

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΑΠΟ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ**

Σοφίδου Μαρία

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2014

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΑΠΟ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ

Σοφίδου Μαρία

Υποβολή Μεταπτυχιακής Διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την
απονομή του Μεταπτυχιακού Διπλώματος του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του
ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014

ΣΑΜΑΡΑΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Κατά κύριο λόγο, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Σαμαρά Πέτρο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια του κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα Μπαντή Δήμητρα για το αμείωτο ενδιαφέρον της, τις υποδείξεις, την καθοδήγηση, την προθυμία και την συμπαράστασή της τόσο κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Μανωλά Βασιλική και την Λάχανη Μαρίνα για την άψογη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για όσα έχει κάνει για μένα και στους αγαπημένους μου φίλους για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΑΠΟ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ

Σοφίδου Μαρία

**ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα
Τεχνολογίας Τροφίμων, 54101 Θεσσαλονίκη, Τ.Θ. 14561**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα εξωκυτταρικά πολυμερή (EPS) αποτελούν ένα πολύπλοκο μίγμα βιοπολυμερών με υψηλή μοριακή μάζα, που αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες και υδατάνθρακες και σε μικρότερο βαθμό από χουμικές ουσίες, DNA και RNA. Κατηγοριοποιούνται σε διαλυτά EPS (soluble) και σε δεσμευμένα EPS (bound), τα οποία με την σειρά τους χωρίζονται σε ισχυρώς δεσμευμένα EPS (tightly bound) και χαλαρά δεσμευμένα (loosely bound). Παίζουν σημαντικό ρόλο στην συγκέντρωση της βιομάζας, στην καθίζηση στα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων και είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνα για την έμφραξη των μεμβρανών σε βιοαντιδραστήρες MBR. Ως εκ τούτου, τα EPS διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο σε διάφορα συστήματα επεξεργασίας λυμάτων. Ο κύριος στόχος αυτής της εργασίας είναι ο προσδιορισμός του μηχανισμού παραγωγής των EPS σε διαφορετικά συστήματα ενεργού ιλύος και η διερεύνηση των σημαντικότερων παραμέτρων που επηρεάζουν την έκλυσή τους από τους μικροοργανισμούς.

Στη διάρκεια της εργασίας αυτής μελετήθηκε η παραγωγή των εξωκυτταρικών πολυμερών που λαμβάνει χώρα κατά την επεξεργασία αποβλήτων από μια βιομηχανία τροφίμων, με υψηλή περιεκτικότητα σε δύσκολα βιοαποδομήσιμες ουσίες. Με τον τρόπο αυτό ήταν δυνατόν να διερευνηθεί η λειτουργία των μικροοργανισμών της ενεργού ιλύος υπό ακραίες συνθήκες, ενώ παράλληλα εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών παραγόντων έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η δράση των μικροοργανισμών και να ελαττωθεί το ρυπαντικό φορτίο των αποβλήτων. Η μελέτη της επεξεργασίας έλαβε χώρα σε ένα σύστημα αντιδραστήρων ασυνεχούς λειτουργίας εναλασσόμενων φάσεων (SBR) που τροφοδοτούνταν με ένα μίγμα αποβλήτων που αποτελούνταν από 10% κο απόβλητα από μια βιομηχανία παραγωγής ζύμης αρτοποιίας με υψηλή περιεκτικότητα σε μελάσσα και 90% κο αστικά λύματα. Για τη βελτιστοποίηση της λειτουργίας εξετάστηκαν οι εξής παράγοντες:

- Προεπεξεργασία των αποβλήτων με όζον και με παρουσία ενός ισχυρού οξειδωτικού μέσου, υπεροξειδίου του υδρογόνου.
- Προσθήκη ενεργού άνθρακα
- Προσθήκη φωτεινής πηγής για την ανάπτυξη φωτοσυνθετικών οργανισμών.

Από κάθε αντιδραστήρα, πραγματοποιούνταν συλλογή δειγμάτων για τον προσδιορισμό των εξωκυτταρικών πολυμερών. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε με την τροποποιημένη μέθοδο Lowry και των πολυσακχαριτών με την μέθοδο Dubois, ενώ η ποιοτική ανάλυση των ουσιών αυτών για τον προσδιορισμό της κατανομής μοριακών βαρών τους έγινε με τον χρωματογράφο μοριακού αποκλεισμού (HPSEC). Για κάθε δειγματοληψία πραγματοποιούνταν εκχύλιση των EPS, κατά την οποία λαμβάνονταν δείγματα των 35 ml και έπειτα από διαδοχικές φυγοκεντρίσεις και θέρμανση των δειγμάτων, προέκυπταν τα κλάσματα SEPS, LBEPS και TBEPS.

Η προεπεξεργασία των αποβλήτων με όζον συνέβαλε αποτελεσματικά στην οξειδωση των μεγάλων μορίων και συνεπώς στη μείωση των διαλυτών εξωκυτταρικών πολυμερών. Η μείωση αυτή ήταν ακόμη μεγαλύτερη κατά την επεξεργασία του μίγματος που είχε υποστεί προηγουμένως οζονισμό με προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη όζοντος διασπά σε μεγαλύτερο βαθμό τις πρωτεΐνες σε σύγκριση με τους πολυσακχαρίτες. Επιπλέον, η προεπεξεργασία είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των ουσιών με μεγάλα μοριακά βάρη (21kDa) και πλήρη απομάκρυνση των ουσιών με μικρότερα μοριακά βάρη (18kDa). Η προσθήκη ενεργού άνθρακα δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των υδατανθράκων στα διαλυτά EPS, αλλά ελάττωσε σημαντικά τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών. Ενώ ο ενεργός άνθρακας προσρόφησε μέρος των εξωκυτταρικών πολυμερών, η παρουσία φωτεινής πηγής συνέβαλε στην αύξησή τους, ως αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής μικροαλγών στη δεξαμενή επεξεργασίας.

Συνοψίζοντας, η παραγωγή των εξωκυτταρικών πολυμερών εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τις συνθήκες λειτουργίας ενός συστήματος ενεργού ιλύος, που μπορούν να επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά τις συγκεντρώσεις τους στο ανάμικτο υγρό. Συνθήκες που ευνοούν τη διάσπαση ή προσρόφηση οργανικών ουσιών όπως η επεξεργασία με όζον και η προσθήκη ενεργού άνθρακα μειώνουν την συγκέντρωσή τους, ενώ η ανάπτυξη ενός σύνθετου βιοπληθυσμού συμβάλλει στην αυξημένη συγκέντρωσή τους. Τα συμπεράσματα αυτά είναι σημαντικά για τον έλεγχο της καλής λειτουργίας μιας εγκατάστασης επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	9
1.1 Ορισμός των εξωκυτταρικών πολυμερών.....	9
1.2 Χαρακτηριστικά των εξωκυτταρικών πολυμερών..... Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης. 11	
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των εξωκυτταρικών πολυμερών	13
1.4 Σχέσεις μεταξύ των εξωκυτταρικών πολυμερών και λειτουργίες των μικροβιακών συσσωματωμάτων.....	15
1.5 Σημαντικότητα των εξωκυτταρικών πολυμερών στη διαχείριση των υγρών αποβλήτων	21
1.6 Μέτρηση πρωτεϊνών και υδανθράκων	23
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	26
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
3.1.1 Δείγματα.....	27
3.1.2 Υλικά και αντιδραστήρια.....	30
3.1.3 Όργανα.....	31
3.2 Πρωτόκολλο εκχύλισης εξωκυτταρικών πολυμερών	32
3.3 Μέθοδοι ανάλυσης.....	33
3.4 Πρωτόκολλο διαδικασίας μέτρησης των εξωκυτταρικών πολυμερών στον Χρωματογράφο Αποκλεισμού Μεγεθών.....	35
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
4.1 Παρασκευή Πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης	36
4.2 Παρασκευή Πρότυπης καμπύλης γλυκόζης	37
4.3 Ποσοτικός χαρακτηρισμός των εξωκυτταρικών πολυμερών	39

4.3.1 Προεπεξεργασία με οζόνωση και υπεροξείδιο του υδρογόνου σε συνδιασμό με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου.....	39
4.3.1.1 Μελέτη συγκέντρωσης πρωτεϊνών	39
4.3.1.2 Μελέτη συγκέντρωσης υδατανθράκων.....	42
4.3.2 Μελέτη επίδρασης του ενεργού άνθρακα σε σχέση με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου.....	45
4.3.2.1 Μελέτη συγκέντρωσης πρωτεϊνών	46
4.3.2.2 Μελέτη συγκέντρωσης υδατανθράκων.....	48
4.3.3 Μελέτη επίδρασης της φωτεινής ακτινοβολίας σε σχέση με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου.....	51
4.3.3.1 Μελέτη συγκέντρωσης πρωτεϊνών	51
4.3.3.2 Μελέτη συγκέντρωσης υδατανθράκων.....	53
4.4 Παρασκευή Πρότυπης Καμπύλης βαθμονόμησης του HPSEC.....	56
4.5 Ποιοτικός χαρακτηρισμός των εξωκυτταρικών πολυμερών με HPSEC	57
4.5.1 Προεπεξεργασία με οζόνωση και υπεροξείδιο του υδρογόνου σε συνδιασμό με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου.....	57
4.5.2 Συνεπεργασία με προσθήκη σκόνης ενεργού άνθρακα και σύγκριση αυτής με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου.....	66
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	69
6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η διαδικασία της ενεργού ιλύος (AS) είναι η πιο κοινή βιολογική διαδικασία που χρησιμοποιείται στην επεξεργασία των λυμάτων. Η κροκίδωση της ιλύος μετατρέπει τα μικροβιακά κύτταρα σε συσσωματώματα, τα οποία ρυθμίζουν την απόδοση του διαχωρισμού βιομάζας/ νερού και επομένως είναι ζωτικής σημασίας για το συνολικό αποτέλεσμα της επεξεργασίας με την διαδικασία της AS. Είναι ενεργή διαδικασία επειδή εξαρτάται από φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες. Η δομή της ενεργού ιλύος είναι ουσιαστικά σύνολα αιωρούμενων στερεών, συμπεριλαμβάνοντας ομάδες από διαφορετικούς μικροοργανισμούς, οργανικά και ανόργανα σωματίδια ενσωματωμένα σε ένα πολυμερικό δίκτυο εξωκυτταρικών ουσιών. Αυτά τα εξωκυτταρικά πολυμερή (Extracellular Polymeric Substances ,EPS) αποτελούν και το κύριο συστατικό της ενεργούς ιλύος (Frølund et al., 1996). Είναι προϊόντα της βακτηριακής έκκρισης από την κυτταρική επιφάνεια ή προέρχονται από την λύση των κυττάρων. Τα EPS συνδέονται με τα κύτταρα μέσω πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων ώστε να σχηματίσουν μια δικτυωτή δομή με περίσσεια νερού που προστατεύει τα κύτταρα από την αφυδάτωση (Wingender et al., 1999) και την επίδραση τοξικών ουσιών (Sutherland a, 2001). Μέρος των EPS μπορεί να χρησιμεύσει ως πηγή ενέργειας σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών (Sutherland, 2001, Zhang & Bishop, 2003). Έχουν σημαντική επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες των μικροβιακών συσσωματωμάτων, όπως στην δομή, το επιφανειακό φορτίο, την κροκίδωση, τις ιδιότητες καθίζησης, τις ιδιότητες αφυδάτωσης και την ικανότητα απορρόφησης. Τέλος, είναι υπεύθυνα σε μεγάλο βαθμό για την έμφραξη των μεμβρανών σε βιοαντιδραστήρες μεμβρανών.

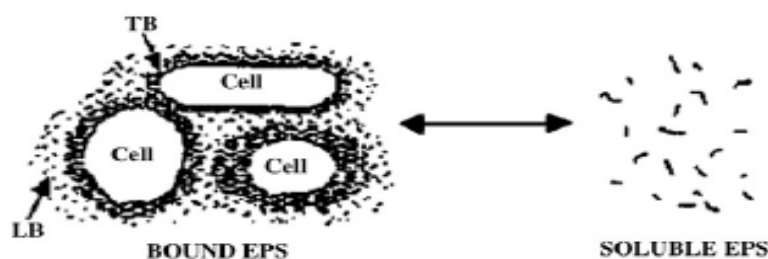
1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 Ορισμός εξωκυτταρικών πολυμερών

Στα συστήματα βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων οι περισσότεροι μικροοργανισμοί εμφανίζονται υπό τη μορφή των μικροβιακών συσσωματωμάτων, όπως κροκίδων λάσπης, βιοφίλμ και κόκκων. Το κοινό χαρακτηριστικό αυτών των μορφών είναι ότι οι μικροοργανισμοί είναι ενσωματωμένοι σε μία μήτρα εξωκυτταρικών πολυμερών (EPS). Στο φυσικό περιβάλλον, η παραγωγή των EPS είναι μια τυπική διαδικασία για τους μικροοργανισμούς.

Τα EPS είναι παρόντα τόσο εκτός των κυττάρων όσο και στο εσωτερικό των μικροβιακών συσσωματωμάτων. Είναι κατά κύριο λόγο εκκρίσεις μικροοργανισμών υψηλού μοριακού βάρους, και προϊόντα της κυτταρικής λύσης και υδρόλυσης των μακρομορίων. Πιο συγκεκριμένα, τα EPS αποτελούν ένα τρισδιάστατο πλέγμα βιοφίλμ, με μορφή γέλης, ιδιαίτερα ενυδατωμένο και συχνά φορτισμένο, στο οποίο οι μικροοργανισμοί ενσωματώνονται και ακινητοποιούνται. Το ποσοστό των EPS στα βιοφίλμ κυμαίνεται στα 50 - 90% της συνολικής οργανικής ύλης (Nielsen et al.,1997). Σύμφωνα με τους Nielsen και Jahn (1999), τα EPS αποτελούνται από πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, χουμικές ουσίες, DNA και RNA. Παρ'όλα αυτά, στο βιοφίλμ της ενεργού ύλης, τα κύρια συστατικά τους είναι οι πρωτεΐνες και σε μικρότερο βαθμό οι πολυσακχαρίτες (Nielsen et al.,1999).

Τα EPS μπορούν να ταξινομηθούν στα διαλυτά EPS (soluble EPS - sEPS) και στα δεσμευμένα EPS (bound EPS – bEPS). (Nielsen and Jahn,1999, Lapidou and Rittmann, 2002). Τα δεσμευμένα EPS είναι στενά συνδεδεμένα με τα κύτταρα, ενώ τα διαλυτά EPS είναι ασθενώς δεσμευμένα με τα κύτταρα ή διαλύονται εντός του διαλύματος (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Τυπική δομή των EPS σε συστήματα ενεργού ιλύος.

Γενικά, αυτοί οι δύο τύποι EPS μπορούν να διαχωριστούν με φυγοκέντρηση. Μολονότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των διαλυτών EPS και των κυττάρων είναι πολύ ασθενής, η μελέτη των Sheng και Yu (2006) , έδειξε ότι τα διαλυτά EPS έχουν ζωτικής σημασίας επίδραση στην μικροβιακή δραστηριότητα και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας της ιλύος. Τα δεσμευμένα EPS αποτελούνται από μια δυναμική δομή διπλής στρώσης, η οποία υποδιαιρείται στα χαλαρά δεσμευμένα EPS (Loosely Bound EPS - LB-EPS) και στα ισχυρώς δεσμευμένα EPS (Tightly Bound EPS - TB-EPS) (Li et al.,2002). Η υποδιαίρεση αυτή εξαρτάται από τη δύναμη της οριοθέτησης μεταξύ των EPS και των κυττάρων. Δηλαδή , το εσωτερικό στρώμα αποτελείται από τα ισχυρώς δεσμευμένα EPS (TB-EPS), τα οποία έχουν ορισμένο σχήμα και είναι δεσμευμένα σφιχτά και σταθερά με την επιφάνεια του κυττάρου. Το εξωτερικό στρώμα, το οποίο αποτελείται από τα χαλαρά συνδεδεμένα EPS (LB-EPS), είναι ένα χαλαρό και διεσπαρμένο στρώμα ιλύος χωρίς σαφή οριοθέτηση. Το ποσοστό των LB-EPS σε μικροβιακά συσσωματώματα είναι πάντα μικρότερο από εκείνο των TB-EPS, και αυτό μπορεί να έχει κάποια επίδραση στα χαρακτηριστικά των μικροβιακών συσσωματωμάτων. (Li and Yang, 2007, Sheng et al., 2006).

Οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες είναι τα κύρια συστατικά των EPS. Χουμικές ουσίες μπορούν επίσης να είναι ένα από τα βασικά συστατικά των EPS στη λάσπη σε αντιδραστήρες βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων, σε ποσοστό περίπου 20% της συνολικής περιεκτικότητας (Frolund et al., 1995). Επιπλέον, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα, ουρονικά οξέα και ορισμένα ανόργανα συστατικά έχουν βρεθεί σε EPS από διαφορετικά υποστρώματα (Frolund et al., 1996, Dignac et al., 1998, D'Abzac et al., 2010). Τα κλάσματά των EPS εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις μεθόδους εκχύλισης και από την προέλευση της ιλύος. Το περιεχόμενο και η σύνθεση των EPS που εκχυλίζονται από διαφορετικά μικροβιακά συσσωματώματα δίνουν ετερογενή αποτελέσματα (Wingender et al., 1999). Η διακύμανση στις συνθέσεις των εκχυλισμένων EPS έχει αποδοθεί σε πολλούς παράγοντες, όπως η καλλιέργεια , η φάση ανάπτυξης, ο τύπος του βιοαντιδραστήρα, η μέθοδος εκχύλισης, καθώς και

μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό τους (Nielsen and Jahn, 1999).

1.2 Χαρακτηριστικά των εξωκυτταρικών πολυμερών

Υδροφιλικότητα / Υδροφοβικότητα

Τα EPS σε μικροβιακά συσσωματώματα έχουν πολλές φορτισμένες ομάδες (π.χ., καρβοξύλια, φωσφορικές ομάδες, σουλφυδρύλια, φαινολικές και ομάδες υδροξυλίου) και μη πολικές ομάδες (π.χ., αρωματικά, αλειφατικές ενώσεις πρωτεϊνών και υδρόφοβα τμήματα υδατανθράκων). Ο σχηματισμός των υδρόφοβων περιοχών των EPS είναι σημαντικός για την προσρόφηση οργανικών ρύπων (Spath et al., 1998). Η παρουσία υδρόφιλων και υδρόφοβων ομάδων στα μόρια EPS δείχνει ότι αυτά είναι επαμφοτερίζοντα. Η σχετική αναλογία των δύο αυτών ομάδων σχετίζεται με τη σύνθεση των EPS. Οι Jorand et al. (1998) που χρησιμοποίησαν ρητίνη XAD για το διαχωρισμό των υδρόφιλων και υδρόφοβων κλασμάτων EPS, διαπίστωσαν ότι περίπου το 7% ήταν υδρόφοβο και περιελάμβανε κυρίως πρωτεΐνες, ενώ το υδρόφιλο κλάσμα αποτελούνταν κυρίως από υδατάνθρακες. Η ανάλυση του περιεχομένου των μονοσακχαριτών και των αμινοξέων σε EPS αποκάλυψε μετά από υδρόλυση, ότι περίπου το 25% των αμινοξέων ήταν αρνητικά φορτισμένα και περίπου 24% ήταν υδρόφοβα (Dignac et al., 1998). Η υδροφιλικότητα / υδροφοβικότητα των EPS είναι πιθανό να επηρεάσει σημαντικά την υδροφοβικότητα των μικροβιακών συσσωματωμάτων και την σύστασή τους στους βιοαντιδραστήρες (Liu and Fang, 2003). Καταδεικνύει, επίσης, τη σημασία των EPS ως θέσεις προσρόφησης οργανικών ρύπων.

Βιοαποικοδομησιμότητα

Τα EPS μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν από τα βακτήρια ως πηγές άνθρακα και ενέργειας. Συνήθως, τα κύρια συστατικά των EPS είναι οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες, και σε αντιδραστήρες βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων τα ένζυμα για την αποικοδόμηση των πολυμερών αυτών είναι άφθονα. Τα βακτήρια της ενεργού ιλύος μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα EPS που εκκρίνονται από άλλα βακτήρια για τη μεταβολική δραστηριότητα (Zhang and Bishop, 2003). Ωστόσο, οι Laspidou και Rittmann (2002) συμπέραναν ότι ορισμένα μέρη των EPS δεν μπορούν να διασπαστούν από μικροοργανισμούς. Οι Park and Novak (2007) ανέφεραν ότι τα EPS

που εκχυλίζονται χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθόδους είχαν και διαφορετικό δυναμικό βιοαποικοδομησιμότητας. Για παράδειγμα, τα EPS που εκχυλίζονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο CER βιοαποικοδομούνται αερόβια, ενώ τα EPS που εκχυλίζονται χρησιμοποιώντας τη μέθοδο “του σουλφιδίου” βιοδιασπώνται αναερόβια. Οι μικρού μοριακού βάρους ουσίες που παράγονται ως αποτέλεσμα της αποικοδόμησης των EPS μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγή άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξη των κυττάρων σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Η αποικοδόμηση των EPS μπορεί επίσης να οδηγήσει στην αποκρίδωση των κροκίδων λάσπης. Το μη βιοαποικοδομήσιμο τμήμα των EPS μπορεί να ρέει έτσι με τα λύματα των αντιδραστήρων.

Προσρόφηση

Τα EPS σε μικροβιακά συσσωματώματα έχουν πολλές θέσεις για την προσρόφηση των μετάλλων και οργανικών υλών, όπως αρωματικές, αλειφατικές (θέσεις) σε πρωτεΐνες, και υδρόφοβες περιοχές σε υδατάνθρακες. Η παρουσία πολλών λειτουργικών ομάδων στα EPS, όπως καρβοξύλια, φωσφορικά, σουλφυδρύλια, φαινολικές και ομάδες υδροξυλίου, μπορούν να τα καταστήσουν ικανά να δημιουργήσουν σύμπλοκα με βαρέα μέταλλα (Liu and Fang, 2002). Με βάση τον εκτιμώμενο αριθμό των διαθέσιμων καρβοξυλίων και ομάδων υδροξυλίου, τα EPS έχουν μια πολύ υψηλή δεσμευτική ικανότητα (Guibaud et al., 2003). Πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα σε EPS διαθέτουν τις ικανότητες να ενώνονται με βαρέα μέταλλα (Dignac et al., 1998, Priester et al., 2006, Zhang et al., 2006). Η δεσμευτική ικανότητα και η αντοχή των δεσμών μεταξύ των EPS και των βαρέων μετάλλων είναι γνωστό ότι είναι υψηλή και η προσρόφηση ακολουθεί τις ισόθερμες Langmuir ή Freundlich (Zhang et al., 2006). Επιπλέον, τα διαλυτά EPS έχουν μεγαλύτερη προσροφητική ικανότητα για τα βαρέα μέταλλα από τα δεσμευμένα EPS σε δείγματα ενεργού ιλύος (Comte et al., 2006). Η σύνδεση μεταξύ των EPS και των δισθενών κατιόντων, όπως Ca^{2+} και Mg^{2+} , είναι μια από τις κύριες διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που συμβάλει στη διατήρηση της δομής του μικροβιακού συσσωματώματος (Mayer et al., 1999). Τα EPS μπορούν, επίσης, να προσροφούν οργανικούς ρύπους, όπως φαινανθρένιο (Liu et al., 2000), βενζόλιο (Spath et al., 1998), χουμικά οξέα (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003), και χρωστικές (Sheng et al., 2008). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν ορισμένες υδρόφοβες περιοχές στα EPS (Spath et al., 1998, Flemming and Leis, 2002). Οι

Spath et al. (1998) ανέφεραν ότι περισσότερο από το 60% του βενζολίου, τολουολίου και του μ-ξυλολίου προσροφήθηκε από τα EPS και ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό αυτών των ρύπων ήταν προσροφημένο από τα κύτταρα. Τα EPS είναι πάντα αρνητικά φορτισμένα, και θα μπορούσαν να δεσμεύουν τους θετικώς φορτισμένους οργανικούς ρύπους μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003). Επιπλέον, οι πρωτεΐνες έχουν πιο υψηλή συνδετική δύναμη και ικανότητα από ό, τι οι χουμικές ουσίες. Τα διαλυτά EPS έχουν ένα μεγαλύτερο κλάσμα πρωτεϊνών από ό, τι τα δεσμευμένα EPS, και έτσι μπορούν να έχουν μεγαλύτερη ικανότητα δέσμευσης από τα δεσμευμένα EPS (Pan et al., 2010).

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή EPS

Τύπος υποστρώματος

Ο τύπος υποστρώματος έχει ουσιώδη επίδραση στις μικροβιακές κοινότητες στην ιλύ, και το μικροβιακό μεταβολισμό, με αποτέλεσμα να επηρεάζει την παραγωγή των EPS. Οι Li και Yang (2007) ανέφεραν ότι η ιλύς που τροφοδοτείται με γλυκόζη είχε μεγαλύτερη παραγωγή EPS από εκείνη που τροφοδοτείται με οξικό άλας. Οι Sheng et al., (2006) συνέκριναν την παραγωγή EPS από ένα στέλεχος φωτοσυνθετικού βακτηρίου χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα, και βρήκαν ότι τα βακτήρια παράγαν περισσότερα EPS χρησιμοποιώντας βενζοϊκό άλας σαν υπόστρωμα από ό, τι χρησιμοποιώντας οξεϊκό, προπιονικό και βουτυρικό άλας.

Περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά

Τα EPS μπορούν να αποικοδομηθούν από βακτήρια και να χρησιμοποιηθούν πηγή άνθρακα και ενέργειας όταν υπάρχει έλλειψη υποστρώματος. Τα θρεπτικά συστατικά έχουν σημαντική επίδραση στην παραγωγή EPS και τη σύνθεση τους. Το περιεχόμενο των EPS στην ιλύ αυξάνεται αναλογικά με αύξηση της τροφής στους μικροοργανισμούς. Οι Bura et al. (1998) και Hoa et al. (2003) διαπίστωσαν, επίσης, ότι η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες των EPS που προέρχονται από ενεργό ιλύ, αυξήθηκε μετά την προσθήκη μικρής ποσότητας φωσφόρου. Οι Durmaz and Sanin (2001) βρήκαν ότι τα EPS από ενεργό ιλύ είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, αλλά φτωχά σε υδατάνθρακες σε αναλογία άνθρακα προς άζωτο 5:1, αλλά όταν η αναλογία άνθρακα προς άζωτο αυξήθηκε σε 40:1, η ποσότητα πρωτεΐνης μειώθηκε απότομα, ενώ εκείνη των υδατανθράκων αυξήθηκε.

Φάση ανάπτυξης

Οι Jia et al. (1996) ερεύνησαν την επίδραση του χρόνου καλλιέργειας για την παραγωγή των EPS σε ενεργό ιλύ, και διαπίστωσαν ότι η περιεκτικότητα σε EPS είναι στενά συνδεδεμένη με τη φάση της βακτηριακής ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, η περιεκτικότητα σε EPS αυξήθηκε αλλά κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης μειώθηκε. Σε αντίθεση, η περιεκτικότητα σε EPS από ένα βακτηριακό φωτοσυνθετικό στέλεχος μειώθηκε κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, αλλά παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης. (Sheng et al. 2006, Sheng and Yu, 2006).

Ο χρόνος κατακράτησης των στερεών (SRT) έχει και αυτός σημαντική επίδραση στην παραγωγή EPS, αλλά τα αποτελέσματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι κάπως αντιφατικά. Πολλοί ερευνητές έχουν διαπιστώσει ότι τα EPS σε διαφορετικά μικροβιακά συσσωματώματα αυξάνονται με την αύξηση του SRT, το οποίο συνεπάγεται ότι τα βακτήρια παράγουν περισσότερα EPS σε ενδογενείς συνθήκες. Οι Sesay et al. (2006) βρήκαν ότι μια αύξηση στον χρόνο παραμονής των μικροοργανισμών (SRT) είχε σημαντική και θετική συσχέτιση με τη συνολική ποσότητα των EPS στη ενεργό ιλύ, καθώς επίσης και το περιεχόμενο των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων σε EPS. Η αναλογία πρωτεϊνών / υδατανθράκων αυξήθηκε επίσης από 1,5 έως 2,5 με μια αύξηση του SRT από 4 έως 20 ημέρες. Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές είχαν προτείνει ότι τα EPS είναι ανεξάρτητα από τον SRT. Οι Liao et al. (2001) διαπίστωσαν ότι η περιεκτικότητα σε EPS δεν άλλαξε σημαντικά με μεγαλύτερο SRT, και η αναλογία πρωτεΐνης / υδατάνθρακα αυξήθηκε καθώς το SRT αυξήθηκε από 4 σε 12 ημέρες, αλλά παρέμεινε αμετάβλητο όταν το SRT αυξήθηκε από 12 έως 16 ημέρες. Οι Li και Yang (2007) ανέφεραν ότι τα TB-EPS της ενεργού ιλύος δεν είχαν καμία σχέση με τον SRT, αλλά τα LB-EPS μειώθηκαν με την αύξηση του SRT.

