

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
MSc ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ



Μεταπτυχιακή εργασία

Παναγιώτα Προδρόμου

Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic
Denitrification by Klebsiella sp. BWM5

Επιβλέπων καθηγητής

Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

Μάιος, Λεμεσός 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
MSc ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΒΙΟΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
Μεταπτυχιακή διατριβή

Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic
Denitrification by Klebsiella sp. BWM5

Προδρόμου Παναγιώτα

Λεμεσός 2016

ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή

**Simultaneous Heterotrophic Nitrification and Aerobic
Denitrification by Klebsiella sp. BWM5**

Παρουσιάστηκε από

Προδρόμου Παναγιώτα

Επιβλέπων καθηγητήςΔρ. Ιωάννης Βυρίδης.....

Μέλος επιτροπήςΔρ. Μιχάλης Κουτινάς.....

Μέλος επιτροπήςΔρ. Μάρλεν Ίνες Βάσκες.....

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Prodromou Panayiota 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής από το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Η παρούσα εργασία είναι αποτέλεσμα εκτενούς αναζήτησης και έρευνας. Αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Περιβαλλοντικές Βιοεπιστήμες και Τεχνολογία του τμήματος Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης περιβάλλοντος.

Πριν την παρουσίαση των αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους από τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίησή της.

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Ιωάννη Βυρίδη επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε. Ο κύριος Βυρίδης στάθηκε αρωγός στην ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας προσφέροντας με μεγάλη προθυμία τις γνώσεις του περί του παρόντος θέματος.

Τέλος αφιερώνω παρούσα πτυχιακή εργασία στην οικογένεια μου για την απρόσκοπτη και ανιδιοτελή στήριξη που μου παρέχουν, από την πρώτη μέρα της ζωής μου μέχρι και σήμερα.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, σε παγκόσμιο και κυρίως σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, παρατηρείται μια προσπάθεια για θέσπιση διαρκώς αυστηρότερων νόμων, που αφορούν την πολιτική περιβάλλοντος, αντικατοπτρίζοντας την αυξημένη οικολογική συνείδηση του συνόλου των πολιτών. Παράλληλα, αναζητούνται μέθοδοι και τεχνικές προκειμένου να επιτυγχάνεται περιορισμός της ρύπανσης σε όλους τους τομείς δραστηριότητας των ανθρώπων.

Στις μέρες μας αποτελεί στόχο, τόσο η προστασία του περιβάλλοντος όσο και της δημόσιας υγείας. Προς αυτή την κατεύθυνση γίνεται έλεγχος και διαχείριση των περιβαλλοντικών υδάτων, προκειμένου να διατηρηθεί η βιοποικιλότητα και να προστατευθεί η δημόσια υγεία. Για την επίτευξη του στόχου αυτού καλό είναι να επιτυγχάνεται η απομάκρυνση μεταξύ άλλων και του αζώτου από τα ύδατα. Έτσι η βιολογική απομάκρυνση τόσο του οργανικού φορτίου, όσο και των θρεπτικών συστατικών (κυρίως αζώτου και φωσφόρου) έχει καταστεί πλέον επιτακτική ανάγκη.

Η βιολογική απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών αποτελεί συμβατική μέθοδο που είναι ευρέως διαδεδομένη και οικονομικά αποδοτική για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων και για την αποφυγή του ευτροφισμού.

Η βιολογική απομάκρυνση του αζώτου επιτυγχάνεται με τις διεργασίες της νιτροποίησης και της απονιτροποίησης. Η νιτροποίηση γίνεται κάτω από αερόβιες συνθήκες με τη συνδρομή αυτότροφων βακτηρίων, που σε πρώτη φάση μετατρέπουν την αμμωνία σε νιτρώδες άζωτο και στη συνέχεια ακολουθεί οξείδωση των νιτρώδων προς νιτρικά. Η απονιτροποίηση συνίσταται στην αναγωγή των νιτρικών προς αέριο άζωτο, με τη βοήθεια προαιρετικά αερόβιων ετερότροφων μικροοργανισμών.

Η συμβατική μέθοδος δύσκολα μπορεί να εφαρμοσθεί σε *in vivo* συνθήκες, λόγω της πολυπλοκότητας του υδάτινου οικοσυστήματος.

Στο υδάτινο οικοσύστημα η κατανομή του διαλυμένου οξυγόνου είναι άνιση και το οργανικό υπόστρωμα που είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι ανεπαρκές με αποτέλεσμα να παρατηρείται χαμηλό ποσοστό νιτροποίησης.

Επιπλέον, η εφαρμογή της συμβατικής μεθόδου απομάκρυνσης αζώτου σε μονάδα διαχείρισης αποβλήτων, δύσκολα μπορεί να εφαρμοσθεί λόγω του γεγονότος ότι πρέπει να υπάρξει έκθεση των αποβλήτων, σε αερόβια και αναερόβια κατάσταση πράγμα που καθιστά δύσκολη τη διαδικασία λόγω της δυσκολίας απομάκρυνσης του διαλυμένου οξυγόνου, προκειμένου να εξασφαλισθεί ανοξική κατάσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η

δράση των απονιτροποιητικών βακτηρίων να είναι ανεπαρκής, λόγω της καταστολής της από τη μη ικανοποιητική αναεροβίωση.

Η καταστολή της διαδικασίας απονιτροποίησης έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της απομάκρυνσης του αζώτου ως στοιχειακού, διότι λόγω της μεγάλης χημικής συγγένειας του με το οξυγόνο σχηματίζει σημαντικές ποσότητες NO και N₂O . Ως ενδιάμεσα υποπροϊόντα της βιολογικής απομάκρυνσης του αζώτου, τόσο το NO όσο και το N₂O μπορούν να έχουν επιβλαβείς συνέπειες για το περιβάλλον. Συγκεκριμένα το NO είναι επικίνδυνο ατμοσφαιρικό ρύπο που οδηγεί στον σχηματισμό της όξινης βροχής. Επίσης το NO είναι ένα μόριο υψηλής διαδραστικότητας το οποίο μπορεί να είναι τοξικό για τα βακτηριακά κύτταρα . Το N₂O είναι γνωστό αέριο που προκαλεί το φαινόμενο του θερμοκηπίου ,λόγω του ότι αντιδρά με το οξυγόνο, με αποτέλεσμα να καταστρέφει το όζον. Η καταστροφή του όζοντος από την παραγωγή N₂O έχει υπολογιστεί ότι προκαλεί 320 φορές μεγαλύτερη υπερθέρμανση από την καταστροφή που έχει προκληθεί από το CO₂.

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον, όσο αφορά στη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση έχει στραφεί σε μια σειρά από νέες τεχνολογίες για την αφαίρεση του αζώτου, οι οποίες έχουν σαν στόχο την αλλαγή του δρόμου της νιτροποίησης και της απονιτροποίησης. Έχει αναπτυχθεί ένα πλήθος από τεχνολογίες για τη βιολογική απομάκρυνση του αζώτου που έχουν σαν στόχο την αύξηση της απόδοσης και τη μείωση του κόστους επένδυσης και λειτουργίας. Σε αυτό το πλαίσιο περιλαμβάνονται και μια σειρά από τεχνολογίες που έχουν ως στόχο τη βιολογική αφαίρεση του αζώτου διαμέσου των διεργασιών νιτροποίησης – απονιτροποίησης με ταυτόχρονη παράκαμψη της παραγωγής νιτρικού αζώτου.

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι πολλοί μικροοργανισμοί, με την παρουσία οξυγόνου είναι ικανοί να πραγματοποιήσουν τόσο τη νιτροποίηση, όσο και την απονιτροποίηση, συμβάλλοντας έτσι στην απομάκρυνση του αζώτου από το υδάτινο περιβάλλον. Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν προσελκύσει την προσοχή των επιστημόνων λόγω του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξης τους και της ικανότητας τους να μετατρέπουν τα νιτρικά και τα νιτρώδη σε αέριο άζωτο. Σήμερα έχει αποδειχθεί ότι κάποιες ομάδες ετερότροφων μικροοργανισμών μπορούν να κάνουν αερόβια απονιτροποίηση, όπως είναι ο *Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas stutzeri* και *Microvirgula aerodenitrificans*.

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι να εντοπιστούν και να ταυτοποιηθούν μικροοργανισμοί που πιθανότατα μπορούν να συμβάλουν στη διαδικασία της νιτροποίησης- απονιτροποίησης και γενικότερα στην απομάκρυνση του αζώτου σε περιβάλλον παρουσίας οξυγόνου. Επιπλέον, με μια σειρά πειραμάτων, όπου θα διαφοροποιηθεί μια σειρά από παραμέτρους, θα βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες, στις οποίες υπάρχει μεγαλύτερη απόδοση.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών στις περιβαλλοντικές βιοεπιστήμες του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου.

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1- Εισαγωγή.....	8
1.1 Βιολογική Απομάκρυνση του αζώτου	
1.2 Ρύπανση Περιβάλλοντος – Ρύπανση νερού	
1.3 Κυριότερες πηγές θρεπτικών συστατικών του αζώτου στο περιβάλλον.....	9
1.4 Ενώσεις Αζώτου στο περιβάλλον	
1.5 Αμμωνία- Αμμωνιακά στο περιβάλλον.....	10
1.6 Οργανικό άζωτο στο περιβάλλον	
1.7 Νιτρώδη ιόντα στο περιβάλλον.....	11
1.8 Νιτρικά ιόντα	
Κεφάλαιο 2- Επεξεργασία υγρών αποβλήτων και Νιτρορύπανση.....	13
2.1 Επεξεργασία αποβλήτων	
2.2 Νιτρορύπανση – Τρόποι αντιμετώπισης.....	14
2.3 Μέτρα Προστασίας.....	16
2.4 Μέτρα Βελτιστοποίησης του προβλήματος	
2.5 Ευτροφισμός στο περιβάλλον.....	17
Κεφάλαιο 3- Κύκλος του Αζώτου.....	18
3.1 Κύκλος του Αζώτου	
3.2 Η δέσμευση του αζώτου.....	19
3.3 Αφομοίωση του αζώτου.....	20
3.4 Νιτροποίηση.....	21
3.5 Απονιτροποίηση.....	22
3.5.1 Απονιτροποίηση και διαλυμένο Οξυγόνο.....	24
3.6 Νεότερες Τεχνολογίες αφαίρεσης αζώτου.....	25
3.6.1 Τεχνολογία SHARON	
3.6.2 Αναερόβια οξειδωση του αμμωνίου ANAMMOX.....	26
3.6.3 Αποαμμωνικοποίηση και OLAND.....	27
Κεφάλαιο 4- Μικροοργανισμός Klebsiella spp.....	29
Κεφάλαιο 5- Υλικά και Μέθοδοι.....	30

5.1 Απομόνωση μικροοργανισμού	
5.2 Πρώτη πειραματική δοκιμή.....	31
5.3 Προσδιορισμός βακτηριακής μάζας.....	32
5.4 Μεθοδολογία μέτρησης νιτρικών.....	33
5.4.2 Καμπύλη βαθμονόμησης νιτρικών	
5.5 Δεύτερη πειραματική δοκιμή.....	35
5.6 Μεθοδολογία μέτρησης αμμωνιακών- blue method.....	36
5.7 Τρίτη πειραματική δοκιμή.....	38
5.8 Τέταρτη πειραματική δοκιμή.....	39
5.9 Πέμπτη πειραματική δοκιμή.....	40
5.10 Μεθοδολογία μέτρησης νιτρωδών	
Κεφάλαιο 6- Αποτελέσματα πειραματικών διαδικασιών.....	42
6.1 Πειραματική Ενότητα 1- Μετρήσεις και αποτελέσματα NO_3^-	
6.2 Πειραματική Ενότητα 2- Μετρήσεις και αποτελέσματα NH_4^+	48
6.3 Πειραματική Ενότητα 3- Μετρήσεις και αποτελέσματα NH_4^+	54
6.4 Πειραματική Ενότητα 4- Μετρήσεις και αποτελέσματα NH_4^+	61
6.5 Πειραματική Ενότητα 5- Μετρήσεις και αποτελέσματα NO_3^-	65
Κεφάλαιο 7- Σχόλια και Συμπεράσματα	70
Κεφάλαιο 8-	

Κεφάλαιο 1- ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βιολογική απομάκρυνση του αζώτου

Τα υγρά απόβλητα είναι η βασικότερη πηγή ρύπανσης του υδάτινου υδροφορέα με αζωτούχες ενώσεις. Τα υγρά απόβλητα προκύπτουν από την χρησιμοποίηση του νερού για διάφορες δραστηριότητες, οι οποίες το επιβαρύνουν με ορισμένες ξένες προσμίξεις που το καθιστούν ακατάλληλο για περαιτέρω χρήση. Η επαναφορά του χρησιμοποιημένου νερού στη φύση, χωρίς να έχει τα αποδεκτά ποιοτικά χαρακτηριστικά, έτσι όπως καθορίζονται από τα πρότυπα ποιότητας, μπορεί να έχει καταστροφικά αποτελέσματα για το φυσικό περιβάλλον και τη δημόσια υγεία.

Κάθε ανθρώπινη δραστηριότητα, είτε αυτή ονομάζεται απλή διαβίωση, είτε πολύπλοκη παραγωγική δραστηριότητα (βιομηχανική) παράγει στερεά, υγρά και αέρια παραπροϊόντα, τα ονομαζόμενα απόβλητα, τα οποία στη συνέχεια πρέπει να απορριφθούν στο φυσικό περιβάλλον, αφού δεν έχουν πλέον άμεση χρησιμότητα για τον άνθρωπο.

Εφόσον ο ρυθμός διάθεσης των αποβλήτων συνεχώς αυξάνει με το πέρασμα του χρόνου, η ικανότητα της φύσης για απορρόφηση, δηλαδή επανένταξη των αποβλήτων στις φυσικές διεργασίες περιορίζεται σημαντικά, προκαλώντας έτσι σημαντικές διαταραχές στις φυσικές ισορροπίες. Προβάλλει επομένως, άμεσα και επιτακτικά η ανάγκη για τεχνολογική παρέμβασή που καθιστούν τα απόβλητα της ανθρώπινης δραστηριότητας ακίνδυνα για το περιβάλλον.

1.2 Ρύπανση Περιβάλλοντος- Ρύπανση Νερού

Το νερό είναι ουσιώδες συστατικό της ζωής και βασική πρώτη ύλη για την ανθρώπινη οικονομία. Μετά τη χρήση του, το νερό έχει αλλοιωμένα και υποβαθμισμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά, που δημιουργούν σοβαρά προβλήματα ρύπανσης και ακαταλληλότητας στον τελικό αποδέκτη. Αυτός μπορεί να είναι η θάλασσα, το ποτάμι, το έδαφος για κάθε επιθυμητή χρήση. Με δεδομένη την έλλειψη των υδατικών αποθεμάτων τα τελευταία χρόνια, η προστασία τόσο των αποθεμάτων αυτών και παράλληλα της δημόσιας υγείας καθώς και του περιβάλλοντος γενικότερα, επιβάλλουν την ανάγκη της επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων πριν από τη διάθεσή τους στον τελικό αποδέκτη. Ταυτόχρονα, ιδιαίτερη προσοχή δίνεται προς στην κατεύθυνση της απορρύπανσης όχι μόνο του νερού που προέρχεται από αστικά λύματα και βιομηχανικά υγρά απόβλητα, αλλά και του πόσιμου νερού, αφού αυτό σχετίζεται άμεσα με την ανθρώπινη υγεία.

Οι κύριες μορφές ρυπογόνων ουσιών στο νερό που πρέπει να εξουδετερωθούν πριν από τη διάθεση του στους φυσικούς του αποδεκτές είναι οι εξής:

- Διαλυτές οργανικές ουσίες και αιωρούμενα στερεά.
- Άζωτο και Φώσφορος
- Τοξικές χημικές ουσίες, βαρέα μέταλλα και ραδιενεργά υλικά.

Αυτές οι ρυπογόνες ουσίες βρίσκονται στο νερό των λυμάτων ή στο δίκτυο ύδρευσης, εάν πρόκειται για πόσιμο νερό.

1.3 Κυριότερες Πηγές Θρεπτικών Συστατικών του Αζώτου στο Περιβάλλον

Οι κυριότερες αιτίες του συνεχούς εμπλουτισμού του περιβάλλοντος και κυρίως των υδάτων με θρεπτικά συστατικά του αζώτου είναι οι αγροτικές και βιομηχανικές δραστηριότητες και τα οικιακά απόβλητα.

Το κυριότερο πρόβλημα από την παρουσία τους στο περιβάλλον είναι ο ευτροφισμός στα υδάτινα οικοσυστήματα. Η βασικότερη πηγή αζώτου που προκαλεί τον ευτροφισμό είναι η χρήση λιπασμάτων και απορρυπαντικών, ακόμη και η διάθεση λυμάτων και αποβλήτων που περιέχουν μεγάλες ποσότητες νιτρικών αλάτων.

1.4 Ενώσεις Αζώτου

Οι ενώσεις του αζώτου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην αξιολόγηση της ρύπανσης των νερών. Το άζωτο συντελεί στη δημιουργία του ευτροφισμού των νερών και ιδιαίτερα των θαλασσών, όπου κατά κανόνα η διαθέσιμη ποσότητα του εμφανίζεται ως περιοριστικός παράγοντας.

Το άζωτο απαντά με διάφορες βαθμίδες οξειδωσης από +5 μέχρι και -3. Οι κυριότερες ενώσεις του αζώτου που απαντώνται στο υδάτινο περιβάλλον είναι:

- Νιτρικά ιόντα
- Αμμωνιακά ιόντα
- Νιτρώδη ιόντα
- Οργανικό άζωτο

Όλες αυτές οι ενώσεις, ακόμη και το διαλυμένο αέριο άζωτο, είναι αφομοιώσιμες μορφές από τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στη διαμόρφωση του κύκλου του αζώτου.

1.5 Αμμωνία-Αμμωνιακά ιόντα στο περιβάλλον

Η αμμωνία κατά τη διάλυση της στο νερό σχηματίζει αμμωνιακά ιόντα. Τα αμμωνιακά ιόντα NH_4^+ ή NH_4OH ή NH_3 απαντώνται σε όλα τα επιφανειακά νερά. Στα αστικά λύματα και βιομηχανικά απόβλητα παρατηρούνται οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων. Η συγκέντρωση τους στα υπόγεια νερά είναι πολύ μικρή έως και μηδενική.

Η αμμωνία προέρχεται κυρίως από την υδρόλυση της ουρίας και την αποικοδόμηση οργανικών αζωτούχων ενώσεων. Επειδή είναι προϊόν μικροβιακών δράσεων, η παρουσία αμμωνιακών ιόντων αποτελεί ένδειξη ρύπανσης των νερών από οργανικές ενώσεις και παρουσία μικροοργανισμών. Γι' αυτό, τα πόσιμα νερά που περιέχουν ίχνη αμμωνιακών ιόντων κρίνονται ακατάλληλα.

Σημαντικό ακόμη είναι ότι τα ιόντα αμμωνίου μπορούν να οξειδωθούν από τα βακτήρια σε νιτρώδη και νιτρικά (νιτρογενής απαίτηση οξυγόνου) με αποτέλεσμα τη μείωση του διαθέσιμου διαλυμένου οξυγόνου που είναι διαθέσιμο από τους υδάτινους αποδέκτες αναλόγως της ελάττωσης που προκαλείται από την οξείδωση των αζωτούχων οργανικών ουσιών (βιοχημική απαίτηση οξυγόνου).

Από τοξικολογικής πλευράς τα ιόντα του αμμωνίου δεν είναι επικίνδυνα για τον άνθρωπο. Όμως τα ψάρια είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο αλκαλικό περιβάλλον. Επιπλέον, η χρήση του οξυγόνου για την οξείδωση των αμμωνιακών ιόντων ελαττώνει τη συγκέντρωση του στο νερό και κατ' επέκταση δυσχεραίνεται η απορρόφηση του από τα βράγχια (McKee and Wolf, 1963). Ως όριο ανοχής για τα ψάρια γενικά δίνεται η συγκέντρωση των 0.2 ppm.

Η αμμωνία επίσης, όπως και τα ιόντα αμμωνίου είναι σε χημική ισορροπία στο περιβάλλον. Η αναλογία $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ καθορίζεται κατά κύριο λόγο από την τιμή του pH και δευτερευόντως από τη θερμοκρασία. Οπότε με ενδεχόμενη αύξηση της θερμοκρασίας και του pH όλο και περισσότερη αμμωνία θα παράγεται.

1.6 Οργανικό άζωτο στο περιβάλλον

Τα επιφανειακά νερά περιέχουν μικρές ποσότητες αζωτούχων ενώσεων που απελευθερώνονται μετά το θάνατο των φυτών. Οι αζωτούχες ενώσεις στα επιφανειακά νερά απαντώνται με τη μορφή διαλυτών, κολλωδών και αδιάλυτων αζωτούχων οργανικών ενώσεων και προέρχονται από τις αμίνες και τα αμινοξέα που παράγονται από τη φωτοσύνθεση.

Μετά το θάνατο των ζωντανών οργανισμών και κατά τη διαδικασία της αποσύνθεσης τους απελευθερώνεται άζωτο, το οποίο οι διάφοροι μικροοργανισμοί μετατρέπουν με τη βιολογική

αποικοδόμηση σε NO_2^- και NO_3^- (νιτροποίηση). Επομένως, το άζωτο των οργανικών ενώσεων αποτελεί μια παράμετρο ελέγχου της ποιότητας και του βαθμού ρύπανσης των υδάτων.

1.7 Νιτρώδη ιόντα στο περιβάλλον

Τα νιτρώδη ιόντα είναι μια ενδιάμεση βαθμίδα της κλίμακας του σθένους του αζώτου. Προέρχονται τόσο από την οξείδωση της αμμωνίας, όσο και από την αναγωγή των νιτρικών ιόντων. Η συγκέντρωση των νιτρωδών στα φυσικά νερά είναι πολύ μικρή, συνήθως κάτω από 0.1 ppm $\text{NO}_2\text{-N}$. Η συγκέντρωσή τους ελαττώνεται, επειδή οξειδώνονται προς νιτρικά ιόντα.

Η παρουσία τους στο πόσιμο νερό το καθιστά ακατάλληλο για πόση, επειδή αποτελεί ένδειξη παρουσίας μικροοργανισμών που προκαλούν αποσύνθεση των πρωτεϊνούχων ενώσεων. Τα νιτρώδη βρίσκονται στα νερά ψύξης των βιομηχανιών, όπου προστίθενται ως αντιδιαβρωτικά, σε διάφορα βιομηχανικά απόβλητα και σε απόβλητα που έχουν υποστεί βιολογικό καθαρισμό.

Τα νιτρώδη είναι επικίνδυνα για τον οργανισμό, διότι σε όξινο περιβάλλον αντιδρούν με τις δευτεροταγείς αμίνες, σχηματίζοντας έτσι τις νιτροζαμίνες RR-N-NO, που είναι καρκινογόνες. Εικάζεται ότι οι νιτροζαμίνες πιθανόν να σχηματίζονται στο όξινο περιβάλλον του στομάχου.

1.8 Νιτρικά ιόντα

Στα νιτρικά ιόντα το άζωτο βρίσκεται στην ανώτατη οξειδωτική του κατάσταση. Αυτά είναι θερμοδυναμικώς σταθερά και οι μεταβολές της συγκέντρωσής τους στα νερά οφείλονται μόνο σε διάφορες βιολογικές δράσεις.

Η συγκέντρωση των νιτρικών στα φυσικά νερά είναι πολύ μικρή, ενώ ορισμένα υπόγεια νερά εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις.

Η ανώτατη επιτρεπτή τιμή των νιτρικών στο πόσιμο νερό είναι 50 ppm δηλαδή 500 φορές μεγαλύτερη των νιτρωδών. Στην πράξη γίνεται προσπάθεια η συγκέντρωση των νιτρικών να μην υπερβαίνει τα 10 ppm. Όταν το πόσιμο νερό υπόκειται σε καθαρισμό με ενεργό άνθρακα τότε είναι δυνατό να παρατηρηθεί αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη, τα οποία είναι ιδιαίτερα επικίνδυνα για την υγεία.

Τα νιτρικά αποτελούν φυσιολογικό συστατικό των τροφών και ιδίως των λαχανικών και των καπνιστών κρεάτων, ενώ περιστασιακά βρίσκονται και στο πόσιμο νερό. Τα νιτρικά ιόντα απορροφώνται εύκολα από το αίμα και αποβάλλονται κυρίως με τα ούρα. Ενώ τα ίδια τα νιτρικά είναι αβλαβή για τον ανθρώπινο οργανισμό, ο κίνδυνος δημιουργείται από την αναγωγή τους στο έντερο από βακτήρια σε νιτρώδη, τα οποία δεσμεύουν και οξειδώνουν την

αιμοσφαιρίνη, του αίματος με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη μείωση της πρόσληψης και μεταφοράς οξυγόνου στα κύτταρα και έχει ως συνέπεια τη μεθαιμοσφαιριναιμία, σοβαρή ασθένεια που μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στον θάνατο. Η κύρια κλινική εκδήλωση της πάθησης είναι η κυάνωση και παρατηρείται ιδιαίτερα σε βρέφη ηλικίας μέχρι 6 μηνών.

Με βάση το πιο πάνω σύνδρομο της κυάνωσης το οποίο αποτελεί και την οξεία μορφή ασθένειας, για σκοπούς πρόληψης έχει καθοριστεί και η ανώτατη επιτρεπόμενη τιμή συγκέντρωσης των νιτρικών στο πόσιμο νερό. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει θεσπίσει από το 1984 για την τιμή αυτή τα 50 mg/l και την επιβεβαίωσε το 1997.

Κεφάλαιο 2- Επεξεργασία υγρών αποβλήτων και Νιτρορύπανση

2.1 Επεξεργασία αποβλήτων

Σε κάθε ανθρώπινη κοινότητα παρατηρείται παραγωγή υγρών και στερεών αποβλήτων. Η δραστηριότητα αυτή έχει ως στόχο την παραγωγή προϊόντων, που είναι χρήσιμα για τον άνθρωπο. Αυτά χρειάζονται πρώτες ύλες, ανάμεσα στις οποίες είναι και το νερό. Από αυτή τη δραστηριότητα προκύπτουν και παραπροϊόντα, τα οποία εφόσον δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω, πρέπει να διατεθούν άμεσα στο φυσικό περιβάλλον. Τα παραπροϊόντα αυτά ονομάζονται απόβλητα και διακρίνονται σε στερεά, υγρά ή αέρια ανάλογα με τη βασική τους φάση και σε αστικά, εμπορικά, βιομηχανικά και αγροτικά, ανάλογα με την πηγή προέλευσής τους.

Η βιομηχανική ανάπτυξη όλων των χωρών τα τελευταία χρόνια και η παραγωγή και αποχέτευση μεγάλων ποσοτήτων αστικών και άλλων υγρών αποβλήτων σε παράκτιες και άλλες περιοχές, δημιούργησαν σοβαρές επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον, όσο και στη δημόσια υγεία, λόγω της ανεξέλεγκτης εισαγωγής των ανεπεξέργαστων υγρών αποβλήτων στον κύκλο του νερού. Έτσι, λοιπόν, η ανάγκη για προστασία της δημόσιας υγείας και των φυσικών οικοσυστημάτων, της ποιότητας ζωής, της αποφυγής της ρύπανσης των φυσικών υδάτινων αποδεκτών οδήγησε την ανθρωπότητα στην εξεύρεση τρόπων, με τους οποίους θα πραγματοποιείτο η επεξεργασία των αποβλήτων αυτών.

Έτσι, για την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων άρχισαν να χρησιμοποιούνται και διάφορες φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες οι οποίες συμβαίνουν στο φυσικό περιβάλλον με την αλληλεπίδραση του νερού, του εδάφους, της ατμόσφαιρας και μικροοργανισμών. Γνωστά φυσικά συστήματα επεξεργασίας είναι τα βραδείας εφαρμογής, ταχείας διήθησης, επιφανειακής ροής, τεχνητών υδροβιοτόπων και τα συνδυασμένα γήινα.

Η επιτακτική ανάγκη της αποφυγής της ρύπανσης του περιβάλλοντος επέβαλε άμεσα την τεχνολογική παρέμβαση, η οποία θα αναπληρώσει, θα υποβοηθήσει ή θα επιταχύνει τα φυσικά συστήματα, με αποτέλεσμα σήμερα η επεξεργασία να βασίζεται σε συνδυασμό από τεχνητές φυσικοχημικές και βιολογικές διεργασίες. Στην ταξινόμηση των διαφόρων διεργασιών αναγνωρίζουμε τα εξής επίπεδα:

- την προεπεξεργασία η οποία βασίζεται στη χρήση κάποιων φυσικών λειτουργιών, όπως είναι το σχάρισμα, η αμμοσυλλογή, η λιποσυλλογή και η εξισορρόπηση, που στοχεύουν στην προετοιμασία των αποβλήτων για την κυρίως επεξεργασία.

- την πρωτοβάθμια επεξεργασία, όπου με τη βοήθεια της καθίζησης και της επίπλευσης απομακρύνονται κατά ένα ποσοστό τα αιωρούμενα στερεά .
- τη δευτεροβάθμια επεξεργασία, όπου χρησιμοποιείται συνδυασμός φυσικοχημικών και βιολογικών μεθόδων για την απομάκρυνση των κολλοειδών και του μεγαλύτερου ποσοστού από το οργανικό φορτίο των αποβλήτων με βιοαποδόμηση.
- την τριτοβάθμια, όπου στόχος είναι η βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του αποβλήτου, χρησιμοποιώντας μεθόδους για την απομάκρυνση άλλων συστατικών, όπως το άζωτο και ο φώσφορος, τα οποία δεν μειώνονται σημαντικά με τη δευτεροβάθμια επεξεργασία.

2.2 Νιτρορύπανση – Τρόποι αντιμετώπισης

Όπως προαναφέρθηκε το άζωτο είναι διαλυτό στα υγρά απόβλητα σε πολλές μορφές όπως αμμωνία, νιτρώδη και νιτρικά, αλλά και σε οργανικό άζωτο. Επιπρόσθετα εμπεριέχεται σε αιωρούμενα οργανικά σωματίδια. Η ύπαρξη της αμμωνίας στα λύματα είτε με την ελεύθερη μορφή ιόντων αμμωνίου, εξαρτάται από το pH και τη θερμοκρασία.

Η μέση περιεκτικότητα στα αστικά λύματα για παράδειγμα είναι περίπου 40 mg/L NH_4^+ -N και 20 mg/L ως οργανικό άζωτο. Οι ενώσεις του οργανικού αζώτου διασπώνται και υδρολύονται από φυσικά απαντώμενους μικροοργανισμούς, παράγοντας έτσι αμμωνία, διαμέσου της βιολογικής διεργασίας της αμμωνικοποίησης. Στα βιομηχανικά υγρά απόβλητα οι συγκεντρώσεις του αζώτου είναι κατά πολύ μεγαλύτερες, σε σχέση με τα αστικά λύματα. Επίσης τα απόβλητα αυτά χαρακτηρίζονται και από υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών.

Αναφορά	Βιομηχανία	Συγκέντρωση N (mg/L)
Adams and Eckenfelder (1972)	Παραγωγή άνθρακα	<450
Koziorowski and Kucharski (1972)	Δυλιστήριο	865
Hutton and La Rocca (1975)	Αεριοποίηση άνθρακα	<1000
Hutton and La Rocca	Λιπάσματα	200-940
Hutton and La Rocca	Συνθετικών ινών	800

Meinck et al.	Σφαγείο	145
ATV	Χοιροστάσιο	2300
Braun R.	Φάρμα Βοδιών	500-2300
Neumann and Viehl	Λιπασματοποίηση	807
Zall R.	Γαλακτοκομείο	<625
Adams and Eckenfelder (1975)	Χαρτί και κυτταρίνη	264
Brown G.	Φαρμακευτικά	475

Η εξάπλωση της νιτρορύπανσης σε παγκόσμιο επίπεδο αποτελεί ήδη ένα αποδεδειγμένα δυσάρεστο γεγονός. Οι σχετικές αναφορές αφορούν σε πλήθος χωρών με ιδιαίτερα συστηματικές έρευνες που έγιναν στις ΗΠΑ και την Ευρωπαϊκή Ένωση. Ειδικά για την Ευρώπη, αποτελέσματα μελετών δείχνουν ότι οι συγκεντρώσεις νιτρικών από απόπλυση καλλιεργούμενων εδαφών ξεπερνούν την κατευθυντήρια τιμή των 25 mg/l στο 87% των γεωργικών εκτάσεων της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ενώ υπερβαίνουν το όριο των 50mg/l στο 22% των εκτάσεων.

Θεωρώντας ως πρωτεύοντα στόχο τη μείωση των τιμών των συγκεντρώσεων στο πόσιμο νερό, η γενική πολιτική αντιμετώπισης της νιτρορύπανσης στηρίζεται σε κάποιες βασικές αρχές:

- i. την εξαιρετικά δύσκολη, δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία απομάκρυνσης των νιτρικών από το νερό
- ii. την αύξηση του μέσου επιπέδου νιτρικών σε πολλούς υδροφορείς
- iii. την αρχή «ο ρυπαίνων πληρώνει»
- iv. την αρχή της εφαρμογής πρόληψης στην πηγή, και
- v. την αρχή της αειφορίας

Στο πλαίσιο αυτών των αρχών που συνδέονται άμεσα τόσο με τη φυσική, όσο και με την οικονομική διάσταση του προβλήματος, αναπτύσσονται διάφορα μέτρα και δράσεις που διαχωρίζονται σε μέτρα προστασίας και μέτρα θεραπείας.

2.3 Μέτρα Προστασίας

Τα μέτρα αυτά αφορούν σε δράσεις που έχουν άμεση σχέση με τον έλεγχο των ποσοτήτων των νιτρικών που εισέρχονται στο σύστημα εδάφους - νερού και απευθύνονται κυρίως στο

αγροτικό τομέα. Τα μέτρα θεραπείας συνιστούν δράσεις που ασκούνται στα σημεία άντλησης νερού ή αμέσως μετά, με στόχο τη συμμόρφωση με τα ισχύοντα όρια του πόσιμου νερού.

Γενικότερα σε παγκόσμιο επίπεδο έχει επικρατήσει η τάση να δίνεται προτεραιότητα στην πρόληψη της ρύπανσης, η κατηγορία των σχετικών δράσεων περιλαμβάνει σαφώς τις κύριες διαχειριστικές επιλογές. Οι σημαντικότερες μορφές μέτρων πρόληψης είναι η βελτίωση των γεωργικών πρακτικών, οι αλλαγές χρήσεων γης, ο καθορισμός ζωνών προστασίας και τα οικονομικά μέτρα ελέγχου.

Η βελτίωση των γεωργικών πρακτικών αφορά σε ένα σύνολο δράσεων, όπως είναι η ορθολογική χρήση των λιπασμάτων, η φυτοκάλυψη και η βελτιστοποίηση συστημάτων και μεθόδων καλλιέργειών. Οι δράσεις αυτές εντάσσονται σε συγκεκριμένους κώδικες ορθής γεωργικής πρακτικής. Οι αλλαγές στις χρήσεις γης αποτελούν λύση που συνήθως έχει πρόσθετες κοινωνικό-οικονομικές συνέπειες. Ο χαρακτηρισμός, σύμφωνα με προκαθορισμένα κριτήρια, ζωνών ευπρόσβλητων στα νιτρικά, αποτελεί τη σύγχρονη βασική πολιτική προστασίας των υπόγειων νερών. Τέλος, τα οικονομικά μέτρα ελέγχου της ρύπανσης, οριοθετούν μια νέα αντίληψη πολιτικής διαχείρισης της.

2.4 Μέτρα Βελτιστοποίησης του προβλήματος

Παρόλο που η κυρίαρχη τάση είναι αυτή της πρόληψης στην πηγή, υπάρχει σήμερα ένας μεγάλος αριθμός ρυπασμένων ήδη υδροφορέων, για τους οποίους θα πρέπει να εξετάζεται με προσοχή η εξυγίανση τους και γενικά η χρήση τους.

Τα μέτρα θεραπείας αφορούν στις περιπτώσεις προϋπάρχουσας ρύπανσης και οι πιο σημαντικές μορφές τους είναι :

- i. μεταφορά νερού από άλλες πηγές
- ii. ανάμειξη νερών με υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών
- iii. επεξεργασία των υφιστάμενων υδατικών πόρων.

Όλες οι μορφές χαρακτηρίζονται από το συνήθως υψηλό κόστος, γεγονός που αποτελεί και το κριτήριο επιλογής τους.

2.5 Ευτροφισμός στο περιβάλλον

Είναι γνωστό ότι οι αυτότροφοι οργανισμοί μετατρέπουν απλές οργανικές ενώσεις, όπως είναι το διοξείδιο του άνθρακα, τα νιτρικά και τα φωσφορικά ιόντα σε διάφορες οργανικές ενώσεις. Χαρακτηριστικοί αυτότροφοι οργανισμοί είναι τα άλγη που υπάρχουν στα νερά

Οι ετερότροφοι οργανισμοί καταναλώνουν οργανικές ουσίες που παράγουν οι αυτότροφοι και παράγουν στη συνέχεια δικές τους πολυπλοκότερες σε μορφή.

Οι αποσυνθέτες είναι υποδεέστεροι των ετερότροφων οργανισμών και ο ρόλος τους είναι να αποσυνθέτουν ουσίες.

Η παραγωγικότητα της πιο πάνω τροφικής αλυσίδας ρυθμίζεται από τα θρεπτικά συστατικά που βρίσκονται στο περιβάλλον . Ανάμεσα σε αυτά καθοριστικό ρολό παίζουν τα νιτρικά άλατα, αφού και όπως προαναφέρθηκε, βρίσκονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο φυσικό περιβάλλον.

Ο εμπλουτισμός των νερών με θρεπτικά συστατικά αζώτου ανατρέπει τη φυσιολογική αύξηση των αλγών. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ευτροφισμός . Τα είδη των αλγών που κατά κανόνα σχηματίζονται είναι ακατάλληλα ως τροφή του ζωοπλαγκτόν και παράλληλα καταπνίγουν την ανάπτυξη άλλων οργανισμών.

Η εμφάνιση του νερού είναι θολή, φαιοπράσινη και γενικά δίνει την εικόνα του βρόμικου. Τα νεκρά φύκη κατατάσσονται στον πυθμένα, όπου ανοικοδομούνται και προκαλούν ελάττωση του διαλυμένου οξυγόνου. Αυτό έχει ως άμεση συνέπεια την επικράτηση των αναερόβιων διασπάσεων που οδηγούν στη δημιουργία δυσοσμίας.

Κεφάλαιο 3- Κύκλος του αζώτου

3.1 Κύκλος του αζώτου

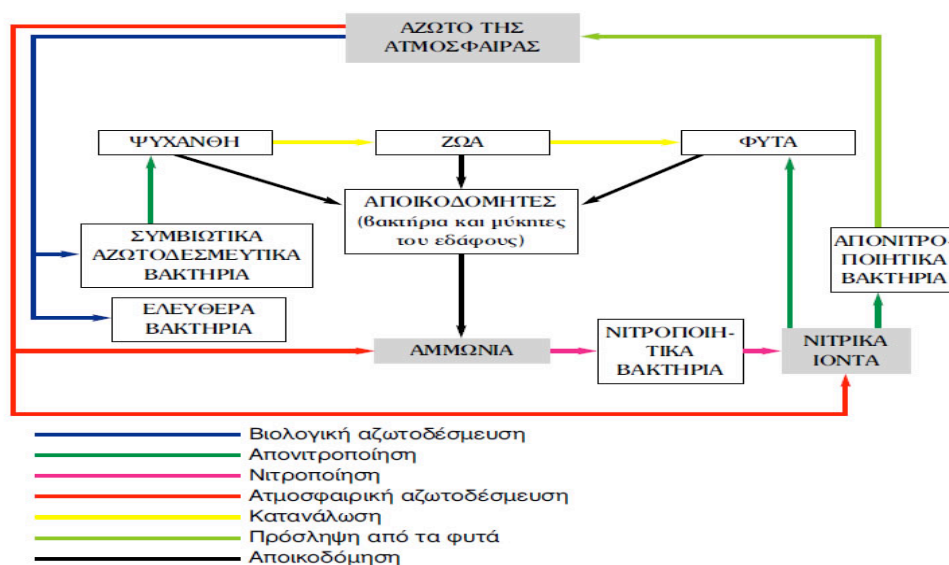
Όπως κάθε κύκλος χημικών στοιχείων στη φύση έτσι και ο κύκλος του αζώτου βασίζεται στις δυναμικές ισορροπίες, ανάμεσα στις διάφορες μορφές ανόργανων και οργανικών ενώσεων του. Στην περίπτωση του αζώτου οι δυναμικές σχέσεις εκτείνονται και μεταξύ ενώσεων διαφορετικών οξειδωτικών καταστάσεων, πράγμα που κάνει τον κύκλο του αζώτου ιδιαίτερα περίπλοκο.

Τρία ακόμη κύρια στοιχεία που πρέπει να επισημανθούν είναι:

- i. Ο σημαντικός ρόλος των βακτηρίων στη μετατροπή των οργανικών αζωτούχων ενώσεων σε ανόργανες και κυρίως νιτρικά.
- ii. Ο ρόλος του φυτοπλαγκτόν που συνθέτει πρωτεΐνες από ανόργανα συστατικά, NO_3^- , NO_2^- και NH_3 και από N_2 .
- iii. Η διαπίστωση ότι ο κύκλος του αζώτου δεν είναι κλειστός. Κάθε χρόνο 9×10^8 τόνοι αζωτούχων ενώσεων καταβυθίζονται προς τις αποθέσεις, ενώ άγνωστα ποσά αζώτου δεσμεύονται από τα κυανοπράσινα φύκη ή και με άλλο χημικό τρόπο που δεν έχει μέχρι τώρα ανιχνευθεί στη θάλασσα ή τις λίμνες. Ταυτόχρονα, νιτρικά κυρίως και διαλελυμένα οξείδια του αζώτου που προέρχονται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις στην ατμόσφαιρα και από την οξείδωση της αέριας αμμωνίας, που προέρχεται από την αποσύνθεση της οργανικής ύλης, υπολογίζονται σε 8×10^7 τόνους/χρόνο. Όλα αυτά εισέρχονται στη θάλασσα από την ατμόσφαιρα με τις βροχές και τα διάφορα επιφανειακά ύδατα.

Με τα ύδατα αυτά εισέρχονται τεράστια ποσά απόπλυσης καλλιεργήσιμων εδαφών, μεταφέροντας υπολείμματα των χρησιμοποιούμενων αζωτούχων λιπασμάτων. Οι άλλες δραστηριότητες του ανθρώπου (π.χ. οχετοί πόλεων, καύσεις ορυκτών καυσίμων κ.λπ.) και οι εισαγόμενες από τις βιομηχανίες αζωτούχες ουσίες, έχουν συχνά μεγάλη τοπική σημασία.

Εξετάζονται συνήθως σε συνάρτηση με τη ρύπανση του συγκεκριμένου υδάτινου αποδέκτη ακόμη και όταν εισάγουν αναντίρρητα μικρά, αλλά υπολογίσιμα ποσά θρεπτικών ουσιών, πού οπωσδήποτε μετέχουν στο γενικό κύκλο των θρεπτικών.



Ο κύκλος του αζώτου περιλαμβάνει:

- Τη δέσμευση (αναγωγή του διαζώτου) προς αμμωνία
- Την αφομοίωση του αζώτου των ανόργανων αζωτούχων ενώσεων προς αμινοξέα και πρωτεΐνες («οικοδόμηση»)
- Την αποικοδόμηση των οργανικών αζωτούχων ενώσεων και την αναγέννηση των νιτρικών – Νιτροποίηση.
- Την απονιτροποίηση

3.2 Η δέσμευση του αζώτου

Είναι γνωστή ή ικανότητα διαφόρων βακτηρίων στο έδαφος, είτε «ριζοβίων» είτε «ανεξαρτήτως δρώντων», να δεσμεύουν απ' ευθείας μοριακό άζωτο. Ανάλογα βακτήρια υπάρχουν και στο υδάτινο περιβάλλον, όπως είναι τα είδη *Clostridium* στις αποθέσεις, αν και έχουν διατυπωθεί αμφιβολίες για ύπαρξη ανάλογων αζωτοδεσμευτικών βακτηρίων στο θαλάσσιο νερό. Δεδομένου πάντως ότι η διεργασία της δεσμεύσεως είναι ενδόθερμη και απαιτεί ικανά ποσά ενέργειας με μορφή οργανικών ενώσεων, δεν φαίνεται πολύ πιθανό, έστω και αν τα βακτήρια υπάρχουν σε αφθονία, να δεσμεύουν σημαντικά ποσά μοριακού αζώτου

Η υπόθεση της χημικής αναγωγής του μοριακού αζώτου σε αμμωνία, με χρήση σύμπλοκων μετάλλων σε χαμηλή οξειδωτική κατάσταση με υποκαταστάτες χουμικά οξέα, απαιτεί πολύ ειδικές συνθήκες σχετικά υψηλού pH και πολύ χαμηλού pE που δύσκολα ικανοποιούνται ταυτόχρονα στα υδάτινα συστήματα. Αντίθετα η δέσμευση από τα κυανοπράσινα φύκη, όπως είναι το *Trichodesmium spp*, φαίνεται να δεσμεύει μεγάλα ποσά αζώτου σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, έστω και χωρίς μεγάλες συγκεντρώσεις

οργανικής ύλης. Για τις περιπτώσεις αυτές πιστεύεται ότι οι οργανισμοί εξασφαλίζουν τα απαιτούμενα ποσά ενέργειας από την ηλιακή ακτινοβολία, όπου το διάζωτο δρα ανάλογα προς τον άνθρακα ως δέκτης του υδρογόνου που ελευθερώνεται φωτοχημικά από το νερό, σε μια διεργασία ανάλογη προς τη φωτοσύνθεση, που βέβαια αναστέλλεται στο σκοτάδι.

Η ικανότητα αυτή απελευθερώνει το μικροοργανισμό από την ανάγκη πρόσληψης και μεταβολισμού αζωτούχων ενώσεων. Μάλιστα δεδομένου ότι για τις ενώσεις αυτές εκδηλώνεται έντονος ανταγωνισμός στα μικροβιακά οικοσυστήματα, η ικανότητα αζωτοδέσμευσης προσδίδει σημαντικό οικολογικό πλεονέκτημα στους αντίστοιχους οργανισμούς.

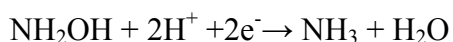
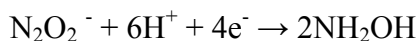
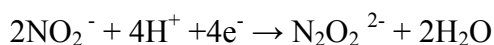
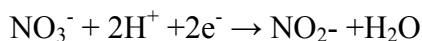
Η ικανότητα καθήλωσης αζώτου απαντά μόνο σε ορισμένους προκαρυώτες. Ποικίλοι προκαρυωτικοί οργανισμοί μπορούν να δεσμεύσουν άζωτο, όπως και αερόβιοι και αναερόβιοι. Από ότι γνωρίζουμε σε επιστημονικό επίπεδο μέχρι σήμερα, η αζωτοδέσμευση δεν εμφανίζεται σε κανέναν ευκαρυωτικό οργανισμό. Κατά την αζωτοδέσμευση το N_2 ανάγεται σε αμμώνιο και αυτό στη συνέχεια μετατρέπεται σε κάποια οργανική μορφή του.

3.3 Αφομοίωση του αζώτου

Το φυτοπλαγκτόν έχει την ικανότητα να προσλαμβάνει οποιαδήποτε από τις τρεις κύριες μορφές του δεσμευμένου αζώτου - τα νιτρικά, τα νιτρώδη ή την αμμωνία- με εκλεκτική προτίμηση στην τελευταία.

Στις περιοχές εξόδου των οχετών των πόλεων, όπου και άλλες μορφές αζωτούχων ουσιών συνυπάρχουν, έχει δείχτει ότι η σειρά προτίμησης στην πρόσληψη για διάφορα είδη φυτοπλαγκτόν είναι αμμωνία > ουρία > νιτρικά και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι και τα νιτρικά πριν ενσωματωθούν στις πρωτεΐνες του οργανισμού πρέπει πρώτα να μετατραπούν σε αμμωνία. Για το σκοπό αυτό απαιτείται ένας δότης υδρογόνου και πιθανόν μία πηγή υψηλής ενέργειας, ώστε να συντελεστεί ή ενδόθερμη αυτή αντίδραση. Μολονότι η αναγωγή αυτή των NO_3^- σε NH_2 είναι δυνατόν να γίνει και στο σκοτάδι, ευνοείται από την παρουσία φωτός και με τη βοήθεια των φωτοσυνθετικών μηχανισμών.

Η αναγωγή μέσα στους οργανισμούς γίνεται σε τέσσερα στάδια με ενδιάμεση παραγωγή αντίστοιχα: νιτρώδων, υπονιτρώδων και υδροξυλαμίνης.



Είναι γνωστό ότι το πρώτο στάδιο καταλύεται από προϊόντα των χλωροπλαστών, αλλά έχουμε περιορισμένη γνώση για τα επόμενα στάδια. Η αμμωνία ακολούθως, ασχέτως προελεύσεως, αντιδρά με ακετογλουταρικό οξύ, παρουσία ανηγμένου φωσφορικού αδένινο - νικοτινάμιδο- δινουκλεοτιδίου (NADPH), και δίνει

γλουταμικό οξύ.: $\text{HOOC} - \text{CO} - (\text{CH}_2\text{O})_2 - \text{COOH} + \text{NH}_3 \rightarrow 2\text{NADPH}$

κετογλουταρικό οξύ: $70 \text{HOOC} - \text{CH}(\text{NH}_2) - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{COOH} + 2\text{NADP} + \text{H}_2\text{O}$

Γλουταμικό οξύ γλουταμίνη αφυδρογονάση Τα αμινοξέα που χρειάζονται για τη δόμηση των πρωτεϊνών των φυκών σχηματίζονται στη συνέχεια από το γλουταμικό οξύ.

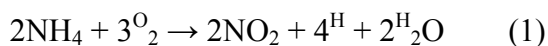
3.4 Νιτροποίηση

Νιτροποίηση είναι ο όρος ο οποίος χρησιμοποιείται για να περιγραφεί η δύο σταδίων βιολογική διεργασία, κατά την οποία η αμμωνία οξειδώνεται σε πρώτη φάση σε νιτρώδη ($\text{NO}_2\text{-N}$), και στη συνέχεια τα νιτρώδη οξειδώνονται περαιτέρω προς νιτρικά ($\text{NO}_3\text{-N}$).

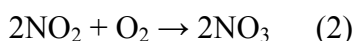
Αυτότροφα βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται κάτω από αερόβιες συνθήκες είναι υπεύθυνα για τη νιτροποίηση. Η νιτροποίηση όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω αποτελείται από δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο μια ομάδα αυτότροφων βακτηρίων οξειδώνει την αμμωνία προς νιτρώδη. Η διεργασία αυτή ονομάζεται νιτροποίηση. Στο δεύτερο στάδιο, τα νιτρώδη οξειδώνονται προς νιτρικά από μια άλλη ομάδα αυτότροφων βακτηρίων. Η διεργασία αυτή ονομάζεται νιτρικοποίηση.

Πειραματικά έχει βρεθεί ότι για τη βιολογική οξείδωση του αμμωνιακού άζωτου είναι υπεύθυνα τα αυτότροφα βακτήρια του γένους *Nitrosomonas* αλλά και άλλοι οξειδωτές της αμμωνίας (ammonia oxidizers), καθώς και τα βακτήρια του γένους *Nitrobacter* και άλλοι οξειδωτές των νιτρωδών (nitrite oxidizers), τα οποία οξειδώνουν την αμμωνία προς νιτρώδη και στη συνέχεια προς νιτρικά, αντίστοιχα (Metcalf & Eddy, 2003).

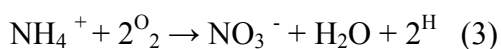
Στο πρώτο στάδιο τα *Nitrosomonas* μετατρέπουν το αμμωνιακό άζωτο σε νιτρώδη:



Ενώ στο δεύτερο στάδιο τα *Nitrobacter* μετατρέπουν το αμμωνιακό άζωτο σε νιτρώδη



Η συνολική αντίδραση οξείδωσης της αμμωνίας (υπό τη μορφή NH_4) είναι (Metcalf & Eddy, 2003):



Οι δύο αυτές ομάδες μικροοργανισμών είναι εντελώς διαφορετικές μεταξύ τους. Καθώς είναι αυτότροφοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν ανόργανο άνθρακα (CO_2) για τη λήψη του

απαραίτητου άνθρακα για την ανάπτυξή τους σε αντίθεση με τα ετερότροφα βακτήρια που χρησιμοποιούν οργανικών άνθρακα. Σύμφωνα με τη σχέση (3) απαιτούνται 4.57 mg O₂ για την οξείδωση 1 mg NH₄ –N σε NO₃ –N (Λυμπεράτος, 2001, Metcalf & Eddy, 2003). . Επίσης είναι σημαντικό να υπάρχει η κατάλληλη αλκαλικότητα για την εξουδετέρωση των παραγόμενων κατιόντων υδρογόνου και τη διασφάλιση ικανοποιητικής συγκέντρωσης HCO₃ για κυτταρική ανάπτυξη. Επίσης λαμβάνουν ενέργεια από την οξείδωση του αμμωνιακού και νιτρώδους αζώτου σύμφωνα με τις αντιδράσεις που παρουσιάζονται πιο πάνω

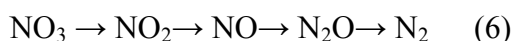
Έχει παρατηρηθεί ότι πολλά άλλα είδη αυτότροφων βακτηρίων μπορούν να πραγματοποιήσουν αυτή τη μετατροπή, ωστόσο στις διεργασίες δραστικής λάσπης τα προαναφερθέντα βακτήρια είναι αυτά που συναντώνται πιο συχνά. Είναι δυνατό να επιτευχθεί νιτροποίηση και με τη χρήση ετερότροφων βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα είναι δυνατόν να έχουμε ετεροτροφική νιτροποίηση από διάφορα είδη βακτηρίων, μυκήτων, και ακτινομυκήτων. Ωστόσο όμως, οι ρυθμοί της αυτογραφικής νιτροποίησης είναι 10 φορές περίπου μεγαλύτεροι από ότι οι ρυθμοί της ετεροτροφικής νιτροποίησης (Focht et al., 1975).

3.5 Απονιτροποίηση

Η νιτροποίηση, η μετατροπή δηλαδή του αμμωνιακού αζώτου σε νιτρικά δεν επαρκεί για τη βιολογική απομάκρυνση του αζώτου, απλά ελαχιστοποιεί την απαίτηση σε διαλυμένο οξυγόνο. Δεν είναι δυνατή η απευθείας διάθεση των αποβλήτων σε αυτό το στάδιο, διότι τα NO₃ έχουν μεγάλη τοξικότητα και είναι επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία, όταν βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες στους φυσικούς αποδέκτες.

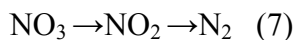
Η απομάκρυνση των νιτρικών που παράγονται σε αυτό το στάδιο γίνεται με τη διαδικασία της απονιτροποίησης. Με τον όρο αυτό περιγράφεται η βιολογική αναγωγή των νιτρικών και των νιτρωδών προς αέριο άζωτο, με ενδιάμεσα προϊόντα NO, N₂O. Το άζωτο απομακρύνεται από το σύστημα εξαιτίας της χαμηλής διαλυτότητας του στις συνθήκες που επικρατούν. Η βιολογική απομάκρυνση του αζώτου είναι τελικά ένας συνδυασμός νιτροποίησης και απονιτροποίησης (Metcalf & Eddy, 2003).

Ο Payne (1973) περιέγραψε για πρώτη φορά τη γενική σειρά των αντιδράσεων της απονιτροποίησης.



Η παραγωγή των αέριων οξειδίων του αζώτου NO και N₂O, επιβαρύνει το παγκόσμιο πρόβλημα της ρύπανσης του περιβάλλοντος, λόγω της ικανότητας τους να αντιδρούν με το όζον στα υψηλότερα στρώματα της ατμόσφαιρας. Η μείωση της συγκέντρωσης του όζοντος

αποτελεί πρόβλημα παγκόσμιου ενδιαφέροντος. Παρά τη μακροχρόνια ερευνητική προσπάθεια που διεξάγεται με αντικείμενο τη διεργασία της απονιτροποίησης, είτε λόγω τεχνικών δυσκολιών είτε λόγω των πραγματικά πολύ μικρών συγκεντρώσεων τους σε συνήθη συστήματα απονιτροποίησης, η παραγωγή των οξειδίων ως ελευθέρων ενδιάμεσων προϊόντων κατά την αναγωγή των νιτρικών και των νιτρωδών προς αέριο άζωτο μόλις πρόσφατα κατέστη δυνατό να διαπιστωθεί με βεβαιότητα. Άμεση συνέπεια αυτού ήταν, η συνήθης θεώρηση για την απονιτροποίηση μέχρι σήμερα, να αποτελεί μια διεργασία δύο σταδίων.



Η διεργασία πραγματοποιείται από τα ετερότροφα, προαιρετικά αερόβια βακτήρια κάτω από ανοξικές συνθήκες. Συνήθη είδη βακτηρίων είναι τα *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Spirillum*. Τα πιο συνηθισμένα είναι το *Ps.aeruginosa*, *Ps.denitrificans* τα οποία απαντώνται συχνά στο χώμα, το νερό και τα υγρά απόβλητα.

Τα απονιτροποιητικά βακτήρια επιτυγχάνουν την αναγωγή των νιτρικών και των νιτρωδών διαμέσου ενός μηχανισμού που είναι γνωστός ως καταβολισμός νιτρικών (nitrate dissimilation). Διαμέσου του μηχανισμού αυτού, τα νιτρικά και τα νιτρώδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων, αντί του οξυγόνου, στη διεργασία αναπνοής των μικροοργανισμών κάτω από ανοξικές συνθήκες.

Τα απονιτροποιητικά βακτήρια είναι εξίσου ικανά για μια διεργασία αφομοίωσης των νιτρικών (nitrate assimilation), διαμέσου της μετατροπής τους σε νιτρώδη και εν συνεχεία σε αμμωνιακό άζωτο. Το άζωτο αυτό χρησιμοποιείται για να καλύψει τις ανάγκες των κυττάρων για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων κατά την ανάπτυξη τους. Η παραπάνω διαδικασία μετατροπής των νιτρικών, δεν λαμβάνει χώρα στην περίπτωση που οι απαιτήσεις των κυττάρων καλύπτονται από την υπάρχουσα ποσότητα αμμωνιακού αζώτου των λυμάτων.

Εκτός όμως από αυτούς τους ετερότροφους μικροοργανισμούς υπάρχουν και άλλες περιπτώσεις βιολογικής απομάκρυνσης αζώτου. Η αμμωνία μπορεί να μετατραπεί σε αέριο άζωτο από αυτότροφα βακτήρια κάτω από αερόβιες συνθήκες. Η πρώτη περίπτωση αναφέρεται στη διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης του αμμωνιακού αζώτου, που είναι γνωστή με το όνομα ANAMMOX (Anaerobic Ammonium Oxidation) και για την οποία θα γίνει αναφορά πιο αναλυτικά. Στη δεύτερη περίπτωση το ετερότροφο βακτήριο *Thiosphaera pantotropa* έχει μελετηθεί εκτεταμένα και μπορεί να πραγματοποιεί ταυτόχρονα νιτροποίηση και απονιτροποίηση κάτω από αερόβιες συνθήκες με χρήση εξωτερικής πηγής άνθρακα.

3.5.1 Απονιτροποίηση και Διαλυμένο Οξυγόνο

Η απονιτροποίηση αρχικά θεωρήθηκε ως μια αυστηρά ανοξική διαδικασία, επειδή τα απονιτροποιητικά βακτήρια, ως προαιρετικά αερόβιοι μικροοργανισμοί προτιμούν τις αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, παρεμποδίζοντας έτσι και τη χρήση των νιτρικών και των νιτρωδών, ως τελικού δέκτη ηλεκτρονίων. Με βάση θερμοδυναμικά δεδομένα παρατηρούμε ότι η ενεργειακή απόδοση του αερόβιου μεταβολισμού του οργανικού άνθρακα είναι υψηλότερη, συγκρινόμενη με την απόδοση της ανοξικής απονιτροποίησης. Η οξείδωση της γλυκόζης παρουσία οξυγόνου αποδίδει 686 kcal/mole γλυκόζης, ενώ σε ανοξικές συνθήκες παρουσία νιτρικών αποδίδει 570 kcal/mole. Για το λόγο αυτό, η απονιτροποίηση διεξάγεται σε ένα ανοξικό περιβάλλον, ώστε να διασφαλίζεται η χρήση των νιτρικών και των νιτρωδών και όχι του οξυγόνου ως τελικών αποδεκτών ηλεκτρονίων.

Τον περασμένο αιώνα έγιναν ορισμένες αναφορές, που σε κάποιες περιπτώσεις η απονιτροποίηση γινόταν παρουσία οξυγόνου. Αυτές οι αναφορές θεωρήθηκαν ανακριβείς, είτε λόγω ανεπάρκειας συστημάτων ελέγχου και ρύθμισης των συγκεντρώσεων του διαλυμένου οξυγόνου είτε λόγω ανακρίβειας στις μετρήσεις του (Nakojima et al., 1984). Σε κάποιες περιπτώσεις είχε παρατηρηθεί και επιβεβαιωθεί η ικανότητα ορισμένων βακτηρίων για απονιτροποίηση, αν και με μειωμένο ρυθμό στη παρουσία οξυγόνου (Lloyd et al., 1987).

Όμως η ικανότητα των μικροοργανισμών για απονιτροποίηση παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων οξυγόνου αποτελεί σήμερα αντικείμενο ενδιαφέροντος τόσο από πλευράς φυσιολογίας των βακτηρίων, αλλά και από οικολογική και οικονομική άποψη.

Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι διάφοροι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να πραγματοποιήσουν και τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση, συμβάλλοντας στην απομάκρυνση του αζώτου από το περιβάλλον παρουσία οξυγόνου (Joo et al., 2005). Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν προσελκύσει την προσοχή των επιστημόνων λόγω του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξης τους και της ικανότητας τους να μετατρέπουν τα νιτρικά και τα νιτρώδη σε αέριο άζωτο (Zhao et al., 2010). Σήμερα έχει αποδειχθεί ότι κάποιες ομάδες ετερότροφων μικροοργανισμών μπορούν να κάνουν αερόβια απονιτροποίηση, όπως είναι ο *Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas stutzeri* και *Microvirgula aerodenitrificans*.

3.6 Νεότερες τεχνολογίες αφαίρεσης του αζώτου

Τα τελευταία χρόνια, όσον αφορά στην νιτροποίηση, αυτή έχει στραφεί σε μια σειρά από νέες τεχνολογίες για την αφαίρεση του αζώτου, οι οποίες έχουν ως στόχο την αλλαγή του δρόμου της νιτροποίησης και της απονιτροποίησης. Συγκεκριμένα οι τεχνολογίες αυτές

επιδιώκουν να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της νιτροποίησης με διαφορετικό τρόπο, να γίνει εκμετάλλευση του νιτρώδους αζώτου που παράγεται στο πρώτο στάδιο της αντίδρασης και να μετατραπεί η αμμωνία μέσω αυτού του νέου δρόμου σε αέριο άζωτο. Άλλες τεχνολογίες πετυχαίνουν τη μετατροπή της αμμωνίας σε αέριο άζωτο, χωρίς την παραγωγή ενδιάμεσων προϊόντων. Όλα αυτά βέβαια είναι βιολογικές διεργασίες και πραγματοποιούνται με τη βοήθεια σε κάθε περίπτωση ειδικών μικροοργανισμών. Σε αυτές ακριβώς τις τεχνολογίες γίνεται αναφορά παρακάτω.

3.6.1 Τεχνολογία SHARON

Η διεργασία SHARON (Single reactor High activity Ammonia Removal over Nitrite) από το πανεπιστήμιο του Delft. Η διεργασία βασίζεται στην αλλαγή του δρόμου της απονιτροποίησης. Πιο συγκεκριμένα γίνεται η διακοπή του δρόμου της νιτροποίησης στο πρώτο στάδιο όπου παράγεται νιτρώδες άζωτο. Μέχρι πρόσφατα προσπάθειες για διακοπή της νιτροποίησης σε αυτό το στάδιο ήταν ανεπιτυχείς. Στη SHARON όμως γίνεται εκμετάλλευση του γεγονότος ότι σε υψηλές θερμοκρασίες, τα βακτήρια Nitrobacter έχουν πολύ χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από ότι τα Nitrosomonas. Χρησιμοποιώντας ένα αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης με μικρό χρόνο παραμονής σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών, είναι δυνατό να επιτευχθεί έκπλυση των Nitrobacter. Εφαρμόζοντας και διακοπόμενο αερισμό ελέγχεται αποτελεσματικά, τόσο η απονιτροποίηση, όσο και το pH μέσα στον αντιδραστήρα. Με βάση τις μελέτες που έγιναν φαίνεται ότι η οικονομία στο κόστος για την παροχή οξυγόνου και εξωτερικής πηγής άνθρακα είναι περίπου 25 και 40% αντίστοιχα. Η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προεπεξεργασία ή ως παράπλευρο ρεύμα επεξεργασίας αποβλήτων. Ωστόσο, επειδή παρατηρείται συσσώρευση νιτρώδους αζώτου, πρέπει να υπάρχει κατάλληλος έλεγχος και πρόληψη, εξαιτίας του γεγονότος ότι τα νιτρώδη είναι δυνατό να λάβουν μέρος σε παράπλευρες αντιδράσεις, σχηματίζοντας νιτρονιλίνες παρουσία ανιλίνης και άλλα χημικά, πράγμα που είναι ανεπιθύμητο (Verstraete et al., 1998)

3.6.2 Αναερόβια οξείδωση αμμωνίου (anammox)

Για πολλά χρόνια, παραδοσιακή μέθοδο για την απομάκρυνση του αζώτου από τα υγρά απόβλητα είχε αποτελέσει ο συνδυασμός των διεργασιών νιτροποίησης και απονιτροποίησης. Η έλλειψη συνήθως απαραίτητων εκτάσεων ή ακόμη και διάφοροι οικονομικοί περιορισμοί, δεν επιτρέπουν την αύξηση της δυναμικότητας των υπάρχουσων εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, και ιδιαίτερα στην περίπτωση που αυτά εμφανίζουν μεγάλα φορτία

αμμωνίου. Τη λύση σε αυτό το πρόβλημα θα μπορούσε να δώσει η ανακάλυψη της αναερόβιας οξειδωσης της αμμωνίας, η οποία δίνει νέες δυνατότητες και εναλλακτικές.

Τα *anammox* βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιούν τα νιτρώδη, ως δέκτη ηλεκτρονίων και να μετατρέπουν αναερόβια την αμμωνία και τα νιτρώδη σε αέριο άζωτο. Σε αντίθεση με τη συμβατική μέθοδο νιτροποίησης- απονιτροποίησης, η αναερόβια οξείδωση του αμμωνίου είναι μια αυτότροφη διεργασία. Οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν τα δισανθρακικά ως πηγή άνθρακα.

Κατά τη συγκεκριμένη διεργασία 1 mol παράγει διπλάσια ποσότητα N₂ ανά mol νιτρωδών που καταναλώνονται, ενώ αυξάνει την παραγωγή N₂ σε περιπτώσεις που η νιτροποίηση είναι περιορισμένη. Με βάση πρόσφατες μελέτες υποδεικνύεται ότι ένα στα δύο μόρια αζώτου στην ατμόσφαιρα έχει παραχθεί μέσω της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας (Jetten M., 2008). Κάποια άλλα στοιχεία δείχνουν ότι τα *anammox* βακτήρια αντιπροσωπεύουν το 13-51% της συνολικής παραγωγής N₂ στα βαθιά ωκεάνια ιζήματα (Penton et al. 2009).

Η υδροξυλαμίνη και η υδραζίνη τακτοποιήθηκαν ως τα σημαντικά ενδιάμεσα προϊόντα (Jetten et al.,1999), ενώ τα πειράματα έδειξαν ένα πολύ χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης των *anammox* βακτηρίων (Strous et al., 1998 & Strous et al.,1999).

Επομένως, οι αντιδράσεις που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για αυτή την νέα μέθοδο επεξεργασίας θα έπρεπε να εμφανίζουν επαρκή χρόνο παραμονής της βιομάζας καθώς και μια αργή περίοδο εκκίνησης της διεργασίας.

Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας πραγματοποιείται από *Planctomycetes* του γένους *Candidatus, Brocadia anammoxidans* και *Kuenenia stuttgartiensis*, από κάποια είδη του γένους *Scalindua* (Schmid et al., 2003) . Λόγω του ότι οι είναι αυτότροφοι μικροοργανισμοί μια πλήρης μετατροπή του αμμωνίου σε αέριο άζωτο μπορεί να λάβει χώρα χωρίς την προσθήκη οργανικής ύλης (Jetten et al., 2002 & Van Dongen et al., 2001).

Οι μικροοργανισμοί *anammox* είναι πιο ευαίσθητοι στην παρουσία σχετικά υψηλών συγκεκριμένων συγκεντρώσεων οξυγόνου και νιτρωδών. Πιο συγκεκριμένα : συγκεντρώσεις οξυγόνου υψηλότερες από 0.06 mg/L, νιτρωδών μεταξύ 230 mg/L και 920mg/L καθώς και φωσφορικών αλάτων υψηλότερες από 180 mg/L αναστέλλουν τη λειτουργία της αναερόβιας οξείδωσης του αμμωνίου αντιστρεπτά

Επίσης τα αναπνοοβacteria είναι πολύ ευαίσθητα στην παρουσία κάποιων πηγών οργανικής ύλης, όπως είναι για παράδειγμα οι αλκοόλες και ειδικά η μεθανόλη. Ακόμη και μια πολύ μικρή συγκέντρωση μεθανόλης, ίση με 40 mg/L, οδήγησε σε άμεση, πλήρη και μη αντιστρέψιμη αναστολή της αναερόβιας οξειδωσης του αμμωνίου (Parades et.al., 2007).

3.6.3 Αποαμμωνικοποίηση και OLAND

Μέχρι τώρα αναφέρθηκαν οι δύο κυριότερες τεχνολογίες αυτής της κατηγορίας. Υπάρχουν όμως και ορισμένες άλλες, που βασίζονται στην ίδια λογική με τις προηγούμενες όμως δεν είναι τόσο αναπτυγμένες ούτε και χρησιμοποιούνται τόσο συχνά.

Η αποαμμωνικοποίηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων τα οποία όμως έχουν μεγάλες συγκεντρώσεις αμμωνίας. Σε αυτή τη διαδικασία γίνεται μετατροπή της αμμωνίας σε αέριο άζωτο, χωρίς όμως να είναι απαραίτητη η στοιχειομετρία για δέκτη ηλεκτρονίων. Η όλη μετατροπή γίνεται κάτω από αερόβιες συνθήκες και το κλειδί είναι η παροχή οξυγόνου η οποία όμως ελέγχεται αυστηρά.

Άλλη εναλλακτικού τρόπου τεχνολογία απομάκρυνσης αζώτου είναι η OLAND η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε απόβλητα που είναι πλούσια σε αμμωνία και στηρίζεται και αυτή στον αυστηρό έλεγχο της παροχής οξυγόνου.

Κεφάλαιο 4- Μικροοργανισμός *Klebsiella spp.*

Τα μέλη του γένους *Klebsiella spp.* είναι ελυτροφόρα, Gram- αρνητικά βακτηρίδια μήκους περίπου 1-2 μm με τους γενικούς χαρακτήρες των εντεροβακτηριοειδών. Διασπών την λακτόζη και είναι ακίνητα. Υδρολύουν την ουρία, διότι έχουν το ένζυμο ουρεάση. Δεν παράγουν H₂S, χρησιμοποιούν τα κιτρικά, ως μόνη πηγή άνθρακα, δίδουν θετική αντίδραση Voges-Proskauer, και δεν παράγουν ινδόλη.

Το έλυτρο παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες, όταν τα μικρόβια αναπτύσσονται σε θρεπτικά υποστρώματα, πλούσια σε υδατάνθρακες. Υπό αυτές τις συνθήκες, σχηματίζουν πλούσιες, γκριζωπές και εξαιρετικά βλενώδεις αποικίες στο άγαρ. Οι πολυσακχαρίτες των διαφόρων οροτύπων είναι όλοι πολύπλοκοι όξινοι πολυσακχαρίτες, και συνήθως περιέχουν γλυκουρονικό και πυροσταφυλικό οξύ. Μοιάζουν με τα αντιγόνα K της *Escherichia coli*.

Οι κλεμψιέλλες είναι ακίνητες αλλά τα περισσότερα στελέχη εκφράζουν ινίδια. Οι οργανισμοί αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 12 και 43 βαθμών κελσίου. Καταστρέφονται από υγρή θερμότητα στους 55 βαθμούς κελσίου. Μπορούν να επιβιώσουν της ξηρασίας για μήνες και εάν διατηρηθούν σε θερμοκρασία δωματίου, οι καλλιέργειες παραμένουν βιώσιμες για εβδομάδες. Είναι δυνητικώς αναερόβιες, ωστόσο η ανάπτυξη τους υπό αυστηρώς αναερόβιες συνθήκες είναι πτωχή.

Η *Klebsiella* έχει σωματικά αντιγόνα O και αντιγόνα του ελύτρου K. Τα αντιγόνα K είναι πολυσακχαρίτες. Υπάρχουν 80 διαφορετικά αντιγόνα K βάσει των οποίων γίνεται τυποποίηση. Τυποποίηση με τη βοήθεια των αντιγόνων O δεν γίνεται, διότι το έλυτρο όπου βρίσκονται τα αντιγόνα K εμποδίζει τη συγκόλληση του αντιγόνου O.

Παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ μερικών *Klebsiella* με πολυσακχαριτικό αντιγονικό έλυτρο και άλλων παθογόνων μικροβίων με έλυτρο, όπως είναι ο *Streptococcus pneumoniae* και ο *Haemophilus influenzae*. Αυτή η διασταυρούμενη αντίδραση δίνει την εντύπωση παράλληλων μηχανισμών που συμμετέχουν στη παθογένεση και την ανοσία, ωστόσο η σχέση ελυτροφόρου της *Klebsiella* και τοξικότητας δεν έχει αποδειχθεί.

Πολλά στελέχη *Klebsiella* παράγουν βακτηριοσίνες που διαφέρουν από τις κολισίνες, διότι δεν είναι δραστικές έναντι του *E.coli*. Έχουν στενό φάσμα δραστηριότητας έναντι άλλων κλεμψιελλών. Η επιδημιολογική ανάλυση μπορεί να βελτιωθεί με τη χρησιμοποίηση βακτηριοσινών σε συνδυασμό με την ομοτυπία βάσει των καψιδικών αντιγόνων.

Στο γένος *Klebsiella* περιλαμβάνονται τα είδη:

- *Klebsiella pneumoniae*

Το σπουδαιότερο παθογόνο είδος του γένους. Ανευρίσκεται στη φυσιολογική χλωρίδα του αναπνευστικού συστήματος και τον εντερικό σωλήνα υγιών ανθρώπων. Είναι αίτιο πνευμονίας (3% περίπου των πνευμονιών μικροβιακής αιτιολογίας οφείλονται στην *Klebsiella pneumoniae*). Η πνευμονία αυτή παρουσιάζει μεγάλη θνητότητα, αν αφεθεί χωρίς θεραπεία. Προκαλεί επίσης λοιμώξεις των ουροφόρων οδών, διαπυήσεις τραυμάτων, ωτίτιδες, λοιμώξεις παραρρινικών κόλπων και σπανιότερα μηνιγγίτιδες. Η *Klebsiella pneumoniae* είναι από τα κυριότερα αίτια ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων, Στελέχη *Klebsiella* ανθεκτικά σε διάφορα αντιβιοτικά προκαλούν τέτοιες λοιμώξεις ιδιαίτερα σε εξασθενημένα άτομα, μετά από βαριές εγχειρήσεις ή με μόνιμους καθετήρες της ουροδόχου κύστεως.

Η λοιμογόνος δύναμη των διαφόρων στελεχών της *Klebsiella* οφείλεται στην ύπαρξη φιμπριών με την βοήθεια των οποίων το μικρόβιο προσκολλάται στην επιφάνεια των βλεννογόνων όπου κι αναπτύσσεται. Οι φιμπρίες αυτές επίσης είναι ικανές να αναστείλουν την φαγοκυττάρωση και την ενδοκυττάρια καταστροφή του μικροβίου. Η θεραπεία των λοιμώξεων από *Klebsiella* με αντιβιοτικά πρέπει να γίνεται μετά από προσδιορισμό της *in vitro* ευαισθησίας του υπεύθυνου στελέχους. Γενικώς η *Klebsiella* είναι ευαίσθητη στην κοτριμοξαζόλη, στρεπτομυκίνη, χλωραμφεκινόλη, τετρακυκλίνες, αμφιογλυκοσίδες και κεφαλοθίνη. Η ανθεκτικότητα της *Klebsiella* στα αντιβιοτικά είναι χρωματοσωματική ή οφείλεται σε ύπαρξη πλασμιδίων.

- *Klebsiella ozaenae*

Είναι αίτιο της όζαινας, χρόνιας ατροφικής ρινίτιδας με χαρακτηριστική δυσσομία.

- *Klebsiella rhinoscleromatis*

Είναι αίτιο του ρινοσκληρώματος, σπάνιας λοίμωξης η οποία χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη χρόνιου κοκκιώματος στη ρίνα και το φάρυγγα.

- *klebsiella oxytoca*

Ανευρίσκεται στα κόπρανα των ανθρώπων και των ζώων, το νερό και το χώμα. Έχει περιγραφεί ως αίτιο λοιμώξεων των ουροφόρων οδών, του αναπνευστικού συστήματος και των τραυμάτων.

Διακρίνεται από την *Klebsiella pneumoniae* από την παραγωγή ινδόλης και τη διάσπαση της ινσουλίνης.

Κεφάλαιο 5-Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Απομόνωση μικροοργανισμών

Ο βασικός σκοπός της εργασίας αυτής, είναι όπως προαναφέρθηκε η μελέτη της απονιτροποίησης, παρουσία O_2 . Για την μελέτη της διεργασίας αυτής κρίθηκε σκόπιμο να απομονωθούν τυχαίοι μικροοργανισμοί από λύματα και από το έδαφος.

Η απομόνωση των μικροοργανισμών αυτών στηρίχθηκε σε συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο, το οποίο δεν περιείχε καμία πηγή άνθρακα (οργανικό υπόστρωμα), αλλά μόνο νιτρικά (ανόργανα άλατα). Με την κατάλληλη πηγή αζώτου παρατηρήθηκε η πιθανή διάσπαση της αμμωνίας ή των νιτρικών.

Η διαδικασία απομόνωσης για τα απονιτροποιητικά και νιτροποιητικά βακτήρια είχε ως εξής (στερεές καλλιέργειες):

Έγινε εμβολιασμός των βακτηρίων σε τρυβλία Petri. Το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης ήταν 3 gr/L Sodium nitrate, 3 gr/L Ammonium chloride 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 0.2g/L Potassium phosphate, 0.5g/L Magnesium sulfate hepta hydrate, 18gr/L Agar. Η ανάπτυξη αυτή πραγματοποιήθηκε στους 33 βαθμούς κελσίου για 48 ώρες και σε pH 7. Το νιτρικό νάτριο χρησιμοποιήθηκε ως κατάλληλη πηγή υποστρώματος (νιτρικών) για να επιτευχθεί ο εμπλουτισμός των απονιτροποιητικών βακτηρίων και των νιτροδοποιητικών.

Κατόπιν, αφού διακρίθηκαν οι μικροοργανισμοί που κατάφεραν να έχουν ανάπτυξη στο πρώτο υπόστρωμα ανακαλλιιεργήθηκαν. Το θρεπτικό υπόστρωμα ανά καλλιέργειας είχε ως εξής: 5gr/L Sodium nitrate 18gr/L Agar. Και σε αυτό το στάδιο έγινε ανάπτυξη στις ίδιες συνθήκες.

Για να κάνουμε ανάπτυξη των μικροοργανισμών και να παρατηρήσουμε διάσπαση νιτρικών ακολουθήσαμε διάφορα θρεπτικά υποστρώματα και διαφορετικές συνθήκες και τεχνικές με σκοπό να βρούμε το βέλτιστο και το ποιο αποδοτικό.

5.2 Πρώτη πειραματική δοκιμή

Βήμα 1-Ανάπτυξη μικροοργανισμών για να παρατηρηθεί η διάσπαση των νιτρικών.

Στάδιο προκαλλιέργειας

Για τους μικροοργανισμούς που κατάφεραν να αναπτυχθούν μετά από 48 ώρες στο προ αναφερθέν θρεπτικό υπόστρωμα ακολουθήθηκε η πιο κάτω πειραματική διαδικασία.

Προκειμένου να μελετηθεί σε μεγαλύτερο βάθος η διάσπαση των νιτρικών και των αμμωνιακών παρασκευάστηκε υγρό εμπλουτιστικό θρεπτικό υπόστρωμα (PC) το οποίο έχει μεγάλες ποσότητες οργανικών. Οι μικροοργανισμοί σε αυτό το στάδιο αναπτύχθηκαν για 24ώρες σε θερμοκρασία 33 βαθμούς κελσίου. Η ανάπτυξη γίνεται σε φιάλες ορού (serum bottles) των 200ml. Στα 100ml εμπλουτιστικού υποστρώματος εμβολιάστηκαν οι μικροοργανισμοί που βρίσκονταν στη λογαριθμική τους φάση με τη βοήθεια αποστειρωμένης βελόνας. Η σύσταση του εμπλουτιστικού θρεπτικού υποστρώματος (PC) φαίνεται πιο κάτω.

Εμπλουτιστικό υπόστρωμα (PC)

5 g/L Peptone

3g/L Yeast

0.2g/L Glucose

0.2 g/L NH₄Cl

0.2 g/L Sodium nitrate

Το pH στο εμπλουτιστικό υπόστρωμα πρέπει να είναι περίπου 7,5

Βήμα 2 :Ανάπτυξη μικροοργανισμών για να παρατηρηθεί η διάσπαση των νιτρικών.

Καλλιέργεια σε κωνικές φιάλες

Κατόπιν, μετά από 24 ώρες αφού παρατηρήθηκε εμφανής ανάπτυξη στο εμπλουτιστικό θρεπτικό υπόστρωμα (PC). Ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε άλλα υγρά θρεπτικά υποστρώματα στα οποία μειώθηκε η ποσότητα των οργανικών και αυξήθηκε η παρουσία των

νιτρικών αλάτων. Εδώ χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις νιτρικών σε κάθε ένα από τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα.

Στάδιο 1-Nitrate medium: 1,5g/L Sodium nitrate (= 1094 mg/L NO_3^-) , 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g/L Glucose.

Στάδιο 2- Nitrate medium: 60mg/L Sodium nitrate (= 43.76 mg/L NO_3^-), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g/L Glucose.

Στάδιο 3- Nitrate medium: 60mg/L Sodium nitrate (= 43.76 mg/L NO_3^-), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g/L Glucose

Για να γίνει η ανακαλλιέργεια πάρθηκαν δείγματα 5ml από το θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμού (PC) και φυγοκεντρήθηκαν για 6 λεπτά στις 1240 στροφές. Η φυγοκέντρωση είχε ως σκοπό να παρθεί το pellet (το “ίζημα” το οποίο αποτελεί την βιομάζα που υπήρχε στο διάλυμα). Σκοπός για τον οποίο έγινε φυγοκέντρωση σε αυτό το στάδιο του πειράματος είναι να μεταφέρεται περίπου η ίδια μάζα μικροοργανισμού σε κάθε κωνική.

Η ανάπτυξη έγινε σε κωνικές φιάλες των 500ml, που περιείχαν 150 ml θρεπτικό υγρό βιομέσο. Σε αυτό μεταφέρθηκε η βιομάζα μετά από τη φυγοκέντρωση.

Ο στόχος σε αυτό το βήμα ήταν να παίρνονται δείγματα ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα και να μετρίωνται οι παράμετροι οπτικής πυκνότητας (στα 600 nm) και περιεκτικότητας νιτρικών (385 nm).

Οι μετρήσεις για όλες τις παραμέτρους δεν μπορούσαν να γίνουν την ίδια χρονική στιγμή, έτσι γινόταν αρχικά η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και στη συνέχεια γινόταν φυγοκέντρωση 5ml για το κάθε δείγμα. Το υπερκείμενο φυλασσόταν στους -20 βαθμούς κελσίου με σκοπό να μπορέσουν σε μετέπειτα στάδιο να γίνουν οι υπόλοιπες μετρήσεις πέραν της οπτικής πυκνότητας.

5.3 Προσδιορισμός της βακτηριακής μάζας

Ο προσδιορισμός της βακτηριακής μάζας έγινε με τη χρήση φασματοφωτόμετρου. Οι μέθοδοι αυτές θεωρούνται αρχικά έμμεσες και βασίζονται στην εκτίμηση της θολερότητας των βακτηριακών εναιωρημάτων και προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα με UV- VIS φασματοφωτόμετρο συνήθως στα 600 nm. Η μέθοδος είναι κατάλληλη μόνο για χαμηλές

συγκεντρώσεις κυττάρων, εφόσον η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η διάμετρος, το σχήμα, ο δείκτης η διάθλασης και σύσταση κυττάρων.

Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας έγιναν με σκοπό να κατασκευαστεί η γραφική καμπύλη ανάπτυξης των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, έτσι ώστε να παρατηρηθεί ο κύκλος ζωής του βακτηρίου. Σε κάθε πειραματική διαδικασία είναι συμπαντικό να βλέπουμε τον κύκλο ζωής για να μπορέσουμε να το συνδέσουμε στη συνέχεια με την απομάκρυνση του βακτηρίου. Σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας γινόταν μέτρηση 1.5ml δείγματος με τη χρήση οπτικού φασματοφωτόμετρου στα 600nm.

5.4 Μεθοδολογία μέτρησης νιτρικών

Για τη μέτρηση των νιτρικών στα δείγματα που πάρθηκαν χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα αντιδραστήρια kits (έτοιμα πακέτα χημικών ποιοτικής ανάλυσης). Για τη διαδικασία αυτή, αφού έγινε μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ακολουθήθηκαν οι μετρήσεις των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης τα οποία είχαν παρθεί κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των βακτηρίων.

Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 4ml R1, 0,5 ml sample και 0.5ml R2. Μετά την παρασκευή του κάθε δείγματος μέτρησης νιτρικών ακολούθησε ανάδευση και έπειτα τοποθετήθηκε σε ηρεμία για περίπου μισή ώρα. Με το πέρασμα της ώρας κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη βοήθεια του φασματοφωτόμετρου στα 385nm.

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τα νιτρικά έγινε με την ακόλουθη μεθοδολογία.

Κατασκευάστηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης νιτρικών (NO_3^-) 30mg/L, 15mg/L, 22.5mg/L, 5mg/L και 1mg/L. Αυτά τα δείγματα μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο στα 385nm και έγινε συσχέτιση της απορρόφησης με την συγκέντρωση. Αφού έγινε η συσχέτιση, με την βοήθεια της γραφικής παράστασης της ευθείας και ακολούθως η εξίσωση της ευθείας ήταν πλέον εφικτό για κάθε δείγμα, έχοντας την απορρόφηση να υπολογίζεται και η συγκέντρωση.

5.4.2 Καμπύλη Βαθμονόμησης Νιτρικών

Κατασκευάσαμε ένα διάλυμα NaNO_3 0,1g/L σε φιάλη 200ml. Το διάλυμα αυτό το βάλουμε σε φιάλη των 500ml και το αραιώσαμε. Με αυτό τον τρόπο το διάλυμα έχει συγκέντρωση 40mg/L.

Με αυτό το τρόπο μπορέσαμε να κάνουμε διαδοχικές αραιώσεις έτσι ώστε να φτιάξουμε μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για να κάνουμε τους υπολογισμούς μας στα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης νιτρικών.

Υπολογίσαμε την πραγματική συγκέντρωση νιτρικών μέσα από το άλας του νιτρικού νατρίου για να μπορέσουμε να υπολογίσουμε την συγκέντρωση του σε κάθε ένα διάλυμα αραιώσεις και να αντιστοιχίσουμε την συγκέντρωση με την οπτική πυκνότητα.

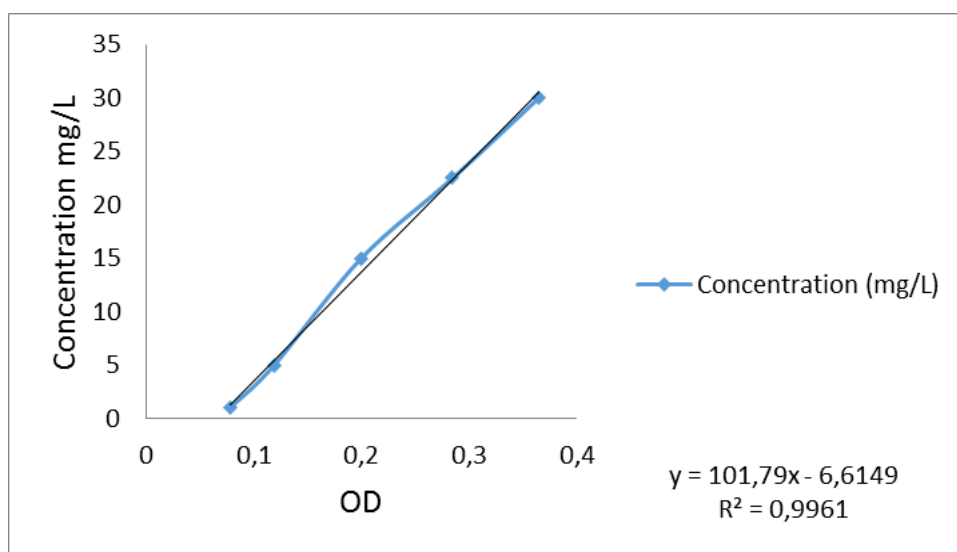
Το συνολικό μοριακό βάρος του NaNO_3 είναι 85g και των νιτρικών μέσα στο άλας 62g. Βάση αυτού καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι από την συνολική συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα που κατασκευάσαμε μόνο το 72,9 % είναι τα νιτρικά.

Αραιώσεις: 30.00mg/L, 22.5mg/L, 15.00mg/L, 5.00mg/L, 1.00mg/L

Η διαδικασία για τις μετρήσεις έγινε χρησιμοποιώντας έτυμα δείγματα (kit).

Το διάλυμα που μετρήσαμε περιείχε 4ml R1, 0.5ml solution, 0.5ml R2

Καμπύλη Βαθμονόμησης:



5.5 Δεύτερη πειραματική δοκιμή

Ανάπτυξη μικροοργανισμών για να παρατηρηθεί η διάσπαση των αμμωνιακών

Το Βήμα 1 του πειράματος ήταν το ίδιο με την πρώτη πειραματική διαδικασία. Αλλαγές στη μεθοδολογία έγιναν στο δεύτερο σκέλος του πειράματος.

Μετά τις 24 ώρες αφού παρατηρήθηκε εμφανής ανάπτυξη στο εμπλουτιστικό θρεπτικό υπόστρωμα (PC). Ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε άλλα υγρά θρεπτικά υποστρώματα στα οποία μειώθηκε η ποσότητα των οργανικών και αυξήθηκε η παρουσία των αμμωνιακών αλάτων. Εδώ χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αμμωνιακών σε κάθε ένα από τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα.

Στάδιο 1- Ammonium medium: 0,6g/L NH_4Cl (= 308,52 mg/L NH_4^+), 0,2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1,5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g/L Glucose

Στάδιο 2- Ammonium medium: 60mg/L NH_4Cl (= 35.99 mg/L NH_4^+), 0,2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1,5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g/L Glucose

Για να γίνει η ανακαλλιέργεια πάρθηκαν από το θρεπτικό υπόστρωμα εμπλουτισμού (PC) και φυγοκεντρήθηκαν για 6 λεπτά στις 1240 στροφές. Με τη φυγοκέντρηση διαχωρίστηκε η βιομάζα που κατακάθισε ως ίζημα. Στη συνέχεια η βιομάζα διαμοιράστηκε σε ίσες ποσότητες στις κωνικές φιάλες.

Η ανάπτυξη έγινε σε κωνικές φιάλες των 500ml που περιείχαν 150 ml θρεπτικό υγρό βιομέσο. Σε αυτό μεταφέρθηκε η βιομάζα μετά από την φυγοκέντρηση.

Ο στόχος σε αυτό το βήμα ήταν να λαμβάνονται δείγματα ανά καθορισμένα χρονικά διαστήματα και να μετριώνται οι παράμετροι οπτικής πυκνότητας (στα 600 nm), και περιεκτικότητας αμμωνιακών (στα 625 nm).

Οι μετρήσεις για όλες τις παραμέτρους την ίδια χρονική στιγμή. Έτσι γινόταν αρχικά η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και στη συνέχεια γινόταν φυγοκέντρηση 5ml για το κάθε δείγμα. Το υπερκείμενο φυλασσόταν στους -20 βαθμούς κελσίου με σκοπό να μπορέσουν σε μετέπειτα στάδιο να γίνουν οι υπόλοιπες μετρήσεις.

5.6 Μεθοδολογία μέτρησης αμμωνιακών – Προσδιορισμός ιόντων αμμωνίου με τη μέθοδο της ινδοφαινόλης (blue method).

Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στο σχηματισμό έντονα κυανής ένωσης, της ινδοφαινόλης, όταν αντιδρούν ιόντα αμμωνίου με φαινόλη παρουσία υποχλωριωδών ιόντων σε αλκαλικό περιβάλλον. Η αντίδραση καταλύεται με ιόντα Mn(II). Η συγκέντρωση της σχηματιζόμενης ινδοφαινόλης είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της αμμωνίας. Η ένταση του χρώματος της ινδοφαινόλης ενισχύεται με την προσθήκη νιτροπρωσσικού νατρίου.

Με τη μέθοδο αυτή μπορούμε να προσδιοριστούν τα ιόντα του αμμωνίου σε δείγματα πόσιμου επιφανειακού και θαλασσινού νερού, αλλά ακόμη και σε δείγματα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων. Η συγκέντρωση πρέπει να βρίσκεται μεταξύ 0.01-2.0 mg/L και η μέτρηση απορρόφησης γίνεται στα 625nm.

Για τη μέτρηση των νιτρικών στα δείγματα που πάρθηκαν δεν χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα αντιδραστήρια, άλλα αντιδραστήρια που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο μας. Όπως και στη μέρηση των νιτρικών έγινε αρχικά κατασκευή, μια πρότυπη καμπύλη με δείγματα γνωστής συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης αμμωνιακών (NH₄) ήταν 15,78mg/L, 12.624mg/L, 9.468mg/L, 6.312mg/L, 3.156mg/L, 1.578mg/L, 0.789mg/L και 0.157mg/L.

Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων ήταν 0.750ml S1, 0.150ml solution, 0.750ml S2.

Καμπύλη βαθμονόμησης αμμωνιακών

Κατασκευάσαμε ένα solution Ammonium Sulfate 0,120g/L σε φιάλη 1000ml.

Με αυτό το τρόπο μπορέσαμε να κάνουμε διαδοχικές αραιώσεις, έτσι ώστε να φτιάξουμε μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για να κάνουμε τους υπολογισμούς μας στα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης αμμωνιακών.

Υπολογίσαμε την πραγματική συγκέντρωση αμμωνιακών μέσα από το άλας του θειικού αμμωνίου για να μπορέσουμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του σε κάθε ένα διάλυμα αραιώσης και να αντιστοιχίσουμε τη συγκέντρωση με την οπτική πυκνότητα.

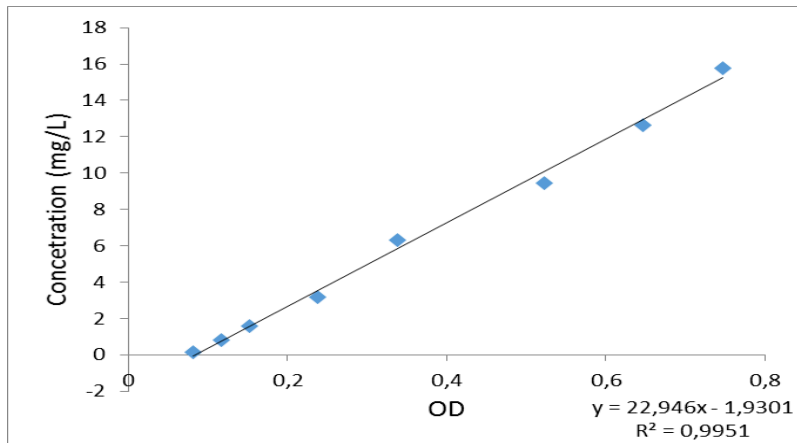
Το συνολικό μοριακό βάρος του NH_4SO είναι 114gr και των νιτρικών μέσα στο άλας 18gr. Βάσει αυτού καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι από τη συνολική συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα που κατασκευάσαμε μόνο το 15.78 % είναι τα αμμωνιακά.

Αραιώσεις: 100.00mg/L, 80mg/L, 60mg/L, 40mg/L, 20mg/L, 10mg/L, 5mg/L, 1mg/L

Η διαδικασία για τις μετρήσεις έγινε χρησιμοποιώντας έτοιμα δείγματα (kit).

Το διάλυμα που μετρήσαμε περιείχε 0.750ml S1, 0.150ml solution, 0.750ml S2.

Συγκέντρωση ammonium fate	Συγκέντρωση ammonium	Οπτική Πυκνότητα
100mg/L	15.78mg/L	0.748
80mg/L	12.624mg/L	0.647
60mg/L	9.468mg/L	0.523
40mg/L	6.312mg/L	0.338
20mg/L	3.156mg/L	0.238
10mg/L	1.578mg/L	0.153
5mg/L	0.789mg/L	0.117
1mg/L	0.157mg/L	0.082



5.7 Τρίτη Πειραματική Διαδικασία

Ανάπτυξη μικροοργανισμών για να παρατηρηθεί η διάσπαση των αμμωνιακών

Το Βήμα 1 του πειράματος ήταν το ίδιο με την πρώτη πειραματική διαδικασία. Αλλαγές στην μεθοδολογία έγιναν στο δεύτερο σκέλος του πειράματος.

Μετά τις 24 ώρες, αφού παρατηρήθηκε εμφανής ανάπτυξη στο εμπλουτιστικό θρεπτικό υπόστρωμα (PC). Ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε άλλα υγρά θρεπτικά υποστρώματα στα οποία μειώθηκε η ποσότητα των οργανικών και αυξήθηκε η παρουσία των αμμωνιακών αλάτων. Εδώ χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις αμμωνιακών σε κάθε ένα από τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα, αλλά διαφορετικές πηγές άνθρακα.

Διάλυμα 1- Ammonium medium: 100 mg/L NH_4Cl (= 51.42 mg/L NH_4^+), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1.5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g/L Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Διάλυμα 2 –Ammonium medium: 100 mg/L NH_4Cl (= 51.42 mg/L NH_4^+), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1.5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.03 ml/L Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)

Διάλυμα 3 –Ammonium medium: 100 mg/L NH_4Cl (= 51.42 mg/L NH_4^+), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1.5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.47 ml/L uccinic acid ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$).

Διάλυμα 4-Ammonium medium: 100 mg/L NH_4Cl (= 51.42 mg/L NH_4^+), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1.5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.73 ml/L Acetic acid (CH_3COOH).

Οι μετρήσεις των αμμωνιακών έγιναν με τον ίδιο τρόπο που ανεγέρθηκε στη δεύτερη πειραματική διαδικασία.

4.8 Τέταρτη Πειραματική Δοκιμή

Ανάπτυξη μικροοργανισμών για να παρατηρηθεί η διάσπαση των αμμωνιακών

Το Βήμα 1 του πειράματος ήταν το ίδιο με την πρώτη πειραματική διαδικασία. Αλλαγές στην μεθοδολογία έγιναν στο δεύτερο σκέλος του πειράματος.

Μετά τις 24 ώρες αφού παρατηρήθηκε εμφανής ανάπτυξη στο εμπλουτιστικό θρεπτικό υπόστρωμα (PC). Ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε άλλα υγρά θρεπτικά υποστρώματα στα οποία μειώθηκε η ποσότητα των οργανικών και αυξήθηκε η παρουσία των αμμωνιακών αλάτων. Εδώ χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις αμμωνιακών και σταθερή πηγή άνθρακα σε κάθε ένα από τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα, όμως ήταν διαφορετική η συγκέντρωση.

Διάλυμα 1- Ammonium medium: 600 mg/L NH_4Cl (= 359,9 mg/L NH_4^+), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1.5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5ml/L Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$).

Διάλυμα 2- Ammonium medium: 600 mg/L NH_4Cl (= 359,9 mg/L NH_4^+), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1.5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1ml/L Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$).

Διάλυμα 3- Ammonium medium: 600 mg/L NH_4Cl (= 359,9 mg/L NH_4^+), 0.2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1.5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Οι μετρήσεις των αμμωνιακών έγιναν με τον ίδιο τρόπο που ανεγέρθηκε στη δεύτερη πειραματική διαδικασία.

5.9 Πέμπτη Πειραματική Διαδικασία

Ανάπτυξη μικροοργανισμών για να παρατηρηθεί η διάσπαση των αμμωνιακών

Το Βήμα 1 του πειράματος ήταν το ίδιο με την πρώτη πειραματική διαδικασία. Αλλαγές στην μεθοδολογία έγιναν στο δεύτερο σκέλος του πειράματος.

Μετά τις 24 ώρες αφού παρατηρήθηκε εμφανής ανάπτυξη στο εμπλουτιστικό θρεπτικό υπόστρωμα (PC). Ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε άλλα υγρά θρεπτικά υποστρώματα στα οποία μειώθηκε η ποσότητα των οργανικών και αυξήθηκε η παρουσία των αμμωνιακών αλάτων. Εδώ χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μεταξύ τους διαλύματα. Ένα διάλλειμα νιτρικών και ένα αμμωνιακών για διαφορετικές κωνικές το κάθε ένα και για το κάθε ένα χρησιμοποιήθηκαν και δυο διαφορετικές πηγές άνθρακα σε διαφορετικά διαλύματα

Διάλυμα 1- Ammonium medium: 3,88g/L NH_4Cl (= 2000 mg/L NH_4^+), 0,2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1,5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11,90g/L Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Διάλυμα 2- Ammonium medium: 3,88g/L NH_4Cl (= 2000 mg/L NH_4^+), 0,2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 1,5 g/L Potassium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14g/L Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$).

Διάλυμα 3-Nitrate medium: 1,37g/L Sodium nitrate (= 1000 mg/L NO_3^-), 0,2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 11,90g/L Glucose.

Διάλυμα 4-Nitrate medium: 1,37g/L Sodium nitrate (= 1000 mg/L NO_3^-), 0,2g/L Sodium sulfate, 4g/L Sodium Phosphate, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14g/L Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$).

Σε αυτή την πειραματική διαδικασία έγιναν μετρήσεις νιτρικών και αμμωνιακών με τις μεθοδολογίες που προαναφέρθηκαν, αλλά και μετρήσεις νιτρωδών.

5.10 Μεθοδολογία μέτρησεις νιτρωδών

Για τη μέτρηση των νιτρωδών στα δείγματα που πάρθηκαν χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα αντιδραστήρια kits (έτοιμα πακέτα χημικών ποιοτικής ανάλυσης). Για τη διαδικασία αυτή, αφού έγινε μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστής συγκέντρωσης ακολουθήθηκαν οι μετρήσεις των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης, τα οποία είχαν ληφθεί κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των βακτηρίων.

Η καμπύλη βαθμονόμησης για τα νιτρώδη έγινε με την ακόλουθη μεθοδολογία.

Κατασκευάστηκαν διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης νιτρωδών (NO_2^-) 15mg/L, 9mg/L, 3mg/L και 1mg/L. Αυτά τα δείγματα μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο στα 543nm και έγινε συσχέτιση της απορρόφησης με τη συγκέντρωση. Αφού έγινε η συσχέτιση, με την βοήθεια της γραφικής παράστασης της ευθείας και ακολούθως η εξίσωση της ευθείας ήταν πλέον εφικτό για κάθε δείγμα έχοντας την απορρόφηση να υπολογίζεται και η συγκέντρωση.

Καμπύλη βαθμονόμησης νιτρωδών

Κατασκευάσαμε ένα solution Sodium Nitrite 22.52 mg/L σε φιάλη 1000ml.

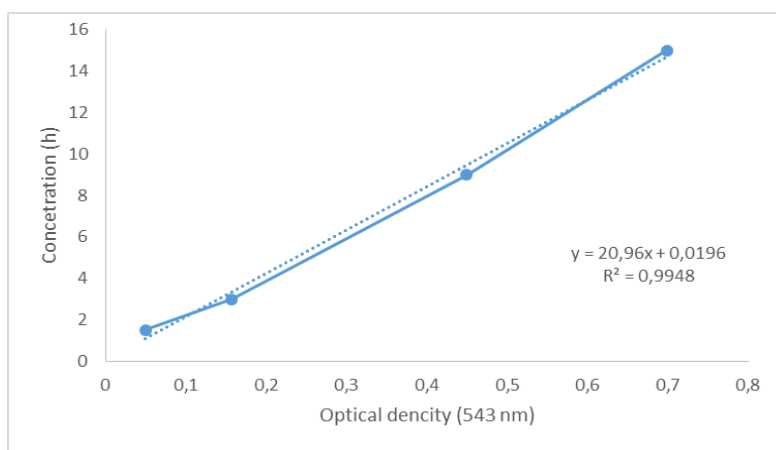
Με αυτό το τρόπο μπορέσαμε να κάνουμε διαδοχικές αραιώσεις, έτσι ώστε να φτιάξουμε μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για να κάνουμε τους υπολογισμούς μας στα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης νιτρωδών.

Υπολογίσαμε την πραγματική συγκέντρωση αμμωνιακών μέσα από το άλας του θειικού αμμωνίου για να μπορέσουμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωση του σε κάθε ένα διάλυμα αραιώσης και να αντιστοιχίσουμε τη συγκέντρωση με την οπτική πυκνότητα.

Το συνολικό μοριακό βάρος του NaNO_2 είναι 69gr και των νιτρωδών μέσα στο άλας 46 gr. Βάσει αυτού καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι από τη συνολική συγκέντρωση του άλατος στο διάλυμα που κατασκευάσαμε μόνο το 66.6 % είναι τα νιτρώδη.

Αραιώσεις: 15mg/L, 9mg/L, 3mg/L, 1,5mg/L

Η διαδικασία για τις μετρήσεις έγινε χρησιμοποιώντας, έτοιμα δείγματα (kit) όπως περιγράφεται πιο πάνω.



Κεφάλαιο 6- Αποτελέσματα πειραματικών διαδικασιών

6.1 Πειραματική Ενότητα 1-Μετρήσεις και αποτελέσματα NO₃

Μετρήσεις των άγνωστης συγκέντρωσης δειγμάτων

Αυτή η πειραματική ενότητα χωρίζεται σε τρία στάδια.

Στάδιο 1 : Μετρήσεις έγιναν σε δυο διαφορετικά βακτήρια, το ΚΣΒ και το ΒΜΜ 5. Για το κάθε ένα από τα προαναφερθέντα βακτήρια έγιναν δύο κωνικές φιάλες. Τα δείγματα αραιώθηκαν 1-10 για να γίνει μέτρηση των νιτρικών. Με τον όρο αραιώση 1 προς 10 εννοούμε ότι παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το αραιώνουμε με 9ml νερό. Σε αυτό το δείγμα η αρχική συγκέντρωση είναι 1500mg/L NaNO₃. Η αναλογία των νιτρικών στο δείγμα είναι το 72.94% από την αρχική συγκέντρωση του άλατος. Συγκεκριμένα στην αρχική μας συγκέντρωση έχουμε 1094mg NO₃⁻. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 5gr γλυκόζης (βλ. υλικά και μέθοδοι)

Στα πιο κάτω γραφήματα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των νιτρικών στην πρώτη πειραματική διαδικασία.

Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης νιτρικών παρουσία βακτηρίου ΚΣΒ 1 και ΚΣΒ 2 (η αρίθμηση 1-2 παραπέμπει στην κωνική φιάλη – για κάθε δείγμα έχουμε δυο κωνικές φιάλες.) σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 1094 mg NO₃⁻ και 5gr/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

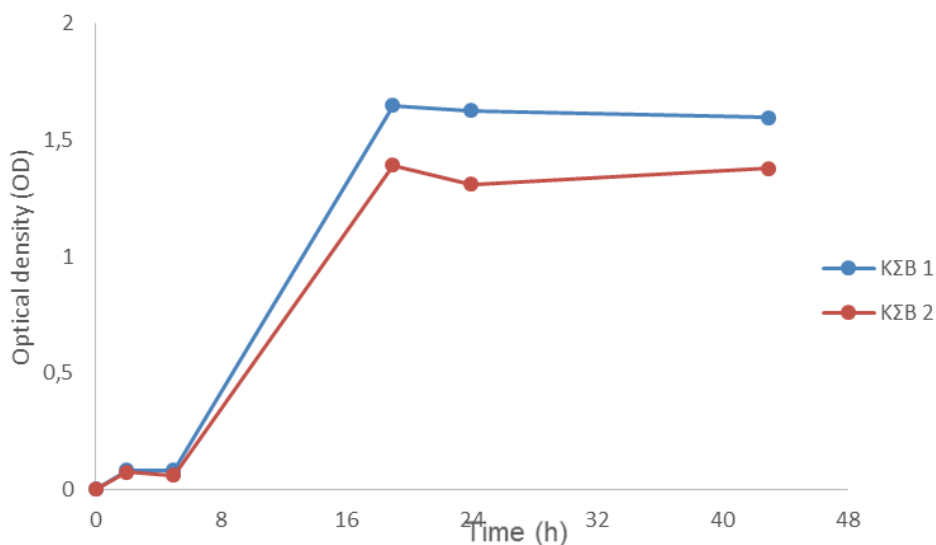


Figure 1: Ανάπτυξη του βακτηρίου ΚΣΒ με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου. Ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τον χρόνο ενώ ο κάθετος την οπτική πυκνότητα.

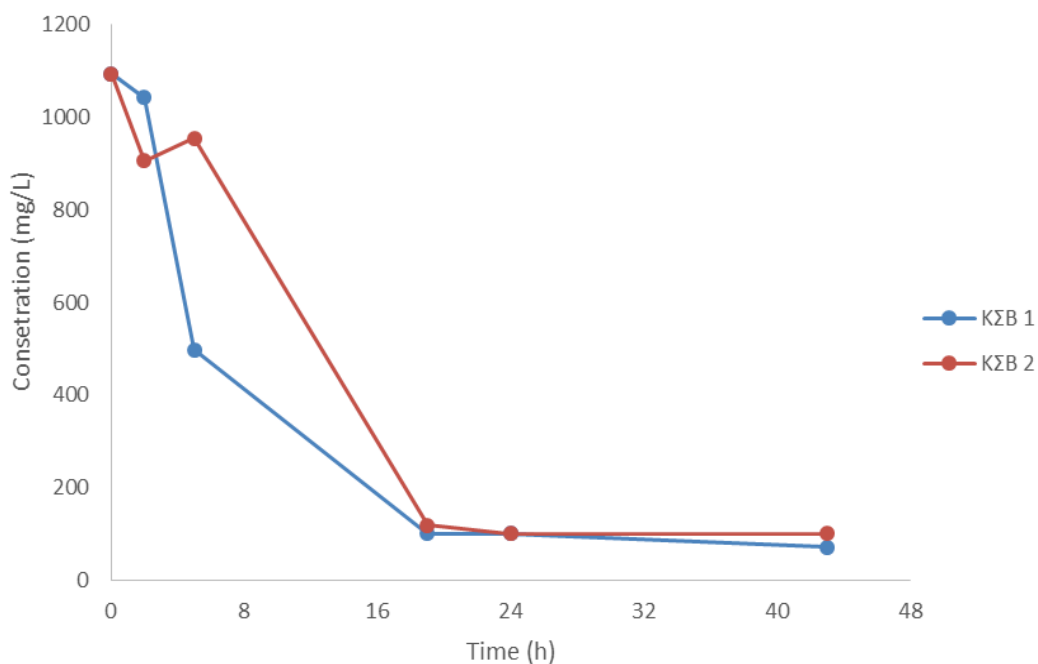


Figure 2: Συγκέντρωση νιτρικών μετά τη δράση του βακτηρίου ΚΣΒ σε διάλυμα νιτρικών συναρτήσει του χρόνου. Ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει των χρόνο, ενώ ο κάθετος την συγκέντρωση των νιτρικών.

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού ΚΣΒ σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν παίρνουμε τη καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού όπως γίνεται στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 1).

Στη δεύτερη γραφική παράσταση (Figure 2), βλέπουμε την συγκέντρωση των νιτρικών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των νιτρικών μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς αυτό οφείλεται στην δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν ήταν μέχρι τις 42 ώρες. Παρατηρούμε βέβαια ότι υπάρχουν κάποιες αποκλίσεις σε κάποιες από τις μετρήσεις μας. Αυτός ήταν και ο λόγος για τον οποίο είχαμε δύο κωνικές φιάλες για κάθε μια από τις δοκιμές μας

Δείγμα 2 :Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης νιτρικών παρουσία βακτηρίου BW5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 1094 mg/LNO₃⁻ και 5gr/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

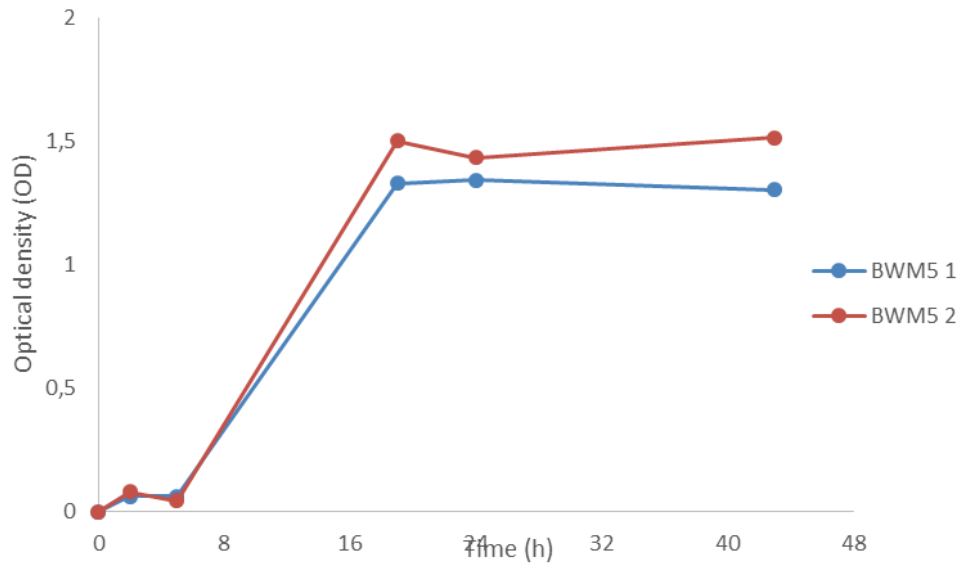


Figure 3: Ανάπτυξη του βακτηρίου BWM5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου. Ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τον χρόνο ενώ ο κάθετος την οπτική πυκνότητα.

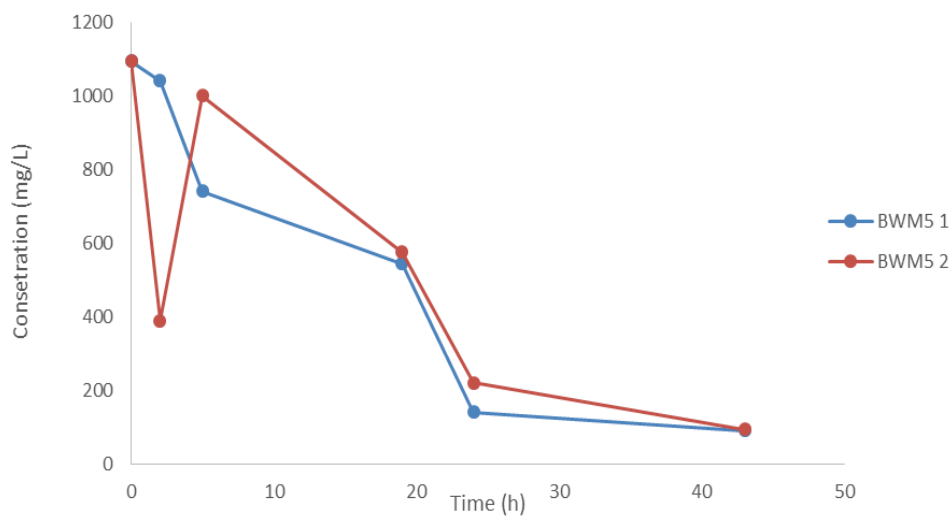


Figure 4: Συγκέντρωση νιτρικών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα νιτρικών συναρτήσει του χρόνου

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM 5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που πάρθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όπως γίνεται στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 3).

Στη δεύτερη γραφική παράσταση (Figure 4), βλέπουμε τη συγκέντρωση των νιτρικών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των νιτρικών μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς αυτό οφείλεται στη δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν ήταν μέχρι τις 42 ώρες.

Στη συνέχεια υπολογίσθηκαν οι μέσοι όροι των τιμών που προέκυψαν από τις δύο κωνικές για το κάθε ένα από τα δύο βακτήρια για να μπορεί να γίνει σύγκριση της δράσης τους σε ότι αφορά στη διάσπαση των νιτρικών. Επίσης έγινε και υπολογισμός του μέσου όρου απομάκρυνσης των νιτρικών, ώστε να παρουσιαστεί ξεκάθαρα η συνολική απομάκρυνση για να μπορέσει να γίνει μετέπειτα αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας.

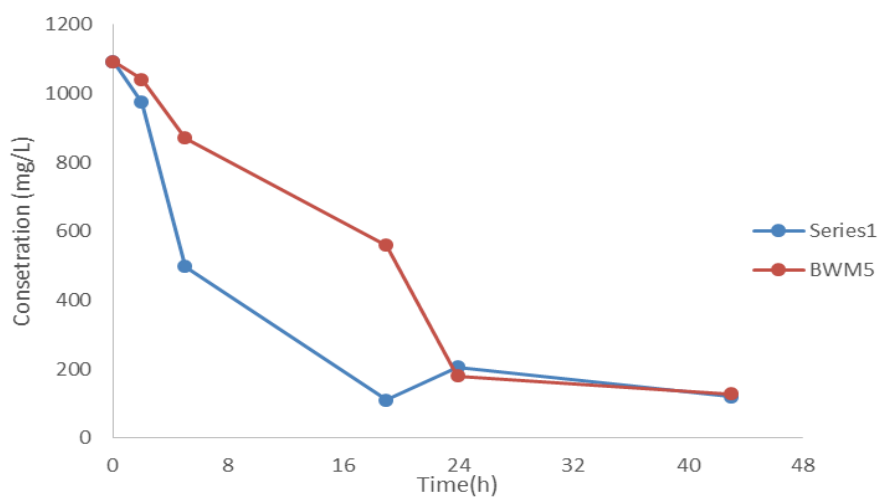


Figure 5: Συγκέντρωση των νιτρικών με βάση τους μέσους όρους των δύο διαλυμάτων νιτρικών παρουσία του βακτηρίου KSB και BWM5. Η παρουσία των νιτρικών παρουσιάζετε συναρτήσει του χρόνου.

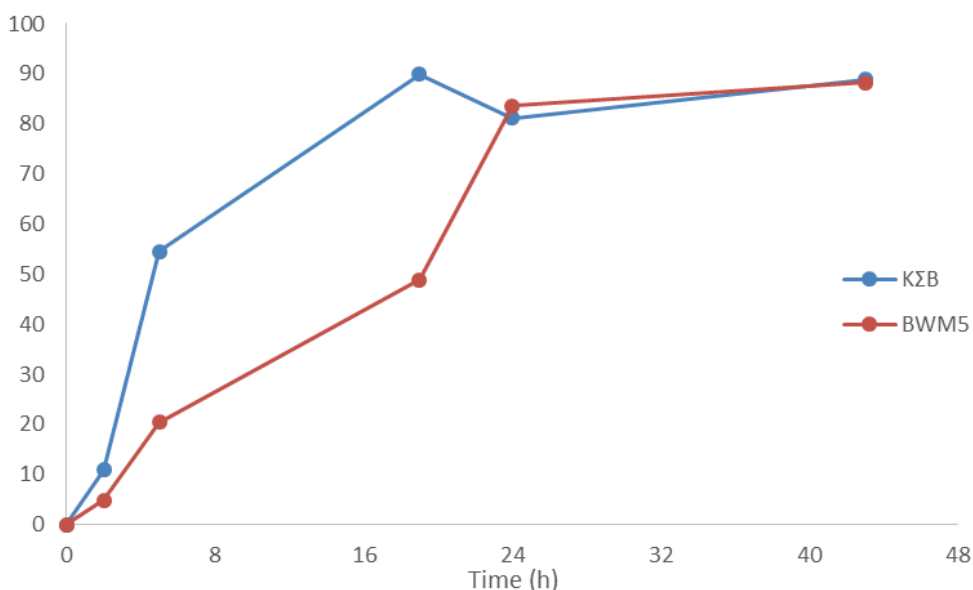


Figure 6: Ποσοστό απομάκρυνσης των νιτρικών στο μέσο όρο των δειγμάτων με παρουσία του βακτηρίου ΚΣΒ και BWM5.

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε τη δράση των δυο μικροοργανισμών σε ότι αφορά την απομάκρυνση νιτρικών. Τα γραφήματα είναι με βάση τους μέσους όρους των τιμών που λήφθηκαν. Επίσης παρουσιάζεται η επί τοις εκατόν απομάκρυνση νιτρικών από τα διαλύματα.

Στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 5) βλέπουμε τους μέσους όρους απομάκρυνσης των νιτρικών για το κάθε βακτήριο. Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι οι τελικές τιμές απομάκρυνσης φαίνεται να ταυτίζονται για τους δύο μικροοργανισμούς. Η διαφορά είναι ότι η δράση του βακτηρίου BWM5 (*Klebsiella spp.*) φαίνεται να παρουσιάζει καλύτερη ομαλότητα και σταθερότητα σε σύγκριση με τον μικροοργανισμό ΚΣΒ.

Παρατηρώντας το δεύτερο γράφημα (Figure 6) βλέπουμε την επί τοις εκατό απομάκρυνση των νιτρικών συναρτήσει του χρόνου. Σε αυτό το γράφημα όπως και στο προηγούμενο παρατηρούμε καλύτερη κατανομή των τιμών και μια ομαλότητα ροής στην καμπύλη του BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε σύγκριση με το ΚΣΒ.

Στάδιο 2: Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκε μόνο το βακτήριο BWM 5 και για να γίνουν οι μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν δύο κωνικές φιάλες. Η διαφορά από το προηγούμενο στάδιο πέραν από τη χρήση ενός βακτηρίου από τα δύο που επιλέχθηκαν αρχικά, ήταν η σημαντική μείωση της συγκέντρωσης νιτρικών.

Τα δείγματα αραιώθηκαν κατά 1:2 για να μετρήσουμε τη συγκέντρωση των νιτρικών. Με τον όρο αραιώση 1 προς 2 εννοούμε ότι παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το

αραιώνουμε με 1ml νερό. Σε αυτά τα δείγματα η αρχική συγκέντρωση είναι 60mg/L NaNO_3 . Η αναλογία των νιτρικών στο δείγμα είναι το 72.94% από την αρχική συγκέντρωση του άλατος. Συγκεκριμένα στην αρχική μας συγκέντρωση έχουμε 43.76mg NO_3^- .

Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης νιτρικών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 43.76 mg /L NO_3^- και 5gr/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

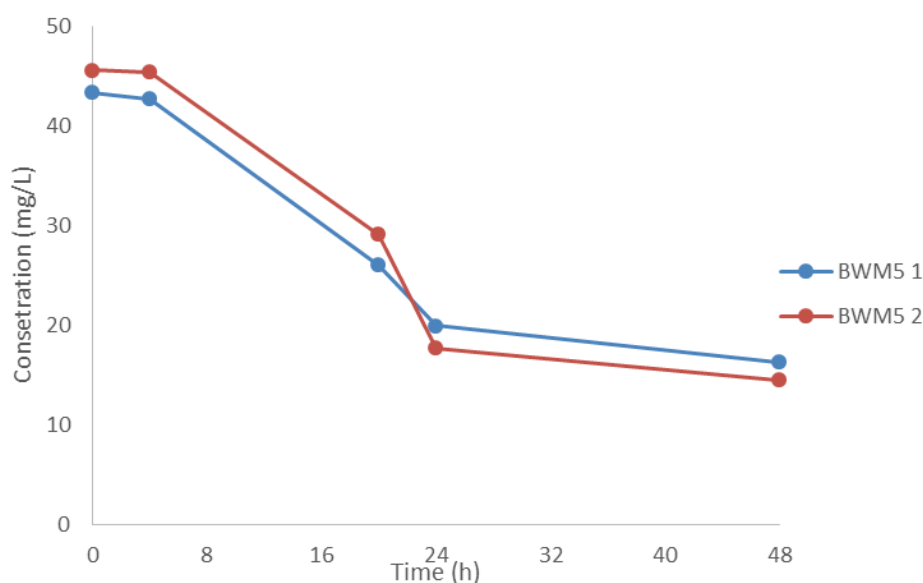


Figure 8: Συγκέντρωση νιτρικών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα νιτρικών συναρτήσει του χρόνου

Στην γραφική παράσταση (Figure 8), βλέπουμε τη συγκέντρωση των νιτρικών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των νιτρικών μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς αυτό οφείλεται στη δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που λήφθηκαν ήταν μέχρι τις 48 ώρες.

Στάδιο3: Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκε μόνο το βακτήριο BWM 5 και για να γίνουν οι μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε μόνο μια κωνική φιάλη. Η διαφορά από το προηγούμενο στάδιο ήταν η μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και κατ' επέκταση η μείωση της πηγής άνθρακα.

Τα δείγματα αραιώθηκαν κατά 1:2 για να μετρήσουμε τη συγκέντρωση των νιτρικών. Με τον όρο αραιώση 1 προς 2 εννοούμε ότι παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το

αραιώνουμε με 1ml νερό. Σε αυτό δείγμα η αρχική συγκέντρωση είναι 60mg/L NaNO_3 . Η αναλογία των νιτρικών στο δείγμα είναι το 72.94% από την αρχική συγκέντρωση του άλατος. Συγκεκριμένα στην αρχική μας συγκέντρωση έχουμε 43.76mg NO_3^- και 2gr/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

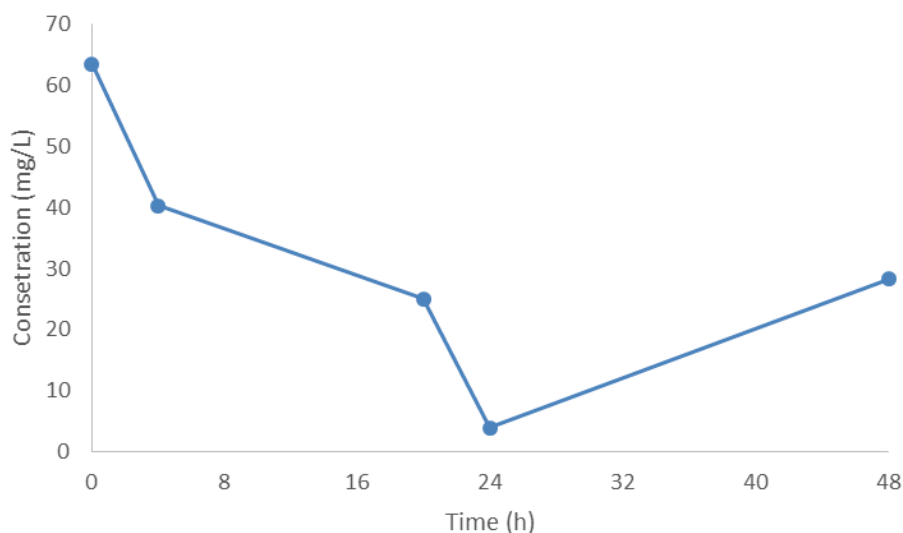


Figure 9: Συγκέντρωση νιτρικών μετά την δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα νιτρικών συναρτήσει του χρόνου

Στη πιο πάνω γραφική παράσταση φαίνεται το αποτέλεσμα της δράσης του βακτηρίου BWM5 (*Klebsiella spp.*), και η μείωση των νιτρικών συναρτήσει του χρόνου. Παρατηρούμε όμως ότι οι τιμές που ληφθήκαν δεν έχουν σωστή κατανομή, αλλά δεν μπορούμε να έχουμε ακριβή συμπεράσματα από αυτό το γράφημα.

6.2 Πειραματική Διαδικασία 2-Μετρήσεις και αποτελέσματα NH_4^+

Μετρήσεις των άγνωστης συγκέντρωσης δειγμάτων

Μετρήσεις έγιναν σε δυο διαφορετικά βακτήρια, το ΚΣΒ και το BWM 5. Για το κάθε ένα από τα προαναφερθέντα βακτήρια έγιναν δύο κωνικές φιάλες. Τα δείγματα αραιώθηκαν κατά 1 - 10 για να μετρήσουμε τα αμμωνιακά. Με τον όρο αραιώση 1 προς 10 εννοούμε ότι παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το αραιώνουμε με 9ml νερό. Σε αυτό το δείγμα η αρχική συγκέντρωση είναι 600mg/L NH_4Cl . Η αναλογία των αμμωνιακών στο δείγμα είναι το 51,42% από την αρχική συγκέντρωση του άλατος. Συγκεκριμένα στην αρχική μας συγκέντρωση έχουμε 308,52mg NH_4^+ . Ο υπολογισμός των αραιώσεων θα γίνει στη συνέχεια, αφού επεξεργαστούμε τα δείγματα μας.

Δείγμα 1: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου ΚΣΒ σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 308,52 mg /L NH_4^+ και 5gr/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

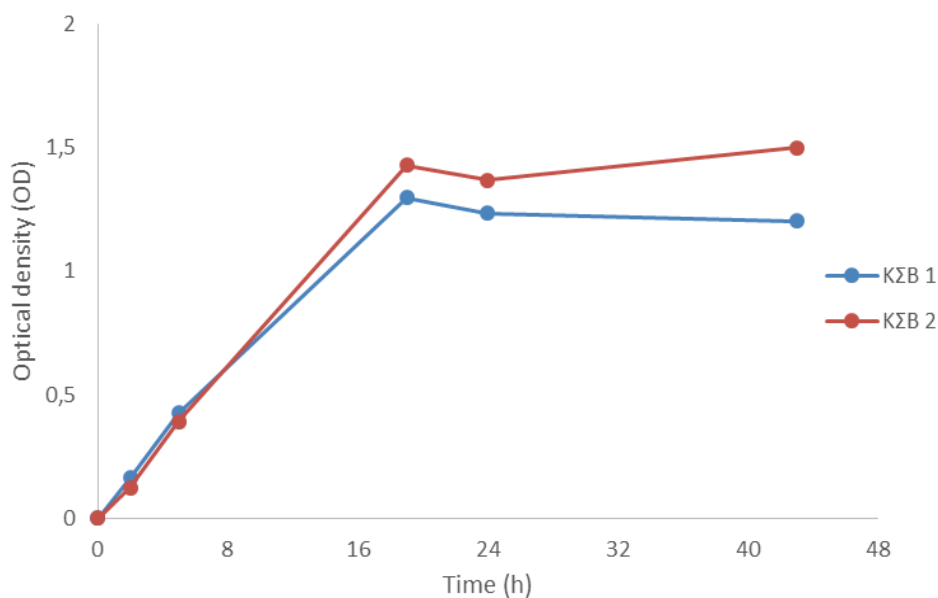


Figure 10: Ανάπτυξη βακτηρίου ΚΣΒ με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

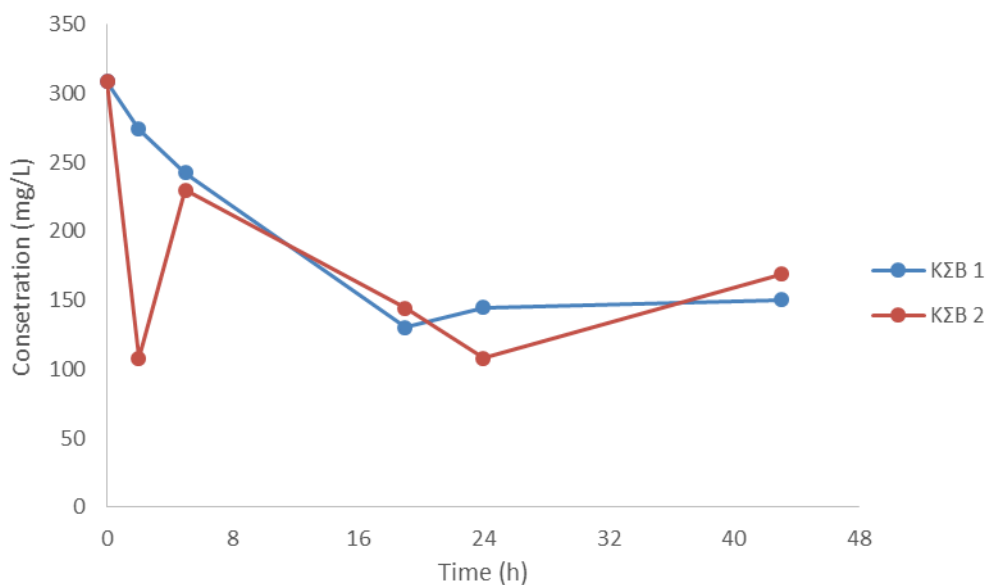


Figure 11: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά τη δράση του βακτηρίου ΚΣΒ σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού ΚΣΒ σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι).

Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού όπως γίνεται στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 10).

Στην δεύτερη γραφική παράσταση (Figure 11), βλέπουμε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των αμμωνιακών μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς αυτό οφείλεται στη δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που λήφθηκαν ήταν μέχρι τις 42 ώρες.

Παρατηρούμε ότι ενώ οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού ταυτίζονται στις δύο κωνικές φιάλες, έχουμε μια έντονη διαφοροποίηση μεταξύ τους σ' ότι αφορά στην απομάκρυνση των αμμωνιακών από το διάλυμα. Παρατηρούμε ότι σε μια από τις δύο κωνικές έχουμε ένα μεγάλο σκαμπανέβασμα των τιμών, το οποίο δεν δικαιολογείται. Ο μόνος πιθανός λόγος είναι πιθανό σφάλμα κατά τη μέτρηση της συγκέντρωσης αμμωνιακών.

Δείγμα 2: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου BWM 5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 308,52 mg /L NH_4^+ και 5gr/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

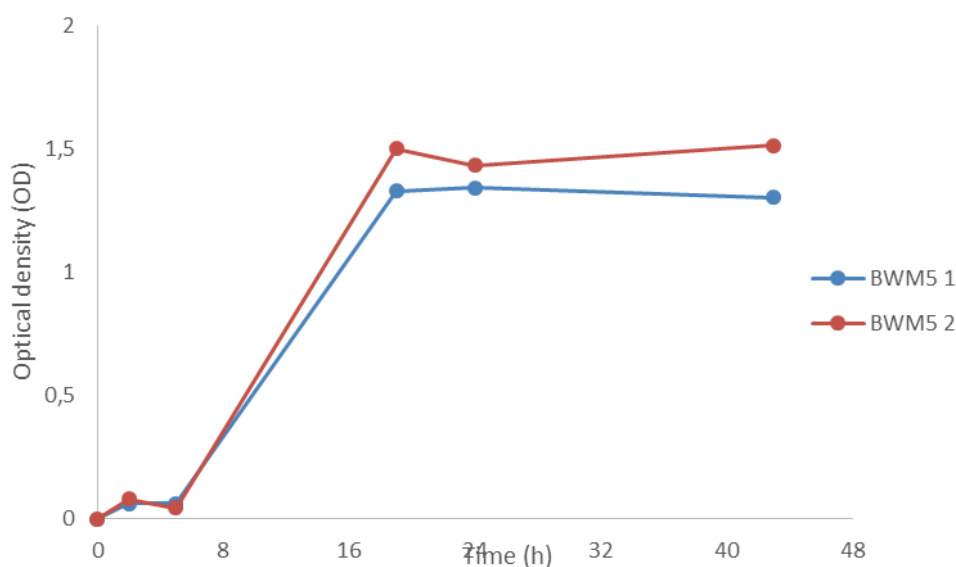


Figure 12: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

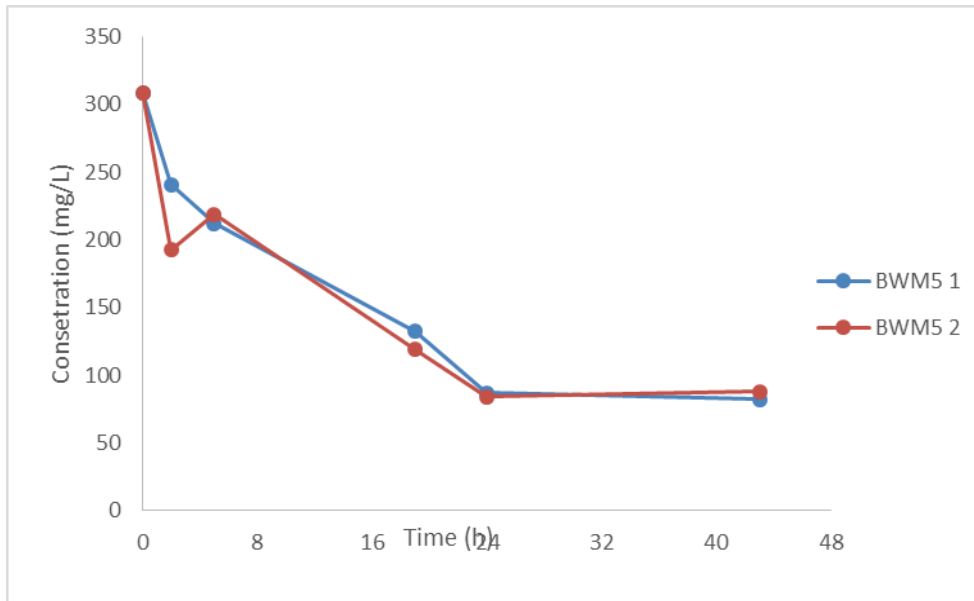


Figure 13: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM 5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όπως γίνεται στη πρώτη γραφική παράσταση (Figure 12).

Στο δεύτερο γράφημα (Figure 13), βλέπουμε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των αμμωνιακών μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς αυτό οφείλεται στη δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που λήφθηκαν ήταν μέχρι τις 42 ώρες.

Παρατηρούμε ότι ενώ οι καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού ταυτίζονται στις δύο κωνικές φιάλες, έχουμε μια έντονη διαφοροποίηση μεταξύ τους σ' ότι αφορά στην απομάκρυνση των αμμωνιακών από το διάλυμα. Παρατηρούμε επίσης ότι στη δεύτερη κωνική στις 2 ώρες έχουμε μια πτώση των αμμωνιακών, η οποία στη συνέχεια διαψεύδεται από την επόμενη μέτρηση. Ο μόνος πιθανός λόγος είναι πιθανό σφάλμα κατά τη μέτρηση της συγκέντρωσης αμμωνιακών.

Στη συνέχεια υπολογίσθηκαν οι μέσοι όροι των τιμών που προέκυψαν από τις δύο κωνικές για το κάθε ένα από τα δύο βακτήρια, για να μπορεί να γίνει η σύγκριση τους. Επίσης έγινε και υπολογισμός του μέσου όρου απομάκρυνσης των νιτρικών, ώστε να παρουσιαστεί ξεκάθαρα η συνολική απομάκρυνση, για να μπορέσει να γίνει μετέπειτα αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας.

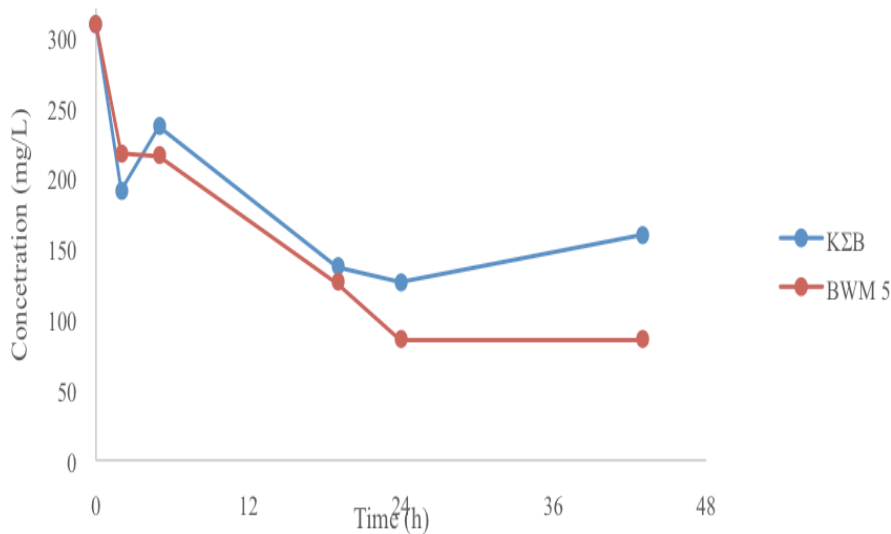


Figure14: Συγκέντρωση των αμμωνιακών με βάση τους μέσους όρους των δύο διαλυμάτων αμμωνιακών παρουσία του βακτηρίου ΚΣΒ και BWM 5. Η παρουσία των αμμωνιακών παρουσιάζεται συναρτήσει του χρόνου.

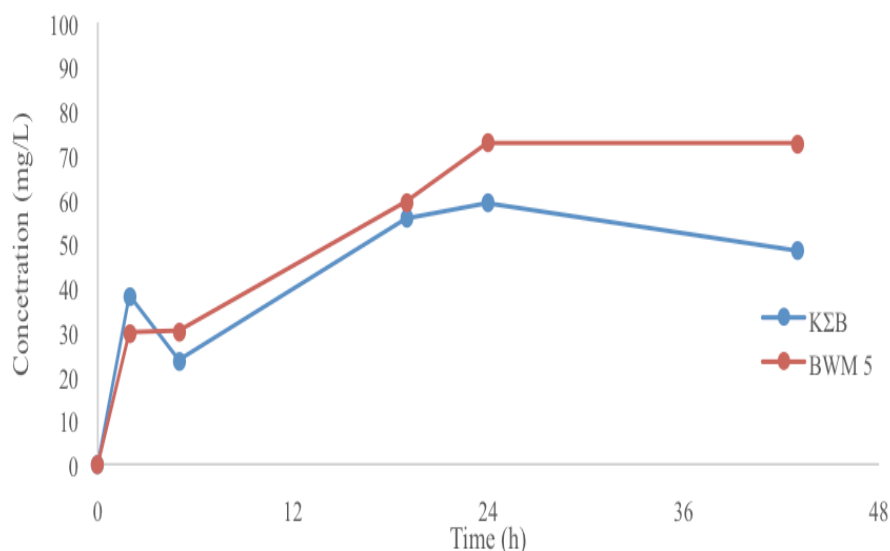


Figure15: Ποσοστό απομάκρυνσης των αμμωνιακών στο μέσο όρο των δειγμάτων με παρουσία του βακτηρίου ΚΣΒ και BWM5

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε τη δράση των δυο μικροοργανισμών σε ότι αφορά την απομάκρυνση αμμωνιακών. Οι γραφικές παραστάσεις είναι με βάση τους μέσους όρους των τιμών που πάρθηκαν. Επίσης παρουσιάζεται η επί τοις εκατόν απομάκρυνση αμμωνιακών από τα διαλύματα.

Στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 14) βλέπουμε τους μέσους όρους απομάκρυνσης των νιτρικών για το κάθε βακτήριο. Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι οι τελικές τιμές απομάκρυνσης φαίνεται να ταυτίζονται για τους δύο μικροοργανισμούς. Η διαφορά είναι ότι η δράση του βακτηρίου BWM5 (*Klebsiella spp.*) φαίνεται να

παρουσιάζει καλύτερη ομαλότητα και σταθερότητα σε σύγκριση με το μικροοργανισμό ΚΣΒ.

Παρατηρώντας την δεύτερη γραφική παράσταση (Figure 15) βλέπουμε την επί τοις εκατό απομάκρυνση των νιτρικών συναρτήσει του χρόνου. Σε αυτό το γράφημα όπως και στο προηγούμενο παρατηρούμε καλύτερη κατανομή των τιμών και μια ομαλότητα ροής στην καμπύλη του BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε σύγκριση με το ΚΣΒ.

Στάδιο 2: Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκε μόνο το βακτήριο BWM 5 και για να γίνουν οι μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν δύο κωνικές φιάλες. Η διαφορά από το προηγούμενο στάδιο πέραν από τη χρήση ενός βακτηρίου από τα δύο που επιλέχθηκαν αρχικά ήταν η σημαντική μείωση της συγκέντρωσης αμμωνιακών.

Τα δείγματα αραιώθηκαν κατά 1:2 για να μετρήσουμε την συγκέντρωση των νιτρικών. Με τον ορό αραιώση 1 προς 2 εννοούμε ότι παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το αραιώνουμε με 1ml νερό. Σε αυτά τα δείγματα η αρχική συγκέντρωση είναι 60mg/L NaNO_3 . Η αναλογία των νιτρικών στο δείγμα είναι το 51,42% από την αρχική συγκέντρωση του άλατος. Συγκεκριμένα στην αρχική μας συγκέντρωση έχουμε 35,99mg NH_4^+ και 5gr/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

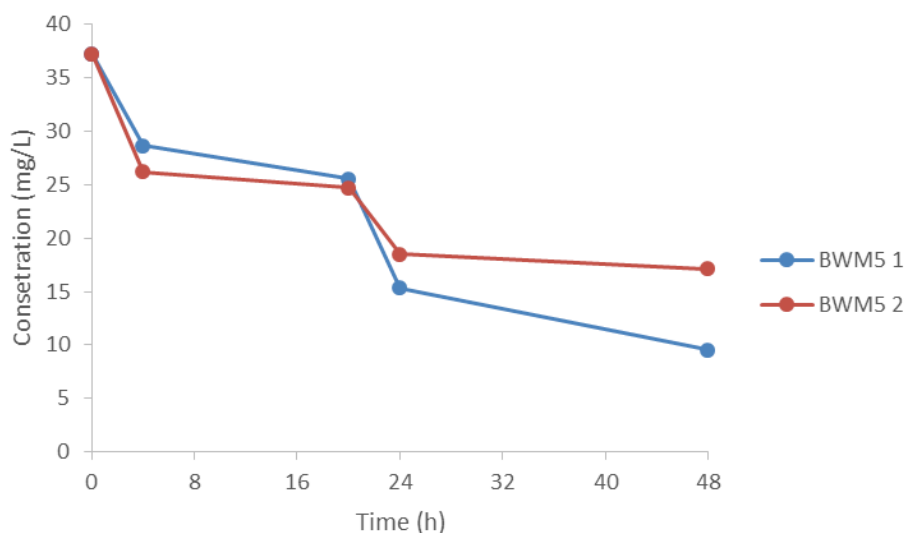


Figure17: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Σε αυτό το στάδιο κρίθηκε σημαντικό να γίνει μέτρηση της συγκέντρωσης των νιτρικών που παράγονται και το κατά πόσον γίνεται απομάκρυνση τους στα δείγματα τα οποία είχαν συγκέντρωση αμμωνιακών και όχι νιτρικών. Η αρχική συγκέντρωση αμμωνιακών στα διαλύματα ήταν 35,99mg NH_4^+ και ως πηγή άνθρακα 5gr/L γλυκόζη.

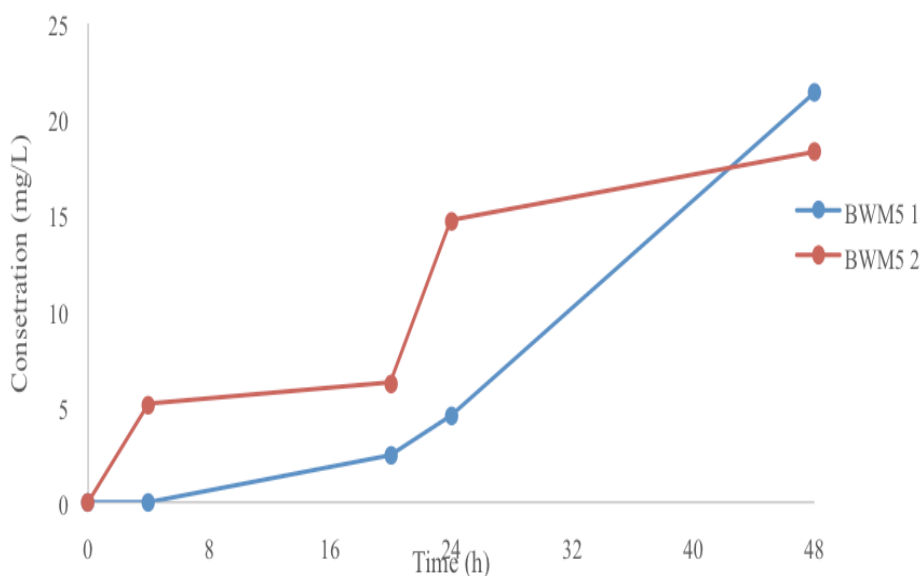


Figure 18: Συγκέντρωση νιτρικών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

6.3 Πειραματική Διαδικασία 3 -Μετρήσεις και αποτελέσματα NH_4^+

Μετρήσεις των άγνωστης συγκέντρωσης δειγμάτων

Τα δείγματα αραιώθηκαν 1 προς 2 για να μετρήσουμε τα αμμωνιακά. Με τον όρο αραιώση 1 προς 2 εννοούμε ότι παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το αραιώνουμε με 1ml νερό. Σε αυτό το δείγμα η αρχική συγκέντρωση είναι $100\text{mg/L NH}_4\text{Cl}$. Η αναλογία των αμμωνιακών στο δείγμα είναι το 51,42% από την αρχική συγκέντρωση του άλατος. Συγκεκριμένα στην αρχική μας συγκέντρωση έχουμε $51,42\text{ mg NH}_4^+$.

Κάθε δείγμα έχει διαφορετική πηγή άνθρακα. Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές άνθρακα ήταν:

- Γλυκερόλη
- Γλυκόζη
- Ηλεκτρικό Οξύ
- Οξικό Οξύ

Δείγμα 1 :Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα $51,42\text{mg/L NH}_4^+$. Σε αυτό το δείγμα η πηγή άνθρακα είναι το ηλεκτρικό οξύ (Succinic acid).

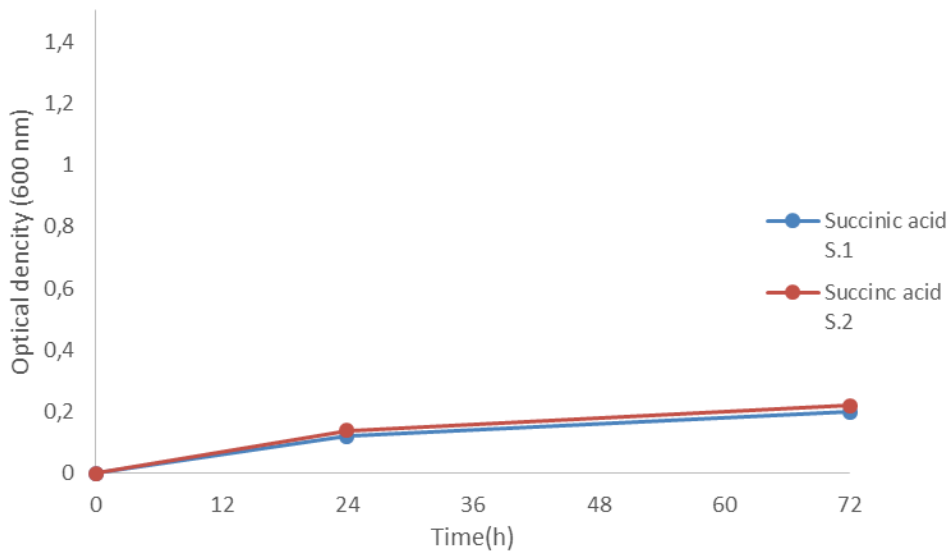


Figure 19: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

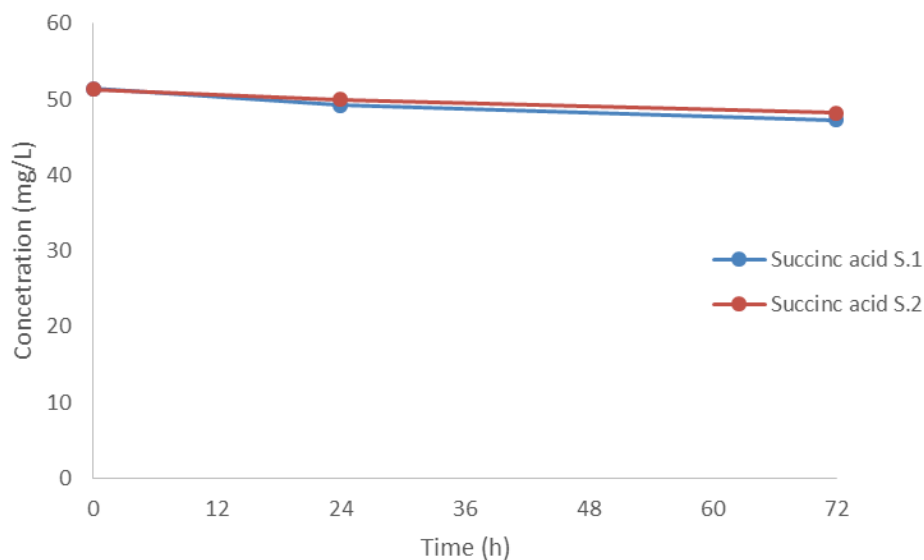


Figure 20: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα το οποίο έχει ως πηγή άνθρακα το ηλεκτρικό οξύ. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όπως γίνεται στο πρώτο γράφημα (Figure 19). Παρατηρώντας το γράφημα μπορούμε να δούμε ότι ο μικροοργανισμός σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα δεν δείχνει να αναπτύσσεται σε τόσο μεγάλο βαθμό.

Στην δεύτερη γραφική παράσταση (Figure 20), βλέπουμε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των αμμωνιακών δεν μειώνεται αισθητά με την πάροδο του χρόνου. Αυτό μας παραπέμπει αυτόματα βλέποντας και τις δύο γράφηκες ότι ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται στο μέγιστο σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να μη μεταβολίζει και τα αμμωνιακά που βρίσκονται σε αυτό.

Δείγμα 2: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 51,42mg/L NH_4^+ . Σε αυτό το δείγμα η πηγή άνθρακα είναι το οξικό οξύ (Acetic acid).

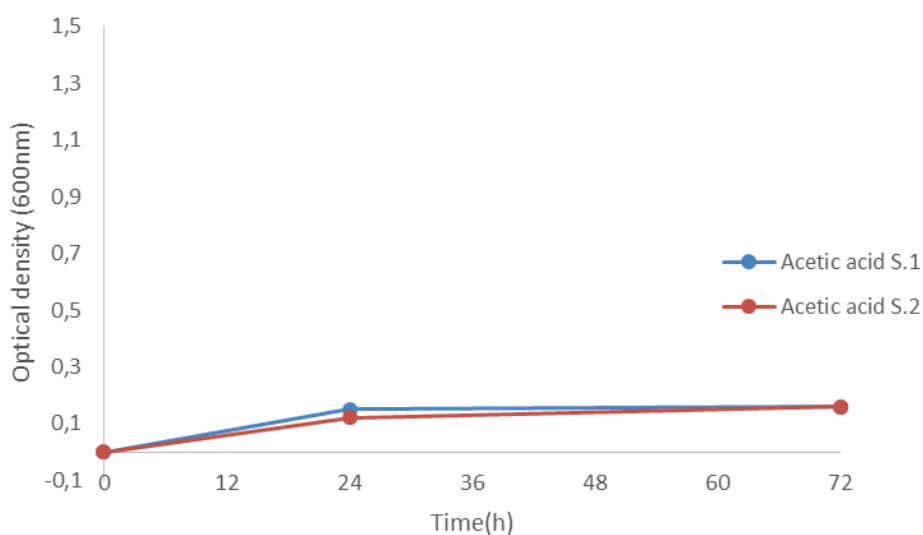


Figure 21: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συνάρτηση του χρόνου

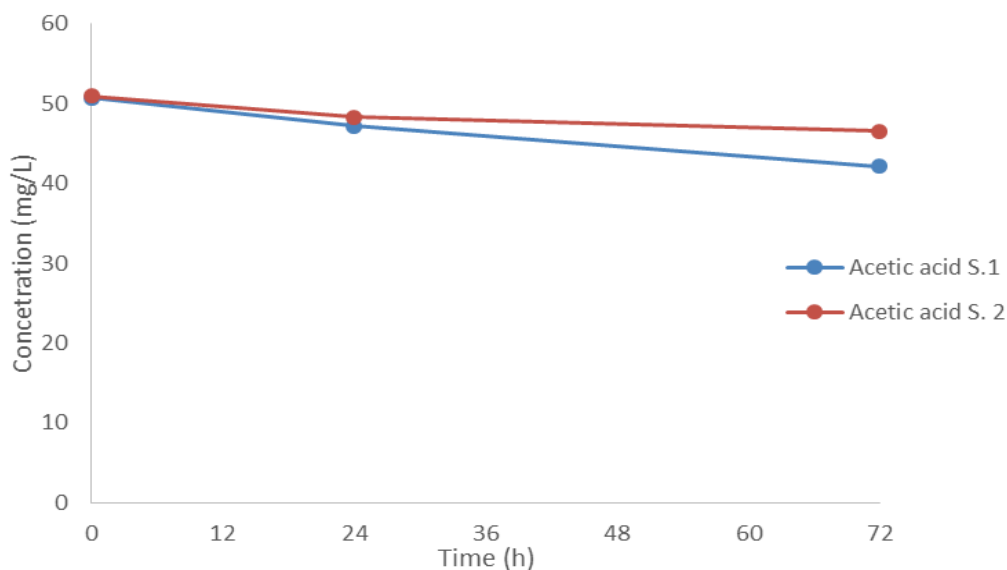


Figure 22: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά την δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσεσι του χρόνου

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα το οποίο έχει ως πηγή άνθρακα το οξικό οξύ. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού όπως γίνεται στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 21). Παρατηρώντας το γράφημα μπορούμε να δούμε ότι ο μικροοργανισμός σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα δεν δείχνει να αναπτύσσεται σε τόσο μεγάλο βαθμό.

Στην δεύτερη γραφική παράσταση (Figure 22), βλέπουμε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσεσι του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των αμμωνιακών δεν μειώνεται αισθητά με την πάροδο του χρόνου. Αυτό μας παραπέμπει αυτόματα βλέποντας και τις δύο γραφικές παραστάσεις ότι ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται στο μέγιστο σε αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα, με αποτέλεσμα να μη μεταβολίζει και τα αμμωνιακά που βρίσκονται σε αυτό.

Δείγμα 3: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 51,42mg/LNH₄. Σε αυτό το δείγμα η πηγή άνθρακα είναι η γλυκερόλη.

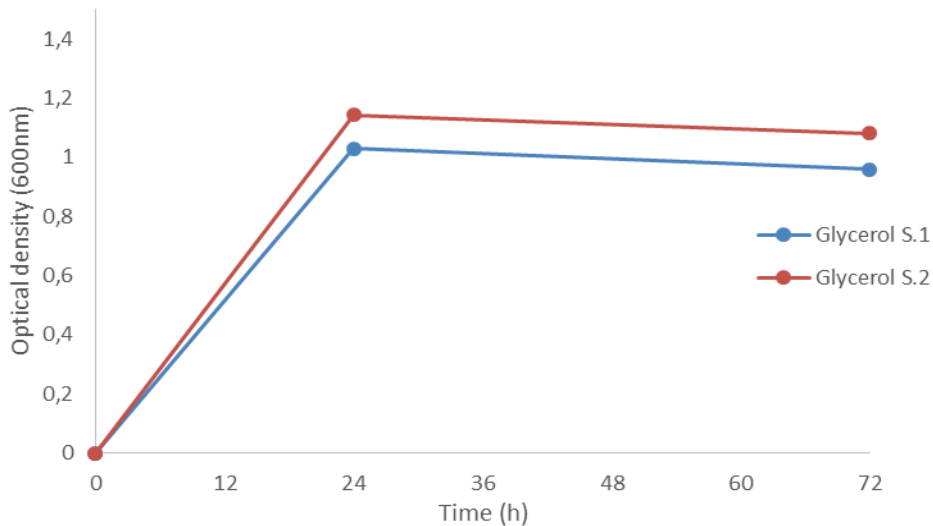


Figure 23: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

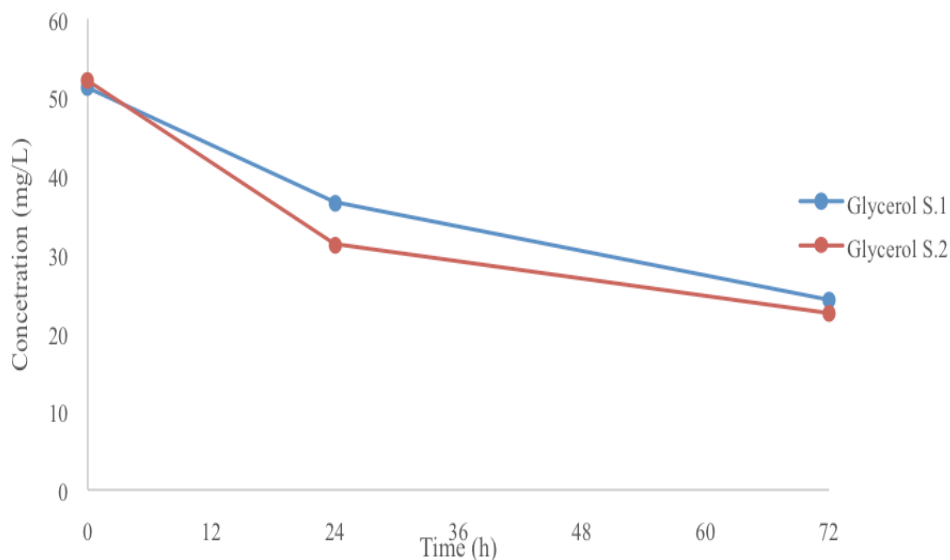


Figure 24: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά την δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα το οποίο έχει ως πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού όπως γίνεται στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 23). Παρατηρώντας το γράφημα μπορούμε να δούμε ότι ο μικροοργανισμός σε αυτό το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα δείχνει να αναπτύσσεται κανονικά.

Στην δεύτερη γραφική παράσταση (Figure 24), βλέπουμε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των

αμμωνιακών μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό μας παραπέμπει αυτόματα βλέποντας και τις δύο γράφικες ότι ο μικροοργανισμός από τη στιγμή που αναπτύσσεται σε αυτό το υπόστρωμα μπορεί να μεταβολίσει τα αμμωνιακά.

Δείγμα 4: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 51,42mg/L NH₄. Σε αυτό το δείγμα η πηγή άνθρακα είναι η γλυκόζη.

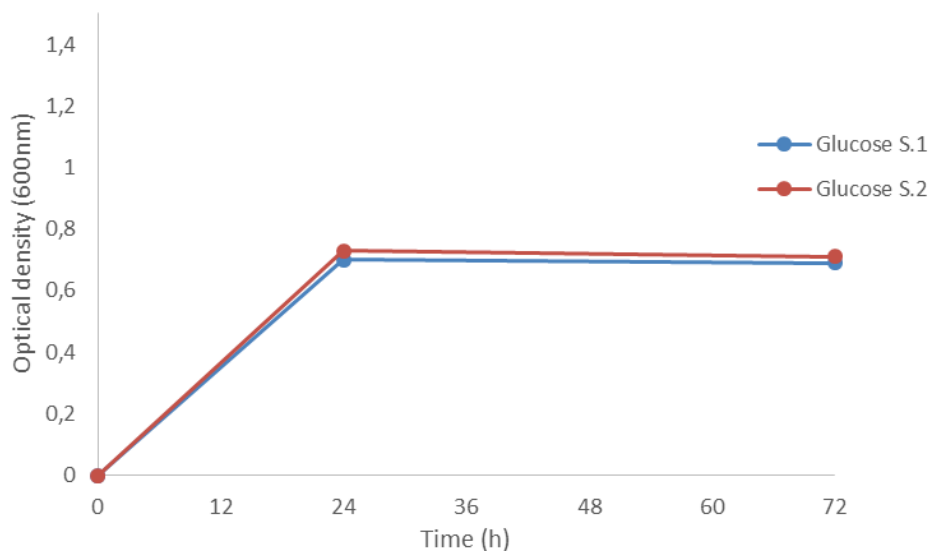


Figure 25: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

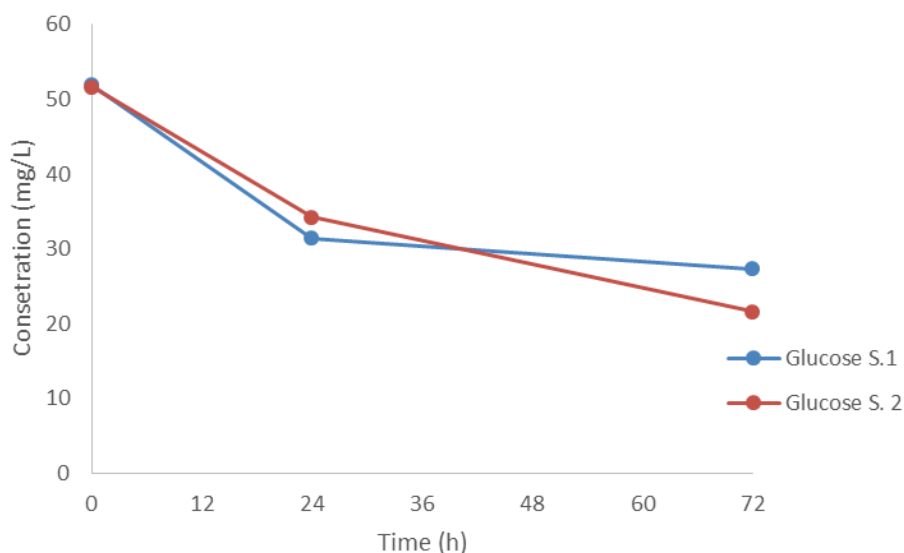


Figure 26: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα το οποίο έχει ως πηγή άνθρακα τη γλυκόζη. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που πάρθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όπως φαίνεται στο πρώτο γράφημα (Figure 25). Παρατηρώντας το γράφημα μπορούμε να δούμε ότι ο μικροοργανισμός σε αυτό το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα δείχνει να αναπτύσσεται κανονικά.

Στο δεύτερο γράφημα (Figure 26), βλέπουμε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των αμμωνιακών μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Αυτό μας παραπέμπει αυτόματα βλέποντας και τις δύο γράφικες ότι ο μικροοργανισμός από τη στιγμή που αναπτύσσεται σε αυτό το υπόστρωμα μπορεί να μεταβολίσει τα αμμωνιακά.

Σκοπός αυτού του πειράματος ήταν να κρίνουμε ποια πηγή άνθρακα λειτουργεί καλύτερα για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου και κατ' επέκταση ποια το βοηθά να διασπά τα αμμωνιακά και τα νιτρικά στο βέλτιστο βαθμό. Για να μπορέσει να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων λήφθηκαν τα αποτελέσματα των μέσων όρων των δειγμάτων της κάθε μιας από τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή άνθρακα.

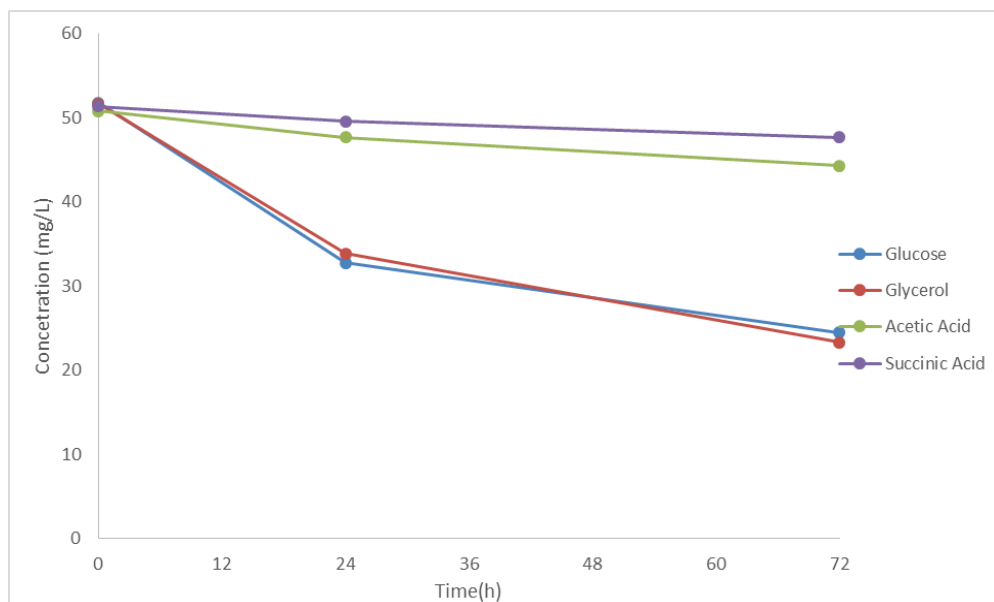


Figure 27: Σύγκριση μέσων τιμών των θρεπτικών με βάση την συγκέντρωση αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου.

Στο πιο πάνω γράφημα βλέπουμε συγκριτικά με βάση τους μέσους όρους την ικανότητα του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) να μειώνει τη συγκέντρωση των

αμμωνιακών. Με βάση το γράφημα παρατηρούμε ότι τα θρεπτικά που είχαν ως πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη και τη γλυκόζη ο μικροοργανισμός μεταβολίζει σε πολύ καλύτερο βαθμό τα αμμωνιακά άλατα συγκριτικά με τα υπόλοιπα.

6.4 Πειραματική Διαδικασία 4-Μετρήσεις και αποτελέσματα NH_4^+

Μετρήσεις των άγνωστης συγκέντρωσης δειγμάτων

Μετρήσεις έγιναν στο μικροοργανισμό BWM 5. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία σκοπός ήταν να μελετήσουμε το κατά πόσο επηρεάζει η συγκέντρωση της ουσίας που δρα ως πηγή άνθρακα την απομάκρυνση των αμμωνιακών. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν η γλυκερόλη που με βάση την προηγούμενη πειραματική διαδικασία έδειξε θετικά αποτελέσματα. Τα δείγματα αραιώθηκαν κατά 1 - 10 για να μετρήσουμε τα αμμωνιακά. Με τον ορό αραιώση 1 προς 10 εννοούμε ότι παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το αραιώνουμε με 9ml νερό. Σε αυτό το δείγμα η αρχική συγκέντρωση των αμμωνιακών ήταν 600mg/L NH_4Cl . Η αναλογία των αμμωνιακών στο δείγμα είναι το 51,42% από την αρχική συγκέντρωση του άλατος. Συγκεκριμένα στην αρχική μας συγκέντρωση είχαμε 308,52mg NH_4^+ . Για το κάθε διάλυμα διαφορετικής συγκέντρωσης γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκαν δυο κωνικές για επαλήθευση.

Δείγμα 1: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 308.5 mg /LNH4 και 5ml/L γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα.

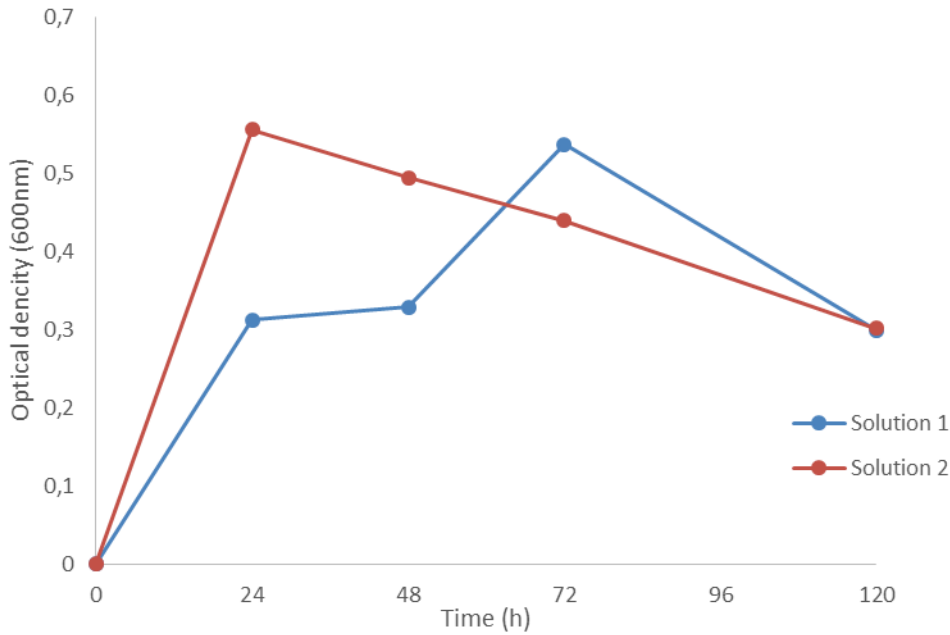


Figure 28: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

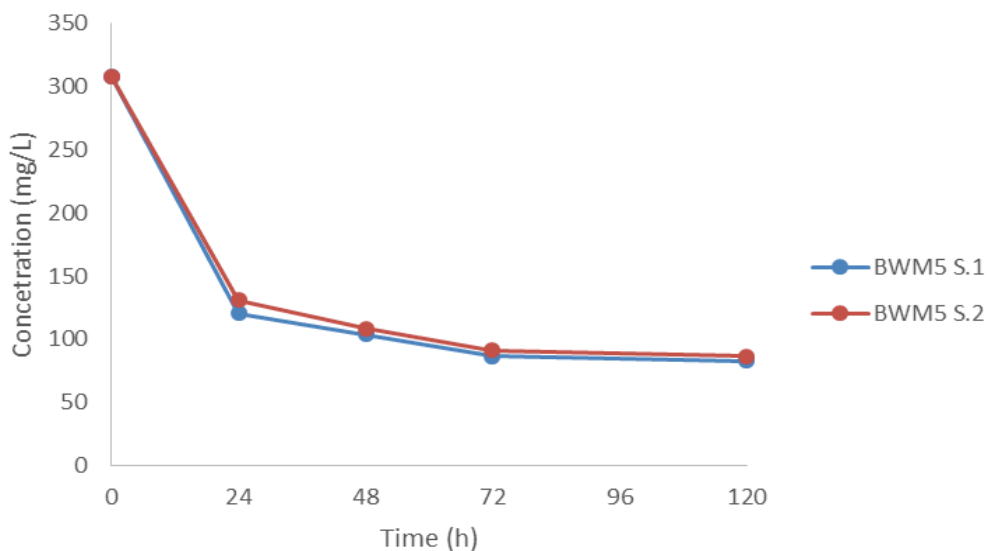


Figure 29: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στα πιο πάνω γραφήματα παρατηρούμε αρχικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα το οποίο περιείχε 5ml γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που πάρθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όπως φαίνεται στο πρώτο γράφημα (Figure 12).

Στο δεύτερο γράφημα (Figure 13), βλέπουμε την συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των αμμωνιακών μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς αυτό οφείλεται στην δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν ήταν μέχρι τις 120 ώρες.

Δείγμα 2: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 308.5 mg /LNH₄ και 1ml/L γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα.

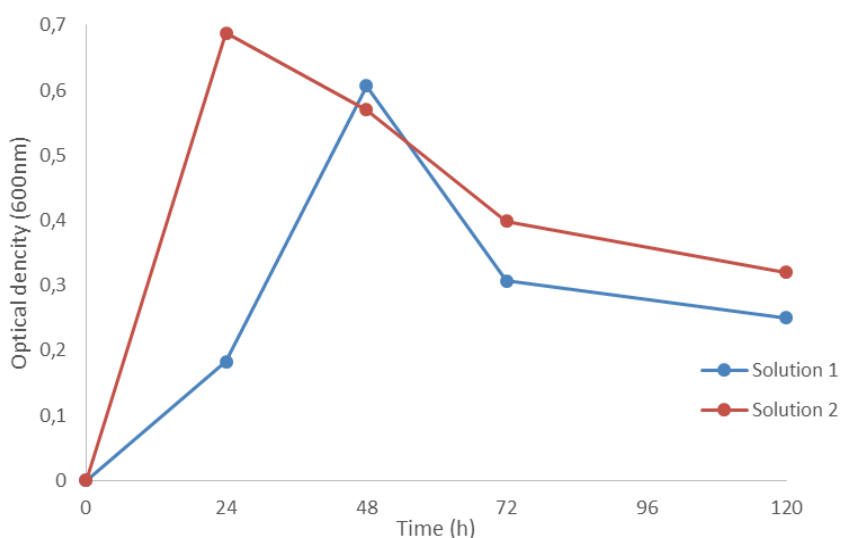


Figure 30: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

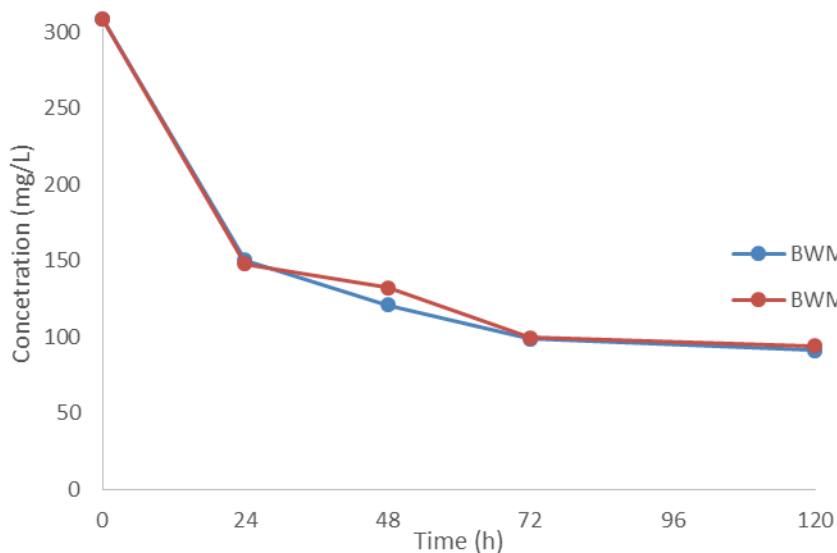


Figure 31: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά την δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στις πιο πάνω γραφικές παραστάσεις παρατηρούμε αρχικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα το οποίο περιείχε 1 ml γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm(βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού όπως φαίνεται στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 30).

Στην δεύτερη γραφική παράσταση (Figure 31), βλέπουμε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των αμμωνιακών μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς αυτό οφείλεται στη δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν ήταν μέχρι τις 120 ώρες.

Δείγμα 3: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης αμμωνιακών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 308.5mg/LNH₄ και χωρίς πηγή άνθρακα.

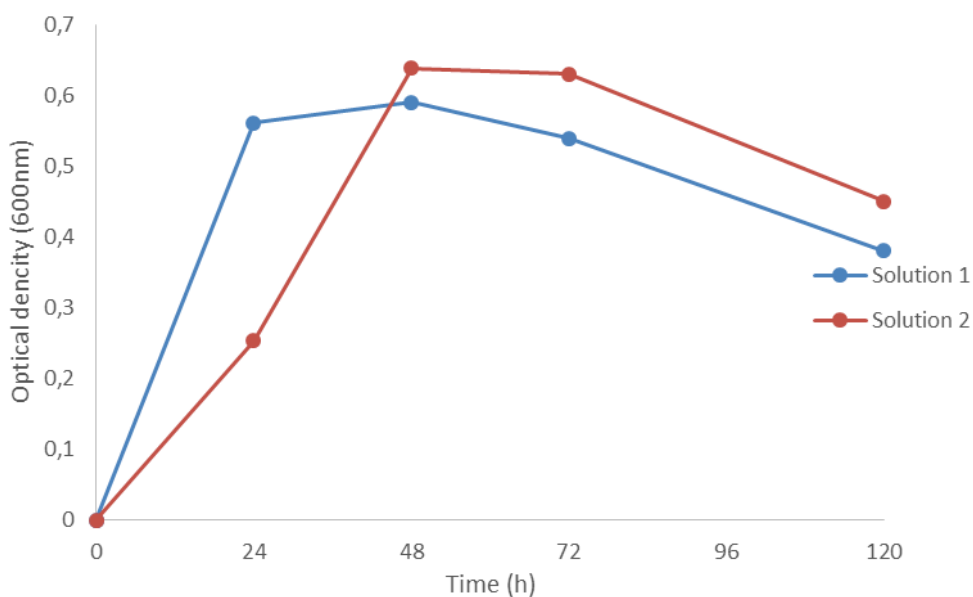


Figure 31: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

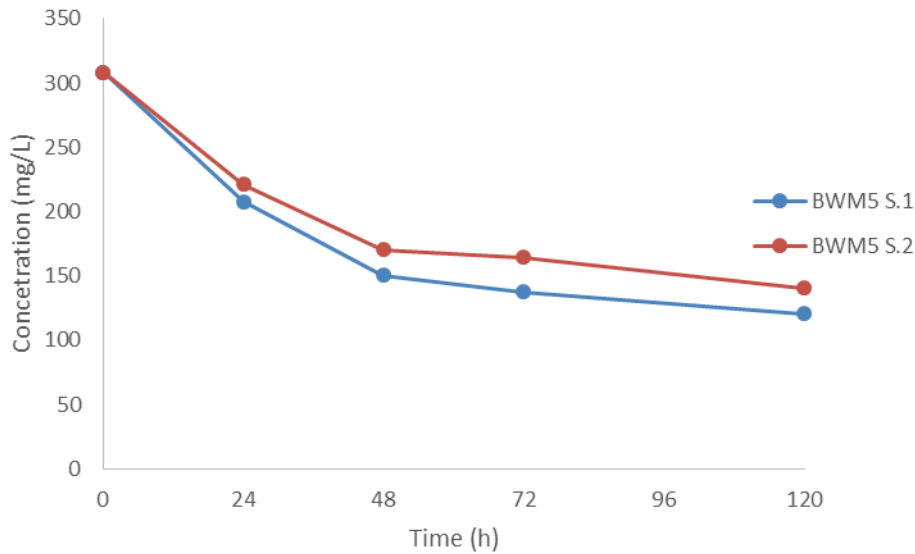


Figure 23: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στα πιο πάνω γραφήματα παρατηρούμε αρχικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα το οποίο δεν είχε καμία πηγή άνθρακα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που λήφθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού, όπως φαίνεται στην πρώτη γραφική παράσταση (Figure 32).

Στο δεύτερο γράφημα (Figure 33), βλέπουμε τη συγκέντρωση των αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των αμμωνιακών μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και συνεπώς αυτό οφείλεται στην δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν ήταν μέχρι τις 120 ώρες.

Για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά μας και να βγάλουμε συμπέρασμα για το ποιά συγκέντρωση πηγής άνθρακα και συγκεκριμένα γλύκερόλης χρησιμοποιήσαμε τους μεσους όρους των αποτελεσμάτων. Στο παρκάτω γράφημα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι.

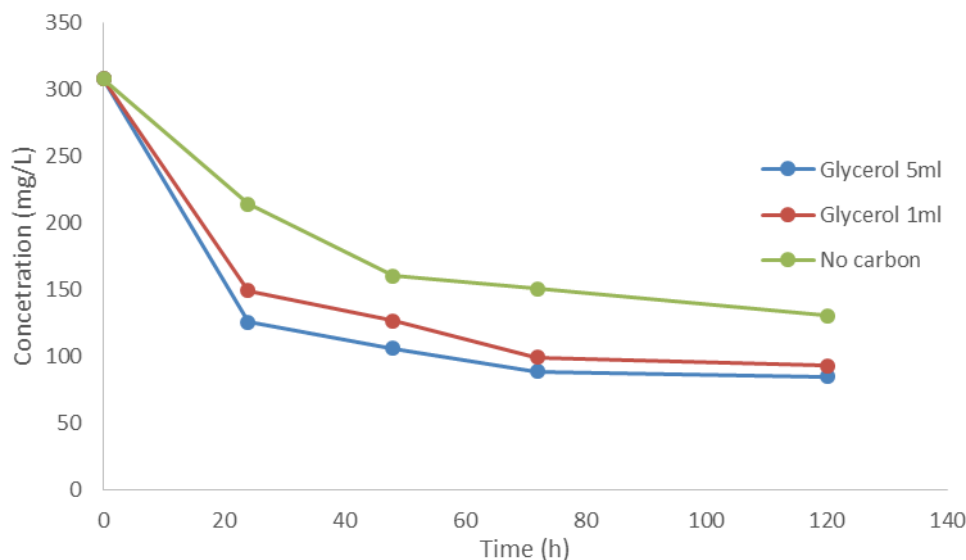


Figure 33: Συγκέντρωση αμμωνιακών μετά την δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στην πιο πάνω γραφική παράσταση (Figure 34), βλέπουμε, όπως προαναφέρθηκε τους μέσους όρους των τιμών από τις δυο κωνικές που υπήρχαν για κάθε διάλυμα. Βλέποντάς το γράφημα είναι εμφανές το ότι όσο μεγαλύτερη είναι η πηγή άνθρακα τόσο πιο αποδοτική είναι και η διαδικασία της απομάκρυνσης των αμμωνιακών αλάτων.

6.5 Πειραματική Διαδικασία 5-Μετρήσεις και αποτελέσματα NO_3^-

Μετρήσεις των άγνωστης συγκέντρωσης δειγμάτων

Μετρήσεις έγιναν στο μικροοργανισμό BWM 5. Σε αυτή την πειραματική διαδικασία σκοπός ήταν να μελετήσουμε το κατά πόσο μπορεί να λειτουργήσει η διαδικασία της νιτροποίησης και απονιτροποίησης σε αερόβιες συνθήκες και μεγάλες ποσότητες νιτρικών και αμμωνιακών. Επίσης έγιναν και μετρήσεις των νιτρικών, για να μπορέσουμε να δούμε την εξέλιξη των ουσιών. Οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η γλυκερόλη και η γλυκόζη που με βάση τις προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες έδειξαν θετικά αποτελέσματα. Τα δείγματα αραιώθηκαν κατά 1 - 10 για να μετρήσουμε τα νιτρικά. Με τον ορό αραιώση 1 προς 10 εννοούμε ότι παίρνουμε 1ml από το δείγμα μας και το αραιώνουμε με 9ml νερό. Σε αυτό το δείγμα η αρχική συγκέντρωση των νιτρικών ήταν 1000 mg/L NO_3^- .

Δείγμα 1: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης νιτρικών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα $1000 \text{ mg /L NO}_3^-$ και $14,30 \text{ ml/L}$ γλυκερόλη ως πηγή άνθρακα.

