



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΣΧΟΛΗ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

FACULTY OF CIVIL ENGINEERING

ΤΟΜΕΑΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

DEPARTMENT OF WATER
RESOURCES
AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΕΠΙ ΤΟΠΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ ΕΔΑΦΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΓΕΙΩΝ
ΥΔΡΟΦΟΡΕΩΝ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΧΛΩΡΙΩΜΕΝΟΥΣ
ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΟΡΝΗΛΙΑ ΑΝΤΩΝΙΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

ΔΑΝΙΗΛ ΜΑΜΑΗΣ

Καθηγητής, ΕΜΠ

ΣΥΝΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ:

ΜΑΡΙΝΑ ΠΑΝΤΑΖΙΔΟΥ

Αναπληρώτρια καθηγήτρια, ΕΜΠ

Αθήνα, 2019



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
NATIONAL TECHNICAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΣΧΟΛΗ ΠΟΛΙΤΙΚΩΝ
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

FACULTY OF CIVIL ENGINEERING

ΤΟΜΕΑΣ ΥΔΑΤΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ
ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

DEPARTMENT OF WATER
RESOURCES
AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΕΦΑΡΜΟΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΕΠΙ ΤΟΠΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΞΥΓΙΑΝΣΗΣ ΕΔΑΦΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΓΕΙΩΝ
ΥΔΡΟΦΟΡΕΩΝ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΧΛΩΡΙΩΜΕΝΟΥΣ
ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΟΡΝΗΛΙΑ ΑΝΤΩΝΙΟΥ

Συμβουλευτική επιτροπή:

1. Δανιήλ Μαμάης, Καθηγητής, ΕΜΠ
(Επιβλέπων)
2. Μαρίνα Πανταζίδου, Αναπληρώτρια
καθηγήτρια, ΕΜΠ
3. Ανδρέας Ανδρεαδάκης, Καθηγητής,
ΕΜΠ

Εξεταστική επιτροπή:

1. Δανιήλ Μαμάης, Καθηγητής, ΕΜΠ
(Επιβλέπων)
2. Μαρίνα Πανταζίδου, Αναπληρώτρια
καθηγήτρια, ΕΜΠ
3. Ανδρέας Ανδρεαδάκης, Καθηγητής, ΕΜΠ
4. Νικόλαος Καλογεράκης, Καθηγητής,
Πολυτεχνείο Κρήτης
5. Σιμεών Μαλαμής, Επίκουρος καθηγητής,
ΕΜΠ
6. Κωνσταντίνος Νουτσόπουλος,
Αναπληρωτής καθηγητής, ΕΜΠ
7. Νυμφοδώρα Παπασιώπη, Καθηγήτρια,
ΕΜΠ

Αθήνα, 2019

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή χρηματοδοτήθηκε μερικώς μέσω της υποτροφίας που χορηγήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας του Ε.Μ.Π.

Copyright © Kornilia Antoniou

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Ευχαριστίες

Η παρουσίαση αυτής της διατριβής θα σηματοδοτήσει και το τέλος μιας σημαντικής περιόδου της ζωής μου, στην οποία συμμετείχαν πολλοί άνθρωποι. Άλλοι περισσότερο, άλλοι λιγότερο, άλλα δεν παύει όλοι να αποτελούν μέρος της και να θέλω να τους ευχαριστήσω θερμά για τη βοήθεια που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια και για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί.

Αρχικά θα ήθελα να ξεκινήσω τις ευχαριστίες μου με τον Καθηγητή Δ. Μαμάη, επιβλέπων της παρούσας διατριβής. Το ήθος και η συμπεριφορά που είχε καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας με έκαναν να τον εκτιμήσω όχι μόνο σαν καθηγητή αλλά και ως άνθρωπο. Τον ευχαριστώ πολύ για τον χρόνο που αφιέρωσε, όσα με δίδαξε, τις γόνιμες και εποικοδομητικές συζητήσεις που είχαμε, την γενικότερη υποστήριξη και εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου. Προπάντων θα ήθελα να τον ευχαριστήσω που με δίδαξε τι θα πει αξιοπρέπεια.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μ. Πανταζίδου, συνεπιβλέπουσα της παρούσας διατριβής. Η επιμονή και ο ζήλος της με δίδαξαν να δίνω έμφαση στη λεπτομέρεια, να διαμορφώνω άρθρα κείμενα και να μην εφησυχάζομαι ως ερευνήτρια, στοιχεία τα οποία είναι πολύ σημαντικά στο δρόμο της επιστήμης.

Αισθάνομαι πως χωρίς την βοήθεια των παραπάνω δύο καθηγητών το έργο αυτό δεν θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή Α. Ανδρεαδάκη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κ. Νουτσόπουλο και τον Επίκουρο Καθηγητή Σ. Μαλαμή για την στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μου καριέρας στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας. Οι γόνιμες συζητήσεις που είχαμε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας, καθώς και οι γνώσεις που απλόχερα μου παρείχαν, αποτέλεσαν καθοριστικό παράγοντα για το χτίσιμο της ερευνητικής μου πορείας. Τους ευχαριστώ θερμά κάθε έναν ξεχωριστά.

Στη συνέχεια, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τις ευχαριστίες μου στην Καθηγήτρια Ν. Παπασιώπη, για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διεξαγωγή σημαντικών πειραμάτων αυτής της διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ν. Καλογεράκη για τον χρόνο που αφιέρωσε να μελετήσει και να αξιολογήσει αυτή τη διατριβή και για τη συμμετοχή του στην επταμελή επιτροπή.

Είναι πολύ σημαντικό να ευχαριστήσω όλους τους συνεργάτες στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας. Ιδιαίτερη έμφαση θα ήθελα να δώσω στον Ν. Κούρη για την καθημερινή συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια και την υποστήριξη που μου παρείχε στις δυσκολίες που αντιμετώπισα. Οι ατελείωτες ώρες στο εργαστήριο δεν θα ήταν ίδιες χωρίς αυτόν. Επιπλέον δεν θα μπορούσα να παραλείψω την Μ. Καλέργη για πολύτιμη βοήθεια κατά τη διάρκεια της συγγραφής αυτής της διατριβής.

Το πολυετές αυτό έργο εμπεριέχει πολλές δημιουργικές στιγμές καθώς και αρκετές δυσκολίες. Χωρίς τους δικούς μου ανθρώπους δεν θα ήταν εφικτό να ολοκληρώσω τις σπουδές μου και την διατριβή αυτή. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Η. Αντωνίου, την Τ. Αντωνίου και τέλος τον σύζυγό μου Γ. Αρετάκη για την αμέριστη στήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

Περίληψη

Από την ομάδα των χλωριωμένων αιθενίων, το τριχλωροαιθένιο (Trichloroethylene, TCE) χρησιμοποιείται πιο συχνά ως απολιπαντικό και διαλύτης στον εμπορικό και τον βιομηχανικό τομέα. Η ευρύτατη χρήση του, σε συνδυασμό με τις μη ορθές πρακτικές αποθήκευσης και διάθεσης οδήγησαν στη συχνή ανίχνευσή του στο υπόγειο νερό. Ταυτόχρονα, το TCE έχει την τάση να εξαπλώνεται σε μεγάλες αποστάσεις προκαλώντας τη ρύπανση του υπεδάφους εξαιτίας των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών του, εφόσον είναι μια ουσία με μεγάλη πυκνότητα και χαμηλό ιξώδες. Εξαιτίας της καρκινογόνου δράσης του, το TCE έχει καταταχθεί στον κατάλογο επικίνδυνων ουσιών στις ΗΠΑ, την Κίνα και την Ευρωπαϊκή Ένωση και συνεπώς είναι επιτακτική η ανάγκη απομάκρυνσής του από τις ρυπασμένες περιοχές.

Μετά από χρόνια ερευνών, αρκετές τεχνολογίες έχουν βρεθεί να απομακρύνουν αποτελεσματικά το TCE υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας επικεντρώνεται στην αναγωγική αποχλωρίωση, η οποία μπορεί να επιτευχθεί είτε αβιοτικά είτε βιολογικά μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Πιο συγκεκριμένα, η βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση χαρακτηρίζεται από την κατανάλωση του TCE και τη συσσώρευση των άλλων χλωριωμένων αιθενίων, όπως τα διχλωροαιθένια (Dichloroethylenes; DCEs) και το βιλυνοχλωρίδιο (Vinyl chloride; VC). Το παραπάνω επιτυγχάνεται μέσω του μονοπατιού της υδρογονόλυσης, όπου ένα μόριο υδρογόνου αντικαθιστά ένα αλογόνο, δηλαδή μια οργανική, ή μη, ουσία παρέχει ηλεκτρόνια στις οργανοχλωριωμένες ενώσεις με τελικό προϊόν το αιθένιο.

Σε αντίθεση με τη βιολογική αναγωγή, η αβιοτική μετατροπή τεκμαίρεται από τη μείωση των ρύπων χωρίς να παρατηρείται αύξηση θυγατρικών χλωριωμένων αιθενίων. Το κύριο προϊόν είναι η ασετυλίνη, η οποία όμως μετατρέπεται σε αιθένιο ή/και αιθάνιο. Κυρίαρχο μονοπάτι της αβιοτικής αποχλωρίωσης των TCE και DCEs είναι η β-απόσπαση, κατά την οποία σχηματίζεται ένας πρόσθετος δεσμός μεταξύ των δύο ανθράκων με την απώλεια δύο αλογόνων. Η αβιοτική αναγωγή εμπλέκεται σε διάφορους μηχανισμούς, όπως η βιογεωχημική μετατροπή, η οποία είναι ένας συνδυασμός βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών, με σκοπό την πλήρη αποχλωρίωση με τη χρήση ορυκτών που έχουν σχηματιστεί από μικροοργανισμούς. Ένα ορυκτό που μπορεί να σχηματιστεί μέσω της βιογεωχημικής μετατροπής είναι ο θειούχος σίδηρος, εάν προϋπάρχουν θειικά ιόντα και σίδηρος, ενώ μπορεί να ανάγει τα χλωριωμένα αιθένια σε αιθάνιο. Όμως, η δραστηριότητα αυτών των ορυκτών μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, καθώς ο σίδηρος οξειδώνεται.

Γενικότερα, σε ένα ρυπασμένο χώρο, παρουσία ορυκτών σιδήρου, αναμένεται να πραγματοποιούνται και η αβιοτική αλλά και η βιολογική αποχλωρίωση: το ποια διεργασία κυριαρχεί εξαρτάται από παράγοντες όπως η αφθονία των αποχλωριωτών, τα χαρακτηριστικά του εδάφους και η μάζα των ενεργών ορυκτών.

Για την πραγματοποίηση της βιολογικής αναγωγής των χλωριωμένων αιθενίων στο επιθυμητό αιθέριο, απαιτούνται συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι η διαθεσιμότητα του δότη ηλεκτρονίων και των θρεπτικών συστατικών, η παρουσία συγκεκριμένων μικροοργανισμών και το κατάλληλο οξειδοαναγωγικό καθεστώς.

Αναλυτικότερα, μια σημαντική παράμετρος για την επιτυχία της διεργασίας είναι η παρουσία κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων σε επαρκείς ποσότητες. Διάφορες οργανικές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν εφόσον η ζύμωσή τους οδηγεί στην παραγωγή διαλυτού υδρογόνου, το οποίο είναι ο τελικός δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Η επιλογή του κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων είναι μία σημαντική παράμετρος σχεδιασμού για την ανάπτυξη ενός σημαντικού πληθυσμού αποχλωριωτών. Τα κριτήρια επιλογής του δότη ηλεκτρονίων είναι η απόδοσή του ως προς την αναγωγική αποχλωρίωση, η σχέση κόστους/αποτελεσματικότητας, η επίπτωσή του στη διαλυτότητα των χλωριωμένων αιθενίων, η επίπτωσή του στη μικροβιακή κοινότητα, η περιεκτικότητά του σε μέταλλα, η ανθεκτικότητά του, η ικανότητα εξάπλωσής του και οι απαιτήσεις για τον κατάλληλο χειρισμό του.

Η ύπαρξη της κατάλληλης βιοκοινότητας είναι άλλη μια βασική απαίτηση, εφόσον πολλά βακτήρια έχουν βρεθεί να ανάγουν το TCE σε DCEs, αλλά μόνο το γένος *Dehalococcoides* έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί την πλήρη αποχλωρίωση σε αιθέριο. Όμως, η διάσπαση οργανικών ουσιών και η παραγωγή απαιτούμενων συμπαραγόντων απαιτεί διαφορετικές κατηγορίες μικροοργανισμών, οι οποίες συνεργάζονται μεταξύ τους. Έτσι, η βιοκοινότητα χαρακτηρίζεται από την παρουσία αποχλωριωτικών, μεθανογόνων, θειικοαναγωγικών και σιδηροαναγωγικών μικροοργανισμών, που εκτελούν διαφορετικά στάδια της διαδοχικής αποχλωρίωσης του PCE σε αιθέριο, καθώς, επίσης, και από ζυμωτικούς και οξικογόνους μικροοργανισμούς που παράγουν ηλεκτρόνια κατά τη ζύμωση οργανικού υλικού. Από τα παραπάνω φαίνεται, λοιπόν, ότι μια κοινότητα με αποχλωριωτική ικανότητα έχει μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που επιτελούν διάφορες διεργασίες.

Άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αποχλωρίωση είναι η ύπαρξη και η ποσότητα άλλων αποδεκτών ηλεκτρονίων, αφού θα υπάρξει ανταγωνισμός για το αναγωγικό μέσο. Τέτοιοι αποδέκτες μπορεί να είναι το οξυγόνο, τα νιτρικά ιόντα, το τετρασθενές μαγγάνιο, ο τρισθενής σίδηρος, τα θειικά ιόντα και το διοξείδιο του άνθρακα, σε αύξουσα σειρά προτίμησης από τους μικροοργανισμούς. Ως αποτέλεσμα, ο ανταγωνισμός για τα παραγόμενα ηλεκτρόνια αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα για την επιτυχία της αναγωγικής αποχλωρίωσης. Ωστόσο, η επιλογή του κατάλληλου είδους δότη ηλεκτρονίων μπορεί να υποβοηθήσει την αναγωγική αποχλωρίωση έναντι άλλων αναγωγικών διεργασιών. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι οι οργανικές ουσίες που διασπώνται αργά παράγοντας υδρογόνο, δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες προσδίδοντας ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην αποχλωριωτική κοινότητα. Το παραπάνω οφείλεται στις μικρές τιμές της οριακής συγκέντρωσης για την πρόσληψη του υδρογόνου που έχει η αποχλωρίωση, συγκριτικά με τη μεθανογένεση και την οξικογένεση. Επομένως, οι χαμηλές

συγκεντρώσεις υδρογόνου χρησιμοποιούνται για την αναγωγή των χλωριωμένων αιθενίων, ενώ μια αύξηση της ποσότητας μπορεί να προκαλέσει μια μετατόπιση της κύριας δράσης της βιοκοινότητας προς την παραγωγή μεθανίου και οξικού οξέος.

Υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες, η απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης φαίνεται να ποικίλλει στα εργαστηριακά πειράματα και το πεδίο, εφόσον είτε δεν πραγματοποιείται πλήρως είτε καθυστερεί, αν και σε μια έρευνα δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά. Επιπλέον, η μέγιστη συνιστώμενη συγκέντρωση θειικών ιόντων, πάνω από την οποία θεωρείται ότι επηρεάζεται αρνητικά η αναγωγική αποχλωρίωση, κυμαίνεται σε μεγάλο εύρος στη βιβλιογραφία από 20 mg/L ως 500 mg/L. Επιπροσθέτως, πέραν του ανταγωνισμού για το δότη ηλεκτρονίων, η αναγωγική αποχλωρίωση φαίνεται να επηρεάζεται αρνητικά από το τελικό προϊόν της θειικοαναγωγής, τα παραγόμενα σουλφίδια. Τέλος, προσομοιώσεις μοντέλου αποχλωρίωσης υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες έδειξαν ότι η μακροχρόνια έκθεση σε σουλφίδια αναστέλλει τη δράση συγκεκριμένων ειδών αποχλωριωτών που είναι αποδοτικοί, προωθώντας παράλληλα λιγότερο αποτελεσματικά είδη οργανοαλογονικής αναπνοής.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τίθενται πολλά ερωτήματα που αφορούν κυρίως στην αποσαφήνιση της αποχλωρίωσης υπό συνθήκες αναγωγής θειικών ιόντων και σιδήρου, θέματα για τα οποία οι μελέτες άλλων ερευνητών έχουν εξαγάγει αντικρουόμενα και αμφιλεγόμενα αποτελέσματα. Έτσι, προέκυψε το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, η μελέτη της επίδρασης γεωχημικών παραμέτρων του εδάφους στην αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση του TCE. Αναλυτικότερα, στο πλαίσιο της διατριβής οι ερευνητικοί στόχοι που τέθηκαν ήταν α) η διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων στην επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας και β) η διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην επίδοση της αποχλωρίωσης του TCE υπό μεθανογόνες και θειικοαναγωγικές συνθήκες.

Με σκοπό τη μελέτη των παραπάνω στόχων σχεδιάστηκαν πειράματα διακοπτόμενης τροφοδοσίας και αναπτύχθηκαν καλλιέργειες που τροφοδοτούνταν με θρεπτικά συστατικά, βουτυρικό οξύ, TCE και θειικά ιόντα. Δείγματα λαμβάνονταν περιοδικά για την ανάλυση των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου, πτητικών λιπαρών οξέων, θειικών ιόντων, σιδήρου, βιομάζας και λοιπών παραμέτρων.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δείχνουν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων προκαλεί τη μείωση της ταχύτητας αναγωγής του cDCE και κυρίως, του VC, αλλά δεν επηρεάζει την πραγμάτωση του τελικού σταδίου της διεργασίας. Όταν η δόση δότη ηλεκτρονίων κάλυπτε τις ανάγκες της αποχλωρίωσης, παρατηρήθηκε η πλήρης μετατροπή των χλωριωμένων αιθενίων σε αιθένιο μετά την πάροδο μεγάλης χρονικής διάρκειας. Η μεθανογένεση, επίσης, επηρεάστηκε από την παρουσία θειικών ιόντων, εφόσον η εκκίνησή της ξεκίνησε με καθυστέρηση πολλών

ημερών έως μηνών. Η αύξηση της ποσότητας του δότη ήταν αποτελεσματική ως μια μέγιστη συγκέντρωση, πάνω από την οποία η περαιτέρω προσθήκη του βουτυρικού οξέος προκάλεσε μια ελαφριά επιδείνωση στην επίδοση της αναγωγής του TCE και την παραγωγή μεθανίου.

Όσον αφορά το είδος του δότη ηλεκτρονίων, το βουτυρικό οξύ και το υδρογόνο ήταν οι βέλτιστες επιλογές δότη για την αναγωγική αποχλωρίωση, ενώ μη αποτελεσματικοί δότες ήταν το οξικό οξύ και η προπανόλη. Το τυρόγαλο, επίσης, αποτελεί σημαντική πηγή ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση μειώνοντας έτσι και το κόστος της αποκατάστασης, εφόσον μπορεί να αντικαταστήσει έναν συμβατικό δότη στο πεδίο. Επιπροσθέτως, η νεκρή βιομάζα συμβάλλει στην παραγωγή ηλεκτρονίων και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό της βιοαποκατάστασης μιας ρυπασμένης περιοχής. Όμως, η συμβολή της οργανικής ύλης του εδάφους και του διαλυτού σιδήρου στην αποχλωρίωση του TCE είναι αμελητέα. Αντιθέτως, ο θειούχος σίδηρος, που παραμένει αδιάλυτος στο νερό, βελτίωσε την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης, δεδομένου ότι έδρασε ως πηγή ηλεκτρονίων για την αναγωγή των χλωριωμένων αιθενίων. Σημαντικό είναι, επιπλέον, το εύρημα ότι η αναγωγική αποχλωρίωση με τη χρήση θειούχου σιδήρου ως δότη ακολούθησε το βιολογική μονοπάτι της υδρογονόλυσης και όχι το αβιοτικό της β-απόσπασης, όπως αναφέρεται σε αρκετές έρευνες στη βιβλιογραφία. Η αντίδραση αυτή μάλλον πραγματοποιείται εξωκυτταρικά από τους μικροοργανισμούς μεταφέροντας με αυτόν τον τρόπο ηλεκτρόνια από τον οργανικό δότη στον ρύπο.

Τα παραπάνω αναδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι γεωχημικές συνθήκες του πεδίου στην βιοαποκατάσταση, υπογραμμίζοντας παράλληλα ότι πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή της μεθόδου και κατά το σχεδιασμό της αποκατάστασης.

Extended Abstract

The group of chlorinated ethenes, i.e the organic substances with a double bond between two atoms of carbon and one to four atoms of chlorine, includes tetrachloroethylene (PCE), trichloroethylene (TCE), three isomers of dichloroethylene (DCEs) and vinyl chloride (VC). Trichloroethylene, a known human carcinogen, is the most prominent of the group, since it was widely used by the military, as well as the commercial and industrial sectors; as a degreasing solvent. Significant usage alongside with improper disposal and storage practices has led to widespread soil and groundwater contamination. Due to its unique combination of physical and chemical properties, such as the high density, low viscosity and poor solubility in water, once released in the environment, TCE tends to form a dense non-aqueous phase (DNAPL) in the aquifer. As a result of its carcinogenic potential, it has been listed as one of the priority pollutants, by the Environmental Protection Agency, Ministry of Environmental Protection of China and the European Commission.

Several in situ technologies have been used to remediate TCE-contaminated sites, such as sorption, volatilization, chemical stabilization, etc., but bioremediation is the preferred method because it transforms chlorinated ethenes to harmless compounds. One major pathway for TCE bioremediation is reductive dechlorination, where various substrates act as electron donors and chlorinated ethenes as electron recipients, in either abiotic or biological process. In environmental conditions, both can take place simultaneously, though the prevalence of the mechanism depends on factors such as microorganism abundance, soil characteristics and active minerals' capacity.

Specifically, abiotic transformation of TCE is achieved via β -elimination; a process where an additional bond between the two carbons is formed with the loss of two vicinal atoms of chlorine. Hence, TCE can be degraded to acetylene without the production of less chlorinated ethenes. Abiotic dechlorination may play a significant role if the concentration of reactive minerals is high and the activity of dechlorinating microorganisms is poor. Especially, iron-mediated abiotic reactions are of particular significance, since iron is abundant in soil. Several studies have shown that chemically precipitated ferrous iron can be an active reductant for halogenated organic compounds, and that surface-bound ferrous iron can react directly with chlorinated ethenes. The reactive iron minerals are considered to include iron sulfide, green rust, magnetite, etc., and can be either naturally occurring or formed through biological processes. The synergistic effect of biological, abiotic and geochemical mechanisms for the removal of contaminants with the use of minerals is referred to as in situ biogeochemical transformation. Recently, biogeochemical transformation has gained the interest of the scientific community as a low-cost remediation technique. However, the effect of iron minerals on TCE removal in the presence of an active dechlorinating culture has not been investigated yet.

Biological reductive dechlorination is a sequential electron transfer process, where a chlorine atom is replaced by hydrogen under anaerobic conditions. Hence, TCE is converted to less chlorinated compounds, such as dichloroethylene isomers (cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE), VC and eventually ethene (ETH). The success of dechlorination depends mainly in three factors, a) the composition of the culture, b) electron donor availability and c) the presence of competitor hydrogen scavengers.

Various bacteria species have the ability to metabolize chloroethenes, however only *Dehalococcoides mccartyi* can achieve a complete transformation of TCE to ethene by using solely hydrogen as the electron source. However, mixed dechlorinating cultures exhibit faster dechlorination rates than pure cultures, due to their high resistance to aerobic conditions exposure. Moreover, *Dehalococcoides* spp. are not capable of producing some important substances necessary for their functions, thus, the presence of other microorganisms is crucial for the growth of *Dehalococcoides* spp. In addition, the production of hydrogen requires at least two different groups of microorganisms, fermenters and acetogens, who work together for the oxidation of organic compounds. Typically, a mixed community that achieves complete or partial reductive dechlorination consists of a variety of microorganisms that carry out many other processes. In brief, it is observed that either *Dehalococcoides* spp. or fermentative microorganisms, such as Synergistetes and Bacteroidetes, are predominant in dechlorinating communities. Other groups often detected are the following: (a) microorganisms that cause partial dechlorination, like *Geobacter* spp. and *Sulfurospirillum* spp., (b) the methanogenic archaea Methanosarcinales and Methanomicrobiales, (c) acetogens, such as Spirochaetes phylum, *Acetobacterium* and *Sporomusa* genus, and (d) Proteobacteria phylum, especially Gamma- and Delta-proteobacteria that contains nitrate-, sulfate- and iron- reducing bacteria.

Although hydrogen is the ultimate electron donor to achieve complete dechlorination, under anaerobic conditions, several types of organic substrates can be oxidized by fermenters to provide acetate and hydrogen. Hence, the fermentable electron donors give faster dechlorination rates and higher dechlorination efficiency than the non-fermentable. Some dechlorinating species can also transform TCE and PCE to DCEs using acetate and formate as electron donors. So, dechlorination performance is linked with the availability of hydrogen in the aquifer.

Overall, the criteria for choosing the type of electron donor are performance of reductive dechlorination, cost-effectiveness, impact on chlorinated ethenes solubility and microbial community, metal content, resilience, spreading ability and the requirements for its proper handling.

Selecting a suitable donor can also be a tool to manage electron delivery so dechlorinators can have a competitive advantage towards other reductive processes, like methanogens, homoacetogens, sulfate reducers and iron-reducing bacteria. Previous studies found that reductive dechlorination is more thermodynamically favorable than methanogenesis and homoacetogenesis under hydrogen limiting

conditions. Therefore, the addition of slowly degrading organic substrates, like butyrate or propionate, can lead to dechlorinators' prevalence over methanogens due to their higher affinity for hydrogen. Therefore, low hydrogen concentrations are used to transform chlorinated ethenes, while an increase in quantity will shift electron delivery towards methane and acetate production.

However, the effect of sulfate reduction on dechlorination has been less studied and the available results are often inconsistent and contradictory, since, the yield of chloroethene removal appears to vary, ranging from ethene production to incomplete dechlorination. The maximum permissible sulfate concentration above which reductive dechlorination is considered to be adversely affected, varies in the literature within a wide range, from 20 mg/L to 500 mg/L. Furthermore, besides electron donor competition, the product of sulfate reduction, sulfide, seem to inhibit dechlorinators in some studies. Simulations of the dechlorination model have shown that long-term exposure to sulfides can be toxic to certain microorganisms, while promoting less efficient dechlorinating species.

The conflicting findings in the literature complicate the interpretation of data and contribute to misconceptions regarding competition mechanisms in sulfate reducing and dechlorinated mixed cultures. The objective of this research is to investigate the effect of soil's geochemical parameters on TCE removal, with the aim to understand the abiotic and biological mechanisms that take part in the reductive dechlorination. To this end, batch experiments were conducted using acclimatized trichloroethene-dechlorinating parent cultures. The parent cultures were developed at various sulfate concentrations in order to provide biomass for the batch experiments that was exposed to selected sulfate concentrations that ranged from 0 to 400 mg/L. All parent cultures were in duplicates with different initial sulfate concentration by adjusting, on weekly basis, the concentration of sulfate to four levels: N (0 mM, zero-sulfate), QL (0.7 mM or 70 mg/L), QM (1.6 mM or 150 mg/L) and M (4.2 mM or 400 mg/L) and were maintained for approximately 2 to 6 years. All cultures were fed with basal medium, vitamin solution, yeast extract and selenium-tungsten solution. At the same time, 0.5 mM TCE (65.7 mg/L; TCE nominal concentration, i.e. total amount added to the bottle divided by liquid volume) and 0.3 mM butyrate (27.0 mg/L), which served as electron donor, were added. The quantity of the electron donor was adequate only for 40% of the required reducing equivalents for complete dechlorination of TCE to ethene (assuming conservatively that butyrate yields 4 eq/mol), without taking into account the presence of sulfate. All parent cultures were acclimatized for a period of at least 300 days, prior to providing biomass for the batch experiments.

The batch experiments differed in type, amount of electron donor added, time of electron donor addition and reductive conditions. Headspace samples were withdrawn frequently for chlorinated ethenes, ethene, methane and acetylene analysis. Liquid samples were taken at longer time intervals to quantify volatile fatty acids (VFAs), sulfate, iron and biomass content. Electron distribution was calculated to identify the prevailing conditions in each batch.

The focus of this research on quantification imposed strict requirements on the quality of chlorinated ethenes and ethene measurements. The screening criteria for measurements were developed according to the following rationale; the total concentration of chlorinated ethenes and ethene, ideally, remains constant and the initial concentration is not known with certainty. So, this sum equated to the target concentration (e.g. the 0.5 mM TCE added in our study) and the sum of all chlorinated ethenes and ethene detected during the first measurement. Moreover, the maximum value of sum throughout the operation of batch experiments equated to the minimum value. A compilation of studies focusing on reductive dechlorination of chlorinated ethenes was necessary, to compare with the state of practice, as it is stated in literature, and to establish an acceptable range of deviations (qualification goals). Sources reviewed include seven journals: Bioremediation Journal (2001 to 2011), Environmental Science and Technology (1991 to 2011), Applied and Environmental Microbiology (1991 to 2011), Water Research (2001-2011), Journal of Contaminant Hydrology (2001-2011), Journal of Hazardous Materials (2001-2011) and Chemosphere (2001-2011). The criteria for selecting a study were sorted into two main categories, compulsory and optional. The compulsory criteria, which had to be satisfied by all studies, were: i) the experiments had to be similar with the experiments described by this study, e.g. a chlorinated ethene, which was injected into a sealed bottle with two phases (headspace and liquid), transforms to a less chlorinated product through the pathway of reductive dechlorination with detailed information about each step, and ii) headspace analysis had to be used for the measurement of chlorinated ethenes and ethene. The optional criteria, which one of the two had to be satisfied by all studies, were: i) articles with over 20 citations up to 2012 or ii) studies which simulate anaerobic dechlorination with kinetics since measurements ought to have high quality to retrieve best-fitting parameters. Based on the criteria above, twenty-nine articles were qualified. Chlorinated ethenes and ethene concentrations and time of the sampling were exported from graphs of the selected studies. The mean and maximum values of deviations were determined for the first week, after one week and all days of operation from each study. This was necessary, considering that throughout the experiment deviations will increase, since leakage problems and small changes in headspace/liquid ratio may occur. Afterwards, the average values of all deviations from the qualified articles were calculated. The two qualitative goals of this study were: (a) each measurement had to be less than the maximum deviation, if not the measurement was repeated and (b) the average values of entire set of measurements had to be less than the average deviation, if not then one or two measurements were removed.

Alternative metrics also served as tools for the quantification of dechlorination efficiency and comparison purposes. Aggregate measures, mole fractions of chloroethenes, M_{Cl} and N_{Cl} , were used to describe the process of reductive dechlorination, i.e. the transformation of TCE to ETH. Moreover, the velocities of TCE, cDCE and VC reduction were calculated and used for comparison between the different batch experiments.

The experimental observations led to the following conclusions. Elevated sulfate concentrations cause slower cDCE and VC reduction rate, but do not affect the completion of the process; given ample time and electron donor, complete transformation of the chlorinated ethene to ethene was observed. Methanogenesis was also influenced by the presence of sulfate, considering the lag phase of methane production of many days to a few months under medium and high sulfate concentrations. The increase in the amount of donor achieved faster VC-dechlorination rates, until a certain concentration above which further addition of butyrate appeared to cause a slight deterioration in TCE reduction and methane production.

Butyrate rapidly disappeared without the corresponding electron consumption or acetate production in batch experiments conducted with medium and excess electron donor addition. Microscopic examinations showed that in all experiments conducted with excess butyrate, poly-hydroxybutyrate (PHB) inclusions were identified. The presence of Neisser positive granules was greater in zero-sulfate experiment, while lesser were noted in sulfate experiments. Hence, part of butyrate consumption obtained at the start of batch experiments was not due to oxidation and it is attributed to intracellular storage by microorganisms forming PHB inclusions.

Furthermore, molecular analysis of parent cultures showed that *Dehalococcoides* spp. thrives even in the presence of sulfate. Compared to other dechlorinating communities found in the literature, the cultures described herein have a typical microbial composition, containing mainly organohalide-respiring bacteria, acetogens, methanogenic archaea and Deltaproteobacteria. Methanogenic archaea percentage is lower under sulfate reducing conditions ranging from 4% to 10%. Likewise, sulfate concentration seems to affect acetogens, too, considering that *Acetobacterium* spp. population was 39% and 20% of total DAPI cells in N and M, respectively. On the contrary, Deltaproteobacteria seems to increase in QM and M cultures, mainly due to higher population of sulfate-reducing bacteria. The above finding may be caused by sulfide toxicity, because methanogens are sensitive to hydrogen sulfide exposure. It could also be due to the competition for the electron donor, since the sulfate-reducing microorganisms maintain the level of hydrogen below the threshold for methanogenic archaea and homoacetogens.

Regarding the type of electron donor, butyric acid and hydrogen were the optimal donor choices for reductive dechlorination, while non-effective donors were acetic acid and propanol. Whey is also an important source of electrons for reductive dechlorination, thus reducing the cost of recovery, since it can replace an expensive donor in the field. In addition, biomass decay contributes to the production of electrons and must be taken into account when designing the bioremediation of contaminated sites.

The contribution to the dechlorination of TCE of natural organic matter and soluble iron seems to be insignificant. On the other hand, iron sulfide, which is insoluble in

water, improved the yield of chlorinated ethenes removal, since it became the source of electrons for reductive dechlorination. The major pathway of reductive dechlorination with ferrous sulfide as a donor was the biological process of hydrogenolysis and not the abiotic β -elimination mechanism, as it is reported in several studies in literature.

The findings of this thesis show the important role the geochemical conditions of the field play in reductive dechlorination of TCE, and should be taken into account in the designing phase of the remediation.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή	1
1.1. Τα χλωριωμένα αιθέρια και τα χαρακτηριστικά τους.....	1
1.2. Ερευνητικοί στόχοι.....	8
1.3. Δομή διδακτορικής διατριβής.....	8
Κεφάλαιο 2 Θεωρητικό υπόβαθρο	10
2.1. Αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών	10
2.1.1. Εισαγωγή	10
2.1.2. Τεχνολογίες αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών	13
2.1.3. Βιοαποκατάσταση-Ενισχυμένη επιτόπια βιοαποκατάσταση.....	17
2.1.4. Μηχανισμοί βιολογικής αποχλωρίωσης.....	20
2.2. Αβιοτική αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση.....	26
2.2.1. Εισαγωγή	26
2.2.2. Μονοπάτια αβιοτικής αποχλωρίωσης	26
2.2.3. Επίδραση ορυκτών σιδήρου στην αναγωγική αποχλωρίωση.....	28
2.2.3.1. Η παρουσία του σιδήρου στο έδαφος. Μορφή - Περιεκτικότητα - Φυσικά Χαρακτηριστικά.....	28
2.2.3.2. Βιογεωχημική μετατροπή - Συνδυασμός βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών	29
2.2.3.3. Ρυθμός αβιοτικής αποχλωρίωσης.....	38
2.2.3.4. Περιορισμοί στη βιογεωχημική μετατροπή.....	43
2.2.4. Συνέργεια αβιοτικής και βιολογικής αποχλωρίωσης	44
2.2.5. Ρόφηση στα ορυκτά.....	48
2.3. Αναερόβια βιολογική αποχλωρίωση.....	49
2.3.1. Εισαγωγή	49
2.3.2. Μονοπάτι βιολογικής αποχλωρίωσης.....	49
2.3.3. Παράγοντες που επιδρούν στην αναγωγική αποχλωρίωση	50
2.3.4. Αναερόβια βιοκοινότητα μικροοργανισμών.....	53
2.3.4.1. Μικροοργανισμοί αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης.....	57
2.3.4.2. Μικροοργανισμοί άλλων αναγωγικών διεργασιών	63
2.3.4.3. Σύσταση μικτών καλλιεργειών αποχλωρίωσης	79
2.3.5. Δότες ηλεκτρονίων	84
2.3.5.1. Υδρογόνο ως δότης ηλεκτρονίων.....	86
2.3.5.2. Οξικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων	88
2.3.5.3. Βουτυρικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων	89
2.3.5.4. Βενζοϊκό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων	90
2.3.5.5. Προπανόλη ως δότης ηλεκτρονίων	91
2.3.5.6. Τυρόγαλο ως δότης ηλεκτρονίων	92
2.3.5.7. Φυσική οργανική ύλη ως δότης ηλεκτρονίων	100
2.3.5.8. Δισθενής σίδηρος ως δότης ηλεκτρονίων	106
2.4. Επίδραση ανταγωνιστικών αναγωγικών διεργασιών.....	107
2.4.1. Εισαγωγή	107
2.4.2. Είδη ανταγωνισμού.....	109

2.4.3. Επίδραση μεθανογένεσης και οξικογένεσης στη βιολογική αποχλωρίωση	112
2.4.4. Επίδραση θειικοαναγωγής στη βιολογική αποχλωρίωση	121
Κεφάλαιο 3 Μεθοδολογία - Πειραματικό πρωτόκολλο	136
3.1. Συντήρηση και ανάπτυξη πειραμάτων.....	136
3.1.1. Εισαγωγή	136
3.1.2. Περιγραφή δημιουργίας και ανάπτυξης μητρικών καλλιεργειών	136
3.1.3. Περιγραφή συντήρησης μητρικών καλλιεργειών	139
3.1.4. Πρωτόκολλο παρασκευής θρεπτικών μέσων	140
3.1.5. Περιγραφή παρασκευής πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch) ..	142
3.2. Αναλυτικές Μέθοδοι.....	145
3.2.1. Εισαγωγή	145
3.2.2. Ανάλυση υπερκείμενης φάσης-Ονομαστική συγκέντρωση	146
3.2.3. Ανάλυση χλωριωμένων αιθινίων, μεθανίου, αιθενίου, αιθανίου & ασετυλίνης.....	149
3.2.4. Ανάλυση πτητικών λιπαρών οξέων, προπανόλης και βενζοϊκού οξέος..	155
3.2.5. Ανάλυση θειικών ιόντων και σουλφιδίων	158
3.2.6. Ανάλυση δισθενούς/τρισθενούς σιδήρου	159
3.2.7. Ανάλυση COD (Χημική απαίτηση οξυγόνου)	160
3.2.8. Ανάλυση βιομάζας (Ολικά και πτητικά αιωρούμενα στερεά-Πρωτεΐνες) ..	160
3.2.9. Ανάλυση Φθορίζουσας Επιτόπου Υβριδοποίησης (FISH).....	162
3.2.10. Μικροσκοπική ανάλυση πολυυδροξυβουτυρικών αλυσίδων (PHBs)....	165
3.2.11. Αναλύσεις pH και θερμοκρασίας.....	166
3.3. Αξιολόγηση μετρήσεων	166
3.3.1. Παράμετροι επαλήθευσης μεθόδων	166
3.3.2. Αξιολόγηση μετρήσεων χλωριωμένων αιθινίων	170
3.3.3. Αξιολόγηση μετρήσεων FISH.....	173
3.3.4. Αξιολόγηση μετρήσεων βιομάζας, θειικών ιόντων και σουλφιδίων	174
3.4. Μέτρα σύγκρισης για την αξιολόγηση αποτελεσμάτων	175
3.4.1. Ισοζύγιο ηλεκτρονίων.....	175
3.4.2. Λοιπά μέτρα σύγκρισης	179
Κεφάλαιο 4 Πειραματικά αποτελέσματα	180
4.1. Εισαγωγή.....	180
4.2. Επίδραση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση.....	180
4.2.1. Σχεδιασμός πειραμάτων	180
4.2.2. Παρουσίαση και σχολιασμός αποτελεσμάτων	184
4.2.2.1. Μητρικές καλλιέργειες.....	184
4.2.2.2. Επίδραση μηδενικής συγκέντρωσης θειικών ιόντων	200
4.2.2.3. Επίδραση 70 mg/L θειικών ιόντων	207
4.2.2.4. Επίδραση 150 mg/L θειικών ιόντων	209
4.2.2.5. Επίδραση 400 mg/L θειικών ιόντων	213
4.2.2.6. Συγκριτικά αποτελέσματα πειραμάτων υπό διάφορες συγκεντρώσεις θειικών ιόντων	216

4.2.2.7. Επίδραση συνεχούς προσθήκης 400 mg/L θειικών ιόντων.....	220
4.2.2.8. Πειράματα διερεύνησης της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας	224
4.3. Επίδραση του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην αποχλωρίωση	232
4.3.1. Σχεδιασμός πειραμάτων	232
4.3.2. Παρουσίαση και σχολιασμός αποτελεσμάτων	236
4.3.2.1. Επίδραση του είδους δότη ηλεκτρονίων.....	236
4.3.2.2. Επίδραση οργανικής ύλης εδάφους	244
4.3.2.3. Επίδραση είδους και ποσότητας σιδήρου	253
4.3.2.4. Επίδραση σιδήρου υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες	269
4.3.2.5. Τυρόγαλα ως δότης ηλεκτρονίων	276
4.3.2.6. Τυρόγαλα ως δότης ηλεκτρονίων υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες	280
Κεφάλαιο 5 Συμπεράσματα & προτάσεις μελλοντικής έρευνας	284
5.1 Εισαγωγή.....	284
5.2 Κύρια ευρήματα της διερεύνησης της επίδρασης των θειικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση.....	284
5.3 Κύρια ευρήματα της διερεύνησης της επίδρασης των φυσικών αναγωγικών μέσων στην αναγωγική αποχλωρίωση.....	285
5.4 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	288
Βιβλιογραφία	290
Παραρτήματα	336
A. Πειραματικά πρωτόκολλα.....	336
A.1. Πρωτόκολλο συντήρησης μητρικών καλλιεργειών	336
A.2. Πρωτόκολλο παρασκευής αναερόβιου θρεπτικού μέσου και άλλων θρεπτικών	340
A.3. Πρωτόκολλο παρασκευής πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας	343
A.4. Μέθοδοι αέριου χρωματογράφου	349
A.4.1. Πρότυπες καμπύλες για TCE, cis-1,2 DCE, trans-1,2 DCE, 1,1-DCE	349
A.4.2. Πρότυπη καμπύλη για VC.....	351
A.4.3. Πρότυπες καμπύλες για Αιθάνιο, Αιθάνιο, Μεθάνιο και Ασετυλίνη.....	353
A.4.4. Πρότυπες καμπύλες για πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs)	355
A.4.5. Πρότυπη καμπύλη για προπανόλη	357
A.4.6. Πρότυπη καμπύλη για βενζοϊκό οξύ	358
A.5. Λοιπές μέθοδοι	360
A.5.1. Μέθοδος ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών	360
A.5.2. Μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεΐνης κατά Lowry	361
A.5.3. Μέθοδος θειικών ιόντων και σουλφιδίων	363
A.5.4. Μέθοδος δισθενούς/τριθενούς σιδήρου	366
A.5.5. Μέθοδος χημικής απαίτησης οξυγόνου (COD)	367
A.5.6. Πρωτόκολλο ανάλυσης FISH.....	368
B. Υπολογισμός ηλεκτρονίων	371
B.1. Υπολογισμοί παραγωγής ηλεκτρονίων.....	372
B.1.1. Δότης ηλεκτρονίων: Βουτυρικό οξύ.....	372
B.1.2. Δότης ηλεκτρονίων: Οξικό οξύ	374

B.1.3. Δότης ηλεκτρονίων: Υδρογόνο.....	375
B.1.4. Δότης ηλεκτρονίων: Τυρόγαλο και Διαλυτή οργανική ύλη	375
B.1.5. Δότης ηλεκτρονίων: Υδροκινόνη	376
B.1.6. Δότης ηλεκτρονίων: Δισθενής σίδηρος (Fe^{2+})	376
B.1.7. Δότης ηλεκτρονίων: Προπανόλη.....	377
B.1.8. Δότης ηλεκτρονίων: Βενζοϊκό οξύ	378
B.1.9. Δότης ηλεκτρονίων: Συνδυασμός δοτών ηλεκτρονίων.....	379
B.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων.....	379
B.3. Βιομάζα ως δότης ή αποδέκτης ηλεκτρονίων	382
Γ. Αποτελέσματα σχετικών πειραμάτων	384
Γ.1. Πείραμα προσθήκης υδρογόνου στις 14 ημέρες λειτουργίας.....	384
Γ.2. Πείραμα με 400 mg/L θειικών ιόντων σε μη-εγκλιματισμένες καλλιέργειες	384
Γ.3. Πείραμα προσθήκης θρεπτικών ιόντων σε πειράματα μακράς διάρκειας ..	385
Γ.4. Πείραμα με την προσθήκη τυρόγαλου	387
Γ.5. Αποτελέσματα L, MMB και H μητρικών καλλιεργειών.....	388
Δ. Φωτογραφικό υλικό.....	391
Ε. Επανάληψη πινάκων με πειράματα διδακτορικής διατριβής.....	396

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1.1. Χημικά χαρακτηριστικά χλωριωμένων αιθενίων.....	2
Πίνακας 1.2. Επιπτώσεις χλωριωμένων αιθενίων στην ανθρώπινη υγεία.....	6
Πίνακας 1.3. Νομοθετικά όρια χλωριωμένων αιθενίων για τα πόσιμα νερά.....	7
Πίνακας 1.4. Τιμές ορίων και παρέμβασης σύμφωνα με την Ολλανδική νομοθεσία (Rijkswaterstaat, 2013).....	8
Πίνακας 2.1 Τεχνολογίες αποκατάστασης χλωριωμένων αιθενίων (Πηγές: Christ et al., 2005; Γιδάρακος κ.ά., 2009; Russell et al., 1992; USEPA, 2010b; USEPA, 2013).....	14
Πίνακας 2.2. Αριθμός εφαρμογών στις ΗΠΑ για το διάστημα 1982-2011 (Πηγή: USEPA, 2013).....	15
Πίνακας 2.3 Εκτίμηση κόστους τεχνολογίας ανά μάζα εδάφους για κάθε κατηγορία (Πηγή: Juwarkar et al., 2010).....	17
Πίνακας 2.4 Τεχνολογίες βιοαποκατάστασης (Πηγή: Juwarkar et al., 2010).....	19
Πίνακας 2.5 Κυριότεροι μηχανισμοί αποχλωρίωσης χλωριωμένων αιθενίων (Πηγές: Schmidt et al., 2014; Abe et al., 2009b; Tiehm & Schmidt; 2011; Frascari et al., 2015; Scheutz et al., 2011; Παναγιωτάκης, 2010; Badin et al., 2016; Tobiszewski & Namieśnik, 2012).....	21
Πίνακας 2.6 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιογεωχημικής μετατροπής (Πηγή: Evans, 2014).....	31
Πίνακας 2.7 Ρυθμοί αβιοτικής αποχλωρίωσης σε μικρόκοσμους με ορυκτά σιδήρου στη διεθνή βιβλιογραφία.....	41
Πίνακας 2.8 Σειρά προτεραιότητας για την πραγμάτωση αναγωγικών διεργασιών (Πηγή: Bradley et al., 2008; Παναγιωτάκης, 2010; Aulenta et al., 2006a; Weissflog, 2005).....	52
Πίνακας 2.9 Σύστημα κατάταξης περιοχών για την επιτυχία της αναγωγικής αποχλωρίωσης σύμφωνα με τις παραμέτρους που επηρεάζουν την διαδικασία (Πηγή: Morse et al., 1998).....	53
Πίνακας 2.10 Μικροοργανισμοί οργανοαλογονικής αναπνοής των χλωριωμένων αιθενίων.....	60
Πίνακας 2.11 Μικροοργανισμοί αναγωγής τρισθενούς σιδήρου (Πηγή: Παραλλαγή από Lovley et al., 2004; Lovley, 2013).....	65
Πίνακας 2.12 Μεθανογόνα αρχαία και τα χαρακτηριστικά τους (Πηγή: Παραλλαγή από Hedderich & Whitman, 2013).....	70
Πίνακας 2.13 Θεικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί και τα χαρακτηριστικά τους (Πηγή: Παραλλαγή από Rabus et al., 2013).....	74
Πίνακας 2.14 Οξικογενή βακτήρια και τα χαρακτηριστικά τους (Πηγή: Παραλλαγή από Drake et al., 2013).....	78
Πίνακας 2.15 Σύσταση βιοκοινοτήτων με ικανότητα αποχλωρίωσης.....	81
Πίνακας 2.16 Λειτουργικές δράσεις αποχλωριωτικής κοινότητας (Πηγή: Saiyari et al., 2018).....	83
Πίνακας 2.17 Υδρογόνο ως δότης ηλεκτρονίων σε μικρόκοσμους.....	87
Πίνακας 2.18 Οξικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων σε μικρόκοσμους.....	89

Πίνακας 2.19 Βουτυρικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων σε μικρόκοσμους.	90
Πίνακας 2.20 Βενζοϊκό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων σε μικρόκοσμους.	91
Πίνακας 2.21 Συστατικά τυρόγαλου.	92
Πίνακας 2.22 Σχέση κόστους/αποτελεσματικότητας δοτών ηλεκτρονίων (DiStefano et al., 2001; Semkiw & Barcelona, 2011).	93
Πίνακας 2.23 Εργαστηριακά πειράματα και πιλοτικές εφαρμογές στο πεδίο με το τυρόγαλο ως δότης ηλεκτρονίων στη βιβλιογραφία.....	95
Πίνακας 2.24 Ποσοστό οργανικής ύλης στο έδαφος (Σακελλαριάδης, 1992).	100
Πίνακας 2.25 Χρήση οργανικής ύλης ως δότης ηλεκτρονίων στη βιβλιογραφία.	104
Πίνακας 2.26 Αντιδράσεις κατανάλωσης υδρογόνου (Πηγές: Thauer et al., 1977; Dolfing & Janssen, 1994; Dolfing J., 2016; Dolfing, 2004; He et al., 2002; Stams et al., 2005; Löffler et al., 1999).	108
Πίνακας 2.27 Αντιδράσεις κατανάλωσης οξικού οξέος (Πηγές: Thauer et al., 1977; Dolfing & Janssen, 1994; Dolfing J., 2016; Dolfing, 2004; Krumholz et al., 1996; Lovley & Phillips, 1988; Stams et al., 2005).	108
Πίνακας 2.28 Οριακές συγκεντρώσεις υδρογόνου σε αναερόβιο περιβάλλον (Πηγές: Löffler et al., 1999; Lu et al., 2001; Luijten et al., 2004; Hoelen & Reinhard, 2004).	111
Πίνακας 2.29 Απόδοση μεθανογένεσης και οξικογένεσης σε καλλιέργειες αποχλωρίωσης.	114
Πίνακας 2.30 Βιβλιογραφική ανασκόπηση των αποτελεσμάτων εργαστηριακών πειραμάτων αποχλωρίωση υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες.....	124
Πίνακας 3.1 Χαρακτηριστικά τροφοδοσίας μητρικών καλλιεργειών.	139
Πίνακας 3.2 Αναερόβιο θρεπτικό μέσο (RAMM).	140
Πίνακας 3.3 Διάλυμα ιχνοστοιχείων μετάλλων (Trace metal solution; Tandoi et al., 1995).	141
Πίνακας 3.4 Διάλυμα βιταμινών (Vitamins solution; Παναγιωτάκης, 2010).	142
Πίνακας 3.5 Διάλυμα σεληνίου-βολφραμίου (Widdel F., 1988).	142
Πίνακας 3.6 Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας.....	143
Πίνακας 3.7 Αναλύσεις στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας και τις μητρικές καλλιέργειες.	145
Πίνακας 3.8 Παράδειγμα συχνότητας αναλύσεων στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας.	146
Πίνακας 3.9 Τιμές σταθεράς Henry στους 25°C.....	148
Πίνακας 3.10 Πρότυπα διαλύματα χλωριωμένων αιθενίων.	150
Πίνακας 3.11 Πρότυπα διαλύματα μεθανίου, αιθανίου, αιθενίου και ασετυλίνης.	151
Πίνακας 3.12 Πρότυπα διαλύματα με υψηλές συγκεντρώσεις μεθανίου.	151
Πίνακας 3.13 Πρότυπα διαλύματα πτητικών λιπαρών οξέων, προπανόλης και βενζοϊκού οξέος.	155
Πίνακας 3.14 Πρότυπα διαλύματα θειικών ιόντων και σουλφιδίων.	158
Πίνακας 3.15 Πρότυπα διαλύματα BSA.	161
Πίνακας 3.16 Οι ιχνηλάτες και τα χαρακτηριστικά τους που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών στις μητρικές καλλιέργειες.	164
Πίνακας 3.17 Εξειδίκευση ιχνηλατών.	165

Πίνακας 3.18 Επαναληψιμότητα (RSDr %) μεθόδων.....	168
Πίνακας 3.19 Όριο ανίχνευσης (LoD) μεθόδων.	169
Πίνακας 3.20 Έγκριτα περιοδικά για την εύρεση άρθρων.....	171
Πίνακας 3.21 Επιλεγμένα άρθρα σύμφωνα με τα κριτήρια επιλογής.....	172
Πίνακας 3.22 Αποδεκτά όρια μέτρησης.	173
Πίνακας 3.23 Ισοδυναμία ηλεκτρονίων για κάθε διεργασία.....	176
Πίνακας 3.24 Αναγωγή αποδεκτών ηλεκτρονίων υπό διάφορες συγκεντρώσεις δοτών.	177
Πίνακας 3.25 Οξειδωση δοτών ηλεκτρονίων υπό διάφορες συγκεντρώσεις αποδεκτών ηλεκτρονίων.....	178
Πίνακας 3.26 Μέτρα σύγκρισης για την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης.....	179
Πίνακας 4.1 Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης των θειικών ιόντων.....	182
Πίνακας 4.2 Αποτελέσματα των μητρικών καλλιεργειών στο τέλος του επταήμερου κύκλου τροφοδοσίας (δίδονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση κάθε παραμέτρου).....	188
Πίνακας 4.3 Ισοζύγια ηλεκτρονίων στις μητρικές καλλιέργειες.....	191
Πίνακας 4.4 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με μηδενική συγκέντρωση θειικών.	205
Πίνακας 4.5 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με 70 mg/L θειικών.....	209
Πίνακας 4.6 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με 150 mg/L θειικών.....	213
Πίνακας 4.7 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με 400 mg/L θειικών.....	215
Πίνακας 4.8 Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με θειικά ιόντα.....	218
Πίνακας 4.9 Απόδοση μεθανογένεσης στα πειράματα με μέση συγκέντρωση βουτυρικού οξέος (2.2 με 3 mM) υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες.....	220
Πίνακας 4.10 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με συνεχή προσθήκη 400 mg/L θειικών ιόντων.	223
Πίνακας 4.11 Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με συνεχή προσθήκη 400 mg/L θειικών ιόντων.....	223
Πίνακας 4.12 Οξειδοαναγωγικές διεργασίες και ισοζύγιο ηλεκτρονίων στα πειράματα μιας μέρας με υψηλή δόση δότη ηλεκτρονίων.....	230
Πίνακας 4.13 Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων.	234
Πίνακας 4.14. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με διαφορετικά είδη δότη ηλεκτρονίων.	243
Πίνακας 4.15. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με διαφορετικά είδη και συγκεντρώσεις οργανικής ύλης εδάφους.	252
Πίνακας 4.16. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με διαφορετικά είδη και συγκεντρώσεις σιδήρου.	268
Πίνακας 4.17. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με σίδηρο υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες.	275
Πίνακας 4.18. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με τυρόγαλο.....	280
Πίνακας 4.19. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με τυρόγαλο υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες.	283
Πίνακας A.1. Συγκεντρώσεις φορμαμιδίου στο διάλυμα υβριδοποίησης.....	370

Πίνακας Α.2. Συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και EDTA στο διάλυμα έκπλυσης.....	371
Πίνακας Ε.1. Επανάληψη πίνακα 4.1. Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης των θειικών ιόντων.....	396
Πίνακας Ε.2. Επανάληψη πίνακα 4.13. Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων.....	397

Περιεχόμενα Σχημάτων

Σχήμα 1.1. Τριδιάστατη μορφή χλωριωμένων αιθενίων.	1
Σχήμα 1.2. Μοντέλο κίνησης «Μη υδατικής φάσης ελαφρών υγρών» (LNAPLs) (USEPA, 1999a).....	4
Σχήμα 1.3. Μοντέλο κίνησης «Μη υδατικής φάσης βαρέων υγρών» (DNAPLs) (USEPA, 1999b).....	4
Σχήμα 1.4. Σχέσεις φάσεων.	5
Σχήμα 2.1 Τάσεις αποφάσεων για την επιλογή μέτρων σε ρυπασμένες περιοχές των ΗΠΑ από το 1986 ως το 2011 (Πηγή: USEPA, 2017).....	16
Σχήμα 2.2 Μονοπάτια υδρογονόλυσης (μαύρο βέλος), β-απόσπασης (λευκό βέλος) και υδρογόνωσης (βέλος με μοτίβο) (Hara et al., 2005; Arnold & Roberts, 2000).	28
Σχήμα 2.3. Παραδείγματα βιογεωχημικής μετατροπής του TCE (Πηγή: Parsons, 2008).	32
Σχήμα 2.4 Μηχανισμοί βιογεωχημικής μετατροπής του cis-DCE (Πηγή: Jeong et al., 2011).	32
Σχήμα 2.5 Σχηματικό μοντέλο διεργασιών που επιτελεί το FeS (Gong et al., 2016) .	36
Σχήμα 2.6 Διεργασίες με τη χρήση του σιδήρου ως μεταφορέα ηλεκτρονίων (Μπλε βέλη: Οξειδωση; Κόκκινα βέλη: Αναγωγή).	46
Σχήμα 2.7 Το μονοπάτι της βιολογικής αναγωγικής αποχλωρίωσης (υδρογονόλυση) με την κύρια πορεία να ακολουθεί τα μαύρα βέλη (Löffler & Edwards, 2006).....	50
Σχήμα 2.8 Συνήθεις διεργασίες που μπορεί να επιτελούνται υπό αναερόβιες συνθήκες σε καλλιέργειες που ανάγουν βιολογικά το τριχλωροαιθέριο (Πηγές: Muyzer & Stams, 2008; Αντωνίου, 2008; Fennell & Gossett, 2003; Bossert & Häggblom , 2003; Kandris, 2017). Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τη ροή των ηλεκτρονίων από τους δότες προς τους αποδέκτες.....	56
Σχήμα 2.9 Ρόλος μη αποχλωριωτικής κοινότητας σε μικτή καλλιέργεια και παρατηρούμενες ομάδες μικροοργανισμών στα πειράματα των Hug et al. (2012). ..	57
Σχήμα 2.10 Ταξινομικό δέντρο μικροοργανισμών αναγωγικής αποχλωρίωσης.	58
Σχήμα 2.11 Χουμοποίηση οργανικής ύλης.	101
Σχήμα 2.12 Διεργασίες με τη χρήση της κινόνης ως μεταφορέα ηλεκτρονίων. (Μπλε βέλη: Οξειδωση; Κόκκινα βέλη: Αναγωγή).	103
Σχήμα 3.1 Ιστορική αναδρομή μητρικών καλλιεργειών.	138
Σχήμα 3.2 Κατανομή πτητικών και μη-πτητικών ουσιών στις δύο φάσεις.....	147
Σχήμα 3.3 Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες (a) Τριχλωροαιθέριο, (b) cis-Διχλωροαιθέριο, (c) trans-Διχλωροαιθέριο, (d) 1,1-Διχλωροαιθέριο,	154
Σχήμα 3.4 Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες (a) Οξικό οξύ, (b) Προπιονικό οξύ, (c) Ισοβουτυρικό οξύ, (d) Βουτυρικό οξύ, (e) Προπανόλη, (f) Βενζοϊκό οξύ.	157
Σχήμα 3.5 Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες: (a) Θεικών ιόντων, (b) Σουλφιδίων....	159
Σχήμα 3.6 Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης.	162
Σχήμα 3.7 Διάγραμμα ροής της μεθόδου FISH.....	163
Σχήμα 4.1 Επίδοση καλλιέργειας N1 (0 mM, 0 mg/L θεικών ιόντων).	184
Σχήμα 4.2 Επίδοση καλλιέργειας N2 (0 mM, 0 mg/L θεικών ιόντων).	185
Σχήμα 4.3 Επίδοση καλλιέργειας QL1 (0.7 mM, 70 mg/L θεικών ιόντων).....	185

Σχήμα 4.4 Επίδοση καλλιέργειας QL2 (0.7 0 mM, 70 mg/L θειικών ιόντων).....	186
Σχήμα 4.5 Επίδοση καλλιέργειας QM1 (1.6 mM, 150 mg/L θειικών ιόντων).....	186
Σχήμα 4.6 Επίδοση καλλιέργειας QM2 (1.6 mM, 150 mg/L θειικών ιόντων).....	187
Σχήμα 4.7 Επίδοση καλλιέργειας M1 (4.2 mM, 400 mg/L θειικών ιόντων).....	187
Σχήμα 4.8 Επίδοση καλλιέργειας M2 (4.2 mM, 400 mg/L θειικών ιόντων).....	188
Σχήμα 4.9 Σύγκριση αναγωγικών διεργασιών στις μητρικές καλλιέργειες.	190
Σχήμα 4.10 Κατανάλωση οξικού οξέος και παραγωγή μεθανίου στην N1 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).....	192
Σχήμα 4.11 Κατανάλωση οξικού οξέος και παραγωγή μεθανίου στην N2 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).....	192
Σχήμα 4.12 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξειδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια N1 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).	193
Σχήμα 4.13 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξειδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια N2 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).	193
Σχήμα 4.14 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξειδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια QM1 (1.6 mM, 150 mg/L θειικών ιόντων).....	194
Σχήμα 4.15 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξειδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια QM2 (1.6 mM, 150 mg/L θειικών ιόντων).....	194
Σχήμα 4.16 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξειδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια M1 (4.2 mM; 400 mg/L θειικών ιόντων).....	195
Σχήμα 4.17 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξειδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια M2 (4.2 mM; 400 mg/L θειικών ιόντων).....	195
Σχήμα 4.18 Σύνθεση μικροβιακής κοινότητας των μητρικών καλλιεργειών N (0 mg/L SO ₄ ²⁻), QM (150 mg/L SO ₄ ²⁻) και M (400 mg/L SO ₄ ²⁻).	198
Σχήμα 4.19 Σύγκριση της σύνθεσης της βιοκοινότητας των N και M καλλιεργειών (0 και 400 mg/L θειικών ιόντων, αντιστοίχως).	199
Σχήμα 4.20 Συγκριτική αξιολόγηση της απόδοσης των καλλιεργειών χωρίς θειικά (N) και με 400 mg/L θειικών ιόντων (M) ως προς τις αναγωγικές διεργασίες.....	200
Σχήμα 4.21 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NLED (0 mM SO ₄ ²⁻ & 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ).	201
Σχήμα 4.22 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NQMED (0 mM SO ₄ ²⁻ & 2.2 mM But, βουτυρικό οξύ).	202
Σχήμα 4.23 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NMED (I) (0 mM SO ₄ ²⁻ & 3.0 mM But, βουτυρικό οξύ). ^a	202

Σχήμα 4.24 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NMED (II) (0 mM SO ₄ ²⁻ & 3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).	203
Σχήμα 4.25 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NHED (0 mM SO ₄ ²⁻ & 9.1 mM But, βουτυρικό οξύ).	204
Σχήμα 4.26 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QLLED (0.73 mM SO ₄ ²⁻ & 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ).	207
Σχήμα 4.27 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QLQMED (0.73 mM SO ₄ ²⁻ & 2.2 mM But, βουτυρικό οξύ).	208
Σχήμα 4.28 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QMLED (1.56 mM SO ₄ ²⁻ & 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ).	210
Σχήμα 4.29 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QMQLED (1.56 mM SO ₄ ²⁻ & 0.9 mM But, βουτυρικό οξύ).	210
Σχήμα 4.30 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QMMED (1.56 mM SO ₄ ²⁻ & 3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).	211
Σχήμα 4.31 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QMHED (1.56 mM SO ₄ ²⁻ & 9.1 mM But, βουτυρικό οξύ).	211
Σχήμα 4.32 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MMED (4.16 mM SO ₄ ²⁻ & 3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).	214
Σχήμα 4.33 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MHED (4.16 mM SO ₄ ²⁻ & 9.1 mM But, βουτυρικό οξύ).	214
Σχήμα 4.34 Συσχέτιση αρχικής συγκέντρωσης θειικών ιόντων με τις απαιτούμενες ημέρες λειτουργίας για τη μετατροπή περίπου 99% του αρχικού TCE σε αιθέριο στα πειράματα με τη μέση δόση δότη ηλεκτρονίων και βιομάζα από τις καλλιέργειες με μηδενική συγκέντρωση θειικών ιόντων (N), 70 mg/L (QL), 150 mg/L (QM) και 400 mg/L (M).....	219
Σχήμα 4.35 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα CMLED (4.16 ⁺ mM SO ₄ ²⁻ & 0.3 ⁺ mM But, βουτυρικό οξύ).	221
Σχήμα 4.36 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα CMMED (4.16 ⁺ mM SO ₄ ²⁻ & 3.0 ⁺ mM But, βουτυρικό οξύ).	221
Σχήμα 4.37 Συγκέντρωση μεθανίου (τετράγωνα και διακεκομμένη γραμμή με κουκκίδες) και οξικού οξέος (τρίγωνα και διακεκομμένη γραμμή με παύλες) στα	

πειράματα MTHHyd (3 mM H ₂ , υδρογόνο, κενά σύμβολα) και MTHAc (0.8 mM Ac, οξικό οξύ, συμπαγή σύμβολα).	224
Σχήμα 4.38 Συγκέντρωση θειικών ιόντων (τετράγωνα και κουκκίδες ως γραμμή), σουλφιδίων (τρίγωνα και απλή γραμμή) και οξικού οξέος (ρόμβοι και γραμμή με παύλες) στα πειράματα SLF150Hyd (6 mM H ₂ , υδρογόνο, σύμβολα χωρίς γέμισμα) και SLF150Ac (1.5 mM Ac, οξικό οξύ, σύμβολα με γέμισμα).	225
Σχήμα 4.39 Συγκέντρωση θειικών ιόντων (τετράγωνα και κουκκίδες ως γραμμή), σουλφιδίων (τρίγωνα και απλή γραμμή) και οξικού οξέος (ρόμβοι και γραμμή με παύλες) στα πειράματα SLF400Hyd (6 mM H ₂ , υδρογόνο, σύμβολα χωρίς γέμισμα) και SLF400Ac (1.5 mM Ac, οξικό οξύ, σύμβολα με γέμισμα).	226
Σχήμα 4.40 Συγκέντρωση (α) θειικών ιόντων (τετράγωνα και κουκκίδες ως γραμμή), και σουλφιδίων (τρίγωνα και απλή γραμμή), (β) βουτυρικού οξέος (κύκλοι και απλή γραμμή) και οξικού οξέος (ρόμβοι και γραμμή με παύλες) στα πειράματα SLF150LED (0.3 mM βουτυρικό οξύ, σύμβολα με γέμισμα), SLF150MED (3 mM But, βουτυρικό οξύ, σύμβολα χωρίς γέμισμα) και τις μητρικές καλλιέργειες QM (0.5 mM TCE, 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ, σύμβολα με κουκκίδες ως γέμισμα).	227
Σχήμα 4.41 Συγκέντρωση (α) θειικών ιόντων (τετράγωνα και κουκκίδες ως γραμμή), και σουλφιδίων (τρίγωνα και απλή γραμμή), (β) βουτυρικού οξέος (κύκλοι και απλή γραμμή) και οξικού οξέος (ρόμβοι και γραμμή με παύλες) στα πειράματα SLF400LED (0.3 mM βουτυρικό οξύ, σύμβολα με γέμισμα), SLF400MED (3 mM But, βουτυρικό οξύ, σύμβολα χωρίς γέμισμα) και τις μητρικές καλλιέργειες M (0.5 mM TCE, 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ, σύμβολα με κουκκίδες ως γέμισμα).	228
Σχήμα 4.42 Φωτογραφίες βιομάζας των πειραμάτων (α) MPHBCo (β) NPHB, (γ) QMPHB, (δ) MPHB, σε δείγματα που έχει χρησιμοποιηθεί η χρώση Neisser. Οι κύκλοι καταδεικνύουν τις αλυσίδες PHB.	231
Σχήμα 4.43 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα DWNED (μηδενική συγκέντρωση δότη σε απιονισμένο νερό).	237
Σχήμα 4.44 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NNED (βιοκοινότητα από τις N καλλιέργειες με μηδενική συγκέντρωση δότη).	238
Σχήμα 4.45 Συγκέντρωση (α) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (β) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NMED (II) (3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).	239
Σχήμα 4.46 Συγκέντρωση (α) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (β) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα N1DHyd (3.0 mM Hyd, υδρογόνο & 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ).	239
Σχήμα 4.47 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAc (1.5 mM Ac, οξικό οξύ).	240
Σχήμα 4.48 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και προπανόλης στο πείραμα NMProp (0.7 mM Prop, προπανόλη).	241
Σχήμα 4.49 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και βενζοϊκού οξέος στο πείραμα NMBenz (0.4 mM Benz, βενζοϊκό οξύ).	242

Σχήμα 4.50 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με διαφορετικά είδη δότη ηλεκτρονίων.	242
Σχήμα 4.51 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα DWMHq (6 mM Hq, υδροκινόνη σε απιονισμένο νερό).	246
Σχήμα 4.52 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMHq (6 mM Hq, υδροκινόνη στις καλλιέργειες N).	247
Σχήμα 4.53 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcLHq (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 0.6 mM Hq, υδροκινόνη).	248
Σχήμα 4.54 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcMHq (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 6 mM Hq, υδροκινόνη).	248
Σχήμα 4.55 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMDOM (661 mg/L DOM, διαλυτή οργανική ύλη).	249
Σχήμα 4.56 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcMDOM (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 661 mg/L DOM, διαλυτή οργανική ύλη).	250
Σχήμα 4.57 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με φυσική οργανική ύλη εδάφους.	250
Σχήμα 4.58 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα DWMFeS (6 mM FeS σε απιονισμένο νερό).	255
Σχήμα 4.59 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMFeS (6 mM FeS στις καλλιέργειες N).	256
Σχήμα 4.60 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcLFeS (1.5 mM Ac & 0.6 mM FeS). ...	256
Σχήμα 4.61 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NQMAcLFeS (2 mM Ac & 0.6 mM FeS).	257
Σχήμα 4.62 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcMFeS (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 6 mM FeS).	258
Σχήμα 4.63 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMHqMFeS (6 mM Hq, υδροκινόνη, & 0.6 mM FeS).	259
Σχήμα 4.64 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με θειούχο σίδηρο (FeS) και σύγκριση με πειράματα NNED (βιομάζα) και NMAc (οξικό οξύ).	260
Σχήμα 4.65 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMFeCl ₂ (6 mM FeCl ₂ στις καλλιέργειες N).	261
Σχήμα 4.66 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcMFeCl ₂ (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 6 mM FeCl ₂).	262
Σχήμα 4.67 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NQMAcLFeCl ₃ (2 mM Ac, οξικό οξύ & 0.6 mM FeCl ₃).	263
Σχήμα 4.68 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με διαλυτό σίδηρο (FeCl ₂ και FeCl ₃) και σύγκριση με πειράματα NNED (βιομάζα) και NMAc (οξικό οξύ)	264

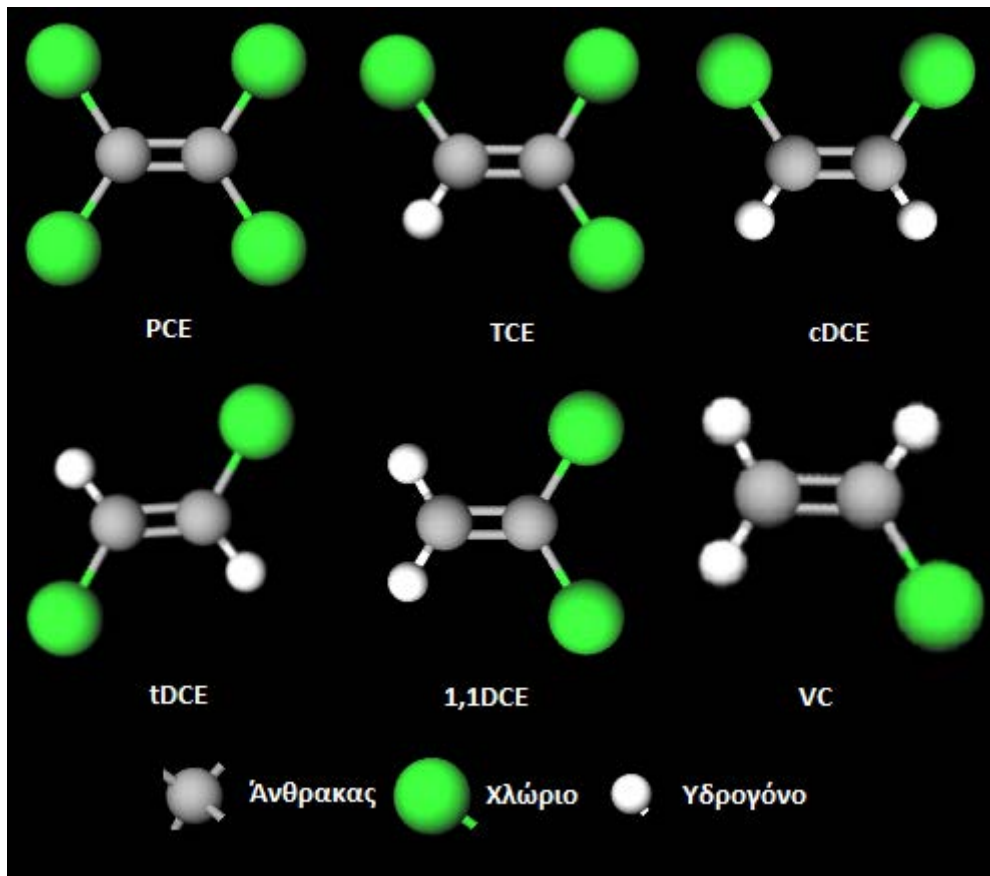
Σχήμα 4.69 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και προπανόλης στο πείραμα NMPPropLFeS (0.7 mM Prop, προπανόλη & 0.6 mM FeS).	265
Σχήμα 4.70 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και προπανόλης στο πείραμα NMPPropMFeS (0.7 mM Prop, προπανόλη & 6 mM FeS).	265
Σχήμα 4.71 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με προπανόλη (Prop) και θειούχο σίδηρο (FeS).	266
Σχήμα 4.72 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου, θειικών ιόντων και οξικού οξέος στο πείραμα MMAcMFeS (1.5 mM Ac, οξικό οξύ, 6 mM FeS & 400 mg/L SO_4^{2-}).	270
Σχήμα 4.73 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου, θειικών ιόντων και οξικού οξέος στο πείραμα MQHAcLFeS (5.7 mM Ac, οξικό οξύ, 0.6 mM FeS & 400 mg/L SO_4^{2-}).	271
Σχήμα 4.74 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα MMAcLFeCl ₃ (1.5 mM Ac, οξικό οξύ, 0.6 mM FeCl ₃ & 400 mg/L SO_4^{2-}).	272
Σχήμα 4.75 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα MQHAcLFeCl ₃ (5.7 mM Ac, οξικό οξύ, 0.6 mM FeCl ₃ & 400 mg/L SO_4^{2-}).	273
Σχήμα 4.76 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με σίδηρο υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες και σύγκριση με πείραμα MMED (βουτυρικό οξύ).	273
Σχήμα 4.77 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NMRCW (96 mg/L COD από προεπεξεργασμένο τυρόγαλο).	277
Σχήμα 4.78 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NHRCW (480 mg/L COD από προεπεξεργασμένο τυρόγαλο).	277
Σχήμα 4.79 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NMPCW (96 mg/L COD από επεξεργασμένο τυρόγαλο).	278
Σχήμα 4.80 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NHPCW (480 mg/L COD από επεξεργασμένο τυρόγαλο).	279
Σχήμα 4.81 Μέτρο αποχλωρίωσης M_{Cl} στα πειράματα με τυρόγαλο πλούσιας περιοικτικότητας σε οργανική ύλη (NMRCW και NHRCW), τυρόγαλο με χαμηλή περιοικτικότητα (NMPCW και NHPCW) και σύγκριση με πείραμα NMED (βουτυρικό οξύ).	279
Σχήμα 4.82 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων στο πείραμα MMRCW (96 mg/L COD από προεπεξεργασμένο τυρόγαλο & 400 mg/L SO_4^{2-}).	281
Σχήμα 4.83 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων στο πείραμα MHRCW (480 mg/L COD από προεπεξεργασμένο τυρόγαλο & 400 mg/L SO_4^{2-}).	282
Σχήμα 4.84 Δείκτης M_{Cl} στα πειράματα με τυρόγαλο υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες (MMRCW και MHRCW) και σύγκριση με πείραμα MMED (μέση δόση βουτυρικού οξέος και μέση συγκέντρωση θειικών ιόντων).	283

Σχήμα Γ.1. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα N14DHyd (0.3 mM But και 3.0 mM Hyd στις 14 ημέρες λειτουργίας).....	384
Σχήμα Γ.2. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NMEDMS (4.16 mM SO42- & 3.0 mM But στις N καλλιέργειες).....	384
Σχήμα Γ.3. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NHEDMS (4.16 mM SO42- & 9.1 mM But στις N καλλιέργειες).....	385
Σχήμα Γ.4. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MMEDR (4.16 mM SO42- & 3 mM But, όπου προστέθηκε 1 mL RAMM την 133η ημέρα).	385
Σχήμα Γ.5. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MMEDST (4.16 mM SO42- & 3 mM But, όπου προστέθηκαν 15 μ L διαλύματος σεληνίου-βολφραμίου την 133η ημέρα).....	386
Σχήμα Γ.6. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MMEDVit (4.16 mM SO42- & 3 mM But, όπου προστέθηκε 150 μ L διαλύματος βιταμινών την 133η ημέρα).....	386
Σχήμα Γ.7. Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου και μεθανίου στο πείραμα NMCW (96 mg/L COD τυρόγαλου από τυροκομείο στην Αρκαδία).....	387
Σχήμα Γ.8. Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου και μεθανίου στο πείραμα NHCW (480 mg/L COD τυρόγαλου από τυροκομείο στην Αρκαδία).....	387
Σχήμα Γ.9. Επίδοση καλλιέργειας L1.....	388
Σχήμα Γ.10. Επίδοση καλλιέργειας L2.	388
Σχήμα Γ.11. Επίδοση καλλιέργειας MMB1.....	389
Σχήμα Γ.12. Επίδοση καλλιέργειας MMB2.....	389
Σχήμα Γ.13. Επίδοση καλλιέργειας H1.....	390
Σχήμα Γ.14. Επίδοση καλλιέργειας H2.....	390

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή

1.1. Τα χλωριωμένα αιθένια και τα χαρακτηριστικά τους

Τα χλωριωμένα αιθένια είναι ομάδα ενώσεων που αποτελούνται από δύο άτομα άνθρακα ενωμένα μεταξύ τους με διπλό δεσμό και ένα ως τέσσερα άτομα χλωρίου. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα των χλωριωμένων αιθενίων αποτελείται από: α) το τετραχλωροαιθένιο (Tetrachloroethylene or Perchloroethylene; PCE) με 4 άτομα χλωρίου, β) το τριχλωροαιθένιο (Trichloroethylene; TCE) με 3 άτομα χλωρίου και 1 υδρογόνου, γ) το διχλωροαιθένιο (Dichloroethylene; DCE) με 2 άτομα χλωρίου και 2 υδρογόνου και δ) το βινυλοχλωρίδιο (Vinyl Chloride; VC) με 1 άτομο χλωρίου και 3 υδρογόνου. Ιδιαίτερα το διχλωροαιθένιο παρουσιάζεται με τρία ισομερή ανάλογα με τη θέση των ατόμων χλωρίου στην ένωση, το cis- (cDCE), το trans- (tDCE) και το 1,1- (1,1DCE) DCE (McCarty, 1993). Στο Σχήμα 1.1 εμφανίζεται η τριδιάστατη μορφή όλων των μελών της ομάδας, ενώ στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα χημικά χαρακτηριστικά τους.



Σχήμα 1.1. Τριδιάστατη μορφή χλωριωμένων αιθενίων.

Πίνακας 1.1. Χημικά χαρακτηριστικά χλωριωμένων αιθενίων.

Χαρακτηριστικά	PCE	TCE	cDCE	tDCE	1,1DCE	VC
Μοριακός τύπος	C ₂ Cl ₄	C ₂ HCl ₃		C ₂ H ₂ Cl ₂		C ₂ H ₃ Cl
Μοριακό βάρος (gr/mole)	165.83 ^d	131.39 ^d		96.94 ^d		62.50 ^d
Σχετική πυκνότητα (gr/mL) ^a	1.623 ⁱ	1.464 ⁱ	1.284 ⁱ	1.257 ^{iv}	1.218 ⁱ	0.911 ⁱ
Διαλυτότητα (mg/L) ^b	151 ⁱ	1198 ⁱ	3500 ⁱ	4520 ^{iv}	2250 ⁱ	2792 ⁱ
Συντελεστής διαχωρισμού οκτανόλης-νερού (log K _{ow}) ^b	2.88 ⁱ	2.42 ⁱ	1.86 ⁱ	2.06 ^{iv}	2.02 ⁱ	1.38 ^{viii}
Συντελεστής διαχωρισμού άνθρακα-νερού (K _{oc}) ^b	364 ^{viii}	126 ^{viii}	49 ^{viii}	59 ^{viii}	65 ^{viii}	15 ^{d,xii}
Συντελεστής Henry ^{b,c}	0.690 ⁱⁱ	0.357 ⁱⁱ	0.167 ⁱⁱⁱ	0.384 ⁱⁱⁱ	1.069 ⁱⁱⁱ	1.137 ⁱⁱⁱ
Σημείο βρασμού (°C)	121 ^{iv}	87.2 ^v	60.1 ^{vi}	48.7 ^{vi}	31.6 ^{vii}	-13.4 ^{xiii}
Σημείο τήξης (°C)	-19 ^{iv}	-84.7 ^v	-80 ^{vi}	-49.8 ^{vi}	-122.5 ^{vii}	-153.8 ^{xiii}
Τάση ατμών (mmHg)	18.5 ^{a,iv}	69.8 ^{b,v}	200 ^{b,vi}	331 ^{b,vi}	502 ^{a,vii}	2660 ^{a,viii}
Ικανότητα διάχυσης (*10 ⁻⁶ cm ² /sec) ^a	7.59 ^{ix}	8.43 ^{ix}	9.58 ^{ix}	9.58 ^{ix}	9.58 ^{ix}	11.3 ^x
Ιξώδες (cP)	0.90 ^{a,x}	0.57 ^{a,x}	0.44 ^{b,xi}	0.40 ^{a,xi}	0.36 ^{a,xi}	

^aΣτους 20°C; ^bΣτους 25°C; ^cΑδιάστατο μέγεθος; ^dΥπολογισμένο.

Πηγή: ⁱScheutz et al., 2011; ⁱⁱPeng & Wan, 1997; ⁱⁱⁱGossett, 1987; ^{iv}USEPA, 2012; ^vUSEPA, 2011; ^{vi}USEPA, 2010a; ^{vii}USEPA, 2002; ^{viii}LaGrega et al., 1994; ^{ix}Wüst et al., 1999; ^xRivett et al., 2001; ^{xi}Mercer & Cohen, 1990; ^{xii}Karickhoff et al., 1979; ^{xiii}Huang et al., 2014.

Από την ομάδα των χλωριωμένων αιθενίων, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το τριχλωροαιθέριο (TCE), εξαιτίας της ευρείας χρήσης του στον εμπορικό, τον στρατιωτικό και τον βιομηχανικό τομέα (Jin et al., 2008; Moran et al., 2007). Η παραγωγή του ξεκίνησε το 1923, ενώ τη δεκαετία του 1960 ήταν ο συνηθέστερος χρησιμοποιούμενος διαλύτης (Pankow & Cherry, 1996). Χρησιμοποιείται ευρέως ως απολιπαντικό για μεταλλικά και ηλεκτρονικά μέρη, εκχυλιστικό μέσο για την παραγωγή λαδιών, κεριών, λιπών, και άλλων χημικών, διαλύτης σε καρβοξυλικούς εστέρες και αιθέρες, υγρό στεγνού καθαρισμού, κ.λπ., ενώ μπορεί να βρίσκεται στις κατοικίες μέσα σε βαφές, υγρά καθαρισμού, κ.ά. (USEPA, 2009).

Η ευρύτατη χρήση του, λοιπόν, σε συνδυασμό με τις μη ορθές πρακτικές αποθήκευσης και διάθεσης που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν οδήγησαν στη συχνή ανίχνευσή του στο υπόγειο νερό (Pankow & Cherry, 1996; Squillace et al., 1999). Πιο συγκεκριμένα, είναι ο πιο συχνά παρατηρούμενος οργανικός ρύπος σε ρυπασμένους χώρους εθνικής προτεραιότητας (National Priority List-NPL) στις ΗΠΑ (USEPA, 2016), ενώ βρίσκεται στο 20% των υποβαθμισμένων υπόγειων νερών στη Δανία (Hønning, 2007). Αν και τα χλωριωμένα αιθένια έχουν θεωρηθεί κατά καιρούς ότι είναι ανθρωπογενούς προέλευσης, δηλαδή δεν παρουσιάζονται φυσικά στο

περιβάλλον (USEPA, 2009), έχουν βρεθεί σε ηφαιστειακές εκπομπές (Jordan et al., 2000), ενώ το VC μπορεί να παραχθεί στο έδαφος μέσω αντιδράσεων της οργανικής ύλης, του τριθενούς σιδήρου και του χλωρίου (Kerpler et al., 2002). Επίσης, τα πειράματα των Weissflog (2005) με ιζήματα λίμνης έδειξαν de novo παραγωγή του PCE και του TCE.

Το TCE είναι ένα άχρωμο, μη εύφλεκτο υγρό που εξατμίζεται γρήγορα στην αέρια φάση (USEPA, 2009). Στηριζόμενες σε αυτές τις ιδιότητές του, οι χημικές βιομηχανίες στις ΗΠΑ θεωρούσαν μέχρι το 1971 ότι η απόθεση του χρησιμοποιημένου TCE μπορεί να γίνει σε ρηχές εκσκαφές στο έδαφος, με σκοπό την εξάτμισή του, ή ότι μπορεί να θαφτεί μακριά από πηγές νερού, χωρίς όμως να θεωρείται αναγκαία κάποια επένδυση, δηλαδή χωρίς κάποια μέριμνα για τη διήθησή του στο έδαφος (Pankow & Cherry, 1996).

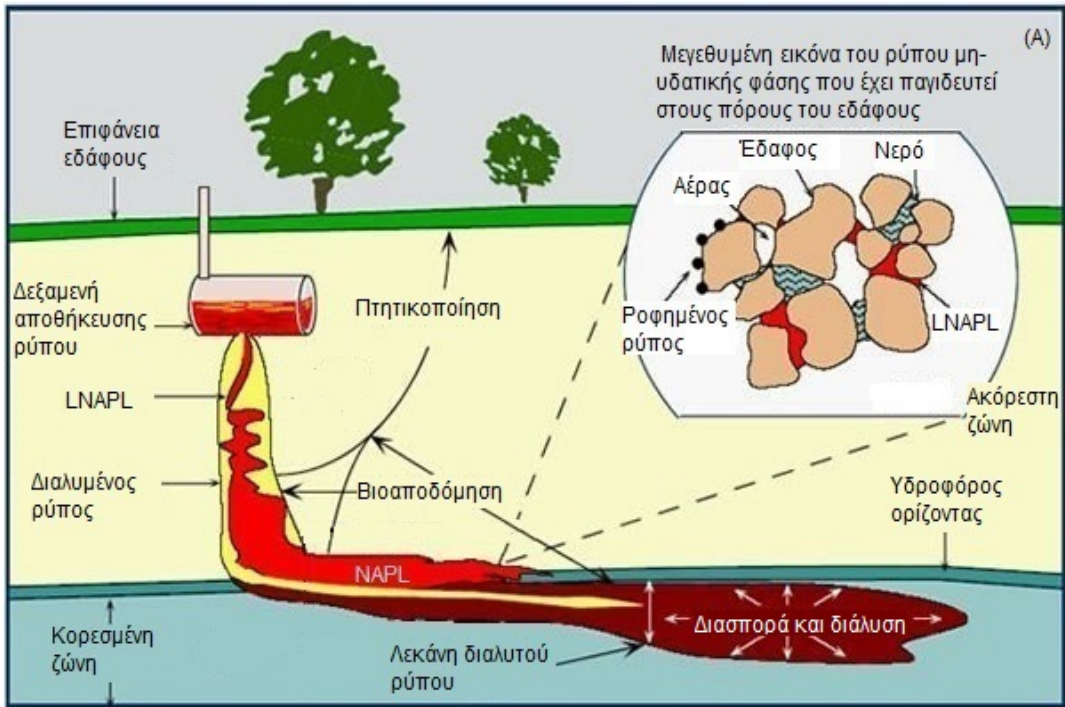
Ταυτόχρονα, όμως, με την απόθεσή του στο περιβάλλον, το TCE έχει την τάση να εξαπλώνεται σε ευρεία κλίμακα προκαλώντας ρύπανση του υπεδάφους¹ εξαιτίας των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών του (Moran et al., 2007). Μια ουσία με μεγάλη πυκνότητα και χαμηλό ιξώδες έχει την ικανότητα να διαπεράσει γρήγορα ένα πορώδες μέσο (Morrison & Murphy, 2013). Αναλυτικότερα, το ιξώδες του TCE είναι περίπου το μισό από αυτό του νερού (Mercer & Cohen, 1990), με αποτέλεσμα, όταν διαρρεύσει η ουσία, να φτάνει σε ένα σημαντικό βάθος (Abe et al., 2009a). Επιπλέον, η σχετική πυκνότητά του είναι 1.46 gr/mL, ενώ έχει μικρή διαλυτότητα στο νερό, περίπου 1198 mg/L (Scheutz et al., 2011). Έτσι, διηθείται ως μια ξεχωριστή μη υδατική φάση.

Εφόσον η σχετική πυκνότητα του TCE είναι μιάμιση φορά μεγαλύτερη από αυτή του νερού, ο συγκεκριμένος ρύπος ανήκει στην κατηγορία «Μη υδατικής φάσης βαρέων υγρών» (Dense Non Aqueous Phase Liquids; DNAPLs). Η φάση αυτή βρίσκεται σε χαμηλότερη στάθμη από το νερό, σε αντίθεση με τα «Μη υδατικής φάσης ελαφρά υγρά», τα οποία επιπλέουν στο υπόγειο νερό (Pankow & Cherry, 1996). Έτσι, μάζα του TCE παγιδεύεται στη μη υδατική φάση σχηματίζοντας σβώλους ή λεκάνες πάνω από το αδιαπέρατο στρώμα υπεδάφους και δρώντας μακροχρόνια ως πηγή ρύπου.

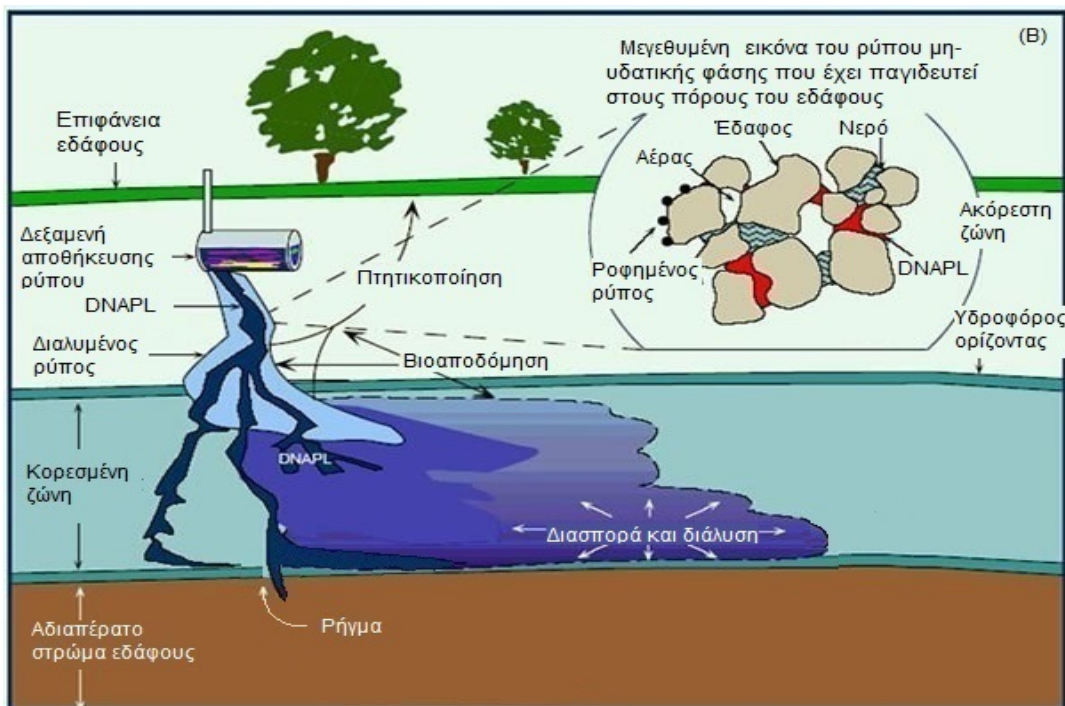
Ταυτόχρονα, διαλύεται αργά στο υπόγειο νερό (Clement et al., 2004; Dridi et al., 2009), ροφάται στο έδαφος (Clement et al., 2004) και παράγει ατμούς εξαιτίας της υψηλής πτητικότητας του TCE, οι οποίοι μεταβαίνουν στην ακόρεστη ζώνη (Dridi et al., 2009). Υπό τις συνθήκες αυτές, το TCE ενδέχεται να μετατραπεί μέσω χημικών και βιολογικών διαδικασιών είτε σε άλλα χλωριωμένα αιθέρια είτε σε άλλες ουσίες, όπως η ασετυλίνη, το διοξειδίο του άνθρακα, κ.ά. (McCarty, 1993). Στα Σχήματα 1.2 και 1.3 παρουσιάζεται το μοντέλο κίνησης των δύο κατηγοριών υγρών μη υδατικής φάσης (NAPLs), ενώ στο Σχήμα 1.4 παρουσιάζονται οι σχέσεις μεταξύ των φάσεων του ρύπου, όπως περιγράφηκαν παραπάνω.

¹ Ο όρος υπεδάφος χρησιμοποιείται εδώ για να περιλάβει το έδαφος και το υπόγειο νερό (subsurface).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

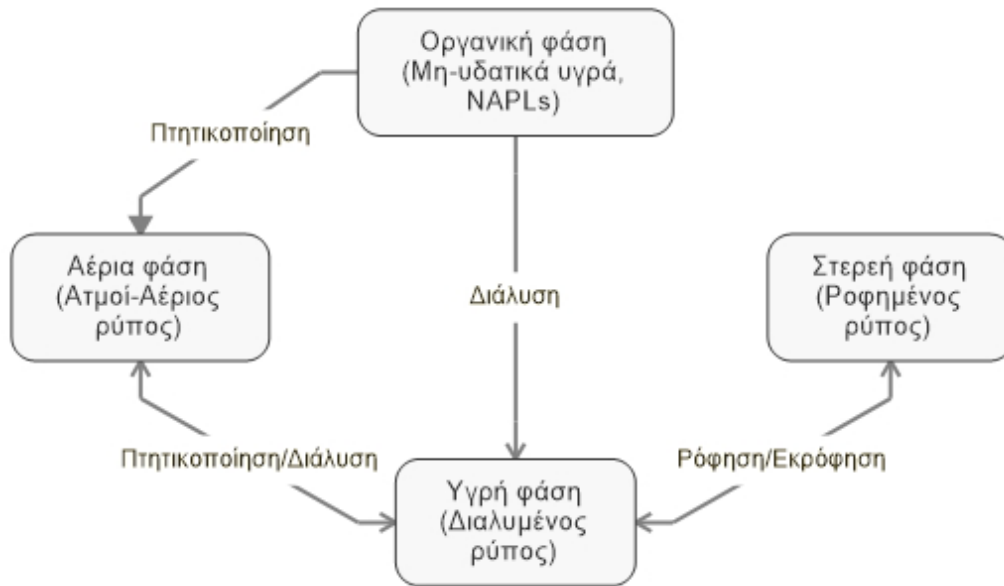


Σχήμα 1.2. Μοντέλο κίνησης «Μη υδατικής φάσης ελαφρών υγρών» (LNAPLs) (USEPA, 1999a).



Σχήμα 1.3. Μοντέλο κίνησης «Μη υδατικής φάσης βαρέων υγρών» (DNAPLs) (USEPA, 1999b).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 1.4. Σχέσεις φάσεων.

Επιπροσθέτως, το TCE, αλλά και τα χλωριωμένα παράγωγά του μπορεί να έχουν επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να εκτεθεί σε αυτές ουσίες μέσω της αναπνοής, της λήψης πόσιμου νερού και τροφής, της κολύμβησης, του πλυσίματος του σώματος ή/και των ρούχων (Huang et al., 2014). Χαρακτηριστικά, η μακροχρόνια έκθεση σε TCE ή/και VC μπορεί να προκαλέσει την αύξηση της πιθανότητας καρκίνου στο συκώτι, τον εγκέφαλο, τον πνεύμονα, κ.ά. (USEPA, 2011; USEPA, 2000a). Πιο συγκεκριμένα, επιδημιολογικές μελέτες επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση μεταξύ του αυξημένου ποσοστού εμφάνισης καρκίνου στον οισοφάγο, το αίμα και τον τράχηλο της μήτρας με την έκθεση σε PCE, ενώ υπάρχει ανάλογη συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε TCE με το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου στο συκώτι, τη χολή και το αίμα (Huang et al., 2014). Τα χλωριωμένα αιθένια μπορούν να προκαλέσουν και άλλα προβλήματα υγείας, όπως επιπτώσεις στο συκώτι, το κεντρικό νευρικό σύστημα, τα νεφρά, το ανοσοποιητικό σύστημα, κ.λπ. (USEPA, 2011; USEPA, 2012a; USEPA, 2000a; USEPA, 2002; USEPA, 2010a).

Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται τα βασικότερα προβλήματα υγείας που προκαλεί το κάθε χλωριωμένο αιθένιο μετά από μακροχρόνια έκθεση, την κατάταξή του ως προς την καρκινογόνο δράση του και τις βασικές πηγές του ρύπου στο πόσιμο νερό.

Πίνακας 1.2. Επιπτώσεις χλωριωμένων αιθενίων στην ανθρώπινη υγεία.

Χλωριωμένα αιθένια	Πιθανές επιπτώσεις από μακροχρόνια έκθεση ⁱ	Κατάταξη ως προς την καρκινογόνο δράση ^{a,ii}	Πηγές ρύπου στο πόσιμο νερό ⁱ
PCE	Αυξημένη πιθανότητα καρκίνου, προβλήματα στο συκώτι	2A	Εργοστάσια παραγωγής χημικών και στεγνοκαθαριστήρια
TCE	Αυξημένη πιθανότητα καρκίνου, προβλήματα στο συκώτι	1	Χώροι απολίπανσης μετάλλων και άλλα εργοστάσια
1,1DCE	Προβλήματα στο συκώτι	UnC	Εργοστάσια παραγωγής χημικών
tDCE	Προβλήματα στο συκώτι	UnC	Εργοστάσια παραγωγής χημικών
cDCE	Προβλήματα στο συκώτι	3	Εργοστάσια παραγωγής χημικών
VC	Αυξημένη πιθανότητα καρκίνου	1	Διαρροή από σωλήνες PVC, εργοστάσια παρασκευής πλαστικών

^a1: Προκαλεί καρκίνο στους ανθρώπους, 2A: Πιθανότατα καρκινογόνο, 3: Μη-ταξινομημένο ως προς την καρκινογόνο δράση του, UnC: δεν παρουσιάζεται στη λίστα.

Πηγή: ⁱUSEPA, 2016; ⁱⁱIARC, 2016.

Εξαιτίας των επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία ορισμένα χλωριωμένα αιθένια έχουν καταταχθεί ως ουσίες προτεραιότητας από την Environmental Protection Agency (EPA) των ΗΠΑ, το Υπουργείο Προστασίας του περιβάλλοντος της Κίνας και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Huang et al., 2014). Το PCE και το TCE είναι στον κατάλογο επικίνδυνων ουσιών της Οδηγίας Πλαισίου για τα Νερά 2000/60, η οποία θεσμοθετήθηκε από το Ευρωπαϊκό κοινοβούλιο με σκοπό την κάλυψη της ανάγκης για μια ολοκληρωμένη προσέγγιση στο θέμα της διαχείρισης και προστασίας των υδατικών πόρων, με τους εξής τρεις βασικούς στόχους:

- 1) τη διατήρηση και τη βελτίωση των υδάτινων οικοσυστημάτων, αλλά και την αποτροπή της περαιτέρω επιδείνωσης,
- 2) την καλή κατάσταση των υπόγειων υδάτων και την αναστροφή κάθε σημαντικής συγκέντρωσης ρύπων, και τέλος,
- 3) την εξάλειψη των επικίνδυνων ουσιών προτεραιότητας και τη μείωση των υπόλοιπων επικίνδυνων ουσιών.

Η οδηγία 2000/60/EK περιέχει, επίσης, γενικές διατάξεις για την προστασία και τη διατήρηση των υπόγειων υδάτων. Ειδικότερα, σύμφωνα με το άρθρο 17, πρόκυψε το θέμα θέσπισης ειδικών μέτρων πρόληψης και ελέγχου της ρύπανσης των υπόγειων

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

υδάτων, ενώ περιλαμβάνουν και κριτήρια για την αξιολόγηση της καλής χημικής κατάστασης των υπόγειων υδάτων, τον προσδιορισμό σημαντικής και βιώσιμης ανοδικής τάσης, και τον καθορισμό σημείων εκκίνησης για την αναστροφή της τάσης.

Με σκοπό τη θέσπιση των ειδικών μέτρων αλλά και τη συμπλήρωση διατάξεων για την πρόληψη ή τον περιορισμό της εισαγωγής ρύπων σε υπόγεια ύδατα, η Ευρωπαϊκή Κοινότητα συνέταξε την οδηγία 2006/118 σχετικά με την προστασία των υπόγειων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση. Τα κριτήρια που τέθηκαν ήταν ποιοτικά πρότυπα υπόγειων υδάτων και ανώτερες αποδεκτές τιμές για ρύπους, οι οποίοι συμβάλλουν στην υποβάθμιση των υπόγειων υδάτων. Η ενσωμάτωσή της στο ελληνικό δίκαιο πραγματοποιήθηκε με την ΚΥΑ 39626/2208/Ε130/2009, ενώ οι ανώτερες αποδεκτές τιμές των επικίνδυνων ουσιών ορίστηκαν στο ΦΕΚ 3322/30-12-2011. Στον Πίνακα 1.3 φαίνονται τα όρια νομοθεσίας για το πόσιμο νερό που έχουν τεθεί σε διάφορες χώρες, η παρουσία των χλωριωμένων αιθενίων και η καρκινογόνος δράση τους, ενώ στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζονται οι οριακές τιμές και οι τιμές παρέμβασης για το έδαφος και τα υπόγεια νερά που τέθηκαν στην Ολλανδία, η οποία πρωτοστατεί στην ΕΕ σε θέματα περιβάλλοντος.

Πίνακας 1.3. Νομοθετικά όρια χλωριωμένων αιθενίων για τα πόσιμα νερά.

Ουσίες	PCE	TCE	cDCE	tDCE	1,1DCE	VC
Όρια νομοθεσίας (µg/L)						
ΗΠΑ	5 ⁱ	5 ⁱ	70 ⁱ	100 ⁱ	7 ⁱ	2 ⁱ
Καλιφόρνια, ΗΠΑ	5 ⁱⁱ	5 ⁱⁱ	6 ⁱⁱ	10 ⁱⁱ	6 ⁱⁱ	0.5 ⁱⁱ
Δανία	1 ⁱⁱⁱ	1 ⁱⁱⁱ	1 ⁱⁱⁱ	1 ⁱⁱⁱ	1 ⁱⁱⁱ	0.2 ⁱⁱⁱ
Ελλάδα	10 ^{a,iv}		N/S ^{b,iv}	N/S ^{b,iv}	N/S ^{b,iv}	N/S ^{b,iv}
Π.Ο.Υ.	40 ^v	20 ^v	50 ^{a,v}		N/S ^{b,v}	0.3 ^v
Χαρακτηριστικά ρύπανσης						
Ρυπασμένες περιοχές των ΗΠΑ (ως το 2010)	494 ^{vi}	634 ^{vi}	225 ^{vi}		182 ^{vi}	518 ^{vi}

^aΆθροισμα των δύο ουσιών; ^bN/S (Not Set): Δεν ορίστηκε τιμή.

Πηγή: ⁱUSEPA, 2016; ⁱⁱCDPH, 20098; ⁱⁱⁱDanish EPA, 2014; ^{iv}ΚΥΑ Υ2/2600/2001; ^vWHO, 2011; ^{vi}Scheutz et al., 2011.

Ζητήματα όπως οι επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, το νομοθετικό πλαίσιο, κ.λπ., μπορεί να κάνουν επιτακτική την ανάγκη μείωσης του TCE, αλλά και όλων των χλωριωμένων αιθενίων. Αν θεωρηθεί αναγκαία η λήψη τεχνικών μέτρων σε ένα ρυπασμένο πεδίο, τότε θα πρέπει να γίνει η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου. Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματεύεται μια σημαντική μέθοδο αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών, την αναγωγική αποχλωρίωση, η οποία μετατρέπει τον αρχικό ρύπο σε μια μορφή με λιγότερα άτομα χλωρίου, έως ότου το τελικό προϊόν να είναι το αιθέριο, και αναλύεται λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 2.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 1.4. Τιμές ορίων και παρέμβασης σύμφωνα με την Ολλανδική νομοθεσία (Rijkswaterstaat, 2013).

Ουσίες	Οριακή τιμή		Τιμή παρέμβασης	
	Υπόγειο νερό	Έδαφος	Έδαφος	Υπόγειο νερό
	μg/L	mg/kg	mg/kg	μg/L
PCE	0.01	8.8	8.8	40
TCE	24	2.5	2.5	500
DCEs	0.01	1.0	1.0	20
1,1DCE	0.01	0.3	0.3	10
VC	0.01	0.1	0.1	5.0

1.2. Ερευνητικοί στόχοι

Το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι μελέτη της εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες. Τα ερωτήματα που τίθενται αφορούν κυρίως στην αποσαφήνιση και την απάντηση θεμάτων σχετικά με την αποχλωρίωση υπό συνθήκες αναγωγής θειικών ιόντων και σιδήρου, θέμα για το οποίο είτε οι μελέτες άλλων ερευνητών είχαν εξαγάγει αντικρουόμενα και αμφιλεγόμενα αποτελέσματα είτε δεν φαίνεται να είχαν διερευνηθεί επαρκώς. Αναλυτικότερα, στο πλαίσιο της διατριβής οι ερευνητικοί στόχοι που τίθενται είναι οι εξής:

- Η διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων στην επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας.
- Η διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην επίδοση της αποχλωρίωσης του TCE υπό μεθανογόνες και θειικοαναγωγικές συνθήκες.

1.3. Δομή διδακτορικής διατριβής

Σύμφωνα με τους ερευνητικούς στόχους που τίθενται και με σκοπό την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελείται από πέντε Κεφάλαια.

- Το παρόν κεφάλαιο 1, έδωσε μια εισαγωγή σχετικά με τα χλωριωμένα αιθέρια και το θεσμοθετημένο νομικό πλαίσιο για την προστασία των υπόγειων υδάτων, τους ερευνητικούς στόχους και τη διάρθρωση της διατριβής.
- Στο Κεφάλαιο 2 αναλύεται το θεωρητικό υπόβαθρο της βιβλιογραφικής ανασκόπησης και απαρτίζεται από τέσσερις βασικές ενότητες, στις οποίες αναπτύσσονται τα εξής: i) οι μέθοδοι απομάκρυνσης των χλωριωμένων αιθέρια στο υπόγειο νερό, ii) η αβιοτική αναγωγική αποχλωρίωση και η επίδραση των ορυκτών σιδήρου, iii) η βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση, με

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

έμφαση στον δότη ηλεκτρονίων και τη σύνθεση της κοινότητας καλλιεργειών ανεπτυγμένων με χλωριωμένα αιθένια και iv) η αναγωγική αποχλωρίωση υπό ανταγωνιστικές συνθήκες.

- Στο Κεφάλαιο 3 περιγράφονται τα πειράματα που σχεδιάστηκαν με βάση τους ερευνητικούς στόχους, ο εργαστηριακός εξοπλισμός, ο τρόπος παρασκευής-συντήρησης των πειραμάτων και οι εργαστηριακές αναλύσεις που χρησιμοποιήθηκαν.
- Στο Κεφάλαιο 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και η ανάλυση αυτών των αποτελεσμάτων.
- Το Κεφάλαιο 5 συνοψίζει τα συμπεράσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής.
- Τα παραρτήματα περιέχουν το φωτογραφικό υλικό, τα αποτελέσματα πρόσθετων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και άλλες πληροφορίες.

Κεφάλαιο 2 Θεωρητικό υπόβαθρο

Στο παρόν κεφάλαιο πραγματοποιείται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την αναγωγική αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθενίων σε ρυπασμένες περιοχές με ιδιαίτερη έμφαση στην επίδραση των γεωχημικών παραμέτρων του εδάφους στη συγκεκριμένη τεχνολογία. Πιο συγκεκριμένα, απαρτίζεται από τέσσερις ενότητες, όπου αναλύονται οι μέθοδοι απομάκρυνσης των χλωριωμένων αιθενίων στο υπόγειο νερό, η αβιοτική αναγωγική αποχλωρίωση και η επίδραση των ορυκτών σιδήρου, η βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση με την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων και ο ανταγωνισμός για το δότη ηλεκτρονίων.

2.1. Αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών

2.1.1. Εισαγωγή

Η αστικοποίηση, η βιομηχανοποίηση και ιδίως η ανεξέλεγκτη διάθεση αποβλήτων, σε συνδυασμό με την αύξηση του πληθυσμού έχουν οδηγήσει σε συσσωρευμένες ποσότητες επικίνδυνων οργανικών και ανόργανων ρύπων στο υπέδαφος, προκαλώντας μια πίεση στο περιβάλλον, αλλά και στην ανθρώπινη υγεία (Gong et al., 2016; Häggblom & Bossert, 2003; Δερματάς, 2012). Επιπροσθέτως, η αντιμετώπιση του προβλήματος αλλά και η θέσπιση κατάλληλης νομοθεσίας πραγματοποιήθηκαν με μια χρονική υστέρηση, κυρίως γιατί η ρύπανση του υπόγειου νερού και του υδροφορέα δεν γίνεται άμεσα αντιληπτή, ενώ εξαπλώνεται με αργούς ρυθμούς (Πανταζίδου, 2011).

Στην Ευρώπη, μόνο, το πλήθος των εν δυνάμει ρυπασμένων περιοχών και των περιοχών των οποίων η ρύπανση έχει επιβεβαιωθεί προσεγγίζει τις 3,500 και 500 χιλιάδες αντίστοιχα, ενώ το ετήσιο κόστος αποκατάστασης εκτιμάται μεταξύ 2.5-17.3 δισεκατομμύρια ευρώ (Majone et al., 2015). Οι κύριοι λόγοι για την αποκατάσταση μιας περιοχής είναι η προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος, η επανέναρξη της ανάπτυξης, η βελτίωση προηγούμενου έργου και η αποφυγή περιβαλλοντικών προστίμων (Γιδαράκος κ.ά., 2009). Η πραγματοποίησή της μπορεί να επιτευχθεί με μια σειρά από τεχνικά και διαχειριστικά μέτρα (Πανταζίδου, 2011; USEPA, 2012b).

Τα διαχειριστικά μέτρα (Institutional controls; ICs) δεν είναι μηχανικά εργαλεία αλλά διοικητικές και νομικές ενέργειες, που βοηθούν να μειωθεί η πιθανότητα έκθεσης των ανθρώπων στον ρύπο ή/και να βελτιωθούν και να προστατευθούν τα άλλα μέτρα (USEPA, 2012b; USEPA, 2010b). Τυπικά παραδείγματα διαχειριστικών μέτρων είναι η ενημέρωση για την ορθή ανθρώπινη συμπεριφορά στο πεδίο, ο περιορισμός πρόσβασης στην περιοχή ή/και χρήσης των πόρων, όπως η παύση υδροληψίας από γεωτρήσεις, κ.ά. (USEPA, 2012b; Πανταζίδου, 2011).

Ο εντοπισμός ενός περιστατικού ρύπανσης δεν επιβάλλει ταυτόχρονα τη λήψη τεχνικών μέτρων, αφού πρέπει να εξεταστεί το μέγεθος του προβλήματος και να τεθούν περιβαλλοντικές προτεραιότητες σε εθνικό ή τουλάχιστον περιφερειακό επίπεδο (Πανταζίδου, 2011). Η επιλογή των κατάλληλων μέτρων ορίζεται ανάλογα με τη συγκεκριμένη περιοχή και τους στόχους της αποκατάστασης (USEPA, 2012b; Πανταζίδου, 2011).

Για την κατάλληλη αντιμετώπιση της ρύπανσης στο πεδίο, πρέπει πρώτα να ερευνηθούν και να χαρακτηριστούν ο τύπος, η έκταση, η τύχη και η μεταφορά των συγκεκριμένων ρύπων (ITRC, 2007).

Επιπλέον, χαρακτηρίζεται η περιοχή σύμφωνα με τις υφιστάμενες δραστηριότητες και τη δυναμικότητά τους, ενώ ταυτόχρονα αξιολογείται η έκθεση των αποδεκτών σε κίνδυνο όσο και η ευαισθησία τους (Γιδαράκος κ.ά., 2009). Όταν θεωρηθεί αναγκαία η παρέμβαση σε ένα ρυπασμένο πεδίο, τότε επιλέγεται η μέθοδος αποκατάστασης για την αποπεράτωση των ακόλουθων στόχων: α) την επίτευξη των νομοθετικών ορίων, β) τη μείωση της μάζας του ρύπου, γ) τη μείωση της διακινδύνευσης, δηλαδή τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης αρνητικής επίδρασης (Πανταζίδου, 2011).

Οι συγκεκριμένοι στόχοι, όμως, θεωρούνται μη-ρεαλιστικοί, ιδιαίτερα εφόσον τα νομοθετικά όρια είναι πολύ χαμηλά (μέρη ανά δισεκατομμύριο; ppb) με σκοπό τη μελλοντική αξιοποίηση των υπόγειων υδάτων ως πόσιμου νερού. Έτσι, υπάρχει η γενική αντίληψη ότι οι στόχοι είναι εφικτοί μόνο σε σχετικά απλοϊκά πεδία (Leeson et al., 2013). Βέβαια, υπάρχει και η περίπτωση να είναι επιτεύξιμοι σε ένα εύλογο χρονικό πλαίσιο μόνο με τους μηχανισμούς της φυσικής εξασθένησης (Natural Attenuation), δηλαδή τις διεργασίες που επιτελούνται φυσικά στο πεδίο, όπου δεν είναι αναγκαία η ανθρώπινη παρέμβαση σε τεχνικό επίπεδο (Πανταζίδου, 2011; Pant & Pant, 2010). Στην περίπτωση αυτή, λοιπόν, μπορούν να ληφθούν μόνο διαχειριστικά μέτρα, εκτός αν θεωρηθεί αναγκαία η παρακολούθηση της περιοχής για την επιβεβαίωση της επιτυχίας της αποκατάστασης (Πανταζίδου, 2011), αν δηλαδή πραγματοποιηθεί η «Παρακολουθούμενη Φυσική Εξασθένηση» (Monitored Natural Attenuation; MNA) (Wiedemeier et al., 1998; USEPA, 2000b; Pant & Pant, 2010).

Η παρακολουθούμενη φυσική εξασθένηση είναι μια απλή τεχνολογία με αρκετά πλεονεκτήματα (Juwarakar et al., 2010). Ένα προτέρημα των επιτόπιων διαδικασιών είναι η παραγωγή μικρότερου όγκου αποβλήτων αποκατάστασης, η οποία μειώνει την πιθανότητα της πολυφασικής μεταφοράς ρύπων που συνδέεται συνήθως με μη-επιτόπιες επεξεργασίες, ενώ μειώνεται και ο κίνδυνος της άμεσης έκθεσης του ανθρώπου στη ρύπανση (Wiedemeier et al., 1998). Επιπλέον, οι παρεμβάσεις στο πεδίο είναι λιγότερες ή μηδαμινές, καθώς απαιτούνται λίγες κατασκευές στην επιφάνεια και ταυτόχρονα υπάρχει η δυνατότητα για εφαρμογή σε όλο ή μέρος του πεδίου, ανάλογα με τις συνθήκες και τους καθορισμένους στόχους αποκατάστασης (Juwarakar et al., 2010; Wiedemeier et al., 1998). Επίσης, μπορεί να γίνει η χρήση της σε συνδυασμό ή ως συνέχεια άλλων τεχνικών μέτρων και με χαμηλότερο συνολικό κόστος συγκριτικά με άλλες τεχνολογίες (Wiedemeier et al., 1998).

Όμως, η παρακολουθούμενη φυσική εξασθένηση έχει και σημαντικά μειονεκτήματα, όπως είναι τα μεγάλα χρονικά διαστήματα που μπορεί να απαιτούνται για την επίτευξη των στόχων αποκατάστασης ή το να θεωρηθεί αναγκαία η μακροχρόνια παρακολούθηση της περιοχής, γεγονός που αυξάνει και το κόστος του έργου (Wiedemeier et al., 1998; Juwarkar et al., 2010). Παράλληλα, ο χαρακτηρισμός της περιοχής μπορεί να είναι περίπλοκος και δαπανηρός, ενώ οι υδρολογικές και γεωχημικές συνθήκες του πεδίου που επιδέχεται φυσική εξασθένηση μπορεί να αλλάξουν με την πάροδο του χρόνου και μπορεί να αλλάξει η κινητικότητα των άλλοτε σταθερών ρύπων, επηρεάζοντας αρνητικά την αποτελεσματικότητα της αποκατάστασης (Wiedemeier et al., 1998). Ως εκ τούτου, είναι αρκετά δύσκολη η πρόβλεψη της επίδοσης της φυσικής εξασθένησης με μεγάλη ακρίβεια (Juwarkar et al., 2010).

Αφετέρου, υπάρχει η περίπτωση να συνεχιστεί η εξάπλωση της ρύπανσης και η μεταφορά ρύπων σε διάφορες φάσεις, ενώ, συν τοις άλλοις, η τοξικότητα των προϊόντων μπορεί να υπερβαίνει εκείνη της αρχικής ένωσης (Wiedemeier et al., 1998; Juwarkar et al., 2010). Στην περίπτωση της φυσικής εξασθένησης, τα διαχειριστικά εργαλεία μπορεί να είναι απαραίτητα για να εξασφαλιστεί η μακροπρόθεσμη προστασία των ανθρώπων και του έργου. Για παράδειγμα, μπορεί να απαιτούνται πιο εκτεταμένες προσπάθειες εκπαίδευσης και ευαισθητοποίησης προκειμένου η παρακολουθούμενη φυσική εξασθένηση να χρήζει γενικής αποδοχής (Wiedemeier et al., 1998).

Οι επιτόπιοι μηχανισμοί της φυσικής εξασθένησης του TCE περιλαμβάνουν τη βιοαποδόμηση, την εξάπλωση, τη διάλυση, τη ρόφηση, την πτητικοποίηση, τη χημική ή βιολογική σταθεροποίηση, τη μεταφορά ή/και καταστροφή των ρύπων (Lien et al., 2016; Wiedemeier et al., 1998; Pant & Pant, 2010). Οι περισσότερες έρευνες που πραγματοποιούνται την εφαρμογή αυτή, έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους κυρίως στη βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση, η οποία καταδεικνύεται με την ανίχνευση συγκεκριμένων πτητικών προϊόντων, παραδείγματος χάριν λιγότερο χλωριωμένα αιθένια, αιθάνιο, κ.λπ. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που θεμελιώνουν την ύπαρξη και άλλων διεργασιών που συμβάλλουν στη φυσική εξασθένηση, όπως η αναερόβια οξειδωση και η αβιοτική αναγωγική αποχλωρίωση. Αυτές οι διεργασίες είναι δυσκολότερο να καταγραφούν στο πεδίο, διότι δεν παράγουν χαρακτηριστικά προϊόντα αλλά ενώσεις όπως το διοξείδιο του άνθρακα, το χλώριο, κ.ά. και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της αποχλωρίωσης (Darlington et al., 2008). Στην Ενότητα 2.2. αναλύεται η αβιοτική αναερόβια αποχλωρίωση, ενώ στην παρακάτω Ενότητα παρουσιάζονται οι παρεμβατικές τεχνολογίες αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών και η μεταξύ τους σύγκριση.

2.1.2. Τεχνολογίες αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών

Τα τελευταία 30 χρόνια η βελτίωση των τεχνικών γνώσεων, οι καινοτόμες ιδέες, οι εξιδανικευμένοι στόχοι, οι σημαντικές οικονομικές και νομικές υποχρεώσεις οδήγησαν σε μια αύξηση του αριθμού των τεχνολογιών αποκατάστασης και των εφαρμογών τους (Leeson et al., 2013).

Οι τεχνολογίες αποκατάστασης μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε επιτόπιες (*in situ*) και μη-επιτόπιες (*ex situ*), ανάλογα με τον βαθμό επέμβασης, δηλαδή το αν εφαρμόζονται εντός του πεδίου ή αν αντίστοιχα εξάγονται από το ρυπασμένο έδαφος ή/και νερό με σκοπό την επεξεργασία τους. Επίσης, κατατάσσονται σύμφωνα με το είδος των μηχανισμών που χρησιμοποιεί η κάθε τεχνολογία για τη μείωση του ρύπου, όπου χωρίζονται σε φυσικές, χημικές, βιολογικές ή θερμικές τεχνολογίες (Γιδαράκος κ.ά., 2009; Πανταζίδου, 2011). Μετά από χρόνια ερευνών αρκετές τεχνολογίες έχουν βρεθεί να απομακρύνουν αποτελεσματικά το TCE υπό τις κατάλληλες συνθήκες (Pant & Pant, 2010). Μερικά παραδείγματα τεχνολογιών που έχουν ερευνηθεί στο εργαστήριο για την απομάκρυνση των συγκεκριμένων ρύπων είναι οι εξής: i) οι μη-καταστρεπτικές διεργασίες, π.χ. η εμφύσηση αέρα (Li et al., 2012; Cheng et al., 2009) και η προσρόφηση (Yang et al., 2009; Wei & Seo, 2010), ii) η καύση (Tseng et al., 2003), iii) οι φυσικές διεργασίες, παραδείγματος χάριν η βιοαποκατάσταση (Holliger & Zehndert, 1993; Maymó-Gatell et al., 1995) και η φυτοαποκατάσταση (Gopalakrishnan et al., 2009; Graber et al., 2007) iv) η προχωρημένη χημική οξειδωση (Advanced Chemical Oxidation) όπως η οζόνωση (Fujita et al., 2004; Alcántara-Garduño et al., 2008), η φωτοκαταλυτική οξειδωση (photocatalytic oxidation; Jia & Chu, 2009; Annapragada et al., 1997; Dibble & Raupp, 1992) και η χημική οξειδωση μέσω της Fenton αντίδρασης (Jho et al., 2010; Khan et al., 2009; Tsai et al., 2009) και v) οι αναγωγικές διεργασίες, π.χ. η αναγωγή μέσω μετάλλων μηδενικού σθένους (Roberts et al., 1996; Lin & Lo, 2005), η καταλυτική αποχλωρίωση (catalytic hydrodechlorination; Cobo et al., 2011; Schreier & Reinhard, 1995) και η ηλεκτροχημική αποχλωρίωση (Huang et al., 2016; Aulenta et al., 2009; Aulenta et al., 2010a; Aulenta et al., 2011). Στον Πίνακα 2.1 συνοψίζονται οι κύριες τεχνολογίες αποκατάστασης ρυπασμένων περιοχών που έχουν πραγματοποιηθεί στο πεδίο και τα χαρακτηριστικά τους, ενώ στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζεται το πλήθος εφαρμογών πλήρους κλίμακας για κάθε τεχνολογία που έχει πραγματοποιηθεί στις ΗΠΑ από το 1982 ως το 2011.

Στον Πίνακα 2.2 παρατηρείται ότι στις ΗΠΑ μεταξύ 1982-1996 ήταν αρκετά διαδεδομένες οι μη-επιτόπιες τεχνολογίες με μια ισόποση κατανομή χρήσης του υπόγειου νερού και του εδάφους ως μέσου αποκατάστασης. Την τελευταία, όμως, δεκαπενταετία, φαίνεται μια τάση αύξησης των επιτόπιων τεχνολογιών με συχνότερο μέσο για την εξυγίανση του υπεδάφους το υπόγειο νερό. Πιο συγκεκριμένα, αυξήθηκε η χρήση της επιτόπιας βιοαποκατάστασης με έμφαση στις διεργασίες υπό αναερόβιες συνθήκες (USEPA, 2013), ενώ υπήρξε μια μικρή άνοδος των εφαρμογών της παρακολουθούμενης φυσικής εξασθένησης τα έτη μεταξύ 1992-1998. Η τάση όμως αυτή δείχνει να σταθεροποιείται σταδιακά τα τελευταία χρόνια και επιλέγεται

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

περίπου στο 37% των ρυπασμένων περιοχών υπό αποκατάσταση (USEPA, 2017). Σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζουν και τα διαχειριστικά μέτρα, τα οποία σημείωσαν μεγάλη άνοδο που προσεγγίζει το 86%. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται ότι περίπου σε όλες τις ρυπασμένες περιοχές διεξάγονται διοικητικές και νομικές ενέργειες για την άμεση αντιμετώπιση του προβλήματος. Στο Σχήμα 2.1 παρατηρούνται οι αναφερθείσες αυξομειούμενες τάσεις της τελευταίας εικοσαετίας σε ρυπασμένες περιοχές των ΗΠΑ.

Πίνακας 2.1 Τεχνολογίες αποκατάστασης χλωριωμένων αιθενίων (Πηγές: Christ et al., 2005; Γιδάρακος κ.ά., 2009; Russell et al., 1992; USEPA, 2010b; USEPA, 2013).

Τεχνολογία αποκατάστασης	Προσέγγιση εφαρμογής	Είδος μηχανισμών	Μέσο εξυγίανσης
Άντληση εδαφικού αέρα (Soil Vapor Extraction)	Επιτόπια	Φυσική	Έδαφος
Ταχεία έκπλυση (Flushing)	Επιτόπια	Χημική	Έδαφος
Έκπλυση εδάφους (Soil Washing)	Μη-επιτόπια	Χημική	Έδαφος
Χημική επεξεργασία (Chemical treatment)	Επιτόπια/Μη-επιτόπια	Χημική	Υπόγειο νερό/Έδαφος
Καύση (Incineration)	Μη-επιτόπια	Θερμική	Έδαφος
Θερμική εκρόφηση (Thermal Desorption)	Μη-επιτόπια	Θερμική	Έδαφος
Άντληση και επεξεργασία (Pump & Treat)	Μη-επιτόπια	Φυσική	Υπόγειο νερό
Εμφύσηση αέρα (Air Stripping)	Επιτόπια/Μη-επιτόπια	Φυσική	Υπόγειο νερό
Αεριοδιασκορπισμός (Air Sparging)	Επιτόπια	Φυσική	Υπόγειο νερό
Ενεργά Διαπερατά Φράγματα (permeable reactive barrier; PRB)	Επιτόπια	Χημική	Υπόγειο νερό
Βιοαποκατάσταση (Bioremediation)	Επιτόπια/Μη-επιτόπια	Βιολογική	Υπόγειο νερό/Έδαφος
Παρακολουθούμενη Φυσική Εξυγίανση (MNA)	Επιτόπια	Βιολογική	Υπόγειο νερό/Έδαφος
Φυτοαποκατάσταση (Phytoremediation)	Επιτόπια/Μη-επιτόπια	Βιολογική	Υπόγειο νερό/Έδαφος

Παρόμοια στροφή επιθυμεί και η Ευρωπαϊκή επιτροπή, δηλαδή από τις συμβατικές προσεγγίσεις με υψηλή κατανάλωση ενέργειας και μεγάλη παραγωγή αποβλήτων, όπως είναι η άντληση και η επεξεργασία, που είναι οι κυρίαρχες επιλογές αποκατάστασης σε πιο βιώσιμες τεχνολογίες. Η βιωσιμότητά τους ορίζεται από τη δυνατότητα α) να αξιοποιούν τις φυσικές δραστηριότητες και τους πόρους της περιοχής, β) να ελαχιστοποιούν την εξαγωγή του νερού και την παραγωγή αποβλήτων, και γ) να ευνοούν την οικονομική χρήση της περιοχής δίχως διακοπή (Majone et al., 2015).

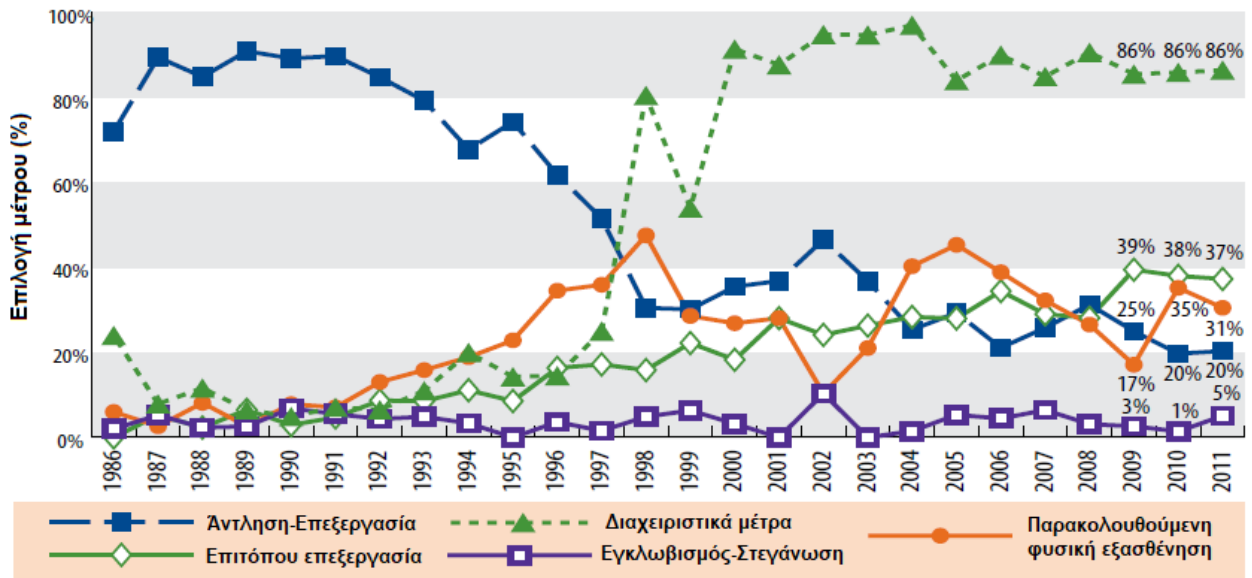
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 2.2. Αριθμός εφαρμογών στις ΗΠΑ για το διάστημα 1982-2011 (Πηγή: USEPA, 2013).

Μέσο	Εφαρμογή	Τεχνολογία	1982-1986	1987-1991	1992-1996	1997-2001	2002-2006	2007-2011	Σύνολο
Έδαφος	Μη-επιτόπια	Καύση	12	72	41	19	7	2	153
		Θερμική εκρόφηση	3	25	16	18	9	1	72
		Βιοαποκατάσταση	2	11	27	12	9	6	67
		Χημική επεξεργασία	1	2	3	2	4	6	18
		Φυτοαποκατάσταση	0	0	0	1	0	5	6
		Έκπλυση εδάφους	0	3	2	1	0	0	6
		Σύνολο	18	113	89	53	29	20	312
	Επιτόπια	Άντληση εδαφικού αέρα	6	82	75	59	37	43	302
		Βιοαποκατάσταση	0	8	23	17	12	7	67
		Χημική επεξεργασία	1	1	0	7	13	21	43
		Ταχεία έκπλυση	0	2	3	4	11	11	31
		Θερμική επεξεργασία	2	5	6	3	1	3	20
Φυτοαποκατάσταση		0	0	0	4	4	0	8	
	Σύνολο	9	98	107	94	78	85	514	
Υπόγειο νερό	Μη-επιτόπια	Άντληση & επεξεργασία	27	143	280	218	88	89	845
	Επιτόπια	Βιοαποκατάσταση	0	9	10	21	48	76	164
		Χημική επεξεργασία	0	0	3	15	34	46	98
		Αεριοδιασκορπισμός	1	10	17	35	14	15	92
		Ενεργά διαπερατά φράγματα	0	0	4	13	11	10	38
		Φυτοαποκατάσταση	0	0	0	9	7	1	17
		Εμφύσηση εδαφικού αέρα	0	0	1	5	2	2	10
	Σύνολο	1	19	35	98	116	150	419	

Οι τάσεις μείωσης της χρήσης των μη-επιτόπιων συμβατικών εφαρμογών αλλά και της αύξησης της επιτόπιας βιολογικής εξυγίανσης, μάλλον οφείλονται στα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα που έχει η βιοαποκατάσταση σε σχέση πάντα με το κόστος. Και αυτό διότι οι φυσικές διεργασίες, όπως η εκσκαφή και ο εδαφικός αερισμός αλλά και η άντληση του υπόγειου νερού, έχουν χαμηλά ποσοστά απομάκρυνσης του TCE, βραδύ ρυθμό, υψηλό κόστος, μεγάλες απαιτήσεις σε ενέργεια, ενώ προκαλούν διαταραχές στο περιβάλλον (Pant & Pant, 2010; Majone et al., 2015). Επιπλέον, η τεχνολογία άντλησης και επεξεργασίας μπορεί να μην είναι αποτελεσματική επειδή επιδρούν πολλοί παράγοντες, όπως είναι η ετερογένεια που χαρακτηρίζει έναν υπόγειο υδροφόρο, η ρόφηση του ρύπου στα ορυκτά, η παγίδευσή του στους πόρους του εδάφους, η πυκνότητα και η υδρόφοβη φύση της μη υδατικής φάσης, κ.λπ. (Pant & Pant, 2010; Parsons, 2004; Majone et al., 2015).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 2.1 Τάσεις αποφάσεων για την επιλογή μέτρων σε ρυπασμένες περιοχές των ΗΠΑ από το 1986 ως το 2011 (Πηγή: USEPA, 2017).

Όσον αφορά στην τύχη του επεξεργασμένου νερού, η επανεισπίεση ή η επαναχρησιμοποίηση δεν είναι προτιμώμενες εναλλακτικές λύσεις εξαιτίας της αυστηρής νομοθεσίας. Πιο συχνά, το επεξεργασμένο υπόγειο νερό απορρίπτεται σε επιφανειακά ύδατα ή στο αποχετευτικό δίκτυο, όπου υπάρχουν λιγότερο αυστηρές οριακές τιμές. Επομένως, η τεχνολογία της άντλησης και επεξεργασίας δεν έχει τη δυνατότητα της άμεσης διατήρησης της μάζας του νερού με σκοπό τη μελλοντική χρήση (Majone et al., 2015), αλλά στοχεύει περισσότερο στην απομάκρυνση του TCE. Με τη χρήση άλλων φυσικοχημικών τεχνολογιών έχει βρεθεί ότι παραμένει περίπου το 10% των χλωριωμένων αιθενίων υπό βέλτιστες συνθήκες (Christ et al., 2005), ενώ απαιτούν τοξικά χημικά ή είναι δαπανηρές. Τέλος, άλλες επιτόπιες τεχνολογίες, όπως είναι η χημική επεξεργασία, η ρόφηση, η διασπορά και η πτητικοποίηση, είτε έχουν χαμηλό ρυθμό απομάκρυνσης του TCE είτε δεν δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα (Pant & Pant, 2010).

Αντιθέτως, η επιτόπια βιολογική επεξεργασία προσφέρει πιθανά πλεονεκτήματα, όπως είναι το χαμηλότερο κόστος λειτουργίας εξαιτίας των χαμηλότερων απαιτήσεων σε ενέργεια, η απουσία εξωτερικής επεξεργασίας και αποβλήτων προς διάθεση, καθώς και ο μικρότερος περιορισμός στην αρχική χρήση της περιοχής, αφού οι διεργασίες πραγματοποιούνται κάτω από το έδαφος (Majone et al., 2015). Στον Πίνακα 2.3 παρουσιάζεται το εκτιμώμενο κόστος ανάλογα με την κατηγορία του μηχανισμού, όπου φαίνεται ότι οι τεχνολογίες που βασίζονται στις βιολογικές διεργασίες έχουν το χαμηλότερο κόστος (Juwarkar et al., 2010).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 2.3 Εκτίμηση κόστους τεχνολογίας ανά μάζα εδάφους για κάθε κατηγορία
(Πηγή: Juwarkar et al., 2010)

Κατηγορία τεχνολογίας	Εκτιμώμενο Κόστος (Ευρώ/τόνος έδαφος)
Βιολογικές	5.8 - 198
Χημικές	14 - 697
Φυσικές	23 - 198
Θερμικές	35 - 871

Για τους παραπάνω λόγους το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στις επιτόπιες επεξεργασίες και συγκεκριμένα σε βιολογικές μεθόδους, γιατί επιτρέπουν την πλήρη μετατροπή του TCE σε ακίνδυνες χημικές μορφές, συμπεριλαμβανομένων του διοξειδίου του άνθρακα, του χλωρίου, κ.λπ. (Pant & Pant, 2010). Βέβαια, η επιλογή της τεχνολογίας που θα πραγματοποιηθεί εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των χαρακτηριστικών της περιοχής. Ως εκ τούτου είναι ειδική για κάθε χώρο και οι αποφάσεις πρέπει να λαμβάνονται σύμφωνα με τις επικρατούσες συνθήκες σε κάθε περίπτωση, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω (USEPA, 2000b).

2.1.3. Βιοαποκατάσταση-Ενισχυμένη επιτόπια βιοαποκατάσταση

Αν και η βιοαποκατάσταση χρησιμοποιείται ως ένα καινοτόμο και οικολογικό εργαλείο τις τελευταίες δεκαετίες, οι μικροοργανισμοί έχουν επανειλημμένως χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία και τη μετατροπή ρύπων την τελευταία εκατονταετία. Η εμπειρία έχει λοιπόν δείξει ότι μια ορθά σχεδιασμένη και ελεγχόμενη εκμετάλλευση των μικροοργανισμών μπορεί να μειώσει τους ρύπους σε μια εγκατάσταση που περιέχει επιλεγμένη και εγκλιματισμένη βιομάζα (Juwarkar et al., 2010). Η βιοαποκατάσταση ως τεχνολογία έχει την ικανότητα να τροποποιεί τις συνθήκες του περιβάλλοντος (φυσικές, χημικές, βιοχημικές, μικροβιολογικές) και να υποβοηθά τους μικροοργανισμούς να απομακρύνουν ή να αποτοξινώσουν οργανικούς και ανόργανους ρύπους στο περιβάλλον (USEPA, 2013).

Όπως προαναφέρθηκε, η επιτόπια βιοαποκατάσταση επιλέγεται συχνά ως τεχνολογία, εφόσον προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων πιο συμβατικών τεχνολογιών (Biswas et al., 2015; Majone et al., 2015; Juwarkar et al., 2010; USEPA, 2000b). Κυρίως μπορεί να εξυγιάνει αποτελεσματικά ρυπασμένες περιοχές από επικίνδυνα απόβλητα με σχετικά μικρό κόστος, δεν απαιτεί έντονες παρεμβάσεις στο πεδίο, όπως είναι η εκσκαφή, προσαρμόζεται στις συνθήκες πεδίου, ενώ παράλληλα παράγει σχετικά μικρές ποσότητες αποβλήτων από την απορρύπανση (USEPA, 2013; USEPA, 2000b; Majone et al., 2015). Επιπλέον, επιτρέπει συνήθως την αποτελεσματική διάσπαση των ρύπων και όχι την απλή μεταφορά τους από φάση σε φάση, ενώ είναι πιο αποτελεσματική όταν στοχεύει σε μια φάση. Σε πολλές

περιπτώσεις, η χρήση της γης μπορεί να συνεχιστεί ενόσω εφαρμόζεται η τεχνολογία αποκατάστασης (Majone et al., 2015). Επιπλέον, η βιοαποκατάσταση μπορεί να συνδυαστεί με άλλες τεχνολογίες για την αντιμετώπιση μικτής ρύπανσης ή/και περίπλοκων ρύπων (Juwarkar et al., 2010).

Ωστόσο, όπως οι περισσότερες τεχνολογίες επεξεργασίας, η βιοαποκατάσταση έχει επίσης περιορισμούς και μειονεκτήματα. Μερικοί ρύποι, παραδείγματος χάριν οι χλωριωμένες ενώσεις και τα βαρέα μέταλλα, δεν είναι άμεσα επιδεκτικοί σε βιολογική αποδόμηση και σταθεροποίηση, ενώ η βιοδιάσπασή τους μπορεί να οδηγήσει σε πιο τοξικά προϊόντα από ότι είναι ο αντιδρών ρύπος (Lien et al., 2016; Majone et al., 2015; Juwarkar et al., 2010; USEPA, 2000b). Βασικό πρόβλημα είναι και η δυσκολία επίτευξης των χαμηλών ορίων της νομοθεσίας με τη συγκεκριμένη τεχνολογία (Majone et al., 2015). Επιπλέον, σε περίπτωση μικτής ρύπανσης μπορεί οι κατάλληλες ομάδες μικροοργανισμών να είναι ευαίσθητες σε άλλους τοξικούς ρύπους (Juwarkar et al., 2010). Ως εκ τούτου επιβάλλεται η μελέτη των μικροβιακών διαδικασιών, καθώς και των μεταβολικών και χημικών μονοπατιών, που συντελούνται για να μην οδηγήσει στην περαιτέρω υποβάθμιση της περιοχής (Juwarkar et al., 2010; USEPA, 2000b).

Έτσι, η εφαρμογή της βιοαποκατάστασης πρέπει να προσαρμόζεται σύμφωνα με τις συνθήκες κάθε περιοχής για την ελαχιστοποίηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων (Juwarkar et al., 2010). Άρα, η εφαρμογή της απαιτεί τον εξονυχιστικό έλεγχο της γεωχημείας, της υδρογεωλογίας, της μικροβιολογίας και της οικολογίας των ρυπασμένων εδαφών και υπόγειων υδάτων (Majone et al., 2015). Επομένως, το αρχικό κόστος για τον χαρακτηρισμό της περιοχής μπορεί να είναι μεγαλύτερο από εκείνο των άλλων συμβατικών τεχνολογιών, ενώ κατά τη διάρκεια της απορρύπανσης απαιτείται μια εκτεταμένη παρακολούθηση της περιοχής για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας, συμπεριλαμβανομένων μικροβιακών και χημικών αναλύσεων (Juwarkar et al., 2010).

Το κόστος μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω, αν θεωρηθεί αναγκαία η ενίσχυση της διεργασίας με την προσθήκη χημικών ή μικροοργανισμών (USEPA, 2000b). Επίσης, οι μεθοδολογίες και τα τυποποιημένα πρωτόκολλα σχεδιασμού και παρακολούθησης δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η αποδοχή και η έγκριση της εφαρμογής των επιτόπιων τεχνολογιών από τις διοικητικές και τοπικές μονάδες, ενώ ακόμα και οι δοκιμές πεδίου συχνά απαιτούν ειδικές άδειες (Majone et al., 2015).

Ο Πίνακας 2.4 συνοψίζει τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνολογίες βιοαποκατάστασης. Από τις τεχνολογίες που περιγράφονται στον Πίνακα, οι πιο σημαντικές σε σχέση με την παρούσα διδακτορική διατριβή είναι η βιοεπαύξηση και πρωτίστως η βιοδιέγερση. Η βιοεπαύξηση είναι η εισπίεση μικροοργανισμών στο πεδίο για την ενίσχυση των ποσοστών απομάκρυνσης, όταν δεν υπάρχει η κατάλληλη μικροβιακή κοινότητα ή όπου οι διεργασίες της βιοαποδόμησης είναι αργές. Οι μικροοργανισμοί που προστίθενται προέρχονται είτε από το πεδίο αφότου

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

αναπτύχθηκαν στοχεύοντας σε συγκεκριμένη ομάδα υπό ελεγχόμενες συνθήκες, είτε είναι γενετικά τροποποιημένοι με σκοπό τη βέλτιστη απόδοση της απορρύπανσης (GeoSyntec Consultants, 2005; Juwarkar et al., 2010; USEPA, 2013).

Πίνακας 2.4 Τεχνολογίες βιοαποκατάστασης (Πηγή: Juwarkar et al., 2010).

Τεχνολογία	Εφαρμογή	Περιγραφή - Χαρακτηριστικά
Βιοεπαύξηση (Bioaugmentation)	Επιτόπια/ Μη-επιτόπια	Προσθήκη μικροβιακής κοινότητας στο ρυπασμένο μέσο, χρησιμοποιείται συχνά σε βιοαντιδραστήρες και άλλα μη-επιτόπια συστήματα
Βιολογικά φίλτρα (Biofilters)	Μη-επιτόπια	Χρήση μικροοργανισμών για την απομάκρυνση των αέριων ρύπων
Βιοδιέγερση (Biostimulation)	Επιτόπια/ Μη-επιτόπια	Διέγερση του ενδογενούς μικροβιακού πληθυσμού στο έδαφος και το υπόγειο νερό
Βιοαντιδραστήρες (Bioreactors)	Μη-επιτόπια	Βιοαποδόμηση σε έναν αντιδραστήρα, χρησιμοποιείται κυρίως όταν υπόγειο νερό είναι το μέσο
Βιοαερισμός (Bioventing)	Επιτόπια	Εξαγωγή οξυγόνου από το έδαφος για τη διέγερση της αναερόβιας μικροβιακής κοινότητας, χρησιμοποιείται για την απορρύπανση του εδάφους
Κομποστοποίηση (Composting)	Μη-επιτόπια	Αερόβια, θερμόφιλη επεξεργασία στην οποία το ρυπογόνο υλικό αναμειγνύεται με παράγοντα διόγκωσης
Διάθεση στο έδαφος (Landfarming)	Μη-επιτόπια	Επεξεργασία στερεής φάσης για ρυπασμένα εδάφη

Ως βιοδιέγερση ορίζεται η προσθήκη διαλυμάτων στο πεδίο με απαραίτητα στοιχεία για την ενίσχυση της βιοαποδόμησης. Το προστιθέμενο υπόστρωμα μπορεί να περιέχει θρεπτικά συστατικά, αποδέκτες/δότες ηλεκτρονίων ή άλλες ουσίες, αλλά η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί την παρουσία ενός ικανοποιητικού πληθυσμού μικροοργανισμών που μπορεί να απομακρύνει τους ρύπους (USEPA, 2013; Juwarkar et al., 2010). Βέβαια, βελτιώνει την απορρύπανση σε άλλα πεδία, όπως για παράδειγμα σε εδάφη με χαμηλή περιεκτικότητα φυσικής οργανικής ύλης, όπου δεν ευδοκίμει η βιοαποδόμηση. Έτσι δείχνει ότι το οργανικό υλικό είναι ένας περιοριστικός παράγοντας της διαδικασίας, ενώ με την προσθήκη μιας οργανικής ουσίας πραγματοποιείται η απομάκρυνση του ρύπου (Lien et al., 2016).

Όμως, τόσο η βιοεπαύξηση όσο και η βιοδιέγερση δεν θεωρούνται εφαρμόσιμες τεχνολογίες σε εδάφη με υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανων αλάτων, βαρέων μετάλλων ή οργανικών ενώσεων, εφόσον οι ποσότητές τους μπορεί να αναστείλουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Επιπλέον, οι ρύποι πρέπει να είναι διαθέσιμοι στους μικροοργανισμούς για την επιτυχία της αποχλωρίωσης και όχι ροφημένοι στη στερεή φάση του υπεδάφους. Τα υλικά που προστίθενται μπορεί να προκαλέσουν τη φραγή

ενός πηγαδιού εξαιτίας της ανάπτυξης μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών στο άκρο του, ή μπορεί να αυξήσουν την κινητικότητα του ρύπου (Juwarakar et al., 2010). Ταυτόχρονα, αυξάνεται το κόστος κεφαλαίου, λειτουργίας και συντήρησης (Lien et al., 2016). Αν και το κόστος αυτών των τεχνολογιών ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή, συνήθως είναι η πιο οικονομική εναλλακτική πρόταση όπου μπορεί να εφαρμοσθεί. Σε πολλές περιπτώσεις, επίσης, μπορεί να μειώσουν τη διάρκεια της απορρύπανσης με αποτέλεσμα να χαμηλώνει περισσότερο το κόστος όλης της διαδικασίας (Juwarakar et al., 2010; GeoSyntec Consultants, 2005).

Η βιοεπαύξηση και η βιοδιέγερση συγκαταλέγονται στην ενισχυμένη επιτόπια βιοαποκατάσταση (Enhanced *in situ* bioremediation; EISB), η οποία ορίζεται ως η εισπίεση στο πεδίο οργανικής πηγής άνθρακα, θρεπτικών, δότη/αποδέκτη ηλεκτρονίων ή/και μικροβιακής κοινότητας για αποτελεσματικότερη αποδόμηση των ρύπων (ITRC, 1998; USEPA, 2013). Η ενισχυμένη επιτόπια βιοαποκατάσταση είναι μια από τις πολλά υποσχόμενες τεχνολογίες. Παγκοσμίως, η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει εφαρμοστεί ή πραγματοποιείται σε 93 ρυπασμένες περιοχές στις ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Ολλανδία και την Ιαπωνία (Majone et al., 2015). Επιπλέον, η ενίσχυση της αποχλωριωτικής κοινότητας θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες τεχνολογίες, δηλαδή μετά τη χρήση μιας συμβατικής τεχνολογίας για την πλήρη απομάκρυνση των ρύπων (Christ et al., 2005).

2.1.4. Μηχανισμοί βιολογικής αποχλωρίωσης

Όπως προαναφέρθηκε, στο υπέδαφος τα χλωριωμένα αιθένια μπορούν να μετασχηματιστούν με διάφορες αντιδράσεις, είτε αβιοτικά είτε βιολογικά, με τις τελευταίες να κυριαρχούν συνήθως (Majone et al., 2015). Η βιοαποκατάσταση αξιοποιεί τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που εκτελούν οι μικροοργανισμοί για τη συντήρηση και την ανάπτυξή τους, ως μέσο για την απομάκρυνση των ρύπων από το υπόγειο νερό και κατ' επέκταση από το έδαφος. Επομένως, οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούν διαφορετικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων (οξειδωμένες μορφές ενώσεων) και δότες (ανηγμένες μορφές) μέσω τριών μονοπατιών, της αερόβιας αναπνοής, της αναερόβιας αναπνοής και της ζύμωσης (USEPA, 2013).

Η απομάκρυνση, λοιπόν, των ρύπων μπορεί να επιτευχθεί υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες με τον μηχανισμό του άμεσου μεταβολισμού, του συμμεταβολισμού ή της αβιοτικής μετατροπής, η οποία μπορεί να έχει προέλθει από βιολογική δραστηριότητα (USEPA, 2013; Abe et al., 2009b). Στον Πίνακα 2.5 φαίνονται οι μηχανισμοί αποχλωρίωσης που μπορούν να πραγματοποιηθούν σε σχέση με τον ρύπο στην περιοχή προς αποκατάσταση.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 2.5 Κυριότεροι μηχανισμοί αποχλωρίωσης χλωριωμένων αιθενίων (Πηγές: Schmidt et al., 2014; Abe et al., 2009b; Tiehm & Schmidt; 2011; Frascari et al., 2015; Scheutz et al., 2011; Παναγιωτάκης, 2010; Badin et al., 2016; Tobiszewski & Namieśnik, 2012).

Αποχλωρίωση	Βιολογική				Αβιοτική	
	Ουσίες	Αερόβια οξείδωση		Αναερόβια αναγωγή		
		Άμεση	Συμμεταβολική	Άμεση		Συμμεταβολική
PCE	-	-	√	√	√	
TCE	√	√	√	√	√	
DCEs	√	√	√	√	√	
VC	√	√	√	√	√	

Ως μεταβολισμός ορίζεται το σύνολο των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μέσα στο κύτταρο με σκοπό την παραγωγή ενέργειας (καταβολισμός) ή τη σύνθεση νέας βιομάζας (αναβολισμός) (Κολιάης, 2001). Συμμεταβολισμός θεωρείται η διαδικασία κατά την οποία επιτυγχάνεται η μετατροπή του ρύπου μέσω ενζυματικών διεργασιών που πραγματοποιούνται κατά την αποδόμηση μιας άλλης ουσίας με σκοπό την παραγωγή ενέργειας ή άνθρακα για την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού (Bhatt et al., 2007; Madsen E., 1991; Middeldorp et al., 1999).

Η αβιοτική μετατροπή μπορεί να πραγματοποιηθεί, φυσικά, υπό την παρουσία επαρκούς ποσότητας ορυκτών και υπό τις κατάλληλες γεωχημικές συνθήκες (Badin et al., 2016) και περιγράφεται αναλυτικότερα στην Ενότητα 2.2.

Η αερόβια οξείδωση λαμβάνει χώρα παρουσία οξυγόνου και βασίζεται στη χρήση ενός ρύπου από τους μικροοργανισμούς ως πηγή άνθρακα και ενέργειας, με αποτέλεσμα τη διάσπασή του μέσω της μεταβολικής οδού (USEPA, 2013; Frascari et al., 2015). Το κύριο ενδιαφέρον στη σχεδίαση ενός αερόβιου συστήματος είναι η διάθεση του οξυγόνου, που διαδραματίζει ρόλο αποδέκτη ηλεκτρονίων, στους μικροοργανισμούς. Το οξυγόνο μπορεί να προστεθεί άμεσα στο υπέδαφος ή έμμεσα με τη χρήση χημικών οξειδωτικών, που απελευθερώνουν αργά οξυγόνο με τη διάλυση ή την αποσύνθεσή τους.

Η εισπίαση του οξυγόνου ή των οξειδωτικών χημικών στο υπόγειο νερό μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διαφόρων μεθόδων, ανάλογα με τις φυσικές τους ιδιότητες, την υδρογεωλογία της περιοχής και την επιθυμητή απόδοση παροχής (USEPA, 2013). Τα βασικά πλεονεκτήματά του είναι ότι δεν απαιτεί την εισαγωγή πρόσθετου υποστρώματος ανάπτυξης (Frascari et al., 2015; Bradley, 2003) και ότι η απόδοση ως προς το παρεχόμενο οξυγόνο είναι πολύ αποτελεσματική. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας των μη-ανταγωνιστικών συνθηκών δεδομένης της επικράτησης των χλωριωμένων αλειφατικών υδρογονανθράκων (Frascari et al., 2015).

Επιπλέον, εφόσον τελικά προϊόντα της αερόβιας αναπνοής είναι συνήθως το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό (USEPA, 2013), δεν σχηματίζονται ανεπιθύμητα

παραπροϊόντα κατά την επεξεργασία. Ωστόσο, η άμεση αερόβια οξειδωση παρεμποδίζεται σημαντικά από τον περιορισμένο αριθμό ειδών που είναι ικανά να οξειδώνουν τους χλωριωμένους διαλύτες (Frascari et al., 2015). Επίσης, παρότι έχει αποδειχθεί η χρήση του TCE (Schmidt et al., 2014), του tDCE (Olaniran et al., 2008) και, κυρίως του cDCE (Schmidt et al., 2010; Olaniran et al., 2008; Bradley & Chapelle, 2000; Abe et al., 2009b) και του VC (Gossett, 2010; Jin & Mattes, 2008; Coleman et al., 2002; Chartrand et al., 2005; Abe et al., 2009b; Frascari et al., 2013) ως υποστρώματος για την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών, ως τώρα δεν έχει αναφερθεί κάποια καλλιέργεια ικανή για την οξειδωση του 1,1DCE και του PCE (Scheutz et al., 2011; Schmidt et al., 2014). Ένα ακόμα μειονέκτημα της διαδικασίας είναι ότι η σημαντική αναχαίτιση του μεταβολισμού των ρύπων υπό την παρουσία άλλων μη-βιοαποδομήσιμων υδρογονανθράκων (Frascari et al., 2015; Zhao et al., 2010).

Ο αερόβιος συμμεταβολισμός πραγματοποιείται όταν ένζυμα παρασκευάζονται βιολογικά με σκοπό την πρόσληψη ενός υποστρώματος ανάπτυξης, ενώ ταυτόχρονα οξειδώνεται μια άλλη ουσία, δηλαδή εισάγονται δύο άτομα οξυγόνου σε μια ένωση που δεν υποστηρίζει άμεσα την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Frascari et al., 2015; Karlson et al., 1998; Kocamemi & Çeçen, 2005). Το πλήθος ενζύμων που επιτυγχάνουν την προαναφερθείσα διαδικασία είναι οι οξυγονάσες, που ανήκουν στην κατηγορία των οξειδοαναγωγάσεων (Kocamemi & Çeçen, 2007; Chartrand et al., 2005; Karlson et al., 1998). Τα συγκεκριμένα ένζυμα αρχίζουν την οξειδωση ενός χλωριωμένου αιθενίου σχηματίζοντας ένα εποξειδίο, το οποίο είναι ασταθές και διασπάται σχηματίζοντας μια σειρά προϊόντων (Semprini, 2013). Τα προϊόντα της συμμεταβολικής οξειδωσης των χλωριωμένων αιθενίων είναι κυρίως το διοξειδίο του άνθρακα και το χλώριο (Tiehm & Schmidt, 2011). Η παρουσία του οξυγόνου αλλά και του υποστρώματος ανάπτυξης είναι απαραίτητες για την έναρξη και τη διατήρηση της παραγωγής του κατάλληλου ενζύμου (Bradley, 2003; Semprini, 2013).

Μια ευρεία ποικιλία υποστρωμάτων ανάπτυξης που μπορεί να αξιοποιηθεί για την οξειδωση των χλωριωμένων αιθενίων έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων οι εξής ενώσεις: i) απλοί υδρογονάνθρακες, παραδείγματος χάριν μεθάνιο (Powell et al., 2011; Paszczynski et al., 2011), αιθάνιο (Freedman & Herz, 1996), προπάνιο (Frascari et al., 2006), βουτάνιο (Kim et al., 2000; Semprini et al., 2007), πεντάνιο (Frascari et al., 2013), εξάνιο (Frascari et al., 2013), αιθένιο (Freedman & Herz, 1996; Jin & Mattes, 2008), προπένιο (Saeki et al., 1999; Ensign et al., 1992), ισοπρένιο (Ewers et al., 1990), ii) οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, φαινόλη (Chen et al., 2008; Chen et al., 2004; Futamata et al., 2005; Hopkins & McCarty, 1995), τολουένιο (toluene; Kuo et al., 2004; Azizian et al., 2007; Han et al., 2007), ξυλένιο (xylene; Ryoo et al., 2000; Wu et al., 2008), βενζένιο (benzene; Wu et al., 2008), ισοπροπυλοβενζένιο (Dabrock et al., 1994; Dabrock et al., 1992), iii) μη-οργανικές ουσίες όπως η αμμωνία (Kocamemi & Çeçen, 2005; Powell et al., 2011), iv) οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, VC (Verge et al., 2002), χλωροβενζένιο (Elango et

al., 2011), καθώς και ν) μίγματα οργανικών ενώσεων (Wu et al., 2008; Frascari et al., 2006; Gualandi et al., 2007).

Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί δεν κερδίζουν ενέργεια από αυτές τις διεργασίες, περιορίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την ικανότητα τους να μετατρέπουν τις χλωριωμένες ενώσεις (Conrad et al., 2010). Η οξειδωση των TCE, cDCE, tDCE και VC μπορεί να επιτευχθεί συμμεταβολικά, όμως σπάνια αναφέρεται στη βιβλιογραφία η απομάκρυνση του PCE (Tiehm & Schmidt, 2011; Semprini, 1997), ενώ έχει θεωρηθεί ότι δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί η οξειδωσή του μέσω μεθανότροφων μικροοργανισμών (Hazen et al., 2009). Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι ο ρυθμός της οξειδωσης τείνει να μειώνεται καθώς αυξάνονται τα άτομα χλωρίου στον ρύπο, και για τον λόγο αυτό δεν φαίνεται η απομάκρυνση των πολυχλωριωμένων ενώσεων, όπως είναι το PCE, ο τετραχλωράνθρακας, κ.λπ. (Frascari et al., 2015). Η απόδοση της οξειδωσης ποικίλλει μεταξύ των υποστρωμάτων, αφού μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0.0025 mg TCE/mg τολουενίου και 0.034 mg TCE/mg μεθανίου, και ενώ απαιτούνται μεγάλες ποσότητες υποστρώματος (Semprini, 1997), η διαθεσιμότητά του είναι περιορισμένη (Zhao et al., 2010).

Επιπλέον, παρουσιάζονται και εγγενή όρια σχετικά με τον ανταγωνισμό μεταξύ των χλωριωμένων αιθενίων και του υποστρώματος, την τοξική επίδραση ορισμένων ενδιάμεσων προϊόντων και την υπερβολική ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο άκρο του πηγαδιού εισπίεσης (Frascari et al., 2013). Όμως, ο αερόβιος συμμεταβολισμός παρουσιάζει και σημαντικά πλεονεκτήματα, τουλάχιστον έναντι της αναερόβιας αποκατάστασης. Χαρακτηριστικά, παρουσιάζει υψηλά ποσοστά βιοαποικοδόμησης και παρόλο που παράγονται πολλές τοξικές ενδιάμεσες ενώσεις, αυτές είναι ασταθείς, με αποτέλεσμα ο σχηματισμός τοξικών τελικών προϊόντων να είναι χαμηλός (Frascari et al., 2015). Παρά ταύτα, η συγκεκριμένη μέθοδος έχει εφαρμοσθεί λιγότες φορές στο πεδίο για την αποκατάσταση μιας περιοχής ρυπασμένης από χλωριωμένους υδρογονάνθρακες (Schmidt et al., 2014; Frascari et al., 2013). Και αυτό κυρίως διότι η επιτυχία της στηρίζεται σε μια πληθώρα παραγόντων προκαλώντας δυσκολίες στον σχεδιασμό, την προσομοίωση και τον έλεγχο της διαδικασίας (Frascari et al., 2015), ενώ δεν θεωρείται ένας σημαντικός μηχανισμός σε μακροχρόνια βάση της φυσικής εξασθένησης (Bradley, 2003).

Όσον αφορά στην αναερόβια οξειδωση, ένας μικρός αριθμός εργαστηριακών ερευνών έχει πραγματοποιηθεί κυρίως από μια ομάδα ερευνητών (Bradley, 2003), αλλά ακόμα δεν έχουν διαλευκανθεί σημαντικά ερωτήματα σχετικά με την ύπαρξη του συγκεκριμένου μηχανισμού (Scheutz et al., 2011). Από το 1996 ως το 2000, η ομάδα αυτή παρατηρούσε την κατανάλωση των χλωριωμένων αιθενίων δίχως την παραγωγή συγκεκριμένων προϊόντων υπό ανοξικές (Bradley & Chapelle, 1998), μεθανογόνες (Bradley & Chapelle, 1997; Bradley et al., 1998; Bradley & Chapelle, 2000), θεικοαναγωγικές (Bradley & Chapelle, 2002), σιδηροαναγωγικές (Bradley & Chapelle, 1996; Bradley & Chapelle, 1997) και συνθήκες αναγωγής μαγγανίου (Bradley et al., 1998), θεωρώντας μάλιστα ότι οι ρύποι οξειδώνονταν χρησιμοποιώντας διάφορους αποδέκτες ηλεκτρονίων.

Ταυτόχρονα, θεωρήθηκε ότι παράγονταν διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο, τα οποία, όμως, δεν μπορούν να καταδείξουν την αποχλωρίωση ως μοναδική πηγή τους (Gossett, 2010). Μάλιστα παρατήρησαν ότι η οξειδωση των DCE και VC μειωνόταν με τη μείωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (redox potential). Αναλυτικότερα, ο ρυθμός και η έκταση της οξειδωσης του VC μειωνόταν με την εξής σειρά: αερόβιες > σιδηροαναγωγικές > θεικοαναγωγικές > μεθανογόνες συνθήκες (Bradley, 2003). Όμως, σε μεταγενέστερο χρόνο παρατήρησαν ότι τα πειράματα που διεξήγαγαν υπό αναερόβιες μπορεί να περιείχαν πολύ χαμηλές ποσότητες οξυγόνου (Bradley et al., 2008). Μια άλλη ερευνητική ομάδα έδειξε ότι η αερόβια οξειδωση μπορεί να υποστηριχθεί από πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, φτάνοντας κάτω των 20 µg/L (Gossett, 2010). Η παραπάνω διαπίστωση, σε συνδυασμό με την αδυναμία απομόνωσης και ταυτοποίησης συγκεκριμένου είδους μικροοργανισμού που επιτελεί τη διεργασία (Gossett, 2010; Bradley, 2003), οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η απομάκρυνση του VC και του cDCE στα πειράματα που περιγράφηκαν παραπάνω προκλήθηκε από την αερόβια οξειδωση με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου (Scheutz et al., 2011). Για τον λόγο αυτό, θεωρείται ότι η αναερόβια οξειδωση δεν πραγματοποιείται και δεν θα αναλυθεί περαιτέρω στο παρόν κείμενο.

Το κυρίαρχο μονοπάτι αποδόμησης του TCE είναι αναερόβιο, εφόσον εξαφανίζεται ταχύτερα από ότι σε αερόβιες συνθήκες (Morrison & Murphy, 2013). Υπό την παρουσία ηλεκτραρνητικών ενώσεων, τα χλωριωμένα αιθένια μετατρέπονται σε οξειδωμένες ενώσεις με αποτέλεσμα συχνά να χρησιμεύουν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων για το φυσικό οργανικό υλικό αλλά και ανθρωπογενείς ενώσεις (Abe et al., 2009a). Έτσι, ενώ κατά την οξειδωτική αποχλωρίωση τα χλωροαιθένια χρησιμοποιούνται ως δότες ηλεκτρονίων, σε αναγωγικές συνθήκες, ιδιαίτερα οι πολύ οξειδωμένες μορφές, όπως το PCE, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποδέκτες (Chapelle & Bradley, 2003). Επομένως, το TCE μπορεί να αναχθεί σε λιγότερο χλωριωμένα αιθένια από διάφορα είδη μικροοργανισμών είτε μέσω μεταβολισμού είτε συμμεταβολικά σε αναερόβιο περιβάλλον (Tandoi et al., 1994; Bradley, 2003; Tiehm & Schmidt, 2011; Badin et al., 2016; Kocamemi & Çeçen, 2005). Για την ενίσχυση της αναερόβιας διεργασίας, βοηθητικά υποστρώματα συχνά εισάγονται σε περίσσεια στο πεδίο, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση της ποιότητας των υπόγειων υδάτων λόγω της ταυτόχρονης διέγερσης ανταγωνιστικών διαδικασιών, όπως η θεικοαναγωγή και η μεθανογένεση (Schmidt et al., 2014). Ένας από τους στόχους της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι να κατανοηθεί εις βάθος η σχέση της αποχλωρίωσης με τις ανταγωνιστικές διαδικασίες, για τον λόγο αυτό η βιολογική αναγωγική αποκατάσταση θα αναπτυχθεί λεπτομερώς στην Ενότητα 2.3.

Όπως προαναφέρθηκε, το διαλυμένο οξυγόνο (DO) είναι ο δέκτης ηλεκτρονίων κατά την αερόβια βιοαποικοδόμηση. Όμως, μετά την κατανάλωσή του, τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-), ο τρισθενής σίδηρος (Fe^{3+}), το τετρασθενές μαγγάνιο (Mn^{4+}), τα θειικά ιόντα (SO_4^{2-}) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) χρησιμοποιούνται κατά σειρά ως δέκτες ηλεκτρονίων υπό αναερόβιες συνθήκες (Lien et al., 2016; Tiehm & Schmidt, 2011; Chapelle & Bradley, 2003) και κατά συνέπεια δρουν ανταγωνιστικά στην αναερόβια

αναγωγική αποχλωρίωση του TCE. Ακόμη και σε αερόβιο περιβάλλον η σημασία της αναγωγική αποχλωρίωσης δεν είναι αμελητέα καθώς παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες του πεδίου μπορεί να είναι αερόβιες, η αναερόβια αποχλωρίωση μπορεί να εμφανιστεί σε μερικές μικρό-περιοχές στο υπέδαφος, χρησιμοποιώντας τη φυσική οργανική ύλη ως το κύριο υπόστρωμα και με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ρύπων υπό τους μηχανισμούς της φυσικής εξασθένησης (Lien et al., 2016). Ωστόσο, η διαθεσιμότητα των δοτών ηλεκτρονίων για την επίτευξη της πλήρους αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης, καθώς και των υποστρωμάτων ανάπτυξης για την πραγματοποίηση της συμμεταβολικής αερόβιας οξειδωσης είναι περιορισμένη (Zhao et al., 2010). Επιπλέον, παρά την παρουσία των μικροοργανισμών στο υπέδαφος, μπορεί να έχουν χαμηλή δραστηριότητα ή να είναι ακόμα και αδρανείς, το οποίο μπορεί να εμποδίσει τη βιολογική αποχλωρίωση (Badin et al., 2016). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι διεργασίες αποχλωρίωσης που επιτελούνται εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, ενώ υπάρχει η πιθανότητα να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα είτε μεμονωμένα είτε συνδυαστικά σε μια ρυπασμένη περιοχή. Αντικείμενο αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη της επίδρασης γεωχημικών παραμέτρων του εδάφους ή του νερού που δρουν είτε ανταγωνιστικά είτε συνεργιστικά στην αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση .

Σημειώνεται επίσης ότι στα υπόγεια ύδατα, όπου η μικροβιολογική κοινότητα και οι περιβαλλοντικές συνθήκες είναι περίπλοκες (Bradley & Chapelle, 1999), η διαδοχική αναερόβια και αερόβια βιοαποδόμηση έχει προταθεί ως εργαλείο για την επίτευξη της πλήρους απομάκρυνσης οργανοχλωριωμένων ενώσεων (Scheutz et al., 2011).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η εμφάνιση της φυσικής εξασθένησης και γενικά των διεργασιών αποκατάστασης στο πεδίο μπορεί να επιβεβαιωθεί αν παρατηρηθούν τα εξής: α) μείωση της μάζας του TCE, β) εξάντληση του αποδέκτη ηλεκτρονίων, γ) παραγωγή δισθενούς σιδήρου, σουλφιδίου, μεθανίου, διοξειδίου του άνθρακα, δ) παραγωγή των λιγότερο χλωριωμένων προϊόντων, ε) αύξηση της αλκαλικότητας και του μικροβιακού πληθυσμού, στ) μείωση του pH και του δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh) και ζ) αύξηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών αναγωγικής αποχλωρίωσης (Lien et al., 2016).

Η παρούσα διδακτορική διατριβή, λοιπόν, επικεντρώνεται σε δύο σημαντικές διεργασίες που συμβάλλουν είτε μαζί ή και χωριστά στην απομάκρυνση των χλωριωμένων αιθενίων υπό από αναερόβιες συνθήκες στην αβιοτική και τη βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση, όπως περιγράφονται παρακάτω.

2.2. Αβιοτική αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση

2.2.1. Εισαγωγή

Παλαιότερα, η έρευνα σχετικά με τη φυσική εξασθένηση σε ρυπασμένες περιοχές είχε επικεντρωθεί στη βιολογική εξυγίανση. Όπου δεν είχαν παρατηρηθεί τα προϊόντα της βιολογικής αποχλωρίωσης, είχε θεωρηθεί ότι μη-καταστρεπτικές διαδικασίες, όπως η ρόφηση, η διασπορά και η πτητικοποίηση, προκαλούσαν την ελάττωση των ρύπων. Την τελευταία, όμως, δεκαπενταετία, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί στην αβιοτική αναγωγή, η οποία φαίνεται να διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην αποχλωρίωση (Brown et al., 2009; He et al., 2010).

Οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής κατέχουν σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα, τη μεταφορά και την τύχη των χλωριωμένων αιθενίων, με αποτέλεσμα πολλές αποτελεσματικές και οικονομικές τεχνολογίες να έχουν βασιστεί στην οξειδοαναγωγή χρησιμοποιώντας φυσικά αναγωγικά μέσα, λόγω χάριν τα ορυκτά και τους εγγενείς μικροοργανισμούς (Lee & Batchelor, 2003). Η αβιοτική αναγωγή πραγματοποιείται κυρίως στην επιφάνεια των ορυκτών, ενώ απαραίτητα είναι τα ορυκτά που καθιστούν δυνατή τη μεταφορά ηλεκτρονίων (He et al., 2010).

Πολλές πρόσφατες τεχνολογίες έχουν βασιστεί στη δραστικότητα των ορυκτών σιδήρου· παραδείγματος χάριν, τα ενεργά διαπερατά φράγματα (permeable reactive barrier, PRB). Επίσης, πολλά ενεργά ορυκτά βρίσκονται στο έδαφος φυσικά, με αποτέλεσμα να συνεισφέρουν στη φυσική εξασθένηση του ρύπου (Liang et al., 2009; Maithreepala & Doong, 2005).

Συνεπώς, δύο αναγωγικές διαδικασίες που μπορούν να εφαρμοστούν επί τόπου στο πεδίο είναι η βιολογική και η αβιοτική (χημική) αποχλωρίωση. Αν και οι δύο μέθοδοι βασίζονται στη μεταφορά των ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των ρύπων, τα μονοπάτια και οι μηχανισμοί τους διαφέρουν (Brown et al., 2009), όπως αναλύεται παρακάτω.

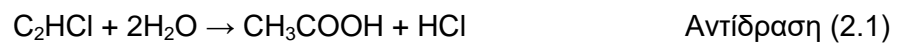
2.2.2. Μονοπάτια αβιοτικής αποχλωρίωσης

Η βιολογική απομάκρυνση των χλωριωμένων αιθενίων χαρακτηρίζεται από την κατανάλωση των αρχικών ρύπων και τη συσσώρευση των θυγατρικών προϊόντων, δηλαδή των DCEs και του VC, μέσω της υδρογονόλυσης (hydrogenolysis - αντικατάσταση ενός αλογόνου με ένα υδρογόνο), όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 2.3 (Gong et al., 2016; Whiting et al., 2014; Butler & Hayes, 1999). Σε αντίθεση με τη βιολογική αναγωγή, η αβιοτική μετατροπή αποδεικνύεται από τη μείωση των ρύπων χωρίς να παρατηρείται αύξηση θυγατρικών χλωριωμένων αιθενίων και περιλαμβάνεται σε διάφορους μηχανισμούς, όπως η βιογεωχημική μετατροπή και οι μη καταστρεπτικοί μηχανισμοί (Gong et al., 2016; Whiting et al., 2014; Butler & Hayes, 1999). Ο κανόνας αυτός δίνει ένα μεγάλο πλεονέκτημα,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

λοιπόν, υπέρ της επιλογής της αβιοτικής αποχλωρίωσης του TCE και του PCE, εφόσον δεν ανιχνεύονται τα τυπικά επικίνδυνα DCEs και VC (Liang et al., 2009).

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, κυρίαρχο μονοπάτι της αβιοτικής αποχλωρίωσης των PCE, TCE και DCEs θεωρείται η β-απόσπαση (β-elimination - σχηματισμός ενός πρόσθετου δεσμού μεταξύ ανθράκων με την απώλεια δύο γειτονικών αλογόνων) με κύριο προϊόν την ασετυλίνη (Gong et al., 2016). Όμως, η ασετυλίνη δεν ανιχνεύεται πάντα, εξαιτίας της υψηλής βιοδιασπασιμότητάς της (Evans et al., 2014), αλλά μετατρέπεται σε αιθένιο ή/και αιθάνιο μέσω της υδρογόνωσης (Arnold & Roberts, 2000). Ένα ενδιαμέσο προϊόν της β-απόσπασης του TCE είναι η χλωροασετυλίνη, η οποία μπορεί να μετατραπεί σε ασετυλίνη ή να υδρολυθεί σε οξικό οξύ μέσω της παρακάτω αντίδρασης (Brown et al., 2009):



Όποιο μονοπάτι όμως και να πραγματοποιηθεί, η αντίδραση είναι γρήγορη, με αποτέλεσμα η χλωροασετυλίνη να έχει μικρή διάρκεια ζωής στο υπόγειο νερό (Parsons, 2008).

