99% τις πρώτες 20–30 ημέρες και στα δύο πειράματα, δεδομένου ότι οι συνθήκες οξειδοαναγωγής ευνοούν τη δημιουργία ορυκτών που μπορούν να αντιδράσουν με το Cr(VI), όπως περιγράφεται στις Ενότητες 4.2 και 4.4. Στο υπόλοιπο πείραμα, οι ρυθμοί αναγωγής ήταν παρόμοιοι με εκείνους που περιείχαν μόνο τον αντίστοιχο οργανικό δότη ηλεκτρονίων.

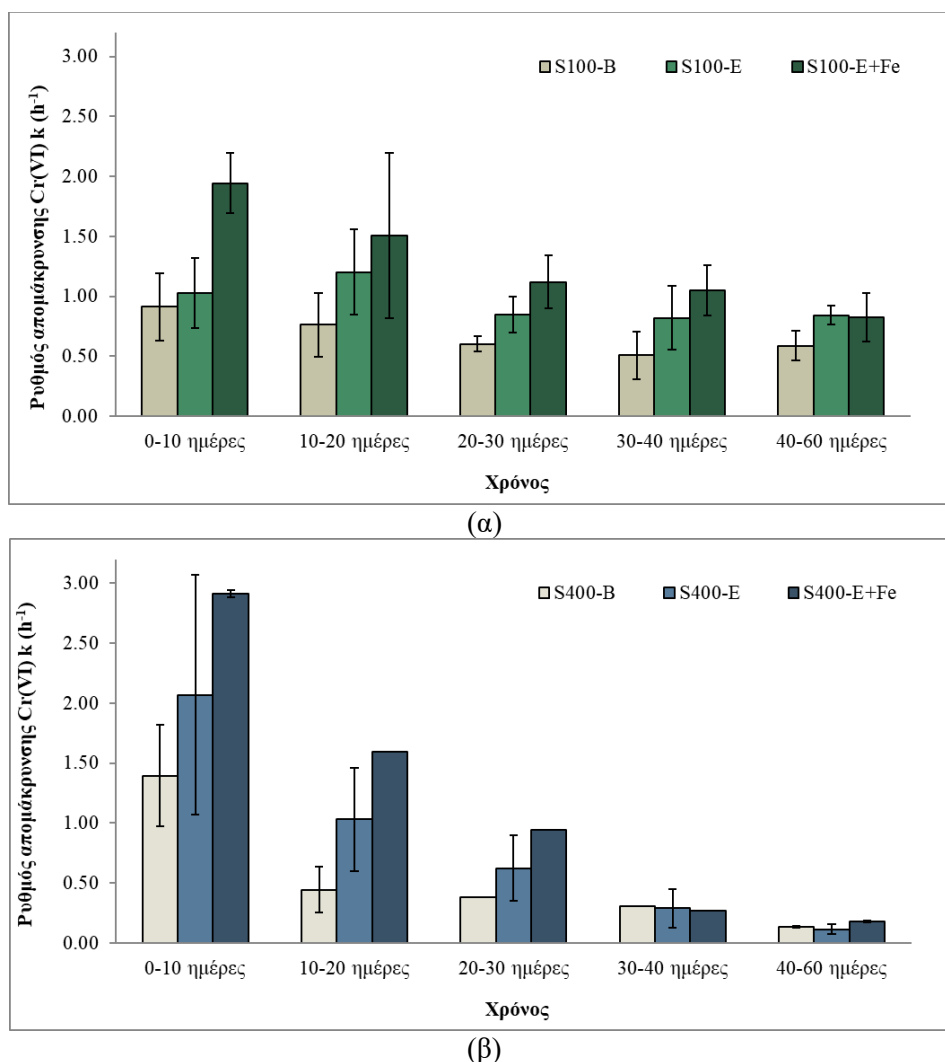


(α)



(β)

Σχήμα 4.11 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (k) των μικρόκοσμων με την προσθήκη μελάσας και συνδυασμού μελάσας και Fe(II) στα πειράματα (α) S100 και (β) S400 (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).



Σχήμα 4.12 Ρυθμοί απομάκρυνσης Cr(VI) (k) των μικρόκοσμων με την προσθήκη EVO και συνδυασμού EVO και Fe(II) στα πειράματα (α) S100 και (β) S400 (οι γραμμές σφάλματος ισούνται με την τυπική απόκλιση).

4.7 Σύγκριση ρυθμών αναγωγής χρωμίου υπό διαφορετικές αναγωγικές συνθήκες

Ένας σημαντικός στόχος αυτής της έρευνας ήταν η αξιολόγηση της βιολογικής αναγωγής του Cr(VI) σε *in situ* εφαρμογές βιοαποκατάστασης υπό διαφορετικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες και όταν ο δότης ηλεκτρονίων είναι περιοριστικός παράγοντας. Οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) στους πλήρως αναερόβιους (ANAER) και ανοξικούς (ANOX) μικρόκοσμους ήταν συγκρίσιμοι στους αντίστοιχους περιέκτες ($k_{ANOX} \approx k_{ANAER}$), ακόμη και με την αύξηση της

αρχικής συγκέντρωσης Cr(VI) στα 3,000 μg/L στο ανοξικό πείραμα. Επιπλέον, η βιοδιέγερση των μικροοργανισμών φαίνεται ότι ευνοεί την αναγωγή του Cr(VI) υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες. Στο πείραμα S100, η αναγωγή του Cr(VI) ήταν στην πλειονότητα των συνθηκών που μελετήθηκαν τουλάχιστον δύο φορές ταχύτερη από την αντίστοιχή τους στο αναερόβιο πείραμα καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου παρατήρησης των 60 ημερών, ενώ στο πείραμα βιοτικού ελέγχου τέσσερις έως επτά φορές ταχύτερη ($k_{S100-B} = 4-7 \cdot k_{ANAER-B}$). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν επίσης στο πείραμα S400 κατά τις 30 πρώτες πειραματικές ημέρες, αν και για τις υπόλοιπες, οι ρυθμοί απομάκρυνσης του Cr(VI) δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους αντίστοιχους αναερόβιους. Υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες η αναγωγή του Cr(VI) φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω δύο μηχανισμών: 1) άμεσα, λόγω απευθείας αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου και οξείδωση του δότη και 2) έμμεσα από τα σουλφίδια που παράγονται κατά την αναγωγή των θεικών ιόντων. Δεν είναι σαφές εάν οι μικροοργανισμοί ανάγουν άμεσα το Cr(VI) μέσω ενός ενζυματικού μηχανισμού ή ένα σημαντικό μέρος της αναγωγής του Cr(VI) πραγματοποιείται έμμεσα από μικροοργανισμούς που ανάγουν τα θεικά ιόντα σε σουλφίδια, τα οποία στη συνέχεια ανάγουν αβιοτικά το Cr(VI). Σε κάθε περίπτωση, είναι σαφές ότι στο εύρος των SO_4^{2-} που μελετήθηκε, η προσθήκη ενός οργανικού δότη ηλεκτρονίων είναι ένας αποτελεσματικός μηχανισμός για τη διέγερση της βιολογικής αναγωγής του Cr(VI) στο υπέδαφος υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι πιο ευνοϊκές συνθήκες για την αναγωγή του Cr(VI) μέσω μικροοργανισμών, όσον αφορά τους ρυθμούς αναγωγής και τη διάρκεια ζωής της διαδικασίας, είναι οι θεικοαναγωγικές συνθήκες, όταν η συγκέντρωση των SO_4^{2-} είναι χαμηλή (100 mg/L).

Τα αποτελέσματα της σύγκρισης των ρυθμών αναγωγής εξασθενούς χρωμίου υπό διαφορετικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες μπορούν να συνοψιστούν στις ακόλουθες σχέσεις:

$$k_{ANOX} \approx k_{ANAER} \quad (4.5)$$

$$k_{S100} \geq 2 \cdot k_{ANAER} \quad (4.6)$$

$$k_{S400} \geq 2 \cdot k_{ANAER} \quad (0-30 \text{ ημέρες}) \quad (4.7)$$

$$k_{S400} \approx k_{ANAER} \quad (30-60 \text{ ημέρες}) \quad (4.8)$$

Επιπλέον, με βάση την εξίσωση 4.2 για τους περιέκτες στους οποίους είχαν προστεθεί δότες ηλεκτρονίων:

$$k_{\text{Cr(VI),total}} = k_{\text{Cr(VI),abiotic}} + k_{\text{Cr(VI),biotic}} + k_{\text{Cr(VI),enhanced}} \quad (4.2)$$

προκύπτει ότι κατά μέσο όρο σε όλα τα πειράματα και για όλο το διάστημα παρακολούθησης των 60 ημερών, οι ρυθμοί της αβιοτικής, βιοτικής και βιοενισχυμένης αναγωγής συμμετείχαν στη συνολική αναγωγή του Cr(VI) με τα ακόλουθα ποσοστά:

$$k_{\text{Cr(VI),abiotic}} = 13.5\% k_{\text{Cr(VI),total}} \quad (4.9)$$

$$k_{\text{Cr(VI),biotic}} = 50\% k_{\text{Cr(VI),total}} \quad (4.10)$$

$$k_{\text{Cr(VI),enhanced}} = 36.5\% k_{\text{Cr(VI),total}} \quad (4.11)$$

Τα αποτελέσματα των παρόντων πειραμάτων προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με εφαρμογές για την *in situ* βιολογική αποκατάσταση τόπων ρυπασμένων με Cr(VI). Η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες είναι το πιο ευνοϊκό περιβάλλον αφού, ακόμη και χωρίς την προσθήκη πηγής άνθρακα, η απομάκρυνση του Cr(VI) μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω άμεσης χημικής αναγωγής από τις βιολογικά παραγόμενες θειούχες ενώσεις. Ωστόσο, ιδιαίτερη έμφαση πρέπει να δοθεί στη δημιουργία μιας ισορροπημένης αναλογίας μεταξύ της παρεχόμενης ποσότητας COD και της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων για τη διασφάλιση της μακροζωίας της διαδικασίας αποκατάστασης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι τα ανοξικά περιβάλλοντα θα απαιτούσαν συχνότερες ενέσεις οργανικών δοτών ηλεκτρονίων, καθώς η αναγωγή των νιτρικών είναι μια διαδικασία υψηλής ενεργειακής απαίτησης με υψηλή κατανάλωση οργανικών δοτών.

4.8 Συμπεράσματα πειραμάτων μικρόκοσμου

Στόχος των πειραμάτων μικρόκοσμου ήταν η διερεύνηση της επίδρασης δύο διαφορετικών πηγών οργανικού άνθρακα και μιας πηγής σιδήρου στη βιολογική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου σε τρισθενές υπό ανοξικές συνθήκες, πλήρως αναερόβιες και θεικοαναγωγικές συνθήκες και όταν ο δότης ηλεκτρονίων αποτελεί περιοριστικό παράγοντα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα συμπεράσματα.

Αρχικά, η παρουσία διαφορετικών αποδεκτών ηλεκτρονίων, επηρεάζει τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας που ανάγει το Cr(VI), ευνοώντας την ανάπτυξη διαφορετικών μικροοργανισμών. Στην πλήρως αναερόβια καλλιέργεια, ευνοήθηκε η ανάπτυξη των αρχαίων και μεθαγονόνων μικροοργανισμών, η παρουσία των οποίων ήταν αμελητέα στις θεικοαναγωγικές και στην ανοξική μητρική καλλιέργεια. Αντίστοιχα, στις θεικοαναγωγικές καλλιέργειες, σύμφωνα με την ανάλυση FISH, επικρατέστερη βακτηριακή ομοταξία ήταν τα *Deltaproteobacteria*, ενώ στην ανοξική τα *Gammaproteobacteria*. Επιπλέον, φάνηκε ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικών ιόντων δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας.

Τα πειραματικά αποτελέσματα αναγωγής του Cr(VI) στα πειράματα μικρόκοσμου μπορούν να περιγράψουν ικανοποιητικά με την εφαρμογή του μοντέλου κινητικής ψευδό-πρώτης τάξης. Τα αποτελέσματα από τους αποστειρωμένους περιέκτες σε όλες τις πειραματικές διατάξεις κατέδειξαν ότι αβιοτικές διεργασίες, όπως η προσρόφηση, συμμετέχουν σε πολύ μικρό ποσοστό στη συνολική απομάκρυνση του εξασθενούς χρωμίου. Στους αποστειρωμένους περιέκτες στους οποίους έγινε προσθήκη FeSO₄ για τη μελέτη της χημικής αναγωγής του Cr(VI) μέσω Fe(II), παρατηρήθηκε ότι η χημική αναγωγή χωρίς την προσθήκη πηγής άνθρακα δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική διαδικασία και θα απαιτούσε συχνές εγχύσεις Fe(II).

Όσον αφορά την αναγωγή του Cr(VI) υπό αναερόβιες συνθήκες, φαίνεται ότι η βιοδιέγερση των μικροοργανισμών με την προσθήκη ενός οργανικού δότη ηλεκτρονίων μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI) έως και έξι φορές σε σύγκριση με τη φυσική ικανότητα των μικροοργανισμών να ανάγουν το Cr(VI). Ακόμη, συγκρίνοντας τους ρυθμούς αναγωγής στους περιέκτες που περιείχαν μελάσα και EVO, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Επιπλέον, συνδυασμός οργανικού δότη ηλεκτρονίων και σιδήρου κατάφερε να αυξήσει ακόμη περισσότερο το ρυθμό απομάκρυνσης του εξασθενούς χρωμίου, μέσω βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών. Ωστόσο, αυτή η βιοδιέγερση δεν είχε μακροχρόνια επίδραση στην αναγωγή του Cr(VI) και σταδιακά μειώθηκε, μετά την εξάντληση των δοτών ηλεκτρονίων.

Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης, ότι η αναγωγή του Cr(VI) είναι εφικτή παρουσία νιτρικού αζώτου και πραγματοποιείται σχεδόν ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση, όταν υπάρχουν

διαθέσιμοι δότες ηλεκτρονίων. Οι μικροοργανισμοί που έχουν εγκλιματιστεί υπό ανοξικές συνθήκες μπορούν να απομακρύνουν πλήρως Cr(VI) και NO₃-N συγκεντρώσεων 3 mg/L και 20 mg/L αντίστοιχα από ρυπασμένο νερό, μέσω βιοδιέγερσης, χρησιμοποιώντας είτε οργανικούς είτε συνδυασμό οργανικών και ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων. Ωστόσο, μετά την εξάντληση του δότη ηλεκτρονίων, τόσο ο ρυθμός αναγωγής του Cr(VI), όσο και ο ρυθμός απονιτροποίησης μειώνονται σημαντικά.

Παρατηρήθηκε επιπλέον ότι η παρουσία θεικών ιόντων σε υδροφόρο ορίζοντα ρυπασμένο με Cr(VI) βελτιώνει σημαντικά τη μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI), ακόμη και χωρίς την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων, είτε άμεσα, μέσω ενζυματικών διεργασιών των μικροοργανισμών, είτε έμμεσα, λόγω αντίδρασης του Cr(VI) με τα παραγόμενα σουλφίδια από την αναγωγή των SO₄²⁻. Ωστόσο, σε υψηλές συγκεντρώσεις SO₄²⁻ (400 mg/L), φαίνεται ότι η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) είναι ελαφρώς μειωμένη σε σύγκριση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις SO₄²⁻ (100 mg/L), λόγω της ταχύτερης κατανάλωσης του οργανικού δότη ηλεκτρονίων.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις διαφορετικές οξειδοαναγωγικές συνθήκες, οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) στους πλήρως αναερόβιους και ανοξικούς μικρόκοσμους ήταν συγκρίσιμοι στους αντίστοιχους περιέκτες, ενώ στο πείραμα με χαμηλή συγκέντρωση SO₄²⁻, η αναγωγή του Cr(VI) ήταν στην πλειονότητα των συνθηκών που μελετήθηκαν τουλάχιστον δύο φορές ταχύτερη από την αντίστοιχή τους στο αναερόβιο πείραμα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν επίσης στο πείραμα S400 κατά τις 30 πρώτες πειραματικές ημέρες, ενώ για τις υπόλοιπες, οι ρυθμοί απομάκρυνσης του Cr(VI) δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους αντίστοιχους αναερόβιους.

5. Μελέτη μικροβιακής αναγωγής εξασθενούς χρωμίου σε πειράματα εδαφικών στηλών

5.1 Εισαγωγή

Στο πλαίσιο της διατριβής πραγματοποιήθηκαν πειράματα εδαφικών στηλών (πειράματα συνεχούς τροφοδοσίας) για την προσομοίωση της αναγωγής του Cr(VI) σε υπόγειους υδροφορείς με μεγαλύτερη ακρίβεια, καθώς λαμβάνονται υπόψη βιοχημικές διεργασίες σε συνδυασμό με φαινόμενα μεταφοράς ρύπου. Η μελέτη αυτή καλύπτει κενό που υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με τη διερεύνηση της βιοτικής και αβιοτικής αναγωγής του Cr(VI), με τη διεξαγωγή πειραμάτων σε φυσικό έδαφος και την εφαρμογή βιοδιέγερσης για την τροποποίηση των υπάρχοντων φυσικών βακτηρίων.

Για την πραγμάτωση των πειραμάτων κατασκευάστηκαν δύο (2) εδαφικές στήλες, κάθε μία από τις οποίες ήταν συνδεδεμένη μέσω περισταλτικής αντλίας με γυάλινο δοχείο χωρητικότητας 5L (Σχήμα 3.2 και 3.3), που περιείχε το διάλυμα Cr(VI) για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, όπως αναλυτικά περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες απουσίας οξυγόνου και μελετήθηκαν:

- η φυσική αναγωγική ικανότητα του εδάφους χωρίς την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων
- η αβιοτική αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση δισθενούς σιδήρου
- η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) με τη χρήση δύο πηγών οργανικού άνθρακα
- η συζευγμένη αβιοτική-βιοτική αναγωγή του Cr(VI) μέσω πιθανής αναγέννησης του Fe(II) λόγω προσθήκης οργανικών πηγών άνθρακα

5.2 Κινητικές εξισώσεις αναγωγής Cr(VI) στα πειράματα στήλης

Τα πειραματικά δεδομένα από τις εισόδους και των δύο στηλών σχεδιάστηκαν σε γραφήματα $\ln(C_t/C_{\text{initial}})$ συναρτήσεως του χρόνου, προκειμένου να αξιολογηθεί η σταθερά της εξίσωσης πρώτης τάξης ($k_{\text{Cr(VI)}}$), που περιγράφει την απομάκρυνση του εξασθενούς χρωμίου :

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_{\text{initial}}}\right) = -k \times t \quad (5.1)$$

$$k = k_{\text{Cr(VI)}} \times \left(\frac{V_{\text{soil}}}{V_{\text{liquid}}}\right) \quad (5.2)$$

Όπου, C_{initial} : συγκέντρωση Cr(VI) στην είσοδο κάθε στήλης στην αρχή του πειραματικού κύκλου (mg/L), C_t : συγκέντρωση Cr(VI) στην είσοδο κάθε στήλης τη χρονική στιγμή t (mg/L), t : χρόνος/η πειραματική ημέρα, k : κλίση της γραμμής τάσης που παράγεται στα γραφήματα, $k_{\text{Cr(VI)}}$: η σταθερά απομάκρυνσης Cr(VI) πρώτης τάξης (d^{-1}), $V_{\text{soil}}/V_{\text{liquid}}$: αναλογία όγκων του εδάφους και του ρυπασμένου νερού που υποβλήθηκε σε επεξεργασία σε κάθε πειραματικό κύκλο.

Η παράμετρος $V_{\text{soil}}/V_{\text{liquid}}$ χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει το γεγονός ότι σε υψηλότερες αναλογίες εδάφους προς νερό, το νερό έρχεται σε επαφή με μεγαλύτερη ποσότητα εδάφους, το οποίο περιέχει τους πρόσθετους αναγωγικούς παράγοντες και επομένως αναμένεται να ανάγει το Cr(VI) με υψηλότερο ρυθμό. Παρόμοιο κινητικό μοντέλο για την περιγραφή της αναγωγής του Cr(VI) έχει προταθεί και από τους Kathiravan et al. (2011).

Σε έναν κορεσμένο υδροφόρο ορίζοντα το $V_{\text{soil}}/V_{\text{liquid}}$ μπορεί να υπολογιστεί με βάση το πορώδες, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση (Εξίσωση 5.3):

$$\left(V_{\text{soil}}/V_{\text{liquid}}\right) = ((1 - \Theta)/\Theta) \quad (5.3)$$

Όπου, Θ : το πορώδες του εδάφους.

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις 5.1-5.3, προκύπτει η εξίσωση 5.4:

$$\ln\left(\frac{C_t}{C_{\text{initial}}}\right) = -k_{\text{Cr(VI)}} \times \left(\frac{1 - \Theta}{\Theta}\right) \times t \quad (5.4)$$

Σε έναν κορεσμένο υδροφορέα και γνωρίζοντας την ταχύτητα του υπογείου νερού, καθώς και το πορώδες του εδάφους, εφαρμογή της εξίσωσης 5.4, δύναται να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα αναγωγής του υδροφορέα μετά την προσθήκη οργανικών και ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων (απαιτούμενος χρόνος επαφής με τη ζώνη αντίδρασης, πάχος της ζώνης αντίδρασης, κ.ά.).

Το Βιοτικό πείραμα διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου στους $17\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, ενώ τα υπόλοιπα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στους $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$. Οι ρυθμοί αναγωγής από τα βιοτικά πειράματα διορθώθηκαν στους $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ χρησιμοποιώντας την εξίσωση Arrhenius, όπως περιγράφεται στην εξίσωση 5.5:

$$k_{\text{Cr(VI)}} = A \times \exp[-E_a/(R \times T)] \quad (5.5)$$

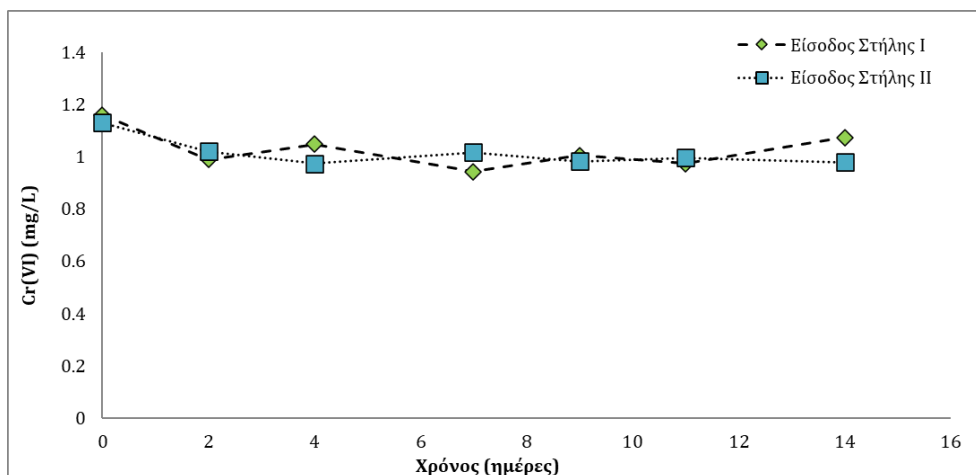
Όπου, $k_{\text{Cr(VI)}}$: ο ρυθμός αναγωγής Cr(VI) (d^{-1}), A: ένας παράγοντας συχνότητας (d^{-1}), E_a : η ενέργεια ενεργοποίησης της διεργασίας (J/mol), R: η σταθερά ιδανικού αερίου (8.314 J/mol/K) και T: η θερμοκρασία (K).

Για τη διόρθωση των ρυθμών χρησιμοποιήθηκαν τιμές από μελέτες σχετικές με τη βιολογική αναγωγή χρωμίου υπό αναερόβιες συνθήκες (Grady et al., 2011; Guo et al., 2012; Mamais et al., 2016).

5.3 Μελέτη της φυσικής αναγωγικής ικανότητας του εδάφους (πείραμα control)

Το πείραμα ελέγχου (control) διήρκησε 14 ημέρες, στη διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκε ανακυκλοφορία διαλύματος Cr(VI) αρχικής συγκέντρωσης 1 mg/L . Σκοπός του πειράματος ήταν να εξεταστεί η φυσική ικανότητα του εδάφους να απομακρύνει το Cr(VI). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η ικανότητα αυτή ήταν πολύ χαμηλή (περίπου $1.12 \pm 0.21\text{ mg Cr(VI)/kg}$ εδάφους). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.1, η συγκέντρωση Cr(VI) στις εισόδους των δύο στηλών παρέμεινε κοντά στην αρχική συγκέντρωση (1 mg/L) του διαλύματος ανακυκλοφορίας, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο ρυθμός απομάκρυνσης του εξασθενούς χρωμίου $k_{\text{Cr(VI)}}$ ήταν περίπου $0.16 \pm 0.05\text{ d}^{-1}$. Σε άλλες παρόμοιες μελέτες που

έχουν πραγματοποιηθεί σε αποστειρωμένα ή και μη αποστειρωμένα εδάφη χωρίς τη χρήση αναγωγικού μέσου, βρέθηκαν αντίστοιχα χαμηλοί ρυθμοί απομάκρυνσης εξασθενούς χρωμίου (Shashidhar et al., 2006; Wen et al., 2017).



Σχήμα 5.1 Προφίλ Cr(VI) στην είσοδο της στήλης I και II κατά τη διάρκεια του πειράματος control.

Μετά τον εμπλουτισμό του εδάφους με μικροοργανισμούς και πριν την έναρξη του βιοτικού πειράματος, το οποίο πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη μείγματος πηγών άνθρακα, έγινε μέτρηση της υδραυλικής αγωγιμότητας των εδαφικών στηλών μέσω δοκιμής διαπερατότητας σταθερού υδραυλικού φορτίου. Ο συντελεστής υδραυλικής αγωγιμότητας ήταν κατά μέσο όρο και για τις δύο στήλες $5.1 \cdot 10^{-3}$ cm/s.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε δοκιμή ιχνηθέτησης (tracer test), για την αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ροής του Cr(VI) μέσω των εδαφικών στηλών. Ως ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε το χλωριούχο νάτριο (NaCl) και η δοκιμή πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην ενότητα 3.4.11. Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζονται οι καμπύλες εξόδου του ιχνηθέτη και για τις δύο στήλες. Τα αποτελέσματα περιγράφηκαν χρησιμοποιώντας την κλασική μονοδιάστατη εξίσωση συναγωγής-διασποράς (Convection-Dispersion Equation) (Εξισώσεις 5.5 και 5.6) και αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας τον κώδικα CXFIT του λογισμικού STANMOD.

$$R \frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v \frac{\partial C}{\partial z} \quad (5.5)$$

$$R = 1 + \frac{\rho_b K_d}{\Theta} \quad (5.6)$$

Όπου, C: η συγκέντρωση του ιχνηθέτη στην υδατική φάση (mg/cm^3), v: η γραμμική ταχύτητα (cm/min), D: η σταθερά υδροδυναμικής διασποράς (cm^2/min), R: ο συντελεστής επιβράδυνσης, ρ_b : η φαινόμενη πυκνότητα του πορώδους μέσου (g/cm^3), K_d : ο συντελεστής κατανομής της διαλυμένης ουσίας μεταξύ της υδατικής και της στερεάς φάσης (cm^3/g) και Θ : το πορώδες του εδάφους.

Οι συντελεστές K_d και R θεωρήθηκαν ίση με 0 και 1 αντίστοιχα, καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ιόντα χλωρίου (Cl^-) δεν αντιδρούν με τα σωματίδια του εδάφους. Με την εφαρμογή της εξίσωσης συναγωγής-διασποράς προσδιορίστηκαν ο συντελεστής διασποράς D και η γραμμική ταχύτητα v.

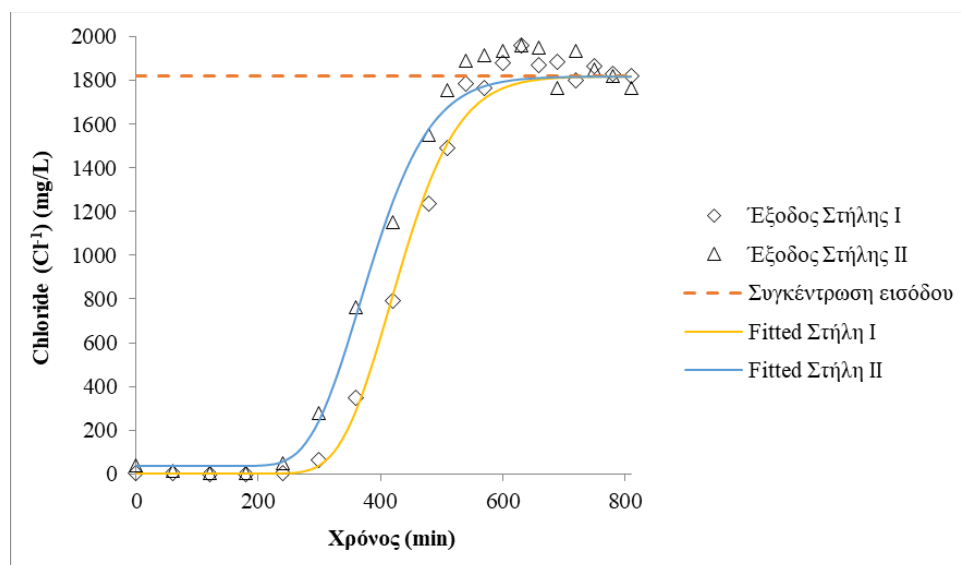
Επιπλέον, η ταχύτητα v μπορεί να υπολογιστεί και μέσω της εξίσωσης 5.7 :

$$v = \frac{Q}{\pi d^2 / 4 \cdot \Theta} \quad (5.7)$$

Όπου, Q: η παροχή του διαλύματος (ml/min), d: η εσωτερική διάμετρος της στήλης (cm) και Θ : το πορώδες του εδάφους. Σύμφωνα με την εξίσωση 5.7, η ταχύτητα v ήταν και για τις δύο στήλες ίση με $0.064 \pm 0.001 \text{ cm}/\text{min}$.

Εφαρμόζοντας τις εξισώσεις 5.5 και 5.6 προέκυψε ότι $D=0.042 \pm 0.012 \text{ cm}^2/\text{min}$ και $v=0.073 \pm 0.005 \text{ cm}/\text{min}$, που δεν έχει σημαντική διαφορά με αυτή που προέκυψε μέσω της εξίσωσης 5.7.

Με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμών ιχνηθέτησης τα χαρακτηριστικά της ροής και στις δύο στήλες σχεδόν συμπίπτουν με αυτά της εμβολοειδούς ροής.



Σχήμα 5.2 Συγκεντρώσεις χλωριόντων (Cl^-) στις εξόδους των δύο στηλών κατά τη διάρκεια του tracer test πριν την έναρξη των πειραμάτων. Οι γραμμές με την ένδειξη “Fitted” έχουν προκύψει μέσω προσομοίωσης με το λογισμικό STANMOD.

5.4 Επίδραση του οργανικού δότη ηλεκτρονίων στη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) (Βιοτικό πείραμα)

Η ικανότητα των εδαφικών στηλών να ανάγουν βιολογικά το εξασθενές χρώμιο αξιολογήθηκε μέσω τροφοδοσίας διαλύματος Cr(VI) για 110 ημέρες σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 3 (Ενότητα 3.2.4). Κάθε στήλη τροφοδοτήθηκε για δύο (2) ημέρες μέσω ανακυκλοφορίας με ένα υδατικό διάλυμα που περιείχε το απαραίτητο οργανικό φορτίο για τη βιοδιέγερση των μικροοργανισμών. Το διάλυμα οργανικού φορτίου παρασκευάστηκε διαλύοντας 0.2 g συμπυκνωμένης μελάσας και 0.8 g συμπυκνωμένου γαλακτωματοποιημένου φυτικού ελαίου (EVO) σε 1 L διηθημένου υπόγειου νερού. Το πείραμα στη συνέχεια προχώρησε σε συνεχή ανακύκλωση διαλύματος Cr(VI) χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε αναγωγικού παράγοντα. Πριν την τροφοδοσία με τους οργανικούς δότες ηλεκτρονίων, είχε προηγηθεί εμπλουτισμός του εδάφους με φυσικούς μικροοργανισμούς. Ο εμπλουτισμός επετεύχθη με τον κορεσμό κάθε στήλης με αφιλτράριστο υπόγειο νερό από το δίκτυο παροχής νερού του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και επώαση υπό αναερόβιες συνθήκες για 14 ημέρες.

Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, πραγματοποιήθηκαν συνολικά επτά (7) πειραματικοί κύκλοι. Σε κάθε κύκλο, η αρχική συγκέντρωση Cr(VI) ήταν περίπου 1,000 μg/L, ενώ θεωρήθηκε ότι κάθε κύκλος είχε ολοκληρωθεί όταν απομακρυνόταν/αναγόταν τουλάχιστον το 90% της συγκέντρωσης Cr(VI) στο διάλυμα του δοχείου ανακυκλοφορίας. Το συνολικό COD που συγκρατήθηκε μέσα στις στήλες κατά τη 2ημερη τροφοδοσία και η συνολική ποσότητα Cr(VI) που ανάχθηκε παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1. Οι στήλες συγκράτησαν κατά μέσο όρο 1,816 mg COD/kg εδάφους, ενώ σημειώνεται ότι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις COD στην είσοδο και έξοδο των στηλών ήταν κάτω από το από το όριο ανίχνευσης (<15 mg/L). Υπενθυμίζεται ότι το 80% της πηγής άνθρακα ήταν υπόστρωμα EVO, το οποίο αποτελείται από μικρά κολλοειδή σωματίδια ελαίου, που έχουν την τάση να προσκολλώνται στα σωματίδια του εδάφους. Η συνολική ποσότητα Cr(VI) που απομακρύνθηκε βάσει της ικανότητας της Στήλης I και II ήταν 34.53 mg Cr(VI)/kg εδάφους και 31.44 mg Cr(VI)/kg εδάφους αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τα πειραματικά αποτελέσματα από τις δύο στήλες, φαίνεται ότι και οι δύο λειτούργησαν σχεδόν με τον ίδιο τρόπο. Κατά τη διάρκεια του κάθε κύκλου, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 5.3 (α) και (β), η βιοδιεγερθείσα μικροβιακή κοινότητα που αναπτύχθηκε στη μήτρα του εδάφους μπορούσε να απομακρύνει πλήρως το Cr(VI) από το διάλυμα τροφοδοσίας Cr(VI) σε περίπου δώδεκα ημέρες (κύκλοι 2-6). Τα γραφήματα που κατασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό της σταθεράς k παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α (Σχήματα Α.3 και Α.8). Εξαιρώντας τον τελευταίο κύκλο, όπου ο οργανικός δότης ηλεκτρονίων είχε εξαντληθεί πλήρως, η σταθερά βιοτικής απομάκρυνσης Cr(VI) πρώτης τάξης (d^{-1}), κυμαίνονταν από 1.74 έως 4.35 d^{-1} , ενώ η πλειοψηφία τους ήταν μεταξύ 3-4 d^{-1} (36%). Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με τα αποτελέσματα από το πείραμα Control, φαίνεται ότι η βιοδιέγερση των μικροοργανισμών έχει επιτευχθεί, με ρυθμούς απομάκρυνσης του Cr(VI) να παρουσιάζουν αύξηση έως και 20 φορές σε σχέση με το πείραμα Ελέγχου.

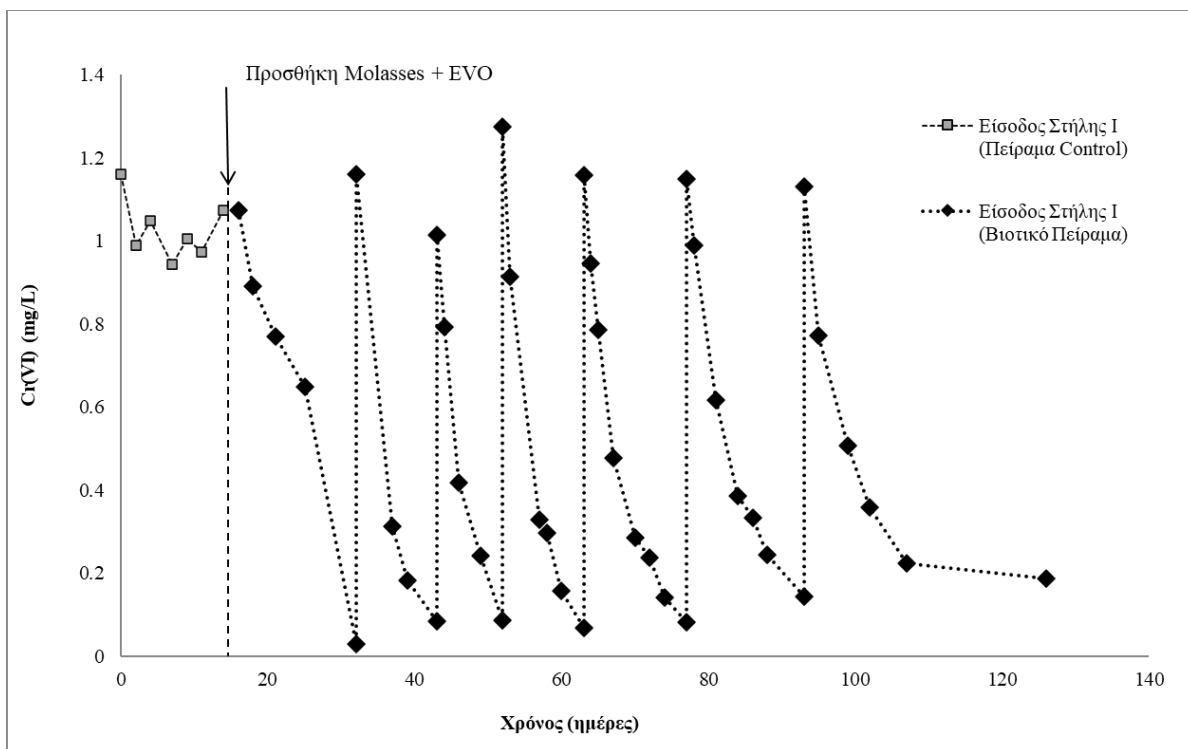
Πίνακας 5.1 Αποτελέσματα Βιοτικού πειράματος.

Πείραμα	Παράμετρος	Στήλη	
		I	II
Βιοτικό	COD που συγκρατήθηκε (mg COD/kg εδάφους)	1,834	1,798
	Διάρκεια πειράματος (Ημέρες)	110	110
	Αριθμός πειραματικών κύκλων	7	7
	Μάζα ανηγμένου Cr(VI) (mg)	22.41	21.06
	Συνολικό Cr(VI) που απομακρύνθηκε (mg Cr(VI)/kg εδάφους)	34.53	31.44
	Υδραυλική αγωγιμότητα k (cm/s) (Τέλος περιόδου start-up)	$5.6 \cdot 10^{-3}$	$4.3 \cdot 10^{-3}$
	Υδραυλική αγωγιμότητα k (cm/s) (Τέλος πειράματος)	$3.1 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
	Μείωση διαπερατότητας (Τέλος πειράματος) ¹ (%)	44.92	63.32

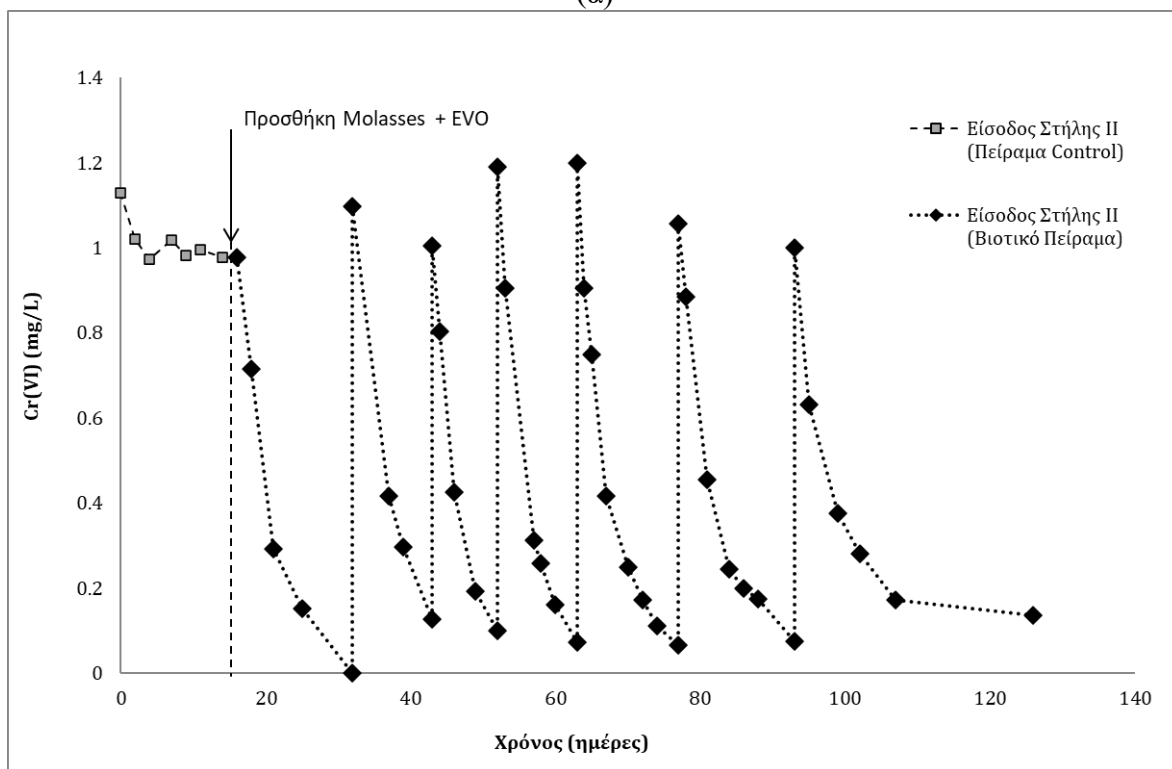
¹: Η μεταβολή της διαπερατότητας υπολογίζεται σε σχέση με το αμέσως προηγούμενο στάδιο.

Η προσθήκη απλών οργανικών δοτών ηλεκτρονίων όπως η μελάσα ή το EVO έχει αξιολογηθεί σε αρκετές μελέτες εργαστηριακής κλίμακας (Dong et al., 2018; Jeyasingh & Philip, 2005; Krishna & Philip, 2005; Michailides et al., 2015; Somasundaram et al., 2011; Sun et al., 2020; Wen et al., 2017). Τα αποτελέσματα από προηγούμενες μελέτες συμφωνούν με τα ευρήματα αυτής της εργασίας και δείχνουν ότι και οι δύο πηγές άνθρακα μπορούν να υποστηρίξουν την πλήρη αναγωγή του Cr(VI) ακόμη και σε υψηλές αρχικές συγκεντρώσεις Cr(VI), που υπερβαίνουν κατά πολύ τα επίπεδα ρύπανσης στο περιβάλλον.

Στο τέλος του βιοτικού πειράματος πραγματοποιήθηκαν ξανά δοκιμές διαπερατότητας και tracer test για τον έλεγχο της πιθανής μεταβολής των χαρακτηριστικών ροής του διαλύματος Cr(VI) μέσα από τις εδαφικές στήλες. Παρατηρήθηκε ότι ο συντελεστής υδραυλικής αγωγιμότητας ήταν κατά μέσο όρο και για τις δύο στήλες $2.4 \cdot 10^{-3}$ cm/s, μειώθηκε δηλαδή κατά 44.92%-63.32% (Πίνακας 5.1). Από τη δοκιμή ιχνηθέτησης (Σχήμα 5.4), οι συντελεστές D και ν προέκυψαν ίσοι με $D=0.061 \pm 0.020$ cm²/min και $\nu=0.065 \pm 0.000$ cm/min αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δοκιμών ιχνηθέτησης τα χαρακτηριστικά της ροής και στις δύο στήλες διατηρούν τα χαρακτηριστικά της εμβολοειδούς ροής.

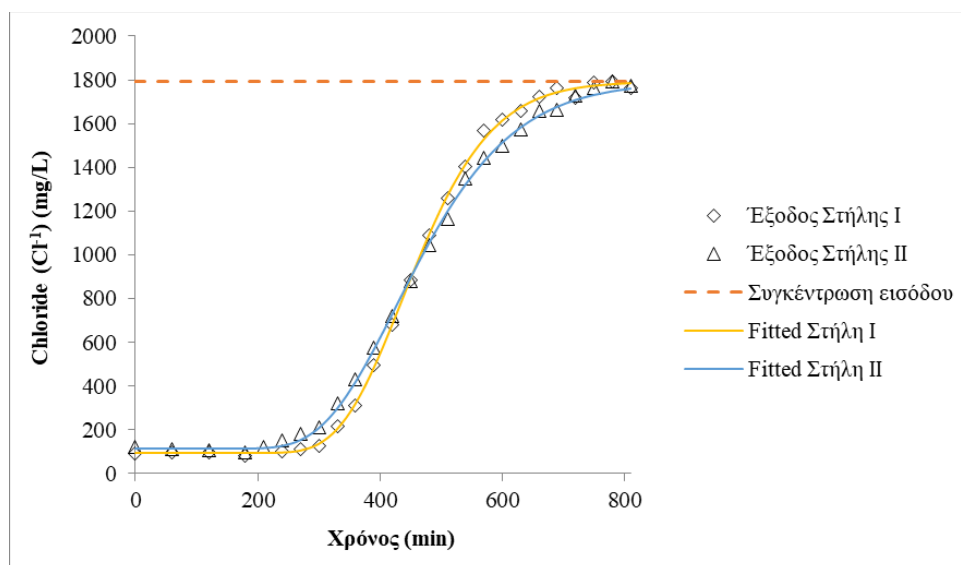


(α)



(β)

Σχήμα 5.3 Προφίλ Cr(VI) στην είσοδο της στήλης I (α) και II (β) κατά τη διάρκεια του πειράματος control και του βιοτικού πειράματος.



Σχήμα 5.4 Συγκεντρώσεις χλωριόντων (Cl^-) στις εξόδους των δύο στηλών κατά τη διάρκεια του tracer test αμέσως μετά τη λήξη του Βιοτικού πειράματος. Οι γραμμές με την ένδειξη “Fitted” έχουν προκύψει μέσω προσομοίωσης με το λογισμικό STANMOD.

5.5 Μελέτη της συζευγμένης Βιοτικής – Αβιοτικής απομάκρυνσης Cr(VI)

Προκειμένου να διερευνηθεί η βιοτική – αβιοτική απομάκρυνση Cr(VI) και να εξεταστεί η υπόθεση ότι η προσθήκη πηγών άνθρακα παρουσία σιδήρου έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναγωγικών συνθηκών και μπορεί να οδηγήσει στη διέγερση βακτηρίων που ανάγουν τον σίδηρο (σιδηροαναγωγικά βακτήρια) και σε σταθερή παραγωγή Fe(II), πραγματοποιήθηκαν πειράματα στηλών όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.5. Τα πειράματα διεξήχθησαν σε δύο φάσεις: κατά την 1η φάση αξιολογήθηκε μόνο η αβιοτική/χημική απομάκρυνση του Cr(VI), ενώ κατά τη 2η φάση μελετήθηκε η συνδυασμένη βιοτική-αβιοτική απομάκρυνση του Cr(VI).

5.5.1 Αβιοτική απομάκρυνση Cr(VI)

Αρχικά κάθε στήλη τροφοδοτήθηκε με 1 L διαλύματος επταένδρου θεικού σιδήρου ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), το οποίο περιείχε περίπου 50 mg/L Fe^{+2} . Η τροφοδοσία με το διάλυμα σιδήρου πραγματοποιήθηκε για μια (1) ημέρα χωρίς ανακυκλοφορία. Στο τέλος του κύκλου τροφοδότησης η συγκέντρωση του διαλυτού Fe^{+2} ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης,

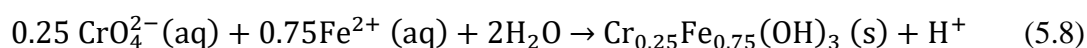
υποδηλώνοντας ότι όλη η ποσότητα του Fe^{+2} του διαλύματος είχε προσροφηθεί στην εδαφική στήλη. Το πείραμα συνεχίστηκε με την ανακυκλοφορία διαλύματος Cr(VI) για 45 ημέρες, με αρχικό όγκο 4 L και αρχική συγκέντρωση 1,000 $\mu\text{g/L}$ (μάζα Cr(VI) = 4 mg). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.5, η προσθήκη του θεικού σιδήρου είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του Cr(VI) από τα υπόγεια ύδατα μέσω των μηχανισμών της αναγωγής, προσρόφησης και κατακρήμνισης. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της αβιοτικής απομάκρυνσης ήταν πολύ περιορισμένη (περίπου 0.77-2.52 mg Cr(VI)), καθώς ένα μεγάλο μέρος του προστιθέμενου Fe(II) παθητικοποιήθηκε, μειώνοντας έτσι τη συνολική απόδοση και διάρκεια ζωής της διαδικασίας (Πίνακας 5.2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται επίσης ότι η αναγωγική ικανότητα της στήλης I ήταν λίγο καλύτερη από αυτή της στήλης II.

Πίνακας 5.2 Αποτελέσματα Αβιοτικού πειράματος.

Πείραμα	Παράμετρος	Στήλη	
		I	II
Αβιοτικό	Διάρκεια πειράματος (Ημέρες)	45	45
	Αριθμός πειραματικών κύκλων	1	1
	Μάζα ανηγμένου Cr(VI) (mg)	2.52	0.77
	Συνολικό Cr(VI) που απομακρύνθηκε (mg Cr(VI)/kg εδάφους)	3.88	1.14
	Υδραυλική αγωγιμότητα k (cm/s) (Τέλος Βιοτικού πειράματος)	$3.1 \cdot 10^{-3}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
	Υδραυλική αγωγιμότητα k (cm/s) (Αμέσως μετά την προσθήκη διαλύματος Fe(II))	$2.6 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-3}$
	Μείωση διαπερατότητας ¹ (%)	16.63	16.73

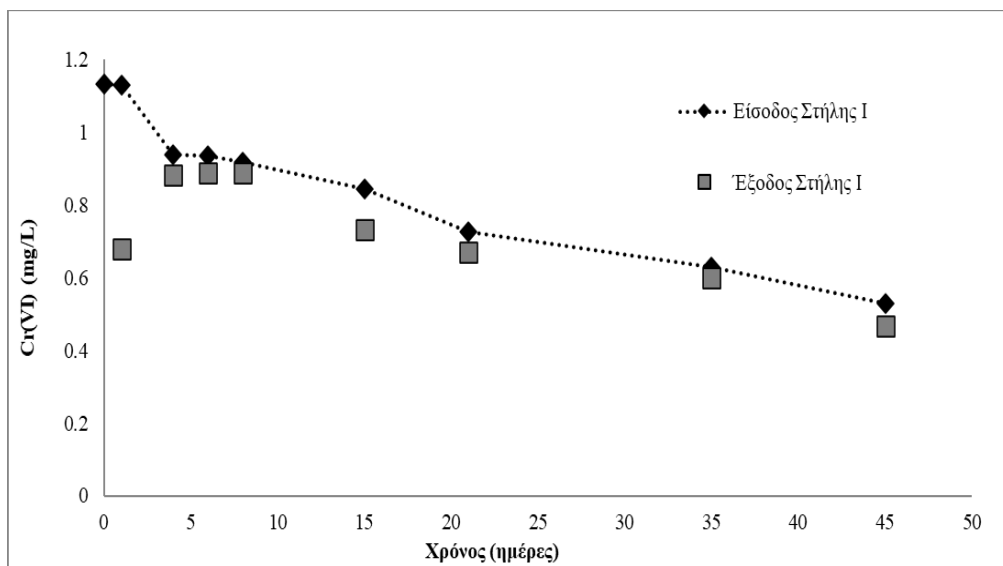
¹: Η μεταβολή της διαπερατότητας υπολογίζεται σε σχέση με το αμέσως προηγούμενο στάδιο.

Υπό αλκαλικές συνθήκες pH, η επικρατέστερη μορφή εξασθενούς χρωμίου είναι το χρωμικό ιόν (CrO_4^{2-}), το οποίο αντιδρά χημικά με το δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) σύμφωνα με την εξίσωση 5.8, παράγοντας μη τοξικό τρισθενές χρώμιο:

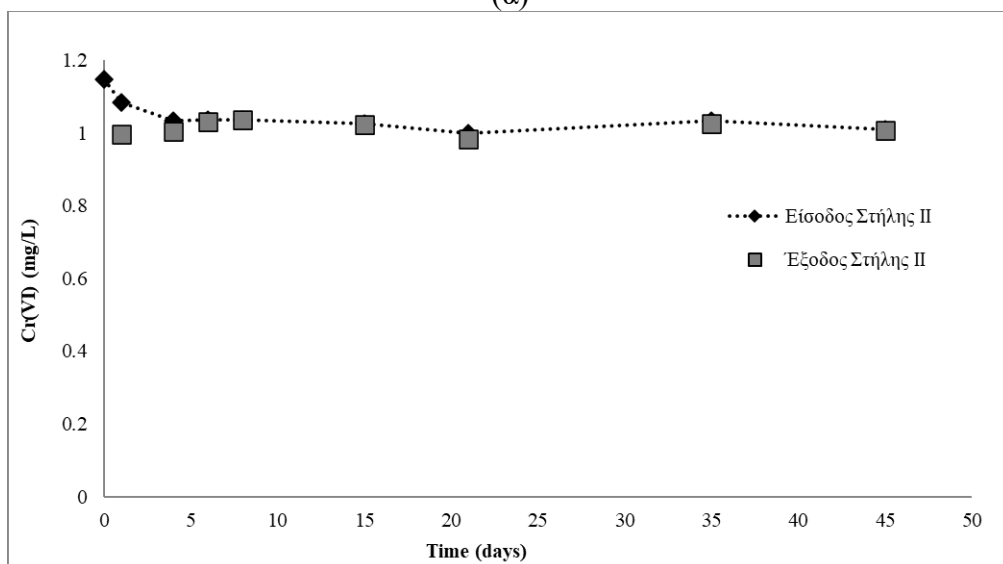


Με βάση την ανωτέρω αντίδραση η θεωρητικά αναμενόμενη ποσότητα Cr(VI) που ανάγεται λόγω της προσθήκης του Fe(II), ανέρχεται σε 15.5 mg Cr(VI) / 50 mg Fe(II). Λαμβάνοντας υπόψη αυτή τη θεωρητική στοιχειομετρική αναλογία και την ποσότητα του Fe(II) που είχε προσροφηθεί στην εδαφική στήλη, είναι προφανές ότι το μεγαλύτερο μέρος του Fe(II) δεν ήταν διαθέσιμο για την αναγωγή του Cr(VI). Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 4, το pH του εδάφους και των υπόγειων υδάτων (8.37 ± 0.11), καθώς και η σύνθεση τους, ευνοούν το σχηματισμό στερεών που περιέχουν σίδηρο, όπως σιδερίτη (FeCO_3), ανκερίτη ($\text{Ca(Fe,Mg,Mn)(CO}_3)_2$), μαγνητίτη ($\text{Fe}^{2+}\text{F}^{3+}_2\text{O}_4$), πράσινες σκουριές ($\text{GR(CO}_3^{2-})$ ή $\text{GR(Cl}^-)$ ή $\text{GR(SO}_4^{2-})$), θειούχο σίδηρο (FeS), πυρίτη (FeS_2), και σύμφωνα με τα δεδομένα αυτής της μελέτης, λιγότερο από το 16% του σιδήρου που προστέθηκε στις στήλες ήταν διαλυτό και επομένως αποτελεσματικό για την αναγωγή του Cr(VI). Σημειώνεται ότι σε αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στην είσοδο και έξοδο κάθε στήλης, οι συγκεντρώσεις Fe(II) παρέμειναν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Η οπτική επιθεώρηση του εδάφους στις στήλες κατέδειξε επίσης το σχηματισμό ενός καφέ-κόκκινου στερεού μέσα στους πόρους του εδάφους στην είσοδο των στηλών, η έκταση του οποίου ήταν μικρότερη από το 20% του συνολικού μήκους της κάθε στήλης (Σχήμα 5.6), υποδεικνύοντας το σχηματισμό πιθανότατα ανκερίτη και σιδερίτη (ενώσεις με καφέ-κόκκινο χρώμα) και ότι ο Fe(II) είχε περιορισμένη κινητικότητα στη μήτρα του συγκεκριμένου εδάφους.

Δοκιμή διαπερατότητας που πραγματοποιήθηκε στις στήλες αμέσως μετά την προσθήκη του διαλύματος FeSO_4 και πριν την έναρξη τροφοδοσίας με Cr(VI), κατέδειξε μείωση της υδραυλικής διαπερατότητας του εδάφους κατά $16.7\% \pm 0.1$.

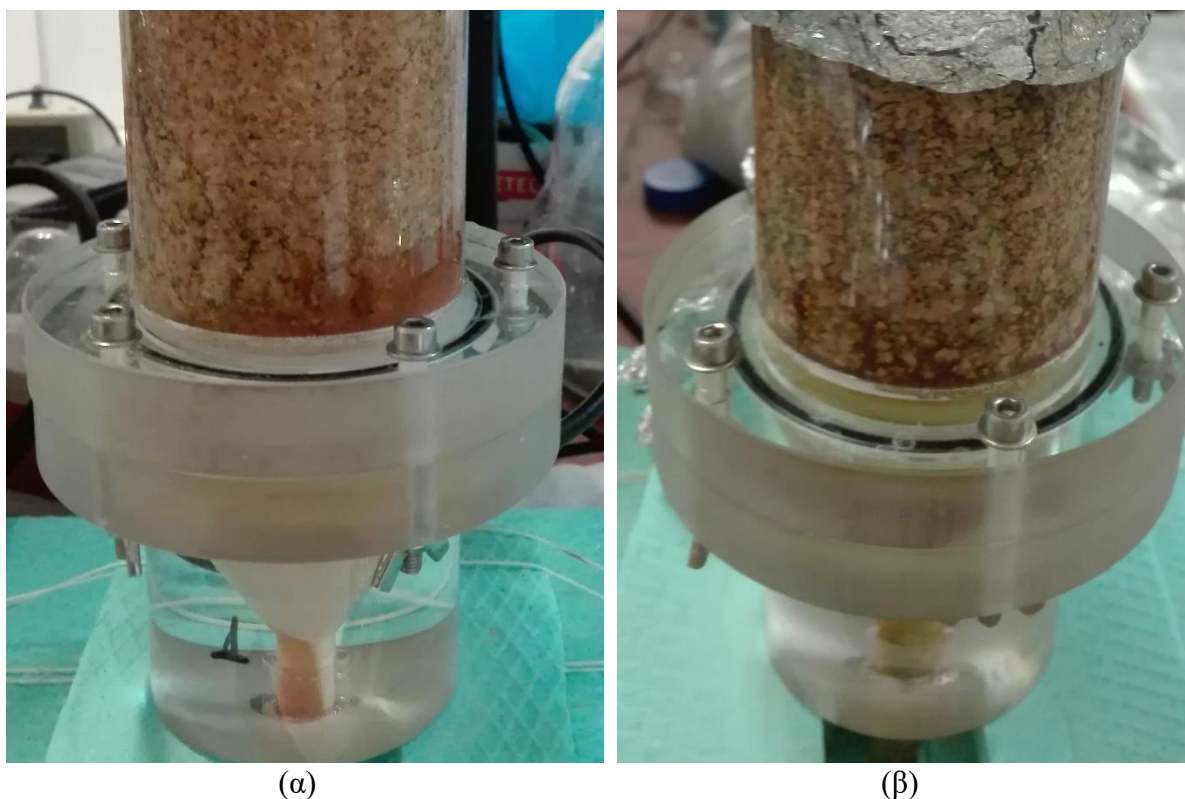


(α)



(β)

Σχήμα 5.5 Προφίλ Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της στήλης I (α) και II (β) μετά την προσθήκη δισθενούς σιδήρου.



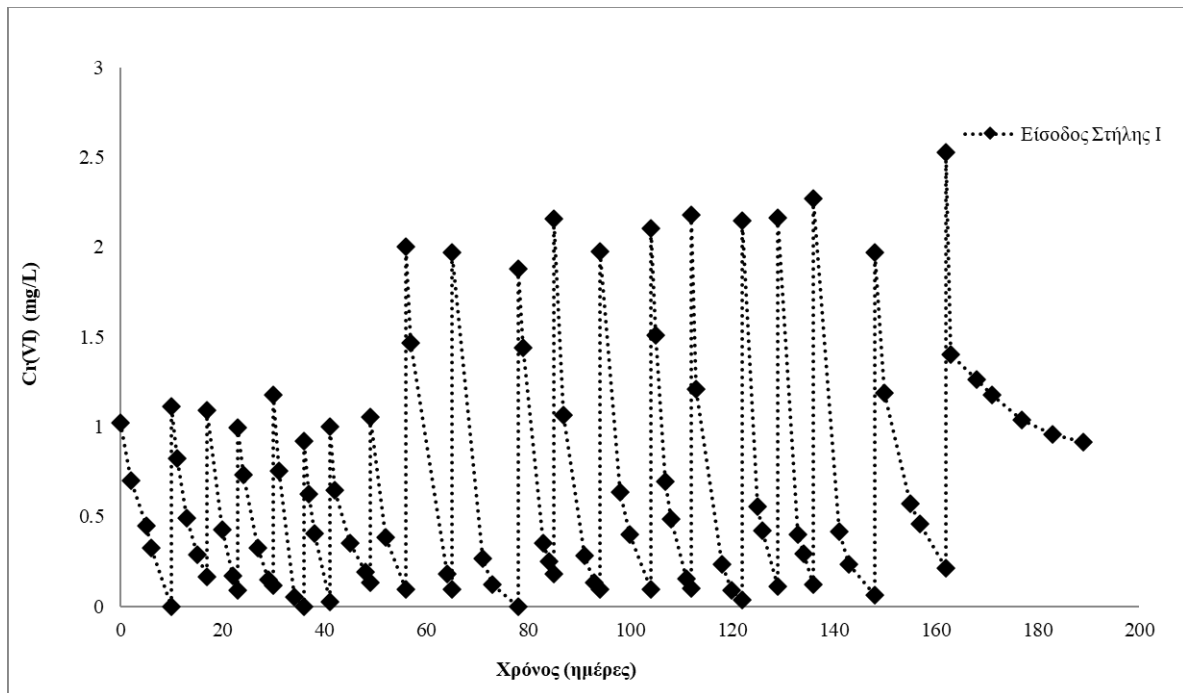
Σχήμα 5.6 Φωτογραφίες από την είσοδο των στηλών όπου φαίνεται ο σχηματισμός του στερεού μετά την προσθήκη διαλύματος FeSO_4 .

