

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000263250





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ &
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ
ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ



ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΗ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβληθείσα στο
Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Υπό
ΙΩΑΝΝΑΣ Α. ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΟΥ

Για την απόκτηση του Τίτλου του Διδάκτορα του
Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων
του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΑΓΡΙΝΙΟ 2008



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΗ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ

Υπό ΙΩΑΝΝΑΣ Α. ΒΑΣΙΛΕΙΑΔΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ & ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

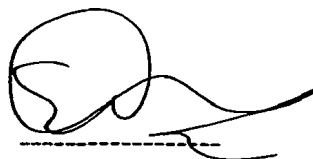
Δ. ΒΑΓΕΝΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμ. Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



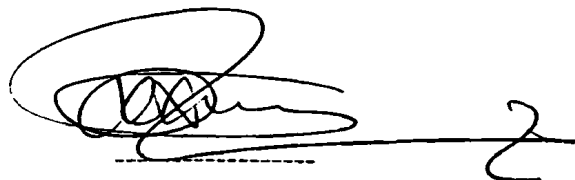
Σ. ΠΑΥΛΟΥ

Καθηγητής
Τμ. Χημικών Μηχανικών
Πανεπιστήμιο Πατρών



Κ. ΧΡΥΣΙΚΟΠΟΥΛΟΣ

Καθηγητής
Τμ. Πολιτικών Μηχανικών
Πανεπιστήμιο Πατρών



Γ. ΛΥΜΠΕΡΑΤΟΣ

Καθηγητής
Τμ. Χημικών Μηχανικών
Πανεπιστήμιο Πατρών



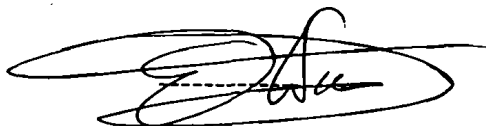
Κ. ΜΠΟΥΡΤΖΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμ. Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Ε. ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής
Τμ. Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Ι. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ

Επίκουρος Καθηγητής
Τμ. Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αύξηση του πληθυσμού, η τεχνολογική εξέλιξη και η βιομηχανική δραστηριότητα έχουν οδηγήσει στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων υγρών αποβλήτων και κατά συνέπεια στην υποβάθμιση των υδατικών αποθεμάτων. Η εκτεταμένη ρύπανση των πηγών πόσιμου νερού από νιτρικά είναι ένα σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα σε πολλά μέρη του κόσμου. Αυτό προκαλεί σοβαρές ανησυχίες λόγω της σύνδεσης μεταξύ των νιτρικών και της μεθαιμοσφαιριναϊμίας (σύνδρομο blue-baby) και του σχηματισμού καρκινογόνων ενώσεων στο πεπτικό σύστημα. Τα βιολογικά συστήματα επεξεργασίας υπερτερούν των φυσικοχημικών, καθώς είναι φιλικά προς το περιβάλλον, δεν απαιτείται η προσθήκη επιπλέον χημικών και επιτυγχάνουν υψηλές αποδόσεις. Στην κατεύθυνση αυτή ορίστηκε το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής με τίτλο 'Υδρογονοτροφική απονιτροποίηση πόσιμου νερού'.

Η διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Συστημάτων του τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με επιβλέποντα τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Βαγενά.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Βαγενά για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και την εποικοδομητική συνεργασία που κατέστησαν δυνατή τη διεκπεραίωση της διδακτορικής αυτής εργασίας. Η συνεργασία αυτή αποτελεί πρότυπο για μένα.

Θερμά ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων για τις πολύτιμες συμβουλές τους για την επιτυχή ολοκλήρωση της έρευνας αυτής.

Ευχαριστώ, τον Καθηγητή του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, κ. Κωνσταντίνο Χρυσικόπουλο και τον Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, κ. Σταύρο Παύλου, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Σταύρο Παύλου για την πολύτιμη βοήθειά του και για τις επιστημονικές του συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Ευχαριστώ τους κ. Γεράσιμο Λυμπεράτο, Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, τον κ. Ευάγγελο Παπαδάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Ιωάννη Κωνσταντίνου, Επίκουρο Καθηγητή του



Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Κωνσταντίνο Μπούρτζη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για το ότι δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην Επιταμελή Επιτροπή Αξιολόγησης της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Θέλω να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων και ιδιαίτερα τους υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικών Συστημάτων, για την ηθική συμπαράσταση, το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας και το χρήσιμο συμβουλευτικό ρόλο που διαδραμάτισαν όλο αυτό το διάστημα. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στη διδάκτορα Αθανασία Τεκερλεκοπούλου, με την οποία συνεργάστηκα άριστα στο παρελθόν στα πλαίσια της διπλωματικής μου εργασίας και έπειτα. Στεκόταν πάντα στο πλευρό μου με χρήσιμες επιστημονικές συμβουλές, ενθαρρύνοντάς με συνεχώς.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου στους γονείς μου Αδάμ και Βαρβάρα, για τη συνεχή ψυχολογική στήριξη και την τόνωση του ηθικού μου όλα τα χρόνια της ζωής μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κωνσταντίνο Χριστοφορίδη, για την αμέριστη συμπαράσταση, την υπομονή και ενθάρρυνση όλα αυτά χρόνια.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αύξηση του πληθυσμού, του καταναλωτισμού, αλλά κυρίως η υπέρμετρη και αλόγιστη λίπανση των χωραφιών και η αυξανόμενη παραγωγή νέων χημικών ενώσεων, έχουν οδηγήσει σε σημαντική μείωση των διαθέσιμων αποθεμάτων πόσιμου νερού και στην ποιοτική υποβάθμισή τους. Η ύπαρξη νιτρικών και νιτρωδών είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των υπογείων και επιφανειακών νερών.

Η παρουσία νιτρικών στο πόσιμο νερό προκαλεί ανεπιθύμητες για τον ανθρώπινο οργανισμό επιπτώσεις, όπως τη μεθαιμοσφαιριναιμία και διάφορες μορφές καρκίνου. Γίνεται, λοιπόν, κατανοητό ότι είναι επιτακτική η ανάγκη ανάληψης δράσης.

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει μια σημαντική στροφή προς τα βιολογικά συστήματα επεξεργασίας καθώς είναι φιλικά προς το περιβάλλον, και επιτυγχάνουν υψηλές αποδόσεις. Η βιολογική απονιτροποίηση είναι μία μέθοδος επεξεργασίας που πραγματοποιείται μέσω κατάλληλων μικροοργανισμών που χρησιμοποιούν τα NO_3^- ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων για αναπνοή υπό ανοξικές συνθήκες. Η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος απομάκρυνσης νιτρικών. Το H_2 είναι μια άριστη επιλογή δότη ηλεκτρονίων, λόγω της καθαρής φύσης, της χαμηλής παραγωγής βιομάζας, καθώς επίσης δεν απαιτείται η αφαίρεση αυτού ή των παραγώγων του από το επεξεργασμένο νερό.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση πόσιμου νερού σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου αιρούμενης ανάπτυξης και σταθερής κλίνης. Πραγματοποιήθηκαν σειρές πειραμάτων για τη διεξοδική μελέτη της συμπεριφοράς μικτής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας και μεμονωμένων υδρογονοτροφικών βακτηριών σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Διεξήχθησαν πειράματα σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, σε διάφορες λειτουργικές παραμέτρους, για τον προσδιορισμό του κατάλληλου μεγέθους πληρωτικού υλικού και του πιο αποτελεσματικού τρόπου λειτουργίας με γνώμονα τη μέγιστη απόδοση και την αποφυγή λειτουργικών προβλημάτων.

Τέλος, αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα τα οποία περιγράφουν τη διαδικασία της απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και σταθερής κλίνης για διαφορετικές λειτουργικές συνθήκες και ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων νιτρικού αζώτου. Τα μοντέλα επιτρέπουν το σωστό σχεδιασμό συστημάτων απομάκρυνσης νιτρικών με γνώμονα το μικρότερο κόστος με τη μεγαλύτερη απόδοση.



ABSTRACT

The increase of population, consumerism, but mainly the immoderate and thoughtless fertilization of fields and the increasing production of new chemical compounds, have led to considerable reduction of available reserves of potable water and to the relegation of their quality. The existence of nitrate and nitrite at underground and surface waters is one of the most important problems.

The presence of nitrates in potable water causes undesirable for the human organism repercussions, as methemoglobinemia and various forms of cancer. It becomes, therefore, comprehensible that the need of undertaking of action is imperative.

The last decades have become an important turn to the biological systems of treatment as they are friendly to the environment, and achieve high performances. The biological denitrification is a method of treatment that is realised via facultative bacteria that use NO_3^- as terminal electron acceptor for respiration, under anoxic conditions. Hydrogenotrophic denitrification is a promising method for nitrate removal of contaminated drinking water. Hydrogen gas is an excellent autotrophic choice, as electron donor, because of its clean nature and low biomass yield, as well as that no further steps are required to remove either excess substrate or its derivatives.

In the present study the hydrogenotrophic denitrification of potable water in batch and packed-bed reactors was studied. Series of experiments were performed for the extensive study of the behaviour of a mixed hydrogenotrophic culture and the behaviour of pure cultures of hydrogenotrophic bacteria in reactors of suspended growth (batch). Experiments, also, were carried out in packed-bed reactors, under various operating conditions, for the determination of the optimum size of support material and the most effective way of operation, concerning the maximum efficiency without operating problems.

Finally, mathematic models were developed which describe the process of hydrogenotrophic denitrification in batch and packed-bed reactors for various operating conditions and a wide range of NO_3^- -N concentrations. The models allow the right planning of systems of NO_3^- -N removal taking into consideration the lower cost with the highest performance.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	i
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	xvii
ΣΥΜΒΟΛΑ.....	xix
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	 1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1.1. Η χημεία του αζώτου.....	3
1.2. Πηγές νιτρικών.....	6
1.3. Το πρόβλημα στην Ελλάδα.....	9
1.4. Επιπτώσεις των νιτρικών.....	9
1.4.1. Μεθαιμοσφαιριναιμία.....	10
1.4.2. Άλλες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.....	11
1.4.3. Επιπτώσεις νιτρικών και νιτρωδών στην πανίδα των υδάτινων οικοσυστημάτων.....	12
1.4.4. Επιπτώσεις στο περιβάλλον.....	14
1.5. Μέθοδοι απομάκρυνσης.....	14
1.5.1. Αντίστροφη όσμωση.....	15
1.5.2. Ιονανταλλαγή.....	16
1.5.3. Ηλεκτροδιάλυση.....	16
1.5.4. Χημική και καταλυτική απομάκρυνση νιτρικών.....	17
1.5.5. Φυσική προσρόφηση.....	17
1.6. Βιολογική απονιτροποίηση.....	18
1.6.1. Αναερόβια αναπνοή και απονιτροποιητικά βακτήρια.....	19
1.6.2. Ένζυμα.....	21
1.6.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την απονιτροποίηση.....	24
1.6.4. Ετερότροφη απονιτροποίηση.....	27
1.6.5. Αυτότροφη απονιτροποίηση με ενώσεις θείου.....	33
1.6.6. Αυτότροφη υδρογονοτροφική απονιτροποίηση.....	36



1.7. Μικροβιακές καλλιέργειες - Είδη αλληλεπιδράσεων -	
Δυναμική συμπεριφορά βιοαντιδραστήρων.....	43
1.7.1. Μικροβιακές καλλιέργειες.....	43
1.7.2. Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις.....	46
1.7.3. Η περίπτωση του απλού και αμιγή συναγωνισμού.....	48
1.7.4. Δυναμική συμπεριφορά βιοαντιδραστήρων.....	51
1.7.5. Στοιχεία θεωρίας διακλαδώσεων.....	55
1.7.6. Λειτουργικό διάγραμμα χημοστάτη και μέθοδος κατασκευής.....	56
1.8. Αντικείμενο και συμβολή της διδακτορικής διατριβής.....	57
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	61
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	62
2.1. Πειραματικά συστήματα.....	62
2.2. Πληρωτικό υλικό.....	64
2.3. Αναλυτικές μέθοδοι.....	65
2.4. Ανάπτυξη μικροοργανισμών.....	69
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	71
3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ	
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΔΙΑΛΕΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ	
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΜΙΚΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	72
3.1. Εισαγωγή.....	72
3.2. Πείραμα άντλησης - πλήρωσης.....	72
3.3. Εφαρμογή και πιστοποίηση μαθηματικού μοντέλου.....	76
3.3.1. Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων.....	77
3.3.2. Πιστοποίηση του μοντέλου.....	87
3.4. Συμπεράσματα.....	90
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	92
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ	
ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΚΛΙΝΗΣ.....	93
4.1. Εισαγωγή.....	93
4.2. Εγκλιματισμός αντιδραστήρων - ανάπτυξη βιοφίλμ.....	94



4.3. Πειραματική και θεωρητική μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, σε λειτουργία άντλησης πλήρωσης.....	97
4.3.1. Λειτουργία άντλησης-πλήρωσης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης με διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό.....	97
4.3.2. Εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου για την προσομοίωση της λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης.....	104
4.4. Πειραματική και θεωρητική μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, συνεχούς λειτουργίας.....	111
4.4.1. Μελέτη συνεχούς λειτουργίας του αντιδραστήρα 2 ($d_2=2.41$ mm).....	111
4.4.2. Μελέτη συνεχούς λειτουργίας σε σύστημα τριών αντιδραστήρων σε σειρά.....	116
4.4.3. Η επίδραση του τρόπου λειτουργίας - Σύγκριση συνεχούς και λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης.....	122
4.4.4. Εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου για την προσομοίωση της συνεχούς λειτουργίας.....	126
4.4.5. Μεταβολή του πάχους του βιοφίλμ.....	132
4.5. Συμπεράσματα.....	138
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	140
5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΘΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΕ ΜΙΚΤΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	141
5.1. Εισαγωγή.....	141
5.2. Απομόνωση απονιτροποιητικών βακτηρίων.....	143
5.2.1 Απομόνωση DNA - αλληλούχιση και ανάλυση του γονιδίου 16S rDNA.....	145
5.3. Απομόνωση και ταυτοποίηση απονιτροποιητικών βακτηρίων.....	147
5.4. Πειραματική και θεωρητική μελέτη καθαρών καλλιεργειών.....	147
5.5. Πειραματική και θεωρητική μελέτη μικτών καλλιεργειών.....	156
5.5.1. Μικτή / συνδυασμένη καλλιέργεια των <i>Acidovorax</i> sp. strain Ic3 και <i>Acinetobacter</i> sp. strain Ic2.....	157
5.5.2. Μικτή / συνδυασμένη καλλιέργεια των <i>Paracoccus</i> sp. strain Ic1 και <i>Acinetobacter</i> sp. strain Ic2.....	161
5.5.3. Μικτή / συνδυασμένη καλλιέργεια	



των <i>Acidovorax</i> sp. strain Ic3, <i>Paracoccus</i> sp. strain Ic1 και <i>Acinetobacter</i> sp. strain Ic2.....	162
5.6. Συμπεράσματα.....	167
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	177
6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ.....	178
6.1. Εισαγωγή.....	178
6.2. Εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων.....	180
6.2.1. Μοντελοποίηση του Συστήματος I.....	180
6.2.2. Μοντελοποίηση του Συστήματος II.....	181
6.2.3. Μοντελοποίηση του Συστήματος III.....	182
6.3. Μεθοδολογία.....	185
6.4. Ανάλυση της δυναμικής συμπεριφοράς των συστημάτων.....	187
6.4.1. Σύστημα I. Δυναμική συμπεριφορά δύο απονιτροποιητικών πληθυσμών X_1 και X_3	187
6.4.2. Σύστημα II. Δυναμική συμπεριφορά δύο απονιτροποιητικών πληθυσμών X_2 και X_3	192
6.4.3. Σύστημα III. Δυναμική συμπεριφορά δύο απονιτροποιητικών πληθυσμών X_1 , X_2 και X_3	194
6.5. Ρυθμός απονιτροποίησης και συσσώρευση νιτρώδους αζώτου για κάθε σύστημα σε χημοστάτη.....	199
6.5.1. Ρυθμός απονιτροποίησης και συσσώρευση νιτρώδους αζώτου του Συστήματος I (X_1 και X_3).....	200
6.5.2. Ρυθμός απονιτροποίησης και συσσώρευση νιτρώδους αζώτου του Συστήματος II (X_2 και X_3)	202
6.5.3. Ρυθμός απονιτροποίησης και συσσώρευση νιτρώδους αζώτου του Συστήματος III (X_1 , X_2 και X_3).....	205
6.6. Συμπεράσματα.....	211
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	211
7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ -	



ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ.....	217
7.1. Γενικά συμπεράσματα.....	217
7.2. Προτάσεις για μελλοντική εργασία.....	220
Βιβλιογραφία.....	222
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	232
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	245



ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1. Ο κύκλος του αζώτου (Hiscock et al., 1991).....	4
Σχήμα 1.2. Διάγραμμα σταθερότητας των ενώσεων του αζώτου στους 25°C και 1atm (Hiscock et al., 1991).....	6
Σχήμα 1.3. Δέκτες ηλεκτρονίων τοποθετημένη σειρά προτίμησης από τους μικροοργανισμούς (Korom, 1992).....	20
Σχήμα 1.4. Μοντέλο διαδρομής της μεταφοράς ηλεκτρονίων για τον <i>Paracoccus denitrificans</i> . NaR=νιτρική αναγωγή, NiR=αναγωγή νιτρώδων, NOR=αναγωγή μονοξειδίου του αζώτου, N ₂ OR=αναγωγή υποξειδίου του αζώτου, Fr=φλαβοπρωτεΐνη, Q=υβικινόνη, Cyt=κυτόχρωμα, FeS=σιδηροθειούχα πρωτεΐνη, Mo=μολυβδαίνιο, MeOH=μεθανόλη (Knowles, 1982).....	23
Σχήμα 1.5. Μεταφορά ηλεκτρονίων στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου <i>Pseudomonas stutzeri</i> κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης υπό ανοξικές συνθήκες (Madigan και Martinko, 2006).....	24
Σχήμα 1.6. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης βακτηρίων.....	31
Σχήμα 1.7. Χημοστάτης (Παύλου, 2000).....	48
Σχήμα 1.8. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης βακτηρίων.....	50
Σχήμα 1.9. Διάγραμμα λειτουργίας του συστήματος.....	54
Σχήμα 2.1. Πειραματική διάταξη αντιδραστήρων α) διαλείποντος έργου, β) σταθερής κλίνης και γ) σταθερής κλίνης σε σειρά.....	67-68
Σχήμα 3.1. Πειραματική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους- αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mg/L.....	74
Σχήμα 3.2. Επιβεβαίωση της σταθερής συμπεριφοράς της καλλιέργειας. Πειραματική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους-αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mg/L.....	76
Σχήμα 3.3. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους- αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου όπως	



προέκυψαν από τα πειράματα κινητικής. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ ήταν: α) 31 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, β) 42.96 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, γ) 81.46 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, δ) 165.14 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, ε) 201.7 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$	78-80
Σχήμα 3.4. α) Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης για τα πειράματα κινητικής με τις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις από 30 έως 200 mg /L και β) ημιλογαριθμικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα κινητικής των 80 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$	82
Σχήμα 3.5. α) Ρυθμοί απονιτροποίησης καθ' όλη τη χρονική διάρκεια των πειραμάτων κινητικής και β) ρυθμοί απονιτροποίησης όπως υπολογίστηκαν για το χρονικό διάστημα των πρώτων 40 ωρών των πειραμάτων κινητικής όπου η παρεμπόδιση είναι πιο έντονη.....	84
Σχήμα 3.6. Υπολογισμός συντελεστή απόδοσης $Y_{X/N}$ ($\text{mg βιομάζας/mg αζώτου}$).....	87
Σχήμα 3.7. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους- αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου όπως προέκυψαν από τα πειράματα κινητικής. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ και της βιομάζας ήταν: α) 7.4 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, 27.02 mgβιομάζας/L ; β) 20.91 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, 42.06 mgβιομάζας/L ; γ) 68.39 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, 52.91 mgβιομάζας /L	89-90
Σχήμα 4.1. Εγκλιματισμός αντιδραστήρα 3 ($d_3=1.75 \text{ mm}$). Πειραματική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού- και του νιτρώδους- αζώτου συναρτήσει του χρόνου α) για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mg/L για χρονικό διάστημα 20 ημερών και β) για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 40 mg/L για χρονικό διάστημα από την 20 ^η έως την 33 ^η ημέρα.....	95
Σήμα 4.2. Πειραματικοί λειτουργικοί κύκλοι όπως προέκυψαν από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης του αντιδραστήρα 3 με χαλίκι μέσης διαμέτρου 1.75 mm , για συγκεντρώσεις $\text{NO}_3^- \text{-N}$ από 10 έως 200 mg/L	98
Σχήμα 4.3. Πειραματικοί και θεωρητικοί λειτουργικοί κύκλοι όπως προέκυψαν από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης του αντιδραστήρα 2 με χαλίκι μέσης διαμέτρου 2.41 mm , για συγκεντρώσεις $\text{NO}_3^- \text{-N}$ από 10 έως 200 mg/L	99
Σήμα 4.4. Πειραματικοί και θεωρητικοί λειτουργικοί κύκλοι όπως προέκυψαν από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης του αντιδραστήρα 1 με χαλίκι μέσης διαμέτρου 4.03 mm , για συγκεντρώσεις $\text{NO}_3^- \text{-N}$ από 10 έως 200 mg/L	100
Σήμα 4.5. Ρυθμοί απονιτροποίησης σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου όπως προέκυψαν από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των	



αντιδραστήρων 1 ($d_1=4.03\text{mm}$), 2 ($d_2=2.41\text{ mm}$) και 3 ($d_3=1.75\text{ mm}$) για συγκεντρώσεις $\text{NO}_3^- \text{-N}$ από 10 έως 200 mg/L.....	101
Σχήμα 4.6. Δυναμικό οξειδοαναγωγής σε σχέση με το χρόνο όπως προέκυψε από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης α) του αντιδραστήρα 2 και β) του αντιδραστήρα 3 για διάφορες συγκεντρώσεις $\text{NO}_3^- \text{-N}$	103
Σχήμα 4.7. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ κατά μήκος του φίλτρου με χαλίκι μέσης διαμέτρου 2.41 mm, κατά τη συνεχή λειτουργία με παροχή α) 5, β) 10 και γ) 20 mL/min.....	113-114
Σχήμα 4.8. Επί της εκατό απόδοση του φίλτρου α) για σταθερή παροχή και διαφορετική συγκέντρωση τροφοδοσίας και β) για σταθερή συγκέντρωση τροφοδοσίας και διαφορετική παροχή.....	115
Σχήμα 4.9. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ κατά μήκος του συστήματος των τριών αντιδραστήρων 1, 2 και 3, κατά τη συνεχή λειτουργία με παροχή α) 10, β) 15 και 20 mL/min.....	121
Σχήμα 4.10. Οργανικές φορτίσεις που εφαρμόστηκαν κατά τη συνεχή λειτουργία του αντιδραστήρα 2 ($d=2.41\text{ mm}$) (κλειστά σύμβολα) και του συστήματος των τριών αντιδραστήρων σε σειρά (ανοιχτά σύμβολα).....	122
Σχήμα 4.11. Διαμόρφωση πάχους βιοφίλμ για τα δέκα τμήματα του αντιδραστήρα σε σχέση με το χρόνο από τη στιγμή της πλύσης μέχρι τη στιγμή της τελευταίας δειγματοληψίας.....	129
Σχήμα 4.12. Διαμόρφωση των συγκεντρώσεων του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το χρόνο για τα δέκα τμήματα του αντιδραστήρα από τη στιγμή της πλύσης μέχρι τη στιγμή της τελευταίας δειγματοληψίας.....	130
Σχήμα 4.13. Διαμόρφωση των συγκεντρώσεων του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το χρόνο για τα τμήματα που αντιστοιχούν στα δειγματοληπτικά σημεία του αντιδραστήρα.....	131
Σχήμα 4.14. Διαμόρφωση πάχους βιοφίλμ σε σχέση με την οργανική φόρτιση, όπως διαμορφώθηκε μετά την τέταρτη μέρα με αρχικό πάχος βιοφίλμ 0.0012 cm και 0.0016 cm.....	132
Σχήμα 4.15. Θεωρητική μεταβολή του πάχους του βιοφίλμ κατά μήκος του αντιδραστήρα 2 ($d=2.41\text{ mm}$), κατά τη συνεχή λειτουργία με συγκέντρωση	



τροφοδοσίας από 20 μέχρι 200 mgNO ₃ ⁻ -N/L, και παροχή α) 5 mL/min, β) 10 mL/min, και γ) 20 mL/min.....	134-135
Σχήμα 4.16. Συγκέντρωση αποκολλημένης βιομάζας σε σχέση με την οργανική φόρτιση, όπως διαμορφώθηκε μετά την τέταρτη μέρα με αρχικό πάχος βιοφίλμ 0.0012 cm και 0.0016 cm.....	136
Σχήμα 4.17. Θεωρητική μεταβολή του πάχους του βιοφίλμ κατά μήκος των τριών αντιδραστήρων σε σειρά, κατά τη συνεχή λειτουργία με συγκέντρωση τροφοδοσίας από 100 μέχρι 340 mgNO ₃ ⁻ -N/L, και παροχή α) 10 mL/min, β) 15 και 20 mL/min.....	137
Σχήμα 4.18. Αρχική τιμή πάχους βιοφίλμ σε σχέση με την οργανική φόρτιση, όπως προκύπτει από την πρόβλεψη του μοντέλου για τη συνεχή λειτουργία των τριών αντιδραστήρων σε σειρά.....	138
Σχήμα 5.1. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.....	144
Σχήμα 5.2. Φυλογενετικό δέντρο που υποδεικνύει τις φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών Ic1, Ic2, Ic3 σε σχέση με συγγενικά είδη από τις ομάδες α, β και γ των πρωτεοβακτηρίων. Το δέντρο είναι βασισμένο στο γονίδιο 16S rDNA και ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο neighbour-joining. Σαν παραομάδα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ATCC <i>Bacillus cereus</i> . Οι αριθμοί στα σημεία διακλάδωσης αναπαριστούν τιμές bootstrap (ο αριθμός των επαναλήψεων είναι 100). Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών του 16S rDNA φαίνονται σε παρένθεση.....	146
Σχήμα 5.3. Πειραματική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της καθαρής καλλιέργειας του βακτηριακού είδους <i>Alcaligenes sp.</i> strain Ic1 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και βιομάζας ήταν: α) 47.1 mgNO ₃ ⁻ -N/L και 1.7 mgβιομάζας/L και β) 30 mgNO ₃ ⁻ -N/L και 4.86 mgβιομάζας/L.....	149
Σχήμα 5.4. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της καθαρής καλλιέργειας του βακτηριακού είδους <i>Acidovorax sp.</i> strain Ic3 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και βιομάζας ήταν: 34.92 mgNO ₃ ⁻ -N/L και 25.26 mgβιομάζας/L.....	152
Σχήμα 5.5. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της καθαρής καλλιέργειας του	