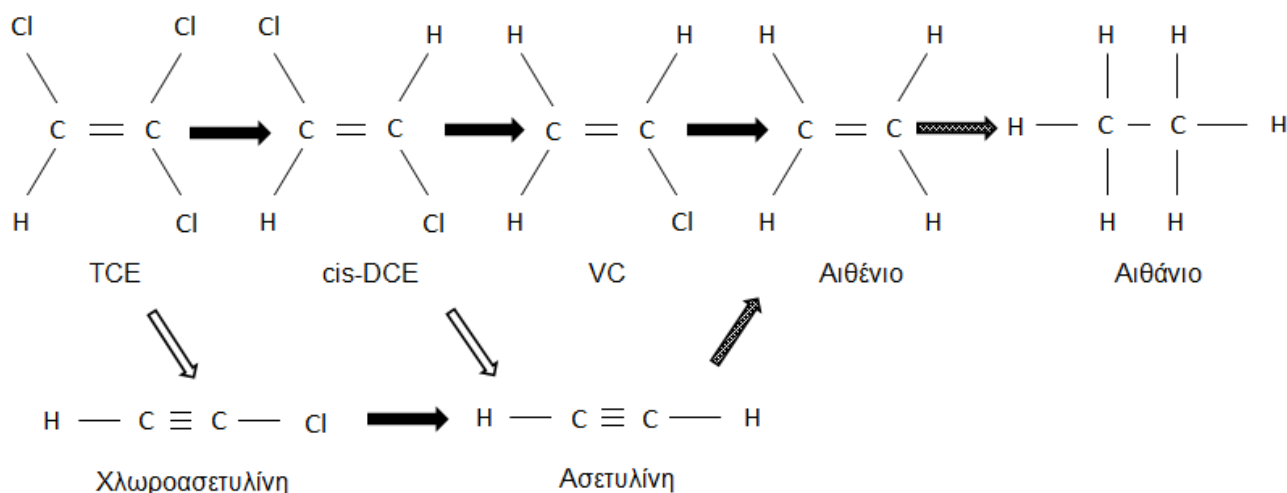
Η αβιοτική αποχλωρίωση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων μπορεί, λοιπόν, να πραγματοποιηθεί είτε με το μονοπάτι της β-απόσπασης είτε με το μονοπάτι της υδρογονόλυσης, αλλά μόνο το 10% της αρχικής μάζας του τριχλωροαιθενίου ακολουθεί το δεύτερο και μετατρέπεται σε διχλωροαιθένιο (Arnold & Roberts, 2000; Butler & Hayes, 2001; Brown et al., 2009). Επίσης, ο ρυθμός μειώνεται καθώς η διαδικασία μεταβαίνει σε λιγότερα χλωριωμένα αιθένια, μιας και το cis-DCE μετατρέπεται πολύ πιο αργά από ότι το TCE (Butler & Hayes, 2001).

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το ισοζύγιο των προϊόντων καταδεικνύει τον τύπο της αποχλωρίωσης που επιτεύχθηκε και θεωρείται ότι τα θυγατρικά προϊόντα DCEs και VC προέρχονται μέσω της βιολογικής αποδόμησης, ενώ η χλωροασετυλίνη και η ασετυλίνη μέσω της αβιοτικής διεργασίας (Evans et al., 2014; Whiting et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, τα μονοπάτια της αποχλωρίωσης περιγράφονται στο Σχήμα 2.2.

Η κατανομή των δύο μονοπατιών, β-απόσπασης και υδρογονόλυσης, φαίνεται να επηρεάζεται και από την ποσότητα ατόμων χλωρίου στην ένωση, εφόσον η αναγωγή του TCE σε cis-DCE και του PCE σε TCE έγινε 11.8 ± 1.1 φορές και 8.2 ± 1.8 φορές πιο αργά αντιστοίχως, σε σχέση με τη μετατροπή τους σε ασετυλίνη (Butler & Hayes, 1999). Επομένως, το TCE έχει περισσότερο την τάση να χρησιμοποιεί το μονοπάτι της β-απόσπασης από ότι το PCE.

Άλλος παράγοντας που ευνοεί ένα από τα δύο μονοπάτια είναι το pH, αφού επιδρά στην κατανομή των προϊόντων. Σε πειράματα με FeS και τρία διαφορετικά pH, 7.3, 8.3 και 9.3 η ασετυλίνη ήταν περίπου 78%, 92% και 92% του αρχικού TCE, ενώ το cis-DCE μόλις 11%, 8% και 2%, αντιστοίχως, δείχνοντας ότι η αύξηση του pH ευνοεί το μονοπάτι της β-απόσπασης έναντι της υδρογονόλυσης (Butler & Hayes, 2001).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 2.2 Μονοπάτια υδρογονόλυσης (μαύρο βέλος), β-απόσπασσης (λευκό βέλος) και υδρογόνωσης (βέλος με μοτίβο) (Hara et al., 2005; Arnold & Roberts, 2000).

2.2.3. Επίδραση ορυκτών σιδήρου στην αναγωγική αποχλωρίωση

Όπως προαναφέρθηκε, η χρήση της αβιοτικής αποχλωρίωσης στις τεχνολογίες απορρύπανσης, μέσω ορυκτών για την απομάκρυνση ρύπων από τα υπόγεια ύδατα συγκεντρώνει σημαντικό ενδιαφέρον (Kennedy et al., 2006; Liang et al., 2009). Πολλά ορυκτά που παίρνουν μέρος στην αποχλωρίωση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων αποτελούνται από σίδηρο, όπως τα οξειδία δισθενούς σιδήρου, ο θειούχος σιδήρος, κ.ά (Kennedy et al., 2006; He et al., 2010; Brown et al., 2009), κυρίως εξαιτίας της αφθονίας τους στο έδαφος και της υψηλής αναγωγικής τους ικανότητας (Jeong et al., 2011; Han et al., 2012). Παρακάτω αναλύεται η επίδραση των ορυκτών σιδήρου στην αναγωγή των χλωριωμένων αιθινίων και, κυρίως, του θειούχου σιδήρου, που θεωρείται ότι συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στη διαδικασία της αποχλωρίωσης.

2.2.3.1. Η παρουσία του σιδήρου στο έδαφος. Μορφή - Περιεκτικότητα - Φυσικά Χαρακτηριστικά

Ο σίδηρος είναι ένα κοινό συστατικό του φλοιού της γης (5-6%), ενώ απαντάται είτε ως δισθενές (Fe^{2+}) είτε ως τρισθενές ιόν (Fe^{3+}) (Elsner, 2002). Η συγκέντρωσή του όμως, στα ορυκτά εδάφους ποικίλλει ευρέως, εφόσον κυμαίνεται από <1% ως >20% με διάμεση τιμή 3% (Loerper & Inskeep, 1996). Προέρχεται από τη διάβρωση μαγματικών πετρωμάτων που περιέχουν δισθενή σίδηρο, ενώ στη συνέχεια επανακαθαρίζει ως τρισθενής σίδηρος (Elsner, 2002).

Τα κυρίαρχα ορυκτά του σιδήρου είναι ο αιματίτης (Fe_2O_3), ο γκετίτης ($\alpha\text{-FeO(OH)}$), ο μαγνητίτης (Fe_3O_4), ο λεπιδοκροκίτης ($\gamma\text{-FeO(OH)}$), ο μαγγελμίτης ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) και ο σιδηριϋδρίτης ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$). Όλα είναι οξειδία του τρισθενούς σιδήρου, με εξαίρεση τον μαγνητίτη που περιέχει μίγμα δισθενούς και τρισθενούς ιόντος. Επίσης, ο σίδηρος είναι συστατικό πυριτικών, φωσφορικών, ανθρακικών, θειούχων ορυκτών, όπως ο σιδηροπυρίτης (FeS_2), ενώ σε χαμηλές τιμές pH (<5) και αναγωγικές συνθήκες μπορεί να δημιουργήσει σύμπλοκα με την οργανική ύλη, παραδείγματος χάριν με τα χουμικά οξέα (Loeppert & Inskeep, 1996).

Παράλληλα, οι μικροβιακές και χημικές διεργασίες στο έδαφος μπορούν να υποβοηθήσουν τη διαλυτοποίηση των οξειδίων με αποτέλεσμα να παράγεται δισθενής διαλυτός σίδηρος (Elsner, 2002). Τέλος, ενώ έχει χαμηλή διαλυτότητα σε αλκαλικό (και ασβεστολιθικό) περιβάλλον, υπό όξινες ή/και αναγωγικές συνθήκες, η συγκέντρωση του διαλυτού σιδήρου είναι αρκετά υψηλή.

Επομένως, η ποσότητα του διαλυτού σιδήρου στην υγρή φάση εξαρτάται από το pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής αλλά και από τη συγκέντρωση των διαλυτών συμπλόκων σιδήρου, τη διαλυτότητα και τους ρυθμούς της διάλυσης και της κατακρήμνισης των οξειδίων του. Όμως, η βασική παράμετρος που επιδρά στη βιοδιαθεσιμότητα ενός ορυκτού σιδήρου είναι η ευχέρεια της διάλυσής του, η οποία επηρεάζεται από το μέγεθος του σωματιδίου και τη δραστηριότητα της επιφάνειας του ορυκτού (Loeppert & Inskeep, 1996).

2.2.3.2. Βιογεωχημική μετατροπή - Συνδυασμός βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών

Οι βιολογικές και οι αβιοτικές διεργασίες, μέχρι και το πρόσφατο παρελθόν, έχουν περιγραφεί ως δύο ξεχωριστές διεργασίες οι οποίες δεν συνδέονται. Σύμφωνα, όμως, με την πρόσφατη βιβλιογραφία, μπορεί να παρατηρηθεί ότι υπάρχουν δύο τύποι αλληλεπίδρασης των βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών. Ο ένας τύπος δείχνει μια συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο διαδικασιών, ενώ ο άλλος τύπος μια αιτιολογική σχέση, όπου τα ορυκτά μετατρέπονται σε αναγωγικά μέσα μέσω βιολογικών αντιδράσεων και μετέπειτα οι χλωριωμένες ενώσεις απομακρύνονται με αβιοτικές διαδικασίες (Brown et al., 2009).

Εξαιτίας της αλληλοεπικάλυψης, αλλά και της συνδυασμένης δράσης των βιολογικών, αβιοτικών και γεωχημικών διεργασιών, συνήθως για το δεύτερο τύπο χρησιμοποιείται ο όρος βιογεωχημική μετατροπή. Ως βιογεωχημική μετατροπή ορίζεται η διαδικασία όπου οι ρύποι μειώνονται μέσω αβιοτικών αντιδράσεων με ορυκτά, τα οποία είτε προκύπτουν φυσικά είτε παράγονται με βιογενείς διεργασίες στο έδαφος (Parsons, 2008).

Συνεπώς, η επί τόπου βιογεωχημική μετατροπή περιλαμβάνει το βιολογικό σχηματισμό εκείνων των ενεργών ορυκτών στον υδροφορέα που έχουν την

ικανότητα να ανάγουν το TCE μέσω της αβιοτικής αποχλωρίωσης (Evans et al., 2014). Αν και έχει καταφανεί η σπουδαιότητα της βιολογικής αναγωγής σιδήρου, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της γεωχημείας του ορυκτού και των βιολογικών διεργασιών ακόμα μελετώνται, ιδιαίτερα όσον αφορά στους παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό και την έκταση της διαδικασίας, αλλά και την ταυτοποίηση των ορυκτών μετά από αυτήν (Fredrickson et al., 1998).

Μέχρι τώρα έχει αποδειχθεί ότι η αντίδραση της αβιοτικής αποχλωρίωσης επιτυγχάνεται επάνω στην επιφάνεια του ορυκτού (Elsner, 2002), η οποία μπορεί να περιέχει δισθενή ή τρισθενή οξειδία σιδήρου ή/και διάφορα ανιόντα, όπως το θείο, το χλώριο και το ανθρακικό (Parsons, 2008). Θεωρείται ότι τα δισθενή ιόντα του σιδήρου που βρίσκονται επάνω στην επιφάνεια είναι πιο ενεργά από ότι ο διαλυτός δισθενής σίδηρος (Maithreepala & Doong, 2005). Επομένως, η διαδικασία που επιτελείται μπορεί να τμηματοποιηθεί σε τρία βασικά βήματα, όπως προτάθηκε από τους Arnold & Roberts (2000) για την αναγωγή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων από σίδηρο μηδενικού σθένους:

(α) προσρόφηση ρύπων στην ενεργή επιφάνεια των ορυκτών,

(β) αντίδραση στην επιφάνεια και

(γ) εκρόφιση των προϊόντων.

Η εφαρμογή της μεθόδου μπορεί να επιτευχθεί με διάφορους τρόπους, όπως ενεργά διαπερατά φράγματα, επιτόπιοι βιοαντιδραστήρες, συστήματα άμεσης εισπίεσης στο έδαφος, ή μπορεί να επιτευχθεί μέσω φυσικών διεργασιών, πριν ή/και μετά από τη βιοαποκατάσταση της ρυπασμένης περιοχής (Evans, 2014). Όμως, αν και υπάρχει πρωτόκολλο για τη διεξαγωγή της βιογεωχημικής μετατροπής (Parsons, 2008), ταυτόχρονα υπάρχει μια μεγάλη αβεβαιότητα σχετικά με τα υλικά και τις γεωχημικές συνθήκες του υπόγειου νερού που απαιτούνται για τη διέγερση των βιογεωχημικών διεργασιών. Αυτή η αβεβαιότητα έχει οδηγήσει στην εγκατάσταση και τη λειτουργία μη αποτελεσματικών συστημάτων (Evans et al., 2014; Jeong et al., 2011). Με βάση το παραπάνω, αρκετές έρευνες έχουν στραφεί στην εξέταση του συγκεκριμένου θέματος. Τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της μεθόδου συνοψίζονται στον Πίνακα 2.6.

Μερικά από τα ορυκτά που μπορούν να σχηματιστούν με βιογενείς διεργασίες και μπορούν να αναγάγουν το τριχλωροαιθέριο είναι ο μακινάβιτης (mackinawite; $(\text{Fe,Ni})_{1+x}\text{S}$), ο θειούχος σίδηρος ή τροϊλίτης (troilite; FeS), ο σιδηροπυρίτης (pyrite; FeS_2), ο μαγνητίτης (magnetite; Fe_3O_4) και ο φουγγερίτης ($[\text{Fe}_4\text{Fe}_2(\text{OH})_{12}] [\text{CO}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - "green rust") (Whiting et al., 2014; Evans et al., 2014; He et al., 2010; Parsons, 2008).

Στο Σχήμα 2.3 φαίνονται μερικά παραδείγματα από τις χιλιάδες βιοχημικές διαδικασίες και αντιδράσεις που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιτόπου βιογεωχημική μετατροπή, ενώ στο Σχήμα 2.4 φαίνονται οι μηχανισμοί που

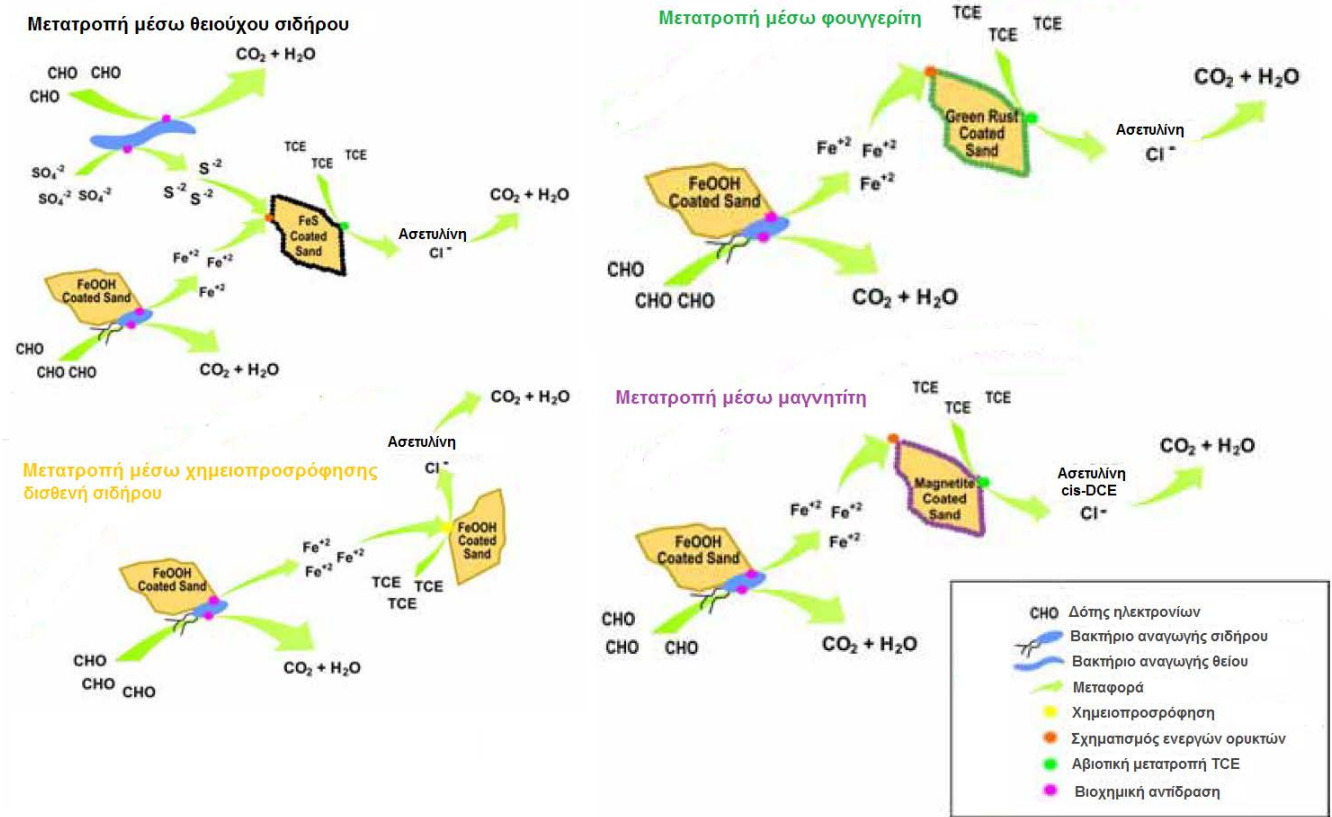
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

πραγματοποιούνται κατά τη διεργασία. Οι μετατροπές μέσω θειούχου σιδήρου, φουγγερίτη, μαγνητίτη και χημειοπροσρόφησης δισθενούς σιδήρου περιγράφονται παρουσιάζοντας τον τρόπο που συνδέονται οι βιολογικές και γεωχημικές αντιδράσεις, με σκοπό τη δημιουργία των ενεργών επιφανειών (Parsons, 2008) και αναλύονται παρακάτω. Συνοπτικά, μικροοργανισμοί οξειδώνουν τα ορυκτά του τρισθενούς σιδήρου σε διαλυτό δισθενή σίδηρο με τη χρήση οργανικών ουσιών ως δοτών ηλεκτρονίων, ενώ ο παραγόμενος δισθενής σίδηρος επικολλάται στην επιφάνεια ορυκτών δημιουργώντας στρώσεις αναγωγικού υλικού, το οποίο μετατρέπει το TCE σε ασετυλίνη.

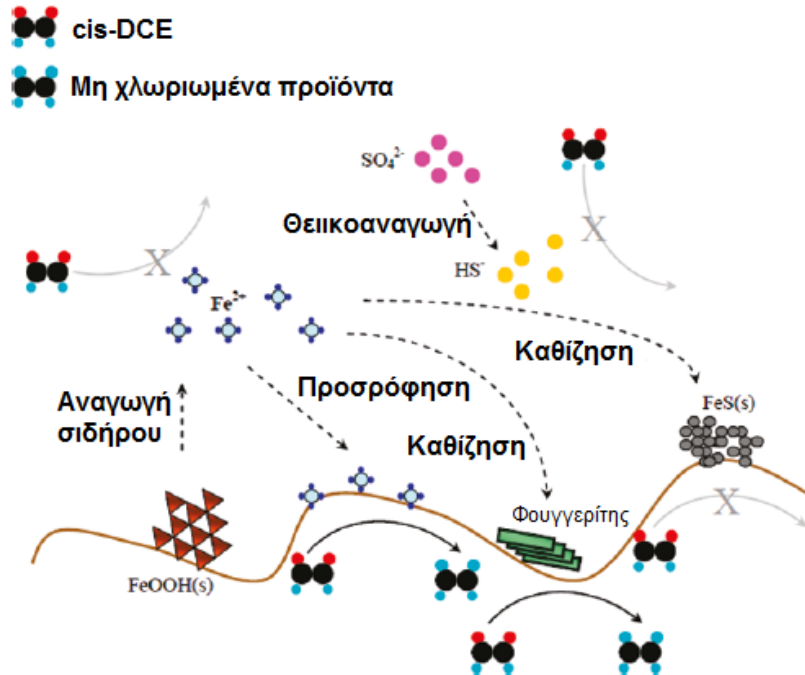
Πίνακας 2.6 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιογεωχημικής μετατροπής (Πηγή: Evans, 2014).

<input type="checkbox"/> Πλεονεκτήματα	<input type="checkbox"/> Μειονεκτήματα
<input type="checkbox"/> Χρήση πολλαπλών μηχανισμών για τη μείωση των ρύπων	<input type="checkbox"/> Περιορισμένη διαθέσιμη γνώση επί του θέματος
<input type="checkbox"/> Μηχανισμός μη-εξαρτώμενος από την αποχλωριωτική βιοκοινότητα	<input type="checkbox"/> Άμεση εφαρμογή συνήθως μόνο για το συγκεκριμένο σκοπό (ad hoc)
<input type="checkbox"/> Ελαχιστοποίηση των τοξικών θυγατρικών προϊόντων	<input type="checkbox"/> Μικρή εμπειρία στο πεδίο
<input type="checkbox"/> Εφαρμογή για την απομάκρυνση πολλών ρύπων	<input type="checkbox"/> Συμμετοχή πολύπλοκων αντιδράσεων
<input type="checkbox"/> Ελαχιστοποίηση υποτροπής	
<input type="checkbox"/> Μακροχρόνιες αναγωγικές συνθήκες για εν δυνάμει φυσική εξασθένηση	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 2.3. Παραδείγματα βιογεωχημικής μετατροπής του TCE (Πηγή: Parsons, 2008).



Σχήμα 2.4 Μηχανισμοί βιογεωχημικής μετατροπής του cis -DCE (Πηγή: Jeong et al., 2011).

Μετατροπή μέσω φουγγερίτη

Ο φουγγερίτης ($[\text{Fe}^{\text{II}}_{(6-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{OH})_{12}]^x [\text{A}_{x/n}\text{yH}_2\text{O}]^x$ - "green rust") αποτελείται από ένα μίγμα δισθενών και τρισθενών υδροξειδίων σιδήρου, ενώ πάνω στην επιφάνειά του υπάρχουν αρνητικά φορτία ιόντων και νερού που περιβάλλονται από τα θετικά φορτισμένα μεταλλικά υδροξείδια (Han et al., 2012; O'Loughlin & Burris, 2004; Maithreepala & Doong, 2005; Lee & Batchelor, 2002b). Τα χαρακτηριστικά του φουγγερίτη εξαρτώνται από τον τύπο του ανιόντος εντός των στρωμάτων. Συνήθη ανιόντα (A στον ανώτερο χημικό τύπο) είναι τα χλωριούχα (Cl^-), τα ανθρακικά (CO_3^{2-}), τα θειικά (SO_4^{2-}) ή τα φθοριούχα ιόντα (F^-) κ.ά. (Maithreepala & Doong, 2005; Choi & Lee, 2008; Han et al., 2012).

Υπάρχει φυσικά στο έδαφος, αφού κατά τη διάβρωση των ορυκτών σιδήρου είναι πρόδρομος άλλων προϊόντων, όπως ο γκετίτης, ο λεπιδοκροκίτης ή ο μαγνητίτης (Lee & Batchelor, 2002b; Tobiszewski & Namieśnik, 2012), ενώ μπορεί να δημιουργηθεί και βιολογικά μέσω της μικροβιακής οξειδωσης του δισθενούς και της αναγωγής του τρισθενούς σιδήρου από σιδηροαναγωγικά βακτήρια (iron reducing bacteria; IRB) (Maithreepala & Doong, 2005). Θεωρείται, λοιπόν, ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις οξειδοαναγωγής του σιδήρου σε υδάτινα και εδαφικά περιβάλλοντα.

Από τη σχετική έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί στο παρελθόν φαίνεται ότι το ορυκτό αυτό μπορεί να ανάγει χλωριωμένες ενώσεις, όπως ο τετραχλωράνθρακας (CT), τα χλωριωμένα αιθάνια, το τριχλωροαιθάνιο (TCA), το τετραχλωροαιθάνιο (TeCA), κ.ά. (O'Loughlin & Burris, 2004; Maithreepala & Doong, 2005). Τα πειράματα των Lee & Batchelor (2002b) έδειξαν ότι τα χλωριωμένα αιθάνια μπορούν γρήγορα αλλά μερικώς μόνο να ελαττωθούν με τη χρήση θειικού φουγγερίτη ($[\text{Fe}_4\text{Fe}_2(\text{OH})_{12}][\text{SO}_4] \cdot \text{yH}_2\text{O} - \text{GR}_{\text{SO}_4}$), στις 20 ημέρες παρέμεινε περίπου το 68-75% της αρχικής συγκέντρωσής τους. Στη συνέχεια, όμως, δεν πραγματοποιήθηκε κάποια ιδιαίτερη μείωση, παρότι τα πειράματα συνεχίστηκαν μέχρι τις 70 ημέρες. Επίσης, το PCE και το TCE τείνουν να μετατρέπονται περισσότερο σε ασετυλίνη, ενώ τα cis-DCE και VC παράγουν κατά κύριο λόγο αιθένιο.

Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Maithreepala & Doong (2005), κατά την έρευνα των οποίων το PCE και το TCE μειώθηκαν σε ποσοστά 33% και 20% αντίστοιχα με την προσθήκη 1.5 gr/L χλωριούχου φουγγερίτη ($[\text{Fe}_4\text{Fe}_2(\text{OH})_{12}][\text{Cl}]\cdot \text{yH}_2\text{O} - \text{GR}_{\text{Cl}}$). Όμως, παρότι μετρήθηκαν η ασετυλίνη, το αιθένιο και το αιθάνιο, δεν ανακτήθηκε όλη η μάζα στο τέλος των πειραμάτων. Υψηλότερες απομακρύνσεις αναφέρουν, οι Liang et al. (2009), οι οποίοι έδειξαν ότι τα πειράματα που περιείχαν 10 gr/L χλωριούχο φουγγερίτη πέτυχαν καλύτερη αναγωγή σε σχέση με τα πειράματα που διεξήχθησαν με 25 gr/L θειικό φουγγερίτη, αφού περίπου 70% και 6-17% της συνολικής τελικής μάζας αποτελούνταν από τα προϊόντα της αποχλωρίωσης αντιστοίχως. Όσον αφορά στον ρυθμό αποχλωρίωσης, φαίνεται ότι η αύξηση του pH υποβοηθά τη διεργασία, λαμβάνοντας υπόψη την αύξηση της απομάκρυνσης κατά 11% με την άνοδο του pH από 5.5 σε 9 (Maithreepala & Doong, 2005). Επιπλέον, τα πιο χλωριωμένα αιθάνια

ανάγονται γρηγορότερα από ότι οι λιγότερο χλωριωμένες ενώσεις (O'Loughlin & Burris, 2004).

Μετατροπή μέσω χημειοπροσρόφησης δισθενούς σιδήρου

Ο προσροφημένος δισθενής σίδηρος θεωρείται ότι έχει υψηλή δραστικότητα και ενεργεί ως αναγωγικό μέσο για ανόργανους ρύπους, όπως ο υδράργυρος, το αρσενικό, το ουράνιο, το χρώμιο, ο χαλκός, κ.ά. αλλά και για οργανικές ενώσεις (Hiemstra & van Riemsdijk, 2007). Η διεργασία της χημειοπροσρόφησης σιδήρου μπορεί να περιγραφεί ως εξής: οξειδίο του τρισθενούς σιδήρου, για παράδειγμα ο γκετίτης που είναι το πιο κοινό στο έδαφος, αντιδρά με διαλυτό δισθενή σίδηρο για το σχηματισμό πλέγματος δισθενούς σιδήρου στην επιφάνειά του (Liang et al., 2009). Ύστερα, οι οργανοχλωριωμένες ουσίες προσροφώνται στην επιφάνεια του πλέγματος με φυσικό τρόπο και προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια (Zhang et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, σχηματίζονται δεσμοί σ επικαλύπτοντας τα ατομικά τροχιακά μεταξύ του TCE και του σιδήρου (Li & Farrell, 2001).

Οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής επιτυγχάνονται όταν γίνεται η διοχέτευση των ηλεκτρονίων μέσα από το πλέγμα, δηλαδή μέσα από τους δεσμούς σ, ενώ δεν σχηματίζονται δεσμοί μεταξύ της επιφάνειας και του προϊόντος που σχηματίστηκε. Η αδύναμη σχέση της φυσικής προσρόφησης οδηγεί στη μικρή παραμονή της χημικής ένωσης πάνω στην επιφάνεια και την εκρόφηση της ουσίας μετά την αντικατάσταση ενός ατόμου χλωρίου (Zhang et al., 2008; Li & Farrell, 2001). Η χημειοπροσρόφηση του τετραχλωράνθρακα χρησιμοποιεί ως κυρίαρχο μονοπάτι την υδρογονόλυση προβάλλοντας μια διαδοχική αποχλωρίωση.

Αντίθετα, ο κύριος μηχανισμός της χημειοπροσρόφησης του TCE είναι η β-απόσπαση, δηλαδή η παραγωγή μη-χλωριωμένων προϊόντων (Farrell et al., 2000; Li & Farrell, 2001). Ο συντελεστής μετατροπής του TCE φαίνεται να εξαρτάται από τη θερμοκρασία και δεν επηρεάζεται αποκλειστικά από τον ρυθμό της μεταφοράς ηλεκτρονίων, επομένως οι περιοριστικοί παράγοντες της αποχλωρίωσης είναι χημικοί, παραδείγματος χάριν η διάσπαση δεσμών και η μοριακή αναδιοργάνωση που πραγματοποιούνται στην εσωτερική στρώση του πλέγματος (Li & Farrell, 2001).

Επιπλέον, η μετατροπή του TCE μέσω της χημειοπροσρόφησης σιδήρου μπορεί να είναι και έμμεση, χρησιμοποιώντας ως αναγωγικό μέσο το υδρογόνο που παράγεται από την αναγωγή του νερού (Li & Farrell, 2000; Li & Farrell, 2001). Το παραπάνω φαίνεται να ισχύει εφόσον δεν υπάρχει εξάρτηση του δυναμικού οξειδοαναγωγής με τον ρυθμό αποχλωρίωσης του TCE, ενώ πραγματοποιείται σχηματίζοντας ενώσεις υδρογονανθράκων με αρνητικά φορτισμένα υδρογόνα (υδρίδια) (Li & Farrell, 2001).

Παρά ταύτα, η χημειοπροσρόφηση παρουσιάζει αρκετές διακυμάνσεις αναφορικά με την απόδοσή της στην αποχλωρίωση, όπως φαίνεται σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι Liang et al. (2009), για παράδειγμα, δεν

παρατήρησαν μετατροπή των PCE και TCE μετά την πάροδο 233 ημερών με 4 gr/L γκετίτη και 4 mM FeCl₂, ενώ ο ρυθμός της αναγωγής του PCE και του TCE φάνηκε να μειώνεται με την προσθήκη 10 mM Fe²⁺ σε 10 gr/L FeS (Jeong et al., 2007). Αντιθέτως, σε άλλες έρευνες βελτίωση του ρυθμού ή/και της έκτασης της αποχλωρίωσης επιτεύχθηκε όταν προστέθηκε δισθενής σίδηρος σε πειράματα που περιείχαν μαγνητίτη (Lee & Batchelor, 2002a; Brown et al., 2009), γκετίτη (Kim et al., 2008), κ.ά.

Μετατροπή μέσω μαγνητίτη

Ο μαγνητίτης (Fe₃O₄) είναι ένα σιδηρομαγνητικό ορυκτό αποτελούμενο από μίγμα δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου. Σχηματίζεται με βιογενείς διεργασίες κατά τη βιολογική αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου από τα σιδηροαναγωγικά βακτήρια. Ο συνδυασμός της αναγωγής του σιδήρου, του σχηματισμού του μαγνητίτη και της ακόλουθης αβιοτικής αποδόμησης αποτελεί τη βιογεωχημική μετατροπή που μπορεί να συμβεί φυσικά ή ως αποτέλεσμα της ενισχυμένης αναερόβιας αποκατάστασης (Parsons, 2008). Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο μαγνητίτης μπορεί να ανάγει οργανοχλωριωμένες ενώσεις, αλλά ο ρυθμός αποχλωρίωσης θεωρείται ότι είναι πολύ πιο αργός συγκριτικά με άλλα ενεργά ορυκτά σιδήρου (Lee & Batchelor, 2002a).

Σε πειράματα που διεξήγαγαν οι Liang et al. (2009) δεν διαπιστώθηκε κάποια ιδιαίτερη μείωση των TCE και PCE με 20 gr/L μαγνητίτη στις 131 και 141 ημέρες λειτουργίας αντιστοίχως. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Lee & Batchelor (2002a), κατά την έρευνα των οποίων δεν παρατηρήθηκε αναγωγική αποχλωρίωση στα πειράματα με PCE, TCE, cis-DCE και VC ως αρχικούς ρύπους, και μαγνητίτη. Όμως, μετά την προσθήκη ~43 mM δισθενούς σιδήρου (με τη μορφή FeSO₄) στις λιγότερο χλωριωμένες ενώσεις, cis-DCE και VC, καταναλώθηκαν περίπου το 35% και το 45% των αρχικών συγκεντρώσεων αντιστοίχως, σε διάστημα 100 ημερών. Η καλύτερη απόδοση της αποχλωρίωσης με την προσθήκη διαλυτού σιδήρου μάλλον οφείλεται στο σχηματισμό ενεργών περιοχών δισθενούς σιδήρου στην επιφάνεια του ορυκτού.

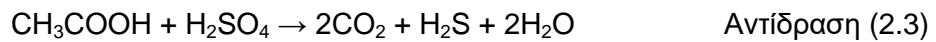
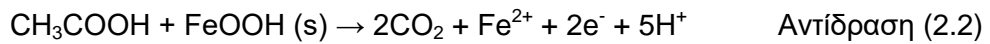
Μετατροπή μέσω θειούχου σιδήρου ή τροϊλίτη

Ο θειούχος σίδηρος (FeS) είναι μια μη τοξική ουσία που υπάρχει σε αφθονία στο έδαφος και είναι πρόδρομος άλλων σταθερών θειούχων ορυκτών, όπως ο σιδηροπυρίτης (Gong et al., 2016, Amir & Lee, 2012, Huo et al., 2016). Εξαιτίας της χαλκόφιλης φύσης του και της αναγωγικής του ικανότητας ο θειούχος σίδηρος αντιδρά με ένα μεγάλο εύρος χημικών ειδών (He et al., 2010). Επίσης, είναι μια σημαντική πηγή δισθενών ιόντων σιδήρου (Fe²⁺) και θείου (S²⁻), τα οποία μπορούν να δράσουν αμφότερα ως δότες ηλεκτρονίων σε αναγωγικές αντιδράσεις (Huo et al.,

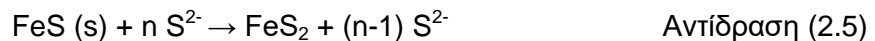
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Ο θειούχος σίδηρος μπορεί να σχηματιστεί μέσω της βιογεωχημικής μετατροπής, εφόσον τα θεικοαναγωγικά βακτήρια (SRB) χρησιμοποιούν τα θειικά ιόντα για την παραγωγή θειωδών, τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με τον σίδηρο φερτών υλικών ή με άλλες πηγές για να σχηματίσουν ένα άμορφο ίζημα που κρυσταλλώνεται περαιτέρω στη σταθερή μορφή του θειούχου σιδήρου (Gong et al., 2016). Πιο αναλυτικά, ένα οξειδίο σιδήρου, παραδείγματος χάριν ο γκετίτης, αντιδρά με τα διαλυτά σουλφίδια, τα οποία έχουν παραχθεί από την αναγωγή των θειικών ιόντων, με αποτέλεσμα να προκληθεί η διαλυτοποίηση του σιδήρου ακολουθούμενη από την κατακρήμνιση του σχηματισθέντος θειικού σιδήρου (Liang et al., 2009).

Η διαδικασία αυτή μπορεί να περιγραφεί με τις παρακάτω αντιδράσεις με την υπόθεση ότι το οξικό οξύ χρησιμοποιείται ως άμεσος ή έμμεσος δότης ηλεκτρονίων για τη θεικοαναγωγή ή/και την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή:



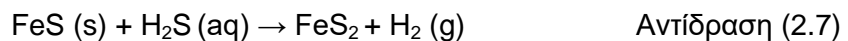
Ύστερα, ο θειούχος σίδηρος μετατρέπεται κυρίως σε σιδηροπυρίτη (FeS_2) μέσω τριών μονοπατιών (He et al., 2008; Kennedy et al., 2006). Κυρίαρχο θεωρείται το μονοπάτι των πολυθειούχων ιόντων, όπου ο τροϊλίτης αντιδρά με το στοιχειακό θείο, ή με πολυθειούχα ιόντα και σχηματίζει τον σιδηροπυρίτη, όπως φαίνεται και στην αντίδραση 2.5.



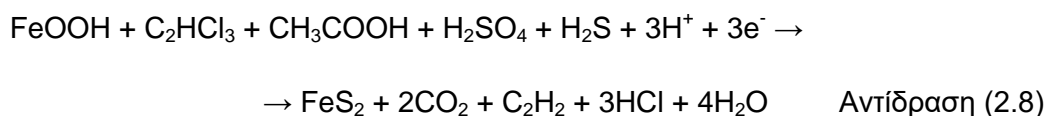
Ένα άλλο πιθανό μονοπάτι είναι μέσω της παραγωγής ενός ενδιάμεσου προϊόντος, του γκρεγκίτη (Fe_3S_4), όπως φαίνεται στην αντίδραση 2.6 (Kim et al., 2014).



Επιπλέον, υπό αυστηρά ανοξικές συνθήκες, το υδρόθειο (H_2S) μπορεί να λειτουργήσει ως οξειδωτικός παράγοντας ως εξής:



Οι παραπάνω περιγραφόμενοι μηχανισμοί μπορούν, λοιπόν, να συνοψιστούν σε μια ολική αντίδραση (παραλλαγμένη από Kennedy et al., 2006; He et al., 2008):



Ένα περιοριστικό βήμα στην παραπάνω διεργασία είναι η μετατροπή των οξειδίων του σιδήρου σε θειικό σίδηρο. Στα πειράματα που διεξήγαγαν οι Liang et al. (2009),

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

δεν παρατηρήθηκε αναγωγή των PCE και TCE στις 233 ημέρες λειτουργίας με 4 gr/L γκετίτη και 1 mM Na₂S, γεγονός που οφείλεται στη χαμηλή παραγωγή FeS, περίπου 0.06 gr/L.

Από την άλλη, οι Butler & Hayes (2001) παρατήρησαν μείωση 88.8% στη συγκέντρωση του TCE σε διάστημα 120 ημερών μέσω της αβιοτικής αποχλωρίωσης με 10 gr/L θειούχο σίδηρο, ενώ το 81.3% μετατράπηκε σε ασετυλίνη. Οι ανακτήσεις μάζας ήταν ατελείς πιθανώς εξαιτίας του σχηματισμού μη-πτητικών ή υδατοδιαλυτών ενώσεων, πέραν των συνήθων προϊόντων της αποχλωρίωσης, όπως παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 2.2 (He et al., 2010). Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι τα θεικοαναγωγικά βακτήρια αφθονούν στο έδαφος και είναι εύκολο να διεγερθούν, ενώ τα απαραίτητα υλικά για την πραγματοποίηση της μετατροπής μπορούν να αποκτηθούν εύκολα και είναι φτηνά (Kennedy et al., 2006).

Από τις αντιδράσεις 2.7 και 2.8 φαίνεται επίσης ότι το θείο οξειδώθηκε και το σθένος του άλλαξε από -2 σε -1, προσφέροντας, έτσι, 1 ηλεκτρόνιο/mole, άρα συνολικά 2 ηλεκτρόνια. Το παραπάνω συμφωνεί με παλαιότερες έρευνες όπου είχε παρατηρηθεί ότι το θείο μπορεί να λειτουργήσει ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγή χλωριωμένων ρύπων (Kriegman-King & Reinhard, 1992; Aller & Rude, 1988).

Συνεπώς, με την προσθήκη ισχυρών ή ασθενών οξειδωτικών ουσιών το θείο (S²⁻) μπορεί να μετατραπεί σε θειικά (SO₄²⁻) ή στοιχειακό θείο (S⁰). Η αναγωγική ικανότητα του FeS μπορεί να υπολογισθεί με τον παρακάτω τύπο (Jeong et al., 2011):

$$R \text{ (meq/L)} = [\text{Fe}^{2+}] + 2 * [\text{S}^{2-}] \text{ (meq/L)} \quad \text{Εξίσωση 2.1}$$

Όσον αφορά στον ρυθμό μετατροπής του τριϊλίτη σε σιδηροπυρίτη, φαίνεται ότι επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση πολλών παραγόντων, όπως ο ρυθμός σχηματισμού του υδρόθειου, η διαθεσιμότητα του οργανικού υλικού και των οξειδωτικών μέσων, κ.ά., ενώ ο βαθμός επίτευξης της αντίδρασης εξαρτάται κυρίως από τη διαθεσιμότητα των ενεργών περιοχών του σιδήρου και τις ενδιάμεσες ενώσεις θείου που παράγονται (He et al., 2010). Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει, επίσης, και ο ανταγωνισμός μεταξύ των μικροοργανισμών του ίδιου είδους για τον περιορισμένο αριθμό των ενεργών περιοχών (Arnold & Roberts, 2000).

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής μελετάται η επίδραση του θειούχου σιδήρου στην αποχλωρίωση του TCE, κατά συνέπεια τα πειραματικά αποτελέσματα που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 4 επικεντρώνονται κυρίως στη συγκεκριμένη διεργασία της βιογεωχημικής μετατροπής.

2.2.3.3. Ρυθμός αβιοτικής αποχλωρίωσης

Ο ρυθμός της αβιοτικής αποχλωρίωσης ποικίλλει ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση των ρύπων, τον τύπο της εφαρμογής στο πεδίο ή των πειραμάτων, τον

τύπο και τη συγκέντρωση των ενεργών περιοχών (Han et al., 2012). Επιπλέον, οι γεωχημικές συνθήκες (pH, χαρακτηριστικά υπόγειου νερού, κ.λπ.) επιδρούν στη φύση και τον ρυθμό της βιογεωχημικής μετατροπής (He et al., 2010; Han et al., 2012), εφόσον φαίνεται ότι η πιο έντονη αβιοτική διεργασία προκύπτει υπό συνθήκες αναγωγής σιδήρου και θειικών. Στις συγκεκριμένες συνθήκες, υπάρχουν μεγάλες ποσότητες στερεών δισθενούς σιδήρου και θειωδών, τα οποία δημιουργούνται από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή συγκεκριμένων κατηγοριών ορυκτών στην αβιοτική αποχλωρίωση (Dong et al., 2009).

Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι ο θειούχος σίδηρος που προέρχεται μέσω βιολογικής παρασκευής (βιογενής FeS) είναι πιο δραστήριος από τον FeS που έχει παραχθεί αβιοτικά, εφόσον επιτύγχανε 5 φορές καλύτερη αποχλωρίωση του τετραχλωράνθρακα. Η παραπάνω παρατήρηση ισχύει εξαιτίας της υψηλότερης περιεκτικότητας σε αναγωγικά είδη, όπως ο σίδηρος (Fe^{2+}) και το θείο (S^{2-}), και της ομοιόμορφα διασκορπισμένης δομής που έχει ο βιογενής θειούχος σίδηρος (Huo et al., 2016).

Η αύξηση του pH, ακόμη, μπορεί να προκαλέσει την αύξηση του ρυθμού της αβιοτικής αποχλωρίωσης του TCE (He et al., 2010; Jeong et al., 2013). Το παραπάνω μάλλον οφείλεται στη μείωση της διαλυτότητας του σιδήρου, με αποτέλεσμα να παράγονται και να καθιζάνουν μεγαλύτερες ποσότητες ενεργών φάσεων ενώ, ταυτόχρονα, αυξάνονται και τα ορυκτά με μη υδρογονωμένη επιφάνεια, τα οποία έχουν μεγαλύτερη δραστικότητα (Jeong et al., 2013). Είναι, έτσι, πιθανό η αλλαγή του pH να συμβάλει στην αύξηση του δυναμικού αναγωγής της ενεργής επιφάνειας (Butler & Hayes, 2001) ή/και στη γρηγορότερη μεταφορά ηλεκτρονίων (He et al., 2010).

Η αβιοτική μετατροπή των χλωριωμένων αιθενίων θεωρείται αντίδραση ψευδο-πρώτης τάξης (Dong et al., 2009; He et al., 2010; Jeong et al., 2011). Επομένως, η μείωση στην αρχή είναι γρήγορη, αλλά ο ρυθμός μειώνεται σταδιακά με το χρόνο, γεγονός που οφείλεται στην κατανάλωση των ενεργών περιοχών καθώς προχωρά η αντίδραση. Ταυτόχρονα, τα μη χλωριωμένα προϊόντα που αυξάνονται ανταγωνίζονται τους χλωριωμένους ρύπους για τις εναπομείνουσες ενεργές περιοχές (Jeong et al., 2011). Ο ρυθμός της αβιοτικής αποχλωρίωσης αλλάζει, λοιπόν, σταδιακά σύμφωνα με τη φάση του ορυκτού, τον βαθμό κρυσταλλικότητας και την ηλικία της κάθε φάσης (Whiting et al., 2014).

Επιπλέον, η φυσική οργανική ύλη, τα κυκλικά μακρομόρια και η επιφάνεια των ορυκτών μπορούν να αυξήσουν σημαντικά τον ρυθμό της αβιοτικής αποχλωρίωσης των οργανοχλωριωμένων, εφόσον μπορούν να ενεργήσουν και ως μεταφορείς ηλεκτρονίων (Lee & Batchelor, 2002a). Για παράδειγμα, το πείραμα των Weerasooriya & Dharmasena (2001) έδειξε ότι ο σιδηροπυρίτης ενεργεί ως μεταφορέας ηλεκτρονίων από τα ανιόντα της επιφάνειάς του στο τριχλωροαιθέριο σχηματίζοντας μια ασταθή ρίζα, το διχλωροβινύλιο (DVC).

Στον Πίνακα 2.7 παρουσιάζονται πειράματα αβιοτικής αποχλωρίωσης με τη χρήση ορυκτών σιδήρου σε μικροκόσμους. Πιο συγκεκριμένα, αναγράφεται το ορυκτό σιδήρου που χρησιμοποιήθηκε και ο τρόπος προμήθειάς του, ο αρχικός ρύπος και το βασικότερο προϊόν, ο ρυθμός αποχλωρίωσης και η διάρκεια των πειραμάτων. Όλοι οι ρυθμοί απομάκρυνσης θεωρήθηκαν ότι είναι ψευδο-πρώτης τάξης, ανεξάρτητα με τη συγκέντρωση του ορυκτού σιδήρου, δηλαδή η ταχύτητα αντίδρασης επηρεάζεται μόνο από τη συγκέντρωση των χλωριωμένων αιθενίων. Αυτή η θεώρηση είναι λογική, αφού στα πειράματα που παρουσιάζονται ο σίδηρος ήταν σε μεγάλη περίσσεια -σε όρους κανονικότητας (eq/L)- συγκριτικά με την απαίτηση σε ηλεκτρόνια για την επίτευξη της πλήρους αποχλωρίωσης.

Η χρήση κανονικοποιημένου ρυθμού σύμφωνα με την έκταση της επιφάνειας του ενεργού ορυκτού, θα ήταν επιθυμητή για τη βέλτιστη αξιολόγηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων (Tobiszewski & Namieśnik, 2012; Lee & Batchelor, 2002a; Han et al., 2012; Liang et al., 2007; Liang et al., 2009). Όμως, στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής δεν μετρήθηκε η ενεργή επιφάνεια του στερεού σιδήρου, άρα προτιμήθηκε η χρήση της σταθεράς k (day^{-1}) από την ψευδο-πρώτης τάξης αντίδραση για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων, σε συνάρτηση με την ποσότητα του ορυκτού. Επομένως, η κινητική είναι της μορφής:

$$[A] = [A_0] * e^{-kt} \quad \text{Εξίσωση (2.2)}$$

Όπου A : συγκέντρωση χλωριωμένου αιθενίου $[M]$ στον t χρόνο,
 A_0 : αρχική συγκέντρωση χλωριωμένου αιθενίου $[M]$,
 k : ρυθμός αβιοτικής αποχλωρίωσης $[\text{day}^{-1}]$ και
 t : χρόνος $[\text{day}]$.

Στον Πίνακα 2.7 παρατηρείται μια μεγάλη διακύμανση του ρυθμού της αβιοτικής αποχλωρίωσης, ακόμη και όταν χρησιμοποιείται το ίδιο είδος αναγωγικού μέσου (ορυκτού σιδήρου). Αξιοσημείωτο είναι ότι οι περισσότεροι ερευνητές επέλεξαν να κατασκευάσουν το αναγωγικό μέσο χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, άρα και με διάφορα χαρακτηριστικά. Με βάση αυτό, η μεγάλη διακύμανση των τιμών θα μπορούσε να οφείλεται στους διάφορους τρόπους προμήθειας του μέσου (Jeong et al., 2011).

Το μόνο ασφαλές συμπέρασμα είναι ότι ο μαγνητίτης είχε τη χειρότερη αναγωγική ικανότητα, όπως έχει ειπωθεί παραπάνω. Μια επιπρόσθετη διαπίστωση είναι ότι ο ρυθμός απομάκρυνσης του *cis*-DCE ήταν ο μικρότερος συγκριτικά με των άλλων χλωριωμένων αιθενίων, ανεξαρτήτως του ορυκτού που εισήχθηκε/δημιουργήθηκε στον μικρόκοσμο.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 2.7 Ρυθμοί αβιοτικής αποχλωρίωσης σε μικρόκοσμους με ορυκτά σιδήρου στη διεθνή βιβλιογραφία.

Αναγωγικό μέσο	Προμήθεια μέσου	Αρχικός ρύπος	Κυρίαρχο προϊόν ^a	Ρυθμός αποχλωρίωσης (day ⁻¹) ^a	Χρόνος (Μέρες) ^a	Αναφορά
FeS ₂ (84 gr/L) [Σιδηροπυρίτης]	Τυποποιημένο προϊόν	PCE (190 μM)	Ασετυλίνη (32%)	0.008	≈65	Lee & Batchelor (2002a)
		TCE (250 μM)	Ασετυλίνη (43%)	0.009		
		cis-DCE (410 μM)	Ασετυλίνη (13%)	0.005 ^b	≈60	
		VC (400 μM)	Αιθένιο (34%)	0.008		
FeS ₂	Έδαφος πεδίου (2 gr/L)	TCE (0.27 μM)	Ασετυλίνη (64%)	0.415	10	Weerasooriya & Dharmasena (2001)
FeS (20 gr/L) [Τροιλίτης]	Παρασκευή στο εργαστήριο - Άμεση χρήση	TCE (60 μM)	Ασετυλίνη (100%)	0.139	56	He et al. (2010)
FeS (10 gr/L)	Παρασκευή στο εργαστήριο	PCE (20 μM)	Ασετυλίνη (56%)	0.014	120	Butler & Hayes (1999)
		TCE (20 μM)	Ασετυλίνη (65%)	0.036		
FeS (10 gr/L)	Παρασκευή στο εργαστήριο	TCE (20 μM)	Ασετυλίνη (76%)	0.012	146	Butler & Hayes (2001)
FeS (10 gr/L)	Παρασκευή στο εργαστήριο	PCE (15 μM)	Ασετυλίνη (36%)	0.019	≈35	Jeong & Hayes (2007)
		TCE (16 μM)	Ασετυλίνη (76%)	0.051		
Fe ₃ O ₄ [Μαγνητίτης]	Αποστειρωμένο έδαφος πεδίου	cis-DCE (5.2-20.6 μM)		0.001-0.006	832	Ferrey et al. (2004)
		1,1-DCE (0.1-0.5 μM)		0.004-0.006		
Fe ₃ O ₄ (63 gr/L)	Παρασκευή στο εργαστήριο	PCE (190 μM)	Χαμηλή παραγωγή χλωρίου 2%-11%	0.001 ^b	≈100	Lee & Batchelor (2002a)
		TCE (250 μM)		0.001 ^b		
		cis-DCE (410 μM)		0.0003 ^b		
		VC (400 μM)		0.0005 ^b		

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Αναγωγικό μέσο	Προμήθεια μέσου	Αρχικός ρύπος	Κυρίαρχο προϊόν ^a	Ρυθμός αποχλωρίωσης (day ⁻¹) ^a	Χρόνος (Μέρες) ^a	Αναφορά
Fe ₃ O ₄ (63 gr/L) + Fe ²⁺ (42.6 mM)	Παρασκευή στο εργαστήριο	cis-DCE (410 μM)	Χλώριο (29%)	0.004	≈100	Lee & Batchelor (2002a)
		VC (400 μM)	Χλώριο (44%)	0.006		
FeOOH (4 gr/L) + Fe ²⁺ (4 mM)	Παρασκευή στο εργαστήριο	PCE	Αιθένιο (1%)	-	222	Liang et al. (2009)
GR _{Cl} (10 gr/L) [Φουγγερίτης]	Παρασκευή στο εργαστήριο	PCE (30 μM)	Ασετυλίνη (52%)	0.028 ^c	417	Liang et al. (2009)
		TCE (30 μM)	Ασετυλίνη (68%)	0.147	275	
GR _{SO4} (7 gr/L)	Παρασκευή στο εργαστήριο	PCE (190 μM)	Ασετυλίνη (5%)	0.005 ^{b,c}	60.4	Lee & Batchelor (2002b)
		TCE (250 μM)	Ασετυλίνη (9%)	0.007 ^{b,c}		
		cis-DCE (410 μM)	Αιθάνιο (9%)	0.005 ^b	64.4	
		VC (400 μM)	Αιθένιο (20%)	0.005		
GR _{SO4} (1.1 gr Fe ²⁺ /L)	Παρασκευή στο εργαστήριο	cis-DCE (5.8 μM)	Αιθένιο (41%)	0.042	46	Han et al. (2012)
		VC (5.8 μM)	Αιθένιο (55%)	0.192	46	
GR _{CO3} (13.9 gr/L) + Pt (1 mM)	Παρασκευή στο εργαστήριο	PCE (245 μM)	Ασετυλίνη (81%-95%)	2.23	1.0	Choi & Lee (2008)
GR _{Cl} (13.9 gr/L) + Pt (1 mM)				2.98	1.1	
GR _F (13.9 gr/L) + Pt (1 mM)				9.26	0.2	
GR _{SO4} (13.9 gr/L) + Pt (1 mM)				3.70	1.1	

^aΤα μεγέθη που παρουσιάζονται έχουν εξαχθεί και υπολογιστεί είτε άμεσα από τους ίδιους τους αρθρογράφους είτε έμμεσα από τα γραφήματα των άρθρων (με τη χρήση του προγράμματος GetData Graph Digitizer). ^bΟι ρυθμοί αποχλωρίωσης που έχουν υπολογιστεί στα συγκεκριμένα πειράματα έδειξαν χαμηλή παραγωγή προϊόντων (ασετυλίνης, αιθενίου, αιθανίου, χλωριωμένων αιθενίων). ^cΤο ισοζύγιο των χλωριωμένων αιθενίων ήταν εκτός ενός αποδεκτού εύρους τιμών (75%-125%). Πιο συγκεκριμένα, ήταν 132% και ≈70% στα πειράματα των Liang et al. (2009) και Lee & Batchelor (2002b) αντιστοίχως.

2.2.3.4. Περιορισμοί στη βιογεωχημική μετατροπή

Η δραστηριότητα των διαφόρων ορυκτών σιδήρου ποικίλλει, αλλά είναι συστηματική (Elsner, 2002) και εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των ορυκτών και του περιβάλλοντος (Parsons, 2008). Παραδείγματος χάριν, η απουσία σιδήρου και θειικών οδηγεί σε μικρότερες συγκεντρώσεις ενεργών περιοχών σε σχέση με την τέλεση της αποχλωρίωσης, υπό συνθήκες αναγωγής σιδήρου και θειικών (Dong et al., 2009). Άρα, τα χημικά χαρακτηριστικά του υπόγειου νερού επιδρούν στον τύπο του ορυκτού που σχηματίζεται, ενώ ο τύπος του διαμορφωμένου ενεργού ορυκτού μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό και την έκταση της αποχλωρίωσης (Brown et al., 2009).

Πιο συνοπτικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή ενεργού θειικού σιδήρου είναι οι εξής (Evans, 2014):

- Μορφή του ανηγμένου σιδήρου
- Μορφή των οξειδίων σιδήρου
- Παρουσία οργανικού άνθρακα
- Γεωχημικές συνθήκες (Eh/pH)
- Ιοντική ισχύς
- Συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου
- Μικροβιακή κοινότητα
- Ρυθμός εισροής θειικών ιόντων και
- Υδραυλικός χρόνος παραμονής.

Αρκετοί παράγοντες, επίσης, υποστηρίζουν τη βιογεωχημική μετατροπή του TCE, όπως (1) η υψηλή κατανάλωση θειικών ιόντων, (2) ο μεγάλος υδραυλικός χρόνος παραμονής (19 ημέρες), (3) η οργανική ουσία που χρησιμοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων και (4) η παρουσία είτε αιματίτη ή μαγνητίτη (Evans et al., 2014).

Οι Lee & Batchelor (2003) χρησιμοποιώντας τον όρο «αναγωγική ικανότητα», για να ορίσουν την έκταση της αναγωγής που μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα σύστημα, ταξινόμησαν διάφορα ορυκτά. Ο φουγγερίτης ($[\text{Fe}_4\text{Fe}_2(\text{OH})_{12}] [\text{CO}_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - “green rust”) θεωρήθηκε το καλύτερο αναγωγικό μέσο, ενώ με φθίνουσα σειρά ακολούθησαν ο μαγνητίτης, ο σιδηροπυρίτης (FeS_2), ο βιοτίτης ($\text{K}(\text{Mg},\text{Fe})_3 (\text{AlSi}_3\text{O}_{10}) (\text{F},\text{OH})_2$), ο μοντμοριλλονίτης ($(\text{Na},\text{Ca})_{0.33} (\text{Al},\text{Mg})_2 (\text{Si}_4\text{O}_{10}) (\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) και ο βερμικουλίτης ($(\text{Mg},\text{Fe}^{2+},\text{Fe}^{3+})_3 [(\text{Al},\text{Si})_4\text{O}_{10}] (\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), υποδεικνύοντας ότι η ποσότητα δισθενούς σιδήρου επηρεάζει σημαντικά την αποχλωρίωση. Επιπλέον, με την αύξηση της μάζας του φουγγερίτη αυξάνεται η απόδοση της αποχλωρίωσης, αφού με 0.37 gr/L φουγγερίτη το 11% του PCE καταναλώθηκε στις 65 ημέρες, ενώ με 9 gr/L η μείωση έφτασε το 22%.

Έτσι προκύπτει ότι η ποσότητα του δισθενούς σιδήρου είναι μια κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει τον ρυθμό και την απόδοση της αποχλωρίωσης (Maithreepala & Doong, 2005). Πιο συγκεκριμένα, η αναγωγική ικανότητα των ορυκτών αυξάνει

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

γραμμικά με την περιεκτικότητά τους σε δισθενή σίδηρο, σύμφωνα με τη σχέση (Lee & Batchelor, 2003):

$$RC_{PCE} \text{ (meq/gr)} = 0.01 * [Fe^{2+}] \text{ (meq/gr)} \quad \text{Εξίσωση (2.3)}$$

Όμως, όπως δείχνει και η εξίσωση 2.3, μόνο το 1% του δισθενούς σιδήρου χρησιμοποιείται για να ανάγει το PCE. Επίσης, φάνηκε ότι το TCE και το PCE ανάγονται καλύτερα μέσω της αβιοτικής διεργασίας από ότι τα λιγότερα χλωριωμένα παράγωγά τους, cis-DCE και VC.

Πέραν της εγγενούς ποικιλότητας της δραστηριότητας των ορυκτών, η δραστηριότητα ενός ορυκτού μπορεί να μειωθεί με το χρόνο, καθώς ο σίδηρος οξειδώνεται ή, πιο συγκεκριμένα, ο θειούχος σίδηρος μετατρέπεται σε διθειούχο σίδηρο (Parsons, 2008). Αναλυτικότερα, η γήρανση του FeS μπορεί να προκαλέσει τη μείωση της δραστηριότητάς του, καθώς ο FeS μετατρέπεται σε γκρεγκίτη (Fe_3S_4) και σιδηροπυρίτη (FeS_2) με την πάροδο του χρόνου.

Επομένως, ο βαθμός οξείδωσης των ορυκτών επηρεάζει την ικανότητα της φυσικής αποκατάστασης (Butler & Hayes, 2001; He et al., 2010). Όμως, η προσθήκη διαφορετικών ορυκτών με συγκρίσιμη ενεργή επιφάνεια δεν προκαλεί το ίδιο αποτέλεσμα αποχλωρίωσης και άρα το μέγεθος της ενεργής επιφάνειας δεν θεωρείται το περιοριστικό στάδιο της διεργασίας (Lee & Batchelor, 2002a).

Επιπρόσθετα, τα ορυκτά που παράγονται με βιογενείς διεργασίες είναι πιο ενεργά από τα ορυκτά που υπάρχουν φυσικά στο περιβάλλον, πιθανόν λόγω της αυξημένης επιφάνειάς τους (Brown et al., 2009). Η προσθήκη μετάλλων μπορεί να αυξήσει τη δραστηριότητα του σιδήρου πριν ή/και μετά την εγκατάσταση διαπερατών φραγμάτων (Butler & Hayes, 2001). Για παράδειγμα, η χημειοπροσρόφηση του διαλυτού δισθενούς σιδήρου στην επιφάνεια του ορυκτού μπορεί να διευκολύνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων, αλλά και να δημιουργήσει ένα αντιδρών σύμπλεγμα πιο ισχυρό επάνω στην επιφάνεια, υποβοηθώντας τη διαδικασία (Parsons, 2008).

2.2.4. Συνέργεια αβιοτικής και βιολογικής αποχλωρίωσης

Ένας ακόμη τρόπος συνδυασμού των βιολογικών και αβιοτικών διεργασιών είναι μέσω συνεργιστικών αντιδράσεων, στις οποίες οι βιολογικές αντιδράσεις βελτιώνουν την απόδοση της αβιοτικής απομάκρυνσης των ρύπων (Brown et al., 2009; Darlington et al., 2008). Από την άλλη πλευρά, οι αβιοτικές διεργασίες συμβάλλουν θετικά στην αποχλωρίωση όταν μεγάλες ποσότητες ενεργών ορυκτών αξιοποιούνται επί τόπου στην απορρύπανση ή όταν η δραστηριότητα των μικροοργανισμών είναι χαμηλή. Συνεπώς, ο συνδυασμός βιολογικών-αβιοτικών διαδικασιών μπορεί να υποβοηθήσει την επίτευξη της πλήρους αποχλωρίωσης, όπου δεν επιτυγχάνεται, εφόσον έχει παρατηρηθεί αβιοτική μετατροπή των cis-DCE και VC σε αιθέριο,

αιθάνιο ή/και ασετυλίνη, με αποτέλεσμα ο συνδυασμός αυτός να προωθείται για την εφαρμογή του σε ρυπασμένες περιοχές.

Συγκρίνοντας τις δύο διεργασίες φαίνεται ότι η κυρίαρχη διαδικασία στο πεδίο θα εξαρτηθεί από παράγοντες όπως η αφθονία των αποχλωριωτών, τα χαρακτηριστικά του εδάφους και η μάζα των ενεργών ορυκτών (Dong et al., 2009). Απόρροια των πολλών παραμέτρων που επηρεάζουν την κυρίαρχη διαδικασία είναι η ασυμφωνία (διχογνωμία) που εμφανίζεται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Οι Ferrey et al. (2004) μελέτησαν έναν υπόγειο υδροφορέα πλούσιο σε μαγνητίτη ρυπασμένο με cis-DCE και 1,1-DCE, όπου φάνηκε ότι το αποστειρωμένο έδαφος είχε τον ίδιο ρυθμό αποχλωρίωσης συγκριτικά με το έδαφος που περιείχε μικροοργανισμούς, υποδεικνύοντας ότι η αποχλωριωτική δραστηριότητα ήταν αβιοτική. Αναλυτικότερα, σε τρία διαφορετικά βάθη ο ρυθμός μείωσης του cis-DCE ήταν 0.42/year, 0.56/year και 2.31/year, ενώ για το αποστειρωμένο έδαφος ήταν 0.31/year, 0.58/year και 2.29/year. Μια μικρή διαφορά παρατηρήθηκε στο πείραμα με το 1,1-DCE ως ρύπο, όπου ο ρυθμός ήταν 2.29/year και 1.37/year, στο κανονικό και το αποστειρωμένο έδαφος, αντιστοίχως.

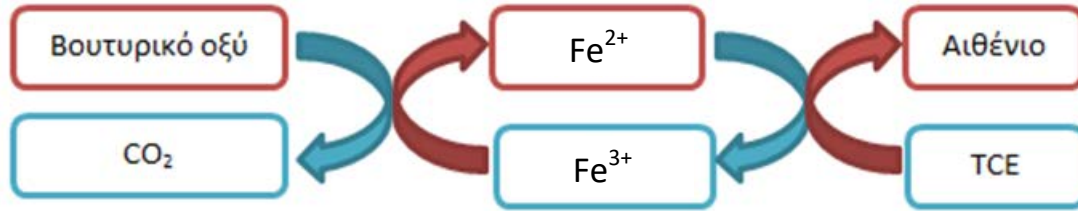
Αντιθέτως, οι Dong et al. (2009) παρατήρησαν ότι σε κάποια πειράματα με έντονη μικροβιακή δραστηριότητα το κυρίαρχο μονοπάτι μετατροπής του TCE και PCE ήταν η βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση, καταδεικνύοντας ότι οι βιολογικές διεργασίες μπορούν να υπερτερήσουν έναντι των αβιοτικών. Ενδιαφέρον αποτελεί το εύρημα ότι ο ρυθμός της αβιοτικής μετατροπής είχε την ίδια τάξη μεγέθους με τον ρυθμό της βιολογικής αποχλωρίωσης, σε λίγα μόνο πειράματα, όπου η δραστηριότητα των μικροοργανισμών ήταν αργή. Σε εφαρμογή στο πεδίο βρέθηκε ότι η παρουσία πυριτίτη επηρέασε την αποδόμηση των χλωριωμένων αιθενίων, και πιο συγκεκριμένα, ενώ το PCE και το TCE μετατράπηκαν σε cDCE μέσω βιολογικών διεργασιών, περαιτέρω αναγωγή του cDCE πραγματοποιήθηκε με το αβιοτικό μονοπάτι (Badin et al., 2016).

Γενικά, θεωρείται ότι σε μια ρυπασμένη περιοχή παρουσία ορυκτών σιδήρου και μεταβλητών συνθηκών δυναμικού οξειδοαναγωγής πολλές διεργασίες θα μπορούσαν να λάβουν μέρος πιθανά στην αποκατάσταση της περιοχής, όπως η βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση, η αβιοτική μετατροπή και η βιολογική οξειδωση των λιγότερο χλωριωμένων αιθενίων υπό αερόβιες ή ανοξικές συνθήκες (Hunkeler et al., 2011; Vogel et al., 2018).

Επιπλέον, ο σίδηρος μπορεί να λειτουργήσει και ως μεταφορέας ηλεκτρονίων από μία οργανική ουσία, που δρα ως δότης, σε έναν αποδέκτη, π.χ. το TCE, το οποίο ανάγεται σε αιθάνιο (Ebrahiminezhad et al., 2017), όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 2.6. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα ορυκτά σιδήρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αγωγοί ηλεκτρονίων για τη διευκόλυνση της επίτευξης των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Η μεταφορά ηλεκτρονίων μπορεί να πραγματοποιείται άμεσα μεταξύ των ειδών (Direct Interspecies Electron Transfer-

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

DIET) και κυρίως με τη συμμετοχή σιδηροαναγωγικών μικροοργανισμών, όπως του γένους *Geobacter* spp. (Lovley, 2017).



Σχήμα 2.6 Διεργασίες με τη χρήση του σιδήρου ως μεταφορέα ηλεκτρονίων (Μπλε βέλη: Οξειδωση; Κόκκινα βέλη: Αναγωγή).

Πρόσφατα πειράματα έδειξαν ότι η προσθήκη μαγνητίτη σε καλλιέργεια με διχλωροαιθάνιο και οξικό οξύ είχε θετική επίδραση στον ρυθμό της αποχλωρίωσης. Πιο συγκεκριμένα, η αποχλωρίωση ήταν κατά 3.3 φορές γρηγορότερη από στα μπουκάλια χωρίς το συγκεκριμένο ορυκτό. Όμως, τα νανοσωματίδια του μαγνητίτη δεν ανιχνεύτηκαν στο κυτταρικό τοίχωμα των μικροοργανισμών, συνεπώς η οξειδοαναγωγή πραγματοποιήθηκε μέσω εξωκυτταρικής μεταφοράς ηλεκτρονίων (Leitão et al., 2018).

Σε έρευνα πεδίου φάνηκε ότι η εφαρμογή ενεργού άνθρακα με νανοσωματίδια ZVI προκάλεσε τη δράση και των δύο μονοπατιών, αβιοτικής και βιολογικής, αποχλωρίωσης του TCE, ενώ υποστήριξε την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αποχλωρίωσης είτε μέσω της απελευθέρωσης υδρογόνου από το ZVI ή μέσω των μηχανισμών ρόφησης από τον ενεργό άνθρακα (Vogel et al., 2018). Όμως, παλαιότερες έρευνες έχουν δείξει ότι ο νανοσίδηρος μηδενικού σθένους μπορεί να προκαλέσει την αναχαίτιση των αποχλωριωτών και να διοχετεύσει με ηλεκτρόνια την παραγωγή μεθανίου (Xie et al., 2017).

Οι Brown et al. (2009), επίσης, παρατήρησαν ότι η προσθήκη σιδήρου μηδενικού σθένους (ZVI) ή οργανικής ουσίας ως δότη ηλεκτρονίων συχνά προκαλεί την περιορισμένη και ατελή μείωση του 1,2-DCA. Αντίθετα, η ταυτόχρονη προσθήκη και των δύο υλικών πρόσφερε πλήρη κατανάλωση του ρύπου, άρα συνάγεται ότι η συνέργεια της αβιοτικής και της βιολογικής αποχλωρίωσης μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα από ότι η κάθε διεργασία μόνη της. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν οι Wang & Tseng (2009a) σε πειράματα συνεχούς τροφοδοσίας υδρογόνου, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η απομάκρυνση του TCE στους αντιδραστήρες με βιομάζα από χωνεμένη ιλύ και ZVI ήταν κατά 2.6 και 5.2 φορές γρηγορότερη από ότι στους αντιδραστήρες μόνο με ZVI ή με χωνεμένη ιλύ, αντιστοίχως. Ίδια τάση παρατήρησαν σε πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας εφόσον,

η συνεργιστική δράση των δύο διεργασιών είχε υψηλότερο ρυθμό κατανάλωσης του TCE από ότι η καθεμία μέθοδος ξεχωριστά (Wang & Tseng, 2009b).

Ενδιαφέρον αποτελεί και η έρευνα των Lampron et al. (2001), οι οποίοι εξέτασαν εάν μπορεί το παραγόμενο υδρογόνο κατά την αναερόβια οξειδωση του σιδήρου να υποστηρίξει τη βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση του TCE. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι αναπτύχθηκε μια αναερόβια καλλιέργεια μικροοργανισμών που μπορούσε να επιτύχει την πλήρη αναγωγή του TCE σε αιθέριο, με κυρίαρχο προϊόν το VC.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Rosenthal et al. (2004), κατά την έρευνα των οποίων η πλήρη αναγωγή του PCE σε αιθέριο πραγματοποιήθηκε μέσα σε 30 ημέρες λειτουργίας των πειραμάτων. Το παραπάνω εύρημα αποτελεί ένα πρόβλημα της αβιοτικής απορρύπανσης, εφόσον έπεται η διαδοχική υδρογονόλυση και άρα η παραγωγή του VC (Lampron et al., 2001), ενώ ταυτόχρονα πρόκειται να μειωθεί η διαπερατότητα των φραγμάτων εξαιτίας της ανάπτυξης βιομάζας σε αποδεκτό εύρος pH (Lampron et al., 2001; Rosenthal et al., 2004). Από την άλλη, το παραγόμενο υδρογόνο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί κατόπιν του φράγματος από τους μικροοργανισμούς για την πλήρη αναγωγή των εναπομενόντων ρύπων (Lampron et al., 2001). Επίσης, μπορεί να μειωθεί η αρχική απαίτηση σε σίδηρο στο φράγμα, άρα να μειωθεί και το κόστος κατασκευής (Rosenthal et al., 2004).

Οι Evans et al. (2014) προσπάθησαν να μελετήσουν τους παράγοντες που επηρεάζουν τη βιογεωχημική μετατροπή για τη βελτιστοποίηση του σχεδιασμού και της λειτουργίας διαπερατών φραγμάτων. Οι παράγοντες που μελέτησαν ήταν το είδος του οξειδίου τρισθενούς σιδήρου, το pH, ο τύπος και η συγκέντρωση των θειικών ιόντων, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής και ο τύπος του δότη ηλεκτρονίων. Τα πειράματά τους έδειξαν τέσσερα διαφορετικά μοτίβα: 1) μη-κατανάλωση του TCE, 2) βιολογική αποχλωρίωση με το σχηματισμό του cis-DCE, 3) βιογεωχημική μετατροπή και 4) συνέργεια αβιοτικών και βιολογικών διεργασιών.

Από τα αποτελέσματά τους φαίνεται ότι τα περισσότερα πειράματα παρουσίασαν το τελευταίο μοτίβο, δείχνοντας μια κατανάλωση του TCE χωρίς όμως την ανάλογη παραγωγή χλωριωμένων προϊόντων. Ιδιαίτερα, οι παράγοντες που προώθησαν και την αβιοτική και τη βιολογική διεργασία ήταν η προσθήκη οργανικής ουσίας ως δότη ηλεκτρονίων, ο υψηλός χρόνος παραμονής και η παρουσία αιματίτη. Αρνητική επίπτωση στη βιολογική αποχλωρίωση είχε η υψηλή συγκέντρωση θειικών ιόντων στο υπόγειο νερό, το οποίο θα εξετασθεί σε επόμενη Ενότητα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Επίσης, οι αλκαλικές συνθήκες δεν φαίνεται να ευνοούν την ανάπτυξη των αποχλωριωτών (Dong et al., 2009) ενώ, ταυτόχρονα, η αύξηση του pH μπορεί να προκαλέσει την αύξηση του ρυθμού της αβιοτικής αποχλωρίωσης του TCE (He et al., 2010; Jeong et al., 2013).

Παράλληλα, τα ορυκτά σιδήρου μπορούν να δημιουργήσουν ανταγωνιστικές συνθήκες στους μικροοργανισμούς αναγωγικής αποχλωρίωσης ανάλογα με τη ποσότητα του βιοδιαθέσιμου τρισθενούς σιδήρου που περιέχουν (Paul et al., 2013).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Όπως έχει αναφερθεί και στην ενότητα 2.2.1, τα προϊόντα μπορούν να καταδείξουν τον τύπο της αποχλωρίωσης που επιτελείται, εφόσον η αβιοτική αποχλωρίωση δεν παράγει κυρίως λιγότερο χλωριωμένα αιθέρια, αλλά ακολουθεί το μονοπάτι της β-απόσπασης, με αποτέλεσμα οι δύο διεργασίες να μπορούν να διαχωριστούν και να προσδιοριστούν σύμφωνα με την ποσότητα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων μετά την εφαρμογή. Για τη διάγνωση και την ποσοτικοποίηση της διαδικασίας που επιτελείται, λοιπόν, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο παρακάτω τύπος (Whiting et al., 2014; Evans et al., 2014; Evans, 2014):

$$f_{\text{αβιοτικό}} = \frac{\sum \text{VOCs}_{\text{ανάντη}} - \sum \text{VOCs}_{\text{κατάντη}}}{\sum \text{VOCs}_{\text{ανάντη}}} \quad \text{Εξίσωση (2.4)}$$

Όπου, $f_{\text{αβιοτικό}}$: Ποσοστό ρύπων που μειώνεται αβιοτικά (1=αβιοτική αποχλωρίωση, 0=βιολογική), $\sum \text{VOCs}_{\text{ανάντη}}$: Σύνολο χλωριωμένων αιθέρια και αιθενίου πριν την εφαρμογή, $\sum \text{VOCs}_{\text{κατάντη}}$: Σύνολο χλωριωμένων αιθέρια και αιθενίου μετά την εφαρμογή.

2.2.5. Ρόφηση στα ορυκτά

Συχνά, η κατανάλωση ενός ρύπου και η μη ανίχνευση προϊόντων υποδηλώνει την αβιοτική αποχλωρίωση ή/και τη βιογεωχημική μετατροπή (Brown et al., 2009). Όμως, άλλες διεργασίες μπορούν, επίσης, να προκαλέσουν τη μείωση του ρύπου δίχως τη συσσώρευση θυγατρικών προϊόντων (AFCEE, 2008). Η ρόφηση του ρύπου στο ορυκτό μπορεί να υποβοηθήσει τη μεταφορά ηλεκτρονίων, και κατ'επέκταση τον ρυθμό της αναγωγικής αποχλωρίωσης. Η υψηλή υδροφοβικότητα του τριχλωροαιθενίου βελτιώνει τη ρόφησή του στα ορυκτά. Ο θειούχος σίδηρος είναι πιο αποτελεσματικός στην αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθέρια από ότι άλλα αναγωγικά μέσα, εξαιτίας του υδροφοβικού χαρακτήρα των σουλφιδίων μετάλλων (He et al., 2010). Βέβαια, η ρόφηση για να είναι αποτελεσματική θα πρέπει να πραγματοποιηθεί χωρίς να προκύψει και η εκρόφηση του προϊόντος.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η έρευνα των Ferrey et al. (2004), κατά την παρατήρηση των οποίων το 5% της αρχικής συγκέντρωσης του cis-DCE που απομακρύνθηκε από την υγρή φάση των μικρόκοσμων ροφήθηκε στην οργανική ύλη των ορυκτών εξαιτίας του υδροφοβικού χαρακτήρα των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Το μικρό ποσοστό απομάκρυνσης λόγω ρόφησης οφείλεται στη χαμηλή οργανική περιεκτικότητα του συγκεκριμένου εδάφους.

2.3. Αναερόβια βιολογική αποχλωρίωση

2.3.1. Εισαγωγή

Στις αρχές της δεκαετίας του '80 παρατηρήθηκε για πρώτη φορά η απομάκρυνση των χλωριωμένων υδρογονανθράκων από το υπόγειο νερό μέσω αναγωγικών διαδικασιών υπό αναερόβιες συνθήκες. Τότε θεωρήθηκε ότι οι περισσότερες αντιδράσεις ήταν βιολογικές, αν και η αβιοτική αποχλωρίωση είχε τη δυνατότητα να επιτευχθεί σε περίπτωση ύπαρξης κατάλληλων οξειδοαναγωγικών συνθηκών (McCarty, 1993). Το εύρημα αυτό προκάλεσε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, η οποία στράφηκε στη βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση, καθότι θεωρήθηκε ότι είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τη μείωση των επικίνδυνων χλωριωμένων αιθενίων στο περιβάλλον. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή της βιοτικής αναγωγικής αποχλωρίωσης στην περίπτωση ρύπανσης από οργανικές ενώσεις με πολλά άτομα χλωρίου, γιατί εμφανίζουν επιμονή υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ είναι δυνατή η υπό όρους πλήρους απομάκρυνσής τους μέσω της βιοτικής αναερόβιας αποχλωρίωσης (Middelдорp et al., 1999).

Στη συνέχεια της παραγράφου αυτής παρουσιάζονται ο μηχανισμός της βιολογικής αποχλωρίωσης και οι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της διεργασίας, όπως η σύνθεση της βιοκοινότητας, το είδος δότη ηλεκτρονίων και ο ανταγωνισμός με άλλες αναγωγικές διεργασίες για το δότη ηλεκτρονίων.

2.3.2. Μονοπάτι βιολογικής αποχλωρίωσης

Το μονοπάτι της αποχλωρίωσης έχει μελετηθεί εκτενώς σε εργαστηριακές έρευνες τις προηγούμενες δεκαετίες. Επομένως, είναι πλέον γνωστό ότι η βιολογική αναγωγή του PCE προχωρά σε μια σταδιακή αποχλωρίωση υπό αυστηρά αναερόβιες συνθήκες, παράγοντας αιθένιο ως τελικό προϊόν (Freedman & Gossett, 1989; Maymó-Gatell et al., 1995). Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται εξαιτίας της ισχυρής ηλεκτραρνητικότητας των ατόμων χλωρίου δίνοντας, έτσι, έναν οξειδωτικό χαρακτήρα στις χλωριωμένες ενώσεις, με αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί να τις χρησιμοποιούν ως αποδέκτες ηλεκτρονίων για την αναπνοή τους (Majone et al., 2015). Η κάθε αντίδραση που επιτελείται ονομάζεται υδρογονόλυση, η οποία επιτυγχάνει την αντικατάσταση ενός ατόμου χλωρίου με ένα άτομο υδρογόνου σε κάθε στάδιο του μονοπατιού, προσθέτοντας δύο ηλεκτρόνια τη φορά, ως εξής (Mohn & Tiedje, 1992; Bouwer & Zehnder, 1993; Majone et al., 2015):



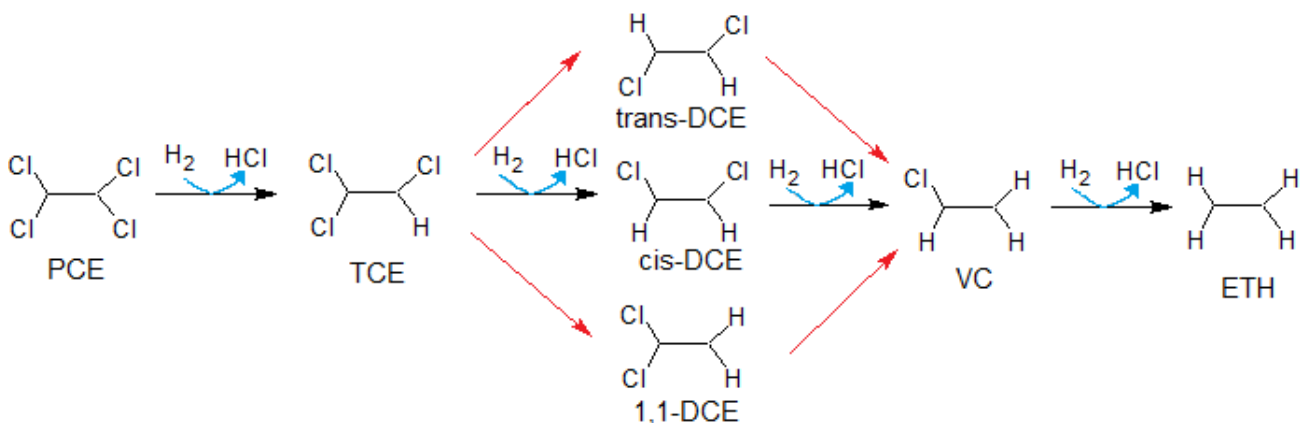
Άρα, η αποχλωρίωση του PCE πραγματοποιείται βαθμιαία με την παραγωγή άλλων λιγότερο χλωριωμένων αιθενίων, δηλαδή το TCE, τα DCEs (cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE), το VC και το αιθένιο (de Bruin et al., 1992; Freedman & Gossett, 1989; Maymó-Gatell et al., 1995; Majone et al., 2015). Ωστόσο, η συχνότητα παραγωγής

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

των τριών πιθανών διχλωριωμένων ισομερών (DCEs), που απαντώνται από την αποχλωρίωση του TCE, είναι η εξής, 1,1-DCE < trans-DCE < cis-DCE, ξεκινώντας από το πιο σπάνιο (Freedman & Gossett, 1989). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι το χλώριο που απομακρύνεται από τον ρύπο απελευθερώνεται ως υδροχλώριο στην υδάτινη φάση (Mohn & Tiedje, 1992). Οι de Bruin et al. (1992) παρατήρησαν ότι το αιθέριο μπορεί να αναχθεί περαιτέρω μέσω της αντίδρασης της υδρογόνωσης και το αιθάνιο ως τελικό προϊόν της αποχλωρίωσης.

Επιπλέον, η ταχύτητα της αντίδρασης ποικίλλει ανάλογα με τη μάζα του ρύπου και τα στελέχη των μικροοργανισμών που την επιτυγχάνουν. Στα πειράματα των Ise et al. (2011), όταν προστέθηκαν διαφορετικές μάζες cDCE σε καλλιέργεια, η χρονική περίοδος ολοκλήρωσης της αποχλωρίωσης εξαρτιόταν από την αρχική συγκέντρωση. Όσο μεγαλύτερη η ποσότητα του ρύπου τόσο περισσότερος χρόνος απαιτούνταν για την πλήρη αποχλωρίωση.

Με βάση τα όσα περιγράφηκαν παραπάνω, η σχηματική αναπαράσταση της βιολογικής αποχλωρίωσης φαίνεται στο Σχήμα 2.7.



Σχήμα 2.7 Το μονοπάτι της βιολογικής αναγωγικής αποχλωρίωσης (υδρογονόλυση) με την κύρια πορεία να ακολουθεί τα μαύρα βέλη (Löffler & Edwards, 2006).

2.3.3. Παράγοντες που επιδρούν στην αναγωγική αποχλωρίωση

Η αποτελεσματικότητα της αποχλωρίωσης ποικίλλει υπό διαφορετικές συνθήκες οξειδοαναγωγής, αλλά και τον αριθμό των ατόμων χλωρίου στην ένωση (Chapelle & Bradley, 2003; Bradley, 2003). Επομένως για την πραγματοποίηση αυτής της διαδικασίας, καθώς και την πλήρη αναγωγή των χλωριωμένων αιθινίων στο επιθυμητό αιθέριο, απαιτούνται συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Pant & Pant, 2010), όπως είναι η διαθεσιμότητα του δότη ηλεκτρονίων και των θρεπτικών συστατικών, η παρουσία συγκεκριμένων μικροοργανισμών και το κατάλληλο οξειδοαναγωγικό καθεστώς (Ni et al., 2014; Morrison & Murphy, 2013). Πιο

συγκεκριμένα, βασική απαίτηση είναι η παρουσία κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων (αναγωγικού μέσου) σε επαρκείς ποσότητες (Mohn & Tiedje, 1992; McCarty, 1993). Η ζύμωση των οργανικών ουσιών οδηγεί στην παραγωγή διαλυτού υδρογόνου το οποίο λειτουργεί ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων. Ο δότης μπορεί να υπάρχει είτε φυσικά στο έδαφος (USEPA, 2000) είτε να γίνεται η προσθήκη του μέσω γεωτρήσεων για άμεση εισπίεση ενεργών διαπερατών φραγμάτων, συστημάτων επανακυκλοφορίας υπόγειου νερού ή διηθητικής τάφρου (Parsons, 2004).

Μία ποικιλία δοτών έχει χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές στο πεδίο, συμπεριλαμβανομένων των δυσκολο-διασπάσιμων δοτών (Slow-release donor), όπως φυτικά έλαια (Emulsified Soybean Oil-ESO), πολυγαλακτικοί εστέρες (polylactate esters), χιτίνη (chitin) κ.ά., και των διαλυτών δοτών, όπως αλκοόλες, πτηνικά λιπαρά οξέα, σάκχαρα κ.ά. (Scheutz et al., 2011). Πολύ σημαντική παράμετρος είναι και η ύπαρξη της κατάλληλης βιοκοινότητας (McCarty, 1993), εφόσον πολλά βακτήρια έχουν βρεθεί να ανάγουν το PCE και το TCE σε DCEs (Haest et al., 2010; Kadlec et al., 2012), αλλά μόνο το γένος *Dehalococcoides* έχει την ικανότητα να πραγματοποιεί την πλήρη αποχλωρίωση σε αιθένιο (Scheutz et al., 2011). Αναλυτικότερα, διάφορα στελέχη μικροοργανισμών, τα οποία ανήκουν στα γένη *Desulfitobacterium*, *Sulfurospirillum*, *Desulfuromonas*, *Geobacter*, *Shewanella*, *Dehalobium*, *Dehalococcoides*, *Dehalobacter* spp., έχει βρεθεί ότι μπορούν να μεταβολίσουν τα χλωριωμένα αιθένια (Adrian & Löffler, 2016; Cheng & He, 2009).

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, διάφορες έρευνες αναφέρουν ότι τα *Dehalococcoides* spp. μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της αποχλωρίωσης (Lien et al., 2016). Παραδείγματος χάριν, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative Polymerase Chain Reaction; qPCR) και η αντίστροφη μεταγραφάση σε πραγματικό χρόνο (Real-Time Reverse Transcription; PCR) θεωρούνται σημαντικά διαγνωστικά εργαλεία για την παρακολούθηση των επιτόπιων μεθόδων βιοαποκατάστασης και ένα απαραίτητο βήμα για την ταυτοποίηση και την εκτίμηση της γονιδιακής έκφρασης των μικροοργανισμών αποχλωρίωσης (Majone et al., 2015; Lien et al., 2016).

Άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αποχλωρίωση είναι η ύπαρξη και η ποσότητα άλλων αποδεκτών ηλεκτρονίων, αφού θα υπάρξει ανταγωνισμός για το αναγωγικό μέσο (Pant & Pant, 2010). Τέτοιοι αποδέκτες μπορεί να είναι το οξυγόνο, τα νιτρικά ιόντα, το τετρασθενές μαγγάνιο, ο τρισθενής σίδηρος, τα θειικά ιόντα και το διοξείδιο του άνθρακα, σε αύξουσα σειρά προτίμησης από τους μικροοργανισμούς (Pant & Pant, 2010; Brown et al., 2005), όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.8.

Επομένως, το καθεστώς οξειδοαναγωγής επιδρά σημαντικά στην παρουσία και δραστηριότητα των μικροοργανισμών αποχλωρίωσης (Ni et al., 2014). Πολλές χλωριωμένες ενώσεις έχει αποδειχθεί ότι αποδομούνται υπό μεθανογόνες συνθήκες (Bhatt et al., 2007), ιδίως γιατί, όσο τα προϊόντα της αποχλωρίωσης γίνονται λιγότερο χλωριωμένα, το αυξημένο δυναμικό οξειδοαναγωγής μπορεί να αναχαιτίσει τη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

διεργασία. Πιο συγκεκριμένα, το PCE είναι ένα από τα πιο ισχυρά οξειδωτικά μέσα που απαντώνται φυσικά στα υπόγεια ύδατα και υπολείπεται μόνο του οξυγόνου (Bradley, 2003). Ως εκ τούτου, το PCE μπορεί να αναχθεί σε TCE υπό ανοξικές συνθήκες και σε πιο αναγωγικά περιβάλλοντα. Όμως, η αποτελεσματική αναγωγική αποχλωρίωση του TCE πραγματοποιείται υπό σιδηροαναγωγικές συνθήκες, ενώ η αποτελεσματική αναγωγή του cDCE και VC υπό θειικοαναγωγικές και μεθανογόνες συνθήκες, αντίστοιχα (Abe et al., 2009a; Bradley, 2003; Chapelle & Bradley, 2003).

Πίνακας 2.8 Σειρά προτεραιότητας για την πραγμάτωση αναγωγικών διεργασιών (Πηγή: Bradley et al., 2008; Παναγιωτάκης, 2010; Aulenta et al., 2006a; Weissflog, 2005).

Συνθήκες	Αποδέκτης e^-	Διεργασία	Τελικό προϊόν	Οξειδοαναγωγικό δυναμικό (mV)	Οξειδοαναγωγικό καθεστώς
Ισχυρά οξειδωτικές	O_2	Οξείδωση	H_2O	+350 ↔ +500	Αερόβιο (αυστηρώς οξειδωτικό)
	NO_3^-	Απονιτροποίηση	N_2	+100 ↔ +350	Αναερόβιο (μερικώς οξειδωτικό ή αναγωγικό)
	Mn^{4+}	Αναγωγή Mn^{4+}	Mn^{2+}	+200 ↔ +400	
	Fe^{3+}	Σιδηροαναγωγή	Fe^{2+}	+150 ↔ +300	
	SO_4^{2-}	Θειικοαναγωγή	H_2S	-150 ↔ 0	Αναερόβιο (αυστηρώς αναγωγικό)
Ισχυρά αναγωγικές	CO_2	Μεθανογένεση	CH_4	<-150	

Η διαθέσιμη γνώση σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν την αναγωγική αποχλωρίωση είναι ανεπαρκής, εφόσον αδυνατεί να προβλέψει την πιθανή αποτυχία μιας επιτόπιας βιολογικής εφαρμογής (Majone et al., 2015). Το πρωτόκολλο RABITT (Alleman et al., 2002) προβαίνει σε μια προκαταρκτική αξιολόγηση της περιοχής για την επιτυχία της βιολογικής αποχλωρίωσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιεί ένα σύστημα βαθμολόγησης που περιλαμβάνει την περιγραφή της περιοχής και της ρύπανσης με γεωχημικά και υδρογεωλογικά δεδομένα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.9.

Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, μια υψηλή βαθμολογία των παραμέτρων, όπως φαίνεται στον Πίνακα, μπορεί να αποτιμήσει θετικά την αναγωγική αποχλωρίωση, ενώ μια χαμηλή βαθμολογία παραπέμπει στην επιλογή διαφορετικής μεθόδου (Morse et al., 1998). Τα δεδομένα της περιοχής μαζί με καινοτόμα εργαλεία, όπως οι αναλύσεις μοριακής βιολογίας (Molecular Biological Tools; MBT) και σταθερών ισοτόπων (Stable Isotope Analysis; SIA) μπορούν να προβλέψουν την επιτυχή αποκατάσταση του ρυπασμένου χώρου (Adrian & Löffler, 2016). Σημαντικά θεωρούνται και τα πειράματα μικρόκοσμων, εφόσον μπορούν να επιβεβαιώσουν την παρουσία της κατάλληλης βιοκοινότητας, τον προσδιορισμό του τύπου και της βέλτιστης ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων, αλλά και την αξιολόγηση των ανταγωνιστικών διεργασιών και των επιπτώσεών τους (Alleman et al., 2002).

Πίνακας 2.9 Σύστημα κατάταξης περιοχών για την επιτυχία της αναγωγικής αποχλωρίωσης σύμφωνα με τις παραμέτρους που επηρεάζουν την διαδικασία (Πηγή: Morse et al., 1998).

Παράμετρος	Χαμηλότερη βαθμολογία	Υψηλότερη βαθμολογία
Περιγραφή ρύπανσης	Απουσία θυγατρικών προϊόντων, DO<0.5 mg/L, NO ₃ ⁻ <1 mg/L	Ανίχνευση αιθενίου ή πτώση της μάζας του VC
Υδραυλική αγωγιμότητα	K≤10 ⁻⁵ cm/sec	K≥10 ⁻³ cm/sec
Γεωχημικά χαρακτηριστικά		
Διαλυτό οξυγόνο	DO>3 mg/L	DO<0.5 mg/L
Νιτρικά	NO ₃ ⁻ >5 mg/L	NO ₃ ⁻ <1 mg/L
Σουλφίδια	H ₂ S≤0.1 mg/L	H ₂ S>0.1 mg/L
Θειικά ιόντα	SO ₄ ²⁻ >20 mg/L	SO ₄ ²⁻ <20 mg/L
Δυναμικό οξειδοαναγωγής	ORP>200 mV	ORP<-200 mV
Θερμοκρασία	T<10°C	T>15°C
Διαλυτός οργανικός άνθρακας	DOC<10 mg/L	DOC>20 mg/L
Διττανθρακική αλκαλικότητα	Alk<1 gr/L	Alk>5 gr/L
pH	pH<5 ή pH>9	6.5<pH<7.5
Μεθάνιο	CH ₄ ≤0.1 mg/L	CH ₄ >0.1 mg/L

Στις επόμενες παραγράφους θα αναλυθούν οι βασικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση, με ιδιαίτερη έμφαση στην επίδραση των θειικών ιόντων και την επιλογή του τύπου και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων, οι οποίοι είναι βασικοί ερευνητικοί στόχοι της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής.

2.3.4. Αναερόβια βιοκοινότητα μικροοργανισμών

Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί σχετικά με την ποικιλομορφία των μικροοργανισμών αναγωγικής αποχλωρίωσης και των μεταβολικών μονοπατιών τους, επειδή η σύνθεση της κατάλληλης μικροβιακής κοινότητας θεωρείται ότι διαδραματίζει ένα βασικό ρόλο στην επιτυχία ή αποτυχία της πλήρους αποχλωρίωσης (Daprato et al., 2007). Η αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση μπορεί να επιτευχθεί από πλήθος μικροοργανισμών, τους λεγόμενους αποχλωριωτές, ή και από μη-εξειδικευμένα βακτήρια, π.χ. οξικογόνα βακτήρια (Judger et al., 2015; Terzenbach & Blaut, 1994). Και στις δύο περιπτώσεις, απαιτείται μια επαρκής ποσότητα οξικού οξέος, και κυρίως υδρογόνου, η οποία δρα ως δότης ηλεκτρονίων και μπορεί να παραχθεί από τη ζύμωση οργανικών ουσιών (Berggren et al., 2013; Harkness et al., 2012; Löffler & Edwards, 2006). Η διάσπαση οργανικών ενώσεων απαιτεί τουλάχιστον τρεις

διαφορετικές ομάδες μικροοργανισμών, οι οποίες συνεργάζονται μεταξύ τους. Έτσι, τα σύνθετα οργανικά μακρομόρια ζυμώνονται από μια ποικιλία μικροοργανισμών σε οργανικές ενώσεις, όπως το γαλακτικό οξύ, το βουτυρικό οξύ, κ.λπ. Μετά, οι οξικογόνοι μικροοργανισμοί οξειδώνουν τις οργανικές ουσίες περαιτέρω σε υδρογόνο και οξικό οξύ, τα οποία προσλαμβάνονται από τους μικροοργανισμούς για την αναγωγή των χλωριωμένων υδρογονοανθράκων (deBok et al., 2004). Σε αναερόβιες μικτές καλλιέργειες αποχλωρίωσης, τα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για τη ζύμωση συνήθως συμπεριλαμβάνουν τουλάχιστον ένα είδος οξικογόνων μικροοργανισμών από τα γένη *Sporomusa*, *Spirochaetes* ή *Acetobacterium* (Ziv-El et al., 2011).

Όμως, σε ένα αναερόβιο πεδίο οι δότες ηλεκτρονίων μπορεί να καταναλωθούν και από μεθανογόνους, θειικοαναγωγικούς, σιδηροαναγωγικούς και άλλους μικροοργανισμούς (Fennell & Gossett, 1998; Berggren et al., 2013). Κατ' αυτόν τον τρόπο, άλλες οξειδοαναγωγικές διεργασίες μπορεί να επιτευχθούν αυξάνοντας την ποικιλία μικροοργανισμών που μπορούν να βρεθούν σε μία ρυπασμένη περιοχή (Daprato et al., 2007).

Η πλειονότητα των καλλιεργειών που έχουν μελετηθεί περιέχουν τα είδη του γένους *Dehalococcoides* είναι μικτές καλλιέργειες, εφόσον είναι δύσκολη η απομόνωση του συγκεκριμένου είδους (He et al., 2005). Επίσης, αξιοσημείωτο γεγονός είναι ότι οι μικτές καλλιέργειες εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης των συγκεκριμένων ειδών (Cheng et al., 2009) και κατ' επέκταση γρηγορότερη αποχλωρίωση (Duhamel & Edwards, 2006). Βασικό αίτιο είναι ότι οι μικτές καλλιέργειες είναι πιο ανθεκτικές στην έκθεση σε αερόβιες συνθήκες, που θα μπορούσαν να καταστρέψουν μια καθαρή καλλιέργεια, διότι οι μη-αποχλωριωτικοί μικροοργανισμοί, όπως τα δ-Proteobacteria, χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων για την κατανάλωση του οξυγόνου (Hug et al., 2012). Επιπλέον, τα *Dehalococcoides* spp. συνθέτουν μόνο μερικώς σημαντικές ουσίες απαραίτητες για την ανάπτυξή τους. Ως εκ τούτου, η ύπαρξη άλλων μικροοργανισμών στις μικτές καλλιέργειες προκαλεί την παραγωγή του, οξικού οξέος και κοβαλαμινών για χρήση ως δότη ηλεκτρονίων, πηγή άνθρακα και ενζυματικών συμπαραγόντων, αντιστοίχως, καλύπτοντας την ανάγκη και των *Dehalococcoides* spp. (He et al., 2007). Η παρουσία της βιταμίνης B12 είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των αποχλωριωτών, μιας και δεν την αναπτύσσουν σε επαρκή ποσότητα οι ίδιοι (He et al., 2007; Johnson et al., 2009; Wen et al., 2017). Για παράδειγμα, το στέλεχος 195 του είδους *Dehalococcoides mccartyi* φαίνεται να έχει ως ελάχιστη απαίτηση την ύπαρξη 1 μg/L βιταμίνης B12 για την ανάπτυξή του (He et al., 2007).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Hug et al. (2012), φαίνεται ότι όλο το μονοπάτι παραγωγής της συγκεκριμένης βιταμίνης εκφράστηκε από τις συνομοταξίες Euryarchaeota και Firmicutes σε τρεις διαφορετικές μικτές καλλιέργειες. Άρα, αν και η μεθανογένεση και η οξικογένεση θεωρούνται ανταγωνιστικές διεργασίες ως προς τον τελικό δότη ηλεκτρονίων, δηλαδή το υδρογόνο, κάποια από τα είδη των συγκεκριμένων ομάδων βακτηρίων φαίνεται ότι υποβοηθούν την αποχλωρίωση με την παραγωγή βιταμίνης B12, που είναι απαραίτητη για τα ένζυμα μεταβολισμού των

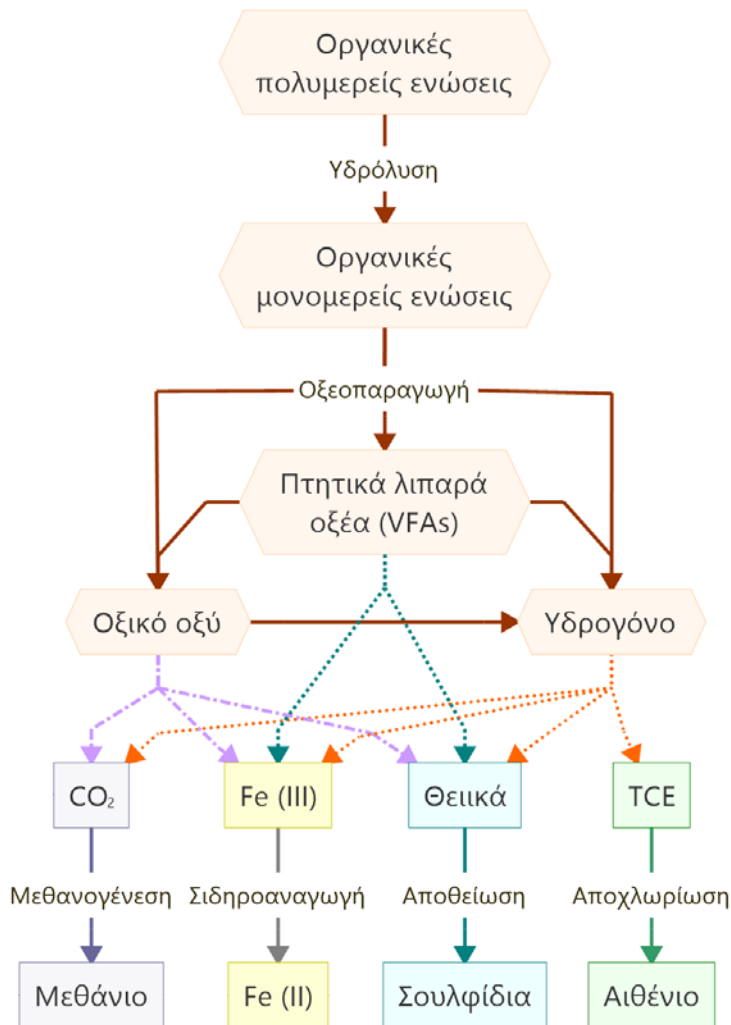
Dehalococcoides spp. (He et al., 2007; Maymó-Gatell et al., 1995). Επιπλέον, δεν έχουν εντοπισθεί τα γονίδια σύνθεσης μεθειονίνης² στο γένος *Dehalococcoides*, όμως έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν την εξωγενή μεθειονίνη, η οποία φαίνεται να παράγεται κυρίως από τη συνομοταξία Firmicutes σε μικτές καλλιέργειες (Hug et al., 2012).

Ενδιαφέρον, επίσης, αποτελεί το εύρημα ότι ανάλογα με τις συνθήκες μεταβάλλεται η μικροβιακή κοινότητα, αλλά χωρίς να υπάρχει απώλεια λειτουργικότητας ως προς την αποχλωρίωση. Αν ένα είδος να εξαφανισθεί στην καλλιέργεια, μπορεί ένα άλλο να αναπτυχθεί στη θέση του και να αναλάβει το ρόλο που απαιτείται για τη διατήρηση της αποτελεσματικότητας (Duhamel & Edwards, 2006).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η βιοκοινότητα μπορεί να χαρακτηρίζεται από την παρουσία διαφορετικών πληθυσμών μικροοργανισμών, όπως αποχλωριωτικοί, μεθανογόνοι, θεικοαναγωγικοί και σιδηροαναγωγικοί, που εκτελούν διαφορετικά στάδια της διαδοχικής αποχλωρίωσης του PCE σε αιθέριο (Chambon et al., 2012; Fothergill & Tiedje, 1994), καθώς, επίσης, και από ζυμωτικούς και οξειδογόνους μικροοργανισμούς που παράγουν ηλεκτρόνια κατά τη ζύμωση φυσικού ή μη οργανικού υλικού (Chapelle et al., 1997; Carr & Hughes, 1998; Gao et al., 1997). Έτσι, σε μια περιοχή ρυπασμένη με χλωριωμένα αιθέρια πραγματοποιούνται βιολογικά πλήθος διεργασιών και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών που εκτελούν συγκεκριμένους ρόλους έχουν μεγάλη ποικιλομορφία, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.8. Παράλληλα, στο Σχήμα 2.9 παρουσιάζεται η επίδραση των μεθανογόνων, οξειδογόνων και αποθειωτών στην ανάπτυξη των αποχλωριωτών και ειδικά του γένους *Dehalococcoides*.

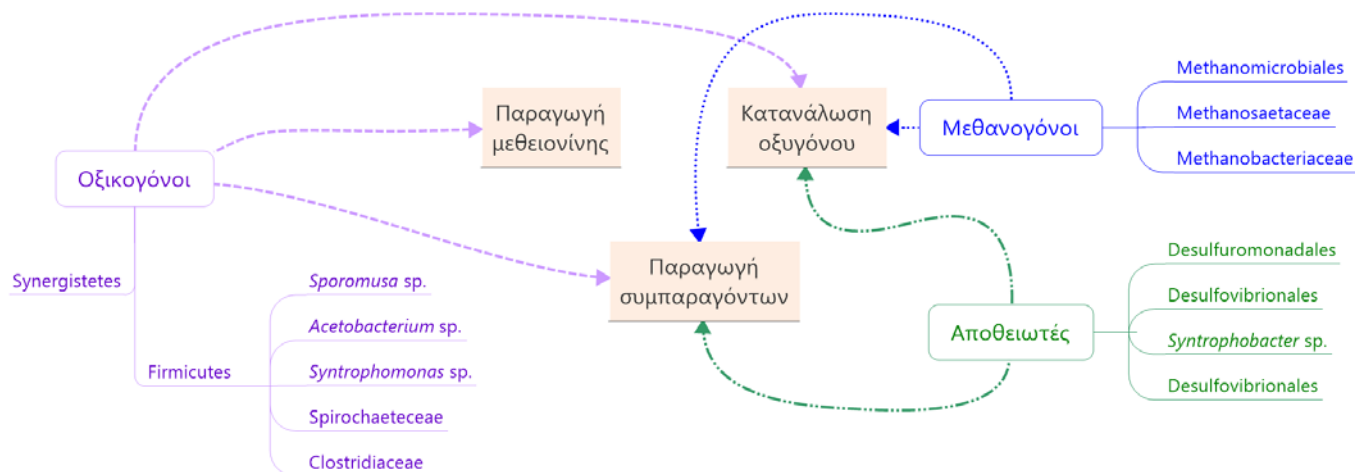
² Η μεθειονίνη είναι ένα αμινοξύ απαραίτητο για τη σύνθεση πρωτεϊνών.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 2.8 Συνήθεις διεργασίες που μπορεί να επιτελούνται υπό αναερόβιες συνθήκες σε καλλιέργειες που ανάγουν βιολογικά το τριχλωροαιθένιο (Πηγές: Muyzer & Stams, 2008; Αντωνίου, 2008; Fennell & Gossett, 2003; Bossert & Häggblom, 2003; Kandris, 2017). Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν τη ροή των ηλεκτρονίων από τους δότες προς τους αποδέκτες.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 2.9 Ρόλος μη αποχλωριωτικής κοινότητας σε μικτή καλλιέργεια και παρατηρούμενες ομάδες μικροοργανισμών στα πειράματα των Hug et al. (2012).

2.3.4.1. Μικροοργανισμοί αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης

Όπως προαναφέρθηκε, το μονοπάτι της αναερόβιας βιολογικής αναγωγικής αποχλωρίωσης μπορεί να επιτευχθεί μέσω δύο μηχανισμών, του μεταβολισμού και του συμμεταβολισμού (Wang & Tseng, 2009a; Guerrero-Barajas & García-Reña, 2010). Επομένως, οι μικροοργανισμοί μπορεί να παράγουν ενέργεια ή/και άνθρακα για την ανάπτυξή τους είτε άμεσα από την αποχλωρίωση των συγκεκριμένων ρύπων είτε έμμεσα από την κατανάλωση άλλων ουσιών (USEPA, 2013; Field & Sierra-Alvarez, 2004; Madsen E., 1991). Επιπλέον, μερικά στελέχη αποχλωριωτών επιτυγχάνουν κάποια στάδια του μονοπατιού μόνο συμμεταβολικά, γεγονός το οποίο καταδεικνύει την απαίτηση της παρουσίας ενός άλλου υποστρώματος αναγκαίου για την ανάπτυξη (Chambon et al., 2012). Οι δύο μηχανισμοί μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα καθιστώντας δύσκολη τη διάκριση της συνεισφοράς του καθενός, εφόσον παράγονται τα ίδια προϊόντα (Hazen et al., 2009).

Μικροοργανισμοί οργανοαλογονικής αναπνοής

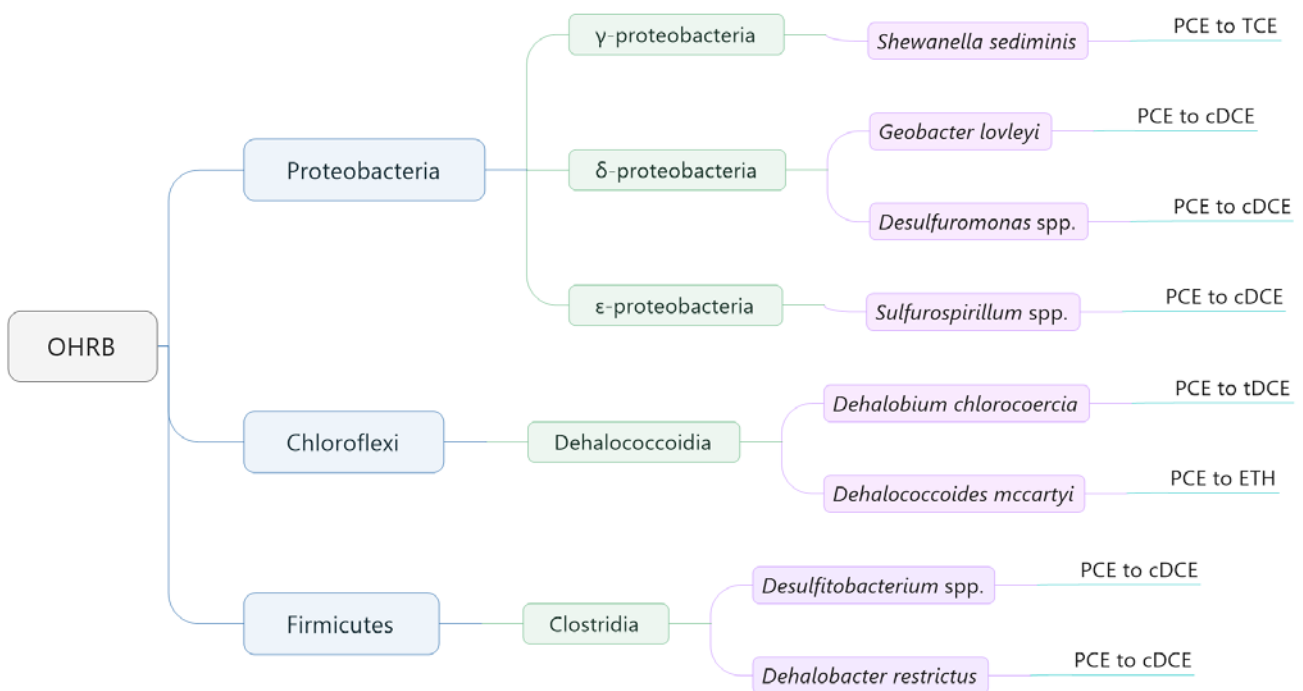
Η διεργασία απόκτησης ενέργειας μέσω της αναγωγής των χλωριωμένων αιθενίων ονομάζεται οργανοαλογονική αναπνοή (Organohalide respiration). Παλαιότερα χρησιμοποιούνταν οι όροι «Χλωροαναπνοή» (Chlororespiration), «Μεταβολική αναγωγική αποχλωρίωση» (Metabolic reductive dechlorination) κ.ά., οι οποίοι πλέον δεν θεωρούνται ακριβείς (Adrian & Löffler, 2016).

Πλήθος ειδών έχουν την ιδιότητα της διεργασίας αυτής μέσω της μετατροπής των χλωροαιθενίων (Majone et al., 2015). Τα είδη αυτά, που έχουν βρεθεί σε ιζήματα ποταμών, εκβολών ποταμών και θάλασσας και συνδέονται με την ύπαρξη των

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

χλωριωμένων ρύπων στην περιοχή (Matturro et al., 2016), έχουν απομονωθεί και αναπτυχθεί σε καθαρές καλλιέργειες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί θεωρείται ότι μεταβολίζουν άμεσα κατ' αποκλειστικότητα ή μη τις οργανοχλωριωμένες ενώσεις (Hug et al., 2013).

Με τα τωρινά δεδομένα, θεωρείται ότι τα βακτήρια οργανοαλογονικής αναπνοής (Organohalide-respiring bacteria; OHRB) ανήκουν, κυρίως, σε τρεις συνομοταξίες, Chloroflexi, Firmicutes και Proteobacteria (Judger et al., 2015), όπως φαίνεται και στο ταξινομικό δέντρο του Σχήματος 2.10. Τα περισσότερα είδη μπορούν να πραγματοποιήσουν τα πρώτα στάδια της αποχλωρίωσης, ενώ μόνο τα είδη *Dehalococcoides mccartyi* μπορούν να ανάγουν τα DCEs και το VC σε αιθάνιο (Futagami et al., 2011) χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό μεταβολικών και συμμεταβολικών διεργασιών. Επομένως, σε περίπτωση απουσίας του συγκεκριμένου είδους, η διαδικασία θα σταματήσει και θα συσσωρευτούν στο πεδίο DCEs ή/και VC (DiStefano et al., 1991; Fletcher et al., 2011).



Σχήμα 2.10 Ταξινομικό δέντρο μικροοργανισμών αναγωγικής αποχλωρίωσης.

Τα είδη που ανήκουν στη συνομοταξία Proteobacteria μεταβολίζουν τις χλωριωμένες ενώσεις με τη χρήση διαφόρων μονοπατιών και εμπίπτουν στα βακτήρια οργανοαλογονικής αναπνοής, αλλά όχι κατ' αποκλειστικότητα. Αντιθέτως, τα είδη που ανήκουν στη συνομοταξία Chloroflexi είναι εξειδικευμένα και χρησιμοποιούν κατ' αποκλειστικότητα μόνο το μονοπάτι της αναγωγικής αποχλωρίωσης, ενώ τα είδη της συνομοταξίας Firmicutes εντάσσονται και στις δύο κατηγορίες, εφόσον σε αυτή

ανήκουν τα είδη *Dehalobacter* spp. και *Desulfitobacterium* spp., τα οποία πραγματοποιούν την οργανοαλογονική αναπνοή κατ' αποκλειστικότητα και μη, αντιστοίχως (Maphosa et al., 2010).

Η μεταφορά των δύο ηλεκτρονίων στην αντίδραση της βιολογικής αποχλωρίωσης καταλύεται από τα ένζυμα αναγωγικής αποαλογονάσης (dehalogenase; RDase), (Bommer et al., 2014; Futagami et al., 2008; Hug et al., 2013), τα οποία ανήκουν στην κατηγορία οξειδοαναγωγάσες (oxidoreductases) (Judger et al., 2015) και εκφράζονται από τα λεγόμενα *rdhA* γονίδια (Futagami et al., 2011). Το γονίδιο *rdhA* περιέχει δύο συμπλέγματα σιδήρου-θείου (Fe/S clusters) και έχει αποδειχθεί ότι απαιτείται ένας συμπαράγοντας πορφυρίνης για τη δραστηριότητά του (Lohner & Spormann, 2013; Bommer et al., 2014). Είναι επίσης ευαίσθητο στο οξυγόνο, ενώ καταλύει το δεσμό μεταξύ του άνθρακα και του υδρογόνου (Saiyari et al., 2018). Τα συγκεκριμένα γονίδια έχουν ανιχνευθεί σε διάφορα γένη που περιλαμβάνονται στις ομοταξίες Chloroflexi, Firmicutes, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria αλλά και στα αρχαία (Bommer et al., 2014). Μάλιστα, τα γονιδιώματα των *Desulfitobacterium* spp., *Dehalococcoides* spp. και *Dehalobacter* spp. περιέχουν πολλαπλά γονίδια *rdhA* (Hug et al., 2013), ενώ τα διάφορα στελέχη *Dehalococcoides* spp. έχουν διαφορετικό είδος και πληθυσμό γονιδίων αποχλωρίωσης (Ταῖ et al., 2010), εφόσον γονίδια όπως τα *vcrA*, *bncA*, *tceA*, *pceA*, *mbrA* και *prdA* είναι υπεύθυνα για την επίτευξη συγκεκριμένων σταδίων του μονοπατιού της βιολογικής αποχλωρίωσης (Cheng & He, 2009; Hug et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα, το γονίδιο *tceA*, που ευθύνεται για τη μετατροπή από TCE σε VC, έχει βρεθεί στα *Dehalococcoides mccartyi* 195 (Magnuson et al., 2000) και FL2 (He et al., 2005). Επιπλέον, το γονίδιο *vcrA*, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αποχλωρίωση των DCEs σε αιθένιο μέσω VC, έχει εκφραστεί από τα στελέχη VS (Müller et al., 2004) και GT (Sung et al., 2006a). Η αναγωγή του VC σε αιθένιο, επίσης, καταλύεται από το γονίδιο *bncA*, που έχει βρεθεί στο *Dehalococcoides mccartyi* BAV1 (Krajmalnik-Brown et al., 2004). Η μετατροπή του PCE σε tDCE έχει βρεθεί ότι πραγματοποιείται από τα στελέχη MB (Chow et al., 2010) και CBDB1 (Marco-Urrea et al., 2011) που περιέχουν το γονίδιο *mbrA*. Ενδιαφέρον, τέλος, αποτελεί το *Dehalococcoides mccartyi* BTF08 το οποίο περιλαμβάνει τα γονίδια *vcrA*, *tceA*, *pceA*, και άρα είναι το μοναδικό στέλεχος που μπορεί να κωδικοποιήσει όλα τα στάδια της αναγωγικής αποχλωρίωσης (Pöritz et al., 2013). Γενικά, τα είδη του γένους *Dehalococcoides* έχουν ταξινομηθεί στις εξής 3 ομάδες σύμφωνα με τις διαφορές που συναντώνται στην γονιδιακή αλληλουχία τους (Hendrickson et al., 2002; Lee et al., 2013): α) τα στελέχη 195, MB ανήκουν στην Cornell ομάδα, β) τα στελέχη BAV1, CBDB1, FL2, GT στην Pinellas και γ) το στέλεχος VS στην Victoria.

Εκτός όμως από το είδος *Dehalococcoides mccartyi*, και άλλα είδη βακτηρίων εμπεριέχουν *rdhA* γονίδια, αφού πραγματοποιούν, κυρίως, την αναγωγή του PCE σε λιγότερο χλωριωμένες ενώσεις. Τα γένη στα οποία έχει ανιχνευτεί το γονίδιο *pceA* είναι τα *Sulfurospirillum* (Bommer et al., 2014; Neumann et al., 1998), *Dehalobacter* (Maillard et al., 2003; Sjuts et al., 2012), *Desulfitobacterium* (Suyama et al., 2002;

Goris et al., 2015) και *Shewanella* (Lohner & Spormann, 2013). Επίσης, η αναγωγή του PCE μπορεί να εκφραστεί με το γονίδιο *prdA* το οποίο έχει ταυτοποιηθεί στο γονιδίωμα του *Desulfitobacterium* sp. KBC1 (Tsukagoshi et al., 2006). Μεταξύ των ειδών οργανοαλογονικής αναπνοής μπορεί να υπάρξει συνεργασία για την επίτευξη όλων των σταδίων του μονοπατιού (Holmes et al., 2006; Nishimura et al., 2008).

Καθώς προχωρά, λοιπόν, η αντίδραση αποχλωρίωσης, το κυρίαρχο γονίδιο αλλάζει. Έτσι, όταν υπάρχει αυξημένη ποσότητα TCE, το *tceA* είναι το επικρατέστερο, ενώ όσο μειώνεται η συγκέντρωση του TCE και αυξάνεται του VC το στέλεχος που εκφράζει το *tceA* εξαφανίζεται και τη θέση του παίρνει ένα άλλο στέλεχος με το γονίδιο *vcrA* ή *bncA* (Lee et al., 2006; Ise et al., 2011). Αν και η ύπαρξη των γονιδίων δεν δηλώνει, κατ' ανάγκη, και την έκφρασή τους ή τη δραστηριότητά τους, είναι σημαντικά εργαλεία για την παρακολούθηση της σύνθεσης της μικροβιακής κοινότητας (Lee et al., 2008), καθώς έχει βρεθεί ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση της αποχλωρίωσης του VC και ταυτόχρονη αύξηση των γονιδίων *vcrA* και *bncA* που την πραγματοποιούν (van der Zaan et al., 2010). Επομένως, τα κατάλληλα μέρη της αλληλουχίας του αγγελιοφόρου RNA (mRNA), δηλαδή τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα ένζυμα, θεωρούνται σημαντικοί δείκτες του δυναμικού βιοαποκατάστασης στο πεδίο (Ritalahti et al., 2010; Chambon et al., 2012), αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη του ρυθμού αποχλωρίωσης (Lee et al., 2006).

Επομένως, τα βακτήρια οργανοαλογονικής αναπνοής έχουν αρκετά διαφορετικά χαρακτηριστικά όσον αφορά το απαιτούμενο είδος δότη ηλεκτρονίων, την κινητική των αντιδράσεων, το τελικό προϊόν αποχλωρίωσης και την αντίσταση στην αναστολή του υποστρώματος (Majone et al., 2015). Στον Πίνακα 2.10 φαίνονται τα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην οργανοαλογονική αναπνοή ταξινομημένα σύμφωνα με τη συνομοταξία στην οποία ανήκουν.

Πίνακας 2.10 Μικροοργανισμοί οργανοαλογονικής αναπνοής των χλωριωμένων αιθενίων.

Στελέχη μικροοργανισμών	Μετατροπή	Δότης ηλεκτρονίων	Αναφορά
Chloroflexi			
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> strain BAV1	PCE→ETH ^{1,2}	Υδρογόνο	He et al., 2003
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> strain 195 ^a	PCE→ETH ³	Υδρογόνο	Maymó-Gatell et al., 1997
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> strain FL2	PCE→ETH ^{1,3}	Υδρογόνο	He et al., 2005
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> strain BTF08*	PCE→ETH	Υδρογόνο	Cichocka et al., 2010
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> strain GT	TCE→ETH	Υδρογόνο	Sung et al., 2006a
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> strain VS*	TCE→ETH ²	Υδρογόνο	Cupples et al., 2003

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Στελέχη μικροοργανισμών	Μετατροπή	Δότης ηλεκτρονίων	Αναφορά
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> strain MB	PCE→tDCE	Υδρογόνο	Cheng & He, 2009
<i>Dehalococcoides mccartyi</i> strain CBDB1*	PCE→tDCE	Υδρογόνο	Marco-Urrea et al., 2011
<i>Dehalobium chlorocoercia</i> strain DF-1	PCE→tDCE	Μυρμηκικό οξύ	Miller et al., 2005
Firmicutes			
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> strain PCE1	PCE→TCE	Γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, μυρμηκικό οξύ	Gerritse et al., 1996
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> strain PCE-S	PCE→cDCE	Μεθυλοβιολογόνο	Miller et al., 1997
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> strain TCE1 ^b	PCE→cDCE	Υδρογόνο, αιθανόλη, γαλακτικό οξύ, βουτυρικό οξύ, μυρμηκικό οξύ	Gerritse et al., 1999
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> strain Y51	PCE→cDCE	Πυροσταφυλικό οξύ	Suyama et al., 2001
<i>Desulfitobacterium</i> sp. strain KBC1	PCE→TCE	Πυροσταφυλικό οξύ	Tsakagoshi et al., 2006
<i>Dehalobacter restrictus</i> strain PER-K23	PCE→cDCE	Υδρογόνο, μυρμηκικό οξύ	Holliger & Zehndert, 1993
<i>Dehalobacter restrictus</i> strain TEA	PCE→cDCE	Υδρογόνο	Wild et al., 1996
Proteobacteria			
<i>Desulfuromonas chloroethenica</i> strain TT4B	PCE→cDCE	Οξικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ	Krumholz L., 1997
<i>Desulfuromonas michiganensis</i> strains BB1 & BRS1	PCE→cDCE	Οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ, ηλεκτρικό οξύ, μηλικό οξύ, φουμαρικό οξύ	Sung et al., 2003
<i>Sulfurospirillum multivorans</i> strain K ^c	PCE→cDCE	Πυροσταφυλικό οξύ	Scholz-Muramatsu et al., 1995
<i>Sulfurospirillum halorespirans</i> strain PCE-M2	PCE→cDCE	Υδρογόνο, γαλακτικό οξύ	Luijten et al., 2003
<i>Geobacter lovleyi</i> strain SZ	PCE→cDCE	Υδρογόνο, οξικό οξύ, πυροσταφυλικό οξύ	Sung et al., 2006b
<i>Shewanella sediminis</i> strain HAW-EB3	PCE→TCE	Μεθυλοβιολογόνο	Lohner & Spormann, 2013

^aΠρώην είδος *Dehalococcoides ethenogenes*; ^bΠρώην είδος *Desulfitobacterium frappieri*; ^cΠρώην είδος *Dehalospirillum multivorans*. *Μικτή καλλιέργεια. Συμμεταβολική αποχλωρίωση: ¹PCE σε TCE, ²TCE σε DCEs, ³VC σε ETH.

Μικροοργανισμοί συμμεταβολικής αναγωγικής αποχλωρίωσης

Πλήθος ερευνών έχει αποδείξει τη συμμεταβολική αποχλωρίωση που πραγματοποιείται από αποθειωτικούς, οξεοπαραγωγικούς και μεθανογόνους μικροοργανισμούς (Holliger & Schraa, 1994; Holliger et al., 2003; Middeldorp et al., 1999; Bhatt et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα, έχει θεωρηθεί ότι τα είδη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Methanosarcina spp. (Cabirol et al., 1998; Fathepure & Boyd, 1988a; Fathepure & Boyd, 1988b), *Clostridium bifermentans* (Chang et al., 2000), *Clostridium formicaceticum*, *Acetobacterium woodii*, *Sporomusa ovata* (Terzenbach & Blaut, 1994), *Enterobacter* spp. (Sharma & McCarty, 1996), *Desulfomonile tiedjei* (Fathepure et al., 1987) προκαλούν την αναγωγική αποχλωρίωση, δίχως να κερδίζουν άμεσα ενέργεια για την ανάπτυξή τους, χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα, όπως μεθανόλη, φρουκτόζη, γλυκόζη, υδρογόνο κ.ά.

Επομένως, τα χλωριωμένα αιθένια μετατρέπονται από ένζυμα ή συμπαραγόντες που εκφράζονται κατά τη μικροβιακή κατάλυση άλλου υποστρώματος (Field & Sierra-Alvarez, 2004; AFCEE, 2008). Ο συμπαραγόντας είναι ένα μη πρωτεϊνικό μόριο και μπορεί να βοηθήσει την καταλυτική δράση ενός ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, οι συμπαραγόντες μπορεί να είναι δύο ειδών: i) μία πορφυρίνη που περιέχει μέταλλο, παραδείγματος χάριν σύμπλοκα μαγγανίου, χαλκού, σιδήρου, μαγνησίου κ.ά. ή ii) μία οργανική ένωση η οποία ονομάζεται συνένζυμο και είναι κυρίως βιταμίνες (Διαμαντίδης, 1994). Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η βιταμίνη B12, ο συμπαραγόντας F430 και η αιμίνη, που περιέχουν κοβάλτιο, νικέλιο και σίδηρο, αντιστοίχως, στο ενεργό τους κέντρο και έχει βρεθεί ότι υποβοηθούν στην κατάλυση των χλωριωμένων αιθενίων (Middeldorp et al., 1999; Glod et al., 1997).

Θεωρείται δε ότι τα οξικογόνα βακτήρια παράγουν υψηλές συγκεντρώσεις από δακτυλίους τετραπυρρολίου, οι οποίοι δρουν ως καταλύτες στην αναγωγική αποχλωρίωση, και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των *Dehalococcoides mccartyi* (Wen et al., 2017; Terzenbach & Blaut, 1994). Συγκεκριμένα για το στέλεχος 195 έχει δειχθεί ότι η σύνθεση της βιταμίνης B12 (κυανοκοβαλαμίνης), της βιοτίνης, της θειαμίνης, των κινονών, της μεθειονίνης και ο κύκλος του τρικαρβοξυλικού οξέος είναι ατελείς (Kube et al., 2005; Tang et al., 2016), αφού τα στελέχη του γένους *Dehalococcoides* στερούνται ολόκληρης της σειράς των ~20 γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση δακτυλίων τετραπυρρολίου και η ανάπτυξη των καθαρών καλλιεργειών εξαρτάται από την εξωγενή προσθήκη κοβαλαμίνης, δηλαδή βιταμίνης B12 (Yan et al., 2016).

Παρομοίως, οι αποθειωτικοί και οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί παρέχουν αρκετές ποσότητες συμπαραγόντων για τη διατήρηση της αποχλωριωτικής ικανότητας της βιοκοινότητας (Men et al., 2012), ενώ έχει αποδειχθεί και ότι το *Geobacter lovleyi*, που μπορεί να ανάγει τον τρισθενή σίδηρο, αλλά και το PCE, παράγει κοβαλαμίνες απαραίτητες για την ανάπτυξη των αποχλωριωτών που πραγματοποιούν την αναγωγή του VC (Yan et al., 2012). Επιπλέον, διάφορα στάδια του μονοπατιού, όπως το τελευταίο στάδιο της αποχλωρίωσης, δηλαδή η μετατροπή του VC σε αιθένιο, μπορεί να επιτευχθούν συμπτωματικά εξαιτίας του μεταβολισμού άλλου χλωριωμένου αιθενίου (Maymó-Gatell et al., 2001; Holliger et al., 2003).

Ο μηχανισμός του συμμεταβολισμού είναι μεν ευρύτατα διαδεδομένος σε αναερόβια συστήματα, αλλά είναι ένα μη αποτελεσματικό μέσο αποχλωρίωσης (Bradley, 2003), με πολύ πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με τον άμεσο μεταβολισμό (Middeldorp et al.,

1999). Το στέλεχος GT, παραδείγματος χάριν, μεταβολίζει άμεσα το VC σε αιθέριο με ένα ρυθμό τρεις φορές μεγαλύτερο από ό,τι μετατρέπει το TCE και το cDCE (Sung et al., 2006a). Ωστόσο, το στέλεχος 195 φάνηκε να ανάγει το PCE σε VC σε λιγότερο από μία ημέρα, ενώ για τη συμμεταβολική αποχλωρίωση του VC απαιτούνταν περίπου 24 ημέρες (Maymó-Gatell et al., 1997). Ο συμμεταβολισμός, όμως, μπορεί να επιτευχθεί ακόμα και όταν οι συγκεντρώσεις των ρύπων είναι πολύ χαμηλές, όπου δεν μπορούν να αναπυχθούν οι μικροοργανισμοί αποχλωρίωσης (Hazen T., 2010). Έτσι, η βιωσιμότητα της συμμεταβολικής διεργασίας εξαρτάται από τη μεταφορά των ηλεκτρονίων και τη συγκέντρωση του πρωτεύοντος υποστρώματος το οποίο υποστηρίζει ενεργειακά τη βιοκοινότητα (Field & Sierra-Alvarez, 2004; ITRC, 2008; Parsons, 2004; Bhatt et al., 2007).

2.3.4.2. Μικροοργανισμοί άλλων αναγωγικών διεργασιών

Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι διάφορα είδη μικροοργανισμών συνυπάρχουν με τα είδη οργανοαλογονικής αναπνοής, όπως οξικογόνοι, μεθανογόνοι, αποθειωτικοί κ.ά., σε καλλιέργειες και φυσικά περιβάλλοντα. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να υποβοηθήσουν την αναγωγική αποχλωρίωση (Hug et al., 2012) ή/και να την ανταγωνιστούν ως προς τον παρεχόμενο δότη ηλεκτρονίων (Adrian & Löffler, 2016). Στην Ενότητα αυτή θα γίνει μια συνοπτική αναφορά στις ομάδες των μικροοργανισμών που παρουσιάζονται σε βιοκοινότητες αναγωγικής αποχλωρίωσης και είναι συναφείς με το πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Μικροοργανισμοί αναγωγής τρισθενούς σιδήρου

Η αναγωγή του σιδήρου είναι μια σημαντική και ευρέως διαδομένη διεργασία σε υπόγεια ύδατα με πλούσια οργανική ύλη (Lin et al., 2007), αλλά και σε ρυπασμένους υπόγειους υδροφορείς (Lovley et al., 2004). Η αναγωγή επιτυγχάνεται όταν μικροοργανισμοί μεταφέρουν ηλεκτρόνια από τον δότη στον τρισθενή σίδηρο (ferric iron; Fe(III)) για τη μετατροπή του σε δισθενή (ferrous iron; Fe(II)) (Lovley, 2013). Η αντίδραση που πραγματοποιείται είναι η εξής (Huo et al., 2016):



Η αναγωγή του σιδήρου απαιτεί, λοιπόν, μία πηγή ηλεκτρονίων, που προκύπτει από την αποδόμηση διαλυμένου οργανικού άνθρακα (Lin et al., 2007), όπως το φουμαρικό οξύ, το μυρμηκικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, το πυροσταφιλικό οξύ, το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ, το μηλικό οξύ, την προπανόλη και την αιθανόλη (Ebrahiminezhad et al., 2017). Οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να αποκτούν ενέργεια μέσω αυτής της διεργασίας ανήκουν σε διάφορα είδη βακτηρίων και αρχαίων (Lovley, 2013), ενώ, πλέον, έχουν αναγνωρισθεί περισσότερα από 71 προαιρετικά σιδηροαναγωγικά βακτήρια με διαφορετική μορφολογία

(Ebrahiminezhad et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, σε ρυπασμένο υπόγειο νερό βρέθηκε ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών αναγωγής σιδήρου, όπως είδη των γενών *Geobacter*, *Serratia*, *Clostridium*, *Rhodoferrax*, *Desulfitobacterium*, *Anaeromyxobacter* και *Geothrix* (Lin et al., 2005; Lin et al., 2007). Στον Πίνακα 2.11 φαίνονται οι μικροοργανισμοί αναγωγής τρισθενούς σιδήρου και τα χαρακτηριστικά τους, ταξινομημένοι φυλογενετικά.

Επιπλέον, η αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου μπορεί να επιτευχθεί συμμεταβολικά, δηλαδή η ανάπτυξη του μικροοργανισμού επιτυγχάνεται μέσω άλλων αντιδράσεων και ο σίδηρος μετατρέπεται από ένζυμα έμμεσα. Ο μηχανισμός αυτός πραγματοποιείται είτε από τη ζύμωση οργανικού υποστρώματος είτε από την αναγωγή θειικών ιόντων (Lovley, 2013).

Η πιο συχνή μορφή τρισθενούς σιδήρου, που απαντάται στο φυσικό περιβάλλον, είναι τα οξειδία σιδήρου, τα οποία όμως είναι αδιάλυτα στο νερό σε ουδέτερο pH (Weber et al., 2006; Lovley, 2013). Έτσι, οι μικροοργανισμοί αντιμετωπίζουν τη δυσκολία της μεταφοράς των ηλεκτρονίων από το μεταβολικό κέντρο του κυττάρου σε έναν αδιάλυτο εξωκυτταρικό αποδέκτη (Lovley et al., 2004). Θεωρείται δε ότι τα είδη του γένους *Geobacter* spp. απαιτούν άμεση επαφή με τα οξειδία σιδήρου (Weber et al., 2006), εφόσον φαίνεται ότι δεν μπορούν να παράγουν ένζυμα που διαλυτοποιούν τον σίδηρο ή τις ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων (Lovley, 2013). Ενώσεις, όμως, όπως τα χουμικά οξέα (βλ. Ενότητα 2.3.5.7), μπορούν να λειτουργήσουν ως μεταφορείς από την κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού στην επιφάνεια των οξειδίων του σιδήρου (Lovley et al., 2004). Παρά ταύτα, οι μηχανισμοί μεταφοράς ηλεκτρονίων στον αδιάλυτο σίδηρο δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί και είναι αναγκαία η περαιτέρω μελέτη του αντικειμένου.

Πολύ σημαντικό είναι, επίσης, ότι οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν άμεσα διάφορες ενώσεις ως δότες ηλεκτρονίων, δηλαδή δεν απαιτείται η υδρόλυσή τους, με αποτέλεσμα το υδρογόνο να μην έχει καθοριστικό ρόλο στην αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου (Lovley et al., 2004). Έτσι, η σιδηροαναγωγική βιοκοινότητα μπορεί να υπερισχύσει έναντι των θειικοαναγωγικών και μεθανογόνων μικροοργανισμών στον ανταγωνισμό για το δότη ηλεκτρονίων, μιας και η ζύμωση των οργανικών ουσιών είναι ένα περιοριστικό στάδιο στην παραγωγή σουλφιδίων και μεθανίου (Lovley, 2013).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 2.11 Μικροοργανισμοί αναγωγής τρισθενούς σιδήρου (Πηγή: Παραλλαγή από Lovley et al., 2004; Lovley, 2013).

Ομοταξία	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Χαρακτηριστικά
Βακτήρια				
Acidithiobacillia	Acidithiobacillales	Acidithiobacillaceae	<i>Acidithiobacillus</i>	Το είδος <i>A. ferroxidans</i> με Σχήμα ράβδου και δότη ηλεκτρονίων το υδρογόνο.
Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	<i>Acidimicrobium</i>	Το είδος <i>A. ferroxidans</i> με Σχήμα ράβδου και δότη ηλεκτρονίων τη γλυκερόλη.
Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Acidiphilium</i>	Το είδος <i>A. cryptum</i> προκαλεί την πλήρη οξειδωση διάφορων οργανικών ουσιών, όπως γλυκερόλη, ηλεκτρικό οξύ, κ.ά.
Bacilli	Bacillales	Alicyclobacillaceae	<i>Alicyclobacillus</i>	Είδος του γένους <i>Alicyclobacillus</i> Σχήματος ράβδου που χρησιμοποιεί το γλουταμικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων.
			<i>Sulfobacillus</i>	Είδη του γένους <i>Sulfobacillus</i> με ραβδοειδές Σχήμα και το τετραθειονικό οξύ, τη γλυκερόλη και τη γλυκόζη ως δότες.
		Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	Είδη του γένους <i>Bacillus</i> με ραβδοειδές Σχήμα που οξειδώνουν διάφορες οργανικές ουσίες, όπως γαλακτικό οξύ, κ.ά.
Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Ferribacterium</i>	Το είδος <i>F. limneticum</i> σε Σχήμα ράβδου, οξειδώνει πλήρως το οξικό οξύ.
	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Rhodoferax</i>	Το <i>R. ferrireducens</i> ραβδοειδούς Σχήματος οξειδώνει διάφορα οξέα, όπως το οξικό, το προπιονικό, το γαλακτικό, κ.ά.
	Nitrosomonadales	Thiobacillaceae	<i>Thiobacillus</i>	Το είδος <i>T. ferroxidans</i> χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων το στοιχειακό θείο.
Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium</i>	Είδη του γένους <i>Clostridium</i> με ραβδοειδές Σχήμα που οξειδώνουν μερικώς το γλουταμικό οξύ.
			<i>Desulfitobacterium</i>	Είδη του γένους <i>Desulfitobacterium</i> μπορούν να ανάγουν και το PCE με δότες, όπως γαλακτικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, κ.ά.
		Peptococcaceae	<i>Desulfosporosinus</i>	Το είδος <i>D. meridiei</i> με ραβδοειδές Σχήμα προκαλεί τη μερική οξείδωση του γαλακτικού οξέος.
			<i>Desulfotomaculum</i>	Το είδος <i>D. reducers</i> οξειδώνει μερικώς τα οξέα, γαλακτικό, βουτυρικό και βαλερικό.
			<i>Carboxydotherrmus</i>	Το <i>C. ferrireducens</i> έχει Σχήμα ράβδου και χρησιμοποιεί ως δότες το υδρογόνο και τη γλυκερόλη.
Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacter</i>	Τα <i>Thermoanaerobacter</i> spp. με Σχήμα ράβδου οξειδώνουν το υδρογόνο, το γαλακτικό οξύ, το πυροσταφυλικό οξύ, κ.ά.	
	N/A ¹	<i>Thermovenabulum</i>	Το <i>T. ferriorganovorum</i> σε Σχήμα ράβδου προκαλεί την οξείδωση πεπτόνης, διάφορων εκχυλισμάτων και οξέων.	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Ομοταξία	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Χαρακτηριστικά
Deferribacteres	Deferribacterales	Deferribacteraceae	<i>Deferribacter</i>	Τα είδη <i>D. abyssi</i> και <i>D. thermophilus</i> με δότη ηλεκτρονίων το οξικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, το υδρογόνο, κ.ά.
			<i>Geovibrio</i>	Το είδος <i>G. ferrireducens</i> σε Σχήμα δονάκι, χρησιμοποιούν διάφορα οξέα και το υδρογόνο ως δότες ηλεκτρονίων.
Deinococci	Thermales	Thermaceae	<i>Thermus</i>	Είδη του γένους <i>Thermus</i> ραβδοειδούς Σχήματος χρησιμοποιούν το γαλακτικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων.
	Myxococcales	Myxococcaceae	<i>Anaeromyxobacter</i>	Είδη του γένους <i>Anaeromyxobacter</i> με Σχήμα ράβδου που προκαλούν την πλήρη οξειδωση του οξικού οξέος.
	Desulfobacterales	Desulfobulbaceae	<i>Desulfobulbus</i>	Το είδος <i>D. propionicus</i> χρησιμοποιεί ως δότες το υδρογόνο και οξέα, όπως πυροσταφυλικό, προπιονικό και γαλακτικό.
	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	Το είδος <i>D. profundus</i> σε Σχήμα δονάκι οξειδώνει το οξικό οξύ, το τολουόλιο, το υδρογόνο και το πυροσταφυλικό οξύ.
Deltaproteobacteria	Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	<i>Desulfuromonas</i>	Είδη του γένους <i>Desulfuromonas</i> με ραβδοειδές Σχήμα, χρησιμοποιούν ως δότες διάφορα οξέα και αλκοόλες.
			<i>Desulfuromusa</i>	Είδη του γένους <i>Desulfuromusa</i> με ραβδοειδές Σχήμα οξειδώνουν πλήρως το οξικό οξύ.
	Desulfuromonadales	Geobacteraceae	<i>Geobacter</i>	Πολλά είδη του γένους <i>Geobacter</i> με ραβδοειδές Σχήμα και χρησιμοποιούν διάφορους δότες ηλεκτρονίων, ενώ κάποια είδη μπορούν να ανάγουν το PCE, το TCE και το TCA.
			<i>Geothermobacter</i>	Το είδος <i>G. ehrlichii</i> με Σχήμα ράβδου, οξειδώνει πλήρως διάφορα οξέα και αλκοόλες για την αναγωγή του σιδήρου.
Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	<i>Pelobacter</i>	Είδη του γένους <i>Pelobacter</i> με Σχήμα ράβδου, οξειδώνουν αιθανόλη, υδρογόνο, μυρμηκικό και γαλακτικό οξύ.
			<i>Sulfurospirillum</i>	Το είδος <i>S. barnesii</i> με Σχήμα δονάκι οξειδώνει το μυρμηκικό οξύ, το γαλακτικό οξύ και το υδρογόνο.
Gammaproteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	Το είδος <i>A. hydrophila</i> προκαλεί την πλήρη οξείδωση γλυκερόλης, ηλεκτρικού οξέος και γαλακτικού οξέος.
			Ferrimonadaceae	<i>Ferrimonas</i>
	Alteromonadales	Shewanellaceae	<i>Shewanella</i>	Πολλά είδη του γένους <i>Shewanella</i> με Σχήμα ράβδου, χρησιμοποιεί διάφορες ουσίες ως δότες ηλεκτρονίων, όπως γαλακτικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, αιθανόλη, υδρογόνο, κ.ά.
			Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	Είδος του γένους <i>Pseudomonas</i> ανάγει τον τρισθενή σίδηρο με τη χρήση του υδρογόνου ως δότη ηλεκτρονίων.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Ομοταξία	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Χαρακτηριστικά
Holophagae	Holophagales	Holophagaceae	<i>Geothrix</i>	Το είδος <i>G. fermentans</i> ραβδοειδούς Σχήματος προκαλεί την οξειδωση του οξικού και γαλακτικού οξέος.
Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteriales	Thermodesulfobacteriaceae	<i>Geothermobacterium</i>	Το είδος <i>G. ferrireducens</i> με Σχήμα ράβδου, χρησιμοποιεί το υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων και αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες.
Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	<i>Thermotoga</i>	Είδη του γένους <i>Thermotoga</i> με ραβδοειδές Σχήμα, οξειδώνουν το υδρογόνο και την πεπτόνη.
Αρχαία				
Archaeoglobi	Archaeoglobales	Archaeoglobaceae	<i>Ferroglobus</i>	Το είδος <i>F. placidus</i> σε κοκκοειδές Σχήμα χρησιμοποιεί διάφορα οξέα, αλδεΐδες, αλκοόλες ως δότες ηλεκτρονίων.
			<i>Geoglobus</i>	Το <i>G. electriphilus</i> με Σχήμα ράβδου χρησιμοποιεί διάφορους δότες ηλεκτρονίων, όπως υδρογόνο, οξικό οξύ, κ.ά.
Thermococci	Thermococcales	Thermococcaceae	<i>Thermococcus</i>	Τα <i>Thermococcus</i> spp. με κοκκοειδές Σχήμα οξειδώνει την πεπτόνη, το υδρογόνο κ.ά. για την παραγωγή ηλεκτρονίων.
Thermoprotei	Desulfurococcales	Pyrodictiaceae	<i>Geogemma</i>	Είδη του γένους <i>Geogemma</i> σε κοκκοειδές Σχήμα προκαλούν την οξειδωση του υδρογόνου και του μυρμηκικού οξέος.
			<i>Hyperthermus</i>	Το είδος <i>H. butylicus</i> με κοκκοειδές Σχήμα, που αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες, οξειδώνει το υδρογόνο.
	Thermoproteales	Thermoproteaceae	<i>Pyrodictium</i>	Το <i>P. occultum</i> έχει κοκκοειδές Σχήμα, αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες και χρησιμοποιεί το υδρογόνο ως δότη.
			<i>Pyrobaculum</i>	Τα <i>Pyrobaculum</i> spp. με ραβδοειδές Σχήμα χρησιμοποιούν διάφορους δότες και αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες.

¹ N/A = Not available (Δεν έχει ακόμα αναγνωρισθεί)

Μικροοργανισμοί μεθανογένεσης

Οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είναι μία μεγάλη ομάδα που διαφέρει μορφολογικά, εφόσον έχουν διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια, σχήματα και μεγέθη (Gerardi, 2003). Οι μικροοργανισμοί, όμως, που αποτελούν την ομάδα των μεθανογόνων έχουν τρία κοινά χαρακτηριστικά: α) παράγουν μεθάνιο ως τελικό προϊόν του μεταβολισμού τους, δηλαδή έχουν την ικανότητα να αποκτούν ενέργεια για την ανάπτυξή τους από τη μετατροπή συγκεκριμένων υποστρωμάτων σε μεθάνιο, β) είναι αυστηρώς αναερόβιοι και γ) ανήκουν στην επικράτεια των αρχαίων και τη συνομοταξία των Euryarchaeota (Whitman et al., 2006; Hedderich & Whitman, 2013; Gerardi, 2003).

Έχουν βρεθεί περίπου 50 είδη που σχηματίζουν μεθάνιο και έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις ομοταξίες και πέντε τάξεις (Gerardi, 2003), όπως παρουσιάζονται και στον Πίνακα 2.12. Τα αρχαία αυτά αναπτύσσονται πληθυσμιακά σε αναερόβιες συνθήκες όπου θειικά ιόντα, οξειδωμένα μέταλλα και νιτρικά απουσιάζουν, ενώ ο δότης ηλεκτρονίων είναι άμεσα βιοδιαθέσιμος (Hedderich & Whitman, 2013). Τα κύρια υποστρώματα είναι το υδρογόνο, το μυρμηκικό οξύ και το οξικό οξύ, ενώ άλλες οργανικές ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η τριμεθυλαμίνη, το διμεθυλοσουλφίδιο και οι αλκοόλες, όπως η μεθανόλη, η ισοπροπανόλη, η ισοβουτανόλη, η πεντανόλη και η αιθανόλη (Ferry J., 1997).

Επομένως, η παραγωγή του μεθανίου μπορεί να χωριστεί σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες, την υδρογονοτροφική, τη μεθυλοτροφική και την οξικοτροφική μεθανογένεση, όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις (Ferry J., 1997; Whitman et al., 2006):



Στην υδρογονοτροφική μεθανογένεση (Hydrogenotrophic methanogenesis) ως δότης ηλεκτρονίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί το υδρογόνο, το μυρμηκικό οξύ (HCOOH), και διάφορες αλκοόλες, ενώ το ρόλο του αποδέκτη λαμβάνει το CO₂ (Whitman et al., 2006), όπως φαίνεται και στην αντίδραση 2.11. Η αναγωγή του CO₂ σε μεθάνιο είναι το πιο συχνά παρατηρούμενο μονοπάτι (Hedderich & Whitman, 2013) με το υδρογόνο να χρησιμεύει ως γενικό υπόστρωμα (Gerardi, 2003). Πολλά μεθανογόνα χρησιμοποιούν, επίσης, το μυρμηκικό οξύ, αλλά η ικανότητα οξειδωσης των αλκοολών είναι σπάνια (Whitman et al., 2006).

Η δεύτερη κατηγορία μεθανογένεσης, η μεθυλοτροφική (Methylotrophic methanogenesis), πραγματοποιείται από λίγες ομάδες αρχαίων (αντίδραση 2.12). Περιλαμβάνει ενώσεις που έχουν στο μόριό τους έναν άνθρακα σε μία μεθυλομάδα ενωμένη με οξυγόνο, άζωτο ή θείο. Ενώσεις αυτού του τύπου είναι η μεθανόλη, οι

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

μεθυλαμίνες, το τετραμυθαλαμμώνιο, το διμεθυλοσουλφίδιο και μεθανοθειόλη (Hedderich & Whitman, 2013). Όμως, αν και η μεθανοθειόλη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για τη μεθανογένεση, δεν υποστηρίζει την ανάπτυξη (Whitman et al., 2006).

Η τελευταία κατηγορία είναι η οξικοτροφική μεθανογένεση (Aceticlastic methanogenesis), όπου το οξικό έχει το ρόλο του δότη ηλεκτρονίων. Στην αντίδραση 2.13 ο άνθρακας της μεθυλομάδας στο μόριο του οξικού οξέος ανάγεται σε μεθάνιο με τη χρήση των ηλεκτρονίων που λήφθηκαν κατά την οξείδωση του άνθρακα του καρβοξυλίου (Hedderich & Whitman, 2013). Το μονοπάτι, όμως, αυτό περιορίζεται στα γένη *Methanosarcina* και *Methanosaeta* που χρησιμοποιούν το οξικό οξύ στο μεταβολικό τους μονοπάτι για την ανάπτυξή τους (Welte & Deppenmeier, 2014; Ferry J., 1997). Το γένος *Methanosarcina* έχει την ικανότητα να αξιοποιεί ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, π.χ. οξικό οξύ, μεθανόλη, υδρογόνο κ.ά., ενώ το γένος *Methanosaeta* μπορεί να χρησιμοποιήσει μόνο το οξικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.12 (Welte & Deppenmeier, 2014).

Η οξικοτροφική μεθανογένεση είναι πολύ σημαντική για την αναγωγική αποχλωρίωση, γιατί οξειδώνεται το οξικό οξύ και το υδρογόνο μπορεί να αξιοποιηθεί από άλλες αναγωγικές διεργασίες, όπως παρατήρησαν στα πειράματά τους οι Heimann et al., (2006). Εντούτοις, η διεργασία αναστέλλεται από την παρουσία του TCE ή των θυγατρικών προϊόντων του σε μία συγκέντρωση περίπου 0.5 mM, (Siggins et al., 2011). Επίσης, οι οξικοτροφικοί αναπαράγονται πιο αργά από τους υδρογονοτροφικούς μεθανογόνους και επηρεάζονται αρνητικά από τη συσσώρευση του υδρογόνου. Συνεπώς, η διατήρηση μίας χαμηλής μερικής πίεσης υδρογόνου σε ένα αναερόβιο σύστημα ευνοεί τους οξικοτροφικούς μικροοργανισμούς (Gerardi, 2003).

Πίνακας 2.12 Μεθανογόνα αρχαία και τα χαρακτηριστικά τους (Πηγή: Παραλλαγή από Hedderich & Whitman, 2013).

Ομοταξία	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Χαρακτηριστικά
Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i>	Μικροοργανισμός ραβδοειδούς μορφής που αναπτύσσεται στους 37-45°C με υδρογόνο (και άλλα υποστρώματα). ¹
			<i>Methanothermobacter</i>	Θερμόφιλος μικροοργανισμός (55-65°C) ραβδοειδούς μορφής και χρησιμοποιεί υδρογόνο (και μυρμηκικό οξύ). ¹
			<i>Methanobrevibacter</i>	Μεσόφιλος μικροοργανισμός ραβδοειδούς μορφής και χρησιμοποιεί υδρογόνο (και μυρμηκικό οξύ). ¹
			<i>Methanosphaera</i>	Μεσόφιλος με κοκκοειδές σχήμα που χρησιμοποιεί το υδρογόνο και τη μεθανόλη ως πηγή ενέργειας.
			<i>Methanothermus</i>	Υδρογονοτροφικός με σχήμα ράβδου που αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες (80-88°C).
Methanococci	Methanococcales	Methanococcaceae	<i>Methanococcus</i>	Μεσόφιλος μικροοργανισμός (35-40°C) σε σχήμα κόκκου που χρησιμοποιεί υδρογόνο και μυρμηκικό οξύ.
			<i>Methanothermococcus</i>	Κοκκοειδής μικροοργανισμός που αναπτύσσεται στους 60-65°C με τη χρήση υδρογόνου και μυρμηκικού οξέος.
		Methanocaldococcaceae	<i>Methanocaldococcus</i>	Υδρογονοτροφικός, που αναπτύσσεται στους 80-85°C με σχήμα κόκκου
			<i>Methanotorris</i>	Υδρογονοτροφικός μικροοργανισμός κοκκοειδούς μορφής, που αναπτύσσεται στους 88°C.
Methanomicrobia	Methanomicrobiales	Methanomicrobiaceae	<i>Methanomicrobium</i>	Ραβδοειδής μεσόφιλος μικροοργανισμός (40°C) που χρησιμοποιεί υδρογόνο και μυρμηκικό οξύ.
			<i>Methanoculleus</i>	Αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασιών 20-55°C με υδρογόνο, μυρμηκικό οξύ (και αλκοόλες) σε κοκκοειδές σχήμα. ¹
			<i>Methanofollis</i>	Μεσόφιλος (37-40°C) που χρησιμοποιεί υδρογόνο, μυρμηκικό οξύ (και αλκοόλες) σε σχήμα κόκκου. ¹
			<i>Methanogenium</i>	Αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασιών 15-57°C με υδρογόνο, μυρμηκικό οξύ (και αλκοόλες) σε σχήμα κόκκου. ¹
			<i>Methanolacinia</i>	Μικροοργανισμός κοκκοειδούς μορφής, που αναπτύσσεται στους 40°C με υδρογόνο (και διάφορες αλκοόλες). ¹
			<i>Methanoplanus</i>	Μεσόφιλος μικροοργανισμός (32-40°C) που χρησιμοποιεί υδρογόνο, μυρμηκικό οξύ (και αλκοόλες). ¹

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Ομοταξία	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Χαρακτηριστικά
		Methanospirillaceae	<i>Methanospirillum</i>	Σε Σχήμα σπειριλλίου που αναπτύσσεται στους 30-37°C με τη χρήση υδρογόνου, μυρμηκικού οξέος (και αλκοολών). ¹
		Methanocorpusculaceae	<i>Methanocorpusculum</i>	Μικροί κόκκοι, που αναπτύσσονται στους 30-40°C με υδρογόνο, (μυρμηκικό οξύ και αλκοόλες). ¹
		N/A ²	<i>Methanocalculus</i>	Μικροοργανισμός με μορφή κόκκου, που αναπτύσσεται στους 30-40°C με υδρογόνο και μυρμηκικό οξύ.
			<i>Methanosarcina</i>	Έχει τη μορφή κόκκου, αναπτύσσεται στους 35-60°C και απαιτεί πηγή μεθανόλης, μεθυλαμινών, (υδρογόνου, οξικού οξέος και διμεθυλοσουλφιδίου) ¹
			<i>Methanococcoides</i>	Κοκκοειδούς Σχήματος που αναπτύσσεται στους 23-35°C και χρησιμοποιεί μεθανόλη και μεθυλαμίνες.
			<i>Methanohalophilus</i>	Μεσόφιλος μικροοργανισμός (35-40°C) σε Σχήμα κόκκου που χρησιμοποιεί τη μεθανόλη και μεθυλαμίνες.
			<i>Methanohalobium</i>	Αναπτύσσεται στους 40-55°C με τη χρήση μεθανόλης και μεθυλαμινών.
	Methanosarcinales	Methanosarcinaceae	<i>Methanolobus</i>	Ακανόνιστοι κόκκοι που αναπτύσσονται στους 37°C με μεθανόλη, μεθυλαμίνες (και διμεθυλοσουλφίδιο). ¹
			<i>Methanomethylovorans</i>	Μεσόφιλος μικροοργανισμός (34-37°C) σε κόκκους που χρησιμοποιεί μεθανόλη, μεθυλαμίνες, μεθανοθειόλη, κ.ά.
			<i>Methanomicrococcus</i>	Αναπτύσσεται στους 39°C με τη χρήση μεθανόλης, μεθυλαμινών και υδρογόνου.
			<i>Methanosalsum</i>	Ακανόνιστοι κόκκοι που αναπτύσσονται στους 35-45°C με μεθανόλη, μεθυλαμίνες και διμεθυλοσουλφίδιο.
			<i>Methanosaeta</i>	Οξικοτροφικός μικροοργανισμός, ραβδοειδούς μορφής που αναπτύσσεται στους 35-60°C.
Methanopyri	Methanopyrales	Methanopyraceae	<i>Methanopyrus</i>	Υδρογονοτροφικός ραβδοειδής μικροοργανισμός που αναπτύσσεται στους 98°C.

¹ Τα υπόστρωμα στην παρένθεση δεν χρησιμοποιούνται από όλα τα είδη. Οι αλκοόλες είναι η αιθανόλη, η ισοπροπανόλη, η ισοβουτανόλη και η πεντανόλη.

² N/A = Not available (Δεν έχει ακόμα αναγνωρισθεί)

Μικροοργανισμοί θεικοαναγωγής

Η θεικοαναγωγή είναι η διαδικασία κατά την οποία αναερόβιοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ανόργανα θειικά ιόντα ως δέκτη ηλεκτρονίων για την οξειδωση υποστρωμάτων με αποτέλεσμα την παραγωγή σουλφιδίων (H_2S) (Muyzer & Stams, 2008; Barton & Fauque, 2009), όπως φαίνεται και στην αντίδραση 2.14. Άλλωστε, η παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων σουλφιδίων συχνά θεωρείται ότι καταδεικνύει τη δραστηριότητα και την παρουσία της συγκεκριμένης ομάδας μικροοργανισμών στο φυσικό περιβάλλον (Rabus et al., 2013).



Η αντίδραση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί από βακτήρια, αλλά και από αρχαία, αν και έχει επικρατήσει ο όρος “SRB” (Sulfate Reducing Bacteria), εξαιτίας της πλειονότητας των βακτηρίων που επιτυγχάνουν τη διεργασία έναντι του μικρού πλήθους των αρχαίων (Barton & Fauque, 2009). Επιπλέον, τα είδη των αρχαίων απαντώνται σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το είδος *Archaeoglobus veneficus*, παραδείγματος χάριν, αναπτύσσεται σε υψηλές θερμοκρασίες (~85°C), ενώ ανάγει μόνο τα θειώδη ιόντα (SO_3^{2-} ; sulfite) (Rabus et al., 2013). Γενικά όμως οι αποθειωτές ευδοκίμουν σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών και έχουν βρεθεί σε πολλά οικοσυστήματα υπό την παρουσία θειικών ιόντων (Barton & Fauque, 2009; Muyzer & Stams, 2008).

Μολονότι οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν ονομαστεί από την ικανότητά τους να χρησιμοποιούν τα θειικά ιόντα για την ανάπτυξή τους, μπορούν να ανάγουν κι άλλες ουσίες ή να προκαλέσουν τη ζύμωση οργανικών υποστρωμάτων σε περίπτωση απουσίας ανόργανων δεκτών ηλεκτρονίων (Muyzer & Stams, 2008). Χαρακτηριστικά, η ικανότητα των θεικοαναγωγικών μικροοργανισμών να αξιοποιούν υδρογονάνθρακες σε καθарές και μικτές καλλιέργειες έχει αποτελέσει σημαντική αιτία για τη χρήση αυτών των μικροοργανισμών στην βιοαποκατάσταση περιοχών ρυπασμένων με BTEX (Βενζόλιο, Τολουόλιο, Αιθυλοβενζόλιο και Ξυλόλιο) (Barton & Fauque, 2009). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι στελέχη του γένους *Desulfitobacterium* μπορούν να ανάγουν τα χλωριωμένα αιθέρια (Drzyzga et al., 2001). Μάλιστα, το συγκεκριμένο γένος κυριάρχησε σε καλλιέργειες αναγωγής του TCE έναντι των γνωστών αποχλωριωτών *Dehalococcoides* spp. (Aulenta et al., 2008a). Ως αποδέκτες ηλεκτρονίων για τους αποθειωτές μπορεί να χρησιμοποιηθούν οι εξής ουσίες: θειοθειικά ($S_2O_3^{2-}$), θειώδη (SO_3^{2-}), θείο (S^0), νιτρικά (NO_3^-), νιτρώδη (NO_2^-), οξυγόνο (O_2), σίδηρος (Fe^{3+}), ουράνιο (U^{6+}), τεχνητίο (Tc^{7+}), σελήνιο (Se^{6+}), χρώμιο (Cr^{6+}), αρσενικό (As^{6+}), φουμαρικό οξύ κ.ά. (Muyzer & Stams, 2008).

Η ροή ηλεκτρονίων από το δότη στο θείο συνδέεται με την παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπνοής και σ' αυτήν εμπλέκεται ένα μεγάλο πλήθος μεταφορέων ηλεκτρονίων. Τα βακτήρια αποθείωσης χρησιμοποιούν ως δότες ηλεκτρονίων μια μεγάλη ποικιλία οργανικών υλικών, χαμηλού μοριακού βάρους και σχετικά απλά στη δομή τους (Rabus et al., 2013). Περισσότερες από 100 ενώσεις, όπως σάκχαρα

(φρουκτόζη, γλυκόζη κ.λπ.), αμινοξέα (γλυκίνη, αλανίνη κ.ά.), καρβοξυλικά οξέα (οξικό, προπιονικό, βουρυτικό οξύ κ.λπ.), αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη κ.ά.) και αρωματικές ουσίες (βενζοϊκό οξύ, φαινόλες κ.λπ.) είναι δυνητικοί δότες ηλεκτρονίων για τους αποθειωτές (Barton et al., 2008). Επιπλέον, ανάλογα με τη σύνθεση της βιοκοινότητας έχουν την ικανότητα να επιλέγουν άλλο μεταβολικό μονοπάτι. Για παράδειγμα, το είδος *Syntrophobacter woolinii* σταματά την αναγωγή των θειικών και αναπτύσσεται με την παραγωγή οξικού οξέος, υπό την παρουσία μικροοργανισμού αναγωγής θειικών ιόντων που οξειδώνει υδρογόνο.

Από τα παραπάνω φαίνεται, λοιπόν, ότι η ύπαρξη μεγάλου πλήθους θειικοαναγωγικών μικροοργανισμών δεν αντανάκλα απαραίτητα την αναγωγή των θειικών ιόντων, αλλά μπορεί να παρουσιάζεται λόγω άλλων βιολογικών διεργασιών (Muyzer & Stams, 2008).

Τα βακτήρια αναγωγής θειικών ιόντων διαφέρουν μορφολογικά, εφόσον μπορεί να έχουν σχήμα κόκκου, ράβδου, δονακίου ή νηματοειδούς, και μπορούν να δημιουργούν συσσωματώματα. Επίσης, αν και η αναγωγή των θειικών ιόντων πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες, ορισμένα είδη είναι ανεκτικά στην παρουσία οξυγόνου (Rabus et al., 2013).

Επομένως, οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν μία μεγάλη φυλογενετική και μεταβολική ποικιλομορφία, ενώ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βιοχημεία του οικοσυστήματος που ζουν (Barton & Fauque, 2009). Τα θειικοαναγωγικά βακτήρια ανήκουν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες, τα Deltaproteobacteria με περισσότερα από 25 γένη, τα Gram-θετικά Clostridia με δύο γένη και δύο θερμόφιλα γένη *Thermodesulfobacterium* και *Thermodesulfovibrio* που ανήκουν στις ομοταξίες Thermodesulfobacteria και Nitrospiria, αντιστοίχως (Rabus et al., 2013). Πιο αναλυτικά, οι θειικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί με τα χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.13.

Πίνακας 2.13 Θεικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί και τα χαρακτηριστικά τους (Πηγή: Παραλλαγή από Rabus et al., 2013).

Ομοταξία	Κλάση	Οικογένεια	Γένος	Χαρακτηριστικά
Βακτήρια				
Clostridia	Clostridiales	Peptococcaceae	Desulfosporosinus	Με μορφή ράβδου, χρησιμοποιεί το γαλακτικό οξύ, το υδρογόνο, την αιθανόλη, κ.ά.
			Desulfotomaculum	Ραβδοειδής μικροοργανισμός που προκαλεί την οξείδωση της μεθανόλης, αιθανόλης, κ.ά.
Deltaproteobacteria	Desulfobacterales	Desulfarculaceae	Desulfoarculus	Σε Σχήμα δονάκι, οξειδώνει πλήρως τα πτητικά λιπαρά οξέα.
			Desulfobacter	Σε Σχήμα ελλειψοειδούς ή δονάκι, οξειδώνει πλήρως το οξικό οξύ.
		Desulfobacteraceae	Desulfobacterium	Σε ελλειψοειδές Σχήμα, μπορεί να χρησιμοποιήσει οξέα, αλκοόλες και άλλες οργανικές ουσίες ως δότες.
			Desulfobacula	Ραβδοειδούς μορφής, οξειδώνει πλήρως το οξικό οξύ, την αιθανόλη, το μηλικό οξύ, το ηλεκτρικό οξύ, κ.ά.
			Desulfocella	Με Σχήμα δονάκι προκαλεί την οξείδωση πτητικών λιπαρών οξέων όπως το βουτυρικό οξύ, κ.ά.
			Desulfococcus	Με μορφή κόκκων, οξειδώνει πλήρως προπιονικό οξύ, αιθανόλη, γαλακτικό οξύ, ακετόνη, κ.ά.
			Desulfofaba	Ψυχρόφιλος μικροοργανισμός ραβδοειδούς μορφής οξειδώνει την αιθανόλη και διάφορα οξέα.
			Desulfofrigus	Ψυχρόφιλος με μορφή ράβδου, χρησιμοποιεί την αιθανόλη, το οξικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, κ.ά.
		Desulfobacteraceae	Desulfonema	Νηματοειδής μικροοργανισμός που οξειδώνει πλήρως το οξικό οξύ και άλλα πτητικά λιπαρά οξέα.
			Desulfosarcina	Ελλειψοειδής μικροοργανισμός, προκαλεί την οξείδωση του υδρογόνου, του προπιονικού οξέος, της αιθανόλης, κ.ά.
			Desulfospira	Με Σχήμα ράβδου, οξειδώνει το υδρογόνο και διάφορα άλλα οξέα.
		Desulfobulbaceae	Desulfobulbus	Με ελλειψοειδή μορφή, προκαλεί την οξείδωση του υδρογόνου, του προπιονικού οξέος, της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος.
			Desulfobulbus	Σε Σχήμα δονάκι, χρησιμοποιεί ως δότη τα πτητικά λιπαρά οξέα και το γαλακτικό οξύ.
			Desulfocapsa	Με μορφή ράβδου, χρησιμοποιεί την αιθανόλη για δότη ηλεκτρονίων.
Desulfofustis	Σε Σχήμα ράβδου, οξειδώνει το υδρογόνο, οξέα, αλκοόλες και διάφορες άλλες οργανικές ενώσεις.			

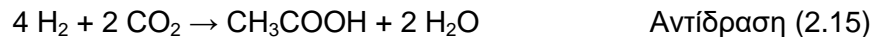
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Ομοταξία	Κλάση	Οικογένεια	Γένος	Χαρακτηριστικά
			Desulfotalea	Ψυχρόφιλος σε Σχήμα ράβδου μικροοργανισμός χρησιμοποιεί το υδρογόνο, την αιθανόλη, το μηλικό οξύ, κ.ά.
			Desulforhopalus	Μικροοργανισμός με ελλειψοειδές Σχήμα αναπτύσσεται στους 18-19°C και οξειδώνει το υδρογόνο, το προπιονικό οξύ, κ.ά.
	Desulfovibrionales	Desulfohalobiaceae	Desulfonatronovibrio	Μικροοργανισμός σε Σχήμα δονάκι που χρησιμοποιεί το υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων.
		Desulfomicrobiaceae	Desulfomicrobium	Ραβδοειδής ή ελλειψοειδής μικροοργανισμός που οξειδώνει το υδρογόνο, το γαλακτικό και άλλα οξέα.
			Desulfohalobium	Ραβδοειδής μικροοργανισμός οξειδώνει το υδρογόνο, την αιθανόλη και το γαλακτικό οξύ.
		Desulfovibrionaceae	Desulfonatronum	Σε Σχήμα δονάκι, προκαλεί την οξείδωση του υδρογόνου και της αιθανόλης.
			Desulfovibrio	Σε Σχήμα δονάκι, χρησιμοποιεί ως δότες το υδρογόνο, την αιθανόλη, το γαλακτικό οξύ, κ.ά.
	Desulfuromonadales	Desulfuromonadaceae	Desulfuromusa	Ραβδοειδούς μορφής μικροοργανισμός που χρησιμοποιεί οξέα, όπως το οξικό, το ηλεκτρικό, κ.ά.
		Syntrophaceae	Desulfomonile	Σε Σχήμα ράβδου, χρησιμοποιεί το υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων, αλλά και άλλες οργανικές ουσίες.
	Syntrophobacterales	Syntrophobacteraceae	Desulfacinum	Θερμόφιλος, ελλειψοειδούς μορφής, οξειδώνει το υδρογόνο, το οξικό οξύ, την αιθανόλη, κ.ά.
			Desulforhabdus	Ραβδοειδής μικροοργανισμός που προκαλεί την οξείδωση του υδρογόνου, του οξικού οξέος, της αιθανόλης, κ.ά.
			Thermosulforhabdus	Θερμόφιλος ραβδοειδής μικροοργανισμός χρησιμοποιεί την αιθανόλη και οξέα όπως το οξικό, το γαλακτικό, το ηλεκτρικό κ.ά.
			Syntrophaceae	Desulfobacca
Nitrospiria	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Thermodesulfovibrio	Θερμόφιλος μικροοργανισμός σε Σχήμα δονάκι, που οξειδώνει το υδρογόνο και το γαλακτικό οξύ.
Thermodesulfobacteria	Thermodesulfobacteriales	Thermodesulfobacteriaceae	Thermodesulfobacterium	Μικροοργανισμός σε Σχήμα ράβδου αναπτύσσεται στους 65-70°C και οξειδώνει το υδρογόνο και το γαλακτικό οξύ.
Αρχαία				
Archaeoglobi	Archaeoglobales	Archaeoglobaceae	Archaeoglobus	Κοκκοειδής μικροοργανισμός που αναπτύσσεται στους 82-83°C με υδρογόνο, γαλακτικό οξύ, γλυκόζη, κ.ά.

Μικροοργανισμοί οξικογένεσης

Ως οξικογόνα βακτήρια (Acetogens) χαρακτηρίζονται οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν το μονοπάτι του ακετυλο-συνένζυμου Α (Acetyl-CoA) για (α) την αναγωγική παρασκευή της ακετυλο-ομάδας (CH₃CO-) από το διοξείδιο του άνθρακα, (β) την παραγωγή ενέργειας και (γ) την πρόσληψη και την ενσωμάτωση του διοξειδίου του άνθρακα στη σύνθεση νέων κυττάρων (Drake et al., 2008). Ο κύριος ρόλος του συγκεκριμένου μονοπατιού είναι η μεταφορά ατόμων άνθρακα στον κύκλο του Krebs (Karlson et al., 1998; Διαμαντίδης, 1994). Έτσι, το ακετυλο-συνένζυμο Α έχει σπουδαία σημασία στη λειτουργία του κυττάρου, εφόσον αποτελεί ένα ενδιάμεσο προϊόν για το μεταβολισμό των σακχάρων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων (Διαμαντίδης, 1994).

Τα οξικογόνα βακτήρια, λοιπόν, μπορούν να παράγουν οξικό οξύ είτε από το υδρογόνο και το διοξείδιο του άνθρακα (Αντίδραση 2.15) είτε από τη ζύμωση απλών υδρογονανθράκων, όπως η μεθανόλη, η γλυκόζη (Αντίδραση 2.16) μέσω της σύνθεσης του ακετυλο-συνένζυμου Α (Balch et al., 1977; Kotsyurbenko et al., 1995). Με αυτόν τον τρόπο οι μικροοργανισμοί αποκτούν την απαιτούμενη ενέργεια για την ανάπτυξή τους αυτοτροφικά ή ετεροτροφικά, σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις (Kotsyurbenko et al., 1995; Zinder S., 1994):



Ωστόσο, οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν το μονοπάτι του ακετυλο-συνένζυμου Α ή αλλιώς Wood-Ljungdahl μονοπάτι έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν διάφορα τελικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένου του οξικού οξέος, ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (Drake et al., 2013; Ragsdale & Pierce, 2008). Επομένως, απαραίτητη προϋπόθεση για την επίτευξη της οξικογένεσης είναι η χρήση του μονοπατιού και όχι το τελικό προϊόν (Drake et al., 2013). Επιπλέον, η ομοοξικογένεση αναφέρεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν μόνο οξικό οξύ ως τελικό προϊόν της αναγωγής (Ragsdale & Pierce, 2008). Γενικά, ο όρος «οξικογένεση» χρησιμοποιείται εσφαλμένα για την παραγωγή του οξικού οξέος από την οξειδωση των οργανικών ουσιών, όπως το βουτυρικό οξύ. Όμως, δεν πληρούνται οι προϋποθέσεις για τον χαρακτηρισμό αυτό, λόγω χάριν κατά την οξειδωση του βουτυρικού οξέος δεν πραγματοποιείται η αναγωγική παραγωγή του ακετυλο-συνένζυμου Α (Drake et al., 2013). Επομένως, η συγκεκριμένη διεργασία θα πρέπει να λέγεται «οξειδωση οργανικών οξέων».