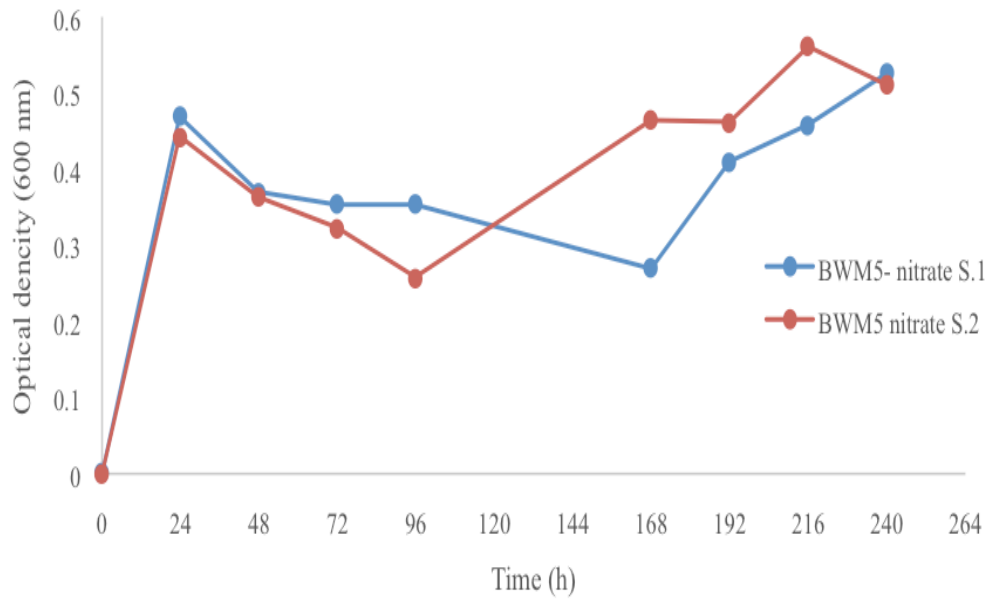


Figure 35: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

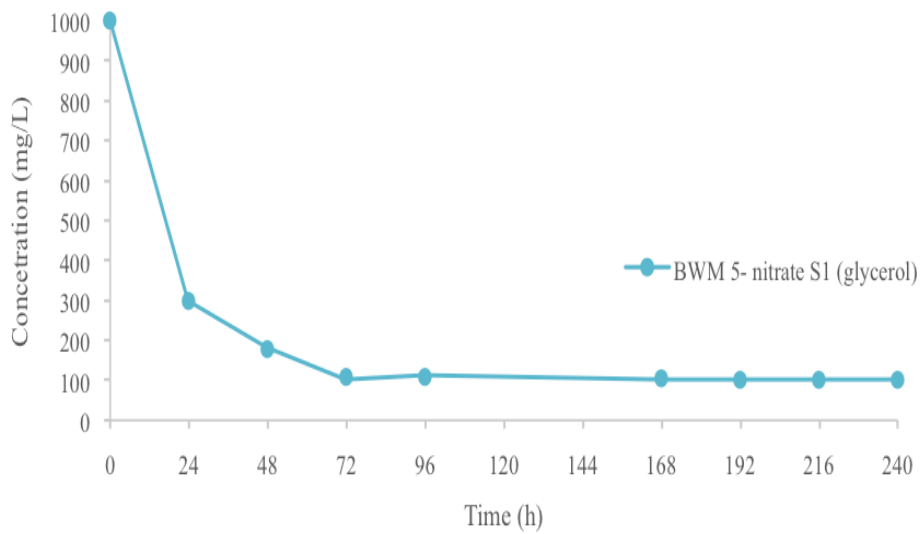


Figure 34: Συγκέντρωση νιτρικών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

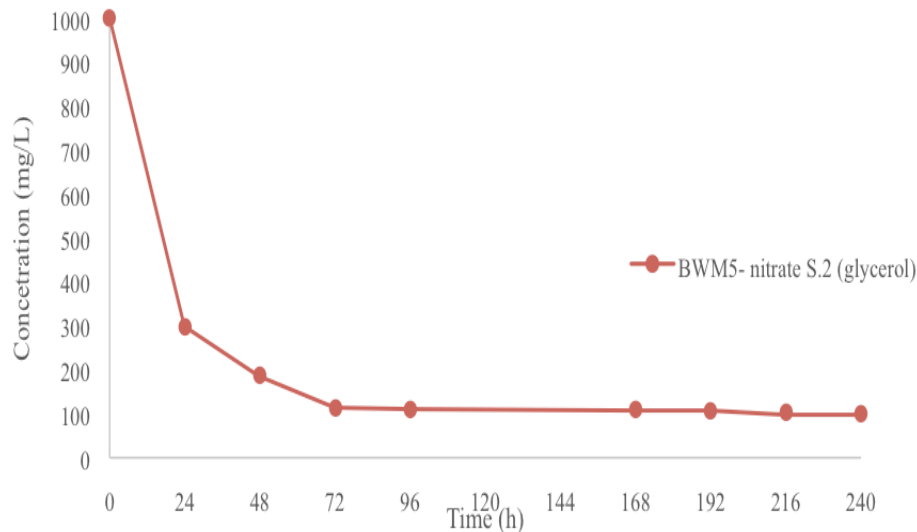


Figure 35: Συγκέντρωση νιτρικών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

Στα πιο πάνω γραφήματα παρατηρούμε αρχικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που πάρθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού όπως φαίνεται στο πρώτο γράφημα (Figure 35).

Στο δεύτερο γράφημα (Figure 36) όπως και στο τρίτο (Figure 37), βλέπουμε τη συγκέντρωση των νιτρικών συναρτήσει του χρόνου για την κάθε κωνική ξεχωριστά. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των νιτρικών μειώνεται απότομα τις πρώτες 24 ώρες και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η μείωση οφείλεται στη δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που λήφθηκαν ήταν μέχρι τις 240 ώρες.

Δείγμα 2: Αποτελέσματα μετρήσεων συγκέντρωσης νιτρικών παρουσία βακτηρίου BWM5 σε θρεπτικό υπόστρωμα με περιεκτικότητα 1000 mg /L NO_3^- και 11,90 ml/L γλυκόζη ως πηγή άνθρακα.

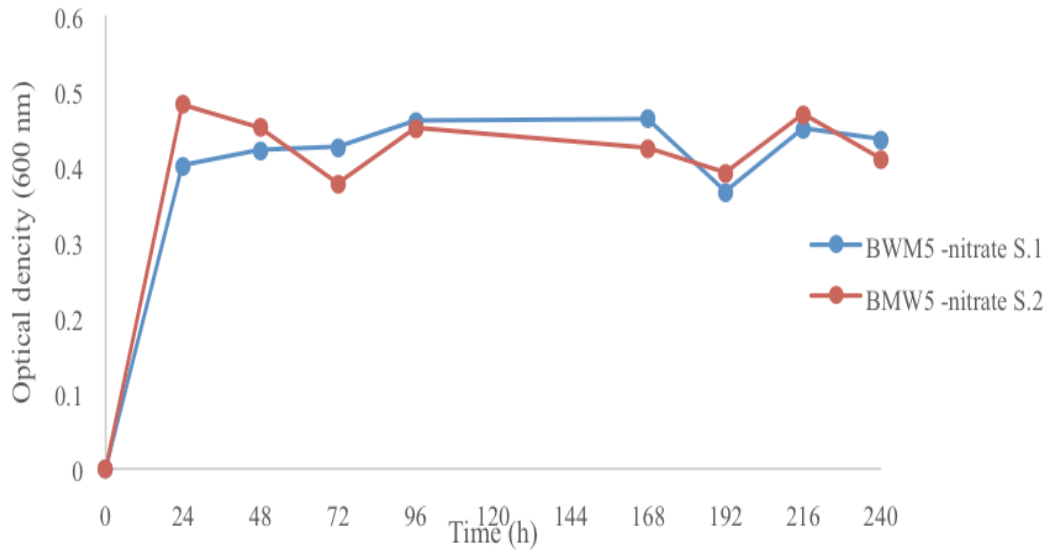


Figure 36: Ανάπτυξη βακτηρίου BWM 5 με βάση την οπτική πυκνότητα (600nm) συναρτήσει του χρόνου

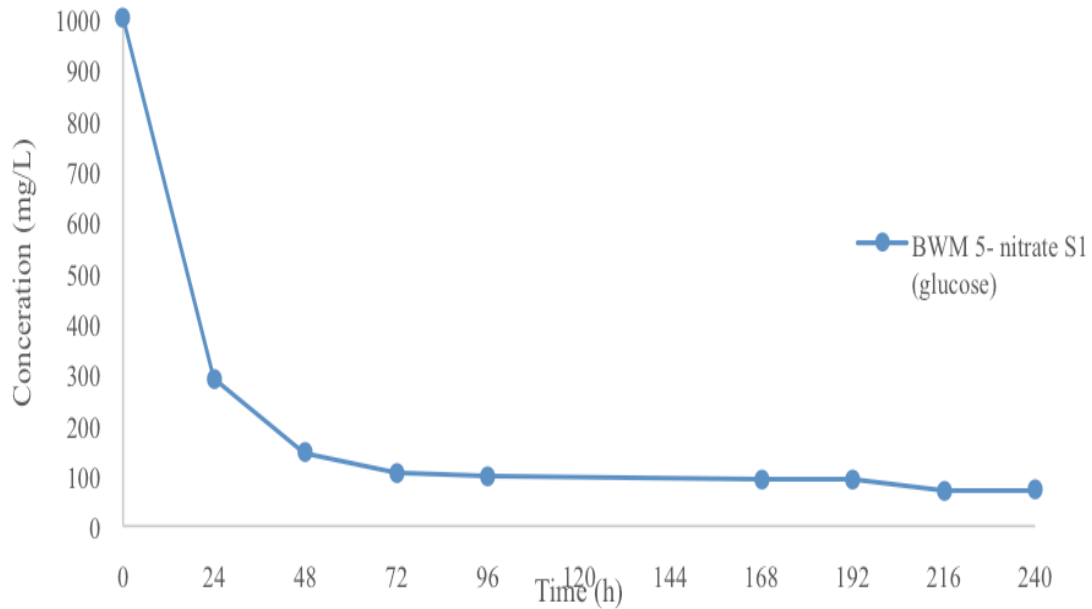


Figure 37: Συγκέντρωση νιτρικών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσει του χρόνου

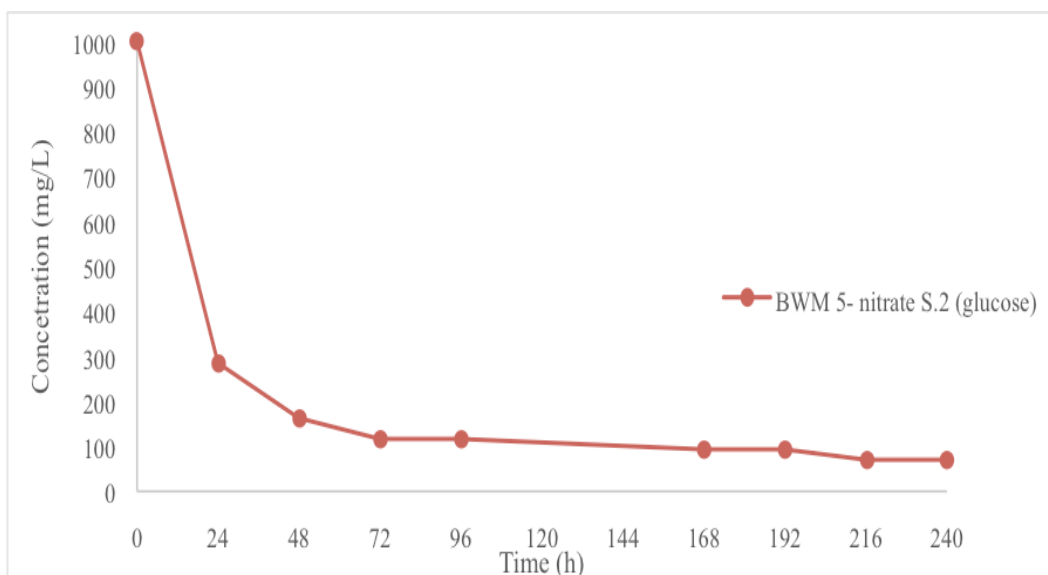


Figure 8: Συγκέντρωση νιτρικών μετά τη δράση του βακτηρίου BWM5 σε διάλυμα αμμωνιακών συναρτήσεως του χρόνου

Στα πιο πάνω γραφήματα παρατηρούμε αρχικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε δύο κωνικές φιάλες με το ίδιο διάλυμα. Η μέτρηση της βακτηριακής βιομάζας γίνεται με φασματοφωτόμετρο στα 600 nm (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με βάση τις μετρήσεις που πάρθηκαν παίρνουμε την καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού όπως φαίνεται στο πρώτο γράφημα (Figure 38).

Στο δεύτερο γράφημα (Figure 39) όπως και στο τρίτο (Figure 40), βλέπουμε την συγκέντρωση των νιτρικών συναρτήσεως του χρόνου για την κάθε κωνική ξεχωριστά. Όπως παρατηρούμε η συγκέντρωση των νιτρικών μειώνεται απότομα τις πρώτες 24 ώρες και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου. Αυτή η μείωση οφείλεται στη δράση του βακτηρίου. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν ήταν μέχρι τις 240 ώρες.

Κεφάλαιο 7- Σχόλια και Συμπεράσματα

Από την παρατήρηση και τη μελέτη των αποτελεσμάτων όλων των πειραματικών διαδικασιών που πραγματοποιήθηκαν είναι δυνατόν να εξαχθούν κάποια σημαντικά συμπεράσματα.

Αρχικά, όπως προ αναφέρθηκε ο σκοπός της μελέτης ήταν να μπορέσουμε να πετύχουμε απονιτροποίηση και νιτροποίηση αμμωνιακών και νιτρικών αλάτων κάτω από αερόβιες συνθήκες με τη δράση ενός μικροοργανισμού. Αυτό ήταν η αρχική πρόκληση, αλλά στη συνέχεια η βασική πρόκληση ήταν να βρούμε τις κατάλληλες συνθήκες για να μπορέσουμε να έχουμε ένα μεγάλο ποσοστό απομάκρυνσης.

Ξεκινώντας την πειραματική διαδικασία επιλέξαμε δύο μικροοργανισμούς, έχοντας ως στόχο να προσδιορίσουμε ποιος από τους δύο αναπτύσσεται καλύτερα αλλά και δίνει μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης. Με τον ίδιο τρόπο ελέγξαμε τη λειτουργικότητα και την αποδοτικότητα και στα νιτρικά και στα αμμωνιακά άλατα. Μελετώντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων καταλήξαμε ότι ο μικροοργανισμός που λειτούργησε καλύτερα αρχικά στα νιτρικά και στη συνέχεια στα αμμωνιακά άλατα ήταν ο BWM5 (*Klebsiella spp.*) (βλ. Figure 8 & Figure 15). Ενώ στα νιτρικά η αποδοτικότητα τους βλέποντας το τελικό αποτέλεσμα ήταν η ίδια το BWM5 (*Klebsiella spp.*) είχε μια πιο ομαλή απόδοση, χωρίς τιμές που να υποδεικνύουν σφάλματα (Figure 8). Στην πειραματική διαδικασία για τα αμμωνιακά άλατα η εικόνα ήταν πιο ξεκάθαρη ο μικροοργανισμός BWM5 (*Klebsiella spp.*) λειτούργησε πολύ καλύτερα (Figure 15). Παίρνοντας αυτό ως δεδομένο οι διαδικασίες που ακολούθησαν με σκοπό να βρεθούν οι άριστες συνθήκες για τη μέγιστη απομάκρυνση των νιτρικών και αμμωνιακών αλάτων έγιναν μόνο με τη χρήση ενός βακτηρίου.

Επόμενο βήμα ήταν ο έλεγχος της συγκέντρωσης των αμμωνιακών και των νιτρικών αλάτων στα διαλύματα. Στόχος δηλαδή ήταν να ελέγξουμε, αν ο μικροοργανισμός αποδίδει καλύτερα σε υψηλές ή σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Μελετώντας τα αποτελέσματα των δυο πειραμάτων, ένα για τα αμμωνιακά και ένα για τα νιτρικά, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αλάτων δρουν θετικά. Βλέποντας τα γραφήματα των συνολικών αποτελεσμάτων παρατηρούμε ότι έχουμε μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης νιτρικών και αμμωνιακών αλάτων από τα διαλύματα τους, όταν η αρχική συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη. Με αυτό τον τρόπο καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι θα είναι ευκολότερη η απομάκρυνση των νιτρικών και αμμωνιακών αλάτων από απόβλητα η φυσικούς αποδέκτες, τα οποία έχουν

μεγάλα ποσοστά αζωτούχων ενώσεων και κατ' επέκταση δημιουργούν και μεγαλύτερο πρόβλημα νιτρορύπανσης.

Μια σημαντική παράμετρος ακόμη που μελετήθηκε, ήταν τα οι πηγές άνθρακα. Θέτοντας το ερώτημα ποια πηγή άνθρακα είναι αυτή που μας δίνει μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης; Αλλά και σε ποιες συγκεντρώσεις είναι η καλύτερη απόδοση; Ακολούθησε μια σειρά από πειραματικές διαδικασίες για να μπορέσουμε να καταλήξουμε μεταξύ αυτών που χρησιμοποιήθηκαν από άλλους ερευνητές σε ήδη υπάρχουσες έρευνες αλλά και αυτών που εμείς επιλέξαμε, ποια από αυτές τις χημικές ενώσεις είχε τη μεγαλύτερη απόδοση στην απομάκρυνση των νιτρικών και αμμωνιακών αλάτων. Αυτή η διαδικασία έγινε μόνο στα διαλύματα που περιείχαν αμμωνιακά άλατα για εξοικονόμηση χρόνου, θεωρώντας ως δεδομένο ότι η λειτουργία του βακτηρίου θα είναι η ίδια. Μελετώντας τα αποτελέσματα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι χρησιμοποιώντας γλυκερόλη ή γλυκόζη έχουμε μεγάλα ποσοστά απομάκρυνσης αμμωνιακών αλάτων (Figure 27). Η διαφορά από τις υπόλοιπες πηγές άνθρακα ήταν πολύ μεγάλη. Υπάρχει όμως και διαφορά μεταξύ της γλυκόζης και της γλυκερόλης. Η γλυκόζη έδωσε μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης όμως δεν μπορούμε να απορρίψουμε τη λειτουργία της γλυκερόλης μιας και είναι μια χαμηλού κόστους χημική ουσία που βοηθάει τη δράση του βακτηρίου εξίσου σε πολύ καλό βαθμό. Έτσι στην συνέχεια μελετήθηκε η αποδοτικότητα του μικροοργανισμού BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Διεξάγοντας αυτή την πειραματική δοκιμή καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της γλυκερόλης και κατ' επέκταση της πηγής άνθρακα στο διάλυμα έχουμε μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης αμμωνιακών αλάτων (Figure 34).

Στο τελευταίο στάδιο μελετήσαμε την απόδοση στα ποσοστά απομάκρυνσης στα αμμωνιακά και νιτρικά άλατα, χρησιμοποιώντας υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, αλλά και υψηλές συγκεντρώσεις πηγής άνθρακα σε μεγαλύτερο εύρος χρόνου. Με αυτή την τελευταία πειραματική δοκιμή καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης γίνεται τις πρώτες 24-48 ώρες και πιθανότατα αυτό σχετίζεται με το ότι ο μικροοργανισμός βρίσκεται στη φάση ανάπτυξης, ενώ στη συνέχεια βρίσκεται σε στάσιμη φάση.

Συνοψίζοντας τα συμπεράσματα από τις πέντε πειραματικές διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν καταλήγουμε στα ακόλουθα :

- Έχουμε μεγαλύτερα ποσοστά απομάκρυνσης νιτρικών και αμμωνιακών αλάτων όταν έχουμε υψηλές συγκεντρώσεις αυτών στα διαλύματα.
- Η γλυκόζη καθώς και η γλυκερόλη είναι οι καλύτερες πηγές άνθρακά (σε σχέση με αυτές που μελετήθηκαν) για να μπορέσουμε να πέτυχουμε υψηλά ποσοστά απομάκρυνσης.
- Όσο μεγαλύτερη συγκέντρωση πηγής άνθρακά έχουμε στο διάλυμα τόσο υψηλότερα είναι και τα ποσοστά απομάκρυνσης.
- Το μεγαλύτερο ποσοστό απομάκρυνσης των νιτρικών και αμμωνιακών αλάτων γίνεται τις πρώτες 24-48 ώρες.

Κεφάλαιο 8- Μελλοντικές έρευνες

Στα μελλοντικά σχέδια μας, όσον αφορά σε αυτή την ερεύνα, είναι αρχικά να μπορέσουμε να εντάξουμε αυτή την τεχνική σε τομείς της βιομηχανίας, όπως είναι η επεξεργασία υγρών αποβλήτων. Αυτό θεωρούμε ότι είναι εφικτό μιας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στους α ντιδραστήρες αναερόβιας χώνευσης, όπου υπάρχουν μεγάλα ποσοστά νιτρικών και αμμωνιακών αλάτων. Ακόμη μπορεί να είναι ένα βήμα για την εξέλιξη των τεχνικών που αφορούν την επεξεργασία υγρών αποβλήτων, αφού όπως αναφέρθηκε είναι ένας τρόπος για να μην είναι πάντοτε απαραίτητο να έχουμε εντελώς ανοξικές συνθήκες.

Ακόμη μια σημαντική παράμετρος που χρήζει περαιτέρω έρευνας είναι ο προσδιορισμός των παραγόμενων χημικών ενώσεων που προέρχονται από τη νιτροποίηση και την απονιτροποίηση, που πραγματοποιεί το BWM5 (*Klebsiella spp.*) σε συνθήκες παρουσίας οξυγόνου. Αυτό είναι ένα από τα σημαντικότερα βήματα που πρέπει να γίνει γιατί ο πρωταρχικός μας στόχος είναι να απομακρύνουμε τα νιτρικά και τα αμμωνιακά άλατα σε ένα δεύτερο στάδιο όμως πρέπει να γνωρίζουμε τι έπεται αυτής απομάκρυνσης. Υπάρχει μεγάλος κίνδυνος οι παραγόμενες χημικές ενώσεις να είναι επιβλαβέστερες στο οικοσύστημα και κατ' επέκταση στον άνθρωπο, σε σύγκριση με τα νιτρικά και αμμωνιακά άλατα.

Βιβλιογραφία

1. Κατσογιάννης Α. (2001) “Βιολογική απομάκρυνση αζώτου και προσαρμοσμένη βελτιστοποίηση της νιτροποίησης σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με περιοδική λειτουργία”, Διδακτορική διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, Φεβρουάριος 2001.
2. Λυμπεράτος Γ. (2001) “Μηχανική υγρών αποβλήτων” Πάτρα.
3. Μαραζιώτη Κ. (2003) “Βιολογική απομάκρυνση αζώτου- επίδραση του τύπου απονιτροποιητικών μικροοργανισμών και προσομοίωση αντιδραστήρα SBR.”, Διδακτορική διατριβή υποβληθείσα στο Τμήμα Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, 2001.
4. Μαρκαντωνάτος Γ. (1990) “Επεξεργασία και διάθεση υγρών αποβλήτων”, Αθήνα.
5. Παπαρίζος Κ. “ Matlab 6. Βασικές λειτουργίες, προγραμματισμός, γραφικά, animation”, Εκδόσεις Ζυγός, Θεσσαλονίκη.
6. Στάμου Α, Βιογιατζής Ζ. “Βασικές αρχές και σχεδιασμός συστημάτων επεξεργασίας αποβλήτων”, 2η έκδοση, Αθήνα.
7. Στάμου Α. (1995) “Βιολογικός καθαρισμός αστικών αποβλήτων. Με παρατεταμένο αερισμό και βιολογική απομάκρυνση θρεπτικών”, Παπασωτηρίου, Αθήνα.

Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

1. Anderson J. S., Kim H., McAvoy T. J., Hao O. J., (2000) “Control of an alternating aerobic-anoxic activated sludge system – Part 1: development of a linearization-based modeling approach”, *Control Engineering Practice*, 8, 271-278.
2. Biran A., Breiner M., (1995) “Matlab for Engineers”, Addison – Wesley.
3. Carrera J., Baeza J. A., Vicent T., Lafuente J., (2003) “Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system”, *Water Research*, 37, 4211-4221.
4. Ciudad G., Rubilar O., Munoz P, Ruiz G., Chamy R., Vergara C., Jeison D., (2004) “Partial nitrification of high ammonia concentration wastewater as a part of a shortcut biological nitrogen removal process”, *Process Biochemistry* 144
5. Dong X., Tollner E. W., (2003) “Evaluation of Anammox and denitrification during anaerobic digestion of poultry manure”, *Bioresource Technology*, 86, 139-145.
6. EPA, United States Environmental Protection Agency, (2000) “Oxidation ditches”, Wastewater technology fact sheet, Office of Water, Washington, D.C.

7. Focht, D. D., Chang A. C., (1975), "Nitrification and denitrification processes related to wastewater treatment", *Adv. Appl. Microbiol.*, 20, 631.
8. Gernaey K. V., C. M. Van Loosdrecht M., Henze M, Lind M., Jorgensen S. B. (2003) "Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation and simulation: state of the art", *Environmental Modelling & Software*
9. Hao X., Doddema H. J., Groenestijn W., (1997) "Conditions and mechanisms affecting simultaneous nitrification and denitrification in a Pasveer oxidation ditch", *Bioresource Technology*, 59, 207-215.
10. Hu Z., Wentzel M. C., Ekama G. A. (2003), "Modelling biological nutrient removal activated sludge systems- a review", *Water Research*, 37, 3430-3444.
11. IAWRC (1986), "Activated sludge model No. 1", Report.
12. IAWRC (1995), "Activated sludge model No. 2", Scientific and technical report.
13. Ilies P., Mavinic D. S., (2001) "The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate", *Water Research*, 35 (8), 2065-2072.
14. Jialong W., Ning Y., (2004) "Partial nitrification under limited dissolved oxygen conditions", *Process Biochemistry*, 39, 1223-1229.
15. Liang Z., Wei D., Li-juan F., Yun K., Xiang X., (2012) "Isolation of aerobic denitrifiers and characterization for their potential application in the bioremediation of oligotrophic ecosystem", *Bio resource Technology* 108, 1-7
16. Lukasse L. J. S., Keesman K. J., (1999) "Optimized operation and design of alternating activated sludge processes for N-removal", *Water Research*, 33 (11), 2651-2659.
17. Metcalf & Eddy (2003) "Wastewater Engineering: treatment and reuse", Fourth Edition revised by Tchobanoglou G., Burton F., Stensel D., McGraw-Hill
18. Muller A., Wentzel M. C., Loewenthal R. E., Ekama G. A. (2003) "Heterotroph anoxic yield in anoxic aerobic activated sludge systems treating municipal wastewater", *Water Research*, 37, 2435-2441.
19. Pai T. Y. Tsai Y. P., Chou Y. J., Chang H. Y., Leu H. G., Ouyang C. F. (2004) "Microbial kinetic analysis of three different types of EBNR process", *Chemosphere*, 55, 109-118.
20. Ruiz G., Jeison D., Chamy R., (2003) "Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration", *Water Research*, 37, 1371-1377. 145

21. Shumei Z., Changqing S., Wei J., Weiguang L., Duoying Z., Jing L., Liquiang M., and Yongjian P., (2015) “Ammonium removal at low temperature by a newly isolated heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium *Pseudomonas fluorescens* wsw-1001” *Environmental Technology* 1035-759
22. Sliemers A. O., Derwort N., Campos Gomez J. L., Strous M., Kuenen J. G., Jetten M. S. M. (2002) “Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor”, *Water research*, 36, 2475-2482.
23. Strous M., Van Gerven E., Zheng P., Kuenen J. G., Jetten M. S. M. (1997) “Ammonium removal from concentrated waste streams with anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process in different reactor configurations”, *Water Research*, 31 (8), 1955-1962.
24. Verstraete W., Philips, S., (1998) “Nitrification – denitrification processes and technologies in new contexts”, *Environmental Pollution*, 102 (S1), 717-726.
25. Xia S., Liu J., (2004) “An innovative integrated oxidation ditch with vertical circle for domestic wastewater treatment”, *Process Biochemistry*, 39, 1111-1117.
26. Rigopoulos S., Linke P., (2002) “Systematic development of optimal activated sludge process designs”. *Computers and Chemical Engineering*, 26, 585-597.
27. Zhao H., Isaacs S. H., Soeberg H., Kummel M., (1995) “An analysis of nitrogen removal and control strategies in an alternating activated sludge process”, *Water Research*, 29 (2), 535-544