Εξωτερικές συνθήκες

Επειδή τα EPS δεσμεύονται με τα κύτταρα κυρίως με γέφυρες ιόντων με πολυσθενή μέταλλα, η συγκέντρωση του μετάλλου μπορεί επίσης να επηρεάσει το περιεχόμενο

EPS. Οι Turakhia και Characklis (1989), και Sheng et al. (2006c) ανέφεραν ότι η συγκέντρωση Ca^{2+} δεν είχε καμία επίδραση επί των EPS, ενώ οι Higgins και Novak (1997) βρήκαν ότι η περιεκτικότητα των EPS σε πρωτεΐνες αυξήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις Ca^{2+} ή Mg^{2+} και ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις Na οδήγησαν σε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.

Με την παρουσία των τοξικών ουσιών, όπως τα βαρέα μέταλλα, παράγονται περισσότερα EPS για την προστασία των μικροοργανισμών υπό τέτοιες συνθήκες. Επιπλέον, σε τοξικές συνθήκες, η αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη υπερβαίνει κατά πολύ εκείνη των κανονικών συνθηκών. Ωστόσο, ορισμένες τοξικές ουσίες, για παράδειγμα, το βισμούθιο διμερκαπτοπροπανολόλης, μπορεί επίσης να αναστείλει την παραγωγή των EPS. (Badireddy et al., 2008)

Οι αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες, επίσης, μπορούν να επηρεάσουν τη παραγωγή EPS. Το περιεχόμενο των EPS στην ενεργό ιλύ μειώνεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Έχει αναφερθεί ότι κροκίδες ιλύος τείνουν να αποδομούνται σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (Nielsen et al., 1996). Μια τέτοια αποδόμηση μπορεί να προκληθεί από την καταστολή της παραγωγής των EPS ή την υδρόλυση τους. Οι Shin et al. (2001) συνέκριναν την παραγωγή EPS σε ενεργό ιλύ σε τρεις βιοαντιδραστήρες και βρήκαν ότι σε υψηλό επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου η παραγωγή στα EPS αυξήθηκε, ενώ το περιεχόμενο της πρωτεΐνης παρέμεινε αμετάβλητο. Σε ένα χαμηλό επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου, οι συγκεντρώσεις και των δύο (υδατανθράκων και πρωτεϊνών) διατηρείται ίδια.

1.4 Σχέσεις μεταξύ των EPS και των λειτουργιών των μικροβιακών συσσωματωμάτων

Μαζική μεταφορά στα μικροβιακά συσσωματώματα

Στους αντιδραστήρες επεξεργασίας λυμάτων, τα EPS καλύπτουν την επιφάνεια ή βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων των μικροβιακών συσσωματωμάτων. Οι Li και Ganczarezyk (1990) παρατήρησαν αφθονία των EPS στο εσωτερικό των κροκίδων της ιλύος. Αυτό υποδηλώνει ότι το υπόστρωμα θα πρέπει να περάσει μέσα από το στρώμα των EPS για να μεταφερθεί στα κύτταρα. Οι πόροι της κοκκώδους ιλύος μπορεί επίσης να φράξει από τα EPS και αυτό μειώνει την

αποτελεσματικότητα της μεταφοράς των υποστρωμάτων .(Mu et al., 2006, Zheng and Yu, 2007).

Επιφανειακό φορτίο μικροβιακών συσσωματωμάτων

Δεδομένου ότι υπάρχουν πολλές φορτισμένες λειτουργικές ομάδες στα EPS, το περιεχόμενο και η σύνθεση τους επηρεάζουν το φορτίο της επιφάνειας των μικροβιακών συσσωματωμάτων. Ωστόσο, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των διαφόρων συστατικών των EPS δεν είναι πανομοιότυπα και ως εκ τούτου έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στο επιφανειακό φορτίο των μικροβιακών συσσωματωμάτων. Συνήθως, η περιεκτικότητα σε EPS είχε θετική επίδραση στο αρνητικό επιφανειακό φορτίο της ιλύος. Οι Wilen et al. (2003) βρήκαν ότι τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε EPS όσο και τα επιμέρους συστατικά είχαν μια θετική επίδραση στο αρνητικό φορτίο της ιλύος και ότι τα αποτελέσματα ήταν πιο σημαντικά στις πρωτεΐνες και τις χουμικές ουσίες. Οι Liao et al.(2001) ανέφεραν ότι η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες των EPS είχαν θετική σχέση με το καθαρό φορτίο επιφανείας. Αντιθέτως, οι Wang et al. (2005) εντόπισαν αλλαγές στα EPS και τα χαρακτηριστικά επιφάνειας της ιλύος στην αερόβια διαδικασία κοκκοποίησης ιλύος και διαπίστωσαν ότι η συνολική περιεκτικότητα σε EPS είχε αρνητική επίδραση στο φορτίο επιφανείας της ιλύος. Αντιθέτως, η περιεκτικότητα σε DNA δεν είχε σημαντική επίδραση ούτε στο επιφανειακό φορτίο ούτε στην υδροφοβικότητα της ιλύος.

Η αναλογία πρωτεϊνών / υδατανθράκων βρέθηκε να έχει αρνητική επίδραση στο επιφανειακό φορτίο της ιλύος, ενώ η συνολική περιεκτικότητα σε EPS βρέθηκε να μην έχει καμία επίδραση (Liao et al., 2001). Οι άμινο ομάδες στις πρωτεΐνες είναι θετικά φορτισμένες και μπορούν να εξουδετερώσουν τα αρνητικά φορτία από το καρβοξύλιο και τις φωσφορικές ομάδες, και έτσι μειώνεται το αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια της λάσπης.

Ικανότητα κροκίδωσης των μικροβιακών συσσωματωμάτων

Η ικανότητα κροκίδωσης των μικροβιακών συσσωματωμάτων είναι το κλειδί για την επίτευξη χαμηλής θολότητας και υψηλής ποιότητας λυμάτων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των EPS και των κυττάρων έχουν σημαντική επίδραση στην μικροβιακή ικανότητα κροκίδωσης .

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί κροκίδωσης που προκαλούνται από κατιόντα: η συμπίεση διπλοστοιβάδας και η γέφυρα ιόντων μέσω των EPS. Μια υψηλή ιοντική συγκέντρωση θα βοηθούσε την βακτηριακή κροκιδώση και αυτό το φαινόμενο αποδίδεται στην συμπίεση διπλοστοιβάδας (Liu et al., 2007). Κατά την γέφυρα ιόντων, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυσθενών κατιόντων και EPS επίσης μπορούν να διαδραματίσουν καίριο ρόλο στη μικροβιακή κροκιδώση. Η βελτίωση της ικανότητας κροκιδώσης της ιλύος με άμεση προσθήκη πολυσθενών κατιόντων θα μπορούσε να είναι μία χρήσιμη προσέγγιση (Higgins et al., 2004).

Η σύνθεση των EPS σε σχέση με την κροκιδώση έχει επίσης μελετηθεί εκτενώς. Τα μικροβιακά συσσωματώματα τείνουν να αποκροκιδωθούν μετά την απομάκρυνση των πρωτεϊνών της επιφανείας τους. Η προσθήκη μιας μικρής ποσότητας ενός ενζύμου το οποίο υδρολύει τις πρωτεΐνες, οδηγεί σε καταστροφή της ικανότητας της ιλύος ενώ μια ποσότητα ενός ενζύμου το οποίο αποικοδομεί τους υδατάνθρακες προκαλεί μικρότερη μείωση της κροκιδωτικής ικανότητας (Higgins and Novak, 1997). Στην κροκιδώση, επίσης, τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να παίξουν ένα σημαντικό ρόλο.

Οι Wilen et al. (2003) βρήκαν ότι η κροκιδωτική ικανότητα της ιλύος αυξήθηκε με την αύξηση της πρωτεΐνης ή με την μείωση των χουμικών ουσιών. Επίσης, μείωση αυτής (της κροκιδωτικής ικανότητας της ιλύος), παρατηρήθηκε με αύξηση της συνολικής περιεκτικότητας σε EPS. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η επίδραση των μεμονωμένων συστατικών των EPS στην κροκιδώση των μικροβιακών συσσωματωμάτων είναι πολύπλοκη. Οι αναλογίες των κύριων συστατικών των EPS ασκούν μεγάλη επιρροή στη μικροβιακή κροκιδώση (Liao et al., 2001). Οι Li και Yang (2007) έδειξαν ότι τα LB-EPS έχουν αρνητική επιρροή στην κροκιδώση της ιλύος και η ύπαρξη υπερβολικής ποσότητας LB-EPS θα μπορούσε να αποδυναμώσει την προσκόλληση των κυττάρων και να οδηγήσει σε κακή κροκιδώση.

Ικανότητα καθίζησης των μικροβιακών συσσωματωμάτων

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα EPS έχουν αρνητική επίδραση στην καθίζηση των μικροβιακών συσσωματωμάτων (Jin et al., 2003). Επειδή τα EPS είναι αρνητικά φορτισμένα, η υψηλή συγκέντρωσή τους αυξάνει το φορτίο επιφανείας και αυτό οδηγεί σε αύξηση των απωθητικών δυνάμεων μεταξύ των κυττάρων, με αποτέλεσμα την μείωση της καθίζησης των μικροβιακών συσσωματωμάτων (Morgan et al., 1990).

Τα LB-EPS έχουν αρνητικό αποτέλεσμα στην καθίζηση της ιλύος, λόγω του γεγονότος ότι μια αύξηση της περιεκτικότητας σε LB-EPS μπορεί να φέρει περισσότερο δεσμευμένο νερό στα συσσωματώματα, και ως εκ τούτου παράγονται κροκύδες εξαιρετικά πορώδεις με χαμηλή πυκνότητα (Yang and Li, 2009). Ο δείκτης όγκου λάσπης (SVI), συχνά χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει την καθίζηση της ιλύος. Οι χαμηλές τιμές SVI δηλώνουν καλή καθίζηση. Σε γενικές γραμμές, ο SVI των μικροβιακών συσσωματωμάτων αυξάνει όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε EPS. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, τα αποτελέσματα των κύριων συνιστωσών των EPS στην καθίζηση των μικροβιακών συσσωματωμάτων δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Οι πρωτεΐνες και το περιεχόμενο DNA στα EPS βρέθηκε ότι έχουν μια θετική σχέση με το SVI (Bura et al., 1998, Martinez et al., 2000, Liao et al., 2001), ενώ η επίδραση των υδατανθράκων των EPS σε σχέση με το SVI, δεν ήταν σημαντική (Liao et al., 2001, Hoa et al., 2003).

Ικανότητα αφυδάτωσης των μικροβιακών συσσωματωμάτων

Τα EPS μπορούν να θεωρηθούν ως ένας από τους βασικούς παράγοντες που σχετίζονται με την πάχυνση και τις διεργασίες αφυδάτωσης της ιλύος. Υπάρχουν δύο τύποι δέσμευσης των μορίων του νερού και των EPS και είναι οι εξής: ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου. Η αύξηση των EPS γενικά οδηγεί σε μια μικρότερη ικανότητα αφυδάτωσης της ιλύος, πιθανώς επειδή η στερεοχημική δύναμη που δημιουργείται από τα EPS εμποδίζει την επαφή μεταξύ των κυττάρων. Τα EPS μπορούν επίσης να σχηματίσουν μια σταθερή γέλη που αποτρέπει την διαρροή νερού από τους πόρους των κροκίδων και έτσι μειώνεται η ικανότητα αφυδάτωσης της λάσπης. Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα αφυδάτωσης της ιλύος βελτιώνεται καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα σε EPS (Mikkelsen and Keiding, 2002, Jin et al, 2004). Τα διάφορα συστατικά των EPS έχουν διαφορετικές συνέπειες στην ικανότητα αφυδάτωσης των μικροβιακών συσσωματωμάτων. Οι πρωτεΐνες έχουν μεγάλη ικανότητα συγκράτησης νερού. Έτσι, ένα μειωμένο πρωτεϊνικό κλάσμα στην ιλύ μπορεί να βελτιώσει την ικανότητα αφυδάτωσης της ιλύος. Η αύξηση στα κλάσμα των υδατανθράκων στα EPS θα ενισχύσει την αφυδάτωση της ιλύος. Η επίδραση των χουμικών ουσιών στην ικανότητα αφυδάτωσης της ιλύος είναι ασήμαντη.

Σταθερότητα των μικροβιακών συσσωματωμάτων

Η σταθερότητα των μικροβιακών συσσωματωμάτων είναι απαραίτητη για την διαδικασία διαχωρισμού στερεών/ υγρών σε συστήματα βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων. Ως σταθερότητα ορίζεται η ικανότητα των μικροβιακών συσσωματωμάτων να αντιστέκεται στην υδροδυναμική και μηχανική διάτμηση (Liao et al., 2002, Mikkelsen and Keiding, 2002, Sheng and Yu, 2006). Η δομή των μικροβιακών συσσωματωμάτων είναι ένας σημαντικός παράγοντας που διέπει τη σταθερότητα των κροκίδων και τη διεργασία διαχωρισμού στερεού / υγρού. Τα EPS εμπλέκονται στη δομή των μικροβιακών συσσωματωμάτων και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων. Επιπλέον, οι κύριες μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, όπως γέφυρες ιόντων μέσω EPS και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Klausen et al, 2004 Sheng et al., 2006), καθώς και δυνάμεις van deer Waal's (Mayer et al., 1999), συμβάλλουν στη σταθερότητα των μικροβιακών συσσωματωμάτων. Τα EPS αναμένεται επομένως να ρυθμίζουν σε ορισμένο βαθμό τη σταθερότητα των μικροβιακών συσσωματωμάτων . Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε EPS στη λάσπη θα οδηγήσει σε μεγαλύτερη σταθερότητα ιλύος. (Mikkelsen and Nielsen, 2001).

Ικανότητα προσκόλλησης των μικροβιακών συσσωματωμάτων

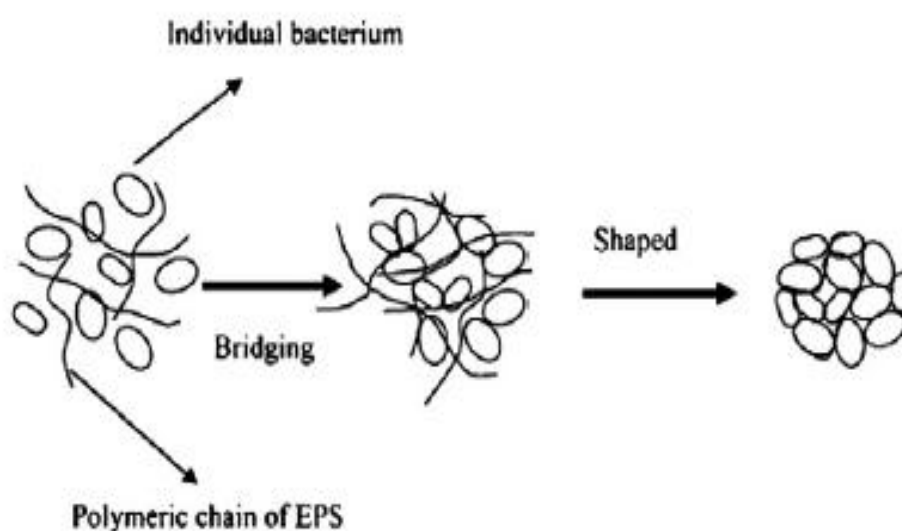
Οι μικροβιακές ιδιότητες επιφάνειας είναι σημαντικές για τις διεπιφανειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και τη στερεά επιφάνεια, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για το σχηματισμό βιοφίλμ στο υδάτινο περιβάλλον. Η παρουσία των EPS στις επιφάνειες των κυττάρων θα μπορούσε να ενισχύσει την εναπόθεση των κυττάρων στη στερεή επιφάνεια . Το καρβοξύλιο όπως και οι φωσφορικές και αμινικές ομάδες, βρέθηκε ότι συμβάλλουν στην προσκόλληση των βακτηρίων στη στερεά επιφάνεια . Μετά από την απομάκρυνση των EPS από την επιφάνεια της λάσπης, ο αριθμός των συνδεδεμένων μικροβιακών κυττάρων βρέθηκε ότι μειώνεται.

Οι Tsuneda et al. (2003) βρήκαν ότι εάν το ποσό των EPS ήταν σχετικά μικρό, η κυτταρική προσκόλληση σε στερεές επιφάνειες αναστέλλεται λόγω ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης ενώ εάν ήταν σχετικά μεγάλη, η κυτταρική προσκόλληση ενισχύεται από τις χημικές αλληλεπιδράσεις.

Σχηματισμός των μικροβιακών συσσωματωμάτων

Ως διαδικασία σχηματισμού κόκκων της ιλύος αναφέρεται η αυτο-ακινητοποίηση των μικροβίων στους βιολογικούς αντιδραστήρες επεξεργασίας λυμάτων, η οποία οδηγεί

σε μια συμπαγή δομή των αερόβιων και αναερόβιων κόκκων. Υπάρχουν πολλές μελέτες με μικροσκόπιο που δείχνουν ότι υπάρχουν πολλά EPS στο εσωτερικό αυτών των αερόβιων και αναερόβιων κόκκων (de Beer et al., 1996, Tay et al., 2001, McSwain et al., 2005). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των EPS και των μικροβιακών κυττάρων μπορούν να επηρεάσουν τον σχηματισμό κοκκώδους ιλύος. Προσθήκη εξωγενών EPS σε αναερόβιους αντιδραστήρες με μικρή παραγωγή κόκκων, οδηγεί σε σημαντική ανάκτηση των λειτουργικών επιδόσεων των αντιδραστήρων. Στην αερόβια διαδικασία κοκκοποίησης της ιλύος, η περιεκτικότητα σε EPS αυξήθηκε σε σχέση με το χρόνο της καλλιέργειας κατά το αρχικό στάδιο, αλλά παρέμεινε σταθερή κατά το στάδιο της ωρίμανσης (των κόκκων) (Wang et al., 2005). Όλα αυτά δείχνουν τον ουσιαστικό ρόλο των EPS στη μικροβιακή κοκκοποίηση. Η σύνθεση και η κατανομή των EPS επηρεάζουν τον σχηματισμό των μικροβιακών κόκκων. Τα EPS μπορούν να δεσμεύσουν τα κύτταρα στενά μέσω γέφυρας ιόντων ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, ενισχύοντας έτσι τη δημιουργία μικροβιακών κόκκων, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2. Σχηματική αναπαράσταση της μικροβιακής κοκκοποίησης από τα EPS.

Τα μεγάλα ποσά των EPS που συνδέονται με τα κύτταρα, συμβάλλουν στην ετερογένεια των βιοφίλμ (Sutherland, 2001). Τα EPS θεωρούνται σημαντικοί μεσολαβητές στην προσκόλληση των βακτηρίων σε επιφάνειες. Αυτά εμπλέκονται στη διεργασία προσκόλλησης κατά το σχηματισμό βιοφίλμ και στη διατήρηση της

δομικής ακεραιότητας των βιοφίλμ και επομένως στη συνολική σταθερότητα των κοινοτήτων βιοφίλμ (Wingender et al., 2006).

1.5 Σημασία των EPS στη διαχείριση των υγρών αποβλήτων

Η διεργασία της ενεργού ιλύος και των μεμβρανών σε βιοαντιδραστήρες αποτελούν τις πιο κοινές βιολογικές διεργασίες για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων. Η τεχνολογία του βιοαντιδραστήρα μεμβρανών (Membrane BioReactor, MBR), αποτελεί έναν από τους καλύτερους τρόπους επεξεργασίας λυμάτων, συνδυάζοντας την βιολογική διαδικασία αποδόμησης της ενεργού ιλύος με τον άμεσο διαχωρισμό στερεών / υγρών μέσω μεμβράνης διήθησης. Με την χρήση της μεμβράνης διήθησης, το μέγεθος των πόρων της οποίας μπορεί να κυμαίνεται από 0,05-0,4 μm , τα συστήματα MBR επιτρέπουν την πλήρη κατακράτηση των βακτηριακών κροκίδων και σχεδόν όλων των αιωρούμενων στερεών εντός του βιοαντιδραστήρα. Τα συστήματα MBRs προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών συστημάτων ενεργού ιλύος (CAS), όπως υψηλότερη ποιότητα εκροής (σχεδόν πλήρη απουσία παθογόνων βακτηρίων στην εκροή), λιγότερη παραγωγή ιλύος και μικρότερο αποτύπωμα. Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, τα MBR εμφανίζουν διάφορα λειτουργικά προβλήματα όπως για παράδειγμα η ρύπανση των μεμβρανών (membrane fouling), η οποία προκαλείται από την επικάλυψη ουσιών στη μεμβράνη. Η σταδιακή απόθεσή τους αυξάνει βαθμιαία την αντίσταση του συστήματος στη ροή του διηθήματος με αποτέλεσμα να μικραίνει ο κύκλος ζωής των μεμβρανών, αυξάνοντας τόσο το πάγιο όσο και το λειτουργικό κόστος. (Visvanathan et al., 2000).

Η έμφραξη των μεμβρανών εξαρτάται σε καταλυτικό βαθμό από τις ιδιότητες της βιομάζας και κυρίως από τα εξωκυτταρικά πολυμερή. Οι λειτουργίες της μήτρας των EPS είναι πολλαπλές και περιλαμβάνουν συσσωμάτωση των βακτηριακών κυττάρων σε κροκίδες και βιοφίλμ, σχηματισμό ενός προστατευτικού φράγματος γύρω από τα βακτήρια, συγκράτηση του νερού και προσκόλληση σε επιφάνειες. Με την ετερογενή φύση τους και με τροποποιήσεις αυτής, τα EPS μπορούν να σχηματίσουν ένα υψηλά ενυδατωμένο περίβλημα μέσα στο οποίο τα μικροβιακά κύτταρα μπορούν να εγκλειστούν. Για αυτό το λόγο μπορεί να είναι υπεύθυνα για την δημιουργία ενός σημαντικού φράγματος στην διαπερατότητα της μεμβράνης από τη ροή. Τέλος, οι βιοκροκίδες οι οποίες είναι συνδεδεμένες στην μεμβράνη μπορούν να αποτελέσουν

σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών κατά την διάρκεια σχηματισμού του βιοφίλμ στην επιφάνεια των μεμβρανών. Όσον αφορά την βιομάζα, αυτή μπορεί να κλασματοποιηθεί σε τρία διακριτά κλάσματα:

- 1) τα αιωρούμενα στερεά (suspended solids),
- 2) τα κολλοειδή (colloids) και
- 3) τα διαλυτά στερεά (soluble solids).

Αυτή η κλασματοποίηση χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της σχετικής συμβολής του κάθε κλάσματος στην έμφραξη των μεμβρανών. Με βάση τα παραπάνω, η συνεισφορά των κολλοειδών και των διαλυτών σωματιδίων στη μη αναστρέψιμη έμφραξη των πόρων της μεμβράνης είναι μεγάλη. Επιπλέον φαίνεται ότι η μη αναστρέψιμη έμφραξη από αυτές τις ουσίες παρατηρείται ακόμα και σε πολύ χαμηλές ταχύτητες ροής, σε πολύ μικρότερο βέβαια βαθμό από την έμφραξη που παρατηρείται σε υψηλές ροές. Αντιθέτως η έμφραξη που οφείλεται στα αιωρούμενα στερεά (cake layer) μπορεί να περιορισθεί σημαντικά με τη λειτουργία του συστήματος σε ροές χαμηλότερες από την κρίσιμη ροή, με τον αερισμό της μονάδας των μεμβρανών και με τη περιοδική έκπλυση των μεμβρανών (Judd, 2004).

Επιπρόσθετα υπάρχουν αρκετές ακόμα παράμετροι που επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των EPS στα συστήματα MBR, όπως ο αερισμός, η σύνθεση του υποστρώματος, ο ρυθμός φόρτισης, ενώ ο χρόνος παραμονής των στερεών (SRT) παραμένει μάλλον η σημαντικότερη παράμετρος από όλες. Οι Le-Clech et al.(2006), αναφέρουν ότι σε μεγάλους χρόνους παραμονής στερεών παρατηρείται μείωση των EPS. Η επίδραση του χρόνου παραμονής στερεών στις βιολογικές παραμέτρους όπως τα MLSS, τη συγκέντρωση των SMP, τη συγκέντρωση των EPS, αποκαλύπτει το μεγάλο αντίκτυπο αυτής της λειτουργικής παραμέτρου στην έμφραξη των συστημάτων MBR. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, η επιλογή του SRT να θεωρείται πολύ σημαντική για την βελτιστοποίηση της λειτουργίας του συστήματος.

Ακόμα, έχει μελετηθεί από τους Cho et al. (2006) η σχέση μεταξύ των EPS και της ροής διήθησης, και βρέθηκε ότι υπάρχει μια λειτουργική συσχέτιση κατά την οποία η αντίσταση στη ροή διήθησης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των EPS. Το γεγονός ότι τα EPS μειώνονται με την αύξηση του χρόνου παραμονής δείχνει ότι μπορεί να υπάρξουν σημαντικές αλλαγές στην αντίσταση στη ροή διήθησης εξαιτίας της

μείωσης των κολλοειδών συστατικών που συμβάλλουν στην έμφραξη (Massé et al., 2006, Cho et al., 2006; Liao et al., 2004).

Τέλος ,ένας ακόμα παράγοντας μέγιστης σημασίας για την έμφραξη είναι το υλικό των μεμβρανών. Ίσως η πιο σημαντική ιδιότητα του υλικού κατασκευής των μεμβρανών είναι το κατά πόσο είναι υδρόφιλο ή υδρόφοβο. Οι πρωτεΐνες, οι διαλυμένες ουσίες και οι μικροοργανισμοί έχουν την τάση να προσροφώνται πιο έντονα σε υδρόφοβες επιφάνειες με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συσσώρευση σωματιδίων σε τέτοιες επιφάνειες (Choi et al., 2002b). Για το λόγο αυτό η επιφάνεια των μεμβρανών κατασκευάζεται ώστε να είναι αρκετά υδρόφιλη (Judd, 2004).

Η έμφραξη των μεμβρανών τόσο στο εσωτερικό τους όσο και στην επιφάνειά τους είναι αναπόφευκτη. Διάφορες μέθοδοι αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού έχουν προταθεί κατά καιρούς, όμως καμία από αυτές δεν προσφέρει οριστική λύση στο πρόβλημα. Μπορούν να επιβραδύνουν το ρυθμό με τον οποίο φράσσει η μεμβράνη, δεν μπορούν όμως να τον αναστείλουν οριστικά.

1.6 Μέθοδοι μέτρησης πρωτεϊνών και υδατανθράκων

Στην βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι έχουν για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων.

Στα υγρά απόβλητα η ευαισθησία των μεθόδων θα πρέπει να είναι υψηλή γιατί κυρίως στα αστικά λύματα η σύσταση σε EPS είναι χαμηλή και διαφορετική. Μια συνήθης μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι η ανάλυση Kjeldahl-N, κυρίως για το οργανικό άζωτο. Δεδομένου ότι η περιεκτικότητα σε άζωτο ποικίλλει στις διάφορες πρωτεΐνες αυτή η μέθοδος δεν προτιμάται επειδή η πρωτεϊνική σύνθεση των λυμάτων δεν είναι προβλέψιμη. Μία άλλη μέθοδος που εφαρμόζεται για την ανάλυση πρωτεΐνης είναι η μέθοδος biuret. Αυτή, απαιτεί μία σχετικά υψηλή ποσότητα πρωτεϊνών στο δείγμα (1-20 mg) (Ramanathan et al., 1968). Η χαμηλή ευαισθησία αποκλείει την εφαρμογή της παρούσας μεθόδου για την ανάλυση των πρωτεϊνών σε δείγματα με χαμηλές συγκεντρώσεις όπως σε αστικά λύματα. Μια πιο ευαίσθητη μέθοδος για την μέτρηση των πρωτεϊνών , είναι με τη μέθοδο του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteau (FCP) (Lowry et al., 1951). Είναι μια χρωματομετρική μέθοδος και έχει δείξει ανοχή στα χαμηλά όρια των συγκεντρώσεων των αστικών λυμάτων. Οι Smith et al. (1985), πρότειναν μια μέθοδο με βάση την

αρχή του Lowry, αλλά χρησιμοποιώντας ένα εναλλακτικό αντιδραστήριο ανίχνευσης, το bicinchoninic acid (BCA). Αυτό το αντιδραστήριο είναι πιο σταθερό και ευαίσθητο από το FCP αντιδραστήριο και η μέθοδος γενικά πιο ανεκτική σε σχέση με τις ουσίες παρεμβολής. Η μέθοδος είναι, ωστόσο, πολύ ευαίσθητη σε παρεμβολές από αναγωγικά σάκχαρα (Smith et al., 1985), που αποτελεί πρόβλημα κατά την μέτρηση των πρωτεϊνών στα λύματα, όπου αναμένεται να υπάρχουν αναγωγικά σάκχαρα. Ένας άλλος τύπος ανίχνευσης πρωτεϊνών είναι η μέθοδος δέσμευσης χρωστικής ουσίας. Χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG) ως χρωστική είναι η πιο πολλά υποσχόμενη μέθοδος που αρχικά αναπτύχθηκε από τον Bradford (1976). Προκειμένου να δεσμευτεί η CBBG στην πρωτεΐνη πρέπει να υπάρχει μια δομή - τουλάχιστον 8-9 πεπτιδικών δεσμών και η το χρώμα που αναπτύσσεται μετράται φασματοφωτομετρικά. Λαμβάνοντας υπόψη την απαίτηση για ευαισθησία κατά την μέτρηση των πρωτεϊνών, η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου είναι μεταξύ των Lowry et al. (1951) και του Bradford (1976). Εξ αιτίας της μεταβλητότητας στην εξάλειψη των διαφόρων πρωτεϊνών, η μέθοδος Lowry φαίνεται να είναι πολύ πιο ακριβής από τη μέθοδο Bradford. Η τελευταία εφαρμόζεται πιο πολύ για τη μέτρηση των καθαρών πρωτεϊνών από μείγματα πρωτεϊνών. Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου Bradford είναι ότι απαιτείται μια μακρομοριακή δομή της πρωτεΐνης, σε σύγκριση με την μέθοδο Lowry όπου μετρώνται μόρια τόσο μικρά όσο τα διπεπτίδια. Τα δύο μειονεκτήματα της Bradford μπορεί να προκαλέσουν χαμηλή ανίχνευση των πρωτεϊνών στα λύματα χρησιμοποιώντας αλβουμίνη βόειου ορού ως πρότυπο. Λαμβάνοντας αυτά υπόψη, η μέθοδος Lowry φαίνεται να είναι η σωστή επιλογή για την ανάλυση των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά τους υδατάνθρακες οι περισσότερες τεχνικές μέτρησης είναι χρωματομετρικές. Αυτές περιλαμβάνουν τη θέρμανση του δείγματος με ισχυρό θειικό οξύ και την προσθήκη ενός αντιδραστηρίου με σκοπό την εμφάνιση χρώματος. Τα δυο αντιδραστήρια που έχουν φανεί πολύ χρήσιμα είναι η ανθρόνη και η φαινόλη. Η χρήση του αντιδραστηρίου ανθρόνης για την ανίχνευση των ολικών υδατανθράκων εισήχθη ως μια ποιοτική δοκιμή από τον Dreywood (1946). Η δοκιμή τροποποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε σε ποσοτική μέτρηση των υδατανθράκων από τον Morris (1948). Η μέθοδος αργότερα βελτιώθηκε μέσω αρκετών ερευνών όπως π.χ. του Koehler (1952), Bailey (1958). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε μία

αντίδραση μεταξύ των υδατανθράκων και του αντιδραστηρίου ανθρόνης σε ισχυρό θετικό οξύ, όπου και αναπτύσσεται ένα πράσινο χρώμα το οποίο μετράται φασματοφωτομετρικά. Ο μηχανισμός της ανάπτυξης χρώματος στηρίζεται στο ότι οι πολυσακχαρίτες υδρολύονται κατά τη διάρκεια της θέρμανσης με το ισχυρό οξύ, σε μονοσακχαρίτες, οι οποίοι είναι αφυδατωμένοι προς παράγωγα φουρφουράλης τα οποία αντιδρούν με την ανθρόνη. Η μέθοδος ανθρόνης παρουσιάζει υψηλή επιλεκτικότητα ως προς τους υδατάνθρακες. Οι ενώσεις που είναι παρούσες σε λυμάτα, είναι π.χ. λίπη, πρωτεΐνες και οξικό και δεν προκαλούν παρεμβολές (Gaudy, 1962). Ο Koehler (1952) διαπίστωσε ότι δεν σχηματίζουν όλοι οι υδατάνθρακες το σύμπλοκο χρώματος με την ίδια ένταση. Η ένταση είναι υψηλότερη για τις εξόζες και χαμηλότερη για τις πεντόζες. Αυτό είναι ένα μειονέκτημα εφόσον η σύνθεση των υδατανθράκων δεν είναι επακριβώς γνωστή.

Οι Dubois et al. (1956) ανέπτυξαν μια μέθοδο η οποία χρησιμοποιεί ως αντιδραστήριο, την φαινόλη. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ίδια αρχή όπως η μέθοδος ανθρόνης. Η μέθοδος της φαινόλης, έχει υψηλή επιλεκτικότητα ως προς τους υδατάνθρακες και όλα τα σάκχαρα φαίνεται να αποδίδουν την ίδια ένταση χρώματος. Έτσι, στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η μέθοδος της φαινόλης ή η μέθοδος Dubois, για την ανίχνευση των υδατανθράκων.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα εξωκυτταρικά πολυμερή (EPS) αποτελούν το βασικό συστατικό των βιοφίλμ. Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό τους στο βιοφίλμ που αναπτύσσεται σε σύστημα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων κυμαίνεται στα 50 - 90% της συνολικής οργανικής ύλης. Από το σύνολο των λοιπών συστατικών που υπάρχει στο βιοφίλμ, τα EPS είναι κυρίως υπεύθυνα για τη δομική και λειτουργική ενότητα των βιοφίλμ και για τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητές τους.

Στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής εργασίας πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός χαρακτηρισμός των τριών κλασμάτων των EPS (Soluble EPS, Loosely Bound EPS, Tightly Bound EPS) ως προς τη συγκέντρωσή τους σε πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες, με τη μορφή υδατανθράκων. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός χαρακτηρισμός των τριών κλασμάτων των EPS με την ανάλυση της κατανομής μοριακού βάρους των εκχυλισμάτων.

Στόχος ήταν η κατανόηση των μηχανισμών σχηματισμού και διάσπασης/διάλυσης των κλασμάτων των EPS και η αξιολόγηση της απόδοσης του εξεταζόμενου συστήματος επεξεργασίας. Επιπλέον, το αντικείμενο της εργασίας αυτής ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των διαφορετικών παραμέτρων λειτουργίας και των χαρακτηριστικών των αποβλήτων στην παραγωγή των EPS σε ένα σύστημα ενεργού ιλύος.

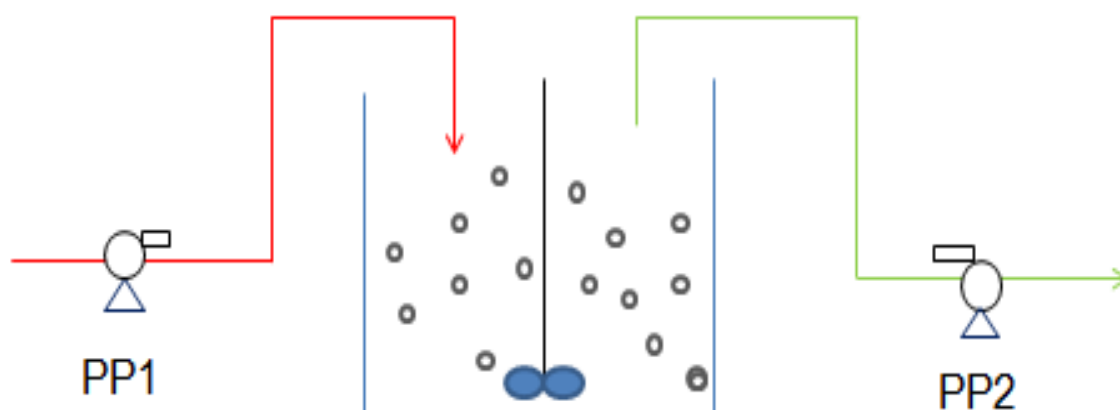
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1 Δείγματα

Η μελέτη των μηχανισμών παραγωγής των εξωκυτταρικών πολυμερών έλαβε χώρα σε ένα σύστημα αντιδραστήρων ενεργού ιλύος που λειτουργούσαν ως αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας εναλλασόμενων φάσεων (SBR). Οι αντιδραστήρες αυτοί αποτελούνταν από κυλινδρικά δοχεία plexi glass ενεργού όγκου 10 l, τα οποία διέθεταν όλα τα συστήματα για την τροφοδοσία των αποβλήτων, τον αερισμό, αλλά και την απομάκρυνση των επεξεργασμένων εκροών. Συγκεκριμένα, κάθε σύστημα περιελάμβανε τα εξής:

1. Περισταλτική αντλία για την τροφοδοσία των αποβλήτων
2. Σύστημα ανάδευσης με αναδευτήρα μεταβαλλόμενων στροφών
3. Σύστημα τροφοδοσίας αέρα που αποτελούνταν από κεραμικούς πορώδεις δίσκους
- 4 Περισταλτική αντλία για την απομάκρυνση της εκροής.



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση συστήματος αντιδραστήρα.

Οι αντιδραστήρες λειτουργούσαν σε κύκλους 12 ωρών και η λειτουργία τους περιελάμβανε διαδοχικές φάσεις με συγκεκριμένη διάρκεια. Έτσι, ένας κύκλος λειτουργίας περιελάμβανε τα εξής:

τροφοδοσία (1/2 ώρες), ανοξική φάση με ανάδευση (2 ώρες), αερισμός (8 ώρες), καθίζηση (1 ώρα), απομάκρυνση εκροής (1/2 ώρες). Η παροχή στο σύστημα κατά τη φάση της τροφοδοσίας ήταν 2 L/hr και ο υδραυλικός χρόνος παραμονής 2.5 ημέρες . Οι συνθήκες λειτουργίας των συστημάτων που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στη συνέχεια:

Το σύστημα 1 αποτελούσε το μάρτυρα (έλεγχος) και τροφοδοτήθηκε με μίγμα 90% αστικού λύματος και 10% αποβλήτων μελάσας.

Το σύστημα 2 τροφοδοτήθηκε με μίγμα 90% αστικού λύματος και 10% αποβλήτων μελάσας. Η εισροή είχε υποστεί ένα στάδιο προεπεξεργασίας με όζον σε ένα σύστημα αντιδραστήρα φυσαλίδων. Οι συνθήκες οζόνωσης ήταν όγκος δείγματος 1 L, χρόνος επαφής 20 min και παροχή όζοντος 2 g/h. Η διεργασία του οζονισμού προστέθηκε με στόχο τη διάσπαση των μεγάλων μορίων που περιέχονται στο απόβλητο μελάσας και τη διευκόλυνση της αποδόμησής τους κατά την ακόλουθη βιολογική επεξεργασία τους.

Το σύστημα 3 τροφοδοτήθηκε, ομοίως με τα δυο προηγούμενα συστήματα, με μίγμα 90% αστικού λύματος και 10% αποβλήτου μελάσας. Η εισροή είχε υποστεί προεπεξεργασία με όζον όπου όμως είχε προστεθεί υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) σε συγκέντρωση 50 έως 100 mM. Ο συνδυασμός της χρήσης οζόνωσης και H_2O_2 πραγματοποιήθηκε, όπως προαναφέρθηκε, έχοντας ως στόχο τη διάσπαση των μεγάλων μορίων του αποβλήτου μελάσας και τη διευκόλυνση της αποδόμησής τους κατά την ακόλουθη βιολογική επεξεργασία τους (Heroniemi & Lassi 2012).

Το σύστημα 4 τροφοδοτήθηκε με μίγμα 90% αστικού λύματος και 10% αποβλήτων μελάσας. Στο σύστημα αυτό, προστέθηκε μια φορά στην αρχή της λειτουργίας ενεργός άνθρακας (PAC) με συγκέντρωση 500 mg/ L.

Τέλος, το σύστημα 5 τροφοδοτήθηκε, ομοίως με τα δυο προηγούμενα , με μίγμα 90% αστικού λύματος και 10% αποβλήτου μελάσας. Στο εσωτερικό της δεξαμενής τοποθετήθηκαν λαμπτήρες led με χρώματα κόκκινο, πράσινο και μπλε έτσι ώστε να διευκολυνθεί η παραγωγή φωτοσυνθετικών οργανισμών που ευνοούν την απομάκρυνση θρεπτικών συστατικών.

ΔΕΞΑΜΕΝΗ 1	ΔΕΞΑΜΕΝΗ 2	ΔΕΞΑΜΕΝΗ 3	ΔΕΞΑΜΕΝΗ 4	ΔΕΞΑΜΕΝΗ 5
90% ΑΣΤΙΚΟ ΛΥΜΑ + 10% ΑΠΟΒΛΗΤΟ ΜΕΛΑΣΑΣ	90% ΑΣΤΙΚΟ ΛΥΜΑ + 10% ΑΠΟΒΛΗΤΟ ΜΕΛΑΣΑΣ ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΟΖΟΝ	90% ΑΣΤΙΚΟ ΛΥΜΑ + 10% ΑΠΟΒΛΗΤΟ ΜΕΛΑΣΑΣ ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΟΖΟΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ	90% ΑΣΤΙΚΟ ΛΥΜΑ + 10% ΑΠΟΒΛΗΤΟ ΜΕΛΑΣΑΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΣΚΟΝΗΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ	90% ΑΣΤΙΚΟ ΛΥΜΑ + 10% ΑΠΟΒΛΗΤΟ ΜΕΛΑΣΑΣ ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΗ ΛΑΜΠΤΗΡΩΝ LED ΣΤΟ ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΤΗΣ ΔΕΞΑΜΕΝΗΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Περιεχόμενο και προεπεξεργασία που έχουν υποστεί και τα πέντε συστήματα.

Για την τροφοδοσία των αντιδραστήρων χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αποβλήτων που συλλέχθηκαν:

1. Από την υπερχειλίση της δεξαμενής πρωτοβάθμιας καθίζησης της εγκατάστασης επεξεργασίας αστικών λυμάτων της Θεσσαλονίκης.
2. Από την εκροή του αναερόβιου χωνευτή στην εγκατάσταση επεξεργασίας υγρών αποβλήτων μιας βιομηχανικής μονάδας παραγωγής ζύμης αρτοποιίας.

Η συλλογή των δειγμάτων για τη μέτρηση των EPS πραγματοποιούνταν 1 ώρα πριν από το τέλος της αερόβιας φάσης από το ανάμικτο υγρό κάθε συστήματος. Στη συνέχεια ακολουθούσε η εκχύλιση των EPS και τα εκχυλισμένα κλάσματα αποθηκεύονταν σε χαμηλή θερμοκρασία, -18°C , για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών.

3.1.2 Υλικά και αντιδραστήρια

Για την μέθοδο Lowry :

- Αλβουμίνη βόειου ορού (BSA)
- Αντιδραστήριο Folin : Folin and Ciocalteus Phenol Reagent, 2N
- Τρυγικό Νάτριο : Sodium tartrate
- Θεϊκός χαλκός : $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$
- Λοιπά χημικά : NaOH , Na_2CO_3
- Αποσταγμένο νερό

Για την μέθοδο Dubois :

- Θεϊκό οξύ 95,5%
- Φαινόλη 5%
- Αποσταγμένο νερό

Για την εκχύλιση :

- Χλωριούχο Νάτριο 0,05%

Για την χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού :

- Χλωριούχο Νάτριο NaCl 0,05%
- Όξινο Φωσφορικό Δινάτριο Na_2HPO_4
- Δισόξινο Φωσφορικό Νάτριο NaH_2PO_4
- Νατραζίδιο NaN_3
- Υδροξείδιο του Νατρίου NaOH

3.1.3 Όργανα

- Μικροπιπέτες 200-1000 μl
- Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Fisher Stirring Hotplace, Fisher Scientific).
- Αναλυτικός ζυγός (KERN & Sohn Gmbh, Electronic Balance, ABJ 220-4M, max 180g, d=0.1mg).
- Φυγόκεντρος
- Φασματοφωτόμετρο έως 750nm
- Γυάλινες πιπέτες των 5 και 10 ml
- Συσκευή Vortex
- Ογκομετρικούς κυλίνδρους των 50ml
- Πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης
- Υδατόλουτρο
- Πλαστικά δοχεία αποθήκευσης δειγμάτων-κλασμάτων εκχύλισης
- Γυάλινη σύριγγα των 100 ml
- Φίλτρα μιας χρήσης των 0.1μm , 0,45 μm και των 0,2 μm.
- Χρωματογράφος Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography – SEC)
- 2 χρωματογραφικές στήλες GPC/SEC Columns PL aquagel-OH MIXED-H της Agilent
- Απαερωτής υπό κενό (vacuum degasser) SpectraSystem SCM 1000
- Αντλία Binary Pump SpectraSystem P2000.
- Ανιχνευτής στατικής σκέδασης φωτός (Static Light Scattering-SLS) (Brookhaven BI-MwA)
- Ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας UV (Rigas Labs Fasma 525)
- Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (Refractive Index-RI) (Brookhaven WGE-Dr. Bures)

3.2 Πρωτόκολλο εκχύλισης EPS

Σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων εκχύλισης των EPS έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία. Ωστόσο θα πρέπει να τονιστεί ότι οι διαφορετικές μέθοδοι έχουν και διαφορετικές αποδόσεις στην εκχύλιση, και αυτό είναι αποτέλεσμα των διαφορετικών τρόπων σύνθεσης των EPS. Η βέλτιστη μέθοδος εκχύλισης των EPS πρέπει να είναι αποτελεσματική, προκαλώντας ελάχιστη λύση κυττάρων και να μην διασπά τη δομή των EPS. Η κυτταρική λύση μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της εκχύλισης των EPS αλλά η έκταση της λύσης των κυττάρων είναι δύσκολο να αξιολογηθεί. Επιπλέον, σε ορισμένες μεθόδους εκχύλισης EPS, μπορεί να συμβεί αποδιοργάνωση των μακρομορίων. Για την εκχύλιση των διαλυτών EPS, χρησιμοποιείται πάντα φυγοκέντρηση. Για την εκχύλιση των δεσμευμένων EPS, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται διαχωρίζονται σε φυσικές, χημικές ή έναν συνδυασμό φυσικών και χημικών (μεθόδων). Οι φυσικές μέθοδοι εκχύλισης χρησιμοποιούν εξωτερικές δυνάμεις, οι οποίες μπορεί να προκληθούν από υπερήχους, φυγοκέντρηση ή θέρμανση, για να αποκολληθούν τα κύτταρα από τα EPS και να διαλυθούν στο διάλυμα. Στις χημικές μεθόδους εκχύλισης, χημικές ενώσεις, όπως ρητίνη ανταλλαγής κατιόντων (CER), το EDTA [17] ή HCHO / NaOH [16], προστίθενται προκειμένου να διασπάσουν τους δεσμούς μεταξύ των EPS και των κυττάρων και να διαλύσουν τα EPS στο διάλυμα. Οι χημικές μέθοδοι εκχύλισης είναι πιο αποτελεσματικές σε σύγκριση με τις φυσικές μεθόδους εκχύλισης. Ωστόσο προκαλούν προβλήματα κατά τη διαδικασία της ίδιας της εκχύλισης ή σε επακόλουθη ανάλυση των EPS, όπως λύση κυττάρων, διατάραξη της μακρομορίων, ή μόλυνση της εκχύλισης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα επιλέχθηκε η φυγοκέντρηση ως μέθοδος εκχύλισης. Αρχικά, συλλέγονται 35 ml δείγματος με την βοήθεια ογκομετρικών κυλίνδρων και τοποθετούνται στους ειδικούς σωλήνες φυγοκέντρησης ώστε να επιτευχθεί φυγοκέντρηση στις 4000 (rcf) για δέκα λεπτά με την χρήση κεφαλής F28/50. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης παραλαμβάνεται το πρώτο κλάσμα (αιώρημα). Στη συνέχεια για την παραλαβή των επιμέρους κλασμάτων LBEPs και TBEPs ακολουθούν δυο επιμέρους φυγοκεντρήσεις-εκχυλίσεις (Sheng et al., 2010). Έπειτα επαναϊωρείται το εναπομείναν κλάσμα με θερμό NaCl 0,05% έως τα 35ml, ζυγίζονται και φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά. Παραλαμβάνεται και αποθηκεύεται το δεύτερο κλάσμα (LBEPs). Τέλος για την απομάκρυνση των TBEPs η μέθοδος

γίνεται πιο επιθετική επαναιωρώντας με NaCl 0.05% και αυτή τη φορά τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 60 °C για 30 λεπτά. Τέλος όλα τα κλάσματα αποθηκεύονται στην κατάψυξη έως ότου αυτά χρειαστούν για χρωματογραφική ανάλυση.

3.3 Μέθοδοι ανάλυσης

Πρωτόκολλο Lowry

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu phenol (FCP) (Lowry et al.,1951) αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους υπολογισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Το πρώτο βήμα είναι μια αντίδραση biuret όπου οι πεπτιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών αντιδρούν με τον χαλκό σε αλκαλικό διάλυμα. Στη συνέχεια, παρασκευάζεται και προστίθεται το απαραίτητο για την διαδικασία αντιδραστήριο Folin. Το τελικό προϊόν της αντίδρασης δίνει μπλε χρώμα το οποίο μπορεί να μετρηθεί με απορρόφηση στα 750 nm έναντι του στάνταρ διαλύματος πρωτεΐνης βόειου ορού (Bovine Serum Albumin BSA). Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί ο κίνδυνος παρεμβολής άλλων ουσιών (οξέα, λιπαρά οξέα, ζάχαρα, λιπίδια) παρόλα αυτά όμως 27 διαφορετικές πρωτεΐνες μας δίνουν το ίδιο χρωματικό αποτέλεσμα με αυτό της πρωτεΐνης BSA (Peterson, 1979). Το αντιδραστήριο Lowry παρασκευάζεται πάντα φρέσκο την ημέρα της μέτρησης και αποτελεί μίξη των διαλυμάτων A, B και C σε αναλογία 100:1:1.

Διάλυμα A (500ml): 2.8598gr NaOH

14.3084gr Na₂CO₃

Διάλυμα B (100ml): 1.4232gr CuSO₄·5(H₂O)

Διάλυμα C (100ml) : 2.85299gr Sodium tartrate

Στη συνέχεια προστίθενται 0,5 ml δείγματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες και το διάλυμα Lowry. Τα δείγματα ανακινούνται με τη βοήθεια της συσκευής Vortex και αφήνονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στα τελευταία 5 λεπτά της 20λεπτής παραμονής (στο σκοτάδι) ετοιμάζεται το αντιδραστήριο Folin.

Παρασκευή αντιδραστηρίου Folin: Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 7ml Folin και 0,252 ml H₂O, από αυτά λαμβάνονται 5ml και προστίθενται 6ml H₂O.

Μετά το πέρας των 20 λεπτών προστίθενται 0,1ml του αραιωμένου Folin σε κάθε δοκιμαστικό και αναδεύονται με την συσκευή Vortex. Ακολουθεί 30λεπτή παραμονή στο σκοτάδι. Τέλος γίνεται μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο στα 750nm (UV-VIS).

Σημειώσεις :

- *Η επιλογή μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης ως στάνταρ καθ όλη τη διάρκεια των πειραμάτων είναι σημαντική.*
- *Πάντα παρασκευάζεται τυφλό.*
- *Η διαδικασία αυτή εκτελείτε στο **ΣΚΟΤΑΔΙ**.*

Μέθοδος Dubois

Οι περισσότερες μέθοδοι μέτρησης πολυσακχαριτών είναι χρωματομετρικές, μια από αυτές έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη και συμπεριλαμβάνει τη χρήση αντιδραστηρίου φαινόλης (Herbert et al., 1971). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε μια αντίδραση μεταξύ των υδατανθράκων και του αντιδραστηρίου της φαινόλης σε ισχυρό θειικό οξύ, όπου και αναπτύσσεται ένα πράσινο χρώμα το οποίο μετράται φασματομετρικά. Ο μηχανισμός της μεθόδου στηρίζεται στην υδρόλυση των πολυσακχαριτών σε μονοσακχαρίτες λόγω της προσθήκης θειικού οξέος, οι όποιοι είναι αφυδατωμένα παράγωγα φουρφουράλης τα οποία αντιδρούν με την φαινόλη. Η φαινόλη δίνει μεγάλη εξειδίκευση στους πολυσακχαρίτες και όλα τα σάκχαρα φαίνεται να προσδίδουν ίδια χρωματική ένταση. Γλυκόζη (glucose Panreac) χρησιμοποιείται ως στάνταρ για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης συγκέντρωσης.

Δείγματα 1 ml προστίθενται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, έπειτα προστίθεται 1 ml 5% φαινόλης και 5 ml πυκνό θειικό οξύ γρήγορα και με προσοχή ώστε να μην πέσει στο τοίχωμα του σωλήνα αλλά κατευθείαν στην υγρή επιφάνεια. Οι σωλήνες αφήνονται σε ηρεμία για δέκα λεπτά. Έπειτα ανακινούνται με την βοήθεια της συσκευής Vortex και αφήνονται για μισή ώρα είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε σε

υδατόλουτρο αντίστοιχης θερμοκρασίας (25-30 °C). Μετά το περάς των 30 λεπτών ακολουθεί φασματοφωτομετρική μέτρηση στα 490 nm.

Σημειώσεις :

- *Η διαδικασία εκτελείται ΠΑΝΤΑ με διπλά γάντια και μάσκα.*
- *Προετοιμασία τυφλού.*
- *Οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν και αρκετές ώρες αργότερα γιατί το χρώμα παραμένει σταθερό.*

3.4 Πρωτόκολλο Χρωματογράφου Αποκλεισμού Μεγεθών (Size Exclusion Chromatography – SEC)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC), είναι ένας τύπος υγρής χρωματογραφίας στην οποία τα μόρια της διαλυμένης ουσίας διαχωρίζονται κατά μέγεθος, σαν συνέπεια της διόδου τους μέσα από τους γεμάτους διαλύτη πόρους στο υλικό πληρώσεως της στήλης (column packing). Είναι μια εντροπικός ελεγχόμενη τεχνική διαχωρισμού που εξαρτάται από τη σχέση που έχει το σχετικό μέγεθος ή ο υδροδυναμικός όγκος ενός μακρομορίου, με το μέσο μέγεθος των πόρων του πληρωτικού υλικού της διάταξης. Σε κάθε σύστημα SEC υπάρχει κατάλληλη αλληλουχία στηλών με διαφορετικό μέγεθος πόρων και πειραματικώς προσδιοριζόμενα όρια μεγέθους, μεταξύ των οποίων είναι δυνατός ο διαχωρισμός.

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δυο χρωματογραφικές στήλες GPC/SEC Columns PL aquagel-OH MIXED-H της Agilent με μέγεθος πόρων 8 μm , ένας απαερωτής υπό κενό με σκοπό το φιλτράρισμα της κινητής φάσης στα 0.1 μm και απαέρωση υπό κενό για 1hr και μια αντλία Binary Pump. Το φάσμα των μοριακών βαρών που μπορούν να διαχωρίσουν οι στήλες είναι 6-10000kDa και ο όγκος έκλουσης είναι 20 mL με την ροή να διατηρείται σταθερή στα 0.8 mL/min. Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος, το οποίο παρασκευάζεται από Na_2HPO_4 και NaH_2PO_4 . Για την αποφυγή της ανάπτυξης μικροβίων στην κινητή φάση, το οποίο θα είχε αρνητική επίδραση στη λειτουργία της στήλης προστέθηκε (στην κινητή φάση) νατραζίδιο. Τα δείγματα

διηθήθηκαν με φίλτρο 1 μm και ποσότητα 100 μL εγχύθηκε στον χρωματογράφο. Για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις ανιχνευτές. Ένας, ανιχνευτής στατικής σκέδασης φωτός (Static Light Scattering-SLS) για τον εντοπισμό των μεγάλων σωματιδίων, ένας ανιχνευτής υπεριώδους ακτινοβολίας UV ο οποίος ήταν ρυθμισμένος στα 280 nm για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών και ένας ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (Refractive Index-RI). Τέλος, για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Brookhaven Instruments Corporation (BIC) ParSEC Software.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

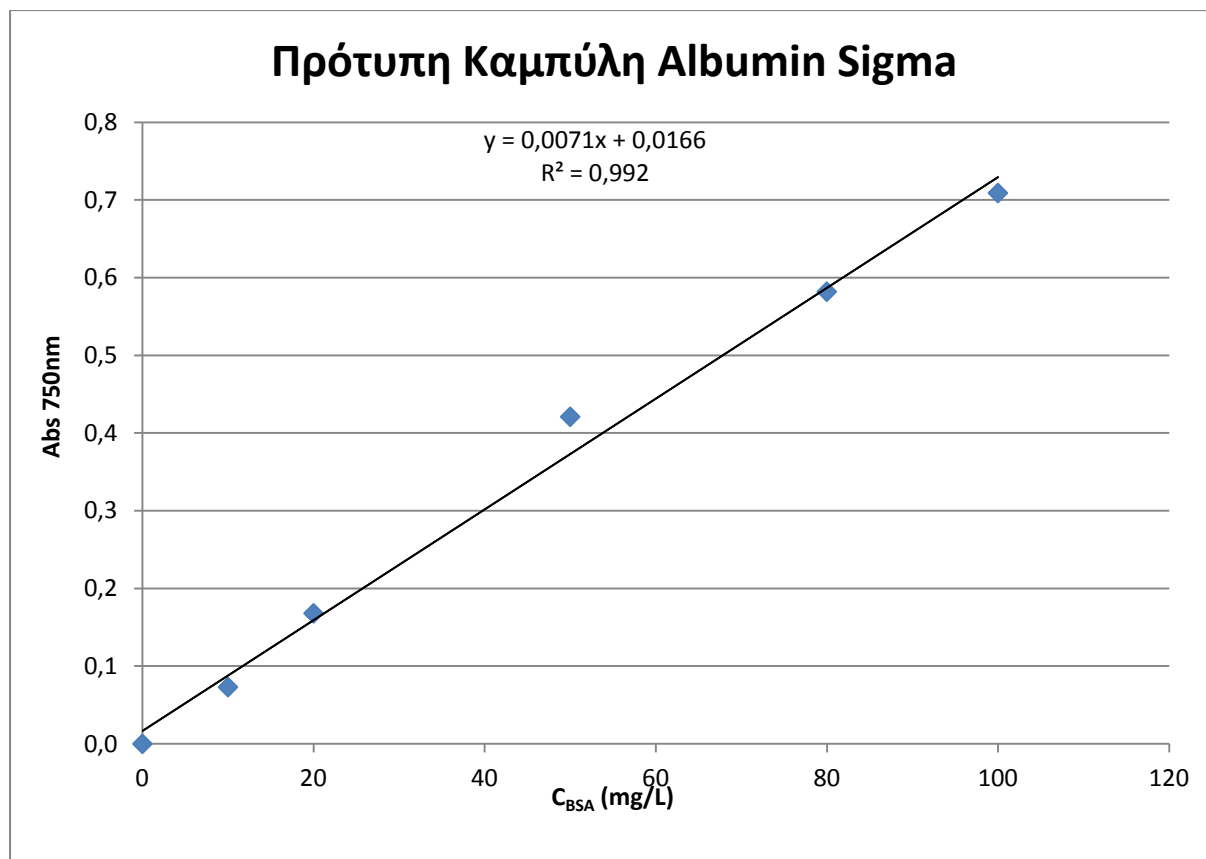
4.1 Παρασκευή Πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης

Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών μετρήθηκαν οι απορροφήσεις αραιωμένων διαλυμάτων αλβουμίνης γνωστής συγκέντρωσης. Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων καθώς και οι αντίστοιχες απορροφήσεις τους (Πίνακας 2).

Διάλυμα BSA (ml) 0.1mg/ml	απεστ. H ₂ O (ml)	Συγκέντρωση BSA (mg/L)	Abs 750nm
0	10	0	0,000
1	9	10	0,073
2	8	20	0,168
5	5	50	0,421
7	2	80	0,582
8	0	100	0,709

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις διαλυμάτων αλβουμίνης και τιμές απορρόφησης για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης BSA.

Στη συνέχεια απεικονίζεται η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από τις παραπάνω μετρήσεις.



Σχήμα 4. Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης αλβουμίνης (Albumin Sigma)

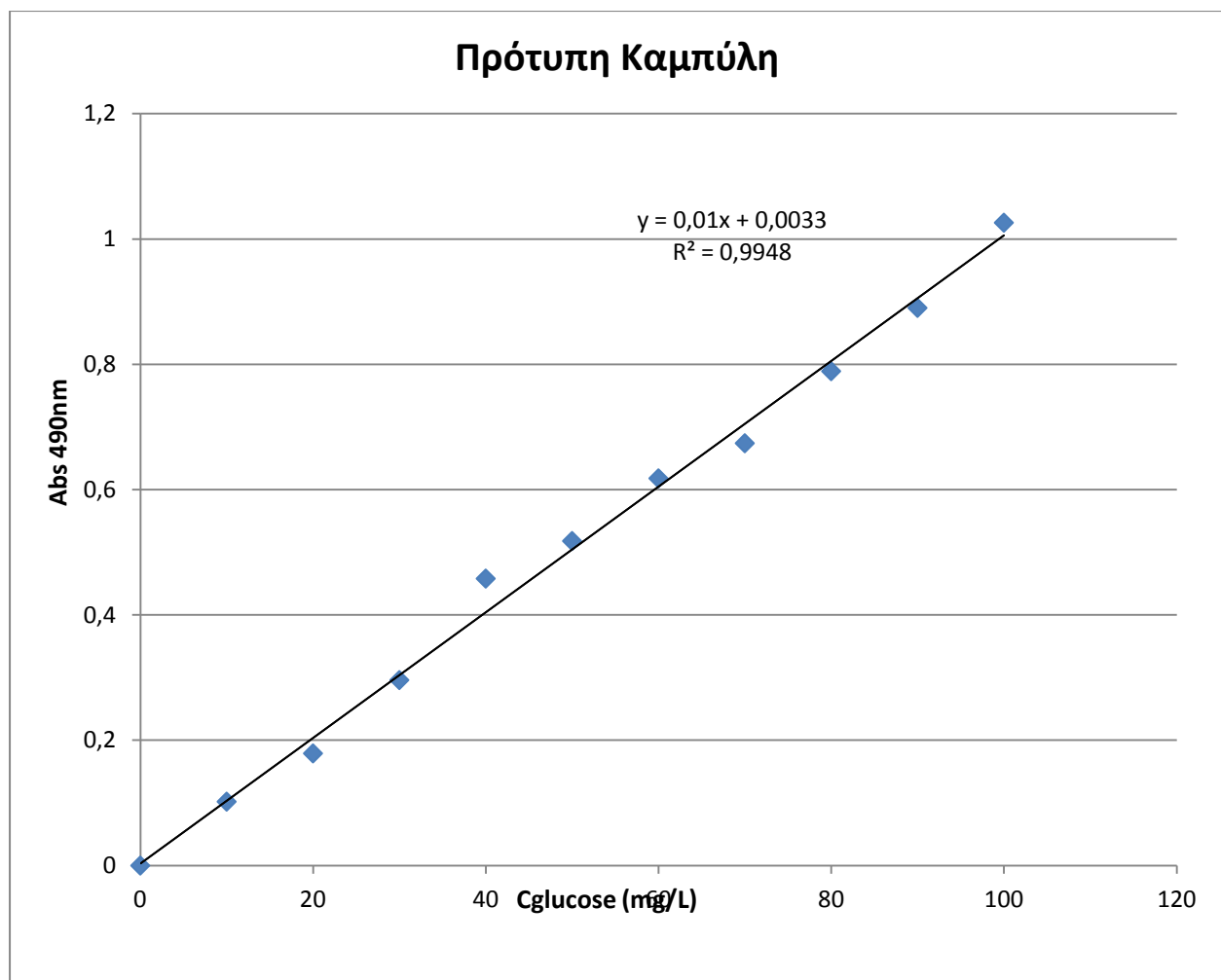
4.2 Παρασκευή Πρότυπης καμπύλης γλυκόζης

Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης της συγκέντρωσης των υδατανθράκων μετρήθηκαν οι απορροφήσεις αραιωμένων διαλυμάτων γλυκόζης με γνωστή συγκέντρωση. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων καθώς και οι απορροφήσεις τους (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις διαλυμάτων γλυκόζης και τιμές απορρόφησης για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης γλυκόζης.

Διάλυμα γλυκόζης (ml) 0.1mg/ml	H ₂ O (ml)	Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/L)	Abs 490nm
0	100	0	0
10	90	10	0,102
20	80	20	0,179
30	70	30	0,296
40	60	40	0,458
50	50	50	0,518
60	40	60	0,618
70	30	70	0,674
80	20	80	0,789
90	10	90	0,89
100	0	100	1,026

Στη συνέχεια δίνεται η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει από τις παραπάνω μετρήσεις.



Σχήμα 5. Πρότυπη καμπύλη συγκέντρωσης γλυκόζης (glucose Panreac).

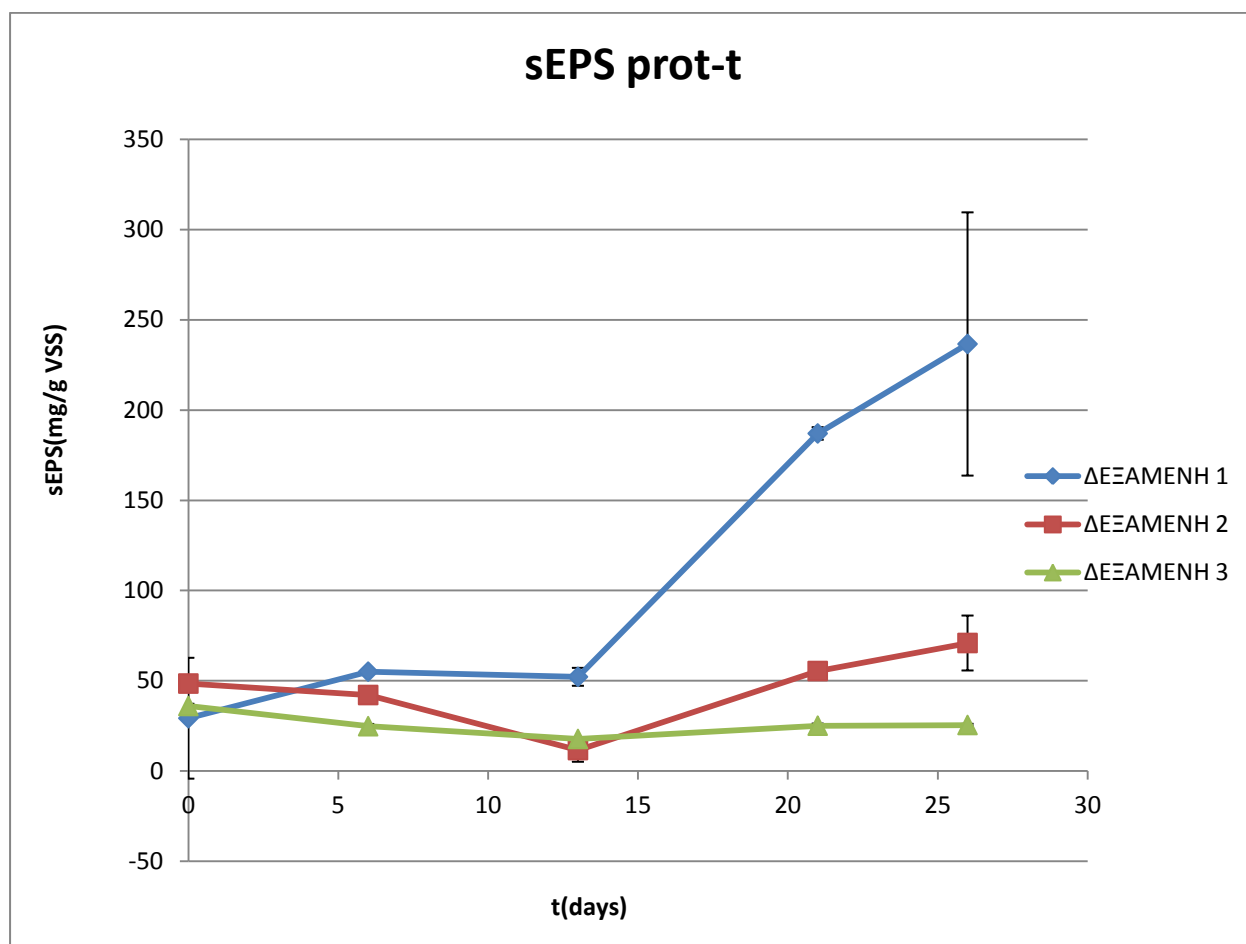
4.3 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΚΚΥΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

4.3.1 Μελέτη επίδρασης προεπεξεργασίας με οζόν και προεπεξεργασίας με όζον και μετέπειτα προσθήκης υπεροξειδίου του υδρογόνου σε σχέση με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου

4.3.1.1 Μελέτη συγκέντρωσης πρωτεϊνών

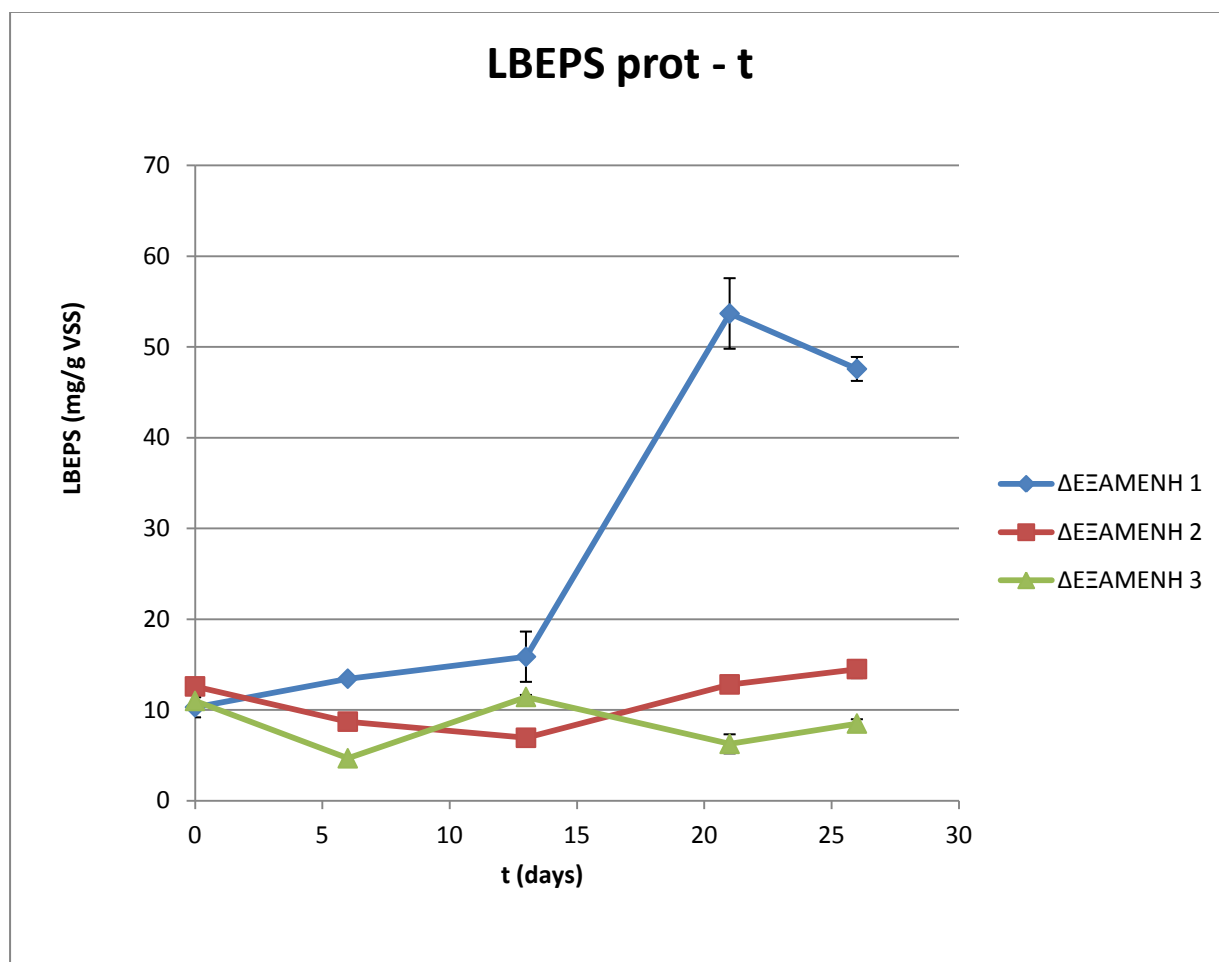
Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 6) αναπαρίσταται η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στα SEPS σε σχέση με το χρόνο. Κατά την βιολογική επεξεργασία, η υψηλότερη τιμή που εμφανίζεται είναι στις 26 ημέρες (236,60mg/g VSS) και κάτι αντίστοιχο συμβαίνει και για τις άλλες δυο δεξαμενές (ΔΕΞ2:SEPS=70,88 mg/g Vss και ΔΕΞ3:SEPS=25,45 mg/g Vss) . Η δεξαμενή που παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές συγκέντρωσης είναι εκείνη στην οποία έχει γίνει η προεπεξεργασία με όζον και

εν συνεχεία προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου (δεξαμενή 3). Έτσι, αυτή αποδεικνύεται αποδοτικότερη σε σχέση με τις άλλες δύο μιας και έχουν διασπαστεί τα μεγαλομόρια σε μικρότερα καθιστώντας τα ευκολότερα βιοαποικοδομήσιμα, οπότε και οι συγκεντρώσεις των SEPS είναι μικρότερες.



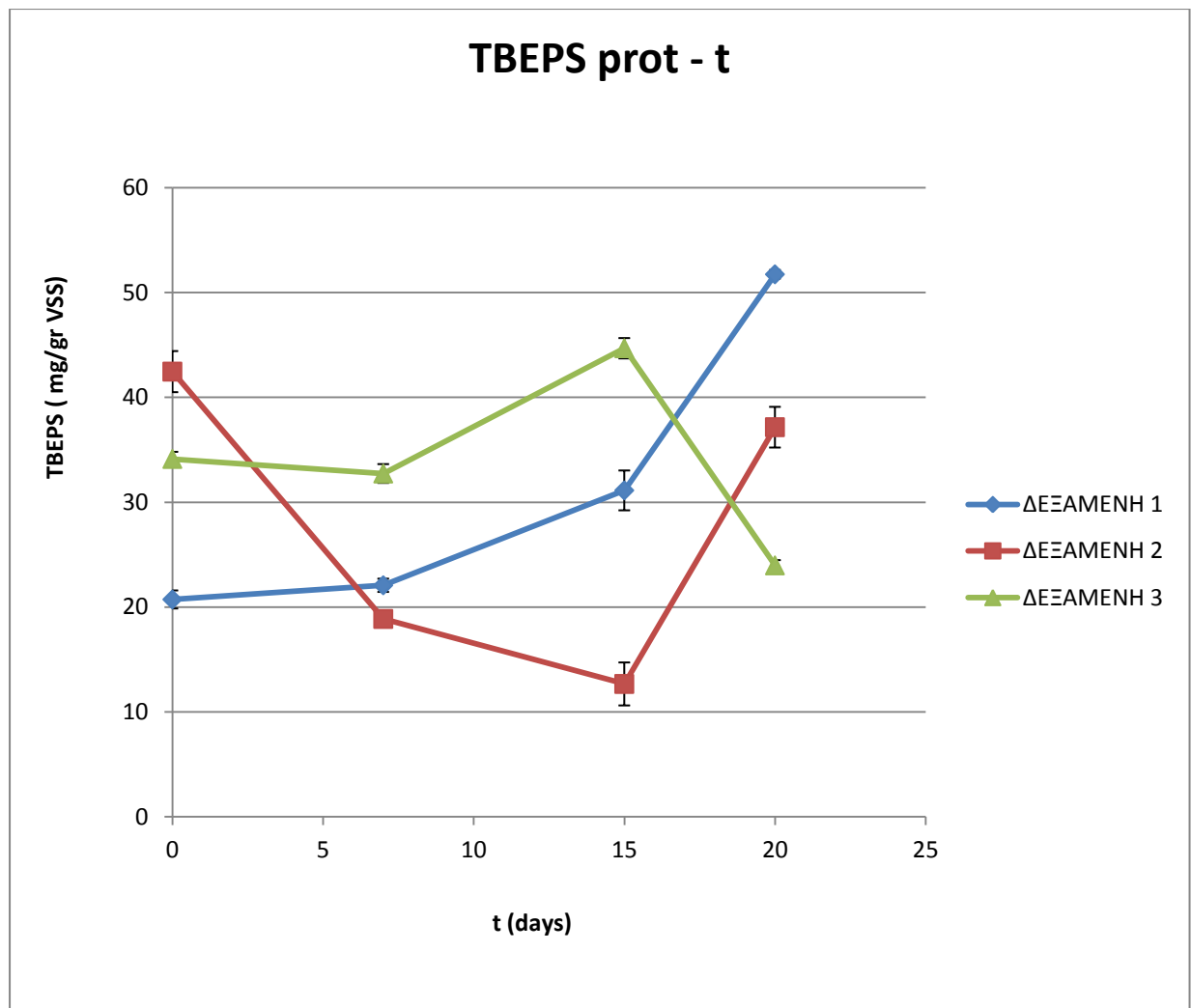
Σχήμα 6. Καμπύλες συγκεντρώσεων πρωτεϊνών στα SEPS των τριών δεξαμενών σε σχέση με το χρόνο

Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα απεικονίζεται η συμπεριφορά των LBEPS κατά την πάροδο του χρόνου στις τρεις δεξαμενές (Σχήμα 7). Παρατηρείται αυξητική τάση την 21 ημέρα στην δεξαμενή 1 με τιμή 53,69mg/g vss, ενώ από εκεί και έπειτα παρατηρείται μείωση φτάνοντας στις 26 ημέρες στα 47,58mg/g vss. Οσον αφορά τις δεξαμενές 2 και 3 σε γενικές γραμμές παρουσιάζουν παρόμοια τάση, προκύπτοντας έτσι το συμπέρασμα ότι τόσο η οζόνωση όσο και η προεπεξεργασία με όζον και με μετέπειτα προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου, δρουν θετικά μειώνοντας την παραγωγή των LBEPS.



Σχήμα 7. Καμπύλες συγκεντρώσεων πρωτεϊνών στα LBEPS των τριών δεξαμενών σε σχέση με το χρόνο.

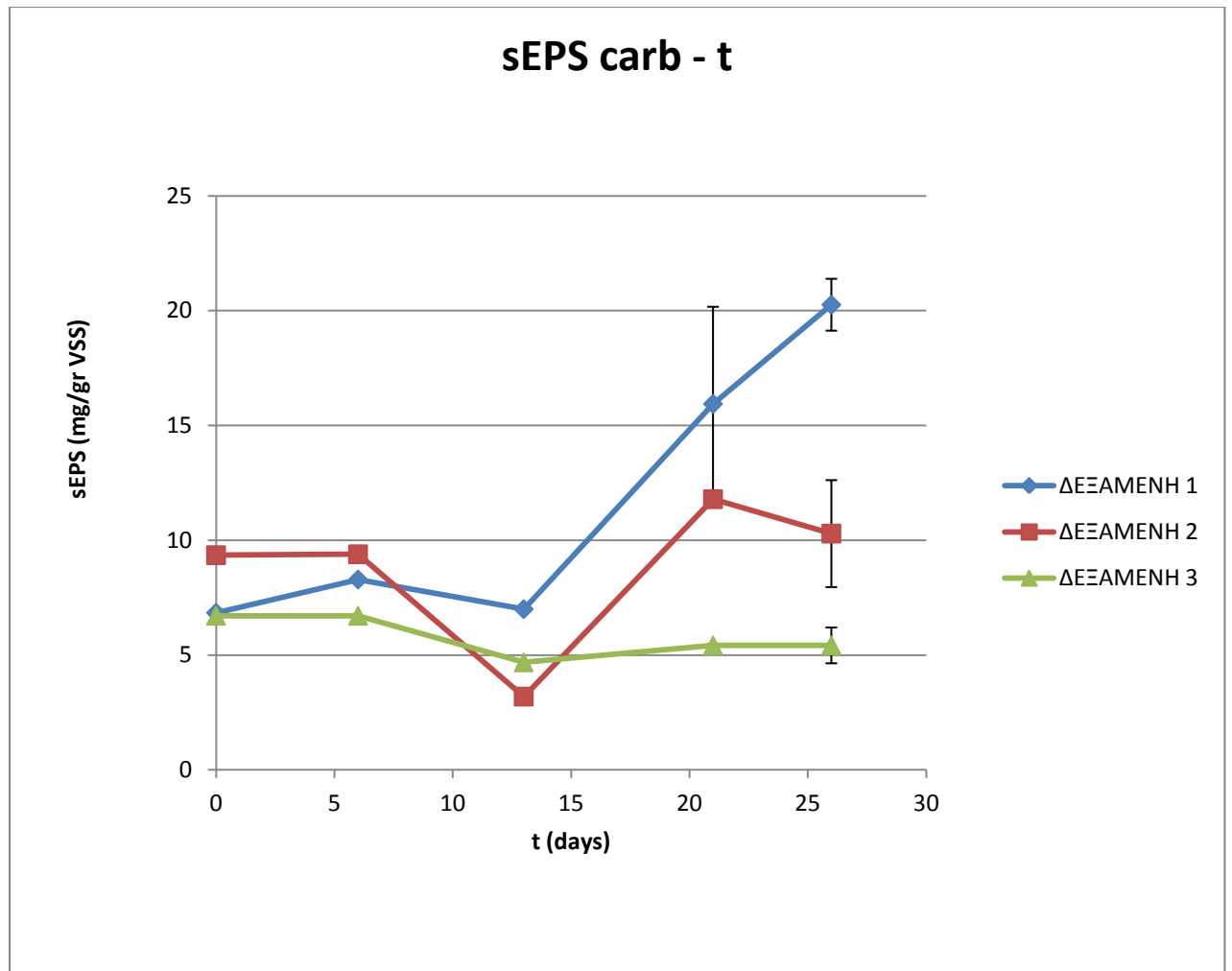
Τέλος, όσον αφορά τις πρωτεΐνες των TBEPS σε σχέση με το χρόνο (Σχήμα 8) παρατηρούνται παρόμοιες γραμμικές τάσεις, κάτι το οποίο καταδεικνύει ότι σε γενικές γραμμές η σύσταση τους είναι παραπλήσια ασχέτως συνθηκών. Με υψηλότερες τιμές για τις δεξαμενές 1 και 2 την 20 ημέρα με 51,74 mg/g VSS και 37,16 mg/g VSS και την δεξαμενή 3 στις 15 ημέρες με 44,69mg/g VSS.



Σχήμα 8. Καμπύλες συγκεντρώσεων πρωτεϊνών σε TBEPS των τριών δεξαμενών σε σχέση με το χρόνο.

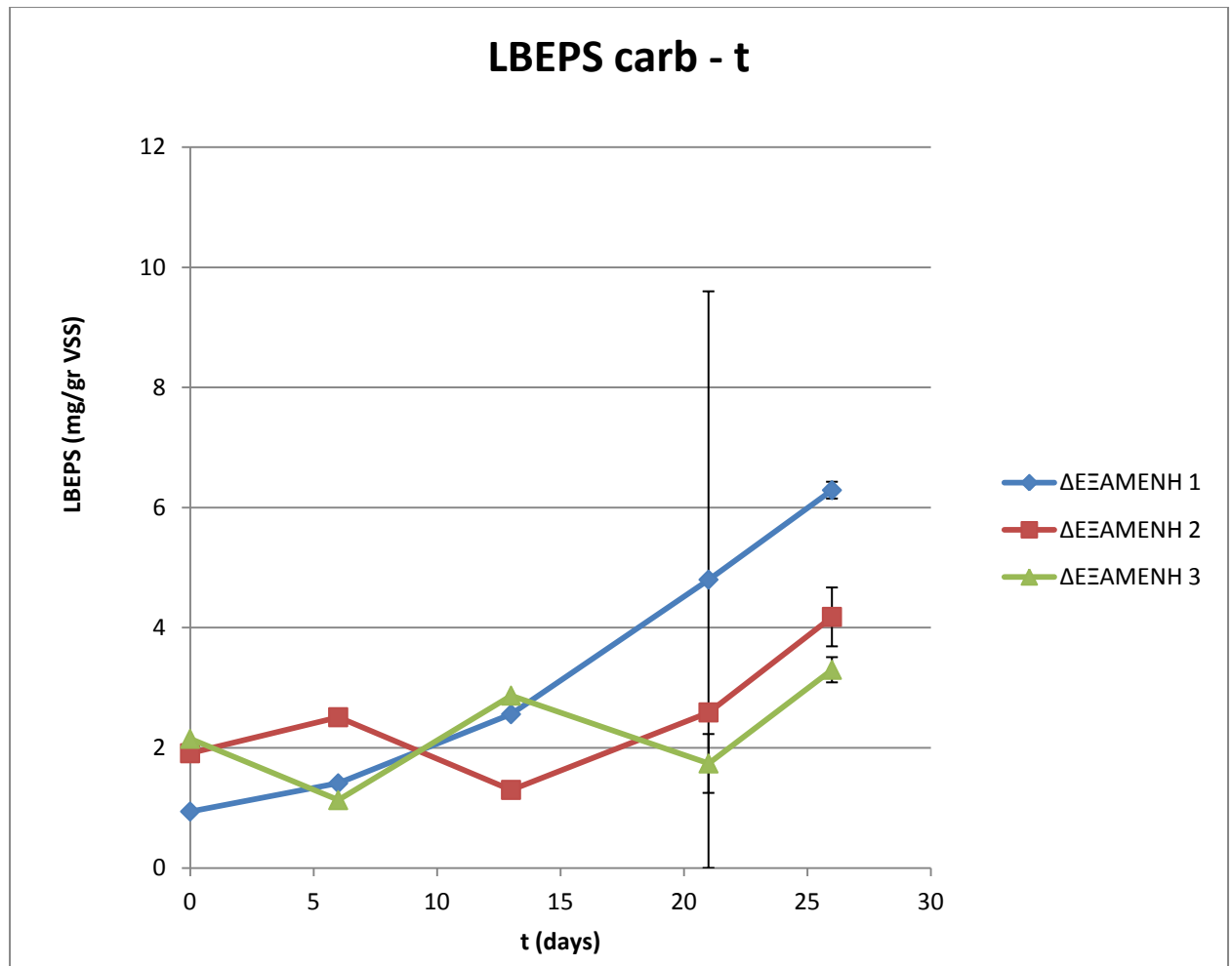
4.3.1.2 Μελέτη συγκέντρωσης υδατανθράκων

Με βάση το Σχήμα 9 εμφανίζονται υψηλότερες τιμές συγκεντρώσεων SEPS πολυσακχαριτών στην δεξαμενή 1 από ότι στις άλλες δυο. Αυτό το αποτέλεσμα έγγυται στην οξειδωτική δραστηριότητα που έχουν τόσο το όζον όσο και το υπεροξείδιο, οπότε και εμφανίζονται χαμηλότερες τιμές στις δεξαμενές 2 και 3.



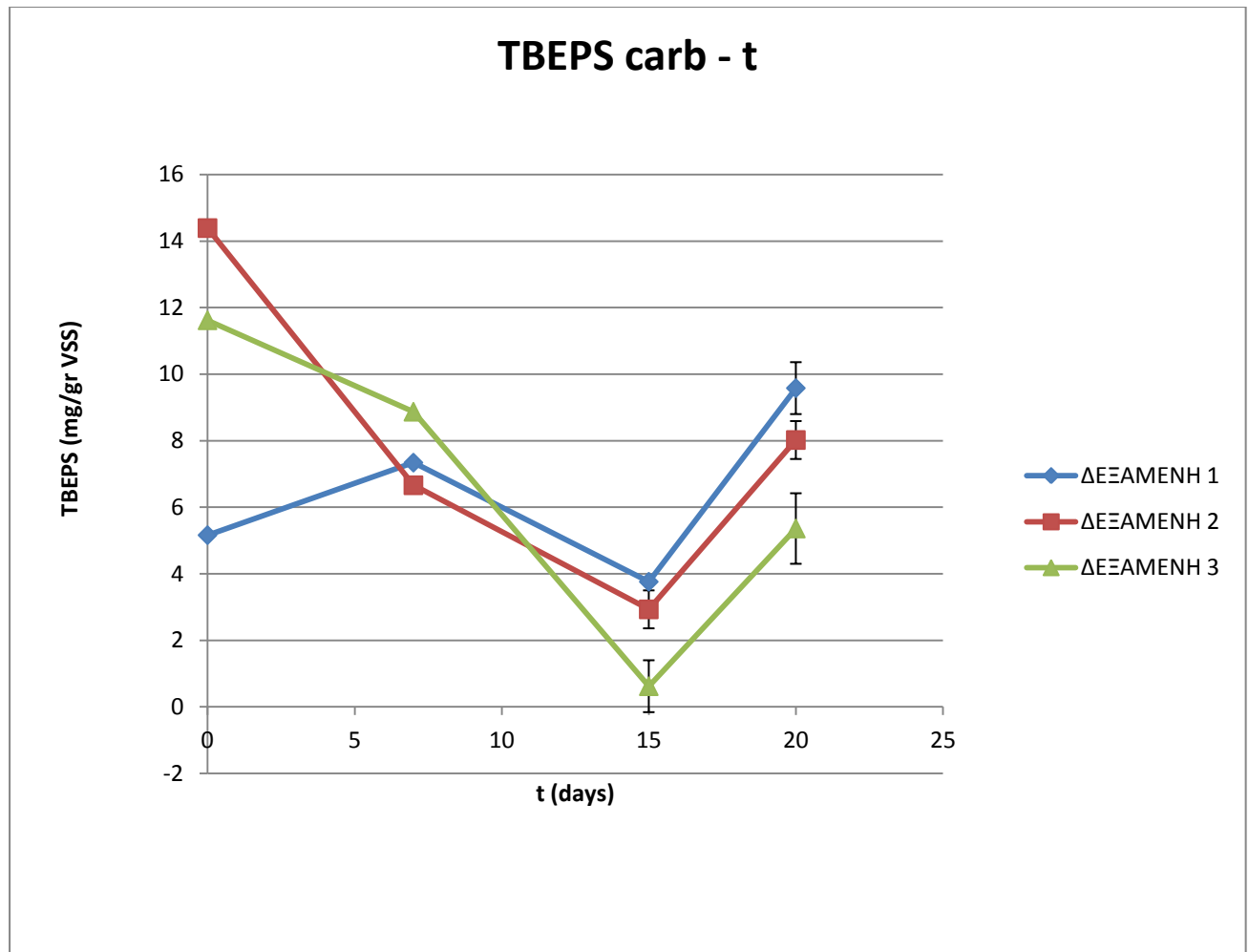
Σχήμα 9. Καμπύλες συγκεντρώσεων σε SEPS υδατανθράκων των 3 δεξαμενών σε σχέση με τον χρόνο.

Στο Σχήμα 10 παρατηρείται και για τις τρεις δεξαμενές ότι ακολουθείτε ένας παρόμοιος κύκλος μεταβολών όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των LBEPS. Σε όλες τις δεξαμενές η υψηλότερη τιμή συγκέντρωσης των πολυσακχαριτών, εμφανίζεται την 26 ημέρα. Στην τελευταία δεξαμενή και πάλι παρατηρούνται οι μικρότερες συγκεντρώσεις λόγω της οξονωσης και της προσθήκης H_2O_2 που οδηγούν στη διάσπαση των δεσμών των εξωκυτταρικών πολυμερών.



Σχήμα 10. Καμπύλες συγκεντρώσεων υδατανθράκων σε LBEPS των 3 δεξαμενών σε σχέση με τον χρόνο.

Το Σχήμα 11 αναπαριστά την συμπεριφορά των TBEPS των τριών δεξαμενών σε σχέση με το χρόνο. Κατά γενική ομολογία η συγκέντρωση τους και στις τρεις δεξαμενές δεν παρουσιάζει μεγάλες αποκλίσεις με το περας των ημερών. Υπάρχει μείωση στις δύο τελευταίες δεξαμενές Δ2:2,93 mg/g Vss και Δ3:0,62mg/g Vss συγκριτικά με την πρώτη Δ1:3,79mg/g Vss λόγω της οζόνωσης και του υπεροξειδίου.



Σχήμα 11. Καμπύλες συγκέντρωσεων υδατανθράκων σε TBEPS των τριών δεξαμενών σε σχέση με τον χρόνο.

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό και μπορεί να οξειδώσει ένα ευρύ φάσμα οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Σύμφωνα με τους Ting Liu et al. (2011), οι οποίοι συνέκριναν 2 συστήματα από τα οποία το ένα είχε υποστεί ένα στάδιο προεπεξεργασίας με όζον και το άλλο όχι, απέδειξαν ότι στο πρώτο σύστημα τα φάσματα των EPS που πάρθηκαν ήταν μειωμένης έντασης λόγω της οξείδωσης (οζόνωσης) που είχαν υποστεί. Αυτό το συμπέρασμα συμπίπτει και με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας.

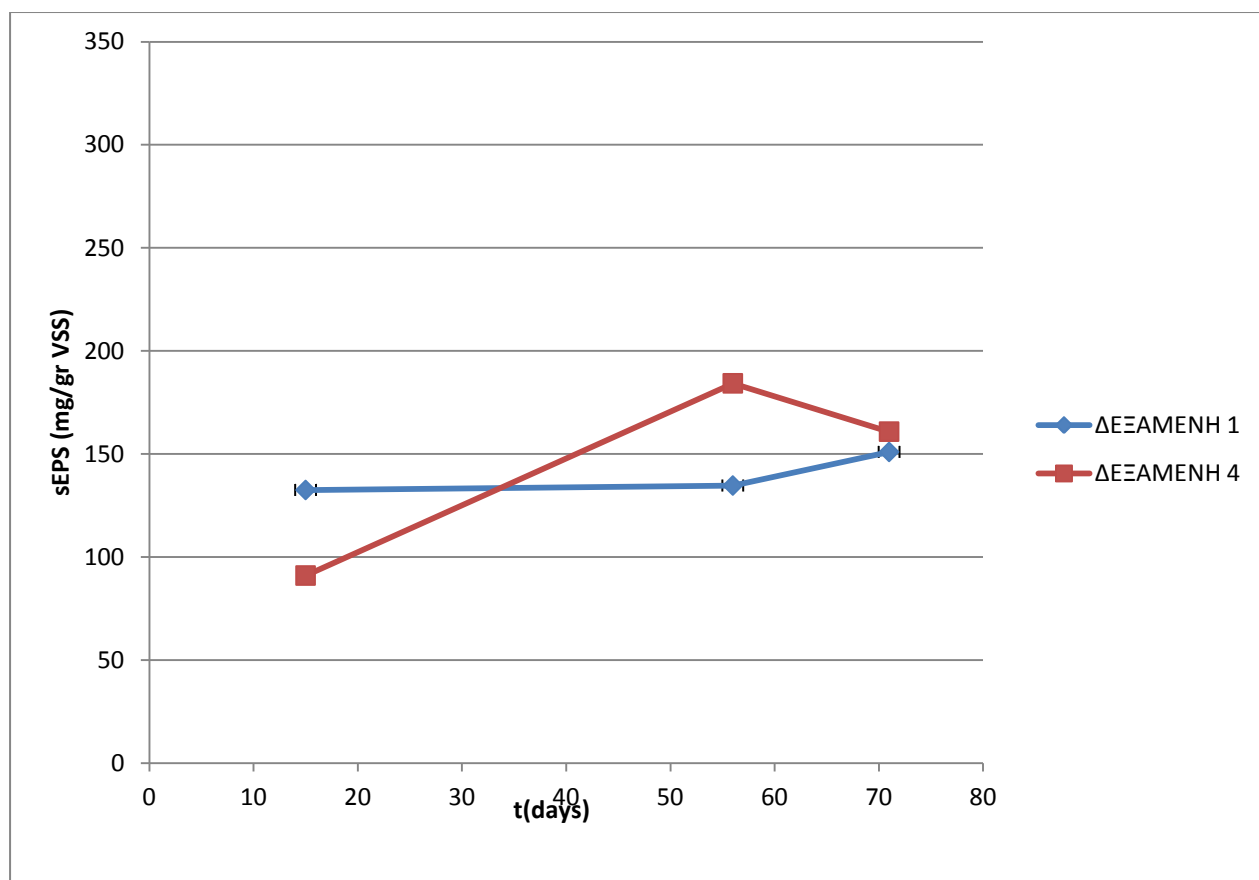
4.3.2 Μελέτη επίδρασης του ενεργού άνθρακα σε σχέση με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου

Οι J.S. Kim et al βρήκαν ότι η προσθήκη σκόνης ενεργού άνθρακα (PAC) οδηγεί σε μείωση της περιεκτικότητας των EPS των μικροβιακών κόκκων. Στη

συγκεκριμένη μελέτη, τα EPS αυξήθηκαν, όταν αυξήθηκε η δόση από 0,75 σε 1,5 g / L. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ότι οι μηχανισμοί της προσρόφησης και της βιοαποικοδόμησης πραγματοποιούνται ταυτόχρονα. Όταν η δόση του PAC φτάνει σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση, η προσρόφηση γίνεται ταχύτερα από ό, τι η βιοαποικοδόμηση. (Zhao Ying et al. 2006)

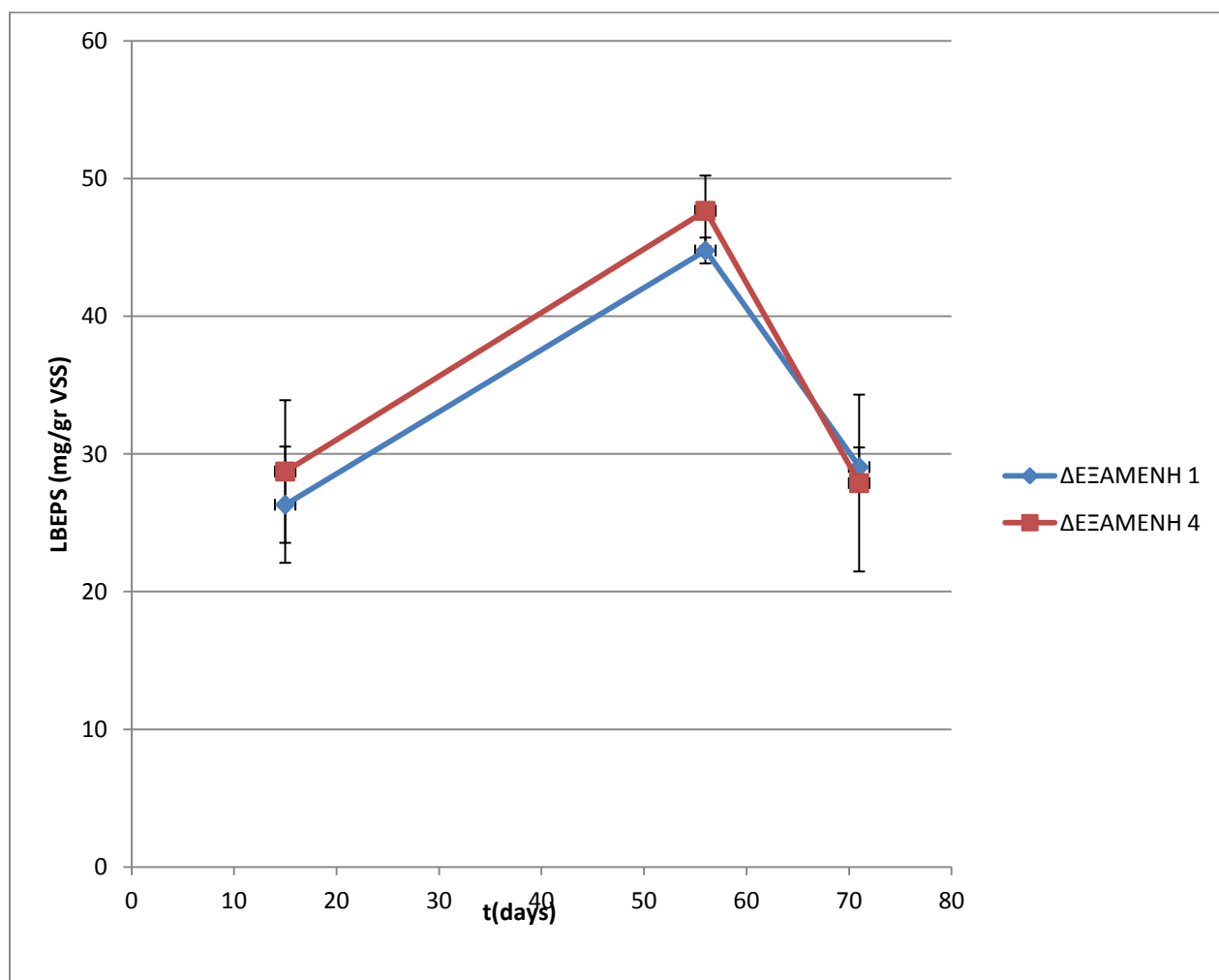
4.3.2.1 Μελέτη συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Στο σχήμα που ακολουθεί αναπαρίσταται η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στα SEPS σε σχέση με το χρόνο. Στην δεξαμενή 4 (Σχήμα 12) αρχικά παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές συγκέντρωσης (90,96 mg/gr VSS την 15^η ημέρα) σε σχέση με την δεξαμενή 1 (132,48 mg/gr VSS την 15^η ημέρα) και αυτό οφείλεται στην απορρόφηση των sEPS από την σκόνη ενεργού άνθρακα που προστέθηκε. Στις 56 ημέρες ο ενεργός άνθρακας έφτασε στο σημείο κορεσμού του οπότε από εκείνο το σημείο και έπειτα, παρατηρείται μείωση διότι το σύστημα προσπαθεί να ξαναφτάσει σε κατάσταση ισορροπίας.

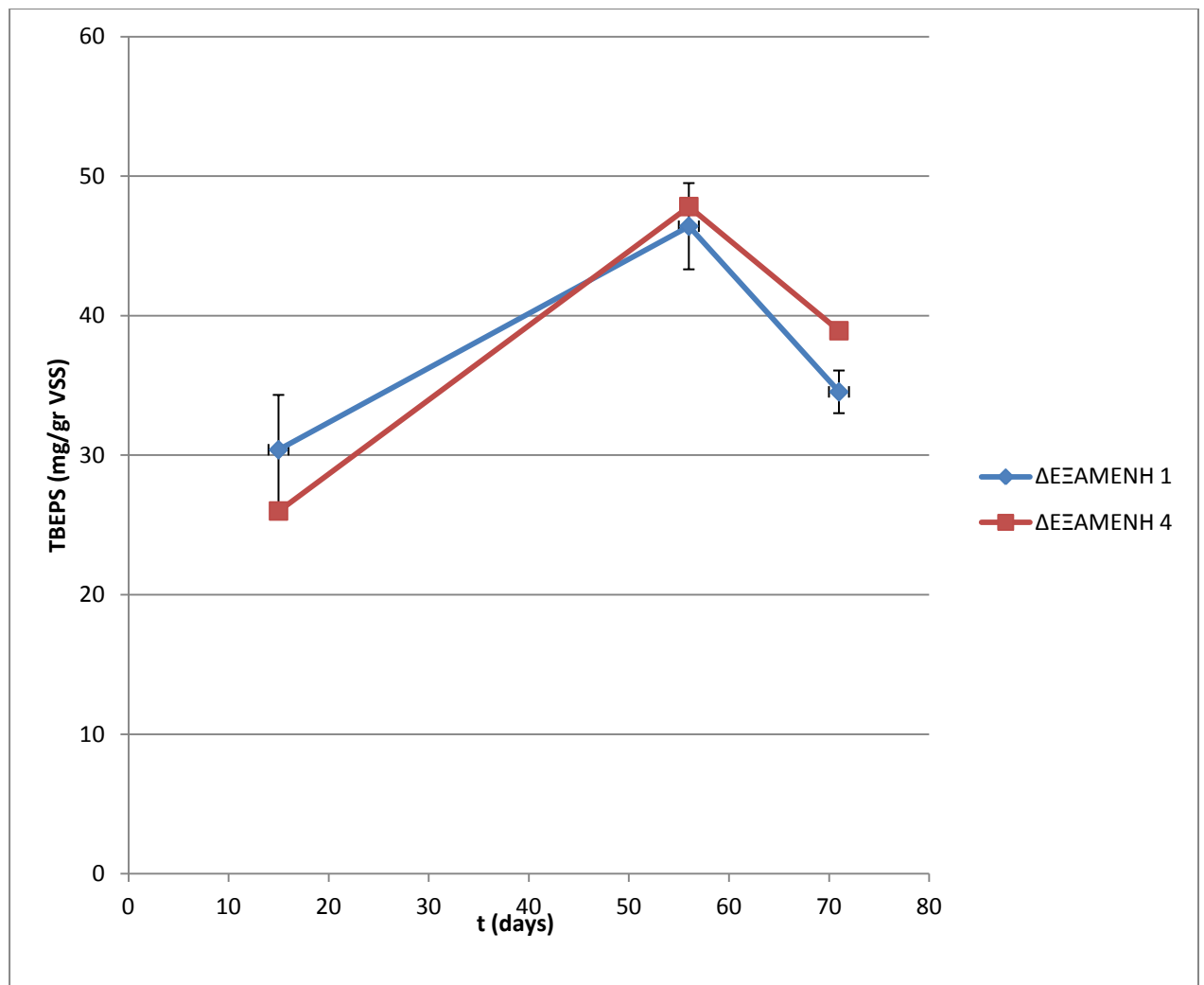


Σχήμα 12. Συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα SEPS των δεξαμενών 1 και 4 σε σχέση με το χρόνο.

Στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήματα 13 και 14) αναπαριστώνται οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα TB-EPS και LB-EPS σε σχέση με τον χρόνο. Οι διαφορές που εμφανίζονται είναι ελάχιστες και αν ληφθούν υπ όψιν και τα τυπικά σφάλματα , δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο σημαντικό συμπέρασμα.



Σχήμα 13. Συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα LBEPs των δεξαμενών 1 και 4 σε σχέση με το χρόνο.

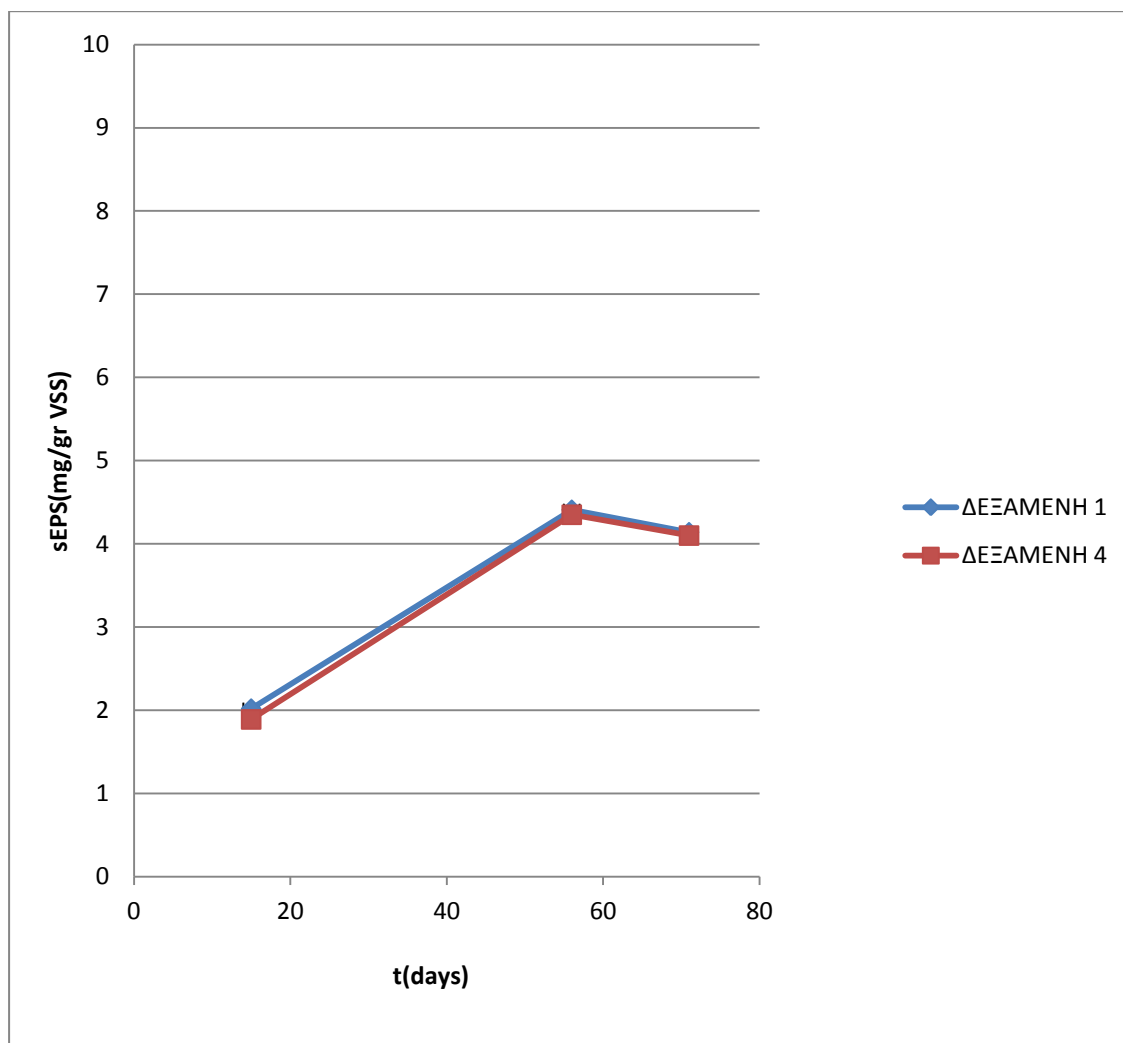


Σχήμα 14. Συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα TBEPS των δεξαμενών 1 και 4 σε σχέση με το χρόνο.

4.3.2.2 Μελέτη συγκέντρωσης υδατανθράκων

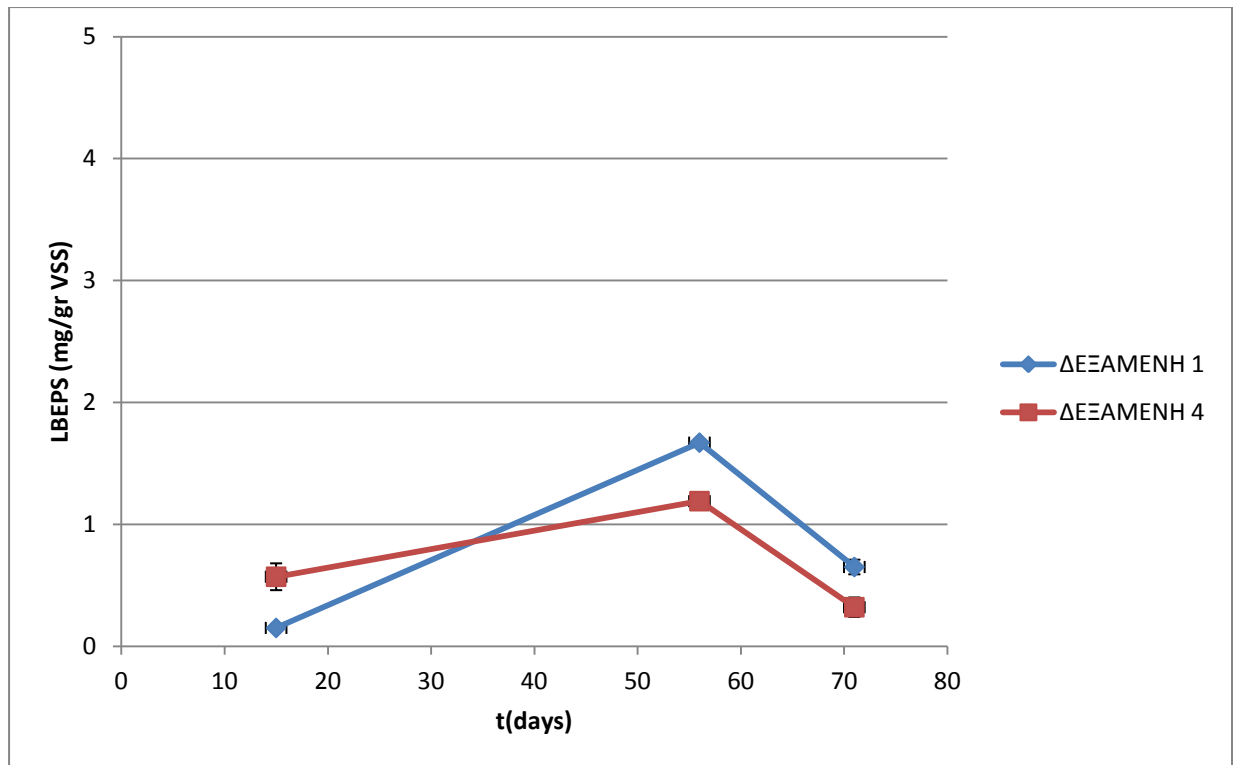
Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα (Σχήμα 15) απεικονίζεται η συγκέντρωση των υδατανθράκων στα SEPS στην δεξαμενή της βιολογικής επεξεργασίας και στην δεξαμενή οπού είχε προστεθεί σκόνη ενεργού άνθρακα (Δεξαμενή 4). Αυτό που παρατηρείται είναι ότι δεν παρουσιάζουν αυτές οι δυο δεξαμενές κάποια μεταβολή. Δηλαδή δεν επηρεάζει ο ενεργός άνθρακας τους υδατάνθρακες των διαλυτών EPS. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η ποσότητα του ενεργού άνθρακα που προστέθηκε να μην ήταν αρκετή ώστε να επηρεάσει την συγκέντρωση των υδατανθράκων. Ο κύριος λόγος για αυτό μπορεί να είναι ότι, στη ποσότητα που

χρησιμοποιήθηκε , οι μηχανισμοί της προσρόφησης και της βιοαποικοδόμησης πραγματοποιούνται ταυτόχρονα.

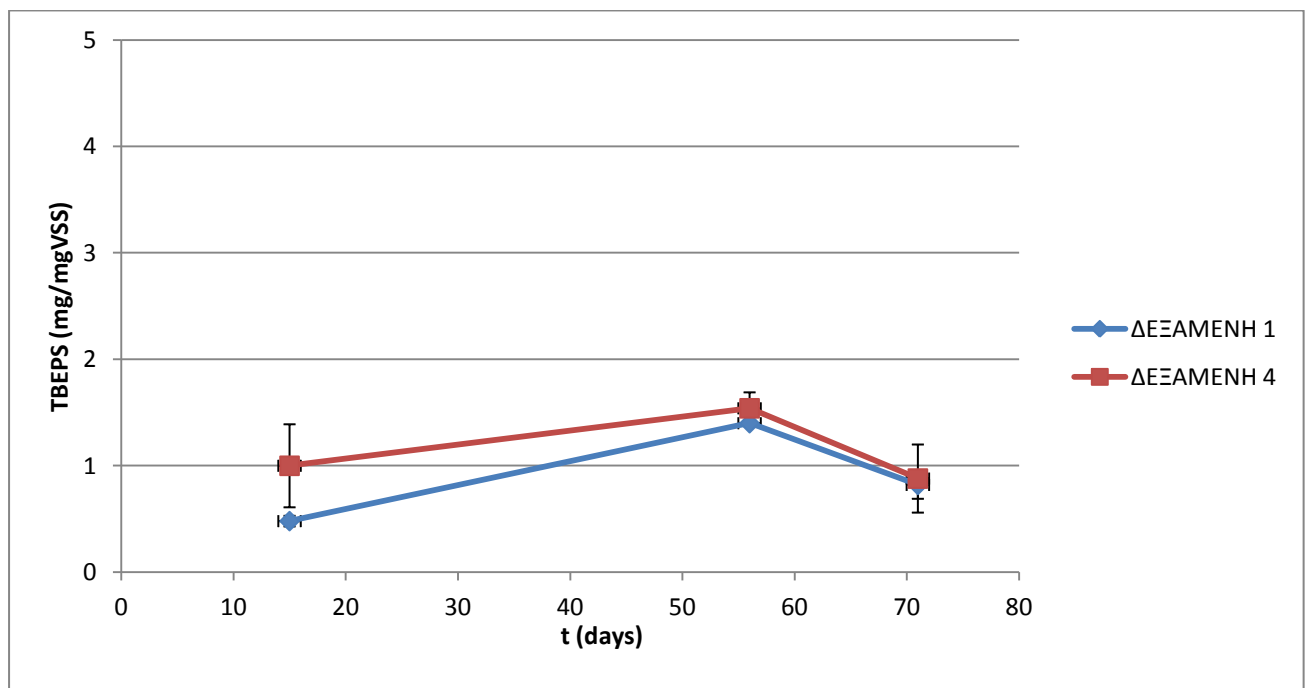


Σχήμα 15. Συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στα SEPS των δεξαμενών 1 και 4 σε σχέση με τον χρόνο.

Στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήματα 16 και 17) αναπαριστώνται οι συγκεντρώσεις των υδατανθράκων των TB-EPS και LB-EPS σε σχέση με τον χρόνο στις δεξαμενές 1 και 4. Οι μετρήσεις κυμαίνονται από 0 έως 1, 5 mg/gVSS, δηλαδή σε πολύ μικρό εύρος για να είναι συγκρίσιμες οι διαφορές τους. Μια πιθανή εξήγηση και εδώ για το γεγονός ότι δεν υπάρχουν εμφανείς μεταβολές μπορεί να είναι ότι η ποσότητα του ενεργού άνθρακα που προστέθηκε να μην ήταν αρκετή ώστε να επηρεάσει την συγκέντρωση των υδατανθράκων των LBEPS και των TBEPS.



Σχήμα 16. Συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στα LBEPS των δεξαμενών 1 και 4 σε σχέση με τον χρόνο.

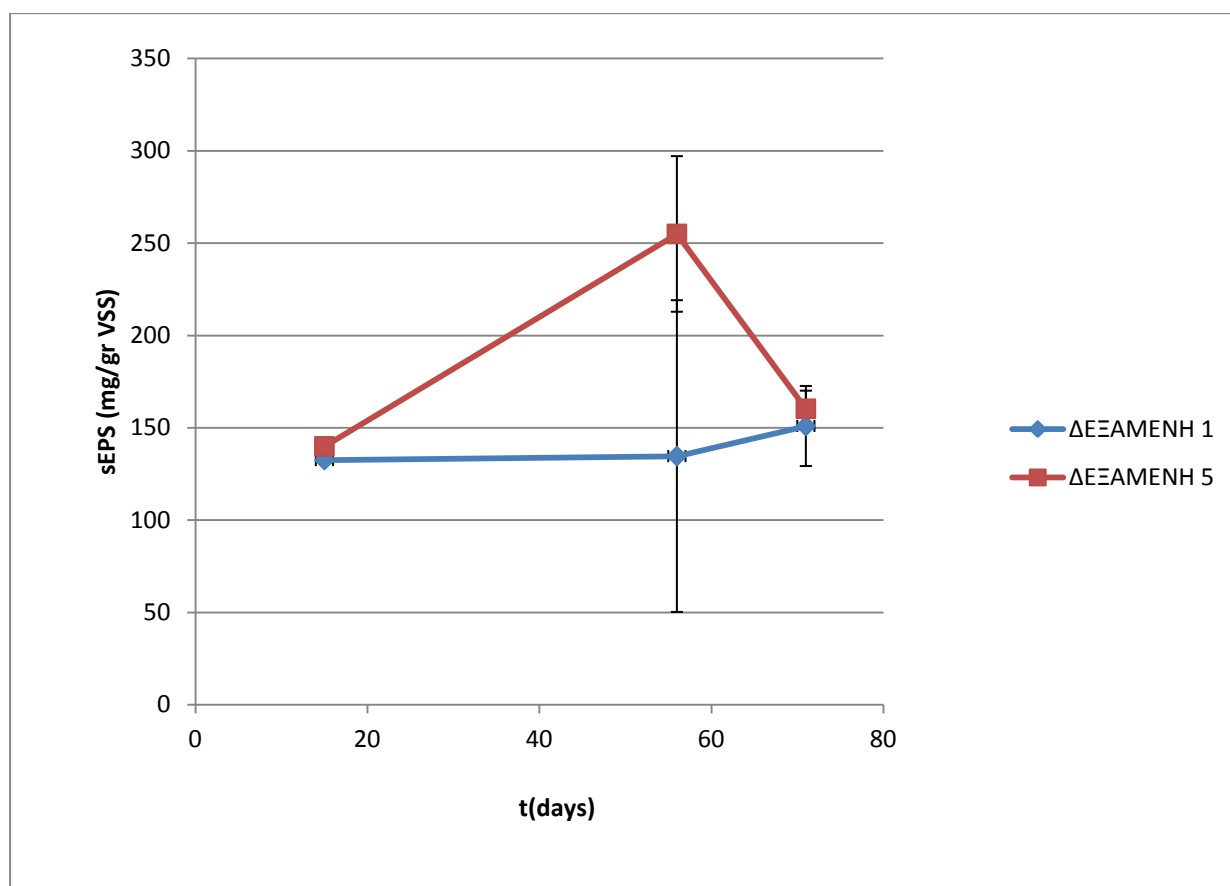


Σχήμα 17. Συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στα TBEPs των δεξαμενών 1 και 4 σε σχέση με τον χρόνο.

4.3.3 Μελέτη επίδρασης του φωτεινής ακτινοβολίας σε σχέση με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου

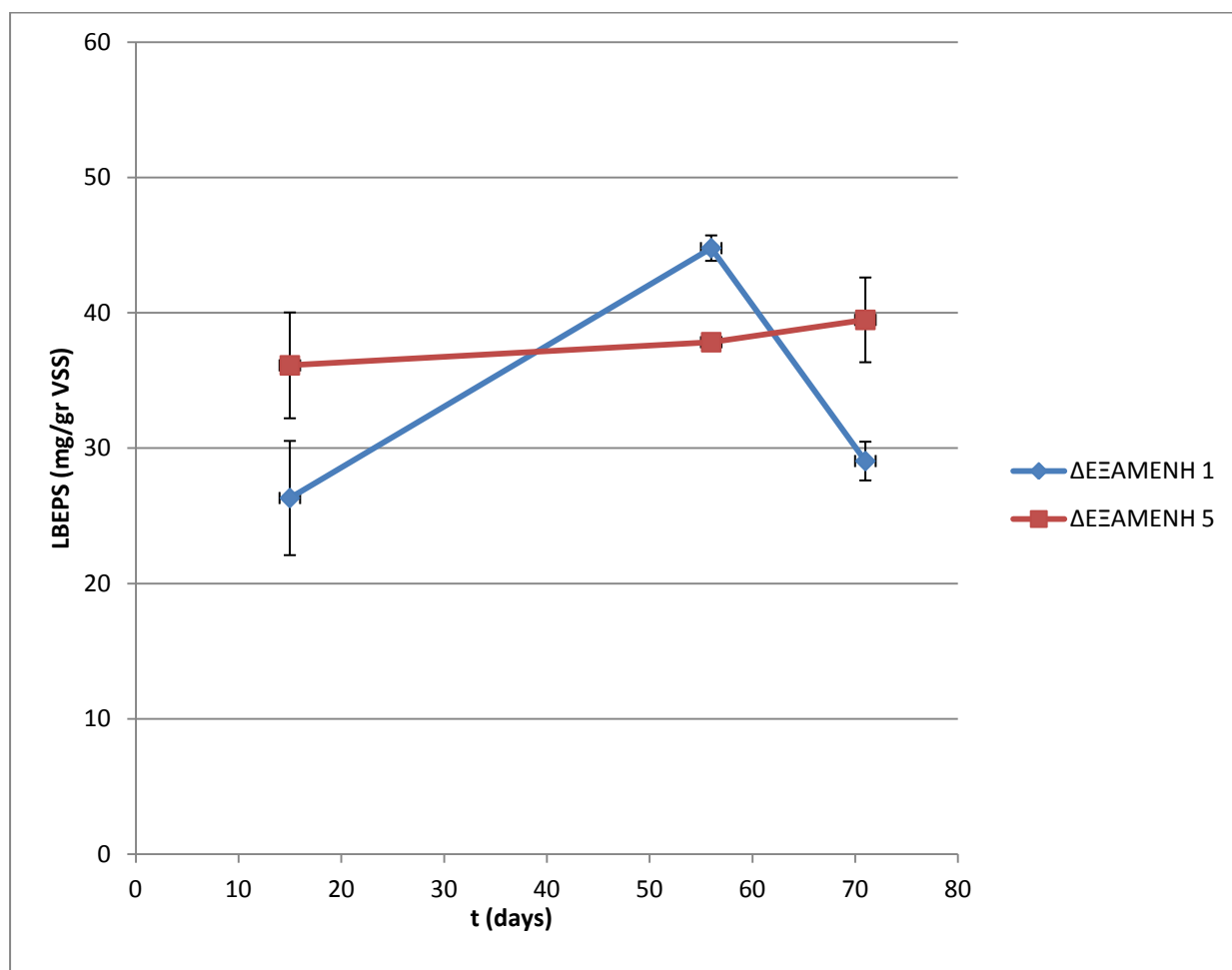
4.3.3.1 Μελέτη συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στα SEPS στις δεξαμενές 1 και 5. Στην δεξαμενή 5, εμφανίζονται αυξημένες τιμές συγκεντρώσεων σε σχέση με την δεξαμενή 1, διότι οι λαμπτήρες led συνέβαλαν στην ανάπτυξη μικροαλγών, οπότε και σε αύξηση των sEPS που εκκρίνονται. Από τις 57 ημέρες και έπειτα παρατηρείται μείωση και αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι τα μικροάλγη παύουν να υπάρχουν στο σύστημα μιας και ακολουθούν ένα συγκεκριμένο κύκλο ζωής.

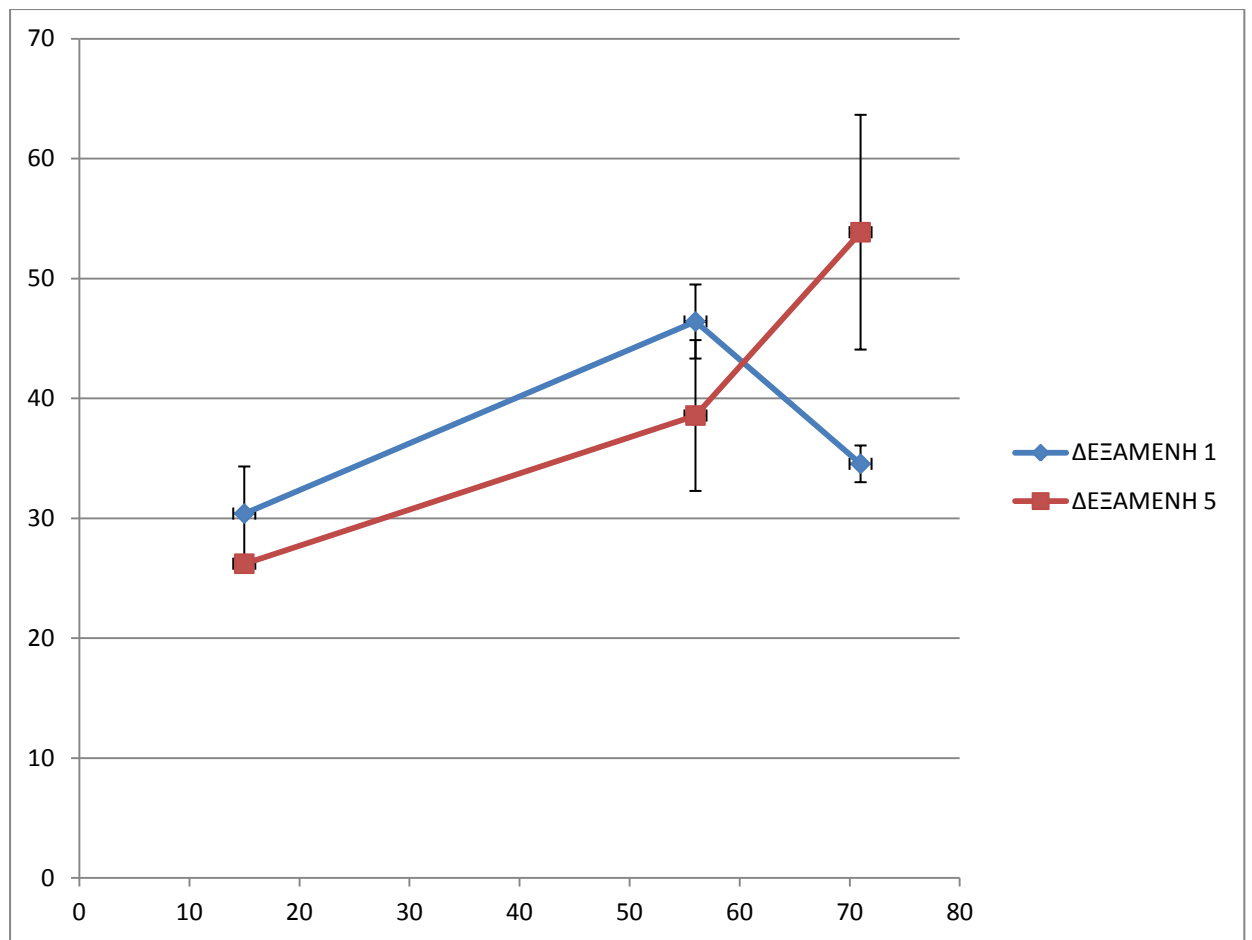


Σχήμα 18. Συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα SEPS των δεξαμενών 1 και 5 σε σχέση με το χρόνο.

Στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήματα 19 και 20) αναπαριστώνται οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα TB-EPS και LB-EPS σε σχέση με τον χρόνο. Οι διαφορές που εμφανίζονται είναι έλαχιστες και αν ληφθούν υπ όψιν και τα τυπικά σφάλματα , δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο σημαντικό συμπέρασμα.



Σχήμα 19. Συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα LBEPS των δεξαμενών 1 και 5 σε σχέση με το χρόνο.

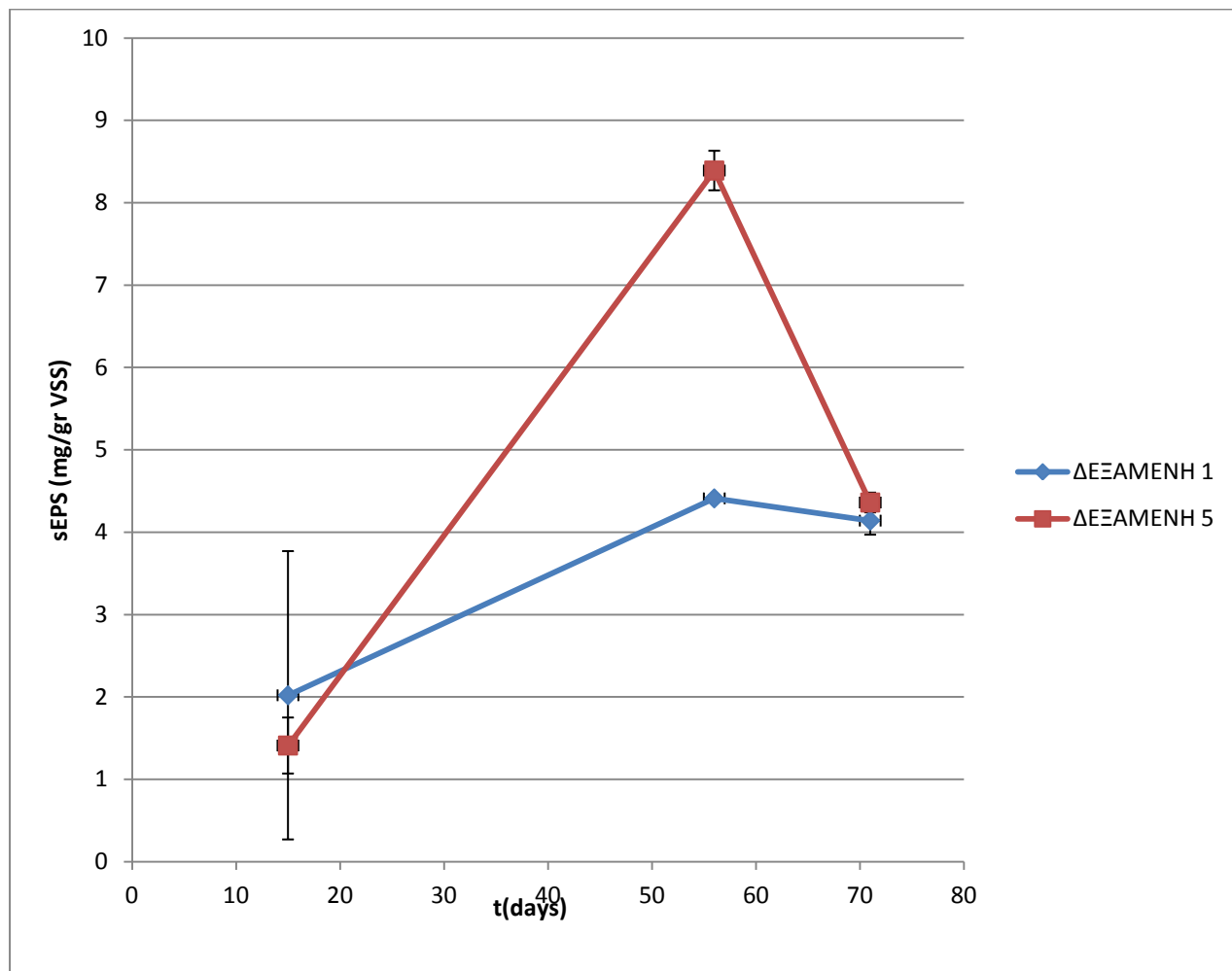


Σχήμα 20. Συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στα TBEPS των δεξαμενών 1 και 5 σε σχέση με το χρόνο

4.3.3.2 Μελέτη συγκέντρωσης υδατανθράκων

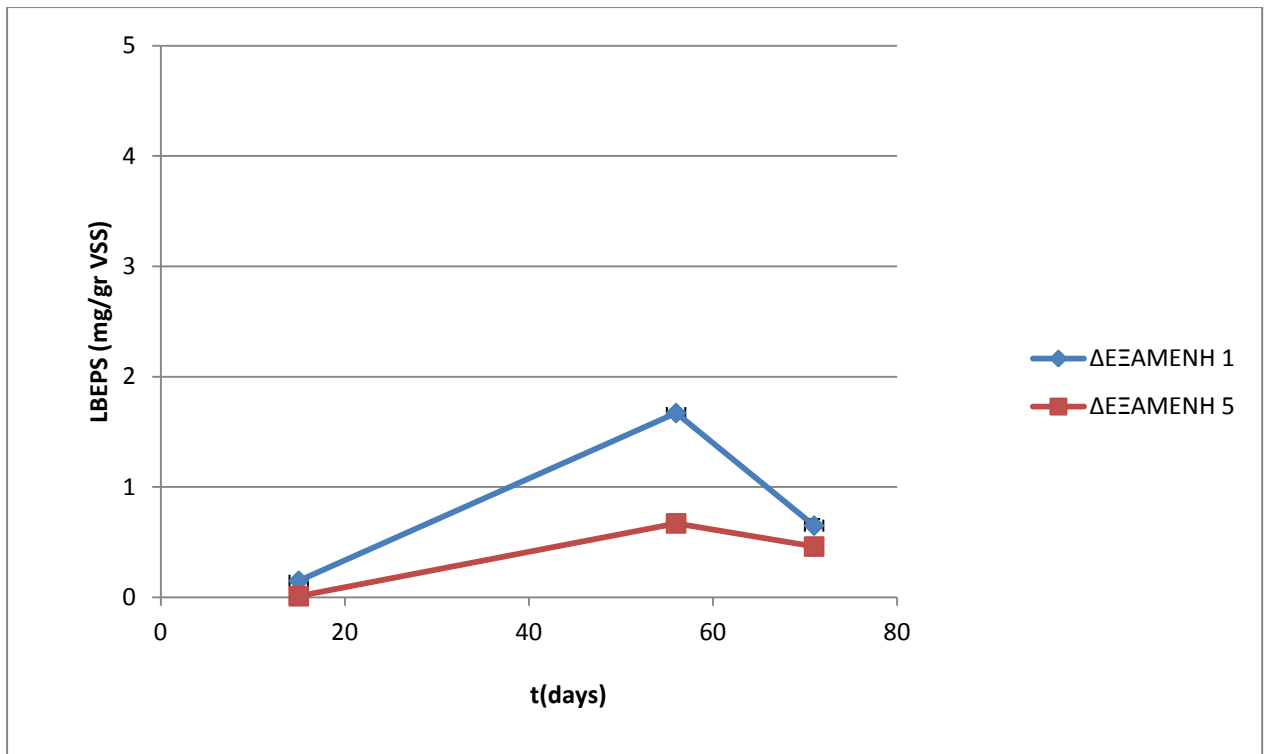
Στο σχεδιάγραμμα (Σχήμα 21) που ακολουθεί αναπαρίσταται η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες των SEPS σε σχέση με το χρόνο. Στη δεξαμενή 5 παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση των sEPS με υψηλότερη τιμή τα 8,39 mg/gr VSS στις 56 ημέρες σε σχέση με τη βιολογική επεξεργασία και αυτό οφείλεται στην αύξηση των μικροαλγών. Αυτά αυξήθηκαν λόγω της ακτινοβολίας LED που εξέπεμπε στο εσωτερικό της δεξαμενής. Τα μικροάλλα είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί οι οποίοι έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν θρεπτικά συστατικά όπως το άζωτο και ο φώσφορος καθώς επίσης και να εκκρίνουν EPS. Μεταξύ των παραγόντων που επιδρούν στην ανάπτυξη των μικροαλγών, το φως που επηρεάζει άμεσα τους μηχανισμούς φωτοσύνθεσης και αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές παραμέτρους. (Basil George et al ,2014).

Οι οργανισμοί αυτοί ακολουθούν έναν κύκλο ζωής και όταν παύουν να υπάρχουν στο σύστημα, παρατηρείται μείωση των sEPS, όπως αυτή που παρατηρείται στις 71 ημέρες.

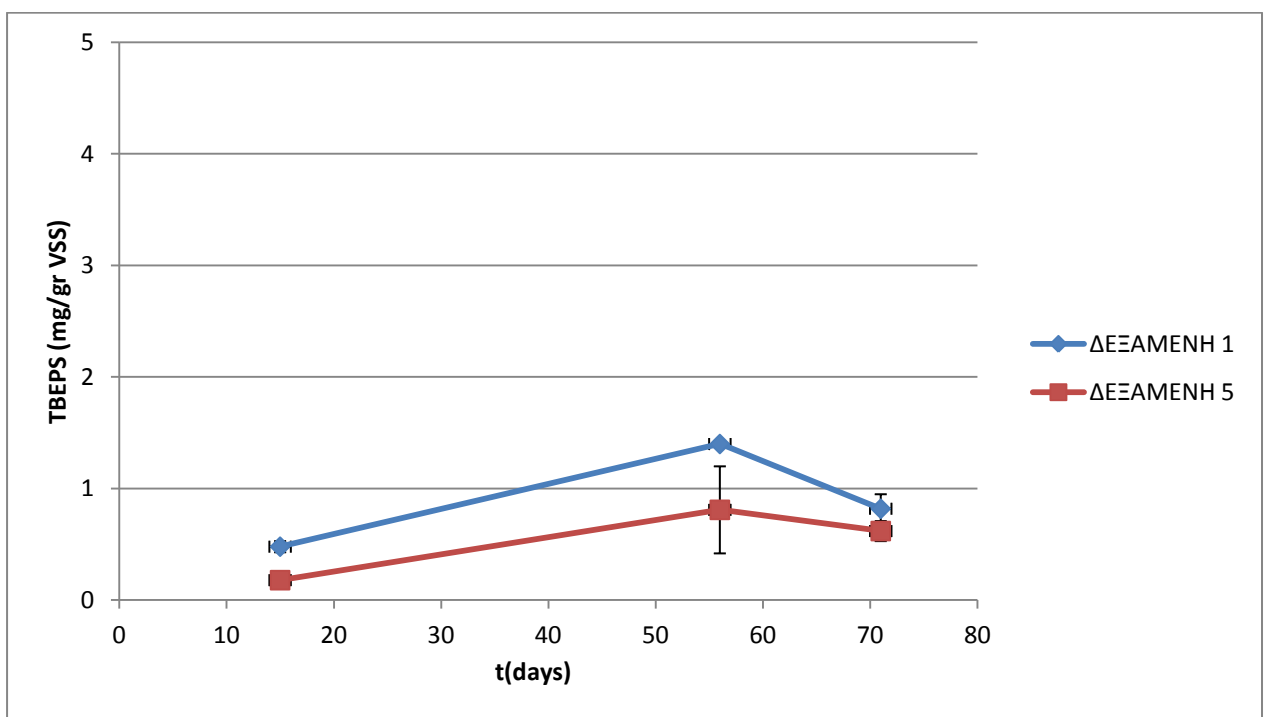


Σχήμα 21. Συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στα SEPS των δεξαμενών 1 και 5 σε σχέση με τον χρόνο

Στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήματα 22 και 23) αναπαριστώνται οι συγκεντρώσεις των υδατανθράκων των TB-EPS και LB-EPS σε σχέση με τον χρόνο. Οι μετρήσεις κυμαίνονται από 0 έως 0,81 mg/gVSS, δηλαδή σε πολύ μικρό εύρος για να είναι συγκρίσιμες οι διαφορές τους.