Οι οξικογόνοι μικροοργανισμοί ανήκουν στην επικράτεια των βακτηρίων, ενώ έχουν αναγνωρισθεί περίπου 22 διαφορετικά γένη τα οποία διαφέρουν στη μορφολογία, τη κυτταρολογία και τη φυσιολογία τους (Drake et al., 2013). Από αυτά τα 22 διαφορετικά γένη το *Acetobacterium* και το *Clostridium* φέρουν τα πιο γνωστά οξικογόνα είδη (Drake et al., 2008). Επιπλέον, το γένος *Sporomusa* ανιχνεύθηκε σε

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

καλλιέργειες που ανήγαγαν το τετραχλωροαιθέριο (PCE), ενώ το υδρογόνο χρησιμοποιούταν ως δότης ηλεκτρονίων (Yang et al., 2005). Στον Πίνακα 2.14 παρουσιάζονται τα οξικογόνα βακτήρια με τα χαρακτηριστικά τους.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 2.14 Οξικογόνα βακτήρια και τα χαρακτηριστικά τους (Πηγή: Παραλλαγή από Drake et al., 2013).

Ομοταξία	Κλάση	Οικογένεια	Γένος	Χαρακτηριστικά
Clostridia	Clostridiales	Eubacteriaceae	<i>Eubacterium</i>	Το <i>E. aggregans</i> και το <i>E. limosum</i> είναι μεσόφιλα με Σχήμα ράβδου.
		Clostridiaceae	<i>Bryantella</i>	Το είδος <i>B. formatexigens</i> είναι μεσόφιλος με Σχήμα ράβδου.
			<i>Caloramator</i>	Θερμόφιλο είδος <i>C. fervidus</i> με μορφή ράβδου.
			<i>Natronincola</i>	Ραβδοειδούς μορφής μεσόφιλο είδος <i>N. histidinovorans</i> .
			<i>Oxobacter</i>	Το είδος <i>O. pfennigii</i> , μεσόφιλο σε Σχήμα ράβδου.
		Eubacteriaceae	<i>Acetobacterium</i>	Πολλά μεσόφιλα και ψυχρόφιλα είδη του γένους <i>Acetobacterium</i> με κοκκοειδή και κυρίως ραβδοειδή μορφή.
		Halobacteroidaceae	<i>Natroniella</i>	Μεσόφιλο είδος <i>N. acetigena</i> ραβδοειδούς μορφής.
		Lachnospiraceae	<i>Syntrophococcus</i>	Το μεσόφιλο <i>S. sucromutans</i> με μορφή κόκκων.
		N/A	<i>Acetoanaerobium</i>	Μεσόφιλα είδη του γένους <i>Acetoanaerobium</i> σε Σχήμα ράβδου.
		Peptostreptococcaceae	<i>Clostridium</i>	Πολλά είδη του γένους <i>Clostridium</i> , μεσόφιλα με ραβδοειδή μορφή.
		Ruminococcaceae	<i>Ruminococcus</i>	Είδη του γένους <i>Ruminococcus</i> που είναι μεσόφιλα και έχουν κοκκοειδή μορφή.
		Veillonellaceae	<i>Acetonema</i>	Το είδος <i>A. longum</i> με Σχήμα ράβδου, μεσόφιλο.
		Halanaerobiales	Halobacteroidaceae	<i>Acetohalobium</i>
Thermoanaerobacterales	Thermoanaerobacteraceae	<i>Thermoanaerobacter</i>	Το ραβδοειδούς μορφής θερμόφιλο είδος <i>T. kivui</i> .	
		<i>Moorella</i>	Θερμόφιλα είδη του γένους <i>Moorella</i> με Σχήμα ράβδου.	
		<i>Thermacetogenium</i>	Το είδος <i>T. phaeum</i> που είναι θερμόφιλο και ραβδοειδούς μορφή.	
Holophagae	Holophagales	Holophagaceae	<i>Holophaga</i>	Το μεσόφιλο είδος <i>H. foetida</i> , ραβδοειδούς μορφής.
Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	<i>Sporomusa</i>	Μεσόφιλα είδη του γένους <i>Sporomusa</i> με ραβδοειδές Σχήμα.
Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	<i>Treponema</i>	Μεσόφιλο είδος <i>T. primitia</i> σε Σχήμα σπείρας.

2.3.4.3. Σύσταση μικτών καλλιεργείων αποχλωρίωσης

Από τα προηγούμενα φαίνεται ότι μια κοινότητα με αποχλωριωτική ικανότητα έχει μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών που τελούν διάφορες διεργασίες. Πέραν των αποχλωριωτών, η υπόλοιπη κοινότητα είναι τυπικά μικροοργανισμοί ζύμωσης, οξικογόνοι και μεθανογόνοι (Hug et al., 2012). Στον Πίνακα 2.15 παρουσιάζεται η σύσταση διάφορων μικτών καλλιεργείων και δειγμάτων από ρυπασμένες περιοχές με χλωριωμένα αιθέρια, όπου φαίνεται ότι πολύ συχνά ανιχνεύονται ορισμένες ομάδες μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, είδη του βασιλείου *Bacteroides* έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλές μικτές καλλιέργειες, όπως η KB1 και η ANAS (Futagami et al., 2011). Τα είδη αυτά θεωρείται ότι πραγματοποιούν τη ζύμωση των διάφορων υδρογονανθράκων σε λιπαρά οξέα μικρότερου μοριακού βάρους (Dong et al., 2011). Επίσης, τα *Eubacterium* και *Clostridium* spp. συνήθως συνδέονται με τη ζύμωση οργανικών ουσιών (Freeborn et al., 2005), όμως τα τελευταία μπορεί να θεωρηθεί ότι συμμετέχουν και στην αναγωγική αποχλωρίωση (Dong et al., 2011).

Συνοπτικά, παρατηρείται ότι στις βιοκοινότητες κυριαρχούν είτε είδη του γένους *Dehalococcoides* είτε μικροοργανισμοί που συμβάλλουν στη ζύμωση ουσιών και την παραγωγή ηλεκτρονίων. Πολύ συχνά σε καλλιέργειες αποχλωρίωσης συναντώνται: α) είδη που προκαλούν τη μερική μετατροπή των χλωριωμένων, όπως *Geobacter* spp. και *Sulfurospirillum* spp., β) οι τάξεις μεθανογόνων *Methanosarcinales* και *Methanomicrobiales*, γ) οι οξικογόνες ομάδες *Acetobacterium* spp., *Spirochaetes* και *Sporomusa* spp., δ) οι μικροοργανισμοί ζύμωσης *Synergistetes* και *Bacteroidetes*, και ε) η συνομοταξία *Proteobacteria*, ιδιαίτερα τα *Gamma* και τα *Deltaproteobacteria*, που περιέχουν μικροοργανισμούς αναγωγής νιτρικών ιόντων, θειικών ιόντων και τρισθενούς σιδήρου.

Εκτός της παραγωγής συμπαραγόντων, απαραίτητη είναι και η πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπου στην περίπτωση της πλειονότητας των αποχλωριωτών χρησιμοποιείται το οξικό οξύ. Η παραγωγή του πραγματοποιείται μέσω της διάσπασης πολύπλοκων οργανικών ουσιών ή της αντίδρασης διοξειδίου του άνθρακα και υδρογόνου, δηλαδή των διεργασιών ζύμωσης ή οξικογένεσης, αντίστοιχα, από διάφορους μικροοργανισμούς που συνυπάρχουν με τους αποχλωριωτές, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην κατανάλωση των χλωριωμένων αιθέρια (Wen et al., 2015). Επομένως, τα αποτελέσματα άλλων ερευνών υποδεικνύουν την ύπαρξη μιας πολύπλοκης βιοκοινότητας που, ενδεχομένως, θα μπορούσε να συμμετέχει άμεσα ή έμμεσα στην αναγωγική αποχλωρίωση (Nijenhuis et al., 2007). Στον Πίνακα 2.16 παρουσιάζονται οι διάφορες δράσεις των μηαποχλωριωτικών ομάδων που είτε υποβοηθούν ή παρεμποδίζουν τους μικροοργανισμούς οργανοαλογονικής αναπνοής.

Η σύνθεση αυτής της βιοκοινότητας επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, μιας και οι μικροοργανισμοί μπορεί είτε να ωφεληθούν είτε να αναχαιτιστούν από την παρουσία των χλωριωμένων αιθέρια (Nemir et al., 2010), ενώ αλλαγές στη σύστασή της παρατηρήθηκαν με την αλλαγή του χρόνου παραμονής στερεών,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

εφόσον το επικρατέστερο είδος ήταν το *Desulfitobacterium* sp. και το *Dehalococcoides* sp., όταν ο μέσος χρόνος ήταν 20-25 και 52 ημέρες, αντιστοίχως (Aulenta et al., 2008a). Αξιοσημείωτο είναι ότι η μεταβολή στη σύνθεση της βιοκοινότητας υπό διάφορες συνθήκες δεν οδηγεί απαραίτητα στην τροποποίηση της λειτουργικότητας ως προς την αναγωγική αποχλωρίωση, διότι, εάν οι συνθήκες προκαλέσουν την αναχαίτιση ενός είδους, ένα άλλο είδος αναπτύσσεται στη θέση του και αναλαμβάνει το ρόλο του για τη διατήρηση των διεργασιών που επιτελούνται από τη βιοκοινότητα (Duhamel & Edwards, 2006).

Πίνακας 2.15 Σύσταση βιοκοινοτήτων με ικανότητα αποχλωρίωσης.

Προέλευση	Χλωροαιθένια	Άλλοι δέκτες ηλεκτρονίων	Δότης ηλεκτρονίων	Ομάδες μικροοργανισμών ¹	Αναφορά
Μητρικές καλλιέργειες (DP)	PCE (100μM)		Υδρογόνο, Μυρμηκικό οξύ	Firmicutes, Bacteroidetes, Spirochaetes, Proteobacteria (delta- & epsilon-)	Dong et al., 2011
Μητρικές καλλιέργειες (KB1, Donall & ANAS)	TCE (278-858μM), PCE (110μM)	CH ₄ , SO ₄ , Οξικογένεση	Μεθανόλη (4.3mM), Βουτυρικό οξύ (0.44mM), Γαλακτικό οξύ (25mM)	Firmicutes , Deltaproteobacteria, Euryarchaeota, Bacteroidetes, Spirochaetes, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Chloroflexi, Betaproteobacteria, Actinobacteria, Synergistetes, Cyanobacteria, Thermotogae, Acidobacteria	Hug et al., 2012
Μητρικές καλλιέργειες (KB1)	PCE, TCE, cDCE, VC (240-320μM)	CH ₄	Υδρογόνο (980μM), Μεθανόλη	Dehalococcoides spp., <i>Geobacter</i> spp., <i>Sulfospirillum</i> spp., <i>Sporomusa</i> spp., Spirochaetes, <i>Acetobacterium</i> spp., <i>Methanomethylovorans</i> spp., <i>Methanosarcina</i> spp., Methanomicrobiales, <i>Methanosaeta</i> spp., Bacteroidetes, <i>Syntrophus</i> spp., <i>Syntrophobacter</i> spp.	Duhamel & Edwards, 2006
Μητρικές καλλιέργειες (DehaloR ²)	TCE (320μM)		Γαλακτικό οξύ (5mM) & Μεθανόλη (11.1mM)	Firmicutes , Chloroflexi, Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Synergistetes, Verrucomicrobia	Ziv-El et al., 2011
Μητρικές καλλιέργειες με υλικό από ΕΕΛ	TCE (0.5mM)	SO ₄ , CH ₄	Βουτυρικό οξύ (0.3mM)	<i>Dehalococcoides</i> spp., Deltaproteobacteria, Desulfobacteraceae & Syntrophobacteraceae, <i>Sulfospirillum</i> spp., Archaea	Panagiotakis et al., 2014
Μικρόκοσμοι με μητρική καλλιέργεια (ANAS)	TCE (110μM)	CH ₄	Μεθανόλη (10mM), Προπιονικό οξύ (10mM), Βουτυρικό οξύ (10mM) & Γαλακτικό οξύ (10mM)	<i>Dehalococcoides</i> spp., <i>Desulfovibrio</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Eubacterium</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.	Freeborn et al., 2005
Μικρόκοσμοι με μητρική καλλιέργεια (ANAS)	TCE (200-400μM)		Γαλακτικό οξύ (10-20mM)	<i>Dehalococcoides</i> spp., Clostridia, Proteobacteria (Delta-, Gamma-, Beta), <i>Spirochaeta</i> spp., Bacteroidetes	Richardson et al., 2002
Μικρόκοσμοι με μητρική καλλιέργεια (YCQ1)	TCE (300μM)	CH ₄ , Οξικογένεση	Γαλακτικό οξύ (1.5mM), Μεθανόλη (3mM), Οξικό οξύ (2.25mM), Υδρογόνο (9mM)	<i>Desulfovibrio</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Dehalococcoides</i> spp., <i>Geobacter</i> spp., <i>Anaerovorax</i> spp., Bacteroidetes, <i>Dehalogenimonas</i> spp., <i>Petrimonas</i> spp., <i>Proteiniclasticum</i> spp., <i>Sedimentibacter</i> spp., Spirochaetaceae, <i>Youngiibacter</i> spp., <i>Methanobacterium</i> spp.	Wen et al., 2015
Μικρόκοσμοι με μητρική καλλιέργεια (YH)	TCE (300μM)	CH ₄	Μίγμα πυροσταφυλικού οξέος, εκχυλίσματος ζύμης, οξικού οξέος, υδρογόνου	Chloroflexi, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Chlorobi, Spirochaetae, Synergistetes	Wen et al., 2017
Μικρόκοσμοι με έδαφος από θαλάσσια περιοχή	PCE	NO ₃ , SO ₄ , CH ₄	Οξικό οξύ (0.5mM)	Proteobacteria (κυρίως gamma- & delta-), Chloroflexi, Actinobacteria, Methanomicrobiales, Methanosarcinales,	Kittlmann & Friedrich, 2008
Μικρόκοσμοι με έδαφος από θαλάσσια περιοχή	PCE (0.5mM)	CH ₄		Chloroflexi , Proteobacteria (Delta-, Gamma-, Alpha-), Firmicutes	Matturo et al., 2016

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Μικρόκοσμοι με έδαφος από θαλάσσια περιοχή	TCE (450μM)		Γαλακτικό οξύ (2mM)	Proteobacteria , Firmicutes, Chloroflexi, Acidobacteria, Bacteroidetes	Ziv-El et al., 2012
Μικρόκοσμοι με έδαφος από ρυπασμένο πεδίο	TCE (50μM)	CH ₄	Οξικό οξύ (5mM), Μηλεϊνικό οξύ (5mM)	Spirochaetes, Bacteroidetes, Firmicutes, Methanomicrobiales	Futagami et al., 2011
Μικρόκοσμοι με έδαφος από ρυπασμένο πεδίο	TCE (1-10000μg/L)			Proteobacteria (Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon-), Bacteroidetes, Acidobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes	Nemir et al., 2010
Μικρόκοσμοι με έδαφος και υπόγειο νερό από πεδίο	PCE (7.8μM) & TCE (15μM)	NO ₃ (0.6mM), SO ₄ (5.1mM), 1,1,2,2-TeCA (80.2μM)	Γαλακτικό οξύ (3mM), Βουτυρικό οξύ (3mM), Υδρογόνο (3mM) & Οξικό οξύ (3mM)	Dehalococcoides spp., Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria	Aulenta et al., 2007
Μικρόκοσμοι με υπόγειο νερό από πεδίο	TCE (7.6μM)	SO ₄ , Fe ²⁺ , CH ₄	Γαλακτικό οξύ (10mM)	Clostridia (κυρίως <i>Acetobacterium</i> spp.), Sphingobacteria, Bacteroidetes, Epsilon- & Delta-proteobacteria, Spirochaetes, Mollicutes, Methanosarcinales, Methanomicrobiales	Macbeth et al., 2004
Δείγματα & μικρόκοσμοι με έδαφος από θαλάσσια περιοχή	PCE (60μM)	CH ₄	Γαλακτικό οξύ (5mM)	Proteobacteria (κυρίως gamma- & delta-, αλλά και alpha-), Bacteroidetes, Firmicutes, Chloroflexi	Lee et al., 2011
Δείγματα εδάφους από ρυπασμένη περιοχή	TCE (≈0.8mg/L)	NO ₃ (11mg/L), SO ₄ (36mg/L)		<i>Acidovorax</i> spp., Alcaligenaceae, <i>Azospira</i> spp., <i>Bordetella</i> spp., Burkholderiaceae, Comamonadaceae, <i>Dechlorosoma</i> spp., <i>Dechlorospirillum</i> spp., <i>Dehalococcoides</i> spp., <i>Desulfosporosinus</i> spp., <i>Diaphorobacter</i> spp., <i>Geobacter</i> spp., <i>Hydrogenophaga</i> spp., <i>Magnetospirillum</i> spp., <i>Mitsuaria</i> spp., <i>Nitrosospira</i> spp., <i>Rhodoferax</i> spp., <i>Variovorax</i> spp.	Lien et al., 2016
Δείγματα εδάφους από ρυπασμένο πεδίο	PCE (31mg/kg)	NO ₃ (2mg/kg), SO ₄ (93mg/kg)		Bacilli, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Acidobacteria, <i>Dehalococcoides</i> spp., <i>Dehalobacter</i> spp., <i>Desulfospirillum</i> spp., <i>Desulfosporosinus</i> spp.	Low et al., 2007
Δείγματα από ρυπασμένη περιοχή	PCE, TCE, cDCE (0.7-10mg/L)			Proteobacteria (κυρίως beta-, αλλά και gamma-, alpha-, delta-), Bacteroidetes, Actinobacteria, Firmicutes	Kotik et al., 2013
Δείγματα από ρυπασμένη περιοχή	PCE (0.05 μg/L - 16mg/L), TCE (0.5 μg/L - 410mg/L)			<i>Desulfitobacterium</i> sp., <i>Propionispora</i> sp., <i>Dehalobacterium</i> sp., <i>Desulfosporosinus</i> sp., <i>Dehalobacter</i> sp., <i>Desulforomonas</i> sp., <i>Dehalococcoides</i> sp.	Nijenhuis et al., 2007
Δείγματα υπόγειου νερού από ρυπασμένη περιοχή	cDCE (~100 μM), VC (20 μM)	SO ₄ (4.8mM), Fe ²⁺ (~0.3 mM)	Γλυκερόλη	Campylobacteriales , Flavobacteriales, Desulfobacteriales, Clostridiales, Bacteroidales, Lactobacillales, Desulfomonadales, Deferribacteriales, Desulfovibrionales, Pseudomonadales	Atashgahi et al., 2017

¹Οι ομάδες μικροοργανισμών με έντονα γράμματα είναι οι επικρατέστερες στη μικτή κοινότητα.

Πίνακας 2.16 Λειτουργικές δράσεις αποχλωριωτικής κοινότητας (Πηγή: Saiyari et al., 2018).

Ομάδα	Ταξινόμηση	Δράση για τη αποχλωριωτική κοινότητα
Ζυμωτές	Συνομοταξία Firmicutes	<ul style="list-style-type: none"> Παραγωγή συμπαραγόντων και μεθιονίνης. Κατανάλωση οξυγόνου.
	Ομοταξίες δ-Proteobacteria & ε-Proteobacteria	<ul style="list-style-type: none"> Μετατροπή του οργανικού υλικού σε υδρογόνο και οξικό οξύ.
	Οικογένεια Geobacteraceae	<ul style="list-style-type: none"> Επιτυγχάνει την αποχλωρίωση του PCE και TCE. Παραγωγή συμπαραγόντων.
Μικροοργανισμοί οργανοαλογονικής αναπνοής	Γένος <i>Dehalococcoides</i>	<ul style="list-style-type: none"> Αναγωγική αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθενίων σε αιθέριο.
	Γένος <i>Dehalobacter</i>	<ul style="list-style-type: none"> Επιτυγχάνει την αποχλωρίωση του PCE και του TCE.
	Γένος <i>Sulfospirillum</i>	<ul style="list-style-type: none"> Επιτυγχάνει την αποχλωρίωση του PCE σε cDCE. Ανταγωνισμός για τη χρήση του υδρογόνου.
	Γένος <i>Desulfitobacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> Επιτυγχάνει την αποχλωρίωση του PCE σε cDCE. Ανταγωνισμός για τη χρήση του υδρογόνου.
	Γένος <i>Desulfuromonas</i>	<ul style="list-style-type: none"> Επιτυγχάνει την αποχλωρίωση του PCE σε cDCE. Ανταγωνισμός για τη χρήση του υδρογόνου.
Θεικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί	Οικογένεια <i>Desulfobacteraceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> Επιτυγχάνει την αποχλωρίωση του PCE και του TCE. Παραγωγή υδρογόνου και συμπαραγόντων.
	Οικογένεια <i>Desulfobulbaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> Παραγωγή υδρογόνου και συμπαραγόντων.
	Οικογένεια <i>Desulfovibrionaceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> Παραγωγή συμπαραγόντων. Κατανάλωση οξυγόνου.
	Οικογένεια <i>Syntrophobacteraceae</i>	<ul style="list-style-type: none"> Παραγωγή συμπαραγόντων. Κατανάλωση οξυγόνου.
	Μεθανογόνα αρχαία	Γένος <i>Methanospirillum</i>

2.3.5. Δότες ηλεκτρονίων

Η αναγωγική αποχλωρίωση βασίζεται στην ανταλλαγή ηλεκτρονίων, όπου διάφορες ουσίες δρουν ως δότες και τα χλωριωμένα αιθένια ως τελικοί αποδέκτες (Kouznetsova et al., 2010). Τα είδη του γένους *Dehalococcoides*, που μετατρέπουν το TCE σε αιθένιο, χρησιμοποιούν ως δότη ηλεκτρονίων το υδρογόνο (Maymó-Gatell et al., 1997). Αν και μπορεί να πραγματοποιηθεί η απευθείας εισπίεση του αέριου υδρογόνου στο πεδίο (Newell et al., 1997; Dyer et al., 2006), εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητάς του και της τάσης του να αεριοποιείται, δεν χρησιμοποιείται συχνά (Wen et al., 2015). Όμως, υπό αναερόβιες συνθήκες, πολλές οργανικές ουσίες μπορούν να αποδομηθούν και να ζυμωθούν, με αποτέλεσμα την παραγωγή υδρογόνου (DiStefano et al., 1992; Fennell et al., 1997; Smatlak et al., 1996), ενώ ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών συμβάλλουν σε αυτές τις αντιδράσεις (Nandi & Sengupta, 1998). Η σύνθεση του υδρογόνου καταλύεται, κατά κύριο λόγο, από ένζυμα που μετατρέπουν τα κατιόντα σε μοριακό υδρογόνο, τις υδρογονάσες. Οι ομάδες Chloroflexi, Firmicutes, Euryarchaeota και Alphaproteobacteria παράγουν υδρογονάσες με ευρεία ποικιλομορφία, αφού μπορούν να χρησιμοποιήσουν το νικέλιο, το σίδηρο ή ένα σύμπλεγμα σιδήρου-νικελίου ως συμπαραγόνα (Hug et al., 2012).

Άλλα είδη μικροοργανισμών που προκαλούν τη μερική αποχλωρίωση του TCE και PCE χρησιμοποιούν άμεσα οργανικές ουσίες, όπως το οξικό και το μυρμηκικό οξύ, ως δότες ηλεκτρονίων (He et al., 2002; Ballapragada et al., 1997a; Löffler Löffler & Edwards, 2006). Ωστόσο, η χρήση τους εξαρτάται από τη σύνθεση της βιοκοινότητας και, άρα, δεν θεωρείται δεδομένη (Kouznetsova et al., 2010).

Αποτελεσματικοί δότες ηλεκτρονίων είναι χαμηλού μοριακού βάρους λιπαρά οξέα (γαλακτικό οξύ, βουτυρικό οξύ, οξικό οξύ, βενζοϊκό οξύ), αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη), τυρόγαλο, ζάχαρη (μελάσες, φρουκτόζη), φυτικά έλαια, χιτίνη, προϊόντα εμπορίου (ουσίες αργής αποδέσμευσης υδρογόνου; Hydrogen Releasing Compound; HRC), αέρια (μοριακό υδρογόνο) και στερεά υλικά (εδαφοβελτιωτικό σύμμιγμα, φυσικό οργανικό λίπασμα) (U.S. Department of Energy, 2013; Parsons, 2004). Για παράδειγμα, η βιολογική αποδόμηση του TCE και του PCE ενισχύθηκε σημαντικά μετά την εισπίεση γαλακτοποιημένων ή μη φυτικών ελαίων σε ρυπασμένους υδροφορείς, εφόσον αποδεσμεύουν αργά υδρογόνο στο πεδίο, ενώ η τιμή τους είναι προσιτή (Lee et al., 2007b). Όμως, κάθε είδος υποστρώματος απαιτεί διαφορετικό τρόπο εισπίεσης και τα κατάλληλα μέτρα στο πεδίο (Majone et al., 2015).

Η επιλογή του κατάλληλου δότη ηλεκτρονίων είναι μία σημαντική παράμετρος σχεδιασμού για την ανάπτυξη ενός σημαντικού πληθυσμού αποχλωριωτών (Alleman et al., 2002). Ο δότης πρέπει να επιλέγεται σύμφωνα με τα βιογεωχημικά και υδροδυναμικά χαρακτηριστικά της ρυπασμένης περιοχής (Parsons, 2004). Τα κριτήρια επιλογής του δότη ηλεκτρονίων είναι (Armstrong et al., 2004; Macbeth et al., 2006; Parsons, 2004; Alleman et al., 2002):

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- η απόδοσή του ως προς την αναγωγική αποχλωρίωση,
- η σχέση κόστους/αποτελεσματικότητας,
- η επίπτωσή του στη διαλυτότητα των χλωριωμένων αιθενίων,
- η επίπτωσή του στη μικροβιακή κοινότητα,
- η περιεκτικότητά του σε μέταλλα,
- η ανθεκτικότητά του,
- η ικανότητα εξάπλωσής του και
- οι απαιτήσεις για τον κατάλληλο χειρισμό του.

Η επιλογή του κατάλληλου δότη μπορεί, επίσης, να περιορίσει τον ανταγωνισμό για το παραγόμενο υδρογόνο με άλλες ομάδες μικροοργανισμών, όπως οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί. Ουσίες που παράγουν με αργό ρυθμό μικρές ποσότητες υδρογόνου υποβοηθούν την επικράτηση των αποχλωριωτών έναντι των μεθανογενών μικροοργανισμών (Smatlak et al., 1996; Fennell et al., 1997). Τέλος, ο κατάλληλος δότης μπορεί να μειώσει τον αριθμό των απαιτούμενων εισπιέσεων και των σημείων εισπίεσης, με αποτέλεσμα τη μείωση του συνολικού κόστους (Parsons, 2004). Ένας συνδυασμός δοτών ηλεκτρονίων (Parsons, 2004) ή μία λιγότερο κοστοβόρα ουσία μετά τη διέγερση των μικροοργανισμών από έναν ακριβό και κατάλληλο δότη ηλεκτρονίων (Alleman et al., 2002) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα εργαλείο σχεδιασμού για την επίτευξη της πλήρους αποχλωρίωσης.

Επιπρόσθετα, άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης είναι η ποσότητα του δότη ηλεκτρονίων που πρέπει να προστεθεί στο πεδίο. Ο ρυθμός της αποχλωρίωσης των χλωριωμένων αιθενίων φαίνεται ότι είναι εξαρτώμενος από τη συγκέντρωση του υδρογόνου (Ballapragada et al., 1997b; Cupples et al., 2004; Smatlak et al., 1996). Η κινητική της αποχλωρίωσης ακολουθεί το μοντέλο Michaelis-Menten και η σταθερά ημικορεσμού της μερικής πίεσης του υδρογόνου κυμαίνεται εντός του εύρους 12-28 ppm (Ballapragada et al., 1997a). Επίσης, η ποσότητα του υδρογόνου που παράγεται από τη ζύμωση οργανικών ουσιών μπορεί να διαφέρει κατά τάξεις μεγέθους, ανάλογα με την κινητική και τη θερμοδυναμική ισορροπία της συγκεκριμένης αντίδρασης. Επομένως, οι μικροοργανισμοί ζύμωσης έχουν μία συντροφική σχέση με την υδρογονοτροφική κοινότητα για τη διατήρηση της μερικής πίεσης του υδρογόνου σε χαμηλά επίπεδα, έτσι ώστε να συνεχιστούν οι θερμοδυναμικά ευνοϊκές συνθήκες (Aulenta et al., 2006a). Γενικά, η ελάχιστη δόση του δότη ηλεκτρονίων για την αποχλωρίωση του τετραχλωροαιθενίου σε βινυλοχλωρίδιο θεωρείται ότι είναι 14.5-15.7 mg οργανικού άνθρακα/mg PCE (υπολογισμένη τιμή) (Lee et al., 1997).

Πάρα ταύτα, από τα πειράματα της βιβλιογραφίας, δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την αποτελεσματικότητα των δοτών ηλεκτρονίων, όπως το υδρογόνο, εύκολα βιοδιασπάσιμες ουσίες, οργανικές ουσίες αργής διάσπασης, σύνθετα οργανικά υλικά, ενώ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η χρήση της φυσικής οργανικής ύλης ως δότη ηλεκτρονίων (Schneidewind et al., 2014). Κατά τη βιοαποκατάσταση μίας ρυπασμένης περιοχής προτείνεται η διεξαγωγή πειραμάτων σε μικρόκοσμους για την εύρεση της απόδοσης και του ρυθμού αποχλωρίωσης, με

στόχο την επιλογή του είδους και της ποσότητας δότη ηλεκτρονίων που θα πρέπει να εισαχθεί στο πεδίο (Alleman et al., 2002). Η μελέτη της επίδρασης διάφορων δότην ηλεκτρονίων στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας θεωρείται ότι μπορεί να οδηγήσει στη βελτιστοποίηση των στρατηγικών για επιτόπια βιοαποκατάσταση (Azizian et al., 2010).

Στις παρακάτω παραγράφους παρουσιάζονται αναλυτικά τα στοιχεία της βιβλιογραφίας σχετικά με τη χρήση των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν ως δότες ηλεκτρονίων στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, δηλαδή το αέριο υδρογόνο, το οξικό οξύ, το βουτυρικό οξύ, το βενζοϊκό οξύ, η προπανόλη, το τυρόγαλο, η φυσική οργανική ύλη και ο δισθενής σίδηρος.

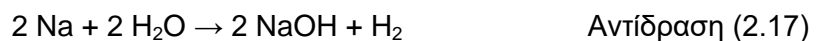
2.3.5.1. Υδρογόνο ως δότης ηλεκτρονίων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το υδρογόνο χρησιμοποιείται ως δότης ηλεκτρονίων από τα *Dehalococcoides* spp. για την πλήρη αναγωγική αποχλωρίωση του TCE σε αιθένιο (Maymó-Gatell et al., 1997). Επομένως, η αποτελεσματικότητα της διεργασίας εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του υδρογόνου στο πεδίο (Chapelle & Bradley, 2003).

Η εισπίεση του αέριου υδρογόνου στο ρυπασμένο πεδίο μπορεί να επιτευχθεί μέσω διάφορων τρόπων:

(α) Αεριοδιασκορπισμός χαμηλής πίεσης, όπου το αέριο εισάγεται σε ένα φρεάτιο υπό επαρκή πίεση, και σχηματίζει διακλαδώσεις εντός του υδροφορέα.

(β) Επιτόπου χημική απελευθέρωση, όπου ηλεκτροθετικά μέταλλα αντιδρούν και παράγουν υδρογόνο, για παράδειγμα η εισαγωγή νατρίου, όπως παρουσιάζεται και στην ακόλουθη αντίδραση:



(γ) Εισπίεση διαλυτού υδρογόνου, όπου το αέριο υδρογόνο εξαπλώνεται σε αντλούμενο υπόγειο νερό, με στόχο τη διαλυτοποίησή του στην υγρή φάση και την επανεισαγωγή του νερού στον υδροφορέα.

(δ) Διαπερατές μεμβράνες, όπου το υδρογόνο εισπνέζεται στις μεμβράνες, τις οποίες διαπερνά το υπόγειο νερό, με αποτέλεσμα να διαλυτοποιείται στην υγρή φάση και

(ε) Ηλεκτροχημική διεργασία, όπου δύο ηλεκτρόδια παράγουν κατιόντα υδρογόνου (Newell et al., 1997; Fang et al., 2002; Zhang et al., 2001).

Με την άμεση προσθήκη υδρογόνου στο υπόγειο νερό αυξάνεται ο ρυθμός αποχλωρίωσης, αφού αποφεύγονται οι αργές αντιδράσεις ζύμωσης. Παράλληλα, οι

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

μικροοργανισμοί μπορούν να προμηθευτούν μεγάλες ποσότητες δότη ηλεκτρονίων με ασφαλή τρόπο και σε χαμηλό κόστος (Aulenta et al., 2006a; Newell et al., 1997).

Η εισπίεση, όμως, του υδρογόνου μπορεί να παρουσιάσει αρκετές δυσκολίες. Η αυξημένη συγκέντρωσή του αποτελεί προτιμητέα πηγή ενέργειας για πολλούς ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς της αποχλωρίωσης, όπως μεθανογόνους, θεικοαναγωγικούς, σιδηροαναγωγικούς, ομοοξικογόνους, που τείνουν να βρίσκονται παντού στο περιβάλλον (Adrian & Löffler, 2016; Middeldorp et al., 1999). Επιπλέον, η διαλυτότητά του στο νερό είναι χαμηλή (<1 mM), ενώ η πτητικότητα του είναι υψηλή (αδιάστατη σταθερά Henry ≈ 52.4 ; υπολογισμένο από Sander, 2015) με αποτέλεσμα να έχει μία τάση διαφυγής στην αέρια φάση (Aulenta et al., 2006a; Wen et al., 2015).

Εξαιτίας της άμεσης χρήσης του από τα αποχλωριωτικά βακτήρια, το υδρογόνο έχει χρησιμοποιηθεί ως δότης σε πολλά πειράματα εργαστηριακής κλίμακας. Στον Πίνακα 2.17 παρουσιάζονται πειράματα σε μικτή βιοκοινότητα από επιλεγμένα άρθρα που χρησιμοποιούν το αέριο υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων. Συνοπτικά, φαίνεται ότι η προσθήκη αέριου υδρογόνου μπορεί να υποστηρίξει την πλήρη αναγωγική αποχλωρίωση. Εξαιρεση αποτελούν τα πειράματα των He et al. (2002) και Aulenta et al. (2007), όπου το υδρογόνο δεν φάνηκε να δρα ως δότης ηλεκτρονίων, ενώ οι οργανικές ουσίες που ζυμώνονται, όπως το γαλακτικό οξύ, υπερτερούσαν ως προς την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης (Wen et al., 2015; Bunge et al., 2007; DiStefano et al., 1992).

Πίνακας 2.17 Υδρογόνο ως δότης ηλεκτρονίων σε μικρόκοσμοις.

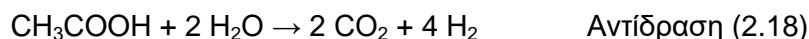
Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 0.5 mM PCE & ~7.9 mM H ₂	Πλήρης μετατροπή του PCE σε αιθένιο σε 150 ώρες, ενώ το 25% του υδρογόνου που εισήχθηκε, χρησιμοποιήθηκε για την αναγωγική αποχλωρίωση.	Aulenta et al., 2002
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 20 μM PCE & 4 μM H ₂ (το H ₂ προστέθηκε στις ~9 ώρες λειτουργίας)	Μία ημέρα μετά είχε παραμείνει περίπου 15μM VC και το υπόλοιπο ήταν αιθένιο και cDCE. Η προσθήκη προπιονικού και γαλακτικού οξέος προκάλεσε την παραγωγή αιθενίου, αλλά οι συγκεκριμένοι δότες εισήχθησαν στην αρχή του πειράματος.	Ballapragada et al., 1997a
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 80 μM cDCE & 4.1 mM H ₂	Σε ~76 ημέρες το cDCE είχε μετατραπεί σε αιθένιο και VC σε ποσοστό 89% και 11%, αντιστοίχως. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και το πείραμα με βενζοϊκό οξύ ως δότη.	Yang & McCarty, 1998
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 300 μM TCE & 9 mM H ₂	Μετά από 40 ημέρες λειτουργίας ανιχνεύτηκαν DCEs, αιθένιο και, κυρίως, VC, ενώ είχαν παραχθεί ~450μM μεθανίου από την 10 ^η ημέρα. Συγκριτικά με άλλους δότες, η βέλτιστη απόδοση επιτεύχθηκε με το γαλακτικό οξύ, όπου πραγματοποιήθηκε πλήρης αποχλωρίωση στις 20 ημέρες με μικρή παραγωγή μεθανίου.	Wen et al., 2015
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 250 μM PCE ή 500 μM cDCE & 2.5 mM οξικό οξύ & 2.5 mM H ₂	Την 61 ^η ημέρα το PCE είχε μετατραπεί σε cDCE, ενώ στο πείραμα με αρχικό ρύπο το cDCE υπήρξε μία μικρή άνοδος (~50μM) VC. Τα πειράματα με οξικό οξύ και βενζοϊκό οξύ έδειξαν σαφώς καλύτερη απόδοση ως προς την αποχλωρίωση.	Bunge et al., 2007
Μικρόκοσμοι με καλλιέργειες, 0.2 mM PCE & H ₂ σε περίσσεια	Η αποχλωρίωση πραγματοποιήθηκε γρηγορότερα σε δύο από τις τρεις καλλιέργειες συγκριτικά με την απόδοσή τους όταν προστέθηκε μεθανόλη ως δότης.	Daprato et al., 2007
Μικρόκοσμοι με έδαφος, 4.9	Δεν πραγματοποιήθηκε σημαντική αποχλωρίωση ούτε με το	He et al., 2002

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
mM PCE & 7mM H ₂	πέρας 222 ημερών, ενώ τα πειράματα με οξικό οξύ παρήγαγαν 5-10 φορές παραπάνω cDCE.	
Μικρόκοσμοι με έδαφος και υπόγειο νερό, 7.8 μM PCE & 15 μM TCE & 3 mM H ₂ & 3 mM οξικό οξύ (το οξικό οξύ προστέθηκε την 135 ^η ημέρα)	Με δότη ηλεκτρονίων μόνο το υδρογόνο η αποχλωρίωση κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα με το πείραμα ελέγχου που είχε τη βιομάζα ως δότη. Το οξικό οξύ βελτίωσε την απόδοση της αποχλωρίωσης παρουσιάζοντας παρόμοια αποτελέσματα με άλλους δότες, όπως το γαλακτικό και το βουτυρικό οξύ. Το PCE μετατράπηκε κυρίως σε VC τις πρώτες ημέρες των πειραμάτων, μετά όμως άρχισε να συσσωρεύεται η ποσότητα του TCE. Παρόμοιο πείραμα με μεθανόλη έδειξε την παραγωγή VC και αιθενίου, με αποτέλεσμα να θεωρηθεί καλύτερος δότης.	Aulenta et al., 2007
Καλλιέργειες με 0.55 μM PCE & 4.7 μM H ₂ κάθε 2 ημέρες		DiStefano et al., 1992

2.3.5.2. Οξικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων

Το οξικό οξύ χρησιμοποιείται αρκετά συχνά ως δότης ηλεκτρονίων σε πειράματα αναγωγικής αποχλωρίωσης, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.18 (Ballapragada et al., 1997; Lee et al., 2007; Bunge et al., 2007; Wen et al., 2015), εφόσον μπορεί να καταναλωθεί είτε άμεσα, από οξικοτροφικούς μικροοργανισμούς, είτε έμμεσα, από την οξειδωση του οξικού οξέος σε υδρογόνο και διοξειδίο του άνθρακα, όπως παρουσιάζεται στην παρακάτω αντίδραση (He et al., 2002).



Υπάρχουν τρεις πιθανές πηγές οξικού οξέος στο υπόγειο νερό (1) μέσω της οξικογένεσης, (2) από την αποσύνθεση της βιομάζας, την υδρόλυση και τη ζύμωση που τροφοδοτεί με υδρογόνο και οξικό οξύ και (3) μέσω της οξειδωσης της οργανικής ύλης του εδάφους (Ma et al., 2006). Η οξειδωση του οξικού οξέος είναι μια ενδόεργη αντίδραση ($\Delta G^{\circ} = +108.1 \text{ kJ/mole}$), αλλά πραγματοποιείται αυθόρμητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις υδρογόνου (Hattori S., 2008). Πλήθος μικροοργανισμών τροφοδοτούνται με ηλεκτρόνια από την άμεση αποδόμηση του οξικού οξέος προκαλώντας την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου (Lovley, 2013), των θειικών ιόντων (Rabus et al., 2013) και την παραγωγή μεθανίου (Welte & Deppenmeier, 2014). Επίσης, ορισμένα βακτήρια οργανοαλογονικής αναπνοής, που πραγματοποιούν τα πρώτα στάδια της αναγωγικής αποχλωρίωσης, δηλαδή τη μετατροπή PCE σε cDCE, μπορούν να χρησιμοποιήσουν το οξικό οξύ άμεσα ως δότη ηλεκτρονίων (Sung et al., 2003; Krumholz et al., 1996). Επιπλέον, το οξικό οξύ φαίνεται ότι απαιτείται για τη βιοσύνθεση του γένους *Dehalococcoides* ως πηγή άνθρακα (Tang et al., 2009) και χρησιμοποιείται σε πολλές έρευνες για αυτόν το σκοπό (Sung et al., 2006a; Adrian et al., 2007; Adrian et al., 2000).

Από τον Πίνακα 2.18 φαίνεται ότι το οξικό οξύ δεν θεωρείται ιδανικός δότης ηλεκτρονίων για τη μετατροπή των χλωριωμένων αιθενίων. Μάλιστα, οργανικές ουσίες που οξειδώνονται παράγοντας υδρογόνο, όπως το γαλακτικό οξύ και η μεθανόλη, υπερτερούσαν ως προς την απόδοση και τον ρυθμό της αναγωγικής αποχλωρίωσης, ενώ η βιοκοινότητα των μικρόκοσμων φαίνεται να έχει μεγαλύτερη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

ποικιλία μικροοργανισμών συγκριτικά με πειράματα που χρησιμοποιούν το οξικό οξύ και το υδρογόνο ως δότες (Wen et al., 2015).

Πίνακας 2.18 Οξικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων σε μικρόκοσμους.

Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 20 μM PCE & 2.1 μM οξικό οξύ & 4 μM H_2 (το H_2 προστέθηκε στις ~9 ώρες λειτουργίας)	Στις 9 ώρες μόνο 10% του PCE είχε μετατραπεί σε cDCE, ενώ δεν ανιχνεύτηκε TCE. Μετά προστέθηκε υδρογόνο και παρατηρήθηκε η παραγωγή του VC σε 24 ώρες λειτουργίας.	Ballapragada et al., 1997a
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 333 μM PCE & 346-1127 μM οξικού οξέος	Μετατροπή του PCE σε cDCE σε 25-30 ημέρες. Η απόδοση βελτιώθηκε μετά την εισαγωγή είτε μυρμηκικού οξέος είτε βενζοϊκού οξέος, που προστέθηκαν ως συμπληρωματικοί δότες.	Lee et al., 2007a
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 300 μM TCE & 2.25 mM οξικό οξύ	Μετά από 40 ημέρες λειτουργίας το TCE είχε μετατραπεί σε VC και DCEs. Επομένως, το οξικό οξύ δεν θεωρήθηκε αποδοτικός δότης, συγκριτικά με το γαλακτικό οξύ και τη μεθανόλη. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεθανογένεση.	Wen et al., 2015
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 250 μM PCE ή 500 μM cDCE & 5 mM οξικό οξύ	Όπως και στα πειράματα με υδρογόνο και οξικό οξύ, έτσι και στα πειράματα μόνο με οξικό οξύ δεν παρατηρήθηκε πλήρης αποχλωρίωση, εφόσον φαίνεται ότι το cDCE ανάγεται αργά σε VC.	Bunge et al., 2007
Μικρόκοσμοι με έδαφος, 4.9 mM PCE & 5 mM οξικό οξύ	Σημαντικό μέρος του PCE μετατράπηκε σε cDCE και λίγο TCE, μετά από 250 ημέρες λειτουργίας.	He et al., 2002

2.3.5.3. Βουτυρικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη Ενότητα, μία ποικιλία οργανικών ουσιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δότες ηλεκτρονίων είτε άμεσα είτε έμμεσα, όπως λιπαρά οξέα με μικρού μήκους αλυσίδα (μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό, γαλακτικό, βουτυρικό και ισοβουτυρικό οξέα), αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη) και υδρογονάνθρακες (γλυκόζη) (Heimann et al., 2007).

Το βουτυρικό οξύ μπορεί να καταναλωθεί άμεσα από τους μικροοργανισμούς αναγωγής τρισθενούς σιδήρου και θειικών ιόντων για την παραγωγή ηλεκτρονίων (Rabus et al., 2013; Lovley, 2013). Όμως, για την αναγωγή των οργανοχλωριωμένων ουσιών σε αιθένιο (Richardson R., 2016) και την παραγωγή μεθανίου (Welte & Derpenmeier, 2014), πρέπει πρώτα να παραχθούν οξικό οξύ και υδρογόνο μέσω της β -οξειδωσης, όπως φαίνεται στην αντίδραση 2.19 (Aulenta et al., 2007; He et al., 2002). Η πλήρης μετατροπή του βουτυρικού οξέος σε CO_2 παρουσιάζεται στην αντίδραση 2.20 (υπολογισμένη σύμφωνα με τις αντιδράσεις 2.18 και 2.19).



Επιπλέον, η οξείδωση του βουτυρικού οξέος είναι μία ενδόεργη διεργασία υπό κανονικές συνθήκες ($\Delta G^\circ = +48.3 \text{ KJ/mole}$), όμως η αντίδραση αυτή γίνεται

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

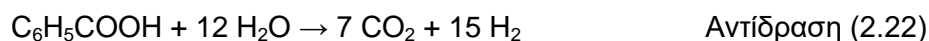
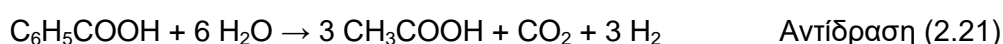
θερμοδυναμικά εφικτή, μόνο υπό χαμηλή μερική πίεση υδρογόνου, περίπου 10^{-4} bar (McInerney et al., 2008; Schink & Stams, 2006). Στον Πίνακα 2.19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα της βιβλιογραφίας που χρησιμοποιούν το βουτυρικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι το βουτυρικό οξύ έχει την ικανότητα επίτευξης της πλήρους αναγωγικής αποχλωρίωσης. Επιπλέον, πειράματα που διεξήχθησαν σε μικρόκοσμους με εδάφη από ρυπασμένες περιοχές έδειξαν ότι το βουτυρικό οξύ ήταν ο πιο αποτελεσματικός δότης ηλεκτρονίων εξεταζόμενος συγκριτικά με άλλους, όπως το γαλακτικό οξύ, το εκχύλισμα ζύμης, το προπιονικό οξύ, το οξικό οξύ και μίγμα γαλακτικού/βενζοϊκού οξέος (Alleman et al., 2002).

Πίνακας 2.19 Βουτυρικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων σε μικρόκοσμους.

Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 110 μ M PCE & 220 μ M ή 440 μ M βουτυρικό οξύ	Παρατηρήθηκε ότι σε 24 ώρες το PCE είχε μετατραπεί σε VC και αιθάνιο, ξεπερνώντας σε απόδοση τα πειράματα με αιθανόλη, γαλακτικό οξύ και προπιονικό οξύ ως δότες. Επίσης, το 90% των ηλεκτρονίων καταναλώθηκαν για την αποχλωρίωση, ενώ το υπόλοιπο 10% χρησιμοποιήθηκε για τη μεθανογένεση.	Fennell et al., 1997
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 10-110 μ M TCE & 10 mM βουτυρικό οξύ	Όλα τα πειράματα έδειξαν πλήρη αποχλωρίωση, είτε περιείχαν δότες ηλεκτρονίων ταχείας ζύμωσης (γαλακτικό οξύ και μεθανόλη) είτε αργής ζύμωσης (προπιονικό και βουτυρικό οξύ). Η μεθανογένεση, όμως, ήταν περίπου 20 φορές υψηλότερη όταν ο δότης ήταν το γαλακτικό οξύ.	Freeborn et al., 2005
Μικρόκοσμοι με έδαφος και υπόγειο νερό, 7.8 μ M PCE & 15 μ M TCE & 3 mM βουτυρικό οξύ	Στις 240 ημέρες παρουσίασε τα ίδια αποτελέσματα με το γαλακτικό οξύ, όμως η αποχλωρίωση ήταν πιο αργή. Στις 25 ημέρες, ενώ με το βουτυρικό οξύ δεν είχε πραγματοποιηθεί η αναγωγή των χλωριωμένων αιθινίων, με το γαλακτικό είχαν παραχθεί 150 μ M Cl ⁻ .	Aulenta et al., 2007
Καλλιέργειες με 0.5 mM TCE & 0.3 mM βουτυρικό οξύ κάθε 7 ημέρες	Στο τέλος του κάθε κύκλου, το TCE έχει καταναλωθεί και έχει παραχθεί cDCE και VC. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και σε πειράματα με δότη ηλεκτρονίων τη μεθανόλη.	Panagiotakis et al., 2007

2.3.5.4. Βενζοϊκό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων

Το βενζοϊκό οξύ είναι ένα απλό αρωματικό καρβοξυλικό οξύ και ενδιάμεσο προϊόν μεταβολισμού, που χρησιμοποιείται αρκετά συχνά ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση (Lee et al., 1997; Teclu et al., 2009; Schöllhorn et al. 1997; Yu & Semprini, 2002). Η μετατροπή του βενζοϊκού οξέος σε οξικό οξύ και η πλήρης οξειδωσή του παρουσιάζονται στις αντιδράσεις 2.21 και 2.22, αντίστοιχα (Yang & McCarty, 1998; Lee et al., 2007a):



Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Η οξειδωση του βενζοϊκού οξέος, υπό κανονικές συνθήκες, είναι μια ενδόεργη αντίδραση ($\Delta G^{\circ} = +91.2 \text{ kJ/mole}$), δηλαδή απαιτεί ενέργεια, όπως και η οξειδωση του βουτυρικού οξέος. Επομένως, για να είναι θερμοδυναμικά εφικτή πρέπει η συγκέντρωση του υδρογόνου να είναι σε χαμηλά επίπεδα (Bunge et al., 2007; Wu et al., 1998), υποβοηθώντας με αυτό τον τρόπο την αναγωγική αποχλωρίωση που έχει μικρή οριακή συγκέντρωση υδρογόνου (threshold). Οι αντιδράσεις αυτές επιτυγχάνονται από μικροοργανισμούς ζύμωσης, όπως είδη του γένους *Syntrophus* (Bunge et al., 2007; deBok et al., 2004).

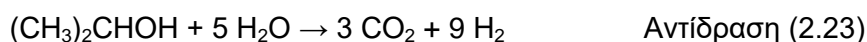
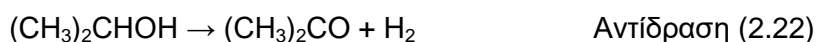
Σύμφωνα με τον Πίνακα 2.20, όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από πειράματα εργαστηριακής κλίμακας στη βιβλιογραφία, το βενζοϊκό οξύ μέσω της αργής διάσπασής του μπορεί να επιτελέσει έναν έμμεσο και αποτελεσματικό δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση.

Πίνακας 2.20 Βενζοϊκό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων σε μικρόκοσμους.

Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 333 μM PCE & 346 μM οξικού οξέος & 474 μM βενζοϊκού οξέος	Παρότι με το οξικό οξύ είχε παρατηρηθεί μόνο η αναγωγή του PCE σε cDCE σε 45 ημέρες, όταν προστέθηκε βενζοϊκό οξύ, στην αρχή του πειράματος, ως συμπληρωματικός δότης, τότε το PCE μετατράπηκε σε αιθένιο σε 34 ημέρες.	Lee et al., 2007a
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 80 μM cDCE & 300 μM βενζοϊκού οξέος	Σε ~76 ημέρες το 83% του cDCE είχε αναχθεί σε αιθένιο, ενώ το υπόλοιπο ήταν VC. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν τα πειράματα με δότη ηλεκτρονίων το υδρογόνο.	Yang & McCarty, 1998
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 250 μM PCE ή 500 μM cDCE & 2.5 mM οξικό οξύ & 2.5 mM βενζοϊκό οξύ	Παρότι στα πειράματα με οξικό οξύ δεν παρατηρήθηκε σημαντική αποχλωρίωση, στα πειράματα με την προσθήκη βενζοϊκού οξέος το PCE και το cDCE μετατράπηκαν σε αιθένιο σε ~31 ημέρες.	Bunge et al., 2007
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με 110 μM PCE & 125 mM βενζοϊκό οξύ	Το PCE μετατράπηκε σε αιθένιο και VC σε 50 ημέρες, όμως με ένα χαμηλότερο ρυθμό από ότι όταν χρησιμοποιήθηκε το γαλακτικό οξύ ως δότης, ενώ το πλεονέκτημα του βενζοϊκού οξέως ήταν ότι η παραγωγή μεθανίου ήταν περίπου η μισή.	Shen & Sewell, 2005

2.3.5.5. Προπανόλη ως δότης ηλεκτρονίων

Η οξειδωση της 2-προπανόλης (ισοπροπανόλη; $(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$) προκαλεί την ταυτόχρονη παραγωγή της ακετόνης ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$) και του υδρογόνου (Widdel F., 1986; Tanaka K., 1992), όπως φαίνεται στην αντίδραση 2.22, ενώ η πλήρης οξειδωσή της παρουσιάζεται στην αντίδραση 2.23.



Η παραπάνω διεργασία είναι μια ενδόεργη αντίδραση υπό κανονικές συνθήκες ($\Delta G^{\circ} = +206.8 \text{ kJ/mole}$), που επιτυγχάνεται μόνο όταν η συγκέντρωση του υδρογόνου είναι χαμηλή (Widdel F., 1986).

Η προπανόλη θεωρείται ένας αποδοτικός δότης ηλεκτρονίων για την οξικογένεση (Eichler & Schink, 1984), τη μεθανογένεση (Widdel F., 1986) και τη θειικοαναγωγή (Tanaka K., 1992), όμως η προσθήκη της σε μικρόκοσμους με υπόγειο νερό δεν επέφερε την αναγωγική αποχλωρίωση του PCE. Αντιθέτως, υπήρξε αυξημένη παραγωγή DCEs, όταν εισήχθησαν στα πειράματα το γαλακτικό οξύ, το προπιονικό οξύ και η αιθανόλη (Gibson & Sewell, 1992). Επίσης, άλλες αλκοόλες, όπως η μεθανόλη (Carr & Hughes, 1998; vanEekert et al., 2001), η αιθανόλη (Slater et al., 2001; Fennell et al., 1997) και η βουτανόλη (Lee et al., 2010) έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποχλωρίωση των χλωριωμένων ενώσεων με θετικά αποτελέσματα.

2.3.5.6. Τυρόγαλο ως δότης ηλεκτρονίων

Το τυρόγαλο είναι ένα παραπροϊόν της παρασκευής τυριού, το οποίο λαμβάνεται μετά τη χρήση οξέων, πυτιάς ή/και φυσικοχημικών μεθόδων (Κανονισμός 625/30-3-1978 ΕΕ). Αποτελείται κυρίως από λακτόζη ($C_{12}H_{22}O_{11}$), η οποία είναι ένας δισακχαρίτης γλυκόζης-γαλακτόζης, και σε μικρότερα ποσοστά από πρωτεΐνες, λίπη, γαλακτικό οξύ, σκόνη και μεταλλικά άλατα (Mora et al., 2008; Castelló et al., 2009; Lee et al., 1997; Καραδήμα, 2009; Καπτή, 2010). Η περιεκτικότητά του κυμαίνεται ανάλογα με τη σύσταση και τον τρόπο επεξεργασίας του γάλακτος για την παραγωγή του τυριού. Στον Πίνακα 2.21 φαίνονται οι περιεκτικότητες των συστατικών του τυρόγαλου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 2.21 Συστατικά τυρόγαλου.

Αναφορές	Λακτόζη	Πρωτεΐνες	Λίπη	Γαλακτικό οξύ	Μεταλλικά ιόντα
Υγρή μορφή					
Mishra et al., 2000	45.0 gr/L	7.0 gr/L	3.0 gr/L		5.5 gr/L
González Siso, 1996	47.5 gr/L	7.0 gr/L	4.5 gr/L	0.5 gr/L	≈6.0 gr/L
Βαμβακάκη κ.α., 2009	60.0 gr/L	8.0 gr/L	2.3 gr/L		
Jelen., 2002	49.0 gr/L	8.0 gr/L		2.0 gr/L	
Στερεή μορφή					
Macbeth et al., 2006; Mora et al., 2008	70-75% w/w	10-13% w/w			

Σημείωση: Οι τιμές του Πίνακα είναι υπολογισμένες.

Διάφορες οργανικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως τρόφιμα (food-grade) παρέχουν αποτελεσματικά και για μεγάλο χρονικό διάστημα ηλεκτρόνια, με στόχο την ενίσχυση της αναερόβιας βιοαποδόμησης (Lien et al., 2016), όπως τα έλαια και το τυρόγαλο. Το τελευταίο είναι διαλυτό στο νερό και, εξαιτίας της περίπλοκης δομής του, έχει μεγάλη ανθεκτικότητα (Semkiw & Barcelona, 2011; Macbeth et al., 2006). Λόγω αυτών των ιδιοτήτων του, απαιτείται λιγότερος αριθμός εισπιέσεων στη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

ρυπασμένη περιοχή και σε μικρή συχνότητα. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε σε υγρή μορφή (χωρίς επεξεργασία) είτε σε σκόνη (μετά από επεξεργασία) (U.S. Department of Energy, 2013). Η υγρή μορφή του είναι λιγότερο κοστοβόρα από ό,τι η στερεά (περίπου 96% οικονομικότερη), μιας και το συνολικό κόστος είναι τα έξοδα μεταφοράς και χειρισμού (Parsons, 2004), απαιτεί, όμως, τη συντήρηση του τυρόγαλου σε χαμηλή θερμοκρασία. Η στερεή μορφή του είναι ακριβότερη και πρέπει να διαλυθεί στο νερό πριν την χρήση της, αλλά μπορεί να αποκτηθεί, μεταφερθεί και αποθηκευτεί πιο εύκολα (González Siso M., 1996; U.S. Department of Energy, 2013).

Γενικότερα, το τυρόγαλο είναι μία οικονομική πηγή άνθρακα και ηλεκτρονίων που περιέχει, επίσης, πρωτεΐνες και θρεπτικά συστατικά για τη βελτίωση της μικροβιακής ανάπτυξης (Mora et al., 2008; González Siso M., 1996). Στον αντίποδα, το υψηλό περιεχόμενό του σε σάκχαρα και η χαμηλή ρυθμιστική του ικανότητα μπορεί να οδηγήσουν στην υψηλή παραγωγή οξέων και τη μείωση του pH (Castelló et al., 2009; Mora et al., 2008). Στον Πίνακα 2.22 φαίνεται η σχέση κόστους/αποτελεσματικότητας διάφορων δοτών ηλεκτρονίων.

Πίνακας 2.22 Σχέση κόστους/αποτελεσματικότητας δοτών ηλεκτρονίων (DiStefano et al., 2001; Semkiw & Barcelona, 2011).

Δότες ηλεκτρονίων	Κόστος/Αποτελεσματικότητα ¹	
	Μετατροπή PCE σε DCE (€/kg, Εργαστηριακή κλίμακα)	Μετατροπή PCE σε ΕΤΗ ² (€/kg, Κλίμακα πεδίου)
Τυρόγαλο (στερεή μορφή)	0.07	6.0
Μελάσες	0.13	10.6
Γάλα	0.25	6.9
Εκχύλισμα καλαμποκιού	0.34	
Ζάχαρη	0.69	55.3
Μεθανόλη	1.05	12.8
Γαλακτικό οξύ	1.24	
Αλεύρι	2.34	61.8
Βενζοϊκό οξύ		66.7

¹Οι τιμές του Πίνακα είναι υπολογισμένες. ²Θεωρείται ότι απαιτούνται 60 kg TOC/kg PCE.

Στον Πίνακα 2.23 φαίνονται εργαστηριακά πειράματα και πιλοτικές εφαρμογές στο πεδίο, όπου χρησιμοποιήθηκε το τυρόγαλο ως δότης ηλεκτρονίων. Περιληπτικά, το τυρόγαλο φαίνεται ότι μπορεί να ανταγωνιστεί άλλους δότες ηλεκτρονίων ως προς την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης (Rénész et al., 2006; Semkiw et al., 2009; Lee et al., 1997; McLean et al., 2015), αλλά και ως προς το κόστος (DiStefano et al., 2001). Μόνη εξαίρεση αποτελούν τα πειράματα των Scherr et al. (2011), όπου η γλυκόζη και η γαλακτόζη (κύρια προϊόντα του τυρόγαλου) έδειξαν καλύτερα αποτελέσματα ως προς την αποχλωρίωση του PCE. Το τυρόγαλο, όμως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί εξίσου αποτελεσματικά ως δότης για τις ανταγωνιστικές διεργασίες,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

όπως τη μεθανογένεση, τη θειικοαναγωγή και την απονιτροποίηση (Lee et al., 1997; Semkiw et al., 2009; Frizzell et al., 2004; Mora et al., 2008; Révész et al., 2006). Όσον αφορά τις πιλοτικές εφαρμογές, σε όλες επιτεύχθηκε αποχλωρίωση των PCE και TCE στις λιγότερο χλωριωμένες μορφές με παραγωγή αιθενίου και αιθανίου (Macbeth et al., 2006; Lee et al., 2008; Mora et al., 2008; Semkiw & Barcelona, 2011; Frizzell et al., 2004). Το τυρόγαλο, εκτός από δότης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τη μεταφορά των χλωροαιθενίων από την οργανική στην υδατική φάση (Macbeth et al., 2006) μέσω του μηχανισμού διάλυσης.

Πίνακας 2.23 Εργαστηριακά πειράματα και πιλοτικές εφαρμογές στο πεδίο με το τυρόγαλο ως δότης ηλεκτρονίων στη βιβλιογραφία.

Μορφή τυρόγαλου	Χλωριωμένα αιθέρια	Εφαρμογή	Σκοπός	Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
Σκόνη	TCE (DNAPL)	Αβιοτικά πειράματα	Μεταφορά μάζας του TCE από την οργανική στην υδατική φάση	Χρήση διαλυμάτων τυρόγαλου και λακτόζης στις εξής συγκεντρώσεις 0%, 1%, 3%, 5%, 8%, 10% και 12% w/v.	Αύξηση διαλυτότητας του TCE (6 φορές) σε μικρόκοσμους με 10% w/v τυρόγαλο (73 gr COD/L και 9 eq/L) συγκριτικά με 1% w/v. Επάνω από 10% δεν παρατηρήθηκε διαφορά.	Macbeth et al., 2006
		Αβιοτικές στήλες		Χρήση διαλυμάτων τυρόγαλου στις εξής συγκεντρώσεις 0%, 1% και 10% w/v.	Παρατηρήθηκε πενταπλάσια ποσότητα των συγκεντρώσεων του TCE στην υδατική φάση με την προσθήκη 10%w/v (73000 mg COD/L) τυρόγαλου, συγκριτικά με 0% και 1%w/v (7300 mg COD/L).	
		Πιλοτική εφαρμογή σε πεδίο	Μεταφορά μάζας του TCE από την οργανική στην υδατική φάση και βιοαποκατάσταση	Πραγματοποιήθηκαν 3 εγχύσεις στο πεδίο με 8.5%-9.7% ≈ 10% w/v τυρόγαλο. Για 5 χρόνια γινόταν χρήση 5% w/v γαλακτικού οξέος ως δότη ηλεκτρονίων.	Αύξηση (περίπου 3 φορές) της συνολικής συγκέντρωσης των χλωροαιθινίων και του αιθινίου μετά την εισπίεση 10% w/v τυρόγαλου. Η μετατροπή του TCE σε ETH συνεχίστηκε και το COD μειώθηκε γρήγορα. Μεγάλες συγκεντρώσεις λακτόζης, το κύριο συστατικό του τυρόγαλου, παρατηρήθηκε στα πηγάδια, όμως υπήρξε μείωσή του και παραγωγή οξικού, προπιονικού και βουτυρικού οξέος την 7 ^η ημέρα. Τα δευτερεύοντα παρέμειναν ως την 35 ^η ημέρα, όπου ήταν κάτω του ορίου ανίχνευσης.	
Σιρόπι γλυκόζης πλούσιο σε οπρωροσάκχαρο (σιρόπι καλαμποκιού) και σκόνη τυρόγαλου	PCE	Πιλοτική εφαρμογή πεδίου	Χρήση οικονομικά αποδοτικών υλικών με αργή αποδέσμευση δότη και υψηλή διάρκεια ζωής	Πραγματοποιήθηκαν 2 εγχύσεις στο πεδίο με 5800 mg TOC/L (θειικά στο πεδίο 660 mg/L)	Το μίγμα καλαμποκιού και τυρόγαλου διατήρησε υψηλά επίπεδα ολικού οργανικού άνθρακα για περίπου ένα χρόνο, μειώνοντας ταυτόχρονα τις συγκεντρώσεις του PCE από 4200 μg/L σε 460 μg/L. Με τη μείωση του PCE υπήρξε αύξηση του TCE και του cis-DCE, μειώνοντας ταυτόχρονα και τον ολικό οργανικό άνθρακα. Επίσης, υπήρξε μείωση του pH και έγινε η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις θειικών ιόντων και νιτρικών μειώθηκαν, φτάνοντας κάτω του ορίου ανίχνευσης, και μετέπειτα υπήρξε αύξηση της παραγωγής του μεθανίου. Στη δεύτερη εισπίεση μειώθηκαν οι συγκεντρώσεις του cis-DCE, αλλά δεν παρατηρήθηκε VC, εξαιτίας του μεγάλου ορίου ανίχνευσης, της μικρής παραγωγής ή της γρήγορης κατανάλωσής του. Όμως, παρατηρήθηκε παραγωγή	Frizzell et al., 2004

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Μορφή τυρόγαλου	Χλωριωμένα αιθέρια	Εφαρμογή	Σκοπός	Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
					αιθινίου.	
Σκόνη	TCE (DNAPL)	Πιλοτική εφαρμογή πεδίου	Βιοδιέγερση με τυρόγαλο, βιοεπαύξηση με καλλιέργεια που περιείχε <i>Dehalococcoides</i> spp. και στρατηγικές εφαρμογής με βάση τη συγκέντρωση του τυρόγαλου	Πραγματοποιήθηκαν 10 εγχύσεις με χαμηλή (10 gr/L), μεσαία (30 gr/L) και υψηλή (100 gr/L) συγκέντρωση τυρόγαλου	Παρατηρήθηκε αύξηση του cis-DCE (≈92% συνολική μάζα χλωροαιθινίων) με την προσθήκη 30 gr/L τυρόγαλου. Μετά τη βιοεπαύξηση, η μάζα του cis-DCE έφτασε το 99%, όμως με την προσθήκη 100 gr/L δεν παρατηρήθηκε VC, ενώ με την προσθήκη 10 gr/L το VC αυξήθηκε σε 0.3%. Το VC και το αιθίνιο αυξήθηκαν σε 35% και 6%, αντίστοιχα, με την προσθήκη 10 gr/L και 100 gr/L. Ένα χρόνο μετά τη βιοδιέγερση και τη βιοεπαύξηση, οι συγκεντρώσεις των 16s RNA γονιδίων αυξήθηκαν 3 τάξεις μεγέθους.	Lee et al., 2008
Σκόνη και ρυθμιστικό διάλυμα σκόνης	TCE	Πιλοτική εφαρμογή πεδίου	Εφαρμογή της βιοαποκατάστασης με τη χρήση σκόνης τυρόγαλου σε κατατημένο γρανιτικό υδροφορέα, με πολυσύνθετα γεωχημικά χαρακτηριστικά και περιορισμένη βιολογική δραστηριότητα για την αναγωγική αποχλωρίωση	Φάση 1: 4 εγχύσεις τυρόγαλου (0.5% - 2.5%). Φάση 2: 2 εγχύσεις ρυθμιστικού διαλύματος τυρόγαλου (1% και 3% με 2/3 και 3/2 τυρόγαλο/ρυθμιστικό διάλυμα) και βιοεπαύξηση. Συγκέντρωση θειικών ιόντων 1200-1600 mg/L	Φάση 1: Παρατηρήθηκε μετατροπή του TCE σε cis-DCE, το οποίο όμως συσσωρεύτηκε για 20 μήνες. Το pH μειώθηκε φτάνοντας κάτω από 5. Φάση 2: Αύξηση του pH σε 6.1-5.9 και του ρυθμού κατανάλωσης του δότη ηλεκτρονίων. Δύο μήνες μετά την βιοεπαύξηση, η συγκέντρωση του cis-DCE μειώθηκε κάτω του ορίου ανίχνευσης και παρατηρήθηκε αύξηση του VC (6.8 μg/L) και του αιθινίου (2.8 μg/L). Ο ρυθμός κατανάλωσης του δότη ηλεκτρονίων μειώθηκε, υποδεικνύοντας την ανθεκτικότητα του δότη. Τα αποτελέσματα της qPCR έδειξαν ότι δεν υπήρξε αλλαγή της μικροβιακής κοινότητας, υποδηλώνοντας μικρή ανάπτυξη των <i>Dehalococcoides</i> spp. Οι συγκεντρώσεις των θειικών ιόντων μειώθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης, όμως παρατηρήθηκε επαναφορά των θειικών ιόντων σε δύο πηγάδια, μετά τη μείωση του οργανικού άνθρακα. Υπήρξε παραγωγή μεθανίου περίπου 1.4 με 9.8 mg/L.	Mora et al., 2008
Σκόνη	TCE	Μικρόκοσμοι με υπόγειο νερό	Απόδοση οικονομικού δότη ηλεκτρονίων σε συνθήκες θειικοαναγωγής	Τυρόγαλο ή μελάσες (500 mg/L) με χαμηλή (70 mg/L) και υψηλή (685 mg/L) συγκέντρωση θειικών ιόντων	Σε χαμηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων με το τυρόγαλο ως δότη, το TCE μετατράπηκε σε cis-DCE και μετά τις 54 ημέρες το cis-DCE μειώθηκε. Επίσης, στις 155 ημέρες παρατηρήθηκε παραγωγή αιθινίου και μεθανίου, υποδεικνύοντας ότι το τυρόγαλο είναι καταλληλότερο ως δότης από ό,τι οι μελάσες. Τα θειικά μειώθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης, στις 155 ημέρες, και στους δύο δότες ηλεκτρονίων. Σε υψηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων το TCE εξαφανίστηκε την	Révész et al., 2006

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Μορφή τυρόγαλου	Χλωριωμένα αιθέρια	Εφαρμογή	Σκοπός	Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
					πρώτη ημέρα, αλλά δεν παρατηρήθηκε αιθέρια, αιθάνιο ή μεθάνιο στις 315 ημέρες λειτουργίας. Όμως, το τυρόγαλο ήταν καταλληλότερο για την αναγωγή των χλωροαιθινίων από ό,τι οι μελάσες. Η συγκέντρωση των θειικών ιόντων μειώθηκε απότομα την πρώτη ημέρα και παρέμειναν 173 mg/L στις 315 ημέρες, όταν ο δότης ηλεκτρονίων ήταν το τυρόγαλο, δείχνοντας έτσι αυξημένη θειικοαναγωγή, συγκριτικά με τις μελάσες.	
Σκόνη (εμπορική)	PCE	Μικρόκοσμοι με έδαφος (100 gr) και υπόγειο νερό (400 mL)	Αποτελεσματικότητα της εφαρμογής των δοτών ηλεκτρονίων για την επίτευξη της πλήρους αποχλωρίωσης του PCE υπό αναερόβιες συνθήκες.	Λακτόζη, γλυκόζη, μελάσες, τυρόγαλο και χωνεμένη ιλύ, που περιέχει προπιονικό οξύ, χρησιμοποιήθηκαν ως δότες ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια που προστέθηκαν ήταν σε πλεόνασμα (500 φορές, περίπου 100 meq/L) για την πλήρη αποχλωρίωση του PCE (200 meq/L)	Από τους πέντε δότες ηλεκτρονίων, μόνο η γλυκόζη και η γαλακτόζη προκάλεσαν τη βιοαποδόμηση του PCE και την παραγωγή των προϊόντων του. Το τυρόγαλο, οι μελάσες και η χωνεμένη ιλύ δεν έδειξαν σημαντική κατανάλωση του PCE.	Scherr et al., 2011
Σκόνη	TCE	Μικρόκοσμοι	Αποτελεσματικότητα εφαρμογής διαπερατού φράγματος	Μικρόκοσμοι με 10 gr ίζημα και 70 ml υπόγειο νερό ή καλλιέργεια (KB1/LV1). Προστέθηκαν ως δότες ηλεκτρονίων τυρόγαλο, 60% γαλακτικό οξύ και ουσία αργής αποδέσμευσης υδρογόνου. Οι μικρόκοσμοι με το τυρόγαλο περιείχαν 19.68 mM C	Πλήρης αποχλωρίωση επιτεύχθηκε σε 70 ημέρες με το τυρόγαλο ως δότη ηλεκτρονίων, είτε με γηγενείς μικροοργανισμούς είτε με την KB1/LV1 καλλιέργεια. Το τυρόγαλο και το γαλακτικό οξύ είχαν την ταχύτερη αποχλωρίωση και τους υψηλότερους ρυθμούς παραγωγής οξικού οξέος. Μετά την πλήρη αποχλωρίωση, οι μικρόκοσμοι με το τυρόγαλο είχαν την υψηλότερη συγκέντρωση οργανικού άνθρακα και υπήρξε αύξηση (περίπου 3 τάξεις μεγέθους) των γηγενών <i>Dehalococcoides</i> spp. Το pH φαίνεται να παρέμεινε ίδιο στην αρχή (6.8), αλλά μετά αυξήθηκε (7.8). Παρατηρήθηκε μεθανογένεση, με την παραγωγή μεθανίου (2214 μM) να συμβαδίζει με την κατανάλωση του οξικού οξέος (2955 μM).	Semkiw et al., 2009
Σκόνη (εισπίεση ως ιλύς)	TCE	Πιλοτική εφαρμογή πεδίου και εφαρμογή	Αξιολόγηση του τυρόγαλου ως δότη ηλεκτρονίων με βάση την ανθεκτικότητά του	Χρησιμοποιήθηκαν εννέα πηγάδια και πραγματοποιήθηκαν δέκα εξαμηνιαίες εγχύσεις (180	Το cis-DCE και το VC μειώθηκαν σημαντικά (από 504 μg/L και 550 μg/L την 6η ημέρα σε 11 μg/L και 4 μg/L στις 133 ημέρες, αντίστοιχα, σε ένα από τα πηγάδια), ενώ ο ολικός οργανικός άνθρακας μειώθηκε σταδιακά. Η	Semkiw & Barcelona, 2011

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Μορφή τυρόγαλου	Χλωριωμένα αιθέρια	Εφαρμογή	Σκοπός	Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
		πεδίου (διαπερατό φράγμα)	(σε σύγκριση με το COD), τους μεταβολίτες του τυρόγαλου, την τάση των χλωριωμένων αιθέρια και το κόστος.	ημέρες) Οι 1-7 εγχύσεις έγιναν ως πιλοτική εφαρμογή και οι 8-10 εγχύσεις έγιναν με στόχο όλη τη ρυπασμένη περιοχή. Οι πρώτες 3 και οι τελευταίες 3 εγχύσεις έγιναν με χαμηλή συγκέντρωση τυρόγαλου (0.21-0.41 kg/m ³), ενώ οι 4-7 έγιναν με αυξημένη τη συγκέντρωσή του (1.66 kg/m ³)	διάρκεια ζωής του φράγματος θεωρήθηκε ότι κυμαίνεται μεταξύ 70 και 130 ημερών. Κατά την εφαρμογή στο πεδίο, το TCE, το cis-DCE και σε κάποια πηγάδια το VC μειώθηκαν, ενώ παράλληλα υπήρξε αύξηση του αιθενίου και του αιθανίου. Κατά τη διάρκεια της 10ης εισπίεσης, το τυρόγαλο παρέμεινε εντός της ζώνης επεξεργασίας και αποδομήθηκε σε χαμηλότερου μοριακού βάρους δότες ηλεκτρονίων. Η σταθερή και μακράς διάρκειας μείωση των χλωριωμένων αιθέρια, εντός της ζώνης επεξεργασίας, υποδεικνύει τη βελτίωση της αποχλωριωτικής ικανότητας, εξαιτίας της αύξησης του πληθυσμού των αποχλωριωτών και πιθανώς των ευνοϊκών αλλαγών των βιογεωχημικών συνθηκών με την προσθήκη του τυρόγαλου.	
Σκόνη (εμπορική)	PCE	Καλλιέργειες	Διάφοροι δότες ηλεκτρονίων αξιολογήθηκαν ως προς το χρόνο εγκλιματισμού, την ικανότητα αποχλωρίωσης του PCE, την ελάχιστη δόση δότη που απαιτείται για την απομάκρυνση του PCE και το κόστος. Οι δότες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ζάχαρη, αλεύρι, εκχύλισμα καλαμποκιού, μελάσες, γάλα και τυρόγαλο.	Καλλιέργειες με 1 mL μη-εγκλιματισμένη αναερόβια ιλύ και 49 mL διάλυμα θρεπτικών. Προστέθηκαν 80 mg COD/L από τον κάθε δότη ηλεκτρονίων, 3.7 mM PCE (ονομαστική συγκέντρωση) και 20 mg/L εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract). Μετά από 20 ημέρες σε όλες τις καλλιέργειες προστέθηκαν 5 mL αναερόβιας ιλύος και δύο δόσεις των 240 mg COD/L από κάθε δότη για τη διέγερση της βιομάζας.	Οι ημέρες που απαιτήθηκαν για τη συνεχή μείωση του PCE για κάθε δότη ήταν: εκχύλισμα καλαμποκιού (10), γάλα (10), τυρόγαλο (10), μεθανόλη (12), μελάσες (14), ζάχαρη (26) και αλεύρι (30). Γρήγορος εγκλιματισμός και παραγωγή αιθενίου παρατηρήθηκε στις καλλιέργειες με γάλα, τυρόγαλο και μεθανόλη, ενώ στις υπόλοιπες καλλιέργειες δεν υπήρξε παραγωγή αιθενίου στις 135 ημέρες λειτουργίας. Μετά τον εγκλιματισμό η μείωση του PCE ήταν παρόμοια σε όλες τις καλλιέργειες. Το εκχύλισμα καλαμποκιού, το τυρόγαλο, οι μελάσες και η ζάχαρη απαιτούσαν 5 φορές τη στοιχειομετρική μάζα που απαιτείται για την πλήρη αποχλωρίωση των 3.7 mM PCE σε αιθέρια (δότης/eq PCE σε αιθέρια), ενώ το γάλα και η μεθανόλη απαιτούσαν 20 και 50 φορές, αντιστοίχως, πιθανώς εξαιτίας της παραγωγής μεθανίου. Ανάμεσα στους δότες ηλεκτρονίων οι οικονομικότεροι, με βάση και την αποτελεσματικότητά τους, ήταν το τυρόγαλο και οι μελάσες.	DiStefano et al., 2001
Διήθημα τυρόγαλου	PCE	Μικρόκοσμοι (1: 25% έδαφος+75% υπόγειο)	Αποτελεσματικότητα δοτών ηλεκτρονίων και καταλληλότερη δόση δότη για την	1: Προσθήκη 25 mg/L αζώτου & 5 mg/L φωσφόρου. Οι δότες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν	Σχεδόν όλοι οι εναλλακτικοί δότες ηλεκτρονίων μετέτρεψαν το PCE σε VC υπό μεθανογενείς συνθήκες, υποδεικνύοντας ότι οι μικροοργανισμοί μπορούσαν εύκολα να χρησιμοποιήσουν τους δότες ηλεκτρονίων	Lee et al., 1997

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Μορφή τυρόγαλου	Χλωριωμένα αιθέρια	Εφαρμογή	Σκοπός	Περιγραφή	Αποτελέσματα	Αναφορά
		νερό, 2: 50% έδαφος+50% υπόγειο νερό)	επίτευξη της αναγωγικής αποχλωρίωσης. Αξιολόγηση σύμφωνα με το κόστος και την ικανότητα διάχυσής του.	εκχύλισμα μαγιάς, λύματα, διήθημα τυρόγαλου, εκχύλισμα καλαμποκιού, μελάσες, εναιώρημα κοπριάς σε συγκεντρώσεις 20-400 mg C/L για την αποχλωρίωση 23 μM PCE. 2: Προσθήκη 50 mg/L αζώτου & 10 mg/L φωσφόρου. Οι δότες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βενζοϊκό οξύ, οξικό οξύ, μελάσες και εκχύλισμα καλαμποκιού, σε συγκεντρώσεις 200-23000 mg C/L για την αποχλωρίωση 26 μM PCE.	κατά την περίοδο εγκλιματισμού. Η ελάχιστη δόση που απαιτείται είναι περίπου 60 mg/L οργανικού άνθρακα για την αποχλωρίωση 23 μM PCE. Το pH παρέμεινε ουδέτερο καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Υψηλότερη συκέντρωση VC είχαν οι μικρόκοσμοι με τυρόγαλο, εκχύλισμα καλαμποκιού και κοπριά με 60 mg C/L. Παραγωγή μεθανίου έδειξαν και οι τρεις δότες με υψηλότερη το τυρόγαλο και μικρότερη την κοπριά. Στα 40 mg C/L, η μεγαλύτερη παραγωγή VC επιτεύχθηκε στο τυρόγαλο με πολύ μικρή παραγωγή μεθανίου.	
Υγρή μορφή	TCE	Πειράματα σε στήλες με έδαφος από ρυπασμένη περιοχή	Προσδιορισμός της απόδοσης της αποχλωρίωσης σε πειράματα μεγάλης χρονικής διάρκειας και η αποτελεσματικότητα της βιοεπαύξεσης των <i>Dehalococcoides</i> spp.	Στήλες με έδαφος ως πληρωτικό υλικό και υπόγειο νερό εμπλουτισμένο με 76 μM TCE και δότη ηλεκτρονίων. Τυρόγαλο (502 mg C/L) και δύο είδη γαλακτοποιημένων ελαίων (24000 mg C/L).	Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το τυρόγαλο ήταν η βέλτιστη πηγή ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση εφόσον μετατράπηκε όλο το TCE σε αιθέρια. Αντιθέτως, και τα δύο είδη γαλακτοποιημένου ελαίου δεν υποστήριξαν την ανάπτυξη της κατάλληλης βιοκοινότητας για την πλήρη αποχλωρίωση ακόμα και μετά την βιοεπαύξεση και συσσωρεύτηκε ποσότητα cDCE στις στήλες.	McLean et al., 2015; Mirza et al., 2016

2.3.5.7. Φυσική οργανική ύλη ως δότης ηλεκτρονίων

Η φυσική οργανική ουσία του εδάφους είναι προϊόν της αποσύνθεσης των ζωικών και φυτικών υπολειμμάτων που καταλήγουν στο έδαφος. Ο τρόπος της συσσώρευσής της εξαρτάται τόσο από το είδος των υπολειμμάτων όσο και από τις συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και οξύτητας του εδάφους. Από τα οργανικά συστατικά της τα σημαντικότερα είναι οι υδατάνθρακες (άμυλο, σάκχαρα, πηκτίνες, κυτταρίνες, ημικυτταρίνες, που αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο του 50% των οργανικών συστατικών), τα αζωτούχα συστατικά (πρωτεΐνες, απλές και σύνθετες, αμινοξέα, πεπτιδία κ.λπ., αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο του 20% της ξηρής ουσίας), η λιγνίνη (συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων, μαζί με τις κυτταρίνες και τις ημικυτταρίνες, αποτελεί ποσοστό 5%-30% ξηρής οργανικής ουσίας), τα λίπη, οι κηροί και οι ρητίνες (σε μικρότερες ποσότητες, περίπου <10%). Στις παραπάνω ομάδες οργανικών συστατικών των φυτικών υπολειμμάτων η μέση σύνθεση εκφρασμένη σε ξηρή οργανική ουσία κυμαίνεται ως εξής: C 47%, O 44%, H 7% και N 0,5%-2%. Εκτός όμως αυτών, είναι και τα ανόργανα συστατικά όπως Ca, Mg, K, P, S, σε μικρότερα ποσοστά, λιγότερα του 10%, σε σχέση με τα κύρια συστατικά (Θεοδωρίκας, 2000).

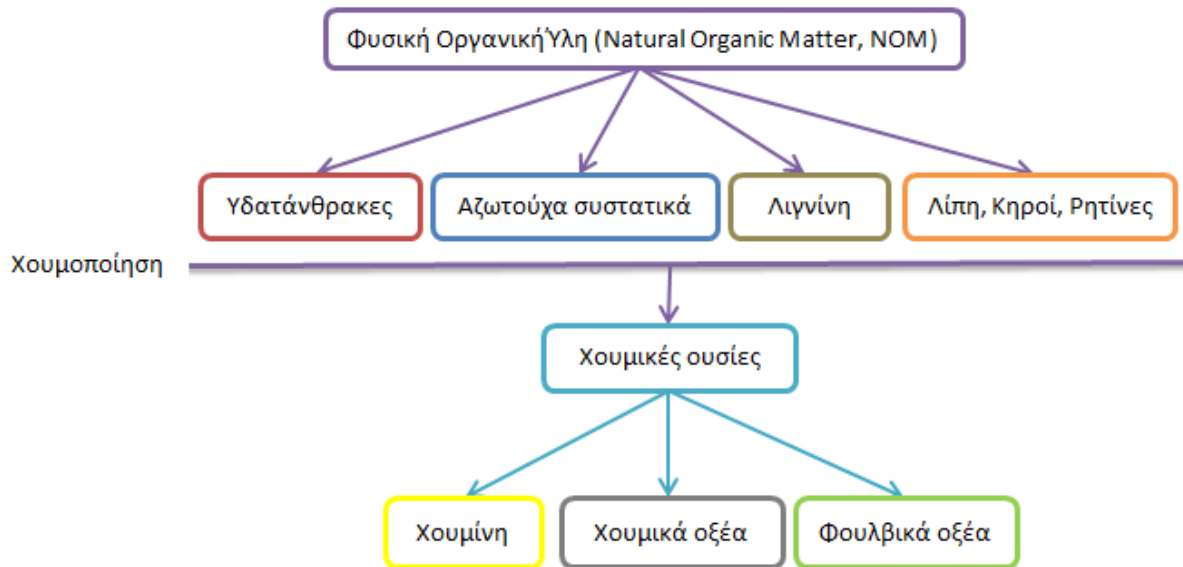
Πίνακας 2.24 Ποσοστό οργανικής ύλης στο έδαφος (Σακελλαριάδης, 1992).

Ποσοστό	Ποσότητα οργανικής ύλης
<0.5%	Χαμηλή
0.5%-1%	Χαμηλή έως μέση
1%-2%	Μέση
2%-4%	Υψηλή

Η αποσύνθεση των οργανικών ζωικών και φυτικών υπολειμμάτων επιτυγχάνεται από πλήθος οργανισμών που ζουν στο έδαφος. Ο όρος της φυσικής οργανικής ουσίας είναι ευρύτερος και περιλαμβάνει αποσυντεθειμένα και μη ζωικά και φυτικά υπολείμματα, ενώ με τον όρο χουμικές ουσίες εννοούμε συστατικά που έχουν υποστεί διάφορου βαθμού μεταβολές και βρίσκονται σε διάφορα στάδια αποσύνθεσης και ανασύνθεσης νέων συστατικών από τους οργανισμούς του εδάφους (Σακελλαριάδης, 1992). Οι χουμικές ουσίες είναι βασικά συστατικά της φυσικής οργανικής ύλης του εδάφους και του νερού, περίπου το 50% των διαλυτών οργανικών ουσιών. Οι χουμικές ουσίες επηρεάζουν τις φυσικές και χημικές ιδιότητες του εδάφους και βελτιώνουν τη γονιμότητά του, ενώ στο νερό επηρεάζουν το pH και την αλκαλικότητά του. Επίσης, επηρεάζουν τη χημεία, τον κύκλο και τη βιοδιαθεσιμότητα των χημικών στοιχείων, όπως και τη μεταφορά και αποδόμηση των ξενοβιοτικών και φυσικών οργανικών χημικών (International Humic Substances Society, 2007; IHSS). Οι χουμικές ουσίες έχουν κολλοειδή χαρακτήρα και το χρώμα τους ποικίλλει από ανοιχτό καφέ έως και μαύρο, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη ειδική επιφάνεια και μεγάλο ηλεκτρικό φορτίο. Τα ανωτέρω χαρακτηριστικά σημαίνουν ότι

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

συγκρατούν μεγάλες ποσότητες νερού (Σακελλαριάδης, 1992). Οι χουμικές ουσίες, με βάση τη διαλυτότητά τους στο νερό, ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες: τη χουμίνη, που δεν διαλύεται στο νερό σε καμία τιμή του pH, το χουμικό οξύ, που δεν διαλύεται σε πολύ ισχυρό όξινο περιβάλλον, δηλαδή $pH < 2$, αλλά διαλύεται στο νερό σε υψηλότερες τιμές του pH, και το φουλβικό οξύ, το οποίο διαλύεται στο νερό σε οποιαδήποτε τιμή του pH (Θεοδωρίκας, 2000).



Σχήμα 2.11 Χουμοποίηση οργανικής ύλης.

Οι χουμικές ενώσεις είναι ετερογενή και σύνθετα μίγματα που δεν έχουν πλήρως διευκρινισμένη τη χημική τους σύσταση (International Humic Substances Society, 2007; Θεοδωρίκας, 2000). Επίσης, μπορούν να αναδιαταχθούν εάν αλλάξουν οι περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως το pH, η ιονική ισχύς και η υγρασία (Aquino et al., 2011). Τα δομικά συστατικά του μορίου τους είναι συμπυκνωμένες ισο- και ετεροκυκλικές ενώσεις 6 και 5 δακτυλίων άνθρακος, σε συνδυασμό με άλλες πλευρικές μονάδες. Τα κύρια συστατικά των χουμικών ενώσεων είναι το βενζόλιο, η πυριδίνη, η κινόνη, το φουράνιο, το πυρόλιο, το ναφθαλένιο, η ινδόλη και η κινολίνη (Σακελλαριάδης, 1992). Οι κινόνες είναι κύρια τμήματα των χουμικών ενώσεων και συχνά χρησιμοποιούνται ως αντιπρόσωποί τους, μιας και θεωρούνται βασικοί δέκτες ηλεκτρονίων. Οι κινόνες χωρίζονται σε 4 κατηγορίες, τις ανθρακινόνες, τις βενζοκινόνες, τις ινδοκινόνες και τις ναφθοκινόνες (Aeschbacher et al., 2011; Lovley et al., 1998).

Οι πιο πολλές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής στο έδαφος επιτυγχάνονται μέσω του μεταβολισμού της φυσικής οργανικής ύλης ή των ρύπων (Wilson et al., 1997). Έτσι,

η φυσική οργανική ύλη μπορεί να επιδράσει θετικά ή/και αρνητικά στην αναγωγική αποχλωρίωση του τριχλωροαιθενίου, αφού μπορεί να δράσει ως δότης, αλλά και ως δέκτης ηλεκτρονίων. Επιπλέον, μπορεί να ροφήσει το τριχλωροαιθένιο στο έδαφος.

❖ Ρόφηση στο έδαφος από τη φυσική οργανική ύλη

Η απορρόφηση στο οργανικό κλάσμα του εδάφους είναι ιδιαίτερα σημαντική για οργανικούς υδροφοβικούς ρύπους, αφού μειώνεται η μάζα του ρύπου στην υγρή φάση, άρα και η βιοδιαθεσιμότητά του. Το αποτέλεσμα είναι ότι δεν είναι εύκολος ο διαχωρισμός της μικροβιακής αποδόμησης και της ρόφησης από το έδαφος. Πολλές έρευνες έχουν δείξει μεγαλύτερους ρυθμούς αποδόμησης σε πειράματα με υπόγειο νερό, χωρίς έδαφος (Althoff et al., 2001).

❖ Φυσική οργανική ύλη ως δότης ηλεκτρονίων

Το τριχλωροαιθένιο μπορεί κάτω από φυσικές συνθήκες να βιοαποδομηθεί μέσω της αναγωγικής αποχλωρίωσης, μία διαδικασία που απαιτεί επαρκή ποσότητα δοτών ηλεκτρονίων. Ο δότης ηλεκτρονίων μπορεί να είναι και η οργανική ύλη του εδάφους, είτε φυσική είτε ανθρωπογενής (άλλοι ρύποι που συνυπάρχουν με τους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες, π.χ. BTEX). Εάν το έδαφος δεν έχει αρκετή ποσότητα δοτών ηλεκτρονίων, τότε η αναγωγική αποχλωρίωση θα σταματήσει. Θεωρείται ότι εάν ένα έδαφος έχει περίπου DOC > 20 mg/l, υδρογόνο > 1 nM ή/και πτητικά λιπαρά οξέα > 0,1 mg/l, τότε έχει μεγαλύτερη δυνατότητα επίτευξης της πλήρους αποχλωρίωσης (Wiedemeier et al., 1998). Επίσης, το είδος της φυσικής οργανικής ύλης παίζει ρόλο, αφού το οξειδοαναγωγικό δυναμικό των χουμικών οξέων είναι μικρότερο από ό,τι των φουλβικών οξέων, με αποτέλεσμα τα φουλβικά οξέα να είναι καλύτερα αναγωγικά μέσα (Wittbrodt & Palmer, 1996).

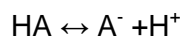
❖ Φυσική οργανική ύλη ως αποδέκτης ηλεκτρονίων

Οι κινόνες αποτελούν το τμήμα των χουμικών ουσιών που χρησιμεύει ως αποδέκτης ηλεκτρονίων, όταν οι μικροοργανισμοί ανάγουν τα χουμικά (Scott et al., 1998; Aeschbacher et al., 2011; Aulenta et al., 2010b; Lovley et al., 1998). Ανάλογα, λοιπόν, με τον τύπο των κινόνων, αυτές μπορούν να αναχθούν, με αποτέλεσμα να είναι ανταγωνιστές για το δότη ηλεκτρονίων με το τριχλωροαιθένιο.

❖ Φυσική οργανική ύλη ως μεταφορέας ηλεκτρονίων

Τα χουμικά οξέα, και πιο συγκεκριμένα οι κινόνες, υπό αναερόβιες συνθήκες μπορούν να εμπλέκονται στη ροή του άνθρακα και των ηλεκτρονίων, μιας και χρησιμοποιούνται εναλλακτικά ως δότης και ως αποδέκτης ηλεκτρονίων, χωρίς τα ίδια να καταναλώνονται. Μεταφέρουν, δηλαδή, ηλεκτρόνια από το αναγωγικό μέσο σε έναν αποδέκτη εναλλάσσοντας συνεχώς την ανηγμένη και την όξινη μορφή τους (Scott et al., 1998; Lovley et al., 1996; Lovley et al., 1998; Aulenta et al., 2010b; Ma et al., 2001; O'Loughlin et al., 1999; Aeschbacher et al., 2011).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Αντίδραση (2.24)



Σχήμα 2.12 Διεργασίες με τη χρήση της κινόνης ως μεταφορέα ηλεκτρονίων. (Μπλε βέλη: Οξείδωση; Κόκκινα βέλη: Αναγωγή).

Πίνακας 2.25 Χρήση οργανικής ύλης ως δότη ηλεκτρονίων στη βιβλιογραφία.

Εφαρμογή	Ρύπος	Οργανική ουσία	Ρόλος	Αποτελέσματα	Αναφορά
Ρυπασμένη περιοχή	PCE	Οργανική ύλη στο έδαφος	Δότης ηλεκτρονίων	Στα σημεία που η οργανική ύλη ήταν >2% έγινε πλήρης αποχλωρίωση και ανιχνεύτηκαν είδη του γένους <i>Dehalococcoides</i> , σε αντίθεση με τα σημεία που η ποσότητα της οργανικής ύλης ήταν περιορισμένη.	Abe et al., 2009a
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	TCE	Δισουλφονική-2,6-ανθρακινόνη (AQDS)	Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (βιοηλεκτροχημικό σύστημα) σε δέκτη	Το TCE μετατράπηκε σε cDCE στις 6 ημέρες λειτουργίας, αλλά δεν προχώρησε η αποχλωρίωση σε VC ή αιθέριο.	Aulenta et al., 2010b
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	Εξαχλωροαιθάνιο, τετραχλωροάνθρακας, βρωμοφόρμιο	Οργανική ύλη στο έδαφος, χουμικά οξέα (IHSS), δισουλφονική-2,6-υδροανθρακινόνη (AHQDS)	Δότης ηλεκτρονίων-Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (Fe (II), HS-) σε δέκτη	Όταν η οργανική ουσία ήταν ο δότης ηλεκτρονίων τότε ο ρυθμός μετατροπής των ρύπων ήταν αργός, με μεγαλύτερο να έχει η κινόνη. Η οργανική ύλη στο έδαφος και τα χουμικά οξέα χρησιμοποιήθηκαν και ως μεταφορείς ηλεκτρονίων, όπου αύξησαν την ταχύτητα μετατροπής των ρύπων (μέχρι και 10 φορές).	Curtis & Reinhard, 1994
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	PCE	Χουμικό οξύ, δισουλφονική-2,6-ανθρακινόνη (AQDS), 2-υδροξύ-1,4-ναφθοκινόνη, υδροκινόνη	Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (Fe/Pd) σε δέκτη	Τα χουμικά οξέα μείωσαν τον ρυθμό αποχλωρίωσης, μιας και μείωσαν τη δραστική επιφάνεια του σιδήρου. Όμως μετά από 24 ώρες ισορροπίας μεταξύ σιδήρου και χουμικών οξέων ο ρυθμός και η απόδοση της αποχλωρίωσης αυξανόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης των χουμικών οξέων. Επίσης, οι κινόνες ενίσχυαν την αναγωγική αποχλωρίωση μετά από 24 ώρες.	Doong & Lai, 2005
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	PCE	Χουμικό οξύ	Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (Fe(0)) σε δέκτη	Τα χουμικά οξέα μείωσαν τον ρυθμό και την απόδοση της αποχλωρίωσης, μιας και μείωσαν τη δραστική επιφάνεια του σιδήρου.	Doong & Lai, 2006
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	TCE	Χουμικό οξύ	Δότης ηλεκτρονίων-Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (γαλακτικό οξύ) σε δέκτη	Αύξηση του ρυθμού αποχλωρίωσης με την αύξηση της συγκέντρωσης των χουμικών οξέων. Πιο συγκεκριμένα, 250 mg/L χουμικών οξέων είχαν 33.3% περισσότερο αιθέριο και 500 mg/L χουμικών οξέων είχαν 60% περισσότερο αιθέριο, από ό,τι το πείραμα ελέγχου (0 mg/L χουμικών οξέων).	Hu et al., 2011
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	Fe (III)	Χουμικό οξύ, δισουλφονική-2,6-ανθρακινόνη (AQDS), 2-υδροξύ-1,4-	Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (οξικό οξύ) σε δέκτη	Η προσθήκη χουμικών οξέων και κινόνων αύξησε τον ρυθμό και την απόδοση της αναγωγής του σιδήρου.	Lovley et al., 1998

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

		ναφθοκινόνη, μεναδιόνη			
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	TCE	Χουμικό οξύ, 8-υδροξυκινόνη, υδροκινόνη, 5-υδροξύ-1,4-ναφθαλινοδιόνη, 2-υδροξύ-1,4-ναφθοκινόνη, κινολινικό οξύ, πολυακρυλικό οξύ	Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (κιτρικό τιτάνιο) σε δέκτη	Η προσθήκη χουμικών οξέων και κινόνων αύξησε τον ρυθμό αναγωγής του TCE.	Ma et al., 2001
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	TCE	Χουμικό οξύ	Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (titanium citrate) σε δέκτη	Μη επίτευξη αποχλωρίωσης με την προσθήκη χουμικών οξέων. Όμως με την προσθήκη νικελίου ή χαλκού παράχθηκε αιθάνιο με τη μείωση του TCE.	O'Loughlin et al., 1999
Μητρικές καλλιέργειες	PCE	Εκχυλισμένη οργανική ύλη εδάφους	Δότης ηλεκτρονίων	Το PCE μετατράπηκε σε cDCE και VC με την προσθήκη οργανικής ύλης εδάφους, ενώ στο πείραμα ελέγχου, με δότη ηλεκτρονίων το εκχύλισμα ζύμης, το PCE μετατράπηκε σε cDCE, όμως με πιο γρήγορο ρυθμό.	Rectanus et al., 2007
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	TCE, carbon chloride, nitrobenzene	Χουμικό οξύ, φουλβικό οξύ, 5-υδροξύ-1,4-ναφθαλινοδιόνη, 2-υδροξύ-1,4-ναφθοκινόνη, δισουλφονική-2,6-ανθρακινόνη (AQDS)	Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (Fe(0)) σε δέκτη	Η οργανική ύλη ανέστειλε τη μετατροπή του TCE, ενώ με την αύξηση της ποσότητάς της χαμήλωνε ο ρυθμός μείωσης, εξαιτίας της μείωσης της δραστηρικής επιφάνειας του σιδήρου. Επίσης, τα χουμικά οξέα είναι πιο ανασταλτικά από τα φουλβικά οξέα, αλλά οι κινόνες αύξαναν τον ρυθμό μείωσης των ρύπων.	Tratnyek et al., 2001
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας	TCE	Διαλυτή οργανική ύλη εδάφους (DOM)	Μεταφορά ηλεκτρονίων από δότη (Fe/Pd) σε δέκτη	Η παρουσία της διαλυτής οργανικής ύλης του εδάφους μπορεί να αναστείλει τη μείωση του TCE.	Zhang et al., 2011

2.3.5.8. Δισθενής σίδηρος ως δότης ηλεκτρονίων

Εκτός από τις οργανικές ουσίες, πηγή ηλεκτρονίων μπορεί να αποτελέσουν και ανόργανες ενώσεις, όπως ο δισθενής σίδηρος, που μελετήθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Έτσι, ο δισθενής σίδηρος μετατρέπεται σε τρισθενή με την ταυτόχρονη παραγωγή ενός ηλεκτρονίου, όπως φαίνεται και στην αντίδραση 2.25:



Σε πειράματα που διεξήχθησαν με δότη ηλεκτρονίων το στοιχειακό σίδηρο (Fe^0) παρατηρήθηκε ότι η μετατροπή του TCE ήταν γρηγορότερη, παρουσία μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα, παράχθηκε cDCE και μετέπειτα VC, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι πραγματοποιήθηκε βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση (Lampron et al., 2001). Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Rosenthal et al. (2004), όπου η ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου είδους του γένους *Dehalococcoides* spp. φάνηκε να σχετίζεται με την παρουσία του στοιχειακού σιδήρου στην καλλιέργεια, ενώ το PCE μετατράπηκε σε αιθένιο σε λιγότερο από 30 ημέρες. Αντιθέτως, στα πειράματα με υδρογόνο παρατηρήθηκε η συσσώρευση του VC, εξαιτίας της κατανάλωσης των ηλεκτρονίων από τη μεθανογένεση.

Αναλυτικότερα, η επίδραση του σιδήρου στη βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση περιγράφηκε λεπτομερώς στην Ενότητα 2.2.4.

2.4. Επίδραση ανταγωνιστικών αναγωγικών διεργασιών

2.4.1. Εισαγωγή

Ένα από τα βασικά προβλήματα της βιολογικής αναγωγικής αποχλωρίωσης είναι ο ανταγωνισμός για το δότη ηλεκτρονίων, που μπορεί να δημιουργηθεί μεταξύ των αποχλωριωτών και άλλων αναερόβιων μικροοργανισμών (Aulenta et al., 2005a). Μάλιστα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα για τον προσδιορισμό του ρυθμού και της απόδοσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης, της ποσότητας δότη ηλεκτρονίων που απαιτείται για τη μετατροπή σε αιθέριο και τελικώς την επιτυχή αποκατάσταση της ρυπασμένης περιοχής (Schneidewind et al., 2014).

Οι ανταγωνιστικές αναγωγικές διεργασίες που συναντώνται συχνότερα είναι η μεθανογένεση, η οξικογένεση, η θεικοαναγωγή, η σιδηροαναγωγή και η απονιτροποίηση. Στις οποίες αναφερόμαστε με τον όρο «Τελικές διεργασίες αποδοχής ηλεκτρονίων» (Terminal Electron-Accepting Processes; TEAPs; Jakobsen et al., 1998; Watson et al., 2003). Η διαθεσιμότητα του δότη ηλεκτρονίων ρυθμίζει τη σειρά πραγματοποίησης των αντιδράσεων. Όταν ο δότης είναι σε περιορισμένη ποσότητα, οι πιο θερμοδυναμικά αποδοτικές διεργασίες και οι μικροοργανισμοί που τις επιτελούν θα επικρατούν στο πεδίο (Wei et al., 2016). Η κυρίαρχη αναγωγική διεργασία μπορεί να επικρατεί είτε σε αρκετά χιλιόμετρα σε έναν υπόγειο υδροφόρα ή μόλις λίγα μέτρα σε μια ρυπασμένη περιοχή, ενώ σε μια κάθετη τομή του εδάφους για λιγότερο από ένα μέτρο (Brown et al., 2005). Όμως, εξαιτίας της ανομοιομορφίας του πεδίου μπορεί οι διεργασίες να πραγματοποιούνται ταυτόχρονα και η ομάδα μικροοργανισμών που κυριαρχεί να αλλάζει από σημείο σε σημείο (Bennett et al., 2007).

Λόγω αυτού του ανταγωνισμού, η αναγωγή των χλωριωμένων αιθερίων καταναλώνει μόνο ένα μικρό κλάσμα των παραγόμενων ηλεκτρονίων (Tiehm & Schmidt, 2011). Ο τρισθενής σίδηρος και τα θειικά ιόντα θεωρούνται ως οι κύριοι ανταγωνιστές των οργανοχλωριωμένων ενώσεων (Ni et al., 2014). Επομένως, απαιτούνται μεγαλύτερες ποσότητες δότη για να επιτευχθεί η επιθυμητή πλήρης αποχλωρίωση από ότι ορίζουν οι στοιχειομετρικοί υπολογισμοί, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το κόστος της αποκατάστασης (Yang & McCarty, 1998). Ταυτόχρονα η βιοκοινότητα πληθαίνει προκαλώντας εμφράξεις κοντά στα σημεία εγχύσεων, ενώ μπορεί να συσσωρευτούν επικίνδυνα προϊόντα όπως το υδρόθειο και το μεθάνιο (Heimann et al., 2007).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Ενότητα 2.3, το υδρογόνο καταναλώνεται από τα είδη του γένους *Dehalococcoides* spp. για τη μετατροπή των χλωριωμένων υδρογονανθράκων σε αιθέριο, όμως, πολλές άλλες αναγωγικές διεργασίες, το χρησιμοποιούν ως τελικό δότη ηλεκτρονίων (Chapelle & Bradley, 2003). Ως αποτέλεσμα, ο ανταγωνισμός για το μοριακό υδρογόνο αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα της απόδοσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης (Badin et al., 2016). Στον Πίνακα 2.26 παρουσιάζονται οι αντιδράσεις των αναγωγικών διεργασιών που χρησιμοποιούν το υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 2.26 Αντιδράσεις κατανάλωσης υδρογόνου (Πηγές: Thauer et al., 1977; Dolfing & Janssen, 1994; Dolfing J., 2016; Dolfing, 2004; He et al., 2002; Stams et al., 2005; Löffler et al., 1999).

Αντίδραση	ΔG° (KJ)	Διεργασία
$5H_2 + 2NO_3^- + 2H^+ \rightarrow N_2 + 6H_2O$	-1290	Απονιτροποίηση
$H_2 + 2Fe^{3+} \rightarrow 2Fe^{2+} + 2H^+$	-228.3	Σιδηροαναγωγή
$4H_2 + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$	-152.2	Θεικοαναγωγή
$4H_2 + HCO_3^- + CO_2 \rightarrow CH_3COO^- + 3H_2O$	-108.1	Οξικογένεση
$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	-135.6	Μεθανογένεση
$H_2 + C_2Cl_4 \rightarrow C_2HCl_3 + H^+ + Cl^-$	-173.4	Αποχλωρίωση
$H_2 + C_2HCl_3 \rightarrow C_2H_2Cl_2 + H^+ + Cl^-$	-168.9	
$H_2 + C_2H_2Cl_2 \rightarrow C_2H_3Cl + H^+ + Cl^-$	-139.4	
$H_2 + C_2H_3Cl \rightarrow C_2H_4 + H^+ + Cl^-$	-149.5	

Εκτός από το υδρογόνο, το οξικό οξύ μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί άμεσα ως δότης ηλεκτρονίων από οξικοτροφικούς μικροοργανισμούς οργανοαλογονικής αναπνοής που πραγματοποιούν τα πρώτα στάδια της αναγωγικής αποχλωρίωσης, δηλαδή την αναγωγή του PCE και του TCE σε DCEs (Krumholz L., 1997; Krumholz et al., 1996). Παράλληλα, μπορεί να καταναλωθεί άμεσα από οξικοτροφικούς μικροοργανισμούς για την πραγματοποίηση άλλων διεργασιών, όπως η μεθανογένεση, η σιδηροαναγωγή, η θεικοαναγωγή, κ.ά., (Hedderich & Whitman, 2013; Lovley, 2013; Rabus et al., 2013) ή έμμεσα από την οξειδωσή του σε υδρογόνο, όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 2.3.5.2. Το οξικό οξύ μπορεί να καταναλωθεί και από τους υδρογονοτροφικούς μικροοργανισμούς αναγωγικής αποχλωρίωσης ως η απαιτούμενη πηγή άνθρακα για την ανάπτυξή τους (Richardson R., 2016; Tang et al., 2009), ενώ οι υδρογονοτροφικοί μεθανογόνοι και οξικογόνοι θεωρούνται ότι είναι γενικά αυτοτροφικοί (Ma et al., 2006). Στον Πίνακα 2.27 παρουσιάζονται οι αντιδράσεις των αναγωγικών διεργασιών που ανταγωνίζονται για το οξικό οξύ.

Πίνακας 2.27 Αντιδράσεις κατανάλωσης οξικού οξέος (Πηγές: Thauer et al., 1977; Dolfing & Janssen, 1994; Dolfing J., 2016; Dolfing, 2004; Krumholz et al., 1996; Lovley & Phillips, 1988; Stams et al., 2005).

Αντίδραση	ΔG° (KJ)	Διεργασία
$CH_3COO^- + 2HNO_3 + 2H^+ \rightarrow N_2 + HCO_3^- + CO_2 + 3H_2O$	-1182	Απονιτροποίηση
$CH_3COO^- + 3H_2O + 2Fe^{3+} \rightarrow 2Fe^{2+} + 2H^+ + HCO_3^- + CO_2 + 3H_2$	-138.6	Σιδηροαναγωγή
$CH_3COO^- + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow HS^- + HCO_3^- + CO_2 + H_2O$	-44.1	Θεικοαναγωγή
$CH_3COO^- + H_2O \rightarrow CH_4 + HCO_3^-$	-31.0	Μεθανογένεση
$CH_3COO^- + C_2Cl_4 + 3H_2O \rightarrow C_2HCl_3 + HCO_3^- + CO_2 + H^+ + Cl^- + 3H_2$	-65.3	Αποχλωρίωση
$CH_3COO^- + C_2HCl_3 + 3H_2O \rightarrow C_2H_2Cl_2 + HCO_3^- + CO_2 + H^+ + Cl^- + 3H_2$	-60.7	

Η οξειδοαναγωγή είναι ένα συχνό φαινόμενο που δημιουργεί ένα σύνθετο ιστό συντροφικών σχέσεων μεταξύ των παραγωγών και των καταναλωτών ηλεκτρονίων

(Richardson R, 2016). Υπό αναερόβιες συνθήκες, το υδρογόνο και το οξικό οξύ παράγονται συνεχώς από ζυμωτικούς μικροοργανισμούς που μεταβολίζουν τη φυσική ή ανθρωπογενή οργανική ύλη (Chapelle & Bradley, 2003). Οι οξειδώσεις των οργανικών ουσιών είναι κυρίως ενδόεργες αντιδράσεις (απαιτούν ενέργεια), αλλά υπό χαμηλή μερική πίεση υδρογόνου γίνονται εξώεργες, δηλαδή παράγουν ενέργεια (Schink & Stams, 2006). Η συγκέντρωση του υδρογόνου, όμως, στον υδροφόρο εξαρτάται από τις τελικές διεργασίες αποδοχής ηλεκτρονίων (Chapelle & Bradley, 2003). Έτσι, η απόδοση της οργανοαλογονικής αναπνοής εξαρτάται από την οξείδωση των οργανικών ουσιών και την αποτελεσματική χρήση του υδρογόνου και του οξικού οξέος, που είναι οι άμεσοι δότες ηλεκτρονίων.

Επιπλέον, η αποχλωρίωση επιτυγχάνεται και συμμεταβολικά, όπως έχει αναπτυχθεί στην Ενότητα 2.3, όπου ο δότης ηλεκτρονίων καταναλώνεται από μικροοργανισμούς που ανάγουν διάφορους αποδέκτες και ένα μικρό κλάσμα των ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται τυχαία για την αναγωγή των χλωριωμένων αιθενίων (Frascati et al., 2015). Μια ακόμη αρνητική επίπτωση των αναερόβιων διεργασιών που επιτελούνται σε έναν υδροφόρο είναι η πιθανή τοξική επίδραση των προϊόντων τους στη βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση. Πιο συγκεκριμένα, έχει θεωρηθεί ότι τα σουλφίδια, που είναι το τελικό προϊόν της αναγωγής των θειικών ιόντων είναι τοξικά για τα βακτήρια οργανοαλογονικής αναπνοής (Sung, 2005).

Επομένως, η ύπαρξη διάφορων αναγωγικών διεργασιών μπορεί να καταστείλει, αλλά και να υποβοηθήσει την αποχλωρίωση. Στην παρούσα ενότητα, εξετάζεται η επίδραση των αναγωγικών διεργασιών στη βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση με έμφαση στη διερεύνηση του ανταγωνισμού για το δότη ηλεκτρονίων, που αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών από χλωριωμένα αιθένια.

2.4.2. Είδη ανταγωνισμού

Τα είδη του ανταγωνισμού μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες: α) κινητικός ανταγωνισμός, ο οποίος αναφέρεται στην ικανότητα ανάπτυξης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης υποστρώματος και β) θερμοδυναμικός ανταγωνισμός, ο οποίος εκφράζει την ικανότητα ανάπτυξης και συντήρησης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών υπό χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (Stams et al., 2003).

Πιο συγκεκριμένα, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορεί να εκφραστεί με την κινητική Monod ανάλογη της εξίσωσης τύπου Michaelis-Menten (Καραγκούνη-Κύρτσου, 1999; Κολιάης, 2001; Kandris, 2017):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}$$

Εξίσωση 2.5

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Όπου, μ : ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μικροοργανισμών, day^{-1}

μ_{\max} : μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης μικροοργανισμών, day^{-1}

S: συγκέντρωση υποστρώματος που είναι περιοριστικός παράγοντας, mg/L

K_s : σταθερά κορεσμού, η τιμή της οποίας ισούται με τη συγκέντρωση υποστρώματος όταν ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης είναι ίσος με το ήμισυ του μέγιστου ρυθμού ($\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$), mg/L .

Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός υπολογίζεται στην περίπτωση της απουσίας περιοριστικής συγκέντρωσης υποστρώματος, ενώ η σταθερά κορεσμού εκφράζει την εξάρτηση του ρυθμού αύξησης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Επίσης, η τιμή της δείχνει την ευκολία πρόσληψης του υποστρώματος από τον μικροοργανισμό. Όσο χαμηλότερη είναι η K_s τόσο μεγαλύτερη είναι η ευκολία πρόσληψης της τροφής και ο μικροοργανισμός αυξάνεται πιο γρήγορα σε ένα περιβάλλον με περιορισμένη συγκέντρωση υποστρώματος (Καραγκούνη-Κύρτσου, 1999).

Επομένως, ο κινητικός ανταγωνισμός επιτυγχάνεται όταν ο μικροοργανισμός A έχει υψηλότερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης από τον B με την ίδια συγκέντρωση υποστρώματος. Έτσι, ο μικροοργανισμός A που επικρατεί αναπτύσσεται περισσότερο από τον ανταγωνιστή του σε οποιαδήποτε συγκέντρωση υποστρώματος. Αυτού του τύπου ο ανταγωνισμός παρατηρείται συνήθως μεταξύ μικροοργανισμών που χρησιμοποιούν διαφορετικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων, εφόσον η παραγωγή ενέργειας αυξάνει όσο μεγαλώνει το δυναμικό οξειδοαναγωγής του αποδέκτη ηλεκτρονίων. Αντιθέτως, ο θερμοδυναμικός ανταγωνισμός πραγματοποιείται όταν ο μικροοργανισμός A έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το υπόστρωμα, δηλαδή μικρότερη τιμή K_s , και μικρότερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ από τον μικροοργανισμό B. Έτσι, υπό χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος ο μικροοργανισμός A θα μπορεί να αναπτύσσεται και να υπερτερεί έναντι του B (Stams et al., 2003). Επομένως, μια μικρή τιμή οριακής συγκέντρωσης δείχνει ότι ο μικροοργανισμός έχει την ικανότητα ανάπτυξης υπό χαμηλές ποσότητες δότη και μπορεί να διατηρεί τη συγκέντρωση σε αυτό το επίπεδο.

Σε ένα υπόγειο υδροφόρα, το υδρογόνο παράγεται από τη ζύμωση οργανικών ουσιών και καταναλώνεται από πλήθος μικροοργανισμών αναγωγής νιτρικών, θειικών, σιδήρου και διοξειδίου του άνθρακα (Wiedemeier et al., 1998), που είναι σε αφθονία στο περιβάλλον (Christ et al., 2005). Ως αποτέλεσμα, η συγκέντρωση του υδρογόνου διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα (Cord-Ruwisch et al., 1988) και ο ανταγωνισμός που συναντάται πιο συχνά στο συγκεκριμένο περιβάλλον είναι ο θερμοδυναμικός. Άρα το διαθέσιμο επίπεδο υδρογόνου είναι καθοριστικός παράγοντας για τη δράση των διάφορων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών (Yang & McCarty, 1998; Fennell & Gossett, 1998).

Κάθε αναγωγική διεργασία σχετίζεται με ένα εύρος τιμών οριακής συγκέντρωσης, το οποίο εξαρτάται αφενός από τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών

που την επιτελούν και αφετέρου από την απόδοση ενέργειας από την οξειδωση υδρογόνου. Όσο μεγαλύτερη η παραγωγή ενέργειας από την αντίδραση τόσο μικρότερη είναι η οριακή συγκέντρωση (Yang & McCarty, 1998). Οι οριακές συγκεντρώσεις (threshold) για την πρόσληψη και χρήση του υδρογόνου με σκοπό την ανάπτυξη των μικροοργανισμών για κάθε αναγωγική διεργασία φαίνονται στον Πίνακα 2.28.

Πίνακας 2.28 Οριακές συγκεντρώσεις υδρογόνου σε αναερόβιο περιβάλλον (Πηγές: Löffler et al., 1999; Lu et al., 2001; Luijten et al., 2004; Hoelen & Reinhard, 2004).

Αναγωγική διεργασία	Μετατροπή	Οριακή συγκέντρωση H ₂ (nM)
Απονιτροποίηση	NO ₃ ⁻ → N	<0.05
Σιδηροαναγωγή	Fe ³⁺ → Fe ²⁺	0.1 - 0.8
Θεικοαναγωγή	SO ₄ ²⁻ → S ²⁻	1 - 15
Οξικογένεση	CO ₂ → CH ₃ COOH	>336
Μεθανογένεση	CO ₂ → CH ₄	5 - 95
Αποχλωρίωση	PCE, TCE → cDCE	0.6 - 0.9
	cDCE → VC	0.1 - 2.5
	VC → ETH	1.6 - 24

Από τον Πίνακα 2.28 φαίνεται ότι η αναγωγική αποχλωρίωση των PCE, TCE και cDCE, έχει μικρές οριακές τιμές για την πρόσληψη του υδρογόνου, δηλαδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο δότης ηλεκτρονίων ακόμα και σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης. Ως εκ τούτου η αναγωγική αποχλωρίωση αποκτά ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα συγκριτικά με τη μεθανογένεση, τη θεικοαναγωγή και κυρίως την οξικογένεση όταν το υδρογόνο βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση. Όμως, η αναγωγή των ουσιών με λιγότερα άτομα χλωρίου στο μόριό τους, όπως το VC, έχουν υψηλότερη οριακή συγκέντρωση πρόσληψης υδρογόνου με αποτέλεσμα η διεργασία να είναι λιγότερο ανταγωνιστική, καθώς μεταβαίνει στα τελευταία στάδια (Lu et al., 2001). Επιπλέον, οι απονιτροποιητικοί και οι σιδηροαναγωγικοί μικροοργανισμοί υπερτερούν στην πρόσληψη των χαμηλών συγκεντρώσεων του υδρογόνου από ότι τα βακτήρια οργανοαλογονικής αναπνοής (Chapelle & Bradley, 2003; Kouznetsova et al., 2010). Επομένως, η αποτελεσματικότητα της αποχλωρίωσης ποικίλλει ανάλογα με τις αναγωγικές συνθήκες και την οργανοχλωριωμένη ουσία. Οι λιγότερο χλωριωμένες ουσίες, TCE και PCE ανάγονται υπό ανοξικές και σιδηροαναγωγικές συνθήκες, ενώ τα DCEs και το VC υπό θεικοαναγωγικές και μεθανογόνες συνθήκες (Chapelle & Bradley, 2003).

Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα πειράματα σε στήλη που πραγματοποίησαν οι Azizian et al. (2010), όπου παρατηρήθηκε μια μετατόπιση στη σειρά προτεραιότητας των αναγωγικών διεργασιών. Συγκεκριμένα, η αποχλωρίωση και θεικοαναγωγή πραγματοποιήθηκαν πριν την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου. Η αλλαγή αυτή μάλλον οφείλεται στη διαφορετική κατανομή των μικροοργανισμών γύρω από τα εδαφικά ορυκτά, δεδομένου ότι, οι μικροοργανισμοί αναγωγής σιδήρου

αναπτύσσονται κοντύτερα στην επιφάνεια των ορυκτών συγκριτικά με τους θεικοαναγωγικούς μικροοργανισμούς και οργανοαλογονικής αναπνοής, που μπορούν να αναπτυχθούν στην εξωτερική στρώση της βιολογικής μεμβράνης και να έχουν άμεση επαφή με το δότη ηλεκτρονίων.

Παρακάτω, αναλύεται η επίδραση της μεθανογένεσης, της οξικογένεσης και της αποθείωσης, με έμφαση στην τελευταία αναφερόμενη αναγωγική διεργασία, εφόσον αποτελεί βασικό στόχο μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

2.4.3. Επίδραση μεθανογένεσης και οξικογένεσης στη βιολογική αποχλωρίωση

Η παραγωγή μεθανίου θεωρείται μια από τις κύριες αναερόβιες διεργασίες, ενώ πραγματοποιείται κατά σειρά μετά την απονιτροποίηση, την αποθείωση, τη σιδηροαναγωγή και την οξικογένεση (Bennett et al., 2007; Gerardi, 2003). Ο όρος «οξικογένεση» (Acetogenesis) αναφέρεται στη διεργασία κατά την οποία γίνεται η σύνθεση του ακετυλο-συνένζυμου Α (acetyl-CoA) από την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα (Ragsdale & Pierce, 2008), όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 2.3.4.2.

Η μεθανογένεση είναι σημαντικός ανταγωνιστής για το δότη ηλεκτρονίων, εφόσον πραγματοποιείται σε παρόμοιες περιβαλλοντικές και αναγωγικές συνθήκες με την αποχλωρίωση των TCE, DCEs και VC (Aulenta et al., 2006a). Λόγου χάριν, 95% των ηλεκτρονίων από την οξειδωση του γαλακτικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μεθανίου και το υπόλοιπο 5% για την αναγωγική αποχλωρίωση του PCE (Ballapragada et al., 1997a). Επιπλέον, σε πειράματα που διεξήχθησαν σε στήλες, το 94% του υδρογόνου που εισήχθη χρησιμοποιήθηκε για τη μεθανογένεση και το υπόλοιπο για την αναγωγή του PCE (Ma et al., 2003), ενώ σε πειράματα με μικρόκοσμους το 72.5% των ηλεκτρονίων καταναλώθηκαν από την παραγωγή του μεθανίου και υπόλοιπο από την αποδόμηση του TCE (Men et al., 2013). Οι Schneidewind et al. (2014) παρατήρησαν, επίσης, ότι το μεγαλύτερο μέρος των ισοδύναμων ηλεκτρονίων από το γαλακτικό οξύ και τις μελάσσες διοχετεύθηκαν προς τη μεθανογένεση. Όμως και η οξικογένεση μπορεί να υπερισχύσει ως πρωταρχική αναγωγική διεργασία με τη μεθανόλη ως δότη ηλεκτρονίων, όπως φάνηκε από τα πειράματα των DiStefano et al. (1991) και των Duhamel & Edwards (2007).

Ωστόσο, η επιλογή του κατάλληλου είδους δότη ηλεκτρονίων μπορεί να υποβοηθήσει την αναγωγική αποχλωρίωση έναντι των μεθανογόνων και οξικογόνων μικροοργανισμών (Fennell & Gossett, 1998). Από παλαιότερες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η επιθυμητή πλήρης αποχλωρίωση μπορεί να επιτευχθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις υδρογόνου, όπως αναλύθηκε και παραπάνω, εξαιτίας της μικρής οριακής συγκέντρωσης που φέρουν οι αποχλωριωτές (Smatlak et al., 1996; Fennell et al., 1997; Ballapragada et al., 1997a). Το εύρημα αυτό δείχνει ότι οι μικροοργανισμοί αποχλωρίωσης έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν υπό χαμηλά επίπεδα υδρογόνου, αλλά άλλες ομάδες μικροοργανισμών θα υπερισχύσουν σε

υψηλότερες συγκεντρώσεις (Middelorp et al., 1999). Κατά συνέπεια, οι οργανικές ουσίες που διασπώνται αργά παράγοντας υδρογόνο, όπως το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ, δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες προσδίδοντας ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στην αποχλωριωτική κοινότητα (Smatlak et al., 1996; Fennell et al., 1997; Middelorp et al., 1999).

Για παράδειγμα, στα πειράματα των Yang & McCarty (1998) παρατηρήθηκε ότι με την προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης υδρογόνου (4.1 mM) η κυρίαρχη διεργασία ήταν η οξικογένεση, ενώ όταν προστέθηκαν 300 μM βενζοϊκού οξέος, το οποίο παρήγαγε έως και ~130 nM υδρογόνου, υπήρξε αύξηση της παραγωγής του μεθανίου. Όμως, η επίδοση της αποχλωρίωσης βελτιώθηκε με το προπιονικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων, το οποίο παρήγαγε αργά ποσότητες υδρογόνου κάτω από την οριακή συγκέντρωση για τη μεθανογένεση. Κατά συνέπεια θεωρήθηκε ότι η μείωση της δόσης δότη ηλεκτρονίων και η χρήση ουσιών που παράγουν αργά μικρές ποσότητες υδρογόνου ή η περιοδική προσθήκη του υποστρώματος είναι ενδεδειγμένες πρακτικές για την ενίσχυση της αποχλωρίωσης (Lee et al., 2007b; Ma et al., 2006).

Πάρα ταύτα, η αποχλωρίωση του TCE μπορεί να επιτευχθεί ακόμα και με υψηλές συγκεντρώσεις δότη ηλεκτρονίων υπό διάφορες αναγωγικές συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, 2 μM TCE μετατράπηκαν σε cDCE και αιθένιο εντός 20 ημερών με 30 mM οξικού οξέος σε μεθανογόνες συνθήκες ή 0.3% v/v μελάσσα σε οξικογόνες (Boorathy & Peters, 2001). Επίσης, εγκλιματισμένη μικτή καλλιέργεια είχε την ικανότητα αποχλωρίωσης 35 μM PCE χρησιμοποιώντας 300 mM μεθανόλη, δηλαδή καλύπτοντας την ανάγκη σε ηλεκτρόνια περίπου 6500 φορές παραπάνω, υπό την παρουσία μικροοργανισμών παραγωγής μεθανίου (Cabirol et al., 1998). Όμως, η προσθήκη μεγάλης ποσότητας δότη ηλεκτρονίων οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή μεθανίου κατά τη διάρκεια ή/και μετά τη μετατροπή των χλωριωμένων αιθινίων σε αιθένιο. Επίσης, η προσθήκη δοτών ηλεκτρονίων που οξειδώνονται γρήγορα για την παραγωγή υδρογόνου ευνοεί τον ρυθμό και την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης, μόνο όμως αν οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να διατηρηθούν σε χαμηλά επίπεδα (Wen et al., 2015).

Τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας συνοψίζονται, στον Πίνακα 2.29 όπου παρουσιάζεται ο καταμερισμός των ηλεκτρονίων από πειράματα αναγωγικής αποχλωρίωσης υπό μεθανογόνες συνθήκες με διάφορες οργανικές ουσίες ως δότες.

Πίνακας 2.29 Απόδοση μεθανογένεσης και οξικογένεσης σε καλλιέργειες αποχλωρίωσης.

Περιγραφή πειράματος	Καλλιέργεια	Ρύπος	Δότης ηλεκτρονίων	Απόδοση αποχλωρίωσης	$\frac{e^- \text{Αποχλωρίωση}}{e^- \text{Δόσης}}$	Απόδοση παραγωγής οξικού οξέος	$\frac{e^- \text{Παραγωγή οξικού οξέος}}{e^- \text{Δόσης}}$	Απόδοση μεθανογένεσης	$\frac{e^- \text{Μεθανογένεση}}{e^- \text{Δόσης}}$	Αναφορά
Πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας	Αναπτυγμένη από ίζημα ποταμού	0.3 mM TCE (1.8 meq/L)	1.5 mM Γαλακτικό οξύ (18 meq/L)	Μέχρι την 19 ^η ημέρα είχε παραμείνει 1% VC, με ρυθμό παραγωγής αιθενίου 34 mM/day.	11%	Από την 1 ^η ημέρα ξεκίνησε η παραγωγή του οξικού οξέος και παρέμεινε περίπου 0.7 mM από την 5 ^η ημέρα και μετά.	<<32%*	Το μεθάνιο αυξανόταν με σταθερό ρυθμό και έφτασε περίπου 85 μM την τελευταία ημέρα λειτουργίας (23 ^η ημέρα).	4%	Wen et al., 2015
			3 mM Μεθανόλη (18 meq/L)	Την 40 ^η ημέρα υπήρχε ακόμα 1% cDCE και 10% VC, ενώ το υπόλοιπο είχε μετατραπεί σε αιθέριο.	12%	Η παραγωγή ξεκίνησε την 5 ^η ημέρα, ενώ από την 10 ^η ημέρα και μετά η τιμή παρέμεινε σταθερή περίπου σε 1.2 mM.	55%	Από την 10 ^η ημέρα το μεθάνιο ήταν περίπου 0.4 mM όπου παρέμεινε σταθερό ως το τέλος του πειράματος.	15%	
			2.25 mM Οξικό οξύ (18 meq/L)	Στο τέλος του πειράματος το μισό TCE είχε μετατραπεί σε cDCE και το άλλο μισό σε VC.	10%	Η μεγαλύτερη μάζα του οξικού οξέος (95%) παρέμεινε στο μπουκάλι και δεν καταναλώθηκε.		Η παραγωγή του μεθανίου παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (30 μM).	1%	
			9 mM Υδρογόνο (18 meq/L)	Την 40 ^η ημέρα, το 63% του TCE είχε μετατραπεί σε VC και το 39% σε αιθέριο, ενώ είχε παραμείνει μια μικρή ποσότητα cDCE (17%).	8%	Η οξικογένεση ξεκίνησε από 1 ^η ημέρα και συνεχίστηκε ως την 5 ^η ημέρα όπου η συγκέντρωση ήταν 1.6 mM. Στη συνέχεια παρέμεινε σταθερή ως την 40 ^η ημέρα.	72%	Η συγκέντρωση του μεθανίου έφτασε περίπου 0.45 mM την 9 ^η ημέρα και μετά παρέμεινε σταθερή ως το τέλος.	19%	
Πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας	Προέλευση από αναερόβιο ιλύ ΕΕΛ	110 μM PCE (0.88 meq/L)	220 μM Αιθανόλη (2.6 meq/L)	Σε 8 ώρες το PCE είχε μειωθεί κατά 64% και είχε μετατραπεί κυρίως σε VC.	17%	Δεν μετρήθηκε το οξικό οξύ.		Μεθάνιο παράχθηκε γρήγορα τις πρώτες 3.5 ώρες και μετά σταμάτησε.	11%	Fennell et al., 1997

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Περιγραφή πειράματος	Καλλιέργεια	Ρύπος	Δότης ηλεκτρονίων	Απόδοση αποχλωρίωσης	$\frac{e^-_{\text{Αποχλωρίωση}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Απόδοση παραγωγής οξικού οξέος	$\frac{e^-_{\text{Παραγωγή οξικού οξέος}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Απόδοση μεθανογένεσης	$\frac{e^-_{\text{Μεθανογένεση}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Αναφορά
			220 μM Γαλακτικό οξύ (2.6 meq/L)	Την 2 ^η ημέρα μετρήθηκε μόνο VC και μια μικρή ποσότητα αιθενίου (9%).	30%			Η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν λιγότερο από 10 μM στις 46 ώρες λειτουργίας.	7%	
			147 μM Προπιονικό οξύ (2.1 meq/L)	Μετά από 44 ώρες λειτουργίας, το PCE είχε μετατραπεί σε VC (77%) και TCE (9%).	25%			Μόνο ίχνη μεθανίου ανιχνεύτηκαν.	0%	
			220 μM Βουτυρικό οξύ (4.4 meq/L)	Το PCE ανάχθηκε σε VC (64%) και TCE (36%) εντός 24 ωρών.	12%			Η παραγωγή μεθανίου ήταν μικρότερη από ότι στα πειράματα με αιθανόλη αλλά περισσότερη από ότι στα πειράματα με προπιονικό.	1%	
Πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας	Παρασκευή από χωνεμένη ιλύ ΕΕΛ	80 μM cDCE (0.32 meq/L)	300 μM Βενζοϊκό οξύ (9 meq/L)	Στις 77 ημέρες λειτουργίας, 15% VC είχε παραμείνει, ενώ το υπόλοιπο είχε παραμείνει σε cDCE.	3%	Στις 30 ημέρες, η συγκέντρωση του οξικού οξέος αυξήθηκε φτάνοντας περίπου 1.9 mM. Μετά η τιμή παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος του πειράματος.	38%	Η συγκέντρωση μεθανίου αυξήθηκε την 18 ^η ημέρα και παρέμεινε σταθερή μέχρι την 28 ^η ημέρα (0.3 mM).	27%	Yang & McCarty, 1998
			4.1 mM Υδρογόνο (8.2 meq/L)	Όλο το cDCE είχε μετατραπεί σε VC (10%) αλλά και κυρίως σε αιθέριο (85%) σε 77 ημέρες.	4%	Η παραγωγή οξικού οξέος πραγματοποιήθηκε στις 10 ημέρες και μετά παρέμεινε σταθερή (1.8 mM).	106%	Η παραγωγή του μεθανίου παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (0.08 mM).	8%	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Περιγραφή πειράματος	Καλλιέργεια	Ρύπος	Δότης ηλεκτρονίων	Απόδοση αποχλωρίωσης	$\frac{e^-_{\text{Αποχλωρίωση}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Απόδοση παραγωγής οξικού οξέος	$\frac{e^-_{\text{Παραγωγή οξικού οξέος}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Απόδοση μεθανογένεσης	$\frac{e^-_{\text{Μεθανογένεση}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Αναφορά
Πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας με τη συχνή προσθήκη cDCE		50 μM cDCE (0.2 meq/L)	300 μM Βενζοϊκό οξύ (9 meq/L)	Συνολικά προστέθηκαν 0.15 mM cDCE από τα οποία το 75% μετατράπηκε σε αιθέριο σε 75 ημέρες.	4%	Δεν μετρήθηκε το οξικό οξύ.		Περίπου 0.45 mM μεθανίου παράχθηκαν μέχρι την 10 ^η ημέρα και η συγκέντρωση αυτή παρέμεινε σταθερή ως το τέλος του πειράματος.	38%	
			650 μM Προπιονικό οξύ (9.1 meq/L)	Στο διάστημα 75 ημερών περίπου 0.3 mM cDCE προστέθηκαν και μετατράπηκαν σε αιθέριο.	14%			Η παραγωγή του μεθανίου ξεκίνησε από τις πρώτες ημέρες λειτουργίας και μετέπειτα παρέμεινε σχεδόν σταθερή.	16%	
Καλλιέργεια με εβδομαδιαία τροφοδοσία	Αναπτυγμένη από ίζημα ποταμού	0.5 mM PCE (4 meq/L)	Πείραμα ελέγχου δίχως δότη + 10 mg/L Εκχύλισμα ζύμης (YE; 1.8 meq/L)	Μια μικρή ποσότητα PCE (17%) είχε παραμείνει στο σύστημα. Η μεγαλύτερη μάζα είχε μετατραπεί σε cDCE (43%), ενώ η υπόλοιπη είχε αναχθεί σε TCE και VC.	72%	Η οξικογένεση κατανάλωσε το μεγαλύτερο μέρος των ηλεκτρονίων στους αντιδραστήρες με τη μεθανόλη και το βουτυρικό οξύ. Όμως, δεν μπορούσε να υπολογιστεί η παραγωγή του οξικού οξέος από την εκχυλίσματος ζύμης και του βουτυρικού οξέος.	<<31%*	Καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης των καλλιεργειών, οι αντιδραστήρες που ως δότες είχαν τη μεθανόλη, το βουτυρικό οξύ αλλά και το πείραμα ελέγχου δεν έδειξαν τη δράση των μεθανογόνων. Όμως η συγκέντρωση του μεθανίου έφτασε το 1 mM όταν ο δότης ήταν το υδρογόνο.	0%	Aulenta et al., 2005a
			2 mM Μεθανόλη (12 meq/L) + 10 mg/L YE (1.8 meq/L)	Στις 7 ημέρες, 48%, 36% και 17% του PCE είχε αναχθεί σε cDCE, VC και αιθέριο, αντίστοιχα	14%				0%	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Περιγραφή πειράματος	Καλλιέργεια	Ρύπος	Δότης ηλεκτρονίων	Απόδοση αποχλωρίωσης	$\frac{e^-_{\text{Αποχλωρίωση}}}{e^-_{\Delta\delta\tau\eta\varsigma}}$	Απόδοση παραγωγής οξικού οξέος	$\frac{e^-_{\text{Παραγωγή οξικού οξέος}}}{e^-_{\Delta\delta\tau\eta\varsigma}}$	Απόδοση μεθανογένεσης	$\frac{e^-_{\text{Μεθανογένεση}}}{e^-_{\Delta\delta\tau\eta\varsigma}}$	Αναφορά
			0.6 mM Βουτυρικό οξύ (12 meq/L) + 10 mg/L ΥΕ (1.8 meq/L)	Όλο το PCE είχε μετατραπεί σε VC (69%) και αιθένιο (26%), ενώ μετρήθηκε μια μικρή ποσότητα cDCE.	21%		<<72%*		0%	
			6 mM Υδρογόνο (12 meq/L) + 10 mg/L ΥΕ (1.8 meq/L)	Σε 3 ημέρες όλο το PCE είχε αναχθεί σε αιθένιο.	21%		10%		53%	
Πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας με συχνή προσθήκη δότη	Παρασκευή από ίζημα περιοχής	0.5 mM PCE (4 meq/L)	~13 mM Μεθανόλη (78.2 meq/L)	Μετά από 144 ώρες λειτουργίας, μετρήθηκε αιθένιο (90%) και VC (10%).	5%	Η οξικογένεση ήταν η κυρίαρχη διεργασία κατανάλωσης ηλεκτρονίων.	72%	Οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί έδειξαν μεγάλη δραστηριότητα όταν προστέθηκε υδρογόνο συγκριτικά με το οξικό οξύ που προϋπήρχε από την καλλιέργεια. Όμως, η μεθανογένεση ήταν υψηλότερη υπό την παρουσία μεθανόλης.	8%	Aulenta et al., 2002
			~7.9 mM Υδρογόνο (15.7 meq/L)	Πλήρης αναγωγή σε 144 ώρες.	25%		60%		20%	
Πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας	Προέλευση από υλικό ρυπασμένου υπόγειου υδροφορέα	333 μM PCE (2.7 meq/L)	654 μM Οξικό οξύ (5.2 meq/L)	Σε 30 ημέρες, όλο το PCE μετατράπηκε σε cDCE, ενώ μέχρι τις 50 ημέρες μια μικρή ποσότητα VC ανιχνεύτηκε.	23%	Το 71% του οξικού οξέος παρέμεινε μέχρι το τέλος του πειράματος		Δεν ανιχνεύτηκε μεθάνιο στις 50 ημέρες λειτουργίας.	0%	Lee et al., 2007a
			346 μM Οξικό οξύ (2.8 meq/L)	Το PCE ανακλήθηκε με τη μορφή cDCE σε 45 ημέρες.	44%	133 μM οξικού οξέος είχε παραμείνει στο σύστημα.		Δεν μετρήθηκε σημαντική συγκέντρωση μεθανίου.	0%	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Περιγραφή πειράματος	Καλλιέργεια	Ρύπος	Δότης ηλεκτρονίων	Απόδοση αποχλωρίωσης	$\frac{e^-_{\text{Αποχλωρίωση}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Απόδοση παραγωγής οξικού οξέος	$\frac{e^-_{\text{Παραγωγή οξικού οξέος}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Απόδοση μεθανογένεσης	$\frac{e^-_{\text{Μεθανογένεση}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Αναφορά
			346 μM Οξικό (2.8 meq/L) + 259 μM Βενζοϊκό οξύ (7.8 meq/L)	Η μεγαλύτερη μάζα του PCE είχε μετατραπεί σε αιθένιο (50%) στις 30 ημέρες, ενώ παρέμεινε VC (35%) και cDCE (10%).	19%	Η αύξηση του αιθενίου είναι περίπου ίση με την ποσότητα που παράγεται στοιχειομετρικά από την οξειδωση του βενζοϊκού οξέος.	0%	Η συγκέντρωση του μεθανίου ήταν αμελητέα.	0%	
			346 μM Οξικό (2.8 meq/L) + 282 μM Βενζοϊκό οξύ (8.5 meq/L)	Όλο το PCE ανακτήθηκε σε αιθένιο στο τέλος του πειράματος.	22%	Η παραγωγή του οξικού οξέος φαίνεται να προήλθε από την οξειδωση του βενζοϊκού οξέος.	0%	Μια μικρή παραγωγή μεθανίου, περίπου 20 μM, παρατηρήθηκε στις 68 ημέρες.	2%	
			346 μM Οξικό (2.8 meq/L) + 474 μM Βενζοϊκό οξύ (14.2 meq/L)	Σε λιγότερο από 40 ημέρες, το PCE είχε αναχθεί πλήρως σε αιθένιο.	15%	Η συγκέντρωση του οξικού οξέος αυξήθηκε κατά την οξειδωση του βενζοϊκού οξέος, αλλά δεν παρατηρήθηκε οξικογένεση.	0%	Περίπου 0.54 mM μεθανίου παράχθηκαν σε 49 ημέρες λειτουργίας του πειράματος.	3%	
			1.1 mM Οξικό (8.6 meq/L) + 717 μM Φορμικό οξύ (1.4 meq/L)	Το 75% του PCE μετατράπηκε σε cDCE και το υπόλοιπο σε VC σε 5 ημέρες. Ίχνη αιθενίου μετρήθηκαν ως τις 24 ημέρες λειτουργίας.	37%	Δεν φαίνεται να υπήρξε παραγωγή οξικού οξέος, δεδομένου ότι παρέμεινε σταθερή η συγκέντρωσή του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.	0%	Μόνο 33 μM μεθανίου παράχθηκαν σε 24 ημέρες.	11%	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Περιγραφή πειράματος	Καλλιέργεια	Ρύπος	Δότης ηλεκτρονίων	Απόδοση αποχλωρίωσης	$\frac{e^-_{\text{Αποχλωρίωση}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Απόδοση παραγωγής οξικού οξέος	$\frac{e^-_{\text{Παραγωγή οξικού οξέος}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Απόδοση μεθανογένεσης	$\frac{e^-_{\text{Μεθανογένεση}}}{e^-_{\text{Δότης}}}$	Αναφορά
Πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας με τη συχνή προσθήκη PCE			1.1 mM Οξικό οξύ (9 meq/L)	Περίπου 1.6 mM PCE εισήχθησαν σταδιακά σε διάστημα 83 ημερών στο σύστημα, τα οποία ανάχθηκαν σε cDCE.	76%	Το 18% οξικού οξέος είχε παραμείνει στο σύστημα στο τέλος του πειράματος.		Δεν παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης του μεθανίου στις 83 ημέρες λειτουργίας.	0%	
			585 μM Οξικό οξύ (4.7 meq/L) + 1.4 mM Φορμικό οξύ (2.9 meq/L)	667 μM PCE ανάχθηκαν σε cDCE και VC, ενώ μετρήθηκε μια μικρή ποσότητα αιθενίου.	53%	Η συγκέντρωση του οξικού οξέος παρέμεινε σταθερή όλες τις ημέρες του πειράματος.	0%	Δεν μετρήθηκε σημαντική συγκέντρωση μεθανίου.	0%	
			125 mM Τολουόλιο (4.5 meq/L)	Το 22% PCE μετατράπηκε σε αιθένιο και VC σε 58 ημέρες.	13%			Μετρήθηκε μια μικρή ποσότητα μεθανίου 20 μM μέχρι το τέλος του πειράματος.	15%	
Πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας	Αναπτυγμένη από έδαφος ρυπασμένης περιοχής	75 μM PCE (0.6 meq/L)	125 mM Βενζοϊκό οξύ (3.75 meq/L)	Περίπου το μισό PCE ανάχθηκε σε αιθένιο και VC μέχρι την 50 ^η ημέρα.	7%	Δεν παρουσιάζονται οι μετρήσεις του οξικού οξέος.	Η συγκέντρωση του μεθανίου έφτασε περίπου 0.3 mM την 58 ^η ημέρα.	45%	Shen & Sewell, 2005	
			150 mM Γαλακτικό οξύ (1.8 meq/L)	Μέχρι την 20 ^η ημέρα, το μεγαλύτερο μέρος του PCE (70%) μετατράπηκε σε αιθένιο και VC.	5%		0.5 mM μεθανίου παράχθηκαν σε 58 ημέρες λειτουργίας.	44%		

Σημείωση: Τα δεδομένα του Πίνακα έχουν εξαχθεί από τους πίνακες και τα γραφήματα των άρθρων της βιβλιογραφίας, ενώ οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με βάση το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής και αναλύεται στο Κεφάλαιο 3.

*Συμπεριλαμβάνεται η παραγωγή του οξικού οξέος από την οξειδωση των οργανικών ουσιών. Δεν μπορεί να υπολογιστεί η συνεισφορά της οξικογένεσης.

Επιπλέον, ο ανταγωνισμός για το υδρογόνο, που χρησιμοποιείται άμεσα από τα είδη του γένους *Dehalococcoides* για την αναγωγή των χλωριωμένων αιθενίων σε αιθένιο, είναι περιορισμένος στο πεδίο, εφόσον το 70% του μεθανίου παράγεται μέσω της οξικοτροφικής μεθανογένεσης, δηλαδή μέσω του οξικού οξέος (Bradley & Chapelle, 1999). Όπως προαναφέρθηκε, μόνο δύο γένη πραγματοποιούν την παραγωγή μεθανίου από το οξικό οξύ, τα *Methanosaeta* spp. και τα *Methanosarcina* spp. Η βιοχημεία της συγκεκριμένης διεργασίας είναι περίπλοκη και περιλαμβάνει πολλά ένζυμα, τα οποία είναι διαφορετικά για τα δύο γένη, έτσι υπάρχουν βασικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών. Παραδείγματος χάριν, η ελάχιστη οριακή συγκέντρωση για το οξικό οξύ είναι πολύ χαμηλότερη στα είδη του γένους *Methanosaeta* από ότι στα είδη του γένους *Methanosarcina* (Welte & Deppenmeier, 2014). Ως αποτέλεσμα, τα *Methanosaeta* spp. έχουν χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης και κυριαρχούν σε υπόγειο υδροφορέα με μικρές ποσότητες οργανικών ουσιών συγκριτικά με τα *Methanosarcina* spp., τα οποία αναπτύσσονται γρηγορότερα, με αποτέλεσμα οι συνθήκες για την ανάπτυξή τους να είναι ευνοϊκές όταν οι συγκεντρώσεις του οξικού οξέος είναι υψηλές (Demirel & Scherer, 2008; Liu & Whitman, 2008).

Η σχέση των δύο αναγωγικών διεργασιών που περιγράφεται παραπάνω φαίνεται να είναι αμφίδρομη, εφόσον η μεθανογένεση επηρεάζεται αρνητικά από την ύπαρξη των χλωριωμένων αιθενίων. Πιο συγκεκριμένα, η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του PCE από 0.35 σε 550 μM προκάλεσε αρχικά τη μείωση της παραγωγής του μεθανίου και τελικώς την παύση της διαδικασίας, ενώ άλλαξε τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας (DiStefano et al., 1991). Επιπλέον, η παρουσία 200 μM PCE οδήγησε στην πτώση της μεθανογένεσης κατά 27% στα πειράματα των Adamson & Parkin (2000), εξαιτίας της κατανάλωσης μιας μικρής ποσότητας ηλεκτρονίων από την αναγωγική αποχλωρίωση αλλά και της πιθανής τοξικότητας από τα χλωριωμένα αιθένια. Μάλιστα, όταν πραγματοποιήθηκε η αναχαίτιση της παραγωγής του μεθανίου από τις υψηλές συγκεντρώσεις TCE (0.77 mM), αυξήθηκε η ροή των ηλεκτρονίων προς την αναγωγική αποχλωρίωση κατά μέσο όρο περίπου 7% (Men et al., 2013). Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Yang & McCarty (1998), όπου η προσθήκη 80 μM cDCE προκάλεσε την αναχαίτιση της οξικοτροφικής μεθανογένεσης, ενώ δεν φάνηκε να επιδρά η συγκεκριμένη ποσότητα των χλωριωμένων αιθενίων στο υδρογονοτροφικό μονοπάτι της παραγωγής του μεθανίου. Οι Siggins et al. (2011) οδηγήθηκαν στο ίδιο συμπέρασμα, αφού διαπίστωσαν ότι οι οξικοτροφικοί μεθανογόνοι μικροοργανισμοί αναχαίτίζονται άμεσα από την παρουσία των χλωριωμένων αιθενίων.

Επιπλέον, σε πειράματα που διεξήγαγαν οι Men et al. (2013) φαίνεται ότι και η οξικογένεση ενδέχεται να αναχαίτίζεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις του TCE. Όμως, η επίδραση των χλωριωμένων αιθενίων στην οξικογένεση δεν έχει μελετηθεί επαρκώς για να εξαχθεί σαφές συμπέρασμα.

Εκτός όμως της πιθανής αρνητικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των διεργασιών, θεωρείται ότι οι μεθανογόνοι και οι οξικογόνοι μπορεί να υποβοηθήσουν την αναγωγική αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθενίων, όπως έχει αναφερθεί και στην

Ενότητα 2.3. Για παράδειγμα, μπορούν να παράγουν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά ή να ανάγουν τα χλωριωμένα αιθέρια συµµεταβολικά (Saiyari et al., 2018; Duhamel & Edwards, 2007; Fathpure & Boyd, 1988a).

2.4.4. Επίδραση θεικοαναγωγής στη βιολογική αποχλωρίωση

Τα θειικά ιόντα παρατηρούνται συχνά στο υπόγειο νερό με την συγκέντρωσή τους να κυμαίνεται από 0.1 ως 50 mM (Miao et al., 2012; Zanaroli et al., 2015; Pantazidou et al., 2012). Ωστόσο, υπό την παρουσία θειικών ιόντων, η απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης φαίνεται να ποικίλλει στα εργαστηριακά πειράματα και το πεδίο, εφόσον είτε δεν πραγματοποιείται πλήρως (El Mamouni et al., 2002; Freitas et al., 2015; Pérez-de-Mora et al., 2014; Mora et al., 2008) είτε καθυστερεί (Hoelen & Reinhard, 2004; Berggren et al., 2013; Aulenta et al., 2008b; Atashgahi et al., 2017; Damgaard et al., 2013; Verce et al., 2015), ενώ σε μια έρευνα δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά (Heimann et al., 2005). Επιπλέον, η μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση θειικών ιόντων, πάνω από την οποία θεωρείται ότι επηρεάζεται αρνητικά η αναγωγική αποχλωρίωση, φαίνεται να έχει μεγάλο εύρος στα διάφορα τεχνικά πρωτόκολλα, που κυμαίνεται από 20 mg/L ως 500 mg/L (Pantazidou et al., 2012). Κατά συνέπεια, τα αποτελέσματα της βιβλιογραφίας δυσχεραίνουν την εξαγωγή σαφούς συμπεράσματος. Τα παραπάνω αντικατοπτρίζονται στον Πίνακα 2.30, όπου παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα των εργαστηριακών πειραμάτων αποχλωρίωσης υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες στη διεθνή βιβλιογραφία. Τα άρθρα που παρουσιάζονται επιλέχθηκαν με βάση τα εξής κριτήρια: α) τα πειράματα έπρεπε να είναι είτε σε θεικοαναγωγικές είτε σε θερμοδυναμικά λιγότερο ευνοϊκές συνθήκες, όπως η οξικογένεση και η μεθανογένεση. Επομένως δεν περιείχαν νιτρικά ή τρισθενή σίδηρο για να μην υπολογιστεί η οποιαδήποτε επίδραση στην αποχλωρίωση άλλων ανταγωνιστικών αναγωγικών διεργασιών, και β) έπρεπε να εξετάζουν μόνο την αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθέρων και όχι άλλων οργανοχλωριωμένων ουσιών. Με τα κριτήρια που τέθηκαν, δεκαεπτά άρθρα επιλέχθηκαν από τα οποία έντεκα περιγράφουν πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch), ένα συνεχούς τροφοδοσίας σε αντιδραστήρες, δύο σε στήλες και τρία σε μητρικές καλλιέργειες. Αναλυτικότερα, περιγράφονται τα αποτελέσματα επιλεγμένων ερευνών ξεχωριστά παρακάτω.

Με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της θεικοαναγωγής στην αναγωγική αποχλωρίωση του PCE, οι Aulenta et al. (2008b) πραγματοποίησαν πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας με μηδενική συγκέντρωση και 360 mg/L (3.75 mM) θειικών ιόντων. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η πλήρης μετατροπή σε αιθέριο ήταν εφικτή και στις δύο περιπτώσεις, αλλά, η παραγωγή του αιθέρου ήταν περίπου 4 φορές γρηγορότερη υπό μεθανογόνες συνθήκες. Αφετέρου, μόνο το 60% των θειικών ιόντων καταναλώθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, το οποίο μάλλον οφείλεται στη μικροβιακή κοινότητα της καλλιέργειας, η οποία δεν ήταν εγκλιματισμένη στα θειικά ιόντα.

Παρομοίως, οι Berggren (2011) και Berggren et al. (2013) παρατήρησαν ότι η προσθήκη 96.1 mg/L (1 mM) θειικών ιόντων προκάλεσε τη σταδιακή μείωση του ρυθμού αποχλωρίωσης του VC και μια μεταβολή στην κοινότητα των *Dehalococcoides* spp. Το στέλεχος 195 κυριάρχησε στην καλλιέργεια, το οποίο μετατρέπει το VC σε αιθέριο μέσω της συμμεταβολικής αποχλωρίωσης, ενώ οι αλλαγές εντάθηκαν με την αύξηση της αναγωγής των θειικών ιόντων.

Επίσης, τα πειράματα των El Mamouni et al. (2002) έδειξαν ότι ως και 960 mg/L (10 mM) θειικών ιόντων δεν επιδρούν στην αποχλωρίωση του TCE, ενώ άνω του ορίου αυτού μειώνεται η αποχλωρίωση, θεωρώντας ότι δρα αρνητικά η παραγόμενη ποσότητα σουλφιδίων. Όμως, τα πειράματα ολοκληρώθηκαν πριν την ολοκλήρωση της αναγωγικής αποχλωρίωσης, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζεται η επίδραση των θειικών ιόντων στη μετατροπή του VC, που είναι το κρίσιμο στάδιο της διαδικασίας.

Οι Mao et al. (2017) πραγματοποίησαν πειράματα με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων, 192 mg/L (2 mM) SO_4^{2-} και 480 mg/L (5 mM) SO_4^{2-} με βιομάζα από την ίδια μητρική καλλιέργεια σε συνθήκες έλλειψης δότη ηλεκτρονίων. Όμως, η αναγωγή του TCE σταμάτησε την 6^η μέρα και στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικών. Κατόπιν τούτου έγινε η προσθήκη επαρκούς δόσης δότη και φάνηκε ότι συνεχίστηκε η αποχλωρίωση στα πειράματα με 192 mg/L (2 mM) SO_4^{2-} . Ωστόσο, η μεγάλη συγκέντρωση των θειικών ιόντων έδειξε μικρότερη αποχλωριωτική ικανότητα, εφόσον δεν παρατηρήθηκε η περαιτέρω αναγωγή του TCE σε cDCE μετά την προσθήκη του επιπλέον δότη.

Για τη μελέτη του ανταγωνισμού μεταξύ αποχλωριωτών και θειικοαναγωγικών μικροοργανισμών, οι Hoelen και Reinhard (2004) πραγματοποίησαν πειράματα σε μικρόκοσμους με υλικό από ρυπασμένη περιοχή. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η αναγωγική αποχλωρίωση του PCE μπορεί να προχωρήσει υπό την παρουσία συγκεντρώσεων θειικών ιόντων άνω των 100 mg/L (1 mM) SO_4^{2-} . Μάλιστα, 59 μM PCE μετατράπηκαν σε αιθέριο σε περίπου 1000 ημέρες λειτουργίας με 230 mg/L (2.4 mM) θειικών ιόντων ως αρχική συγκέντρωση. Όμως, η δράση των θειικοαναγωγικών μικροοργανισμών φαίνεται να ήταν μικρή, εφόσον είτε δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων είτε η μείωση ήταν μικρή συγκριτικά με άλλες καλλιέργειες.

Αντιθέτως, με τα παραπάνω αποτελέσματα, τα πειράματα των Heimann et al. (2005) με 230 mg/L (2.4 mM) θειικών ιόντων δεν παρουσίασαν ιδιαίτερη διαφορά ως προς την απόδοση της αποχλωρίωσης με τη μηδενική συγκέντρωση, όμως επηρέασαν τον ρυθμό της. Παρόμοιο αποτέλεσμα είχαν οι Aulenta et al. (2006b), όπου βρήκαν ότι τα πρώτα στάδια της αναγωγής των οργανοχλωριωμένων ενώσεων πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με τη θειικοαναγωγή. Όμως, η μετατροπή των λιγότερο χλωριωμένων ενώσεων ήταν αργή και παρατηρήθηκε μετά την πλήρη κατανάλωση των θειικών ιόντων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης, το πείραμα σε στήλη των Guerrero-Barajas et al. (2014), όπου γινόταν συνεχής τροφοδοσία δότη ηλεκτρονίων και θειικών ιόντων έτσι ώστε η συγκέντρωση να παραμένει σταθερή στα 4000 mg/L (41.6 mM) SO_4^{2-} . Μετά 10 ημέρες, το 98% των θειικών είχε αναχθεί και το 67% του TCE είχε μετατραπεί σε αιθένιο, δείχνοντας έτσι ότι η θειικοαναγωγή δεν έδρασε ανασταλτικά στην αποχλωρίωση.

Συνοπτικά, από τα πειράματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.30 φαίνεται ότι η αναγωγή των θειικών ιόντων επιδρά αρνητικά στην αναγωγική αποχλωρίωση, όμως ο βαθμός επίδρασης φαίνεται να είναι διαφορετικός ανάλογα με την καλλιέργεια. Αυτός ο διαφορετικός βαθμός επίδρασης μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως η σύνθεση της βιοκοινότητας, ο εγκλιματισμός της καλλιέργειας στη συγκέντρωση των θειικών ιόντων, η ικανότητα των καλλιεργειών να επιτυγχάνουν την πλήρη αποχλωρίωση, κ.ά. Τα αντιφατικά ευρήματα που προκύπτουν, καθιστούν δύσκολη την κατανόηση των πιθανών μηχανισμών ανταγωνισμού και περιπλέκουν την ερμηνεία των δεδομένων πεδίου.

Παρόμοια δυσκολία αναγνώρισαν και οι Pantazidou et al. (2012), οι οποίοι γι' αυτό το λόγο πραγματοποίησαν μια βιβλιογραφική ανασκόπηση συλλέγοντας δεδομένα από περιοχές ρυπασμένες με χλωροαιθένια και συγκεντρώσεις θειικών ιόντων που κυμαίνονταν από 40 (0.42 mM) ως 4800 mg/L (50 mM) SO_4^{2-} . Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι όσο αυξάνει η συγκέντρωση των θειικών τόσο καθυστερεί η διαδικασία της αποχλωρίωσης, ενώ το μέγιστο όριο της αρχικής συγκέντρωσης θειικών ιόντων για την βιολογική αναγωγική αποχλωρίωση κυμαίνεται μεταξύ 250 (2.6 mM) με 300 mg/L (3.1 mM) SO_4^{2-} . Το όριο αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τους Hoelen & Reinhard (2004), οι οποίοι θεώρησαν ότι πλήρης αποχλωρίωση μπορεί να επιτευχθεί ακόμα και υπό την παρουσία 250 mg/L (2.6 mM) θειικών ιόντων.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 2.30 Βιβλιογραφική ανασκόπηση των αποτελεσμάτων εργαστηριακών πειραμάτων αποχλωρίωση υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες.

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δότης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια		Αποχλωρίωση			Θεικοαναγωγή			Αναφορά		
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθενίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}^-}$	Αρχική συγκέντρωση		% που παραμένει	$\% \frac{\sum e^-}{e_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}^-}$
Batch πειράματα	Καλλιέργεια αναπτυγμένη από ίζημα βιομηχανικής περιοχής	55 Ημέρες	Βουτυρικό οξύ	3 mM (60 meq/L)	PCE	60 μM (0.48 meq/L)	6 Ημέρες	21 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	3.12 (r ² =0.99)	0.5%	-	-	-	Aulenta et al., 2008b
		55 Ημέρες					21 Ημέρες	-	Αιθένιο (84%)	0.79 (r ² =0.94)	0.5%	360 mg/L (30 meq/L)	40%	30%	
Batch πειράματα	Καλλιέργεια από πειράματα συνεχούς τροφοδοσίας	5 Ημέρες	Γαλακτικό οξύ	4.3 mM (51.6 meq/L)	PCE	~0.3 mM (2.4 meq/L)	1.6 Ημέρες	3.2 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	179 (r ² =0.99)	5%	-	-	-	Berggren, 2011
		8 Ημέρες					3.4 Ημέρες	-	VC (93%)	4.91 (r ² =0.99)	4%	96.1 mg/L (8 meq/L)	Δεν αναφέρεται/ παρουσιάζεται	-	
Batch πειράματα	Καλλιέργεια αναπτυγμένη από χωνεμένη ιλύ	22 Ημέρες	Μελάσσες	~21mM (510 meq/L)	TCE	2 μM (0.12 meq/L)	-	-	DCEs, VC, αιθένιο	Δεν αναφέρεται	Δεν αναφέρεται	-	-	-	Boopathy & Peters, 2001
			Γαλακτικό οξύ	20 mM (240 meq/L)			-	-	DCEs (100%)	-	1920 mg/L (160 meq/L)	Δεν αναφέρεται	-		
Batch πειράματα	Καλλιέργεια αναπτυγμένη από χωνεμένη ιλύ	9 Ημέρες	Μεθανόλη & Γαλακτικό οξύ	300 mM Μεθανόλη & 300 mM Γαλακτικό (2340 meq/L)	PCE	35 μM (280 meq/L)	-	-	Δεν αναφέρεται, αλλά και στα δύο πειράματα 85% του PCE καταναλώθηκε.	-	0%	-	-	-	Cabirol et al., 1998

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δόσης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια		Αποχλωρίωση				Θεικοαναγωγή			Αναφορά	
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθινίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$	Αρχική συγκέντρωση	% που παραμένει		$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$
Batch πειράματα	Έδαφος από ρυπασμένη περιοχή με χλωροαιθένια	50 Ημέρες	Γαλακτικό οξύ & Μεθανόλη	1000 mg/L COD (125 meq/L)	TCE	76.1 μM (0.46 meq/L)	-	-	cDCE (53%)	Δεν μπορεί να εξαχθεί ο ρυθμός των πειραμάτων από τα δημοσιευμένα γραφήματα.	0.2%	0 mg/L (0 meq/L)	-	-	EI Mamouni et al., 2002
							-	-	cDCE (49%)		0.2%	9.61 mg/L (0.8 meq/L)	0%	1%	
							-	-	cDCE (53%)		0.2%	480 mg/L (40 meq/L)	0%	32%	
							-	-	cDCE (55%)		0.2%	961 mg/L (80 meq/L)	11%	57%	
							-	-	cDCE (73%)		0.1%	1440 mg/L (120 meq/L)	18%	79%	
							-	-	cDCE (81%)		0.1%	1920 mg/L (160 meq/L)	19%	104%	
Batch πειράματα	Έδαφος και υπόγειο νερό από ρυπασμένη περιοχή με χλωροαιθένια και θειικά ιόντα	1070 Ημέρες	Τολουόλιο	-	PCE	150 μM (1.2 meq/L)	835 Ημέρες	-	VC (100%)	-	-	-	100%	-	Hoelen & Reinhard, 2004
		1070 Ημέρες		1η ημέρα: 160 μM + 558η ημέρα: 160			368 Ημέρες	986 Ημέρες	Αιθίνιο (100%)	0.20 (r ² =0.72)	6.1%	238 mg/L (19.8 meq/L)	61%	66%	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δότης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια			Αποχλωρίωση			Θεικοαναγωγή			Αναφορά
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθενίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$	Αρχική συγκέντρωση	% που παραμένει	
		14 Ημέρες	Υδρογόνο	11.5 μM (11.5 meq/L) Σε αυξημένη ποσότητα		129 μM (1.0 meq/L)	11 Ημέρες	12 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	15.4 (r ² =0.94)	Άγνωστη ποσοτήτα δότη	192 mg/L (16 meq/L)	0%	Άγνωστη ποσοτήτα δότη
	Καλλιέργεια KB-1 με θρεπτικό υλικό	32 Ημέρες	Γαλακτικό οξύ	1.78 mM (21.4 meq/L)	11.5 μM (0.07 meq/L)	20 Ημέρες	30 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	0.77 (μόνο δύο σημεία)	0.2%	<0.4 mg/L (<0.04 meq/L)	Δεν αναφέρεται		
		32 Ημέρες				31 Ημέρες	-	Αιθένιο (97%)	0.73 (μόνο δύο σημεία)	0.2%	240 mg/L (20 meq/L)	92%	7.3%	
Batch πειράματα	Διοχέτευση αερίου αζώτου και εκ νέου προσθήκη TCE στα πειράματα batch με την καλλιέργεια KB-1	74 Ημέρες	Περισσευούμενο οξικό οξύ από την οξειδωση του γαλακτικού οξέος	TCE	26 μM (0.16 meq/L)	53 Ημέρες	55 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	2.24 (r ² =0.76)	0.5%	<0.4 mg/L (<0.04 meq/L)	Δεν αναφέρεται		
		74 Ημέρες				63 Ημέρες	68 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	1.14 (r ² =0.96)	0.5%	221 mg/L (18 meq/L)			
		80 Ημέρες				63 Ημέρες	66 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	6.66 (r ² =0.99)	1.4%	<0.4 mg/L (<0.04 meq/L)			
		80 Ημέρες				70 Ημέρες	74 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	4.29 (r ² =0.94)	1.5%	221 mg/L (18 meq/L)			

Heimann et al., 2005

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δότης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια		Αποχλωρίωση			Θεικοαναγωγή			Αναφορά						
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθηνίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$	Αρχική συγκέντρωση		% που παραμένει	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$				
		80 Ημέρες				213 μM (1.3 meq/L)	80 Ημέρες	-	Αιθένιο (87%)	6.54 (r ² =0.86)	3.2%	<0.4 mg/L (<0.04 meq/L)							
		80 Ημέρες					-	-	Αιθένιο (65%)	3.02 (r ² =0.93)	2.6%	221 mg/L (18 meq/L)							
Batch πειράματα	Υπόγειο ρυπασμένο νερό με TCE και θειικά ιόντα	318 Ημέρες	Μελάσσες	~2.5 mM (59 meq/L)	TCE, cDCE & VC	3.1 mM TCE, 0.2 mM cDCE, 0.1 mM VC (7.4 meq/L)	Δεν παρουσιάζεται/ αναφέρεται	cDCE (92%), αιθένιο (4%), αιθάνιο (4%)	Δεν παρουσιάζονται	9%	114 mg/L (9.5 meq/L)	59%	8%						
				75 μM TCE, 107 μM cDCE, 80 μM VC (0.27 meq/L)		cDCE (97%) & VC (3%)									-	0%	685 mg/L (57 meq/L)	79%	20%
			Τυρόγαλο	~1.6 mM (61 meq/L)		3.1 mM TCE, 0.2 mM cDCE, 0.1 mM VC (7.4 meq/L)									cDCE (74%), αιθένιο (15%), αιθάνιο (11%)	Δεν παρουσιάζονται	7%	100 mg/L (8.35 meq/L)	40%

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δότης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια		Αποχλωρίωση			Θεικοαναγωγή			Αναφορά		
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθενίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$	Αρχική συγκέντρωση		% που παραμένει	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$
						75 μM TCE, 107 μM cDCE, 80 μM VC (0.27 meq/L)			cDCE (94%) & VC (6%)	-	0%	685 mg/L (57 meq/L)	25%	70%	
	Μίγμα δύο καθαρών καλλιιεργειών <i>Dehalococcoides</i> sp. & <i>Desulfovibrio</i> sp.	16 Ημέρες	Γαλακτικό οξύ	1η ημέρα: 12 mM + 4η ημέρα: 5 mM + 9η ημέρα: 2 mM (228 meq/L)	TCE	0.55 mM (3.3 meq/L)	-	-	TCE (38%)	-	0%	480 mg/L (40 meq/L)	0%	18%	
Batch πειράματα	Καλλιέργεια μετά από διοχέτευση αερίου αζώτου σε πείραμα batch με 5 mM θειικών ιόντων	5 Ημέρες		16η ημέρα: 1 mM (12 meq/L)		0.5 mM (3 meq/L)	Δεν παρουσιάζεται		Αιθένιο (100%)	Δεν παρουσιάζεται		-	-	-	Mao et al., 2017
	Μίγμα δύο καθαρών καλλιιεργειών <i>Dehalococcoides</i> sp. & <i>Desulfovibrio</i> sp. (1:3)	18 Ημέρες	Υδρογόνο	Σε αυξημένα ποσοτήτα	TCE	1η ημέρα: 0.67 mM + 8η ημέρα: 0.54 mM + 14η	-	-	Αιθένιο (70%)	120 (r ² =0.87)	Άγνωστη ποσοτήτα δότη	192 mg/L (16 meq/L)	0%	Άγνωστη ποσοτήτα δότη	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δόσης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια		Αποχλωρίωση			Θεικοαναγωγή			Αναφορά	
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθενίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}^-}$	Αρχική συγκέντρωση		% που παραμένει
		20 Ημέρες	Υδρογόνο	Σε αυξημένη ποσότητα	TCE	1η ημέρα: 0.62 mM (11 meq/L)	-	-	TCE (80%)	-	Άγνωστη ποσοτήτα δότη	480 mg/L (40 meq/L)	0%	Άγνωστη ποσοτήτα δότη
	Μίγμα δύο καθαρών καλλιιεργειών <i>Dehalococcoides</i> sp. & <i>Desulfonivbrios</i> sp. (3:1)	18 Ημέρες	Υδρογόνο	Σε αυξημένη ποσότητα	TCE	1η ημέρα: 0.74 mM + 8η ημέρα: 0.6 mM + 14η ημέρα: 0.6 mM (11.5 meq/L)	-	-	Αιθένιο (70%)	115 (r ² =0.93)	Άγνωστη ποσοτήτα δότη	192 mg/L (16 meq/L)	0%	Άγνωστη ποσοτήτα δότη
		20 Ημέρες	Υδρογόνο	Σε αυξημένη ποσότητα	TCE	1η ημέρα: 0.6 mM (3.6 meq/L)	-	-	TCE (74%)	-	Άγνωστη ποσοτήτα δότη	480 mg/L (40 meq/L)	0%	Άγνωστη ποσοτήτα δότη
	Καλλιέργεια αναπτυγμένη με έδαφος από	8 Ημέρες	Υδρογόνο	0.15 μM (0.3 meq/L)	TCE	0.2 mM (1.2 meq/L)	-	-	cDCE (91%)	Δεν αναφέρεται/ παρουσιάζεται		192 mg/L (16 meq/L)	1%	<<100% *

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δότης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια		Αποχλωρίωση			Θεικοαναγωγή			Αναφορά		
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθηνίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$	Αρχική συγκέντρωση		% που παραμένει	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$
	ρυπασμένη περιοχή	8 Ημέρες	Υδρογόνο	0.15 μM (0.3 meq/L)	TCE	0.2 mM (1.2 meq/L)	-	-	cDCE (82%)			480 mg/L (40 meq/L)	1%		
Batch πειράματα	Καλλιέργεια αναπτυγμένη από έδαφος ρυπασμένης περιοχής	84 Ημέρες	Μεθανόλη	0.36 mM (2.13 meq/L)	PCE	98 μM (0.78 meq/L)	-	-	1,1DCE (13%)	-	3%	403 mg/L (34 meq/L)	Δεν αναφέρεται	Ndon et al., 2000	
			Γαλακτικό οξύ	0.11 mM (1.33 meq/L)			-	-	TCE (29%)	-	4%				
			Οξικό οξύ	0.17 mM (1.33 meq/L)			-	-	cDCE (78%)	-	23%				
Batch πειράματα	Καλλιέργεια αναπτυγμένη από χωνεμένη ιλύ	14 Ημέρες	Βουτυρικό οξύ	0.3 mM (6 meq/L)	TCE	0.5 mM (3 meq/L)	4-9 Ημέρες	-	VC (95%)	4.1 (r ² =0.97)	34%	<0.5 mg/L	-	-	Παναγιωτάκης, 2010
							9 Ημέρες	-	VC (95%)	1.7 (r ² =1.0)	33%	1η ημέρα: 30 mg/L + 7η ημέρα: 30 mg/L (5.0 meq/L)	21%	66%	
							-	-	cDCE (59%)	-	24%	400 mg/L (33.3 meq/L)	83%	93%	
							-	-	cDCE (58%)	-	24%	1100 mg/L	94%	96%	

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δότης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια		Αποχλωρίωση			Θεικοαναγωγή			Αναφορά		
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθινίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$	Αρχική συγκέντρωση		% που παραμένει	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$
Πειράματα συνεχούς τροφοδοσίας (χημειοστάτης)	Καλλιέργεια από υπόγειο νερό ρυπασμένης περιοχής με TCE και θειικά ιόντα (34-5500 mg/L)	700 ημέρες	Γαλακτικό οξύ	4.3 mM (51.6 meq/L)	PCE	1.12 mM (8.96 meq/L)	Δεν αναφέρονται	-	Αιθίνιο (98%)	Δεν αναφέρεται/ παρουσιάζονται	17%	(96.61 meq/L)	-	-	Berggren et al., 2013
		1200 ημέρες (Προσθήκη θειικών ιόντων την 733η ημέρα)					-	-	VC (67%)		14%	96.1 mg/L (8 meq/L)	0% (Μετά την πάροδο 1000 ημερών)	16%	
Πειράματα σε στήλες με συνεχή τροφοδοσία	Χαλαζιακή άμμος με συνθετικό υπόγειο νερό και μικτή αποχλωριωτική καλλιέργεια	238 Ημέρες	Γαλακτικό οξύ	0.67-1.1 mM (8-13.2 meq/L)	PCE	0.1 mM (0.8 meq/L)	84 Ημέρες	-	Αιθίνιο (88%) & VC (11%)	Δεν μπορεί να εξαχθεί με ακρίβεια λόγω της συνεχούς προσθήκης PCE.	5-8%	19.2 mg/L (1.6 meq/L)	0%	12-20%	Azizian & Semprini, 2016
		1150 Ημέρες	Φορμικό οξύ	1.5-2.1 mM (3.0-4.2 meq/L)			-	-	Αιθίνιο (55%), VC (33%) & cDCE (11%)		17-24%	19.2 mg/L (1.6 meq/L)	0%	38-53%	
		240 Ημέρες		1.5 mM (3.0 meq/L)			-	-	Αιθίνιο (82%), VC (16%) & cDCE (1%)		25%	-	-	-	
Πείραμα σε στήλη με συνεχή τροφοδοσία θειικών ιόντων και δότη	Έδαφος με συνθετικό υπόγειο νερό, μίγμα πτητικών λιπαρών οξέων και	10 Ημέρες	Μίγμα οξικού, προπιονικού και βουτυρικού οξέων	2.7-10 gr/L COD (21600-80000 meq/L)	TCE	300 μM	Δεν αναφέρονται	Δεν αναφέρεται	Αιθίνιο (67%), VC (5%) & TCE (26%)	Δεν παρουσιάζονται, αλλά η παραγωγή αιθινίου πραγματοποιήθηκε σε	Συνεχής ή προσθήκη άγνωστης ποσότητας	4000 mg/L (333 meq/L)	98%	Συνεχής προσθήκη κυμαινόμενης ποσότητας δότη.	Guerrero-Barajas et al., 2014

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Χαρακτηριστικά πειραμάτων			Δότης ηλεκτρονίων		Χλωροαιθένια		Αποχλωρίωση			Θεικοαναγωγή			Αναφορά		
Τύπος	Προέλευση	Διάρκεια	Τύπος	Συγκέντρωση	Τύπος	Ονομαστική συγκέντρωση	<1% cDCE	<1% VC	Ουσία (% που παραμένει)	Ρυθμός αιθηνίου (μM/day)	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$	Αρχική συγκέντρωση		% που παραμένει	$\% \frac{\sum e^-}{e^-_{\delta\sigma\tau\eta\varsigma}}$
ηλεκτρονίων	θειικά ιόντα									12 ώρες λειτουργίας.	ητας δότη.				
Μητρική καλλιέργεια	Καλλιέργεια αναπτυγμένη από χωνεμένη ιλύ	22-65 Ημέρες	Γαλακτικό οξύ	12.3 mM (148 meq/L)	PCE	4.9-5.4 μM (39-43 meq/L)	-	-	TCE (22-81%)	-	0%	870-1200 mg/L (72.5-100 meq/L)	Δεν αναφέρονται	Δεν μπορεί να εξαχθεί	Bagley & Gossett, 1990
Μητρική καλλιέργεια	Καλλιέργεια αναπτυγμένη με έδαφος από ρυπασμένη περιοχή	281 Ημέρες	Οξικό οξύ & Γαλακτικό οξύ	21 mM Οξικό & 44 mM Γαλακτικό (697 meq/L)	TCE	0.56-74 μM (39-43 meq/L)	-	-	cDCE (49-82%)	-	0%	4400 mg/L (366 meq/L)	19%	43%	Pavlostathis & Zhuang, 1991
Μητρικές καλλιέργειες	Καλλιέργειες αναπτυγμένες από ρυπασμένες περιοχές με TCE	35 Ημέρες	Υδρογόνο	0.33 mM (0.65 meq/L) ή σε περίσσεια	PCE	490 μM (3.9 meq/L)	28 Ημέρες	33 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	29.2 (r ² =1)	Άγνωστη ποσοτήτα δότη	-	-	Άγνωστη ποσοτήτα δότη	Sung, 2005
		100 Ημέρες					-	-	cDCE (100%)	-	760 mg/L (64 meq/L)	65%	-		
		65 Ημέρες	Γαλακτικό οξύ	5 mM (60 meq/L)			42 Ημέρες	65 Ημέρες	Αιθένιο (100%)	14.1 (r ² =0.95)	7%	-	-	-	
		100 Ημέρες					57 Ημέρες	-	PCE (30%), VC (65%) & αιθένιο (4%)	0.2 (r ² =1)	4%	687 mg/L (57 meq/L)	60%	38%	

Όσον αφορά τον ανταγωνισμό για το δότη ηλεκτρονίων μεταξύ της θειικοαναγωγής και της μεθανογένεσης, φαίνεται ότι οι θειικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί υπερτερούν έναντι των μεθανογόνων αρχαίων γιατί διατηρούν τη συγκέντρωση του υδρογόνου κάτω από την ελάχιστη οριακή συγκέντρωση για την παραγωγή του μεθανίου (Yang & McCarty, 1998; Stams et al., 2005). Σε εφαρμογή πεδίου, η θειικοαναγωγή αναχαίτισε τη μεθανογένεση, η οποία διαδραμάτισε μικρό ρόλο στην κατανάλωση ηλεκτρονίων, δηλαδή μόνο 2-4%, έναντι της αναγωγής των θειικών ιόντων που χρησιμοποίησε το 59% του δότη ηλεκτρονίων (Pérez-de-Mora et al., 2014). Όμως, τα δεδομένα πεδίου και τα εργαστηριακά πειράματα της βιβλιογραφίας καταδεικνύουν ότι η μεθανογένεση και η αναγωγή των θειικών μπορεί να πραγματοποιηθούν παράλληλα, αν και σε κάποιες περιπτώσεις η παραγωγή μεθανίου υστερούσε της θειικοαναγωγής (Pantazidou et al., 2012).