5.5.2 Συζευγμένη βιοτική – αβιοτική απομάκρυνση Cr(VI) (Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα)

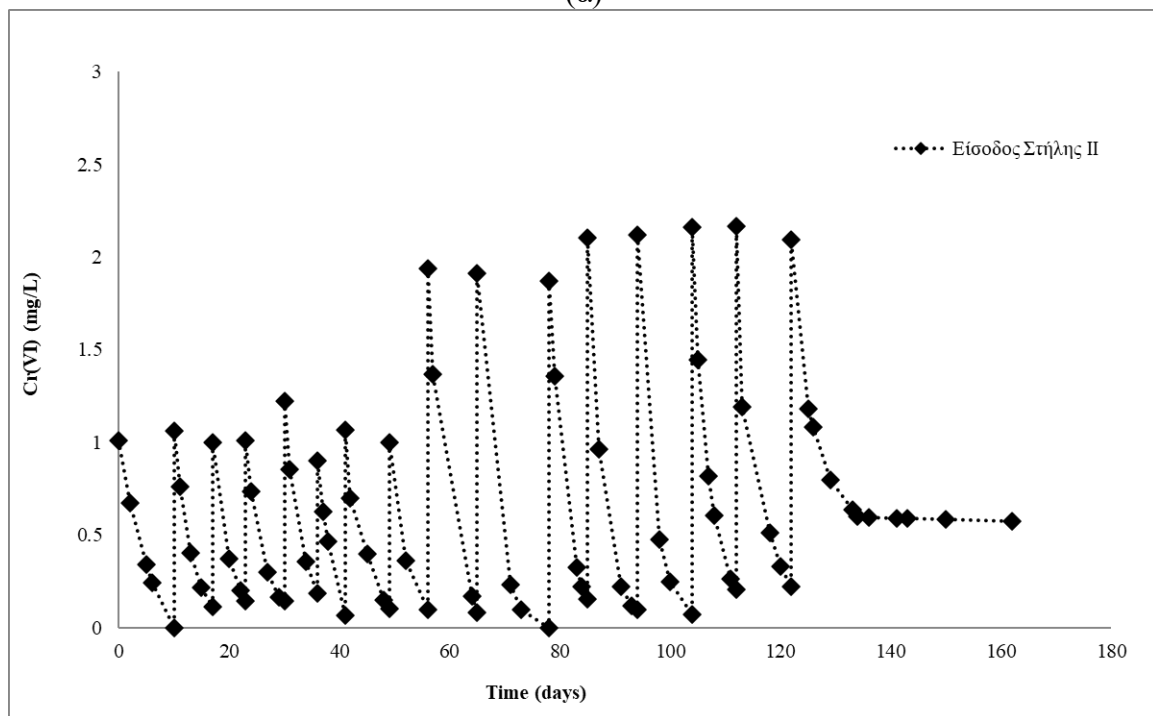
Μετά το πέρας του αβιοτικού πειράματος, οι δύο στήλες τροφοδοτήθηκαν για δύο (2) ημέρες με το μείγμα οργανικών δοτών ηλεκτρονίων, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της ενότητας 3.2.5 για τη μελέτη της συζευγμένης Βιοτικής-Αβιοτικής αναγωγής του Cr(VI) . Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, κάθε στήλη τροφοδοτήθηκε μέσω ανακυκλοφορίας με ένα υδατικό διάλυμα που περιείχε 0.2 g συμπυκνωμένης μελάσας και 0.8 g συμπυκνωμένου γαλακτωματοποιημένου φυτικού ελαίου (EVO) σε 1 L διηθημένου υπόγειου νερού για δύο (2) συνεχόμενες ημέρες. Το πείραμα στη συνέχεια προχώρησε σε συνεχή ανακύκλωση διαλύματος Cr(VI) χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε αναγωγικού παράγοντα, έως ότου κάθε στήλη να χάσει την αναγωγική της ικανότητα. Συνολικά το πείραμα διήρκεσε για τη Στήλη I, 189 ημέρες και για τη Στήλη II, 162 ημέρες.

Στο Σχήμα 5.7 (α), (β) και στον Πίνακα 5.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και για τις δύο στήλες μετά την προσθήκη των πηγών άνθρακα. Οι στήλες τροφοδοτήθηκαν με ρυπασμένο με Cr(VI) υπόγειο νερό, έως ότου εξαντλήθηκαν σχεδόν πλήρως οι αναγωγικές τους ικανότητες. Αναλυτικότερα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.3, κατά τη διάρκεια της 2μερης τροφοδοσίας με το διάλυμα που περιείχε τους οργανικούς δότες ηλεκτρονίων (μείγμα μελάσας και EVO), οι στήλες συγκράτησαν κατά μέσο όρο 2,357 mg COD/kg εδάφους. Η συνολική ποσότητα Cr(VI) που απομακρύνθηκε βάσει της ικανότητας της Στήλης I και II ήταν 127.51 mg Cr(VI)/kg εδάφους (82.8 mg Cr(VI) για την 1^η στήλη) και 94.27 mg Cr(VI)/kg εδάφους (63.2 mg Cr(VI) για την 2^η στήλη) αντίστοιχα. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 20 πειραματικοί κύκλοι στη Στήλη I και 16 στη Στήλη II. Η διαφορά αυτή στην αναγωγική ικανότητα των δύο στηλών, πιθανότατα συνδέεται με την παρουσία του σιδήρου και παρατηρήθηκε και στην αβιοτική απομάκρυνση που εξετάστηκε στο προηγούμενο στάδιο.

Κατά τους πρώτους 8 πειραματικούς κύκλους, η αρχική συγκέντρωση Cr(VI) ήταν περίπου ίση με 1,000 μg/L. Λόγω της υψηλής ικανότητας απομάκρυνσης Cr(VI) που παρατηρήθηκε και στις δύο στήλες, οι υπόλοιποι πειραματικοί κύκλοι πραγματοποιήθηκαν με αρχική συγκέντρωση Cr(VI) που ήταν περίπου 2,000 μg/L. Στη στήλη I, η συνολική απομάκρυνση Cr(VI) ήταν 26% υψηλότερη σε σύγκριση με τη στήλη II και το πείραμα διήρκεσε για 30 περισσότερες ημέρες. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.7, και οι δύο στήλες είχαν την ικανότητα να απομακρύνουν πλήρως το Cr(VI) από το διάλυμα τροφοδοσίας σε περίπου οκτώ ημέρες. Επιπλέον, η συγκέντρωση Cr(VI) στις εξόδους και των δύο στηλών βρισκόταν συνήθως κάτω από το όριο ανίχνευσης (Παράρτημα Α, Σχήματα Α.13 και Α.14). Τα γραφήματα που κατασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό της σταθεράς k παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α (Σχήματα Α.4, Α.5, Α.9 και Α.10). Εξαιρώντας τον τελευταίο πειραματικό κύκλο, όπου οι οργανικοί δότες ηλεκτρονίων είχαν εξαντληθεί, οι ρυθμοί απομάκρυνσης του Cr(VI) κυμαίνονταν από 2.44 έως 7.38 d⁻¹, ενώ στην πλειονότητα τους ήταν 3-4 d⁻¹ (50%).



(α)



(β)

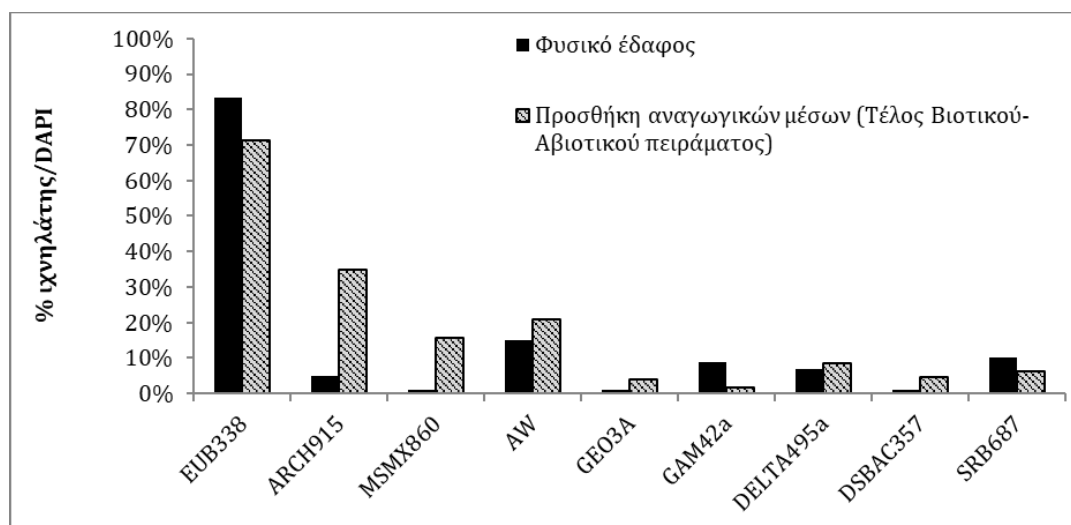
Σχήμα 5.7 Προφίλ Cr(VI) στην είσοδο της στήλης I (α) και II (β) κατά τη διάρκεια του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος μετά την προσθήκη των πηγών οργανικού άνθρακα.

Πίνακας 5.3 Πειραματικά αποτελέσματα Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος.

Πείραμα	Παράμετρος	Στήλη	
		I	II
Βιοτικό- Αβιοτικό	COD που συγκρατήθηκε (mg COD/kg εδάφους)	2,354	2,360
	Διάρκεια πειράματος (Ημέρες)	189	162
	Αριθμός πειραματικών κύκλων	20	16
	Μάζα ανηγμένου Cr(VI) (mg)	82.8	63.2
	Συνολικό Cr(VI) που απομακρύνθηκε (mg Cr(VI)/kg εδάφους)	127.51	94.27
	Υδραυλική αγωγιμότητα k (cm/s) (Αμέσως μετά την προσθήκη Fe^{2+})	$2.6 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-3}$
	Μείωση διαπερατότητας αμέσως μετά την προσθήκη Fe^{2+} (%) ¹	16.63	16.73
	Υδραυλική αγωγιμότητα k (cm/s) (Τέλος πειράματος)	$6.9 \cdot 10^{-4}$	$3.1 \cdot 10^{-4}$
	Συνολική μείωση διαπερατότητας (Τέλος πειράματος) (%) ¹	89.91	94.33

¹: Η μεταβολή της διαπερατότητας υπολογίζεται σε σχέση με το αμέσως προηγούμενο στάδιο.

Για τη διερεύνηση της μεταβολής της μικροβιακής κοινότητας λόγω της προσθήκης αναγωγικών μέσων, πραγματοποιήθηκαν μικροσκοπικές αναλύσεις FISH στην αρχή του πειράματος, αμέσως μετά την περίοδο start-up, καθώς και στο τέλος του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος. Τα αποτελέσματα δίνονται στο Σχήμα 5.8. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα βακτήρια (EUB338) παρέμειναν οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί σε όλο το πείραμα. Ωστόσο, στο τέλος του πειράματος παρατηρήθηκε αύξηση των αρχαίων (ARCH915) από 5% σε 35% και ορισμένων ομάδων μεθανογόνων μικροοργανισμών (*Methanosarcina spp.* και *Methanosaeta spp.*) (MSMX860), η συγκέντρωση των οποίων αυξήθηκε από 0,5% σε 16%. Η αύξηση αυτή οφείλεται πιθανότατα στη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Η ανάλυση κατέδειξε επιπλέον την ύπαρξη και μια μικρή αύξηση του γένους *Geobacter spp.* (GEO3A), που συμμετέχει στην αναγωγή του Fe(III) σε Fe(II) (Usman et al., 2018). Τα σήματα των ιχνηθετών για τις ομάδες των Gammaproteobacteria (GAM42a) και Deltaproteobacteria (DELTA495a) ήταν χαμηλά, καθώς το νιτρικό άζωτο και τα θειικά ιόντα που υπήρχαν στο διάλυμα τροφοδοσίας είχαν πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Ενότητα 3.3.2, Πίνακας 3.10) και καταναλώθηκαν την 1^η εβδομάδα του πειράματος.



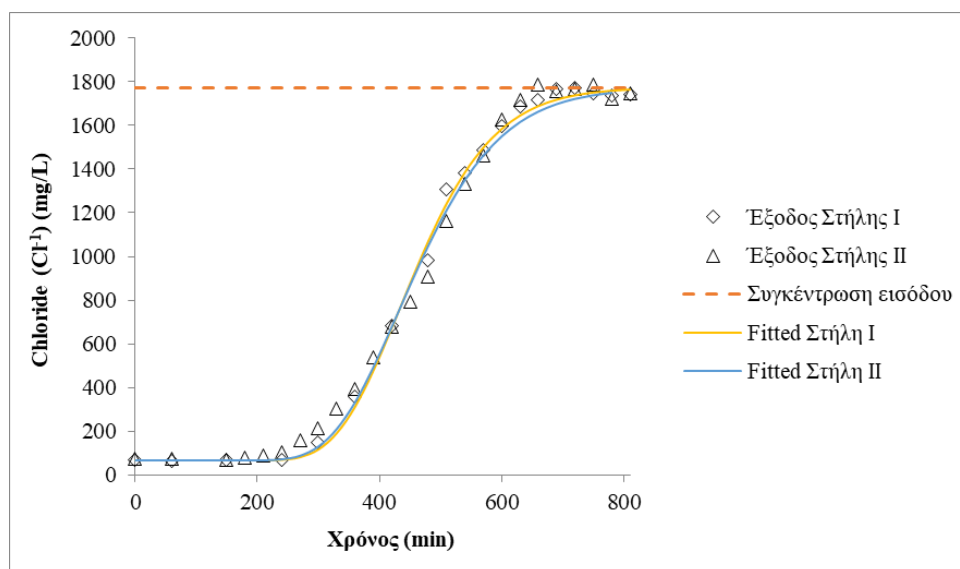
Σχήμα 5.8 Αποτελέσματα ανάλυσης FISH σε φυσικό έδαφος και μετά την προσθήκη των αναγωγικών παραγόντων (μελάσα, EVO και FeSO_4).

Από αναλύσεις ολικού χρωμίου σε δείγματα από την είσοδο και έξοδο των στηλών, παρατηρήθηκε ότι το ολικό χρώμιο ήταν ίσο με το εξασθενές χρώμιο και ότι όλη η ποσότητα του τρισθενούς χρωμίου συγκρατήθηκε μέσα στους πόρους του εδάφους. Επιπλέον, ανάλυση XRF που πραγματοποιήθηκε σε δείγματα εδάφους μετά το πέρας των πειραμάτων, έδειξε ότι η μεγαλύτερη ποσοστιαία συγκέντρωση ολικού χρωμίου εντοπίστηκε στα πρώτα 20 εκατοστά των στηλών. Το εύρημα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο δισθενής σίδηρος που προστέθηκε παθητικοποιήθηκε κοντά στο σημείο εισόδου της κάθε στήλης και το EVO αποτελείται από κολλοειδή σωματίδια που έχουν μειωμένη κινητικότητα σε πορώδη υλικά.

Η δοκιμή διαπερατότητας που πραγματοποιήθηκε στο τέλος του πειράματος, έδειξε συνολική μείωση της υδραυλικής αγωγιμότητας του εδάφους κατά 89.91%-94.33% (Πίνακας 5.3). Ένα από τα ζητήματα που προκύπτουν κατά τη μέθοδο της επί τόπου αποκατάστασης ρυπασμένων τόπων είναι το φαινόμενο της έμφραξης των πόρων κυρίως λόγω της προσθήκης των αναγωγικών μέσων. Μετά το τέλος των πειραμάτων, οι στήλες πληρώθηκαν με υπόγειο νερό και αφέθηκαν σε ηρεμία για διάστημα τριών (3) μηνών, μετά το πέρας του οποίου πραγματοποιήθηκε εκ νέου μέτρηση του συντελεστή υδραυλικής αγωγιμότητας. Σκοπός του πειράματος ήταν να διερευνηθεί πιθανή μεταβολή της διαπερατότητας. Τα αποτελέσματα της δοκιμής έδειξαν ότι η διαπερατότητα του εδάφους αυξήθηκε κατά 6.2%-28.4%, που δείχνει

ότι αν το έδαφος αφεθεί αδιατάρακτο για αρκετό χρονικό διάστημα, χωρίς την προσθήκη οποιουδήποτε αναγωγικού μέσου, η διαπερατότητα του εδάφους σε κάποιο περιορισμένο βαθμό μπορεί να αυξηθεί.

Από τη δοκιμή ιχνηθέτησης που πραγματοποιήθηκε μετά τη λήξη του πειράματος (Σχήμα 5.9), οι συντελεστές D και ν προέκυψαν ίσοι με $D=0.066\pm 0.000$ cm^2/min και $\nu=0.055\pm 0.005$ cm/min αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των δοκιμών ιχνηθέτησης, τα χαρακτηριστικά της ροής και στις δύο στήλες διατηρούν τα χαρακτηριστικά της εμβολοειδούς ροής.



Σχήμα 5.9 Συγκεντρώσεις χλωριόντων (Cl^-) στις εξόδους των δύο στηλών κατά τη διάρκεια του tracer test μετά τη λήξη του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος. Οι γραμμές με την ένδειξη “Fitted” έχουν προκύψει μέσω προσομοίωσης με το λογισμικό STANMOD.

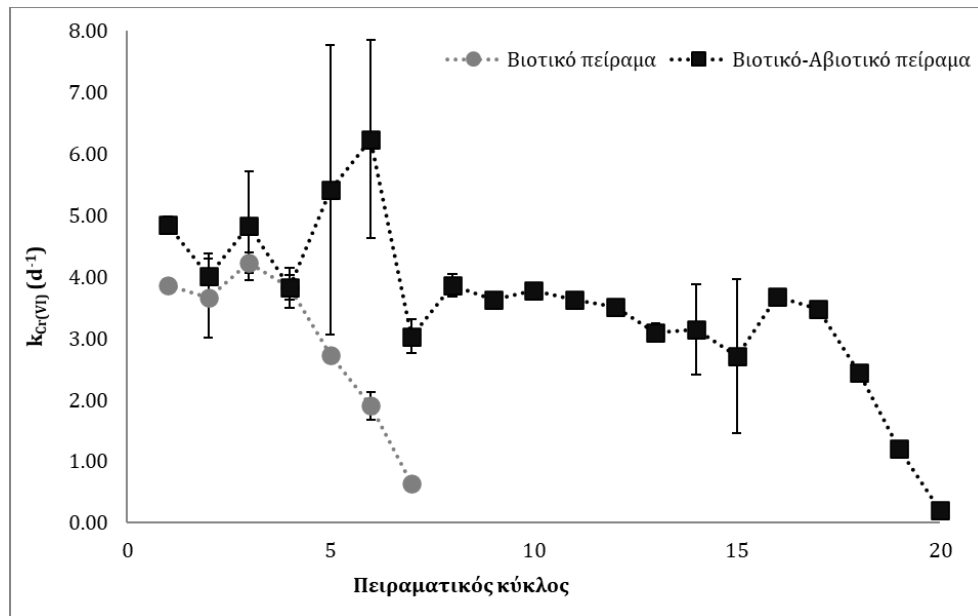
5.6 Σύγκριση μεταξύ βιοτικού και αβιοτικού – βιοτικού πειράματος

Στο Σχήμα 5.10 παρουσιάζονται οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) από το Βιοτικό και το Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα σε σχέση με τον πειραματικό κύκλο. Συγκρίνοντας τους ρυθμούς απομάκρυνσης από τα δύο πειράματα, παρατηρείται ότι κατά τους πρώτους τέσσερις πειραματικούς κύκλους, οι ρυθμοί $k_{\text{Cr(VI)}}$ είναι παρόμοιοι και στα δύο πειράματα (3.90 ± 0.35

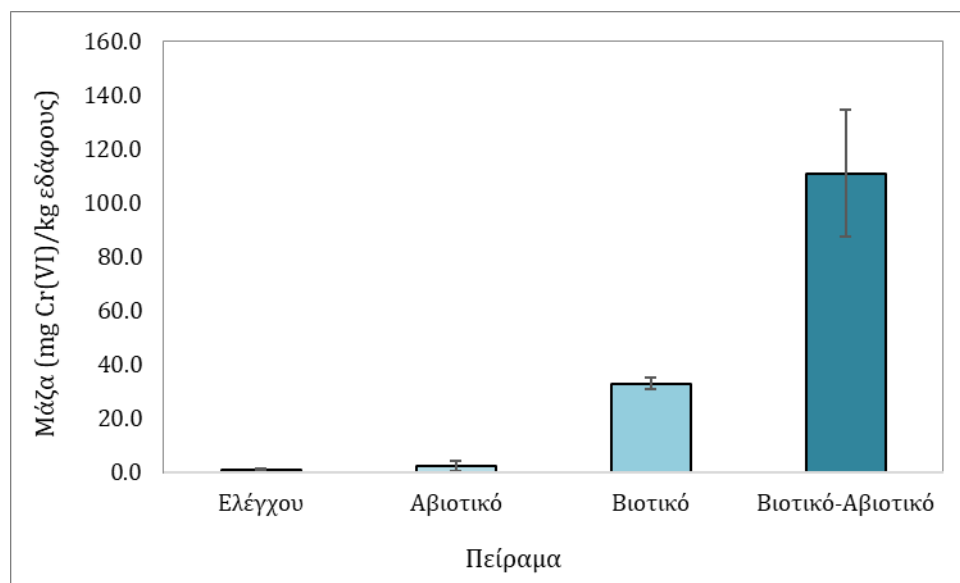
d^{-1} για το Βιοτικό πείραμα και $4.38 \pm 0.63 d^{-1}$ για το Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα). Ωστόσο, μετά τον 5ο πειραματικό κύκλο, τα δύο πειράματα είχαν τελείως διαφορετική εξέλιξη. Στο Βιοτικό πείραμα, ο ρυθμός απομάκρυνσης μειωνόταν σταδιακά μέχρι τον τερματισμό του πειράματος στον 7ο κύκλο, όπου $k_{Cr(VI)} = 0.64 \pm 0.01 d^{-1}$. Αντιθέτως, το Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα διήρκεσε πολύ περισσότερο (16-20 κύκλους), με τα ποσοστά απομάκρυνσης να αυξάνονται σημαντικά στον 5ο και 6ο κύκλο ($5.42 \pm 2.35 d^{-1}$ και $6.24 \pm 1.61 d^{-1}$ αντίστοιχα). Σε όλο το υπόλοιπο πείραμα οι ρυθμοί αναγωγής παρέμειναν μεταξύ $3-4 d^{-1}$. Επομένως, αν και η προσθήκη Fe(II) σε συνδυασμό με το μείγμα πηγών άνθρακα (μελάσα και EVO) δεν φαίνεται να αυξάνει σημαντικά τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI), φαίνεται ότι επηρεάζει θετικά τη διάρκεια ζωής αυτής της μεθόδου αποκατάστασης. Αναλυτικότερα, ο συνδυασμός βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών είχε ως αποτέλεσμα πολύ μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (αύξηση 48%-72%) συγκριτικά με τη βιοτική απομάκρυνση. Επιπλέον, η συζευγμένη βιοτική και αβιοτική μέθοδος κατέδειξε αύξηση 67-73% στη συνολική απομάκρυνση του Cr(VI) (mg Cr(VI)/kg εδάφους). Στο Σχήμα 5.11 παρουσιάζεται η συνολική απομάκρυνση του Cr(VI) βάσει των πειραματικών συνθηκών. Παρατηρείται ότι στο Βιοτικό πείραμα απομακρύνθηκαν κατά μέσο όρο και για τις δύο στήλες περίπου 33 mg Cr(VI)/kg εδάφους, στο Αβιοτικό 2.51 mg Cr(VI)/kg εδάφους, ενώ στο Βιοτικό-Αβιοτικό 127.51 mg Cr(VI)/kg εδάφους για τη Στήλη I και 94.27 mg Cr(VI)/kg εδάφους για τη Στήλη II. Τα πειραματικά αποτελέσματα αποδεικνύουν συνεπώς ότι η προσθήκη οργανικού δότη ηλεκτρονίων μπορεί να οδηγήσει στην αναγέννηση του Fe(II) και οι συζευγμένες αβιοτικές και βιοτικές διεργασίες μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την απομάκρυνση του Cr(VI) από τα υπόγεια ύδατα. Οι Wen et al. (2017) έχουν αναφέρει ότι η παρουσία υποστρωμάτων EVO βελτιώνει τη μικροβιακή αναγωγή του Fe^{+3} , με αποτέλεσμα μεγαλύτερη παραγωγή Fe^{+2} . Επιπλέον, σύμφωνα με αρκετές μελέτες (Génin et al., 2002; Opa-Nguema et al., 2002; Zhong et al., 2017), οι αναερόβιες μικροβιακές διεργασίες βελτιώνουν την αβιοτική αναγωγή του Cr(VI) μέσω Fe(II), δημιουργώντας ορυκτά που μπορούν να αντιδράσουν με το Cr(VI) και να ευνοήσουν την απομάκρυνση του με μηχανισμούς όπως η προσρόφηση, η ταυτόχρονη καθίζηση και/ή η αναγωγή. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος έδειξαν ότι η συγκέντρωση Fe^{+2} ήταν μικρότερη από 0.2 mg/L (όριο ανίχνευσης) τόσο στην είσοδο, όσο και στην έξοδο των στηλών, γεγονός που εξηγείται από (α) την περιορισμένη κινητικότητα του σιδήρου στη συγκεκριμένη μήτρα εδάφους, (β) το γεγονός ότι παρουσία Cr^{+6} , ο Fe(II) οξειδώνεται σε

Fe(III) και (γ) την πιθανή δημιουργία συμπλεγμάτων Cr-Fe (Somasundaram et al., 2011). Επισημαίνεται ότι η παρούσα εργασία αποτελεί ουσιαστικά την πρώτη ολοκληρωμένη συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών στο φαινόμενο της μικροβιακής αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου, δεδομένου ότι οι προγενέστερες ερευνητικές προσπάθειες (Lu et al., 2020; Shashidhar et al., 2006; Somasundaram et al., 2011; Wen et al., 2017) που χρησιμοποιούν φυσικό έδαφος ή άμμο για τη μελέτη της αναγωγής του Cr(VI) παρουσία μικροοργανισμών, δεν έχουν πραγματοποιήσει συγκριτική μελέτη των διαφορετικών συνθηκών (φυσική εξασθένηση, χημική αναγωγή, βιολογική αναγωγή και συζευγμένη βιοτική-αβιοτική αναγωγή) που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή.

Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.3, κατά τη διάρκεια του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος η διαπερατότητα του εδάφους μειώθηκε συνολικά και στα δύο στάδια κατά $92.1 \pm 3.1\%$, ενώ στο Βιοτικό πείραμα μόνο κατά $54.1 \pm 13.0\%$. Αυτή η διαφορά στη μείωση της διαπερατότητας του εδάφους ανάμεσα στα δύο πειράματα, αποδίδεται σε φυσική έμφραξη των πόρων του εδάφους λόγω της προσθήκης θειικού σιδήρου, καθώς και στη δημιουργία αδιάλυτου Cr(III). Μείωση της υδραυλικής αγωγιμότητας έχει παρατηρηθεί και σε εφαρμογές πεδίου με προσθήκη FeSO_4 για την εξυγίανση του ρυπασμένου με Cr(VI) χώρου, όπως στη Νότια Καρολίνα και την Καλιφόρνια (US EPA, 2000).



Σχήμα 5.10 Διάγραμμα μεταβολής των ρυθμών απομάκρυνσης του Cr(VI) σε σχέση με τον πειραματικό κύκλο στο Βιοτικό και Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα.



Σχήμα 5.11 Σύγκριση μαζών που απομακρύνθηκαν στα διαφορετικά πειράματα.

5.7 Συναξιολόγηση

Στόχος των πειραμάτων συνεχούς τροφοδοσίας σε συστήματα εδαφικών στηλών ήταν η προσομοίωση της βιολογικής αναγωγής του Cr(VI) σε υπόγειους υδροφορείς υπό αναερόβιες συνθήκες, λαμβάνοντας υπόψη τις βιοχημικές διεργασίες που πραγματοποιούνται σε πορώδη εδαφικά υλικά σε συνδυασμό με φαινόμενα μεταφοράς του ρύπου. Εξετάστηκε η πιθανή μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III) μέσω της προσθήκης δύο πηγών οργανικού άνθρακα (μελάσα και EVO). Παράλληλα, αξιολογήθηκε η δυνατότητα αναγωγής του Cr(VI) μέσω μιας συζευγμένης βιοτικής-αβιοτικής οδού, λόγω αναγέννησης του Fe(II). Τα ευρήματα από τα πειράματα μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα.

- Ο ρυθμός αναγωγής του Cr(VI) μέσω βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών μπορεί να περιγραφεί με μεγάλη ακρίβεια με το μοντέλο κινητικής 1^{ης} τάξης λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση ανάμεσα στον όγκο του ρυπασμένου νερού και στην ποσότητα του εδάφους που περιέχει τα αναγωγικά μέσα. Παράλληλα, κατασκευάστηκε εξίσωση η οποία δύναται να περιγράψει την αναγωγή του Cr(VI) σε κορεσμένους υδροφορείς, λαμβάνοντας υπόψη το πορώδες της περιοχής αποκατάστασης.
- Η φυσική ικανότητα του εδάφους να ανάγει το Cr(VI) σε Cr(III) (φυσική εξασθένηση) είναι ιδιαίτερα χαμηλή και δεν επαρκεί λόγω της ποσότητας του Cr(VI) που υπήρχε στα ρυπασμένα υπόγεια ύδατα που επεξεργάστηκαν στο σύστημα των στηλών.
- Η προσθήκη οργανικών δοτών ηλεκτρονίων μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI) έως και 20 φορές σε σύγκριση με το ρυθμό της φυσικής εξασθένησης. Φαίνεται λοιπόν ότι η προσθήκη πηγών άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ρυθμών των γηγενών βακτηρίων, που είναι σε θέση να ανάγουν άμεσα βιολογικά το Cr(VI).
- Ο δισθενής σίδηρος Fe²⁺ έχει χαμηλή κινητικότητα σε έδαφος και υπόγεια νερά με pH κοντά στο 8 και παθητικοποιείται σχετικά γρήγορα κοντά στο σημείο εισόδου της στήλης σχηματίζοντας ένα καφε-κόκκινο ίζημα, γεγονός που οδηγεί σε μικρή αβιοτική (χημική) απομάκρυνση του Cr(VI).
- Η συζευγμένη αναγωγή του Cr(VI) μέσω βιοτικών-αβιοτικών διεργασιών (Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα) παρουσίασε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής όσον αφορά την αποκατάσταση ρυπασμένων με Cr(VI) υπόγειων υδάτων σε σύγκριση με το Βιοτικό πείραμα. Τα

αποτελέσματα του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος επιβεβαιώνουν ότι η προσθήκη άνθρακα ευνοεί την ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών και την αναγωγή του Fe(III) που είχε συγκερατηθεί στους πόρους του εδάφους σε Fe(II). Οι αναερόβιες συνθήκες επιβεβαιώνονται και μέσω της αύξησης της παρουσίας των μεθανογόνων βακτηρίων.

- Τα πειραματικά αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η απομάκρυνση του Cr(VI) μέσω των βιοτικών-αβιοτικών διεργασιών είναι σημαντικά μεγαλύτερη της συνισταμένης των δύο διεργασιών όταν λειτουργούν χωριστά. Κατά συνέπεια η προσθήκη οργανικού δότη ηλεκτρονίων προκαλεί την αναγέννηση του Fe(II) και οι συζευγμένες αβιοτικές και βιοτικές διεργασίες μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την απομάκρυνση του Cr(VI) από τα υπόγεια ύδατα.

6. Συμπεράσματα – Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

6.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η επιτόπια βιολογική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου για την εξυγίανση ρυπασμένων υπογείων υδάτων. Συγκεκριμένα, οι ερευνητικοί στόχοι που τέθηκαν ήταν:

- i. η διερεύνηση της επίδρασης του αποδέκτη ηλεκτρονίων στις μικροβιακές κοινότητες που ανάγουν το Cr(VI) υπό ανοξικές, αναερόβιες και διαφορετικές θεικοαναγωγικές συνθήκες,
- ii. η αξιολόγηση της επίδρασης συνδυασμού δοτών ηλεκτρονίων (πηγών οργανικού άνθρακα και σιδήρου) στην πλήρως αναερόβια ή ανοξική αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου με παράλληλη αναγωγή νιτρικών ιόντων, καθώς και στην αναγωγή του Cr(VI) παρουσία θεικών ιόντων και
- iii. η διερεύνηση των σχετικών με την αναγωγή του Cr(VI) αβιοτικών και βιοτικών διεργασιών που επικρατούν σε έναν υπόγειο υδροφορέα, λαμβάνοντας υπόψη την κίνηση και μεταφορά του ρύπου μέσα στους πόρους του υπεδάφους.

Για την επίτευξη αυτών των στόχων, υλοποιήθηκαν πειράματα μικροκόσμων (Κεφάλαιο 4) και εδαφικών στηλών (Κεφάλαιο 5) και τα κύρια συμπεράσματα που εξήχθησαν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων στα Κεφάλαια 4 και 5, συνοψίζονται στις επόμενες ενότητες.

