



**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΑΕΡΙΟΥ ΜΕ ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ  
ΧΩΝΕΥΣΗ ΑΣΤΙΚΗΣ ΙΛΥΟΣ ΚΑΙ ΓΛΥΚΕΡΙΝΗΣ»**



**ΣΠΟΥΔΑΣΤΕΣ: ΚΟΥΡΑΤΟΡΑ ΜΑΡΙΑΝΝΑ**  
**ΣΦΕΝΔΟΥΡΑΚΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ: Δρ. ΦΟΥΝΤΟΥΛΑΚΗΣ ΜΙΧΑΛΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΙΟΥΛΙΟΣ 2009**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια από τις διαδικασίες επεξεργασίας και αξιοποίησης της γλυκερίνης θα μπορούσε να είναι και η αναερόβια χώνευση καθώς ταυτόχρονα με την σταθεροποίηση της οποιασδήποτε βιομάζας παράγεται και μεθάνιο. Η αναερόβια βιοαποδόμιση περιγράφεται ως μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων με οριζόντιες και παράλληλες αντιδράσεις η οποία έχει μελετηθεί επαρκώς και έχει κατανοηθεί σε μεγάλο βαθμό στο παρελθόν (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991).

Είναι γνωστό από εργασίες στο παρελθόν ότι η γλυκερίνη εμφανίζεται στα ενδιάμεσα στάδια της αναερόβιας χώνευσης και τελικά αποδομείται για την παραγωγή μεθανίου (Angelidaki et al. 1998, Schauder and Schink, 1989). Ωστόσο δεν έχει μελετηθεί η αξιοποίηση της για το σκοπό αυτό λόγω του ότι ήταν πιο συμφέρον μέχρι τώρα να καθαρίζεται και να διατίθεται για την παρασκευή φαρμάκων, καλλυντικών και συνθετικών. Τα νέα δεδομένα που δημιουργούνται από την αύξηση της παραγωγής του βιοντίζελ θα οδηγήσουν αναγκαστικά στην συστηματική μελέτη της αναερόβιας χώνευσης της γλυκερίνης.

Την τελευταία δεκαετία έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στο υδρογόνο και τις δυνατότητες που υπάρχουν για την αξιοποίηση του ως καύσιμο σε αυτοκίνητα ή για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας. Το υδρογόνο είναι μια καθαρή πηγή ενέργειας που δεν συμμετέχει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου (Benemann, 1996). Συγκρινόμενη με την κλασική σύνθεση υδρογόνου με φυσικοχημικές μεθόδους η μικροβιακή μετατροπή της βιομάζας σε βιο-υδρογόνο είναι μια φιλική προς το περιβάλλον διεργασία η οποία παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια (Fan et al.2004, Levin et al. 2007). Μέχρι τώρα έχουν γίνει μελέτες παραγωγής βιο-υδρογόνου από διάφορα οργανικά υπολείμματα όπως πούλπα ελαιοτριβείου (Koutrouli et al. 2006), υπολείμματα σιτηρών (Fan et al.2006), γλυκό σόργο (Antonopoulou et al.2007), άχυρο κι ρύζι (Fun et al.2006) και καλαμπόκι (Zhang et al. 2007). Ωστόσο δεν υπάρχει ακόμα καμία συστηματική μελέτη για την παραγωγή βιο-υδρογόνου από γλυκερίνη. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η γλυκερίνη συμμετέχει στην αναερόβια ζύμωση του οργανικού υλικού και επομένως δημιουργώντας τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να παράγει βιο-υδρογόνο.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΓΛΥΚΕΡΙΝΗ.....	4
1.1 Εισαγωγή .....	4
1.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	4
2. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ .....	6
2.1 Εισαγωγή .....	6
2.2 Μικροβιολογία της αναερόβιας επεξεργασίας .....	7
2.2.1 Μικροβιολογία της μη μεθανογόνου φάσης.....	10
2.2.2 Μεταβολισμός των μη μεθανογόνων βακτηρίων .....	11
2.2.3 Μικροβιολογία της μεθανογόνου φάσης.....	13
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια χώνευση. ....	15
2.3.1 Θερμοκρασία.....	15
2.3.2. pH.....	16
2.3.3. Αλκαλικότητα.....	17
2.3.4. Θρεπτικά.....	18
2.3.5 Τοξικές ουσίες .....	18
3. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ.....	21
3.1 Γενικά.....	21
3.2 Τα στάδια της αναερόβιας χώνευσης.....	23
3.3 Ανάσχεση της μεθανογένεσης με στόχο την παραγωγή υδρογόνου .....	25
3.4 Αναερόβιος μεταβολισμός οργανικής ύλης για παραγωγή υδρογόνου .....	27
3.5 Υδρόλυση στη αναερόβια χώνευση.....	29
3.5.1 Γενικά.....	29
3.5.2 Υδρόλυση υδατανθράκων .....	30
3.6 Οξεογένεση στην αναερόβια χώνευση .....	32
3.7 Ζύμωση σακχάρων και προιόντα.....	32
3.8 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια παραγωγή υδρογόνου.....	32
3.8.1 Θρεπτικά συστατικά και παρεμποδιστές .....	33
3.8.2 Λειτουργικές παράμετροι .....	34
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	36
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	39
5.1.1 Αντιδραστήρας παραγωγής υδρογόνου .....	39
5.1.2 Αντιδραστήρας παραγωγής βιοαερίου .....	40
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	43
6.1 Προσδιορισμός της απόδοσης σε μεθάνιο.....	43
6.2 Προσδιορισμός της απόδοσης σε υδρογόνο .....	45
6.3 Συμπεράσματα .....	46
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	47

# **1. ΓΛΥΚΕΡΙΝΗ**

---

---

## **1.1 Εισαγωγή**

Η γλυκερίνη είναι μια τρισθενής αλκοόλη η οποία απαντάται στη φύση σε όλα τα ζωικά και φυτικά λίπη στη μορφή γλυκεριδίων. Όταν αυτά τα λίπη υποστούν μετεστεροποίηση με την προσθήκη αλκοόλης (συνήθως μεθανόλη) για τον σχηματισμό βιοντίζελ, η γλυκερίνη ανακτάται στην αρχική της μορφή ως παραπροϊόν της αντίδρασης.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αλματώδη αύξηση στην σύνθεση βιοντίζελ. Στην Ευρώπη για παράδειγμα, η ετήσια παραγωγή του συγκεκριμένου βιοκαυσίμου, από 1.065.000 τόνους το 2002 ανήλθε στους 3.184.000 τόνους το 2005 και στους 6.069.000 τόνους το 2006 (European Biodiesel Board, 2006). Αποτέλεσμα αυτής της αύξησης είναι να συσσωρεύονται σημαντικές ποσότητες γλυκερίνης που όπως αναφέρθηκε είναι το κύριο παραπροϊόν της παραγωγής βιοντιζελ. Υπολογίζεται ότι κάθε 9 kg βιοκαυσίμου που παράγεται δημιουργεί 1 kg γλυκερίνης (Dasari *et al.*2005)

Η καθαρή γλυκερίνη έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμακευτικών, συνθετικών και καλλυντικών. Γι' αυτό το λόγο η γλυκερίνη που παράγεται στις μονάδες σύνθεσης βιοντιζελ καθαρίζεται και διοχετεύεται στις διάφορες αυτές εφαρμογές. Ωστόσο, η αλματώδης αύξηση του παραγόμενου βιοντιζελ έχει σαν αποτέλεσμα την υπερεπάρκεια των ποσοτήτων γλυκερίνης. Συνέπεια αυτού του γεγονότος ήταν να πέσει η τιμή της από 0,43 \$/kg το 2003 στα 0,22 \$/kg το 2005 (Hartenbower, 2006). Η αναμενόμενη συνέχιση της πτώσης της τιμής θα καθιστούν οικονομικά ασύμφορο τον καθαρισμό της ακατέργαστης μορφής της από τις μονάδες παραγωγής βιοντιζελ. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο να βρεθούν άλλοι τρόποι αξιοποίησης του παραπροϊόντος αυτού.

## **1.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση**

Τα τελευταία χρόνια η διεθνής κοινότητα δείχνει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον στις εναλλακτικές και ανανεώσιμες μορφές ενέργειας. Η νέα Ευρωπαϊκή οδηγία έχει ήδη επιβάλει από το Μάρτιο του 2003 την εκτεταμένη χρήση των βιοκαυσίμων στον τομέα των μεταφορών για τα επόμενα χρόνια (Directive 2003/30/EC). Το βιοντιζελ

είναι ένα υγρό καθαρό βιοκαύσιμο που παράγεται από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας. Η μέθοδος παραγωγής βιοντίζελ που εφαρμόζεται παγκοσμίως είναι η μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων, που αποτελούν το κύριο συστατικό των φυτικών ελαίων και ζωικών λιπών. Με την μέθοδο αυτή παράγονται μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων που συνιστούν το βιοντίζελ και γλυκερίνη ως παραπροϊόν.

Η αλματώδης αύξηση της παραγωγής βιοντίζελ, έχει σαν αποτέλεσμα την αντίστοιχη αλματώδη αύξηση της παραγόμενης ακατέργαστης γλυκερίνης. Συνέπεια αυτού του γεγονότος είναι να συσσωρεύονται σημαντικές ποσότητες γλυκερίνης στις μονάδες και να έχουμε συνεχιζόμενη πτώση της τιμής πώλησης της. Η μελλοντική υποβάθμιση του προϊόντος αυτού από την υπερεπάρκεια που θα δημιουργηθεί καθιστά απαραίτητο την εύρεση νέων μεθόδων διαχείρισης της γλυκερίνης που παράγεται.

Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της γλυκερίνης διαφέρουν ανάλογα το πρωτογενές υλικό και την διαδικασία που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιοντίζελ. Μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες μονάδες της Αμερικής που παράγουν βιοντίζελ από σινάπι, σόγια, ελαιοκάμψη και διάφορα άλλα υλικά έδειξαν σημαντικές διαφορές στα χαρακτηριστικά της ακατέργαστης γλυκερίνης ( Thompson and He, 2006). Παραμένει μάλλον άγνωστο το κατά πόσο η διαφοροποίηση στην ποιότητα μπορεί να επηρεάσει και με ποιό τρόπο την οποιαδήποτε διαδικασία επεξεργασίας της γλυκερίνης και αν ο καθαρισμός της είναι προαπαιτούμενος.

## 2. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΧΩΝΕΥΣΗ

---

### 2.1 Εισαγωγή

Η διεργασία της αναερόβια χώνευσης η οποία λαμβάνει χώρα και στη φύση μπορεί να προσδιοριστεί ως η βιολογική διεργασία κατά την οποία οργανικό υλικό, απουσία οξυγόνου, μετατρέπεται σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (Toerien and Hattingh, 1969).

Ιστορικά η ύπαρξη αυτών των αερίων ήταν γνωστή από την αρχαιότητα, ωστόσο η παρατήρηση του Alessandro Volta (1776) ότι σε ιζήματα από βαλτώδεις περιοχές παράγεται ένα εύφλεκτο αέριο οδήγησε την επιστημονική κοινότητα στην μελέτη της βιολογικής παραγωγής του μεθανίου.

Ένα αιώνα νωρίτερα ο Leeuwenhoek (1680) ήταν ο πρώτος επιστήμονας που παρατήρησε αναερόβιους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, την εποχή εκείνη δεν ήταν ακόμη κατανοητή η ανακάλυψη του αυτή. Έτσι έπρεπε να περάσουν περίπου 200 χρόνια για να πιστοποιηθεί η ύπαρξη αναερόβιων βακτηρίων από τον Louis Pasteur (1862). Το 1913 ο Beijerinck επανέλαβε με ακρίβεια τα πειράματα του Leeuwenhoek και ταυτοποίησε τον αναερόβιο μικροοργανισμό *Clostridium butyricum*.

Σήμερα, η αναερόβια επεξεργασία με ταυτόχρονη παραγωγή μεθανίου είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την σταθεροποίηση της παραγόμενης λάσπης στις μονάδες βιολογικής επεξεργασίας αστικών και βιομηχανικών λυμάτων, ενώ χρησιμοποιείται ακόμη για την επεξεργασία στερεών απορριμμάτων και αστικών λυμάτων (Metcalf and Eddy, 1991, Gunaseelan, 1997, Van Starckenburg, 1997).

Από τις αρχές του προηγούμενου αιώνα μέχρι τώρα έχουν δημοσιευθεί πολλές εργασίες για την λειτουργία αναερόβιων αντιδραστήρων. Ωστόσο, υπήρχαν δυσκολίες στη σύγκριση των αποτελεσμάτων, λόγω του μεγάλου πλήθους υποστρωμάτων και μικροοργανισμών που λαμβάνουν μέρος στη συνολική διεργασία. Γι' αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια καταβλήθηκαν σημαντικές προσπάθειες για να

συνδεθούν η μικροβιολογία και η βιοχημεία της αναερόβιας χώνευσης και οι θεωρητικές και πρακτικές παρατηρήσεις των αναερόβιων βιοαντιδραστήρων.

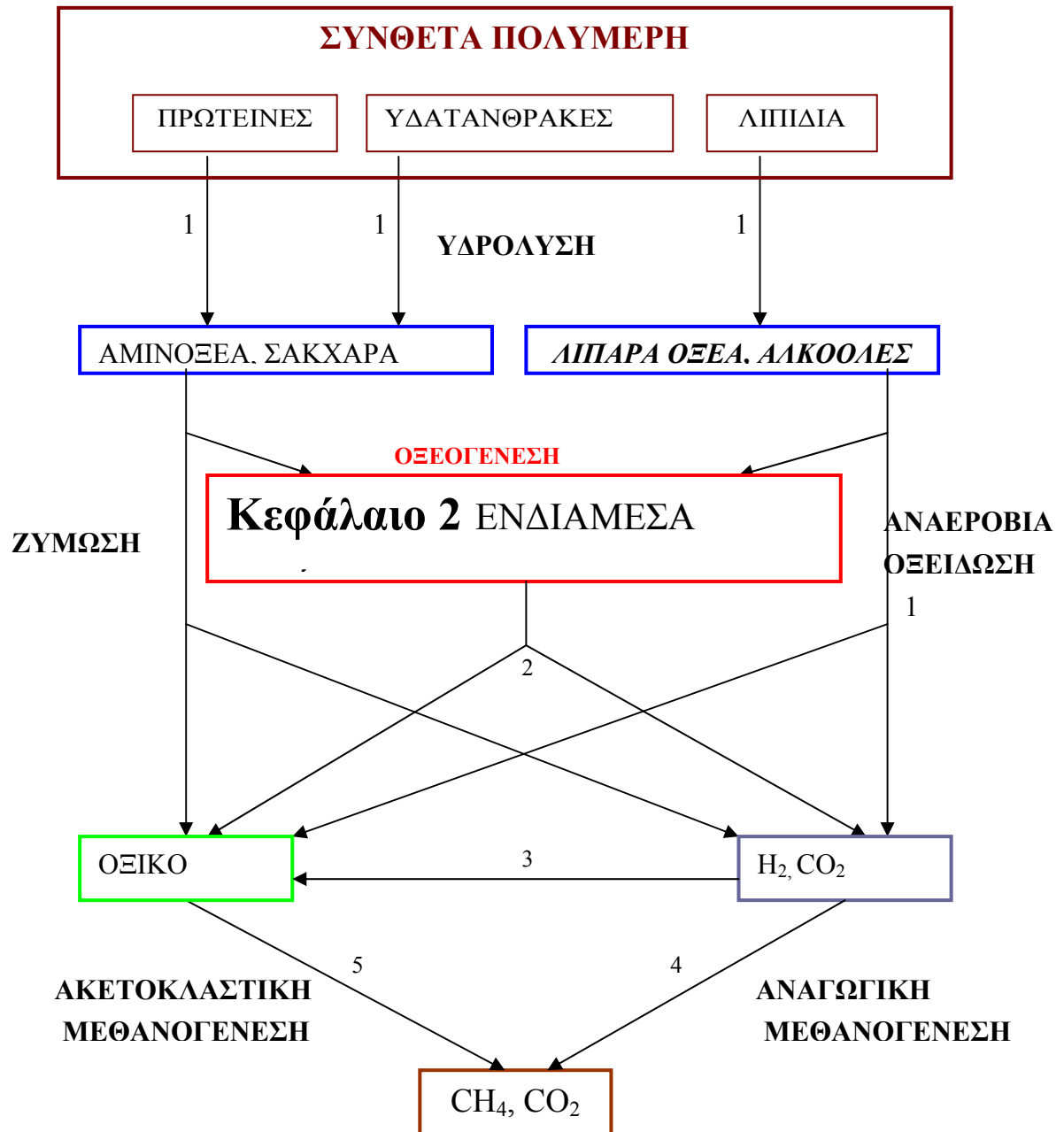
Στο κεφάλαιο αυτό σημειώνονται οι κύριες αναφορές για την μικροβιολογία και την βιοχημεία της αναερόβιας επεξεργασίας καθώς και η σημερινή τεχνολογία για την λειτουργία αναερόβιων αντιδραστήρων.

