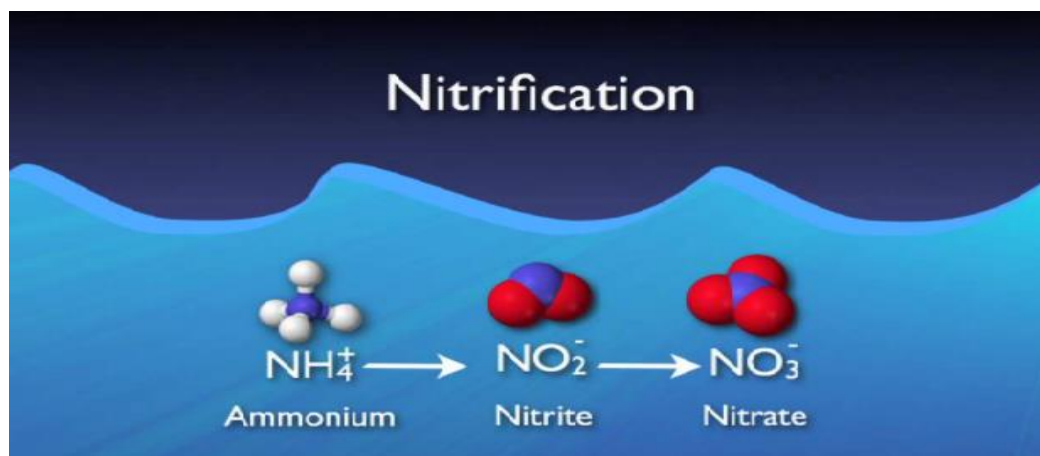


ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΕΛΑΦΗ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΩΝ”



ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΠΥΡΟΠΟΥΛΟΣ - ΑΜ : 2013050070

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΡΑΝΥΧΙΑΝΑΚΗΣ

ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :

Α) ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΠΑΡΑΝΥΧΙΑΝΑΚΗΣ

Β) ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΝΙΚΟΛΑΙΔΗΣ

Γ) ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΣΤΕΦΑΝΑΚΗΣ

XANIA/9/2021

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της διπλωματικής αυτής εργασίας, η οποία αποτελεί και τον επίλογο των σπουδών μου στην Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης, θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Παρανυχιανάκη Νικόλαο για την παρακολούθηση, την επιστημονική καθοδήγηση, την άψογη συνεργασία και κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση του παρόντος επίκαιρου θέματος.

Επίσης ευχαριστώ θερμά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, για τη συμμετοχή τους και την προσοχή τους κατά την αξιολόγηση της διπλωματικής αυτής.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υπομονή και την στήριξη τους καθ' όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως θέμα την “Νιτροποίηση σε εδάφη θερμοκηπίων” και αποσκοπεί στην αναλυτική παρουσίαση των αντιδράσεων που σχετίζονται με τον βιογεωχημικό κύκλο του αζώτου, εστιάζοντας στην συνεισφορά που έχουν τα Αρχαία σε εδάφη θερμοκηπίου .

Αρχικά, γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση σε ότι αφορά τον μετασχηματισμό του αζώτου με έμφαση στην νιτροποίηση την συνεισφορά των Αρχαίων καθώς και των βακτηρίων που συμμετέχουν στην νιτροποίηση και τις αγρονομικές τεχνικές που παρεμποδίζουν την δράση των νιτροποιητικών βακτηρίων. Κατόπιν, ακολουθεί το πειραματικό μέρος της εργασίας με μετρήσεις νιτρικών και αμμωνιακών σε εδάφη θερμοκηπίου τα οποία διαχωρίζονται ανάλογα με την μεταχείριση τους η μη με παρεμποδιστή καθώς και την επώαση τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες και τα αποτελέσματα μέσω της ανάλυσης των διαγραμμάτων μέσων όρων των συγκεντρώσεων.

ABSTRACT

This diploma thesis is entitled "Nitrification in greenhouse soils" and aims to present in detail the reactions related to the biogeochemical cycle of nitrogen in these soils, focusing on the contribution of the Archaea to greenhouse soils.

First, a literature review is made regarding the transformation of nitrogen with emphasis on nitrification, the contribution of the Archaea as well as the bacteria involved in nitrification and the agronomic techniques that inhibit the action of nitrifying bacteria. Then follows the experimental part of the work with measurements of nitrate and ammonium in greenhouse soils which are discriminated according to their treatment or not with the inhibitor as well as their incubation at different temperatures and the results through the analysis of the diagrams of average concentrations.

Λέξεις-Κλειδιά : Κύκλος του Αζώτου, Νιτροποίηση, Παρεμπόδιση Νιτροποίησης, Εδάφη
Θερμοκηπίου, Συγκέντρωση Νιτρικών , Συγκέντρωση Αμμωνιακών, Αρχαία, Νιτροποιητικά
Βακτήρια

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες.....	σελ.1
Περίληψη.....	σελ.2
Abstract.....	σελ.2
Πίνακας Περιεχομένων.....	σελ.4
Κατάλογος Διαγραμμάτων.....	σελ.6
Κατάλογος Εικόνων.....	σελ.7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	σελ.8
1.1 - Ο Βιοχημικός κύκλος του Ν.....	σελ.8
1.2 - Βιολογική Δέσμευση Ν.....	σελ.10
1.3 - Νιτροποίηση.....	σελ.12
1.3.1 - Αυτότροφοι Μικροοργανισμοί Νιτροποίησης.....	σελ.15
1.3.2 - Κινητική της Νιτροποίησης.....	σελ.16
1.3.3 - Περιβαλλοντικοί παράγοντες Νιτροποίησης.....	σελ.17
1.3.4 - Αναμμοχ.....	σελ.21
1.4 - Απονιτροποίηση.....	σελ.22
1.4.1 - Κινητική Απονιτροποίησης.....	σελ.23
1.4.2 - Παράγοντες Απονιτροποίησης.....	σελ.24
1.5 - Παρεμπόδιση Νιτροποίησης.....	σελ.25
1.6 - Νιτροποίηση στα Αγρό-οικοσυστήματα.....	σελ.27
1.7 - Νιτροποίηση στην Επεξεργασία Λυμάτων.....	σελ.28
1.8 - Οικολογικές Επιπτώσεις ανθρώπινης δραστηριότητας στον Κύκλο του Ν.....	σελ.29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	σελ.31
2.1 - Σκοπός της Μελέτης.....	σελ.31
2.2 - Διαδικασία Επεξεργασίας Δειγμάτων.....	σελ.31
2.3 - Ο παρεμποδιστής Νιτροποίησης 4 – Octyne.....	σελ.33
2.3.1- Προσδιορισμός αμμωνιακών και νιτρικών	σελ.34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ.....	σελ.36
3.1 - Διαγράμματα Μετρήσεων.....	σελ.36

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....σελ.52

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....σελ.55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διαγράμματα 3.1 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N / Ημέρας 2 (10mg/kg).....σελ.36	
Διαγράμματα 3.2 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N / Ημέρας 2 (100 mg/kg).....σελ.37	
Διαγράμματα 3.3 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N / Ημέρας 2 (10mg/kg).....σελ.37	
Διαγράμματα 3.4 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N / Ημέρας 2 (100mg/kg).....σελ.38	
Διαγράμματα 3.5 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N / Ημέρας 7(10mg/kg).....σελ.38	
Διαγράμματα 3.6 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N / Ημέρας 7(100mg/kg).....σελ.39	
Διαγράμματα 3.7 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N / Ημέρας 7(10mg/kg).....σελ.40	
Διαγράμματα 3.8 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N / Ημέρας 7(100mg/kg).....σελ.40	
Διαγράμματα 3.9 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N / Ημέρας 14(10mg/kg).....σελ.41	
Διαγράμματα 3.10 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N / Ημέρας 14(100mg/kg).....σελ.42	
Διαγράμματα 3.11 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N / Ημέρας 14(10mg/kg).....σελ.42	
Διαγράμματα 3.12 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N / Ημέρας 14(100mg/kg).....σελ.43	
Διαγράμματα 3.13 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N / Ημέρας 21(10mg/kg).....σελ.43	
Διαγράμματα 3.14 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N / Ημέρας 21(100mg/kg).....σελ.44	
Διαγράμματα 3.15 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N / Ημέρας 21(10mg/kg).....σελ.45	
Διαγράμματα 3.16 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N Ημέρας 21(100mg/kg).....σελ.45	
Διαγράμματα 3.17 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N Μέτρηση1- 40°C(έδαφος1).....σελ.46	
Διαγράμματα 3.18– Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NO_3^- -N Μέτρηση1- 40°C(έδαφος3).....σελ.47	
Διαγράμματα 3.19 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων NH_4^+ -N Μέτρηση1- 40°C(έδαφος1).....σελ.47	

Διαγράμματα 3.20 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων $\text{NH}_4^+\text{-N}$ Μέτρηση 1-40°C(έδαφος3).....σελ.48	σελ.48
Διαγράμματα 3.21 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων $\text{NO}_3\text{-N}$ Μέτρηση 2-40°C(έδαφος1).....σελ.48	σελ.48
Διαγράμματα 3.22 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων $\text{NO}_3\text{-N}$ Μέτρηση 2-40°C(έδαφος3).....σελ.49	σελ.49
Διαγράμματα 3.23 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων $\text{NH}_4^+\text{-N}$ Μέτρηση 2-40°C(έδαφος1).....σελ.49	σελ.49
Διαγράμματα 3.24 – Μέσων Όρων Συγκεντρώσεων $\text{NH}_4^+\text{-N}$ Μέτρηση 2-40°C(έδαφος3).....σελ.50	σελ.50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 - Οι κυριότεροι μετασχηματισμοί στον κύκλο του N.....	σελ.9
Εικόνα 1.2 - Τα μονοπάτια νιτροποίησης αυτότροφων μικροοργανισμών...	σελ.14
Εικόνα 1.3 - Σχέση Θερμοκρασίας, pH και βιομάζας κατά τη νιτροποίηση..	σελ.18
Εικόνα 1.4 - Ο βιογεωχημικός κύκλος του N σε χερσαία οικοσυστήματα.....	σελ.26
Εικόνα 2.1 - Τα δείγματα εδάφους και τα φιαλίδια του πειράματος.....	σελ.33
Εικόνα 2.2 - Τα falcons εντός των αεροστεγών δοχείων όπου έγινε η εφαρμογή του παρεμποδιστή.....	σελ.34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

1.1 Ο Βιογεωχημικός Κύκλος του Αζώτου (N)

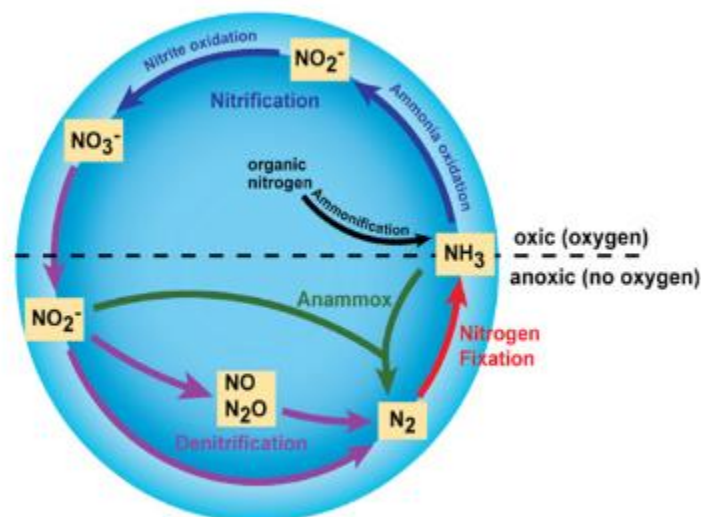
Το άζωτο (N) είναι ένα από τα βασικά θρεπτικά στοιχεία που είναι κρίσιμα για την ανάπτυξη και επιβίωση των ζωντανών οργανισμών. Είναι απαραίτητο συστατικό πολλών βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών, του DNA και της χλωροφύλλης. Αν και το N είναι άφθονο στην ατμόσφαιρα ως μοριακό άζωτο (N_2), είναι σε μεγάλο βαθμό μη διαθέσιμο σε αυτή τη μορφή στους περισσότερους οργανισμούς, καθιστώντας το N το στοιχείο που καθορίζει την πρωτογενή παραγωγικότητα σε πολλά οικοσυστήματα. Μόνο όταν το N μετατρέπεται από N_2 σε αμμωνία (NH_3), τίθεται στη διάθεση των πρωτογενών παραγωγών, όπως τα φυτά ή τους μικροοργανισμούς.

Εκτός από τα N_2 και NH_3 , το N υπάρχει σε πολλές διαφορετικές μορφές, συμπεριλαμβανομένων τόσο των ανόργανων (π.χ. αμμωνίας, νιτρικών, νιτρωδών) όσο και των οργανικών μορφών (π.χ. αμινο- και νουκλεϊνικά οξέα, πρωτεΐνες). Έτσι, το N υφίσταται πολλούς διαφορετικούς μετασχηματισμούς στα οικοσυστήματα, αλλάζοντας από τη μια μορφή στην άλλη, καθώς οι οργανισμοί το χρησιμοποιούν για την ανάπτυξη τους και, σε ορισμένες περιπτώσεις, για την παραγωγή ενέργειας. Οι κύριοι μετασχηματισμοί του N είναι η αζωτοδέσμευση, η νιτροποίηση, η απονιτροποίηση, η αναερόβια οξείδωση NH_3 (anammox) και η αναγωγή του νιτρικού αζώτου σε NH_3 (αμμωνιοποίηση). Ο μετασχηματισμός του N σε διαφορετικές καταστάσεις οξείδωσης είναι καθοριστικής σημασίας για την παραγωγικότητα της βιόσφαιρας και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις δραστηριότητες μιας ποικίλης συνάθροισης μικροοργανισμών, όπως τα βακτήρια, τα αρχαία και οι μύκητες.

Από τα μέσα της δεκαετίας του 1900, οι άνθρωποι ασκούν συνεχώς αυξανόμενη

επίδραση στον παγκόσμιο κύκλο N. Δραστηριότητες, όπως η παραγωγή λιπασμάτων και η καύση ορυκτών καυσίμων, έχουν αλλάξει σημαντικά την διαθεσιμότητα N στα οικοσυστήματα της Γης. Στην πραγματικότητα, προβλέπεται ότι μέχρι το 2030, η ανθρωπογενής επίδραση στον κύκλο του N θα υπερβεί εκείνη που καθορίζεται από τις μικροβιακές διεργασίες.

Η αυξανόμενη διαθεσιμότητα N μπορεί να μεταβάλλει τα οικοσυστήματα αυξάνοντας την πρωτογενή παραγωγικότητα και επηρεάζοντας την αποθήκευση άνθρακα (C). Λόγω της σημασίας του N στη λειτουργικότητα των οικοσυστημάτων και της σημαντικής επίδρασης από τις ανθρώπινες δραστηριότητες, το N και οι μετασχηματισμοί του έχουν λάβει μεγάλη ερευνητική προσοχή τα τελευταία έτη.



Εικόνα 1.1. Οι κύριοι μετασχηματισμοί στον κύκλο του N. (Bernhard, 2010)

1.2 Βιολογική Δέσμευση N

Το αέριο άζωτο (N_2) αποτελεί σχεδόν το 80% της ατμόσφαιρας της Γης, αλλά το N αυτό είναι πρακτικά μη διαθέσιμο στα έμβια όντα. Αυτό συμβαίνει επειδή τα φυτά και οι (μικρο)οργανισμοί δεν είναι σε θέση να χρησιμοποιούν το N_2 . Για να είναι διαθέσιμο το N για τη σύνθεση πρωτεϊνών, DNA και άλλων βιολογικών σημαντικών ενώσεων, πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε διαφορετική χημική μορφή. Η διαδικασία μετατροπής του N_2 σε βιολογικά διαθέσιμο N ονομάζεται δέσμευση N_2 . Το αέριο N_2 είναι μια πολύ σταθερή ένωση λόγω της ισχύος του τριπλού δεσμού μεταξύ των ατόμων N και απαιτεί μεγάλη ποσότητα ενέργειας για να σπάσει αυτόν τον δεσμό. Η όλη διαδικασία απαιτεί οκτώ ηλεκτρόνια και τουλάχιστον δεκαέξι μόρια ATP. Ως αποτέλεσμα, μόνο μια επιλεγμένη ομάδα προκαρυωτών είναι σε θέση να πραγματοποιήσει αυτήν την ενεργειακά απαιτητική διεργασία.

Το κύριο μονοπάτι δέσμευσης N αποτελούν οι μικροοργανισμοί και ειδικότερα ορισμένα γένη βακτηρίων, κάποιο ποσοστό N_2 μπορεί να σταθεροποιηθεί ωστόσο αβιοτικά με κεραυνούς ή με ορισμένες βιομηχανικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της καύσης ορυκτών καυσίμων. (Ward, 2008)

Ορισμένοι οργανισμοί που δεσμεύουν το N_2 διαβιούν ελεύθερα, ενώ άλλοι είναι συμβιωτικοί, οι οποίοι απαιτούν μια στενή σχέση με έναν φυτό ξενιστή για να πραγματοποιήσουν την εν λόγω διαδικασία. Οι περισσότεροι συμβιωτικοί οργανισμοί έχουν αρκετά πολύπλοκους μηχανισμούς. Για παράδειγμα, τα εκχυλίσματα από την ρίζα των φυτών των οσπρίων (π.χ. μπιζέλια, τριφύλλια, σόγια) χρησιμεύουν ως "σήματα" για ορισμένα είδη βακτηρίων του γένους *Rhizobium*. Αυτά τα σήματα προσελκύουν τα βακτήρια στις ρίζες, τα οποία και σχηματίζουν εκεί όζους, και στη συνέχεια μέσα από μια περίπλοκη σειρά συμβάντων ξεκινά η πρόσληψη των βακτηρίων από το φυτό και η ενεργοποίηση της αζωτοδέσμευσης .

Μερικά από αυτά τα βακτήρια είναι αερόβια, άλλα είναι αναερόβια. Μερικά είναι

φωτοτροφικά, άλλα είναι χημειοτροφικά. Αν και υπάρχει μεγάλη φυσιολογική και φυλογενετική ποικιλομορφία μεταξύ των οργανισμών που πραγματοποιούν δέσμευση του N_2 , όλοι έχουν ένα παρόμοιο σύμπλεγμα ενζύμων, την νιτρογενάση (nitrogenase), - που καταλύει τη μετατροπή του N_2 σε NH_3 και η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενετικός δείκτης για τον προσδιορισμό του δυναμικού για τη σταθεροποίηση του N.

Ένα από τα χαρακτηριστικά της νιτρογενάσης είναι ότι το σύμπλεγμα ενζύμου είναι πολύ ευαίσθητο στο O_2 και απενεργοποιείται στην παρουσία του. Αυτό αναγκάζει τους αερόβιους αζωτούχους παράγοντες και ιδιαίτερα τους φωτοσυνθετικούς αερόβιους δεσμευτές N που παράγουν O_2 , να αναπτύξουν διάφορους μηχανισμούς για την προστασία της νιτρογενάσης από αυτό.

Για παράδειγμα, μερικά κυανοβακτήρια αναπτύσσουν δομές που ονομάζονται ετεροκύστες και παρέχουν ένα περιβάλλον με χαμηλή περιεκτικότητα σε O_2 για την λειτουργία του ένζυμου, χρησιμεύοντας ως η θέση όπου λαμβάνει χώρα η δέσμευση του N_2 σε αυτούς τους οργανισμούς. Άλλοι φωτοσυνθετικοί δεσμευτές N ενεργοποιούν το ένζυμο της νιτρογενάσης μόνο τη νύχτα όταν τα φωτοσυστήματα τους είναι αδρανή και δεν παράγουν O_2 . Τα γονίδια που κωδικοποιούν την νιτρογενάση κατανέμονται σε μικροοργανισμούς που διαβιούν σε πολλά αερόβια οικοσυστήματα (π.χ. ωκεανοί, λίμνες, εδάφη) καθώς και σε οικοσυστήματα που μπορεί να είναι αναερόβια ή μικροαεροφιλικά.

Η ευρεία κατανομή των μικροοργανισμών που δεσμεύουν το N υποδηλώνει ότι οι οργανισμοί αυτοί εμφανίζουν λειτουργικότητα σε ένα πολύ ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως και αναμένεται για μια διαδικασία που είναι κρίσιμη για την επιβίωση της ζωής στη Γη.

1.3 Νιτροποίηση

Νιτροποίηση, ονομάζεται η βιολογική διεργασία της μετατροπής της αμμωνίας (NH_3) ή του αμμώνιου (NH_4^+), σε νιτρώδη ($\text{NO}_2\text{-N}$) και νιτρικά ($\text{NO}_3\text{-N}$) και είναι απαραίτητη στον κύκλο του N σε φυσικά, βιομηχανικά και γεωργικά συστήματα. Τα νιτρικά ανιόντα (NO_3^-), το τελικό προϊόν της διαδικασίας της νιτροποίησης, είναι η κύρια βιοδιαθέσιμη μορφή N στα θαλασσινά οικοσυστήματα. Επικράτηση υψηλών ρυθμών νιτροποίησης στα γεωργικά συστήματα μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαθεσιμότητας N καθώς και σε ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων πηγών νερού.

Μέχρι το 1890 και για περισσότερα από 100 χρόνια, υπήρχε η αντίληψη ότι μόνο βακτηριακοί νιτροποιητές ήταν ικανοί να πραγματοποιήσουν *αυτότροφη νιτροποίηση*. Ύστερα από απομόνωση των AOB (ammonia oxidizing bacteria) και των NOB (nitrite oxidizing bacteria) ανακαλύφθηκε ότι είναι αυτότροφα και ικανά να πραγματοποιήσουν οξείδωση του NH_4^+ , αρχικά σε $\text{NO}_2\text{-N}$ και στην συνέχεια σε $\text{NO}_3\text{-N}$. (Strong et al., 1999)

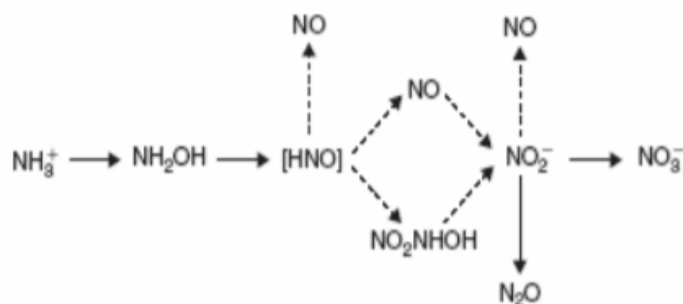
Ωστόσο, μέσα στην δεκαετία του '90, έγιναν σημαντικές ανακαλύψεις όσον αφορά τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στην νιτροποίηση και πιο συγκεκριμένα ανακαλύφθηκαν οργανισμοί ικανοί να κάνουν *αναερόβια οξείδωση της* NH_3 . (Bottomley et al., 2015) (Taylor et al., 2017)

Επιπρόσθετα, ακόμα πιο πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι πολλοί, αν όχι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που συντελούν στην οξείδωση της NH_3 στους ωκεανούς, αλλά και σε πολλά χερσαία οικοσυστήματα είναι τα αρχαιοβακτήρια. (Bottomley et al., 2015) (Taylor et al., 2017). Προφανώς αυτές οι ανακαλύψεις τα τελευταία 15 χρόνια έχουν αλλάξει την οπτική γύρω από τον κύκλο του N και της νιτροποίησης, προσδίδοντας τους νέο ενδιαφέρον.

Η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα αερόβια και εκτελείται αποκλειστικά από προκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Υπάρχουν δύο διαφορετικά στάδια νιτροποίησης που πραγματοποιούνται από διαφορετικούς τύπους μικροοργανισμών.

Το πρώτο στάδιο είναι η οξείδωση της NH_3 σε $\text{NO}_2\text{-N}$ η οποία διεξάγεται από μικροοργανισμούς γνωστούς ως οξειδωτές της NH_3 . Οι αερόβιοι οξειδωτές NH_3 μετατρέπουν την NH_3 σε $\text{NO}_2\text{-N}$ μέσω της ενδιάμεσης σύνθεσης υδροξυλαμίνης, μια διαδικασία που απαιτεί δύο διαφορετικά ένζυμα, την μονοοξυγενάση της NH_3 (ammonia monooxygenase) και την οξειδο-αναγωγάση της υδροξυλαμίνης (hydroxylamine oxidoreductase). Η διαδικασία δημιουργεί μια πολύ μικρή ποσότητα ενέργειας σε σχέση με άλλους τύπους μεταβολισμού. Επιπλέον, οι αερόβιοι οξειδωτές NH_3 είναι αυτότροφοι, οι οποίοι χρησιμοποιούν CO_2 για να συνθέσουν οργανικές ενώσεις, όπως οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, με την διαφορά ότι χρησιμοποιούν την NH_3 ως πηγή ενέργειας και όχι το φως.

Αντίθετα με τη δέσμευση του N, που πραγματοποιείται από πολλά διαφορετικά είδη μικροοργανισμών, η οξείδωση NH_3 κατανέμεται λιγότερο ευρέως μεταξύ των προκαρυωτικών. Μέχρι πρόσφατα κυριαρχούσε η πεποίθηση ότι η οξείδωση NH_3 διεξάγεται μόνο με λίγα είδη βακτηρίων στα γένη *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* και *Nitrosococcus*. Ωστόσο, το 2005 ανακαλύφθηκε ένας μικροοργανισμός, που κατατάσσεται στα Αρχαία, και μπορεί να οξειδώσει NH_3 . (Konneke, 2005). Από την ανακάλυψή τους, τα αμμώνιο-οξειδωτικά αρχαία, βρέθηκαν συχνά να ξεπερνούν σε πληθυσμό τα βακτήρια οξείδωσης NH_3 σε πολλά ενδιαιτήματα. Τα τελευταία χρόνια, τα αμμώνιο-οξειδωτικά αρχαία έχουν βρεθεί να είναι άφθονα σε ωκεανούς, εδάφη και αλμυρά έλη, γεγονός που υποδηλώνει σημαντικό ρόλο στον κύκλο N για αυτούς τους νεοανακαλυφθέντες οργανισμούς. Επί του παρόντος, μόνο ένα είδος αμμώνιο-οξειδωτικού αρχαίου έχει αναπτυχθεί σε καθαρή καλλιέργεια, το *Nitrosopumilus maritimus*, οπότε η κατανόηση της φυσιολογίας, βιοχημείας και μοριακής βιολογίας τους παραμένει περιορισμένη.



Εικόνα 1.2. Μονοπάτια νιτροποίησης αυτοτροφικών μικροοργανισμών. (Οι διακεκομμένες γραμμές αφορούν μη επιβεβαιωμένα μονοπάτια) (Firestone et al. , 1989)

Το δεύτερο στάδιο της νιτροποίησης είναι η οξείδωση του ($\text{NO}_2\text{-N}$) σε ($\text{NO}_3\text{-N}$)

Το βήμα διεξάγεται από μία πλήρως ξεχωριστή ομάδα προκαρυωτικών οργανισμών, γνωστή ως βακτήρια οξειδώσεως νιτρωδών. Ορισμένα από τα γένη που εμπλέκονται στην οξείδωση των $\text{NO}_2\text{-N}$ αποτελούν τα *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *Nitrococcus* και *Nitrospina*. Παρόμοια με τους οξειδωτές NH_3 , η ενέργεια που παράγεται από την οξείδωση των $\text{NO}_2\text{-N}$ σε $\text{NO}_3\text{-N}$ είναι πολύ μικρή και επομένως οι αποδόσεις της ανάπτυξης είναι πολύ χαμηλές. Στην πραγματικότητα, οι οξειδωτές NH_3 και $\text{NO}_2\text{-N}$ πρέπει να οξειδώσουν πολλά μόρια NH_3 ή $\text{NO}_2\text{-N}$ για να σταθεροποιήσουν ένα μόριο CO_2 . Για πλήρη νιτροποίηση, πρέπει να πραγματοποιηθεί οξείδωση NH_3 και οξείδωση $\text{NO}_2\text{-N}$

Οι οξειδωτές NH_3 και οι οξειδωτές $\text{NO}_2\text{-N}$ είναι αρκετά διαδεδομένοι σε αερόβια περιβάλλοντα. Έχουν μελετηθεί εκτενώς σε φυσικά περιβάλλοντα όπως είναι τα εδάφη, οι εκβολές ποταμών, οι λίμνες και τα ανοικτά ωκεάνια περιβάλλοντα. Ωστόσο, οι οξειδωτές NH_3 και $\text{NO}_2\text{-N}$ παίζουν επίσης έναν πολύ σημαντικό ρόλο στις εγκαταστάσεις

επεξεργασίας λυμάτων, αφαιρώντας δυνητικά επιβλαβή επίπεδα NH_4^+ , που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη ρύπανση των υδάτων υποδοχής. Πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στον τρόπο διατήρησης σταθερών πληθυσμών αυτών των σημαντικών μικροβίων σε μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων.

Επιπρόσθετα, οι οξειδωτές NH_3 και $\text{NO}_2\text{-N}$ βοηθούν στη διατήρηση της ποιότητας νερού των ενυδρείων διευκολύνοντας την απομάκρυνση των δυνητικά τοξικών αμμωνιών που εκκρίνονται στα ούρα των ψαριών. (Ward, 2008)

1.3.1 Αυτότροφοι μικροοργανισμοί που συμβάλλουν στη νιτροποίηση

Τα καλλιεργημένα AOB και NOB παρείχαν τη βάση για την διερεύνηση της φυσιολογίας και της βιοχημείας της νιτροποίησης για δεκαετίες. Χαρακτηριστικά της γενικής φυσιολογίας των νιτροποιητικών μικροοργανισμών, όπως συγκεκριμένη απαίτηση σε O_2 προκειμένου να οξειδωθεί η NH_3 αλλά ανοχή πολύ χαμηλού O_2 και ευαισθησία σε ανοχή από το φως, παρατηρήθηκαν στα φυσικά συστήματα.

Όταν η νιτροποίηση πραγματοποιείται από αυτότροφους μικροοργανισμούς, διεξάγεται σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση τα AOB των γενών *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* και *Nitrosococcus* καταλύουν την οξείδωση της $\text{NH}_4^+\text{-N}$ σε $\text{NO}_2\text{-N}$. Στη δεύτερη φάση τα NOB του γένους *Nitrobacter*, καταλύουν την οξείδωση των $\text{NO}_2\text{-N}$ σε $\text{NO}_3\text{-N}$. (Irigoyen et al. , 2003)

Η οξείδωση της NH_3 σε $\text{NO}_2\text{-N}$ δεν πραγματοποιείται μόνο από βακτήρια αλλά και άλλους μικροοργανισμούς που έχουν το ένζυμο της AMO, όπως αυτοί που ανήκουν στο φύλο των *Thaumarchaeota*, της τάξης των αρχαίων, που έχουν βρεθεί σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα. (Konneke, 2005)

Αν και δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός της οξείδωσης της NH_3 , (Kim et al. , 2011) έχει αναφερθεί ότι τα διάφορα υποστρώματα έχουν τη δυνατότητα να δρουν ανταγωνιστικά ή μη ανταγωνιστικά με τη NH_3 (McCarty, 1999) . Στην περίπτωση των

υποστρωμάτων με ανταγωνιστική δράση, αυτά συνδέονται και οξειδώνονται στο ενεργό μέρος του ενζύμου, εκεί ακριβώς που οξειδώνεται η NH_3 με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η νιτροποίηση .

Τα μη ανταγωνιστικά υποστρώματα συνδέονται σε διαφορετικό σημείο της ΑΜΟ από αυτό στο οποίο οξειδώνεται η NH_3 με αποτέλεσμα η νιτροποίηση να διενεργείται με χαμηλούς ρυθμούς.

Σε διάφορες μελέτες έχει αναφερθεί ότι ο πληθυσμός των ΑΟΑ είναι μεγαλύτερος από τα ΑΟΒ και αυτό μπορεί να σχετίζεται με το γεγονός ότι τα ΑΟΑ έχουν πιο σημαντικό ρόλο στη νιτροποίηση, κάτι που χρειάζεται να διερευνηθεί με περισσότερες μελέτες. (Prosser et al. , 2008)

Στην πρώτη φάση της νιτροποίησης παράγονται ενδιάμεσα προϊόντα που μπορούν να δώσουν αέριες ενώσεις Ν της μορφής N_xO οι οποίες να ενισχύουν το φαινόμενο θερμκηπίου (Lipschultz et al. , 1981).

1.3.2. Κινητική της Νιτροποίησης

Η ανάπτυξη των απαραίτητων αυτότροφων μικροοργανισμών για την νιτροποίηση εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις O_2 , C, αμμωνιακού υποστρώματος, την θερμοκρασία και την τιμή του pH. Η τιμή του ρυθμού νιτροποίησης καθορίζεται κατά κύριο λόγο από την συγκέντρωση αυτών των αυτότροφων μικροοργανισμών.

Οι παρακάτω εξισώσεις περιγράφουν την κινητική της νιτροποίησης (Αιβαζίδης, 2000) :

$$\mu = \mu_{\max, \text{AO}} \frac{S_{\text{NH}_3}}{(K_{m, \text{NH}_3, \text{AO}} + S_{\text{NH}_3})} \cdot \frac{S_{\text{O}_2}}{K_{m, \text{O}_2, \text{AO}} + S_{\text{O}_2}} \cdot \frac{S_{\text{CO}_2}}{K_{m, \text{CO}_2, \text{AO}} + S_{\text{CO}_2}} - m_{\text{AO}} Y_{(X / \Delta N) \max, \text{AO}}$$

$$\mu = \mu_{\max, \text{NO}} \frac{S_{\text{HNO}_2}}{K_{m, \text{HNO}_2, \text{AO}} + S_{\text{HNO}_2}} \cdot \frac{S_{\text{O}_2}}{K_{m, \text{O}_2, \text{AO}} + S_{\text{O}_2}} \cdot \frac{S_{\text{CO}_2}}{K_{m, \text{CO}_2, \text{AO}} + S_{\text{CO}_2}} - m_{\text{AO}} Y_{(X / \Delta N) \max, \text{NO}}$$

1.3.3 Περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την νιτροποίηση

Όταν η ποικιλία των ειδών είναι μικρή, όπως στην περίπτωση της νιτροποίησης, ένας μόνο περιβαλλοντικός καθοριστικός παράγοντας μπορεί να έχει μετρήσιμη και σημαντική επίδραση στους μικροοργανισμούς και στο ρυθμό που γίνεται η νιτροποίηση. Ωστόσο, η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ δύο ή περισσότερων περιβαλλοντικών παραγόντων τείνει συχνά να αποφέρει αποτελέσματα τα οποία μεταξύ ανεξάρτητων μελετών φαίνεται να είναι αντιφατικά.

Για παράδειγμα η επίδραση της θερμοκρασίας στις βιολογικές διεργασίες από μόνη της είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει τη διαλυτότητα του O_2 . Όμως και τα διαθέσιμα οργανικά μπορεί να χρησιμεύσουν ως αναγωγικό για το O_2 και τα οξειδία του N, με τη μείωση του τελευταίου να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το ρυθμό μείωσης του πρώτου. Ταυτόχρονα όμως αν το εξετάσουμε από την βιοχημική ή την φυσική πλευρά, φαίνεται ότι ο ρυθμός μείωσης του O_2 εξαρτάται καθαρά από την θερμοκρασία (οξείδωση του υποστρώματος, διαλυτότητα, διάχυση) .

Η νιτροποίηση επηρεάζεται από ένα αριθμό περιβαλλοντικών παραμέτρων οι οποίοι με συντομία μπορούν να συνοψιστούν στους παρακάτω σημαντικότερους:

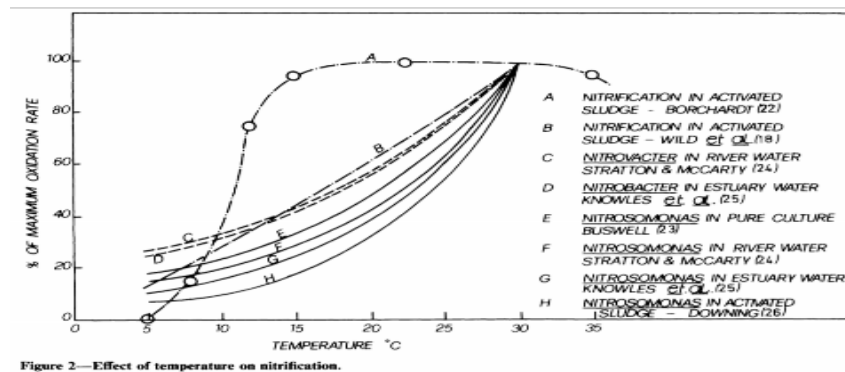
- Θερμοκρασία:

Η αύξηση της θερμοκρασίας προκαλεί την αύξηση της νιτροποίησης. Η πιο ιδανική θερμοκρασία στην οποία μπορεί να γίνει νιτροποίηση κυμαίνεται μεταξύ 25-35°C για είδη του γένους *Nitrosomonas*, αλλά και για τα *Nitrobacter*. Σε θερμοκρασίες πιο χαμηλές από 5 °C ή υψηλότερη από 35 °C δεν παρατηρείται δραστηριότητα για τα *Nitrosomonas* και σε θερμοκρασίες μικρότερες από 5 °C ή μεγαλύτερες από 40 °C για τα *Nitrobacter*.

Ο ρυθμός ανάπτυξης φτάνει κοντά στον διπλασιασμό για κάθε αύξηση θερμοκρασίας κατά 10 °C, αλλά πέρα από τους 30 °C αρχίζει η μείωση. Στους 38 °C ο ρυθμός νιτροποίησης γίνεται ίδιος με τους 5 °C, ενώ στους 49°C τα νιτροποιητικά

βακτήρια πεθαίνουν. Η νιτροποίηση έχει μείωση κατά 50% στους 18°C, κατά 75% στους 8-10°C, ενώ στους 4°C δεν υπάρχει καμία απολύτως λειτουργία.

Στους 0°C η δραστηριότητα των νιτροποιητικών βακτηρίων αναστέλεται. Οι μικροοργανισμοί αυτοί γενικά είναι ανθεκτικότεροι σε χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά σε συνθήκες υψηλότερης θερμοκρασίας η ενεργότητα τους μειώνεται λόγω του ότι λαμβάνει χώρα διάσπαση των πρωτεϊνών.



Εικόνα 1.3. Σχέσεις θερμοκρασίας, pH και βιομάζας κατά την νιτροποίηση (Nazih Kh. Shammas , 1986)

Το παραπάνω γράφημα, στην Εικόνα 1.3. δείχνει ότι ο ρυθμός νιτροποίησης έχει ένα φάσμα από 5°C μέχρι 35°C. Ο μεγαλύτερος ρυθμός παρατηρείται περίπου στους 30 °C. Η καμπύλη A δείχνει ότι δεν υπάρχει ακριβής βέλτιστη θερμοκρασία η οποία μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 15 °C και 35 °C. Ωστόσο σε θερμοκρασίες κάτω από 15 °C ο ρυθμός νιτροποίησης πέφτει πολύ απότομα και μειώνεται στο 50 % στους 12 °C.

Στην καμπύλη B του διαγράμματος παρατηρείται ότι μια κατά προσέγγιση ευθεία γραμμή σχηματίζεται μεταξύ του ρυθμού νιτροποίησης και θερμοκρασίας. Διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός στους 27 °C ήταν το 90% του ρυθμού στους 30 °C, και ο ρυθμός στους 17 °C ήταν το 50% του ρυθμού στους 30 °C . Διαφορές παρατηρούνται σε σχέση με το γράφημα A. Παρόμοια εξάρτηση από τη θερμοκρασία έχει αναφερθεί σε συστήματα νιτροποίησης και απονιτροποίησης που γίνονται σε ένα στάδιο.

Σύμφωνα με τον Bishop (Bishop P. L. , 1996) , το καλοκαίρι η αποδοτικότητα απομάκρυνσης ήταν 84% ενώ τον χειμώνα μειώθηκε στο 75%. Διερευνήθηκε ο ρυθμός ανάπτυξης για νιτροποιητές μεταξύ 7 °C και 26 °C και αναφέρθηκε μείωση 53% στους 5 °C και 21% στους 7 °C σε σύγκριση με το ρυθμό ανάπτυξης στους 26 °C .

Υπάρχουν επίσης διαθέσιμα δεδομένα όσον αφορά τις επιπτώσεις της θερμοκρασίας στην οξείδωση της NH_3 σε $\text{NO}_2^- \text{N}$ από το *Nitrosomonas*, όπως παρουσιάζεται στις καμπύλες (E,F,G,H), αλλά και από $\text{NO}_2^- \text{N}$ σε $\text{NO}_3^- \text{N}$ από το *Nitrobacter* (καμπύλες C,D). Και τα δύο είδη φαίνεται ότι επηρεάζονται παρόμοια από τη θερμοκρασία.

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι παρόλο που ο σχηματισμός $\text{NO}_2^- \text{N}$ και $\text{NO}_3^- \text{N}$ παρεμποδίζεται έντονα από θερμοκρασίες μικρότερες ή ίσες των 10 °C, το ανασταλτικό αποτέλεσμα της μειωμένης θερμοκρασίας είναι μεγαλύτερο για το *Nitrobacter* από ότι για το *Nitrosomonas* και αυτό έχει γίνει εμφανές λόγω συσσώρευσης $\text{NO}_2^- \text{N}$ σε αντιδραστήρες σε 12-14°C.

- pH του εδάφους:

Η νιτροποίηση σε έδαφος επηρεάζεται από τη διαθεσιμότητα ιόντων NH_3 στους πληθυσμούς νιτροποιητικών οργανισμών, η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από την ποιότητα της οργανικής ύλης του εδάφους, ιδιαίτερα του λόγου C/N. Υψηλοί λόγοι C/N οδηγούν στην ακινητοποίηση NH_3 . Το pH του εδάφους είναι ο κύριος παράγοντας που ρυθμίζει τη διαδικασία νιτροποίησης στα εδάφη. Η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα στο έδαφος σε pH που κυμαίνεται μεταξύ 5,5 και 10,0, με το βέλτιστο γύρω στα 8,5. Εντούτοις, έχει αναφερθεί νιτροποίηση που εμφανίζεται σε εδάφη με pH μόλις 3,8.

Η επίδραση του pH είναι ικανή να παρατηρηθεί από το γεγονός ότι με τη νιτροποίηση παράγονται ιόντα υδρογόνου (καταναλίσκεται αλκαλικότητα), με αποτέλεσμα το pH να πέφτει. Ο ρυθμός της νιτροποίησης μειώνεται σημαντικά για μικρές τιμές και ειδικότερα, για τιμές του pH χαμηλότερες του 6.8. Σε τιμές του pH κοντά στο 5,8 με 6, ο ρυθμός μπορεί να είναι 10-20 % χαμηλότερος του ρυθμού νιτροποίησης για pH ίσο με 7.

Ο Sahrawat (1982) μελέτησε τη νιτροποίηση σε 10 εδάφη έχοντας ένα αρκετά μεγάλο εύρος υφής, pH (3,4 έως 8,6), οργανικό C (12,2 έως 227,0 g ανά kg⁻¹) και TN (900 έως 12000 mg ανά kg⁻¹). Η συγκέντρωση NO₃⁻ που παράγονται στους 30°C, μετά από 4 εβδομάδες επώασης των εδαφών, ποίκιλλαν από 0 σε 123 mg ανά kg⁻¹ εδάφους. (Sahrawat, 1982). Σε εδάφη με pH μικρότερο από 5,0 δεν παρατηρήθηκε νιτροποίηση. Οργανικά εδάφη με pH 5,6 παρήγαγαν μόνο 5 mg N ανά kg⁻¹ εδάφους κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Σε εδάφη με pH υψηλότερο του 6,0 η νιτροποίηση ελάμβανε χώρα με ταχύ ρυθμό και η συγκέντρωση NO₃⁻ κυμαίνονταν από 98 έως 123 mg ανά kg⁻¹ εδάφους. (Sahrawat, 1982). Η συγκέντρωση των NO₃⁻, στα εδάφη συσχετίστηκε ιδιαίτερα θετικά με το pH του εδάφους ($r = 0,86$, $n = 10$, $P < 0,01$), αλλά δεν συσχετίστηκε σημαντικά με οργανικό C ή ολικό N. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έδειξε επίσης ότι στα NO₃⁻ ο σχηματισμός δεν συσχετίστηκε σημαντικά με το pH του εδάφους σε εδάφη με pH υψηλότερο από 6,0.

- [Διαθεσιμότητα του υποστρώματος](#)

Μεταξύ των φυσικών παραγόντων που επηρεάζουν τη νιτροποίηση, η διαθεσιμότητα και η προσβασιμότητα του υποστρώματος (NH₃) στα βακτήρια νιτροποίησης είναι κρίσιμη. Οι Strong, Sale, Helyar μελέτησαν την επίδραση του εδαφικού πλέγματος στην νιτροποίηση σε πολύ μικρούς, μη διαταραγμένους όγκους εδάφους, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε κατεργασία με υπόστρωμα, ξηράνθηκαν και εμπλουτίστηκαν ξανά με νερό και επωάστηκαν για 20 μέρες. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι ο άργιλος και η άμμος είχαν σημαντική επίδραση στην νιτροποίηση, ενώ η ιλύς όχι. (Strong et al., 1999)

Σε εδάφη που διατηρήθηκε συνεχής υγρασία, το ποσοστό της αργίλου είχε αρνητική σχέση με την νιτροποίηση, αλλά αυτή η σχέση ήταν θετική σε εδάφη που είχαν ξεραθεί και ξαναυγρανθεί. Σε περιόδους με σχετικά υψηλή υγρασία, τα εδάφη με περισσότερο άργιλο είναι ικανά να προστατεύσουν το οργανικό N καλύτερα. Η νιτροποίηση σε εδάφη

με υψηλή περιεκτικότητα σε άργιλο είναι υψηλότερη σε σχέση με εδάφη με χαμηλότερη περιεκτικότητα . (Strous et al. , 1999)

Υγρασία του εδάφους και αερισμός

Η επίδραση των επιμέρους περιβαλλοντικών παραγόντων στη νιτροποίηση, επιτυγχάνεται κυρίως με πειράματα υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Για παράδειγμα, στο σύστημα εδάφους η υγρασία του εδάφους και ο αερισμός ή τα επίπεδα O_2 ακολουθούν αντίθετες τάσεις. Η περιεκτικότητα σε O_2 στο έδαφος μειώνεται με την αύξηση της υγρασίας, καθώς οι περισσότεροι πόροι καταλαμβάνονται από το νερό και η αυξημένη υγρασία του εδάφους περιορίζει επίσης τη διάχυση του ατμοσφαιρικού αέρα στο έδαφος. Έτσι, οι βέλτιστες συνθήκες τόσο για την υγρασία όσο και για τον αερισμό είναι κρίσιμες για την πραγματοποίηση της νιτροποίησης στο έδαφος.

Τα νιτροβακτήρια είναι υποχρεωτικά αυτότροφα και παράγουν νιτρικά σε παρουσία μοριακού οξυγόνου καθώς η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε καλά αεριζόμενα εδάφη. Ο μέγιστος ρυθμός νιτροποίησης επιτυγχάνεται την στιγμή που η συγκέντρωση O_2 είναι περίπου 20% στον αέρα και αυτή η συγκέντρωση είναι παρόμοια με τη συγκέντρωση του στην ατμόσφαιρα. Η παρουσία του O_2 είναι απολύτως απαραίτητη για την ανάπτυξη τόσο των *Nitrosomonas* όσο και των *Nitrobacter*. Η ελάχιστη συγκέντρωση διαλυόμενου O_2 πρέπει να είναι 0.3mg/l ώστε να συντηρείται η νιτροποίηση.

1.3.4 Anammox

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ένας νέος μηχανισμός οξείδωσης NH_3 που λαμβάνει χώρα υπό ανοξικές συνθήκες (Strous et al. ,1999). Η διεργασία anammox (αναερόβια οξείδωση αμμωνίας) διεξάγεται από προκαρυωτικούς οργανισμούς που ανήκουν στο φύλο των Planctomycetes.

Το πρώτο περιγραφόμενο βακτήριο anammox ήταν το *Brocadia anammoxidans*. Τα βακτήρια Anammox οξειδώνουν την NH_3 χρησιμοποιώντας νιτρώδη ως δέκτη ηλεκτρονίων για να παράγουν N_2 . Ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε ανοξικούς

αντιδραστήρες εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, αλλά από τότε βρέθηκαν σε μια ποικιλία υδάτινων συστημάτων, συμπεριλαμβανομένων των ζωνών χαμηλού O_2 των ωκεανών, των ιζημάτων των παράκτιων υδάτων κι εκβολών ποταμών καθώς και των λιμνών γλυκού νερού. (Ward, 2008)

Σε ορισμένες περιοχές του ωκεανού, η διαδικασία αναμμοχ θεωρείται υπεύθυνη για σημαντική απώλεια N από τα οικοσυστήματα . Ωστόσο, ο Ward (2009) διαφωνεί για το αν η απονιτροποίηση αντί για αναμμοχ είναι υπεύθυνη για την απώλεια περισσότερου N σε άλλες περιοχές. Ανεξάρτητα από το αν η αναμμοχ ή η απονιτροποίηση κυριαρχούν στις απώλειες N στον ωκεανό, είναι σαφές ότι το αναμμοχ αντιπροσωπεύει μια σημαντική διαδικασία στον παγκόσμιο κύκλο του N. (Ward, 2008)

1.4 Απονιτροποίηση

Η απονιτροποίηση είναι η διεργασία που μετατρέπει τα νιτρικά σε N_2 , αφαιρώντας έτσι το βιοδιαθέσιμο N και επιστρέφοντάς το στην ατμόσφαιρα. Το αέριο N_2 είναι το τελικό προϊόν της απονιτροποίησης αλλά υπάρχουν και κάποιες ενδιάμεσες αέριες μορφές N. Μερικά από αυτά τα αέρια, όπως το N_2O , θεωρούνται αέρια θερμοκηπίου, αντιδρούν με το όζον και συμβάλλουν στην ατμοσφαιρική ρύπανση.

Σε αντίθεση με τη νιτροποίηση, η απονιτροποίηση είναι μια αναερόβια διαδικασία, η οποία απαντάται κυρίως σε εδάφη, ιζήματα και σε ανοξικές ζώνες σε λίμνες και ωκεανούς. Παρόμοια με τη σταθεροποίηση του N, η απονιτροποίηση διεξάγεται από μια διαφορετική ομάδα προκαρυωτικών και υπάρχουν πρόσφατες ενδείξεις ότι κάποιοι ευκαρυωτικοί είναι επίσης ικανοί για απονιτροποίηση. (Verstraete et al., 1977)

Ορισμένα βακτήρια απονιτροποίησης περιλαμβάνουν είδη στα γένη *Bacillus*, *Paracoccus* και *Pseudomonas*. Τα απονιτροποιητικά βακτήρια είναι χημειοργανοτρόφα και έτσι πρέπει να τροφοδοτούνται με κάποια μορφή οργανικού άνθρακα.

Η απονιτροποίηση είναι σημαντική επειδή αφαιρεί δεσμευμένο N από το

οικοσύστημα και το επιστρέφει στην ατμόσφαιρα σε βιολογικά αδρανή μορφή (N₂). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη γεωργία, όπου η απώλεια νιτρικών στα λιπάσματα είναι δαπανηρή. Ωστόσο, η απονιτροποίηση στην επεξεργασία λυμάτων παίζει πολύ θετικό ρόλο, αφαιρώντας τα ανεπιθύμητα νιτρικά άλατα από τα απόβλητα των λυμάτων, μειώνοντας έτσι τις πιθανότητες όπου το παραγόμενο νερό από τις μονάδες επεξεργασίας θα προκαλούσε ανεπιθύμητες συνέπειες στο περιβάλλον. (Verstraete et al., 1977)

1.4.1. Κινητική της Απονιτροποίησης

Η κινητική έκφραση που, εν γένει, περιγράφει την απονιτροποίηση διατυπώνεται με μία σχέση τύπου Monod. (Αιβαζίδης, 2000)

$$q_{DN} = q_{DN,max} \frac{S_{NO_x-N}}{(K_{m, DN} + S_{NO_x-N})} \cdot \frac{S_C}{K_{m,C} + S_C}$$

όπου:

q_{DN} : ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης [gNO_x-N / (gVSS·d)]

q_{DN,max} : μέγιστος ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης [gNO_x-N / (gVSS·d)]

S_{NO_x-N} : συγκέντρωση NO_x - -N (NO₂ - -N+NO₃ - -N) στο μικτό υγρό [mg/L]

K_{DN} : σταθερά ημικορεσμού αναφορικά με το NO_x - N [mg/L]

S_c : συγκέντρωση οργανικού υποστρώματος στο υγρό [mg/L]

$K_{m,c}$: σταθερά ημικορεσμού ως προς το ανθρακούχο υπόστρωμα [mg/L]

1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την Απονιτροποίηση

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απονιτροποίηση είναι κυρίως η υφή του εδάφους, οι κλιματικές συνθήκες, το pH, ο οργανικός C, η θερμοκρασία και το διαλυμένο οξυγόνο.

- Υφή του εδάφους

Αλλάζει τον ρυθμό απονιτροποίησης μέσω της επίδρασης που έχει στην υγρασία του εδάφους και το O_2 . Στην κορυφή του λόφου, στην πλαγιά, στην παρόχθια ζώνη ενός εδαφικού συστήματος, με δασική βλάστηση, παρατηρούνται κυμαινόμενες διαφορές .

- Οργανικός C

Ο οργανικός C έχει θετική επίδραση στον ρυθμό απονιτροποίησης. Δεν υπάρχει συγκεκριμένο όριο για τις τιμές του οργανικού C που να διατηρήσει ή να αυξήσει την διεργασία της απονιτροποίησης. Η έλλειψη μιας οριακής τιμής μπορεί να οφείλεται στον διπλό ρόλο του C στην απονιτροποίηση (δίνει ηλεκτρόνια και επιδρά στην βιοδιαθεσιμότητα O_2 του εδάφους).

- Θερμοκρασία

Η απονιτροποίηση συμβαίνει σε ένα μεγάλο φάσμα θερμοκρασίας (5- 50 °C) και είναι μια αυστηρά ανοξική διεργασία. Όταν μειώνεται η θερμοκρασία υπάρχει μείωση στο ρυθμό απονιτροποίησης και πλησιάζοντας στους 10 °C η απόδοση πέφτει κοντά στο

5%.

- [pH](#)

Ως ιδανική τιμή pH θεωρείται από 7,5-8,5 ενώ η μείωση του προς το όξινο περιβάλλον, επιβραδύνει τον ρυθμό απονιτροποίησης ενώ ευνοεί και την παραγωγή νιτρικών οξειδίων.

1.5 Παρεμπόδιση της Νιτροποίησης

Η διαθεσιμότητα N στις καλλιέργειες είναι καθοριστική όσον αφορά την παραγωγικότητα τους. Η δράση του N είναι καθοριστική επίσης και στα φυσικά οικοσυστήματα καθώς είναι περιοριστικός παράγοντας παραγωγικότητας, επηρεάζοντας και την ρύπανση του περιβάλλοντος. Για τον περιορισμό των απωλειών του N χρησιμοποιούνται μηχανισμοί ελέγχου του ρυθμού νιτροποίησης.

Σκοπός είναι τα οικοσυστήματα να γίνουν σταθερότερα και παραγωγικότερα. Με την πάροδο των χρόνων αναγκαία έγινε η μελέτη και έρευνα ώστε να αναπτυχθούν ενώσεις οι οποίες λειτουργούν παρεμποδιστικά στην λειτουργία της νιτροποίησης. Η παρεμπόδιση δεν πρέπει να διαταράσσει ωστόσο τις βιολογικές διαδικασίες απομάκρυνσης N.

Μελετώντας την δραστηριότητα του βακτηρίου *Nitrosomonas* ανακαλύφθηκαν χημικοί παράγοντες οι οποίοι αναστέλλουν την νιτροποίηση και επιτρέπουν την συσσώρευση αμμωνίου αντί για νιτρικά ιόντα στο έδαφος. Τέτοιοι παρεμποδιστές αποτελούν οι nitrapiryn και dicyandimide.

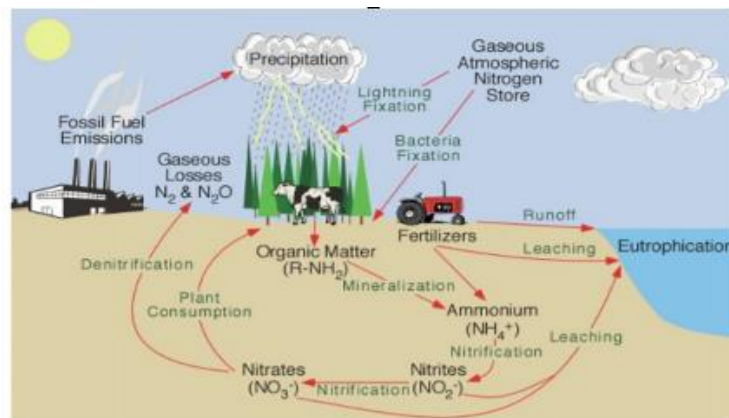
Αρκετές φορές είναι ζήτημα ο περιορισμός των διαδικασιών νιτροποίησης σε εδαφικές εκτάσεις που δέχονται λίπανση. Αυτό επιτυγχάνεται με τον έλεγχο του ποσοστού της ουρίας που υδρολύεται.

Όταν η νιτροποίηση έχει χαμηλό ρυθμό, η συγκέντρωση NH_4^+ στα εδάφη μπορεί να

φθάσει σε υψηλά επίπεδα και να έχει ανασταλτική δράση σε ομάδες βακτηρίων καθώς και στην βλάστηση. Όταν το pH του εδάφους και η θερμοκρασία έχουν υψηλή τιμή τότε η νιτροποίηση γίνεται γρηγορότερα.

