



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ - ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»

*ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΟΤΗ
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΘΕΙΙΚΩΝ
ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ
ΑΠΟΧΛΩΡΙΩΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΟΠΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΥΠΟΓΕΙΩΝ ΥΔΡΟΦΟΡΕΩΝ*

Επιμέλεια: Γεώργιος Α. Παυλίδης

Επιβλέπων: Δρ. Μαμάης Δανιήλ, Αναπλ. Καθηγητής

«Δ.Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»

Αθήνα, Ιούλιος 2013



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ - ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»

*ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΔΟΤΗ
ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΘΕΙΙΚΩΝ
ΙΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ
ΑΠΟΧΛΩΡΙΩΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΤΟΠΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ
ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΥΠΟΓΕΙΩΝ ΥΔΡΟΦΟΡΕΩΝ*

Επιμέλεια: Γεώργιος Α. Παυλίδης

Επιβλέπων: Δρ. Μαμάης Δανιήλ, Αναπλ. Καθηγητής

**«Δ.Π.Μ.Σ. ΕΠΙΣΤΗΜΗ
& ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»**

Αθήνα, Ιούλιος 2013

Πίνακας Περιεχομένων

Πίνακας Περιεχομένων	σελ. 1
Κατάλογος Πινάκων	σελ. 3
Κατάλογος Σχημάτων	σελ. 5
Κατάλογος Εικόνων	σελ. 7
Περίληψη	σελ. 8
Extended Abstract	σελ. 11
Ευχαριστίες	σελ. 14
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγή	σελ. 15
1.1 Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή	σελ. 15
1.2 Σκοπός	σελ. 16
1.3 Δομή	σελ. 17
Κεφάλαιο 2 ^ο : Θεωρητικό Υπόβαθρο	σελ. 18
2.1 Χλωριωμένα Αιθυλένια - Τριχλωροαιθυλένιο (TCE) - Παράγωγα	σελ. 18
2.2 Αποκατάσταση Ρυπασμένων Περιοχών – Αντιρρυπαντικές Μέθοδοι	σελ. 21
2.3 Η διαδικασία της Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης	σελ. 26
2.4 Οι δότες ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 33
2.4.1 Το Υδρογόνο (H ₂) ως δότης ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 37
2.4.2 Το Βουτυρικό Οξύ ως δότης ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 38
2.4.3 Το Γαλακτικό Οξύ ως δότης ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 39
2.4.4 Άλλοι δότες ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 41
2.5 Τα κυριότερα αποχλωριωτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 46
2.6 Μηχανισμοί αναχαίτισης – ανταγωνισμού στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 47
2.6.1 Η επίδραση των θεικών ιόντων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 50
2.6.2 Η επίδραση των μεθανογόνων μικροοργανισμών στην Αναερόβια	

Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 54
2.6.3 Η επίδραση των νιτρικών ιόντων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 57
2.6.4 Η επίδραση άλλων ρύπων ή προσθέτων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση	σελ. 58
Κεφάλαιο 3 ^ο : Μεθοδολογία – Πειραματικό Πρωτόκολλο	σελ. 59
3.1 Συντήρηση των μητρικών καλλιιεργειών	σελ. 59
3.1.1 Αρχές Λειτουργίας Αέριου Χρωματογράφου	σελ. 60
3.1.1.1 Ανάλυση της στατικής υπερκείμενης φάσης	σελ. 63
3.1.2 Υλικά και Οργανολογία	σελ. 64
3.1.2.1 Υλικά	σελ. 64
3.1.2.2 Οργανολογία – Εργαστηριακός εξοπλισμός	σελ. 66
3.1.3 Διαδικασία Συντήρησης	σελ. 67
3.1.3.1 Πρωτόκολλο παρασκευής αναερόβιου θρεπτικού μέσου (RAMM)	σελ. 68
3.1.3.2 Βήματα τροφοδοσίας μητρικών καλλιιεργειών	σελ. 69
3.2 Πρωτόκολλο παρασκευής πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch)	σελ. 75
3.2.1 Βήματα παρασκευής μικρόκοσμων	σελ. 76
3.3 Παρασκευή καμπυλών πρότυπων διαλυμάτων	σελ. 82
3.3.1 Πρότυπες καμπύλες για TCE, cis-1,2 DCE, trans-1,2 DCE, 1,1-DCE	σελ. 83
3.3.2 Πρότυπη καμπύλη για VC	σελ. 85
3.3.3 Πρότυπες καμπύλες για Methane, Ethylene	σελ. 87
3.3.4 Πρότυπες καμπύλες για VFAs (Volatile Fatty Acids)	σελ. 91
3.3.5 Πρότυπη καμπύλη για SO_4^{2-}	σελ. 95
3.3.6 Μέτρηση ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών (TSS/VSS)	σελ. 97
3.3.7 Μέτρηση πρωτεϊνών	σελ. 99
3.3.8 Μέτρηση θειούχων ιόντων (S^{2-})	σελ. 102
3.3.8.1 Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης μέτρησης των θειούχων (S^{2-})	σελ. 103
3.3.9 Υπολογισμός n_{chloride}	σελ. 104
Κεφάλαιο 4 ^ο : Παρουσίαση και σχολιασμός αποτελεσμάτων	σελ. 105

4.1 Εισαγωγή	σελ. 105
4.2 Αποτελέσματα από την ανάλυση των μητρικών καλλιεργειών	σελ. 107
4.2.1 Οι αποχλωριωτικές καλλιέργειες απουσίας θεικών ιόντων (NS1-NS2)	σελ. 107
4.2.2 Οι αποχλωριωτικές καλλιέργειες με χαμηλή και μέση συγκέντρωση θεικών ιόντων (LS1-LS2 και MS1-MS2)	σελ. 113
4.2.3 Απόδοση των μητρικών καλλιεργειών αποχλωρίωσης	σελ. 118
4.3 Παρουσίαση και σχολιασμός των πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch)	σελ. 122
4.3.1 Πειράματα διερεύνησης ρυθμού αναγωγικής αποχλωρίωσης σε διαφορετικές δόσεις δότη ηλεκτρονίων	σελ. 123
4.3.2 Πειράματα προσθήκης υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές	σελ. 128
4.3.3 Πειράματα διερεύνησης της επίδοσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης παρουσία θεικών ιόντων	σελ. 131
Κεφάλαιο 5 ^ο : Συμπεράσματα	σελ. 139
Κεφάλαιο 6 ^ο : Βιβλιογραφία	σελ. 142
Ελληνική Βιβλιογραφία	σελ. 142
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	σελ. 143
Ιστογραφία	σελ. 150

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1: Όρια ρύπανσης του πόσιμου νερού από χλωριωμένα αιθυλένια (πηγή: USEPA, 2009).	σελ. 21
Πίνακας 2-2: Μηχανισμοί βιολογικής αποχλωρίωσης χλωροαιθυλενίων (Πηγή: Παναγιωτάκης, 2010).	σελ. 24
Πίνακες 2-3α & β: Κόστη διαφορετικών υποστρωμάτων/δοτών ηλεκτρονίων για την Αναερόβια Αναγωγική αποχλωρίωση του TCE (πηγή: Wu et al., 1998 (α); diStefano et al., 2001 (β)).	σελ. 44-45
Πίνακας 3-1: Συχνότητα αναλύσεων στο πείραμα ελέγχου δόσης και ρυθμού εισπίεσης δότη ηλεκτρονίων.	σελ. 81
Πίνακας 3-2: Συχνότητα αναλύσεων στο πείραμα διερεύνησης της μικροβιακής	

κοινότητας με την προσθήκη διαφορετικού είδους δότη ηλεκτρονίων.	σελ. 81
Πίνακας 3-3: Συχνότητα αναλύσεων στα πειράματα αναγωγής θεικών ιόντων.	σελ. 82
Πίνακας 3-4: Ονομαστικές συγκεντρώσεις χλωροαιθυλενίων.	σελ. 84
Πίνακας 3-5: Χρόνοι έκλυσης χλωριωμένων υδρογονανθράκων.	σελ. 84
Πίνακας 3-6: Ονομαστικές συγκεντρώσεις βινυλοχλωριδίου.	σελ. 86
Πίνακας 3-7. Ονομαστικές συγκεντρώσεις μεθανίου και αιθενίου.	σελ. 89
Πίνακας 3-8. Ονομαστικές συγκεντρώσεις πτητικών λιπαρών οξέων.	σελ. 92
Πίνακας 3-9: Χρόνοι έκλυσης των VFAs.	σελ. 93
Πίνακας 3-10: Ονομαστικές συγκεντρώσεις θεικών για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.	σελ. 96
Πίνακας 4-1. Ποσότητες βουτυρικού οξέος, θεικών ιόντων και τριχλωροαιθυλενίου που προστίθενται στις μητρικές καλλιέργειες.	σελ. 106
Πίνακας 4-2: Συστατικά εβδομαδιαίας τροφοδοσίας των καλλιεργειών.	σελ. 106
Πίνακας 4-3: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια NS1.	σελ. 108
Πίνακας 4-4: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια NS2.	σελ. 108
Πίνακας 4-5: Τα πειράματα ελέγχου της μικροβιακής κονότητας μεθανογένεσης	σελ. 111
Πίνακας 4-6: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs), θεικών ιόντων και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια LS1.	σελ. 113
Πίνακας 4-7: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs), θεικών ιόντων και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια LS2.	σελ. 113
Πίνακας 4-8: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs), θεικών ιόντων και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια MS1.	σελ. 116
Πίνακας 4-9: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs), θεικών ιόντων και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια MS2.	σελ. 116

Πίνακας 4-10: Καταναλισκόμενες ποσότητες θεικών ιόντων στις μητρικές καλλιέργειες.	σελ. 119
Πίνακας 4-11: Μέσες συγκεντρώσεις και διαστήματα εμπιστοσύνης των τιμών των 7ήμερων κύκλων ΑΝΑΠ στα πειράματα μεγάλης διάρκειας με διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικών ιόντων και δότη ηλεκτρονίων.	σελ. 120
Πίνακας 4-12: Στατιστική ανάλυση των τιμών του pH των μητρικών καλλιεργειών.	σελ. 121
Πίνακας 4-13: Τα πειράματα ασυνεχους τροφοδοσίας που διεξήχθησαν	σελ. 122
Πίνακας 4-14: Οι ταχύτητες αποχλωρίωσης ανα στάδιο που προέκυψαν απο τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας που εκτελέσαμε.	σελ. 138

Κατάλογος Σχημάτων

Διάγραμμα 3-1. Πρότυπη καμπύλης βαθμονόμησης για το Μεθάνιο (για χαμηλές συγκεντρώσεις).	σελ. 89
Διάγραμμα 3-2. Πρότυπη καμπύλης βαθμονόμησης για το Μεθάνιο (για υψηλές συγκεντρώσεις).	σελ. 90
Διάγραμμα 3-3. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το αιθένιο.	σελ. 90
Διάγραμμα 3-4. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το βουτυρικό οξύ.	σελ. 93
Διάγραμμα 3-5. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το ισοβουτυρικό οξύ.	σελ. 93
Διάγραμμα 3-6. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το οξικό οξύ.	σελ. 94
Διάγραμμα 3-7. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το προπιονικό οξύ	σελ. 94
Διάγραμμα 3-8: Η καμπύλη μέτρησης των θεικών ιόντων για το πείραμα μας.	σελ. 96
Διάγραμμα 3-9. Καμπύλη βαθμονόμησης πρωτεΐνης.	σελ. 101
Διάγραμμα 3-10. Καμπύλη βαθμονόμησης θειούχων (S^{2-}).	σελ. 103
Διάγραμμα 4-1: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια NS1.	σελ. 109
Διάγραμμα 4-2: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια NS2.	σελ. 109

Διάγραμμα 4-3: Διακύμανση του δότη-οξικού οξέως και του παραγόμενου μεθανίου στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας.

σελ. 111

Διάγραμμα 4-4: Διακύμανση του οξικού οξέος και του παραγόμενου μεθανίου στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας με δότη ηλεκτρονίων το Υδρογόνο.

σελ. 112

Διάγραμμα 4.5: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια LS1.

σελ. 115

Διάγραμμα 4-6: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια LS2.

σελ. 115

Διάγραμμα 4-7: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια MS1.

σελ. 117

Διάγραμμα 4-8: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια MS2.

σελ. 117

Διάγραμμα 4-9: Διακύμανση της τιμής του pH για όλες τις μητρικές καλλιέργειες.

σελ. 121

Διάγραμμα 4-10: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα N1,2-MED (3 mM But).

σελ. 123

Διάγραμμα 4-11: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα N1,2-HED (9,1 mM But).

σελ. 124

Διάγραμμα 4-12: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα N1,2-QMED (2,2 mM But).

σελ. 124

Διαγραμμα 4-13: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα N1,2-MED (3 mM But).

σελ. 126

Διαγραμμα 4-14: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα N1,2-HED (9,1 mM But).

σελ. 126

Διαγραμμα 4-15: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα N1,2-QMED (2,2 mM But).

σελ. 127

Διάγραμμα 4-16: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα N12-7DH₂ (2,74 μl ButA & 7,35 ml H₂)

σελ. 129

Διαγραμμα 4-17: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα N12-7DH₂ (2,74 μl ButA & 7,35 ml H₂)

σελ. 130

Διάγραμμα 4-18: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα L12-LED.

σελ. 132

Διάγραμμα 4-19: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα L12-QLED.	σελ. 132
Διάγραμμα 4-20: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα L12-MED.	σελ. 133
Διάγραμμα 4-21: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα L12-HED.	σελ. 133
Διάγραμμα 4-22: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα L1,2-LED.	σελ. 135
Διάγραμμα 4-23: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα L1,2-QLED.	σελ. 136
Διάγραμμα 4-24: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα L1,2-MED.	σελ. 136
Διάγραμμα 4-25: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα L1,2-HED.	σελ. 137

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2-1: Η κίνηση ενός DNAPL ρύπου στο υπέδαφος (πηγή: La Grega et al., 1994)	σελ. 19
Εικόνα 2-2: Τα στάδια της αναερόβιας αποχλωριωτικής διαδικασίας σε ένα ρυπασμένο υδροφόρο στρώμα (Tiehm & Schmidt, 2011).	σελ. 25
Εικόνα 2-3: Τα στάδια της Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης (Πηγή: Ernst, 2009).	σελ. 26
Εικόνα 3-1: Ενδεικτική διάταξη συστήματος αέριας χρωματογραφίας (Πηγή: Ιστοσελίδα Χημικό Εργαστήριο, 2013).	σελ. 60

Περίληψη

Οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις έκαναν την εμφάνιση τους κατά τη δεκαετία του 1920, με επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία να εμφανίζονται με τη σειρά τους κατά τη δεκαετία του 1960. Οι επιπτώσεις των χλωριωμένων ενώσεων προέρχονται από την εκτεταμένη βιομηχανική δραστηριότητα αλλά και την ολοένα αυξανόμενη αστικοποίηση, κάνοντας επιτακτική την ανάγκη, μια δεκαετία μετά, για προστασία αλλά και πρόληψη τόσο του ανθρώπου όσο και του φυσικού περιβάλλοντος από τις προαναφερθείσες ενώσεις. Στις μέρες μας έχουν επισήμως αναγνωριστεί ως ρύποι τόσο στα υπόγεια όσο και στα επιφανειακά ύδατα, ενώ σε μεγάλο μέρος τους έχουν επίσημα χαρακτηριστεί ως επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία λόγω της ιδιαίτερης καρκινογενετικής της ιδιότητας ή άλλων προβλημάτων υγείας που προκαλούν.

Οι ουσίες που μελετάμε στην παρούσα έρευνα (PCE, TCE, DCE και VC) στο σύνολο τους έχουν χαρακτηριστεί και ως «επιβλαβείς για τη δημόσια υγεία», ενώ το τριχλωροαιθυλένιο (TCE) και το βινυλοχλωρίδιο (VC) θεωρούνται καρκινογόνες ουσίες. Το TCE κατά τις περασμένες δεκαετίες χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα σε μία ευρεία γκάμα εφαρμογών από βιομηχανικός διαλύτης έως και αναισθητικό, ενώ η ρύπανση που προκλήθηκε από την κακή διαχείριση των αποβλήτων που παράγει είναι αποτέλεσμα της κακής χημικής κατάστασης των υπόγειων υδροφορέων πολλών περιοχών ανα τον κόσμο.

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτελεί η διερεύνηση ορισμένων παραμέτρων που επιδρούν είτε θετικά είτε αρνητικά στη διαδικασία της αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης (ΑΝΑΠ). Η διαδικασία αυτή τελείται υπό συνθήκες απουσίας οξυγόνου και ουσιαστικά τα πολυχλωριωμένα αιθυλένια σε κάθε στάδιο της αντικαθιστούν ένα άτομο χλωρίου από την αλυσίδα τους, προσλαμβάνοντας στη θέση του ένα ελεύθερο ηλεκτρόνιο (H^+).

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδοσης της αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης τριχλωροαιθυλενίου σε αιθένιο υπόανταγωνιστικές συνθήκες. Στη συνέχεια θα εξεταστεί η παρεμπόδιση που προκαλείται στις αντιδράσεις αποχλωρίωσης λόγω της χρήσης του δότη ηλεκτρονίων από τα θεικοαναγωγικά βακτήρια και τόσο για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικών

ιόντων (αποδεκτών ηλεκτρονίων), όσο και από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς. Τέλος θα εξεταστεί η διερεύνηση της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων, αλλά και του ρυθμού εισπίεσης του στην αναγωγική αποχλωρίωση καθώς και ο έλεγχος του τύπου των μεθανογόνων μικροοργανισμών που έχουμε στις καλλιέργειες μας.

Οι μητρικές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο για ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας ήταν οι NS1-NS2, οι LS1-LS2, οι MS1-MS2. Συγκεκριμένα οι NS1-NS2 είχαν αμελητέα συγκέντρωση θεικών, οι LS1-LS2 είχαν συγκέντρωση θεικών ίση με 150 mg/l και οι MS1-MS2 με συγκέντρωση θεικών ίση με 400 mg/l. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίσουμε ότι και οι τρεις κατηγορίες καλλιεργειών διατηρήθηκαν σε διπλότυπες στο εργαστήριο.

Τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας – εντατικής παρακολούθησης (batch) είχαν σκοπό τον έλεγχο και διαπίστωση ορισμένων σημαντικών για την αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση παραμέτρων, τα οποία παρουσιάζονται στη συνέχεια του παρόντος κειμένου. Έτσι, εκτελέστηκαν τα παρακάτω πειράματα:

- Πείραμα ελέγχου δόσης-χρόνου με διαφορετικές συγκεντρώσεις δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα ελέγχου προσθήκης υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων την 7^η ημέρα.
- Πείραμα διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας
- Πείραμα αναγωγής θεικών ιόντων με διαφορετικές συγκεντρώσεις δότη ηλεκτρονίων.

Στο παρόν κείμενο γίνεται αρχικά μία βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τη σύσταση, την προέλευση και τις ιδιότητες των χλωριωμένων αιθυλενίων και συγκεκριμένα του τριχλωροαιθυλενίου (TCE), τις μεθόδους αντιρύπανσης για αυτές τις ενώσεις, τις μικροβιακές κοινότητες που είναι ικανές να επιτελέσουν την αναγωγή αλλά και τους απαραίτητους για τη διαδικασία δότες ηλεκτρονίων. Ακολούθως, σχολιάζονται οι μηχανισμοί αναχαίτισης της διεργασίας – με έμφαση στην αναχαίτιση από την παρουσία θεικοαναγωγικών μικροοργανισμών και θεικών ιόντων καθώς και τη μεθανογένεση ως ανταγωνιστικό μηχανισμό. Στη συνέχεια, παρατίθενται τα πειραματικά πρωτοκόλλα που εφαρμόστηκαν κατά τις εργαστηριακές μας αναλύσεις καθώς επίσης και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτές. Τέλος, γίνεται

σχολιασμός των αποτελεσμάτων των πειραμάτων τόσο για τις μητρικές καλλιέργειες όσο και για τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) που πραγματοποιήθηκαν και εκτιμάται ουσιαστικά η αναχαιτιστική δράση των θεικών ιόντων στη διεργασία της Αναερόβιας Βιολογικής Αποδόμησης των χλωροαιθυλενίων.

Από την ανάλυση των πειραματικών αποτελεσμάτων παρατηρείται ότι σε γενικές γραμμές οι μητρικές καλλιέργειες παρουσιάζουν μεταξύ τους παρόμοια συμπεριφορά, με τις NS1-NS2 να έχουν ελαφρώς καλύτερη απόδοση (μεγαλύτερη παραγωγή ΕΤΗ) ως προς την αποχλωρίωση. Η αποχλωριωτική διαδικασία σχεδόν σε όλες τις καλλιέργειες έφτασε στο στάδιο του αιθινίου αλλά όχι πλήρως, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο σχετικά μικρό διαθέσιμο χρόνο μεταξύ των διαδοχικών τροφοδοσιών (7 ημέρες) και τη μη-επάρκεια του δότη ηλεκτρονίων. Επίσης, με τη μείωση της δραστηριότητας των μεθανογόνων, υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέως και αντίστροφα. Μία ακόμα παρατήρηση που έγινε είναι ότι στην περίπτωση καλλιέργειας με παρουσία θεικών, η μεθανογένεση είναι σχεδόν ανύπαρκτη, καθώς οι θεικοαναγωγικοί (SRB) μικροοργανισμοί προσλαμβάνουν αντί για τους μεθανογόνους το δότη ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να δημιουργείται περιοριστικός παράγοντας καθώς οι τελευταίοι απαιτούν μεγάλες ποσότητες εύκολα προσλήψιμου δότη για τη δραστηριότητα τους. Όσον αφορά τα batch πειράματα εκτιμάται ότι η υπερβολική αύξηση του δότη μειώνει την αποχλωρίωση ενώ επιδρά αρνητικά και στη μεθανογένεση χωρίς ωστόσο να φαίνεται να επηρεάζει τη θεικοαναγωγή. Αρνητική επίδραση στην παραπάνω διαδικασία έχουν και τα θειικά ιόντα καθώς μειώνουν τόσο την αποχλωρίωση των χλωροαιθυλενίων όσο και τη μεθανογένεση που πραγματοποιείται σε αμελητέες ποσότητες. Επιπλέον, από τα πειράματα ρυθμού εισπίεσης δότη ηλεκτρονίων παρατηρούμε ότι με την προσθήκη του υδρογόνου η ΑΝΑΠ επηρεάζεται άμεσα και θετικά καθώς το υδρογόνο χρησιμοποιείται ως δότης. Έτσι, έχουμε συγκριτική υπεροχή των καλλιεργειών χωρίς θειικά τόσο για την ΑΝΑΠ όσο και την μεθανογένεση. Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει το συμπέρασμα που προέκυψε τόσο από τις μητρικές καλλιέργειες όσο και από τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch), ότι η ποσότητα των θεικών που καταναλώνεται είναι περίπου η ίδια σε κάθε περίπτωση ανεξαρτήτως της ποσότητας που προσθέτουμε.

Extended Abstract

Trichloroethylene (TCE) is an organic compound classified as carcinogenic substance, that has been widely used in many industrial and commercial applications over the last decades. Due to its improper storage and/or disposal it is a very common groundwater pollutant in industrialized sites all over the world. Until the 1960's the effects of chlorinated ethenes on human health haven't been explored but around 1970's rules and laws confronting the prevention and reduce of pollution have been published. Some years later, around 1985 a new fulfilling remediation technique has been proposed. It was called microbial anaerobic reductive dechlorination and is an important mechanism of in situ remediation of groundwater contaminated with chlorinated ethenes, since it can transform TCE to ethene by gradually disengaging the chlorine atoms. However, in some cases the whole process can become dangerous, as incomplete TCE reduction is a problem due to the accumulation of its toxic intermediates of cis-dichloroethylene (cDCE) and vinyl chloride (VC). This accumulation may be caused by interdependent factors, such as the suitability and the quantity of electron donor, the composition of the microbial community and groundwater's sulfate concentration – as sulfate use dechlorinations's electron donor to be depleted. In most field applications the addition of electron donors to the subsurface (biostimulation) is needed and it significantly can enhance reductive dechlorination efficiency, by stimulating the native dechlorinating population. According to international research results it is noted that in every case, the final electron donor for the anaerobic dechlorination of chlorinated ethenes is hydrogen and the usage of electron donors that produce small and steady hydrogen quantities, such as butyrate or propionate, provide an advantage to dechlorinating bacteria over methanogens and homoacetogens.

This thesis is an experimental study on the effects of sulphate reduction and methanogenesis on the reductive dechlorination of trichloroethylene. Experiments are consisted by two types of cultures; maternal cultures and batch experiments. Batch experiments were made in order to determine the proper electron donor quantity for cases with and without sulfate to determine their inhibitory effect and also, in order to examine a trend that was observed and confirm the hypothesis that our systems

included acetotrophic methanogens a batch experiment was established. Furthermore, a Butyrate-H₂ fed batch experiment was prepared to evaluate the use of mixed donor in our cultures.

All cultures were maintained in duplicate in the laboratory, under darkened conditions and constant temperature 25 °C and were divided in three different categories: NS cultures (NS1-NS2), wherein the concentration of sulfate ion was negligible, cultures LS (LS1-LS2) with sulphate concentration equal to 150 mg/l and the cultures end (MS1-MS2) with a concentration of sulfate 400 mg/l. The purpose of these cultures was for: a) the manufacture of mixed crop dechlorination of chlorinated ethylene in the presence of various concentrations of sulfate, b) to prepare batch (discontinuous feeding) experiments and c) laboratory investigation interceptors for the process parameters (e.g. methanogenesis).

On a weekly basis, cultures were flushed with N₂/CO₂ (70%/30%) and were enriched with basal medium, vitamin solution, selenium-tungsten solution, yeast extract (10% w/v) and fed with 0.5 mM TCE (65.7 mg/L) (nominal concentration, i.e. total amount added to the bottle divided by liquid volume). The cultures were kept at a solid retention time (SRT) of 48 days, at constant temperature of 25 °C, stirred in the dark. These cultures operated under limiting electron donor conditions, since they were fed with 0.3 mM butyrate (27.0 mg/L), providing 1.2 meq/L as H₂ or 40% of the required reducing equivalents for complete dechlorination of 0.5 mM TCE to ethene (ETH). Under these conditions, the cultures developed contained methanogens and dechlorinating bacteria that, with sufficient electron donor, were capable of completely dechlorinating TCE to ETH. Two different generations of these cultures were used as source cultures to conduct the batch experiments presented herein.

Batch studies were conducted using 160 ml serum bottles, containing 100 ml of liquid, thus resulting in a 6:10 headspace to liquid ratio. All bottles were sealed with Teflon rubbers stoppers and aluminum crimp caps and were flushed with N₂/CO₂ (70%/30%). Basal medium, selenium-tungsten solution and vitamin solution were added as in parent cultures. The batch experiments differed in the type, amount of the electron donor added and the time of the electron donor addition so in most cases the experimental protocols differ.

All samples were measured for chlorinated ethenes removal, as well as ethene and

methane production. For the measurement, a Perkin-Elmer Autosystem XL gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), a PLOT column GS-GasPro (30 m, 0.32 mm diameter, J&W, Folsom, CA). Furthermore, volatile fatty acids (VFAs) were measured by gas chromatography equipped with an autosampler (Perkin-Elmer) and a fused-silica capillary column Nukol (15 m, 0.53 mm, Supelco, Inc., Bellefonte, PA) by injecting 0.5 µl pretreated liquid samples.

From the analysis of experimental results we observed that the dechlorination process at almost every experiment reached ethene but was not complete, which may be due to the relatively short time available between successive feeds (7 days) and the non-sufficiency of electron donor. Furthermore with reduction in activity of methanogenic microorganisms, we have increased concentrations of acetic acid, and vice versa. Moreover we observed that in cultures with presence of sulfate, methanogenesis is almost nonexistent, as sulfate reducing (SRB) microorganisms compete with the methanogenics for the electron donor and thus a limiting factor problem occurs.

Regarding batch experiments it is assessed that excessive donor reduces dechlorination while adversely and methanogenesis but seem to affect sulfate reduction. Negative influence on the above process have definitely the sulfate ions as they reduce the dechlorination of chloroethylene and methanogenesis is performed in negligible quantities. Moreover, from experiments where we had direct addition of hydrogen simultaneously with Butyrate, dechlorination affected directly and positively. Finally, an important observation is that in cultures containing sulfates – no matter the amount of sulphate added, the consumption of sulfate by the SRB is approximately the same.

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία θα ήθελα μέσα από τη σελίδα αυτή να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της, τόσο άμεσα όσο και έμμεσα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου εργασίας, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μαμάη Δανιήλ, για την εμπιστοσύνη του και την ανάθεση του παρόντος θέματος, το οποίο μου προσέφερε ιδιαίτερες και εξειδικευμένες γνώσεις σε ένα αντικείμενο ιδιαίτερα χρήσιμο στην επιστήμη της Περιβαλλοντικής Μηχανικής.

Επιπλέον, ένα από τα μεγαλύτερα ευχαριστώ θα πρέπει να δοθεί στην υποψήφια Διδάκτορα Κορίνα Αντωνίου για την αμέριστη υποστήριξη της από την πρώτη στιγμή που ανέλαβα το θέμα έως και την τελευταία ημέρα της παρουσίας του. Η αμέριστη υποστήριξη της κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, η διαθεσιμότητα της για την επίλυση των αποριών μου αλλά και η ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε είναι πραγματικά ανεκτίμητης αξίας! Ελπίζω όλες οι συνεργασίες στην καριέρα μου να είναι τόσο εποικοδομητικές και ενδιαφέρουσες!

Ένα μεγάλο ευχαριστώ αξίζει και στους φίλους και συναδέλφους που επί πολλές ώρες κατά τον περασμένο χρόνο συνεργάστηκα στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας και ιδιαίτερα στο Νίκο Κουρή και την υποψ. Διδάκτορα Έλενα Κουμάκη αλλά και τους συμφοιτητές μου για την άριστη και ευχάριστη συνεργασία μας καθόλη τη διάρκεια εργαστηριακής μας «συμβίωσης»...

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τα μέλη της επιτροπής εξέτασης της εργασίας αυτής – κ. Μαρίνα Πανταζίδου, κ. Νυμφοδώρα Παπασιώπη και κ. Δανιήλ Μαμάη, για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση μου και για τυχόν παρατηρήσεις τους προκειμένου να επιτευχθεί το βέλτιστο δυνατό αποτέλεσμα για το παρόν κείμενο.

Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ αξίζει στην οικογένεια μου, τη σύντροφο μου - Ένη και τους φίλους μου, για την αέναη κάθε μορφής υποστήριξη τους σε όλες μου τις προσπάθειες κατά την προσωπική μου ζωή και την ακαδημαϊκή μου πορεία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Ίδρυμα Α. Γ. Λεβέντη που τις δύσκολες αυτές οικονομικά ημέρες συνέβαλε στο να φτάσω ένα βήμα πιο κοντά στο όνειρο μου, με την χρηματοδότηση ενός μέρους των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Γ.Π.

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

1.1 Εισαγωγή – Ιστορική Αναδρομή

Η εμφάνιση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων στην αγορά γίνεται τη δεκαετία του 1920 με τις εφαρμογές τους να επεκτείνονται διαρκώς μέσω της αναπτυσσόμενης βιομηχανικής δραστηριότητας και της εκτεταμένης αστικοποίησης (Tandoi et al., 1995). Το φαινόμενο ωστόσο της ρύπανσης που αυτές προκαλούν καθώς και των επιπτώσεων τους στην ανθρώπινη υγεία παρατηρείται αρκετές δεκαετίες μετά, με τα πρώτα βήματα να γίνονται τη δεκαετία του 1960 με την εμφάνιση του σύγχρονου οικολογικού κινήματος στις Η.Π.Α. και ιδιαίτερα μετά την έκδοση του βιβλίου της Rachel Carson το 1964 με τίτλο «Σιωπηλή Άνοιξη», που περιέγραφε τις επιπτώσεις του DDT στην орνιθοπανίδα (Βαλαβανίδης & Ευσταθίου, 2006). Πριν το 1970 είχαν παρατηρηθεί από την επιστημονική κοινότητα μόλις 30 οργανοχλωριωμένες ενώσεις φυσικής προέλευσης (Gribble, 1994). Έτσι, αυξανόμενων των πιέσεων στο περιβάλλον αλλά παράλληλα και των ομάδων για την προστασία του, κατά τη δεκαετία του 1970 άρχισε να γίνεται αντιληπτή η οικολογική απειλή που προέκυπτε από τις ανθρωπογενείς χλωριωμένες ενώσεις με φαινόμενα όπως αυτό του Love Canal που αποτέλεσε ουσιαστικά την πρώτη παρατήρηση των επιπτώσεων της ρύπανσης από οργανοχλωριωμένες ενώσεις στον άνθρωπο (Bradley, 2003). Παρόλα αυτά, στις αρχές της δεκαετίας του '80, έρευνες δείχνουν τα πρώτα σημάδια ότι οι ουσίες αυτές δύνανται να αποδομηθούν στο υπέδαφος απουσία οξυγόνου, σε λιγότερο χλωριωμένες ενώσεις ή και σε μη χλωριωμένες (λ.χ. αιθέριο), υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις – με κύριες την παρουσία αποχλωριωτικών βακτηρίων και την παρουσία ορισμένων ουσιών που λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων (Bradley, 2003).

Σήμερα, οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις που έχουν αναγνωριστεί ως ρύποι σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα είναι πάνω από 2000 με τις επιπτώσεις ορισμένων εξ' αυτών να διερευνώνται ακόμα, ενώ άλλες έχουν αναγνωριστεί ως επιβλαβείς για την υγεία, δυνητικά καρκινογόνες ή και καρκινογόνες – όπως και οι ουσίες που μελετάμε στην παρούσα έρευνα (PCE, TCE, DCE και VC) (Gribble, 1994; US EPA, 2011). Οι ενώσεις αυτές στο σύνολο τους έχουν χαρακτηριστεί και ως «επιβλαβείς για τη

δημόσια υγεία», ενώ το τριχλωροαιθυλένιο (TCE) και το βινυλοχλωρίδιο (VC) θεωρούνται καρκινογόνες ουσίες, με την πιο πρόσφατη που προστίθεται στη λίστα από την U.S. EPA να είναι το τριχλωροαιθυλένιο (TCE) το 2011. Η μελετούμενη ουσία (TCE) κατά τις περασμένες δεκαετίες χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα ως βιομηχανικός διαλύτης σε μία ευρεία έκταση εφαρμογών (U.S. EPA, 2007), ενώ η ρύπανση που προκλήθηκε από την κακή διαχείριση των βιομηχανικών αποβλήτων που την περιείχαν είναι αποτέλεσμα της υφιστάμενης κατάστασης των υδροφόρων πολλών περιοχών ανά τον κόσμο.

Η απομάκρυνση αυτών των ουσιών από το πόσιμο νερό και το υπέδαφος κρίνεται επιτακτική λόγω των επιπτώσεων τους στην ανθρώπινη υγεία, συνεπώς, έχουν προταθεί και δοκιμαστεί αρκετές μέθοδοι, με την επιτόπου βιολογική εξυγίανση να παρουσιάζει συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων λόγω της ευκολίας στην εφαρμογή της και του συγκριτικά χαμηλού κόστους της, δεδομένου μάλιστα ότι πάνω από πολλές ρυπασμένες περιοχές υφίστανται σήμερα αστικές και βιομηχανικές δραστηριότητες (Παναγιωτάκης, 2009). Παρόλα αυτά, η αντίδραση της αποχλωρίωσης δύναται να παρεμποδιστεί από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες με τον επιλεγόμενο σε αυτή την έρευνα να είναι τα θειικά ιόντα και η μεθανογένεση.

1.2 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδοσης της αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης τριχλωροαιθυλενίου σε αιθέριο υπό ανταγωνιστικές συνθήκες. Έτσι θα εξεταστεί η παρεμπόδιση που προκαλείται στις αντιδράσεις αποχλωρίωσης λόγω της χρήσης του δότη ηλεκτρονίων από τα θεικοαναγωγικά βακτήρια και για διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικών ιόντων (αποδεκτών ηλεκτρονίων), αλλά και από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς. Επίσης, θα μελετηθεί η διερεύνηση της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων, αλλά και του ρυθμού εισπίεσής του στην αναγωγική αποχλωρίωση καθώς και ο έλεγχος του τύπου των μεθανογόνων μικροοργανισμών που έχουμε στις καλλιέργειες μας.

1.3 Δομή

Στο πρώτο κεφάλαιο του παρόντος κειμένου, γίνεται εισαγωγή με αναφορά σε ιστορικές πηγές και παρατίθεται ο σκοπός της παρούσας εργασίας. Στη συνέχεια ακολουθεί το δεύτερο κεφάλαιο, στο οποίο γίνεται εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση η οποία σε πρώτο στάδιο αναφέρεται στην αναγκαιότητα εντοπισμού και αποκατάστασης των ρυπασμένων περιοχών και την επικινδυνότητα που εγκυμονούν τα χλωροαιθυλένια, ενώ η βιβλιογραφική ανασκόπηση ολοκληρώνεται με τη διερεύνηση των μηχανισμών απομάκρυνσης τους από τα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να προσθέσουμε ότι γίνεται αναφορά στην αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση και στους σημαντικότερους δότες ηλεκτρονίων, τους μικροοργανισμούς που εκτελούν τη διεργασία αυτή καθώς και τα φαινόμενα της αναχαίτισης και παρεμπόδισης που την επηρεάζουν.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρατίθενται λεπτομερώς όλες οι πειραματικές διαδικασίες που ακολουθήθηκαν, ενώ στο τέταρτο παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας, με παράλληλη σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με τα βιβλιογραφικά δεδομένα τα οποία είχαν μελετηθεί στο δεύτερο κεφάλαιο.

Τέλος στο πέμπτο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας παρατίθενται τα κυριότερα συμπεράσματα που εξήχθησαν και αναλύονται οι πιθανές ελλείψεις της παρούσας έρευνας δίνοντας το έναυσμα για περαιτέρω έρευνα.

Κεφάλαιο 2^ο: Θεωρητικό Υπόβαθρο

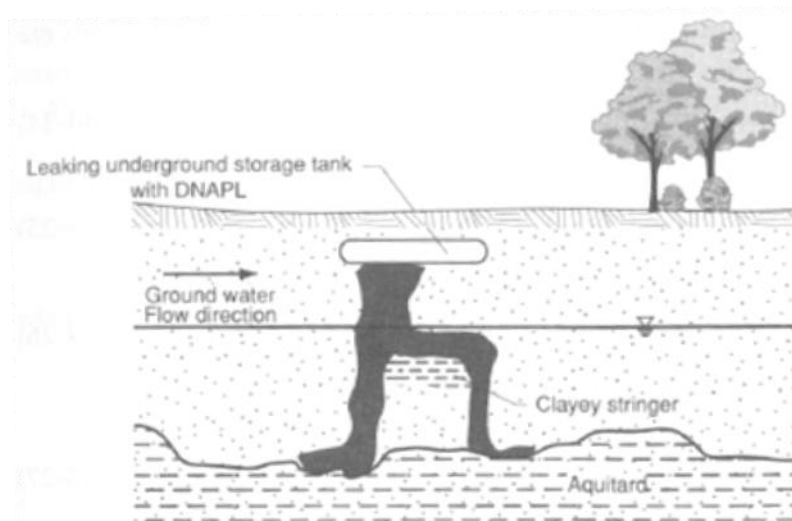
2.1 Χλωριωμένα Αιθυλένια - Τριχλωροαιθυλένιο (TCE) - Παράγωγα

Το τριχλωροαιθυλένιο (TCE) είναι μία ανθρωπογενούς προέλευσης πτητική οργανική ένωση (VOC) που ανήκει στην κατηγορία των χλωριωμένων υδρογονανθράκων και συγκεκριμένα σε αυτή των χλωριωμένων αιθυλενίων και έχει μοριακό τύπο C_2HCl_3 . Η κατά IUPAC ονομασία του είναι τριχλωροαιθένιο (trichloroethene) και κωδικό CAS 79-01-6, ενώ η μοριακή δομή του αποτελείται από δύο άτομα άνθρακα συνδεδεμένα μεταξύ των με διπλό δεσμό, 3 άτομα χλωρίου και ένα υδρογόνο (U.S. EPA, 2000). Ως ουσία είναι άχρωμη ή μπλε, με γλυκιά οσμή που μοιάζει με αυτή του χλωροφορμίου και ο χρόνος ημιζωής της ως αέριο στη ατμόσφαιρα είναι 7 ημέρες (U.S. EPA, 2007). Γενικότερα, το TCE αλλά και το PCE (τετραχλωροαιθυλένιο), καθώς και τα υπόλοιπα χλωριωμένα αιθυλένια είναι από τους πιο κοινούς ρύπους που εντοπίζονται στους υπόγειους υδροφορείς κυρίως λόγω της εκτεταμένης χρήσης τους, της ευρείας εφαρμογής τους και της μη ελεγχόμενης διαχείρισης και απόρριψης τους (Westrick et al., 1984). Οι ενώσεις των χλωροαιθυλενίων διαφέρουν από τα άτομα του χλωρίου που βρίσκονται στην αλυσίδα τους και μπορεί να είναι από 4 (τετραχλωροαιθυλένιο) έως 1 (Βινυλοχλωρίδιο) (Bradley, 2003). Τα κύρια παράγωγα της αποχλωρίωσης του TCE είναι τα διχλωροαιθυλένια (1,1-c DCE, cis-DCE και trans-DCE), το βινυλοχλωρίδιο (VC) και τελικώς το αιθένιο (ETH). Τα διχλωροαιθυλένια, με δύο άτομα χλωρίου και ένα διπλό δεσμό, είναι πολύ εύφλεκτα, άχρωμα υγρά με έντονη μυρωδιά, ενώ, η εισπνοή ατμών DCE προκαλεί νάρκωση. Το βινυλοχλωρίδιο, με ένα άτομο χλωρίου και ένα διπλό δεσμό, είναι ένα αέριο που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του πολυβινυλοχλωρίδιου (PVC), σύνθετες υλικό για πλαστικές συσκευασίες και σωλήνες.

Η διάχυση των χλωριωμένων ενώσεων μέσα σε ένα υδροφόρο στρώμα είναι συνάρτηση της πυκνότητας και του ιξώδους τους – τα οποία είναι υψηλότερη και χαμηλότερη αντίστοιχα από του νερού, γεγονός που ευνοεί την κάθετη κίνηση των ουσιών που καταλήγουν να συσσωρεύονται στον πυθμένα του υδροφόρου στρώματος δημιουργώντας μια ξεχωριστή οργανική φάση (Tandoi et al., 1994). Χαρακτηρίζονται κατά κανόνα ως DNAPL (Dense Non Aqueous Phase Liquid) καθώς είναι πυκνότερες

(συνεπώς έχουν και μεγαλύτερο ειδικό βάρος) από το νερό και κατά την κίνηση τους στο υπέδαφος και τον υπόγειο υδροφόρο δημιουργούν πλούμια (Kouznetsova et al., 2010).

Όταν το τριχλωροαιθυλένιο καταλήξει στο περιβάλλον, λόγω της οργανικής φύσης του διαλύεται ελάχιστα στο νερό με αποτέλεσμα να είναι ικανό να παραμένει για μεγάλο χρόνο σε έναν υπόγειο υδροφορέα. Στην περίπτωση ωστόσο που βρεθεί σε επιφανειακά νερά, λόγω της πτητικότητας του εξατμίζεται σε μεγάλο βαθμό ενώ αντίθετα όταν βρεθεί στο χώμα προσροφάται στα σωματίδια του εδάφους και μπορεί να παραμείνει εκεί για μεγάλο διάστημα ρυπαίνοντας παράλληλα και το διερχόμενο νερό (ATSDR, 2003). Στην περίπτωση που η ποσότητα τους είναι μεγαλύτερη από αυτή που μπορεί να διαλυθεί στο νερό ή να ροφηθεί στο έδαφος καταλήγουν στο αδιαπέρατο τμήμα κάτω από την υδάτινη ζώνη (La Grega et al, 1994).



Εικόνα 2-1: Η κίνηση ενός DNAPL ρύπου στο υπέδαφος (πηγή: La Grega et al., 1994).

Η μελετούμενη ουσία κατά τις περασμένες δεκαετίες χρησιμοποιήθηκε εκτεταμένα ως βιομηχανικός διαλύτης (U.S. EPA, 2007). Οι κύριες χρήσεις του ήταν για την έκπλυση - απολίπανση μετάλλων σε βιομηχανικές και στρατιωτικές εφαρμογές (Bradley, 2003), σε βιομηχανίες ηλεκτρονικών εξαρτημάτων (Kadlec et al., 2012; Helwegg et al., 2005; U.S. EPA, 2000; Aulenta et al., 2007; Wang & Tseng, 2009; Pant et al., 2010), επιπλοποιίες και αυτοκινητοβιομηχανίες (Environment Canada, 2010) καθώς και για τον καθαρισμό ορισμένων υφασμάτων από γράσο (U.S. EPA, 2007; Pant et al., 2010) ή άλλα έλαια και λίπη (ATSDR, 1997). Άλλες χρήσεις του ήταν ως ψυκτικό μέσο, ως ενδιάμεσο στην παραγωγή άλλων χημικών ενώσεων, σε

αφαιρετικά χρωμάτων και λεκέδων, σε διορθωτικά κειμένου, σε διαβρωτικά υγρά και κόλλες καθώς και σε πολλά καθαριστικά, ενώ είχε χρησιμοποιηθεί ακόμα και ως αναισθητικό στο παρελθόν (ATSDR, 1997; U.S. EPA, 2000; Pant et al., 2010). Ιδιαίτερα εκτεταμένη λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων του ήταν και η χρήση του σε καθαριστήρια ρούχων για στεγνό καθάρισμα γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα και την εμφάνιση του ρύπου σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε αστικές περιοχές, ωστόσο αυτή η περίπτωση ρύπανσης είναι σχετικά ελεγχόμενη και περιορισμένη καθώς εφαρμοζόταν τεχνολογίες ανάκτησης (διύλιση) με σκοπό την επαναχρησιμοποίηση του διαλύματος (Helwegg et al., 2005).

Οι κυριότεροι τρόποι εισροής της ουσίας στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μέσω της κατάποσης και της αναπνοής του. Η κίνηση του TCE από τα ρυπασμένα εδάφη και υδροφορείς προς τον εσωτερικό αέρα των υπερκείμενων κτηρίων είναι μια ιδιαίτερα σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία καθώς η έκθεση σε αυτή την περίπτωση είναι κατά κανόνα μακροχρόνια, για αυτό και τα τελευταία χρόνια γίνεται στις Η.Π.Α. μια ιδιαίτερα σημαντική προσπάθεια καθορισμού των ρυπασμένων περιοχών για την προστασία της υγείας των πολιτών από τις χλωριωμένες ενώσεις (U.S. EPA, 2011). Η διαδικασία της αντιρύπανσης υπόγειων υδροφόρων – και ιδίως για επιτόπου (in situ) εφαρμογές ωστόσο είναι μία ιδιαίτερα χρονοβόρα και ακριβή διαδικασία (Pant et al., 2010) η οποία θα πρέπει παράλληλα να μελετάται και να εφαρμόζεται ανά περίπτωση και πάντα με την κατάλληλη παρακολούθηση της πορείας της.

Ως ουσία τόσο το TCE όσο και τα παράγωγά του και ιδιαίτερα το βινυλοχλωρίδιο (VC) έχουν ιδιαίτερα σημαντικές επιπτώσεις για την ανθρώπινη υγεία καθώς επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα, το συκώτι, τα νεφρά, το γαστροοισοφαγικό και το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ πρόσφατα (2011), έχουν αποδειχθεί και οι καρκινογενετικές ιδιότητες του TCE (U.S. EPA, 2001; Kadlec et al., 2012; U.S. EPA, 2011). Το βινυλοχλωρίδιο μάλιστα είναι στις ουσίες προτεραιότητας της U.S. EPA καθώς θεωρείται ουσία υψηλού κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία και πέραν της προέλευσης του από τη διάσπαση του TCE προέρχεται ως ρύπος και από βιομηχανίες παραγωγής πλαστικών υλών πολυβινυλοχλωριδίου (Bradley, 2003). Στην τελευταία αναφορά της Αμερικάνικης Υπηρεσίας Προστασίας Περιβάλλοντος για το TCE, εκτός από τις καρκινογενετικές του ιδιότητες, αναφέρεται και η επίρεια του στο ενδοκρινικό σύστημα, καθώς επίσης και συμπτώματα όπως κόπωση, υπνηλία,

πονοκέφαλοι, σύγχυση, προβλήματα όρασης και δερματικές παθήσεις (U.S. EPA, 2011). Επιπλέον, έρευνες συσχετίζουν την έκθεση στην ουσία αυτή με καρδιακά προβλήματα και προβλήματα γεννητικότητας καθώς και προβλήματα σε νεογνά (Goldberg et al., 1990; Yauck et al., 2004; Bove et al., 1995; Rodenbeck et al., 2000). Τέλος, από πρόσφατη έρευνα, η έκθεση σε TCE συνδέεται και με την εμφάνιση της νόσου Πάρκινσον (Goldman, 2010).

Για το λόγο αυτό και λόγω της ευρείας χρήσης των ουσιών αυτών στις διάφορες εφαρμογές έχουν θεσμοθετηθεί παγκοσμίως όρια συγκεντρώσεων για το υπόγειο πόσιμο νερό. Στις Η.Π.Α. η συγκέντρωση αυτή έχει καθοριστεί στα 5 µg/l πόσιμου νερού (ATSDR, 1997; Bradley, 2003), ενώ στην Ελλάδα οι μέγιστες επιτρεπτές συγκεντρώσεις των χλωροαιθυλενίων καθορίζονται από την ΚΥΑ Υ2/2600/2001 (ΦΕΚ Β'/892/2001), με την οποία ενσωματώθηκε στο Ελληνικό Δίκαιο η Οδηγία 98/83/ΕΚ, με τα όρια που κάνουν το νερό ακατάλληλο για πόση να είναι ιδιαίτερα χαμηλά (Παναγιωτάκης, 2009). Συγκεκριμένα, για το PCE και το TCE το όριο είναι στα 10 µg/l, ενώ για το VC η τιμή αυτή περιορίζεται στο 0,5 µg/l (ΚΥΑ Υ2/2600/2001).

Πίνακας 2.1: Όρια ρύπανσης του πόσιμου νερού από χλωριωμένα αιθυλένια (πηγή: USEPA, 2009).

Ουσία	Μέγιστη αποδεκτή συγκέντρωση (mg/l)
TCE	0,005
1,1-DCE	0,007
cis-1,2-DCE	0,07
trans-1,2-DCE	0,1
VC	0,002

2.2 Αποκατάσταση Ρυπασμένων Περιοχών – Αντιρρυπαντικές Μέθοδοι

Η ρύπανση των εδαφών και των υπόγειων υδροφορέων αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες περιβαλλοντικές απειλές στις μέρες μας που προκαλούνται από τις ολοένα και εντονότερες βιομηχανικές και αστικές πιέσεις, τις στρατιωτικές δραστηριότητες και ιδίως της ανεξέλεγκτης διάθεσης αποβλήτων απευθείας στο έδαφος και τα επιφανειακά νερά (Δερματάς, 2012). Η ρύπανση των εδαφών και των

υπόγειων νερών άρχισε να αντιμετωπίζεται ως πρόβλημα με σχετική υστέρηση καθώς δεν γίνεται άμεσα εύκολα αντιληπτή από τον άνθρωπο και εξαπλώνεται με βραδύτερους ρυθμούς (Πανταζίδου κ.α., 2013). Στόχος της αποκατάστασης των εδαφών και των υδροφόρων είναι η προστασία της ανθρώπινης υγείας καθώς και της ποιότητας των υπογείων και επιφανειακών υδάτων, παρόλα αυτά, για τις σημερινές κοινωνίες αποτελεί ένα πρόβλημα εκτεταμένο αλλά και δύσκολο στην αντιμετώπισή του που χρήζει επιπλέον προσοχής και διαχείρισης (Ντούλα, 2013).