Γενικότερα, η μεθανογένεση, η σιδηροαναγωγή και η θειικοαναγωγή πραγματοποιούνται μαζί με την αναγωγική αποχλωρίωση (Wei & Finneran, 2013). Επομένως, οι διάφορες ομάδες μικροοργανισμών δρουν και καταναλώνουν τον δότη ηλεκτρονίων ταυτόχρονα. Επιπλέον, η οριακή συγκέντρωση (threshold) για την πρόσληψη του δότη ηλεκτρονίων και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι κρίσιμη παράμετρος και τα βακτήρια οργανοαλογονικής αναπνοής σε αυτό το πλαίσιο των χαμηλών συγκεντρώσεων του δότη ηλεκτρονίων, μπορούν να ανταγωνιστούν άλλες αναγωγικές ομάδες μικροοργανισμών. Σημειώνεται ότι, σε ένα φυσικό περιβάλλον η ανάπτυξη γενικά, περιορίζεται λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων του αποδέκτη ηλεκτρονίων (Adrian & Löffler, 2016).

Τοξικότητα σουλφιδίων

Εκτός από τον ανταγωνισμό για το δότη ηλεκτρονίων, η αναγωγική αποχλωρίωση φαίνεται να επηρεάζεται αρνητικά από το τελικό προϊόν της θειικοαναγωγής, τα παραγόμενα σουλφίδια.

Πιο συγκεκριμένα, σε πειράματα με 2 mM σουλφιδίων στην υγρή φάση, παρατηρήθηκε η συσσώρευση του cDCE, ενώ σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις διαλυτών σουλφιδίων (0.2 mM S²⁻) όλη η ποσότητα του PCE ανήχθη σε αιθέριο. Πλήρης αναχαίτιση παρουσιάστηκε όταν η συγκέντρωση ήταν 5 mM S²⁻ στην υγρή φάση (Sung, 2005). Την τοξικότητα των σουλφιδίων μελέτησαν και οι Hoelen & Reinhard (2004), όπου μετά την πάροδο 21 ημερών, το 91% του TCE είχε μετατραπεί σε αιθέριο, ενώ στην καλλιέργεια με 4.2-4.3 mM S²⁻ (5 mM ονομαστική συγκέντρωση) μόλις το 10% είχε αναχθεί πλήρως. Ωστόσο, η αναχαιτιστική δράση των σουλφιδίων μειώθηκε με την εισαγωγή εδάφους από τη ρυπασμένη περιοχή ή τη στοιχειομετρικά ανάλογη ποσότητα δισθενούς σιδήρου. Στα πειράματα με 4.4 mM S²⁻ στην υγρή φάση και 20 gr ιζήματος ή 5 mM FeCl₂, περίπου το 91% του TCE είχε αναχθεί σε αιθέριο. Η ικανότητα του εδάφους να εξουδετερώνει την τοξικότητα των σουλφιδίων φαίνεται να εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του εδάφους. Τα

παραπάνω πειράματα, διεξήχθησαν σε μη-εγκλιματισμένη βιομάζα σε υψηλές συγκεντρώσεις σουλφιδίων, ενώ πειράματα σε εγκλιματισμένη κοινότητα έχουν δείξει ότι η δράση της αναγωγικής αποχλωρίωσης ήταν παρόμοια υπό μεθανογόνες συνθήκες και υπό 3.4 mM σουλφιδίων στην υγρή φάση (4.2 mM ονομαστική συγκέντρωση) (Panagiotakis et al., 2010).

Πάρα ταύτα, η ομάδα μικροοργανισμών που υπερτερεί σε μια μικτή αναερόβια καλλιέργεια ακόμα και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων, που φτάνουν τα 1100 mg/L (11,5 mM) SO_4^{2-} , έχει αποδειχθεί ότι είναι το *Dehalococcoides* sp. (Panagiotakis et al., 2014). Ωστόσο, η ταυτοποίηση των *Dehalococcoides* spp. δεν συνοδεύεται απαραίτητως από τη δράση των ίδιων των μικροοργανισμών και τη μείωση των χλωριωμένων αιθενίων (Lu et al., 2006). Εντούτοις, η αρνητική επίδραση των θειικών ιόντων φαίνεται να σχετίζεται με την παρουσία των γονιδίων, *vcrA* και *tceA*, που είναι υπεύθυνα για την αναγωγική αποχλωρίωση του cDCE σε αιθέριο και του TCE σε VC, αντιστοίχως (Van der Zaan et al., 2010). Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Ενότητα 2.3, το γονίδιο *tceA* έχει βρεθεί στο στέλεχος FL2, που αναχαιτίζεται σε 2 mM διαλυτών σουλφιδίων (Sung, 2005; He et al., 2005). Η ίδια συγκέντρωση φαίνεται να αναστέλλει τη λειτουργία του *Dehalococcoides mccartyi* BAV1, το οποίο έχει την ικανότητα να ανάγει το VC σε αιθέριο (Sung, 2005; Krajmalnik-Brown et al., 2004). Ο Berggren (2011) παρατήρησε ότι με την αύξηση των σουλφιδίων στην καλλιέργεια, επικράτησε το *Dehalococcoides mccartyi* 195, το οποίο μετατρέπει το VC σε αιθέριο μέσω του αργού συμμεταβολισμού. Αντιθέτως, καθαρές καλλιέργειες του *Dehalococcoides mccartyi* 195 με 0, 1.8 και 4.5 mM διαλυτών σουλφιδίων (0, 2 και 5 mM ονομαστικής συγκέντρωσης σουλφιδίων) αποχλωρίωσαν 0.6 mM TCE σε 6, 10 και 14 ημέρες λειτουργίας, αντιστοίχως, ενώ, ο πληθυσμός τους μειώθηκε κατά 35% και 65% με την αύξηση των σουλφιδίων σε 1.8 και 4.5 mM S^{2-} στην υγρή φάση (Mao et al., 2017). Προσομοιώσεις μοντέλου αποχλωρίωσης υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες έδειξαν ότι η μακροχρόνια έκθεση σε σουλφίδια αναστέλλει τη δράση συγκεκριμένων ειδών αποχλωριωτών που είναι αποδοτικοί, προωθώντας παράλληλα λιγότερο αποτελεσματικά είδη οργανοαλογονικής αναπνοής (Kandris, 2017).

Ταυτόχρονα, έχει αποδειχθεί ότι τα σουλφίδια είναι τοξικά και για άλλους μικροοργανισμούς. Μάλιστα, 16.1 mM διαλυτών σουλφιδίων αναστέλλουν πλήρως τους θειικοαναγωγικούς μικροοργανισμούς (Reis et al., 1992), ενώ, το θειικοαναγωγικό βακτήριο, *Desulfonvibrio vulgaris* Hildenborough, αναχαιτίστηκε υπό 10 mM S^{2-} στην υγρή φάση. Ο πληθυσμός του *Syntrophomonas wolfei*, που ζυμώνει οργανικές ενώσεις, μειώθηκε κατά 40% με την εισαγωγή 4.5 mM διαλυτών σουλφιδίων (Mao et al., 2017). Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί ότι τα μεθανογόνα αρχαία είναι πιο ευαίσθητα στην έκθεση στο υδρόθειο, εφόσον οι τιμές IC_{50}^3 είναι μεταξύ 1.5 με 7.9 mM διαλυτού υδρόθειου (Scherr et al., 2011; Oude Elferink et al., 1994). Πιο συγκεκριμένα, τα σουλφίδια φαίνεται να αναχαιτίζουν το οξικοτροφικό

³ Τιμή συγκέντρωσης τοξικής ουσίας όταν η αναχαιτίση είναι στο 50% της μέγιστης αναχαιτίσης.

γένος *Methanosaeta*, δίνοντας έτσι το περιθώριο για την ανάπτυξη των ειδών του γένους *Methanosarcina* (Demirel & Scherer, 2008).

Γενικά, η τοξικότητα του υδρόθειου έχει αποδοθεί στην ικανότητά του να αναστέλλει τη λειτουργία του κυτοχρώματος c-οξειδάσης, να εμποδίζει την κυτταρική αναπνοή και να αναχαιτίζει τη δραστηριότητα αρκετών ενζύμων σχηματίζοντας δεσμούς με τα μέταλλά τους (Truong et al., 2006). Όμως, το *Dehalococcoides mccaryi* κωδικοποιεί ένζυμα που περιέχουν μέταλλα, όπως οι οξειδοαναγωγάσες, για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το δότη στις οργανοχλωριωμένες ενώσεις (Bommer et al., 2014; Futagami et al., 2008; Hug et al., 2013). Τα παραπάνω συμφωνούν με την πρωτεομική ανάλυση του στελέχους 195 υπό υψηλές συγκεντρώσεις σουλφιδίων, όπου παρουσιάστηκε η μειορρύθμιση των γονιδίων (downregulated genes) για τη σύνθεση ATP, τη βιοσύνθεση και την Hym υδρογονάση (Mao et al., 2017), η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το υδρογόνο στο σύμπλεγμα FeS πρωτεϊνών και το οξειδοαναγωγικό συνένζυμο NAD⁺ (Adrian & Löffler, 2016).

Συνοπτικά, φαίνεται ότι η επίδραση των θειικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση συνδέεται με την τοξικότητα του υδρόθειου και τον ανταγωνισμό για το δότη ηλεκτρονίων. Επομένως, η προσθήκη μεγάλης ποσότητας δότη για τη μετατροπή των θειικών ιόντων και τη μετέπειτα ανάπτυξη των μικροοργανισμών οργανοαλογονικής αναπνοής υπό την απουσία της θεικοαναγωγής, μπορεί να υποστηρίξει την, με αργό ρυθμό, αναγωγή των χλωριωμένων ενώσεων σε αιθέριο, λόγω των παραγόμενων σουλφιδίων.

Κεφάλαιο 3 Μεθοδολογία - Πειραματικό πρωτόκολλο

3.1. Συντήρηση και ανάπτυξη πειραμάτων

3.1.1. Εισαγωγή

Με σκοπό την αποσαφήνιση ερωτημάτων που τίθενται, είτε από αντικρουόμενα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία, είτε από την ανεπαρκή διερεύνηση συγκεκριμένων θεμάτων, σχεδιάστηκαν πειράματα διακοπτόμενης τροφοδοσίας (batch). Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων απαιτείτο η κατάλληλη βιοκοινότητα, με την ικανότητα της αναγωγικής αποχλωρίωσης των χλωριωμένων αιθενίων. Έτσι, παρασκευάστηκαν αναερόβιες καλλιέργειες που τροφοδοτούνταν με τριχλωροαιθέριο, δότη ηλεκτρονίων και θρεπτικών ουσιών. Στην παρούσα Ενότητα περιγράφεται η δημιουργία και η τροφοδοσία αυτών των μητρικών καλλιεργειών, καθώς και η παρασκευή των πειραμάτων. Επίσης, αναλύονται οι εργαστηριακές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των χλωριωμένων αιθενίων, των ηλεκτρονίων που παράχθηκαν και της βιομάζας.

3.1.2. Περιγραφή δημιουργίας και ανάπτυξης μητρικών καλλιεργειών

Όλες οι αναερόβιες μητρικές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή προέρχονται από παλαιότερες ανάμικτες καλλιέργειες, που συντηρούνταν στο εργαστήριο υγειονομικής τεχνολογίας για τις ανάγκες άλλης διδακτορικής διατριβής (Παναγιωτάκης, 2010). Οι ανάμικτες καλλιέργειες είχαν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας αναερόβιο μέσο ανάπτυξης (Reduced Anaerobic Mineral Medium; RAMM) και χωνεμένη ιλύ από τις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων (ΕΕΛ) Βόλου και Ψυτάλειας, ενώ ήταν ικανές να ανάγουν είτε το τριχλωροαιθέριο, είτε τα θειικά ιόντα (Panagiotakis et al., 2007). Οι καλλιέργειες που ανήγαγαν τα χλωριωμένα αιθένια ή τα θειικά εμπλουτίζονταν με εβδομαδιαίες δόσεις TCE (0.5 mM ή 66.7 mg/L) ή θειικών ιόντων (0.52 mM ή 50 mg/L), αντιστοίχως, και βουτυρικού οξέος (0.3 mM ή 26.4 mg/L). Πριν την κάθε τροφοδοσία, στους αντιδραστήρες διοχετευόταν αέριο μίγμα CO₂/N₂ (30%/70%) για την απομάκρυνση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και υδρόθειου. Ο χρόνος παραμονής στερεών (Solids Retention Time; SRT; χρόνος ανανέωσης όλου του υγρού όγκου) ορίστηκε στις 48 ημέρες. Έτσι, το 14.5% του υγρού όγκου αντικαθίστατο κάθε εβδομάδα με νέο αναερόβιο μέσο ανάπτυξης. Οι καλλιέργειες συντηρήθηκαν με αυτόν τον τρόπο για πάνω από 200 μέρες συνολικά, οπότε και απέκτησαν βιοκοινότητες με ενισχυμένη ικανότητα αναγωγής είτε του TCE ή των θειικών ιόντων.

Χρησιμοποιώντας αυτές τις αρχικές βιοκοινότητες, τέσσερις νέες μητρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν εις διπλούν, συνδυάζοντας όγκους και από τους δύο αντιδραστήρες, σε ίσες συγκεντρώσεις πτητικών αιωρούμενων στερεών (VSS). Με αυτόν τον τρόπο, έγινε μια προσπάθεια σε αυτές τις καινούργιες καλλιέργειες να

δοθούν ίσες αρχικές ευκαιρίες για ανάπτυξη στα αποχλωριωτικά και τα θεικοαναγωγικά βακτήρια. Το πρωτόκολλο συντήρησης των τεσσάρων νέων καλλιιεργειών συνεχίστηκε, όπως και πριν. Δηλαδή, σε εβδομαδιαία βάση, προστίθεντο 0.5 mM TCE και 0.3 mM βουτυρικού οξέος, ενώ η συγκέντρωση των θειικών ιόντων, η οποία διέφερε μεταξύ των καλλιιεργειών, ρυθμιζόταν στο πλαίσιο της συντήρησης. Οι αντιδραστήρες ήταν σε ανάδευση και υπό σκότος, ενώ η θερμοκρασία ήταν σταθερή και κυμάνθηκε γύρω στους 25°C με τη ρύθμιση της θερμοκρασίας του εργαστηρίου.

Σε ένα ζεύγος καλλιιεργειών, που χρησιμοποιήθηκε ως ζεύγος αναφοράς, δεν προστέθηκαν θειικά ιόντα. Έτσι, η συγκέντρωση δεν ξεπερνούσε τα 0.5 mg/L, η οποία αντιστοιχεί στην ποσότητα των θειικών ιόντων του μέσου ανάπτυξης. Τα μέλη αυτού του ζεύγους ονομάστηκαν N1 και N2, όπου το «N» («No») αναφέρεται στη σχεδόν μηδενική συγκέντρωση των θειικών ιόντων, ενώ τα 1 και 2 στα δύο αντίγραφα. Στις άλλες τρεις καλλιιεργειες, μετά τη μέτρηση των υπολειπόμενων θειικών, προστίθετο κατάλληλη ποσότητα, για να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση στην αρχή του εβδομαδιαίου κύκλου, και πιο συγκεκριμένα ίση με 30 mg/L (0.3 mM), 400 mg/L (4.2 mM) και 1100 mg/L (11.5 mM). Αυτά τα τρία ζεύγη μητρικών καλλιιεργειών ορίστηκαν ως ακολούθως: οι καλλιιεργειες με χαμηλές συγκεντρώσεις θειικών (30 mg/L) ως L1 και L2 («Low»), οι καλλιιεργειες με μέσες συγκεντρώσεις θειικών (400 mg/L) ως M1 και M2 («Medium») και οι καλλιιεργειες με υψηλές συγκεντρώσεις (1100 mg/L) ως H1 και H2 («High»).

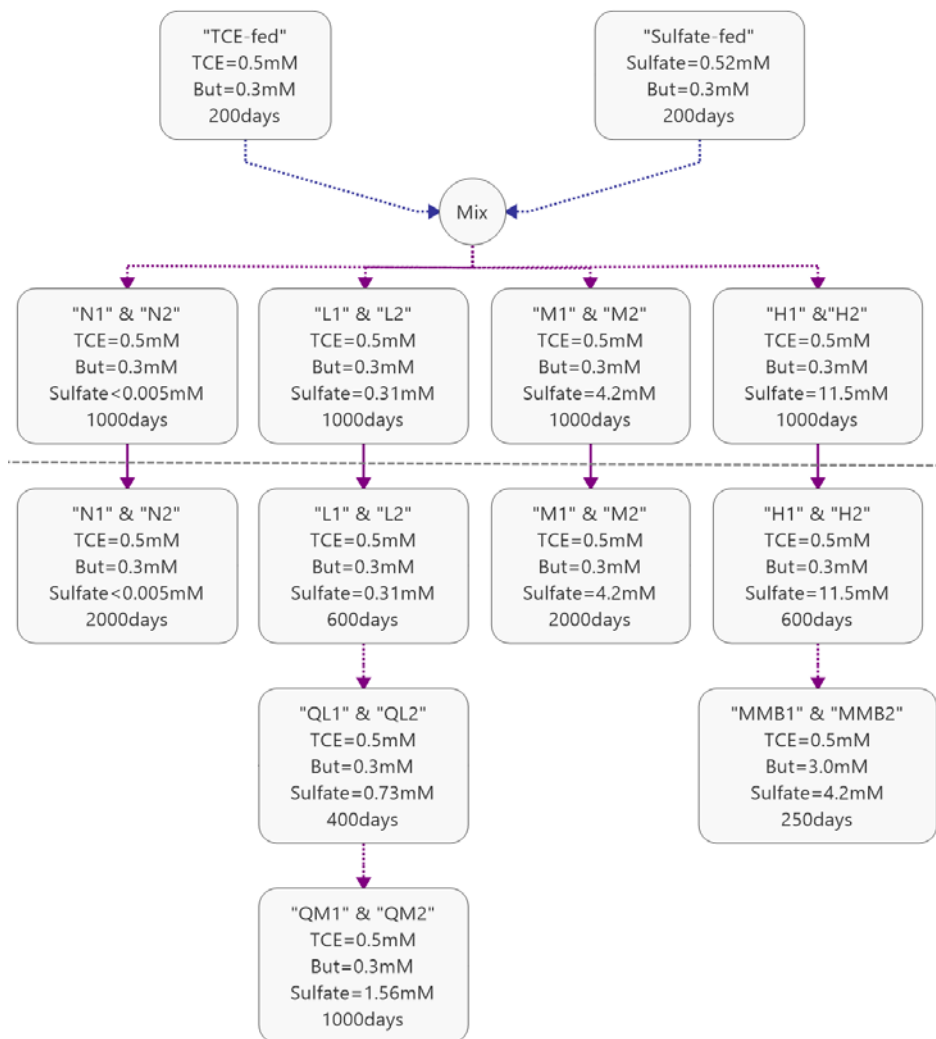
Μετά την πάροδο 1000 ημερών συντήρησης καλλιιεργειών, οι καλλιιεργειες διατήρησαν την ικανότητα να ανάγουν το TCE και τα θειικά ιόντα. Η παρακολούθηση των προϊόντων της αποχλωρίωσης και της απομάκρυνσης των θειικών έδειξε ότι, από τη 350^η μέρα, όλες οι ανάμικτες καλλιιεργειες είχαν επιτύχει σταθερή αναγωγική συμπεριφορά, παράγοντας κυρίως διχλωροαιθέριο (cDCE) και βινυλοχλωρίδιο (VC). Οι καλλιιεργειες με χαμηλές συγκεντρώσεις θειικών (N και L), είχαν μια παρόμοια συμπεριφορά και παρήγαγαν 0.371 ± 0.107 mM cDCE και 0.439 ± 0.051 mM VC (μέση συγκέντρωση \pm τυπική απόκλιση). Η συμπεριφορά των καλλιιεργειών με υψηλές συγκεντρώσεις θειικών (M και H) ήταν επίσης συγκρίσιμη, και με μικρότερο ρυθμό αποχλωρίωσης από ότι οι N και L καλλιιεργειες. Μάλιστα, στις καλλιιεργειες με υψηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων, το cDCE και το VC ήταν ίσα με 0.356 ± 0.071 mM και 0.340 ± 0.051 mM, αντιστοίχως. Κατά τη διάρκεια της ίδιας περιόδου, τα θειικά σχεδόν τελείως ανάχθηκαν στις L καλλιιεργειες, αλλά μερικώς και παρομοίως ανάχθηκαν στις M και H καλλιιεργειες, με μέση απώλεια θειικών 0.626 ± 0.275 mM και 0.669 ± 0.278 mM, αντιστοίχως. Για περισσότερες πληροφορίες, ο αναγνώστης παραπέμπεται στη διδακτορική διατριβή του Ηρακλή Παναγιωτάκη (2010).

Κατά την έναρξη της συγκεκριμένης διατριβής, όλες οι καλλιιεργειες συντηρούνταν με το ίδιο πρωτόκολλο. Όμως, μετά την πάροδο περίπου 600 ημερών, η ποσότητα των θειικών ιόντων άλλαξε στους L αντιδραστήρες από 30 mg/L σε 70 mg/L (0.7 mM) και οι καλλιιεργειες μετονομάστηκαν σε QL («Quasi-Low»). Η συγκέντρωση αυτή διατηρήθηκε για περίπου ένα χρόνο και ύστερα άλλαξε σε 150 mg/L (1.6 mM), με την

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

νέα ονομασία QM («Quasi-Medium»). Η τελευταία διατηρήθηκε ως το τέλος της πειραματικής μελέτης, δηλαδή για άλλες 1000 μέρες. Επιπλέον, στις Η καλλιέργειες η ποσότητα των θειικών ιόντων μειώθηκε στα 400 mg/L, ενώ δεκαπλασιάστηκε η συγκέντρωση του δότη ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να προστίθενται 3 mM βουτυρικού οξέος, κάθε εβδομάδα. Οι καινούριες καλλιέργειες έφεραν την ονομασία MMB1 και MMB2, όπου το «M» δήλωνε τη συγκέντρωση των θειικών και το «MB» («Medium Butyrate») τη μέση δόση βουτυρικού οξέος. Οι N και M διατηρήθηκαν όπως είχαν, για περίπου 2000 μέρες.

Στο Σχεδιάγραμμα 3.1 φαίνεται το ιστορικό δημιουργίας των καλλιεργειών και οι συγκεντρώσεις των δοτών και των αποδεκτών ηλεκτρονίων, ενώ οι μέρες που αναγράφονται είναι, κατά προσέγγιση, οι μέρες διατήρησης των καλλιεργειών. Η διακεκομμένη γκρι γραμμή υποδεικνύει τον τερματισμό των πειραμάτων για τη διδακτορική διατριβή του Ηρακλή Παναγιωτάκη (2010) σηματοδοτώντας την έναρξη των πειραμάτων της παρούσας διατριβής.



Σχήμα 3.1 Ιστορική αναδρομή μητρικών καλλιεργειών.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης των μητρικών καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για την ανάλυση των χλωριωμένων αιθενίων, μεθανίου, πτητικών λιπαρών οξέων, βιομάζας, κ.ά. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων περιγράφονται στο Κεφάλαιο 4, ενώ στις παρακάτω παραγράφους περιγράφεται το πρωτόκολλο συντήρησης και των αναλύσεων.

3.1.3. Περιγραφή συντήρησης μητρικών καλλιιεργειών

Η συντήρηση όλων των καλλιιεργειών επιτυγχανόταν με την τροφοδοσία απαραίτητων θρεπτικών ουσιών και πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επίσης, προστίθεντο TCE και θειικά ιόντα ως αποδέκτες ηλεκτρονίων και βουτυρικό οξύ ως δότης ηλεκτρονίων για την πραγματοποίηση στοχευόμενων αναγωγικών διεργασιών και, κατ' επέκταση, την απόκτηση ενέργειας για τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών.

Οι μητρικές καλλιιεργειες διατηρούνταν στο Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας στους 25°C, απουσία φωτός και υπό μαγνητική ανάδευση. Κάθε εβδομάδα διεξαγόταν η τροφοδοσία των αντιδραστήρων ακολουθώντας τα βήματα που αναλύονται λεπτομερώς στο Παράρτημα Α.1. Οι καλλιιεργειες αναπτύχθηκαν σε σφραγισμένα μπουκάλια serum με χωρητικότητα 600 mL και η αναλογία αερίου/υγρού/ολικού όγκου ήταν 60/100/160. Επομένως, ο όγκος της υγρής φάσης και της αέριας ήταν 375 και 225 mL αντιστοίχως, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1 Χαρακτηριστικά τροφοδοσίας μητρικών καλλιιεργειών.

Μητρικές καλλιιεργειες	N	L ^a	QL	QM	M	MMB ^a	H ^a
C _{sulfate} (mM)	<0.005	0.31	0.72	1.56	4.16	4.16	11.5
V _{υγρής φάσης} (mL)	375	375	375	375	375	375	375
V _{αέριας φάσης} (mL)	225	225	225	225	225	225	225
V _{RAMM} (mL) ¹	55	55	55	55	55	55	55
V _{S-T} (μL) ¹	55	55	55	55	55	55	55
V _{Vit} (μL) ¹	550	550	550	550	550	550	550
V _{YE} (μL) ¹	19	19	19	19	19	19	19
V _{TCE} (μL)	17	17	17	17	17	17	17
V _{But} (μL)	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	105	10.5

¹RAMM (Reduced Anaerobic Mineral Medium): Αναερόβιο θρεπτικό μέσο; S-T (Selenium-Tungstate solution): Διάλυμα Σεληνίου/Βολφραμίου; Vit (Vitamins solution): Διάλυμα βιταμινών; YE (Yeast Extract): Διάλυμα 10% w/v εκχυλίσματος ζύμης. ^aΤα αποτελέσματα παρουσιάζονται μόνο στο Παράρτημα Γ.

Συνοπτικά, η διαδικασία τροφοδοσίας είχε ως εξής: Αρχικά γινόταν η δειγματοληψία από την αέρια φάση για την ανάλυση των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

μεθανίου, και από την υγρή φάση για τις αναλύσεις βιομάζας, πτητικών λιπαρών οξέων, θειικών ιόντων, σουλφιδίων και pH. Ύστερα, διοχετευόταν αέριο βιομηχανικό άζωτο (99% N₂) ή/και μίγμα αζώτου και διοξειδίου του άνθρακα (70%/30% N₂/CO₂), με στόχο την απομάκρυνση των παραγόμενων αερίων και τυχόν φυλακισμένου οξυγόνου για την δημιουργία αναερόβιων συνθηκών. Κατόπιν, λαμβανόταν υγρός όγκος, έως ότου ο τελικός όγκος εντός του αντιδραστήρα να είναι 320 mL και προστίθεντο το αναερόβιο μέσο ανάπτυξης (RAMM), το εκχύλισμα ζύμης (ΥΕ), τα διαλύματα σεληνίου/βολφραμίου (S-T) και βιταμινών (Vit). Τα συγκεκριμένα διαλύματα παρασκευάζονταν, όπως περιγράφεται παρακάτω. Επίσης, πραγματοποιείτο η εισπίεση του TCE και του βουτυρικού οξέος κατευθείαν από καθαρά τυποποιημένα διαλύματα. Ο όγκος των θειικών ιόντων που έπρεπε να εισαχθεί υπολογιζόταν κάθε φορά, σύμφωνα με την καταμέτρησή τους, για να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση.

3.1.4. Πρωτόκολλο παρασκευής θρεπτικών μέσων

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την τροφοδοσία των μητρικών καλλιεργειών παρασκευάζονταν στο εργαστήριο. Γενικότερα, τα θρεπτικά μέσα που επιλέχθηκαν για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής χρησιμοποιούνται συχνά με μικρές διαφορές στη βιβλιογραφία (Aulenta et al., 2005b; Freedman & Gossett, 1989; Μαγμό-Gatell et al., 1995). Στην πλειονότητά τους, τα συγκεκριμένα πρωτόκολλα αφορούν την ανάπτυξη μεθανογόνων μικροοργανισμών, αλλά χρησιμοποιούνται και σε πιο γενικές περιπτώσεις, όπως για τη συντήρηση μικτών αναερόβιων καλλιεργειών.

Το αναερόβιο θρεπτικό μέσο (RAMM) παρασκευάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από τους Tandoi et al. (1995), ενώ τα συστατικά του φαίνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Αναερόβιο θρεπτικό μέσο (RAMM).

Συστατικά	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό (mL)	2000
MgCl ₂ * 6H ₂ O (mg)	200
CaCl ₂ * 6H ₂ O (mg)	100
K ₂ HPO ₄ (mg)	800
NH ₄ Cl (mg)	1000
Διάλυμα μετάλλων (mL)	20
Διάλυμα 8% w/v NaHCO ₃ (mL)	50
Διάλυμα 5% w/v Na ₂ S * 9H ₂ O (mL)	10
Διάλυμα 0.1% w/v resazurin (μL)	200

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Το θρεπτικό μέσο ετοιμαζόταν σε μπουκάλια serum χωρητικότητας 2 L, τα οποία σφραγίζονταν με πώματα βουτυλίου για την αποφυγή εισροής οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη χλωριούχου μαγνησίου ($MgCl_2$), χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$), όξινου φωσφορικού καλίου (K_2HPO_4), χλωριούχου αμμωνίου (NH_4Cl) και διαλύματος μετάλλων σε απιονισμένο νερό, πραγματοποιείτο η διοχέτευση μίγματος αερίων N_2/CO_2 (70%/30%) για 30 λεπτά με σκοπό την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών. Ύστερα, εξάγονταν 60 mL από το διάλυμα και αντικαθίσταντο με διαλύματα διττανθρακικού νατρίου ($NaHCO_3$) και θειούχου νατρίου (Na_2S). Τέλος, εισαγόταν ποσότητα διαλύματος resazurin, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0.1 mg/L, με στόχο την επιβεβαίωση των αναερόβιων συνθηκών. Αν το διάλυμα ήταν ροζ, τότε υπήρχε φυλακισμένο οξυγόνο εντός του θρεπτικού μέσου, δηλαδή κυριαρχούσαν οξειδωτικές συνθήκες. Αν το διάλυμα ήταν άχρωμο, τότε είχαν επιτευχθεί οι αναερόβιες αναγωγικές συνθήκες. Τα λεπτομερή βήματα της παρασκευής του μέσου ανάπτυξης παρουσιάζονται στο Παράρτημα Α.2.

Το διάλυμα μετάλλων παρασκευαζόταν χρησιμοποιώντας ένα παραλλαγμένο πρωτόκολλο του Zeikus J. (1977) (Tandoi et al., 1995), ενώ το διάλυμα βιταμινών (Vitamins solution) εγχέονταν απευθείας στις μητρικές καλλιέργειες, σύμφωνα με τους Balch et al. (1979) με μικρές τροποποιήσεις (Παναγιωτάκης, 2010). Τα συστατικά των διαλυμάτων μετάλλων, βιταμινών και σεληνίου-βολφραμίου φαίνονται στους πίνακες 3.3, 3.4 και 3.5, αντιστοίχως. Στο Παράρτημα Α καταγράφεται, επίσης, ο τρόπος παρασκευής των λοιπών διαλυμάτων.

Πίνακας 3.3 Διάλυμα ιχνοστοιχείων μετάλλων (Trace metal solution; Tandoi et al., 1995).

Συστατικά	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό (mL)	1000
Nitrilotriacetic acid (mg) ¹	4500
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (mg)	556
$MnSO_4 \cdot H_2O$ (mg)	86
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (mg)	170
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (mg)	210
H_3BO_3 (mg)	19
$NiCl_2$ (mg)	20
$NaMoO_4$ (mg)	10
Διάλυμα 10M KOH	# ²

¹Νιτριλοτριοξικό οξύ (NTA); ²Ρύθμιση pH στο 7 με την προσθήκη διαλύματος 10M KOH.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 3.4 Διάλυμα βιταμινών (Vitamins solution; Παναγιωτάκης, 2010).

Συστατικά	Ποσότητα
Απιονισμένο νερό (mL)	1000
Υδροχλωρική θειαμίνη B1 (mg)	50
Ριβοφλαβίνη B2 (mg)	50
Νικοτινικό οξύ B3 (mg)	50
DL-παντοθενικό ασβέστιο B5 (mg)	50
Υδροχλωρική πυριδοξίνη B6 (mg)	100
Βιοτίνη B7 (mg)	20
Φολικό οξύ B9 (mg)	20
p-αμινοβενζοϊκό οξύ B10 (mg) ¹	50
Κυανοκοβαλαμίνη B12 (mg)	5

¹ p-amino-benzoic acid (PABA).

Πίνακας 3.5 Διάλυμα σεληνίου-βολφραμίου (Widdel F., 1988).

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

3.1.5. Περιγραφή παρασκευής πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch)

Με την εβδομαδιαία συντήρηση των μητρικών καλλιέργειών, συλλεγόταν βιομάζα από τα δύο αντίγραφα της κάθε καλλιέργειας σε σφραγισμένο serum μπουκάλι, με σκοπό την υλοποίηση πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch). Η βιοκοινότητα αυτή είχε, λοιπόν, την ικανότητα να ανάγει πλήρως το TCE σε αιθέριο, ενώ ήταν εγκλιματισμένη σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση θειικών ιόντων. Η συντήρηση της βιομάζας γινόταν όπως αυτή των μητρικών καλλιέργειών, και ανάλογα με τον όγκο της προστίθεντο οι κατάλληλες ποσότητες θρεπτικού μέσου και διαλυμάτων κάθε εβδομάδα. Το παραπάνω βήμα επαναλαμβανόταν έως ότου συλλεγόταν ο απαραίτητος όγκος για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι αντιδραστήρες που πραγματοποιούνταν τα πειράματα ήταν serum μπουκάλια χωρητικότητας 160 mL, με αναλογία αέρας/υγρής φάσης 6:10, συνεπώς, ο όγκος υγρού σε κάθε μικρόκοσμο ήταν 100 mL. Πριν την εισαγωγή της μικτής βιοκοινότητας στους αντιδραστήρες, τα μπουκάλια σφραγίζονταν με πώματα βουτυλίου και αλουμινένια καπάκια και γινόταν η διοχέτευση αερίου N₂/CO₂ (70%/30%) για 15 λεπτά. Επίσης, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών προστίθεντο αναερόβιο θρεπτικό μέσο, διάλυμα σεληνίου-βολφραμίου και διάλυμα βιταμινών, τα οποία αποτελούσαν το 15% του υγρού όγκου. Η θερμοκρασία των πειραμάτων παρέμεινε σταθερή στους 25 ± 2°C, ενώ τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν σε ανακινήρα για την ομοιόμορφη ανάδυσή τους υπό την απουσία φωτός. Τα βήματα της παρασκευής των μικρόκοσμων καταγράφονται λεπτομερώς στο Παράρτημα Α.3,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα ένα πείραμα με μέση δόση βουτυρικού οξέος (3 mM) και με 400 mg/L συγκέντρωση θειικών ιόντων (MMED).

Στόχος των πειραμάτων ήταν η διερεύνηση της επίδρασης: α) της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων, β) του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης του TCE. Για την κάλυψη των στόχων που τέθηκαν, πειράματα σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τον Πίνακα 3.6. Όλοι οι μικρόκοσμοι πραγματοποιήθηκαν σε δύο αντίγραφα, «α» και «β», ενώ τα αποτελέσματα που αναγράφονται στο Κεφάλαιο 4 είναι ο μέσος όρος των τιμών, συνοδευόμενος από την τυπική τους απόκλιση.

Πίνακας 3.6 Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας.

Όνομασία	Υπόστρωμα	TCE (mM)	Δότης e ⁻ (mM) ^a	Ύστερη προσθήκη ^{a,b}	Θειικά ιόντα (mM)	Μέρες λειτουργίας
DWNED	Απιονισμένο νερό (DW)	0.5	0		<0.005	22
DWMHq	Απιονισμένο νερό (DW)	0.5	6 Hq		<0.005	59
DWMFeS	Απιονισμένο νερό (DW)	0.5	6 FeS		<0.005	114
NNED	N1 & N2	0.5	0		<0.005	143
NLED	N1 & N2	0.5	0.3 But		<0.005	184
NQMED	N1 & N2	0.5	2.2 But		<0.005	9
NMED	N1 & N2	0.5	3.0 But		<0.005	5 & 9
NHED	N1 & N2	0.5	9.1 But		<0.005	6
N1DHyd	N1 & N2	0.5	0.3 But + 3 Hyd		<0.005	5
N14DHyd ^c	N1 & N2	0.5	0.3 But	3 mM Hyd (14 ⁿ)	<0.005	18
NMAc	N1 & N2	0.5	1.5 Ac		<0.005	128
NMFeS	N1 & N2	0.5	6 FeS		<0.005	211
NMAcLFeS	N1 & N2	0.5	1.5 Ac + 0.6 FeS		<0.005	143
NQMAcLFeS	N1 & N2	0.5	2 Ac + 0.6 FeS		<0.005	143
NMAcMFeS	N1 & N2	0.5	1.5 Ac + 6 FeS		<0.005	28
NMBenz	N1 & N2	0.5	0.4 Benz		<0.005	69
NMHq	N1 & N2	0.5	6 Hq		<0.005	128
NMAcLHq	N1 & N2	0.5	1.5 Ac + 0.6 Hq		<0.005	92
NMAcMHq	N1 & N2	0.5	1.5 Ac + 6 Hq		<0.005	211
NMHqMFeS	N1 & N2	0.5	6 Hq + 6 FeS		<0.005	211
NMDOM	N1 & N2	0.5	(661mg/L) DOM ^d		<0.005	128
NMAcMDOM	N1 & N2	0.5	1.5 Ac + (661mg/L) DOM ^d		<0.005	128
NMFeCl ₂	N1 & N2	0.5	6 FeCl ₂		<0.005	142
NMAcMFeCl ₂	N1 & N2	0.5	1.5 Ac + 6 FeCl ₂		<0.005	142
NQMAcMFeCl ₃	N1 & N2	0.5	2 Ac + 0.6 FeCl ₃		<0.005	142
NMProp	N1 & N2	0.5	0.7 Prop		<0.005	266
NMPropLFeS	N1 & N2	0.5	0.7 Prop + 0.6 FeS		<0.005	266
NMPropMFeS	N1 & N2	0.5	0.7 Prop + 6 FeS		<0.005	69
NMCW ^c	N1 & N2	0.5	(96 mgCOD/L) CW ^d		<0.005	7
NHCW ^c	N1 & N2	0.5	(480 mgCOD/L) CW ^d		<0.005	15
NMRCW	N1 & N2	0.5	(96 mgCOD/L) CW ^d		<0.005	13
NHRCW	N1 & N2	0.5	(480 mgCOD/L) CW ^d		<0.005	51

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Όνομασία	Υπόστρωμα	TCE (mM)	Δότης e ⁻ (mM) ^a	Ύστερη προσθήκη ^{a,b}	Θειικά ιόντα (mM)	Μέρες λειτουργίας
NMPCW	N1 & N2	0.5	(96 mgCOD/L) CW ^d		<0.005	51
NHPCW	N1 & N2	0.5	(480 mgCOD/L) CW ^d		<0.005	51
NMEDMS ^c	N1 & N2	0.5	3.0 But		4.2	366
NHEDMS ^c	N1 & N2	0.5	9.1 But		4.2	366
QLLED	QL1 & QL2	0.5	0.3 But		0.7	149
QLQMED	QL1 & QL2	0.5	2.2 But		0.7	83
QMLED	QM1 & QM2	0.5	0.3 But		1.6	181
QMQLLED	QM1 & QM2	0.5	0.9 But		1.6	181
QMMED	QM1 & QM2	0.5	3.0 But		1.6	171
QMLED	QM1 & QM2	0.5	9.1 But		1.6	257
MMED	M1 & M2	0.5	3.0 But		4.2	366
MLED	M1 & M2	0.5	9.1 But		4.2	366
MMAcMFeS	M1 & M2	0.5	1.5 Ac + 6 FeS		4.2	141
MQAclFeS	M1 & M2	0.5	5.7 Ac + 0.6 FeS		4.2	141
MMAclFeCl ₃	M1 & M2	0.5	1.5 Ac + 0.6 FeCl ₃		4.2	141
MQAclFeCl ₃	M1 & M2	0.5	5.7 Ac + 0.6 FeCl ₃		4.2	141
MMRCW	M1 & M2	0.5	(130 mg/L) CW ^d		4.2	181
MHRCW	M1 & M2	0.5	(540 mg/L) CW ^d		4.2	181
MMEDR ^c	M1 & M2	0.5	3.0 But	RAMM (133)	4.2	366
MMEDST ^c	M1 & M2	0.5	3.0 But	ST (133)	4.2	366
MMEDVit ^c	M1 & M2	0.5	3.0 But	Vit (133)	4.2	366
CMQLLED	M1 & M2	0.5	0.3 But	But & slf (κάθε 7 μέρες)	4.2	180
CMMED	M1 & M2	0.5	3.0 But	But & slf (κάθε 7 μέρες)	4.2	180
MTHHyd	N1 & N2	0	3.0 Hyd		<0.005	26
MTHAc	N1 & N2	0	0.8 Ac		<0.005	26
SLF150Hyd	QM1 & QM2	0	6.0 Hyd		1.6	7
SLF150Ac	QM1 & QM2	0	1.5 Ac		1.6	7
SLF400Hyd	M1 & M2	0	6.0 Hyd		4.2	7
SLF400Ac	M1 & M2	0	1.5 Ac		4.2	7
SLF150LED	QM1 & QM2	0	0.3 But		1.6	7
SLF150MED	QM1 & QM2	0	3.0 But		1.6	7
SLF400LED	M1 & M2	0	0.3 But		4.2	7
SLF400MED	M1 & M2	0	3.0 But		4.2	7
MPHBCo	M1 & M2	0.5	0		4.2	1
NPHB	N1 & N2	0.5	9.1 But		<0.005	1
QMPHB	QM1 & QM2	0.5	9.1 But		1.6	1
MPHB	M1 & M2	0.5	9.1 But		4.2	1

^aBut: βουτυρικό οξύ, Hyd: μοριακό υδρογόνο, Ac: Οξικό οξύ, Hq: Υδροκινόνη, DOM: Διαλυτή οργανική ύλη, Prop: Προπανόλη, Benz: Βενζοϊκό οξύ, CW: Τυρόγαλο, RAMM: Αναερόβιο θρεπτικό μέσο, ST: διάλυμα σεληνίου-βολφραμίου, slf: θειικά ιόντα. ^bΟι τιμές στην παρένθεση δηλώνουν τη μέρα εισαγωγής της περιγραφόμενης ουσίας. ^cΠαρουσιάζονται μόνο στο Παράρτημα Γ. ^dΔεν είναι γνωστό το μοριακό βάρος.

Οι ποσότητες TCE και θεικών ιόντων χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης των θεικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση και εν μέρει βασίσθηκε στα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής του Παναγιωτάκη (2010). Η επιλογή της δόσης δότη ηλεκτρονίων έχει γίνει, σύμφωνα με την απαίτηση σε ηλεκτρόνια για την αναγωγική αποχλωρίωση και τη θεικοαναγωγή. Στο Κεφάλαιο

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

4 αναλύεται η λογική που ακολουθήθηκε κατά το σχεδιασμό του κάθε πειράματος, ενώ στην Ενότητα 3.4.1 παρουσιάζονται παραδείγματα με τις αναλογικές σχέσεις μεταξύ των διάφορων ειδών δοτών και αποδεκτών ηλεκτρονίων.

3.2. Αναλυτικές Μέθοδοι

3.2.1. Εισαγωγή

Επιλεγμένες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν για την εξαγωγή αποτελεσμάτων, που οδηγούν σε μια ολοκληρωμένη εικόνα με σαφή συμπεράσματα. Οι αναλύσεις που υλοποιήθηκαν στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας, αλλά και στις μητρικές καλλιέργειες φαίνονται στον Πίνακα 3.7. Στις παρακάτω παραγράφους περιγράφονται συνοπτικά οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν και η οργανολογία αυτών.

Πίνακας 3.7 Αναλύσεις στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας και τις μητρικές καλλιέργειες.

Ανάλυση	Στόχος	Όργανο	Είδος δείγματος
TCE, DCEs, VC, Αιθένιο, Αιθάνιο Ασετυλίνη	Απόδοση αναγωγικής αποχλωρίωσης Απόδοση αβιοτικής αποχλωρίωσης	Αέριος χρωματογράφος Αέριος χρωματογράφος	Αέρια φάση Αέρια φάση
Πτητικά λιπαρά οξέα, Βενζοϊκό οξύ, Προπανάλη COD, Διαλυτό COD	Παραγωγή ηλεκτρονίων Παραγωγή ηλεκτρονίων	Αέριος χρωματογράφος Φασματοφωτόμετρο	Υγρή φάση Υγρή φάση
TSS, VSS Πρωτεΐνες	Μέτρηση βιομάζας, Παραγωγή/κατανάλωση ηλεκτρονίων Μέτρηση βιομάζας, Παραγωγή/κατανάλωση ηλεκτρονίων	Φούρνοι & Ζυγός Φασματοφωτόμετρο	Υγρή φάση Υγρή φάση
Μεθάνιο Θειικά ιόντα, Σουλφίδια Fe^{2+} , Fe^{3+}	Απόδοση μεθανογένεσης Απόδοση θεικοαναγωγής Απόδοση αναγωγής σιδήρου, παραγωγή ηλεκτρονίων	Αέριος χρωματογράφος Φασματοφωτόμετρο Φασματοφωτόμετρο	Αέρια φάση Υγρή φάση Υγρή φάση
Φθορίζουσα επί τόπου υβριδοποίηση (FISH) Χρώση Neisser	Σύσταση βιοκοινότητας Ταυτοποίηση πολύ- υδροξυβουτυρικών αλυσίδων	Μικροσκόπιο Μικροσκόπιο	Υγρή φάση Υγρή φάση
Θερμοκρασία pH	Ιδανικές συνθήκες (25 °C) Ιδανικές συνθήκες (pH~7)	Θερμόμετρο pHμετρο	Υγρή φάση Υγρή φάση

Η συχνότητα των αναλύσεων εξαρτάτο από το είδος του δείγματος, τη διάρκεια του πειράματος, αλλά και τον στόχο του πειράματος. Σε γενικές γραμμές, οι

Δειγματοληψίες των αερίων δειγμάτων ήταν πιο συχνές από ότι των υγρών, για να μην μεταβληθεί η αναλογία 6:10 αέριας/υγρής φάσης (βλ. Ενότητα 3.2.2). Σύμφωνα με θεωρητικούς υπολογισμούς, μια μέγιστη ποσότητα υγρού που θα μπορούσε να αφαιρεθεί κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ήταν περίπου 5 mL από συντηρητική σκοπιά. Η εξαγωγή πάνω από το όριο του όγκου προκαλούσε πρόβλημα στις μετρήσεις ουσιών υψηλής πτητικότητας, δηλαδή των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, ασετυλίνης, μεθανίου και σουλφιδίων, αυξάνοντας το σφάλμα της μέτρησης άνω του ποσοστού 10%.

Επομένως, οι μετρήσεις των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, ασετυλίνης και μεθανίου ήταν σχεδόν καθημερινές την πρώτη εβδομάδα, αλλά μετά μειώνονταν, αναλογικά με το διάστημα λειτουργίας του συστήματος. Όμως, οι λοιπές αναλύσεις, που έπρεπε να υλοποιηθούν σε υγρό δείγμα, ήταν πιο αραιές, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.8. Εξαίρεση αποτελεί η μέτρηση της θερμοκρασίας που πραγματοποιείτο σε ξεχωριστό serum μπουκάλι με 100 mL απιονισμένου νερού και τοποθετείτο δίπλα στα υπόλοιπα μπουκάλια καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.

Πίνακας 3.8 Παράδειγμα συχνότητας αναλύσεων στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας.

Ανάλυση ανά πείραμα	1 ^η μέρα	1 ^η εβδομάδα	2 ^η & 3 ^η εβδομάδα	4 ^η εβδομάδα-Τέλος
TCE, DCEs, VC Αιθένιο, Αιθάνιο, Ασετυλίνη, Μεθάνιο	3 μετρήσεις 3 μετρήσεις	1 μέτρηση/μέρα 1 μέτρηση/μέρα	1 μέτρηση/3 μέρες 1 μέτρηση/3 μέρες	1 μέτρηση/εβδομάδα 1 μέτρηση/εβδομάδα
Πτητικά λιπαρά οξέα, Βενζοϊκό οξύ, Προπανόλη COD, Διαλυτό COD	2 μετρήσεις	1 μέτρηση/2 μέρες	1 μέτρηση/εβδομάδα	1 μέτρηση/εβδομάδα
TSS, VSS Πρωτεΐνες	1 μέτρηση 1 μέτρηση	- -	- -	1 μέτρηση 1 μέτρηση
Θειικά ιόντα, Σουλφίδια Fe ²⁺ , Fe ³⁺	1 μέτρηση 1 μέτρηση	1 μέτρηση 1 μέτρηση	(1 μέτρηση) (1 μέτρηση)	1 μέτρηση 1 μέτρηση
pH Θερμοκρασία	1 μέτρηση 3 μετρήσεις	- 1 μέτρηση/μέρα	- 1 μέτρηση/3 μέρες	1 μέτρηση 1 μέτρηση/εβδομάδα

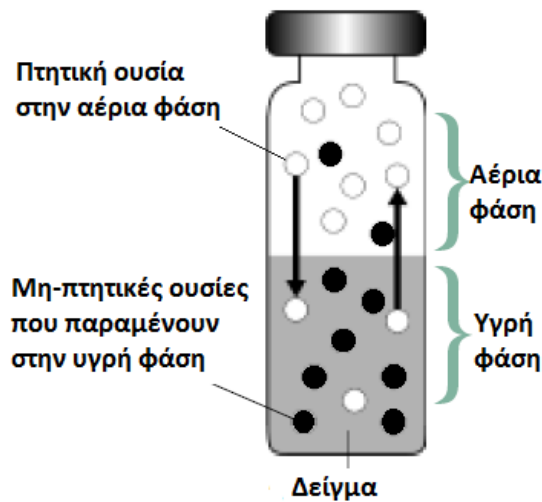
3.2.2. Ανάλυση υπερκείμενης φάσης-Ονομαστική συγκέντρωση

Οι πτητικές ενώσεις, όπως χλωριωμένα αιθένια, αιθένιο, αιθάνιο, ασετυλίνη και σουλφίδια, μπορούν να μετρηθούν στην αέρια φάση των πειραμάτων παίρνοντας αέριο δείγμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος ονομάζεται ανάλυση στατικής υπερκείμενης φάσης (Static Headspace Analysis; SHA) και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες έρευνες (Aulenta et al., 2009; Adamson & Parkin, 1999; Fennell et al., 2004; Hunkeler et al., 2011; Smatlak et al., 1996; Takeuchi et al., 2011; Yu & Semprini,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

2002), γιατί έχει την ικανότητα να εξαγάγει πτητικές ουσίες με σχετική ευκολία και χωρίς ιδιαίτερες παρεμβολές από ένα μίγμα με πολλά συστατικά (Σχήμα 3.2).

Η υπερκείμενη φάση (Headspace) θεωρείται ως η αέρια φάση πάνω από ένα υγρό ή στερεό δείγμα, που εγκλείεται σε σφραγισμένο μπουκάλι. Μετά την πάροδο ενός εύλογου χρόνου, οι συγκεντρώσεις μιας ένωσης μεταξύ των δύο φάσεων θα σταθεροποιηθούν, δηλαδή θα επιτευχθεί ισορροπία. Το ποσοστό της μάζας της πτητικής ένωσης που έχει μεταφερθεί στην υπερκείμενη φάση εξαρτάται από τις σχέσεις μεταξύ των φάσεων και την αλληλεπίδραση της ουσίας με το μίγμα. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση υπερκείμενης φάσης (Headspace analysis), ο αναγνώστης μπορεί να απευθυνθεί στα βιβλία των Kolb & Ettre (1997; 2006).



Σχήμα 3.2 Κατανομή πτητικών και μη-πτητικών ουσιών στις δύο φάσεις.

Επομένως, η κατανομή μεταξύ της αέριας και της υγρής φάσης μπορεί να υπολογιστεί μέσω του συντελεστή Henry (H), σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις (Gossett, 1987; Peng & Wan, 1997):

$$M = C_l * V_l + C_g * V_g \quad \text{Εξίσωση 3.1}$$

$$C_g = H_c * C_l \quad \text{Εξίσωση 3.2}$$

$$M = C_l * (V_l + H_c * V_g) \quad \text{Εξίσωση 3.3}$$

Όπου, M: ολική μάζα ουσίας, mole

C_l: συγκέντρωση ουσίας στην υγρή φάση, M

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

V_l : όγκος υγρής φάσης, L

C_g : συγκέντρωση ουσίας στην αέρια φάση, M

V_g : όγκος αέριας φάσης, L

H_c : αδιάστατη σταθερά Henry.

Αλλιώς, μπορεί να υπολογιστεί από τη μερική πίεση του αερίου ως εξής:

$$P * V_g = n * R * T \rightarrow P = C_g * R * T \quad \text{Εξίσωση 3.4}$$

$$P = H * C_l \quad \text{Εξίσωση 3.5}$$

$$M = C_l * [V_l + (H * V_g) / (R * T)] \quad \text{Εξίσωση 3.6}$$

Όπου, P: μερική πίεση αερίου, atm

n: μάζα της ουσίας στην αέρια φάση, moles

R: παγκόσμια σταθερά αερίων [= 0,08206 L* atm / (mole * Kelvin)]

T: θερμοκρασία αερίου, Kelvin

H: σταθερά Henry, L * atm / mole.

Αρκετές μελέτες έχουν υπολογίσει τις τιμές της σταθεράς Henry των χλωριωμένων αιθενίων (Nielsen et al., 1994; Tse et al., 1992; Peng & Wan, 1997), όμως, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι από την έρευνα του Gossett (1987). Οι τιμές της κάθε ουσίας, λοιπόν, που επιλέχθηκαν από τη βιβλιογραφία, φαίνονται στον Πίνακα 3.9. Η σταθερά εξαρτάται από τη θερμοκρασία, γι' αυτόν τον λόγο, όταν γινόταν η δειγματοληψία, η θερμοκρασία έπρεπε να είναι ίση με 25 ± 1 °C.

Πίνακας 3.9 Τιμές σταθεράς Henry στους 25°C.

Ουσίες	H	H_c	Αναφορά
	L*atm/mole	Αδιάστατη	
TCE	9.58	0.392	Gossett (1987)
cis-DCE	4.08	0.167	Gossett (1987)
trans-DCE	9.38	0.384	Gossett (1987)
1,1-DCE	26.1	1.069	Gossett (1987)
VC	27.8	1.137	Gossett (1987)
Μεθάνιο	665	27.19	Mackay & Shiu (1981)
Αιθένιο	214	8.753	Mackay & Shiu (1981)
Αιθάνιο	499	20.41	Mackay & Shiu (1981)
Ασετυλίνη	24.1	0.984	Sander (2015)
Σουλφίδια	9.87	0.403	Sander (2015)

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Οι υπολογιζόμενες ποσότητες των ουσιών παρουσιάζονται ως ονομαστικές συγκεντρώσεις ($C_{nominal}$), δηλαδή η ολική μάζα της ένωσης ως προς τον όγκο του νερού, όπως δείχνει και η Εξίσωση 3.8.

$$C_{nominal} = M / V_l \quad \text{Εξίσωση 3.7}$$

Η ονομαστική συγκέντρωση επιλέχθηκε ως η κύρια παράμετρος με την οποία θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα, εφόσον όλες οι αβιοτικές και βιολογικές διεργασίες διεξάγονταν στην υγρή φάση.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πτητικών ενώσεων στην υγρή φάση με λόγο αέριας:υγρής φάσης 6:10, η ολική μάζα πολλαπλασιάζεται με 7.98, 9.09, 8.13, 6.09, 5.94, 0.58, 1.60, 0.76, 6.29 και 8.05 για TCE, cis-DCE, trans-DCE, 1,1-DCE, VC, μεθάνιο, αιθένιο, αιθάνιο, ασετυλίνη και σουλφίδια, αντιστοίχα.

3.2.3. Ανάλυση χλωριωμένων αιθενίων, μεθανίου, αιθενίου, αιθανίου & ασετυλίνης

Δύο δείγματα των 50 μL από την αέρια φάση του μικρόκοσμου λαμβάνονταν και εισάγονταν στον αέριο χρωματογράφο Autosystem XL PerkinElmer (Gas Chromatography; GC), χειροκίνητα. Σκοπός ήταν η μέτρηση μεθανίου, αιθενίου, αιθανίου και ασετυλίνης στη μια περίπτωση, και των χλωριωμένων αιθενίων στην άλλη.

Για τη λήψη από την υπερκείμενη φάση χρησιμοποιούνταν ειδική σύριγγα συλλογής αερίων με βαλβίδα (Hamilton gas-tight syringe), έτσι ώστε να φυλακιστεί και να μην διαφύγει το δείγμα. Στη συνέχεια, γινόταν εισπίεση του δείγματος στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου (Programmed-temperature Split/Splitless inlet system; PSS; της εταιρείας PerkinElmer), όπου το δείγμα εξαερωνόταν και οδηγούνταν στη στήλη του οργάνου (GS-GasPro; 30 m, 0.32 mm; της εταιρείας J&W). Στο σημείο αυτό, πραγματοποιούνταν ο διαχωρισμός των ουσιών που υπήρχαν στο μίγμα, σύμφωνα με την κατανομή τους, μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Η στατική φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό, υψηλού μοριακού βάρους, το οποίο βρίσκεται καθλωμένο στα τοιχώματα της στήλης, ενώ η κινητή φάση είναι ένα αδρανές φέρον αέριο, όπου, στη συγκεκριμένη περίπτωση, ήταν το ήλιο (He; καθαρότητας 99.999%). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας της κίνησης των ουσιών με διαφορετικές ταχύτητες και εξαρτάται από την τάση ατμών των ενώσεων και την αλληλεπίδρασή τους με τη στατική φάση. Η κατανομή μεταξύ των δύο φάσεων υπολογίζεται ως εξής:

$$K = C_s / C_m \quad \text{Εξίσωση 3.8}$$

Όπου, K: Συντελεστής κατανομής

C_s : Συγκέντρωση ουσίας στη στατική φάση

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

C_M: Συγκέντρωση ουσίας στην κινητή φάση.

Το φέρον αέριο διατηρεί τις ουσίες σε αέρια μορφή εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας του και τις μεταφέρει στον ανιχνευτή, όπου πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση της κάθε ένωσης. Στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος εξοπλισμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (Flame Ionization Detector; FID), ο οποίος προκαλεί την καύση των οργανικών ουσιών και καταγράφει τον αριθμό των ιονισμένων σωματιδίων. Για τη λειτουργία του ανιχνευτή απαιτείται η παροχή υδρογόνου (H₂; καθαρότητας 99.999%) και συνθετικού αέρα (80%N₂/20%O₂) με μια αναλογία 1/10. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις αρχές λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου, ο αναγνώστης παραπέμπεται στο βιβλίο των Karasek & Clement (1988).

Επομένως, δύο μέθοδοι αναπτύχθηκαν: η μια για τη μέτρηση των χλωριωμένων αιθενίων και η άλλη για τη μέτρηση μεθανίου, αιθενίου, αιθανίου και ασετυλίνης. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ρυθμίστηκε στους 220°C και 250°C, αντίστοιχα. Όμως, η θερμοκρασία του φούρνου που περιείχε τη στήλη διέφερε μεταξύ των δύο μεθόδων, αφού ήταν ίση με 160°C για τη μέτρηση των χλωριωμένων αιθενίων και ίση με 50°C για τη μέτρηση των λοιπών αερίων.

Για την ποσοτικοποίηση των ουσιών, καμπύλες με πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας *serum* μπουκάλια χωρητικότητας 160 mL, με 100 mL απιονισμένου νερού. Επομένως, η αναλογία αερίου και υγρού ήταν 6:10, έτσι ώστε η κατανομή της ουσίας μεταξύ των δύο φάσεων να είναι ίδια με των πειραμάτων. Τα μπουκάλια σφραγίζονταν με πώματα βουτυλίου και με αποσπώμενα αλουμινένια καπάκια. Στη συνέχεια, προστίθεντο οι ουσίες, όπως καταγράφονται στους πίνακες 3.10, 3.11 και 3.12, με τον χρόνο έκλουσης της καθεμίας, ενώ ενδεικτικές καμπύλες βαθμονόμησης παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.3.

Πίνακας 3.10 Πρότυπα διαλύματα χλωριωμένων αιθενίων.

Όγκος (μL)	1	2	3	5	6	Χρόνος (min)
TCE (mM)	0.111	0.222	0.332	0.554	0.665	4.6
cis-DCE (mM)	0.128	0.257	0.385	0.642	0.771	3.6
trans-DCE (mM)	0.127	0.254	0.381	0.635	0.762	2.7
1,1-DCE (mM)	0.124	0.248	0.372	0.619	0.743	2.3
Όγκος (mL)	0.5	1	5	10	20	Χρόνος (min)
VC (mM)	0.017	0.034	0.167	0.335	0.669	1.7

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 3.11 Πρότυπα διαλύματα μεθανίου, αιθανίου, αιθενίου και ασετυλίνης.

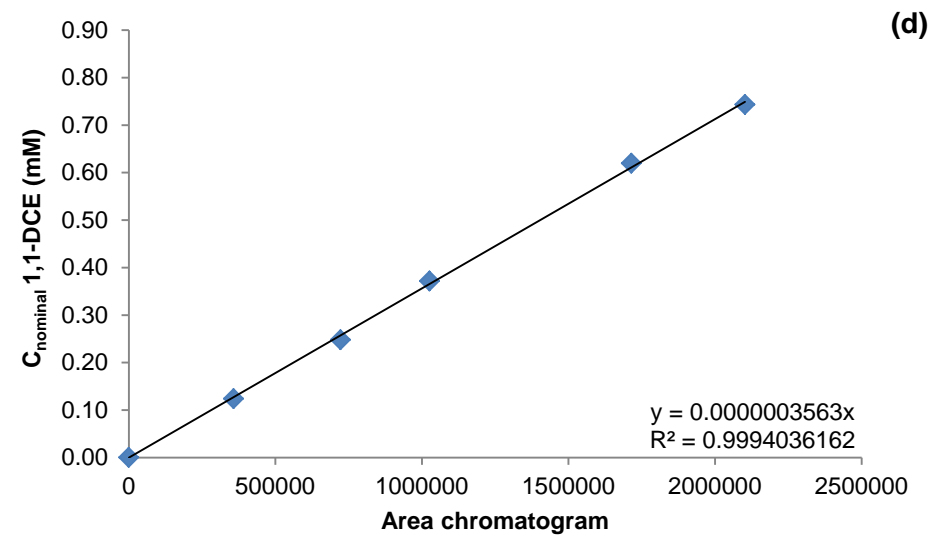
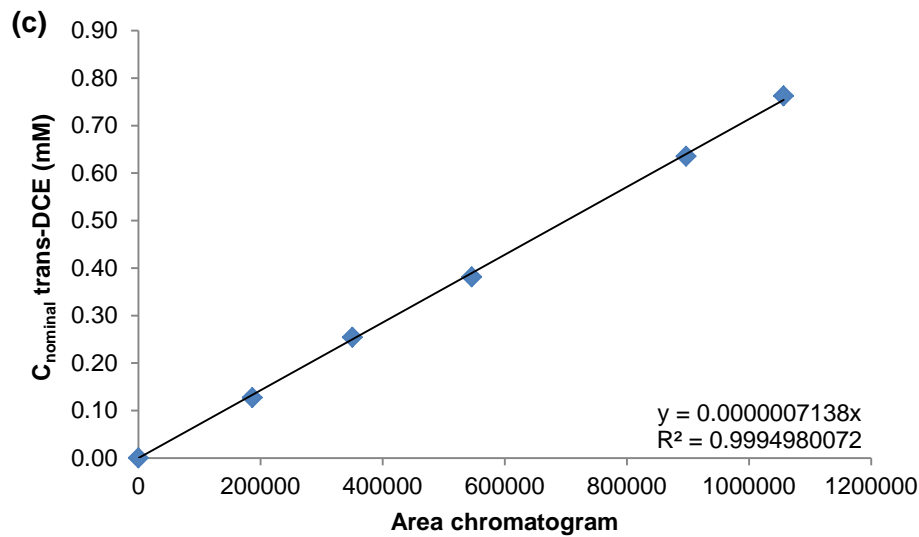
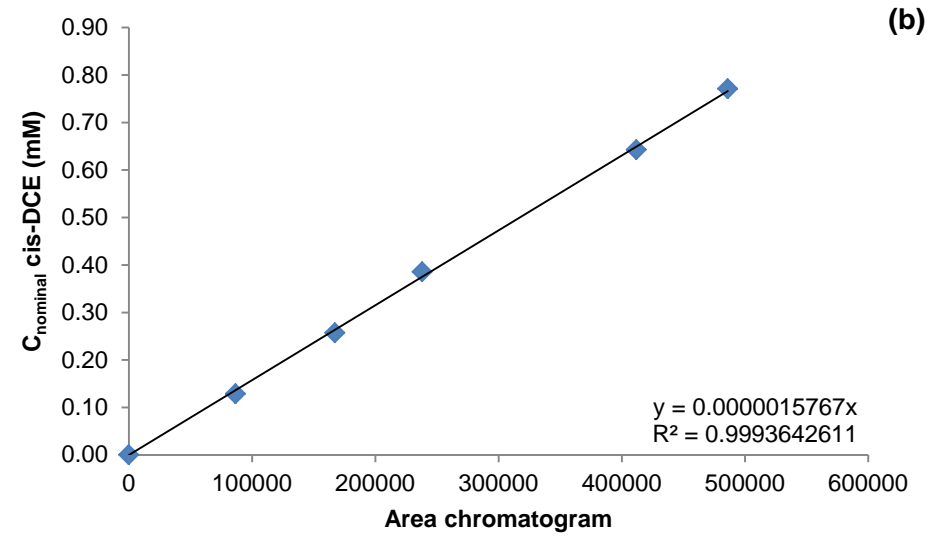
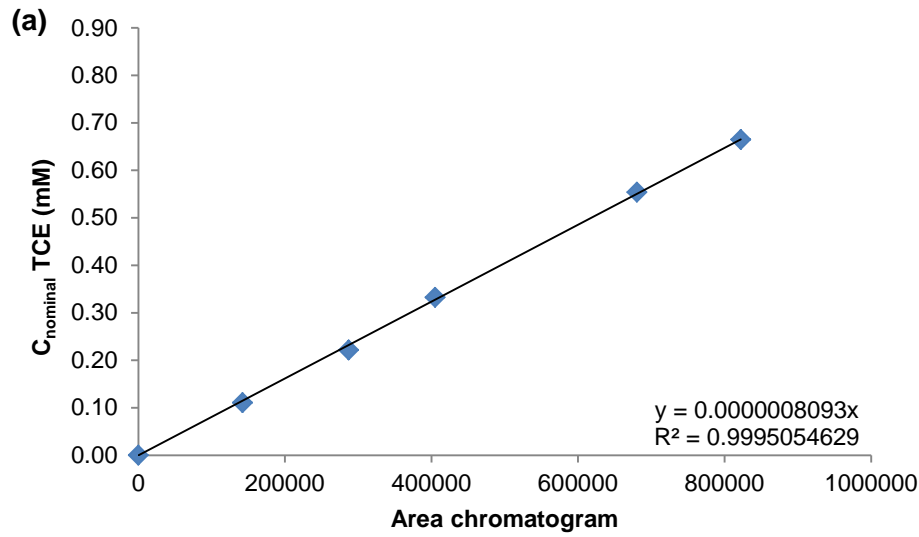
Όγκος (mL)	0.1	0.5	1	2	5	Χρόνος (min)
METH (mM) ^a	0.041	0.204	0.409	0.818	2.044	1.0
Όγκος (mL)	0.1	0.5	1	1.5	2	Χρόνος (min)
ΕΤΗΑ (mM) ^b	0.041	0.203	0.407	0.610	0.814	1.4
ΕΤΗ (mM) ^c	0.041	0.204	0.409	0.613	0.817	1.6
Acet (mM) ^d	0.041	0.204	0.407	0.611	0.814	2.2

^aMETH: Μεθάνιο; ^bΕΤΗΑ: Αιθάνιο; ^cΕΤΗ: Αιθένιο; ^dAcet: Ασετυλίνη.

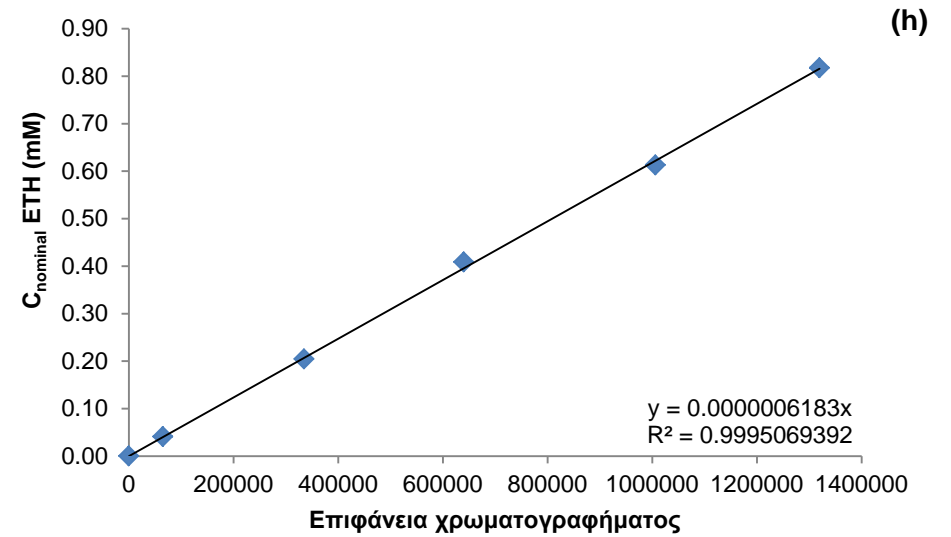
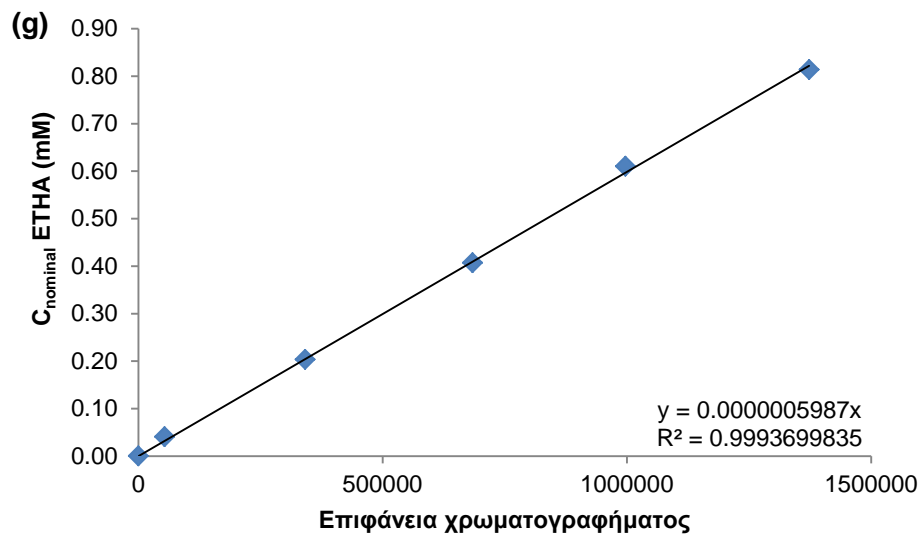
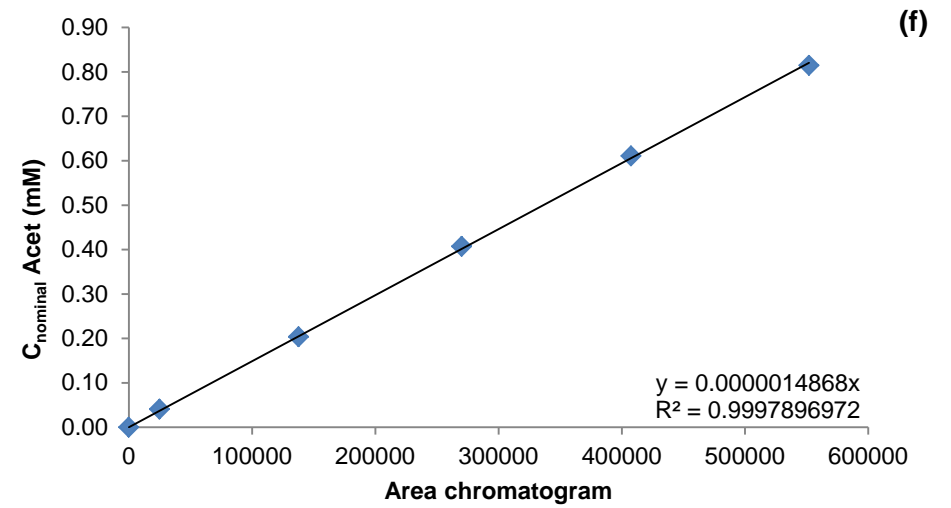
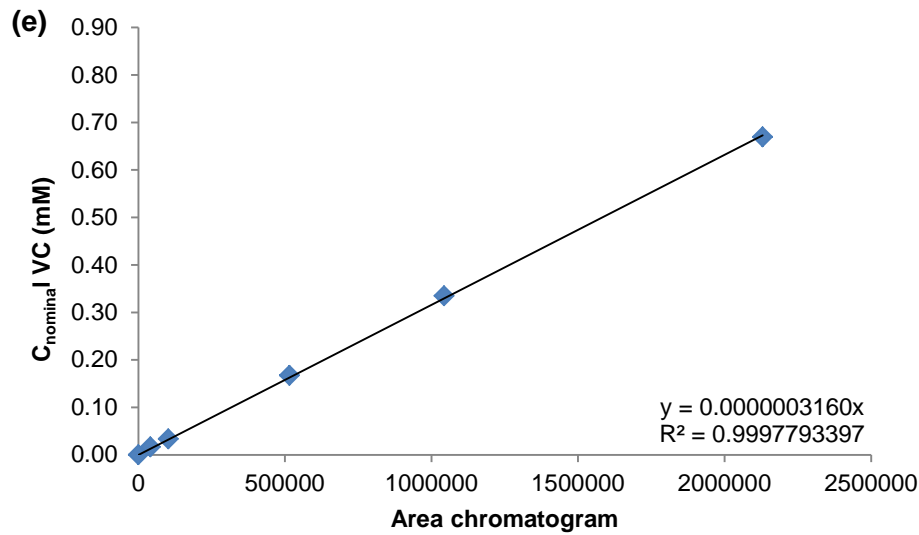
Πίνακας 3.12 Πρότυπα διαλύματα με υψηλές συγκεντρώσεις μεθανίου.

Όγκος (mL)	8	10	15	20	25	Χρόνος (min)
METH (mM)	3.271	4.088	6.132	8.176	10.22	1.0

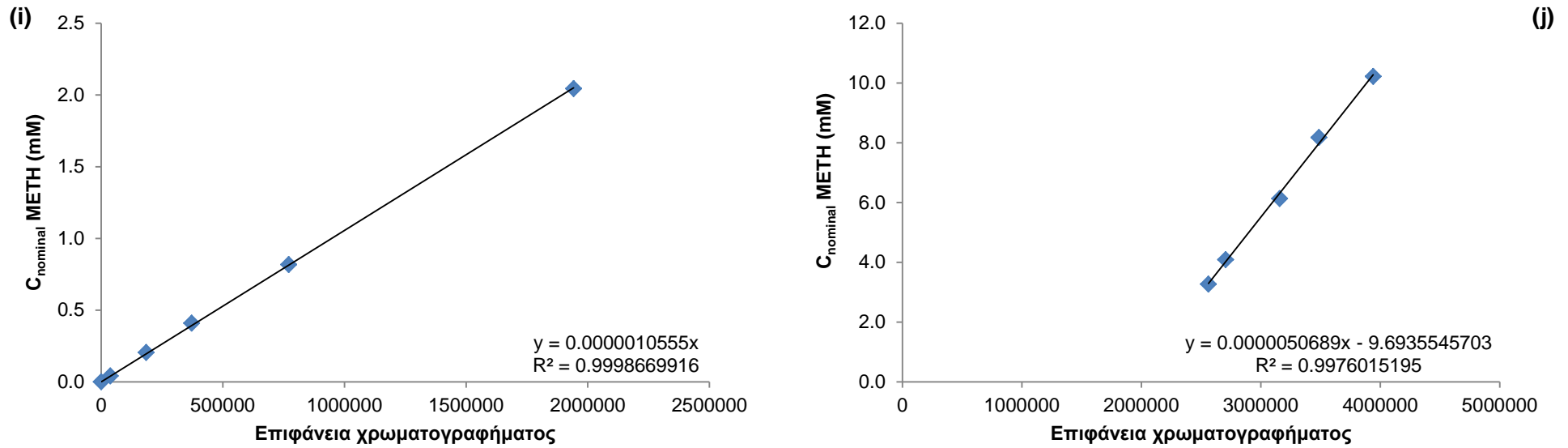
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 3.3 Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες (a) Τριχλωροαιθένιο, (b) cis-Διχλωροαιθένιο, (c) trans-Διχλωροαιθένιο, (d) 1,1-Διχλωροαιθένιο, (e) Βινυλοχλωρίδιο, (f) Ασετυλίνη, (g) Αιθάνιο, (h) Αιθένιο, (i) Μεθάνιο σε χαμηλές συγκεντρώσεις, (j) Μεθάνιο σε υψηλές συγκεντρώσεις.

3.2.4. Ανάλυση πτητικών λιπαρών οξέων, προπανόλης και βενζοϊκού οξέος

Τα πτητικά λιπαρά οξέα (Volatile Fatty Acids; VFAs), βουτυρικό (Butyric acid; But), ισοβουτυρικό (iso-Butyric acid; isoBut), προπιονικό (Propionic acid; Pr) και οξικό οξύ (Acetic acid; Ac), καθώς επίσης, η προπανόλη (2-Propanol; Prop) και το βενζοϊκό οξύ (Benzoic acid; Benz) αναλύονται με τη χρήση αέριου χρωματογράφου εξοπλισμένου με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Οι αρχές λειτουργίας της μεθόδου περιγράφηκαν περιληπτικά στην Ενότητα 3.2.3. (Ανάλυση χλωριωμένων αιθενίων, μεθανίου, αιθενίου, αιθανίου & ασετυλίνης), αλλά υπήρχαν μικρές διαφορές, όπως παρουσιάζονται παρακάτω.

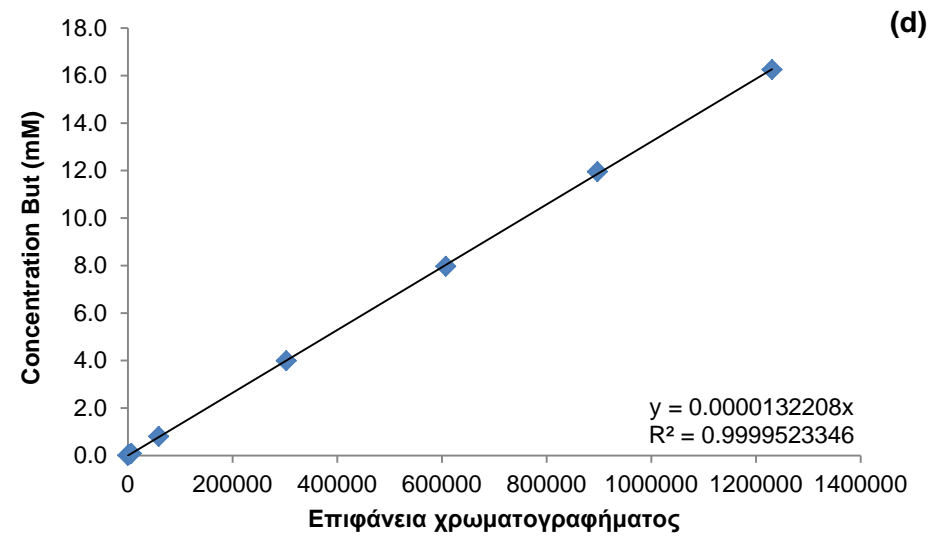
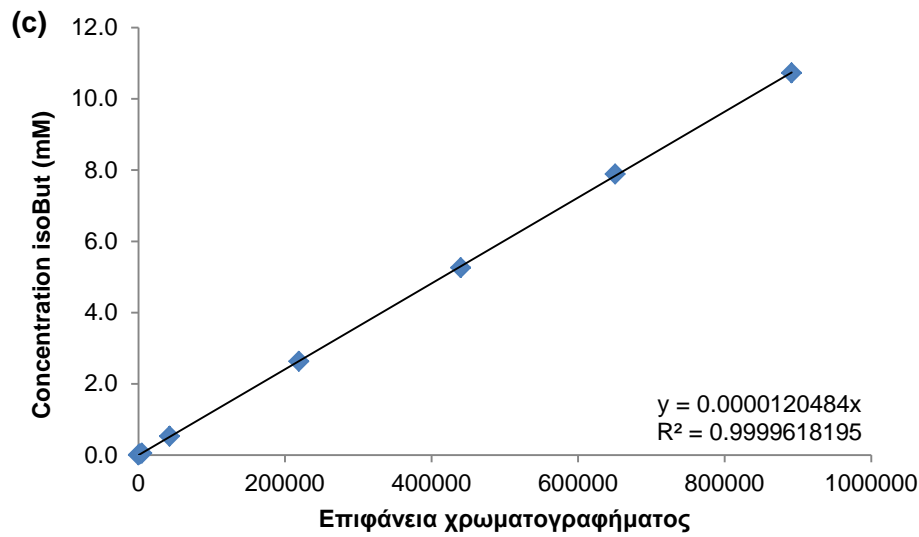
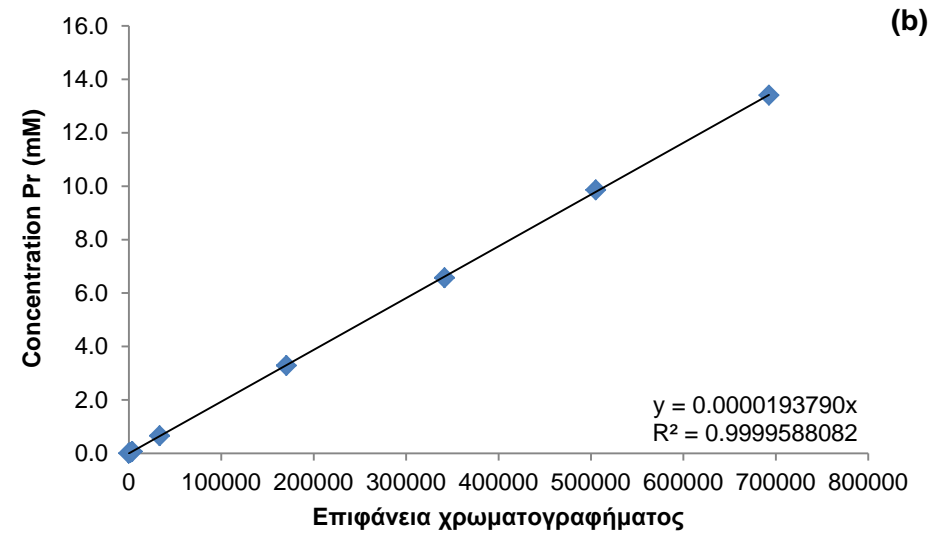
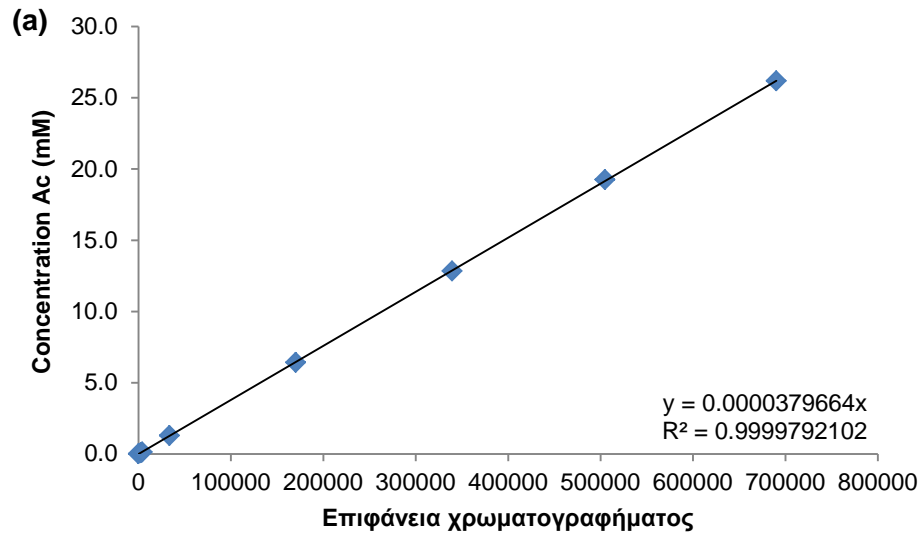
Πιο συγκεκριμένα, περίπου 200 μL δείγμα από την καλλιέργεια, διηθούνται μέσω μεμβράνης με διάμετρο πόρων 0.45 μm . Το διηθημένο δείγμα θεωρείται πλήρως διαλυτό και αποθηκεύεται στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$, έως ότου πραγματοποιούνταν η μέτρηση. Πριν την ανάλυση, τα δείγματα τήκονταν και οξινίζονταν με την προσθήκη 2% v/v HCl (2N). Μετά τοποθετούνταν σε ειδικά δοχεία για να γίνει η εισπίεση 0.5 μL στο όργανο, μέσω ενός αυτοματοποιημένου συστήματος δειγματοληψίας (Autosampler XL PerkinElmer). Η θερμοκρασία του εισαγωγέα και του ανιχνευτή ήταν $220\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ η στήλη (Nukol; 15 m, 0.53 mm; της εταιρείας Supelco) ρυθμιζόταν ανάλογα με την ουσία, που ποσοτικοποιούνταν ως εξής: για τα πτητικά λιπαρά οξέα στους $90\text{ }^\circ\text{C}$, για την προπανόλη στους $40\text{ }^\circ\text{C}$ και για το βενζοϊκό οξύ στους $180\text{ }^\circ\text{C}$. Οι χρόνοι έκλουσης και οι ποσότητες των πρότυπων διαλυμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.13, ενώ κάποιες ενδεικτικές καμπύλες βαθμονόμησης φαίνονται στο Σχήμα 3.4.

Πίνακας 3.13 Πρότυπα διαλύματα πτητικών λιπαρών οξέων, προπανόλης και βενζοϊκού οξέος.

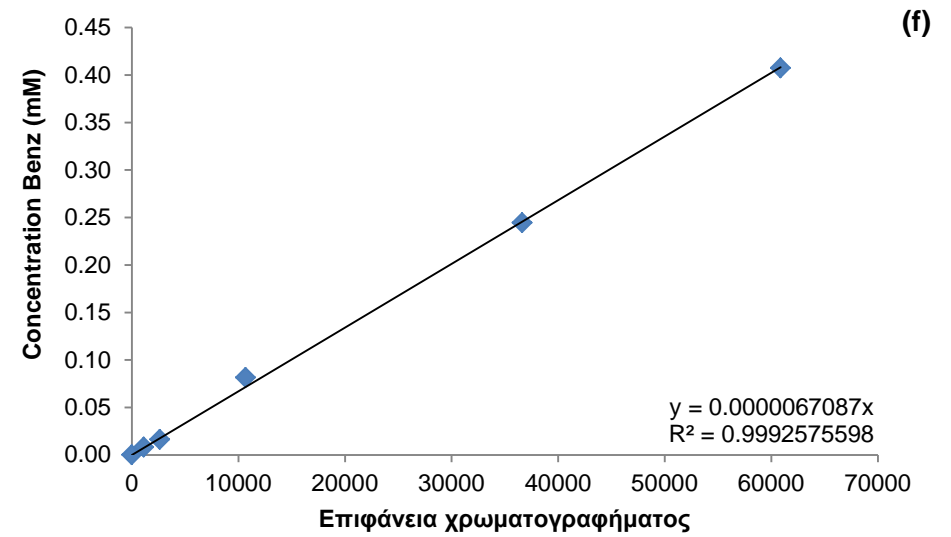
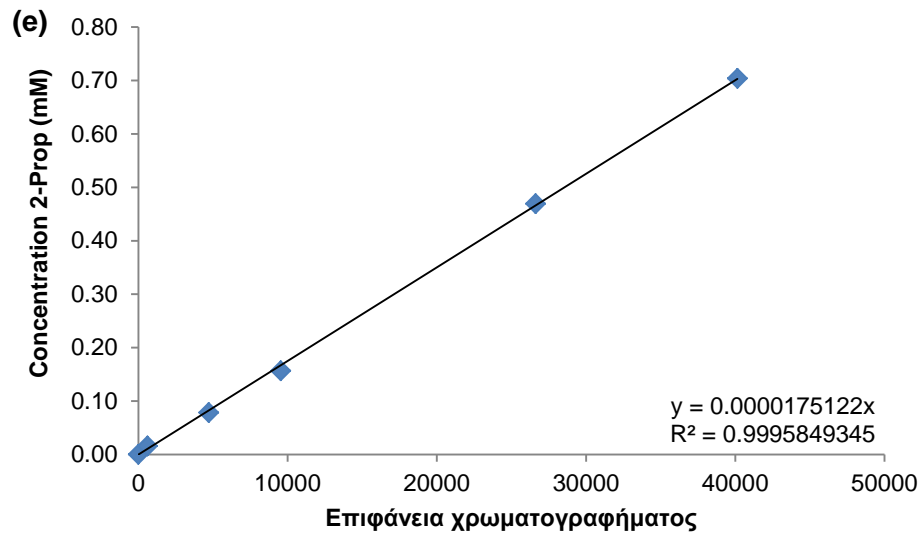
Διαλύματα ^a	1	2	3	4	5	Χρόνος (min)
Ac (mM)	0.065	0.128	6.416	19.25	26.18	2.2
Pr(mM)	0.065	0.657	3.285	6.571	13.40	3.4
isoBut(mM)	0.052	0.526	5.259	7.888	10.73	3.8
But (mM)	0.079	0.796	3.982	7.964	16.25	5.3
Prop (mM)	0.016	0.078	0.156	0.469	0.704	0.7
Benz (mM)	0.008	0.016	0.081	0.244	0.407	3.9

^aAc: Οξικό οξύ; Pr: Προπιονικό οξύ; isoBut: Ισοβουτυρικό οξύ ; But: Βουτυρικό οξύ; Prop: 2-Προπανόλη; Benz: Βενζοϊκό οξύ.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 3.4 Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες (a) Οξικό οξύ, (b) Προπιονικό οξύ, (c) Ισοβουτυρικό οξύ, (d) Βουτυρικό οξύ, (e) Προπανόλη, (f) Βενζοϊκό οξύ.

3.2.5. Ανάλυση θειικών ιόντων και σουλφιδίων

Δύο δείγματα από την υγρή φάση εξάγονταν από τις μητρικές καλλιέργειες και από τα πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας, με στόχο τον υπολογισμό της συμμετοχής της θειικοαναγωγής στην κατανάλωση των ηλεκτρονίων.

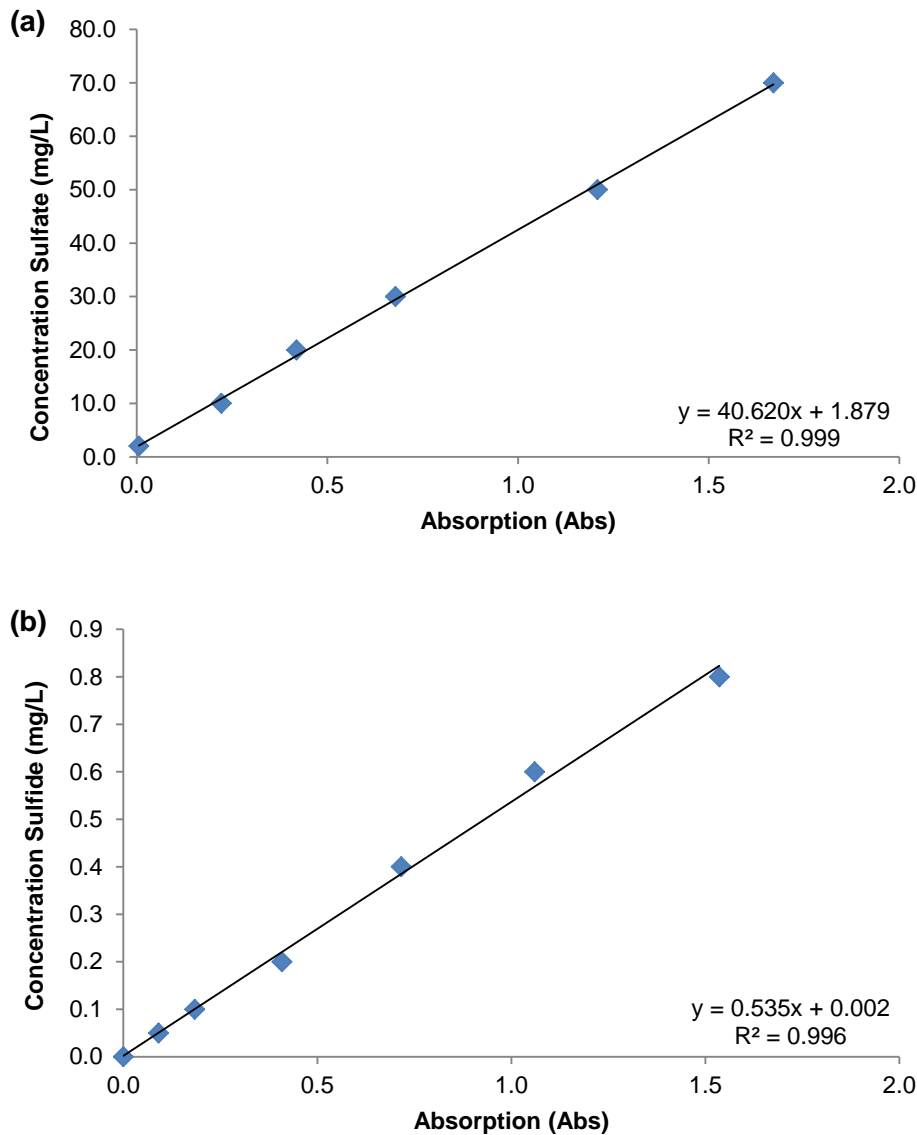
Πιο συγκεκριμένα, τα δύο δείγματα χρησίμευαν για τον προσδιορισμό αφενός των θειικών ιόντων και αφετέρου των σουλφιδίων. Ο προσδιορισμός των δύο αυτών παραμέτρων πραγματοποιείτο μέσω της μέτρησης του BaSO_4 και του κυανού του μεθυλενίου (APHA, 2016), αντιστοίχως, με τη χρήση έτοιμων αντιδραστηρίων και φασματοφωτόμετρου της εταιρείας HACH (DR2800). Επιπλέον, τα σουλφίδια είναι αρκετά πτητικά, με αποτέλεσμα ένα μέρος της ολικής μάζας τους να βρίσκεται στην αέρια φάση. Επομένως, στα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν, η κατανομή μάζας υπολογίστηκε όπως στην Ενότητα 3.2.2 (εξισώσεις 3.1 ως 3.7), ενώ η σταθερά Henry θεωρήθηκε ίση είτε με $9.87 \text{ L} \cdot \text{atm}/\text{mole}$, είτε με 0.403 ως αδιάστατο μέγεθος (Sander, 2015).

Τα πρωτόκολλα των αναλύσεων περιγράφονται στο Παράρτημα Α.5, ενώ στην παρούσα Ενότητα παρουσιάζονται τα πρότυπα διαλύματα (Πίνακας 3.14), καθώς και οι καμπύλες βαθμονόμησης (Σχήμα 3.5).

Πίνακας 3.14 Πρότυπα διαλύματα θειικών ιόντων και σουλφιδίων.

Διαλύματα	1	2	3	4	5	6
Sulfate ($\text{mg SO}_4^{2-}/\text{L}$)	2	10	20	30	50	70
Sulfide ($\text{mg S}^{2-}/\text{L}$)	0.05	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 3.5 Ενδεικτικές πρότυπες καμπύλες: (a) Θειικών ιόντων, (b) Σουλφιδίων

3.2.6. Ανάλυση δισθενούς/τρισθενούς σιδήρου

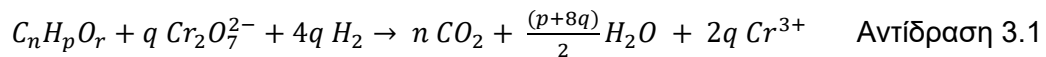
Σε πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας, δείγμα εξαγόταν για την ανάλυση της δισθενούς (Fe^{2+}) και της τρισθενούς (Fe^{3+}) μορφής του σιδήρου. Στόχος ήταν να υπολογισθεί η συνεισφορά του σιδήρου, είτε στην παραγωγή, είτε στην κατανάλωση των ηλεκτρονίων. Η ανάλυση στηρίζεται στην ικανότητα του δισθενούς σιδήρου να αντιδρά με την 1,10-φαινανθρολίνη και να σχηματίζει σύμπλοκα πορτοκαλί χρώματος. Μετά τον προσδιορισμό της δισθενούς μορφής, πραγματοποιείται η μετατροπή της τρισθενούς σε δισθενή και επαναλαμβάνεται η μέτρηση. Για την ανάλυση χρησιμοποιούνταν έτοιμα φιαλίδια (LCK320) και το φασματοφωτόμετρο της εταιρείας HACH. Το φιαλίδιο με το δείγμα εισαγόταν στο όργανο και αυτόματα πραγματοποιείτο η ποσοτικοποίηση των μορφών του σιδήρου. Στην αρχή των

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

πειραμάτων είχε διεξαχθεί έλεγχος με πρότυπα διαλύματα για την επιβεβαίωση της ακρίβειας της μεθόδου, όπου η απόκλιση από τη θεωρητική τιμή ήταν μικρότερη του 5%.

3.2.7. Ανάλυση COD (Χημική απαίτηση οξυγόνου)

Σε πειράματα με περίπλοκη μορφή δότη ηλεκτρονίων, παραδείγματος χάριν μικρόκοσμοι με τυρόγαλο, χρησιμοποιούνταν οι μετρήσεις της χημικής απαίτησης οξυγόνου (Chemical Oxygen Demand; COD), με στόχο τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του διαλυτού οργανικού υλικού και, κατ' επέκταση, των διαθέσιμων ηλεκτρονίων προς κατανάλωση. Αναλυτικότερα, το COD ορίζεται ως η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται για την οξείδωση οργανικών ενώσεων, όμως η αντίδραση επιτυγχάνεται με τη χρήση διχρωμικού καλίου ως το αναγωγικό μέσο. Η στοιχειομετρία της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης μιας οργανικής ουσίας με γενικό μοριακό τύπο $C_nH_pO_r$, κατά τον προσδιορισμό της χημικής απαίτησης οξυγόνου, είναι η εξής (Μαμάης, 2017):



Όπου, $q = \frac{2}{3} n + \frac{p}{6} - \frac{r}{3}$.

Η ανάλυση στηρίζεται στη μετατροπή του εξασθενούς χρωμίου με κίτρινο χρώμα στο πράσινο τρισθενές χρώμιο, ενώ η ποσότητα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της οργανικής ουσίας. Έτσι, γίνεται η ποσοτικοποίηση του COD με τη χρήση φασματοφωτόμετρου και έτοιμων φιαλιδίων (LCK114 και LCK314) της εταιρείας HACH. Η μέτρηση γινόταν αυτόματα με την εισαγωγή του φιαλιδίου στο όργανο και έχοντας ήδη εξετάσει την ακρίβεια της μεθόδου με απόκλιση μικρότερη του 5% από τη θεωρητική τιμή των προτύπων διαλυμάτων.

3.2.8. Ανάλυση βιομάζας (Ολικά και πτητικά αιωρούμενα στερεά-Πρωτεΐνες)

Στο πλαίσιο του παρόντος διδακτορικού, η βιομάζα προσδιορίζεται με δύο τρόπους: με τις μετρήσεις των πτητικών αιωρούμενων στερεών αφενός, και της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών αφετέρου.

Η ανάλυση των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών (Total and Volatile Suspended Solids; TSS, VSS) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις μεθόδους 2540D και 2540E που περιγράφονται στο "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA, 2016). Πιο συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός των στερεών επιτυγχάνεται με τη διήθηση δείγματος μέσω στρωματικού φίλτρου GF/C, με διάμετρο πόρων ~1.2 μm (Whatman), την εξάτμιση του νερού στους 103 °C και τη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

ζύγιση του. Η διαφορά βάρους πριν τη διαδικασία και μετά την εξάτμιση προς τον όγκο του δείγματος δίνει τη συγκέντρωση των ολικών αιωρούμενων στερεών. Για τον προσδιορισμό των πτητικών αιωρούμενων στερεών, το ίδιο φίλτρο οδηγείται προς την καύση στους 550 °C, ενώ η διαφορά βάρους μετά την εξάτμιση και μετά την καύση ισούται με τα VSS, τα οποία εκφράζουν τη βιομάζα του μικρόκοσμου. Όμως, οι μικροί όγκοι που εξάγονταν από τις καλλιέργειες και τα πειράματα, σε συνδυασμό με τις χαμηλές συγκεντρώσεις βιομάζας, επέφεραν ένα αυξημένο σφάλμα στις μετρήσεις. Ως συνέπεια αυτού, αποφασίσθηκε να μετράται και η συγκέντρωση πρωτεΐνης με στόχο την υποβοήθηση των αποτελεσμάτων των στερεών.

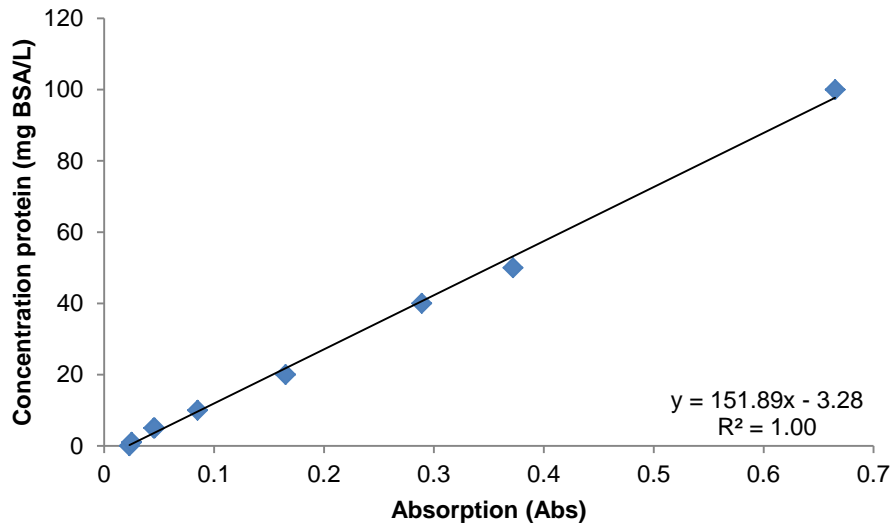
Για την ανάλυση της πρωτεΐνης, δύο μέθοδοι επιλέχθηκαν: η Bradford (Bradford, 1976) και η Lowry (Lowry et al., 1951), εξαιτίας του εύκολου και γρήγορου πρωτόκολλου, αλλά και επειδή συναντώνται πιο συχνά στη βιβλιογραφία. Μετά από τη συγκριτική αξιολόγηση των δύο μεθόδων, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η τελευταία, που είχε καλύτερη ακρίβεια και μεγαλύτερο εύρος μέτρησης (1-1500 mg/L) σε σχέση με την Bradford (100-1500 mg/L). Η ανάλυση Lowry στηρίζεται στην αντίδραση των ιόντων δισθενούς χαλκού (Cu^{2+}) με το άζωτο, του πεπτιδικού δεσμού υπό αλκαλικές συνθήκες και τη συνακόλουθη αναγωγή του Folin-Ciocalteu σε πολυμολυβδένιο μπλε χρώματος από αρωματικά υπολείμματα. Το αντιδραστήριο του Folin-Ciocalteu αποτελείται από ένα μίγμα φωσφορομολυβδαινικού και φωσφοροβολφραμικού οξέος. Για τη μέτρηση, η πρωτεΐνη πρέπει να είναι σε διαλυτή μορφή, ενώ το pH πρέπει να είναι ρυθμισμένο μεταξύ 10 με 10.5, αφού η μέθοδος Lowry είναι ευαίσθητη στις αλλαγές του pH.

Η προεπεξεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα παραλλαγμένο πρωτόκολλο των Chartrand et al. (2005), το οποίο περιγράφεται στο Παράρτημα Α.5 μαζί με τα βήματα της ανάλυσης Lowry. Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με τη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος στα 750nm με το φασματοφωτόμετρο Hitachi-U2001. Η καμπύλη βαθμονόμησης (Σχήμα 3.6) παρασκευαζόταν με ορό βόειου αλβουμίνης (Bovine serum albumin; BSA) ως το διάλυμα αναφοράς σύμφωνα με τα πρότυπα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.15.

Πίνακας 3.15 Πρότυπα διαλύματα BSA.

Διαλύματα	1	2	3	4	5	6	7	8
BSA (mg/L)	0	1	5	10	20	40	60	100

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



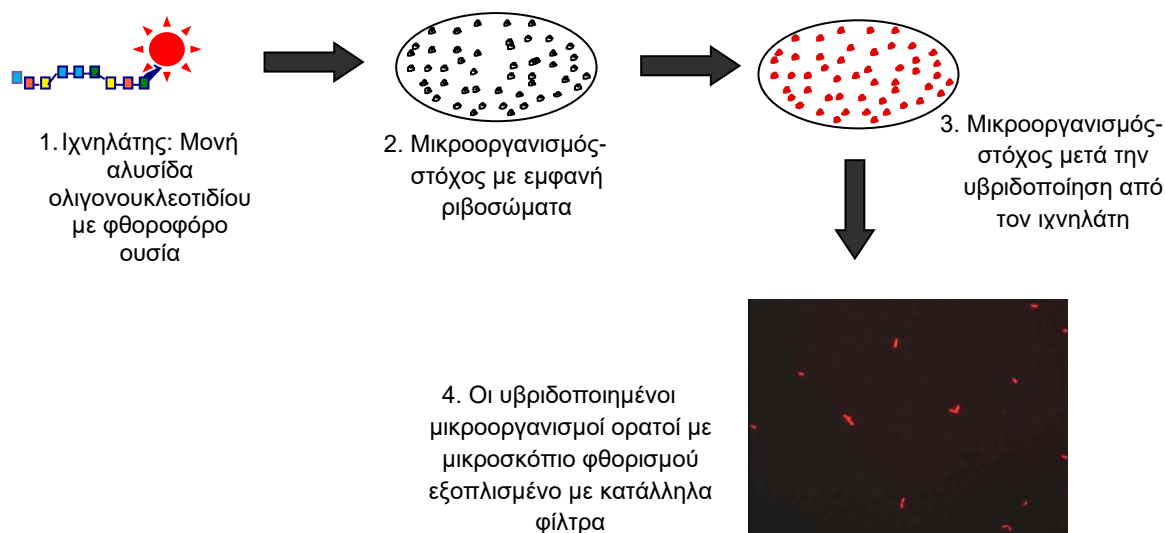
Σχήμα 3.6 Ενδεικτική πρότυπη καμπύλη πρωτεΐνης.

3.2.9. Ανάλυση Φθορίζουσας Επιτόπου Υβριδοποίησης (FISH)

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των θειικών ιόντων στη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας των καλλιεργειών εφαρμόστηκε η ανάλυση φθορίζουσας επιτόπου υβριδοποίησης (Fluorescence In Situ Hybridization; FISH). Η μοριακή μέθοδος FISH βασίζεται στη μοναδικότητα της αλληλουχίας των ολιγονουκλεοτιδίων στο ριβοσωμικό ριβονουκλεϊκό οξύ (rRNA) για το κάθε είδος μικροοργανισμού. Έτσι, η αναγνώριση των μικροβιακών ομάδων σε περιβαλλοντικά δείγματα πραγματοποιείται από το γενότυπο και όχι από το φαινότυπο του μικροοργανισμού.

Αναλυτικότερα, μια σύντομη μονή αλυσίδα ολιγονουκλεοτιδίου, γνωστή ως ιχνηλάτης, εισάγεται στο δείγμα και εισχωρεί στο εσωτερικό του κυττάρου για να υβριδοποιήσει τη συμπληρωματική της ακολουθία RNA. Στην άκρη του ιχνηλάτη, μετά την αλληλουχία των βάσεων, είναι προσκολλημένη μια φθοροφόρος ουσία, η οποία παράγει σήμα υπό φθορίζον φως, με αποτέλεσμα να βοηθά στην αναγνώριση των ριβονουκλεοτιδίων του μικροοργανισμού-στόχου. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει η συμπληρωματική ακολουθία RNA, τότε δεν πραγματοποιείται η υβριδοποίηση και οι ιχνηλάτες απομακρύνονται στο στάδιο καθαρισμού. Το διάγραμμα ροής της μεθόδου FISH φαίνεται και στο Σχήμα 3.7 (Μαρνέρη, 2010).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 3.7 Διάγραμμα ροής της μεθόδου FISH.

Η προσέγγιση της μεθόδου είναι η στόχευση γενικά σε ομάδες μικροοργανισμών ή εξειδικευμένα σε είδος. Οι ιχνηλάτες, λοιπόν, μπορούν να ταυτοποιούν τα στελέχη που απαρτίζουν την ομάδα-στόχο, η οποία θα μπορούσε να είναι συγκεκριμένο/η βασίλειο, ομοταξία, οικογένεια, γένος ή ακόμα και είδος (Amann et al., 1990; Μαρνέρη, 2010). Επιπλέον, το μήκος της αλληλουχίας προσφέρει εξαιρετικό έλεγχο της εξειδίκευσης του ιχνηλάτη (Amann et al., 1990). Πάρα ταύτα, η μέθοδος έχει αρκετούς περιορισμούς, είτε λόγω σφαλμάτων κατά τη διαδικασία της υβριδοποίησης, είτε εξαιτίας της ύπαρξης της αλληλουχίας ολιγονουκλεοτιδίου σε μικροοργανισμούς εκτός ομάδας, ενώ μπορεί ο ιχνηλάτης να ανιχνεύει ένα μέρος της ομάδας και όχι όλα τα στελέχη που την απαρτίζουν. Για τον λόγο αυτό προτείνεται να πραγματοποιείται ένας έλεγχος της εξειδίκευσης του κάθε ιχνηλάτη.

Σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές, από το Μάρτιο του 2015 έως τον Απρίλιο του ίδιου έτους, δείγματα συλλέχτηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες N, QM και M με αρχική συγκέντρωση 0 mg/L, 150 mg/L και 400 mg/L θειικών ιόντων, αντιστοίχως. Οι ομάδες μικροοργανισμών που επιλέχθηκαν για ανίχνευση και οι αντίστοιχοι ιχνηλάτες με τα χαρακτηριστικά τους φαίνονται στον Πίνακα 3.16. Τα βήματα του πρωτοκόλλου περιγράφονται αναλυτικά στο Παράρτημα Α.5.

Πίνακας 3.16 Οι ιχνηλάτες και τα χαρακτηριστικά τους που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών στις μητρικές καλλιέργειες.

Ιχνηλάτης	Ομάδα-Στόχος	Φθορίζουσα ουσία	Ακολουθία (5' άκρο-3' άκρο)	Αναφορά
EUB338	Βακτήρια	Cy3	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann et al. (1990b)
ARCH915	Αρχαία	Cy3	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	Stahl & Amann (1991)
MSMX860	<i>Methanosarcina</i> & <i>Methanosaeta</i> spp.	Cy3	GGCTCGCTTCACGGCTTCCCT	Raskin et al. (1994)
ALF968	Alphaproteobacteria	Cy3	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	Neef et al. (1998)
BET42a	Betaproteobacteria	Cy3	GCCTTCCCACCTTCGTTT	Manz et al. (1992)
GAM42a	Gammaproteobacteria	Cy3	GCCTTCCCACATCGTTT	Manz et al. (1992)
PAE997	<i>Pseudomonas</i> spp.	Texas-Red	TCTGGAAAGTTCTCAGCA	Amann et al. (1996)
DELTA495a	Deltaproteobacteria	Cy3	AGTTAGCCGGTGCTTCCT	Loy et al. (2002)
DSBAC357	Desulfobacteraceae & Syntrophobacteraceae	Cy3	CCATTGCGCAAATTCCTCAC	Lücker et al. (2007)
Clost I	Clostridia	Cy3	TTCTTCCTAATCTCTACGCA	Kusel et al. (1999)
AW	<i>Acetobacterium</i> spp.	Cy3	GGCTATTCCCTTCCATAGGG	Kusel et al. (1999)
Dhe1259t	<i>Dehalococcoides</i> spp.	Cy3	AGCTCCAGTTCACACTGTTG	Yang & Zeyer (2003)

Ταυτόχρονα, καταμετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των μικροοργανισμών προσθέτοντας 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), με σκοπό την παρουσίαση των αποτελεσμάτων ως ποσοστό. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Nikon Eclipse 80 υπό φθορισμό με το κατάλληλο φίλτρο (Cy3 ή Texas-Red). Για κάθε δείγμα, τουλάχιστον 20 ζεύγη φωτογραφιών υπό μεγέθυνση 1000x χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του ποσοστού της ομάδας-στόχου προς το σύνολο των μικροοργανισμών (% target group/DAPI) μέσω του προγράμματος Image-Pro.

Στον Πίνακα 3.17 παρουσιάζεται ο έλεγχος της εξειδίκευσης του κάθε ιχνηλάτη αναφορικά με δύο παραμέτρους: (α) την ικανότητα στόχευσης της ομάδας-στόχου, δηλαδή το ποσοστό των στοχευμένων μικροοργανισμών που καταμετρείται ως προς το σύνολο της ομάδας, (% target hit / target) και (β) την απόκλιση της στόχευσης, δηλαδή το ποσοστό των μετρήσιμων ομάδων που δεν είναι στόχος προς το σύνολο των μετρούμενων μικροοργανισμών (% non-target hit / total hits). Για την εύρεση των παραπάνω ποσοστών και την αξιολόγηση της εξειδίκευσης των ιχνηλατών χρησιμοποιήθηκε το Probe match του RDP (Ribosomal Database Project).

Πίνακας 3.17 Εξειδίκευση ιχνηλατών.

Ιχνηλάτης	Ομάδα-Στόχος	Ακολουθία	% target hits/target	% non-target hits/total hits
EUB338	Βακτήρια	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	75%	0%
ARCH915	Αρχαία	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	64%	0%
MSMX860	<i>Methanosarcina</i> & <i>Methanosaeta</i> spp.	GGCTCGCTTCACGGCTTCCT	48%	3%
ALF968	Alphaproteobacteria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	44%	20%
*BET42a	Betaproteobacteria	GCCTTCCCACTTCGTTT	-	-
*GAM42a	Gammaproteobacteria	GCCTTCCCACTTCGTTT	-	-
PAE997	<i>Pseudomonas</i> spp.	TCTGGAAAGTTCTCAGCA	8%	4%
DELTA495a	Deltaproteobacteria	AGTTAGCCGGTGCCTTCCT	58%	19%
DSBAC357	Desulfobacteraceae & Syntrophobacteraceae	CCATTGCGCAAAAATTCCTCAC	42%	11%
Clost I	Clostridia	TTCTTCCTAATCTCTACGCA	5%	22%
AW	<i>Acetobacterium</i> spp.	GGCTATTCCCTTCCATAGGG	53%	23%
Dhe1259t	<i>Dehalococcoides</i> spp.	AGCTCCAGTTCACACTGTTG	16%	0%

*Οι ιχνηλάτες BET42a και GAM42a δεν είχαν καλή εξειδίκευση σύμφωνα με τα αποτελέσματα της βιβλιοθήκης του RDP, αλλά είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ιχνηλάτες στη βιβλιογραφία για τη συγκεκριμένη ομάδα-στόχο.

3.2.10. Μικροσκοπική ανάλυση πολυυδροξυβουτυρικών αλυσίδων (PHBs)

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων παρατηρήθηκε μια απότομη μείωση του βουτυρικού οξέος τις πρώτες μέρες λειτουργίας των πειραμάτων, χωρίς όμως την ανάλογη κατανάλωση ηλεκτρονίων από αναγωγικές διεργασίες (βλ. Ενότητα 4.2.2.8). Μια αιτία για τη μείωση του διαλυτού οργανικού δότη αποτελεί η δημιουργία πολυυδροξυβουτυρικών αλυσίδων (Polyhydroxybutyrate; PHBs) εντός του κυττάρου, με σκοπό την αποθήκευση ενέργειας από τους μικροοργανισμούς. Το πολυυδροξυβουτυρικό οξύ ανήκει στα πολυυδροξυαλκανοϊκά οξέα (Polyhydroxyalkanoates; PHA), δηλαδή είναι μια πολυμερής ένωση της τάξης των πολυεστέρων που παράγεται βιολογικά.

Τρία πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας σε διπλά αντίτυπα διεξήχθησαν, για να διερευνηθεί η ύπαρξη αυτών των αλυσίδων. Τα πειράματα NPHB, QMPHB, MPHBC, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.6, διήρκεσαν μια μέρα και είχαν υψηλή συγκέντρωση βουτυρικού οξέος (9.1 mM). Ταυτόχρονα, ένα πείραμα ελέγχου χωρίς την προσθήκη δότη ηλεκτρονίων πραγματοποιήθηκε με βιομάζα από την καλλιέργεια M με 400 mg/L θειικών ιόντων και την ονομασία «MPHBCo». Οι αναλύσεις χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου, θειικών ιόντων, βιομάζας και πτητικών λιπαρών οξέων διεξήχθησαν για τον υπολογισμό των παραγόμενων και καταναλωμένων ηλεκτρονίων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική ανάλυση της βιομάζας των πειραμάτων σύμφωνα με τους Eikelboom & van Buijsen (1981) και Jenkins et al. (1993). Πιο συγκεκριμένα, η χρώση Neisser χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση των κυττάρων και την ταυτοποίηση των PHB αλυσίδων. Η ανάλυση

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

πραγματοποιήθηκε υπό μεγέθυνση 1000x, χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης (Nikon Eclipse 80).

3.2.11. Αναλύσεις pH και θερμοκρασίας

Μετρήσεις pH πραγματοποιούνταν, με στόχο την επιβεβαίωση της ύπαρξης βέλτιστων συνθηκών για την ανάπτυξη των αποχλωριωτικών μικροοργανισμών. Περίπου 5 mL δείγμα εξαγόταν από τις μητρικές καλλιέργειες και τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας και διεξαγόταν η μέτρηση με φορητό pHμετρο (pH315i) της εταιρείας WTW. Επιπλέον, η μέτρηση της θερμοκρασίας πραγματοποιείτο με ένα θερμόμετρο υδραργύρου σε serum μπουκάλι με 100 mL απιονισμένο νερό, το οποίο παρέμενε καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων στον ανακινητήρα μαζί με τα υπόλοιπα μπουκάλια.

3.3. Αξιολόγηση μετρήσεων

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή τέθηκαν αυστηρά κριτήρια αξιολόγησης των μετρήσεων, με στόχο τη χρήση βέλτιστων τεχνικών και την εξαγωγή έγκυρων αποτελεσμάτων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν, εκτός των γνωστών παραμέτρων επαλήθευσης μεθόδων, και κάποια κριτήρια αξιολόγησης των αποτελεσμάτων που θα πρέπει να τηρούνται, για να θεωρηθεί αποδεκτή μια μέτρηση. Στην Ενότητα αυτή αναλύεται η αξιολόγηση των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκε σε κάθε ανάλυση.

3.3.1. Παράμετροι επαλήθευσης μεθόδων

Πολλοί διαφορετικοί παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων μιας μεθόδου, όπως: ο αναλυτής, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε, η βαθμονόμηση του οργάνου, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και ο χρόνος που μεσολάβησε μεταξύ των μετρήσεων. Για τον λόγο αυτό, απαιτείται ο έλεγχος των μεθόδων με συγκεκριμένες παραμέτρους που ορίζονται από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (International Organization for Standardization; ISO), ιδιαίτερα στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται καινούριες μέθοδοι. Έτσι, στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής εξετάστηκε η επαναληψιμότητα (repeatability; r), το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection; LoD) και η γραμμικότητα (Linearity) των μεθόδων.

Η επαναληψιμότητα (r) είναι η τυπική απόκλιση που προκύπτει από τις μετρήσεις της ανάλυσης στις ίδιες συνθήκες, δηλαδή με την ίδια μέθοδο, στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή και τον ίδιο εξοπλισμό, σε περιορισμένο χρονικό διάστημα (ISO TC

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

69/SC 6N, 2011). Η τυπική απόκλιση και η σχετική σταθερή απόκλιση της επαναληψιμότητας υπολογίζονται από τις εξισώσεις 3.8 και 3.9, αντιστοίχως:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad \text{Εξίσωση 3.8}$$

$$RSD_r \% = \frac{100 * SD}{\bar{x}} \quad \text{Εξίσωση 3.9}$$

Όπου, SD: τυπική απόκλιση των μετρήσεων,

x_i : μετρούμενη τιμή,

\bar{x} : η μέση τιμή λαμβανόμενη από μεγάλο αριθμό μετρούμενων τιμών,

n: αριθμός δειγμάτων (>10),

RSDr: σχετική σταθερή απόκλιση επαναληψιμότητας.

Στον Πίνακα 3.18 καταγράφεται η επαναληψιμότητα των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, αλλά και άλλων μεθόδων που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία για συγκριτικούς σκοπούς.

Επιπλέον, υπολογίστηκε η επαναληψιμότητα για τις μεθόδους των ολικών αιωρούμενων στερεών (TSS), πτητικών αιωρούμενων στερεών (VSS), πρωτεΐνης, θειικών ιόντων και σουλφιδίων ως 11.6% (51.6 mg TSS/L), 16.1% (33.6 mg VSS/L), 5.8% (8.1 mg protein/L), 8.8% (30 mg SO₄²⁻/L) και 6.4% (59.4 μg S²⁻/L), αντιστοίχως. Μάλιστα, μια αποδεκτή επαναληψιμότητα στις μετρήσεις TSS θεωρείται ότι είναι 33% στα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης, δηλαδή περίπου 15 mg/L, και 10% στη μέση συγκέντρωση των 242 mg/L, ενώ για την ανάλυση των πτητικών αιωρούμενων στερεών η σχετική τυπική απόκλιση είναι 6.5%, όταν τα VSS είναι 170 mg/L (APHA, 1999).

Ως όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LoD) ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση της μετρούμενης ποσότητας που μπορεί να ανιχνευτεί με την ίδια μέθοδο. Προσδιορίζεται με τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (n>10) ενός δείγματος πολύ χαμηλής συγκέντρωσης και προκύπτει αριθμητικά, σύμφωνα με την εξίσωση 3.10 (ISO TC 69/SC 6N, 2011):

$$LoD = \frac{3.3 * SD}{a} \quad \text{Εξίσωση 3.10}$$

Όπου, a: κλίση της καμπύλης αναφοράς.

Στον Πίνακα 3.19 παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης των μεθόδων που περιγράφηκαν στην Ενότητα 3.2 και διαφόρων ερευνών της βιβλιογραφίας.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 3.18 Επαναληψιμότητα (RSDr %) μεθόδων.

Ουσία	Παρούσα διατριβή ¹	Hunkeler et al., 2011	Avila et al., 2007	Li et al., 2006	Ronen et al., 2010	Volpe et al., 2007	Voolapalli & Stuckey, 2001
TCE	2.0% (0.22 mM)	7.5%	5.2%	1.9%	11.3%	7.0%	
cDCE	2.7% (0.26 mM)	14.0%	8.8%	4.4%	3.3%	4.0%	
tDCE	2.0% (0.25 mM)			7.5%		4.0%	
1,1DCE	1.7% (0.25 mM)				11.3%	4.0%	
VC	2.0% (0.13 mM)	7.7%				4.0%	
ETH	1.0% (0.41 mM)	9.0%				2.0%	
ETHA	1.5% (0.41 mM)						
METH	1.0% (0.41 mM)					2.0%	
Acet	1.6% (0.37 mM)						
Ac	1.1% (3.5 mM)						5.0%
Pr	0.8% (0.27 mM)						5.0%
isoBut	0.7% (1.1 mM)						5.0%
But	0.5% (2.2 mM)						5.0%
Prop	0.7% (0.31 mM)						
Benz	1.8% (0.24 mM)						
Μέθοδοι²	Βλ. Παραγράφους 3.2.2 ως 3.2.4	CEs: Purge & Trap-GC/MS, ETH: Headspace-GC/FID	SPME-Headspace-GC/FID	HPLC/UV-Vis	Pretreatment-Headspace-GC/MS	Headspace-GC/FID	HPLC

¹Εντός των παρενθέσεων σημειώνεται η συγκέντρωση που μετρήθηκε η επαναληψιμότητα. ²MS: Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry), SPME: Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid-phase microextraction), HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-performance liquid chromatography), UV-Vis: Φασματομετρία υπεριώδους (Ultraviolet-visible spectroscopy).

Όσον αφορά τα ολικά αιωρούμενα στερεά, το όριο ανίχνευσης βρέθηκε ίσο περίπου με 2 mg/L. Τα θειικά ιόντα, τα σουλφίδια και οι πρωτεΐνες μετρούνταν ως το όριο της καμπύλης τους, κάτω από το οποίο θεωρούνταν ότι η μέτρηση εμπεριείχε μεγάλο σφάλμα και ήταν πρακτικά μηδαμινές οι ποσότητές τους.

Η γραμμικότητα (linearity) είναι η ικανότητα της μεθόδου να παρουσιάζει καλή αναλογικότητα, σε όλο το εύρος συγκέντρωσης μιας ουσίας. Προσδιορίζεται μέσω της μέτρησης δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων ($N > 5 + 1$ τυφλό δείγμα), που καλύπτουν όλο το εύρος μετρήσεων της μεθόδου. Τα αποτελέσματα χρησιμεύουν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς (calibration curve), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων και υπολογίζοντας τον συντελεστή συσχέτισης (R^2). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, θεωρείται ότι, για να υπάρχει καλή γραμμικότητα, πρέπει να ισχύει $R^2 > 0.99$. Αυτή η αρχή υιοθετήθηκε στο πλαίσιο της παρούσης έρευνας και όλες οι καμπύλες είχαν συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερο από τον αποδεκτό (0.99), όπως φαίνεται και στα Σχήματα 3.3 ως 3.6.

Κάθε μήνα, γινόταν ο έλεγχος των καμπυλών βαθμονόμησης με ένα πρότυπο διάλυμα και η απόκλιση του από τη θεωρητική τιμή έπρεπε να είναι $< 10\%$. Σε διαφορετική περίπτωση, πραγματοποιούνταν είτε έλεγχος των παραμέτρων των οργάνων, είτε καινούριες καμπύλες.

Πίνακας 3.19 Όριο ανίχνευσης (LoD) μεθόδων.

Ουσία	Παρούσα διατριβή	Aulenta et al., 2007	Scherr et al., 2011	Panagiotakis et al., 2014	Bagley et al., 2004	Schaefer et al., 2015	Darlington et al., 2008	Lee & Batchelor, 2002a	Harkness & Fisher, 2013	Miller et al., 2005	Shen & Sewell, 2005
TCE	23.1 µg/L (0.18 µM)	1064 µg/L	0.21 µg/L	27.6 µg/L	30.2 µg/L	100 µg/L	2.9 µg/L	105 µg/L	55.2 µg/L	355 µg/L	1.5 µg/L
cDCE	14.2 µg/L (0.15 µM)	881 µg/L	0.40 µg/L	30.1 µg/L	15.5 µg/L		5.2 µg/L	200 µg/L	44.6 µg/L	931 µg/L	1.0 µg/L
tDCE	7.6 µg/L (0.08 µM)	788 µg/L	0.30 µg/L	13.6 µg/L			2.2 µg/L	805 µg/L		262 µg/L	1.1 µg/L
1,1DCE	7.4 µg/L (0.08 µM)	591 µg/L	0.34 µg/L	8.7 µg/L				233 µg/L		611 µg/L	
VC	1.6 µg/L (0.03 µM)	372 µg/L	0.52 µg/L	0.62 µg/L	6.25 µg/L		0.48 µg/L	1000 µg/L	33.1 µg/L	350 µg/L	0.9 µg/L
ETH	1.2 µg/L (0.04 µM)	0.45 µg/L		0.28 µg/L	1.40 µg/L	2 µg/L		931 µg/L	13.5 µg/L	182 µg/L	1.1 µg/L
ETHA	1.3 µg/L (0.04 µM)	0.23 µg/L				2 µg/L					2.3 µg/L
METH	0.9 µg/L (0.06 µM)	0.09 µg/L		0.16 µg/L	1.28 µg/L						1.6 µg/L
Acet	1.6 µg/L (0.06 µM)					2 µg/L					
Ac	156 µg/L (2.6 µM)	~2000 µg/L	~100 µg/L	1261 µg/L							30.0 µg/L
Pr	180 µg/L (2.4 µM)	~2000 µg/L	~100 µg/L								37.0 µg/L
isoBut	163 µg/L (1.9 µM)	~2000 µg/L									
But	94 µg/L (1.1 µM)	~2000 µg/L	~100 µg/L	1322 µg/L							44.1 µg/L
Prop	181 µg/L (3.0 µM)										
Benz	117 µg/L (1.0 µM)										488 µg/L
Μέθοδοι¹	Βλ. Παραγράφους 3.2.2 ως 3.2.4	CEs: Headspace-GC/FID, VFAs: Pretreatment-GC/FID	CEs: Pretreatment Headspace-GC/MS, VFAs: HPLC/RI	CEs: Headspace-GC/FID, VFAs: Pretreatment-GC/FID	CEs: Headspace-GC/FID	Headspace-GC/FID	Headspace-GC/FID/Combustion technique	TCE,1,1DCE: Preparation-GC/ECD, Λοιπά: Pretreatment-Headspace-GC/FID	Purge & Trap-Autosampler-GC/FID	Headspace-GC/FID,	Benz: CE/UV, Λοιπά: Headspace-GC/FID

¹RI: Ανιχνευτής δείκτης διαθλάσεως (Refractive Index), CE: Ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς (Capillary Electrophoresis)

3.3.2. Αξιολόγηση μετρήσεων χλωριωμένων αιθενίων

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή τέθηκαν αυστηρά ποιοτικά κριτήρια για τη μέτρηση και την ποσοτικοποίηση των χλωριωμένων αιθενίων, του αιθενίου και του αιθανίου. Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται για τις μετρήσεις αναπτύχθηκαν με βάση το ακόλουθο σκεπτικό: Τα moles του TCE και των προϊόντων του ιδανικά παραμένουν σταθερά, ενώ η αρχική συγκέντρωση που εισήχθη στον αντιδραστήρα δεν είναι γνωστή με βεβαιότητα. Επομένως, το άθροισμα των χλωριωμένων αιθενίων, του αιθενίου και του αιθανίου σε κάθε μέτρηση αντιστοιχεί (α) στη θεωρητική συγκέντρωση που επιδιώχθηκε (π.χ. 0.5 mM TCE) και (β) στη συνολική ποσότητα που ανιχνεύτηκε κατά την πρώτη μέτρηση. Επιπλέον, (γ) η μέγιστη τιμή του αθροίσματος καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων θα έπρεπε να ισοδυναμεί με την ελάχιστη τιμή. Οι εξισώσεις, λοιπόν, που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται παρακάτω:

$$(\alpha) \quad \text{Απόκλιση από τη θεωρητική τιμή} = \frac{\text{Θεωρητική τιμή} - \sum_i(\text{CES} + \text{ETH} + \text{ETHA})}{\text{Θεωρητική τιμή}}$$

Εξίσωση 3.11

$$(\beta) \quad \text{Απόκλιση από την πρώτη μέτρηση} = \frac{\sum_1(\text{CES} + \text{ETH} + \text{ETHA}) - \sum_i(\text{CES} + \text{ETH} + \text{ETHA})}{\sum_1(\text{CES} + \text{ETH} + \text{ETHA})}$$

Εξίσωση 3.12

$$(\gamma) \quad \text{Μέγιστη απόκλιση} = \frac{\max \sum(\text{CES} + \text{ETH} + \text{ETHA}) - \min \sum(\text{CES} + \text{ETH} + \text{ETHA})}{\min \sum(\text{CES} + \text{ETH} + \text{ETHA})}$$

Εξίσωση 3.13

Όπου, i : ο αριθμός της μέτρησης.

Για να καθοριστούν τα μέγιστα όρια των τριών αποκλίσεων, πάνω από τα οποία δεν θα γινόταν δεκτή μια μέτρηση, χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία, με βάση τη λογική ότι ο κάθε ερευνητής έχει θέσει κάποια κριτήρια επιλογής και στα δημοσιευόμενα αποτελέσματα έχει ήδη πραγματοποιηθεί η διαλογή των μετρήσεων. Από τα διαγράμματα των άρθρων εξάχθηκαν οι τιμές των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου και υπολογίστηκαν οι αποκλίσεις σύμφωνα με τις εξισώσεις 3.11 ως 3.13 για κάθε πείραμα. Οι μέσοι όροι των αποκλίσεων (α), (β) και (γ) όλων των πειραμάτων, αποτέλεσαν τα μέγιστα όρια αποδοχής μιας μέτρησης για την παρούσα διδακτορική διατριβή. Τα άρθρα, από όπου εξάχθηκαν τα πειραματικά δεδομένα, έπρεπε να πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια, τα οποία αναλύονται παρακάτω.

Πρώτον, επιλέχθηκαν έγκριτα επιστημονικά περιοδικά για την εύρεση άρθρων σχετικών με το αντικείμενο, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.20.

Πίνακας 3.20 Έγκριτα περιοδικά για την εύρεση άρθρων.

Περιοδικά	Χρονική περίοδος έκδοσης άρθρων	Impact factor 2010	Λόγος επιλογής περιοδικού
Environmental Science and Technology (EST)	1991-2011	4.63	Έγκριτο επιστημονικό περιοδικό γενικού ενδιαφέροντος
Applied and Environmental Microbiology (AEM)	1991-2011	3.69	Έγκριτο επιστημονικό περιοδικό με μικροβιολογική θεματολογία
Journal of Contaminated Hydrology (JCH)	2001-2011	2.01	Σχετικό με αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών
Journal of Hazardous Materials (JHM)	2001-2011	4.14	Σχετικό με απομάκρυνση επικίνδυνων ουσιών
Chemosphere	2001-2011	3.25	Περιέχει πολλές έρευνες σχετικές με το αντικείμενο
Water research (WR)	2001-2011	4.36	Έγκριτο επιστημονικό περιοδικό γενικού ενδιαφέροντος

Η επιλογή των άρθρων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια που τέθηκαν, τα οποία κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, στα υποχρεωτικά και τα κατ' επιλογήν υποχρεωτικά.

1. Τα υποχρεωτικά κριτήρια επιλογής έπρεπε να πληρούνται απ' όλα τα άρθρα και είναι τα εξής:
 - a) Τα πειράματα που περιγράφονται στα άρθρα πρέπει να έχουν βασιστεί στην ίδια λογική με αυτά που πραγματεύεται το παρόν αντικείμενο, δηλαδή πειράματα όπου γίνεται η προσθήκη χλωριωμένων αιθέρων σε μικρόκοσμους, με σκοπό τη μετατροπή τους σε αιθέριο, αιθάνιο ή σε άλλα λιγότερο χλωριωμένα αιθέρια, μέσω της αναερόβιας αναγωγικής αποχλωρίωσης. Τα άρθρα πρέπει να έχουν σαφή αποτελέσματα και όλα τα απαραίτητα στοιχεία για την ανάλυση της διαδικασίας.
 - b) Πρέπει να χρησιμοποιείται η ανάλυση στατικής υπερκείμενης φάσης (Headspace analysis) για τη μέτρηση των χλωροαιθέρων και των προϊόντων τους, όπως και στην παρούσα έρευνα (βλ. Ενότητα 3.2.2)
2. Τουλάχιστον ένα από τα τρία παρακάτω κριτήρια πρέπει να πληρούταν από όλα τα άρθρα, τα οποία χαρακτηρίζονται ως κατ' επιλογήν υποχρεωτικά:
 - a) Πρέπει να έχουν πάνω από 20 αναφορές (Highly-cited articles), τουλάχιστον τη χρονική στιγμή που πραγματοποιείται η επιλογή των άρθρων (Αύγουστος 2011),
 - b) Άρθρα που προσομοιάζουν με κινητικές της αντίδρασης την αναερόβια αποχλωρίωση,
 - c) Άρθρα που θεωρούνται άξια μνείας (expert judgement).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Περίπου 53 έρευνες πληρούσαν τα υποχρεωτικά κριτήρια, ενώ 29 άρθρα παρέμειναν μετά τη διαλογή και από τα κατ' επιλογήν υποχρεωτικά κριτήρια. Τα άρθρα που αξιολογήθηκαν και επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.21.

Πίνακας 3.21 Επιλεγμένα άρθρα σύμφωνα με τα κριτήρια επιλογής.

Ερευνητής	Περιοδικό	Έτος	Υποχρεωτικά ¹		Κατ'επιλογήν ¹		
			Παρόμοια πειράματα	Ανάλυση υπερκείμενης φάσης	>20 αναφορές ²	Kinetics	Άξιο μνείας
Adamson	EST	2004	Y	Y	21	N	N
Adamson	EST	2000	Y	Y	20	N	N
Cupples	EST	2004	Y	Y	49	Y	Y
Cupples	EST	2004b	Y	Y	37	Y	Y
Cupples	AEM	2003	Y	Y	116	Y	Y
Duhamel	EST	2007	Y	Y	22	Y	N
Duhamel	AEM	2004	Y	Y	80	N	Y
Freeborn	EST	2005	Y	Y	22	N	N
Fung	AEM	2007	Y	Y	34	N	N
Gerritse	AEM	1999	Y	Y	87	Y	N
He	AEM	2003	Y	Y	135	N	Y
He	AEM	2007	Y	Y	24	N	N
Kengen	AEM	1999	Y	Y	22	N	N
Lee	AEM	2006	Y	Y	31	N	N
Lee	JCH	2004	Y	Y	11	Y	N
Magnuson	AEM	1998	Y	Y	122	N	N
Maymó-Gatell	EST	2001	Y	Y	92	N	Y
Miller	EST	2005	Y	Y	20	N	N
Rahm	AEM	2006	Y	Y	28	N	N
Richardson	EST	2002	Y	Y	68	N	N
Rosner	AEM	1997	Y	Y	42	N	N
Shen	EST	2005	Y	Y	6	Y	N
Slater	EST	2001	Y	Y	89	N	N
Sung	AEM	2006	Y	Y	56	N	N
Tandoi	EST	1994	Y	Y	105	Y	Y
Yang	EST	1998	Y	Y	155	Y	Y
Yang	EST	2000	Y	Y	84	N	Y
Yang	WR	2005	Y	Y	20	N	N
Yu	EST	2005	Y	Y	45	Y	Y

¹Y: Έγκριση λόγω επιβεβαίωσης κριτηρίου (Yes), N: Απόρριψη λόγω διάψευσης κριτηρίου (No). ²Το πλήθος των αναφορών αντιστοιχεί στο έτος 2011.

Από τα διαγράμματα και τους πίνακες των παραπάνω 29 άρθρων, εξάχθηκαν οι τιμές των χλωριωμένων αιθενίων, του αιθενίου και του αιθανίου της κάθε μέτρησης, σε κάθε πείραμα. Τα δεδομένα αυτά χωρίστηκαν σε δύο διαφορετικά χρονικά πλαίσια, στις μετρήσεις της πρώτης εβδομάδας και στις μετέπειτα μετρήσεις, διότι με το πέρασμα του χρόνου η μάζα μπορεί να αλλάζε δραστικά λόγω διαρροών, απομάκρυνσης υγρού όγκου, κ.λπ. Έτσι, υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι μέγιστες τιμές των αποκλίσεων για τις πρώτες επτά μέρες των πειραμάτων, τις υπόλοιπες μέρες και τη συνολική διάρκεια των πειραμάτων. Οι αποκλίσεις από τη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

θεωρητική τιμή (Εξίσωση 3.11), από την πρώτη μέτρηση (Εξίσωση 3.12) και η μέγιστη απόκλιση (Εξίσωση 3.13), όπως υπολογίστηκαν, καταγράφονται στον Πίνακα 3.22

Πίνακας 3.22 Αποδεκτά όρια μέτρησης.

	Απόκλιση από τη θεωρητική τιμή	Απόκλιση από την πρώτη μέτρηση	Απόκλιση θεωρητικής τιμής και πρώτης μέτρησης	Μέγιστη απόκλιση
1^η εβδομάδα				
average	23.7%	12.2%	22.3%	23.7%
max	36.8%	20.7%	-	-
Μετά την 1^η εβδομάδα				
average	29.5%	16.3%	-	19.2%
max	38.8%	24.3%	-	-
Συνολική διάρκεια				
average	24.9%	14.2%	-	39.5%
max	38.6%	24.7%	-	-

Οι ποιοτικοί στόχοι των μετρήσεων ήταν: (α) κάθε μέτρηση έπρεπε να είναι μικρότερη από τις μέγιστες τιμές των αποκλίσεων, αλλιώς έπρεπε να επαναληφθεί και (β) οι μέσοι όροι όλων των μετρήσεων έπρεπε να είναι μικρότεροι από τις μέσες τιμές των αποκλίσεων, αλλιώς έπρεπε να αφαιρεθούν οι ακραίες τιμές. Επομένως, η αξιολόγηση των μετρήσεων πραγματοποιείται δύο φορές: σε πραγματικό χρόνο για την κάλυψη του (α) ποιοτικού στόχου, όπου περίπου το 10% των μετρήσεων επαναλαμβάνονται και στο τέλος των πειραμάτων για τον (β) ποιοτικό στόχο, όπου περίπου το 20% των μετρήσεων απορρίπτονται.

3.3.3. Αξιολόγηση μετρήσεων FISH

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μεθόδου FISH και την απόρριψη εσφαλμένων μετρήσεων τέθηκαν κριτήρια, τα οποία θα αναλυθούν σε αυτή την Ενότητα. Μια μέτρηση, λοιπόν, θεωρείται αποδεκτή όταν πληροί τα παρακάτω κριτήρια:

A) Το άθροισμα των βακτηρίων και των αρχαίων μικροοργανισμών έπρεπε να κυμαίνεται μεταξύ 75-125%. Το μεγάλο εύρος των επιλογών οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν δύο διαφορετικοί μέθοδοι προεπεξεργασίας των δειγμάτων. Η παραφορμαλδεΰδη και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται για τη σταθεροποίηση των Gram-αρνητικών και των Gram-θετικών, αντιστοίχως. Όμως, ένα μεγάλο ποσοστό της μιας κατηγορίας μπορεί να προσμετρηθεί χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της άλλης. Επομένως, συνίσταται η μέτρηση των βακτηρίων και των αρχαίων μικροοργανισμών

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

χρησιμοποιώντας τη μέθοδο προεπεξεργασίας για τους Gram-αρνητικούς, θεωρώντας ότι με αυτόν τον τρόπο μετριέται το σύνολο των μικροοργανισμών.

Β) Το ποσοστό ενός υποσυνόλου (π.χ. γένος) ή το άθροισμα των υποσυνόλων θα πρέπει να είναι ίσο ή μικρότερο της μεγαλύτερης κατηγορίας (π.χ. τάξη), με αποδεκτό σφάλμα $\pm 5\%$. Εξαιρέση αποτελούν οι ιχνηλάτες, που δεν μετρούν το συγκεκριμένο υποσύνολο, παρότι οι μικροοργανισμοί ανήκουν στην συγκεκριμένη κατηγορία. Για παράδειγμα, ο ιχνηλάτης AW ανιχνεύει το είδος *Acetobacterium* spp. που ανήκει στην ομοταξία Clostridia, όμως ο ιχνηλάτης Clost I είναι εξειδικευμένος για άλλα είδη της ίδιας ομοταξίας.

Γ) Ο λόγος της τυπικής απόκλισης των μετρήσεων μιας καλλιέργειας προς τον μέσο όρο δεν πρέπει να ξεπερνάει το 30%. Εξαιρέση αποτελεί η περίπτωση, όπου ο μέσος όρος των μετρήσεων είναι μικρότερος από 10% της ομάδας-στόχου ως προς το σύνολο των μικροοργανισμών, μιας και σ' αυτήν την περίπτωση η συγκέντρωση θεωρείται αμελητέα.

3.3.4. Αξιολόγηση μετρήσεων βιομάζας, θειικών ιόντων και σουλφιδίων

Στην παρούσα Ενότητα αναλύεται η αξιολόγηση των μετρήσεων των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών, καθώς και της πρωτεΐνης. Το κριτήριο που τέθηκε για την εξαγωγή εσφαλμένων μετρήσεων είναι το εξής:

- Ο λόγος του μέσου όρου της πρωτεΐνης προς τον μέσο όρο των πτητικών αιωρούμενων στερεών πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 25-75%. Το παραπάνω ισχύει, μιας και το κύτταρο περιέχει περίπου 50% w/w πρωτεΐνη, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Κολιάης, 2001).

Εάν δεν πληρούνται το κριτήριο, τότε προτείνεται να ελεγχθούν οι τιμές σύμφωνα με το ισοζύγιο ηλεκτρονίων (βλ. Ενότητα 3.4.1), τα αποτελέσματα των μητρικών καλλιεργειών και τις τιμές του διπλού αντιτύπου. Σε περίπτωση που δεν μπορεί να επιλεγεί μια τιμή, τότε προτείνεται να εξαχθεί η μέτρηση της πρωτεΐνης, που είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος.

Όσον αφορά τις αναλύσεις θειικών ιόντων και σουλφιδίων, τέθηκαν κριτήρια για την αξιολόγηση των μετρήσεων, σύμφωνα με τα οποία θα πρέπει:

- Στις μητρικές καλλιέργειες, ο λόγος των ανηγμένων θειικών ιόντων προς τα παραγόμενα σουλφίδια πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 75-125%, εφόσον 1 mole θειικών ιόντων παράγει 1 mole σουλφιδίου.
- Στα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας, ο λόγος του συνόλου των σουλφιδίων και των θειικών ιόντων μιας ημέρας προς το σύνολο της αρχικής μέρας πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 75%-125%.

Εάν τα παραπάνω κριτήρια δεν πληρούνται, τότε οι μετρήσεις δεν θεωρούνται αποδεκτές και απορρίπτονται.

3.4. Μέτρα σύγκρισης για την αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων θεωρήθηκε αναγκαία η ποσοτικοποίηση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και η χρήση μέτρων σύγκρισης. Όλα τα πειράματα που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 4 αξιολογούνται βάσει των παραμέτρων που αναλύονται στην παρούσα Ενότητα.

3.4.1. Ισοζύγιο ηλεκτρονίων

Για την πραγματοποίηση της πλήρους αναγωγικής αποχλωρίωσης των χλωριωμένων υδρογονανθράκων απαιτείται κατάλληλος και επαρκής δότης ηλεκτρονίων. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι το υδρογόνο είναι ο τελικός δότης ηλεκτρονίων για τα βακτήρια της πλήρους αναγωγικής αποχλωρίωσης, ενώ το βουτυρικό οξύ και το οξικό οξύ μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα από βακτήρια μερικής αναγωγικής αποχλωρίωσης. Εκτός από την αναγωγική αποχλωρίωση, η θειικοαναγωγή, η σιδηροαναγωγή, η μεθανογένεση και η οξικογένεση απαιτούν δότη ηλεκτρονίων για την πραγματοποίησή τους, με αποτέλεσμα να είναι ανταγωνιστικές διαδικασίες. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η παραγωγή και η κατανάλωση των ηλεκτρονίων αποτελούν βασικές παραμέτρους σύγκρισης μεταξύ των πειραμάτων, εφόσον μπορεί να αποτελέσουν ένδειξη για την ικανότητα των αποχλωριωτών να ανταγωνιστούν μικροοργανισμούς άλλων αναγωγικών διεργασιών υπό τις εκάστοτε συνθήκες του πειράματος.

Ο τρόπος υπολογισμού του ισοζυγίου περιγράφεται αναλυτικά στο Παράρτημα Β.1. Περιληπτικά, υπολογίστηκε η χρήση των δοτών και η ανάκτηση των αποδεκτών, χρησιμοποιώντας τις αρχικές και τις τελευταίες μετρήσεις των πειραμάτων. Η ποσοστιαία κατανομή των ηλεκτρονίων μεταξύ των αναγωγικών διεργασιών, αλλά και το ποσοστό διάθεσης από τους δότες προσδιορίστηκαν με βάση τις ισοδυναμίες που συνοψίζονται στον Πίνακα 3.23.

Το σύνολο των ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν από τις αναγωγικές διεργασίες (Εξίσωση 3.14) θα πρέπει ισούται με το άθροισμα των ηλεκτρονίων που παράχθηκε (Εξίσωση 3.15). Ωστόσο, οι παράμετροι που λήφθηκαν υπόψη έπρεπε να έχουν διαφορά, μεταξύ της αρχικής και της τελικής τιμής, μεγαλύτερη από την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Παραδείγματος χάριν, η διαφορά των τιμών των πτητικών αιωρούμενων στερεών έπρεπε να είναι μεγαλύτερη από 16.1% και της πρωτεΐνης μεγαλύτερη από 11.3 για να θεωρηθεί ότι η βιομάζα διαδραμάτισε ρόλο στην ανταλλαγή ηλεκτρονίων. Το ισοζύγιο υπολογίστηκε, όπως φαίνεται στην εξίσωση 3.16, ενώ το επιτρεπτό εύρος τιμών ήταν μεταξύ 75% με 125%.

$$\sum e_{\text{καταναλώθηκαν}}^- = x_1 \left(\frac{meq}{mole} \right) * \Delta \delta \acute{\epsilon} κ τ η ς e_1^- (M) + \dots + x_n \left(\frac{meq}{mole} \right) * \Delta \delta \acute{\epsilon} κ τ η ς e_n^- (M)$$

Εξίσωση 3.14

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

$$\sum e_{\text{παραχθηκαν}}^- = x_1 \left(\frac{\text{meq}}{\text{mole}} \right) * \Delta\delta\delta\tau\eta\varsigma e_1^-(M) + \dots + x_n \left(\frac{\text{meq}}{\text{mole}} \right) * \Delta\delta\delta\tau\eta\varsigma e_n^-(M)$$

Εξίσωση 3.15

$$\text{Ισοζύγιο ηλεκτρονίων \%} = \frac{\sum e_{\text{καταναλώθηκαν}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L} \right)}{\sum e_{\text{παραχθηκαν}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L} \right)}$$

Εξίσωση 3.16

Όπου, x: ισοδυναμία ηλεκτρονίων.

Επομένως, τα πειράματα σχεδιάστηκαν σύμφωνα με τα ηλεκτρόνια που απαιτούνταν για τις αναγωγικές διαδικασίες και που παρήγαγε εν δυνάμει ο δότης ηλεκτρονίων. Στους πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ δότην και αποδεκτών, δηλαδή η ποσότητα αποδεκτών ηλεκτρονίων που δυνητικά θα παραγόταν με την κατανάλωση του δότη (Πίνακας 3.24) και η ποσότητα δότη που χρειάζεται για τη μετατροπή του αποδέκτη (Πίνακας 3.25).

Πίνακας 3.23 Ισοδυναμία ηλεκτρονίων για κάθε διεργασία.

Διεργασίες	Ισοδυναμία	Διεργασίες	Ισοδυναμία
Αναγωγική αποχλωρίωση	2 eq/mole HCl που παράγεται	Οξειδωση βουτυρικού οξέος	4 eq/mole
Αναγωγή θειικών ιόντων	8 eq/mole	Κατανάλωση υδρογόνου	2 eq/mole
Αναγωγή/Οξειδωση σιδήρου	1 eq/mole	Οξειδωση προπανόλης	18 eq/mole
Οξικογένεση/Οξειδωση οξικού οξέος	8 eq/mole	Οξειδωση βενζοϊκού οξέος	30 eq/mole
Μεθανογένεση	8 eq/mole	Οξειδωση υδροκινόνης	2 eq/mole
Παραγωγή/ Κατανάλωση βιομάζας	20 eq/mole	Οξειδωση οργανικού υλικού	0.125 eq/gr COD

Πίνακας 3.24 Αναγωγή αποδεκτών ηλεκτρονίων υπό διάφορες συγκεντρώσεις δοτών.

Οξειδωση ^a	Δότες ηλεκτρονίων			Αποδέκτες ηλεκτρονίων														
				TCE			Θειικά ιόντα			Μεθάνιο			Fe (III)			Οξικό οξύ		
	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l
Βουτυρικό οξύ (4 e ⁻) ^b	0.3	26.4	1.2	0.2	26.3	1.2	0.2	14.4	1.2	0.2	2.4	1.2	1.2	67.0	1.2	0.2	9.0	1.2
	2.2	194	8.8	1.5	193	8.8	1.1	106	8.8	1.1	17.6	8.8	8.8	491	8.8	1.1	66	8.8
	3.0	264	12.0	2.0	263	12.0	1.5	144	12.0	1.5	24.1	12.0	12.0	670	12.0	1.5	90	12.0
	9.1	802	36.4	6.1	797	36.4	4.6	437	36.4	4.6	73.0	36.4	36.4	2033	36.4	4.6	273	36.4
Βουτυρικό οξύ (20 e ⁻) ^b	0.3	26.4	6.0	1.0	131	6.0	0.8	72.0	6.0	0.8	12.0	6.0	6.0	335	6.0			
	2.2	194	44.0	7.3	964	44.0	5.5	528	44.0	5.5	88.2	44.0	44.0	2457	44.0			
	3.0	264	60.0	10	1314	60.0	7.5	720	60.0	7.5	120	60.0	60.0	3351	60.0			
	9.1	802	182	30	3985	182	23	2185	182	23	365	182	182	10165	182			
Οξικό οξύ	0.6	36.0	4.8	0.8	105	4.8	0.6	57.6	4.8	0.6	9.6	4.8	4.8	268	4.8			
	1.5	90.1	12.0	2.0	263	12.0	1.5	144	12.0	1.5	24.1	12.0	12.0	670	12.0			
	2.0	120	16.0	2.7	350	16.0	2.0	192	16.0	2.0	32.1	16.0	16.0	894	16.0			
	5.7	342	45.6	7.6	999	45.6	5.7	548	45.6	5.7	91.4	45.6	45.6	2547	45.6			
Υδρογόνο	3.0	3.0	6.0	1.0	131	6.0	0.8	72.0	6.0	0.8	12.0	6.0	6.0	335	6.0	0.8	45	6.0
Προπανάλη	0.7	40.1	12.0	2.0	263	12.0	1.5	144	12.0	1.5	24.1	12.0	12.0	670	12.0	1.5	90	12.0
Βενζοϊκό οξύ	0.4	48.8	12.0	2.0	263	12.0	1.5	144	12.0	1.5	24.1	12.0	12.0	670	12.0	1.5	90	12.0
Υδροκινόνη	0.6	66.1	1.2	0.2	26.3	1.2	0.2	14.4	1.2	0.2	2.4	1.2	1.2	67.0	1.2	0.2	9.0	1.2
	6.0	661	12.0	2.0	263	12.0	1.5	144	12.0	1.5	24.1	12.0	12.0	670	12.0	1.5	90	12.0
Fe (II)	0.6	33.5	0.6	0.1	13.1	0.6	0.1	7.2	0.6	0.1	1.2	0.6				0.1	4.5	0.6
	6.0	335	6.0	1.0	131	6.0	0.8	72.0	6.0	0.8	12.0	6.0				0.8	45	6.0
COD	-	120	15.0	2.5	328	15.0	1.9	180	15.0	1.9	30.1	15.0	15.0	838	15.0	1.9	113	15.0
	-	530	66.3	11	1451	66.3	8.3	795	66.3	8.3	133	66.3	66.3	3700	66.3	8.3	497	66.3

^a Εξαιρουμένου του βουτυρικού οξέος, όλοι οι υπόλοιποι δότες ηλεκτρονίων θεωρήθηκε ότι οξειδώθηκαν πλήρως. ^b Ο υπολογισμός των ηλεκτρονίων από το βουτυρικό οξύ μπορεί να υπολογιστεί θεωρώντας είτε ότι το 1 mole βουτυρικού οξέος παράγει 4 ηλεκτρόνια και 2 moles οξικού οξέος, είτε ότι το βουτυρικό οξύ παράγει 20 ηλεκτρόνια και 2 moles διοξειδίου του άνθρακα.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 3.25 Οξείδωση δοτών ηλεκτρονίων υπό διάφορες συγκεντρώσεις αποδεκτών ηλεκτρονίων.

Αναγωγή	Αποδέκτες ηλεκτρονίων			Δότες ηλεκτρονίων														
	mM	mg/l	meq/l	Βουτυρικό οξύ (4 e ⁻)			Βουτυρικό (20 e ⁻)			Οξικό οξύ			Υδρογόνο			Fe (II)		
	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l
TCE	0.5	65.7	3.0	0.8	66.1	3.0	0.2	13.2	3.0	0.4	22.5	3.0	1.5	1.5	3.0	3.0	168	3.0
Μεθάνιο	1.0	16.0	8.0	2.0	176	8.0	0.4	35.2	8.0	1.0	60.1	8.0	4.0	4.0	8.0	8.0	447	8.0
	1.5	16.0	12.0	3.0	264	12.0	0.6	52.9	12.0	1.5	90.1	12.0	6.0	6.1	12.0	12.0	670	12.0
Οξικό οξύ	1.0	60.1	8.0	2.0	176	8.0	0.4	35.2	8.0	1.0	60.1	8.0	4.0	4.0	8.0	8.0	447	8.0
	6.0	360	48.0	12.0	1057	48.0	2.4	211	48.0	6.0	360	48.0	24.0	24.2	48.0	48.0	2681	48.0
Fe (III)	0.6	33.5	0.6	0.2	13.2	0.6	0.03	2.6	0.6	0.1	4.5	0.6	0.3	0.3	0.6			
	6.0	335	6.0	1.5	132	6.0	0.3	26.4	6.0	0.8	45.0	6.0	3.0	3.0	6.0			
Θειικά ιόντα	0.7	70.0	5.8	1.5	128	5.8	0.3	25.7	5.8	0.7	43.8	5.8	2.9	2.9	5.8	5.8	326	5.8
	1.6	150	12.5	3.1	275	12.5	0.6	55.0	12.5	1.6	93.8	12.5	6.2	6.3	12.5	12.5	698	12.5
	4.2	400	33.3	8.3	734	33.3	1.7	147	33.3	4.2	250	33.3	16.7	16.8	33.3	33.3	1861	33.3
Αναγωγή	Αποδέκτες ηλεκτρονίων			Προπανάλη			Βενζοϊκό οξύ			Υδροκινόνη			COD					
	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l	mM	mg/l	meq/l			
TCE	0.5	65.7	3.0	0.2	10.0	3.0	0.1	12.2	3.0	1.5	165	3.0		24.0	3.0			
Μεθάνιο	1.0	16.0	8.0	0.4	26.7	8.0	0.3	32.6	8.0	4.0	440	8.0		64.0	8.0			
	1.5	16.0	12.0	0.7	40.1	12.0	0.4	48.8	12.0	6.0	661	12.0		96.0	12.0			
Οξικό οξύ	1.0	60.1	8.0	0.4	26.7	8.0	0.3	32.6	8.0	4.0	440	8.0		64.0	8.0			
	6.0	360	48.0	2.7	160	48.0	1.6	195	48.0	24.0	2643	48.0		384	48.0			
Fe (III)	0.6	33.5	0.6	0.03	2.0	0.6	0.02	2.4	0.6	0.3	33.0	0.6		4.80	0.6			
	6.0	335	6.0	0.3	20.0	6.0	0.2	24.4	6.0	3.0	330	6.0		48.0	6.0			
Θειικά ιόντα	0.7	70.0	5.8	0.3	19.5	5.8	0.2	23.7	5.8	2.9	321	5.8		46.6	5.8			
	1.6	150	12.5	0.7	41.7	12.5	0.4	50.9	12.5	6.2	688	12.5		100	12.5			
	4.2	400	33.3	1.9	111	33.3	1.1	136	33.3	16.7	1834	33.3		267	33.3			

3.4.2. Λοιπά μέτρα σύγκρισης

Εναλλακτικοί τρόποι ποσοτικοποίησης της απόδοσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης μπορούν να χρησιμεύσουν ως εργαλεία, με στόχο τον έλεγχο και την άμεση σύγκριση των διαφορετικών συνθηκών των πειραμάτων. Στον Πίνακα 3.26 συνοψίζονται τα μέτρα σύγκρισης που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Πίνακας 3.26 Μέτρα σύγκρισης για την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης.

Παράμετρος	Χαρακτηριστικά	Μονάδες μέτρησης
M_{Cl}	Δείκτης τελικού σταδίου της αναγωγικής αποχλωρίωσης, της μετατροπής του VC σε αιθέριο	-
N_{Cl}	Δείκτης της συνολικής απόδοσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης,	-
$cDCE_{peak}$	Ημέρα παρατήρησης της μέγιστης συγκέντρωσης cDCE	Day
VC_{peak}	Ημέρα παρατήρησης της μέγιστης συγκέντρωσης VC	Day
λ (VC)	Ταχύτητα αποχλωρίωσης 1 ^{ης} τάξης του VC	1/Day
k (TCE), k (cDCE),	Ταχύτητες αποχλωρίωσης μηδενικής τάξης του TCE και του cDCE	mM/Day
% $VC_{εναπομείναν}/\Sigma_{CES}$	Το ποσοστό του VC που έχει παραμείνει στο τέλος του πειράματος ως προς τη συνολική μάζα των χλωροαιθινίων	%

Οι δείκτες M_{Cl} (Harkness et al., 2012) και N_{Cl} (Heimann et al., 2005) υπολογίζονται βάσει των ακόλουθων εξισώσεων:

$$M_{Cl} = \frac{TCE+DCES+VC}{TCE+DCES+VC+ETH} \quad \text{Εξίσωση 3.17}$$

$$N_{Cl} = \frac{DCES+2*VC+3*ETH}{TCE+DCES+VC+ETH} \quad \text{Εξίσωση 3.18}$$

Σύμφωνα με τις εξισώσεις, οι συγκεκριμένοι δείκτες έχουν την ιδιότητα να αποδίδουν μια μονοσήμαντη τιμή στη διεργασία της αναγωγικής αποχλωρίωσης, σε μια χρονική στιγμή (t). Έτσι, ο δείκτης M_{Cl} ταξινομεί τη διαδικασία λαμβάνοντας τιμές μεταξύ 1 (απουσία αιθενίου) ως 0 (πλήρης μετατροπή σε αιθέριο), ενώ ο δείκτης N_{Cl} καταδεικνύει το στάδιο της αποχλωρίωσης παίρνοντας τιμές από 0 (απουσία αποχλωρίωσης) ως 3 (πλήρης αποχλωρίωση). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, παρότι ο δείκτης M_{Cl} επικεντρώνεται στο στάδιο της μετατροπής του VC σε αιθέριο, ο δείκτης N_{Cl} προσδιορίζει ολόκληρη τη διαδικασία της αναγωγικής αποχλωρίωσης. Όμως, στο πεδίο έχει παρατηρηθεί η δυσκολία της επίτευξης του τελευταίου σταδίου, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση του VC, θεωρήθηκε ότι και οι δείκτες θα χρησιμοποιηθούν ως μέτρα σύγκρισης.

Κεφάλαιο 4 Πειραματικά αποτελέσματα

4.1. Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το αντικείμενο της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες. Αν και όπως αναφέρθηκε στο 2^ο κεφάλαιο, η έως τώρα έρευνα φαίνεται να είναι εκτενής στους παράγοντες που επηρεάζουν την αναγωγή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων, δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος των θειικών ιόντων και του σιδήρου.

Αναλυτικότερα, στο πλαίσιο της διατριβής οι ερευνητικοί στόχοι που τέθηκαν είναι οι εξής:

- Η διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων στην επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας καλλιεργειών που αποδομούν βιολογικά το TCE.
- Η διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην επίδοση της αποχλωρίωσης του TCE υπό μεθανογόνες και θειικοαναγωγικές συνθήκες.

4.2. Επίδραση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση

4.2.1. Σχεδιασμός πειραμάτων

Όπως παρουσιάστηκε και στην Ενότητα 2.4.4., τα αντικρουόμενα αποτελέσματα από τα πειράματα άλλων ερευνητών γεννούν πολλά ερωτήματα σχετικά με την επίδραση των θειικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση. Βασικά ερωτήματα που τίθενται είναι το όριο της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων που αναστέλλει την αποχλωρίωση καθώς και αν η προσθήκη αυξημένης ποσότητας δότη βελτιώνει την επίδοση και την ταχύτητα της αναγωγής των χλωριωμένων αιθινίων. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη αυτών των ερωτημάτων πραγματοποιώντας μια σειρά κατάλληλα σχεδιασμένων πειραμάτων. Έτσι, για τη πραγμάτωση του πρώτου ερευνητικού στόχου, δηλαδή τη διερεύνηση της επίδρασης των θειικών ιόντων στην επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης του TCE, διεξήχθησαν τα πειράματα τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1.

Μητρικές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο εις διπλούν, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 3.1, που ήταν εγκλιματισμένες σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις θειικών ιόντων. Οι συγκεντρώσεις σε mg/L SO_4^{-2} που επιλέχθηκαν ήταν οι ακόλουθες: (i) <0.5 mg/L (0 mM; N; «No»), (ii) 70 mg/L (0.7 mM; QL; «Quasi-Low»), (iii) 150 mg/L (1.6 mM; QM; «Quasi-Medium») και (iv) 400 mg/L (4.2 mM; M;

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

«Medium»), για την επίτευξη της σταδιακής αύξησης των θειικών ιόντων από τη μηδενική ποσότητα στο επίπεδο των 400 mg/L.

Ταυτόχρονα, πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας (batch) διεξήχθησαν με διάφορες δόσεις δότη ηλεκτρονίου χρησιμοποιώντας τις μητρικές καλλιέργειες ως μέσο. Οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν με το αντίστοιχο σκεπτικό ήταν οι εξής:

- (i) η χαμηλή δόση δότη ηλεκτρονίων (0.3 mM; LED: Low Electron Donor) θεωρείται χαρακτηριστική συγκέντρωση στο υπόγειο νερό για τη φυσική αποδόμηση του TCE και χρησιμοποιείται στην εβδομαδιαία τροφοδοσία των μητρικών καλλιεργειών,
- (ii) η σχεδόν χαμηλή δόση (0.9 mM; QLED: Quasi-Low Electron Donor) αντιστοιχεί στην πλήρη αναγωγή του TCE και την αναγωγή 150 mg/L θειικών ιόντων, θεωρώντας ότι 1 mole βουτυρικού οξέος αποδίδει 20 ηλεκτρόνια,
- (iii) η σχεδόν μεσαία δόση (2.2 mM; QMED: Quasi-Medium Electron Donor) έχει 100% επάρκεια δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση του TCE και την αναγωγή 70 mg/L θειικών ιόντων με τη μερική διάσπαση του βουτυρικού οξέος, με το συντηρικό υπολογισμό ότι 1 mole βουτυρικού οξέος παράγει 4 ηλεκτρόνια.
- (iv) η μεσαία δόση (3.0 mM; MED: Medium Electron Donor) θεωρητικά παράγει δέκα φορές παραπάνω αριθμό ηλεκτρονίων από το τη χαμηλή δόση,
- (v) και η υψηλή δόση (9.1 mM; HED: High Electron Donor) πετυχαίνει θεωρητικά την αναγωγική αποχλωρίωση του TCE και την αναγωγή των 400 mg/L θειικών ιόντων, πάλι με το συντηρητικό υπολογισμό ότι 1 mole βουτυρικού οξέος παράγει 4 ηλεκτρόνια.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 4.1 Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης των θειικών ιόντων.

Όνομα αντιδραστήρα	Μέσο (Μέρα καλλιέργειας)	Δότης ηλεκτρονίων ^{a,b}			SO ₄ ²⁻			TCE			Μέρες λειτουργίας
		mM	mg/L	meq/L	mM	mg/L	meq/L	mM	mg/L	meq/L	
A. Μητρικές καλλιέργειες											
N	(εβδομαδιαία τροφοδοσία) ^c	0.3 But	26.4 But	1.2 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	~2000
QL	(εβδομαδιαία τροφοδοσία) ^c	0.3 But	26.4 But	1.2 But	0.7	70	5.6	0.5	65.7	3.0	~400
QM	(εβδομαδιαία τροφοδοσία) ^c	0.3 But	26.4 But	1.2 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	~1000
M	(εβδομαδιαία τροφοδοσία) ^c	0.3 But	26.4 But	1.2 But	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	~2000
B. Επίδραση μηδενικής συγκέντρωσης θειικών ιόντων											
NLED	N1, 2 (982)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	184
NQMED	N1, 2 (1283)	2.2 But	195 But	8.8 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	9
NMED	N1, 2 (912 & 1283)	3.0 But	264 But	12.0 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	5 & 9
NHED	N1 & N2 (912)	9.1 But	800 But	36.3 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	6
Γ. Επίδραση 70 mg/L θειικών ιόντων											
QLLED	QL1, 2 (374)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	0.7	70	5.6	0.5	65.7	3.0	149
QLQMED	QL1, 2 (374)	2.2 But	195 But	8.8 But	0.7	70	5.6	0.5	65.7	3.0	83
Δ. Επίδραση 150 mg/L θειικών ιόντων											
QMLED	QM1, 2 (236)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	181
QMQLLED	QM1, 2 (236)	0.9 But	81.1 But	3.7 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	181
QMMED	QM1, 2 (246)	3.0 But	264 But	12.0 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	171
QMLED	QM1, 2 (246)	9.1 But	800 But	36.3 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	257
Ε. Επίδραση 400 mg/L θειικών ιόντων											
MMED	M1, 2 (556 & 926)	3.0 But	264 But	12.0 But	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	166
MLED	M1, 2 (556 & 926)	9.1 But	800 But	36.3 But	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	166
ΣΤ. Επίδραση συνεχούς τροφοδοσίας 400 mg/L θειικών ιόντων											
CMQLLED	M1, 2 (1356 & 1728)	0.3 But + όσο καταναλώθηκε κάθε 14 μέρες	26.4 But	1.2 But	4.2 + όσο καταναλώθηκε κάθε 14 μέρες	400+	33.3+	0.5	65.7	3.0	180

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

CMMED	M1, 2 (1356 & 1728)	3.0 But + όσο καταναλώθηκε κάθε 14 μέρες	264 But	12.0 But	4.2 + όσο καταναλώθηκε κάθε 14 μέρες	400+	33.3+	0.5	65.7	3.0	180
Z. Διερεύνηση βιοκοινότητας											
MTHHyd	N1, 2 (1290)	3.0 Hyd	6.0 Hyd	6.0 Hyd	<0.005	<0.5	<0.04	0	0	0	26
MTHAc	N1, 2 (1290)	0.8 Ac	46.1 Ac	6.1 Ac	<0.005	<0.5	<0.04	0	0	0	26
SLF150Hyd	QM1, 2 (612)	6.0 Hyd	12.0 Hyd	12.0 Hyd	1.6	150	12.8	0	0	0	7
SLF150Ac	QM1, 2 (612)	1.5 Ac	90.1 Ac	12.0 Ac	1.6	150	12.8	0	0	0	7
SLF400Hyd	M1, 2 (1256 & 1628)	6.0 Hyd	12.0 Hyd	12.0 Hyd	4.2	400	33.3	0	0	0	7
SLF400Ac	M1, 2 (1256 & 1628)	1.5 Ac	90.1 Ac	12.0 Ac	4.2	400	33.3	0	0	0	7
SLF150LED	QM1, 2 (612)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	1.6	150	12.8	0	0	0	7
SLF150MED	QM1, 2 (612)	9.1 But	800 But	36.3 But	1.6	150	12.8	0	0	0	7
SLF400LED	M1, 2 (1256 & 1628)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	4.2	400	33.3	0	0	0	7
SLF400MED	M1, 2 (1256 & 1628)	9.1 But	800 But	36.3 But	4.2	400	33.3	0	0	0	7
MPHBCo	M1, 2 (1285 & 1657)	0	0	0	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	1
NPHB	N1, 2 (1657)	9.1 But	800 But	36.3 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	1
QMPHB	QM1,2 (641)	9.1 But	800 But	36.3 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	1
MPHB	M1, 2 (1285 & 1657)	9.1 But	800 But	36.3 But	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	1

^aBut: βουτυρικό οξύ, Hyd: μοριακό υδρογόνο, Ac: Οξικό οξύ. ^bΘεωρείται ότι η διάσπαση του βουτυρικού οξέος αποδίδει 4 ηλεκτρόνια. ^cΕβδομαδιαία τροφοδοσία όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 3.1.3.