Κατά τη μεταχείριση των εδαφών με παρεμποδιστή, το pH, το οποίο επιδρά στην ενεργότητα των ενζύμων, παίρνει μεγάλες τιμές κατά την δέσμευση του ενζύμου με το υπόστρωμα. (Rodgers , 1986)

Όσον αφορά την θερμοκρασία , η αύξηση της κάνει την νιτροποίηση γρηγορότερη, ωστόσο δρα ανασταλτικά στην δράση των παρεμποδιστών. Αύξηση από 10-30°C εμποδίζει τους παρεμποδιστές σε ποσοστά 6-62%.



Εικόνα 1.4. Ο βιογεωχημικός κύκλος του N σε χερσαία οικοσυστήματα

1.6 Νιτροποίηση στα Αγρέ-οικοσυστήματα

Αντιδράσεις που σχετίζονται με τον κύκλο του N στο περιβάλλον, έχουν σε μεγάλο βαθμό μελετηθεί από επιστήμονες που ασχολούνται με τις γεωργικές επιστήμες από τότε που το N και η λειτουργία του στο έδαφος συνδέθηκε με την παραγωγή τροφής και ινών.

Από τη στιγμή που τα νιτρικά είναι η μορφή N που αφομοιώνεται ευκολότερα από τα φυτά, τότε η διαδικασία της νιτροποίησης είναι κύρια παράμετρος της γονιμότητας του εδάφους.

Αν και η ανάπτυξη και ο μεταβολισμός των νιτροποιητών γίνονται σχετικά αργά, σε σύγκριση με την ετεροτροφική χλωρίδα, ο ρυθμός σχηματισμού νιτρικών προχωράει ταχύτερα από ό τι το φυτό μπορεί να αφομοιώσει το ανιόν και η περίσσεια νιτρικών μπορεί να διηθηθεί στα υπόγεια ύδατα. Οι αγρονομικές πρακτικές που επιβραδύνουν το ρυθμό σχηματισμού νιτρικών, αφορούν τη χρήση των λιπασμάτων αργής απελευθέρωσης, προσθήκη λιπασμάτων σε περισσότερες εφαρμογές, ή την χρήση αναστολέων νιτροποίησης.

Οι δύο πρώτες διαδικασίες ελαχιστοποιούν το ρυθμό της νιτροποίησης μειώνοντας ουσιαστικά τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Η τρίτη διαδικασία λειτουργεί άμεσα με αναστολή της αρχικής οξείδωσης του αμμωνίου. Με τον καιρό, ο αναστολέας αποικοδομείται από άλλους μικροοργανισμούς εδάφους και αρχίζει η νιτροποίηση. Στην ιδανική περίπτωση, θα προέκυπτε αποδόμηση και η νιτροποίηση θα ξεκινήσει όταν το φυτό αναπτύσσεται ενεργά. Ωστόσο, η επιτυχία αυτής της μεθόδου σχετίζεται με την ταχύτητα με την οποία η μικροχλωρίδα αποσυνθέτει τον αναστολέα.

Είναι αρκετά σαφές ότι η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα κοντά στην επιφάνεια του εδάφους αλλά υπάρχουν μεγάλες διακυμάνσεις σχετικά με το πού βρίσκονται οι ζώνες όπου λαμβάνει χώρα η απονιτροποίηση.

Το βάθος στο οποίο είναι πιθανότερο να εμφανιστεί απονιτροποίηση σε ένα προφίλ εδάφους, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από διάφορους παράγοντες: διαθέσιμη οργανική

ύλη, κατάλληλος πληθυσμός απονιτροποιητών, η συγκέντρωση νιτρικών και η επικράτηση ανοξικών συνθηκών. Οι τρεις πρώτοι παράγοντες είναι σχεδόν πάντα μεγαλύτεροι κοντά στην επιφάνεια και αυτό υποδεικνύει ότι το μεγαλύτερο μέρος των νιτρικών παράγεται είτε από την ανοργανοποίηση των οργανικών, είτε το N των λιπασμάτων απονιτροποιείται πριν φτάσει τις ρίζες των φυτών, εάν υπάρχουν ανοξικές ζώνες κοντά στην επιφάνεια του εδάφους.

Η ελαχιστοποίηση της απονιτροποίησης ώστε να αποφευχθεί μείωση του επιπέδου του N, αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αγρονομικά προβλήματα. Ο Deherain (1897) πρότεινε ότι η κοπριά και τα νιτρικά άλατα δεν πρέπει ποτέ να αναμιγνύονται μαζί, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι η κοπριά διεγείρει την αέρια απώλεια N. Η πρόταση του για προσθήκη κοπριάς κατά το φθινόπωρο και νιτρικών την άνοιξη ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες N, είναι μια χρήσιμη πρακτική ακόμα και στις μέρες μας.

Η αφθονία όσον αφορά τις ανοξικές ζώνες στους ορυζώνες είναι άλλος ένας λόγος για τον οποίον δεν χρησιμοποιούνται νιτρικά λιπάσματα και αντί για αυτά προτιμότερη είναι η χρήση λιπασμάτων αμμωνίου ή μειωμένου αζώτου. (Verstraete et al., 1977)

1.7 Νιτροποίηση στην επεξεργασία λυμάτων

Ο Eckenfelder (1967) υπολόγισε έναν χρόνο κατακράτησης ιλύος 2 ημερών για επαρκή νιτροποίηση των οικιακών λυμάτων (10-50 mg N / L). Μελέτες από τους Wong-Chong και Loehr (1975) έδειξαν ότι η οξειδωση αμμωνίου ήταν το στάδιο περιορισμού του ρυθμού, με ένα μέγιστο ποσοστό απομάκρυνσης περίπου 80 mg N / L/h. (Wong-Chong et al. , 1975)

Σε μικτή καλλιέργεια, η οξειδωση των NO₂-N από το Nitrobacter διπλασίασε αυτό το ρυθμό και τα NO₂-N δεν συσσωρεύτηκαν. Υπήρξε πλήρης οξειδωση της ουρίας και της καζείνης από μια συγκέντρωση 1000 mg N / L σε 40 ώρες με pH 7.0 και σε 45 ώρες με pH 8.0. Ο ελαφρώς μεγαλύτερος χρόνος στην τελευταία περίπτωση, οφειλόταν

προφανώς στην τοξικότητα της NH_3 στο *Nitrobacter*, όπως φαίνεται από τον μειωμένο ρυθμό οξειδωσης νιτρωδών, την αντίστοιχη αύξηση σε νιτρώδη άλατα, και την παρατεταμένη περίοδο καθυστέρησης. (Strous et al. , 1999)

1.8 Οικολογικές επιπτώσεις ανθρώπινης δραστηριότητας στον κύκλο του αζώτου

Πολλές ανθρώπινες δραστηριότητες έχουν σημαντικό αντίκτυπο στον κύκλο του N. Η καύση ορυκτών καυσίμων, η εφαρμογή λιπασμάτων με βάση το N και άλλες δραστηριότητες, μπορούν να αυξήσουν δραματικά την ποσότητα βιολογικώς διαθέσιμου N σε ένα οικοσύστημα.

Επειδή η διαθεσιμότητα N συχνά περιορίζει την πρωτογενή παραγωγικότητα πολλών οικοσυστημάτων, μεγάλες αλλαγές στη διαθεσιμότητα N μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές αλλοιώσεις του κύκλου του N τόσο στα υδρόβια όσο και στα χερσαία οικοσυστήματα. Η βιομηχανική σταθεροποίηση N έχει αυξηθεί εκθετικά από τη δεκαετία του 1940 και η ανθρώπινη δραστηριότητα έχει διπλασιάσει την ποσότητα της παγκόσμιας σταθεροποίησης N. (Vitousek, 1997)

Στα χερσαία οικοσυστήματα, η προσθήκη N μπορεί να οδηγήσει σε ανισορροπία θρεπτικών ουσιών στα δέντρα, αλλαγές στη δασική υγεία και μείωση της βιοποικιλότητας. Με αυξημένη διαθεσιμότητα N υπάρχουν συχνά διαφοροποιήσεις στην αποθήκευση του C, κάτι που έχει αντίκτυπο σε περισσότερες διεργασίες από τον κύκλο του N.

Σε αγροτικά συστήματα, τα λιπάσματα χρησιμοποιούνται εκτεταμένα για την αύξηση της φυτικής παραγωγής, αλλά το αχρησιμοποίητο N συνήθως με τη μορφή νιτρικών αλάτων, μπορεί να διέλθει από το έδαφος, να εισέλθει σε ρεύματα και ποτάμια και τελικά να εισέλθει στο πόσιμο νερό. Η διαδικασία παραγωγής συνθετικών λιπασμάτων για χρήση στη γεωργία, προκαλώντας την αντίδραση του N_2 με το H_2 , γνωστή ως διαδικασία Haber-Bosch, έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Στην πραγματικότητα, σήμερα, σχεδόν το 80% του N που βρέθηκε στους ανθρώπινους ιστούς προέρχεται από

τη διαδικασία Haber-Bosch. (Vitousek, 1997)

Μεγάλο μέρος του N που εφαρμόζεται στις γεωργικές και αστικές περιοχές εισέρχεται τελικά σε ποτάμια και παράκτια συστήματα. Σε θαλάσσια συστήματα που βρίσκονται κοντά στη θάλασσα, οι αυξήσεις του N μπορούν συχνά να οδηγήσουν σε ανοξικά (χωρίς O_2) ή υποξικά (χαμηλό O_2), αλλοιωμένη βιοποικιλότητα, μεταβολές στη δομή τροφικού ιστού και γενική υποβάθμιση των οικοτόπων.

Μια κοινή συνέπεια της αύξησης του N είναι η αύξηση των βλαβερών ανθών. Τα τοξικά άνθη ορισμένων ειδών διφωσφορούχων έχουν συνδεθεί με υψηλή θνησιμότητα ψαριών και οστρακοειδών σε ορισμένες περιοχές. Ακόμη και χωρίς τέτοιες οικονομικά καταστροφικές επιπτώσεις, η προσθήκη N μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη βιοποικιλότητα και τη σύνθεση των ειδών που μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη λειτουργία του συνόλου των οικοσυστημάτων.

Μερικοί έχουν ακόμη προτείνει ότι οι μεταβολές στον κύκλο του N μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένο κίνδυνο παρασιτικών και μολυσματικών ασθενειών μεταξύ ανθρώπων και άγριων ζώων. Επιπλέον, η αύξηση του N στα υδρόβια συστήματα μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη οξίνιση στα οικοσυστήματα γλυκού νερού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

2.1 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την αποσαφήνιση της συνεισφοράς των νιτροποιητικών οργανισμών και ειδικότερα των Βακτηρίων και Αρχαίων σε γεωργικά εδάφη. Ειδικότερα, προγενέστερη έρευνα είχε δείξει πολύ υψηλούς πληθυσμούς Αρχαίων στο σύνολο των γεωργικών εδαφών στην Κρήτη, ωστόσο η απόκριση των πληθυσμών σε εφαρμογή αμμωνιακών και η συνεισφορά τους στην νιτροποίηση παραμένει αβέβαιη. Για την επίτευξη του προαναφερόμενου στόχου στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν αναστολείς της ενεργότητας των Αρχαίων ώστε να ποσοτικοποιηθεί η σχετική συνεισφορά των Βακτηρίων και Αρχαίων στην νιτροποίηση.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν εδάφη από τέσσερα διαφορετικά θερμοκήπια Κουντούρα, τα οποία και συλλέχθηκαν κατά την περίοδο Σεπτεμβρίου – Οκτωβρίου 2018.

2.2 Διαδικασία Επεξεργασίας Δειγμάτων

Τα εδάφη μελετήθηκαν σε μικρόκοσμους (microcosms) προκειμένου να παρατηρηθεί καλύτερα η συμπεριφορά των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στη διεργασία της νιτροποίησης .

Αρχικά , τα εδάφη χωρίστηκαν ανάλογα με την προέλευσή τους.(Έδαφος 1, Έδαφος 2, Έδαφος 3 , Έδαφος 4). Τοποθετήθηκαν σε μεγάλα δοχεία, και δέχτηκαν εφαρμογή περίσσειας νερού ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια NO_3^- -N και να είναι πιο αξιόπιστη

η παρακολούθηση της διεργασίας της νιτροποίησης. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 2 φορές.

Στο επόμενο στάδιο τα εδάφη ομογενοποιήθηκαν και ακολούθησε κοσκίνισμα και απομάκρυνση μεγάλων συσσωματωμάτων και πετρών. Ακολούθησε η κατασκευή μικρόκοσμων εδάφους με 15g εδάφους.

Οι μικρόκοσμοι επωάσθηκαν στους 30° C και πραγματοποιήθηκαν σε αυτά πέντε διαφορετικές μετρήσεις προσδιορισμού των νιτρικών (ημέρες: 0, 2, 7, 14 και 21). Επιπλέον έγιναν και δύο ξεχωριστές μετρήσεις στα Εδάφη 1 και 3 (Μέτρηση I και II) τα οποία επωάσθηκαν στους 40° C, ώστε να μελετηθεί και η επίδραση της θερμοκρασίας στην νιτροποίηση.

Κατά την προετοιμασία των εδαφών τα μισά δείγματα από το κάθε έδαφος εμπλουτίστηκαν με 10 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$. Τα άλλα μισά δείγματα εμπλουτίστηκαν με 100 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

Σε κάθε δειγματοληψία προσδιορισμού των νιτρικών χρησιμοποιούνταν 3 μικρόκοσμου εδάφους από το κάθε έδαφος.



Εικόνα 2.1 Τα δείγματα εδάφους και τα φιαλίδια του πειράματος

2.3 Ο Παρεμποδιστής Νιτροποίησης 4 – Octyne

Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό κομμάτι, στην νιτροποίηση εκτός από τα AOB, συνεισφέρουν και τα AOA. Ωστόσο δεν είχε γίνει ξεκάθαρο το πώς συνεισφέρουν ακριβώς τα AOA στην νιτροποίηση. Σύμφωνα με έρευνες, βρέθηκε ότι η οξείδωση της αμμωνίας από κάποια AOB, σταμάτησε πολύ γρήγορα και μη αναστρέψιμα, με την χρήση μικρής συγκέντρωσης οκτανίου (C_8). Όσον αφορά τα AOA, βρέθηκε ότι έκθεση σε δόση οκτανίου μικρότερη από 20μl, η οξείδωση της αμμωνίας δεν επηρεάστηκε καθόλου. Το C_8 λοιπόν, είναι χρήσιμο για βραχυχρόνιες μελέτες, ώστε να διαχωριστεί η συνεισφορά των AOA και AOB στην νιτροποίηση.

Η χρήση του παρεμποδιστή έγινε με τον εξής τρόπο: Πρώτα τοποθετήθηκαν σε οχτώ φιαλίδια 7 ml $-C_8$ μαζί με 18 ml αέρα. Παράλληλα, τοποθετήθηκαν, ξεχωριστά, σε τέσσερα αεροστεγή δοχεία, 3 μικρόκοσμοι εδάφους από τον κάθε τύπο δείγματος εδάφους υπό διαφορετική διαθεσιμότητα υποστρώματος (NH_4^+-N) 10 mg/L και 100mg/L και έκλεισαν αεροστεγώς. Αφού ετοιμάστηκαν όλα τα παραπάνω, ακολούθησε μετάγγιση

δύο φιαλίδιων με παρεμποδιστή μέσω σύριγγας σε κάθε αεροστεγή δοχείο και έπειτα τα αεροστεγή δοχεία έκλεισαν μέχρι να γίνουν οι μετρήσεις νιτρικών και αμμωνιακών. Με τον ίδιο τρόπο προετοιμάστηκαν τα δείγματα με παρεμποδιστή και στις επόμενες μετρήσεις.



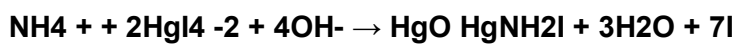
Εικόνα 2.2 Τα falcons εντός των αεροστεγών δοχείων όπου έγινε η εφαρμογή του παρεμποδιστή

2.3.1 Προσδιορισμός Αμμωνιακών και Νιτρικών

Το αμμωνιακό άζωτο ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) στα εδάφη βρίσκεται σε ανταλλάξιμη μορφή και μπορεί να εκχυλιστεί σε θερμοκρασία δωματίου με ένα ουδέτερο διάλυμα άλατος καλίου

(KCl συγκέντρωσης 2,0 M). Την εκχύλιση του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση για 45 min και ακολούθησε η διήθηση του εκχυλίσματος σε WhatmanTM FILTER PAPERS 42. Τέλος, η συγκέντρωση του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ προσδιορίζεται φωτομετρικά με τη μέθοδο Nessler σε μήκος κύματος 425 nm.

Η μέθοδος Nessler βασίζεται στο σχηματισμό συμπλόκου της αμμωνίας με αλκαλικό διάλυμα ιωδιούχου υδραργύρου. Ο προσδιορισμός των ιόντων αμμωνίου βασίζεται στην αντίδραση του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ με το αντιδραστήριο Nessler, οπότε σχηματίζεται ένα διπλό άλας χρώματος καφεκιτρίνου σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



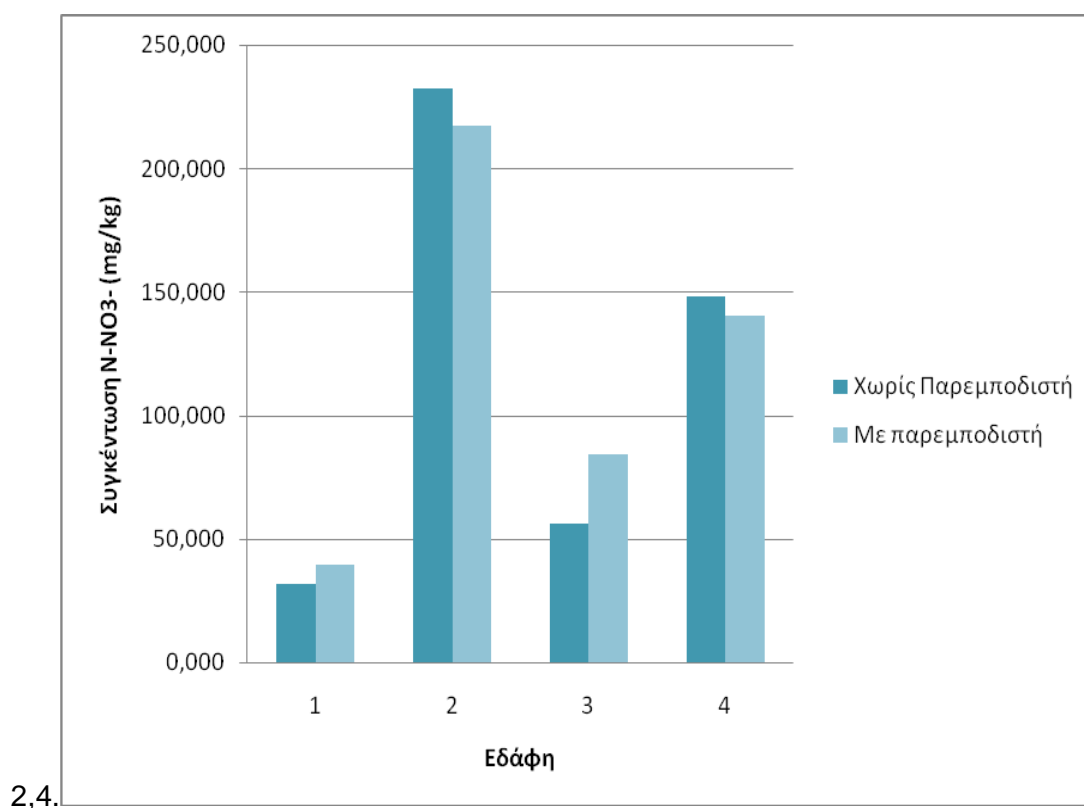
Το αντιδραστήριο Nessler ενδείκνυται για συγκεντρώσεις ιόντων αμμωνίου από 0.02 μέχρι 5 mg/l.

Το άζωτο υπό μορφή νιτρικών ($\text{NO}_3^- \text{-N}$) είναι υδατοδιαλυτό και για την εκχύλιση του χρησιμοποιήθηκε διάλυμα CaCl_2 συγκέντρωσης 0,01 M. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση για 45 min. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε διήθηση του εκχυλίσματος σε φίλτρα WhatmanTM FILTER PAPERS 42. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του $\text{N} - \text{NO}_3$ πραγματοποιήθηκε φασματοφωτομετρικά, σε μήκος κύματος 400 nm με χρήση του αντιδραστηρίου NitraVer[®] 5, Powder Pillow της εταιρείας HACH με εύρος προσδιορισμού τα 0-30 mg .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

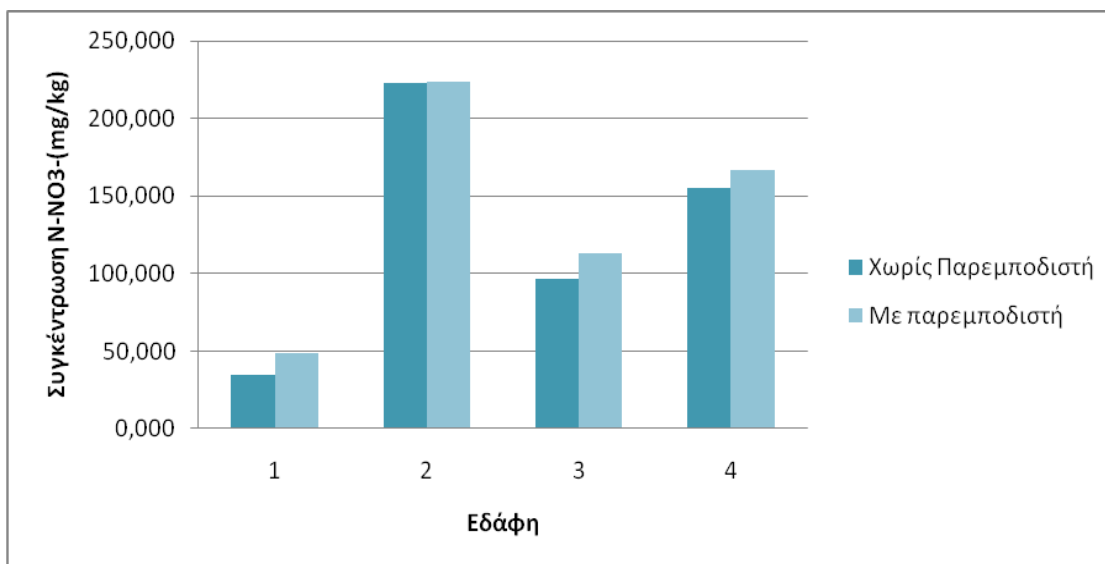
3.1 Διαγράμματα Μετρήσεων

Γενικά παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις με τον χρόνο, καθώς και την συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ στις μεταχειρίσεις. Την ημέρα 2 παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των $\text{NO}_3^- \text{-N}$ σε εδάφη που εφαρμόστηκε συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 10 mg (Γράφημα 3.1). Όσον αφορά τα εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή 100 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$, η συγκέντρωση του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ αυξήθηκε μόνο στα εδάφη που δεν έχει χρησιμοποιηθεί παρεμποδιστής. (Γράφημα 3.2). Τέλος, παρατηρούμε ότι στα εδάφη 1 και 3 η συγκέντρωση των νιτρικών ήταν αρκετά χαμηλότερη σε σχέση με το έδαφος



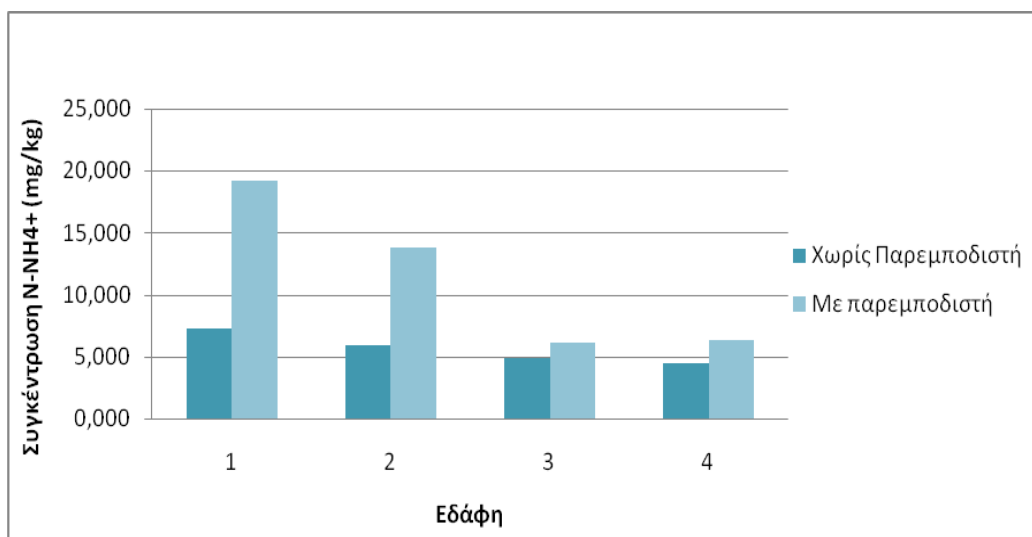
Γράφημα 3.1: Συγκέντρωση $\text{NO}_3^- \text{-N}$ σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 10

mg/kg

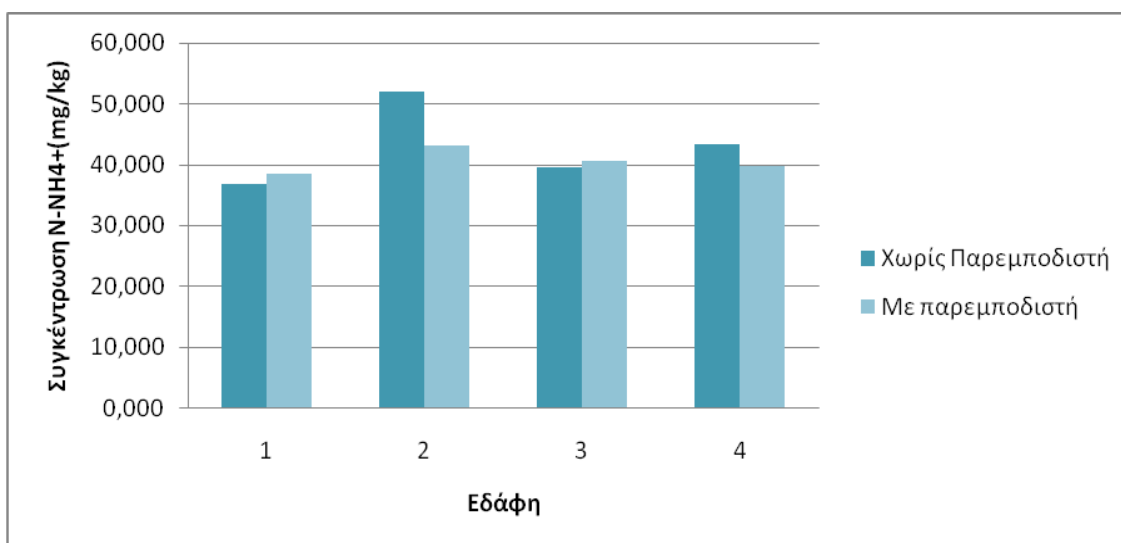


Γράφημα 3.2: Συγκέντρωση NO_3^- -N σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή NH_4^+ -N 10 mg/kg

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις NH_4^+ -N, αυτές παρουσιάζονται αυξημένες για τα εδάφη που μεταχειρίστηκαν με 10 mg NH_4^+ -N και που είχαν δεχθεί μεταχείριση με παρεμποδιστή σε σχέση με τα εδάφη χωρίς την χρήση παρεμποδιστή. Αντίθετα, τα εδάφη που δέχθηκαν εφαρμογή 100 mg NH_4^+ -N η συγκέντρωση NH_4^+ -N η συγκέντρωση δεν διαφοροποιήθηκε σημαντικά. Τέλος, όπως αναμένονταν, εδάφη που μεταχειρίστηκαν με 10 mg NH_4^+ -N είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με εδάφη που μεταχειρίστηκαν με 100 mg NH_4^+ -N. (Γράφημα 3.3 και 3.4).

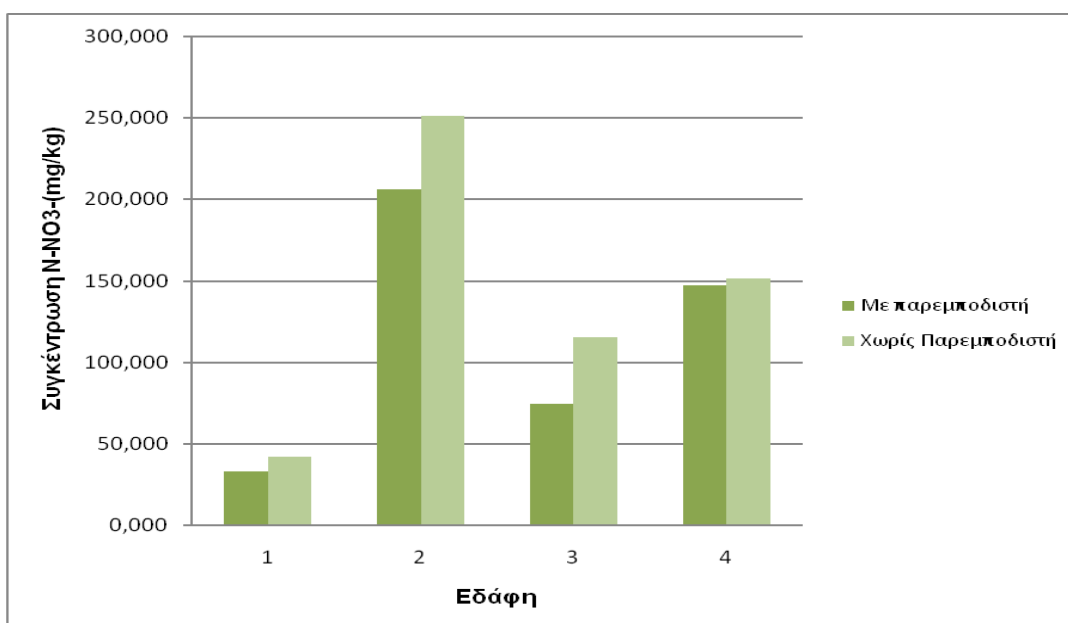


Γράφημα 3.3: Συγκέντρωση NH_4^+ -N σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή NH_4^+ -N 10mg/kg



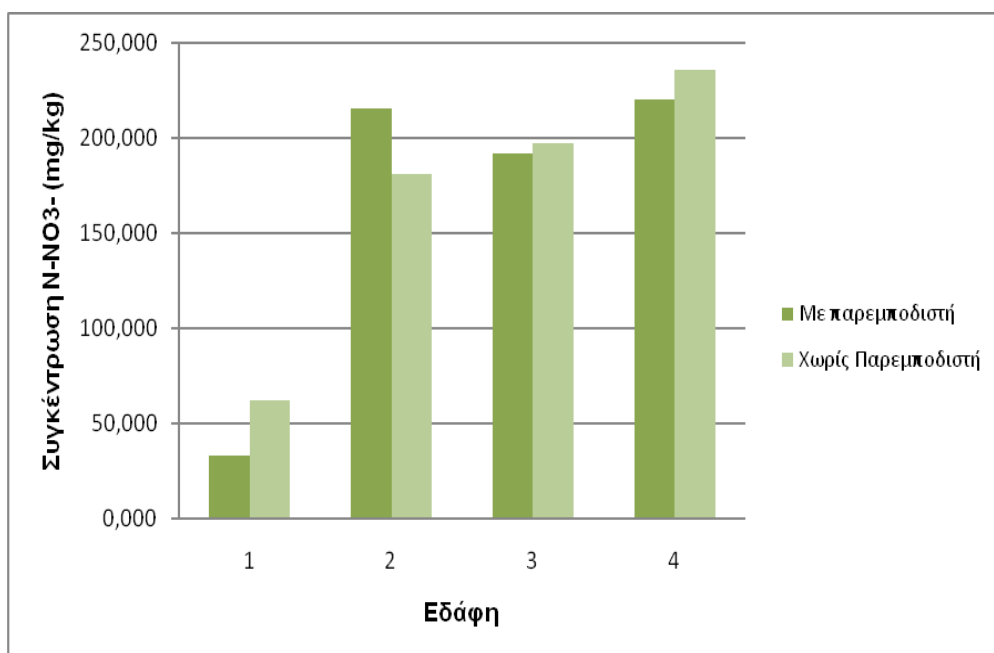
Γράφημα 3.4 Συγκέντρωση NH_4^+-N σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή NH_4^+-N 100 mg/kg

Στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν την Ημέρα 7, για τα 10 mg NH_4^+-N , παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης NO_3^--N σε μικρόκοσμους που δεν χρησιμοποιήθηκε παρεμποδιστής, ενώ με την χρήση παρεμποδιστή, οι συγκεντρώσεις νιτρικών ήταν μικρότερες τόσο στα εδάφη που μεταχειρίστηκαν με 10 mg NH_4^+-N αλλά και με 100 mg NH_4^+-N , σε όλα τα δείγματα εκτός από το έδαφος 2 που αφορούσε την υψηλότερη μεταχείριση (100 mg NH_4^+-N) (Γράφημα 3.5 και 3.6).



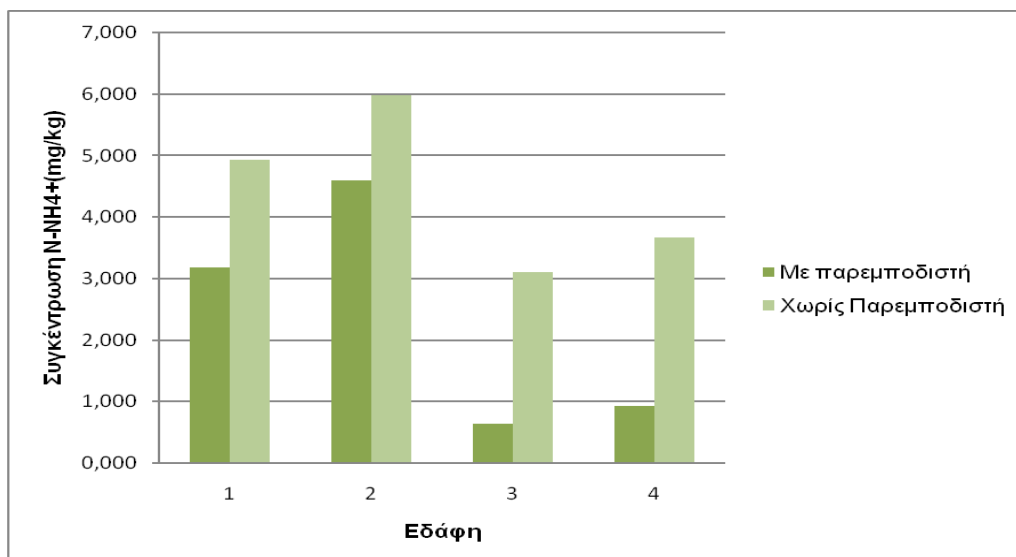
Γράφημα 3.5: Συγκέντρωση NO_3^--N σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή NH_4^+-N 10 mg/kg

την Ημέρα 7



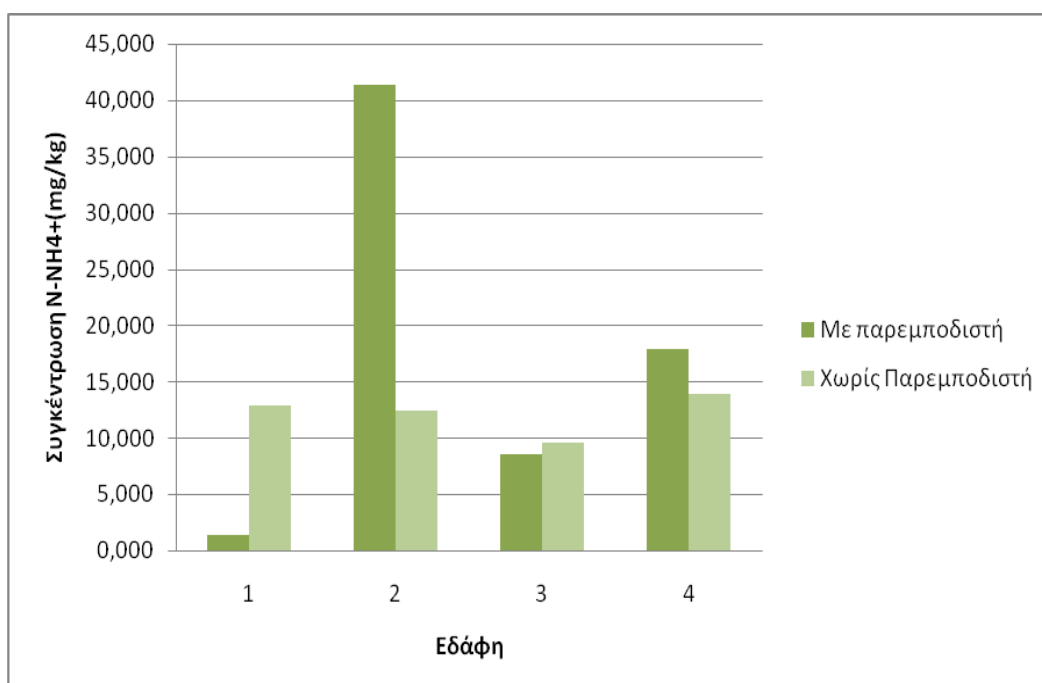
Γράφημα 3.6: Συγκέντρωση NO_3^- -N σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή NH_4^+ -N 100 mg/kg την Ημέρα 7

Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης NO_3^- -N συγκριτικά με την 2^η ημέρα. Στην μεταχείριση εδαφών με 100 mg NH_4^+ -N παρατηρείται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης NO_3^- -N με παρεμποδιστή είναι μικρότερη της αντίστοιχης αύξησης χωρίς την χρήση αυτού. Όσον αφορά τους μέσους όρους συγκεντρώσεως των NH_4^+ -N, παρατηρούμε ότι, η συγκέντρωση σε εδάφη που δεν χρησιμοποιήθηκε παρεμποδιστής ήταν πολύ μεγαλύτερη (Γράφημα 3.7).



Γράφημα 3.7: Συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 10 mg/kg την Ημέρα 7

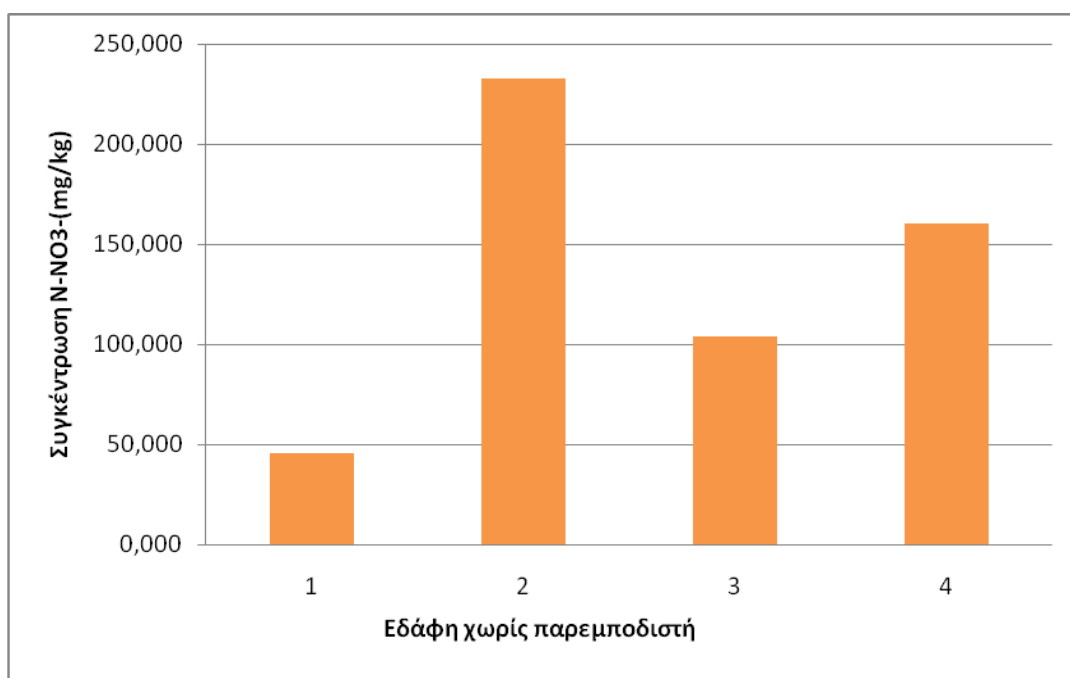
Στα εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό με 100 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$, μεγάλη εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι στο έδαφος 1, η συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ χωρίς την χρήση του παρεμποδιστή είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τη συγκέντρωση με παρουσία του παρεμποδιστή δράσης των AOB, ενώ αντίθετη επίδραση παρατηρήθηκε στο έδαφος 2 (Γράφημα 3.8).



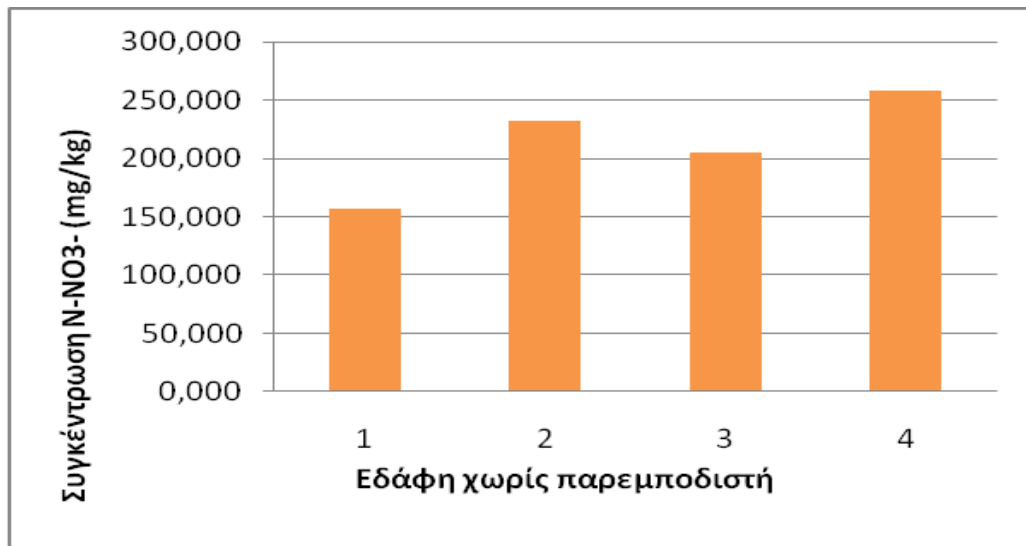
Γράφημα 3.8 Συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ σε εδάφη που δέχτηκαν εφαρμογή $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 100 mg/kg

την Ημέρα 7

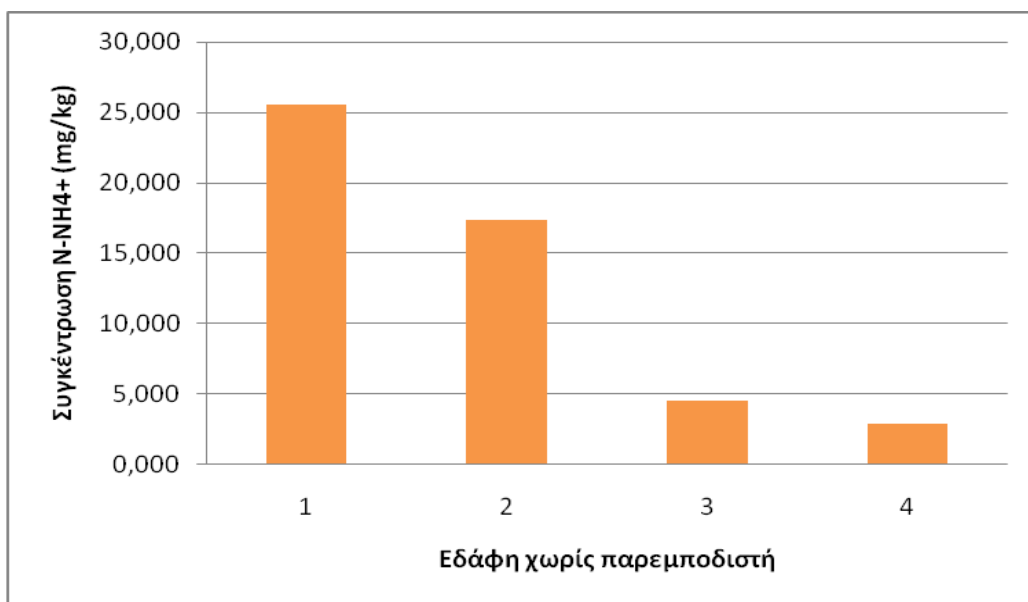
Την Ημέρα 14, χωρίς την χρήση παρεμποδιστή, παρατηρήθηκαν μικρές έως αρκετά μεγάλες αυξήσεις στην συγκέντρωση των NO_3^- -N, σε σχέση με την Ημέρα 7. Πολύ μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα εδάφη έχει το έδαφος 2 που δέχτηκε χειρισμό 10mg NH_4^+ -N. Στα 100 mg , οι τιμές των συγκεντρώσεων είναι αισθητά μεγαλύτερες, ενώ δεν παρουσιάζουν μεγάλες διακυμάνσεις (Γράφημα 3.9 και 3.10). Όσον αφορά τις τιμές των NH_4^+ -N, χωρίς παρεμποδιστή, την ημέρα 14, διαπιστώθηκε μείωση, η οποία αποδίδεται στην οξειδωση των NH_4^+ -N από τους νιτροποιητικούς οργανισμούς (Γράφημα 3.11 και 3.12).



Γράφημα 3.9. Συγκέντρωση NO_3^- -N σε εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό 10 mg/kg NH_4^+ -N την Ημέρα 14



Γράφημα 3.10: Συγκέντρωση NO₃⁻ -N σε εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό 100 mg/kg NH₄⁺-N την Ημέρα 14

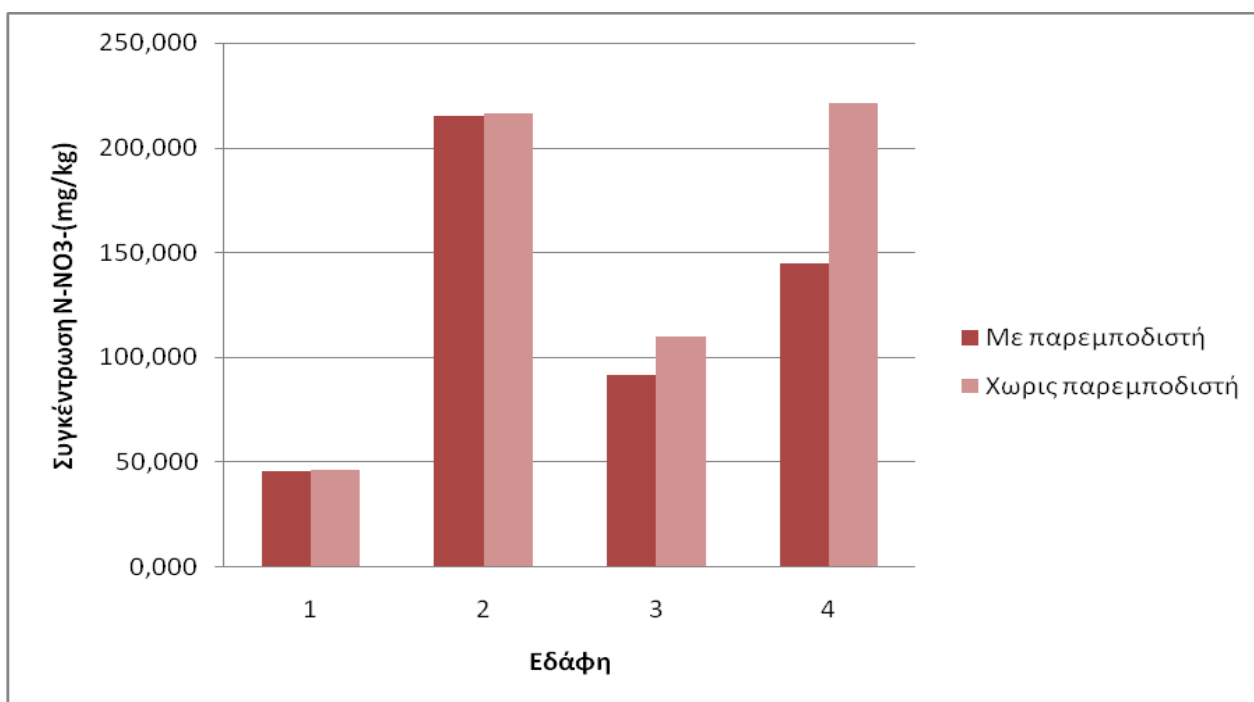


Γράφημα 3.11: Συγκέντρωση NH₄⁺ -N σε εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό 10 mg/kg την Ημέρα 14



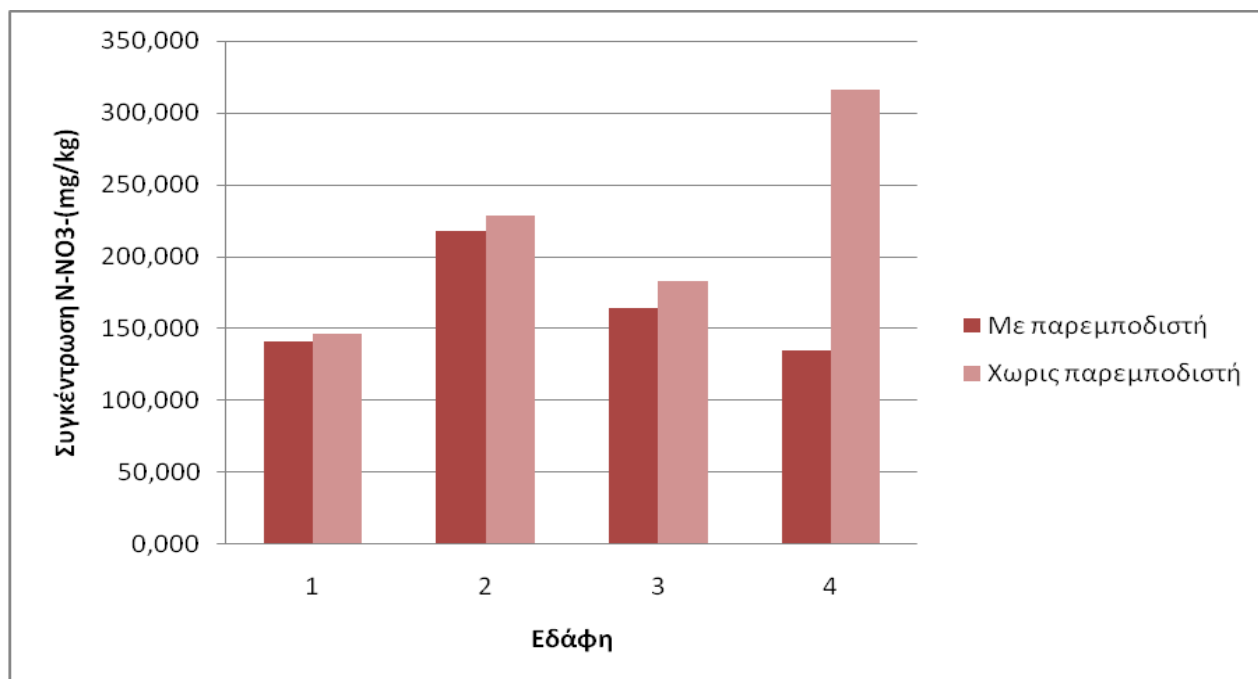
Γράφημα 3.12 Συγκέντρωση NH_4^+-N σε εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό $100 \text{ mg/kg } \text{NH}_4^+-\text{N}$ την Ημέρα 14

Στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν την Ημέρα 21 σε εδάφη που δέχτηκαν χειρισμό με $10 \text{ mg } \text{NH}_4^+-\text{N}$, παρουσία παρεμποδιστή, παρατηρήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τις μεταχειρίσεις χωρίς παρεμποδιστή στα εδάφη 3 και 4 (Γράφημα 3.13).



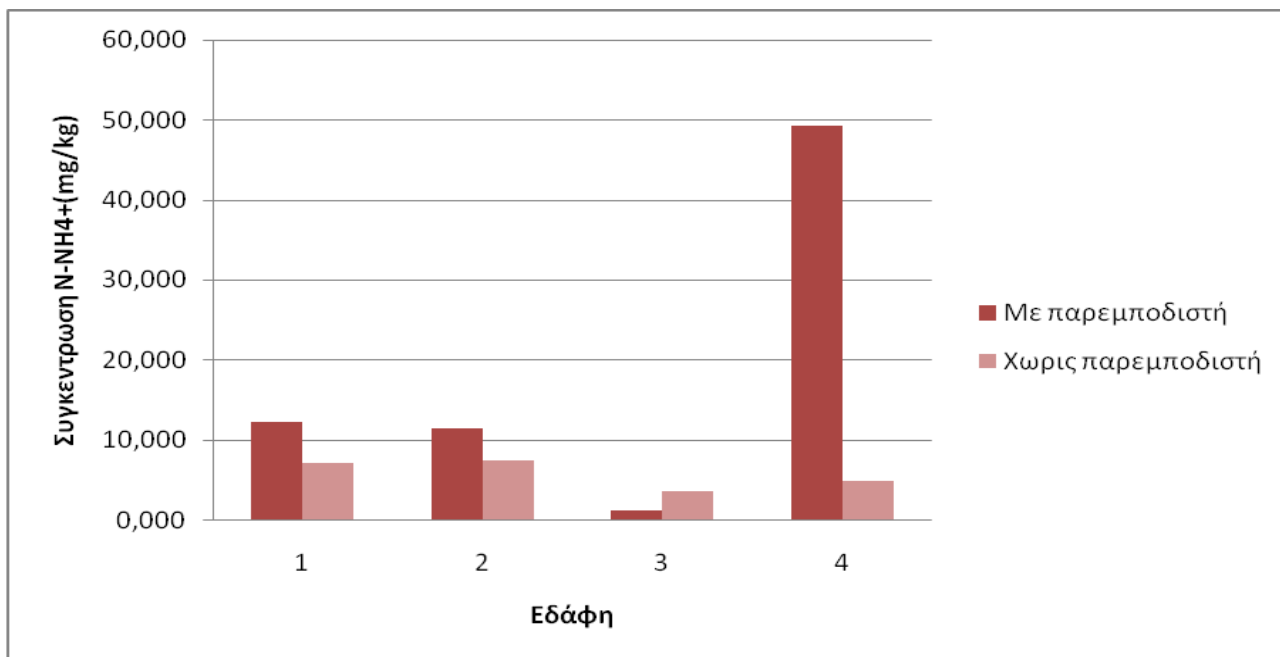
Γράφημα 3.13: Συγκέντρωση NO_3^--N σε εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό $10 \text{ mg/kg } \text{NH}_4^+-\text{N}$ την Ημέρα 21

Στις μεταχειρίσεις εδάφους που δέχτηκαν χειρισμό με 100 mg $\text{NH}_4^+\text{-N}$, η συγκέντρωση $\text{NO}_3^- \text{-N}$, με την εφαρμογή του παρεμποδιστή, οδήγησε σε χαμηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την Ημέρα 7, σε αντίθεση με τις τιμές των μέσων όρων των συγκεντρώσεων χωρίς παρεμποδιστή οι οποίες εμφανίζουν εντυπωσιακή αύξηση (Γράφημα 3.14)

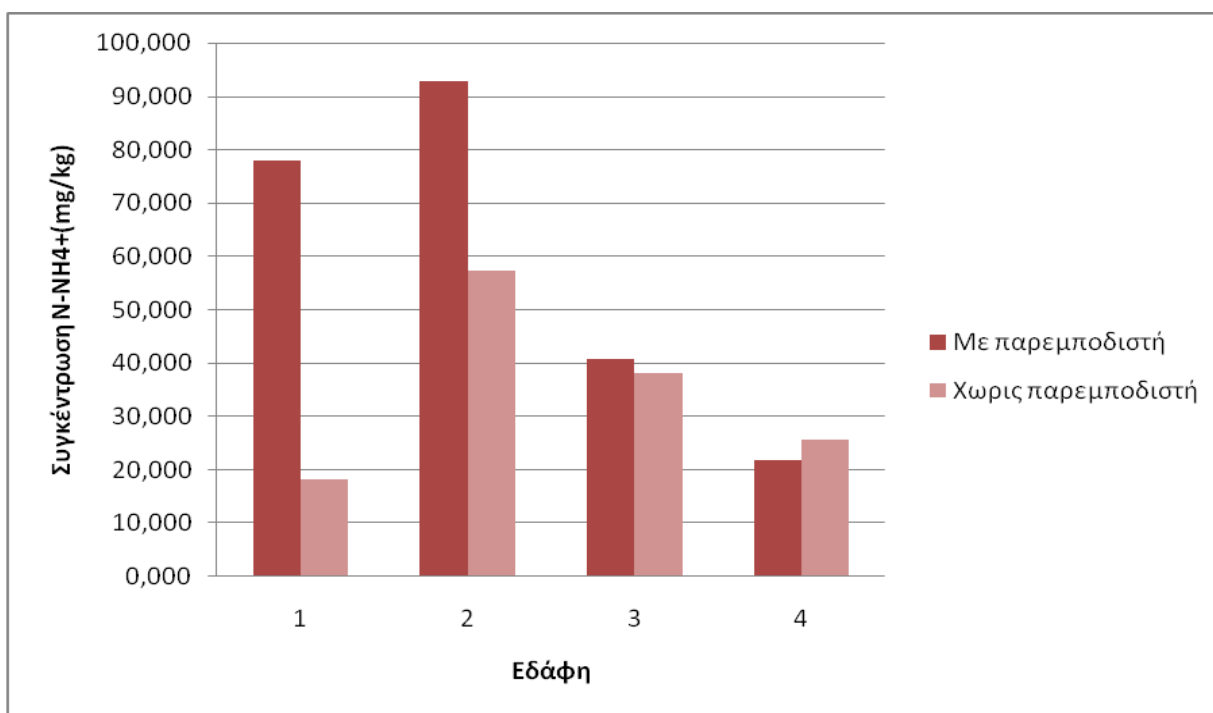


Γράφημα 3.14: Συγκέντρωση $\text{NO}_3^- \text{-N}$ σε εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό 100 mg/kg $\text{NH}_4^+\text{-N}$ την Ημέρα 21

Την Ημέρα 21, στα 10 mg μεταχείρισης οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των $\text{NH}_4^+\text{-N}$ με παρεμποδιστή είναι σημαντικά αυξημένοι σε σχέση με τις τιμές της Ημέρας 14 και Ημέρας 7. Πολύ υψηλές τιμές παρατηρούνται στο έδαφος 4. Συμπληρωματικά, στα εδάφη που μεταχειρίστηκαν με 100 mg, στα εδάφη 1,2, παρουσιάζεται μεγάλη αύξηση στην συγκέντρωση των $\text{NH}_4^+\text{-N}$ με την χρήση παρεμποδιστή (Γράφημα 3.15 και 3.16).



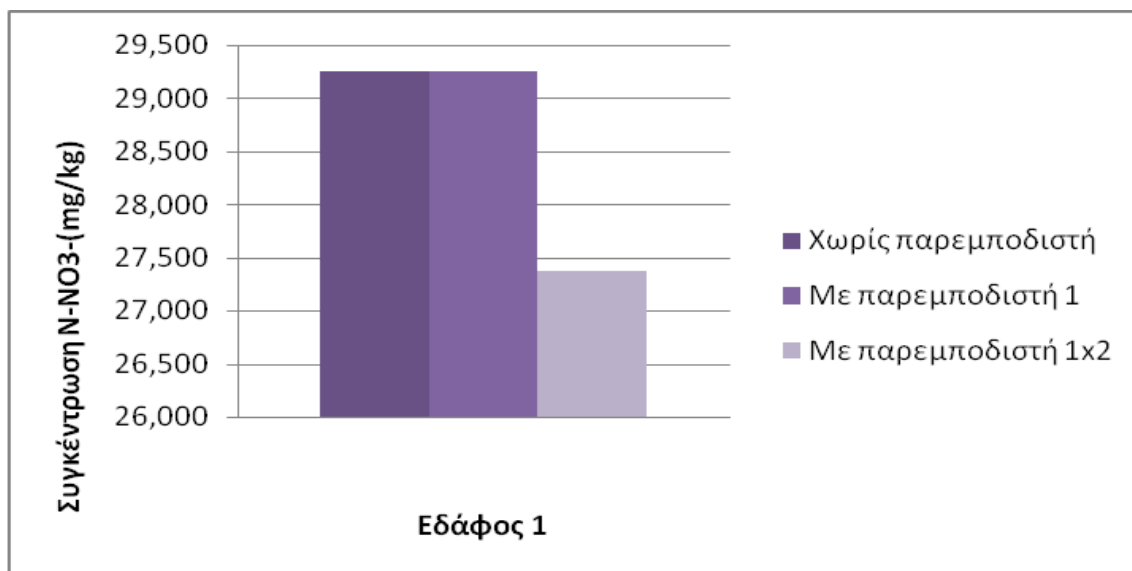
Γράφημα 3.15: Συγκέντρωση NH_4^+-N σε εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό $10 \text{ mg/kg } \text{NH}_4^+-\text{N}$ την Ημέρα 21



Γράφημα 3.16 Συγκέντρωση NH_4^+-N σε εδάφη που δέχθηκαν χειρισμό $10 \text{ mg/kg } \text{NH}_4^+-\text{N}$ την Ημέρα 21

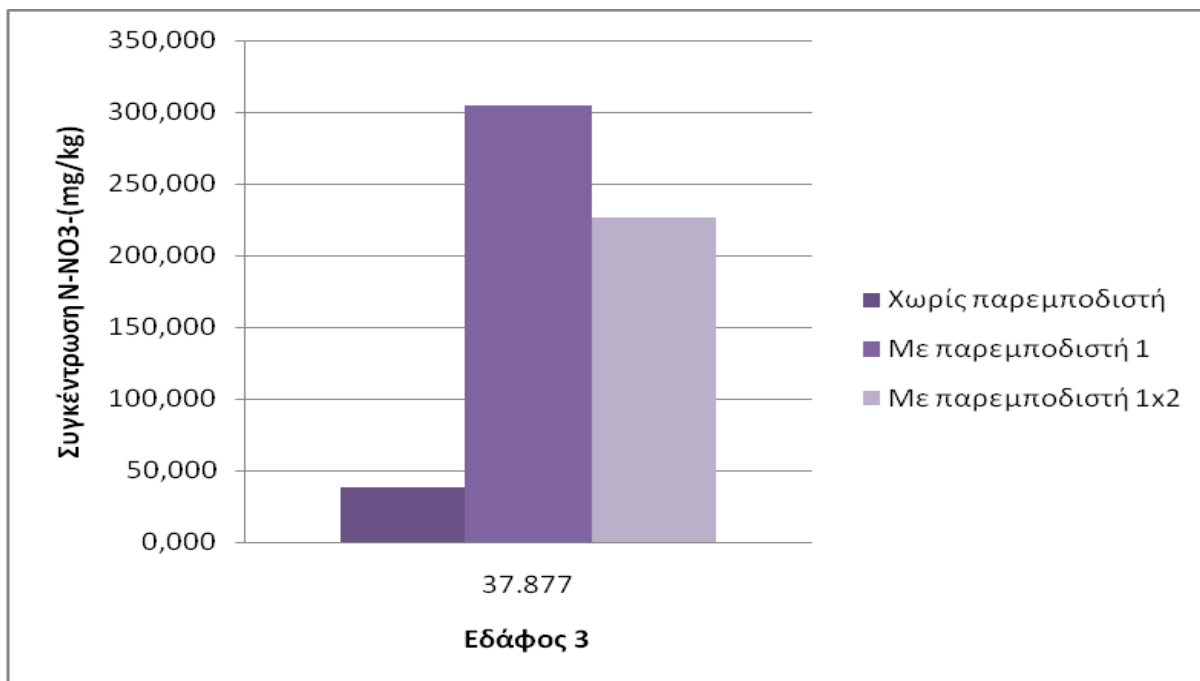
Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 2 διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην νιτροποίηση στα Εδάφη 1 και 3 (Μέτρηση I και II), τα οποία επωάσθηκαν στους 40°C . Τα

εδάφη αυτά μεταχειρίστηκαν χωρίς παρεμποδιστή, με την ίδια δόση παρεμποδιστή που χρησιμοποιήθηκε στις προηγούμενες μετρήσεις (παρεμποδιστής x1), αλλά και με διπλάσια δόση παρεμποδιστή (παρεμποδιστής x2).

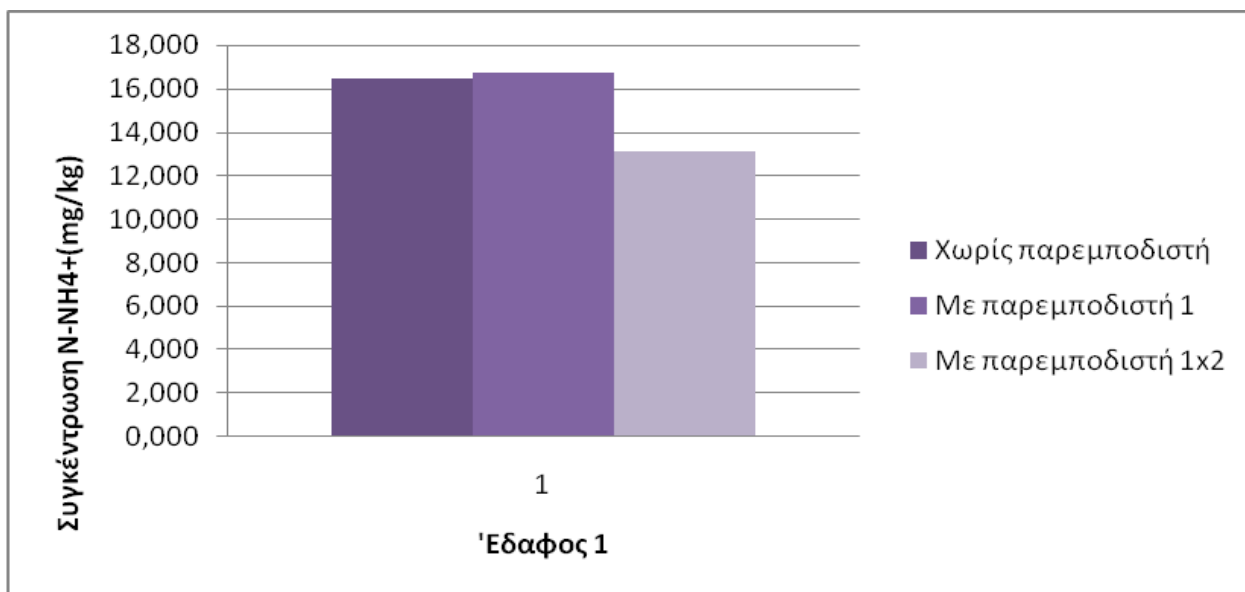


Γράφημα 3.17: Συγκέντρωση $\text{NO}_3^- - \text{N}$ σε εδάφη που μεταχειρίστηκαν με $10 \text{ mg/kg } \text{NH}_4^+ - \text{N}$ σε θερμοκρασία -40°C (έδαφος 1)

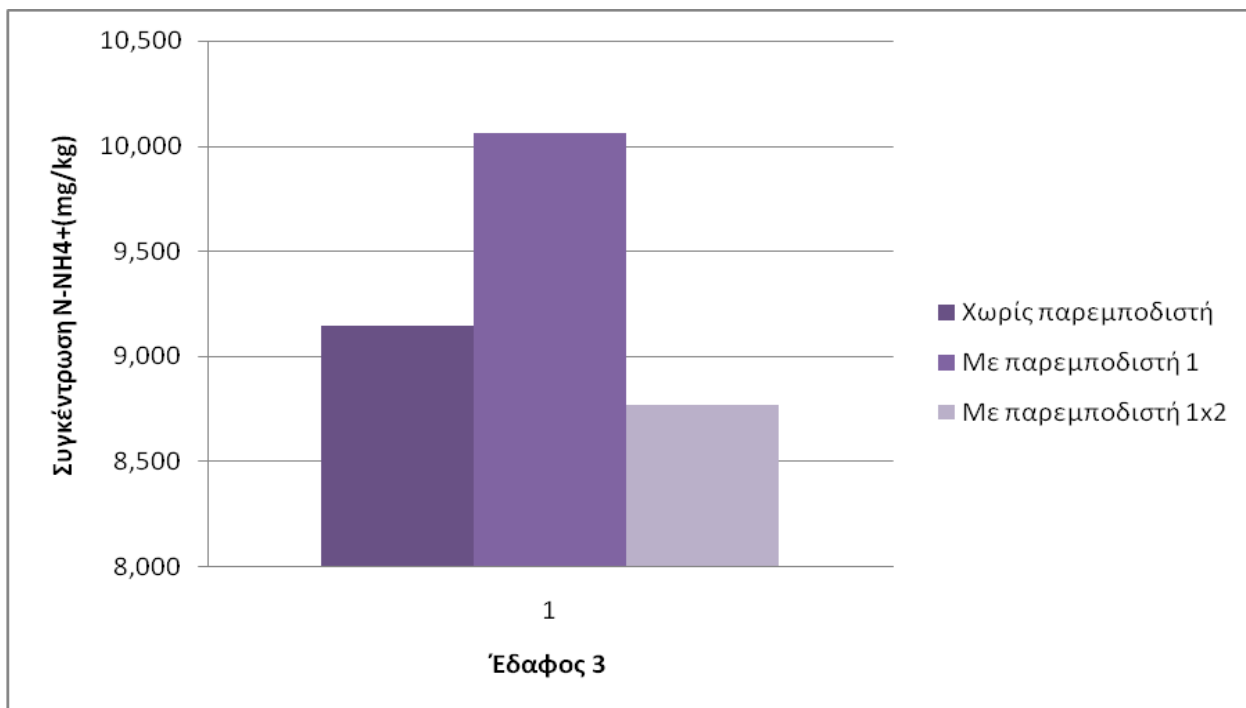
Στην 2^η μέτρηση, χωρίς την χρήση του παρεμποδιστή, υπάρχει μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης $\text{NO}_3^- - \text{N}$ σε σχέση με την 1^η Μέτρηση, η οποία παρατηρείται και στο Έδαφος 1 και στο Έδαφος 3. Οι μέσοι όροι των τιμών των συγκεντρώσεων των $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ παρουσιάζονται αυξημένοι σε σχέση με την Μέτρηση I. Με την χρήση του παρεμποδιστή παρατηρείται μικρή αύξηση των τιμών των μέσων όρων των συγκεντρώσεων των $\text{NO}_3^- - \text{N}$ για το Έδαφος 1 και σημαντική μείωση τους για το Έδαφος 3. Οι τιμές των $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, και σε αυτήν την περίπτωση παρουσιάζονται αυξημένες. Τέλος, με την χρήση του παρεμποδιστή x2, στην Μέτρηση II οι τιμές των $\text{NO}_3^- - \text{N}$ για το Έδαφος 1 παραμένουν αυξημένες σε σχέση με την Μέτρηση I, ενώ για το Έδαφος 3 παρουσιάζουν σημαντική μείωση. Οι τιμές των $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ παρουσιάζουν αύξηση σημαντική κατά την Μέτρηση II. (Γράφημα 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.24)



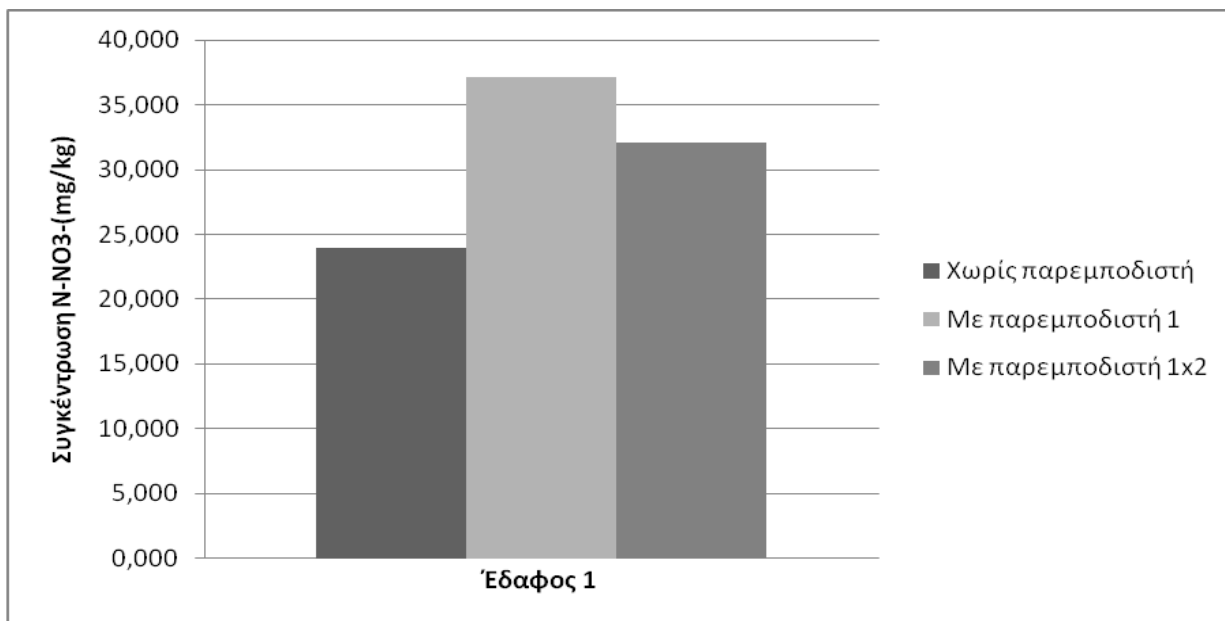
Γράφημα 3.18: Συγκέντρωση NO₃⁻-N σε εδάφη που μεταχειρίστηκαν με 10 mg/kg NH₄⁺-N σε θερμοκρασία-40° C (έδαφος 3)



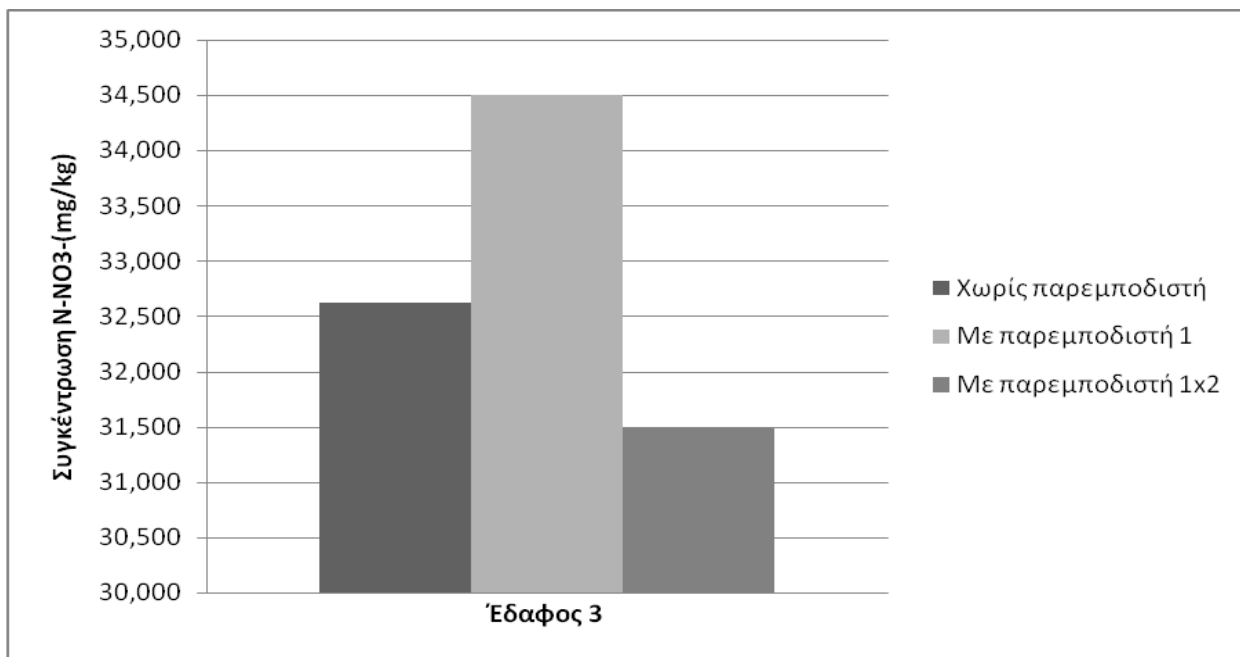
Γράφημα 3.19: Συγκέντρωση NH₄⁺-N σε εδάφη που μεταχειρίστηκαν με 10 mg/kg NH₄⁺-N σε θερμοκρασία-40° C (έδαφος 1)



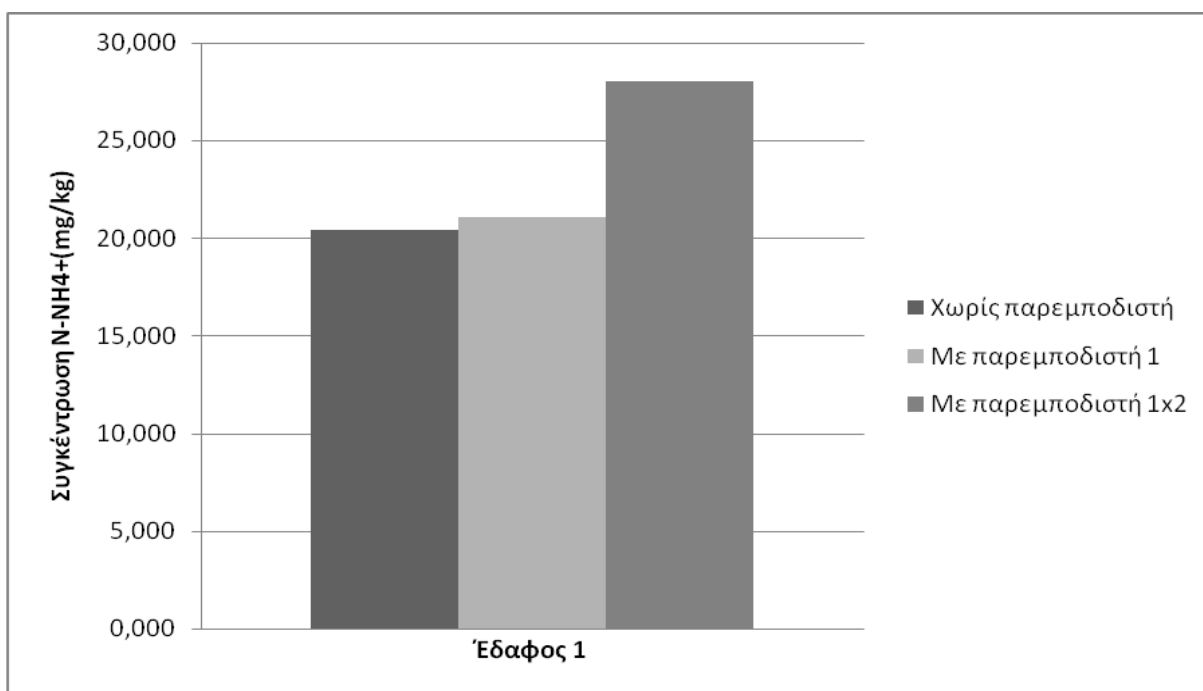
Γράφημα 3.20: Συγκέντρωση $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ σε εδάφη που μεταχειρίσθηκαν με 10 mg/kg $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ σε θερμοκρασία 40°C (έδαφος 3)



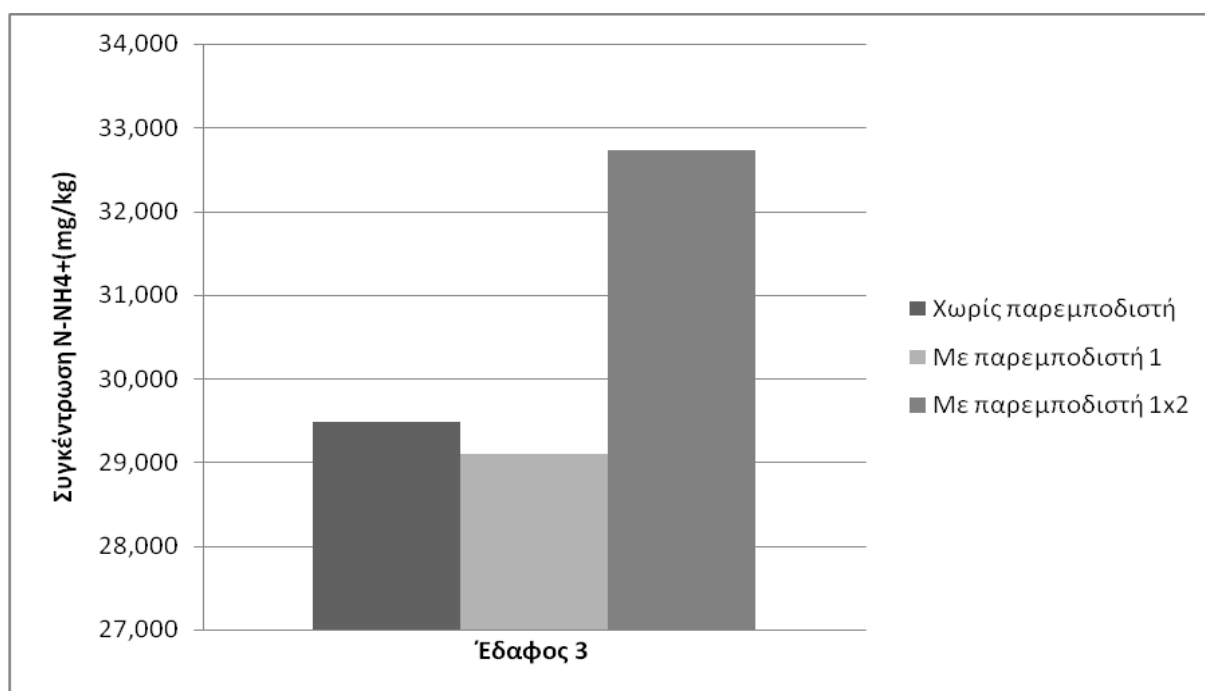
Γράφημα 3.21: Συγκέντρωση $\text{NO}_3^- - \text{N}$ σε εδάφη που μεταχειρίσθηκαν με 10 mg/kg $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ σε θερμοκρασία 40°C (έδαφος 1 Μέτρηση 2)



Γράφημα 3.22: Συγκέντρωση $\text{NO}_3^- \text{N}$ σε εδάφη που μεταχειρίσθηκαν με $10 \text{ mg/kg } \text{NH}_4^+ \text{N}$ σε θερμοκρασία 40°C (έδαφος 3 Μέτρηση 2)



Γράφημα 3.23: Συγκέντρωση $\text{NH}_4^+ \text{N}$ σε εδάφη που μεταχειρίσθηκαν με $10 \text{ mg/kg } \text{NH}_4^+ \text{N}$ σε θερμοκρασία 40°C (έδαφος 1 μέτρηση 2η)



Γράφημα 3.24: Συγκέντρωση NH_4^+-N σε εδάφη που μεταχειρίστηκαν με 10 mg/kg NH_4^+-N σε θερμοκρασία -40°C (έδαφος 3 μέτρηση 2η).

Εν κατακλείδι, μελετώντας τα διαγράμματα, όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των $\text{NO}_3^- -\text{N}$ και λαμβάνοντας υπ' όψιν συνολικά τις μετρήσεις μέχρι την ημέρα 21, παρατηρούμε ότι σε γενικές γραμμές οι συγκεντρώσεις ,με την χρήση του παρεμποδιστή (4-octyne, C_8) παίρνουν μικρότερες τιμές κατά την διάρκεια των εδαφικών μεταχειρίσεων.

Αυτό ισχύει για τα εδάφη που έγινε προσθήκη 10 mg/kg NH_4^+-N αλλά και για τα εδάφη που έγινε προσθήκη 100 mg/kg NH_4^+-N . Ωστόσο ,οι συγκεντρώσεις των $\text{NO}_3^- -\text{N}$ παρατηρώντας τις διαφορές μεταξύ μεταχείρισης και μη-μεταχείρισης των εδαφικών μικρόκοσμων με παρεμποδιστή δεν είναι τόσο μεγάλες. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των NH_4^+-N , αυτό που προκάλεσε μεγαλύτερη εντύπωση είναι το γεγονός ότι , οι τιμές ήταν μεγαλύτερες με την χρήση του παρεμποδιστή παρά χωρίς την χρήση του. Παρατηρώντας τα διαγράμματα μετά την Ημέρα 7, παρατηρείται μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης NH_4^+-N σε εδάφη που έχει χρησιμοποιηθεί ο παρεμποδιστής σε σχέση με τις προηγούμενες μετρήσεις. Μελετώντας τις συγκεντρώσεις νιτρικών και αμμωνιακών σε

μεγαλύτερες θερμοκρασίες (40° C), οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων NO_3^- -N και NH_4^+ -N είναι μικρότεροι από τους μέσους όρους που προέκυψαν από τις προηγούμενες μετρήσεις .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 –ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας από τους βασικούς στόχους της παρούσας διατριβής, ήταν η ξεχωριστή μελέτη της συνεισφοράς των AOB σε σχέση με την συνεισφορά των AOA. Αυτή η διάκριση μελετήθηκε με μεταχειρίσεις που περιλάμβαναν: i) παρεμποδιστή ανάσχεσης της δράσης των νιτροποιητικών βακτηρίων (Taylor et al., 2013), ii) την εφαρμογή διαφορετικής συγκέντρωσης $\text{NH}_4^+\text{-N}$ για την επαγωγή διαφορετικής δραστηριότητας AOA και AOB (Hink et al., 2018), καθώς και με την επώαση των εδαφικών μικρόκοσμων σε υψηλές θερμοκρασίες που έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη σχετική συνεισφορά των AOA και AOB (Taylor et al., 2019).

Όσον αφορά την μεταχείριση των εδαφών με τον παρεμποδιστή, έρευνες έχουν δείξει ότι συγκεκριμένα το C_8 στο εύρος συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα, σταματάει την οξείδωση της NH_3 από τα AOB *N. europaea* και το *Nitrospira Multiformis* (Taylor et al., 2013). Αντίθετα, ο ρυθμός οξείδωσης της NH_3 από το AOA *N. maritimus* δεν επηρεάζεται από την παρουσία του C_8 . Επίσης, τα AOA στο καλλιεργημένο έδαφος, όπως τα εδάφη που μεταχειρίστηκαν στην μελέτη (εδάφη θερμοκηπίου), είναι ικανά να πολλαπλασιαστούν σε απόκριση σε συμπληρωματικό NH_4^+ και έχουν την δυνατότητα να αλλάξουν τις σχετικές συνεισφορές των AOA και AOB στην νιτροποίηση του εδάφους (Taylor et al., 2013). Ωστόσο σε αρκετές εργασίες ο πληθυσμός των AOA δεν δείχνει απόκριση σε μεταχειρίσεις αμμωνίας αμφισβητώντας ουσιαστικά πιθανό ρόλο τους στην νιτροποίηση λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων αμμωνίας που ουσιαστικά παρεμποδίζει την δράση τους (Hink et al., 2018). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ένα σημαντικό ρόλο των AOA στην οξείδωση αμμωνίας που ουσιαστικά τεκμηριώνει τους μεγάλους πληθυσμούς που έχουν ταυτοποιηθεί σε εδάφη της Κρήτης από προγενέστερες εργασίες του εργαστηρίου μας (Tsiknia et al., 2015; Tsiknia et al., 2014). Στην

Μελετώντας τις τιμές των συγκεντρώσεων στα διαγράμματα, είναι εμφανές από τις τιμές των $\text{NO}_3^- \text{N}$ ότι στα εδάφη με μεταχείριση $\text{NH}_4^+ \text{N}$ 100 mg/kg, επικρατούν αυξημένες συγκεντρώσεις στα εδάφη με χειρισμό C_8 , σε σχέση με τα εδάφη με μεταχείριση $\text{NH}_4^+ \text{N}$ 10 mg/kg. Αυτό υποδεικνύει ότι η συνεισφορά των AOA στη οξείδωση της NH_3 στα εδάφη θερμοκηπίου που χρησιμοποιήθηκαν είναι εμφανής. (Γράφημα 3.1, 3.2, 3.5, 3.6). Ακόμα, η διαφορά μεταξύ συγκεντρώσεων $\text{NO}_3^- \text{N}$ στις μεταχειρίσεις με C_8 σε σχέση με τις μεταχειρίσεις χωρίς δεν είναι πολύ έντονη, ούτε στα διαγράμματα των χειρισμών με 10 mg/kg $\text{NH}_4^+ \text{N}$, ούτε σε εκείνα των χειρισμών με 100 mg/kg $\text{NH}_4^+ \text{N}$. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι ενώ υπήρξε αναστολή της λειτουργίας σημαντικού ποσοστού των AOB, η οξείδωση της NH_3 έγινε κατά κύριο λόγο από τα AOA (Taylor et al., 2013).

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των $\text{NH}_4^+ \text{N}$, ήταν μικρότερες από των $\text{NO}_3^- \text{N}$ κάτι που είναι λογικό καθώς το μεγαλύτερο μέρος των $\text{NH}_4^+ \text{N}$ οξειδώθηκε στα εδάφη θερμοκηπίου που χρησιμοποιήθηκαν (Ward, 2008). Αυτό που προκάλεσε μεγαλύτερη εντύπωση είναι το γεγονός ότι, οι τιμές ήταν μεγαλύτερες στα εδάφη που έγινε μεταχείριση με C_8 παρά στα εδάφη που δεν μεταχειρίστηκαν με C_8 . Ίσως, λοιπόν, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι οι περιβαλλοντικές και εργαστηριακές συνθήκες ήταν ίδιες σε όλες τις μετρήσεις μέχρι την ημέρα 21 (Γράφημα 3.3, 3.4, 3.7, 3.8, 3.11, 3.12, 3.15, 3.16), η οξείδωση της αμμωνίας έγινε σε υψηλούς ρυθμούς και από τα AOA όταν το C_8 περιόριζε την λειτουργία των AOB, αλλά και από τα AOB σε συνδυασμό με τα AOA στα εδάφη που δεν έγινε χειρισμός με C_8 .

Στο κομμάτι της διατριβής στο οποίο μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με τον χειρισμό με C_8 (Γράφημα 3.17- 3.24), παρατηρήθηκαν μικρότεροι μέσοι όροι συγκεντρώσεων $\text{NH}_4^+ \text{N}$ και $\text{NO}_3^- \text{N}$ από αυτούς που προέκυψαν σε όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις σε χαμηλότερη θερμοκρασία επώασης του εδάφους. Βέβαια τα εδάφη 1,3 που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις μετρήσεις, είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις $\text{NH}_4^+ \text{N}$ και $\text{NO}_3^- \text{N}$ από τα εδάφη 1,2. Η θερμοκρασία είναι σημαντικός

παράγοντας όσον αφορά την απόκριση των AOA και των AOB στην παραγωγή NO_3^- . Τα AOB και AOA στα εδάφη διαθέτουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, εξαρτώμενα από την θερμοκρασία και συμβάλλουν διαφορετικά στην νιτροποίηση ανάλογα με το εύρος της θερμοκρασίας. Έχει αποδειχθεί ότι τα AOA εμφανίζουν τον μεγαλύτερο ρυθμό νιτροποίησης σε υψηλές θερμοκρασίες (περίπου 35-40°C), ενώ τα AOB σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται χαμηλότερα από 30°C. (Taylor et al., 2017) Οι συγκεντρώσεις που εμφανίστηκαν στην συγκεκριμένη διατριβή και στα διαγράμματα, δείχνουν αρκετά χαμηλότερους ρυθμούς νιτροποίησης σε σχέση με τις προηγούμενες μετρήσεις. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι στα συγκεκριμένα εδάφη (Εδάφη 1,3) τα AOB κυριαρχούν σε σχέση με τα AOA καθώς στις μετρήσεις των Ημερών 7,14,21 οι συγκεντρώσεις $\text{NO}_3\text{-N}$ ήταν μεγαλύτερες στα εδάφη που δεν είχαν δεχθεί χειρισμό με παρεμποδιστή παρά σε αυτά που είχαν δεχθεί χειρισμό με παρεμποδιστή.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Αϊβαζίδης Α., “Τεχνολογία και Διαχείριση Υγρών Αποβλήτων”, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνική Σχολή, Δ.Π.Θ, 2000

Bernhard, A. ,” *The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. Nature Education Knowledge* “ ,2010

Bishop P. L. , “*Evaluation of substrate and pH effects in a nitrifying biofilm*”, 1996

X. Lu, Bottomley, P. J., and Myrold, D. D., “Contributions of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to nitrification in Oregon forest soils”, *Soil Biology and Biochemistry*, 2015.

Byung Kwon Kim, Man-Young Jung, Dong Su Yu,1 Soo-Je Park, Tae Kwang Oh, Sung-Keun Rhee, and Jihyun F. Kim “*Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*”, *Genome Sequence of an Ammonia-Oxidizing Soil Archaeon*, 2011

Firestone, M.K. and Davidson, E.A., “ *Microbiological Basis of NO and N₂O Production and Consumption in Soils.*” In: Andreae, M.O. and Schimel, D.S., Eds., *Exchange of Trace Gases between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere*, John Willey and Sons, New York, 7-21, 1989

Hink, L., Gubry-Rangin, C., Nicol, G.W. *et al.* “*The consequences of niche and physiological differentiation of archaeal and bacterial ammonia oxidisers for nitrous oxide emissions*”. 2018

Howarth W., " *Coastal nitrogen pollution: A review of sources and trends globally and regionally*", Department of Ecology and Evolutionary Biology, E309 Corson Hall, Cornell University , 2007

Irigoyen I. , " *Ammonium oxidation kinetics in the presence of nitrification inhibitors DCD and DMPP at various temperatures*" , 2003

Konneke Martin, " *Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon*", 2005

Lipschultz, F., O.C. Zafiriou, F.C. Wofsy, M.B. McElroy, F.W. Valois and S.W. Watson. " *Production of NO and N₂O by nitrifying bacteria* ." Nature. 294:641-643., 1981

McCarty G. W., " *Modes of action of nitrification inhibitors*", Springer, 1999

Metcalf & Eddy, " *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*."4th Edition, McGraw-Hill, New York, 2003

Nazih Kh. Shammass, " *Interactions of Temperature, pH, and Biomass on the Nitrification Process*", Journal Water Pollution Control Federation, 1986

Rodgers G. A., " *Nitrification inhibitors in agriculture*", Journal of Environmental Science And Health, Part A: Environmental Science and Engineering, Volume 21, Issue 7, 1986

Prosser, J.I., W.N. Graeme. " *relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment*." Environmental Microbiology. 10(11):2931-2941.,

2008

Sahrawat K. L., “ *Nitrification in some tropical soils*”, Springer, 1982

Strong D.T., Sale P.W.G, Helyar K.R ‘*The influence of the soil matrix on nitrogen mineralisation and nitrification V. Microporosity and manganese*”, Australian Journal of Soil Research”, 1999

Strous M., Kuenen J. G., Jetten M.S., “*Key physiology of anaerobic ammonium oxidation*”, Pubmed, NCBI, 1999

Taylor A.E., Department of Crop and Soil Science, Oregon State University, Corvallis OR, USA

Taylor A.E., “*Modeling of soil nitrification responses to temperature reveals thermodynamic differences between ammonia-oxidizing activity of archaea and bacteria*”,2017

Taylor A.E., “*Use of Aliphatic n-Alkynes To Discriminate Soil Nitrification Activities of Ammonia-Oxidizing Thaumarchaea and Bacteria*”,2013

Myrto Tsiknia, Nikolaos V. Paranychanakis, Emmanouil A. Varouchakis, Daniel Moraetis, Nikolaos P. Nikolaidis, “*Environmental drivers of soil microbial community distribution at the Koiliaris Critical Zone Observatory*”, *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 90, Issue 1, October 2014, Pages 139–152

Myrto Tsiknia, Nikolaos V. Paranychanakis, Emmanouil A. Varouchakis, Nikolaos P.

Nikolaidis, '*Environmental drivers of the distribution of nitrogen functional genes at a watershed scale*', *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 91, Issue 6, June 2015

Verstraete W. & Focht D.D., "*Biochemical Ecology of Nitrification and Denitrification. Advances in Microbial Ecology*", 1977.

Vitousek P. M., "*Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Sources And Consequences*", *Esa Journals*, 1997

Ward B. B. , "*Nitrification*", in *Encyclopedia of Ecology*, 2008

Wong – Chong & Loehr, " *industrial water quality book*", Eckenfelder, 1975