Οι μέθοδοι οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν για την απομάκρυνση της ουσίας από το υπέδαφος και τους υδροφορείς είναι πολλαπλές, τόσο φυσικής όσο και χημικής φύσης – με την καθεμία να έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η επιλογή της καταλληλότερης εξ αυτών εξαρτάται από τη φύση των ρύπων, τη συγκέντρωση και τις επιπτώσεις τους καθώς και την υδρογεωλογία της περιοχής, τις κλιματικές, καθώς και τις κοινωνικο-οικονομικές συνθήκες της περιοχής, τις ιδιαιτερότητες και την έκταση της προς αποκατάσταση περιοχής (Ντούλα, 2013).

Οι κυριότερες εφαρμοζόμενες τεχνικές είναι (Tandoi et al., 1995; Wang & Tseng, 2009; Kadlec et al., 2012; Πανταζίδου, 2013):

- Απομάκρυνση της οργανικής φάσης που βρίσκεται παγιδευμένη στην ακόρεστη ζώνη του εδάφους (Soil Vapor Extraction).
- Απομάκρυνση των πτητικών οργανικών ρύπων από το νερό με αεροδιασκορπισμό (Air Sparging).
- Θερμική εκρόφηση (Thermal desorption).
- Προσρόφηση σε Ενεργό Άνθρακα.
- Εκσκαφή και επεξεργασία (Ex situ treatment).
- Άντληση και επεξεργασία (Pump & Treat).
- Παθητικά διαπερατά αντιδρώντα φράγματα.
- Άλλες μέθοδοι, όπως: Επί τόπου επεξεργασία (In Situ), διάχυση, διάλυση, μετασχηματισμός, καταστροφή και χημική/βιολογική σταθεροποίηση των ρύπων.

Τα παραπάνω συμβατικά συστήματα έχουν αρκετά υψηλή απόδοση απαιτούν ωστόσο σχετικά υψηλά κόστη εφαρμογής και συντήρησης. Παράλληλα, συχνά δεν είναι εφικτή η αποτελεσματική εφαρμογή τους λόγω της πολυπλοκότητας των υδροφόρων

(όπως π.χ. το γεγονός ότι παγιδεύεται ο ρύπος στο πορώδες του εδάφους) ή της περιβαλλοντικής υποβάθμισης που δύνανται να προκαλέσουν (π.χ. εκσκαφή και επεξεργασία) (Pant et al., 2010), ενώ είναι πιθανό σε περίπτωση εφαρμογής χημικών μεθόδων εξουδετέρωσης η ποιότητα των υδάτων να υποβαθμιστεί περαιτέρω από τα παραπροϊόντα των αντιδράσεων. Στον αντίποδα υπάρχουν τα συστήματα βιολογικής αποδόμησης των οργανικών ουσιών, με κυριότερα αυτά της φυτοεξυγίανσης, της φυσικής εξασθένησης, των τεχνητών υγροτόπων και της βιοεξυγίανσης.

Η φυσική εξασθένηση ως μέθοδος προτιμάται συχνά για την απορρύπανση υπόγειων υδάτων ρυπασμένων από χλωριωμένα αιθυλένια ωστόσο δεν είναι εφικτή πάντα ως λύση καθώς εξαρτάται από την ύπαρξη συγκεκριμένων περιβαλλοντικών και μικροβιολογικών παραγόντων (Hoelen et al., 2006). Η πλέον αναπτυσσόμενη και οικονομικότερη τεχνολογία αντιρύπανσης υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωροαιθυλένια, είναι σήμερα αυτή της Επιτόπου Βιολογικής Εξυγίανσης (In Situ Bioremediation). Η ενισχυμένη αποδόμηση αφορά ουσιαστικά τη διαδικασία ενίσχυσης των μικροοργανισμών για να επιτευχθεί μείωση συγκεκριμένων ρύπων και περιλαμβάνει την αφαίρεση των περιοριστικών παραγόντων ή και την προσθήκη μικροοργανισμών όπου αυτό είναι απαραίτητο (Hoelen et al., 2006).

Κύρια πλεονεκτήματα της αποτελούν το χαμηλό κόστος εφαρμογής, οι περιορισμένες περιβαλλοντικές επιπτώσεις της, καθώς επίσης και τα υψηλά ποσοστά αποτελεσματικότητας της (Παναγιωτάκης, 2010). Όπως αναφέρει ο τελευταίος, μπορεί να εφαρμοστεί είτε ως Ενδογενής Βιολογική εξυγίανση (Intrinsic Bioremediation) – που δεν εμπεριέχει ανθρώπινη παρέμβαση, είτε ως Ενισχυμένη Επιτόπου Βιολογική Εξυγίανση (Enhanced In Situ Bioremediation) η οποία ωστόσο προϋποθέτει ανθρώπινη παρέμβαση που μπορεί να αφορά προσθήκη του κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων (Βιοδιέγερση) ή προσθήκη του δότη ηλεκτρονίων και των κατάλληλων μικροοργανισμών (Βιοεπαύξηση) (Παναγιωτάκης, 2010; Löffler και Edwards, 2006; La Grega et al. 1994). Η ενίσχυση της δραστηριότητας των εξειδικευμένων αυτών βακτηρίων θεωρείται από τις αποτελεσματικότερες μεθόδους αντιρύπανσης από χλωριωμένες ενώσεις παγκοσμίως, με μόνη απαίτηση την προσθήκη των κατάλληλων δοτών ηλεκτρονίων οι οποίοι θα υποκαθιστούν τα χλώρια της αρχικής ένωσης (Ma et al., 2006). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονίσουμε ότι υπάρχουν και άλλες τεχνολογίες μικροβιακής αποδόμησης των χλωριωμένων

αιθυλενίων, όπως αυτή της ενζυματικής αποδόμησης (συμμεταβολισμού) και της άμεσης οξειδωσης – που πραγματοποιούνται υπό αερόβιες συνθήκες, ωστόσο δεν επικράτησαν έναντι της Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης (Pant et al., 2010; Tiehm & Schmidt, 2011). Η τελευταία μάλιστα (Άμεση Αερόβια Οξειδωση), σύμφωνα με τους ερευνητές αναμένεται να είναι η οικονομικότερη σε εφαρμογή και ταυτόχρονα αμεσότερη και σχετικά αποτελεσματική, ωστόσο στην συγκεκριμένη έρευνα δεν υπήρξε πλήρης αναγωγική αποχλωρίωση (Pant et al., 2010). Η μείωση των ατόμων χλωρίου στην αρχική χλωριωμένη ένωση υπο αναερόβιες συνθήκες συνεπάγεται και μείωση του ρυθμού αποχλωρίωσης, ενώ αντίθετα η αναγωγή από cis-DCE και VC προς λιγότερο χλωριωμένα τελικά προϊόντα είναι πιο εύκολο να πραγματοποιηθεί με αερόβιες διεργασίες (Tiehm & Schmidt, 2011). Επιπροσθέτως, με τη μέθοδο αυτή, η ποιότητα νερού δεν υποβαθμίζεται με την παραγωγή δευτερογενών προϊόντων (π.χ. μεθάνιο, H₂S) ωστόσο απαιτεί ακόμα επιπλέον έρευνα για τον καθορισμό όλων των παραμέτρων της. Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, ενδιαφέρον σε κάθε περίπτωση παρουσιάζει το σύστημα εναλλασσόμενης αναερόβιας/αερόβιας λειτουργίας για αποχλωρίωση των Tiehm & Schmidt (2011).

Πίνακας 2-2: Μηχανισμοί βιολογικής αποχλωρίωσης χλωροαιθυλενίων (Πηγή: Παναγιωτάκης, 2010).

Μηχανισμός αποχλωρίωσης	PCE	TCE	DCEs	VC
Αερόβια οξειδωτική αποχλωρίωση	-	-	√	√
Αερόβια συμμεταβολική οξειδωτική αποχλωρίωση	√	√	√	√
Αναερόβια οξειδωτική αποχλωρίωση	-	-	√	√
Συμμεταβολική αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση	√	√	√	√
Αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση	√	√	√	√

Τέλος, θα πρέπει να επισημανθεί ότι, υπό αερόβιες συνθήκες το PCE θεωρείται μη βιοδιασπάσιμο ενώ το TCE μπορεί να διασπαστεί σε μη τοξικά προϊόντα μέσω διαφόρων οξυγενασών (Maymo-Gatell et al., 1999). Αποτέλεσμα της δυσκολίας χρήσης των παραπάνω διεργασιών είναι η υπερίσχυση της εφαρμογής της Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης.

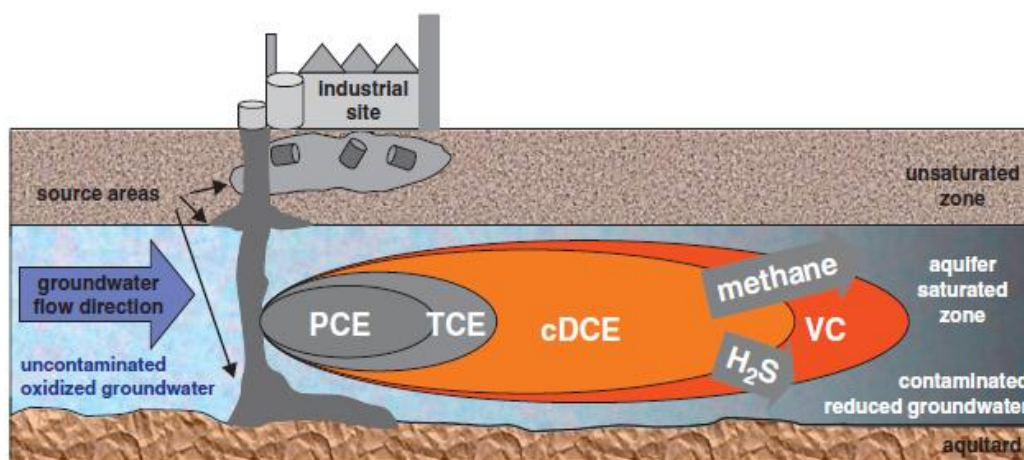
Σε κάθε περίπτωση, όποια από τις μεθόδους βιο-αποκατάστασης πρόκειται να χρησιμοποιηθεί πρέπει να ακολουθηθούν τα παρακάτω τρία στάδια (Ντούλα, 2013):

1. Εργαστηριακές δοκιμές με σκοπό να προσδιοριστεί ο βαθμός βιο-αποδόμησης

των ενώσεων-στόχων από τους μικροοργανισμούς.

2. Πιλοτική εφαρμογή της μεθόδου (μικρή κλίμακα) είτε στο εργαστήριο, είτε στην προς αποκατάσταση περιοχή.
3. Εφαρμογή της μεθόδου στην προς αποκατάσταση περιοχή ή σε άλλο καθορισμένο και ελεγχόμενο χώρο.

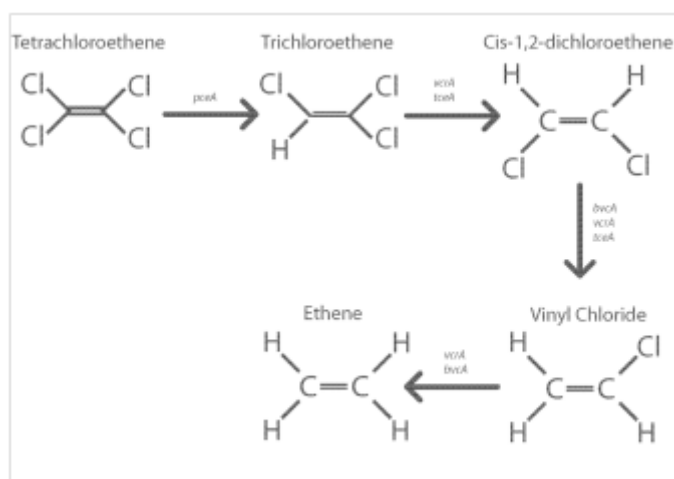
Στα πλαίσια της παρούσας έρευνας θα ασχοληθούμε με το κομμάτι της Επιτόπου Βιολογικής Εξυγίανσης και πιο συγκεκριμένα με την Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση. Η αναερόβια μικροβιακή αναγωγική αποχλωρίωση είναι ένας σημαντικός μηχανισμός επιτόπου φυσικής εξασθένησης των ρυπασμένων υδροφορέων από χλωριωμένες ενώσεις (Aulenta et al., 2006) που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1980 (Tantoi et al., 1995), η οποία μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη δόση ηλεκτρονίων ή/και θρεπτικών συστατικών καθώς και την προσθήκη εξειδικευμένων μικροοργανισμών ικανών να απομειώσουν τις ουσίες αυτές ανάγοντας τες σε ασθενέστερες – μη επιβλαβείς για το περιβάλλον και τον άνθρωπο.



Εικόνα 2-2: Τα στάδια της αναερόβιας αποχλωριωτικής διαδικασίας σε ένα ρυπασμένο υδροφόρο στρώμα (Tiehm & Schmidt, 2011).

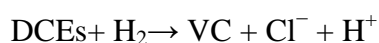
2.3 Η διαδικασία της Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης

Η Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση (ΑΝΑΠ) είναι μία βιολογική διεργασία μέσω της οποίας γίνεται μετατροπή των επικίνδυνων χλωροαιθυλενίων σε λιγότερο επικίνδυνα τελικά προϊόντα, όπως αιθένιο και αιθάνιο. Όπως σε κάθε βιολογική διεργασία, έτσι και στην ΑΝΑΠ λαμβάνουν χώρα ο αναβολισμός και ο καταβολισμός για την ανάπτυξη και επιβίωση των μικροοργανισμών. Ο αναβολισμός αφορά την παραγωγή βιομάζας ενώ ο καταβολισμός στην παραγωγή ενέργειας – διεργασίες που θεωρούνται αλληλοσυνδεόμενες και σε κάθε περίπτωση απαραίτητες για την ύπαρξη και ανάπτυξη της ζωής. Η πραγματοποίηση της Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης (ΑΝΑΠ) προϋποθέτει την προσθήκη του κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων, που θα χρησιμοποιηθεί από τα αναερόβια αναγωγικά βακτήρια – αποχλωριωτές (Harkness et al., 2012). Κατά τη μεταβολική διαδικασία των μικροοργανισμών οι χλωριωμένες ενώσεις λειτουργούν ως δέκτες ηλεκτρονίων ενώ από τους δότες ηλεκτρονίων αποδεσμεύονται τα άτομα υδρογόνου και αντικαθιστούν τα χλώρια που απελευθερώνονται σταδιακά (Tiehm & Schmidt, 2011).



Εικόνα 2-3: Τα στάδια της Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης (Πηγή: Ernst, 2009).

Οι αντιδράσεις της αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης είναι (He et al., 2002):



Οι δότες ηλεκτρονίων μπορεί να είναι πολλοί και διαφορετικοί, όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, αλκοόλες, πολυμερή γαλακτικού οξέος, γαλακτοποιημένα φυτικά έλαια, χιτίνη, πριονίδια ξύλου, υδατάνθρακες και αρκετά άλλα υλικά (AFCEE, 2004; Harkness and Fischer, 2013; Harkness et al., 2012; Bennett et al., 2007; Wu et al., 1998).

Η επιλογή του κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων ανά περίπτωση αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία καθώς από αυτή εξαρτάται η αποτελεσματικότητα της εφαρμογής. Έτσι, η εισπύση ενός οποιοδήποτε δότη ηλεκτρονίων σε έναν ρυπασμένο υπόγειο υδροφορέα δε συνεπάγεται αυτομάτως και την επιτυχή εξυγίανση αυτού, καθώς η διέγερση που προκαλείται δεν αφορά μόνο τα ANAP βακτήρια που βρίσκονται εκεί, αλλά το σύνολο της μικροβιακής κοινότητας του υδροφορέα (Παναγιωτάκης, 2009). Σε κάθε περίπτωση, το υδρογόνο θεωρείται καλός και ταυτόχρονα άμεσος δότης ηλεκτρονίων (H_2) ωστόσο υπάρχει δυσκολία εφαρμογής στις περισσότερες περιπτώσεις εφαρμογής (ιδίως λόγω του γεγονότος ότι ευνοεί τη μεθανογένεση), για αυτό και αντικαθίσταται με οργανικές ενώσεις όπως οι παραπάνω οι οποίες με τη διάσπαση τους θα δώσουν το H_2 (Lee et al., 2007).

Εκτός από το δότη ηλεκτρονίων, είναι απαραίτητα για την διαδικασία και άλλα βασικά θρεπτικά, όπως άζωτο, φωσφόρο, μεταλλικά ιχνοστοιχεία, εκχύλισμα ζύμης και ρυθμισμένο pH μεταξύ 6-8 (Harkness et al., 2012). Στην περίπτωση απουσίας κάποιων από τα παραπάνω είναι πιθανό να αναχαιτιστεί μερικώς ή πλήρως η διαδικασία της αποχλωρίωσης καθώς υπάρχει ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Κατά τη διεργασία της αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης εξειδικευμένα βακτήρια χρησιμοποιούν τα χλωροαιθυλένια ως αποδέκτες ηλεκτρονίων και αποχλωρίωνουν τα PCE και TCE αρχικά σε cis-DCE, στη συνέχεια σε βινυλοχλωρίδιο (VC) και τέλος σε ελάχιστα διαλυτό στο νερό αιθέριο (ETH) (McCarty, 1997; Guerrero-Barajas & Garcia-Pena, 2010; Harkness et al., 2012; Wang & Tseng, 2009).

Η παραπάνω διαδικασία μπορεί να διακριθεί σε δύο τύπους: αυτόν της συμμεταβολικής αναγωγικής αποχλωρίωσης – όπου συμμετέχουν μεθανογόνοι και θειοαναγωγικοί μικροοργανισμοί, και αυτόν της αλογονοαναπνοής – όπου η

ανάπτυξη των παραπάνω βακτηρίων βασίζεται στον δότη ηλεκτρονίων (H_2) και στον άμεσο δέκτη του που είναι οι χλωριωμένες ενώσεις οι οποίες ανάγονται (Wang & Tseng, 2009; Guerrero-Barajas & Garcia-Pena, 2010).

Μέχρι σήμερα έχουν παρατηρηθεί αρκετά είδη βακτηρίων που αποχλωριώνουν τους αλιφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Κάποια από αυτά αποχλωριώνουν μερικώς τα PCE και TCE σε cis-DCE ή και VC, ωστόσο, μόνο τα βακτήρια *Dehalococcoides spp.* έχουν την ιδιότητα να αποχλωριώνουν τα χλωροαιθυλένια πλήρως σε αιθένιο (ETH) (Holliger et al., 2003; Παναγιωτάκης, 2009; Haest et al., 2010; Harkness et al., 2012). Ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας είναι η ύπαρξη ποικιλίας μικροοργανισμών και όχι η απομόνωση ενός μόνο είδους (π.χ. *Dehalococcoides spp.*), καθώς για την πραγμάτωση της αποχλωρίωσης πρέπει να έχει προηγηθεί η διάσπαση του δότη ηλεκτρονίων (στην περίπτωση που ο δότης δεν είναι άμεσα H_2 , αλλά κάποιος έμμεσος, π.χ. λιπαρό οξύ) ώστε να είναι διαθέσιμος ο δότης ηλεκτρονίων για να προσληφθεί από αυτούς (Kouznetsova et al., 2010; Azizian et al., 2010; Harkness et al., 2012).

Ένα ακόμα ζήτημα το οποίο αφορά το ρυθμό της αναγωγικής αποχλωρίωσης, είναι ότι αυτός μειώνεται με τη μείωση των ατόμων χλωρίου με αποτέλεσμα στα τελευταία στάδια και ιδίως σε αυτό της μετατροπής του βινυλοχλωριδίου (VC) σε αιθένιο (ETH) η διαδικασία να είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και θερμοδυναμικά δυσκολότερη από ότι στα προηγούμενα αποχλωριωτικά στάδια (Tiehm & Schmidt, 2011). Χαρακτηριστικά, αναφέρεται ότι κάθε βήμα αποχλωρίωσης είναι 10 φορές αργότερο από το προηγούμενο του κάτι που έχει ως αποτέλεσμα η αναγωγή του VC σε αιθένιο να πραγματοποιείται περίπου κατά 10000 φορές πιο αργά από ότι η αναγωγή αντίστοιχης συγκέντρωσης του PCE σε TCE (Tandoi et al., 1994). Παράλληλα, μηχανισμό παρεμπόδισης της αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης αποτελεί και η ίδια η προς αποχλωρίωση ουσία (TCE) καθώς, σύμφωνα με έρευνες που πραγματοποιήθηκαν η τοξικότητα του σε μεγάλες συγκεντρώσεις δύναται να προκαλέσει αναχαίτιση στην ανάπτυξη αλλά και τη δράση των αποχλωριωτικών μικροοργανισμών (Haest et al., 2010). Έτσι, αυξανόμενη της συγκέντρωσης της χλωριωμένης ένωσης παρατηρήθηκε από ερευνητές τόσο αυτό-αναχαίτιση της διαδικασίας όσο και μεγάλοι χρόνοι υστέρησης (Yang & McCarty, 2000). Οι τελευταίοι μάλιστα παρατηρούν ότι για συγκεντρώσεις πάνω από 1 mM TCE

αναμένεται να υπάρχει κάποιος χρόνος υστέρησης και για ποσότητες πάνω από 8.4 mM είναι πιθανή η πλήρης αναχαίτιση της δράσης των μικροοργανισμών, με τους Duhamel et al. (2002), να θέτουν το όριο αποφυγής της αναχαίτισης στα 2 mM TCE και από τα πειράματα των Haest et al. (2010) να είναι στα 4 mM TCE. Παρόλα αυτά, πιθανή αιτία του χρόνου υστέρησης που εμφανίζεται σε αρκετές εφαρμογές αποτελεί και το γεγονός του μεγαλύτερου απαιτούμενου χρόνου εγκληματισμού για τους αποχλωριωτές – σε σχέση με τους μεθανογόνους και τους θεικοαναγωγικούς μικροοργανισμούς, όπως εξηγείται στο άρθρο των Nelson et al. (2002).

Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει και η έρευνα των Tandoi et al. (1994), οι οποίοι εξέτασαν τη συμπεριφορά των καλλιεργειών υπό συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης PCE (550 $\mu\text{mol/l}$, που αντιστοιχούν περίπου σε 322 $\mu\text{mol/l}$ της συγκέντρωσης στο υδατικό διάλυμα) και μετά τον απαιτούμενο χρόνο εγκληματισμού των μικροοργανισμών πάνω από το 80% του PCE αποχλωριονόταν πλήρως σε αιθέριο μέσα σε 2 ημέρες με το υπολειπόμενο ποσοστό να αφορά κατά βάση VC, ενώ μετά τις 4 ημέρες από την εισαγωγή της ουσίας-ρύπου το αιθέριο αντιπροσώπευε πάνω από το 99% των προϊόντων. Όσον αφορά τα δευτερογενή προϊόντα της διάσπασης του TCE, δηλαδή το cis-DCE και το VC αυτά σύμφωνα με τις πειραματικές παρατηρήσεις αρχίζουν να διασπώνται μετά την εξάλειψη του TCE ή PCE (Haest et al., 2010; Tandoi et al., 1994). Τέλος την ίδια θεωρία επιβεβαιώνει και η ομάδα των Maymo-Gatell et al. (1999), καθώς όπως παρατήρησαν η μετατροπή του VC σε ΕΤΗ ξεκίνησε μετά την εξάντληση του PCE ενώ όπως αναφέρεται ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης – κάτι που επιβεβαιώνεται και από τις παρατηρήσεις των Tandoi et al. (1994) που επιπλέον χαρακτηρίζουν τις κινητικές μείωσης των PCE, TCE, cis-DCE και 1,1-DCE ως μηδενικής τάξης και αυτή της αναγωγής του 1,2-DCE σε VC ως πρώτης τάξης.

Συχνό φαινόμενο κατά τις εφαρμογές αποχλωρίωσης αποτελεί και η μερική αποχλωρίωση του TCE που έχει ως αποτέλεσμα συσσώρευση cis-DCE και VC, χωρίς δηλαδή περαιτέρω μετασχηματισμό στο τελικό προϊόν (αιθέριο), γεγονός που μπορεί να οφείλεται (Bennett et al., 2007; Maymo-Gatell et al., 1995; Smatlak et al., 1996 & Cupples et al., 2004):

- Στην απουσία κατάλληλων μικροβιακών κοινοτήτων αποχλωρίωσης,

- Στην ύπαρξη ανταγωνισμού από άλλες μικροβιακές κοινότητες ή άλλους αποδέκτες ηλεκτρονίων, ή
- Σε περιορισμούς κινητικών παραμέτρων που δεν επιτρέπουν την πλήρη αποχλωρίωση.

Αναφορικά με την αξιοπιστία της διαδικασίας αξίζει να αναφερθεί ότι τα ισοζύγια μάζας που επιτεύχθηκαν από τα πειράματα των Aulenta et al. (2006) παρουσίαζαν ανάκτηση του ρύπου στα προϊόντα της αποχλωρίωσης από 74.1% έως και 106.3%, αποδεικνύοντας ότι η μείωση οφείλεται κατά βάση στην αποδόμηση των ουσιών παρά σε μηχανισμούς ρόφησης ή πτητικοποίησης. Συχνό φαινόμενο ωστόσο το οποίο παρατηρείται στις μικροβιακές κοινότητες αποχλωρίωσης είναι η μετατροπή του αιθενίου σε CO₂ υπό αναερόβιες συνθήκες με αποτέλεσμα αυτός ο «δείκτης» της αποχλωρίωσης από VC να μην υφίσταται και να υπάρχουν αμφιβολίες για την τύχη της διεργασίας (Bradley & Chapelle, 2002 από Bradley, 2003).

Ακόμη, παρατηρώντας τους χρόνους του πειράματος οι Maymo-Gatell et al. (1999) παρατηρούν στις 2 πρώτες ώρες μετασχηματισμό του PCE σε TCE, το πρώτο ισομερές του DCE (cis-DCE) να εμφανίζεται στις 5,5 ώρες, το 1,1-DCE και το VC στις 14,5 ώρες ενώ το trans-DCE στις 21,5 ώρες. Μετά την πλήρη απομείωση του PCE – που πραγματοποιήθηκε περίπου στις 72 ώρες τα περισσότερα ενδιάμεσα προϊόντα είχαν εξαφανιστεί με εξαίρεση το trans-DCE, ενώ παράλληλα το αιθέριο έκανε την εμφάνισή του στις 40 ώρες με το ρυθμό παραγωγής του να αυξάνεται μετά την εξάλειψη του PCE (Maymo-Gatell et al., 1999).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η εφαρμογή πεδίου των Hoelen et al., (2006) οι οποίοι έπειτα από την πειραματική τους παρατήρηση εφάρμοσαν τη μέθοδο στην ρυπασμένη περιοχή Moffett, στην Καλιφόρνια όπου ωστόσο προϋπήρχε μερική αποχλωρίωση έχοντας προκαλέσει συσσώρευση cis-DCE και VC – τα οποία και αποτελούν πλέον τους ρύπους-στόχους τους. Σκοπός τους ήταν να εξαντλήσουν τα χλωριωμένα αιθυλένια από το υπέδαφος στο οποίο ωστόσο παράλληλα υπήρχε παρουσία θειικών ιόντων (250 mg/l) και επιτεύχθηκε μέσω της προσθήκης προπιονικού οξέως ως δότη ηλεκτρονίων σε περίσσεια 40% (150 mg/l), και της ανακυκλοφορίας για την ομογενοποίηση της διαδικασίας σε όλα τα σημεία του υδροφόρου ώστε να μη δημιουργηθεί περιοριστικός παράγοντας από την πρόσληψη ηλεκτρονίων για τη θεικοαναγωγή. Όπως αναφέρεται, η αρχική συγκέντρωση του

cis-DCE ήταν από 50 – 1000 µg/l και του VC στα 10 – 200 µg/l, με την κηλίδα της ρύπανσης να εκτείνεται αρκετά χιλιόμετρα μακριά από την πηγή της – με τις συγκεντρώσεις του cis-DCE σχεδόν να εκμηδενίζονται σε περίπου μία εβδομάδα, αποδίδοντας VC και εν συνεχεία μετά από μερικές μέρες αιθέριο, έχοντας στους 2 πρώτους μήνες λειτουργίας απόδοση μετασχηματισμού πάνω από 90% (ό.π.). Αντίστοιχα, οι μικρόκοσμοι των He et al., που δημιουργήθηκαν με υλικό από τα κατώτερα στρώματα του υδροφόρου της περιοχής Bachman αποχλωρίωναν πλήρως τα PCE, TCE, cis-DCE και VC σε αιθέριο μέσα σε 14 εβδομάδες, ανεξαρτήτως του είδους του δότη ηλεκτρονίων που τους χορηγούνταν (He et al., 2002). Ενδιαφέρον κατ' αυτούς παρουσιάζει το γεγονός ότι ορισμένοι από τους μικροκόσμους που τροφοδοτούνταν με μοναδικό δότη το οξικό οξύ παρουσίασαν πλήρη αποχλωρίωση του PCE σε αιθέριο. Παρόλα αυτά, η προσθήκη του δότη ηλεκτρονίων ήταν απαραίτητη για να επιτευχθεί πλήρης αποχλωρίωση της αρχικά προστιθέμενης ποσοτήτας χλωροαιθυλενίου, ειδάλλως σύμφωνα και με τα πειράματα ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν, δεν αναμενόταν πάνω από 20% μείωση της χλωριωμένης ένωσης (ό.π.).

Ορισμένα προβλήματα που ενδέχεται να προκύψουν από την εφαρμογή της συγκεκριμένης αντιρυπαντικής τεχνολογίας είναι: η μείωση του pH του νερού, τα αυξημένα στερεά και διαλυμένα μέταλλα, η παραγωγή σουλφιδίων και συμπλόκων μετάλλων κ.α. – ωστόσο κατά κανόνα περιορίζονται στη ζώνη εφαρμογής της (Bennett et al., 2007; Hoelen et al., 2006), ενώ σε κάποιες περιπτώσεις αναμένεται και πιθανώς αυξημένο δυναμικό πυρκαγιάς και έκρηξης από την υπερβολική παραγωγή μεθανίου από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς (Lee et al., 2007). Η αύξηση ωστόσο της βιομάζας δυνητικά ενδέχεται να προκαλέσει τοπικά φαινόμενα συσσώρευσης, μείωσης του πορώδους του υδροφόρου και πιθανώς κατ' επέκταση έμφραξη του υδροφόρου και μείωση της υδραυλικής του αγωγιμότητας (Hoelen et al., 2006). Πιθανή λύση στα παραπάνω προβλήματα αποτελεί η διαρκής ανάδευση του νερού μέσω ανακυκλοφορίας του με γεωτρήσεις άντλησης και εισπίεσης, η ασυνεχής παροχή του δότη ηλεκτρονίων (π.χ. για 8 ώρες/ημέρα), η διατήρηση χρόνων «ανάπαυσης» του υδροφόρου μέσω της διακοπής της Βιοδιέγερσης του ή και εισπίεση χημικών που δύνανται να αντιμετωπίσουν κάποια από τα προβλήματα που προαναφέρθηκαν (Hoelen et al., 2006). Ένα ακόμα σημαντικό πρόβλημα που μπορεί να δημιουργηθεί κατά την εφαρμογή της διαδικασίας είναι η παραγωγή οξικού οξέως

ως παραπροϊόν το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του COD σε συγκεντρώσεις έως και μερικών χιλιάδων mg/l (Lee et al., 2007). Παρόλα αυτά, υπάρχουν ενδείξεις ότι το οξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αναγωγική αφαλογόνωση του PCE και TCE σε cis-DCE, ή ακόμα και για τη μείωση των cis-DCE σε VC (Lee et al., 2007).

Από τα πειράματα που πραγματοποίησαν οι Azizian et al. (2010) με στήλη αποχλωρίωσης από υλικό του ρυπασμένου υδροφόρου Hanford στην περιοχή Pasco των ΗΠΑ γίνεται κατανοητό ότι όλοι οι αργά διασπώμενοι δότες ηλεκτρονίων μπορούν να αποτελέσουν μηχανισμούς αποτελεσματικής αποχλωρίωσης – ξεχωρίζοντας ωστόσο για την απόδοση του το φορμικό οξύ.

Εκτός όμως από τις βιοτικούς παράγοντες, σημαντικό ρόλο στη διαδικασία παίζουν και οι αβιοτικοί – όπως είναι η θερμοκρασία και το pH (Harkness et al., 2012). Έτσι, στο πείραμα των Heimann et al. το 2007, μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών θερμοκρασιών (σε εύρος 4 – 60°C) σε ανάμικτες καλλιέργειες *Dehalococcoides* για την αναγωγική αποχλωρίωση TCE με δότες ηλεκτρονίων προπιονικό και γαλακτικό οξύ. Οι συγγραφείς παρατηρούν ότι μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία αλλάζουν οι ρυθμοί ωστόσο το σύνολο της διαδικασίας εξαρτάται κατά βάση από το είδος του δότη ηλεκτρονίων καθώς χρησιμοποιώντας το ταχέως διασπώμενο γαλακτικό οξύ επακολούθησε γρήγορη και πλήρης αποχλωρίωση σε συνδυασμό με άμεση μεθανογένεση. Αντίθετα σε αργά διασπώμενους δότες – όπως το προπιονικό οξύ απαιτήθηκε 2 με 3 φορές μεγαλύτερος χρόνος για την πραγμάτωση της διαδικασίας καθώς υπήρξε και μία φάση υστέρησης πριν την αποχλωρίωση του cis-DCE με παράλληλη συσσώρευση υδρογόνου και μεθανίου, για μέσες θερμοκρασίες (15–30°C) (Heimann et al., 2007). Επιπλέον, για τον ίδιο δότη και θερμοκρασίες κάτω των 10°C παρατηρήθηκε ότι δεν πραγματοποιούνταν αποχλωρίωση από το cis-DCE προς το τελικό προϊόν της αντίδρασης (αιθένιο), ενώ, στον αντίποδα χρησιμοποιώντας το ταχέως διασπώμενο γαλακτικό οξύ η πλήρης αποχλωρίωση επετεύχθη στις 74 ημέρες παρά τη χαμηλή θερμοκρασία με ταυτόχρονη μεθανογένεση (ό.π.). Με βάση λοιπόν τις παραπάνω παρατηρήσεις, γίνεται αντιληπτό ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες και με τη χρήση αργά διασπώμενου δότη ηλεκτρονίων η αποχλωριωτική διαδικασία είναι πιθανό να απαιτήσει περισσότερο χρόνο για να πραγματοποιηθεί ή και να αναχαιτιστεί. Αντίστοιχα, όπως προαναφέρθηκε το pH θα πρέπει να είναι ρυθμισμένο μεταξύ 6-8 ειδάλλως είναι πιθανή η αναχαίτιση της δράσης των μικροοργανισμών (Harkness et

al., 2012). Τέλος, αναχαιτιστική δράση φέρεται να έχουν τα νιτρικά ιόντα που συχνά υπάρχουν στους υπόγειους υδροφορείς – είτε λόγω φυσικής προέλευσης είτε ως παράλληλη ανθρωπογενής ρύπανση, ενώ δεν αποκλείεται και η αναχαιτίση λόγω των παραπροϊόντων της αποθείωσης (Nelson et al., 2002).

2.4 Οι δότες ηλεκτρονίων (e⁻) στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Όπως προαναφέρθηκε, η μέθοδος της αποχλωρίωσης η οποία μελετάται στο παρόν κείμενο βασίζεται στην αναγωγή των χλωριωμένων ενώσεων σε απλούστερες ενώσεις από τις οποίες απομακρύνονται τα άτομα χλωρίου που τις καθιστούν επιβλαβείς για το περιβάλλον και τα έμβια όντα. Λόγω του ηλεκτραρνητικού τους χαρακτήρα τα χλωροαιθυλένια, έχουν την τάση να συμπεριφέρονται ως αποδέκτες ηλεκτρονίων και να αποχλωριώνονται αναγωγικά (Γιολδάση, 2009). Βάση των στοιχειομετρικών υπολογισμών τα απαιτούμενα ηλεκτρόνια για τη διαδικασία της αποχλωρίωσης είναι 8 ανά μόριο PCE και 6 ανά μόριο TCE, άρα με την πλήρη μετατροπή οργανικού δότη ηλεκτρονίων κάθε γραμμάριο COD μπορεί να αποχλωρίώσει 20.83 mmol TCE ή 15.63 mmol PCE σε αιθένιο που αντιστοιχούν εν τέλει σε 0.048 g COD/mmol TCE και 0.064 g COD/mmol PCE αντίστοιχα, ώστε να επιτευχθεί πλήρης αποχλωρίωση (Wu et al., 1998), ωστόσο, αυτό ισχύει υπό την προϋπόθεση ότι έχουμε πλήρη μετατροπή του δότη – κάτι που δεν είναι εφικτό για όλους τους δότες ηλεκτρονίων που χρησιμοποιούνται στην αναγωγική αποχλωρίωση. Για να πραγματοποιηθεί η αναγωγή είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων ο οποίος μπορεί να είναι είτε άμεσος (H⁺), είτε έμμεσος μέσω της αναερόβιας αποδόμησης οργανικών ουσιών (π.χ. η γλυκόζη, το φορμικό οξύ, το εκχύλισμα ζύμης, η μεθανόλη, το γαλακτικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το βουτυρικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, η αιθανόλη και άλλα οργανικά οξέα ή οργανικές ύλες) (Fennell et al., 1997; Heimann et al., 2007; Duhamel et al., 2002; He et al., 2002) καθώς και υλικά όπως αλεύρι, γάλα, βιομηχανικά λύματα, τυρόγαλο, καλαμποκέλαιο, μελάσσες και κοπριά (Lee et al., 1997 από DiStefano et al., 2001).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Aulenta και την ομάδα του, το 2007, μελετήθηκε η μεταβλητότητα στις παράλληλες με την αποχλωρίωση αντιδράσεις για

ορισμένους διαφορετικούς δότες ηλεκτρονίων. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκαν οι δυνατότητες διαφορετικών υποστρωμάτων όπως γαλακτικό οξύ, βουτυρικό οξύ και μίγμα οξικού οξέως και υδρογόνου ως δότες στην αναγωγική αποχλωριωτική διαδικασία σε μικροκόσμους που περιείχαν χόμα και υπόγειο νερό από ρυπασμένη με χλωροαιθυλένια περιοχή και βρέθηκε ότι όλοι ήταν ικανοί να ενισχύσουν την αντίδραση (Aulenta et al., 2007). Ιδιαίτερα σημαντική παράμετρο αποτελεί η γνώση και κατανόηση των κινητικών παραμέτρων μετασχηματισμού του δότη ηλεκτρονίων και της απελευθέρωσης υδρογόνου από αυτόν (Heimann et al., 2005). Παρόλα αυτά, εκτός του είδους του δότη, η επιλογή και εισπίεση της σωστής ποσότητας δότη ηλεκτρονίων παίζει σημαντικό ρόλο καθώς στο υδροφόρο στρώμα που θέλουμε να απορρυπάνουμε από τις χλωριωμένες ενώσεις υπάρχουν και άλλοι μικροοργανισμοί οι οποίοι δρουν ανταγωνιστικά απέναντι στους αποχλωριωτές. Έτσι, είναι πιθανό να διεγείρει την δραστηριότητα τους με αποτέλεσμα να προσλαμβάνουν και αυτά δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγή θεικών, διοξειδίου του άνθρακα, σιδήρου (Fe^{+3}) ή άλλων αποδεκτών ηλεκτρονίων και να δημιουργείται ανταγωνισμός για την πρόσληψη της τροφής μεταξύ των διαφορετικών πληθυσμών (Lee et al., 2007; Aulenta et al., 2007).

Σε κάθε περίπτωση, τα οργανικά οξέα ως δότες – όπως το βουτυρικό οξύ που χρησιμοποιούμε και στη δική μας εφαρμογή θεωρούνται ως βέλτιστοι καθώς αποδεσμεύουν αργά το υδρογόνο (H_2) που περιέχεται στις κυκλικές αλυσίδες τους και μπορεί να δεσμεύει με το βέλτιστο ρυθμό από τους μικροοργανισμούς (Ma et al., 2006) ώστε να αποφεύγονται έντονα φαινόμενα ανταγωνισμού από μικροοργανισμούς με χαμηλό χρόνο ανάπτυξης/παραμονής, όπως οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί. Η σπουδαιότητα χορήγησης του δότη ηλεκτρονίων με τον τρόπο αυτό περιγράφεται και στη μελέτη της ομάδας του Aulenta, όπου σε καλλιέργεια Αποχλωρίωσης PCE με βουτυρικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων, όταν το τελευταίο αντικαταστάθηκε από H_2 ο ρυθμός της αποχλωρίωσης τετραπλασιάστηκε ωστόσο υπήρξαν μεγάλες απώλειες προς άλλες διεργασίες που το χρησιμοποίησαν ως δότη πριν την ANAP (Aulenta et al., 2006). Οι τελευταίοι, στην έρευνα τους κάνουν μνεία σε αυτή των Fennell et al. (1997), όπου πραγματοποιήθηκε μία εκτεταμένη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών δοτών ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση του τετραχλωροαιθυλενίου. Συγκεκριμένα, εξέτασαν την αιθανόλη, το γαλακτικό οξύ, το προπιονικό οξύ και βουτυρικό οξύ και έφτασαν στο συμπέρασμα ότι όντως η χρήση

του προπιονικού και του βουτυρικού οξέος, υπόσχονταν αποδοτικότερη ΑΝΑΠ, με λιγότερη μεθανογένεση, σε σχέση με τους δύο πρώτους δότες ηλεκτρονίων (Fennell et al., 1997), ενώ προσθέτουν ότι η ποσότητα του δότη ηλεκτρονίων αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό παράγοντα για την εκτέλεση και την ολοκλήρωση της αποχλωριωτικής διαδικασίας γι' αυτό και η χρήση οργανικών δοτών ηλεκτρονίων με χαμηλές ταχύτητες ζύμωσης και χαμηλή μερική πίεση υδρογόνου έχει συγκριτικό πλεονέκτημα (Fennell et al., 1997; Aulenta et al., 2007).

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τους Aulenta et al., (2007) επισημαίνεται ότι στο τέλος της περιόδου παρακολούθησης – που ορίστηκε στις 240 ημέρες, η αποχλωρίωση που πραγματοποιήθηκε είχε περίπου τα ίδια αποτελέσματα και για τους τρεις δότες ηλεκτρονίων που δοκιμάστηκαν (γαλακτικό ανιόν, βουτυρικό ανιόν και μίγμα υδρογόνου - οξικού οξέως). Γίνεται συνεπώς κατανοητό ότι οι παραπάνω δότες μπορούν να λειτουργήσουν εξίσου καλά στο σύνολο της διαδικασίας και ουσιαστικά η διαφορά τους έγκειται στο χρόνο υστέρησης και στους ρυθμούς αποδέσμευσης των ηλεκτρονίων και κατ' επέκταση στους ρυθμούς αποχλωρίωσης. Κατά την έρευνα των Aulenta et al. (2006) η μέγιστη αποχλωρίωση βάσει δότη ακολουθεί την παρακάτω φθίνουσα σειρά: *Γαλακτικό Ανιόν - Βουτυρικό Ανιόν - Υδρογόνο - Εκχύλισμα Ζύμης - Δείγμα ελέγχου* (χωρίς δότη), με τις πρώτες ενώσεις να μετασχηματίζονται ταχύτερα σε σχέση με τις επόμενες, αποδεσμεύοντας οξικό οξύ και υδρογόνο. Παρά τις διαφορές στην ποσότητα του δότη που καταναλώθηκε, όλοι οι δότες ηλεκτρονίων που δοκιμάστηκαν ολοκλήρωσαν την αποχλωριωτική διαδικασία σε βάθος χρόνου (Aulenta et al., 2006). Σε νεότερη έρευνα τους οι ίδιοι παρατηρούν ότι για την απομάκρυνση 1 mmol χλωριωμένων ενώσεων ήταν απαραίτητα 2.13 meq/mmol Cl για το γαλακτικό οξύ, 1.01 meq/mmol Cl για το βουτυρικό οξύ και 0.39 meq/mmol Cl για το μίγμα υδρογόνου - οξικού (Aulenta et al., 2007). Από τις παραπάνω ποσότητες παρατηρείται ότι το μίγμα υδρογόνου-οξικού ήταν πιο αποδοτικό για την αποχλωριωτική διαδικασία παρόλο που δεν κατάφερε να εκμηδενίσει την προστιθέμενη συγκέντρωση θεικών ιόντων (ό.π). Παρόλα αυτά, τονίζεται ότι η προσθήκη του δότη ηλεκτρονίων σε μία ρυπασμένη από χλωριωμένες ενώσεις περιοχή δεν ακολουθείται απαραίτητα από την αποχλωριωτική διαδικασία καθώς είναι πιθανό να μην υπάρχουν στο έδαφος οι απαραίτητοι μικροοργανισμοί, συνεπώς και απαιτείται η προσθήκη τους (Ma et al., 2006)

Έτσι, γίνεται αντιληπτό ότι σημαντικό ρόλο σε μία τέτοια εφαρμογή διαδραματίζει ο συνδυασμός των συντροφικών βακτηρίων-αποδομητών. Ένας ορθός σχεδιασμός της καλλιέργειας που συνδυάζει αποδομητές για το προπιονικό ή το βουτυρικό οξύ με τους αποχλωριωτές είναι ικανός στο να δημιουργήσει και να συντηρήσει ένα σύστημα στο οποίο ο δότης ηλεκτρονίων αποδεσμεύει αργά αλλά σταδιακά υδρογόνο (H^+) το οποίο χρησιμοποιείται για να τροφοδοτηθεί η αποχλωρίωση, παραμερίζοντας παράλληλα και τη δράση των μεθανογόνων μικροοργανισμών – οι οποίοι απαιτούν αρκετά μεγαλύτερες ποσότητες δότη ηλεκτρονίων και μάλιστα άμεσα προσλαμβανόμενες (Fennell et al, 1997). Αντίθετα, όπως παρατήρησε στην έρευνα της η τελευταία, ο άμεσος μετασχηματισμός των δοτών – όπως αυτός που συμβαίνει με την αιθανόλη και το γαλακτικό οξύ δίνει άμεσα αλλά για σύντομο διάστημα μία δόση H_2 η οποία εκμεταλλεύεται από τους υπόλοιπους υδρογονοτροφικούς οργανισμούς και προκαλεί περιορισμό του δότη για τη διαδικασία της αποχλωρίωσης και κατ' επέκταση περαιτέρω ζήτηση για δότη ηλεκτρονίων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Fennell et al. (1997) από τη λειτουργία των πειραματικών συστημάτων τους σε βάθος χρόνου προκύπτει να μην υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στην αποχλωριωτική διαδικασία σε βάθος χρόνου για τους διαφορετικούς δότες ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν (αιθανόλη, γαλακτικό οξύ, βουτυρικό οξύ και H_2), καθώς όλοι οι δότες προχώρησαν την αποχλωρίωση σε VC και αιθένιο σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Παράλληλα, όπως παρατήρησαν κατά την πειραματική διαδικασία, διπλασιάζοντας το δότη ηλεκτρονίων αυξήθηκε και το παραγόμενο αιθένιο σε όλες τις καλλιέργειες. Σημαντικό ρόλο πηγής ηλεκτρονίων φαίνεται να διαδραματίζει και το Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) το οποίο προστίθεται στις καλλιέργειες ως θρεπτικό για την ανάπτυξη των υποστρωμάτων, καθώς σε βάθος χρόνου αποδεσμεύει το περιεχόμενο του υδρογόνο και παράλληλα δίνει στον μικρόκοσμο θρεπτικές ουσίες απαραίτητες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Fennell et al., 1997). Παρόλα αυτά, δε χρησιμοποιείται όλο το ποσοστό του δότη που προστίθεται για την Αναγωγική Αποχλωρίωση. Από τα πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας (batch) που πραγματοποίησαν οι Carr et al. (1998), παρατήρησαν ότι μόλις το 0,4% της ισοδύναμης προστιθέμενης ποσότητας υδρογόνου καταναλώθηκε από τους αποχλωριωτές, το 69% χρησιμοποιήθηκε για μεθανογένεση και το υπόλοιπο 30% για την ανάπτυξη της βιομάζας και οξικογένεση

– γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλες έρευνες (Yang & McCarty, 1998; Wu et al., 1998; Bradley, 2003).

2.4.1 Το Υδρογόνο (H₂) ως δότης ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Το υδρογόνο (H₂) ως δότης ηλεκτρονίων θεωρείται από τους βέλτιστους λόγω της αμεσότερης πρόσληψης του από τα αναγωγικά βακτήρια (Loffler et al., 2000), ωστόσο σε εκτεταμένες εφαρμογές πεδίου παρουσιάζει δυσκολίες στην εφαρμογή και αρκετά υψηλό κόστος σε σχέση με τους οργανικούς δότες (Ma et al., 2006). Ακόμη, ένας δότης ηλεκτρονίων δε μπορεί να θεωρηθεί βέλτιστος για όλα τα είδη των βακτηρίων, έτσι, παρόλο που το υδρογόνο θεωρείται βέλτιστο για τον μικροοργανισμό *D. ethenogenes*, σε ένα μικρόκοσμο που περιέχει άλλους *Dehalococcoides* η αναγωγική αποχλωρίωση ήταν δυνατή με μεγάλο βαθμό επιτυχίας με πολλαπλούς δότες – όπως βουτυρικό ανιόν, γαλακτικό ανιόν, μίγμα γαλακτικού και βενζοϊκού οξέος και προπιονικού οξέως (Bradley, 2003). Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι με την άμεση εισπύση υδρογόνου για την αποχλωρίωση, αυτό προσλαμβάνεται από άλλους μικροοργανισμούς για τις δραστηριότητες τους (π.χ. θειοαναγωγικούς) περιορίζοντας έτσι την ποσότητα που απομένει για τους αποχλωριωτές και απαιτώντας μεγαλύτερες δόσεις για το ίδιο αποτέλεσμα (Yang & McCarty, 1998; Ma et al., 2006).

Τόσο ο Aulenta όσο και ο Ma στα πειράματά τους με μίγμα υδρογόνου-οξικού οξέως παρατήρησαν ότι ο ρυθμός αποχλωρίωσης αυξήθηκε μετά την προσθήκη του οξικού οξέως (και συγκεκριμένα την 130^η ημέρα), συνιστώντας ότι οι αποχλωριωτές μικροοργανισμοί απαιτούν το οξικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων και πηγή άνθρακα (Aulenta et al., 2006; Ma et al., 2006; Aulenta et al., 2007). Επιπλέον, όπως παρατηρήθηκε από την ομάδα του Aulenta κατά τις πρώτες 125 ημέρες που το σύστημα τροφοδοτούνται μόνο με H₂ οι μικροοργανισμοί έδιναν σχετικά χαμηλό ρυθμό κατανάλωσης και συγκεκριμένα 0.19 meq/l (Aulenta et al., 2007). Στη συνέχεια του πειράματος (ημέρες 135-240) που τροφοδότησαν το σύστημα και με οξικό οξύ, ο ρυθμός αυξήθηκε φτάνοντας τα 0.49 meq/l. Έτσι, ως βέλτιστος δότης,

από την έρευνα των Aulenta et al. (2007) προέκυψε ο συνδυασμός υδρογόνου-οξικού οξέος καθώς επιτυγχάνει στο βέλτιστο τη διαδικασία της αποχλωρίωσης και έχει χαμηλή συσσώρευση παραπροϊόντων όπως VFAs, Fe(II) και Mn(II), και υπολειπόμενη τοξικότητα στο επεξεργασμένο δείγμα. Επιπλέον, σύμφωνα με τους τελευταίους από την μικροσκοπική παρατήρηση με τη μέθοδο FISH που εφαρμόστηκε εντοπίστηκε στους συγκεκριμένους μικροκόσμους επικράτηση των *Dehalococcoides spp.*, σε αντίθεση με τους μικροκόσμους που τροφοδοτήθηκαν με γαλακτικό ή βουτυρικό οξύ που παρουσίαζαν υψηλότερη βιοποικιλότητα.

Το υδρογόνο ως άμεσος δότη ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε και στα πειράματα της ομάδας του Hoelen (2004), όπου και παρατηρήθηκε άμεση ανταπόκριση των πρωτογενών ρύπων (PCE & TCE) καθώς και των παραγώγων του και επήλθε γρήγορος και πλήρης μετασχηματισμός τους σε αιθυλένιο. Παράλληλα, αναφέρεται ότι υπήρξε ταυτόχρονα θεικοαναγωγή – με τα θεικά να εξαντλούνται σε λιγότερο από 4 ημέρες καθώς επίσης και μεθανογένεση η οποία ωστόσο ξεκίνησε με υστέρηση 7 μέρες (Hoelen et al., 2004). Σε κάθε περίπτωση ισχύει ότι η άμεση προσθήκη υδρογόνου σε ένα ρυπασμένο από χλωλοαιθένια υδροφόρο που βρίσκεται υπό αναερόβιες συνθήκες, κατά κανόνα δεν επιτυγχάνει μόνο την ανάπτυξη των αποχλωριωτών αλλά και των μεθανογόνων και οξικοτροφικών μικροοργανισμών, ωστόσο, παρά την ύπαρξη ανταγωνισμού για το δότη ηλεκτρονίων μεταξύ των οργανισμών αυτών, είναι αναμενόμενο να αναπτυχθούν και συντροφικές σχέσεις μεταξύ των βακτηριακών ομάδων (Ma et al., 2006).

2.4.2 Το Βουτυρικό Οξύ ως δότης ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Όσον αφορά τους μικροκόσμους των Aulenta et al. (2006) που περιείχαν βουτυρικό οξύ, ο ρυθμός αποχλωρίωσης μπορεί να ήταν χαμηλότερος, αλλά παρόλα αυτά διατηρούσε ωστόσο σταθερές τιμές κατά τη διάρκεια του πειράματος. Αναλυτικότερα, στα αρχικά στάδια, κατά την μείωση των νιτρικών και θεικών ιόντων η ουσία χρησιμοποιούνταν σε υψηλότερο ρυθμό (1.56 meq/l/d), ενώ μετά τη εξάντληση των θεικών ο ρυθμός χρησιμοποίησης μειώθηκε σε 0.76 meq/l/d (Aulenta

et al., 2007). Το φαινόμενο αυτό αιτιολογήθηκε από τον Schink (1997) και πιθανολογείται ότι οφείλεται στη συσσώρευση των προϊόντων της διάσπασης του βουτυρικού οξέος, ενώ μπορεί να έγκειται στο γεγονός ότι οι θειοαναγωγικοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν και απευθείας το συγκεκριμένο δότη (Aulenta et al., 2007). Έπειτα από εκτεταμένες συγκριτικές έρευνες που διεξήχθησαν από την ομάδα της Fennell (1997) το βουτυρικό οξύ θεωρείται και κατά αυτούς ως ένας εξαιρετικός δότης ηλεκτρονίων για μακροπρόθεσμες εφαρμογές καθώς διασπάται αργά και είναι ικανός να πραγματοποιήσει ικανοποιητική αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθυλενίων (83% του προστιθέμενου PCE σε ΕΤΗ) διατηρώντας ταυτόχρονα σχετικά χαμηλά τις συγκεντρώσεις παραγόμενου μεθανίου (4 mmol ανά τροφοδοσία).

Λόγω της ανάγκης εύρεσης ενός δότη ηλεκτρονίων που θα μπορούσε να τροφοδοτήσει σταθερά την Αναγωγική Αποχλωρίωση και χωρίς υψηλές απώλειες προς άλλες διεργασίες, εκτελέστηκαν ερευνητικές εργασίες που απέδειξαν ότι οι οργανικοί δότες ηλεκτρονίων που αποδίδουν σταθερά μικρές συγκεντρώσεις H_2 , είναι δυνατόν να εξασφαλίσουν συγκριτικό πλεονέκτημα στα βακτήρια αποχλωρίωσης, έναντι των άλλων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών (Παναγιωτάκης, 2010; Ballapragada et al., 1997; Yang & McCarty, 1998). Έτσι, σε εμπειριστατωμένες έρευνες όπως της Fennell et al. (1997) έφτασαν στο συμπέρασμα ότι η χρήση του προπιονικού και του βουτυρικού οξέος δύναται να αποδώσει μεγαλύτερο ποσοστό αποχλωρίωσης και παράλληλα ασθενέστερη μεθανογένεση, σε σχέση με τους άλλους δύο δότες ηλεκτρονίων που δοκίμασαν (γαλακτικό ανιόν και αιθανόλη).

2.4.3 Το Γαλακτικό Οξύ ως δότης ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Σύμφωνα με έρευνες, ενδιαφέρον παρουσιάζει η συμπεριφορά των μικροκόσμων που τροφοδοτούνταν με γαλακτικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων, καθώς αυτοί εμφανίζουν τη χαμηλότερη φάση υστέρησης (χρόνος που απαιτείται από την προσθήκη του δότη μέχρι την αρχή της αποχλωριωτικής διαδικασίας) καθώς και τον υψηλότερο αρχικό ρυθμό αποχλωρίωσης (Aulenta et al., 2006; Aulenta et al., 2007). Σαν δότης έχει

αντίστοιχη συμπεριφορά με αυτή της αιθανόλης με τη διαφορά ότι επιτυγχάνει ελαφρώς καλύτερη αποχλωρίωση (Fennell et al., 1997). Παρατηρείται ωστόσο, ότι μετά τον αρχικώς υψηλό ρυθμό (περίπου τις 50 πρώτες ημέρες) η αποχλωρίωση σταθεροποιείται και το προϊόν που παρήχθη τις πρώτες αυτές ημέρες ήταν κατά βάση διγλωροαιθυλένια (DCEs) (Aulenta et al., 2006). Από τα αποτελέσματα του πειράματος των Aulenta et al. (2007), γίνεται αντιληπτό ότι το γαλακτικό οξύ είναι αυτό που καταναλώνεται με τη μεγαλύτερη ταχύτητα από τους μικροοργανισμούς έχοντας ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) και διαλυμένων μετάλλων στους μικροκόσμους που εμπλουτίστηκαν με το συγκεκριμένο δότη. Η συσσώρευση τους έχει ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη δημιουργία άχρηστων παραπροϊόντων αλλά και την υποβάθμιση της ποιότητας του προς απορρόπηση νερού (στην περίπτωση που πρόκειται για υδροφόρο) καθώς επίσης και την αύξηση της τοξικότητας του (Aulenta et al., 2007). Όλοι οι δότες ηλεκτρονίων, όπως φαίνεται από τη μελέτη της ομάδας του Aulenta (2007) χρησιμοποιήθηκαν από τους μικροοργανισμούς χωρίς υψηλό χρόνο υστέρησης, με το γαλακτικό οξύ να έχει τον υψηλότερο ρυθμό πρόσληψης (2.00 meq/l-d) ο οποίος και κατά τη διάρκεια του πειράματος παρέμεινε σταθερός. Ακόμη, εργαστηριακές μελέτες των El Mamouni et al. (2002), απέδειξαν ότι το μίγμα μεθανόλης – γαλακτικού οξέως ως δότης ηλεκτρονίων ήταν αποτελεσματικότερη από την μεθανόλη για την πραγμάτωση της αποχλωρίωσης του TCE ενώ παράλληλα παρατηρούν ότι η διαδικασία επωφελείται για χαμηλές συγκεντρώσεις COD (100 – 1000 mg/l) αποδεικνύοντας το γεγονός ότι είναι προτιμότερο να προστίθεται ο δότης σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθώς έτσι αποδεσμεύονται πιο αργά τα ηλεκτρόνια και αποφεύγονται φαινόμενα ανταγωνισμού από τους υπόλοιπους υδρογονοτροφικούς μικροοργανισμούς.

Το γαλακτικό οξύ μελετήθηκε και στο πείραμα της ομάδας του Azizian και όπως αναφέρουν προστέθηκε στη στήλη πριν τους μικροοργανισμούς αποχλωρίωσης σε συγκέντρωση 0.68 mM ώστε να κατανεμηθεί πλήρως στο δείγμα. Αιθένιο παρατηρήθηκε στην έξοδο της στήλης κατά την 51^η ημέρα και έπειτα από σημαντική απομείωση των TCE και cis-DCE, ενώ κατά την 55^η ημέρα – δηλαδή 25 ημέρες μετά την προσθήκη της μικροβιακής καλλιέργειας στη στήλη, το TCE είχε εξαφανιστεί (Azizian et al., 2010). Έτσι, κατά τις ημέρες 300-320 που το σύστημα ήρθε σε σταθερές συνθήκες λειτουργίας απέδιδε 94,1% του αρχικού TCE σε Αιθένιο και

περίπου 3,5% σε VC – ενώ όπως επισημαίνουν αυξάνοντας τη συγκέντρωση του Γαλακτικού οξέως στο 1 mM η πλήρης αποχλωρίωση σε αιθένιο ήταν εφικτή (ό.π.)

2.4.4 Άλλοι δότες ηλεκτρονίων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Ένας εναλλακτικός των παραπάνω δότης ηλεκτρονίων αποτελεί η μεθανόλη και η αιθανόλη. Σύμφωνα με μελέτες η αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθυλενίων σε αιθένιο και ένα μέρος βινυλοχλωριδίου ήταν εφικτή στα πειράματα των Fennell et al. (1997), ωστόσο δεν ήταν πλήρης. Παρόλα αυτά, λόγω της φύσης του δότη υπήρξαν περίοδοι κατά τη διάρκεια του πειράματος στις οποίες παρατηρήθηκαν από τους τελευταίους προβλήματα στην αποχλωρίωση γεγονός που οφείλεται αφενός στη δραστηριότητα των μεθανογόνων μικροοργανισμών και στα υψηλά επίπεδα υδρογόνου που αποδεσμεύτηκαν άμεσα και αφετέρου στη δράση των οξικοτροφικών μεθανογόνων. Αναφέρεται επιπλέον ότι, το οξικό οξύ που συσσωρεύτηκε από την αποδόμηση της αιθανόλης αποδομήθηκε σχεδόν άμεσα μετά την εκατοστή ημέρα όποτε η οξικοτροφική δραστηριότητα είχε αναπτυχθεί ωστόσο παρατηρήθηκε συσσώρευση προπιονικού οξέως στη φιάλη λόγω της υπερπροσθήκης δότη (Fennell et al., 1997). Η αποδόμηση της αιθανόλης είναι ως διαδικασία άμεση, εκλύοντας κατά τις 2 πρώτες ώρες ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες υδρογόνου το οποίο χρησιμοποιείται τόσο από τους αποχλωριωτές όσο και από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς άμεσα για τις πρώτες 3,5 ώρες με τη δραστηριότητα τους να μειώνεται σταδιακά στη συνέχεια με τους μεθανογόνους να σταματούν τη δραστηριότητα τους όταν μειωθεί η συγκέντρωση του H_2 (Fennell et al., 1997). Πειράματα με μεθανόλη ως δότη ηλεκτρονίων πραγματοποιήθηκαν ακόμη και από τους El Mamouni et al. το 2002, όπου σε αναερόβιες αποχλωριωτικές καλλιέργειες προστέθηκαν 100 mg COD/l μεθανόλης με το αποτέλεσμα ωστόσο να δείχνει σχετικά αργούς ρυθμούς για την πλήρη αποχλωρίωση του TCE, καθώς απαιτήθηκαν 40 ημέρες. Οι ίδιοι εφήρμοσαν εναλλακτικά μίγμα ίδιας συγκέντρωσης (100 mg COD/l) με μεθανόλη και γαλακτικό οξύ το οποίο πέτυχε μεγαλύτερο βαθμό αποχλωρίωσης και μάλιστα σε 15 ημέρες (El Mamouni et al., 2002).

Μεθανόλη χρησιμοποίησε και η ομάδα της Duhamel στα πειράματα της και παρόλο που σε γενικές γραμμές θεωρείται ότι ωφελεί τη μεθανογένεση σε αυτούς, λειτούργησε ιδιαίτερα αποδοτικά ενώ ρυθμίζοντας τη δόση της ήταν δυνατό να μειωθεί και η παραγωγή μεθανίου χωρίς να επηρεάζεται μάλιστα σημαντικά η αποχλωρίωση (Duhammel et al., 2002). Αποχλωριωτική εφαρμογή με τη χρήση μεθανόλης ως δότη ηλεκτρονίων πραγματοποιήθηκε και στα πειράματα των Carr et al. (1998), όπου σε μη εγκλιματισμένη καλλιέργεια αποχλωριωτών προστέθηκε PCE το οποίο ωστόσο ξεκίνησε να μετατρέπεται σε TCE κατά το πρώτο κιόλας εικοσιτετράωρο και μειώθηκε στα 0,5 μM κατά την 20^η ημέρα της παρατήρησης. Κατά την 62^η ημέρα του πειράματος τόσο οι συγκεντρώσεις του PCE όσο και του TCE ήταν εκτός των ορίων ανίχνευσης με το τελικό προϊόν ακόμα και για τα δύο πρώτα χρόνια να είναι κατά βάση το cis-DCE και μικρή ποσότητα VC, ενώ παρατηρήθηκαν και σημαντικά ποσοστά μεθανογένεσης (Carr et al., 1998). Παρόλα αυτά, όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, η αποχλωριωτική διαδικασία μπορούσε να διατηρηθεί με αντίστοιχη απόδοση και με τους υπόλοιπους δότες ηλεκτρονίων που δοκίμασαν (αιθανόλη, βουτυρικό οξύ, γαλακτικό οξύ και προπιονικό οξύ) (Carr et al., 1998).

Ένας ακόμη ιδιαίτερα σημαντικός ως δότης ηλεκτρονίων θεωρείται το προπιονικό οξύ, το οποίο μπορεί να προέρχεται τόσο άμεσα με την προσθήκη του για την τροφοδοσία της εκάστοτε καλλιέργειας ή και από το μετασχηματισμό άλλων οργανικών ενώσεων – δοτών ως παραπροϊόν (Fennell et al., 1997). Όπως παρατηρήθηκε από τους τελευταίους, η ένωση αυτή δεν ευνοεί τη δράση των μεθανογόνων μικροοργανισμών ή την ευνοεί σε μικρό βαθμό, ενώ παράλληλα συμβάλει στην αποχλωρίωση, ωστόσο ως ουσία αποδομείται σχετικά αργά και τείνει να συσσωρεύεται στις καλλιέργειες προκαλώντας σε ορισμένες περιπτώσεις ελλιπή αποχλωρίωση.

Γαλακτικό, προπιονικό και οξικό οξύ καθώς επίσης και υδρογόνο χρησιμοποιήθηκε και από τους Ballarpragada et al. (1997) για την αποχλωρίωση PCE, με το προπιονικό να αποδεικνύεται κατ' αυτούς ο βέλτιστος δότης καθώς ξεκίνησε άμεσα την αποχλωρίωση και φτάνοντας από τις πρώτες κιόλας ώρες σε όλα τα παράγωγα της, συμπεριλαμβανομένου και του αιθένιου. Ιδιαίτερα αργή όπως αναφέρουν ήταν η αποχλωρίωση στην περίπτωση του οξικού οξέος σε σχέση με την απόδοση του

προπιονικού οξέος, του γαλακτικού οξέος και του υδρογόνου. Παράλληλα, από την πειραματική τους διαδικασία επιβεβαιώνεται η άποψη των Fennell et al. (1997) και El Mamouni et al.(2002), ότι δηλαδή οι αποχλωριωτές έχουν συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι των μεθανογόνων σε συνθήκες χαμηλής ποσότητας δότη ηλεκτρονίων (Ballapragada et al., 1997). Το προπιονικό οξύ ως δότη επιλέγει και η ομάδα του Hoelen ως βέλτιστο καθώς είναι ικανός να συντελέσει στην αποχλωριωτική διαδικασία με πολύ καλό ρυθμό απόδοσης ηλεκτρονίων ενώ παράλληλα λόγω της ταχύτητας αποδόμησης του δεν ευνοεί τους μεθανογόνους – μειώνοντας έτσι ουσιαστικά και το παραγόμενο μεθάνιο στο υπέδαφος, εφόσον πρόκειται για *in situ* εφαρμογή (Hoelen et al., 2006).

Δοκιμές διαφορετικού δότη ηλεκτρονίων για τον προσδιορισμό του βέλτιστου πραγματοποιήθηκαν και από τους Azizian et al. σε μελέτη τους που δημοσιεύτηκε το 2010, με τους δότες που δοκιμάστηκαν να είναι γαλακτικό, φορμικό και προπιονικό οξύ. Το φορμικό οξύ αντικατέστησε το γαλακτικό κατά την 46^η ημέρα των πειραμάτων των Azizian et al., (2010) επιτυγχάνοντας την ίδια αποχλωρίωση (94% αιθέριο και 6% VC) έχοντας ωστόσο προσθέσει το 50% της ισοδύναμης δόση σε σχέση με αυτή του γαλακτικού οξέως. Όλοι οι δότες εκτέλεσαν αναγωγική αποχλωρίωση του TCE σε αιθέριο, αποθείωση καθώς και αναγωγή σιδήρου και μαγγανίου – με τον αποδοτικότερη αποχλωρίωση ωστόσο να εμφανίζεται σύμφωνα με αυτούς κατά την τροφοδότηση με φορμικό οξύ καθώς αξιοποιήθηκε από τους αποχλωριωτές το 14% του δότη, σε σχέση με 9,6% για το προπιονικό και 6,5% για το γαλακτικό (Azizian et al., 2010). Ένα ακόμα πλεονέκτημα του φορμικού οξέος, πέραν της μεγαλύτερης ποσοστιαίας εκμετάλλευσης του από τα αποχλωριωτικά βακτήρια, αποτελεί το γεγονός ότι ευνοεί σε μικρότερο βαθμό την αναγωγή του σιδήρου και του μαγγανίου σε σχέση με το γαλακτικό και προπιονικό οξύ (Azizian et al., 2010).

Ένας ακόμη δότης που δοκιμάστηκε σε έρευνες είναι το βενζοϊκό οξύ (Benzoate). Από το ισοζύγιο μάζας που πραγματοποιήθηκε από τους ερευνητές αναφέρεται ότι το 91% των ενδιάμεσων προϊόντων της διάσπασης του δότη χρησιμοποιήθηκε για τη μεθανογένεση ενώ μόλις το 9% για την αποχλωρίωση, ωστόσο μετά τη μείωση του δότη κάτω από 11 nM φέρεται να επικράτησαν οι αποχλωριωτικοί μικροοργανισμοί (Yang & McCarty, 1998).

Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι η δράση των αναχαιτιστικών – ως προς την αποχλωρίωση, μικροοργανισμών μειώνεται από ένα κατώφλι δότη ηλεκτρονίων και κάτω, ενώ παράλληλα στην περιοχή εκείνη οι μεταβολικές λειτουργίες των αποχλωριωτών εκτελούνται κανονικά (Yang και McCarty, 1998). Από τις πειραματικές τους παρατηρήσεις προέκυψε ότι στο διάστημα παρατήρησης που ήταν 2,5 μήνες στις καλλιέργειες που προστίθετο προπιονικό οξύ παράχθηκε τουλάχιστον 3 φορές περισσότερο αιθέριο ενώ παράλληλα σε αυτές που τροφοδοτούνταν με βενζοϊκό οξύ παράχθηκε 3 φορές περισσότερο μεθάνιο, με τα κατώφλια των συγκεντρώσεων υδρογόνου να καθορίζονται από τους ερευνητές στα 2.2 ± 0.9 nM για την αποχλωρίωση και στα 10.9 ± 3.3 nM για τη μεθανογένεση (Yang & McCarty, 1998). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η καλλιέργεια των Duhamel et al., (2002) η οποία τροφοδοτούνταν με τολουένιο ωστόσο επι της ουσίας επρόκειτο για καλλιέργεια μεθανογόνων η οποία αναμίχθηκε με αποχλωριωτές συνεπώς και τα ποσοστά αποχλωρίωσης της δεν ήταν αντίστοιχα με αυτές των *Dehalococcoides spp.*.

Ως δότες ηλεκτρονίων μπορούν να λειτουργήσουν ακόμη και άλλες οργανικές ύλες όπως η μελάσα από ζαχαροκάλαμο που χρησιμοποιήθηκε από τους Wu et al. (1998) και επέδειξε ικανοποιητική αποχλωρίωση φτάνοντας σε αιθέριο σε διάστημα περίπου 30 ωρών, έχοντας παράλληλα και μεθανογένεση. Οι ίδιοι εκτέλεσαν πειράματα και με άλλους εναλλακτικούς λιγνοκυτταρικούς δότες ηλεκτρονίων – όπως τα πριονίδια, τα στάχνα καλαμποκιού καθώς και χαρτί εφημερίδας, που παρουσίαζαν αρκετές διαφορές στη βιοδιασπασιμότητα τους. Ενδεικτικά, παρατίθεται στον ακόλουθο πίνακα το κόστος και το διαθέσιμο οργανικό φορτίο για μερικούς δότες ηλεκτρονίων:

Πίνακες 2-3α & β: Κόστη διαφορετικών υποστρωμάτων/δοτών ηλεκτρονίων για την Αναερόβια Αναγωγική αποχλωρίωση του TCE (πηγή: Wu et al., 1998 (α); diStefano et al., 2001 (β)).

Είδος δότη	g COD/ g δότη	Διαθέσιμο COD(%)	Τιμή \$/τόνο δότη	Τιμή \$/τόνο COD
Καλαμπόκι	1,18	80	170-180	144-152
Πριονίδια ξύλου	1,26	45	20-30	16-24
Χαρτί εφημερίδας	1,24	35	15-20	18-24
Μελάσα από ζαχαροκάλαμο	1,09	>95	60-106	55-97
Μεθανόλη	1,5	100	180-184	120-122
Βουτυρικό οξύ	1,816	100	1200-1300	670-720
Βενζοϊκό οξύ	1,967	100	1390-1410	710-720
Γαλακτικό οξύ	1,066	100	1740-2030	1630-1900

Δότης ηλεκτρονίων	Ελάχιστη δόση	Ενδεικτικό κόστος/ μονάδα	\$/lb δότη	Lb COD/lb δότη	\$/lb COD	Lb COB/lb PCE	\$/lb PCE
Τυρόγαλο	5x	\$0.02/lb	0.02	1.04	0.02	1.93	0.04
Μελάσα	5x	\$58.15/lb	0.03	0.81	0.04	1.93	0.07
Γάλα	20x	\$0.025/lb	0.025	1.33	0.02	7.71	0.14
CSL	5x	\$50/lb	0.025	0.25	0.10	1.93	0.19
Ζάχαρη	5x	\$0.22/lb	0.22	1.12	0.20	1.93	0.38
Μεθανόλη	50x	\$0.30/gallon	0.045	1.49	0.03	19.30	0.58
Αλεύρι	20x	\$11.62/100lb	0.12	0.71	0.17	7.71	1.30

Τα υλικά αυτά υποστήριξαν την αποχλωρίωση του TCE σε αιθέριο με τελικό ποσοστό απομάκρυνσης του TCE στις 140 ημέρες που διήρκησε το πείραμα πάνω από 93%. Τέλος, όπως παρατηρούν, όσο μεγαλύτερο ποσοστό λιγνίνης υπήρχε στο δότη τόσο χαμηλότερη ήταν η βιοδιασπασσιμότητα του για αυτό και στα στάχνα καλαμποκιού η παράγωγή αιθυλενίου ήταν 92.4 μmol , στην εφημερίδα 58.3 μmol , ενώ στο πριονίδι 7.6 μmol που συνδέονται επίσης άμεσα και με παράλληλη αύξηση του παραγόμενου ενώ και από οικονομικής άποψης οι μελάσες ζαχαροκάλαμου θεωρούνται προτιμότερες από ότι το γαλακτικό οξύ καθώς και άλλοι δότες μεθανίου (Wu et al., 1998).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αντίστοιχη έρευνα των DiStefano et al. το 2001, οι οποίοι δοκίμασαν εναλλακτικούς δότες ηλεκτρονίων όπως ζάχαρη, αλεύρι, καλαμποκέλαιο (corn steep liquor), μολάσα, απαχο γάλα και τυρόγαλο, με σκοπό να εξετάσουν το βέλτιστο και συνάμα οικονομικότερο δότη για μεγάλες εφαρμογές πεδίου. Τα χαρακτηριστικά που εξέτασαν ήταν ο χρόνος εγκλιματισμού, η επιτυχία της αποχλωρίωσης του PCE, η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα δότη καθώς επίσης και το κόστος αυτού, με το χρόνο που απαιτήθηκε για την αποχλωρίωση από PCE για τους διαφορετικούς δότες να είναι για το καλαμποκέλαιο, το γάλα και το τυρόγαλο – 10 ημέρες, για τη μεθανόλη 12 ημέρες, για τη μολάσα 14 ημέρες, για τη ζάχαρη 26 ημέρες και για το αλεύρι 30 ημέρες (DiStefano et al., 2001). Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα του καθενός, αποχλωρίωση του PCE ήταν εφικτή με κάθε δότη, ωστόσο παραγωγή αιθενίου στο χρονικό διάστημα παρατήρησης (135 ημέρες) επιτεύχθηκε μόνο στις καλλιέργειες που τροφοδοτήθηκαν με γάλα, τυρόγαλα και μεθανόλη, ενώ για τις καλλιέργειες που τροφοδοτήθηκαν με καλαμποκέλαιο, τυρόγαλο, μολάσα και ζάχαρη απαιτήθηκε 5 φορές η στοιχειομετρικά υπολογιζόμενη ποσότητα αποχλωρίωσης από PCE σε DCEs, σε σχέση με το γάλα και το αλεύρι που χρειάστηκαν 20 φορές παραπάνω από τη στοιχειομετρική απαίτηση και τη μεθανόλη

που χρειάστηκε 50 φορές παραπάνω – πιθανώς λόγω προσληψης της για μεθανογένεση (DiStefano et al., 2001).

Τέλος, πρόσφατες έρευνες παρουσιάζουν τη χρήση τεχνολογιών ηλεκτρόλυσης – όπου διασπάται το άτομο του νερού σε υδρογόνο και οξυγόνο παρέχοντας μια ικανοποιητική συγκέντρωση υδρογόνου για την αποχλωρίωση χωρίς τη χρήση επιπλέον χημικών ενώσεων, ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τις πιθανές επιπτώσεις που μπορεί να έχει το αποδεδειγμένο άτομο οξυγόνου στο σύστημα (Lohner & Tiehm, 2009), ενώ όπως τονίζει ο Ernst (2009) είναι απαραίτητη και μία μεγάλης κλίμακα εφαρμογή για τον έλεγχο της εφαρμοσιμότητας και αξιοπιστίας της μεθόδου.

2.5 Τα κυριότερα αποχλωριωτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Τα συνηθέστερα είδη αναγωγικών βακτηρίων ανήκουν στις ομάδες των *Desulfitobacterium species*, *Sulfurospirillum multivorans*, *Dehalobacter restrictus* και κυρίως στα είδη *Dehalococcoides spp.* (Aulenta et al., 2006). Κατηγορία ιδιαίτερου ενδιαφέροντος που μελετάται ευρέως τα τελευταία χρόνια αποτελεί αυτή του γένους *Dehalococcoides*, η οποία αποτελείται από αμιγώς αναερόβια, Gram θετικά, κοκκοειδή βακτήρια (Ernst, 2009). Τα βακτήρια αυτά είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην παρουσία οξυγόνου και λόγω της «εξειδίκευσης» τους μπορούν να επιβιώσουν μόνο υπό συγκεκριμένες θρεπτικές απαιτήσεις και υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Tiehm & Schmidt, 2011).

Η αποχλωρίωση του PCE και TCE σε αιθένιο (ETH) προϋποθέτει την εμπλοκή πολλαπλών ειδών βακτηρίων, ωστόσο το κύριο βακτήριο που έχει απομονωθεί και επιτυγχάνει πλήρη αποχλωρίωση είναι αυτό που συνηθίζεται να χαρακτηρίζεται ως *Dehalococcoides spp.* (Ma et al., 2006; Aulenta et al., 2006; Ernst, 2009). Τα κυριότερα βακτήρια του γένους ως προς τις αποχλωριωτικές τους ικανότητες είναι τα *Dehalococcoides ethenogenes 195*, *Dehalococcoidessp. FL2*, *Dehalococcoides sp. VS* και το *Dehalococcoides sp. GT* (Maymo-Gatell, 1999; Hu et al., 2011). Ο οργανισμός αυτός είναι ένα βακτήριο χωρίς στενή υπαγωγή σε οποιαδήποτε γνωστή ομάδα και είναι το μοναδικό αναερόβιο βακτήριο που έχει απομονωθεί μέχρι σήμερα το οποίο

μπορεί να φέρει την πλήρη αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθυλενών σε αιθένιο χρησιμοποιώντας H_2 ως δότη ηλεκτρονίων (Holliger et al., 1999). Σημαντική παράμετρος αποτελεί το γεγονός ότι ο συνδυασμός πολλών ειδών *Dehalococcoides* ή και άλλων αναγωγικών βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει σε ένα καλύτερο αποτέλεσμα, επιτυγχάνοντας πλήρη αποχλωρίωση (Ernst, 2009; Holliger et al., 1999), ιδίως για το τελικό στάδιο αποχλωρίωσης από VC σε αιθένιο (Bradley, 2003). Ωστόσο, ορισμένες ομάδες βακτηρίων όπως τα *Desulfomonile*, *Dehalobacter*, *Desulfito bacterium* και *Desulfuromonas* είναι ικανά να αποχλωρίωσουν το TCE και το PCE μόνο σε cis-DCE, ενώ και για το *Dehalococcoides* που επιτυγχάνει πλήρη αποχλωρίωση η διαδικασία μέχρι το στάδιο του cis-DCE είναι ταχύτερη και θερμοδυναμικά προτιμώμενη από ότι αυτή της μετατροπής του cis-DCE σε VC και του VC σε αιθένιο (Bradley, 2003). Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο η συσσώρευση cis-DCE και VC σε εφαρμογές αποχλωρίωσης είναι συχνά παρατηρούμενη (Tiehm & Schmidt, 2011).

Όπως παρατηρείται και από τον παραπάνω πίνακα, ορισμένα είδη του γένους *Desulfobacterium* είναι ικανά να αναγάγουν τετραχλωροαιθυλένιο και τριχλωροαιθυλένιο. Άλλα βακτήρια που είναι ικανά να εκτελέσουν μέρος της διαδικασίας είναι το *Dehalobacter restrictus* όπως επίσης και τα *Dehalospirillum multivorans*, *Desulfuromonas chloroethenica*, *Dehalococcoides ethenogenes*, το *Enterobacterstrain MS-1* και το *Enterobacter agglomerans* (Holliger et al., 1999). Το *Desulfobacterium* είναι ένα σχετικά πρόσφατα περιγραφόμενο γένος Gram θετικού βακτηρίου το οποίο δύναται να εκτελέσει αναγωγική αποχλωρίωση χλωριωμένων ενώσεων αλλά και να αναγάγει θειώδη και θειοθειικά ιόντα αλλά όχι θειικά (Holliger et al., 1999).

2.6 Μηχανισμοί αναχαίτισης – ανταγωνισμού στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Κυριότεροι μικροοργανισμοί - ανταγωνιστές στην περίπτωση της αντιρύπανσης υπόγειων υδροφόρων από χλωριωμένες ενώσεις είναι οι μεθανογόνοι, οι οξικοτροφικοί, οι θειοαναγωγικοί και οι απονιτροποιητές καθώς επιζούν και

ευνοούνται υπό αναερόβιες συνθήκες, όπως ακριβώς και οι αποχλωριωτές (Aulenta et al., 2007; Tiehm & Schmidt, 2011). Οι μικροοργανισμοί αυτοί καταλαμβάνουν στο οικοσύστημα τους ένα θώκο αντίστοιχο με αυτό που καταλαμβάνουν οι αποχλωριωτές και ανταγωνίζονται μεταξύ τους για το δότη ηλεκτρονίων (H_2) με αποτέλεσμα να είναι κατά κανόνα απαραίτητη η πολλαπλάσια ποσότητα δότη από τη στοιχειομετρικά απαιτούμενη για να πραγματοποιηθούν οι μεταβολικές τους διεργασίες (Yang & McCarty, 1998).

Για το λόγο αυτό στη συνέχεια του παρόντος κειμένου θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στη δράση τους και στους τρόπους με τους οποίους είναι δυνατή η αντιμετώπιση τους. Σημαντικοί αναχαιτιστές σε κάθε περίπτωση είναι και η ίδια η σύσταση του εδάφους και του νερού μιας και αυτό από τη φύση του περιέχει αποδέκτες ηλεκτρονίων όπως οξυγόνο, νιτρικά και θειικά ιόντα (Tiehm & Schmidt, 2011; Bradley, 2003) καθώς και τυχόν μέταλλα – όπως σίδηρος ή μαγγάνιο (Stams et al., 2005), τα οποία θα πρέπει να αφαιρεθούν ώστε να είναι δυνατή η πραγμάτωση της αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης. Αναχαιτίσιμη στη διαδικασία μπορεί να προκληθεί και από ένα σύνολο ενώσεων όπως οι κυανιούχο νάτριο, αζιδιούχο νάτριο, θειώδη, διθεινώδη, χλωριούχος χαλκός, χλωριούχος ψευδάργυρος και N,N' -δι(2-υδροξυλοαιθυλο)-2-αμινοσουλφονικό οξύ (BES) (Bradley, 2003). Επιπλέον, αρνητική επίδραση φέρεται να έχουν δύο ακόμα συνηθισμένοι ρύποι στο υπέδαφος, το χλωροφόρμιο και το 1,1,1-Τριχλωροαιθάνιο στις καλλιέργειες αποχλωρίωσης όπως παρατηρήθηκαν και από τα πειράματα των Duhamel et al., (2002), ωστόσο απαιτείται περαιτέρω έρευνα πάνω σε αυτό το κομμάτι ώστε να εξακριβωθεί η παρατήρηση αυτή. Από τις πειραματικές τους παρατηρήσεις προκύπτει ότι το χλωροφόρμιο είναι πιο ισχυρός αναχαιτιστής από το 1,1,1-TCA καθώς με μόλις 2,5 μM της ουσίας είναι δυνατόν να παρεμποδιστεί η αποχλωρίωση του βινυλοχλωριδίου, ενώ με 6,7 μM σταμάτησε και η αποχλωρίωση του τριχλωροαιθυλενίου (Duhamel et al., 2002).

Σύμφωνα με τους Yang & McCarty (1998), ανταγωνισμός σε ένα μικτό σύστημα βακτηρίων αναμένεται να υπάρχει μεταξύ των αποχλωριωτών, των μεθανογόνων και οξικοτροφικών, όταν το επίπεδο του περιεχόμενου υδρογόνου είναι μεταξύ 2 – 11 nM. Το κατώφλι των 2 nM επιλέχθηκε από τους συγγραφείς ώστε να διασφαλιστεί το κρισιμότερο στάδιο στην αποχλωριωτική διαδικασία, που είναι η μετατροπή από cis-DCE στο τελικό προϊόν (ETH). Σε κάθε περίπτωση, όταν τα επίπεδα του υδρογόνου

πέσουν κάτω από 11 nM, η διεργασία που επωφελείται είναι αυτή της αποχλωρίωσης έναντι των υπολοίπων που απαιτούν αρκετά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Yang & McCarty, 1998). Αντίστοιχη μελέτη, για την περίπτωση των πολλαπλών δεκτών ηλεκτρονίων – ανταγωνιστών, πραγματοποιήθηκε και από τους Boopathy & Peters το 2001 με τους ερευνητές να επισημαίνουν ότι το τριχλωροαιθυλένιο (TCE) απομακρύνθηκε ταχύτερα υπό συνθήκες διαφόρων αποδεκτών ηλεκτρονίων και συγκεκριμένα σε διάστημα 9 ημερών όταν στην περίπτωση της μεθανογένεσης, αναγωγής σιδήρου και ζύμωσης ο απαιτούμενος χρόνος ήταν 20-22 ημέρες. Αναλυτικότερα, το TCE απομακρύνθηκε κατά 100% υπό συνθήκες μεθανογένεσης, ζύμωσης και αναγωγής σιδήρου, ενώ η απομάκρυνση του για τις περιπτώσεις απονιτροποίησης και θεικοαναγωγής ήταν 77% και 94% αντίστοιχα, με το δείγμα ελέγχου να εμφανίζει απομακρύνσεις 9-15%. Γίνεται έτσι κατανοητό ότι η απομάκρυνση του TCE είναι εφικτή παρουσία κάθε αποδέκτη ηλεκτρονίων ωστόσο επηρεάζεται σημαντικά η απόδοση της αποχλωριωτικής διαδικασίας (Boopathy & Peters, 2001). Τέλος, όσον αφορά τις δευτερογενείς ενώσεις (cis & transDCE και VC) και το τελικό προϊόν (αιθάνιο – αιθένιο) αυτό παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες υπό συνθήκες μεθανογένεσης, ζύμωσης και αναγωγής σιδήρου ενώ στις περιπτώσεις αποθείωσης και αναγωγής των νιτρικών η αποχλωρίωση σταμάτησε στο DCE (Boopathy & Peters, 2001).

Σε αντίστοιχη περίπτωση – παρουσίας δηλαδή νιτρικών, όπως παρατηρούν οι Bennett et al. (2007), ο δότης ηλεκτρονίων κατά τις 125 πρώτες ημέρες του πειράματος ήταν περιορισμένος λόγω της χρήσης του για την αναγωγή των νιτρικών, των θεικών αλλά και του σιδήρου, με αποτέλεσμα η αποχλωριωτική διαδικασία να κυριαρχήσει μετά την 125^η ημέρα – όποτε και τα νιτρικά ιόντα εξαντλήθηκαν. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας ήταν από την 125^η που ξεκίνησε ουσιαστικά η πλήρης αποχλωρίωση να υπάρχει εκτεταμένη αποχλωρίωση με παραγωγή βινυλοχλωριδίου και παρουσία περίσσειας δότη να έχουμε εν τέλει μεγάλες ποσότητες τελικών προϊόντων (αιθένιο, χλωριούχα άλατα, διττανθρακικό οξύ) αλλά και μεθανίου (Bennett et al., 2007).

2.6.1 Η επίδραση των θεικών ιόντων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Σημαντικότερο πρόβλημα σε σχέση με την παράλληλη διαδικασία της απονιτροποίησης αποτελεί η αναγωγή των θεικών ιόντων – από την οποία δεσμεύονται αρκετά υψηλότερες ποσότητες της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δράση των αποχλωριωτικών μικροοργανισμών (Aulenta et al., 2008). Έτσι, για το σχεδιασμό μίας οικονομικά αποδοτικής εφαρμογής αντιρύπανσης από χλωριωμένες ενώσεις είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε το κατά πόσο επηρεάζεται η αποχλωριωτική διαδικασία από τα θειικά ιόντα και την παρουσία ή μη των θεικοαναγωγικών βακτηρίων (SRB), καθώς επηρεάζουν την απαιτούμενη ποσότητα δότη ηλεκτρονίων που θα πρέπει να προστεθεί άλλα και το σύνολο της διαδικασίας αφαλογόνωσης (dehalogenation) (Hoelen et al., 2004). Σημαντικό σημείο το οποίο θα πρέπει να διερευνάται σε κάθε εφαρμογή αποτελεί ο καθορισμός του αρχικού πληθυσμού των θειοαναγωγικών βακτηρίων – ο οποίος θα πρέπει να είναι αρκετά μικρότερος από αυτό των αποχλωριωτών (Aulenta et al., 2008). Ακόμα, από μία συγκέντρωση θεικών ιόντων και πάνω η διαδικασία παρεμποδίζεται, συνεπώς είναι αναγκαίο να καθοριστεί το όριο στο οποίο η διαδικασία αποδίδει στο μέγιστο δυνατό αιθέριο. Η περιοχή αυτή, όπου η συγκέντρωση των θεικών ιόντων δεν επηρεάζει τη διαδικασία της αποχλωρίωσης μπορεί να καθοριστεί από τα 20 έως 100 mg/l (Pantazidou et al., 2012) και είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό κομμάτι που μελετάται από τους επιστήμονες του αντικειμένου παγκοσμίως.

Η συμπεριφορά του κάθε δότη – σύμφωνα με τα πειράματα του Aulenta (2006), απέναντι στην θεικοαναγωγή διαφέρει ανά περίπτωση καθώς έχοντας ως δότη ηλεκτρονίων γαλακτικό ή βουτυρικό οξύ τα θειικά ιόντα είχαν εξαντληθεί σε 70 και 98 ημέρες αντίστοιχα. Στην περίπτωση ωστόσο που χρησιμοποιήθηκε ως δότης ηλεκτρονίων το μίγμα οξικού-υδρογόνου η πλήρης απομείωση δεν επετεύχθη κατά την περίοδο εκτέλεσης του πειράματος (240 ημέρες), ενώ στα πειράματα ελέγχου (απουσία δότη ηλεκτρονίων) δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή της ουσίας (Aulenta et al., 2007). Όπως αναφέρεται και στο “Πρωτόκολλο εφαρμογής μεθόδων φυσικής εξασθένησης χλωριωμένων ενώσεων στο υπέδαφος” της EPA, έχοντας μία σχετικά χαμηλή συγκέντρωση της τάξης των 20 mg/l είναι δυνατή ακόμα και η φυσική

εξασθένηση μέσω ενδογενούς βιοαποικοδόμησης, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι εφικτή η αποχλωρίωση αλλά όχι πλήρης, καθώς δεδομένης της απουσίας νιτρικών ιόντων και διαλυμένου οξυγόνου τα θειικά λειτουργούν ως δέκτης ηλεκτρονίων δεσμεύοντας τον απαραίτητο για την αποχλωρίωση δότη ηλεκτρονίων (Weidemeier et al., 1998). Όρια τίθενται και στη μελέτη του AFCEE (2004), όπου αναφέρεται ότι σε συγκεντρώσεις θεικών έως 500 mg/l είναι εφικτή έως ένα βαθμό η βιοαποδόμηση – τιμή την οποία επιβεβαιώνει και η μελέτη των Pantazidou et al. (2012), ενώ συγκεντρώσεις άνω των 5000 mg/l καθιστούν τη διαδικασία αδύνατη. Στα ενδιάμεσα στάδια – από 500 – 5000 mg/l, η διαδικασία είναι δυνατή υπό προϋποθέσεις και ανά περίπτωση. Σε κάθε περίπτωση, για τη διασφάλιση της διαδικασίας, προτείνεται μία πιο συντηρητική και αντιπροσωπευτική προσέγγιση για τις εφαρμογές πεδίου, με τη συγκέντρωση των θεικών να είναι στα 250 – 300 mg/l (Pantazidou et al., 2012). Στην περίπτωση αυτή η χρήση αργά διασπώμενου δότη ηλεκτρονίων δείχνει να μην έχει επίδραση στον ανταγωνισμό των αποχλωριωτών με τους θειοαναγωγικούς μικροοργανισμούς (Aulenta et al., 2007). Αναλυτικότερα, και οι δύο μικροοργανισμοί είναι σε θέση να ευδοκιμήσουν σε πολύ χαμηλά και παρόμοια επίπεδα H_2 (Hoelen & Reinhard, 2004; Heimann et al., 2005). Δεδομένου μάλιστα ότι οι υδρογονοτροφικοί αποθειωτές έχουν ταχύτερους ρυθμούς ανάπτυξης σε σχέση με τους αποχλωριωτές είναι προφανές ότι οι συνθήκες ανταγωνισμού ακόμα και αν δεν υπάρχουν εξαρχής είναι πιθανό να προκύψουν αρκετά σύντομα στην αποχλωριωτική εφαρμογή (Aulenta et al., 2008). Ως πιθανές λύσεις είναι αφενός η εξάντληση όλων των θεικών ιόντων (διαλυτά και στερεά) αλλά και των υπολοίπων δεκτών ηλεκτρονίων που περιέχονται στον υδροφόρο και αποτελούν παρεμποδιστές στην αποχλωριωτική διαδικασία, με την εισπίεση υψηλής ποσότητας δότη ηλεκτρονίων (Hoelen et al., 2004) και αφετέρου η μηδενική παρέμβαση, αφήνοντας την εξάντληση τους στη διαδικασία της φυσικής εξασθένησης στην περίπτωση που η συγκέντρωση των θεικών δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για τη δράση των αποχλωριωτών. Ωστόσο, από την εφαρμογή των μεθόδων μείωσης των θεικών ενδέχεται να προκληθούν παράπλευρες απώλειες και ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως έμφραξη του υδροφόρου (bioclogging) λόγω της εκτεταμένης παραγωγής βιομάζας, πιθανώς αυξημένο δυναμικό πυρκαγιάς και έκρηξης από την υπερβολική παραγωγή μεθανίου από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς (Lee et al., 2007; Aulenta et al., 2007) και συσσώρευση δευτερογενών ρύπων ή παραπροϊόντων της διαδικασίας (π.χ. Fe(II) και Mn(II) από την αναγωγή του Fe(III) και Mn(IV)

αντίστοιχα), που πιθανώς να υποβαθμίσουν περαιτέρω την ποιότητα του υπόγειου νερού (Aulenta et al., 2007).

Θεωρείται δεδομένο πάντως ότι η παρουσία των θεικών ιόντων αποτελεί κατά κανόνα περιοριστικό παράγοντα αλλά κυρίως στην καθυστέρηση της διαδικασίας της αναγωγικής αποχλωρίωσης και όχι στη μη-πραγμάτωση της (Pantazidou et al., 2012). Παράλληλα, σε πειράματα που πραγματοποιήθηκαν από τους ίδιους αναφέρεται ότι η διαδικασία της αποχλωρίωσης έλαβε χώρα παράλληλα με αυτή της θεικοαναγωγής και δεν αυξήθηκε μετά την εξάντληση των θεικών κάτι που σημαίνει ότι δεν επηρεάστηκε στην περίπτωση αυτή από την ανταγωνιστική δραστηριότητα – ενώ πιθανώς και να ωφελήθηκε από το παραγόμενο από τα θειοαναγωγικά βακτήρια υδρογόνο (Aulenta et al., 2006; Aulenta et al., 2007), με την ποσότητα θεικών ιόντων που προστέθηκε να είναι 5.1 mmol/l (που αντιστοιχούν σε περίπου 490 mg/l). Ένας ακόμα τρόπος ρύθμισης/περιορισμού της δράσης των θεικοαναγωγικών βακτηρίων είναι η παροχή σταθερών χαμηλών δόσεων υδρογόνου – στην περίπτωση που έχει επιλεγεί ως άμεσος δότης, ώστε να δημιουργηθούν περιοριστικοί παράγοντες για την ανάπτυξη τους και να ευνοηθούν οι αποχλωριωτές (Hoelen et al., 2004). Αρνητική επίπτωση εντοπίζεται να έχουν τα θεικά και στην περίπτωση των Aulenta et al., (2008) όπου γίνεται προσπάθεια κατανόησης του ανταγωνισμού μεταξύ των αποχλωριωτών και των αποθειωτικών μικροοργανισμών. Όπως προέκυψε από την πειραματική εφαρμογή τους, απουσία θεικών το PCE (που είχε αρχική συγκέντρωση 60 mM) αποχλωρίωθηκε πλήρως σε αιθέριο κατά τις 20 πρώτες ημέρες απουσία θεικών ιόντων, με το VC να εμφανίζει και σε αυτή την περίπτωση την υψηλότερη συσσώρευση. Παράλληλα, στο πείραμα όπου προστέθηκαν θεικά (σε αρχική συγκέντρωση 3.75 mmol/L), η αποχλωρίωση πραγματοποιήθηκε κανονικά αλλά σε χαμηλότερους ρυθμούς (Aulenta et al., 2008). Αντίστοιχη άποψη φέρεται να προκύπτει και από το πείραμα των Pantazidou et al. (2012), οι οποίοι πραγματοποίησαν εργαστηριακή εφαρμογή σε μικτές καλλιέργειες αποχλωρίωσης υπό ελεγχόμενες εργαστηριακές συνθήκες με διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικών. Συγκεκριμένα, έγιναν δοκιμές με 0 mg/l, 30 mg/l (0.3 mM), 400 mg/l (4.2 mM) και 1100 mg/l (11.5 mM) θεικών ιόντων. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προκύπτει ότι το TCE μετατράπηκε κατά 100% σε VC παρουσία θεικών όταν στην αντίστοιχη καλλιέργεια χωρίς θεικά το TCE μετατράπηκε κατά 75% σε VC και 25%

αιθένιο, με το cis-DCE να καταναλώνεται σε 12-15 ημέρες έναντι των 7 ημερών αντίστοιχα (Pantazidou et al., 2012).

Αντίστοιχα, σύμφωνα με τους Heimann et al. (2005), στις καλλιέργειες που μελέτησαν, η αποχλωριωτική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε πλήρη βαθμό – από TCE σε cis-DCE και στη συνέχεια VC και αιθένιο μέσα σε 32 ημέρες από την τροφοδοσία με παρόμοιους μάλιστα ρυθμούς τόσο παρουσία όσο και απουσίαθειικών ιόντων. Ως δότης ηλεκτρονίων είχε επιλεγεί το γαλακτικό οξύ το οποίο από την αποδόμηση του απέδωσε συγκεντρώσεις υδρογόνου μέχρι και 135 nmol/l και εξαντλήθηκε πλήρως μετά τις 17 ημέρες με το οξικό οξύ που παρήχθη να φτάνει σε συγκεντρώσεις έως 885 μmol/l, ενώ παράλληλα όπως αναφέρουν παρατηρήθηκαν μόνο μικρές συγκεντρώσεις προπιονικού οξέως (Heimann et al., 2005). Και στις δύο καλλιέργειες (παρουσία και απουσίαθειικών) πάντως η συγκέντρωση του παραγόμενου μεθανίου κατά την 77^η ημέρα ήταν παρεμφερής με 130 μmol/l (+/- 58 μmol/l) και 200 μmol/l (+/- 67 μmol/l) αντίστοιχα, με τηθειικοαναγωγή να παρουσιάζει μείωση κατά 195 μmol/l – τιμή η οποία ωστόσο είναι πολύ κοντά στην αβεβαιότητα των μετρήσεων (212 μmol/l) (Heimann et al., 2005). Έτσι, από τα πειράματα των τελευταίων γίνεται αντιληπτό ότι η αρνητική επίδραση τωνθειικών στην αποχλωριωτική διαδικασία είναι δεδομένη υπό συνθήκες περιορισμού του δότη ηλεκτρονίων αλλά είναι περισσότερο εμφανείς στην αναγωγή των λιγότερο χλωριωμένων παραγώγων του (cis-DCE, VC) και ότι θα πρέπει σε κάθε περίπτωση να λαμβάνονται υπόψη σε μία εφαρμογή αποκατάστασης.