## **2.2 Μικροβιολογία της αναερόβιας επεξεργασίας**

Η αναερόβια βιοαποδόμηση του σύνθετου οργανικού υλικού περιγράφεται ως μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων με οριζόντιες και παράλληλες αντιδράσεις (Σχήμα 3.1) (Pavlostathis and Giraldo-Gomez,1991, Guger and Zehnder, 1983). Αρχικά, σύνθετες πολυμερικές ενώσεις όπως είναι οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες και τα λίπη υδρολύονται από εξωκυτταρικά ένζυμα σε διαλυτά προϊόντα μικρότερου μεγέθους έτσι ώστε να μπορούν να εισχωρήσουν διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυτές οι σχετικά απλές διαλυτές ενώσεις ζυμώνονται ή οξειδώνονται αναερόβια σε πτητικά λιπαρά οξέα, αλκοόλες, διοξείδιο του άνθρακα, υδρογόνο και αμμωνία. Τα πτητικά λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε οξικό οξύ, υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Τέλος, παράγεται μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα, είτε από την αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα από το υδρογόνο είτε από το οξικό.

Η συνολική διαδικασία της μετατροπής του σύνθετου οργανικού υλικού σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να υποδιαιρεθεί σε 7 στάδια ανάλογα με το σχήμα 3.1 (Pavlostathis and Giraldo-Gomez,1991).

1. Υδρόλυση του σύνθετου οργανικού υλικού
2. Ζύμωση των αμινοξέων και των σακχάρων
3. Αναερόβια οξείδωση των μεγάλου μήκους λιπαρών οξέων και αλκοολών
4. Αναερόβια οξείδωση των ενδιάμεσων προϊόντων
5. Παραγωγή οξικού από διοξείδιο του άνθρακα και υδρογόνο
6. Μετατροπή του οξικού σε μεθάνιο
7. Παραγωγή μεθανίου με αναγωγή του διοξειδίου του άνθρακα από υδρογόνο



Σχήμα 2.1 Μετατροπή του οργανικού υλικού προς μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα κατά τη διεργασία της αναερόβιας χώνευσης (Pavlostathis and Giraldo-Gomez, 1991).

Οι κύριες ομάδες βακτηρίων που παίρνουν μέρος σε αυτές τις αντιδράσεις χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες: (1) βακτήρια ζύμωσης, (2) οξικογόνα βακτήρια που



παράγουν υδρογόνο, (3) οξικογόνα βακτήρια που καταναλώνουν υδρογόνο, (4) μεθανογόνα βακτήρια που ανάγουν το διοξείδιο του άνθρακα, (5) ακετοκλαστικά μεθανογόνα βακτήρια.

Ένα γενικό κριτήριο κατάταξης των μικροοργανισμών είναι η σχέση της κυτταρικής τους λειτουργίας με το οξυγόνο. Στον πίνακα 3.1 παρουσιάζεται η κατάταξη των μικροοργανισμών ανάλογα με την ικανότητα τους να χρησιμοποιούν - και με ποιο τρόπο - το οξυγόνο.

Πίνακας 2.1 Κατάταξη των μικροοργανισμών με κριτήριο τη σχέση της κυτταρικής τους λειτουργίας με το οξυγόνο (Αγγελής, 2000).

Μικροοργανισμοί	Ιδιότητα
1. Αερόβιοι (aerobes)	Χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο
2. Προαιρετικά αναερόβιοι (facultative anaerobes)	Χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο αλλά μπορούν να ζήσουν με ζυμωτικό μεταβολισμό και σε αναερόβιες συνθήκες
3. Υποχρεωτικά αναερόβιοι (obligate anaerobes)	Δεν διαθέτουν την ικανότητα χρήσης το μοριακού οξυγόνου
3α. Αδιάφοροι αναερόβιοι (indifferent anaerobes)	Μπορούν να επιβιώσουν και σε αερόβιες συνθήκες
3β. Ανθεκτική στον αέρα αναερόβιοι (aerotolerant anaerobes)	Έχουν κάποιο όριο ανοχής στη συγκέντρωση οξυγόνου στο περιβάλλον τους
3γ. Αυστηρά αναερόβιοι (strict anaerobes)	Πεθαίνουν ακόμα και με ίχνη ελεύθερου οξυγόνου στο περιβάλλον τους

Γενικά στην αναερόβια χώνευση μπορούμε να πούμε ότι σε πρώτο στάδιο ένα ετερογενές σύμπλεγμα μικροοργανισμών μετατρέπει τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λίπη, κυρίως σε λιπαρά οξέα και, σε ένα δεύτερο στάδιο, τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των μικροοργανισμών του πρώτου σταδίου μετατρέπονται σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα από μια ξεχωριστή φυσιολογικά ομάδα αυστηρώς αναερόβιων βακτηρίων που ονομάζονται μεθανογόνα βακτήρια

(Toerien and Hattingh, 1969). Στη συνέχεια μελετώνται ξεχωριστά οι δύο αυτές κύριες ομάδες μικροοργανισμών που συμβάλλουν στην αναερόβια επεξεργασία.

### *2.2.1 Μικροβιολογία της μη μεθανογόνου φάσης*

Έχει διαπιστωθεί η παρουσία διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών στο στάδιο της μη μεθανογόνου φάσης της αναερόβιας χώνευσης όπως είναι τα βακτήρια, τα πρωτόζωα και οι μύκητες ενώ έχουν απομονωθεί πολλά είδη των μικροοργανισμών αυτών. Η ύπαρξη, ο αριθμός, ο τύπος και το είδος των μικροοργανισμών αυτών κάτω από αναερόβιες συνθήκες εξαρτάται από τα ποιοτικά και τα ποσοτικά χαρακτηριστικά των προς επεξεργασία αποβλήτων (Hobson et al, 1974).

Η κύρια κατηγορία μικροοργανισμών που απαντώνται στους αναερόβιους αντιδραστήρες είναι τα βακτήρια. Στη μη μεθανογόνο φάση υπάρχουν είτε προαιρετικά αναερόβια είτε υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια.. Ο O'Shaughnessy το 1914 ανέφερε την ύπαρξη κολοβακτηριδίων, απονιτροποιητικών, λιπολυτικών και κυτταρινολυτικών βακτηρίων σε αναερόβια επεξεργασμένη ιλύ. Επίσης ο Gaub (1924) κατάφερε να απομονώσει 16 αερόβια και 5 προαιρετικά αναερόβια βακτήρια από αναερόβια λάσπη. Ωστόσο η πλειονότητα των βακτηρίων είναι αυστηρώς αναερόβια και βρίσκονται σε ποσότητες 100 φορές μεγαλύτερες από τα προαιρετικά αναερόβια (Toerien and Hattingh, 1969). Στον πίνακα 3.2 παρουσιάζονται διάφορα είδη μη μεθανογόνων βακτηρίων που έχουν καταγραφεί στην αναερόβια χώνευση. Όσον αφορά την υδρόλυση του σύνθετου οργανικού υλικού λαμβάνουν μέρος διάφορα βακτήρια όπως είναι τα κυτταρινολυτικά βακτήρια που παράγουν κυρίως οξικό και προπιονικό οξύ, τα ημικυτταρινολυτικά βακτήρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή αμμωνίας κατά την διάσπαση των αμινοξέων, τα αμυλολυτικά βακτήρια, τα πρωτεϊνολυτικά βακτήρια και τα λιπολυτικά βακτήρια. Έχει βρεθεί ότι τα υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην υδρολυτική ενεργότητα του χωνευτήρα, ιδιαίτερα όταν επεξεργάζονται αστικά λύματα (Hobson et al, 1974). Σε παρόμοια συμπεράσματα έφθασαν και οι Toerien et al. (1967) υποστηρίζοντας ότι τα υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια είναι η κύρια ομάδα μικροοργανισμών για την παραγωγή οξέων, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Burbank et al. 1966) που θεωρούσαν τα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια ως τα σημαντικότερα για την παραγωγή οξέων.

Πίνακας 3.2 Μη μεθανογόνα βακτήρια που έχει διαπιστωθεί η παρουσία τους στην αναερόβια χώνευση (Toerien and Hattingh, 1969)

Γένος	Είδος	Αναφορά
<i>Aerobacter</i>	<i>A.aerogenes</i>	Toerien (1967a)
<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas sp.</i>	Kotze et al. (1968)
<i>Alcaligenes</i>	<i>A. boukerii</i>	Toerien (1967b)
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	Hattingh et al. (1967)
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides sp.</i>	Post et al. (1967)
<i>Clostridium</i>	<i>C. aminovalericum</i>	Hardman and Stadman (1960)
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	McCarty et al. (1962)
<i>Leptospira</i>	<i>L. biflexa</i>	Toerien (1967b)
<i>Micrococcus</i>	<i>M. candidus</i>	Toerien (1967a)
<i>Neisseria</i>	<i>N. catarrhalis</i>	McCarty et al. (1962)
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. denitrificans</i>	Burbank et al. (1966)
<i>Sarcina</i>	<i>S. lutea</i>	Burbank et al. (1966)
<i>Streptococcus</i>	<i>S. diploidus</i>	Buck et al. (1953)
<i>Streptomyces</i>	<i>S. bikiniensis</i>	Toerien (1967a)

Ορισμένα από τα βακτήρια που υπάρχουν στους αναερόβιους αντιδραστήρες, όπως τα υποχρεωτικά αερόβια νιτροποιητικά βακτήρια, εισάγονται σε αυτούς μέσω της τροφοδοσίας και θεωρούνται ‘μολυσματικοί’ μικροοργανισμοί που δεν είναι όμως σε ενεργή μορφή (Hobson et al, 1974). Σημαντικό ρόλο στην όλη διαδικασία παίζουν δυο ιδιαίτερες μορφές αναερόβιων βακτηρίων, αυτά που ανάγουν τα  $SO_4^-$  σε υδρόθειο (sulfate-reducing bacteria) και τα ομοοξικογόνα που μετατρέπουν το  $CO_2$  και το  $H_2$  σε οξικό (homoacetogenic).

### 2.2.2 Μεταβολισμός των μη μεθανογόνων βακτηρίων

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, για την πλήρη διάσπαση του οργανικού υλικού απαιτείται ένα πλήθος διαφορετικών βακτηρίων προκειμένου να έρθουν σε πέρας ένας αριθμός αντιδράσεων απαραίτητων για την αποδόμηση του πολύπλοκου υποστρώματος. Έχει βρεθεί η παρουσία διαφόρων εξωκυτταρικών ενζύμων όπως είναι η κελοβίαση

(cellobiase), η πρωτεάση (protease) και η αμυλάση (amylase) σε αναερόβιους αντιδραστήρες (Kotze et al. 1968). Τα εξωκυτταρικά ένζυμα, ή εξωένζυμα, διασπών το σύνθετο οργανικό υπόστρωμα (λίπη, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες) σε μικρότερα μόρια.

Ειδικότερα η αποδόμηση των λιπιδίων αρχίζει με τη βοήθεια του ενζύμου λιπάση προκαλώντας β-οξειδωση. Ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων για την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων μεγάλου μοριακού βάρους κάτω από αναερόβιες συνθήκες είναι το διοξειδίο του άνθρακα (McCarty et al. 1968).

Από την άλλη μεριά, οι πρωτεΐνες διασπώνται εξωκυτταρικά σε πολυπεπίδια και αμινοξέα από την πρωτεάση (Lackey and Hendricson, 1958). Περαιτέρω διάσπαση των αμινοξέων γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων διαφορετικών μηχανισμών, ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται κάθε φορά. Τα τελικά προϊόντα της αποδόμησης των πρωτεϊνών είναι τα οργανικά οξέα (McCarty et al. 1962).

Τέλος, οι υδατάνθρακες αποδομούνται με τη βοήθεια διαφόρων ενζύμων παράγοντας διάφορα προϊόντα όπως : υδρογόνο, διοξειδίο του άνθρακα, αιθανόλη, μυρμηκικό, οξικό, προπιονικό, βουτυρικό, βαλερικό, γαλακτικό οξύ και διάφορα άλλα οξέα. Τα προϊόντα αυτά της ζύμωσης διαφέρουν ανάλογα με το είδος ή το γένος των βακτηρίων καθώς επίσης και με τις συνθήκες που αναπτύσσονται (Hobson et al, 1974).

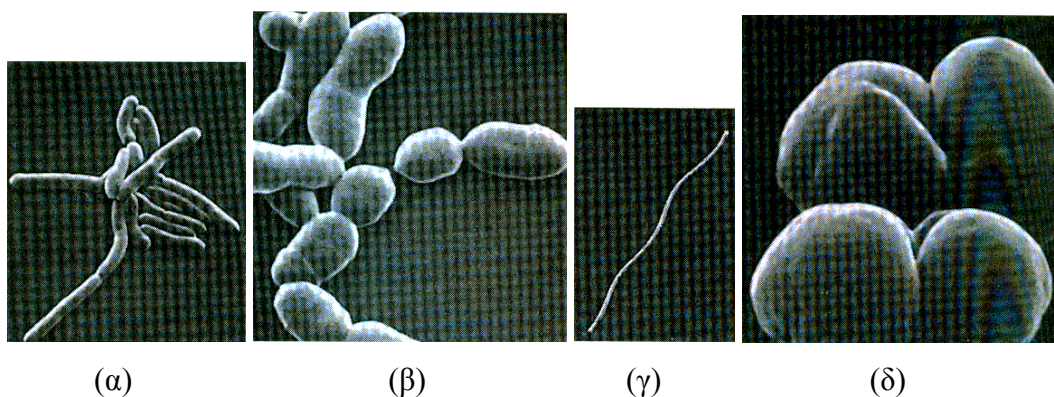
Τα τελικά προϊόντα του μη μεθανογόνου πληθυσμού είναι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, το υδρογόνο, το διοξειδίο του άνθρακα και η αμμωνία. Οι ενώσεις αυτές είναι πολύ σημαντικές για την λειτουργία της αναερόβιας χώνευσης, καθώς αποτελούν ενεργειακές πηγές για την ανάπτυξη ακολούθως των βακτηρίων.

Γενικά λοιπόν μπορούμε να πούμε ότι σε ένα αναερόβιο αντιδραστήρα πραγματοποιούνται μια σειρά από πολύπλοκες βιοχημικές αντιδράσεις από διαφορετικούς σε φυσιολογία μικροοργανισμούς. Τα τελικά προϊόντα της μη μεθανογόνου φάσης χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από τους μεθανογόνους μικροοργανισμούς, όπως θα δούμε παρακάτω, για την τελική μετατροπή του σύνθετου οργανικού υλικού σε μεθάνιο και διοξειδίο του άνθρακα.