6.2 Κύρια ευρήματα πειραμάτων μικρόκοσμου

Στόχος των πειραμάτων μικρόκοσμου ήταν η διερεύνηση της επίδρασης δύο διαφορετικών πηγών οργανικού άνθρακα (μελάσας και EVO) και μιας πηγής σιδήρου (FeSO₄) στη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III) υπό πλήρως αναερόβιες, ανοξικές και θεικοαναγωγικές συνθήκες. Για την επίτευξη του στόχου παρασκευάστηκαν τέσσερις (4) μητρικές καλλιέργειες για την τροφοδοσία των μικρόκοσμων. Τα ευρήματα από τα πειράματα μικρόκοσμου μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα:

- Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μικροσκοπίου FISH σε δείγματα των μητρικών καλλιεργειών έδειξε ότι ο δότης ηλεκτρονίων έχει σημαντική επίδραση στη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων. Στην πλήρως αναερόβια καλλιέργεια, επικράτησαν τα αρχαία και οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί, ενώ στην ανοξική, τα Gammaproteobacteria, βακτηριακή ομοταξία που συμμετέχει στην αναγωγή του νιτρικού ιόντος. Στις θεικοαναγωγικές καλλιέργειες επικρατέστερη βακτηριακή ομοταξία ήταν τα Deltaproteobacteria. Επιπλέον, συγκρίνοντας τις δυο θεικοαναγωγικές καλλιέργειες, παρατηρήθηκε ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικών ιόντων (100 mg/L και 400 mg/L) δεν οδήγησε σε σημαντικές διαφορές στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας.
- Η αναγωγή του Cr(VI) και του νιτρικού αζώτου στα πειράματα μικρόκοσμου περιγράφεται ποσοτικά με εφαρμογή μοντέλου κινητικής ψευδο-πρώτης τάξης (συντελεστής συσχέτισης γραμμικής παλινδρόμησης $R^2 \geq 92\%$).
- Οι αβιοτικές διεργασίες (πχ. προσρόφηση) συμμετέχουν σε πολύ μικρό ποσοστό στη συνολική απομάκρυνση του εξασθενούς χρωμίου για όλες τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες που μελετήθηκαν.
- Η χημική αναγωγή του Cr(VI) μέσω Fe(II) σε αυτή τη μήτρα εδάφους χωρίς την προσθήκη πηγής άνθρακα δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική διαδικασία, καθώς ο σίδηρος παθητικοποιείται γρήγορα, οδηγώντας σε χαμηλούς ρυθμούς απομάκρυνσης, αντίστοιχους με τους ρυθμούς που προέκυψαν από τα πειράματα για την ποσοτικοποίηση των αβιοτικών διεργασιών.
- Σε πλήρως αναερόβιες συνθήκες, η προσθήκη ενός οργανικού δότη ηλεκτρονίων οδηγεί σε βιοδιέγερση της μικροβιακής κοινότητας, αυξάνοντας σημαντικά τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI) (ακόμα και 600%) σε σύγκριση με τη φυσική ικανότητα των μικροοργανισμών να ανάγουν το Cr(VI). Παρατηρήθηκε επίσης ότι οι ρυθμοί αναγωγής που προέκυψαν μετά την προσθήκη μελάσας και EVO δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Ο συνδυασμός οργανικού δότη ηλεκτρονίων και ανόργανου (σιδήρου) αύξησε ακόμη περισσότερο το ρυθμό απομάκρυνσης του εξασθενούς χρωμίου, μέσω βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών, χωρίς ωστόσο, αυτή η βιοδιέγερση να έχει μακροχρόνια επίδραση στην αναγωγή του Cr(VI).
- Ένα από τα βασικά ερωτήματα της εργασίας ήταν η διερεύνηση της βιοαναγωγής του Cr(VI) παρουσία νιτρικού αζώτου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναγωγή του Cr(VI)

είναι εφικτή παρουσία νιτρικών και πραγματοποιείται σχεδόν ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση, όταν υπάρχουν διαθέσιμοι δότες ηλεκτρονίων. Μικροοργανισμοί εγκλιματισμένοι υπό ανοξικές συνθήκες και με την προσθήκη οργανικών ή συνδυασμού οργανικών και ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων, έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν πλήρως Cr(VI) και NO₃-N συγκεντρώσεων 3 mg/L και 20 mg/L αντίστοιχα από ρυπασμένο νερό. Ωστόσο, και οι δύο διεργασίες (αναγωγή Cr(VI) και νιτρικών) μειώνονται σημαντικά μετά την εξάντληση του δότη ηλεκτρονίων.

- Η παρουσία θεικών ιόντων (SO₄²⁻) σε υδροφόρο ορίζοντα ρυπασμένο με Cr(VI) ευνοεί τη μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI), ακόμη και χωρίς την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων. Η αναγωγή αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί άμεσα, μέσω ενζυματικών διεργασιών των μικροοργανισμών, ή έμμεσα, λόγω αντίδρασης του Cr(VI) με τα παραγόμενα σουλφίδια από την αναγωγή των SO₄²⁻. Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις SO₄²⁻ (400 mg/L), η βιολογική αναγωγή του Cr(VI) ήταν ελαφρώς μειωμένη σε σύγκριση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις SO₄²⁻ (100 mg/L), πιθανόν λόγω της ταχύτερης κατανάλωσης του οργανικού δότη ηλεκτρονίων.
- Σύγκριση των ρυθμών αναγωγής από όλες τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες που εξετάστηκαν έδειξε ότι οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) στους πλήρως αναερόβιους και ανοξικούς μικρόκοσμους ήταν συγκρίσιμοι στους αντίστοιχους περιέκτες. Επιπλέον, η παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης θεικών ιόντων (πείραμα S100) οδήγησε σε ρυθμούς αναγωγής Cr(VI) που ήταν τουλάχιστον δύο φορές ταχύτεροι από αυτούς στους αντίστοιχους περιέκτες στο αναερόβιο πείραμα. Τέλος, η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης θεικών ιόντων (πείραμα S400) οδήγησε σε ρυθμούς αναγωγής Cr(VI) που ήταν τουλάχιστον δύο φορές ταχύτεροι από αυτούς στους αντίστοιχους περιέκτες στο αναερόβιο πείραμα κατά τις 30 πρώτες πειραματικές ημέρες, όπως και στο πείραμα S100, ενώ για τις υπόλοιπες, οι ρυθμοί απομάκρυνσης του Cr(VI) ήταν σημαντικά μειωμένοι και χωρίς ιδιαίτερες διαφορές σε σύγκριση με τους αντίστοιχους αναερόβιους. Οι σχέσεις αυτές περιγράφηκαν και με μαθηματικές εξισώσεις.

6.3 Κύρια ευρήματα πειραμάτων εδαφικών στηλών

Στόχος των πειραμάτων συνεχούς τροφοδοσίας σε συστήματα εδαφικών στηλών ήταν η προσομοίωση της βιολογικής αναγωγής του Cr(VI) σε υπόγειους υδροφορείς υπό αναερόβιες συνθήκες, λαμβάνοντας υπόψη τις βιοχημικές διεργασίες που πραγματοποιούνται σε πορώδη εδαφικά υλικά σε συνδυασμό με φαινόμενα μεταφοράς του ρύπου. Στο πλαίσιο της διατριβής εξετάστηκε η πιθανή μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI) σε Cr(III) μέσω της προσθήκης δύο πηγών οργανικού άνθρακα (μελάσα και EVO), ενώ παράλληλα, αξιολογήθηκε η δυνατότητα αναγωγής του Cr(VI) μέσω μιας συζευγμένης βιοτικής-αβιοτικής οδού, λόγω αναγέννησης του Fe(II). Τα ευρήματα από τα πειράματα μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Οι ρυθμοί αναγωγής του Cr(VI) μέσω βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών μπορούν να περιγραφούν ποσοτικά με μεγάλη ακρίβεια μέσω μοντέλου κινητικής 1^{ης} τάξης. Το μοντέλο εφαρμόστηκε έπειτα από κατάλληλη τροποποίησή του με τη συμπερίληψη λόγου που περιγράφει τη σχέση ανάμεσα στον όγκο του ρυπασμένου νερού που επεξεργάστηκε το σύστημα και στην ποσότητα του εδάφους που περιέχει τα αναγωγικά μέσα. Παράλληλα, αναπτύχθηκε εξίσωση η οποία δύναται να περιγράψει την αναγωγή του Cr(VI) σε κορεσμένους υδροφορείς, λαμβάνοντας υπόψη το πορώδες της περιοχής αποκατάστασης.
- Η φυσική ικανότητα του εδάφους να ανάγει το Cr(VI) σε Cr(III) (φυσική εξασθένηση) είναι ιδιαίτερα χαμηλή και περίπου ίση με 1.12±0.21 mg (Cr(VI)/kg εδάφους.
- Η προσθήκη οργανικών δοτών ηλεκτρονίων (μελάσα και γαλακτοποιημένο φυτικό έλαιο) μπορεί να αυξήσει τον ρυθμό αναγωγής του Cr(VI) έως και 20 φορές σε σύγκριση με το ρυθμό της φυσικής εξασθένησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη πηγών άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ρυθμών των γηγενών βακτηρίων, που είναι σε θέση να ανάγουν άμεσα βιολογικά το Cr(VI) και μπορούν να υποστηρίξουν την πλήρη αναγωγή του, ακόμα και σε συγκεντρώσεις που αγγίζουν τα 1,000 μg/L. Η συνολική απομάκρυνση Cr(VI) που μετρήθηκε ήταν υψηλή και περίπου ίση με 33 mgCr(VI)/kg εδάφους.
- Η προσθήκη FeSO₄ για τη μελέτη της αβιοτικής (χημικής) απομάκρυνσης του Cr(VI) δεν αποτελεί ιδιαίτερα αποτελεσματική διαδικασία για την αποκατάσταση ρυπασμένων χώρων

σε αυτή τη μήτρα εδάφους. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι ο δισθενής σίδηρος (Fe^{2+}) είχε χαμηλή κινητικότητα σε έδαφος και υπόγεια νερά με pH κοντά στο 8 και παθητικοποιήθηκε σχετικά γρήγορα κοντά στο σημείο εισόδου της στήλης, σχηματίζοντας ένα καφε-κόκκινο ίζημα, γεγονός που οδήγησε σε χαμηλή απομάκρυνση Cr(VI) (περίπου 0.77-2.52 mg Cr(VI)/kg εδάφους).

- Τα αποτελέσματα του Βιοτικού-Αβιοτικού πειράματος επιβεβαίωσαν την υπόθεση ότι η προσθήκη πηγών άνθρακα ευνοούν την ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών στα υπόγεια ύδατα και το έδαφος και κατ' επέκταση, την αναγωγή του Fe^{3+} που είχε συγκρατηθεί στους πόρους του εδάφους σε Fe^{2+} (αναγέννηση δισθενούς σιδήρου). Η συνολική απομάκρυνση Cr(VI) που μετρήθηκε ήταν ιδιαίτερα υψηλή και περίπου ίση με 120 mg Cr(VI)/kg εδάφους. Οι αναερόβιες συνθήκες επιβεβαιώθηκαν και μέσω της αύξησης της παρουσίας των μεθανογόνων μικροοργανισμών (ανάλυση FISH). Παρατηρήθηκε επίσης, ότι η συζευγμένη αναγωγή του Cr(VI) μέσω βιοτικών-αβιοτικών διεργασιών είχε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής όσον αφορά την αποκατάσταση ρυπασμένων με Cr(VI) υπόγειων υδάτων σε σύγκριση με τις βιοτικές διεργασίες (Βιοτικό πείραμα). Παράλληλα, τα πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν ότι η απομάκρυνση του Cr(VI) μέσω των βιοτικών-αβιοτικών διεργασιών είναι σημαντικά μεγαλύτερη της συνισταμένης των δύο διεργασιών όταν λειτουργούν χωριστά. Σύμφωνα με τα παραπάνω, αποδείχτηκε ότι οι συζευγμένες αβιοτικές και βιοτικές διεργασίες μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την απομάκρυνση του Cr(VI) από τα υπόγεια ύδατα.

6.4 Σύνοψη ερευνητικής συμβολής της παρούσας διατριβής

Συνολικά, τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δίνουν απαντήσεις σε ζητήματα που συνδέονται με την επιτόπια μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI) και δύνανται να αποτελέσουν βάση για εφαρμογές μεγαλύτερης κλίμακας. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικρόκοσμου προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με εφαρμογές για την *in situ* βιολογική αποκατάσταση τόπων ρυπασμένων με Cr(VI) σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου και παρουσία άλλων ανιόντων. Παρατηρήθηκε ότι σε όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν πειραματικά, υπό πλήρως αναερόβιες, ανοξικές και θεικοαναγωγικές συνθήκες, η επιτόπια μικροβιακή αναγωγή του Cr(VI) είναι δυνατή στο εύρος των συγκεντρώσεων

Cr(VI) που δοκιμάστηκαν. Η βιο-ενίσχυση με την προσθήκη οργανικών δοτών εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με την προσθήκη χημικών για την αναγωγή του Cr(VI). Οι πιο ευνοϊκές συνθήκες για τη βιολογική αναγωγή του Cr(VI) είναι οι θεικοαναγωγικές, καθώς, ακόμη και χωρίς την προσθήκη πηγής άνθρακα, η απομάκρυνση του Cr(VI) μπορούσε να πραγματοποιηθεί μέσω άμεσης χημικής αναγωγής από τις βιολογικά παραγόμενες θειούχες ενώσεις. Παράλληλα η επιτόπια βιοαναγωγή Cr(VI) παρουσία νιτρικών ιόντων, απαιτεί συχνότερες ενέσεις οργανικών δοτών ηλεκτρονίων, καθώς η αναγωγή των νιτρικών είναι μια διαδικασία υψηλής ενεργειακής απαίτησης με υψηλή κατανάλωση οργανικών δοτών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων των εδαφικών στηλών καταδεικνύουν ότι η προσθήκη συνδυασμού οργανικών και ανόργανων αναγωγικών μέσων αποτελεί τη βέλτιστη μέθοδο απορρύπανσης υπογείων υδάτων, βελτιώνοντας σημαντικά την απομάκρυνση του Cr(VI) από τα υπόγεια ύδατα. Τα αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι η προσθήκη πηγής άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αναερόβιων συνθηκών, που οδηγεί στην αναγέννηση δισθενούς σιδήρου, σημαντικού αναγωγικού μέσου του Cr(VI). Η παρούσα εργασία αποτελεί ουσιαστικά την πρώτη ολοκληρωμένη συγκριτική αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών στο φαινόμενο της μικροβιακής αναγωγής του εξασθενούς χρωμίου και καλύπτει κενό που υπάρχει στη βιβλιογραφία σχετικά με τη διερεύνηση της βιοτικής και αβιοτικής αναγωγής του Cr(VI), διεξάγοντας πειράματα με φυσικό έδαφος και εφαρμόζοντας βιοδιέγερση για την τροποποίηση των υπαρχόντων αυτόχθονων βακτηρίων. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση της στρατηγικής αποκατάστασης που θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε έναν ρυπασμένο χώρο.

6.5 Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Η *in situ* βιοαποκατάσταση είναι μια μέθοδος που ενσωματώνει πρακτικές από πολλούς κλάδους, με την επιτυχία της να εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το εύρος της ρύπανσης, τη γεωλογία της περιοχής αποκατάστασης, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, κ.ά. Επιπλέον, στους βασικούς περιορισμούς εφαρμογής της μεθόδου ανήκουν και η ανεπαρκής γνώση των μικροβιακών διεργασιών στο πεδίο, η δυσκολία προσθήκης αναγωγικών μέσων, η εξασφάλιση επαφής του ρύπου με τα αναγωγικά μέσα, καθώς και η δυσκολία ποσοτικής

αντιστοίχισης των εργαστηριακών ευρημάτων με τις συνθήκες στο πεδίο. Συνολικά, τα ευρήματα αυτής της μελέτης προσφέρουν μια σημαντική βάση για τη βιολογική αποκατάσταση των υπόγειων υδάτων που έχουν ρυπανθεί με Cr(VI) υπό διαφορετικά οξειδοαναγωγικά περιβάλλοντα, σημαντικές πληροφορίες για την *in situ* βιοαποκατάσταση μέσω βιοδιέγερσης των μικροοργανισμών, καθώς και δεδομένα για τη μακροζωία της διαδικασίας όταν ο δότης ηλεκτρονίων είναι περιοριστικός παράγοντας. Ωστόσο, υπάρχει ακόμα η ανάγκη για τη δημιουργία συγκεκριμένων πειραματικών πρωτοκόλλων σχετικών με τον ορθότερο σχεδιασμό των τεχνικών αποκατάστασης και την παρακολούθηση ρυπασμένων περιοχών. Προτείνεται συνεπώς για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου της *in situ* βιοαποκατάστασης περαιτέρω έρευνα για την ανάπτυξη ολοκληρωμένων πρωτοκόλλων αξιολόγησης της ρύπανσης και επέμβασης στο πεδίο, καινοτόμων τεχνικών χαρακτηρισμού της ρυπασμένης περιοχής και βελτιωμένων μοντέλων για την προσομοίωση των φαινομένων που επικρατούν σε έναν ρυπασμένο τόπο.

Βάσει των παραπάνω, προτείνονται επιπλέον εργαστηριακά πειράματα για την πληρέστερη κατανόηση διαφόρων παραμέτρων που επιδρούν στην επιτυχία της βιοαποκατάστασης. Στο πλαίσιο αυτής της διατριβής μελετήθηκε η επιτόπια αποκατάσταση υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο μέσω του μηχανισμού της βιοδιέγερσης των γηγενών μικροβιακών κοινοτήτων και συγκεκριμένα, η αναγωγή του Cr(VI) παρουσία διαφορετικών ειδών ανιόντων (νιτρικά και θειικά ιόντα). Δεδομένου ότι τα ανιόντα αυτά συναντώνται αρκετά συχνά στους υπόγειους υδροφορείς, τα ευρήματα αυτής της μελέτης παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη βιοαναγωγή του Cr(VI) υπό αυτές τις συνθήκες. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η αναγωγή του χρωμίου παρουσία άλλων ανιόντων σε *in situ* εφαρμογές με φυσικό έδαφος.

Παράλληλα, διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών δοτών ηλεκτρονίων (δύο οργανικών και ενός ανόργανου) στο ρυθμό αναγωγής του Cr(VI). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες όπου ο οργανικός δότης ηλεκτρονίων ήταν περιοριστικός παράγοντας. Ενδιαφέρον θα είχε η διενέργεια πειραμάτων στήλης με την προσθήκη των αντίστοιχων δοτών ηλεκτρονίων σε περίσσεια, για τη μελέτη των ρυθμών αναγωγής, καθώς και τη διάρκεια ζωής της διαδικασίας.

Επιπλέον, προτείνεται η διενέργεια πειραμάτων σε φυσικό έδαφος, με διαφορετικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες από αυτό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα. Το έδαφος που χρησιμοποιήθηκε είχε υψηλό ποσοστό ανθρακικού ασβεστίου, γεγονός που το καθιστούσε αρκετά αλκαλικό (τιμή pH=8.1), με αποτέλεσμα ο προστιθέμενος σίδηρος να έχει μικρή κινητικότητα στη συγκεκριμένη μήτρα εδάφους. Προτείνεται συνεπώς η μελέτη της επίδρασης δισθενούς σιδήρου στην αναγωγή του Cr(VI) σε έδαφος, στο οποίο θα έχει μεγαλύτερη κινητικότητα και δε θα παθητικοποιείται κοντά στο σημείο εισόδου. Επίσης, στα πειράματα στήλης και μικρόκοσμου παρατηρήθηκε ότι η φυσική ικανότητα του εδάφους να απομακρύνει το Cr(VI) ήταν πολύ χαμηλή. Θα μπορούσε λοιπόν να πραγματοποιηθεί μια συγκριτική μελέτη με διάφορα είδη εδαφών για την εύρεση της φυσικής αναγωγικής τους ικανότητας και των παραγόντων που την επηρεάζουν. Τέλος ιδιαίτερο ερευνητικό και πρακτικό ενδιαφέρον έχει η ποσοτική αντιστοίχιση των ερευνητικών ευρημάτων των εργαστηριακής κλίμακας και πιλοτικών πειραμάτων στο πεδίο και η μαθηματική προσομοίωση του φαινομένου της αναγωγής του Cr(VI) στο έδαφος στις πραγματικές συνθήκες πεδίου.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Abascal, E., Gómez-Coma, L., Ortiz, I., & Ortiz, A. (2022). Global diagnosis of nitrate pollution in groundwater and review of removal technologies. *Science of the Total Environment*, 810. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152233>
- Abinaya, M., Govindan, K., Kalpana, M., Saravanakumar, K., Prabavathi, S. L., Muthuraj, V., & Jang, A. (2020). Reduction of hexavalent chromium and degradation of tetracycline using a novel indium-doped Mn₂O₃ nanorod photocatalyst. *Journal of Hazardous Materials*, 397, 122885. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122885>
- Abo-Alkasem, M. I., Maany, D. A., El-Abd, M. A., & Ibrahim, A. S. S. (2022). Bioreduction of hexavalent chromium by a novel haloalkaliphilic *Salipaludibacillus agaradhaerens* strain NRC-R isolated from hypersaline soda lakes. *3 Biotech*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03082-2>
- Acharya, R., & Parida, K. (2020). A review on adsorptive remediation of cr (Vi) by magnetic iron oxides and their modified forms. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 10(2), 5266–5272. <https://doi.org/10.33263/BRIAC102.266272>
- Al-Amshawee, S., Yunus, M. Y. B. M., Azoddein, A. A. M., Hassell, D. G., Dakhil, I. H., & Hasan, H. A. (2020). Electrodialysis desalination for water and wastewater: A review. *Chemical Engineering Journal*, 380. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.122231>
- Al-Homaidan, A. A., Al-Qahtani, H. S., Al-Ghanayem, A. A., Ameen, F., & Ibraheem, I. B. M. (2018). Potential use of green algae as a biosorbent for hexavalent chromium removal from aqueous solutions. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(8), 1733–1738. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.07.011>
- Aldmour, S. T., Burke, I. T., Bray, A. W., Baker, D. L., Ross, A. B., Gill, F. L., Cibin, G., Ries, M. E., & Stewart, D. I. (2019). Abiotic reduction of Cr(VI) by humic acids derived from peat and lignite: kinetics and removal mechanism. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(5), 4717–4729. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3902-1>
- Aliane, A., Bounatiro, N., Cherif, A. T., & Akretche, D. E. (2001). Removal of chromium from aqueous solution by complexation - Ultrafiltration using a water-soluble macroligand. *Water Research*, 35(9), 2320–2326. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00501-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00501-7)
- Alvarez, C. C., Gomez, M. E. B., & Zavala, A. H. (2021). Journal of Trace Elements in Medicine and Biology Hexavalent chromium : Regulation and health effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 65.

- Amann, R. I., Krumholz, L., & Stahl, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 762–770. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.762-770.1990>
- Ao, M., Chen, X., Deng, T., Sun, S., Tang, Y., Morel, J. L., Qiu, R., & Wang, S. (2022). Chromium biogeochemical behaviour in soil-plant systems and remediation strategies: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127233. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127233>
- Apte, A. D., Verma, S., Tare, V., & Bose, P. (2005). Oxidation of Cr(III) in tannery sludge to Cr(VI): Field observations and theoretical assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 121(1–3), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.02.010>
- Arias, Y. M., & Tebo, B. M. (2003). Cr(VI) reduction by sulfidogenic and nonsulfidogenic microbial consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1847–1853. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1847-1853.2003>
- Armienta-Hernandez, M. A., & Rodriguez-Castillo, R. (1995). Environmental exposure to chromium compounds in the valley of Leon, Mexico. *Environmental Health Perspectives*, 103, 47–51. <https://doi.org/10.1289/ehp.103-1519325>
- Artioli, Y. (2008). Adsorption. *Encyclopedia of Ecology*, 60–65, Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00252-4>
- Asbaghi, O., Fatemeh, N., Mahnaz, R. K., Ehsan, G., Elham, E., Behzad, N., Damoon, A. L., & Amirmansour, A. N. (2020). Effects of chromium supplementation on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pharmacological Research*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105098>
- Australian Water Association (2000). Australian and New Zealand Guidelines for Fresh and Marine Water Quality.
- Avudainayagam, S., Megharaj, M., Owens, G., Kookana, R. S., Chittleborough, D., & Naidu, R. (2003). Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 178, 53–91. https://doi.org/10.1007/0-387-21728-2_3
- Awang, N. A., Wan Salleh, W. N., Ismail, A. F., Yusof, N., Aziz, F., & Jaafar, J. (2019). Adsorption Behavior of Chromium(VI) onto Regenerated Cellulose Membrane [Research-article]. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 58(2), 720–728. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b02366>

- Aydin, Y. A., & Aksoy, N. D. (2009). Adsorption of chromium on chitosan: Optimization, kinetics and thermodynamics. *Chemical Engineering Journal*, 151(1–3), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.02.010>
- Ayele, A., & Godeto, Y. G. (2021). Bioremediation of Chromium by Microorganisms and Its Mechanisms Related to Functional Groups. *Journal of Chemistry*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/7694157>
- Badessa, T. S., Wakuma, E., & Yimer, A. M. (2020). Bio-sorption for effective removal of chromium(VI) from wastewater using *Moringa stenopetala* seed powder (MSSP) and banana peel powder (BPP). *BMC Chemistry*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13065-020-00724-z>
- Baird, R., & Bridgewater, L. (2012). 5220 CHEMICAL OXYGEN DEMAND (COD). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*.
- Bakshi, A., & Panigrahi, A. K. (2018). A comprehensive review on chromium induced alterations in fresh water fishes. *Toxicology Reports*, 5, 440–447. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.03.007>
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R., & Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological Reviews*, 43(2), 260–296. <https://doi.org/10.1128/membr.43.2.260-296.1979>
- Baldiris, R., Acosta-Tapia, N., Montes, A., Hernández, J., & Vivas-Reyes, R. (2018). Reduction of hexavalent chromium and detection of chromate reductase (ChrR) in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Molecules*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/molecules23020406>
- Ball, J. W., & Izbicki, J. A. (2004). Occurrence of hexavalent chromium in ground water in the western Mojave Desert, California. *Applied Geochemistry*, 19(7), 1123–1135. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2004.01.011>
- Barnhart, J. (1997). Occurrences, Uses, and Properties of Chromium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 26(1), 3–7. <https://doi.org/10.1006/rtph.1997.1132>
- Barrera-Díaz, C. E., Lugo-Lugo, V., & Bilyeu, B. (2012). A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. *Journal of Hazardous Materials*, 223–224, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.054>
- Becquer, T., Quantin, C., Rotte-Capet, S., Ghanbaja, J., Mustin, C., & Herbillon, A. J. (2006).

- Sources of trace metals in Ferralsols in New Caledonia. *European Journal of Soil Science*, 57(2), 200–213. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2005.00730.x>
- Bertolo, R., Bourotte, C., Hirata, R., Marcolan, L., & Sracek, O. (2011). Geochemistry of natural chromium occurrence in a sandstone aquifer in Bauru Basin, São Paulo State, Brazil. *Applied Geochemistry*, 26(8), 1353–1363. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.05.009>
- Bertsch, J., & Müller, V. (2015). CO metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(17), 5949–5956. <https://doi.org/10.1128/AEM.01772-15>
- Bhatti, M. S., Reddy, A. S., Kalia, R. K., & Thukral, A. K. (2011). Modeling and optimization of voltage and treatment time for electrocoagulation removal of hexavalent chromium. *Desalination*, 269(1–3), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.10.055>
- Bhunia, A., Lahiri, D., Nag, M., Upadhye, V., & Pandit, S. (2022). Bacterial biofilm mediated bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102397. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102397>
- Bierkens, M. F. P., & Wada, Y. (2019). Non-renewable groundwater use and groundwater depletion: A review. *Environmental Research Letters*, 14(6). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab1a5f>
- Bishop, M. E., Dong, H., Glasser, P., Briggs, B. R., Pentrak, M., Stucki, J. W., Boyanov, M. I., Kemner, K. M., & Kovarik, L. (2019). Reactivity of redox cycled Fe-bearing subsurface sediments towards hexavalent chromium reduction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 252, 88–106. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.02.039>
- Bonilla, J. O., Callegari, E. A., Delfini, C. D., Estevez, M. C., & Villegas, L. B. (2016). Simultaneous chromate and sulfate removal by *Streptomyces* sp. MC1. Changes in intracellular protein profile induced by Cr(VI). *Journal of Basic Microbiology*, 56(11), 1212–1221. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600170>
- Borch, T., Kretzschmar, R., Skappler, A., Van Cappellen, P., Ginder-Vogel, M., Voegelin, A., & Campbell, K. (2010). Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environmental Science and Technology*, 44(1), 15–23. <https://doi.org/10.1021/es9026248>
- Borden, R. C. (2007a). Concurrent bioremediation of perchlorate and 1,1,1-trichloroethane in an emulsified oil barrier. *Journal of Contaminant Hydrology*, 94(1–2), 13–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.06.002>

- Borden, R. C. (2007b). Effective distribution of emulsified edible oil for enhanced anaerobic bioremediation. *Journal of Contaminant Hydrology*, 94(1–2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.06.001>
- Brodie, E. L., Joyner, D. C., Faybishenko, B., Conrad, M. E., Rios-Velazquez, C., Malave, J., Martinez, R., Mork, B., Willett, A., Koenigsberg, S., Herman, D. J., Firestone, M. K., & Hazen, T. C. (2011). Microbial community response to addition of polylactate compounds to stimulate hexavalent chromium reduction in groundwater. *Chemosphere*, 85(4), 660–665. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.021>
- Brookshaw, D. R., Coker, V. S., Lloyd, J. R., Vaughan, D. J., & Patrick, R. A. D. (2014). Redox interactions between Cr(VI) and Fe(II) in bioreduced biotite and chlorite. *Environmental Science and Technology*, 48(19), 11337–11342. <https://doi.org/10.1021/es5031849>
- Bryce, C., Blackwell, N., Schmidt, C., Otte, J., Huang, Y. M., Kleindienst, S., Tomaszewski, E., Schad, M., Warter, V., Peng, C., Byrne, J. M., & Kappler, A. (2018). Microbial anaerobic Fe(II) oxidation – Ecology, mechanisms and environmental implications. *Environmental Microbiology*, 20(10), 3462–3483. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14328>
- Bulmer, C. E., & Lavkulich, L. M. (1994). Pedogenic and geochemical processes of ultramafic soils along a climatic gradient in southwestern British Columbia. *Canadian Journal of Soil Science*, 74(2), 165–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.4141/cjss94-024>
- Burton, E. D., Choppala, G., Karimian, N., & Johnston, S. G. (2019). A new pathway for hexavalent chromium formation in soil: Fire-induced alteration of iron oxides. *Environmental Pollution*, 247, 618–625. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.094>
- Camargo, F. A. O., Bento, F. M., Okeke, B. C., & Frankenberger, W. T. (2004). Hexavalent chromium reduction by an actinomycete, *Arthrobacter crystallopoietes* ES 32. *Biological Trace Element Research*, 97(2), 183–194. <https://doi.org/10.1385/BTER:97:2:183>
- Caravelli, A. H., Giannuzzi, L., & Zaritzky, N. E. (2008). Reduction of hexavalent chromium by *Sphaerotilus natans* a filamentous micro-organism present in activated sludges. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1–3), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.014>
- Carlos, F. S., Giovanella, P., Bavaresco, J., Borges, C. de S., & Camargo, F. A. de O. (2016). A Comparison of Microbial Bioaugmentation and Biostimulation for Hexavalent Chromium Removal from Wastewater. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2872-5>

- Cavaco, S. A., Fernandes, S., Quina, M. M., & Ferreira, L. M. (2007). Removal of chromium from electroplating industry effluents by ion exchange resins. *Journal of Hazardous Materials*, 144(3), 634–638. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.087>
- CDC & NIOSH (2013). Criteria for a Recommended Standard: Occupational Exposure to Hexavalent Chromium, *DHHS (NIOSH) Publication Number 2013-128*.
- CEPA. (1988). Canadian Environmental Protection Act, Priority Substances List Assessment Report, Chromium and its Compounds
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 335–347. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00057-2)
- Çetin, D., Dönmez, S., & Dönmez, G. (2008). The treatment of textile wastewater including chromium(VI) and reactive dye by sulfate-reducing bacterial enrichment. *Journal of Environmental Management*, 88(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.01.019>
- Chang, I. S., & Kim, B. H. (2007). Effect of sulfate reduction activity on biological treatment of hexavalent chromium [Cr(VI)] contaminated electroplating wastewater under sulfate-rich condition. *Chemosphere*, 68(2), 218–226. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.031>
- Chang, J., Wang, H., Zhang, J., Xue, Q., & Chen, H. (2021). New insight into adsorption and reduction of hexavalent chromium by magnetite: Multi-step reaction mechanism and kinetic model developing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 611, 125784. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125784>
- Chen, M. A., Mehta, N., & Kocar, B. D. (2022). Semiconducting hematite facilitates microbial and abiotic reduction of chromium. *Scientific Reports*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12824-y>
- Chen, Ye, Cheng, J. J., & Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresour. Technology*, 99(10), 4044–4064. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.057>
- Chen, Yinguang, & Gu, G. (2005). Preliminary studies on continuous chromium(VI) biological removal from wastewater by anaerobic-aerobic activated sludge process. *Bioresour. Technology*, 96(15), 1713–1721. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.024>

