

Χανιά 2015

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΚΡΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑ  
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ  
ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ  
ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΤΟΥ ΑΖΩΤΟΥ ΣΕ ΤΕΧΝΗΤΟΥΣ ΥΓΡΟΒΙΟΤΟΠΟΥΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ | Στασινού Νιόβη

Επιβλέπων καθηγητής: Νικόλαος Παρανυχιανάκης

## **Ευχαριστίες**

Ευχαριστώ πολύ όσους συνέβαλαν με την παρουσία τους, τη βοήθειά τους, την κατανόηση, τη δύναμη και τη στήριξή τους για την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής και κυρίως ευχαριστώ τον κ. Παρανυχιανάκη Νικόλαο, επιβλέπων καθηγητή μου και την Τσικνιά Μυρτώ.

# Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
SUMMARY .....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	7
1. Τεχνητοί υγροβιότοποι .....	7
1.1. Τεχνητοί υγροβιότοποι επιφανειακής ροής (FWS).....	8
1.2. Τεχνητοί υγροβιότοποι οριζόντιας υπό-επιφανειακής ροής (SSFS) .....	10
1.3. Τεχνητοί υγροβιότοποι κατακόρυφης υπό-επιφανειακής ροής .....	10
1.4. Υβριδικά συστήματα.....	11
2. Βλάστηση των υγροβιότοπων.....	12
2.1. <i>Phragmites communis</i> .....	14
2.2. <i>Typha latifolia</i> .....	15
3. Βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου .....	16
3.1. Διεργασίες μετασχηματισμού-απομάκρυνσης N .....	20
Εξάχνωση (ammonia volatilization) .....	21
Αμμωνιοποίηση .....	22
Νιτροποίηση .....	24
Αυτότροφη Νιτροποίηση .....	24
Αερόβια οξείδωση της αμμωνίας .....	25
Μικροβιολογία της οξείδωσης της αμμωνίας.....	26
Οξείδωση νιτρωδών.....	30
Μικροβιολογία της οξείδωσης νιτρωδών .....	31
Ετερότροφη νιτροποίηση .....	33
Ετερότροφοι Νιτροποιητές .....	34
Αμμωνιοποίηση νιτρικών .....	35
Απονιτροποίηση .....	36
Μικροβιολογία της απονιτροποίησης.....	37
Αζωτοδέσμευση (N fixation).....	40
Ενταφιασμός οργανικού αζώτου.....	40
Αναερόβια οξείδωση αμμωνίας (ANAMMOX) .....	41
Μικροβιολογία της διεργασίας ANAMMOX .....	43
3.2. Απομάκρυνση N σε ΤΥ.....	43
2. Στόχος – σκοπός της εργασίας .....	46
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
1. Πειραματικός σχεδιασμός .....	47
2. Δειγματοληψίες .....	53
3. Χημικές Αναλύσεις.....	53
3.1. Αμμωνιακό Άζωτο ( $\text{NH}_4^+-\text{N}$ ).....	54
3.2. Νιτρικό Άζωτο ( $\text{NO}_3-\text{N}$ ).....	54
3.3. Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD).....	54
3.4. Ολικό N (TKN).....	54
3.5. Ουρία .....	54
4. Μοριακές αναλύσεις.....	55
4.1. Εξαγωγή DNA .....	55
4.2. Real time PCR.....	55

<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>58</b>
1. <i>Χημικές αναλύσεις.....</i>	58
1.1.   Συγκέντρωση $\text{NH}_4\text{-N}$ .....	58
1.2.   Συγκέντρωση $\text{NO}_3\text{-N}$ .....	58
1.3.   Μέτρηση COD .....	59
1.4.   Ολικό N (TKN).....	61
1.5.   Μέτρηση Ουρίας.....	61
1. <i>Μοριακές αναλύσεις.....</i>	62
1.   Εξαγωγή DNA .....	62
2.   Real time PCR .....	62
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>65</b>
<b>ΒΙΒΛΙΑ.....</b>	<b>68</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>68</b>

# Περίληψη

---

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διερευνά τις διεργασίες που εμπλέκονται στην απομάκρυνση του αζώτου σε τεχνητούς υδροβιότοπους. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν έξι τεχνητοί υδροβιότοποι υποεπιφανειακής ροής μικρής κλίμακας στους οποίους έγινε φύτευση ανά δύο με τα είδη *Typha latifolia* και *Phragmites communis* ενώ δυο παρέμειναν κενοί από βλάστηση. Για την αξιολόγηση της απόδοσης των υδροβιότοπων και ειδικότερα του είδους της βλάστησης, χρησιμοποιείται συνθετικό απόβλητο εμπλουτισμένο με ουρία (0,1mg/L). Οι χημικές αναλύσεις αφορούν την παρακολούθηση της συγκέντρωσης του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{N}$ , TKN, COD και της ουρίας. Πρόσθετα, και σε μηνιαία βάση πραγματοποιούνται αναλύσεις μοριακής βιολογίας για την παρακολούθηση της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στην απομάκρυνση του αζώτου, όπως τα *amoA*, *nirK*, *nirS*, και *nosZ* μετά από εξαγωγή DNA μικροοργανισμών από το υπόστρωμα των υδροβιότοπων. Εκτιμάται ότι οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία θα βελτιώσουν την διαθέσιμη γνώση σχετικά με τους μηχανισμούς που καθορίζουν το γίνεσθαι του αζώτου στους τεχνητούς υδροβιότοπους και θα συνεισφέρουν στην βελτιστοποίηση του.

# Summary

---

Main goal of the present study is the investigation of the processes that take part in the removal of nitrogen in constructed wetlands. For this purpose, six pilot constructed wetlands with sub-surface flow were used, in which two of them were planted with *Typha latifolia*, two with *Phragmites communis* and the last two remained without vegetation for control. For the evaluation of the performance of these CW and more particular for the type of vegetation, synthetic waste is used which was enriched with Urea (0,1mg/L). Chemical analysis took place to monitor the concentrations of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{N}$ , TKN, COD and Urea. Additionally, on monthly basis, DNA was extracted from microorganisms that live on the wetland substrate and molecular analysis was also performed for monitoring the abundance of functional genes which are involved in nitrogen removal such as *amoA*, *nirK*, *nirS*, and *nosZ*. It is estimated that the methodologies which were used in that study, will improve the available knowledge about the mechanisms that determine N cycling and contribute in optimization of nitrogen removal in CW.

# Εισαγωγή

---

## 1. Τεχνητοί υδροβιότοποι

Οι τεχνητοί υδροβιότοποι αποτελούν μια σχετικά νέα τεχνολογία συστημάτων σχεδιασμένα να εκμεταλλεύονται τις φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε φυσικά οικοσυστήματα (υδροβιότοπους, εδάφη, υδάτινους αποδέκτες) συμβάλλοντας έτσι στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων. (Brix et al, 2003)

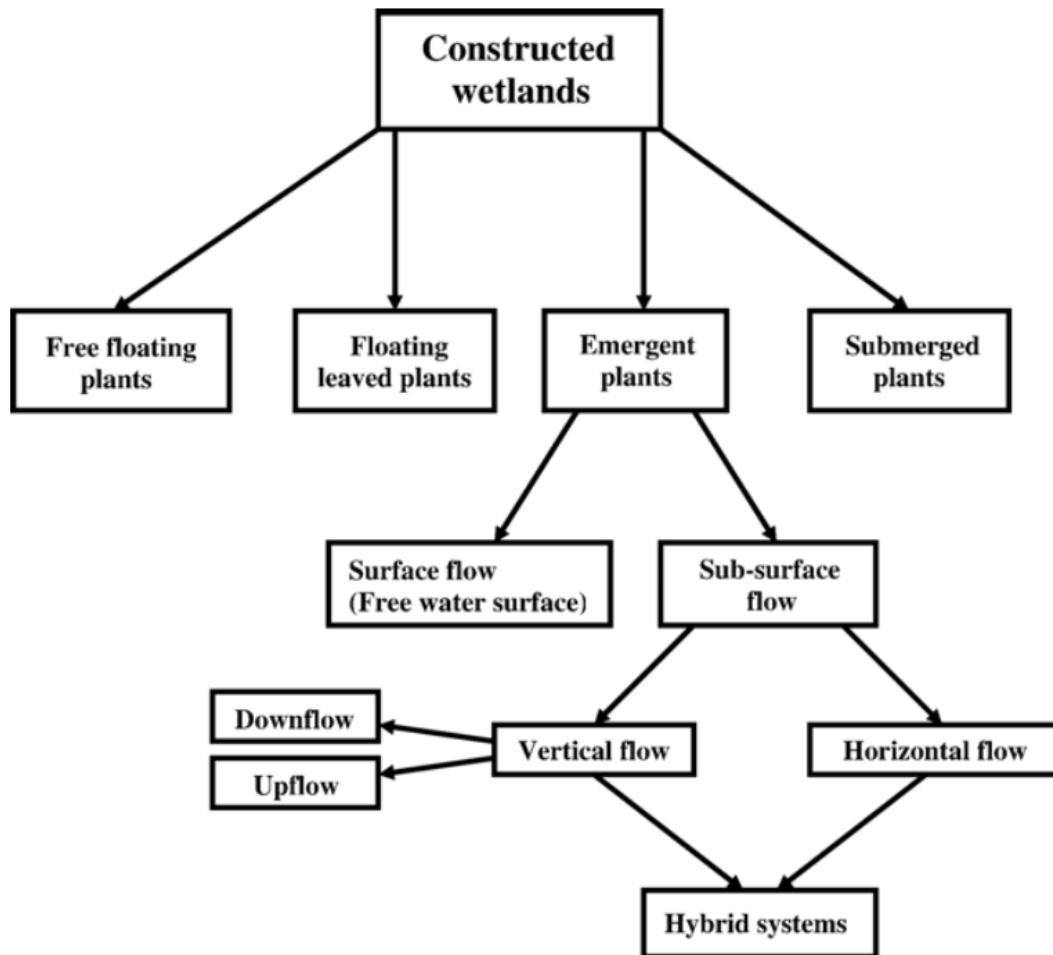
Σε τέτοια συστήματα, η εφαρμογή του αποβλήτου διενεργείται πάνω ή κάτω από την επιφάνεια του εδάφους (Reed et al., 1984). Με βάση αυτήν την αρχή, τα συστήματα τεχνητών υδροβιότοπων (TY) διακρίνονται σε αυτά με ελεύθερη επιφάνεια νερού (FWS) και σε αυτά με βυθισμένη βάση ή υποεπιφανειακή ροή (SFS).

Η αποδοτικότητα των TY βασίζεται στην ικανότητα που έχουν τα φυτά να προσλαμβάνουν και να αποθηκεύουν στους ιστούς τους διάφορα στοιχεία εάν αυτό συνδυάζεται με συγκομιδή και απομάκρυνση της βλάστησης, καθώς επίσης και στη μικροβιακή πανίδα που αναπτύσσεται στο χώρο των ριζών και του εδάφους και είναι υπεύθυνη για τον μετασχηματισμό ανόργανων ενώσεων και την αποικοδόμηση οργανικών ουσιών.

Η μικροβιακή κοινότητα στους TY αποτελείται από αυτόχθονους (autochthonous-indigenous) και αλλόχθονους (allochthonous-foreign) μικροοργανισμούς. Οι αυτόχθονοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν προσαρμοστικές δυνατότητες –είναι σε θέση να διαθέτουν μεταβολική δραστηριότητα, να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε συστήματα υδροβιότοπων συμμετέχοντας στις διαδικασίες καθαρισμού– ενώ οι αλλόχθονοι μικροοργανισμοί (συμπεριλαμβανομένων και των παθογόνων που εισέρχονται με τα ΥΑ) συνήθως δεν επιβιώνουν ή δεν έχουν σημαντική λειτουργική συνεισφορά στο περιβάλλον των TY (Vymazal, 2005)

Οι Brown και Reed (1994) βασιζόμενοι σε μια προκαταρκτική επισκόπηση τέτοιων συστημάτων στις ΗΠΑ, συμπεραίνουν ότι τα συστήματα αυτά είναι τόσο αξιόπιστα όσο

και χαμηλού σχετικά κόστους, κυρίως σε ότι αφορά την απομάκρυνση BOD και διαλυμένων ενώσεων κατά την επεξεργασία υγρών αποβλήτων. Αντίθετα, τα συστήματα αυτά υστερούν σε ότι αφορά την απομάκρυνση  $\text{NH}_3$  που πιθανόν οφείλεται σε περιορισμένο εφοδιασμό με οξυγόνο. (Αγγελακης και Tchobanoglous, 1995)



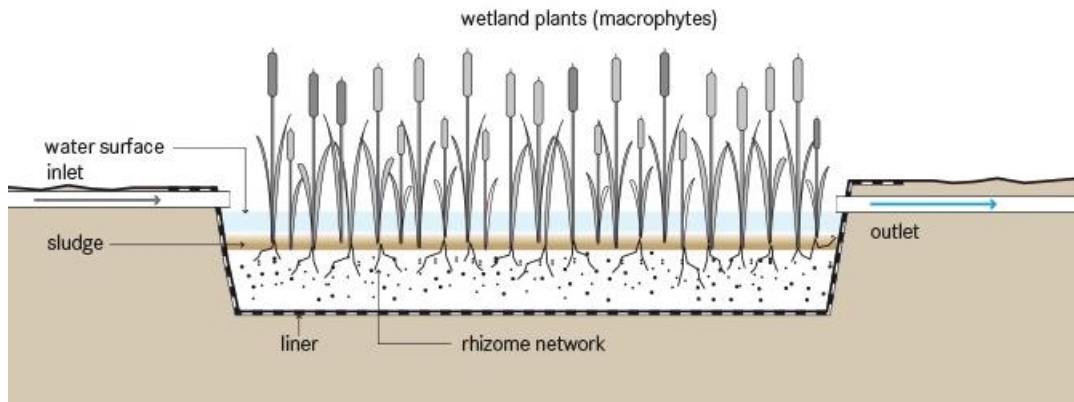
**Εικόνα 1.** Κατηγοριοποίηση τεχνητών υγροβιότοπων για εξυγίανση λυμάτων (Vymazal, 2007b)

### 1.1. Τεχνητοί υγροβιότοποι επιφανειακής ροής (FWS)

Τα συστήματα επιφανειακής αποτελούνται από υδατοστεγείς παράλληλες λεκάνες, κανάλια ή τάφρους στα οποία φύτεται βλάστηση σε μικρό βάθος νερού (0.1-0.6 μ.). Στα συστήματα αυτά εφαρμόζεται ελεγχόμενη εφαρμογή υγρών αποβλήτων που έχουν



δεχθεί προ-επεξεργασία. Το απόβλητο ρέει με μικρή ταχύτητα διαμέσου των στελεχών και των ριζωμάτων όπου και πραγματοποιείται η επεξεργασία. (Αγγελάκης & Tcobanoglu, 1995)



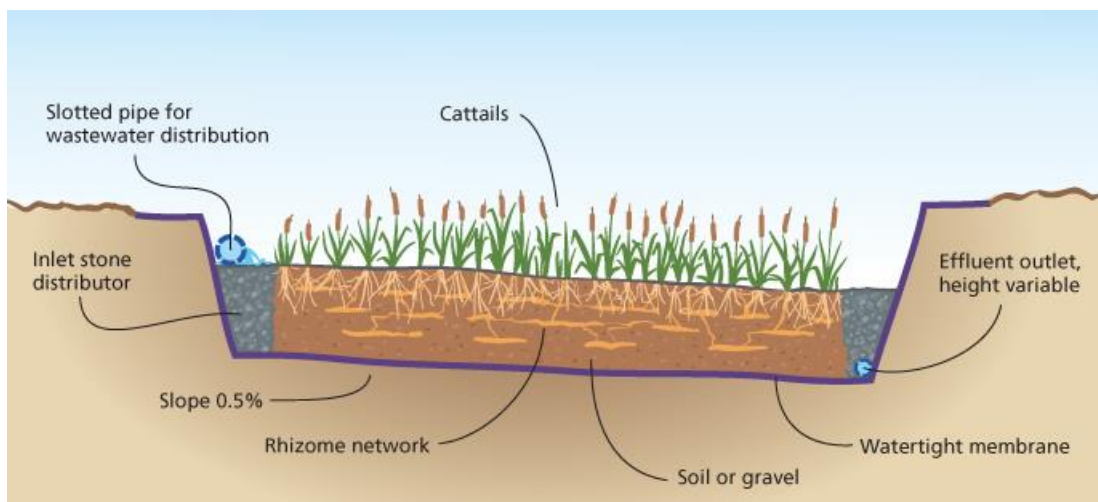
**Εικόνα 2.** Τεχνητός υγροβιότοπος οριζόντιας επιφανειακής ροής (Tilley, Lüthi, Morel, Zurbrügg, & Schertenleib, 2008)

Γενικά, στα συστήματα FWS κύρια πηγή  $O_2$  είναι η ελεύθερη επιφάνεια τους, άλλα η ύπαρξη βλάστησης επιβραδύνει τον φυσικό επαναερισμό, που είναι δυνατό να διενεργείται με τον άνεμο.

Η απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών επιτελείται με τον μηχανισμό της καθίζησης ενώ η απομάκρυνση του αζώτου οφείλεται στις διεργασίες νιτροποίησης-απονιτροποίησης και λιγότερο στην συμβολή της φυτικής βλάστησης και για αυτό εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα εφαρμογής του οργανικού φορτίου και τον χρόνο συγκράτησης. Η απομάκρυνση του φωσφόρου σε τέτοια συστήματα είναι περιορισμένη εξαιτίας της περιορισμένης επαφής του αποβλήτου με το έδαφος (Σωτηροπούλου 2008).

## 1.2. Τεχνητοί υγροβιότοποι οριζόντιας υπό-επιφανειακής ροής (SSFS)

Στα συστήματα αυτά η επιφάνεια του νερού διατηρείται ακριβώς κάτω από την επιφάνεια του εδάφους ή του χρησιμοποιούμενου μέσου. Για την κατασκευή των υποστρωμάτων χρησιμοποιείται κυρίως έδαφος άμμος και διάφορα άλλα χονδρόκοκα αδρανή υλικά. Η επεξεργασία του υγρού αποβλήτου οφείλεται σε φυσικές και βιοχημικές αποκρίσεις του μέσου, καθώς επίσης και στην επαφή του με το ριζικό σύστημα των φυτών. Τα επίπεδα απομάκρυνσης είναι ισοδύναμα των συστημάτων επιφανειακής ροής και παρουσιάζουν μειωμένα προβλήματα, σχετικά με την ανάπτυξη κουνουπιών και δυσάρεστων οσμών.

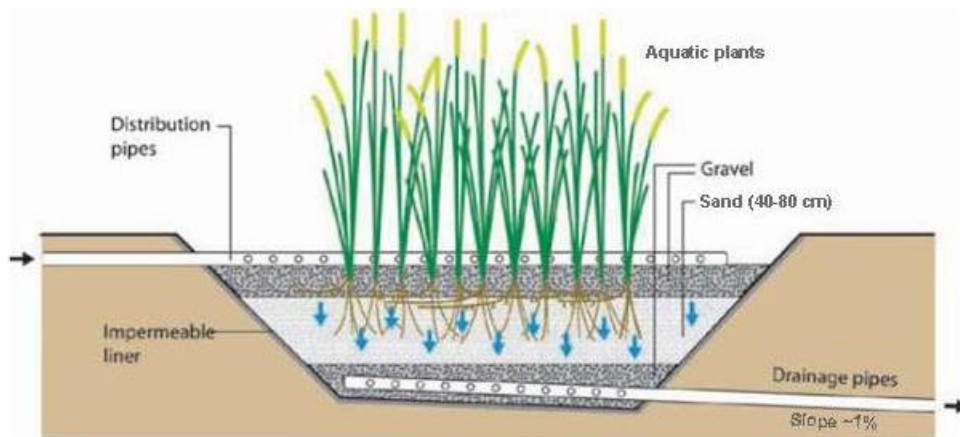


**Εικόνα 3.** Τεχνητός υγροβιότοπος οριζόντιας υπό-επιφανειακής ροής (Morel & Diener, 2006)

## 1.3. Τεχνητοί υγροβιότοποι κατακόρυφης υπό-επιφανειακής ροής

Τα συστήματα αυτά χαρακτηρίζονται από την κατακόρυφη ροή των προς επεξεργασία λυμάτων μέσα από τις εδαφικές στρώσεις των λεκανών τους. Η λειτουργία τους προσομοιάζει αρκετά με το περιοδικό πότισμα μιας γλάστρας στην οποία το νερό

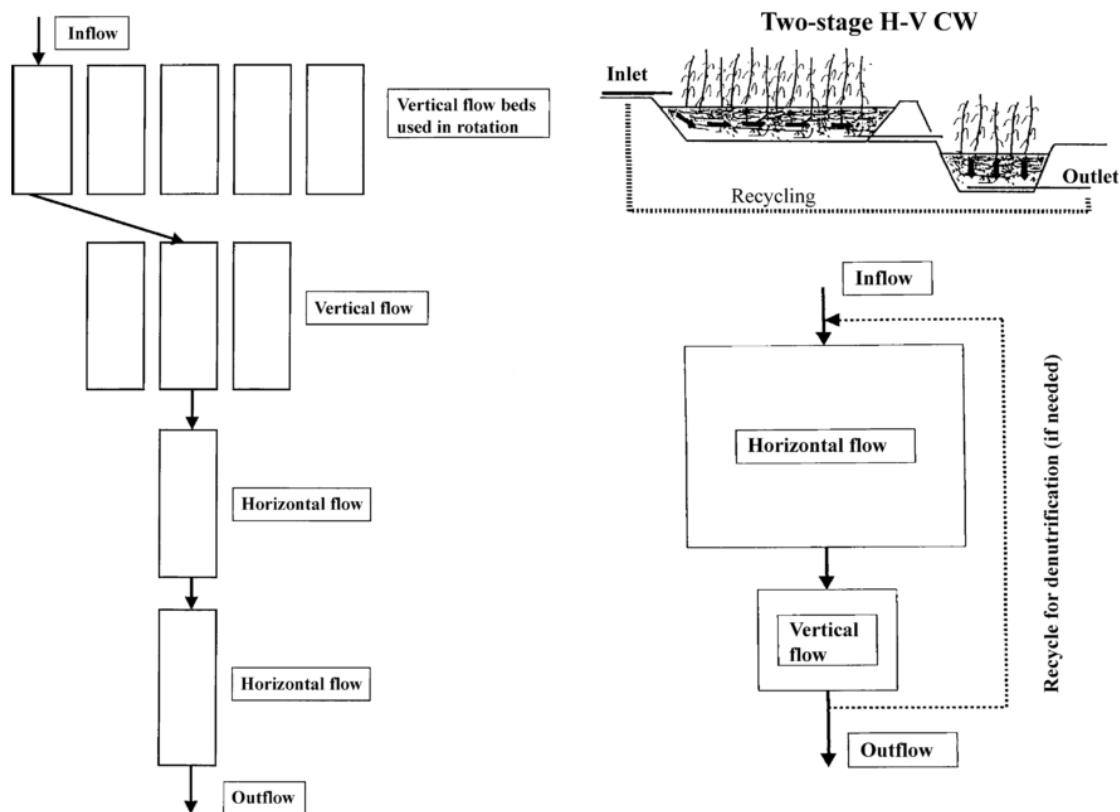
αρχικά πλημμυρίζει τη λεκάνη και εν συνεχεία αφήνεται να στραγγίσει (Καραμούζης, 2003). Οι λεκάνες στα συστήματα αυτά κατασκευάζονται με ένα βάθος περίπου 0,90 έως 1,20 m, με μια μέση κλίση πυθμένα περίπου 1%. Ο πυθμένας και τα πρανή τους καλύπτονται από γεωμεμβράνη ή κατασκευάζονται από σκυρόδεμα. Στη συνέχεια, γίνεται πλήρωση των λεκανών με αδρανή υλικά συνολικού βάθους μέχρι ενός μέτρου, μειούμενης κοκκομετρίας από τον πυθμένα προς την επιφάνεια. Το επιφανειακό στρώμα της λεκάνης, βάθους 10 έως 30 cm, καλύπτεται με άμμο, μέσα στην οποία φυτεύονται και αναπτύσσονται είδη καλαμιών. Για τη λειτουργία αυτού του συστήματος οι λεκάνες κατακλύζονται περιοδικά με μεγάλες παροχές λυμάτων και η ροή γίνεται κατά την κατακόρυφη διεύθυνση. Τα πλεονεκτήματα αυτού του είδους τεχνητού υγροβιοτόπου έναντι των υπολοίπων είναι η απαίτηση μικρότερης έκτασης για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων και η διατήρηση αερόβιων συνθηκών επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων, εξαιτίας της περιοδικής ανάπαυσης και ως εκ τούτου και περιοδικής ξήρανσης κάθε λεκάνης.



**Εικόνα 4.** Τεχνητός υγροβιότοπος κατακόρυφης υπό-επιφανειακής ροής (Morel & Diener, 2006)

#### 1.4. Υβριδικά συστήματα

Τα συστήματα αυτά αποτελούνται από ένα σύνολο των προηγούμενων τύπων τεχνητών υγροβιοτόπων όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικ.5)



**Εικόνα 5.** Τεχνητός υγροβιότοπος υβριδίου σχηματισμού (Vymazal, 2005)

## 2. Βλάστηση των υγροβιότοπων

Η φυτική βλάστηση ασκεί ένα πολύ σημαντικό και ολοκληρωμένο ρόλο στη λειτουργία των συστημάτων ή υγροβιότοπων με τη μεταφορά οξυγόνου δια μέσου του ριζικού συστήματος στον πυθμένα των λεκανών επεξεργασίας. Έτσι, εφοδιάζεται με οξυγόνο το μέσο κάτω από την επιφάνεια του νερού, επιτρέποντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών που διενεργούν τη βασική επεξεργασία του εφαρμοζόμενου αποβλήτου. Διάφορα είδη φυτών που ριζοβολούν σε χονδρόκοκκα υποστρώματα και αναφύονται ή και βλασταίνουν πάνω από την επιφάνεια του νερού, χρησιμοποιούνται στα συστήματα υγροβιότοπων. Τα πιο συνήθη είδη φυτών είναι διάφορα είδη της

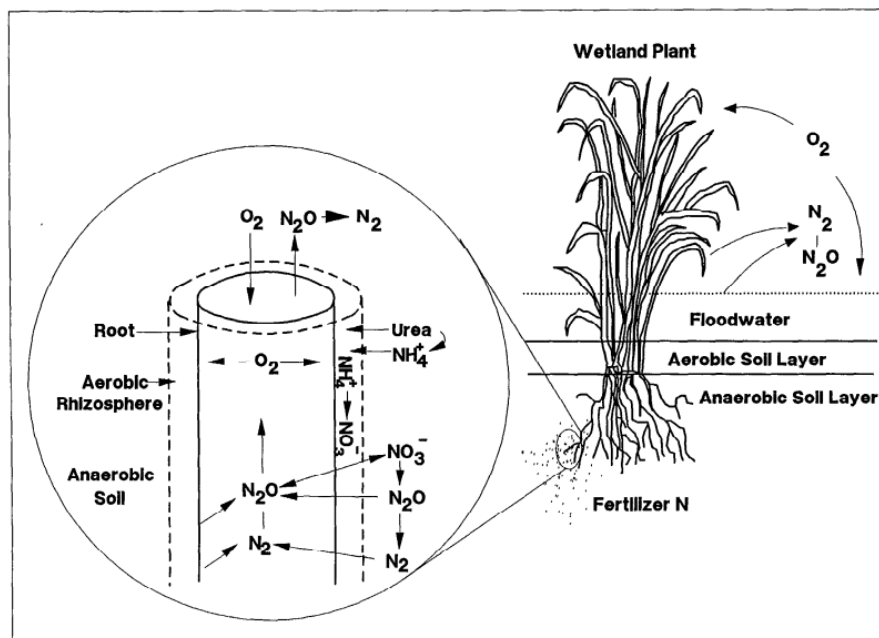
οικογενείας *Cyperaceae*, κυρίως του γένους *Carex spp.* (είδη κύπερης) και των γενών *Scirpus*, *Typha* και *Phragmites*, δηλαδή βούρλων, ψαθιού και νεροκάλαμων, αντίστοιχα.

Μερικές από τις γνωστές λειτουργίες των φυτών σε έναν τεχνητό υγροβιότοπο είναι οι εξής:

- Είναι οι κύριοι αυτότροφοι οργανισμοί, παραγωγοί βιομάζας, που αποτελεί τροφή για τα βακτήρια. Ελευθερώνουν υδατάνθρακες και ένζυμα που χρησιμοποιούνται σαν τροφή από τους μικροοργανισμούς (Bastviken, 2006).
- Απομακρύνουν θρεπτικά, τοξικά και οργανικά από το νερό.
- Εμποδίζουν την υπέρμετρη ανάπτυξη αλγών που διαφορετικά θα επιδείνωναν την ποιότητα των νερών του υγροβιότοπου μέσω της παραγωγής αιωρούμενων στερεών και BOD.
- Σταθεροποίηση του εδάφους και συσσώρευση νέων ιζημάτων μέσω της δράσης των φύλλων και του κορμού (Stottmeister et al., 2003).
- Μεταφορά οξυγόνου ( $O_2$ ) από τα φύλλα προς τις ρίζες. Σύμφωνα με τους Reedetal. (1995), η ποσότητα  $O_2$  που μπορεί να μεταφερθεί εξαρτάται από την πυκνότητα των φυτών και τα επίπεδα  $O_2$  στα φύλλα και μεταβάλλεται μεταξύ 5-45  $gO_2/d/m^2$  επιφάνειας υγροβιότοπου. Αν και το περισσότερο από το  $O_2$  αυτό χρησιμοποιείται από τα φυτά, μέρος αυτού μεταφέρεται και στο εξωτερικό μέρος των ριζών και έτσι εκεί επικρατούν αερόβιες συνθήκες και αναπτύσσονται αερόβια μικρόβια, επιτρέποντας και αερόβιες διεργασίες όπως είναι η νιτροποίηση (αφορά τους υγροβιότοπους υπό-επιφανειακής ροής) (Brix, 1999)
- Λειτουργούν σαν βιολογικοί αντιδραστήρες. Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε επαφή με τις ρίζες, τα ριζώματα, τα φύλλα, τον κορμό, τα υπολείμματα της φυτικής ύλης και, στην περίπτωση των υγροβιότοπων υπό-επιφανειακής ροής, την επιφάνεια του πορώδους υλικού. Επομένως, τα σκεπασμένα από απόβλητο μέρη των φυτών αποτελούν το υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροοργανισμών που συντελούν στην επεξεργασία των αποβλήτων (Stottmeister et al., 2003).

- Λειτουργούν σαν μέσο φίλτρανσης. Τα μέρη των φυτών έξω από το νερό σκιάζουν και ελέγχουν την ανάπτυξη των φυκών, ενώ τα υπολείμματα της φυτικής ύλης, τα οποία πέφτουν στον πυθμένα, συντελούν στην θερμική μόνωση του αποβλήτου, ώστε να επηρεάζεται λιγότερο από χαμηλές θερμοκρασίες αέρα (Stein & Hook, 2005).

Γενικά, στους τεχνητούς υγροβιότοπους και ιδιαίτερα στα συστήματα SFS δεν απαιτείται η συγκομιδή της φυτικής βλάστησης. Όμως στα συστήματα FWS απαιτείται περιοδική καταστροφή της υπάρχουσας ξηράς βλάστησης με σκοπό τη διατήρηση συνθηκών ελεύθερης ροής και παρεμπόδιση της δημιουργίας ροής σε αύλακες. Συνήθως δεν ενδείκνυται συγκομιδή-απομάκρυνση της φυτικής βιομάζας με σκοπό την αύξηση της απομάκρυνσης θρεπτικών στοιχείων.



**Εικόνα 6.** Σχηματική αναπαράσταση της νιτροποίησης-απονιτροποίησης στην ρίζα ενός φυτού

(Reddy, Patrick, & Lindau, 1989)

### 2.1. *Phragmites communis*

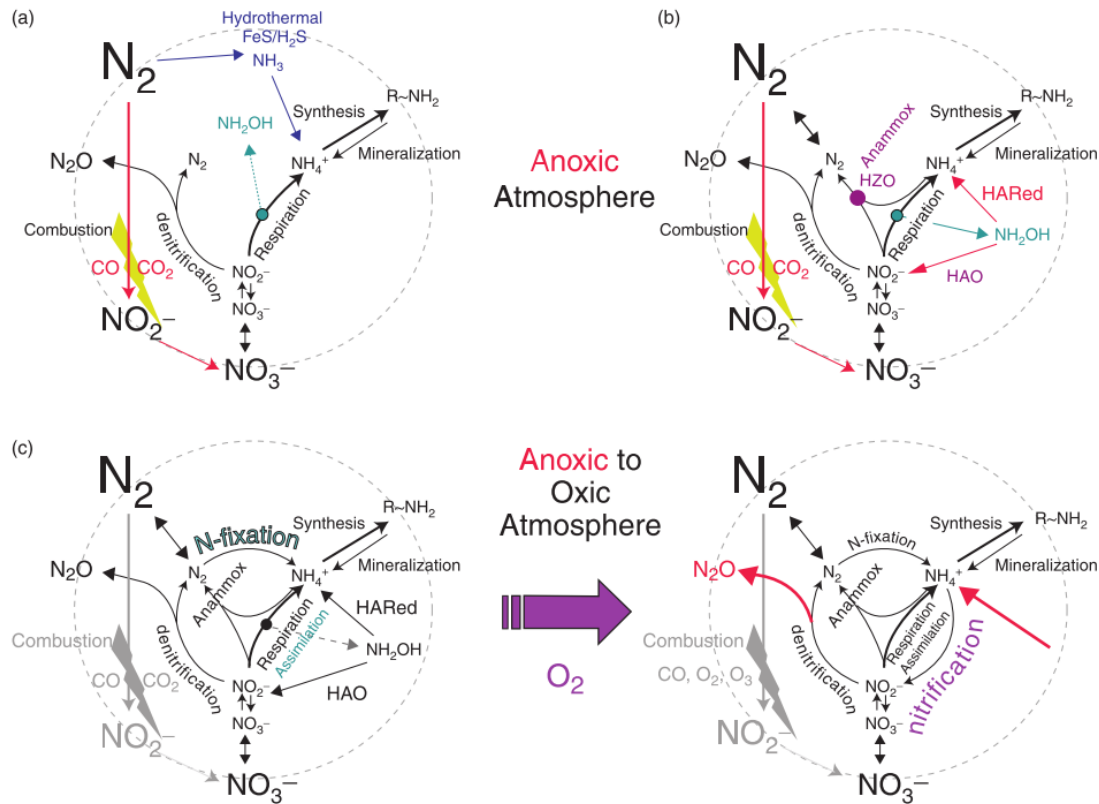
Το καλάμι (*Phragmites communis*) είναι φυτό ιθαγενές της Νότιας Ευρώπης και αναπτύσσεται καλύτερα σε εύκρατο κλίμα. Ωστόσο, παρουσιάζει μεγάλη ευκολία

προσαρμογής σε διάφορες κλιματολογικές αλλά και εδαφολογικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να απαντάται, σε μεγάλους πληθυσμούς, σε πολλές εύκρατες ή υποτροπικές περιοχές και στα δύο ημισφαίρια του πλανήτη (Μεσόγειος, Καλιφόρνια, Καραϊβική κτλ.). Συγκεκριμένα, το γιγάντιο καλάμι μπορεί να αναπτυχθεί σε περιοχές με μέση ετήσια θερμοκρασία 9 – 28.5 °C και σε εδάφη με pH 5.0 – 8.7. Ανήκει στα αγρωστώδη φυτά με C3 φωτοσυνθετικό μηχανισμό και είναι πολυετές. Γενικά, αναπτύσσεται καθ' ύψος μέχρι τα 6 m αλλά σε ιδανικές συνθήκες μπορεί να ξεπεράσει ακόμα και τα 10m, εμφανίζοντας ρυθμούς ανάπτυξης, που προσεγγίζουν τα 5 cm ανά ημέρα. Το στέλεχος του είναι κούφιο και έχει διάμετρο 2-3 cm, ενώ τα φύλλα έχουν μήκος 40-60 cm, πλάτος 2-6 cm και χρώμα γκριζοπράσινο. Συναντάται συνήθως κοντά σε ποτάμια και λίμνες, γενικά σε εδάφη με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και υψηλή υπόγεια στάθμη νερού, ωστόσο μπορεί να καλλιεργηθεί σε ευρεία κλίμακα εδαφικών και κλιματικών συνθηκών. Θεωρείται ένα πολύ δυναμικό φυτό και πολλαπλασιάζεται κυρίως με ριζώματα, μπορεί όμως να πολλαπλασιαστεί και με μοσχεύματα.

## 2.2. *Typha latifolia*

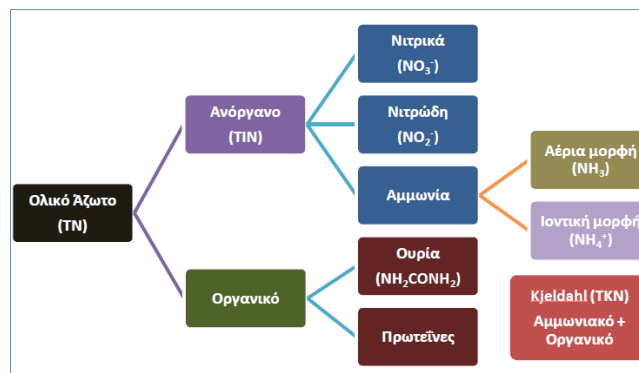
Το ψαθί (*Typha latifolia*) είναι ένα πολυετές ανθοφόρο φυτό που ανήκει στο γένος *Typha*. Αποτελεί ιθαγενές είδος στην βόρεια και νότια Αμερική, Ευρώπη, Ασία και Αφρική. Έχει ύψος 1,5 έως 3 μέτρα και έχει 2-4 εκ. πλάτους φύλλα. Συναντάται σε πληθώρα κλιμάτων όπως τροπικά, υποτροπικά, υγρά παραθαλάσσια και ξηρά ηπειρωτικά. Θεωρείται όμως αυστηρά είδος υδροβιότοπων αφού απαιτεί νερό για την ύπαρξη του. Εκφύεται συνήθως σε υδροβιότοπους όπου το βάθος του νερού δεν ξεπερνάει το 1 μέτρο, σε ρέοντα ή στάσιμα νερά. Το είδος αυτό μπορεί να εκτοπίσει φυτά ιθαγενή της περιοχής καθώς μειώνει την αλατότητα, επεμβαίνοντας έτσι στην διατήρηση ενδιαιτημάτων με αλατότητα.

### 3. Βιογεωχημικός κύκλος του αζώτου



**Εικόνα 7.** Η εξέλιξη του κύκλου του αζώτου από την αρχική αναερόβια ατμόσφαιρα στην σημερινή αερόβια (Klotz & Stein, 2008)

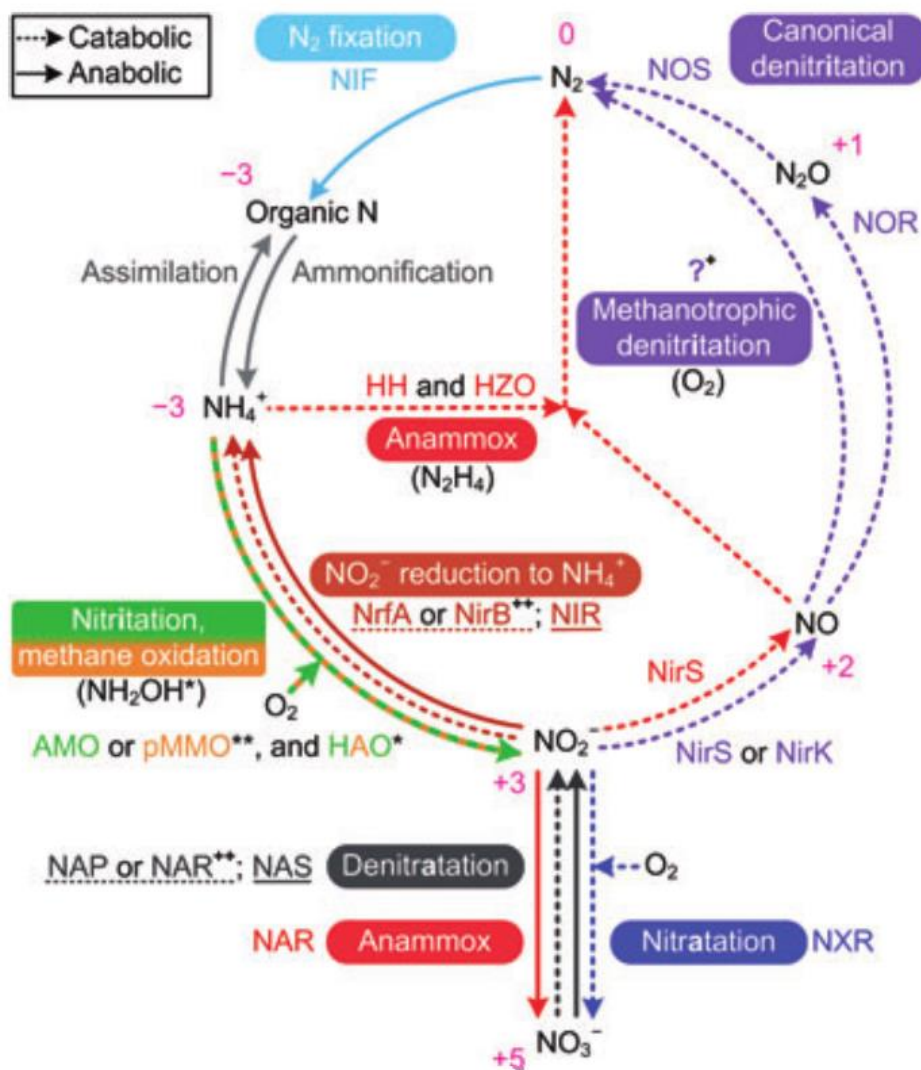
Το άζωτο (TN) συναντάται σε ανόργανες μορφές (IN) νιτρώδη ( $NO_2^-$ ), νιτρικά ( $NO_3^-$ ) και αμμωνιακά ( $NH_4^+$ ) άλατα και σε οργανικό άζωτο (Total Organic Nitrogen, TON). Στο οργανικό άζωτο ανήκει η ουρία ( $NH_2CONH_2$ ) και το N των πρωτεϊνών. Το αμμωνιακό και το οργανικό άζωτο αποτελούν το άζωτο Kjeldahl (TKN). (Εικ.8)





**Εικόνα 8.** Διάφορες μορφές στις οποίες εντοπίζεται το άζωτο.

Στη φύση, το IN εμφανίζεται σε διαφορετικές οξειδωτικές καταστάσεις. Οι ποικίλες μορφές του N εμπλέκονται συνεχώς σε χημικούς μετασχηματισμούς από ανόργανες σε οργανικές ενώσεις και αντίστροφα. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις N που αντιπροσωπεύουν τις παραπάνω οξειδωτικές καταστάσεις μπορούν να μετατραπούν σε άλλες μορφές μέσω της μικροβιακής δραστηριότητας (Kartal et al., 2008) .Η εναλλαγή-μετατροπή του N στη βιόσφαιρα είναι γνωστή ως κύκλος του N που συνοψίζεται στην Εικόνα 9. Η πιο σημαντική μορφή ανόργανου N στους υδροβιότοπους είναι τα αμμωνιακά ιοντα ( $\text{NH}_4^+$ ), τα νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ) και τα νιτρικά ( $\text{NO}_3^-$ ). Σε αέρια μορφή το N απαντάται ως μοριακό N, νιτρώδες οξείδιο ( $\text{N}_2\text{O}$ ), νιτρικά οξείδια ( $\text{NO}_2$  και  $\text{N}_2\text{O}_4$ ) και αμμωνία ( $\text{NH}_3$ ) (Vymazal, 2007b).

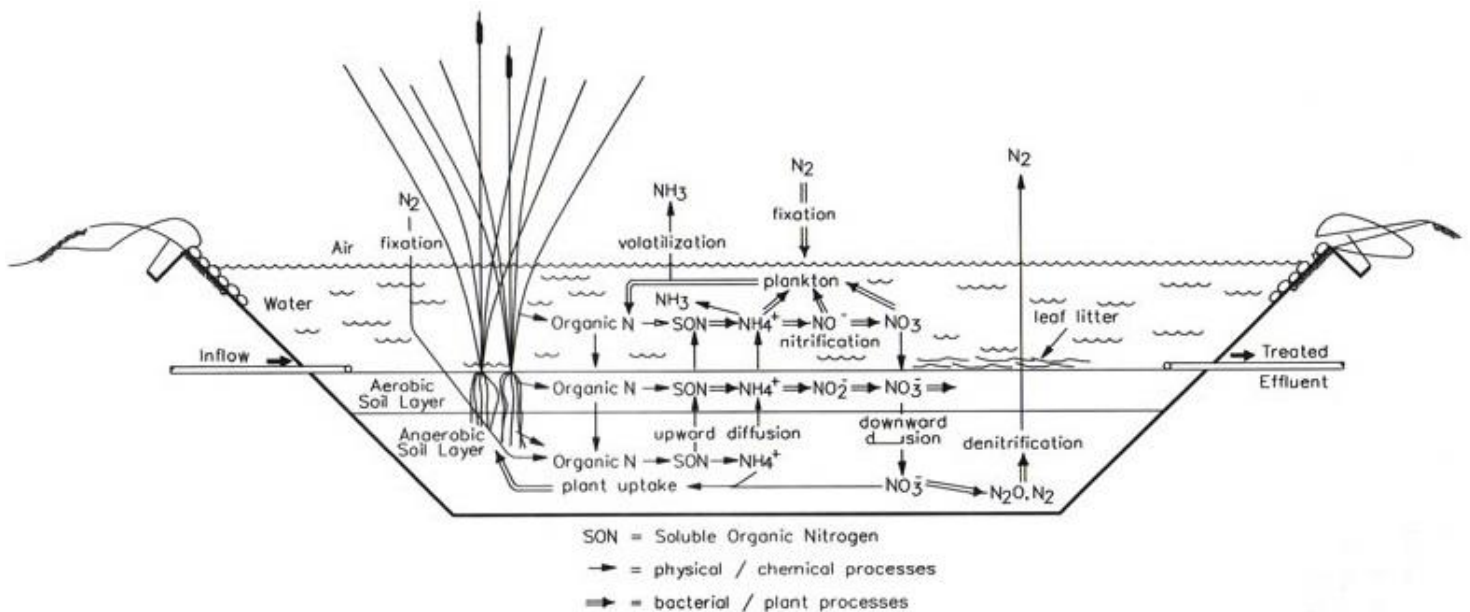


**Εικόνα 9.** Ο Κύκλος του αζώτου που περιλαμβάνει μονοπάτια αναβολικά και καταβολικά. Τα βασικά ενζυμα που συμμετέχουν κατά αλφαβητική σειρά είναι η μονοξυγενάση της αμμωνίας (AMO), η οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (HAO), η υδρολάση της υδραζίνης (HH), η οξειδοαναγωγή της υδραζίνης (HZO), η περιπλασματική αναγωγή νιτρικών (NAP), η συνδεόμενη με τη μεμβράνη αναγωγή των νιτρικών (NAR), η κυτοπλασμική αναγωγή των νιτρικών (NAS), η νιτρογενάση (NIF), οι siroheme αναγωγάσεις των νιτρικών (NIR and NirB), η CU-αναγωγή των νιτρικών (NirK), η κυτοχρωμική cd1 αναγωγή των νιτρικών (NirS), η αναγωγή του NO (NOR), η αναγωγή του N<sub>2</sub>O (NOS), η pentaheme κυτοχρωμική c αναγωγή των νιτρικών (NrfA), η νιτρική οξειδοαναγωγή (NXR), και η μεθανική μονοοξυγενάση (pMMO) (Vlaeminck, Hay, Maignien, & Verstraete, 2011)

Η οξειδωτική κατάσταση του N μεταβάλλεται κυρίως από μικροοργανισμούς, οι οποίοι πραγματοποιούν καταβολικές αντιδράσεις (νιτρωδοποίησης, νιτροποίησης, απονιτροποίησης, αμμωνιοποίησης, αναερόβιας οξείδωσης της  $\text{NH}_4^+$  κτλ), αναβολικές αντιδράσεις (N δέσμευσης, πρόσληψης αμμωνίου, αφομοιωτική αναγωγή νιτρικών) και αμμωνιοποίησης (Darpena-Mora et al., 2007). Μερικές από αυτές τις διεργασίες απαιτούν ενέργεια (τυπικά προερχόμενη από μία πηγή οργανικού C) ώστε να ξεκινήσουν, και άλλες απελευθερώνουν ενέργεια, η οποία χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για την ανάπτυξη και επιβίωση τους. Γενικά, οι τεχνητοί υγροβιότοποι χαρακτηρίζονται από χαμηλή αποδοτικότητα όσο αφορά την απομάκρυνση N που αποδίδεται στον ανταγωνισμό με τους ετερότροφους οργανισμούς για το διαθέσιμο  $\text{O}_2$ .

Όλοι αυτοί οι μετασχηματισμοί είναι απαραίτητοι για τα οικοσυστήματα των υγροβιότοπων ώστε να λειτουργήσουν σωστά, και οι περισσότερες χημικές αλλαγές ελέγχονται μέσω της παραγωγής ενζύμων και καταλυτών των συμμετεχόντων μικροοργανισμών.

### 3.1. Διεργασίες μετασχηματισμού-απομάκρυνσης N

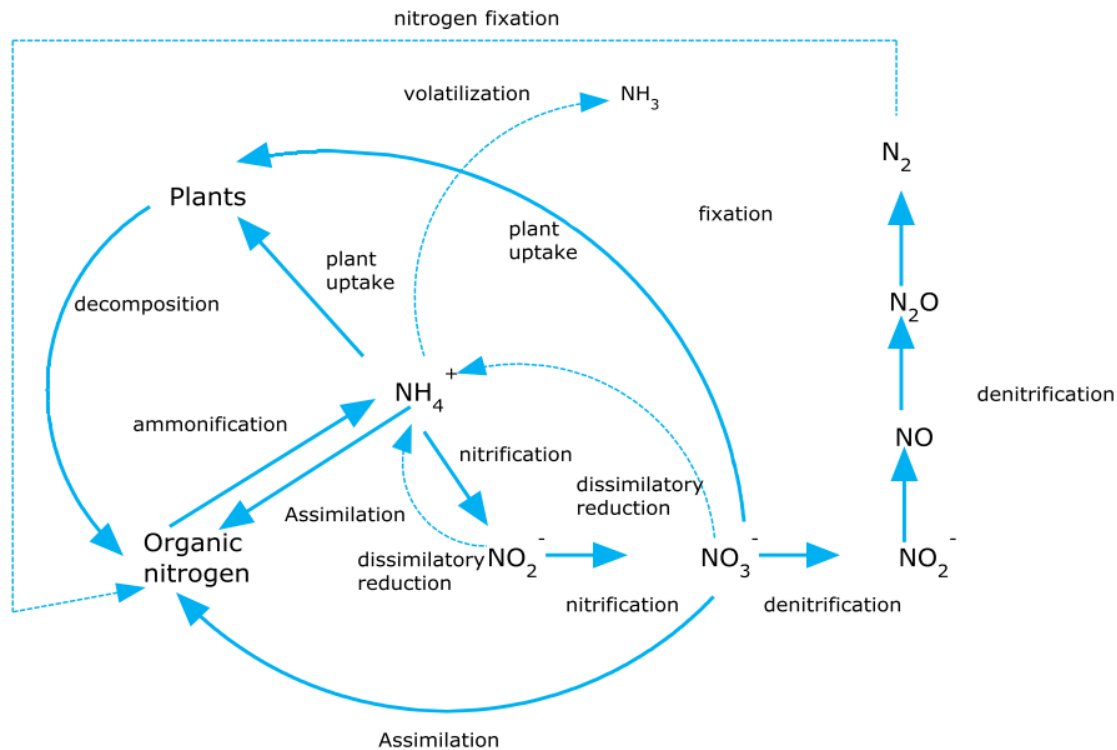


Εικόνα 10. Ο κύκλος αζώτου σε έναν τεχνητό υγροβιότοπο. (Bowden, 1987)

Συνοπτικά παρουσιάζονται οι κύριες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά τον κύκλο του N σε τεχνητούς υγροβιότοπους:

Διεργασία	Μετασχηματισμός
Εξάχνωση αμμωνίας	Αμμωνία-N (aq) $\rightarrow$ Αμμωνία-N (g)
Αμμωνιοποίηση	Οργανικό άζωτο $\rightarrow$ Αμμωνία-N
Νιτροποίηση	Αμμωνία-N $\rightarrow$ Νιτρώδες-N $\rightarrow$ Νιτρικό-N
Αμμωνιοποίηση νιτρικών	Νιτρικό-N $\rightarrow$ Αμμωνία-N
Απονιτροποίηση	Νιτρικό-N $\rightarrow$ Νιτρώδες-N $\rightarrow$ $N_2$ (g) και $N_2O$
Αζωτοδέσμευση	$N_2$ (g) $\rightarrow$ Αμμωνία-N (οργανικό N)
Πρόσληψη από φυτά κ μικροοργανισμούς	Αμμωνία-N, Νιτρώδες-N, Νιτρικό-N $\rightarrow$ οργανικό-N
Απορρόφηση αμμωνίας	
Καθίζηση οργανικού αζώτου	
ANAMMOX	Αμμωνία-N $\rightarrow$ $N_2$ (g)

**Πίνακας 1.** Πίνακας μετασχηματισμών μεταξύ των μορφών του αζώτου (Vymazal, 2007b)



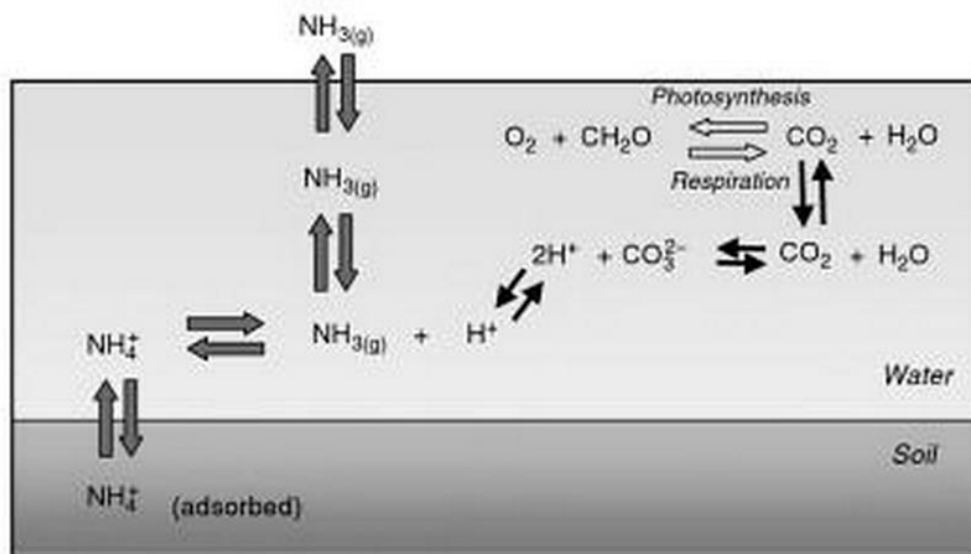
**Εικόνα 11.** Οι βασικές διεργασίες απομάκρυνσης N σε έναν ΤΥ υποεπιφανιακής ροής (Saeed & Sun, 2012)

### Εξάχνωση (*ammonia volatilization*)

Η απομάκρυνση  $\text{NH}_3$  στην ατμόσφαιρα είναι μια περιπλοκή διαδικασία που ρυθμίζεται από ένα σύνολο φυσικών, χημικών και βιολογικών παραμέτρων. Η μεταφορά αμμωνίας μεταξύ στήλης ύδατος, εδαφών και ατμόσφαιρας παίζει σημαντικό ρόλο στον κύκλο του N στους ΤΥ καθώς οι τελευταία αποτελούν ένα ιδανικό περιβάλλον για την αμμωνιακή εξάχνωση. Αυτή η διεργασία περιλαμβάνει την ισορροπία μεταξύ της ιοντικής μορφής ( $\text{NH}_4$ ) και της μη ιοντικής αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) η οποία ρυθμίζεται από το pH του διαλύματος στο οποίο περιέχονται. (Ramesh Reddy and Ronald D . DeLaune,

2008). Κάτω από αλκαλικές συνθήκες τα υδροξύλια αντιδρούν με το αμμώνιο με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αμμωνίας.

Οι Reddy και Patrick (1984) έδειξαν ότι ο ρυθμός εξάχνωσης  $\text{NH}_3$  από πλημμυρισμένα εδάφη και δεξαμενές καθίζησης είναι αμελητέα εάν η τιμή του pH είναι μικρότερη από 7,5 και πολύ συχνά οι απώλειες δεν είναι σημαντικές εάν η τιμή του βρίσκεται κάτω του 8. Σε pH 9,3 το ποσοστό μεταξύ της αμμωνίας και του ιόντος αμμωνίου είναι 1:1 και οι απώλειες μέσω της εξάχνωσης είναι σημαντικές.



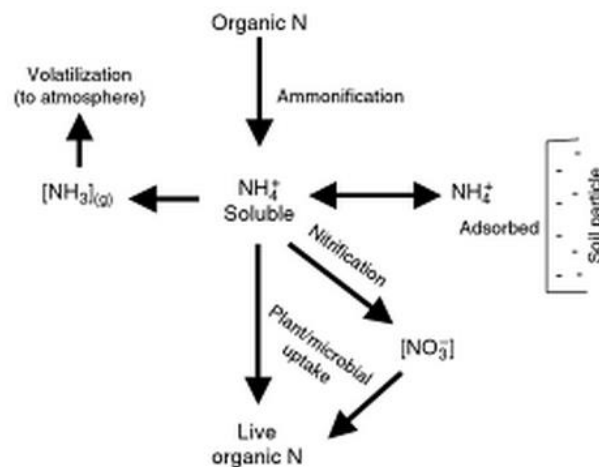
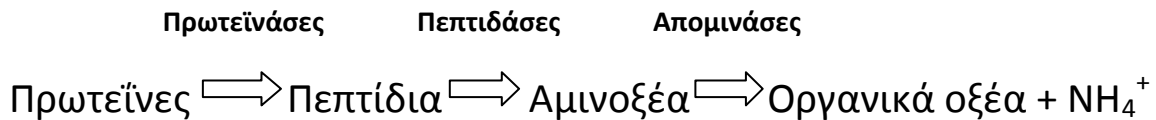
**Εικόνα 12.** Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην αμμωνιακή εξάχνωση. (Ramesh Reddy and Ronald D . DeLaune, 2008)

### Αμμωνιοποίηση

Η αμμωνιοποίηση είναι η διεργασία κατά την οποία το οργανικό N μετατρέπεται βιολογικά σε αμμωνία. Άζωτο υπάρχει δεσμευμένο μέσα στην οργανική ύλη των φυτών και των ζώων. Αυτό είναι δεσμευμένο σε μεγαλομοριακές ενώσεις όπως πρωτεΐνες και αμινοξέα. Όταν αυτό διασπάται μέσα στα μικροβιακά κύτταρα το τελικό προϊόν της αποικοδόμησης είναι η αμμωνία. Πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς οι οποίοι ελευθερώνουν ή ανοργανοποιούν N ως παραπροϊόν της αποδόμησης της νεκρής

οργανικής ύλης. Αυτή η διεργασία αποτελεί πηγή ενέργειας και άνθρακα για τους μικροοργανισμούς, καθώς επίσης και πηγή θρεπτικών, κυρίως N, έτσι ώστε να μπορούν να συνθέσουν πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα κυτταρικά συστατικά (Groffman, 2007) Η ανοργανοποίηση του N στο έδαφος αποτελεί μια από τις βασικές διεργασίες με την οποία αυξάνεται το ποσό του αζώτου που είναι διαθέσιμο στα φυτά.

Με τον όρο απαμίνωση χαρακτηρίζεται η αφαίρεση μιας αμινικής ομάδας ( $-NH_2$ ) από ένα μόριο οργανικής αμινο-ένωσης μετατρεπόμενη σε αμμωνία. Πρόκειται για μια σειρά αντιδράσεων μεταβολισμού όπου αποικοδομούνται τα αμινοξέα από τους οργανισμούς.



**Εικόνα 13.** Σχηματική αναπαράσταση της τύχης της αμμωνίας σε υδροβιότοπους. (Reddy&DeLaune, 2008)

## Νιτροποίηση

### Αυτότροφη Νιτροποίηση

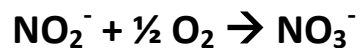
Νιτροποίηση είναι η βιολογική διεργασία μετατροπής του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  σταδιακά σε νιτρώδες και νιτρικό άζωτο. Η νιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο στάδια, κατά την οποία η αμμωνία μετατρέπεται (οξειδώνεται) σε νιτρικά ( $\text{NO}_3^-$ ) ιόντα με ενδιάμεση βαθμίδα τα νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ) ιόντα και καθένα από τα οποία καταλύεται από διαφορετικά γένη μικροοργανισμών (Painter, 1970) σύμφωνα με τις αντιδράσεις που ακολουθούν:

- ❖ Στάδιο 1: οξείδωση αμμωνίας σε νιτρώδη

Η συνολική αντίδραση οξείδωσης της αμμωνίας (υπό τη μορφή  $\text{NH}_4^+$ ) είναι (Metcalf & Eddy, 2003):



- ❖ Στάδιο 2: οξείδωση νιτρώδων σε νιτρικά

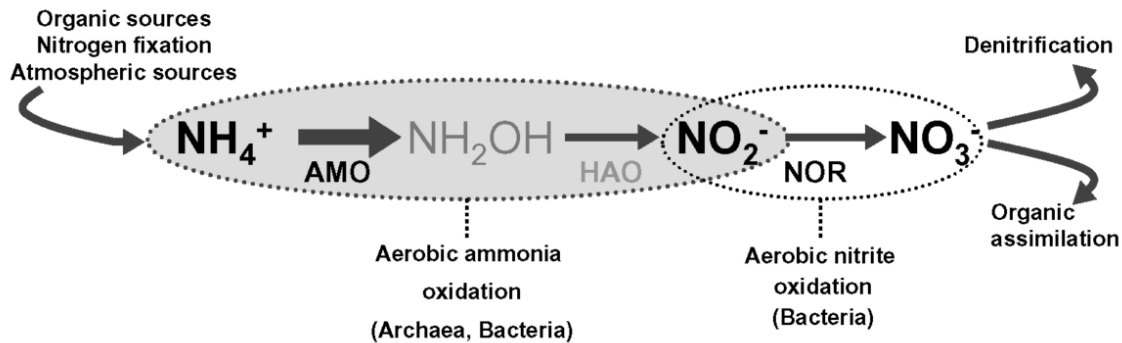


Ήδη από τα τέλη του προηγούμενου αιώνα, οι Schloesing και Muntz (1877) μελετώντας τη διήθηση αποβλήτου μέσω στήλης άμμου ανακάλυψαν ότι η μετατροπή του αμμωνιακού αζώτου σε νιτρώδες και νιτρικό άζωτο οφειλόταν σε ζωντανούς οργανισμούς, αφού η αντίδραση μπορούσε να σταματήσει με εισαγωγή χλωροφορμίου στη στήλη.

Στο πρώτο στάδιο η αμμωνία οξειδώνεται σε νιτρώδη ( $\text{NO}_2^-$ ) (νιτρωδοποίηση) από νιτρωδοποιητικούς μικροοργανισμούς (ή νιτρωδοποιητές). Η επακόλουθη οξείδωση του παραγόμενου  $\text{NO}_2^-\text{-N}$  σε  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  ονομάζεται νιτρικοποίηση και καταλύεται από νιτρικοποιητικούς μικροοργανισμούς (ή νιτρικοποιητές). Και τα δύο είδη μικροοργανισμών που συνολικά ονομάζονται νιτροποιητικοί (ή νιτροποιητές) ανήκουν στην κατηγορία των χημειολιθοαυτότροφων μικροοργανισμών.



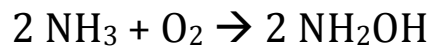
### Αερόβια οξείδωση της αμμωνίας



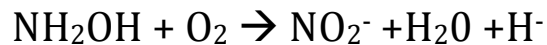
**Εικόνα 14.** Η αερόβια οξείδωση της αμμωνίας από βακτήρια και αρχαία κατά την νιτροποίηση και η οξείδωση των νιτρικών από βακτήρια. (Schleper & Nicol, 2010)

Σταδια μετατροπής:

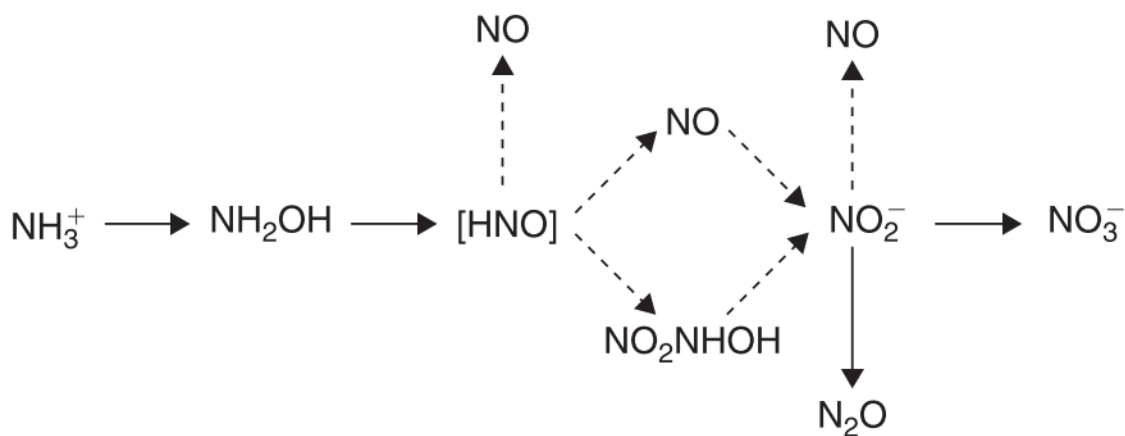
- Βήμα 1: οξείδωση αμμωνίας σε υδροξυλαμίνη (ως ενδιάμεσο προϊόν)



- Βήμα 2: οξείδωση υδροξυλαμίνης σε νιτρώδες με ταυτόχρονη έκλυση ενέργειας



Κατά την αντίδραση της υδροξυλαμίνης δημιουργούνται ενδιάμεσες ενώσεις του N, της γενικής μορφής  $\text{N}_x\text{O}$  (Εικ. 13), οι οποίες ελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα και αποτελούν αέρια που συνεισφέρουν στο φαινόμενο του θερμοκηπίου. Σε συνθήκες αναεροβίωσης τόσο τα  $\text{NO}_3^-$  όσο και ενδιάμεσά τους είναι δυνατόν να υποστούν απονιτροποίηση, τα τελικά προϊόντα της οποίας είναι τα αέρια  $\text{N}_2$  και  $\text{N}_2\text{O}$ .

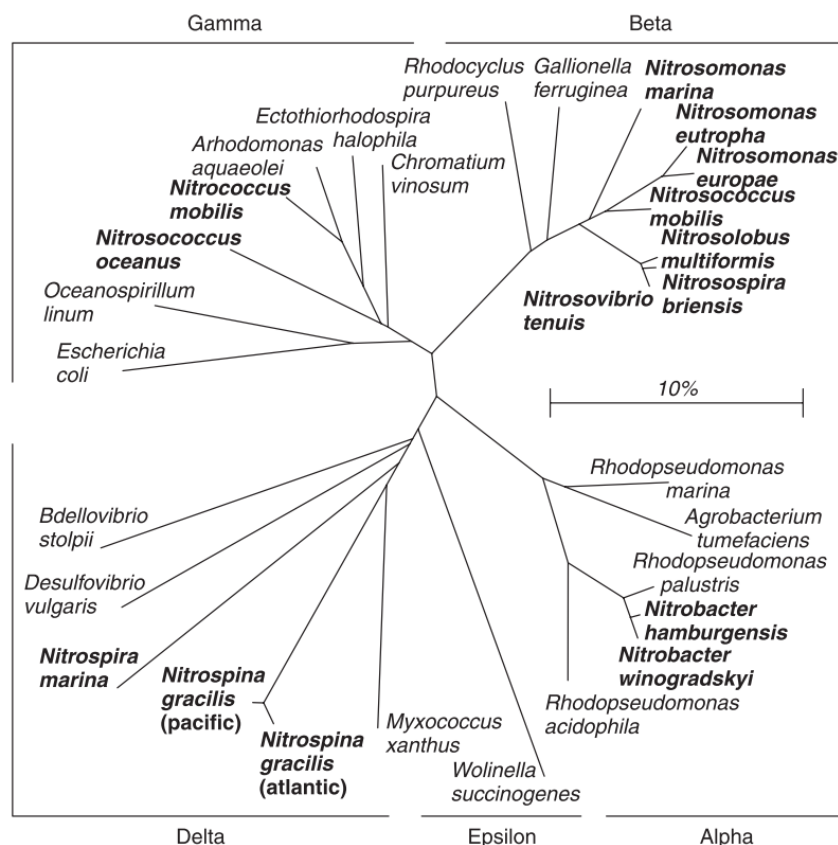


**Εικόνα 15.** Τα μονοπάτια της νιτροποίησης από τους αυτότροφους μικροοργανισμούς.  
(Groffman, 2007)

### *Μικροβιολογία της οξείδωσης της αμμωνίας*

Βακτήρια (Ammonia-Oxidizing Bacteria AOB)

Η ανακάλυψη βακτηρίων, υπεύθυνων για την οξείδωση της αμμωνίας και νιτρωδών, έγινε από τους Percy Faraday Frankland και Sergei Winogradsky και άλλους πριν από περισσότερα από 100 χρόνια. Τα χημειολιθοτροφικά βακτήρια ομαδοποιούνται λόγω της φυσιολογικής τους ικανότητας να χρησιμοποιούν ανόργανους ηλεκτρονιοδότες ως πηγές ενέργειας. Πιο συγκεκριμένα μπορούν να χρησιμοποιούν ανηγμένες ενώσεις αζώτου (πχ.  $\text{NH}_3$ ) για ενεργειακή πηγή,  $\text{CO}_2$  ως μοναδική πηγή άνθρακα και μοριακό οξυγόνο για δέκτη ηλεκτρονίων. Αυτά τα χημειολιθοτροφα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία συνήθως ανήκουν στα β και γ πρωτεοβακτήρια (Madigan et al., 2011).