### 2.2.3 Μικροβιολογία της μεθανογόνου φάσης

Η παραγωγή μεθανίου είναι το βασικό χαρακτηριστικό των μεθανογόνων μικροοργανισμών και αποτελεί το κύριο καταβολικό προϊόν τους. Φυλογενετικά οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί ανήκουν στα αρχαιοβακτήρια που διαφέρουν από τα κοινά βακτήρια σε ορισμένα χαρακτηριστικά, όπως είναι η θέση των λιπιδίων στην κυτταρική μεμβράνη, η έλλειψη πεπτιδογλυκάνης, διαφορές στην αλληλουχία του RNA κ.α (Ferry, 1993).

Έχει βρεθεί μια μεγάλη ποικιλία μεθανογόνων μικροοργανισμών που διαφέρουν σε μέγεθος και σχήμα (Εικόνα 3.1). Επίσης υπάρχουν τόσο θετικοί όσο και αρνητικοί κατά Gram μεθανογόνοι. Γι' αυτό το λόγο, η κατάταξη τους δεν γίνεται με βάση το στίγμα τους κατά Gram αλλά με βάση την αλληλουχία της αλυσίδας του RNA. Στον πίνακα 3.3 παρουσιάζονται τα κύρια χαρακτηριστικά των μεθανογόνων αρχαιοβακτηρίων.



Εικόνα 3.1 Κύτταρα μεθανογόνων αρχαιοβακτηρίων που δείχνουν την μορφολογική ποικιλία των μικροοργανισμών αυτών. α) *Methanobrevibacter ruminantium* (διάμετρος κυττάρου 0.7  $\mu\text{m}$ ) β) *Methanobacterium AZ* (διάμετρος κυττάρου 1  $\mu\text{m}$ ) γ) *Methanospirillum hungatii* (διάμετρος κυττάρου 0.4  $\mu\text{m}$ ) δ) *Methanosarcina barkeri* (διάμετρος κυττάρου 1.7  $\mu\text{m}$ ) (Madigan et al, 1997).

Πίνακας 3.3 Χαρακτηριστικά μεθανογόνων μικροοργανισμών (Madigan et al, 1997).

Γένος	Μορφολογία	Gram αντίδραση	Υπόστρωμα για μεθανογένεση
<i>Methanobacterium</i>	Ράβδοι	+ ή -	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό
<i>Methanobrevibacter</i>	Ράβδοι	+	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό
<i>Methanosphaera</i>	Κόκκοι	+	Μεθανόλη + H <sub>2</sub>
<i>Methanothermus</i>	Ράβδοι	+	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , S
<i>Methanococcus</i>	Κόκκοι	-	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό προσταφυλικό+CO <sub>2</sub> ,
<i>Methanomicrobium</i>	Ράβδοι	-	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό
<i>Methanogenium</i>	Κόκκοι	-	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό
<i>methanospirillum</i>	Σπιρίλια	-	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό
<i>Methanoplanus</i>	Δίσκοι	-	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό
<i>Methanosarcina</i>	Κόκκοι	+	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μεθανόλη, μεθυλαμίνες, οξικό
<i>Methanolobus</i>	Κόκκοι	-	Μεθανόλη, μεθυλαμίνες
<i>Methanoculleus</i>	Κόκκοι	-	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό, αλκοολές
<i>Methanohallobium</i>	Κόκκοι	-	Μεθανόλη, μεθυλαμίνες
<i>Methanococcoides</i>	Κόκκοι	-	Μεθανόλη, μεθυλαμίνες
<i>Methanohalophilus</i>	Κόκκοι	-	Μεθανόλη, μεθυλαμίνες, μεθυλοσουλφίδια
<i>Methanotherix</i>	Ράβδοι	-	οξικό
<i>Methanopyrus</i>	Ράβδοι	+	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub>
<i>methanocorpusculum</i>	κόκκοι	-	H <sub>2</sub> +CO <sub>2</sub> , μυρμηγκικό, αλκοολές

Υπάρχουν τρεις διαφορετικές ομάδες υποστρωμάτων που μπορούν να καταναλώσουν οι οργανισμοί αυτοί παράγοντας ενέργεια για τις λειτουργίες του κυττάρου. α) τύπου διοξειδίου του άνθρακα, β) μεθυλομάδες, γ) οξικό. Στον πίνακα 3.4 παρουσιάζονται οι κυριότερες αντιδράσεις παραγωγής μεθανίου.

Πίνακας 2.4 Κυριότερες αντιδράσεις παραγωγής μεθανίου.

Αντιδράσεις		$\Delta G^\circ$ (KJ)
Υπόστρωμα	προϊόντα	
τύπου CO <sub>2</sub>		
CO <sub>2</sub> + 4H <sub>2</sub>	→ CH <sub>4</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-131
4HCOOH + 4H <sup>+</sup>	→ CH <sub>4</sub> + 3CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-145
4CO + 2H <sub>2</sub> O	→ CH <sub>4</sub> + 3CO <sub>2</sub>	-210
Μεθυλομάδες		
4CH <sub>3</sub> OH	→ 3CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-319
4CH <sub>3</sub> NH <sub>3</sub> Cl + 2H <sub>2</sub> O	→ 3CH <sub>4</sub> + CO <sub>2</sub> + 4NH <sub>4</sub> Cl	-230
Οξικό		
CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O	→ CH <sub>4</sub> + 3CO <sub>2</sub> + 2H <sub>2</sub> O	-31

Όλοι οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ως πηγή αζώτου ενώ σε όλα τα είδη είναι απολύτως απαραίτητα το νικέλιο, ο σίδηρος και το κοβάλτιο ως ιχνοστοιχεία (Madigan et al, 1997). επίσης, έχει βρεθεί ένας σημαντικός αριθμός συνενζύμων που είναι μοναδικά και τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των οργανισμών αυτών (Ferry, 1993).

### **2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια γώνευση.**

Εκτός από τα απαραίτητα υποστρώματα και τους κατάλληλους μικροβιακούς πληθυσμούς υπάρχουν και ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, η αλκαλικότητα, τα θρεπτικά στοιχεία και οι τοξικές ουσίες που επιδρούν στη διαδικασία παραγωγής μεθανίου κατά την αναερόβια επεξεργασία.

#### *2.3.1 Θερμοκρασία*

Η μεθανογένεση είναι από τις διεργασίες που εξαρτώνται ισχυρά από τη θερμοκρασία. Μεθανογόνοι μικροοργανισμοί έχουν βρεθεί σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιακών περιοχών από 2 °C σε θαλάσσια ιζήματα μέχρι πάνω από 100°C σε γεωθερμικές περιοχές (Ferry, 1993). Γενικά οι ρυθμοί των αντιδράσεων αυξάνονται με την θερμοκρασία μέχρι τους 60°C. Για παράδειγμα, ο χρόνος διπλασιασμού της

παραγόμενης ποσότητας H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> στους 37°C για τον *Methanococcus voltae* είναι περίπου 2 ώρες ενώ ο αντίστοιχος χρόνος για τον *Methanococcus thermolithotrophicus* στους 65°C είναι 1 ώρα.

Έχουν βρεθεί δυο βέλτιστες θερμοκρασιακές περιοχές για την λειτουργία αναερόβιων αντιδραστήρων, η μεσόφιλη ( ~35 °C) και η θεرمόφιλη (55 °C με 60 °C), ανάμεσα στις οποίες οι ρυθμοί μειώνονται (Malina et al, 1992). Η μείωση αυτή θεωρείται ότι οφείλεται στην έλλειψη προσαρμογής των μικροοργανισμών (Macki and Bryant, 1981). Ωστόσο, έχει αναφερθεί αναερόβια επεξεργασία λυμάτων σε χωνευτήρες που λειτουργούσαν ακόμη και στους 15 °C (Zeeman et al, 1988).

Αυτή η θερμοφιλική τάση των μεθανογόνων μικροοργανισμών είναι κοινή σχεδόν για όλα τα αρχαιοβακτήρια (Woese, 1987). Για να προσαρμοστεί ένας μικροοργανισμός σε υψηλές θερμοκρασίες θα πρέπει να μπορεί να διατηρήσει τη δομή και τις λειτουργίες των μακρομορίων του (πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα και λιπίδια) καθώς αυξάνει η θερμοκρασία (Sundaram, 1986). Φαίνεται ότι οι μεθανογόνοι έχουν αυτούς τους κατάλληλους μηχανισμούς να διατηρούν σταθερές τις πρωτεΐνες τους. επίσης, επειδή μόνο τα αρχαιοβακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 90 °C, τα λιπίδια που σχηματίζουν τη μεμβράνη θα πρέπει να έχουν ειδικά χαρακτηριστικά για να διατηρούν την συνοχή της. Αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί αντέχουν σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών, απότομες μεταβολές τις θερμοκρασίας μπορούν να αποβούν μοιραίες για την διεργασία της αναερόβιας χώνευσης.

### 2.3.2. pH

Οι περισσότερες διεργασίες αναερόβιας επεξεργασίας λειτουργούν σε περίπου ουδέτερο pH. Διαφοροποιήσεις από αυτή την περιοχή παρατηρούνται εξαιτίας της συσσώρευσης όξινων ή βασικών μεταβολικών προϊόντων όπως είναι τα λιπαρά οξέα ή η αμμωνία, αντίστοιχα. Η αύξηση της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων είναι από τα πιο κοινά προβλήματα των αναερόβιων αντιδραστήρων και συμβαίνει συνήθως όταν οι οξικογόνοι ή οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί έχουν παρεμποδιστεί με αποτέλεσμα τα οξέα να μην καταναλώνονται από αυτούς και να συσσωρεύονται στον χωνευτήρα. Η ευαισθησία στη μείωση του pH είναι μεγαλύτερη για τα μεθανογόνα



βακτήρια απ' ότι στα ζυμωτικά βακτήρια. Κατά συνέπεια, ενώ η παραγωγή των οξέων από τους ζυμωτικούς μικροοργανισμούς συνεχίζεται, η μεθανογένεση έχει παρεμποδιστεί αυξάνοντας συνεχώς το πρόβλημα της οξύτητας στον αντιδραστήρα και οδηγώντας τελικά σε αποτυχία τη διεργασία.

Ωστόσο, παραγωγή μεθανίου έστω και σε μικρές ποσότητες μπορεί να συμβεί είτε σε όξινο είτε σε βασικό περιβάλλον υποδηλώνοντας ότι η μεθανογένεση δεν περιορίζεται μόνο στα όρια του ουδέτερου pH. Η *Methanosarcina barkeri* και η *Methanosarcina vacuolata*, δυο μεθανοβακτήρια που καταναλώνουν οξικό, αναπτύσσονται και σε pH~5 (Maestrojuan and Boone, 1991). Επίσης μεθανογόνοι μικροοργανισμοί σε βαλτώδη τύρφη παράγουν σημαντικές ποσότητες μεθανίου σε pH~3 ενώ η βέλτιστη τιμή τους είναι σε pH~6 (Williams and Crawford, 1984). Από την άλλη μεριά, έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη μεθανοβακτηρίων σε pH~9 (Blotvogel, 1985).

### 2.3.3. Αλκαλικότητα

Μεθανογόνοι μικροοργανισμοί έχουν βρεθεί σε διαφορετικής αλκαλικότητας περιβάλλοντα, από γλυκά μέχρι υπεραλατούχα νερά. Ωστόσο έχει αναφερθεί ότι αλκαλικότητες πάνω από 0.2 M Na<sup>+</sup> παρεμποδίζουν την παραγωγή μεθανίου (Boone, 1991).

Η επαρκής ποσότητα αλκαλικότητας είναι σημαντική για τη ρύθμιση του pH. Σε ένα αναερόβιο αντιδραστήρα παράγεται αλκαλικότητα (κατά τη διάσπαση των οργανικών υποστρωμάτων) κυρίως σε μορφή διττανθρακικών που βρίσκονται σε ισορροπία με το διοξείδιο του άνθρακα στην αέρια φάση (στο συγκεκριμένο pH). Οι εξισώσεις που αναπαριστούν την ισορροπία αυτή είναι οι εξής:



Η συγκέντρωση των ιόντων [H<sup>+</sup>] και του pH του συστήματος μπορεί να υπολογιστεί από την παρακάτω εξίσωση ισορροπίας :

$$[H^+] = k_1 \frac{[H_2CO_3]}{[HCO_3^-]}$$

Σε τιμές pH από 6.6 μέχρι 7.4 και σε τυπική σύσταση διοξειδίου του άνθρακα στην αέρια φάση 30 με 40%, η διττανθρακική αλκαλικότητα κυμαίνεται από 1000mg/l μέχρι 5000mg/l CaCO<sub>3</sub>. Όταν η συγκέντρωση των πτητικών οξέων είναι μικρή σε ένα αναερόβιο αντιδραστήρα, η ολική αλκαλικότητα είναι σχεδόν ίση με την διττανθρακική αλκαλικότητα (Malina et al, 1991).

#### 2.3.4. Θρεπτικά

Για να πραγματοποιηθεί η διάσπαση των οργανικών μορίων και να παραχθεί μεθάνιο χρειάζεται να υπάρχουν στον αναερόβιο αντιδραστήρα κάποια απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και των μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Γενικά, τα επίπεδα στην τροφοδοσία των βασικών θρεπτικών C και N συνήθως εκφράζονται με το λόγο COD:N που πρέπει να κυμαίνεται από 400:7 έως 1000:7 (Henze and Harremoos, 1983). Παρόμοια ο βέλτιστος λόγος N:P είναι 7:1 (Stronach et al, 1986).

Επίσης διάφορα ιχνοστοιχεία είναι απαραίτητα για τη μεθανογένεση όπως είναι ο σίδηρος, το νικέλιο, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το βάριο, το βολφράμιο, ο μόλυβδος, το σελήνιο και το κοβάλτιο. Τα στοιχεία αυτά συνήθως εμπλέκονται στο ενζυμικό σύστημα των μεθανογόνων και οξικογόνων βακτηρίων (Stronach et al, 1986). Στις περισσότερες περιπτώσεις αναερόβιας επεξεργασίας αποβλήτων τα ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα βρίσκονται σε περίσσεια στην τροφοδοσία.

#### 2.3.5 Τοξικές ουσίες

Η διαδικασία της παραγωγής μεθανίου μπορεί να παρεμποδιστεί από διάφορες ουσίες που είναι τοξικές για την μεθανογένεση όπως είναι το οξυγόνο, η αμμωνία, τα λιπαρά οξέα, τα βαρέα μέταλλα, τα θειούχα και θειικά ιόντα και διάφορες άλλες ξενοβιοτικές ενώσεις.

Το οξυγόνο είναι τοξικό ακόμα και σε ίχνη για τα αυστηρώς αναερόβια μεθανογόνα βακτήρια. Μελέτες, ωστόσο, έδειξαν ότι ενώ οι μεθανογόνοι δεν αναπτύσσονται και δεν παράγουν μεθάνιο, ορισμένοι από αυτούς είναι αρκετά ανθεκτικοί στο οξυγόνο.

Για παράδειγμα ο *Methanobrevibacter arboriphilus* και ο *Methanobacterium thermoautotrophicum* μπορούν να συντηρηθούν για μερικές ώρες μετά την έκθεση τους στο οξυγόνο, ενώ ο *Methanosarcina barkeri* αντέχει για πάνω από 24 ώρες (Kiener and Leisinger, 1983).

Η αμμωνία επίσης μπορεί να δράσει παρεμποδιστικά στην διαδικασία της αναερόβιας χώνευσης. Η τιμή της συγκέντρωσης που είναι τοξική στους μικροοργανισμούς εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως είναι το pH και η συγκέντρωση των πτητικών λιπαρών οξέων, καθώς και από τον τρόπο που εκτίθεται στα μεθανοβακτήρια, με την ελεύθερη μορφή να θεωρείται γενικά πιο τοξική από την ιονισμένη μορφή (Malina et al, 1991). Η συγκέντρωση αμμωνίας που παρεμποδίζει την παραγωγή μεθανίου είναι μεταξύ 1500 και 3000 mg/l ενώ από 4000 mg/l και πάνω επέρχεται πλήρης αναστολή της διεργασίας (Stronach et al, 1986). Από την άλλη μεριά, ο μη μεθανογόνος πληθυσμός επηρεάζεται σε συγκεντρώσεις αμμωνίας μεγαλύτερες από 6000 mg/l (Cross et al, 1983).

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η συσσώρευση πτητικών λιπαρών οξέων παρεμποδίζει την μεθανογένεση. Οι επιπτώσεις που έχουν οι ουσίες αυτές εξαρτώνται συχνά και από άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες (pH, αλκαλικότητα) που επικρατούν στον αναερόβιο αντιδραστήρα. Πτητικά οξέα, όπως το οξικό και το βουτυρικό, εμφανίζουν μικρή τοξικότητα όταν το pH είναι ουδέτερο. Αντίθετα, το προπιονικό οξύ, είναι τοξικό και για τα μεθανογόνα και για τα οξεογόνα βακτήρια. Επίσης τα ανώτερα λιπαρά οξέα (π.χ στεατικό, παλμιτικό, λαουρικό κ.ά.) παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα των οξικολυτικών μεθανογόνων βακτηρίων. Γενικά τα πτητικά λιπαρά οξέα αναγνωρίζονται ως τα πιο σημαντικά ενδιάμεσα προϊόντα της αναερόβιας διεργασίας και προτείνονται ως οι παράμετροι ελέγχου όλης της διαδικασίας ( Ahring and Angelidaki, 1997, Pind et al, 1999).

Η παρουσία βαρέων μετάλλων σε συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων όπως είδαμε είναι απαραίτητη για την λειτουργία πολλών βακτηρίων. Ωστόσο, όταν οι ουσίες αυτές βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις, επιδρούν αρνητικά στην αναερόβια χώνευση. Είναι δύσκολο να προσδιοριστούν με ακρίβεια τα επίπεδα των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων που αρχίζουν να είναι τοξικά, αφού εξαρτώνται από τις συνθήκες λειτουργίας του αναερόβιου αντιδραστήρα, ενώ είναι πιθανό, τα βακτήρια να

προσαρμόζονται στην παρουσία μετάλλων και να αυξάνει σταδιακά η ανθεκτικότητα τους σε αυτά. Γενικά η σειρά που μειώνεται η τοξικότητα των μετάλλων είναι  $Ni > Ca > Pb > Cr > Zn$  ( Hayes et al, 1978).

Το υδρόθειο ( $H_2S$ ) και γενικότερα τα θειούχα ανιόντα ( $HS^-$ ,  $S^{2-}$ ) είναι από τους πιο ισχυρούς παρεμποδιστές της αναερόβιας χώνευσης. Μελέτες έδειξαν ότι είναι τοξικό για τα μεθανογόνα βακτήρια σε συγκεντρώσεις μεταξύ 200-1500 mg/l. Η τοξικότητα του υδρόθειου όπως και των βαρέων μετάλλων εξαρτάται από το pH.

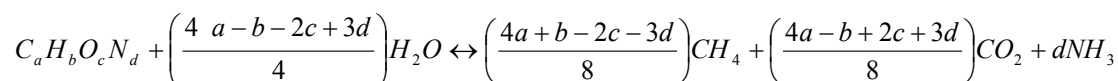
### 3. ΑΝΑΕΡΟΒΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ

---

#### 3.1 Γενικά

Η αναερόβια χώνευση αποτελεί μια από τις βασικότερες και πιο παραδοσιακές μεθόδους επεξεργασίας (σταθεροποίησης) της βιολογικής ύλης, που παράγεται κατά την πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια επεξεργασία αστικών αποβλήτων. Ωστόσο, για περισσότερες από δυο δεκαετίες η αναερόβια χώνευση έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την επεξεργασία υγρών και στερεών αποβλήτων υψηλού οργανικού ρυπαντικού φορτίου.

Η ρύπανση χώνευση είναι μια πολύπλοκη βιολογική διεργασία, κατά την οποία οργανική ύλη καταβολίζεται από αυστηρά αναερόβιους ή προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς στο σκοτάδι απουσία εξωτερικών αποδεκτών ηλεκτρονίων (π.χ. οξυγόνο, νιτρικά ιόντα/θειικά ιόντα), παράγοντας κυρίως μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα (εξίσωση 3.1). Η αναερόβια χώνευση λαμβάνει χώρα σε πολλά αναερόβια οικοσυστήματα (ιζήματα, έλη, στομάχι βοοειδών κ.α.) και μπορεί να περιγραφεί από τη συνολική αντίδραση:



Ένα από τα πλεονεκτήματα της αναερόβιας χώνευσης, εκτός από τη σταθεροποίηση της βιολογικής ύλης, είναι η ανάκτηση χρήσιμων προϊόντων, όπως αλκοολών, πτητικών λιπαρών οξέων (VFAS) και ενέργειας υπό μορφή υδρογόνου και μεθανίου. Η ανάκτηση ενέργειας έχει εστιαστεί στο μεθάνιο, το τελικό προϊόν της αναερόβιας χώνευσης (εξίσωση 3.1), παρόλο που παραγωγή και η χρήση του παρουσιάζει αρκετά προβλήματα (π.χ. συνεισφορά στο φαινόμενο του θερμοκηπίου κ.α.). Αντίθετα, το υδρογόνο, του οποίου η παραγωγή μέσω της αναερόβιας χώνευσης έχει προταθεί και αναπτυχθεί επιτυχώς από αρκετούς ερευνητές, θεωρείται ιδανικότερο καύσιμο με πάρα πολλά πλεονεκτήματα, όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο [Zoetemeyer et al., 1982; Nandi & Sengupta, 1998; Li & Fang, 2007].

Κατά την αναερόβια χώνευση, το υπόστρωμα οξειδώνεται μερικώς και επομένως απελευθερώνεται ένα μικρό μόνο μέρος της διαθέσιμης ενέργειας του, που είναι απαραίτητη για τις λειτουργίες του κυττάρου. Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά στο αναγωγικό δυναμικό μεταξύ του δότη και του δέκτη ηλεκτρονίων, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό ενέργειας που απελευθερώνεται (εξίσωση 3.1). Η ενέργεια φωσφορικών δεσμών υψηλής ενέργειας, οι οποίοι όταν υδρολύονται σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και όξινο φωσφορικό ιόν  $\text{HPO}_4^{2-}$  (Pi), απελευθερώνουν μεγάλη ποσότητα ενέργειας και χρήσης της από τους οργανισμούς βασίζεται στην αντίδραση  $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ . Στην αναερόβια χώνευση, το μόριο της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) παράγεται μέσω μιας διεργασίας που ονομάζεται φωσφορυλίωση οργανικού υποστρώματος σχηματίζονται ενώσεις, οι οποίες περιέχουν φωσφορικούς δεσμούς υψηλής ενέργειας. Περαιτέρω μεταβολισμός αυτών των ενδιάμεσων ενώσεων οδηγεί στη μεταφορά φωσφορικής ομάδας στο ADP και συνεπώς στο σχηματισμό του ATP [Gottschalk, 1986].

### Πίνακας 1.

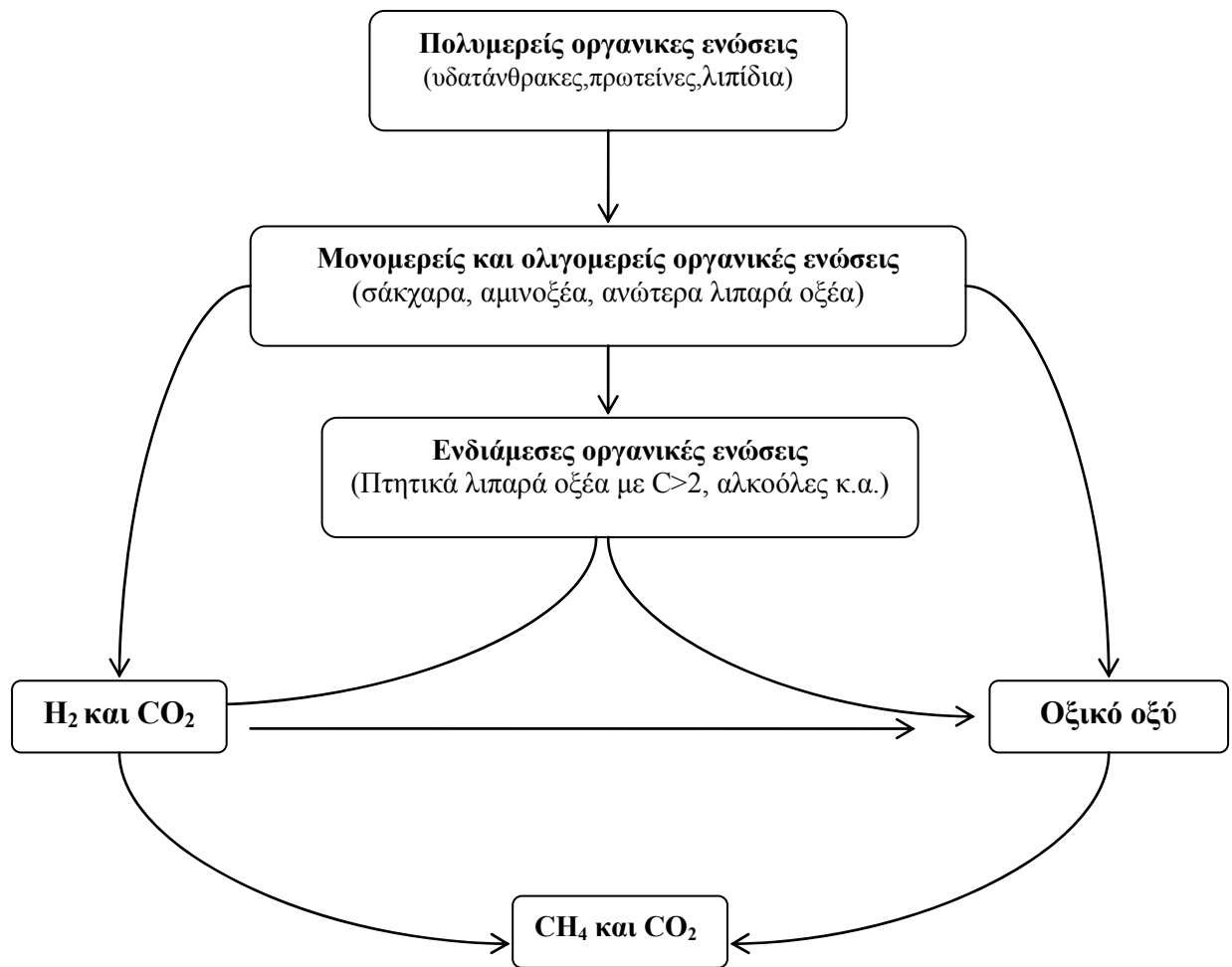
Οξειδοαναγωγικό ζεύγος	$E'_0$ (V) για Ph=7
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2$	-0.420
Φερρεδοξίνη( $\text{Fe}^{3+}$ ) $\rightarrow$ Φερρεδοξίνη( $\text{Fe}^{2+}$ )	-0.400
$\text{NAD}^+ + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$	-0.320
$\text{SO}_4^{2-} + 10\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O}$	-0.220
Ακεταλδευδη $+ 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow$ αιθανόλη	-0.197
Πυροσταφιλικό $^{2-} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow$ Γαλακτικό	-0.185
$\text{FAD} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{FADH}_2$	-0.180
$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	+0.421
$\text{NO}_2^- + 8\text{H}^+ + 6\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	+0.440
$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	+0.815

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κατά την αναερόβια χώνευση λαμβάνει χώρα η βιολογική οξείδωση οργανικών υποστρωμάτων, η οποία ισοδυναμεί με την απώλεια ατόμων υδρογόνου και συνεπώς με την απώλεια ηλεκτρονίων. Οι κυριότεροι δέκτες ηλεκτρονίων, είναι το συνένζυμο  $\text{NAD}^+$  (νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδιο) με ανηγμένη μορφή NADH και το συνένζυμο  $\text{NADP}^+$ . Το συνένζυμο  $\text{NAD}^+$  συμμετέχει σε καταβολικές αντιδράσεις. Ένας άλλος σημαντικός μεταφορέας ηλεκτρονίων είναι η φερρεδοξίνη.

Η αναερόβια χώνευση μπορεί να είναι τόσο απλή, όπως φαίνεται στο σχήμα 3.3 [Muller, 2001]. Το υπόστρωμα οξειδώνεται προς ένα οργανικό ενδιάμεσο προϊόν το οποίο ανάγεται στα τελικά προϊόντα. Ως οξειδωτικό μέσο δρα το  $\text{NAD}^+$  και ως αναγωγικό μέσο το  $\text{NADH}$ . Μέρος της ενέργειας που απελευθερώνεται κατά την οξείδωση, αποθηκεύεται στα παραγόμενα μόρια του ATP (φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος).

### 3.2 Τα στάδια της αναερόβιας χώνευσης

Κατά την αναερόβια χώνευση η οργανική ύλη μετατρέπεται κυρίως σε μεθάνιο και διοξείδιο του άνθρακα μέσω μιας σειράς αλυσιδωτών αντιδράσεων, οι οποίες λαμβάνουν χώρα από διακριτές ομάδες αναερόβιων μικροοργανισμών. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, κυρίως τρεις σημαντικές ομάδες μικροοργανισμών έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί και θεωρείται ότι, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διεργασία της αναερόβιας βιοαποδόμησης της οργανικής ύλης, η οποία λαμβάνει χώρα σε τέσσερα στάδια [Ahng, 2003; Largus et al., 2004]. Σύμφωνα με το σχήμα 3.4, τα υδρολυτικά βακτήρια (1α) υδρολύουν τις πολυμερείς οργανικές ενώσεις προς μονομερή ή ολιγομερή, τα οποία στη συνέχεια, κατά το στάδιο της οξεογένεσης/ζύμωσης, μεταβολίζονται από τα ζυμωτικά βακτήρια (1β) σε πτητικά λιπαρά οξέα, αλκοόλες κ.α., με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Στο στάδιο της οξικογένεσης, συντελείται η μετατροπή των ανωτέρων πτητικών λιπαρών οξέων καθώς και των αλκοολών σε οξικό οξύ με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα από τα υποχρεωτικά οξικογόνα βακτήρια παραγωγής υδρογόνου (2α). επίσης, ομοοξικογόνα βακτήρια (2β) παράγουν οξικό οξύ από υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα. Τέλος, κατά το τέταρτο στάδιο της αναερόβιας ζύμωσης, τη μεθανογένεση, μεθάνιο παράγεται είτε από οξικό οξύ μέσω των οξικολυτικών μεθανογόνων βακτηρίων (3α) είτε από υδρογόνο και διοξείδιο του άνθρακα μέσω των μεθανογόνων βακτηρίων που χρησιμοποιούν το υδρογόνο για να ανάγουν το διοξείδιο του άνθρακα προς μεθάνιο (3β). είναι γνωστό ότι περίπου το 65-70% του παραγόμενου μεθανίου προέρχεται από τα οξικολυτικά μεθανογόνα βακτήρια. Το γεγονός αυτό καθιστά το οξικό οξύ ως το σπουδαιότερο υπόστρωμα των μεθανογόνων κατά την αναερόβια χώνευση.