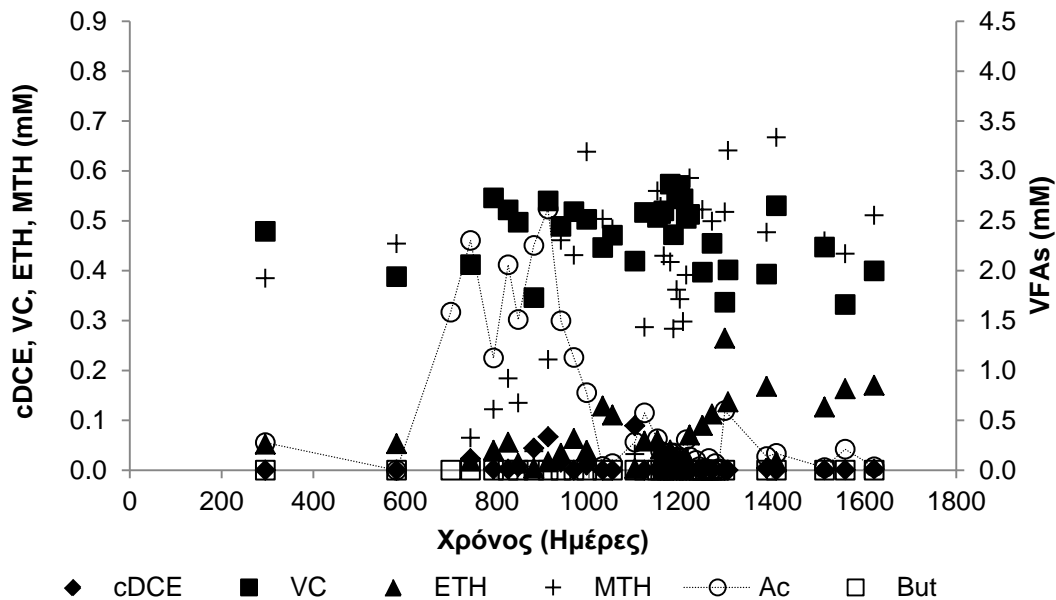
4.2.2. Παρουσίαση και σχολιασμός αποτελεσμάτων

Στην παρούσα Ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μητρικές καλλιέργειες και τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας για τη διερεύνηση της επίδρασης των θειικών ιόντων.

4.2.2.1. Μητρικές καλλιέργειες

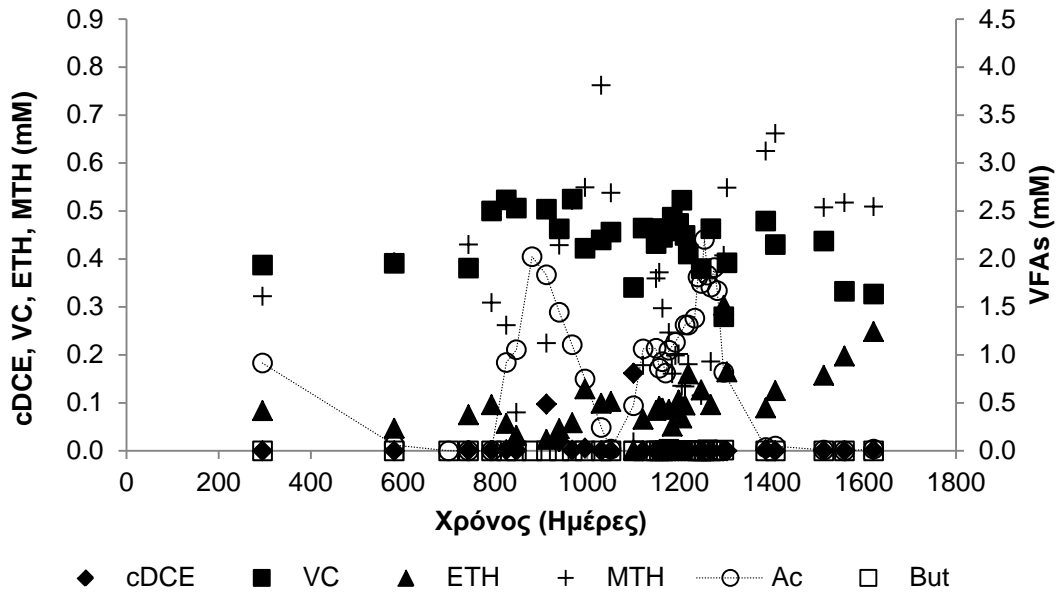
Επίδοση αναγωγικής αποχλωρίωσης, μεθανογένεσης και θεικοαναγωγής στις μητρικές καλλιέργειες

Μητρικές καλλιέργειες εγκλιματισμένες σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων, 0 mg/L (N, 0 mM), 70 mg/L (QL, 0.7 mM), 150 mg/L (QM, 1.6 mM) και 400 mg/L (M, 4.2 mM), αναπτύχθηκαν με σκοπό τη διεξαγωγή πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας. Στα Σχήματα 4.1 ως 4.8 παρουσιάζονται οι μετρήσεις των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου, οξικού και βουτυρικού οξέος σε κάθε διπλότυπο καλλιέργειας ξεχωριστά, που πραγματοποιήθηκαν στο τέλος του κύκλου των επτά ημερών. Το προπιονικό και ισοβουτυρικό οξύ δεν παρουσιάζονται εξαιτίας των χαμηλών συγκεντρώσεών τους καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων.



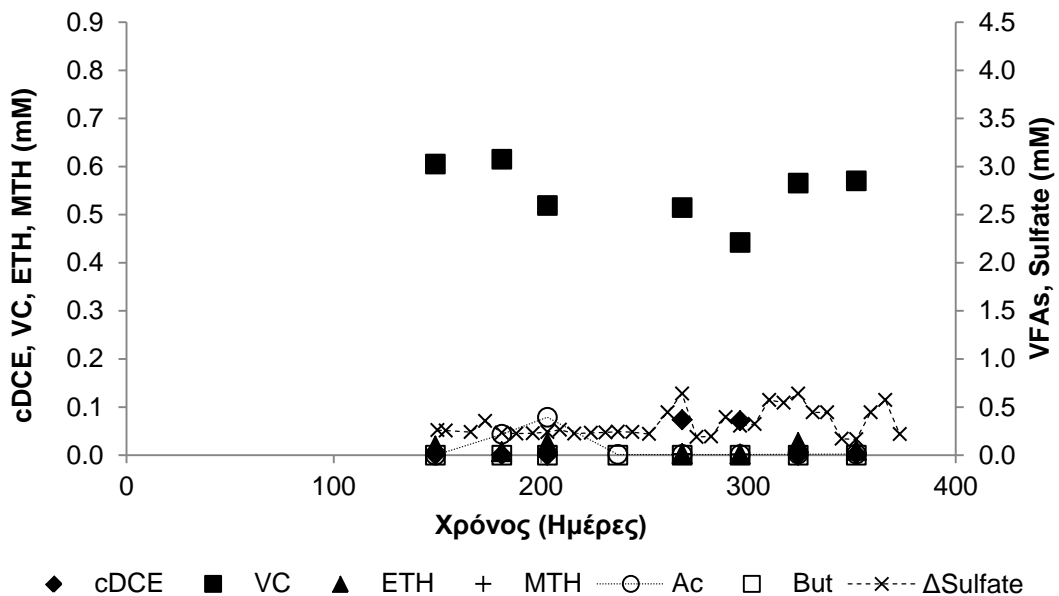
Σχήμα 4.1 Επίδοση καλλιέργειας N1 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



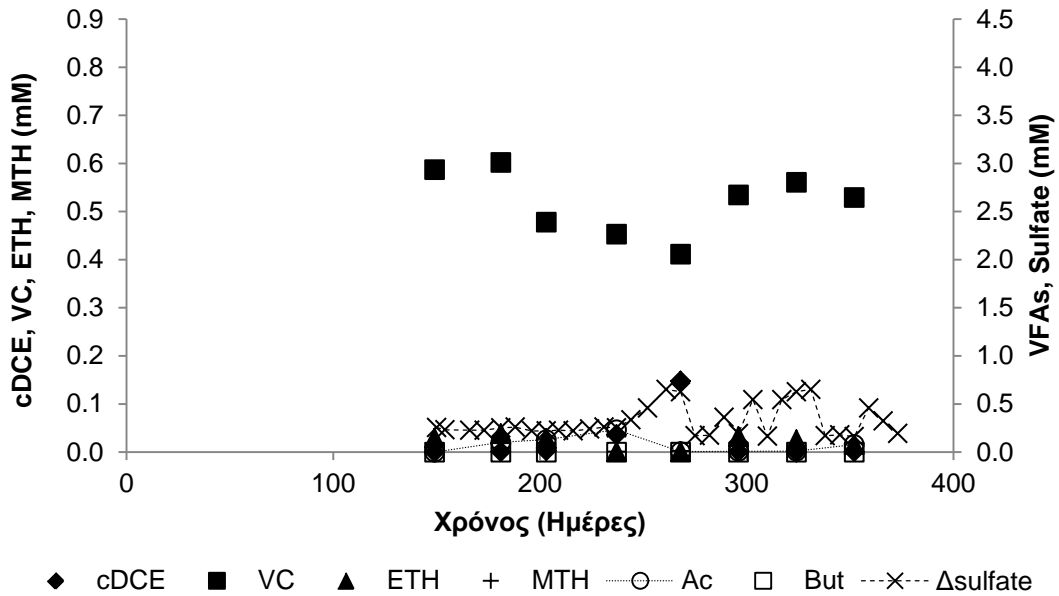
Σχήμα 4.2 Επίδοση καλλιέργειας N2 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).

Στις N καλλιέργειες κύρια προϊόντα της αποχλωρίωσης ήταν το VC και το αιθέριο με μέση συγκέντρωση περίπου 0.45 mM και 0.08 mM, αντίστοιχα. Επίσης, η μεθανογένεση ήταν κυρίαρχη διεργασία με παραγωγή 0.37 mM μεθανίου στις 7 μέρες λειτουργίας των αντιδραστήρων. Αναλυτικά τα αποτελέσματα της αποχλωρίωσης και των υπόλοιπων αναερόβιων διεργασιών, καθώς και η διακύμανσή τους, για τις καλλιέργειες N δίνονται στον Πίνακα 4.2.



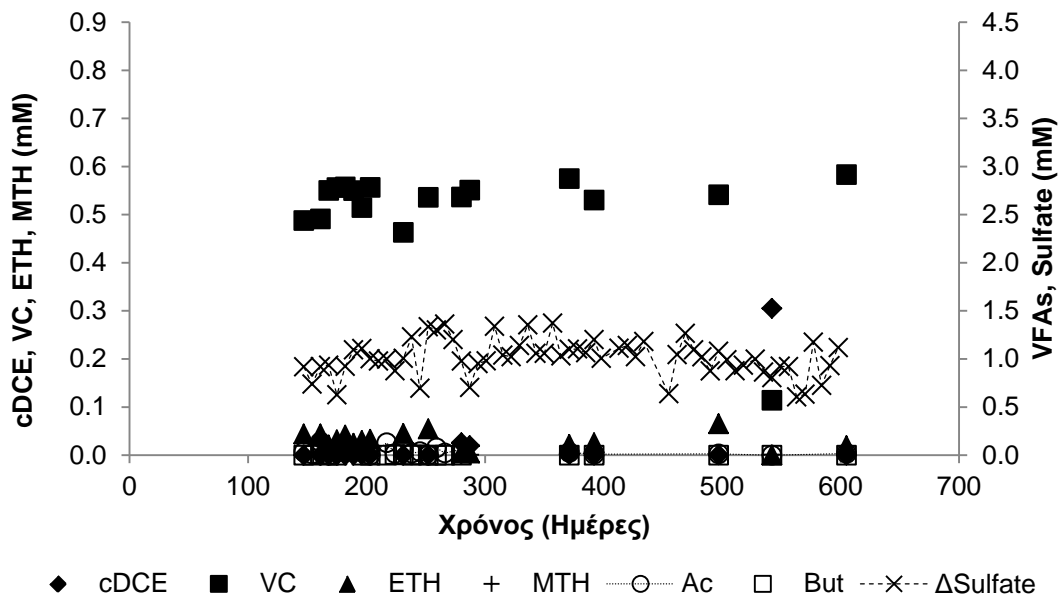
Σχήμα 4.3 Επίδοση καλλιέργειας QL1 (0.7 mM, 70 mg/L θειικών ιόντων).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



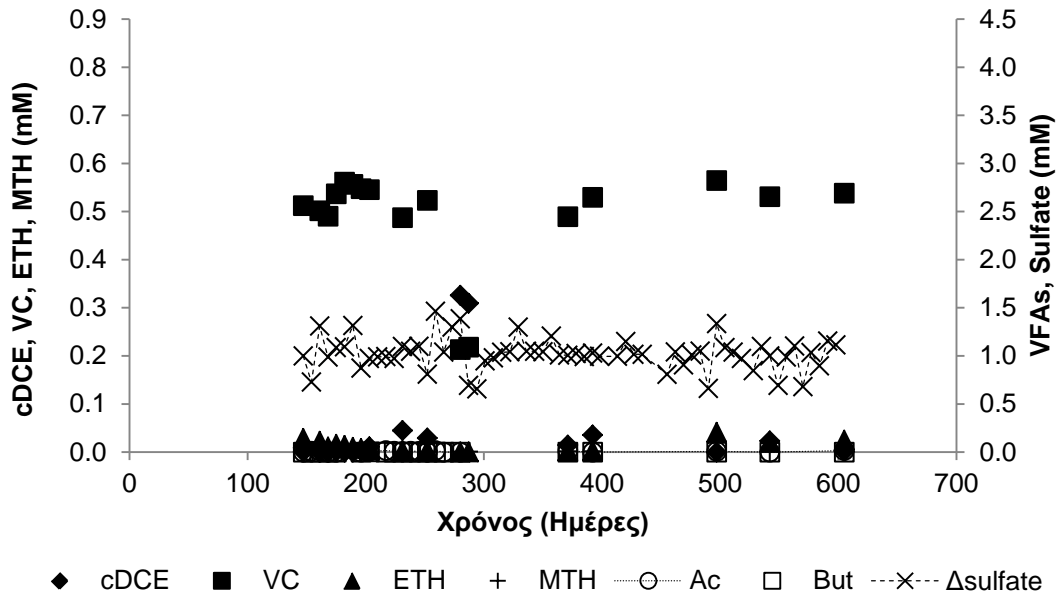
Σχήμα 4.4 Επίδοση καλλιέργειας QL2 (0.7 0 mM, 70 mg/L θειικών ιόντων).

Στις καλλιέργειες 70 m/L (0.7 mM) θειικών ιόντων (QL), η αναγωγική αποχλωρίωση έφθασε ως την παραγωγή του VC με μέση συγκέντρωση ~0.53 mM. Η εναπομένουσα συγκέντρωση των θειικών ιόντων στο τέλος του εβδομαδιαίου κύκλου ήταν περίπου 0.32 mM με αποτέλεσμα η θεικοαναγωγή να θεωρείται η κυρίαρχη διεργασία. Αναλυτικά τα αποτελέσματα της αποχλωρίωσης και των υπόλοιπων αναερόβιων διεργασιών, καθώς και η διακύμανσή τους, για τις καλλιέργειες QL δίνονται στον Πίνακα 4.2.



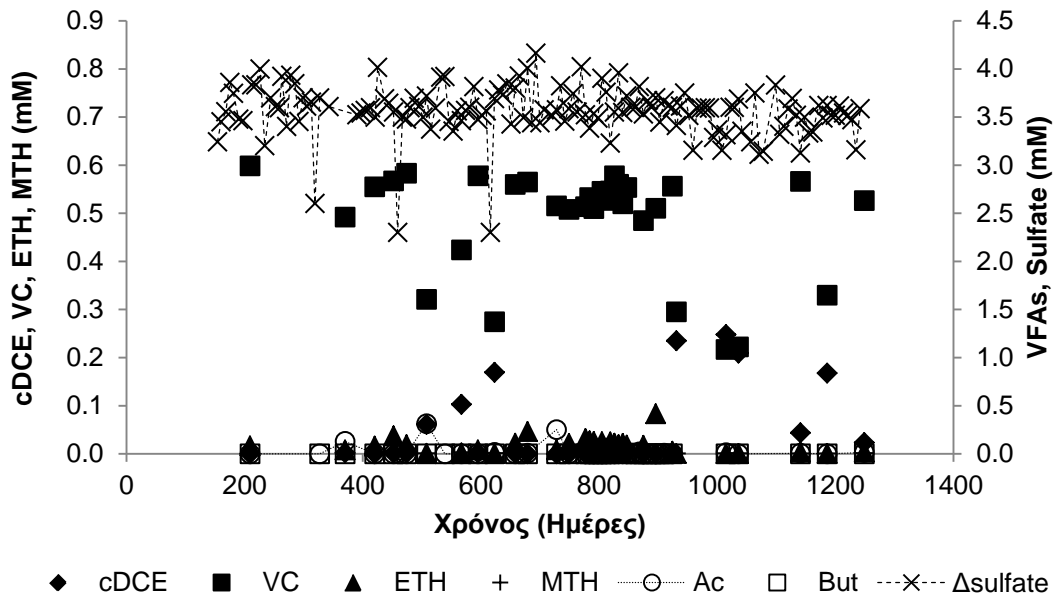
Σχήμα 4.5 Επίδοση καλλιέργειας QM1 (1.6 mM, 150 mg/L θειικών ιόντων).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



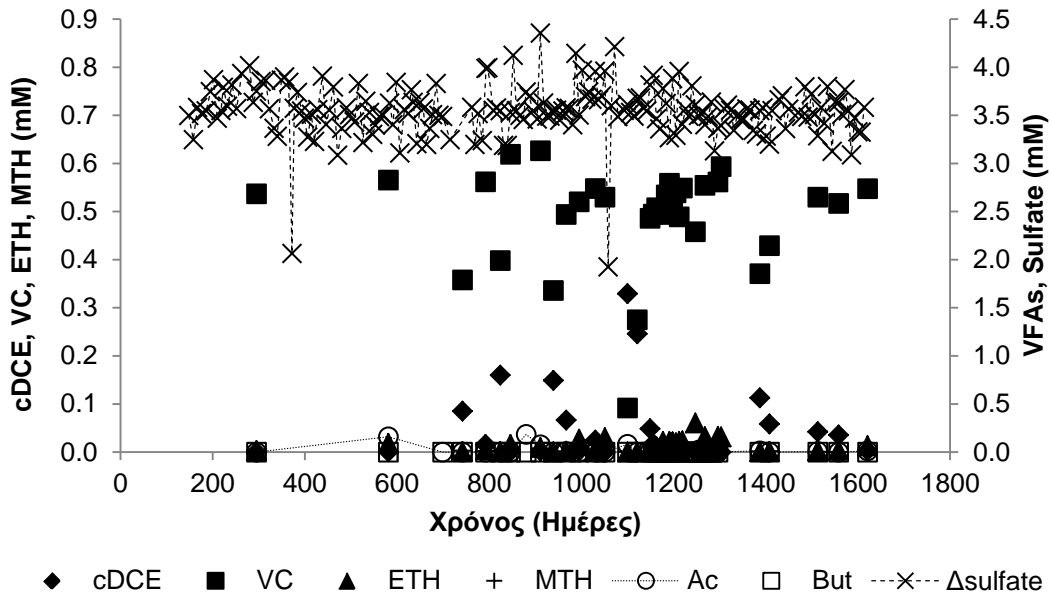
Σχήμα 4.6 Επίδοση καλλιέργειας QM2 (1.6 mM, 150 mg/L θειικών ιόντων).

Από τα Σχήματα 4.7 και 4.8, φαίνεται ότι οι καλλιέργειες με 150 mg/L (1.6 mM) θειικών ιόντων (QM) είχαν παρόμοια αποτελέσματα με τις QL, επομένως το VC συσσωρεύτηκε και στα δύο αντίτυπα, ενώ η συγκέντρωση των θειικών ιόντων μετά τις 7 ημέρες ήταν περίπου 1 mM.



Σχήμα 4.7 Επίδοση καλλιέργειας M1 (4.2 mM, 400 mg/L θειικών ιόντων).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.8 Επίδοση καλλιέργειας M2 (4.2 mM, 400 mg/L θειικών ιόντων).

Στους αντιδραστήρες με 400 mg/L (4.2 mM) αρχική συγκέντρωση θειικών ιόντων (M), φαίνεται ότι κύρια προϊόντα ήταν το VC και το cDCE με μέση συγκέντρωση 0.49 mM και 0.04 mM, αντιστοίχως, ενώ η συγκέντρωση θειικών ιόντων που παρέμενε ήταν περίπου 3.6 mM. Σε κάποιες χρονικές στιγμές, φαίνεται ότι η μείωση των θειικών ιόντων ήταν πολύ μεγάλη συγκριτικά με τη μέση κατανάλωση, το οποίο μπορεί είτε να οφείλεται σε υπερεκτίμηση της ποσότητας στον προηγούμενο κύκλο είτε στο ότι οι καλλιέργειες δείχνουν μια μικρή αστάθεια ως προς την επίδοση των οξειδοαναγωγικών διεργασιών. Συνοπτικά, στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζεται ο μέσος όρος με την τυπική απόκλιση όλων των αναλύσεων και ο αριθμός μετρήσεων της κάθε ανάλυσης, ενώ στο Σχήμα 4.9 συγκρίνεται η απόδοση των καλλιεργειών ως προς τις αναγωγικές διεργασίες.

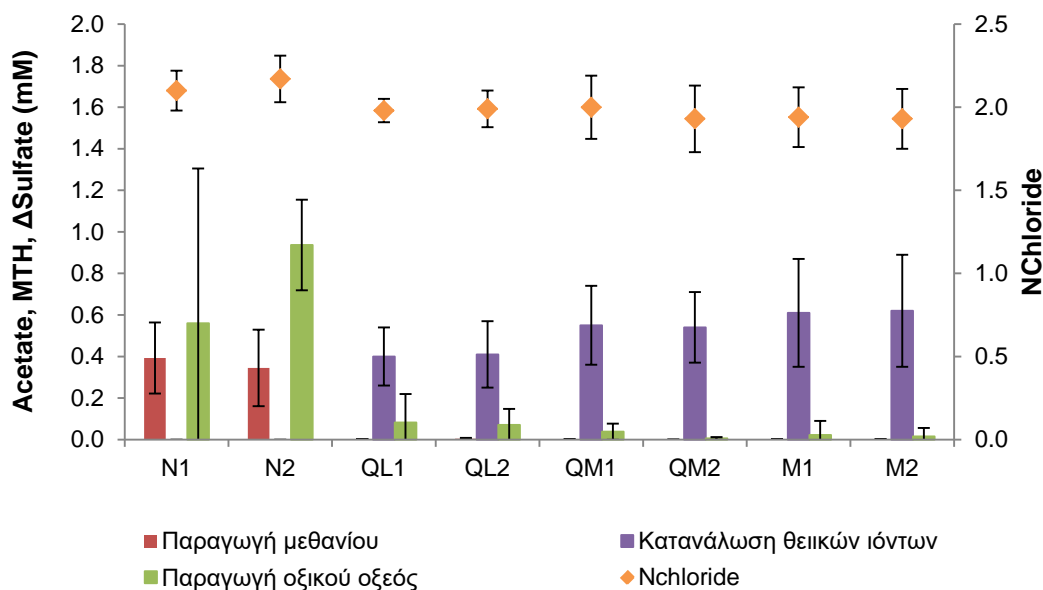
Πίνακας 4.2 Αποτελέσματα των μητρικών καλλιεργειών στο τέλος του επταήμερου κύκλου τροφοδοσίας (δίδονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση κάθε παραμέτρου).

Καλλιέργεια	N1	N2	QL1	QL2	QM1	QM2	M1	M2
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	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000
cDCE (mM)	0.008 ±0.020	0.009 ±0.032	0.021 ±0.032	0.024 ±0.048	0.021 ±0.071	0.047 ±0.100	0.040 ±0.076	0.042 ±0.076
VC (mM)	0.472 ±0.067	0.437 ±0.060	0.547 ±0.056	0.519 ±0.062	0.511 ±0.104	0.491 ±0.103	0.489 ±0.109	0.491 ±0.106

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Καλλιέργεια	N1	N2	QL1	QL2	QM1	QM2	M1	M2
ETH (mM)	0.067 ±0.060	0.101 ±0.061	0.013 ±0.009	0.021 ±0.013	0.030 ±0.017	0.013 ±0.011	0.017 ±0.017	0.014 ±0.014
METH (mM)	0.393 ±0.171	0.345 ±0.184	0.002 ±0.001	0.004 ±0.004	0.001 ±0.001	0.001 ±0.000	0.001 ±0.001	0.001 ±0.001
n _{chloride}	2.10 ±0.12	2.17 ±0.14	1.98 ±0.07	1.99 ±0.11	2.00 ±0.19	1.93 ±0.20	1.94 ±0.18	1.93 ±0.18
Αριθμός μετρήσεων	34	33	7	8	17	17	32	33
ΔSO ₄ ²⁻ (mM)	-	-	0.40 ±0.14	0.41 ±0.16	0.55 ±0.19	0.54 ±0.17	0.61 ±0.26	0.62 ±0.27
Αριθμός μετρήσεων	-	-	32	32	62	62	142	186
S ²⁻ (mM)	-	-	-	-	0.67 ±0.12	0.65 ±0.09	0.71 ±0.11	0.75 ±0.11
Αριθμός μετρήσεων	-	-	-	-	19	19	19	19
But (mM)	0.000 ±0.000	0.001 ±0.003	0.000 ±0.000	0.000 ±0.000	0.001 ±0.002	0.000 ±0.001	0.000 ±0.001	0.000 ±0.001
Ac (mM)	0.560 ±0.745	0.937 ±0.218	0.082 ±0.137	0.071 ±0.077	0.038 ±0.039	0.006 ±0.006	0.022 ±0.068	0.015 ±0.041
Αριθμός μετρήσεων	38	38	8	8	20	20	37	38
TSS (mg/L)	31.6 ±6.2	26.5 ±5.9	40.4 ±4.9	41.7 ±4.2	28.4 ±8.3	29.3 ±4.9	31.6 ±8.2	32.3 ±8.9
VSS (mg/L)	24.8 ±5.0	21.8 ±4.4	28.3 ±4.0	30.8 ±1.8	27.8 ±6.3	27.3 ±4.2	26.8 ±4.6	27.0 ±5.1
Αριθμός μετρήσεων	28	28	5	5	16	15	30	30
Proteins (mg/L)	8.8 ±2.8	10.0 ±1.7	16.1 ±3.3	16.5 ±2.9	14.5 ±4.5	14.7 ±4.4	16.1 ±2.5	15.7 ±3.0
Αριθμός μετρήσεων	17	21	4	4	11	11	22	23
pH	6.67 ±0.13	6.67 ±0.14	6.89 ±0.10	6.89 ±0.08	6.73 ±0.13	6.75 ±0.11	6.81 ±0.16	6.80 ±0.14
Αριθμός μετρήσεων	159	159	17	17	57	57	113	157
Χρονικό διάστημα (days)	1621	1621	352	352	605	605	1249	1621

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.9 Σύγκριση αναγωγικών διεργασιών στις μητρικές καλλιέργειες.

Από τον Πίνακα 4.2 και το Σχήμα 4.9 παρατηρείται ότι οι N καλλιέργειες (0 mg/L) παρήγαγαν περισσότερο αιθέριο από ότι οι υπόλοιπες καλλιέργειες που είχαν θειικά ιόντα, εφόσον, το N_{Cl} ήταν 2.10 ± 0.12 και 2.17 ± 0.14 , για τα δύο διπλότυπα, ενώ στις καλλιέργειες με θειικά κυμαίνεται μεταξύ 1.93 ως 2.00.

Επιπλέον, η θειικοαναγωγή κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα στις QL, QM και M, περίπου 0.52 mM θειικά ιόντα ανήχθησαν, παρά τη διαφορετική αρχική συγκέντρωση, ενώ στις δύο τελευταίες καλλιέργειες τα παραγόμενα σουλφίδια μετρήθηκαν περίπου 0.7 mM (0.56 μ M στην υγρή φάση). Η μεθανογένεση φαίνεται να αναχαιτίζεται από τη θειικοαναγωγή, μιας και το μεθάνιο στις 7 μέρες είναι 0.393 ± 0.171 mM και 0.345 ± 0.184 mM στις N καλλιέργειες, ενώ στους αντιδραστήρες με θειικά ιόντα είναι μηδαμινό. Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Aulenta et al. (2008b), όπου περίπου 23% και 0.2% του αρχικού δότη ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε για τη μεθανογένεση υπό μηδενική και 3.75 mM συγκέντρωση θειικών ιόντων. Το παραπάνω μπορεί να οφείλεται είτε στον ανταγωνισμό για το δότη ηλεκτρονίων, εφόσον οι θειικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί διατηρούν τη συγκέντρωση υδρογόνου κάτω από το όριο πρόσληψης για την ανάπτυξη των μεθανογόνων αρχαίων (Yang & McCarty, 1998), είτε στην τοξικότητα από τα σουλφίδια, αφού οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είναι πιο ευαίσθητοι στην έκθεση στο υδρόθειο (Scherr et al., 2011).

Η βιομάζα των καλλιεργειών υπό μεθανογόνες συνθήκες ήταν σε λίγο χαμηλότερα επίπεδα από ότι των μπουκαλιών με θειικά ιόντα. Συγκεκριμένα, τα VSS μετρήθηκαν 23.3 mg/L και 27.1 mg/L και το περιεχόμενο σε πρωτεΐνες ήταν περίπου 9.4 mg/L και 14.8 mg/L, για τις N και τις υπόλοιπες καλλιέργειες, αντίστοιχα. Επίσης, το pH σε όλες τις καλλιέργειες κυμάνθηκε μεταξύ 6.67 με 6.89. Επομένως ήταν εντός του αποδεκτού εύρους 6 με 8 (Parsons, 2004), ενώ τιμές κάτω από 5 με 5.5 προκαλούν

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

την παύση της αποχλωρίωσης, αλλά και των υπολοίπων αναγωγικών διεργασιών (Církva et al., 1999; Parsons, 2004).

Συνοψίζοντας τα δεδομένα από τα ισοζύγια ηλεκτρονίων, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3, φαίνεται ότι κυρίαρχες διεργασίες ήταν η μεθανογένεση στις N καλλιέργειες και η θεικοαναγωγή στις καλλιέργειες με θειικά ιόντα.

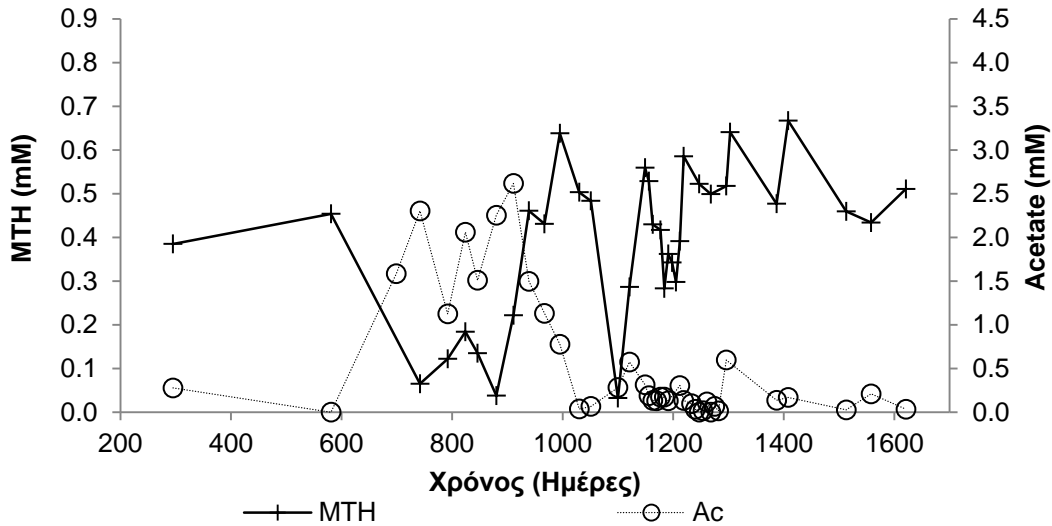
Πίνακας 4.3 Ισοζύγια ηλεκτρονίων στις μητρικές καλλιέργειες.

Καλλιέργειες	N	QL	QM	M
$\% \frac{\sum e^-_{\text{αποχλωρίωση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	44±3%	41±1%	34±1%	30±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{μεθανογένεση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	56±3%	0±0%	0±0%	0±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{θεικοαναγωγή}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	0%	58±1%	66±1%	70±0%
$\sum e^-_{\text{αποδέκτης}} \left(\frac{meq}{L}\right)$	5.1±0	5.5±0	6.6±0.2	7.1±0.1
$\sum e^-_{\text{δότης}} \left(\frac{meq}{L}\right)^*$	6.0	6.0	6.0	6.0
% Ανάκτηση	86±0%	92±0%	109±3%	118±1%

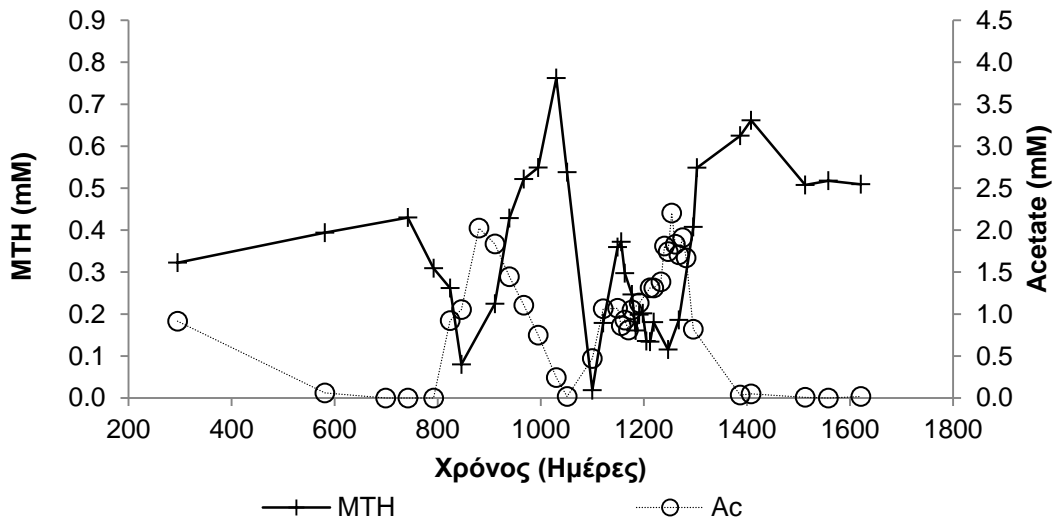
* Θεωρητικός υπολογισμός αν θεωρηθεί ότι το βουτυρικό οξύ αποδίδει 20e⁻/mole.

Όσον αφορά τα πτητικά λιπαρά οξέα, το βουτυρικό οξύ καταναλώθηκε άμεσα σε όλους τους αντιδραστήρες. Όμως, σε κάποιες περιόδους το οξικό οξύ συσσωρεύεται στις N καλλιέργειες, δείχνοντας έτσι μεγάλη διακύμανση στις τιμές του και μια αστάθεια στην απόδοση της μεθανογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι μια αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος συνοδεύεται από μείωση της παραγωγής μεθανίου, ενώ η κατανάλωση του οξέος συνοδεύεται αντίστοιχα από αύξηση της παραγωγής του μεθανίου (βλ. Σχήματα 4.10 και 4.11). Η αυξομείωση αυτή μπορεί να δρα ανασταλτικά στη σταθερή λειτουργία των καλλιεργειών και να προκαλεί μικρές αλλαγές στη βιοκοινότητα άρα και στην επίδοση των οξειδοαναγωγικών διεργασιών, δεν φαίνεται όμως να επηρεάζουν την ικανότητα επίτευξης πλήρους αναγωγικής αποχλωρίωσης (Duhamel & Edwards, 2006; Freeborn et al., 2005).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.10 Κατανάλωση οξικού οξέος και παραγωγή μεθανίου στην N1 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).



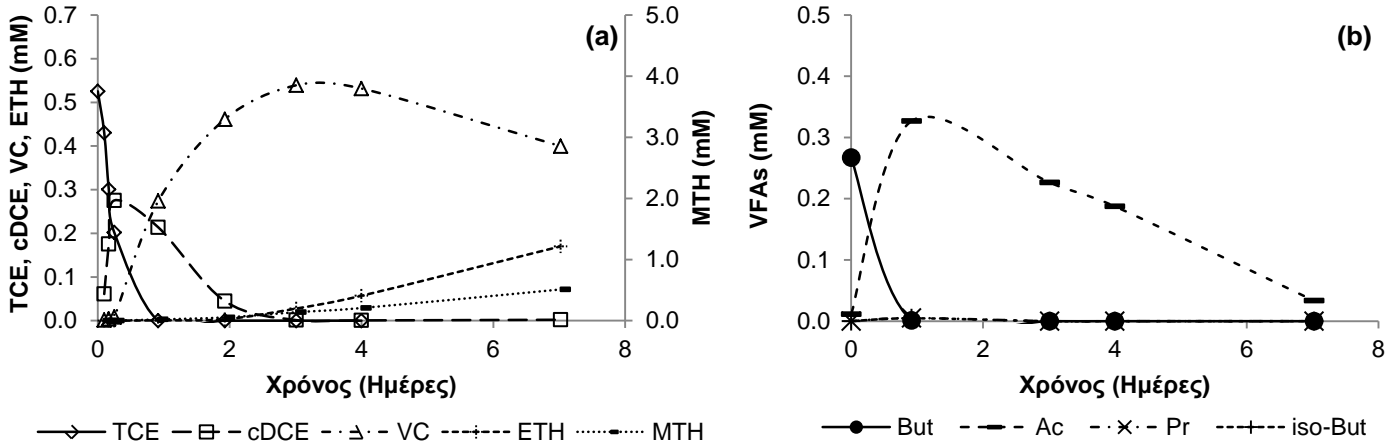
Σχήμα 4.11 Κατανάλωση οξικού οξέος και παραγωγή μεθανίου στην N2 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).

Ρυθμοί οξειδοαναγωγικών διεργασιών στις μητρικές καλλιέργειες

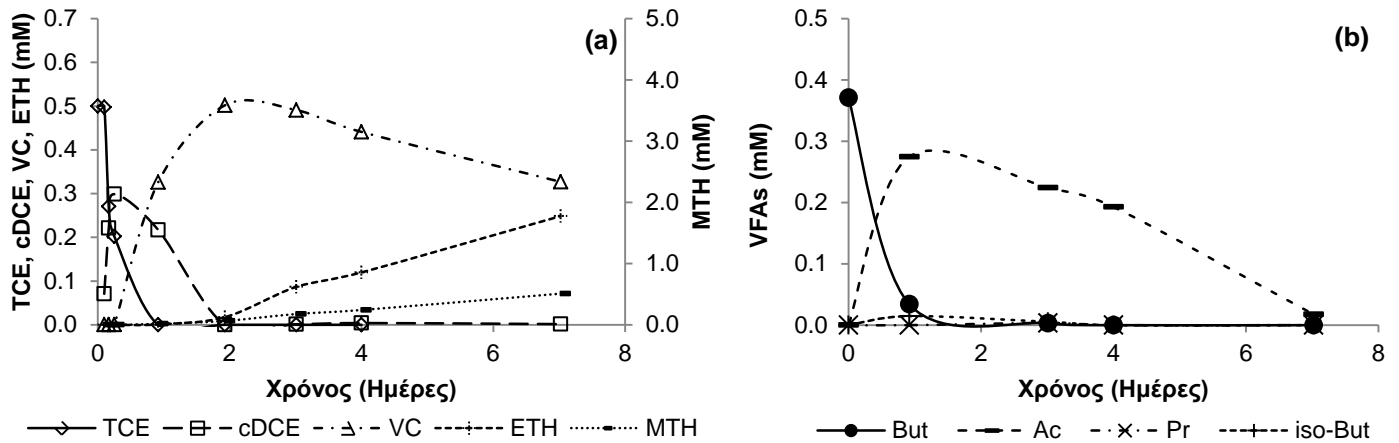
Για μια ολοκληρωμένη παρουσίαση της λειτουργίας των καλλιεργειών και την εξαγωγή ρυθμών, κατά τη διάρκεια του κύκλου των επτά ημερών, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις σε 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές. Δείγματα λήφθηκαν μεταξύ των 1550 ως 1620 ημερών λειτουργίας για τις N (0 mg/L θειικών ιόντων) και M (400 mg/L θειικών ιόντων) καλλιέργειες και από τις 530 ως τις 600 ημέρες λειτουργίας για τις QM καλλιέργειες. Έτσι, οι ρυθμοί αποχλωρίωσης,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

μεθανογένεσης, θεικοαναγωγής και οξειδωσης των πτητικών λιπαρών οξέων στις καλλιέργειες εξήχθησαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων ενός κύκλου περιγράφονται στα Σχήματα 4.12 ως 4.17, ενώ οι ρυθμοί που υπολογίζονται παρακάτω είναι οι μέσοι όροι από τα αποτελέσματα και των δύο κύκλων.

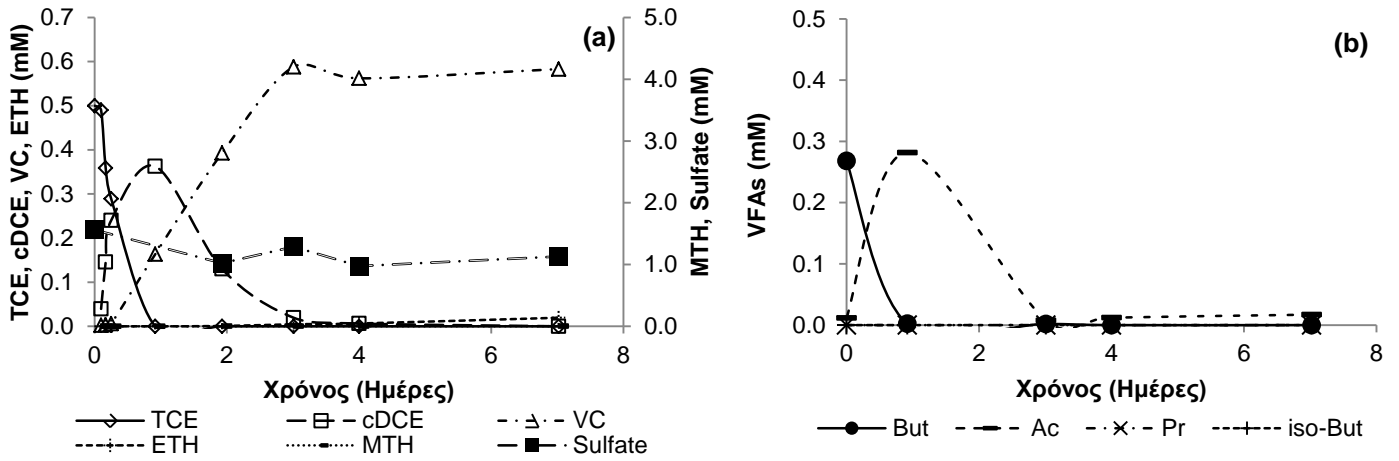


Σχήμα 4.12 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξείδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια N1 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).

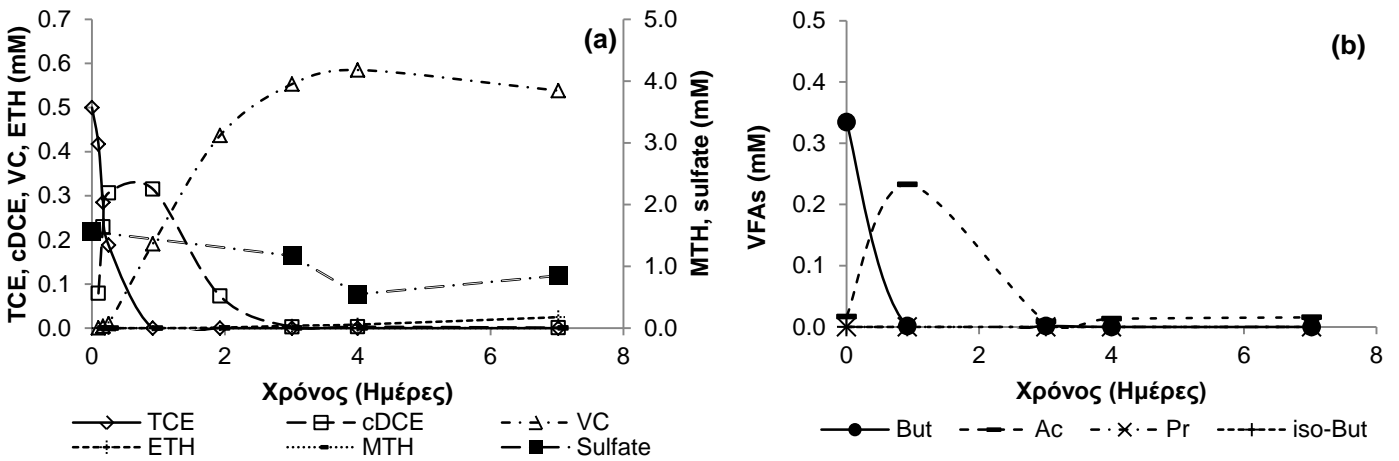


Σχήμα 4.13 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξείδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια N2 (0 mM, 0 mg/L θειικών ιόντων).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

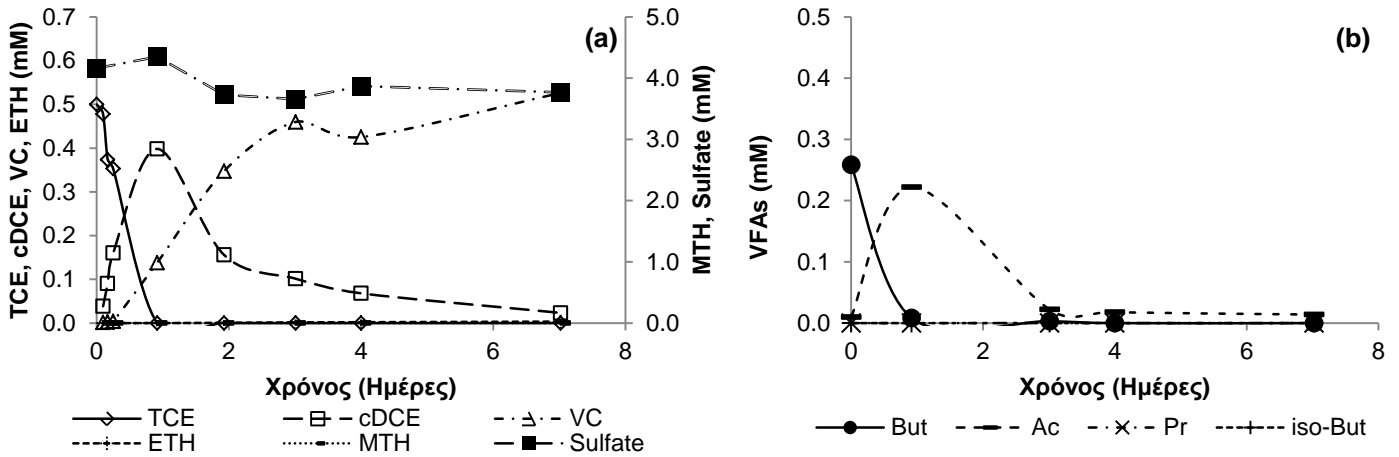


Σχήμα 4.14 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξειδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια QM1 (1.6 mM, 150 mg/L θειικών ιόντων).

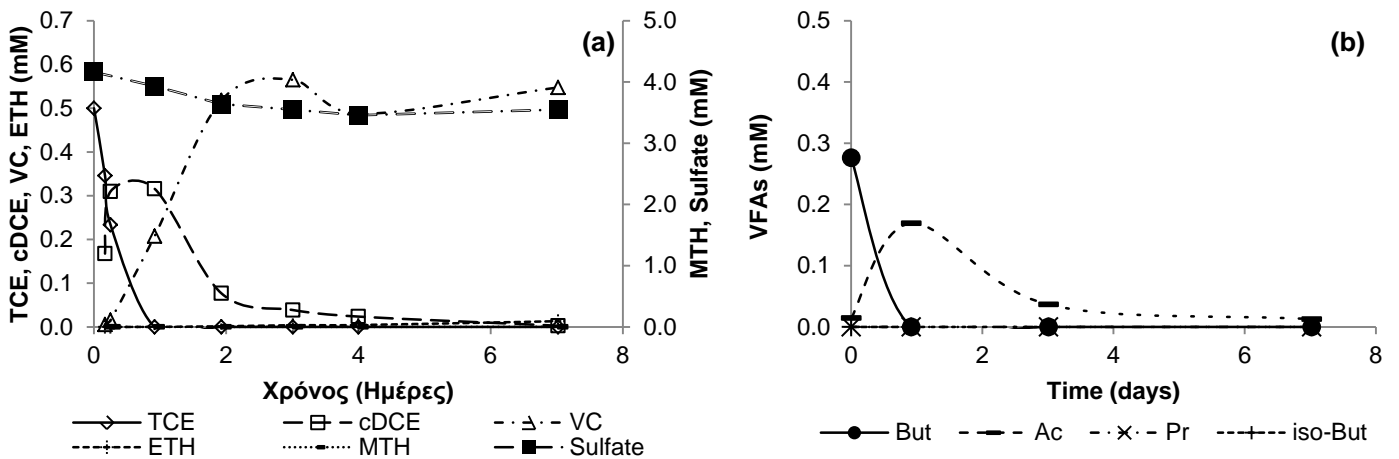


Σχήμα 4.15 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξειδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια QM2 (1.6 mM, 150 mg/L θειικών ιόντων).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.16 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξείδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια M1 (4.2 mM; 400 mg/L θειικών ιόντων).



Σχήμα 4.17 (a) Αναγωγική αποχλωρίωση και μεθανογένεση, (b) Οξείδωση πτητικών οξέων κατά τον κύκλο των επτά ημερών στην καλλιέργεια M2 (4.2 mM; 400 mg/L θειικών ιόντων).

Όπως παρατηρείται στα παραπάνω σχεδιαγράμματα, η μεθανογένεση πραγματοποιήθηκε μόνο στους N αντιδραστήρες (0 mg/L θειικών ιόντων) με ρυθμό 0.09 mM/day, ενώ από τις μετρήσεις σουλφιδίων εξάγεται ότι ο ρυθμός παραγωγής τους ήταν ίδιος (0.10 mM/day) σε όλες τις καλλιέργειες με θειικά ιόντα. Επιπλέον, φαίνεται πως η αποδόμηση του TCE ολοκληρώθηκε την πρώτη μέρα σε όλες τις καλλιέργειες με ταχύτητα 1.67 ± 0.21 mM/day στις N (0 mg/L θειικών ιόντων), 1.50 ± 0.21 mM/day στις QM (150 mg/L θειικών ιόντων) και 1.37 ± 0.03 mM/day στις M (400 mg/L θειικών ιόντων). Το cDCE εξαφανίστηκε πλήρως στους N (0 mg/L θειικών ιόντων) και QM (150 mg/L θειικών ιόντων) αντιδραστήρες με ρυθμό 0.31 ± 0.11

mM/day και 0.17 ± 0.02 mM/day, αντιστοίχως, αλλά μια μικρή ποσότητα παρέμεινε στους M μέχρι το τέλος του κύκλου. Αιθέριο μετρήθηκε μόνο στις N καλλιέργειες (0 mg/L θειικών ιόντων), διότι ο δότης ηλεκτρονίων στις καλλιέργειες με θειικά είχε εξαντληθεί στις 3 πρώτες ημέρες λειτουργίας των συστημάτων. Επομένως, ενώ η παρουσία θειικών ιόντων φαίνεται να προκαλεί την καθυστέρηση της αναγωγικής αποχλωρίωσης στις μητρικές καλλιέργειες, εξαιτίας της κατανάλωσης του δότη ηλεκτρονίων, η επίδραση στα πρώτα στάδια της αποχλωρίωσης δεν φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική, εφόσον το εύρος των αποτελεσμάτων με 70, 150 και 400 mg/L θειικών ιόντων είναι συγκρίσιμο με το εύρος των μετρήσεων των καλλιέργειών με μηδενική συγκέντρωση θειικών ιόντων.

Σύνθεση βιοκοινότητας των μητρικών καλλιεργειών

Όσον αφορά την ταυτοποίηση των ειδών που απαρτίζουν τη βιοκοινότητα, δείγματα συλλέχθηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες N (0 mg/L SO_4^{2-}), QM (150 mg/L SO_4^{2-}) και M (400 mg/L SO_4^{2-}), σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές, από το Μάρτιο του 2015 έως τον Απρίλιο του ίδιου έτους με στόχο τη διερεύνηση της σύστασης της βιοκοινότητας των καλλιεργειών με εφαρμογή της μεθόδου FISH. Δείγματα λήφθηκαν στις 2000 ημέρες λειτουργίας για τις N (0 mg/L θειικών ιόντων) και M (400 mg/L θειικών ιόντων) καλλιέργειες και στις 1000 ημέρες λειτουργίας για τις QM (150 mg/L θειικών ιόντων) καλλιέργειες. Οι ιχνηλάτες που χρησιμοποιήθηκαν με την ομάδα που στόχευαν ήταν οι εξής: EUB338 (Βακτήρια), ARCH915 (Αρχαία), MSMX860 (*Methanosarcina* και *Methanosaeta* spp.), ALF968 (Alphaproteobacteria), BET42a (Betaproteobacteria), GAM42a (Gammaproteobacteria), PAE997 (*Pseudomonas* spp.), DELTA495a (Deltaproteobacteria), DSBAC357 (Desulfobacteraceae και Syntrophobacteraceae), Clost I (Clostridia), AW (*Acetobacterium* spp.) και Dhe1259t (*Dehalococcoides* spp.). Τα αποτελέσματα του κάθε ιχνηλάτη με το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.18.

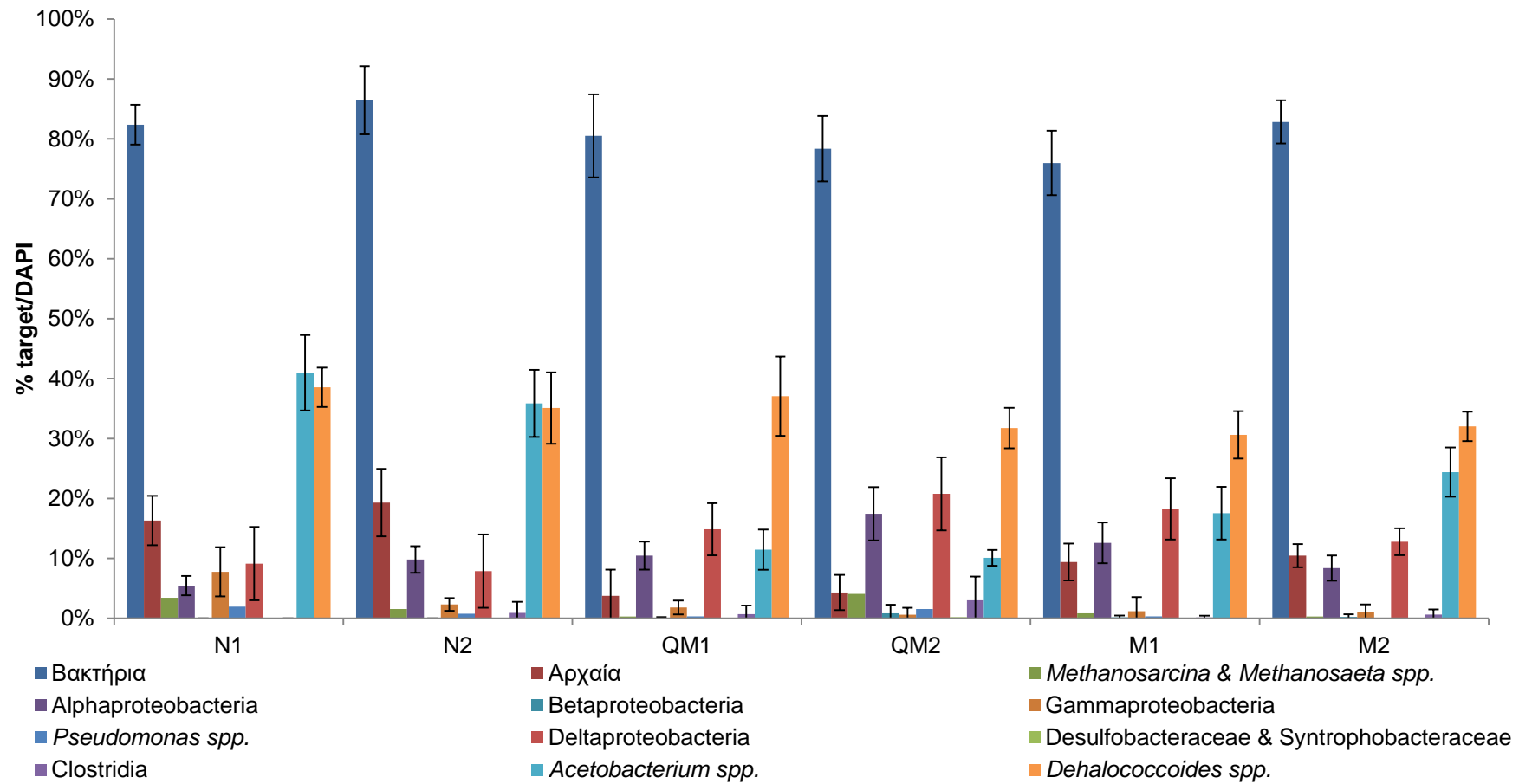
Από το διάγραμμα φαίνεται ότι σε όλες τις καλλιέργειες τα βακτήρια επικράτησαν των αρχαίων με ποσοστά που κυμάνθηκαν μεταξύ 76-86% και 4-19%, αντιστοίχως. Τα *Dehalococcoides* spp. βρέθηκαν σε υψηλά ποσοστά μεταξύ 31%-39% σε όλες τις καλλιέργειες, συνεπώς υπερίσχυσαν ανεξαρτήτως των συνθηκών, είτε υπό μεθανογόνες ή υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες, εύρημα το οποίο συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Panagiotakis et al., 2014).

Στις καλλιέργειες με θειικά ιόντα η συγκέντρωση των αρχαίων ήταν λίγο χαμηλότερη από ότι στις καλλιέργειες χωρίς θειικά. Πιο συγκεκριμένα, ο μέσος όρος ήταν 18% \pm 2% στις N (0 mg/L θειικών ιόντων), 4% \pm 0% στις QM (150 mg/L θειικών ιόντων) και 10% \pm 1% στις M (400 mg/L θειικών ιόντων). Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και στο γένος *Acetobacterium*, όπου τα ποσοστά ήταν 38% \pm 4%, 11% \pm 1% και 21% \pm 5% στις N (0 mg/L θειικών ιόντων), QM (150 mg/L θειικών ιόντων) και M (400 mg/L

θειικών ιόντων) καλλιέργειες, αντίστοιχα. Ωστόσο, τα Deltaproteobacteria, που περιλαμβάνουν τους μικροοργανισμούς αναγωγής θειικών, έχουν μια αντίθετη ροπή, εφόσον στις καλλιέργειες με 150 και 400 mg/L θειικά ιόντα το ποσοστό τους κυμάνθηκε μεταξύ 18%-16%, ενώ σε αμελητέα συγκέντρωση θειικών ήταν περίπου $9\% \pm 1\%$. Οι τάσεις αυτές στις καλλιέργειες προκαλούνται από το γεγονός ότι οι αποθειωτές είναι πιο ανταγωνιστικοί από τους μεθανογόνους και τους ομοοξικογόνους μικροοργανισμούς, εφόσον η αναγωγή των θειικών ιόντων είναι μια αντίδραση θερμοδυναμικά πιο ευνοϊκή (Hedderich & Whitman, 2013; Stams et al., 2005). Επομένως, οι θειικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί διατηρούν τη συγκέντρωση του δότη ηλεκτρονίων κάτω από την οριακή συγκέντρωση για την επίτευξη της μεθανογένεσης (Hoelen & Reinhard, 2004; Luijten et al., 2004; Yang & McCarty, 1998), ενώ το βουτυρικό οξύ διασπάται αργά παράγοντας σε μικρές ποσότητες υδρογόνο και οξικό οξύ (Fennell & Gossett, 1998; McInerney et al., 2008). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τους Mao et al. (2017), όπου δεν παρατήρησαν την παραγωγή μεθανίου σε καλλιέργειες με 2 mM θειικά ιόντα, επειδή η συγκέντρωση του υδρογόνου παρέμενε χαμηλή (10 nM) σε σχέση με το πείραμα ελέγχου που δεν περιείχε θειικά ιόντα και η συγκέντρωση υδρογόνου έφτασε τα 100 nM.

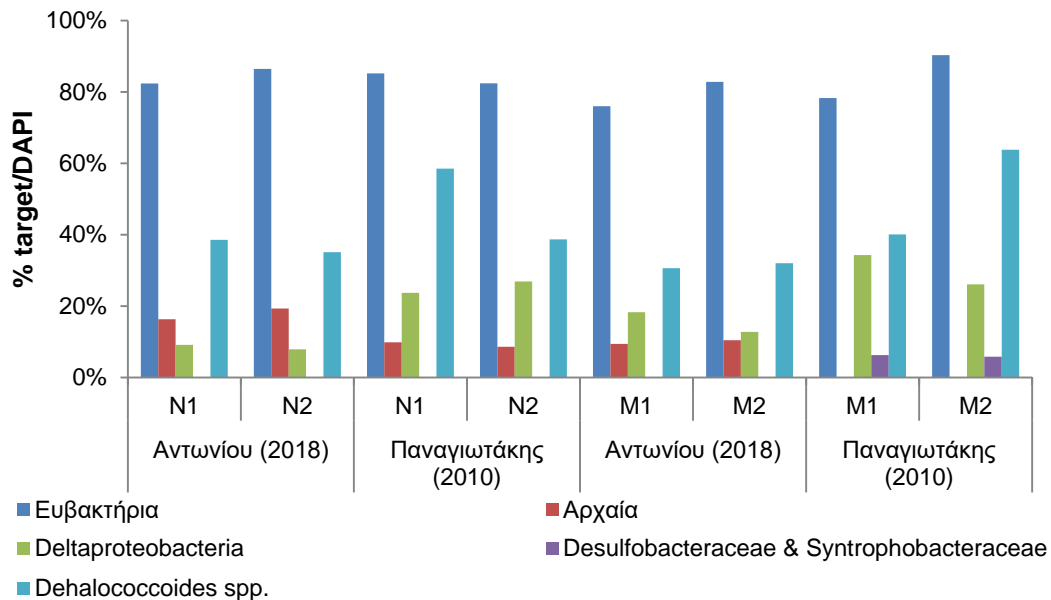
Η ύπαρξη του γένους *Acetobacterium* spp. στις καλλιέργειες με θειικά μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να αναπτύσσονται είτε άμεσα από τη ζύμωση οργανικών ουσιών είτε αυτοτροφικά χρησιμοποιώντας CO₂ και H₂ για την παραγωγή οξικού οξέος (He et al., 2007; Balch et al., 1977). Αν και τα συγκεκριμένα είδη χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας αρκετές οργανικές ουσίες, όπως φρουκτόζη, γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, κ.ά., δεν έχουν επιδείξει ανάπτυξη με τη χρήση είτε βουτυρικού οξέος είτε οξικού οξέος (Balch et al., 1977; Mayer et al., 1977). Παρόλα αυτά, έχουν τη δυνατότητα χρήσης του εκχυλίσματος ζύμης που προστίθεται με την τροφοδοσία του συστήματος στην αρχή του κάθε κύκλου (Ise et al., 2011).

Ασήμαντες συγκεντρώσεις (<10%) είχαν οι ομοταξίες των Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria και Clostridia, οι οικογένειες Desulfobacteraceae και Syntrophobacteraceae και τα γένη *Methanosarcina*, *Methanosaeta* και *Pseudomonas*. Τα Alphaproteobacteria κυμάνθηκαν μεταξύ 5-17% σε όλες τις καλλιέργειες χωρίς να υπάρχει κάποια ιδιαίτερη τάση.



Σχήμα 4.18 Σύθεση μικροβιακής κοινότητας των μητρικών καλλιεργειών N (0 mg/L SO₄²⁻), QM (150 mg/L SO₄²⁻) και M (400 mg/L SO₄²⁻).

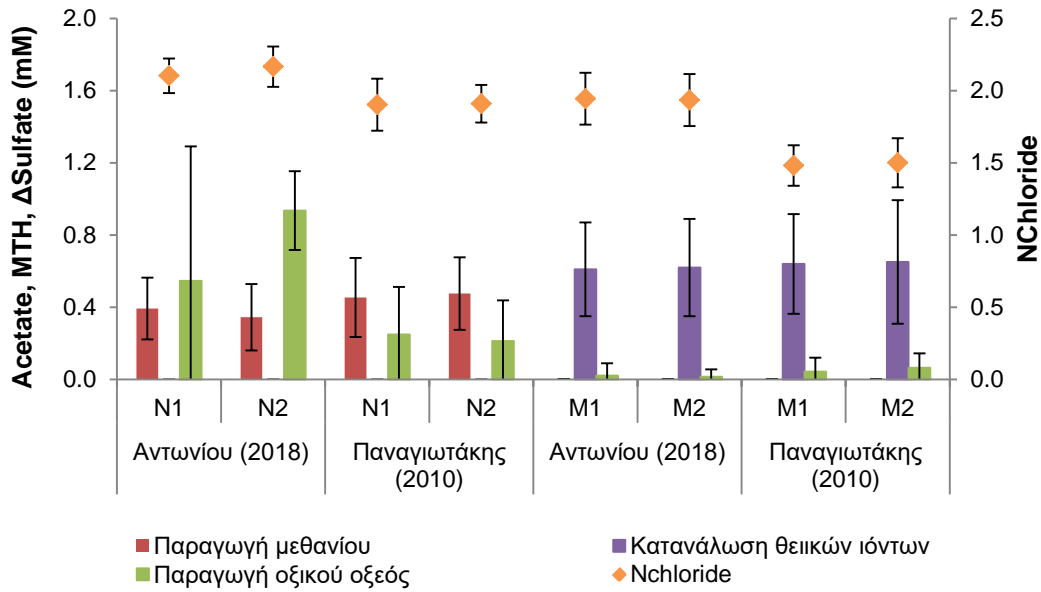
Συγκριτικά με προγενέστερες καλλιέργειες N και M που είχαν αναπτυχθεί με παρόμοιο τρόπο στο ΕΥΤ (Παναγιωτάκης, 2010), φαίνεται ότι υπήρξαν μεταβολές που επηρέασαν ελαφρώς την επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης (βλ. Σχήμα 4.20). Τα αρχαία έχουν αυξηθεί σε μικρό βαθμό, ενώ έχουν μειωθεί τα Deltaproteobacteria και το γένος *Dehalococcoides*. Οι δύο οικογένειες των αποθειωτών δεν ανιχνεύτηκαν σε αξιοσημείωτες συγκεντρώσεις και στις δύο περιπτώσεις, ενώ τα βακτήρια είναι σταθερά σε ποσοστά μεταξύ 76% με 90%, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.19. Ταυτόχρονα, από το Σχήμα 4.20 παρατηρείται μια μικρή αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών ως προς την αναγωγική αποχλωρίωση, ενώ η θειικοαναγωγή και η μεθανογένεση φαίνεται να παραμένουν στα ίδια επίπεδα. Επομένως, η μικρή μείωση των *Dehalococcoides* spp. και της ομοταξίας των Deltaproteobacteria δεν προκάλεσε την επιδείνωση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και της θειικοαναγωγής, αντίστοιχα.



Σχήμα 4.19 Σύγκριση της σύνθεσης της βιοκοινότητας των N και M καλλιεργειών (0 και 400 mg/L θειικών ιόντων, αντιστοίχως).

Περίληπτικά, όλες οι καλλιέργειες έδειξαν παρόμοια αποχλωρίωση στις 7 μέρες λειτουργίας του συστήματος με τιμές N_{cl} μεταξύ 1.93 ως 2.17. Άρα έχει επιτευχθεί η μετατροπή του cDCE σε VC σε μεγάλο βαθμό και έχει ξεκινήσει η παραγωγή του αιθενίου χωρίς να επηρεάζεται ιδιαίτερα από τα θειικά ιόντα. Όσον αφορά τις ανταγωνιστικές διεργασίες, η μεθανογένεση ήταν κυρίαρχη στις καλλιέργειες N (0 mg/L θειικών ιόντων), ενώ η θειικοαναγωγή στις QL (70 mg/L θειικών ιόντων), QM (150 mg/L θειικών ιόντων) και M (400 mg/L θειικών ιόντων), εφόσον η παραγωγή μεθανίου αναχαιτίζεται από τα θειικά ιόντα, το οποίο παρατηρείται και από τη μείωση των αρχαίων στις συγκεκριμένες καλλιέργειες.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.20 Συγκριτική αξιολόγηση της απόδοσης των καλλιεργειών χωρίς θειικά (N) και με 400 mg/L θειικών ιόντων (M) ως προς τις αναγωγικές διεργασίες.

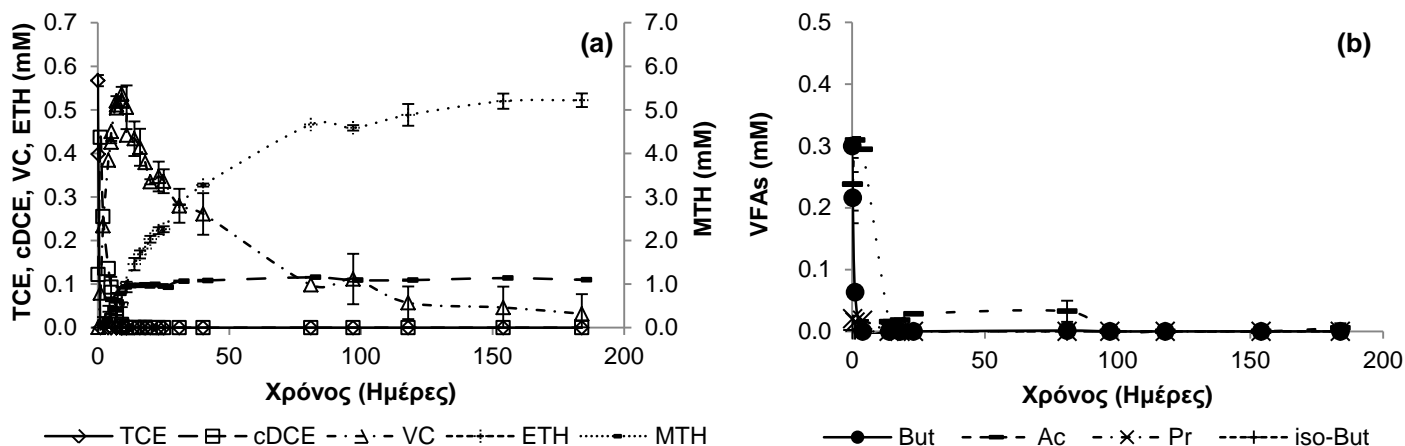
Οι μητρικές καλλιέργειες, που περιγράφηκαν παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες χρονικές στιγμές για τη διεξαγωγή πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας με στόχο τη μελέτη της επίδρασης των θειικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση του TCE. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πειραμάτων, όπου σε κάθε Ενότητα αναλύεται η απόδοση των αναγωγικών διεργασιών υπό διάφορες συγκεντρώσεις δότη ηλεκτρονίων και τελικώς πραγματοποιείται μια σύγκριση όλων των πειραμάτων για την αξιολόγηση της επίδρασης της θειικοαναγωγής.

4.2.2.2. Επίδραση μηδενικής συγκέντρωσης θειικών ιόντων

Αρχικά μελετάται η επίδοση της αποχλωρίωσης υπό μηδενική συγκέντρωση θειικών ιόντων χρησιμοποιώντας τις καλλιέργειες N για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι δόσεις βουτυρικού οξέος είχαν ως εξής: (i) 0.3 mM (NLED: N καλλιέργειες, Low Electron Donor), (ii) 2.2 mM (NQMED: N καλλιέργειες, Quasi-Medium Electron Donor), (iii) 3 mM (NMED: N καλλιέργειες, Medium Electron Donor) και (iv) 9.1 mM (NHED: N καλλιέργειες, High Electron Donor). Αν θεωρηθεί ότι η μετατροπή του 1 mole βουτυρικού οξέος αποδίδει 4 ηλεκτρόνια, η συνολική παραγωγή ηλεκτρονίων ήταν τουλάχιστον διπλάσια από τη στοιχειομετρική ζήτηση για την πλήρη αναγωγή του TCE σε αιθέριο. Εξαίρεση αποτελεί το πείραμα NLED, όπου η επάρκεια των παραγόμενων ηλεκτρονίων ήταν 40% με τη μερική οξειδωση του βουτυρικού οξέος.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Οι μέσοι όροι των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και πτητικών λιπαρών οξέων φαίνονται στα Σχήματα 4.21 ως 4.25, ενώ οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση στα δύο serum μπουκάλια. Μόνο το πείραμα NLED (I) (Σχήμα 4.23) πραγματοποιήθηκε χωρίς αντίγραφο και συνεπώς παρουσιάζονται μόνο οι μετρημένες τιμές.

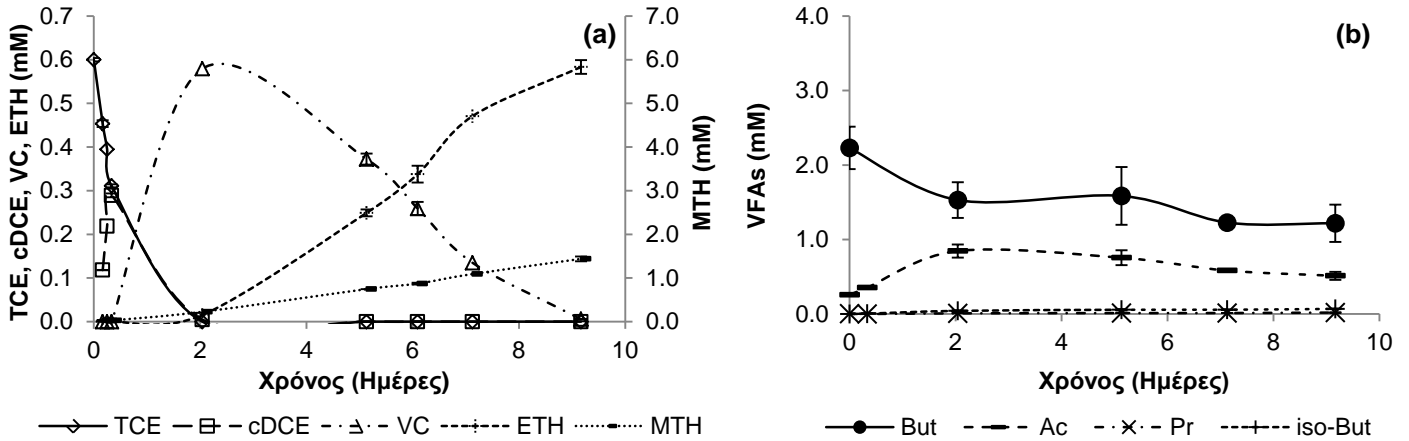


Σχήμα 4.21 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NLED (0 mM SO_4^{2-} & 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ).

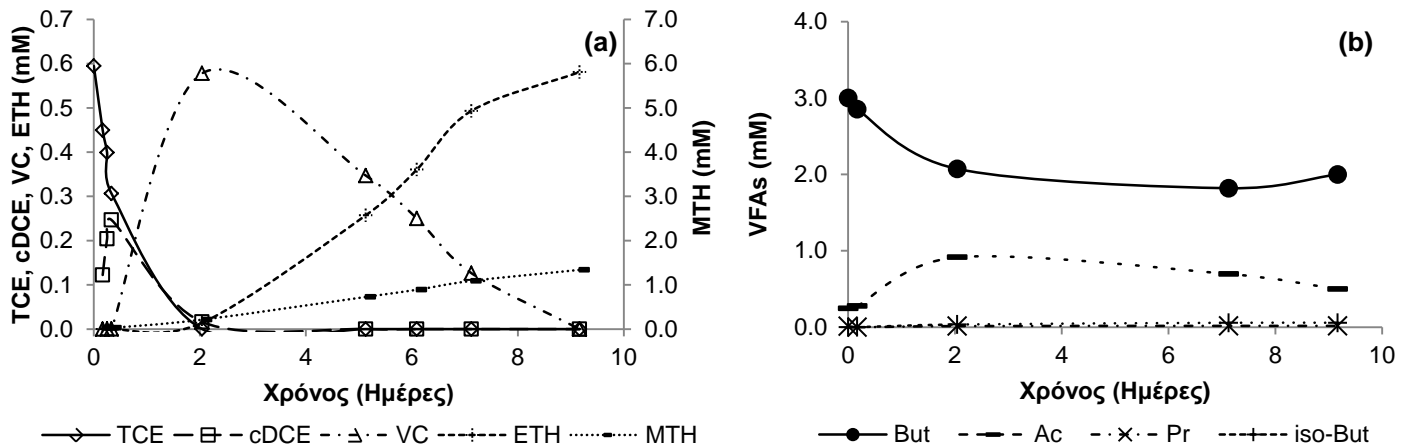
Στο Σχήμα 4.21 φαίνεται ότι στις NLED καλλιέργειες το 90% του VC μετατράπηκε σε αιθέριο, που είναι το κρίσιμο στάδιο της αποχλωρίωσης, στις 184 μέρες, ενώ η αναγωγή του TCE και του cDCE είχε πραγματοποιηθεί περίπου σε 0.5 και 7.5 μέρες λειτουργίας, αντιστοίχως. Παρότι είχε απομείνει μια μικρή συγκέντρωση VC (0.03 mM), η ποσότητα αυτή θεωρείται αρκετά χαμηλή συγκριτικά με την αρχική εισερχόμενη ποσότητα χλωριωμένων αιθενίων (5.7%). Η μεθανογένεση έφτασε σε μια μέγιστη τιμή, περίπου 1.0 mM μεθανίου, στις 14 μέρες και παρέμεινε στο ίδιο επίπεδο μέχρι το τέλος του πειράματος. Όσον αφορά τα πτητικά λιπαρά οξέα, το βουτυρικό οξύ φάνηκε ότι μετατράπηκε από την πρώτη μέρα και παράχθηκε οξικό οξύ. Όμως, ενώ η αναμενόμενη συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν 0.6 mM, εφόσον 1 mole βουτυρικού οξέος οξειδώνεται σε 2 mole οξικού οξέος και 2 mole υδρογόνου, η μέγιστη τιμή που μετρήθηκε ήταν 0.31 mM. Επομένως, η κατανάλωση του οξικού οξέος ξεκίνησε από την πρώτη μέρα λειτουργίας και όλη η ποσότητα είχε εξαφανιστεί ως την 14^η μέρα. Παρότι ο δότης ηλεκτρονίων είχε πλέον καταναλωθεί και η μεθανογένεση είχε σταματήσει, η αναγωγή του VC συνεχίστηκε με έναν πιο αργό ρυθμό ως την 184^η μέρα. Η αργή αποχλωρίωση θεωρείται ότι προκλήθηκε από την φθορά της βιομάζας, εφόσον ~18.9 mg VSS/L καταστράφηκαν παράγοντας ταυτόχρονα 3.3 meq/L, αν θεωρηθεί ότι 1 mole $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ (γενικός χημικός τύπος κυττάρου) αποδίδει 20 meq. Τη χρήση της νεκρής βιομάζας ως δότη ηλεκτρονίων για

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

την αναγωγική αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθενίων μελέτησαν οι Yang & McCarty (2000) και οι Sleep et al. (2005). Οι τελευταίοι έδειξαν ότι η μετατροπή του PCE σε cDCE συνεχίστηκε για ένα χρόνο με σταθερό ρυθμό υπό απουσία δότη ηλεκτρονίων. Επομένως, η φθορά φαίνεται να παρέχει θρεπτικά και ηλεκτρόνια για την παραγωγή νέων κυττάρων και τη συντήρηση των αναγωγικών διεργασιών.



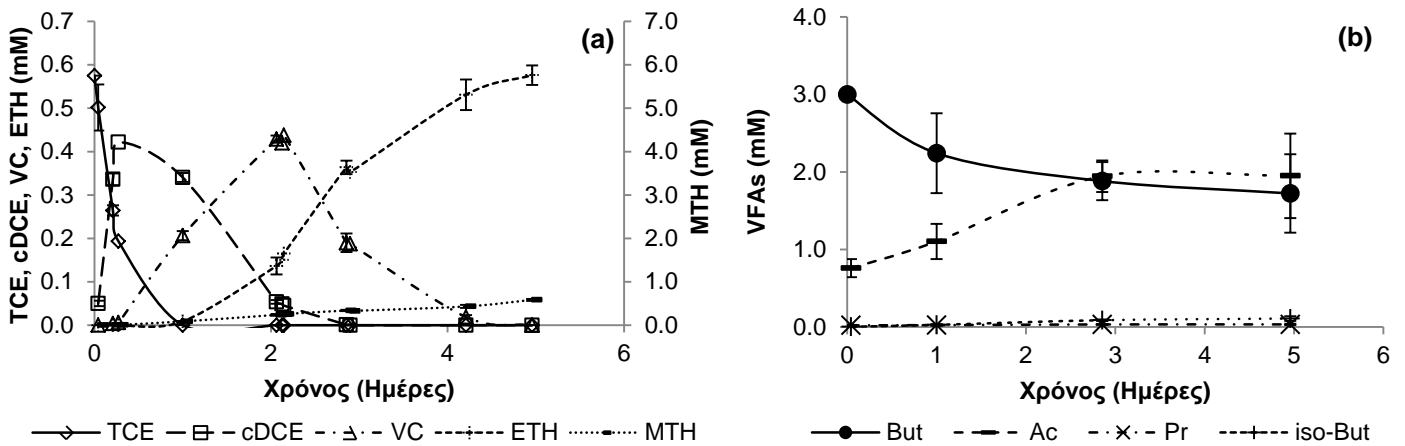
Σχήμα 4.22 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NQMED (0 mM SO_4^{2-} & 2.2 mM But, βουτυρικό οξύ).



Σχήμα 4.23 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NMED (I) (0 mM SO_4^{2-} & 3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).^a

^a Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε ένα μόνο serum μπουκάλι.

Πλήρης αποχλωρίωση επιτεύχθηκε σε μόλις 9 μέρες λειτουργίας στα πειράματα NQMED και NMED (I) (Σχήματα 4.22 και 4.23). Το TCE εξαφανίστηκε την πρώτη μέρα και το cDCE την δεύτερη μέρα, ενώ η συγκέντρωση του μεθανίου έφτασε περίπου την τιμή 1.4 mM και στα δύο πειράματα. Επιπλέον, φαίνεται ότι 1 mM βουτυρικού οξέος οξειδώθηκε, ενώ το οξικό οξύ που παρέμεινε ήταν 0.5 mM και στα δύο πειράματα. Έτσι, η παραγωγή ηλεκτρονίων ήταν η ίδια, δηλαδή περίπου 16.6 meq/L, παρότι, η αρχική δόση δότη που προστέθηκε ήταν διαφορετική. Από τα παραπάνω μπορεί να εξαχθεί ότι, δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά όταν εισήχθησαν οι δύο διαφορετικές δόσεις, 2.2 mM και 3.0 mM βουτυρικού οξέος, και η όμοια απόδοση που έδειξαν τα δύο πειράματα στη μεθανογένεση και την αναγωγική αποχλωρίωση αποδίδεται στην παραγωγή ίσης ποσότητας ηλεκτρονίων από τις διεργασίες οξείδωσης των πτητικών λιπαρών οξέων.

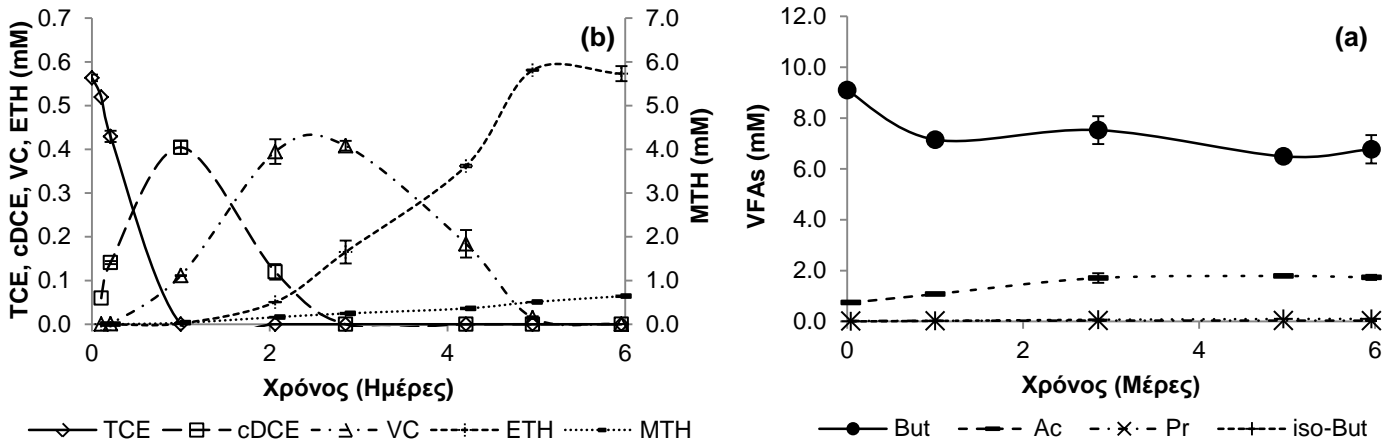


Σχήμα 4.24 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NMED (II) (0 mM SO_4^{2-} & 3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).

Όπως παρατηρείται στα Σχήματα 4.24a και 4.25a (NMED(II) και NHED), το 90% του VC είχε αναχθεί στις 4 και τις 5 μέρες, αντιστοίχως. Η μικρή καθυστέρηση της αποχλωρίωσης που έδειξε το σύστημα όταν η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος ήταν 3 φορές μεγαλύτερη, είχε προκληθεί από το πρώτο βήμα της διαδικασίας, δηλαδή από τη μετατροπή του TCE σε cDCE. Πιο συγκεκριμένα, το TCE είχε εξαλειφθεί σε 12 ώρες με τη μέση δόση δότη ηλεκτρονίων και την πρώτη μέρα με την υψηλή δόση. Η μικρή καθυστέρηση που παρατηρήθηκε μπορεί να οφείλεται στην μικρή διαφορά του pH υπό 9.1 mM βουτυρικού οξέος, το οποίο ήταν 6.28 ± 0.03 στο τέλος του πειράματος, ενώ υπό 3 mM ήταν 6.55 ± 0.12 . Αν και τα δύο πειράματα ήταν εντός του αποδεκτού εύρους για την ανάπτυξη των αποχλωριωτών (Parsons, 2004), οι ρυθμοί των βιολογικών διεργασιών ευνοούνται περισσότερο από ουδέτερο pH, δηλαδή μεταξύ 6.5-7.5 (McCarty et al., 2007; Adamson et al., 2004). Αν και τα

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

πειράματα NMED (II) και NHED πραγματοποιήθηκαν με τις ίδιες αρχικές συνθήκες μητρικής καλλιέργειας, η μικρή καθυστέρηση της αναγωγής δείχνει μια τάση αλλά δεν θεωρείται αξιοσημείωτη.



Σχήμα 4.25 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NHED (0 mM SO_4^{2-} & 9.1 mM But, βουτυρικό οξύ).

Όσον αφορά τη μεθανογένεση, ήταν παρόμοια στα δύο πειράματα: 0.55 mM μεθανίου παράχθηκαν την 5^η μέρα. Όμως, εξαιτίας της μιας επιπλέον μέρας λειτουργίας του συστήματος με την υψηλή δόση, η τελική συγκέντρωση μεθανίου έφτασε τα 0.64 mM. Επιπρόσθετα, η αποδόμηση του βουτυρικού οξέος δεν πραγματοποιήθηκε πλήρως, εφόσον όταν εισήχθηκε η μέση δόση δότη ηλεκτρονίων περίπου 1.1 mM βουτυρικού οξέος και 0.32 mM οξικού οξέος οξειδώθηκαν, οπότε παράχθηκαν 7.1 meq/L. Όμως, στο πείραμα με την υψηλή δόση, καταναλώθηκαν 2.2 mM βουτυρικού και 2.7 mM οξικού οξέος, δηλαδή η διπλάσια και η οχταπλάσια ποσότητα, αντιστοίχως. Ως αποτέλεσμα, η απόδοση ηλεκτρονίων ήταν περίπου 30 meq/L, ενώ η αντίστοιχη χρήση ηλεκτρονίων μόλις 9.5 meq/L. Έτσι, ενώ η διαφορά που παρατηρήθηκε στην απόδοση των αναγωγικών διεργασιών ήταν μικρή, φαίνεται να υπάρχει μεγάλη απόκλιση στην παραγωγή των ηλεκτρονίων.

Τα παραπάνω συνοψίζονται στον Πίνακα 4.4, όπου παρουσιάζεται το ισοζύγιο ηλεκτρονίων των πειραμάτων με μηδενική συγκέντρωση θειικών ιόντων που περιγράφηκαν.

Τα πειράματα NLED, NQMED και NMED (I) είχαν καλή ανάκτηση ηλεκτρονίων, εφόσον βρίσκονταν εντός του αποδεκτού εύρους 75-125%. Όμως, τα διπλά αντίτυπα των NMED (II) και NHED έδειξαν χαμηλή ανάκτηση, δηλαδή η ποσότητα ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν μικρότερη της ποσότητας που παράχθηκε. Ταυτόχρονα, όλα τα πειράματα στα οποία ο δότης ηλεκτρονίων ήταν σε επάρκεια,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

δηλαδή όταν η δόση δότη ήταν 2.2 mM, 3 mM και 9.1 mM, έδειξαν ότι η κατανάλωση του βουτυρικού οξέος πραγματοποιήθηκε την πρώτη μέρα, χωρίς όμως να υπάρχει η αντίστοιχη παραγωγή οξικού οξέος ή η ανάλογη χρήση ηλεκτρονίων από τις αναγωγικές διεργασίες. Μετέπειτα, η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος παρέμεινε σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, παρότι η αναγωγική αποχλωρίωση και η μεθανογένεση συνέχισαν να δρουν με τον ίδιο ρυθμό.

Πίνακας 4.4 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με μηδενική συγκέντρωση θειικών.

Πείραμα	NLED	NQMED	NMED (I)	NMED (II)	NHED
$\% \frac{\sum e^-_{\text{αποχλωρίωση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	27±0%	22±1%	25%	41±2%	34±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{μεθανογένεση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	73±0%	72±1%	75%	55±4%	50±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{παραγωγή βιομάζας}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$		6±2%		4±6%	16±0%
$\sum e^-_{\text{αποδέκτης}} \left(\frac{meq}{L} \right)$	12.1±0.1	16.0±0.9	14.2	8.5±0.8	10.2±0.3
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση οξικού οξέος}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	60±7%	78±0%	76%	66±2%	70±5%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση βουτυρικού οξέος}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	11±1%	22±0%	24%	34±2%	30±5%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση βιομάζας}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	29±8%				
$\sum e^-_{\text{δότης}} \left(\frac{meq}{L} \right)$	11.2±1.3	16.5±0.3	16.7	13.7±1.0	30.0±12.1
% Ανάκτηση	108±11%	97±8%	85%	63±11%	37±14%

Η εξαφάνιση του βουτυρικού οξέος και η φαινομενική αυξημένη χρήση ηλεκτρονίων από την πρώτη μέρα των πειραμάτων θεωρείται ότι οφείλεται στην ικανότητα των μικροοργανισμών να δημιουργούν αλυσίδες πολυυδροξυβουτυρικού οξέος (Polyhydroxybutyrate; PHB) εντός κυττάρου, όπως συζητείται στην Ενότητα 4.2.2.8, με αποτέλεσμα η κατανάλωση ηλεκτρονίων και η οξείδωση του βουτυρικού οξέος να υπερεκτιμάται ιδιαίτερα τις αρχικές μέρες των πειραμάτων. Έτσι, το βουτυρικό οξύ θεωρείται ότι μεταφέρεται από τη διαλυτή φάση εντός των μικροοργανισμών, αποθηκεύεται ενδοκυτταρικά και καταναλώνεται σταδιακά.

Επίσης, όταν το πείραμα με συγκέντρωση δότη ηλεκτρονίων 3.0 mM επαναλήφθηκε (βλ. Σχήματα 4.23 και 4.24), η πλήρης αναγωγή σε αιθέριο επιτεύχθηκε σε διαφορετικές μέρες λειτουργίας. Αναλυτικότερα, ο απαιτούμενος χρόνος στα δύο πειράματα ήταν 5 και 9 ημέρες, με αποτέλεσμα στο πείραμα NMED (I) που είχε μεγαλύτερη διάρκεια, ο αποθηκευμένος δότης εντός του κυττάρου να χρησιμοποιείται για την παραγωγή μεθανίου. Επομένως, το πείραμα NMED (I) με 9 ημέρες λειτουργίας έδειξε αυξημένη συγκέντρωση μεθανίου κατά 230% και καλύτερη ανάκτηση ηλεκτρονίων από ότι το πείραμα NMED (II) που διήρκησε 5 ημέρες.

Η απόκλιση στις απαιτούμενες ημέρες λειτουργίας των δύο πειραμάτων μάλλον οφείλεται στις διαφορετικές αρχικές συνθήκες μητρικής καλλιέργειας. Κατά τη διάρκεια συλλογής της βιομάζας για την παρασκευή των μικρόκοσμων NQMED και NMED (I), στις μητρικές καλλιέργειες N παρατηρήθηκε η συσσώρευση μιας μικρής ποσότητας αιθενίου. Επιπλέον, η N1 είχε υψηλή παραγωγή μεθανίου, ενώ η συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν αμελητέα. Αντιθέτως, κατά τη δημιουργία των πειραμάτων NMED (II) και NHED, είχε απομείνει μια ποσότητα cDCE στις δύο καλλιέργειες, ενώ στην N1 το οξικό οξύ έφτασε τα 2.5 mM και τα επίπεδα μεθανίου ήταν χαμηλά. Η N2 δεν επέδειξε κάποια διαφορά στις συγκεντρώσεις μεθανίου και οξικού οξέος κατά τη δειγματοληψία σε αυτές τις δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές, όμως η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από μίγμα των δύο μητρικών καλλιεργειών και σαφώς επηρεάστηκε από την ανόμοια εικόνα της N1. Επομένως, φαίνεται ότι, τη στιγμή εκκίνησης των πειραμάτων, η κατάσταση της καλλιέργειας N1 και η συγκέντρωση οξικού οξέος ήταν διαφορετικές.

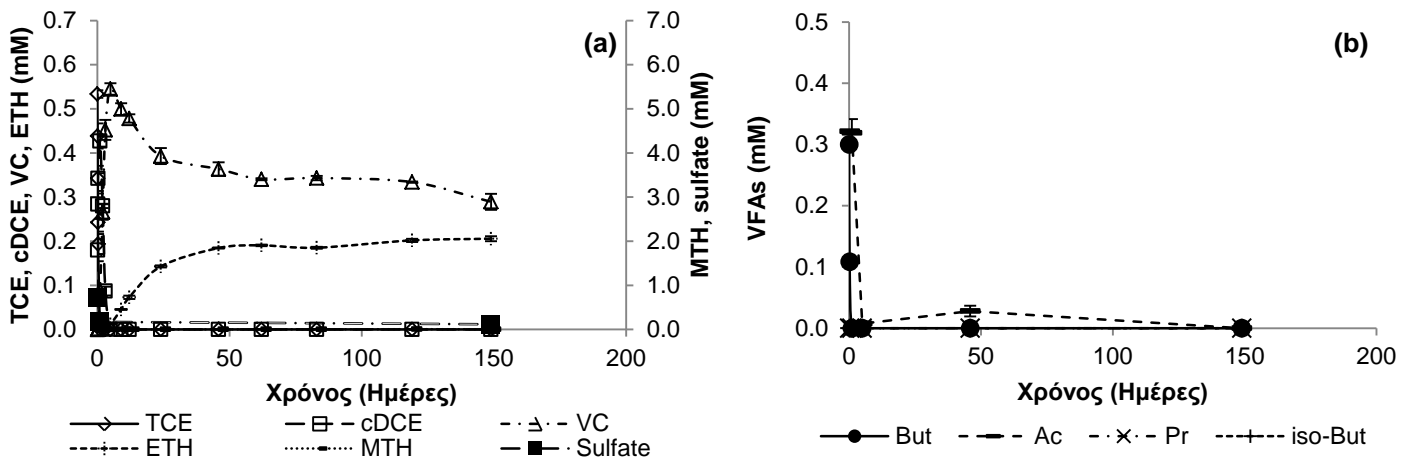
Συμπερασματικά, η μετατροπή του TCE σε αιθέριο πραγματοποιήθηκε σε όλες τις δόσεις δότη ηλεκτρόνιων, όμως η ταχύτητα αποχλωρίωσης άρα και ο απαιτούμενος χρόνος επίτευξης διέφεραν σημαντικά. Όταν η αρχική ποσότητα του δότη ήταν επαρκής για την πλήρη αποχλωρίωση κατά ~300%, 400% και 1200%, θεωρώντας ότι πραγματοποιείται μερική οξειδωση του βουτυρικού οξέος, το VC εξαφανίστηκε σε 5 με 9 ημέρες, αντιθέτως όταν ο δότης κάλυπτε το 40% των αναγκών για αποχλωρίωση, χρειάστηκαν 184 ημέρες για τη μετατροπή όλων των χλωριωμένων αιθενίων. Όμως, η υψηλή δόση δότη, 9.1 mM, δεν φάνηκε να βελτιώνει τον ρυθμό της αποχλωρίωσης, αλλά να προκαλεί μια μικρή καθυστέρηση στη μετατροπή του TCE. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τους El Mamouni et al. (2002), οι οποίοι βρήκαν ότι η αποχλωρίωση ευνοείται όταν η δόση δότη κυμαίνεται στα 100 mg/L COD, δηλαδή 12.5 meq/L.

Η προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων δότη για να επιτευχθεί η επιθυμητή πλήρης αποχλωρίωση, οι οποίες αυξάνουν σημαντικά το κόστος της αποκατάστασης (Yang & McCarty, 1998) δεν είναι σκόπιμο να εφαρμόζεται. Ταυτόχρονα η πρακτική αυτή οδηγεί σε αύξηση της βιοκοινότητας προκαλώντας εμφράξεις κοντά στα σημεία εγχύσεων, ενώ μπορεί να συσσωρευτούν επικίνδυνα προϊόντα όπως το υδρόθειο και το μεθάνιο (Lee et al., 2007a). Προσθήκη δότη κατά 300% ή και λιγότερο της στοιχειομετρικά απαιτούμενης ποσότητας για την πλήρη αποχλωρίωση φαίνεται να υπερεπαρκεί για την πλήρη απομάκρυνση όλων μετατροπή όλων των χλωριωμένων αιθενίων και την διατήρηση υψηλών ρυθμών αποχλωρίωσης. Επιπλέον, η προσθήκη μικρής ποσότητας δότη, μικρότερης της στοιχειομετρικά απαιτούμενης ποσότητας για την πλήρη αποχλωρίωση, οδηγεί στη χρήση της νεκρής βιομάζας ως κύριας πηγής ηλεκτρονίων και στην περιορισμένη παραγωγή μεθανίου (Adrian & Löffler, 2016). Σύμφωνα με τα παραπάνω, η επιτυχημένη βιοαποκατάσταση εξαρτάται από τον προσεκτικό σχεδιασμό της δόσης δότη έτσι ώστε οι ρύποι να απομακρύνονται γρήγορα, ενώ τα επίπεδα μεθανίου να παραμείνουν χαμηλά (Heimann et al., 2007).

4.2.2.3. Επίδραση 70 mg/L θειικών ιόντων

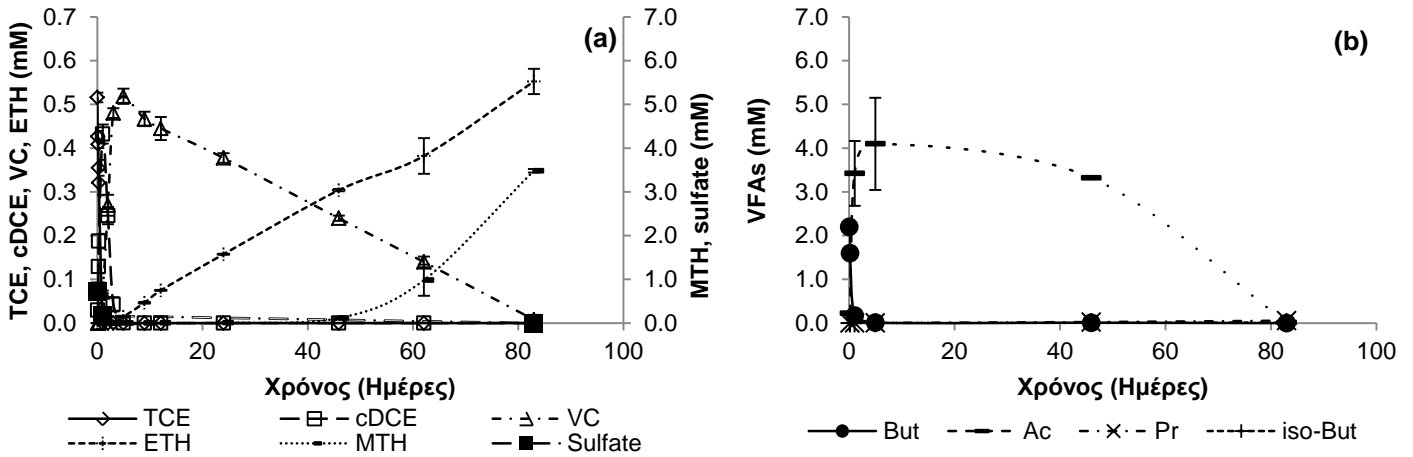
Στην παρούσα Ενότητα αναλύεται η επίδοση της αποχλωρίωσης υπό αρκετά χαμηλή συγκέντρωση θειικών ιόντων χρησιμοποιώντας τις καλλιέργειες QL για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Οι δόσεις βουτυρικού οξέος είχαν ως εξής: (i) 0.3 mM (QLLED: QL καλλιέργειες, Low Electron Donor), (ii) 2.2 mM (QLQMED: QL καλλιέργειες, Quasi-Medium Electron Donor). Οι συγκεκριμένες δόσεις επιλέχθηκαν με το εξής σκεπτικό: α) για να ελεγχθεί αν οι αποχλωριωτές μπορούν να ανταγωνιστούν υπό χαμηλή δόση δότη ηλεκτρονίων τους αποθειωτές, εφόσον τα 0.3 mM βουτυρικού οξέος αποδίδουν το 40% της απαιτούμενης ποσότητας για την πλήρη αναγωγή του TCE σε αιθένιο και β) για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης της αποχλωρίωσης όταν ο δότης είναι 100% επαρκής για την πλήρη αναγωγή του TCE και των θειικών ιόντων. Οι παραπάνω υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν θεωρώντας ότι το βουτυρικό οξύ οξειδώνεται μερικώς, δηλαδή 1 moles βουτυρικού οξέος αποδίδει 4 ηλεκτρόνια.

Στα Σχήματα 4.26 ως 4.27 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και πτητικών λιπαρών οξέων και η τυπική απόκλιση από τα διπλότυπα μπουκάλια.



Σχήμα 4.26 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QLLED (0.73 mM SO_4^{2-} & 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.27 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QLQMED (0.73 mM SO_4^{2-} & 2.2 mM But, βουτυρικό οξύ).

Στο πείραμα με 0.3 mM βουτυρικού οξέος (QLLED; Σχήμα 4.26a), το TCE μηδενίστηκε σε περίπου 12 ώρες και το cDCE την 5^η ημέρα. Μετά την πάροδο 46 ημερών, όλο το TCE είχε μετατραπεί σε VC και αιθέριο σε ποσοστά 66% και 34% του συνόλου των χλωριωμένων αιθενίων, αντίστοιχα, όταν η δόση δότη είναι χαμηλή. Τα ποσοστά αυτά παρέμειναν σταθερά ως το τέλος του πειράματος, δηλαδή ως την 149^η ημέρα, χωρίς δηλαδή να πραγματοποιηθεί περαιτέρω σημαντική αποχλωρίωση, εξαιτίας της εξάντλησης των πτητικών λιπαρών οξέων και της χρήσης της βιομάζας ως πηγής ηλεκτρονίων. Την 1^η ημέρα τα θειικά ιόντα μειώθηκαν κατά 76.7%, ενώ μέχρι το τέλος του πειράματος είχαν παραμείνει 0.12 mM. Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος δεν ανιχνεύτηκε μεθάνιο, εφόσον, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, οι θεικοαναγωγικοί μικροοργανισμοί διατηρούν τη συγκέντρωση του υδρογόνου κάτω από την ελάχιστη οριακή συγκέντρωση για τη μεθανογένεση (Yang & McCarty, 1998; Stams et al., 2005).

Το πείραμα με 2.2 mM βουτυρικού οξέος (QLQMED; Σχήμα 4.27) ολοκληρώθηκε στις 83 ημέρες με την πλήρη μετατροπή του TCE σε αιθέριο. Το TCE, το cDCE και το VC εξαφανίστηκαν την 1^η, την 5^η και την 83^η, αντιστοίχως. Όσον αφορά τη μεθανογένεση, μικρές ποσότητες μεθανίου εμφανίστηκαν την 46^η ημέρα φτάνοντας τα 3.5 mM, χρησιμοποιώντας 28 meq/L. Ταυτόχρονα άρχισε η ραγδαία πτώση του οξικού οξέος. Συγκεκριμένα, καταναλώθηκαν περίπου 3.3 mM, δηλαδή 26.4 meq/L. Η υστέρηση αυτή στην παραγωγή του μεθανίου έχει παρατηρηθεί και σε άλλες έρευνες, ενώ έχει αποδοθεί στην αναχαίτιση των μεθανογόνων αρχαίων παρουσία των θειικών ιόντων και σουλφιδίων (Hoelen & Reinhard, 2004; Pantazidou et al., 2012). Η θεικοαναγωγή ξεκίνησε από την 1^η μέρα καταλώνοντας 0.56 mM θειικών ιόντων, όπως ακριβώς και στη χαμηλή δόση βουτυρικού οξέος, αλλά η συγκέντρωσή τους είχε μηδενιστεί μέχρι το τέλος του πειράματος.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Τα ισοζύγια ηλεκτρονίων των δύο πειραμάτων με 70 mg/L θειικών ιόντων φαίνονται στον Πίνακα 4.5. Η κυρίαρχη αναγωγική διεργασία ήταν διαφορετική στα δύο πειράματα, στο QLLED ήταν η θειικοαναγωγή με ποσοστό 67% ± 2%, ενώ στο QLQMED ήταν η μεθανογένεση (75% ± 0%), η οποία ξεκίνησε την 46^η ημέρα. Η οξειδωση του οξικού οξέος ήταν η κύρια πηγή ηλεκτρονίων και στις δύο δόσεις δότη, αλλά στο πείραμα με 0.3 mM βουτυρικού οξέος, η νεκρή βιομάζα συνείσφερε κατά 22% στη συνολική παραγωγή ηλεκτρονίων.

Πίνακας 4.5 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με 70 mg/L θειικών.

Πείραμα	QLLED	QLQMED
$\% \frac{\sum e^-_{\text{αποχλωρίωση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	33±2%	9±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{μεθανογένεση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	0±0%	75±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{θειικοαναγωγή}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	67±2%	16±0%
$\sum e^-_{\text{αποδέκτης}} \left(\frac{meq}{L} \right)$	7.3±0.1	37.0±0.2
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση οξικού οξέος}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	62±0%	80±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση βουτυρικού οξέος}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	16±0%	20±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση βιομάζας}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	22±0%	
$\sum e^-_{\text{δότης}} \left(\frac{meq}{L} \right)$	7.7±0.0	42.6±0.4
% Ανάκτηση	95±0%	87±0%

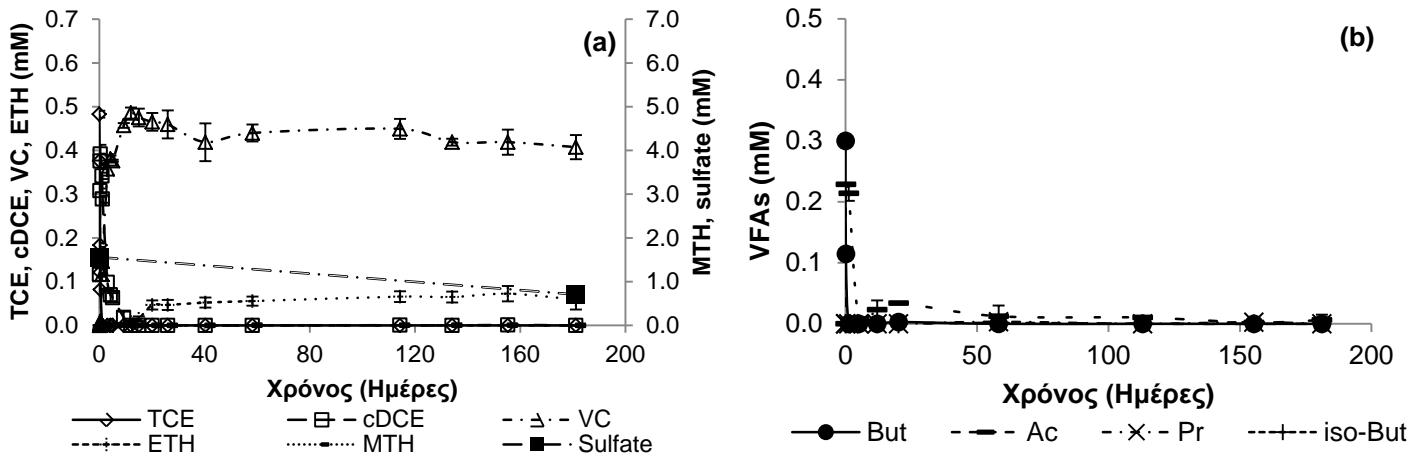
4.2.2.4. Επίδραση 150 mg/L θειικών ιόντων

Παρακάτω αναλύεται η επίδραση των 150 mg/L θειικών ιόντων, όπου οι καλλιέργειες QM χρησιμοποιήθηκαν ως η κατάλληλα εγκλιματισμένη βιοκοινότητα στην αρκετά υψηλή συγκέντρωση θειικών ιόντων. Οι δόσεις βουτυρικού οξέος που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής: (i) 0.3 mM (QMLED: QM καλλιέργειες, Low Electron Donor), (ii) 0.9 mM (QMQLLED: QM καλλιέργειες, Quasi-Low Electron Donor), (iii) 3.0 mM (QMMED: QM καλλιέργειες, Medium Electron Donor) και (iv) 9.1 mM (QMHEd: QM καλλιέργειες, High Electron Donor). Οι συγκεκριμένες δόσεις επιλέχθηκαν με στόχο την βελτιστοποίηση της αναγωγικής αποχλωρίωσης με την ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα δότη ηλεκτρονίων. Αναλυτικότερα, η χαμηλή δόση δότη, 0.3 mM βουτυρικού οξέος, παράγει το 40% των απαιτούμενων ηλεκτρονίων για την πλήρη αποχλωρίωση του TCE. Επιπλέον, η συνολική παραγωγή ηλεκτρονίων των QMQLLED, QMMED και QMHEd πειραμάτων ήταν περίπου μια, τέσσερις και δώδεκα φορές μεγαλύτερη, αντιστοίχως, από τη στοιχειομετρική ζήτηση για την αναγωγή του

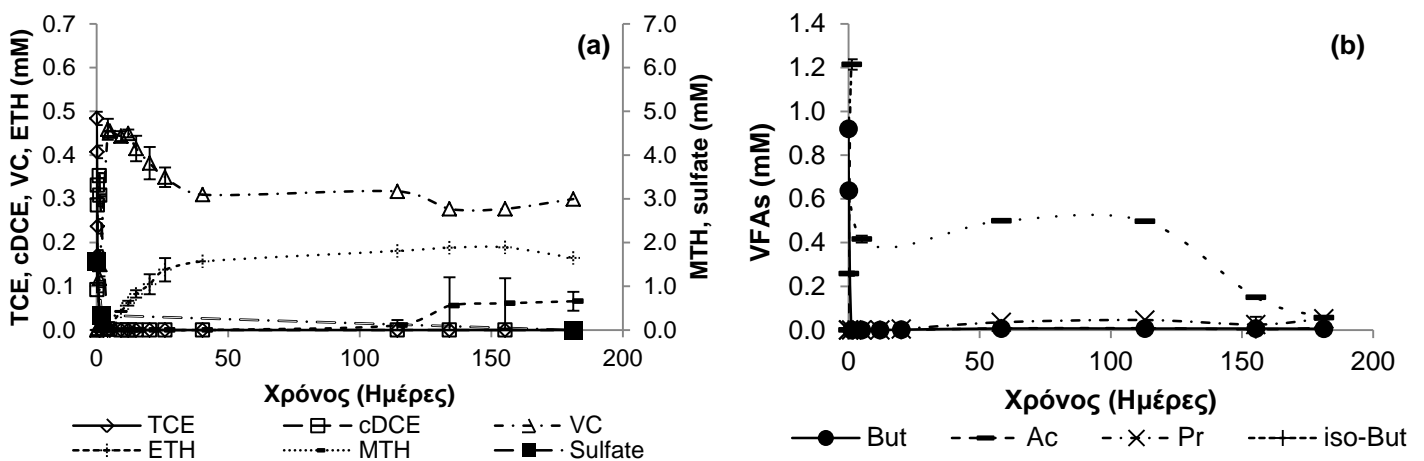
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

TCE σε αιθέριο. Οι παραπάνω υπολογισμοί έγιναν με την υπόθεση ότι το βουτυρικό οξύ οξειδώνεται μερικώς αποδίδοντας 4 ηλεκτρόνια/mole.

Στα Σχήματα 4.28 ως 4.31 φαίνονται οι μέσες τιμές από τις μετρήσεις των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και πτητικών λιπαρών οξέων και οι υπολογισμένες τυπικές αποκλίσεις στα διπλότυπα serum μπουκάλια.

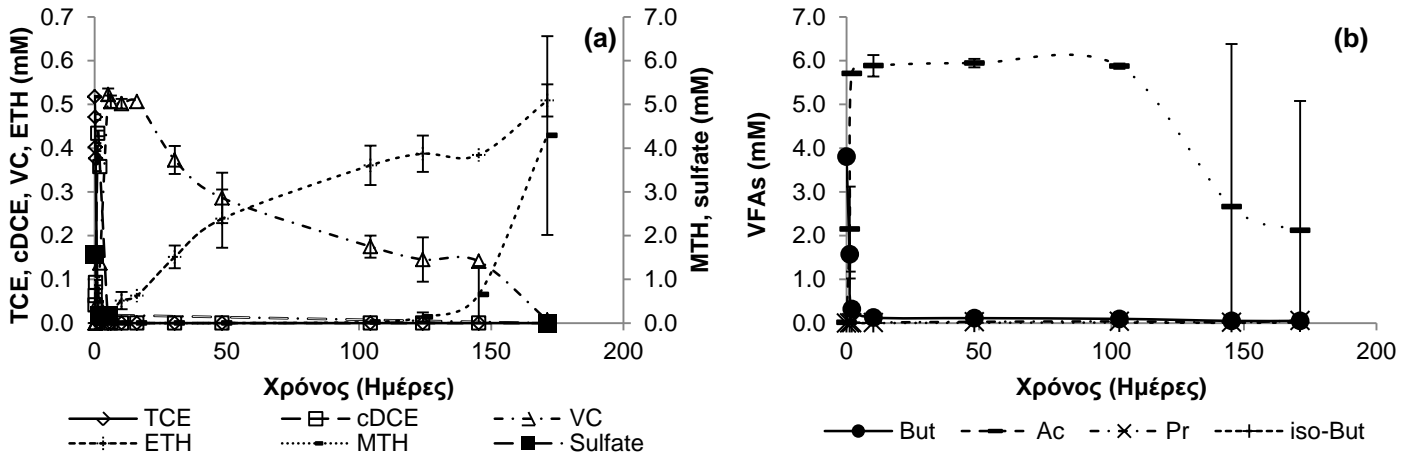


Σχήμα 4.28 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QMLED (1.56 mM SO_4^{2-} & 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ).

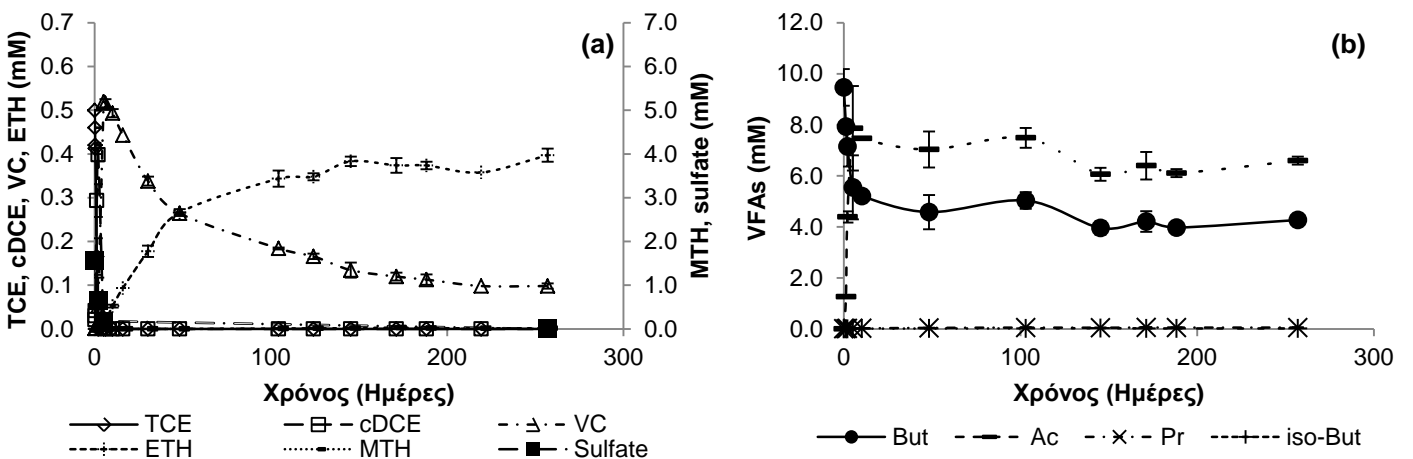


Σχήμα 4.29 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QMQLED (1.56 mM SO_4^{2-} & 0.9 mM But, βουτυρικό οξύ).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.30 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QMMED (1.56 mM SO_4^{2-} & 3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).



Σχήμα 4.31 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα QMHED (1.56 mM SO_4^{2-} & 9.1 mM But, βουτυρικό οξύ).

Στα πειράματα με τις δύο χαμηλές συγκεντρώσεις βουτυρικού οξέος, 0.3 mM και 0.9 mM (Σχήματα 4.28 & 4.29), το TCE εξαφανίστηκε την 1^η ημέρα, ενώ το cDCE στις 12 και τις 4 ημέρες, αντίστοιχα. Ωστόσο, φαίνεται ότι δεν επιτεύχθηκε η πλήρης αποχλωρίωση, καθώς το 82% και το 60% του αρχικού TCE είχε αναχθεί σε VC στις 181 ημέρες λειτουργίας, ενώ το υπόλοιπο είχε μετατραπεί σε αιθέριο. Ταυτόχρονα, τα θειικά μειώθηκαν κατά 55% στο πείραμα QMLD και δεν ανιχνεύθηκε μεθάνιο, αλλά όταν η δόση σχεδόν τριπλασιάστηκε, όλα τα θειικά μετατράπηκαν σε σουλφίδια και μετά την 114^η ημέρα υπήρξε μια μικρή παραγωγή μεθανίου που έφτασε τα 0.66 mM. Στο τέλος των πειραμάτων μετρήθηκαν τα σουλφίδια, σε συγκεντρώσεις 1.33 ± 0.04

mM (1.07 mM στην υγρή φάση) και 1.78 ± 0.24 mM (1.43 mM στην υγρή φάση), για τη δόση 0.3 mM και 0.9 mM, αντιστοίχως, ενώ η ανακτήση ήταν 114% και για τα δύο πειράματα. Ελαφρές διακυμάνσεις οξικού οξέος παρατηρήθηκαν, οι οποίες μπορεί να προκλήθηκαν είτε από την αποδόμηση των πολυυδροξυβουτυρικών αλυσίδων εντός κυττάρου και την έκκριση μικροποσοτήτων στην υγρή φάση (Heavner et al., 2013), είτε από τη διάλυση της νεκρής βιομάζας και τη μετατροπή του περιεχόμενου οργανικού υλικού σε οξικό οξύ.

Όσον αφορά τις υψηλότερες δόσεις, το TCE και το cDCE μηδενίστηκε την 1^η ημέρα και την 5^η ημέρα, αντιστοίχως (Σχήματα 4.30 & 4.31). Όμως, πλήρη αποχλωρίωση έδειξε μόνο το πείραμα με 3 mM βουτυρικού οξέος στις 171 ημέρες λειτουργίας. Στο πείραμα QMHED, η συγκέντρωση του VC μετά τις 145 ημέρες σχεδόν σταθεροποιήθηκε, με αποτέλεσμα να παραμείνει περίπου 0.1 mM VC, δηλαδή το 20% του αρχικού TCE, μετά την πάροδο 257 ημερών. Το 89% των θειικών ιόντων είχε αναχθεί εντός 5 ημερών και στις δύο δόσεις δότη, ενώ μέχρι το τέλος των πειραμάτων η συγκέντρωση των θειικών ήταν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης και όλη η ποσότητα είχε ανακτηθεί με τη μορφή σουλφιδίων. Η παραγωγή μεθανίου παρατηρήθηκε μόνο στο πείραμα QMMED, η οποία συνοδεύτηκε από την κατανάλωση του οξικού οξέος, αλλά έδειξε μεγάλη διαφορά μεταξύ των διπλότυπων μπουκαλιών. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του μεθανίου την τελευταία ημέρα ήταν 5.9 mM στο ένα μπουκάλι, ενώ είχε καταναλωθεί όλο το παραγόμενο οξικό οξύ. Στο δεύτερο μπουκάλι υπήρξε μια καθυστέρηση στην εκκίνηση της μεθανογένεσης με αποτέλεσμα το μεθάνιο να φτάσει τα 2.7 mM και να παραμένουν περίπου 4.2 mM οξικού οξέος. Το μεγάλο εύρος των συγκεντρώσεων δείχνει ότι υπάρχει μια εξίσου μεγάλη διακύμανση στη βιοκοινότητα της καλλιέργειας υπό την επίδραση της θεικοαναγωγής. Επιπλέον, στην υψηλή δόση δότη, μεγάλο μέρος του βουτυρικού και οξικού οξέος καταναλώθηκε γρήγορα στην αρχή του πειράματος, αλλά ο ρυθμός οξειδωσής τους μετά μειώθηκε. Μετά την 145^η ημέρα, η συγκέντρωσή τους σταθεροποιήθηκε, ενώ παρομοίως οι αναγωγικές διεργασίες δεν έδειξαν ιδιαίτερη δραστηριότητα.

Η αναχαίτιση της μεθανογένεσης στο QMHED πιθανόν να οφείλεται στις υψηλές τιμές οξικού οξέος, που κυμαίνονταν περίπου στα 6.6 mM, αφού το οξικό οξύ μπορεί να δράσει τοξικά για τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς (Gerardi, 2003; Αντωνίου, 2008). Άλλη αιτία για τη μειωμένη απόδοση των αναγωγικών διεργασιών είναι ενδεχομένως η πτώση του pH, εφόσον στη μέση συγκέντρωση βουτυρικού οξέος το pH ήταν 6.83 ± 0.09 στο τέλος του πειράματος και στην υψηλή 6.35 ± 0.05 .

Ο Πίνακας 4.6 δείχνει τα ισοζύγια ηλεκτρονίων στα πειράματα με 150 mg/L θειικών ιόντων και τις τέσσερις δόσεις δότη ηλεκτρονίων. Η αναγωγική διεργασία που επικράτησε ήταν η θεικοαναγωγή με ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 63%-81% του συνόλου των ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν. Εξαίρεση αποτελεί το πείραμα QMMED, όπου η κυρίαρχη διεργασία ήταν η μεθανογένεση ($67\% \pm 12\%$), που εμφανίστηκε μετά την 124^η ημέρα, ενώ έδειξε απόκλιση μεταξύ των διπλότυπων πειραμάτων. Σε όλα τα πειράματα, το οξικό οξύ αποτέλεσε την πρωταρχική πηγή

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

ηλεκτρονίων, αν και στις χαμηλές δόσεις δότη, η νεκρή βιομάζα διαδραμάτισε σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ηλεκτρονίων. Η ανάκτηση στις τρεις πρώτες δόσεις κυμάνθηκε μεταξύ σε αποδεκτά όρια (87-108%), όμως στην υψηλή δόση φάνηκε ότι η κατανάλωση ήταν περίπου 3.5 φορές μικρότερη από την παραγωγή, το οποίο αποδίδεται στη δημιουργία αλυσίδων πολυυδροξυβουτυρικού οξέος, όπως αναλύεται σε επόμενη Ενότητα.

Πίνακας 4.6 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με 150 mg/L θειικών.

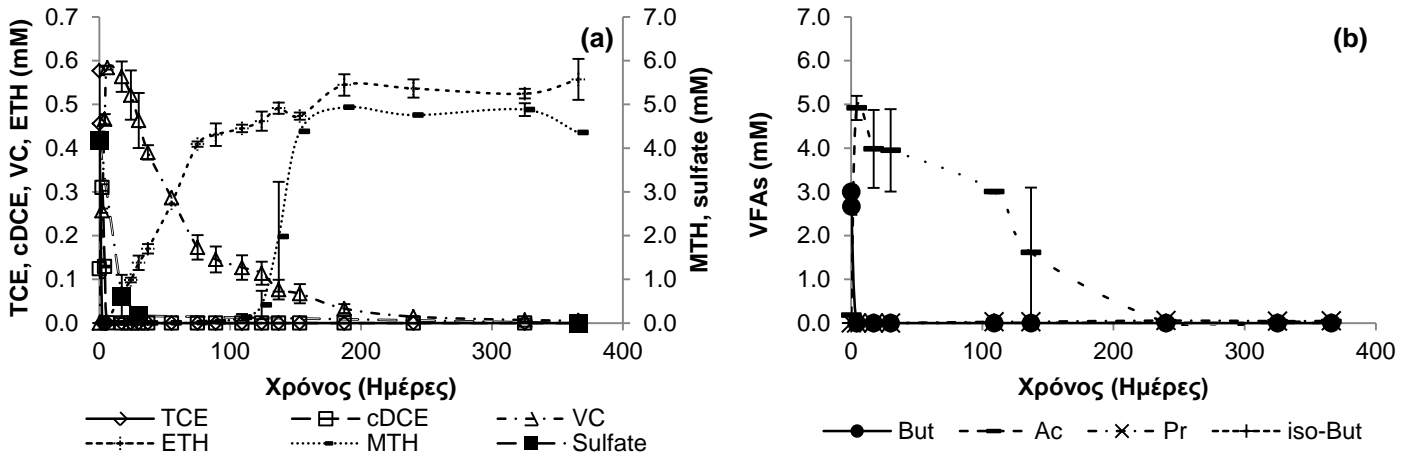
Πείραμα	QMLED	QMQLLED	QMMED	QMLED
$\% \frac{\sum e^-_{\text{αποχλωρίωση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	23±0%	11±1%	7±2%	18±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{μεθανογένεση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	0±0%	26±6%	67±12%	1±1%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{θειικοαναγωγή}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	77±0%	63±6%	27±10%	81±1%
$\sum e^-_{\text{αποδέκτης}} \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	8.8±0.3	20.0±1.8	49.9±18.4	15.4±0.2
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση οξικού οξέος}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	58±2%	70±4%	70±14%	55±9%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση βουτυρικού οξέος}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	15±0%	18±0%	28±11%	41±7%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξειδωση βιομάζας}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	27±2%	12±5%	2±3%	4±2%
$\sum e^-_{\text{δότης}} \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	8.1±0.1	18.9±0.2	57.8±23.7	52.0±17.3
% Ανάκτηση	108±5%	106±11%	87±4%	31±10%

4.2.2.5. Επίδραση 400 mg/L θειικών ιόντων

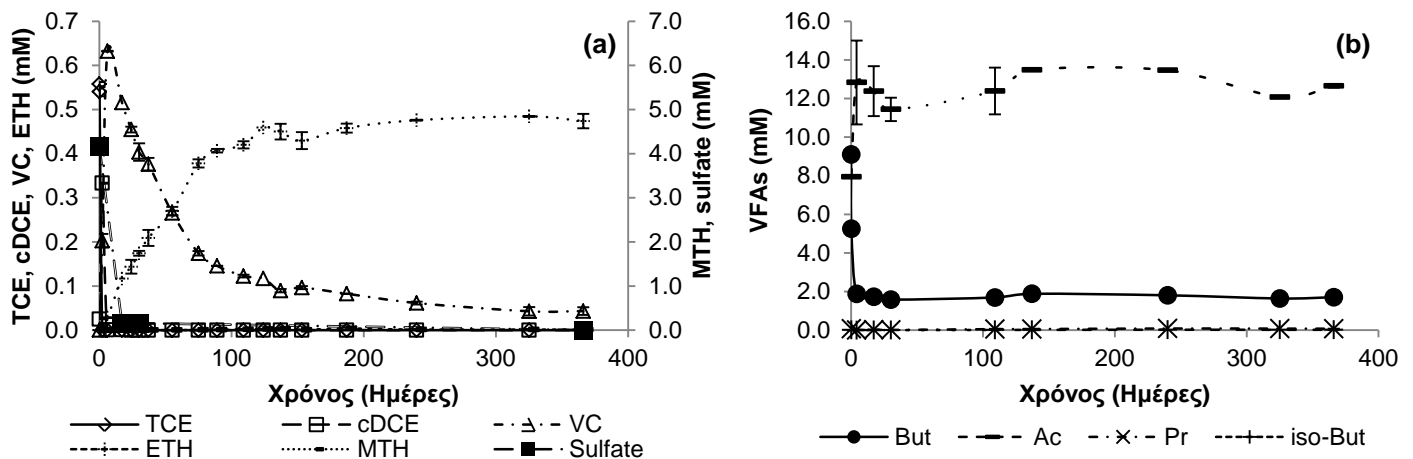
Στην παρούσα Ενότητα περιγράφεται η επίδραση των 400 mg/L θειικών ιόντων, όπου η βιοκοινότητα των καλλιέργειών M χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Δύο ποσότητες βουτυρικού οξέος επιλέχθηκαν, η μέση (3.0 mM; MMED: M καλλιέργειες, Medium Electron Donor) και η υψηλή δόση (9.1 mM; MHED: M καλλιέργειες, High Electron Donor), οι οποίες κάλυπταν περίπου το 33% και το 100% της στοιχειομετρικής απαίτησης σε ηλεκτρόνια για την αναγωγή των 400 mg/L θειικών ιόντων και την αναγωγική αποχλωρίωση του TCE, αντιστοίχως, αν το βουτυρικό οξύ οξειδωθεί μερικώς αποδίδοντας 4 ηλεκτρόνια/mole.

Οι μέσες τιμές των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και πτητικών λιπαρών οξέων με την τυπική απόκλιση των διπλότυπων μπουκαλιών, παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.32 και 4.33.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.32 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MMED (4.16 mM SO_4^{2-} & 3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).



Σχήμα 4.33 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MHED (4.16 mM SO_4^{2-} & 9.1 mM But, βουτυρικό οξύ).

Μετά την πάροδο 366 ημερών, όλο το TCE είχε μετατραπεί σε αιθέριο στη μέση δόση δότη (MMED; Σχήμα 4.32), ενώ στην υψηλή δόση το VC που είχε παραμείνει ήταν το 8% του αρχικού TCE και το υπόλοιπο ήταν αιθέριο (MHED; Σχήμα 4.33). Οι πιο χλωριωμένες ουσίες, TCE και cDCE είχαν απομακρυνθεί τις πρώτες 6 ημέρες των πειραμάτων, επομένως η καθυστέρηση της αποχλωρίωσης προήλθε από τη χαμηλή ταχύτητα αναγωγής του VC σε αιθέριο. Μάλιστα, στο MMED πείραμα είχαν παραμείνει 0.01 mM VC μέχρι την 240^η ημέρα, ενώ απαιτήθηκαν 120 ημέρες παραπάνω για να μειωθεί αυτή η ποσότητα κατά 40%. Η θειικοαναγωγή ήταν παρόμοια στα δύο πειράματα, εφόσον το 96% των θειικών ιόντων απομακρύνθηκε

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

σε 30 ημέρες. Στο τέλος των πειραμάτων, μετρήθηκαν τα σουλφίδια περίπου 3.6 mM (2.9 mM στην υγρή φάση), ανακτώντας το 86% της αρχικής ποσότητας θειικών ιόντων. Όμως, η παραγωγή μεθανίου παρατηρήθηκε μόνο στο πείραμα MMED την 124^η ημέρα, όπου υπήρξε μια μικρή διακύμανση μεταξύ των διπλότυπων πειραμάτων, όπως και στο πείραμα QMMED. Η καθυστέρηση της παραγωγής μεθανίου προκάλεσε την απόκλιση στις μετρήσεις οξικού οξέος. Επιπλέον, η μη ανίχνευση του μεθανίου στα πειράματα με τα θειικά ιόντα και την υψηλή δόση δότη προκαλείται από τις υψηλές τιμές οξικού οξέος. Αναφορικά με το δότη ηλεκτρονίων, όλα τα οξέα είχαν καταναλωθεί στις 240 ημέρες στο MMED πείραμα. Αντιθέτως, στο MHED το βουτυρικό οξύ είχε σταθεροποιηθεί περίπου στα 1.8 mM και το οξικό οξύ στα 12.7 mM, από την 4^η ημέρα ως το τέλος του πειράματος, χωρίς να προχωρούν οι αναγωγικές διεργασίες. Η συσσώρευση μεγάλων συγκεντρώσεων οξικού οξέος σε τοξικά επίπεδα για τους μικροοργανισμούς ήταν μάλλον η αιτία που δεν πραγματοποιήθηκε κάποια οξειδοαναγωγική διαδικασία παρά την ύπαρξη σημαντικών ποσοτήτων δότη ηλεκτρονίων. Πιθανή είναι και η αρνητική επίδραση του αποδεκτού μεν αλλά χαμηλού δε pH που μπορεί να επηρέασε τον ρυθμό των διεργασιών. Συγκεκριμένα, στο πείραμα με τη μέση δόση δότη το pH ήταν 6.78±0.14 και στο πείραμα με την υψηλή 6.34±0.06.

Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζεται το ισοζύγιο ηλεκτρονίων των πειραμάτων με τη μέση συγκέντρωση θειικών ιόντων.

Πίνακας 4.7 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με 400 mg/L θειικών.

Πείραμα	MMED	MHED
$\% \frac{\sum e_{\text{αποχλωρίωση}}^-}{\sum e_{\text{αποδέκτης}}^-}$	5±1%	8±0%
$\% \frac{\sum e_{\text{μεθανογένεση}}^-}{\sum e_{\text{αποδέκτης}}^-}$	50±3%	0±0%
$\% \frac{\sum e_{\text{θειικοαναγωγή}}^-}{\sum e_{\text{αποδέκτης}}^-}$	45±2%	91±0%
$\sum e_{\text{αποδέκτης}}^- \left(\frac{\text{meq}}{\text{L}} \right)$	74.0±3.3	36.4±0.1
$\% \frac{\sum e_{\text{οξείδωση οξικού οξέος}}^-}{\sum e_{\text{δότης}}^-}$	75±0%	33±1%
$\% \frac{\sum e_{\text{οξείδωση βουτυρικού οξέος}}^-}{\sum e_{\text{δότης}}^-}$	19±0%	61±1%
$\% \frac{\sum e_{\text{οξείδωση βιομάζας}}^-}{\sum e_{\text{δότης}}^-}$	6±0%	6±0%
$\sum e_{\text{δότης}}^- \left(\frac{\text{meq}}{\text{L}} \right)$	62.3±0.1	47.6±1.2
% Ανάκτηση	119±5%	77±2%

Στο MMED πείραμα (3 mM βουτυρικού οξέος και 400 mg/L SO₄²⁻) η επικρατέστερη αναγωγική διεργασία ήταν η μεθανογένεση (50% ± 3%) και ακολουθούσε η

θειικοαναγωγή ($45\% \pm 2\%$). Στο πείραμα MHED (9.1 mM βουτυρικού οξέος και $400 \text{ mg/L SO}_4^{2-}$), που δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική ποσότητα μεθανίου, τα περισσότερα ηλεκτρόνια καταναλώθηκαν κυρίως για τη μετατροπή των θειικών ιόντων ($91\% \pm 0\%$). Η κύρια πηγή ηλεκτρονίων στις δύο δόσεις ήταν διαφορετική, εφόσον στη μέση δόση κυριάρχησε η οξειδωση του οξικού οξέος με ποσοστό 75% του συνόλου των παραγόμενων ηλεκτρονίων, και στην υψηλή δόση του βουτυρικού οξέος με ποσοστό 61%. Τέλος, οι ανακτήσεις των δύο πειραμάτων ήταν εντός του αποδεκτού εύρους 75-125%, δηλαδή ήταν 119% και 77% για το MMED και MHED, αντιστοίχως.

4.2.2.6. Συγκριτικά αποτελέσματα πειραμάτων υπό διάφορες συγκεντρώσεις θειικών ιόντων

Με στόχο την αποσαφήνιση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων, στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζονται τα μέτρα σύγκρισης των πειραμάτων για την αξιολόγηση της επίδρασης των θειικών ιόντων.

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η μετατροπή των χλωριωμένων αιθενίων πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τη θειικοαναγωγή. Επίσης, η πλήρης αποχλωρίωση μπορεί να συμβεί ακόμα και σε περιβάλλοντα με 400 mg/L θειικών ιόντων, αλλά απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την επίτευξή της. Επομένως, η αρνητική επίδραση της θειικοαναγωγής φαίνεται να εστιάζει περισσότερο στον ρυθμό παρά στην απόδοση της διαδικασίας, συμπέρασμα στο οποίο είχαν καταλήξει και οι Pantazidou et al. (2012). Πιο συγκεκριμένα, τα θειικά ιόντα επιδρούν αρνητικά στην αναγωγική αποχλωρίωση κυρίως του VC και δευτερευόντως του cDCE. Μάλιστα, η διαδοχική αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης θειικών ιόντων από μηδενική σε 70 mg/L , 150 mg/L και 400 mg/L είχε ως συνέπεια τη μείωση του ρυθμού αναγωγής cDCE κατά 18%, 52% και 68%, αντιστοίχως.

Επιπλέον, η προσθήκη μιας αρκετά χαμηλής ποσότητας θειικών ιόντων προκαλεί την ελάττωση της ταχύτητας μετατροπής του VC περίπου 20 με 40 φορές στη μέση δόση δότη ηλεκτρονίων. Η περαιτέρω προσθήκη θειικών φαίνεται να μειώνει ακόμη περισσότερο τον ρυθμό αποδόμησης του VC. Συγκεκριμένα, οι ταχύτητες της αντίδρασης ήταν $0.07/\text{day}$, $0.03/\text{day}$ και $0.01/\text{day}$ στα πειράματα με 70 mg/L , 150 mg/L και 400 mg/L θειικών ιόντων, αντιστοίχως. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται σχηματικά στο διάγραμμα 4.34, όπου φαίνεται η επίδραση της αρχικής ποσότητας θειικών ιόντων στο χρόνο που απαιτείται για την αποχλωρίωση του TCE σε αιθέριο. Η σχέση φαίνεται ότι είναι γραμμική (με συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.993$) και η κλίση ισούται με $84.6 \text{ day/mM sulfate}$. Παρόμοιες τάσεις έδειξαν και τα πειράματα με τις άλλες ποσότητες δότη.

Επιπλέον, φαίνεται ότι η αναγωγή των θειικών ιόντων κατανάλωσε μεγάλο μέρος του βουτυρικού οξέος, αφήνοντας το οξικό οξύ ως το μοναδικό δότη ηλεκτρονίων για την

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

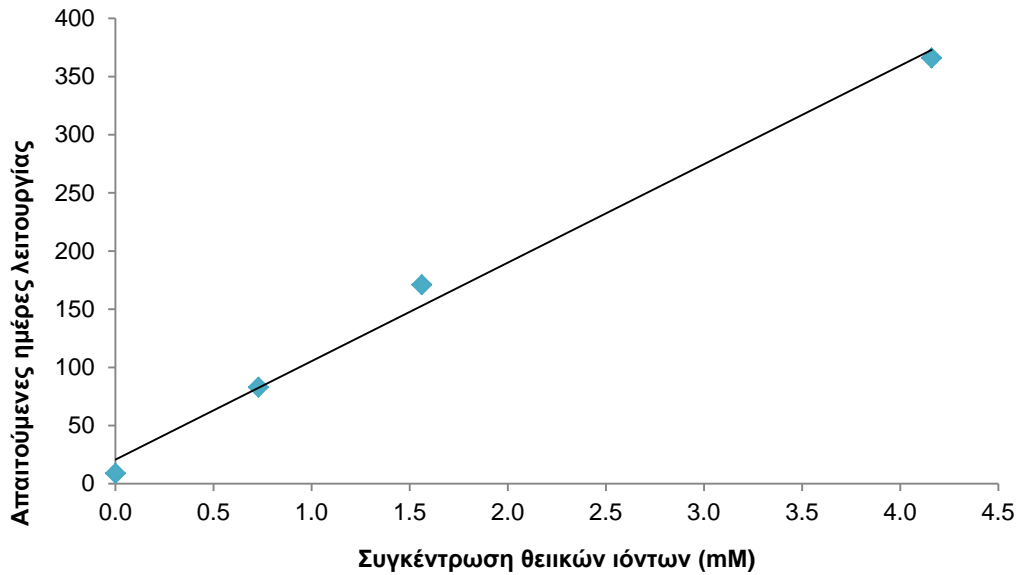
αναγωγή του cDCE και κυρίως του VC. Όμως, έχει αποδειχθεί ότι το οξικό οξύ δεν είναι ένας ιδανικός δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση (Wen et al., 2015; Lee et al., 2007a), ενώ υποβοηθά άλλες αναγωγικές διεργασίες, όπως η μεθανογένεση (Fennell et al., 1997).

Πίνακας 4.8 Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με θειικά ιόντα.

Πειράματα	Βουτυρικό οξύ	Θειικά ιόντα	Ημέρες (% VC _{εναπομείναν} / Σ _{CES})	cDCE _{peak}	VC _{peak}	50% VC _{εναπομείναν} / Σ _{CES}	10% VC _{εναπομείναν} / Σ _{CES}	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)
	mM	mM		Ημέρες				mM/day	mM/day	1/day
NLED	0.3	0.00	184 (6%)	0.5	7.5	31	118	1.673	0.058	0.026
NQMED	2.2	0.00	9 (1%)	1.0	2.0	5.5	8.0	0.855	0.166	1.082
NMED (I)	3.0	0.00	9 (0%)	1.0	2.0	5.5	8.0	0.862	0.135	1.240
NMED (II)	3.0	0.00	5 (0%)	0.5	1.5	2.5	3.5	1.397	0.237	3.135
NHED	9.1	0.00	6 (0%)	1.0	2.5	3.5	5.0	0.864	0.237	2.637
QLLED	0.3	0.73	149 (54%)	0.5	5.0			1.330	0.170	0.004
QLQMED	2.2	0.73	83 (2%)	1.0	5.0	46	65	0.574	0.195	0.068
QMLED	0.3	1.56	181 (84%)	0.5	12			1.035	0.043	0.001
QMQLLED	0.9	1.56	181 (62%)	1.0	4.0			0.996	0.106	0.003
QMMED	3.0	1.56	171 (1%)	1.0	5.0	50	160	0.455	0.113	0.030
QMLED	9.1	1.56	257 (20%)	1.5	5.0	50		0.258	0.113	0.007
MMED	3.0	4.16	366 (1%)	1.0	6.0	55	165	0.967	0.076	0.014
MLED	9.1	4.16	366 (8%)	1.0	6.0	55	240		0.084	0.008

Επεξήγηση: Μπλε γράμματα: οι ρυθμοί που υπολογίστηκαν δεν είναι μέσοι όροι αλλά οι τιμές από ένα μόνο μπουκάλι, **Πορτοκαλί γράμματα:** οι ρυθμοί είναι από παρόμοια πειράματα τα οποία είτε αναλύονται σε άλλη Ενότητα είτε παρουσιάζονται στο Παράρτημα Γ και παρουσιάζονται ως υποδείγματα ρυθμών υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.34 Συσχέτιση αρχικής συγκέντρωσης θειικών ιόντων με τις απαιτούμενες ημέρες λειτουργίας για τη μετατροπή περίπου 99% του αρχικού TCE σε αιθέριο στα πειράματα με τη μέση δόση δότη ηλεκτρονίων και βιομάζα από τις καλλιέργειες με μηδενική συγκέντρωση θειικών ιόντων (N), 70 mg/L (QL), 150 mg/L (QM) και 400 mg/L (M).

Η κατανάλωση του TCE φαίνεται να επηρεάζεται περισσότερο από την ποσότητα δότη ηλεκτρονίων, εφόσον η αύξηση του δότη προκαλεί μια μείωση του ρυθμού αναγωγής του. Αναλυτικότερα, η ταχύτητα αντίδρασης ήταν 1.04, 1.00, 0.46 και 0.26 mM/day στα πειράματα με 150 mg/L θειικών ιόντων και 0.3, 0.9, 3.0, 9.1 mM βουτυρικού οξέος, αντίστοιχα. Επομένως, η υψηλή δόση δεν βοήθησε την αναγωγική αποχλωρίωση. Τουναντίον, όλες οι σειρές πειραμάτων έδειξαν ότι δεν αξιοποιούνται οι μεγάλες ποσότητες των πτητικών λιπαρών οξέων. Παρόμοια τάση διαπίστωσαν και οι El Mamouni et al. (2002), όπου οι υψηλές δόσεις δότη επιδείνωσαν την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης.

Επιπλέον, οι χαμηλές δόσεις δότη ηλεκτρονίων δεν ήταν επαρκείς για την ολοκλήρωση της διεργασίας, αφού η συγκέντρωση του VC ήταν περίπου 54% με 84% του αρχικού TCE παρότι οι ημέρες λειτουργίας είχαν ξεπεράσει τις 149. Μόνο το πείραμα NLED, όπου συνεισέφερε η βιομάζα στην παραγωγή ηλεκτρονίων, έδειξε σχεδόν πλήρη αποχλωρίωση, καθώς είχε παραμείνει μια μικρή ποσότητα VC μετά από 184 ημέρες.

Συμπερασματικά, η βέλτιστη ποσότητα δότη ηλεκτρονίων κυμαίνεται στις μεσαίες δόσεις, 3 και 2.2 mM βουτυρικού οξέος, οι οποίες έχουν δείξει πανομοιότυπη συμπεριφορά στα πειράματα χωρίς θειικά ιόντα. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη δόση φαίνεται να ευνοείται και η μεθανογένεση, καθώς, στις χαμηλές συγκεντρώσεις βουτυρικού οξέος φαίνεται ότι δεν παράγονται αρκετά ηλεκτρόνια για την

πραγματοποίηση της αντίδρασης, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις πτητικών λιπαρών οξέων είναι τοξικές για τα μεθανογόνα αρχαία (Gerardi, 2003). Τα αποτελέσματα της μεθανογένεσης στα πειράματα με τη μεσαία δόση δότη παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.9, για την αξιολόγηση της επίδρασης της θεικοαναγωγής στην παραγωγή του μεθανίου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως, η αύξηση των θειικών ιόντων προκαλεί την καθυστέρηση της εκκίνησης της μεθανογένεσης. Συγκεκριμένα, στα πειράματα με 70, 150 και 400 mg/L θειικών ιόντων απαιτήθηκαν 42, 115 και 95 ημέρες λειτουργίας, αντιστοίχως, για την παραγωγή >0.05 mM μεθανίου, ενώ η διεργασία σταματούσε όταν εξαντλούνταν ο δότης ηλεκτρονίων. Ωστόσο, ο ρυθμός παραγωγής ήταν παρόμοιος σε όλα τα πειράματα υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης των θειικών.

Πίνακας 4.9 Απόδοση μεθανογένεσης στα πειράματα με μέση συγκέντρωση βουτυρικού οξέος (2.2 με 3 mM) υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες.

Πειράματα	Βουτυρικό οξύ	Θειικά ιόντα	Ημέρες (Μέγιστη συγκέντρωση μεθανίου)	% Δότης αναπομείνας / Αρχική δόση	>0.05 mM METH	Σταθεροποίηση συγκέντρωσης	k (ME TH) mM/day
	mM	mM			Ημέρες	Ημέρες	
NQMED	2.2	0.00	9 (1.44 mM)	61%	1.0	9.0	0.159
NMED (I)	3.0	0.00	9 (1.34 mM)	71%	1.0	9.0	0.155
NMED (II)	3.0	0.00	5 (0.58 mM)	76%	1.0	5.0	0.117
QLQMED	2.2	0.73	83 (3.48 mM)	0%	42.0	83.0	0.092
QMMED	3.0	1.56	171 (4.29 mM)	24%	115.0	171.0	0.091
MMED	3.0	4.16	366 (4.88 mM)	0%	95.0	187.0	0.099

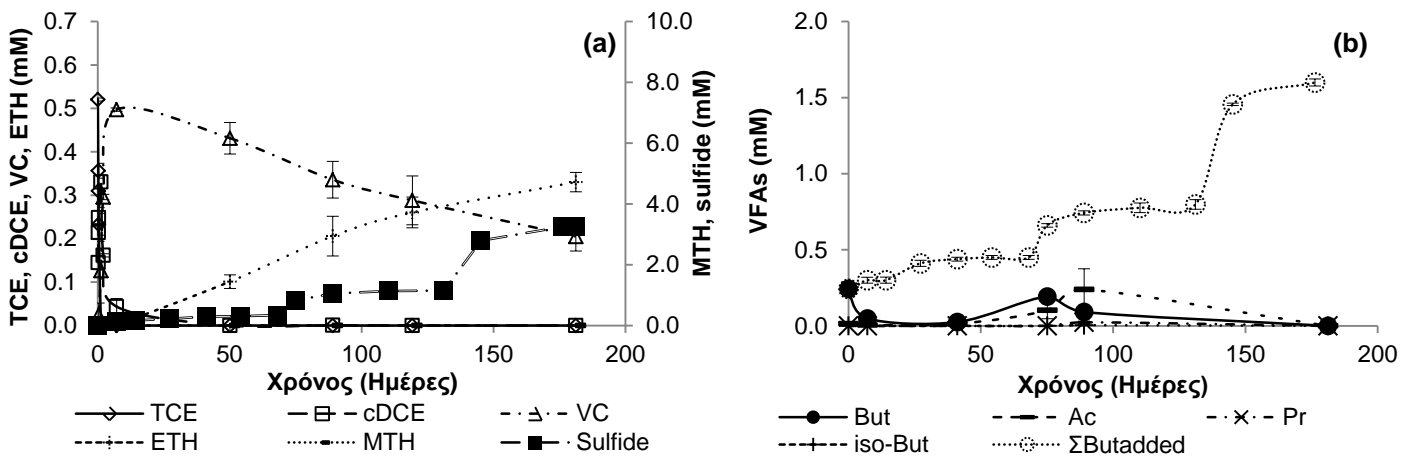
4.2.2.7. Επίδραση συνεχούς προσθήκης 400 mg/L θειικών ιόντων

Στις παραπάνω παραγράφους μελετήθηκε η επίδραση διάφορων αρχικών συγκεντρώσεων θειικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση. Όμως, στο υπέδαφος η πηγή θειικών μπορεί να είναι συνεχής με αποτέλεσμα να επιδρά με διαφορετικό τρόπο στην αποχλωρίωση. Για το λόγο αυτό, σχεδιάστηκε πείραμα όπου η συγκέντρωση των θειικών ιόντων παρέμενε σταθερή στα 400 mg/L καθ' όλη τη διάρκεια λειτουργίας, ενώ παράλληλα υπήρχε αρκετός δότης ηλεκτρονίων για τις αναγωγικές διεργασίες. Η βιοκοινότητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν από τις M καλλιέργειες και οι αρχικές δόσεις βουτυρικού οξέος που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής: (i) 0.3 mM (CMLED: Continuous, M καλλιέργειες, Low Electron Donor) και (ii) 3.0 mM (CMMED: Continuous, M καλλιέργειες, Medium Electron Donor). Σε τακτά χρονικά διαστήματα, γινόταν η μέτρηση των σουλφιδίων και υπολογιζόταν το βουτυρικό οξύ που καταναλώθηκε για τη θεικοαναγωγή, έτσι ώστε να εκτιμηθούν οι μάζες των

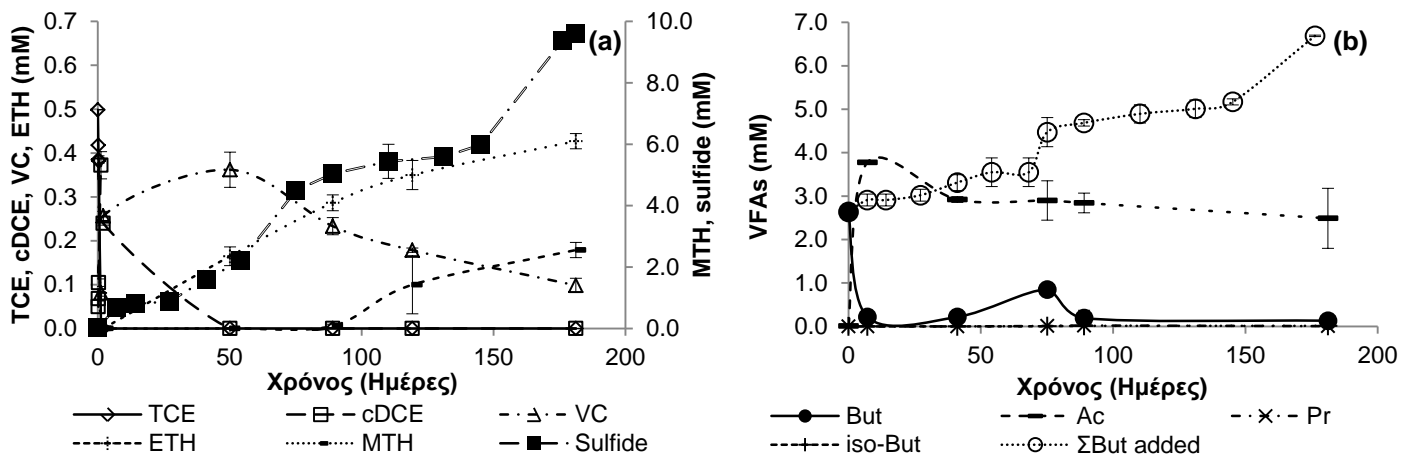
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

θεικών ιόντων και του δότη που υπολείπονταν και να προστεθούν στα μπουκάλια. Τα πειράματα παρέμειναν σε λειτουργία για 181 ημέρες, όπου αποφασίστηκε η διακοπή τους εξαιτίας της επικίνδυνης συγκέντρωσης σουλφιδίων και της πιθανής διαρροής από το πώμα βουτυλίου.

Οι μέσοι όροι από τις μετρήσεις των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και πτητικών λιπαρών οξέων και οι υπολογισμένες τυπικές αποκλίσεις στα διπλότυπα serum μπουκάλια παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.35 ως 4.36.



Σχήμα 4.35 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα CMLD ($4.16^+ \text{ mM SO}_4^{2-}$ & 0.3^+ mM But , βουτυρικό οξύ).



Σχήμα 4.36 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα CMMED ($4.16^+ \text{ mM SO}_4^{2-}$ & 3.0^+ mM But , βουτυρικό οξύ).

Μέχρι τις 181 ημέρες που τερματίστηκε το CMLED πείραμα (Σχήμα 4.35), το 41% του αρχικού TCE είχε μετατραπεί σε VC και το υπόλοιπο ήταν αιθέριο. Το TCE και το cDCE είχαν καταναλωθεί την 1^η και 8^η ημέρα, αντίστοιχα. Αναφορικά με τη θεικοαναγωγή, τα σουλφίδια που είχαν συσσωρευτεί είχαν φτάσει τη συγκέντρωση 3.25 ± 0.27 mM (2.62 mM στην υγρή φάση) και η τελική συγκέντρωση των θειικών ιόντων ήταν περίπου 3.75 ± 0 mM. Η ανάκτηση των moles θείου της τελικής μέτρησης ως προς τη θεωρητική τιμή ήταν 111%, άρα η θεικοαναγωγή ολοκληρώθηκε μέχρι το τελευταίο στάδιο, την παραγωγή θειωδών. Από το Σχήμα 4.35b, φαίνεται ότι ο δότης ηλεκτρονίων που προστίθετο καταναλωνόταν άμεσα για τη διεξαγωγή της θεικοαναγωγής και της αναγωγικής αποχλωρίωσης.

Όταν ο δότης ηλεκτρονίων στην εκκίνηση του πειράματος είναι δέκα φορές παραπάνω φαίνεται ότι η αποχλωρίωση έχει καλύτερη εικόνα (CMMED; Σχήμα 4.36), εφόσον στις 181 ημέρες λειτουργίας το μοναδικό χλωριωμένο αιθέριο που είχε παραμείνει ήταν το VC σε συγκέντρωση 0.098 mM. Συγκεκριμένα, το TCE είχε εξαφανιστεί την 1^η ημέρα και το cDCE την 4^η ημέρα. Η ποσότητα θειικών που είχε παραμείνει στην τελευταία μέτρηση ήταν 4.28 ± 0.14 mM ανακτώντας το 98% των moles του θείου. Τα σουλφίδια έφτασαν στα 9.61 ± 0.11 mM (7.74 mM στην υγρή φάση), συγκέντρωση η οποία είναι τοξική για πολλά αναερόβια βακτήρια, όπως έχει αναλυθεί στην Ενότητα 2.4.4. Πάρα ταύτα, η εικόνα της αποχλωρίωσης ήταν παρόμοια με αυτή του MMED πειράματος, εφόσον στις 181 ημέρες το VC ήταν 0.03 mM. Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Guerrero-Barajas et al. (2014), οι οποίοι πραγματοποίησαν πειράματα σε στήλες με συνεχή προσθήκη θειικών ιόντων έτσι ώστε η συγκέντρωση να παραμένει σταθερή στα 4000 mg/L. Παρότι η τελική συγκέντρωση του υδρόθειου έφτασε περίπου τα 28 mM ως διαλυτή συγκέντρωση, το 67% του TCE είχε μετατραπεί σε αιθέριο σε 10 ημέρες. Επίσης, η μεθανογένεση ξεκίνησε την 87^η ημέρα, όταν τα σουλφίδια είχαν συγκέντρωση 5 mM (4.03 mM στην υγρή φάση), και συνεχίστηκε μέχρι την τελευταία ημέρα λειτουργίας με ρυθμό 0.024 ± 0.002 mM/day. Ο χαμηλός ρυθμός της μεθανογένεσης μπορεί να οφείλεται αφενός στον ανταγωνισμό για το δότη ηλεκτρονίων με τη θεικοαναγωγή αφετέρου στις τοξικές συγκεντρώσεις σουλφιδίων, που μπορεί να είναι αναχαιτιστικοί παράγοντες για τη δράση συγκεκριμένου είδους μεθανογόνου μικροοργανισμού. Όσον αφορά τα πτητικά λιπαρά οξέα, το βουτυρικό οξύ μετατρεπόταν άμεσα σε οξικό οξύ το οποίο κυμαινόταν περίπου 3.5 mM καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Στον Πίνακα 4.10 παρουσιάζονται τα ισοζύγια ηλεκτρονίων των πειραμάτων με σταθερή συγκέντρωση θειικών ιόντων. Η κυρίαρχη αναγωγική διεργασία και στα δύο πειράματα ήταν η θεικοαναγωγή με ποσοστό $90\% \pm 1\%$ για το CMLED και $77\% \pm 2\%$ για το CMMED. Η οξειδωση του οξικού οξέος παρήγαγε τη μεγαλύτερη μάζα ηλεκτρονίων και για τα δύο πειράματα με ποσοστό 76%. Τέλος, οι ανακτήσεις των δύο πειραμάτων ήταν εντός του αποδεκτού εύρους.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Πίνακας 4.10 Ισοζύγιο ηλεκτρονίων πειραμάτων με συνεχή προσθήκη 400 mg/L θειικών ιόντων.

Πείραμα	CMLED	CMMED
$\% \frac{\sum e^-_{\text{αποχλωρίωση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	10±1%	3±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{μεθανογένεση}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	0±0%	20±2%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{θεικοαναγωγή}}}{\sum e^-_{\text{αποδέκτης}}}$	90±1%	77±2%
$\sum e^-_{\text{αποδέκτης}} \left(\frac{meq}{L}\right)$	28.9±2.1	100.3±1.1
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξείδωση οξικού οξέος}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	76±1%	76±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξείδωση βουτυρικού οξέος}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	19±0%	24±0%
$\% \frac{\sum e^-_{\text{οξείδωση βιομάζας}}}{\sum e^-_{\text{δότης}}}$	6±1%	
$\sum e^-_{\text{δότης}} \left(\frac{meq}{L}\right)$	35.4±1.9	96.4±18.3
% Ανάκτηση	81±2%	106±21%

Τα παραπάνω συνοψίζονται στον Πίνακα 4.11, όπου γίνεται μια συγκριτική αξιολόγηση των δεδομένων των πειραμάτων με σταθερή συγκέντρωση θειικών ιόντων. Όπως φαίνεται στον Πίνακα, η εισαγωγή μεγαλύτερης ποσότητας δότη ηλεκτρονίων στην αρχή του πειράματος, αν και επιδεινώνει την αναγωγή του TCE, βελτιώνει τον ρυθμό απομάκρυνσης του cDCE και του VC, που είναι τα πιο κρίσιμα στάδια της διαδικασίας. Επιπλέον, το πείραμα MMED φάνηκε να είναι λίγο γρηγορότερο από το CMMED, εφόσον η ταχύτητα αναγωγής του VC ήταν 0.014/day και 0.010/day, αντιστοίχως.

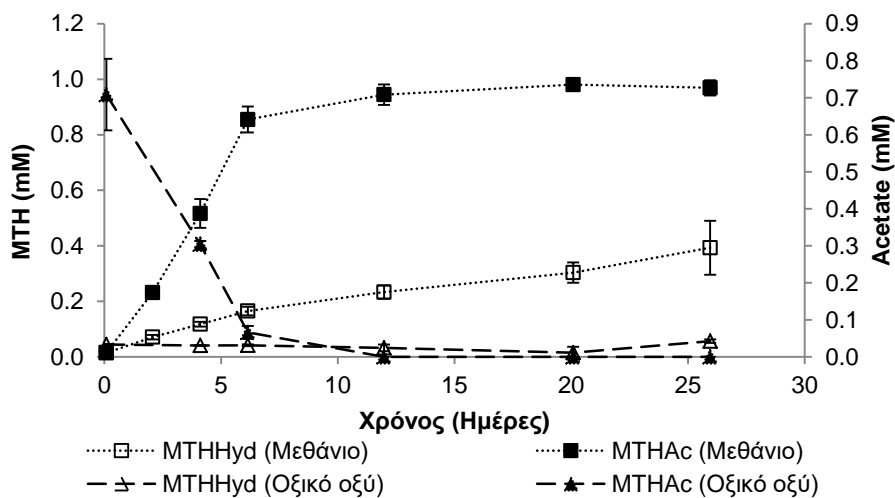
Πίνακας 4.11 Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με συνεχή προσθήκη 400 mg/L θειικών ιόντων.

Πειράματα	Βουτυρικό οξύ	Θειικά ιόντα	Ημέρες (% VC _{εναπομείναν} /Σ _{CES})	cDCE _{peak}	VC _{peak}	50% VC _{εναπομείναν} /Σ _{CES}	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)
	mM	mM		Ημέρες	mM/day	mM/day	1/day		
CMLED	1.7	4.16	181 (39%)	0.5	8.0	140	0.935	0.031	0.006
CMMED	5.9	4.16	181 (20%)	1.0	4.0	85	0.413	0.149	0.010

4.2.2.8. Πειράματα διερεύνησης της σύστασης της μικροβιακής κοινότητας

Διερεύνηση είδους μεθανογένεσης και θειικοαναγωγής

Για την αναγνώριση των μικροοργανισμών που αποτελούν τη βιοκοινότητα και το διαχωρισμό των υδρογονοτροφικών και οξικοτροφικών διαδικασιών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας χωρίς την προσθήκη TCE και με δότη ηλεκτρονίων το οξικό οξύ ή το υδρογόνο. Η βιομάζα που χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση του είδους της μεθανογένεσης ήταν από τις N καλλιέργειες, ενώ για τη μελέτη της θειικοαναγωγής αξιοποιήθηκαν οι QM και οι M μητρικές καλλιέργειες.



Σχήμα 4.37 Συγκέντρωση μεθανίου (τετράγωνα και διακεκομμένη γραμμή με κουκκίδες) και οξικού οξέος (τρίγωνα και διακεκομμένη γραμμή με παύλες) στα πειράματα MTHHyd (3 mM H₂, υδρογόνο, κενά σύμβολα) και MTHAc (0.8 mM Ac, οξικό οξύ, συμπαγή σύμβολα).

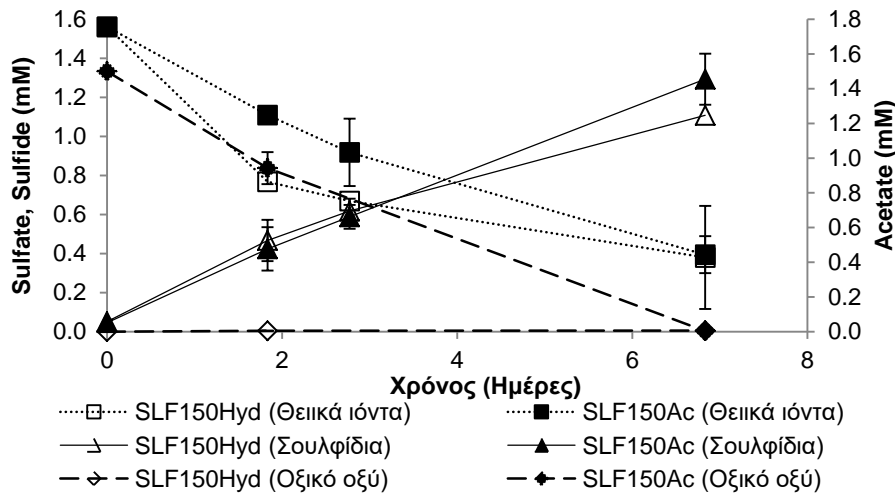
Από το Σχήμα 4.37 φαίνεται ότι η οξικοτροφική μεθανογένεση υπερέχει έναντι της υδρογονοτροφικής, εφόσον η προσθήκη οξικού οξέος παράγει περισσότερο μεθάνιο και σε πιο γρήγορο ρυθμό. Πιο συγκεκριμένα, το μεθάνιο έφτασε στα 0.86 ± 0.05 mM σε 6 μέρες, ενώ την ίδια στιγμή στα πειράματα με το υδρογόνο ήταν μόλις 0.16 ± 0.02 mM. Μετά την πάροδο των 6 ημερών, το μεθάνιο στα πειράματα MTHAc παρέμεινε περίπου στα ίδια επίπεδα μέχρι την 26^η μέρα λειτουργίας, διότι είχε εξαντληθεί το οξικό οξύ που παρείχε τα ηλεκτρόνια. Αντιθέτως, η παραγωγή του συνέχισε με τον ίδιο ρυθμό στα πειράματα MTHHyd, αφού μόνο το 63% του υδρογόνου είχε χρησιμοποιηθεί μέχρι το τέλος των πειραμάτων.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν έγινε σύγκριση της απόδοσης των μητρικών καλλιεργειών, όπου στις καλλιέργειες N φαίνεται ότι η μεθανογένεση

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

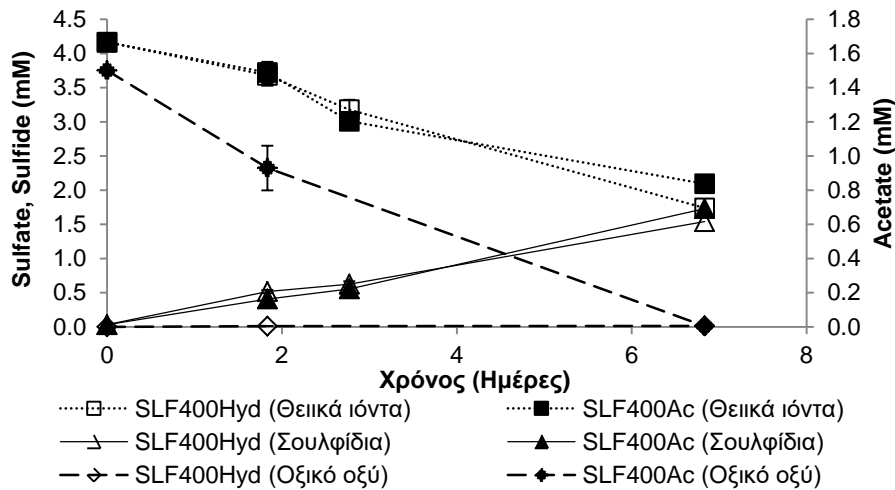
ακολουθεί την παραγωγή του οξικού οξέος. Ειδικότερα, η συσσώρευση του οξικού οξέος προκαλούσε την ύστερη αύξηση της παραγωγής του μεθανίου, μέχρι την εξάντλησή του όπου υποχωρούσε και η μεθανογένεση (Βλ. Σχήματα 4.10 και 4.11).

Επιπλέον, στα μπουκάλια που εισήχθηκε υδρογόνο φαίνεται να υπάρχουν μικρές αυξομειώσεις της συγκέντρωσης του οξικού οξέος, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να υπάρχει σε περιορισμένο τουλάχιστον βαθμό υδρογονοτροφική οξικογένεση (ή αλλιώς ομοοξικογένεση). Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα άλλων πειραμάτων, όπου όταν εξαντλήθηκε ο δότης ηλεκτρονίων, υδρογόνο εισήχθηκε και προκάλεσε την αύξηση του οξικού οξέος (Βλ. πείραμα N14DHyd στο Παράρτημα Γ). Η ομοοξικογένεση οφείλεται στην ύπαρξη του γένους *Acetobacterium* spp., το οποίο βρέθηκε στις N μητρικές καλλιέργειες σε υψηλό ποσοστό, περίπου 38% και, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσεται αυτοτροφικά χρησιμοποιώντας CO₂ και H₂.



Σχήμα 4.38 Συγκέντρωση θειικών ιόντων (τετράγωνα και κουκκίδες ως γραμμή), σουλφιδίων (τρίγωνα και απλή γραμμή) και οξικού οξέος (ρόμβοι και γραμμή με παύλες) στα πειράματα SLF150Hyd (6 mM H₂, υδρογόνο, σύμβολα χωρίς γέμισμα) και SLF150Ac (1.5 mM Ac, οξικό οξύ, σύμβολα με γέμισμα).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.39 Συγκέντρωση θειικών ιόντων (τετράγωνα και κουκκίδες ως γραμμή), σουλφιδίων (τρίγωνα και απλή γραμμή) και οξικού οξέος (ρόμβοι και γραμμή με παύλες) στα πειράματα SLF400Hyd (6 mM H₂, υδρογόνο, σύμβολα χωρίς γέμισμα) και SLF400Ac (1.5 mM Ac, οξικό οξύ, σύμβολα με γέμισμα).

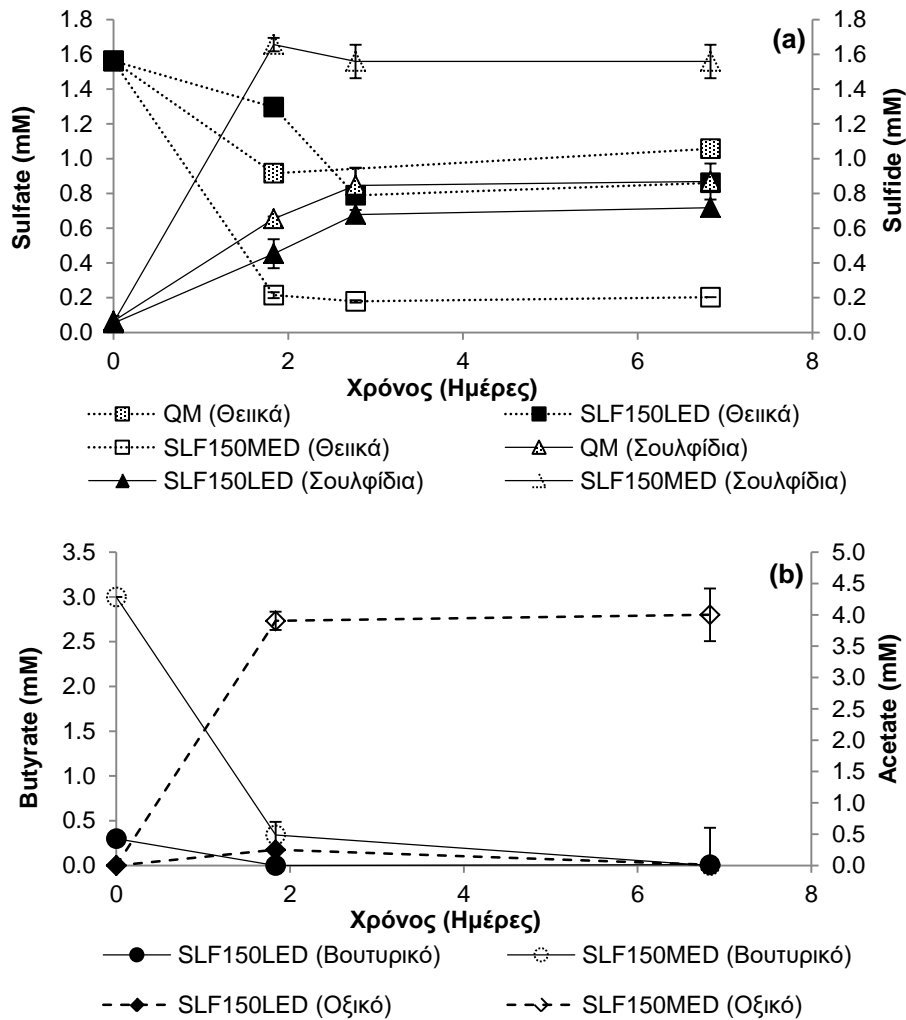
Η συμπεριφορά των καλλιεργειών υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες με δότη ηλεκτρονίων υδρογόνο ή οξικό οξύ δίνεται στα Σχήματα 4.38-4.39. Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες δεν παρουσιάζεται αξιοσημείωτη διαφορά παρά την εισαγωγή διαφορετικού δότη ηλεκτρονίων και στα δύο σετ καλλιεργειών. Πιο συγκεκριμένα, με την προσθήκη οξικού οξέος ή υδρογόνου περίπου 1.2 mM και 1.9 mM θειικών ιόντων καταναλώθηκαν σχηματίζοντας θειώδη στις καλλιέργειες QM και M, αντιστοίχως. Δηλαδή, η κατανάλωση των θειικών ιόντων και παραγωγή θειωδών παρουσιάζει τον ίδιο ρυθμό και στις δύο περιπτώσεις δότη. Επομένως, στις μητρικές καλλιέργειες με θειικά ιόντα η θειικοαναγωγή μπορεί να είναι είτε οξικοτροφική είτε υδρογονοτροφική. Αυτή η αβεβαιότητα για το είδος της θειικοαναγωγής ενισχύεται από τα αποτελέσματα των μητρικών καλλιεργειών, όπως αναλύθηκαν παραπάνω, όπου δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των θειικών ιόντων και του οξικού οξέος.