- Chen, Z. F., Zhao, Y. S., Zhang, J. W., & Bai, J. (2015). Mechanism and Kinetics of Hexavalent Chromium Chemical Reduction with Sugarcane Molasses. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(11). <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2629-6>
- Cheng, Q., Wang, C., Doudrick, K., & Chan, C. K. (2015). Hexavalent chromium removal using metal oxide photocatalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 176–177, 740–748. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.04.047>
- Cheung, K. H., & Gu, J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.05.002>
- Chilean Ministry of Public Works (1998). Norma de emision para la Regulation de contaminantes asociados a las descargas de residuos industriales liquidos a sistemas de alcantarillado.
- Chon, C. M., Kim, J. G., & Moon, H. S. (2006). Kinetics of chromate reduction by pyrite and biotite under acidic conditions. *Applied Geochemistry*, 21(9), 1469–1481. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2006.06.012>
- Chovanec, P., Sparacino-Watkins, C., Zhang, N., Basu, P., & Stolz, J. F. (2012). Microbial reduction of chromate in the presence of nitrate by three nitrate respiring organisms. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00416>
- Chrysochoou, M., Fakra, S. C., Marcus, M. A., Deok, H. M., & Dermatas, D. (2009). Microstructural analyses of Cr(VI) speciation in chromite ore processing residue (COPR). *Environmental Science and Technology*, 43(14), 5461–5466. <https://doi.org/10.1021/es9005338>
- Chrysochoou, M., Theologou, E., Bompoti, N., Dermatas, D., & Panagiotakis, I. (2016). Occurrence, Origin and Transformation Processes of Geogenic Chromium in Soils and Sediments. *Current Pollution Reports*, 2(4), 224–235. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0044-2>
- Cundy, A. B., Hopkinson, L., & Whitby, R. L. D. (2008). Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: A review. *Science of the Total Environment*, 400(1–3), 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.002>
- Currell, M., McCance, W., & Jones, O. A. H. (2022). Novel molecular tracers for the assessment of groundwater pollution. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 26, 100331. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2022.100331>

- Dar, S. A., Kleerebezem, R., Stams, A. J. M., Kuenen, J. G., & Muyzer, G. (2008). Competition and coexistence of sulfate-reducing bacteria, acetogens and methanogens in a lab-scale anaerobic bioreactor as affected by changing substrate to sulfate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), 1045–1055. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1391-8>
- Das, S., Chandra Behera, B., Mohapatra, R. K., Pradhan, B., Sudarshan, M., Chakraborty, A., & Thatoi, H. (2021). Reduction of hexavalent chromium by *Exiguobacterium mexicanum* isolated from chromite mines soil. *Chemosphere*, 282, 131135. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131135>
- Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., Sudarshan, M., Das, N., & Thatoi, H. (2014). Investigation on mechanism of Cr(VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*, a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.080>
- Davis, S. N., Thompson, G. M., Bentley, H. W., & Stiles, G. (1980). Ground-Water Tracers - A Short Review. *Groundwater*, 18(1), 14–23. <https://ngwa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-6584.1980.tb03366.x>
- Dermatas, D., Chrysochoou, M., Moon, D. H., Grubb, D. G., Wazne, M., & Christodoulatos, C. (2006). Ettringite-induced heave in chromite ore processing residue (COPR) upon ferrous sulfate treatment. *Environmental Science and Technology*, 40(18), 5786–5792. <https://doi.org/10.1021/es0604461>
- Dermatas, D., Mpouras, T., Chrysochoou, M., Panagiotakis, I., Vatsaris, C., Linardos, N., Theologou, E., Boboti, N., Xenidis, A., Papassiopi, N., & Sakellariou, L. (2015). Origin and concentration profile of chromium in a Greek aquifer. *Journal of Hazardous Materials*, 281, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.050>
- Dermatas, D., Panagiotakis, I., Mpouras, T., & Tettas, K. (2017). The Origin of Hexavalent Chromium as a Critical Parameter for Remediation of Contaminated Aquifers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 98(3), 331–337. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1985-2>
- DesMarias, T. L., & Costa, M. (2019). Mechanisms of chromium-induced toxicity. *Current Opinion in Toxicology*, 14(III), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.05.003>
- Dey, S., & Kanti Paul, A. (2016). Assessment of heavy metal tolerance and hexavalent chromium reducing potential of *Corynebacterium paurometabolum* SKPD 1204 isolated from chromite mine seepage. *AIMS Bioengineering*, 3(3), 337–351.

<https://doi.org/10.3934/bioeng.2016.3.337>

- Dey, S., Pandit, B., & Paul, A. K. (2014). Reduction of Hexavalent Chromium by Viable Cells of Chromium Resistant Bacteria Isolated from Chromite Mining Environment. *Journal of Mining, 2014*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/941341>
- Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N., & Pandey, B. D. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *Journal of Hazardous Materials, 250–251*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.048>
- Ding, L., Song, J., Huang, D., Lei, J., Li, X., & Sun, J. (2021). Simultaneous removal of nitrate and hexavalent chromium in groundwater using indigenous microorganisms enhanced by emulsified vegetable oil: Interactions and remediation threshold values. *Journal of Hazardous Materials, 406*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124708>
- Dogan, N. M., Kantar, C., Gulcan, S., Dodge, C. J., Yilmaz, B. C., & Mazmanci, M. A. (2011). Chromium(VI) bioremoval by pseudomonas bacteria: Role of microbial exudates for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination. *Environmental Science and Technology, 45*(6), 2278–2285. <https://doi.org/10.1021/es102095t>
- Dokou, Z., Karagiorgi, V., Karatzas, G. P., Nikolaidis, N. P., & Kalogerakis, N. (2016). Large scale groundwater flow and hexavalent chromium transport modeling under current and future climatic conditions: the case of Asopos River Basin. *Environmental Science and Pollution Research, 23*(6), 5307–5321. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5771-1>
- Dong, J., Ding, L., & Chi, Z. (2021). An in-situ bio-remediation of nitrobenzene in stimulated aquifer using emulsified vegetable oil. *Environmental Pollution, 290*, 118035. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118035>
- Dong, J., Yu, D., Li, Y., Li, B., & Bao, Q. (2019). Transport and release of electron donors and alkalinity during reductive dechlorination by combined emulsified vegetable oil and colloidal Mg(OH)₂: Laboratory sand column and microcosm tests. *Journal of Contaminant Hydrology, 225*, 103501. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2019.103501>
- Dong, J., Yu, J., & Bao, Q. (2018). Simulated reactive zone with emulsified vegetable oil for the long-term remediation of Cr(VI)-contaminated aquifer: dynamic evolution of geological parameters and groundwater microbial community. *Environmental Science and Pollution Research, 25*(34), 34392–34402. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3386-z>
- Dos Santos, C. S. L., Miranda Reis, M. H., Cardoso, V. L., & De Resende, M. M. (2019).

- Electrodialysis for removal of chromium (VI) from effluent: Analysis of concentrated solution saturation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5), 103380. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103380>
- Dzemua, G. L., Mees, F., Stoops, G., & Van Ranst, E. (2011). Micromorphology, mineralogy and geochemistry of lateritic weathering over serpentinite in south-east Cameroon. *Journal of African Earth Sciences*, 60(1–2), 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2011.01.011>
- Economou-Eliopoulos, M., Megremi, I., & Vasilatos, C. (2011). Factors controlling the heterogeneous distribution of Cr(VI) in soil, plants and groundwater: Evidence from the Assopos basin, Greece. *Chemie Der Erde*, 71(1), 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.chemer.2011.01.001>
- Ekenberg, M., Martander, H., & Welander, T. (2005). Biological Reduction of Hexavalent Chromium—A Field Study. *Water Environment Research*, 77(4), 425–428. <https://doi.org/10.2175/106143005x52175>
- Elahi, A., & Rehman, A. (2019). Comparative behavior of two gram positive Cr⁶⁺ resistant bacterial strains Bacillus aerius S1 and Brevibacterium iodinum S2 under hexavalent chromium stress. *Biotechnology Reports*, 21(2019), e00307. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00307>
- Elangovan, R., Abhipsa, S., Rohit, B., Ligy, P., & Chandraraj, K. (2006). Reduction of Cr(VI) by a Bacillus sp. *Biotechnology Letters*, 28(4), 247–252. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-5526-z>
- Eliopoulos, I. P. D., Eliopoulos, G. D., & Economou-Eliopoulos, M. (2021). The cr(Vi) stability in contaminated coastal groundwater: Salinity as a driving force. *Minerals*, 11(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/min11020160>
- Enbaia, S., Eswayah, A., Hondow, N., & Smith, T. J. (2021). Detoxification, Active Uptake, and Intracellular Accumulation of Chromium Species by a Methane-Oxidizing Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(2), 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.00947-20>
- EPA (2009). National Primary Drinking Water Regulations. EPA 816-F-09-004
- Esmaili, A., Ghasemi, S., & Zamani, F. (2012). Investigation of Cr(VI) adsorption by dried brown algae Sargassum sp. and its Activated Carbon. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 31(4), 11–19.

- Fang, Y., Wu, X., Dai, M., Lopez-Valdivieso, A., Raza, S., Ali, I., Peng, C., Li, J., & Naz, I. (2021). The sequestration of aqueous Cr(VI) by zero valent iron-based materials: From synthesis to practical application. *Journal of Cleaner Production*, 312, 127678. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127678>
- Fantoni, D., Brozzo, G., Canepa, M., Cipolli, F., Marini, L., Ottonello, G., & Vetuschi Zuccolini, M. (2002). Natural hexavalent chromium in groundwaters interacting with ophiolitic rocks. *Environmental Geology*, 42(8), 871–882. <https://doi.org/10.1007/s00254-002-0605-0>
- Faybishenko, B., Hazen, T. C., Long, P. E., Brodie, E. L., Conrad, M. E., Hubbard, S. S., Christensen, J. N., Joyner, D., Borglin, S. E., Chakraborty, R., Williams, K. H., Peterson, J. E., Chen, J., Brown, S. T., Tokunaga, T. K., Wan, J., Firestone, M., Newcomer, D. R., Resch, C. T., Koenigsberg, S. (2008). In situ long-term reductive bioimmobilization of Cr(VI) in groundwater using hydrogen release compound. *Environmental Science and Technology*, 42(22), 8478–8485. <https://doi.org/10.1021/es801383r>
- Fendorf, S. E. (1995). Surface reactions of chromium in soils and waters. *Geoderma*, 67(1–2), 55–71. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(94\)00062-F](https://doi.org/10.1016/0016-7061(94)00062-F)
- Fendorf, S., Wielinga, B. W., & Hansel, C. M. (2000). Chromium Transformations in Natural Environments: The Role of Biological and Abiological Processes in Chromium(VI) Reduction. *International Geology Review*, 42(8), 691–701. <https://doi.org/10.1080/00206810009465107>
- Fernández, P. M., Viñarta, S. C., Bernal, A. R., Cruz, E. L., & Figueroa, L. I. C. (2018). Bioremediation strategies for chromium removal: Current research, scale-up approach and future perspectives. *Chemosphere*, 208, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.166>
- Franco, L. C., Steinbeisser, S., Zane, G. M., Wall, J. D., & Fields, M. W. (2018). Cr(VI) reduction and physiological toxicity are impacted by resource ratio in *Desulfovibrio vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(6), 2839–2850. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8724-4>
- Fruchter, J. (2002). In situ treatment of chromium-contaminated groundwater. *Environmental Science and Technology*, 36(23).
- Fruchter, J. S., Cole, C. R., Williams, M. D., Vermeul, V. R., Amonette, J. E., Szecsody, J. E., Istok, J. D., & Humphrey, M. D. (2000). Creation of a Subsurface Permeable Treatment Zone for Aqueous Chromate Contamination Using In Situ Redox Manipulation. *Ground Water Monitor. Remediat.*, 20, 66–77.

- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Fu, L., Feng, A., Xiao, J., Wu, Q., Ye, Q., & Peng, S. (2021). Remediation of soil contaminated with high levels of hexavalent chromium by combined chemical-microbial reduction and stabilization. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123847. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123847>
- Gadd, G. M. (1990). Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia*, 46(8), 834–840. <https://doi.org/10.1007/BF01935534>
- Gan, M., Li, J., Sun, S., Cao, Y., Zheng, Z., Zhu, J., Liu, X., Wang, J., & Qiu, G. (2018). The enhanced effect of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on pyrite based Cr(VI) reduction. *Chemical Engineering Journal*, 341, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.02.014>
- Garnier, J., Quantin, C., Martins, E. S., & Becquer, T. (2006). Solid speciation and availability of chromium in ultramafic soils from Niquelândia, Brazil. *Journal of Geochemical Exploration*, 88(1-3), 206–209. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2005.08.040>
- Génin, J. M. R., Refait, P. H., & Abdelmoula, M. (2002). Green rusts and their relationship to iron corrosion; a key role in microbially influenced corrosion. *Hyperfine Interactions*, 139–140(1–4), 119–131. <https://doi.org/10.1023/A:1021219021919>
- George, J. S., Ramos, A., & Shipley, H. J. (2015). Tanning facility wastewater treatment: Analysis of physical-chemical and reverse osmosis methods. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(2), 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.03.011>
- Gheju, M., & Balcu, I. (2011). Removal of chromium from Cr(VI) polluted wastewaters by reduction with scrap iron and subsequent precipitation of resulted cations. *Journal of Hazardous Materials*, 196, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.002>
- Gonzalez, C. F., Ackerley, D. F., Park, C. H., & Matin, A. (2003). A soluble flavoprotein contributes to chromate reduction and tolerance by *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnologica*, 23(2–3), 233–239. <https://doi.org/10.1002/abio.200390030>
- Goulhen, F., Gloter, A., Guyot, F., & Bruschi, M. (2006). Cr(VI) detoxification by *Desulfovibrio vulgaris* strain Hildenborough: Microbe-metal interactions studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), 892–897. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0211-7>

- GracePavithra, K., Jaikumar, V., Kumar, P. S., & SundarRajan, P. S. (2019). A review on cleaner strategies for chromium industrial wastewater: Present research and future perspective. *Journal of Cleaner Production*, 228, 580–593. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.117>
- Grady, C. P. L., Daigger, G. T., Love, N. G., & Filipe, C. D. M. (2011). Biological wastewater treatment: Third edition. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b13775>
- Guerrero, M. M. L., Alonso, E. V., Pavón, J. M. C., Cordero, M. T. S., & De Torres, A. G. (2012). On-line preconcentration using chelating and ion-exchange minicolumns for the speciation of chromium(iii) and chromium(vi) and their quantitative determination in natural waters by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(4), 682–688. <https://doi.org/10.1039/c2ja10290k>
- Guo, H., Chen, Y., Hu, H., Zhao, K., Li, H., Yan, S., Xiu, W., Coyte, R. M., & Vengosh, A. (2020). High Hexavalent Chromium Concentration in Groundwater from a Deep Aquifer in the Baiyangdian Basin of the North China Plain. *Environmental Science and Technology*, 54(16), 10068–10077. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c02357>
- Guo, J., Lian, J., Xu, Z., Xi, Z., Yang, J., Jefferson, W., Liu, C., Li, Z., & Yue, L. (2012). Reduction of Cr(VI) by *Escherichia coli* BL21 in the presence of redox mediators. *Bioresource Technology*, 123, 713–716. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.090>
- Gupta, V. K., Shrivastava, A. K., & Jain, N. (2001). Biosorption of chromium(VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species. *Water Research*, 35(17), 4079–4085. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00138-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00138-5)
- Han, S., Zang, Y., Gao, Y., Yue, Q., Zhang, P., Kong, W., Jin, B., Xu, X., & Gao, B. (2020). Co-monomer polymer anion exchange resin for removing Cr(VI) contaminants: Adsorption kinetics, mechanism and performance. *Science of the Total Environment*, 709, 136002. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136002>
- Han, X., Wong, Y. S., Wong, M. H., & Tam, N. F. Y. (2007). Biosorption and bioreduction of Cr(VI) by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *Journal of Hazardous Materials*, 146(1–2), 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.11.053>
- Harish, R., Samuel, J., Mishra, R., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2012). Bio-reduction of Cr(VI) by exopolysaccharides (EPS) from indigenous bacterial species of Sukinda chromite mine, India. *Biodegradation*, 23(4), 487–496. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9527-4>
- Harkness, M., & Fisher, A. (2013). Use of emulsified vegetable oil to support bioremediation

- of TCE DNAPL in soil columns. *Journal of Contaminant Hydrology*, 151, 16–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.04.002>
- Hausladen, D. M., Alexander-Ozinskas, A., McClain, C., & Fendorf, S. (2018). Hexavalent Chromium Sources and Distribution in California Groundwater. *Environmental Science and Technology*, 52(15), 8242–8251. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06627>
- He, C., Zhang, B., Yan, W., Ding, D., & Guo, J. (2020). Enhanced Microbial Chromate Reduction Using Hydrogen and Methane as Joint Electron Donors. *Journal of Hazardous Materials*, 395, 122684. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122684>
- He, D., Zheng, M., Ma, T., Li, C., & Ni, J. (2015). Interaction of Cr(VI) reduction and denitrification by strain *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 under aerobic conditions. *Bioresource Technology*, 185, 346–352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.109>
- He, Yaxue, Gong, Y., Su, Y., Zhang, Y., & Zhou, X. (2019). Bioremediation of Cr(VI) contaminated groundwater by *Geobacter sulfurreducens*: Environmental factors and electron transfer flow studies. *Chemosphere*, 221, 793–801. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.039>
- He, Yin Hai, Lin, H., Luo, M., Liu, J., Dong, Y., & Li, B. (2020). Highly efficient remediation of groundwater co-contaminated with Cr(VI) and nitrate by using nano-Fe/Pd bimetal-loaded zeolite: Process product and interaction mechanism. *Environmental Pollution*, 263, 114479. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114479>
- Headlam, H. A., & Lay, P. A. (2001). EPR spectroscopic studies of the reduction of Chromium(VI) by methanol in the presence of peptides. Formation of long-lived Chromium(V) peptide complexes. *Inorganic Chemistry*, 40(1), 78–86. <https://doi.org/10.1021/ic000299m>
- Hepburn, D. D. D., Xiao, J., Bindom, S., Vincent, J. B., & O'Donnell, J. (2003). Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3766–3771. <https://doi.org/10.1073/pnas.0636646100>
- Herath, A., Salehi, M., & Jansone-Popova, S. (2022). Production of polyacrylonitrile/ionic covalent organic framework hybrid nanofibers for effective removal of chromium(VI) from water. *Journal of Hazardous Materials*, 427, 128167. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128167>
- Hess, V., Oyrik, O., Trifunović, D., & Müller, V. (2015). 2,3-Butanediol metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14),

4711–4719. <https://doi.org/10.1128/AEM.00960-15>

Hessel, E. V. S., Staal, Y. C. M., Piersma, A. H., den Braver-Sewradj, S. P., & Ezendam, J. (2021). Occupational exposure to hexavalent chromium. Part I. Hazard assessment of non-cancer health effects. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 126, 105048. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105048>

Hlihor, R. M., Figueiredo, H., Tavares, T., & Gavrilescu, M. (2017). Biosorption potential of dead and living *Arthrobacter viscosus* biomass in the removal of Cr(VI): Batch and column studies. *Process Safety and Environmental Protection*, 108(VI), 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.06.016>

Holmes, D. E., Giloteaux, L., Barlett, M., Chavan, M. A., Smith, J. A., Williams, K. H., Wilkins, M., Long, P., & Lovley, D. R. (2013). Molecular analysis of the In situ growth rates of subsurface geobacter species. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1646–1653. <https://doi.org/10.1128/AEM.03263-12>

Homan, N. P., Green, P. G., & Young, T. M. (2018). Evaluating Ferrous Chloride for Removal of Chromium From Ion-Exchange Waste Brines. *Journal - American Water Works Association*, 110(4), E43–E54. <https://doi.org/10.5942/jawwa.2018.110.0022>

Hora, A., & Shetty K, V. (2014). Inhibitory and stimulating effect of single and multi-metal ions on hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter* sp. Cr-B2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 3211–3219. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1748-3>

Hosseini, S. M., Sohrabnejad, S., Nabiyouni, G., Jashni, E., Van der Bruggen, B., & Ahmadi, A. (2019). Magnetic cation exchange membrane incorporated with cobalt ferrite nanoparticles for chromium ions removal via electrodialysis. *Journal of Membrane Science*, 583, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.04.069>

Hseu, Z. Y. (2006). Concentration and distribution of chromium and nickel fractions along a serpentinitic toposequence. *Soil Science*, 171(4), 341–353. <https://doi.org/10.1097/01.ss.0000209354.68783.f3>

Hu, Y., Liu, T., Chen, N., & Feng, C. (2022). Changes in microbial community diversity, composition, and functions upon nitrate and Cr(VI) contaminated groundwater. *Chemosphere*, 288. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132476>

Hu, Y., Liu, T., Chen, N., Feng, C., Lu, W., & Guo, H. (2022). Simultaneous bio-reduction of nitrate and Cr(VI) by mechanical milling activated corn straw. *Journal of Hazardous Materials*, 429, 128258. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128258>

- Huang, J., Wu, M., Tang, J., Zhou, R., Chen, J., Han, W., & Xie, Z. (2016). Enhanced bio-reduction of hexavalent chromium by an anaerobic consortium using henna plant biomass as electron donor and redox mediator. *Desalination and Water Treatment*, *57*(32), 15125–15132. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1070292>
- Huang, Y., Zeng, Q., Hu, L., Zhong, H., & He, Z. (2021). Bioreduction performances and mechanisms of Cr(VI) by *Sporosarcina saromensis* W5, a novel Cr(VI)-reducing facultative anaerobic bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, *413*, 125411. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125411>
- Husien, S., Labena, A., El-Belely, E. F., Mahmoud, H. M., & Hamouda, A. S. (2019). Absorption of hexavalent chromium by green micro algae *Chlorella sorokiniana*: Live planktonic cells. *Water Practice and Technology*, *14*(3), 515–529. <https://doi.org/10.2166/wpt.2019.034>
- Ishibashi, Y., Cervantes, C., & Silver, S. (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(7), 2268–2270. <https://doi.org/10.1128/aem.56.7.2268-2270.1990>
- Istok, J. D., Amonette, J. E., Cole, C. R., Fruchter, J. S., Humphrey, M. D., Szecsody, J. E., Teel, S. S., Vermeul, V. R., Williams, M. D., & Yabusaki, S. B. (1999). In Situ Redox Manipulation by Dithionite Injection: Intermediate-Scale Laboratory Experiments. *Ground Water*, *37*, 884–889.
- Iyer, G. V., Mastorakis, N. E., & Theologou, A. I. (2006). Environmental health effects of chromium—a modeling approach to find environmental impacts. *WSEAS Transactions on Environment and Development*, *2*(3), 188–197.
- Izbicki, J. A., Wright, M. T., Seymour, W. A., McCleskey, R. B., Fram, M. S., Belitz, K., & Esser, B. K. (2015). Cr(VI) occurrence and geochemistry in water from public-supply wells in California. *Applied Geochemistry*, *63*, 203–217. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2015.08.007>
- Jang, E. H., Pack, S. P., Kim, I., & Chung, S. (2020). A systematic study of hexavalent chromium adsorption and removal from aqueous environments using chemically functionalized amorphous and mesoporous silica nanoparticles. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61505-1>
- Jeyasingh, J., & Philip, L. (2005). Bioremediation of chromium contaminated soil: Optimization of operating parameters under laboratory conditions. *Journal of Hazardous Materials*, *118*(1–3), 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.10.003>

- Jiang, K., Zhang, J., Deng, Z., Barnie, S., Chang, J., Zou, Y., Guan, X., Liu, F., & Chen, H. (2021). Natural attenuation mechanism of hexavalent chromium in a wetland: Zoning characteristics of abiotic and biotic effects. *Environmental Pollution*, 287, 117639. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117639>
- Jin, R., Wang, B., Liu, G., Wang, Y., Zhou, J., & Wang, J. (2017). Bioreduction of Cr(VI) by acinetobacter sp. WB-1 during simultaneous nitrification/denitrification process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92(3), 649–656. <https://doi.org/10.1002/jctb.5046>
- Jin, W., Du, H., Yan, K., Zheng, S., & Zhang, Y. (2016). Improved electrochemical Cr(VI) detoxification by integrating the direct and indirect pathways. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775, 325–328. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.06.030>
- Jin, W., Du, H., Zheng, S., & Zhang, Y. (2016). Electrochemical processes for the environmental remediation of toxic Cr(VI): A review. *Electrochimica Acta*, 191, 1044–1055. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.01.130>
- Jobby, R., Jha, P., Yadav, A. K., & Desai, N. (2018). Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: A comprehensive review. *Chemosphere*, 207, 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.050>
- Jones, A. S., Marini, J., Solo-Gabriele, H. M., Robey, N. M., & Townsend, T. G. (2019). Arsenic, copper, and chromium from treated wood products in the U.S. disposal sector. *Waste Management*, 87, 731–740. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.004>
- Joutey, N. T., Sayel, H., Bahafid, W., & El Ghachtouli, N. (2015). Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 233, 45–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10479-9_2
- Kabdasli, I., & Tünay, O. (2023). Hexavalent Chromium Removal from Water and Wastewaters by Electrochemical Processes : Review. *Molecules*, 28(2411).
- Kafle, A., Timilsina, A., Gautam, A., Adhikari, K., Bhattarai, A., & Aryal, N. (2022). Phytoremediation: Mechanisms, plant selection and enhancement by natural and synthetic agents. *Environmental Advances*, 8, 100203. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100203>
- Kalsoom, A., Jamil, N., Hassan, S. M. U., Khan, J. A., & Batool, R. (2023). Chromate Removal by *Enterobacter cloacae* Strain UT25 from Tannery Effluent and Its Potential Role in Cr

- (VI) Remediation. *Current Microbiology*, 80(3), 99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00284-023-03194-3>
- Kanmani, P., Aravind, J., & Preston, D. (2012). Remediation of chromium contaminants using bacteria. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 9(1), 183–193. <https://doi.org/10.1007/s13762-011-0013-7>
- Kapoor, R. T., Bani Mfarrej, M. F., Alam, P., Rinklebe, J., & Ahmad, P. (2022). Accumulation of chromium in plants and its repercussion in animals and humans. *Environmental Pollution*, 301. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119044>
- Karimi-Maleh, H., Ayati, A., Ghanbari, S., Orooji, Y., Tanhaei, B., Karimi, F., Alizadeh, M., Rouhi, J., Fu, L., & Sillanpää, M. (2021). Recent advances in removal techniques of Cr(VI) toxic ion from aqueous solution: A comprehensive review. *Journal of Molecular Liquids*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115062>
- Karthik, C., Barathi, S., Pugazhendhi, A., Ramkumar, V. S., Thi, N. B. D., & Arulselvi, P. I. (2017). Evaluation of Cr(VI) reduction mechanism and removal by *Cellulosimicrobium funkei* strain AR8, a novel haloalkaliphilic bacterium. *Journal of Hazardous Materials*, 333, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.037>
- Kathiravan, M. N., Karthick, R., & Muthukumar, K. (2011). Ex situ bioremediation of Cr(VI) contaminated soil by *Bacillus* sp.: Batch and continuous studies. *Chemical Engineering Journal*, 169(1–3), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.02.060>
- Kaya, A., Onac, C., Alpoguz, H. K., Yilmaz, A., & Atar, N. (2016). Removal of Cr(VI) through calixarene based polymer inclusion membrane from chrome plating bath water. *Chemical Engineering Journal*, 283, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.07.052>
- Kazakis, N., Kantiranis, N., Voudouris, K. S., Mitrakas, M., Kaprara, E., & Pavlou, A. (2015). Geogenic Cr oxidation on the surface of mafic minerals and the hydrogeological conditions influencing hexavalent chromium concentrations in groundwater. *Science of the Total Environment*, 514, 224–238. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.080>
- Kazakis, Nerantzis, Kantiranis, N., Kalaitzidou, K., Kaprara, E., Mitrakas, M., Frei, R., Vargemezis, G., Vogiatzis, D., Zouboulis, A., & Filippidis, A. (2018). Environmentally available hexavalent chromium in soils and sediments impacted by dispersed fly ash in Sarigkiol basin (Northern Greece). *Environmental Pollution*, 235, 632–641. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.117>
- Kierczak, J., Neel, C., Bril, H., & Puziewicz, J. (2007). Effect of mineralogy and pedoclimatic variations on Ni and Cr distribution in serpentine soils under temperate climate.