Σχήμα 2.1. Η διεργασία της αναερόβιας χώνευσης για την παραγωγή βιοαερίου από οργανική ύλη

Η οξείδωση του προπιονικού οξέος προς οξικό οξύ και υδρογόνο είναι εφικτή μόνο όταν η μερική πίεση του υδρογόνου είναι μικρότερη από  $10^{-4}$  atm, ενώ η οξείδωση του βουτυρικού οξέος προς οξικό οξύ και υδρογόνο λαμβάνει χώρα μόνο όταν η μερική πίεση του υδρογόνου είναι μικρότερη από  $10^{-3}$  atm. Η οξείδωση της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος προς οξικό οξύ και υδρογόνο είναι αδύνατη όταν η μερική πίεση του υδρογόνου είναι σχεδόν 1 atm.

Ωστόσο, σε έναν αναερόβιο αντιδραστήρα παραγωγής μεθανίου, η μερική πίεση του υδρογόνου διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, λόγω της δράσης των μεθανογόνων βακτηρίων που είναι χρήστες υδρογόνου, με αποτέλεσμα να είναι θερμοδυναμικά



εφικτές οι αντιδράσεις οξείδωσης των προϊόντων της οξεογένεσης. Η σχέση μεταξύ των μικροοργανισμών που αποδομούν τα πτητικά λιπαρά οξέα και τα βακτήρια που παράγουν μεθάνιο από υδρογόνο χαρακτηρίζεται ως ‘συντροφική’ και το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως η μεταξύ μικροβιακών ειδών μεταφορά υδρογόνου (interspecies hydrogen transfer).

Αντίθετα, σε αναερόβιους βιοαντιδραστήρες παραγωγής υδρογόνου, όπου η μερική πίεση του υδρογόνου καθιστάται αρκετά μεγαλύτερη από τις απαγορευτικές τιμές και η δράση των μικροοργανισμών που καταναλώνουν υδρογόνο (όπως υδρογονοχρηστικά μεθανογόνα βακτήρια, ομοοξικογόνα βακτήρια και βακτήρια που ανάγουν τα θειικά ιόντα) καταστέλλεται, η οξείδωση των προϊόντων της οξεογένεσης και η παραγωγή μεθανίου καθιστάται μη αυθόρμητη με βάση τη θερμοδυναμική.

### **3.3 Ανάσχεση της μεθανογένεσης με στόχο την παραγωγή υδρογόνου**

Η βιολογική παραγωγή υδρογόνου, μέσω της αναερόβιας επεξεργασίας βιοαποδομήσιμων οργανικών αποβλήτων, έχει πολλά κοινά σημεία με την παραγωγή μεθανίου, καθώς το υδρογόνο αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν της αναερόβιας χώνευσης, αφού παράγεται κατά το στάδιο της οξεογένεσης. Για αυτό, έχει προταθεί και αναπτυχθεί με επιτυχία η αναερόβια επεξεργασία δυο σταδίων σε σειρά, όπου η οξεογένεση και η μεθανογένεση λαμβάνουν χώρα ξεχωριστά για την ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και μεθανίου, αντίστοιχα [Benemann et al., 2004; Ting et al., 2004; Gavala et al., 2005; Ueno et al., 2007].

Τα ζυμωτικά βακτήρια που έχουν την ικανότητα να παράγουν υδρογόνο, μπορεί να είναι αυστηρά αναερόβια (Clostridia, Methanobacteria κ.α.), προαιρετικά αναερόβια (Enterobacteria κ.α.) ακόμα και αερόβια βακτήρια (Alcaligenes, Bacillus κ.α.) υπό ανοξικές συνθήκες [Nandi & Sengupta, 1998].

Συχνά μικτές καλλιέργειες αντί καθαρών καλλιιεργειών χρησιμοποιούνται για την αναερόβια επεξεργασία αποβλήτων με στόχο την παραγωγή υδρογόνου, καθώς μπορούν να μεταβολίσουν μια μεγάλη ποικιλία από υποστρώματα σε μη άσηπτες συνθήκες, καθιστώντας τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα ευκολότερη σε επίπεδο χειρισμών και οικονομικότερη [Valdez-Vazquez et al., 2005]. Ωστόσο, το υδρογόνο που παράγεται από μικτές καλλιέργειες υπό αναερόβιες συνθήκες, συχνά

καταναλώνεται από άλλα βακτήρια, που το χρησιμοποιούν για το μεταβολισμό τους. Κατά συνέπεια η μικτή αναερόβια καλλιέργεια πρέπει να υποστεί κατάλληλη επεξεργασία, ώστε να περιοριστεί στο ελάχιστο η μη επιθυμητή διεργασία της κατανάλωσης του παραγόμενου υδρογόνου από τα βακτήρια αυτά. Η επιτυχία των μεθόδων προεπεξεργασίας της μικτής αναερόβιας καλλιέργειας βασίζεται στην ικανότητα των βακτηρίων που παράγουν υδρογόνο να σχηματίζουν σπόρους (όπως έλλειψη θρεπτικών, αύξηση θερμοκρασίας, ξήρανση, ακτινοβολία κ.α.), σε αντίθεση με την πλειοψηφία των βακτηρίων που καταναλώνουν υδρογόνο (μεθανογόνα βακτήρια που είναι χρήστες υδρογόνου, ομοοξικογόνα βακτήρια και βακτήρια που ανάγουν τα θειικά ιόντα) [Brock et al., 1994, Mizuno et al., 2000]. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι, οι μικτές καλλιέργειες που προέρχονται από αναερόβια λάσπη και ιζήματα, αποτελούνται κυρίως από αναερόβια βακτήρια του γένους *Clostridia* [Hawkes et al., 2002]. Η θέρμανση, η όξινη ή βασική επεξεργασία, ο αερισμός, η χρήση χημικών και η χρήση ηλεκτρικού ρεύματος είναι οι πιο γνωστές και αποτελεσματικές μέθοδοι προεπεξεργασίας.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η αναερόβια μετατροπή της οργανικής ύλης προς μεθάνιο λαμβάνει χώρα για ουδέτερες τιμές του pH. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο ρυθμός παραγωγής μεθανίου μειώνεται απότομα ή και σταματά για pH κάτω από 6.3 ή πάνω από 7.8 [Chen et al., 2002]. Συνεπώς, ρύθμιση του pH σε τιμές μικρότερες ή μεγαλύτερες του 7, παρεμποδίζει τη δράση των μεθανογόνων, αρκεί από τους οποίους καταναλώνουν υδρογόνο, χωρίς όμως να περιορίζεται η δράση των ζυμωτικών μικροοργανισμών παραγωγής υδρογόνου.

Οι μεθανογόνοι μικροοργανισμοί είναι αυστηρά αναερόβιοι και ιδιαίτερα ευαίσθητοι όταν εκτίθενται σε αρκετές ουσίες. Επομένως, η δράση των μεθανογόνων μπορεί να ανασταλεί με απλό αερισμό ή με την προσθήκη τοξικών ουσιών. Για παράδειγμα, ο Ueno και οι συνεργάτες του (1995, 1996) αναφέρουν ότι η λάσπη προερχόμενη από λιπασματοποίηση ύστερα από έντονο αερισμό παρήγαγε αναερόβια, από απόβλητο πλούσιο σε κυτταρίνη, 330-340 mL H<sub>2</sub>/g εξόζης, ενώ δεν παρήγαγε καθόλου μεθάνιο. Οι χημικές ουσίες που συνήθως χρησιμοποιούνται για να αναστείλουν τη δράση των μεθανογόνων είναι το βρωμιούχο άλας του αιθανοσουλφονικού οξέος (2-Bromoethanesulfonate, BES) το ακετυλένιο και το χλωροφόρμιο [Sparling et al., 2002; Cheng et al., 2003]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί ότι η χρήση

BES σε συγκεντρώσεις μέχρι 25 mM [Sparling et al.,1997] ή 100 mM [Wang et al., 2003a] είναι αποτελεσματική για την παραγωγή υδρογόνου, καθίσταται όμως οικονομικά ασύμφορη για λειτουργία σε μεγάλη κλίμακα.

### **3.4 Αναερόβιος μεταβολισμός οργανικής ύλης για παραγωγή υδρογόνου**

Τα σημαντικότερα κριτήρια για το χαρακτηρισμό ενός τύπου οργανικής ύλης ως κατάλληλου για την παραγωγή υδρογόνου είναι η διαθεσιμότητα, το κόστος, η περιεκτικότητα κυρίως σε υδατάνθρακες και η βιοαποδομησιμότητα της [Kardan & Kargi, 2006]. Πολλοί τύποι οργανικών ενώσεων, από πολυμερή μέχρι μονομερή σάκχαρα, λίπη και πρωτεΐνες, μπορούν να αποτελέσουν υποστρώματα για την παραγωγή υδρογόνου [Classen et al., 1999]. Ωστόσο, πειράματα διαλείποντος έργου με υπόστρωμα υγρά ή στερεά απόβλητα κατέδειξαν ότι, η παραγωγή υδρογόνου είναι πιο αποδοτική όταν το απόβλητο είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες σε αντίθεση με απόβλητα που είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και λίπη [ Nokie & Mizuno, 2000; Okamoto et al., 2000; Lay et al., 2003]. Τα απλά σάκχαρα (όπως γλυκόζη, σακχαρόζη, λακτόζη) παρόλο που είναι εύκολα βιοδιασπάσιμες οργανικές ενώσεις αποτελούν ακριβές πρώτες ύλες. Επομένως, η παραγωγή υδρογόνου μέσω της αναερόβιας ζύμωσης καθίσταται ιδιαίτερα ελκυστική όταν, εκτός από μικτές καλλιέργειες, ως υποστρώματα χρησιμοποιούνται απόβλητα (υγρά ή στερεά), καθώς παράγεται ενέργεια χωρίς μεγάλο οικονομικό κόστος με σημαντικά οφέλη για το περιβάλλον (βιοτεχνολογική επεξεργασία αποβλήτων). Τα απόβλητα που χρησιμοποιούνται κυρίως ως υποστρώματα για την παραγωγή υδρογόνου συνοψίζονται στα ακόλουθα:

- Γεωργικά απόβλητα, απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων και αγροτοβιομηχανικά απόβλητα (στερεά ή υγρά) πλούσια σε άμυλο και κυτταρίνη.

Πολλά γεωργικά απόβλητα , αγροτοβιομηχανικά απόβλητα (όπως απόβλητα ελαιοτριβείων, τυροκομείων κ.α.), απόβλητα βιομηχανίας τροφίμων περιέχουν πολυμερή υδατανθράκων, όπως άμυλο ή/και κυτταρίνη, η σύνθεση δομή των οποίων επηρεάζει δυσμενώς τη βιοδιαθεσιμότητα τους. Το άμυλο, που περιέχεται στα απόβλητα, μέσω της όξινης ή της ενζυμικής υδρόλυσης από εξωκυτταρικά ένζυμα

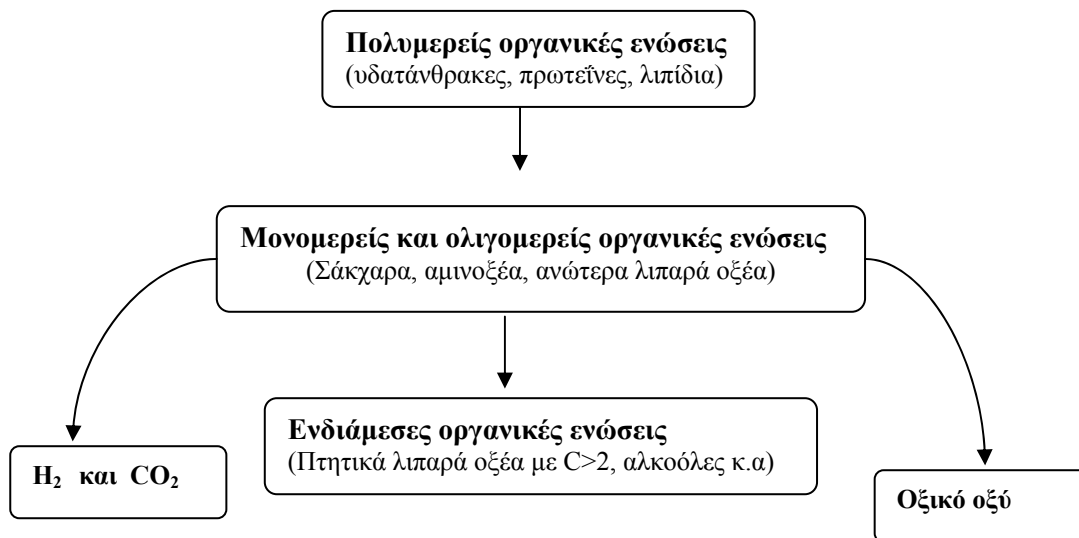
(αμυλάσες), μετατρέπεται σε γλυκόζη, μαλτόζη και άλλα ολιγομερή και στη συνέχεια μέσω της αναερόβιας ζύμωσης προς υδρογόνο και πτητικά λιπαρά οξέα. Τα απόβλητα που ανήκουν στην κατηγορία των λιγνοκυτταρινούχων υλικών, απαιτούν περαιτέρω προεπεξεργασία, ώστε να είναι κατάλληλα για την αναερόβια βιολογική παραγωγή υδρογόνου.

- Περίσσεια ιλύος από μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

Η περίσσεια ιλύος από μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, έχει προταθεί από αρκετούς ερευνητές ως υποστρώμα για την παραγωγή υδρογόνου, παρά τη χαμηλή απόδοση της, αφού πρώτα επεξεργαστεί κατάλληλα ώστε να ανασταλεί η δράση των μικροοργανισμών που καταναλώνουν υδρογόνο [Wang et al., 2003a, 2003b και 2004; Ting & Lee, in press].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το υδρογόνο κατά την αναερόβια χώνευση της οργανικής ύλης παράγεται στο στάδιο της οξεογένεσης. Επομένως, για να θεωρηθεί επιτυχής η βιολογική παραγωγή υδρογόνου από αναερόβια μικτή καλλιέργεια, οι μικροοργανισμοί που καταναλώνουν υδρογόνο θα πρέπει να παρεμποδιστούν. Έχοντας εξασφαλίσει ότι η δράση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών έχει ανασταλεί, η διεργασία της αναερόβιας χώνευσης για την παραγωγή υδρογόνου περιλαμβάνει τα ακόλουθα δύο στάδια (Σχήμα 3.6):

1. Ενζυμική υδρόλυση των οργανικών πολυμερών προς ενδιάμεσα οργανικά μονομερή ή ολιγομερή.
2. Ζύμωση των οργανικών ενδιάμεσων προς πτητικά λιπαρά οξέα, αλκοόλες κ.α. με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα.



**Σχήμα 3.2.** Η διεργασία της αναερόβιας χώνευσης για την παραγωγή υδρογόνου από οργανική ύλη.

### 3.5 Υδρόλυση στη αναερόβια χώνευση

#### 3.5.1 Γενικά

Οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να μεταβολίσουν απευθείας τη σύνθετη διαλυτή ή αδιάλυτη οργανική ύλη, καθώς η κυτταρική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη για τέτοιου είδους υλικά. Πρέπει να προηγηθεί υδρόλυση των σύνθετων οργανικών ενώσεων προς διαλυτά πολυμερή και στη συνέχεια προς διμερή ή μονομερή, τα οποία μπορούν πλέον να εισαχθούν στο κύτταρο με την δράση ειδικών ενζύμων (περμεάσες) και να μεταβολιστούν. Η υδρόλυση λαμβάνει χώρα με τη δράση μιας ειδικής κατηγορίας ενζύμων (υδρολάσες), τα οποία δρουν είτε εξωκυτταρικά (όπως στην περίπτωση των βιοπολυμερών) είτε ενδοκυτταρικά (όπως στην περίπτωση των μικρών διμερών). Η οργανική ύλη των αποβλήτων έχει συνήθως τη μορφή πολύπλοκων ενώσεων (μακρομόρια) και μπορεί να διακριθεί σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λίπη. Τα ένζυμα με βάση την κατηγορία των ενώσεων που υδρολύουν μπορούν να ταξινομηθούν όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί.