Σχήμα 22. Συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στα LBEPS των δεξαμενών 1 και 5 σε σχέση με τον χρόνο

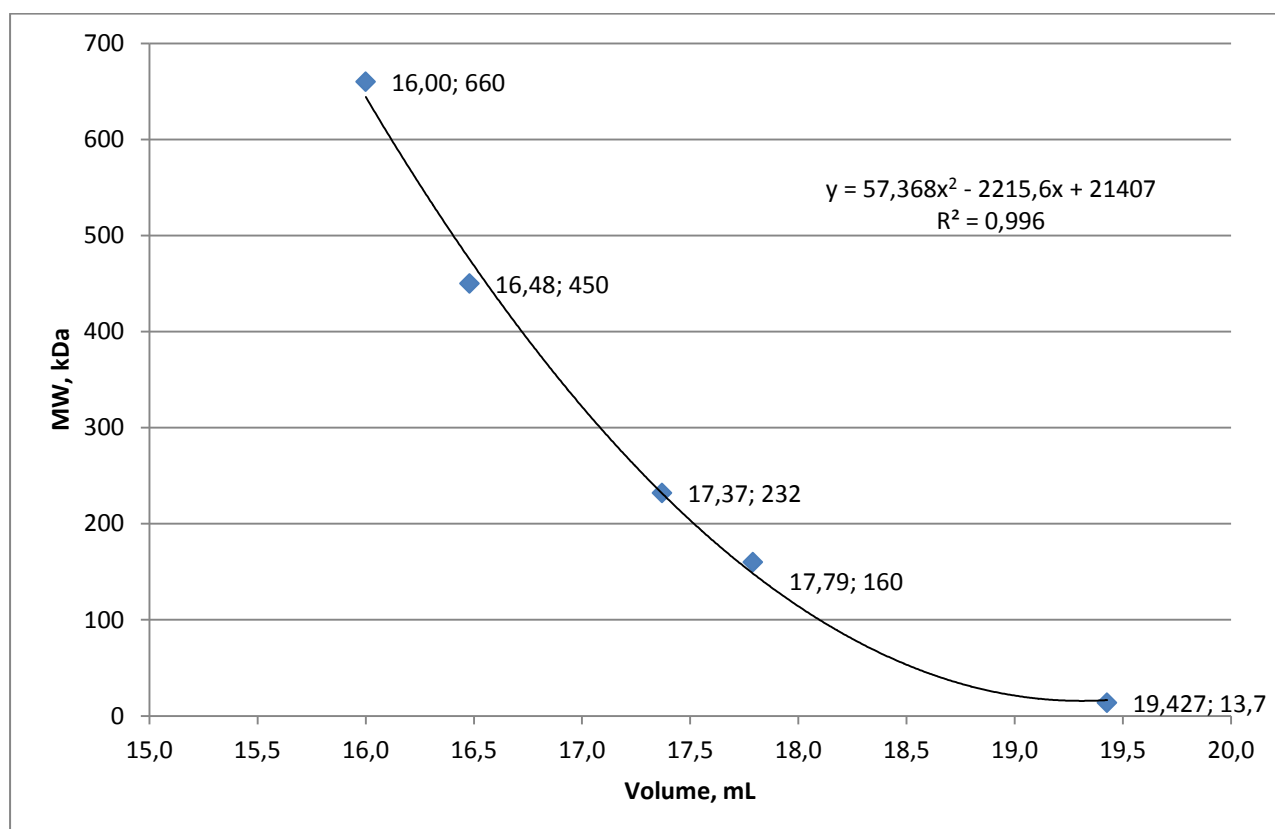


Σχήμα 23. Συγκεντρώσεις των υδατανθράκων στα TBEPS των δεξαμενών 1 και 5 σε σχέση με τον χρόνο.

4.4 Παρασκευή Πρότυπης Καμπύλης βαθμονόμησης του HPSEC

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των τριών κλασμάτων των EPS μέσω του προσδιορισμού της κατανομής μοριακών βαρών τους, πραγματοποιήθηκε η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού σε δείγματα που πάρθηκαν από τα προαναφερθέντα συστήματα.

Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν 5 πρότυπα πρωτεϊνών, το εύρος των οποίων κυμαίνεται από 660 kDa -14 kDa : θυρογλουβίνης (M.B. 660 kDa), φερριτίνης (M.B. 450 kDa), καταλάσης (M.B. 232 kDa), β-φωσφορυλάσης (M.B. 194 kDa) και της ιμογλουβίνης (M.B. 155 kDa). Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αυτά τα 5 πρότυπα πρωτεϊνών διότι βρέθηκε ότι παρουσιάζουν εγγύς ιδιότητες με κάποιες ενώσεις που υπάρχουν στα EPS. (Gorner et al., 2003; Garnier et al., 2006)



Σχήμα 24. Πρότυπη καμπύλη για τον κατά προσέγγιση προσδιορισμό του Μοριακού Βάρους με το HPSEC.

4.5 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΞΩΚΚΥΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΜΕ HPSEC

4.5.1 Μελέτη επίδρασης προεπεξεργασίας με οζόν και προεπεξεργασίας με όζον και μετέπειτα προσθήκης υπεροξειδίου του υδρογόνου σε σχέση με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου

Ανιχνευτής UV

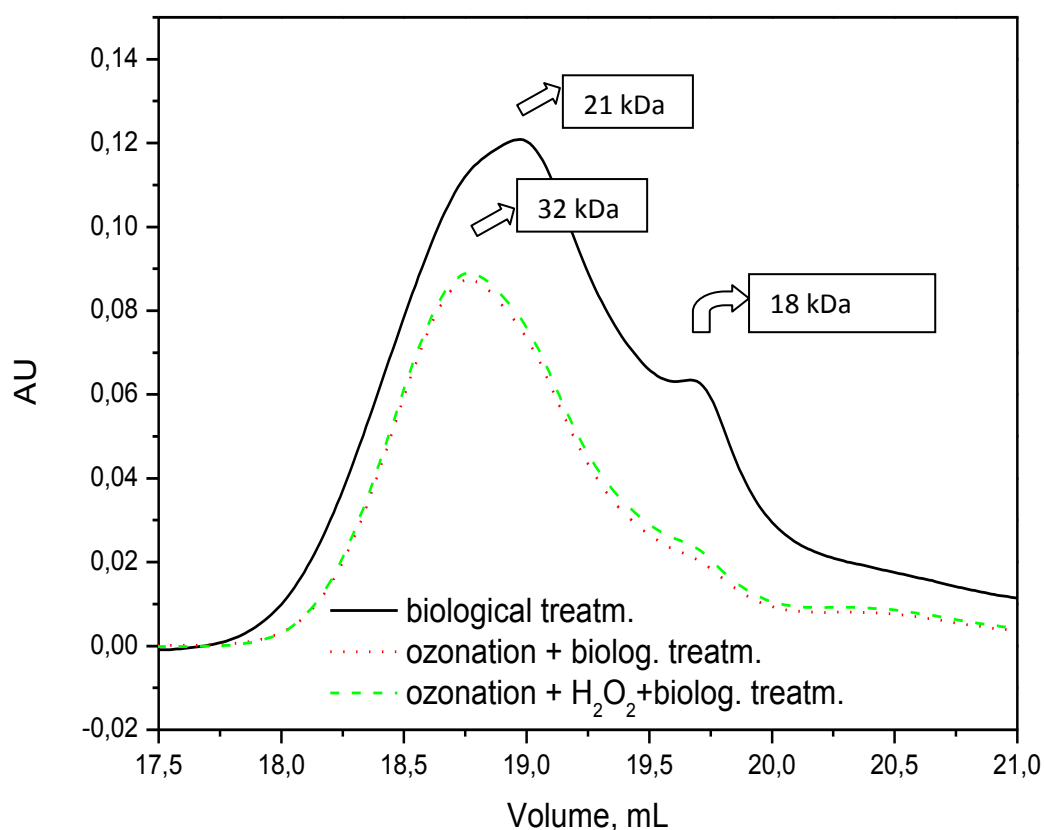
Τα παρακάτω σχήματα (Σχήματα 25 και 26) παρουσιάζουν τα χρωματογραφήματα των EPS που λαμβάνονται σε μήκος κύματος 280 nm και για τις 3 δεξαμενές, έτσι όπως πάρθηκαν από τον χρωματογράφο μοριακού αποκλεισμού (HPSEC). Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής ήταν ρυθμισμένος στα 280 nm. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Garnier et al. 2006, Simon et al. 2009, Bhatia et al., 2013) η ανίχνευση UV στα 280 nm είναι μια συνήθης μέθοδος για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών των EPS, μιας και έχουν την ικανότητα να απορροφούν σε αυτό το μήκος κύματος.

Τα SEPS (Σχήμα 25) παρατηρείται ότι αποτελούνται κυρίως από ουσίες μοριακού βάρους (21kDa) και σε μικρότερη συγκέντρωση από ουσίες μοριακού βάρους (18kDa) για την περίπτωση της απλής βιολογικής επεξεργασίας. Για την περίπτωση της επιπρόσθετης προεπεξεργασίας με οζόνωση (κόκκινη διακεκομμένη γραμμή) και με οζόνωση και H₂O₂ (πράσινη διακεκομμένη γραμμή), εντοπίζεται ότι τα SEPS αποτελούνται κυρίως από ουσίες με μοριακό βάρος 32kDa . Δηλαδή στην περίπτωση της οζόνωσης εντοπίζονται κυρίως ουσίες ελαφρώς μεγαλύτερου μοριακού βάρους σε σύγκριση με την απλή βιολογική επεξεργασία, ενώ αναμένονταν το αντίθετο αποτέλεσμα. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα στην ύπαρξη μορίων μη διαλυτής μορφής στο μικτό υγρό, οι οποίες μετατράπηκαν σε διαλυτή μορφή κατά την οζόνωση.

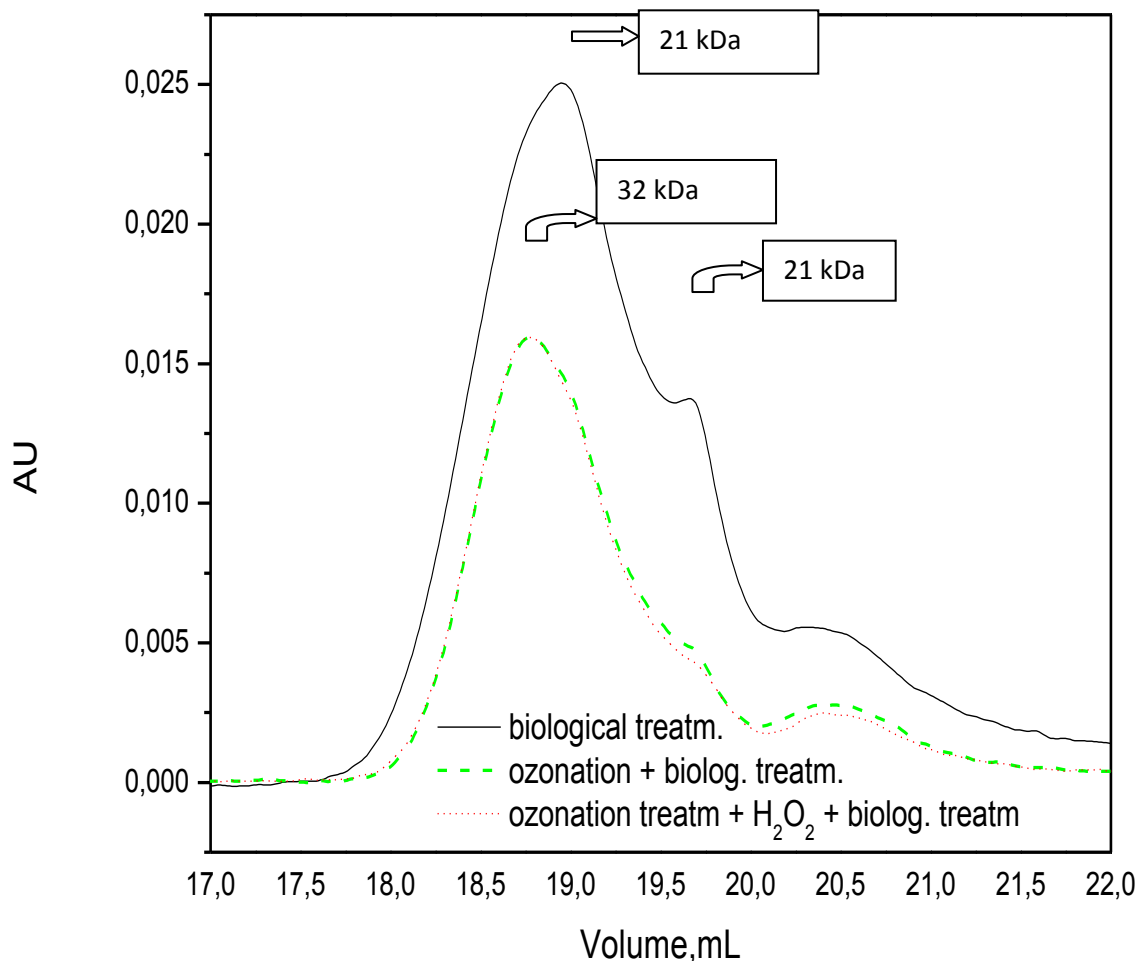
Επίσης, σε σύγκριση με τη βιολογική επεξεργασία, με την επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και με οζόνωση και H₂O₂, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών των μεγάλων μοριακών βαρών (21kDa) και εξαφάνιση των μικρότερων (18kDa). Η μείωση της συγκέντρωσης επαληθεύει τις ποσοτικές μετρήσεις πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών που προαναφέρθηκαν. Συνεπώς η οζόνωση έχει διασπάσει σχεδόν πλήρως τα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους

και έχει διασπάσει σε μεγάλο βαθμό τα συστατικά υψηλότερου μοριακού βάρους μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους.

Τα LBEPS (Σχήμα 26) έχουν την ίδια τάση με τα SEPS και συνεπώς προκύπτουν τα ίδια συμπεράσματα. Επιπλέον, για τα LBEPS παρατηρείται ότι κυμαίνονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα sEPS (Adsorbance Units=0-0,12 για τα SEPS και 0-0,025 για τα LBEPS).



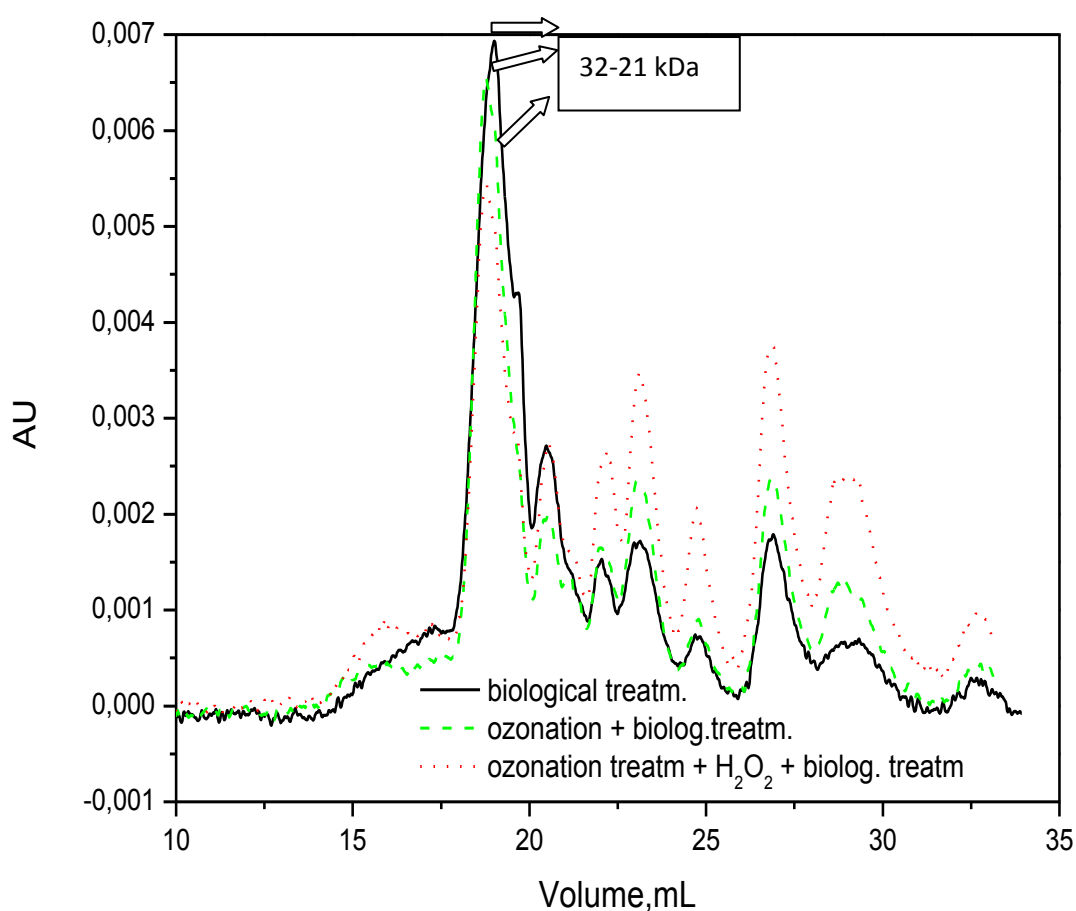
Σχήμα 25. Χρωματογράφηματα των sEPS για τα 3 συστήματα επεξεργασίας: βιολογική επεξεργασία, επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και H₂O₂.



Σχήμα 26. Χρωματογράφημα των LBEPS για τα 3 συστήματα επεξεργασίας: βιολογική επεξεργασία, επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και H₂O₂.

Τα TBEPS της βιολογικής επεξεργασίας παρατηρείται ότι αποτελούνται κυρίως από συστατικά μοριακού βάρους που κυμαίνονται στα 32-21kDa και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από μόρια μικρότερων μοριακών βαρών, που ξεπερνούν το όριο της διαχωριστικής ικανότητας των χρωματογραφικών στηλών του HPSEC. Από το σχήμα 27 εντοπίζεται ότι η συγκέντρωση των μεγάλων μορίων μειώνεται σε μικρό βαθμό με την οζόνωση και σε μεγαλύτερο με την προσθήκη H₂O₂. Αντίστοιχα αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των συστατικών μικρότερου μοριακού βάρους σε μικρό βαθμό με την

οζόνωση και σε μεγαλύτερο με την προσθήκη H_2O_2 σε σύγκριση με την απλή βιολογική επεξεργασία. Ακόμη από τις επιφάνειες των κορυφών (κόκκινη και πράσινη διακεκομμένη γραμμή) επαληθεύεται η αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών, που μετρήθηκαν με τη μέθοδο Lowry, για την περίπτωση της οζόνωσης και προσθήκης H_2O_2 σε σύγκριση με την απλή βιολογική επεξεργασία. Η αύξηση αυτή οφείλεται σε μόρια πολύ μικρού μοριακού βάρους και αυτό αιτιολογείται από τη δράση του όζοντος και του H_2O_2 .



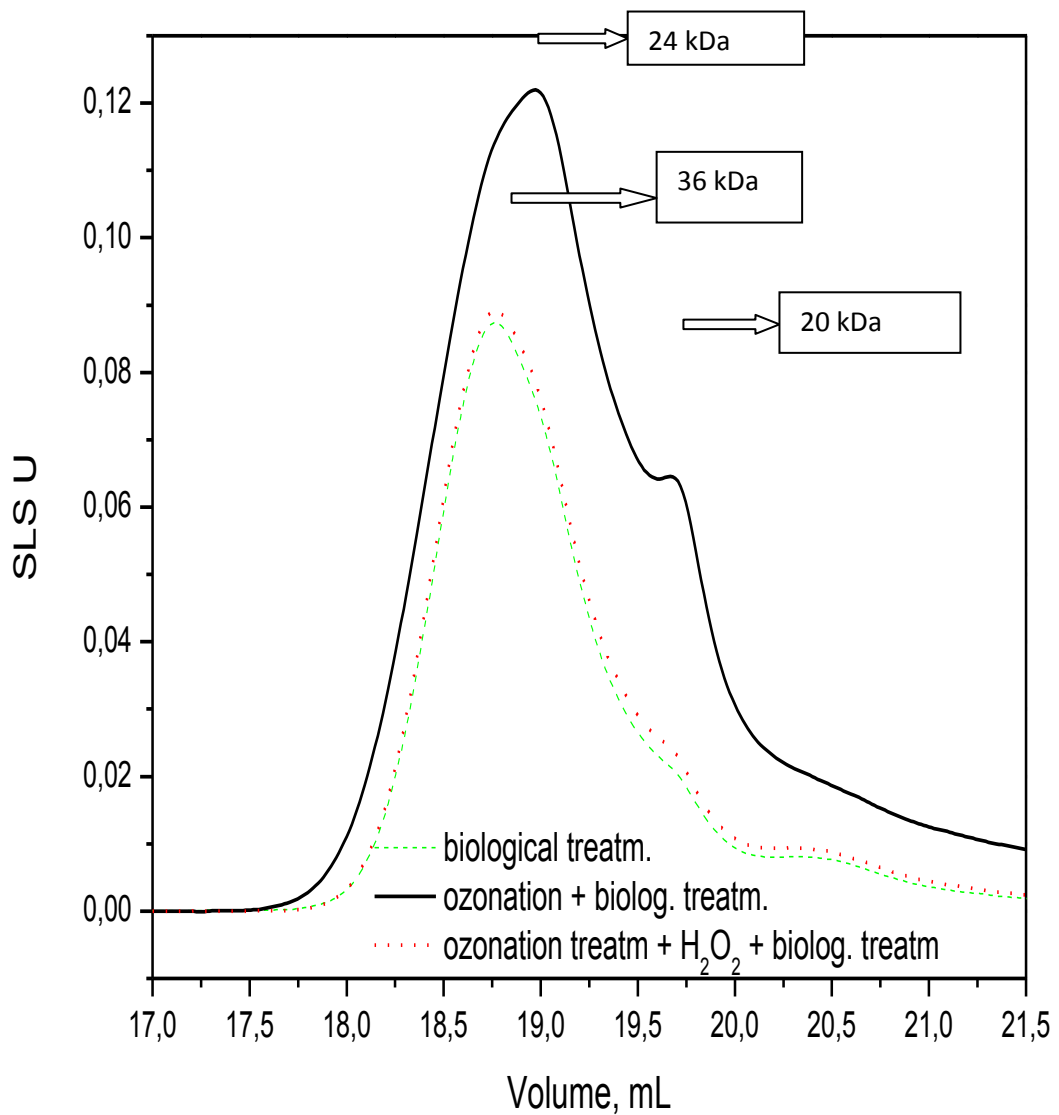
Σχήμα 27. Χρωματογράφημα των TBEPS για τα 3 συστήματα επεξεργασίας: βιολογική επεξεργασία, επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και H_2O_2 .

Ανιχνευτής SLS

Τα παρακάτω σχήματα (Σχήματα 28 και 29) παρουσιάζουν τα χρωματογραφήματα των sEPS και LBEPS που λαμβάνονται από τον ανιχνευτή SLS και για τις 3 δεξαμενές, έτσι όπως πάρθηκαν από τον χρωματογράφο μοριακού αποκλεισμού (HPSEC). Ο ανιχνευτής SLS (Static Light Scattering) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των μεγαλομορίων.

Τα SEPS (Σχήμα 28) παρατηρείται ότι αποτελούνται κυρίως από ουσίες μοριακού βάρους (24kDa) και σε μικρότερη συγκέντρωση από ουσίες μοριακού βάρους (20kDa) για την περίπτωση της απλής βιολογικής επεξεργασίας. Για την περίπτωση της επιπρόσθετης προεπεξεργασίας με οζόνωση (κόκκινη διακεκομμένη γραμμή) και με οζόνωση και H₂O₂ (πράσινη διακεκομμένη γραμμή), εντοπίζεται ότι τα SEPS αποτελούνται κυρίως από ουσίες με μοριακό βάρος 36kDa . Δηλαδή στην περίπτωση της οζόνωσης εντοπίζονται κυρίως ουσίες ελαφρώς μεγαλύτερου μοριακού βάρους σε σύγκριση με την απλή βιολογική επεξεργασία, και αυτό οφείλεται πιθανότατα στην ύπαρξη μορίων μη διαλυτής μορφής στο μίκτο υγρό, οι οποίες μετατράπηκαν σε διαλυτή μορφή κατά την οζόνωση.

Επίσης, σε σύγκριση της βιολογικής επεξεργασίας με την επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και με οζόνωση και H₂O₂, παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών των μεγάλων μοριακών βαρών (24kDa) και εξαφάνιση των μικρότερων (20kDa) όπως συνέβη και στην περίπτωση του ανιχνευτή UV. Έτσι εξάγεται το συμπέρασμα ότι η οζόνωση έχει διασπάσει σχεδόν πλήρως τα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους και επίσης, ότι έχει διασπάσει σε μεγάλο βαθμό τα συστατικά υψηλότερου μοριακού βάρους μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους.



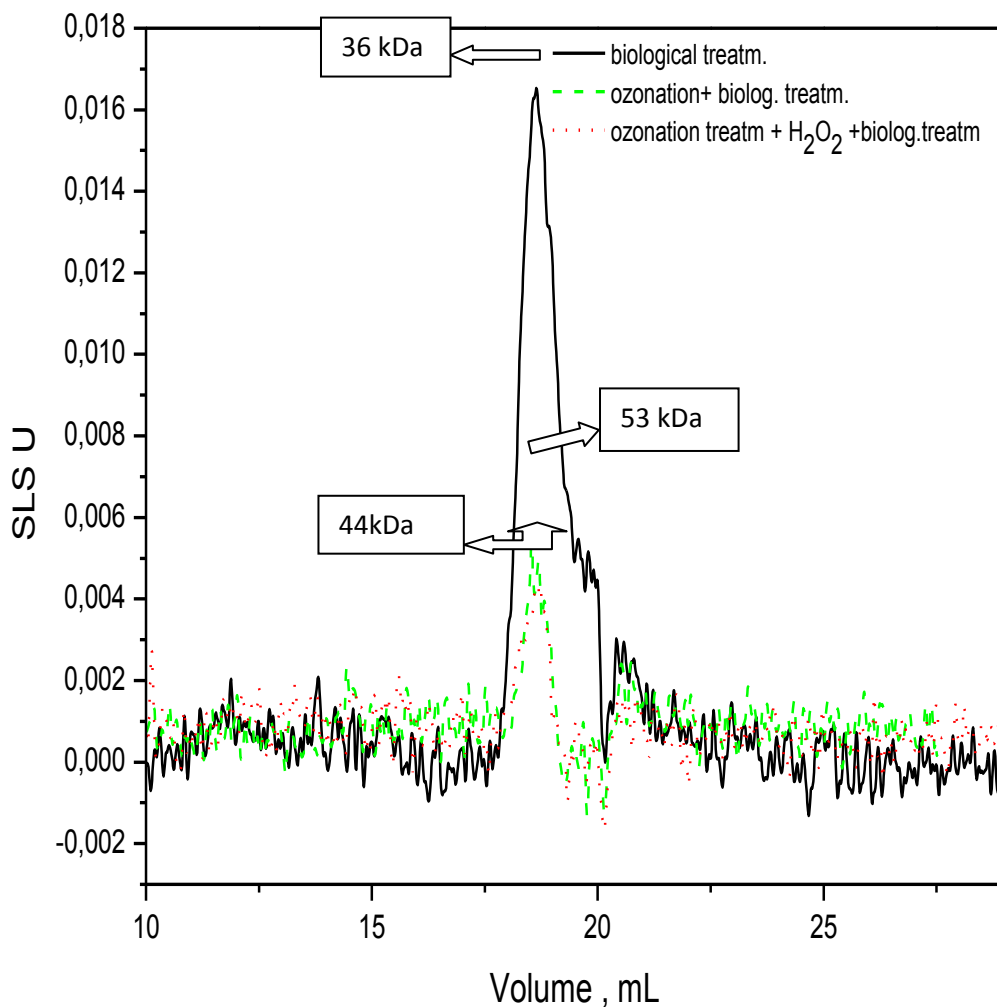
Σχήμα 28. Χρωματογράφημα των sEPS για τα 3 συστήματα επεξεργασίας: βιολογική επεξεργασία, επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και H₂O₂.