Παράλληλα, δεν παρουσιάστηκε κάποια μικρή άνοδος της συγκέντρωσης του οξικού οξέος στα πειράματα με την προσθήκη υδρογόνου, οπότε η δράση της υδρογονοτροφικής οξικογένεσης μπορεί να μην είναι σημαντική ή η μικρή παραγωγή του οξικού οξέος να καταναλώνεται γρήγορα από τις αναγωγικές διεργασίες.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της χαμηλής και της μέτριας δόσης του βουτυρικού οξέος στη θειικοαναγωγή, αλλά και η επιρροή της ταυτόχρονης αναγωγής των χλωριωμένων αιθενίων. Έτσι, πειράματα διεξήχθησαν με υλικό από τις καλλιέργειες QM και M, προσθέτοντας 0.3 mM βουτυρικού οξέος για τη χαμηλή δόση και 3.0 mM για τη μεσαία, χωρίς όμως την προσθήκη του TCE. Συγχρόνως

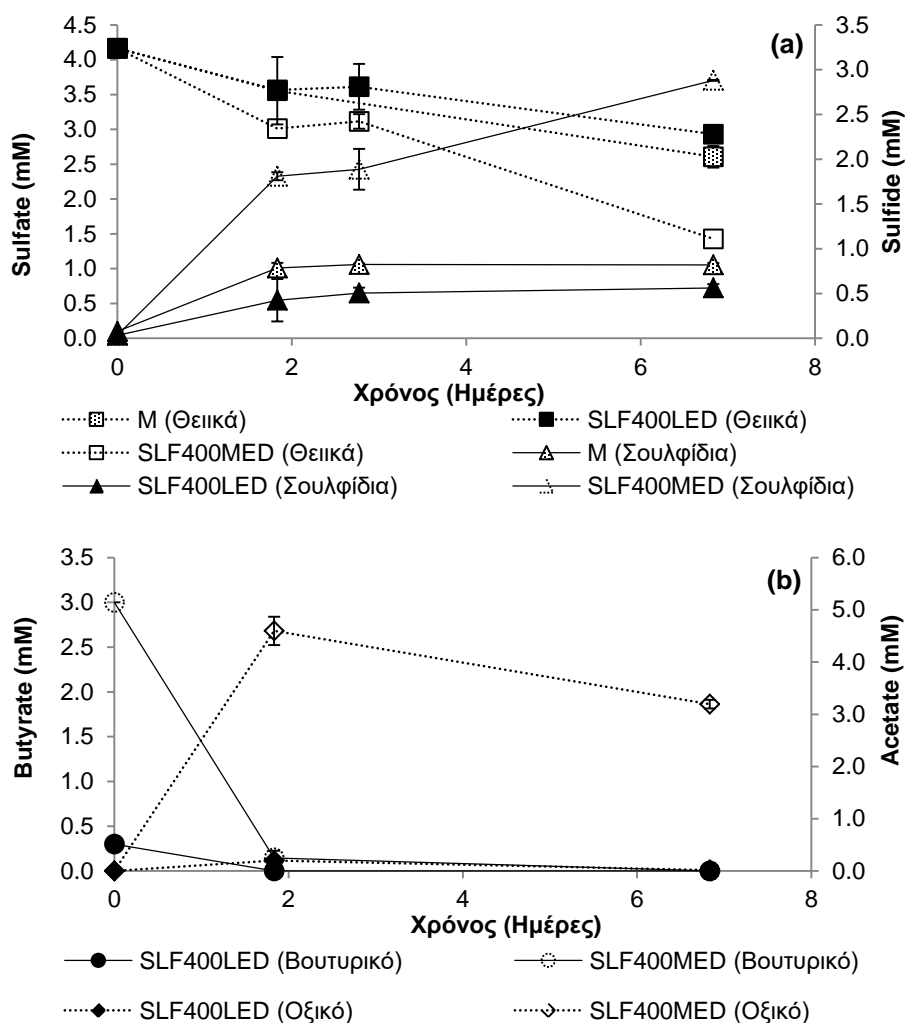
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

πραγματοποιούνταν δειγματοληψίες από τις μητρικές καλλιέργειες για να συγκριθεί η επίδοση της θεικοαναγωγής με ή χωρίς TCE.



Σχήμα 4.40 Συγκέντρωση (a) θειικών ιόντων (τετράγωνα και κουκκίδες ως γραμμή), και σουλφιδίων (τρίγωνα και απλή γραμμή), (b) βουτυρικού οξέος (κύκλοι και απλή γραμμή) και οξικού οξέος (ρόμβοι και γραμμή με παύλες) στα πειράματα SLF150LED (0.3 mM βουτυρικό οξύ, σύμβολα με γέμισμα), SLF150MED (3 mM But, βουτυρικό οξύ, σύμβολα χωρίς γέμισμα) και τις μητρικές καλλιέργειες QM (0.5 mM TCE, 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ, σύμβολα με κουκκίδες ως γέμισμα).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.41 Συγκέντρωση (a) θειικών ιόντων (τετράγωνα και κουκκίδες ως γραμμή), και σουλφιδίων (τρίγωνα και απλή γραμμή), (b) βουτυρικού οξέος (κύκλοι και απλή γραμμή) και οξικού οξέος (ρόμβοι και γραμμή με παύλες) στα πειράματα SLF400LED (0.3 mM βουτυρικό οξύ, σύμβολα με γέμισμα), SLF400MED (3 mM But, βουτυρικό οξύ, σύμβολα χωρίς γέμισμα) και τις μητρικές καλλιέργειες M (0.5 mM TCE, 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ, σύμβολα με κουκκίδες ως γέμισμα).

Σύμφωνα με τα διαγράμματα 4.40 και 4.41, φαίνεται ότι η χαμηλή δόση βουτυρικού οξέος εξαντλείται στις 2 με 3 μέρες με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των θειωδών να παραμένει σταθερή εφόσον σταματούν οι αναγωγικές αντιδράσεις. Έτσι, στα πειράματα SLF150LED και SLF400LED περίπου 0.71 mM θειικών ιόντων ανήχθησαν σε 3 μέρες, ενώ η τιμή αυτή παρέμεινε σταθερή μέχρι το τέλος του πειράματος.

Επιπλέον, συγκρίνοντας την απόδοση της θεικοαναγωγής στα πειράματα με τη χαμηλή δόση (SLF150LED και SLF400LED) και τις μητρικές καλλιέργειες, παρατηρείται ότι δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στη μείωση των θειικών άρα και

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

στην παραγωγή των θειωδών. Κατόπιν τούτου, μπορεί να εξαχθεί ότι η αναγωγική αποχλωρίωση των χλωριωμένων αιθενίων δεν επιδρά αρνητικά είτε μέσω τοξικότητας είτε ανταγωνιστικά στη θεικοαναγωγή.

Δημιουργία αλυσίδων πολυυδροξυβουτυρικού οξέος (PHBs)

Η γρήγορη εξαφάνιση του βουτυρικού οξέος χωρίς την αντίστοιχη κατανάλωση ηλεκτρονίων, παρατηρήθηκε στα πειράματα που εισήχθηκαν μεσαίες και υψηλές δόσεις δότη ηλεκτρονίων όπως περιγράφηκαν παραπάνω (Βλ. παραγράφους 4.2.2.2 ως 4.2.2.5). Το εύρημα αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί αν οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν το βουτυρικό και δημιουργούν αλυσίδες πολυυδροξυβουτυρικού οξέος, οι οποίες αποθηκεύονται εντός του κυττάρου. Ως αποτέλεσμα, οι μετρήσεις της διαλυτής φάσης που πραγματοποιούνται να υποδεικνύουν χαμηλές τιμές των πτητικών λιπαρών οξέων και να αυξάνουν φαινομενικά τα ηλεκτρόνια που παράγονται.

Στη βιβλιογραφία, η δημιουργία των αλυσίδων PHB έχει παρατηρηθεί σε πλήθος μικροοργανισμών, όπως σε μεθανότροφες καλλιέργειες (Henrysson & McCarty, 1993; Ackermann et al., 1995), σε θερμόφιλα είδη της συνομοταξίας Crenarchaeota (Berg et al., 2008), σε είδη του γένους *Bacillus* (Getachew & Woldesenbet, 2016), κ.ά. Επίσης, το πολυυδροξυβουτυρικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση οργανοχλωριωμένων ουσιών και την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών (Baric et al., 2012; Mannino & Ceccarelli, 2014).

Για την επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης, πειράματα διεξήχθησαν με υψηλή δόση δότη ηλεκτρονίων (9.1 mM) και βιομάζα από τις καλλιέργειες N, QM και M. Εξαίρεση αποτελεί το πείραμα MPHBCo, το οποίο κατασκευάστηκε από τις καλλιέργειες M, αλλά δεν εισήχθηκε βουτυρικό οξύ. Την επόμενη μέρα, έγιναν οι απαραίτητες αναλύσεις για τον υπολογισμό των ηλεκτρονίων που παράχθηκαν και καταναλώθηκαν από τις οξειδοαναγωγικές διεργασίες. Τα αποτελέσματα του ισοζυγίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.12.

Όπως διαπιστώθηκε στα πειράματα ασυνεχούς λειτουργίας με μεσαίες και υψηλές δόσεις δότη ηλεκτρονίων, NMED (II), NHED και QMHED, έτσι και στα πειράματα μιας μέρας με 9.1 mM βουτυρικού οξέος, η ανάκτηση των ηλεκτρονίων ήταν εκτός των ορίων του αποδεκτού εύρους (75-125%). Επομένως, η παραγωγή ηλεκτρονίων είναι σημαντικά υψηλότερη από την κατανάλωση, εξαιτίας της εξαφάνισης του δότη. Θεωρητικά, η οξειδωση του βουτυρικού οξέος επιφέρει την αύξηση του οξικού οξέος, το οποίο μετά καταναλώνεται από τις αναγωγικές διεργασίες. Άρα μια υποθετική αύξηση της συγκέντρωσής του που δεν παρουσιάζεται στη μέτρηση του δείγματος θα προκαλέσει την υπερεκτίμηση των ηλεκτρονίων από την φαινομενική οξειδωση του οξικού οξέος. Έτσι, η παραγωγή υπολογίστηκε ως 10.98 meq/L, 20.78 meq/L και

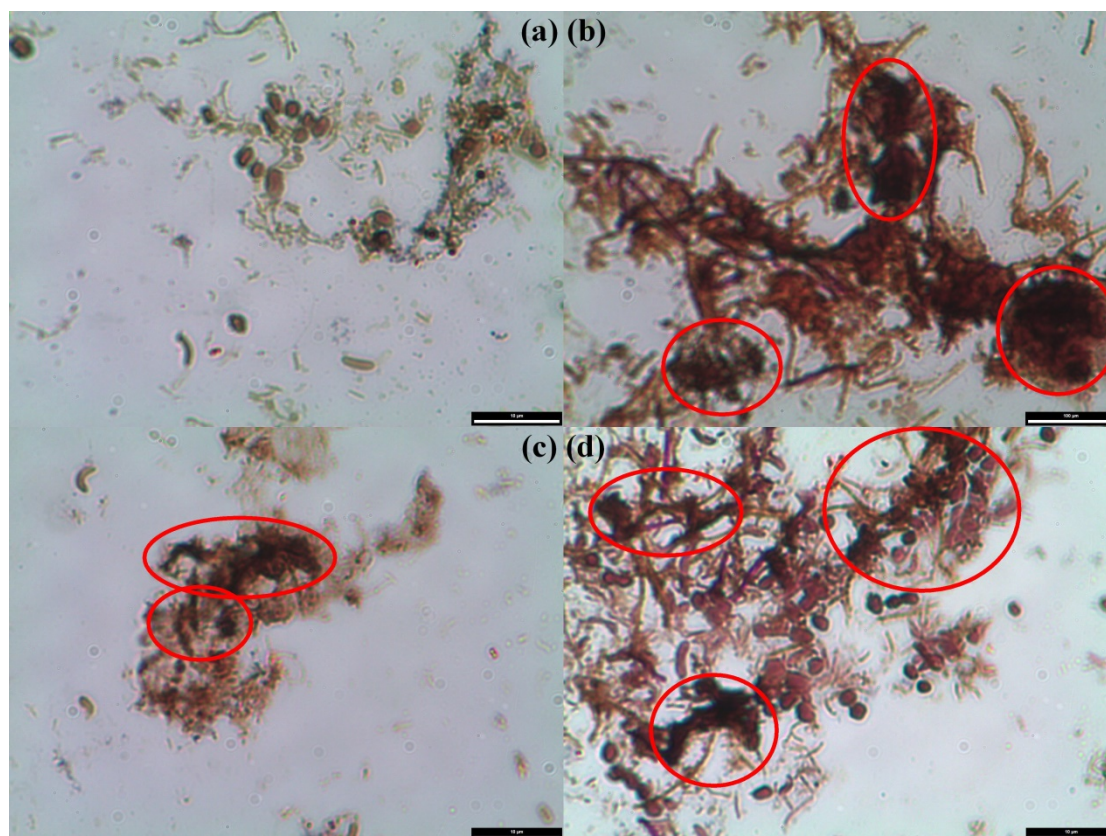
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

29.84 meq/L, ενώ η κατανάλωση ήταν μόλις 2.68 meq/L, 4.13 meq/L και 1.60 meq/L στα πειράματα NPHB, QMPHB και MPHVB, αντιστοίχως.

Πίνακας 4.12 Οξειδοαναγωγικές διεργασίες και ισοζύγιο ηλεκτρονίων στα πειράματα μιας μέρας με υψηλή δόση δότη ηλεκτρονίων.

Πείραμα	NPHB	QMPHB	MPHB
$\sum e_{\text{αποχλωρίωση}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	0.29±0.04	0.79±0.02	0.28±0.02
$\sum e_{\text{μεθανογένεση}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	0±0	0±0	0±0
$\sum e_{\text{θεικοαναγωγή}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$		0.60±0.21	0.13±0.08
$\sum e_{\text{παραγωγή βιομάζας}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	2.39±0.21	2.74±0.19	1.19±0.08
$\sum e_{\text{αποδέκτης}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	2.68±0.25	4.13±0	1.60±0.19
$\sum e_{\text{οξειδωση οξικού οξέος}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	9.53±1.29	17.89±9.60	26.12±5.57
$\sum e_{\text{οξειδωση βουτυρικού οξέος}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	1.45±0.17	2.89±1.19	3.72±0.72
$\sum e_{\text{δότης}}^- \left(\frac{\text{meq}}{L}\right)$	10.98±1.47	20.78±10.79	29.84±6.29
% Ανάκτηση	25±1%	23±11%	6±1%

Αφού διαπιστώθηκε η μεγάλη απόκλιση μεταξύ της απόδοσης των αναγωγικών και των οξειδωτικών διεργασιών, δείγματα ελήφθησαν για την επιβεβαίωση του ανωτέρω μηχανισμού απομάκρυνσης του βουτυρικού οξέος μέσω της μικροσκοπικής παρατήρησης της βιομάζας των πειραμάτων. Η χρώση Neisser χρησιμοποιήθηκε με στόχο την αναγνώριση των αλυσίδων PHB εντός των μικροοργανισμών, που απεικονίζονται στις παρακάτω φωτογραφίες με κόκκινο χρώμα.



Σχήμα 4.42 Φωτογραφίες βιομάζας των πειραμάτων (a) MPHBCo (b) NPHB, (c) QMPHB, (d) MPHVB, σε δείγματα που έχει χρησιμοποιηθεί η χρώση Neisser. Οι κύκλοι καταδεικνύουν τις αλυσίδες PHB.

Σε όλα τα πειράματα με 9.1 mM βουτυρικού οξέος (βλ. Σχήμα 4.42 b, c, d), ανιχνεύτηκε ένας μεγάλος αριθμός αλυσίδων πολυυδροξυβουτυρικού οξέος (Polyhydroxybutyrate; PHB), ενώ στο δείγμα από το πείραμα ελέγχου, η ποσότητά τους είναι περιορισμένη. Επιπλέον, η παρουσία των θετικών σημάτων ήταν πιο εμφανής στα μπουκάλια με τις N καλλιέργειες από ότι στα πειράματα με θειικά ιόντα. Κατά συνέπεια τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η αρχική απομάκρυνση του βουτυρικού οξέος, στα πειράματα με υψηλές δόσεις δότη, οφείλεται κυρίως σε ενδοκυτταρική αποθήκευση από μικροοργανισμούς που σχηματίζουν PHB αλυσίδες. Στη συνέχεια, τα PHBs καταναλώνονται σταδιακά και παρέχουν ηλεκτρόνια για τη θειικοαναγωγή, τη μεθανογένεση και την αναγωγική αποχλωρίωση.

Παρόμοια αποτελέσματα είχαν και οι Heaven et al., (2013), οι οποίοι μελέτησαν τη βιολογική αποχλωρίωση του PCE. Σε πειράματα με υψηλές συγκεντρώσεις δότη ηλεκτρονίων, διαπίστωσαν ότι μεγάλη μάζα ηλεκτρονίων που φάνηκε να παράγεται, δεν καταμετρήθηκε από τις αναγωγικές διεργασίες. Όμως, η βιοκοινότητα των καλλιεργειών περιείχε είδη του γένους *Syntrophomonas*, τα οποία έχουν την ικανότητα δημιουργίας αλυσίδων PHB και αποθήκευσή τους εντός των κυττάρων, όταν εκτίθενται σε παροδική προσθήκη υποστρωμάτων. Μάλιστα, παρατήρησαν ότι

οι μεγαλύτερες ποσότητες ελλείμματος ηλεκτρονίων ήταν ανάλογες με την αυξορρύθμιση των γονιδίων (upregulated genes) της συνθετάσης που είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία των PHB αλυσίδων.

4.3. Επίδραση του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην αποχλωρίωση

4.3.1. Σχεδιασμός πειραμάτων

Το είδος των δοτών ηλεκτρονίων έχει μελετηθεί εκτενώς ιδιαίτερα ως προς τη βελτιστοποίηση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και του ανταγωνισμού με τη μεθανογένεση (Fennell et al., 1997; Azizian et al., 2010; Carr & Hughes, 1998). Όμως, η έρευνα στράφηκε κυρίως είτε σε συμβατικές οργανικές ενώσεις, όπως το γαλακτικό οξύ, το βουτυρικό οξύ, η μεθανόλη, κ.ά., είτε σε φτηνές λύσεις, λόγω χάριν γαλακτοποιημένα έλαια, σκόνη τυρογάλακτος, μελάσσες, κ.λπ., ενώ δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η επίδραση των φυσικών αναγωγικών μέσων του εδάφους.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση σε δύο αναγωγικά μέσα του εδάφους, στη φυσική οργανική ύλη και το σίδηρο που εμπεριέχεται σε ορυκτά με στόχο την κατανόηση των μηχανισμών που συμμετέχουν για την απομάκρυνση των χλωριωμένων αιθενίων. Επομένως, για την πραγμάτωση του δεύτερου ερευνητικού στόχου, δηλαδή τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην επίδοση της αποχλωρίωσης του TCE, σχεδιάστηκαν πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.13.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, βιομάζα χρησιμοποιήθηκε από τις μητρικές καλλιέργειες N (μηδενική συγκέντρωση θειικών ιόντων) και τις καλλιέργειες M (400 mg/L), όπως περιγράφηκαν στην ενότητα 4.2, για τα μπουκάλια υπό μεθανογόνες και θεικοαναγωγικές συνθήκες, αντιστοίχως.

Αναλυτικότερα, η επιλογή του είδους και των ποσοτήτων που προστέθηκαν στα μπουκάλια με το αντίστοιχο σκεπτικό παρουσιάζονται στην κάθε παράγραφο ξεχωριστά. Συνοπτικά, τα είδη του δότη ηλεκτρονίων που ελέγχθηκαν είχαν ως εξής:

- (i) απιονισμένο νερό (DW: Distilled Water) που χρησιμοποιείται ως πείραμα ελέγχου για την ποσοτικοποίηση των διαρροών από το μπουκάλι,
- (ii) βιομάζα (NED: No Electron Donor), πείραμα ελέγχου για την αξιολόγηση της βιομάζας ως δότη ηλεκτρονίων,
- (iii) βουτυρικό οξύ (But: Butyrate), το οποίο δίνει ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στους αποχλωριωτές έναντι άλλων ομάδων μικροοργανισμών μέσω της αργής διάσπασής του σε υδρογόνο και οξικό οξύ, όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 2.3,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- (iv) υδρογόνο (Hyd: Hydrogen), το οποίο χρησιμοποιείται από τα *Dehalococcoides* spp. για την αποχλωρίωση του TCE σε αιθένιο,
- (v) οξικό οξύ (Ac: Acetate), το οποίο χρησιμοποιείται άμεσα ως δότης σε πολλές αναγωγικές διεργασίες, όπως η μεθανογένεση και η θειικοαναγωγή,
- (vi) προπανόλη (Prop: Propanol), που χρησιμοποιείται ως πηγή ηλεκτρονίων από μια πληθώρα μικροοργανισμών για τις αναγωγικές διεργασίες,
- (vii) βενζοϊκό οξύ (Benz: Benzoate), που διασπάται αργά παράγοντας ηλεκτρόνια,
- (viii) υδροκινόνη (Hq: Hydroquinone), ως αντιπρόσωπος των χουμικών οξέων για την αξιολόγηση της επίδρασης της φυσικής οργανικής ύλης στην αναγωγική αποχλωρίωση,
- (ix) διαλυτή οργανική ύλη (DOM: Dissolved Organic Matter), για τη μελέτη της επίδρασης της φυσικής οργανικής ύλης στην αναγωγική αποχλωρίωση του TCE,
- (x) θειούχος σίδηρος (FeS), για την αξιολόγηση της επίδρασης του στερεού σιδήρου,
- (xi) διχλωριούχος σίδηρος (FeCl₂), για τη μελέτη του διαλυτού σιδήρου ως δότη ηλεκτρονίων, και
- (xii) τυρόγαλο (CW: Cheese Whey) ως μια φτηνή πηγή ηλεκτρονίων για τη χρήση της στην αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών από TCE.

Αναφορικά με την ποσότητα των ουσιών που προαναφέρθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές δόσεις. Η χαμηλή δόση (0.6 meq/L) για τη μελέτη του φαινομένου μεταφοράς ηλεκτρονίων από έναν δότη στα χλωριωμένα αιθένια, οι μέσες δόσεις (6-16 meq/L) για την αξιολόγηση της επίδρασης των διάφορων δοτών ηλεκτρονίων στην αναγωγική αποχλωρίωση και οι υψηλες δόσεις (45-60 meq/L) για τη μελέτη της επίδρασης της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων στην απόδοση και το ρυθμό της αναγωγικής αποχλωρίωσης.

Το pH των πειραμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 6.5-6.9, άρα ήταν εντός του βέλτιστου εύρους για το μέγιστο ρυθμό της αναγωγικής αποχλωρίωσης 6.5-7.5, και δεν παρουσιάζεται παρακάτω.

Πίνακας 4.13 Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων.

Όνομα αντιδραστήρα	Μέσο (Μέρες καλλιέργειας)	Δότης ηλεκτρονίων ^a			SO ₄ ²⁻			TCE			Μέρες λειτουργίας
		mM	mg/L	meq/L	mM	mg/L	meq/L	mM	mg/L	meq/L	
A. Επίδραση είδους δότη ηλεκτρονίων											
DWNED	Απιονισμένο νερό (DW)	0	0	0	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	22
NNED	N1, 2 (1523)	0	0	0	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	143
NMED	N1, 2 (912)	3.0 But	264 But	12.0 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	5
NMAc	N1, 2 (1391)	1.5 Ac	90.1 Ac	12.0 Ac	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	128
N1DHyd	N1, 2 (912)	0.3 But + 3.0 Hyd	26.4 But + 6.0 Hyd	1.2 But + 6.0 Hyd	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	5
NMProp	N1, 2 (1643)	0.7 Prop	40.1 Prop	12.0 Prop	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	266
NMBenz	N1, 2 (1643)	0.4 Benz	48.9 Benz	12.0 Benz	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	69
B. Επίδραση οργανικής ύλης εδάφους											
DWMHq	Απιονισμένο νερό (DW)	6.0 Hq	661 Hq	12.0 Hq	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	59
NMHq	N1, 2 (1391)	6.0 Hq	661 Hq	12.0 Hq	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	128
NMAcLHq	N1, 2 (1523)	1.5 Ac + 0.6 Hq	90.1 Ac + 66.1 Hq	12.0 Ac + 1.2 Hq	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	92
NMAcMHq	N1, 2 (1405)	1.5 Ac + 6.0 Hq	90.1 Ac + 661 Hq	12.0 Ac + 12.0 Hq	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	211
NMDOM	N1, 2 (1391)	x DOM ^b	661 DOM	x DOM ^c	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	128
NMAcMDOM	N1, 2 (1391)	1.5 Ac + x DOM ^b	90.1 Ac + 661 DOM	12.0 Ac + x DOM ^c	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	128
Γ. Επίδραση είδους και ποσότητας σιδήρου											
DWMFeS	Απιονισμένο νερό (DW)	6.0 FeS	528 FeS	6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	114
NMFeS	N1, 2 (1405)	6.0 FeS	528 FeS	6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	211
NMAcLFeS	N1, 2 (1523)	1.5 Ac + 0.6 FeS	90.1 Ac + 52.8 FeS	12.0 Ac + 0.6 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	143
NQMAcLFeS	N1, 2 (1523)	2.0 Ac + 0.6 FeS	120 Ac + 52.8 FeS	16.0 Ac + 0.6 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	143
NMAcMFeS	N1, 2 (1405)	1.5 Ac + 6 FeS	90.1 Ac + 528 FeS	12.0 Ac + 6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	28
NMHqMFeS	N1, 2 (1405)	6.0 Hq + 6.0 FeS	661 Hq + 528 FeS	12.0 Hq + 0.6 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	211
NMFeCl ₂	N1, 2 (1524)	6.0 FeCl ₂	758 FeCl ₂	6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	142
NMAcMFeCl ₂	N1, 2 (1524)	1.5 Ac + 6.0 FeCl ₂	90.1 Ac + 758 FeCl ₂	12.0 Ac + 6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	142
NQMAcLFeCl ₃	N1, 2 (1524)	2 Ac + 0.6 FeCl ₃	120.1 Ac + 97.3 FeCl ₃	16.0 Ac + (0.6 ^e Fe ²⁺)	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	142

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

NMPropLFeS	N1, 2 (1643)	0.7 Prop + 0.6 FeS	40.1 Prop + 52.8 FeS	12.0 Prop + 0.6 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	266
NMPropMFeS	N1, 2 (1643)	0.7 Prop + 6.0 FeS	40.1 Prop + 528 FeS	12.0 Prop + 6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	69
Δ. Επίδραση σιδήρου υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες											
MMAcMFeS	M1, 2 (1145 & 1517)	1.5 Ac + 6.0 FeS	90.1 Ac + 528 FeS	12.0 Ac + 6.0 ^d Fe ²⁺	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	141
MQHAcLFeS	M1, 2 (1145 & 1517)	5.7 Ac + 0.6 FeS	340 Ac + 52.8 FeS	45.3 Ac + 0.6 ^d Fe ²⁺	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	141
MMAcLFeCl ₃	M1, 2 (1145 & 1517)	1.5 Ac + 0.6 FeCl ₃	90.1 Ac + 97.3 FeCl ₃	12.0 Ac + (0.6 ^e Fe ²⁺)	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	141
MQHAcLFeCl ₃	M1, 2 (1145 & 1517)	5.7 Ac + 0.6 FeCl ₃	340 Ac + 97.3 FeCl ₃	45.3 Ac + (0.6 ^e Fe ²⁺)	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	141
Ε. Τυρόγαλα ως δότης ηλεκτρονίων											
NMRCW	N1, 2 (1727)	x RCW ^b	96 COD	12.0 COD	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	13
NHRCW	N1, 2 (1727)	5.0x RCW ^b	480 COD	60.0 COD	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	51
NMPCW	N1, 2 (1727)	x PCW ^b	96 COD	12.0 COD	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	51
NHPCW	N1, 2 (1727)	5.0x PCW ^b	480 COD	60.0 COD	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	51
ΣΤ. Τυρόγαλα ως δότης ηλεκτρονίων υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες											
MMRCW	M1, 2 (1356 & 1728)	x RCW ^b	96 COD	12.0 COD	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	181
MHRCW	M1, 2 (1356 & 1728)	5.0x RCW ^b	480 COD	60.0 COD	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	181

^aBut: βουτυρικό οξύ, Hyd: μοριακό υδρογόνο, Ac: Οξικό οξύ, Hq: Υδροκινόνη, DOM: Διαλυτή οργανική ύλη, Prop: Προπανόλη, Benz: Βενζοϊκό οξύ, CW: Τυρόγαλο. ^bΔεν είναι γνωστό το μοριακό βάρος. ^cΔεν είναι γνωστή η κανονικότητα. ^dΥπολογισμός παραγόμενων ηλεκτρονίων από τον δισθενή σίδηρο. ^eΜετά την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή.

4.3.2. Παρουσίαση και σχολιασμός αποτελεσμάτων

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων, όπως ο σίδηρος και η φυσική οργανική ύλη. Τα πειράματα χωρίστηκαν σύμφωνα με τα ερωτήματα που τίθενται και τα αποτελέσματά τους περιγράφονται σε κάθε Ενότητα, ενώ στο τέλος του κεφαλαίου πραγματοποιείται μια συγκριτική αξιολόγηση όλων των δοτών ηλεκτρονίων και των αναγωγικών μέσων.

4.3.2.1. Επίδραση του είδους δότη ηλεκτρονίων

Για τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους δότη ηλεκτρονίων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με διάφορες οργανικές ή μη, ουσίες υπό μεθανογόνες συνθήκες. Οι ουσίες που επιλέχθηκαν ως συμβατικοί δότες ήταν οι εξής:

- (i) το βουτυρικό οξύ (NMED: N καλλιέργειες, Medium Electron Donor), που διασπάται αργά σε υδρογόνο και οξικό οξύ, ενώ χρησιμοποιείται στην εβδομαδιαία τροφοδοσία των μητρικών καλλιιεργειών,
- (ii) το υδρογόνο (N1DHyd: N καλλιέργειες, 1Day Hydrogen), το οποίο είναι ο μοναδικός δότης που χρησιμοποιούν τα *Dehalococcoides* spp. για την πλήρη αποχλωρίωση του TCE σε αιθέριο,
- (iii) το οξικό οξύ (NMAc: N καλλιέργειες, Medium Acetate dose), που χρησιμοποιείται από πληθώρα μικροοργανισμών για την επίτευξη αναγωγικών διεργασιών,
- (iv) η προπανόλη (NMProp: N καλλιέργειες, Medium Propanol dose), η οποία φαίνεται να διοχετεύει με ηλεκτρόνια την οξικογένεση, τη θειικοαναγωγή και τη μεθανογένεση, αλλά δεν υποβοηθά στην επίδοση της αποχλωρίωσης, και
- (v) το βενζοϊκό οξύ (NMBenz: N καλλιέργειες, Medium Benzoate dose), ως μια ουσία αργής διάσπασης και παραγωγής ηλεκτρονίων, που ενισχύει τους αποχλωριωτές συγκριτικά με τα μεθανογόνα αρχαία.

Όσον αφορά τη δόση δότη ηλεκτρονίων, θεωρήθηκε ότι η βέλτιστη ποσότητα δότη ισούται με 12 meq/L, εφόσον τα πειράματα με 3 mM βουτυρικού οξέος, που περιγράφηκαν στην ενότητα 4.2., έδειξαν πλήρη αποχλωρίωση σε σύντομη χρονική διάρκεια. Επομένως, τα πειράματα σχεδιάστηκαν με την προσθήκη 12 meq/L δότη και υπολογίστηκαν οι ποσότητες σε moles της κάθε ουσίας που εισήχθησαν στα μπουκάλια. Εξαίρεση αποτέλεσε το πείραμα με το υδρογόνο όπου εγχύθηκαν 3 mM (6 meq/L), δηλαδή η ίδια ποσότητα σε moles με το πείραμα που προστέθηκε βουτυρικό οξύ.

Πάρα ταύτα, όλες οι δόσεις που χρησιμοποιήθηκαν απέδωσαν τουλάχιστον διπλάσια ποσότητα ηλεκτρονίων από τη στοιχειομετρική ζήτηση για την πλήρη αναγωγή του

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

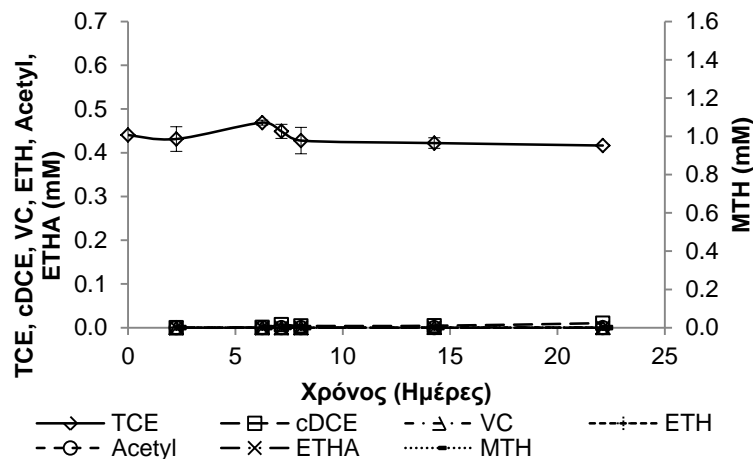
TCE σε αιθέριο. Πιο συγκεκριμένα, στα πειράματα NMAc, NMP_{prop} και NMBenz καλύφθηκε το 400% των αναγκών σε ηλεκτρόνια για την αναγωγική αποχλωρίωση, ενώ στο πείραμα με το υδρογόνο περιείχε το 200% των απαιτήσεων σε ηλεκτρόνια, και μια μικρή ποσότητα βουτυρικού οξέος ως πηγή οργανικού άνθρακα για την ανάπτυξη των ετερότροφων μικροοργανισμών.

Επιπλέον, σχεδιάστηκαν δύο πειράματα ελέγχου:

- (vi) με απιονισμένο νερό και TCE (DWNED: Distilled Water, No Electron Donor) για την αξιολόγηση των διαρροών από το μπουκάλι και τη ρόφηση του πώματος βουτυλίου, και
- (vii) με τις καλλιέργειες και TCE (NNED: N καλλιέργειες, No Electron Donor), για τον υπολογισμό της συνεισφοράς της βιομάζας στην παραγωγή ηλεκτρονίων.

Στα γραφήματα 4.43 ως 4.49 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου, πτητικών λιπαρών οξέων και η τυπική τους απόκλιση στα διπλότυπα μπουκάλια.

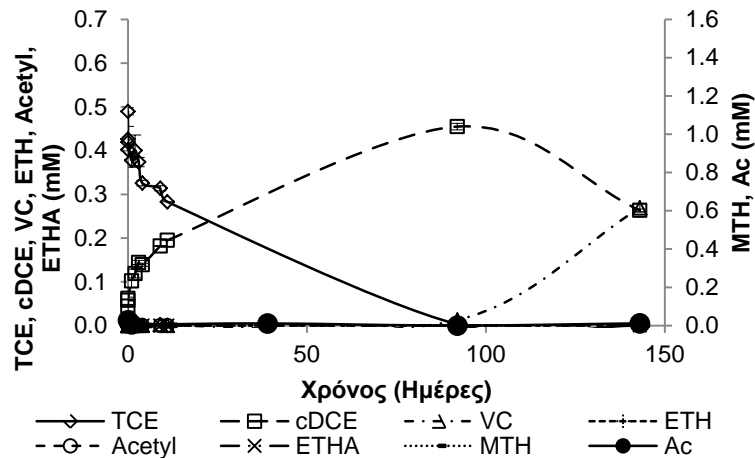
Το πείραμα DWNED λειτούργησε για 22 ημέρες και δεν είχε παρατηρηθεί κάποια σημαντική απώλεια της ποσότητας του TCE είτε λόγω διαρροής είτε εξαιτίας της ρόφησης από το πώμα. Επίσης, δεν υπήρξε κάποια αξιοσημείωτη παραγωγή των προϊόντων της αβιοτικής ή βιολογικής αποχλωρίωσης.



Σχήμα 4.43 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα DWNED (μηδενική συγκέντρωση δότη σε απιονισμένο νερό).

Τα αποτελέσματα του πειράματος που εκτελέστηκε μόνο με βιομάζα και TCE (NNED), για τον υπολογισμό της συνεισφοράς της βιομάζας στην παραγωγή ηλεκτρονίων δίνονται στο Σχήμα 4.44. Από το γράφημα, φαίνεται ότι το TCE

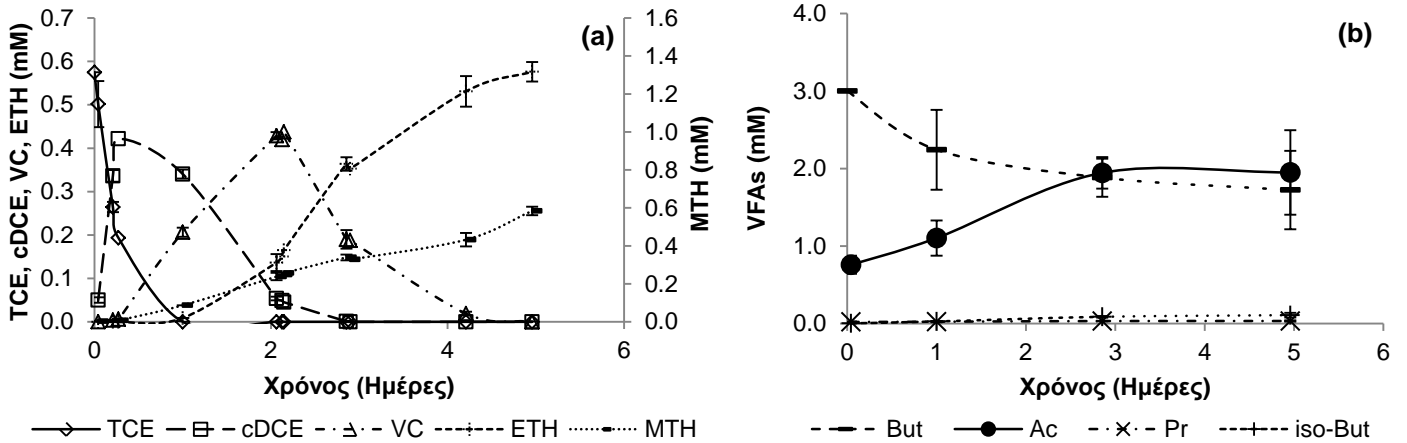
απομακρύνθηκε στις 92 ημέρες λειτουργίας και παράχθηκε cDCE, ενώ μέχρι το τέλος του πειράματος, δηλαδή την 143^η ημέρα, περίπου το 56% του αρχικού TCE μετατράπηκε σε VC. Ταυτόχρονα, η συγκέντρωση των VSS μειώθηκε από 24.5 mg/L σε 15.7 ± 0.1 mg/L, παράγοντας το $92\% \pm 2\%$ των ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν, με την υπόθεση ότι 1 mole $C_5H_7O_2N$ (γενικός χημικός τύπος κυττάρου) αποδίδει 20 meq. Το υπόλοιπο 8% των παραγόμενων ηλεκτρονίων προήλθαν από την οξείδωση του οξικού οξέος, που είχε απομείνει στις μητρικές καλλιέργειες N. Επομένως, η νεκρή βιομάζα μπορεί να δρα ως δότης ηλεκτρονίων, όπως έχει αναφερθεί και από τους Sleep et al. (2005) και McGuire et al. (2006), οι οποίοι παρατήρησαν ότι η αποχλωρίωση συνεχίζεται ακόμα και για χρόνια μετά τη λήξη της αποκατάστασης του ρυπασμένου πεδίου. Μάλιστα, οι Adamson & Newell (2009) θεώρησαν ότι η ενδογενής αναπνοή πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό της βιοαποκατάστασης.



Σχήμα 4.44 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NNED (βιοκοινότητα από τις N καλλιέργειες με μηδενική συγκέντρωση δότη).

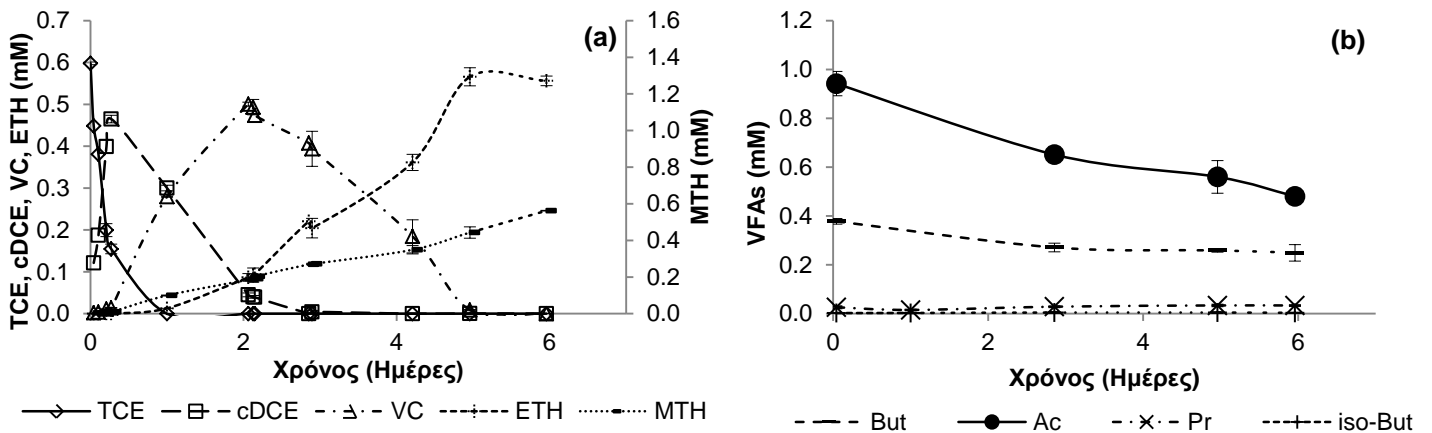
Στο Σχήμα 4.45 φαίνεται το πείραμα NMED (II), όπως έχει παρουσιαστεί και στην Ενότητα 4.2.2.2., όπου καταδεικνύεται ότι υπό μεθανογόνες συνθήκες πραγματοποιείται πλήρης αποχλωρίωση σε 5 με 9 ημέρες λειτουργίας με την προσθήκη 3 mM βουτυρικού οξέος.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.45 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NMED (II) (3.0 mM But, βουτυρικό οξύ).

Παρόμοια απόδοση αποχλωρίωσης με το NMED (II), προέκυψε όταν εισήχθησαν 3 mM υδρογόνου και 0.3 mM βουτυρικού οξέος (Σχήμα 4.46). Αναλυτικότερα, στις 5 ημέρες λειτουργίας το 99% του αρχικού TCE είχε μετατραπεί σε αιθέριο, ενώ το υπόλοιπο 1% ήταν VC. Επιπλέον, η εισπνοή του υδρογόνου προκάλεσε μια πιο αργή παραγωγή μεθανίου από ότι η μέση δόση βουτυρικού οξέος, εφόσον η συγκέντρωσή του ήταν 0.44 mM και 0.58 mM στις 5 ημέρες, αντιστοίχως.



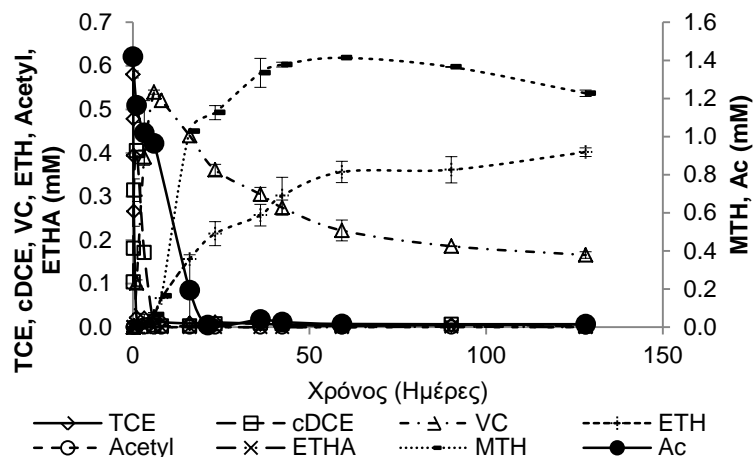
Σχήμα 4.46 Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα N1DHyd (3.0 mM Hyd, υδρογόνο & 0.3 mM But, βουτυρικό οξύ).

Η προσθήκη μιας μικρής ποσότητας βουτυρικού οξέος κρίθηκε απαραίτητη ως πηγή άνθρακα για τη σύνθεση των ετερότροφων μικροοργανισμών. Βέβαια, από τις

μετρήσεις βιομάζας φάνηκε ότι δεν υπήρξε κάποια διακύμανση στον πληθυσμό της κοινότητας. Άρα η ανάπτυξη ήταν περίπου ίδια με τη φθορά και δεν απαιτήθηκε σημαντική ποσότητα άνθρακα για την παραγωγή των νέων κυττάρων.

Επιπλέον, η κύρια πηγή ηλεκτρονίων ήταν το οξικό οξύ, που είχε παραμείνει από τις μητρικές καλλιέργειες N, αφού παρήγαγε περίπου 5.8 meq/L, δηλαδή το 73% του συνόλου των ηλεκτρονίων, ενώ μόνο το 34% του βουτυρικού οξέος καταναλώθηκε, παράγοντας 0.5 meq/L. Συνεπώς, το υπόλοιπο 20%, θεωρητικά προήλθε από το υδρογόνο, δηλαδή το 26% του αρχικού υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε για τις αναγωγικές διεργασίες.

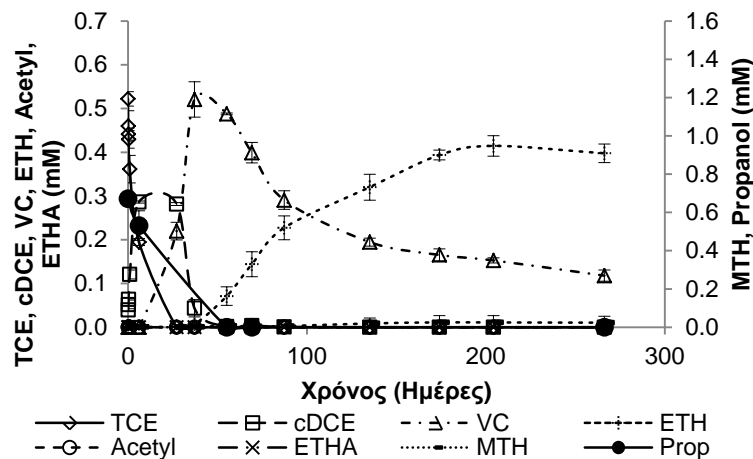
Στο Σχήμα 4.47 δίνεται η επίδραση της χρήσης οξικού οξέος στην αναγωγική αποχλωρίωση (NMAc; 1.5 mM οξικό οξύ). Όπως φαίνεται στο Σχήμα, μετά από 128 ημέρες λειτουργίας το TCE είχε μετατραπεί σε αιθένιο και VC, με ποσοστά 70% και 29%, αντιστοίχως. Πιο συγκεκριμένα, το TCE είχε εξαφανιστεί από την πρώτη ημέρα και το cDCE από την 6^η, ενώ περίπου το 60% του VC είχε αναχθεί σε αιθένιο μέχρι την 21^η ημέρα. Μετά ο ρυθμός αναγωγής του μειώθηκε, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η διεργασία. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με άλλες έρευνες, αφού το οξικό οξύ δεν θεωρείται αποδοτικός δότης ηλεκτρονίων (Wen et al., 2015; Ballaragada et al., 1997a; Lee et al., 2007a; Bunge et al., 2007). Επιπλέον, η παραγωγή μεθανίου σταμάτησε περίπου την 36^η ημέρα, όταν η συγκέντρωση έφτασε τα 1.3 mM. Η αλλαγή στην ταχύτητα αναγωγής του VC και η παύση της μεθανογένεσης πιθανόν προκλήθηκαν από την κατανάλωση του οξικού οξέος και τη χρήση της νεκρής βιομάζας ως δότη ηλεκτρονίων, σε ποσοστά 90% και 10% του συνόλου των παραγόμενων ηλεκτρονίων, αντιστοίχως.



Σχήμα 4.47 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAc (1.5 mM Ac, οξικό οξύ).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

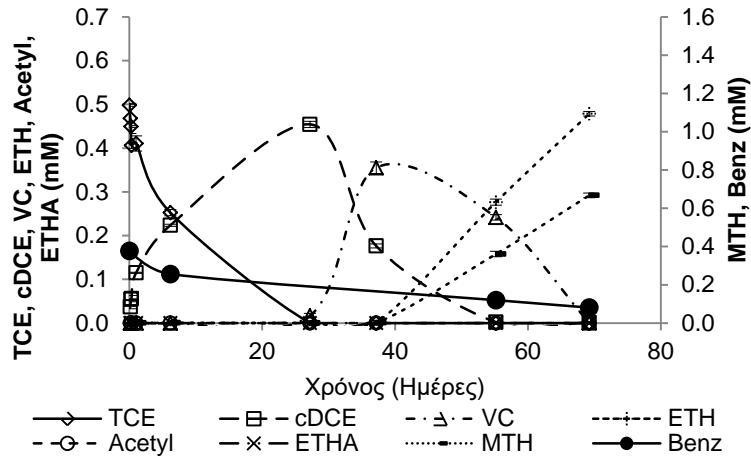
Η χρήση της προπανόλης ως δότη ηλεκτρονίων (NMPprop; 0.7 mM προπανόλη; Σχήμα 4.48) έδειξε ότι στις 266 ημέρες λειτουργίας είχαν παραμείνει 0.12 mM VC και το υπόλοιπο ήταν αιθένιο. Το TCE είχε μετατραπεί μέχρι την 27^η ημέρα, ενώ χρειάστηκαν περίπου 55 ημέρες για την απομάκρυνση του cDCE. Οι Gibson & Sewell (1992) παρατήρησαν παρόμοια τάση, εφόσον δεν ολοκληρώθηκε η αποχλωρίωση του PCE σε πειράματα με προπανόλη, ενώ αντιθέτως υπήρξε αυξημένη παραγωγή των DCEs όταν ο δότης ήταν η αιθανόλη, το προπιονικό και το γαλακτικό οξύ. Άλλες αναγωγικές διεργασίες δεν πραγματοποιήθηκαν, με αποτέλεσμα όλη η ποσότητα του δότη ηλεκτρονίων να καταναλωθεί για την αναγωγική αποχλωρίωση ως την 55^η ημέρα. Ύστερα, η αποχλωρίωση συνεχίστηκε με την οξείδωση της νεκρής βιομάζας, η οποία παρήγαγε περίπου 1.6 meq/L.



Σχήμα 4.48 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και προπανόλης στο πείραμα NMPprop (0.7 mM Prop, προπανόλη).

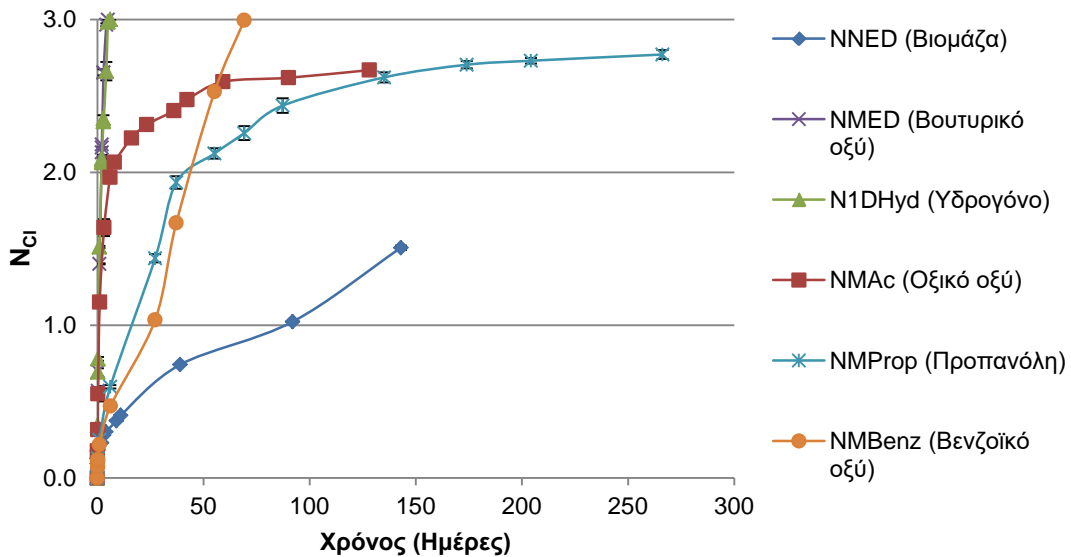
Αντιθέτως, το πείραμα με το βενζοϊκό οξύ (NMBenz; 0.4 mM βενζοϊκό οξύ; Σχήμα 4.49) έδειξε πλήρη αποχλωρίωση σε 69 ημέρες, ενώ το TCE και το cDCE είχαν απομακρυνθεί την 27^η και 55^η ημέρα, αντιστοίχως, όπως είχε συμβεί και στο πείραμα NMPprop. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τη βιβλιογραφία, αφού η αναγωγή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων σε αιθένιο αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία, όταν ο δότης είναι το βενζοϊκό οξύ (Lee et al., 2007a; Yang & McCarty, 1998; Bunge et al., 2007; Shen & Sewell, 2005). Μεθάνιο παρατηρήθηκε μετά την 37^η ημέρα, και έφτασε τα 0.67 mM ως την ολοκλήρωση του πειράματος, καταναλώνοντας το 65% των ηλεκτρονίων.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.49 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και βενζοϊκού οξέος στο πείραμα NMBenz (0.4 mM Benz, βενζοϊκό οξύ).

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, στον Πίνακα 4.14 συγκρίνεται η απόδοση των συστημάτων ως προς την αναγωγική αποχλωρίωση και τη μεθανογένεση, αντίστοιχα, ενώ στο διάγραμμα 4.50 παρουσιάζεται ο δείκτης N_{Cl} για τη σχηματική αναπαράσταση της συνολικής απόδοσης της αναγωγικής αποχλωρίωσης.



Σχήμα 4.50 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με διαφορετικά είδη δότη ηλεκτρονίων.

Πίνακας 4.14. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με διαφορετικά είδη δότη ηλεκτρονίων.

Πειράματα	Δότης ηλεκτρονίων		% Δότης $\frac{\text{εναπομείνας}}{\text{Αρχική δόση}}$	Ημέρες (% VC/ Σ CES)	cDCE _{peak}	VC _{peak}	50%	10%	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)	Τελική συγκέντρωση				
	mM	meq/L					VC _{εναπομείν} van/ Σ CES	VC _{εναπομείν} van/ Σ CES				k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)	mM	k (MTH)
DWNED	0.0	0.0	0%	22 (0%)									0.00			
NNED	0.0	0.0	0%	143 (56%)	91.0				0.007	0.004			0.00			
NMED	3.0	12.0	76%	5 (0%)	0.5	1.5	2.5	3.5	1.397	0.237	3.135		0.58	0.117		
N1DHyd	3.0	6.0	74%	6 (0%)	0.5	2.0	3.5	5.0	1.580	0.232	1.591		0.56	0.092		
NMAc	1.5	12.0	1%	128 (33%)	0.5	6.0	46.0		1.323	0.080	0.010		1.23	0.044		
NMProp	0.7	12.0	0%	266 (23%)	15.0	40.0	98.0		0.028	0.024	0.017		0.02	0.000		
NMBenz	0.4	12.0	21%	69 (0%)	27.0	44.0	50.0	68.0	0.023	0.028	0.022		0.67	0.021		

Επεξήγηση: Πορτοκαλί γράμματα: Το ποσοστό του δότη είναι υπολογισμένο σύμφωνα με την κατανάλωση και την παραγωγή ηλεκτρονίων από τις αναγωγικές διεργασίες και τους άλλους δότες, αντιστοίχως, διότι δεν γινόταν μέτρηση του υδρογόνου.

Συγκρίνοντας τους δότες ηλεκτρονίων, φαίνεται ότι ο βέλτιστος δότης ήταν το βουτυρικό οξύ, με το οποίο γινόταν η τροφοδοσία των μητρικών καλλιεργειών, αφού πλήρης αποχλωρίωση πραγματοποιήθηκε σε μόλις 5 ημέρες, ενώ η μεγαλύτερη μάζα ηλεκτρονίων διοχετεύθηκε στην παραγωγή μεθανίου (55%). Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό αν θεωρηθεί ότι η σύνθεση της βιοκοινότητας ευνόησε την οξειδωση του βουτυρικού οξέος. Αν και οι Hug et al. (2012) διαπίστωσαν ότι οι καλλιέργειες δεν χάνουν την ικανότητα οξειδωσης κάποιων ουσιών και το κατάλληλο γονιδίωμα κωδικοποιείται για το μεταβολισμό τους, ακόμα και αν έχουν περάσει χρόνια από την τελευταία έκθεση στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Το υδρογόνο ήταν, επίσης, ένας αποδοτικός δότης, παρά τη χαμηλή διαλυτότητά του στο νερό, αφού το TCE μετατράπηκε σε αιθέριο σε 6 ημέρες. Αν και τα πειράματα NMED (II) και N1DHyd πραγματοποιήθηκαν την ίδια χρονική στιγμή, δηλαδή είχαν τις ίδιες αρχικές συνθήκες μητρικής καλλιέργειας (βλ. Ενότητα 4.2.2.2.), η μικρή καθυστέρηση της αναγωγής που παρατηρήθηκε θεωρείται μηδαμινή.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τους άλλους δότες ηλεκτρονίων, συμφωνούν με τα ευρήματα άλλων ερευνών, εφόσον το οξικό οξύ και η προπανόλη δεν θεωρούνται αποδοτικοί δότες (Wen et al., 2015; Lee et al., 2007a; Bunge et al., 2007; Gibson & Sewell, 1992), αλλά το βενζοϊκό οξύ έχει δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα (Lee et al., 2007a; Bunge et al., 2007). Γενικά, οι ουσίες που υδρολύονται εύκολα αποδίδουν υψηλότερους ρυθμούς αποχλωρίωσης, δείχνουν καλύτερη απόδοση στην αποχλωρίωση και μεγαλύτερο πληθυσμό μικροοργανισμών συγκριτικά με τις μη-υδρολύσιμες (Wen et al., 2015). Όμως, ταυτόχρονα τροφοδοτούν με ηλεκτρόνια άλλες αναγωγικές διεργασίες, όπως η μεθανογένεση, εφόσον διατηρούν την οριακή συγκέντρωση υδρογόνου σε υψηλά επίπεδα ευνοώντας τη μη-αποχλωριωτική κοινότητα (Smatlak et al., 1996). Επιπλέον, όπως έχει αναλυθεί και στην Ενότητα 2.3., η ύπαρξη άλλων μικροοργανισμών είναι σημαντική για τους *Dehalococcoides* spp. που συνθέτουν μόνο μερικώς τις απαραίτητες ουσίες για την ανάπτυξή τους (He et al., 2007). Τα παραπάνω συμφωνούν με τα αποτελέσματά των πειραμάτων της παρούσας διατριβής, αφού η καλή απόδοση στην αποχλωρίωση συνοδεύεται με την παραγωγή μεθανίου.

4.3.2.2. Επίδραση οργανικής ύλης εδάφους

Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας πραγματοποιήθηκαν, με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της φυσικής οργανικής ύλης του εδάφους στην αναγωγική αποχλωρίωση. Η απλούστερη μορφή κινονών, η υδροκινόνη (Hydroquinone; Hq), επιλέχτηκε ως ο αντιπρόσωπος για τη μελέτη της δράσης των χουμικών οξέων, που είναι βασικά συστατικά της οργανικής ύλης του εδάφους. Επίσης, η διαλυτή οργανική ύλη (Dissolved Organic Matter; DOM), η οποία είναι ένα μίγμα πολύπλοκων οργανικών ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της φυσικής διαλυτής οργανικής ύλης (NOM) του εδάφους και του υπόγειου νερού.

Όπως προαναφέρθηκε στην Ενότητα 2.3.5.7, η φυσική οργανική ύλη μπορεί να δράσει με διάφορους τρόπους στην απομάκρυνση των χλωριωμένων αιθενίων, όπως η χρήση της ως δότης ηλεκτρονίων, η χρήση της ως μεταφορέας ηλεκτρονίων, κ.λπ. Επιπλέον, ελέγχθηκε η επίδραση της φυσικής οργανικής ύλης στην ενισχυμένη βιολογική αποχλωρίωση με την προσθήκη του οξικού οξέος ως εξωτερικής πηγής ηλεκτρονίων. Η διαλυτή οργανική ύλη επιλέχθηκε γιατί χρησιμοποιείται άμεσα από πληθώρα μικροοργανισμών με στόχο την χρήση της ως δότης ή/και μεταφορέας ηλεκτρονίων για την αναγωγή των οργανοχλωριωμένων ενώσεων.

Επομένως, πειράματα σχεδιάστηκαν με στόχο τον έλεγχο αυτών των δράσεων ως εξής:

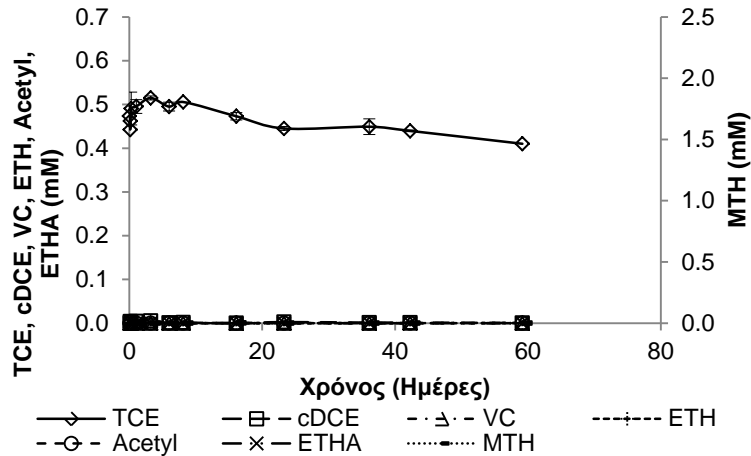
- (i) 6 mM υδροκινόνης σε απιονισμένο νερό (DWMHq: Distilled Water, Medium dose of Hydroquinone), για τον έλεγχο της αβιοτικής αποχλωρίωσης και της ρόφησης από τα χουμικά οξέα,
- (ii) 6 mM υδροκινόνης στις καλλιέργειες N (NMHq: N καλλιέργειες, Medium dose of Hydroquinone), για την αξιολόγηση της χρήσης της υδροκινόνης ως δότη ηλεκτρονίων,
- (iii) 1.5 mM οξικού οξέος και 0.6 mM υδροκινόνης στις καλλιέργειες N (NMAcLHq: N καλλιέργειες, Medium dose of Acetate, Low dose of Hydroquinone), για τη μελέτη της δράσης των χουμικών οξέων ως μεταφορείς ηλεκτρονίων,
- (iv) 1.5 mM οξικού οξέος και 6 mM υδροκινόνης στις καλλιέργειες N (NMAcMHq: N καλλιέργειες, Medium dose of Acetate, Medium dose of Hydroquinone), για τη μέτρηση της επίδοσης της υδροκινόνης ως συμπληρωματικού δότη ηλεκτρονίων στην ενισχυμένη βιοαποκατάσταση,
- (v) 661 mg/L DOM στις καλλιέργειες N (NMDOM: N καλλιέργειες, Medium dose of DOM), για τον έλεγχο της απόδοσης της φυσικής οργανικής ύλης ως δότη ηλεκτρονίων στην αναγωγική αποχλωρίωση, και
- (vi) 1.5 mM οξικού οξέος και 661 mg/L DOM στις καλλιέργειες N (NMAcMDOM: N καλλιέργειες, Medium dose of Acetate, Medium dose of DOM), για την αξιολόγηση της χρήσης του φυσικού οργανικού υλικού ως συμπληρωματικού δότη ηλεκτρονίων.

Θεωρητικά, 1 mole υδροκινόνης μπορεί να αποδώσει 2 ηλεκτρόνια, επομένως οι ποσότητες των 6 mM και 0.6 mM υδροκινόνης εξισώνονται με τη μέση δόση βουτυρικού οξέος (3 mM, 12 meq/L) και τη χαμηλή δόση (0.3 mM, 1.2 meq/L), που θεωρείται χαρακτηριστική συγκέντρωση στο υπόγειο νερό. Σημειώνεται ότι το μοριακό βάρος και ο χημικός τύπος της DOM είναι άγνωστα, εφόσον θεωρείται ένα μίγμα ουσιών.

Οι μέσοι όροι των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος φαίνονται στα Σχήματα 4.51 ως 4.56, ενώ οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση στα διπλότυπα serum μπουκάλια.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

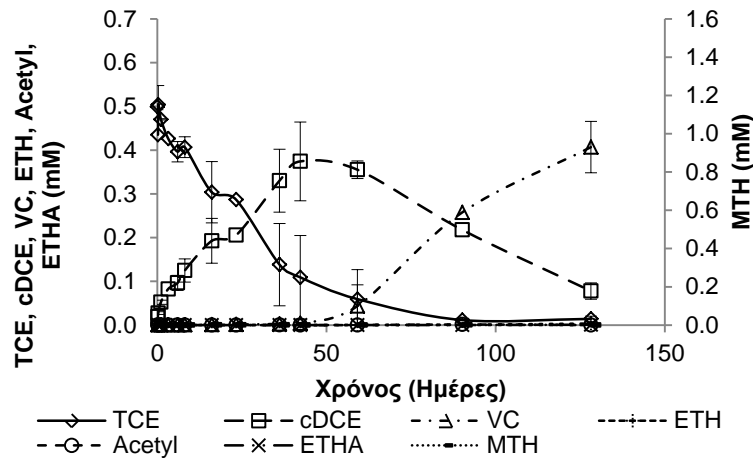
Όπως παρατηρείται στο πείραμα DWMHq (6 mM υδροκινόνη σε απιονισμένο νερό; Σχήμα 4.51), το TCE δεν φάνηκε να απομακρύνεται στις 60 ημέρες λειτουργίας. Επομένως, είτε ο ρυθμός της αβιοτικής αποχλωρίωσης ήταν πολύ χαμηλός είτε δεν πραγματοποιείται αυτή η διεργασία από την υδροκινόνη. Το COD, επίσης, παρέμεινε σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στα 1230 mg/L.



Σχήμα 4.51 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα DWMHq (6 mM Ηq, υδροκινόνη σε απιονισμένο νερό).

Στο Σχήμα 4.52 όπου παρουσιάζεται το πείραμα με μέση συγκέντρωση υδροκινόνης (NMHq; 6 mM υδροκινόνη στις καλλιέργειες N), φαίνεται ότι το TCE μετατράπηκε σε cDCE στις 90 ημέρες, ενώ μέχρι το τέλος του πειράματος είχε παραμείνει κυρίως VC και cDCE σε ποσοστά 80% και 15% του συνόλου των χλωριωμένων αιθενίων. Παράλληλα, η παραγωγή μεθανίου παρέμεινε μηδαμινή, το ολικό COD παρέμεινε σταθερό καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ τα VSS μειώθηκαν κατά 41%, ποσότητα που αντιστοιχεί σε 1.6 meq/L. Επομένως σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που πραγματοποιήθηκαν μόνο με βιομάζα (NNED, Σχήμα 4.44), εκτιμήθηκε ότι το 88% των ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από την οξείδωση της νεκρής βιομάζας, ενώ θεωρήθηκε ότι δεν συμμετείχε άλλη οξειδωτική διεργασία. Καθώς η ανάκτηση του πειράματος, υπολογίζοντας μόνο την παραγωγή ηλεκτρονίων από τη βιομάζα, ήταν 113% και το αποδεκτό εύρος είναι μεταξύ 75-125%. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στο πείραμα NNED, όπου η νεκρή βιομάζα οξειδώθηκε αποδίδοντας 1.6 meq/L. Άρα, η υδροκινόνη δεν χρησιμοποιήθηκε ως δότης ηλεκτρονίων από τους μικροοργανισμούς οργανοαλογονικής αναπνοής και μεθανογένεσης.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

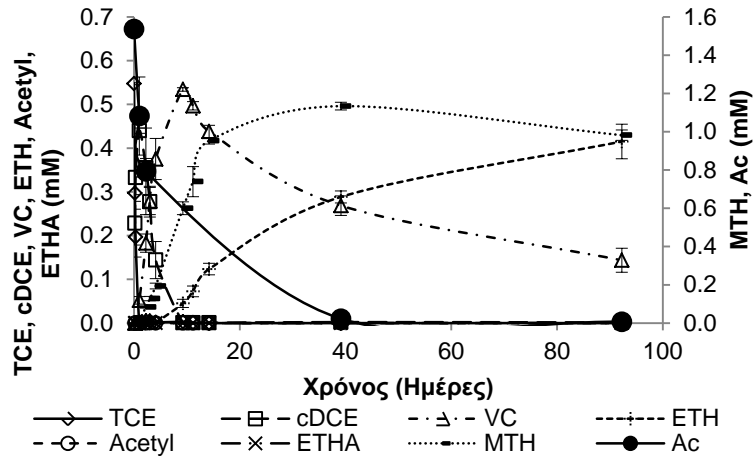


Σχήμα 4.52 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMHq (6 mM Hq, υδροκινόνη στις καλλιέργειες N).

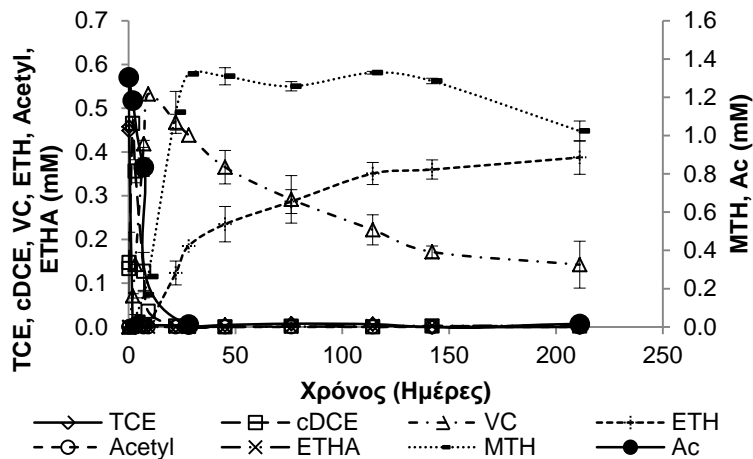
Από το Σχήμα 4.53 (Πείραμα με οξικό οξύ και μικρή συγκέντρωση υδροκινόνης, NMAcLHq) φαίνεται ότι το TCE και το cDCE καταναλώθηκαν την πρώτη και την 6^η ημέρα, αντιστοίχως. Μέχρι το τέλος του πειράματος, δηλαδή την 92^η ημέρα είχε παραμείνει μόνο το VC σε ποσοστό 26% του συνόλου των χλωριωμένων αιθενίων και το υπόλοιπο ήταν αιθέριο. Όσον αφορά τη μεθανογένεση, η παραγωγή μεθανίου ξεκίνησε την πρώτη ημέρα και σταθεροποιήθηκε στο 1 mM. Το οξικό οξύ παρήγαγε το 90% των ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ το υπόλοιπο 10% δημιουργήθηκε από τη νεκρή βιομάζα. Έτσι, οι ρυθμοί των αναγωγικών διεργασιών μειώθηκαν μετά την κατανάλωση του οξικού οξέος, διότι η πηγή ηλεκτρονίων ήταν η νεκρή βιομάζα. Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να συμφωνούν με τα αποτελέσματα του πειράματος μόνο με το οξικό οξύ ως δότη ηλεκτρονίων, αφού στις 90 ημέρες το VC ήταν 33% του αθροίσματος των χλωροαιθενίων και το μεθάνιο ήταν περίπου 1.2 mM.

Το πείραμα με το οξικό οξύ και τη μέση συγκέντρωση υδροκινόνης, NMAcMHq (Σχήμα 4.54), έδειξε ότι το TCE είχε μετατραπεί σε VC και κυρίως σε αιθέριο μετά την πάροδο 211 ημερών λειτουργίας. Το οξικό οξύ καταναλώθηκε τις πρώτες 30 ημέρες, όποτε σταθεροποιήθηκε και η παραγωγή μεθανίου στα 1.2 mM, ενώ το ολικό COD παρέμεινε σταθερό στα 1330 mg/L. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο κύριος δότης ηλεκτρονίων ήταν το οξικό οξύ που παρήγαγε το 92% των ηλεκτρονίων, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό προήλθε από την οξείδωση της νεκρής βιομάζας. Οι τάσεις αυτές ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στο πείραμα με το οξικό οξύ, άρα η μέση δόση υδροκινόνης δεν ωφέλησε την αναγωγική αποχλωρίωση και τη μεθανογένεση.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



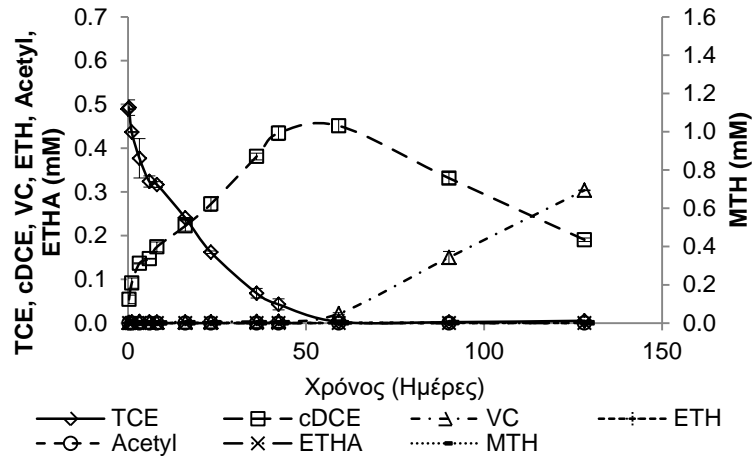
Σχήμα 4.53 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcLHq (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 0.6 mM Hq, υδροκινόνη).



Σχήμα 4.54 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcMHq (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 6 mM Hq, υδροκινόνη).

Η επίδραση της φυσικής οργανικής ύλης παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.55 (NMDOM; 661 mg/L DOM), όπου φαίνεται ότι το TCE ανάχθηκε σε cDCE στις 60 ημέρες λειτουργίας και ως το τέλος των πειραμάτων, είχε παραμείνει cDCE και VC σε ποσοστά 38% και 60% του συνόλου των χλωριωμένων αιθενίων, αντιστοίχως. Η αναγωγική αποχλωρίωση ήταν η μόνη διεργασία κατανάλωσης ηλεκτρονίων και φαίνεται ότι χρησιμοποίησε 1.6 meq/L, δηλαδή ίδια ποσότητα όπως στο πείραμα με δότη ηλεκτρονίων μόνο τη βιομάζα (NNED, σχήμα 4.44). Επιπλέον, το ολικό COD παρέμεινε σταθερό σε όλη την πορεία του πειράματος, δηλαδή περίπου 806 mg/L.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



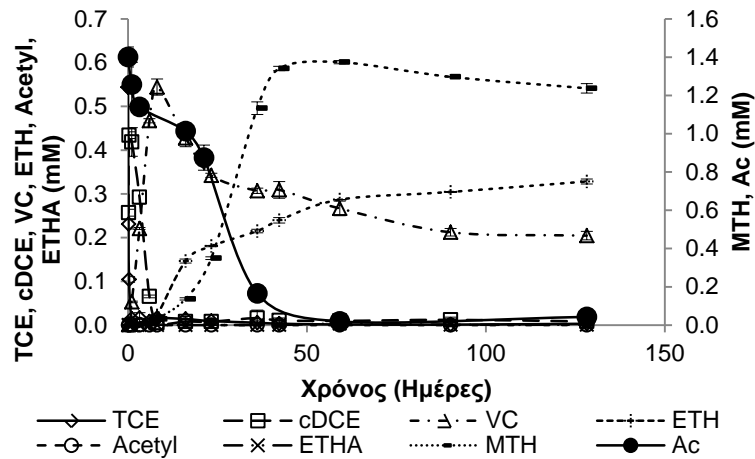
Σχήμα 4.55 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMDOM (661 mg/L DOM, διαλυτή οργανική ύλη).

Το Σχήμα 4.56 δείχνει το πείραμα με το οξικό οξύ και DOM (NMAcMDOM), που ως στόχο είχε τη διερεύνηση της επίδρασης της φυσικής οργανικής ύλης στην ενισχυμένη βιολογική αποχλωρίωση. Όπως παρουσιάζεται λοιπόν, το TCE μετατράπηκε σε cDCE την πρώτη ημέρα και το cDCE σε VC την 7^η ημέρα. Στο τέλος του πειράματος, δηλαδή τις 128 ημέρες λειτουργίας, είχε παραμείνει περίπου το 38% του αρχικού TCE ήταν VC και το υπόλοιπο αιθέριο. Η μεθανογένεση ξεκίνησε την 1^η ημέρα, αλλά σταθεροποιήθηκε στις 42 ημέρες στη συγκέντρωση 1.3 mM μεθανίου. Το παραπάνω μάλλον οφείλεται στην κατανάλωση του οξικού οξέος, επηρεάζοντας την ταχύτητα αποχλωρίωσης και την παραγωγή μεθανίου, οι οποίες μειώθηκαν ραγδαία. Η οξειδωση του οξικού οξέος πρόσφερε το 85% των ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν, ενώ το υπόλοιπο 15% προήλθε από τη χρήση της νεκρής βιομάζας ως δότη ηλεκτρονίων. Το ολικό COD κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος (860 mg/L). Συνεπώς, το DOM δεν συμμετείχε στις οξειδοαναγωγικές διεργασίες είτε ως δότης είτε ως αποδέκτης ηλεκτρονίων.

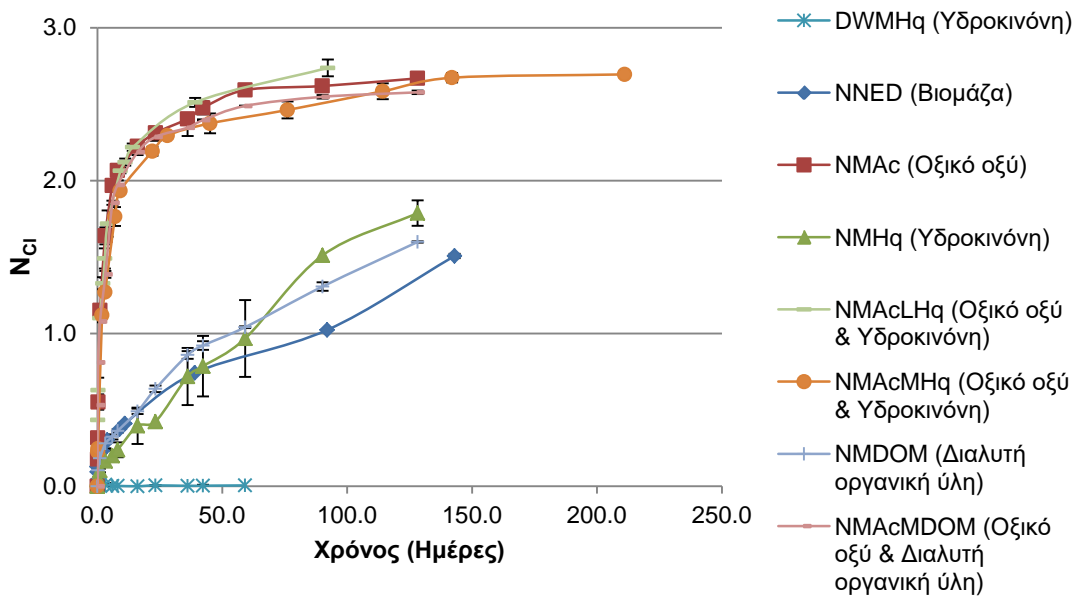
Πιο αναλυτικά, τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων συγκρίνονται στον Πίνακα 4.15, και το N_{Cl} παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.57.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 4.57 και τον Πίνακα 4.15, η υδροκινόνη και το DOM δεν χρησιμοποιούνται ως δότες, εφόσον η βιομάζα παρήγαγε τα ηλεκτρόνια που καταναλώθηκαν για την αναγωγική αποχλωρίωση στα πειράματα NMHq και NMDOM, αποδίδοντας περίπου 1.6 meq/L, όπως και στο πείραμα NNED. Επιπλέον, οι ρυθμοί απομάκρυνσης του TCE και cDCE ήταν παρόμοιοι και στα τρία πειράματα οι οποίοι κυμαίνονται μεταξύ 0.007-0.010 mM/day και 0.003-0.004 mM/day, αντιστοίχως.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.56 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcMDOM (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 661 mg/L DOM, διαλυτή οργανική ύλη).



Σχήμα 4.57 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με φυσική οργανική ύλη εδάφους.

Όσον αφορά την επίδραση της φυσικής οργανικής ύλης στην ενισχυμένη βιοαποκατάσταση, τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι το οξικό οξύ ήταν η κύρια πηγή ηλεκτρονίων, ενώ η νεκρή βιομάζα συμμετείχε σε ποσοστό 8-15%. Ο ρυθμός αναγωγής του TCE φάνηκε να ελαττώνεται κατά 27% και 38% με την αύξηση της συγκέντρωσης της υδροκινόνης από τη μηδενική συγκέντρωση σε 0.6 mM και 6 mM, αντιστοίχως. Αντιθέτως, οι ταχύτητες αναγωγής του cDCE και VC εκτιμήθηκαν στα ίδια επίπεδα στα πειράματα NMAc (Οξικό οξύ), NMAcLHq (Οξικό οξύ με μικρή

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

συγκέντρωση υδροκινόνης), NMAcMHq (Οξικό οξύ με μέση συγκέντρωση υδροκινόνης) και NMAcMDOM (Οξικό οξύ με μέση συγκέντρωση διαλύτης οργανικής ύλης), με τις τιμές τους να κυμαίνονται περίπου μεταξύ 0.064-0.096 mM/day και 0.007-0.016/day. Επιπλέον, η μεθανογένεση ήταν παρόμοια και στα τέσσερα πειράματα με τελική τιμή μεθανίου περίπου 1.1 mM. Επομένως, το οργανικό υλικό του εδάφους δεν φαίνεται να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το οξικό οξύ στους αποδέκτες, εφόσον δεν βελτίωσε τον ρυθμό και την επίδοση των αναγωγικών διαδικασιών.

Συμπερασματικά, η υδροκινόνη και το DOM δεν θεωρήθηκε ότι διαδραμάτισαν κάποιο σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση των χλωριωμένων αιθενίων, σε αντίθεση με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας, όπου παρουσιάζεται η χρήση των χουμικών οξέων και γενικά της φυσικής οργανικής ύλης ως δότες και μεταφορείς ηλεκτρονίων (Aulenta et al., 2010b; Lovley et al., 1998; Ma et al., 2001).

Πίνακας 4.15. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με διαφορετικά είδη και συγκεντρώσεις οργανικής ύλης εδάφους.

Πειράματα	Φυσική οργανική ύλη		Οξικό οξύ		Ημέρες (% VC/Σ _{CES})	cDCE _{peak}	VC _{peak}	50% VC _{εναπομείν} van/Σ _{CES}	10% VC _{εναπομείν} van/Σ _{CES}	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)	Τελική συγκέντρωση	k (MTH)
	mM	meq/L	mM	meq/L		Ημέρες	mM/day	mM/day	1/day	mM	mM/day			
DWMHq	6.0	12.0	0.0	0.0	59 (0%)								0.00	
NNED	0.0	0.0	0.0	0.0	143 (56%)	91.0				0.007	0.004		0.00	
NMED	0.0	0.0	3.0	12.0	5 (0%)	0.5	1.5	2.5	3.5	1.397	0.237	3.135	0.58	0.117
NMAc	0.0	0.0	1.5	12.0	128 (33%)	0.5	6.0	46.0		1.323	0.080	0.010	1.23	0.044
NMHq	6.0	12.0	0.0	0.0	128 (80%)	59.0				0.009	0.003		0.00	
NMAcLHq	0.6	1.2	1.5	12.0	92 (26%)	1.0	6.0	40.0		0.961	0.096	0.016	0.98	0.074
NMAcMHq	6.0	12.0	1.5	12.0	211 (32%)	1.0	9.0	65.0		0.825	0.064	0.007	0.99	0.053
NMDOM	N/A	N/A	0.0	0.0	128 (60%)	59.0				0.010	0.004		0.00	
NMAcMDOM	N/A	N/A	1.5	12.0	128 (38%)	0.5	8.0	59.0		1.552	0.072	0.007	1.24	0.040

Επεξήγηση: Πορτοκαλί γράμματα: Η συγκέντρωση της διαλυτής οργανικής ύλης ήταν 661 mg/L, αλλά το μοριακό βάρος και τα ηλεκτρόνια που μπορεί να παραχθούν δεν είναι γνωστά.

4.3.2.3. Επίδραση είδους και ποσότητας σιδήρου

Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας πραγματοποιήθηκαν, με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης του σιδήρου στην επίδοση και τον ρυθμό της αναγωγικής αποχλωρίωσης. Μια στερεή και μια διαλυτή μορφή δισθενή σιδήρου ελέγχθηκαν για τη δράση τους ως δότες και μεταφορείς ηλεκτρονίων. Η στερεή φάση σιδήρου που επιλέχθηκε ήταν ο θειούχος σίδηρος (FeS), ο οποίος έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει την αβιοτική αποχλωρίωση του PCE και του TCE σε πληθώρα άρθρων (He et al., 2010; Jeong & Hayes, 2007; Gong et al., 2016), ενώ η διαλυτή μορφή ήταν διχλωριούχος σίδηρος, που δεν έχει μελετηθεί επαρκώς, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.3.5.8. Επίσης, διαλυτός τρισθενής σίδηρος (FeCl₃) χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση της μεταφοράς των ηλεκτρονίων από τον δότη στον αποδέκτη. Επισημαίνεται ότι, όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 2.2 και 2.3 η προσθήκη σιδήρου μπορεί να συμβάλει είτε στην αβιοτική μετατροπή του TCE σε ασετυλίνη είτε στην βιοτική αναγωγική αποχλωρίωση του TCE με τελικό προϊόν το αιθένιο. Τα πειράματα που σχεδιάστηκαν, με τον στόχο που εκπληρώνει το κάθε ένα, ήταν τα εξής:

- (i) 6 mM FeS (324 mg Fe/L) σε απιονισμένο νερό (DWMFeS: Distilled Water, Medium dose of FeS), για τη μελέτη της αβιοτικής αποχλωρίωσης από τον θειούχο σίδηρο,
- (ii) 6 mM FeS (324 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NMFeS: N καλλιέργειες, Medium dose of FeS), για την αξιολόγηση της χρήσης του θειούχου σιδήρου ως δότη ηλεκτρονίων,
- (iii) 1.5 mM οξικού οξέος (90 mg/L) και 0.6 mM FeS (32.4 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NMAcLFeS: N καλλιέργειες, Medium dose of Acetate, Low dose of FeS), για τη μελέτη της δράσης του θειούχου σιδήρου ως μεταφορέα ηλεκτρονίων,
- (iv) 2 mM οξικού οξέος (120 mg/L) και 0.6 mM FeS (32.4 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NQMAcLFeS: N καλλιέργειες, Quasi Medium dose of Acetate, Low dose of FeS), για την αξιολόγηση του θειούχου σιδήρου ως μεταφορέα ηλεκτρονίων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δότη,
- (v) 1.5 mM οξικού οξέος (90 mg/L) και 6 mM FeS (324 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NMAcMFeS: N καλλιέργειες, Medium dose of Acetate, Medium dose of FeS), για κατανόηση της δράσης του θειούχου σιδήρου ως μεταφορέα και δότη ηλεκτρονίων,
- (vi) 6 mM υδροκινόνης (661 mg/L) και 6 mM FeS (324 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NMHqMFeS: N καλλιέργειες, Medium dose of Hydroquinone, Medium dose of FeS), για τη μελέτη της συνδυαστικής επίδρασης του θειούχου σιδήρου και του οργανικού υλικού που περιέχονται στο έδαφος,
- (vii) 6 mM FeCl₂ (324 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NMFeCl₂: N καλλιέργειες, Medium dose of FeCl₂), για την αξιολόγηση του διαλυτού σιδήρου ως δότη ηλεκτρονίων,

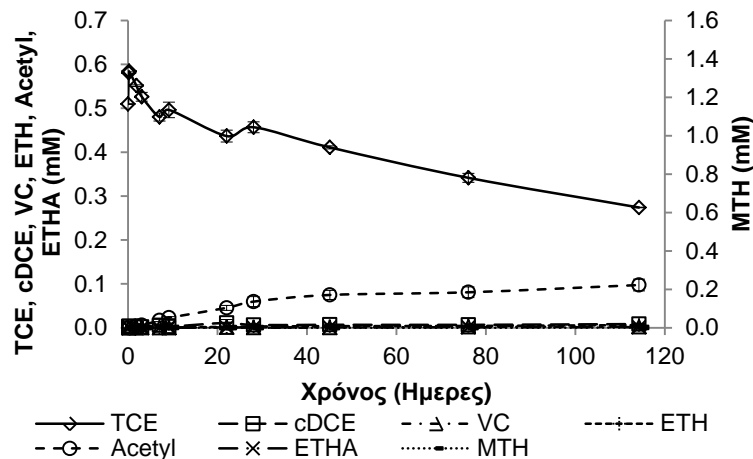
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- (viii) 1.5 mM οξικού οξέος (90 mg/L) και 6 mM FeCl₂ (324 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NMAcMFeCl₂: N καλλιέργειες, Medium dose of Acetate, Medium dose of FeCl₂), για την έρευνα της χρήσης του διαλυτού σιδήρου ως μεταφορέα και δότη ηλεκτρονίων,
- (ix) 2 mM οξικού οξέος (120 mg/L) και 0.6 mM FeCl₃ (32.4 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NQMAcLFeCl₃: N καλλιέργειες, Quasi Medium dose of Acetate, Low dose of FeCl₃), για τον έλεγχο της δράσης της διαλυτής μορφής του τρισθενούς σιδήρου ως μεταφορέα ηλεκτρονίων,
- (x) 0.7 mM προπανόλης (40.1 mg/L) και 0.6 mM FeS (32.4 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NMPropLFeS: N καλλιέργειες, Medium dose of Propanol, Low dose of FeS), για τη μελέτη της δράσης του θειούχου σιδήρου ως μεταφορέα ηλεκτρονίων σε άλλο είδος δότη, και
- (xi) 0.7 mM προπανόλης (40.1 mg/L) και 6 mM FeS (324 mg Fe/L) στις καλλιέργειες N (NMPropMFeS: N καλλιέργειες, Medium dose of Propanol, Medium dose of FeS), για την αξιολόγηση του θειούχου σιδήρου ως μεταφορέα και δότη ηλεκτρονίων σε άλλο είδος δότη.

Η προπανόλη και το οξικό οξύ επιλέχθηκαν διότι θεωρούνται μη-αποδοτικοί δότες για την αποχλωρίωση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων, όπως παρουσιάστηκε σε προηγούμενη Ενότητα. Οι μέσες δόσεις δότη ήταν υπολογισμένες, έτσι ώστε να προσφέρουν 12 meq/L και να εξισωθούν με το πείραμα NMED, που περιείχε τη μέση δόση βουτυρικού οξέος και έδειξε την καλύτερη απόδοση ως προς την απομάκρυνση του TCE. Εξαίρεση αποτελούν τα πειράματα με τη σχεδόν μέση συγκέντρωση οξικού οξέος (Quasi Medium Acetate), 2 mM (16 meq/L), που πραγματοποιήθηκαν για να ελεγχθεί η επίδραση του σιδήρου σε υψηλότερες δόσεις δότη. Επιπλέον, 6 mM και 0.6 mM σιδήρου αποδίδουν 6 meq/L και 0.6 meq/L, καθώς 1 mole Fe²⁺ οξειδώνεται σε 1 mole Fe³⁺ και ένα ηλεκτρόνιο. Κατά συνέπεια, όλα τα πειράματα είχαν τουλάχιστον διπλάσια επάρκεια ηλεκτρονίων για την πλήρη αναγωγή του TCE σε αιθένιο.

Στα Σχήματα 4.58 ως 4.63, παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των μετρήσεων των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος για τα πειράματα με τη στερεή μορφή του δισθενούς σιδήρου, και οι μπάρες σφάλματος υποδεικνύουν την τυπική απόκλιση ανάμεσα στα δύο serum μπουκάλια.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

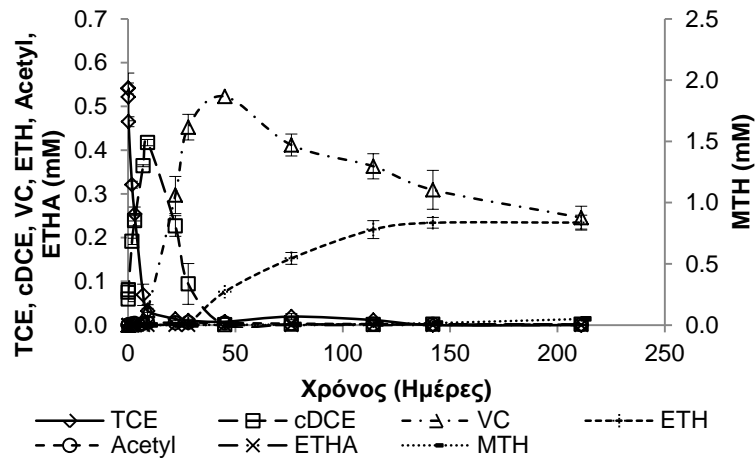


Σχήμα 4.58 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα DWMFeS (6 mM FeS σε απιονισμένο νερό).

Το αβιοτικό πείραμα με την προσθήκη 6 mM FeS (324 mg/L) (DWMFeS; Σχήμα 4.58) έδειξε ότι το TCE μετατρέπεται με έναν αργό ρυθμό (0.006/day) σε χλωροασετυλίνη (δεν μετρήθηκε) και μετέπειτα σε ασετυλίνη. Στις 114 ημέρες λειτουργίας περίπου το 46% του αρχικού TCE είχε αναχθεί, ενώ το 19% είχε ανακτηθεί με τη μορφή ασετυλίνης. Επομένως, περίπου 0.46 meq/L παράχθηκαν από τον θειούχο σίδηρο και καταναλώθηκαν από την αβιοτική αναγωγική αποχλωρίωση. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξαν και πειράματα της βιβλιογραφίας, τα οποία είχαν υψηλότερο ρυθμό μετατροπής του TCE που κυμαίνονταν μεταξύ 0.012-0.051/day αλλά με την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας δότη, 10 gr/L FeS (Butler & Hayes, 1999; Butler & Hayes, 2001; Jeong & Hayes, 2007). Η απόδοση σε ηλεκτρόνια φαίνεται να είναι υψηλότερη από την αναμενόμενη μιας και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η αναγωγική ικανότητα των ορυκτών αυξάνει γραμμικά με την περιεκτικότητά τους σε δισθενή σίδηρο και το 1% του δισθενούς σιδήρου χρησιμοποιείται για την παραγωγή ηλεκτρονίων (Lee & Batchelor, 2003). Οι μετρήσεις όμως του διαλυτού σιδήρου έδειξαν ότι 11.0 mg/L ήταν στη δισθενή μορφή του και μόλις 1.7 mg/L στην τρισθενή, δείχνοντας έτσι ότι ο σίδηρος παρέμεινε κυρίως στην αδιάλυτη μορφή του.

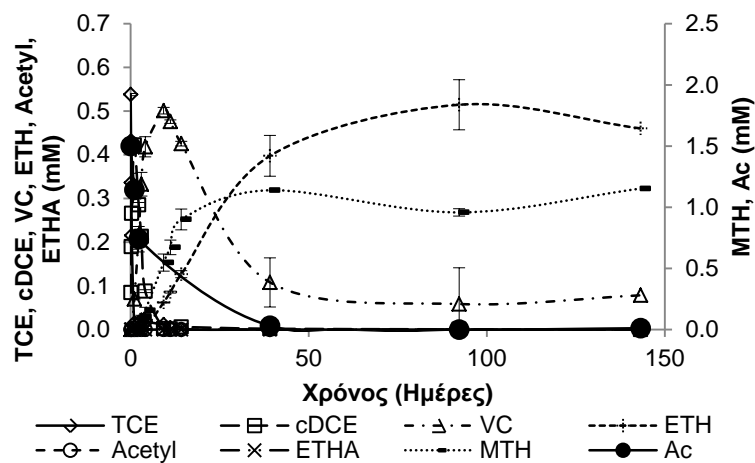
Το πείραμα με την προσθήκη 6 mM FeS στις καλλιέργειες N (NMMFeS; Σχήμα 4.59) έδειξε ότι το TCE μετατράπηκε μέσω του μονοπατιού της υδρογονόλυσης σε αιθέριο και VC στις 211 ημέρες λειτουργίας, σε ποσοστά 43% και 45% της αρχικής ποσότητας οργανοχλωριωμένων ενώσεων, αντιστοίχως. Πιο συγκεκριμένα, το TCE ανάχθηκε σε cDCE την 9^η ημέρα, ενώ το cDCE σε VC την 34^η ημέρα. Η παραγωγή του αιθενίου μετά τις 114 ημέρες άρχισε να καθυστερεί μάλλον εξαιτίας της μείωσης της βιοδιαθεσιμότητας του δότη ηλεκτρονίων. Άρα από τα αποτελέσματα φαίνεται η έντονη δράση της βιολογικής έναντι της αβιοτικής αποχλωρίωσης, αφού τα προϊόντα που παράχθηκαν καταδεικνύουν την προτίμηση του μονοπατιού της υδρογονόλυσης (Evans et al., 2014; Whiting et al., 2014).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



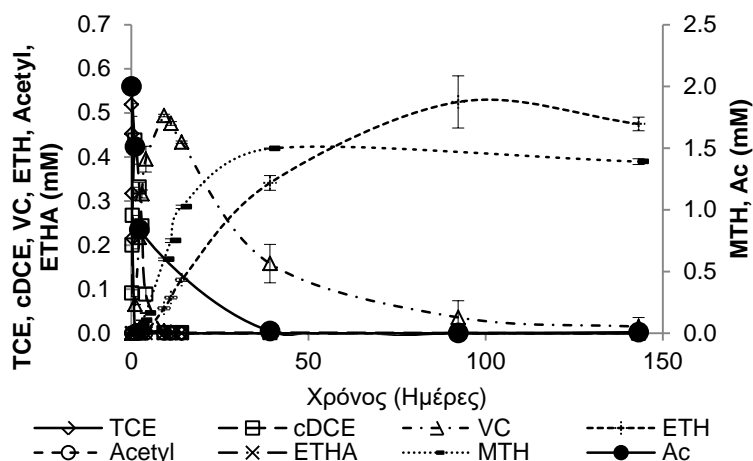
Σχήμα 4.59 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMFes (6 mM FeS στις καλλιέργειες N).

Η κατανάλωση ηλεκτρονίων από την αναγωγική αποχλωρίωση ήταν 2.8 meq/L, ενώ η οξειδωση της βιομάζας απέδωσε 1.7 meq/L (62%), άρα το υπόλοιπο 1.1 meq/L (38%) προήλθε από τον θειούχο σίδηρο. Το παραπάνω ενισχύεται με τη σύγκριση της επίδοσης του πειράματος με τη βιομάζα (NNED, Σχήμα 4.44), όπου μετά την πάροδο 143 ημερών είχαν παραμείνει cDCE και VC, ενώ στο πείραμα με τον θειούχο σίδηρο το TCE είχε μετατραπεί ήδη σε αιθένιο και VC. Επομένως, ο θειούχος σίδηρος μπορεί να χρησιμοποιηθεί εμμέσως από τους μικροοργανισμούς οργανοαλογονικής αναπνοής ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών, όπου ο σίδηρος μηδενικού σθένους προκαλεί τη βιολογική αποχλωρίωση του PCE μέσω της απελευθέρωσης μορίων υδρογόνου (Vogel et al., 2018).



Σχήμα 4.60 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcLFeS (1.5 mM Ac & 0.6 mM FeS).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



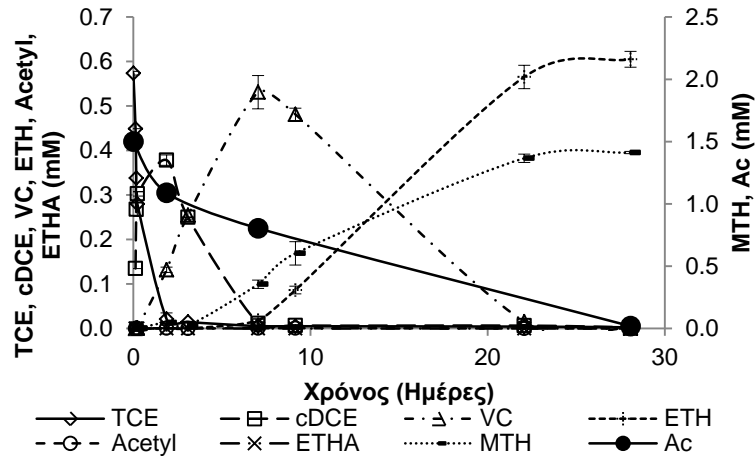
Σχήμα 4.61 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NQMAcLFeS (2 mM Ac & 0.6 mM FeS).

Στα Σχήματα 4.60 και 4.61 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από το πείραμα με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις οξικού οξέος και μια μικρή ποσότητα θειούχου σιδήρου (NMAcLFeS και NQMAcLFeS). Το TCE και το cDCE εξαφανίστηκαν την 1^η και την 5^η ημέρα, αντιστοίχως. Όμως, μέχρι το τέλος των πειραμάτων τα διπλότυπα μπουκάλια έδειξαν ελαφρά διαφορετική εικόνα στα δύο πειράματα. Στο πείραμα με την μικρότερη ποσότητα οξικού οξέος (NMAcLFeS) είχαν παραμείνει περίπου 0.08 mM VC στο ένα μπουκάλι, ενώ στο άλλο αντίτυπο επιτεύχθηκε πλήρης αποχλωρίωση την 92^η ημέρα. Επομένως, θεωρήθηκε ότι η συγκέντρωση του δότη ηλεκτρονίων ήταν οριακή και σε υψηλότερη συγκέντρωση δότη, η επιθυμητή πλήρης μετατροπή του TCE σε αιθένιο θα ήταν εφικτή.

Παρόμοια αποτελέσματα (Σχήμα 4.61) παρατηρήθηκαν στο πείραμα με τη σχεδόν μέση δόση δότη ηλεκτρονίων (2 mM) (NQMAcLFeS), όπου στο ένα μπουκάλι το VC εξαφανίστηκε σε περίπου 100 ημέρες, ενώ στο άλλο μετρήθηκε VC σε ποσοστό 6% του αρχικού TCE, δηλαδή 0.03 mM, την 143^η ημέρα. Άρα η αύξηση της δόσης του οξικού οξέος κατά περίπου 33% προκάλεσε μια μικρή βελτίωση στην επίδοση της αποχλωρίωσης, αλλά μεγάλο μέρος των ηλεκτρονίων διοχετεύθηκαν στη μεθανογένεση, με αποτέλεσμα η παραγωγή μεθανίου να αυξηθεί κατά 21%.

Επιπλέον, συγκρίνοντας τα δύο πειράματα με τα αποτελέσματα του μικρόκοσμου που περιείχε μόνο οξικό οξύ, φαίνεται ότι η προσθήκη σιδήρου δεν βελτίωσε σημαντικά τον ρυθμό αναγωγής του TCE και του cDCE, αλλά αύξησε την ποσότητα του διαθέσιμου δότη και επομένως υποβοήθησε την αναγωγή του VC. Επομένως, για την επίτευξη της πλήρους αποχλωρίωσης σχεδιάστηκε πείραμα με υψηλότερη συγκέντρωση θειούχου σιδήρου, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.62.

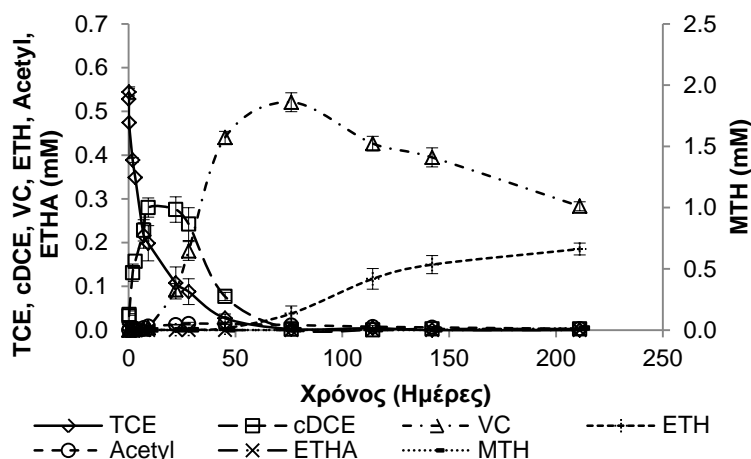
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.62 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcMFeS (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 6 mM FeS).

Η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας θειούχου σιδήρου (NMAcMFeS; Σχήμα 4.62) οδήγησε στην πραγματοποίηση της πλήρους βιοτικής αποχλωρίωσης σε 23 ημέρες λειτουργίας. Πιο αναλυτικά, το TCE και το cDCE μετατράπηκαν την 1^η ημέρα και την 7^η ημέρα, αντιστοίχως, ενώ 97% του VC είχε εξαφανιστεί ως την 22^η ημέρα. Η συγκέντρωση του μεθανίου έφτασε τα 1.4 mM (11.3 meq/L), καταναλώνοντας το 76% των ηλεκτρονίων, ενώ το οξικό οξύ εξαντλήθηκε μέχρι την 28^η ημέρα, παράγοντας 12 meq/L. Επομένως, η μεγαλύτερη ποσότητα ηλεκτρονίων από την οξειδωση του οξικού οξέος χρησιμοποιήθηκαν από τη μεθανογένεση. Η παροχή των ηλεκτρονίων για την αποχλωρίωση (3 meq/L) φαίνεται να προήλθε από την οξειδωση του FeS, εφόσον η βιομάζα παρέμεινε σταθερή. Ταυτόχρονα, αυξήθηκε ελαφρώς η συγκέντρωση του διαλυτού δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου περίπου στα 2.8 mg/L και 1.2 mg/L, αντιστοίχως. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας, όπως με την έρευνα των Leitão et al. (2018), οι οποίοι έδειξαν ότι ορυκτό σιδήρου, όπως ο μαγνητίτης, βελτιώνει την επίδοση της βιολογικής απομάκρυνσης του διχλωροαιθανίου. Η παραπάνω διεργασία πραγματοποιήθηκε μέσω της εξωκυτταρικής μεταφοράς των ηλεκτρονίων από τον οργανικό δότη στον ρύπο. Όμως, κατά την εφαρμογή αυτής της πρακτικής πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι υψηλές συγκεντρώσεις FeS μπορεί να οδηγήσουν σε απόφραξη του υδροφορέα και των φρεατίων επεξεργασίας (Hoelen et al., 2006).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



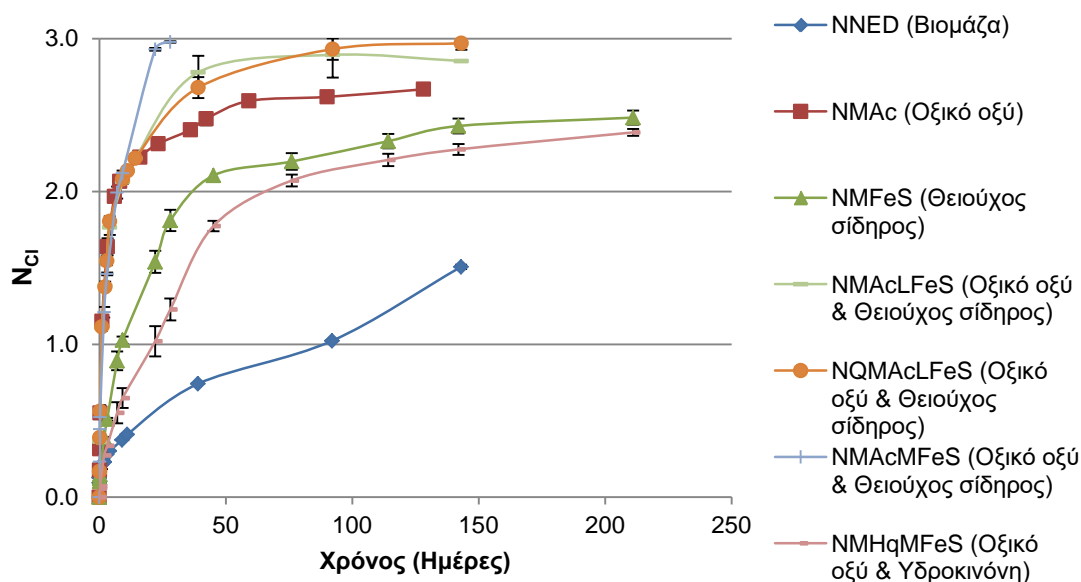
Σχήμα 4.63 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα NMHqMFeS (6 mM Hq, υδροκινόνη, & 0.6 mM FeS).

Επιπλέον, μελετήθηκε η συνδυαστική επίδραση της υδροκινόνης και του θειούχου σιδήρου στην αναγωγική αποχλωρίωση (NMHqMFeS; 6 mM υδροκινόνη & 0.6 mM FeS; Σχήμα 4.63). Το μεγαλύτερο μέρος της μάζας του TCE εξαφανίστηκε την 12^η ημέρα και του cDCE την 48^η ημέρα. Μέχρι το τέλος του πειράματος, είχε παραμείνει 60% του αρχικού TCE ως VC, ενώ το υπόλοιπο είχε αναχθεί σε αιθέριο, καταναλώνοντας 2.27 meq/L. Επίσης, παρατηρήθηκε μια μικρή παραγωγή μεθανίου, περίπου 0.015 mM που ισοδυναμεί με 0.12 meq/L. Η προσφορά των ηλεκτρονίων για τις αναγωγικές διεργασίες, προήλθε από την οξείδωση της βιομάζας διοχετεύοντας 1.3 meq/L, δηλαδή το 53% των ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν. Τα υπόλοιπα ισοδύναμα ηλεκτρόνια, περίπου 1.1 meq/L μπορεί να παράχθηκαν είτε από την υδροκινόνη είτε από τον θειικό σίδηρο, αλλά συγκρίνοντας την επίδοση της αποχλωρίωσης με τα πειράματα μόνο με θειούχο σίδηρο και μόνο με υδροκινόνη, φαίνεται ότι η προσθήκη υδροκινόνης δεν αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα για την επίτευξη των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων και τα αποτελέσματα των πειραμάτων με προσθήκη αποκλειστικά θειούχου σιδήρου (NMFeS) ταυτίζονται με τα αποτελέσματα της προσθήκης υδροκινόνης και του θειούχου σιδήρου (NMHqMFeS). Τα παραπάνω είναι σε αντίθεση με την έρευνα των Paul et al. (2013), όπου τα χουμικά οξέα ενέργησαν είτε ως πηγή ηλεκτρονίων είτε ως μεταφορείς από σιδηρούχα ορυκτά στο TCE. Τα διαφορετικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στη χρήση διαφορετικών υλικών ως αντιπροσώπους των χουμικών οξέων του εδάφους.

Όπως φαίνεται από τα προηγούμενα διαγράμματα, το μονοπάτι που χρησιμοποιήθηκε για τη μετατροπή του TCE ήταν η υδρογονόλυση, άρα ο θειούχος σίδηρος απελευθέρωσε μόρια υδρογόνου, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν από τους μικροοργανισμούς οργανοαλογονικής αναπνοής ως δότες ηλεκτρονίων. Συνεπώς, η βιολογική δραστηριότητα ήταν η κύρια διεργασία αφού ήταν γρηγορότερη από ότι η αβιοτική αναγωγή.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Η απόδοση της αποχλωρίωσης όλων των προαναφερθέντων πειραμάτων παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.64 για την άμεση σύγκριση και την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων.

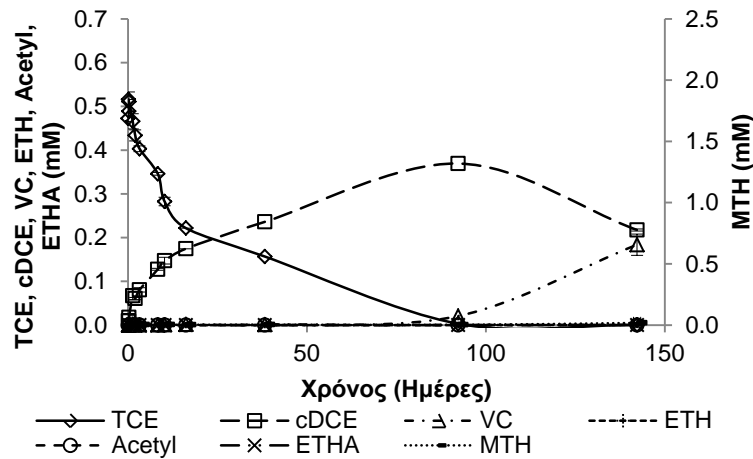


Σχήμα 4.64 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με θειούχο σίδηρο (FeS) και σύγκριση με πειράματα NNED (βιομάζα) και NMAc (οξικό οξύ).

Ο δείκτης N_{Cl} , ως μέτρο της βιολογικής αποχλωρίωσης, επιβεβαιώνει ότι ο θειούχος σίδηρος βελτίωσε την απόδοση της αναγωγής των χλωριωμένων αιθενίων. Χαρακτηριστικά, το πείραμα με τη μέση δόση FeS έδειξε καλύτερη αναγωγική ικανότητα από ότι το πείραμα ελέγχου με μόνο δότη τη βιομάζα, ενώ η παρουσία της υδροκινόνης δεν συνέβαλλε στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Επιπλέον, η προσθήκη του θειούχου σιδήρου προκάλεσε την άνοδο της συγκέντρωσης αιθενίου και ενίσχυσε την αποτελεσματικότητα του οξικού οξέος, το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως μη-αποδοτικός δότης από τη βιβλιογραφία αλλά και από την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Η επίδραση του διαλυτού δισθενούς σιδήρου στις καλλιέργειες αποχλωρίωσης παρουσιάζεται στα Σχήματα 4.65 ως 4.67, όπου φαίνονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος των δύο serum μπουκαλιών.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

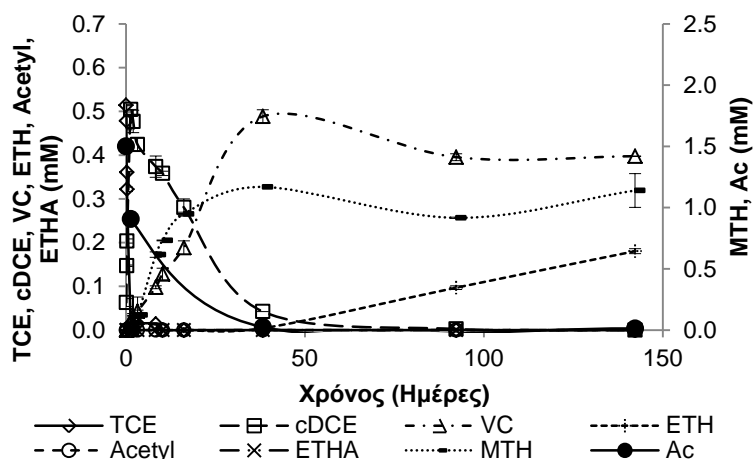


Σχήμα 4.65 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης και μεθανίου στο πείραμα $NMFeCl_2$ (6 mM $FeCl_2$ στις καλλιέργειες N).

Στο πείραμα $NMFeCl_2$ (6 mM $FeCl_2$ στις καλλιέργειες N; Σχήμα 4.65) το TCE μετατράπηκε σε cDCE στις 92 ημέρες λειτουργίας του μικρόκοσμου, ενώ μέχρι το τέλος του πειράματος, δηλαδή την 142^η ημέρα, είχαν παραχθεί 0.18 mM VC. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια μικρή παραγωγή μεθανίου περίπου 0.018 mM (0.14 meq/L). Επομένως, περίπου 1.32 meq/L καταναλώθηκαν από τις αναγωγικές διεργασίες, τα οποία προήλθαν από την οξείδωση της νεκρής βιομάζας. Πράγματι, η επίδοση της αποχλωρίωσης και της μεθανογένεσης του μικρόκοσμου αυτού, ταυτίζεται με τα αποτελέσματα του πειράματος ελέγχου που περιείχε μόνο τη βιομάζα από τις καλλιέργειες N. Συνεπώς, η προσθήκη δισθενούς σιδήρου δεν συνέβαλλε στην αναγωγή των χλωριωμένων αιθενίων.

Η συγκέντρωση του διαλυτού δισθενούς σιδήρου μετρήθηκε στο τέλος του πειράματος περίπου 167 mg/L, ενώ ο τρισθενής σίδηρος ήταν 3.0 mg/L. Έτσι, ανιχνεύτηκε περίπου το 22% της αρχικής ποσότητας του σιδήρου που προστέθηκε στα συστήματα (758 mg/L). Το παραπάνω μάλλον οφείλεται στη δημιουργία συμπλεγμάτων που δέσμευσαν τον διαλυτό σίδηρο και προκάλεσαν την καθίζησή του. Τα συμπλέγματα αυτά ήταν εμφανή με τη μορφή βούρκου στο κάτω μέρος των μπουκαλιών.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



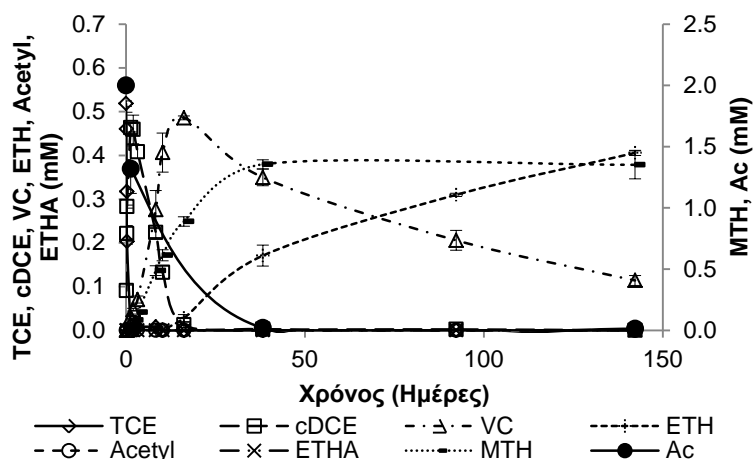
Σχήμα 4.66 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NMAcMFeCl₂ (1.5 mM Ac, οξικό οξύ & 6 mM FeCl₂).

Τα αποτελέσματα του πειράματος (NMAcMFeCl₂) με προσθήκη μέσης δόσης δισθενούς σιδήρου και οξικού οξέος δίνονται στο Σχήμα 4.66. Όπως φαίνεται στο Σχήμα το πείραμα αυτό είχε παρόμοια αποτελέσματα με το πείραμα με προσθήκη μόνο μέσης δόσης οξικού οξέος, NMAc (Σχήμα 4.47). Πιο συγκεκριμένα, το TCE και το cDCE ανάχθηκαν την 1^η και τη 41^η ημέρα, ενώ η μεγαλύτερη μάζα του VC (77%) είχε παραμείνει μέχρι το τέλος του πειράματος. Όσον αφορά τη μεθανογένεση, η συγκέντρωση μεθανίου έφτασε τα 1.1 mM και χρησιμοποίησε το 77% των ηλεκτρονίων. Το οξικό οξύ αποτέλεσε το μοναδικό δότη ηλεκτρονίων, παράγοντας 11.9 meq/L, ενώ η κατανάλωση υπολογίσθηκε 11.8 meq/L. Επίσης, συγκρίνοντας τα πειράματα NMAc και NMAcMFeCl₂ φαίνεται ότι ο δισθενής σίδηρος μάλλον επέδρασε αρνητικά στην επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης, εφόσον η συγκέντρωση αιθενίου ήταν 55% λιγότερη.

Οι μετρήσεις του διαλυτού σιδήρου έδειξαν ότι ο δισθενής ήταν 147 mg/L και ο τρισθενής 11.2 mg/L, άρα περίπου το 21% της προστιθέμενης ποσότητας ήταν στη διαλυτή μορφή και το υπολειπόμενο ποσοστό φάνηκε να δεσμεύεται στη στερεά μορφή.

Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης του τρισθενούς σιδήρου που έχει ως στόχο τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το οξικό οξύ στα χλωριωμένα αιθένια μέσω της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης του σιδήρου. Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα είχαν ως εξής, το οξικό οξύ παρέχει ηλεκτρόνια για τη σιδηροαναγωγή με προϊόν τον δισθενή σίδηρο, και μετά πραγματοποιείται η οξείδωση του δισθενούς σιδήρου σε τρισθενή με την παραγωγή μορίων υδρογόνου τα οποία χρησιμοποιούνται για την μετατροπή των χλωριωμένων αιθενίων (βλ. Σχήμα 2.6). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 4.67.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.67 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα NQMAcLFeCl_3 (2 mM Ac, οξικό οξύ & 0.6 mM FeCl_3).

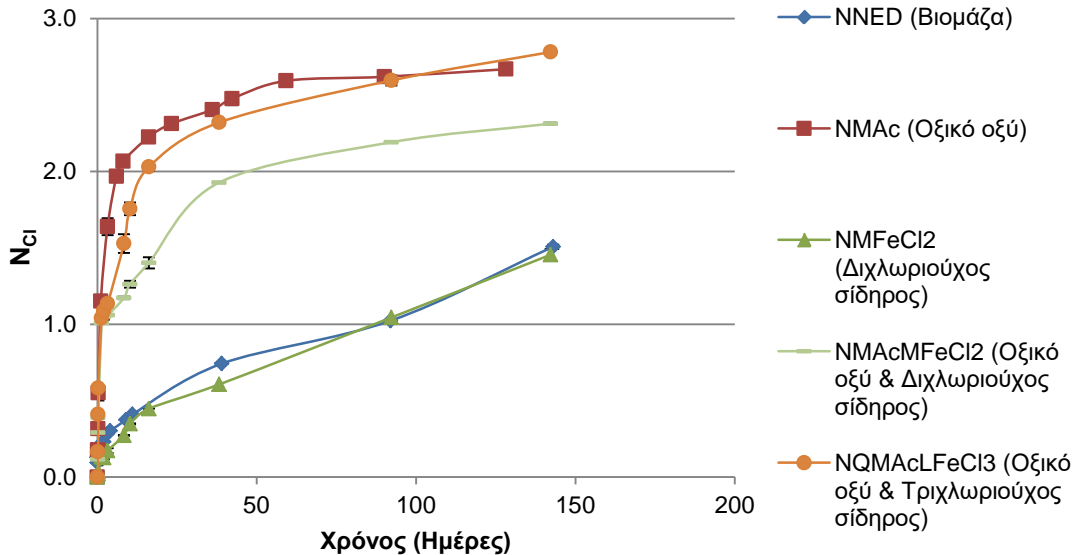
Για να ελεγχθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από το οξικό οξύ στα χλωριωμένα αιθέρια προστέθηκε στο σύστημα μια μικρή ποσότητα τρισθενούς σιδήρου (NQMAcLFeCl_3 ; 2 mM οξικό οξύ & 0.6 mM FeCl_3). Από το Σχήμα 4.67 φαίνεται ότι το TCE και το cDCE αποδομήθηκαν σε μια ημέρα και 15 ημέρες λειτουργίας, αντιστοίχως. Στο τέλος του πειράματος είχαν παραμείνει 0.11 mM VC (22%), ενώ η υπόλοιπη μάζα του TCE είχε μετατραπεί σε αιθένιο, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί το 21% των ηλεκτρονίων. Η συγκέντρωση μεθανίου έφτασε τα 1.4 mM, καταναλώνοντας το 77% των ηλεκτρονίων, ενώ το υπόλοιπο 1% χρησιμοποιήθηκε για την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή. Από τα ισοζύγια ηλεκτρονίων, φάνηκε ότι το οξικό οξύ ήταν η μοναδική πηγή ηλεκτρονίων, παράγοντας 15.9 meq/L. Όμως, η προσθήκη του τρισθενούς σιδήρου δεν φάνηκε να βελτιώνει τον ρυθμό αποχλωρίωσης, παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και ο μικρόκοσμος με το οξικό οξύ ως αποκλειστικό δότη. Ο τρισθενής σίδηρος επίσης δεσμεύτηκε και δημιούργησε συμπλέγματα, μιας και στο διάλυμα μετρήθηκαν μόνο 9 mg/L Fe^{3+} , ενώ η ανάκτηση της συνολικής ποσότητας σιδήρου ήταν 26% σε σχέση με την εισερχόμενη συγκέντρωση.

Το μέτρο της αναγωγικής αποχλωρίωσης, N_{Cl} , των πειραμάτων NMFeCl_2 , NMAcMFeCl_2 και NQMAcLFeCl_3 παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.68 για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Από το Σχήμα 4.68, φαίνεται ότι ο διαλυτός σίδηρος δεν προκάλεσε τη βελτίωση της αναγωγικής αποχλωρίωσης, καθώς έδειξε την ίδια απόδοση με μόνο τη βιομάζα. Επιπλέον, η προσθήκη διαλυτού σιδήρου σε πείραμα με οξικό οξύ ως δότη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

ηλεκτρονίων είτε δεν παρουσίασε κάποια μεταβολή (NQMAcLFeCl₃) είτε χειροτέρευσε την απόδοση της παραγωγής αιθενίου (NMAcMFeCl₂).

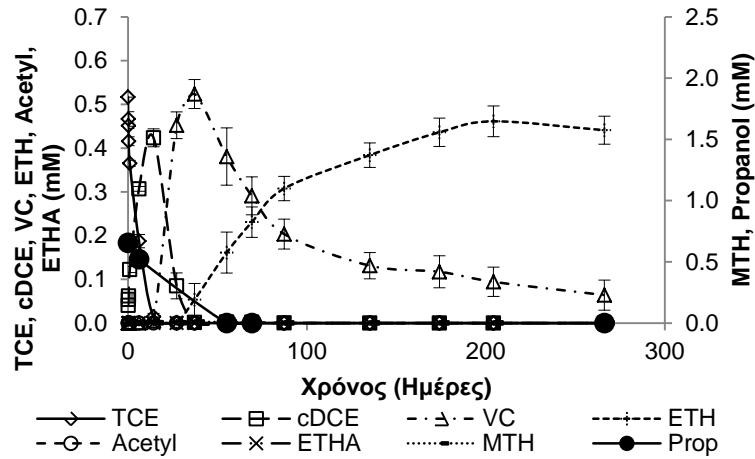


Σχήμα 4.68 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με διαλυτό σίδηρο (FeCl₂ και FeCl₃) και σύγκριση με πειράματα NNED (βιομάζα) και NMAc (οξικό οξύ) .

Πέραν της επίδρασης του θειούχου σιδήρου όταν ο δότης ηλεκτρονίων είναι το οξικό οξύ, μελετήθηκε η προσθήκη του σε άλλους μη-αποδοτικούς δότες, όπως η προπανόλη. Οι μέσες τιμές των χλωριωμένων αιθινίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και προπανόλης φαίνονται στα Σχήματα 4.69 ως 4.70, ενώ οι τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων στα διπλότυπα μπουκάλια παρουσιάζονται ως μπάρες σφάλματος.

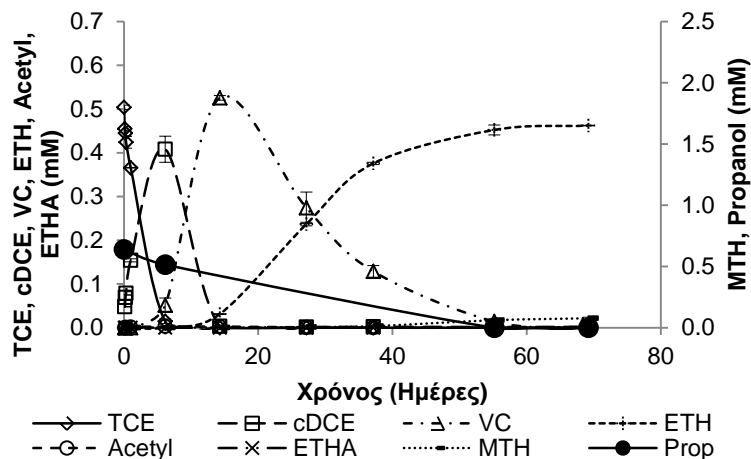
Στο Σχήμα 4.69 δίνεται η επίδραση της χαμηλής συγκέντρωσης θειούχου σιδήρου στην αναγωγική αποχλωρίωση. Όπως, παρουσιάζεται και σχηματικά, το TCE εξαφανίστηκε τη 14^η ημέρα και το cDCE την 30^η ημέρα. Μετά ξεκίνησε η μείωση του VC εκθετικά και η μετατροπή του σε αιθέριο, με αποτέλεσμα στις 266 ημέρες, να έχει παραμείνει το 13% του VC. Άλλες αναγωγικές διεργασίες δεν παρατηρήθηκαν άρα το σύνολο των ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν ήταν 2.9 meq/L. Η προπανόλη οξειδώθηκε και δεν μετρήθηκε κάποια αξιόλογη ποσότητα ακετόνης (δεν παρουσιάζονται οι μετρήσεις), ενώ δεν ήταν εφικτή η ανάλυση ακεταλδεΐδης, άρα δεν μπορεί να εξαχθεί η ποσότητα των ηλεκτρονίων που παράχθηκε. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με το πείραμα NMP_{org}, φαίνεται ότι η προσθήκη μιας μικρής ποσότητας θειούχου σιδήρου υποβοήθησε την απόδοση της προπανόλης ως δότη ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση του TCE, αλλά δεν επιτεύχθηκε η επιθυμητή πλήρης αποχλωρίωση.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.69 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και προπανόλης στο πείραμα NMPPropLFeS (0.7 mM Prop, προπανόλη & 0.6 mM FeS).

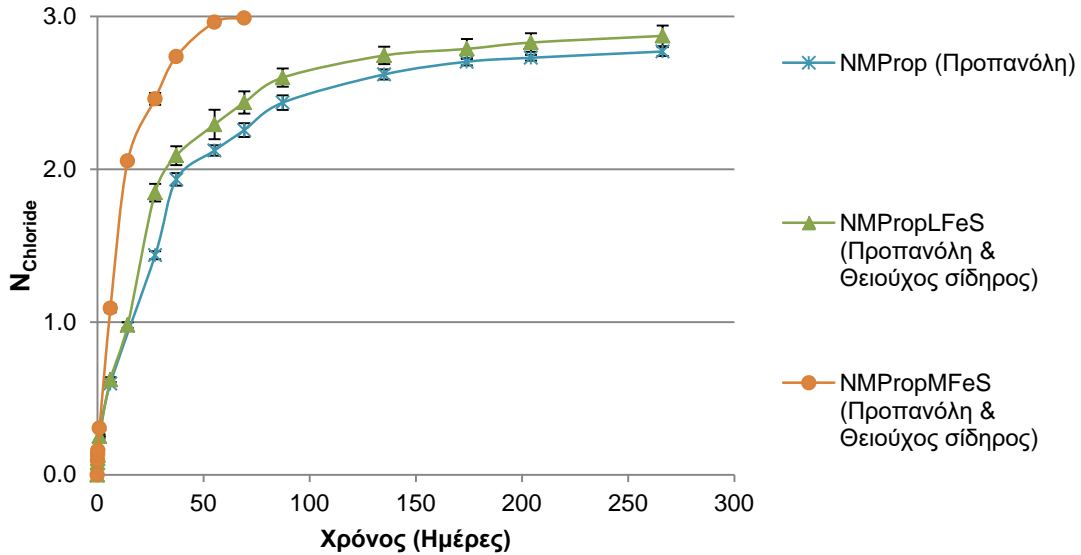
Η επίδραση της αύξησης της δόσης του θειούχου σιδήρου παρουσία προπανόλης ως δότη ηλεκτρονίων δίνεται στο Σχήμα 4.70 (NMPPropMFeS; 0.7 mM προπανόλη & 6 mM FeS). Πλήρης αποχλωρίωση επιτεύχθηκε στις 69 ημέρες λειτουργίας, ενώ η αναγωγή του TCE και του cDCE παρατηρήθηκε την 6^η και τη 14^η ημέρα, αντιστοίχως. Το σύνολο των ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κυρίως για την αναγωγική αποχλωρίωση και υπολογίστηκε σε περίπου 82%, ενώ μια μικρή ποσότητα μεθανίου ανιχνεύτηκε (0.62 mM) που κατανάλωσε το υπόλοιπο ποσοστό. Συμπερασματικά, η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας θειούχου σιδήρου οδήγησε στην πλήρη μετατροπή του TCE σε αιθένιο.



Σχήμα 4.70 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και προπανόλης στο πείραμα NMPPropMFeS (0.7 mM Prop, προπανόλη & 6 mM FeS).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Η επίδραση του θειούχου σιδήρου στην αναγωγική αποχλωρίωση με την προπανάλη ως δότη καταδεικνύεται από το δείκτη επίδοσης, N_{Cl} σχηματικά στο διάγραμμα 4.71.



Σχήμα 4.71 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με προπανάλη (Prop) και θειούχο σίδηρο (FeS).

Παρατηρώντας το Σχήμα 4.71, φαίνεται ότι ο θειούχος σίδηρος είχε θετική επίδραση στην απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης, μιας και η αύξηση της ποσότητάς του επέφερε μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθενίου. Η θετική συμβολή του φαίνεται να είναι καθοριστική για την πραγματοποίηση του τελευταίου σταδίου της υδρογονόλυσης, την αναγωγή του VC.

Αναλυτικότερα, τα παραπάνω πειράματα συγκρίνονται μεταξύ τους ως προς την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και της μεθανογένεσης στον Πίνακα 4.16.

Παρατηρείται ότι ο θειούχος σίδηρος ευνόησε την επίτευξη της πλήρους αποχλωρίωσης με τη συνεισφορά του σε ηλεκτρόνια είτε ως η κύρια πηγή μορίων υδρογόνου είτε ως συμπληρωματική για την ενίσχυση μη-αποδοτικών δοτών ηλεκτρονίων, όπως το οξικό οξύ ή η προπανάλη. Για παράδειγμα, η προσφορά αυτή βελτίωσε τον ρυθμό αποχλωρίωσης του VC από 0.010 day^{-1} στο πείραμα NMAc σε 0.25 day^{-1} στο πείραμα NMAcMFeS, όμως δεν επηρέασε τις ταχύτητες αναγωγής του TCE και του cDCE που υπολογίστηκαν περίπου 1.32 mM/day και 0.09 mM/day , αντιστοίχως, και στους δύο μικρόκοσμους. Παρόμοια τάση έδειξαν και τα πειράματα με την προπανάλη ως κύριο δότη ηλεκτρονίων, όπου η ταχύτητα αναγωγής του VC από 0.02 day^{-1} στο πείραμα ελέγχου αυξήθηκε σε 0.08 day^{-1} στο πείραμα με τη μέση δόση FeS. Επιπλέον, ο θειούχος σίδηρος δεν φάνηκε να ευνοεί τη μεθανογένεση,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

εφόσον η τελική συγκέντρωση μεθανίου κυμάνθηκε μεταξύ 1.2-1.4 mM με μέσο ρυθμό παραγωγής 0.06 mM/day σε όλα τα πειράματα που περιείχαν οξικό οξύ, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν σημαντικές ποσότητες μεθανίου στο πείραμα με προπανάλη.

Όσον αφορά τη χρήση του FeCl_2 ως κύριο ή συμπληρωματικό δότη ηλεκτρονίων και τον έλεγχο της ενισχυμένης βιοαποκατάστασης με την εισπίεση διαλυτού σιδήρου στο πεδίο, φαίνεται ότι ούτε ο ρυθμός ούτε η επίδοση της διεργασίας βελτιώθηκαν με την προσθήκη μιας μέσης δόσης. Τουναντίον, παρατηρήθηκε μια μικρή καθυστέρηση της αποχλωρίωσης του cDCE στο πείραμα NMAcMFeCl₂ συγκριτικά με το πείραμα με μόνο το οξικό οξύ, καθώς μετρήθηκε 0.01 mM/day και 0.08 mM/day, αντιστοίχως. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε η δέσμευση του διαλυτού σιδήρου από συμπλέγματα που δημιουργήθηκαν και ήταν εμφανή στο κάτω μέρος των μπουκαλιών.

Επιπλέον, ο τρισθενής σίδηρος δεν λειτούργησε ως μεταφορέας ηλεκτρονίων από το οξικό οξύ στα χλωριωμένα αιθένια, αλλά η διαδικασία σταματούσε στην οξειδωση του δισθενούς σιδήρου, καθώς η βιοκοινότητα των καλλιεργειών N προτιμούσε την παροχή των ηλεκτρονίων από το οξικό οξύ για τις αναγωγικές διεργασίες.

Συμπερασματικά, η ύπαρξη FeS στο πεδίο μπορεί να ευνοήσει την επίτευξη της αναγωγικής αποχλωρίωσης και θα μπορούσε να θεωρηθεί ένα εργαλείο σχεδιασμού για τη βιοαποκατάσταση ρυπασμένου πεδίου από οργανοχλωριωμένες ενώσεις.

Πίνακας 4.16. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με διαφορετικά είδη και συγκεντρώσεις σιδήρου.

Πειράματα	Σίδηρος		Δότης ηλεκτρονίων		Ημέρες (% VC/ΣCES)	cDCE _{peak}	VC _{peak}	50%	10%	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)	Τελική					
	mM	meq/L	mM	meq/L				VC/ΣCES	VC _{εναπομείν} ναν/ΣCES				VC _{εναπομείν} ναν/ΣCES	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)	συγκέντρ ωση	k (MTH)
DWMFeS	6.0	6.0	0.0	0.0	114 (0%)					0.003			0.00					
NNED	0.0	0.0	0.0	0.0	143 (56%)	91.0				0.007	0.004		0.00					
NMFeS	6.0	6.0	0.0	0.0	211 (45%)	8.0	35.0	200.0		0.049	0.017	0.005	0.05	0.001				
NMHqMFeS*	6.0	6.0	6.0*	12.0	211 (54%)	12.0	45.0			0.036	0.006	0.004	0.02	0.000				
NMFeCl ₂	6.0	6.0	0.0	0.0	142 (39%)	91.0				0.015	0.003		0.02	0.000				
NMAc	0.0	0.0	1.5	12.0	128 (33%)	0.5	6.0	46.0		1.323	0.080	0.010	1.23	0.044				
NMAcLFeS	0.6	0.6	1.5	12.0	143 (15%)	0.5	5.0	30.0		1.360	0.108	0.015	1.15	0.067				
NQMAcLFeS	0.6	0.6	2.0	16.0	211 (32%)	0.5	5.0	30.0		1.324	0.113	0.025	1.39	0.078				
NMAcMFeS	6.0	6.0	1.5	12.0	28 (0%)	0.5	7.0	15.0	21.0	1.302	0.068	0.247	1.42	0.069				
NMAcMFeCl ₂	6.0	6.0	1.5	12.0	142 (77%)	1.0	41.0			0.953	0.012	0.002	1.14	0.065				
NQMAcLFeCl ₃	0.6	-0.6	2.0	16.0	142 (22%)	1.0	14.0	86.0		0.799	0.038	0.011	1.35	0.036				
NMProp*	0.0	0.0	0.7*	12.0	266 (23%)	15.0	40.0	98.0		0.028	0.023	0.017	0.02	0.000				
NMPropLFeS*	0.6	0.6	0.7*	12.0	266 (13%)	10.0	30.0	76.0		0.030	0.035	0.009						
NMPropMFeS*	6.0	6.0	0.7*	12.0	69 (0%)	5.0	14.0	32.0	49.0	0.059	0.058	0.077	0.08	0.000				

Επεξήγηση: *Στο πείραμα NMHqMFeS προστέθηκαν 6mM υδροκινόνης για να ελεγχθεί η δράση της είτε ως δότης ή ως μεταφορέας ηλεκτρονίων, ενώ στα πειράματα NMProp, NMPropLFeS και NMPropMFeS προστέθηκε προπανόλη ως δότης ηλεκτρονίων. **Πορτοκαλί γράμματα:** Προστέθηκε τρισθενής σίδηρος με στόχο την αναγωγή του σε δισθενή και τη χρήση του ως δότη ή μεταφορέα ηλεκτρονίων.

4.3.2.4. Επίδραση σιδήρου υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες

Σύμφωνα με τα πειράματα που περιγράφηκαν στην Ενότητα 4.3.2.3, η ύπαρξη θειούχου σιδήρου βελτιώνει την επίδοση της αποχλωρίωσης. Επομένως, στην παρούσα Ενότητα ελέγχεται η απόδοση των συστημάτων είτε με την άμεση προσθήκη είτε με τη δημιουργία FeS μέσω της βιογεωχημικής μετατροπής υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες, όπως περιγράφηκε από τη βιβλιογραφία (Whiting et al., 2014; Evans et al., 2014; Evans, 2014).

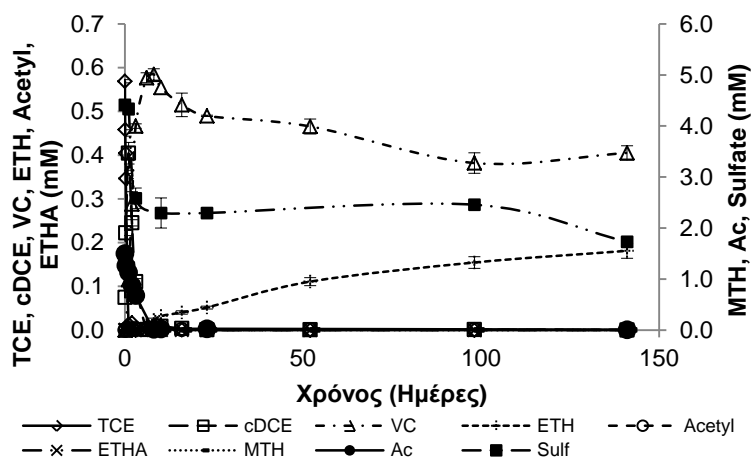
Τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας που σχεδιάστηκαν με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του θειούχου σιδήρου σε θεικοαναγωγικές συνθήκες, υπό την παρουσία 400 mg/L θειικών ιόντων, με τις αντίστοιχες δόσεις δότη ηλεκτρονίων, ήταν τα εξής:

- (i) 1.5 mM οξικού οξέος και 6 mM FeS στις καλλιέργειες M (MMAcMFeS: M καλλιέργειες, Medium dose of Acetate, Medium dose of FeS), για αξιολόγηση του θειούχου σιδήρου ως συμπληρωματικού δότη ηλεκτρονίων,
- (ii) 5.7 mM οξικού οξέος και 0.6 mM FeS στις καλλιέργειες M (MQHAcLFeS: M καλλιέργειες, Quasi High dose of Acetate, Low dose of FeS), για τη μελέτη της δράσης του θειούχου σιδήρου ως μεταφορέα ηλεκτρονίων,
- (iii) 1.5 mM οξικού οξέος και 0.6 mM FeCl₃ στις καλλιέργειες M (MMAcLFeCl₃: M καλλιέργειες, Medium dose of Acetate, Low dose of FeCl₃), με στόχο τη διερεύνηση της βιογεωχημικής μετατροπής, και
- (iv) 5.7 mM οξικού οξέος και 0.6 mM FeCl₃ στις καλλιέργειες M (MQHAcLFeCl₃: M καλλιέργειες, Quasi High dose of Acetate, Low dose of FeCl₃), για τη μελέτη της βιογεωχημικής μετατροπής και της δράσης του θειούχου σιδήρου ως μεταφορέας ηλεκτρονίων.

Η μέση δόση οξικού οξέος, 1.5 mM, που παράγει 12 meq/L, επιλέχθηκε για τη σύγκριση των πειραμάτων με τη βέλτιστη δόση βουτυρικού οξέος, 3 mM, ενώ η σχεδόν υψηλή συγκέντρωση οξικού οξέος, παρέχει 45.3 meq/L, τα οποία ισούνται με το σύνολο της ποσότητας που απαιτείται για την αναγωγή των θειικών ιόντων (33.3 meq/L) και τέσσερις φορές παραπάνω από την απαιτούμενη μάζα για την πλήρη μετατροπή του TCE σε αιθένιο (12 meq/L).

Τα Σχήματα 4.72 ως 4.75 παρουσιάζουν τις μετρήσεις των χλωριωμένων αιθινίων, αιθενίου, ασετυλίνης, αιθανίου, μεθανίου, θειικών ιόντων και οξικού οξέος στα προαναφερθέντα πειράματα, ενώ οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση των μετρησιών στα δύο serum μπουκάλια.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



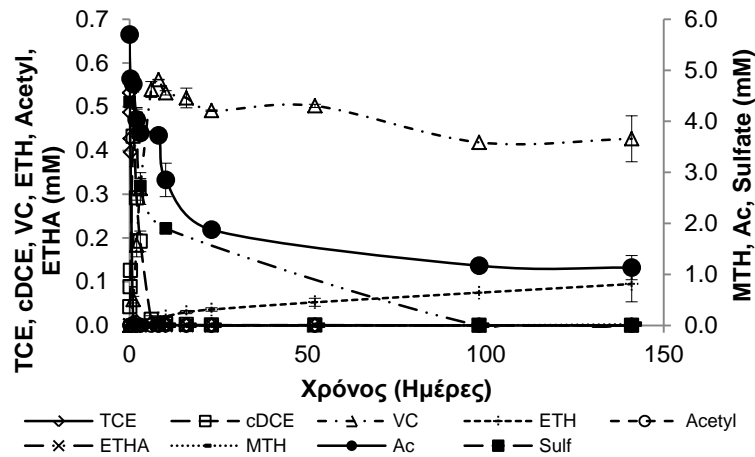
Σχήμα 4.72 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου, θειικών ιόντων και οξικού οξέος στο πείραμα MMAcMFeS (1.5 mM Ac, οξικό οξύ, 6 mM FeS & 400 mg/L SO_4^{2-}).

Στο πείραμα MMAcMFeS (Σχήμα 4.72; 1.5 mM οξικό οξύ, 6 mM FeS & 400 mg/L SO_4^{2-}) φαίνεται ότι το TCE απομακρύνθηκε σε 24 ώρες λειτουργίας, ενώ το cDCE σε 6 ημέρες. Η αναγωγή του VC όμως ήταν αργή και μόνο το 31% μετατράπηκε σε αιθέριο μέχρι τις 141 ημέρες. Μια σημαντική ποσότητα θειικών ιόντων (1.7 mM) επίσης παρέμεινε στο σύστημα, η οποία ήταν περίπου σταθερή από τη 10^η ημέρα. Τα ηλεκτρόνια που καταναλώθηκαν λοιπόν ήταν το 11% και το 89% του συνόλου (24.2 meq/L) για την αποχλωρίωση και τη θειικοαναγωγή, αντιστοίχως. Η ανεπιτυχής αποχλωρίωση και η μερική αναγωγή των θειικών ιόντων μάλλον οφείλεται στην ανεπαρκή ποσότητα του δότη ηλεκτρονίων, εφόσον η οξειδωση του οξικού οξέος και της βιομάζας πρόσφεραν αθροιστικά μόλις 12.4 meq/L, ενώ το FeS παράγει 6 meq/L με τη συμβατική θεώρηση ότι μόνο ο δισθενής σίδηρος είναι δότης ηλεκτρονίων. Όμως, η ανάκτηση των θείου έδειξε ότι η συγκέντρωση των παραγόμενων σουλφιδίων ήταν χαμηλή, αφού μετρήθηκε 0.1 mM. Η αιτία μπορεί να είναι διπλή, είτε γιατί η αναγωγή των θειικών ιόντων δεν ήταν πλήρης και σταμάτησε στην παραγωγή θειωδών (SO_3^{2-}) και θειοθειικών ιόντων ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), με αποτέλεσμα να υπερεκτιμάται και η ποσότητα ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν από τη θειικοαναγωγή, ή επειδή δεσμεύτηκαν τα σουλφίδια από το FeS παράγοντας FeS_2 και 2 ηλεκτρόνια/μολε κατά τη διαδικασία (Αντίδραση 2.5). Στην τελευταία περίπτωση τα ηλεκτρόνια που παράχθηκαν από την οξειδωση των σουλφιδίων υπολογίζονται περίπου 5.2 meq/L, χρησιμοποιώντας το 43% του θειούχου σιδήρου.

Η προσθήκη αρκετά υψηλής συγκέντρωσης οξικού οξέος και χαμηλής ποσότητας FeS στις καλλιέργειες M (MQHAcLFeS; Σχήμα 4.73) οδήγησε στην αναγωγή του TCE και cDCE την 1^η και την 6^η ημέρα, αντιστοίχως. Όμως, η αναγωγή του VC ήταν ανεπιτυχής, εφόσον παρέμεινε σχεδόν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και η παραγωγή του αιθενίου ήταν μόλις 0.1 mM (18%). Τα θειικά ιόντα έδειξαν ότι είχαν ήδη μηδενιστεί από τις 100 πρώτες ημέρες, καταναλώνοντας το 93% των

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

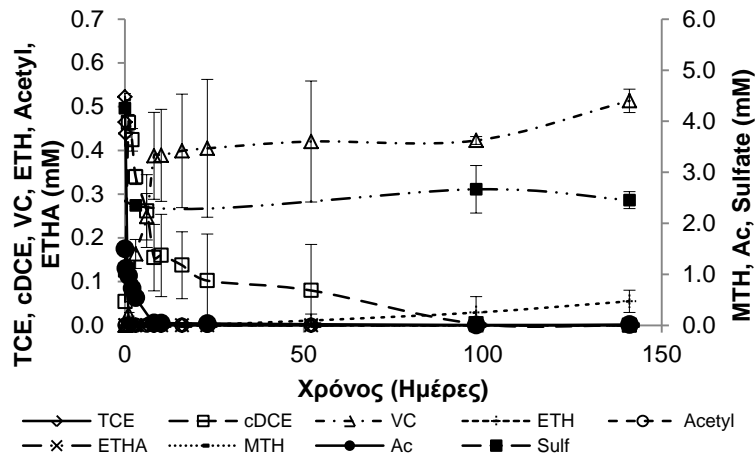
ηλεκτρονίων. Μια σημαντική ποσότητα οξικού οξέος (1.1 mM) είχε παραμείνει στο τέλος του πειράματος, οπότε υπήρχε επαρκής δόση για τη συνέχεια των αναγωγικών διεργασιών, παρόλα αυτά η συγκέντρωση του VC μειωνόταν με πολύ αργό ρυθμό. Η οξειδωση του οξικού οξέος πρόσφερε 36.5 meq/L και η χρήση της νεκρής βιομάζας μόλις 0.9 meq/L, επομένως η ανάκτηση των ηλεκτρονίων ήταν 100%.



Σχήμα 4.73 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου, θειικών ιόντων και οξικού οξέος στο πείραμα MQHAcLFeS (5.7 mM Ac, οξικό οξύ, 0.6 mM FeS & 400 mg/L SO_4^{2-}).

Τα αποτελέσματα του πειράματος με προσθήκη 1.5 mM οξικού οξέος και 0.6 mM FeCl_3 στις καλλιέργειες M σε θειικοαναγωγικές συνθήκες δίνονται στο Σχήμα 4.74 (MMAcLFeCl_3). Το TCE και το cDCE ανάχθηκαν σε 24 ώρες και 96 ημέρες, αντιστοίχως, αν και τα διπλότυπα μπουκάλια έδειξαν μια μικρή απόκλιση ως προς την ικανότητα αναγωγής του cDCE, όπως παρουσιάζεται από τις μπάρες σφάλματος στο Σχήμα 4.74. Μέχρι τις 141 ημέρες, που ήταν και ο τερματισμός του πειράματος, η συγκέντρωση του VC ήταν 0.513 mM και του αιθενίου μόλις 0.055 mM, ενώ το 42% των θειικών ιόντων είχαν μετατραπεί σε σουλφίδια. Άρα το 14% των ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε για την αναγωγική αποχλωρίωση, το 84% καταναλώθηκε από τη θειικοαναγωγή, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενές. Το οξικό οξύ εξαφανίστηκε την 8^η ημέρα, παράγοντας 11.9 meq/L, δηλαδή το 97% των ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκαν. Μια μικρή ποσότητα σιδήρου και θείου δεν ανιχνεύτηκαν, θεωρώντας ότι μπορεί να δεσμεύτηκαν για το σχηματισμό FeS και FeS_2 , σύμφωνα με τις αντιδράσεις 2.4 και 2.5 μέσω της βιογεωχημικής μετατροπής, ενώ εμφανίστηκαν εντός των μπουκαλιών κάποια στερεά συμπλέγματα.

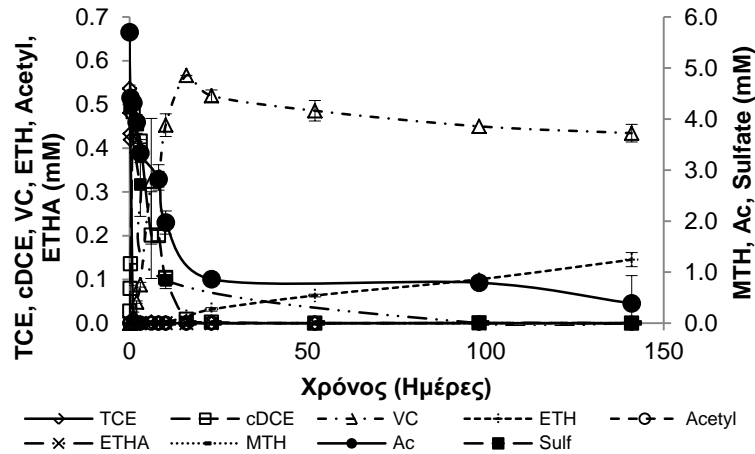
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.74 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα MMAcLFeCl₃ (1.5 mM Ac, οξικό οξύ, 0.6 mM FeCl₃ & 400 mg/L SO₄²⁻).

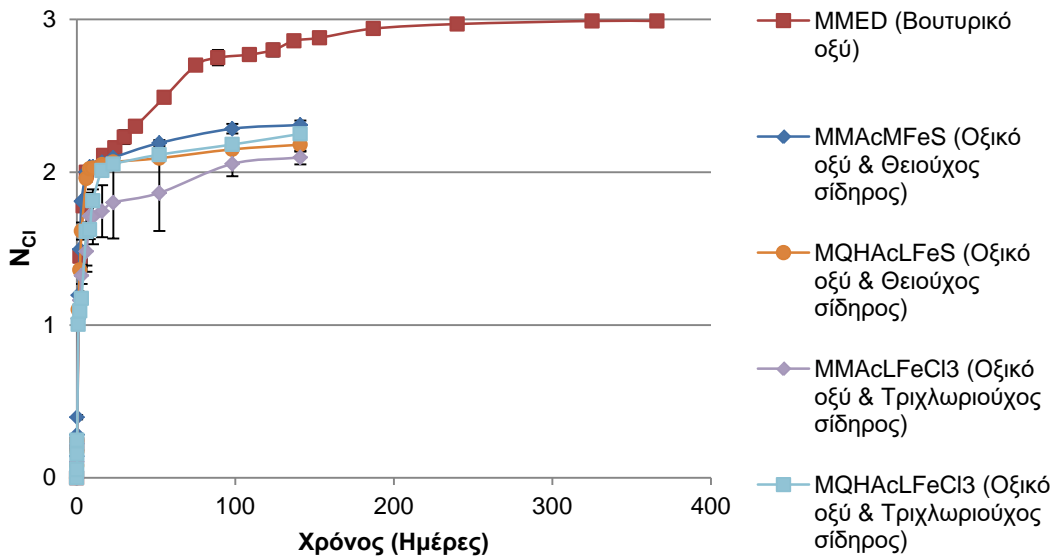
Τα αποτελέσματα του πειράματος με προσθήκη 5.7 mM οξικού οξέος και 0.6 mM FeCl₃ στις καλλιέργειες M σε θειικοαναγωγικές συνθήκες δίνονται στο Σχήμα 4.75 (MQHAcLFeCl₃). Από το Σχήμα 4.75, φαίνεται ότι το TCE και το cDCE μετατράπηκε την 1^η και τη 16^η ημέρα. Μέχρι το τέλος των πειραμάτων, το VC που είχε παραμείνει ήταν 75% και το υπόλοιπο 25% είχε αναχθεί σε αιθένιο. Όλη η ποσότητα των θειικών ιόντων εξαφανίστηκε, καταναλώνοντας 33.7 meq/L, δηλαδή το 90% των ηλεκτρονίων. Επιπλέον, παρατηρήθηκε η αύξηση της βιομάζας και η αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου με αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθεί αθροιστικά για αυτές τις διεργασίες, το 3% του συνόλου των ηλεκτρονίων. Η παραγωγή των ηλεκτρονίων προήλθε από την οξείδωση οξικού οξέος, η οποία υπολογίστηκε περίπου 42.5 mM, επομένως δεν χρειάστηκε η παραγωγή από άλλη πηγή ηλεκτρονίων. Όμως, η ανάκτηση του σιδήρου και θείου έδειξαν ότι μέρος της μάζας τους απομακρύνθηκε από τη διαλυτή και την αέρια φάση. Η παραπάνω ένδειξη ενισχύεται από τα ευρήματα οπτικής παρατήρησης των μπουκαλιών, στα οποία είχαν σχηματιστεί στερεά υπολείμματα, ενώ είχαν αποκτήσει ένα σκούρο χρώμα.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.75 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, αιθανίου, ασετυλίνης, μεθανίου και οξικού οξέος στο πείραμα MQHAcLFeCl₃ (5.7 mM Ac, οξικό οξύ, 0.6 mM FeCl₃ & 400 mg/L SO₄²⁻).

Για την άμεση σύγκριση των παραπάνω πειραμάτων στο Σχήμα 4.76 φαίνεται το μέτρο αποχλωρίωσης, N_{Cl}, και τον Πίνακα 4.17, παρουσιάζονται ο ρυθμός αποχλωρίωσης του TCE, cDCE και VC.



Σχήμα 4.76 Μέτρο αποχλωρίωσης N_{Cl} στα πειράματα με σίδηρο υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες και σύγκριση με πείραμα MMED (βουτυρικό οξύ).

Από τον δείκτη N_{ci} φαίνεται ότι η αναγωγική αποχλωρίωση καθυστερούσε στο κρίσιμο στάδιο της διαδικασίας, στην αναγωγή του VC. Η ταχύτητα αποχλωρίωσης ήταν παρόμοια στα πειράματα $MMAcMFeS$, $MQHAcLFeS$ και $MQHAcLFeS$. Έναν πιο αργό ρυθμό έδειξε το πείραμα με τη μέση δόση οξικού οξέος και τη χαμηλή συγκέντρωση τριχλωριούχου σιδήρου, όπου η πλήρης αναγωγή του cDCE σε VC πραγματοποιήθηκε στις 96 ημέρες λειτουργίας (βλ. Πίνακα 4.17).

Αναλυτικότερα, ο ρυθμός αναγωγής του cDCE κυμάνθηκε μεταξύ 0.045-0.078 mM/day στα τρία πειράματα με την αρκετά υψηλή συγκέντρωση οξικού οξέος και τη μέση συγκέντρωση FeS, ενώ υπολογίστηκε γύρω στα 0.01 mM/day στο πείραμα $MMAcLFeCl_3$. Επιπλέον, η ταχύτητα αναγωγής του TCE φαίνεται ότι μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος, όπως παρουσιάστηκε στην Ενότητα 4.1, και με την προσθήκη τριχλωριούχου σιδήρου που προκαλεί ανταγωνιστικές συνθήκες για το δότη ηλεκτρονίων. Η μετατροπή του VC πραγματοποιείται 79% φορές πιο αργά στους μικρόκοσμους με το σίδηρο από ότι με τη μέση δόση βουτυρικού οξέος.

Οι Yu et al. (2018) επίσης παρατήρησαν ότι η προσθήκη θειικών ιόντων σε καλλιέργεια με σίδηρο δεν ενίσχυσε την αβιοτική αποχλωρίωση, αλλά αναχαίτισε τη βιολογική διεργασία. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τη λογική της βιογεωχημικής μετατροπής, όπως την παρουσίασαν οι Evans et al. (2014), οι οποίοι πρόσθεσαν θειικά ιόντα σε διαπερατά φράγματα για το σχηματισμό του βιογενούς θειούχου σιδήρου. Όμως, στην ίδια έρευνα διαπίστωσαν ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων συσχετίστηκαν με την αποτυχία της αποχλωρίωσης του TCE.

Πίνακας 4.17. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με σίδηρο υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες.

Πειράματα	Σίδηρος		Δότης ηλεκτρονίων		Θειικά ιόντα mM	Ημέρες (% VC/Σ _{CES})	cDCE _{peak}	VC _{peak}	50%	10%	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)
	mM	meq/L	mM	meq/L					VC _{εναπομεί ναν/Σ_{CES}}	VC _{εναπομεί ναν/Σ_{CES}}			
MMED*	0.0	0.0	3.0*	12.0	4.2	366 (1%)	1.0	6.0	55.0	165.0	0.967	0.076	0.014
MMAcMFeS	6.0	6.0	1.5	12.0	4.2	141 (69%)	1.0	6.0			0.791	0.074	0.003
MQHAcLFeS	0.6	0.6	5.7	45.3	4.2	141 (82%)	1.0	6.0			0.550	0.078	0.002
MMAcLFeCl ₃	0.6	-0.6	1.5	12.0	4.2	141 (90%)	1.0	96.0			0.462	0.011	
MQHAcLFeCl ₃	0.6	-0.6	5.7	45.3	4.2	141 (75%)	1.0	15.0			0.363	0.045	0.003

Επεξήγηση: *Στο πείραμα MMED προστέθηκαν 3mM βουτυρικού οξέος ως δότης ηλεκτρονίων. **Πορτοκαλί γράμματα:** Προστέθηκε τρισθενής σίδηρος με στόχο την αναγωγή του σε δισθενή και τη χρήση του ως δότη ή μεταφορέα ηλεκτρονίων.

4.3.2.5. Τυρόγαλα ως δότης ηλεκτρονίων

Το τυρόγαλο, επίσης, επιλέχθηκε ως μια φτηνή λύση για τη μείωση του κόστους της αποκατάστασης, εφόσον είναι μια ουσία πλούσια σε λακτόζη, η οποία μπορεί να γίνει πηγή ηλεκτρονίων για τις αναγωγικές διεργασίες. Ανάλογα με τη γραμμή παραγωγής του προϊόντος (τυριού) διακρίνονται δύο είδη τυρογάλακτος που δημιουργούνται, με μεγάλη και με μικρή περιεκτικότητα σε οργανικό άνθρακα («Rich» και «Poor») από την παραγωγή φέτας και ανθότυρου, αντιστοίχως. Στην παρούσα Ενότητα περιγράφεται η επίδραση του τυρόγαλου στην αναγωγική αποχλωρίωση κάτω από μεθανογόνες συνθήκες. Επομένως, πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας πραγματοποιήθηκαν, τα οποία σχεδιάστηκαν ως εξής:

- (i) 96 mg/L COD από επεξεργασμένο τυρόγαλο με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό στις καλλιέργειες N (NMRCW: N καλλιέργειες, Medium dose of Rich Cheese Whey),
- (ii) 480 mg/L COD από επεξεργασμένο τυρόγαλο με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό στις καλλιέργειες N (NHRCW: N καλλιέργειες, High dose of Rich Cheese Whey),
- (iii) 96 mg/L COD από ανεπεξεργαστο τυρόγαλο με χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό στις καλλιέργειες N (NMPCW: N καλλιέργειες, Medium dose of Poor Cheese Whey), και
- (iv) 480 mg/L COD από επεξεργασμένο τυρόγαλο με χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό στις καλλιέργειες N (NHPCW: N καλλιέργειες, High dose of Poor Cheese Whey).

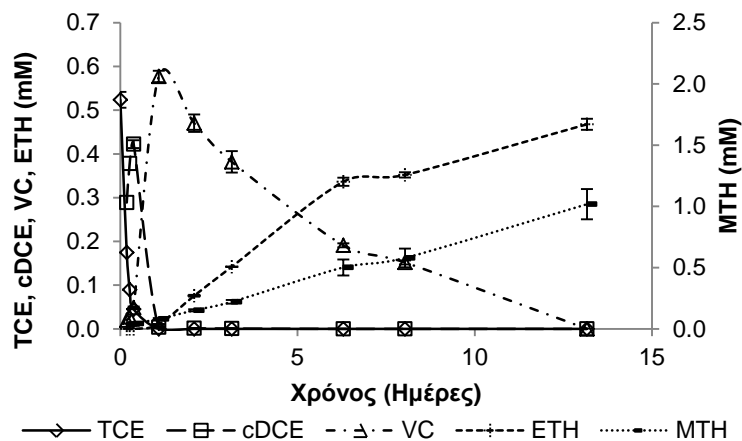
Εξαιτίας της πολύπλοκης σύνθεσης του τυρόγαλου, η δόση δότη και η παραγωγή ηλεκτρονίων προσδιορίστηκαν με τις μετρήσεις COD με βάση τη θεώρηση ότι η οξειδωση 1 mg COD παράγει 0.125 ηλεκτρόνια. Η μέση δόση τυρόγαλου, 96 mg/L COD, επιλέχθηκε γιατί ισοδυναμεί με τη μέση δόση βουτυρικού οξέος (3 mM), που αντιστοιχεί σε 12 meq/L, με το συμβατικό υπολογισμό ότι 1 mole βουτυρικού οξειδώνεται σε 2 moles οξικού και 4 ηλεκτρόνια. Επίσης, η υψηλή δόση τυρογάλακτος επιλέχθηκε διότι η χημική απαίτηση σε οξυγόνο (COD) των 3 mM βουτυρικού οξέος ισούται με 480 mg/L, εφόσον 1 mole βουτυρικού οξέος απαιτεί 5 moles οξυγόνου.

Οι τιμές των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στα πειράματα με το τυρόγαλο υπό μεθανογόνες συνθήκες παρουσιάζονται στα Σχήματα 4.77 ως 4.80, ενώ οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση στα διπλότυπα μπουκάλια.

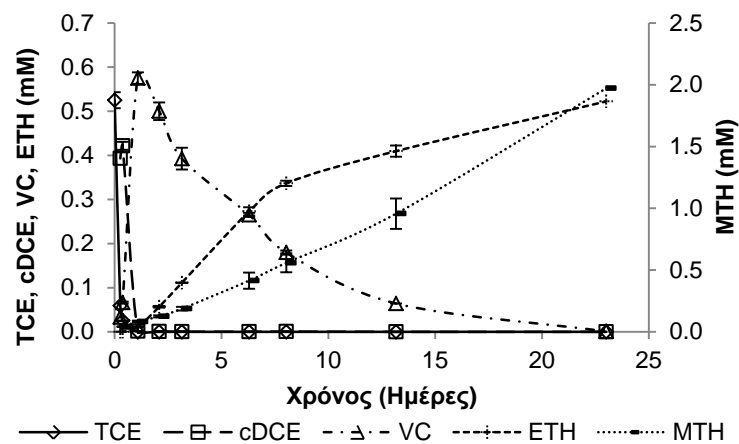
Από τα Σχήματα 4.77 (NMRCW) και 4.78 (NHRCW) μπορεί να παρατηρηθεί ότι η πλήρης αποχλωρίωση πραγματοποιήθηκε στις 13 και 23 ημέρες λειτουργίας με τη μέση και υψηλή δόση τυρόγαλου πλούσιου σε οργανικό υλικό. Αναλυτικότερα, το TCE και το cDCE εξαφανίστηκαν μαζί την πρώτη ημέρα και στις δύο δόσεις, ενώ η αναγωγή του VC σε αιθένιο πραγματοποιήθηκε με έναν εκθετικό ρυθμό μείωσης. Επιπλέον, η παραγωγή μεθανίου ξεκίνησε την πρώτη ημέρα και έφτασε 1 mM και 2

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

mM στη μέση και την υψηλή συγκέντρωση τυρογάλακτος, αντιστοίχως. Επομένως, το ποσοστό των ηλεκτρονίων που καταναλώθηκε για τη μεθανογένεση ήταν 74% στη μέση δόση και 86% στην υψηλή δόση, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκαν για την αναγωγική αποχλωρίωση. Η παραγωγή ηλεκτρονίων για τις αναγωγικές διεργασίες προήλθε από την οξείδωση των οργανικών συστατικών του τυρογάλακτος και της νεκρής βιομάζας. Το ολικό COD της μέσης δόσης μειώθηκε 41%, που αντιστοιχεί σε 11.7 meq/L, με αποτέλεσμα η ανάκτηση του πειράματος να είναι 94%. Στην υψηλή δόση καταναλώθηκε το 32% του COD, παράγοντας 20.3 meq/L, ανακτώντας έτσι το 115% της συνολικής μάζας των ηλεκτρονίων.



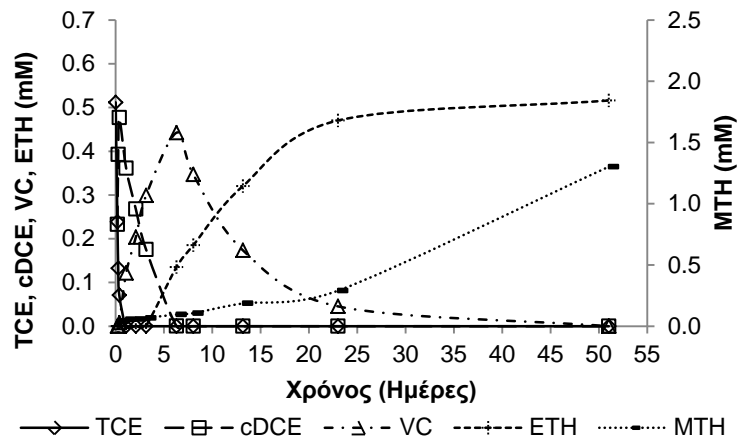
Σχήμα 4.77 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NMRCW (96 mg/L COD από προεπεξεργασμένο τυρόγαλο).



Σχήμα 4.78 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NHRCW (480 mg/L COD από προεπεξεργασμένο τυρόγαλο).

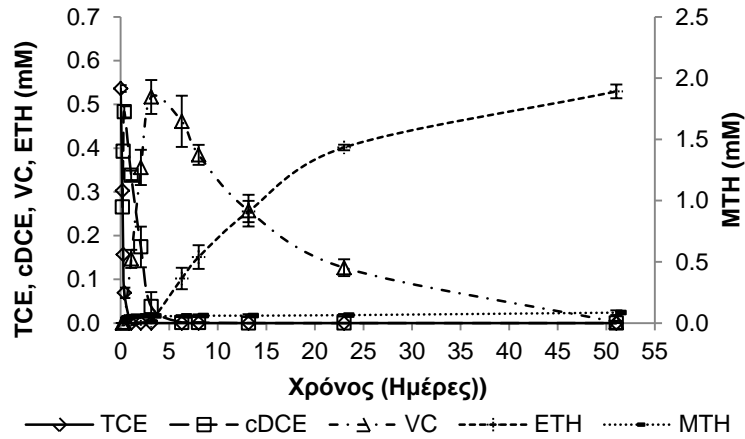
Στα πειράματα με το ανεπεξέργαστο τυρόγαλο μικρής περιεκτικότητας σε οργανικό υλικό (Σχήματα 4.79 και 4.80, NMPCW και NHPCW αντιστοίχως), όλο το TCE μετατράπηκε σε αιθένιο μέχρι το τέλος του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, το TCE μετατράπηκε την πρώτη ημέρα και στις δύο δόσεις ηλεκτρονίων, ενώ το cDCE την 5^η και την 3^η ημέρα όταν η αρχική συγκέντρωση του ολικού COD ήταν 96 mg/L και 480 mg/L, αντιστοίχως. Στις 51 ημέρες το VC είχε αναχθεί σε αιθένιο και στα δύο πειράματα. Όμως, η παραγωγή μεθανίου παρατηρήθηκε μόνο στη μέση δόση δότη, η οποία έφτασε τα 1.3 mM, καταναλώνοντας 10.4 meq/L. Κύρια πηγή ηλεκτρονίων ήταν η οξείδωση του τυρογάλακτος και της νεκρής βιομάζας, ενώ από τις μετρήσεις COD φαίνεται ότι μειώθηκε το 43% και το 4% του οργανικού φορτίου, ανακτώντας το 103% και 118% του συνόλου των ηλεκτρονίων στη μέση και στην υψηλή δόση, αντιστοίχως.

Στο Σχήμα 4.81 και τον Πίνακα 4.18 παρουσιάζεται μια συγκριτική αξιολόγηση των πειραμάτων ως προς τον ρυθμό των αναγωγικών διεργασιών και με ιδιαίτερη έμφαση στο κρίσιμο στάδιο της αναγωγικής αποχλωρίωσης, την αναγωγή του VC.

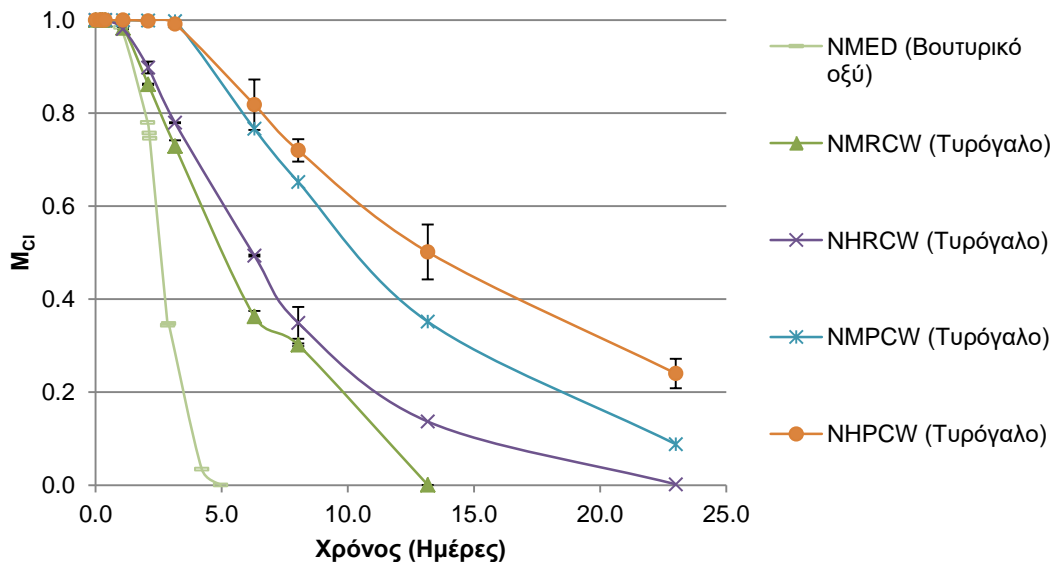


Σχήμα 4.79 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθινίων, αιθινίου και μεθανίου στο πείραμα NMPCW (96 mg/L COD από επεξεργασμένο τυρόγαλο).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.80 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NHPCW (480 mg/L COD από επεξεργασμένο τυρόγαλο).



Σχήμα 4.81 Μετρο αποχλωρίωσης M_{Cl} στα πειράματα με τυρόγαλο πλούσιας περιοικτικότητας σε οργανική ύλη (NMRCW και NHRCW), τυρόγαλο με χαμηλή περιοικτικότητα (NMPCW και NHPCW) και σύγκριση με πείραμα NMED (βουτυρικό οξύ).

Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση των πειραμάτων δείχνουν ότι το τυρόγαλο είναι ένας αποτελεσματικός δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση, εφόσον και οι δύο δόσεις στα διαφορετικά είδη τυρόγαλο προκάλεσαν την πλήρη μετατροπή του TCE σε αιθένιο. Αναλυτικότερα, το τυρόγαλο με αυξημένη περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό έδειξε καλύτερη αναγωγική ικανότητα και μεγαλύτερο ρυθμό μετατροπής του VC, παρότι τα πειράματα είχαν την ίδια αρχική συγκέντρωση δότη,

άρα σημαντικό ρόλο έπαιξε η ποιότητα του είδους των οργανικών ενώσεων. Δευτερεύοντα ρόλο διαδραμάτισε η δόση δότη, εφόσον η αύξηση του δότη προκάλεσε την καθυστέρηση της αναγωγής του VC, όπως φαίνεται σχηματικά στο Σχήμα 4.81 και τον Πίνακα 4.18. Το TCE φάνηκε να απομακρύνεται με τον ίδιο ρυθμό σε όλα τα πειράματα, και κυμάνθηκε μεταξύ 1.2-1.4 mM/day. Όμως, η αναγωγή του cDCE φαίνεται να είναι γρηγορότερη όταν το τυρόγαλο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικές ενώσεις, εφόσον μετρήθηκε 0.59 mM/day, ενώ ο ρυθμός στα πειράματα NMPCW και NHPCW ήταν 0.11 και 0.16 mM/day, αντιστοίχως.

Παρόμοια τάση με την αναγωγική αποχλωρίωση έδειξε και η μεθανογένεση, άρα ο ρυθμός της παραγωγής του μεθανίου μειωνόταν αφενός με την χρήση τυρόγαλου με χαμηλή περιεκτικότητα σε οργανικές ενώσεις και αφετέρου με την αύξηση της δόσης.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με άλλες έρευνες στη βιβλιογραφία, εφόσον έχουν δείξει ότι το τυρόγαλο μπορεί να λειτουργήσει ικανοποιητικά ως δότης ηλεκτρονίων για την αναγωγή των χλωριωμένων αιθενίων (McLean et al., 2015; Semkiw et al., 2009; Macbeth et al., 2006). Συμπερασματικά, το τυρόγαλο μπορεί να αντικαταστήσει άλλους συμβατικούς δότες ηλεκτρονίων γιατί μπορεί να διατηρήσει την πλήρη αναγωγή του TCE στο πεδίο αν και απαιτεί περισσότερο χρόνο. Όμως, η εξοικονόμηση κόστους από την αντικατάσταση ενός συμβατικού δότη, όπως του βουτυρικού οξέος (9.2 €/kg ή 5 €/kg COD) με το υγρό τυρόγαλο (μόνο το κόστος μεταφοράς) μπορεί να αντισταθμίσει πιθανές καθυστερήσεις στην επίδοση της αποχλωρίωσης.