Η επίδραση της παρουσίαςθειικών σε πιλοτική εφαρμογή εξετάστηκε και από τους Bennett et al. σε άρθρο τους το 2007. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι ηθειικοαναγωγή έλαβε χώρα αλλά μετά το πέρας της απονιτροποίησης με αποτέλεσμα να ξεκινήσει σε πλήρη έκταση ακριβώς την ίδια περίοδο με την αποχλωρίωση (την 125^η ημέρα) και έως την 208^η ημέρα (πριν δηλαδή το πέρας της αποχλωρίωσης) προκαλώντας μερική αναχαίτιση της αναγωγής των χλωριωμένων ενώσεων. Επιπλέον, από το πείραμα των El Mamouni et al. (2002) στο οποίο χρησιμοποιήθηκε ως δότης ηλεκτρονίων μίγμα μεθανόλης και γαλακτικού οξέως, προέκυψε έπειτα από 50 ημέρες παρατήρησης ότι ποσότητεςθειικών ιόντων μέχρι 10 mM δεν είχαν σημαντική επίπτωση στην αποχλωριωτική διεργασία, ωστόσο για 15 mM και 20 mM που δοκιμάστηκαν παρατηρήθηκε μείωση στην ποσότητα των προϊόντων της αποχλωρίωσης (VC και

αιθένιο). Αξίζει τέλος να αναφερθεί ότι στην πιλοτική εφαρμογή των τελευταίων υπήρξε παράλληλη ρύπανση με νικέλιο το οποίο ωστόσο όπως αναφέρουν απομακρύνθηκε μετά την ένωση του με τα παραγόμενα από την δραστηριότητα των αποθειωτών σουλφίδια δημιουργώντας θειούχο νικέλιο (NiS), αποδεικνύοντας ότι σε ορισμένες περιπτώσεις είναι δυνατή η ταυτόχρονη αντιμετώπιση περισσότερων του ενός ρυπαντών σε ένα υδροφόρο στρώμα (El Mamouni et al., 2002). Παρουσία θεικών πάντως, πλεονέκτημα μεταξύ των ανταγωνιζομένων μεθανογόνων, οξικοτροφικών και θεικοαναγωγικών, προκύπτει ότι κατέχουν από θερμοδυναμικής άποψης οι θεικοαναγωγικοί όπως παρατήρησε ο Stams και η ομάδα του στην έρευνα τους (2005).

Η αρχική συγκέντρωση των θεικών και στα δύο σημεία ελέγχου στην εφαρμογή των Hoelen et al. (2006) άρχισε να μειώνεται 4 ημέρες μετά την προσθήκη του προπιονικού οξέως για το ανοδικό ρεύμα σχεδόν εξαντλήθηκε κατά την 63η ημέρα του πειράματος (<10mg/l) με παράλληλη μείωση και στο καθοδικό ενώ με βάση τις αναλύσεις των χλωριωμένων αιθυλενίων συνέβη παράλληλα με την αποχλωρίωση. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι είναι δυνατή η πραγμάτωση και των δύο διεργασιών υπο περίσσεια δότη ηλεκτρονίων αλλά και εντός ορισμένων συγκεντρώσεων θεικών όπως περιγράφηκε και από άλλους ερευνητές (βλ. παραπάνω), ενώ παράλληλα η παρουσία των σουλφιδίων που προέκυψαν από τη θεικοαναγωγή δε φαίνεται να έχει αναχαιτιστική δράση έναντι της αποχλωρίωσης (Hoelen et al., 2006).

2.6.2 Η επίδραση των μεθανογόνων μικροοργανισμών στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Ανταγωνιστική διαδικασία για την αναγωγική αποχλωρίωση αποτελεί αυτή της μεθανογένεσης. Κατά κανόνα η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα σε όλους τους μικροκόσμους ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις – όπως και σε αυτήν της μελέτης των Aulenta et al. (2007), είναι αμελητέα. Πιθανή εξήγηση για τη μη παρουσία μεθανογένεσης στους συγκεκριμένους μικρόκοσμους αποτελεί η παρουσία των νιτρικών, θεικών και των χλωριωμένων ενώσεων ή των προϊόντων τους καθώς επίσης και ο χαμηλός αριθμός μεθανογόνων μικροοργανισμών και οργανικών

ενώσεων στο χώμα (Aulenta et al., 2006). Η μεθανογένεση σύμφωνα με τους Ma et al. (2006) βασίζεται στους υδρογονοτροφικούς μεθανογόνους μικροοργανισμούς χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η συμμετοχή οξικοτροφικών μεθανογόνων μικροοργανισμών. Σημαντική στρατηγική για εφαρμογές αποχλωρίωσης σύμφωνα με τους Yang & McCarty (1998), αποτελεί η διατήρηση των συγκεντρώσεων υδρογόνου μεταξύ 2 και 11 nM καθώς στο όριο αυτό η μεθανογένεση σταματά και ευνοείται η αποχλωρίωση. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί είτε προσαρμόζοντας το ρυθμό τροφοδοσίας των δοτών ηλεκτρονίων, είτε χρησιμοποιώντας αργά διασπώμενο δότη ηλεκτρονίων ή και κάποιον δότη που απαιτεί χαμηλή μερική πίεση υδρογόνου για το μετασχηματισμό του (Yang & McCarty, 1998).

Ο ανταγωνισμός μεταξύ μεθανογόνων – αποχλωριωτών βασίζεται κατά κανόνα σε 3 παράγοντες (Ballapragada et al., 1997):

- Στις ταχύτητες μετατροπής υποστρώματος - Y,
- Στην ικανότητα χρήσης ενός κοινού δέκτη ηλεκτρονίων και
- Στη μέγιστη ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος

Μεθανογένεση παρατηρήθηκε και στο πείραμα των Pantazidou et al. (2012) και μάλιστα παράλληλα με την αποθείωση, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ένας χρόνος υστέρησης έναντι της μείωσης των θεικών, ενώ παράλληλα από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν επιβεβαιώνεται η συσχέτιση της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων με το παραγόμενο στην καλλιέργεια μεθάνιο. Επισημαίνεται ότι στις καλλιέργειες με μεσαίες και υψηλές συγκεντρώσεις θεικών ιόντων δεν εντοπίστηκε συστηματικά μεθανογένεση (Pantazidou et al., 2012). Όπως χαρακτηριστικά αναφέρει και η μελέτη των Heimann et al. (2005) η παρουσία περισσότερων μεθανογόνων στις καλλιέργειες που απουσιάζουν τα θειικά ιόντα είναι αναμενόμενη καθώς δεν υπάρχει ο περιοριστικός παράγοντας της πρόσληψης του δότη ηλεκτρονίων από τους θεικοαναγωγικούς μικροοργανισμούς. Ένα ακόμα σημαντικό μειονέκτημα που προκύπτει από τη διαδικασία της μεθανογένεσης στις εφαρμογές αποχλωρίωσης είναι το γεγονός της περιορισμένης διαλυτότητας του μεθανίου στο νερό και ο ανταγωνισμός που προκαλείται για το δότη ηλεκτρονίων που έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό στην ανάπτυξη των αποχλωριωτικών μικροοργανισμών και της κατ' επέκταση της αποδόμησης των χλωριωμένων ενώσεων (Boopathy & Peters, 2001).

Σημαντική παρουσία μεθανίου καθώς και CO₂, αιθενίου και αιθανίου, παρατηρήθηκε και στα πειράματα αποδόμησης χλωροαιθυλενίων των Bradley & Chapelle (1999). Η μεθανογένεση στις καλλιέργειες τους ήταν έντονη με την αποχλωρίωση του TCE να ολοκληρώνεται σε 80 ημέρες, δημιουργώντας ωστόσο συσσώρευση cis-DCE και VC, συγκεντρώσεις οι οποίες ωστόσο εκμηδενίστηκαν στις 250 περίπου ημέρες. Το φαινόμενο της μεθανογένεσης περιγράφεται και από τους Bennett et al. (2007), στην περίπτωση των οποίων μάλιστα υπήρχε και παρουσία νιτρικών και θεικών ιόντων και σιδήρου. Η διαδικασία όπως ήταν αναμενόμενο και από τους συγγραφείς ξεκίνησε μετά την εξάντληση των θεικών ιόντων και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε στο μέγιστο της από την 125^η ημέρα μέχρι την 208^η και μάλιστα συνέβη παράλληλα με τη διαδικασία αναγωγής του σιδήρου κάνοντας έτσι αντιληπτό ότι είναι δυνατή η παράλληλη μεταβολική δραστηριότητα των μεθανογόνων παρουσία και άλλων αποδεκτών ηλεκτρονίων (Bennett et al., 2007).

Ανταγωνισμός για τη διαθέσιμη «τροφή» ωστόσο παρατηρείται και μεταξύ μεθανογόνων και οξικοτροφικών μικροοργανισμών με τον άμεσο ανταγωνισμό να έγκειται στην εκμετάλλευση του υδρογόνου ή του οξικού οξέος (Stams et al., 2005). Οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί στη συγκεκριμένη καλλιέργεια προήλθαν από τη βιολογική ιλύ που χρησιμοποιήθηκε κατά το σχεδιασμό τους, ενώ από τις παρατηρήσεις των συγγραφέων προέκυψε ότι οι μεθανογόνοι μπορούν να αναπτυχθούν αυτοτροφικά, αλλά η ανάπτυξή τους επηρεάζεται και από το οξικό οξύ – όπως δηλαδή συμβαίνει και στα αποθειωτικά βακτήρια, γεγονός που εξηγεί και τον ανταγωνισμό που παρατηρείται (Stams et al., 2005).

Στην περίπτωση της εφαρμογής των Hoelen et al. (2006) η μεθανογένεση ήταν αμελητέα, γεγονός που οι συγγραφείς βασίζονται στο ότι το προπιονικό ανιόν ως δότης είναι αργά διασπώμενος με αποτέλεσμα το υδρογόνο που απελευθερώνεται να μη μπορεί να στηρίξει τις μεταβολικές ανάγκες των μεθανογόνων μικροοργανισμών ενώ παράλληλα δεν υπήρξε και μεθανογένεση από οξικοτροφικούς μικροοργανισμούς. Σύμφωνα ωστόσο με τις παρατηρήσεις των Fennell et al., (1997), η χρήση βουτυρικού ή δευτερευόντως προπιονικού οξέος συμβάλει στη μείωση της μεθανογένεσης χωρίς ταυτόχρονα να επηρεάζει την απόδοση της αποχλωρίωσης.

2.6.3 Η επίδραση των νιτρικών ιόντων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Σημαντικό ρόλο στην αποχλωριωτική διαδικασία εκτός από την παρουσία των θεικών ιόντων παίζει και η παρουσία των νιτρικών ιόντων, τα οποία υπό τις ανοξικές συνθήκες που δημιουργούνται, δύνανται να δεσμεύσουν τα ηλεκτρόνια που προοριζόταν για την αποχλωρίωση πραγματοποιώντας αντί αυτής, τη διαδικασία της απονιτροποίησης. Ωστόσο, κατά βάση, η απονιτροποιητική διαδικασία πραγματοποιείται με χαμηλές ποσότητες του δότη ηλεκτρονίων (~20 mg/l) και είναι δυνατό να συντηρείται και με το προστιθέμενο για τη διαδικασία εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) ή το υπάρχον οργανικό φορτίο στο έδαφος και το νερό, συνεπώς θα πρέπει σε κάθε περίπτωση παρουσίας νιτρικών ιόντων να εξετάζεται η απαίτησή τους σε δότη ηλεκτρονίων ώστε να μη λειτουργούν παρεμποδιστικά απέναντι στην αναγωγική αποχλωρίωση (Aulenta et al., 2007).

Η επίδραση των νιτρικών ιόντων στην αποχλωριωτική διαδικασία αποτέλεσε και αντικείμενο μελέτης των Bennett et al. (2007), σε πιλοτική εφαρμογή αποχλωρίωσης στο πεδίο (in situ). Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις υποβάθρου των νιτρικών ήταν πάνω από 230 mg/l με το TCE και το cis-DCE να αποτελούν τις ουσίες προς αποχλωρίωση σε συγκεντρώσεις 300 και 200 mg/l, αντίστοιχα. Όπως ήταν αναμενόμενο από τους ερευνητές η αναγωγή των νιτρικών ξεκίνησε από τα πρώτα κίοντα στάδια μετά την προσθήκη του δότη ηλεκτρονίων – καθώς το οξυγόνο είχε ήδη εξαντληθεί και κατά την 54^η ημέρα είχε μειωθεί σε συγκεντρώσεις μικρότερες του 1 mg/l για το ένα σημείο δειγματοληψίας και 31 mg/l για το δεύτερο (Bennett et al., 2007). Όπως αποδεικνύεται από το πείραμα των Nelson et al. (2002), τόσο η διαδικασία της αποχλωρίωσης όσο και της μεθανογένεσης δύναται να παρεμποδιστούν παρουσία νιτρικών ιόντων σε ένα υδάτινο σώμα που χρήζει αποχλωρίωσης ωστόσο το φαινόμενο αυτό εξαρτάται άμεσα και από το ρυθμό τροφοδοσίας με υδρογόνο καθώς και την παρεχόμενη συγκέντρωσή του. Οι τελευταίοι σε πείραμα τους το 2002, δοκίμασαν με τη χρήση συστήματος μεμβρανών να τροφοδοτήσουν με υδρογόνο τη μικτή αποχλωριωτική καλλιέργεια τους σε βαθμό που να μην επιτρέπει ωστόσο τη δράση των μεθανογόνων και των θεικοαναγωγικών. Παρόλα αυτά, όπως αποδείχτηκε για τον αναχαιτισμό της δράσης των αποχλωριωτών ο περιορισμός του υδρογόνου δεν ήταν η μόνη αιτία αναχαιτίσεως ενώ παράλληλα

εξέτασαν την αναχαιτιστική δράση του οξειδίου του αζώτου – προϊόντος της αναγωγής των νιτρικών που σε μεγάλες συγκεντρώσεις (π.χ. >13 μM) γίνεται αναχαιτιστικός παράγοντας για τη διαδικασία (Nelson et al., 2002).

2.6.4 Η επίδραση άλλων ρύπων ή προσθέτων στην Αναερόβια Αναγωγική Αποχλωρίωση

Συχνό φαινόμενο σε ρυπασμένους από χλωροαιθυλένια υδροφορείς είναι και η ταυτόχρονη παρουσία άλλων ρύπων. Το τολουόλιο – που σε γενικές γραμμές χρησιμοποιείται και ως δότης, σύμφωνα με τα πειράματα των Hoelen et al. (2004) δύναται να χρησιμοποιηθεί απευθείας από τους θεικοαναγωγικούς μικροοργανισμούς για την απομάκρυνση θεικών ιόντων, γεγονός που έχει θετικό αντίκτυπο στη διαθεσιμότητα του δότη ηλεκτρονίων για την αποχλωρίωση – καθώς μειώνεται ο ανταγωνισμός για αυτόν. Παρόλα αυτά, η διαδικασία της ενισχυμένης αφαλογόνωσης προέκυψε μόνο μετά την εξάντληση του τολουολίου ενώ οι συγγραφείς παρατηρούν επιπλέον ότι το τολουόλιο έχει βρεθεί αποτελεσματικό για την τόνωση της αποχλωρίωσης δρώντας ως πρόδρομη ένωση προς τα ζυμώσιμα υποστρώματα (Hoelen et al., 2004).

Σημαντικό πρόβλημα δημιουργείται στις περιπτώσεις εδαφών με παρουσία σιδήρου και μαγγανίου, ωστόσο τα στοιχεία αυτά δεν είναι πάντοτε σε μορφή που μπορεί να αναχθούν από τους δότες ηλεκτρονίων συνεπώς απαιτείται ενδελεχής μελέτη κάθε ξεχωριστής περίπτωσης εφαρμογής (Bennett et al., 2007). Στην αποχλωριωτική εφαρμογή των τελευταίων υπήρξε μείωση σιδήρου που παρατηρήθηκε την 208^η ημέρα ωστόσο δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο ένωσης του διαλυτού ανηγμένου σιδήρου με θειούχες ρίζες που προήλθαν από τη μείωση των θεικών (ό.π.).

Κεφάλαιο 3^ο: Μεθοδολογία – Πειραματικό Πρωτόκολλο

Στο παρόν κεφάλαιο θα γίνει μία εκτενής περιγραφή του συνόλου των εργαστηριακών μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλο το διάστημα μελέτης της διαδικασίας της Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης. Όλες οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των συγκεντρώσεων ρύπων με αέρια χρωματογραφία αναπτύχθηκαν και εκτελέστηκαν από την την υποψήφια διδάκτορα Αντωνία Κορνηλία. Για λόγους πληρότητας κρίθηκε σκόπιμη η παρουσίασή τους στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Επίσης θα αναλυθούν οι τεχνικές συντήρησης των μητρικών καλλιιεργειών, η διαδικασία σχεδιασμού των πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) καθώς και των εβδομαδιαίων αναλύσεων που εκτελούνταν. Το πρωτόκολλο συντήρησης των καλλιιεργειών αναπτύχθηκε από την υποψήφια διδάκτορα Αντωνία Κορνηλία και εφαρμόστηκε από τον γράφοντα.

3.1 Συντήρηση των μητρικών καλλιιεργειών

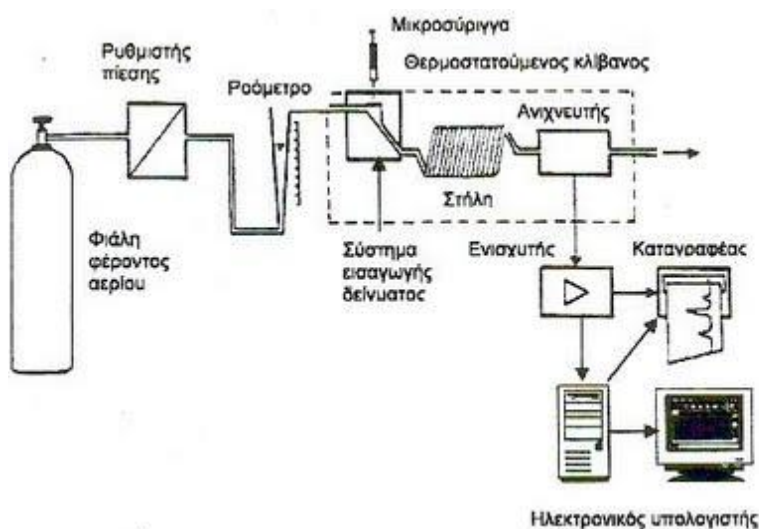
Στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής της Αντωνίου Κορνηλίας, καθώς και παλαιότερων διδακτορικών και διπλωματικών διατριβών συντηρούνται στο εργαστήριο 3 καλλιέργειες Αναερόβιας Αναγωγικής Αποχλωρίωσης εις διπλούν, που διακρίνονται από τη συγκέντρωση των θεικών ιόντων με την οποία τροφοδοτούνται. Ο στόχος του πειράματος είναι να μελετηθεί η επίδραση των θεικών ιόντων, της δόσης του δότη ηλεκτρονίων και της μεθανογένεσης στην αναγωγική αποχλωρίωση.

Με βάση τα παραπάνω, έχουμε ένα ζεύγος καλλιιεργειών NS – Non Sulfate (NS1-NS2) όπου η συγκέντρωση θεικών είναι αμελητέα, ένα ζεύγος καλλιιεργειών LS – Low Sulfate (LS1-LS2) που έχουν συγκέντρωση θεικών 150 mg/l και τέλος ένα ζεύγος καλλιιεργειών MS – Medium Sulfate (MS1-MS2) με συγκέντρωση θεικών 400 mg/l. Οι καλλιέργειες βρίσκονται όλες υπό αναερόβιες συνθήκες σε serum φιάλες όγκου 600 ml όπου η αναλογία υδατικής φάσης με την αέρια είναι ίση με 375:225 ml, ενώ διατηρούνται υπό συνθήκες σκοτούς και πάνω σε τράπεζα ανάδευσης χαμηλής

ταχύτητας. Σκοπός της συντήρησης, είναι η παρακολούθηση της σύστασης και της συμπεριφοράς των καλλιεργείων των αναερόβιων βακτηρίων που συντελούν στην αποδόμηση του TCE για διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικών, καθώς και η διατήρηση μέρους της βιομάζας τους προκειμένου να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch).

3.1.1 Αρχές Λειτουργίας Αέριου Χρωματογράφου

Η αέρια χρωματογραφία (GC, Gas Chromatography) αναπτύχθηκε ως αναλυτική τεχνική τα τελευταία σαράντα περίπου χρόνια. Η τεχνική αυτή είναι σχετικά απλή και χρησιμοποιείται για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε τρόφιμα, φάρμακα, προϊόντα πετρελαίου κ.λ.π (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001). Αποτελεί μια αναλυτική μέθοδο στην οποία ο διαχωρισμός των συστατικών (αέριων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών, και ενός αερίου (κινητή φάση, φέρον αέριο). Ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από τη στήλη με διαφορετικές ταχύτητες, που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με τη στατική φάση (Γιολδάση, 2009).



Εικόνα 3-1: Ενδεικτική διάταξη συστήματος αέριας χρωματογραφίας (Πηγή: Ιστοσελίδα Χημικό Εργαστήριο, 2013).

Όπως αναφέρεται από τη Γιολδάση (2009), η αέρια χρωματογραφία βασίζεται στη

θεωρία των πλακών. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η κίνηση μιας ουσίας μέσα από τη χρωματογραφική στήλη μπορεί να θεωρηθεί ως μετακίνηση μέσω διαδοχικών θαλάμων (ζωνών) εξισορροπήσεως, που ονομάζονται θεωρητικές πλάκες. Μία θεωρητική πλάκα είναι ο απαιτούμενος όγκος της στήλης, ώστε μέσα σε αυτόν να αποκαθίσταται ισορροπία μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης.

Η ισορροπία αυτή περιγράφεται από τον συντελεστή κατανομής:

$$K = C_S/C_M$$

όπου C_S και C_M είναι οι συγκεντρώσεις του συστατικού στην στατική και στην κινητή φάση αντίστοιχα.

Το κομμάτι αυτό, όπου γίνεται και η σημαντικότερη διαδικασία του χρωματογράφου είναι η στήλη. Υπάρχουν δύο είδη στηλών οι πληρωμένες στήλες και οι τριχοειδείς. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα, συνήθως με τη μορφή σπειράματος ή U, ώστε να καταλαμβάνει κατά το δυνατόν μικρότερο χώρο, από ανοξειδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό, μήκους 1 – 2 m για της πληρωμένες στήλες, μέχρι αρκετών εκατοντάδων μέτρων για τις τριχοειδείς, εσωτερικής διαμέτρου της τάξεως των mm στις αναλυτικές στήλες, πολλών δεκάδων cm στις παρασκευαστικές στήλες (Χατζηγιάννου και Κουμπάρης, 2003). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλουσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Έτσι, μετά την εισαγωγή του δείγματος στη βαλβίδα εισαγωγής (septum) στην κορυφή της στήλης, τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται στον ανιχνευτή και τα σήματα ανίχνευσης καταγράφονται από καταγραφικό.

Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Συνήθως χρησιμοποιούνται He, N₂, Ar, H₂, CO₂ με προτιμότερο το He, επειδή έχει μεγάλη θερμική αγωγιμότητα και μικρή πυκνότητα, που επιτρέπει τη χρησιμοποίηση μεγαλύτερων ταχυτήτων ροής αερίου, με αντίστοιχη μείωση του χρόνου αναλύσεως. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις και ίχνη υγρασίας. Ένα ροόμετρο μέσα από το οποίο διέρχεται το αέριο μετράει με ακρίβεια την ταχύτητά του και υπάρχει και η δυνατότητα ρύθμισης της

ταχύτητας αυτής (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001; Χατζηιωάννου και Κουπάρης, 2003).

Ο χώρος εισαγωγής του δείγματος, ο ανιχνευτής και η στήλη, και σε πολλούς αεριοχρωματογράφους, θερμοστατούνται, συνήθως στην περιοχή 50 – 300°C, είτε όλα μαζί είτε χωριστά. Η διαχωριστικότητα αυξάνεται όταν η θερμοκρασία ελαττώνεται, η μείωση όμως της θερμοκρασίας προκαλεί αύξηση του χρόνου tR, και επομένως και αύξηση του χρόνου αναλύσεως. Όταν η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της χρωματογράφησης, συχνά είναι δύσκολο να επιτευχθεί πλήρης διαχωρισμός και ανίχνευση των συστατικών ενός μίγματος όταν τα σημεία ζέσεως τους ή και οι πολικότητες τους καλύπτουν ευρείες περιοχές. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κορυφές των πτητικότερων συστατικών (χαμηλά σημεία ζέσεως) εμφανίζονται η μία κοντά στην άλλη ή αλληλεπικαλύπτονται (μικρή διαχωριστικότητα), ενώ οι κορυφές των λιγότερο πτητικών ουσιών, είναι μικρού ύψους, πλατιές και σε ορισμένες περιπτώσεις απέχουν τόσο πολύ μεταξύ τους (υπέρμετρη διαχωριστικότητα), ώστε ενώσεις υψηλού σημείου ζέσεως να μην ανιχνεύονται. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται η θερμοπρογραμματιζόμενη αέρια χρωματογραφία, όπου η θερμοκρασία μεταβάλλεται με βάση προκαθορισμένο πρόγραμμα (Γιολδάση, 2009).

Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης. Στην περίπτωση μας, που χρησιμοποιείται ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID, Flame Ionization Detector) η λειτουργία του στηρίζεται στο γεγονός ότι η ηλεκτρική αγωγιμότητα (εξαιτίας του ιονισμού) ενός αερίου είναι ανάλογη της συγκεντρώσεως των φορτισμένων σωματιδίων μέσα σε αυτό. Ο ιονισμός του αερίου γίνεται με ανάμιξη του εκλυόμενου από τη στήλη αερίου με υδρογόνο και καύση του στον αέρα μέσα στο φούρνο του χρωματογράφου. Η φλόγα βρίσκεται σε χώρο, όπου εφαρμόζεται τάση της τάξεως των 100 V, μεταξύ του ακροφυσίου (αρνητικό ηλεκτρόδιο) και ενός άλλου ηλεκτροδίου πάνω ή γύρω από αυτό. Όταν το καιόμενο αέριο περιέχει οργανικές ενώσεις (και δεδομένου ότι το φέρον αέριο δεν περιέχει καύσιμες ενώσεις άρα δίνει ασθενές σήμα), παρατηρείται έντονη αύξηση της έντασης του ρεύματος, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των ιόντων που παράγονται, το οποίο ενισχύεται και στη συνέχεια καταγράφεται (Παπαδογιάννης & Σαμανίδου, 2001; Χατζηιωάννου & Κουπάρης, 2003; Γιολδάση, 2009).

3.1.1.1 Ανάλυση της στατικής υπερκείμενης φάσης

Σύμφωνα με το πειραματικό μας πρωτόκολλο το υγρό δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί και που περιέχει την υπό ανάλυση πτητική ουσία μάζας M εισάγεται σε κλειστό φιαλίδιο, τμήμα του οποίου καταλαμβάνεται από το δείγμα (V_S), ενώ ο υπόλοιπος όγκος του (V_G) αποτελεί την αέρια υπερκείμενη φάση. Αφού η ισορροπία μεταξύ της υγρής και της αέριας φάσης των πτητικών ενώσεων του δείγματος έχει επιτευχθεί με την παρέλευση ενός εύλογου χρονικού διαστήματος, ένα ποσοστό της μάζας της πτητικής ένωσης έχει μεταφερθεί στην αέρια υπερκείμενη φάση, ενώ η υπόλοιπη μάζα της ουσίας παραμένει στο υγρό δείγμα, με την ισορροπία μεταξύ της υγρής και της αέριας φάσης να είναι (Παναγιωτάκης, 2010):

$$M = C_w V_w + C_G V_G$$

Όπου:

M : η μάζα της πτητικής ουσίας, mol.

C_w : η συγκέντρωση της πτητικής ουσίας στην υγρή φάση, mol/l.

C_G : η συγκέντρωση της πτητικής ουσίας στην αέρια υπερκείμενη φάση, mol/l.

V_w : ο όγκος της υγρής φάσης, l.

V_G : ο όγκος της αέριας υπερκείμενης φάσης, l.

Ωστόσο γνωρίζοντας ότι η σταθερά Henry (H) ισούται με:

$$H = \frac{C_G}{C_w}$$

Έχουμε:

$$M = C_G \frac{V_w}{H} + C_G V_G = C_G \left(\frac{V_w}{H} + V_G \right)$$

Και διαιρώντας τα δύο μέρη της παραπάνω εξίσωσης με το V_w έχουμε:

$$\frac{M}{V_w} = C_o = \frac{C_G}{V_w} \left(\frac{V_w}{H} + V_G \right) = C_G \left(\frac{1}{H} + \frac{V_G}{V_S} \right)$$

Όπου:

C_o : η αρχική συγκέντρωση της πτητικής ουσίας στην υγρή φάση (ονομαστική συγκέντρωση ή nominal concentration- C_{nom}), mol/l.

H : αδιάστατη σταθερά Henry.

Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η δυνατότητα που δίνεται στον αναλυτή, μετρώντας τη συγκέντρωση της πτητικής ένωσης στο δείγμα της αέριας υπερκείμενης φάσης, να προσδιορίζει την αρχική ή ονομαστική συγκέντρωση της εν λόγω ένωσης. Ένα πρόβλημα το οποίο παρόλα αυτά ανακύπτει είναι το γεγονός ότι η μέτρηση του αέριου δείγματος με τον αέριο χρωματογράφο μας δίνει πληροφορίες σε όρους εμβαδού κορυφών και όχι σε όρους συγκέντρωσης της υπό ανάλυση πτητικής ουσίας. Έτσι, αυτές οι πληροφορίες θα πρέπει να μετατραπούν σε όρους συγκέντρωσης με τη βοήθεια εξωτερικών πρότυπων διαλυμάτων της αντίστοιχης πτητικής ένωσης, γνωστών συγκεντρώσεων. Αν και πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιούνται για τις μετρήσεις και στη συμβατική αέρια χρωματογραφία, η ιδιαιτερότητα της μεθόδου αυτής είναι ότι τα πρότυπα διαλύματα, όπως και τα δείγματα, βρίσκονται εντός κλειστού φιαλιδίου, μέρος του οποίου καταλαμβάνεται από την υπερκείμενη αέρια φάση, με την ίδια αναλογία που ήταν στα δείγματα, ωστόσο, προκειμένου να μπορούν να συγκριθούν με τα πρότυπα διαλύματα θα πρέπει η ισορροπία στα πρώτα να έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με την ισορροπία στα δεύτερα (Παναγιωτάκης, 2010).

3.1.2 Υλικά και Οργανολογία

3.1.2.1 Υλικά

Τα διαλύματα και οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των καλλιιεργειών είναι:

Διάλυμα RAMM (Reduced Anaerobic Mineral Medium) (2 l):

- 0,2 gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
- 0,1gr $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 1 gr NH_4Cl
- 0,8 gr KH_2PO_4
- 20 ml Διάλυμα Ιχνοστοιχείων Μετάλλων
- 40 ml $NaHCO_3$ 10% w/v
- 10 ml Na_2S 5% w/v
- 200 μl Resazurin (δείκτης αναγωγικών συνθηκών)

Διάλυμα Βιταμινών (Vitamin Mixture) (1l):

- 20 gr Βιοτίνη (B7)
- 20 gr Φολικό οξύ (Bc)
- 100 gr Υδροχλωρική Πυριδοξίνη (B6)
- 50 gr Ριβοφλαβίνη (B2)
- 50 gr Νικοτινικό οξύ (B3)
- 50 gr DL-Παντοθενικό Ασβέστιο(B5)
- 2 gr Βιταμίνη B12
- 50 gr p-άμινο-βενζοϊκό οξύ (PABA)

Διάλυμα Εκχυλίσματος Ζύμης (Yeast Solution):

- 10gr εκχύλισμα ζύμης (Yeastextract) σε 100 ml απιονισμένο νερό

Διάλυμα Σεληνίου-Βολφραμίου (Selenite-Tungstate Solution, S-T) (1 l):

- 0,4 gr NaOH (10 mM)
- 6 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,02 mM)
- 8 mg $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 mM)

Διάλυμα Μετάλλων (Trace Element Mixture) (1 l):

- 4,5 gr Νίτριλοτριοξικό οξύ (NTA)
- 0,556 gr $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,086 gr $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 0,17 gr $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,21 gr $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,019 gr H_3BO_3
- 0,02 gr NiCl_2
- 0,01 gr NaMoO_4
- Ρυθμίζουμε σε pH 7 με διάλυμα KOH 10 M

Τριχλωροαιθυλένιο (TCE)

Βουτυρικό οξύ (ButA)

Διάλυμα Na₂SO₄ γνωστής συγκέντρωσης

Αέριο N₂ 99,9%

Αέριο μίγμα N₂/CO₂ σύστασης 70%/30%

3.1.2.2 Οργανολογία – Εργαστηριακός εξοπλισμός

Τα όργανα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης των καλλιεργειών στο εργαστήριο, αλλά και της παρασκευής των πρότυπων καμπυλών καθώς και των πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας, είναι τα εξής:

1. Αεριοχρωματογράφος GC Autosystem XL της Perkin Elmer εξοπλισμένος με ανιχνευτή ιονισμού δια φλογός (FID) και Autosampler υγρών δειγμάτων
2. pHmeter της WTW pH315i
3. Φασματοφωτόμετρο DR2800 της HACH
4. Φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2001
5. Κυψελίδες 10 ml και 2 ml
6. Γυάλινες φιάλες Serum με λεπτό στόμιο 600 ml
7. Γυάλινες φιάλες Serum 160 ml
8. Γυάλινες φιάλες Serum 2 lt
9. Αεροστεγή πώματα βουτυλίου (Wheaton Butyl Teflon-faced stoppers)
10. Αλουμινένια σφραγίσματα φιαλών για πώματα Wheaton (Aluminum Crimp Seals)
11. Αυτόματες πιπέτες 10 –1000 μl
12. Ποτήρια ζέσεως 50 ml – 100 ml
13. Vial των 10 ml για τη μέτρηση του pH
14. Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
15. Φούρνοι 103°C και 550°C για τον προσδιορισμό των ολικών και αιωρούμενων στερεών
16. Συσκευή διήθησης με αντλία κενού
17. Ξηραντήρας
18. Απαγωγός
19. Συσκευή φυγοκέντρισης

20. Γυάλινη σύριγγα για αέρια 1 ml (Hamilton)
21. Γυάλινη σύριγγα 1 ml με βαλβίδα
22. Γυάλινες σύριγγες για υγρά 25 ml, 100 ml
23. Πλαστικές σύριγγες μιας χρήσεως με αποσπώμενη βελόνα για υγρά (50 ml, 1 ml και 5 ml)
24. Πλαστικές σύριγγες μιας χρήσεως με προσαρτημένη βελόνα για υγρά (1 ml)
25. Βελόνες 21G
26. Βελόνες 22G
27. Πλαστικά φιαλίδια (tube) 0,5ml και 2 ml για την αποθήκευση δειγμάτων
28. Μembrάνες σύριγγας 0,45 μm (Millipore)
29. Θερμόμετρο
30. Χρονόμετρο
31. Κατάψυξη (-4°C) για τη συντήρηση των δειγμάτων VFAs και πρωτεϊνών
32. Ειδικό εξάρτημα σφράγισης φιαλών Wheaton
33. Ειδικό εξάρτημα αποσφράγισης φιαλών Wheaton
34. Πλαστικά δοχεία με υποδοχείς απο καουτσούκ για τις serum φιάλες των 600ml
35. Φίλτρα στερεών Whatman GF/C
36. Αντιδραστήρια HACH Sulfaver σε σκόνη για τη μέτρησηθειικών ιόντων
37. Λοιπά υλικά: 1 ανεξίτηλος μαρκαδόρος, 1 φάκελος, 1 μολύβι και 7 κομμάτια αλουμινόχαρτο και άλλος εργαστηριακός εξοπλισμός πιο σπάνια χρησιμοποιούμενος.

3.1.3 Διαδικασία Συντήρησης

Η διαδικασία συντήρησης πραγματοποιούνταν εβδομαδιαίως με σκοπό τη διατήρηση των καλλιεργειών και τον προσδιορισμό της απόδοσης τους για τη μετέπειτα χρήση τους τόσο ως πρωτογενή δεδομένα όσο και για τη δημιουργία πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch).

Τα αναλώσιμα που ήταν αναγκαία για την τροφοδοσία κάθε εβδομάδα είναι:

Υγρά μείγματα (θρεπτικά κλπ): αναερόβιο θρεπτικό μέσο (RAMM – περιέχει resazurin), διάλυμα ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (S-T), διάλυμα

βιταμινών (Vitamins), διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης 10% (Yeast Extract), διάλυμα θεικών ιόντων.

Χημικές ενώσεις: τριγλωροαιθυλένιο (TCE), βουτυρικό οξύ (Butyric acid).

3.1.3.1 Πρωτόκολλο παρασκευής αναερόβιου θρεπτικού μέσου (RAMM)

Για την παρασκευή του αναερόβιου θρεπτικού μέσου (Reduced Anaerobic Mineral Medium) για τις καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε φιάλη serum των 2 λίτρων η οποία αρχικά είχε ξεπλυθεί με απιονισμένο νερό και αποστειρώθηκε στον φούρνο των 103°C για μία ώρα. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν:

Βήμα 1: Με τη χρήση ενός μικρού γυάλινου χωνιού καθώς και ενός ογκομετρικού κύλινδρου 1 l εισάγεται το 1^ο από τα 2 λίτρα απιονισμένου νερού στη φιάλη. Το άλλο ένα λίτρο αδειάζεται σε έναν υδροβολέα προκειμένου να εισαχθεί σταδιακά στη συνέχεια.

Βήμα 2: Σε ένα καθαρό ύαλο ζυγίζονται 0,2 gr MgCl₂, 0,1 gr CaCl₂, 1 gr NH₄Cl και 0,8 gr KH₂PO₄ τα οποία εισέρχονται στη φιάλη ξεπλένοντας την ύαλο με μέρος από το υπολειπόμενο απιονισμένο νερό.

Βήμα 3: 20 ml Trace Element Mixture ογκομετρούνται και προστίθενται στη φιάλη ενώ με μέρος από το υπολειπόμενο απιονισμένο νερό ξεπλένεται ο ογκομετρικός κύλινδρος.

Βήμα 4: Εισάγεται στη φιάλη το υπολειπόμενο απιονισμένο νερό.

Βήμα 5: Η φιάλη σφραγίζεται με αεροστεγές πώμα βουτυλίου Wheaton (Butyl Teflon-faced stoppers) και αλουμινένιο σφράγισμα και πραγματοποιείται purging με αέριο N₂-CO₂ για 30 λεπτά βάζοντας ταυτόχρονα και μία βελόνα ώστε να αφαιρεθεί το οξυγόνο που έχει παγιδευτεί στη φιάλη.

Βήμα 6: Μόλις τελειώσει το παραπάνω στάδιο τοποθετείται στη βελόνα μία σύριγγα των 50 ml και ασκείται σε αυτήν πίεση.

Βήμα 7: Η φιάλη ανακινείται καλά και έπειτα τοποθετείται σε πλάγια θέση ώστε να αφαιρεθούν 50 ml από το διάλυμα τα οποία και απορρίπτονται.

Βήμα 8: Ακολούθως, εισάγονται 10 ml Na₂S και 40 ml NaHCO₃.

Βήμα 9: Προστίθενται 0,2 ml δείκτη ελέγχου παρουσίας οξυγόνου Resasurin (0,1%

w/v) και ανακινείται καλά η φιάλη.

Το διάλυμα θα πρέπει μετά από μερικές ώρες να έχει χρώμα διαυγές ή ωχρό-καφέ ώστε να είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί. Αν το χρώμα του παραμείνει ροζ ή μπλε σημαίνει ότι υπάρχει εισροή οξυγόνου και θα πρέπει να παρασκευαστεί εξαρχής.

3.1.3.2 Βήματα τροφοδοσίας μητρικών καλλιιεργειών

Μετά την μέτρηση των χλωριωμένων ενώσεων στις μητρικές καλλιιεργειες που απαιτείται για τον έλεγχο της απόδοσης της αποχλωριωτικής διαδικασίας (περιγράφεται σε επόμενο κεφάλαιο) γίνεται εβδομαδιαία η τροφοδοσία των μητρικών καλλιιεργειών για τη συντήρηση τους. Έτσι, με βάση το πρωτόκολλο που προκαθορίστηκε ακολουθήθηκαν εβδομαδιαίως τα παρακάτω βήματα καθ' όλο το διάστημα της παρούσας μελέτης:

Βήμα 1: Οι έξι μητρικές καλλιιεργειες N1, N2, L1, L2, M1 και M2, 6 πλαστικές σύριγγες του 1 ml με αποσπώμενη βελόνα, 1 γυάλινη σύριγγα του 1 ml με βαλβίδα, 6 μεμβράνες (0,45 μm) για σύριγγες των 1000 μl, 6 tube 0,5ml, 6 tube 2ml, 7 πλαστικές σύριγγες των 50 ml στις οποίες τοποθετούνται 7 βελόνες 21G, 6 μεμονωμένες βελόνες 21G, 6 αλουμινένια αποσπώμενα σφραγίσματα (Wheaton), 6 Teflon πώματα από βουτύλιο (Wheaton), το ειδικό εξάρτημα σφράγισης (λευκό εξάρτημα-Wheaton), το ειδικό εξάρτημα αποσφράγισης (γκρι εξάρτημα – Wheaton), 2 πλαστικά δοχεία με υποδοχείς από καουτσούκ, ένα ποτήρι ζέσεως των 50 ml, το pHμετρό και απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στον απαγωγό.

Βήμα 2: Η πρώτη καλλιιεργεια N1, ανακινείται πολύ καλά και τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ. Όλο το σύστημα φέρνεται σε πλάγια θέση. Εξάγονται περίπου 220 μl δείγμα τρυπώντας το Teflon πώμα με μια πλαστική σύριγγα του 1 ml με αποσπώμενη βελόνα. Έπειτα αφαιρείται η βελόνα από τη σύριγγα και τοποθετείται μπροστά μια μεμβράνη (0,45 μm). Το δείγμα διηθείται αργά πιέζοντας τη σύριγγα και μεταφέρεται σε ένα tube 0,5 ml, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs). Το tube σφραγίζεται πολύ καλά και η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε για τη διήθηση απορρίπτεται. Η βελόνα τοποθετείται ξανά στη σύριγγα και εξάγεται επιπλέον 1 ml δείγμα από την καλλιιεργεια. Το

δείγμα αδειάζεται σε ένα tube των 2 ml, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης. Πάνω στα tube καταγράφεται το όνομα της καλλιέργειας με ένα μαρκαδόρο και η σύριγγα και η βελόνα της απορρίπτονται. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλες τις καλλιέργειες (Βήμα 2). Όταν συλλεχτούν όλα τα δείγματα, τοποθετούνται σε ένα φάκελο, αναγράφοντας απ' έξω την ημερομηνία και το είδος των αναλύσεων για τις οποίες προορίζονται και αποθηκεύεται στην κατάψυξη (-4°C).

Βήμα 3: Η πρώτη καλλιέργεια N1, ανακινείται πολύ καλά και τοποθετείται πάλι στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ. Όλο το σύστημα τοποθετείται και πάλι σε πλάγια θέση. Με μια σύριγγα των 50 ml και τη βελόνα της, εξάγονται 5 ml, τα οποία τοποθετούνται στο vial. Ενεργοποιείται το pHμέτρο και αφού καθαριστεί το ηλεκτρόδιο με απιονισμένο νερό και χαρτί, μετράμε το pH. Το περιεχόμενο του vial αδειάζεται στο νεροχύτη του απαγωγού με ανοιχτή βρύση, ενώ το σκεύος ξεπλένεται πολύ καλά με απιονισμένο νερό και το στεγνώνουμε με λίγο χαρτί ώστε να χρησιμοποιηθεί για την επόμενη μέτρηση. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για όλες τις καλλιέργειες, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη πλαστική σύριγγα και βελόνα για κάθε καλλιέργεια.

Βήμα 4: Στο στάδιο αυτό επιλέγεται η καλλιέργεια LS1 και με τη χρήση πλαστικής σύριγγας 1 ml με προσαρμοσμένη βελόνα εξάγονται από τη φιάλη 200 μl δείγματος, αφού έχει τοποθετηθεί πρώτα σε πλάγια θέση, στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ. Το δείγμα αυτό αδειάζεται σε κυψελίδα 10 ml και θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των σουλφιδίων (βλ. ανάλυση σουλφιδίων). Έπειτα, ακολουθείται το ίδιο βήμα (βήμα 4) και ώστε να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις των σουλφιδίων για τις άλλες 3 καλλιέργειες που περιείχαν θειικά (LS2, MS1 και MS2).

Βήμα 5: Παίρνεται η πρώτη καλλιέργεια N1 και γαντζώνεται, με το ειδικό εξάρτημα αποσφράγισης το στόμιο πιέζοντας τα χερούλια έως ότου εξάγουμε το αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα. Στο στόμιο της τοποθετείται ένα νέο Teflon πώμα από βουτύλιο (Wheaton) και από πάνω το αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα. Γαντζώνεται με το εξάρτημα σφράγισης το στόμιο και πιέζονται τα χερούλια, έως ότου το αλουμινένιο σφράγισμα να μην κινείται. Στη συνέχεια, τοποθετείται ένα καπάκι από τις βελόνες στην άκρη

της σχισμής του αλουμινένιου αποσπώμενου σφραγίσματος και πιέζεται με τη φόρα του βέλους, έτσι ώστε να διπλωθεί το σφράγισμα και να φαίνεται η μισή επιφάνεια του Teflon πώματος. Η ίδια διαδικασία ακολουθείται για όλες τις καλλιέργειες. Το Βήμα 5 επαναλαμβάνεται κάθε 2 εβδομάδες.

Βήμα 6: Οι καλλιέργειες N1 και N2 ξανατοποθετούνται στα πλαστικά δοχεία με τους υποδοχείς από καουτσούκ. Οι δυο βαλβίδες (πάνω και κάτω βαλβίδες) του αερίου αζώτου ανοίγονται και το μανόμετρο ρυθμίζεται στην πίεση 1 atm (ρυθμίζοντας την κάτω βαλβίδα). Τα Teflon πώματα τρυπιούνται με τις ατσάλινες βελόνες 22G του αερίου αζώτου και με δυο μεμονωμένες βελόνες 21G – αντίστοιχες για κάθε καλλιέργεια. Με αυτόν τον τρόπο διοχετεύεται αέριο άζωτο για 30 λεπτά στις δύο καλλιέργειες, ενώ από τη δεύτερη βελόνα (21G) απομακρύνεται το οξυγόνο που έχει φυλακιστεί εντός των μπουκαλιών. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, αφαιρούνται πρώτα οι βελόνες 21G και μετά οι ατσαλένιες βελόνες του αερίου αζώτου. Οι ατσαλένιες βελόνες του αερίου αζώτου καθαρίζονται καλά με απιονισμένο νερό και χαρτί και τοποθετούνται στις επόμενες δύο καλλιέργειες, επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία για όλες τις καλλιέργειες. Μόλις τελειώσει η διαδικασία για όλες τις καλλιέργειες, η ατσαλένια βελόνα του αερίου καθαρίζεται καλά και ακολουθείται η αντιστροφή διαδικασία για να κλείσει το μανόμετρο.

Βήμα 7: Η μητρική καλλιέργεια N1 τοποθετείται μέσα στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ. Οι δυο βαλβίδες (πάνω και κάτω βαλβίδες) του αερίου μίγματος αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα ανοίγονται και ρυθμίζονται στην πίεση 1 atm (ρυθμίζοντας την κάτω βαλβίδα). Τα Teflon πώματα τρυπιούνται με τις ατσάλινες βελόνες 22G του αερίου αζώτου και με δυο μεμονωμένες βελόνες 21G, αντίστοιχες για κάθε καλλιέργεια. Πραγματοποιείται διοχέτευση του μίγματος αερίου για 2 λεπτά, για να έχουμε αναερόβιες συνθήκες και να ρυθμιστεί το pH στη φιάλη. Μόλις τελειώσει αυτή η διαδικασία, τοποθετείται στη βελόνα μία πλαστική σύριγγα των 50 ml η οποία αφήνεται να γεμίσει σταδιακά με 50 ml αερίου μίγματος και μετά ασκείται πίεση στη σύριγγα για να εξαχθεί το αέριο μίγμα στο serum μπουκάλι, ούτως ώστε να προκαλέσουμε αυξημένη πίεση εντός της φιάλης. Πρώτα αφαιρείται η πλαστική σύριγγα με τη βελόνα 21G και μετά η ατσαλένια βελόνα του αερίου μίγματος, η οποία και καθαρίζεται με απιονισμένο νερό και χαρτί και τοποθετείται η επόμενη καλλιέργεια. Η

διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλες τις καλλιέργειες και μόλις ολοκληρωθεί κλείνεται η βαλβίδα του αερίου μίγματος.

Βήμα 8: Η καλλιέργεια L1, ανακινείται πολύ καλά και τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ. Όλο το σύστημα τοποθετείται σε πλάγια θέση. Λαμβάνονται 1 ml δείγματος τρυπώντας το Teflon πώμα με τη γυάλινη σύριγγα του 1 ml, κλείνεται η βαλβίδα και εξάγεται από την καλλιέργεια. Το δείγμα αδειάζεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml, το οποίο γεμίζεται ως την χαραγή με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια ανακινείται. Το δείγμα αυτό θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των θεικών ιόντων (βλ. ανάλυση θεικών ιόντων) και η διαδικασία (βήμα 8) επαναλαμβάνεται για τις καλλιέργειες που περιέχουν θειικά ιόντα (LS2, MS1 και MS2).

Βήμα 9: Στο στάδιο αυτό η καλλιέργεια N1, ανακινείται ξανά πολύ καλά και επανατοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ. Όλο το σύστημα φέρνεται σε πλάγια θέση και αφού τρυπηθεί το Teflon πώμα της καλλιέργειας με τη βελόνα 21G και την αντίστοιχη πλαστική σύριγγα, εξάγονται 50 ml, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για τη μέτρηση των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών (βλ. ανάλυση ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών). Σημαντικό σημείο στη διαδικασία είναι το να ελέγχεται ο όγκος που αφαιρέθηκε για τυχόν παγιδευμένο αέρα ο οποίος και θα πρέπει να αφαιρεθεί από την τιμή της διηθούμενης ποσότητας του υγρού.

Βήμα 10: Με τη σύριγγα και τη βελόνα 21G του RAMM τρυπάται το Teflon πώμα του αναερόβιου θρεπτικού μέσου (RAMM) και εξάγονται 55 ml. Για να υπάρχει αρκετή πίεση στο αναερόβιο θρεπτικό μέσο και να είναι ευκολότερη η λήψη του παραπάνω όγκου, χρησιμοποιείται όποτε είναι αναγκαίο το αέριο μίγμα αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα σε πίεση 1 atm μέχρι να μειωθεί η ροή του αερίου μίγματος στο υγρό μέσο.

Βήμα 11: Το σύστημα της καλλιέργειας NS1 με το ειδικό πλαστικό δοχείο τοποθετείται σε οριζόντια θέση. Με τη σύριγγα του RAMM τρυπάται το Teflon πώμα της καλλιέργειας και σταδιακά πιέζοντας τη πλαστική σύριγγα το θρεπτικό μέσο εισέρχεται στην καλλιέργεια. Ταυτόχρονα, τοποθετείται μια μεμονωμένη βελόνα 21G στο πώμα της καλλιέργειας για να εξέλθει το φυλακισμένο αέριο άζωτο στο περιβάλλον.

Βήμα 12: Όταν εισέλθουν τα πρώτα 30 ml στο μπουκάλι τότε αφαιρείται η μεμονωμένη βελόνα 21G και συνεχίζεται η προσθήκη των υπολοίπων 25 ml

(έτσι ώστε να υπάρχει αυξημένη πίεση και να μην εισαχθεί αέρας στην καλλιέργεια από τις χαραμάδες του πόματος). Στο στάδιο αυτό είναι σημαντικό να ελεγχθεί ο όγκος που βρίσκεται τελικά στο μπουκάλι ώστε να εξακριβωθεί ότι έχει εισαχθεί ο ακριβής όγκος – ειδάλλως προστίθεται RAMM μέχρι να φτάσει τα 375 ml.

Βήμα 13: Ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία (Βήματα 9-12) για όλες τις καλλιέργειες.

Βήμα 14: 6 ποτήρια ζέσεως των 50 ml, πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στο φούρνο των 103°C για 5 λεπτά για να στεγνώσουν και στη συνέχεια αφήνονται στον απαγωγό για 5 λεπτά για να κρυώσουν (να έρθουν περίπου στη θερμοκρασία δωματίου). Ξεχωριστά στα 6 ποτηράκια τοποθετούνται περίπου 1 ml διαλύματος ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (ST), 5 ml διαλύματος θεικών ιόντων (Na_2SO_4), 5 ml διαλύματος βιταμινών, 1 ml διαλύματος εκχυλίσματος ζύμης (Yeast extract), 1 ml τριγλωροαιθυλενίου (TCE), 1 ml βουτυρικού οξέος (Butyric Acid). Στον απαγωγό επίσης τοποθετείται η γυάλινη σύριγγα των 100 μl, η γυάλινη σύριγγα των 25 μl και 2 πλαστικές σύριγγες του 1 ml με προσαρμοσμένη βελόνα.

Βήμα 15: Οι δύο πρώτες καλλιέργειες NS1 και NS2 τοποθετούνται στα ειδικά πλαστικά δοχεία με υποδοχείς από καουτσούκ και προστίθενται κατά σειρά: 55 μl S-T (με τη σύριγγα των 100 μl) και 550 μl Vitamins (με τη πλαστική σύριγγα του 1 ml). Έπειτα, το σύστημα έρχεται και πάλι σε πλάγια θέση και προστίθενται 19 μl Yeast, 17 μl TCE και 10,5 μl Butyric acid (με μια σύριγγα των 25 μl, η οποία ξεπλένεται σε κάθε χρήση με απιονισμένο νερό αρκετές φορές) παρατηρώντας εάν διαχέονται οι ποσότητες των ουσιών που προστέθηκαν, για να διασφαλιστεί ότι εισήχθηκε η ποσότητα των ουσιών.

Βήμα 16: Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τις καλλιέργειες LS1, LS2, MS1 και MS2, προσθέτοντας, επίσης και μια ποσότητα θεικών ιόντων (με τη πλαστική σύριγγα του 1 ml) έτσι ώστε το τελικό μίγμα να περιέχει 150 mg/l για τις καλλιέργειες LS και 400 mg/l για τις καλλιέργειες MS, σύμφωνα με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Βήμα 7.

Βήμα 17: Οι καλλιέργειες ανακινούνται πολύ καλά, καθαρίζονται με απιονισμένο νερό και χαρτί και αποθηκεύονται στους 25°C υπό σκότος, πάνω σε τράπεζα

ανάδευσης χαμηλής ταχύτητας.

Βήμα 18: Ο απαγωγός και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν καθαρίζονται πολύ καλά με τη χρήση απιονισμένου νερού, αιθανόλης και απορροφητικού χαρτιού και τα αναλώσιμα που δεν μπορούν να ξαναχρησιμοποιηθούν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου απορρίπτονται κατάλληλα.

Με την παραπάνω διαδικασία (Βήματα 1-18) γίνεται η τροφοδοσία/συντήρηση των αναερόβιων μητρικών καλλιιεργειών. Η κάθε καλλιέργεια περιέχει 375 ml υγρού σε 600 ml serum φιάλης για να έχουμε σταθερή αναλογία 60/100 όγκου αέριας/υγρής φάσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε εβδομάδα (με εξαίρεση το Βήμα 5) με αποτέλεσμα ο χρόνος παραμονής των μικροοργανισμών να είναι 7 εβδομάδες.

3.2 Πρωτόκολλο παρασκευής πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch)

Ο στόχος του πειράματος είναι να μελετηθεί η επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης των θεικών ιόντων με διαφορετικές δόσης δότη ηλεκτρονίων αλλά και η επίδραση της δόσης δότη ηλεκτρονίων και ο ρυθμός εισπίεσης του στην αναγωγική απογλωρίωση. Επίσης, διεξήχθησαν πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) για τη διερεύνηση του είδους της μικροβιακής κοινότητας με την προσθήκη διαφορετικών δοτών ηλεκτρονίων.

Υλικά:

Αέρια: αέριο άζωτο 99,9%, μίγμα αερίου αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα 70%/30%, αέριο υδρογόνο 99,9%.

Υγρά μείγματα (θρεπτικά κλπ): αναερόβιο θρεπτικό μέσο (RAMM – περιέχει resazurin), διάλυμα ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (S-T), διάλυμα βιταμινών (Vitamins), διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης 10% (yeast), διάλυμα θεικών ιόντων, απιονισμένο νερό.

Αντιδραστήρια: Διάλυμα NaOH 0,1N, διάλυμα HCl 0,1N, διάλυμα NaOH και Na₂CO₃, διάλυμα CuSO₄, διάλυμα Na₂Tartate, αντιδραστήριο Folin 2N.

Χημικές ενώσεις: τριγλωροαιθυλένιο, βουτυρικό οξύ.

3.2.1 Βήματα παρασκευής μικρόκοσμων

Βήμα 1: Δύο serum φιάλες των 2 l πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, στεγνώνονται τοποθετώντας τις στο φούρνο των 103°C για 5 λεπτά και μετά μένει για περίπου 5 λεπτά στον απαγωγό ώστε να κρυώσει (να φτάσει περίπου τη θερμοκρασία δωματίου).

Βήμα 2: Στον απαγωγό τοποθετούνται: οι serum φιάλες, οι τέσσερις μητρικές καλλιέργειες NS1, NS2, LS1 και LS2, δύο πλαστικές σύριγγες των 50 ml, 2 βελόνες 21G, δύο αλουμινένια αποσπώμενα σφραγίσματα (Wheaton), δύο Teflon πώματα από βουτύλιο (Wheaton), το ειδικό εξάρτημα σφράγισης (λευκό εξάρτημα-Wheaton), ένα πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ και τα θρεπτικά υλικά που είναι απαραίτητα σε ποτηράκια ζέσεως μαζί με τις κατάλληλες σύριγγες (S-T, Yeast, Vitamins, TCE, Butyric acid, SO_4^{2-}).

Βήμα 3: Τοποθετείται στο στόμιο της μιας serum φιάλης των 2 l το Teflon πώμα από βουτύλιο και από πάνω το αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα. Με το εξάρτημα σφράγισης γαντζώνεται το στόμιο και πιέζοντας τα χερούλια επιτυγχάνεται η σωστή σφράγιση της φιάλης. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας ένα καπάκι από βελόνα ανοίγουμε το σφράγισμά του αλουμινένιου αποσπώμενου σφραγίσματος κατά τη φορά του βέλους, έτσι ώστε να φαίνεται η μισή επιφάνεια του Teflon πώματος. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία (βήμα 3) για την άλλη serum φιάλη.

Βήμα 4: Ανοίγεται η βαλβίδα του αερίου αζώτου και ρυθμίζεται σε πίεση 1 atm. Έχοντας ελέγξει τη ροή του αέρα από τις βελόνες 22G τρυπώνονται με αυτές τα Teflon πώματα ενώ προστίθενται και οι αντίστοιχες βελόνες 21G. Με αυτόν τον τρόπο διοχετεύεται αέριο άζωτο για 5 λεπτά, ενώ από τη δεύτερη βελόνα (21G) απομακρύνεται το οξυγόνο που έχει φυλακιστεί εντός της φιάλης. Οι βελόνες απομακρύνονται κατά την αντίθετη φορά και έπειτα κλείνεται η βαλβίδα του αερίου αζώτου.

Βήμα 5: Η μητρική καλλιέργεια NS1 τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ και όλο το σύστημα φέρνεται σε πλάγια θέση. Χρησιμοποιώντας μια βελόνα 21G και την πλαστική σύριγγα των 50 ml, εξάγονται 50 ml από τη μητρική καλλιέργεια NS1.

Βήμα 6: Ο παραπάνω όγκος μεταφέρεται στη μια serum φιάλη των 2 l. Έχοντας

τρυπησει με τη βελόνα 21G το Teflon πώμα της φιάλης πιέζουμε σταδιακά τη πλαστική σύριγγα ώστε η υγρή καλλιέργεια να εισέλθει στο μπουκάλι χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα μια μεμονωμένη βελόνα 21G ώστε να εξέλθει το φυλακισμένο αέριο άζωτο στο περιβάλλον.

Βήμα 7: Όταν εισέλθουν 45 ml στο μπουκάλι τότε η μεμονωμένη βελόνα 21G αφαιρείται και εισέρχονται τα υπόλοιπα 5 ml (έτσι ώστε να υπάρχει αυξημένη πίεση και να μην εισαχθεί περαιτέρω αέρας στο μπουκάλι από τις χαραμάδες του πώματος).

Βήμα 8: Τα βήματα 5-8 επαναλαμβάνονται για τη μητρική καλλιέργεια NS2 χρησιμοποιώντας την ίδια serum φιάλη, ενώ για τις μητρικές καλλιέργειες LS1 και LS2 ακολουθείται η ίδια διαδικασία (βήματα 5-8) χρησιμοποιώντας την δεύτερη serum φιάλη.

Βήμα 9: Μετά τη μεταφορά των παραπάνω όγκων ανοίγεται η βαλβίδα του μίγματος αερίου αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα και ρυθμίζεται σε πίεση 1 atm. Το Teflon πώμα της πρώτης serum φιάλης τρυπάται με την ατσάλινη βελόνα 22G του αερίου μίγματος και με μια μεμονωμένη βελόνα 21G ώστε να γίνει διοχέτευση του αερίου μίγματος για 2 λεπτά ώστε να έχουμε αναερόβιες συνθήκες. Μόλις τελειώσει αυτή η διαδικασία, τοποθετείται μια πλαστική σύριγγα των 50 ml στη μεμονωμένη βελόνα 21G, έως ότου να γεμίσει σταδιακά με 50 ml αερίου μίγματος και έπειτα ασκείται πίεση στη σύριγγα για να εξαχθεί το αέριο μίγμα στη serum φιάλη για να προκληθεί αυξημένη πίεση εντός. Πρώτα αφαιρείται η πλαστική σύριγγα με τη βελόνα 21G και στη συνέχεια η ατσαλένια βελόνα του αερίου μίγματος και κλείνεται η βαλβίδα της φιάλης N₂/CO₂.

Βήμα 10: Ακολουθείται ξανά το βήμα 9 για τη δεύτερη serum φιάλη των 2 l. Επίσης, αφαιρείται 1 ml δείγμα και τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο των 10 ml, ο οποίος γεμίζεται ως την χαραγή με απιονισμένο νερό. Το δείγμα αυτό για την μέτρηση θεικών ιόντων (βλ. ανάλυση θεικών ιόντων).

Βήμα 11: Μέχρι το σημείο αυτό ο όγκος που θα έχει συλλεχθεί θα είναι περίπου 100 ml υγρής καλλιέργειας σε κάθε serum φιάλη η οποία ανακινείται πολύ καλά. Έπειτα, η πρώτη serum φιάλη τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ, και όλο το σύστημα φέρνεται σε πλάγια θέση, ώστε με μια σύριγγα των 50 ml και την βελόνα της (21G) να εξαχθούν 15 ml από το υγρό τα οποία και απορρίπτονται στο νεροχύτη του απαγωγού. Στη

συνέχεια, προστίθενται θρεπτικά από τα τρία έτοιμα υγρά σκευάσματα ως ακολούθως: 15 ml από το RAMM (με μια σύριγγα των 50 ml), 15 ml S-T (με μια σύριγγα των 100 ml) και 150 ml Vitamins (με μια πλαστική σύριγγα των 1000 ml). Η φιάλη επανατοποθετείται ανάποδα, κρατώντας τη με τα χέρια και προστίθενται 5 ml Yeast, 4.5 ml TCE και 3 ml βουτυρικό οξύ (με μια σύριγγα των 25 ml, η οποία ξεπλένεται σε κάθε χρήση με απιονισμένο νερό αρκετές φορές) παρατηρώντας ταυτόχρονα εάν διαχέονται οι ποσότητες των ουσιών. Σημειωτέον ότι, οι ποσότητες αυτές είναι ανάλογες της συντήρησης των μητρικών καλλιέργειών και αποσκοπούν στη συντήρηση του μίγματος NS1 και NS2 και μεταβάλλονται ανάλογα με τον όγκο που έχουμε στη φιάλη. Το βήμα 11 ακολουθείται ξανά για τη δεύτερη serum φιάλη με το μίγμα των LS1 και LS2, προσθέτοντας, επίσης, μια ποσότητα θεικών ιόντων έτσι ώστε το τελικό μίγμα να περιέχει 150 mg/l, σύμφωνα με τη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στο βήμα 10.

Βήμα 12: Οι φιάλες ανακινούνται πολύ καλά και αποθηκεύονται στους 25°C πάνω στην τράπεζα ανάδευσης (μαζί με τις άλλες μητρικές καλλιέργειες).

Βήμα 13: Τα βήματα 2 και 4 – 12 ακολουθούνται μέχρι να μαζευτεί αρκετό μίγμα από τις καλλιέργειες NS1, NS2 και LS1, LS2 στις δύο serum φιάλες των 2 lt για όσες συνεχόμενες εβδομάδες απαιτούνται και μια φορά την εβδομάδα, ενώ προστείνονται τα θρεπτικά που απαιτούνται κάθε φορά αναλογικά με τον όγκο που έχει συλλεχθεί, όπως ακριβώς στα βήματα 10-12 (σύνολο 12 μπουκάλια για το μίγμα NS1 και NS2 και 8 μπουκάλια για το μίγμα LS1 και LS2, το καθένα από 100 ml).

Βήμα 14: 20 serum μπουκάλια των 160 ml, πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, στεγνώνονται στο φούρνο στους 103°C για 5 λεπτά και αφήνονται να κρυώσουν για 5 λεπτά στον απαγωγό (να φτάσουν περίπου τη θερμοκρασία δωματίου).

Βήμα 15: Οι serum φιάλες με τα μίγματα NS1-NS2 και LS1-LS2 τοποθετούνται στον απαγωγό, όπως επίσης και τα καθαρά serum μπουκάλια των 160 ml, 2 πλαστικές σύριγγες των 50 ml, 4 βελόνες 21G, 20 αλουμινένια αποσπώμενα σφραγίσματα (Wheaton), 20 Teflon πώματα από βουτύλιο (Wheaton), το ειδικό εξάρτημα σφράγισης (λευκό εξάρτημα-Wheaton), το ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ και τα απαραίτητα θρεπτικά υλικά για

την τροφοδοσία σε ποτηράκια ζέσεως μαζί με τις κατάλληλες σύριγγες όπως περιγράφονται στο βήμα 11 (S-T, Yeast, Vitamins, TCE, Butyric acid, SO_4^{2-}).

Βήμα 16: Τα καθαρά serum μπουκάλια των 160 ml διαχωρίζονται καταγράφοντάς τα με ανεξίτηλο μαρκαδόρο κατά τον εξής τρόπο (εντός των παρενθέσεων είναι οι ποσότητες που θα εισαχθούν στο κάθε σύστημα):

- 1) N12-QMED (85,5 ml NS1+NS2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,5 μl TCE, 20,2 μl ButA). [Πείραμα ελέγχου δόσης-χρόνου με σχεδόν μέση συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων]
- 2) N12-MED (85,5 ml NS1+NS2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,5 μl TCE, 27,4 μl ButA). [Πείραμα ελέγχου δόσης-χρόνου με μέση συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων]
- 3) N12-HED (85,5ml NS1+NS2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,5 μl TCE, 83,6 μl ButA). [Πείραμα ελέγχου δόσης-χρόνου με υψηλή συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων]
- 4) N12-7DHyd (85,5 ml NS1+NS2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,5 μl TCE, 2,74 μl ButA (1^η μέρα), 7,35 ml H₂ (7^η μέρα)). [Πείραμα ελέγχου προσθήκης υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων την 7^η ημέρα]
- 5) N12-MTHAc (85,5 ml NS1+NS2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,4 μl AcA). [Πείραμα διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας με οξικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων]
- 6) N12-MTHHyd (85,5 ml NS1+NS2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 7,4 ml Hyd). [Πείραμα διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας με υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων]
- 7) L12-LED (85,5 ml LS1+LS2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,5 μl TCE, 2,74 μl ButA, 150 mg/l SO_4^{2-}). [Πείραμα αναγωγής θεικών ιόντων με χαμηλή συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων]
- 8) L12-QLED (85,5 ml L1+L2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,5 μl TCE, 8,4 μl ButA, 150 mg/l SO_4^{2-}). [Πείραμα αναγωγής θεικών ιόντων με σχεδόν χαμηλή συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων]

9) L12-MED (85,5 ml L1+L2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,5 μl TCE, 27,4 μl ButA, 150 mg/lit SO₄²⁻). [Πείραμα αναγωγήςθειικών ιόντων με μέση συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων]

10) L12-HED (85,5 ml L1+L2, 14,5 ml RAMM, 14,5 μl S-T, 145 μl Vitamins, 4,5 μl TCE, 83,6 μl ButA, 150 mg/lit SO₄²⁻). [Πείραμα αναγωγήςθειικών ιόντων με υψηλή συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων]

Όλα τα συστήματα θα είναι σε δύο αντίγραφα, ενώ θα έχουμε σταθερή αναλογία 60/100 όγκου αέριας/υγρής φάσης.

Βήμα 17: Όλα τα serum μπουκάλια των 160 ml σφραγίζονται και διοχετεύονται με αέριο άζωτο, με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στα βήματα 3 και 4.

Βήμα 18: Η πρώτη serum φιάλη που περιέχει 1200 ml μίγματος NS1 και NS2 τοποθετείται μέσα σε ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ και όλο το σύστημα φέρνεται σε πλάγια θέση. Με μία σύριγγα και τη βελόνα της τρυπάται το Teflon πώμα και εξάγονται 50 ml από τη serum φιάλη τα οποία μεταφέρονται στο serum μπουκαλάκι των 160 ml με τη βοήθεια και μίας δεύτερης μεμονωμένης βελόνας 21G για να εξέλθει το φυλακισμένο οξυγόνο στο περιβάλλον. Όταν θα έχουν απομείνει 5 ml στη σύριγγα τότε αφαιρείται από το Teflon πώμα η μεμονωμένη βελόνα 21G και εισάγεται η υπόλοιπη ποσότητα, έτσι ώστε να υπάρχει αυξημένη πίεση και να μην εισαχθεί περαιτέρω αέρας στο μπουκάλι. Η ίδια διαδικασία (Βήμα 17) επαναλαμβάνεται προσθέτοντας το επιπλέον δείγμα στον ίδιο μικρόκοσμο μέχρι να συμπληρωθεί ο απαιτούμενος όγκος του (δηλαδή 85,5 ml). Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα υπόλοιπα serum μπουκάλια των 160 ml και τα αντίγραφα τους, χρησιμοποιώντας κάθε φορά το ανάλογο μίγμα

Βήμα 19: Πραγματοποιείται διοχέτευση μίγματος αερίου αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα σε όλα τα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) serum μπουκάλια για 15 λεπτά, χρησιμοποιώντας και μία μεμονωμένη βελόνα 21G ώστε να διαφύγει τυχόν παγιδευμένο οξυγόνο.

Βήμα 20: Την επόμενη μέρα εισάγονται τα RAMM (με μια πλαστική σύριγγα των 50 ml), S-T (με μια σύριγγα των 25 μl) και Vitamins (με μια πλαστική σύριγγα των 1000 μl). Το κάθε serum μπουκάλι τοποθετείται ανάποδα, και κρατώντας το με τα χέρια, προστίθενται όπου είναι απαραίτητο (βλ.βήμα 16) TCE (με μια σύριγγα των 10 μl), η απαιτούμενη ποσότηταθειικών ιόντων (με μια πλαστική

σύριγγα του 1 ml) καθώς και η απαιτούμενη ποσότητα του δότη για το κάθε πείραμα (το υδρογόνο είναι σε φιάλη αερίου, συνεπώς η ποσότητά του θα προστεθεί με μια σύριγγα gas-tight των 10 ml). Όταν δημιουργηθούν και οι είκοσι νέοι μικρόκοσμοι τότε τα εναπομείναντα μίγματα, συλλέγονται για την ανάλυση πτητικών αιωρούμενων στερεών, πρωτεϊνών και στην περίπτωση του μίγματος με παρουσία θεικών για τη μέτρηση θεικών ιόντων.

Βήμα 19: Μετά από 1 ώρα, όποτε δηλαδή έχει επιτευχθεί η ισορροπία μεταξύ των φάσεων, εκτελείται η πρώτη μέτρηση στον αέριο χρωματογράφο για μεθάνιο, αιθένιο και χλωροαιθυλένια ενώ λαμβάνονται και δείγμα για πτητικά λιπαρά οξέα. Σύμφωνα με τους στόχους του πειράματος καθορίζεται και η συχνότητα των μετρήσεων, όπως φαίνεται και στους παρακάτω πίνακες.

Βήμα 20: Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και κάθε μήνα ελέγχεται η καμπύλη βαθμονόμησης με την παρασκευή ενός πρότυπου διαλύματος (βλ. πρωτόκολλο παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων), ενώ μετά το πέρας των πειραμάτων, όλος ο όγκος των μικρόκοσμων θα χρησιμοποιηθεί για αναλύσεις πτητικών αιωρούμενων στερεών, πρωτεΐνης και στην περίπτωση των πειραμάτων αναγωγής θεικών ιόντων για τη μέτρηση αυτών.

Πίνακας 3-1: Συχνότητα αναλύσεων στο πείραμα ελέγχου δόσης και ρυθμού εισπίεσης δότη ηλεκτρονίων.

Συχνότητα αναλύσεων	1 ^η μέρα	1 ^η εβδομάδα	2 ^η -3 ^η εβδομάδα
Χλωροαιθυλένια	3 μετρήσεις	1 μέτρηση/ ημέρα	1 μέτρηση/ 2 ημέρες
ETH+MTH	3 μετρήσεις	1 μέτρηση/ ημέρα	1 μέτρηση/ 2 ημέρες
VFAs	1 μέτρηση	1 μέτρηση/ 2 ημέρες	1 μέτρηση/ 4 ημέρες
TSS/VSS	1 μέτρηση (μίγμα)		1 μέτρηση (τελικό)
Πρωτεΐνες	1 μέτρηση(μίγμα)		1 μέτρηση (τελικό)

Πίνακας 3-2: Συχνότητα αναλύσεων στο πείραμα διερεύνησης της μικροβιακής κοινότητας με την προσθήκη διαφορετικού είδους δότη ηλεκτρονίων.

Συχνότητα αναλύσεων	1 ^η μέρα	1 ^η εβδομάδα	2 ^η -3 ^η εβδομάδα
Χλωροαιθυλένια	2 μετρήσεις	1 μέτρηση/ ημέρα	
MTH	2 μετρήσεις	1 μέτρηση/ ημέρα	1 μέτρηση/ 2 ημέρες
Οξικό οξύ	1 μέτρηση	1 μέτρηση/ 2 ημέρες	1 μέτρηση/ 4 ημέρες
TSS/VSS	1 μέτρηση (μίγμα)		1 μέτρηση (τελικό)
Πρωτεΐνες	1 μέτρηση(μίγμα)		1 μέτρηση (τελικό)

Πίνακας 3-3: Συχνότητα αναλύσεων στα πειράματα αναγωγής θεικών ιόντων.

Συχνότητα αναλύσεων	1 ^η μέρα	1 ^η εβδομάδα	2 ^η - 3 ^η εβδομάδα	4 ^η εβδομάδα-τέλος
Χλωροαιθυλένια	1 μέτρηση	1 μέτρηση/ 1 ημέρα	1 μέτρηση/ ημέρα	1 μέτρηση/ 1 εβδομάδα
ETH+MTH	1 μέτρηση	1 μέτρηση/ 1 ημέρα	1 μέτρηση/ ημέρα	1 μέτρηση/ 1 εβδομάδα
VFAs	1 μέτρηση	1 μέτρηση/ 1 ημέρα	1 μέτρηση/2 ημέρες	1 μέτρηση/ 2 εβδομάδες
Θεικά ιόντα		1 μέτρηση (1 ml)		1 μέτρηση (τελικό-10 ml)
TSS/VSS	1 μέτρηση (μίγμα)			1 μέτρηση (τελικό)
Πρωτεΐνες	1 μέτρηση (μίγμα)		1 μέτρηση	1 μέτρηση (τελικό)

3.3 Παρασκευή καμπυλών πρότυπων διαλυμάτων

Γενικά

Για να μετρηθούν οι οργανικές ενώσεις στον αέριοχρωματογράφο είτε αυτές είναι σε αέρια είτε σε υγρή μορφή, καθώς και τις συγκεντρώσεις σουλφιδίων, θεικών ιόντων και πρωτεϊνών στο φασματοφωτόμετρο, είναι αναγκαίο να παρασκευαστούν γραμμικές καμπύλες πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης.

3.3.1 Πρότυπες καμπύλες για TCE, cis-1,2 DCE, trans-1,2 DCE, 1,1-DCE

1. Τριχλωροαιθυλένιο (TCE),
2. Cis-1,2 δίχλωροαιθυλένιο (cis-1,2 DCE),
3. Trans-1,2 δίχλωροαιθυλένιο (trans-1,2 DCE),
4. 1,1 δίχλωροαιθυλένιο (1,1-DCE),
5. Απιονισμένο νερό.

Οργανολογία

1. Αεριοχρωματογράφος GC Autosystem XL της Perkin Elmer,
2. Απαγωγός,
3. Φούρνος των 103°C,
4. 6 Γυάλινες φιάλες με λεπτό στόμιο 160 ml (Serum bottles),
5. Γυάλινη σύριγγα 10 ml για υγρά δείγματα (Hamilton),
6. Γυάλινη σύριγγα για αέρια δείγματα 100 ml (Hamilton),
7. 5 Στρογγυλά πώματα (Gray Butyl Teflon-faced),
8. 5 Αλουμινένια καπάκια,
9. Ογκομετρικός κύλινδρος των 100 ml,
10. Σταντ με πιάστρα,
11. Θερμόμετρο,
12. 1 ποτήρι ζέσεως των 50 ml,

Μέθοδος: Η θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίζεται στους 160°C, του εισαγωγέα στους 220°C και του ανιχνευτή (FID) στους 220°C (μέθοδος [finalces.mth]).

Βήμα 1: 5 serum μπουκάλια των 160 ml, και 1 ποτήρι ζέσεως τα οποία πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό και στεγνώνονται βάζοντας τα στο φούρνο των 103°C για 15 λεπτά, αφήνοντας τα στη συνέχεια να κρυσώσουν για περίπου 5 λεπτά (να φτάσουν περίπου την θερμοκρασία δωματίου).

Βήμα 2: Στο ποτήρι ζέσεως προστίθεται το τριχλωροαιθυλένιο (TCE). Στα 5s serum μπουκάλια των 160 ml προστίθεται 100 ml απιονισμένο νερό το οποίο έχει ογκομετρηθεί με τον κύλινδρο των 100 ml. Τα μπουκάλια κλείνονται και σφραγίζονται με πώματα βουτυλίου και αλουμινένια καπάκια.

Βήμα 3: Όλα τα serum μπουκάλια τοποθετούνται στον απαγωγό μαζί με ένα σταντ και μια πιάστρα. Τα serum μπουκάλια των 160 ml τοποθετούνται στην πιάστρα του σταντ ανάποδα ώστε να φαίνεται η εισαγωγή των ουσιών και παρασκευάζονται πέντε πρότυπα διαλύματα που το καθένα περιέχει από τις ουσίες σε όγκο 1 ml, 2 ml, 4 ml, 5 ml, 7 ml αντίστοιχα με μια γυάλινη σύριγγα των 10 ml. Αφού παραμείνουν μία ημέρα σε ηρεμία, μετρώνται στον αέριο χρωματογράφο. Για την καταγραφή της θερμοκρασίας θα χρησιμοποιηθεί 1 serum μπουκάλι των 160 ml με 100 ml απιονισμένο νερό και ένα θερμόμετρο. Οι μετρήσεις επιτυγχάνονται στους 25°C.

Πίνακας 3-4: Ονομαστικές συγκεντρώσεις χλωροαιθυλενίων.

Όγκος (μl)	1,1-DCE (mM)	trans-1,2 DCE (mM)	cis-1,2 DCE (mM)	TCE (mM)
1	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
2	0,12388	0,12707	0,12848	0,11079
3	0,24776	0,25415	0,25696	0,22158
4	0,49551	0,50830	0,51392	0,44316
5	0,61939	0,63537	0,64240	0,55396
7	0,86714	0,88952	0,89936	0,77554

Βήμα 4: Με σύριγγα 100μl για αέρια δείγματα (gas-tight), λαμβάνονται 50 μl δείγματος από την αέρια φάση κάθε μπουκαλιού και εισάγονται στον αεριοχρωματογράφο κάνοντας τρεις επαναλήψεις, από τις οποίες βγαίνει στη συνέχεια ο μέσος όρος, μέσω των εμβαδών που μας δίνει για τη κάθε καμπύλη. Βάσει των εμβαδών που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις, με τη βοήθεια του Excel κατασκευάζονται καμπύλες της μορφής $y=ax$.

Οι χρόνοι έκλυσης των ουσιών κατά σειρά φαίνονται στον ακόλουθο Πίνακα (Πίνακας 3-5).

Πίνακας 3-5: Χρόνοι έκλυσης χλωριωμένων υδρογονανθράκων.

Ένωση	TR (min)
1,1-DCE	2,3
trans-1,2 DCE	2,6
cis-1,2 DCE	3,5
TCE	4,4

3.3.2 Πρότυπη καμπύλη για VC

1. Αέριο βινυλοχλωρίδιο (VC),
2. Απιονισμένο νερό.

Οργανολογία

1. Αεριοχρωματογράφος GC Autosystem XL της Perkin Elmer
2. Απαγωγός
3. Φούρνος των 103°C
4. Μανόμετρο
5. Γυάλινες σύριγγες για αέρια δείγματα 1 ml, 10 ml, 100 μl (Hamilton)
6. 6 Γυάλινα μπουκάλια με λεπτό στόμιο 160 ml (Serum bottles)
7. 5 Στρογγυλά πώματα (Gray Butyl Teflon-faced)
8. 5 Αλουμινένια καπάκια
9. Ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml
10. Σταντ με δύο πιάστρες
11. Θερμόμετρο
12. 1 ποτήρι ζέσεως των 250 ml

Μέθοδος: Η θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίζεται στους 160°C, του εισαγωγέα στους 220°C και του ανιχνευτή (FID) στους 220°C. [finalces.mth]

Βήμα 1: 5 serum μπουκάλια των 160 ml πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, στεγνώνονται βάζοντας τα στο φούρνο των 103°C για 15 λεπτά και τέλος αφήνονται για περίπου 5 λεπτά ώστε να κρυώσουν (να φτάσουν περίπου την θερμοκρασία δωματίου).

Βήμα 2: Στα 6 serum μπουκάλια προστίθεται 100 ml απιονισμένο νερό το οποίο έχει ογκομετρηθεί με τον κύλινδρο των 100 ml και σφραγίζονται με πώματα βουτυλίου και αλουμινένια καπάκια.

Βήμα 3: Όλα τα serum μπουκάλια τοποθετούνται στον απαγωγό μαζί με ένα σταντ, δύο πιάστρες, τη φιάλη του αερίου VC με ένα μανόμετρο και ένα ποτήρι

ζέσεως με απιονισμένο νερό στο οποίο τοποθετείται η έξοδος του αερίου VC. Η βαλβίδα του μανόμετρου ανοίγει τόσο ώστε να παράγεται αρκετό βιλνοχλωρίδιο προσέχοντας το αέριο που εξάγεται στο απιονισμένο νερό. Τα serum μπουκάλια τοποθετούνται ανάποδα στην άλλη πιάστρα έτσι ώστε να ελεγχθεί η εισαγωγή του αερίου. Έτσι, παρασκευάζονται πέντε πρότυπα διαλύματα που το καθένα περιέχει 1 ml, 10 ml, 20 ml, 40 ml, 60 ml αέριο VC αντίστοιχα με δύο γυάλινες αεροστεγείς σύριγγες του 1 ml και των 10 ml. Για την καταγραφή της θερμοκρασίας θα χρησιμοποιηθεί και σε αυτή την περίπτωση 1 serum φιάλη των 160 ml με 100 ml απιονισμένο νερό και ένα θερμόμετρο. Οι μετρήσεις επιτυγχάνονται στους 25°C.

Πίνακας 3-6: Ονομαστικές συγκεντρώσεις βιλνοχλωριδίου.

Όγκος (ml)	VC (mM)
1	0,00000
10	0,01255
20	0,12551
40	0,25102
60	0,50204

Βήμα 4: Με σύριγγα για αέρια δείγματα, λαμβάνονται 50 μl από την αέρια φάση κάθε μπουκαλιού και εισάγονται για μέτρηση στον αεριοχρωματογράφο κάνοντας τρεις επαναλήψεις, από τις οποίες εξάγεται ο μέσος όρος. Βάσει των εμβαδών που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις, με τη βοήθεια του Excel κατασκευάζεται καμπύλη της μορφής $y=ax$. Το VC έχει χρόνο έκλουσης 1,7 min.

3.3.3 Πρότυπες καμπύλες για Methane, Ethylene

1. Αέριο μεθάνιο (Meth),
2. Αέριο αιθένιο (Eth),
3. Απιονισμένο νερό.

Οργανολογία

1. Αεριοχρωματογράφος GC Autosystem XL της Perkin Elmer,
2. Απαγωγός,
3. Φούρνος των 103°C,
4. Μανόμετρο,
5. Γυάλινες σύριγγες για αέρια δείγματα 100 μl, 1 ml, 10 ml (Hamilton),
6. 10 Γυάλινα μπουκάλια με λεπτό στόμιο 160 ml (Serum bottles),
7. 9 Στρογγυλά πώματα (Gray Butyl Teflon-faced),
8. 9 Αλουμινένια καπάκια,
9. Ογκομετρικό κύλινδρο των 100 ml,
10. Σταντ με δύο πιάστρες,
11. Θερμόμετρο,
12. 1 ποτήρι ζέσεως των 250 ml.

Μέθοδος: Η θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίζεται στους 50°C, του εισαγωγέα στους 220°C και του ανιχνευτή (FID) στους 220°C. (μέθοδος [methð.mth])

Βήμα 1: 9 serum μπουκάλια των 160 ml πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, και στεγνώνονται βάζοντας τα στο φούρνο των 103°C για 15 λεπτά. Στη συνέχεια αφήνονται για περίπου 5 λεπτά να κρυώσουν (να φτάσουν περίπου την θερμοκρασία δωματίου).

Βήμα 2: Στα 9 serum μπουκάλια των 160 ml προστίθεται 100 ml απιονισμένο νερό το οποίο έχει ογκομετρηθεί με τον κύλινδρο των 100 ml και στη συνέχεια σφραγίζονται με πώμα βουτυλίου και αλουμινένιο καπάκι.

Βήμα 3: Όλα τα serum μπουκάλια τοποθετούνται στον απαγωγό μαζί με ένα σταντ,

δύο πιάστρες, τη φιάλη του αερίου αιθυλενίου με ένα μανόμετρο και ένα ποτήρι ζέσεως με απιονισμένο νερό στο οποίο τοποθετείται η έξοδος του αερίου VC. Η βαλβίδα του μανόμετρου ανοίγει τόσο ώστε να παράγεται αρκετό αιθυλένιο προσέχοντας το αέριο που εξάγεται στο απιονισμένο νερό. Τα serum μπουκάλια τοποθετούνται ανάποδα στην άλλη πιάστρα έτσι ώστε να ελεγχθεί η εισαγωγή του αερίου. Έτσι, παρασκευάζονται πέντε πρότυπα διαλύματα που το καθένα περιέχει 0,25 ml, 0,5 ml, 1ml, 1,25ml, 1,75 ml, αντίστοιχα με τρεις γυάλινες σύριγγες των 150 μl, του 1 ml και των 10 ml αέριο αιθυλένιο.

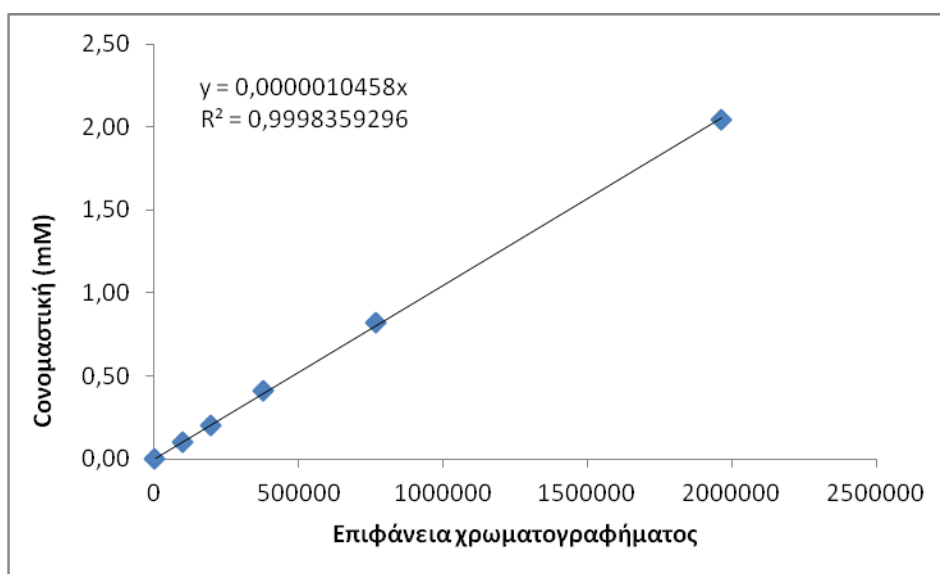
Στη συνέχεια και προκειμένου να προετοιμαστούν τα μπουκάλια για την καμπύλη του μεθανίου, εκτελείται η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το καθένα θα περιέχει 0,25 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, ενώ θα χρησιμοποιηθούν και άλλα 4 μπουκάλια των 160 ml στα οποία θα εισαχθούν 10ml, 15ml, 20ml και 25 ml αερίου μεθανίου, για την παρασκευή πρότυπης καμπύλης μεγαλύτερων συγκεντρώσεων. Αφού μείνουν μία ημέρα σε ηρεμία, μετρώνται με τη βοήθεια του αερίου χρωματογράφου. Για την καταγραφή της θερμοκρασίας θα χρησιμοποιηθεί και σε αυτή την περίπτωση 1 serum μπουκάλι των 160 ml με 100 ml απιονισμένο νερό και ένα θερμόμετρο, ενώ οι μετρήσεις θα επιτευχθούν στους 25°C.

Βήμα 4: Με σύριγγα για αέρια δείγματα λαμβάνονται 50 μl από την αέρια φάση κάθε μπουκαλιού και τα εισάγονται στον αέριοχρωματογράφο κάνοντας τρεις επαναλήψεις, από τις οποίες θα εξαχθεί μέσω των εμβαδών των καμπυλών ο μέσος όρος. Βάσει των εμβαδών που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις, με τη βοήθεια του Excel κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη της μορφής $y=ax$. Το μεθάνιο έχει χρόνο έκλυσης 1,1 min και το αιθυλένιο 1,7 min.

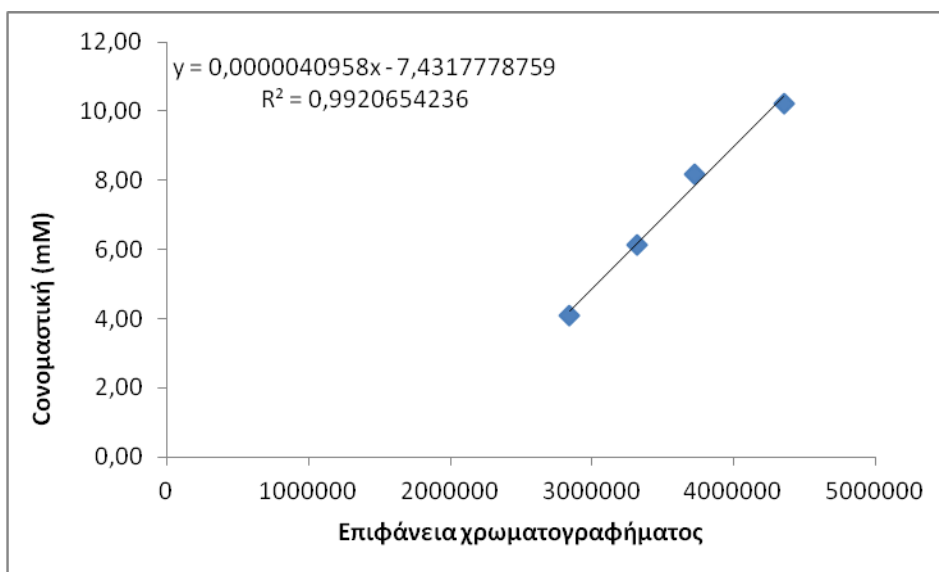
Οι ονομαστικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3-7) μαζί με τις αντίστοιχες καμπύλες των πρότυπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για τις αναλύσεις μας.

Πίνακας 3-7. Ονομαστικές συγκεντρώσεις μεθανίου και αιθενίου.

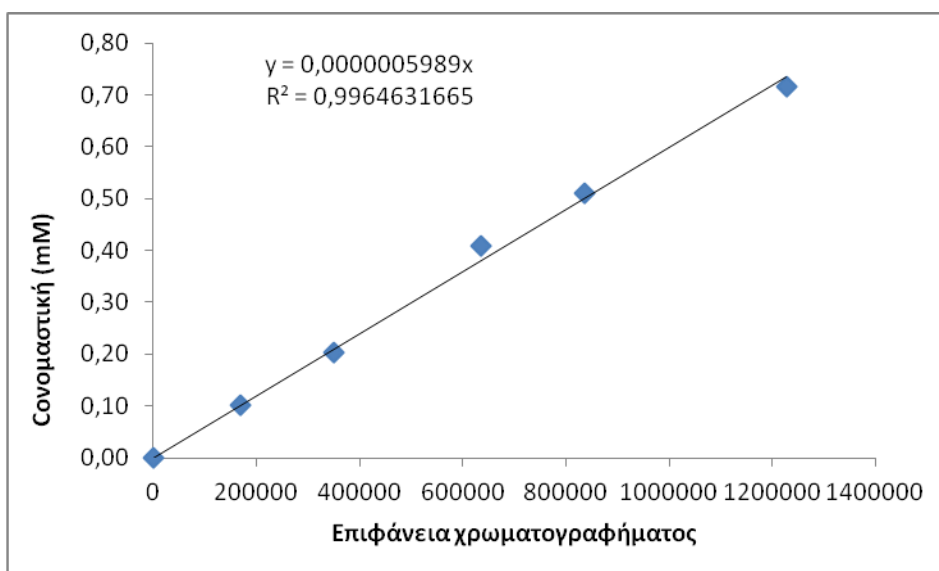
Όγκος (ml)	Μεθάνιο (mM)	Αιθένιο(mM)
0	0,00000	0,00000
0,25	0,10220	0,10216
0,5	0,20440	0,20431
1	0,40881	0,40862
1,25		0,51078
1,75		
2	0,81761	
5	2,04403	
10	4,08807	
15	6,13210	
20	8,17613	
25	10,22016	



Διάγραμμα 3-1. Πρότυπη καμπύλης βαθμονόμησης για το Μεθάνιο (για χαμηλές συγκεντρώσεις).



Διάγραμμα 3-2. Πρότυπη καμπύλης βαθμονόμησης για το Μεθάνιο (για υψηλές συγκεντρώσεις).



Διάγραμμα 3-3. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το αιθέριο.

3.3.4 Πρότυπες καμπύλες για VFAs (Volatile Fatty Acids)

Εξαιτίας της ύπαρξης ενός μόνο αέριου χρωματογράφου με έναν αισθητήρα FID, δεν ήταν δυνατή η μέτρηση δειγμάτων για χλωροαιθυλένια, ΕΤΗ και μεθάνιο ταυτόχρονα με τα VFAs. Έτσι, ενώ οι μετρήσεις των αερίων δειγμάτων πραγματοποιούνταν σε πραγματικό χρόνο, κάτι τέτοιο δεν ήταν εφικτό για τις μετρήσεις των VFAs, που πραγματοποιούνταν στο τέλος της περιόδου κάθε πειράματος. Για το λόγο αυτό τα υγρά δείγματα που λαμβάνονταν είτε από τις καλλιέργειες είτε από τους αντιδραστήρες των πειραμάτων εντατικής παρακολούθησης ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch), αφού υφίσταντο διήθηση με φίλτρα σύριγγας αποθηκεύονταν σε φιαλίδια (tube) erpendorf του 0,5 ml και καταψύχονταν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, μέχρι τη στιγμή της μέτρησής τους. Στο τέλος κάθε πειράματος τα δείγματα αποψύχονταν, οξινίζονταν και μετρούνταν ακολουθώντας την παρακάτω μέθοδο.

Υλικά

1. Βουτυρικό οξύ (ButA),
2. Ισοβουτυρικό οξύ (iso-ButA),
3. Οξικό οξύ (AcA),
4. Προπιονικό οξύ (PropA),
5. Διάλυμα HCl 2 N,
6. Απιονισμένο νερό.

Οργανολογία

1. Αεριοχρωματογράφος GC Autosystem XL της Perkin Elmer,
2. Αυτόματος δειγματολήπτης,
3. 6 Φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη,
4. Φούρνος 103°C ,
5. Γυάλινες σύριγγες για υγρά δείγματα 10 μl (Hamilton),
6. Αυτόματες πιπέτες 0,1-5 ml,
7. 1 ογκομετρική φιάλη 500 ml,
8. 6 ογκομετρικές φιάλες των 25 ml,
9. Διηθητικό χαρτί.

Μέθοδος: Η θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίζεται στους 90°C, του εισαγωγέα στους 220°C και του ανιχνευτή (FID) στους 220°C.

Βήμα 1: 1 φιάλη 500 ml και 6 ογκομετρικές φιάλες των 25 ml πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, και στεγνώνονται βάζοντας τα στο φούρνο των 103°C για 5 λεπτά και ακολούθως αφήνονται για 5 περίπου λεπτά προκειμένου να κρυσώσουν (να φτάσουν περίπου την θερμοκρασία δωματίου).

Βήμα 2: Στη φιάλη 500 ml προετοιμάζεται ένα διάλυμα που περιέχει 250 μl από το καθένα από τα τέσσερα πτητικά λιπαρά οξέα.

Βήμα 3: Τα έξι πρότυπα διαλύματα παρασκευάζονται σε ογκομετρικές φιάλες των 25 ml με τις εξής αραιώσεις του παραπάνω αρχικού διαλύματος με τη χρήση αυτόματων πιπετών: 0,1/25, 0,5/25, 2/25, 5/25, 15/25, 20/25.

Βήμα 4: Το δείγμα οξυνίζεται με διάλυμα HCl 2N, σε αναλογία 2% (0,5 ml στα 25 ml πρότυπου διαλύματος), έτσι ώστε να παραμείνουν τα πτητικά λιπαρά οξέα αλλά να μετατραπούν στην αδιάστατη μορφή τους και έπειτα τοποθετείται η κάθε αραιώση στα 6 φιαλίδια του αυτόματου δειγματολήπτη.

Πίνακας 3-8. Ονομαστικές συγκεντρώσεις πτητικών λιπαρών οξέων.

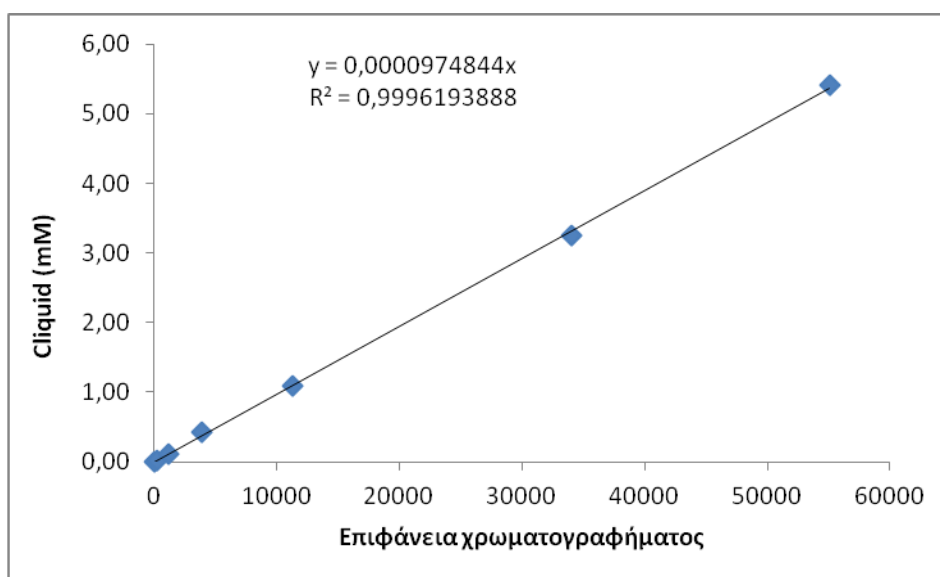
Αραιώσεις	ButA (mM)	isoButA (mM)	AcA (mM)	PrA (mM)
0,1/25	0,02166	0,02146	0,03490	0,02681
0,5/25	0,10831	0,10728	0,17450	0,13405
2/25	0,43326	0,42912	0,69802	0,53618
5/25	1,08315	1,07281	1,74505	1,34046
15/25	3,24944	3,21842	5,23514	4,02137
20/25	5,41573	5,36403	8,72523	6,70228

Βήμα 5: Ο αυτόματος δειγματολήπτης ρυθμίζεται έτσι ώστε να παίρνει 0,5 μl από την υγρή φάση κάθε φιαλιδίου, να τα εισάγει στο χρωματογράφο κάνοντας τρεις επαναλήψεις και ενδιάμεσα να ξεπλένει τη σύριγγα. Τα εμβαδά (area) που προκύπτουν από το χρωματογράφημα καταγράφονται και εξάγεται ο μέσος όρος. Βάσει των εμβαδών που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις, με τη βοήθεια του Excel κατασκευάζονται καμπύλες της μορφής $y=ax$. Οι χρόνοι έκλουσης των ουσιών φαίνονται στον Πίνακα 3-9.

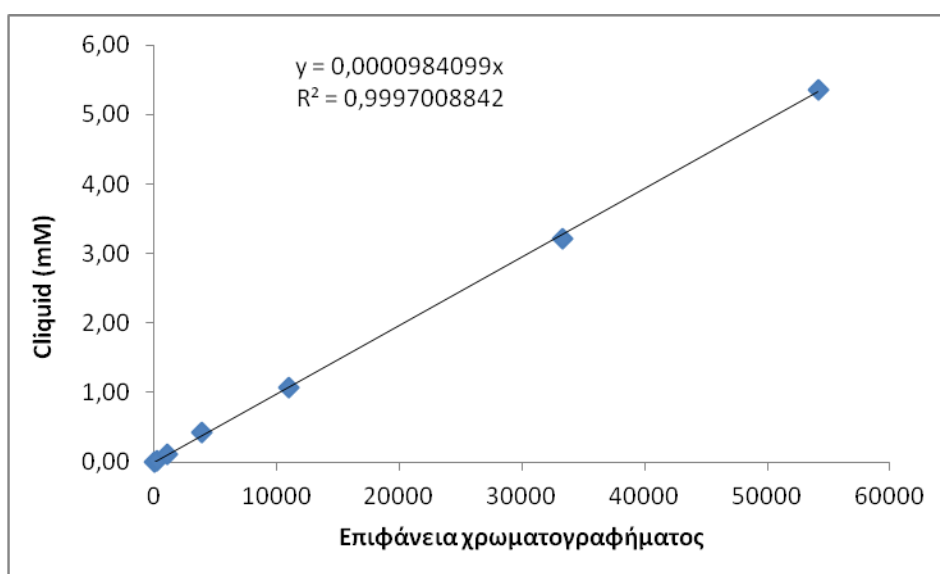
Πίνακας 3-9: Χρόνοι έκλυσης των VFAs.

Ένωση	T _R (min)
AcA	2,6
PrA	4,0
iso-ButA	4,6
ButA	6,4

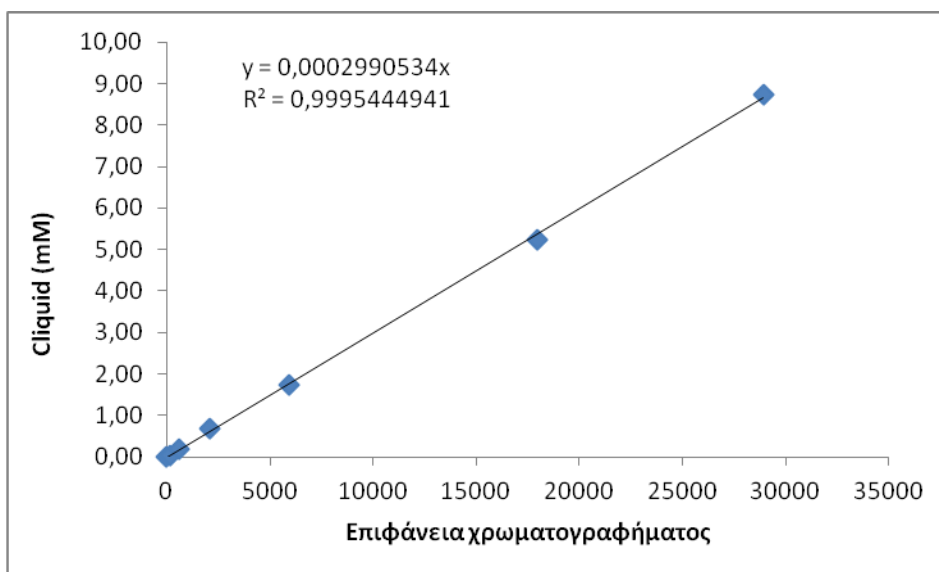
Οι πρότυπες καμπύλες που προέκυψαν για τα VFAs είναι:



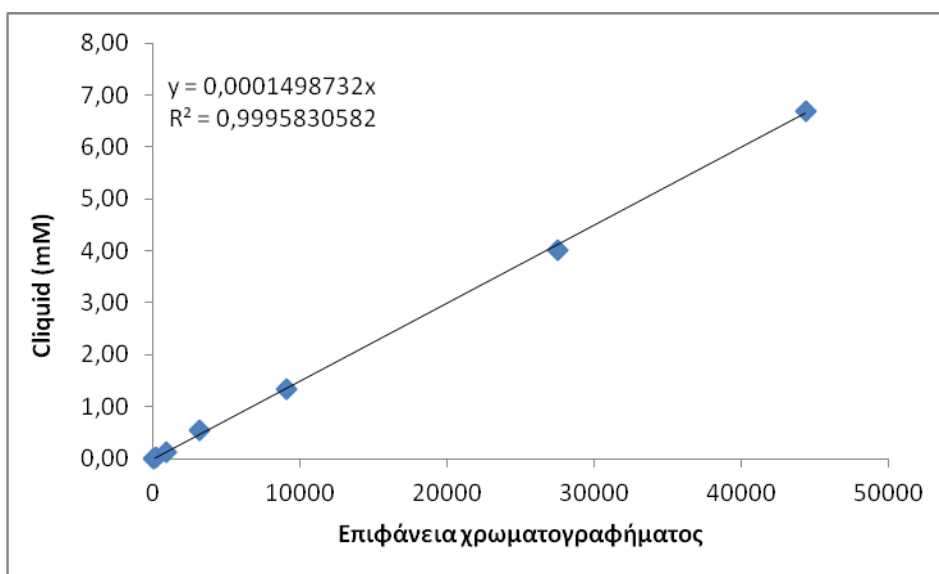
Διάγραμμα 3-4. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το βουτυρικό οξύ.



Διάγραμμα 3-5. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το ισοβουτυρικό οξύ.



Διάγραμμα 3-6. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το οξικό οξύ.



Διάγραμμα 3-7. Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για το προπιονικό οξύ.

3.3.5 Πρότυπη καμπύλη για SO_4^{2-}

Για τη μέτρηση των θεικών ιόντων ακολουθείται η εξής διαδικασία: Το φασματοφωτόμετρο ενεργοποιείται και ρυθμίζεται στο πρόγραμμα 680 (Μέτρηση θεικών ιόντων – στα 450 nm).

Αναλυτικότερα, τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης είναι:

Βήμα 1: Από αρχικό πρότυπο διάλυμα θεικών συγκέντρωσης 1000 mg/l παρασκευάζεται μία σειρά διαλυμάτων σε εύρος συγκεντρώσεων από 10 mg/l έως 70 mg/l (10, 30, 50, 60, 70 mg/l).

Βήμα 2: Το διάλυμα προστίθεται σε γυάλινη κυψελίδα των 10 ml, το φασματοφωτόμετρο προγραμματίζεται στο πρόγραμμα 680 ($\lambda=685$ nm), η οποία καθαρίζεται διεξοδικά με χαρτί, και τοποθετείται εντός του φασματοφωτομέτρου. Ο μηδενισμός του οργάνου γίνεται με το δείγμα στο οποίο στη συνέχεια προστίθεται το αντιδραστήριο Sulfaver της HACH. Έπειτα το δείγμα ανακατεύεται με το αντιδραστήριο έως ότου η σκόνη διαλυθεί και μένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, όποτε και λαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησης (Abs). Οι μετρήσεις των θεικών πραγματοποιούνταν μέσω του νεφελομετρικού προσδιορισμού του BaSO_4 , σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο APHA 4500- SO_4^{2-} E:2005.

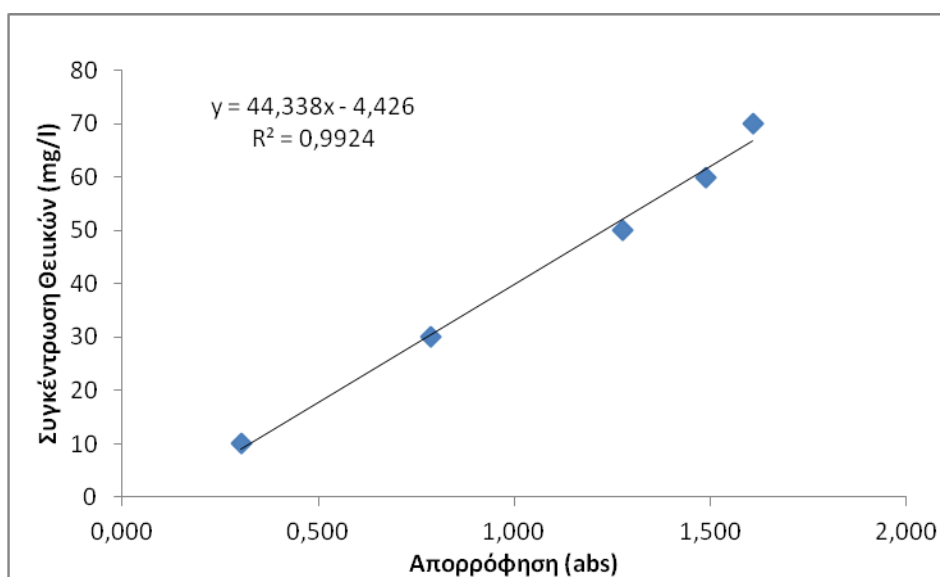
Για κάθε συγκέντρωση εκτελούνται τρεις επαναλήψεις και λαμβάνεται υπόψη για το σχεδιασμό της καμπύλης ο μέσος όρος τους. Βάσει των απορροφήσεων που αντιστοιχούν σε γνωστές συγκεντρώσεις και με τη βοήθεια του Excel προκύπτει η καμπύλη της μορφής $y=ax+b$.

Με αντίστοιχο τρόπο πραγματοποιείται και η διαδικασία μέτρησης των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, το δείγμα προς μέτρηση μεταφέρεται όλο σε κυψελίδα των 10 ml και μηδενίζεται με αυτό – ως τυφλό δείγμα, το όργανο. Προστίθεται το αντίδραστήριο Sulfaver της HACH στο δείγμα και ανακατεύεται καλά ώστε το δείγμα να είναι ομοιογενές. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, μετριέται η απορρόφησή του (Abs) και μέσω της πρότυπης καμπύλης που έχει κατασκευαστεί υπολογίζεται η συγκέντρωση των θεικών ιόντων. Τα όρια της καμπύλης είναι 2-70 mg/l.

Πίνακας 3-10: Ονομαστικές συγκεντρώσεις θεικών για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

C (mg/L)	C' (mg/L)
10	9,023193
30	30,48279
50	52,07539
60	61,53416
70	66,88428

Η καμπύλη των πρότυπων διαλυμάτων θεικών ιόντων που κατασκευάστηκε στο πείραμα μας, φαίνεται στο παρακάτω γράφημα:



Διάγραμμα 3-8: Η καμπύλη μέτρησης των θεικών ιόντων για το πείραμα μας.

3.3.6 Μέτρηση ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών (TSS/VSS)

Οργανολογία

1. Αναλυτικός Ηλεκτρονικός ζυγός (ακρίβεια ζύγισης 0,0001 g),
2. Φούρνος καύσης στερεών BINDER (διατήρηση θερμοκρασίας στους 103°C),
3. Συσκευή διήθησης με χρήση αντλίας κενού,
4. Ξηραντήρας,
5. Φίλτρα διήθησης Whatman GF/C διαμέτρου 47 mm,
6. Ανοξειδωτή μεταλλική λαβίδα.

Η εκτέλεση της διαδικασίας προσδιορισμού ολικών αιωρούμενων στερεών (TSS) και των πτητικών αιωρούμενων στερεών (VSS) πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο 2540 D και 2540 E του Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, 2005. Σύμφωνα με την 2540 D, καλά αναμεμιγμένος όγκος δείγματος διηθείται μέσω φίλτρου, το οποίο έχει προξηρανθεί και ζυγιστεί και το υπόλειμμα στο φίλτρο ξηραίνεται στους 103°C για 1 ώρα και έπειτα από 15 λεπτά στον ξηραντήρα ζυγίζεται. Η αύξηση του βάρους του φίλτρου εκπροσωπεί τα ολικά αιωρούμενα στερεά. Εν συνεχεία, το φίλτρο καίγεται στους 550°C για 15 λεπτά, τοποθετείται στον ξηραντήρα για άλλα 15 λεπτά και ξαναζυγίζεται. Η μείωση του βάρους του φίλτρου αντιστοιχεί στα VSS. Αναλυτικότερα, τα βήματα που πρέπει να ακολουθούνται είναι:

Βήμα 1: Ενεργοποιείται ο φούρνος των 550°C και μόλις φτάσει στη θερμοκρασία των 550°C τοποθετούνται και καίγονται σε αυτόν, για ακριβώς 15 λεπτά, έξι φίλτρα GF/C που έχουν τυλιχτεί καλά με ένα κομμάτι αλουμινόχαρτου.

Βήμα 2: Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, τα φίλτρα εισάγονται σε ξηραντήρα για άλλα 15 λεπτά (μέχρι να φτάσουν τη θερμοκρασία δωματίου) και ζυγίζονται στο ζυγό ακριβείας. Τοποθετούνται ξεχωριστά σε κομμάτια αλουμινόχαρτου, όπου έχει καταγραφτεί το όνομα του δείγματος με ένα μολύβι.

Βήμα 3: Το πρώτο φίλτρο τοποθετείται στη συσκευή διήθησης με την αντλία κενού. Η αντλία κενού ενεργοποιείται και διηθούμε το δείγμα που εξάγαμε από την καλλιέργεια. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για όλα τα δείγματα.

Βήμα 4: Μόλις τελειώσει η διήθηση (πρέπει να περάσει όλος ο υγρός όγκος από τη

συσκευή διήθησης), επανατοποθετείται το φίλτρο στο αλουμινόχαρτο με το καταγεγραμμένο όνομα και το αλουμινόχαρτο κλείνει ώστε να καλυφθεί το φίλτρο (όπως ένας φάκελος) χωρίς όμως να ακουμπά την επιφάνεια του όπου βρίσκονται τα στερεά της διήθησης.

Βήμα 5: Το υπόλειμμα στο φίλτρο ξηραίνεται στους 103°C για 1 ώρα. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού, το φίλτρο εισάγεται και πάλι στο ξηραντήρα για 15 λεπτά και μετρείται το βάρος του στο ζυγό ακριβείας. Η αύξηση του βάρους του φίλτρου M1 (βάρος φίλτρου μετά τους 103°C μείον το αρχικό βάρος φίλτρου) εκπροσωπεί τα ολικά αιωρούμενα στερεά TSS (M1/V).

Βήμα 6: Το φίλτρο καίγεται στους 550°C για 15 λεπτά ακριβώς, αφήνεται στο ξηραντήρα για άλλα 15 λεπτά και ξαναμετρείται το βάρος του στο ζυγό. Η μείωση του βάρους του φίλτρου M2 (βάρος φίλτρου μετά τους 103°C μείον βάρος φίλτρου μετά τους 550°C) αντιστοιχεί στα VSS (M2/V).

3.3.7 Μέτρηση πρωτεϊνών

Υλικά

1. Bovine serum albumin (BSA),
2. Ογκομετρική φιάλη 1 l,
3. 7 Ογκομετρικές φιάλες 25 ml,
4. Αυτόματες πιπέτες 0,1-5 ml.

Διαλυτοποίηση πρωτεΐνης

Βήμα 1: Παρασκευάζεται το τυφλό δείγμα σε ποτήρι ζέσεως. Το blank αποτελείται από 10 ml απιονισμένο νερό και 200 μl NaHCO_3 10% και σε αυτό εφαρμόζονται όλες οι διαδικασίες για την ανάλυση με την εξαίρεση αυτή των φυγοκεντρήσεων.

Βήμα 2: Τα φιαλίδια με το 1 ml δείγματος αποψύχονται.

Βήμα 3: Σε ένα tube προστίθεται 0.5 ml από το blank.

Βήμα 4: Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 10000 rpm για 30 min (μόνο τα δείγματα όχι το blank).

Βήμα 5: Μετά την φυγοκέντρηση με την πιπέτα εξάγεται 0.5 ml από το υπερκείμενο υγρό το οποίο και απορρίπτεται προσέχοντας να μείνουν οι μικροοργανισμοί στον πάτο.

Βήμα 6: Εισάγεται στο tube 0.5 ml NaOH 2N και ανακινείται πολύ καλά (και στο blank).

Βήμα 7: Τα δείγματα μένουν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 8: Πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 10 λεπτά (μόνο τα δείγματα όχι το blank).

Βήμα 9: 0,4 ml από το υπερκείμενο του tube αφαιρείται και μεταφέρεται σε νέο tube (και στο blank).

Βήμα 10: Προστίθεται σε όλα τα δείγματα 0,25 ml HCl 0,2N (και στο blank).

Βήμα 11: Τα tubes σφραγίζονται και ανακινούνται πολύ καλά και έπειτα μένουν σε ηρεμία για 5 λεπτά.

Βήμα 12: Τέλος, αφαιρούνται 0,15 ml από όλα τα δείγματα και το blank για να καταλήξει να είναι ο τελικός όγκος 0,5 ml.

Μέθοδος Lowry

Βήμα 1: Το διάλυμα Lowry προετοιμάζεται σε ένα ποτήρι ζέσεως (100 μέρη NaOH+Na₂CO₃ και 1 μέρος CuSO₄ + 1 μέρος Tartate, ανάλογα τα δείγματα θα βγει ο τελικός όγκος).

Βήμα 2: 0,7 ml τους διαλύματος προστίθεται σε κάθε tube.

Βήμα 3: Τα tubes με το διάλυμα που προστέθηκε αναδεύονται και αποθηκεύονται για 20 λεπτά υπό συνθήκες σκότους σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 4: Μόλις τελειώσει ο χρόνος παρασκευάζεται το διάλυμα Folin (500 μl Folin + 600 μl απιονισμένο νερό, με τον τελικό όγκο να διαμορφώνεται ανάλογα με την ποσότητα των δειγμάτων). Το διάλυμα φτιάχνεται σε κλειστό δοχείο με αλουμινόχαρτο για να διασφαλιστούν συνθήκες σκότους.

Βήμα 5: Το διάλυμα προστίθεται σε όλα τα tube σε ποσότητα 0,1 ml.

Βήμα 6: Τα tubes κλείνονται καλά, ανακινούνται και αποθηκεύονται υπό σκότος σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Βήμα 7: Ενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο UV και επιλέγεται η μέθοδος Lowry.

Βήμα 8: Πραγματοποιείται μηδενισμός του οργάνου (Autozero) με 1,3 ml απιονισμένο και στις 2 κυψελίδες. Η μπροστά κυψελίδα αδειάζεται για να μπει το δείγμα.

Βήμα 9: Όταν τελειώσουν τα 30 λεπτά αναμονής, το δείγμα από κάθε tube μεταφέρεται στην κυψελίδα και μετράται η απορρόφηση (abs) της ουσίας στα 750 nm.

Παρασκευή πρότυπης καμπύλης Lowry

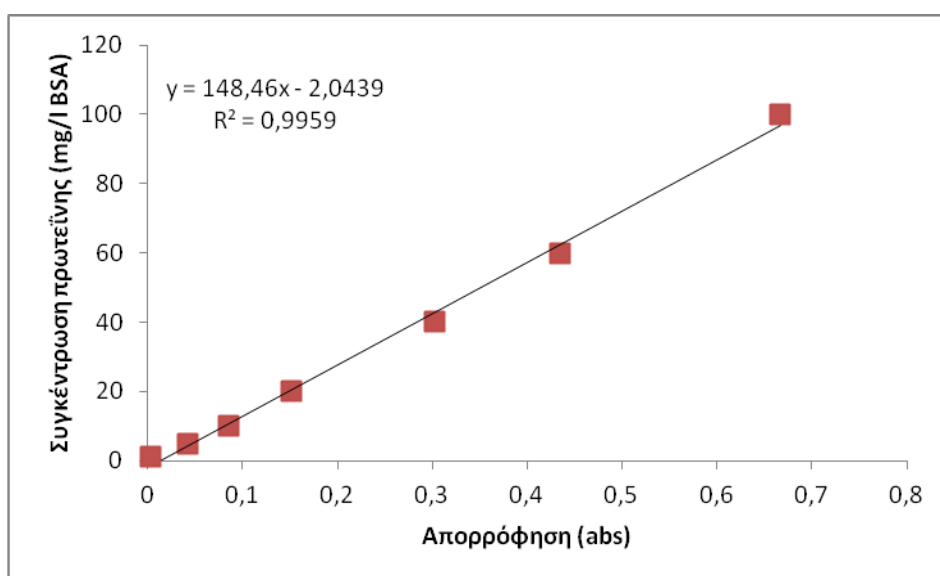
Βήμα 1: Για την παρασκευή πρότυπης καμπύλης πρωτεϊνών ζυγίζονται 200 mgBSA και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 1 l με απιονισμένο νερό και υπό

ανάδευση.

Βήμα 2: Παρασκευάζονται επτά πρότυπα διαλύματα σε ογκομετρικές φιάλες των 25 ml από το παραπάνω αρχικό διάλυμα με τη χρήση αυτόματων πιπετών με τις εξής συγκεντρώσεις: 1, 5, 10, 20, 40, 60, 100 mg/l BSA. Επίσης παρασκευάζεται τυφλό δείγμα όπως περιγράφηκε στη διαλυτοποίηση πρωτεϊνών.

Βήμα 3: 0,5 ml από το κάθε πρότυπο και το τυφλό δείγμα τοποθετούνται σε φιαλίδιο 2 ml και ακολουθείται η διαδικασία μέτρησης Lowry (όπως περιγράφηκε).

Η καμπύλη βαθμονόμησης που προέκυψε ήταν:



Διάγραμμα 3-9. Καμπύλη βαθμονόμησης πρωτεΐνης.

3.3.8 Μέτρηση θειούχων ιόντων (S^{2-})

Υλικά για την ανάλυση

1. Sulfide Reagent Set (Sulfide 1 Reagent, Sulfide 2 Reagent),
2. Απιονισμένο νερό,
3. Tips για αυτόματη πιπέτα 100 μ l– 1000 μ l,
4. Γυάλινη σύριγγα 1 ml για αέρια δείγματα,
5. Φασματοφωτόμετρο DE2800 της HACH.

Υλικά για την πρότυπη καμπύλη

1. Γυάλινες κυψελίδες,
2. Ογκομετρική φιάλη των 10 ml,
3. 1 serum μπουκάλι 160 ml,
4. Sulfide Reagent Set (Sulfide 1 Reagent, Sulfide 2 Reagent),
5. $Na_2S \cdot 9 H_2O$,

3.3.8.1 Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης μέτρησης των θειούχων (S^{2-})

Βήμα 1: Για την παρασκευή πρότυπης καμπύλης παρασκευάζεται διάλυμα Na_2S , ζυγίζοντας 0,2766 gr $Na_2S \cdot 9H_2O$ και τοποθετώντας τα σε serum μπουκάλι των 160 ml με 100 ml απιονισμένο νερό. Το μπουκάλι κλείνεται, σφραγίζεται με πώμα απο βουτύλιο και αλουμινένιο καπάκι και τοποθετείται στην τράπεζα ανάδευσης μια μέρα

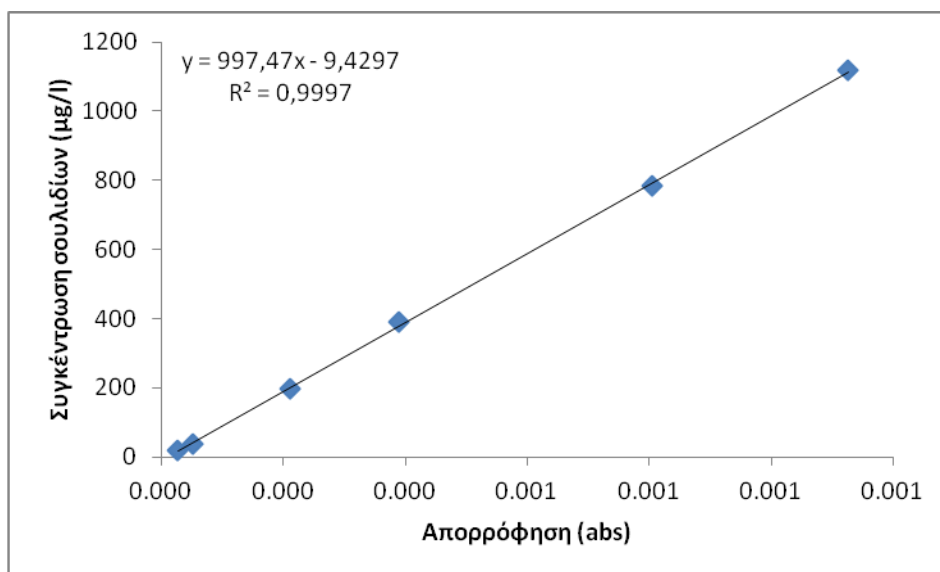
Βήμα 2: Την επόμενη μέρα, παρασκευάζεται πρωτίστως το τυφλό δείγμα, που αποτελείται από 10 ml απιονισμένο νερό, 0,5 ml Sulfide Reagent 1 (αντιδραστήριο 1) και 0,5 ml Sulfide Reagent 2 (αντιδραστήριο 2), τα οποία προστίθενται σε κυψελίδα με πώμα και έπειτα από 5 λεπτά χρησιμοποιούνται για το μηδενισμό του οργάνου.

Βήμα 3: Εξάγονται 5, 10, 50, 100, 200 και 300 μl κάθε φορά απο το πρότυπο διάλυμα και τοποθετούνται σε κυψελίδα με ποσότητα απιονισμένου νερού τόση ώστε ο τελικός όγκος να είναι 10 ml. Η κυψελίδα κλείνεται με κάπακι.

Βήμα 4: Τοποθετούνται τα δυο αντιδραστήρια όπως περιγράφηκε και στο βήμα 2. Κλείνεται η κυψελίδα με το καπάκι, ανακινείται πολύ καλά και παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Βήμα 5: Μετά το πέρας του χρόνου, γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης. Αν υπάρχουν θειούχα τότε το δείγμα θα έχει μπλε χρώμα.

Η καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε για τη μέτρηση των θειούχων είναι:



Διάγραμμα 3-10. Καμπύλη βαθμονόμησης θειούχων (S^{2-}).

Ενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο DR2800 (Hach-Lange) στο πρόγραμμα 690 (μέθοδος Hach 8131). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των σουλφιδίων να μετατρέπουν το N,N-dimethyl-p-phenylenediamine απ' ευθείας σε κυανό του μεθυλενίου (methylene blue) παρουσία κάποιου μέτριου οξειδωτικού παράγοντα, όπως π.χ. K₂Cr₂O₇. Η ένταση του κυανού του μεθυλενίου που σχηματίζεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των σουλφιδίων στο δείγμα. Για την ανάλυση των δειγμάτων ήταν αναγκαία πρωταρχικά η παρασκευή του τυφλού δείγματος (blank), που αποτελούνταν από 10 ml απιονισμένο νερό, 0,5 ml Sulfide Reagent 1 καθώς και 0,5 ml Sulfide Reagent 2, τα οποία προστέθηκαν σε κυψελίδα με πόμα η οποία ανακινήθηκε καλά και έπειτα από 5 λεπτά χρησιμοποιήθηκαν για το μηδενισμό του οργάνου. Στα επόμενα δείγματα η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν σχεδόν η ίδια με τη διαφορά ότι πριν την προσθήκη των αντιδραστηρίων αφαιρέθηκαν 200 μl από την κυψελίδα που είχε ήδη 10 ml και προστέθηκε το δείγμα (όγκου 200 μl) που λήφθηκε από τις μητρικές καλλιέργειες. Μετά το πέρας των 5 λεπτών μετريέται η τιμή απορρόφησης και μέσω της πρότυπης καμπύλης που έχει κατασκευαστεί, υπολογίζεται η τιμή της συγκέντρωσης των σουλφιδίων στο δείγμα.

3.3.9 Υπολογισμός n_{chloride}

Ιδιαίτερα πρακτικός τρόπος εξέτασης της εξέλιξης της αναγωγικής αποχλωρίωσης αποτελεί ο συντελεστής ολοκλήρωσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης, n_{chloride} – όπως αυτός περιγράφεται από τους Heimann et al. (2005).

Ο συντελεστής αυτός χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειραματικά μας αποτελέσματα και αντιπροσωπεύει τη φάση της αποχλωρίωσης, βασίζεται στις συγκεντρώσεις των παραγώγων του TCE και μπορεί να λάβει τιμές από 0 (καθόλου αποχλωρίωση) έως 3 (πλήρης μετατροπή σε αιθένιο).

Η σχέση με την οποία προκύπτει ήταν:

$$n_{\text{chloride}} = \frac{DCEs}{\Sigma_{\text{chlorinated ethenes}}} + \frac{2 \cdot VC}{\Sigma_{\text{chlorinated ethenes}}} + \frac{3 \cdot ETH}{\Sigma_{\text{chlorinated ethenes}}}$$

Κεφάλαιο 4^ο – Παρουσίαση και σχολιασμός αποτελεσμάτων

4.1 Εισαγωγή

Στο πλαίσιο της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής της Αντωνίου Κορηλίας αλλά και παλαιότερων διδακτορικών και μεταπτυχιακών διατριβών (Παναγιωτάκης, 2010 & Γιολλάση, 2009, αντίστοιχα), αναπτύχθηκαν και συντηρούνται στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας του ΕΜΠ, αναερόβιες αποχλωρωτικές καλλιέργειες. Οι καλλιέργειες αυτές συντηρούνταν σε διπλότυπα στο εργαστήριο, υπο συνθήκες σκότους και σταθερής θερμοκρασίας 25°C και είχαν διαχωριστεί σε 3 διαφορετικές κατηγορίες: τις NS καλλιέργειες (NS1-NS2) όπου η συγκέντρωση των θεικών ιόντων ήταν αμελητέα, οι καλλιέργειες LS (LS1-LS2) με συγκέντρωση θεικών ίση με 150 mg/l και τέλος οι καλλιέργειες (MS1-MS2) με συγκέντρωση θεικών 400 mg/l, όπως φαίνεται και στον πίνακα 4.1.

Οι καλλιέργειες αυτές διατηρήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο εργαστήριο και συγκεκριμένα, οι N1, N2 και M2 είχαν ξεκινήσει την 1^η Ιουνίου 2006 και στην αρχή του παρόντος πειράματος διέτρεχαν την 2325^η ημέρα. Αντίστοιχα, οι καλλιέργειες L1 και L2 ξεκίνησαν τη λειτουργία τους την 1^η Ιουνίου 2012 και κατά την πρώτη ημέρα της μέτρησης τους για το παρόν πείραμα ήταν στην 133^η ημέρα λειτουργίας τους έχοντας σχεδόν ολοκληρώσει τον απαιτούμενο χρόνο εγκληματισμού τους ώστε να επιτευχθούν σταθερές συνθήκες (3 φορές επί το χρόνο παραμονής). Τέλος, η καλλιέργεια M1 λειτουργούσε ήδη εδώ και χρόνια και κατά την πρώτη ημέρα μέτρησης μας βρισκόταν στην 777^η ημέρα λειτουργίας. Η παρούσα εργαστηριακή μελέτη ξεκίνησε στις 5/10/2012 με τις πρώτες μετρήσεις να λαμβάνονται στις 12/10/2012 και ολοκληρώθηκε στις 24/5/2013. Οι αναλύσεις των δειγμάτων από τις μητρικές καλλιέργειες καθώς και η τροφοδοσία τους πραγματοποιείτο εβδομαδιαία, και συγκεκριμένα κάθε Παρασκευή. Οι αποχλωρωτικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε φιάλες-αντιδραστήρες (serum), ολικού όγκου 600 ml και μπουκάλια serum ολικού όγκου 160 ml, υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες με αναλογία $V_{ΥΓΡΟΥ}/V_{ΟΛΙΚΟ}$ σταθερή και ίση με 10/16 – που αντιστοιχεί σε 375 ml υγρής φάσης στις φιάλες serum των μητρικών καλλιερειών και 100 ml στα μπουκάλια των πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας batch).

Σκοπός των παραπάνω καλλιιεργειών ήταν για: α) την παρασκευή μικτών καλλιιεργειών αποχλωρίωσης χλωριωμένων αιθυλενίων – παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων θεικών, β) την εκτέλεση πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας και γ) την εργαστηριακή διερεύνηση αναχαιτιστικών για τη διαδικασία παραμέτρων (π.χ. Μεθανογένεση). Η κύρια διαφοροποίηση μεταξύ των μητρικών καλλιιεργειών έγκειται στη διαφορετική συγκέντρωση θεικών ιόντων, καθώς οι ποσότητες βάσει των οποίων τροφοδοτούνταν, φαίνεται στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 4-1).

Πίνακας 4-1. Ποσότητες βουτυρικού οξέος, θεικών ιόντων και τριγλωροαιθυλενίου που προστίθενται στις μητρικές καλλιιεργειες.

Όνομα καλλιιεργειας	Βουτυρικό οξύ			Θειικά ιόντα			TCE		
	mM	mg/lt	meq/lt	mM	mg/lt	meq/lt	mM	mg/lt	meq/lt
NS	0,3	26,4	1,2	<0,005	<0,5	<0,042	0,5	65,7	3,0
LS	0,3	26,4	1,2	1,56	150	12,5	0,5	65,7	3,0
MS	0,3	26,4	1,2	4,2	400	33,3	0,5	65,7	3,0

Πίνακας 4-2: Συστατικά εβδομαδιαίας τροφοδοσίας των καλλιιεργειών.

Παράμετρος	Ποσότητα
Purging (N ₂ +N ₂ /CO ₂)	30+2 min
Tungstate Solution (μl)	55
Yeast Extract (μl)	19,0
Vitamins Solution (μl)	550,0
Butyric acid (μl)	10,5
SO ₄ ²⁻ (μl)	Αναλόγη της επιζητούμενης συγκέντρωσης
TCE (μl)	17,0
RAMM (ml)	55

Τα 55 ml περίσσειας του υγρού της καλλιιεργειας που προέκυπταν από τη συντήρηση κάθε εβδομάδα, χρησιμοποιούνταν είτε για τη μέτρηση των ολικών και αιωρούμενων στερεών στο σύστημα, είτε για τη συλλογή υλικού με σκοπό την παρασκευή άλλων πειραμάτων (ασυνεχούς τροφοδοσίας).

Τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας – εντατικής παρακολούθησης (batch) είχαν

σκοπό τον έλεγχο και διαπίστωση ορισμένων σημαντικών για την αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση παραμέτρων, τα οποία παρουσιάζονται στη συνέχεια του παρόντος κειμένου. Έτσι, εκτελέστηκαν τα παρακάτω πειράματα:

- Πείραμα ελέγχου δόσης-χρόνου με σχεδόν μέση συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα ελέγχου δόσης-χρόνου με μέση συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα ελέγχου δόσης-χρόνου με υψηλή συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα ελέγχου προσθήκης υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων την 7^η ημέρα.
- Πείραμα διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας με οξικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας με υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα αναγωγής θεικών ιόντων με χαμηλή συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα αναγωγής θεικών ιόντων με σχεδόν χαμηλή συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα αναγωγής θεικών ιόντων με μέση συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων.
- Πείραμα αναγωγής θεικών ιόντων με υψηλή συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων.

4.2 Αποτελέσματα από την ανάλυση των μητρικών καλλιεργειών

4.2.1 Οι αποχλωριωτικές καλλιέργειες απουσίας θεικών ιόντων (NS1-NS2)

Το συγκεκριμένο ζεύγος καλλιεργειών, όπως προαναφέρθηκε περιείχε αμελητέα έως μηδενική συγκέντρωση θεικών ιόντων. Από τη στατιστική ανάλυση των μετρήσεων, προέκυψε ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 4-3: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια NS1.

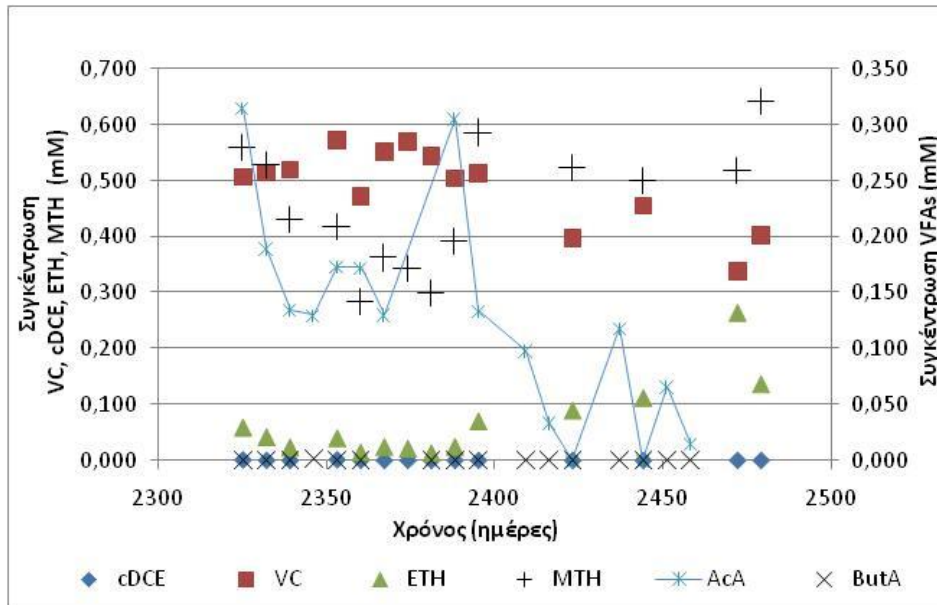
	AcA	PrA	isoButA	ButA	MTH	ETH	VC	1,1DCE	tDCE	cDCE	TCE	n
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	
Μέσος Όρος	0,126	0,001	0,001	0,000	0,456	0,067	0,490	0,000	0,000	0,000	0,000	2,118
Τυπική απόκλιση	0,094	0,002	0,002	0,000	0,111	0,068	0,070	0,000	0,000	0,000	0,000	0,117
Διάστημα εμπιστοσύνης	0,046	0,001	0,001	0,000	0,058	0,036	0,037	0,000	0,000	0,000	0,000	0,061

Πίνακας 4-4: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs) και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια NS2.

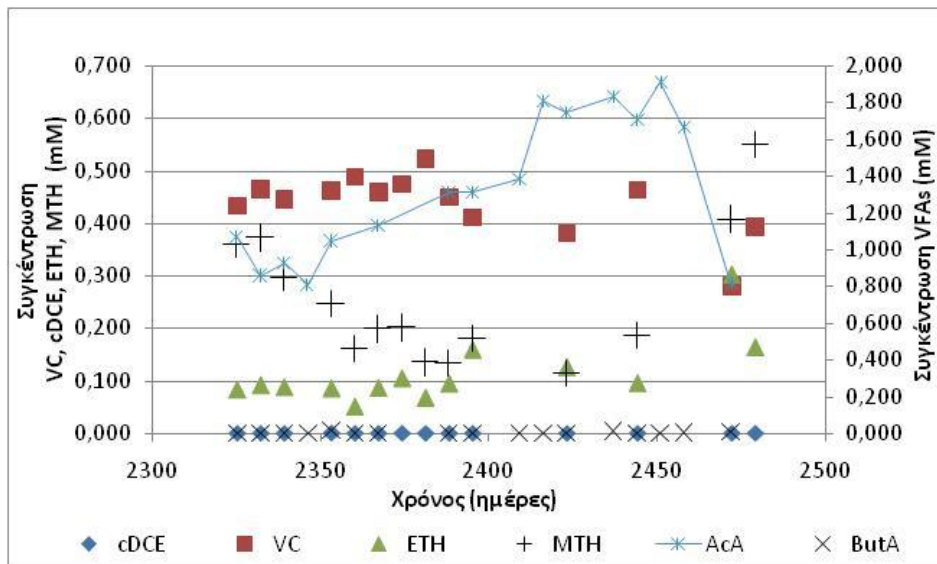
	AcA	PrA	isoButA	ButA	MTH	ETH	VC	1,1DCE	tDCE	cDCE	TCE	n
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	
Μέσος Όρος	1,334	0,010	0,006	0,003	0,253	0,115	0,437	0,000	0,000	0,000	0,000	2,206
Τυπική Απόκλιση	0,396	0,008	0,005	0,005	0,127	0,063	0,059	0,000	0,001	0,000	0,000	0,106
Διάστημα εμπιστοσύνης	0,194	0,004	0,002	0,002	0,066	0,033	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,055

Στους παραπάνω πίνακες (Πίνακας 4-3 και 4-4) παρουσιάζεται η στατιστική ανάλυση των τιμών που πραγματοποιήθηκε για τις αναλύσεις των μητρικών καλλιεργειών NS1-NS2. Παρατηρούμε από αριστερά προς δεξιά τις συγκεντρώσεις (σε mM) του οξικού οξέος, προπιονικού οξέος, ισοβουτυρικού οξέος, βουτυρικού οξέος, μεθανίου, αιθενίου, βινυλοχλωριδίου, 1,1-διχλωροαιθυλενίου, trans-διχλωροαιθυλενίου, cis-διχλωροαιθυλενίου, τριχλωροαιθυλενίου, καθώς και του συντελεστή ολοκλήρωσης της αποχλωρίωσης, n_{chloride} . Για κάθε παράμετρο υπολογίστηκε ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και το διάστημα εμπιστοσύνης ενώ στον πίνακα παρατίθενται και οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές που παρατηρήθηκαν στο σύνολο των μετρήσεων μας.

Με τη χρήση των παραπάνω τιμών προέκυψαν και τα ακόλουθα γραφήματα:



Διάγραμμα 4-1: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια NS1.



Διάγραμμα 4-2: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια NS2.

Στα παραπάνω διαγράμματα (Διαγράμματα 4-1 και 4-2) παρατίθενται σχηματικά οι τιμές των συγκεντρώσεων των χλωριωμένων αιθυλενίων και των πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs). Από τη σχηματική αναπαράσταση απουσιάζουν οι τιμές του προπιονικού και ισοβουτυρικού οξέως, καθότι ήταν μηδαμινές και στη μέγιστη δυνατή τιμή τους δεν υπερέβαιναν το 2% του συνόλου του αρχικού δότη έκαστη (συνολικά δηλαδή <4%), ενώ δεν εμφανίζονται και οι τιμές του TCE, trans-DCE και 1,1-DCE δεδομένων και σε αυτή την περίπτωση των μηδενικών συγκεντρώσεων του στο δείγμα.

Από τα παραπάνω δεδομένα παρατηρείται ότι το TCE είχε αποχλωριωθεί πλήρως σε cis-DCE και VC, με τις συγκεντρώσεις του cis-DCE να είναι αμελητέες και να εμφανίζεται συσσώρευση VC αλλά και παραγωγή αιθενίου. Στα μέσα του διαστήματος του πειράματος μας παρατηρήθηκε μια συσσώρευση του οξικού οξέος μετά τη μείωση της δραστηριότητας των μεθανογόνων μικροοργανισμών. Η συσσώρευση αυτή φαίνεται ότι μάλλον οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής αιθενίου με παράλληλη μείωση της συγκέντρωσης του VC και επιπλέον, σε αύξηση της μεθανογένεσης. Γενικότερα, παρατηρείται ότι με τη μείωση της συγκέντρωσης του μεθανίου – που υποδεικνύει μειωμένη δραστηριότητα των μεθανογόνων, υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέως και αντίστροφα. Η τάση αυτή αποτελεί τον κύριο λόγο για τον οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) για τον έλεγχο του είδους των μεθανογόνων μικροοργανισμών ενώ την ίδια τάση παρατήρησαν στα πειράματα τους και οι Stams et al., (2005) και Heimann et al. (2006).

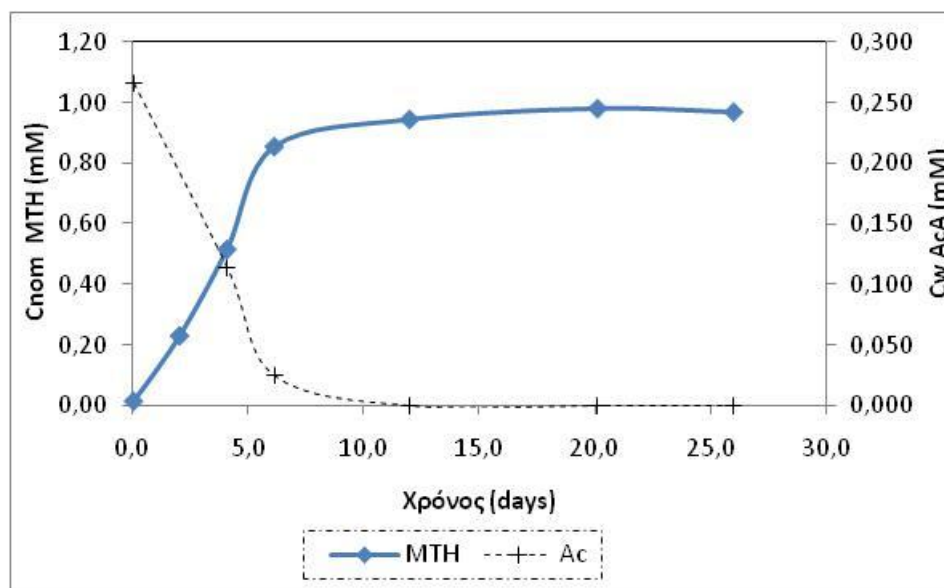
Όσον αφορά την καλλιέργεια NS1, ο μέσος όρος του συντελεστή ολοκλήρωσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης, n_{chloride} ήταν ίσος με $2,118 \pm 0,061$ – που υποδηλώνει ότι η αποχλωριωτική διαδικασία προχωρούσε στο στάδιο του αιθενίου αλλά όχι πλήρως, πιθανώς λόγω του σχετικά μικρού διαθέσιμου χρόνου μεταξύ των διαδοχικών τροφοδοσιών (7 ημέρες) και της μη-επαρκούς δόσης δότη ηλεκτρονίων (40% επάρκεια για πλήρη αποχλωρίωση). Αντίστοιχη γενικά συμπεριφορά παρουσιάζει και η καλλιέργεια NS2 στην οποία ωστόσο εμφανίζονται αρκετά υψηλότερες συγκεντρώσεις και συσσώρευση οξικού οξέως, με παράλληλη μείωση της δραστηριότητας των μεθανογενετικών αρχαίων συγκριτικά με την αντίστοιχη καλλιέργεια NS1. Το φαινόμενο αυτό, της χαμηλής μεθανογενετικής δραστηριότητας φαίνεται να προϋπήρχε στην συγκεκριμένη καλλιέργεια και να έγινε πιο έντονο στο διάστημα μελέτης και μέχρι και τις τελευταίες εβδομάδες των μετρήσεων – όποτε και παρατηρείται μια αύξηση της συγκέντρωσης μεθανίου με ταυτόχρονη μείωση του οξικού οξέος.

Από τα παραπάνω δεδομένα, παρατηρείται επίσης ότι σε αυτή την περίπτωση πέρα από το TCE έχει εκμηδενιστεί πλήρως και το cis-DCE, ενώ ταυτόχρονα και η τιμή του συντελεστή ολοκλήρωσης της αποχλωρίωσης (n_{chloride}) είναι αυξημένη στο $2,206 \pm 0,055$. Τέλος, οι συγκεντρώσεις του προπιονικού και ισοβουτυρικού οξέως δεν

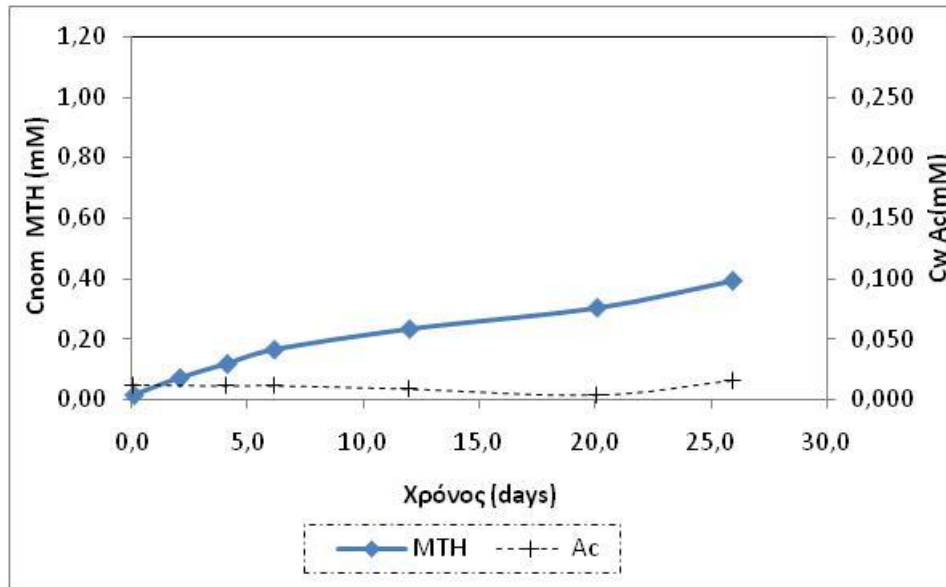
απεικονίζονται δεδομένου ότι στη μέγιστη τιμή τους αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 1% της ποσότητας του οξικού οξέως που ήταν το κύριο παράγωγο από την αποδόμηση του βουτυρικού οξέος. Επιπλέον, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης οξικού οξέως – το οποίο μπορεί να δράσει και ως δότης όπως προαναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2, έχουμε αύξηση και στην παραγόμενη ποσότητα αιθενίου (Ma et al., 2006; He et al., 2002; Aulenta et al., 2007). Παρατηρώντας συνεπώς την τάση της αντίστροφης συσχέτισης της συγκέντρωσης του οξικού οξέος με τη μεθανογένεση κρίθηκε απαραίτητο να εξεταστεί η περίπτωση αυτή και πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα N12-METHAc (Πείραμα διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας με οξικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων) και N12-METHHyd (Πείραμα διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας με υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων).

Πίνακας 4-5: Τα πειράματα ελέγχου της μικροβιακής κοινότητας μεθανογένεσης.

Όνομα αντιδραστήρα	Δότης ηλεκτρονίων		
	mM	mg/l	meq/l
N12-METHHyd	3,05 H ₂	6,1 H ₂	6,1 H ₂
N12-METHAc	0,77Ac	46.1 Ac	6,1 Ac



Διάγραμμα 4-3: Διακύμανση του δότη-οξικού οξέως και του παραγόμενου μεθανίου στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας.



Διάγραμμα 4-4: Διακύμανση του οξικού οξέος και του παραγόμενου μεθανίου στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας διερεύνησης μικροβιακής κοινότητας με δότη ηλεκτρονίων το Υδρογόνο.

Από τα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 4-3 και 4-4) συμπεραίνουμε ότι έχουμε μεγαλύτερη παραγωγή μεθανίου στην περίπτωση που ο δότης ηλεκτρονίων είναι το οξικό οξύ, γεγονός που αποδεικνύει την προτίμηση των μεθανογόνων μικροοργανισμών στο συγκεκριμένο δότη σε σχέση με το υδρογόνο. Επιπλέον, η μέγιστη παραγωγή μεθανίου (0,9 mM) στην περίπτωση χρήσης του οξικού οξέως παρατηρείται σε 6 περίπου ημέρες από την έναρξη του πειράματος σε σχέση με τις 25 που απαιτήθηκαν για την περίπτωση χρήσης του υδρογόνου με μέγιστη παραγωγή μεθανίου 0,4 mM. Αξίζει να σημειωθεί ότι από την πρώτη εβδομάδα η ποσότητα του οξικού οξέος είχε εξαντληθεί δίνοντας ένα «πλατώ» με σχεδόν σταθερή μέγιστη συγκέντρωση.

Γίνεται συνεπώς κατανοητό ότι οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί που είχαμε στις καλλιέργειες μας ήταν κατά βάση οξικοτροφικοί δικαιολογώντας έτσι και τις παρατηρήσεις που έγιναν στις καλλιέργειες NS1-NS2 σχετικά με τη διακύμανση του μεθανίου και του οξικού οξέος.

4.2.2 Οι απογλωριωτικές καλλιέργειες με χαμηλή και μέση συγκέντρωση θεικών ιόντων (LS1-LS2 και MS1-MS2)

Η συγκεκριμένη ομάδα καλλιεργειών, περιείχε χαμηλή συγκέντρωση θεικών ιόντων στις δύο πρώτες καλλιέργειες (LS1-LS2) ρυθμιζόμενη εβδομαδιαία με την προσθήκη Na₂SO₄ ώστε να βρίσκεται στα 150 mg/l και μέση συγκέντρωση θεικών στις δύο τελευταίες (MS1-MS2), ρυθμιζόμενη στα 400 mg/l.

Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε:

Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs), θεικών ιόντων και γλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια LS1.

	AcA	PrA	isoButA	ButA	SO ₄	MTH	ETH	VC	1,1DCE	tDCE	cDCE	TCE	n
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	
Μέσος Όρος	0,048	0,001	0,000	0,001	0,602	0,001	0,034	0,524	0,000	0,000	0,003	0,000	2,05 3
Τυπική απόκλιση	0,041	0,003	0,001	0,002	0,263	0,001	0,016	0,033	0,001	0,000	0,008	0,000	0,04 3
Διάστημα εμπιστοσύνης	0,019	0,001	0,000	0,001	0,138	0,000	0,008	0,017	0,001	0,000	0,004	0,000	0,02 3

Πίνακας 4-7: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs), θεικών ιόντων και γλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια LS2.