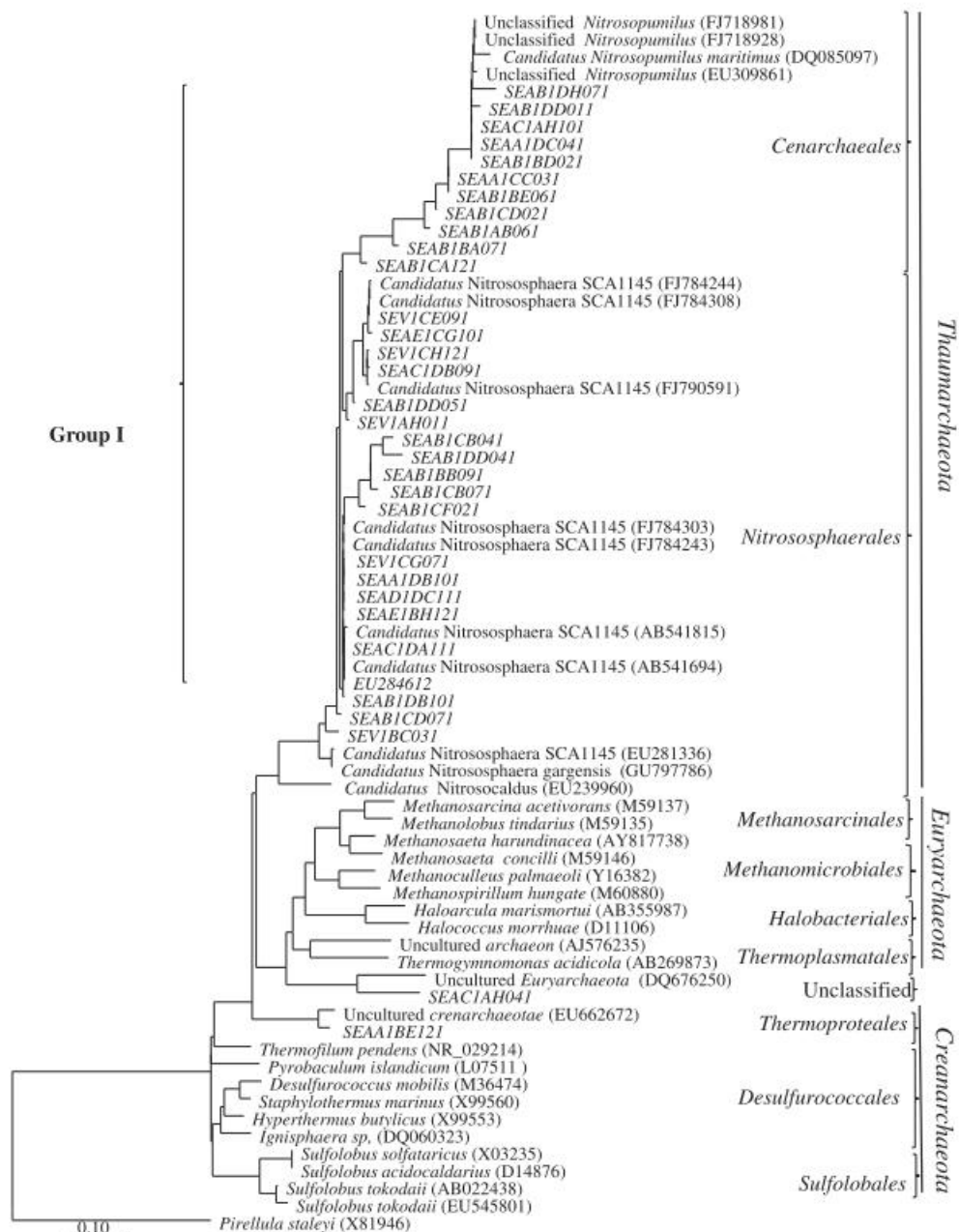
**Εικόνα 16.** Φυλογενετικό δέντρο για τα πρωτεοβακτηρια που περιλαμβάνει τους νιτροποιητές με έντονα γράμματα. Η κλίμακα ανταποκρίνεται σε υπολογισμένες 0,1 μεταλλάξεις ανά θέση αλληλουχίας. (Teske et al., 1994). Πιο πρόσφατες μελέτες όμως τοποθετούν το *Nitrococcus mobilis* στα β πρωτεοβακτηρια όπως φαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.

### Αρχαία (Ammonia-Oxidizing Archaea AOA)

Μέχρι πρόσφατα, ο ρόλος των αρχαίων στον γεωχημικό κύκλο του αζώτου, η φυλογενετική τους ποικιλότητα καθώς η διαφοροποίηση τους σε θέματα φυσιολογίας είχαν υποτιμηθεί σε μεγάλο βαθμό. Για πάνω από 100 χρόνια, η διεργασία της οξείδωσης της αμμωνίας θεωρούνταν ότι εκτελούνταν από τα χημειολιθότροφα β και γ πρωτεοβακτήρια. (Purkhold et al., 2000) και ανά περιπτώσεις υποστηριζόταν από ετερότροφους νιτροποιητές σε εδάφη (Boer & Kowalchuk, 2001). Παρόλα αυτά, in situ μετρήσεις της νιτροποίησης σε θαλάσσια και χερσαία οικοσυστήματα παρουσίασαν ότι και άλλοι οργανισμοί είναι ικανοί για οξείδωση της αμμωνίας (Pester, Schleper, &

Wagner, 2011; Schleper & Nicol, 2010). Η ανακάλυψη ομολόγων του γονιδίου της μονοξυγενάσης της αμμωνίας σε αρχαία (Hallam, Mincer, et al., 2006) καθώς και η καλλιέργεια αυτότροφων αρχαίων που οξειδώνουν την αμμωνία (Blainey et al, 2011; de la Torre et al, 2008; Konneke et al., 2005) αποκάλυψε ότι μια επιπλέον ομάδα μικροοργανισμών είναι ικανή να καταλύσει αυτήν την διεργασία. Η ευρεία διασπορά και αφθονία αυτών των ΑΟΑ έχει δειχτεί με στοχευμένη ανάκτηση γονιδίων αρχαίων πχ της ριβοσωμικής υπομονάδας 16S και της μονοοξυγενάσης της αμμωνίας (amo), με αναλύσεις των χαρακτηριστικών λιπιδικών στιβάδων των αρχαίων, με μεταγενομικές μελέτες κ.α. (Hallam, Konstantinidis, et al., 2006; Schleper, Jurgens, & Jönascheit, 2005). Σύμφωνα με τον Mussmann et al. (2011) αφού έχει αποδειχτεί σε πολλές περιπτώσεις ακόμα και η αριθμητική υπεροχή τους έναντι των ομολόγων τους βακτηρίων σε πολλά περιβάλλοντα, η αντίληψη μας για την μικροβιακή νιτροποίηση έχει αλλάξει. Δυστυχώς όμως η κατανόηση μας της εξελικτικής τους ιστορίας και του μεταβολισμού τους βρίσκεται ακόμα σε εμβρυικό στάδιο (Pester et al., 2011). Τα περισσότερα βακτήρια έχουν αερόβιο μεταβολισμό ενώ τα αρχαία επιβιώνουν πιο εύκολα σε υποξικές συνθήκες και συνεπώς μπορεί να είναι υπεύθυνα για νιτροποίηση και απονιτροποίηση σε περιβάλλοντα με ελάχιστο αερισμό και χαμηλές συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου (πχ κάτω από εναλλασσόμενες αερόβιες/αναερόβιες συνθήκες) (Park, Wells, Bae, Criddle, & Francis, 2006)

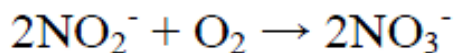
Τα αρχαία αποτελούνται από 3 κύρια φύλα, τα ευκαρυωτα, τα κρεναρχαιωτα και τα θαυμαρχαιωτά (Bouali et al., 2012; Brochier-Armanet et al, 2008; Pester et al, 2011; Wei et al, 2011)



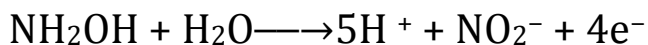
**Εικόνα 17.** Φυλογενετικό δέντρο που δημιουργήθηκε με τη μέθοδο Neighbor-joining χρησιμοποιώντας αλληλουχίες του γονιδίου 16S rRNA από αρχαία που λήφθηκαν από τεχνητό υγροβίοτοπο οριζόντιας υπο-επιφανειακής ροής και παρουσιάζει την συγκριτική θέση των μελετημένων αλληλουχιών από το βασίλειο των αρχαίων (Bouali et al., 2012).

#### Οξείδωση νιτρωδών

Η οξείδωση των νιτρωδών, σε αντίθεση με την οξείδωση της αμμωνίας, πραγματοποιείται χωρίς τον σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων και έτσι η αντίδραση μπορεί να παρασταθεί ικανοποιητικά από την εξίσωση:



Η διεργασία οξείδωσης της αμμωνίας σε νιτρικά περιλαμβάνει τη μεταφορά οκτώ ηλεκτρονίων και πραγματοποιείται διαδοχικά. Διάφορα ένζυμα εμπλέκονται στην οξείδωση των ανόργανων ενώσεων του N. Στα νιτρωδοποιητικά βακτήρια η αμμωνία οξειδώνεται από την αμμωνιακή μονοοξυγενάση (ammonia monooxygenase), η οποία χρησιμοποιεί το NADH ως δότη ηλεκτρονίων, παράγοντας  $\text{NH}_2\text{OH}$  και  $\text{H}_2\text{O}$ . Η αμμωνιακή μονοοξυγενάση καταλύει την μεταφορά μόνο ενός ατόμου του  $\text{O}_2$  στην οργανική ένωση ως υδροξύλιο (OH), με το δεύτερο άτομο του  $\text{O}_2$  να ανάγεται σε νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Το πρώτο προϊόν οξείδωσης της αμμωνίας είναι η  $\text{NH}_2\text{OH}^-$  και στο στάδιο αυτό δεν παράγεται ενέργεια (στην πραγματικότητα η παραγόμενη ενέργεια καταναλώνεται για την οξείδωση του NADH). Στη συνέχεια, η υδροξυλαμίνη μεταφέρεται στο περίπλασμα και οξειδώνεται σε νιτρώδη από την οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης (hydroxylamine oxidoreductase), μεταφέροντας τέσσερα ηλεκτρόνια κατά την αντίδραση αυτή:



Η αμμωνιακή μονοοξυγενάση είναι ένζυμο που βρίσκεται μέσα στη μεμβράνη ενώ η οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης είναι περιπλασμικό ένζυμο. Στην αντίδραση που καταλύεται από την AMO απαιτούνται δύο εξωγενώς παρεχόμενα ηλεκτρόνια για να αναχθεί ένα άτομο  $\text{O}_2$  σε  $\text{H}_2\text{O}$ . Τα ηλεκτρόνια αυτά προέρχονται από την οξείδωση της υδροξυλαμίνης και παρέχονται στην αμμωνιακή μονοοξυγενάση από την οξειδοαναγωγή της υδροξυλαμίνης μέσω του κυτοχρώματος c (cytochrome c) και της ουβικινόνης (ubiquinone), όπως φαίνεται παρακάτω.

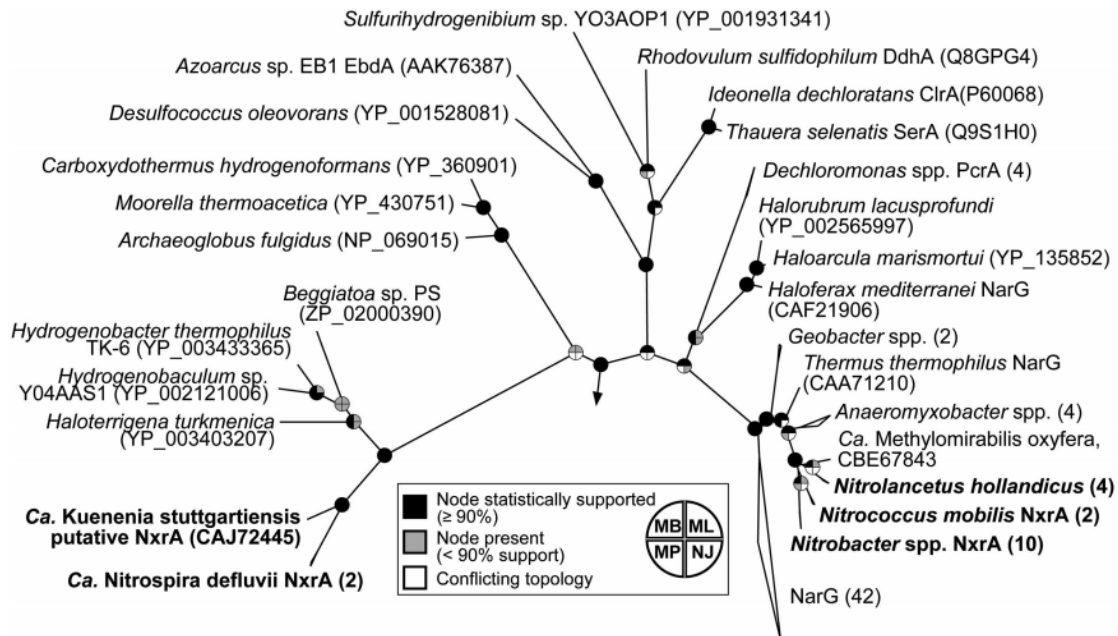
## Μικροβιολογία της οξειδωσης νιτρωδών

### Βακτήρια (Nitrite-Oxidizing Bacteria NOB)

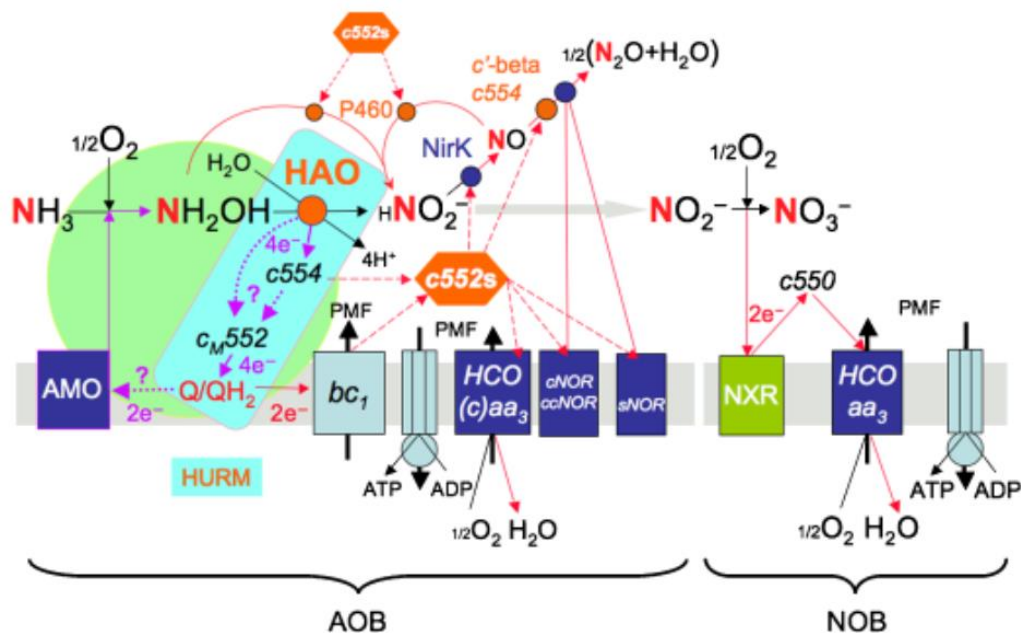
Τα χημειολιθοαυτοτροφα βακτήρια που οξειδώνουν νιτρώδη λαμβάνουν ενέργεια από την οξείδωση των νιτρωδών σε νιτρικά ιόντα. Σε αερόβιες συνθήκες η οξείδωση των νιτρωδών είναι η κύρια πηγή νιτρικών στους ωκεανούς (Gruber, 2004) και η κύρια ανόργανη πηγή αζώτου στα αεριζόμενα εδάφη (Dechorgnat et al., 2011). (Sorokin et al., 2012)

Σε αντίθεση με τα βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία που περιορίζονται σε δυο γενεές μέσα στα πρωτεοβακτήρια, οι οξειδωτές των νιτρωδών είναι πιο διεσπαρμένοι φυλογενετικά. Στο σύνολο τους ανήκουν σε διαφορετικές υποκατηγορίες των πρωτεοβακτηρίων και στα φύλα *Nitrospirae* και *Chloroflexi* (Sorokin et al., 2012; Spieck & Bock, 2005; Spieck, Keuter, Wenzel, Bock, & Ludwig, 2014). Το γένος *Nitrobacter* ανήκει στα α πρωτεοβακτήρια, ενώ το γένος *Nitrococcus* στα γ πρωτεοβακτήρια και το γένος *Nitrospina* φαίνεται να ανήκει στα δ πρωτεοβακτήρια (Spieck & Bock, 2005).

Όλα τα γνωστά NOB οξειδώνουν νιτρώδη μέσω του ενζύμου NXR, που ανήκει στην ομάδα τύπου II στην αναγωγική οικογένεια των διμεθυλο-θειοξειδιο των molybdopterin-cofactor-binding ενζύμων (Lücker et al., 2010).



**Εικόνα 18.** Φυλογένεση των NXR και σχετικών ενζύμων σύμφωνα με την μέγιστη πιθανοφάνεια κατά τους Sorokin et al., 2012.



**Εικόνα 19.** Ροή ενέργειας κατά την διεργασία της νιτροποίησης (c)aa3, cytochrome (c)aa3; bc1, cytochrome bc1 (complex III); NirK, Cu-dependent nitrate reductase; c0-b, cytochrome c0-b; c550, cytochrome c550; c552, cytochrome c552; cM552, cytochrome cM552; c554,



cytochrome c554; NXR, nitrite oxidoreductase; P460, cytochrome P460; PMF, proton-motive force; Q/QH<sub>2</sub>, ubiquinone-ubiquinol pool; sNOR, cNOR, ccNOR, nitric oxide reductase with differing electron acceptor mechanisms. (Klotz & Stein, 2008)

#### Αρχαία (Nitrite-Oxidizing Archaea NOA)

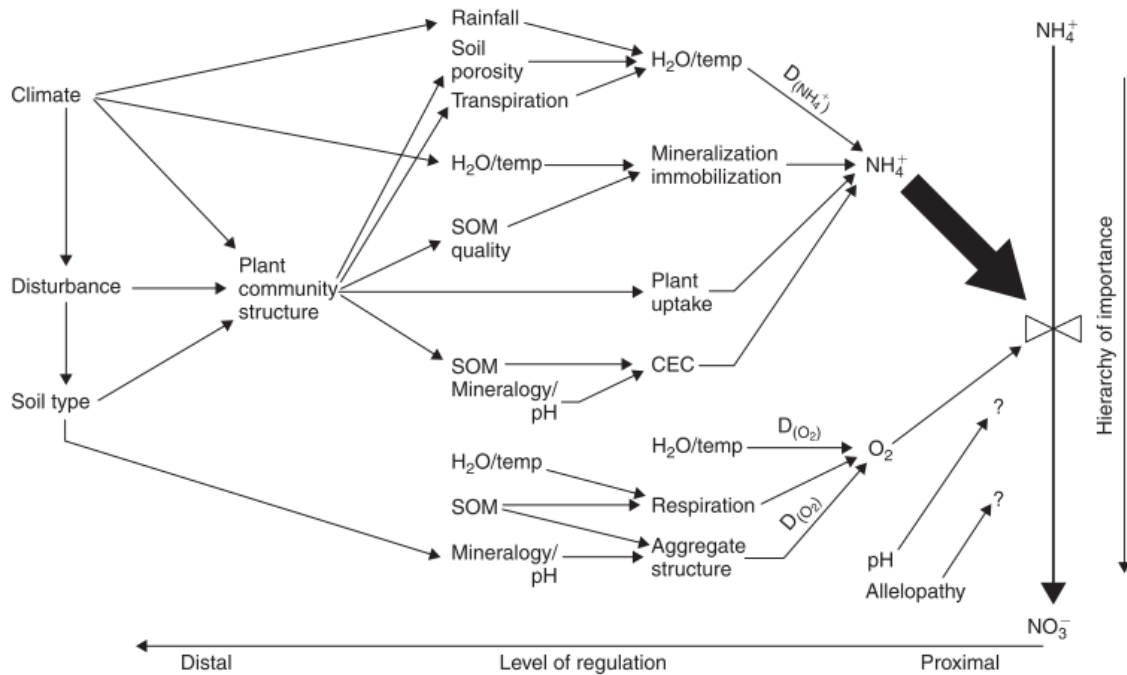
Σύμφωνα με τους You et al, 2009 δεν έχουν ανακαλυφθεί αρχαία υπεύθυνα για την οξείδωση νιτρώδων, δηλαδή για το δεύτερο σκέλος της νιτροποίησης άλλα δεν αποκλείεται να υπάρχουν και να ανακαλυφθούν στο μέλλον. Παρόλα αυτά, η αλληλεπίδραση των αρχαίων που οξειδώνουν την αμμωνία με τα βακτήρια που οξειδώνουν τα νιτρώδη είναι ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα ανεξάρτητα από την πιθανή ύπαρξη αρχαίων που οξειδώνουν τα νιτρώδη. (You et al., 2009)

#### Ετερότροφη νιτροποίηση

Μια μεγάλη ποικιλία ετερότροφων μικροοργανισμών όπως βακτηρίων, ακτινομυκήτων και μυκήτων έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν την αμμωνία μέσω διαφόρων μεταβολικών οδών. Σε αντίθεση με την αυτότροφη νιτροποίηση, η ετερότροφη δεν συνδέεται με την κυτταρική ανάπτυξη και την παραγωγή της ενέργειας. Τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούνται κατά κύριο λόγο είναι δύο και οι ετερότροφοι νιτροποιητές μπορούν να χρησιμοποιήσουν είτε οργανικό είτε ανόργανο υπόστρωμα. (Boer & Kowalchuk, 2001).

- Το πρώτο μονοπάτι είναι αντίστοιχο με αυτό των αυτότροφων μικροοργανισμών, όπου οξειδώνουν την NH<sub>3</sub> ή μετατρέπουν το N οργανικών μορίων σε NH<sub>2</sub>OH, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> και NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, καθώς χρησιμοποιούν τα οργανικά μόρια στον μεταβολισμό τους. Εικάζεται βέβαια ότι η αμμωνία είναι δευτερεύων στόχος ακολουθούμενη από άλλες οργανικές ενώσεις, όπως φαινόλες, προπένια κ.α (Groffman, 2007)
- Το άλλο ετεροτροφικό μονοπάτι περιορίζεται στους μύκητες. Κατά τη λύση κυττάρων και την αποδόμηση της λιγνίνης, απελευθερώνονται ελεύθερες ρίζες

υδροξυλίου οι οποίες αντιδρούν με τις ενώσεις N. (Boer & Kowalchuk, 2001; Groffman, 2007)



**Εικόνα 20.** Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την νιτροποίηση σε έδαφος. (Peter M Groffman & Tiedje, 1988; Robertson, 1989). Η proximal κλίμακα (δεξιά) αφορά κυτταρικό επίπεδο.