Τα LBEPS παρατηρείται ότι αποτελούνται κυρίως από ουσίες μοριακού βάρους (36 kDa για την περίπτωση της απλής βιολογικής επεξεργασίας ενώ για την περίπτωση της επιπρόσθετης προεπεξεργασίας με οζόνωση (κόκκινη διακεκομμένη γραμμή) και

με οζόνωση και H_2O_2 (πράσινη διακεκομμένη γραμμή), εντοπίζεται ότι αποτελούνται κυρίως από ουσίες με μοριακό βάρος 53kDa(Σχήμα 29) . Δηλαδή , όπως και στα sEPS, στην περίπτωση της οζόνωσης εντοπίζονται ουσίες μεγαλύτερου μοριακού βάρους σε σύγκριση με την απλή βιολογική επεξεργασία.

Επίσης, σε σύγκριση της βιολογικής επεξεργασίας, με την επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και με οζόνωση και H_2O_2 , παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών των μεγάλων μοριακών βαρών (36kDa) διότι η οζόνωση, ότι έχει διασπάσει σε μεγάλο βαθμό τα συστατικά υψηλότερου μοριακού βάρους μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους.

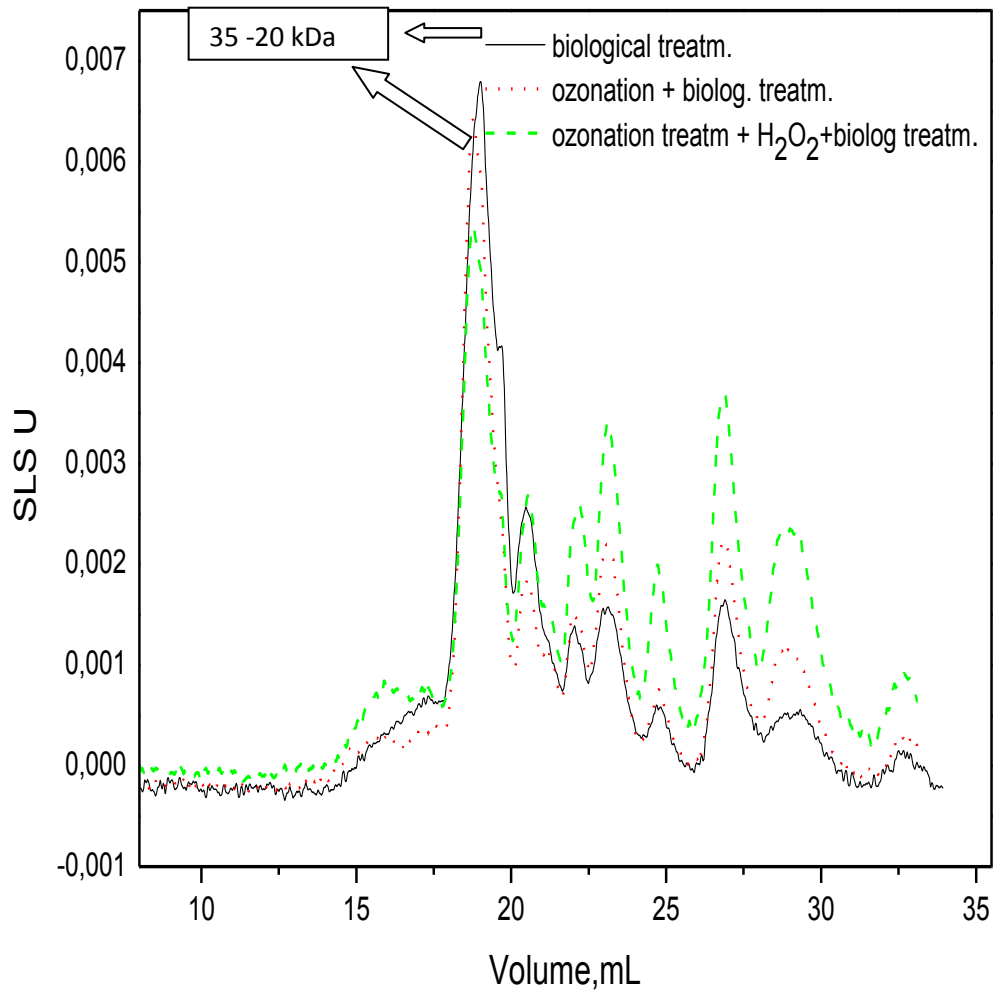
Επιπλέον, για τα LBEPS παρατηρείται ότι κυμαίνονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα sEPS (Adsorbance Units=0-0,12 για τα SEPS και 0-0,018 για τα LBEPS).



Σχήμα 29. Χρωματογράφηματα των LBEPs για τα 3 συστήματα επεξεργασίας: βιολογική επεξεργασία, επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και H₂O₂.

Τα TBEPS της βιολογικής επεξεργασίας παρατηρείται ότι αποτελούνται κυρίως από συστατικά μοριακού βάρους που κυμαίνονται στα 35-20kDa και σε μικρότερες συγκεντρώσεις από μόρια μικρότερων μοριακών βαρών, που ξεπερνούν το όριο της διαχωριστικής ικανότητας των χρωματογραφικών στηλών του HPSEC. Από το σχήμα 30 εντοπίζεται ότι η συγκέντρωση των μεγάλων μορίων μειώνεται σε μικρό βαθμό με την οζόνωση και σε μεγαλύτερο με την προσθήκη H₂O₂. Αντίστοιχα αυξάνονται οι

συγκεντρώσεις των συστατικών μικρότερου μοριακού βάρους σε μικρό βαθμό με την οζόνωση και σε μεγαλύτερο με την προσθήκη H₂O₂ σε σύγκριση με την απλή βιολογική επεξεργασία λόγω της οξειδωτικής δράσης του όζοντος και του H₂O₂.



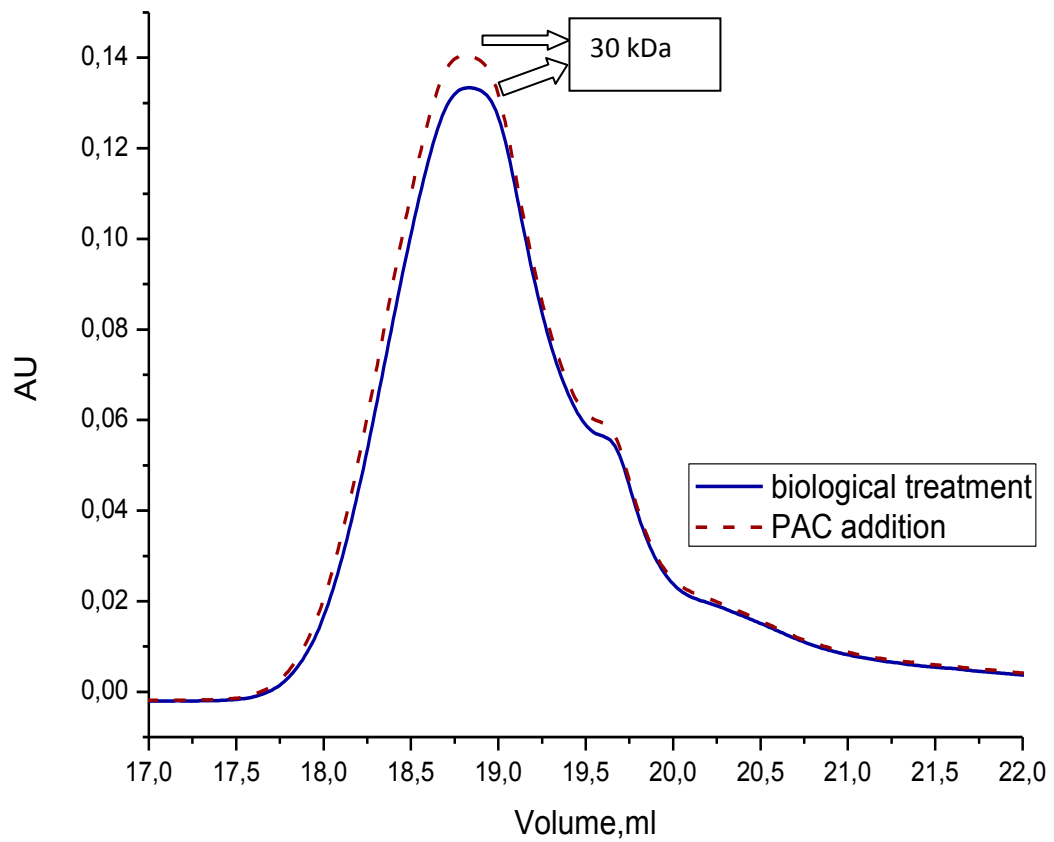
Σχήμα 30. Χρωματογράφημα των TBEPS για τα 3 συστήματα επεξεργασίας: βιολογική επεξεργασία, επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και επιπρόσθετη προεπεξεργασία με οζόνωση και H₂O₂.

4.5.2 Μελέτη επίδρασης της προσθήκη ενεργού άνθρακα σε σχέση με την βιολογική επεξεργασία του αποβλήτου

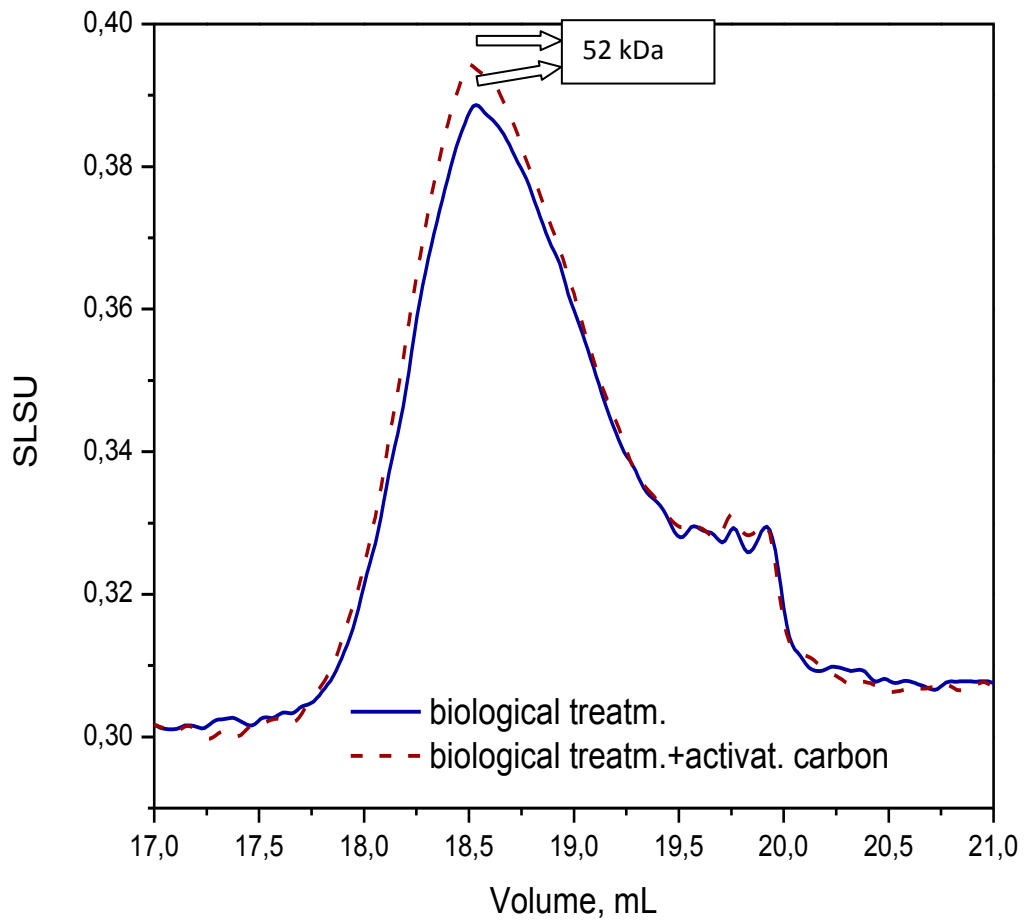
Μελέτη των sEPS

Τα σχήματα 31 και 32 παρουσιάζουν τα χρωματογραφήματα των sEPS που λαμβάνονται από τους ανιχνευτές UV και SLS, αντίστοιχα, έπειτα από την προσθήκη σκόνης ενεργού άνθρακα σε συνδυασμό με την βιολογική επεξεργασία.

Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε την 26^η ημέρα λειτουργίας των δεξαμενών και όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα η συγκέντρωση των SEPS στην δεξαμενή όπου έγινε η συνεπεξεργασία με την σκόνη άνθρακα είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με την βιολογική επεξεργασία. Αυτό συμβαίνει διότι ο ενεργός άνθρακας είχε ήδη φτάσει στο σημείο κορεσμού του την ημέρα που έγινε η μέτρηση. Το αποτέλεσμα αυτό ,συμπίπτει και με τις ποσοτικές μετρήσεις οι οποίες συζητήθηκαν παραπάνω. Ωστόσο, τα sEPS , αποτελούνται κυρίως από ουσίες μοριακού βάρους περίπου 30 kDa (ανιχνευτής UV) και 50 kDa (ανιχνευτής SLS) και στις δυο δεξαμενές. Οπότε , παρ όλο που η συγκέντρωση των μορίων στις δυο δεξαμενές αλλάζει, το μοριακό τους βάρος κυμαίνεται στα 30 kDa ή στα 50 kDa για τους ανιχνευτές UV και SLS, αντίστοιχα .



Σχήμα 31. Χρωματογράφημα των sEPS για τα 2 συστήματα επεξεργασίας: βιολογική επεξεργασία και συνεπεξεργασία με προσθήκη σκόνης ενεργού άνθρακα, που λαμβάνονται από τον ανιχνευτή UV.



Σχήμα 32. Χρωματογράφημα των sEPS για τα 2 συστήματα επεξεργασίας: βιολογική επεξεργασία και συνεπεξεργασία με προσθήκη σκόνης ενεργού άνθρακα, που λαμβάνονται από τον ανιχνευτή SLS.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα βασικά συμπεράσματα της παρούσας έρευνας ήταν τα ακόλουθα:

- Η οζόνωση διασπά τα μεγαλομόρια σε μικρότερα καθιστώντας τα ευκολότερα βιοαποικοδομήσιμα, οπότε και οι συγκεντρώσεις των SEPS είναι μικρότερες σε σχέση με εκείνες του συστήματος απλής βιολογικής επεξεργασίας (σύστημα έλεγχος).
- Η οζόνωση διασπά σε μεγαλύτερο βαθμό τις πρωτεΐνες σε σύγκριση με τους πολυσακχαρίτες.
- Η προ-επεξεργασία με όζον και η μετέπειτα προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου, έχει πιο έντονη οξειδωτική δράση σε σχέση με την επεξεργασία μόνο με όζον. Το γεγονός αυτό συμπεραίνεται από τη μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης των SEPS για την περίπτωση οζόνωσης και προσθήκης υπεροξειδίου του υδρογόνου. (Στις 26 ημέρες στην δεξαμενή που είχε υποστεί προεπεξεργασία με όζον η συγκέντρωση των SEPS ήταν 70,88 mg/g Vss ενώ σε εκείνη που είχε υποστεί προ επεξεργασία με όζον και μετέπειτα προσθήκη H₂O₂ ήταν 25,45 mg/g Vss).
- Στο μίγμα αποβλήτων οπού εξέπεμπε η ακτινοβολία LED, παρατηρήθηκε αύξηση των μικροαλγών, η οποία είχε ως άμεσο επακόλουθο την αύξηση των SEPS που εκκρίνονται από τους μικροοργανισμούς και τα μικροάλλα.
- Η προσθήκη της σκόνης ενεργού άνθρακα δεν επηρεάζει τους υδατάνθρακες των διαλυτών EPS. Επηρεάζει όμως τις πρωτεΐνες και πιο συγκεκριμένα, μειώνει την συγκέντρωσή τους μέχρι τη στιγμή που φθάνει στο σημείο κορεσμού του. Από εκεί και έπειτα παρατηρείται αύξηση των διαλυτών EPS διότι το σύστημα προσπαθεί να ξαναφτάσει σε κατάσταση ισορροπίας.
- Από τα χρωματογραφήματα του HPSEC εντοπίζεται ότι κατά την επεξεργασία με οζόνωση και με οζόνωση και H₂O₂, τα SEPS αποτελούνται κυρίως από ουσίες με μοριακό βάρος 32kDa δηλαδή κυρίως ουσίες ελαφρώς μεγαλύτερου μοριακού βάρους σε σύγκριση με την απλή βιολογική επεξεργασία που ήταν 18 kDa. Το γεγονός αυτό οφείλεται πιθανότατα στην ύπαρξη μορίων μη διαλυτής μορφής στο μικό υγρό, οι οποίες μετατράπηκαν σε διαλυτή μορφή κατά την οζόνωση.

- Η προεπεξεργασία με οζόνωση και με οζόνωση και H_2O_2 , οδηγεί σε μείωση της συγκέντρωσης των συστατικών των μεγάλων μοριακών βαρών (21kDa) και εξαφάνιση των μικρότερων (18kDa). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι η οζόνωση έχει διασπάσει σχεδόν πλήρως τα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους και έχει διασπάσει σε μεγάλο βαθμό τα συστατικά υψηλότερου μοριακού βάρους μειώνοντας τη συγκέντρωσή τους.
- Στα χρωματογραφήματα των TBEPS εντοπίζεται ότι η συγκέντρωση των μεγάλων μορίων μειώνεται σε μικρό βαθμό με την οζόνωση και σε μεγαλύτερο με την προσθήκη H_2O_2 . Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των μορίων μικρού μοριακού βάρους εμφανίζουν αύξηση η οποία αιτιολογείται από τη δράση του όζοντος και του H_2O_2 .
- Παρατηρείται τέλος ότι συμπίπτουν τα χρωματογραφήματα των ανιχνευτών UV στα 280nm (ανίχνευση πρωτεϊνών) και SLS (ανίχνευση όλων των μεγαλομορίων), που μελετήθηκαν ξεχωριστά, άρα επαληθεύετε το συμπέρασμα που προέκυψε από τις ποσοτικές μετρήσεις ότι υπάρχουν κυρίως πρωτεΐνες στα κλάσματα των EPS.

6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

- Χρήση αποβλήτων από διαφορετικές πηγές (άλλης φύσης βιομηχανικά απόβλητα).
- Χρήση διαφορετικής μεθόδου εκχύλισης (χρήση υπερήχων) και άλλης μεθόδου μέτρησης πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών (BCA method/ Bradford method για πρωτεΐνες, Anthrone method για πολυσακχαρίτες).
- Επανάληψη της παρούσας μεθοδολογίας για την μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών και των πολυσακχαριτών χρησιμοποιώντας διαφορετικές παραμέτρους-συνθήκες στα συστήματα μας. Στη μέθοδο Dubois παραδείγματος χάρι αντί για 97% φαινόλη να κάνουμε χρήση 5% (Raunkjaer et al., 1993).
- Μελέτη του ρόλου των EPS σε σχέση με την κροκίδωση, την αφυδάτωση, σε μικροβιακά σύνολα ενεργού ιλύος λαμβάνοντας υπόψη και άλλες παραμέτρους χαρακτηρισμού του αποβλήτου.
- Προσδιορισμός των βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή των EPS.
- Χρήση ακτινοβολίας LED με στόχο την παραγωγή (και μετέπειτα απομόνωση) των EPS ώστε να χρησιμοποιηθούν σε άλλες εφαρμογές ή μελέτες.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Badireddy AR, Chellam S, Yanina S, Gassman P, Rosso KM. (2008). Bismuth dimercaptopropanol (BisBAL) inhibits the expression of extracellular polysaccharides and proteins by *Brevundimonas diminuta*: implications for membrane microfiltration. *Biotechnol Bioeng* , **99**, 634–43.
2. Basil George , Imran Pancha , Chahana Desai , Kaumeel Chokshi , Chetan Paliwal , Tonmoy Ghosh , Sandhya Mishra. (2014). Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. *Bioresource Technology* , **171**, 367–374
3. Bhatia Divya, Isabelle Bourven, Stephane Simon, Francois Bordas, Eric D. van Hullebusch, Stephanie Rossano, Piet N.L. Lens, Gilles Guibaud.(2013). Fluorescence detection to determine proteins and humic-like substances fingerprints of exopolymeric substances (EPS) from biological sludges performed by size exclusion chromatography (SEC). *Bioresource Technology*, **131**, 159–165
4. Bourven I., S. Simon and G. Guibaud. (2013). Influence of extraction method on size exclusion chromatography fingerprints of EPS from wastewater sludges. *Environmental Technology* , **34(1-4)**, 321-32.
5. Bradford M.M. (1973) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Analyt.Biochem* , **72**, 248-254
6. Bura R, Cheung M, Liao B, Finlayson J, Lee BC, Droppo IG, et al, (1998). Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Sci Technol*, **37(4–5)**, 325–33.
7. Cho J., Song K.G. and Ahn K.H. (2006). The activated sludge and microbial substances influences on membrane fouling in submerged membrane bioreactor: unstirred batch cell test. *Desalination*, **183** ,425-429.
8. D'Abzac P, Bordas F, Joussein E, van Hullebusch E, Lens PNL, Guibaud G, (2010). Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludge. *Environ Sci Technol* , **44**, 412–418.
9. Dignac MF, Urbain V, Rybacki D, Bruchet A, Snidaro D, Scribe P, (1998). Chemical description of extracellular polymeric substances: implication on activated sludge floc structure. *Water Sci Technol*, **38**, 45–53.
10. Durmaz B and Sanin FD, (2001). Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge. *Water Sci Technol*, **44** , 221–229.

11. Esparza-Soto M, Westerhoff PK, (2001). Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass. *Water Sci Technol*, **36** , 87–95.
12. Frolund B, Griebe T and Nielsen PH, (1995). Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl Microbiol Biotechnol*, **43**,755–61.
13. Frølund B., Palmgren R., Keiding K.(1995). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res.*, **30**, 1749 – 1758.
14. Garnier Christophe, Tatiana Gorner, Bruno S. Lartiges, Sandra Abdelouhab, Philippe de Donato (2005). Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Research* , **39** ,3044–3054.
15. Garnier T. Gorner, P. Guinot-Thomas, P. Chappe, and P. de Donato (2006). Exopolymeric production by bacterial strains isolated from activated sludge of paper industry. *Water Research* , **40**, 3115–3122.
16. Gorner Tatiana, Philippe de Donato, Marie-Helene Ameil, Emmanuelle Montarges-Pelletier, Bruno S. Lartiges(2003). Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Research* , **37**, 2388–2393.
17. Guibaud G, Tixier N, Bouju A, Baudu M, (2003). Relation between extracellular polymer's composition and its ability to complex Cd, Cu, and Pb. *Chemosphere*, **52**, 1701–1710.
18. Higgins MJ and Novak JT, (1997). Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J Environ Eng* , **123**, 479–485.
19. Hoa PT, Nair L, Visvanathan C, (2003). The effect of nutrients on extracellular polymeric substances production and its influence on sludge properties. *Water SA*, **29**, 437–442.
20. J.S. Kim, C.H. Lee, H.D. Chun, (1988). Comparison of ultrafiltration characteristics between activated sludge and BAC sludge, *Water Res.* **32**, 3443–3451.
21. Jia XS, Furumai H, Fang HHP, (1996). Extracellular polymers of hydrogen-utilizing methanogenic and sulfate-reducing sludges. *Water Res*, **30**, 1439–1444.
22. Jorand F, Zartarian F, Thomas F, Block JC, Bottero JY, Villemin G, (1995). Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Res*, **29**, 1639–1647.
23. Judd S. (2004). A Review of Fouling of Membrane Bioreactors in Sewage Treatment. *Water Science and Technology*, **49**, 229-235.
24. Laspidou CS and Rittmann BE, (2002). A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res*, **36**, 2711–2720.

25. Le-Clech P., Chen V. and Fane T. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of membrane Science*, **284**, 17-53.
26. Li DH and Ganczarczyk JJ, (1990). Structure of activated sludge flocs. *Biotechnol Bioeng* . **35**, 57–65.
27. Li X and Logan B., (2004). Analysis of bacterial adhesion using a gradient force analysis method and colloid probe atomic force microscopy. *Langmuir*, **20**, 8817–8822.
28. Liao BQ, Allen DG, Droppo IG, Leppard GG, Liss SN, (2001). Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Res*, **35**,339–350.
29. Liu H and Fang HHP, (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J Biotechnol*, **95**, 249–56.
30. Liu Ting ,Zhong-lin Chen, Wen-zheng Yu, Shi-jie You (2011). Characterization of organic membrane foulants in a submerged membrane bioreactor with pre-ozonation using three-dimensional excitation–emission matrix fluorescence spectroscopy. *water Reasearch* , **45**, 2111-21
31. Liu XM, Sheng GP, Yu HQ, (2007). DLVO approach to the flocculability of a photosynthetic H₂- producing bacterium, *Rhodospseudomonas acidophila*. *Environ Sci Technol*, **41**, 4620–4625.
32. Lowry O.H. , Rosebrough N.J., Farr A.L and Randall R.J (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, **193**, 265-275.
33. Masse A., Sperandio M. and Cabassaud C. (2006). Comparison of Sludge Characteristics and Performance of a Submerged Membrane Bioreactor and an Activated Sludge Process at High Solids Retention Time. *Water Research*, **40**, 2405-2415.
34. Nielsen P., (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, **30**, 1749–1758.
35. Pan XL, Liu J, Zhang DY, Chen X, Song WJ, Wu FC, (2010). Binding of dicamba to soluble and bound extracellular polymeric substances (EPS) from aerobic activated sludge: a fluorescence quenching study. *J Colloid Interface Sci* , **345**, 442–447.
36. Park C and Novak JT, (2007) .Characterization of activated sludge exocellular polymers using several cation-associated extraction methods. *Water Res*, **41**, 1679–1688.
37. Priester JH, Olson SG, Webb SM, Neu MP, Hersman LE, Holden PA, (2006). Enhanced exopolymer production and chromium stabilization in *Pseudomonas putida* unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol*, **72**, 1988–1996.
38. Raunkjaer K., Hvitved-Jacobsen T. and Halkjaer Nielsen P. (1993). Measurement of pools of protein , carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Research*, **28**, 251-262.

39. Sesay ML, Ozcengiz G, Sanin FD, (2006) . Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water Res*, **40**, 1359–1366.
40. Sheng GP and Yu HQ , (2006). Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anerobic sludge using 3-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Res*, **40**, 1233–1239.
41. Shin HS, Kang ST, Nam SY, (2001). Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Water Sci Technol*, **43**, 193–196.
42. Sophie Comte, Gilles Guibaud , Michel Baudu , (2007). Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials*, **140**, 129-137.
43. Spath R, Flemming HC, Wuertz S (1998). Sorption properties of biofilms. *Water Sci Technol*, **37**, 207–210.
44. Stephane Simon, Birengre Paoro, Maud Villain, Paul D'Abzac, Eric Van Hullebusch, Piet Lens, Gilles Guibaud, (2009). Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresource Technology* **100**, 6258–6268.
45. Sutherland IW, (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology- SGM*, **147**, 3–9.
46. Sutherland IW, (2001). The biofilm matrix — an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* , **9**, 222–227.
47. Tsuneda S, Aikawa H, Hayashi H, Yuasa A, Hirata A, (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol Lett*, **223**, 287–92.
48. Turakhia MH and Characklis WG , (1989). Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: effect of calcium. *Biotechnol Bioeng*, **33**, 406–414.
49. Visvanathan C., Ben Aim R. and Parameshwaran K. (2000). Membrane Separation Bioreactors for Wastewater Treatment. *Critical Review in Environmental Science and Technology*, **30 (1)**, 1-48.
50. Wang ZW, Liu Y, Tay JH, (2005). Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol* , **69** , 469–73
51. Wilen BM, Keiding K, Nielsen PH, (2000). Anaerobic deflocculation and aerobic reflocculation of activated sludge. *Water Res*, **34**, 3933–3942.
52. Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C., (1996). Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function. *Springer-Verla*, **3**, 49–72.
53. Yang SF and Li XY,(2009). Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on the characteristics of activated sludge under non-steady-state conditions. *Process Biochem* , **44**, 91–96.

54. Yu H.Y., Hu M.X., Xu Z.K., Wang J.L. and Wang S.Y. (2005b). Surface modification of polypropylene microporous membranes to improve their antifouling property in MBR: NH_3 plasma treatment. *Separation and Purification Technology*, **45**, 8-15.
55. Yu H.Y., Xie Y.J., Hu M.X., Wang J.L., Wang S.Y. and Xu Z.K. (2005a). Surface modification of polypropylene microporous membrane to improve its antifouling property in MBR: CO_2 plasma treatment. *Journal of Membrane Science*, **254**, 219-227.
56. Zhao Ying, Gu Ping (2006). Effect of powdered activated carbon dosage on retarding membrane fouling in MBR. *Separation and Purification technology*, **52**, 154-160
57. Zhang XQ and Bishop PL, (2001). Spatial distribution of extracellular polymeric substances in biofilms. *J Environ Eng*, **127**, 850–856.