- Geoderma*, 142(1–2), 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.08.009>
- Kim, C., Zhou, Q., Deng, B., Thornton, E. C., & Xu, H. (2001). Chromium(VI) reduction by hydrogen sulfide in aqueous media: Stoichiometry and kinetics. *Environmental Science and Technology*, 35(11), 2219–2225. <https://doi.org/10.1021/es0017007>
- Kimbrough, D. E., Cohen, Y., Winer, A. M., Creelman, L., & Clayton, M. (1999). A Critical Assessment of Chromium in the Environment A Critical Assessment of Chromium in the Environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 29(1), 1–46. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389991259164>
- Komori, K., Rivas, A., Toda, K., & Ohtake, H. (1990). A method for removal of toxic chromium using dialysis-sac cultures of a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 117–119. <https://doi.org/10.1007/BF00170582>
- Korak, J. A., Huggins, R., & Arias-Paic, M. (2017). Regeneration of pilot-scale ion exchange columns for hexavalent chromium removal. *Water Research*, 118, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.018>
- Kourtev, P. S., Nakatsu, C. H., & Konopka, A. (2009). Inhibition of nitrate reduction by chromium(VI) in anaerobic soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(19), 6249–6257. <https://doi.org/10.1128/AEM.00347-09>
- Krishna, K. R., & Philip, L. (2005). Bioremediation of Cr(VI) in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 121(1–3), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.01.018>
- Kumar, A. R., & Riyazuddin, P. (2011). Chromium speciation in a contaminated groundwater: Redox processes and temporal variability. *Environmental Monitoring and Assessment*, 176(1–4), 647–662. <https://doi.org/10.1007/s10661-010-1610-5>
- Kumaraguru, K., Saravanan, P., Rajesh kannan, R., & Saravanan, V. (2021). A systematic analysis of hexavalent chromium adsorption and elimination from aqueous environment using brown marine algae (*Turbinaria ornata*). *Biomass Conversion and Biorefinery*, Vi. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01795-1>
- Kumaresan Sarankumar, R., Arulprakash, A., Devanesan, S., Selvi, A., AlSalhi, M. S., Rajasekar, A., & Ahamed, A. (2020). Bioreduction of hexavalent chromium by chromium resistant alkalophilic bacteria isolated from tannery effluent. *Journal of King Saud University - Science*, 32(3), 1969–1977. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.02.010>

- Kurniawan, T. A., Chan, G. Y. S., Lo, W. H., & Babel, S. (2006). Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chemical Engineering Journal*, 118(1–2), 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.01.015>
- Küsel, K., Pinkart, H. C., Drake, H. L., & Devereux, R. (1999). Acetogenic and sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizoplane and deep cortex cells of the sea grass *Halodule wrightii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5117–5123. <https://doi.org/10.1128/aem.65.11.5117-5123.1999>
- Lawrence K. Wang, Jiaping Paul Chen, Yung-Tse Hung, N. K. S. (2011). Membrane and Desalination Technologies. In *Membrane and Desalination Technologies vol. 13*. <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-278-6>
- Laxmi, V., & Kaushik, G. (2020). Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety. *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1891-7>
- Lazaridis, N. K., & Charalambous, C. (2005). Sorptive removal of trivalent and hexavalent chromium from binary aqueous solutions by composite alginate-goethite beads. *Water Research*, 39(18), 4385–4396. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.09.013>
- Lee, D. C., Park, C. J., Yang, J. E., Jeong, Y. H., & Rhee, H. I. (2000). Screening of hexavalent chromium biosorbent from marine algae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(4), 597–600. <https://doi.org/10.1007/s002530000367>
- Lee, L., Hsu, C. Y., & Yen, H. W. (2017). The effects of hydraulic retention time (HRT) on chromium(VI) reduction using autotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(12), 1725–1731. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1827-6>
- Li, M., He, Z., Hu, Y., Hu, L., & Zhong, H. (2019). Both cell envelope and cytoplasm were the locations for chromium(VI) reduction by *Bacillus* sp. M6. *Bioresource Technology*, 273, 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.006>
- Li, Xiaotong, Zhang, H., Zhou, X., & Zhong, W. (2022). Research on the evolution of the global import and export competition network of chromium resources from the perspective of the whole industrial chain. *Resources Policy*, 79(29), 102987. <https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2022.102987>
- Li, Xilin, Fan, M., Liu, L., Chang, J., & Zhang, J. (2019). Treatment of high-concentration chromium-containing wastewater by sulfate-reducing bacteria acclimated with ethanol. *Water Science and Technology*, 80(12), 2362–2372. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.057>

- Li, Y., Bian, Y., Qin, H., Zhang, Y., & Bian, Z. (2017). Photocatalytic reduction behavior of hexavalent chromium on hydroxyl modified titanium dioxide. *Applied Catalysis B: Environmental*, 206, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2017.01.044>
- Lin, W. H., Chen, C. C., Ou, J. H., Sheu, Y. T., Hou, D., & Kao, C. M. (2022). Bioremediation of hexavalent-chromium contaminated groundwater: Microcosm, column, and microbial diversity studies. *Chemosphere*, 295, 133877. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133877>
- Lin, W. H., Chen, S. C., Chien, C. C., Tsang, D. C. W., Lo, K. H., & Kao, C. M. (2020a). Application of enhanced bioreduction for hexavalent chromium-polluted groundwater cleanup: Microcosm and microbial diversity studies. *Environmental Research*, 184, 109296. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109296>
- Lin, W. H., Chen, S. C., Chien, C. C., Tsang, D. C. W., Lo, K. H., & Kao, C. M. (2020b). Application of enhanced bioreduction for hexavalent chromium-polluted groundwater cleanup: Microcosm and microbial diversity studies. *Environmental Research*, 184. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109296>
- Lin, Y. H., Tu, Y. C., & Chen, G. L. (2015). Kinetics of Chromium(VI) Reduction with Acetate Biodegradation by *Escherichia coli* 33456 in a Fixed Biofilm Reactor. *Environmental Engineering Science*, 32(9), 761–772. <https://doi.org/10.1089/ees.2015.0059>
- Liu, H., Wang, Y., Zhang, H., Huang, G., Yang, Q., & Wang, Y. (2019). Synchronous detoxification and reduction treatment of tannery sludge using Cr (VI) resistant bacterial strains. *Science of the Total Environment*, 687, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.093>
- Liu, L., Xu, Y., Wang, K., Li, K., Xu, L., Wang, J., & Wang, J. (2019). Fabrication of a novel conductive ultrafiltration membrane and its application for electrochemical removal of hexavalent chromium. *Journal of Membrane Science*, 584, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.05.018>
- Liu, T., Hu, Y., Chen, N., He, Q., & Feng, C. (2021). High redox potential promotes oxidation of pyrite under neutral conditions: Implications for optimizing pyrite autotrophic denitrification. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 125844. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125844>
- Liu, Z., Wu, Y., Lei, C., Liu, P., & Gao, M. (2012). Chromate reduction by a chromate-resistant bacterium, *Microbacterium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1585–1592. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0962-5>

- Long, D., Hashmi, M. Z., Su, X., & Pongpiachan, S. (2019). Cr(VI) reduction by an extracellular polymeric substance (EPS) produced from a strain of *Pseudochrobactrum saccharolyticum*. *3 Biotech*, *9*, 111. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1641-8>
- Losi, M. E., Amrhein, C., & Frankenberger, W. T. (1994). Environmental biochemistry of chromium. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *136*, 91–121. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2656-7_3
- Lovley, D. R., & Phillips, E. J. P. (1994). Reduction of chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and its c3 cytochrome. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(2), 726–728. <https://doi.org/10.1128/aem.60.2.726-728.1994>
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K. H., & Wagner, M. (2002). Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(10), 5064–5081. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5064-5081.2002>
- Lu, J., Zhang, B., He, C., & Borthwick, A. G. L. (2020). The role of natural Fe(II)-bearing minerals in chemoautotrophic chromium (VI) bio-reduction in groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, *389*, 121911. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121911>
- Lücker, S., Steger, D., Kjeldsen, K. U., MacGregor, B. J., Wagner, M., & Loy, A. (2007). Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, *69*(3), 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.009>
- Lukina, A. O., Boutin, C., Rowland, O., & Carpenter, D. J. (2016). Evaluating trivalent chromium toxicity on wild terrestrial and wetland plants. *Chemosphere*, *162*, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.055>
- Lund, P. A., De Biase, D., Liran, O., Scheler, O., Mira, N. P., Cetecioglu, Z., Fernández, E. N., Bover-Cid, S., Hall, R., Sauer, M., & O’Byrne, C. (2020). Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556140>
- Lv, P. L., Zhong, L., Dong, Q. Y., Yang, S. L., Shen, W. W., Zhu, Q. S., Lai, C. Y., Luo, A. C., Tang, Y., & Zhao, H. P. (2018). The effect of electron competition on chromate reduction using methane as electron donor. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(7), 6609–6618. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0937-7>
- Lytras, G., Lytras, C., Argyropoulou, D., Dimopoulos, N., Malavetas, G., & Lyberatos, G.

- (2017). A novel two-phase bioreactor for microbial hexavalent chromium removal from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 336, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.04.049>
- Ma, L., Xu, J., Chen, N., Li, M., & Feng, C. (2019). Microbial reduction fate of chromium (Cr) in aqueous solution by mixed bacterial consortium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 763–770. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.041>
- Ma, Yan, Zhong, H., & He, Z. (2019). Cr(VI) reductase activity locates in the cytoplasm of *Aeribacillus pallidus* BK1, a novel Cr(VI)-reducing thermophile isolated from Tengchong geothermal region, China. *Chemical Engineering Journal*, 371, 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.04.085>
- Ma, Yibing & Hooda, P. S. (2010). Chromium, Nickel and Cobalt. *Trace Elements in soils*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781444319477.ch19>
- Mabrouk, M. E. M., Arayes, M. A., & Sabry, S. A. (2014). Hexavalent chromium reduction by chromate-resistant haloalkaliphilic halomonas sp. M-Cr newly isolated from tannery effluent. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28(4), 659–667. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.937092>
- Mahlknecht, J., & Mora, A. (2022). Editorial overview: Management of groundwater resources and pollution prevention. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 28, 100365. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2022.100365>
- Majone, M., Verdini, R., Aulenta, F., Rossetti, S., Tandoi, V., Kalogerakis, N., Agathos, S., Puig, S., Zanaroli, G., & Fava, F. (2015). In situ groundwater and sediment bioremediation: Barriers and perspectives at European contaminated sites. *New Biotechnology*, 32(1), 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.011>
- Malaviya, P., & Singh, A. (2014). Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(4), 607–633. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.974501>
- Mamais, D., Noutsopoulos, C., Kavallari, I., Nyktari, E., Kaldis, A., Panousi, E., Nikitopoulos, G., Antoniou, K., & Nasioka, M. (2016). Biological groundwater treatment for chromium removal at low hexavalent chromium concentrations. *Chemosphere*, 152, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.124>
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., & Schleifer, K. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System Appl Microbiol*, 15, 593–600.

- Margalef-Marti, R., Carrey, R., Benito, J. A., Marti, V., Soler, A., & Otero, N. (2020). Nitrate and nitrite reduction by ferrous iron minerals in polluted groundwater: Isotopic characterization of batch experiments. *Chemical Geology*, 548, 119691. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2020.119691>
- Marques Neto, J. de O., Bellato, C. R., & Silva, D. de C. (2019). Iron oxide/carbon nanotubes/chitosan magnetic composite film for chromium species removal. *Chemosphere*, 218, 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.080>
- Márquez-Reyes, J. M., López-Chuken, U. J., Valdez-González, A., & Luna-Olvera, H. A. (2013). Removal of chromium and lead by a sulfate-reducing consortium using peat moss as carbon source. *Bioresource Technology*, 144, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.067>
- Mary Mangaiyarkarasi, M. S., Vincent, S., Janarthanan, S., Subba Rao, T., & Tata, B. V. R. (2011). Bioreduction of Cr(VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(2), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.12.003>
- Matouq, M., Saleh, M., Al-Ayed, O., El-Hasan, T., Hiroshi, Y., & Tagawa, T. (2021). Biosorption of chromium and nickel from aqueous solution using pine cones, eucalyptus bark, and moringa pods: A comparative study. *Water Practice and Technology*, 16(1), 72–82. <https://doi.org/10.2166/wpt.2020.096>
- Mclean, J., & Beveridge, T. J. (2001). Chromate Reduction by a Pseudomonad Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), 1076–1084. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1076-1084.2001>
- Meng, J., Wang, T., Shi, B., Li, Q., Wang, C., Dai, L., & Su, G. (2022). Integrating industrial source and environmental sink towards chromium emission evaluation in China: Insights from the improved substance flow analysis. *Journal of Cleaner Production*, 371, 133628. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133628>
- Miao, Y., Liao, R., Zhang, X. X., Wang, Y., Wang, Z., Shi, P., Liu, B., & Li, A. (2015). Metagenomic insights into Cr(VI) effect on microbial communities and functional genes of an expanded granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater. *Water Research*, 76, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.042>
- Michailides, M. K., Tekerlekopoulou, A. G., Akrotas, C. S., Coles, S., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2015). Molasses as an efficient low-cost carbon source for biological Cr(VI) removal. *Journal of Hazardous Materials*, 281, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.004>

- Middleton, S. S., Latmani, R. B., Mackey, M. R., Ellisman, M. H., Tebo, B. M., & Criddle, C. S. (2003). Cometabolism of Cr(VI) by *Shewanella oneidensis* MR-1 produces cell-associated reduced chromium and inhibits growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(6), 627–637. <https://doi.org/10.1002/bit.10725>
- Mishra, R. R., Dhal, B., Dutta, S. K., Dangar, T. K., Das, N. N., & Thatoi, H. N. (2012). Optimization and characterization of chromium(VI) reduction in saline condition by moderately halophilic *Vigribacillus* sp. isolated from mangrove soil of Bhitarkanika, India. *Journal of Hazardous Materials*, 227–228, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.063>
- Mishra, S., & Bharagava, R. N. (2016a). Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, 34(1), 1–32. <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1096883>
- Mishra, S., & Bharagava, R. N. (2016b). Toxic and genotoxic effects of hexavalent chromium in environment and its bioremediation strategies. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(1), 1–32. <https://doi.org/10.1080/10590501.2015.1096883>
- Mishra, S., Chowdhary, P., & Bharagava, R. N. (2018). Conventional methods for the removal of industrial pollutants, their merits and demerits. In *Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management* (pp. 1–31). https://doi.org/10.1007/978-981-10-8669-4_1
- Mnif, A., Bejaoui, I., Mouelhi, M., & Hamrouni, B. (2017). Hexavalent Chromium Removal from Model Water and Car Shock Absorber Factory Effluent by Nanofiltration and Reverse Osmosis Membrane. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7415708>
- Mohamed, M. S. M., El-Arabi, N. I., El-Hussein, A., El-Maaty, S. A., & Abdelhadi, A. A. (2020). Reduction of chromium-VI by chromium-resistant *Escherichia coli* FACU: a prospective bacterium for bioremediation. *Folia Microbiologica*, 65(4), 687–696. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00771-y>
- Mohan, D., & Pittman, C. U. (2006). Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials*, 137(2), 762–811. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.06.060>
- Monga, A., Fulke, A. B., & Dasgupta, D. (2022). Recent developments in essentiality of trivalent chromium and toxicity of hexavalent chromium: Implications on human health and remediation strategies. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 7, 100113.

<https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100113>

- Moon, D. H., Wazne, M., Dermatas, D., Christodoulatos, C., Sanchez, A. M., Grubb, D. G., Chrysochoou, M., & Kim, M. G. (2007). Long-term treatment issues with chromite ore processing residue (COPR): Cr⁶⁺ reduction and heave. *Journal of Hazardous Materials*, *143*(3), 629–635. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.013>
- Morais, P. V., Branco, R., & Francisco, R. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: What makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. *BioMetals*, *24*(3), 401–410. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9446-1>
- Mortensen, A., & Larsen, J. C. (2012). Risk assessment of sweeteners used as food additives. In *Sweeteners: Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology* (pp. 419–435). <https://doi.org/10.1201/b12065>
- Morvaridzadeh, M., Estêvão, M. D., Qorbani, M., Heydari, H., Hosseini, A. sadat, Fazelian, S., Belančić, A., Persad, E., Rezamand, G., & Heshmati, J. (2022). The effect of chromium intake on oxidative stress parameters: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *69*. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126879>
- Motzer, W. E. (2005). Chemistry, geochemistry, and geology of chromium and chromium compound. In C. P. A. (Eds. J. Guertin, J.A. Jacobs (Ed.), *Chromium (VI) Handbook*.
- Mtimunye, P. J., Lutsinge, T. B., Molokwane, P. E., & Chirwa, E. M. N. (2017). Cr(VI) remediation in groundwater aquifer media using natural organic matter as carbon source. *Chemical Engineering Transactions*, *61*, 1831–1836. <https://doi.org/10.3303/CET1761303>
- Muthumareeswaran, M. R., Alhoshan, M., & Agarwal, G. P. (2017). Ultrafiltration membrane for effective removal of chromium ions from potable water. *Scientific Reports*, *7*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep41423>
- Mystrioti, C., Toli, A., Papasiopi, N., Dermatas, D., & Thimi, S. (2018). Chromium Removal with Environmentally Friendly Iron Nanoparticles in a Pilot Scale Study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *101*(6), 705–710. <https://doi.org/10.1007/s00128-018-2424-3>
- N. Chirwa, E. M., & Molokwane, P. E. (2011). Biological Cr(VI) Reduction: Microbial Diversity, Kinetics and Biotechnological Solutions to Pollution. In *Biodiversity*. <https://doi.org/10.5772/24311>

- Narayani, M., & Shetty, K. V. (2013). Chromium-resistant bacteria and their environmental condition for hexavalent chromium removal: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(9), 955–1009. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.627022>
- Narayani, M., & Vidya Shetty, K. (2012). Characteristics of a novel *Acinetobacter* sp. and its kinetics in hexavalent chromium bioreduction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), 690–698. <https://doi.org/10.4014/jmb.1110.10073>
- Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2002). Mechanisms for Fe(III) oxide reduction in sedimentary environments. *Geomicrobiology Journal*, 19(2), 141–159. <https://doi.org/https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00206810009465107>
- Nguema, P. F., & Luo, Z. (2012). Aerobic chromium(VI) reduction by chromium-resistant bacteria isolated from activated sludge. *Annals of Microbiology*, 62(1), 41–47. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0224-7>
- Nielsen, J. L., Juretschko, S., Wagner, M., & Nielsen, P. H. (2002). Abundance and phylogenetic affiliation of iron reducers in activated sludge as assessed by fluorescence in situ hybridization and microautoradiography. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4629–4636. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4629-4636.2002>
- NOM-127-SSA1-1994 (modification) - Secretaría de Salud: México, D.F. (1998). Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Noraee, Z., Jafari, A., Ghaderpoori, M., Kamarehie, B., & Ghaderpoury, A. (2019). Use of metal-organic framework to remove chromium (VI) from aqueous solutions. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 17(2), 701–709. <https://doi.org/10.1007/s40201-019-00385-8>
- Nussbaumerova, B., Rosolova, H., Krizek, M., Sefrna, F., Racek, J., Müller, L., & Sindberg, C. (2018). Chromium Supplementation Reduces Resting Heart Rate in Patients with Metabolic Syndrome and Impaired Glucose Tolerance. *Biological Trace Element Research*, 183(2), 192–199. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1128-6>
- O'Carroll, D., Sleep, B., Krol, M., Boparai, H., & Kocur, C. (2013). Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Advances in Water Resources*, 51, 104–122. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2012.02.005>
- Odoemelam, S. A., & Ukpe, R. A. (2008). Heavy metal decontamination of polluted soils using *Bryophyllum pinnatum*. *African Journal of Biotechnology*, 7(23), 4301–4303.

- Ohtake, H., Fujii, E., & Toda, K. (1990). Bacterial reduction of hexavalent chromium: Kinetic aspects of chromate reduction by enterobacter cloacae HO1. *Biocatalysis and Biotransformation*, 4(2–3), 227–235. <https://doi.org/10.3109/10242429008992094>
- Oliveira, H. (2012). Chromium as an Environmental Pollutant: Insights on Induced Plant Toxicity. *Journal of Botany*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/375843>
- Ona-Nguema, G., Abdelmoula, M., Jorand, F., Benali, O., Géhin, A., Block, J. C., & Génin, J. M. R. (2002). Iron(II,III) hydroxycarbonate green rust formation and stabilization from lepidocrocite bioreduction. *Environmental Science and Technology*, 36(1), 16–20. <https://doi.org/10.1021/es0020456>
- Opperman, D. J., Piater, L. A., & van Heerden, E. (2008). A Novel Chromate Reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 Related to Old Yellow Enzyme. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 3076–3082. <https://doi.org/10.1128/JB.01766-07>
- Othman, N., Noah, N. F. M., Sulaiman, R. N. R., Jusoh, N., & Tan, W. T. (2021). Emulsion liquid membrane modeling for chromium removal from electroplating wastewater using TOMAC as a carrier. *Water Environment Research*, 93(9), 1669–1679. <https://doi.org/10.1002/wer.1551>
- Ozaki, H., Sharma, K., & Saktaywin, W. (2002). Performance of an ultra-low-pressure reverse osmosis membrane (ULPROM) for separating heavy metal: Effects of interference parameters. *Desalination*, 144(1–3), 287–294. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00329-6](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00329-6)
- Özdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B., & Güven, K. (2009). Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub.sp. decanicus and *Geobacillus thermoleovorans* sub.sp. stromboliensis: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 152(1), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.04.041>
- Oze, C., Bird, D. K., & Fendorf, S. (2007). Genesis of hexavalent chromium from natural sources in soil and groundwater. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16), 6544–6549. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701085104>
- Oze, C., Fendorf, S., Bird, D. K., & Coleman, R. G. (2004). Chromium geochemistry of serpentine soils. *International Geology Review*, 46(2), 97–126. <https://doi.org/10.2747/0020-6814.46.2.97>
- Pal, A., & Paul, A. K. (2004). Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Microbiological Research*, 159(4), 347–354.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.08.001>

- Palma, L. Di, Gueye, M. T., & Petrucci, E. (2015). Hexavalent chromium reduction in contaminated soil: A comparison between ferrous sulphate and nanoscale zero-valent iron. *Journal of Hazardous Materials*, 281, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.058>
- Palmer, C. D., & Wittbrodt, P. R. (1991). Processes Affecting the Remediation of Chromium-Contaminated Sites. *Environmental Health Perspectives*, 92(6), 25. <https://doi.org/10.2307/3431134>
- Pan, C., & Giammar, D. (2020). Interplay of transport processes and interfacial chemistry affecting chromium reduction and reoxidation with iron and manganese. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 14(5). <https://doi.org/10.1007/s11783-020-1260-y>
- Pan, C., Troyer, L. D., Catalano, J. G., & Giammar, D. E. (2016). Dynamics of chromium(VI) removal from drinking water by iron electrocoagulation. *Environmental Science and Technology*, 50(24), 13502–13510. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03637>
- Panousi, E., Mamais, D., Noutsopoulos, C., Mpertoli, K., Kantzavelou, C., Nyktari, E., Kavallari, I., Nasioka, M., & Kaldis, A. (2019). Biological groundwater treatment for hexavalent chromium removal at low chromium concentrations under anoxic conditions. *Environmental Technology*, 40(3), 365–373. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1393013>
- Panousi, E., Mamais, D., Noutsopoulos, C., Antoniou, K., Koutoula, K., Mastrantoni, S., Koutsogiannis, C., & Gkioni, A. (2016). Biological treatment of groundwater with a high hexavalent chromium content under anaerobic and anoxic conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(6), 1681–1687. <https://doi.org/10.1002/jctb.4973>
- Papassiopi, N., Vaxevanidou, K., Christou, C., Karagianni, E., & Antipas, G. S. E. (2014). Synthesis, characterization and stability of Cr(III) and Fe(III) hydroxides. *Journal of Hazardous Materials*, 264, 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.058>
- Papazotos, P., Vasileiou, E., & Perraki, M. (2019). The synergistic role of agricultural activities in groundwater quality in ultramafic environments: the case of the Psachna basin, central Euboea, Greece. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(5). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7430-3>
- Papazotos, P., Vasileiou, E., & Perraki, M. (2020). Elevated groundwater concentrations of

- arsenic and chromium in ultramafic environments controlled by seawater intrusion, the nitrogen cycle, and anthropogenic activities: The case of the Gerania Mountains, NE Peloponnese, Greece. *Applied Geochemistry*, 121, 104697. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2020.104697>
- Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S., & Matin, A. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1788–1795. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1788-1795.2000>
- Paternoster, M., Rizzo, G., Sinisi, R., Vilardi, G., Di Palma, L., & Mongelli, G. (2021). Natural Hexavalent Chromium in the Pollino Massif Groundwater (Southern Apennines, Italy): Occurrence, Geochemistry and Preliminary Remediation Tests by Means of Innovative Adsorbent Nanomaterials. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 106(3), 421–427. <https://doi.org/10.1007/s00128-020-02898-7>
- Patra, D. K., Pradhan, C., & Patra, H. K. (2020). Toxic metal decontamination by phytoremediation approach: Concept, challenges, opportunities and future perspectives. *Environmental Technology and Innovation*, 18, 100672. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100672>
- Pattanapitpaisal, P., Brown, N. L., & Macaskie, L. E. (2001). Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 257–261. <https://doi.org/10.1007/s002530100758>
- Patterson, R. R., Fendorf, S., & Fendorf, M. (1997). Reduction of hexavalent chromium by amorphous iron sulfide. *Environmental Science and Technology*, 31(7). <https://doi.org/10.1021/es960836v>
- Paul, O., Jasu, A., Lahiri, D., Nag, M., & Ray, R. R. (2021). In Situ and Ex Situ Bioremediation of Heavy Metals: the Present Scenario. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, 29(4), 454–469. <https://doi.org/10.3846/jeelm.2021.15447>
- Pei, Y., Tao, C., Ling, Z., Yu, Z., Ji, J., Khan, A., Mamtimin, T., Liu, P., & Li, X. (2020). Exploring novel Cr(VI) remediation genes for Cr(VI)-contaminated industrial wastewater treatment by comparative metatranscriptomics and metagenomics. *Science of the Total Environment*, 742, 140435. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140435>
- Peng, H., Guo, J., Li, G., Cheng, Q., Zhou, Y., Liu, Z., & Tao, C. (2019). Highly efficient oxidation of chromium (III) with hydrogen peroxide in alkaline medium. *Water Science and Technology*, 79(2), 366–374. <https://doi.org/10.2166/wst.2019.056>

- Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Schönhuber, W., & Amann, R. (2001). Fluorescence in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiology*, 30, 207–226. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(01\)30046-6](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(01)30046-6)
- Perraki, M., Vasileiou, E., & Bartzas, G. (2021). Tracing the origin of chromium in groundwater: Current and new perspectives. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, 22, 100267. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2021.100267>
- Pettine, M. (2000). Redox Processes of Chromium in Sea Water. *Chemical Processes in Marine Environments, III*, 281–296. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04207-6_16
- Pettine, M., Millero, F. J., & Passino, R. (1994). Reduction of chromium (VI) with hydrogen sulfide in NaCl media. *Marine Chemistry*, 46(4), 335–344. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0304-4203(94)90030-2)
- Philip, L., Iyengar, L., & Venkobachar, C. (1998). Cr(VI) Reduction by *Bacillus coagulans* Isolated from Contaminated Soils. *Journal of Environmental Engineering*, 124(12), 1165–1170. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)0733-9372\(1998\)124:12\(1165\)](https://doi.org/10.1061/(asce)0733-9372(1998)124:12(1165))
- Plestenjak, E., Kraigher, B., Leskovec, S., Mandic Mulec, I., Marković, S., Ščančar, J., & Milačič, R. (2022). Reduction of hexavalent chromium using bacterial isolates and a microbial community enriched from tannery effluent. *Scientific Reports*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24797-z>
- Poopal, A. C., & Laxman, R. S. (2009). Studies on biological reduction of chromate by *Streptomyces griseus*. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.126>
- Prabhakaran, D. C., & Subramanian, S. (2017). Studies on the Bioremediation of Chromium from Aqueous Solutions Using *C. paurometabolum*. *Transactions of the Indian Institute of Metals*, 70(2), 497–509. <https://doi.org/10.1007/s12666-016-1009-2>
- Pradhan, D., Sukla, L. B., Sawyer, M., & Rahman, P. K. S. M. (2017). Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 55, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.06.040>
- Prasad, S., Yadav, K. K., Kumar, S., Gupta, N., Cabral-Pinto, M. M. S., Rezanian, S., Radwan, N., & Alam, J. (2021). Chromium contamination and effect on environmental health and its remediation: A sustainable approaches. *Journal of Environmental Management*, 285, 112174. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112174>

- Puls, R. W., Blowes, D. W., & Gillham, R. W. (1999). Long-term performance monitoring for a permeable reactive barrier at the U.S. Coast Guard Support Center, Elizabeth City, North Carolina. *Journal of Hazardous Materials*, 68(1–2), 109–124. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(99\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(99)00034-5)
- Pushkar, B., Sevak, P., Parab, S., & Nilkanth, N. (2021). Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 287, 112279. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112279>
- Qasem, N. A. A., Mohammed, R. H., & Lawal, D. U. (2021). Removal of heavy metal ions from wastewater: a comprehensive and critical review. *Npj Clean Water*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41545-021-00127-0>
- Qian, J., Wei, L., Liu, R., Jiang, F., Hao, X., & Chen, G. H. (2016). An exploratory study on the pathways of Cr (VI) reduction in sulfate-reducing Up-flow Anaerobic Sludge Bed (UASB) reactor. *Scientific Reports*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep23694>
- Qin, G., McGuire, M. J., Blute, N. K., Seidel, C., & Fong, L. (2005). Hexavalent chromium removal by reduction with ferrous sulfate, coagulation, and filtration: A pilot-scale study. *Environmental Science and Technology*, 39(16), 6321–6327. <https://doi.org/10.1021/es050486p>
- Qu, W., Suo, L., Liu, R., Liu, M., Zhao, Y., Xia, L., Fan, Y., Zhang, Q., & Gao, Z. (2022). Influence of Temperature on Denitrification and Microbial Community Structure and Diversity: A Laboratory Study on Nitrate Removal from Groundwater. *Water*, 14(3), 1–15. <https://doi.org/10.3390/w14030436>
- Racek, J., Trefil, L., Rajdl, D., Mudrová, V., Hunter, D., & Senft, V. (2006). Influence of Chromium-Enriched Yeast on Blood Glucose and Insulin Variables, Blood Lipids, and Markers of Oxidative Stress in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Biological Trace Element Research*, 109(3), 215–230. <https://doi.org/10.1385/BTER:109:3:215>
- Rahman, Z., & Thomas, L. (2021). Chemical-Assisted Microbially Mediated Chromium (Cr) (VI) Reduction Under the Influence of Various Electron Donors, Redox Mediators, and Other Additives: An Outlook on Enhanced Cr(VI) Removal. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.619766>
- Rai, D., Eary, L. E., & Zachara, J. M. (1989). Environmental chemistry of chromium. *The Science of the Total Environment*, 86, 15–23.
- Rajapaksha, A. U., Selvasembian, R., Ashiq, A., Gunarathne, V., Ekanayake, A., Perera, V. O., Wijesekera, H., Mia, S., Ahmad, M., Vithanage, M., & Ok, Y. S. (2022). A systematic

- review on adsorptive removal of hexavalent chromium from aqueous solutions: Recent advances. *Science of the Total Environment*, 809, 152055. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152055>
- Ramachandran, G., Chackaravarthi, G., Rajivgandhi, G. N., Quero, F., Maruthupandy, M., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., & Li, W. J. (2022). Biosorption and adsorption isotherm of chromium (VI) ions in aqueous solution using soil bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*. *Environmental Research*, 212(Part B), 113310. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113310>
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals*, 21(3), 321–332. <https://doi.org/10.1007/s10534-007-9121-8>
- Raskin, L., Stromley, J. M., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1232–1240. <https://doi.org/10.1128/aem.60.4.1232-1240.1994>
- Ray, R. R. (2016). Adverse hematological effects of hexavalent chromium: An overview. *Interdisciplinary Toxicology*, 9(2), 55–65. <https://doi.org/10.1515/intox-2016-0007>
- Reid, D. D. (2017). Guidelines for Canadian Drinking Water Quality, Committee on Health and the Environment, *Journal of Guidelines for Canadian Drinking Water Quality*. <https://www.healthcanada.gc.ca/waterquality>
- Rengaraj, S., Joo, C. K., Kim, Y., & Yi, J. (2003). Kinetics of removal of chromium from water and electronic process wastewater by ion exchange resins: 1200H, 1500H and IRN97H. *Journal of Hazardous Materials*, 102(2–3), 257–275. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(03)00209-7)
- Rivero-Huguet, M., & Marshall, W. D. (2009). Influence of various organic molecules on the reduction of hexavalent chromium mediated by zero-valent iron. *Chemosphere*, 76(9), 1240–1248. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.040>
- Robertson, F. N. (1975). Hexavalent Chromium in the Ground Water in Paradise Valley, Arizona. *Groundwater*, 13(6), 516–527. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.1975.tb03621.x>
- Sacchi, E., Bergamini, M., Lazzari, E., Musacchio, A., Mor, J. R., & Pugliaro, E. (2021). Natural background levels of potentially toxic elements in groundwater from a former asbestos mine in Serpentinite (Balangero, north Italy). *Water*, 13(5).