Πίνακας 4.18. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με τυρόγαλο.

Πειράματα	COD _t		Ημέρες (% VC/Σ _{CES})	cDCE _{peak}	VC _{peak}	50% VC _{εναπομεί} ναν/Σ _{CES}	10% VC _{εναπομεί} ναν/Σ _{CES}	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)	Τελική συγκέντρ ωση	k (MTH)
	mg/L	meq/L		Ημέρες				mM/day	mM/day	1/day	mM	mM/day
NMED	480.0	12.0	5 (0%)	0.5	1.5	2.5	3.5	1.397	0.237	3.135	0.58	0.117
NMRCW	96.0	12.0	13 (0%)	0.5	1.0	5.5	11.0	1.295	0.591	0.198	1.02	0.077
NHRCW	480.0	60.0	51 (0%)	0.5	1.0	6.5	13.0	1.411	0.594	0.180	2.52	0.055
NMPCW	96.0	12.0	51 (0%)	0.5	5.0	11.0	16.0	1.221	0.106	0.136	1.30	0.025
NHPCW	480.0	60.0	51 (0%)	0.5	3.0	13.0	20.5	1.268	0.160	0.078	0.09	0.001

Επεξήγηση: Μπλε γράμματα: Οι ρυθμοί υπολογίστηκαν μόνο από ένα μπουκάλι.

4.3.2.6. Τυρόγαλα ως δότης ηλεκτρονίων υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες

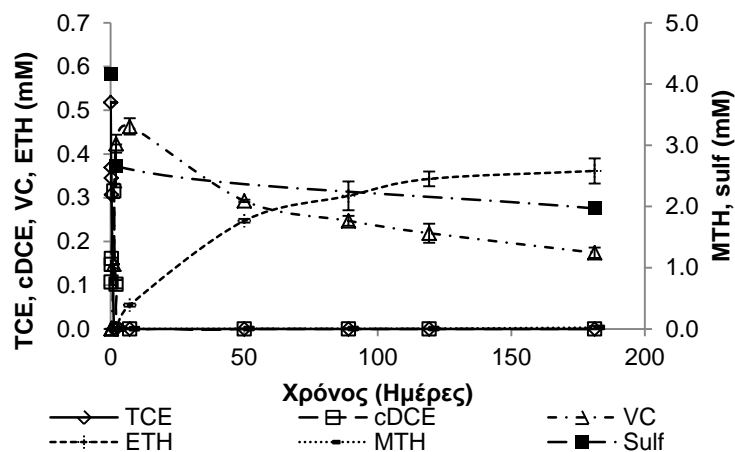
Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας σχεδιάστηκαν, με στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης του τυρογάλακτος στην αναγωγική αποχλωρίωση υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες, ως εξής:

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- (i) 96 mg/L COD από το τυρόγαλο με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό και 400 mg/L θειικών ιόντων (MMRCW: M καλλιέργειες, Medium dose of Rich Cheese Whey) και
- (ii) 480 mg/L COD από το τυρόγαλο με υψηλή περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό και 400 mg/L θειικών ιόντων (MHRCW: M καλλιέργειες, High dose of Rich Cheese Whey),

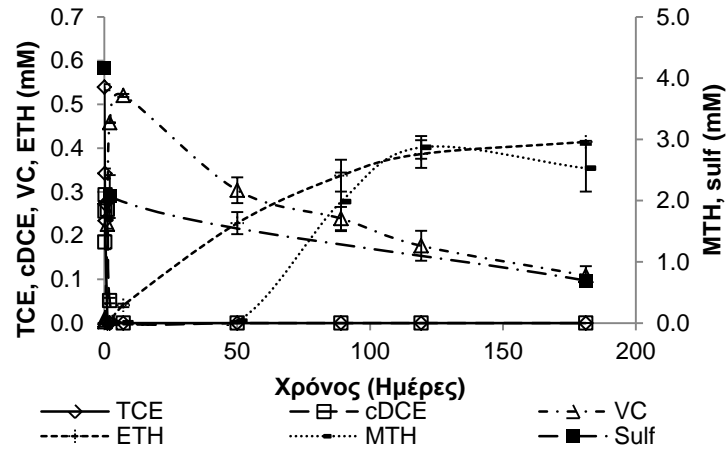
Οι αρχικές συγκεντρώσεις τυρογάλακτος επιλέχθηκαν, όπως αναφέρθηκε στην παραπάνω Ενότητα. Όμως, η μέση δόση ήταν επαρκής μόνο για το 33% της ζήτησης σε ηλεκτρόνια για τη θειικοαναγωγή και την αποχλωρίωση, ενώ η υψηλή δόση κάλυπτε το 165% των αναγκών σε ηλεκτρόνια.

Στα Σχήματα 4.82 και 4.83 παρουσιάζονται οι μετρήσεις των χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στα πειράματα με το τυρόγαλο υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες, ενώ οι μπάρες σφάλματος δείχνουν την τυπική απόκλιση στα διπλότυπα μπουκάλια.



Σχήμα 4.82 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων στο πείραμα MMRCW (96 mg/L COD από προεπεξεργασμένο τυρόγαλο & 400 mg/L SO_4^{2-}).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

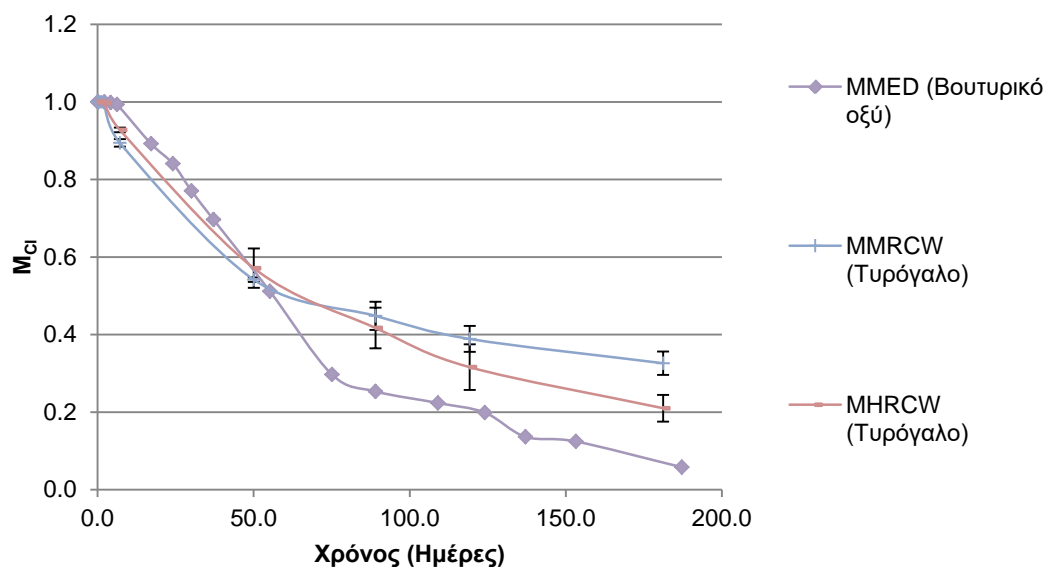


Σχήμα 4.83 Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων στο πείραμα MHCW (480 mg/L COD από προεπεξεργασμένο τυρόγαλο & 400 mg/L SO_4^{2-}).

Από τα παραπάνω πειράματα φαίνεται ότι το TCE μετατράπηκε την πρώτη ημέρα και το cDCE τη δεύτερη ημέρα στα δύο πειράματα. Στο τέλος του πειράματος, δηλαδή τις 181 ημέρες, είχε εναπομείνει το 34% και το 20% του παραγόμενου VC, στη μέση και την υψηλή δόση δότη ηλεκτρονίων, αντιστοίχως, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα μετατράπηκε σε αιθέριο. Επίσης, η αύξηση της δόσης δότη αύξησε την παραγωγή των σουλφιδίων από 2.2 mM σε 3.5 mM (1,77 mM σε 2,82 mM στην υγρή φάση), ανακτώντας το 78% της μάζας του θείου και στις δύο περιπτώσεις. Όμως, η μεθανογένεση παρατηρήθηκε μόνο στην υψηλή δόση τυρογάλακτος, με τελική συγκέντρωση μεθανίου 2.5 mM (20.2 meq/L), ενώ ο ρυθμός παραγωγής ήταν 0.04 mM/day. Άρα η συνολική κατανάλωση ηλεκτρονίων στη μέση δόση ήταν περίπου 20.6 meq/L και στην υψηλή 50.9 meq/L.

Αναλυτικότερα, στο Σχήμα 4.84 δίνεται ο δείκτης του τελευταίου σταδίου της αναγωγικής αποχλωρίωσης, M_{Cl} , ενώ στον Πίνακα 4.19 παρουσιάζονται οι ρυθμοί αναγωγής των TCE, cDCE και VC με στόχο τη σύγκριση των δύο διαφορετικών αρχικών δόσεων δότη.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα 4.84 Δείκτης M_{Cl} στα πειράματα με τυρόγαλο υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες (MMRCW και MHRCW) και σύγκριση με πείραμα MMED (μέση δόση βουτυρικού οξέος και μέση συγκέντρωση θειικών ιόντων).

Τα συνοπτικά αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 4.19 και καταδεικνύεται ότι οι ρυθμοί αναγωγής των χλωριωμένων αιθενίων με το τυρόγαλο και το βουτυρικό οξύ είναι παρόμοιοι. Συνεπώς, η αντικατάσταση ενός συμβατικού δότη ηλεκτρονίων με το τυρόγαλο μπορεί να διατηρήσει την αναγωγική ικανότητα της βιοκοινότητας και την πλήρη μετατροπή του TCE σε αιθέριο δεδομένου αρκετού χρόνου και δότη ηλεκτρονίων.

Πίνακας 4.19. Μέτρα σύγκρισης πειραμάτων με τυρόγαλο υπό θειικοαναγωγικές συνθήκες.

Πειράματα	COD _t		Θειικά ιόντα mM	Ημέρες (% VC/Σ _{CES})	cDCE _{peak}	VC _{peak}	50%	10%	k (TCE)	k (cDCE)	λ (VC)
	mg/L	meq/L					VC _{εναπομείναν} /Σ _{CES}	VC _{εναπομείναν} /Σ _{CES}			
	Ημέρες							mM/day	mM/day	1/day	
MMED	480.0	12.0	4.2	366 (1%)	1.0	6.0	55.0	165.0	0.967	0.076	0.014
MMRCW	96.0	12.0	4.2	181 (34%)	1.0	2.5	85.0		0.685	0.259	0.006
MHRCW	480.0	60.0	4.2	181 (20%)	0.5	2.5	80.0		1.021	0.253	0.009

Κεφάλαιο 5 Συμπεράσματα & προτάσεις μελλοντικής έρευνας

5.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η επίδραση των γεωχημικών παραμέτρων του εδάφους στην αναερόβια αναγωγική αποχλωρίωση του TCE. Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητικοί στόχοι του τέθηκαν ήταν οι εξής:

- (i) η διερεύνηση της επίδρασης των θειικών ιόντων στην επίδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης και τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας, και
- (ii) η διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην επίδοση της αποχλωρίωσης του TCE υπό μεθανογόνες και θειικοαναγωγικές συνθήκες.

Για την επίτευξη των στόχων αυτών υλοποιήθηκαν πειράματα όπως περιγράφονται στο Κεφάλαιο 3, ενώ τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την ανάλυση των αποτελεσμάτων στο Κεφάλαιο 4, συνοψίζονται παρακάτω.

5.2 Κύρια ευρήματα της διερεύνησης της επίδρασης των θειικών ιόντων στην αναγωγική αποχλωρίωση

Σχετικά με την επίδραση των θειικών ιόντων στον ρυθμό και την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης, φαίνεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων προκαλεί τη μείωση της ταχύτητας αναγωγής του cDCE, αλλά κυρίως, του VC. Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 4, η μείωση αυτή παρουσιάζεται ως ανάλοση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων στην εκκίνηση του πειράματος. Όμως, η υψηλότερη συγκέντρωση σουλφιδίων δεν φαίνεται να επηρεάζει την παρουσία του γένους *Dehalococcoides* spp., καθώς μετρήθηκε σε παρόμοια ποσοστά σε όλες τις καλλιέργειες, ανεξαρτήτως των αναγωγικών συνθηκών που κυριαρχούσαν σε αυτές.

Επίσης, άλλο ένα αίτιο της μείωσης του ρυθμού αναγωγής μπορεί να είναι και ο ανταγωνισμός για τον δότη ηλεκτρονίων, εφόσον παρατηρήθηκε η άμεση κατανάλωση του βουτυρικού οξέος, κυρίως από τους θειικοαναγωγικούς μικροοργανισμούς, και η ταυτόχρονη παραγωγή οξικού οξέος. Έτσι, η κύρια πηγή ηλεκτρονίων, που συσσωρεύτηκε στα πειράματα, ήταν το οξικό οξύ, το οποίο δεν θεωρείται ιδανικός δότης για τη μετατροπή του VC σε αιθέριο, ενώ καταναλώνεται γρήγορα από άλλες αναγωγικές διεργασίες, όπως η μεθανογένεση.

Παρόλα αυτά, η αρνητική επίδραση των θειικών ιόντων, δεν επηρεάζει την πραγμάτωση του τελικού σταδίου της διεργασίας, εφόσον όταν η δόση του δότη ηλεκτρονίων κάλυπτε τις ανάγκες της αποχλωρίωσης, παρατηρήθηκε η πλήρης

μετατροπή των χλωριωμένων αιθινίων σε αιθίνιο μετά την πάροδο μεγάλου χρονικού διαστήματος. Επιπλέον, στην περίπτωση συνεχούς τροφοδοσίας του υπόγειου νερού με θειικά ιόντα, παρατηρήθηκε ότι η εισαγωγή μιας μέσης δόσης και οι μετέπειτα διαδοχικές εγχύσεις μικροποσοτήτων δότη μπορούν να προκαλέσουν την αναγωγή 80% του VC σε 181 ημέρες, ενώ η συγκέντρωση σουλφιδίων έφτασε τα 308 mg/L (248 mg/L στην υγρή φάση). Επομένως, η ικανότητα της βιοκοινότητας να επιτελεί την αναγωγική αποχλωρίωση παραμένει ακόμα και σε υψηλά επίπεδα σουλφιδίων, αλλά σε πολύ χαμηλότερους ρυθμούς.

Παρόμοια τάση παρουσίασε και η μεθανογένεση, διότι παρατηρήθηκε η καθυστερημένη εκκίνησή της στα πειράματα με θειικά ιόντα, μιας και απαιτήθηκαν περίπου 42 με 115 ημέρες για την παραγωγή συγκεντρώσεων μεθανίου >0.05 mM. Ωστόσο, μετά την εκκίνηση της διεργασίας ο ρυθμός παραγωγής του μεθανίου ήταν παρόμοιος, περίπου 0.094 mM/day, στα πειράματα με τη μέση δόση δότη και υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες, καταναλώνοντας το 50% με 75% των ηλεκτρονίων που παράχθηκαν από την οξειδωση του οξικού οξέος. Το παραπάνω εύρημα ενισχύεται με τη μηδενική παραγωγή μεθανίου, αλλά και με τον μικρό πληθυσμό των αρχαίων στις μητρικές καλλιέργειες με 150 mg/L και 400 mg/L θειικών ιόντων.

Ένα μέτρο που μελετήθηκε για τη βελτίωση του ρυθμού αποχλωρίωσης υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες ήταν η εισαγωγή μεγαλύτερης ποσότητας δότη ηλεκτρονίων. Η αύξηση της συγκέντρωσης του δότη ήταν αποτελεσματική ως ένα σημείο, πέρα από το οποίο η προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης βουτυρικού οξέος φαίνεται να προκάλεσε μια ελαφριά επιδείνωση στην επίδοση της αναγωγής του TCE και την παραγωγή μεθανίου. Αναλυτικότερα, ταχύτερη αποχλωρίωση επιτεύχθηκε όταν η συγκέντρωση του δότη ήταν 3 με 4 φορές μεγαλύτερη από την απαίτηση σε ηλεκτρόνια για την πλήρη αναγωγή του TCE σε όλες τις συγκεντρώσεις θειικών ιόντων. Τουναντίον, σε όλες τις σειρές πειραμάτων φαίνεται ότι δεν αξιοποιούνται οι μεγάλες ποσότητες των πτητικών λιπαρών οξέων που έφθασαν και 9 φορές την απαίτηση σε ηλεκτρόνια για την πλήρη αναγωγή του TCE. Όμως, ένα ενδιαφέρον εύρημα που παρατηρήθηκε στις μεγάλες ποσότητες δότη, ήταν η ικανότητα των μικροοργανισμών να προσλαμβάνουν το βουτυρικό οξύ και να το αποθηκεύουν ενδοκυτταρικά σχηματίζοντας αλυσίδες πολυυδροξυβουτυρικού οξέος για τη μετέπειτα κατανάλωσή παράγοντας ηλεκτρόνια για τη θεικοαναγωγή, τη μεθανογένεση και την αναγωγική αποχλωρίωση.

5.3 Κύρια ευρήματα της διερεύνησης της επίδρασης των φυσικών αναγωγικών μέσων στην αναγωγική αποχλωρίωση

Αναφορικά με το δεύτερο σκέλος της παρούσας διδακτορικής διατριβής, τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της ποσότητας του δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων στην αποχλωρίωση του TCE, πειράματα

διεξήχθησαν όπου προστέθηκαν διάφορες συμβατικές οργανικές ουσίες, φυσική οργανική ύλη και σίδηρος υπό μεθανογόνες και θειικοαναγωγικές συνθήκες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το βουτυρικό οξύ και το υδρογόνο ήταν οι βέλτιστες επιλογές δότη για την αναγωγική αποχλωρίωση, ενώ λιγότερο αποδοτικό ήταν το βενζοϊκό οξύ. Μη αποτελεσματικοί δότες ήταν το οξικό οξύ και η προπανόλη, το οποίο συμφωνεί και με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας. Επίσης, σε αρκετά πειράματα έχει φανεί ότι η νεκρή βιομάζα συμβάλλει στην παραγωγή ηλεκτρονίων και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό της βιοαποκατάστασης μιας ρυπασμένης περιοχής.

Το τυρόγαλο, επίσης, αποτέλεσε σημαντική πηγή ηλεκτρονίων για την αναγωγική αποχλωρίωση μειώνοντας έτσι και το κόστος της αποκατάστασης, εφόσον μπορεί να αντικαταστήσει ένα συμβατικό δότη στο πεδίο. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η ποιότητά του μιας και το τυρόγαλο με αυξημένη περιεκτικότητα σε οργανικό υλικό έδειξε καλύτερη αναγωγική ικανότητα.

Όσον αφορά τη συμβολή της υδροκίνωσης και γενικότερα της διαλυτής οργανικής ύλης στην αποχλωρίωση του TCE, φαίνεται ότι δεν αποτέλεσαν σημαντικές πηγές ηλεκτρονίων για καμία αναγωγική διεργασία. Συνάμα, δεν υποβοήθησαν τη μεταφορά ηλεκτρονίων από έναν συμβατικό δότη ηλεκτρονίων στα χλωριωμένα αιθένια, μιας και οι ταχύτητες όλων των αναγωγικών διεργασιών παρέμειναν στα ίδια επίπεδα με τα πειράματα ελέγχου, παρά τις διαφορετικές απόψεις που υπάρχουν στη βιβλιογραφία.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως είχαν τα πειράματα όπου προστέθηκε δισθενής σίδηρος σε δύο διαφορετικές μορφές, στη διαλυτή (διχλωριούχος σίδηρος) και την αδιάλυτη (θειούχος σίδηρος) μορφή του. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η διαλυτή μορφή του δισθενούς σιδήρου δεν συνέβαλε στην απόδοση, αλλά ούτε και στη βελτίωση του ρυθμού της αποχλωρίωσης, οπότε αν και ο σίδηρος θεωρητικά μπορούσε να προσληφθεί από τους μικροοργανισμούς δεν αξιοποιήθηκε από τις αναγωγικές διεργασίες για την παραγωγή ή τη μεταφορά ηλεκτρονίων.

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και ο τρισθενής σίδηρος (τριχλωριούχος σίδηρος), ο οποίος αναμενόταν λόγω της παρουσίας του οξικού οξέος να αναχθεί στη δισθενή του μορφή και μετέπειτα να οξειδωθεί παράγοντας ηλεκτρόνια. Επομένως, στόχος ήταν η βελτίωση του ρυθμού αναγωγικής αποχλωρίωσης με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από έναν μη-αποδοτικό δότη στα χλωριωμένα αιθένια. Όμως, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μορφή του τρισθενούς σιδήρου δεν συνέβαλε στην απόδοση, αλλά ούτε και στη βελτίωση του ρυθμού της αποχλωρίωσης. Τα παραπάνω αποτελέσματα μάλλον οφείλονται στη δημιουργία συμπλεγμάτων που δέσμευσαν τον διαλυτό σίδηρο και προκάλεσαν την καθίζησή του, τα οποία ήταν εμφανή στο κάτω μέρος των μπουκαλιών.

Αντιθέτως, ο θειούχος σίδηρος, που παραμένει αδιάλυτος στο νερό, βελτίωσε την απόδοση της αναγωγικής αποχλωρίωσης είτε όταν ήταν ο μοναδικός δότης ηλεκτρονίων είτε όταν χρησιμοποιήθηκε ως βοηθητικός δότης για την ενίσχυση των διεργασιών στα πειράματα που περιείχαν μη-αποτελεσματικούς δότες. Έτσι, φαίνεται ότι η αδιάλυτη μορφή του σιδήρου έγινε πηγή ηλεκτρονίων για την αναγωγή των χλωριωμένων αιθενίων. Για να ελεγχθεί η ικανότητά του ως μεταφορέα ηλεκτρονίων, μικρότερες συγκεντρώσεις αδιάλυτου σιδήρου εισήχθησαν σε πειράματα με οξικό οξύ ή προπανόλη. Ο ρυθμός, όμως, της αποχλωρίωσης δεν φάνηκε να βελτιώνεται, άρα ο θειούχος σίδηρος δεν μπορούσε να ανακυκλωθεί μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής.

Σημαντικό είναι επίσης το εύρημα ότι η αναγωγική αποχλωρίωση με τη χρήση θειούχου σιδήρου ως δότη ακολούθησε το βιολογικό μονοπάτι της υδρογονόλυσης και όχι το αβιοτικό της β-απόσπασης, όπως αναφέρεται σε αρκετές έρευνες στη βιβλιογραφία. Η αντίδραση αυτή μάλλον πραγματοποιείται εξωκυτταρικά από τους μικροοργανισμούς μεταφέροντας με αυτόν τον τρόπο ηλεκτρόνια από τον οργανικό δότη στον ρύπο.

Πειράματα με την προσθήκη οξικού οξέος και σιδήρου υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες πραγματοποιήθηκαν για να μελετηθεί η βιογεωχημική μετατροπή των χλωριωμένων αιθενίων μέσω του θειούχου σιδήρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη θειούχου σιδήρου οδήγησε στην επιθυμητή παραγωγή αιθενίου με έναν αργό ρυθμό, εφόσον μετά από 141 ημέρες το 31% του VC είχε μετατραπεί σε αιθέριο. Επιπλέον, η προσθήκη μικροποσοτήτων τριχλωριούχου σιδήρου με στόχο τη μεταφορά ηλεκτρονίων δεν υποβοήθησε την αναγωγική αποχλωρίωση, τουναντίον προκάλεσε μια καθυστέρηση της διεργασίας.

Συμπερασματικά, η φυσική παρουσία θειούχου σιδήρου στο πεδίο μπορεί να ευνοήσει την επίτευξη της αναγωγικής αποχλωρίωσης και μπορεί να θεωρηθεί μια σημαντική παράμετρος σχεδιασμού για τη βιοαποκατάσταση ρυπασμένου πεδίου από οργανοχλωριωμένες ενώσεις, αλλά με επιφύλαξη υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες.

Καταλήγοντας, εκτιμάται ότι η ιδιαίτερη συμβολή της παρούσας διατριβής είναι:

- 1) Η εύρεση ότι πλήρης αποχλωρίωση μπορεί να επιτευχθεί ακόμα και με 400 mg/L αρχική συγκέντρωση θειικών ιόντων, αν προστεθεί επαρκής δόση δότη ηλεκτρονίων, και με την πάροδο μεγάλης χρονικής διάρκειας. Όμως, οι ρυθμοί αποχλωρίωσης του cDCE και του VC επηρεάζονται αρνητικά από την ποσότητα των θειικών ιόντων. Μάλιστα, η ταχύτητα μείωσης του VC και η ποσότητα των θειικών ιόντων είναι αντιστρόφως ανάλογα ποσά.
- 2) Η βέλτιστη ποσότητα δότη για την αποδόμηση είναι 3 με 4 φορές παραπάνω από την απαιτούμενη ποσότητα για την αποχλωρίωση. Μάλιστα, αποδείχθηκε ότι οι

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

χαμηλές δόσεις δότη καταναλώθηκαν δίχως την πλήρη αποχλωρίωση εφόσον χρησιμοποιήθηκαν από άλλες αναγωγικές διεργασίες, ενώ η προσθήκη δότη σε αυξημένη περίσσεια δε βελτίωσε τον ρυθμό της αποχλωρίωσης,

- 3) Το τυρόγαλο μπορεί να αντικαταστήσει συμβατικούς δότες ηλεκτρονίων, όπως το βουτυρικό οξύ ως μια φτηνή λύση για την απομάκρυνση του τριχλωροαιθενίου από μια ρυπασμένη περιοχή.
- 4) Η ύπαρξη του θειούχου σιδήρου υποβοηθά στην πραγματοποίηση των αναγωγικών αντιδράσεων με την παροχή ηλεκτρονίων και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό της αποκατάστασης ρυπασμένου πεδίου.
- 5) Η αναγωγική αποχλωρίωση με την προσθήκη του θειούχου σιδήρου ακολούθησε το βιολογικό μονοπάτι της υδρογονόλυσης και όχι το αβιοτικό της β-απόσπασης, σε αντίθεση με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας.

Από τα παραπάνω προκύπτει ο σημαντικός ρόλος που διαδραματίζουν οι γεωχημικές συνθήκες του πεδίου στην βιοαποκατάσταση, υπογραμμίζοντας παράλληλα, ότι πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή της μεθόδου και κατά το σχεδιασμό της αποκατάστασης.

5.4 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσε ένα βήμα στην κατανόηση των μηχανισμών της αναγωγικής αποχλωρίωσης των χλωριωμένων αιθενίων και κατέδειξε την σπουδαιότητα των γεωχημικών συνθηκών στην αποτελεσματικότητα της βιοαποκατάστασης του πεδίου. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η επίδραση διάφορων συγκεντρώσεων θειικών ιόντων, όπου φάνηκε η αρνητική επίδραση στον ρυθμό αποχλωρίωσης του VC, αλλά και η προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων δότη ηλεκτρονίων για τη βελτίωση του ρυθμού αποκατάστασης. Όμως, ένα σημαντικό ακόμα στοιχείο που δεν έχει μελετηθεί ακόμα στη βιβλιογραφία είναι η επίδραση των σουλφιδίων στην αναγωγική αποχλωρίωση και τους μικροοργανισμούς οργανοαλογονικής αναπνοής. Επομένως, μια σημαντική συνεισφορά στο συγκεκριμένο αντικείμενο, θα ήταν η μελέτη της δράσης των σουλφιδίων στο γένος *Dehalococcoides* σε επίπεδο πρωτεΐνης μέσω πρωτεομικών αναλύσεων, με στόχο την αναγνώριση των λειτουργιών του μικροοργανισμού που αναχαιτίζονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σουλφιδίων.

Επίσης, προτείνεται μια πιο εντατική μελέτη του ανταγωνισμού μεταξύ των μικροοργανισμών αναγωγής θειικών ιόντων και οργανοαλογονικής αναπνοής υπό μόνιμες θειοαναγωγικές συνθήκες. Πειράματα με τη συνεχή προσθήκη δότη ηλεκτρονίων και θειικών ιόντων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θα μπορούσαν να σχεδιαστούν με στόχο την προσομοίωση υπεδάφους υπό σταθερή συγκέντρωση θειικών ιόντων.

Ένα ακόμα αντικείμενο που μελετήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή ήταν η επίδραση διάφορων φυσικών αναγωγικών μέσων, όπως τα ορυκτά σιδήρου και η οργανική ύλη του εδάφους. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο θειούχος σίδηρος βελτίωσε την απόδοση της αποχλωρίωσης ως συμπληρωματικός δότης ηλεκτρονίων. Όμως, προτείνεται και η μελέτη της χρήσης διάφορων ειδών κινονών για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το δότη στα χλωριωμένα αιθέρια, εφόσον στη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί το συγκεκριμένο φαινόμενο. Περαιτέρω έρευνα θα ήταν ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί και στους μηχανισμούς της βιογεωχημικής μετατροπής χρησιμοποιώντας διάφορα είδη ορυκτών σιδήρου, αλλά και να γίνει μια πιο ενδελεχής έρευνα στη βιολογική αποχλωρίωση των οργανοχλωριωμένων ενώσεων με αδιάλυτες μορφές σιδήρου, που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Βιβλιογραφία

- Abe, Y., Aravena, R., Zopfi, J., Parker, B., Hunkeler, D., 2009a. Evaluating the fate of chlorinated ethenes in streambed sediments by combining stable isotope, geochemical and microbial methods. *Journal of Contaminant Hydrology* 107, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2009.03.002>
- Abe, Y., Aravena, R., Zopfi, J., Shouakar-Stash, O., Cox, E., Roberts, J.D., Hunkeler, D., 2009b. Carbon and Chlorine Isotope Fractionation during Aerobic Oxidation and Reductive Dechlorination of Vinyl Chloride and *cis* -1,2-Dichloroethene. *Environmental Science & Technology* 43, 101–107. <https://doi.org/10.1021/es801759k>
- Ackermann, J. U., Miiller, S., Liische, A., Bley, T., Babel, W., 1995. *Methylobacterium rhodesianum* cells tend to double the DNA content under growth limitations and accumulate PHB. *Elsevier* 39, 9–20.
- Adamson, D.T., Parkin, G.F., 1999. Biotransformation of mixtures of chlorinated aliphatic hydrocarbons by an acetate-grown methanogenic enrichment culture. *Water Research* 33, 1482–1494. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00344-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00344-3)
- Adamson, D.T., Parkin, G.F., 2000. Impact of Mixtures of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons on a High-Rate, Tetrachloroethene-Dechlorinating Enrichment Culture. *Environmental Science & Technology* 34, 1959–1965. <https://doi.org/10.1021/es990809f>
- Adamson, D.T., Lyon, D.Y., Hughes, J.B., 2004. Flux and Product Distribution during Biological Treatment of Tetrachloroethene Dense Non-Aqueous-Phase Liquid. *Environmental Science & Technology* 38, 2021–2028. <https://doi.org/10.1021/es034737a>
- Adamson, D.T., Newell, C.J., 2009. Support of Source Zone Bioremediation through Endogenous Biomass Decay and Electron Donor Recycling. *Bioremediation Journal* 13, 29–40. <https://doi.org/10.1080/10889860802690539>
- Adrian, L., Szewzyk, U., Wecke, J., Görsch, H., 2000. Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes. *Letters to nature* 408, 580–583. <https://doi.org/10.1038/35046063>
- Adrian, L., Hansen, S.K., Fung, J.M., Görsch, H., Zinder, S.H., 2007. Growth of *Dehalococcoides* Strains with Chlorophenols as Electron Acceptors. *Environmental Science & Technology* 41, 2318–2323. <https://doi.org/10.1021/es062076m>
- Adrian, L., Löffler, F.E. , 2016. *Organohalide-respiring bacteria*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Aeschbacher, M., Vergari, D., Schwarzenbach, R.P., Sander, M., 2011. Electrochemical Analysis of Proton and Electron Transfer Equilibria of the Reducible Moieties in Humic Acids. *Environmental Science & Technology* 45, 8385–8394. <https://doi.org/10.1021/es201981g>
- Air Force Center for Engineering and the Environment (AFCEE), Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP), Naval Facilities

- Engineering Service Center, 2008. Workshop on In Situ Biogeochemical Transformation of Chlorinated Solvents.
- Alcántara-Garduño, M.E., Okuda, T., Nishijima, W., Okada, M., 2008. Ozonation of trichloroethylene in acetic acid solution with soluble and solid humic acid. *Journal of Hazardous Materials* 160, 662–667. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.106>
- Alleman, B., Morse, J., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 2002. Reductive Anaerobic Biological In Situ Treatment Technology (RABITT) Treatability Testing: Defense Technical Information Center, Fort Belvoir, VA. <https://doi.org/10.21236/ADA607313>
- Aller, R.C., Rude, P.D., 1988. Complete oxidation of solid phase sulfides by manganese and bacteria in anoxic marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 52, 751–765. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(88\)90335-3](https://doi.org/10.1016/0016-7037(88)90335-3)
- Althoff, K., Mundt, M., Eisentraeger, A., Dott, W., Hollender, J., 2001. Microcosms-experiments to assess the potential for natural attenuation of contaminated groundwater. *Water Research* 35, 720–728. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00315-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00315-8)
- Amann, R., Ludwig, W., Schulze, R., Spring, S., Moore, E., Schleifer, K.H., 1996. rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for the Identification of Genuine and Former Pseudomonads. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 501–509. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80023-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80023-3)
- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Microbiology and Biotechnology* . 56, 1919–1925.
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990b. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* 172, 762–770. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.762-770.1990>
- American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF), 1999. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition, Washington DC, USA.
- American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF), 2016. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd edition, Washington DC, USA.
- Amir, A., Lee, W., 2012. Enhanced reductive dechlorination of tetrachloroethene during reduction of cobalamin (III) by nano-mackinawite. *Journal of Hazardous Materials* 235–236, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.017>

- Annapragada, R., Leet, R., Changrani, R., Raupp, G.B., 1997. Vacuum Photocatalytic Oxidation of Trichloroethylene. *Environmental Science & Technology* 31, 1898–1901. <https://doi.org/10.1021/es960541h>
- Aquino, A.J.A., Tunega, D., Pašalić, H., Schaumann, G.E., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., Lischka, H., 2011. Molecular Dynamics Simulations of Water Molecule-Bridges in Polar Domains of Humic Acids. *Environmental Science & Technology* 45, 8411–8419. <https://doi.org/10.1021/es201831g>
- Armstrong, A.T., Wymore, R.A., Dettmers, D.L., Lebow, P.S., Harris, K.L., Wood, T., (2004). Annual Performance Report for In Situ Bioremediation, Operations November 2002 to October 2003, Test Area North, Operable Unit I-07B.
- Arnold, W.A., Roberts, A.L., 2000. Pathways and Kinetics of Chlorinated Ethylene and Chlorinated Acetylene Reaction with Fe(0) Particles. *Environmental Science & Technology* 34, 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/es990884g>
- Atashgahi, S., Lu, Y., Zheng, Y., Saccenti, E., Suarez-Diez, M., Ramiro-Garcia, J., Eisenmann, H., Elsner, M., J.M. Stams, A., Springael, D., Dejonghe, W., Smidt, H., 2017. Geochemical and microbial community determinants of reductive dechlorination at a site biostimulated with glycerol: Enhanced reductive dechlorination. *Environmental Microbiology* 19, 968–981. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13531>
- Aulenta, F., Majone, M., Verbo, P., Tandoi, V., 2002. Complete dechlorination of tetrachloroethene to ethene in presence of methanogenesis and acetogenesis by an anaerobic sediment microcosm. *Kluwer Academic Publishers* 13, 411–424.
- Aulenta, F., Gossett, J. M., Papini, M. P., Rossetti, S., Mojone, M., 2005a. Comparative Study of Methanol, Butyrate, and Hydrogen as Electron Donors for Long-Term Dechlorination of Tetrachloroethene in Mixed Anaerobic Cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 91, 6, 743–753.
- Aulenta, F., Bianchi, A., Majone, M., Petrangeli Papini, M., Potalivo, M., Tandoi, V., 2005b. Assessment of natural or enhanced in situ bioremediation at a chlorinated solvent-contaminated aquifer in Italy: a microcosm study. *Environment International* 31, 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.014>
- Aulenta, F., Majone, M., Tandoi, V., 2006a. Enhanced anaerobic bioremediation of chlorinated solvents: environmental factors influencing microbial activity and their relevance under field conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81, 1463–1474. <https://doi.org/10.1002/jctb.1567>
- Aulenta, F., Potalivo, M., Majone, M., Papini, M.P., Tandoi, V., 2006b. Anaerobic Bioremediation of Groundwater Containing a Mixture of 1,1,2,2-Tetrachloroethane and Chloroethenes. *Biodegradation* 17, 193–206. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-4218-7>
- Aulenta, F., Pera, A., Rossetti, S., Petrangeli Papini, M., Majone, M., 2007. Relevance of side reactions in anaerobic reductive dechlorination microcosms amended with different electron donors. *Water Research* 41, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.019>

- Aulenta, F., Canosa, A., Majone, M., Panero, S., Reale, P., Rossetti, S., 2008a. Trichloroethene Dechlorination and H₂ Evolution Are Alternative Biological Pathways of Electric Charge Utilization by a Dechlorinating Culture in a Bioelectrochemical System. *Environmental Science & Technology* 42, 6185–6190. <https://doi.org/10.1021/es800265b>
- Aulenta, F., Beccari, M., Majone, M., Papini, M. P., Tandoi, V., 2008b. Competition for H₂ between sulfate reduction and dechlorination in butyrate-fed anaerobic cultures. *Process Biochemistry* 43, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.006>
- Aulenta, F., Canosa, A., Roma, L.D., Reale, P., Panero, S., Rossetti, S., Majone, M., 2009. Influence of mediator immobilization on the electrochemically assisted microbial dechlorination of trichloroethene (TCE) and *cis*-dichloroethene (*cis*-DCE): Bioelectrochemically assisted reductive dechlorination of TCE and *cis*-DCE. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84, 864–870. <https://doi.org/10.1002/jctb.2162>
- Aulenta, F., Reale, P., Canosa, A., Rossetti, S., Panero, S., Majone, M., 2010a. Characterization of an electro-active biocathode capable of dechlorinating trichloroethene and *cis*-dichloroethene to ethene. *Biosensors and Bioelectronics* 25, 1796–1802. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.12.033>
- Aulenta, F., Maio, V.D., Ferri, T., Majone, M., 2010b. The humic acid analogue anthraquinone-2,6-disulfonate (AQDS) serves as an electron shuttle in the electricity-driven microbial dechlorination of trichloroethene to *cis*-dichloroethene. *Bioresource Technology* 101, 9728–9733. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.090>
- Aulenta, F., Tocca, L., Verdini, R., Reale, P., Majone, M., 2011. Dechlorination of Trichloroethene in a Continuous-Flow Bioelectrochemical Reactor: Effect of Cathode Potential on Rate, Selectivity, and Electron Transfer Mechanisms. *Environmental Science & Technology* 45, 8444–8451. <https://doi.org/10.1021/es202262y>
- Avila, M. A. S., Breiter, R., Mott, H., 2007. Development of a simple, accurate SPME-based method for assay of VOCs in column breakthrough experiments, *Chemosphere* 66, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.069>
- Azizian, M.F., Istok, J.D., Semprini, L., 2007. Evaluation of the in-situ aerobic cometabolism of chlorinated ethenes by toluene-utilizing microorganisms using push–pull tests. *Journal of Contaminant Hydrology* 90, 105–124. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2006.09.015>
- 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* 113, 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.02.004>
- Azizian, M.F., Semprini, L., 2016. Simultaneous anaerobic transformation of tetrachloroethene and carbon tetrachloride in a continuous flow column.

- Journal of Contaminant Hydrology 190, 58–68.
<https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2016.04.002>
- Badin, A., Broholm, M.M., Jacobsen, C.S., Palau, J., Dennis, P., Hunkeler, D., 2016. Identification of abiotic and biotic reductive dechlorination in a chlorinated ethene plume after thermal source remediation by means of isotopic and molecular biology tools. *Journal of Contaminant Hydrology* 192, 1–19.
<https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2016.05.003>
- Bagley, D., Gossett, J., 1990. Tetrachloroethene transformation to trichloroethene and cis-1,2-dichloroethene by sulfate-reducing enrichment cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 2511–2515.
- Bagley, D., Sutherland, I., Sleep, B., 2004. Impact of Chlorofluorocarbon 113 on Chlorinated Ethene Biodegradation. *Bioremediation Journal* 8, 13–21.
<https://doi.org/10.1080/10889860490279487>
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S., 1979. Methanogens: Reevaluation of a Unique Biological Group. *Microbiological Reviews* 43, 260-296.
- Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S., Wolfe, R.S., 1977. *Acetobacterium*, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing, Carbon Dioxide-Reducing, Anaerobic Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 27, 355–361.
<https://doi.org/10.1099/00207713-27-4-355>
- Ballapragada, B.S., Stensel, H.D., Puhakka, J.A., Ferguson, J.F., 1997a. Effect of Hydrogen on Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethenes. *Environmental Science & Technology* 31, 1728–1734.
<https://doi.org/10.1021/es9606539>
- Ballapragada, B.S., Stensel, H.D., Ferguson, J.F., 1997b. Comment on “Comparative Kinetics of Hydrogen Utilization for Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene and Methanogenesis in an Anaerobic Enrichment Culture.” *Environmental Science & Technology* 31, 1250–1250.
<https://doi.org/10.1021/es960973s>
- Baric, M., Majone, M., Beccari, M., Papini, M., 2012. Coupling of polyhydroxybutyrate (PHB) and zero valent iron (ZVI) for enhanced treatment of chlorinated ethanes in permeable reactive barriers (PRBs) 195, 22–30.
- Barton, J.W., Vodraska, C.D., Flanary, S.A., Davison, B.H., 2008. Solubility of toluene, benzene and TCE in high-microbial concentration systems. *Chemosphere* 73, 1737–1740.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.008>
- Barton, L.L., Fauque, G.D., 2009. Chapter 2 Biochemistry, Physiology and Biotechnology of Sulfate-Reducing Bacteria, in: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, pp. 41–98. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)01202-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)01202-7)
- Bennett, P., Gandhi, D., Warner, S., Bussey, J., 2007. In situ reductive dechlorination of chlorinated ethenes in high nitrate groundwater. *Journal of Hazardous Materials* 149, 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.092>

- Berg, I., Kockelkom, D., Buckel, W., Fuchs, G., 2008. Response to Comment on “A 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Autotrophic Carbon Dioxide Assimilation Pathway in Archaea.” *Science* 321, 342–345.
- Berggren, D.R.V., 2011. Kinetic and Molecular Effects of Sulfate Reduction on a Dechlorinating Culture under Chemostat Growth Conditions. Master Thesis, Oregon State University.
- Berggren, D.R.V., Marshall, I.P.G., Azizian, M.F., Spormann, A.M., Semprini, L., 2013. Effects of Sulfate Reduction on the Bacterial Community and Kinetic Parameters of a Dechlorinating Culture under Chemostat Growth Conditions. *Environmental Science & Technology* 47, 1879–1886. <https://doi.org/10.1021/es304244z>
- Bhatt, P., Kumar, M.S., Mudliar, S., Chakrabarti, T., 2007. Biodegradation of Chlorinated Compounds-A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 37, 165–198. <https://doi.org/10.1080/10643380600776130>
- Biswas, B., Sarkar, B., Rusmin, R., Naidu, R., 2015. Bioremediation of PAHs and VOCs: Advances in clay mineral–microbial interaction. *Environment International* 85, 168–181. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.09.017>
- Bommer, M., Kunze, C., Fessler, J., Schubert, T., Diekert, G., Dobbek, H., 2014. Structural basis for organohalide respiration. *Science* 346, 455–458. <https://doi.org/10.1126/science.1258118>
- Boopathy, R., Peters, R., 2001. Enhanced Biotransformation of Trichloroethylene Under Mixed Electron Acceptor Conditions. *Current Microbiology* 42, 134–138. <https://doi.org/10.1007/s002843348>
- Bossert, I.D., Häggblom, M.M., 2003. Microbial Ecology of Dehalogenation, in: Häggblom, M.M., Bossert, I.D. (Eds.), *Dehalogenation*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. https://doi.org/10.1007/0-306-48011-5_2
- Bouwer, E., 1993. Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology* 11, 360–367. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90159-7)
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 1996. Anaerobic Mineralization of Vinyl Chloride in Fe(III)-Reducing, Aquifer Sediments. *Environmental Science & Technology* 30, 2084–2086. <https://doi.org/10.1021/es950926k>
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 1997. Kinetics of DCE and VC Mineralization under Methanogenic and Fe(III)-Reducing Conditions. *Environmental Science & Technology* 31, 2692–2696. <https://doi.org/10.1021/es970110e>
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 1998. Effect of Contaminant Concentration on Aerobic Microbial Mineralization of DCE and VC in Stream-Bed Sediments. *Environmental Science & Technology* 32, 553–557. <https://doi.org/10.1021/es970498d>

- Bradley, P., Landmeyer J., Dinicola R., 1998. Anaerobic oxidation of [1,2-14C] dichloroethene under Mn(IV)-reducing conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 1560–1562.
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 1999. Methane As a Product of Chloroethene Biodegradation under Methanogenic Conditions. *Environmental Science & Technology* 33, 653–656. <https://doi.org/10.1021/es9920112>
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., 2000. Aerobic Microbial Mineralization of Dichloroethene as Sole Carbon Substrate. *Environmental Science & Technology* 34, 221–223. <https://doi.org/10.1021/es990785c>
- Bradley, P., Chapelle, F.H., 2002. Microbial mineralization of ethene under sulfate reducing conditions. *Bioremediation Journal* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1080/10889860290777431>
- Bradley, P.M., 2003. History and Ecology of Chloroethene Biodegradation: A Review. *Bioremediation Journal* 7, 81–109. <https://doi.org/10.1080/713607980>
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., Löffler, F.E., 2008. Anoxic Mineralization: Environmental Reality or Experimental Artifact? *Ground Water Monitoring & Remediation* 28, 47–49. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2007.00186.x>
- Brown, D.G., Komlos, J., Jaffé, P.R., 2005. Simultaneous Utilization of Acetate and Hydrogen by *Geobacter sulfurreducens* and Implications for Use of Hydrogen as an Indicator of Redox Conditions. *Environmental Science & Technology* 39, 3069–3076. <https://doi.org/10.1021/es048613p>
- Brown, R.A., Mueller, J.G., Seech, A.G., Henderson, J.K., Wilson, J.T., 2009. Interactions between biological and abiotic pathways in the reduction of chlorinated solvents. *Remediation Journal* 20, 9–20. <https://doi.org/10.1002/rem.20226>
- Bruin, W.P.D., Kotterman, M.J.J., Posthumus, M. A., Schraa, G., Zehnder, A.J.B., 1992. Complete Biological Reductive Transformation of Tetrachloroethene to Ethane. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 1996–2000.
- Bunge, M., Kleikemper, J., Miniaci, C., Duc, L., Muusse, M.G., Hause, G., Zeyer, J., 2007. Benzoate-driven dehalogenation of chlorinated ethenes in microbial cultures from a contaminated aquifer. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 1447–1456. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1097-3>
- Butler, E.C., Hayes, K.F., 2001. Factors Influencing Rates and Products in the Transformation of Trichloroethylene by Iron Sulfide and Iron Metal. *Environmental Science & Technology* 35, 3884–3891. <https://doi.org/10.1021/es010620f>
- Butler, E.C., Hayes, K.F., 1999. Kinetics of the Transformation of Trichloroethylene and Tetrachloroethylene by Iron Sulfide. *Environmental Science & Technology* 33, 2021–2027. <https://doi.org/10.1021/es9809455>
- Cabirol, N., Jacob, F., Perrier, J., Fouillet, B., Chambon, P., 1998. Interaction between methanogenic and sulfate-reducing microorganisms during dechlorination of a high concentration of tetrachloroethylene. *The Journal of General and Applied Microbiology* 44, 297–301. <https://doi.org/10.2323/jgam.44.297>

- Castelló, E., y Santos, G., Iglésis, T., Paolino, G., Wenzel, J., Borzacconi, L., Etchebehere, C., 2009. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance 34, 5671–5682. *International journal of hydrogen energy* 34, 5674-5682. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.060>
- California Department of Public Health (CDPH), 2009. Groundwater information sheet - Trichloroethylene (TCE), 2009. State Water Resources Control Board, Division of Water Quality, GAMA Program.
- Carr, C.S., Hughes, J.B., 1998. Enrichment of High-Rate PCE Dechlorination and Comparative Study of Lactate, Methanol, and Hydrogen as Electron Donors To Sustain Activity. *Environmental Science & Technology* 32, 1817–1824. <https://doi.org/10.1021/es970985t>
- Chambon, J.C., Bjerg, P.L., Scheutz, C., Bælum, J., Jakobsen, R., Binning, P.J., 2012. Review of reactive kinetic models describing reductive dechlorination of chlorinated ethenes in soil and groundwater. *Biotechnology and Bioengineering*, 110, 1–23. <https://doi.org/10.1002/bit.24714>
- Chang, Y.C., Hatsu, M., Jung, K., Yoo, Y.S., Takamizawa, K., 2000. Isolation and characterization of a Tetrachloroethylene dechlorinating bacterium, *Clostridium bifermantans* DPH-1, *Journal of Bioscience and bioengineering* 89, 489–491. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)89102-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)89102-1)
- Chapelle, F.H., Vroblesky, D.A., Woodward, J.C., Lovley, D.R., 1997. Practical Considerations for Measuring Hydrogen Concentrations in Groundwater. *Environmental Science & Technology* 31, 2873–2877. <https://doi.org/10.1021/es970085c>
- Chapelle, F.H., Bradley, P.M., 2003. Redox Conditions and the Reductive/Oxidative biodegradation of Chlorinated Ethenes in Groundwater Systems, in: Häggblom, M.M., Bossert, I.D. (Eds.), *Dehalogenation*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. https://doi.org/10.1007/0-306-48011-5_14
- Chartrand, M.M.G., Waller, A., Mattes, T.E., Elsner, M., Lacrampe-Couloume, G., Gossett, J.M., Edwards, E.A., Sherwood Lollar, B., 2005. Carbon Isotopic Fractionation during Aerobic Vinyl Chloride Degradation. *Environmental Science & Technology* 39, 1064–1070. <https://doi.org/10.1021/es0492945>
- Chen, W.M., Chang, J.S., Wu, C.H., Chang, S.C., 2004. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Research in Microbiology* 155, 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.05.004>
- Chen, Y.M., Lin, T.F., Huang, C., Lin, J.C., 2008. Cometabolic degradation kinetics of TCE and phenol by *Pseudomonas putida*. *Chemosphere* 72, 1671–1680. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.035>
- Cheng, H., Hu, Y., Luo, J., Sabatini, D.A., 2009. Multipass membrane air-stripping (MAS) for removing volatile organic compounds (VOCs) from surfactant micellar solutions. *Journal of Hazardous Materials* 170, 1070–1078. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.072>

- Cheng, D., He, J., 2009. Isolation and Characterization of “Dehalococcoides” sp. Strain MB, Which Dechlorinates Tetrachloroethene to trans-1,2-Dichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5910–5918. <https://doi.org/10.1128/AEM.00767-09>
- Choi, J., Lee, W., 2008. Enhanced Degradation of Tetrachloroethylene by Green Rusts with Platinum. *Environmental Science & Technology* 42, 3356–3362. <https://doi.org/10.1021/es702661d>
- Chow, W.L., Cheng, D., Wang, S., He, J., 2010. Identification and transcriptional analysis of trans-DCE-producing reductive dehalogenases in *Dehalococcoides* species. *The ISME Journal* 4, 1020–1030. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.27>
- Christ, J.A., Ramsburg, C.A., Abriola, L.M., Pennell, K.D., Löffler, F.E., 2005. Coupling Aggressive Mass Removal with Microbial Reductive Dechlorination for Remediation of DNAPL Source Zones: A Review and Assessment. *Environmental Health Perspectives* 113, 465–477. <https://doi.org/10.1289/ehp.6932>
- Cichocka, D., Nikolausz, M., Haest, P.J., Nijenhuis, I., 2010. Tetrachloroethene conversion to ethene by a *Dehalococcoides* -containing enrichment culture from Bitterfeld. *FEMS Microbiology Ecology* 72, 297–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00845.x>
- Cirpka, O.A., Windfuhr, C., Bisch, G., Granzow, S., Scholz-Muramatsu, H., Kobus, H., 1999. Microbial Reductive Dechlorination in Large-Scale Sandbox Model. *Journal of Environmental Engineering* 125, 861–870. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1999\)125:9\(861\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1999)125:9(861))
- Clement, T., Gautam, T., Lee, K., Truex, M., Davis, G., 2004. Modeling of DNAPL-Dissolution, Rate-Limited Sorption and Biodegradation Reactions in Groundwater Systems. *Bioremediation Journal* 8, 47–64. <https://doi.org/10.1080/10889860490453177>
- Cobo, M., González, C.A., Sánchez, E.G., Montes, C., 2011. Catalytic hydrodechlorination of trichloroethylene with 2-propanol over Pd/Al₂O₃. *Catalysis Today* 172, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2011.02.064>
- Coleman, N.V., Mattes, T.E., Gossett, J.M., Spain, J.C., 2002. Phylogenetic and Kinetic Diversity of Aerobic Vinyl Chloride-Assimilating Bacteria from Contaminated Sites. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6162–6171. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6162-6171.2002>
- Conrad, M.E., Brodie, E.L., Radtke, C.W., Bill, M., Delwiche, M.E., Lee, M.H., Swift, D.L., Colwell, F.S., 2010. Field Evidence for Co-Metabolism of Trichloroethene Stimulated by Addition of Electron Donor to Groundwater. *Environmental Science & Technology* 44, 4697–4704. <https://doi.org/10.1021/es903535j>
- Cord-Ruwisch, R., Seitz, H.J., Conrad, R., 1988. The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology* 149, 350–357. <https://doi.org/10.1007/BF00411655>

- Cupples, A.M., Spormann, A.M., McCarty, P.L., 2003. Growth of a Dehalococcoides-Like Microorganism on Vinyl Chloride and cis-Dichloroethene as Electron Acceptors as Determined by Competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 953–959. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.953-959.2003>
- Cupples, A.M., Spormann, A.M., McCarty, P.L., 2004. Comparative Evaluation of Chloroethene Dechlorination to Ethene by *Dehalococcoides* -like Microorganisms. *Environmental Science & Technology* 38, 4768–4774. <https://doi.org/10.1021/es049965z>
- Curtis, G.P., Reinhard, M., 1994. Reductive Dehalogenation of Hexachloroethane, Carbon Tetrachloride, and Bromoform by Anthrahydroquinone Disulfonate and Humic Acid. *Environmental Science & Technology* 28, 2393–2401. <https://doi.org/10.1021/es00062a026>
- Dabrock, B., Riedel, J., Bertram, J., Gottschalk, G., 1992. Isopropylbenzene (cumene)- a new substrate for the isolation of trichloroethene-degrading bacteria. *Archives of Microbiology* 158, 9–13. <https://doi.org/10.1007/BF00249058>
- Dabrock, B., Ke, M., Averhoff, B., Gottschalk, G., 1994. Identification and Characterization of a Transmissible Linear Plasmid from *Rhodococcus erythropolis* BD2 That Encodes Isopropylbenzene and Trichloroethene Catabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 853–860 .
- Damgaard, I., Bjerg, P.L., Jacobsen, C.S., Tsitonaki, A., Kern-Jespersen, H., Broholm, M.M., 2013. Performance of Full-Scale Enhanced Reductive Dechlorination in Clay Till. *Groundwater Monitoring & Remediation* 33, 48–61. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2012.01405.x>
- Danish Environmental Protection Agency (EPA) 2014. Evaluation of health hazards by exposure to Tetrachloroethylene and proposal of a health-based quality criterion for ambient air. Danish Ministry of Environment.
- Daprato, R.C., Löffler, F.E., Hughes, J.B., 2007. Comparative Analysis of Three Tetrachloroethene to Ethene Halorespiring Consortia Suggests Functional Redundancy. *Environmental Science & Technology* 41, 2261–2269. <https://doi.org/10.1021/es061544p>
- Darlington, R., Lehmicke, L., Andrachek, R.G., Freedman, D.L., 2008. Biotic and Abiotic Anaerobic Transformations of Trichloroethene and cis -1,2-Dichloroethene in Fractured Sandstone. *Environmental Science & Technology* 42, 4323–4330. <https://doi.org/10.1021/es702196a>
- deBok, F.A.M., Plugge, C.M., Stams, A.J.M., 2004. Interspecies electron transfer in methanogenic propionate degrading consortia. *Water Research* 38, 1368–1375. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.11.028>
- Demirel, B., Scherer, P., 2008. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 7, 173–190. <https://doi.org/10.1007/s11157-008-9131-1>

- Dibble, L.A., Raupp, G.B., 1992. Fluidized-bed photocatalytic oxidation of trichloroethylene in contaminated air streams. *Environmental Science & Technology* 26, 492–495. <https://doi.org/10.1021/es00027a006>
- DiStefano, T.D., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1991. Reductive Dechlorination of High Concentrations of Tetrachloroethene to Ethene by an Anaerobic Enrichment Culture in the Absence of Methanogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2287–2292.
- Distefano, T.D., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1992. Hydrogen as an Electron Donor for Dechlorination of Tetrachloroethene by an Anaerobic Mixed Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3622–3629.
- DiStefano, T.D., Baral, R., Duran, M., Speece, R.E., 2001. A Comparison of Complex Electron Donors for Anaerobic Dechlorination of PCE. *Bioremediation Journal* 5, 131–143. <https://doi.org/10.1080/20018891079249>
- Dolfing, J., Janssen 1994. Estimates of Gibbs free energies of formation of chlorinated aliphatic compounds. *Biodegradation* 5, 21–28.
- Dolfing, J., 2004. Thermodynamic considerations for dehalogenation. in: Häggblom, M.M., Bossert, I.D. (Eds.), *Dehalogenation*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. https://doi.org/10.1007/0-306-48011-5_4
- Dolfing, J., 2016. Energetic Considerations in Organohalide Respiration, in: Adrian, L., Löffler, F.E. (Eds.), *Organohalide-Respiring Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49875-0_3
- Dong, Y., Butler, E.C., Philp, R.P., Krumholz, L.R., 2011. Impacts of microbial community composition on isotope fractionation during reductive dechlorination of tetrachloroethylene. *Biodegradation* 22, 431–444. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9416-2>
- Dong, Y., Liang, X., Krumholz, L.R., Philp, R.P., Butler, E.C., 2009. The Relative Contributions of Abiotic and Microbial Processes to the Transformation of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene in Anaerobic Microcosms. *Environmental Science & Technology* 43, 690–697. <https://doi.org/10.1021/es801917p>
- Doong, R., Lai, Y., 2006. Effect of metal ions and humic acid on the dechlorination of tetrachloroethylene by zerovalent iron. *Chemosphere* 64, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.12.038>
- Doong, R.A., Lai, Y.J., 2005. Dechlorination of tetrachloroethylene by palladized iron in the presence of humic acid. *Water Research* 39, 2309–2318. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.036>
- Drake, H.L., Gößner, A.S., Daniel, S.L., 2008. Old Acetogens, New Light. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 100–128. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.016>
- Drake, H.L., Küsel, K., Matthies, C., 2013. Acetogenic Prokaryotes, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg,. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_61

- Dridi, L., Pollet, I., Razakarisoa, O., Schäfer, G., 2009. Characterisation of a DNAPL source zone in a porous aquifer using the Partitioning Interwell Tracer Test and an inverse modelling approach. *Journal of Contaminant Hydrology* 107, 22–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2009.03.003>
- Drzyzga, O., Gerritse, J., Dijk, J.A., Elissen, H., Gottschal, J.C., 2001. Coexistence of a sulphate-reducing *Desulfovibrio* species and the dehalorespiring *Desulfitobacterium frappieri* TCE1 in defined chemostat cultures grown with various combinations of sulphate and tetrachloroethene. *Environmental Microbiology* 3, 92–99. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00157.x>
- Duhamel, M., Edwards, E.A., 2007. Growth and Yields of Dechlorinators, Acetogens, and Methanogens during Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethenes and Dihaloelimination of 1,2-Dichloroethane. *Environmental Science & Technology* 41, 2303–2310. <https://doi.org/10.1021/es062010r>
- Duhamel, M., Edwards, E.A., 2006. Microbial composition of chlorinated ethene-degrading cultures dominated by Dehalococcoides: Quantitative PCR of dechlorinating cultures. *FEMS Microbiology Ecology* 58, 538–549. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00191.x>
- Dyer, M., Marnette, E., Schuren, C., van den Brink, K., 2006. Full-scale stimulation of reductive dechlorination using the Liner technique. *Engineering Geology* 85, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.enggeo.2005.09.047>
- Ebrahiminezhad, A., Manafi, Z., Berenjian, A., Kianpour, S., Ghasemi, Y., 2017. Review Paper: Iron-Reducing Bacteria and Iron Nanostructures. *Journal of Advanced Medical Sciences and Applied Technologies* 3, 9-16.
- Eichler, B., Schink, B., 1984. Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Archives of Microbiology* 140, 147–152. <https://doi.org/10.1007/BF00454917>
- Eikelboom D., van Buijsen H., 1981. Microscopic sludge investigation manual, IMG-TNO. ed.
- 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* 45, 49–54. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0286>
- Elango, V., Kurtz, H.D., Freedman, D.L., 2011. Aerobic cometabolism of trichloroethene and cis-dichloroethene with benzene and chlorinated benzenes as growth substrates. *Chemosphere* 84, 247–253. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.007>
- Elsner, M., 2002. Reductive Dehalogenation of Chlorinated Hydrocarbons by Surface-Bound Fe(II) Kinetic and Mechanistic Aspects. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich.
- Elferink, S. J. W. H. Oude, Visser, A., Hulshoff, P., Stams, A., 1994. Sulfate reduction in methanogenic bioreactors. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 119–136.
- Ensign, S.A., Hyman, M.R., Arp, D.J., 1992. Cometabolic Degradation of Chlorinated Alkenes by Alkene Monooxygenase in a Propylene-Grown *Xanthobacter* Strain. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 9.

- Evans, P.J., 2014. Biogeochemical Transformation of Chlorinated Solvents. WebSeminar, CDM Smith.
- Evans, P.J., Nguyen, D., Chappell, R.W., Whiting, K., Gillette, J., Bodour, A., Wilson, J.T., 2014. Factors Controlling In Situ Biogeochemical Transformation of Trichloroethene: Column Study. *Groundwater Monitoring & Remediation* 34, 65–78. <https://doi.org/10.1111/gwmr.12069>
- Ewers, J., Freier-Schröder, D., Knackmuss, H. J., 1990. Selection of trichloroethene (TCE) degrading bacteria that resist inactivation by TCE. *Archives of Microbiology* 154, 410–413. <https://doi.org/10.1007/BF00276540>
- Fang, Y., Hozalski, R.M., Clapp, L.W., Novak, P.J., Semmens, M.J., 2002. Passive dissolution of hydrogen gas into groundwater using hollow-fiber membranes. *Water Research* 36, 3533–3542. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00046-5)
- Farrell, J., Melitas, N., Kason, M., Li, T., 2000. Electrochemical and Column Investigation of Iron-Mediated Reductive Dechlorination of Trichloroethylene and Perchloroethylene. *Environmental Science & Technology* 34, 2549–2556. <https://doi.org/10.1021/es991135b>
- Fatthepure, B.Z., Nengu, J.P., Boyd, S.A., 1987. Anaerobic Bacteria That Dechlorinate Perchloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2671-2674.
- Fatthepure, B.Z., Boyd, S.A., 1988a. Dependence of Tetrachloroethylene Dechlorination on Methanogenic Substrate Consumption by *Methanosarcina* sp. Strain DCM. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2976-2980.
- Fatthepure, B.Z., Boyd, S.A., 1988b. Reductive dechlorination of perchloroethylene and the role of methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 49, 149–156.
- Fatthepure, B.Z., Tiedje, J.M., 1994. Reductive Dechlorination Of Tetrachloroethylene by a Chlorobenzoate-Enriched Biofilm Reactor. *Environmental Science & Technology* 28, 746–752. <https://doi.org/10.1021/es00053a031>
- 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. *Environmental Science & Technology* 31, 918–926. <https://doi.org/10.1021/es960756r>
- Fennell, D.E., Gossett, J.M., 1998. Modeling the Production of and Competition for Hydrogen in a Dechlorinating Culture. *Environmental Science & Technology* 32, 2450–2460. <https://doi.org/10.1021/es980136l>
- Fennell, D.E., Gossett, J.M., 2003. Microcosms for site-specific evaluation of enhanced biological reductive dehalogenation, in: Häggblom, M.M., Bossert, I.D. (Eds.), *Dehalogenation*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. https://doi.org/10.1007/0-306-48011-5_15
- Fennell, D.E., Nijenhuis, I., Wilson, S.F., Zinder, S.H., Häggblom, M.M., 2004. *Dehalococcoides ethenogenes* Strain 195 Reductively Dechlorinates Diverse Chlorinated Aromatic Pollutants. *Environmental Science & Technology* 38, 2075–2081. <https://doi.org/10.1021/es034989b>

- Ferrey, M.L., Wilkin, R.T., Ford, R.G., Wilson, J.T., 2004. Nonbiological Removal of *cis* -Dichloroethylene and 1,1-Dichloroethylene in Aquifer Sediment Containing Magnetite. *Environmental Science & Technology* 38, 1746–1752. <https://doi.org/10.1021/es0305609>
- Ferry, J.G., 1997. Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *BioFactors* 6, 25–35. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060104>
- Field, J., Sierra-Alvarez, R., 2004. Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated aliphatic compounds. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 3, 185–254. <https://doi.org/10.1007/s11157-004-4733-8>
- Fletcher, K.E., Nijenhuis, I., Richnow, H.H., Löffler, F.E., 2011. Stable Carbon Isotope Enrichment Factors for *cis* -1,2-Dichloroethene and Vinyl Chloride Reductive Dechlorination by *Dehalococcoides*. *Environmental Science & Technology* 45, 2951–2957. <https://doi.org/10.1021/es103728q>
- Frasconi, D., Pinelli, D., Nocentini, M., Zannoni, A., Fedi, S., Baleani, E., Zannoni, D., Farneti, A., Battistelli, A., 2006. Long-term aerobic cometabolism of a chlorinated solvent mixture by vinyl chloride-, methane- and propane-utilizing biomasses. *Journal of Hazardous Materials* 138, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.05.009>
- Frasconi, D., Fraraccio, S., Nocentini, M., Pinelli, D., 2013. Aerobic/anaerobic/aerobic sequenced biodegradation of a mixture of chlorinated ethenes, ethanes and methanes in batch bioreactors. *Bioresource Technology* 128, 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.026>
- Frasconi, D., Zanaroli, G., Danko, A.S., 2015. In situ aerobic cometabolism of chlorinated solvents: A review. *Journal of Hazardous Materials* 283, 382–399. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.041>
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Kennedy, D.W., Dong, H., Onstott, T.C., Hinman, N.W., Li, S., 1998. Biogenic iron mineralization accompanying the dissimilatory reduction of hydrous ferric oxide by a groundwater bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 62, 3239–3257. [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(98\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(98)00243-9)
- Freeborn, R.A., West, K.A., Bhupathiraju, V.K., Chauhan, S., Rahm, B.G., Richardson, R.E., Alvarez-Cohen, L., 2005. Phylogenetic Analysis of TCE-Dechlorinating Consortia Enriched on a Variety of Electron Donors. *Environmental Science & Technology* 39, 8358–8368. <https://doi.org/10.1021/es048003p>
- Freedman, D.L., Gossett, J.M., 1989. Biological Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene to Ethylene under Methanogenic Conditions, *Applied and Environmental Microbiology* 55, 2144–2151.
- Freedman, D.L., Herz, S.D., 1996. Use of ethylene and ethane as primary substrates for aerobic cometabolism of vinyl chloride. *Water Environment Research* 68, 320–328. <https://doi.org/10.2175/106143096X127767>
- Freitas, J.G., Rivett, M.O., Roche, R.S., Durrant (néé Cleverly), M., Walker, C., Tellam, J.H., 2015. Heterogeneous hyporheic zone dechlorination of a TCE

- groundwater plume discharging to an urban river reach. *Science of The Total Environment* 505, 236–252. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.083>
- Frizzell, A., Lutes, C. C., Trask, J. C. 2004. Enhanced Reductive Dechlorination of a PCE Plume using Molasses at a Former Dry Cleaning Site in Wisconsin, in: Parsons (Eds.) Principles and Practices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents. Air Force Center for Environmental Excellence, Naval Facilities Engineering Service Center, U.S. Army, Environmental Security Technology Certification Program.
- Fujita, H., Izumi, J., Sagehashi, M., Fujii, T., Sakoda, A., 2004. Decomposition of trichloroethene on ozone-adsorbed high silica zeolites. *Water Research* 38, 166–172. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00392-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00392-0)
- Futagami, T., Goto, M., Furukawa, K., 2008. Biochemical and genetic bases of dehalorespiration. *The Chemical Record* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1002/tcr.20134>
- Futagami, T., Nazir, N.H., Goto, M., Furukawa, K., 2011. Enrichment and Characterization of a Trichloroethene-Dechlorinating Consortium Containing Multiple “Dehalococcoides” Strains. *KHM Nazmul Hussain Nazir* 75, 1268–1274.
- Futamata, H., Nagano, Y., Watanabe, K., Hiraishi, A., 2005. Unique Kinetic Properties of Phenol-Degrading Variovorax Strains Responsible for Efficient Trichloroethylene Degradation in a Chemostat Enrichment Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 904–911. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.904-911.2005>
- Gao, J., Skeen, R.S., Hooker, B.S., Quesenberry, R.D., 1997. Effects of several electron donors on tetrachloroethylene dechlorination in anaerobic soil microcosms. *Water Research* 31, 2479–2486. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00108-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00108-5)
- GeoSyntec Consultants, 2005. Bioaugmentation for remediation of chlorinated solvents: Technology Development, Status and Research needs. Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP).
- Gerardi, M.H., 2003. The microbiology of anaerobic digesters, Wastewater microbiology series. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ.
- Gerritse, J., Renard, V., Gomes, T.M.P., Lawson, P.A., Collins, M.D., Gottschal, J.C., 1996. Desulfitobacterium sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or ortho -chlorinated phenols. *Archives of Microbiology* 165, 132–140. <https://doi.org/10.1007/s002030050308>
- Gerritse, J., Drzyzga, O., Kloetstra, G., Keijmel, M., Wiersum, L.P., Hutson, R., Collins, M.D., Gottschal, J.C., 1999. Influence of Different Electron Donors and Acceptors on Dehalorespiration of Tetrachloroethene by Desulfitobacterium frappieri TCE. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5212–5221.
- Getachew, A., Woldesenbet, F., 2016. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural

- waste material. BMC Research Notes 9. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>
- Gibson, S.A., Sewell, G.W., 1992. Stimulation of Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene in Anaerobic Aquifer Microcosms by Addition of Short-Chain Organic Acids or Alcohols. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1392–1393.
- Glod, G., Brodmann, U., Angst, W., Holliger, C., Schwarzenbach, R.P., 1997. Cobalamin-Mediated Reduction of *cis* - and *trans* -Dichloroethene, 1,1-Dichloroethene, and Vinyl Chloride in Homogeneous Aqueous Solution: Reaction Kinetics and Mechanistic Considerations. *Environmental Science & Technology* 31, 3154–3160. <https://doi.org/10.1021/es9701220>
- Gong, Y., Tang, J., Zhao, D., 2016. Application of iron sulfide particles for groundwater and soil remediation: A review. *Water Research* 89, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.063>
- Gopalakrishnan, G., Burken, J.G., Werth, C.J., 2009. Lignin and Lipid Impact on Sorption and Diffusion of Trichloroethylene in Tree Branches for Determining Contaminant Fate during Plant Sampling and Phytoremediation. *Environmental Science & Technology* 43, 5732–5738. <https://doi.org/10.1021/es9006417>
- Goris, T., Hornung, B., Kruse, T., Reinhold, A., Westermann, M., Schaap, P.J., Smidt, H., Diekert, G., 2015. Draft genome sequence and characterization of *Desulfitobacterium hafniense* PCE-S. *Standards in Genomic Sciences* 10. <https://doi.org/10.1186/1944-3277-10-15>
- Gossett, J.M., 1987. Measurement of Henry's law constants for C1 and C2 chlorinated hydrocarbons. *Environmental Science & Technology* 21, 202–208. <https://doi.org/10.1021/es00156a012>
- Gossett, J.M., 2010. Sustained Aerobic Oxidation of Vinyl Chloride at Low Oxygen Concentrations. *Environmental Science & Technology* 44, 1405–1411. <https://doi.org/10.1021/es9033974>
- Graber, E.R., Sorek, A., Tsechansky, L., Atzmon, N., 2007. Competitive Uptake of Trichloroethene and 1,1,1-Trichloroethane by *Eucalyptus camaldulensis* Seedlings and Wood. *Environmental Science & Technology* 41, 6704–6710. <https://doi.org/10.1021/es070743l>
- Gualandi, G., Frascari, D., Pinelli, D., Nocentini, M., 2007. Growth of Chlorinated Solvent-Degrading Consortia in Fed-Batch Bioreactors and Development of a Double-Substrate High-Performing Microbial Inoculum. *Engineering in Life Sciences* 7, 217–228. <https://doi.org/10.1002/elsc.200620189>
- Guerrero-Barajas, C., García-Peña, E.I., 2010. Evaluation of enrichments of sulfate reducing bacteria from pristine hydrothermal vents sediments as potential inoculum for reducing trichloroethylene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26, 21–32. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0136-x>
- Guerrero-Barajas, C., Ordaz, A., Garibay-Orijel, C., García-Solares, S.M., Bastida-González, F., Zárate-Segura, P.B., 2014. Enhanced sulfate reduction and trichloroethylene (TCE) biodegradation in a UASB reactor operated with a

- sludge developed from hydrothermal vents sediments: Process and microbial ecology. *International Biodeterioration & Biodegradation* 94, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.07.015>
- Haest, P.J., Springael, D., Smolders, E., 2010. Dechlorination kinetics of TCE at toxic TCE concentrations: Assessment of different models. *Water Research* 44, 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.033>
- Hägglom, M.M., Bossert, I.D., 2003. Halogenated Organic Compounds - A Global Perspective, in: Hägglom, M.M., Bossert, I.D. (Eds.), *Dehalogenation*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. https://doi.org/10.1007/0-306-48011-5_1
- Han, Y.L., Kuo, M.C.T., Tseng, I.C., Lu, C.J., 2007. Semicontinuous microcosm study of aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene. *Journal of Hazardous Materials* 148, 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.03.013>
- Han, Y.-S., Hyun, S.P., Jeong, H.Y., Hayes, K.F., 2012. Kinetic study of cis-dichloroethylene (cis-DCE) and vinyl chloride (VC) dechlorination using green rusts formed under varying conditions. *Water Research* 46, 6339–6350. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.041>
- Hara, J., Ito, H., Suto, K., Inoue, C., Chida, T., 2005. Kinetics of trichloroethene dechlorination with iron powder. *Water Research* 39, 1165–1173. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.12.011>
- Harkness, M., Fisher, A., Lee, M.D., Mack, E.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* 131, 100–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2012.01.011>
- Harkness, M., Fisher, A., 2013. Use of emulsified vegetable oil to support bioremediation of TCE DNAPL in soil columns. *Journal of Contaminant Hydrology* 151, 16–33. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.04.002>
- Hattori, S., 2008. Syntrophic Acetate-Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments. *Microbes and Environments* 23, 118–127. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.118>
- Hazen, T.C., Chakraborty, R., Fleming, J.M., Gregory, I.R., Bowman, J.P., Jimenez, L., Zhang, D., Pfiffner, S.M., Brockman, F.J., Sayler, G.S., 2009. Use of gene probes to assess the impact and effectiveness of aerobic in situ bioremediation of TCE. *Archives of Microbiology* 191, 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0445-8>
- Hazen, T.C., 2010. Cometabolic Bioremediation, in: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_185
- He, J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M., Löffler, F.E., 2002. Acetate versus Hydrogen as Direct Electron Donors To Stimulate the Microbial Reductive Dechlorination Process at Chloroethene-Contaminated

- Sites [†]. *Environmental Science & Technology* 36, 3945–3952. <https://doi.org/10.1021/es025528d>
- He, J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M., Löffler, F.E., 2003. Acetate versus Hydrogen as Direct Electron Donors To Stimulate the Microbial Reductive Dechlorination Process at Chloroethene-Contaminated Sites. *Environmental Science & Technology* 37, 816–816. <https://doi.org/10.1021/es021048a>
- He, J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E., 2005. Isolation and characterization of Dehalococcoides sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environmental Microbiology* 7, 1442–1450. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00830.x>
- He, J., Holmes, V.F., Lee, P.K.H., Alvarez-Cohen, L., 2007. Influence of Vitamin B12 and Cocultures on the Growth of Dehalococcoides Isolates in Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 2847–2853. <https://doi.org/10.1128/AEM.02574-06>
- He, Y.T., Wilson, J.T., Wilkin, R.T., 2008. Transformation of Reactive Iron Minerals in a Permeable Reactive Barrier (Biowall) Used to Treat TCE in Groundwater. *Environmental Science & Technology* 42, 6690–6696. <https://doi.org/10.1021/es8010354>
- He, Y.T., Wilson, J.T., Wilkin, R.T., 2010. Impact of iron sulfide transformation on trichloroethylene degradation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 74, 2025–2039. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.01.013>
- Heavner, G.L.W., Rowe, A.R., Mansfeldt, C.B., Pan, J.K., Gossett, J.M., Richardson, R.E., 2013. Molecular Biomarker-Based Biokinetic Modeling of a PCE-Dechlorinating and Methanogenic Mixed Culture. *Environmental Science & Technology* 47, 3724–3733. <https://doi.org/10.1021/es303517s>
- Hedderich, R., Whitman, W.B., 2013. Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_81
- 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* 39, 3579–3586. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.029>
- Heimann, A.C., Batstone, D.J., Jakobsen R., 2006. Methanosarcina spp. Drive Vinyl Chloride Dechlorination via Interspecies Hydrogen Transfer. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2942–2949. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2942-2949.2006>
- Heimann, A.C., Blodau, C., Postma, D., Larsen, F., Viet, P.H., Nhan, P.Q., Jessen, S., Duc, M.T., Hue, N.T.M., Jakobsen, R., 2007. Hydrogen Thresholds and Steady-State Concentrations Associated with Microbial Arsenate Respiration. *Environmental Science & Technology* 41, 2311–2317. <https://doi.org/10.1021/es062067d>

- Hendrickson, E.R., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M.P., Fahnestock, S., Ellis, D.E., Ebersole, R.C., 2002. Molecular Analysis of Dehalococcoides 16S Ribosomal DNA from Chloroethene-Contaminated Sites throughout North America and Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 485–495. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.485-495.2002>
- Henrysson, T., Mccarty, P., 1993. Influence of the Endogenous Storage Lipid Poly-,3-Hydroxybutyrate on the Reducing Power Availability during Cometabolism of Trichloroethylene and Naphthalene by Resting Methanotrophic Mixed Cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1602–1606.
- Hiemstra, T., van Riemsdijk, W.H., 2007. Adsorption and surface oxidation of Fe(II) on metal (hydr)oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 5913–5933. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2007.09.030>
- Hoelen, T.P., Reinhard, M., 2004. Complete Biological Dehalogenation of Chlorinated Ethylenes in Sulfate Containing Groundwater. *Biodegradation* 15, 395–403. <https://doi.org/10.1023/B:BIOD.0000044592.33729.d6>
- Hoelen, T.P., Cunningham, J.A., Hopkins, G.D., Lebrón, C.A., Reinhard, M., 2006. Bioremediation of cis-DCE at a Sulfidogenic Site by Amendment with Propionate. *Ground Water Monitoring & Remediation* 26, 82–91. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2006.00088.x>
- Holliger, C., Zehndert, A.J.B., 1993. A Highly Purified Enrichment Culture Couples the Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene to Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2991–2997.
- Holliger, C., Schraa, G., 1994. Physiological meaning and potential for application of reductive dechlorination by anaerobic bacteria. *FEMS microbiology Reviews* 15, 297–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00141.x>
- Holliger, C., Regeard, C., Diekert, G., 2003. Dehalogenation by Anaerobic Bacteria, in: Häggblom, M.M., Bossert, I.D. (Eds.), *Dehalogenation*. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. https://doi.org/10.1007/0-306-48011-5_5
- Holmes, V.F., He, J., Lee, P.K.H., Alvarez-Cohen, L., 2006. Discrimination of Multiple Dehalococcoides Strains in a Trichloroethene Enrichment by Quantification of Their Reductive Dehalogenase Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 5877–5883. <https://doi.org/10.1128/AEM.00516-06>
- Hønning, J., 2007. Use of in situ chemical oxidation with permanganate in PCE-contaminated clayey till with sand lenses. PhD Thesis, Institute of Environment & Resources, University of Denmark.
- Hopkins, G., Mccarty, P., 1995. Field Evaluation of in Situ Aerobic Cometabolism of Trichloroethylene and Three Dichloroethylene Isomers Using Phenol and Toluene as the Primary Substrates. *Environmental Science & Technology* 29, 1628–1637.
- 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* 190, 1074–1078. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.088>

- Huang, B., Lei, C., Wei, C., Zeng, G., 2014. Chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs) in environment - sources, potential human health impacts, and current remediation technologies. *Environment International* 71, 118–138. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.06.013>
- Huang, B., Long, J., Chen, W., Zhu, Y., Zeng, G., Lei, C., 2016. Linear free energy relationships of electrochemical and thermodynamic parameters for the electrochemical reductive dechlorination of chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs). *Electrochimica Acta* 208, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.04.182>
- Hug, L.A., Beiko, R.G., Rowe, A.R., Richardson, R.E., Edwards, E.A., 2012. Comparative metagenomics of three Dehalococcoides-containing enrichment cultures: the role of the non-dechlorinating community. *BMC Genomics* 13, 327. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-327>
- Hug, L.A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F.E., Smidt, H., Edwards, E.A., Adrian, L., 2013. Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, 20120322–20120322. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0322>
- Hunkeler, D., Abe, Y., Broholm, M.M., Jeannotat, S., Westergaard, C., Jacobsen, C.S., Aravena, R., Bjerg, P.L., 2011. Assessing chlorinated ethene degradation in a large scale contaminant plume by dual carbon–chlorine isotope analysis and quantitative PCR. *Journal of Contaminant Hydrology* 119, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2010.09.009>
- Huo, Y.C., Li, W.W., Chen, C.B., Li, C.X., Zeng, R., Lau, T.C., Huang, T.Y., 2016. Biogenic FeS accelerates reductive dechlorination of carbon tetrachloride by *Shewanella putrefaciens* CN32. *Enzyme and Microbial Technology* 95, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.013>
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2016. URL <https://www.iarc.fr/>
- International Humic Substances Society (IHSS), 2007. <http://humic-substances.org>
- Interstate Technology & Regulatory Council (ITRC), 1998. Technical and regulatory requirements for enhanced in situ bioremediation of chlorinated solvents in groundwater – final, Washington DC, USA.
- Interstate Technology & Regulatory Council (ITRC), 2007. In Situ Bioremediation of Chlorinated Ethene DNAPL Source Zones: A Resource Guide, Bioremediation of DNAPLs, Washington DC, USA.
- Interstate Technology & Regulatory Council (ITRC), 2008. In Situ Bioremediation of Chlorinated Ethene: DNAPL Source Zones. Washington DC, USA.
- ISO TC 69/SC 6 N, 2011. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. ISO/WD 15725-1.
- Ise, K., Suto, K., Inoue, C., 2011. Microbial Diversity and Changes in the Distribution of Dehalogenase Genes during Dechlorination with Different Concentrations of *cis*-DCE. *Environmental Science & Technology* 45, 5339–5345. <https://doi.org/10.1021/es104199y>

- Jakobsen, R., Albrechtsen, H.J., Rasmussen, M., Bay, H., Bjerg, P.L., Christensen, T.H., 1998. H₂ Concentrations in a Landfill Leachate Plume (Grindsted, Denmark): In Situ Energetics of Terminal Electron Acceptor Processes. *Environmental Science & Technology* 32, 2142–2148. <https://doi.org/10.1021/es970858x>
- Jelen, P., 2002. Whey Processing: Utilization and Products, *Encyclopedia of Dairy sciences*, 2739-2745. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00511-3>
- Jenkins D., Richard M., Daigger G., 1993. *Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming*. 2nd ed. Lewis Publishers, USA.
- Jeong, H.Y., Hayes, K.F., 2007. Reductive Dechlorination of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene by Mackinawite (FeS) in the Presence of Metals: Reaction Rates. *Environmental Science & Technology* 41, 6390–6396. <https://doi.org/10.1021/es0706394>
- Jeong, H.Y., Kim, H., Hayes, K.F., 2007. Reductive Dechlorination Pathways of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene and Subsequent Transformation of Their Dechlorination Products by Mackinawite (FeS) in the Presence of Metals. *Environmental Science & Technology* 41, 7736–7743. <https://doi.org/10.1021/es0708518>
- Jeong, H.Y., Anantharaman, K., Han, Y.S., Hayes, K.F., 2011. Abiotic Reductive Dechlorination of *cis*-Dichloroethylene by Fe Species Formed during Iron- or Sulfate-Reduction. *Environmental Science & Technology* 45, 5186–5194. <https://doi.org/10.1021/es104387w>
- Jeong, H.Y., Anantharaman, K., Hyun, S.P., Son, M., Hayes, K.F., 2013. pH impact on reductive dechlorination of *cis*-dichloroethylene by Fe precipitates: An X-ray absorption spectroscopy study. *Water Research* 47, 6639–6649. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.08.035>
- Jho, E.H., Singhal, N., Turner, S., 2010. Fenton degradation of tetrachloroethene and hexachloroethane in Fe(II) catalyzed systems. *Journal of Hazardous Materials* 184, 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.027>
- Jia, J., Chu, W., 2009. The photodegradation of trichloroethylene with or without the NAPL by UV irradiation in surfactant solutions. *Journal of Hazardous Materials* 161, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.072>
- Jin, S., Fallgren, P.H., Morris, J.M., Edgar, E.S., 2008. Degradation of trichloroethene in water by electron supplementation. *Chemical Engineering Journal* 140, 642–645. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.01.035>
- Jin, Y.O., Mattes, T.E., 2008. Adaptation of Aerobic, Ethene-Assimilating Mycobacterium Strains to Vinyl Chloride as a Growth Substrate. *Environmental Science & Technology* 42, 4784–4789. <https://doi.org/10.1021/es8000536>
- Johnson, D.R., Nemir, A., Andersen, G.L., Zinder, S.H., Alvarez-Cohen, L., 2009. Transcriptomic microarray analysis of corrinoid responsive genes in *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *FEMS Microbiology Letters* 294, 198–206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01569.x>

- Jordan, A., Harnisch, J., Borchers, R., Le Guern, F., Shinohara, H., 2000. Volcanogenic Halocarbons. *Environmental Science & Technology* 34, 1122–1124. <https://doi.org/10.1021/es990838q>
- Judger, B.-E., Ertan, H., Lee, M., Manefield, M., Christopher P. Marquis, C.P., 2015. Reductive Dehalogenases Come of Age in Biological Destruction of Organohalides. *Trends in Biotechnology* 33, 595–610. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.07.004>
- Juwarkar, A.A., Singh, S.K., Mudhoo, A., 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 9, 215–288. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9215-6>
- Kadlec, R.H., Martin, D.C., Tsao, D., 2012. Constructed marshes for control of chlorinated ethenes: An 11-year study. *Ecological Engineering* 46, 11–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.04.032>
- Kandris, K.K., 2017. Kinetic modeling of reductive biodegradation of chloroethenes in groundwater. PhD Thesis. National Technical University of Athens. School of Civil Engineering.
- Karasek, F.W., Clement, R.E., 1988. *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Principles and Techniques*. 1st edition, Elsevier Science.
- Karickhoff, S., Brown, D., Scott, T., 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research* 13, 241–248. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(79\)90201-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(79)90201-X)
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J., 1998. Βιοχημεία. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας.
- Kennedy, L.G., Everett, J.W., Becvar, E., DeFeo, D., 2006. Field-scale demonstration of induced biogeochemical reductive dechlorination at Dover Air Force Base, Dover, Delaware. *Journal of Contaminant Hydrology* 88, 119–136. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2006.06.007>
- Keppler, F., Borchers, R., Pracht, J., Rheinberger, S., Schöler, H.F., 2002. Natural Formation of Vinyl Chloride in the Terrestrial Environment. *Environmental Science & Technology* 36, 2479–2483. <https://doi.org/10.1021/es015611l>
- Khan, E., Wirojanagud, W., Sermsai, N., 2009. Effects of iron type in Fenton reaction on mineralization and biodegradability enhancement of hazardous organic compounds. *Journal of Hazardous Materials* 161, 1024–1034. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.049>
- Kim, H.S., Kang, W.H., Kim, M., Park, J.Y., Hwang, I., 2008. Comparison of hematite/Fe(II) systems with cement/Fe(II) systems in reductively dechlorinating trichloroethylene. *Chemosphere* 73, 813–819. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.092>
- Kim, H.T., Nguyen, T.P.N., Kim, C., Park, C., 2014. Formation mechanisms of pyrite (FeS₂) nano-crystals synthesized by colloidal route in sulfur abundant environment. *Materials Chemistry and Physics* 148, 1095–1098. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2014.09.024>
- Kim, Y., Arp, D.J., Semprini, L., 2000. Chlorinated Solvent Cometabolism by Butane-Grown Mixed Culture. *Journal of Environmental Engineering* 126, 934–942. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2000\)126:10\(934\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2000)126:10(934))

- Kittelmann, S., Friedrich, M.W., 2008. Novel uncultured Chloroflexi dechlorinate perchloroethene to trans-dichloroethene in tidal flat sediments: Uncultured marine Chloroflexi form trans-DCE. *Environmental Microbiology* 10, 1557–1570. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01571.x>
- Kocamemi, B.A., Çeçen, F., 2005. Cometabolic degradation of TCE in enriched nitrifying batch systems. *Journal of Hazardous Materials* 125, 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.06.002>
- Kocamemi, B.A., Çeçen, F., 2007. Kinetics analysis of the inhibitory effect of trichloroethylene (TCE) on nitrification in cometabolic degradation, *Biodegradation* 18, 71-81. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-9037-3>
- Kolb, B., Ettre, L. S., 1997. *Static headspace-gas chromatography: theory and practice*. 1st edition, Wiley-VCH.
- Kolb, B., Ettre, L.S., 2006. *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*, 2nd edition, Wiley-VCH.
- Kotik, M., Davidová, A., Voříšková, J., Baldrian, P., 2013. Bacterial communities in tetrachloroethene-polluted groundwaters: A case study. *Science of The Total Environment* 454–455, 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.082>
- Kotsyurbenko, O.R., Simankova, M.V., Nozhevnikova, A.N., Zhilina, T.N., Bolotina, N.R., Lysenko, A.M., Osipov, G.A., 1995. New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov. *Springer-Verlag* 163, 29–34.
- Kouznetsova, I., Mao, X., Robinson, C., Barry, D.A., Gerhard, J.I., McCarty, P.L., 2010. Biological reduction of chlorinated solvents: Batch-scale geochemical modeling. *Advances in Water Resources* 33, 969–986. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2010.04.017>
- Krajmalnik-Brown, R., Holscher, T., Thomson, I.N., Saunders, F.M., Ritalahti, K.M., Löffler, F.E., 2004. Genetic Identification of a Putative Vinyl Chloride Reductase in *Dehalococcoides* sp. Strain BAV1. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6347–6351. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6347-6351.2004>
- Kriegman-King, M.R., Reinhard, M., 1992. Transformation of carbon tetrachloride in the presence of sulfide, biotite, and vermiculite. *Environmental Science & Technology* 26, 2198–2206. <https://doi.org/10.1021/es00035a019>
- Krumholz, L.R., Sharp, R., Fishbain, S.S., 1996. A Freshwater Anaerobe Coupling Acetate Oxidation to Tetrachloroethylene Dehalogenation. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4108–4113.
- Krumholz, L.R., 1997. *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. Uses Tetrachloroethylene and Trichloroethylene as Electron Acceptors. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 1262–1263.
- Kube, M., Beck, A., Zinder, S.H., Kuhl, H., Reinhardt, R., Adrian, L., 2005. Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1. *Nature Biotechnology* 23, 1269–1273. <https://doi.org/10.1038/nbt1131>

- Kuo, M.C.T., Liang, K.F., Han, Y.L., Fan, K.C., 2004. Pilot studies for in-situ aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene-vapor as the primary substrate. *Water Research* 38, 4125–4134. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.08.009>
- Kusel, K., Pinkart, H.C., Drake, H.L., Devereux, R., 1999. Acetogenic and Sulfate-Reducing Bacteria Inhabiting the Rhizoplane and Deep Cortex Cells of the Sea Grass *Halodule wrightii*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5117–5123.
- LaGrega M., Buckingham P., Evans J., 1994. *Hazardous Waste Management*. McGraw-Hill.
- Lampron, K.J., Chiu, P.C., Cha, D.K., 2001. Reductive Dehalogenation of Chlorinated Ethenes with Elemental Iron: The Role of Microorganisms. *Water Research* 35, 3077–3084. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00017-3)
- Lee, I.S., Bae, J.H., McCarty, P.L., 2007a. Comparison between acetate and hydrogen as electron donors and implications for the reductive dehalogenation of PCE and TCE. *Journal of Contaminant Hydrology* 94, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2007.05.003>
- Lee, J.-H., Dolan, M., Field, J., Istok, J., 2010. Monitoring Bioaugmentation with Single-Well Push–Pull Tests in Sediment Systems Contaminated with Trichloroethene. *Environmental Science & Technology* 44, 1085–1092. <https://doi.org/10.1021/es9019645>
- Lee, J., Lee, T.K., Löffler, F.E., Park, J., 2011. Characterization of microbial community structure and population dynamics of tetrachloroethene-dechlorinating tidal mudflat communities. *Biodegradation* 22, 687–698. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9429-x>
- Lee, M.D., Quinton, G.E., Beeman, R.E., Biehle, A.A., Liddle, R.L., Ellis, D.E., Jr, R.B., 1997. Scale-up issues for in situ anaerobic tetrachloroethene bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 18, 106–115. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900289>
- Lee, P.K.H., Johnson, D.R., Holmes, V.F., He, J., Alvarez-Cohen, L., 2006. Reductive Dehalogenase Gene Expression as a Biomarker for Physiological Activity of *Dehalococcoides* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6161–6168. <https://doi.org/10.1128/AEM.01070-06>
- Lee, P.K.H., Macbeth, T.W., Sorenson, K.S., Deeb, R.A., Alvarez-Cohen, L., 2008. Quantifying Genes and Transcripts To Assess the In Situ Physiology of “*Dehalococcoides*” spp. in a Trichloroethene-Contaminated Groundwater Site. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2728–2739. <https://doi.org/10.1128/AEM.02199-07>
- Lee, P.K.H., Cheng, D., West, K.A., Alvarez-Cohen, L., He, J., 2013. Isolation of two new *Dehalococcoides mccartyi* strains with dissimilar dechlorination functions and their characterization by comparative genomics via microarray analysis: Physiology and genome of new *Dehalococcoides*. *Environmental Microbiology* 15, 2293–2305. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12099>

- Lee, W., Batchelor, B., 2002a. Abiotic Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethylenes by Iron-Bearing Soil Minerals. 1. Pyrite and Magnetite. *Environmental Science & Technology* 36, 5147–5154. <https://doi.org/10.1021/es025836b>
- Lee, W., Batchelor, B., 2002b. Abiotic Reductive Dechlorination of Chlorinated Ethylenes by Iron-Bearing Soil Minerals. 2. Green Rust. *Environmental Science & Technology* 36, 5348–5354. <https://doi.org/10.1021/es0258374>
- Lee, W., Batchelor, B., 2003. Reductive Capacity of Natural Reductants. *Environmental Science & Technology* 37, 535–541. <https://doi.org/10.1021/es025830m>
- Lee, Y. C., Kwon, T. S., Yang, J. S., Yang, J. W., 2007b. Remediation of groundwater contaminated with DNAPLs by biodegradable oil emulsion. *Journal of Hazardous Materials* 140, 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.036>
- Leeson, A., Stroo, H.F., Johnson, P.C., 2013. Groundwater Remediation Today and Challenges and Opportunities for the Future. *Groundwater* 51, 175–179. <https://doi.org/10.1111/gwat.12039>
- Leitão, P., Aulenta, F., Rossetti, S., Nouws, H.P.A., Danko, A.S., 2018. Impact of magnetite nanoparticles on the syntrophic dechlorination of 1,2-dichloroethane. *Science of The Total Environment* 624, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.110>
- Li, B., Lin, K., Zhang, W., Lu, S., Liu, Y., 2012. Effectiveness of Air Stripping, Advanced Oxidation, and Activated Carbon Adsorption-Coupled Process in Treating Chlorinated Solvent-Contaminated Groundwater. *Journal of Environmental Engineering* 138, 903–914. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000557](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000557)
- Li, T., Farrell, J., 2000. Reductive Dechlorination of Trichloroethene and Carbon Tetrachloride Using Iron and Palladized-Iron Cathodes. *Environmental Science & Technology* 34, 173–179. <https://doi.org/10.1021/es9907358>
- Li, T., Farrell, J., 2001. Electrochemical Investigation of the Rate-Limiting Mechanisms for Trichloroethylene and Carbon Tetrachloride Reduction at Iron Surfaces. *Environmental Science & Technology* 35, 3560–3565. <https://doi.org/10.1021/es0019878>
- Li, Z., Willms, C., Alley, J., Zhang, P., Bowman, R.S., 2006. A shift in pathway of iron-mediated perchloroethylene reduction in the presence of sorbed surfactant—A column study. *Water Research* 40, 3811–3819. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.08.025>
- Liang, X., Dong, Y., Kuder, T., Krumholz, L.R., Philp, R.P., Butler, E.C., 2007. Distinguishing Abiotic and Biotic Transformation of Tetrachloroethylene and Trichloroethylene by Stable Carbon Isotope Fractionation. *Environmental Science & Technology* 41, 7094–7100. <https://doi.org/10.1021/es070970n>
- Liang, X., Paul Philp, R., Butler, E.C., 2009. Kinetic and isotope analyses of tetrachloroethylene and trichloroethylene degradation by model Fe(II)-bearing

- minerals. *Chemosphere* 75, 63–69.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.042>
- Lien, P.J., Yang, Z.H., Chang, Y.M., Tu, Y.T., Kao, C.M., 2016. Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater with coexistence of fuel oil: Effectiveness and mechanism study. *Chemical Engineering Journal* 289, 525–536. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.011>
- Lin, B., Braster, M., van Breukelen, B.M., van Verseveld, H.W., Westerhoff, H.V., Røling, W.F.M., 2005. Geobacteraceae Community Composition Is Related to Hydrochemistry and Biodegradation in an Iron-Reducing Aquifer Polluted by a Neighboring Landfill. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5983–5991. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.5983-5991.2005>
- Lin, B., Braster, M., Røling, W.F.M., van Breukelen, B.M., 2007. Iron-Reducing Microorganisms in a Landfill Leachate-Polluted Aquifer: Complementing Culture-Independent Information with Enrichments and Isolations. *Geomicrobiology Journal* 24, 283–294. <https://doi.org/10.1080/01490450701456834>
- Lin, C.J., Lo, S.-L., 2005. Effects of iron surface pretreatment on sorption and reduction kinetics of trichloroethylene in a closed batch system. *Water Research* 39, 1037–1046.
- Liu, Y., Whitman, W.B., 2008. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Loeppert, P.H., Inskeep, W.P., 1996. *Methods of Soil Analysis Part 3-Chemical Methods*. Soil Science Society of America, American Society of Agronomy.
- Löffler, F.E., Tiedje, J.M., Sanford, R.A., 1999. Fraction of Electrons Consumed in Electron Acceptor Reduction and Hydrogen Thresholds as Indicators of Halorespiratory Physiology. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4049–4056.
- Löffler, F.E., Edwards, E.A., 2006. Harnessing microbial activities for environmental cleanup. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.001>
- Lohner, S.T., Spormann, A.M., 2013. Identification of a reductive tetrachloroethene dehalogenase in *Shewanella sediminis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368, 20120326–20120326. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0326>
- Lovley, D.R., Phillips, E.J.P., 1988. Novel Mode of Microbial Energy Metabolism: Organic Carbon Oxidation Coupled to Dissimilatory Reduction of Iron or Manganese. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1472–1480. 54, 9.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J. C., 1996. Humic Substances as electron acceptors for microbial respiration. *Letters to nature* 382, 445–448.
- Lovley, D.R., Fraga, J.L., Blunt-Harris, E.L., Hayes, L.A., Phillips, E.J.P., Coates, J.D., 1998. Humic Substances as a Mediator for Microbially Catalyzed Metal Reduction. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 26, 152–157.

- Lovley, D.R., Holmes, D.E., Nevin, K.P., 2004. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. *Advances in Microbial Physiology*, 49, 219–286. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49005-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49005-5)
- Lovley, D., 2013. Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_69
- Lovley, D., 2017. Syntrophy Goes Electric: Direct Interspecies Electron Transfer. *Annual Review of Microbiology* 71, 643–664. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-030117-020420>
- Low, A., Schleheck, D., Khou, M., Aagaard, V., Lee, M., Manefield, M., 2007. Options for In Situ Remediation of Soil Contaminated with a Mixture of Perchlorinated Compounds. *Bioremediation Journal* 11, 113–124. <https://doi.org/10.1080/10889860701548556>
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall R., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.-H., Wagner, M., 2002. Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of All Recognized Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes in the Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5064–5081. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5064-5081.2002>
- Lu, X., Wilson, J.T., Kampbell, D.H., 2006. Relationship between Dehalococcoides DNA in ground water and rates of reductive dechlorination at field scale. *Water Research* 40, 3131–3140. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.05.030>
- Lu, X. X., Tao, S., Bosma, T., Gerritse, J., 2001. Characteristic hydrogen concentrations for various redox processes in batch study. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 36, 1725–1734. <https://doi.org/10.1081/ESE-100106254>
- Lücker, S., Steger, D., Kjeldsen, K.U., MacGregor, B.J., Wagner, M., Loy, A., 2007. Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods* 69, 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.009>
- Luijten, M.L.G.C., de Weert, J., Smidt, H., Boschker, H.T., de Vos, W.M., Schraa, G., Stams, A.J.M. 2003. Description of *Sulfurospirillum halospirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene-respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 787–793. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02417-0>
- Luijten, M.L.G.C., Roelofsen, W., Langenhoff, A.A.M., Schraa, G., Stams, A.J.M., 2004. Hydrogen threshold concentrations in pure cultures of halo-respiring bacteria and at a site polluted with chlorinated ethenes. *Environmental Microbiology* 6, 646–650. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00608.x>
- Ma, H., O’Loughli, E.J., Burris, D.R., 2001. Factors Affecting Humic-Nickel Complex Mediated Reduction of Trichloroethene in Homogeneous Aqueous Solution.

- Environmental Science & Technology 35, 717–724.
<https://doi.org/10.1021/es001314p>
- Ma, X., Novak, P.J., Clapp, L.W., Semmens, M.J., Hozalski, R.M., 2003. Evaluation of polyethylene hollow-fiber membranes for hydrogen delivery to support reductive dechlorination in a soil column. *Water Research* 37, 2905–2918.
[https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00111-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00111-8)
- Ma, X., Novak, P.J., Semmens, M.J., 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* 40, 1155–1166.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.005>
- Macbeth, T.W., Cummings, D.E., Spring, S., Petzke, L.M., Sorenson, K.S., 2004. Molecular Characterization of a Dechlorinating Community Resulting from In Situ Biostimulation in a Trichloroethene-Contaminated Deep, Fractured Basalt Aquifer and Comparison to a Derivative Laboratory Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7329–7341.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7329-7341.2004>
- Macbeth, T.W., Nelson, L., Rothermel, J.S., Wymore, R.A., Sorenson, K.S., 2006. Evaluation of Whey for Bioremediation of Trichloroethene Source Zones. *Bioremediation Journal* 10, 115–128.
<https://doi.org/10.1080/10889860600952339>
- Mackay, D., Shiu, W.Y., 1981. A critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 10, 1175–1199. <https://doi.org/10.1063/1.555654>
- Madsen, E.L., 1991. Determining in situ biodegradation facts and challenges. *Environmental Science & Technology* 25, 1663–1673.
- Magnuson, J.K., Romine, M.F., Burris, D.R., Kingsley, M.T., 2000. Trichloroethene Reductive Dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and Substrate Range Characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5141–5147. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5141-5147.2000>
- Maillard, J., Schumacher, W., Vazquez, F., Regeard, C., Hagen, W.R., Holliger, C., 2003. Characterization of the Corrinoid Iron-Sulfur Protein Tetrachloroethene Reductive Dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4628–4638.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4628-4638.2003>
- Maitreepala, R.A., Doong, R., 2005. Enhanced Dechlorination of Chlorinated Methanes and Ethenes by Chloride Green Rust in the Presence of Copper(II). *Environmental Science & Technology* 39, 4082–4090.
<https://doi.org/10.1021/es048428b>
- Majone, M., Verdini, R., Aulenta, F., Rossetti, S., Tandoi, V., Kalogerakis, N., Agathos, S., Puig, S., Zanaroli, G., Fava, F., 2015. In situ groundwater and sediment bioremediation: barriers and perspectives at European contaminated sites. *New Biotechnology* 32, 133–146.
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.02.011>

- Mannino, P., Ceccarelli, V., 2014. Poly-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate as solid slow-releasing source of electron donors for the reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane in-situ. *International Biodeterioration & Biodegradation* 86, 278–285.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K., 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 593–600.
- Mao, X., Polasko, A., Alvarez-Cohen, L., 2017. Effects of Sulfate Reduction on Trichloroethene Dechlorination by Dehalococcoides-Containing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.03384-16>
- Maphosa, F., Smidt, H., Vod, de W.M., Roling, W.F.M., 2010. Microbial Community- And Metabolite Dynamics of an Anoxic Dechlorinating Bioreactor. *Environmental Science & Technology* 44, 4884–4890.
- Marco-Urrea, E., Nijenhuis, I., Adrian, L., 2011. Transformation and Carbon Isotope Fractionation of Tetra- and Trichloroethene to *Trans* -Dichloroethene by *Dehalococcoides* sp. Strain CBDB1. *Environmental Science & Technology* 45, 1555–1562. <https://doi.org/10.1021/es1023459>
- Matturo, B., Presta, E., Rossetti, S., 2016. Reductive dechlorination of tetrachloroethene in marine sediments: Biodiversity and dehalorespiring capabilities of the indigenous microbes. *Science of the Total Environment* 545–546, pp. 445–452. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.098>
- Mayer, F., Lurz, R., Schoberth, S., 1977. Electron microscopic investigation of the hydrogen-oxidizing acetate-forming anaerobic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Archives of Microbiology* 115, 207–213. <https://doi.org/10.1007/BF00406376>
- Maymó-Gatell, X., Tandoi, V., Gossett, J.M., Zinder, S., 1995. Characterization of an H₂-Utilizing Enrichment Culture That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Vinyl Chloride and Ethene in the Absence of Methanogenesis and Acetogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 3928–3933.
- Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1997. Isolation of a Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethene. *Science* 276, 1568-1571. <https://doi.org/10.1126/science.276.5318.1568>
- Maymó-Gatell, X., Nijenhuis, I., Zinder, S.H., 2001. Reductive Dechlorination of *cis* -1,2-Dichloroethene and Vinyl Chloride by “ *Dehalococcoides ethenogenes* .” *Environmental Science & Technology* 35, 516–521. <https://doi.org/10.1021/es001285i>
- McCarty, P.L., 1993. In situ bioremediation of chlorinated solvents. *Current Opinion in Biotechnology* 4, 323-330.
- McCarty, P.L., Chu, M.-Y., Kitanidis, P.K., 2007. Electron donor and pH relationships for biologically enhanced dissolution of chlorinated solvent DNAPL in groundwater. *European Journal of Soil Biology* 43, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.03.004>

- McGuire, T.M., McDade, J.M., Newell, C.J., 2006. Performance of DNAPL Source Depletion Technologies at 59 Chlorinated Solvent-Impacted Sites. *Groundwater Monitoring & Remediation* 26, 73–84. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2006.00054.x>
- McInerney, M.J., Struchtemeyer, C.G., Sieber, J., Mouttaki, H., Stams, A.J.M., Schink, B., Rohlin, L., Gunsalus, R.P., 2008. Physiology, Ecology, Phylogeny, and Genomics of Microorganisms Capable of Syntrophic Metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125, 58–72. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.005>
- McLean, J.E., Ervin, J., Zhou, J., Sorensen, D.L., Dupont, R.R., 2015. Biostimulation and Bioaugmentation to Enhance Reductive Dechlorination of TCE in a Long-Term Flow Through Column Study. *Groundwater Monitoring & Remediation* 35, 76–88. <https://doi.org/10.1111/gwmr.12113>
- Men, Y., Feil, H., VerBerkmoes, N.C., Shah, M.B., Johnson, D.R., Lee, P.K.h., West, K.A., Zinder, S.H., Andersen, G.L., Alvarez-Cohen, L., 2012. Sustainable syntrophic growth of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 with *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough and *Methanobacterium congolense*: global transcriptomic and proteomic analyses. *The ISME Journal* 6, 410–421. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.111>
- Men, Y., Lee, P.K.H., Harding, K.C., Alvarez-Cohen, L., 2013. Characterization of four TCE-dechlorinating microbial enrichments grown with different cobalamin stress and methanogenic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 6439–6450. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4896-8>
- Mercer, J.W., Cohen, R.M., 1990. A review of immiscible fluids in the subsurface: Properties, models, characterization and remediation. *Journal of Contaminant Hydrology* 6, 107–163. [https://doi.org/10.1016/0169-7722\(90\)90043-G](https://doi.org/10.1016/0169-7722(90)90043-G)
- Miao, Z., Brusseau, M.L., Carroll, K.C., Carreón-Diazconti, C., Johnson, B., 2012. Sulfate reduction in groundwater: characterization and applications for remediation. *Environmental Geochemistry and Health* 34, 539–550. <https://doi.org/10.1007/s10653-011-9423-1>
- Middeldorp, P.J.M., Luijten, M.L.G.C., Pas, B.A. van de, Eekert, M.H.A. van, Kengen, S.W.M., Schraa, G., Stams, A.J.M., 1999. Anaerobic Microbial Reductive Dehalogenation of Chlorinated Ethenes. *Bioremediation Journal* 3, 151–169. <https://doi.org/10.1080/10889869991219280>
- Miller, E., Wohlfarth, G., Diekert, G., 1997. Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. *Archives of Microbiology* 168, 513–519. <https://doi.org/10.1007/s002030050529>
- Miller, G.S., Milliken, C.E., Sowers, K.R., May, H.D., 2005. Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene to *trans* -Dichloroethene and *cis* -Dichloroethene by PCB-Dechlorinating Bacterium DF-1. *Environmental Science & Technology* 39, 2631–2635. <https://doi.org/10.1021/es048849t>
- Mirza, B.S., Sorensen, D.L., Dupont, R.R., McLean, J.E., 2016. *Dehalococcoides* abundance and alternate electron acceptor effects on large, flow-through

- trichloroethene dechlorinating columns. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 2367–2379. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7112-1>
- Mishra, S., Barik, S.K., Ayyappan, S., Mohapatra, B.C., 2000. Fish bioassays for evaluation of raw and bioremediated dairy effluent. *Bioresource Technology* 72, 213-218. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00124-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00124-8)
- Mohn, W.W., Tiedje, J.M., 1992. Microbial Reductive Dehalogenation. *Microbiological reviews* 56, 482–507.
- Mora, R.H., Macbeth, T.W., MacHarg, T., Gundarlahalli, J., Holbrook, H., Schiff, P., 2008. Enhanced bioremediation using whey powder for a trichloroethene plume in a high-sulfate, fractured granitic aquifer. *Remediation Journal* 18, 7–30. <https://doi.org/10.1002/rem.20168>
- Moran, M.J., Zogorski, J.S., Squillace, P.J., 2007. Chlorinated Solvents in Groundwater of the United States. *Environmental Science & Technology* 41, 74–81. <https://doi.org/10.1021/es061553y>
- Morrison, R.D., Murphy, B., 2013. Chapter 1. Physical and Chemical Properties of Selected Chlorinated Solvents, 2013. , in: *Environmental Forensics*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. <https://doi.org/10.1039/9781849737265-00001>
- Morse, J.J., Alleman, B.C., Gossett, J.M., Zinder, S.H., Fennell, D.E., Sewell, G.W., Vogel, C.M., 1998. A Treatability Test for Evaluating the Potential Applicability of the Reductive Anaerobic Biological In Situ Treatment Technology (RABITT) to Remediate Chloroethenes, Defense Technical Information Center, Fort Belvoir, VA..
- Müller, J.A., Rosner, B.M., von Abendroth, G., Meshulam-Simon, G., McCarty, P.L., Spormann, A.M., 2004. Molecular Identification of the Catabolic Vinyl Chloride Reductase from *Dehalococcoides* sp. Strain VS and Its Environmental Distribution. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4880–4888. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4880-4888.2004>
- Muyzer, G., Stams, A.J.M., 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6, 441–454. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1892>
- Nandi, R., Sengupta, S., 1998. Microbial Production of Hydrogen: An Overview. *Critical Reviews in Microbiology* 24, 61–84. <https://doi.org/10.1080/10408419891294181>
- Ndon, U. J., Randall, A. A., Khouri, T. Z., 2000. Reductive dechlorination of tetrachloroethylene by soil sulfate-reducing microbes under various electron donor conditions. *Environmental Monitoring and Assessment* 60, 329–336. <https://doi.org/10.1023/A:1006186220604>
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K. H., 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology* 144, 3257–3266. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-12-3257>
- Nemir, A., David, M.M., Perrussel, R., Sapkota, A., Simonet, P., Monier, J.-M., Vogel, T.M., 2010. Comparative phylogenetic microarray analysis of microbial

- communities in TCE-contaminated soils. *Chemosphere* 80, 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.036>
- Neumann, A., Wohlfarth, G., Diekert, G., 1998. Tetrachloroethene Dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: Cloning, Sequencing of the Encoding Genes, and Expression of the *pceA* Gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 180, 4140–4145.
- Newell, C.J., Fisher, R.T., Hughes, J., 1997. Direct hydrogen addition for the in-situ biodegradation of chlorinated solvents. NGWA Petroleum Hydrocarbons Conference, November, California.
- Ni, Z., Smit, M., Grotenhuis, T., Gaans, P. van, Rijnaarts, H., 2014. Effectiveness of stimulating PCE reductive dechlorination: A step-wise approach. *Journal of Contaminant Hydrology* 164, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2014.06.005>
- Nielsen, F., Olsen, E., Fredenslund, A., 1994. Henry's Law Constants and Infinite Dilution Activity Coefficients for Volatile Organic Compounds in Water by a Validated Batch Air Stripping Method. *Environmental Science & Technology* 28, 2133–2138. <https://doi.org/10.1021/es00061a022>
- Nijenhuis, I., Nikolausz, M., Köth, A., Felföldi, T., Weiss, H., Drangmeister, J., Großmann, J., Kästner, M., Richnow, H.H., 2007. Assessment of the natural attenuation of chlorinated ethenes in an anaerobic contaminated aquifer in the Bitterfeld/Wolfen area using stable isotope techniques, microcosm studies and molecular biomarkers. *Chemosphere* 67, 300–311. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.084>
- Nishimura, M., Ebisawa, M., Sakihara, S., Kobayashi, A., Nakama, T., Okochi, M., Yohda, M., 2008. Detection and identification of *Dehalococcoides* species responsible for in situ dechlorination of trichloroethene to ethene enhanced by hydrogen-releasing compounds. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 51, 1. <https://doi.org/10.1042/BA20070171>
- Olaniran, A.O., Pillay, D., Pillay, B., 2008. Aerobic biodegradation of dichloroethenes by indigenous bacteria isolated from contaminated sites in Africa. *Chemosphere* 73, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.003>
- O'Loughlin, E.J., Burris, D.R., Delcomyn, C.A., 1999. Reductive dechlorination of trichloroethene mediated by humic-metal complexes. *Environmental Science Technology* 33, 1145–1147. <https://doi.org/10.1021/es9810033>
- O'Loughlin, E.J., Burris, D.R., 2004. Reduction of halogenated ethanes by green rust. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 41. <https://doi.org/10.1897/03-45>
- Panagiotakis, I., Mamais, D., Pantazidou, M., Marneri, M., Parapouli, M., Hatziloukas, E., Tandoi, V., 2007. Dechlorinating ability of TCE-fed microcosms with different electron donors. *Journal of Hazardous Materials* 149, 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.113>
- Panagiotakis, I., Pantazidou, M., Mamais, D., Gioldasi, M., 2010. Biological Reductive Dechlorination of Chloroethenes in The Presence of Sulfide. *Protection and Restoration of the Environment* 10, July, Corfu.

- Panagiotakis, I., Mamais, D., Pantazidou, M., Rossetti, S., Aulenta, F., Tandoi, V., 2014. Predominance of Dehalococcoides in the presence of different sulfate concentrations. *Water, Air, & Soil Pollution* 225. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1785-9>
- Pankow, J., Cherry, J., 1996. Dense Chlorinated Solvents and other DNAPLs in Groundwater: History, Behavior and Remediation. Waterloo Press.
- Pant, P., Pant, S., 2010. A review: Advances in microbial remediation of trichloroethylene (TCE). *Journal of Environmental Sciences* 22, 116–126. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60082-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60082-6)
- Pantazidou, M., Panagiotakis, I., Mamais, D., Zikidi, V., 2012. Chloroethene Biotransformation in the Presence of Different Sulfate Concentrations. *Ground Water Monitoring & Remediation* 32, 106–119. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2011.01372.x>
- Parsons, 2004. Principles and Practices of Enhanced Anaerobic Bioremediation of Chlorinated Solvents. Air Force Center for Environmental Excellence, Naval Facilities Engineering Service Center, U.S. Army, Environmental Security Technology Certification Program.
- Parsons, 2008. Technical protocol for enhanced anaerobic bioremediation using permeable mulch biowalls and bioreactors. Air Force Center for Engineering and the Environment (AFCEE).
- Paszczynski, A.J., Paidisetti, R., Johnson, A.K., Crawford, R.L., Colwell, F.S., Green, T., Delwiche, M., Lee, H., Newby, D., Brodie, E.L., Conrad, M., 2011. Proteomic and targeted qPCR analyses of subsurface microbial communities for presence of methane monooxygenase. *Biodegradation* 22, 1045–1059. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9462-4>
- Paul, L., Herrmann, S., Bender Koch, C., Philips, J., Smolders, E., 2013. Inhibition of microbial trichloroethylene dechlorination by Fe (III) reduction depends on Fe mineralogy: A batch study using the bioaugmentation culture KB-1. *Water Research* 47, 2543–2554. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.029>
- Pavlostathis, S., Zhuang, P., 1991. Transformation of trichloroethylene by sulfate-reducing cultures enriched from a contaminated subsurface soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36. <https://doi.org/10.1007/BF00208167>
- Peng, J., Wan, A., 1997. Measurement of Henry's Constants of High-Volatility Organic Compounds Using a Headspace Autosampler. *Environmental Science & Technology* 31, 2998–3003. <https://doi.org/10.1021/es970240n>
- Pérez-de-Mora, A., Zila, A., McMaster, M.L., Edwards, E.A., 2014. Bioremediation of Chlorinated Ethenes in Fractured Bedrock and Associated Changes in Dechlorinating and Nondechlorinating Microbial Populations. *Environmental Science & Technology* 48, 5770–5779. <https://doi.org/10.1021/es404122y>
- Pöritz, M., Goris, T., Wubet, T., Tarkka, M.T., Buscot, F., Nijenhuis, I., Lechner, U., Adrian, L., 2013. Genome sequences of two dehalogenation specialists – Dehalococcoides mccartyi strains BTF08 and DCMB5 enriched from the highly polluted Bitterfeld region. *FEMS Microbiology letters* 343, 101–104. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12160>

- Powell, C.L., Nogaro, G., Agrawal, A., 2011. Aerobic cometabolic degradation of trichloroethene by methane and ammonia oxidizing microorganisms naturally associated with *Carex comosa* roots. *Biodegradation* 22, 527–538. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9425-1>
- Rabus, R., Hansen, T.A., Widdel, F., 2013. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes, in: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_70
- Ragsdale, S.W., Pierce, E., 2008. Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1784, 1873–1898. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.012>
- Raskin, L., Poulsen, L. K., Noguera, D. R., Rittmann, B. E., Stahl, D. A., 1994. Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Applied and environmental microbiology* 60, 4, 1241–1248.
- Rectanus, H.V., Widdowson, M.A., Chapelle, F.H., Kelly, C.A., Novak, J.T., 2007. Investigation of Reductive Dechlorination Supported by Natural Organic Carbon. *Groundwater Monitoring & Remediation* 27, 53–62. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2007.00173.x>
- Reis, M., Almeida, P., Lemos, P., Carrondo, M., 1992. Effect of Hydrogen Sulfide on Growth of Sulfate Reducing Bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 593–600.
- Révész, S., Sipos, R., Kende, A., Rikker, T., Romsics, C., Mészáros, É., Mohr, A., Táncsics, A., Márialigeti, K., 2006. Bacterial community changes in TCE biodegradation detected in microcosm experiments. *International Biodeterioration & Biodegradation* 58, 239–247. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.018>
- Richardson, R.E., 2016. Organohalide-Respiring Bacteria as Members of Microbial Communities: Catabolic Food Webs and Biochemical Interactions, in: Adrian, L., Löffler, F.E. (Eds.), *Organohalide-Respiring Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 309–341. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49875-0_14
- Richardson, R.E., Bhupathiraju, V.K., Song, D.L., Goulet, T.A., Alvarez-Cohen, L., 2002. Phylogenetic Characterization of Microbial Communities That Reductively Dechlorinate TCE Based upon a Combination of Molecular Techniques. *Environmental Science & Technology* 36, 2652–2662. <https://doi.org/10.1021/es0157797>
- Rijkswaterstaat, 2013. Soil Remediation Circular. 1st edition Environment Department of the Directorate-General for Public Works and Water Management, Netherlands.
- Ritalahti, K.M., Hatt, J.K., Lugmayr, V., Henn, K., Petrovskis, E.A., Ogles, D.M., Davis, G.A., Yeager, C.M., Lebrón, C.A., Löffler, F.E., 2010. Comparing On-Site to Off-Site Biomass Collection for *Dehalococcoides* Biomarker Gene Quantification To Predict in Situ Chlorinated Ethene Detoxification Potential.

- Environmental Science & Technology 44, 5127–5133.
<https://doi.org/10.1021/es100408r>
- Rivett, M.O., Feenstra, S., Cherry, J.A., 2001. A controlled field experiment on groundwater contamination by a multicomponent DNAPL: creation of the emplaced-source and overview of dissolved plume development. *Journal of Contaminant Hydrology* 49, 111–149. [https://doi.org/10.1016/S0169-7722\(00\)00191-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7722(00)00191-1)
- Roberts, A.L., Totten, L.A., Arnold, W.A., Burris, D.R., Campbell, T.J., 1996. Reductive Elimination of Chlorinated Ethylenes by Zero-Valent Metals. *Environmental Science & Technology* 30, 2654–2659. <https://doi.org/10.1021/es9509644>
- Ronen, D., Lev-Wiener, H., Graber, E.R., Dahan, O., Weisbrod, N., 2010. Simultaneous counter-flow of chlorinated volatile organic compounds across the saturated–unsaturated interface region of an aquifer. *Water Research* 44, 2107–2112. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.016>
- Rosenthal, H., Adrian, L., Steiof, M., 2004. Dechlorination of PCE in the presence of Fe₀ enhanced by a mixed culture containing two Dehalococcoides strains. *Chemosphere* 55, 661–669. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.053>
- Russell, H.H., Matthews, J.E., Sewell, G.W., 1992. Ground Water Issue: TCE Removal from Contaminated Soil and Ground Water. United States Environmental Protection Agency.
- Ryoo, D., Shim, H., Canada, K., Barbieri, P., Wood, T.K., 2000. Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nature Biotechnology* 18, 775–778. <https://doi.org/10.1038/77344>
- Saeki, H., Akira, M., Furuhashi, K., Averhoff, B., Gottschalk, G., 1999. Degradation of trichloroethene by a linearplasmid- encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. *Microbiology* 145, 1721–1730.
- Saiyari, D.M., Chuang, H.P., Senoro, D.B., Lin, T.F., Whang, L.M., Chiu, Y.T., Chen, Y.H., 2018. A review in the current developments of genus *Dehalococcoides*, its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater. *Sustainable Environment Research* 28, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.01.006>
- Sander, R., 2015. Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. *Atmospheric Chemistry and Physics* 15, 4399–4981. <https://doi.org/10.5194/acp-15-4399-2015>
- Schaefer, C.E., Towne, R.M., Lippincott, D.R., Lacombe, P.J., Bishop, M.E., Dong, H., 2015. Abiotic dechlorination in rock matrices impacted by long-term exposure to TCE. *Chemosphere* 119, 744–749. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.005>
- Scherr, K.E., Nahold, M.M., Lantschbauer, W., Loibner, A.P., 2011. Sequential application of electron donors and humic acids for the anaerobic

- bioremediation of chlorinated aliphatic hydrocarbons. *New Biotechnology* 29, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.04.010>
- Scheutz, C., Durant, N.D., Hansen, M.H., Bjerg, P.L., 2011. Natural and enhanced anaerobic degradation of 1,1,1-trichloroethane and its degradation products in the subsurface – A critical review. *Water Research* 45, 2701–2723. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.02.027>
- Schink, B., Stams, A.J.M., 2006 *Syntrophism among Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_9.
- Schmidt, K.R., Augenstein, T., Heidinger, M., Ertl, S., Tiehm, A., 2010. Aerobic biodegradation of cis-1,2-dichloroethene as sole carbon source: Stable carbon isotope fractionation and growth characteristics. *Chemosphere* 78, 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.033>
- Schmidt, K.R., Gaza, S., Voropaev, A., Ertl, S., Tiehm, A., 2014. Aerobic biodegradation of trichloroethene without auxiliary substrates. *Water Research* 59, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.008>
- Schneidewind, U., Haest, P.J., Atashgahi, S., Maphosa, F., Hamonts, K., Maesen, M., Calderer, M., Seuntjens, P., Smidt, H., Springael, D., Dejonghe, W., 2014. Kinetics of dechlorination by *Dehalococcoides mccartyi* using different carbon sources. *Journal of Contaminant Hydrology* 157, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2013.10.006>
- Schöllhorn, A., Savary, C., Stucki, G., Hanselmann, K.W., 1997. Comparison of different substrates for the fast reductive dechlorination of trichloroethene under groundwater conditions. *Water Research* 31, 1275–1282. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00130-3)
- Scholz-Muramatsu, H., Neumann, A., Meßmer, M., Moore, E., Diekert, G., 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. Nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Archives of Microbiology* 163, 48–56. <https://doi.org/10.1007/BF00262203>
- Schreier, C.G., Reinhard, M., 1995. Catalytic hydrodehalogenation of chlorinated ethylenes using palladium and hydrogen for the treatment of contaminated water. *Chemosphere* 31, 3475–3487. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00200-R](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00200-R)
- Scott, D.T., Mcknight, D.M., Blunt-Harris, E.L., Kolesar, S.E., Lovley, D.R., 1998. Quinone Moieties Act as Electron Acceptors in the Reduction of Humic Substances by Humics-Reducing Microorganisms *Environmental Science & Technology* 32, 29-84–2989.
- Semkiw, E.S., Dybas, M.J., Barcelona, M.J., 2009. Evaluation of Three Electron-Donor Permeable Reactive Barrier Materials for Enhanced Reductive Dechlorination of Trichloroethene. *Bioremediation Journal* 13, 7–20. <https://doi.org/10.1080/10889860802690489>
- Semkiw, E.S., Barcelona, M.J., 2011. Field Study of Enhanced TCE Reductive Dechlorination by a Full-Scale Whey PRB. *Ground Water Monitoring & Remediation* 31, 68–78. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2010.01321.x>

- Semprini, L., 1997. Strategies for the aerobic co-metabolism of chlorinated solvents. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 296–308. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80007-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80007-9)
- Semprini, L., Dolan, M.E., Mathias, M.A., Hopkins, G.D., McCarty, P.L., 2007. Bioaugmentation of butane-utilizing microorganisms for the in situ cometabolic treatment of 1,1-dichloroethene, 1,1-dichloroethane, and 1,1,1-trichloroethane. *European Journal of Soil Biology* 43, 322–327. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.03.006>
- Semprini, L., 2013. *Bioaugmentation for the In situ Aerobic Cometabolism of Chlorinated Solvents*. Springer New York, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4115-1_8
- Sharma, P.K., McCarty, P.L., 1996. Isolation and Characterization of a Facultatively Aerobic Bacterium That Reductively Dehalogenates Tetrachloroethene to cis-1,2-Dichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 761-765.
- Shen, H., Sewell, G.W., 2005. Reductive Biotransformation of Tetrachloroethene to Ethene during Anaerobic Degradation of Toluene: Experimental Evidence and Kinetics. *Environmental Science & Technology* 39, 9286–9294. <https://doi.org/10.1021/es050390v>
- Siggins, A., Enright, A.-M., O'Flaherty, V., 2011. Methanogenic community development in anaerobic granular bioreactors treating trichloroethylene (TCE)-contaminated wastewater at 37 °C and 15 °C. *Water Research* 45, 2452–2462. doi:10.1016/j.watres.2011.01.030
- Siso, M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology* 57, 1–11. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00036-3](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00036-3)
- Sjuts, H., Fisher, K., Dunstan, M.S., Rigby, S.E., Leys, D., 2012. Heterologous expression, purification and cofactor reconstitution of the reductive dehalogenase PceA from *Dehalobacter restrictus*. *Protein Expression and Purification* 85, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.08.007>
- Slater, G.F., Sherwood Lollar, B., Sleep, B.E., Edwards, E.A., 2001. Variability in Carbon Isotopic Fractionation during Biodegradation of Chlorinated Ethenes: Implications for Field Applications. *Environmental Science & Technology* 35, 901–907. <https://doi.org/10.1021/es001583f>
- Sleep, B.E., Brown, A.J., Lollar, B.S., 2005. Long-term tetrachlorethene degradation sustained by endogenous cell decay. *Journal of Environmental Engineering and Science* 4, 11–17. <https://doi.org/10.1139/s04-038>
- Smatlak, C.R., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1996. Comparative Kinetics of Hydrogen Utilization for Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene and Methanogenesis in an Anaerobic Enrichment Culture. *Environmental Science & Technology* 30, 2850–2858.
- Squillace, P.J., Moran, M.J., Lapham, W.W., Price, C.V., Clawges, R.M., Zogorski, J.S., 1999. Volatile Organic Compounds in Untreated Ambient Groundwater of the United States, 1985–1995. *Environmental Science & Technology* 33, 4176–4187. <https://doi.org/10.1021/es990234m>

- Stahl, D., Amann R., 1991. Development and application of nucleic acid probes, in: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 205–248.
- Stams, A.J.M., Elferink, S.J.W.H.O., Westermann, P., 2003. Metabolic Interactions Between Methanogenic Consortia and Anaerobic Respiring Bacteria, in: Ahring, B.K., Angelidaki, I., de Macario, E.C., Gavala, H.N., Hofman-Bang, J., Macario, A.J.L., Elferink, S.J.W.H.O., Raskin, L., Stams, A.J.M., Westermann, P., Zheng, D. (Eds.), *Biomethanation I*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 31–56. https://doi.org/10.1007/3-540-45839-5_2
- Stams, A.J.M., Plugge, C.M., de Bok, F.A.M., van Houten, B.H.G.W., Lens, P., Dijkman, H., Weijma, J., 2005. Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors. *Water Science and Technology* 52, 13–20. <https://doi.org/10.2166/wst.2005.0493>
- Sung, Y., Ritalahti, K.M., Sanford, R.A., Urbance, J.W., Flynn, S.J., Tiedje, J.M., Löffler, F.E., 2003. Characterization of Two Tetrachloroethene-Reducing, Acetate-Oxidizing Anaerobic Bacteria and Their Description as *Desulfuromonas michiganensis* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2964–2974. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2964-2974.2003>
- Sung, Y., 2005. Isolation and ecology of bacterial populations involved in reductive dechlorination of chlorinated solvents. Thesis, Georgia Institute of Technology.
- Sung, Y., Ritalahti, K.M., Apkarian, R.P., Löffler, F.E., 2006a. Quantitative PCR Confirms Purity of Strain GT, a Novel Trichloroethene-to-Ethene-Respiring Dehalococcoides Isolate. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1980–1987. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1980-1987.2006>
- Sung, Y., Fletcher, K.E., Ritalahti, K.M., Apkarian, R.P., Ramos-Hernandez, N., Sanford, R.A., Mesbah, N.M., Löffler, F.E., 2006b. *Geobacter lovleyi* sp. nov. Strain SZ, a Novel Metal-Reducing and Tetrachloroethene-Dechlorinating Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2775–2782. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2775-2782.2006>
- Suyama, A., Iwakiri, R., Kai, K., Tokunaga, T., Sera, N., Furukawa, K., 2001. Isolation and Characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 Capable of Efficient Dehalogenation of Tetrachloroethene and Polychloroethanes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65, 1474–1481. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1474>
- Suyama, A., Yamashita, M., Yoshino, S., Furukawa, K., 2002. Molecular Characterization of the PceA Reductive Dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. Strain Y51. *Journal of Bacteriology* 184, 3419–3425. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3419-3425.2002>
- Takeuchi, M., Kawabe, Y., Watanabe, E., Oiwa, T., Takahashi, M., Nanba, K., Kamagata, Y., Hanada, S., Ohko, Y., Komai, T., 2011. Comparative study of microbial dechlorination of chlorinated ethenes in an aquifer and a clayey

- aquitar. *Journal of Contaminant Hydrology* 124, 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2011.01.003>
- Tanaka, K., 1992. Anaerobic oxidation of 1,5-pentanediol, 2-butanol, and 2-propanol by a newly isolated sulfate-reducer. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73, 362–365. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90279-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90279-4)
- Tandoi, V., DiStefano, T.D., Bowser, P.A., Gossett, J.M., Zinder, S.H., 1994. Reductive Dehalogenation of Chlorinated Ethenes and Halogenated Ethanes by a High-Rate Anaerobic Enrichment Culture. *Environmental Science & Technology* 28, 973–979. <https://doi.org/10.1021/es00054a033>
- Tandoi, V., Pinto A., Majone M., Tomei, M., 1995. Reductive Dechlorination of PCE (Perchloroethene) by an anaerobic bacterial consortium. *Med. Fac. Landbouww Univ Gent* 60, 2527–2534.
- Tang, S., Wang, P.H., Higgins, S.A., Löffler, F.E., Edwards, E.A., 2016. Sister Dehalobacter Genomes Reveal Specialization in Organohalide Respiration and Recent Strain Differentiation Likely Driven by Chlorinated Substrates. *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00100>
- Tang, Y.J., Yi, S., Zhuang, W.-Q., Zinder, S.H., Keasling, J.D., Alvarez-Cohen, L., 2009. Investigation of Carbon Metabolism in “Dehalococcoides ethenogenes” Strain 195 by Use of Isotopomer and Transcriptomic Analyses. *Journal of Bacteriology* 191, 5224–5231. <https://doi.org/10.1128/JB.00085-09>
- Taş, N., van Eekert, M.H.A., de Vos, W.M., Smidt, H., 2010. The little bacteria that can – diversity, genomics and ecophysiology of ‘Dehalococcoides’ spp. in contaminated environments, *Microbial biotechnology* 3, 389–402. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00147.x>
- Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M., Wallis, M., 2009. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. *Journal of Hazardous Materials* 161, 1157–1165. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.120>
- Terzenbach, D.P., Blaut, M., 1994. Transformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene by homoacetogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 123, 213–218. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07224.x>
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological reviews* 41, 100–180.
- Tiehm, A., Schmidt, K.R., 2011. Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes—aspects of field application. *Current Opinion in Biotechnology* 22, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.003>
- Tobiszewski, M., Namieśnik, J., 2012. Abiotic degradation of chlorinated ethanes and ethenes in water. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1994–2006. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0764-9>
- Tratnyek, P.G., Scherer, M.M., Deng, B., Hu, S., 2001. Effects of Natural Organic Matter, Anthropogenic Surfactants, and Model Quinones on the Reduction of Contaminants by Zero-Valent Iron. *Water Research* 35, 4435–4443. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00165-8)

- Truong, D.H., Eghbal, M.A., Hindmarsh, W., Roth, S.H., O'Brien, P.J., 2006. Molecular Mechanisms of Hydrogen Sulfide Toxicity. *Drug Metabolism Reviews* 38, 733–744. <https://doi.org/10.1080/03602530600959607>
- Tsai, T.T., Kao, C.M., Yeh, T.Y., Liang, S.H., Chien, H.Y., 2009. Application of surfactant enhanced permanganate oxidation and biodegradation of trichloroethylene in groundwater. *Journal of Hazardous Materials* 161, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.061>
- Tseng, T.-K., Chu, H., Hsu, H.-H., 2003. Characterization of γ -Alumina-Supported Manganese Oxide as an Incineration Catalyst for Trichloroethylene. *Environmental Science & Technology* 37, 171–176. <https://doi.org/10.1021/es0255960>
- Tsukagoshi, N., Ezaki, S., Uenaka, T., Suzuki, N., Kurane, R., 2006. Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 543–553. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0022-x>
- United States Department of Energy (DOE), 2013. Appendix I: Technology screening not retained technologies remedial investigation feasibility study for the 100-kr-1 100-kr-2 and 100-kr-4 operable units. Hanford site, United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1999a. Monitored Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons. Office of Research and Development, United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1999b. Monitored Natural Attenuation of Chlorinated Solvents, Office of Research and Development, United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2000a. Toxicological Review of Vinyl Chloride. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2000b. Engineered approaches to in situ bioremediation of chlorinated solvents: Fundamentals and field applications, United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2002. Toxicological Review of 1,1 Dichloroethylene. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2009. Groundwater information sheet – Trichloroethylene (TCE). State water resources control board, Division of water quality, Gama program.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2010a. Toxicological Review of cis-1,2-Dichloroethylene and trans-1,2-dichloroethylene. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2010b. Superfund Remedy report. Solid waste and emergency response, 13th Edition, United States.

- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2011. Toxicological Review of Trichloroethylene. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2012a. Toxicological Review of Tetrachloroethylene (Perchloroethylene). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2012b. A Guide to Planning, Implementing, Maintaining, and Enforcing Institutional Controls at Contaminated Sites, United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2013. Superfund Remedy report. Solid waste and emergency response, 14th Edition, United States.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2016. URL <https://www.epa.gov>
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2017. Superfund Remedy report. Solid waste and emergency response, 15th Edition, United States.
- Van der Zaan, B., Hannes, F., Hoekstra, N., Rijnaarts, H., de Vos, W.M., Smidt, H., Gerritse, J., 2010. Correlation of Dehalococcoides 16S rRNA and Chloroethene-Reductive Dehalogenase Genes with Geochemical Conditions in Chloroethene-Contaminated Groundwater. Applied and Environmental Microbiology 76, 843–850. <https://doi.org/10.1128/AEM.01482-09>
- van Eekert, M.H.A., Schröder, T. J., van Rhee, Astrid, Stams, A.J.M., Schraa, G., Field, J.A., 2001. Constitutive dechlorination of chlorinated ethenes by a methanol degrading methanogenic consortium. Bioresource technology 77, 163–170. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00149-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00149-8)
- Verce, M.F., Gunsch, C.K., Danko, A.S., Freedman, D.L., 2002. Cometabolism of *cis*-1,2-Dichloroethene by Aerobic Cultures Grown on Vinyl Chloride as the Primary Substrate. Environmental Science & Technology 36, 2171–2177. <https://doi.org/10.1021/es011220v>
- Verce, M.F., Madrid, V.M., Gregory, S.D., Demir, Z., Singleton, M.J., Salazar, E.P., Jackson, P.J., Halden, R.U., Verce, A., 2015. A Long-Term Field Study of In Situ Bioremediation in a Fractured Conglomerate Trichloroethene Source Zone. Bioremediation Journal 19, 18–31. <https://doi.org/10.1080/10889868.2014.978836>
- Vogel, M., Nijenhuis, I., Lloyd, J., Boothman, C., Pöritz, M., Mackenzie, K., 2018. Combined chemical and microbiological degradation of tetrachloroethene during the application of Carbo-Iron at a contaminated field site. Science of The Total Environment 628–629, 1027–1036. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.310>
- Volpe, A., Del Moro, G., Rossetti, S., Tandoi, V., Lopez, A., 2007. Remediation of PCE-contaminated groundwater from an industrial site in southern Italy: A laboratory-scale study. Process Biochemistry 42, 1498–1505. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.017>

- Voolapalli, R., 2001. Hydrogen production in anaerobic reactors during shock loads— influence of formate production and H₂ kinetics. *Water Research* 35, 1831–1841. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00441-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00441-3)
- Wang, S.-M., Tseng, S., 2009a. Dechlorination of trichloroethylene by immobilized autotrophic hydrogen-bacteria and zero-valent iron. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107, 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.11.010>
- Wang, S.-M., Tseng, S., 2009b. Reductive dechlorination of trichloroethylene by combining autotrophic hydrogen-bacteria and zero-valent iron particles. *Bioresource technology* 100, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.033>
- Watson, I.A., Oswald, S.E., Mayer, K.U., Wu, Y., Banwart, S.A., 2003. Modeling Kinetic Processes Controlling Hydrogen and Acetate Concentrations in an Aquifer-Derived Microcosm. *Environmental Science & Technology* 37, 3910–3919. <https://doi.org/10.1021/es020242u>
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nature Reviews Microbiology* 4, 752–764. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1490>
- Weerasooriya, R., Dharmasena, B., 2001. Pyrite-assisted degradation of trichloroethene (TCE). *Chemosphere* 42, 389–396. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00160-0)
- Wei, K., Grostern, A., Chan, W.W.M., Richardson, R.E., Edwards, E.A., 2016. Electron Acceptor Interactions Between Organohalide-Respiring Bacteria: Cross-Feeding, Competition, and Inhibition, in: Adrian, L., Löffler, F.E. (Eds.), *Organohalide-Respiring Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 283–308. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49875-0_13
- Wei, N., Finneran, K.T., 2013. Low and high acetate amendments are equally as effective at promoting complete dechlorination of trichloroethylene (TCE). *Biodegradation* 24, 413–425. <https://doi.org/10.1007/s10532-012-9598-x>
- Wei, Z., Seo, Y., 2010. Trichloroethylene (TCE) adsorption using sustainable organic mulch. *Journal Hazardous Materials* 181, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.012>
- Weissflog, L., 2005. Sediments of salt lakes as a new source of volatile highly chlorinated C₁/C₂ hydrocarbons. *Geophysical Research Letters* 32. <https://doi.org/10.1029/2004GL020807>
- Welte, C., Deppenmeier, U., 2014. Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetoclastic methanogens. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837, 1130–1147.
- Wen, L.L., Zhang, Y., Chen, J.X., Zhang, Z.X., Yi, Y.Y., Tang, Y., Rittmann, B.E., Zhao, H.P., 2017. The dechlorination of TCE by a perchlorate reducing consortium. *Chemical Engineering Journal* 313, 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.021>
- Wen, L.L., Zhang, Y., Pan, Y.W., Wu, W.-Q., Meng, S.H., Zhou, C., Tang, Y., Zheng, P., Zhao, H.P., 2015. The roles of methanogens and acetogens in dechlorination of trichloroethene using different electron donors.

- Environmental Science and Pollution Research 22, 19039–19047.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5117-z>
- Whiting, K., Evans, P.J., Lebrón, C., Henry, B., Wilson, J.T., Becvar, E., 2014. Factors Controlling In Situ Biogeochemical Transformation of Trichloroethene: Field Survey. Groundwater Monitoring & Remediation 34, 79–94.
<https://doi.org/10.1111/gwmr.12068>
- Whitman, W.B., Bowen, T.L., Boone, D.R., 2006. The Methanogenic Bacteria, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes. Springer New York, New York, NY, pp. 165–207.
https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_9
- Widdel, F., 1986. Growth of Methanogenic Bacteria in Pure Culture with 2-Propanol and Other Alcohols as Hydrogen Donors. Applied and Environmental Microbiology. 51, 7. <https://doi.org/10.1007/BF00115297>
- Widdel, F., 1988. Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In biology of anaerobic microorganisms. A.J.B. Zahnder, John Wiley & Sons.
- Wiedemeier, T.H., Swanson, M.A., Moutoux, D.E., Gordon, E.K., Wilson, J.T., Wilson, B.H., Kampbell, D.H., Haas, P.E., Miller, R.N., Hansen, J.E., Chapelle, F.H., Carolina, S., 1998. Technical Protocol for Evaluating Natural attenuation of Chlorinated Solvents in Groundwater. United States Environmental Protection Agency (USEPA), United States.
- Wild, A., Hermann, R., Leisinger, T., 1996. Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloethene and trichloethene. Biodegradation 7, 507–511.
- Wilson, B.H., Wilson, J.T., Luce, D., 1997. Design and Interpretation of Microcosm Studies for Chlorinated Compounds, Proceedings of the symposium on natural attenuation of chlorinated organics groundwater, May, Washington D.C.
- Wittbrodt, P.R., Palmer, C.D., 1996. Effect of Temperature, Ionic Strength, Background Electrolytes, and Fe(III) on the Reduction of Hexavalent Chromium by Soil Humic Substances. Environmental Science & Technology 30, 2470–2477. <https://doi.org/10.1021/es950731c>
- World Health Organization (WHO), 2011. Guidelines for drinking-water quality. 4th ed., World Health Organization, Geneva.
- Wu, W.M., Nye, J., Jain, M.K., Hickey, R.F., 1998. Anaerobic dechlorination of trichloroethylene (TCE) to ethylene using complex organic materials. Water Research 32, 1445–1454. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00356-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00356-4)
- Wu, W.M., Shi, J., Hickey, R.F., 2008. Long-term performance of co-metabolic degradation of trichloroethylene in a fluidized bed reactor fed with benzene, toluene and xylene. Journal of Chemical Technology & Biotechnology 83, 513–523. <https://doi.org/10.1002/jctb.1826>
- Wüst, W.F., Köber, R., Schlicker, O., Dahmke, A., 1999. Combined Zero- and First-Order Kinetic Model of the Degradation of TCE and *cis* -DCE with Commercial Iron. Environmental Science & Technology 33, 4304–4309.
<https://doi.org/10.1021/es980439f>

- Xie, Y., Dong, H., Zeng, G., Tang, L., Jiang, Z., Zhang, C., Deng, J., Zhang, L., Zhang, Y., 2017. The interactions between nanoscale zero-valent iron and microbes in the subsurface environment: A review. *Journal of Hazardous Materials* 321, 390–407. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.028>
- Yan, J., Ritalahti, K.M., Wagner, D.D., Löffler, F.E., 2012. Unexpected Specificity of Interspecies Cobamide Transfer from *Geobacter* spp. to Organohalide-Respiring *Dehalococcoides mccartyi* Strains. *Applied and Environmental Engineering* 78, 6630–6636. <https://doi.org/10.1128/AEM.01535-12>
- Yan, J., Şimşir, B., Farmer, A.T., Bi, M., Yang, Y., Campagna, S.R., Löffler, F.E., 2016. The corrinoid cofactor of reductive dehalogenases affects dechlorination rates and extents in organohalide-respiring *Dehalococcoides mccartyi*. *The ISME Journal* 10, 1092–1101. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.197>
- Yang, J.-S., Baek, K., Kwon, T.-S., Yang, J.-W., 2009. Adsorption of chlorinated solvents in nonionic surfactant solutions with activated carbon in a fixed bed. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15, 777–779. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2009.09.027>
- Yang, Y., McCarty, P.L., 1998. Competition for Hydrogen within a Chlorinated Solvent Dehalogenating Anaerobic Mixed Culture. *Environmental Science & Technology* 32, 3591–3597. <https://doi.org/10.1021/es980363n>
- Yang, Y., McCarty, P.L., 2000. Biologically Enhanced Dissolution of Tetrachloroethene DNAPL. *Environmental Science & Technology* 34, 2979–2984. <https://doi.org/10.1021/es991410u>
- Yang, Y., Zeyer, J., 2003. Specific Detection of *Dehalococcoides* Species by Fluorescence In Situ Hybridization with 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2879–2883. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2879-2883.2003>
- Yang, Y., Pesaro, M., Sigler, W., Zeyer, J., 2005. Identification of microorganisms involved in reductive dehalogenation of chlorinated ethenes in an anaerobic microbial community. *Water Research* 39, 3954–3966. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.010>
- Yu, R., Andrachek, R.G., Lehmicke, L.G., Freedman, D.L., 2018. Remediation of chlorinated ethenes in fractured sandstone by natural and enhanced biotic and abiotic processes: A crushed rock microcosm study, *Science of the total Environment* 626, 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.064>
- Yu, S., Semprini, L., 2002. Comparison of trichloroethylene reductive dehalogenation by microbial communities stimulated on silicon-based organic compounds as slow-release anaerobic substrates. *Water Research* 36, 4985–4996. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00222-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00222-1)
- Zanaroli, G., Negroni, A., Häggblom, M.M., Fava, F., 2015. Microbial dehalogenation of organohalides in marine and estuarine environments. *Current Opinion in Biotechnology* 33, 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.013>
- Zeikus, J.G., 1977. The Biology of Methanogenic Bacteria. *Bacteriological Reviews* 41, 514–541.

- Zhang, M., He, F., Zhao, D., Hao, X., 2011. Degradation of soil-sorbed trichloroethylene by stabilized zero valent iron nanoparticles: Effects of sorption, surfactants, and natural organic matter. *Water Research* 45, 2401–2414. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.01.028>
- Zhang, N., Luo, J., Blowers, P., Farrell, J., 2008. Understanding Trichloroethylene Chemisorption to Iron Surfaces Using Density Functional Theory. *Environmental Science & Technology* 42, 2015–2020. <https://doi.org/10.1021/es0717663>
- Zhang, X.H., Sewell, G.W., Cui, S.-Y., 2001. An Improved Method of hydrogen Production as Electron Donor for Anaerobic Bioremediation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 36, 1661–1670. <https://doi.org/10.1081/ESE-100106250>
- Zhao, H.P., Schmidt, K.R., Tiehm, A., 2010. Inhibition of aerobic metabolic cis-1,2-dichloroethene biodegradation by other chloroethenes. *Water Research* 44, 2276–2282. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.023>
- Zinder, S.H., 1994. Syntrophic Acetate Oxidation and “Reversible Acetogenesis, in: Drake, H.L. (Ed.), *Acetogenesis*. Springer US, Boston, MA, 386–415. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1777-1_14
- Ziv-El, M., Delgado, A.G., Yao, Y., Kang, D.-W., Nelson, K.G., Halden, R.U., Krajmalnik-Brown, R., 2011. Development and characterization of DehaloR², a novel anaerobic microbial consortium performing rapid dechlorination of TCE to ethene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92, 1063–1071. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3388-y>
- Ziv-El, M., Popat, S.C., Parameswaran, P., Kang, D.-W., Polasko, A., Halden, R.U., Rittmann, B.E., Krajmalnik-Brown, R., 2012. Using electron balances and molecular techniques to assess trichloroethene-induced shifts to a dechlorinating microbial community. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, pp. 2230–2239. <https://doi.org/10.1002/bit.24504>
- Αντωνίου, Κ., 2008. Αξιολόγηση Λειτουργίας Αναερόβιων Χωνευτών σε Μικρούς Χρόνους παραμονής, 2008. Μεταπτυχιακή εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, ΔΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων.
- Βαμβακάκη, Α.-Ν., Κανδαράκης, Ι., Γαλιώτου-Παναγιώτου, Μ., Κωμαΐτης, Μ., Παπανικολάου, Σ., 2009. Παραγωγή κυτταρικής μάζας και μικροβιακού λίπους κατά την ανάπτυξη του μύκητα *Mucor* sp. LGAM 366 σε τυρόγαλα, Επιστήμη και τεχνολογία γάλακτος, Εθνική επιτροπή γάλακτος Ελλάδας.
- Γιδαράκος, Ε., Αϊβαλιώτη, Μ., Γιαννής, Α., Καλδέρης, Δ., 2009. Μελέτη για τη διερεύνηση, αξιολόγηση και αποκατάσταση ανεξέλεγκτων ρυπασμένων χώρων/ εγκαταστάσεων από βιομηχανικά και επικίνδυνα απόβλητα στην Ελλάδα. Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
- Διαμαντίδης Γ., 1994. Εισαγωγή στη βιοχημεία. University studio press, Θεσσαλονίκη.
- Δερματάς, Δ., 2012. Σημειώσεις μαθήματος «Διαχείριση επικίνδυνων αποβλήτων». Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, ΔΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων.

- Ευρωπαϊκή Ένωση, 1978. Κανονισμός αριθμού 625/78 της Επιτροπής της 30ής Μαρτίου 1978 περί των λεπτομερειών εφαρμογής της κρατικής αποθεματοποιήσεως του αποκορυφωμένου γάλακτος σε σκόνη.
- Ευρωπαϊκή Ένωση, 2000. Οδηγία 2000/60/EK «για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων» του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23ης Οκτωβρίου 2000.
- Ευρωπαϊκή Ένωση, 2006. Οδηγία 2006/118/EK «σχετικά με την προστασία των υπόγειων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση» του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 12ης Δεκεμβρίου 2006.
- Θεοδωρίκας, Σ. Σ., 2000. Γεωχημεία, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη.
- Καττή, Π. Π., 2010. Πειραματική διερεύνηση παραγωγής βιοαερίου από μίγματα τυρογάλακτος με υγρά μηχανικού διαχωρισμού αποβλήτων χοιροστασίου διαφορετικής πυκνότητας στη μεσόφιλη περιοχή, Γεοπονικό πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Αξιοποίησης φυσικών πόρων και γεωργικής μηχανικής.
- Καραγκούνη-Κύρτσου, Α., 1999. Μικροβιολογία. Εκδόσεις Σταμούλη.
- Καραδήμα, Κ., 2009. Εκτίμηση της τοξικότητας διαφόρων σταδίων επεξεργασίας αποβλήτων τυροκομικών μονάδων με χρήση βιοδεικτών. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Βιολογίας.
- Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001, 2001. Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης, Εθνικό τυπογραφείο, 630, 12865–12880.
- Κοινή Υπουργική Απόφαση 39626/2208/Ε130, 2009. Καθορισμός μέτρων για την προστασία των υπόγειων νερών από την ρύπανση και την υποβάθμιση. Εθνικό τυπογραφείο, 2075, 25773–25780.
- Κολιάης, Σ., 2001. Μικροβιολογία. University Studio Press.
- Μαμάης, Δ., 2017. Σημειώσεις μαθήματος «Εργαστηριακές μέθοδοι υγειονομικής τεχνολογίας». Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, ΔΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων.
- Μαρνέρη, Μ., 2010. Ανάπτυξη και εφαρμογή της μοριακής τεχνικής Fish με στόχο τον ποσοτικό προσδιορισμό και τη διερεύνηση της ενεργότητας νηματοειδών βακτηρίων σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων με απομάκρυνση θρεπτικών, Διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών.
- Παναγιωτάκης, Η., 2010. Επιτόπου Βιολογική Εξυγίανση Υπόγειων Υδροφορέων Ρυπασμένων με Χλωριωμένα Αιθυλένια: Επίδραση Δότη Ηλεκτρονίων και Θεικών. Διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών.
- Πανταζίδου, Μ., 2011. Σημειώσεις μαθήματος «Αποκατάσταση ρυπασμένων χώρων» Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, ΔΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων.
- Σακελλαριάδης, 1992. Σημειώσεις εδαφολογίας. ?????
- Φύλλο Εφημερίδας της Κυβερνήσεως (ΦΕΚ) 3322, 2011. Ορισμός ανώτερων αποδεκτών τιμών για τη συγκέντρωση συγκεκριμένων ρύπων, ομάδων ρύπων ή δεικτών ρύπανσης σε υπόγεια ύδατα. Εθνικό τυπογραφείο, 46701–46704.

Παραρτήματα

A. Πειραματικά πρωτόκολλα

A.1. Πρωτόκολλο συντήρησης μητρικών καλλιέργειών

Οι μητρικές καλλιέργειες, όπως περιγράφονται και στην Ενότητα 3.1.2, ήταν οι εξής: N1 και N2 με σχεδόν μηδενική συγκέντρωση θειικών ιόντων (<0.005 mM), L1 και L2 με 30 mg SO₄²⁻/L, QL1 και QL2 με 70 mg SO₄²⁻/L, QM1 και QM2 με 150 mg SO₄²⁻/L, M1 και M2 με 400 mg SO₄²⁻/L, H1 και H2 με 1100 mg SO₄²⁻/L, MMB1 και MMB2 με 400 mg SO₄²⁻/L. Σε όλες τις καλλιέργειες εισαγόταν 0.3 mM But, με εξαίρεση τις δύο τελευταίες, όπου η συγκέντρωση του δότη ήταν 10 φορές μεγαλύτερη (3 mM). Μια φορά την εβδομάδα πραγματοποιείτο η συντήρησή τους, μετά τη μέτρηση των χλωριωμένων αιθενίων, του αιθενίου και του μεθανίου (Ενότητα 3.2.3). Οι μητρικές καλλιέργειες δεν λειτούργησαν παράλληλα, αλλά σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα (βλ. Σχεδιάγραμμα 3.1). Για λόγους απλοποίησης, το πρωτόκολλο που ακολουθεί περιγράφει τη συντήρηση των N, QM και M. Όμως, το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε και για τις υπόλοιπες καλλιέργειες.

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

- Αναλώσιμα: 7 ποτήρια ζέσεως των 50 mL, 6 πλαστικά δοχεία δειγματοληψίας των 50 mL, 1 γυάλινη σύριγγα του 1 mL με βαλβίδα, 6 πλαστικές σύριγγες του 1 mL με αποσπώμενη βελόνα, 7 πλαστικές σύριγγες των 50 mL, 1 γυάλινη σύριγγα των 100 μL, 2 πλαστικές σύριγγες του 1 mL με προσαρμοσμένη βελόνα, 1 γυάλινη σύριγγα των 25 μL, 7 βελόνες 21G, 6 αλουμινένια αποσπώμενα σφραγίσματα, 6 Teflon πώματα από βουτύλιο, 1 ειδικό εξάρτημα σφράγισης, 1 ειδικό εξάρτημα αποσφράγισης, 2 πλαστικά δοχεία με υποδοχείς από καουτσούκ για την εισαγωγή μπουκαλιών, 1 serum φιάλη 600 mL, 1 μικρό γυάλινο χωνί, 1 ογκομετρικός κύλινδρος 500 mL, 6 μεμβράνες (0.45 μm) για σύριγγες των 1000 μL, 6 tubes 0.5 mL, 6 tubes 2 mL, 1 ανεξίτηλος μαρκαδόρος, 1 φάκελος και διηθητικό χαρτί.
- Αέρια: αέριο άζωτο 99.9%, μίγμα αερίου αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα 70%/30%.
- Απιονισμένο νερό.
- Υγρά μίγματα (θρεπτικά κ.λπ.): αναερόβιο θρεπτικό μέσο (RAMM), διάλυμα ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (S-T), διάλυμα βιταμινών (Vitamins), διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης 10% (Yeast extract), διάλυμα θειικών ιόντων.
- Χημικές ενώσεις: τριχλωροαιθέριο (TCE), βουτυρικό οξύ (Butyric acid).
- Οργανολογία - Εργαστηριακός εξοπλισμός: Απαγωγός, φούρνος των 103°C, χρονόμετρο, pHμετρο, κατάψυξη (-4°C) και μαγνητικός αναδευτήρας πολλών θέσεων.

Τα βήματα δειγματοληψίας και τροφοδοσίας είχαν ως ακολούθως:

Βήμα 1: Οι έξι μητρικές καλλιέργειες, τα 6 πλαστικά δοχεία δειγματοληψίας των 50 mL, ένα ποτήρι ζέσεως των 50 mL, οι 6 πλαστικές σύριγγες του 1 mL με αποσπώμενη βελόνα, η γυάλινη σύριγγα του 1 mL με βαλβίδα, οι 6 μεμβράνες (0.45 μm) για σύριγγες των 1000 μL, τα 6 tubes των 0.5 mL, τα 6 tubes των 2 mL, οι 7 πλαστικές σύριγγες των 50 mL στις οποίες τοποθετούνται οι 7 βελόνες 21G, τα 6 αλουμινένια αποσπώμενα σφραγίσματα (Wheaton), τα 6 Teflon πώματα από βουτύλιο (Wheaton), το ειδικό εξάρτημα σφράγισης (λευκό εξάρτημα-Wheaton), το ειδικό εξάρτημα αποσφράγισης (γκρι εξάρτημα-Wheaton), τα 2 πλαστικά δοχεία με υποδοχείς από καουτσούκ, το pHμετρο, το χρονόμετρο, ο φάκελος, ο ανεξίτηλος μαρκαδόρος, διηθητικό χαρτί και απιονισμένο νερό τοποθετούνται σε ανοιχτό απαγωγό.

Βήμα 2: Η πρώτη καλλιέργεια N1 ανακινείται πολύ καλά και τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ. Όλο το σύστημα φέρεται 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 σιγά σιγά, πιέζοντας τη σύριγγα και τοποθετώντας το δείγμα σε ένα tube 0.5 mL, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs). Σφραγίζεται πολύ καλά το tube και απορρίπτεται η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε για τη διήθηση. Τοποθετείται η βελόνα ξανά στη σύριγγα και εξάγεται 1 mL δείγμα από την καλλιέργεια. Το δείγμα μεταφέρεται σε ένα tube των 2 mL, το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης (Παράρτημα Α.5). Πάνω στα tubes καταγράφεται το όνομα της καλλιέργειας με τον ανεξίτηλο μαρκαδόρο. Η ίδια διαδικασία (Βήμα 2) επαναλαμβάνεται για όλες τις καλλιέργειες. Όταν έχουν συλλεχθεί όλα τα δείγματα, τοποθετούνται στον φάκελο, και καταγράφονται απέξω η ημερομηνία και το είδος των αναλύσεων για τις οποίες προορίζονται, και ο φάκελος αποθηκεύεται στην κατάψυξη (σε θερμοκρασία -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 αφήνεται σε πλάγια θέση. Με μια σύριγγα των 50 mL και τη βελόνα της εξάγονται 5 mL, τα οποία τοποθετούνται στο ποτήρι ζέσεως των 50 mL. Τίθεται το pHμετρο σε λειτουργία, το ηλεκτρόδιο καθαρίζεται με απιονισμένο νερό και χαρτί και μετριέται το pH. Το περιεχόμενο του ποτηριού ζέσεως απορρίπτεται στο νεροχύτη του απαγωγού με ανοιχτή βρύση, ξεπλένεται πολύ καλά με απιονισμένο νερό και στεγνώνεται με λίγο χαρτί. Η ίδια διαδικασία (Βήμα 3) ακολουθείται για όλες τις καλλιέργειες, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένη πλαστική σύριγγα για κάθε καλλιέργεια.

Βήμα 4: Η καλλιέργεια QM1 τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ και φέρεται σε πλάγια θέση. Με τη γυάλινη σύριγγα του 1 mL εξάγονται 200 μL δείγματος, η βαλβίδα κλείνεται και το δείγμα μεταφέρεται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης των σουλφιδίων, όπως αναλύεται στο Παράρτημα Α.5. Το ίδιο βήμα επαναλαμβάνεται για τις καλλιέργειες, όπου πραγματοποιείται η αναγωγήθειικών ιόντων, δηλαδή QM2, M1 και M2.

Βήμα 5: Στο στάδιο αυτό, επιλέγεται η πρώτη καλλιέργεια N1 και με το εξάρτημα αποσφράγισης γαντζώνεται το στόμιο πιέζοντας τα χερούλια. Ταυτόχρονα, στρέφεται το εξάρτημα μέχρι την εξαγωγή του αλουμινένιου αποσπώμενου σφραγίσματος. Στο στόμιο της καλλιέργειας τοποθετείται ένα νέο Teflon πώμα από βουτύλιο και από πάνω το αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα. Με το εξάρτημα σφράγισης γαντζώνεται το στόμιο πιέζοντας τα χερούλια, έως ότου το αλουμινένιο σφράγισμα να μην κινείται. Στη συνέχεια, διπλώνεται το σφράγισμα με τη φορά του βέλους κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να φαίνεται η μισή επιφάνεια του Teflon πώματος. Η ίδια διαδικασία (Βήμα 5) ακολουθείται για όλες τις καλλιέργειες, ενώ επαναλαμβάνεται κάθε 2 εβδομάδες.

Βήμα 6: Οι καλλιέργειες N1 και N2 τοποθετούνται ξανά στα πλαστικά δοχεία με τους υποδοχείς από καουτσούκ. Το μανόμετρο του αερίου αζώτου ανοίγεται γυρνώντας τις δυο βαλβίδες (πάνω και κάτω βαλβίδες) και φτάνοντας την πίεση στη 1 atm (ρυθμίζοντας την κάτω βαλβίδα). Τα πώματα βουτυλίου τρυπιούνται με τις ατσάλινες βελόνες 22G του αερίου αζώτου και με δυο βελόνες 21G που αντιστοιχούν στις δύο καλλιέργειες. Με αυτόν τον τρόπο, πραγματοποιείται η διοχέτευση αερίου αζώτου για 30 λεπτά στις δύο καλλιέργειες, ενώ από τη δεύτερη βελόνα (21G) απομακρύνονται τα αέρια και το οξυγόνο που έχουν φυλακιστεί εντός των μπουκαλιών. Μετά το πέρας του χρόνου (σύμφωνα με το χρονόμετρο), βγαίνουν πρώτα οι βελόνες 21G και ύστερα οι ατσάλινες βελόνες του αερίου αζώτου. Οι ατσάλινες βελόνες του αερίου καθαρίζονται με απιονισμένο νερό και χαρτί και τοποθετούνται στις επόμενες δύο καλλιέργειες, επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία (Βήμα 6) για όλες τις καλλιέργειες. Στο τέλος του βήματος, κλείνονται προσεκτικά οι δύο βαλβίδες του αερίου αζώτου.

Βήμα 7: Η μητρική καλλιέργεια N1 τοποθετείται μέσα στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ και το μανόμετρο του αερίου μίγματος αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα ανοίγεται γυρνώντας τις δυο βαλβίδες (πάνω και κάτω βαλβίδες), ενώ ρυθμίζεται η πίεση στη 1 atm με την κάτω βαλβίδα. Το Teflon πώμα τρυπιέται με την ατσάλινη βελόνα 22G του αερίου μίγματος και με μια μεμονωμένη βελόνα 21G. Γίνεται η διοχέτευση του μίγματος αερίου για 2 λεπτά, με στόχο την επίτευξη των αναερόβιων συνθηκών και τη ρύθμιση του pH, εφόσον η υψηλή συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα στην αέρια φάση αναστέλλει την περαιτέρω αεριοποίησή του. Έτσι, παραμένει στην υγρή φάση, όπως προστέθηκε με το διάλυμα NaHCO_3 του θρεπτικού μέσου και, κατ' επέκταση, προκαλεί την αύξηση του pH. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, η πλαστική σύριγγα των 50 mL τοποθετείται στη μεμονωμένη βελόνα 21G, ενώ όλο το σύστημα του ειδικού δοχείου με την καλλιέργεια φέρεται σε πλάγια θέση. Όταν η πίεση αυξηθεί στο δοχείο, η σύριγγα θα γεμίσει σταδιακά με 48mL καλλιέργειας, έτσι ώστε η συνολική ποσότητα που έχει εξαχθεί να είναι περίπου 54.5 mL και ο χρόνος παραμονής στερεών να ισούται με 48 μέρες. Η σύριγγα εξάγεται και το περιεχόμενο μεταφέρεται σε πλαστικό δοχείο δειγματοληψίας. Ύστερα βγαίνει η ατσάλινη βελόνα του αερίου μίγματος, καθαρίζεται με απιονισμένο νερό και χαρτί και τοποθετείται στην επόμενη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

καλλιέργεια, επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία (Βήμα 7). Όταν ολοκληρωθεί το βήμα για όλες τις καλλιέργειες, κλείνονται προσεκτικά οι βαλβίδες του αερίου μίγματος. Τα 48 mL από τις καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αιωρούμενων στερεών σε όλα τα δείγματα, καθώς και για τη μέτρηση των θειικών ιόντων, όπου εξετάζεται η θειικοαναγωγή (Παράρτημα Α.5).

Βήμα 8: Η περισσευούμενη σύριγγα των 50 mL με τη βελόνα 21G χρησιμοποιείται για την εξαγωγή με αργό ρυθμό 55 mL αναερόβιου θρεπτικού μέσου (RAMM). Εξαιτίας της ελάττωσης της πίεσης εντός του δοχείου, το αέριο μίγμα αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα χρησιμοποιείται για την αύξησή της. Οι δύο βαλβίδες (πάνω και κάτω βαλβίδα) του αερίου μίγματος ανοίγονται και η πίεση ρυθμίζεται στη 1 atm με την κάτω βαλβίδα. Το Teflon πώμα του μέσου τρυπιέται με τη βελόνα του αερίου μίγματος 22G και παραμένει για λίγα λεπτά, μέχρι να μειωθεί η ροή του αερίου μίγματος στο υγρό μέσο.

Βήμα 9: Έπειτα, η καλλιέργεια N1 τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο και τρυπιέται το πώμα με την πλαστική σύριγγα του μέσου. Σταδιακά, πιέζεται προς τα μέσα το έμβολο της σύριγγας, έτσι ώστε το θρεπτικό μέσο να εισέλθει στην καλλιέργεια και ταυτόχρονα, με μια μεμονωμένη βελόνα 21G τρυπιέται το πώμα της καλλιέργειας, για να εξέλθει το φυλακισμένο αέριο μίγμα στο περιβάλλον.

Βήμα 10: Όταν εισέλθουν 25 mL στο μπουκάλι, τότε απομακρύνεται η μεμονωμένη βελόνα 21G και συνεχίζει η έγχυση των υπόλοιπων 30 mL. Με αυτόν τον τρόπο θα υπάρχει αυξημένη πίεση και δεν θα εισαχθεί περαιτέρω αέρας στην καλλιέργεια από τις χαραμάδες του πώματος.

Βήμα 11: Η ίδια διαδικασία (Βήματα 8-10) ακολουθείται για όλες τις καλλιέργειες. Όταν ολοκληρωθεί το βήμα 11, ελέγχεται αν τα μανόμετρα των αερίων είναι κλειστά.

Βήμα 12: Τα 6 ποτήρια ζέσεως των 50 mL πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στο φούρνο των 103 °C για 5 λεπτά για να στεγνώσουν, και μετά αφήνονται να κρυώσουν στον απαγωγό (να φτάσουν περίπου τη θερμοκρασία δωματίου) για 5 λεπτά. Τοποθετούνται ξεχωριστά στα 6 ποτηράκια περίπου 1 mL διαλύματος ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (S-T), 5 mL διαλύματος θειικών ιόντων, 5 mL διαλύματος βιταμινών (Vitamins), 1 mL διαλύματος εκχυλίσματος ζύμης (Yeast extract), 1 mL τριχλωροαιθενίου (TCE) και 1 mL βουτυρικού οξέος (But). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετείται η γυάλινη σύριγγα των 100 μL, οι 2 πλαστικές σύριγγες του 1 mL με προσαρμοσμένη βελόνα και η γυάλινη σύριγγα των 25 μL.

Βήμα 13: Οι δύο πρώτες καλλιέργειες N1 και N2 τοποθετούνται στα ειδικά πλαστικά δοχεία με υποδοχείς από καουτσούκ. Προστίθενται 55 μL S-T (με τη σύριγγα των 100 μL) και 550 μL Vitamins (με τη πλαστική σύριγγα του 1 mL). Όλο το σύστημα αφήνεται σε πλάγια θέση και προστίθενται 19 μL Yeast extract, 17 μL TCE και 10.5 μL Butyric acid (με μια σύριγγα των 25 μL, η οποία ξεπλένεται σε κάθε χρήση με

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

απιονισμένο νερό, αρκετές φορές), παρατηρώντας εάν διαχέονται οι ποσότητες των ουσιών που εγχύθηκαν, για να διασφαλιστεί ότι εισήχθη η ποσότητα των ουσιών.

Βήμα 14: Η ίδια διαδικασία (Βήμα 13) ακολουθείται για τις καλλιέργειες QM1, QM2, M1 και M2, προσθέτοντας, επίσης, μια ποσότητα θειικών ιόντων (με τη πλαστική σύριγγα του 1 mL), έτσι ώστε το τελικό μίγμα να περιέχει 150 mg/L για τις καλλιέργειες QM και 400 mg/L για τις καλλιέργειες M, σύμφωνα με τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο βήμα 7.

Βήμα 15: Επιλέγεται η serum φιάλη των 600 mL και τοποθετείται στο στόμιό της το μικρό γυάλινο χωνί. Με τη βοήθεια του ογκομετρικού κυλίνδρου των 500 mL ογκομετρώνται 375 mL απιονισμένου νερού, τα οποία μεταφέρονται στη φιάλη των 600 mL.

Βήμα 16: Οι καλλιέργειες καθαρίζονται πολύ καλά με απιονισμένο νερό και χαρτί και αποθηκεύονται στους 25°C, υπό σκότος, σε μαγνητικό αναδευτήρα. Μαζί με τις καλλιέργειες τοποθετείται η ασφράγιστη serum φιάλη των 600 mL, με στόχο τον έλεγχο της θερμοκρασίας στην υγρή φάση, θεωρώντας ότι οι καλλιέργειες έχουν ίδια θερμοκρασία.

Βήμα 17: Ο απαγωγός και τα σκεύη καθαρίζονται πολύ καλά με απιονισμένο νερό, ενώ απορρίπτονται όλα τα αναλώσιμα μιας χρήσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου.

Με την παραπάνω διαδικασία (Βήματα 1-17) γίνεται η τροφοδοσία/συντήρηση των αναερόβιων μητρικών καλλιεργειών. Η κάθε καλλιέργεια περιέχει 375 mL υγρού σε 600 mL serum φιάλης, για να υπάρχει σταθερή αναλογία 60/100 όγκου αέριας/υγρής φάσης. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε εβδομάδα (με εξαίρεση το Βήμα 5), με αποτέλεσμα ο χρόνος παραμονής να είναι 7 εβδομάδες.

A.2. Πρωτόκολλο παρασκευής αναερόβιου θρεπτικού μέσου και άλλων θρεπτικών

Για τη συντήρηση των καλλιεργειών και την πραγματοποίηση των πειραμάτων ασυνεχούς λειτουργίας απαιτούνται, εκτός από το δότη και δέκτη ηλεκτρονίων, τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία την ανάπτυξη των αναερόβιων μικροοργανισμών. Το αναερόβιο θρεπτικό μέσο (RAMM), που παρασκευάστηκε για τις ανάγκες της παρούσης διδακτορικής έρευνας, αναπτύχθηκε από τους Tandoi et al. (1995) και περιγράφεται παρακάτω.

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

- Αναλώσιμα: 2 ποτήρια ζέσεως των 50 mL, 1 ογκομετρικός κύλινδρος του 1L, 1 ογκομετρικός κύλινδρος των 25mL, 1 γυάλινο χωνί, 1 ύαλος, 1 σφαιρική

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

serum φιάλη των 2 L, 1 πλαστική σύριγγα του 1 mL με προσαρμοσμένη βελόνα, 1 πλαστική σύριγγα των 50 mL, 1 βελόνα 21G, 1 αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα, 1 Teflon πώμα από βουτύλιο, 1 ειδικό εξάρτημα σφράγισης, 1 πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ για την εισαγωγή σφαιρικών φιαλών, 1 πλαστικός υδροβολέας και διηθητικό χαρτί.

- Αέριο: μίγμα αερίου αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα 70%/30%.
- Απιονισμένο νερό.
- Υγρά μίγματα: Διάλυμα ιχνοστοιχείων μετάλλων (Trace Metal Solution), διάλυμα 8% w/w NaHCO₃, διάλυμα 5% w/v Na₂S * 9H₂O και διάλυμα 0.1% w/v resazurin.
- Χημικά: MgCl₂ * 6H₂O, CaCl₂ * 6H₂O, K₂HPO₄, NH₄Cl της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Οργανολογία - Εργαστηριακός εξοπλισμός: Απαγωγός, φούρνος των 103°C, αναλυτικός ζυγός ακριβείας και χρονόμετρο.

Τα βήματα δειγματοληψίας και τροφοδοσίας είχαν ως ακολούθως:

Βήμα 1: Η σφαιρική serum φιάλη των 2L πλένεται και στεγνώνει στο φούρνο των 103°C για μια ώρα. Μετά, αφήνεται να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου για μισή ώρα και τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ, μέσα στον απαγωγό.

Βήμα 2: Με τη βοήθεια του πλαστικού κυλίνδρου ογκομετρώνται 2 L απιονισμένου νερού. Το πρώτο λίτρο το αδειάζουμε σε υδροβολέα, ενώ το άλλο λίτρο εισάγεται εντός της serum φιάλης με τη βοήθεια του γυάλινου χωνιού.