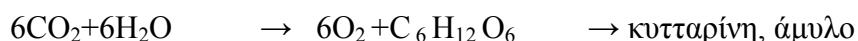
**Πινάκας 3.2** Τα κυριότερα υδρολυτικά ένζυμα

ENZΥΜΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΠΡΟΙΟΝ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ
<i>Υδρολάσες υδατανθράκων</i>		
Φρουκτοσιδάση	Σακχαρόζη	Φρουκτόζη + γλυκόζη
α- γλυκοσιδάση	Μαλτόζη	γλυκόζη
β- γλυκοσιδάση	Κελλοβιόζη	γλυκόζη
β- γαλακτοσιδάση	Λακτόζη	Γαλακτόζη + γλυκόζη
Αμυλάσες	Άμυλο	μαλτόζη
Κυτταρινάση	κυτταρίνη	κελλοβιόζη
<i>Υδρολάσες αζωτούχων ενώσεων</i>		
ενδοπεπτιδάσες		
εξωπεπτιδάσες	Μέσο πρωτεϊνών	Πεπτίδια
απαμινάσες	Άκρα πρωτεϊνών	αμινοξέα
Εστεράσες	αμινοξέα	NH <sub>3</sub> + οργανικά οξέα
λιπάσες	Γλυκερίδια (λίπη)	Γλυκερόλη + λιπαρά οξέα

### 3.5.2 Υδρόλυση υδατανθράκων

Οι υδατάνθρακες (πολυσακχαρίτες) έχουν γενικό εμπειρικό τύπο C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>O<sub>n</sub> και περιλαμβάνουν ενώσεις που περιέχουν τουλάχιστον τρία άτομα άνθρακα. Οι υδατάνθρακες βιοσυντίθενται από τα φυτά μέσω της φωτοσύνθεσης, μιας περίπλοκης διαδικασίας κατά την οποία το ηλιακό φως προσφέρει της απαραίτητη ενέργεια για την

μετατροπή του CO<sub>2</sub> σε γλυκόζη (εξίσωση 3.2). στην συνέχεια, πολλά μόρια γλυκόζης συνδέονται με χημικούς δεσμούς, σχηματίζοντας μεγαλύτερα μόρια τα οποία αποθηκεύονται με την μορφή κυτταρίνης ή αμύλου. Έτσι, οι υδατάνθρακες είναι κατά κάποιο τρόπο οι ενδιάμεσες χημικές ενώσεις, μέσω της βιοσύνθεσης των οποίων, η ηλιακή ενέργεια αποθηκεύεται και αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας όταν μεταβολίζεται από τους ζωντανούς οργανισμούς.



Οι πλέον διαδεδομένοι πολυσακχαρίτες που απαντώνται στα απόβλητα είναι η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και το άμυλο. Η κυτταρίνη, ένα γραμμικό ομοπολυμερές, αποτελείται από μονομερή γλυκόζης, συνδεδεμένα με β-1, 4- γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η ημικυτταρίνη είναι ένα διακλαδισμένο συμπολυμερές, αποτελούμενο από πεντόζες (D-ξυλόζη, L-αραβινόζη), εξόζες (D-μαννόζη, D-γλυκόζη, D-γαλακτόζη) και ουρονικά οξέα.

Το άμυλο είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης, στο οποίο οι μονοσακχαριτικές μονάδες συνδέονται με α-1, 4- γλυκοζιτικούς δεσμούς. Το άμυλο μπορεί να διαχωριστεί σε δυο κλάσματα: σε αυτό που είναι αδιάλυτο στο νερό και ονομάζεται αμυλόζη και σε αυτό που είναι διαλυτό και ονομάζεται αμυλοπηκτίνη (Σχήμα 3.7). Η αμυλόζη, που αντιστοιχεί στο 10-20% περίπου του βάρους του αμύλου, αποτελείται από εκατοντάδες μόρια α-D-γλυκόζης ενωμένα με α-1, 4-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η αμυλοπηκτίνη, που αποτελεί το υπόλοιπο 80-90% του αμύλου, έχει πιο περίπλοκη δομή από την αμυλόζη καθώς παρουσιάζει διακλαδώσεις περίπου κάθε 20-30 μόρια γλυκόζης, τα οποία συνδέονται με α-1, 6-γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Η διάσπαση του αμύλου μπορεί να λάβει χώρα μέσω όξινης ή ενζυμικής υδρόλυσης. Στην περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης, το άμυλο υδρολύεται από εξωκυτταρικά ένζυμα, τις αμυλάσες. Πιο συγκεκριμένα, η α-αμυλάση υδρολύει το άμυλο πολύ γρήγορα, προσβάλλοντας ταυτόχρονα πολλούς δεσμούς, ακόμη και αυτούς που είναι στο κέντρο της αλυσίδας, παράγοντας μαλτόζη, γλυκόζη και ολιγομερή με τρία έως επτά μόρια γλυκόζης. Οι β-αμυλάσες ξεκινούν από τα ελεύθερα μη αναγωγικά άκρα του μακρομορίου. Η υδρόλυση σταματά στα σημεία διακλάδωσης. Όταν τα σημεία αυτά διασπαστούν από άλλα ένζυμα, η υδρόλυση συνεχίζεται μέχρι την πλήρη μετατροπή σε μαλτόζη, η οποία μπορεί να διασπαστεί εξωκυτταρικά από τις

μαλτάσες. Αν το κύτταρο διαθέτει ειδικές περμεάσες, η μαλτόζη και άλλα ολιγομερή μπορούν να περάσουν μέσα στο κύτταρο και να μεταβολιστούν.

### **3.6 Οξεογένεση στην αναερόβια χώνευση**

Κατά το στάδιο της οξεογένεσης/ζύμωσης διαλυτό οργανικό υλικό βιοαποδομείται προς απλούστερες οργανικές ενώσεις, κυρίως προς πτητικά λιπαρά οξέα και αλκοόλες με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα. Στη συνέχεια, περιγράφεται η οξεογένεση από διάφορες οργανικές ενώσεις (όπως σάκχαρα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα) με τους υδατάνθρακες (σάκχαρα) να αποτελούν την κυριότερη πηγή άνθρακα για την αναερόβια βιολογική παραγωγή υδρογόνου [Classen et al., 1999; Lay et al., 2003].

### **3.7 Ζύμωση σακχάρων και προϊόντα**

Κατά την ζύμωση των σακχάρων παράγονται κυρίως πτητικά λιπαρά οξέα (οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, βουτυρικό οξύ κ.α.), γαλακτικό οξύ, μεθανικό (μυρμηκικό) οξύ, αιθανόλη, βουτανόλη, ακετόνη κ.α., με ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα.

Η βιοαποδόμηση της γλυκόζης μέσω διάφορων μεταβολικών δικτύων έχει μελετηθεί εκτενώς, καθώς αποτελεί ένα από τα βασικότερα στοιχεία του κυτταρικού μεταβολισμού. Το πιο σύνηθες μεταβολικό δίκτυο είναι το δίκτυο Embden-Meyerhof-Parnas (AMP) γνωστό και ως γλυκόλυση. Σε κάποιες ζυμώσεις η γλυκόζη βιοαποδομείται μέσω του δικτύου των φωσφορικών πεντοζών ή και μέσω του δικτύου Entner-Doudoroff (ED). Η ζύμωση άλλων σακχάρων εκτός της γλυκόζης περιλαμβάνει την ενζυμική μετατροπή τους σε γλυκόζη είτε σε άλλες ενδιάμεσες ενώσεις των παραπάνω δικτύων. Ο σχηματισμός του υδρογόνου συνεισφέρει έμμεσα στη αξιοποίηση των παραγόμενων ηλεκτρονίων, που μεταφέρονται μέσω της ανηγμένης μορφής συνεχζύμων  $\text{NAD}^+$  ή  $\text{NADP}^+$ .

### **3.8 Παράγοντες που επηρεάζουν την αναερόβια παραγωγή υδρογόνου**



### 3.8.1 Θρεπτικά συστατικά και παρεμποδιστές

Όπως όλες οι βιολογικές διεργασίες, έτσι και η αναερόβια παραγωγή υδρογόνου απαιτεί θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και το μεταβολισμό της οργανικής ύλης. Τα θρεπτικά συστατικά που συνήθως απαιτούνται είναι άζωτο, φώσφορος και κάποια ιχνοστοιχεία.

Το άζωτο είναι το πιο απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, η βέλτιστη συγκέντρωση αζώτου κυμαίνεται από 0.1 έως 2 g N/L και ο λόγος C/N από 3.3 έως 130 [Li & Fang, 2007]. Για παράδειγμα ο Ueno και οι συνεργάτες του (2001a) μελέτησαν την παραγωγή υδρογόνου από κυτταρίνη (10 g/L) σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αζώτου (0.13 και 0.9 g N/L) και αντίστοιχους λόγους C/N 34 και 5, ήταν περίπου 100% υψηλότερη από την παραγωγή υδρογόνου (136 mL H<sub>2</sub>/g εξόζης) με 0.13 g N/L και λόγο C/N ίσο με 34. Επίσης, οι Lin και Lay (2004a) μελέτησαν την παραγωγή υδρογόνου σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης με 0.9 g N/L και λόγους C/N ίσους με 130, 98, 47 και 40 παρατήρησαν ότι, η μέγιστη απόδοση σε υδρογόνο (327 mL H<sub>2</sub>/g εξόζης) επιτεύχθηκε για λόγο C/N ίσο με 47.

Σύμφωνα με ελάχιστες μελέτες έχει βρεθεί ότι, ο φώσφορος είναι απαραίτητος για την παραγωγή υδρογόνου τόσο ως θρεπτικό συστατικό όσο και για την ρυθμιστική ου ικανότητα [Oh et al., 2002; Lin & Lay, 2004b]. Ο Hawkes και οι συνεργάτες του (2002) μελετώντας όλα τα δεδομένα της βιβλιογραφίας κατέληξαν ότι, ο βέλτιστος λόγος C/P για την παραγωγή υδρογόνου είναι ίσος με 130. Ανάλογο είναι και το συμπέρασμα που προκύπτει από την μελέτη των Lin και Lay (2004b) σύμφωνα με την οποία ο βέλτιστος λόγος C/P για την παραγωγή υδρογόνου από σακχαρόζη είναι ίσος με 120.

Lin και Lay (2005) μελέτησαν την επίδραση 11 ιχνοστοιχείων στην αναερόβια βιολογική παραγωγή υδρογόνου και κατέληξαν ότι, το μαγνήσιο, το νάτριο, ο ψευδάργυρος και ο σίδηρος είναι τα πιο απαραίτητα ιχνοστοιχεία, με το μαγνήσιο να είναι το πιο σημαντικό από τα τέσσερα. Η μέγιστη απόδοση σε υδρογόνο, από απόβλητο πλούσιο σε σακχαρόζη, ήταν 233 mL H<sub>2</sub>/g εξόζης, για 4.8 mg Mg<sup>2+</sup>/L 393 mg Na<sup>2+</sup>/L, 0.25 mg Zn<sup>2+</sup>/L και 1 mg Fe<sup>+2</sup>/L. Ωστόσο οι μελέτες επικεντρώνονται στην επίδραση του σιδήρου, καθώς η παρουσία του είναι ουσιώδης για την δράση του

ενζύμου υδρογενάση [Hawkes et al., 2002]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι, η περιορισμένη συγκέντρωση σε σίδηρο όχι μόνο οδηγεί σε μείωση της παραγωγής σε υδρογόνο αλλά και σε αύξηση της παραγωγής σε αλκοόλες (π.χ. αιθανόλη και βουτανόλη) [Lee et al., 2001] με την βέλτιστη συγκέντρωση σιδήρου να κυμαίνεται από 10 mg Fe<sup>2+</sup>/L [Liu & Shen, 2004] έως 353 mg Fe<sup>2+</sup>/L [Lee et al., 2004].

Βαρέα μέταλλα (όπως κάδμιο, χρώμιο, ψευδάργυρος, χαλκός, νικέλιο και μόλυβδος) που βρίσκονται κυρίως σε βιομηχανικά αλλά και αστικά απόβλητα είναι ιδιαίτερα παρεμποδιστικά για την αναερόβια χώνευση. Ο Hsieh (2004) διαπίστωσε ότι κατά την βιολογική παραγωγή υδρογόνου από σακχαρόζη, ο ψευδάργυρος (C<sub>50</sub> 65 mg/L) ήταν πιο τοξικός από τον ψευδάργυρο (C<sub>50</sub> 120 mg/L) [Yu & Fang, 2001a] και το χρώμιο (C<sub>50</sub> 72 mg/L) ήταν πιο τοξικό από το κάδμιο (C<sub>50</sub> 170 mg/L) [Yu & Fang, 2001b].

### *3.8.2 Λειτουργικές παράμετροι*

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, κρίσιμες λειτουργικές παράμετροι για την αναερόβια βιολογική παραγωγή υδρογόνου είναι το pH, η θερμοκρασία και ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT) [Li & Fang, 2007].

Το pH είναι από τις βασικότερες λειτουργικές παραμέτρους καθώς μπορεί να επηρεάσει την ενεργότητα της υδρογενάσης (παρεμπόδιση για χαμηλές τιμές του pH), το δίκτυο μεταβολισμού των υποστρωμάτων, ενώ μπορεί να συμβάλλει στην κααστολή της δράσης των μεθανογόνων βακτηρίων που καταναλώνουν υδρογόνο [Li & Fang, 2007; Khanal et al., in press].

Σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες, το βουτυρικό οξύ και το οξικό οξύ είναι τα κύρια προϊόντα κατά την αναερόβια βιολογική παραγωγή βουτυρικού οξέος. Η παραγωγή του προπιονικού οξέος αυξάνεται αισθητά για τις τιμές pH κοντά στο 7 ή και παραπάνω [Li & Fang, 2007]. Οι ερευνητές Fang και Liu (2002) μελέτησαν την κατανομή των προϊόντων για τιμές pH από 4 έως 7 και διαπίστωσαν ότι, το βουτυρικό οξύ ήταν το κυρίαρχο προϊόν (μέχρι 45.6%) για pH μικρότερο ή ίσο του 6, ενώ το οξικό οξύ ήταν το κυρίαρχο προϊόν (μέχρι 34.1%) για pH μεγαλύτερο ή ίσο του 6.5. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι, η βέλτιστη τιμή του pH για την παραγωγή υδρογόνου ήταν 5.5 (286 mL H<sub>2</sub> /g εξόζης). Επίσης, σύμφωνα με την μελέτη του

ερευνητή Kim και των συνεργατών του (2004), το βουτυρικό οξύ ήταν το κύριο προϊόν για  $pH=5.5$ , ενώ η βουτανόλη έγινε το κυρίαρχο προϊόν  $pH=4.3$ .

Ωστόσο, οι υψηλές συγκεντρώσεις των πτητικών λιπαρών οξέων (κυρίως οξικού οξέος και βουτυρικού οξέος) μπορεί να περιορίσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που παράγουν υδρογόνου [Zheng & Yu, 2005]. Οι Van Ginkel και Logan (2005) παρατήρησαν ότι, η παραγωγή υδρογόνου σταμάτησε, όταν πρόσθεσαν οξικό οξύ και βουτυρικό οξύ, μέχρι η τελική συγκέντρωσή τους να γίνει ίση με 50 mM και 63 mM, αντίστοιχα ( $pH=5$ ). Πιο συγκεκριμένα, τα πτητικά λιπαρά οξέα μειώνοντας το  $pH$  στο εσωτερικό του κυττάρου, καθώς δίστανται λόγω της αρχικά υψηλότερης τιμής του ενδοκυτταρικού  $pH$  [Gottschalk, 1986]. Για να αποφευχθεί η πτώση του  $pH$  στο εσωτερικό του κυττάρου, λόγω της ελεύθερης διείσδυσης των αδιάστατων μορίων των πτητικών λιπαρών οξέων, οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν ενέργεια για να ανταλλάξουν τα πρωτόνια με ιόντα καλίου από το περιβάλλον τους. Αυτό έχει ως συνέπεια τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης τους. Όταν το  $pH$  στο εσωτερικό του κυττάρου μειώνεται, το κύτταρο παράγει αλκοόλες, σπόρια ή παρεμποδίζεται εντελώς η λειτουργία του [Hawkes et al., 2007]. Αξίζει να αναφερθεί ότι, εάν η τιμή του εξωκυτταρικού  $pH$  είναι τέτοια ώστε ένα μεγάλο ποσοστό των πτητικών λιπαρών οξέων έχει διασταθεί, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος και πιθανότατα τη λύση των κυττάρων [Zheng & Yu, 2005].

Η θερμοκρασιακή κλίμακα για την αναερόβια βιολογική παραγωγή υδρογόνου διακρίνεται σε τρεις περιοχές: στην θερμοκρασιακή περιοχή περιβάλλοντος ( $15-30^{\circ}C$ ), στη μεσόφιλη ( $32-39^{\circ}C$ ) και στη θερμόφιλη ( $50-64^{\circ}C$ ) [Li & Fang, 2007]. Τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών έδειξαν ότι, η απόδοση σε υδρογόνο αυξάνει με την θερμοκρασία. Μια πιθανή εξήγηση που μπορεί να δοθεί είναι ότι η υδρογενάση, το ένζυμο κλειδί για την παραγωγή υδρογόνου, έχει βέλτιστη θερμοκρασία  $50^{\circ}C$  και  $70^{\circ}C$  [Koesnandar et al., 1991] και ότι οξεογόνα βακτήρια παραγωγής υδρογόνου (κυρίως Clostridia) είναι στην πλειοψηφία τους θερμοφιλά βακτήρια [Fang et al., 2002; Liu & Fang, 2002].

## **4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

---

### **4.1 Εισαγωγή**

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται περιγραφή όλων των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας.

### **4.2 Μέτρηση pH**

Η μέτρηση του pH γινόταν με τη χρήση φορητού πεχαμέτρου HI 8224 της Hanna.

### **4.3 Προσδιορισμός χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (ΧΑΟ)**

Ως χημικά απαιτούμενο οξυγόνο (ΧΑΟ) ορίζεται η ισοδύναμη ποσότητα οξυγόνου, που απαιτείται για την οξείδωση των συστατικών ενός δείγματος από ισχυρά οξειδωτικό μέσο. Ο προσδιορισμός του ΧΑΟ βασίζεται στο γεγονός ότι όλες οι οργανικές ενώσεις, με ελάχιστες εξαιρέσεις, μπορούν να οξειδωθούν από ισχυρά οξειδωτικά. Η οξείδωση του οργανικού υλικού ενός διαλύματος γίνεται από περίσσεια διχρωμικού καλίου ( $K_2Cr_2O_7$ ) με θέρμανση και σε ισχυρά όξινες συνθήκες. Ως καταλύτης για την οξείδωση των αλειφατικών ενώσεων χρησιμοποιείται θειικός άργυρος ( $AgSO_4$ ). Για την αποφυγή της δέσμευσης των ιόντων αργύρου από χλωριούχα, βρωμιούχα και ιωδιούχα ιόντα, τα οποία συνήθως υπάρχουν στα απόβλητα, γίνεται προσθήκη ιόντων υδραργύρου με τη μορφή θειικού υδραργύρου ( $HgSO_4$ ), τα οποία συμπλοκοποιούνται με τα ιόντα αλογόνων, οδηγώντας τα σε ίζημα.

Ο προσδιορισμός του διαλυτού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου έγινε με τη μέθοδο της κλειστής επαναρροής που περιγράφεται στο Standard Methods, με φωτομέτρηση στα 600 nm των ιόντων  $Cr^{3+}$  που προκύπτουν από την οξείδωση του οργανικού υλικού, ενώ του ολικού χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, με τη μέθοδο της ανοικτής επαναρροής με τιτλοδότηση των ιόντων  $Cr^{3+}$  με αραιό δ/μα  $H_2SO_4$  (0.02N) παρουσία δείκτη.

### **4.4 Προσδιορισμός ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών**

Ο προσδιορισμός των ολικών και πτητικών αιωρούμενων στερεών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την αντίστοιχη μέθοδο, που περιγράφεται στο βιβλίο “ Standard Methods for the examination of water and wastewater ”. Ολικά αιωρούμενα στερεά (ΟΑΣ) χαρακτηρίζονται τα μη διηθούμενα στερεά. Για τον προσδιορισμό τους, γνωστή ποσότητα καλώς αναμεμιγμένου δείγματος διηθείται σε προζυγισμένο ηθμό ινών ύαλου. Το υλικό που κατακρατείται στον ηθμό ξηραίνεται μέχρι σταθερού βάρους σε φούρνο στους 103 –105°C. Η αύξηση του βάρους του ηθμού αντιπροσωπεύει τα ολικά αιωρούμενα στερεά.

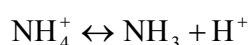
Τα πτητικά αιωρούμενα στερεά αποτελούν το κλάσμα των ολικών αιωρούμενων στερεών, το οποίο εξαερώνεται στους 550°C. Για τον προσδιορισμό τους, ο ηθμός στον οποίο έχουν κατακρατηθεί τα ολικά αιωρούμενα στερεά πυρακτώνεται, μέχρι σταθερού βάρους σε πυραντήριο στους 550°C. Η μείωση του βάρους του ηθμού αντιστοιχεί στα πτητικά αιωρούμενα στερεά.

#### **4.5 Περιγραφή της μεθόδου μέτρησης της σύστασης βιο-υδρογόνου**

Για τη μέτρηση της σύστασης του βιο-υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος (Agilent) εξοπλισμένος με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και ισοθερμοκρασιακό πρόγραμμα στους 80°C, ενώ η θερμοκρασία στον ανιχνευτή ήταν 180°C.

#### **4.6 Προσδιορισμός αμμωνίας και ολικού αζώτου κατά Kjeldahl**

Ο προσδιορισμός της αμμωνίας έγινε με τη μέθοδο της απόσταξης όπως περιγράφεται στο Standard Methods. Στο προς ανάλυση δείγμα προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα τετραβορικού νατρίου ( Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) και υδροξειδίου του νατρίου και ρυθμίζεται το pH στο 9.5 με πυκνό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου, με αποτέλεσμα να μεταφέρεται η χημική ισορροπία των ιόντων αμμωνίου προς τα δεξιά .



Στη συνέχεια ακολουθεί απόσταξη, μέχρι να συλλεχθεί όγκος αποστάγματος ίσος με το 70-80% του αρχικού όγκου του δείγματος. Το απόσταγμα συλλέγεται μέσα σε μία κωνική φιάλη που περιέχει διάλυμα βορικού οξέος (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) και δείκτη. Ο δείκτης

είναι διάλυμα προπανόλης με τις χρωστικές ουσίες methyl blue και methyl red. Το διάλυμα αυτό κατακρατεί την αμμωνία που περιέχεται στο απόσταγμα, μετατρέποντας τη σε ιόντα αμμωνίου. Στο τέλος της απόσταξης, προσδιορίζεται η ισοδύναμη ποσότητα αμμωνίας στο διάλυμα με τιτλοδότηση του αποστάγματος με πρότυπο διάλυμα θεικού οξέος.

Η μέθοδος Kjeldahl προσδιορίζει το άζωτο που βρίσκεται στην οξειδωτική βαθμίδα -3 και έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του “Standard Methods”. Χρησιμοποιήθηκε συσκευή μικρό- Kjeldahl με φιάλες χωρητικότητας 50 ml δείγματος. Η βασική αρχή του προσδιορισμού είναι η εξής: παρουσία θεικού οξέος ( $H_2SO_4$ ), θεικού καλίου ( $K_2SO_4$ ) και θεικού υδραργύρου ( $HgSO_4$ ) και κάτω από θερμοκρασία βρασμού του θεικού οξέος ( $340^{\circ}C$ ), το οργανικό άζωτο και η ελεύθερη αμμωνία μετατρέπονται σε αμμωνιακό άλας ( $NH_4HSO_4$ ), αφού προηγηθεί οξείδωση (χώνευση) του οργανικού υλικού.

Μετά το τέλος της χώνευσης, προστίθεται αντιδραστήριο υδροξειδίου του νατρίου για την ανύψωση της τιμής του pH και αντιδραστήριο θειοθεικού νατρίου ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ) για τη διάσπαση των συμπλόκων του υδραργύρου με τα αμμωνιόντα, και ακολουθεί απόσταξη. Η αποσταχθείσα αμμωνία κατακρατείται από διάλυμα βορικού οξέος και δείκτη. Η ποσότητα της προσδιορίζεται εν συνεχεία με τιτλοδότηση με πρότυπο διάλυμα θεικού οξέος 0.02 N.

#### **4.7 Προσδιορισμός ολικών και διαλυτών υδατανθράκων**

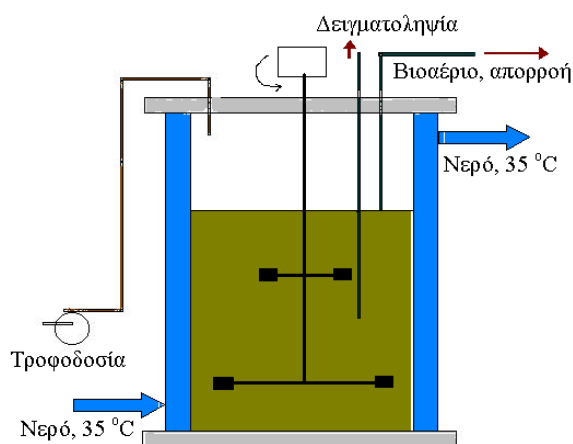
Για την μέτρηση των ολικών και διαλυτών υδατανθράκων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που προτείνει ο Jossefsson (1986) και η οποία περιλαμβάνει την μετατροπή των ουσιών αυτών σε ένα χρωματισμένο παράγωγο σακχάρων με προσθήκη L-tryptophan στο δείγμα παρουσία θεικού και βορικού οξέος. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν φωτομέτρηση του δείγματος στα 520nm.

## 5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 5.1 Πειραματική διάταξη

#### 5.1.1 Αντιδραστήρας παραγωγής υδρογόνου

Για τη μελέτη της παραγωγής υδρογόνου κατασκευάστηκε αναερόβιος αντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας (CSTR). Ο συνολικός όγκος του αντιδραστήρα ήταν 1 l, ενώ ο λειτουργικός όγκος ρυθμίστηκε, στα 0,5 l. Όπως βλέπουμε από το σχήμα 3.1 ο αντιδραστήρας είχε διπλότοιχα τοιχώματα, από τα οποία περνούσε θερμαινόμενο νερό στους 37° C. Η απορροή του αντιδραστήρα πραγματοποιούνταν με φυσική ροή (χωρίς αντλία) λόγω της αύξησης της πίεσης στο εσωτερικό από την παραγωγή βιο-υδρογόνου.



Σχήμα 5.1. Πειραματική διάταξη αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (CSTR) για την παραγωγή υδρογόνου.

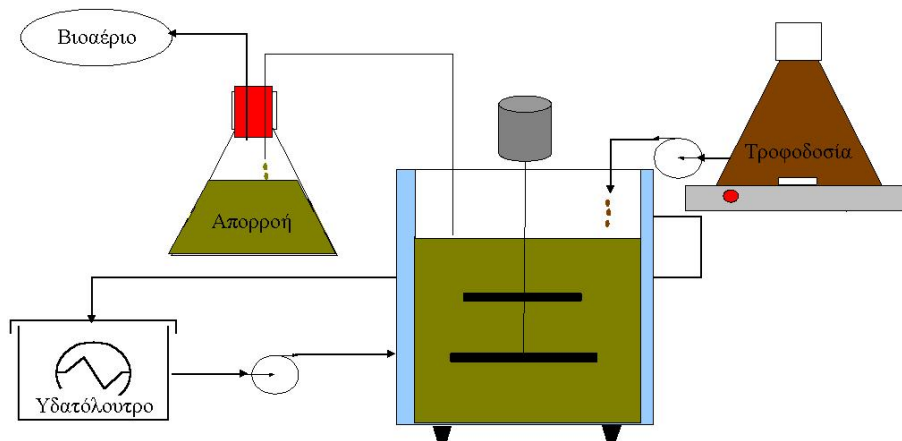
Έγινε σύγκριση της παραγωγής βιο-υδρογόνου πριν και μετά την προσθήκη γλυκερίνης σε κάθε περίπτωση.

Η τροφοδοσία στο σύστημα διατηρούνταν σε κλειστή φιάλη σε θερμοκρασία <math>< 10^{\circ}\text{C}</math> με τη βοήθεια θαλάμου ψύξης (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1. Πραγματική εικόνα τροφοδοσίας του αντιδραστήρα

Ο αντιδραστήρας λειτούργησε με υδραυλικό χρόνο παραμονής 24 h.



Σχήμα 5. 2. Πειραματική διάταξη αναερόβιας σε αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (CSTR).

### 5.1.2 Αντιδραστήρας παραγωγής βιοαερίου

Για τη μελέτη της παραγωγής βιοαερίου κατασκευάστηκε επίσης ένας αναερόβιος αντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας με συνολικό όγκο αυτή τη φορά 4 l, ενώ ο λειτουργικός όγκος ρυθμίστηκε, στα 3 l. Ο αντιδραστήρας είχε διπλότοιχα τοιχώματα, από τα οποία περνούσε θερμαινόμενο νερό στους 37° C και η απορροή του αντιδραστήρα πραγματοποιούταν με φυσική ροή όπως και στον αντιδραστήρα παραγωγής βιο-υδρογόνου.

Στην εικόνα 5.2 παρουσιάζεται συνολικά η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τη λειτουργία των αναερόβιων αντιδραστήρων για την παραγωγή βιοαερίου και υδρογόνου





Εικόνα 5.2 Πειραματική διάταξη των αναερόβιων αντιδραστήρων συνεχούς λειτουργίας που χρησιμοποιήθηκαν στην ερευνητική εργασία.

### 5.2 Τροφοδοσία

Η τροφοδοσία ήταν μίγμα πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια επεξεργασμένης ιλύος από την μονάδα βιολογικού καθαρισμού λυμάτων του δήμου Ηρακλείου. Το μίγμα διατηρήθηκε στην κατάψυξη στους  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι την χρήση του. Η ακατέργαστη γλυκερίνη προήλθε από την εταιρία παραγωγής βιοντίζελ AGROINVEST S.A. που βρίσκεται στην κεντρική Ελλάδα και η οποία παράγει βιοντίζελ χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη, ελαιοκράμβη, ηλιέλαιο και σογιέλαιο (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Κύρια χαρακτηριστικά της ακατέργαστης γλυκερίνης

Παράμετρος	Γλυκερίνη
pH	$5.0 \pm 0.1$
EC ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	$4.2 \pm 0.3$
Density ( $\text{kg}/\text{L}$ )	$1.25 \pm 0.1$
Ash (%)	$2.8 \pm 0.1$
TN ( $\text{mg}/\text{L}$ )	$372 \pm 21$
TP ( $\text{mg}/\text{L}$ )	$9.6 \pm 1.3$

Τα χαρακτηριστικά της λάσπης του βιολογικού παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Κύρια χαρακτηριστικά της λάσπης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα.

Παράμετρος	Λάσπη βιολογικού
pH	$6.8 \pm 0.2$
TS (g/L)	$35.4 \pm 3.1$
VS (g/L)	$26.1 \pm 2.8$
Total COD (g/L)	$35.2 \pm 2.4$
Soluble COD (g/L)	$1.9 \pm 0.3$
TN (mg/L)	$1042 \pm 157$
TP (mg/L)	$845 \pm 58$

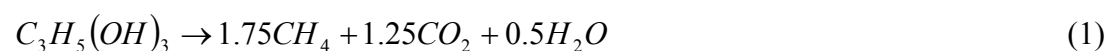
## 6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

### 6.1 Προσδιορισμός της απόδοσης σε μεθάνιο

Στο σχήμα 6.1 παρουσιάζεται η μεταβολή του ρυθμού παραγωγής μεθανίου, του pH και των πτητικών στερεών (VS) στον αντιδραστήρα που τροφοδοτείται με το μίγμα της λάσπης. Το pH ήταν σχεδόν σταθερό με τιμές μεταξύ 6.8 και 7.4. Σε σταθερές συνθήκες λειτουργίας, η παραγωγή του μεθανίου πριν και μετά την προσθήκη της γλυκερίνης ήταν  $1106 \pm 36$  mL/d και  $2353 \pm 94$  mL/d αντίστοιχα. Επομένως η επιπρόσθετη αύξηση της παραγωγή του μεθανίου από την προσθήκη της γλυκερίνης ήταν 1247 mL/d.

Η θεωρητική ποσότητα μεθανίου που παράγεται ανα γραμμάριο γλυκερίνης μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τον τύπο Buswell (Buswell and Neave, 1930):



και τον νόμο των τέλειων αερίων:

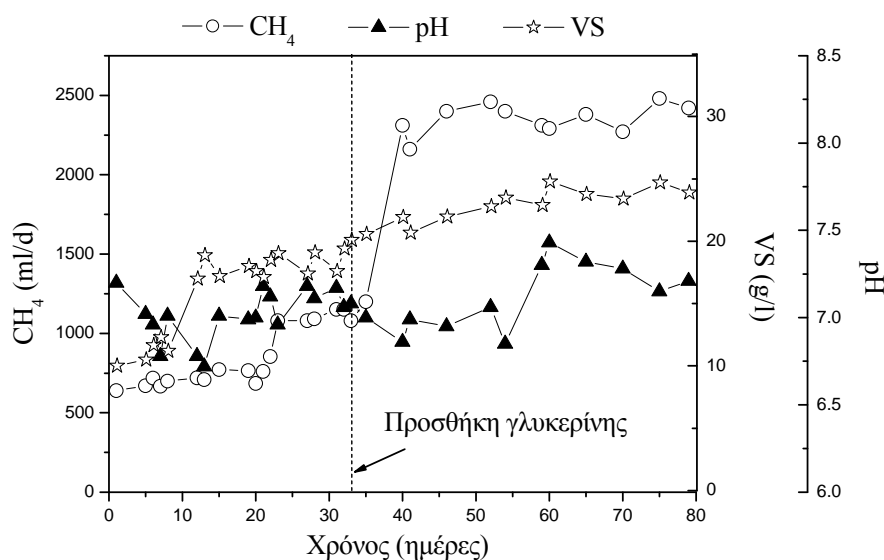
$$PV = nRT \quad (2)$$

Όπου  $P$  είναι η απόλυτη πίεση, atm;  $V$  είναι ο όγκος του αερίου, L;  $n$  είναι ο αριθμός των moles του αερίου;  $R$  είναι η σταθερά,  $0.082 \text{ l atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ; και  $T$  είναι η θερμοκρασία σε K.

Η πυκνότητα της γλυκερίνης στην παρούσα εργασία ήταν 1.25kg/L και επομένως η θεωρητική παραγωγή μεθανίου στον αντιδραστήρα υπολογίζεται στα 751 mL/d, τιμή μικρότερη από την πειραματική παρατηρούμενη. Η προσθήκη της γλυκερίνης στην τροφοδοσία είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση της οργανικής φόρτισης. Ωστόσο η

αύξηση της οργανικής φόρτισης όχι μόνο είχε αρνητική επίδραση αλλά αντιθέτως αύξησε την απόδοση του αντιδραστήρα σε μεθάνιο περισσότερο από την θεωρητική. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε προηγούμενη εργασία σχετικά με την επίδραση της γλυκερίνης στην παραγωγή μεθανίου από το οργανικό κλάσμα των αστικών απορριμμάτων (Fountoulakis and Manios, 2009).

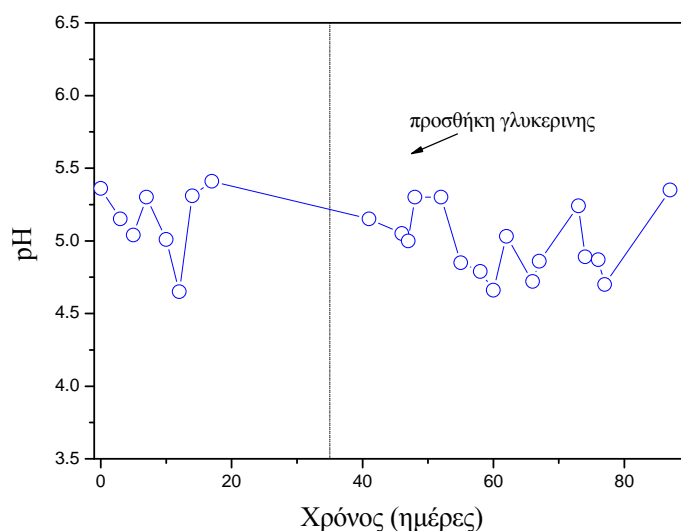
Τα πτητικά στερεά (VS) αυξήθηκαν από  $17.9 \pm 0.8$  g/l χωρίς την γλυκερίνη σε  $23.7 \pm 0.7$  με την γλυκερίνη. Εκτιμάται ότι το επιπλέον οργανικό υλικό που προστίθεται είχε σαν αποτέλεσμα των αύξηση της ενεργής βιομάζας (VS). Αυτή η υπόθεση ενισχύεται και από μια προηγούμενη μελέτη σχετικά με την επίδραση της γλυκερίνης για την παραγωγή μεθανίου κατά την επεξεργασία αποβλήτων από μονάδα επεξεργασίας πατάτας (Ma et al. 2007) οι οποίοι βρήκαν μια αύξηση στην συγκέντρωση πτητικών στερεών κατά 3gVS/l μετά την προσθήκη της γλυκερίνης.



Σχήμα 6.1 Μεταβολή της παραγωγής μεθανίου, pH και VS κατά την διάρκεια της αναερόβιας χώνευσης λάσπης βιολογικού καθαρισμού πριν και μετά την προσθήκη γλυκερίνης.

## 6.2 Προσδιορισμός της απόδοσης σε υδρογόνο

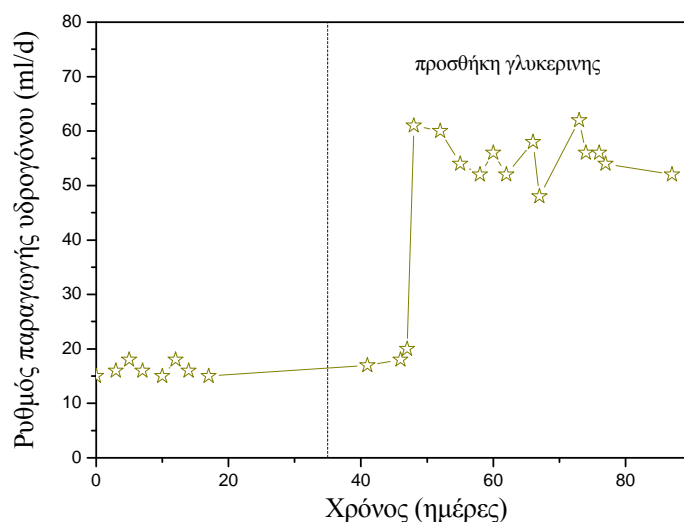
Στο σχήμα 6.2 παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά την διάρκεια λειτουργίας του συστήματος. Η τιμή του pH στον αντιδραστήρα ρυθμιζόταν στο 5.5 με την προσθήκη NaOH 1M καθημερινά ενώ οι καταγραμμένες τιμές ήταν από 4.5 έως 5.5.



**Σχήμα 6.2.** Μεταβολή του pH κατά την διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα για την παραγωγή βιοαερίου

Η μέση παραγωγή υδρογόνου πριν την προσθήκη της γλυκερίνης ήταν  $15 \pm 8$  ml/d. Χρησιμοποιώντας τα παραπάνω αποτελέσματα και λαμβάνοντας υπόψη την συγκέντρωση υδατανθράκων στην τροφοδοσία υπολογίζεται ότι παράγονται 0,6 mmole  $H_2$  ανά γραμμάριο υδατανθράκων που απομακρύνεται. Μετά την προσθήκη της γλυκερίνης η ημερήσια παραγωγή βιο-υδρογόνου στον αντιδραστήρα αυξήθηκε σε  $59 \pm 12$  ml/d, δηλαδή 44 ml/d περισσότερο από πριν. Υπολογίζεται ότι η απόδοση σε υδρογόνο της γλυκερίνης είναι 0.21 mmole  $H_2$  ανά γραμμάριο γλυκερίνης. Επίσης είναι γνωστό ότι η ζύμωση της γλυκερίνης μπορεί να παράγει υδρογόνο (Yazdani and Gonzalez, 2007) ωστόσο σε αυτή την εργασία είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται παραγωγή υδρογόνου από γλυκερίνη σε μικτές καλλιέργειες. Οι Ito et al. (2005) χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένα βακτήρια *enterobacter aerogenes* σε ένα αντιδραστήρα παρήγαγαν 8.2 mmole  $H_2$  ανά γραμμάριο γλυκερίνης. Το βακτήριο *Anerovibrio glycerini* βρέθηκε από τους Schauder και Schink (1989) ότι ζυμώνουν

την γλυκερίνη σε προπιονικό οξύ και παράγουν υδρογόνο με απόδοση 1.5 mmole H<sub>2</sub> ανά γραμμάριο γλυκερίνης.



**Διάγραμμα 5.6.** Μεταβολή του ρυθμού παραγωγής υδρογόνου κατά την διάρκεια λειτουργίας του αντιδραστήρα με αγροτοβιομηχανικά απόβλητα και γλυκερίνη

Οι αποδόσεις που βρέθηκαν σε αυτή την εργασία για την παραγωγή υδρογόνου είναι πολύ μικρές με αποτέλεσμα να μπορούμε να πούμε ότι η παραγωγή υδρογόνου από λάσπη και γλυκερίνη δεν είναι πρακτικά εφαρμόσιμη.

### 6.3 Συμπεράσματα

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η παραγωγή βιοαερίου και βιο-υδρογόνου κατά την αναερόβια συνεπεξεργασία λάσπης βιολογικού καθαρισμού και ακατέργαστης γλυκερίνης. Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε μπορούμε να πούμε ότι:

- Η ακατέργαστη γλυκερίνη αυξάνει δραματικά την παραγωγή βιοαερίου ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την ενεργή βιομάζα στον αντιδραστήρα
- Η παραγωγή υδρογόνου μετά από επεξεργασία λάσπης βιολογικού καθαρισμού και γλυκερίνης δεν είναι αποτελεσματική
- Η γλυκερίνη ένα εύκολα διατηρούμενο υλικό μπορεί να είναι πολύ αποδοτικό στην παραγωγή μεθανίου από τις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

### Ελληνική

1. Λυμπεράτος Γ. 1995. Μηχανική υγρών αποβλήτων. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών.
2. Τσώνης Στυλιανός, (2004) Επεξεργασία λυμάτων. Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
3. Φουντουλάκης Μ. 2005. Τύχη και επίδραση ξενοβιοτικών ουσιών κατά την αναερόβια χώνευση υγρών αποβλήτων και ιλύος. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστημίου Πατρών.
4. Φουντουλάκης Μ. 2009. Εκτίμηση της δυνατότητας αξιοποίησης της γλυκερίνης για παραγωγή Υδρογόνου και βιοαερίου. Τελική έκθεση, Ιδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, ΤΕΙ Κρήτης.

### Ξενόγλωσση

1. Altener, Bioexcell training manual, Biogas from AD. 2004.
2. Angelidaki, I., Eleggaard, L., Ahring, B.K. 2000. A Comprehensive Model of Anaerobic Bioconversion of Complex Substrates to Biogas *Biotechnology and Bioengineering* **63** (3), 363-372
3. Antonopoulou G., Ntaikou, I., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K., Lyberatos, G. Biohydrogen production from sweet sorghum biomass using mixed acidogenic cultures and pure cultures of ruminococcus albus. 2007. Global Nest Journal.
4. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed. American Public Health Association, 1995; Washington DC, USA.
5. Benemann, J. Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nat. Biotechnol.* 1996. **14**(9) 1101-1103.
6. Demirbas, A. 2006. Biogas Potential of Manure and Straw Mixtures. *Energy Sources*, **28**, 71-78.

7. Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the council of 8 May 2003 on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport. Official J L, 2003; 123:0042-6.
8. Dasari, M.A., Kiatsimkul, P.P., Sutterlin, W.R., Suppes G.J. 2005. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol topropylene glycol. *Applied Catalysis A: General* **281**(1-2), 225-231.
9. European Biodiesel Board. 2006. <http://www.ebb-eu.org>
10. Eberlein, K. and Schutt, M. 1986. Automatic methods for the determination of total dissolved and particulate carbohydrates in the marine environment. *Anal Bioanal Chem.* **323**, 47-49.
11. Fan, T., Li, C.L., Lay, J.J., Hou, H.H. and Zhang, G.Sh. 2004. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost, *Bioresource Technology* **91** (2), 189–193
12. Fang H.H.P., Li C., Zhang T., 2007. Acidophilic biohydrogen production from rice slurry. *International journal of Hydrogen Energy.* **31**(6), 683-692.
13. Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Ahring B.K. and Lyberatos, G. 2005. Potential for biohydrogen and methane production from olive pulp. *Wat. Sci. Tech.* **52** (1-2), 209-215.
14. Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Bozinis N.A. and Lyberatos, G. 1996. Anaerobic codigestion of agricultural industries wastewaters. *Wat. Sci. Tech.* **34** (11), 67-75.
15. Hartenbower, B.P, Biogas production using glicerol, the biodiesel by-product, as the carnon source. Aiche annual meeting, San Francisco 2006.
16. Hashimoto A.G., 1986. Pretreatment of Wheat Straw for Fermentation to Methane. *Biotech. Bioeng.* **28**, 1857-1866.
17. Josefsson B. 1983. Rapid spectrophotometric determination of total carbohydrates. *Methods of seawater analysis*, K. Grasshoff, M. Ehrhardt and K. Kremling (eds), Verlag Chemie GmbH, 340-342.
18. Koutrouli E.C. , Gavala H.N., Skiadas, I.V. and Lyberatos. G. 2006. Mesophilic biohydrogen production from olive pulp. *Process Safety and Environ Prot.* **84**, 285-289.
19. Kalfas H., Skiadas, I.V., Gavala, H.N., Stamatelatou, K. and Lyberatos. G. 2006. Application of ADM1 for the simulation of anaerobic digestion of olive



- pulp under mesophilic and thermophilic conditions. *Wat. Sci. Tech.* **54**(4), 149-156.
20. Llabres-Luengo, P. and Mata-Alvarez, J. 1987. Kinetic Study of the anaerobic digestion of Straw-Pig manure Mixtures. *Biomass*, 129-142.
21. Levin, D.B., Zhu, H., Beland, M., Cicek, N., Holbein, B. 2007. Potential for hydrogen and methane production from biomass residues in Canada. *Biores. Technol.* **98**, 654–660.
22. Pavlostathis S.G. and Giraldo-Gomez E. 1991. Kinetics of anaerobic Treatment: a critical review. *Critical reviews in Environ Control.* **21**(5-6), 411-490.
23. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 1995. 19<sup>th</sup> edn, American Public Health Association/ American Water Works Association/ Water Environment Federation, Washington DC, USA
24. Schauder, R., Schink, B. 1989. *Anaerovibrio glycerini* sp. nov., an anaerobic bacterium fermenting glycerol to propionate, cell matter, and hydrogen. *Arch Microbiol.* **152**, 473–478.
25. Thompson, J.C. and He, B. 2006. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. *Applied Eng. Agri.* **22**(2), 261-265.