<https://doi.org/10.3390/w13050735>

- Sadeghalvad, B., Khorshidi, N., Azadmehr, A., & Sillanpää, M. (2021). Sorption, mechanism, and behavior of sulfate on various adsorbents: A critical review. *Chemosphere*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128064>
- Saha, R., Nandi, R., & Saha, B. (2011). Sources and toxicity of hexavalent chromium. *Journal of Coordination Chemistry*, 64(10), 1782–1806. <https://doi.org/10.1080/00958972.2011.583646>
- Şahin, Y., & Öztürk, A. (2005). Biosorption of chromium(VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1895–1901. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.002>
- Sahinkaya, E., & Kilic, A. (2014). Heterotrophic and elemental-sulfur-based autotrophic denitrification processes for simultaneous nitrate and Cr(VI) reduction. *Water Research*, 50, 278–286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.12.005>
- Samborska, K., Halas, S., & Bottrell, S. H. (2013). Sources and impact of sulphate on groundwaters of Triassic carbonate aquifers, Upper Silesia, Poland. *Journal of Hydrology*, 486, 136–150. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.01.017>
- Sathishkumar, K., Murugan, K., Benelli, G., Higuchi, A., & Rajasekar, A. (2017). Bioreduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas stutzeri* L1 and *Acinetobacter baumannii* L2. *Annals of Microbiology*, 67(1), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1240-4>
- Shah, V., & Daverey, A. (2020). Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology and Innovation*, 18, 100774. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774>
- Shahedi, A., Darban, A. K., Taghipour, F., & Jamshidi-Zanjani, A. (2020). A review on industrial wastewater treatment via electrocoagulation processes. *Current Opinion in Electrochemistry*, 22, 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.05.009>
- Shanker, A. K. (2019). Chromium: Environmental pollution, health effects and mode of action. *Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition)*, Elsevier, 624–633. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11575-1>
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., & Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31(5), 739–753. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>

- Sharma, P., Singh, S. P., Parakh, S. K., & Tong, Y. W. (2022). Health hazards of hexavalent chromium (Cr (VI)) and its microbial reduction. *Bioengineered*, 13(3), 4923–4938. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2037273>
- Shashidhar, T., Philip, L., & Bhallamudi, S. M. (2006). Bench-scale column experiments to study the containment of Cr(VI) in confined aquifers by bio-transformation. *Journal of Hazardous Materials*, 131(1–3), 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.09.034>
- Sheikhhossein, F., Amini, M. R., Shahinfar, H., Djafari, F., Safabakhsh, M., & Shab-Bidar, S. (2020). Effects of chromium supplementation on inflammatory biomarkers: A systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials. *European Journal of Integrative Medicine*, 37(44), 101147. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101147>
- Shen, X., Dai, M., Yang, J., Sun, L., Tan, X., Peng, C., Ali, I., & Naz, I. (2022). A critical review on the phytoremediation of heavy metals from environment: Performance and challenges. *Chemosphere*, 291, 132979. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132979>
- Shugaba, A., Wuyep, P. A., Nok, A. J., Ameh, D. A., & Lori, J. A. (2010). Bioremediation of hexavalent chromium and tannic acid in synthetic tannery wastewater using free and calcium alginate-immobilized spores and mycelia of *Aspergillus niger* and *Aspergillus parasiticus*. *Bioremediation Journal*, 14(3), 142–149. <https://doi.org/10.1080/10889868.2010.495661>
- Shupack, S. I. (1991). The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environmental Health Perspectives*, 92(1), 7–11. <https://doi.org/10.1289/ehp.91927>
- Siegel, D. I. (2014). On the effectiveness of remediating groundwater contamination: Waiting for the black swan. *Groundwater*, 52(4), 488–490. <https://doi.org/10.1111/gwat.12180>
- Šimůnek, J., Jarvis, N. J., Van Genuchten, M. T., & Gärdenäs, A. (2003). Review and comparison of models for describing non-equilibrium and preferential flow and transport in the vadose zone. *Journal of Hydrology*, 272(1–4), 14–35. [https://doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00252-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00252-4)
- Singapore National Water Agency (2019). Singapore Drinking Water Quality.
- Singh, R., Dong, H., Liu, D., Zhao, L., Marts, A. R., Farquhar, E., Tierney, D. L., Almquist, C. B., & Briggs, B. R. (2015). Reduction of hexavalent chromium by the thermophilic methanogen *Methanothermobacter thermautotrophicus*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 148, 442–456. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2014.10.012.Reduction>

- Sivakumar, D. (2016). Biosorption of hexavalent chromium in a tannery industry wastewater using fungi species. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 2(2), 105–124. <https://doi.org/10.7508/gjesm.2016.02.002>
- Sjekhawat, K. C. S. J. B. (2015). Chromium toxicity and its health hazards. *International Journal Of Advanced Research*, 3(7), 167–172.
- Smith, R. L., Kent, D. B., Repert, D. A., & Böhlke, J. K. (2017). Anoxic nitrate reduction coupled with iron oxidation and attenuation of dissolved arsenic and phosphate in a sand and gravel aquifer. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 196, 102–120. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2016.09.025>
- Sobol, Z., & Schiestl, R. H. (2012). Intracellular and Extracellular Factors Influencing Cr(VI) and Cr(III) Genotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53, 94–100. <https://doi.org/10.1002/em>
- Somasundaram, V., Philip, L., & Bhallamudi, S. M. (2009). Experimental and mathematical modeling studies on Cr(VI) reduction by CRB, SRB and IRB, individually and in combination. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2–3), 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.043>
- Somasundaram, V., Philip, L., & Bhallamudi, S. M. (2011). Laboratory scale column studies on transport and biotransformation of Cr(VI) through porous media in presence of CRB, SRB and IRB. *Chemical Engineering Journal*, 171(2), 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.04.032>
- Song, X., Wang, Q., Jin, P., Chen, X., Tang, S., Wei, C., Li, K., Ding, X., Tang, Z., & Fu, H. (2021). Enhanced biostimulation coupled with a dynamic groundwater recirculation system for Cr(VI) removal from groundwater: A field-scale study. *Science of the Total Environment*, 772, 145495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145495>
- Soni, S. K., Singh, R., Awasthi, A., Singh, M., & Kalra, A. (2013). In vitro Cr(VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(3), 1661–1674. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1178-4>
- Speight, J. (2020). Remediation technologies. In *Natural Water Remediation*, 8, 263–303. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803810-9.00008-5>
- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W., & Garg, S. K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*, 48(4), 427–435. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00089-9)

- Stahl, D.A. and Amann, R. (1991). Development and application of nucleic acid probe. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 1st ed., Stackebrandt, E., Goodfellow, M., Eds., Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 205-248
- Stambulska, U. Y., Bayliak, M. M., & Lushchak, V. I. (2018). Chromium(VI) toxicity in legume plants: Modulation effects of rhizobial symbiosis. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8031213>
- Stroo, H.F., Leeson, A. & Ward, C. H. (2012). *Bioaugmentation for Groundwater Remediation*. Springer New York.
- Su, C., & Ludwig, R. D. (2005). Treatment of hexavalent chromium in chromite ore processing solid waste using a mixed reductant solution of ferrous sulfate and sodium dithionite. *Environmental Science and Technology*, 39(16), 6208–6216. <https://doi.org/10.1021/es050185f>
- Sun, Y., Lan, J., Du, Y., Guo, L., Du, D., Chen, S., Ye, H., & Zhang, T. C. (2020). Chromium(VI) bioreduction and removal by *Enterobacter* sp. SL grown with waste molasses as carbon source: Impact of operational conditions. *Bioresource Technology*, 302, 121974. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121974>
- Sun, Y., Lan, J., Du, Y., Li, Z., Liao, X., Du, D., Ye, H., Zhang, T. C., & Chen, S. (2020). Efficient removal of heavy metals by synergistic actions of microorganisms and waste molasses. *Bioresource Technology*, 302, 122797. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122797>
- Tan, H., Wang, C., Zeng, G., Luo, Y., Li, H., & Xu, H. (2020). Bioreduction and biosorption of Cr(VI) by a novel *Bacillus* sp. CRB-B1 strain. *Journal of Hazardous Materials*, 386, 121628. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121628>
- Tandoi, V., Di Pinto, A. C., Majone, M., & Tomei, M. C. (1995). Reductive Dechlorination of PCE (Perchloroethene) by an anaerobic bacterial consortium. *Med. Fac. Landbouww Univ Gent*, 60(4b), 2527–2534.
- Tandoi, Valter, DiStefano, T. D., Bowser, P. A., Gossett, J. M., & Zinder, S. H. (1994). Reductive Dehalogenation of Chlorinated Ethenes and Halogenated Ethanes by a High-Rate Anaerobic Enrichment Culture. *Environmental Science and Technology*, 28(5), 973–979. <https://doi.org/10.1021/es00054a033>
- Tang, G., Watson, D. B., Wu, W. M., Schadt, C. W., Parker, J. C., & Brooks, S. C. (2013). U(VI) bioreduction with emulsified vegetable oil as the electron donor -model application to a field test. *Environmental Science and Technology*, 47(7), 3218–3225.

<https://doi.org/10.1021/es304643h>

- Tang, X., Huang, Y., Li, Y., Wang, L., Pei, X., Zhou, D., He, P., & Hughes, S. S. (2021). Study on detoxification and removal mechanisms of hexavalent chromium by microorganisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111699. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111699>
- Tao, Y. (2019). Progress in chromium research and related diseases. *AIP Conference Proceedings*, 2154. <https://doi.org/10.1063/1.5125399>
- Tebo, B. M., & Obraztsova, A. Y. (1998). Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(VI), Mn(IV), and Fe(III) as electron acceptors. *FEMS Microbiology Letters*, 162(1), 193–198. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00122-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00122-0)
- Telfeyan, K., Reimus, P. W., & Migdisov, A. A. (2021). Experiments to determine the suitability of sodium dithionite treatment for a Cr(VI) groundwater plume in a deep aquifer of the United States Southwest. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 104913. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104913>
- Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., & Madamwar, D. (2006). Hexavalent chromium reduction by *Providencia* sp. *Process Biochemistry*, 41(6), 1332–1337. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.006>
- Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y., & Madamwar, D. (2007). Reduction of chromate by cell-free extract of *Brucella* sp. isolated from Cr(VI) contaminated sites. *Bioresource Technology*, 98(8), 1541–1547. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.011>
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Management*, 146, 383–399. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>
- Tokunaga, T. K., Wan, J., Firestone, M. K., Hazen, T. C., Olson, K. R., Herman, D. J., Sutton, S. R., & Lanzirotti, A. (2003). Bioremediation and Biodegradation In Situ Reduction of Chromium(VI) in Heavily Contaminated Soils through Organic Carbon Amendment. *Journal of Environmental Quality*, 32(5), 1641–1649.
- Torres-Martínez, J. A., Mora, A., Knappett, P. S. K., Ornelas-Soto, N., & Mahlknecht, J. (2020). Tracking nitrate and sulfate sources in groundwater of an urbanized valley using a multi-tracer approach combined with a Bayesian isotope mixing model. *Water Research*, 182, 115962. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115962>

- Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S. & Poos, M. (2001). Dietary Reference Intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. *Journal of the American Dietetic Association*, 101(3), 294–301.
- Tumolo, M., Ancona, V., De Paola, D., Losacco, D., Campanale, C., Massarelli, C., & Uricchio, V. F. (2020). Chromium Pollution in European Water, Sources, Health Risk, and Remediation Strategies: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), 5438. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155438>
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (2013). Superfund remedy report: 14th edition - Solid waste and emergency response. www.epa.gov/superfund
- Upadhyay, N., Vishwakarma, K., Singh, J., Mishra, M., Kumar, V., Rani, R., Mishra, R. K., Chauhan, D. K., Tripathi, D. K., & Sharma, S. (2017). Tolerance and reduction of chromium(VI) by *Bacillus* sp. MNU16 isolated from contaminated coal mining soil. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00778>
- US EPA. (2000). In Situ Treatment of Soil and Groundwater Contaminated with Chromium
- US EPA. (1998). Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3300 Soil Biodegradation.
- Usman, M., Byrne, J. M., Chaudhary, A., Orsetti, S., Hanna, K., Ruby, C., Kappler, A., & Haderlein, S. B. (2018). Magnetite and Green Rust: Synthesis, Properties, and Environmental Applications of Mixed-Valent Iron Minerals. *Chemical Reviews*, 118(7), 3251–3304. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00224>
- Vaiopoulou, E., & Gikas, P. (2020). Regulations for chromium emissions to the aquatic environment in Europe and elsewhere. *Chemosphere*, 254, 126876. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126876>
- Vankar, P. S., & Bajpai, D. (2008). Phyto-remediation of chrome-VI of tannery effluent by *Trichoderma* species. *Desalination*, 222(1–3), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.168>
- Varadharajan, C., Beller, H. R., Bill, M., Brodie, E. L., Conrad, M. E., Han, R., Irwin, C., Larsen, J. T., Lim, H. C., Molins, S., Steefel, C. I., Van Hise, A., Yang, L., & Nico, P. S. (2017). Reoxidation of Chromium(III) Products Formed under Different Biogeochemical Regimes. *Environmental Science and Technology*, 51(9), 4918–4927. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06044>

- Vasileiou, E., Papazotos, P., Dimitrakopoulos, D., & Perraki, M. (2019). Expounding the origin of chromium in groundwater of the Sarigkiol basin, Western Macedonia, Greece: a cohesive statistical approach and hydrochemical study. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(8), 509. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7655-1>
- Vasudevan, S., Lakshmi, J., & Sozhan, G. (2011). Studies on the Al-Zn-In-alloy as anode material for the removal of chromium from drinking water in electrocoagulation process. *Desalination*, 275(1–3), 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.03.011>
- Vavilin, V. A., Vasiliev, V. B., Rytov, S. V., & Ponomarev, A. V. (1994). Self-oscillating coexistence of methanogens and sulfate-reducers under hydrogen sulfide inhibition and the pH-regulating effect. *Bioresource Technology*, 49(2), 105–119. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90074-4)
- Vithanage, M., Kumarathilaka, P., Oze, C., Karunatilake, S., Seneviratne, M., Hseu, Z. Y., Gunarathne, V., Dassanayake, M., Ok, Y. S., & Rinklebe, J. (2019). Occurrence and cycling of trace elements in ultramafic soils and their impacts on human health: A critical review. *Environment International*, 131, 104974. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104974>
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., & Giovannetti, L. (2014). Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 633–659. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12051>
- Wang, B., Gao, C., Li, X., Zhang, Y., Qu, T., DU, X., & Zheng, J. (2022). Remediation of groundwater pollution by in situ reactive zone: A review. *Process Safety and Environmental Protection*, 168, 858–871. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.10.046>
- Wang, C. C., Du, X. D., Li, J., Guo, X. X., Wang, P., & Zhang, J. (2016). Photocatalytic Cr(VI) reduction in metal-organic frameworks: A mini-review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 193, 198–216. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.04.030>
- Wang, P. C., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K., & Ohtake, H. (1989). Isolation and characterization of an Enterobacter cloacae strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(7), 1665–1669. <https://doi.org/10.1128/aem.55.7.1665-1669.1989>
- Wang, T., Qian, T., Huo, L., Li, Y., & Zhao, D. (2019). Immobilization of hexavalent chromium in soil and groundwater using synthetic pyrite particles. *Environmental Pollution*, 255, 112992. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112992>
- Wang, X., Li, H., Huang, H., Luo, H., Luo, S., Jiang, L., Feng, S., & Xu, H. (2022).

- Investigation on mechanism of Hexavalent chromium bioreduction by *Escherichia* sp. TH-1 and the stability of reduction products. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107231. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107231>
- Wang, Y. T., & Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 159–163. <https://doi.org/10.1007/BF01569898>
- Wang, Yafei, Su, H., Gu, Y., Song, X., & Zhao, J. (2017). Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update. *OncoTargets and Therapy*, Volume 10, 4065–4079. <https://doi.org/10.2147/OTT.S139262>
- Wang, Y., Liu, Y., Zheng, K., Xie, L., Ren, Q., Yang, Z., Liao, Q., Wang, Y., & Chen, R. (2021). The role of extracellular polymeric substances (EPS) in the reduction of Cr(VI) by *Pannonibacter phragmitetus* BB. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106163. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106163>
- Wang, Z., Gao, M., Wang, S., Xin, Y., Ma, D., She, Z., Wang, Z., Chang, Q. & Ren, Y. (2014). Effect of hexavalent chromium on extracellular polymeric substances of granular sludge from an aerobic granular sequencing batch reactor. *Chemical Engineering Journal*, 251, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.04.078>
- Wani, P. A., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2008). Chromium-reducing and plant growth-promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium-amended soil. *Biotechnology Letters*, 30(1), 159–163. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9515-2>
- Wani, P. A., Wahid, S., Rafi, N., & Wani, U. (2020). Role of NADH-dependent chromium reductases, exopolysaccharides and antioxidants by *Paenibacillus thiaminolyticus* PS 5 against damage induced by reactive oxygen species. *Chemistry and Ecology*, 36(7), 663–684. <https://doi.org/10.1080/02757540.2020.1770736>
- Wani, R., Kodam, K. M., Gawai, K. R., & Dhakephalkar, P. K. (2007). Chromate reduction by *Burkholderia cepacia* MCMB-821, isolated from the pristine habitat of alkaline crater lake. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(3), 627–632. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0862-7>
- Wei, M., Li, W., Tang, J., Barnie, S., Zhang, J., & Chen, H. (2021). New insight into mechanism of Cr(VI) migration and transformation in typical soils of chromite ore processing residue (COPR) contaminated sites. *Environmental Earth Sciences*, 80(19), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12665-021-09986-9>
- Wei, X. Z., Gan, Z. Q., Shen, Y. J., Qiu, Z. L., Fang, L. F., & Zhu, B. K. (2019). Negatively-charged nanofiltration membrane and its hexavalent chromium removal performance.

Journal of Colloid and Interface Science, 553, 475–483.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.06.051>

Wen, C., Sheng, H., Ren, L., Dong, Y., & Dong, J. (2017). Study on the removal of hexavalent chromium from contaminated groundwater using emulsified vegetable oil. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.05.004>

WHO (2020). Chromium in drinking-water: A background document for development of World Health Organisation guidelines for drinking water. *The World Health Organization*, Geneva, Switzerland. <http://apps.who.int/bookorders>.

WHO (2004). Guidelines for Drinking Water, 3rd ed. *The World Health Organization*, Geneva, Switzerland.

Widdel, F. (1988). Microbiology and Ecology of Sulfate-and Sulfur-reducing bacteria. In *Biology of Anaerobic Microorganisms*, A.J.B.Zehnder, John Wiley & Sons, New York, 469-585.

Wielinga, B., Mizuba, M. M., Hansel, C. M., & Fendorf, S. (2001). Iron promoted reduction of chromate by dissimilatory iron-reducing bacteria. *Environmental Science and Technology*, 35(3), 522–527. <https://doi.org/10.1021/es001457b>

Wilbur, S., Abadin, H., Fay, M., & Al., E. (2012). Toxicological Profile for Chromium. In *Toxicological Profile for Chromium*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). https://doi.org/10.1201/9781420061888_ch63

Wu, J., Zhang, H., He, P. J., Yao, Q., & Shao, L. M. (2010). Cr(VI) removal from aqueous solution by dried activated sludge biomass. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1–3), 697–703. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.088>

Xia, S., Song, Z., Jeyakumar, P., Shaheen, S. M., Rinklebe, J., Ok, Y. S., Bolan, N., & Wang, H. (2019). A critical review on bioremediation technologies for Cr(VI)-contaminated soils and wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(12), 1027–1078. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1564526>

Xiao, W., Zhang, Y., Li, T., Chen, B., Wang, H., He, Z., & Yang, X. (2012). Reduction Kinetics of Hexavalent Chromium in Soils and Its Correlation with Soil Properties. *Journal of Environmental Quality*, 41(5), 1452–1458. <https://doi.org/10.2134/jeq2012.0061>

Xiao, X., Deng, Y., Xue, J., & Gao, Y. (2021). Adsorption of chromium by functionalized metal organic frameworks from aqueous solution. *Environmental Technology (United*

- Kingdom*), 42(12), 1930–1942. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1683618>
- Xing, X., Alharbi, N. S., Ren, X., & Chen, C. (2022). A comprehensive review on emerging natural and tailored materials for chromium-contaminated water treatment and environmental remediation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(2), 107325. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107325>
- Xu, F., Ma, T., Shi, L., & Zhang, J. (2014). Bioreduction of Cr(VI) by *Bacillus* sp. QH-1 isolated from soil under chromium-containing slag heap in high altitude area. *Annals of Microbiology*, 64(3), 1073–1080. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0746-2>
- Xu, L., Luo, M., Li, W., Wei, X., Xie, K., Liu, L., Jiang, C., & Liu, H. (2011). Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2–3), 1169–1176. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.028>
- Xu, W. H., Jian, H., Liu, Y. G., Zeng, G. M., Li, X., & Zhang, W. (2015). Bioreduction of Chromate by an Isolated *Bacillus anthracis* Cr-4 with Soluble Cr(III) Product. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(3). <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2356-z>
- Xu, X. R., Li, H. Bin, Li, X. Y., & Gu, J. D. (2004). Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid in aqueous solutions. *Chemosphere*, 57(7), 609–613. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.07.031>
- Yaashikaa, P. R., Senthil Kumar, P., Mohan Babu, V. P., Kanaka Durga, R., Manivasagan, V., Saranya, K., & Saravanan, A. (2019). Modelling on the removal of Cr(VI) ions from aquatic system using mixed biosorbent (*Pseudomonas stutzeri* and acid treated Banyan tree bark). *Journal of Molecular Liquids*, 276, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.12.004>
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Mohd Yusof, M. L., Ghosh, S., & Chen, Z. (2020). Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00359>
- Yan, J., Ye, W., Liang, X., Wang, S., Xie, J., Zhong, K., Bao, M., Yang, J., Wen, H., Li, S., Chen, Y., Gu, J. D., & Zhang, H. (2020). Enhanced reduction of sulfate and chromium under sulfate-reducing condition by synergism between extracellular polymeric substances and graphene oxide. *Environmental Research*, 183, 109157. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109157>
- Yang, C., Cheng, Y., Ma, X., Zhu, Y., Holman, H. Y., Lin, Z., & Wang, C. (2007). Surface-mediated chromate-resistant mechanism of *Enterobacter Cloacae* bacteria investigated by

- atomic force microscopy. *Langmuir*, 23(8), 4480–4485. <https://doi.org/10.1021/la062925j>
- Yang, X., Liu, P., Yao, M., Sun, H., Liu, R., Xie, J., & Zhao, Y. (2021). Mechanism and enhancement of Cr(VI) contaminated groundwater remediation by molasses. *Science of the Total Environment*, 780(2519), 146580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146580>
- Yang, X., Qin, X., Xie, J., Li, X., Xu, H., & Zhao, Y. (2022). Study on the effect of Cr(VI) removal by stimulating indigenous microorganisms using molasses. *Chemosphere*, 308(2519). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136229>
- Yang, Y., Ma, H., Chen, X., Zhu, C., & Li, X. (2020). Effect of incineration temperature on chromium speciation in real chromium-rich tannery sludge under air atmosphere. *Environmental Research*, 183, 109159. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109159>
- Yang, Z., Zhang, X., Jiang, Z., Li, Q., Huang, P., Zheng, C., Liao, Q., & Yang, W. (2021). Reductive materials for remediation of hexavalent chromium contaminated soil – A review. *Science of the Total Environment*, 773. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145654>
- Yu, H., Zhu, H., Zhang, D., & Wang, X. (2023). Understanding and eliminating the reductant interference on Chromium VI measurement with USEPA method 3060A. *Science of the Total Environment*, 879, 163192. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163192>
- Yu, X., Jiang, Y., Huang, H., Shi, J., Wu, K., Zhang, P., Lv, J., Li, H., He, H., Liu, P., & Li, X. (2016). Simultaneous aerobic denitrification and Cr(VI) reduction by *Pseudomonas brassicacearum* LZ-4 in wastewater. *Bioresour. Technol.*, 221, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.037>
- Yurkow, E. J., Hong, J., Min, S., & Wang, S. (2002). Photochemical reduction of hexavalent chromium in glycerol-containing solutions. *Environmental Pollution*, 117(1), 1–3. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00297-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00297-4)
- Yusuff, A. S., Popoola, L. T., & Igbafe, A. I. (2022). Response surface modeling and optimization of hexavalent chromium adsorption onto eucalyptus tree bark-derived pristine and chemically-modified biochar. *Chemical Engineering Research and Design*, 182, 592–603. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2022.04.007>
- Zeikus, J. G. (1977). The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(2), 514–541. <https://doi.org/10.1128/mmbr.41.2.514-541.1977>

- Zetic, V. G., Stehlik-Tomas, V., Grba, S., Lutitsky, L., & Kozlek, D. (2001). Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. *Journal of Biosciences*, 26(2), 217–223. <https://doi.org/10.1007/BF02703645>
- Zhang, Hai, Xu, H. Bin, Zhang, X., Zhang, Y., & Zhang, Y. (2014). Pressure oxidative leaching of Indian chromite ore in concentrated NaOH solution. *Hydrometallurgy*, 142, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2013.10.016>
- Zhang, Huining, Liu, L., Chang, Q., Wang, H., & Yang, K. (2015). Biosorption of Cr(VI) ions from aqueous solutions by a newly isolated bosea sp. Strain zer-1 from soil samples of a refuse processing plant. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(6), 399–408. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0719>
- Zhang, K., Li, N., Liao, P., Jin, Y., Li, Q., Gan, M., Chen, Y., He, P., Chen, F., Peng, M., & Zhu, J. (2021). Conductive property of secondary minerals triggered Cr(VI) bioreduction by dissimilatory iron reducing bacteria. *Environmental Pollution*, 286. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117227>
- Zhang, T., Wang, T., Wang, W., Liu, B., Li, W., & Liu, Y. (2020). Reduction and stabilization of Cr(VI) in soil by using calcium polysulfide: Catalysis of natural iron oxides. *Environmental Research*, 190, 109992. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109992>
- Zhang, X., Cui, L., Chen, B., Xiong, Q., Zhan, Y., Ye, J., & Yin, Q. (2021). Effect of chromium supplementation on hs-CRP, TNF- α and IL-6 as risk factor for cardiovascular diseases: A meta-analysis of randomized-controlled trials. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 42, 101291. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2020.101291>
- Zheng, X., Yuan, D., Li, Y., & Liu, C. (2019). Exploration of the reduction mechanism of Cr(VI) in anaerobic hydrogen fermenter. *Environmental Pollution*, 254, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113042>
- Zhong, J., Yin, W., Li, Y., Li, P., Wu, J., Jiang, G., Gu, J., & Liang, H. (2017). Column study of enhanced Cr(VI) removal and longevity by coupled abiotic and biotic processes using Fe⁰ and mixed anaerobic culture. *Water Research*, 122, 536–544. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.043>
- Zhong, L., Lai, C. Y., Shi, L. D., Wang, K. Di, Dai, Y. J., Liu, Y. W., Ma, F., Rittmann, B. E., Zheng, P., & Zhao, H. P. (2017). Nitrate effects on chromate reduction in a methane-based biofilm. *Water Research*, 115, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.003>
- Zhu, I., & Getting, T. (2012). A review of nitrate reduction using inorganic materials. *Environmental Technology Reviews*, 1(1), 46–58.

<https://doi.org/10.1080/09593330.2012.706646>

Zhu, W., Chai, L., Ma, Z., Wang, Y., Xiao, H., & Zhao, K. (2008). Anaerobic reduction of hexavalent chromium by bacterial cells of *Achromobacter* sp. Strain Ch1. *Microbiological Research*, 163(6), 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.09.008>

Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X., & Matis, K. A. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry*, 39(8), 909–916. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00200-0)

Αντωνίου, Κ. (2019). Διερεύνηση της επίδρασης των γεωχημικών παραμέτρων του εδάφους στην αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση του τριχλωροαιθενίου. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών.

Κοινή Υπουργική Απόφαση Η.Π. 51354/2641/Ε103/2010 (2010). Καθορισμός Προτύπων Ποιότητας Περιβάλλοντος (ΠΠΠ) για τις συγκεντρώσεις ορισμένων ρύπων και ουσιών προτεραιότητας στα επιφανειακά ύδατα. ΦΕΚ 1909/Β/8-12-2010.

Κοινή Υπουργική Απόφαση Γ1(δ)/ΓΠ οικ. 67322/217 (2017). Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης. ΦΕΚ 3282/τΒ/19-09-2017.

Μαρνέρη, Μ. (2010). Ανάπτυξη και εφαρμογή της μοριακής τεχνικής Fish με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό και τη διερεύνηση της ενεργότητας νηματοειδών βακτηρίων σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων με απομάκρυνση θρεπτικών. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών.

Οδηγία 98/83/ΕΚ (1998). Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης. Ευρωπαϊκό Συμβούλιο.

Οδηγία 2000/60/ΕΚ (2000). Υιοθέτηση ενός ευρωπαϊκού μητρώου ρυπογόνων εκπομπών σχετικά με την ολοκληρωμένη πρόληψη και έλεγχο της ρύπανσης. Ευρωπαϊκή Επιτροπή.

Παναγιωτάκης, Η. (2010). Επίτοπου βιολογική εξυγίανση υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένα αιθυλένια: Επίδραση δότη ηλεκτρονίων και θεικών. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών.

Πανούση, Ε. (2018). Διερεύνηση βιολογικών μεθόδων απομάκρυνσης ολικού και εξασθενούς χρωμίου από τα υπόγεια ύδατα. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών.

Πανταζίδου, Μ. (2019). Σημειώσεις μαθήματος «Αποκατάσταση ρυπασμένων χώρων» Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, ΔΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων.

Ιστότοποι

<https://www.elinyae.gr/>

<https://eur-lex.europa.eu>

<https://www.icdacr.com/>

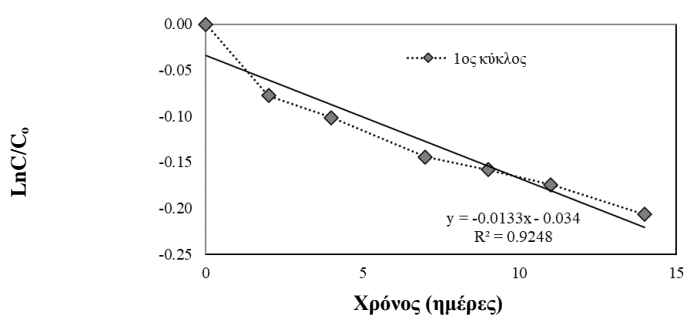
<https://www.mhlw.go.jp>

<https://www.waterquality.gov.au/guidelines>

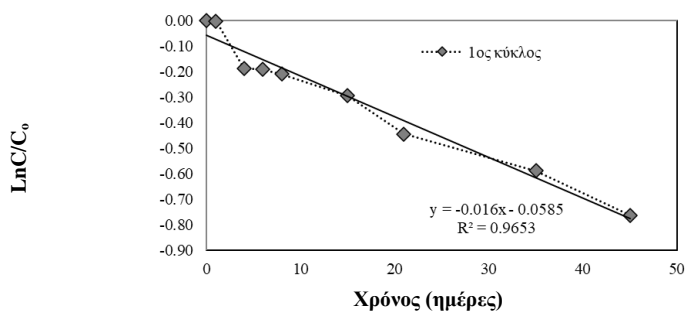
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Α. Γραφήματα πειραμάτων στήλης.

Α.1 Γραφήματα προσδιορισμού σταθεράς k διαφορετικών περιπτώσεων αναγωγής Cr(VI) στα πειράματα της Στήλης Ι

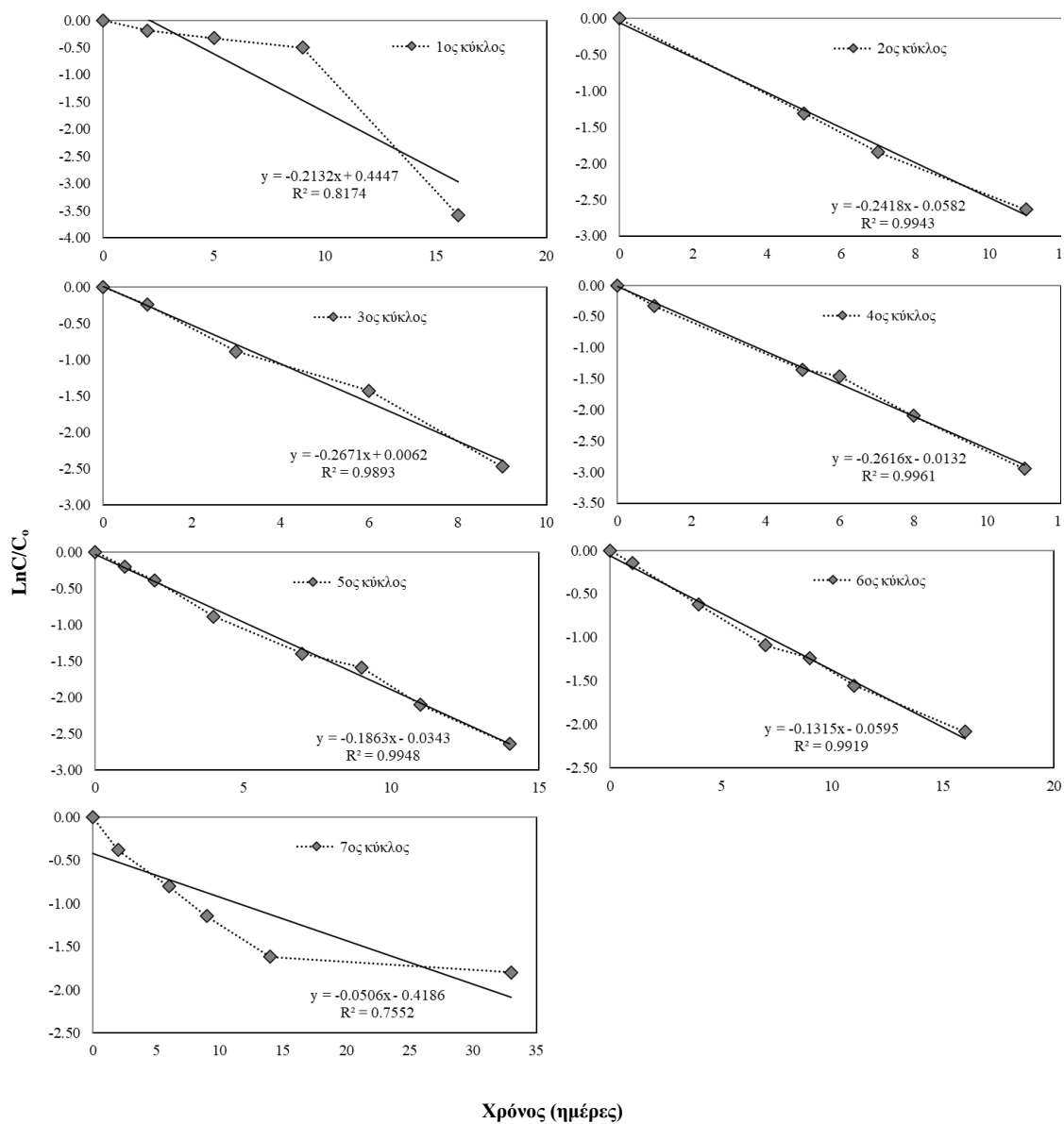


Σχήμα Α.1 Χρονικό προφίλ Cr(VI) στη Στήλη Ι κατά τη διάρκεια του πειράματος Control για την εύρεση της σταθεράς k .