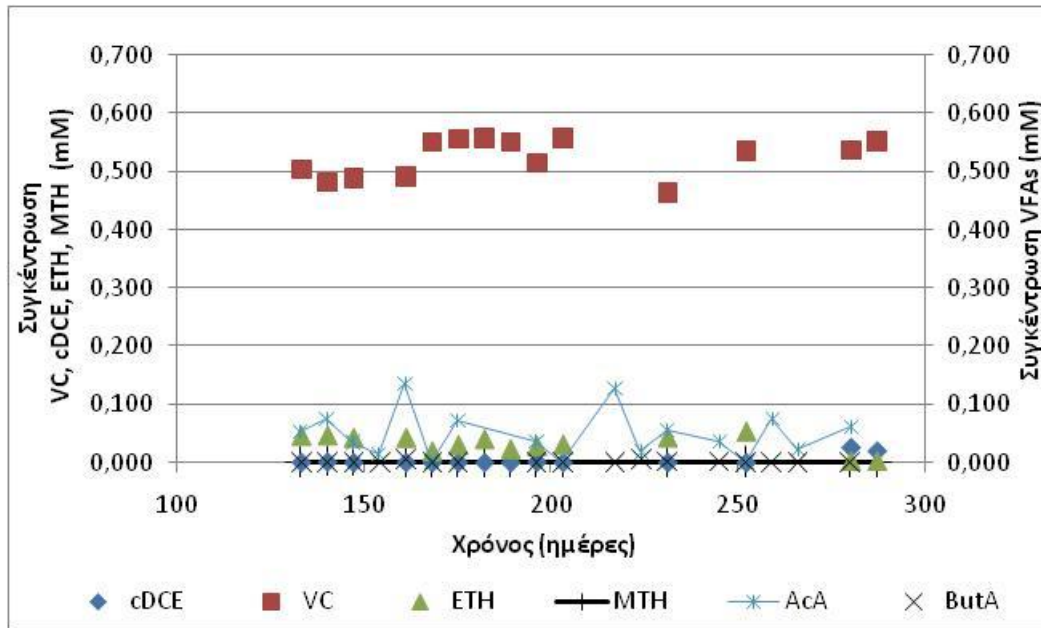
	AcA	PrA	isoButA	ButA	SO ₄	MTH	ETH	VC	1,1DCE	tDCE	cDCE	TCE	N
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	
Μέσος Όρος	0,006	0,000	0,000	0,000	0,662	0,001	0,011	0,481	0,001	0,000	0,052	0,000	1,92
Τυπική απόκλιση	0,006	0,000	0,000	0,001	0,269	0,000	0,008	0,115	0,001	0,000	0,113	0,001	0,22 3
Διάστημα εμπιστοσύνης	0,003	N/A	N/A	0,000	0,167	0,000	0,004	0,060	0,001	0,000	0,059	0,000	0,117

Η πρώτη καλλιέργεια (LS1 παρά την παρουσία θεικών προχώρησε την απογλωριωτική διαδικασία φτάνοντας όμως σε μία συσσώρευση VC αλλά και σε μικρές ποσότητες αιθενίου. Η συγκεντρώση του TCE ήταν μηδενική και του cis-DCE σχεδόν αμελητέα ενώ παράλληλα σχεδόν ανύπαρκτη ήταν και η μεθανογένεση,

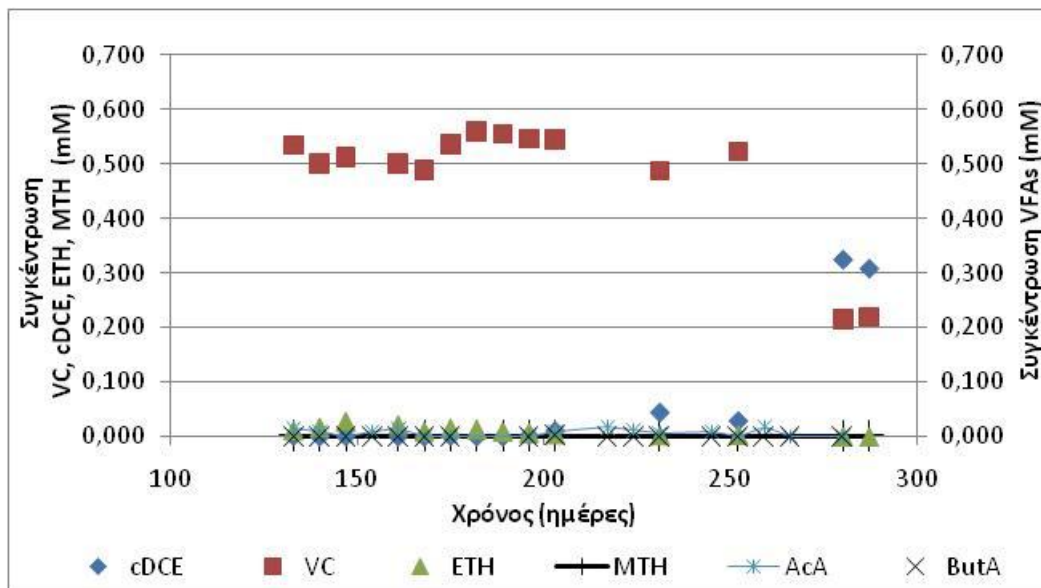
γεγονός που οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στην παρουσία θεικών καθώς οι θεικοαναγωγικοί (SRB) μικροοργανισμοί προσλαμβάνουν αντί για τους μεθανογόνους το δότη ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να δημιουργείται περιοριστικός παράγοντας καθώς οι τελευταίοι απαιτούν μεγάλες ποσότητες εύκολα προσλήψιμου δότη για τη δραστηριότητα τους.

Όσον αφορά το αντιγραφό της παραπάνω καλλιέργειας, δηλαδή την LS2, παρατηρείται γενικότερα μία παρεμφερής συμπεριφορά, ωστόσο παρατηρείται μειωμένη αποχλωρίωση καθώς κατά τις τελευταίες κυρίως εβδομάδες παρατηρήθηκε σχετικά υψηλή συγκέντρωση cis-DCE. Η μεθανογένεση και σε αυτή την περίπτωση είναι αμελητέα ενώ παρατηρείται ότι το σύνολο σχεδόν του δότη ηλεκτρονίων έχει καταναλωθεί δημιουργώντας πιθανώς περιοριστικό παράγοντα και στην αποχλωρίωση η οποία είναι μειωμένη όπως συμπεραίνεται από το συντελεστή n_{chloride} που υπολογίστηκε να είναι $1,92 \pm 0,117$. Αντίστοιχα, για την LS1, η τιμή του συντελεστή ολοκλήρωσης της αποχλωρίωσης (n_{chloride}) είναι αυξημένη στο $2,053 \pm 0,023$.

Παρόμοια συμπεριφορά υποδηλώνουν και τα αποτελέσματα των Stams et al., (2005). Ως πιθανή εξήγηση για τη μη παρουσία μεθανογένεσης στους συγκεκριμένους μικρόκοσμους σύμφωνα και με τους Aulenta et al. (2006), αποτελεί η παρουσία των θεικών ιόντων και των χλωριωμένων ενώσεων ή των προϊόντων τους καθώς επίσης και ο χαμηλός αριθμός μεθανογόνων μικροοργανισμών (Aulenta et al., 2006). Τέλος, σύμφωνα και με άλλη έρευνα, επισημαίνεται ότι δεν εντοπίζεται συστηματικά μεθανογένεση για μεσαίες και υψηλές συγκεντρώσεις θεικών ιόντων (Pantazidou et al., 2012).



Διάγραμμα 4.5: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια LS1.



Διάγραμμα 4-6: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια LS2.

Από τα παραπάνω διαγράμματα (Διάγραμμα 4-5 και 4-6), γίνεται αντιληπτό ότι οι συγκεντρώσεις όλων των χλωροαιθυλενίων αλλά και των πτητικών λιπαρών οξέων είναι ιδιαίτερα χαμηλές, με μόνη εξαίρεση αυτή του VC το οποίο παρουσιάζει σταθερά συσώρευση στην καλλιέργεια αναγόμενο μόνο σε μικρό ποσοστό σε αιθέριο. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις του προπιονικού και ισοβουτυρικού οξέως δεν απεικονίζονται δεδομένου ότι στη μέγιστη τιμή τους

αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 4% για το προπιονικό και 1% για το ισοβουτυρικό της συνολικής ποσότητας του δότη που εισήχθη και σε σχέση και με τις τιμές του οξικού οξέως οι συγκεντρώσεις τους είναι αμελητέες.

Γίνεται συνεπώς αντιληπτό ότι η παρουσίαθεικών πιθανώς να επηρεάζει την ταχύτητα μείωσης του VC και του αιθενίου (φαινόμενο που θα εξετάσουμε και στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας), ενώ στην περίπτωση αυτή γίνεται ξεκάθαρα κατανοητό ότι η ποσότητα του δότη που προστέθηκε καταναλώθηκε στο σύνολο της εκμηδενίζοντας ακόμα και τα προϊόντα της ζύμωσης του βουτυρικού οξέως, δηλαδή τα οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ. Αντίστοιχη συμπεριφορά με τις καλλιέργειες χαμηλής συγκέντρωσηςθεικών παρουσιάζουν και αυτές με μέση συγκέντρωσηθεικών (400 mg/l). Η αποχλωρίωση πραγματοποιείται συσσωρεύοντας στη φιάλη μεγάλες ποσότητες VC και παραγοντας μικρές ποσότητες αιθενίου.

Οι τιμές των παραμέτρων που αναλύθηκαν για τις δύο αυτές καλλιέργειες ήταν:

Πίνακας 4-8: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs),θεικών ιόντων και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια MS1.

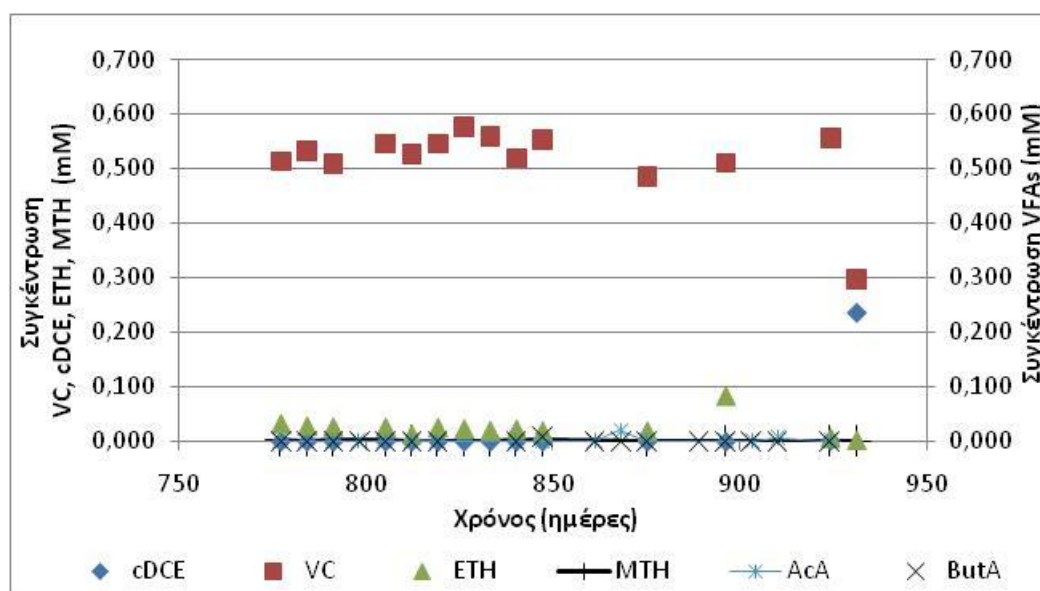
	AcA	PrA	isoButA	ButA	SO ₄	MTH	ETH	VC	1,1DCE	tDCE	cDCE	TCE	n
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	
Μέσος Όρος	0,002	0,000	0,000	0,000	0,615	0,001	0,024	0,517	0,000	0,000	0,017	0,000	2,01
Τυπική απόκλιση	0,005	0	0,002	0,002	0,286	0,000	0,019	0,068	0,001	0,000	0,063	0,000	0,13
Διάστημα εμπιστοσύνης	0,002	N/A	0,001	0,001	0,150	0,000	0,010	0,036	0,000	0,000	0,033	0,000	0,07

Πίνακας 4-9: Αποτελέσματα συγκεντρώσεων πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs),θεικών ιόντων και χλωριωμένων αιθυλενίων που προέκυψαν από τις μετρήσεις στη μητρική καλλιέργεια MS2.

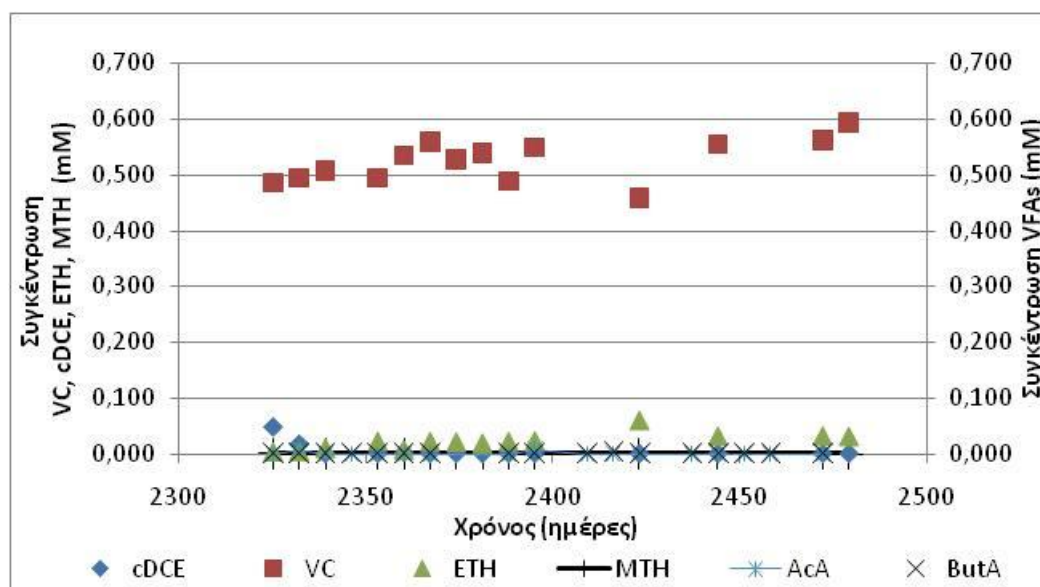
	AcA	PrA	isoButA	ButA	SO ₄	MTH	ETH	VC	1,1DCE	tDCE	cDCE	TCE	n
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	
Μέσος Όρος	0,001	0,000	0,000	0,000	0,608	0,001	0,022	0,525	0,000	0,001	0,005	0,000	2,03
Τυπική απόκλιση	0,003	0,001	0,000	0,001	0,209	0,000	0,015	0,038	0,001	0,001	0,013	0,001	0,05
Διάστημα εμπιστοσύνης	0,001	0,000	0,000	0,000	0,097	0,000	0,008	0,020	0,000	0,000	0,007	0,000	0,03

Οι συγκεντρώσεις του υπολοιπούμενου δότη και των παραγώγων του είναι μηδαμινές ενώ δεν υφίσταται μεθανογένεση σε καμία από τις δύο καλλιέργειες. Μπορούμε

συνεπώς να συμπεράνουμε ότι ήταν σαφής η επικράτηση του VC, ως τελικού προϊόντος της ANΑΠ. Στην MS1 μάλιστα φαίνεται ότι στο τέλος του πειράματος δεν έφτασε η αποχλωρίωση σε VC με αποτέλεσμα να υπάρχει και υπολλειματικό cisDCE. Οι καλλιέργειες επέδειξαν παρόμοια συμπεριφορά αποχλωρίωσης, με το δείκτη n_{chloride} να έχει κατά μέσο όρο τιμές $2,009 \pm 0,07$ και $2,029 \pm 0,025$, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4-7: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια MS1.



Διάγραμμα 4-8: Διακύμανση των συγκεντρώσεων VC, cisDCE, ETH, MTH και VFAs στην καλλιέργεια MS2.

4.2.3 Απόδοση των μητρικών καλλιεργειών αποχλωρίωσης

Αναπόσπαστο κομμάτι της παρούσας μελέτης αποτελούν τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την παρατήρηση της συμπεριφοράς των μητρικών καλλιεργειών αποχλωρίωσης. Από τις τιμές που παρουσιάζονται μητρικές καλλιέργειες αποχλωρίωσης, γίνεται αντιληπτό ότι η παρουσία των θεικών ιόντων επηρεάζει τη διαδικασία σε χαμηλό ωστόσο βαθμό. Αυξανόμενης παρόλα αυτά της συγκέντρωσης των θεικών μειώνεται η αποτελεσματικότητα της αποχλωρίωσης – μέχρι το στάδιο που παράγεται το VC, γεγονός που γίνεται αντιληπτό και από την παρουσία του cis-DCE σε ορισμένες μετρήσεις.

Σύμφωνα και με τα πειραματικά αποτελέσματα από την Διδακτορική Διατριβή της Αντωνίου Κ. (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), η παρουσία των θεικών ιόντων επηρεάζει την αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις (30 mg/l). Στη συνέχεια η επίδρασή τους δεν φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά μειώνεται μέχρι τα 1100 mg/l. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από την σύγκριση των τιμών του συντελεστή ολοκλήρωσης της αποχλωρίωσης n_{chloride} ο οποίος στα πειράματα της Αντωνίου ξεκινά από 2,16 για τις καλλιέργειες χωρίς θεικά και φτάνει στο 1,97 για τις καλλιέργειες με 1100 mg/l θεικών. Αντίστοιχα και στην περίπτωση των πειραμάτων της παρούσας μελέτης η διαφοροποίηση που προκύπτει είναι αμελητέα, με τις τιμές να κυμαίνονται από 1,92 έως 2,21. Όπως παρατηρούμε οι διαφορές δεν είναι ιδιαίτερα έντονες αλλά σημαντικό ρόλο παίζει σε αυτό και η ποσότητα του δότη καθώς και ο χρόνος μεταξύ των τροφοδοσιών και των μετρήσεων που είναι αρκετά χαμηλός (7 ημέρες). Παρόλα αυτά, πρέπει να τονιστεί ότι επι της ουσίας το στάδιο στο οποίο επηρεάζεται η αποχλωριωτική διαδικασία είναι κατά βάση αυτό της μετάβασης από VC σε Αιθένιο αλλά και δευτερευόντως από cis-DCE σε VC – όπως φαίνεται και από τα πειράματα της τελευταίας αλλά και τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας εργασίας. Σε κάθε περίπτωση η απομάκρυνση του TCE ήταν πλήρης – ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης θεικών και της μεθανογένεσης, αλλά ο χρόνος επίτευξης της πλήρους αποχλωρίωσης αυξανόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των θεικών ιόντων.

Σημαντικό επίσης ρόλο διαδραματίζει η ύπαρξη θεικών και για τις περιπτώσεις παράλληλης μεθανογένεσης, καθώς, δεδομένου ότι τα βακτήρια θεικοαναγωγής

αποτελούν ανταγωνιστές ως προς την πρόσληψη ηλεκτρονίων η μεθανογένεση παρεμποδίζεται ή αναχαιτίζεται πλήρως – όπως στην περίπτωση μας, καθώς και τα πειράματα της Αντωνίου Κ. (μη δημοσιευμένα δεδομένα) όπου η αναχαιτίση παρατηρείται ακόμα και στα πειράματα με 70 mg/l θεικών ιόντων.

Πίνακας 4-10: Καταναλισκόμενες ποσότητες θεικών ιόντων στις μητρικές καλλιέργειες.

	LS1	LS2	MS1	MS2
Μέσος όρος (mg/l)	57,7	63,1	64,3	65,8
Τυπική απόκλιση (mg/l)	23,5	22,6	26,8	23,1
Διάστημα Εμπιστοσύνης (mg/l)	9,8	11,4	11,7	9,1
Μέσος όρος (mM)	0,60	0,66	0,67	0,69
Διάστημα Εμπιστοσύνης (mM)	0,10	0,12	0,12	0,09

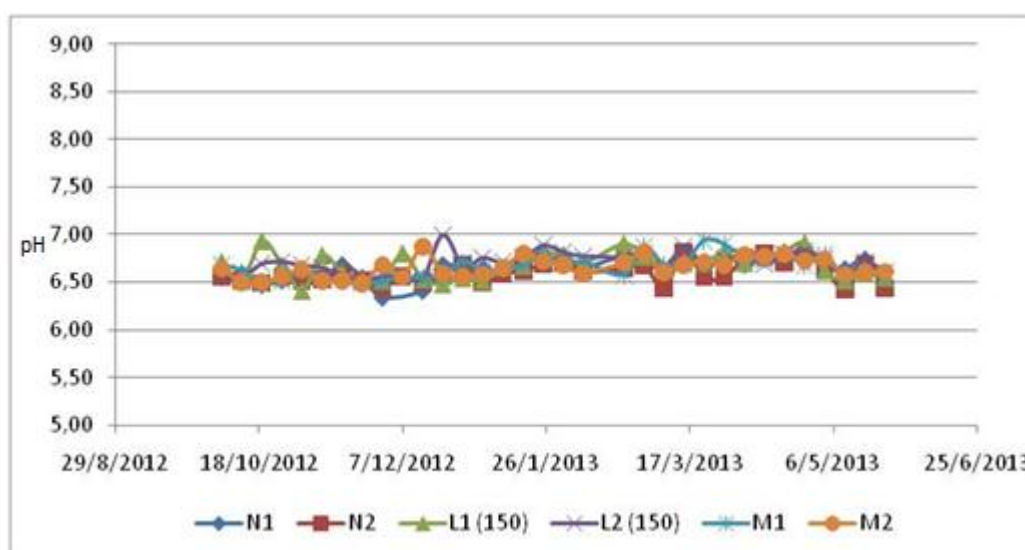
Ενδεικτικά, θα πρέπει να αναφερθεί ότι 1 mol σουλφιδίων φυσιολογικά αντιστοιχεί σε 1 mol θεικών ιόντων, σενάριο που αποδεικνύεται εν μέρει και στη δική μας εφαρμογή καθώς ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των θεικών κυμαίνεται από 0,60 έως 0,69 και ο αντίστοιχος μέσος όρος της ονομαστικής συγκέντρωσης των σουλφιδίων καλύπτει το διάστημα 0,62 – 0,74 (όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα – Πίνακας 4-10). Ενδιαφέρον παρουσιάζει ακόμη το γεγονός ότι η κατανάλωση των θεικών ιόντων σε όλες τις καλλιέργειες – ανεξαρτήτως της προστιθέμενης ποσότητας θεικών, είναι περίπου η ίδια, που σημαίνει ότι μάλλον τα θεικά που καταναλώνονται/απομακρύνονται επηρεάζουν την αναγωγική αποχλωρίωση λόγω ανταγωνισμού για το δότη ηλεκτρονίων, φαινόμενο που περιγράφηκε και από τους Pantazidou et al., (2011).

Σε γενικές γραμμές όλες οι μητρικές καλλιέργειες παρουσιάζουν μεταξύ τους παρόμοια συμπεριφορά, με τις NS1-NS2 να έχουν ελαφρώς καλύτερη απόδοση (μεγαλύτερη παραγωγή ETH) ως προς την αποχλωρίωση, λόγω ασθενέστερου ανταγωνισμού για το δότη ηλεκτρονίων. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε με βάση τις εβδομαδιαίες μετρήσεις μας παρατίθενται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4-11: Μέσες συγκεντρώσεις και διαστήματα εμπιστοσύνης των τιμών των 7ήμερων κύκλων ΑΝΑΠ στα πειράματα μεγάλης διάρκειας με διαφορετικές συγκεντρώσεις θεικών ιόντων και δότη ηλεκτρονίων.

Καλλιέργεια	NS1-0	NS2-0	LS1-150	LS2-150	MS1-400	MS2-400
TCE (mM)	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000	0,000 ±0,000
cDCE (mM)	0,000±0,000	0,025±0,048	0,003 ±0,004	0,052 ±0,059	0,017 ±0,033	0,005 ±0,007
VC (mM)	0,490±0,037	0,437±0,031	0,524 ±0,017	0,481 ±0,060	0,517 ±0,036	0,525 ±0,02
ETH (mM)	0,067±0,036	0,115±0,033	0,034 ±0,008	0,011 ±0,004	0,024 ±0,010	0,022 ±0,008
METH (mM)	0,456±0,058	0,253±0,066	0,001 ±0,000	0,001 ±0,000	0,001 ±0,000	0,001 ±0,000
n _{chloride}	2,118±0,061	2,206±0,055	2,053 ±0,023	1,92 ±0,12	2,009 ±0,07	2,03 ±0,025
ΔSO ₄ ²⁻ (mM)	-	-	0,6 ±0,10	0,66 ±0,12	0,67 ±0,12	0,69 ±0,09
S ²⁻ (mM)	-	-	0,62 ±0,06	0,65 ±0,06	0,70 ±0,09	0,74 ±0,10
ButA (mM)	0,000±0,000	0,003±0,002	0,001 ±0,001	0,000 ±0,000	0,000 ±0,001	0,000 ±0,000
AcA (mM)	0,154±0,069	1,334±0,194	0,048 ±0,019	0,006 ±0,003	0,002 ±0,002	0,001 ±0,001
TSS (mg/l)	28,5±2,26	23,3±2,55	24,8 ±6,65	28,1 ±5,39	29,3 ±2,55	28,2 ±2,4
VSS (mg/l)	22,6±2,17	18,9±1,91	21,3 ±5,3	23,2 ±2,9	26,2 ±2,41	25,0 ±2,56
Πρωτεΐνες (mg/l)	10,3±4,32	7,0±2,86	13,2 ±5,2	14,1 ±3,2	13,3 ±2,27	14,0 ±2,21

Τέλος, όσον αφορά το pH στις μητρικές καλλιέργειες, αυτό διατηρούνταν σε γενικές γραμμές στα ίδια επίπεδα, με μικρές διακυμάνσεις όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα. Το pH θα πρέπει σε αυτού του είδους τις καλλιέργειες να κυμαίνεται μεταξύ 6-8 καθώς σε αντίθετη περίπτωση είναι πιθανό να αναχαιτιστεί μερικώς ή πλήρως η διαδικασία της αποχλωρίωσης καθώς υπάρχει ο περιοριστικός παράγοντας ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Harkness et al., 2012).



Διάγραμμα 4-9: Διακύμανση της τιμής του pH για όλες τις μητρικές καλλιέργειες.

Πίνακας 4-12: Στατιστική ανάλυση των τιμών του pH των μητρικών καλλιιεργειών.

	N1	N2	L1 (150)	L2 (150)	M1	M2
Μέσος Όρος	6,64	6,60	6,67	6,71	6,67	6,66
Τυπική Απόκλιση	0,12	0,11	0,14	0,11	0,12	0,10
Διάστημα	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,03
Εμπιστοσύνης						

4.3 Παρουσίαση και σχολιασμός των πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch)

Στο πλαίσιο της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας (batch) που στόχος τους ήταν:

A) Η διερεύνηση του ρυθμού της αναγωγικής αποχλωρίωσης σε διαφορετικές δόσεις του δότη ηλεκτρονίων.

B) Η διερεύνηση του ρυθμού εισπίεσης στην απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης με προσθήκη υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων.

Γ) Η διερεύνηση του ρυθμού της αναγωγικής αποχλωρίωσης με 150 mg/lt θειικά ιόντα.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές μεταξύ τους χρονικές στιγμές με υλικό που προερχόταν από τις μητρικές καλλιέργειες NS1-NS2 και LS1-LS2, όπως περιγράφεται στο πειραματικό πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε στο 3^ο κεφάλαιο.

Πίνακας 4-13: Τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας που διεξήχθησαν ήταν:

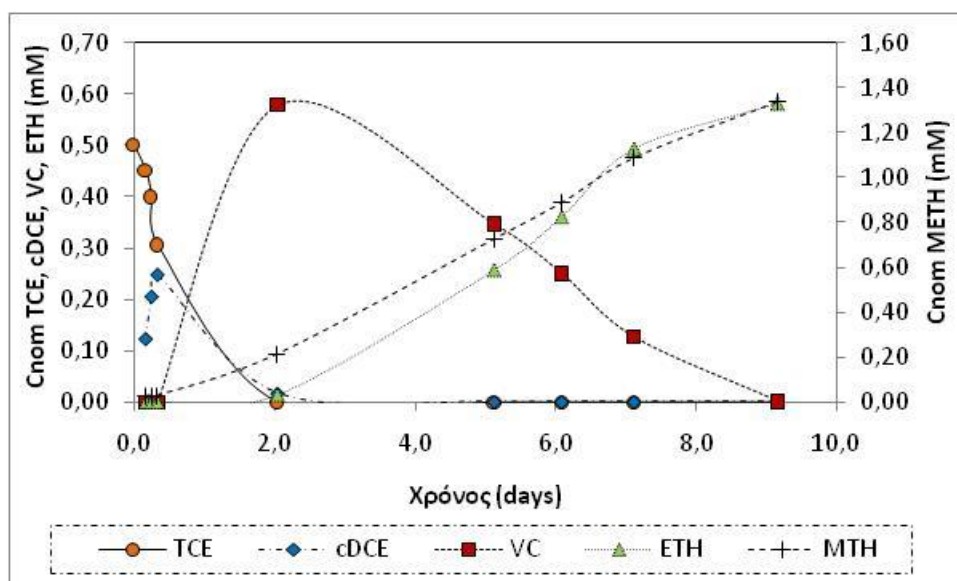
Όνομα αντιδραστήρα	Δότης ηλεκτρονίων			Θειικά ιόντα			Χλωροαιθυλένια		
	mM	mg/lt	meq/lt	mM	mg/lt	meq/lt	mM	mg/lt	meq/lt
A) Διερεύνηση ρυθμού αναγωγικής αποχλωρίωσης σε διαφορετικές δόσεις δότη ηλεκτρονίων									
N12-QMED	2,2	194,5	8,8	<0,005	<0,5	<0,042	0,5	65,7	3
	ButA	ButA	ButA	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	TCE	TCE	TCE
N12-MED	3	264,3	12	<0,005	<0,5	<0,042	0,5	65,7	3
	ButA	ButA	ButA	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	TCE	TCE	TCE
N12-HED	9,1	800,0	36,3	<0,005	<0,5	<0,042	0,5	65,7	3
	ButA	ButA	ButA	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	TCE	TCE	TCE
B) Προσθήκη υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές									
N12-7DHyd	0,3 ButA + 3 H ₂ (7)	26,4 ButA + 6,0 H ₂ (7)	1,2 ButA + 6 H ₂ (7)	<0,005	<0,5	<0,042	0,5	65,7	3
				SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	TCE	TCE	TCE
Γ) Αναγωγή 150 mg/lt θεικών ιόντων									
L12-LED	0,3	26,4	1,2	1,56	150	12,5	0,5	65,7	3
	ButA	ButA	ButA	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	TCE	TCE	TCE
L12-QLED	0,92	55,2	7,4	1,56	150	12,5	0,5	65,7	3
	ButA	ButA	ButA	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	TCE	TCE	TCE
L12-MED	3	264,3	12	1,56	150	12,5	0,5	65,7	3
	ButA	ButA	ButA	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	TCE	TCE	TCE
L12-HED	9,1	800,0	36,3	1,56	150	12,5	0,5	65,7	3
	ButA	ButA	ButA	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	TCE	TCE	TCE

Όλοι οι αντιδραστήρες λειτουργούσαν και συντηρούνταν εις διπλούν και η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μίγμα από τις μητρικές καλλιέργειες NS (N12-χωρίς θειικά ιόντα) και LS (L12-150 mg/lt θειικά ιόντα).

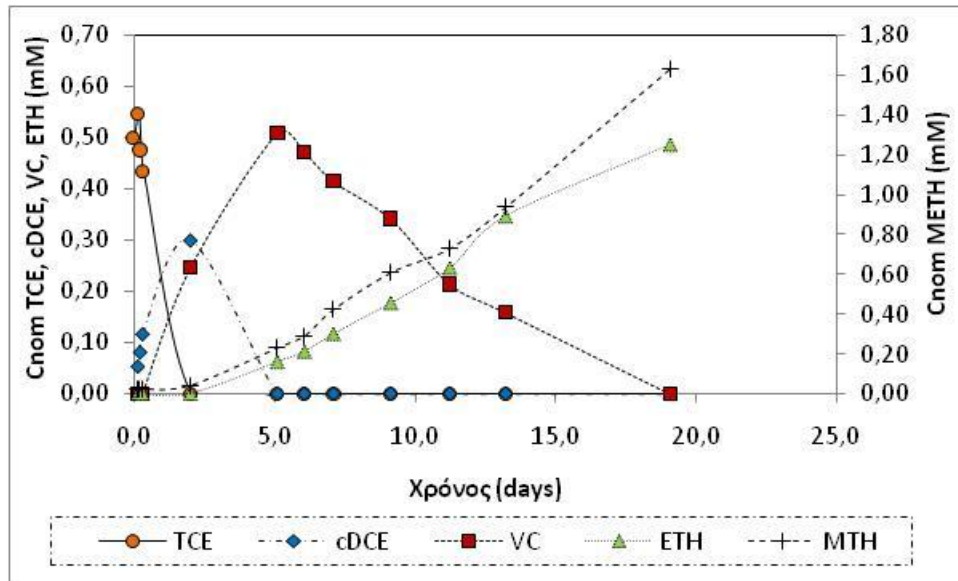
4.3.1 Πειράματα διερεύνησης ρυθμού αναγωγικής αποχλωρίωσης σε διαφορετικές δόσεις δότη ηλεκτρονίων

Τα πειράματα αυτά ήταν ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) QMED, MED και HED, που διακρίνονται βάσει της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων που προστέθηκε (βουτυρικό οξύ) και επι της ουσίας ήταν «σχεδόν μέσου δότη», «μέσης ποσότητας δότη» και «υψηλής ποσότητας δότη», αντίστοιχα.

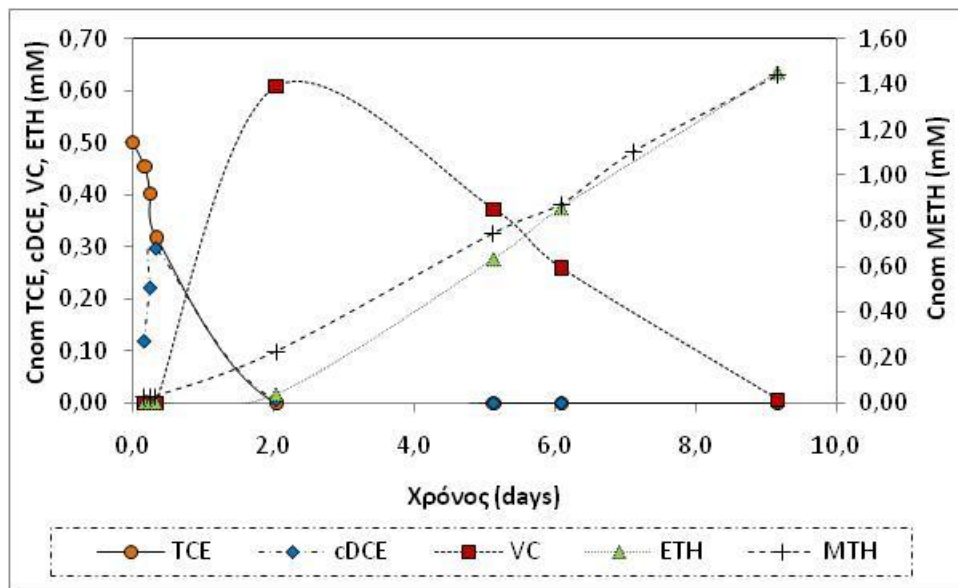
Για τη διερεύνηση του ρυθμού της αναγωγικής αποχλωρίωσης σε διαφορετικές δόσεις δότη ηλεκτρονίων πειράματα διεξήχθησαν με 0,5 mM TCE και τρεις δόσεις βουτυρικού οξέος. Οι τρεις δόσεις που επιλέχθηκαν ήταν 3 mM (N1,2-MED), 9,1 mM (N1,2-HED) βουτυρικού οξέος και 2,2 mM (N1,2-QMED). Τα παρακάτω διαγράμματα αναπαριστούν την επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και της μεθανογένεσης σε σχέση με το χρόνο. Από τα γραφήματα έχουν παραλειφθεί οι τιμές του 1,1-DCE και του trans-DCE καθώς αντιπροσώπευαν ποσοστά περίπου στο 1% του συνόλου των χλωροαιθυλενίων.



Διάγραμμα 4-10: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα N1,2-MED (3 mM But).



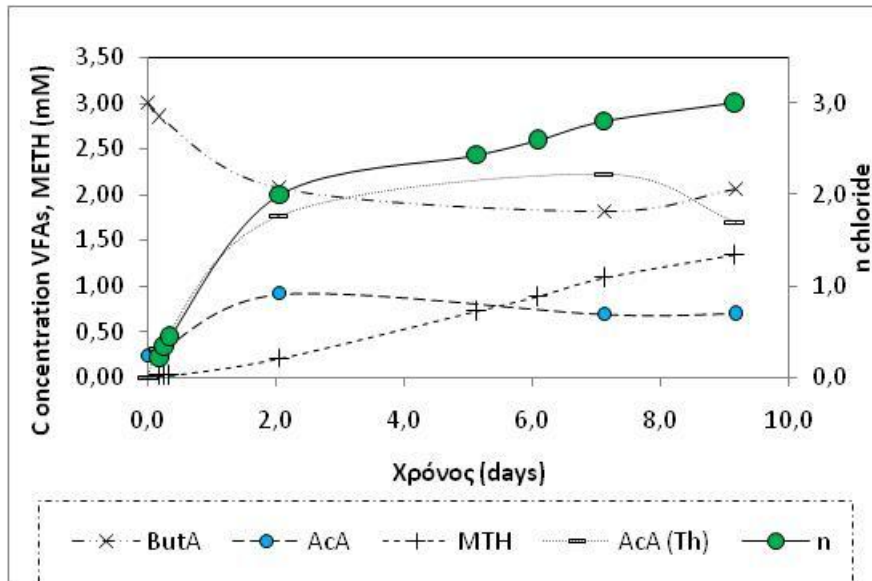
Διάγραμμα 4-11: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα N1,2-HED (9,1 mM But).



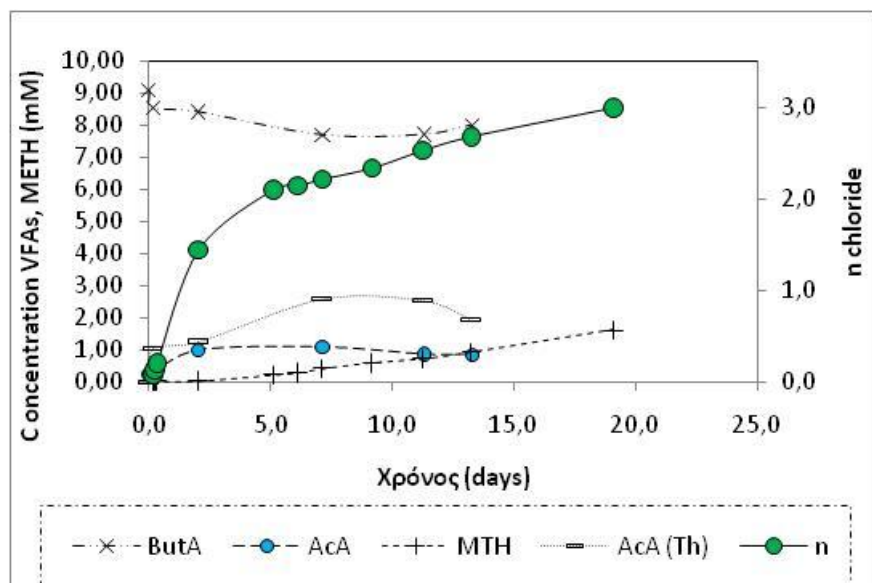
Διάγραμμα 4-12: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα N1,2-QMED (2,2 mM But).

Από τα παραπάνω διαγράμματα (4-10, 4-11 και 4-12) παρατηρούμε ότι τα πειράματα με μέσο δότη και σχεδόν μέσο δότη συμπεριφέρονται σχεδόν πανομοιότυπα και με αντίστοιχα αποτελέσματα παρά τη μικρή διαφορά τους στην προστιθέμενη ποσότητα δότη. Η αποχλωρίωση του TCE στις δύο αυτές καλλιέργειες ολοκληρώθηκε τη δεύτερη ημέρα του πειράματος, ενώ η πλήρης αναγωγική αποχλωρίωση σε αιθέριο απαιτήσε 9,2 ημέρες για να πραγματοποιηθεί ενώ παράχθηκε και περίπου η ίδια

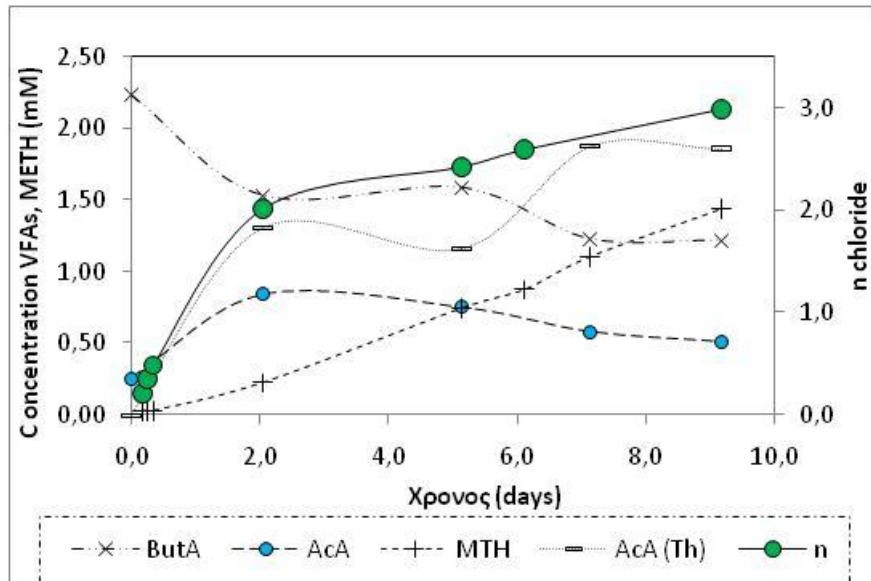
ποσότητα μεθανίου. Παράλληλα, φαίνεται από τη σύγκριση των πειραμάτων με μέση και με υψηλή δόση δότη ηλεκτρονίων ότι ενώ φυσιολογικά η αυξημένη ποσότητα βουτυρικού οξέως (δότη ηλεκτρονίων) θα έπρεπε να οδηγήσει σε ταχύτερες διεργασίες αποχλωρίωσης, εν τέλει, στην περίπτωση μας παρατηρήθηκε μια μικρή καθυστέρηση μετατροπής του τριχλωροαιθυλενίου (TCE) σε διχλωροαιθυλένιο (cis-DCE), η οποία μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη ποσότητα βουτυρικού οξέως που εισήχθη στο πείραμα. Στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε υστέρηση στην ολοκλήρωση της αποχλωρίωσης στο στάδιο του VC προς αιθένιο. Συγκριτικά με τις άλλες δύο περιπτώσεις δότη που εξετάσαμε η συγκεκριμένη συγκέντρωση (9,1 mM But) βρίσκεται σε μειονεκτική θέση καθώς η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 19 περίπου ημέρες έναντι των περίπου 9 που απαιτήθηκε στις εναλλακτικές καλλιέργειες. Ακόμη, στο πείραμα με αυξημένο δότη ηλεκτρονίων παρατηρείται και μικρότερος ρυθμός μεθανογένεσης. Η υστέρηση αυτή είναι εμφανής και από τους ρυθμούς αποχλωρίωσης που υπολογίστηκαν και ήταν $-0,0865 \text{ mM VC/day}$ για την καλλιέργεια μέσου δότη ηλεκτρονίων, $-0,0836 \text{ mM VC/day}$ για την καλλιέργεια σχεδόν μέσου δότη και $-0,0446 \text{ mM VC/day}$ για την καλλιέργεια υψηλής ποσότητας δότη ηλεκτρονίων. Μία πιθανή αιτία εμφάνισης του φαινομένου αυτού είναι η μη ικανότητα των αποχλωριωτικών μικροοργανισμών να προσαρμόσουν τη μέγιστη ταχύτητα κατανάλωσης υποστρώματος τους ή την ικανότητα πρόσληψης του δότη, όπως περιγράφεται από τους Ballapragada et al., (1997) ενώ δεν αποκλείεται λόγω της υψηλής συγκέντρωσης του να λειτούργησε και αναχαιτιστικά. Τα παρακάτω διαγράμματα (4-13, 4-14 και 4-15) παρουσιάζουν τη συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων, του μεθανίου και το ρυθμό της αναγωγικής αποχλωρίωσης ως προς το χρόνο. Οι τιμές του θεωρητικού οξικού οξέος (AcA(Th)) έχουν υπολογιστεί με βάση την κατανάλωση του βουτυρικού οξέος, δηλαδή 1 mol καταναλισκόμενου βουτυρικού οξέος ισοδυναμεί με 2 mol παραγόμενου οξικού οξέος (θεωρητική τιμή οξικού οξέος). Από αυτά έχει παραλειφθεί η απεικόνιση του προπιονικού και ισοβουτυρικού οξέος λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής συγκέντρωσης τους ($<1\%$ του αρχικού βουτυρικού οξέος).



Διαγραμμα 4-13: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα N1,2-MED (3 mM But).



Διαγραμμα 4-14: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα N1,2-HED (9,1 mM But).



Διαγραμμα 4-15: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα N1,2-QMED (2,2 mM But).

Παρατηρούμε ότι και στις τρεις περιπτώσεις η αντίδραση της αποχλωρίωσης ολοκληρώνεται, σε διαφορετικά παρόλα αυτά χρονικά πλαίσια. Όπως φαίνεται, το βουτυρικό οξύ που προσθέτουμε μετασχηματίζεται κατά βάση σε οξικό και ταυτόχρονα ξεκινά η δράση των μεθανογόνων μικροοργανισμών.

Στις περιπτώσεις του μέσου και του υψηλού δότη ηλεκτρονίων παρατηρούμε ότι μέσα στις πρώτες λίγες ώρες καταναλώνεται ένα μέρος της ουσίας που προστέθηκε και στη συνέχεια δεν υπάρχουν έντονες αυξομειώσεις και παραμένει σχετικά σταθερός. Παράλληλα, η παραγωγή του οξικού οξέος ήταν εμφανής αλλά σε συγκεντρώσεις που δεν ξεπέρασαν το 1 mM ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρότι και στα τρία πειράματα καταναλώθηκε σχετικά μεγάλο μέρος του βουτυρικού ανιόντος, αυτό δεν χρησιμοποιήθηκε από τους αποδέκτες ηλεκτρονίων. Σχετικά έντονη είναι η παρουσία της μεθανογένεσης η οποία και ξεκινά από τις πρώτες κιόλας ώρες και συνεχίζεται με ταχείς ρυθμούς ως το τέλος της αποχλωρίωσης που είναι και το τέλος του πειράματος μας.

Συνολικά, βάσει των υπολογισμών μας η ποσότητα δότη που έχει καταναλωθεί ήταν: 13,3 meq/l για το N1,2-MED, 14,76 meq/l για το N1,2-HED και 16,51 meq/l για το N1,2-QMED.

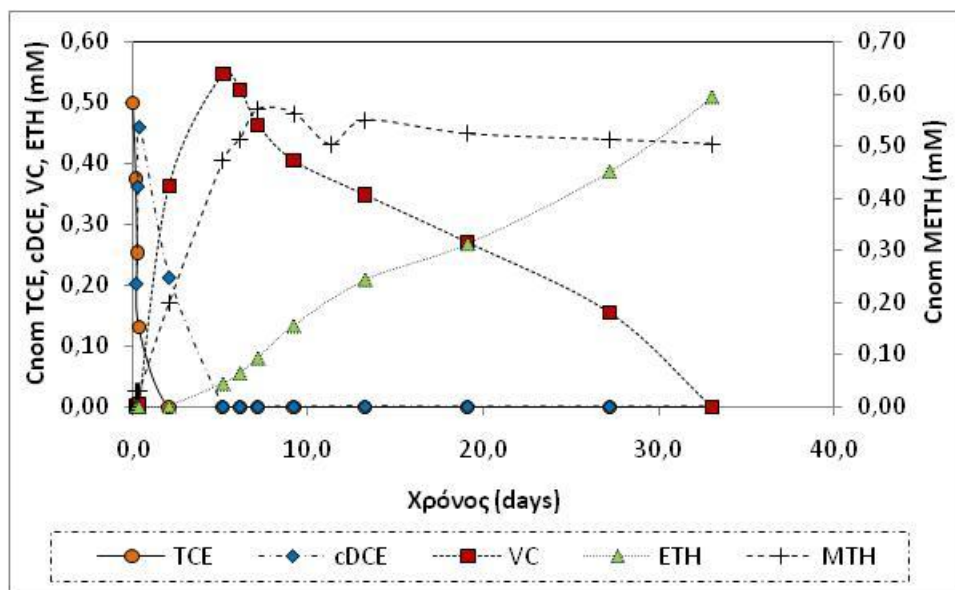
Τέλος, όσον αφορά τα ποσοστά χρήσης των πηγών ηλεκτρονίων, παρατηρήσαμε ότι:

- το N1,2-MED χρησιμοποίησε ως δότη ηλεκτρονίων κατά 74% το οξικό οξύ και κατά 26% το βουτυρικό με το 75% του συνόλου του δότη να χρησιμοποιείται για μεθανογένεση και το υπόλοιπο 25% για αποχλωρίωση
- το N1,2-HED χρησιμοποίησε ως δότη ηλεκτρονίων κατά 73% το οξικό οξύ και κατά 27% το βουτυρικό με το 82% του συνόλου του δότη να χρησιμοποιείται για μεθανογένεση και μόλις 18% για την αποχλωρίωση
- το N1,2-QMED χρησιμοποίησε ως δότη ηλεκτρονίων κατά 78% το οξικό οξύ και κατά 22% το βουτυρικό με το 75% του συνόλου του δότη να χρησιμοποιείται για μεθανογένεση και το υπόλοιπο 25% για αποχλωρίωση.

Τα ισοζύγια μάζας για τα παραπάνω πειράματα έκλεισαν αρκετά ικανοποιητικά εμφανίζοντας ανάκτηση 107%, 108% και 93% αντίστοιχως για κάθε ένα από τα παραπάνω.

4.3.2 Πειράματα προσθήκης υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές

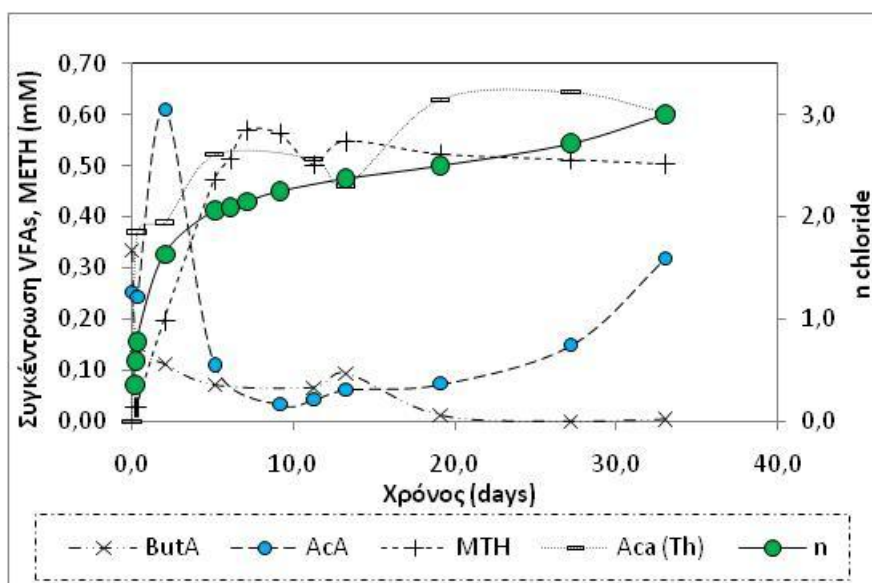
Η δεύτερη σειρά πειραμάτων που εκτελέστηκε ήταν αυτή της άμεσης χρήσης υδρογόνου σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Στο παρόν δείγμα (N12-7DHyd) προσθέτονταν 2,74 ml ButA (την 1^η μέρα) και 7,35 ml H₂ (την 7^η μέρα). Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε 0,3 mM Βουτυρικού οξέος και 3 mM Υδρογόνου, αντίστοιχα.