- βακτηριακού είδους *Acinetobacter sp.* strain Ic2 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και βιομάζας ήταν: 33.67 mgNO₃⁻-N/L και 10.55 mgβιομάζας/L.....153
- Σχήμα 5.6. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της καθαρής καλλιέργειας του βακτηριακού είδους *Paracoccus sp.* strain Ic1 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και βιομάζας ήταν: 37.21 mgNO₃⁻-N/L και 23.18 mgβιομάζας/L.....154
- Σχήμα 5.7. Επίστρωση σε τρυβλίο με τη μέθοδο της σταγόνας.....158
- Σχήμα 5.8. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Acidovorax sp.* strain Ic3 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του νιτρικού αζώτου και της συνολικής βιομάζας ήταν: 42.28 mgNO₃⁻-N/L και 16.3 mgβιομάζας/L. Τα σύμβολα 'X_{ad}' και 'X_{an}' υποδεικνύουν τις θεωρητικά υπολογισμένες τιμές των συγκεντρώσεων των *Acidovorax sp.* strain Ic3 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2, αντίστοιχα, σε σχέση με το χρόνο.....160
- Σχήμα 5.9. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του νιτρικού αζώτου και της συνολικής βιομάζας ήταν: 46.1 mgNO₃⁻-N/L και 11.82 mgβιομάζας/L. Τα σύμβολα 'X_{pr}' και 'X_{an}' υποδεικνύουν τις θεωρητικά υπολογισμένες τιμές των συγκεντρώσεων των *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2, αντίστοιχα, σε σχέση με το χρόνο.....164
- Σχήμα 5.10. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Acidovorax sp.* strain Ic3, *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του νιτρικού αζώτου και της συνολικής βιομάζας ήταν: 17.02 mgNO₃⁻-N/L και 45.54 mgβιομάζας/L. Τα σύμβολα 'X_{ad}', 'X_{pr}' και 'X_{an}' υποδεικνύουν τις θεωρητικά υπολογισμένες τιμές των



συγκεντρώσεων των *Acidovorax* sp. strain Ic3, *Paracoccus* sp. strain Ic1 και *Acinetobacter* sp. strain Ic2, αντίστοιχα, σε σχέση με το χρόνο.....166

Σχήμα 6.1. Διάγραμμα λειτουργίας (D ως προς NO_3^- -N) ενός χημοστάτη (Σύστημα I) στον οποίο δύο απονιτροποιητικοί βακτηριακοί πληθυσμοί αναπτύσσονται μαζί, έχοντας συναγωνισμό για δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικό-, νιτρώδες- άζωτο). Συμβολισμός καμπυλών: T_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_1 ; T_3 μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_3 ; T^1_3 και T^2_3 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; T^1_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_1 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; L^1_3 και L^2_3 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_3 ; L^1_1 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_1 ; L^1_{13} , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; H_{13} , Hopf διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 . Ο χαρακτήρας κάθε μόνιμης κατάστασης στις διάφορες περιοχές του διαγράμματος λειτουργίας δίνεται στον Πίνακα 6.3.....191

Σχήμα 6.2. Διάγραμμα λειτουργίας (D ως προς NO_3^- -N) ενός χημοστάτη (Σύστημα II) στον οποίο δύο απονιτροποιητικοί βακτηριακοί πληθυσμοί αναπτύσσονται μαζί, έχοντας συναγωνισμό για δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικό-, νιτρώδες- άζωτο). Συμβολισμός καμπυλών: T_2 , διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_2 ; T_3 μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_3 ; T^3_3 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 ; L^3_3 και L^4_3 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_3 ; L^1_2 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_2 ; L^1_{23} , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 . Ο χαρακτήρας κάθε μόνιμης κατάστασης στις διάφορες περιοχές του διαγράμματος λειτουργίας δίνεται στον Πίνακα 6.3.....193

Σχήμα 6.3. Διάγραμμα λειτουργίας (D ως προς NO_3^- -N) ενός χημοστάτη (Σύστημα III) στον οποίο τρεις απονιτροποιητικοί βακτηριακοί πληθυσμοί αναπτύσσονται μαζί, έχοντας συναγωνισμό για δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικό-,



νιτρώδες- άζωτο). Συμβολισμός καμπυλών: T_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_1 ; T_2 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_2 ; T_3 μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_3 ; T^2_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_1 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; T^3_1 , T^4_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_1 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_2 ; T^4_3 και T^5_3 , διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; T^6_3 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 ; T^1_2 και T^2_2 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_2 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_2 ; T_{13} και T_{23} , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_2 ; L^6_3 και L^5_3 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_3 ; L^2_1 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_1 ; L^2_2 και L^3_2 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_2 ; L^2_{13} , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; L^2_{23} , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 ; H^2_{13} , Hopf διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; H_{12} , Hopf διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_2 ; H_2 , Hopf διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2 ; Ο χαρακτήρας κάθε μόνιμης κατάστασης στις διάφορες περιοχές του διαγράμματος λειτουργίας δίνεται στον Πίνακα 6.3.....197-198

Σχήμα 6.4. Ρυθμός απονιτροποίησης σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης όπως προέκυψε από τις προβλέψεις του μοντέλου κατά την ανάλυση της δυναμικής συμπεριφοράς του συστήματος I, για συγκέντρωση τροφοδοσίας στο χημοστάτη $N_{if} = 100 \text{ mg/L}$201

Σχήμα 6.5. α) Ρυθμός απονιτροποίησης και β) συσσώρευση νιτρωδών σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης και τη συγκέντρωση τροφοδοσίας για το σύστημα I.203-204

Σχήμα 6.6. α) Ρυθμός απονιτροποίησης και β) συσσώρευση νιτρωδών σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης και τη συγκέντρωση τροφοδοσίας



για το σύστημα II.	206-207
Σχήμα 6.7. α) Ρυθμός απονιτροποίησης και β) συσσώρευση νιτρώδων σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης και τη συγκέντρωση τροφοδοσίας για το σύστημα III.....	209-210

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Επιτρεπτά όρια νιτρικού και νιτρώδους αζώτου (Della Rocca et al., 2007).....	3
Πίνακας 1.2. Βιολογική μείωση νιτρικών.....	5
Πίνακας 1.3. Επιπτώσεις νιτρικών στην υγεία των ανθρώπων (Schoeman and Steyn, 2003).....	10
Πίνακας 1.4. Βακτηριακά είδη ικανά για απονιτροποίηση.....	21
Πίνακας 1.5. Κόστος και οργανικό υπόστρωμα (Della Rocca et al., 2007).....	28
Πίνακας 1.6. Στοιχειομετρικές αντιδράσεις κατά την ετερότροφη απονιτροποίηση.....	29
Πίνακας 1.7. Ενδεικτικές τιμές κινητικών σταθερών για τα ετερότροφα απονιτροποιητικά βακτήρια.....	32
Πίνακας 1.8. Στοιχειομετρικές αντιδράσεις κατά την απονιτροποίηση με ενώσεις θείου.....	35
Πίνακας 1.9. Στοιχειομετρικές αντιδράσεις κατά την υδρογονοτροφική απονιτροποίηση.....	37
Πίνακας 1.10. Ρυθμοί υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης αντιδραστήρων μεμβράνες.....	41
Πίνακας 2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού δικτύου πόλεως.....	63
Πίνακας 3.1. Τιμές κινητικών παραμέτρων.....	86
Πίνακας 4.1. Ρυθμοί απονιτροποίησης για τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των φίλτρων, για ένα εύρος συγκεντρώσεων NO ₃ ⁻ -N από 10 έως 200 mg/L.....	102
Πίνακας 4.2. Τιμές κινητικών παραμέτρων για όπως προέκυψαν από την προσομοίωση της απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και σταθερής κλίνης.....	110



Πίνακας 4.3. Ρυθμοί απονιτροποίησης κατά τη συνεχή και τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των αντιδραστήρων σταθερής κλίνης.....	118
Πίνακας 4.4. Σύγκριση ρυθμών απονιτροποίησης της εργασίας αυτής με άλλα συστήματα υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης.....	125
Πίνακας 5.1. Μαθηματικό μοντέλο για την απονιτροποίηση των καλλιεργειών των τριών υδρογονοτροφικών βακτηρίων.....	169
Πίνακας 5.2. Μαθηματικό μοντέλο για την απονιτροποίηση της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών <i>Acidovorax sp. strain Ic3</i> και <i>Acinetobacter sp. strain Ic2</i>	171
Πίνακας 5.3. Μαθηματικό μοντέλο για την απονιτροποίηση της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών <i>Acinetobacter sp. strain Ic2</i> και <i>Paracoccus sp. strain Ic1</i>	172
Πίνακας 5.4. Μαθηματικό μοντέλο για την απονιτροποίηση της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών <i>Acidovorax sp. strain Ic3</i> , <i>Acinetobacter sp. strain Ic2</i> και <i>Paracoccus sp. strain Ic1</i>	174
Πίνακας 5.5. Τιμές κινητικών παραμέτρων.....	176
Πίνακας 6.1. Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης και ρυθμοί διατήρησης των τριών βακτηριακών πληθυσμών.....	184
Πίνακας 6.2. Τιμές κινητικών παραμέτρων.....	190
Πίνακα 6.3. Χαρακτήρας μονίμων* καταστάσεων των συστημάτων I, II και III, στις διάφορες περιοχές των διαγραμμάτων λειτουργίας.....	213



ΣΥΜΒΟΛΑ

Μαθηματικό μοντέλο μικτής καλλιέργειας σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου

N_I = συγκέντρωση νιτρικού αζώτου (mg/L)

N_2 = συγκέντρωση νιτρώδους αζώτου (mg/L)

X = συγκέντρωση βιομάζας (mg/L)

r_{max1} = μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης για τα νιτρικά (l/h)

r_{max2} = μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης για τα νιτρώδη (l/h)

K_s = σταθερά κορεσμού για τα νιτρικά (mg/L)

K_n = σταθερά κορεσμού για τα νιτρώδη (mg/L)

K_i = σταθερά παρεμπόδισης για τα νιτρικά (mg/L)

k_d = σταθερά του ρυθμού θνησιμότητας (l/h)

Y_s = συντελεστής απόδοσης για τα νιτρικά (mg βιομάζας/mgNO₃⁻-N)

Y_n = συντελεστής απόδοσης για τα νιτρώδη (mg βιομάζας/mgNO₂⁻-N)

k_{d1} = σταθερά του μοντέλου στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των νιτρωδών (mgNO₂⁻-N/mgNO₃⁻-N)

k_{d2} = σταθερά του μοντέλου στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των νιτρικών (mg NO₃⁻-N/mgNO₂⁻-N)

Μαθηματικό μοντέλο μικτής καλλιέργειας σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης

C_{NO_3} = συγκέντρωση νιτρικού αζώτου (mg/cm³)

C_{NO_2} = συγκέντρωση νιτρώδους αζώτου (mg/cm³)

$C_{NO_3,B}$ = συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στο υγρό ρεύμα (mg/cm³)

$C_{NO_2,B}$ = συγκέντρωση νιτρώδους αζώτου στο υγρό ρεύμα (mg/cm³)

X = πυκνότητα της βιομάζας (mg/cm³)

D_{NO_3} = συντελεστής διάχυσης νιτρικών (cm²/d)

D_{NO_2} = συντελεστής διάχυσης νιτρωδών (cm²/h)

A_s = ειδική επιφάνεια του πληρωτικού υλικού (cm²/cm³)

ε = πορώδες



φ = πορώδες βιοφίλμ

L = πάχος βιοφίλμ (cm)

u_L = ταχύτητα μετακίνησης της εξωτερικής επιφάνειας του βιοφίλμ (cm/h)

u_{det} = η ταχύτητα αποκόλλησης βιομάζας από την επιφάνεια του βιοφίλμ (cm/h)

K_{det} = συντελεστής αποκόλλησης (cm/h)

r'_{det} = ρυθμός αποκόλλησης βιομάζας από την επιφάνεια του βιοφίλμ (mg/cm²h)

u_f = ταχύτητα ανάπτυξης του βιοφίλμ (cm/h)

Q = ογκομετρική παροχή (cm³/min)

V = όγκος κάθε τμήματος του αντιδραστήρα (cm³)

$\mu_{(NO_3)}$ = ειδικός ρυθμός ανάπτυξης νιτρικών (l/h)

$\mu_{(NO_2)}$ = ειδικός ρυθμός ανάπτυξης νιτρωδών (l/h)

Μαθηματικό μοντέλο καθαρών καλλιεργειών σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και σε γημοστάτη

k_{d1ad} = σταθερά στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Acidovorax sp. strain Ic3*
(mgNO₂⁻-N/mgNO₃⁻-N)

k_{d1an} = σταθερά στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Acinetobacter sp. strain Ic2*
(mgNO₂⁻-N/mgNO₃⁻-N)

k_{d1pr} = σταθερά στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Paracoccus sp. strain Ic1*
(mgNO₂⁻-N/mgNO₃⁻-N)

k_{d2ad} = σταθερά στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Acidovorax sp. strain Ic3*
(mgNO₃⁻-N/mgNO₂⁻-N)

k_{d2an} = σταθερά στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Acinetobacter sp. strain Ic2*
(mgNO₃⁻-N/mgNO₂⁻-N)

k_{d2pr} = σταθερά στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Paracoccus sp. strain Ic1*
(mgNO₃⁻-N/mgNO₂⁻-N)

k_{dad} = σταθερά του ρυθμού θνησιμότητας του *Acidovorax sp. strain Ic3* (l/h)

k_{dan} = σταθερά του ρυθμού θνησιμότητας του *Acinetobacter sp. strain Ic2* (l/h)

k_{dpr} = σταθερά του ρυθμού θνησιμότητας του *Paracoccus sp. strain Ic1* (l/h)

K_{iad} = σταθερά παρεμπόδισης νιτρικών του *Acidovorax sp. strain Ic3* (mg/L)

K_{ian} = σταθερά παρεμπόδισης νιτρικών του *Acinetobacter sp. strain Ic2* (mg/L)

K_{ipr} = σταθερά παρεμπόδισης νιτρικών του *Paracoccus sp. strain Ic1* (mg/L)



K_{man} = σταθερά παρεμπόδισης νιτρώδων του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (mg/L)

K_{mad} = σταθερά παρεμπόδισης νιτρώδων του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (mg/L)

K_{mpr} = σταθερά παρεμπόδισης νιτρώδων του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (mg/L)

K_{nad} = σταθερά κορεσμού για τα νιτρώδη του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (mg/L)

K_{nan} = σταθερά κορεσμού για τα νιτρώδη του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (mg/L)

K_{npr} = σταθερά κορεσμού για τα νιτρώδη του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (mg/L)

K_{sad} = σταθερά κορεσμού για τα νιτρικά του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (mg/L)

K_{san} = σταθερά κορεσμού για τα νιτρικά του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (mg/L)

K_{spr} = σταθερά κορεσμού για τα νιτρικά του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (mg/L)

m_{lad} = ειδικός ρυθμός διατήρησης νιτρικών του *Acidovorax sp.* strain Ic3
(mgNO₃⁻-N/h mg βιομάζας)

m_{lan} = ειδικός ρυθμός διατήρησης νιτρικών του *Acinetobacter sp.* strain Ic2
(mgNO₃⁻-N/h mg βιομάζας)

m_{lpr} = ειδικός ρυθμός διατήρησης νιτρικών του *Paracoccus sp.* strain Ic1
(mgNO₃⁻-N/h mg βιομάζας)

m_{2ad} = ειδικός ρυθμός διατήρησης νιτρώδων του *Acidovorax sp.* strain Ic3
(mgNO₂⁻-N/h mg βιομάζας)

m_{2ad} = ειδικός ρυθμός διατήρησης νιτρώδων του *Acidovorax sp.* strain Ic3
(mgNO₂⁻-N/h mg βιομάζας)

m_{2pr} = ειδικός ρυθμός διατήρησης νιτρώδων του *Paracoccus sp.* strain Ic1
(mgNO₂⁻-N/h mg βιομάζας)

D = ρυθμός αραίωσης (1/h)

N_{if} = συγκέντρωση τροφοδοσίας νιτρικού αζώτου (mg/L)

N_1 = συγκέντρωση νιτρικού αζώτου (mg/L)

N_2 = συγκέντρωση του νιτρώδους αζώτου (mg/L)

r_{maxlad} = μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης νιτρικών του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (1/h)

r_{maxlan} = μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης νιτρικών του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (1/h)

r_{maxlpr} = μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης νιτρικών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (1/h)

r_{max2ad} = μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης νιτρώδων του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (1/h)

r_{max2an} = μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης νιτρώδων του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (1/h)

r_{max2pr} = μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης νιτρώδων του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (1/h)

X_{ad} = συγκέντρωση της βιομάζας του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (mg/L)

X_{an} = συγκέντρωση της βιομάζας του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (mg/L)



X_{pr} = συγκέντρωση της βιομάζας του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (mg/L)

Y_{sad} = συντελεστής απόδοσης νιτρικών του *Acidovorax sp.* strain Ic3
(mg βιομάζας/mgNO₃⁻-N)

Y_{san} = συντελεστής απόδοσης νιτρικών του *Acinetobacter sp.* strain Ic2
(mg βιομάζας/mgNO₃⁻-N)

Y_{spr} = συντελεστής απόδοσης νιτρικών του *Paracoccus sp.* strain Ic1
(mg βιομάζας/mgNO₃⁻-N)

Y_{nad} = συντελεστής απόδοσης νιτρωδών του *Acidovorax sp.* strain Ic3
(mg βιομάζας/mgNO₂⁻-N)

Y_{nan} = συντελεστής απόδοσης νιτρωδών του *Acinetobacter sp.* strain Ic2
(mg βιομάζας/mgNO₂⁻-N)

Y_{npr} = συντελεστής απόδοσης νιτρωδών του *Paracoccus sp.* strain Ic1
(mg βιομάζας/mgNO₂⁻-N)

q_1 = ρυθμός διατήρησης νιτρικών του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (l/h)

q_2 = ρυθμός διατήρησης νιτρωδών του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (l/h)

q_3 = ρυθμός διατήρησης νιτρικών του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (l/h)

q_4 = ρυθμός διατήρησης νιτρωδών του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (l/h)

q_5 = ρυθμός διατήρησης νιτρικών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (l/h)

q_6 = ρυθμός διατήρησης νιτρωδών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (l/h)

r_1 = ρυθμός ανάπτυξης νιτρικών του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (l/h)

r_2 = ρυθμός ανάπτυξης νιτρωδών του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (l/h)

r_3 = ρυθμός ανάπτυξης νιτρικών του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (l/h)

r_4 = ρυθμός ανάπτυξης νιτρωδών του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (l/h)

r_5 = ρυθμός ανάπτυξης νιτρικών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (l/h)

r_6 = ρυθμός ανάπτυξης νιτρωδών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 (l/h)



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το νερό αποτελεί βασική παράμετρο που διατηρεί τη ζωή πάνω στη γη. Είναι ένας από τους πολυτιμότερους ανανεώσιμους φυσικούς πόρους, ο οποίος έχει ουσιαστική σημασία για τη ζωή, διότι αποτελεί βασικό συστατικό όλων των οργανισμών. Όμως, τα αποθέματα γλυκού νερού ανέρχονται σε 2.6% μόνο των συνολικών υδάτινων αποθεμάτων της γης και από αυτά το 0.6% είναι διαθέσιμο για πόσιμο νερό (Ghafari et al., 2007). Τα ανανεώσιμα παγκόσμια αποθέματα γλυκού νερού υπολογίζονται σήμερα σε 40,000 κυβικά χιλιόμετρα. Σε κάθε άτομο δηλαδή αναλογούν περίπου 7.000 κυβικά μέτρα, ποσότητα πολλαπλάσια από αυτή που χρειάζεται μια κοινωνία για να εξασφαλίσει ένα λογικό μέσο επίπεδο ζωής στα μέλη της.

Τις τελευταίες δεκαετίες η αύξηση του πληθυσμού της γης, η εντατικοποίηση της γεωργίας και η ανάπτυξη της βιομηχανίας έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ζήτησης του νερού, την αύξηση των παραγόμενων υγρών αποβλήτων και κατ' επέκταση τη μείωση και υποβάθμιση των διαθέσιμων αποθεμάτων νερού. Η αυξανόμενη επιβάρυνση των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων, με ρυπογόνες ουσίες, έχει σαν αποτέλεσμα τα νερά να παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ιόντων χλωρίου, θειικών κ.α. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών και αμμωνίας, επίσης, είναι ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα των υπογείων και επιφανειακών νερών. Αυξημένα επίπεδα νιτρικών της τάξης των 50-100 mg/L είναι πλέον συνήθη σε ρυπασμένα νερά.

Κρίνεται λοιπόν αναγκαία η απορρύπανση των ποιοτικά υποβαθμισμένων αποθεμάτων και των αποβλήτων με σκοπό την κατανάλωσή τους ή την επαναχρησιμοποίησή τους, αντίστοιχα.

Εξαιτίας των κινδύνων που εγκυμονεί η κατανάλωση ρυπασμένου νερού από νιτρικά στην υγεία των ανθρώπων, Διεθνείς Οργανισμοί έχουν ορίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια των νιτρικών και των νιτρωδών στο πόσιμο νερό. Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια τόσο για το νιτρικό όσο και για το νιτρώδες άζωτο, όπως έχουν οριστεί από οργανισμούς σε διάφορες χώρες, δίνονται στον Πίνακα 1.1.



Πίνακας 1.1. Επιτρεπτά όρια νιτρικού και νιτρώδους αζώτου (Della Rocca et al., 2007).

		Νιτρικό άζωτο (mg/L)	Νιτρώδες άζωτο (mg/L)
USA	MCLG ^a	10.03	1
	MCL ^b	10.03	1
EEC (1998)	MCL ^γ	11.3	0.15
	EDWTP ^δ	11.3	0.03
WHO (2003)		11.3	0.9
Πακιστάν		10.16	--
Αυστραλία		10.16	0.003
Μαρόκο ^ε		11.3	0.03
Αργεντινή		10.16	0.03
Κορέα		10.03	--
Μαλαισία		10.16	0.0015
Καναδάς ^ζ		10.16	0.97
Αιθιοπία		11.3	0.9
IBWA ^η		2.26	0.3

^a οδηγός για το ανώτατο επιτρεπτό όριο, ^b ανώτατο επιτρεπτό όριο, ^γ πρέπει να τηρείται η σχέση $(\text{NO}_3^-/50) + (\text{NO}_2^-/3) \leq 1$, ^δ αφορά την έξοδο του πόσιμου νερού από μονάδα επεξεργασίας,

^ε από την ONEP εθνική υπηρεσία πόσιμου ύδατος, ^ζ τα 10.16 mgN/L αναφέρονται στο άθροισμα των νιτρικών και των νιτρώδων όταν τα νιτρώδη δεν υπερβαίνουν το 0.97 mgN/L,

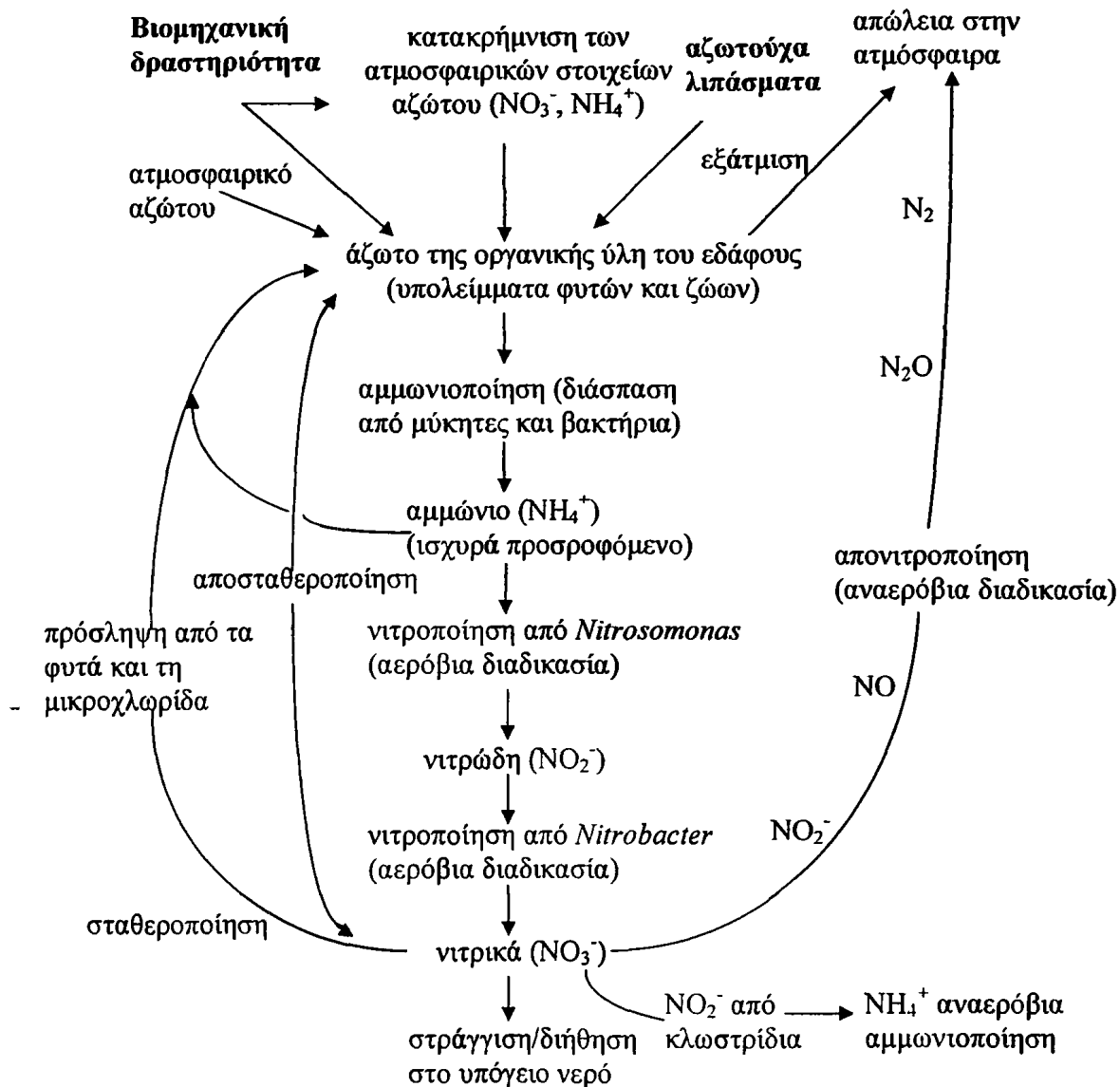
^η Διεθνής Ένωση εμφιάλωσης νερού.

1.1. Η χημεία του αζώτου

Το έδαφος είναι ένα δυναμικό σύστημα στο οποίο πραγματοποιούνται διάφοροι βιολογικοί και χημικοί μετασχηματισμοί των ενώσεων του αζώτου. Το μεγαλύτερο μέρος του ευρωπαϊκού καλλιεργήσιμου εδάφους περιέχει 3,000-5,000 kgN/ha. Το 95% αυτού του αζώτου βρίσκεται με τη μορφή οργανικών ενώσεων στο έδαφος και θα είναι διαθέσιμο στα φυτά αφότου αποσταθεροποιηθεί (μετατροπή σε ανόργανο N) (Owen and Jurgens-Gschwind, 1986).

Στο Σχήμα 1.1. παρουσιάζονται οι πηγές του αζώτου στο περιβάλλον και τα μονοπάτια που συντελούν τον κύκλο αυτού (Hiscock et al., 1991). Οι διάφορες μορφές αζώτου υφίστανται συνεχή ανακύκλωση στη βιόσφαιρα.





Σχήμα 1.1. Ο κύκλος του αζώτου (Hiscock et al., 1991).

Οι κυριότερες μετατροπές είναι: Αποσταθεροποίηση είναι η μετατροπή περίπλοκων μορφών οργανικού αζώτου σε απλούστερες ανόργανες μορφές. Σταθεροποίηση είναι η μετατροπή ευκίνητων ειδών αζώτου σε ορισμένες οργανικές μορφές για τη μικροβιακή και φυτική αφομοίωση. Αμμωνιοποίηση είναι η βιολογική μετατροπή των αζωτούχων ουσιών των νεκρών οργανισμών σε αμμωνία από ετερότροφα βακτήρια και μύκητες (σαπρόφυτα) υπό αερόβιες συνθήκες. Νιτροποίηση είναι η βιοχημική οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά. Παρουσία ορισμένων βακτηρίων καθώς και οξυγόνου, η αμμωνία οξειδώνεται ενζυματικά με μία βήμα προς βήμα πορεία

σε νιτρώδη (NO_2^-) και ακολούθως σε νιτρικά: $2\text{NH}_3 + 3\text{O}_2 \rightarrow \text{Nitrosomonas} \rightarrow 2\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$ και $2\text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{Nitrobacter} \rightarrow 2\text{NO}_3^-$.

Απονιτροποίηση είναι η βιοχημική αναγωγή παρουσία απονιτροποιητικών μικροοργανισμών των νιτρικών και των νιτρωδών σε αέριο άζωτο υπό ανοξικές συνθήκες (Διαμαντίδης, 1994). Το άζωτο υφίσταται βιοχημικές μεταβολές προτού μεταφερθεί στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα μέσω της διήθησης ή της έκπλυσης των εδαφών.

Στα νερά το άζωτο συναντάται σε διάφορες μορφές ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν. Σε αερόβιες συνθήκες (επιφάνεια λιμνών) το άζωτο υπάρχει με την πλήρη οξειδωμένη μορφή του, τα νιτρικά, ενώ σε αναερόβιες συνθήκες, (πυθμένας) εμφανίζεται με την πιο ανηγμένη του μορφή, την αμμωνία και το αμμωνιακό ιόν (Κουϊμτζής κ.α., 1998).

Σε περίπτωση ύπαρξης νιτρικών σε ένα περιβάλλον η κατάληξή τους εξαρτάται από το είδος των μικροοργανισμών και από τις συνθήκες που επικρατούν (Πίνακας 1.2). Η βιολογική απομάκρυνση των νιτρικών πραγματοποιείται από ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών μέσω αφομοιωτικών ή μη μονοπατιών (Σχήμα 1.1). Υπό αερόβιες συνθήκες τα φυτά όπως επίσης και τα βακτήρια, τα φύκη και οι μύκητες, χρησιμοποιούν ως πηγή αζώτου για βιοσύνθεση τόσο τα αμμωνιακά όσο και τα νιτρικά ιόντα. Απουσία αμμωνίας χρησιμοποιείται το νιτρικό άζωτο (νιτρική αναγωγή) για τη σύνθεση της οργανικής ύλης. Η νιτρική αναγωγή πραγματοποιείται σε δύο στάδια, τα νιτρικά μετατρέπονται σε νιτρώδη και στη συνέχεια σε αμμωνία. Η αφομοιωτική μείωση των νιτρικών μπορεί να πραγματοποιηθεί και υπό αναερόβιες συνθήκες. Κατά τη μείωση αυτή των νιτρικών δεν πραγματοποιείται μείωση της ανόργανης μορφής του αζώτου, αλλά μετατροπή του σε οργανική μορφή (Rijn et al., 2006).

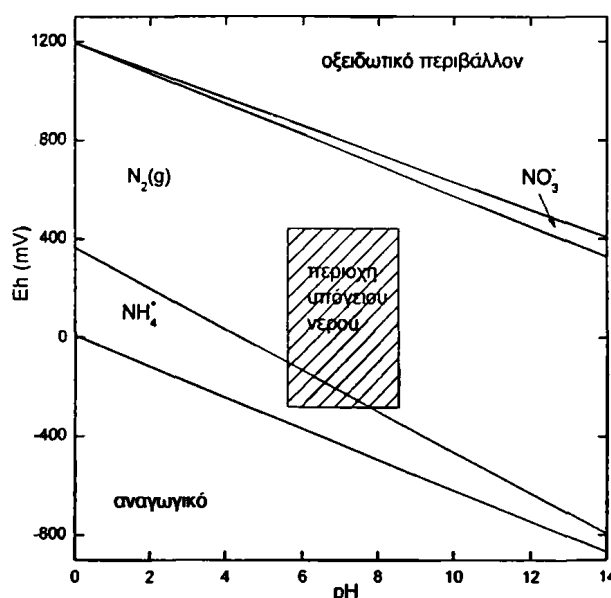
Πίνακας 1.2. Βιολογική μείωση νιτρικών.

Διαδικασία		
Αφομοιωτική μείωση νιτρικών	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	φυτά, βακτήρια, φύκη, μύκητες
Μη αφομοιωτική μείωση νιτρικών	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	προαιρετικά αναερόβια ή αναερόβια βακτήρια
	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	προαιρετικά αναερόβια βακτήρια



Η μη αφομοιωτική μείωση των νιτρικών έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή αυτών σε πιο ανηγμένες μορφές αζώτου, την αμμωνία ή το αέριο άζωτο, με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από δύο ομάδες προκαρυωτικών μικροοργανισμών. Σε αναερόβιες συνθήκες προαιρετικά αναερόβια ή αναερόβια βακτήρια χρησιμοποιούν ως δέκτες ηλεκτρονίων στην αναπνευστική τους αλυσίδα τα νιτρικά ιόντα. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν ορισμένα βακτήρια που μετατρέπουν τα νιτρικά σε αμμωνία, όταν δεν έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν οργανικές ενώσεις για παραγωγή ενέργειας. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν τα απονιτροποιητικά βακτήρια τα οποία μετατρέπουν τα νιτρικά σε αέριο άζωτο (Rijn et al., 2006).

Σημειώνεται ότι η πιο σταθερή μορφή των ενώσεων του αζώτου μέσα σε μια περιοχή pH και δυναμικού οξειδοαναγωγής (Σχήμα 1.2.) είναι το αέριο άζωτο. Ωστόσο αυτή είναι μία εσφαλμένη παρατήρηση δεδομένου ότι τα βακτήρια έχουν την ικανότητα μείωσης των νιτρικών σε χαμηλότερα δυναμικά οξειδοαναγωγής (Hiscock et al., 1991).



Σχήμα 1.2. Διάγραμμα σταθερότητας των ενώσεων του αζώτου στους 25°C και 1atm (Hiscock et al., 1991).

1.2. Πηγές νιτρικών

Κατά τη διάρκεια των δύο προηγούμενων αιώνων, και ειδικά των τελευταίων πέντε δεκαετιών, οι άνθρωποι έχουν αλλάξει ουσιαστικά το σφαιρικό κύκλο του αζώτου



(Σχήμα 1.1.), αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα και την κινητικότητα του αζώτου σε πολλές περιοχές της γης.

Συνεπώς, εκτός από τις φυσικές πηγές, το άζωτο μπορεί να εισαχθεί στα υδρόβια οικοσυστήματα μέσω σημειακών ή μη πηγών προερχόμενες από ανθρώπινες δραστηριότητες. Οι μη σημειακές πηγές αποτελούν μεγαλύτερο πρόβλημα από τις σημειακές, δεδομένου ότι είναι μεγαλύτερης εμβέλειας και ελέγχονται πιο δύσκολα.

Ως πηγές ρύπανσης αζώτου θεωρούνται: τα αστικά απόβλητα, η κτηνοτροφία, η ατμοσφαιρική απόθεση, η βιομηχανική δραστηριότητα και τα αζωτούχα λιπάσματα. Οι συνέπειες της ρύπανσης σε ένα συγκεκριμένο απόθεμα νερού εξαρτώνται από το σύνολο των πηγών που καταλήγουν σε αυτό και από τα χαρακτηριστικά των υδάτων. Οι ρηχοί ποταμοί, οι υγρότοποι και οι λίμνες, έχουν κάποια ικανότητα να αφαιρούν το άζωτο μέσω της απονιτροποίησης που πραγματοποιείται από τα βακτήρια. Η ευαισθησία των εκβολών ποταμών και των παράκτιων υδάτων στον ευτροφισμό εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη διαθεσιμότητα του φωσφόρου για την παραγωγή αλγών και από το ποσοστό ανταλλαγής νερού με τον ανοικτό ωκεανό (McIsaac, 2003).

Λιπάσματα: Σε πολλές περιπτώσεις ο εμποτισμός των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων έχει αυξηθεί εξαιτίας της αύξησης της χρήσης αζωτούχων λιπασμάτων, που αποτελούν μη σημειακή πηγή ρύπανσης. Σε γεωργικές περιοχές όπου γίνεται χρήση λιπασμάτων βασισμένων σε άζωτο, όπως το αμμωνιακό νιτρικό άλας (NH_4NO_3), άλας νιτρικού καλίου (KNO_3) και άλας νιτρικού νατρίου (NaNO_3), παρατηρείται συχνή ανίχνευση υψηλών επιπέδων νιτρικών.

Η υψηλή διαλυτότητα και η χαμηλή προσροφητικότητα των νιτρικών επιτρέπει διείσδυση κάτω από τη ριζική ζώνη όταν χρησιμοποιούνται σε υπερβολικές ποσότητες ή όταν διαβρέχονται υπερβολικά. Έτσι, με την υδατόπτωση ή με την άρδευση, πραγματοποιείται διείσδυση των νιτρικών που δεν έχουν δεσμευθεί από τα φυτά στο υπόγειο νερό. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η συχνή ανίχνευση υψηλών επιπέδων νιτρικών σε έντονα καλλιεργούμενες περιοχές σε όλο τον πλανήτη (McIsaac, 2003). Σημειώνεται ότι κατά τη χρήση νιτρικού λιπάσματος π.χ. για σοδειά δημητριακών (100-200 kgN/ha) το 54-72% προσλαμβάνεται από τα φυτά, το 8-21% συμπεριλαμβάνεται στο άζωτο της οργανικής ύλης του εδάφους, το 2-18% μπαίνει στη διαδικασία της απονιτροποίησης και το 2-8% παρασύρεται από διήθηση στο υπόγειο νερό (Owen and Jurgens-Gschwind, 1986). Η μη ορθολογική χρήση των λιπασμάτων (E.U., 1999) είχε σαν αποτέλεσμα το 87% της γεωργικής γης στην Ευρώπη να έχει συγκεντρώσεις νιτρικών στα υπόγεια ύδατα, οι οποίες βρίσκονται πάνω από το



επιθυμητό επίπεδο των 25 mg/L, ενώ το 22% έχει συγκεντρώσεις νιτρικών πάνω από το επιτρεπτό όριο των 50 mgNO₃⁻/L (δηλαδή πάνω από 11.3 mgNO₃⁻-N/L). Τα επίπεδα αυτά αυξάνονται, ιδίως σε περιοχές με υψηλή πυκνότητα ζωικού κεφαλαίου, ενώ υφιστάμενες πηγές πόσιμου ύδατος απαιτείται να σφραγιστούν ή να αποτελέσουν αντικείμενο δαπανηρής επεξεργασίας.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η συνεισφορά των λιπασμάτων στην ποσότητα του αζώτου στα υδάτινα αποθέματα δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια διότι εξαρτάται από την ύπαρξη και άλλων πηγών ρύπανσης, από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν, από το είδος του εδάφους, από τη μετατροπή του αζώτου του εδάφους σε αέριο άζωτο ή σε άλλες σταθεροποιημένες μορφές, κ.α.

Κτηνοτροφία: Οι κτηνοτροφικές δραστηριότητες συντελούν στη νιτρορύπανση είτε ως σημειακή είτε ως μη σημειακή πηγή. Απόβλητα από εγκαταστάσεις όπου εκτρέφονται ζώα περιέχουν ουρία και άλλες αζωτούχες ενώσεις, με αποτέλεσμα όταν η διάθεση τους δεν γίνεται με ορθολογικό τρόπο, οι αζωτούχες ενώσεις να καταλήγουν να συμμετέχουν στον κύκλο του αζώτου. Η ουρία ((NH₂)₂CO) στα ούρα υδρολύεται γρήγορα σε αμμωνία, η οποία μπορεί να εξατμιστεί στην ατμόσφαιρα ή να μετατραπεί σε νιτρικά (Owen and Jurgens-Gschwind, 1986). Τα μέτρα πρόληψης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (Οδηγία 91/676/ΕΟΚ) ορίζουν ότι για κάθε κτηνοτροφική μονάδα, η ποσότητα κόπρου που προστίθεται κάθε χρόνο στο έδαφος, δεν θα υπερβαίνει 170 kg αζώτου/εκτάριο.

Αστικά απόβλητα: Η διάθεση μεγάλων ποσοτήτων αστικών υγρών ή στερεών αποβλήτων επιβαρυνμένων με οργανικές ή τοξικές ουσίες, δημιουργεί έντονα προβλήματα ρύπανσης στους φυσικούς αποδέκτες. Το άζωτο που υπάρχει στα αστικά λύματα βρίσκεται είτε με τη μορφή της αμμωνίας (40%) είτε ως οργανικό άζωτο. Σημειώνεται ότι τα ακατέργαστα λύματα περιέχουν περίπου 60 mg/L ολικού αζώτου. Η ρύπανση των υδάτων από τα στερεά απόβλητα γίνεται μέσω των εκπλυμάτων αυτών. Τα αποστραγγίσματα των αποβλήτων που βρίσκονται σε ημίρρευστη κατάσταση ή τα εκπλύματα που δημιουργούνται από τα νερά της βροχής αποτελούν πηγή ρύπανσης νιτρικών καθώς περιέχουν ποσότητες οργανικού αζώτου, αμμωνίας και νιτρικών από 10-600, 10-800 και 5-40 mg/L, αντίστοιχα (Κουϊμτζής κ.α., 1998).

Βιομηχανικά απόβλητα: Σημαντική πηγή σημειακής ρύπανσης αποτελούν και τα βιομηχανικά απόβλητα. Οι κλάδοι βιομηχανίας που επιβαρύνουν το περιβάλλον με νιτρικά ή άλλες αζωτούχες ενώσεις είναι η βιομηχανία τροφίμων και ποτών (αλλαντοποιία, ζυθοποιία, γαλακτοκομία) και η βιομηχανία χημικών (χαρτοποιία,



λιπασμάτων, λιπαντικών). Οι Ghafari et al. (2007) αναφέρουν ότι τα απόβλητα βιομηχανιών περιέχουν νιτρικό άζωτο της τάξης των 200 mg/L, ενώ απόβλητα από βιομηχανίες εκρηκτικών, λιπασμάτων και μεταλλοβιομηχανίες περιέχουν ποσότητες μεγαλύτερες από 1000 mgNO₃⁻-N/L.

Νιτρικά φυσικής προέλευσης: Διεργασίες που πραγματοποιούνται με φυσικό τρόπο, μπορούν να προκαλέσουν ρύπανση από νιτρικά στο υπόγειο νερό. Κατά τη διάρκεια καταιγίδων οι οποίες συνοδεύονται από αστραπές και κεραυνούς, το ατμοσφαιρικό άζωτο μετατρέπεται σε νιτρικά και επικάθεται στο έδαφος μέσω της βροχής.

1.3. Το πρόβλημα στην Ελλάδα

Πολύ συχνά από τον έντυπο τύπο καταγράφεται το πρόβλημα της ρύπανσης από τα νιτρικά σε πολλές περιοχές της Ελλάδας. Δημοσιευμένα άρθρα βασιζόμενα σε αποτελέσματα αναλύσεων του Γενικού Χημείου του Κράτους σε νερά γεωτρήσεων, αναφέρουν ότι οι συγκεντρώσεις νιτρικών στα υπόγεια νερά κυμαίνονται από 50 έως 172 mg/L (Η Καθημερινή, 24-06-07; Η Καθημερινή, 30-09-07; Το Βήμα, 23-1-00). Η Κωπαΐδα, το Αργολικό Πεδίο, ο Πηνειός Ηλείας, ο Θεσσαλικός Κάμπος του νομού Λάρισας και ο Μαραθώνας είναι περιοχές όπου τα επίπεδα νιτρικών στα νερά είναι πάνω από τα επιτρεπτά όρια. Τα υπόγεια νερά πολλών περιοχών στην Ελλάδα εμφανίζουν υψηλά ποσοστά νιτρορύπανσης.

1.4. Επιπτώσεις των νιτρικών

Η κατανάλωση ρυπασμένου νερού από νιτρικά, σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του επιτρεπτού ορίου, μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες για τον ανθρώπινο οργανισμό επιπτώσεις, όπως μεθαιμοσφαιριναιμία και καρκίνο του στομάχου. Στον Πίνακα 1.3. φαίνεται η επικινδυνότητα της χρήσης νερού με νιτρικά όταν αυτό χρησιμοποιείται για πόση, για μαγείρεμα και για πλύσιμο. Επίσης, η ύπαρξη υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικών στο νερό έχει επιδράσεις στην υγεία των ζώων και στο περιβάλλον, όπως ο ευτροφισμός.

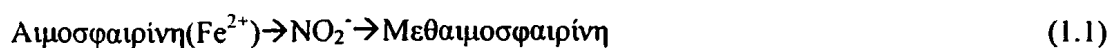


Πίνακας 1.3. Επιπτώσεις νιτρικών στην υγεία των ανθρώπων
(Schoeman and Steyn, 2003).

Νιτρικό και Νιτρώδες άζωτο	Πόση νερού	Μαγείρεμα	Χρήση για πλύσιμο του σώματος
<6 mg/L αζώτου ή <26 mg/L ως NO ₃ ⁻	μηδενικές επιπτώσεις στην υγεία	μηδενικές επιπτώσεις στην υγεία	κανένας κίνδυνος
<6-10 mg/L αζώτου ή <26-44 mg/L ως NO ₃ ⁻	αμελητέος κίνδυνος	αμελητέος κίνδυνος	κανένας κίνδυνος
<10-20 mg/L αζώτου ή <44-89 mg/L ως NO ₃ ⁻	μικρός κίνδυνος σε βρέφη	μικρός κίνδυνος σε βρέφη	αμελητέος κίνδυνος
<20-40 mg/L αζώτου ή <89-177 mg/L ως NO ₃ ⁻	πιθανώς κίνδυνος σε βρέφη	πιθανώς κίνδυνος σε βρέφη	μικρός κίνδυνος σε βρέφη
>40 mg/L αζώτου ή >177 mg/L ως NO ₃ ⁻	οξύς κίνδυνος σε βρέφη	οξύς κίνδυνος σε βρέφη	πιθανώς κίνδυνος σε βρέφη

1.4.1. Μεθαιμοσφαιριναιμία

Η μεθαιμοσφαιριναιμία, γνωστή επίσης και ως Σύνδρομο Blue Baby, είναι μια ασθένεια που οφείλεται στη λήψη υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικών. Στο πεπτικό σύστημα, βακτήρια, π.χ. από μη αποστειρωμένα μπιμπερό ή από το στομάχι των βρεφών, ανάγουν τα νιτρικά (NO₃⁻) σε νιτρώδη (NO₂⁻). Τα νιτρώδη περνάνε μέσω των τοιχωμάτων του λεπτού εντέρου στην κυκλοφορία του αίματος όπου δεσμεύουν και οξειδώνουν την αιμοσφαιρίνη για να σχηματίσουν τη μεθαιμοσφαιρίνη.



(μπορεί να συνδεθεί με το οξυγόνο) (δεν μπορεί να συνδεθεί με το οξυγόνο) (Della Rocca et al., 2007)

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η πρόσληψη και η μεταφορά του οξυγόνου στο αίμα. Τα κανονικά επίπεδα της μεθαιμοσφαιρίνης στο ανθρώπινο αίμα



κυμαίνονται από 1 ως 3%. Όταν τα επίπεδα της μεθαιμοσφαιρίνης γίνουν πολύ υψηλά (10%), το θύμα γίνεται κινδυνώ, αντιμετωπίζει αναπνευστικά προβλήματα και μπορεί να πεθάνει από ασφυξία. Το σώμα δεν έχει πλέον την ικανότητα να μετατρέψει ξανά τη μεθαιμοσφαιρίνη σε αιμοσφαιρίνη. Τα νήπια ηλικίας μικρότερης των 4 μηνών φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα λόγω του ότι το μεγαλύτερο μέρος της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης είναι εύκολα οξειδώσιμη, της μικρής δραστηριότητας του ενζύμου που ανάγει την μεθαιμοσφαιρίνη (ένα ένζυμο των ερυθρών κυττάρων του αίματος που μετατρέπει τη μεθαιμοσφαιρίνη πίσω στην αιμοσφαιρίνη) και τέλος εξαιτίας του υψηλού γαστρικού pH (που επιτρέπει μεγαλύτερη εισβολή βακτηριδίων και ενισχύει τη μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη) (Camargo and Alonso, 2006).

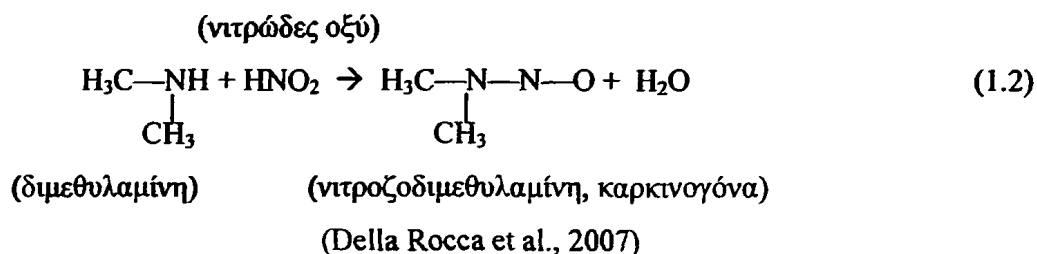
Η αιτία του Συνδρόμου Blue Baby είναι γενικά η ανάμειξη της βρεφικής διατροφής με νερό που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου (μεγαλύτερες από 11.3 mg/L). Σε όλους σχεδόν τους ενήλικες η μεθαιμοσφαιρίνη μπορεί να αναχθεί στην προηγούμενη μορφή της και τα νιτρώδη μετατρέπονται σε νιτρικά, εκτός των περιπτώσεων όπου υπάρχει έλλειψη του ενζύμου.

1.4.2. Άλλες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία

Η μεθαιμοσφαιριναιμία είναι η μόνιμη πάθηση που αποδίδεται ευθέως σε υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών, ωστόσο υπάρχουν άλλες πιθανές αρνητικές επιδράσεις στην υγεία που ενδεχομένως να οφείλονται σε αυτόν τον ρυπαντή. Οι κυριότερες ανάμεσα σε αυτές είναι η πιθανή σύνδεση του ρυπασμένου με νιτρικά πόσιμου νερού με το λέμφωμα non-Hodgkin's και τον καρκίνο του στομάχου (Camargo and Alonso, 2006).

Αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών στο νερό προκαλούν πιθανώς καρκίνο του στομάχου, αν και πρόσφατες έρευνες δεν έχουν αποδείξει μια θετική, στατιστικά εμπεριστατωμένη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των νιτρικών στο πόσιμο νερό και στην εμφάνιση του καρκίνου του στομάχου. Τα νιτρικά έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανά καρκινογόνα λόγω του μετασχηματισμού που υφίστανται στο στομάχι. Περίπου το 5% των εισερχόμενων νιτρικών μετατρέπονται σε νιτρώδη (Camargo and Alonso, 2006), που μπορούν στη συνέχεια να συνδεθούν με οργανικές ενώσεις για να σχηματίσουν N-νιτροξο-ενώσεις, γνωστές ως καρκινογόνες ενώσεις για τους ανθρώπους και τα ζώα (Κουϊμτζής κ.α., 1998).





Οι νιτροζαμίνες σχηματίζονται στο στομάχι λόγω των χαμηλών επιπέδων του pH. Καρκινογένεση μπορεί να προκύψει από τη μικρής διάρκειας έκθεση σε μεγάλες ποσότητες του ρύπου ή από τη χρόνια έκθεση σε σχετικά μικρές ποσότητες νιτρικών, με την αλκυλιοποίηση του DNA ως τον κύριο καρκινογόνο μηχανισμό.

Από την άλλη πλευρά, επιστημονικά στοιχεία έδειξαν ότι τα νιτρικά και τα νιτρώδη είναι πιθανό να προκαλέσουν μεταλλαξιγένεση, τερατογενέσεις, αποβολές σε εγκύους, στεφανιαίες καρδιακές παθήσεις, να συμβάλουν στην εμφάνιση του λεμφώματος non-Hodgkin's, του καρκίνου των ωοθηκών και στην ανάπτυξη της υπερτροφίας του θυροειδή (Camargo and Alonso, 2006). Το non-Hodgkin's λέμφωμα (NHL) είναι ένας καρκίνος που αναπτύσσεται στο λεμφικό ιστό, ο οποίος βρίσκεται σε πολλές περιοχές του σώματος, όπως λεμφαδένες, σπλήνα, θύμο αδέν, αδενοειδείς, αμυγδαλές και μυελό των οστών.

1.4.3. Επιπτώσεις νιτρικών και νιτρώδων στην πανίδα των υδάτινων οικοσυστημάτων

Το νιτρώδες ιόν (NO_2^-) και το νιτρώδες οξύ (HNO_2) σχετίζονται μέσω της χημικής ισορροπίας $\text{NO}_2^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{HNO}_2$. Οι συγκεντρώσεις του NO_2^- και του HNO_2 εξαρτώνται κατά κύριο λόγο από το pH του νερού σε ένα υδάτινο οικοσύστημα. Η συγκέντρωση του HNO_2 είναι 4-5 φορές μικρότερη από αυτή του NO_2^- καθώς το pH κυμαίνεται από 7.5-8.5.

Τόσο το νιτρώδες οξύ όσο και το νιτρώδες ιόν έχουν τοξικές επιδράσεις στα υδρόβια ζώα. Επιπλέον, η ύπαρξη του HNO_2 μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα στα βακτήρια *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*, παρεμποδίζοντας έτσι τη διαδικασία της νιτροποίησης. Αυτή η παρεμπόδιση έχει σαν αποτέλεσμα την αυξανόμενη συσσώρευση NO_2^- στο υδρόβιο περιβάλλον. Η κύρια τοξική δράση του νιτρώδους ιόντος στα υδρόβια ζώα, ιδιαίτερα στα ψάρια και στα οστρακοειδή, οφείλεται στη μετατροπή της ουσίας που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά του οξυγόνου, με αποτέλεσμα την πρόκληση



υποξίας και τελικά τον θάνατο. Η ουσία αυτή στα ψάρια είναι η αιμοσφαιρίνη και μετατρέπεται σε μεθαιμοσφαιρίνη.

Ομοίως, στα οστρακοειδή, η είσοδος του NO_2^- στο πλάσμα αίματος συνδέεται με την οξείδωση του χαλκού ($\text{Cu}^{1+} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$), με αποτέλεσμα η αιμοκυανίνη να μετατρέπεται σε μεθαιμοκυανίνη η οποία δεν μπορεί να δεσμεύσει το μοριακό οξυγόνο. Άλλες επιδράσεις στα ψάρια και τα οστρακοειδή αποτελούν: η μείωση του ενδοκυτταρικού K^+ και η αύξηση του εξωκυτταρικού K^+ που έχει επιπτώσεις στη νευροδιαβίβαση, στους σκελετικούς μύες και στη λειτουργία της καρδιάς, ο σχηματισμός των N-νιτροζο-ενώσεων που είναι μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες και τέλος η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα τη μείωση της ανοχής στις βακτηριακές και παρασιτικές ασθένειες.

Το νιτρικό ιόν δεν μετατρέπεται σε νιτρικό οξύ στο υδάτινο περιβάλλον. Οπότε η επιδράσεις στους οργανισμούς προέρχονται μόνο από την τοξικότητα του νιτρικού ιόντος. Στην πραγματικότητα, για να γίνει τοξική η ουσία, το νιτρικό ιόν πρέπει να μετατραπεί σε νιτρώδες στο σώμα των ζώων. Εντούτοις, εξ αιτίας της μικρής του διαπερατότητας από τα βράγχια, η πρόσληψη του από τα υδρόβια ζώα είναι περιορισμένη, κάτι που συμβάλλει στο να χαρακτηρίζεται ως λιγότερο τοξικό από ότι το νιτρώδες ιόν. Ωστόσο, η μακροχρόνια έκθεση σε συγκεντρώσεις των $10 \text{ mg NO}_3^-/\text{N/L}$, μπορεί να επιδράσει αρνητικά στα υδρόβια ζώα. Σε γεωργικές περιοχές όπου γίνεται χρήση λιπασμάτων βασισμένων σε άζωτο, παρατηρείται βαθμιαία παρακμή των πληθυσμών λόγω της εξασθενημένης δυνατότητας κολύμβησης, του μειωμένου μεγέθους σωμάτων και της μειωμένης γονιμότητας.

Σημειώνεται ότι τα ζώα της θάλασσας είναι πιο ανθεκτικά στην τοξικότητα από τα νιτρικά και τα νιτρώδη, από ότι αυτά του γλυκού νερού, πιθανώς λόγω της παρεμποδιστικής δράση των ιόντων χλωρίου στην πρόσληψη των NO_3^- και των NO_2^- από τα υδρόβια ζώα.

Βάσει στοιχείων τοξικότητας, το Υπουργικό Συμβούλιο για το περιβάλλον στον Καναδά (Canadian Council, 2003) έχει συστήσει κριτήρια για την ποιότητα του νερού με σκοπό την προστασία της ζωής του γλυκού και του θαλάσσιου νερού, με βάση τα οποία το νιτρικό άζωτο πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ του $2.9\text{-}3.6 \text{ mgNO}_3^-/\text{N/L}$, για την αποφυγή τουλάχιστον παθήσεων από μικρής διάρκειας έκθεση σε μεγάλες ποσότητες του ρύπου (Camargo and Alonso, 2006).



1.4.4. Επιπτώσεις στο περιβάλλον

Περίσσεια νιτρικών ιόντων σε απόβλητα που καταλήγουν στις θάλασσες και τις λίμνες προκαλούν υπέρμετρη αύξηση των φυκών. Το άζωτο και ο φώσφορος είναι τα δύο πιο σημαντικά περιοριστικά θρεπτικά συστατικά της πρωτογενούς παραγωγικότητας. Ο εμπλουτισμός των νερών με τα συστατικά αυτά ανατρέπει τη φυσιολογική ροή της τροφικής αλυσίδας και δημιουργεί εκρηκτική αύξηση των αλγών. Τα είδη των αλγών (κυανοφύκη) που κατά κανόνα σχηματίζονται είναι ακατάλληλα για τροφή του ζωοπλαγκτού και παράλληλα καταπνίγουν την ανάπτυξη άλλων οργανισμών. Η εμφάνιση του νερού είναι θολή, φαιοπράσινη. Τα νεκρά φύκη κατατάσσονται στον πυθμένα, όπου αποικοδομούνται, μειώνοντας έτσι το διαλυμένο οξυγόνο. Αυτό θέτει σε λειτουργία αναερόβιες διαδικασίες που οδηγούν σε δυσοσμία (H_2S) (Κουϊμτζής κ.α., 1998).

Τα υψηλά επίπεδα νιτρικών συμβάλλουν σημαντικά στον ευτροφισμό, ιδίως σε θαλάσσιες και παράκτιες περιοχές. Εκτεταμένες περιοχές στην ακτή της Βόρειας Θάλασσας καθώς και τμήματα της Μεσογείου διαπιστώθηκε ότι πλήττονται από προβλήματα ευτροφισμού, μεγάλο μέρος των οποίων οφείλεται στην ρύπανση από γεωργικές πηγές, με αποτέλεσμα να αυξηθεί το φυτικό πλαγκτόν καθώς και άλλες μορφές μεταβολών των οικοσυστημάτων. Κάτι τέτοιο ενδέχεται να οδηγήσει σε οικονομικές απώλειες στους τομείς της αλιείας και του τουρισμού (E.U., 1999).

1.5. Μέθοδοι απομάκρυνσης

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω ανεπιθύμητες επιδράσεις εξαιτίας της ύπαρξης των νιτρικών στο νερό, γίνεται κατανοητό ότι είναι επιτακτική η ανάγκη ανάληψης δράσης. Η ρύπανση από τα νιτρικά μπορεί να αντιμετωπισθεί είτε μειώνοντας την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον, δηλαδή με έλεγχο της πηγής ρύπανσης είτε με την επεξεργασία του ήδη ρυπασμένου νερού.

Η πρόληψη της απελευθέρωσης νιτρικών είναι μέρος μιας στρατηγικής που μπορεί να πραγματοποιηθεί στην πραγματικότητα μέσω της νομοθεσίας. Μέτρο πρόληψης αποτελεί και η Οδηγία 91/676/ΕΟΚ της Ευρωπαϊκής Επιτροπής του 1998. Τα μέτρα περιλαμβάνουν κανόνες σχετικούς με: τις περιόδους κατά οποίες θα απαγορεύεται η διασπορά στο έδαφος ορισμένων τύπων λιπασμάτων, τη χωρητικότητα των δοχείων αποθήκευσης κοπριάς και τον περιορισμό της ποσότητας λιπάσματος που επιτρέπεται



να διασπείρεται στο έδαφος, στο πλαίσιο της ορθής γεωργικής πρακτικής, λαμβανομένων υπόψη των χαρακτηριστικών της εν λόγω ευπρόσβλητης ζώνης.

Η έκδοση της οδηγίας αποτελεί σημαντικό βήμα για την ένταξη του περιβάλλοντος στο γεωργικό τομέα, ενώ η οδηγία υποστηρίζει την αρχή "ο ρυπαίνων πληρώνει" καθώς και την αρχή "πρόληψη στην πηγή". Εντούτοις, τα επιτεύγματα από την εφαρμογή της οδηγίας αυτής είναι πενιχρά.

Αφού τις περισσότερες φορές αποτυγχάνει η πρόληψη η λύση δίνεται από την επεξεργασία του ήδη ρυπασμένου νερού. Οι συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας του ρυπασμένου νερού είναι η αντίστροφη όσμωση, η ιονανταλλαγή και η ηλεκτροδιάλυση. Όμως αυτές οι παραδοσιακές μέθοδοι δεν λύνουν αποτελεσματικά το πρόβλημα των νιτρικών. Το υψηλό λειτουργικό τους κόστος, η πολυπλοκότητα στην εφαρμογή τους επί τόπου (in-situ) για την απορύπανση του υπόγειου νερού και η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων νερού με υψηλή περιεκτικότητα του ρύπου που απομακρύνεται, αποτελούν μειονεκτήματα που περιορίζουν την εφαρμογή τους. Εναλλακτικές μεθόδους επεξεργασίας αποτελούν η χημική απομάκρυνση, η φυσική προσρόφηση και η βιολογική απονιτροποίηση.

1.5.1. Αντίστροφη όσμωση

Η αντίστροφη όσμωση είναι εκείνη η διαδικασία όπου μία ημιπερατή μεμβράνη μπορεί και διαχωρίζει δύο διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων. Η αντίστροφη όσμωση απαιτεί την επιβολή πίεσης, η οποία θα είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση ροής προς το διάλυμα με την υψηλή συγκέντρωση διαμέσου της ημιπερατής μεμβράνης. Αυτή η δύναμη πρέπει να υπερσχύει της οσμωτικής πίεσης, επιβάλλοντας το πέρασμα του νερού μέσω των πόρων της μεμβράνης αφήνοντας πίσω τα νιτρικά και τα άλλα ιόντα. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται στην διαδικασία συνθέτονται κυρίως από κυτταρίνες οξικού οξέος ή πολυαμίδια. Αυτές οι μεμβράνες δεν δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση προς κάποιο ιόν γι' αυτό και η ποσότητα του ρύπου που αποβάλλεται εξαρτάται μονάχα από το σθένος των ιόντων που εμπεριέχονται στο διάλυμα.

Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων νερού με υψηλή περιεκτικότητα στο άλας που απομακρύνεται από το ρυπασμένο νερό. Στην ουσία το πρόβλημα δεν αντιμετωπίζεται αλλά συσσωρεύεται σε νερό μικρότερου όγκου. Το νερό με την υψηλή περιεκτικότητα σε άλας, που είναι το παραπροϊόν της διαδικασίας αποτελεί το 20 με 50% του επεξεργασμένου νερού, ανάλογα με την



ποιότητα του ρυπασμένου νερού. Η απόθεση αυτού του παραπροϊόντος αποτελεί μεγάλο πρόβλημα. Συνήθως το νερό αυτό εναποτίθεται σε δεξαμενές εξάτμισης και η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα δαπανηρή (Schoeman and Steyn, 2003).

1.5.2. Ιονανταλλαγή

Η διαδικασία της ιονανταλλαγής αναφέρεται στην ανταλλαγή ιόντων που περιέχονται στο νερό με ιόντα που περιέχονται σε μία ρητίνη. Η ιονανταλλαγή περιλαμβάνει το πέρασμα του ρυπασμένου με νιτρικά νερού από μια κλίνη ρητίνης που περιέχει ισχυρά βασική ρητίνη ανταλλαγής ανιόντων (χλωριούχο νάτριο) που έχει ως αποτέλεσμα την ανταλλαγή των νιτρικών με τα χλωριόντα. Παράλληλα, οι υψηλές συγκεντρώσεις των θεικών ιόντων στο νερό, των οποίων το σθένος είναι μεγαλύτερο από αυτό των νιτρικών, είναι δυνατόν να μειώσουν τον βαθμό ελάττωσης των νιτρικών εξαιτίας του ότι δεσμεύονται κατά προτίμηση από την ρητίνη (Boumediene and Achour, 2004). Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελούν η επιβάρυνση του επεξεργασμένου νερού με ιόντα χλωρίου και η εναπόθεση των μεγάλων ποσοτήτων θεικών, χλωριούχων και νιτρικών που προκύπτουν από την αναγέννηση της ρητίνης (Hiscock et al., 1991).

1.5.3. Ηλεκτροδιάλυση

Η ηλεκτροδιάλυση είναι μία μέθοδος απομάκρυνσης συναφής με αυτή της αντίστροφης όσμωσης. Είναι μια τεχνική που βασίζεται στην κίνηση και διαχωρισμό των ιόντων από μια σειρά επιλεκτικών μεμβρανών υπό την επίδραση ενός εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Σε μια συνήθη διάταξη ηλεκτροδιάλυσης μεμβράνες ανταλλαγής ανιόντων και κατιόντων τοποθετούνται διαδοχικά μεταξύ της καθόδου και της ανόδου. Η εφαρμογή μιας κατάλληλης διαφοράς δυναμικού μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων, έχει ως αποτέλεσμα τα κατιόντα να μετακινούνται προς την κάθοδο και τα ανιόντα αντίστοιχα προς την άνοδο. Στην πορεία τους αυτή όμως τα κατιόντα διαπερνούν τις μεμβράνες ανταλλαγής κατιόντων και παρακρατούνται από τις μεμβράνες ανταλλαγής ανιόντων.

Σε μια αντίστοιχη διεργασία αντίθετης φοράς υπόκεινται ταυτόχρονα και τα ανιόντα τα οποία διαπερνούν τις μεμβράνες ανταλλαγής ανιόντων, που διαθέτουν σταθεροποιημένες θετικές χημικές ομάδες και παρακρατούνται από τις μεμβράνες ανταλλαγής κατιόντων. Αυτή η κίνηση όλων των ιόντων έχει ως αποτέλεσμα την



αύξηση της συγκέντρωσής τους σε συγκεκριμένες περιοχές της διάταξης και αντίστοιχη ταυτόχρονη μείωσή της σε άλλες

Η διεργασία της ηλεκτροδιάλυσης απαιτεί την παρουσία δύο ηλεκτροδίων, διαφορετικής πολικότητας. Τα ποσοστά μείωσης των νιτρικών με αυτή την μέθοδο κυμαίνονται σε υψηλά επίπεδα. Μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής αποτελούν η παραγωγή ποσοτήτων νερού με υψηλή περιεκτικότητα στο άλας που απομακρύνεται από το ρυπασμένο νερό και το ιδιαίτερα υψηλό λειτουργικό κόστος (Banasiak et al., 2007).

1.5.4. Χημική και καταλυτική απομάκρυνση νιτρικών

Κατά τη χημική επεξεργασία του νερού χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες όπως σίδηρος, και αλουμίνιο. Τα μηδενικού σθένους μέταλλα λόγω της ικανότητάς τους να δίνουν ηλεκτρόνια μειώνουν διάφορα ανιόντα μέσω της αναγωγής. Η ιδιότητα των μετάλλων έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον σε περιβαλλοντικό επίπεδο (Shrimali and Singh, 2001; Liou et al., 2005). Στην καταλυτική απομάκρυνση εφαρμόζονται καταλύτες όπως παλλαδίου με χαλκό και παλλαδίου-κασσίτερου (Pintar et al., 2004). Το κύριο μειονέκτημα των παραπάνω μεθόδων αυτών είναι ότι το προϊόν είναι η αμμωνία ενώ σε μερικές περιπτώσεις παράγονται και νιτρώδη, με αποτέλεσμα να χρειάζεται επιπλέον επεξεργασία για την απομάκρυνση των ενώσεων του αζώτου. Επίσης, είναι αναγκαία η ρύθμιση του pH είτε σε όξινες είτε σε βασικές τιμές.

Ωστόσο η χρήση καταλυτών με υδρογόνο ή μυρμηκικό οξύ (Pd-Sn, Pd-In) μπορεί να οδηγήσει στην μετατροπή των νιτρικών σε αέριο άζωτο. Παρατηρούνται και σε αυτήν την περίπτωση σημαντικές ποσότητες αμμωνίας που αυξάνονται με την αύξηση του pH (Prusse and Vorlop, 2001; Della Rocca et al., 2007).

1.5.5. Φυσική προσρόφηση

Κατά τη φυσική προσρόφηση χρησιμοποιούνται υλικά όπως σκόνη από μπαμπού, ενεργός άνθρακας και σεπιολίτες (είδος φυλλόμορφου πηλού) (Sato et al., 1995; Mizuta et al., 2004; Ozturk and Bektas, 2004), με ικανότητα προσρόφησης 1.12, 4.14 και 3.46 mgNO₃/g. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο κορεσμός των επιφανειών των προσροφητικών υλικών με αποτέλεσμα ο χρόνος ζωής τους να είναι μικρός (Della Rocca et al., 2007).



1.6. Βιολογική απονιτροποίηση

Η βιολογική απονιτροποίηση είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος απομάκρυνσης νιτρικών, καθώς είναι η μόνη μέθοδος που επιτυγχάνει την πλήρη απομάκρυνση των ενώσεων του αζώτου από το ρυπασμένο νερό αφού το τελικό της προϊόν είναι το αέριο άζωτο. Κατά την διεργασία αυτή λαμβάνει χώρα η βιοαποδόμηση των ρύπων μέσω του μεταβολικού συστήματος των μικροοργανισμών.

Το ενδιαφέρον για την αναγωγή του νιτρικού αζώτου άρχισε στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, για να εξηγηθεί η απώλεια αζώτου από λιπασμένο έδαφος. Το 1876 ο Meusel (Payne, 1981) πρότεινε ότι υπεύθυνα για την απομάκρυνση των νιτρικών από το έδαφος ή το νερό είναι κάποια βακτήρια. Το 1882 οι Gayon and Dupetit (Payne, 1981) εισήγαγαν τον όρο απονιτροποίηση για να περιγράψουν την παραγωγή αερίου κατά την αναερόβια δραστηριότητα βακτηρίων.

Βιολογική απονιτροποίηση είναι η βιοχημική αναγωγή των NO_3^- και των NO_2^- σε αέριο N_2 παρουσία απονιτροποιητικών μικροοργανισμών υπό ανοξικές συνθήκες. Η βιολογική απονιτροποίηση πραγματοποιείται μέσω κατάλληλων μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα NO_3^- ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων για αναπνοή υπό ανοξικές συνθήκες.

Τα νιτρικά μετατρέπονται σε αέριο άζωτο ενώ η όλη διαδικασία λαμβάνει χώρα σε τέσσερα στάδια (Payne, 1973):



με κάθε βήμα να καταλύεται από ένα ξεχωριστό ενζυμικό σύστημα του κυττάρου. Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας της αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη κτλ. απαραίτητος είναι και ένας δότης ηλεκτρονίων.

Υπό κατάλληλες συνθήκες συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί είναι δυνατόν να προσαρμόσουν τον μεταβολισμό τους ώστε να καταλύουν τα στάδια του παραπάνω μετασχηματισμού με αποτέλεσμα να αποφορτίζουν το πόσιμο νερό από υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών με μόνο παραπροϊόν το αέριο άζωτο.

Η βιολογική απονιτροποίηση διακρίνεται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το είδος της πηγής άνθρακα που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για την ανάπτυξή τους. Έτσι η απονιτροποίηση χωρίζεται σε ετερότροφη και αυτότροφη.



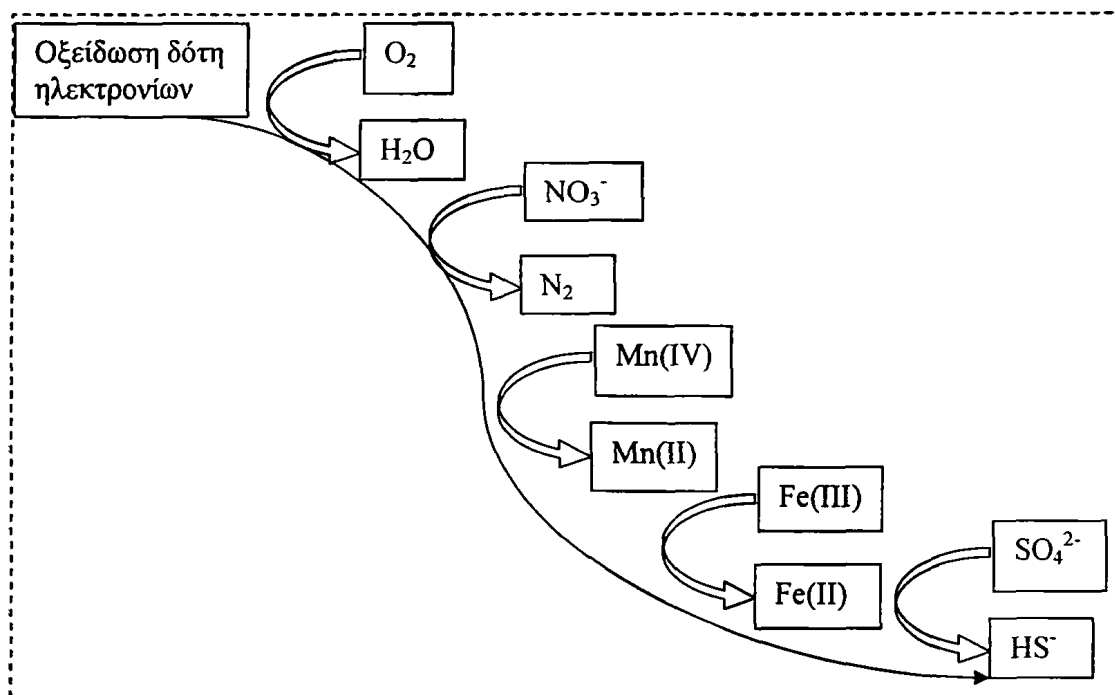
Στην ετερότροφη απονιτροποίηση, η οποία βρίσκει εφαρμογή στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων, χρησιμοποιούνται οργανικές ενώσεις όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, το ακετυλένιο, η γλυκόζη κ.α., για την κάλυψη των αναγκών των μικροοργανισμών σε άνθρακα (κυτταρική σύνθεση). Το ρόλο του δότη των ηλεκτρονίων στην διεργασία της αναπνοής αναλαμβάνουν οι οργανικές αυτές ενώσεις.

Κατά την αυτότροφη απονιτροποίηση, χρησιμοποιούνται ανόργανες πηγές άνθρακα όπως το διοξείδιο του άνθρακα. Το CO_2 λειτουργεί αποκλειστικά ως πηγή άνθρακα καθιστώντας αναγκαία την προσθήκη ουσίας που μπορεί να παίξει το ρόλο του δότη ηλεκτρονίων στην μικροβιακή αναπνοή. Ως δότες ηλεκτρονίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενώσεις θείου, ο δισθενής σίδηρος, το αέριο υδρογόνο κ.α. Στην περίπτωση που στην απονιτροποίηση ο δότης ηλεκτρονίων είναι το υδρογόνο, τότε η διαδικασία ονομάζεται υδρογονοτροφική απονιτροποίηση.

1.6.1. Αναερόβια αναπνοή και απονιτροποιητικά βακτήρια

Ένας εναλλακτικός τρόπος παραγωγής ενέργειας που ανέπτυξαν οι μικροοργανισμοί, με στόχο τη δημιουργία ATP (φωσφορική ένωση υψηλής ενέργειας), είναι μια παραλλαγή της αναπνοής κατά την οποία χρησιμοποιούνται δέκτες ηλεκτρονίων διαφορετικοί από το οξυγόνο. Αυτή η διεργασία ονομάζεται αναερόβια αναπνοή. Στους δέκτες ηλεκτρονίων που χρησιμοποιούνται στην αναερόβια αναπνοή συγκαταλέγονται το νιτρικό ιόν (NO_3^-), το ιόν του σιδήρου (Fe^{3+}), το ανθρακικό (CO_3^{2-}), το θειικό ιόν (SO_4^{2-}), κ.α. Εξαιτίας της θέσης τους στον πύργο ηλεκτρονίων απελευθερώνεται λιγότερη ενέργεια όταν χρησιμοποιούνται αυτοί οι δέκτες ηλεκτρονίων αντί του οξυγόνου. Στο Σχήμα 1.3. φαίνεται η αμέσως επόμενη προτίμηση του δέκτη ηλεκτρονίων, μετά την έκλειψη του οξυγόνου. Για την ολοκλήρωση του κύκλου της διεργασίας της αναερόβιας αναπνοής χρειάζεται και ένας δότης ηλεκτρονίων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω αυτός μπορεί να είναι είτε οργανική είτε ανόργανη ένωση. Παραδείγματα ανόργανων δοτών ηλεκτρονίων είναι το υδρόθειο (H_2S), το αέριο υδρογόνο, ο δισθενής σίδηρος, το δισθενές μαγγάνιο και η αμμωνία (Madigan and Martinko, 2006).





Σχήμα 1.3. Δέκτες ηλεκτρονίων τοποθετημένη σειρά προτίμησης από τους μικροοργανισμούς (Korom, 1992).

Τα απονιτροποιητικά βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί. Τα περισσότερα είναι προαιρετικά αναερόβια και χρησιμοποιούν τα νιτρικά ως τελικούς δέκτες ηλεκτρονίων σε περίπτωση απουσίας οξυγόνου (Rijn et al., 2006). Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα ετερότροφα που χρησιμοποιούν μία αποκλειστικά ή περισσότερες οργανικές ενώσεις για βακτηριακή σύνθεση και στα χημειολιθότροφα που χρησιμοποιούν ανόργανες ενώσεις άνθρακα όπως HCO_3^- ή CO_2 οπότε λέγονται αυτότροφα (Madigan and Martinko, 2006).

Κατά την απονιτροποίηση τα νιτρικά μετατρέπονται σε αέριο άζωτο μέσω μιας διαδικασίας τεσσάρων σταδίων. Πολλά βακτήρια καταλύουν όλα τα στάδια της απονιτροποίησης με τελικό τους προϊόν το αέριο άζωτο, ενώ άλλα πραγματοποιούν μόνο ένα ή δύο από αυτά (Hiscock et al., 1991). Το βακτηριακό είδος *Paracoccus denitrificans* είναι ένα χημειολιθότροφο βακτήριο που οξειδώνει το υδρογόνο και καταλύει όλα τα στάδια της απονιτροποίησης. Βακτηριακά είδη όπως το *Acidovorax facilis* και το *Citrobacter diversus* ανάγουν τα νιτρικά με τελικό τους προϊόν τα νιτρώδη (νιτρική αναπνοή) (Glass and Silverstein, 1998). Επίσης, τα είδη *Propionibacterium pentosaceum* και *Propionibacterium acidipropionici* μειώνουν τα νιτρικά με τελικό

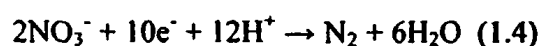
τους προϊόν το N_2O (Knowles, 1982). Στον Πίνακα 1.4. δίνονται διάφορα απονιτροποιητικά είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν από συστήματα απονιτροποίησης ή χρησιμοποιήθηκαν σε αυτά.

Πίνακας 1.4. Βακτηριακά είδη ικανά για απονιτροποίηση.

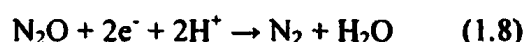
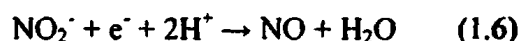
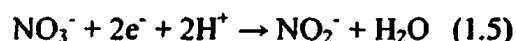
Βακτηριακό είδος	Δότης ηλεκτρονίων	Αναφορά
<i>Paracoccus denitrificans</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Alcaligenes faecalis</i>	οξικό νάτριο ($NaCH_3COO$)	Glass and Silverstein, 1998
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	οξικό κάλιο (KCH_3COO)	Barreiros et al., 1998
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	υδρογόνο	Chang et al., 1999
<i>Paracoccus panthotrophus</i> <i>Ochrobactrum anthropi</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>	υδρογόνο	Szekeres et al., 2002

1.6.2. Ένζυμα

Η απονιτροποίηση είναι η βιολογική διαδικασία κατά την οποία τα νιτρικά ανάγονται σταδιακά σε μοριακό άζωτο: νιτρικά $\rightarrow$ νιτρώδη $\rightarrow$ μονοξείδιο του αζώτου $\rightarrow$ υποξείδιο του αζώτου $\rightarrow$ μοριακό άζωτο. Συνολικά η απονιτροποίηση μπορεί να περιγραφεί ως :



Η αντίδραση αυτή αποτελείται από τις επιμέρους τέσσερις ενζυματικές αντιδράσεις:



Το πρώτο βήμα (εξίσωση 1.5), η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη, καταλύεται από το ένζυμο νιτρική αναγωγάση (Nar). Τα νιτρώδη ανάγονται περαιτέρω σε NO σε ένα δεύτερο βήμα (εξίσωση 1.6), και η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο NiR (αναγωγάση νιτρωδών). Στο τρίτο στάδιο (εξίσωση 1.7), δύο μόρια NO ενώνονται σε

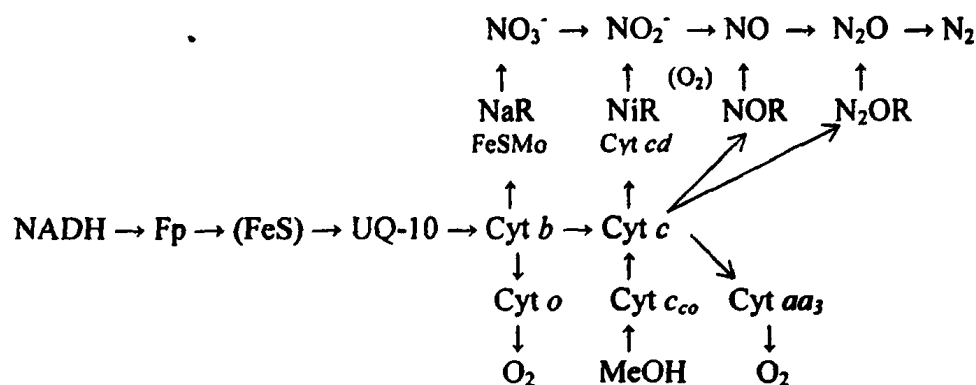


σχηματίζουν N_2O και νερό. Η αντίδραση καταλύεται από την NO-αναγωγή (NOR). Τέλος, το ένζυμο αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου N_2OR καταλύει την αντίδραση της εξίσωσης 1.8, όπου το N_2O ανάγεται σε N_2 .

Τα απονιτροποιητικά βακτήρια όταν εκτίθενται σε αναερόβιες ή ανοξικές συνθήκες, παρουσία ή απουσία NH_4^+ , ενεργοποιούν, σε ένα χρονικό διάστημα από 40 λεπτά μέχρι 3 ώρες, εκείνες τις αναγωγάσες που είναι υπεύθυνες για την μη αφομοιωτική μείωση των οξειδίων του αζώτου. Οι αναγωγάσες αυτές εμφανίζονται στο Σχήμα 1.4. ως NaR (αναγωγή για τα νιτρικά), NiR (αναγωγή για τα νιτρώδη), NOR (αναγωγή για το μονοξείδιο του αζώτου) και N_2OR (αναγωγή για το υποξείδιο του αζώτου). Το μοντέλο της μεταφοράς ηλεκτρονίων που απεικονίζεται στο Σχήμα 1.4. βασίζεται σε πληροφορίες διαθέσιμες για το βακτηριακό είδος *Paracoccus denitrificans*, και δεν είναι απαραίτητα εφαρμόσιμο σε όλους τους μικροοργανισμούς. Παρόλα αυτά αποτελεί παράδειγμα για την διαδικασία που ακολουθείται και για το μονοπάτι μέσα από το οποίο τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο οξυγόνο ή στα οξείδια του αζώτου απουσία οξυγόνου, μέσω των b και c τύπων κυτοχρωμάτων (Knowles, 1982).

Νιτρική αναγωγή: Η νιτρική αναγωγή (NaR) είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη. Η αναγωγή αυτή συμμετέχει στην αναερόβια αναπνευστική διαδικασία, στην οποία τα νιτρικά χρησιμεύουν ως τελικοί αποδέκτες ηλεκτρονίων αντί του μοριακού οξυγόνου, με αποτέλεσμα τη μείωση των νιτρικών σε νιτρώδη. Η NaR είναι ένζυμο που εμφανίζεται στα κύτταρα κάτω από ανοξικές συνθήκες παρουσία νιτρικών. Η τοποθεσία του ενζύμου στο κύτταρο είναι στο εσωτερικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης και συμμετέχει στη διατήρηση της ενέργειας του κυττάρου. Η NaR είναι πρωτεΐνη που αποτελείται από ένα άτομο μολυβδαινίου, τέσσερις αλυσίδες σιδήρου-θείου και ένα κυτόχρωμα τύπου b το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων από την ανηγμένη μορφή του συνενζύμου NADH στη νιτρική αναγωγή (Dvorakova et al., 1998).





Σχήμα 1.4. Μοντέλο διαδρομής της μεταφοράς ηλεκτρονίων για τον *Paracoccus denitrificans*. NaR=νιτρική αναγωγή, NiR=αναγωγή νιτρωδών, NOR=αναγωγή μονοξειδίου του αζώτου, N₂OR=αναγωγή υποξειδίου του αζώτου, Fp=φλαβοπρωτεΐνη, Q=υβικινόνη, Cyt=κυτόχρωμα, FeS=σιδηροθειούχα πρωτεΐνη, Mo=μολυβδαίνιο, MeOH=μεθανόλη (Knowles, 1982).

Αναγωγή νιτρωδών: Η αναγωγή των νιτρωδών (NiR) είναι το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή των νιτρωδών ιόντων σε μονοξείδιο του αζώτου, που είναι ένα αέριο προϊόν. Το ένζυμο NiR βρίσκεται είτε στο εσωτερικό τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης (*Paracoccus denitrificans*) είτε στο περίπλασμα (*Pseudomonas aeruginosa*) του κυττάρου. Η αναγωγή αυτή συναντάται σε δύο τύπους: στον πρώτο τύπο αποτελείται από αιμοπρωτεΐνες (πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη: κέντρα σιδήρου) του κυτοχρώματος *cd* (*Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*) και στον δεύτερο από χαλκό με μεταλλο-φλαβοπρωτεΐνες (*Pseudomonas denitrificans*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*) (Knowles, 1982).

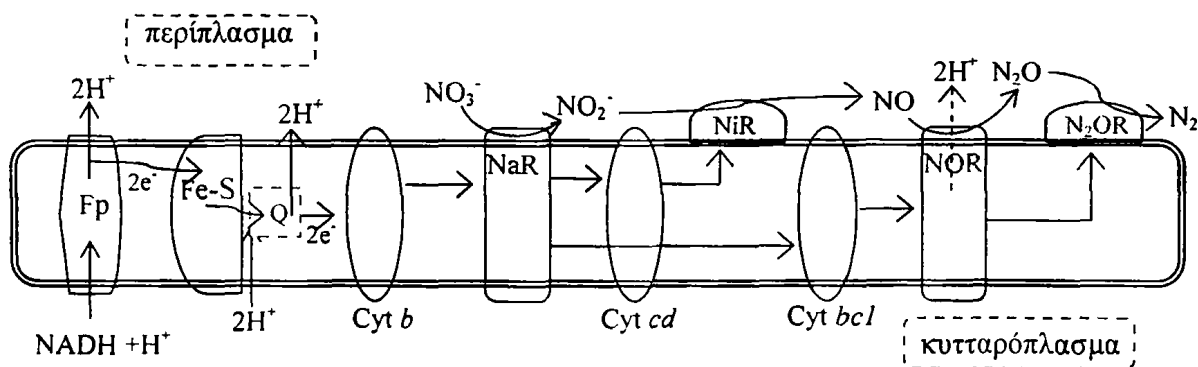
Αναγωγή μονοξειδίου του αζώτου: Η αναγωγή αυτή (NOR) είναι το ένζυμο που μεταφέρει ηλεκτρόνια στο μονοξείδιο του αζώτου ανάγοντας το σε N₂O. Βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων και συναντάται σε δύο τύπους. Στη μία περίπτωση είναι ένα σύμπλεγμα των κυτοχρωμάτων τύπου *b* και *c* (cNOR) και το ένζυμο δέχεται ηλεκτρόνια από το κυτόχρωμα τύπου *c*. Στη δεύτερη περίπτωση απουσιάζει το κυτόχρωμα *c* και ο δότης ηλεκτρονίων είναι οι κινόνες (Hendriks et al., 2000).

Αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου: Η αναγωγή υποξειδίου του αζώτου (N₂OR) είναι το ένζυμο το οποίο καταλύει το τέταρτο και τελευταίο βήμα της



βιολογικής απονιτροποίησης καθώς είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο N_2O ανάγοντας το σε αέριο άζωτο. Όπως και τα υπόλοιπα ένζυμα της απονιτροποίησης έτσι και η N_2OR είναι συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη. Το ένζυμο αυτό αποτελείται από 4 κέντρα χαλκού (Knowles, 1982).

Μέσω των ενζύμων που συμμετέχουν στη διαδικασία της απονιτροποίησης, των κυτοχρωμάτων, των φλαβοπρωτεϊνών, των κινονών και των σιδηροθειούχων πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, πραγματοποιείται η αναγωγή των νιτρικών σε αέριο άζωτο. Η όλη διαδικασία στηρίζεται στη μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ένα συστατικό της μεμβράνης στο άλλο εξαιτίας της διαφοράς δυναμικού μεταξύ αυτών. Για παράδειγμα η φλαβοπρωτεΐνη (E_o -0.22) έχει χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής από την κινόνη (E_o -0.02) με αποτέλεσμα η ροή ηλεκτρονίων να γίνεται με δέκτη την τελευταία (Madigan and Martinko, 2006). Στο Σχήμα 1.5. απεικονίζεται μία πιθανή μεταφορά ηλεκτρονίων στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri* κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης υπό ανοξικές συνθήκες.



Σχήμα 1.5. Μεταφορά ηλεκτρονίων στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου *Pseudomonas stutzeri* κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης υπό ανοξικές συνθήκες (Madigan and Martinko, 2006).

1.6.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την απονιτροποίηση

Θερμοκρασία και pH: Παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την απόδοση των απονιτροποιητικών βακτηρίων είναι η θερμοκρασία και το pH. Οι Claus and Kuntzer (1985) σε πειράματα με το βακτηριακό είδος *Thiobacillus denitrificans* παρατήρησαν τη μέγιστη απόδοση του πληθυσμού στους 30°C και σε pH 7.5-8, σε ένα



εύρος από 15-40°C και pH 6.5-9 που μελετήθηκαν, αντίστοιχα. Οι Kurt et al. (1987) έδειξαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία και το pH για μία μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια ήταν 40°C και 7.5, αντίστοιχα. Οι Lee and Rittmann, (2003) μελέτησαν την επίδραση του pH σε μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια και βρήκαν ότι η βέλτιστη περιοχή είναι από 7.7 έως 8.6. Παρατήρησαν ότι για τιμές του pH από 8.6-9.5 η επί της εκατό απομάκρυνση του αζώτου μειώθηκε κατά 15%, με μία αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών στην έξοδο του αντιδραστήρα από 0.3 σε 1 mg/L. Η αυξημένη τιμή του pH ευνοεί τη συσσώρευση των νιτρικών.

Οι Glass and Silverstein (1998) έδειξαν ότι κατά την επεξεργασία συνθετικά παραγόμενου αποβλήτου τιμές pH 6.5 και 7 παρεμποδίζουν την απονιτροποίηση. Ωστόσο, μία αύξηση του pH από 8.5 σε 9 αύξησε τη συσσώρευση των νιτρικών κατά 90%.

Η συσσώρευση των νιτρικών σε μεγάλες τιμές του pH εξηγείται σε επίπεδο ενζύμων. Όταν πραγματοποιείται μία αναγωγή τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στους δέκτες ηλεκτρονίων. Οι αναγωγάσες καταλύουν τη διαδικασία αυτή και στην περίπτωση της αναγωγής των νιτρικών παράγεται NO και νερό σύμφωνα με την αντίδραση: $\text{NO}_2^- + e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O}$. Κατά τη διάρκεια της μείωσης των νιτρικών σε μονοξείδιο του αζώτου τα πρωτόνια λαμβάνονται από το περίπλασμα της κυτταρικής μεμβράνης, σε αντίθεση με τη νιτρική αναγωγή που παίρνει πρωτόνια από το κυτταρόπλασμα. Σε περιπτώσεις αλκαλικού pH τα πρωτόνια μειώνονται στο περίπλασμα με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται νιτρώδη στο υγρό ρεύμα, αφού περιορίζεται η μετατροπή τους σε μονοξείδιο του αζώτου (Glass and Silverstein, 1998).

Τέλος, οι Delanghe et al. (1994) χρησιμοποιώντας αιθανόλη και μικτή καλλιέργεια έδειξαν ότι το βέλτιστο εύρος pH είναι 8-8.5 και η βέλτιστη θερμοκρασία στους 45°C. Επιπλέον χρησιμοποίησαν μαθηματικές εκφράσεις για την επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στην απονιτροποιητική δραστηριότητα: Specific Denitrification Activity (SA) (gNO₃⁻-N/gβιομάζας d):

$$SA = SA_{20^\circ\text{C}} \cdot 10^{k \cdot (T - 293)} \quad (1.9)$$

όπου k είναι μία σταθερά που υπολογίζεται πειραματικά προσομοιώνοντας τα σημεία που προκύπτουν στο ημιλογαριθμικό διάγραμμα θερμοκρασίας και SA ($k=0.028-0.029$ 1/K). Η σχέση που δίνει την επίδραση του pH είναι:

$$SA = SA_{\text{max}} \cdot \frac{10^{0.028 \cdot (T - 293)}}{1 + 0.03 \cdot [10^{(8.1 - \text{pH})} - 1]} \quad (1.10)$$



Οξυγόνο: Πρέπει να σημειωθεί ότι η νιτρική αναγωγή καθώς και τα υπόλοιπα ένζυμα που συμμετέχουν στην απονιτροποίηση είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο, το οποίο προκαλεί την αναστολή τους και φυσικά τη μη χρησιμότητα τους αφού καλύπτει αυτό της ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η σύνθεση των ενζύμων αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμα και κάτω από αερόβιες συνθήκες, σε μικρά ποσοστά βέβαια και με μικρότερη απονιτροποιητική δράση (Komaros and Lyberatos, 1997). Οι Bonin et al. (1989) μελετώντας το βακτηριακό είδος *Pseudomonas nautica* έδειξαν ότι το κάθε ένζυμο έχει διαφορετική ευαισθησία στο οξυγόνο. Η NaR διατηρεί τη δράση της σε συγκεντρώσεις οξυγόνου μέχρι τα 4 mg/L, σε σύγκριση με τα 2.15 και 0.25 mg/L για τη NiR και τη N₂OR, αντίστοιχα. Οι Komner and Zumft, (1989) μελετώντας το βακτηριακό είδος *Pseudomonas stutzeri*, κατέληξαν στο ότι η NaR εκφράζεται σε τιμές διαλυμένου οξυγόνου ≤ 5 mg/L, η NiR σε τιμές ≤ 2.5 mg/L και η N₂OR σε τιμές ≤ 3.8 mg/L. Παράλληλα έδειξαν ότι η πλήρης έκφραση των ενζύμων (0 mgO₂/L) υποδιπλασιάζεται για τιμές διαλυμένου οξυγόνου 0.8-1.6, 0.7-1.2 και 1-1.6 mg O₂/L, αντίστοιχα.

Η αναλογία άνθρακα/αζώτου (C/N): Η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών είναι μια σημαντική παράμετρος για την βακτηριακή σύνθεση. Οι θρεπτικές ουσίες που είναι απαραίτητες για τη βιοσύνθεση είναι C, H, O, N, P, S, από τις οποίες απαιτούνται μεγάλες ποσότητες, διάφορα μεταλλικά στοιχεία σε μικρότερες ποσότητες (Na, K, Mg, Ca, Fe) και ιχνοστοιχεία (Mn, Zn, Cu, Co, Mo). Κατά μέσο όρο, με βάση τη σύνθεση των κυττάρων, η βέλτιστη αναλογία θρεπτικών είναι C:O:N:P:S = 100:20:4:1, αν και επιπλέον οργανικός άνθρακας απαιτείται ως δότης ηλεκτρονίων για την ετερότροφη απονιτροποίηση. Σημειώνεται ότι ο τύπος της βιομάζας δόθηκε από τους Hoover and Porgess (1952) ως C₅H₇O₂N. Τα περισσότερα υπόγεια νερά περιέχουν επαρκείς συγκεντρώσεις από τα απαραίτητα μεταλλικά στοιχεία και ιχνοστοιχεία για να υποστηρίξουν τη βιοσύνθεση (Hiscock et al., 1991). Η κατάλληλη αναλογία άνθρακα/αζώτου είναι εκείνη που καθορίζει την απόδοση κάθε απονιτροποιητικής καλλιέργειας σε ένα σύστημα επεξεργασίας για την απομάκρυνση των νιτρικών. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί διάφορες αναλογίες C/N. Οι Mansell and Schroeder (2002), αναφέρουν μία αναλογία C/N=0.21/1 χρησιμοποιώντας μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια. Οι Glass and Silverstein (1998), χρησιμοποίησαν αναλογία C/N=1.5/1 για μικτή ετερότροφη καλλιέργεια. Τέλος, οι Delanghe et al. (1994) χρησιμοποιώντας αιθανόλη και μικτή καλλιέργεια έδειξαν ότι η κρίσιμη αναλογία για 100% απομάκρυνση αζώτου είναι C/N=1.45/1.



Το πώς επηρεάζει η αναλογία C/N, το pH, η θερμοκρασία ή το οξυγόνο, ένα σύστημα απονιτροποίησης εξαρτάται κάθε φορά από το είδος των βακτηρίων που αποτελούν την απονιτροποιητική καλλιέργεια.

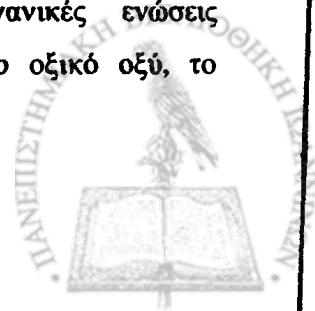
Ενώσεις του αζώτου: Κατά τη διαδικασία της απονιτροποίησης μπορεί να παρατηρηθεί συσσώρευση των νιτρικών όχι μόνο εξαιτίας των παρεμποδιστικών συνθηκών που περιγράφηκαν πιο πάνω, αλλά εξαιτίας της ύπαρξης των νιτρικών. Η νιτρική αναγωγή και η αναγωγή των νιτρικών ανταγωνίζονται για την πρόσληψη ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα (το δότη ηλεκτρονίων) και ειδικά σε περιπτώσεις που το κύτταρο καλύπτει της ενεργειακές του ανάγκες χρησιμοποιώντας τα νιτρικά. Ο ρυθμός μείωσης των νιτρικών είναι μεγαλύτερος από αυτόν των νιτρικών, με αποτέλεσμα η ροή ηλεκτρονίων προς την (NiR) να διακόπτεται κατά περιόδους προκαλώντας έτσι συσσώρευση νιτρικών. Η καταστολή της λειτουργίας της NiR λήγει με την πλήρη μείωση των νιτρικών (Glass and Silverstein, 1998).

Επίσης έχει παρατηρηθεί παρεμπόδιση από τα νιτρικά και τα νιτρώδη στην απόδοση της απονιτροποιητικής καλλιέργειας. Οι Oh et al. (2000) παρατήρησαν ότι για συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου μεγαλύτερες από 660 mg/L μειώνεται η παραγωγή αερίου αζώτου, ενώ επισημαίνουν ότι η συγκέντρωση των νιτρικών μπορεί να επηρεάσει αρνητικά ένα σύστημα σε μικρότερες συγκεντρώσεις (>150 mg/L).

Παρεμποδιστές: Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση είναι ευαίσθητα σε ποικίλες ενώσεις που δρουν παρεμποδιστικά. Για παράδειγμα τα σουλφίδια εμφανίζονται να εμποδίζουν συγκεκριμένα τη μείωση από του NO σε N₂O και είναι πιθανώς αρμόδια για η συσσώρευση αυτών των αερίων. Το ακετυλένιο C₂H₂ (10⁻³ atm) παρεμποδίζει την αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου. Τα αζίδια (N₃⁻) και τα κυανίδια (CN⁻) (10⁻⁴ M) παρεμποδίζουν την μετατροπή του N₂O σε αέριο άζωτο. Τέλος φυτοφάρμακα (Varam 20ppm, Dalapon 10ppm) δρουν αρνητικά σε όλα τα στάδια της απονιτροποίησης (Knowles, 1982).

1.6.4. Ετερότροφη απονιτροποίηση

Η ετερότροφη απονιτροποίηση είναι η βιολογική μέθοδος που έχει μελετηθεί πιο επισταμένα. Κατά την ετερότροφη απονιτροποίηση τα απονιτροποιητικά βακτήρια (*Pseudomonas denitrificans*) χρειάζονται οργανική πηγή άνθρακα για τη βακτηριακή τους σύνθεση και σαν δότη ηλεκτρονίων. Διάφορες οργανικές ενώσεις χρησιμοποιούνται όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, η γλυκόζη, το οξικό οξύ, το



μυρμηκικό οξύ κ.α. (Matezu et al., 1992). Στον Πίνακα 1.5. δίνονται διάφορες πηγές άνθρακα με οικονομικά στοιχεία.

Με βάση τη στοιχειομετρία η αναλογία μεθανόλης/νιτρικών είναι 0.56, αιθανόλης/νιτρικών 0.374 και οξικό οξύ/νιτρικών 1.27. Επιπρόσθετα, οι αναλογίες C/N για τη μεθανόλη, την αιθανόλη και το οξικό οξύ είναι 0.93, 0.87 και 2.24, αντίστοιχα (Shrimali and Singh, 2001). Κατά την ετερότροφη απονιτροποίηση κάθε mg NO_3^- -N που μετατρέπεται σε αέριο άζωτο παράγει 3.57 mg CaCO_3 (Rijn et al., 2006).

Για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας της απονιτροποίησης έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες με αντιδραστήρες μεμβρανών, ρευστοποιημένης και σταθερής κλίνης, ενώ παράλληλα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα. Η ετερότροφη απονιτροποίηση χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλούς ρυθμούς απονιτροποίησης και αυτό την καθιστά πολύ ελκυστική μέθοδο. Σε αντιδραστήρες σταθερής ή ρευστοποιημένης κλίνης αναφέρονται ρυθμοί απονιτροποίησης από 0.036 έως 10 g/Ld, ενώ σε συστήματα μεμβρανών οι ρυθμοί εκφρασμένοι ανά μονάδα επιφάνειας αναφέρονται ότι είναι από 8-56 g/m²d (Rijn et al., 2006; Hirata and Meutia, 1996).

Πίνακας 1.5. Κόστος και οργανικό υπόστρωμα (Della Rocca et al., 2007).

Υπόστρωμα	Κόστος (€/kg)	Κατανάλωση υποστρώματος (kg/kg NO_3^- -N)	(€/kg NO_3^- -N)	Αναφορά
Μεθανόλη	1	2.08-3.98	2-4	Boley et al., 2002
Αιθανόλη	1.2	2	2.4	Boley et al., 2002
Οξικό οξύ	2.4	3.5	8	Boley et al., 2002
PCL (C ₆ H ₁₀ O ₂)	5	1.33-1.77	6.6-8.9	Boley et al., 2002
PHB (C ₄ H ₆ O ₂)	10	2.1-2.7	21-37.2	Boley et al., 2002
Άλας οξικού οξέος	2.38	2.7	6.25	Soares et al., 2000
Βαμβάκι	0.74	2.8	2.12	Soares et al., 2000
Άμυλο	1.76	4.3	7.57	Kim et al., 2002



Παρόλα αυτά, η μεγάλη παραγωγή βιομάζας, καθώς η ετερότροφη απονιτροποίηση συνοδεύεται από μεγάλους συντελεστές απόδοσης (Πίνακας 1.6) και η προσθήκη οργανικών ενώσεων έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία λειτουργικών προβλημάτων (φράξιμο πόρων του αντιδραστήρα) και την επιβάρυνση του επεξεργασμένου νερού με υψηλό οργανικό φορτίο (Ergas and Reuss, 2001).

Πίνακας 1.6. Στοιχειομετρικές αντιδράσεις κατά την ετερότροφη απονιτροποίηση.

Στοιχειομετρική αντίδραση	Συντελεστής απόδοσης g βιομάζας / g N	Αναφορά
$\text{NO}_3^- + 1.09\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}^+ \rightarrow 0.436\text{N}_2 + 0.72\text{CO}_2 + 2.421\text{H}_2\text{O} + 0.074\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ (μεθανόλη)	0.6	Foglar and Briski, 2003
$\text{NO}_3^- + 0.819\text{CH}_3\text{OOH} \rightarrow 0.466\text{N}_2 + 0.301\text{CO}_2 + 0.902\text{H}_2\text{O} + 0.068\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + \text{HCO}_3^-$ (οξικό οξύ)	0.55	Matezu et al., 1992
$2.8\text{NO}_3^- + \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 0.5\text{NH}_4^+ + 2.3\text{H}^+ \rightarrow 1.4\text{N}_2 + 3.5\text{CO}_2 + 6.4\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ (γλυκόζη)	1.44	Matezu et al., 1992
$\text{NO}_3^- + \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + \text{H}^+ \rightarrow 0.43\text{N}_2 + 0.67\text{CO}_2 + 2.07\text{H}_2\text{O} + 0.145\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ (αιθανόλη)	1.17	McAdam and Judd, 2006

Για την προσομοίωση της ετερότροφης απονιτροποίησης έχει χρησιμοποιηθεί η κινητική εξίσωση που προτάθηκε από τον Monod για την περιγραφή της ανάπτυξης της βιομάζας:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \quad (1.11)$$

όπου : μ = ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών (1/h)

$\mu_{\max}$ = μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών (1/h)

S = συγκέντρωση περιοριστικού υποστρώματος (νιτρικά, νιτρώδη (mg/L))

K_s = σταθερά κορεσμού (συγκέντρωση υποστρώματος που αντιστοιχεί σε ρυθμό ίσο με το μισό μέγιστου ειδικού ρυθμού) (mg/L).

Ο ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος (NO_3^- και NO_2^- αντίστοιχα) δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1.12)$$

$$\text{όπου : } \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (1.13)$$



μ = ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών (1/h)

X = συγκέντρωση μικροοργανισμών (mg/L)

Y = συντελεστής απόδοσης βακτηρίων (mg κυττάρων που παράγονται/

mg υποστρώματος που καταναλώνονται)

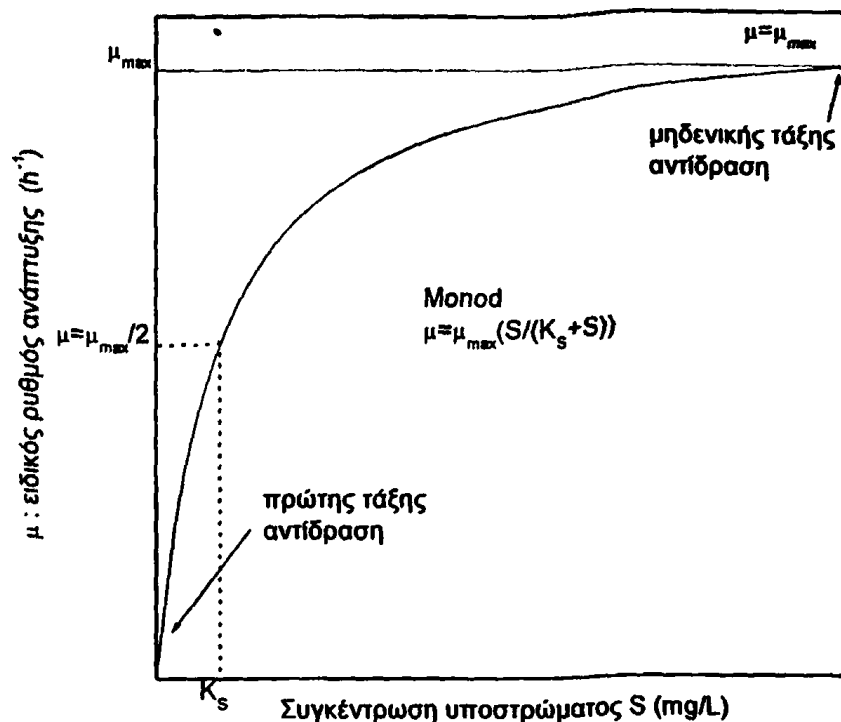
Συνεπώς, η εξίσωση (1.12) μετασχηματίζεται :

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} \cdot \mu_{\max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot X \quad (1.14)$$

Το φυσικό νόημα της κινητικής Monod είναι ότι ο ρυθμός αύξησης του κυττάρου καθορίζεται από μία ενζυματική του αντίδραση στην οποία η συγκέντρωση του ενζύμου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης βιομάζας.

Οι ποσοτικές αναφορές σχετικά με τους ρυθμούς ανάπτυξης των ετερότροφων βακτηρίων ποικίλουν. Το μοντέλο Monod έχει χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της ετερότροφης απονιτροποίησης είτε λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα νιτρικά (Foglar and Briski, 2003) είτε και τα νιτρικά και τα νιτρώδη σαν δύο ανεξάρτητα περιοριστικά υποστρώματα (Green et al., 1995) ή θεωρώντας ότι τα νιτρώδη προέρχονται από την αναγωγή των νιτρικών αντιμετωπίζοντας την απονιτροποίηση σαν διαδικασία δύο σταδίων (νιτρικά→νιτρώδη→αέριο άζωτο) (Marazioti et al., 2003). Στον Πίνακα 1.7 δίνονται ενδεικτικές τιμές των κινητικών σταθερών όπως έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία.





Σχήμα 1.6. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης βακτηρίων.

Στην ετερότροφη απονιτροποίηση, επίσης, έχει γίνει χρήση και κινητικών εκφράσεων μηδενικής τάξης (Green et al., 1995; Glass and Silverstein, 1998). Όπως φαίνεται από το Σχήμα 1.6, η αύξηση της συγκέντρωσης S του υποστρώματος, προκαλεί αύξηση του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων μέχρι ένα οριακό σημείο, από το οποίο και μετά παραμένει σταθερός. Αυτό συμβαίνει επειδή με την αύξηση της τροφής (υπόστρωμα) αυξάνει ο μεταβολισμός των βακτηρίων με αποτέλεσμα να αυξάνει ο ρυθμός ανάπτυξής τους. Μετά από ένα σημείο η συγκέντρωση του υποστρώματος δεν επηρεάζει πλέον το ρυθμό ανάπτυξης και αυτό γιατί δεν μπορεί να επιταχυνθεί επιπλέον ο μεταβολισμός των βακτηρίων και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης σταθεροποιείται στη μέγιστη τιμή του. Όταν το υπόστρωμα είναι σε αφθονία, δηλαδή $S \gg K_s$, τότε ο ρυθμός ανάπτυξης γίνεται σχεδόν ίσος με μ_{max} και θεωρείται ότι η ανάπτυξη δεν εξαρτάται από την ποσότητα του υποστρώματος (Σχήμα 1.6).

Πίνακας 1.7. Ενδεικτικές τιμές κινητικών σταθερών για τα ετερότροφα απονιτροποιητικά βακτήρια.

Κινητική Monod							
$\mu_{\max 1}$ (1/h) μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης σε νιτρικά	$\mu_{\max 2}$ (1/h) μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης σε νιτρώδη	K_s (mgNO ₃ ⁻ /N/L) σταθερά κορεσμού	K_n (mgNO ₂ ⁻ /N/L) σταθερά κορεσμού	Y_s (mgβιομάζας/ mgNO ₃ ⁻ -N) συντελεστής απόδοσης	Y_n (mgβιομάζας/ mgNO ₂ ⁻ -N) συντελεστής απόδοσης	k_d (1/h) συντελεστής θνησιμότητας	Αναφορά
0.023	--	1.4	--	--	--	--	Esoy and Odegaard, 1994
0.45	0.25	3.59	4.1	0.15	0.15	0.002	Green et al., 1995
0.011	--	0.001	--	0.48-0.61	--	--	Foglar and Briski, 2003
0.1	0.1	0.77	0.28	1.02	1.41	--	Marazioti et al., 2003

1.6.5. Αυτότροφη απονιτροποίηση με ενώσεις θείου

Μία εναλλακτική μέθοδος επεξεργασίας, η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια είναι η απονιτροποίηση στην οποία χρησιμοποιούνται ενώσεις θείου σαν δότες ηλεκτρονίων. Η αυτότροφη αυτή μέθοδος έρχεται σε απάντηση της ετερότροφης απονιτροποίησης καθώς επιτυγχάνει υψηλές αποδόσεις, δεν απαιτείται προσθήκη οργανικών ενώσεων και χαρακτηρίζεται από μικρότερη παραγωγή βιομάζας.

Αυτή η μέθοδος πραγματοποιείται από αυτότροφα απονιτροποιητικά βακτήρια, τα οποία οξειδώνουν διάφορες ανηγμένες μορφές θείου, όπως H_2S , S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ και SO_3^{2-} . Βακτηριακά είδη, όπως το *Thiobacillus denitrificans*, το *Thiobacillus pantotrophus* (Ahn, 2006) και το *Thiomicrospira denitrificans* χρησιμοποιούν ανόργανες πηγές άνθρακα για τη βακτηριακή τους σύνθεση (CO_2 , HCO_3^-) και πραγματοποιούν την απονιτροποίηση έχοντας σαν δότες ηλεκτρονίων ενώσεις του θείου (Campos et al., 2007).

Οι στοιχειομετρικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται κατά την απονιτροποίηση με ενώσεις θείου, ανάλογα με την πηγή άνθρακα και τον δότη ηλεκτρονίων, όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία δίνονται στον Πίνακα 1.8. Τα βασικά προβλήματα που χρήζουν λύσης της μεθόδου αυτής είναι η μείωση του pH σε παρεμποδιστικά επίπεδα και η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων θειϊκών ιόντων κατά την απονιτροποίηση. Όπως προκύπτει από τις στοιχειομετρικές αντιδράσεις η απομάκρυνση των νιτρικών έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή υδρογονοκατιόντων και θειϊκών ιόντων.

Για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου αυτής και την εύρεση λύσης στα παραπάνω μειονεκτήματα, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες τόσο για την ανάπτυξη της κατάλληλης τεχνολογίας, όσο και για τη θεωρητική προσομοίωση αυτής. Σημαντικές προσπάθειες έχουν γίνει για την εύρεση του κατάλληλου τρόπου λειτουργίας ενός συστήματος ή της πηγής και της ποσότητας αλκαλικότητας που πρέπει να προστεθεί για την καλή λειτουργία ενός αντιδραστήρα απονιτροποίησης. Μελετήθηκε για παράδειγμα ο χρόνος παραμονής στον αντιδραστήρα, το μέγεθος των σωματιδίων (particles) του θείου, η ποσότητα της προστιθέμενης αλκαλικότητας για διατήρηση του pH, η αναλογία θείου /αζώτου (Koenig and Liu, 1996; Furumai et al., 1996; Kim et al., 2004).

Βασίζόμενοι στη στοιχειομετρία οι Koenig and Liu (2002) αναφέρουν ότι 0.86 mol υδρογονοκατιόντων παράγονται και 0.3 mol HCO_3^- καταναλώνονται για κάθε 1.06 mol νιτρικού αζώτου που απομακρύνεται. Αυτό σημαίνει ότι 3.91 gr αλκαλικότητας (εκφρασμένη σε CaCO_3) καταναλώνεται για κάθε 1 gr N που μετατρέπεται σε αέριο



άζωτο. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η προσθήκη αλκαλικότητας η οποία θα ουδετεροποιήσει τα H^+ εμποδίζοντας το pH να μειωθεί σε απαγορευτικές τιμές για την απονιτροποίηση (<6.7) και θα τροφοδοτεί το σύστημα με αλκαλικότητα.

Η ουσία που χρησιμοποιείται συνήθως ως πηγή αλκαλικότητας είναι το $NaHCO_3$. Σε μία προσπάθεια αντικατάστασης της ουσίας αυτής με μία πιο φθηνή πηγή αλκαλικότητας, όπως το ανθρακικό ασβέστιο, οι Koenig and Liu (2002) πραγματοποίησαν πειράματα σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (φιάλες) με το βακτηριακό είδος *Thiobacillus denitrificans*. Στους αντιδραστήρες πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαφορετικές αναλογίες σωματιδίων (particles) θείου και ασβεστόλιθου ($CaCO_3$) σε κοκκώδη μορφή (2.8-5.6 cm) και παρατηρήθηκε ότι η βέλτιστη αναλογία ήταν 1:1 έτσι ώστε να μειωθεί η αρχική αλκαλικότητα από 680 σε 217 mg/L (που προστίθεται ως $NaHCO_3$) και το pH να μειώνεται από 7.75 σε 6.75.

Οι Gu et al. (2004) χρησιμοποίησαν αντιδραστήρα σταθερής κλίνης συνεχούς λειτουργίας (ανοδικής ροής) για την επεξεργασία ρυπασμένου νερού με 250 mg/L νιτρικού αζώτου. Ο αντιδραστήρας είχε πληρωθεί με σωματίδια (particles) θείου (0.56-1.12cm) και ασβεστόλιθο ($CaCO_3$) σε κοκκώδη μορφή, ενώ εμβολιάστηκε με το βακτηριακό είδος *Thiobacillus denitrificans*. Παρατηρήθηκε ότι για την απομάκρυνση 250 mg NO_3^- -N/L παρήχθησαν στην έξοδο του αντιδραστήρα 1,860 mg/L SO_4^{2-} από 209 mg/L που ήταν στην είσοδο αυτού. Παράλληλα το pH μειώθηκε από 8.2 σε 6.75.

Με βάση την 1^η στοιχειομετρική εξίσωση (Πίνακας 1.8) η μάζα σε mg των SO_4^{2-} που παράγονται ως προς τα mg του NO_3^- -N που καταναλώνονται είναι 7.54 mg SO_4^{2-} . Στην περίπτωση των Gu et al. (2004) αυτή η ποσότητα αλλάζει σε 6.81 mg SO_4^{2-} /mg NO_3^- -N, καθώς έχουν αναφερθεί και άλλες αναλογίες όπως 7.89 mg SO_4^{2-} /mg NO_3^- -N (Koenig and Liu, 1996). Οι διαφορές μεταξύ των ποσοτήτων των SO_4^{2-} που παράγονται οφείλονται στις διαφορετικές καλλιέργειες βακτηριών, στον τύπο του αντιδραστήρα και στις λειτουργικές συνθήκες.



Πίνακας 1.8. Στοιχειομετρικές αντιδράσεις κατά την απονιτροποίηση με ενώσεις θείου.

Στοιχειομετρική αντίδραση	Συντελεστής απόδοσης g βιομάζας / g N	Αναφορά
$1.06\text{NO}_3^- + 1.11\text{S} + 0.3\text{HCO}_3^- + 0.485\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0.5\text{N}_2 + 1.11\text{SO}_4^{2-} + 0.86\text{H}^+ + 0.06\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	0.456	Liu and Koenig, 2002
$\text{NO}_3^- + 0.98\text{S} + 0.188\text{CO}_2 + 0.609\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0.48\text{N}_2 + 0.98\text{SO}_4^{2-} + 0.955\text{H}^+ + 0.0375\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	0.3	McAdam and Judd, 2006
$\text{NO}_3^- + 1.14\text{S} + 0.0842\text{HCO}_3^- + 0.0842\text{NH}_4^+ + 0.337\text{CO}_2 + 0.669\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0.5\text{N}_2 + 1.114\text{SO}_4^{2-} + 1.228\text{H}^+ + 0.0842\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	0.679	Ahn, 2006
$\text{NO}_3^- + 1.1\text{S} + 0.08\text{NH}_4^+ + 0.4\text{CO}_2 + 0.76\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0.5\text{N}_2 + 1.1\text{SO}_4^{2-} + 1.28\text{H}^+ + 0.08\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	0.645	Campos et al., 2007
$\text{NO}_3^- + 0.844\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 0.347\text{CO}_2 + 0.086\text{HCO}_3^- + 0.086\text{NH}_4^+ + 0.434\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0.5\text{N}_2 + 1.689\text{SO}_4^{2-} + 0.697\text{H}^+ + 0.086\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	0.694	Campos et al., 2007

Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο τη μείωση των θεϊκών ιόντων που παράγονται κατά τη διαδικασία της απονιτροποίησης (Campos et al., 2007), ωστόσο το πρόβλημα παραμένει. Σημειώνεται ότι το ανώτατο επιτρεπτό όριο των SO_4^{2-} στο πόσιμο νερό είναι 250 mg/L (Council Directive 98/83/EC, 1998). Κατά την απονιτροποίηση με ενώσεις θείου η ποσότητα των ιόντων αυτών μπορεί να φτάσει σε επίπεδα των χιλιάδων mg/L.

Όσο αναφορά στην προσομοίωση της διαδικασίας της απονιτροποίησης, οι Claus and Kutzner (1985) χρησιμοποίησαν τη μαθηματική έκφραση του Monod για την περιγραφή της συμπεριφοράς του *Thiobacillus denitrificans* σε έναν αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (χημοστάτη). Οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν ότι ήταν: $r_{\max}$ (μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης για τα νιτρικά) = 0.11 (l/h), K_s (σταθερά κορεσμού) = 0.2 (mg/L) και Y_s (ο συντελεστής απόδοσης) = 0.57 (mg βιομάζας/mg NO_3^- -N). Οι Oh et al., (2000) χρησιμοποίησαν κινητική Monod για να περιγράψουν τη συμπεριφορά μικτής καλλιέργειας σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν ότι ήταν: $r_{\max}$ = 0.12-0.2 (l/h), K_s = 3-10 (mg/L) και Y_s = 0.4-0.5 (mg βιομάζας/mg NO_3^- -N).



Επόμενοι ερευνητές στηριζόμενοι στην πολύ μικρή τιμή του K_s της τάξης του 0.2 (Claus and Kutzner, 1985) και 0.03 (mg/L) (Batchelor and Lawrence, 1978) που είχε αναφερθεί στη βιβλιογραφία, απλοποίησαν την έκφραση του Monod και χρησιμοποίησαν μαθηματικές εκφράσεις μηδενικής (Campos et al., 2007) ή μισής τάξης (Koenig and Liu, 2002; Moon et al., 2004) για την περιγραφή των πειραματικών τους αποτελεσμάτων. Ωστόσο, οι Zeng and Zhang (2005) πραγματοποίησαν πειράματα σε αντιδραστήρα σταθερής κλίνης, πληρωμένο με σωματίδια θείου και CaCO_3 , με σκοπό τον υπολογισμό κινητικών παραμέτρων της κινητικής έκφρασης Monod. Οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν ότι ήταν: $r_{\max} = 0.006$ (l/h), $K_s = 0.398$ (mg/L), $Y_s = 0.85\text{--}1.11$ (mg βιομάζας/mg NO_3^- -N) και k_d (συντελεστής θνησιμότητας) = $0.00375\text{--}0.005$ (l/h).

1.6.6. Αυτότροφη υδρογονοτροφική απονιτροποίηση

Η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση είναι η μέθοδος στην οποία απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν το υδρογόνο ως δότη ηλεκτρονίων, με τελικό δέκτη τα νιτρικά. Με τη μέθοδο αυτή αποφεύγονται τα προβλήματα της απονιτροποίησης με ενώσεις θείου, καθώς το υδρογόνο είναι αβλαβές κατά την προσθήκη του στο πόσιμο νερό και δεν χρειάζεται το επεξεργασμένο νερό περαιτέρω επεξεργασία για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων του (Szekeres et al., 2001). Επίσης, λόγω της χαμηλής του διαλυτότητας (1.67 mg/L, 20°C) απομακρύνεται εύκολα από το επεξεργασμένο νερό (Mansell and Schroeder, 2002).

Βακτηριακά είδη, όπως το *Rhizobium japonicum* ή το *Hydrogenophaga flava* (Mansell and Schroeder, 2002) χρησιμοποιούν ανόργανες πηγές άνθρακα για τη βακτηριακή τους σύνθεση (CO_2 , HCO_3^-) και πραγματοποιούν την απονιτροποίηση έχοντας σαν δότη ηλεκτρονίων το υδρογόνο.

Οι στοιχειομετρικές αντιδράσεις που έχουν αναφερθεί για την υδρογονοτροφική απονιτροποίηση δίνονται στον Πίνακα 1.9. Συγκρίνοντας τους συντελεστές απόδοσης της απονιτροποίησης με ενώσεις θείου και της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης (Πίνακες 1.8 και 1.9), παρατηρείται ότι κατά τη δεύτερη παράγονται μικρότερες ποσότητες βιομάζας. Επίσης, στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση παράγεται κατά 50% λιγότερη βιομάζα από ότι στην ετερότροφη απονιτροποίηση με οργανικές πηγές άνθρακα όπως η μεθανόλη (Haugen et al., 2002).

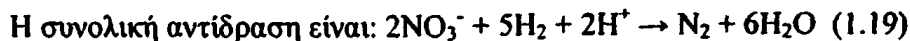
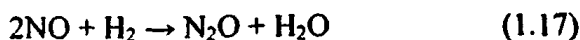
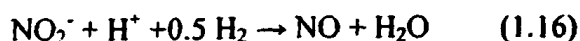


Η θεωρητική απαίτηση σε υδρογόνο για την αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη είναι $0.14 \text{ mgH}_2/\text{mgNO}_3^- \text{-N}$, ενώ για την αναγωγή των νιτρωδών σε αέριο άζωτο είναι $0.21 \text{ mgH}_2/\text{mgNO}_2^- \text{-N}$ (Kurt et al., 1987). Δηλαδή, για τη μετατροπή $1 \text{ mgNO}_3^- \text{-N}$ σε αέριο άζωτο χρειάζονται θεωρητικά 0.35 mgH_2 . Οι Chang et al. (1999) έδειξαν ότι για την πλήρη απομάκρυνση των νιτρικών από έναν αντιδραστήρα ρευστοποιημένης κλίνης η συγκέντρωση του διαλυμένου υδρογόνου στο υγρό ρεύμα πρέπει να παραμένει σε επίπεδα υψηλότερα από 0.1 mg/L για τα νιτρικά και 0.2 mg/L για τα νιτρώδη.

Πίνακας 1.9. Στοιχειομετρικές αντιδράσεις κατά την υδρογονοτροφική απονιτροποίηση.

Στοιχειομετρική αντίδραση	Συντελεστής απόδοσης $\text{g βιομάζας} / \text{g N}$	Αναφορά
$0.35\text{NO}_3^- + \text{H}_2 + 0.35\text{H}^+ + 0.052\text{CO}_2 \rightarrow$ $0.17\text{N}_2 + 1.1 \text{H}_2\text{O} + 0.01\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	0.24	Ergas and Reuss, 2001
$\text{NO}_3^- + 3.03\text{H}_2 + \text{H}^+ + 0.229 \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow$ $0.477\text{N}_2 + 3.6 \text{H}_2\text{O} + 0.0458\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$	0.37	Lee and Rittmann, 2003

Όταν σαν δότης ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται το υδρογόνο η αντίδραση που πραγματοποιείται σε κάθε ένα από τα τέσσερα στάδια της απονιτροποίησης είναι:



Στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση η τιμή του pH αυξάνεται εξαιτίας της κατανάλωσης 1 mol H^+ κατά τη μετατροπή 1 mol NO_2^- σε αέριο άζωτο (Chang et al., 1999), ενώ κατά τη μετατροπή των νιτρικών σε νιτρώδη δεν επηρεάζεται το pH (Kurt et al., 1987). Με βάση τα παραπάνω η κατανάλωση των υδρογονοκατιόντων έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αλκαλικότητας κατά 3.57 g CaCO_3 ανά $\text{g NO}_3^- \text{-N}$ που μετατρέπεται σε αέριο άζωτο. Η αύξηση της αλκαλικότητας συνδέεται με το στάδιο της μετατροπής των νιτρωδών σε μονοξείδιο του αζώτου (Lee and Rittmann, 2003).

Η αύξηση του pH και της αλκαλικότητας έχει δύο μειονεκτήματα: επηρεάζει αρνητικά την απονιτροποιητική συμπεριφορά των βακτηρίων (συσσώρευση νιτρωδών



σε αλκαλικά pH) και αυξάνει τη δημιουργία ιζημάτων (CaHPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$). Για τη διατήρηση του pH γίνεται χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων με φωσφορικά άλατα (Lee and Rittmann, 2003).

Για τη μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν διάφορες πειραματικές διατάξεις όπως αντιδραστήρες σταθερής και ρευστοποιημένης κλίνης και αντιδραστήρες μεμβρανών.

Οι Kurt et al. (1987) μελέτησαν την υδρογονοτροφική απονιτροποίηση σε κωνικό αντιδραστήρα ρευστοποιημένης κλίνης με άμμο, χρησιμοποιώντας μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια. Κατέληξαν στο ότι για την απομάκρυνση $25 \text{ mgNO}_3^- \text{ N/L}$, απαιτείται χρόνος παραμονής 4.5 h με ένα ρυθμό απονιτροποίησης $0.552 \text{ gNO}_3^- \text{ N/Ld}$. Οι Dries et al. (1988) χρησιμοποίησαν δύο αντιδραστήρες (σταθερής κλίνης) σε σειρά πληρωμένους με πολυουρεθάνιο (PU). Ο πρώτος αντιδραστήρας ήταν καθοδικής ροής, ενώ ο δεύτερος ανοδικής. Ο ρυθμός απονιτροποίησης ήταν $0.5 \text{ gNO}_3^- \text{ N/Ld}$ για την απομάκρυνση $15 \text{ mgNO}_3^- \text{ N/L}$.

Οι Gros et al. (1988) μελέτησαν την απόδοση της πρώτης εμπορικού-επιπέδου βιολογικής εγκατάστασης υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης πόσιμου νερού. Η εγκατάσταση έγινε στη Γερμανία (στην πόλη Monchengladbach). Το σύστημα ονομάστηκε Denitropur και αποτελείτο από εννέα αντιδραστήρες σε σειρά σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής. Οι αντιδραστήρες πληρώθηκαν με Mellapack (υλικό φτιαγμένο από πολυπροπυλένιο). Το σύστημα είχε την ικανότητα επεξεργασίας $50 \text{ m}^3/\text{h}$ με $17 \text{ mgNO}_3^- \text{ N/L}$. Στην έξοδο του αντιδραστήρα τα νιτρικά μειώνονταν σε $1 \text{ mgNO}_3^- \text{ N/L}$ μετά από χρόνο παραμονής 1 h. Ο ρυθμός απονιτροποίησης ήταν $0.25 \text{ gNO}_3^- \text{ N/Ld}$.

Οι Chang et al. (1999) μελέτησαν την απόδοση του βακτηριακού είδους *Alcaligenes eutrophus* σε αντιδραστήρα ρευστοποιημένης κλίνης με σφαίρες πολυακρυλαμυδίου, πετυχαίνοντας ρυθμό απονιτροποίησης $0.6\text{-}0.7 \text{ gN/Ld}$ με χρόνο παραμονής 53 min, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου 22-25 mg/L. Οι Szekeres et al. (2001) πραγματοποίησαν πειράματα με μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια σε αντιδραστήρα σταθερής κλίνης με ενεργό άνθρακα (GAC). Η παροχή του υδρογόνου πραγματοποιούνταν μέσω της ηλεκτρόλυσης του νερού με εφαρμογή ηλεκτρικού ρεύματος με τη χρήση ηλεκτροδίων τιτανίου και πλατίνας. Ο ρυθμός απονιτροποίησης που επιτεύχθηκε ήταν 0.25 gN/Ld με χρόνο παραμονής 1 h, απομακρύνοντας $27 \text{ mgNO}_3^- \text{ N/L}$.