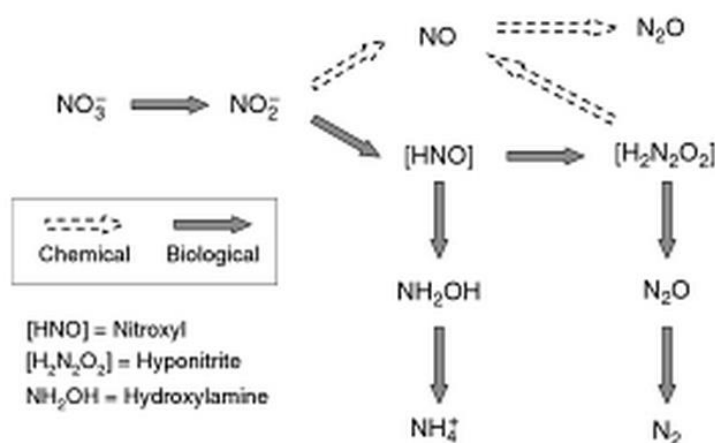
### Ετερότροφοι Νιτροποιητές

Κάποια ετερότροφα βακτήρια αυτής της ομάδας είναι τα *Paracoccus denitrificans*, *Thiosphaera pantotropha*, *Pseudomonas putida* και *Alcaligenes faecalis*. Επιπλέον, ορισμένα από αυτά, όπως το *Thiosphaera pantotropha*, μπορούν να δρουν και ως απονιτροποιητές, με αποτέλεσμα τη μείωση των ρυθμών νιτροποίησης και την υποεκτίμηση της λόγω των μικρών ποσοτήτων των νιτρικών που εντοπίζονται (Islam, Chen, & White, 2007). Αυτού του είδους η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε ορισμένα μικροπεριβάλλοντα όπου οι αυτότροφοι παρεμποδίζονται και αυτά συνήθως είναι τα

όξινα δασικά εδάφη (Islam et al., 2007). Σε υποτροπικό όξινο έδαφος ( $\text{pH} < 4,5$ ) στην Κίνα, τα 27-42% της παραγωγής  $\text{N}_2\text{O}$  ήταν αποτέλεσμα ετερότροφων οργανισμών, εν αντιθέσει με την μικρή συνεισφορά των αυτότροφων (J. Zhang, Cai, & Zhu, 2011) .

### Αμμωνιοποίηση νιτρικών

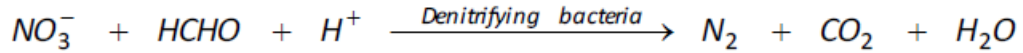
Μπορεί να γίνει αναγωγή των  $\text{NO}_3^-$  μέσω απονιτροποίησης είτε σε  $\text{N}_2\text{O}$  ή  $\text{N}_2(\text{g})$ , με αποτέλεσμα την απώλεια του N από τα χερσαία ή υδάτινα οικοσυστήματα, είτε μέσω αμμωνιοποίησης σε αμμώνιο με συνέπεια την παραμονή του αζώτου στο οικοσύστημα (Klotz & Stein, 2008, 2011). Και στα δυο όμως μονοπάτια πρώτα τα νιτρικά ιόντα ανάγονται σε νιτρώδη. Η αναγωγή των νιτρώδων σε αμμώνιο καταλύεται από τις αφομοιωτικές (NirB/NirA) ή τις αναπνευστικές (NrfA) νιτρικές αναγωγάσες που σχηματίζουν αμμωνία (Εικ. 15).



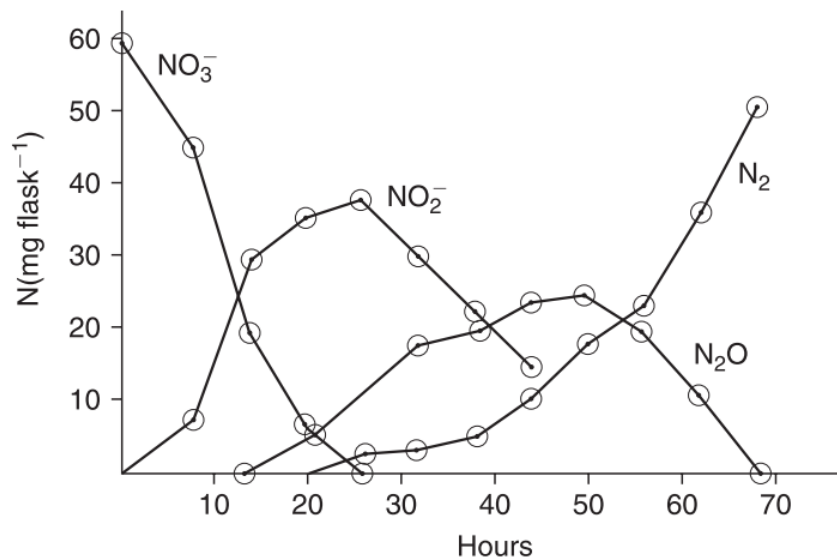
**Εικόνα 21.** Μονοπάτια αμμωνιοποίησης και απονιτροποίησης με τα ενδιάμεσα τους προϊόντα κατά την αναγωγή των νιτρικών (K . Ramesh Reddy and Ronald D . DeLaune, 2008)

### Απονιτροποίηση

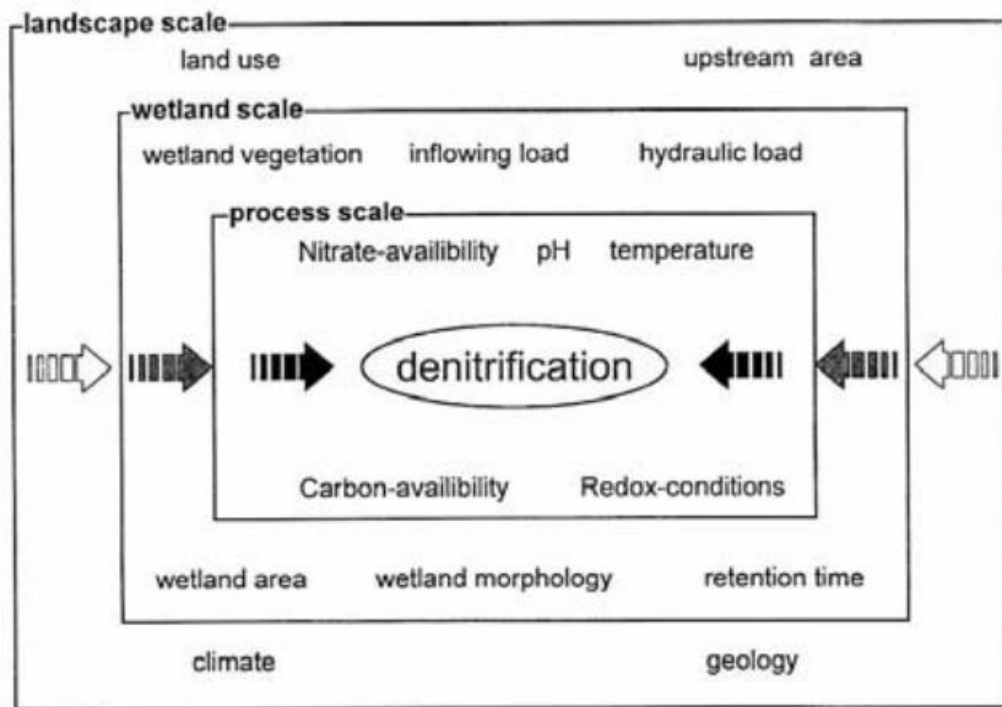
Απονιτροποίηση είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη βιολογική διεργασία κατά την οποία τα νιτρικά ιόντα μετατρέπονται σε αέριο άζωτο.



Κατά την απονιτροποίηση, τα νιτρικά μετατρέπονται σε στοιχειακό άζωτο ( $\text{N}_2$ ), με σύγχρονη έκλυση μικρών ποσοτήτων υποξειδίου ( $\text{N}_2\text{O}$ ) και μονοξειδίου ( $\text{NO}$ ) του N, μέσω μιας κατηγορίας ετερότροφων μικροοργανισμών υπό αναερόβιες συνθήκες (συγκέντρωση  $\text{O}_2 < 0,5 \text{ mg/l}$ ).



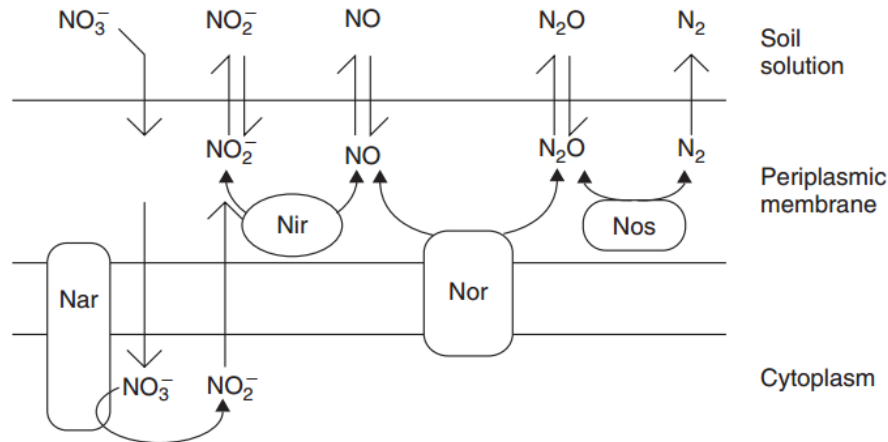
**Εικόνα 22.** Ο σχηματισμός προϊόντων κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης (Cooper & Smith, 1963)



**Εικόνα 23.** Ο παράγοντες που επηρεάζουν τις μικροβιολογικές διεργασίες της απονιτροποίησης σε διαφορετικά επίπεδα σε υγροβιοτόπους (Trepel & Palmeri, 2002).

### *Μικροβιολογία της απονιτροποίησης*

Τα ετερότροφα βακτήρια της απονιτροποίησης χρησιμοποιούν ως πηγή οξυγόνου το  $O_2$  των  $NO_2^-$  και των  $NO_3^-$  που παράγονται κατά τη νιτροποίηση. Αυτό συμβαίνει μόνον σε ανοξικές καταστάσεις γιατί στην αντίθετη περίπτωση τα εν λόγω βακτήρια προτιμούν το διαλυμένο  $O_2$  που υπάρχει στο σύστημα με αποτέλεσμα την αναστολή της νιτροποίησης.

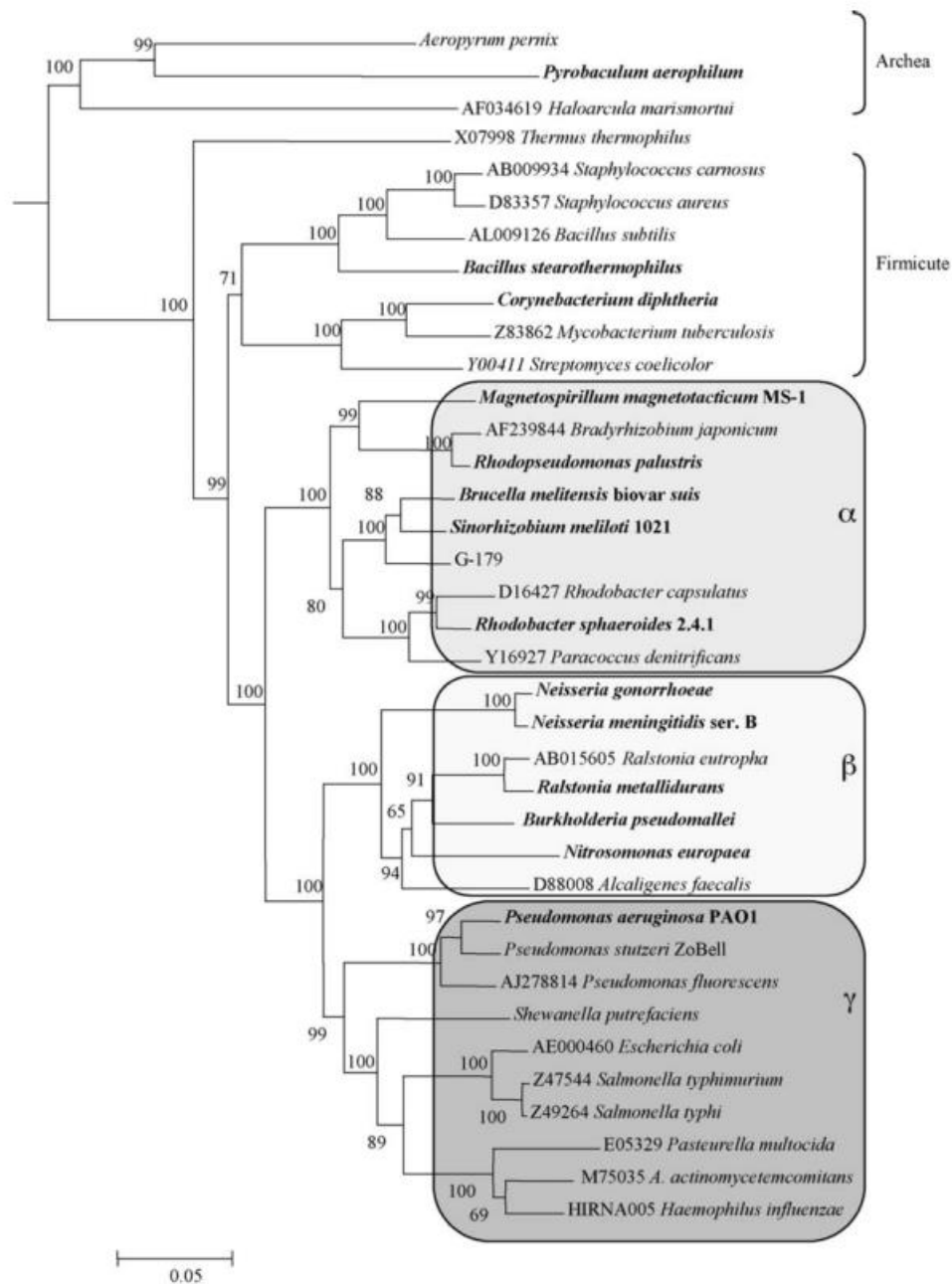


**Εικόνα 24.** Η οργάνωση των απονιτροποιητικών ενζύμων στην κυτταρική μεμβράνη των κατά Gram αρνητικών βακτηρίων. (Ye, Averill, & Tiedje, 1994)

Παρόλο που η απονιτροποίηση θεωρούνταν συχνά ως βακτηριακή διεργασία, η αφθονία των αρχαίων υποδηλώνει ότι είναι διαδεδομένη και στα αρχαία (Zehr & Ward, 2002). Κάποια αρχαία είναι ικανά να εκτελούν και assimilatory and dissimilatory reductions παράγοντας έτσι αέρια του θερμοκηπίου όπως μονοξείδιο και διοξείδιο του αζώτου (Cabello, Roldán, & Moreno-Vivián, 2004; Wrage, Velthof, Beusichem, & Oenema, 2001) οι ποσοτικές πληροφορίες για την αφθονία και την δράση των AOA σε υγροβιότοπους θα βοηθήσουν στο να απαντηθεί η ερώτηση για το αν τα AOA έχουν σημαντικό ρόλο στην απονιτροποίηση (You et al., 2009).

Ο Philippot, 2002 αναφέρει ότι τα γονίδια αναγωγασών των νιτρικών διασπείρονται μεταξύ ταξινομικά απομακρυσμένων βακτηρίων, από πρωτεοβακτήρια μέχρι κατά Gram θετικά βακτήρια αλλά και αρχαία.

Και αλλά βήματα έχουν γίνει προς αυτήν την κατεύθυνση (Abell et al., 2010; Bartossek, Nicol, Lanzen, Klenk, & Schleper, 2010; Cabello et al., 2004; Philippot, 2002; Rusch, 2013).



**Εικόνα 25.** Φυλογενετικό δέντρο που δημιουργήθηκε με neighbor-joining (NJ) από τον Philippot, 2002 αντικατοπτρίζει τις συγγένειες του 16S rDNA

### **Αζωτοδέσμευση (N fixation)**

Η δέσμευση του  $N_2$  της ατμόσφαιρας ( $N_2$  fixation) διακρίνεται σε φυσική και βιολογική. Κατά την φυσική αζωτοδέσμευση το άζωτο της ατμόσφαιρας ενώνεται με το υδρογόνο σχηματίζοντας αμμωνία ή με το οξυγόνο σχηματίζοντας νιτρικά ιόντα. Η ενέργεια που χρειάζεται για να γίνει η δέσμευση αυτή εξασφαλίζεται από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις (κεραυνούς) στην ατμόσφαιρα. Αυτές οι ενώσεις προσλαμβάνονται από τα φυτά καθώς είναι υδατοδιαλυτές και με αυτόν τον τρόπο ενσωματώνονται στην τροφική αλυσίδα. Δηλαδή παρασύρονται από τις κατακρημνίσεις (βροχή) και καταλήγουν στη γη ή στην θάλασσα.

Όμως το άζωτο που δεσμεύεται με αυτόν τον τρόπο δεν αποτελεί παρά το 10 % περίπου που χρησιμοποιείται από τη ζώσα ύλη. Το υπόλοιπο 90% γίνεται διαθέσιμο με τη βιολογική αζωτοδέσμευση.

Κατά τη βιολογική αζωτοδέσμευση διάφοροι οργανισμοί που ονομάζονται αζωτοδεσμευτικοί μετατρέπουν με κατανάλωση ενέργειας, το μόριο του ελεύθερου αζώτου σε διαθέσιμη προς δέσμευση μορφή. Αυτό γίνεται:

- από μικροοργανισμούς που ανήκουν στο γένος *Rhizobium spp* οι οποίοι συμβιώνουν στις ρίζες των ψυχανθών (leguminosae) σχηματίζοντας φυμάτια.
- Από μη συμβιωτικούς μικροοργανισμούς που ζουν ελεύθεροι στο έδαφος και σε νερά (αερόβια βακτήρια του γένους *Clostridium* και μερικά κυανοφύκη, της οικογένειας *Nostococaceae*)

### **Ενταφιασμός οργανικού αζώτου**

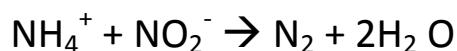
Η ταφή του οργανικού αζώτου στα ιζήματα κάνει το N λιγότερο διαθέσιμο στα φυτά και στους μικροοργανισμούς (Bastviken, 2006). Ένα ποσοστό του οργανικού αζώτου εν τέλει ενσωματώνεται σε τρίμματα και δεν είναι διαθέσιμο για επιπρόσθετη ανακύκλωση θρεπτικών λόγω της διεργασίας ταφής και σχηματισμού τύρφης. Έχουν



υπολογιστεί τιμές ταφής οργανικού N για ποικίλους φυσικούς υδροβιότοπους (Velinsky, 2011), ωστόσο, στους τεχνητούς υδροβιότοπους πρακτικά δεν υπάρχουν αρκετά διαθέσιμα δεδομένα (Vymazal, 2007a).

### *Αναερόβια οξείδωση αμμωνίας (ANAMMOX)*

Μια άλλη παρέκκλιση από την κλασική θεώρηση που θέλει την οξείδωση του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  να λαμβάνει χώρα κάτω από αερόβιες συνθήκες μόνο, είναι η ανοξική οξείδωση της αμμωνίας (**anammox**, **anoxic ammonia oxidation**). Αυτό το εναλλακτικό μονοπάτι απομάκρυνσης N προτάθηκε αρχικά από τον Richards το 1965, ο οποίος παρατήρησε ελλείμματα αμμωνίου σε ανοξικές θαλάσσιες λεκάνες. Κατά τη διάρκεια του μεγαλύτερου μέρους του 20<sup>ου</sup> αιώνα, θεωρούταν ότι το αμμώνιο είναι αδρανές κάτω από ανοξικές συνθήκες. Το προτεινόμενο μονοπάτι “anammox” επιτρέπει την απομάκρυνση του αμμωνίου κάτω από αυστηρά ανοξικές συνθήκες. Ο Broda (1977) πρότεινε ένα νέο τύπο βακτηρίων υπεύθυνα για αυτές τις παρατηρήσεις αλλά δεν ήταν μέχρι το 1995, που η διεργασία anammox επιβεβαιώθηκε σε έναν αντιδραστήρα ρευστοποιημένης κλίνης που έκανε εξυγίανση σε λύματα. (Mulder, van de Graaf, Robertson, & Kuenen, 1995). Η αντίδραση anammox είναι μια χημειολιθότροφη διεργασία κατά την οποία 1mol  $\text{NH}_4^+$  οξειδώνεται από 1mol νιτρωδών για να προκύψει αέριο  $\text{N}_2$  σε απουσία  $\text{O}_2$ . Έτσι, η αμμωνία και τα νιτρώδη μετατρέπονται σε αέριο N, με παράλληλη ανάπτυξη της βιομάζας χρησιμοποιώντας ως πηγή άνθρακα το  $\text{CO}_2$ . Η αντίδραση αυτή είναι ιδιαίτερα εξεργονική, απελευθερώνοντας ενέργεια η οποία πιθανώς σχετίζεται με τη συντήρηση των μικροοργανισμών που είναι υπεύθυνοι.

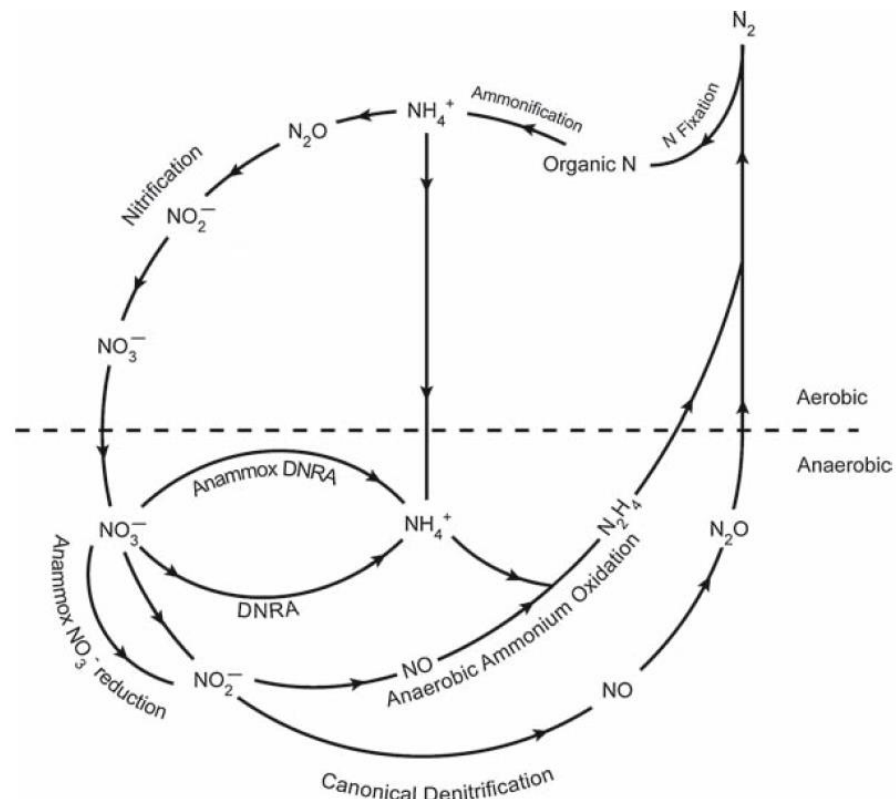


Συγκριτικά με την απονιτροποίηση, αυτή η διεργασία παράγει τη διπλάσια ποσότητα  $\text{N}_2$  ανά mol νιτρωδών που καταναλώνονται και αυξάνει την παραγωγή  $\text{N}_2$  σε ιζήματα όπου η νιτροποίηση είναι περιορισμένη (Penton, 2009).

Η διεργασία ANAMMOX μπορεί να συνδυαστεί με μία διεργασία νιτροποίησης η οποία σταματά στο στάδιο της παραγωγής νιτρωδών. Έτσι μόνο ένα μέρος της αμμωνίας είναι απαραίτητο να οξειδωθεί προς νιτρώδη, αφού η ANAMMOX συνδυάζει την υπόλοιπη

αμμωνία με τα νιτρώδη για την παραγωγή αερίου αζώτου. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη μείωση του κόστους, τόσο του οξυγόνου της νιτροποίησης, όσο και της απαίτησης για COD στο στάδιο της απονιτροποίησης. Το λειτουργικό κόστος επίσης μειώνεται εξαιτίας της μικρής παραγωγής λάσπης που παρατηρείται στην ANAMMOX (Strous et al., 1997). Η λεπτομερής βιοχημεία της διεργασίας βρίσκεται ακόμα υπό καθεστώς έρευνας. Οι υδροξυλαμίνη και η υδραζίνη μπορούν να δράσουν ως δέκτες ηλεκτρονίων και με βάση αυτές λειτουργεί ένας πιθανός μηχανισμός της ANAMMOX.

Τα βακτήρια υπεύθυνα για αυτή τη διαδικασία ταυτοποιήθηκαν ως ένα τάξο του φύλου planctomycete με ιδιαίτερη μορφολογία. (Strous et al., 1999).



**Εικόνα 26.** Η διεργασία της αναερόβιας οξείδωσης της αμμωνίας στο πλαίσιο του αναθεωρημένου κύκλου του αζώτου (Penton, 2009).

## *Μικροβιολογία της διεργασίας ANAMMOX*

Όλα τα αναγνωρισμένα βακτήρια ικανά για αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας ανήκουν στην τάξη Planctomycetales και έχουν υψηλή γενετική ποικιλομορφία. (Schmidt et al., 2003). Η εξελικτική απόσταση μεταξύ των γενών είναι μεγάλη (<85% 16S ομοιότητα νουκλεοτιδίων) παρόλο που μοιράζονται τον ίδιο βασικό αναμμοξ μεταβολισμό και την ίδια κυτταρική δομή. Χαρακτηριστικό στοιχείο των ANAMMOX μικροοργανισμών είναι το αναμμοξosome το οποίο περιλαμβάνει πάνω από 30% του κυτταρικού τους όγκου. Αυτό το κυτταροπλασματικό διαμέρισμα περιέχει λίγο η καθόλου RNA και DNA και περιβάλλεται από μια μεμβράνη που αποτελείται από ladderane λιπίδια τα οποία είναι μοναδικά στα βακτήρια αναμμοξ (Schmidt et al., 2003). Εθαιρικοί και εστερικοί δεσμοί ενώνουν τα λιπίδια σε ένα σκελετό γλυκερόλης στη μεμβράνη ο οποίος έχει βρεθεί μόνο σε Αρχαία και μπορεί να αντικατοπτρίζει μια πρώιμη απόκλιση των αναμμοξ στη βακτηριακή φυλογένεση (Brochier & Philippe, 2002). Εξαιτίας μιας πολύ πυκνής κατανομής των ατόμων άνθρακα, τα ladderane λιπίδια λειτουργούν ως φραγμός διάχυσης το οποίο μπορεί να τα προστατεύει από τη τοξική αναερόβια αντίδραση οξείδωσης της αμμωνίας που έχει σε ενδιάμεσα σταδία την παραγωγή υδροξυλαμίνης και υδραζίνης (Jetten et al., 2003). Εξαιτίας των μοναδικών τους χαρακτηριστικών τα ladderane λιπίδια έχουν χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης για την παρουσία αναμμοξ βακτηρίων (Kuypers et al., 2003).

### **3.2. Απομάκρυνση N σε ΤΥ**

Οι οδοί που απομακρύνουν N στους ΤΥ εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως το pH, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub> καθώς και τις στρατηγικές λειτουργίας όπως η παρουσία οργανικού C, το υδραυλικό φορτίο, η φόρτωση με λίπασμα, η συγκομιδή της φυτικής μάζας κ.α. (Saeed & Sun, 2012). Μεταβολές σε αυτούς τους παράγοντες έχουν και διαφορετικά αντίκτυπα στις διαφορετικές διεργασίες. Για παράδειγμα η διεργασία της νιτροποίησης, όταν πραγματοποιείται με έντονους ρυθμούς, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα μια πτώση στο

pH, το οποίο θα περιορίσει την απονιτροποίηση. Οι βιβλιογραφικές αναφορές δείχνουν ότι απονιτροποίηση γίνεται όταν το pH είναι ανάμεσα στο 6-8 και τα υψηλότερα ποσοστά της στο εύρος pH 7-7,5 ενώ μπορεί να πραγματοποιείται και σε pH 5 αλλά πολύ αργά. (Saeed & Sun, 2012; Vymazal, 2007b). Αντίθετα, σε συστήματα με υψηλές συγκεντρώσεις πλαγκτόν ή περιφυτικών άλγεων το pH μπορεί να φτάσει τιμές μέχρι μεγαλύτερες του 10 κατά τη διάρκεια της μέρας μέσω της φωτοσυνθετικής τους δραστηριότητας, παρέχοντας έτσι κατάλληλες συνθήκες για την εξάχνωση της αμμωνίας, η οποία αποτελεί ένα σημαντικό μονοπάτι για την απομάκρυνση του N στους TY με ανοιχτή επιφάνεια νερού. (Vymazal, 2007b)

Ανάλογα, η διαθεσιμότητα του O<sub>2</sub> αυξάνει τον ρυθμό νιτροποίησης και μειώνει τον ρυθμό απονιτροποίησης. (Zhang et al, 2010; Groffman, 2007)

Οι διαδικασίες της αμμωνιοποίησης και της νιτροποίησης προφανώς δεν είναι υπεύθυνες από μόνες τους για την απομάκρυνση N από τους TY αλλά για τον μετασχηματισμό του N σε άλλες μορφές. Πιο συγκεκριμένα, η διεργασία της αμμωνιοποίησης μετατρέπει οργανικό N σε NH<sub>3</sub> και άρα αυξάνει την ποσότητα του N στον TY ενώ ταυτόχρονα το N γίνεται διαθέσιμο για άλλες διεργασίες όπως είναι η Νιτροποίηση, η εξάχνωση και η προσρόφηση από τα φυτά. Η νιτροποίηση όμοια με την αμμωνιοποίηση, δεν απομακρύνει N από τους υδροβιότοπους αλλά σε συνδυασμό με την απονιτροποίηση φαίνεται να είναι η κύρια διεργασία απομάκρυνσης σε πολλούς TY. (Vymazal, 2007b)

Επίσης, όπως βλέπουμε και στον παρακάτω πίνακα, δεν έχουν όλες οι διεργασίες ίδια αποτελέσματα όσον αφορά την απομάκρυνση του N στους διαφορετικούς τύπους TY. Η αιτία για αυτό είναι ότι υπάρχει διαφοροποίηση στις εδαφικές διεργασίες σε κάθε τύπο αφού οι FFP (free floating plants) TY έχουν έλλειψη από εδαφικές διεργασίες, οι FWS TY έχουν πολύ περιορισμένες εδαφικές διεργασίες και οι SSF TY έχουν έλλειψη διεργασιών στην ελεύθερη ζώνη του νερού. (Vymazal, 2007b)

	FFP	FWS	HSSF	VSSF
<b>Εξάτμωση</b>	<b>Χαμηλό</b>	<b>Μεσαίο</b>	<b>Μηδαμινό</b>	<b>Μηδαμινό</b>
Αμμωνιοποίηση	Υψηλό	Υψηλό	Υψηλό	Υψηλό
Νιτροποίηση	Χαμηλό	Μεσαίο	Πολύ Χαμηλό	Πολύ Υψηλό
Νιτρικά – αμμωνιοποίηση	??	??	??	??
<b>Απονιτροποίηση</b>	<b>Μεσαίο</b>	<b>Μεσαίο</b>	<b>Πολύ Υψηλό</b>	<b>Πολύ Χαμηλό</b>
Δέσμευση N <sub>2</sub>	??	??	??	??
Μικροβιακή ανάληψη	Χαμηλό	Χαμηλό	Χαμηλό	Χαμηλό
<b>Ανάληψη από τα φυτά (με τη συγκομιδή)</b>	<b>Μεσαίο</b>	<b>Χαμηλό</b>	<b>Χαμηλό</b>	<b>Χαμηλό</b>
Προσρόφηση αμμωνίας	Μηδαμινό	Πολύ Χαμηλό	Πολύ Χαμηλό	Πολύ Χαμηλό
<b>Ταφή οργανικού N</b>	<b>Πολύ Χαμηλό</b>	<b>Χαμηλό</b>	<b>Χαμηλό</b>	<b>Πολύ Χαμηλό</b>
Διήθηση και θρυμματισμός	??	??	??	??
<b>ANAMOX</b>	<b>??</b>	<b>??</b>	<b>??</b>	<b>??</b>

**Πίνακας 2.** Πίνακας σύγκρισης ποσότητας μετασχηματισμών του N σε διαφορετικούς τύπους ΤΥ (Vymazal, 2007b)

Αποτελέσματα διάφορων μελετών επιβεβαιώνουν ότι οι μικροβιακές διεργασίες είναι οι κύριοι μηχανισμοί απομάκρυνσης θρεπτικών στους ΤΥ οριζόντιας επιφανειακής ροής. (Sundberg et al, 2007; Tao et al, 2007) Οι διεργασίες απομάκρυνσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις υδραυλικές συνθήκες του FWS (Sundberg et al., 2007)

Η προσρόφηση της αμμωνίας είναι περιορισμένη στους ΤΥ με υποεπιφανειακή ροή όπου η επαφή μεταξύ του υποστρώματος και του λύματος είναι αποδοτική. Επιπλέον, τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στους ΤΥ συνήθως δεν διαθέτουν μεγάλη ικανότητα απορρόφησης. Τα αργιλώδη εδάφη τα οποία είναι τα πιο αποτελεσματικά στη απορρόφηση αμμωνίας δεν χρησιμοποιούνται συνήθως στους ΤΥ.

Η ταφή οργανικού N σαν μηχανισμός απομάκρυνσης είναι περιορισμένος στους ΤΥ με αναδυόμενη βλάστηση και ελεύθερη επιφάνεια νερού όπου η στρώση λύματος παίζει σημαντικό ρόλο στην απομάκρυνση θρεπτικών.

## 2. Στόχος – σκοπός της εργασίας

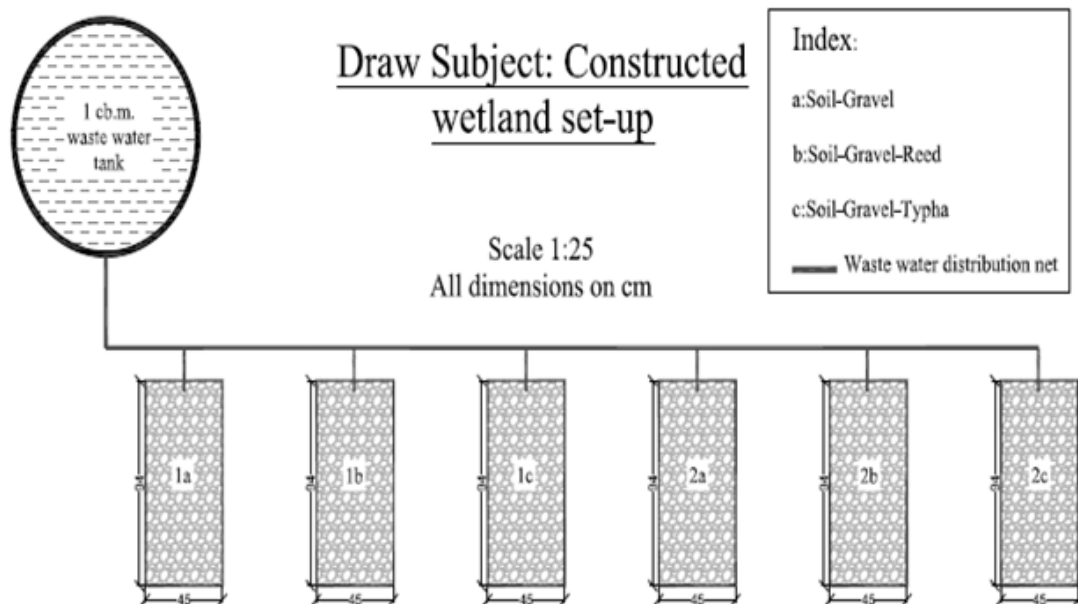
Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή διερευνά τις διεργασίες που εμπλέκονται στην απομάκρυνση του αζώτου σε τεχνητούς υγροβιότοπους. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν έξι τεχνητοί υγροβιότοποι υποεπιφανειακής ροής μικρής κλίμακας στους οποίους έγινε φύτευση ανά δύο με τα είδη *Typha latifolia* και *Phragmites communis* ενώ δυο παρέμειναν κενοί από βλάστηση. Οι χημικές αναλύσεις αφορούν την παρακολούθηση της συγκέντρωσης του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3^-\text{N}$ , TKN, COD και της ουρίας. Πρόσθετα, και σε μηνιαία βάση πραγματοποιούνται αναλύσεις μοριακής βιολογίας για την παρακολούθηση της αφθονίας των λειτουργικών γονιδίων που εμπλέκονται στην απομάκρυνση του αζώτου, όπως τα *amoA*, *nirK*, *nirS*, και *nosZ* μετά από εξαγωγή DNA μικροοργανισμών από το υπόστρωμα των υγροβιότοπων. Εκτιμάται ότι οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα εργασία θα βελτιώσουν την διαθέσιμη γνώση σχετικά τους μηχανισμούς που καθορίζουν το γίνεσθαι του αζώτου στους τεχνητούς υγροβιότοπους και θα συνεισφέρουν στην βελτιστοποίηση του.

# Υλικά και Μέθοδοι

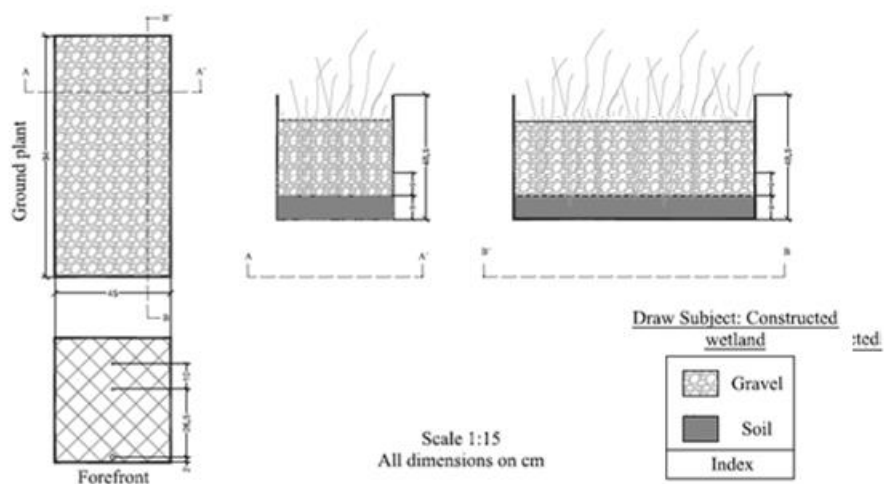
---

## 1. Πειραματικός σχεδιασμός

Για την παρακολούθηση των διεργασιών που συντελούνται κατά την απομάκρυνση του Ν στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων σε τεχνητούς υδροβιότοπους χρησιμοποιήθηκε μια πειραματική εγκατάσταση έξω από το θερμοκήπιο της σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης. Η εγκατάσταση περιέχει μια δεξαμενή αποθήκευσης του Συνθετικού υγρού Αποβλήτου (ΣΑ) όγκου  $1 \text{ m}^3$ , 6 πιλοτικές μονάδες τεχνητών υδροβιότοπων και 6 αντλίες για τη ρύθμιση της τροφοδοσίας των συστημάτων με τεχνητό απόβλητο. Ο τύπος των ΤΥ είναι οριζόντιας υπο-επιφανειακής ροής. Οι δεξαμενές έχουν διαστάσεις  $105 \times 45 \times 20 \text{ cm}$  η κάθε μία. Στη βάση των δεξαμενών τοποθετήθηκε χώμα ύψους  $15 \text{ cm}$ . Το πορώδες υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι καλά πλυμένο και με ορισμένη κοκκομετρία. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε χοντρό χαλίκι ( $0.5\text{-}10 \text{ mm}$ ) το οποίο τοποθετήθηκε στις δεξαμενές σε ύψος  $45 \text{ cm}$ . Δύο από τους ΤΥ φυτεύτηκαν τον Μάιο του 2013 με το φυτό *T. latifolia*, δύο με το φυτό *P. communis* και δύο παρέμειναν χωρίς βλάστηση (control) (Εικ. 32).



**Εικόνα 27.** Σχηματική αναπαράσταση των τεχνητών υγροβιότοπων και της διάταξης τους στον χώρο.



**Εικόνα 28.** Σχηματική αναπαράσταση των τεχνητών υγροβιότοπων, των διαστάσεων των δεξαμενών και της μορφολογίας τους.



1. Σύστημα αντλιών



2. Δεξαμενή ποτίσματος



3. 1<sup>η</sup> Δεξαμενή *Typha latifolia*



4. 2<sup>η</sup> Δεξαμενή *Phragmites communis*



5. 3<sup>η</sup> Δεξαμενή κενή για control



6. 4<sup>η</sup> Δεξαμενή *Typha latifolia*





8. 5<sup>η</sup> Δεξαμενή *Phragmites communis*



9. 6<sup>η</sup> Δεξαμενή κενή για control



**Εικόνα 29-36.** Φωτογραφίες από την εγκατάσταση κατά την κατασκευή και λειτουργία της.

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκε απόβλητο το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με το “*OECD STANDARD SEWAGE, 1996*” με κάποιες τροποποιήσεις που έκαναν οι Zhao και Liu (2010). Στο πείραμα της παρούσας εργασίας, σύμφωνα με την έρευνα τους, επιλέχτηκε η μέτρια ποσότητα γλυκόζης και το απόβλητο παρασκευαζόταν ανά 2 ή 3 μέρες. Το σύστημα τροφοδοτείται από τις αντλίες με παροχή 2l/h και διαλείμματα μιας ώρας ανά οκτάωρο. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η σύνθεση αποβλήτου ανά λίτρο. (Zhao, Liu, Zhang, Hu, & An, 2010)

Χημική ένωση	gm <sup>-3</sup>
glucose	200
carbamide	100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
CaCl <sub>2</sub>	4
MgSO <sub>4</sub>	2

**Πίνακας 3:** Σύνθεση Συνθετικού Αποβλήτου

## 2. Δειγματοληψίες

Για τις ανάγκες της διπλωματικής διατριβής έλαβαν χώρα δειγματοληψίες για χημικές αναλύσεις στο διάστημα 7 Νοεμβρίου 2013 έως 13 Ιανουαρίου 2014. Οι δειγματοληψίες, πραγματοποιούνταν πάντα κατά τις πρωινές ώρες (συνήθως 10 π.μ.).

## 3. Χημικές Αναλύσεις

Στην παράγραφο αυτή περιγράφονται συνοπτικά οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των χημικών παραμέτρων. Σε όλες τις μεθοδολογίες δημιουργήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης (επιλέχτηκε κάθε φορά η γραμμή τάσης με R<sup>2</sup> που να προσεγγίζει όσο το δυνατόν περισσότερο τη μονάδα).

### 3.1. Αμμωνιακό Άζωτο ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )

Για μέτρηση της συγκέντρωσης του  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  έγινε προσθήκη των αντιδραστηρίων mineral stabilizer και Polyvinyl Alcohol και στην συνέχεια προσδιορίστηκε φωτομετρικά με το αντιδραστήριο Nessler σε μήκος κύματος 425 nm.

### 3.2. Νιτρικό Άζωτο ( $\text{NO}_3\text{-N}$ )

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του  $\text{NO}_3\text{-N}$  χρησιμοποιήθηκε το NitraVer® 5, Powder Pillows της εταιρείας HACH με εύρος προσδιορισμού τα 0 - 30 mg/L. Η μέτρηση έγινε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 540nm.

Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε τόσο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του  $\text{NO}_3\text{-N}$  όσο και του  $\text{NH}_4\text{-N}$  είναι το Perkin-ElmerUV/VISLambda 25.

### 3.3. Χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο (COD)

Το COD προσδιορίστηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο. Τα δείγματα προστίθενται σε φιαλίδια της εταιρείας HACH (το κάθε φιαλίδιο περιέχει 86% θειικό οξύ, θειικό υδράργυρο και τριοξείδιο του χρωμίου), τοποθετούνται σε αντιδραστήρα COD (CODReactorHACH, Model 45600) και θερμαίνονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία 150 °C. Έπειτα, τα δείγματα αφήνονται να κρυώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και τοποθετούνται στο φασματοφωτόμετρο (Portable Data logging Spectrophotometer της HACH, DR/2010), σε μήκος κύματος 620 nm.

### 3.4. Ολικό N (TKN)

Το ολικό N προσδιορίστηκε βάση της μεθόδου Kjeldahl, αρχικά χωνεύοντας τα δείγματα με πυκνό  $\text{H}_2\text{SO}_4$  και στη συνέχεια με προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Η μέτρηση του έγινε με μια παραλλαγή της μεθόδου Nessler, φωτομετρικά στα 460nm.

### 3.5. Ουρία

Η μετρηση της ουρίας έγινε σε δείγματα που ληφθηκαν από την έξοδο της μεγάλης δεξαμενής όπου παρωχέυεται το απόβλητο καθώς και από δείγματα που λήφθηκαν από τους τεχνητούς υδροβιότοπους. Ο υπολογισμός των τιμών έγινε σύμφωνα με το πρωτοκολλο μετρησης ουρίας που χρησιμοποιούν οι Mulvaney & Bremner, 1979.

## 4. Μοριακές αναλύσεις

### 4.1. Εξαγωγή DNA

Για την εξαγωγή DNA ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✓ Δειγματοληψίες από 2 σημεία σε κάθε δεξαμενή (χαλίκι)
- ✓ Σε 20 gr χαλικιού προσθήκη 15ml PBS (phosphate buffered saline) της sigma
- ✓ Ανάδευση τους για 1 ώρα ώστε να διαχωριστεί το βιοφίλμ από την επιφάνεια του χαλικιού.
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 10000rpm και απομάκρυνση υπερκλειμένου.
- ✓ Προσθήκη 200μl PBS επιπλέον ώστε να επαναδιαλυθεί η πελέτα
- ✓ Μεταφορά του στα bead beating tubes που παρέχονται στο PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA, USA)
- ✓ Η συνέχεια γίνεται ακολουθώντας τα βήματα που περιγράφονται στο προτεινόμενο πρωτόκολλο του PowerSoil® DNA Isolation Kit.

Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης.

### 4.2. Real time PCR

Με απλή αντίδραση PCR εντοπίστηκαν και δημιουργήθηκαν αντίγραφα του amoA από το απομονωμένο γενωμικό DNA. Στη συνέχεια έλαβαν χώρα real time PCR για τα γονίδια:

- Μονοοξυγενάση της αμμωνίας (amoA)
  - Αναγωγάσες των νιτρικών (nirK και nirS)
  - Αναγωγή του νιτρικού οξιδίου (nosZ)
- } Γόνιδια απονιτροποίησης

Στην αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ζευγάρια εκκινήτων (primers):

- Για το γονίδιο amoA των AOB:

<b>amoA-1F</b>	<b>amoA-2R</b>
5-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3	5- CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3

➤ Για το γονίδιο amoA των AOA:

<b>amoA19F</b>	<b>AmoA643R</b>
5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3	5-TCCCACTTWGACCARGCGGCCATCCA-3

➤ Για το γονίδιο nirK:

<b>nirK876</b>	<b>nirK1040</b>
5'- ATYGGCGGVCA YGGCGA -3	5- GCCTCGATCAGRTT RTGGTT -3

(Henry et al., 2004)

➤ Για το γονίδιο nirS:

<b>nirSCd3aF</b>	<b>nirSR3cd</b>
5'- GTS AACG TSAAGGARACSGG -3	5- GASTTCGGRTGSGTCTTGA -3

➤ Για το γονίδιο nosZ:

<b>nosZ2F</b>	<b>nosZ2R</b>
5'- CGCRACGGCAASAAGGTSMSSGT -3	5- CAKRTGCAKSGC RTGGCAGAA -3

(Henry, Bru, Stres, Hallet, & Philippot, 2006)

Οι εκκινητές και το πρωτόκολλο της θερμικής αντίδρασης το οποίο περιγράφηκε προηγουμένως χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου amoA των αμμωνιοξειδωτικών βακτηρίων (AOB) και αρχαίων (AOA). Η αντίδραση έγινε με χημεία φθορισμού SYBRGreen και πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή



πραγματικού χρόνου StepOnePlus™ Real-TimePCRSystem (AppliedBiosystems). Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 20  $\mu$ l και χρησιμοποιήθηκε το KAPASYBRFastMasterMix (2x) qRT-PCRKit (KAPABiosystems), 0.5  $\mu$ M από κάθε εκκινητή, και 2  $\mu$ l DNA που είχε αρχικά γίνει 1/10 αραίωση. Τα δεδομένα από κάθε κύκλο λήφθηκαν στο στάδιο της τελικής επιμήκυνσης (extension phase) το οποίο αντιστοιχούσε στους 81 °C για τα AOB και στους 76 °C για τα AOA. Όλες οι αντιδράσεις ακολουθήθηκαν από την κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve analysis) ώστε να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature ή  $T_m$ ) των προϊόντων της αντίδρασης και στην προκειμένη, η θερμοκρασία ξεκίνησε από τους 60 °C και με αύξηση κατά 0.5 °C μέχρι τους 95 °C.

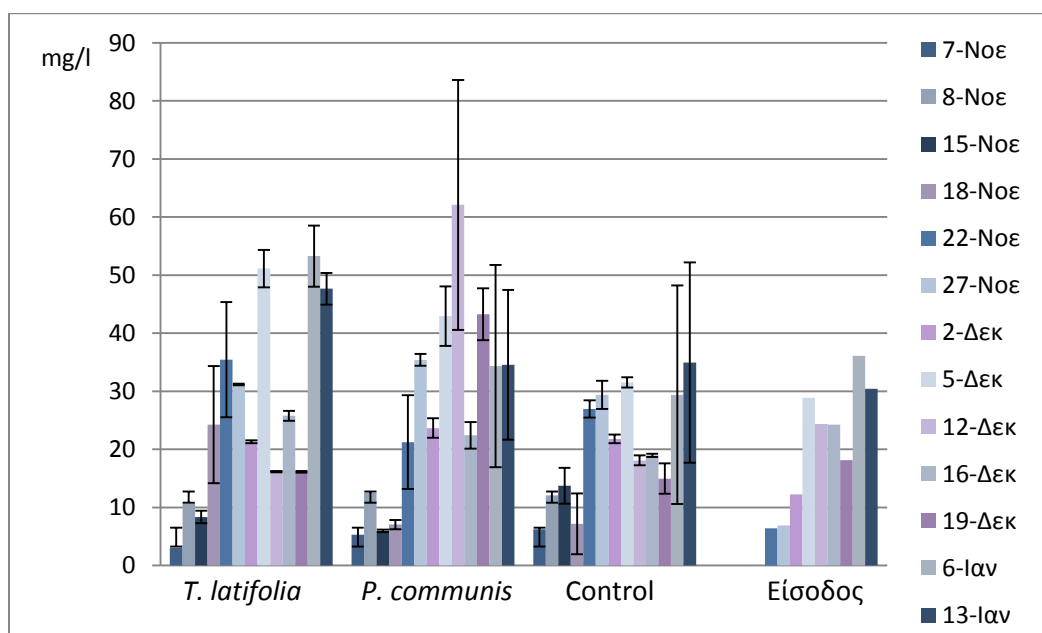
Οι καμπύλες αναφοράς (Standard curves) για τα AOB και τα AOA κατασκευαστήκαν με διαδοχικές αραιώσεις  $10^3$ - $10^8$  του γραμμικού πλασμιδίου (pGE0M-T, Promega) που είχε ενσωματώσει τα γονίδια *amoA* τα οποία είχαν απομονωθεί από τα περιβαλλοντικά δείγματα.

# Αποτελέσματα

## 1. Χημικές αναλύσεις

### 1.1. Συγκέντρωση $\text{NH}_4\text{-N}$

Δεν παρουσιάστηκε κάποια σταθερή αύξηση ή μείωση των συγκεντρώσεων των  $\text{NH}_4^+$  - N. Στα αποτελέσματα των δειγματοληψιών οι συγκεντρώσεις ποικιλαν από δειγματοληψία σε δειγματοληψία αλλά και μεταξύ των δεξαμενών με τη διαφορετική βλάστηση.

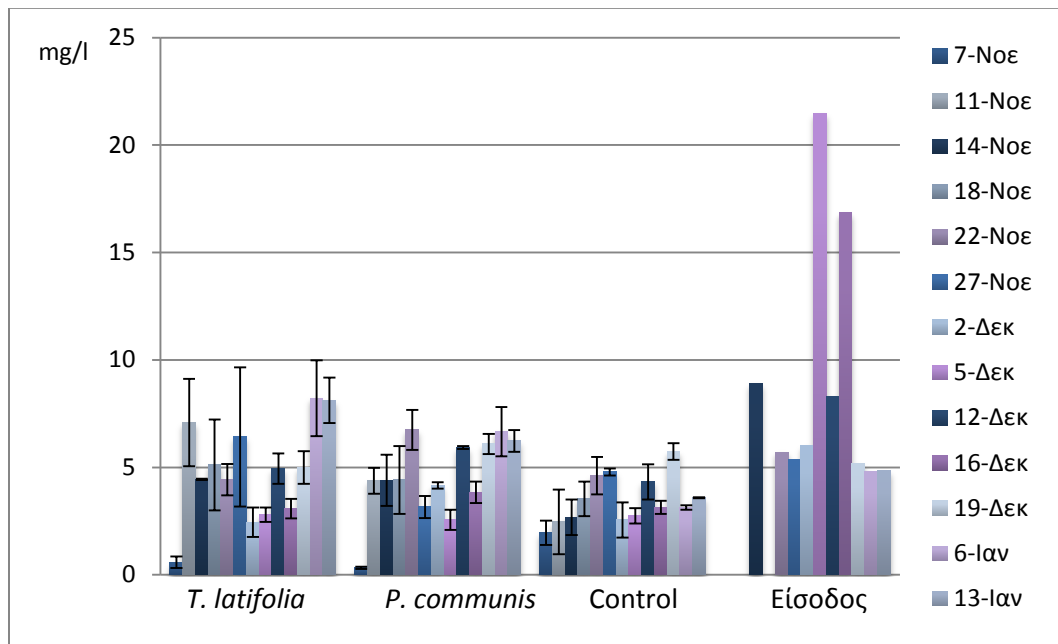


**Διάγραμμα 1.** Οι συγκεντρώσεις των αμμωνιακών ιόντων σε mg/l στους T.Y. από 7 Νοεμβρίου έως 13 ιανουαρίου

### 1.2. Συγκέντρωση $\text{NO}_3\text{-N}$

Δεν παρουσιάστηκε κάποια σταθερή αύξηση ή μείωση των συγκεντρώσεων των  $\text{NO}_3^-$  - N. Στα αποτελέσματα των δειγματοληψιών οι συγκεντρώσεις ποικιλαν από

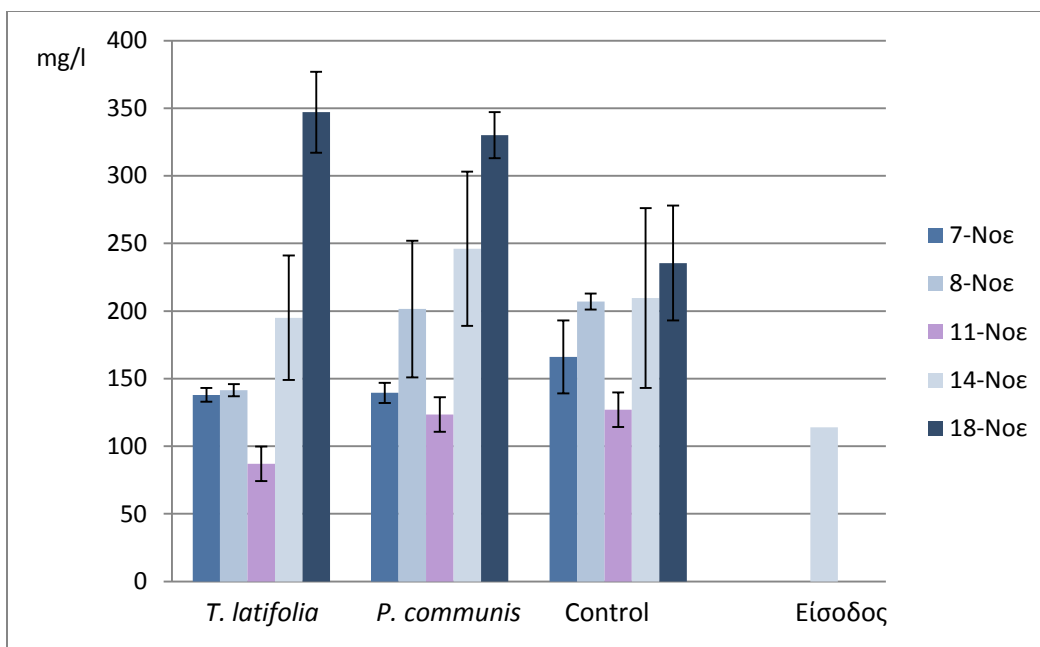
δειγματοληψία σε δειγματοληψία αλλά και μεταξύ των δεξαμενών με τη διαφορετική βλάστηση.



**Διάγραμμα 2.** Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών ιόντων σε mg/l στους Τ.Υ. από 7 Νοεμβρίου έως 13 Ιανουαρίου

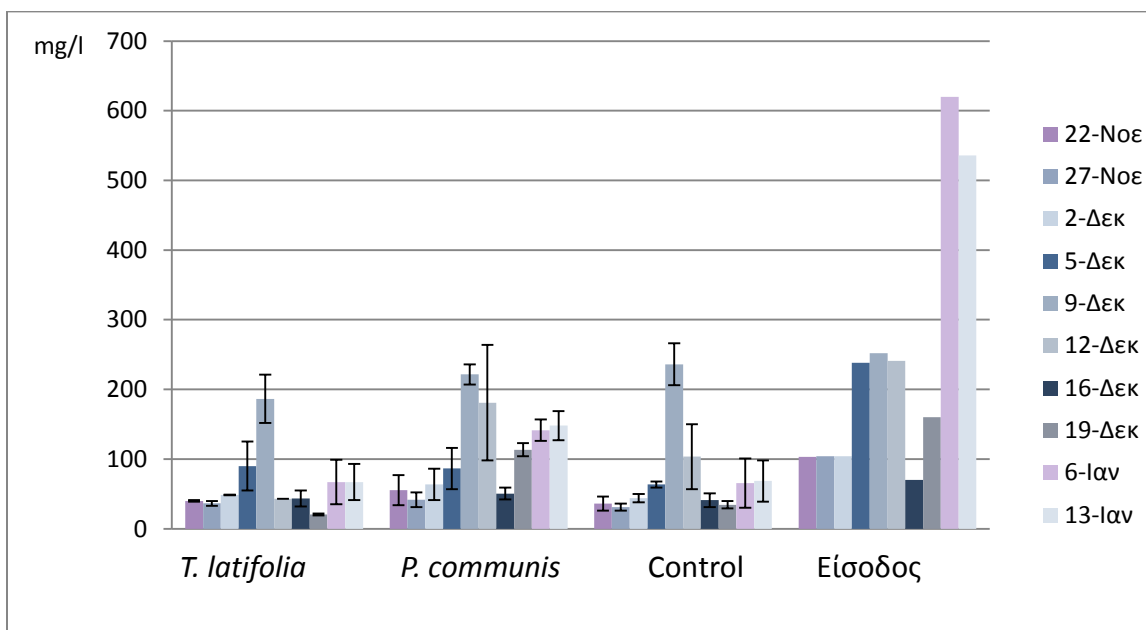
### 1.3. Μέτρηση COD

Πριν εφαρμοστεί διήθηση του δείγματος από φίλτρο στις πρώτες πέντε δειγματοληψίες:



**Διάγραμμα 3.** Οι συγκεντρώσεις του COD σε mg/l στους Τ.Υ. από 7 Νοεμβρίου έως 18 Νοεμβρίου

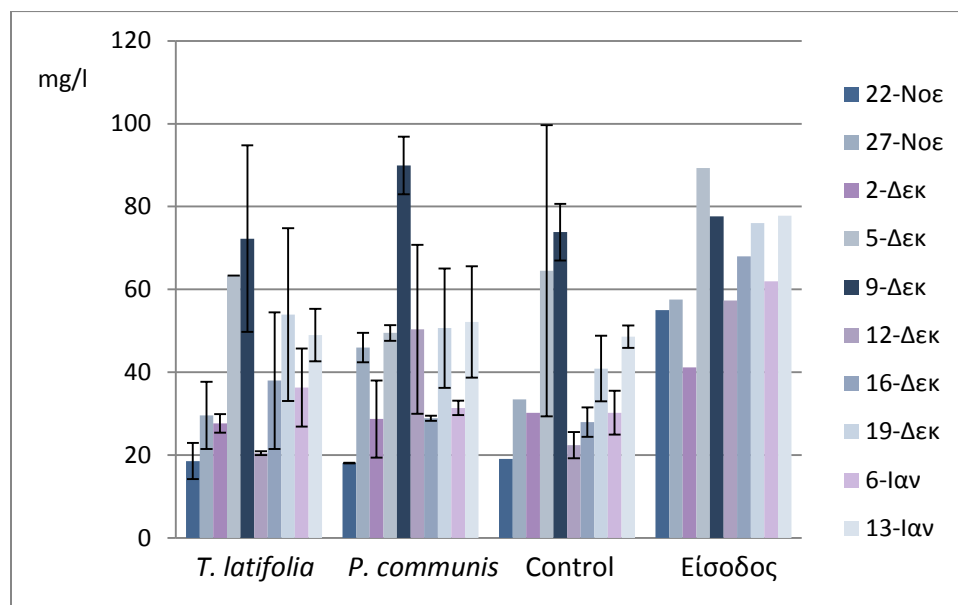
Έχοντας πραγματοποιηθεί διήθηση στις επόμενες δειγματοληψίες:



**Διάγραμμα 4.** Οι συγκεντρώσεις του COD σε mg/l στους Τ.Υ. από 22 Νοεμβρίου έως 13 Ιανουαρίου

#### 1.4. Ολικό N (TKN)

Κατά την εφαρμογή του αποβλήτου στους ΤΥ παρατηρήθηκε μια αυξομείωση της συγκέντρωσης του ολικού N. Το ποσοστό απομακρυνσης N για τις δεξαμενές του *T.latifolia* είναι 38,18%, στο *P. communis* 32,65% και στις κενές 40,89%.



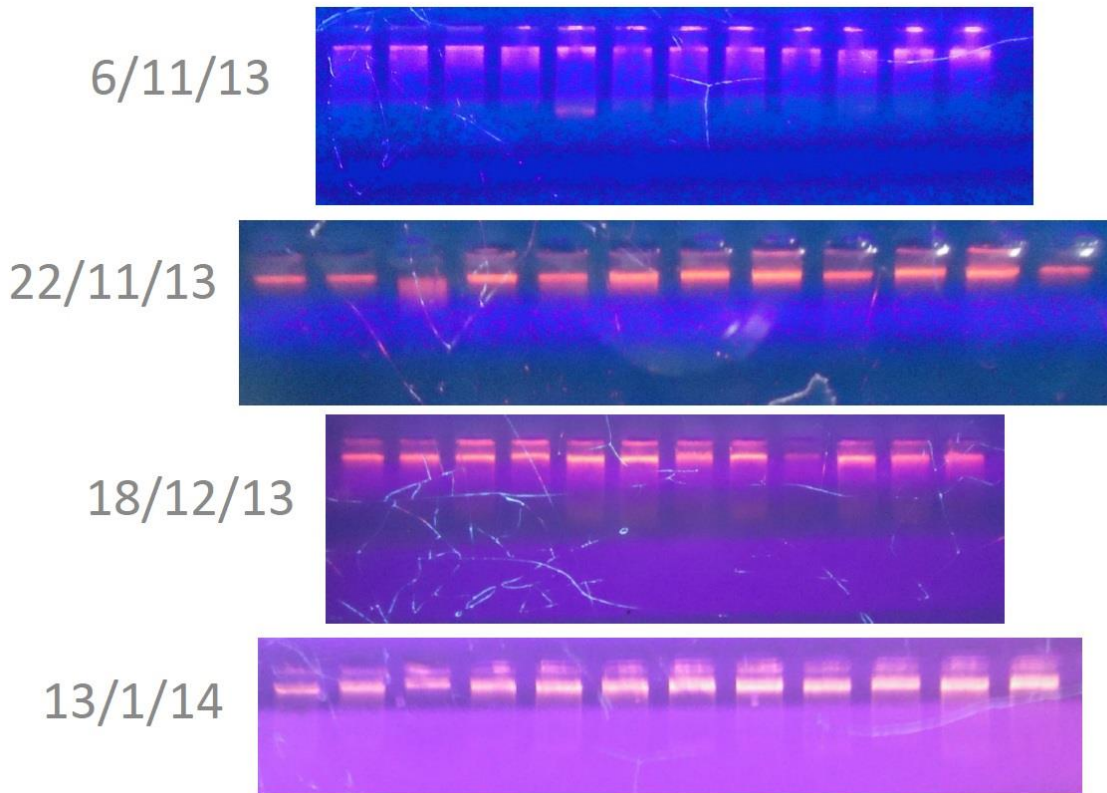
**Διάγραμμα 5.** Οι συγκεντρώσεις του ολικού αζώτου σε mg/l στους Τ.Υ. από 22 Νοεμβρίου έως 13 Ιανουαρίου

#### 1.5. Μέτρηση Ουρίας

Έγινε μια δειγματοληψία για ουρία στην έξοδο της μεγάλης δεξαμενής όπου παρωχέεται το απόβλητο καθώς και στους τεχνητούς υγροβιότοπους στους οποίους η τιμή της μηδενιζόταν. Θεωρήθηκε λογικό αφού η ουρία οξειδωνόταν στις άλλες μορφές N.

## 1. Μοριακές αναλύσεις

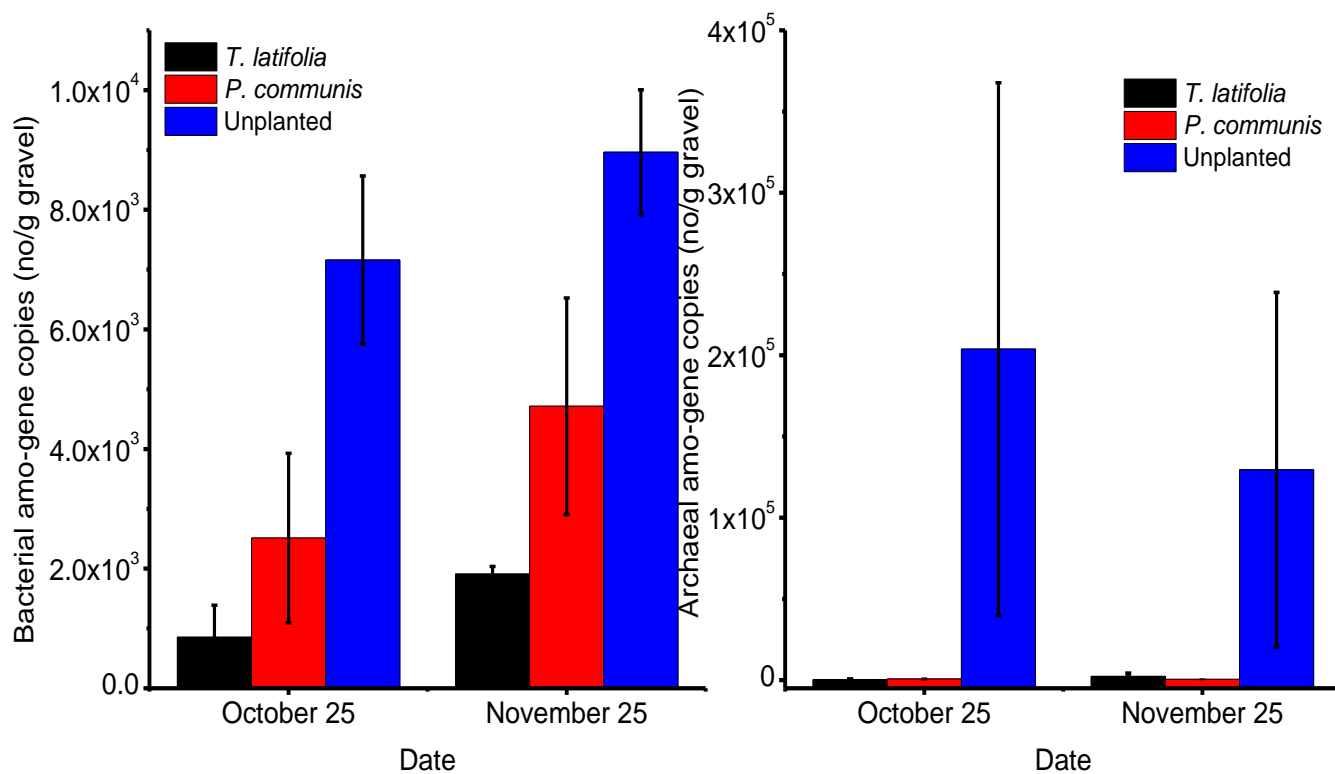
### 1. Εξαγωγή DNA



**Εικόνα 37.** Φωτογραφίες από τα gel αгарόζης μετά από το DNA extraction

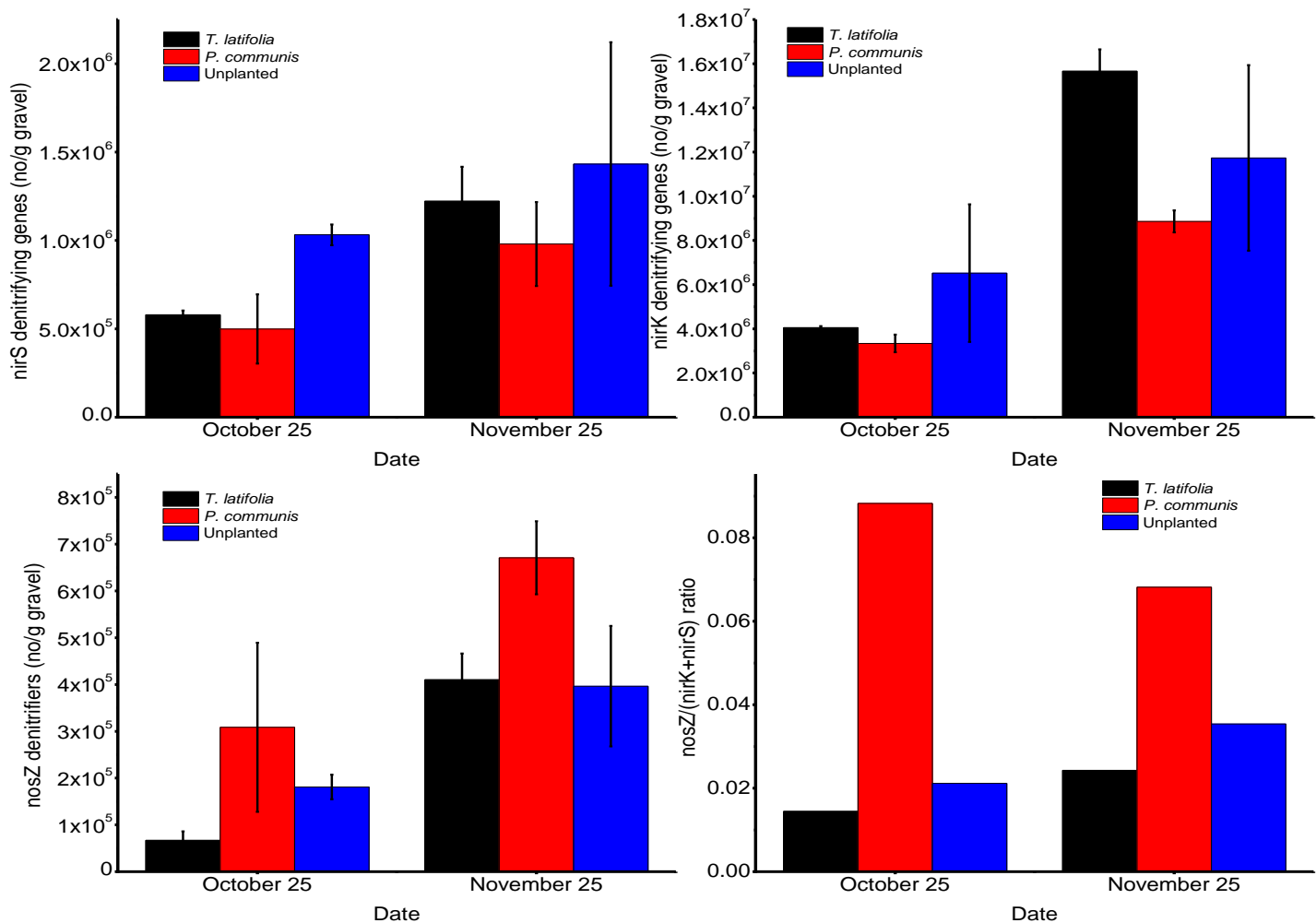
### 2. Real time PCR

Τα αποτελέσματα της real time PCR τα γονίδια *amoA*, *nirK*, *nirS*, και *nosZ* παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα.



**Διάγραμμα 6.** Αντίγραφα γονίδιου απο βακτηρίων και αρχαίων ανά γραμμάριο χαλικιού.

Παρατηρούμε πολύ μικρές τιμές οξειδωτών της αμμωνίας τόσο από βακτήρια όσο και από αρχαία.



**Διάγραμμα 7.** Αντίγραφα γονιδίων *nirS*, *nirK*, *nosZ* και *nosZ*/ (*nirS*+*nirK*) ανά γραμμάριο χαλικιού.

Η αυξημένη αφθονία του γονιδίου *nirS* και κυρίως του *nirK* υποδεικνύει την βασική διεργασία που είναι υπεύθυνη για τις χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών στην εκροή.

Οι χαμηλοί αριθμοί, όμως, των αντιγράφων του γονιδίου *nosZ* πιθανότατα προτείνουν αυξημένη απελευθέρωση νιτρώδους οξειδίου από τους υδροβιότοπους.



# Συζήτηση

---

Μια αρχική παρατήρηση για τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων στις διαφορετικές δεξαμενές είναι ότι δεν παρουσιάστηκε κάποια σταθερή αύξηση ή μείωση των συγκεντρώσεων των διαφόρων μορφών ( $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  και  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ ) στις οποίες συναντάται το N. Στα αποτελέσματα των δειγματοληψιών οι συγκεντρώσεις ποίκιλαν από δειγματοληψία σε δειγματοληψία αλλά και μεταξύ των δεξαμενών με τη διαφορετική βλάστηση.

Στη συνέχεια όμως έγιναν παρατηρήσεις που αφορούσαν την επίδραση εποχιακών καιρικών συνθηκών στην βλάστηση, η οποία με την σειρά της επηρέαζε και τις συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  και  $\text{NO}_3^- - \text{N}$  και συνεπώς την συνολική απομάκρυνση του αζώτου.

Για παράδειγμα μεταξύ της 67<sup>ης</sup> μέρας και της 178<sup>ης</sup> μέρα παρατηρήθηκαν οι μικρότερες συγκεντρώσεις  $\text{NH}_4^+ - \text{N}$  στις δεξαμενές που ήταν φυτεμένες με ψαθί.

Παράλληλα παρατηρήθηκαν μεταβολές, λόγω εποχιακών καιρικών συνθηκών και στις δεξαμενές με βλάστηση *Phragmites communis* και οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις  $\text{NO}_3^- - \text{N}$ .

Σχετικά με τα αποτελέσματα της Real Time PCR και τους ποσοτικούς προσδιορισμούς των αντιγράφων των γονιδίων έχουμε να παρατηρήσουμε τα εξής:

- Για τα βακτήρια και τα αρχαία που οξειδώνουν την αμμωνία:
  - Μεγαλύτερη αφθονία του γονιδίου amoA των βακτηρίων σε σχέση με το αντίστοιχο amoA γονίδιο των αρχαίων το οποίο μπορεί να υποδηλώνει μια μεγαλύτερη συμμετοχή των οξειδωτικών βακτηρίων στη νιτροποίηση.
  - Η αφθονία των αντιγράφων των γονιδίων amoA των αρχαίων παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της περιόδου μελέτης.

- Η χρήση της στατιστικής μεθόδου ANOVA δεν παρουσίασε κάποια σημαντική επίδραση της βλάστησης στην αφθονία των γονιδίων.

➤ Για τους αριθμούς των αντιγράφων των λειτουργικών γονιδίων απονιτροποίησης (nirS, nirK και nosZ):

- η αφθονία των nirK και nirS απονιτροποιητικών γονιδίων ξεπερνάει αυτή των γονιδίων amoA κατά 2 τάξεις μεγέθους υποδηλώνοντας έτσι ετερότροφη νιτροποίηση.
- Η μειωμένη ποσότητα αντιγράφων γονιδίων amoA μπορεί να υποδηλώνει ότι η χαμηλή διαθεσιμότητα οξυγόνου (όπως φαίνεται από τις χαμηλές συγκεντρώσεις των  $\text{NO}_3^-$ -N και τις υψηλές  $\text{NH}_4^+$ -N στους τεχνητούς υγροβιότοπους) αποτελούσε περιοριστικό παράγοντα στην οξείδωση της αμμωνίας. Τα αντίγραφα του γονιδίου nosZ, το οποίο αποτελεί γονίδιο αναγωγής του  $\text{N}_2\text{O}$  παρουσίασαν χαμηλές συγκεντρώσεις υποδηλώνοντας έτσι υψηλή πιθανότητα απελευθέρωσης  $\text{N}_2\text{O}$ .
- Η ANOVA δεν παρουσίασε, ούτε και σε αυτήν την περίπτωση κάποια σημαντική επίδραση της βλάστησης στην αφθονία των γονιδίων, σε αντίθεση με την διαφορετική επίδοση των τεχνητών υγροβιότοπων στην απομάκρυνση αζώτου. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν την επίδραση της δραστηριότητας των μικροοργανισμών αντί της βλάστησης.

Τέλος, σχετικά με την συσχέτιση χημικών παραμέτρων και λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του αζώτου έχουμε να παρατηρήσουμε τα εξής:

- Η ισχυρή συσχέτιση των βακτηρίων οξείδωσης της αμμωνίας, της απομάκρυνσης του αζώτου με τη μορφή αμμωνιακών ιόντων και των γονιδίων απονιτροποίησης ισχυροποιεί την υπόθεση ότι αυτά τα βακτήρια μπορεί να έχουν ακόμα πιο σημαντικό ρολό στην νιτροποίηση.

- Ακόμα και αν οι *nirK* απονιτροποιητές βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία από τους *nirS*, μόνο οι δεύτεροι είναι ισχυρά συνδεδεμένοι με τις χημικές παραμέτρους και με αλλά λειτουργικά γονίδια υποδηλώνοντας έτσι μια πιο ενεργή δραστηριότητα.
- Ισχυρές συσχετίσεις μεταξύ των λειτουργικών γονιδίων του κύκλου του αζώτου αντανakλούν την έντονη σχέση αυτών των λειτουργικών ομάδων.

# Βιβλία

---

**Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J.** (2003). *Biology of Microorganisms*. tenth edition, Prentice-Hall, Inc. New Jersey , chapter **12**, p.418

# Βιβλιογραφία

---

Abell, G. C. J., Revill, A. T., Smith, C., Bissett, A. P., Volkman, J. K., & Robert, S. S. (2010). Archaeal ammonia oxidizers and nirS-type denitrifiers dominate sediment nitrifying and denitrifying populations in a subtropical macrotidal estuary. *The ISME Journal*, 4(2), 286–300. doi:10.1038/ismej.2009.105

Bartossek, R., Nicol, G. W., Lanzen, A., Klenk, H.-P., & Schleper, C. (2010). Homologues of nitrite reductases in ammonia-oxidizing archaea: diversity and genomic context. *Environmental Microbiology*, 12(4), 1075–88. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02153.x

Bastviken, S. (2006). *Nitrogen removal in treatment wetlands – Factors influencing spatial and temporal variations*.

Blainey, P. C., Mosier, A. C., Potanina, A., Francis, C. a, & Quake, S. R. (2011). Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. *PLoS One*, 6(2), e16626. doi:10.1371/journal.pone.0016626

Boer, W. De, & Kowalchuk, G. A. (2001). Nitri<sup>®</sup> cation in acid soils : micro-organisms and mechanisms, 33.

Bouali, M., Zrafi-Nouira, I., Bakhrouf, A., Le Paslier, D., Chaussonnerie, S., Ammar, E., & Sghir, A. (2012). The structure and spatio-temporal distribution of the Archaea in a horizontal subsurface flow constructed wetland. *The Science of the Total Environment*, 435-436, 465–71. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.07.047

Bowden, W. (1987). The biogeochemistry of nitrogen in freshwater wetlands. *Biogeochemistry*, 4(3), 313–348. doi:10.1007/BF02187373

Brix, H. (1999). How ?green? are aquaculture, constructed wetlands and conventional wastewater treatment systems? *Water Science and Technology*, 40(3), 45–50. doi:10.1016/S0273-1223(99)00418-7

Brix Hans, Arias Carlos, J. N.-H. (2003). Experiments in a two-stage constructed wetland system: nitrification capacity and effects of recycling on nitrogen removal. Leiden, The

Netherlands: Wetlands - nutrients, metals and mass cycling pp 237-258 Backhuys Publishers.

- Brochier, C., & Philippe, H. (2002). Phylogeny: A non-hyperthermophilic ancestor for Bacteria. *Nature*, 417(6886), 244. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/417244a>
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., & Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Micro*, 6(3), 245–252. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1852>
- Broda, E. (1977). Two kinds of lithotrophs missing in nature. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 17(6), 491–493. doi:10.1002/jobm.19770170611
- Cabello, P., Roldán, M. D., & Moreno-Vivián, C. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 11), 3527–46. doi:10.1099/mic.0.27303-0
- Cooper, G. S., & Smith, R. L. (1963). Sequence of Products Formed During Denitrification in Some Diverse Western Soils<sup>1</sup>. Retrieved from <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/27/6/659>
- Dapena-Mora, a., Fernández, I., Campos, J. L., Mosquera-Corral, a., Méndez, R., & Jetten, M. S. M. (2007). Evaluation of activity and inhibition effects on Anammox process by batch tests based on the nitrogen gas production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 859–865. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.06.018
- De la Torre, J. R., Walker, C. B., Ingalls, A. E., Könneke, M., & Stahl, D. a. (2008). Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*, 10(3), 810–8. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01506.x
- Groffman, P. M. (2007). Nitrogen ransformations, 341–364.
- Groffman, P. M., & Tiedje, J. M. (1988). Denitrification Hysteresis During Wetting and Drying Cycles in Soil. Retrieved from <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/52/6/1626>
- Hallam, S. J., Konstantinidis, K. T., Putnam, N., Schleper, C., Watanabe, Y., Sugahara, J., ... DeLong, E. F. (2006). Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18296–301. doi:10.1073/pnas.0608549103
- Hallam, S. J., Mincer, T. J., Schleper, C., Preston, C. M., Roberts, K., Richardson, P. M., & DeLong, E. F. (2006). Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biology*, 4(4), e95. doi:10.1371/journal.pbio.0040095

- Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. (2006). Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5181–9. doi:10.1128/AEM.00231-06
- Islam, a, Chen, D., & White, R. (2007). Heterotrophic and autotrophic nitrification in two acid pasture soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(4), 972–975. doi:10.1016/j.soilbio.2006.11.003
- Jetten, M. S. M., Sliekers, O., Kuypers, M., Dalsgaard, T., Niftrik, L., Cirpus, I., ... Strous, M. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(2), 107–114. doi:10.1007/s00253-003-1422-4
- Ramesh Reddy and Ronald D . DeLaune. (2008). Nitrogen. In *Biogeochemistry of Wetlands* (pp. 257–323). CRC Press. doi:doi:10.1201/9780203491454.ch8
- Kartal, B., Van Niftrik, L., Rattray, J., Van De Vossenberg, J. L. C. M., Schmid, M. C., Sinninghe Damsté, J., ... Strous, M. (2008). Candidatus “*Brocadia fulgida*”: an autofluorescent anaerobic ammonium oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(1), 46–55. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00408.x
- Klotz, M. G., & Stein, L. Y. (2008). Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 278, 146–156. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00970.x
- Klotz, M. G., & Stein, L. Y. (2011). Genomics of ammonia-oxidizing bacteria and insights into their evolution. *Nitrification*, 57–94.
- Konneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B., & Stahl, D. A. (2005). Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*, 437(7058), 543–546. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature03911>
- Kuypers, M. M. M., Sliekers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B. B., Kuenen, J. G., ... Jetten, M. S. M. (2003). Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, 422(6932), 608–611. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature01472>
- Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., ... Daims, H. (2010). A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), 13479–13484. doi:10.1073/pnas.1003860107
- Morel, A., & Diener, S. (2006). *Greywater Management in Low and Middle-Income Countries*.
- Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1995). Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(3), 177–183. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0168-6496(94)00081-7

- Mulvaney, R. L., & Bremner, J. M. (1979). A modified diacetyl monoxime method for colorimetric determination of urea in soil extracts<sup>1</sup>. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 10(8), 1163–1170. doi:10.1080/00103627909366969
- Musmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinninghe Damsté, J. S., Hatzenpichler, R., Richter, A., ... Head, I. M. (2011). Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(40), 16771–6. doi:10.1073/pnas.1106427108
- Park, H.-D., Wells, G. F., Bae, H., Criddle, C. S., & Francis, C. a. (2006). Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5643–7. doi:10.1128/AEM.00402-06
- Penton, C. R. (2009). Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox). In R. Margesin (Ed.), *Permafrost Soils SE - 10* (Vol. 16, pp. 149–158). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-69371-0\_10
- Pester, M., Schleper, C., & Wagner, M. (2011). The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 300–6. doi:10.1016/j.mib.2011.04.007
- Philippot, L. (2002). Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, 1577, 355–376. doi:10.1016/S0167-4781(02)00420-7
- Purkhold, U., Pommerening-röser, A., Schmid, M. C., Koops, H., Juretschko, S., Pommerening-ro, A., & Wagner, M. (2000). Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis : Implications for Molecular Diversity Surveys Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amo. doi:10.1128/AEM.66.12.5368-5382.2000.Updated
- Reddy, K. R., Patrick, W. H., & Lindau, C. W. (1989). Nitrification-denitrification at the plant root-sediment interface in wetlands. *Limnology and Oceanography*, 34(6), 1004–1013. doi:10.4319/lo.1989.34.6.1004
- Robertson, G. P. (1989). Nitrification and denitrification in humid tropical ecosystems: potential controls on nitrogen retention. *Mineral Nutrients in Tropical Forest and Savanna Ecosystems*. Blackwell Scientific; British Ecological Society, Special Publication, 9. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0024921522&partnerID=tZOtx3y1>
- Rusch, A. (2013). Molecular tools for the detection of nitrogen cycling archaea. *Archaea*, 2013. doi:10.1155/2013/676450
- Saeed, T., & Sun, G. (2012). A review on nitrogen and organics removal mechanisms in subsurface flow constructed wetlands: dependency on environmental parameters,

- operating conditions and supporting media. *Journal of Environmental Management*, 112, 429–48. doi:10.1016/j.jenvman.2012.08.011
- Schleper, C., Jurgens, G., & Jonuscheit, M. (2005). Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat Rev Micro*, 3(6), 479–488. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1159>
- Schleper, C., & Nicol, G. W. (2010). *Ammonia-oxidising archaea--physiology, ecology and evolution. Advances in microbial physiology* (Vol. 57). Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-12-381045-8.00001-1
- Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Bock, E., Fuerst, J., Kuenen, J. G., ... Strous, M. (2003). New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(4), 481–492. doi:10.1016/S0168-6445(03)00039-1
- Sorokin, D. Y., Lücker, S., Vejmekova, D., Kostrikina, N. a, Kleerebezem, R., Rijpstra, W. I. C., ... Daims, H. (2012). Nitrification expanded: discovery, physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum Chloroflexi. *The ISME Journal*, 2245–2256. doi:10.1038/ismej.2012.70
- Spieck, E., & Bock, E. (2005). The lithoautotrophic nitrite-oxidizing bacteria. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 149–153. doi:10.1007/0-387-28021-9\_19
- Spieck, E., Keuter, S., Wenzel, T., Bock, E., & Ludwig, W. (2014). Characterization of a new marine nitrite oxidizing bacterium, *Nitrospina watsonii* sp. nov., a member of the newly proposed phylum “Nitrospinae.” *Systematic and Applied Microbiology*, 37(3), 170–176. doi:10.1016/j.syapm.2013.12.005
- Stein, O. R., & Hook, P. B. (2005). Temperature, plants, and oxygen: how does season affect constructed wetland performance? *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering*, 40(January 2015), 1331–1342. doi:10.1081/ESE-200055840
- Stottmeister, U., Wießner, a., Kusch, P., Kappelmeyer, U., Kästner, M., Bederski, O., ... Moormann, H. (2003). Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, 22, 93–117. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.08.010
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., ... Jetten, M. S. M. (1999). Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, 400(6743), 446–449. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/22749>
- Sundberg, C., Jenny, J. S., Tonderski, K., & Lindgren, P. E. (2007). Overland flow systems for treatment of landfill leachates-Potential nitrification and structure of the ammonia-oxidising bacterial community during a growing season. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(1), 127–138. doi:10.1016/j.soilbio.2006.06.016



- Tao, W., Hall, K. J., & Ramey, W. (2007). Effects of influent strength on microorganisms in surface flow mesocosm wetlands. *Water Research*, 41(19), 4557–4565. doi:10.1016/j.watres.2007.06.031
- Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., & Stahl, D. A. (1994). Evolutionary Relationships among Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bacteria, 176(21), 6623–6630.
- Tilley, E., Lüthi, C., Morel, A., Zurbrügg, C., & Schertenleib, R. (2008). Compendium of Sanitation Systems and Technologies. *Development*, 158. doi:SAN-12
- Trepel, M., & Palmeri, L. (2002). Quantifying nitrogen retention in surface flow wetlands for environmental planning at the landscape-scale. *Ecological Engineering*, 19, 127–140. doi:10.1016/S0925-8574(02)00038-1
- Velinsky, D. (2011). Nutrient and Ecological Histories in Nutrient and Ecological Histories in Barnegat Bay , New Jersey.
- Vlaeminck, S. E., Hay, A. G., Maignien, L., & Verstraete, W. (2011). In quest of the nitrogen oxidizing prokaryotes of the early Earth. *Environmental Microbiology*, 13, 283–295. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02345.x
- Vymazal, J. (2005). Horizontal sub-surface flow and hybrid constructed wetlands systems for wastewater treatment. *Ecological Engineering*, 25(5), 478–490. doi:10.1016/j.ecoleng.2005.07.010
- Vymazal, J. (2007a). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *Science of the Total Environment*, 380, 48–65. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.09.014
- Vymazal, J. (2007b). Removal of nutrients in various types of constructed wetlands. *The Science of the Total Environment*, 380(1-3), 48–65. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.09.014
- Wei, B., Yu, X., Zhang, S., & Gu, L. (2011). Comparison of the community structures of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rhizoplanes of floating aquatic macrophytes. *Microbiological Research*, 166(6), 468–74. doi:10.1016/j.micres.2010.09.001
- Wrage, N., Velthof, G. L., Beusichem, M. L. Van, & Oenema, O. (2001). Role of nitrification and denitrification in the production of nitrous oxide, 33, 1723–1732.
- Ye, R. W., Averill, B. A., & Tiedje, J. M. (1994). MINIREVIEW Denitrification : Production and Consumption of Nitric Oxide, 60(4), 1053–1058.
- You, J., Das, A., Dolan, E. M., & Hu, Z. (2009). Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research*, 43(7), 1801–9. doi:10.1016/j.watres.2009.01.016
- Zehr, J. P., & Ward, B. B. (2002). MINIREVIEW Nitrogen Cycling in the Ocean : New Perspectives on Processes and Paradigms, 68(3), 1015–1024. doi:10.1128/AEM.68.3.1015

- Zhang, J., Cai, Z., & Zhu, T. (2011). N<sub>2</sub>O production pathways in the subtropical acid forest soils in China. *Environmental Research*, 111(5), 643–9. doi:10.1016/j.envres.2011.04.005
- Zhang, K., Xu, X.-N., & Wang, Q. (2010). Characteristics of N Mineralization in Urban Soils of Hefei, East China. *Pedosphere*, 20(2), 236–244. doi:10.1016/S1002-0160(10)60011-2
- Zhao, Y., Liu, B., Zhang, W., Hu, C., & An, S. (2010). Effects of plant and influent C:N:P ratio on microbial diversity in pilot-scale constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 36(4), 441–449. doi:10.1016/j.ecoleng.2009.11.011