Διάγραμμα 4-16: Γραφική αναπαράσταση της αποχλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα N12-7DHyd (2,74 μl ButA και 7,35 ml H₂).

Από το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 4-16) παρατηρούμε ότι ολο το τριχλωροαιθυλένιο μετατράπηκε σε λιγότερο χλωριωμένη ένωση (cis-DCE, VC) από τις πρώτες κιόλας ημέρες ακόμα και η πριν την προσθήκη του H₂. Η πλήρης αναγωγική αποχλωρίωση επιτεύχθηκε στις 33 μέρες – μετά την προσθήκη δηλαδή του υδρογόνου το οποίο και φαίνεται να παίζει ρόλο στην απόδοση της διεργασίας. Σε παρεμφερές πείραμα της Κ. Αντωνίου (μη δημοσιευμένα δεδομένα) ολο το τριχλωροαιθυλένιο μετατράπηκε σε αιθένιο σε 6 μέρες όταν το υδρογόνο προστειθόταν την 1^η μέρα, ενώ όταν προστειθόταν τη 14^η μέρα υδρογόνο η πλήρης αναγωγική αποχλωρίωση επιτεύχθηκε στις 25 μέρες. Σε πείραμα όπου δεν προστιθόταν υδρογόνο (δότης ηλεκτρονίων 0,3 mM βουτυρικού οξέος) ακόμα και την 160^η μέρα δεν είχε επιτευχθεί πλήρης αποχλωρίωση αφού παρέμενε περίπου το 10% του βινυλοχλωριδίου (VC).

Παρακάτω παρουσιάζονται διαγράμματα που δείχνουν τη συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων και του μεθανίου ως προς το χρόνο. Από αυτά έχει παραλειφθεί η απεικόνιση του προπιονικού και ισοβουτυρικού οξέως λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής συγκέντρωσής τους (<1% του αρχικού βουτυρικού οξέος).



Διαγραμμα 4-17: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα N12-7DHyd (2,74 μl ButA και 7,35 ml H₂).

Από το παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 4-17) γίνεται αντιληπτό ότι κατά τις πρώτες ημέρες της λειτουργίας του πειράματος οι μεταβολές στη συγκέντρωση του δότη ηλεκτρονίων είναι ιδιαίτερα έντονες. Έτσι, παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος μειώνεται δραστικά από τις πρώτες 5 κιόλας ημέρες και εκμηδενίζεται περίπου στις 20 ημέρες – γεγονός που συμβαδίζει και με τις παρατηρήσεις των Antoniou et al. (Not Published Data). Παράλληλα στο αρχικό στάδιο μέχρι και τον εγκλιματισμό των μεθανογόνων μικροοργανισμών παρατηρείται συσσώρευση οξικού οξέως η οποία έφτασε τα 0,6 mM, το οποίο στη συνέχεια εκμεταλεύονται οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί. Ωστόσο, μετά την πλήρη κατανάλωση του οξικού οξέος και παρα την εισπύση του υδρογόνου κατά την 7^η ημέρα του πειράματος, παρατηρείται μια σταδιακή μείωση του ρυθμού της μεθανογένεσης με επακόλουθη την αύξηση του οξικού οξέως αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Η αύξηση αυτή φαίνεται ότι προήλθε με την προσθήκη του υδρογόνου (οξικογένεση), ενώ παράλληλα δεν φαίνεται να καταναλώθηκε το υδρογόνο για την παραγωγή του μεθανίου, αποτέλεσμα που συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις.

Η συμβολή του οξικού οξέος ως δότη στο παρόν πείραμα ήταν 61% σε σχέση με το βουτυρικό οξύ που ήταν 17%, ενώ το υπολειπόμενο 22% θεωρείται ότι ήταν το υδρογόνο. Τέλος, το 57% της συνολικής ποσότητας του δότη καταναλώθηκε από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς και το υπόλοιπο 43% για την αποχλωριωτική

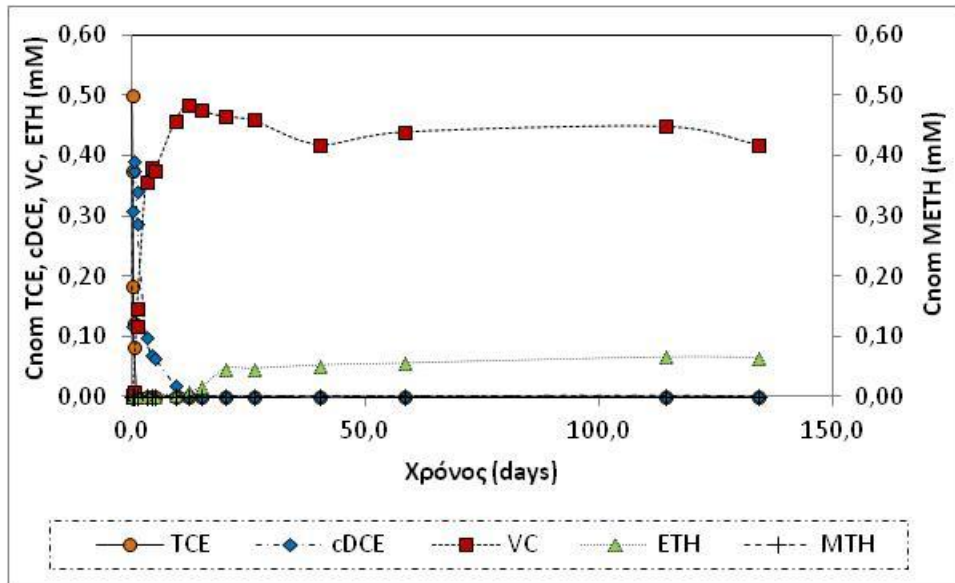
διαδικασία.

Η ταχύτητα μείωσης του TCE για το συγκεκριμένο πείραμα ήταν $-1,4585 \text{ mM/day}$ και του VC $-0,015 \text{ mM/day}$, ενώ η ταχύτητα αποχλωρίωσης για τα πείραματα της Αντωνίου Κ. ήταν $-0,012 \text{ mM VC/day}$ χωρίς προσθήκη υδρογόνου, ήταν $-0,142 \text{ mM VC/day}$ με την προσθήκη δόση από την πρώτη ημέρα και τέλος με προσθήκη υδρογόνου τη 14^η ημέρα ήταν $-0,031 \text{ mM VC/day}$ (Antonίου et al., Not published data).

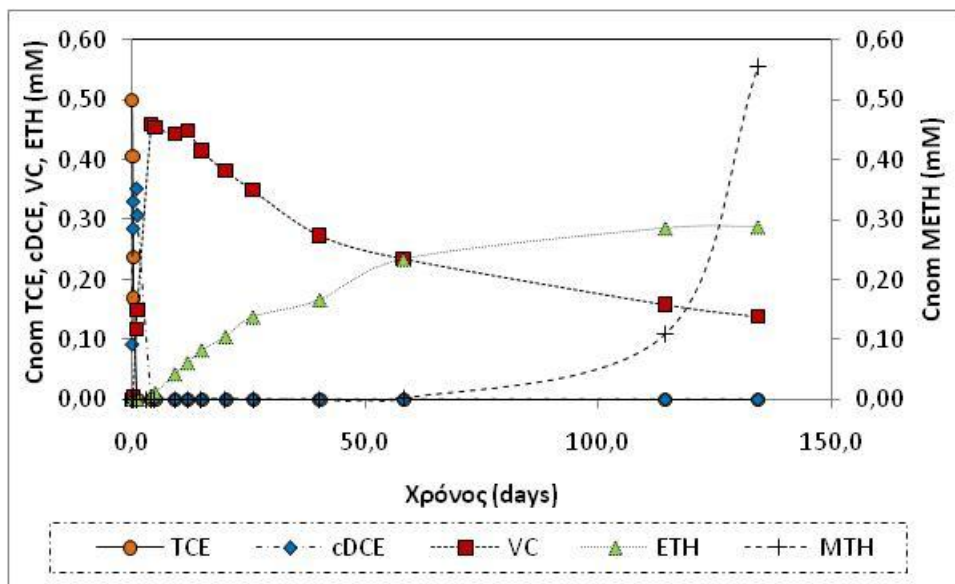
4.3.3 Πειράματα διερεύνησης της επίδωσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης παρουσία θεικών ιόντων

Το τελευταίο από τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας που θα παρουσιαστούν στην παρούσα εργασία είναι αυτό του ελέγχου καλλιεργείων που περιείχαν 150 mg/l θεικών ιόντων.

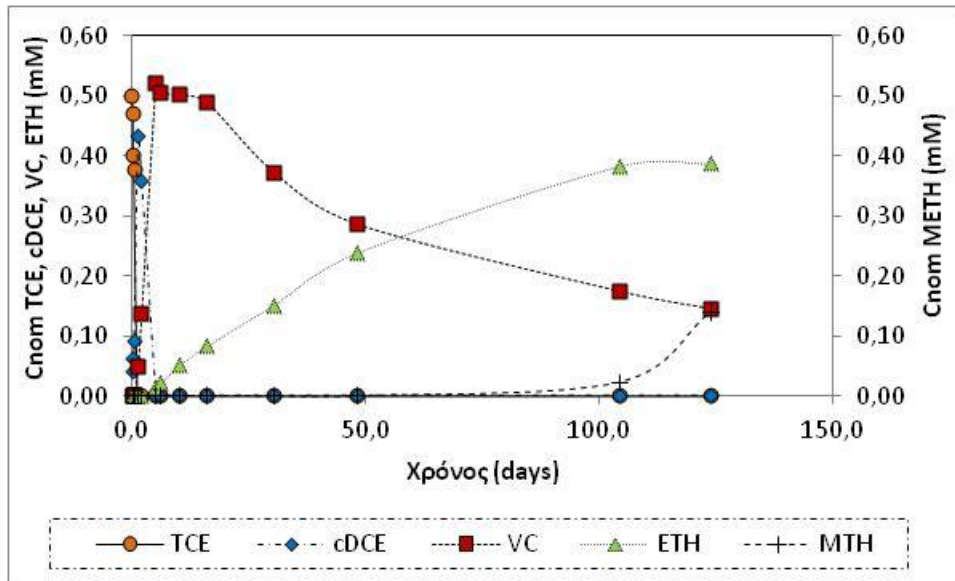
Για τη διερεύνηση της επίτευξης της πλήρους αναγωγικής αποχλωρίωσης με 150 mg/l θεικών ιόντων προετοιμάστηκαν τέσσερα πειράματα τα οποία είχαν αρχική συγκέντρωση TCE $0,5 \text{ mM}$ και μεταβαλλόμενη ποσότητα δόση ηλεκτρονίων – από $0,3 \text{ mM}$ βουτυρικού οξέος έως $9,1 \text{ mM}$ βουτυρικού οξέος. Στα ακόλουθα διαγράμματα παρουσιάζεται η επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και της μεθανογένεσης σε σχέση με το χρόνο.



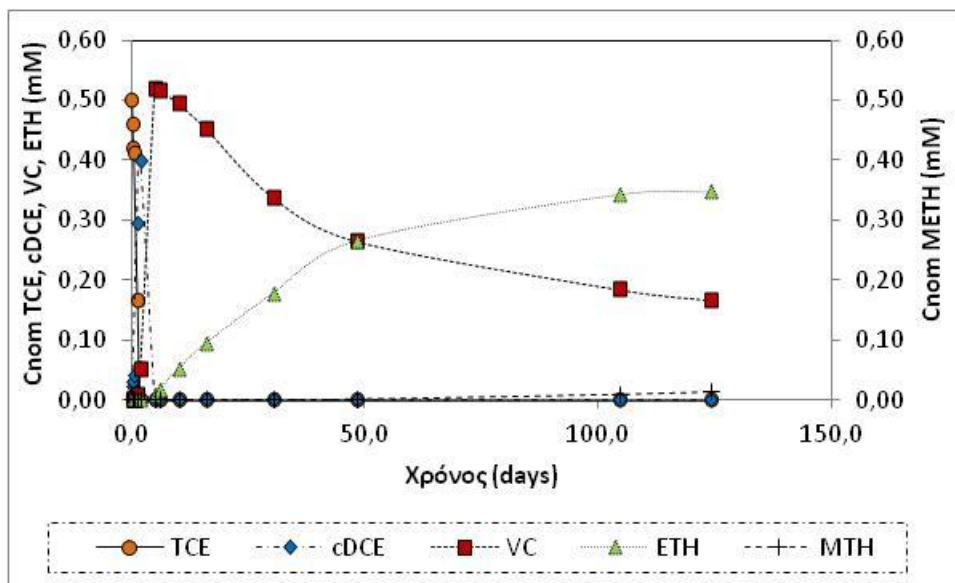
Διάγραμμα 4-18: Γραφική αναπαράσταση της απογλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα L12-LED (0,3 mM But).



Διάγραμμα 4-19: Γραφική αναπαράσταση της απογλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα L12-QLED (0,92 mM But).



Διάγραμμα 4-20: Γραφική αναπαράσταση της απογλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα L12-MED (3 mM But).



Διάγραμμα 4-21: Γραφική αναπαράσταση της απογλωριωτικής διαδικασίας και της μεθανογένεσης στο πείραμα L12-HED (9,1 mM But).

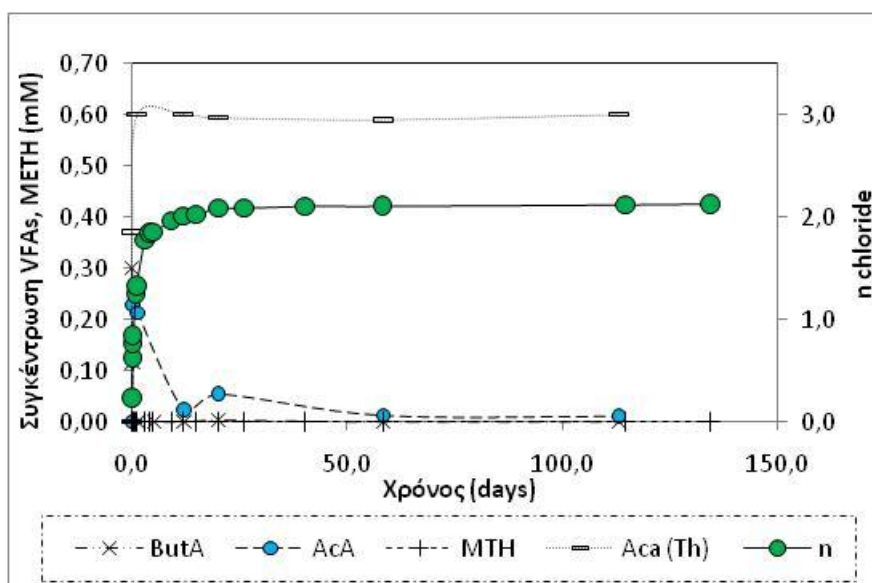
Στην πρώτη περίπτωση (Διάγραμμα 4-17) όπου η συγκέντρωση του δότη ηλεκτρονίων είναι στο χαμηλότερο επίπεδο του πειράματος (0,3 mM) παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του TCE φθίνει κατά την πρώτη ημέρα, ενώ από την 12^η μέρα προκαλείται συσσώρευση VC. Το γεγονός αυτό μας κάνει κατανοητό ότι η αντίδραση προχωρά γρήγορα μέχρι και το στάδιο του βινυλοχλωριδίου. Παράλληλα παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση του αιθενίου από την 20^η περίπου ημέρα και μετά

διατηρείται σταθερή ενώ το μεθάνιο λόγω του έντονου ανταγωνισμού με τους αποθειωτές παρουσιάζει αμελητέα χαμηλές τιμές. Παράλληλα, φαίνεται ότι το μεγαλύτερο μέρος των θειικών ιόντων ανήχθηκε στις πρώτες τρεις μέρες του πειράματος (76%).

Σχετικά διαφοροποιημένη συμπεριφορά παρουσιάζει η καλλιέργεια L1,2-QLED στο οποίο ο δότης ηλεκτρονίων έχει επιλεγεί να είναι 0,92 mM – τριπλάσιος δηλαδή από την προηγούμενη περίπτωση, όπου σύμφωνα με το διάγραμμα 4-18 το TCE και το cis-DCE απομακρύνονται δίνοντας τη θέση τους στο VC για τις πρώτες 4-5 περίπου ημέρες και στη συνέχεια στο αιθέριο. Επίσης, φαίνεται ότι η θεικοαναγωγή επιτεύχθηκε κατά κύριο λόγο τις πρώτες ημέρες αφού η συγκέντρωση των θειικών ιόντων τους ήταν 0,34 mM την τρίτη μέρα του πειράματος. Όσον αφορά τη μεθανογένεση φαίνεται ότι έχουμε παραγωγή μεθανίου μετά τις 100 μέρες του πειράματος. Ακριβώς αντίστοιχες συμπεριφορές εμφανίζουν και οι καλλιέργειες L1,2-MED και L1,2-HED. Με τη μόνη διαφορά ότι στο πείραμα με υψηλή δόση δότη ηλεκτρονίων (L1,2-HED) δεν φαίνεται να είχε παραχθεί μεθάνιο μέχρι την 124^η μέρα του πειράματος.

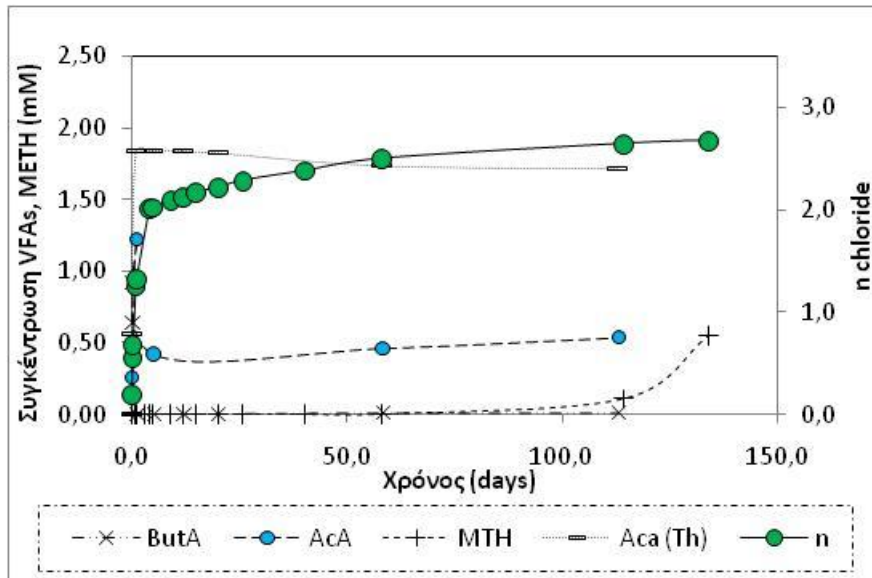
Σε κάθε περίπτωση έχοντας μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δότη ηλεκτρονίου αναμένουμε καλύτερη εξέλιξη της απογλωριωτικής διαδικασίας, το οποίο φαίνεται να ισχύει έως ένα σημείο, αφού το πείραμα με μέση συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων (3 mM But) φαίνεται να έχει την υψηλότερη παραγωγή αιθενίου ως την 124^η μέρα. Επίσης, η θεικοαναγωγή δεν φάνηκε να επηρεάστηκε πολύ από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις δότη ηλεκτρονίων αφού το 76-89% της αρχικής ποσότητας θειικών ιόντων ανήχθηκε τις πρώτες μέρες (3-5 μέρες), που υπήρχε ακόμα δότης ηλεκτρονίων.

Αντίστοιχα με τις προηγούμενες καλλιέργειες στο σημείο αυτό παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής της συγκέντρωσης των πτητικών λιπαρών οξέων και του μεθανίου.



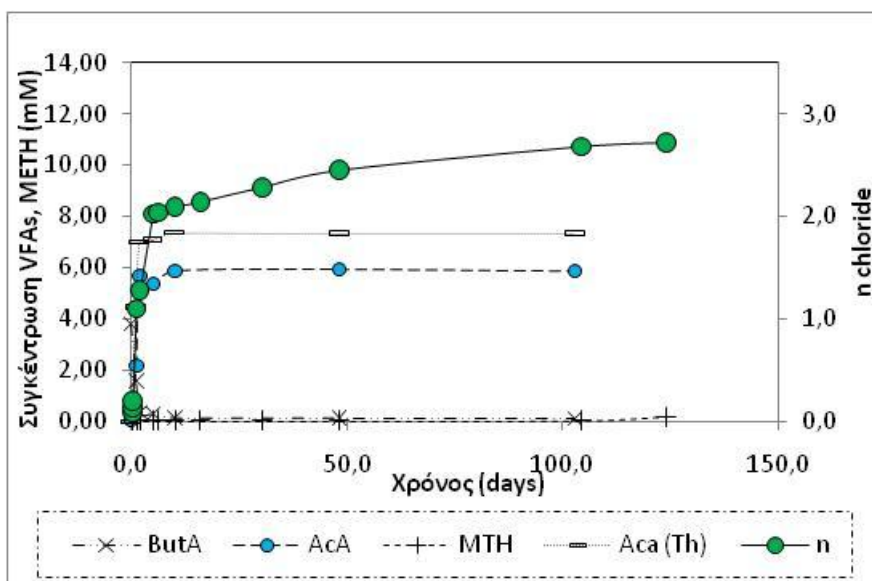
Διάγραμμα 4-22: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα L1,2-LED.

Από την παραπάνω γραφική απεικόνιση παρατηρούμε ότι στο συγκεκριμένο πείραμα ασυνεχούς τροφοδοσίας ο δότης ηλεκτρονίων εξαντλήθηκε άμεσα αφήνοντας παράλληλα μόνο χαμηλές συγκεντρώσεις οξικού οξέως που απέχουν αρκετά από το θεωρητικά αναμενόμενο. Λόγω της έλλειψης του δότη ηλεκτρονίων αμελητέα είναι και η μεθανογένεση ενώ ο συντελεστής ολοκλήρωσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης υποδεικνύει ότι αναμένεται να υπάρξει και παραγωγή αιθυλενίου αλλά σε χαμηλή συγκέντρωση. Θα πρέπει να τονιστεί ότι για λόγους ευκρίνειας ο άξονας των συγκεντρώσεων τόσο στο παραπάνω όσο και το ακόλουθο γράφημα, δεν προσαρμόστηκε στη μέγιστη δυνατή τιμή που έλαβε στο παρόν πείραμα (βλ. πειράματα L1,2-HED και 1,2-MED).



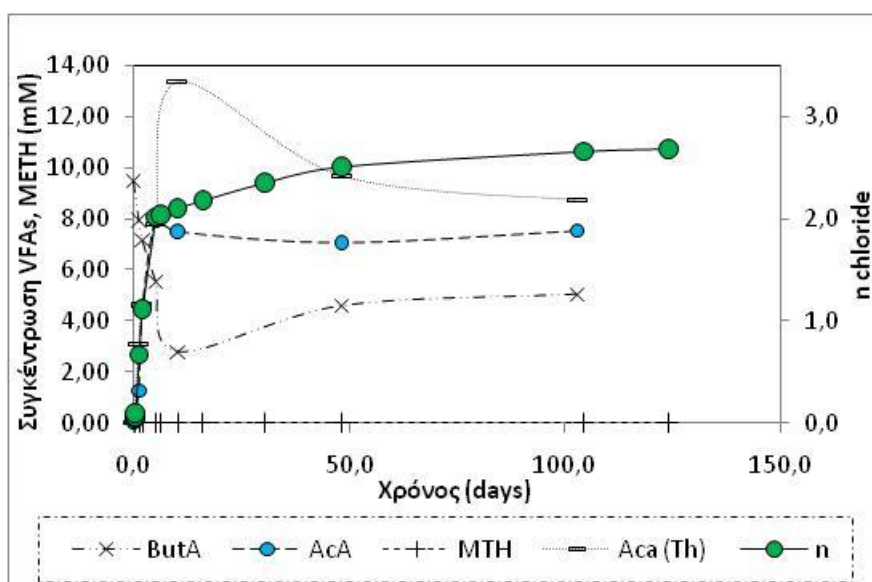
Διάγραμμα 4-23: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα L1,2-QLED.

Σχετικά καλύτερη είναι η πορεία των αποχλωρωτικών αντιδράσεων στο μικρόκοσμο L1,2-QLED, καθώς παρατηρούμε μεγαλύτερη ποσότητα οξικού οξέως με αναπόφευκτη συνέπεια και τη μεθανογένεση. Παρόλα αυτά, στην προκειμένη περίπτωση ο συντελεστής αποχλωρίωσης έχει αρκετά υψηλότερες τιμές που δείχνουν ότι πλησιάζει το στάδιο ολοκλήρωσης του πειράματος.



Διάγραμμα 4-24: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα L1,2-MED.

Από το παραπάνω γράφημα μπορούμε να εκτιμήσουμε ότι και αυτή η καλλιέργεια βρίσκεται στο τελικό στάδιο για την ολοκλήρωση της αποχλωρίωσης της δεδομένου ότι η τιμή του συντελεστή n είναι αρκετά υψηλή και με αυξητική τάση. Επιπλέον, λόγω προσθήκης μέσης ποσότητας δότη ηλεκτρονίων παρατηρείται συσσώρευση οξικού οξέως, με ταυτόχρονη παραγωγή μεθανίου.



Διάγραμμα 4-25: Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής της συγκέντρωσης του δότη ηλεκτρονίων στο πείραμα L1,2-HED.

Τα ίδια συμπεράσματα θα μπορούσαμε να εκφέρουμε και για το τελευταίο διάγραμμα (4-24) στο οποίο ωστόσο, λόγω της πολύ υψηλής δόσης δότη ηλεκτρονίων, υπάρχει υπολειπόμενο βουτυρικό οξύ.

Στο σημείο αυτό, κρίνεται ενδιαφέρον να γίνει μία σύγκριση των καλλιεργειών με παρουσία θεικών και αυτών που δεν περιείχαν. Ο παρακάτω πίνακας περιλαμβάνει τις ταχύτητες αποχλωρίωσης που προέκυψαν από το συγκεκριμένο πείραμα και δείχνει ξεκάθαρα ποια καλλιέργεια θα είχε συγκριτικό πλεονέκτημα.

Πίνακας 4-14: Οι ταχύτητες αποχλωρίωσης ανα στάδιο που προέκυψαν απο τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας που εκτελέσαμε.

	Batch ID	TCE	cDCE	cDCE	VC	VC	ETH
		mM/day	mM/day	mM/day	mM/day	mM/day	mM/day
Μη περιέχουσες θειικά	N12-MED	-0,8616	0,746	-0,1348		-0,0865	0,0917
	N12-HED	-0,5074	0,3782		0,0849	-0,0446	0,0343
	N12-QMED	-0,8144	1,0655			-0,0836	0,0875
Περιέχουσες θειικά	L12-LED	-1,0354	0,9942	-0,1104	0,1256	-0,0023	0,0016
	L12-QLED	-0,9963	1,0399	-0,2681	0,1918	-0,0045	0,0041
	L12-MED	-0,4552	0,3395	-0,0958	0,1118	-0,0056	0,0051
	L12-HED	-0,2896	0,2828	-0,1286	0,1373	-0,0062	0,006

Όπως παρατηρούμε, συγκρίνοντας τα πειράματα που είχαν την ίδια ποσότητα δότη η διαφορά στην ταχύτητα του TCE είναι της τάξης του 50% όταν περιέχονται 150 mg/lθ θεικών ιόντων. Επίσης, με την αύξηση του δότη ηλεκτρονίων φαίνεται να μειώνεται και η ταχύτητα κατανάλωσης του TCE. Όσον αφορά την ταχύτητα κατανάλωσης του VC φαίνεται ότι η διαφορά είναι σαφώς μεγαλύτερη όταν υπάρχουν θειικά ιόντα, μιας και η ταχύτητα μπορεί να μειωθεί κατά μια τάξη μεγέθους. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι το στάδιο αποχλωρίωσης που πρωτίστως επηρεάζεται απο την ύπαρξη θεικών ιόντων είναι αυτό της κατανάλωσης του VC και της παραγωγής αιθενίου. Τέλος, ενδιαφέρον από τον παραπάνω πίνακα παρουσιάζει και το φαινόμενο που αναλύθηκε στη βιβλιογραφική ανασκόπηση, δηλαδή της διαφοράς έως και κατά μία τάξη μεγέθους στην ταχύτητα αποχλωρίωσης ανάλογα με τα υπολοιπόμενα άτομα χλωρίου στο χλωροαιθυλένιο (Tiehm & Schmidt, 2011; Tandoi et al., 1994).

Κεφάλαιο 5^ο - Συμπεράσματα

Από την ανάλυση των παραπάνω πειραματικών αποτελεσμάτων και το συνδυασμό τους με την διεθνή βιβλιογραφία πάνω στο αντικείμενο, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

Απόδοση ως προς τη δόση δότη ηλεκτρονίων

- Η αποχλωριωτική διαδικασία προχωρούσε στο στάδιο του αιθενίου αλλά όχι πλήρως, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο σχετικά μικρό διαθέσιμο χρόνο μεταξύ των διαδοχικών τροφοδοσιών (7 ημέρες) και τη μη-επάρκεια του δότη ηλεκτρονίων. Σε κάθε περίπτωση έχοντας μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δότη ηλεκτρονίων αναμένουμε στις περισσότερες περιπτώσεις καλύτερη εξέλιξη της αποχλωριωτικής διαδικασίας χωρίς ωστόσο να γνωρίζουμε με σιγουριά εάν και κατά πόσο μπορεί να πραγματοποιηθεί πλήρης αποχλωρίωση χωρίς να προηγηθεί η εξάντληση των θεικών ιόντων. Σε περιπτώσεις πολύ υψηλών δόσεων δότη (διαφορετική ανά περίπτωση) η απόδοση της διαδικασίας επιδεινώνεται τόσο για την ANAP όσο και τη μεθανογένεση.
- Η μεθανογένεση επιδεινώνεται με την αύξηση της δόσης ηλεκτρονίων ενώ παράλληλα παρατηρείται και υψηλότερη κατανάλωση του ποσοστού του δότη για μεθανογένεση (75-82%). Ιδανική ποσότητα στην περίπτωση μας ήταν τα 2-3 mM Βουτυρικού οξέος καθώς ενόησαν τη διαδικασία και ταυτόχρονα ολοκλήρωσαν γρήγορα την αποχλωρίωση με αρκετά υψηλές ονομαστικές συγκεντρώσεις μεθανίου.
- Η θεικοαναγωγή δε φαίνεται να επηρεάζεται από τη ποσότητα του δότη ηλεκτρονίων, καθώς στις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, εξαντλείται η ίδια ποσότητα θεικών κατά τις 2-3 πρώτες ημέρες.

Απόδοση ως προς το είδος του δότη ηλεκτρονίων

- Η αναγωγική αποχλωρίωση ευνοείται τόσο παρουσία βουτυρικού οξέος όσο και υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων. Παρόλα αυτά πέρα από το βουτυρικό οξύ, δύναται να χρησιμοποιηθεί ως δότης και το οξικό όπως παρατηρήθηκε από τα πειράματά μας.
- Με τη μείωση της συγκέντρωσης του μεθανίου – που υποδεικνύει μειωμένη δραστηριότητα των μεθανογόνων, φάνηκε να υπάρχει αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος και αντίστροφα. Η τάση αυτή αποτελεί τον

κύριο λόγο για τον οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) για τον έλεγχο του είδους των μεθαγονόνων μικροοργανισμών τα οποία και επιβεβαίωσαν την οξικωτροφική τους προτίμηση.

- Παράλληλα, στο πείραμα όπου είχαμε προσθήκη υδρογόνου παρατηρούμε ότι το υδρογόνο έπαιξε σημαντικό ρόλο στην αποχλωριωτική διαδικασία καθώς συνέβαλε στο να ολοκληρωθεί ταχύτερα σε σχέση με αντίστοιχο πείραμα όπου δεν είχε προστεθεί (Αντωνίου Κ., μη δημοσιευμένα δεδομένα), καθώς η αποχλωριωτική διαδικασία ολοκληρώθηκε στις 33 ημέρες έναντι των 180 που απαιτήθηκαν στη δεύτερη περίπτωση. Επιπλέον, δεν ευνοεί τη μεθανογένεση καθώς η κατανομή του δότη σε αυτή τη περίπτωση ήταν 57% για μεθανογένεση και 43% για την αποχλωρίωση.

Απόδοση ως προς την ύπαρξη των θεικών ιόντων

- Οι μητρικές καλλιέργειες σε γενικές γραμμές παρουσιάζουν μεταξύ τους παρόμοια συμπεριφορά, με τις NS1-NS2 να έχουν ωστόσο σχετικά καλύτερη απόδοση (μεγαλύτερη παραγωγή ETH) ως προς την αποχλωρίωση, λόγω ασθενέστερου ανταγωνισμού για το δότη ηλεκτρονίων.
- Η επίδραση που παρατηρείται στην αναγωγική αποχλωρίωση παρουσία θεικών είναι παρόλα αυτά αρνητική όπως παρατηρείται και από τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) – μιας και οι συγκεντρώσεις παραγόμενου αιθενίου είναι αισθητά χαμηλότερες σε σχέση με τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν απουσία θεικών ιόντων.
- Η αναγωγική αποχλωρίωση είναι εφικτή αλλά σε αισθητά χαμηλότερες ταχύτητες. Έτσι, συγκρίνοντας δύο καλλιέργειες που τροφοδοτούνται με την ίδια ποσότητα δότη οι διαφορές στις ταχύτητες αυτών από τις οποίες απουσιάζουν τα θεικά είναι της τάξης του 50%, ενώ φτάνοντας στο VC η ταχύτητα κατανάλωσης του, δηλαδή και ταχύτητα παραγωγής αιθενίου είναι τάξεις μεγέθους μικρότερη σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια.
- Στην περίπτωση καλλιέργειας με παρουσία θεικών η μεθανογένεση είναι σχεδόν ανύπαρκτη, καθώς οι θεικοαναγωγικοί (SRB) μικροοργανισμοί προσλαμβάνουν αντί για τους μεθανογόνους το δότη ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να δημιουργείται περιοριστικός παράγοντας καθώς οι τελευταίοι απαιτούν μεγάλες ποσότητες εύκολα προσλήψιμου δότη για τη δραστηριότητα

τους.

- Η κατανάλωση των θεικών ιόντων σε όλες τις καλλιέργειες – ανεξαρτήτως της προστιθέμενης ποσότητας θεικών, είναι περίπου η ίδια, που σημαίνει ότι μάλλον τα θειικά που καταναλώνονται/απομακρύνονται επηρεάζουν την αναγωγική αποχλωρίωση λόγω ανταγωνισμού για το δότη ηλεκτρονίων, φαινόμενο που περιγράφηκε και από τους Pantazidou et al., (2011).
- Μετά την εξάλειψη των θεικών ιόντων και με την αύξηση του δότη ηλεκτρονίων ευνοούνται τόσο η αποχλωριωτική όσο και η μεθανογενετική διαδικασία, μέχρι ένα όριο όπου η διαδικασία επηρεάζεται αρνητικά, με εντονότερη επίδραση στη μεθανογένεση όπως παρατηρείται από το πείραμα μας (L12-HED).
 - Τα ισοζύγια μάζας για τα πειράματα μας έκλεισαν αρκετά ικανοποιητικά εμφανίζοντας ανάκτηση 107%, 108% και 93% αντιστοίχως για κάθε ένα από τα παραπάνω.
 - Η συγκέντρωση του TCE φθίνει κατά την πρώτη ημέρα προκαλώντας συσσώρευση VC. Το γεγονός αυτό μας κάνει κατανοητό ότι η αντίδραση προχωρά γρήγορα μέχρι και το στάδιο του βινυλοχλωριδίου.

Κεφάλαιο 6^ο – Βιβλιογραφία

Ελληνική Βιβλιογραφία

Βαλαβανίδης, Θ. και Ευσταθίου, Κ., 2006. Η Χημική Ένωση του Μήνα: DDT, Πανεπιστήμιο Αθηνών, τομέας Χημείας, Αθήνα.

Γιολδάση, Μ., 2009. Επίδραση της Αναγωγής Θεικών Ιόντων σε Μικτές Καλλιέργειες Μικροοργανισμών Αποδόμησης Τριχλωροαιθυλενίου – Μεταπτυχιακή Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Ντούλα, Μ., 2012. Βιοαποκατάσταση εδαφών – «Στρατηγικές βελτίωσης και προστασίας της ποιότητας του εδάφους από την απόρριψη των αποβλήτων ελαιοτριβείων στη περιοχή της Μεσογείου», Prosodol LIFE Project, Ινστιτούτο Εδαφολογίας Αθηνών, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Αθήνα.

Παναγιωτάκης, Η., 2010. Επιτόπου βιολογική εξυγίανση υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένα αιθυλένια: Επίδραση δότη ηλεκτρονίων και θεικών – Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Πανταζίδου, Μ., Παπασιώπη, Ν. και Ξενίδης Α. 2013. Σημειώσεις Μαθήματος “Αποκατάσταση Ρυπασμένων Χώρων”, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα.

Παπαδογιάννης, Ι.Ν. και Σαμανίδου, Β.Φ., 2000. “Ενόργανη Χημική Ανάλυση”, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη.

Χατζηωάννου, Θ.Π. και Κουμπάρης, Μ.Α., 2003. Ενόργανη Ανάλυση. Τέταρτη ανατύπωση, Ιδιωτική Έκδοση, Αθήνα.

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1997. Toxicological Profile for Trichloroethylene (Update), U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

Air Force Center for Environmental Excellence, 2004. Principles and Practices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents, Prepared for: Brooks City-Base, Texas Naval Facilities Engineering Service Center, Port Hueneme, California.

Antoniou, K., Panagiotakis I., Mamais D. & Pantazidou, M., Not published data. Hydrogen addition for reductive dechlorination of trichloroethylene, CEST 2013, Athens, Greece

ATSDR, 2003. Trichloroethylene, Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Aulenta, F., Beccari, M., Majone, M., Papini, M.P., Tandoi, V., 2008. Competition for H₂ between sulfate reduction and dechlorination in butyrate-fed anaerobic cultures, *Process Biochem.*, Volume 43, pp.: 161-168.

Aulenta, F., Pera, A., Rossetti, S., Petrangeli Papinia, M., Majonea, M., 2007. Relevance of side reactions in anaerobic reductive dechlorination microcosms amended with different electron donors, *Water Research*, Volume 41, pp.: 27-38.

Aulenta, F., Potalivo, M., Majonel, M., Patrangeli Papini, M. & Tandoi, V., 2006. Anaerobic bioremediation of groundwater containing a mixture of 1,1,2,2 tetrachloroethane and chloroethenes, *Biodegradation*, Volume 17, pp.: 193-206.

Azizian, M.F., Marshall, I.P.G., Behrens, S., Spormann, A.M., Semprini, L., 2010. Comparison of lactate, formate, and propionate as hydrogen donors for the reductive dehalogenation of trichloroethene in a continuous-flow column, *Journal of Contaminant Hydrology*, Volume 113, pp.: 77–92 .

Ballapragada, B., Puhakka, J.A. & Ferguson, J., 1997. Effect of hydrogen on

reductive dechlorination of chlorinated ethenes, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 31, pp.: 1728-1734.

Bennett, P., Gandhi, D., Warner, S. & Bussey, J., 2007. In situ reductive dechlorination of chlorinated ethenes in high nitrate groundwater, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 149, pp.: 568-573.

Boopathy, R. & Peters, R., 2001. Enhanced biotransformation of trichloroethylene under mixed electron acceptor conditions, *Current Microbiology*, Volume 42, pp.:134-138.

Bove, F.J., et al. 1995. "Public drinking water contamination and birth outcomes." *Am.J.Epidemiol.* 141(9):850-862.

Bradley, M.P., 2003. History and Ecology of Chloroethene Biodegradation: A Review, *Bioremediation Journal*, Volume 7, Issue 2, pp.: 81–109.

Bradley, M.P., 2003. History and ecology of chloroethene biodegradation: A review, *Bioremediation Journal*, Volume 7, Issue 2, pp.: 81-109.

Bradley, P.M. & Chapelle, F., 1999. Methane as a product of chloroethene biodegradation under methanogenic conditions, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 33, pp.: 653-656.

Carr, C. & Hughes, J., 1998. Enrichment of high-rate PCE dechlorination and comparative study of lactate, methanol, and hydrogen as electron donors to sustain activity, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 32, pp.: 1817-1824.

Cupples, A.M., Spormann, A.M., McCarty, P.L., 2004. Vinyl chloride and cis-dichloroethene dechlorination kinetics and microorganism growth under substrate limiting conditions, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 38, Issue 4, pp.: 1102-1107.

DiStefano, T.D., Baral, R., Duran, M. & Speece, R.E., 2001. A comparison of complex electron donors for anaerobic dechlorination of PCE, *Bioremediation Journal*, Volume 5, Issue 2, pp.: 131-143.

Duhamel, M., Wehr, S.D., Yu, L., Rizvi, H., Seepersad, D., Dworatzek, S., Cox, E.E., Edwards, E.A., 2002. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures

maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride, *Water Research*, Volume 36, Issue 17, pp.: 4193–4202.

Duhammel, M., Wehra, S.D., Yua, L., Rizvia, H., Seepersada, D., Dworatzeka, S., Cox, E.E., Edwards, E.A., 2002. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride, *Water Research*, Volume 36, pp.: 4193–4202.

El Mamouni, R., Jacquet, R., Gerin, P. & Agathos, S.N., 2002. Influence of electron donors and acceptors on the bioremediation of soil contaminated with trichloroethene and nickel: laboratory- and pilot-scale study, *Water Science and Technology*, Volume 45, No. 10, pp.: 49-45.

EPA, 2011. Final Health Assessment for TCE, Release Date: 09/28/2011, Washington

Ernst, T., 2009. Use of Dehalococcoides to bioremediate groundwater contaminated with chlorinated solvents, *Basic Biotechnology*, Volume 5, pp.: 72-77.

Fennell, D.E., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1997. Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 31, pp.: 918-926.

Goldberg, S.J., et al. 1990. "An association of human congenital cardiac malformations and drinking water contaminants." *J.Am.Coll.Cardiol.* 16(1):155-164.

Goldman, S.M., 2010. Trichloroethylene and Parkinson's disease: dissolving the puzzle, *Expert Rev. Neurother.* Volume 10, Issue 6, pp.: 835-837.

Gribble, G., 1994. The natural production of chlorinated compounds, *Environm. Sci. Technol.* Volume 28, No. 7, pp.: 310-319.

Guerrero-Barajas, C., Garcia-Pena, Z.E.I., 2010. Evaluation of enrichments of sulfate reducing bacteria from pristine hydrothermal vents sediments as potential inoculums for reducing trichloroethylene, *World J Microbiol Biotechnol*, Volume 26, pp.: 21-32.

Haest, P.J., Spingael, D., Smolders, E., 2010. Dechlorination kinetics of TCE at toxic TCE concentrations: Assessment of different models, *Water Research*, Volume 44, pp.: 331-339.

Harkness, M., Fischer, A., 2013. Use of Emulsified Vegetable Oil to Support Bioremediation of TCE DNAPL in Soil Columns, *Journal of Contaminant Hydrology*, Volume 151C, pp.: 16-33.

Harkness, M., Fischer, A., Lee, M.D., Mark, E., Payne, J.A., Dworatzek, S., Roberts, J., Acheson, C., Herrmann, R., Possolo, A., 2012. Use of statistical tools to evaluate the reductive dechlorination of high levels of TCE in microcosm studies, *Journal of Contaminant Hydrology*, Volume 131, pp.: 100-118.

He, J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fatheure, B.Z., Tiedje, M.J. & Löffler, F.E., 2002. Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 36, pp.: 3945-3952.

Heimann, A.C., Friis, A.K., Jakobsen, R., 2005. Effects of sulfate on anaerobic chloroethene degradation by an enriched culture under transient and steady-state hydrogen supply, *Water Research*, Volume 39, pp.: 3579–3586.

Heimann, A.C., Friis, A.K., Scheutz, C. & Jakobsen, R., 2007. Dynamics of reductive TCE dechlorination in two distinct H₂ supply scenarios and at various temperatures, *Biodegradation*, Volume 18, pp.: 167-179.

Hellweg, S., Demou, E., Scheringer, M., McKone, T. & Hungerbühler, K., 2005. Confronting workplace exposure to chemicals with LCA: Examples of trichloroethylene and perchloroethylene in metal degreasing and dry cleaning, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 39, pp.: 7741-7748.

Hoelen, T.P. & Reinhard, M., 2004. Complete biological dehalogenation of chlorinated ethylenes in sulfate containing groundwater, *Biodegradation*, Volume 15, pp.: 395–403.

Hoelen, T.P. & Reinhard, M., 2004. Complete biological dehalogenation of chlorinated ethylenes in sulfate containing groundwater, *Biodegradation*, Volume 15, pp.: 395–403.

Hoelen, T.P., Cunningham, J.A., Hopkins, G.D., Lebro'n, C.A. & Reinhard, M., 2006. Bioremediation of cis-DCE at a sulfidogenic site by amendment with propionate,

Ground Water Monitoring & Remediation, Volume 26, No. 30, pp.: 82-91.

Holliger, C., Wohlfarth, G., Diekert, G., 1999. Review, Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria, FEMS Microbiology Reviews, Volume 22, pp.: 383-398.

Hu, M., Zhang, Y., Wang, Z., Jiang, Z., Li, J., 2011. Influence of humic acid on the trichloroethene degradation by Dehalococcoides-containing consortium, Journal of Hazardous Materials, Volume 190, pp.: 1074–1078.

Kadlec, R.H., Martin, D.C., Tsao, D., 2012. Constructed marshes for control of chlorinated ethenes: An 11-year study, Ecological Engineering, Volume 11, pp.: 11-23.

Kouznetsova, I., Xiaomin, M., Robinson, C., Barry, D.A., Jason, Gerhard, J.I., McCarty, P.L., 2010. Biological reduction of chlorinated solvents: Batch-scale geochemical modeling, Advances in Water Resources, Volume 33, pp.: 969-989.

Lee, M.D., Quinton, G.E., Beeman, R.E., Biehle, A.A., Liddle, R.L., Ellis, D.E. & Buchanan, R.J., 1997. Scale-Up For In Situ Anaerobic Tetrachloroethene Bioremediation, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., Volume 18, pp.: 106-115.

Löffler, F.E., Edwards, E.A., 2006. Harnessing microbial activities for environmental cleanup, Current Opinion in Biotechnology, Volume 17, pp.: 274-284.

Löffler, F.E., Sun, Q., Li, J. & Tiedje, J. M., 2000. 16S rRNA gene-based detection of tetrachloroethene dechlorinating *Desulfuromonas* and *Dehalococcoides* Species, Appl. Environ. Microbiol., Volume 66, pp.: 1369–1374.

Lohner, S.T. & Tiehm, A., 2009. Application of Electrolysis to Stimulate Microbial Reductive PCE Dechlorination and Oxidative VC Biodegradation, Environ Sci Technol., Volume 43, pp.: 7098-7104.

Ma, X., Novak, P.J., Semmens, J.M., Clapp, L.W., Hozalski, R.M., 2006. Comparison of pulsed and continuous addition of H₂ gas via membranes for stimulating PCE biodegradation in soil columns, Water Research, Volume 40, pp.: 1155-1166.

Maymo-Gatell, X., Anguish, T. & Zinder, S., 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by “*Dehalococcoides ethenogenes*” 195,

Applied And Environmental Microbiology, Volume 65, No. 7, pp.:3108-3113.

Maymo-Gatell, X., Tandoi, V., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1995. Characterization of an H₂-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis, Appl. Environ. Microbiol., Volume 1995, pp.: 3928-3933.

Nelson, D.K., Hozalski, R.M., Clapp, L.W., Semmens, M.J & Novak, P.J., 2002. Effect of nitrate and sulfate on dechlorination by a mixed hydrogen-fed culture, Bioremediation Journal, Volume 6, Issue 3, pp.: 225-236.

Pant, P. & Pant, S., 2010. A review: Advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE), Journal of Environmental Sciences, Volume 22, Issue 1, pp.:116–126.

Pantazidou, M., Panagiotakis, I., Mamais, D. & Zikidi, Z., 2012. Chloroethene biotransformation in the presence of different sulfate concentrations, Ground Water Monitoring & Remediation, Volume 32, No. 1, pp.: 106-119.

Rodenbeck, S.E., et al. 2000. "Maternal exposure to trichloroethylene in drinking water and birth-weight outcomes." Arch.Environ.Health 55(3):188-194.

Schink, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation, Microbiol. Mol. Biol. Rev., Volume 61, Issue 2, pp.: 262.

Smatlak, C.R., Gosset, J.M., Zinder, S.H., 1996. Comparative kinetics of hydrogen utilization for reductive dechlorination of tetrachloroethene and methanogenesis in an anaerobic enrichment culture, Environ. Sci. Technol., Volume 30, Issue 9, pp.: 918-926.

Stams, A.J.M., Plugge, C.M., de Bok, F.A.M., van Houten, B.H.G.W., Lens, H., Dijkman, H. & Weijma, J., 2005. Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors, Water Science & Technology, Volume 52, No.1-2, pp.: 13-20.

Tandoi, V., Di Pinto, A.C., Majone, M., Tomei, M.C., Reductive dechlorination of PCE (Perchloroethene) by anaerobic bacterial consortium, Med. Fac. Landbouww, Volume 60, Issue 4b, pp.: 2527-2534.

Tandoi, V., Di Stefano, T.D., Bowser, A.P., Gossett, J.M., Zindert, S.H., Reductive dehalogenation of chlorinated ethenes and halogenated ethanes by a high-rate anaerobic enrichment culture, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 28, pp.: 973-979.

Tiehm, A. & Schmidt, K.R., 2011. Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes—aspects of field application, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 22, pp.: 415–421.

Wang, S.-M. & Tseng, S.-K., 2009. Dechlorination of trichloroethylene by immobilized autotrophic hydrogen-bacteria and zero-valent iron, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 107, No. 3, pp.: 287-292.

Westrick, J.J., Wayne Mello, J. & Thomas, R.F., 1984. The groundwater supply survey, *American Water Works Association*, Volume 76, No. 5, *Preserving Groundwater Quality*, pp.: 52-59.

Wiedemeier et al., 1998. Technical Protocol for evaluating Natural Attenuation of chlorinated solvents in ground water, Prepared by Parsons Engineering Science Inc. for U.S. EPA.

Wu, W.-M., Nye, J., Jain, M.K. & Hickey, R.F., 1998. Anaerobic dechlorination of trichloroethylene (TCE) to ethylene using complex organic materials, *Wat. Res.* Volume 32, No. 5, pp.: 1445-1454.

Yang, Y. & McCarty, P.L., 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture, *Environ. Sci. Technol.*, Volume 32, pp.: 3591-3597.

Yang, Y.R., McCarty, P.L., 1998. Competition for hydrogen within a chlorinated solvent dehalogenating anaerobic mixed culture, *Environ. Sci. Technol.* Volume 32, Issue 22, pp.: 3591–3597.

Yang, Y.R., McCarty, P.L., 2000. Biologically enhanced dissolution of tetrachloroethene DNAPL, *Environmental Science & Technology*, Volume 34, Issue 14, pp.: 2979–2984.

Yauck, J.S., et al. 2004. "Proximity of residence to trichloroethylene-emitting sites

and increased risk of offspring congenital heart defects among older women." Birth Defects Res.A Clin.Mol.Teratol. 70(10):808-814.

Zhang, Y., Hu, M., Jiang, Z., Liu, Y., 2011. Short communication Effect of anthraquinone-2,6-disulfonate on the trichloroethene degradation by Dehalococcoides-containing consortium, Journal of Hazardous Materials, Volume 192, pp.: 1896– 1899.

Ιστογραφία

Ιστοσελίδα Χημικό Εργαστήριο: <http://chimikoergastirio.blogspot.gr/> (τελευταία προσπέλαση 30/6/2013).

Ιστοσελίδα U.S. Environmental Protection Agency – TCE: <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/tri-ethy.html> (τελευταία προσπέλαση 10/5/2013).