Βήμα 3: Η ύαλος τοποθετείται στον αναλυτικό ζυγό ακριβείας και μηδενίζεται το βάρος της. Στη συνέχεια, ζυγίζονται 0.2 gr MgCl₂* 6H₂O, τα οποία εισέρχονται στη φιάλη ξεπλένοντας την ύαλο με μέρος από το υπολειπόμενο νερό του υδροβολέα. Η ύαλος στεγνώνεται με χαρτί, τοποθετείται πάλι στον αναλυτικό ζυγό για να επαναληφθεί η διαδικασία για 0.1 gr CaCl₂ * 6H₂O, 1 gr NH₄Cl και 0.8 gr KH₂PO₄, κατά σειρά.

Βήμα 4: Με τον ογκομετρικό κύλινδρο των 25 mL, ογκομετρώνται 20 mL του διαλύματος ιχνοστοιχείων και προστίθενται στη serum φιάλη. Ο κύλινδρος ξεπλένεται με το υπολειπόμενο νερό του υδροβολέα, το οποίο, έτσι, εισάγεται σιγά σιγά στη φιάλη.

Βήμα 5: Τα 2 ποτήρια ζέσεως των 50 mL, η πλαστική σύριγγα του 1 mL με προσαρμοσμένη βελόνα, η πλαστική σύριγγα των 50 mL, η βελόνα 21G, το αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα, το Teflon πώμα από βουτύλιο, το ειδικό εξάρτημα σφράγισης, τα υπόλοιπα διαλύματα που περιγράφηκαν παραπάνω και το χρονόμετρο τοποθετούνται εντός απαγωγού, που βρίσκεται σε λειτουργία.

Βήμα 6: Το πώμα βουτυλίου τοποθετείται στο στόμιο της serum φιάλης και από πάνω το αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα. Με το εξάρτημα της σφράγισης

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

γαντζώνεται το στόμιο και πιέζονται τα χερούλια, έως ότου το αλουμινένιο σφράγισμα να παραμένει σταθερό. Στη συνέχεια, το σφράγισμα διπλώνεται με τη φορά του βέλους, για να φαίνεται η μισή επιφάνεια του πώματος.

Βήμα 7: Το μανόμετρο του αερίου μίγματος αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα ανοίγεται γυρνώντας τις δυο βαλβίδες (πάνω και κάτω βαλβίδες), φτάνοντας την πίεση στη 1 atm με την κάτω βαλβίδα. Το Teflon πώμα τρυπιέται με την ασάλινη βελόνα 22G του αερίου μίγματος και με μια μεμονωμένη βελόνα 21G. Γίνεται η διοχέτευση του μίγματος αερίου για 30 λεπτά χρονομετρημένα, με στόχο την επίτευξη των αναερόβιων συνθηκών και τη ρύθμιση του pH. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, η πλαστική σύριγγα των 50 mL τοποθετείται στη μεμονωμένη βελόνα 21G, και όλο το σύστημα του ειδικού δοχείου με τη φιάλη φέρεται σε οριζόντια θέση. Έτσι, θα προκληθεί η αύξηση της πίεσης εντός της φιάλης και το περιεχόμενο θα εισέλθει στην πλαστική σύριγγα. Όταν η ποσότητα γίνει 60 mL, η σύριγγα εξάγεται και το περιεχόμενό της απορρίπτεται στο νεροχύτη του απαγωγού με ανοιχτή βρύση. Ύστερα, απομακρύνεται η βελόνα και κλείνονται προσεκτικά οι βαλβίδες του αερίου μίγματος.

Βήμα 8: Στα δύο ποτήρια ζέσεως εισάγονται 10 mL Na_2S και 50 mL NaHCO_3 , ξεχωριστά και τοποθετούνται εντός απαγωγού. Με τη βοήθεια της πλαστικής σύριγγας, όλος ο όγκος των δύο διαλυμάτων εγχέεται εντός της φιάλης, τρυπώντας το πώμα βουτυλίου και πιέζοντας ελαφρά το έμβολο.

Βήμα 9: Με τη χρήση της πλαστικής σύριγγας του 1 mL ογκομετρώνται 200 μL διαλύματος resazurin και εισάγονται στη φιάλη, έτσι ώστε να ελέγχεται η ύπαρξη αναερόβιων συνθηκών.

Βήμα 10: Το διάλυμα αφήνεται σε ηρεμία για 60 λεπτά και μετά παρατηρείται το χρώμα του θρεπτικού μέσου. Σε περίπτωση που το χρώμα του είναι μωβ/ροζ, τότε έχει εισέλθει οξυγόνο εντός της φιάλης, οπότε το μέσο απορρίπτεται και πραγματοποιείται ξανά η διαδικασία. Αν το χρώμα είναι διαυγές/ωχρο-καφέ, τότε το μέσο είναι έτοιμο προς χρήση.

Βήμα 11: Ο απαγωγός και τα σκεύη καθαρίζονται πολύ καλά με απιονισμένο νερό, ενώ απορρίπτονται όλα τα αναλώσιμα μιας χρήσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου.

Τα βήματα για την παρασκευή των διαλυμάτων, που χρησιμοποιούνται στο θρεπτικό μέσο έχουν ως εξής:

- Διάλυμα ιχνοστοιχείων μετάλλων: Σε 1 L απιονισμένο νερό προστίθενται 4.5 gr Nitritotriacetic acid (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 και 0.01 gr NaMoO_4 , με τη χρήση αναλυτικού ζυγού ακριβείας και υάλου. Το διάλυμα ρυθμίζεται σε pH 7 με διάλυμα 10M KOH, το οποίο παρασκευάζεται εισάγοντας 56.11 gr KOH σε 100 mL απιονισμένο νερό. Το διάλυμα αυτό

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

συντηρείται στους 4°C και είναι αναγκαίο, γιατί περιέχει ιχνοστοιχεία απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς.

- Διάλυμα 8% w/w NaHCO₃: Σε 1 L απιονισμένο νερό προστίθενται 80 gr NaHCO₃. Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμεύει ως ρυθμιστής του pH στο αναερόβιο θρεπτικό μέσο και τις καλλιέργειες.
- Διάλυμα 5% w/v Na₂S * 9H₂O: 5 gr Na₂S * 9H₂O εισάγονται σε 100 mL απιονισμένο νερό, μέσω μαγνητικής ανάδευσης. Το διάλυμα συντηρείται στους 4°C και είναι απαραίτητο για την διασφάλιση των αναγωγικών συνθηκών στο μέσο και τις καλλιέργειες.
- Διάλυμα 0.1% w/v resazurin: Ζυγίζονται 0.2 gr resazurin και εισάγονται σε 200 mL απιονισμένο νερό. Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, χρησιμοποιείται ως δείκτης των αναερόβιων συνθηκών.

Επιπλέον διαλύματα, απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στην τροφοδοσία των μητρικών καλλιεργειών και την παρασκευή των πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας, περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

- Διάλυμα ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (S-T), το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 0.4 gr NaOH, 0.006 gr Na₂SeO₃ * 5H₂O και 0.008 gr Na₂WO₄ * 2H₂O σε 1 L απιονισμένου νερού.
- Διάλυμα βιταμινών (Vitamins), το οποίο περιέχει τις εξής ποσότητες βιταμινών: 0.05 gr Υδροχλωρική θειαμίνη B1, 0.05 gr Ριβοφλαβίνη B2, 0.05 gr Νικοτινικό οξύ B3, 0.05 gr DL-παντοθενικό ασβέστιο B5, 0.1 gr Υδροχλωρική πυριδοξίνη B6, 0.02 gr Βιοτίνη B7, 0.02 gr Φολικό οξύ B9, 0.05 gr p-αμινοβενζοϊκό οξύ B10, 0.005 gr Κυανοκοβαλαμίνη B12, διαλυμένες σε 1 L απιονισμένου νερού.
- Διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης 10% (Yeast extract), που παρασκευάζεται με την προσθήκη 10 gr εκχυλίσματος ζύμης σε 100 mL απιονισμένου νερού.

Επίσης, ένα πυκνό διάλυμα θειικών ιόντων με συγκέντρωση 40 gr/L χρησιμοποιείται για την τροφοδοσία των καλλιεργειών, όπου πραγματοποιείται θειικοαναγωγή, και παρασκευάζεται με τη διάλυση 59.1464 gr Na₂SO₄ σε 1L απιονισμένου νερού. Για την ακριβή τιμή της συγκέντρωσης γίνεται η μέτρηση τριών δειγμάτων με τη μέθοδο που περιγράφεται στο Παράρτημα A.5 και υπολογίζεται ο μέσος όρος αυτών των μετρήσεων.

A.3. Πρωτόκολλο παρασκευής πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας

Κατά τη διάρκεια της διδακτορικής έρευνας, πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας διεξήχθησαν, όπως παρουσιάστηκε και στον Πίνακα 3.6. Το πρωτόκολλο της παρασκευής των πειραμάτων αναλύεται στην παρούσα Ενότητα, χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα τον μικρόκοσμο MMED, με μέση ποσότητα βουτυρικού οξέος και μέση συγκέντρωση θειικών ιόντων.

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- Αναλώσιμα: 3 serum μπουκάλια των 160 mL, 1 serum φιάλη των 600 mL, 6 ποτήρια ζέσεως των 100 mL, 4 πλαστικές σύριγγες των 50 mL, 1 γυάλινη σύριγγα των 100 mL, 4 πλαστικές σύριγγες του 1 mL με προσαρμοσμένη βελόνα, 1 γυάλινη σύριγγα των 25 mL, 1 γυάλινη σύριγγα των 10 mL, 6 βελόνες 21G, 3 αλουμινένια αποσπώμενα σφραγίσματα, 3 Teflon πώματα από βουτύλιο, πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ για την εισαγωγή μπουκαλιού, 1 ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, 1 μικρό γυάλινο χωνί, 1 γυάλινη σύριγγα του 1 mL με βαλβίδα, πλαστικές σύριγγες του 1 mL με αποσπώμενη βελόνα, 1 ανεξίτηλος маркаδόρος, 1 φάκελος, μεμβράνες (0,45 μm) για σύριγγες των 1000 mL, tube 0.5 mL, το ειδικό εξάρτημα σφράγισης και διηθητικό χαρτί.
- Απιονισμένο νερό.
- Αέρια: αέριο άζωτο 99,9%, μίγμα αερίου αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα 70%/30%.
- Υγρά μίγματα (θρεπτικά κ.λπ.): αναερόβιο θρεπτικό μέσο (RAMM - περιέχει resazurin), διάλυμα ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (S-T), διάλυμα βιταμινών (Vitamins), διάλυμα εκχυλίσματος ζύμης 10% (Yeast extract), διάλυμα θειικών ιόντων.
- Χημικές ενώσεις: τριχλωροαιθέριο, βουτυρικό οξύ.
- Οργανολογία - Εργαστηριακός εξοπλισμός: Απαγωγός, χρονόμετρο, φούρνος των 103 °C, θερμόμετρο και ανακινητήρας.

Τα βήματα δειγματοληψίας και τροφοδοσίας είχαν ως ακολούθως:

Βήμα 1: Την ημέρα τροφοδοσίας των μητρικών καλλιιεργειών, μια serum φιάλη των 600 mL πλένεται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, στεγνώνεται στο φούρνο των 103°C για 30 λεπτά και μετά αφήνεται να φτάσει, περίπου, τη θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό για 10 λεπτά.

Βήμα 2: Σε ανοιχτό απαγωγό τοποθετούνται οι δύο μητρικές καλλιέργειες M1 και M2, η πλαστική σύριγγα των 50 mL, οι 2 βελόνες 21G, το αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα (Wheaton), το Teflon πώμα από βουτύλιο (Wheaton), το ειδικό εξάρτημα σφράγισης (λευκό εξάρτημα - Wheaton), το χρονόμετρο και το πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ,

Βήμα 3: Στο στόμιο της φιάλης εφαρμόζεται το Teflon πώμα από βουτύλιο και από πάνω το αλουμινένιο αποσπώμενο σφράγισμα. Με το εξάρτημα σφράγισης γαντζώνεται το στόμιο πιέζοντας τα χερούλια. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ενός καπακιού από τις βελόνες, ασκείται πίεση στην άκρη της σχισμής του αλουμινένιου αποσπώμενου σφραγίσματος με τη φορά του βέλους, έτσι ώστε να διπλωθεί το σφράγισμα και να φαίνεται η μισή επιφάνεια του Teflon πώματος.

Βήμα 4: Οι βαλβίδες του αερίου αζώτου ανοίγονται και η πίεση ρυθμίζεται στη 1 atm. Η ασφάλινη βελόνα 22G του αερίου αζώτου και μια μεμονωμένη βελόνα 21G τρυπούν το Teflon πώμα. Με αυτόν τον τρόπο, γίνεται η διοχέτευση αερίου αζώτου για 15 λεπτά στη serum φιάλη, ενώ από τη δεύτερη βελόνα (21G) απομακρύνεται το

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

οξυγόνο που έχει φυλακιστεί εντός των μπουκαλιών. Όταν περάσει ο χρόνος (σύμφωνα με το χρονόμετρο), πρώτα η βελόνα 21G και μετά η ατσαλένια βελόνα του αερίου αζώτου αφαιρούνται από το πώμα και κλείνεται η βαλβίδα του αερίου αζώτου.

Βήμα 5: Η μητρική καλλιέργεια M1 τοποθετείται μέσα στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ, και όλο το σύστημα φέρεται σε οριζόντια θέση. Σύμφωνα με το Βήμα 7 στο πρωτόκολλο συντήρησης μητρικών καλλιεργειών (Παράρτημα Α.1), εξάγονται περίπου 50 mL, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή των μικρόκοσμων αντί για τη μέτρηση των αιωρούμενων στερεών. [Κατά την παρασκευή των πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας, στις μητρικές καλλιέργειες QL, QM και M πραγματοποιείται η ανάλυση θειικών ιόντων κανονικά, όπως κάθε εβδομάδα].

Βήμα 6: Με τη βελόνα 21G της πλαστικής σύριγγας, που περιέχει το υλικό από την καλλιέργεια, τρυπιέται το Teflon πώμα της φιάλης. Η υγρή καλλιέργεια εισέρχεται στο μπουκάλι, πιέζοντας σταδιακά το έμβολο της πλαστικής σύριγγας. Ταυτόχρονα, με μια μεμονωμένη βελόνα 21G τρυπιέται το πώμα της φιάλης, για να εξέλθει το φυλακισμένο αέριο άζωτο στο περιβάλλον.

Βήμα 7: Όταν εισέλθουν 45 mL στο μπουκάλι, τότε αφαιρείται η μεμονωμένη βελόνα 21G και η διαδικασία συνεχίζει για τα υπόλοιπα 5 mL. Με αυτόν τον τρόπο υπάρχει αυξημένη πίεση και δεν θα εισαχθεί περαιτέρω αέρας στο μπουκάλι από τις χαραμάδες του πώματος.

Βήμα 8: Επαναλαμβάνονται ξανά τα βήματα 5-7 για τη μητρική καλλιέργεια M2, εισάγοντας το υλικό στην ίδια serum φιάλη.

Βήμα 9: Μέχρι το βήμα 8 έχουν μαζευτεί περίπου 100 mL υγρής καλλιέργειας στη serum φιάλη. Η βαλβίδα του μίγματος αερίου αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα ανοίγεται και ρυθμίζεται η πίεση στη 1 atm. Η ατσαλένια βελόνα 22G του αερίου μίγματος και η μεμονωμένη βελόνα 21G τρυπά το πώμα της φιάλης. Γίνεται η διοχέτευση του μίγματος αερίου για 10 λεπτά, για να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες.

Βήμα 10: Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία, η πλαστική σύριγγα των 50 mL τοποθετείται στη μεμονωμένη βελόνα 21G, και όλο το σύστημα στήνεται σε οριζόντια θέση. Η αύξηση της πίεσης θα προκαλέσει την ώθηση του υλικού εντός της σύριγγας και, έτσι, αφήνεται να γεμίσει σταδιακά με 15 mL υγρής καλλιέργειας. Από τον όγκο των 15 mL, 1 mL χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των θειικών ιόντων (Παράρτημα Α.5), ενώ ο υπόλοιπος απορρίπτεται στον νεροχύτη του απαγωγού. Αφαιρείται πρώτα η πλαστική σύριγγα με τη βελόνα 21G και μετά η ατσαλένια βελόνα του αερίου μίγματος, ενώ έπειτα κλείνονται οι βαλβίδες του αερίου μίγματος.

Βήμα 11: Τα 6 ποτήρια ζέσεως των 50 mL πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, στεγνώνουν εντός του φούρνου των 103°C για 5 λεπτά και αφήνονται να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό για 5 λεπτά. Τα διαλύματα και οι ουσίες τοποθετούνται ξεχωριστά στα ποτηράκια με τις εξής ποσότητες: 1 mL διαλύματος

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (S-T), 2 mL διαλύματος θεικών ιόντων, 2 mL διαλύματος βιταμινών (Vitamins), 1 mL διαλύματος εκχυλίσματος ζύμης (Yeast extract), 1 mL τριχλωροαιθενίου (TCE) και 1 mL βουτυρικού οξέος (But). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετούνται μια πλαστική σύριγγα των 50 mL με μια βελόνα 21G, η γυάλινη σύριγγα των 100 μ L, οι 2 πλαστικές σύριγγες του 1 mL με προσαρμοσμένη βελόνα και η γυάλινη σύριγγα των 25 μ L.

Βήμα 12: Προστίθενται θρεπτικά από τα τρία έτοιμα υγρά σκευάσματα ως ακολούθως: 15 mL από το RAMM (με τη σύριγγα των 50 mL με τη βελόνα 21G, όπως στο Βήμα 8 στο πρωτόκολλο συντήρησης μητρικών καλλιέργειών), 15 μ L S-T (με τη σύριγγα των 100 μ L) και 150 μ L Vitamins (με τη πλαστική σύριγγα των 1000 μ L). Όλο το σύστημα (η φιάλη και το ειδικό δοχείο με καουτσούκ) τοποθετείται κάθετα, προστίθενται 5 μ L Yeast extract, 4.5 μ L TCE και 3 μ L Butyric acid (με τη σύριγγα των 25 μ L, η οποία ξεπλένεται σε κάθε χρήση με απιονισμένο νερό, αρκετές φορές), παρατηρώντας εάν διαχέονται οι ποσότητες των ουσιών για τη διασφάλιση της τροφοδοσίας των ουσιών. (Οι ποσότητες αυτές είναι ανάλογες της συντήρησης των μητρικών καλλιέργειών και αποσκοπούν στη συντήρηση του μίγματος M1 και M2).

Βήμα 13: Επίσης, με τη πλαστική σύριγγα του 1 mL με προσαρμοσμένη βελόνα, προστίθεται μια ποσότητα θεικών ιόντων, έτσι ώστε το τελικό μίγμα να περιέχει 400 mg/L, σύμφωνα με τη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στο Βήμα 9.

Βήμα 14: Η serum φιάλη ανακινείται πολύ καλά και αποθηκεύεται υπό σκότος στους 25°C (μαζί με τις άλλες μητρικές καλλιέργειες). Ο απαγωγός και τα σκεύη καθαρίζονται, ενώ απορρίπτονται όλα τα υλικά μιας χρήσης, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου.

Βήμα 15: Τα βήματα 2 και 5-14 ακολουθούνται ξανά μια φορά την εβδομάδα και για τόσες συνεχόμενες εβδομάδες, όσες απαιτούνται, έτσι ώστε να μαζευτεί η απαραίτητη ποσότητα για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Στην περίπτωση που εξετάζεται, στο παράδειγμα του πρωτοκόλλου (MMED πείραμα), απαιτούνται δύο εβδομάδες, μέχρι να συγκεντρωθούν 200 mL από τις καλλιέργειες M1 και M2 στη serum φιάλη των 600 mL, ενώ προστίθενται τα θρεπτικά που απαιτούνται κάθε φορά, αναλογικά με τον όγκο που έχει συλλεχθεί ως τότε, όπως ακριβώς στα βήματα 10-12 (σύνολο 2 μικρόκοσμοι, ο καθένας από 100 mL).

Βήμα 15: Μια μέρα μετά τη συλλογή του επαρκούς όγκου, τα 2 serum μπουκάλια των 160 mL πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, στεγνώνουν στο φούρνο των 103°C για 5 λεπτά και μετά αφήνονται να κρυώσουν για 5 λεπτά στον απαγωγό (να φτάσουν περίπου τη θερμοκρασία δωματίου).

Βήμα 16: Στον απαγωγό τοποθετούνται η serum φιάλη με το μίγμα M1+M2, 2 πλαστικές σύριγγες των 50 mL, 2 βελόνες 21G, 2 αλουμινένια αποσπώμενα σφραγίσματα (Wheaton), 2 Teflon πώματα από βουτύλιο (Wheaton), το ειδικό

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

εξάρτημα σφράγισης (λευκό εξάρτημα - Wheaton) και το ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ.

Βήμα 17: Τα serum μπουκάλια των 160 mL σφραγίζονται και γίνεται διοχέτευση αερίου αζώτου για 5 λεπτά, όπως στα βήματα 3 και 4.

Βήμα 18: Η serum φιάλη των 600 mL με το μίγμα τοποθετείται στο ειδικό πλαστικό δοχείο με υποδοχείς από καουτσούκ και το μανόμετρο του αερίου μίγματος αζώτου/διοξειδίου του άνθρακα ανοίγεται γυρνώντας τις δυο βαλβίδες, ενώ ρυθμίζεται η πίεση στη 1 atm. Με την ασάλινη βελόνα 22G του αερίου μίγματος και με τη βελόνα 21G της πλαστικής σύριγγας τρυπιέται το Teflon πώμα της φιάλης. Όλο το σύστημα φέρεται σε οριζόντια θέση και όταν η πίεση αυξηθεί στο δοχείο, η σύριγγα θα γεμίσει σταδιακά με 50 mL καλλιέργειας. Με τη σύριγγα που περιέχει το υλικό τρυπιέται το πώμα στο πρώτο serum μπουκάλι των 160 mL. Σταδιακά, πιέζεται το έμβολο της σύριγγας, έτσι ώστε το υλικό να εισέλθει στο μπουκάλι και, ταυτόχρονα, με μια μεμονωμένη βελόνα 21G τρυπιέται το πώμα, για να εξέλθει το φυλακισμένο αέριο στο περιβάλλον.

Βήμα 19: Το Βήμα 18 επαναλαμβάνεται για να γίνει η έγχυση άλλων 35 mL. Μόλις ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, η ασαλένια βελόνα του αερίου μίγματος και μια μεμονωμένη βελόνα 21G τοποθετούνται στο μπουκάλι και για 10 λεπτά γίνεται η διοχέτευση αερίου μίγματος, όπως στο Βήμα 9.

Βήμα 20: Η ίδια διαδικασία (Βήματα 18 και 19) πραγματοποιείται ξανά για το δεύτερο μπουκάλι (1 πείραμα επί 2 αντίγραφα = 2 μικρόκοσμοι). Όταν ολοκληρωθεί το βήμα, κλείνονται οι βαλβίδες του αερίου μίγματος.

Βήμα 21: Πέντε ποτήρια ζέσεως πλένονται με απιονισμένο νερό, στεγνώνουν στο φούρνο των 104°C για 5 λεπτά και τοποθετούνται στον απαγωγό, για να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστίθενται τα διαλύματα θρεπτικών και οι χημικές ενώσεις, ως εξής: 1 mL διαλύματος ένυδρου βολφραμικού και σεληνιώδους νατρίου (S-T), 2 mL διαλύματος θειικών ιόντων, 2 mL διαλύματος βιταμινών (Vitamins), 1 mL τριχλωροαιθενίου (TCE) και 1 mL βουτυρικού οξέος (But). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετούνται η γυάλινη σύριγγα των 100 μ L, οι 2 πλαστικές σύριγγες του 1 mL με προσαρμοσμένη βελόνα, η γυάλινη σύριγγα των 25 μ L, η γυάλινη σύριγγα των 10 μ L, 1 γυάλινη σύριγγα του 1 mL με βαλβίδα, 1 ανεξίτηλος μαρκαδόρος, 1 φάκελος, 2 μεμβράνες (0,45 μ m) για σύριγγες των 1000 μ L, 2 tubes 2 mL και 2 tubes 0.5 mL και διηθητικό χαρτί.

Βήμα 22: Τα serum μπουκάλια των 160 mL χωρίζονται, αφού καταγραφούν με ανεξίτηλο μαρκαδόρο, κατά τον εξής τρόπο (εντός των παρενθέσεων είναι οι ποσότητες που θα εισαχθούν στο κάθε σύστημα, όπως περιγράφονται στα βήματα 24 και 25):

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

MMEDa και MMEDb (15 mL RAMM, 15 μ L S-T, 150 μ L Vitamins, 4.5 μ L TCE, 27.5 μ L But). [Πείραμα ελέγχου συγκέντρωσης θειικών ιόντων με μέση δόση δότη ηλεκτρονίων]

Όλοι οι μικρόκοσμοι είναι σε δύο αντίγραφα (a) και (b), ενώ η αναλογία όγκου αέριας/υγρής φάσης παραμένει σταθερή 60/100, όπως και στις μητρικές καλλιέργειες.

Βήμα 23: Από το μίγμα M1+M2, 1 mL δείγματος εξάγεται με τη γυάλινη σύριγγα του 1 mL για τη μέτρηση των θειικών ιόντων, ενώ ο εναπομείνας όγκος συλλέγεται για την ανάλυση πτητικών αιωρούμενων στερεών και πρωτεϊνών.

Βήμα 24: Στο κάθε αντίγραφο του μικρόκοσμου εισάγονται 15 mL RAMM (με τη πλαστική σύριγγα των 50 mL), 15 μ L S-T (με τη σύριγγα των 25 μ L) και 150 μ L Vitamins (με τη πλαστική σύριγγα των 1000 μ L). Επίσης, προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα από το διάλυμα Na_2SO_4 (με μια πλαστική σύριγγα του 1 mL), έτσι ώστε να η αρχική συγκέντρωση στους μικρόκοσμούς να είναι 400 mg/L (μέση συγκέντρωση θειικών ιόντων), σύμφωνα με τη μέτρηση του βήματος 23.

Βήμα 25: Ο μικρόκοσμος κρατείται ανάποδα για την προσθήκη 4.5 μ L TCE (με μια σύριγγα των 10 μ L) και την ποσότητα του δότη που απαιτείται, όπου στην προκειμένη περίπτωση είναι 27.5 μ L But (με τη σύριγγα των 100 μ L). Εάν πρέπει να εισαχθεί αέριο π.χ. το υδρογόνο, τότε η ποσότητά του θα προστεθεί με μια σύριγγα gas-tight των 10 mL.

Βήμα 26: Μετά την εισαγωγή του δότη ηλεκτρονίων, από τα δύο αντίγραφα εξάγονται 200 μ L υγρό δείγμα με μια πλαστική σύριγγα των 1000 μ L, διηθούνται μέσω 0.45 μ m μεμβρανών, οι οποίες τοποθετούνται μπροστά από τη σύριγγα μόλις εξαχθεί η βελόνα, και μεταφέρονται σε tube του 0.5 mL για τη μέτρηση των πτητικών λιπαρών οξέων. Το υγρό δείγμα καταγράφεται με ανεξίτηλο μαρκαδόρο και τοποθετείται στους -20°C σε φάκελο.

Βήμα 27: Οι μικρόκοσμοι αποθηκεύονται υπό σκότος και με θερμοκρασία 25°C σε ανακινητήρα με αργή κίνηση. Ο απαγωγός και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πλένονται με απιονισμένο νερό, ενώ τα αναλώσιμα μιας χρήσης απορρίπτονται, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου.

Βήμα 28: Στο στόμιο του περισσευούμενου serum μπουκαλιού τοποθετείται το μικρό χωνί και με τον ογκομετρικό κύλινδρο ογκομετρώνται 100 mL απιονισμένου νερού. Αυτή η ποσότητα του νερού εισάγεται εντός του μπουκαλιού και αποθηκεύεται μαζί με τους μικρόκοσμούς. Το μπουκάλι αυτό χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της θερμοκρασίας, εφόσον οι αναλύσεις headspace πρέπει να πραγματοποιούνται σε σταθερή θερμοκρασία (25°C).

Βήμα 29: Μετά από 1 ώρα, θεωρείται ότι έχει επιτευχθεί η ισορροπία μεταξύ των φάσεων και μετρείται η θερμοκρασία με το θερμόμετρο στο ασφράγιστο serum

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

μπουκάλι με 100 mL απιονισμένου νερού. Αν η θερμοκρασία είναι 25°C, τότε εξάγονται δύο αέρια δείγματα με μια σύριγγα gas-tight των 150 μ L από το headspace, με στόχο τον προσδιορισμό χλωροαιθινίων (50 μ L) και μεθανίου και αιθενίου (50 μ L) με αέριο χρωματογράφο.

Βήμα 30: Κατά τη διάρκεια του πειράματος, ελέγχονται οι συγκεντρώσεις των χλωροαιθινίων, αιθενίου, μεθανίου, θειικών ιόντων, σουλφιδίων, πτητικών λιπαρών οξέων. Σύμφωνα με τους στόχους του πειράματος, καθορίζεται η συχνότητα της κάθε μέτρησης, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.8. Στο τέλος των πειραμάτων, πραγματοποιείται και ο προσδιορισμός της βιομάζας με τη μέτρηση των αιωρούμενων στερεών και πρωτεΐνης.

Με την παραπάνω διαδικασία (Βήματα 1-30) γίνεται η παρασκευή των πειραμάτων ασυνεχούς τροφοδοσίας, με μέση συγκέντρωση θειικών ιόντων και μέση δόση δότη ηλεκτρονίων (MMED), αλλά ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο και για την παρασκευή των άλλων πειραμάτων, όπως καταγράφονται στον Πίνακα 3.6, με διαφορά στις ουσίες που εισάγονται και την ποσότητά τους.

A.4. Μέθοδοι αέριου χρωματογράφου

Για τη μέτρηση των χλωριωμένων αιθινίων, αιθενίου, μεθανίου, αιθανίου, ασετυλίνης, πτητικών λιπαρών οξέων, προπανόλης και βενζοϊκού οξέος αναπτύχθηκαν πέντε διαφορετικές μέθοδοι στον αέριο χρωματογράφο. Δείγματα εξάγονταν από τα πειράματα και τις καλλιέργειες, με στόχο τον προσδιορισμό των ουσιών. Πιο συγκεκριμένα, κάθε φορά, δύο αέρια δείγματα χρησιμοποιούνταν, ένα για την ανάλυση των χλωριωμένων αιθινίων και άλλο ένα για τη μέτρηση του αιθενίου, του μεθανίου, του αιθανίου και της ασετυλίνης, τα οποία διαχωρίζονται στο GC με τη στήλη Gas-Pro. Επιπλέον, ένα υγρό δείγμα εξαγόταν για τη μέτρηση μιας από τις εξής τρεις ομάδες οργανικών: 1) Βουτυρικό οξύ, ισοβουτυρικό οξύ, προπιονικό οξύ, οξικό οξύ, 2) προπανόλη και 3) βενζοϊκό οξύ, ανάλογα με το είδος του δότη ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκε στην αρχή του πειράματος, και τα οποία διαχωρίζονται μέσω της στήλης Nukol. Η ποσοτικοποίηση των ουσιών πραγματοποιείται μέσω γραμμικών καμπυλών, που έχουν παρασκευαστεί με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων, ενώ παρακάτω αναλύεται η διαδικασία παρασκευής των καμπυλών.

A.4.1. Πρότυπες καμπύλες για TCE, cis-1,2 DCE, trans-1,2 DCE, 1,1-DCE

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

- Αναλώσιμα: 6 serum μπουκάλια των 160 mL, 1 γυάλινο μικρό χωνί, 1 ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, 1 γυάλινη σύριγγα των 10 μ L, 1 γυάλινη

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

σύριγγα των 100 μL με βαλβίδα για τη μέτρηση αερίων δειγμάτων, 1 ποτήρι ζέσεως, 5 αλουμινένια σφραγίσματα, 5 teflon πώματα βουτυλίου, 1 ειδικό εξάρτημα σφράγισης (Wheaton) και ένας ανεξίτηλος μαρκαδόρος.

- Απιονισμένο νερό.
- Χημικές ενώσεις (Sigma Aldrich; >98%): Τριχλωροαιθένιο (TCE), cis-1,2 δίχλωροαιθένιο (cis-1,2 DCE; cDCE), trans-1,2 δίχλωροαιθένιο (trans-1,2 DCE; tDCE), 1,1 δίχλωροαιθένιο (1,1-DCE).
- Αέρια: He (Ήλιον; 99.999%), H^+ (Υδρογόνο; 99.999%), Συνθετικός αέρας (N_2/O_2 80%/20%).
- Οργανολογία: Αέριος χρωματογράφος GC Autosystem XL της PerkinElmer με στήλη Gas-Pro, απαγωγός, φούρνος 103 °C, ανακινήτρας και Θερμόμετρο.

Τα βήματα μέτρησης και παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Τα 6 serum μπουκάλια πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στο φούρνο των 103°C για 30 λεπτά και αφήνονται να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό (περίπου για 30 λεπτά). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετούνται τα 5 πώματα βουτυλίου, τα 5 αλουμινένια σφραγίσματα, ο ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, το γυάλινο χωνί, το ειδικό εξάρτημα σφράγισης, και ο ανεξίτηλος μαρκαδόρος.

Βήμα 2: Με τον κύλινδρο ογκομετρώνται 100 mL απιονισμένου νερού και εισάγονται στα serum μπουκάλια με τη βοήθεια του μικρού χωνιού.

Βήμα 3: Επιλέγεται το πρώτο μπουκάλι και στο στόμιο τοποθετείται ένα πώμα βουτυλίου με ένα αλουμινένιο σφράγισμα. Με το εξάρτημα σφράγισης γαντζώνεται το στόμιο πιέζοντας τα χερούλια, έως ότου το αλουμινένιο σφράγισμα να μείνει σταθερό. Στη συνέχεια, διπλώνεται το σφράγισμα με τη φορά του βέλους κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να φαίνεται η μισή επιφάνεια του Teflon πώματος. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία (Βήμα 3) για άλλα τέσσερα serum μπουκάλια.

Βήμα 4: Μεταφέρονται στον ανοιχτό απαγωγό οι χημικές ενώσεις, TCE, cDCE, tDCE, 1,1DCE, η γυάλινη σύριγγα των 10 μL και το ποτήρι ζέσεως γεμάτο με απιονισμένο νερό.

Βήμα 5: Με το μαρκαδόρο αναγράφεται ο όγκος των ουσιών που θα εισαχθεί σε κάθε σφραγισμένο μπουκάλι. Πιο συγκεκριμένα, πέντε μπουκάλια θα περιέχουν 1 μL , 2 μL , 3 μL , 5 μL , 6 μL από την κάθε ουσία.

Βήμα 6: Επιλέγεται το μπουκάλι 1, το οποίο κρατείται ανάποδα και με τη σύριγγα των 10 μL προστίθεται 1 μL TCE, προσέχοντας αν διαχέεται η ουσία στο υγρό. Συνεχίζεται η ίδια διαδικασία (Βήμα 6) για τα υπόλοιπα μπουκάλια.

Βήμα 7: Επαναλαμβάνεται το Βήμα 6 για όλες τις ουσίες, ξεπλένοντας κάθε φορά τη σύριγγα στο ποτήρι ζέσεως με το απιονισμένο νερό. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία,

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

τότε τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν αποθηκεύονται υπό απουσία φωτός, στον ανακινητήρα.

Βήμα 8: Στο στόμιο του serum μπουκαλιού των 160 mL, το οποίο δεν έχει σφραγιστεί, τοποθετείται ένα μικρό χωνί και εισάγονται 100 mL απιονισμένου νερού, που έχουν ογκομετρηθεί με κύλινδρο. Το μπουκάλι αυτό είναι απαραίτητο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας και αποθηκεύεται μαζί με τα πρότυπα διαλύματα.

Βήμα 9: Ενεργοποιείται ο αέριος χρωματογράφος και οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα, του φούρνου και του ανιχνευτή ρυθμίζονται στους 220°C, 160°C και 250°C, αντιστοίχως, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «finalces.mth». Οι ροές των αερίων ρυθμίζονται ως εξής: He (14.4 psi), H⁺ (45 mL/min), Συνθετικός αέρας (450 mL/min).

Βήμα 10: Μετά από μια ώρα, θεωρείται ότι έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ της υγρής και της αέριας φάσης. Στο ασφράγιστο serum μπουκάλι τοποθετείται ένα θερμόμετρο και καταγράφεται η θερμοκρασία, η οποία πρέπει να είναι 25°C.

Βήμα 11: Επιλέγεται το πρώτο πρότυπο διάλυμα και εξάγονται 50 μL δείγματος από την αέρια φάση, με τη χρήση γυάλινης σύριγγας των 100 μL με βαλβίδα για τον εγκλωβισμό του δείγματος εντός σύριγγας. Το δείγμα εγχέεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου και μετρώνται τα εμβαδά (area) των mV που παρήγαγε στα 2.3, 2.7, 3.6 και 4.6 λεπτά που αντιστοιχούν στις εξής ουσίες: 1,1DCE, tDCE, cDCE και TCE. Η διαδικασία της εισπίεσης-μέτρησης πραγματοποιείται άλλες δύο φορές.

Βήμα 12: Επαναλαμβάνεται το βήμα 11 για όλα τα πρότυπα διαλύματα και υπολογίζονται οι μέσοι όροι των παραγόμενων mV για κάθε ποσότητα και κάθε ουσία. Με τη βοήθεια του Excel, οι μέσοι όροι των mV και οι γνωστές συγκεντρώσεις των ουσιών χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πρότυπων καμπυλών της μορφής $y=a*x$, που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.3.

Βήμα 13: Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, πλένονται όλα τα σκεύη με απιονισμένο νερό και απενεργοποιείται ο χρωματογράφος, με ιδιαίτερη προσοχή στα αέρια.

A.4.2. Πρότυπη καμπύλη για VC

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

- Αναλώσιμα: 6 serum μπουκάλια των 160 mL, 1 γυάλινο μικρό χωνί, 1 ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, 1 γυάλινη σύριγγα των 10 mL με βαλβίδα για τη δειγματοληψία αερίων δειγμάτων, 1 γυάλινη σύριγγα των 100 μL με βαλβίδα για τη μέτρηση αερίων δειγμάτων, 1 ποτήρι ζέσεως, 5 αλουμινένια σφραγίσματα, 5 teflon πώματα βουτυλίου, 1 ειδικό εξάρτημα σφράγισης (Wheaton), ένα stand με μια πιάστρα και ένας ανεξίτηλος μαρκαδόρος.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- Απιονισμένο νερό.
- Αέρια: VC (Βιλυνοχλωρίδιο; 3.07%), He (Ήλιον; 99.999%), H⁺ (Υδρογόνο; 99.999%), Συνθετικός αέρας (N₂/O₂ 80%/20%).
- Οργανολογία: Αέριος χρωματογράφος GC Autosystem XL της PerkinElmer με στήλη Gas-Pro, απαγωγός, φούρνος 103°C, ανακινητήρας και θερμόμετρο.

Τα βήματα παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων και μέτρησης φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Τα 6 serum μπουκάλια πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στο φούρνο των 103°C για 30 λεπτά και αφήνονται να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό (περίπου για 30 λεπτά). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετούνται τα 5 πώματα βουτυλίου, τα 5 αλουμινένια σφραγίσματα, ο ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, το γυάλινο χωνί, το ειδικό εξάρτημα σφράγισης και ο ανεξίτηλος μαρκαδόρος.

Βήμα 2: Με τον κύλινδρο ογκομετρώνται 100 mL απιονισμένου νερού και εισάγονται στα serum μπουκάλια με τη βοήθεια του μικρού χωνιού.

Βήμα 3: Επιλέγεται το πρώτο μπουκάλι και στο στόμιο τοποθετείται ένα πώμα βουτυλίου με ένα αλουμινένιο σφράγισμα. Με το εξάρτημα σφράγισης γαντζώνεται το στόμιο πιέζοντας τα χερούλια, έως ότου το αλουμινένιο σφράγισμα να μείνει σταθερό. Στη συνέχεια, διπλώνεται το σφράγισμα με τη φορά του βέλους κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να φαίνεται η μισή επιφάνεια του Teflon πώματος. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία (Βήμα 3) για άλλα τέσσερα serum μπουκάλια.

Βήμα 4: Μεταφέρονται στον ανοιχτό απαγωγό το αέριο VC, το stand με την πιάστρα, το ποτήρι ζέσεως μισογεμάτο με απιονισμένο νερό και η γυάλινη σύριγγα των 10 mL. Το ποτήρι ζέσεως δεσμεύεται με την πιάστρα στο stand και η άκρη του σωλήνα από το μανόμετρο του αερίου VC τοποθετείται εντός του νερού.

Βήμα 5: Με το μαρκαδόρο αναγράφεται ο όγκος του VC που θα εισαχθεί σε κάθε σφραγισμένο μπουκάλι. Πιο συγκεκριμένα, πέντε μπουκάλια θα περιέχουν 0.5 mL, 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL από την κάθε ουσία.

Βήμα 6: Ανοίγεται η πάνω βαλβίδα του αερίου και μετά ανοίγεται η κάτω βαλβίδα αργά, έως ότου η ροή αερίου που παρατηρείται στο νερό, να είναι χαμηλή. Αφήνεται για λίγα λεπτά να γεμίσει ο σωλήνας του μανομέτρου με το αέριο.

Βήμα 7: Με τη σύριγγα των 10 mL τρυπιέται ο σωλήνας και εξάγονται 0.5 mL αερίου δείγματος. Επιλέγεται το μπουκάλι 0.5, το οποίο κρατείται ανάποδα και με τη σύριγγα των 10 mL προστίθενται τα 0.5 mL VC, προσέχοντας αν διαχέεται το αέριο στο υγρό. Συνεχίζεται η ίδια διαδικασία (Βήμα 7) για τα υπόλοιπα μπουκάλια. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, τότε τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν αποθηκεύονται υπό απουσία φωτός στον ανακινητήρα, ενώ κλείνονται οι βαλβίδες του αερίου VC.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 8: Στο στόμιο του serum μπουκαλιού των 160 mL, το οποίο δεν έχει σφραγιστεί, τοποθετείται ένα μικρό χωνί και εισάγονται 100 mL απιονισμένου νερού, που έχουν ογκομετρηθεί με κύλινδρο. Το μπουκάλι αυτό είναι απαραίτητο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας και αποθηκεύεται μαζί με τα πρότυπα διαλύματα.

Βήμα 9: Ενεργοποιείται ο αέριος χρωματογράφος και οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα, του φούρνου και του ανιχνευτή ρυθμίζονται στους 220°C, 160°C και 250°C, αντιστοίχως, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «finalces.mth». Οι ροές των αερίων ρυθμίζονται ως εξής: He (14.4 psi), H⁺ (45 mL/min), Συνθετικός αέρας (450 mL/min).

Βήμα 10: Μετά από μια ώρα, θεωρείται ότι έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ της υγρής και της αέριας φάσης. Στο ασφράγιστο serum μπουκάλι τοποθετείται ένα θερμόμετρο και καταγράφεται η θερμοκρασία, η οποία πρέπει να είναι 25°C.

Βήμα 11: Επιλέγεται το πρώτο πρότυπο διάλυμα και εξάγονται 50 μL δείγματος από την αέρια φάση με τη χρήση γυάλινης σύριγγας των 100 μL με βαλβίδα για τον εγκλωβισμό του δείγματος εντός σύριγγας. Το δείγμα εγχέεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου και μετρείται το εμβαδό (area) του παραγόμενου mV στα 1.7 λεπτά που αντιστοιχεί στο VC. Η διαδικασία της εισπίεσης-μέτρησης πραγματοποιείται άλλες δύο φορές.

Βήμα 12: Επαναλαμβάνεται το βήμα 11 για όλα τα πρότυπα διαλύματα και υπολογίζονται οι μέσοι όροι των παραγόμενων mV για κάθε ποσότητα. Με τη βοήθεια του Excel, οι μέσοι όροι των mV και οι γνωστές συγκεντρώσεις του VC χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πρότυπης καμπύλης της μορφής $y=a*x$, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.

Βήμα 13: Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, πλένονται όλα τα σκεύη με απιονισμένο νερό και απενεργοποιείται ο χρωματογράφος με ιδιαίτερη προσοχή στα αέρια.

A.4.3. Πρότυπες καμπύλες για Αιθένιο, Αιθάνιο, Μεθάνιο και Ασετυλίνη

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

- Αναλώσιμα: 11 serum μπουκάλια των 160 mL, 1 γυάλινο μικρό χωνί, 1 ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, 1 γυάλινη σύριγγα των 10 mL με βαλβίδα για τη δειγματοληψία αερίων δειγμάτων, 1 γυάλινη σύριγγα των 100 μL με βαλβίδα για τη μέτρηση αερίων δειγμάτων, 1 ποτήρι ζέσεως, 10 αλουμινένια σφραγίσματα, 10 teflon πώματα βουτυλίου, 1 ειδικό εξάρτημα σφράγισης (Wheaton), ένα stand με μια πιάστρα και ένας ανεξίτηλος μαρκαδόρος.
- Απιονισμένο νερό.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- Αέρια: METH (Μεθάνιο; 99.99%), ETH (Αιθάνιο; 99.99%), ETHA (Αιθάνιο; 99.99%), Acet (Ασετυλίνη; 99.99%), He (Ήλιον; 99.999%), H⁺ (Υδρογόνο; 99.999%), Συνθετικός αέρας (N₂/O₂ 80%/20%).
- Οργανολογία: Αέριος χρωματογράφος GC Autosystem XL της PerkinElmer με στήλη Gas-Pro, απαγωγός, φούρνος 103°C, ανακινητήρας και θερμόμετρο.

Τα βήματα παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων και μέτρησης φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Τα 11 serum μπουκάλια πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στο φούρνο των 103°C για 30 λεπτά και αφήνονται να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό (περίπου για 30 λεπτά). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετούνται τα 10 πώματα βουτυλίου, τα 10 αλουμινένια σφραγίσματα, ο ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL, το γυάλινο χωνί, το ειδικό εξάρτημα σφράγισης, και ο ανεξίτηλος μαρκαδόρος.

Βήμα 2: Με τον κύλινδρο ογκομετρώνται 100 mL απιονισμένου νερού και εισάγονται στα serum μπουκάλια με τη βοήθεια του μικρού χωνιού.

Βήμα 3: Επιλέγεται το πρώτο μπουκάλι και στο στόμιο τοποθετείται ένα πώμα βουτυλίου με ένα αλουμινένιο σφράγισμα. Με το εξάρτημα σφράγισης γαντζώνεται το στόμιο πιέζοντας τα χερούλια, έως ότου το αλουμινένιο σφράγισμα να μείνει σταθερό. Στη συνέχεια, διπλώνεται το σφράγισμα με τη φορά του βέλους κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να φαίνεται η μισή επιφάνεια του Teflon πώματος. Ακολουθείται η ίδια διαδικασία (Βήμα 3) για άλλα εννιά serum μπουκάλια.

Βήμα 4: Μεταφέρονται στον ανοιχτό απαγωγό το αέριο μεθάνιο, το stand με την πιάστρα, το ποτήρι ζέσεως μισογεμάτο με απιονισμένο νερό και οι γυάλινες σύριγγες των 100 μL και των 10 mL. Το ποτήρι ζέσεως δεσμεύεται με την πιάστρα στο stand και η άκρη του σωλήνα από το μανόμετρο του αερίου μεθανίου τοποθετείται εντός του νερού.

Βήμα 5: Με το μαρκαδόρο αναγράφονται οι όγκοι του μεθανίου, αιθενίου, αιθανίου και ασετυλίνης που θα εισαχθούν σε κάθε σφραγισμένο μπουκάλι. Πιο συγκεκριμένα, τα πέντε πρώτα μπουκάλια θα περιέχουν 0.1 mL, 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL από το μεθάνιο και 0.1 mL, 0.5 mL, 1 mL, 1.5 mL, 2 mL από τα υπόλοιπα αέρια ξεχωριστά, δηλαδή από το αιθένιο, το αιθάνιο και την ασετυλίνη. Στα υπόλοιπα πέντε μπουκάλια θα προστεθούν 8 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL μόνο από το μεθάνιο για την παρασκευή δεύτερης καμπύλης μεθανίου σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Βήμα 6: Ανοίγεται η πάνω βαλβίδα του αερίου μεθανίου και μετά ανοίγεται η κάτω βαλβίδα αργά, ωστόσο η ροή αερίου που παρατηρείται στο νερό να είναι χαμηλή. Αφήνεται για λίγα λεπτά να γεμίσει ο σωλήνας του μανομέτρου με το αέριο.

Βήμα 7: Με τη σύριγγα των 100 μL τρυπιέται ο σωλήνας και εξάγονται 0.1 mL αερίου δείγματος. Επιλέγεται το μπουκάλι 0.1, το οποίο κρατείται ανάποδα και με τη σύριγγα των 100 μL προστίθεται η ποσότητα του μεθανίου, προσέχοντας αν διαχέεται το

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

αέριο στο υγρό. Συνεχίζεται η ίδια διαδικασία (Βήμα 7) για τα υπόλοιπα μπουκάλια με τη χρήση της σύριγγας των 10 mL. Όταν εισαχθούν οι απαιτούμενες ποσότητες εντός των μπουκαλιών, τότε κλείνονται οι βαλβίδες του αερίου και η φιάλη μεταφέρεται στη θέση της.

Βήμα 8: Τα βήματα 4-7 ακολουθούνται για όλα τα υπόλοιπα αέρια (αιθένιο, αιθάνιο και ασετυλίνη). Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, τα πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν αποθηκεύονται υπό απουσία φωτός στον ανακινήτηρα.

Βήμα 9: Στο στόμιο του serum μπουκαλιού των 160 mL, το οποίο δεν έχει σφραγιστεί, τοποθετείται ένα μικρό χωνί και εισάγονται 100 mL απιονισμένου νερού, που έχουν ογκομετρηθεί με κύλινδρο. Το μπουκάλι αυτό είναι απαραίτητο για τον έλεγχο της θερμοκρασίας και αποθηκεύεται μαζί με τα πρότυπα διαλύματα.

Βήμα 10: Ενεργοποιείται ο αέριος χρωματογράφος και οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα, του φούρνου και του ανιχνευτή ρυθμίζονται στους 220°C, 50°C και 250°C, αντιστοίχως, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «methð.mth». Οι ροές των αερίων ρυθμίζονται ως εξής: He (14.4 psi), H⁺ (45 mL/min), Συνθετικός αέρας (450 mL/min).

Βήμα 11: Μετά από μια ώρα, θεωρείται ότι έχει επέλθει ισορροπία μεταξύ της υγρής και της αέριας φάσης. Στο ασφράγιστο serum μπουκάλι τοποθετείται ένα θερμόμετρο και καταγράφεται η θερμοκρασία, η οποία πρέπει να είναι 25°C.

Βήμα 12: Επιλέγεται το πρώτο πρότυπο διάλυμα και εξάγονται 50 μL δείγμα από την αέρια φάση με τη χρήση γυάλινης σύριγγας των 100 μL με βαλβίδα για τον εγκλωβισμό του δείγματος εντός σύριγγας. Το δείγμα εγχέεται στον εισαγωγέα του αερίου χρωματογράφου και μετρώνται τα εμβαδά (area) των παραγόμενων mV στα 1.1, 1.4, 1.6 και 2.3 λεπτά που είναι οι χρόνοι έκλουσης του μεθανίου, αιθανίου, αιθενίου και ασετυλίνης, αντιστοίχως. Η διαδικασία της εισπίεσης-μέτρησης πραγματοποιείται άλλες δύο φορές.

Βήμα 13: Επαναλαμβάνεται το βήμα 12 για όλα τα πρότυπα διαλύματα και υπολογίζονται οι μέσοι όροι των παραγόμενων mV για κάθε ποσότητα και κάθε ουσία. Με τη βοήθεια του Excel, οι μέσοι όροι των mV και οι γνωστές συγκεντρώσεις των ουσιών χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πρότυπων καμπυλών της μορφής $y=a*x$, που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.3.

Βήμα 14: Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, πλένονται όλα τα σκεύη με απιονισμένο νερό και απενεργοποιείται ο χρωματογράφος, με ιδιαίτερη προσοχή στα αέρια.

A.4.4. Πρότυπες καμπύλες για πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs)

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- Αναλώσιμα: 5 ποτήρια ζέσεως των 50 mL, 5 ογκομετρικές φιάλες των 25 mL, 1 ογκομετρική φιάλη των 500 mL, 5 δοχεία δειγματολήπτη των 2 mL με καπάκι, 1 γυάλινη σύριγγα των 10 μ L για αυτόματο δειγματολήπτη, ένας ανεξίτηλος μαρκαδόρος, διηθητικό χαρτί, 1 πιπέτα των 5 mL, 1 πιπέτα του 1 mL, tips για πιπέτες των 5 mL και 1 mL.
- Απιονισμένο νερό.
- Υγρά διαλύματα: HCl (2 N: 17 mL HCl 37% σε 83 mL απιονισμένου νερού)
- Χημικές ενώσεις (Sigma-Aldrich, 99.8%): Βουτυρικό οξύ (But), Οξικό οξύ (Ac), Ισοβουτυρικό οξύ (isoBut) και προπιονικό οξύ (Pr)
- Αέρια: He (Ήλιον; 99.999%), H⁺ (Υδρογόνο; 99.999%), Συνθετικός αέρας (N₂/O₂ 80%/20%).
- Οργανολογία: Αυτόματος δειγματολήπτης υγρών δειγμάτων προσαρμοσμένος σε Αέριο χρωματογράφο GC Autosystem XL της PerkinElmer με στήλη Nukol, απαγωγός και φούρνος 103°C.

Τα βήματα παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων και μέτρησης φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Η φιάλη 500 mL, οι 5 ογκομετρικές φιάλες των 25 mL και 5 ποτήρια ζέσεως των 50 mL πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στο φούρνο των 103 °C για 30 λεπτά και αφήνονται να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό (περίπου για 30 λεπτά). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετούνται οι χημικές ενώσεις (But, isoBut, Ac, Pr), ο ανεξίτηλος μαρκαδόρος, διηθητικό χαρτί, η πιπέτα των 5 mL, η πιπέτα του 1 mL και τα tips για πιπέτες των 5 mL και 1 mL.

Βήμα 2: Στη φιάλη των 500 mL παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιέχει 250 μ L από κάθε πτητικό λιπαρό οξύ με την πιπέτα του 1 mL.

Βήμα 3: Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται 5 αραιώσεις του διαλύματος που παρασκευάστηκε στο βήμα 2, στις ογκομετρικές φιάλες των 25 mL, ως ακολούθως: 1/25, 5/25, 10/25, 15/25, 20/25. Πριν την προσθήκη απιονισμένου νερού ως τη χαραγή των φιαλών, εισάγεται διάλυμα HCl 2N σε αναλογία 2% v/v (0.5 mL στα 25 mL με την πιπέτα του 1 mL), έτσι ώστε τα πτητικά λιπαρά οξέα να είναι στην αδιάστατη μορφή τους.

Βήμα 4: Με τον ανεξίτηλο μαρκαδόρο αναγράφεται η κάθε αραιώση σε ένα ποτήρι ζέσεως και το πρότυπο μεταφέρεται στο αντίστοιχο ποτήρι.

Βήμα 5: Ενεργοποιείται ο αέριος χρωματογράφος και οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα, του φούρνου και του ανιχνευτή ρυθμίζονται στους 220 °C, 90 °C και 220 °C, αντιστοίχως. Δημιουργείται μια σειρά 15 μετρήσεων, όπου ο δειγματολήπτης με τη σύριγγα των 10 μ L, παίρνει 0.5 μ L υγρού δείγματος από τις θέσεις 1 ως 5, κάνοντας τρεις επαναλήψεις. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «nukol.mth», ενώ οι ροές των αερίων ρυθμίζονται ως εξής: He (5.0 psi), H⁺ (45 mL/min), Συνθετικός αέρας (450 mL/min).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 6: Από το πρώτο πρότυπο διάλυμα εξάγονται 2 mL υγρού με την πιπέτα των 5 mL, τα οποία μεταφέρονται στο πρώτο δοχείο δειγματολήπτη με καπάκι και τοποθετούνται στη θέση 1. Συνεχίζεται η ίδια διαδικασία (Βήμα 6) για όλα πρότυπα διαλύματα μέχρι να συμπληρωθούν οι 5 θέσεις και ξεκινά η μέτρησή τους.

Βήμα 7: Τα εμβαδά (area) των παραγόμενων mV μετρώνται στα 2.2, 3.4, 3.8 και 5.3 λεπτά, που είναι οι χρόνοι έκλουσης του οξικού οξέος, προπιονικού οξέος, ισοβουτυρικού οξέος και βουτυρικού οξέος, αντιστοίχως, και υπολογίζονται οι μέσοι όροι των mV για κάθε ποσότητα και κάθε ουσία. Με τη βοήθεια του Excel, οι μέσοι όροι των mV και οι γνωστές συγκεντρώσεις των ουσιών χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των πρότυπων καμπυλών της μορφής $y=a*x$, που παρουσιάζονται στο Σχήμα 3.4.

Βήμα 8: Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, πλένονται όλα τα σκεύη με απιονισμένο νερό και απενεργοποιείται ο χρωματογράφος, με ιδιαίτερη προσοχή στα αέρια.

A.4.5. Πρότυπη καμπύλη για προπανόλη

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

- Αναλώσιμα: 5 ποτήρια ζέσεως των 50 mL, 5 ογκομετρικές φιάλες των 25 mL, 1 ογκομετρική φιάλη των 500 mL, 5 δοχεία δειγματολήπτη των 2 mL με καπάκι, 1 γυάλινη σύριγγα των 10 μ L για αυτόματο δειγματολήπτη, ένας ανεξίτηλος μαρκαδόρος, διηθητικό χαρτί, 1 πιπέτα των 5 mL, 1 πιπέτα του 1 mL, tips για πιπέτες των 5 mL και 1 mL.
- Απιονισμένο νερό.
- Υγρά διαλύματα: HCl (2 N: 17 mL HCl 37% σε 83 mL απιονισμένο νερό)
- Χημική ένωση (Sigma-Aldrich; 98%): 2-Προπανόλη (Prop)
- Αέρια: He (Ήλιον; 99.999%), H⁺ (Υδρογόνο; 99.999%), Συνθετικός αέρας (N₂/O₂ 80%/20%).
- Οργανολογία: Αυτόματος δειγματολήπτης υγρών δειγμάτων προσαρμοσμένος σε αέριο χρωματογράφο GC Autosystem XL της PerkinElmer με στήλη Nukol, απαγωγός και φούρνος 103°C.

Τα βήματα παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων και μέτρησης φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Η φιάλη 500 mL, οι 5 ογκομετρικές φιάλες των 25 mL και 5 ποτήρια ζέσεως των 50 mL πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στο φούρνο των 103 °C για 30 λεπτά και αφήνονται να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό (περίπου για 30 λεπτά). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετούνται η προπανόλη, ο ανεξίτηλος μαρκαδόρος, διηθητικό χαρτί, η πιπέτα των 5 mL, η πιπέτα του 1 mL και τα tips για πιπέτες των 5 mL και 1 mL.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 2: Στη φιάλη των 500 mL παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιέχει 150 μ L προπανόλη με την πιπέτα του 1 mL.

Βήμα 3: Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται 5 αραιώσεις του διαλύματος, που παρασκευάστηκε στο Βήμα 2 στις ογκομετρικές φιάλες των 25 mL, ως ακολούθως: 0.5/25, 1/25, 2/25, 3/25, 4.5/25. Πριν την προσθήκη απιονισμένου νερού ως τη χαραγή των φιαλών, εισάγεται διάλυμα HCl 2N σε αναλογία 2% v/v (0.5 mL στα 25 mL με την πιπέτα του 1 mL), έτσι ώστε η προπανόλη να παραμείνει στην αδιάστατη μορφή της.

Βήμα 4: Με τον ανεξίτηλο μαρκαδόρο αναγράφεται η κάθε αραιώση σε ένα ποτήρι ζέσεως και το πρότυπο μεταφέρεται στο αντίστοιχο ποτήρι.

Βήμα 5: Ενεργοποιείται ο αέριος χρωματογράφος και οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα, του φούρνου και του ανιχνευτή ρυθμίζονται στους 220°C, 40°C και 220°C, αντιστοίχως. Δημιουργείται μια σειρά 15 μετρήσεων, όπου ο δειγματολήπτης με τη σύριγγα των 10 μ L, παίρνει 0.5 μ L υγρού δείγματος από τις θέσεις 1 ως 5, κάνοντας τρεις επαναλήψεις. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «prop.mth», ενώ οι ροές των αερίων ρυθμίζονται ως εξής: He (5.0 psi), H⁺ (45 mL/min), Συνθετικός αέρας (450 mL/min).

Βήμα 6: Από το πρώτο πρότυπο διάλυμα εξάγονται 2 mL υγρού με την πιπέτα των 5 mL, τα οποία μεταφέρονται στο πρώτο δοχείο δειγματολήπτη με καπάκι και τοποθετείται στη θέση 1. Συνεχίζεται η ίδια διαδικασία (Βήμα 6) για όλα πρότυπα διαλύματα μέχρι να συμπληρωθούν οι 5 θέσεις και ξεκινά η μέτρησή τους.

Βήμα 7: Το εμβαδό (area) των παραγόμενων mV μετράται στα 0.7 λεπτά, που αντιστοιχεί στην προπανόλη και υπολογίζονται οι μέσοι όροι των mV για κάθε ποσότητα. Με τη βοήθεια του Excel, οι μέσοι όροι των mV και οι γνωστές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης της μορφής $y=a*x$, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4.

Βήμα 8: Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, πλένονται όλα τα σκεύη με απιονισμένο νερό και απενεργοποιείται ο χρωματογράφος, με ιδιαίτερη προσοχή στα αέρια.

A.4.6. Πρότυπη καμπύλη για βενζοϊκό οξύ

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

- Αναλώσιμα: 5 ποτήρια ζέσεως των 50 mL, 5 ογκομετρικές φιάλες των 25 mL, 1 ογκομετρική φιάλη των 100 mL, 5 δοχεία δειγματολήπτη των 2 mL με καπάκι, 1 γυάλινη σύριγγα των 10 μ L για αυτόματο δειγματολήπτη, ένας ανεξίτηλος μαρκαδόρος, διηθητικό χαρτί, 1 ύαλος, 1 πιπέτα του 1 mL, 1 πιπέτα των 100 μ L, tips για πιπέτες των 1 mL και 100 μ L.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- Απιονισμένο νερό.
- Υγρά διαλύματα: HCl (2 N: 17 mL HCl 37% σε 83 mL απιονισμένου νερού)
- Χημική ένωση (Sigma-Aldrich; 99.9%): Βενζοϊκό οξύ (Benz)
- Άερα: He (Ήλιον; 99.999%), H⁺ (Υδρογόνο; 99.999%), Συνθετικός αέρας (N₂/O₂ 80%/20%).
- Οργανολογία: Αυτόματος δειγματολήπτης υγρών δειγμάτων προσαρμοσμένος σε αέριο χρωματογράφο GC Autosystem XL της PerkinElmer με στήλη Nukol, αναλυτικός ζυγός ακριβείας, απαγωγός και φούρνος 103°C.

Τα βήματα παρασκευής των πρότυπων διαλυμάτων και μέτρησης φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Η φιάλη 100 mL, οι 5 ογκομετρικές φιάλες των 25 mL και 5 ποτήρια ζέσεως των 50 mL πλένονται διεξοδικά με απιονισμένο νερό, τοποθετούνται στο φούρνο των 103 °C για 30 λεπτά και αφήνονται να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό (περίπου για 30 λεπτά). Στον απαγωγό, επίσης, τοποθετούνται το γυάλινο χωνί, ο ανεξίτηλος μαρκαδόρος, διηθητικό χαρτί, η πιπέτα των 100 μL, η πιπέτα του 1 mL και τα tips για πιπέτες των 1 mL και 100 μL.

Βήμα 2: Στον αναλυτικό ζυγό ακριβείας, ζυγίζονται 0.05 gr βενζοϊκού οξέος με την ύαλο και τοποθετούνται στη φιάλη των 100 mL με τη βοήθεια του χωνιού. Έτσι, παρασκευάζεται ένα διάλυμα που περιέχει 500 mg/L βενζοϊκού οξέος.

Βήμα 3: Στην συνέχεια, πραγματοποιούνται 5 αραιώσεις του διαλύματος, που παρασκευάστηκε στο Βήμα 2, στις ογκομετρικές φιάλες των 25 mL, ως ακολούθως: 0.05/25, 0.1/25, 0.5/25, 1.5/25, 2.5/25. Πριν την προσθήκη απιονισμένου νερού ως τη χαραγή των φιαλών, εισάγεται διάλυμα HCl 2N σε αναλογία 2% v/v (0.5 mL στα 25 mL με την πιπέτα του 1 mL), έτσι ώστε το βενζοϊκό οξύ να παραμείνει στην αδιάστατη μορφή του.

Βήμα 4: Με τον ανεξίτηλο μαρκαδόρο αναγράφεται η κάθε αραιώση σε ένα ποτήρι ζέσεως και το πρότυπο μεταφέρεται στο αντίστοιχο ποτήρι.

Βήμα 5: Ενεργοποιείται ο αέριος χρωματογράφος και οι θερμοκρασίες του εισαγωγέα, του φούρνου και του ανιχνευτή ρυθμίζονται στους 220 °C, 160 °C και 220 °C, αντιστοίχως. Δημιουργείται μια σειρά 15 μετρήσεων, όπου ο δειγματολήπτης με τη σύριγγα των 10 μL, παίρνει 0.5 μL υγρού δείγματος από τις θέσεις 1 ως 5, κάνοντας τρεις επαναλήψεις. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «benz.mth», ενώ οι ροές των αερίων ρυθμίζονται ως εξής: He (5.0 psi), H⁺ (45 mL/min), Συνθετικός αέρας (450 mL/min).

Βήμα 6: Από το πρώτο πρότυπο διάλυμα εξάγονται 2 mL υγρού, τα οποία μεταφέρονται στο πρώτο δοχείο δειγματολήπτη με καπάκι και τοποθετείται στη θέση 1. Συνεχίζεται η ίδια διαδικασία (Βήμα 6) για όλα πρότυπα διαλύματα μέχρι να συμπληρωθούν οι 5 θέσεις και ξεκινά η μέτρησή τους.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 7: Το εμβαδό (area) των παραγόμενων mV μετράται στα 3.9 λεπτά, που αντιστοιχεί στο βενζοϊκό οξύ και υπολογίζονται οι μέσοι όροι των mV για κάθε ποσότητα. Με τη βοήθεια του Excel, οι μέσοι όροι των mV και οι γνωστές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης της μορφής $y=a*x$, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4.

Βήμα 8: Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία, πλένονται όλα τα σκεύη με απιονισμένο νερό και απενεργοποιείται ο χρωματογράφος, με ιδιαίτερη προσοχή στα αέρια.

A.5. Λοιπές μέθοδοι

Στην παρούσα Ενότητα περιγράφονται οι μέθοδοι TSS/VSS, πρωτεΐνης, θειικών ιόντων, σουλφιδίων, δισθενούς/τριθενούς σιδήρου και COD που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των ηλεκτρονίων που παράχθηκαν και καταναλώθηκαν στις μητρικές καλλιέργειες και τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας. Επίσης, περιγράφεται αναλυτικά η μέθοδος FISH που διεξήχθη σε δείγματα μητρικών καλλιιεργειών για τον προσδιορισμό των ομάδων που συνθέτουν τη βιοκοινότητα.

A.5.1. Μέθοδος ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών

Τα ολικά αιωρούμενα στερεά (Total Suspended Solids; TSS) και τα πτητικά αιωρούμενα στερεά (Volatile Suspended Solids; VSS) μετρήθηκαν στην αρχή και το τέλος των πειραμάτων, ενώ, περιοδικά, γινόταν η ανάλυση στις μητρικές καλλιέργειες. Ο στόχος ήταν ο προσδιορισμός της βιομάζας, εφόσον τα VSS θεωρείται ότι ισούνται με τη μάζα των μικροοργανισμών.

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Αναλώσιμα: Φίλτρα GF/C, ογκομετρικός κύλινδρος 100 mL, αλουμινόχαρτο, μολύβι και τσιμπίδα.
- Απιονισμένο νερό.
- Οργανολογία: Αναλυτικός ζυγός ακριβείας, φούρνος 103°C, φούρνος 550°C, συσκευή διήθησης με αντλία κενού, ξηραντήρας και χρονόμετρο.

Τα βήματα της ανάλυσης των TSS/VSS φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Φίλτρα GF/C περιτυλίγονται με αλουμινόχαρτο και εισάγονται στον φούρνο των 550 °C για 15 λεπτά. Μετά το πέρας του χρόνου, τα φίλτρα αποθηκεύονται στο φούρνο των 103°C.

Βήμα 2: Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων, το απαραίτητο πλήθος φίλτρων εισάγεται σε ξηραντήρα για 15 λεπτά, έως ότου φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου και περιτυλιγμένα με αλουμινόχαρτο, καθένα ξεχωριστά.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 3: Ένα φίλτρο μετριέται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και καταγράφεται το βάρος του. Με ένα μολύβι αναγράφεται ο κωδικός του δείγματος που θα διηθηθεί μέσω του φίλτρου στο αλουμινόχαρτο.

Βήμα 4: Το φίλτρο τοποθετείται στη συσκευή διήθησης με την αντλία κενού με τη βοήθεια τσιμπίδας. Το δείγμα αναμιγνύεται καλά και ογκομετρείται με τον κύλινδρο των 100 mL. Ενεργοποιείται η αντλία κενού και το δείγμα διηθείται μέσω του φίλτρου.

Βήμα 5: Όταν ολοκληρωθεί η διήθηση (περάσει όλος ο υγρός όγκος από τη συσκευή διήθησης), απενεργοποιείται η αντλία, αφαιρείται το φίλτρο από τη συσκευή με τη τσιμπίδα, τοποθετείται στο αντίστοιχο αλουμινόχαρτο και μεταφέρεται στο φούρνο των 103°C για μια ώρα. Έτσι, απομακρύνεται η υγρασία από το υπόλειμμα στο φίλτρο.

Βήμα 6: Τα βήματα 3 ως 5 συνεχίζονται και για τα υπόλοιπα δείγματα, ενώ κάθε φορά πλένονται τα σκεύη πριν τη χρήση.

Βήμα 7: Μετά το πέρας του χρόνου, όλα τα φίλτρα εισάγονται στον ξηραντήρα για 15 λεπτά και ύστερα μετριέται το βάρος τους στον ζυγό ακριβείας. Η αύξηση του βάρους των φίλτρων ως προς τον όγκο που διηθήθηκε εκπροσωπεί τα ολικά αιωρούμενα στερεά, όπως φαίνεται στην εξίσωση:

$$TSS \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{B\acute{\alpha}ρoς_{103^{\circ}C}(mg) - B\acute{\alpha}ρoς_{φίλτρου}(mg)}{V_{δeίγματος}(L)}$$

Βήμα 8: Στη συνέχεια, τα φίλτρα μεταφέρονται στον φούρνο των 550°C για 15 λεπτά. Όταν ολοκληρωθεί η καύση, τα φίλτρα τοποθετούνται στον ξηραντήρα για 15 λεπτά, έως ότου φτάσει σε θερμοκρασία δωματίου. Η μείωση του βάρους του φίλτρου προς τον όγκο του δείγματος αντιστοιχεί στα πτητικά αιωρούμενα στερεά που διέφυγαν προς την ατμόσφαιρα, όπως φαίνεται στην εξίσωση:

$$VSS \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{B\acute{\alpha}ρoς_{103^{\circ}C}(mg) - B\acute{\alpha}ρoς_{550^{\circ}C}(mg)}{V_{δeίγματος}(L)}$$

A.5.2. Μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεΐνης κατά Lowry

Πριν τη μέτρηση της πρωτεΐνης απαιτείται η διαλυτοποίησή της. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκε ένα παραλλαγμένο πρωτόκολλο των Chartrand et al. (2005), ενώ για τη μέτρησή της χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry et al. (1951). Η ανάλυση της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε στην αρχή και στο τέλος των πειραμάτων, ενώ περιοδικά γινόταν η ανάλυση στις μητρικές καλλιέργειες. Ο στόχος ήταν ο προσδιορισμός της βιομάζας, εφόσον η πρωτεΐνη αντιστοιχεί στο 50% w/w του κυττάρου.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Αναλώσιμα: tube 2 mL, tube 1.5 mL, 1 πιπέτα του 1 mL, tips για πιπέτα 1 mL, ποτήρι ζέσεως των 100 mL, περιέκτης 100 mL, αλουμινόχαρτο και ανεξίτηλος μαρκαδόρος.
- Αντιδραστήρια: Διάλυμα NaOH 0.1N, διάλυμα HCl 0.1N, διάλυμα NaOH και Na₂CO₃, διάλυμα CuSO₄, διάλυμα Na₂Tartate, αντιδραστήριο Folin 2N.
- Απιονισμένο νερό.
- Οργανολογία: Φυγόκεντρος, vortex, φασματοφωτόμετρο Hitachi/U2001, κυψελίδα 1 mL και χρονόμετρο.

Τα βήματα της διαλυτοποίησης (Βήματα 1-5) και της μέτρησης (Βήματα 6-10) φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Τοποθετείται 1 mL δείγματος σε tube 2 mL, καταγράφεται με ανεξίτηλο μαρκαδόρο ο κωδικός του δείγματος και το tube φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 10000 rpm.

Βήμα 2: Με την πιπέτα του 1 mL εξάγονται 0.5 mL από το υπερκείμενο και εισάγονται 0.4 mL NaOH 0.1N.

Βήμα 3: Τοποθετείται το tube στο vortex στις 1000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα και, μετά, το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Βήμα 4: Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, το tube φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 10000 rpm. Με μια πιπέτα του 1 mL εξάγονται 0.55 mL από το υπερκείμενο και τοποθετείται σε νέο tube 1.5 mL.

Βήμα 5: Εισάγονται 0.25 mL HCl 0.1N και το tube τοποθετείται στο vortex στις 1000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα. Το δείγμα παραμένει για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα εξάγονται 0.3 mL από το δείγμα.

Βήμα 6: Σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL παρασκευάζεται διάλυμα Lowry με διάλυμα NaOH και Na₂CO₃, διάλυμα CuSO₄, διάλυμα Na₂Tartate, σε αναλογία 100/1/1.

Βήμα 7: Προστίθενται 0.7 mL Lowry σε 0.5 mL δείγματος και το tube μένει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, υπό απουσία φωτός.

Βήμα 8: Στα τελευταία 5 λεπτά, παρασκευάζεται το διάλυμα Folin σε συγκέντρωση 2N και απιονισμένο νερό, με αναλογία 5/6 και εισάγεται μέσα σε περιέκτη 100 mL που είναι τυλιγμένος με αλουμινόχαρτο.

Βήμα 9: Μετά το πέρας των 20 λεπτών, εισάγεται 0.1 mL διάλυμα Folin στο δείγμα και το tube τοποθετείται στο vortex στις 1000 στροφές για 10 δευτερόλεπτα. Μένει σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά στο σκοτάδι και, μετά, το tube τοποθετείται στο vortex στις 1000 στροφές για 2 δευτερόλεπτα.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 10: Μεταφέρονται τα 1.3 mL του δείγματος με τη βοήθεια της πιπέτας σε κυψελίδα του 1 mL και μετριέται η απορρόφηση στα 750 nm.

Τα διαλύματα παρασκευάζονται ως εξής:

- Διάλυμα NaOH 0.1N: 0.2 gr NaOH σε 500 mL απιονισμένο νερό,
- Διάλυμα HCl 0.1N: 4.14 mL HCl 37% σε 500 mL απιονισμένο νερό,
- Διάλυμα NaOH και Na₂CO₃: 2.8598 gr NaOH & 14.3084 gr Na₂CO₃ σε 500 mL απιονισμένο νερό,
- Διάλυμα CuSO₄: 1.4232 gr CuSO₄ * 5H₂O σε 100 mL απιονισμένο νερό και
- Διάλυμα Na₂Tartate: 2.8530 gr Na₂Tartate * 2H₂O σε 100 mL απιονισμένο νερό.

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται μέσω καμπύλης βαθμονόμησης, η οποία παρασκευάστηκε με ορό βόειου αλβουμίνης (Bovine serum albumin; BSA). Οκτώ πρότυπα διαλύματα BSA παρασκευάστηκαν και 0.5 mL από αυτά μεταφέρονται σε tube 1.5 mL. Ύστερα ακολουθήθηκαν τα Βήματα 6 ως 10 για τη μέτρηση με τη διαδικασία Lowry.

Όμως, και η μέθοδος της διαλυτοποίησης ελέγχθηκε, χρησιμοποιώντας μίγμα από τις καλλιέργειες και ακολουθώντας τα Βήματα 1 ως 10. Ταυτόχρονα, με αυτή τη μέθοδο αναπτύχθηκαν και άλλες, αλλά το παραπονημένο πρωτόκολλο των Chartrand et al. (2005) έδειξε καλύτερη ανάκτηση. Η επιλογή και αξιολόγηση της μεθόδου έγινε μετά από σύγκριση με τα αποτελέσματα των VSS και την απορρόφηση του δείγματος στα 600 nm, όπου δίνει μια προσεγγιστική τιμή βιομάζας.

A.5.3. Μέθοδος θειικών ιόντων και σουλφιδίων

Για την εξέταση της επίδρασης θειικοαναγωγής στην αναγωγική αποχλωρίωση, πραγματοποιήθηκαν μητρικές καλλιέργειες και πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας με διάφορες συγκεντρώσεις θειικών ιόντων. Η απόδοση της θειικοαναγωγής προσδιορίζεται με τη μέτρηση της συγκέντρωσης των θειικών ιόντων που καταναλώθηκαν και των σουλφιδίων που παράχθηκαν, με τις μεθόδους που περιγράφονται παρακάτω.

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Αναλώσιμα: ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, serum μπουκάλι των 160 mL, Teflon πώμα βουτυλίου, αλουμινένιο καπάκι, ειδικό εξάρτημα σφράγισης, μικρός μαγνήτης, γυάλινο μικρό χωνί, 1 σύριγγα του 1 mL με βαλβίδα, 1 πιπέτα του 1 mL με tips, ψαλίδι, χαρτί και ανεξίτηλος μαρκαδόρος.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- Αντιδραστήρια: Φακελάκια με σκόνη Sulfaver 4 HACH, Σετ υγρών αντιδραστηρίων Sulfide 1 & 2 HACH.
- Απιονισμένο νερό.
- Χημική ένωση: $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich)
- Οργανολογία: Φασματοφωτόμετρο DR2800, κυψελίδα 10 mL με καπάκι και μαγνητική ανάδευση.

Τα βήματα της μέτρησης των θειικών ιόντων φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Δείγμα εξάγεται με τη σύριγγα του 1 mL με βαλβίδα από τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας και τις μητρικές καλλιέργειες.

Βήμα 2: Σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL πραγματοποιείται αραιώση, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι μεταξύ 2 με 70 mg/L, που είναι το εύρος μέτρησης των αντιδραστηρίων.

Βήμα 3: Ενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο DR2800 και ρυθμίζεται σε μήκος κύματος 450 nm.

Βήμα 4: Το αραιωμένο δείγμα μεταφέρεται σε κυψελίδα των 10 mL, τα τοιχώματά της καθαρίζονται με χαρτί και τοποθετείται εντός του φασματοφωτόμετρου, με σκοπό τον μηδενισμό του.

Βήμα 5: Με ψαλίδι ανοίγεται το φακελάκι των αντιδραστηρίων και αδειάζουμε το περιεχόμενό του εντός της κυψελίδας. Το δείγμα ανακινείται έως ότου διαλυτοποιείται πλήρως η σκόνη και αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Βήμα 6: Μετά από 5 λεπτά, καθαρίζονται τα τοιχώματα της κυψελίδας με χαρτί και πραγματοποιείται η μέτρηση της απορρόφησής του.

Βήμα 7: Όταν ολοκληρωθεί η μέτρηση, καθαρίζεται ο πάγκος εργασίας και τα σκεύη με απιονισμένο νερό.

Βήμα 8: Η τιμή της απορρόφησης εισάγεται στην εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης με τη μορφή $y = \alpha \cdot x$, όπου x : η τιμή της απορρόφησης και y : η συγκέντρωση των θειικών ιόντων του αραιωμένου δείγματος. Η τιμή y πολλαπλασιάζεται με την αραιώσή του και υπολογίζεται η συγκέντρωση των θειικών ιόντων στις μητρικές καλλιέργειες ή τα πειράματα.

Η μέτρηση των σουλφιδίων πραγματοποιείται με βάση τη μέθοδο 8131 της HACH, όπως φαίνεται παρακάτω:

Βήμα 1: Ογκομετρώνται 10 mL απιονισμένου νερού με τη φιάλη και μεταφέρονται εντός της κυψελίδας. Καθαρίζονται τα τοιχώματα της κυψελίδας με χαρτί.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 2: Ενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο DR2800 και ρυθμίζεται σε μήκος κύματος 665 nm. Στη συνέχεια γίνεται μηδενισμός του οργάνου με την κυψελίδα με το απιονισμένο νερό.

Βήμα 3: Υπολογίζεται ο όγκος του δείγματος που απαιτείται, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι μεταξύ 2 με 800 µg/L στην κυψελίδα των 10 mL, που είναι και το εύρος μέτρησης της μεθόδου. Ο ίδιος όγκος απιονισμένου νερού αφαιρείται από την κυψελίδα για να παραμείνουν τελικά 10 mL μετά την προσθήκη δείγματος.

Βήμα 4: Δείγμα εξάγεται, σύμφωνα με τους υπολογισμούς του Βήματος 3, με τη σύριγγα του 1 mL με βαλβίδα από τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας και τις μητρικές καλλιέργειες.

Βήμα 5: Το δείγμα τοποθετείται στην κυψελίδα διαχέοντάς το στο νερό και κλείνεται γρήγορα με το καπάκι, εφόσον τα σουλφίδια είναι πτητικά.

Βήμα 6: Προστίθενται 0.5 mL Sufslide 1 reagent και 0.5 mL Sufslide 2 reagent, με πιπέτα 1 mL και γρήγορα κλείνει το καπάκι, για να μην διαφύγει μάζα των σουλφιδίων από την αέρια φάση. Το υλικό ανακινείται καλά και μένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, όπου σταδιακά το χρώμα μετατρέπεται σε μπλε.

Βήμα 7: Μετά, καθαρίζονται τα τοιχώματα της κυψελίδας με χαρτί και γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης του αραιωμένου δείγματος. Με την ολοκλήρωση της μέτρησης απενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο και καθαρίζονται τα σκεύη.

Βήμα 8: Η τιμή της απορρόφησης εισάγεται στην εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης με τη μορφή $y = \alpha * x$, όπου x: η τιμή της απορρόφησης και y: η συγκέντρωση των σουλφιδίων του αραιωμένου δείγματος. Η τιμή y πολλαπλασιάζεται με την αραιώσή του και υπολογίζεται η συγκέντρωση της υγρής φάσης των σουλφιδίων στις μητρικές καλλιέργειες ή στα πειράματα. Η ονομαστική συγκέντρωση (ολική μάζα προς τον όγκο του υγρού) υπολογίζεται με βάση την εξίσωση:

$$C_{nominal} \left(\frac{mg}{L} \right) * V_{liquid}(L) = C_{liquid} \left(\frac{mg}{L} \right) * (V_{liquid}(L) + H_C * V_{headspace}(L))$$

Για την καμπύλη βαθμονόμησης των σουλφιδίων, ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

Βήμα 1: Κρύσταλλοι της χημικής ένωσης $Na_2S * 9H_2O$ πλένονται και σκουπίζονται καλά, με στόχο την αφαίρεση των οξειδωμένων μορφών του θείου πάνω στην επιφάνεια.

Βήμα 2: Ύστερα ζυγίζονται 0.0012 gr και τοποθετούνται σε serum μπουκάλι των 160 mL με 100 mL απιονισμένου νερού με τη βοήθεια χωνιού.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 3: Στο μπουκάλι προστίθεται ένας μικρός μαγνήτης και σφραγίζεται το στόμιο με πώμα και αλουμινένιο καπάκι, όπως στο Βήμα 5 του πρωτόκολλου συντήρησης μητρικών καλλιιεργειών.

Βήμα 4: Τοποθετείται στη μαγνητική ανάδευση και αφήνεται, έως ότου διαλυθεί η ουσία. Η ονομαστική συγκέντρωση του διαλύματος που παρασκευάστηκε ισούται με 12 mg/L, ενώ σύμφωνα με υπολογισμούς η υγρή φάση περιέχει 9.7 mg/L σουλφιδίων, εφόσον ο συντελεστής Henry έχει τιμή 0.403 ως αδιάστατο μέγεθος.

Βήμα 5: Προσθέτοντας 52 μ L, 104 μ L, 207 μ L, 414 μ L, 621 μ L, 828 μ L υγρής φάσης, στην κυβελίδα των 10 mL, πραγματοποιούνται 6 αραιώσεις των 50 μ g/L, 100 μ g/L, 200 μ g/L, 400 μ g/L, 600 μ g/L, 800 μ g/L, αντιστοίχως.

Ο λόγος της μοριακής συγκέντρωσης των σουλφιδίων που παράχθηκε προς τα moles των θειικών ιόντων που καταναλώθηκαν θα πρέπει να ισούται με 100%, εφόσον δεν παρατηρήθηκε η συσσώρευση τριοξειδίου του θείου και θειοθειικών στα πειράματα, με το αποδεκτό εύρος να κυμαίνεται μεταξύ 75-125 %.

A.5.4. Μέθοδος δισθενούς/τρισθενούς σιδήρου

Πειράματα διεξήχθησαν, που εξετάζουν την προσθήκη του σιδήρου ως δότη ή μεταφορέα ηλεκτρονίων. Η απόδοση της αναγωγής του σιδήρου προσδιορίζεται με τη μέτρηση της συγκέντρωσης του δισθενούς και του τρισθενούς σιδήρου και υπολογίζονται τα ηλεκτρόνια που παράχθηκαν/καταναλώθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Αναλώσιμα: 4 ογκομετρικές φιάλες των 50 mL, 1 μαγνήτης, ύαλος, γυάλινο μικρό χωνί, 1 πιπέτα των 5 mL με tips και ανεξίτηλος μαρκαδόρος.
- Αντιδραστήρια: Τεστ σιδήρου (II/III) σε έτοιμα φιαλίδια LCK320 HACH.
- Απιονισμένο νερό.
- Χημικές ενώσεις: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich; 99%), FeCl_2 (Sigma-Aldrich; 98%).
- Οργανολογία: Φασματοφωτόμετρο DR2800, αναλυτικός ζυγός ακριβείας και μαγνητική ανάδευση.

Τα βήματα της μέτρησης του δισθενούς/τρισθενούς σιδήρου φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Δείγμα εξάγεται από τα πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας και αραιώνεται κατάλληλα, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι εντός του εύρους μέτρησης (0.2 με 6 mg/L).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Βήμα 2: Ενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο DR2800 και 2 mL από το αραιωμένο δείγμα τοποθετείται στα έτοιμα φιαλίδια LCK 320 της HACH για τη μέτρηση του δισθενούς σιδήρου. Το δείγμα ανακινείται και αφήνεται για 5 λεπτά.

Βήμα 3: Μετά το πέρας του χρόνου, το φιαλίδιο τοποθετείται στο φασματοφωτόμετρο και αυτόματα ρυθμίζεται το πρόγραμμα που θα χρησιμοποιηθεί. Πραγματοποιείται η μέτρηση του δισθενούς σιδήρου στο αραιωμένο δείγμα, η οποία πολλαπλασιάζεται με τον συντελεστή αραιώσης.

Βήμα 4: Το καπάκι του φιαλιδίου αλλάζει, ανακινείται πολύ καλά και μένει σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Βήμα 5: Τοποθετείται ξανά στο φασματοφωτόμετρο, όπου αυτόματα μετρείται η τιμή του ολικού σιδήρου και πολλαπλασιάζεται με την αραιώση για τον υπολογισμό του σιδήρου στα πειράματα.

Βήμα 6: Όταν ολοκληρωθεί η μέτρηση, απενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο και καθαρίζονται τα σκεύη, ενώ υπολογίζεται η συγκέντρωση του τρισθενούς σιδήρου ως η διαφορά του ολικού σιδήρου μείον τον τρισθενή σίδηρο.

Ο έλεγχος της καμπύλης βαθμονόμησης του οργάνου πραγματοποιήθηκε παρασκευάζοντας διάλυμα δισθενούς και τρισθενούς σιδήρου. Πιο αναλυτικά, ζυγίστηκαν 0.006 gr $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και 0.0028 FeCl_2 στον αναλυτικό ζυγό ακριβείας, τα οποία μεταφέρθηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL. Προστέθηκε μαγνήτης και η φιάλη τοποθετήθηκε σε μαγνητική ανάδευση ως τη διάλυση των στερεών. Άρα, το διάλυμα περιείχε 25 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και 25 mg/L FeCl_2 , από το οποίο πραγματοποιήθηκαν 3 αραιώσεις σε ογκομετρικές φιάλες 1/50, 3/50 και 5/50 με στόχο τον υπολογισμό της απόκλισης της μετρούμενης από τη θεωρητική τιμή σε χαμηλή, μέτρια και υψηλή συγκέντρωση. Η καμπύλη ήταν αποδεκτή, εφόσον οι τρεις αποκλίσεις (διαφορά θεωρητικής από μετρούμενη προς τη θεωρητική τιμή) ήταν μικρότερες από 5%.

A.5.5. Μέθοδος χημικής απαίτησης οξυγόνου (COD)

Πειράματα με περίπλοκη μορφή οργανικού υλικού διεξήχθησαν, με στόχο την εξέταση του είδους δότη ηλεκτρονίων. Ο υπολογισμός των ηλεκτρονίων που παράχθηκε πραγματοποιήθηκε μέσω των τιμών της χημικής απαίτησης οξυγόνου (COD). Επομένως, το ολικό COD και το διαλυτό COD μετρήθηκαν στα πειράματα που προστέθηκε τυρόγαλο, υδροκινόνη και διαλυτό οργανικό υλικό (DOM).

Τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιούνταν ήταν τα εξής:

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

- Αναλώσιμα: 3 ογκομετρικές φιάλες των 50 mL, δειγματοληπτικά δοχεία, 1 πιπέτα των 5 mL με tips, μεμβράνες Whatman 0.45 μm και ανεξίτηλος μαρκαδόρος.
- Αντιδραστήρια: Τεστ COD σε έτοιμα φιαλίδια LCK114 και LCK314 HACH.
- Απιονισμένο νερό.
- Χημικές ενώσεις: Πρότυπο διάλυμα COD 1000 mgO₂/L HACH.
- Οργανολογία: Χωνευτής COD, φασματοφωτόμετρο DR2800 και συσκευή διήθησης με αντλία κενού.

Τα βήματα της μέτρησης του COD φαίνονται παρακάτω:

Βήμα 1: Δύο δείγματα εξάγονται από πείραμα ασυνεχούς τροφοδοσίας για τη μέτρηση του ολικού και διαλυτού COD. Το ένα δείγμα μεταφέρεται στη συσκευή διήθησης με μεμβράνη 0.45 μm και ενεργοποιείται η αντλία κενού. Το υλικό που διαπέρασε τη μεμβράνη τοποθετείται σε δειγματοληπτικό δοχείο.

Βήμα 2: Ανάλογα με την αναμενόμενη συγκέντρωση COD, 2 mL δείγματος προστίθενται στα LCK 314 ή στα LCK114 φιαλίδια, με εύρος μέτρησης 15-150 mg/L και 150-1000 mg/L, αντίστοιχα. Επομένως, υπάρχουν τρεις περιπτώσεις: α) αν αναμένονται χαμηλές συγκεντρώσεις, τότε χρησιμοποιείται το LCK 314 φιαλίδιο, ενώ β) αν αναμένονται υψηλές, το LCK114 και γ) αν είναι η τιμή μεγαλύτερη από 1000 mg/L, τότε πραγματοποιείται αραιώση και χρησιμοποιείται το LCK114 φιαλίδιο. Μόλις το δείγμα εισαχθεί, ανακατεύεται καλά το περιεχόμενο και καταγράφεται ο κωδικός του στα καπάκια των φιαλιδίων με ανεξίτηλο μαρκαδόρο.

Βήμα 3: Ο χωνευτής COD ενεργοποιείται και εισάγονται τα φιαλίδια. Τα δείγματα χωνεύονται για 2 ώρες στους 150°C.

Βήμα 4: Μετά το πέρας των 2 ωρών, ενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο και τοποθετείται το φιαλίδιο, όπου γίνεται αυτόματα η μέτρηση της συγκέντρωσης του COD.

Βήμα 5: Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της μέτρησης, απενεργοποιείται το φασματοφωτόμετρο και καθαρίζονται ο πάγκος εργασίας και τα σκεύη με απιονισμένο νερό. Σύμφωνα με τις αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν στο Βήμα 2, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις, ενώ θα πρέπει η τιμή του ολικού COD να είναι μεγαλύτερη από του διαλυτού COD.

A.5.6. Πρωτόκολλο ανάλυσης FISH

Στις μητρικές καλλιέργειες τέσσερα δείγματα λήφθηκαν από τον Μάρτιο του 2015 ως τον Απρίλιο του 2015 με στόχο τον προσδιορισμό της σύνθεσης της βιοκοινότητας.

Τα βήματα της ανάλυσης FISH παρουσιάζονται παρακάτω:

Βήμα 1: Παρασκευή Διαλύματος 4% w/v PFA/PBS

Κάτω από τον απαγωγό προστίθενται 4 gr παραφορμαλδεΐδης (PFA) σε 80 mL υπερκάρου νερού και θερμαίνονται στους 60°C για περίπου 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 3 σταγόνες 1M NaCl για να καθαρίσει και αφήνεται να κρυώσει. Μετά, προστίθενται 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (PBS) συγκέντρωσης 1 M (αραίωση 1/10 συγκεντρωμένου PBS 10M), μια μικρή ποσότητα 5M θειϊκού οξέος, έως ότου το pH φτάσει 7.2, καθώς και ο απαραίτητος όγκος υπερκάρου νερού, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C για λιγότερο από 24 ώρες ή στους -20 °C.

Βήμα 2: Σταθεροποίηση δειγμάτων

Συλλέγονται δυο δείγματα όγκου 0.4 mL για Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς και 0.6 mL για Gram θετικούς από κάθε καλλιέργεια και μεταφέρονται σε tube των 1.5 mL. Για την επίτευξη του βέλτιστου φθορισμού, η σταθεροποίηση των Gram αρνητικών μικροοργανισμών πραγματοποιείται με την προσθήκη 0.8 mL διαλύματος παραφορμαλδεΐδης και ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού άλατος (4% w/v PFA/PBS), ενώ των Gram θετικών με 0.6 mL καθαρής αιθανόλης (98%). Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4 °C για 4-16 ώρες. Στη συνέχεια, φυγοκεντρώνονται στις 10000 στροφές ανά λεπτό για 5-10 λεπτά και το υπερκείμενο αφαιρείται. Για την επαναδιάλυση των δειγμάτων προστίθενται 1.2 mL 1M PBS. Οι διαδικασίες της φυγοκέντρωσης, αφαίρεσης υπερκειμένου επαναλαμβάνονται και πραγματοποιείται επαναδιάλυση σε 1.2 mL μίγματος, αναλογίας 50%/50% v/v 1M PBS/αιθανόλης. Το δείγμα φυλάσσεται στους -20 °C έως 3 μήνες.

Βήμα 3: Τοποθέτηση σε πλακίδια

Το δείγμα αφήνεται να έρθει σε υγρή μορφή και αναταράσσεται για να επαναδιαλυθεί. 10 μL τοποθετούνται σε μια θέση του μικροσκοπικού πλακιδίου και απλώνονται με την άκρη της μικροπιπέτας σε όλη την επιφάνεια. Όταν συμπληρωθούν οι 12 θέσεις του πλακιδίου, τοποθετείται στον φούρνο στους 46°C, μέχρι να στεγνώσουν τα δείγματα.

Βήμα 4: Αφυδάτωση

Τα πλακίδια τοποθετούνται κάθετα σε ειδικό δοχείο, στο οποίο έχει προστεθεί ποσότητα διαλύματος αιθανόλης, συγκέντρωσης 50% v/v, ώστε η περιοχή των πλακιδίων με δείγμα να είναι πλήρως καλυμμένη, για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, τα πλακίδια μεταφέρονται διαδοχικά σε δεύτερο και τρίτο δοχείο με διαλύματα αιθανόλης, συγκέντρωσης 80% v/v και 98% v/v, για 3 λεπτά στο καθένα, και αφήνονται να στεγνώσουν.

Βήμα 5: Υβριδοποίηση

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Σε tube των 2 mL παρασκευάζεται το διάλυμα υβριδοποίησης υπό σκότος, προσθέτοντας 360 μL NaCl (5M), 40 μL Tris-HCl (1 M) και φορμαμίδιο, αναλόγως τον ιχνηλάτη που θα χρησιμοποιηθεί (Πίνακας A.1). Τέλος, στο καπάκι του tube, προστίθενται 2 μL SDS (10% v/v) για την αποφυγή καθίζησης.

Πίνακας A.1. Συγκεντρώσεις φορμαμιδίου στο διάλυμα υβριδοποίησης

Ιχνηλάτης	% v/v Φορμαμίδιο	Φορμαμίδιο (μL)	Υπερκάθαρο νερό (μL)
EUB338	35	700	900
ARCH915	35	700	900
MSMX860	45	900	700
ALF968	20	400	1200
BET42a	35	700	900
GAM42a	35	700	900
PAE997	0	-	1600
DELTA495a	35	700	900
DSBAC357	35	700	900
Clost I	30	600	1000
AW	30	600	1000
Dhe1259t	30	600	1000

Σε κάθε θέση του πλακιδίου, προστίθενται 8 μL διαλύματος υβριδοποίησης, 1 μL ιχνηλάτη και 1 μL 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). Στη συνέχεια, τα πλακάκια εισάγονται σε υγρό και σκοτεινό θάλαμο και αφήνονται για 2 ώρες στους 46°C.

Βήμα 6: Έκπλυση

Σε 50 mL tube corning προστίθενται 1000 mL Tris-HCl (1M), NaCl και EDTA, σύμφωνα με τη συγκέντρωση φορμαμιδίου που εισήχθη στο βήμα της υβριδοποίησης (Πίνακας A.2). Έπειτα υπερκάθαρο νερό μέχρι τα 50 mL. Τέλος, προστίθενται 50 μL SDS (10%).

Πίνακας Α.2. Συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και EDTA στο διάλυμα έκπλυσης

Ιχνηλάτης	% v/v Φορμαμίδιο	NaCl (mM)	5 M NaCl (μL)	EDTA (μL)
EUB338	35	80	800	500
ARCH915	35	80	800	500
MSMX860	45	40	400	500
ALF968	20	225	2250	500
BET42a	35	80	800	500
GAM42a	35	80	800	500
PAE997	0	900	9000	-
DELTA495a	35	80	800	500
DSBAC357	35	80	800	500
Clost I	30	112	1120	500
AW	30	112	1120	500
Dhe1259t	30	112	1120	500

Τα πλακίδια εκπλένονται μέσα σε σκοτεινό, θερμαινόμενο λουτρό για 20 λεπτά στους 48 °C. Ακολουθεί έκπλυση με υπερκάθαρο νερό και αφήνονται να στεγνώσουν σε σκοτεινό μέρος.

Βήμα 7: Αποθήκευση πλακιδίων

Προστίθενται 2-3 σταγόνες αντι-αποχρωστικής ουσίας (Citifluor), τα δείγματα καλύπτονται με καλυπτρίδες σε χαμηλό φωτισμό και φυλάσσονται στους -20 °C σε ειδικά δοχεία.

Βήμα 8: Παρατήρηση-Καταμέτρηση

Τα πλακίδια παρατηρούνται στο μικροσκόπιο υπό φθορισμό με το κατάλληλο φίλτρο (Cy3 ή TexasRed), το οποίο είναι συμβατό με τη φθοροφόρο ουσία του ιχνηλάτη, για τον εντοπισμό των συγκεκριμένων στοχευμένων μικροοργανισμών (target group) και μετά, με το φίλτρο DAPI, για την εύρεση του συνόλου των μικροοργανισμών. Για κάθε δείγμα, 20 περίπου ζεύγη φωτογραφιών (Cy3-DAPI ή TexasRed-DAPI) τραβήχτηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του ποσοστού γένους ή κλάσης που στοχεύουμε/σύνολο μικροοργανισμών (target group/DAPI) με τη χρήση του προγράμματος Image-Pro.

B. Υπολογισμός ηλεκτρονίων

Για την πραγματοποίηση της πλήρους αναγωγικής αποχλωρίωσης των χλωριωμένων υδρογονανθράκων απαιτείται κατάλληλος και επαρκής δότης ηλεκτρονίων. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι το υδρογόνο είναι ο τελικός δότης ηλεκτρονίων για τα βακτήρια της πλήρους αναγωγικής αποχλωρίωσης, ενώ το βουτυρικό οξύ και το οξικό οξύ μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα από βακτήρια μερικής αναγωγικής αποχλωρίωσης. Εκτός από την αναγωγική αποχλωρίωση, η

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

θεικοαναγωγή, η μεθανογένεση, η σιδηροαναγωγή και η ομοοξικογένεση απαιτούν δότη ηλεκτρονίων για την πραγματοποίησή τους, με αποτέλεσμα να είναι ανταγωνιστικές διαδικασίες. Στην παρακάτω Ενότητα περιγράφεται αναλυτικά ο τρόπος υπολογισμού του ισοζυγίου των ηλεκτρονίων.

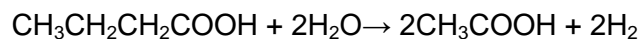
B.1. Υπολογισμοί παραγωγής ηλεκτρονίων

Ένας στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του είδους δότη ηλεκτρονίων στην αναγωγική αποχλωρίωση. Γι' αυτόν τον λόγο διάφοροι δότες ηλεκτρονίων έχουν προστεθεί στα πειράματα. Παρακάτω παρουσιάζεται αναλυτικά ο υπολογισμός των ηλεκτρονίων για κάθε περίπτωση είδους δότη.

B.1.1. Δότης ηλεκτρονίων: Βουτυρικό οξύ

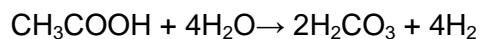
Στην πλειονότητα των πειραμάτων ως δότης ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε το βουτυρικό οξύ, ενώ αναλύσεις πτητικών λιπαρών οξέων (VFAs: βουτυρικό οξύ, ισοβουτυρικό οξύ, προπιονικό οξύ, οξικό οξύ) πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Όμως, οι μετρήσεις προπιονικού και ισοβουτυρικού οξέος ήταν σε χαμηλά επίπεδα, γι' αυτόν τον λόγο δεν λαμβάνονται υπόψη στους υπολογισμούς των παραγόμενων ηλεκτρονίων.

Η οξειδωση του βουτυρικού οξέος πραγματοποιείται ως εξής:



Επομένως, 1 mole βουτυρικού οξέος μετατρέπεται σε 2 moles οξικού οξέος και 2 moles υδρογόνου, άρα η διάσπαση του βουτυρικού οξέος παράγει 4 ηλεκτρόνια.

Η οξειδωση του οξικού οξέος πραγματοποιείται ως εξής:



Επομένως, 1 mole οξικού οξέος μετατρέπεται σε 2 moles ανθρακικού οξέος και 4 moles υδρογόνου, άρα η διάσπαση του βουτυρικού οξέος παράγει 8 ηλεκτρόνια.

Από την αρχική τιμή του βουτυρικού οξέος που εισήχθηκε στο κάθε πείραμα, εάν εξαχθεί η τιμή σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή, τότε υπολογίζεται το βουτυρικό οξύ που καταναλώθηκε μέχρι εκείνη τη στιγμή.

$$\Delta\text{But}(t) = \text{But}_m(0) - \text{But}_m(t)$$

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Όπου, $\Delta But(t)$: συγκέντρωση βουτυρικού οξέος που καταναλώθηκε ως τη χρονική στιγμή t ,

$But_m(0)$: συγκέντρωση βουτυρικού οξέος τη στιγμή έναρξης του πειράματος,

$But_m(t)$: συγκέντρωση βουτυρικού οξέος τη χρονική στιγμή t .

Το βουτυρικό οξύ που καταναλώθηκε θεωρείται ότι οξειδώθηκε σε 2 moles οξικού οξέος και 4 ηλεκτρόνια, όποτε υπολογίζεται η παραγωγή του οξικού οξέος από το βουτυρικό οξύ.

$$Ac_{But}(t) = 2 * \Delta But(t)$$

Όπου, $Ac_{But}(t)$: συγκέντρωση οξικού οξέος που παράχθηκε από τη διάσπαση του βουτυρικού οξέος μέχρι τη χρονική στιγμή t .

Για τον υπολογισμό της παραγωγής ηλεκτρονίων από το οξικό οξύ, πρέπει να εξαχθεί από την παραγωγή του οξικού οξέος και την αρχική τιμή, η μετρούμενη τιμή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Εάν η τιμή είναι θετική, τότε υπήρξε παραγωγή 8 ηλεκτρονίων από το οξικό οξύ, όμως, εάν η τιμή είναι αρνητική, τότε πραγματοποιήθηκε ομοοξικογένεση (βλ. Β.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων).

$$\Delta Ac(t) = Ac_m(0) + Ac_{But}(t) - Ac_m(t) > 0$$

Όπου, $\Delta Ac(t)$: συγκέντρωση παραγόμενου οξικού οξέος από το βουτυρικό οξύ

που στη συνέχεια καταναλώθηκε μέχρι τη χρονική στιγμή t ,

$Ac_m(0)$: συγκέντρωση οξικού οξέος την στιγμή έναρξης του πειράματος,

$Ac_m(t)$: συγκέντρωση οξικού οξέος τη χρονική στιγμή t .

Άρα από την οξείδωση του βουτυρικού και του οξικού οξέος παράγονται τα ηλεκτρόνια που θα χρησιμοποιηθούν για την αναγωγή των χλωριωμένων υδρογονθράκων, των θειικών ιόντων, τη μεθανογένεση και την ομοοξικογένεση.

$$\sum e_{But}^-(t) = 4 * \Delta But(t) + 8 * \Delta Ac(t)$$

Όπου, $\Sigma e_{But}^-(t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που παράχθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t .

Επίσης, μπορεί να υπολογιστεί και το ποσοστό του βουτυρικού και του οξικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν ως δότες ηλεκτρονίων.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

$$\%But = \frac{4 * \Delta But (t)}{\sum e_{κατανάλωση}^{-} (t)} * 100$$

$$\%Ac = \frac{8 * \Delta Ac (t)}{\sum e_{κατανάλωση}^{-} (t)} * 100$$

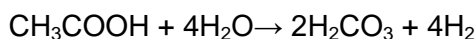
Όπου, $\sum e_{κατανάλωση}^{-} (t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t (βλ. Β.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων).

Με την πρόσθεση των παραπάνω ποσοστών μπορεί να υπολογιστεί η ανάκτηση ηλεκτρονίων του πειράματος.

$$\%Ανάκτηση ηλεκτρονίων = \%But + \%Ac$$

B.1.2. Δότης ηλεκτρονίων: Οξικό οξύ

Η οξειδωση του οξικού οξέος πραγματοποιείται ως εξής:



Επομένως, 1 mole οξικού οξέος μετατρέπεται σε 2 moles ανθρακικού οξέος και 4 moles υδρογόνου, άρα η διάσπαση του οξικού οξέος παράγει 8 ηλεκτρόνια.

Για τον υπολογισμό της παραγωγής ηλεκτρονίων από το οξικό οξύ, πρέπει να εξαχθεί από την αρχική τιμή, η μετρούμενη τιμή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$$\Delta Ac (t) = Ac_m(0) - Ac_m(t)$$

Όπου, $\Delta Ac (t)$: συγκέντρωση οξικού οξέος που έχει καταναλωθεί μέχρι τη χρονική στιγμή t,

$Ac_m(0)$: συγκέντρωση οξικού οξέος τη στιγμή έναρξης του πειράματος,

$Ac_m(t)$: συγκέντρωση οξικού οξέος τη χρονική στιγμή t.

Άρα, από την οξειδωση του οξικού οξέος παράγονται τα ηλεκτρόνια που θα χρησιμοποιηθούν για τις αναγωγικές διεργασίες.

$$\sum e_{Ac}^{-} (t) = 8 * \Delta Ac (t)$$

Όπου, $\sum e_{Ac}^{-} (t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που παράχθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t.

Ενώ η ανάκτηση ηλεκτρονίων, σε αυτήν την περίπτωση, υπολογίζεται ως εξής:

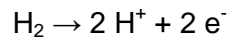
Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

$$\% \text{Ανάκτηση ηλεκτρονίων} = \frac{8 * \Delta Ac (t)}{\sum e^-_{\text{κατανάλωση}} (t)} * 100$$

Όπου, $\Sigma e^-_{\text{κατανάλωση}} (t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t (βλ. Β.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων).

B.1.3. Δότης ηλεκτρονίων: Υδρογόνο

Η αντίδραση του υδρογόνου πραγματοποιείται ως εξής:

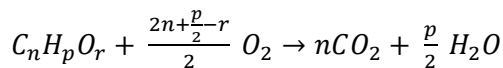


Επομένως, 1 mole υδρογόνου παράγει 2 ηλεκτρόνια.

Όμως, κατά τη διάρκεια της διδακτορικής έρευνας δεν υπήρξε η δυνατότητα μέτρησης του υδρογόνου. Ως εκ τούτου, δεν είναι δυνατός ο υπολογισμός των ηλεκτρονίων που παράχθηκαν από τον συγκεκριμένο δότη.

B.1.4. Δότης ηλεκτρονίων: Τυρόγαλο και Διαλυτή οργανική ύλη

Οι υπολογισμοί σε αυτήν την περίπτωση πραγματοποιήθηκαν μέσω των μετρήσεων COD. Αναλυτικότερα, η αντίδραση της οξειδωσης μιας οργανικής ουσίας, που υποδηλώνει την χημική απαίτηση του οξυγόνου, φαίνεται στην εξής αντίδραση:



Τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την οξειδωση μιας οργανικής ουσίας με μοριακό τύπο $C_n H_p O_r$ είναι $4n + p - 2r$. Επομένως, 1 mole O_2 ανάγεται από 2 moles H_2 , δηλαδή 32 gr O_2 ισοδυναμούν με 4 ηλεκτρόνια.

Για τον υπολογισμό της παραγωγής ηλεκτρονίων από μια οργανική ουσία, πρέπει να εξαχθεί από την αρχική τιμή, η μετρούμενη τιμή COD στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$$\Delta COD (t) = COD_m (0) - COD_m (t)$$

Όπου, $\Delta COD (t)$: συγκέντρωση COD που έχει καταναλωθεί μέχρι τη χρονική στιγμή t,

$COD_m (0)$: συγκέντρωση COD τη στιγμή έναρξης του πειράματος,

$COD_m (t)$: συγκέντρωση COD τη χρονική στιγμή t.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Άρα, από την οξειδωση μιας οργανικής ουσίας παράγονται τα ηλεκτρόνια που θα χρησιμοποιηθούν για τις αναγωγικές διεργασίες.

$$\sum e_{COD}^{-}(t) = 0.125 * \Delta COD(t)$$

Όπου, $\sum e_{COD}^{-}(t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που παράχθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t.

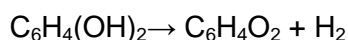
Ενώ η ανάκτηση ηλεκτρονίων, σε αυτή την περίπτωση, υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{Ανάκτηση ηλεκτρονίων} = \frac{0.125 * \Delta COD(t)}{\sum e_{\text{κατανάλωση}}^{-}(t)} * 100$$

Όπου, $\sum e_{\text{κατανάλωση}}^{-}(t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t (βλ. Β.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων).

B.1.5. Δότης ηλεκτρονίων: Υδροκινόνη

Η υδροκινόνη είναι μια δύσκολα βιοδιασπάσιμη ουσία, με αποτέλεσμα να μην θεωρείται ότι πραγματοποιείται η πλήρης οξειδωσή της στα πειράματα της παρούσης διατριβής. Η μερική οξειδωση της υδροκινόνης πραγματοποιείται ως εξής:

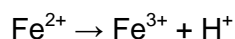


Επομένως, 1 mole υδροκινόνης μετατρέπεται σε 1 mole κινόνης και 1 mole υδρογόνου, άρα η οξειδωση της υδροκινόνης παράγει 2 ηλεκτρόνια.

Όμως, κατά τη διάρκεια της διδακτορικής έρευνας δεν υπήρξε η δυνατότητα μέτρησης της ουσίας. Ως εκ τούτου, δεν είναι δυνατός ο υπολογισμός των ηλεκτρονίων που παράχθηκαν από την υδροκινόνη.

B.1.6. Δότης ηλεκτρονίων: Δισθενής σίδηρος (Fe^{2+})

Η οξειδωση του δισθενούς σιδήρου πραγματοποιείται ως εξής:



Επομένως, 1 mole δισθενούς σιδήρου παράγει 1 mole τρισθενούς σιδήρου και 1 ηλεκτρόνιο.

Για τον υπολογισμό της παραγωγής ηλεκτρονίων από τον δισθενή σίδηρο, πρέπει να εξαχθεί από την αρχική τιμή, η μετρούμενη τιμή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$$\Delta Ferrous(t) = Ferrous_m(0) - Ferrous_m(t)$$

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Όπου, $\Delta Ferrous(t)$: ποσότητα δισθενούς σιδήρου που έχει καταναλωθεί μέχρι τη χρονική στιγμή t ,

$Ferrous_m(0)$: συγκέντρωση δισθενούς σιδήρου τη στιγμή έναρξης του πειράματος,

$Ferrous_m(t)$: συγκέντρωση δισθενούς σιδήρου τη χρονική στιγμή t .

Άρα, από την οξειδωση του δισθενούς σιδήρου παράγονται τα ηλεκτρόνια που θα χρησιμοποιηθούν για τις αναγωγικές διεργασίες.

$$\sum e_{Ferrous}^{-}(t) = \Delta Ferrous(t)$$

Όπου, $\Sigma e_{Ferrous}^{-}(t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που παράχθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t .

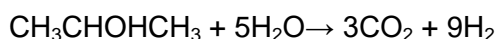
Ενώ η ανάκτηση ηλεκτρονίων, σε αυτή την περίπτωση, υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{Ανάκτηση ηλεκτρονίων} = \frac{\Delta Ferrous(t)}{\sum e_{κατανάλωση}^{-}(t)} * 100$$

Όπου, $\Sigma e_{κατανάλωση}^{-}(t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t (βλ. Β.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων).

B.1.7. Δότης ηλεκτρονίων: Προπανόλη

Στα πλαίσια της διδακτορικής έρευνας δεν ήταν δυνατή η μέτρηση των προϊόντων από μερική οξειδωση της προπανόλης. Για τον λόγο αυτό θεωρείται ότι η προπανόλη οξειδώθηκε πλήρως. Η αντίδραση, λοιπόν, πραγματοποιείται ως εξής:



Επομένως, 1 mole προπανόλης μετατρέπεται σε 3 moles διοξειδίου του άνθρακα και 9 moles υδρογόνου, άρα η πλήρης διάσπαση της προπανόλης παράγει 18 ηλεκτρόνια.

Για τον υπολογισμό της παραγωγής ηλεκτρονίων από την προπανόλη, πρέπει να εξαχθεί από την αρχική τιμή η μετρούμενη τιμή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$$\Delta Prop(t) = Prop_m(0) - Prop_m(t)$$

Όπου, $\Delta Prop(t)$: συγκέντρωση προπανόλης που έχει καταναλωθεί μέχρι τη χρονική στιγμή t ,

$Prop_m(0)$: συγκέντρωση προπανόλης τη στιγμή έναρξης του πειράματος,

$Prop_m(t)$: συγκέντρωση προπανόλης τη χρονική στιγμή t .

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Άρα, από την οξειδωση της προπανόλης παράγονται τα ηλεκτρόνια που θα χρησιμοποιηθούν για τις αναγωγικές διεργασίες.

$$\sum e_{Prop}^{-}(t) = 18 * \Delta Prop(t)$$

Όπου, $\Sigma e_{Prop}^{-}(t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που παράχθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t.

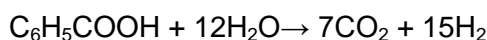
Ενώ η ανάκτηση ηλεκτρονίων, σε αυτή την περίπτωση, υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{Ανάκτηση ηλεκτρονίων} = \frac{18 * \Delta Prop(t)}{\Sigma e_{κατανάλωση}^{-}(t)} * 100$$

Όπου, $\Sigma e_{κατανάλωση}^{-}(t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t (βλ. Β.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων).

B.1.8. Δότης ηλεκτρονίων: Βενζοϊκό οξύ

Στα πλαίσια της διδακτορικής έρευνας δεν ήταν δυνατή η μέτρηση των προϊόντων από μερική οξειδωση του βενζοϊκού οξέος. Για τον λόγο αυτό θεωρείται ότι το βενζοϊκό οξύ οξειδώθηκε πλήρως. Η αντίδραση, λοιπόν, πραγματοποιείται ως εξής:



Επομένως, 1 mole βενζοϊκού οξέος μετατρέπεται σε 7 moles διοξειδίου του άνθρακα και 15 moles υδρογόνου, άρα η διάσπαση του βενζοϊκού οξέος παράγει 30 ηλεκτρόνια.

Για τον υπολογισμό της παραγωγής ηλεκτρονίων από το βενζοϊκό οξύ, πρέπει να εξαχθεί από την αρχική τιμή η μετρούμενη τιμή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$$\Delta Benz(t) = Benz_m(0) - Benz_m(t)$$

Όπου, $\Delta Benz(t)$: συγκέντρωση βενζοϊκού οξέος που έχει καταναλωθεί μέχρι τη χρονική στιγμή t,

$Benz_m(0)$: συγκέντρωση βενζοϊκού οξέος τη στιγμή έναρξης του πειράματος,

$Benz_m(t)$: συγκέντρωση βενζοϊκού οξέος τη χρονική στιγμή t.

Άρα, από την οξειδωση του βενζοϊκού οξέος παράγονται τα ηλεκτρόνια που θα χρησιμοποιηθούν για τις αναγωγικές διεργασίες.

$$\sum e_{Benz}^{-}(t) = 30 * \Delta Benz(t)$$

Όπου, $\Sigma e_{Benz}^{-}(t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που παράχθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Ενώ η ανάκτηση ηλεκτρονίων, σε αυτή την περίπτωση, υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{Ανάκτηση ηλεκτρονίων} = \frac{30 * \Delta Benz (t)}{\sum e_{\text{κατανάλωση}}^{-} (t)} * 100$$

Όπου, $\sum e_{\text{κατανάλωση}}^{-} (t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t (βλ. Β.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων).

B.1.9. Δότης ηλεκτρονίων: Συνδυασμός δοτών ηλεκτρονίων

Σε αρκετά πειράματα έγινε η εισπίεση δύο ή περισσότερων δοτών ηλεκτρονίων, ενώ τα ηλεκτρόνια που παράγονται υπολογίζονται, σύμφωνα με τους υπολογισμούς που περιγράφηκαν παραπάνω, για κάθε περίπτωση ξεχωριστά. Με διαφορά ότι το σύνολο των παραγόμενων ηλεκτρονίων εκτιμάται με την επόμενη εξίσωση:

$$\sum_n e_{\text{παραγωγή}}^{-} (t) = \sum e_1^{-} (t) + \dots + \sum e_n^{-} (t)$$

Όπου $\sum e_1^{-} (t)$: Σύνολο παραγόμενων ηλεκτρονίων από 1^ο δότη,

$\sum e_n^{-} (t)$: Σύνολο παραγόμενων ηλεκτρονίων από n δότη.

Ενώ η ανάκτηση υπολογίζεται με βάση τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\% \delta \delta \tau \eta_{s_1} = \frac{\sum e_1^{-} (t)}{\sum e_{\text{κατανάλωση}}^{-} (t)} * 100$$

$$\% \delta \delta \tau \eta_{s_n} = \frac{\sum e_n^{-} (t)}{\sum e_{\text{κατανάλωση}}^{-} (t)} * 100$$

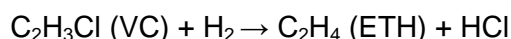
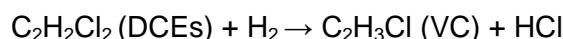
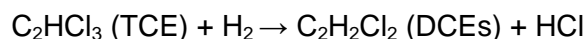
$$\% \text{Ανάκτηση ηλεκτρονίων} = \% \delta \delta \tau \eta_{s_1} + \dots + \% \delta \delta \tau \eta_{s_n}$$

B.2. Υπολογισμοί κατανάλωσης ηλεκτρονίων

Στα πειράματα που διεξήχθησαν, οι διαδικασίες που απαιτούν δότη ηλεκτρονίων θεωρούνται ότι είναι η αναγωγική αποχλωρίωση, η θειικοαναγωγή, η μεθανογένεση, η αναγωγή τρισθενούς σιδήρου και η ομοοξικογένεση, ενώ μαζί με τις αναλύσεις των πτητικών λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις χλωριωμένων υδρογονανθράκων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές.

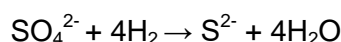
Τα στάδια της αναγωγής του τριχλωροαιθενίου (TCE) σε αιθένιο είναι τα εξής:

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



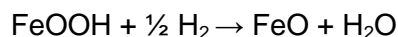
Άρα για την πραγματοποίηση κάθε σταδίου απαιτούνται 2 ηλεκτρόνια, ενώ για την πλήρη μετατροπή 1 mole τριχλωροαιθενίου σε 1 mole αιθένιου απαιτούνται 6 ηλεκτρόνια.

Η αντίδραση της πλήρους αναγωγής των θειικών ιόντων είναι η εξής:



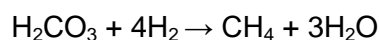
Επομένως, για την αναγωγή 1 mole θειικών ιόντων απαιτούνται 8 ηλεκτρόνια.

Η μετατροπή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:



Άρα για την παραγωγή 1 mole τρισθενούς σιδήρου απαιτείται 1 ηλεκτρόνιο.

Η παραγωγή μεθανίου φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:



Άρα για την παραγωγή 1 mole μεθανίου απαιτούνται 8 ηλεκτρόνια.

Τέλος, η ομοοξικογένεση φαίνεται παρακάτω:



Επομένως, για την παραγωγή 1 mole οξικού οξέος απαιτούνται 8 ηλεκτρόνια.

Τα ηλεκτρόνια που καταναλώθηκαν για την αποχλωρίωση υπολογίζονται από όλες τις παραγόμενες χλωριωμένες ενώσεις, που μετρήθηκαν σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$$\sum e_{\text{ΑΝΑΠ}}^- (t) = 2 * c\text{DCE}_m (t) + 4 * \text{VC}_m (t) + 6 * \text{ETH}_m (t)$$

Όπου, $\Sigma e_{\text{ΑΝΑΠ}}^- (t)$: ηλεκτρόνια που απαιτήθηκαν για την αναγωγική αποχλωρίωση (ΑΝΑΠ) μέχρι τη χρονική στιγμή t,

$c\text{DCE}_m (t)$: συγκέντρωση διχλωροαιθενίου (cis-DCE) τη χρονική στιγμή t,

$\text{VC}_m (t)$: συγκέντρωση βινυλοχλωριδίου (VC) τη χρονική στιγμή t,

$\text{ETH}_m (t)$: συγκέντρωση αιθένιου (ETH) τη χρονική στιγμή t.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Για τον υπολογισμό της κατανάλωσης ηλεκτρονίων από τα θειικά ιόντα, πρέπει να εξαχθεί από τη θεωρητική αρχική τιμή η μετρούμενη τιμή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$$\Delta sulfate (t) = Sulfate_{th} (0) - Sulfate_m (t)$$

Όπου, $\Delta sulfate (t)$: συγκέντρωση θειικών ιόντων που καταναλώθηκαν μέχρι τη χρονική στιγμή t,

$Sulfate_{th} (0)$: θεωρητική τιμή τη στιγμή έναρξης του πειράματος,

$Sulfate_m (t)$: μετρούμενη συγκέντρωση θειικών ιόντων τη χρονική στιγμή t.

Για τον υπολογισμό της κατανάλωσης ηλεκτρονίων από τον τρισθενή σίδηρο, πρέπει να εξαχθεί από τη θεωρητική αρχική τιμή η μετρούμενη τιμή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

$$\Delta Ferric (t) = Ferric_{th} (0) - Ferric_m (t)$$

Όπου, $\Delta Ferric (t)$: συγκέντρωση τρισθενούς σιδήρου που καταναλώθηκε μέχρι τη χρονική στιγμή t,

$Ferric_{th} (0)$: θεωρητική τιμή τη στιγμή έναρξης του πειράματος,

$Ferric_m (t)$: μετρούμενη συγκέντρωση τρισθενούς σιδήρου τη χρονική στιγμή t.

Άρα, όσον αφορά τα ηλεκτρόνια που απαιτήθηκαν για τη μεθανογένεση, τη σιδηροαναγωγή και τη θειικοαναγωγή, ο τρόπος υπολογισμού τους είναι ο εξής:

$$\sum e_{METH}^- (t) = 8 * METH_m (t)$$

$$\sum e_{Ferric}^- (t) = \Delta Ferric (t)$$

$$\sum e_{sulfate}^- (t) = \Delta Sulfate (t)$$

Όπου, $\sum e_{meth}^- (t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν για την παραγωγή μεθανίου μέχρι τη χρονική στιγμή t,

$METH_m (t)$: συγκέντρωση μεθανίου τη χρονική στιγμή t,

$\sum e_{Ferric}^- (t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν για την αναγωγή τρισθενούς σιδήρου μέχρι τη χρονική στιγμή t,

$\sum e_{sulfate}^- (t)$: σύνολο ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν για την αναγωγή θειικών ιόντων μέχρι τη χρονική στιγμή t.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Για την ομοοξικογένεση η κατανάλωση των ηλεκτρονίων υπολογίζεται από τη μετρούμενη τιμή στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή, χωρίς την παραγωγή του οξικού οξέος από το βουτυρικό οξύ. Εάν η τιμή είναι θετική, τότε πραγματοποιήθηκε ομοοξικογένεση, εάν η τιμή είναι αρνητική, τότε υπήρξε κατανάλωση οξικού οξέος (βλ. Υπολογισμοί παραγωγής ηλεκτρονίων).

$$\Delta Ac_{hyd}(t) = Ac_m(t) - Ac_{but}(t) - Ac_m(0) > 0$$

Όπου, $\Delta Ac_{hyd}(t)$: συγκέντρωση οξικού οξέος που παράχθηκε από το υδρογόνο μέχρι τη χρονική στιγμή t.

Ως αποτέλεσμα των παραπάνω αντιδράσεων, η απαίτηση ηλεκτρονίων συνολικά σε κάθε πείραμα μπορεί να υπολογιστεί ως εξής:

$$\sum e_{κατανάλωση}^{-}(t) = \sum e_{ANAP}^{-}(t) + \sum e_{METH}^{-}(t) + \sum e_{Ferric}^{-}(t) + \sum e_{Sulfate}^{-}(t) + 8 * \Delta Ac_{hyd}(t)$$

Επίσης, μπορεί να υπολογιστεί και το ποσοστό του κάθε αποδέκτη ηλεκτρονίου ως προς το σύνολο των ηλεκτρονίων που καταναλώθηκαν.

$$\%ANAP = \frac{\sum e_{ANAP}^{-}(t)}{\sum e_{κατανάλωση}^{-}(t)} * 100$$

$$\%Μεθανογένεση = \frac{\sum e_{METH}^{-}(t)}{\sum e_{κατανάλωση}^{-}(t)} * 100$$

$$\%Σιδηροαναγωγής = \frac{\sum e_{Ferric}^{-}(t)}{\sum e_{κατανάλωση}^{-}(t)} * 100$$

$$\%Θεικοαναγωγής = \frac{\sum e_{Sulfate}^{-}(t)}{\sum e_{κατανάλωση}^{-}(t)} * 100$$

$$\%Ομοοξικογένεση = \frac{8 * \Delta Ac_{hyd}(t)}{\sum e_{κατανάλωση}^{-}(t)} * 100$$

B.3. Βιομάζα ως δότης ή αποδέκτης ηλεκτρονίων

Για την εισαγωγή της βιομάζας στο ισοζύγιο ηλεκτρονίων θα πρέπει η διαφορά μεταξύ της αρχικής και της τελικής τιμής να είναι μεγαλύτερη από την επαναληψιμότητα των μεθόδων. Πιο συγκεκριμένα, αν η διαφορά της αρχικής τιμής μείον την τελική τιμή ως προς την αρχική τιμή ήταν μικρότερη από 16.1% για τα πτητικά στερεά και μεγαλύτερη από 11.3% για την πρωτεΐνη, τότε δεν θεωρείται ότι υπήρξε ουσιαστική διαφορά, και η βιομάζα δεν λαμβάνεται υπόψη στους υπολογισμούς των ηλεκτρονίων.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Αν η διαφορά είναι μεγαλύτερη, τότε υπολογίζονται τα ηλεκτρόνια που παράχθηκαν/καταναλώθηκαν ως εξής:

- Για τα VSS: Θεωρείται ότι η βιομάζα έχει μοριακό τύπο $C_5H_7O_2N$ με βάρος (MB) 113 gr/mole, οπότε η διαφορά της αρχικής τιμής με την τελική τιμή προς το MB θα ισούται με τη μάζα σε moles. Επίσης, τα ηλεκτρόνια που παράγονται με την οξείδωση ή καταναλώνονται με την αναγωγή του χημικού τύπου $C_5H_7O_2N$ είναι 20 e^- /mole. Οπότε, η εξίσωση είναι της μορφής:

$$\sum e_{VSS}^- = \frac{VSS_{in} \left(\frac{gr}{L}\right) - VSS_{out} \left(\frac{gr}{L}\right)}{MB (gr/mole)} * 20 \left(\frac{e^-}{mole}\right)$$

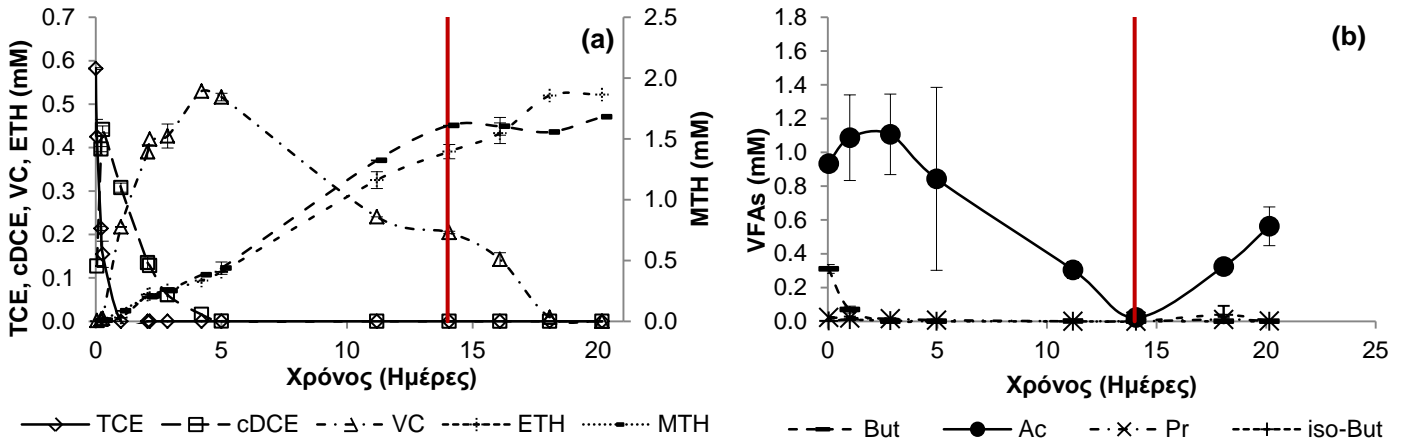
- Για την πρωτεΐνη: Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη καταλαμβάνει το 50% w/w της βιομάζας. Οπότε, σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση, θα ισχύει:

$$\sum e_{protein}^- = \frac{protein_{in} \left(\frac{gr}{L}\right) - protein_{out} \left(\frac{gr}{L}\right)}{0.5 * MB (gr/mole)} * 20 \left(\frac{e^-}{mole}\right)$$

Σύμφωνα με τα παραπάνω, υπολογίζονται τα ηλεκτρόνια που παράχθηκαν (αν η τιμή είναι θετική) ή καταναλώθηκαν (αν η τιμή είναι αρνητική) από τη βιομάζα. Οι μετρήσεις έχουν ήδη αξιολογηθεί, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που αναλύθηκε στην Ενότητα 3.4, άρα δεν αναμένεται μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο τιμών.

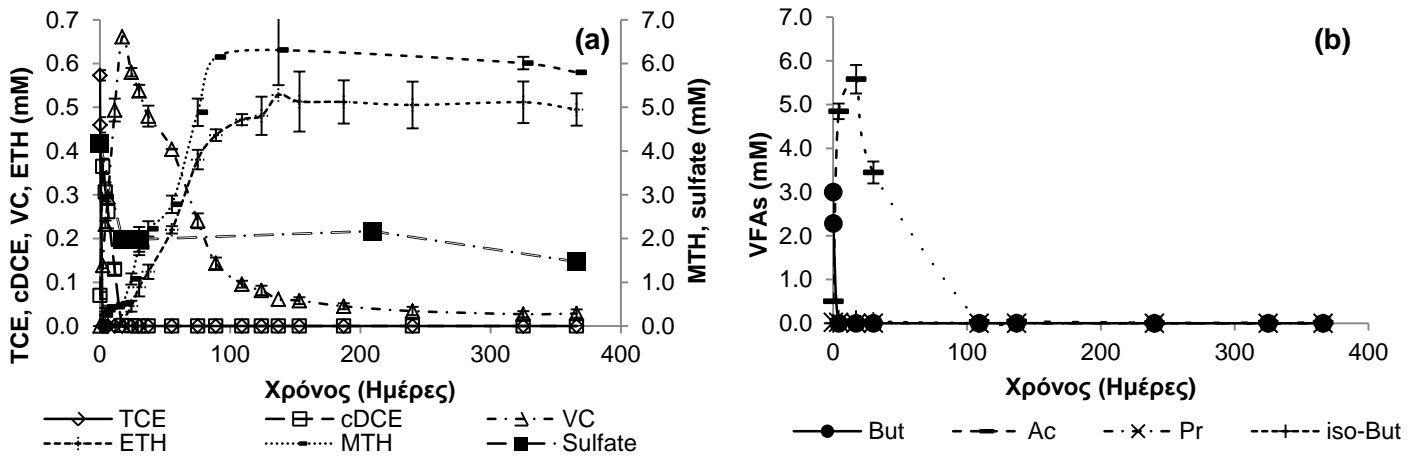
Γ. Αποτελέσματα σχετικών πειραμάτων

Γ.1. Πείραμα προσθήκης υδρογόνου στις 14 ημέρες λειτουργίας



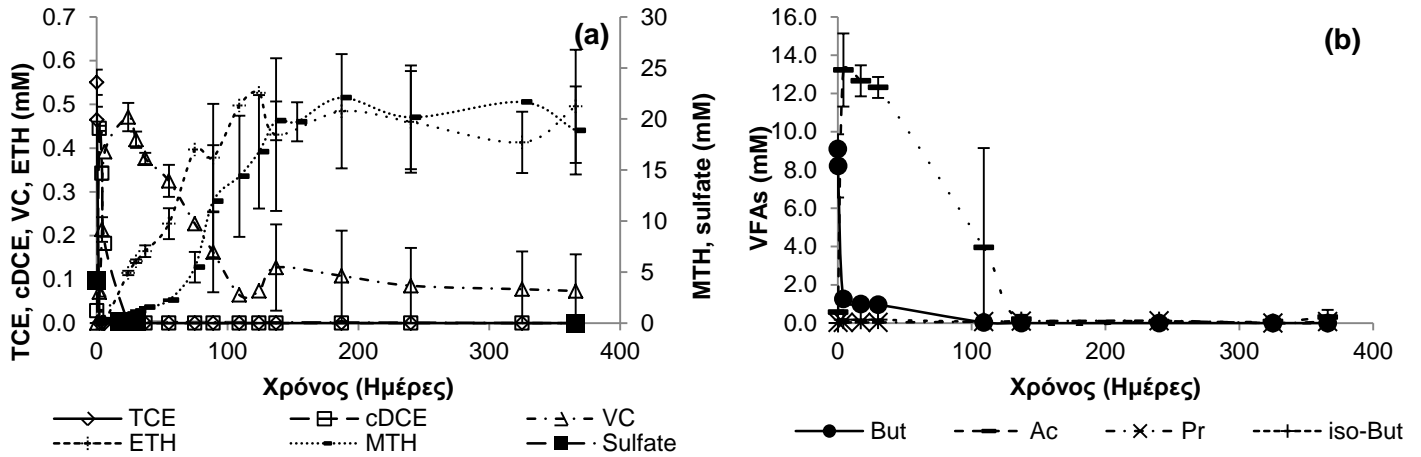
Σχήμα Γ.1. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα N14DHyd (0.3 mM But και 3.0 mM Hyd στις 14 ημέρες λειτουργίας).

Γ.2. Πείραμα με 400 mg/L θειικών ιόντων σε μη-εγκλιματισμένες καλλιέργειες



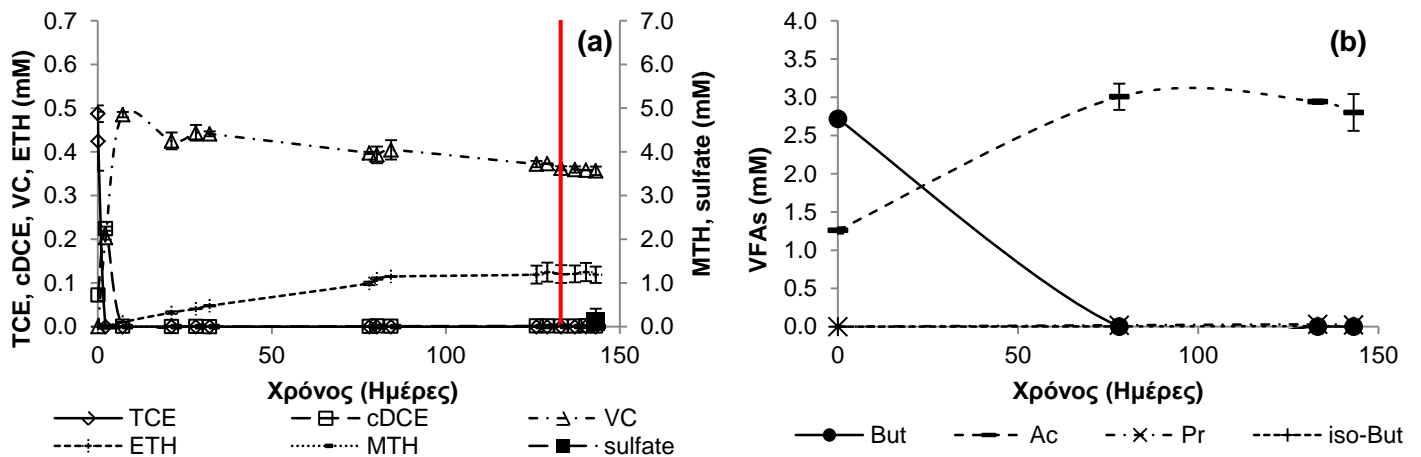
Σχήμα Γ.2. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NMEDMS (4.16 mM SO_4^{2-} & 3.0 mM But στις N καλλιέργειες).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



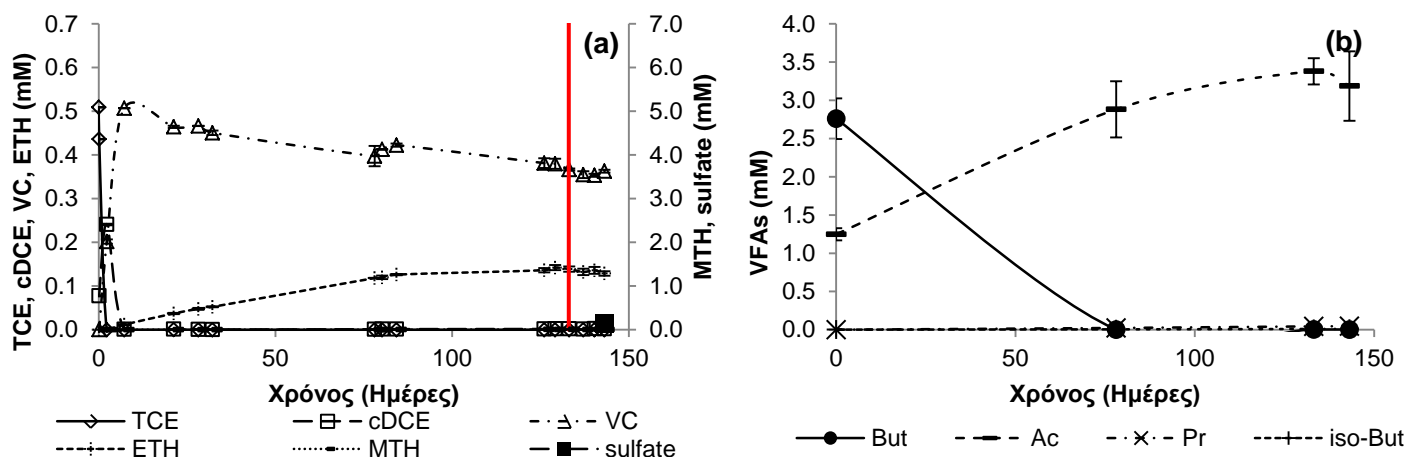
Σχήμα Γ.3. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα NHEDMS (4.16 mM SO_4^{2-} & 9.1 mM But στις N καλλιέργειες).

Γ.3. Πείραμα προσθήκης θρεπτικών ιόντων σε πειράματα μακράς διάρκειας

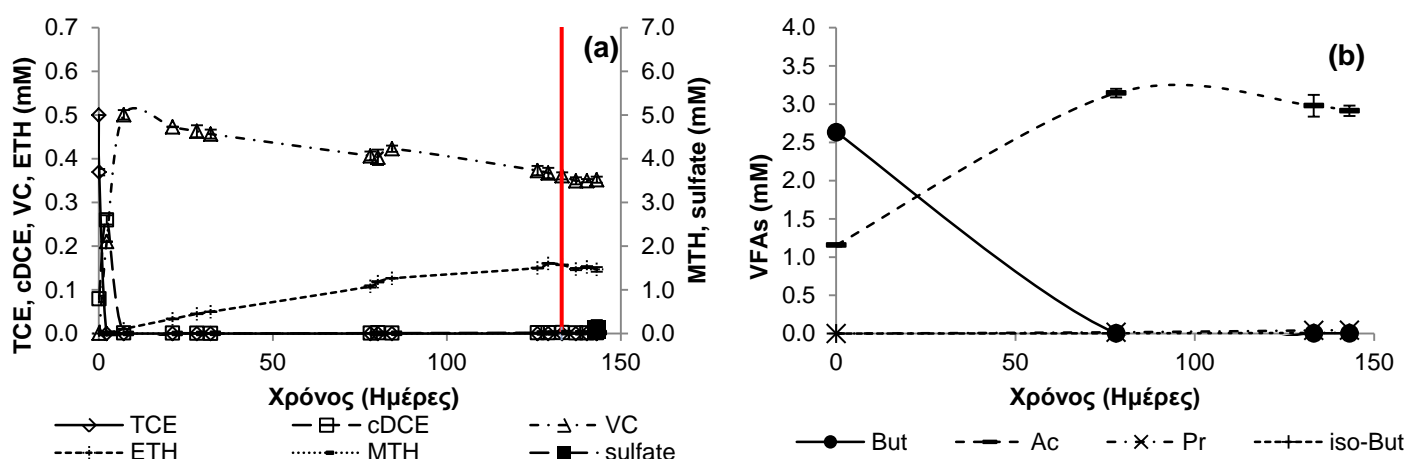


Σχήμα Γ.4. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MMEDR (4.16 mM SO_4^{2-} & 3 mM But, όπου προστέθηκε 1 mL RAMM την 133^η ημέρα).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

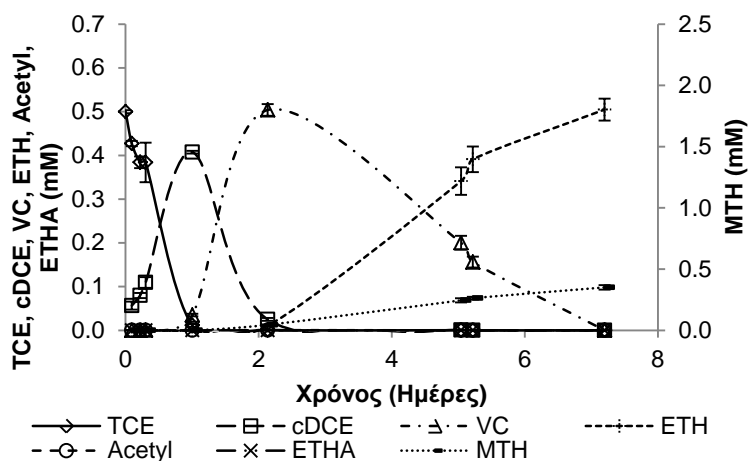


Σχήμα Γ.5. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MMEDST (4.16 mM SO_4^{2-} & 3 mM But, όπου προστέθηκαν 15 μL διαλύματος σεληνίου-βολφραμίου την 133^η ημέρα).

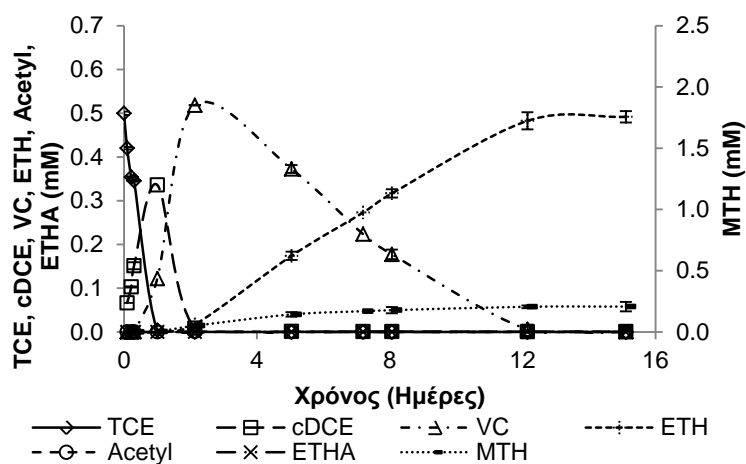


Σχήμα Γ.6. Συγκέντρωση (a) χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου, μεθανίου και θειικών ιόντων, (b) πτητικών λιπαρών οξέων στο πείραμα MMEDVit (4.16 mM SO_4^{2-} & 3 mM But, όπου προστέθηκε 150 μL διαλύματος βιταμινών την 133^η ημέρα).

Γ.4. Πείραμα με την προσθήκη τυρόγαλου



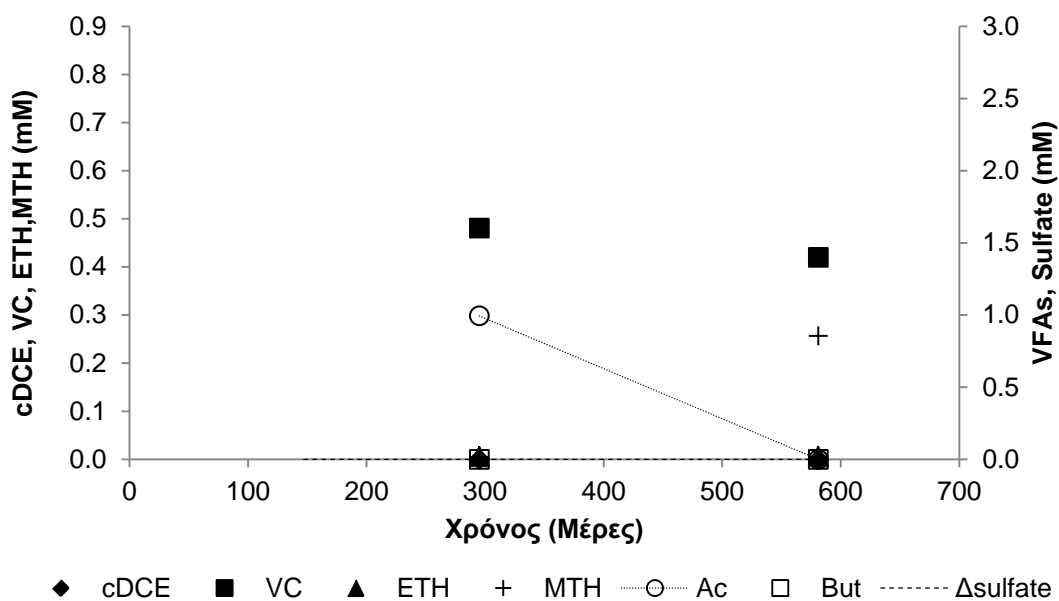
Σχήμα Γ.7. Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NMCW (96 mg/L COD τυρόγαλου από τυροκομείο στην Αρκαδία).



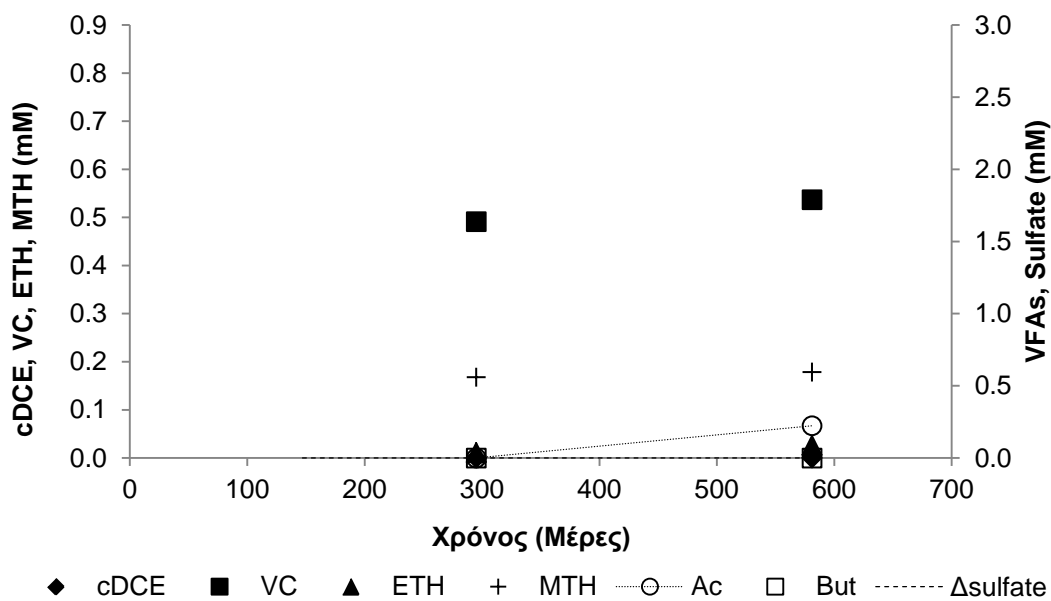
Σχήμα Γ.8. Συγκέντρωση χλωριωμένων αιθενίων, αιθενίου και μεθανίου στο πείραμα NHCW (480 mg/L COD τυρόγαλου από τυροκομείο στην Αρκαδία).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Γ.5. Αποτελέσματα L, MMB και H μητρικών καλλιεργειών

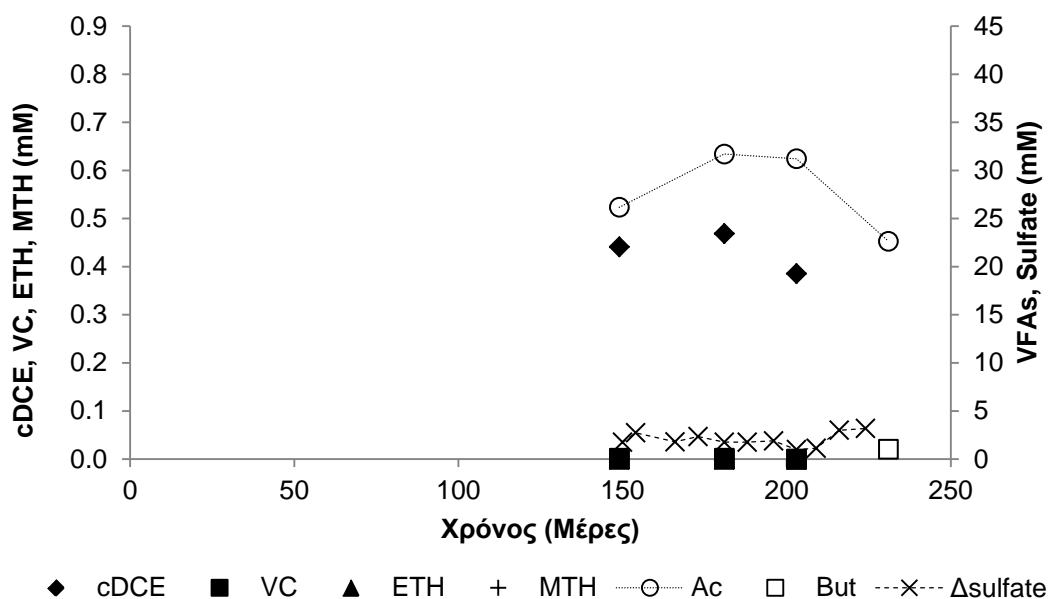


Σχήμα Γ.9. Επίδοση καλλιέργειας L1.

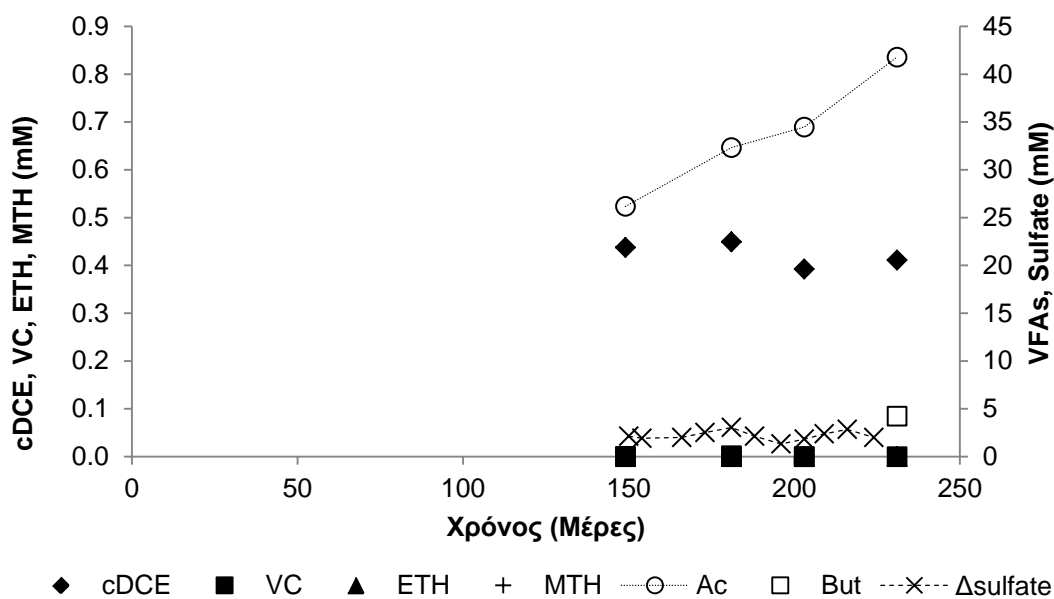


Σχήμα Γ.10. Επίδοση καλλιέργειας L2.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

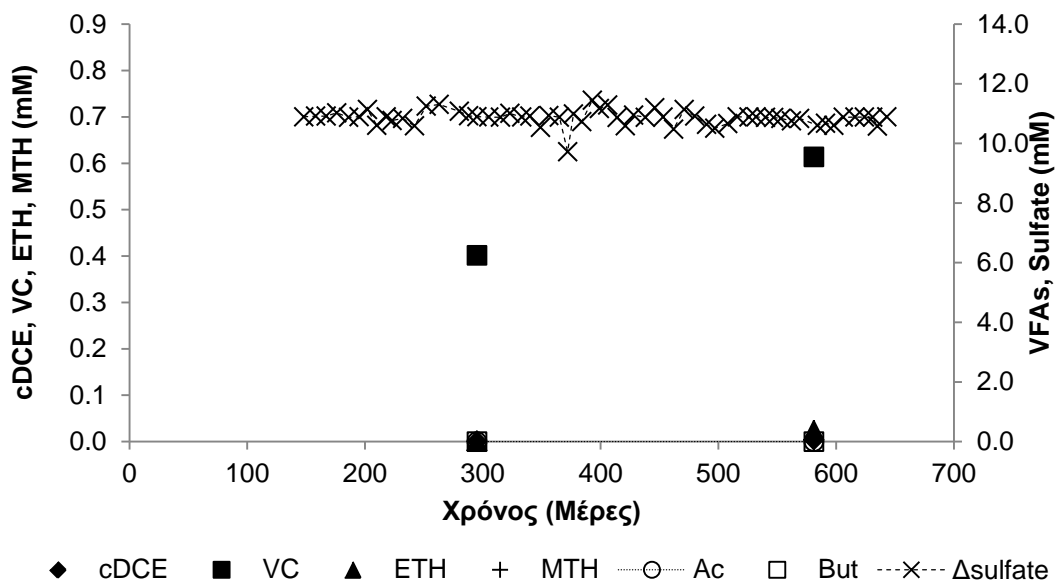


Σχήμα Γ.11. Επίδοση καλλιέργειας MMB1.

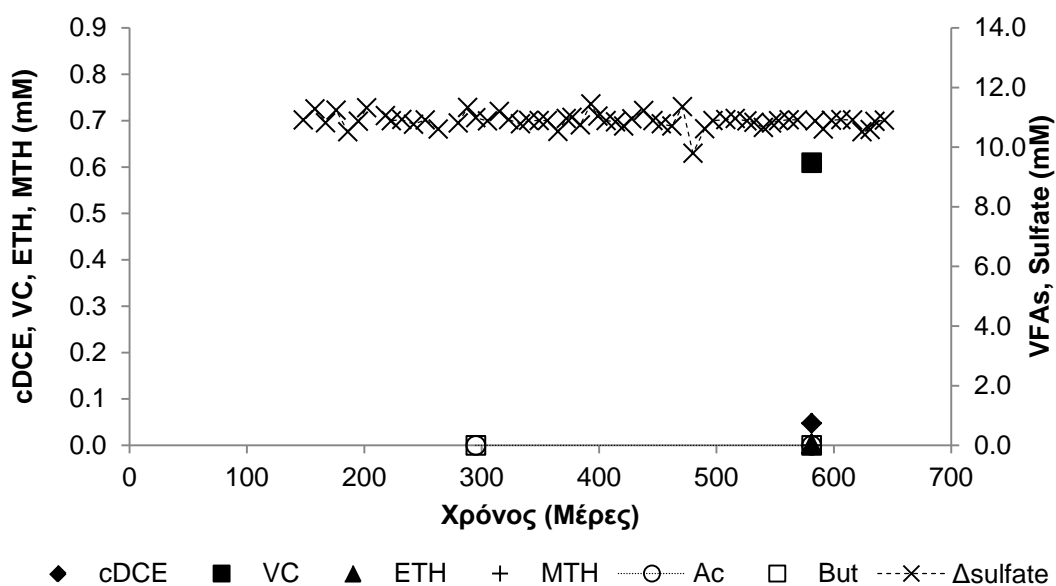


Σχήμα Γ.12. Επίδοση καλλιέργειας MMB2.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπογείων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Σχήμα Γ.13. Επίδοση καλλιέργειας H1.



Σχήμα Γ.14. Επίδοση καλλιέργειας H2.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Δ. Φωτογραφικό υλικό

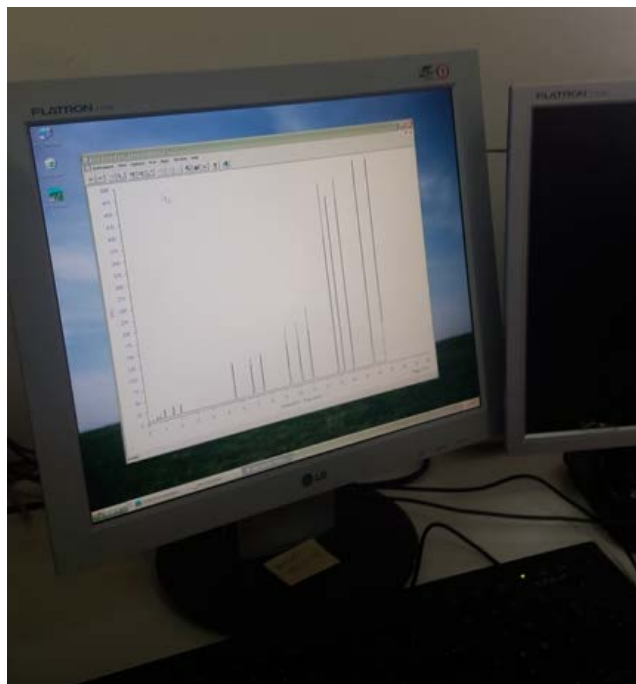


Φωτογραφία Δ1. Πειράματα ασυνεχούς τροφοδοσίας (batch).



Φωτογραφία Δ2. Αέριος χρωματογράφος με αυτόματο δειγματολήπτη (Perkin Elmer Autosystem XLGC/FID).

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Φωτογραφία Δ3. Παράσταση χρωματογραφήματος.



Φωτογραφία Δ4. Αλλαγή στήλης στον αέριο χρωματογράφο.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Φωτογραφία Δ5. Μέτρηση ροής αερίων με ροόμετρο Perkin Elmer στον ανιχνευτή FID.



Φωτογραφία Δ6. Σφράγιση μπουκαλιών με πώμα βουτυλίου και αλουμινένιο καπάκι.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

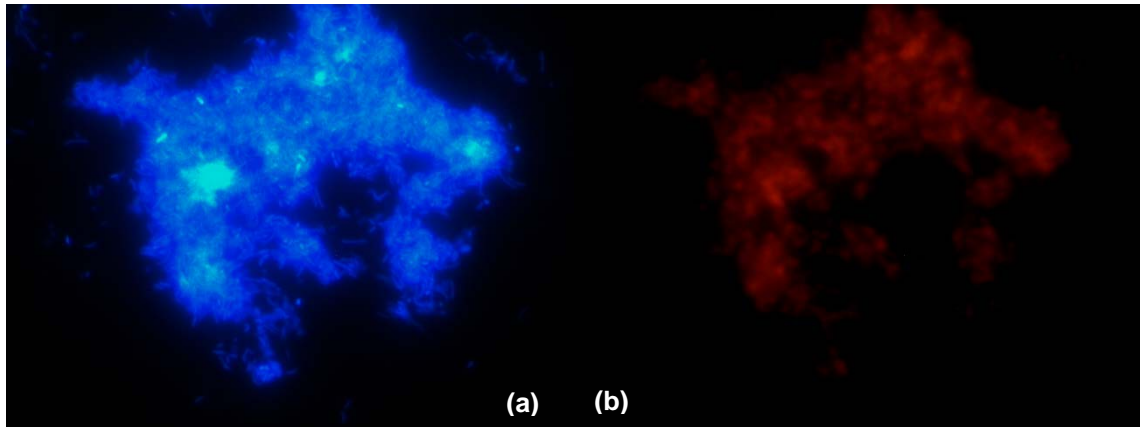


Φωτογραφία Δ7. Πρότυπα διαλύματα με μέτρηση θερμοκρασίας.

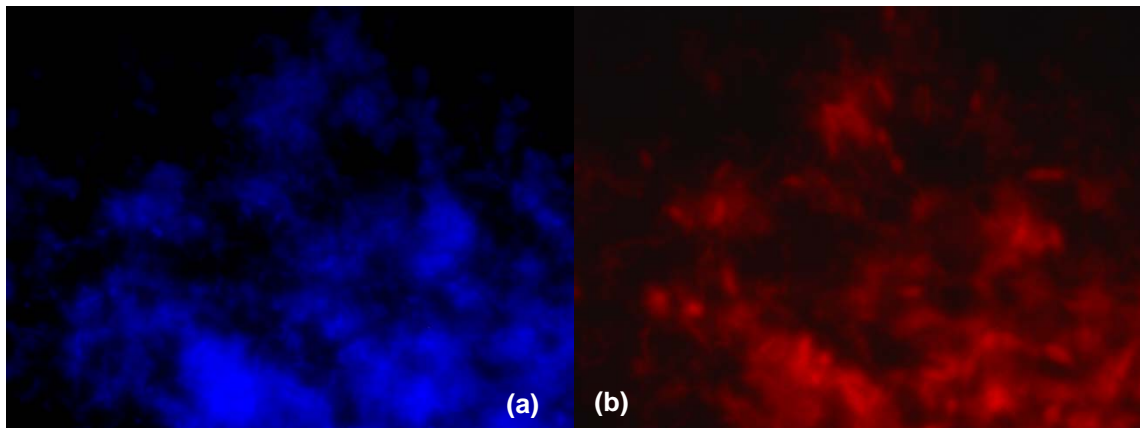


Φωτογραφία Δ8. Στάδιο υβριδοποίησης για τη μέθοδο FISH.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες



Φωτογραφία Δ9. (a) Σύνολο μικροοργανισμών και (b) *Dehalococcoides* spp. στις μητρικές καλλιέργειες.



Φωτογραφία Δ10. (a) Σύνολο μικροοργανισμών και (b) η επικράτεια bacteria στις μητρικές καλλιέργειες.

Ε. Επανάληψη πινάκων με πειράματα διδακτορικής διατριβής

Πίνακας Ε.1. Επανάληψη πίνακα 4.1. Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης των θειικών ιόντων.

Όνομα αντιδραστήρα	Μέσο (Μέρα καλλιέργειας)	Δότης ηλεκτρονίων ^{a,b}			SO ₄ ²⁻			TCE			Μέρες λειτουργίας
		mM	mg/L	meq/L	mM	mg/L	meq/L	mM	mg/L	meq/L	
Α. Μητρικές καλλιέργειες											
N	(εβδομαδιαία τροφοδοσία) ^c	0.3 But	26.4 But	1.2 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	~2000
QL	(εβδομαδιαία τροφοδοσία) ^c	0.3 But	26.4 But	1.2 But	0.7	70	5.6	0.5	65.7	3.0	~400
QM	(εβδομαδιαία τροφοδοσία) ^c	0.3 But	26.4 But	1.2 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	~1000
M	(εβδομαδιαία τροφοδοσία) ^c	0.3 But	26.4 But	1.2 But	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	~2000
Β. Επίδραση μηδενικής συγκέντρωσης θειικών ιόντων											
NLED	N1, 2 (982)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	184
NQMED	N1, 2 (1283)	2.2 But	195 But	8.8 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	9
NMED	N1, 2 (912 & 1283)	3.0 But	264 But	12.0 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	5 & 9
NHED	N1 & N2 (912)	9.1 But	800 But	36.3 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	6
Γ. Επίδραση 70 mg/L θειικών ιόντων											
QLLED	QL1, 2 (374)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	0.7	70	5.6	0.5	65.7	3.0	149
QLQMED	QL1, 2 (374)	2.2 But	195 But	8.8 But	0.7	70	5.6	0.5	65.7	3.0	83
Δ. Επίδραση 150 mg/L θειικών ιόντων											
QMLED	QM1, 2 (236)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	181
QMQLLED	QM1, 2 (236)	0.9 But	81.1 But	3.7 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	181
QMMED	QM1, 2 (246)	3.0 But	264 But	12.0 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	171
QMLED	QM1, 2 (246)	9.1 But	800 But	36.3 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	257
Ε. Επίδραση 400 mg/L θειικών ιόντων											
MMED	M1, 2 (556 & 926)	3.0 But	264 But	12.0 But	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	166
MLED	M1, 2 (556 & 926)	9.1 But	800 But	36.3 But	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	166
ΣΤ. Επίδραση συνεχούς τροφοδοσίας 400 mg/L θειικών ιόντων											

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

CMQLED	M1, 2 (1356 & 1728)	0.3 But + όσο καταναλώθηκε κάθε 14 μέρες	26.4 But	1.2 But	4.2 + όσο καταναλώθηκε κάθε 14 μέρες	400+	33.3+	0.5	65.7	3.0	180
CMMED	M1, 2 (1356 & 1728)	3.0 But + όσο καταναλώθηκε κάθε 14 μέρες	264 But	12.0 But	4.2 + όσο καταναλώθηκε κάθε 14 μέρες	400+	33.3+	0.5	65.7	3.0	180
Z. Διερεύνηση βιοκοινότητας											
MTHHyd	N1, 2 (1290)	3.0 Hyd	6.0 Hyd	6.0 Hyd	<0.005	<0.5	<0.04	0	0	0	26
MTHAc	N1, 2 (1290)	0.8 Ac	46.1 Ac	6.1 Ac	<0.005	<0.5	<0.04	0	0	0	26
SLF150Hyd	QM1, 2 (612)	6.0 Hyd	12.0 Hyd	12.0 Hyd	1.6	150	12.8	0	0	0	7
SLF150Ac	QM1, 2 (612)	1.5 Ac	90.1 Ac	12.0 Ac	1.6	150	12.8	0	0	0	7
SLF400Hyd	M1, 2 (1256 & 1628)	6.0 Hyd	12.0 Hyd	12.0 Hyd	4.2	400	33.3	0	0	0	7
SLF400Ac	M1, 2 (1256 & 1628)	1.5 Ac	90.1 Ac	12.0 Ac	4.2	400	33.3	0	0	0	7
SLF150LED	QM1, 2 (612)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	1.6	150	12.8	0	0	0	7
SLF150MED	QM1, 2 (612)	9.1 But	800 But	36.3 But	1.6	150	12.8	0	0	0	7
SLF400LED	M1, 2 (1256 & 1628)	0.3 But	26.4 But	1.2 But	4.2	400	33.3	0	0	0	7
SLF400MED	M1, 2 (1256 & 1628)	9.1 But	800 But	36.3 But	4.2	400	33.3	0	0	0	7
MPHBCo	M1, 2 (1285 & 1657)	0	0	0	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	1
NPHB	N1, 2 (1657)	9.1 But	800 But	36.3 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	1
QMPHB	QM1,2 (641)	9.1 But	800 But	36.3 But	1.6	150	12.8	0.5	65.7	3.0	1
MPHB	M1, 2 (1285 & 1657)	9.1 But	800 But	36.3 But	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	1

^aBut: βουτυρικό οξύ, Hyd: μοριακό υδρογόνο, Ac: Οξικό οξύ. ^bΘεωρείται ότι η διάσπαση του βουτυρικού οξέος αποδίδει 4 ηλεκτρόνια. ^cΕβδομαδιαία τροφοδοσία όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 3.1.3.

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

Ε.2. Επανάληψη πίνακα 4.13. Πειράματα για τη διερεύνηση της επίδρασης του είδους δότη ηλεκτρονίων και των φυσικών αναγωγικών μέσων.

Όνομα αντιδραστήρα	Μέσο (Μέρες καλλιέργειας)	Δότης ηλεκτρονίων ^a			SO ₄ ²⁻			TCE			Μέρες λειτουργίας
		mM	mg/L	meq/L	mM	mg/L	meq/L	mM	mg/L	meq/L	
A. Επίδραση είδους δότη ηλεκτρονίων											
DWNED	Απιονισμένο νερό (DW)	0	0	0	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	22
NNED	N1, 2 (1523)	0	0	0	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	143
NMED	N1, 2 (912)	3.0 But	264 But	12.0 But	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	5
NMAc	N1, 2 (1391)	1.5 Ac	90.1 Ac	12.0 Ac	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	128
N1DHyd	N1, 2 (912)	0.3 But + 3.0 Hyd	26.4 But + 6.0 Hyd	1.2 But + 6.0 Hyd	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	5
NMProp	N1, 2 (1643)	0.7 Prop	40.1 Prop	12.0 Prop	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	266
NMBenz	N1, 2 (1643)	0.4 Benz	48.9 Benz	12.0 Benz	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	69
B. Επίδραση οργανικής ύλης εδάφους											
DWMHq	Απιονισμένο νερό (DW)	6.0 Hq	661 Hq	12.0 Hq	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	59
NMHq	N1, 2 (1391)	6.0 Hq	661 Hq	12.0 Hq	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	128
NMAcLHq	N1, 2 (1523)	1.5 Ac + 0.6 Hq	90.1 Ac + 66.1 Hq	12.0 Ac + 1.2 Hq	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	92
NMAcMHq	N1, 2 (1405)	1.5 Ac + 6.0 Hq	90.1 Ac + 661 Hq	12.0 Ac + 12.0 Hq	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	211
NMDOM	N1, 2 (1391)	x DOM ^b	661 DOM	x DOM ^c	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	128
NMAcMDOM	N1, 2 (1391)	1.5 Ac + x DOM ^b	90.1 Ac + 661 DOM	12.0 Ac + x DOM ^c	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	128
Γ. Επίδραση είδους και ποσότητας σιδήρου											
DWMFeS	Απιονισμένο νερό (DW)	6.0 FeS	528 FeS	6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	114
NMFeS	N1, 2 (1405)	6.0 FeS	528 FeS	6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	211
NMAcLFeS	N1, 2 (1523)	1.5 Ac + 0.6 FeS	90.1 Ac + 52.8 FeS	12.0 Ac + 0.6 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	143
NQMAcLFeS	N1, 2 (1523)	2.0 Ac + 0.6 FeS	120 Ac + 52.8 FeS	16.0 Ac + 0.6 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	143
NMAcMFeS	N1, 2 (1405)	1.5 Ac + 6 FeS	90.1 Ac + 528 FeS	12.0 Ac + 6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	28
NMHqMFeS	N1, 2 (1405)	6.0 Hq + 6.0 FeS	661 Hq + 528 FeS	12.0 Hq + 0.6 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	211
NMFeCl ₂	N1, 2 (1524)	6.0 FeCl ₂	758 FeCl ₂	6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	142
NMAcMFeCl ₂	N1, 2 (1524)	1.5 Ac + 6.0 FeCl ₂	90.1 Ac + 758 FeCl ₂	12.0 Ac + 6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	142
NQMAcLFeCl ₃	N1, 2 (1524)	2 Ac + 0.6 FeCl ₃	120.1 Ac + 97.3 FeCl ₃	16.0 Ac + (0.6 ^e Fe ²⁺)	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	142

Διερεύνηση εφαρμοσιμότητας της επί τόπου βιολογικής εξυγίανσης εδαφών και υπόγειων υδροφορέων ρυπασμένων με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες

NMPropLFeS	N1, 2 (1643)	0.7 Prop + 0.6 FeS	40.1 Prop + 52.8 FeS	12.0 Prop + 0.6 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	266
NMPropMFeS	N1, 2 (1643)	0.7 Prop + 6.0 FeS	40.1 Prop + 528 FeS	12.0 Prop + 6.0 ^d Fe ²⁺	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	69
Δ. Επίδραση σιδήρου υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες											
MMAcMFeS	M1, 2 (1145 & 1517)	1.5 Ac + 6.0 FeS	90.1 Ac + 528 FeS	12.0 Ac + 6.0 ^d Fe ²⁺	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	141
MQHAcLFeS	M1, 2 (1145 & 1517)	5.7 Ac + 0.6 FeS	340 Ac + 52.8 FeS	45.3 Ac + 0.6 ^d Fe ²⁺	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	141
MMAcLFeCl ₃	M1, 2 (1145 & 1517)	1.5 Ac + 0.6 FeCl ₃	90.1 Ac + 97.3 FeCl ₃	12.0 Ac + (0.6 ^e Fe ²⁺)	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	141
MQHAcLFeCl ₃	M1, 2 (1145 & 1517)	5.7 Ac + 0.6 FeCl ₃	340 Ac + 97.3 FeCl ₃	45.3 Ac + (0.6 ^e Fe ²⁺)	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	141
Ε. Τυρόγαλα ως δότης ηλεκτρονίων											
NMRCW	N1, 2 (1727)	x RCW ^b	96 COD	12.0 COD	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	13
NHRCW	N1, 2 (1727)	5.0x RCW ^b	480 COD	60.0 COD	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	51
NMPCW	N1, 2 (1727)	x PCW ^b	96 COD	12.0 COD	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	51
NHPCW	N1, 2 (1727)	5.0x PCW ^b	480 COD	60.0 COD	<0.005	<0.5	<0.04	0.5	65.7	3.0	51
ΣΤ. Τυρόγαλα ως δότης ηλεκτρονίων υπό θεικοαναγωγικές συνθήκες											
MMRCW	M1, 2 (1356 & 1728)	x RCW ^b	96 COD	12.0 COD	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	181
MHRCW	M1, 2 (1356 & 1728)	5.0x RCW ^b	480 COD	60.0 COD	4.2	400	33.3	0.5	65.7	3.0	181

^aBut: βουτυρικό οξύ, Hyd: μοριακό υδρογόνο, Ac: Οξικό οξύ, Hq: Υδροκινόνη, DOM: Διαλυτή οργανική ύλη, Prop: Προπανόλη, Benz: Βενζοϊκό οξύ, CW: Τυρόγαλο. ^bΔεν είναι γνωστό το μοριακό βάρος. ^cΔεν είναι γνωστή η κανονικότητα. ^dΥπολογισμός παραγόμενων ηλεκτρονίων από τον δισθενή σίδηρο. ^eΜετά την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή.