

تئوری‌های مختلف گرانولاسیون لجن در شرایط بی‌هوازی

آزاده همتی^۲

محمد صالح یوسف‌نژاد^۲

جلال شایگان^۱

(دریافت ۸۸/۱/۱۹ پذیرش ۸۸/۱۰/۱۵)

چکیده

در این مقاله تئوری‌های مختلف گرانولاسیون بی‌هوازی لجن مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی این تئوری‌ها را می‌توان در سه دسته فیزیکی، میکروبی و ترمودینامیکی تقسیم‌بندی نمود. در نگرش فیزیکی به فرایند گرانولاسیون، پدیده بر حسب ملاحظه شرایط فیزیکی حاکم بر راکتور، مانند سرعت جریان‌های رو به بالای گاز و مایع، جامدات معلق در جریان خروجی یا هسته لجن، خردشدن و حذف لجن اضافی، توضیح داده می‌شود. تئوری‌های میکروبی، گرانولاسیون لجن را بر مبنای ویژگی‌های ارگانسیم‌های معین و مشخص و نیز مشاهده خصوصیات گرانول‌ها از جمله ساختار گرانول و میکروبیولوژی مربوط به آن، تشریح می‌کنند. در دیدگاه ترمودینامیکی، عواملی نظیر آبگریزی، تحرک الکتروفور تیکی، انرژی درگیر در فرایند چسبیدن و تأثیر فعالیت جابجایی پروتون در سطح غشاهای باکتریایی مورد بررسی قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: گرانولاسیون بی‌هوازی، تئوری‌های گرانولاسیون، فیزیکی، میکروبی، ترمودینامیکی، راکتور UASB

A Survey of Sludge Granulation Theories Under Anaerobic Conditions

Jalal Shayegan¹

Mohammad Saleh Yousefnejad²

Azadeh Hemmati²

(Received Apr. 8, 2009 Accepted Jan. 5, 2010)

Abstract

This paper surveys the different theories developed on anaerobic sludge granulation. The theories are generally categorized as physical, microbial, and thermodynamic approaches. In the physical approach to the granulation process, granulation is described by such physical conditions of the reactor as upflow velocity of gas and liquid streams, suspended solids in the effluent flow, and excess sludge removal. Microbial theories are based on the properties of specific organisms and on granule properties (granule structure and its microbiology). The thermodynamic approach studies such factors as hydrophobia, electrophoretic mobility, effective energy in granule adhesion process, and effect of proton transferring activities on bacterial membrane surfaces.

Keywords: Anaerobic Granulation, Granulation Theories, Physical, Microbial, Thermodynamical, UASB Reactor.

1. Prof. of Environmental Eng., Dept. of Chemistry and Petroleum Eng., Sharif University of Tech., Tehran (Corresponding Author) (+98 21) 66165420, shayegan@sharif.edu

2. Grad. Student of Environmental Eng., Dept. of Chemistry and Petroleum Eng., Sharif University of Tech., Tehran

۱- استاد گروه مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران (نویسنده مسئول) (۰۲۱) ۶۶۱۶۵۴۲۰ shayegan@sharif.edu

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی محیط زیست، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

لجن) می‌گردد. زمان‌های ماند جامد بالاتر از ۲۰۰ روز را می‌توان در زمان ماند هیدرولیکی فقط ۶ ساعت به‌دست آورد.

۲- فعالیت متانوژنیک ویژه لجن گرانوله زیاد است. این فرایند با سرعت‌های بارگذاری آلی با بیش از ۵۰ کیلوگرم COD بر متر مکعب در روز، تحت شرایط مزوفیلیک و با فعالیت متانوژنیک ویژه بیش از ۲ کیلوگرم VSS در روز به خوبی سازگار می‌شود.

مطالعات میکرومورفولوژی گرانول‌ها نشان داده که کلونی‌های باکتری استوژن به‌صورت فشرده و تنگاتنگ به کلونی‌های بسیار کوچک باکتری متانوژن هیدروژنوتروفیک متصل شده و این عمل سبب انتقال هیدروژن بین اجزای گرانول گردیده و در نتیجه سرعت‌های تجزیه بالایی حاصل می‌گردد. گرانولاسیون لجن در راکتور UASB، زمان ماند را بهینه می‌کند زیرا مشکلات ناشی از فرار لجن^۵ حداقل می‌شود. با این وجود تغییرات در pH، عدم توازن مواد مغذی و یا حضور ترکیبات سمی در سوبسترا می‌تواند به ساختار گرانول آسیب برساند و به دنبال آن بازدهی فرایند کاهش یابد.

اولین گزارشها مربوط به گرانولاسیون لجن توسط لتینگا و همکاران^۶ در سال ۱۹۸۰-۱۹۷۹ منتشر شده است. هم‌اکنون بیش از ۲۷ سال است که بسیاری از محققان در سراسر دنیا فرایند گرانولاسیون را مورد مطالعه و بررسی قرار داده‌اند. با این وجود، هنوز هم اتفاق نظر در مورد تعیین مکانیسم فرایند گرانولاسیون وجود ندارد. یک ارگانسیم کلیدی در گرانولاسیون لجن در شرایط بی‌هوازی، *متانوسانتاکنسیلی*^۷ است. در اکثر مطالعات از نام مترادف آن یعنی *سون جنیل متانوژنیکس*^۸ استفاده شده است.

۲- تئوری‌های مربوط به گرانولاسیون

تئوری‌های گرانولاسیون لجن در شرایط بی‌هوازی را می‌توان در سه دسته رویکرد فیزیکی، میکربی و ترمودینامیکی تقسیم‌بندی نمود که هر سه به‌عنوان عوامل اصلی مسئول تشکیل گرانول، مورد ملاحظه قرار گرفته‌اند. این تئوری‌ها در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

۱-۲- تئوری‌های فیزیکی

در این شیوه نگرش به فرایند گرانولاسیون، پدیده بر حسب ملاحظه شرایط فیزیکی حاکم بر راکتور توضیح داده می‌شود. سرعت جریان‌های رو به بالای گاز و مایع، جامدات معلق در جریان خروجی یا هسته لجن، خرد شدن و حذف لجن اضافی از راکتور به‌عنوان عوامل مسئول در گرانولاسیون بررسی می‌گردند. در ادامه تئوری‌های موجود در این زمینه توضیح داده شده‌اند.

در فرایندهای تصفیه زیستی، نگهداری میکروارگانسیم‌ها در غلظت‌های مناسب و مطلوب عموماً کار مشکلی است. یکی از بهترین روش‌های بالا نگه‌داشتن این غلظت، گرانوله کردن لجن فعال است که مهم‌ترین کاربرد آن در راکتورهای UASB است. در سه دهه اخیر راکتور UASB در سطح گسترده‌ای برای تصفیه فاضلاب‌های صنعتی و شهری مورد استفاده قرار گرفته است. این نوع راکتور مزایای زیادی از قبیل توان پذیرش بار آلی بالا، نیاز به انرژی کم، زمان ماند هیدرولیکی کوتاه و ساختار ساده را داراست. پارامترهای مهم مؤثر بر بازدهی راکتورهای UASB عبارت‌اند از: فرایند گرانولاسیون در راکتور، خصوصیات فاضلابی که باید تصفیه شود، انتخاب لجن نطفه^۱ و تأثیر مواد مغذی افزودنی. در میان این پارامترها فرایند گرانولاسیون از اهمیت بسزایی برخوردار است. مشخصه‌های گرانول‌ها به شرح زیر است:

۱- تقریباً صاف و گرد هستند؛

۲- ته‌نشینی خوبی دارند؛

۳- ساختار میکربی قوی داشته و متراکم هستند؛

۴- زمان اقامت زیست توده^۲ در آنها زیاد است؛

۵- در بار آلی بالا توانایی استقامت دارند؛

۶- آستانه سمیت آن‌ها بالاست.

تشکیل لجن گرانوله در شرایط بی‌هوازی را می‌توان علت اصلی موفقیت راکتور UASB در تصفیه بی‌هوازی فاضلاب دانست. ارتباط نزدیکی بین کارایی این نوع راکتور و ایجاد لجن گرانوله شده وجود دارد. فرایند گرانولاسیون اجازه می‌دهد تا سرعت‌های بارگذاری در راکتورهای UASB بسیار فراتر از سرعت‌های بارگذاری متداول باشد که تا به حال در دیگر فرایندهای زیستی مرسوم به‌کار رفته است. حاصل این فرایند، کاهش در اندازه راکتور و سطح موردنیاز برای عمل تصفیه است که در نتیجه آن هزینه‌های سرمایه‌گذاری کاهش می‌یابد. علاوه بر این به علت عدم استفاده از هوادهی، هزینه‌های عملیاتی نیز کمتر می‌شود.

دو عامل اصلی، سرعت‌های بارگذاری بالا را امکان‌پذیر می‌سازد:

۱- ویژگی‌های ته‌نشینی بی‌نظیر لجن گرانوله. سرعت ته‌نشینی متداول برای لجن گرانوله تقریباً ۶۰ متر بر ساعت است در حالی که سرعت ظاهری جریان رو به بالا در راکتورهای UASB معمولاً زیر ۲ متر بر ساعت نگه داشته می‌شود. این موضوع سبب گسستگی فوق‌العاده زیاد زمان ماند هیدرولیکی^۳ از زمان ماند جامد^۴ (یا عمر

⁵ Washout

⁶ Lettinga et al

⁷ *Methanosanta Concilii*

⁸ *Methanotrrix Soehngenil*

¹ Inoculum

² Biomass

³ Hydraulic Retention Time (HRT)

⁴ Solid Retention Time (SRT)

جدول ۱- تئوری‌های مختلف گرانولاسیون لجن در شرایط بی‌هوازی

رویکرد	مرجع	نام تئوری
فیزیکی	[۱]	فشار انتخابی
	[۲]	رشد جامدات معلق کلونی شده
فیزیولوژیکی	[۲]	-
	[۴]	تئوری کیپ تاون
رشد	[۵]	تئوری اسپاگتی
	[۶]	-
میکربی	[۷]	پل‌سازی ریز لخته‌ها
	[۸]	دسته‌های متانوثریکس
اکولوژیکی	[۹]	سه نوع گرانول تجزیه کننده VFA
	[۱۰]	گرانول‌های چند لایه با مراکز هسته‌زایی
ترمودینامیکی	[۱۱]	مدل چهار مرحله‌ای تشکیل گرانول
	[۱۲]	مدل کششی سطحی
	[۱۳]	جابجایی پروتون-آب‌زدایی

۲-۱-۱- تئوری فشار انتخابی (۱۹۸۳)

در این تئوری اعتقاد بر این است که ماهیت فرایند گرانولاسیون در یک راکتور UASB، گزینش پیوسته ذرات لجن است که درون راکتور رخ می‌دهد. فشار انتخابی را می‌توان به صورت مجموعه سرعت بارگذاری هیدرولیکی^۱ و سرعت بارگذاری گازها^۲ (که به سرعت بارگذاری لجن بستگی دارد) در نظر گرفت. هر دو عامل در گزینش بین اجزای لجن با خصوصیات ته‌نشینی متفاوت، اهمیت دارند.

تحت شرایط فشار انتخابی بالا، لجن سبک و پراکنده از درون راکتور بیرون رانده می‌شود در حالی که اجزای سنگین تر درون راکتور باقی می‌مانند. بنابراین رشد لجنی که پراکندگی زیادی دارد به کمترین میزان می‌رسد و رشد باکتریایی در اطراف تعداد محدودی از هسته‌های رشد، صورت می‌پذیرد که شامل مواد حامل آلی و غیر آلی بی‌اثر یا مجموعه‌های باکتریایی کوچک موجود در هسته لجن است. این هسته‌های رشد تا یک اندازه بیشینه معین می‌گردند. پس از آن اجزای گرانول از هم جدا شده و هسته‌های رشد جدیدی را تولید می‌کند و این فرایند به‌طور پیوسته ادامه می‌یابد.

تحت شرایط فشار انتخابی پایین، رشد عمدتاً به صورت زیست‌توده پراکنده اتفاق می‌افتد که افزایش نوع توده‌ای^۳ لجن را به دنبال خواهد داشت. ارگانیسیم غالب در راکتورهای بی‌هوازی، متانوثریکس است که قادر به تشکیل رشته‌های بسیار طویل می‌باشد

(۳۰۰-۲۰۰ میکرومتر). زمانی که این ارگانیسیم‌ها بدون اتصال به یک ذره نگه‌دارنده جامد رشد می‌کنند، یک ساختار درهم تنیده شده بدون استحکام از رشته‌ها با خصوصیات ته‌نشینی بسیار ضعیف حاصل می‌شود. علاوه بر این، از طریق اتصال حبابهای گاز به این رشته‌های درهم تنیده بدون استحکام، حتی تمایل به شناور شدن در لجن به وجود می‌آید [۱۴].

۲-۱-۲- رشد جامدات معلق کلونی شده (۱۹۹۴)

پی یربام^۴ ادعا کرده است که گرانول‌ها از ذرات ریز ایجاد شده توسط خرد شدن و از کلونی شدن ذرات جامد معلق موجود در جریان ورودی، سرچشمه می‌گیرند (شکل ۱) [۲]. همچنین، طبق این تئوری، افزایش اندازه گرانول فقط به دلیل رشد است و بنابراین لایه‌های متحدالمرکزی که بر روی گرانول‌های برش خورده مشاهده می‌شود مربوط به نوسانات اندکی در شرایط رشد است.

مطابق این نظریه، توزیع اندازه گرانول‌ها در راکتورهای UASB، نتیجه رشد یافتن ذرات کوچک (که از طریق جریان ورودی به داخل راکتور آورده شده یا توسط خرد شدن درون راکتور تولید می‌گردند) و تبدیل آنها به گرانول‌های بزرگ‌تر و حذف مقادیری از گرانول‌ها با اندازه‌گیری مختلف توسط تخلیه لجن است (شکل ۱). علاوه بر این، فاضلابهای با غلظت بالای ذرات معلق جامد منجر به توزیع اندازه محدود می‌شود در حالی که مقادیر کم یا عدم حضور ذرات معلق جامد در جریان ورودی موجب توزیع اندازه گسترده‌ای می‌گردد.

۲-۲- تئوری‌های میکربی

این تئوری‌ها، گرانولاسیون لجن را عمدتاً بر مبنای ویژگی‌های ارگانیسیم‌های معین و مشخصی تشریح می‌کنند. در این رویکرد، عوامل فیزیکی که در تئوری‌های فیزیکی ارائه شده نیز اغلب گنجانده شده است. مشاهده خصوصیات گرانول‌ها یعنی ساختار گرانول و میکروبیولوژی مربوط به آن، به‌علاوه شرایطی که درون راکتور حاکم است (هیدرودینامیک، زیست‌مایه^۵ و نمودارهای غلظت مواد تولید شده میانی در طول راکتور و غیره) مبنای تئوری‌های ارائه شده هستند.

۲-۲-۱- رویکرد فیزیولوژیکی

پس از دالفینگ^۶، تولید پلیمرهای برون سلولی^۷ به وسیله برخی از میکروارگانیسیم‌ها تحت شرایط معین به‌عنوان عامل مسئول در

⁴ Pereboom

⁵ Substrate

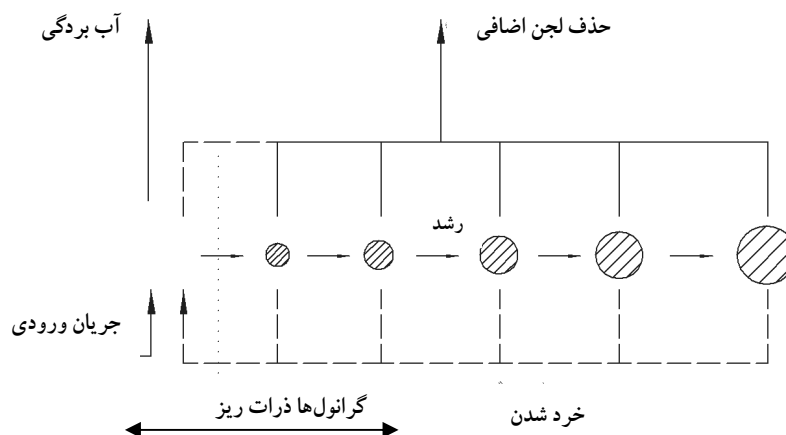
⁶ Dolfling

⁷ Extracellular Polymers (ECP)

¹ Hydraulic Loading Rate (HLR)

² Gas Loading Rate (GLR)

³ Bulking type



شکل ۱- مدل توزیع اندازه برای گرانول‌های متانوژیک [۳]

۳- منبع نامحدود نیتروژن، به صورت آمونیوم و
۴- مقدار محدود سیستمین.

بنابراین بسیار محتمل است که گرانولاسیون در هنگام تبدیل سوبسترای کربوهیدرات در یک سیستم جریان قالبی رخ دهد. هیدروژن در زمان تبدیل کربوهیدرات‌ها به اسیدهای چرب فرار، آزاد می‌شود. تحت شرایط بارگذاری آلی بالا، سرعت جذب H_2 توسط ارگانیسم‌های مصرف‌کننده H_2 ، کمتر از سرعت تولید H_2 می‌باشد و منطقه فشار جزئی H_2 بالا، توسعه می‌یابد. این منطقه در یک سیستم جریان قالبی محفوظ می‌ماند، بنابراین شرایط رشد و توسعه نژاد AZ متانوباکتری را فراهم می‌کند.

شرایطی که تحت آن، تشکیل گرانول طبق فرضیه کیپ تاون غیر محتمل است، عبارت‌اند از:

۱- سیستم‌هایی مانند استات که در آنها زیست مایه در فرایند تخمیر، H_2 تولید نمی‌کند و یا فقط قادر به تجزیه تحت شرایط فشار جزئی H_2 پایین است (مانند پروپیونات و لیپیداها)؛

۲- سیستم‌های اختلاط کامل، به علت رقیق شدن فشار جزئی بالای H_2 .

با این وجود گرانولاسیون در راکتورهای UASB که استات را مورد عمل قرار می‌دهند، مشاهده شده که نشان می‌دهد فرضیه نقض شده است. علاوه بر این، رفتار هیدرودینامیکی در راکتورهای UASB معمولاً به رژیم جریان اختلاط کامل شبیه است و به این معنی است که پروفیل هیدروژن در ارتفاع راکتور شیب‌دار نخواهد بود. همچنین گزارش داده شده که با زیست مایه حاوی پروتئین (کاستئین)، گرانولاسیون به آسانی در یک راکتور UASB رخ داده است و این سیستم رفتاری بسیار شبیه به سیستم مشابهی داشته که زیست مایه آن کربوهیدرات بوده است [۱۴].

پدیده گرانولاسیون بی‌هوازی، توسط چندین پژوهشگر مورد بررسی قرار گرفته است [۳].

۲-۱-۱-۲-۱- فرضیه کیپ تاون^۱ (۱۹۸۷)

طبق نظر سمسون و همکاران^۲، گرانولاسیون به نژاد AZ متانوباکتری وابسته است [۴]. این ارگانیسم، H_2 را به عنوان تنها منبع انرژی اش مصرف می‌کند و قادر به تولید همه اسیدهای آمینه خود به جز سیستمین است. زمانی که این میکروارگانیسم در یک محیط با فشار جزئی H_2 بالا مانند حضور زیست مایه زیاد قرار داشته باشد، رشد سلولی و تولید اسیدهای آمینه تحریک خواهد شد. با این وجود، به دلیل اینکه نژاد AZ متانوباکتری قادر به تولید اسید آمینه ضروری سیستمین نیست، سنتز سلولی توسط نرخ تولید سیستمین محدود خواهد شد. علاوه بر این اگر آمونیوم موجود باشد، اسیدهای آمینه دیگری به مقدار زیاد توسط نژاد AZ متانوباکتری به صورت پلی‌پپتید برون سلولی تولید می‌شوند که این باکتری و سایر باکتری‌ها را برای تشکیل گرانول به هم متصل می‌نماید. به هر حال پژوهشگران پذیرفته‌اند که سایر باکتری‌های بی‌هوازی نیز ممکن است خصوصياتی شبیه به نژاد AZ متانوباکتری داشته باشد و در تشکیل گرانول مشارکت نمایند.

طبق این فرضیه، شرایطی که برای گرانولاسیون مساعد است عبارت‌اند از:

۱- محیطی با فشار جزئی بالای هیدروژن،

۲- راکتوری با جریان قالبی^۳ یا شبه قالبی^۴ (برای تحقق جداسازی فازی) با pH نزدیک به حالت خنثی،

¹ Cape Town

² Sam – Soon et al

³ Plug Flow

⁴ Semi- Plug

و تقطیر الکی خوراک‌دهی شده بود، ارائه کردند که قابل تقسیم به دو مرحله زیر است [۶]:

۱- تشکیل هسته

۲- رشد هسته و تبدیل آن به گرانول.

هر دو نوع باکتری متانوثریکس و متانوسارسینا به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مسئول تشکیل هسته مورد ملاحظه قرار گرفتند. در ابتدا به‌علت قابلیت چسبندگی خوب متانوثریکس و در ادامه به‌دلیل قابلیت رشد آن به‌صورت مجموعه که به‌وسیله ترشح پلیمرهای برون‌سلولی صورت می‌پذیرد، این نوع از باکتری‌ها می‌توانند به‌هم بچسبند. در طول مرحله دوم که در آن، هسته‌ها به‌صورت گرانول توسعه می‌یابند، باکتری‌های مختلف دیگری در کنار متانوژن‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کنند. این باکتری‌ها باید رشدی سازگار با زیست مایه‌های پیچیده داشته باشند.

۲-۲-۳- رویکرد اکولوژیکی

۲-۳-۱- پل‌سازی زیرلخته‌ها^۸ به‌وسیله رشته‌های متانوثریکس (۱۹۸۷)

دبورگیر و همکاران^۹ از طریق آزمایش‌های میکروسکوپی و اندازه‌گیری‌های فعالیت، پیشنهاد دادند که مکانیسم گرانولاسیون با پوشانده شدن متانوثریکس رشته مانند به‌وسیله کلونی‌های باکتری‌های اسیدوژنیک و تشکیل ریزلخته‌هایی با اندازه ۱۰ تا ۵۰ میکرومتر آغاز می‌شود [۷]. ویژگی‌های سطحی و ریخت‌شناسی، وجود پلهایی را بین ریزلخته‌های مختلف که نهایتاً منجر به تشکیل گرانول‌های بزرگ‌تر ($>200\mu\text{m}$) می‌شود تأیید کردند. رشد و توسعه بیشتر اسیدوژن‌ها و باکتری‌های سازگار دیگر سبب رشد گرانول‌ها می‌شود. از این رو، محققان مذکور از این ایده حمایت می‌کنند که متانوثریکس از طریق تشکیل شبکه‌ای که موجب تثبیت ساختار کلی گرانول می‌شود، نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. آنها همچنین بر نقش پلیمرهای برون‌سلولی و دیواره‌های سلولی تأکید کرده‌اند.

۲-۳-۲- دسته‌های متانوثریکس احاطه‌شده توسط ECP (۱۹۹۱)

مورگان و همکاران^{۱۰} مکانیسمی را در رابطه با رشد گرانول‌های بی‌هوازی بر مبنای آزمایش‌های انجام شده بر روی گرانول‌های فاضلاب خروجی از کارخانجات کاغذسازی و تصفیه شکر، پیشنهاد نمودند [۸]. به عقیده آنها گرانول‌ها از پیش ماده‌ای که شامل تجمعات کوچک متانوثریکس و سایر باکتری‌ها است، توسعه می‌یابند. رشد رشته‌های متانوثریکس، دسته‌های مجزایی را تشکیل

ویگانت^۱ فرضیه‌ای را در مورد گرانوله‌شدن لجن در راکتورهای UASB که فاضلابهای اسیدی‌شده، محلول‌های استات یا مخلوط اسیدهای چرب فرار را با باکتری غالب متانوثریکس مورد عمل قرار می‌دهند، پیشنهاد کرد. اگرچه راکتورهای با گونه‌های غالب متانوثریکس می‌توانند گرانول‌های یکپاره^۲ تولید نمایند، اما این نوع از گرانول‌ها به‌علت مشکلات عملیاتی که ایجاد می‌کنند، از اهمیت کمتری در راکتورهای UASB برخوردارند. بنابراین، انتخاب شرایط باید به گونه‌ای باشد که غلظت باکتری متانوثریکس به اندازه کافی زیاد باشد. این موضوع را می‌توان به‌وسیله استفاده از غلظتهای پایین استات در مرحله راه‌اندازی^۳ عملی نمود زیرا متانوثریکس تمایل بیشتری برای مصرف استات در مقایسه با متانوسارسینا^۴ دارد. ویگانت تشکیل گرانول را به دو مرحله تقسیم‌بندی کرد:

۱- تشکیل پیش‌ماده‌ها^۵

۲- رشد حقیقی گرانول‌ها از این پیش‌ماده‌ها

مرحله نخست، حیاتی‌ترین بخش تشکیل گرانول است. در ابتدا باکتری متانوثریکس به‌علت تلاطم ایجادشده توسط تولید گاز، با اتصال به مواد ریز پراکنده، لخته‌های بسیار کوچکی را تشکیل می‌دهند. غلظت مواد جامد معلق نباید خیلی زیاد باشد، در غیر این صورت افزایش اندازه لخته‌ها بسیار کند خواهد بود. گزینش لخته‌ها به‌وسیله یک سرعت افزایشی برای جریان بالارو صورت می‌پذیرد. زمانی که پیش‌ماده‌ها شکل گرفتند و یک افزایش سرعت مناسب و یکنواخت به‌کار گرفته شد، تشکیل گرانول حتمی است. رشد جداگانه باکتری‌ها و به دام انداختن باکتری‌های غیرمتصل موجب رشد ذرات پیش‌ماده و تبدیل آنها به گرانول می‌شود. به‌علت نیروهای برشی هیدرولیکی ناشی از جریان روبه‌بالای بیوگاز، شکل گرانول‌ها کروی می‌شود. در این حالت گرانول‌ها هنوز ظاهری رشته مانند دارند که شبیه به یک توپ اسپاگتی است و از زنجیره‌های بسیار بلند متانوثریکس که بخشی از آن درون گلوله و بخشی دیگر آزاد و رهاست، تشکیل شده‌اند. با گذشت زمان و به‌علت افزایش دانسیته توده باکتریایی، از این گرانول‌های رشته مانند در زمان‌های ماند بالای زیست توده، گرانول‌های میله مانند تشکیل می‌گردند.

مشابه فرضیه ویگانت، چن^۶ و لون^۷ فرضیه‌ای را برای گرانولاسیون بی‌هوازی لجن در یک UASB که با فاضلاب تخمیر

1 Wiegant

2 Spontaneous granulation

3 Start-up

4 Methanosarcina

5 Precursors

6 Chen

7 Lun

8 Bridging of microflocs

9 Dubourgier et al.

10 Morgan et al.

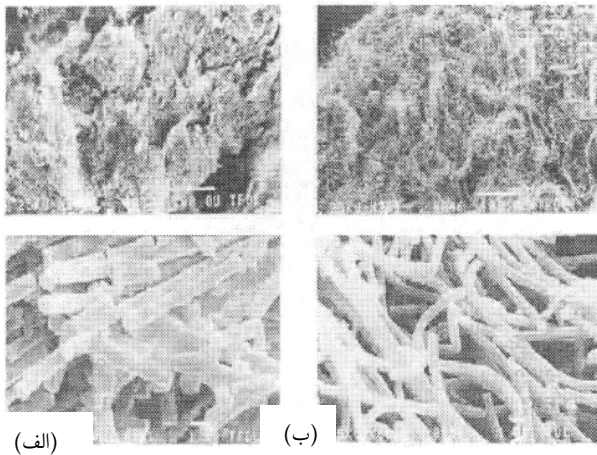
می‌دهد که به وسیله شبکه‌ای از باکتری‌های متانوژن و غیرمتانوژن که آنها را احاطه کرده‌اند، از هم جدا می‌شوند. همان‌طور که اندازه دسته‌ها افزایش می‌یابد از ورود شبکه احاطه‌کننده به منطقه نزدیک مرکز گرانول که منحصراً از رشته‌های متراکم متانوثریکس تشکیل شده و دسته‌های مجزا در آن قابل تمایز نیستند، ممانعت به عمل می‌آید. بنابراین، این محققان از پیشنهاد‌های قبلی مبنی بر اهمیت متانوثریکس و پلیمرهای باکتریایی در رشد گرانول‌ها حمایت کرده‌اند. نتایج به دست آمده از آزمایش‌های زو و همکاران^۱ نشان می‌دهد که افزایش OLR و محتوای ECP (پلیمر چند سلولی) و تشکیل گرانول شدیداً به یکدیگر وابسته است [۱۵].

ECP ترکیبی از پروتئین، پلی ساکاریدها، اسید هیومیک، اسید اورانیک و مقدار کمی چربی و اسید نوکلئیک است. ECP موجود در لجن برای یک دوره تناوب کوتاه در شرایط فزون باری^۲ تجمع می‌یابد و تجمع آن موجب بهبود فرایند گرانولاسیون می‌شود. باید توجه داشت که فزون باری پیوسته موجب زوال فعالیت متانوژنیک‌ها می‌شود و توازن میان خوراک و نیاز زیستی را برهم می‌زند.

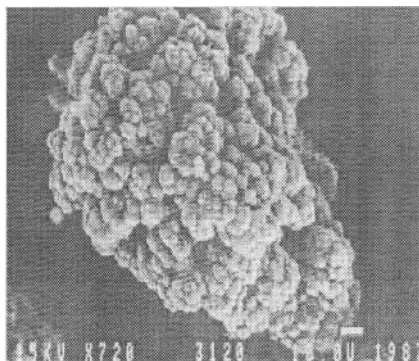
گرانول‌های متانوسارسینا به علت قابلیت‌شان در ایجاد توده‌های باکتریایی، به‌طور مستقل از فشار انتخابی توسعه می‌یابند. توده‌ها، قابلیت رسیدن به ابعاد میکروسکوپی را دارند و حفره‌هایی درون آنها ایجاد می‌شود که سایر گونه‌ها می‌توانند درونشان سکنی گزینند. با این وجود، این نوع از گرانول‌ها فقط در آزمایش‌هایی که غلظت استات به‌عنوان زیست مایه انحصاری، بالای ۱ کیلوگرم COD بر متر مکعب نگه داشته شده بود، یافت گردید و این به آن معناست که متانوسارسینا توانسته متانوثریکس را از گردونه رقابت حذف نماید.

ECP به علت ترکیب و ساختار شیمیایی خود بر روی خواص سطحی گروه‌های تجمع یافته باکتریایی تأثیر می‌گذارد و به آنها کمک می‌کند تا به هم بچسبند. همچنین می‌توان فرایند گرانولاسیون را با افزودن پلیمر مصنوعی، همانند پلیمرهای جاذب آب و هیبریدی و کاتیونی که توسط رندال^۳ و ریچارد^۴ توصیه شده‌اند، بهبود بخشید [۱۶].

البته مصرف پلیمرهای مصنوعی برای راکتورهای UASB در مقیاس صنعتی بسیار هزینه بر است.



شکل ۲- تصویر SEM از رشد سلول‌های متانوثریکس (الف) در زنجیره‌های کوتاه (ب) در رشته‌های بلند [۱۴]



شکل ۳- تجمع باکتری متانوسارسینا، موجود در انتهای یک راکتور UASB [۱۴]

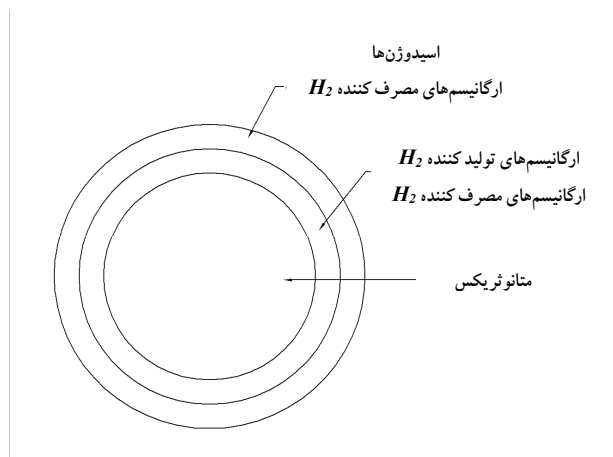
۲-۳-۳- گرانول‌های تجزیه‌کننده اسیدهای چرب فرآر (۱۹۸۰) در این تئوری گرانولاسیون، دو نوع باکتری بیشترین اهمیت را در تشکیل گرانول دارند: متانوثریکس و متانوسارسینا، دی زیو^۵ تشکیل انواع مختلف گرانول را در آزمایش‌های راه‌اندازی راکتور UASB در مقیاس آزمایشگاهی تشریح نمود [۹]. در این آزمایش‌ها از لجن هضم شده به‌عنوان لجن نطفه و از اسیدهای چرب فرآر به‌عنوان زیست توده استفاده شد. گرانول‌های تشکیل شده عبارت‌اند از:

۱- گرانول‌های میله‌ای: گرانول‌های کروی متراکم که عمدتاً از باکتری‌های میله‌ای شکل همانند سون جنیل متانوثریکس در

¹ Zhou et al.
² Overload
³ Randall
⁴ Richard
⁵ De Zeeuw
⁶ Rod granules

⁷ Filamentous granules

انرژی‌دار شدن آن می‌گردد. به عوامل مسئول در فرایند گرانولاسیون افزوده می‌شود.



شکل ۴- ترکیب گرانول پیشنهاد شده توسط مک‌لئود و همکاران [۱۰]

۲-۳-۱- مدل چهار مرحله‌ای جهت تشکیل گرانول و بیوفیلم (۱۹۹۶) آرینگ^۲ و اشمیت^۳ فرایند گرانولاسیون در راکتورها را با سه مرحله تشکیل بیوفیلم تشریح نموده‌اند [۱۱]:

۱- انتقال سلول‌ها به سطح یک ماده بی‌اثر کلونی نشده یا سایر سلول‌ها (لایه زیرین)

۲- جذب سطحی برگشت‌ناپذیر سلول‌ها به لایه زیرین توسط ترشحات میکربی و یا پلیمرها

۳- تکثیر سلولی و توسعه گرانول‌ها.

در یک راکتور UASB، موجودات ذره‌بینی توسط یکی از مکانیسم‌های زیر و یا ترکیبی از آنها منتقل می‌شوند: نفوذ (حرکت براونی)، جابجایی توسط جریان مایع، شناورسازی توسط گاز و ته‌نشینی. جذب سطحی اولیه پس از برخورد میان موجودات و لایه زیرین رخ می‌دهد. لایه زیرین می‌تواند تجمع‌های باکتریایی یا سایر موجودات حاضر در لجن، یا مواد آلی و غیرآلی باشد که به صورت هسته‌های رشد، عمل می‌نمایند.

جذب سطحی اولیه را می‌توان به‌طور تقریبی با تئوری DLVO^۴ توضیح داد. این تئوری قادر به تشریح و پیش‌بینی چسبندگی میکربی با استفاده از محاسبات تغییرات انرژی آزاد چسبندگی است. با استفاده از این تئوری فرض می‌شود که باکتری‌ها همانند ذرات بی‌اثر رفتار می‌نمایند و چسبندگی باکتریایی توسط یک رویکرد شیمی- فیزیکی قابل فهم می‌شود. تئوری DLVO فرض می‌کند که برهم‌کنش بازه بلند^۵ کلی در فواصل بیشتر از ۱ نانومتر،

ایجاد گرانول‌های نوع ۱ یا ۲ به زمان ماند متوسط زیست‌توده که در فرایند راه‌اندازی اتفاق می‌افتد، بستگی دارد. هنگامی که زمان ماند متوسط زیست‌توده بسیار کوتاه است، گرانول‌های متراکم که اکثر آنها منحصراً از ماده باکتریایی تشکیل شده‌اند، شانس برای به‌وجود آمدن ندارند. به این معنی که توده‌های بزرگ باکتری‌ها فقط از طریق اتصال به ذرات نگهدارنده بی‌اثر که برای اقامت طولانی‌تر در راکتور به اندازه کافی سنگین هستند، می‌توانند تشکیل شوند (نوع ۲). فقط در حالتی که زمان ماند متوسط زیست‌توده به اندازه کافی بزرگ باشد، گرانول‌های باکتریایی متراکم (نوع ۱) قادر به تشکیل شدن هستند.

۲-۳-۴- گرانول‌های چندلایه یا تجمع‌های متانوثریکس به‌عنوان مراکز هسته‌زایی (۱۹۹۰)

مک‌لئود و همکاران^۱ با کار بر روی یک راکتور هیبریدی (UASB و فیلتر بی‌هوازی بالارو) فرضیه‌ای را پیشنهاد نمودند که در آن، تجمع‌های باکتری‌های متانوثریکس به‌صورت مراکز هسته‌زایی عمل می‌نمایند و آغازگر توسعه گرانول‌هایی هستند که ساکاروز را تجزیه می‌نمایند (شکل ۴) [۱۰]. تولیدکننده‌های استات که شامل استوژن‌های تولیدکننده H₂ هستند در ادامه به این شبکه متصل می‌شوند و زیست‌مایه لازم برای باکتری‌های متانوثریکس را فراهم می‌کنند. این باکتری‌های استوژن به‌همراه ارگانسیم‌های مصرف‌کننده H₂، لایه ثانویه‌ای را در اطراف هسته متانوثریکس تشکیل می‌دهند. سپس هنگامی که باکتری‌های تخمیرکننده در تماس با سوبستراهای مورد نیازشان که در توده محلول موجودند، قرار گیرند، به این تجمع‌های کوچک چسبیده و لایه خارجی گرانول را تشکیل می‌دهند. محصولات باکتری‌های تخمیرکننده به‌عنوان خوراک به مصرف استوژن‌های لایه زیرین می‌رسد. چنین آرایش فضایی گروه‌های باکتریایی مختلف (از نظر وابستگی به غذا) سطح بالایی از فعالیت باکتری‌های استوژنیک را تضمین می‌نماید.

۲-۳- تئوری‌های ترمودینامیکی

برخی از پژوهشگران، مکانیسم تشکیل گرانول را برحسب انرژی درگیر در فرایند چسبیدن به‌علت برهم‌کنش فیزیکی- شیمیایی بین دیواره‌های سلولی یا بین دیواره‌های سلولی و سطوح خارجی، تحلیل کرده‌اند. عواملی نظیر آبگریزی و تحرک الکتروفورتیکی به‌طور واقع‌بینانه مورد توجه قرار گرفته‌اند. همچنین تأثیر فعالیت جابجایی پروتون در سطح غشاهای باکتریایی که موجب

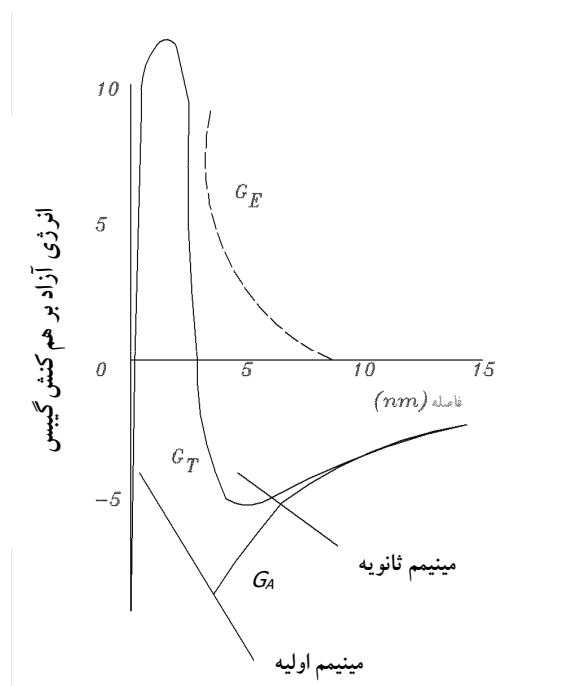
² Ahring

³ Schmit

⁴ Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek

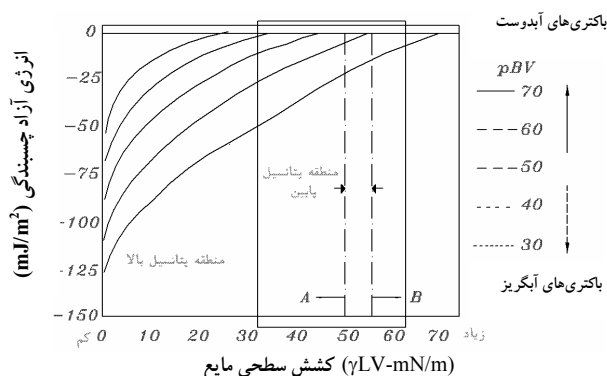
⁵ Long-range interaction

¹ Mcleod et al.



شکل ۵- انرژی گیسی کلی برهم کنش (G_T)، که مجموع G_A، انرژی های آزاد نیروهای واندروالسی و G_E، انرژی آزاد برهم کنش الکترواستاتیکی می باشد)

(باکتری های آبدوست یا با γ_{BV} زیاد) کاهش بیشتری را در انرژی آزاد، در هنگام تجمع ارائه می نمایند و در نتیجه برای تشکیل تجمع های باکتریایی انتخاب می شوند. در منطقه میانی، هم تجمع سلول های آبگریز و هم تجمع سلول های آبدوست نامطلوب است (پتانسیل ΔG_{adh} کم). مشخص شده است که اکثر باکتری های اسیدوژن، آبدوست هستند ولی اکثر استوژن ها و متانوژن های جدا شده از لجن گرانوله، آبگریز می باشند. بنابراین عملکرد سیستم در γ_{LV} بالا برای تجمع باکتری های آبگریز و در γ_{LV} پایین برای تجمع باکتری های آبدوست مطلوب است [۱۲].



شکل ۶- انرژی های آزاد چسبندگی (ΔG_{adh}) برای باکتری هایی با مقادیر مختلف γ_{BV} به عنوان تابعی از γ_{LV} تئوری جابجایی پروتون-آبزدایی (۲۰۰۰) [۱۲]

از جمع برهمکنش های واندروالسی و کولمبی (الکترواستاتیکی) حاصل می شود. طبق این نظریه سه وضعیت متفاوت رخ می دهد (شکل ۵).

۱- یک نیروی دافعه، زمانی که برهم کنش های الکترواستاتیکی غالب است.

۲- یک نیروی جاذبه برگشت ناپذیر قوی، زمانی که نیروهای واندروالسی غالب هستند (حداقل اولیه).

۳- یک نیروی جاذبه برگشت پذیر ضعیف، زمانی که موجودات در یک فاصله معین از یکدیگر قرار گرفته اند (حداقل ثانویه).

چسبندگی اولیه غالباً در حداقل اولیه منحنی انرژی آزاد DLVO رخ می دهد. حداقل ثانویه معمولاً به مقادیر منفی بزرگ نمی رسد و ذرات جذب شده در این حداقل عموماً چسبندگی برگشت پذیری را به نمایش می گذارند. در این حالت، یک فاصله جداکننده بین باکتری های جذب شده وجود دارد و یک لایه نازک آب بین سطوح واکنش دهنده، باقی می ماند. اگر یک باکتری بتواند به حداقل اولیه خود برسد، نیروهای برهم کنش بازه کوتاه^۱، فعال می شوند و چسبندگی برگشت ناپذیر رخ می دهد.

چسبندگی برگشت ناپذیر می تواند به دلیل خصوصیات باکتریایی ویژه نظیر ساختارهای سطح باکتری یا پلیمرهای ترشح شده باشد. زمانی که باکتری جذب می شود، کلونی شدن آغاز می گردد. باکتری های تثبیت شده در شبکه ECP تقسیم می شوند و در نتیجه باکتری ها در میان ساختار بیوفیلم به دام می افتند. سازماندهی باکتری ها درون گرانول ها می تواند انتقال زیست مایه و محصولات را تسهیل نماید. آرایش باکتری ها درون گرانول به قدرت آبگریزی موضعی، حضور موضعی پلیمرها و هندسه میکروبی بستگی دارد [۱۱].

۳- مدل کشش سطحی (۱۹۹۵)

تاویسری و همکاران^۲ چسبندگی باکتری ها در فرایند بی هوازی درون راکتورهای UASB را به ترمودینامیک سطح مرتبط نمودند. آن ها دریافتند که باکتری ها فقط زمانی می توانند بیشترین انرژی آزاد چسبندگی ممکن (ΔG_{adh}) را به دست آورند که کشش سطحی مایع (γ_{LV}) به اندازه کافی کم و یا زیاد باشد (شکل ۶). در منطقه γ_{LV} زیاد (منطقه B) باکتری های با انرژی سطحی کم (باکتری های آبگریز یا با کشش سطحی باکتریایی کم (γ_{BV})) قادر به چسبیدن و به دست آوردن حداقل انرژی هستند، در حالی که در منطقه γ_{LV} کم (منطقه A)، باکتری هایی با انرژی سطحی زیاد

¹ Short- range interaction

² Thaveesri et al.

تای و همکاران^۱ این تئوری را برای مکانیسم مولکولی گرانولاسیون لجن بر مبنای فعالیت انتقال پروتون در سطوح غشای باکتریایی، پیشنهاد نمودند [۱۳]. در این تئوری، پیشرفت فرایند گرانولاسیون در چهار مرحله به صورت زیر مورد بررسی قرار گرفته است:

۱- آب زدایی سطوح باکتریایی: برهم کنش آبگریز بین سطوح باکتریایی، به منظور آغاز چسبندگی باکتریایی لازم است. تحت شرایط فیزیولوژیکی طبیعی، یک سطح باکتریایی بار منفی زیادی دارد که برقراری پیوند هیدروژنی با مولکول های آب را تسهیل می نماید و منجر به تشکیل شبکه ای از آب در اطراف سطوح باکتریایی می گردد که به لایه هیدراسیون^۲ معروف است. با این وجود نیروی دافعه هیدراسیون، معمولاً مرحله آغازین چسبندگی برگشت پذیر باکتریایی را به مقدار قابل ملاحظه ای تحت تأثیر قرار نمی دهد. باکتری های اسیدوژن در هنگام اسیدی شدن زیست توده، پروتون ها را از طرف سیتوپلاسمی غشا به سطح خارجی آن انتقال می دهند. این فعالیت انتقال پروتون، به سطح انرژی می دهد و موجب شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی بین گروه های با بار منفی و مولکول های آب می شود. بنابراین یک خنثی سازی جزئی بارهای منفی بر روی سطوح باکتریایی رخ می دهد که موجب آب زدایی سطوح میکربی می گردد.

۲- تشکیل گرانول های اولیه^۳: ممکن است در نتیجه فشار هیدرولیکی جریان رو به بالا، طبیعت آبگریز باکتری ها و نیروی دافعه هیدراسیون تضعیف شده، اسیدوژن و متانوژن ها به یکدیگر چسبیده و گرانول های اولیه را تشکیل دهند. علاوه بر این به علت انتقال محصولات ناشی از سوخت و ساز بین باکتری ها، آب زدایی بیشتری در سطوح باکتریایی رخ می دهد و منجر به تقویت گرانول های اولیه می شود. در این مرحله توسعه، محیط فیزیولوژیکی جدید سبب آغاز تشرح ECP در سطوح گرانول اولیه می شود.

۳- بلوغ گرانول ها^۴: در این مرحله، کلونی های باکتریایی تشکیل شده، رشد خود را ادامه می دهند و باکتری های پراکنده نیز به گرانول های اولیه می چسبند. انتقال محصولات میانی، توزیع کلونی های ریز را درون گرانول معین می کند و سرانجام موجب تجمع های باکتریایی با ساختار مناسب به صورت گرانول های بالغ می گردد. علاوه بر این مقدار زیاد ECP تولید شده موجب هیدراسیون سطوح گرانوله می شود و گرانول ها را در برابر تنش های برشی و اتصال به حباب های گاز که سبب از بین رفتن زیست توده از طریق

شناور شدن می شود، محافظت می نماید. علت این امر آبدوستی بسیار زیاد ECP و آبگریزی شدید حباب های بیوگاز است.

۴- بلوغ تکمیلی^۵: در این مرحله فعالیت جابجایی پروتون، سطوح باکتریایی را در حالت نسبتاً آبگریزی نگاه می دارد و مسئول اصلی حفاظت و نگهداری ساختار گرانول های بالغ است. از سوی دیگر، لایه ECP در خارج گرانول موجب هیدراسیون سطح گرانول شده و از گرانول در برابر اتصال به حباب های گاز و تنش برشی درون راکتور UASB محافظت می نماید [۱۳].

۴- نتیجه گیری

اکثر تئوری های ارائه شده در مورد گرانول سازی بر این موضوع تأکید می کنند که باکتری استوتروفیک و متانوژن متانوثریکس نقش کلیدی در فرایند گرانوله شدن لجن ایفا می نماید. برخی معتقدند که باکتری متانوسارسینا تشکیل گرانول را بهبود می بخشد. توافق قابل ملاحظه ای بر روی این مطلب وجود دارد که مرحله آغازین گرانوله شدن، اتصال و چسبندگی باکتریایی (یک فرایند فیزیکی- شیمیایی) است که به موازات اوایل مرحله تشکیل زیست لایه صورت می پذیرد. باکتری ها فاقد یک مرز سطحی مشخص و دقیق، هندسه ساده یا ترکیب سطح مولکولی یکنواخت می باشند. در حقیقت، واکنش های شیمیایی داخلی منجر به تغییرات در ترکیب مولکولی، هم در داخل و هم در سطح می گردند. به هر حال، توضیح تمام جنبه های پیچیده چسبندگی باکتریایی تنها با پرداختن به این پدیده به عنوان یک فرایند شیمی- فیزیکی محدود می شود.

ECP نقش مهمی در فرایند گرانوله شدن دارد و به عنوان منعقدکننده مولکولی نقش یک عامل تحریک کننده برای گرانولاسیون بی هوازی را ایفا می نماید. همچنین زمان گرانولاسیون و رفتار چسبندگی ذرات لجن به شرایط موجود در راکتور و نوع رشد مایه بستگی دارد. اگرچه اکثر توجهات در تئوری های گرانوله شدن به سمت شرایطی می رود که بر اتصال و چسبندگی باکتریایی تأثیر می گذارد، هنوز هم شستشو و خارج کردن گزینشی لجن پراکنده از درون راکتور که در نتیجه آن رشد توده های لجن حفظ شده (سنگین تر) افزایش می یابد، برای فرایند گرانوله شدن ضرورت بیشتری دارد. به این منظور، حضور ذرات بی اثر که باکتری ها بتوانند بر روی سطح آن ها بچسبند، کاملاً مفید است. با این وجود ذرات باید قابلیت ته نشینی خوبی داشته باشند، در غیر این صورت شستشو و فرار لجن به صورت ناخواسته رخ می دهد.

¹ Tay et al.

² Hydration Layer

³ Embryonic granules

⁴ Granule maturation

⁵ Post- maturation

- 1- Hulshoff Pol, L.W., De Zeeuw, W.J., Velzeboer, C.T.M., and Lettinga, G. (1983). "Granulation in UASB reactors." *Water Sci. Technol.*, 15(8-9), 291-304.
- 2- Pereboom, J.H.F. (1994). "Size distribution model for methanogenic granules from full scale UASB and IC reactors." *Water Sci. Technol.*, 30(12),211-221.
- 3- Dolfig, J. (1987). "Microbiological aspects of granular methanogenic sludge." Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, Netherlands.
- 4- Sam-Soon, P., Loewenthal, R.E., Dold, P.L., and Marais, G.V.R. (1987). "Hypothesis for pelletisation in the upflow anaerobic sludge bed reactor ." *Water S. A.*, 13(2), 69-80.
- 5- Wiegant, W. M. (1987). "The spaghetti theory on anaerobic sludge formation, or the inevitability of granulation." In: Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J. T.C., and Hulshoff Pol, L. W (Eds.) *Granular anaerobic sludge: Microbiology and technology*, Pudoc. Wageningen, Netherlands.
- 6- Chen, J., and Lun, S.Y. (1993). "Study on mechanism of anaerobic sludge granulation in UASB reactors." *Water Sci. Technol.*, 28(7),171-178.
- 7- Dubourgier, H.C., Prensier, G., and Albagnac, G. (1987). "Structure and microbial activities of granular anaerobic sludge." In: Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J. T .C., and Hulshoff Pol, L. W. (Eds.) *Granular anaerobic sludge: Microbiology and technology*, Pudoc. Wageningen, Netherlands.
- 8- Morgan, J. W., Evison, L.M., and Forster, C.F. (1991). "Internal architecture of anaerobic sludge granules." *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 50, 211-226.
- 9- De Zeeuw, W.J. (1987). "Granular sludge in UASB reactors." In: Lettinga, G., Zehnder, A.J.B., Grotenhuis, J. T.C., and Hulshoff Pol, L. (Eds.) *Granular anaerobic sludge: Microbiology and technology*, Pudoc. Wageningen, Netherlands.
- 10- McLeod, F.A., Guiot, S.R., and Costerton, J. W. (1990) "Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor." *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6),1598-1607.
- 11- Schmidt, J.E., and Ahring, B.K. (1996). "Review: Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors." *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 229-246.
- 12- Thaveesri, J., Daffonchio, D., Liessens, B., Vandermeren, P., and Verstraete, W. (1995). "Granulation and sludge bed stability in upflow anaerobic sludge bed reactors in relation to surface thermodynamics." *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(10),3681-3686.
- 13- Tay, J.H., Xu, H.L., and Too, K.C. (2000). "Molecular mechanism of granulation. I: W translocation-dehydration theory." *J. Environ. Eng.*, 126,403-410.
- 14- Hulshoff Pol, L. W., de Castro Lopes, S. I., Lettinga, G., and Lens, P.N.L. (2004). "Anaerobic sludge granulation." *Water Research*, 38, 1376-1389.
- 15- Zhou, E., Imai, T., Ukita, M., Li, F., and Yuasa, A. (2007). "Effect of loading rate on the granulation process and granular activity in a bench scale UASB reactor." *Bioresource Technology*, 98 (7), 1386-1392.
- 16- Randall, A. W., and Richard, R. D. (1997). "Laboratory studies on enhancement of granulation in the anaerobic sequencing batch reactor." *Water Sci. Technol.*, 36 (4), 279-286.