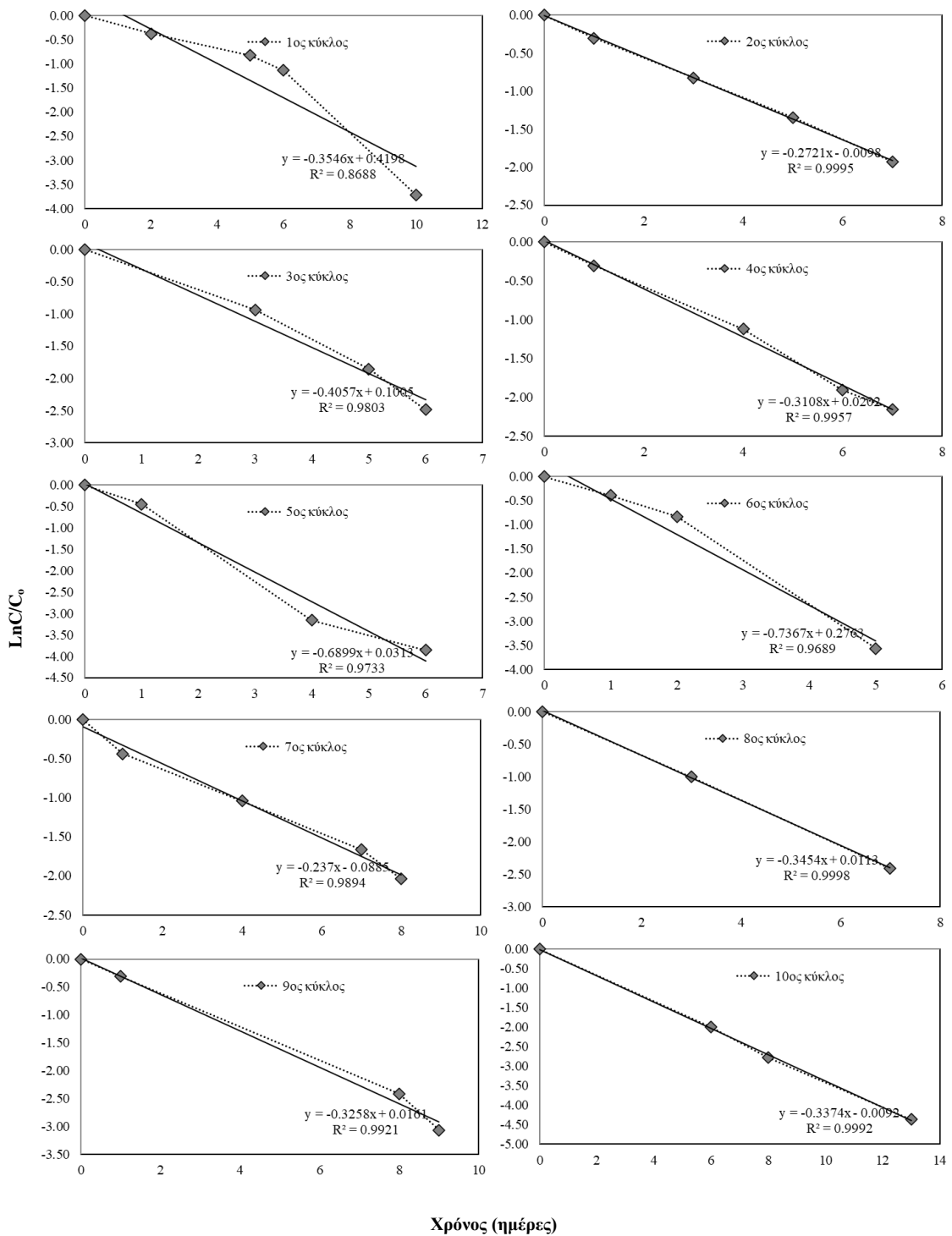


Σχήμα Α.2 Χρονικό προφίλ Cr(VI) στη Στήλη Ι κατά τη διάρκεια του αβιοτικού πειράματος (προσθήκη FeSO_4) για την εύρεση της σταθεράς k .

Διερεύνηση της βιολογικής επί τόπου αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο

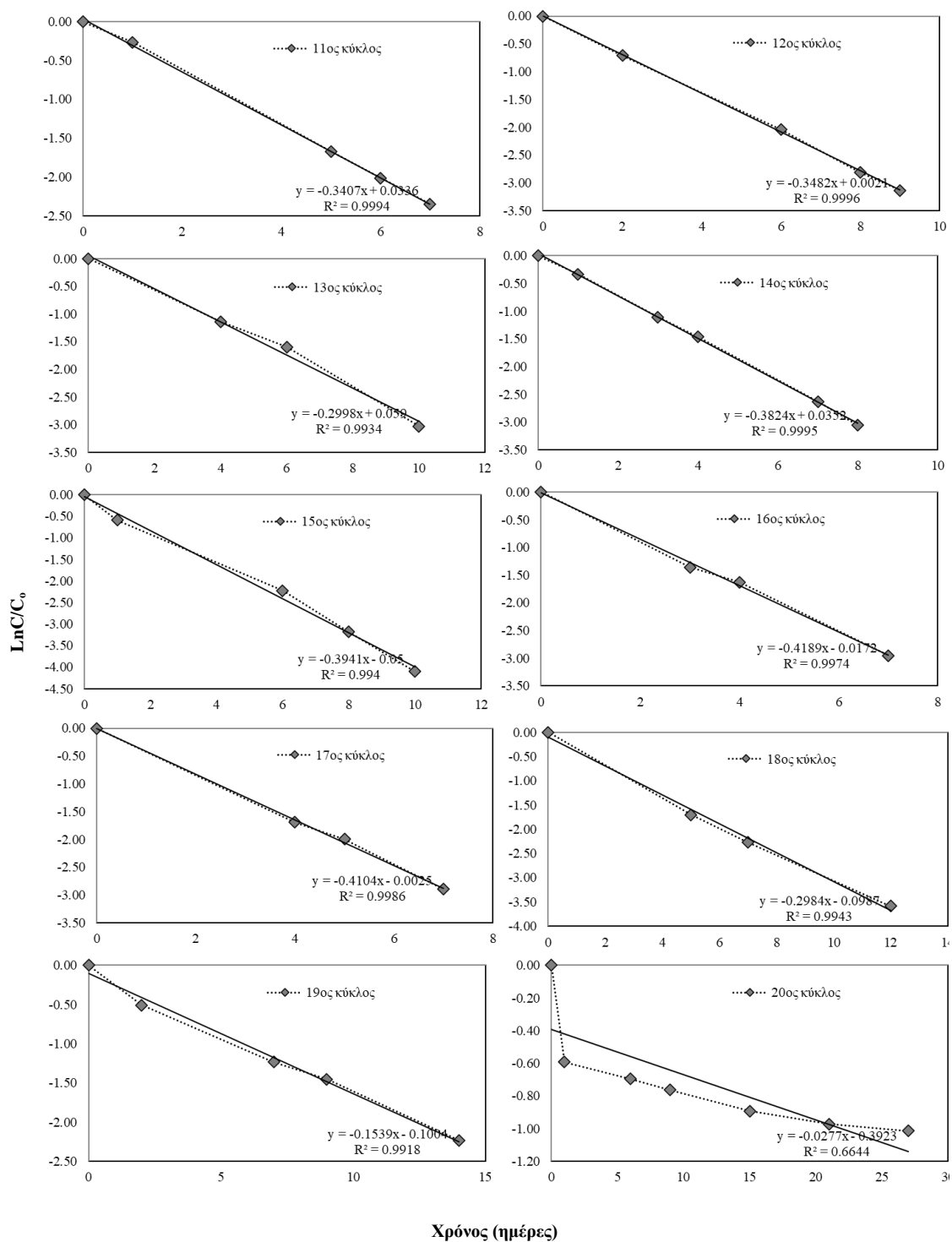


Σχήμα Α.3 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη Ι κατά τη διάρκεια του βιοτικού πειράματος για την εύρεση της σταθεράς k.



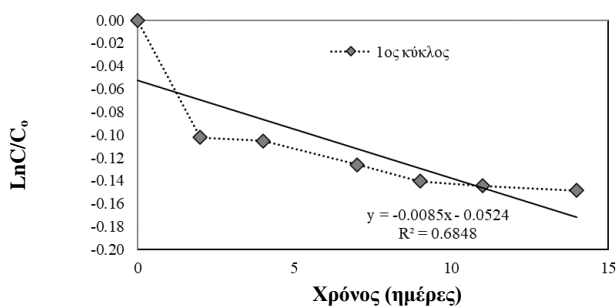
Σχήμα Α.4 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη Ι κατά τη διάρκεια του βιοτικού-αβιοτικού πειράματος (κύκλοι 1-10) για την εύρεση της σταθεράς k.

Διερεύνηση της βιολογικής επί τόπου αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο

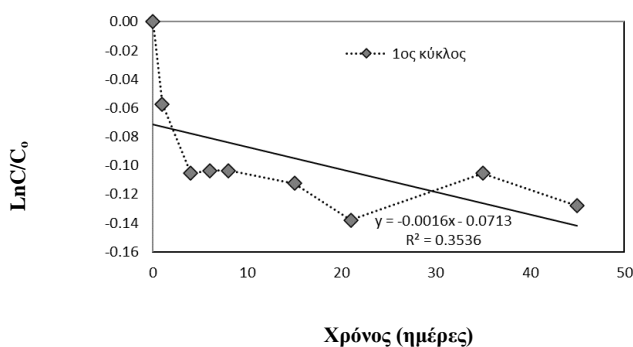


Σχήμα A.5 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη I κατά τη διάρκεια του βιοτικού-αβιοτικού πειράματος (κύκλοι 11-20) για την εύρεση της σταθεράς k.

A.2 Γραφήματα προσδιορισμού σταθεράς k διαφορετικών περιπτώσεων αναγωγής Cr(VI) στα πειράματα της Στήλης II

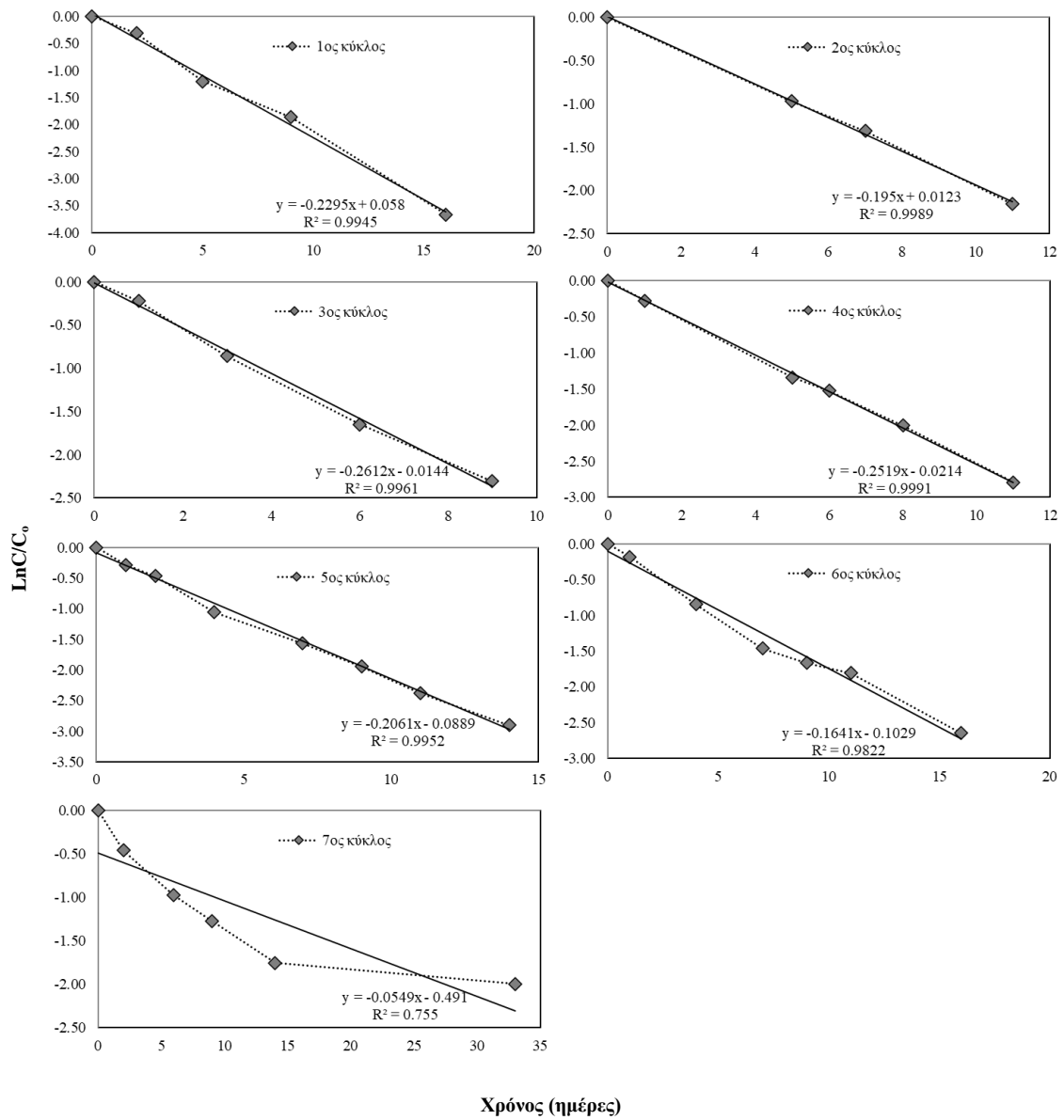


Σχήμα A.6 Χρονικό προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του πειράματος Control για την εύρεση της σταθεράς k.



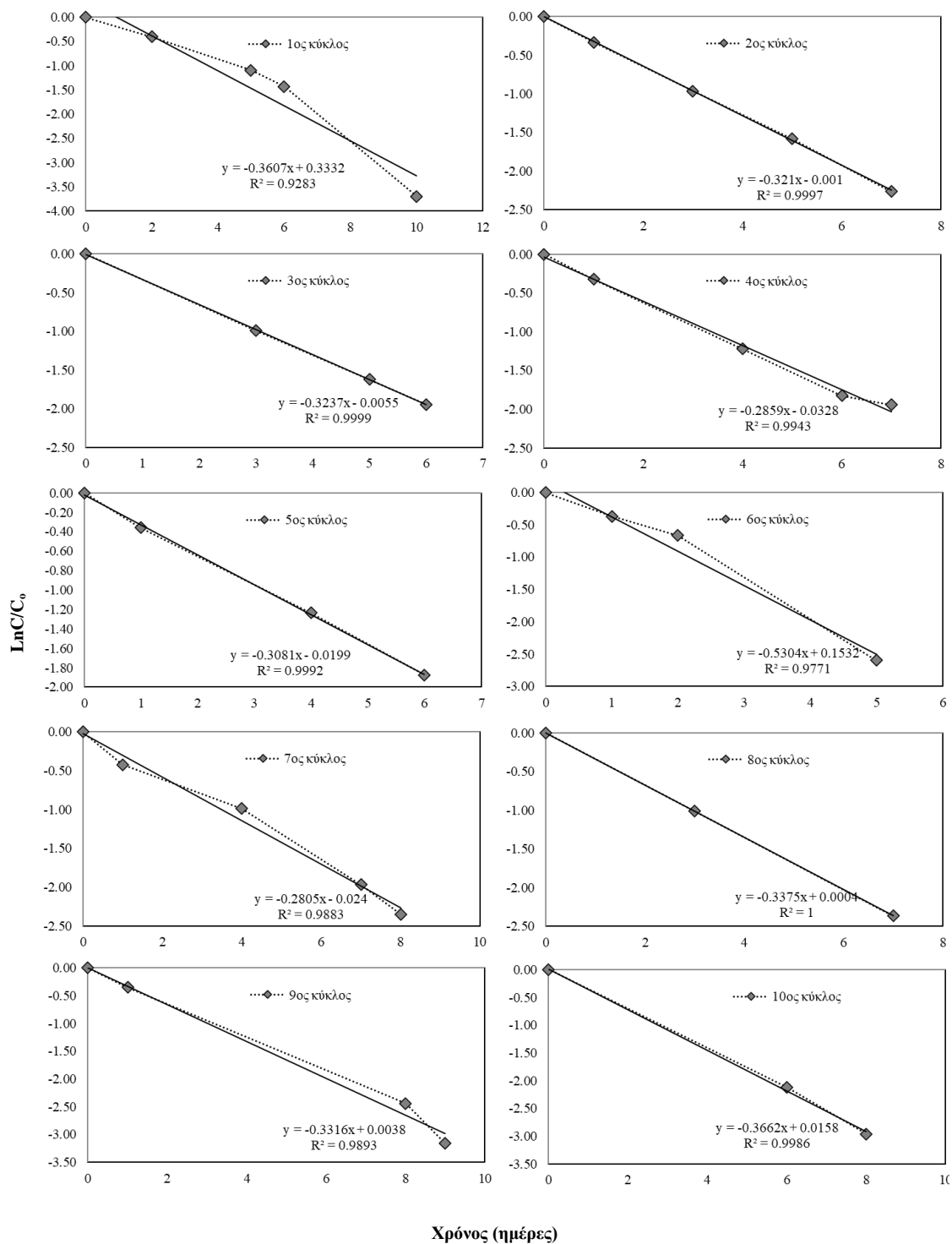
Σχήμα A.7 Χρονικό προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του αβιοτικού πειράματος (προσθήκη FeSO₄) για την εύρεση της σταθεράς k.

Διερεύνηση της βιολογικής επί τόπου αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμο



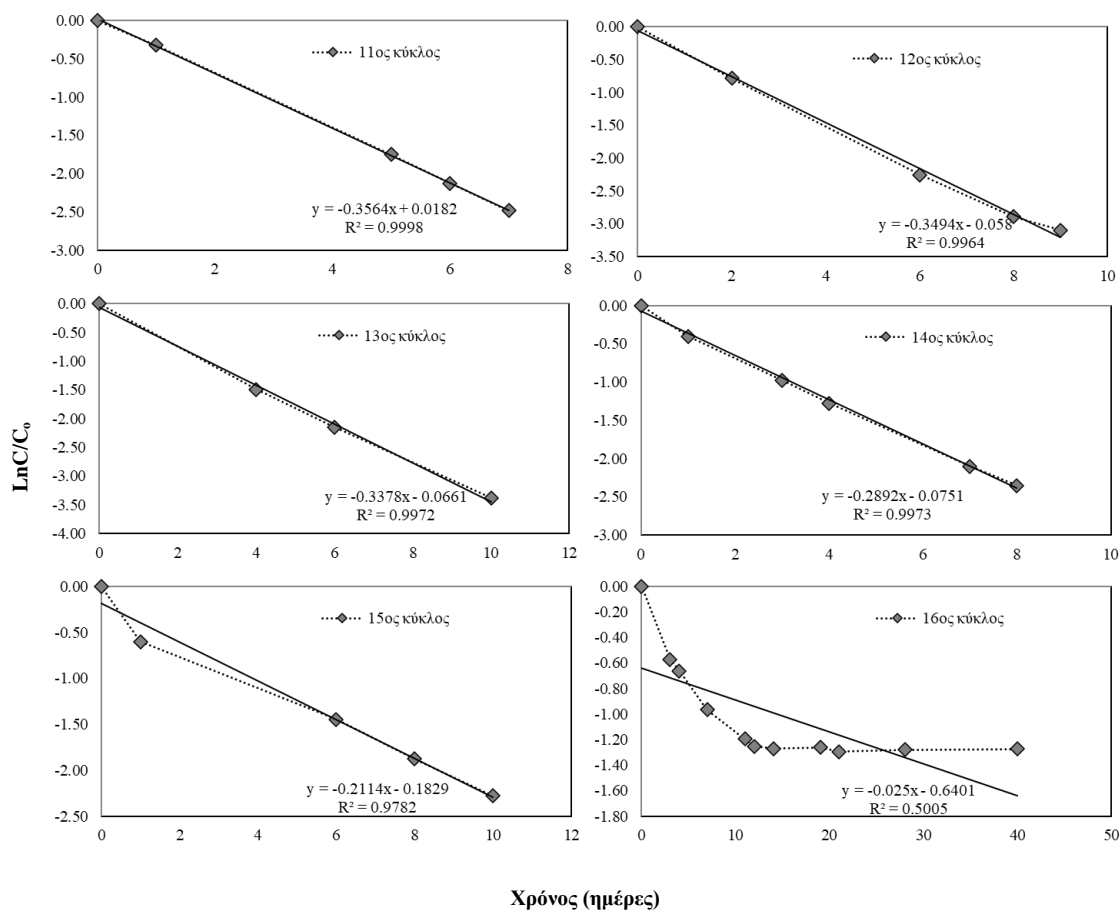
Σχήμα Α.8 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του βιοτικού πειράματος για την εύρεση της σταθεράς k.

Διερεύνηση της βιολογικής επί τόπου αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο



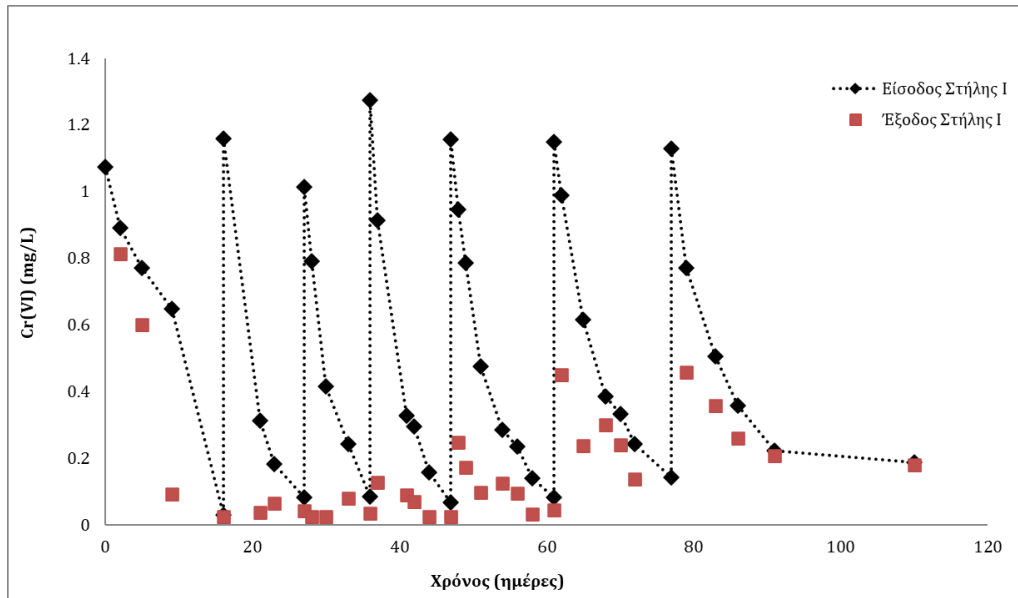
Σχήμα A.9 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του βιοτικού-αβιοτικού πειράματος (κύκλοι 1-10) για την εύρεση της σταθεράς k.

Διερεύνηση της βιολογικής επί τόπου αποκατάστασης υπογείων υδάτων ρυπασμένων με εξασθενές χρώμιο

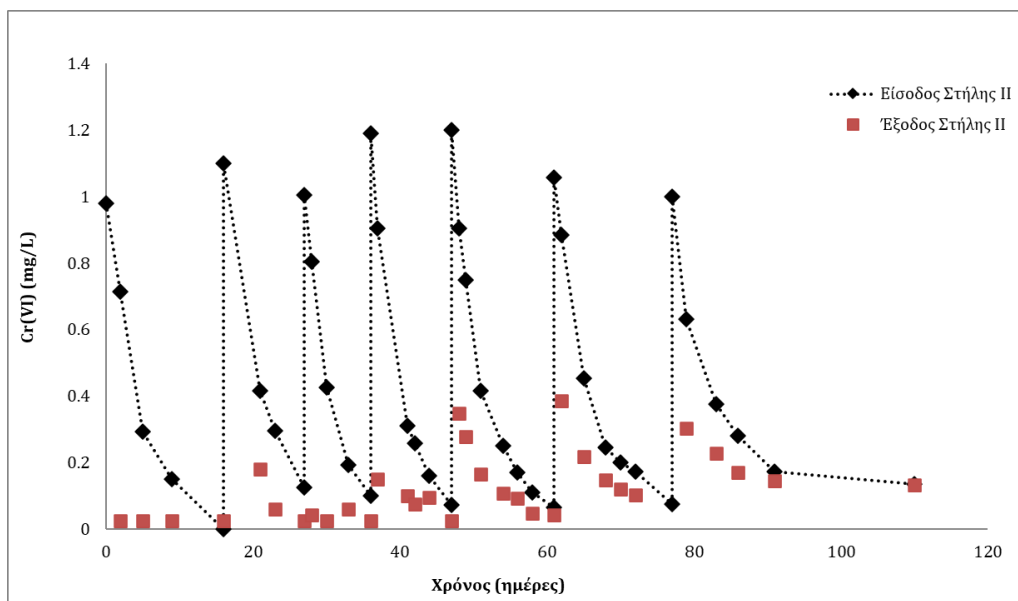


Σχήμα Α.10 Χρονικά προφίλ Cr(VI) στη Στήλη II κατά τη διάρκεια του βιοτικού-αβιοτικού πειράματος (κύκλοι 11-16) για την εύρεση της σταθεράς k.

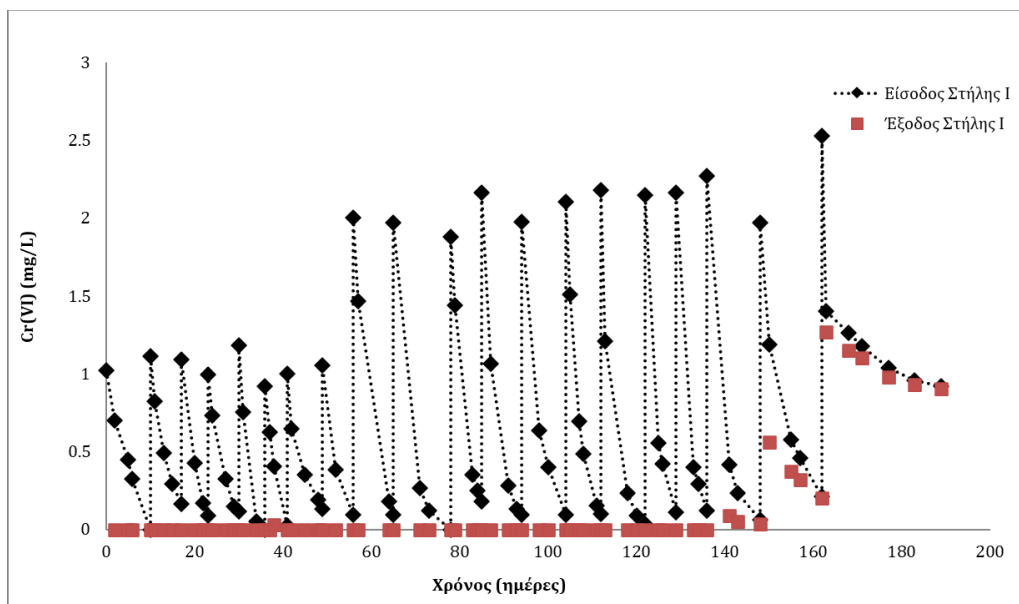
A.3 Χρονική διακύμανση Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο των στηλών



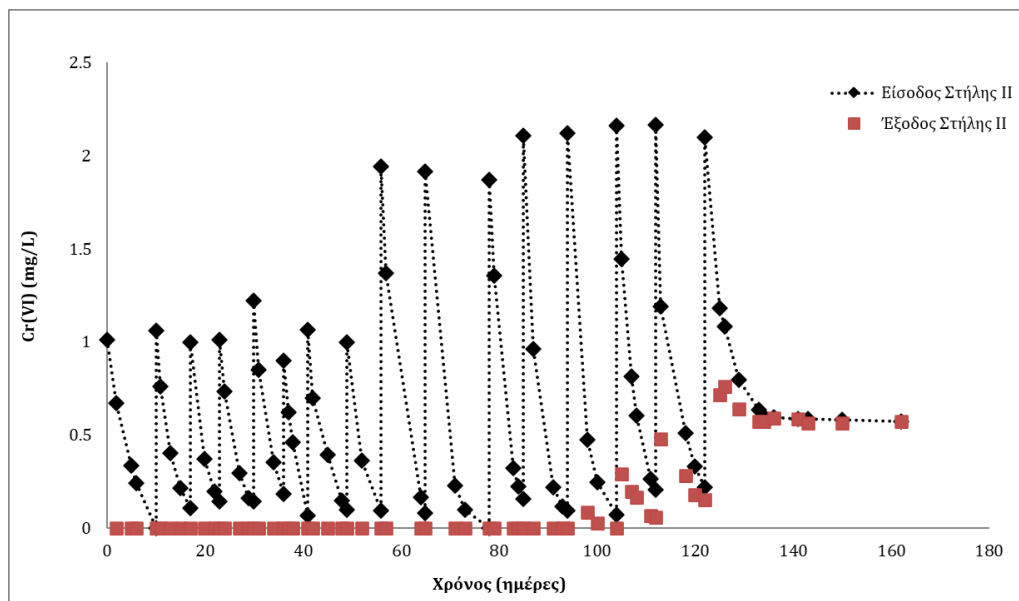
Σχήμα A.11 Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της Στήλης I στο Βιοτικό πείραμα.



Σχήμα A.12 Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της Στήλης II στο Βιοτικό πείραμα.



Σχήμα A.13 Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της Στήλης I στο Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα.



Σχήμα A.14 Χρονική μεταβολή συγκέντρωσης Cr(VI) στην είσοδο και έξοδο της Στήλης II στο Βιοτικό-Αβιοτικό πείραμα.

B. Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά και διεθνή συνέδρια με κρίση

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων της διδακτορικής διατριβής έχουν δημοσιευθεί στα εξής διεθνή επιστημονικά περιοδικά και διεθνή συνέδρια:

- A. Galani, P. Anastopoulou, C. Noutsopoulos and D. Mamais (2021). In-situ bioremediation of groundwater polluted with Cr(VI) under anaerobic conditions. 17th International Conference on Environmental Science and Technology, Athens, Greece, September 1-4.
- Galani, A.; Mamais, D.; Noutsopoulos, C.; Anastopoulou, P.; Varouxaki, A. Biotic and Abiotic Biostimulation for the Reduction of Hexavalent Chromium in Contaminated Aquifers. *Water* 2022, 14, 89. <https://doi.org/10.3390/w14010089>
- Galani, A.; Noutsopoulos, C.; Anastopoulou, P.; Varouxaki, A.; Mamais, D. Reductive Cr(VI) Removal under Different Reducing and Electron Donor Conditions—A Soil Microcosm Study. *Water* 2022, 14, 2179. <https://doi.org/10.3390/w14142179>