Τα τελευταία χρόνια σε μία προσπάθεια να γίνει η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση ανταγωνιστική και οικονομικά βιώσιμη μέθοδος, η έρευνα έχει στραφεί στη βελτιστοποίηση της χρήσης μεμβρανών. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης μεμβρανών στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση αποτελούν οι μεγαλύτεροι ρυθμοί μεταφοράς υδρογόνου, η αποφυγή σπατάλης του αερίου και οι μεγάλες συγκεντρώσεις βιομάζας που αναπτύσσονται στην επιφάνεια της μεμβράνης (Ergas and Reuss, 2001).

Στον Πίνακα 1.10 δίνονται οι ρυθμοί απονιτροποίησης των συστημάτων με μεμβράνες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση. Το κύριο μειονέκτημα της χρήσης μεμβρανών είναι ο κίνδυνος φραξίματος των πόρων από ανόργανα στερεά με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου ζωής της (McAdam et al., 2006). Τα κατιόντα στο νερό, όπως το Ca^{2+} , μπορούν να κατακρημνιστούν μαζί με ανιόντα, όπως ανθρακικά (CO_3^{2-}), φωσφορικά (PO_4^{3-}), όξινα φωσφορικά (HPO_4^{2-}) και δισόξινα φωσφορικά (H_2PO_4^-) (Lee και Rittman, 2003; Rezanian et al., 2005). Ανόργανα συστατικά όπως $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ και CaCO_3 , έχουν υψηλή σταθερά διαλυτότητας pK_{so} (λιγότερο ευδιάλυτα) ίση με 55.9, 24 και 8.34 αντίστοιχα. Αυτά τα ανόργανα στερεά σχηματίζονται και επικάθονται είτε στους πόρους της μεμβράνης είτε ενσωματώνονται στο βιοφίλμ με αποτέλεσμα να δημιουργούνται λειτουργικά προβλήματα στη μεταφορά του υδρογόνου (Lee and Rittman, 2003).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η διαλυτότητα των ιζημάτων που δημιουργούνται εξαρτάται από το pH, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μεγαλύτερη δημιουργία στερεών σε υψηλότερα pH (Rezanian et al., 2005).

Οι Lee and Rittman, (2003) δίνουν μία σχέση για τον υπολογισμό της μεταβολής της αλκαλικότητας:

$$\Delta \text{Alk}_{\text{denitr}} = (S_{\text{εξ}} - S_{\text{εισ}} - N_{\text{εξ}}) \times \left(\frac{1 \text{ mmol}}{14 \text{ mg/L}} \right) \times \left(\frac{50 \text{ mg CaCO}_3}{\text{mmol N}} \right) \quad (1.20)$$

όπου $S_{\text{εισ}}$ και $S_{\text{εξ}}$ είναι η συγκέντρωση νιτρικών (mgN/L) στην είσοδο και την έξοδο, αντίστοιχα, $N_{\text{εξ}}$ είναι η συγκέντρωση νιτρώδων (mgN/L) στην έξοδο του συστήματος. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι σε pH εισόδου 7 και αλκαλικότητα νερού 126 mg CaCO_3/L η απονιτροποίηση 12.5 mg/L προκαλεί μείωση 46 mg CaCO_3/L .

Κατά την υδρογονοτροφική απονιτροποίηση η ποσότητα του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC) που παράγεται έχει προσδιοριστεί από τους Ergas and Reuss, (2001) ότι είναι 20 mg/L. Από 12 mg/L στην είσοδο του αντιδραστήρα αυξήθηκε στα 32 mg/L, καθώς επίσης ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας (DOC) αυξήθηκε κατά 20 mg/L. Οι Haugen et al., (2002) παρατήρησαν μία αύξηση των 0.5 mgTOC/L. Οι Mo et al. (2005)



παρατήρησαν στην έξοδο του αντιδραστήρα συγκεντρώσεις DOC ίσες με 8 mg/L. Οι Lee and Rittmann (2000) παρατήρησαν μία αύξηση από 1.4 mg/L στην είσοδο στα 2.3 mg/L. Η αύξηση αυτή του οργανικού άνθρακα οφείλεται πιθανώς στα συστατικά των κυττάρων και στα διαλυτά βακτηριακά προϊόντα. Επίσης, άλλες πηγές μπορεί να είναι η παραγωγή λιπαρών οξέων από οξεοπαραγωγικά βακτήρια τα οποία μπορεί να αναπτυχθούν στην καλλιέργεια. Σε χαμηλές περιοχές δυναμικού οξειδοαναγωγής μπορεί να αναπτυχθούν ετερότροφα βακτήρια και να παράγουν λιπαρά οξέα. Η δημιουργία βιοφίλμ μπορεί να είναι μία επιπλέον πηγή άνθρακα, εξαιτίας των πολυμερών που παράγονται στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων κατά τη σύνδεση/προσκόλληση τους (Mo et al., 2005).

Ένα από τα θέματα που δημιουργείται στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση είναι ότι υπό ανοξικές συνθήκες το υδρογόνο μπορεί να χρησιμοποιηθεί από οξεοπαραγωγικά ($ORP \leq -50mV$) και μεθανογόνα βακτήρια ή από βακτήρια που παράγουν υδρόθειο ($ORP \geq -250mV$) (Rezania et al., 2005). Οι ίδιοι ερευνητές ωστόσο αναφέρουν ότι τα οξεοπαραγωγικά (δηλαδή τα βακτήρια που μετατρέπουν το CO_2 σε CH_3COOH) δεν επιβιώνουν σε ένα απονιτροποιητικό περιβάλλον λόγω της παρεμπόδισης από τα νιτρικά.

Παρά τις δημοσιευμένες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης, οι κινητικές που περιγράφουν την διαδικασία δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Οι Kurt et al. (1987) μελέτησαν την κινητική της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης λαμβάνοντας υπόψη ότι η απονιτροποίηση πραγματοποιείται σε δύο στάδια (νιτρικά $\rightarrow$ νιτρώδη $\rightarrow$ αέριο άζωτο). Για την περιγραφή της μεταβολής των νιτρικών και των νιτρώδων χρησιμοποιήθηκαν κινητικές εκφράσεις Monod με δύο κάθε φορά περιοριστικά υποστρώματα (Νιτρικά-Υδρογόνο και Νιτρώδη-Υδρογόνο). Θεωρώντας ότι η βιομάζα στον αντιδραστήρα παραμένει σταθερή υπολογίστηκαν οι σταθερές κορεσμού $K_{NO_3} = 0.18 \text{ mg/L}$ και $K_{NO_2} = 0.16 \text{ mg/L}$.



Εισαγωγή

Πίνακας 1.10. Ρυθμοί υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης αντιδραστήρων με μεμβράνες.

Μεμβράνη	Θερμοκρασία (°C)	Επιφάνεια (cm ²)	Χρόνος παραμονής (h)	Συγκέντρωση τροφοδοσίας NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	Ρυθμός απονιτροποίησης (gr/m ² d)	Αναφορά
Σωλήνας σλικόνης Μεμβράνη ινών	--	0.4	8.33	120	1.6-5.4	Ho et al., 2001
Μεμβράνη ινών	--	750	0.7	5-15	0.49-0.77	Lee and Rittman, 2002
Μεμβράνη ινών (πολυπροπυλενίου)	--	3700	4.1	200	2.2	Ergas and Reuss, 2001
Μεμβράνη ινών (PVDF)	15-17	930	9-12	12-72	1.76-2.87	Mo et. al., 2005
Μεμβράνη ινών (PVDF)	--	370	0.33-6	15-40	6.31	Prosnansky et al., 2002
Μεμβράνη ινών (PVDF)	10-12	930	48-81	330	8.2-14.2	Rezania et al., 2006
Σωλήνας σλικόνης με ίνες σιδήρου- νικελίου	25	100	7.78	100	6.58	Terada et al., 2006

Οι Chang et al. (1999) σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 16 mg/L θεώρησαν ότι η μείωση των νιτρικών ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης και ο συντελεστής υπολογίστηκε ότι ήταν 0.15 1/min. Οι Haugen et al. (2002) πραγματοποιώντας πειράματα σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 8.2 mg/L υπολόγισαν τις κινητικές σταθερές πρώτης τάξης ($k_{NO_3}=0.037-0.051$ και $k_{NO_2}=0.013$ 1/d) θεωρώντας ότι ο ρυθμός μείωσης των νιτρικών και των νιτρωδών εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση της βιομάζας.

Οι Rezanian et al. (2005) χρησιμοποίησαν κινητική πρώτης τάξης για την προσομοίωση της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου μικτής καλλιέργειας. Πραγματοποίησαν πειράματα με συγκεντρώσεις νιτρικού και νιτρώδους αζώτου 20 και 25 mg/L, αντίστοιχα, σε διαφορετικές τιμές pH (7.5-9.5) και θερμοκρασίας (12 και 25°C). Με βάση τις κινητικές εκφράσεις, ο ρυθμός μείωσης των νιτρικών και των νιτρωδών εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση της βιομάζας. Οι κινητικές σταθερές k_{NO_3} και k_{NO_2} πήραν τιμές από 0.25 έως 1.7 gN/gβιομάζας d για τους διαφορετικούς συνδυασμούς pH και θερμοκρασίας.

Σε μία πρόσφατη μελέτη οι Tiemyer et al. (2007) μελέτησαν τη συμπεριφορά του βακτηριακού είδους *Ralstonia eutropha* υπό υδρογονοτροφικές συνθήκες σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Για την προσομοίωση της απονιτροποιητικής του συμπεριφοράς θεώρησαν ότι η απονιτροποίηση είναι μία διαδικασία δύο βημάτων (νιτρικά→νιτρώδη→αέριο άζωτο) και αντιμετωπίζοντας τα νιτρικά και τα νιτρώδη σαν δύο περιοριστικά υποστρώματα. Οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των νιτρικών και των νιτρωδών ακολουθούν την κινητική έκφραση Monod με μία έκφραση παρεμπόδισης των νιτρικών στο ρυθμό ανάπτυξης των νιτρωδών. Η έκφραση παρεμπόδισης περιγράφει το ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου χρησιμοποιώντας τα νιτρώδη παρατηρείται αφού ολοκληρωθεί η μείωση των νιτρικών. Από την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων προέκυψαν οι τιμές των κινητικών τους παραμέτρων. $r_{max1} = 0.021$ (1/h), $K_s = 37.8$ (mg/L), $r_{max2} = 0.008$ (1/h), $K_n = 42.98$ (mg/L), $Y_s = 0.146$ (mgβιομάζας/mgNO₃⁻) και $Y_n = 0.1$ (mgβιομάζας/mgNO₂⁻).



1.7. Μικροβιακές καλλιέργειες - Είδη αλληλεπιδράσεων - Δυναμική συμπεριφορά βιοαντιδραστήρων

1.7.1. Μικροβιακές καλλιέργειες

Όταν μία καλλιέργεια μικροοργανισμών βρίσκεται σε ένα θρεπτικό μέσο, είτε αποτελείται από ένα (καθαρή) είτε από περισσότερα είδη (μικτή), η ανάπτυξή της επηρεάζεται από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Οι παράγοντες που έχουν σημαντική επίδραση στην καλλιέργεια είναι η θερμοκρασία, το pH και τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για τη βακτηριακή σύνθεση ή την παραγωγή ενέργειας των κυττάρων.

Για την περιγραφή της ανάπτυξης μιας μικροβιακής καλλιέργειας που βρίσκεται σε ένα υγρό θρεπτικό μέσο έχουν αναπτυχθεί μαθηματικές εκφράσεις. Δεδομένου ότι η καλλιέργεια αλληλεπιδρά με το υγρό περιβάλλον (πρόσληψη ουσιών, απελευθέρωση προϊόντων μεταβολισμού) γίνεται κατανοητό ότι δεν είναι πρακτικό ή δυνατό να συμπεριληφθούν όλες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της βιολογικής φάσης και του περιβάλλοντος. Συνήθως, κατά τη μαθηματική περιγραφή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών θεωρείται ότι τα διάφορα συστατικά είναι σε αφθονία με μόνο ένα να επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης και να αποτελεί το περιοριστικό υπόστρωμα. Το μοντέλο Monod είναι αυτό που χρησιμοποιείται συνήθως για την περιγραφή ενός συστήματος.

Υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπου η μικροβιακή ανάπτυξη εξαρτάται/περιορίζεται από ένα ή περισσότερα θρεπτικά συστατικά καθώς είναι δυνατό να χρησιμοποιούνται πολλές διαφορετικές χημικές ενώσεις για την ικανοποίηση βασικών διαφορετικών ή μη αναγκών των μικροβίων. Δηλαδή, μπορεί για τη βακτηριακή ανάπτυξη να είναι απαραίτητα δύο διαφορετικά συστατικά που το ένα να μη μπορεί να καλύψει την ανάγκη που καλύπτει το άλλο. Επίσης, μπορεί η καλλιέργεια να βρίσκεται σε ένα περιβάλλον το οποίο να περιέχει δύο συστατικά που καλύπτουν ακριβώς την ίδια ανάγκη των κυττάρων.

Όταν πρόκειται για δύο θρεπτικά συστατικά ανάλογα με τις ανάγκες που καλύπτουν διακρίνονται σε συμπληρωματικά και αντικαταστάσιμα συστατικά (Baltzis and Fredrickson, 1988). Στην περίπτωση των συμπληρωματικών τα συστατικά καλύπτουν διαφορετικές ανάγκες του κυττάρου. Για παράδειγμα η αμμωνία και η μεθανόλη



καλύπτουν η μεν πρώτη τις ανάγκες σε άζωτο και η δεύτερη τις ανάγκες σε άνθρακα για τη βακτηριακή σύνθεση του κυττάρου.

Τα συμπληρωματικά αφού είναι και τα δύο απαραίτητα στους μικροοργανισμούς καταναλώνονται ταυτόχρονα. Όταν μια καλλιέργεια αναπτύσσεται χρησιμοποιώντας τέτοια συστατικά τότε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών θα εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις και των δύο συστατικών, δηλαδή $\mu(s_1, s_2)$, όπου $\mu(s_1, s_2) =$ ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών (1/h) καθώς αναπτύσσονται σε δύο περιοριστικά υποστρώματα και $S_1, S_2 =$ συγκέντρωση περιοριστικών υποστρωμάτων (mg/L).

Τα συμπληρωματικά συστατικά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: στα αλληλεπιδρώντα όταν ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης περιορίζεται και από τα δύο συστατικά και στα μη αλληλεπιδρώντα όταν ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης περιορίζεται είτε από το ένα είτε από το άλλο ανάλογα με τις συγκεντρώσεις τους (Παύλου, 2000).

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των αλληλεπιδρώντων συστατικών δίνεται από τη σχέση: $\mu(s_1, s_2) = \mu_{\max} \cdot \frac{S_1 \cdot S_2}{(K_1 + S_1) \cdot (K_2 + S_2)}$ (1.21)

όπου: $\mu_{\max}$ = μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών (1/h)

S_1, S_2 = συγκέντρωση περιοριστικών υποστρωμάτων (mg/L)

K = σταθερά κορεσμού (mg/L).

Ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μη αλληλεπιδρώντων συστατικών δίνεται από τη

$$\text{σχέση: } \mu(s_1, s_2) = \min \left\{ \frac{\mu_{\max} S_1}{(K_1 + S_1)}, \frac{\mu_{\max} S_2}{(K_2 + S_2)} \right\} = \begin{cases} \frac{\mu_{\max} S_1}{(K_1 + S_1)}, & \frac{s_1}{K_1} < \frac{s_2}{K_2} \\ \frac{\mu_{\max} S_2}{(K_2 + S_2)}, & \frac{s_1}{K_1} > \frac{s_2}{K_2} \end{cases} \quad (1.22)$$

Δηλαδή, περιοριστικό υπόστρωμα θεωρείται εκείνο του οποίου η συγκέντρωση είναι τέτοια που δίνει τον μικρότερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.

Στην περίπτωση των αντικαταστάσιμων συστατικών αυτά καλύπτουν την ίδια ή τις ίδιες ανάγκες του κυττάρου. Για παράδειγμα τα νιτρικά και τα νιτρώδη χρησιμεύουν ως πηγές ενέργειας του κυττάρου. Τα συστατικά αυτά χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: στα ανταγωνιστικά, τα απόλυτα αντικαταστάσιμα και τα αυξητικά (Sambanis et al., 1986).

Η γενικευμένη μορφή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης είναι:



$$\mu(s_1, s_2) = \frac{\mu_1 \cdot S_1}{K_1 + S_1 + \Lambda_1 S_2} + \frac{\mu_2 \cdot S_2}{K_2 + S_2 + \Lambda_2 S_1} \quad (1.23)$$

όπου: $\mu(s_1, s_2)$ = ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών (1/h)

μ_1 = μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών για το υπόστρωμα S_1 (1/h)

μ_2 = μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών για το υπόστρωμα S_2 (1/h)

S_1, S_2 = συγκέντρωση περιοριστικών υποστρωμάτων (mg/L)

K_1, K_2 = σταθερές κορεσμού (mg/L)

Λ_1, Λ_2 = σταθερά συνεισφοράς του S_2 και S_1 , αντίστοιχα στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (mg S_1 / mg S_2 και mg S_2 / mg S_1)

Τα αντικαταστάσιμα συστατικά ονομάζονται ανταγωνιστικά, όταν η κατανάλωση των δύο συστατικών έχει ως αποτέλεσμα ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μικρότερο από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του οργανισμού σε κάθε ένα θρεπτικό συστατικό χωριστά. Τότε μορφή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης είναι:

$$\mu(s_1, s_2) = \frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_1 + S_1 + \frac{S_2}{K'_1}} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_2 + S_2 + \frac{S_1}{K'_2}}, \text{ με } K'_1 \cdot K'_2 = 1. \quad (1.24)$$

όπου: K'_1, K'_2 = σταθερά συνεισφοράς του S_2 και S_1 , αντίστοιχα στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης (mg S_2 / mg S_1 και mg S_1 / mg S_2).

Στην περίπτωση των αυξητικών, η κατανάλωση των δύο συστατικών έχει ως αποτέλεσμα ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μεγαλύτερο από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του οργανισμού σε κάθε ένα θρεπτικό συστατικό χωριστά. Τότε μορφή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης είναι:

$$\mu(s_1, s_2) = \frac{\mu_{\max 1} \cdot S_1}{K_1 + S_1} + \frac{\mu_{\max 2} \cdot S_2}{K_2 + S_2} \quad (1.25)$$

Τέλος, απόλυτα ονομάζονται όταν η κατανάλωση των δύο συστατικών έχει ως αποτέλεσμα ειδικό ρυθμό ανάπτυξης ίσο από τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του



οργανισμού σε κάθε ένα θρεπτικό συστατικό χωριστά. Τότε μορφή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης είναι:

$$\mu(s_1, s_2) = \frac{\mu_{\max} \cdot (S_1 + \zeta S_2)}{K + (S_1 + \zeta S_2)} \quad (1.26)$$

όπου ζ είναι τα g του συστατικού S_1 που μπορούν να αντικαταστήσουν 1 g του συστατικού S_2 (Παύλου, 2000).

1.7.2. Μικροβιακές αλληλεπιδράσεις

Σε μία καθαρή καλλιέργεια το είδος του μικροοργανισμού αλληλεπιδρά μόνο με το περιβάλλον ανάπτυξης τους και επηρεάζεται από τα συστατικά που υπάρχουν σε αυτό, τη θερμοκρασία κ.α., όπως σημειώθηκε και προηγουμένως. Σε μία μικτή καλλιέργεια όμως, όπου δύο ή περισσότερα είδη συνυπάρχουν και αναπτύσσονται στο ίδιο θρεπτικό μέσο, τότε σχεδόν πάντα θα αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους. Στη φύση οι καλλιέργειες που συναντώνται κατά κανόνα είναι οι μικτές καλλιέργειες.

Υποθέτοντας ότι σε ένα περιβάλλον ανάπτυξης συνυπάρχουν δυο μικροβιακοί οργανισμοί, ο Α και ο Β, που είναι και η απλούστερη δυνατή περίπτωση, τότε τα είδη των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται εξαρτώνται από τις επιπτώσεις που μπορεί να έχει στον πληθυσμό Α η ύπαρξη του Β και αντίστροφα. Αν η παρουσία του Α βοηθάει με κάποιο τρόπο την ανάπτυξη του Β τότε ο πληθυσμός Α έχει θετική επίδραση στον Β.

Τα είδη των αλληλεπιδράσεων διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες στις άμεσες και τις έμμεσες αλληλεπιδράσεις (Fredrickson, 1977; Fredrickson and Tsuchiya, 1977). Άμεσες είναι οι αλληλεπιδράσεις στις οποίες υπάρχει φυσική επαφή μεταξύ των κυττάρων των δύο πληθυσμών. Στις αλληλεπιδράσεις αυτές κατατάσσονται η θήρευση και ο παρασιτισμός. Στη θήρευση τα μέλη του πληθυσμού Α για παράδειγμα αναπτύσσονται τρώγοντας τα μέλη του Β, ενώ ο Β αναπτύσσεται καταναλώνοντας κάποιο συστατικό του περιβάλλοντος. Στην περίπτωση του παρασιτισμού τα μέλη του παρασιτικού πληθυσμού εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων του άλλου πληθυσμού και τρέφονται από τα συστατικά του.

Οι έμμεσες αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα όταν οι πληθυσμοί προκαλούν με τη δράση τους μεταβολές στο περιβάλλον ανάπτυξης με αποτέλεσμα να επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά ο Α τον Β ή ο Β τον Α ή ο ένας τον άλλο ταυτόχρονα. Στις αλληλεπιδράσεις αυτές συμπεριλαμβάνονται ο κομμενσαλισμός, ο αμενσαλισμός, ο



αμοιβαϊσμός, η πρωτοσυνεργασία, ο ανταγωνισμός και ο συναγωνισμός. Στον κομμενσαλισμό ο πληθυσμός A παράγει κάποιο συστατικό απαραίτητο για την ανάπτυξη του B ή καταναλώνει ουσία που είναι παρεμποδιστική για την ανάπτυξη του B. Στον αμοιβαϊσμό τόσο ο A όσο και ο B παράγουν κάποιο θρεπτικό συστατικό ή καταναλώνουν παρεμποδιστική ουσία και έτσι βοηθούν ο ένας τον άλλον ταυτόχρονα. Η πρωτοσυνεργασία διαφέρει από τον αμοιβαϊσμό στο ότι η παρουσία του ενός δεν είναι απαραίτητη αλλά βοηθητική στην ανάπτυξη του άλλου.

Στην περίπτωση του αμμενσαλισμού παρατηρείται αρνητική επίδραση του A στον B εξαιτίας, για παράδειγμα, της παραγωγής τοξικής ή παρεμποδιστικής ουσίας. Ο ανταγωνισμός είναι μια αλληλεπίδραση στην οποία τόσο ο A όσο και B παράγουν παρεμποδιστική ουσία και έτσι επηρεάζουν αρνητικά ο ένας τον άλλον ταυτόχρονα.

Τέλος, στην περίπτωση του συναγωνισμού η αρνητική επίδραση του ενός πληθυσμού στον άλλον οφείλεται στην κατανάλωση ενός ή περισσότερων θρεπτικών συστατικών που επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Ο συναγωνισμός είναι η πιο συνηθισμένη αλληλεπίδραση που εμφανίζεται τις περισσότερες φορές ανάμεσα στους πληθυσμούς μικτών καλλιεργειών. Όταν δύο μικροβιακοί πληθυσμοί καταναλώνουν τουλάχιστον ένα κοινό θρεπτικό συστατικό και το συστατικό αυτό επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξης τουλάχιστον του ενός από τα δύο τότε αυτή η αλληλεπίδραση αποτελεί τον συναγωνισμό.

Πιο συγκεκριμένα ορίζοντας τα σύνολα S_A για τα συστατικά που καταναλώνονται από τον πληθυσμό A, S_B για τα συστατικά που καταναλώνονται από τον πληθυσμό B, S_A' ($S_A' \subseteq S_A$) για τα συστατικά που καταναλώνονται από τον πληθυσμό A και επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξής του και S_B' ($S_B' \subseteq S_B$) για τα συστατικά που καταναλώνονται από τον πληθυσμό B και επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξής του, τότε ο συναγωνισμός εμφανίζεται όταν το $S_A' \cap S_B \neq \emptyset$ ή το $S_B' \cap S_A \neq \emptyset$. Ανάλογα με τα συστατικά που ανήκουν σε κάθε ένα από τα τέσσερα σύνολα διακρίνονται διάφοροι τύποι συναγωνισμού (Pavlou, 2006).

Για παράδειγμα ο συναγωνισμός ονομάζεται μονός, διπλός κτλ. εάν οι πληθυσμοί συναγωνίζονται για ένα, δύο κτλ. συστατικά. Ο συναγωνισμός ονομάζεται ολικός όταν οι πληθυσμοί συναγωνίζονται για όλα τα συστατικά που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης τουλάχιστον του ενός πληθυσμού. Σε άλλη περίπτωση ο συναγωνισμός ονομάζεται μερικός. Στην περίπτωση που οι δύο πληθυσμοί καταναλώνουν μία μόνο ουσία η οποία επηρεάζει τον ρυθμό ανάπτυξης και των δύο τότε ο συναγωνισμός είναι

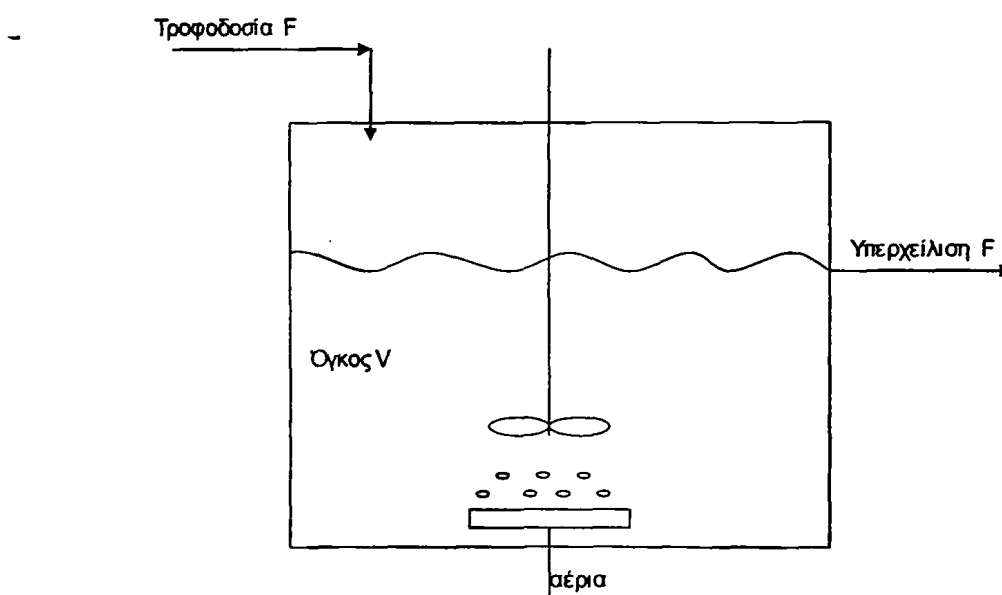


ολικός και μονός. Τέλος, όταν δεν εμφανίζονται άλλες αλληλεπιδράσεις στη μικτή καλλιέργεια παρά μόνο ο συναγωνισμός, αυτός ονομάζεται αμιγή (Παύλου, 2000).

1.7.3. Η περίπτωση του απλού και αμιγή συναγωνισμού

Στον αμιγή και απλό συναγωνισμό υπάρχει μόνο ένα θρεπτικό συστατικό το οποίο επιδρά στο ρυθμό ανάπτυξης των μικροβιακών πληθυσμών και ο συναγωνισμός είναι η μόνη αλληλεπίδραση που εμφανίζεται στη μικτή καλλιέργεια. Η κατάσταση αυτή γίνεται πιο απλή εάν υποθεθεί ότι η μικτή καλλιέργεια βρίσκεται σε ένα χωρικά ομοιογενές περιβάλλον στο οποίο οι εξωτερικοί παράγοντες, όπως η τροφοδοσία, δεν μεταβάλλονται με το χρόνο και όλες οι συνθήκες είναι ελεγχόμενες.

Ένα τέτοιο ιδανικό περιβάλλον μπορεί να προσομοιωθεί από έναν αντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας, τον χημοστάτη.



Σχήμα 1.7. Χημοστάτης (Παύλου, 2000).

Ο χημοστάτης είναι ένας αντιδραστήρας συνεχούς ροής και πλήρους ανάδευσης. Η τροφοδοσία γίνεται με σταθερό ρυθμό με υγρό θρεπτικό που περιέχει τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Novick and Szilard, 1950). Η τροφοδοσία γίνεται με αποστειρωμένο θρεπτικό και από τον χημοστάτη αφαιρείται θρεπτικό μέσο υπερχειλίσσης, με αποτέλεσμα το υγρό να αφήνει τον αντιδραστήρα με ρυθμό ίδιο με αυτόν που προστίθεται στην είσοδο (Παύλου, 2000). Σε ένα τέτοιο



αντιδραστήρα εξωτερικοί παράγοντες (pH, θερμοκρασία, κα.) παραμένουν σταθεροί στο χρόνο. Το περιβάλλον είναι ομοιογενές και καθώς δεν εμφανίζονται μεταβολές είναι ιδανικό για τη μελέτη αλληλεπιδράσεων. Σημαντική είναι η επιλογή του μεγέθους του αντιδραστήρα, η οποία πρέπει να γίνει με γνώμονα το λόγο του όγκου του υγρού ως προς την επιφάνεια επαφής. Ο λόγος αυτός πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος διότι τα κύτταρα έχουν την τάση να προσκολλώνται στα τοιχώματα του αντιδραστήρα με αποτέλεσμα να δημιουργείται χωρική ανομοιογένεια η οποία επηρεάζει τη συμπεριφορά του συστήματος (Baltzis and Fredrickson, 1983)

Για τη μαθηματική προσομοίωση του αμιγής και απλού συναγωνισμού μεταξύ δύο μικροβιακών πληθυσμών σε ένα χημοστάτη εφαρμόζονται τα ισοζύγια μάζας για τις συγκεντρώσεις των δύο πληθυσμών και για τη συγκέντρωση του περιοριστικού υποστρώματος (συστατικό):

$$\frac{dX_1}{dt} = \mu_1(S)X_1 - DX_1, \quad (1.27)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = \mu_2(S)X_2 - DX_2, \quad (1.28)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_f - S_1) - \frac{1}{Y_1} \cdot \mu_1(S) \cdot X_1 - \frac{1}{Y_2} \cdot \mu_2(S) \cdot X_2 \quad (1.29)$$

όπου D ($1/t$) είναι ο ρυθμός αραίωσης του χημοστάτη και προκύπτει από το λόγο της ογκομετρικής παροχής που εφαρμόζεται σε αυτόν ως προς τον λειτουργικό όγκο του χημοστάτη. Επίσης, X_1 και X_2 είναι οι συγκεντρώσεις των βακτηριακών πληθυσμών, S_f είναι η συγκέντρωση του συστατικού στην τροφοδοσία, S είναι η συγκέντρωση του συστατικού, μ_1 και μ_2 οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των δύο πληθυσμών σε συνάρτηση με το υπόστρωμα S και Y_1 και Y_2 οι συντελεστές απόδοσης των δύο πληθυσμών (βιομάζα που παράγεται/υπόστρωμα που καταναλώνεται).

Θεωρώντας ότι οι πληθυσμοί παρεμποδίζονται από την συγκέντρωση του υποστρώματος, οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης των δύο πληθυσμών μπορούν να περιγραφούν από την έκφραση Andrews (1968):



$$\mu(S) = \frac{\mu S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (1.30)$$

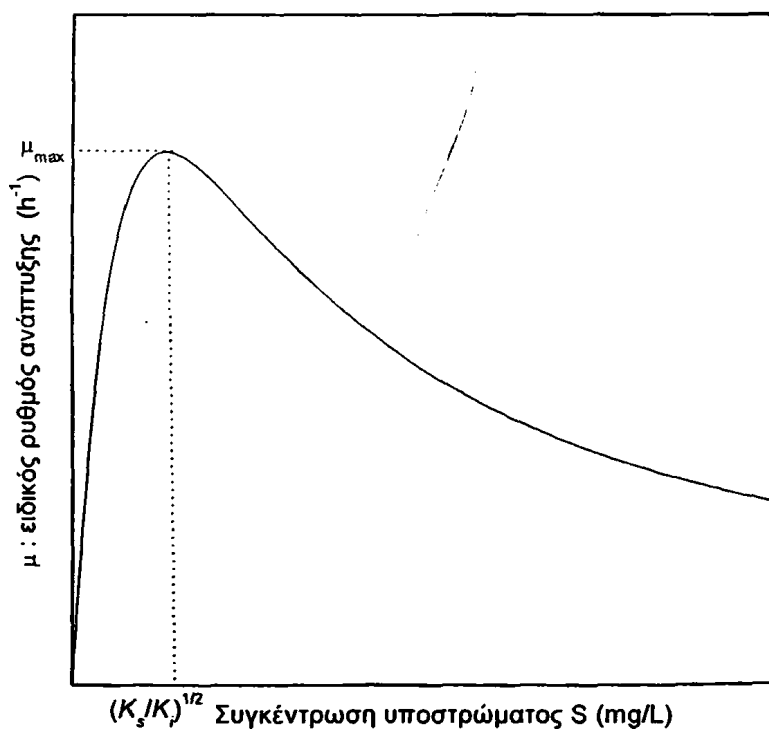
όπου: μ = ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών (1/h)

S = συγκέντρωση περιοριστικού υποστρώματος (mg/L)

K_s = σταθερά κορεσμού (mg/L)

K_i = σταθερά παρεμπόδισης (mg/L)

Με βάση την εξίσωση αυτή από κάποια τιμή της συγκέντρωσης του περιοριστικού υποστρώματος και μετά ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών μειώνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του περιοριστικού υποστρώματος (Σχήμα 1.8).



Σχήμα 1.8. Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης βακτηρίων.

Ο τύπος αυτός παρουσιάζει μέγιστο στη συγκέντρωση $\sqrt{K_s K_i}$.

1.7.4. Δυναμική συμπεριφορά βιοαντιδραστήρων

Ένα δυναμικό σύστημα περιγράφεται από ένα σύστημα διαφορικών εξισώσεων που παρουσιάζει τη χρονική εξέλιξη ενός φαινομένου. Η δυναμική ανάλυση των συστημάτων γίνεται με στόχο τον εντοπισμό και τη μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών των λύσεων των διαφορικών εξισώσεων. Εξίσου σημαντικό στόχο αποτελεί και η εύρεση των σχέσεων που συνδέουν τις μεταβολές των τιμών των παραμέτρων με τις μεταβολές στη συμπεριφορά των συστημάτων. Η μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς βιοαντιδραστήρων γίνεται με την περιγραφή του συστήματος με ένα μαθηματικό μοντέλο και με εφαρμογή των μεθόδων της δυναμικής ανάλυσης συστημάτων διαφορικών εξισώσεων.

Ένα δυναμικό σύστημα είναι ένα σύστημα διαφορικών εξισώσεων το οποίο περιγράφει τη χρονική εξέλιξη ενός φαινομένου. Στην περίπτωση ενός χημοστάτη όπου επικρατεί ομοιομορφία οι μόνες αλλαγές γίνονται σε σχέση με το χρόνο και το σύστημα περιγράφεται από ένα σετ συνήθων διαφορικών εξισώσεων πρώτου βαθμού:

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= f_1(x_1, x_2, \dots, x_n, t) \\ \frac{dx_2}{dt} &= f_2(x_1, x_2, \dots, x_n, t) \\ &\vdots \\ \frac{dx_n}{dt} &= f_n(x_1, x_2, \dots, x_n, t) \end{aligned} \quad (1.31)$$

και σε συμπαγή μορφή γράφεται

$$\frac{dx}{dt} = f(x, t; p) \quad x \in R^n, \quad p \in R^m \quad (1.32)$$

όπου x είναι οι μεταβλητές και p οι παράμετροι του συστήματος. Εάν οι συναρτήσεις του δεύτερου μέλους της εξίσωσης δεν εξαρτώνται από το χρόνο το σύστημα ονομάζεται αυτόνομο. Ένας χημοστάτης με σταθερές λειτουργικές παραμέτρους θεωρείται ένα αυτόνομο σύστημα. Όταν έστω και μία παράμετρος μεταβάλλεται με το χρόνο (π.χ. ο ρυθμός αραίωσης να μεταβάλλεται με το χρόνο) τότε το σύστημα ονομάζεται μη αυτόνομο (Pavliou, 1999).



Ένα δυναμικό σύστημα μπορεί να παρουσιάσει διαφόρων τύπων μακροχρόνια συμπεριφορά: μόνιμη κατάσταση, περιοδική, χαοτική. Ένα μη αυτόνομο σύστημα δεν μπορεί να βρίσκεται σε μόνιμη κατάσταση γιατί εάν για παράδειγμα μεταβάλλεται ο ρυθμός αραίωσης περιοδικά με το χρόνο τότε το σύστημα δεν μπορεί να σταθεροποιήσει τη συμπεριφορά του για απεριόριστο χρονικό διάστημα. Οι μόνιμες καταστάσεις του συστήματος είναι οι λύσεις της εξίσωσης: $f(x:p)=0$. Για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό των καταστάσεων ενός συστήματος χρησιμοποιούνται οι διαφορικές εξισώσεις του συστήματος για την κατασκευή του Ιακωβιανού πίνακα:

$$J = \left[\frac{\partial f(x:p)}{\partial x} \right], \text{ τα στοιχεία οποίου είναι οι πρώτες παράγωγοι των συναρτήσεων του}$$

δεύτερου μέλους των διαφορικών εξισώσεων ως προς τις μεταβλητές $x_1, \dots, x_n$. Από τον Ιακωβιανό πίνακα προκύπτουν οι ιδιοτιμές αντικαθιστώντας στα στοιχεία του Ιακωβιανού τις σχέσεις που ισχύουν στις μόνιμες καταστάσεις.

Σε ένα σύστημα δύο διαστάσεων μία μόνιμη κατάσταση χαρακτηρίζεται ανάλογα με τις τιμές των ιδιοτιμών ως εξής:

1. Ιδιοτιμές πραγματικές και θετικές ($\lambda_1 > \lambda_2 > 0$) $\rightarrow$ ασταθής κόμβος
2. Ιδιοτιμές πραγματικές και αρνητικές ($\lambda_1 < \lambda_2 < 0$) $\rightarrow$ ευσταθής κόμβος
3. Ιδιοτιμές πραγματικές και ετερόσimes $\rightarrow$ σαγματικό σημείο (ασταθής)
4. Ιδιοτιμές μιγαδικές με θετικό πραγματικό μέρος $\rightarrow$ ασταθής εστία
5. Ιδιοτιμές μιγαδικές με αρνητικό πραγματικό μέρος $\rightarrow$ ευσταθής εστία
4. Ιδιοτιμές φανταστικές $\rightarrow$ κέντρο (οριακά ευσταθές)

Για περιπτώσεις που το σύστημα είναι περισσότερων των δύο διαστάσεων τότε υπάρχουν παραπάνω από δύο ιδιοτιμές και οι όροι κόμβος, σαγματικό σημείο, εστία και κέντρο δεν χρησιμοποιούνται με τον ίδιο τρόπο. Οι όροι αυτοί γενικεύονται έτσι ώστε:

α) αν όλες οι ιδιοτιμές είναι πραγματικές και αρνητικές τότε υπάρχει ευσταθής κόμβος, β) αν όλες οι ιδιοτιμές είναι πραγματικές και θετικές τότε υπάρχει ασταθής κόμβος, γ) αν όλες οι ιδιοτιμές είναι πραγματικές και υπάρχουν και θετικές και αρνητικές τότε υπάρχει σαγματικό σημείο, δ) αν υπάρχει ένα ζεύγος μιγαδικών ιδιοτιμών με αρνητικό πραγματικό μέρος, ενώ όλες οι υπόλοιπες είναι πραγματικές και αρνητικές, το σημείο ονομάζεται ευσταθής εστία, ε) αν υπάρχει ένα ζεύγος μιγαδικών ιδιοτιμών με θετικό πραγματικό μέρος, ενώ όλες οι υπόλοιπες είναι πραγματικές και αρνητικές, το σημείο ονομάζεται ασταθής εστία (Pavlou, 1999).



Για την καλύτερη κατανόηση των παραπάνω ακολουθεί παράδειγμα συστήματος διαφορικών εξισώσεων δε χημοστάτη:

Υποθέτοντας ότι σε ένα χημοστάτη αναπτύσσεται ένα βακτηριακό είδος με ένα περιοριστικό υπόστρωμα και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ακολουθεί το μοντέλο Andrews:

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (1.33)$$

τότε οι εξισώσεις του χημοστάτη είναι:

$$\frac{dX}{dt} = \mu(S)X - DX \quad (1.34)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_f - S) - \frac{1}{Y} \cdot \mu(S) \cdot X \quad (1.35)$$

Το σύστημα έχει δύο μόνιμες καταστάσεις:

1) Έκπλυση των μικροοργανισμών: $X = 0, S = S_f$

2) Κανονική μόνιμη κατάσταση: $X > 0, 0 < S < S_f$

όπου S_f η συγκέντρωση του υποστρώματος στην τροφοδοσία, X και S η συγκέντρωση της βιομάζας και του υποστρώματος, αντίστοιχα στην έξοδο του αντιδραστήρα.

Οι τιμές της συγκέντρωσης του υποστρώματος και της βιομάζας στη 2^η μόνιμη κατάσταση υπολογίζονται από τις εξισώσεις:

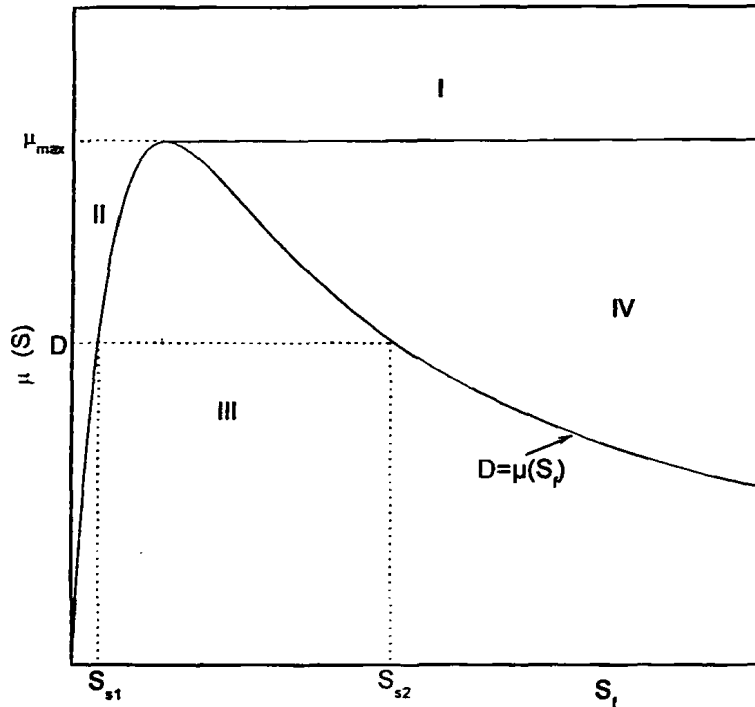
$$D = \frac{\mu(S) \cdot S}{K + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (1.36) \quad \text{και} \quad X = Y(S_f - S) \quad (1.37)$$

Οι εξισώσεις αυτές προκύπτουν από την επίλυση των εξισώσεων του χημοστάτη αντικαθιστώντας σε αυτές τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και θέτοντας τα δεξιά μέλη των εξισώσεων ίσα με μηδέν (αφού υπάρχει μόνιμη κατάσταση δεν υπάρχει μεταβολή της συγκέντρωσης με το χρόνο).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.9 δεν υπάρχουν θετικές πραγματικές ρίζες της εξίσωσης (1) για $D > \mu_{\max}$, υπάρχουν όμως δύο θετικές πραγματικές ρίζες της εξίσωσης (1.36) για $D < \mu_{\max}$. Για να έχουν οι ρίζες της εξίσωσης (1.37) φυσικό νόημα πρέπει να ισχύει $0 < S_s < S_f$. Μπορεί μία ρίζα να εκπληρώνει την παραπάνω συνθήκη, δύο ρίζες ή



καμία, ανάλογα με τις τιμές του D και του S_f . Στο Σχήμα 1.9 δημιουργούνται διάφορες περιοχές τιμών των λειτουργικών παραμέτρων. Στην περιοχή I δεν υπάρχουν πραγματικές ρίζες της εξίσωσης (1.37). Στην περιοχή II υπάρχουν δύο θετικές ρίζες αλλά μεγαλύτερες από S_f . Έτσι στις περιοχές I και II δεν υπάρχει κανονική μόνιμη κατάσταση με φυσικό νόημα. Στην περιοχή III υπάρχουν δύο θετικές ρίζες της εξίσωσης (1.37) με μόνο μία να έχει φυσικό νόημα, ενώ στην περιοχή IV υπάρχουν δύο θετικές ρίζες της εξίσωσης (1.37) με φυσικό νόημα.



Σχήμα 1.9. Διάγραμμα λειτουργίας του συστήματος.

Για να μελετηθεί η ευστάθεια των μονίμων καταστάσεων κατασκευάζεται ο Ιακωβιανός πίνακας του συστήματος. Ο Ιακωβιανός προκύπτει από την παραγωγή του δεύτερου μέλους των διαφορικών εξισώσεων ως προς X και S .

$$J = \begin{bmatrix} -D + \mu(S) & \frac{d\mu}{dS} X \\ -\frac{1}{Y} \mu(S) & -D - \frac{1}{Y} \frac{d\mu}{dS} X \end{bmatrix} \quad (1.38)$$

Στη μόνιμη κατάσταση έκπλυσης (όπου $X = 0$, $S = S_f$) ο Ιακωβιανός γίνεται:

$$J = \begin{bmatrix} -D + \mu(S_f) & 0 \\ -\frac{1}{Y} \mu(S_f) & -D \end{bmatrix} \quad (1.39)$$

Οι ιδιοτιμές είναι $-D$ και $-D + \mu(S_f)$. Η μόνιμη κατάσταση έκπλυσης είναι ευσταθής κόμβος όταν $D > \mu(S_f)$, άρα η κατάσταση έκπλυσης είναι ευσταθής στις περιοχές I, II και IV. Στις περιοχές αυτές ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού είναι μικρότερος από το ρυθμό αραιώσης με αποτέλεσμα η βιομάζα να αποβάλλεται από το χημοστάτη (με την υπερχειλίση) με ρυθμό μεγαλύτερο από αυτόν που αναπτύσσεται. Στην περιοχή II ισχύει $D < \mu(S_f)$ και αφού υπάρχουν δύο πραγματικές ιδιοτιμές με διαφορετικό πρόσημο, η μόνιμη κατάσταση είναι σαγματικό σημείο (ασταθής)

Στην κανονική μόνιμη κατάσταση (όπου αντικαθίστανται στον Ιακωβιανό οι εξισώσεις (1) και (2)) ο Ιακωβιανός είναι:

$$J = \begin{bmatrix} 0 & \mu(S_s)X_s \\ -\frac{D}{Y} & -D - \frac{1}{Y} \mu(S_s)X_s \end{bmatrix} \quad (1.40)$$

Οι ιδιοτιμές είναι $-D$ και $-\frac{1}{Y} \mu(S_s)X_s$.

Ανάλογα με τις τιμές των λειτουργικών παραμέτρων το σύστημα μπορεί να λειτουργεί κάθε φορά σε διαφορετική περιοχή του διαγράμματος (Σχήμα 1.9). Οι ιδιοτιμές (το πρόσημο αυτών) της κάθε μόνιμης κατάστασης θα καθορίσουν εάν σε μια περιοχή η μόνιμη κατάσταση είναι ευσταθής ή ασταθής.

1.7.5. Στοιχεία θεωρίας διακλαδώσεων

Δομικά ευσταθές λέγεται το δυναμικό σύστημα του οποίου η δυναμική συμπεριφορά στο χώρο των φάσεων παραμένει αμετάβλητη μετά από μικρές διαταραχές. Χώρος φάσεων ενός συστήματος είναι ο χώρος η διαστάσεων με συντεταγμένες τις μεταβλητές $x_1, x_2, \dots, x_n$ του συστήματος. Εάν ένα σύστημα είναι δισδιάστατο τότε ο χώρος των φάσεων έχει δύο διαστάσεις. Στο χώρο αυτό απεικονίζονται τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των λύσεων ενός συστήματος (Παύλου, 2001).



Οι ποιοτικές μεταβολές των λύσεων που μπορούν να παρατηρηθούν σε ένα δυναμικό σύστημα με μεταβολή των παραμέτρων ονομάζονται διακλαδώσεις. Οι πιο απλές αφορούν διακλαδώσεις σημείων ισορροπίας ή περιοδικών λύσεων (όταν το σύστημα μεταβάλλεται περιοδικά με το χρόνο). Η πιο απλή μεταβολή είναι η μεταβολή της τιμής μιας παραμέτρου.

1.7.6. Λειτουργικό διάγραμμα χημοστάτη και μέθοδος κατασκευής

Η μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς ενός χημοστάτη γίνεται με τη χρήση λειτουργικών διαγραμμάτων. Το λειτουργικό διάγραμμα είναι ένα διάγραμμα διακλαδώσεων δύο διαστάσεων με άξονες δύο από τις λειτουργικές παραμέτρους (π.χ. ρυθμός αραίωσης και συγκέντρωση τροφοδοσίας υποστρώματος) (Jost et al., 1973). Επίσης, το διάγραμμα αυτό είναι ένα μέσο παρουσίασης της επίδρασης των λειτουργικών παραμέτρων του συστήματος στη δυναμική συμπεριφορά ενός βιοαντιδραστήρα.

Τα λειτουργικά διαγράμματα κατασκευάζονται αναλύοντας τις διαφορικές εξισώσεις του μαθηματικού μοντέλου που περιγράφει τη συμπεριφορά ενός συστήματος. Στις περιοχές που εμφανίζονται λόγω των διακλαδώσεων σε ένα τέτοιο διάγραμμα παρατηρείται διαφορετική δυναμική συμπεριφορά του συστήματος. Ένα διάγραμμα διακλαδώσεων κατασκευάζεται με τον προσδιορισμό και τον υπολογισμό των ορίων των περιοχών στα οποία συμβαίνουν ποιοτικές αλλαγές της συμπεριφοράς του συστήματος. Αυτό σημαίνει ότι πρέπει να προσδιοριστούν οι τιμές των παραμέτρων του συστήματος στις οποίες εμφανίζονται αυτές οι ποιοτικές αλλαγές.

Ένα δυναμικό σύστημα μπορεί να έχει διάφορους τύπους συμπεριφοράς: μόνιμη, περιοδική κα. Η μετακίνηση του συστήματος από μία περιοχή του διαγράμματος σε μία άλλη δε συνοδεύεται απαραίτητα από μία αλλαγή στη δυναμική συμπεριφορά του συστήματος από ένα τύπο σε ένα άλλο. Μπορεί να παρατηρηθεί για παράδειγμα μία αλλαγή στον αριθμό των μονίμων καταστάσεων.

Όταν οι τιμές των παραμέτρων του συστήματος μεταβάλλονται αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή και των μονίμων καταστάσεων και των ιδιοτιμών. Έτσι για την κατασκευή ενός λειτουργικού διαγράμματος πρέπει να χαραχθούν στο χώρο των δύο παραμέτρων (π.χ. συγκέντρωση υποστρώματος στην είσοδο και ρυθμός αραίωσης) οι καμπύλες πάνω στις οποίες συμβαίνουν αλλαγές (διακλαδώσεις).



Για τη χάραξη αυτών των διακλαδώσεων στο επίπεδο των δύο παραμέτρων θα πρέπει να εντοπισθεί πρώτα ένα από τα σημεία αυτής της καμπύλης της διακλάδωσης έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν σημείο εκκίνησης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ο αλγόριθμος AUTO (Doedel et al., 1997).

Για την κατασκευή του διαγράμματος των διακλαδώσεων, οι διαφορικές εξισώσεις που περιγράφουν ένα σύστημα τροφοδοτούνται στον αλγόριθμο του προγράμματος AUTO. Το πρόγραμμα υπολογίζει τις λύσεις του συστήματος στις μόνιμες καταστάσεις, κατασκευάζει τον Ιακωβιανό πίνακα και προσδιορίζει τις ιδιοτιμές του. Η ανάλυση ξεκινά από την εύρεση των μόνιμων καταστάσεων και τον εντοπισμό των σημείων όπου αλλάζουν τα χαρακτηριστικά των μόνιμων καταστάσεων. Τα σημεία αυτά αποτελούν σημεία των καμπυλών των διακλαδώσεων. Η διαδικασία αυτή γίνεται διατηρώντας όλες τις παραμέτρους του συστήματος σταθερές και μεταβάλλοντας μόνο μία (το ρυθμό αραιώσης).

Αφού το πρόγραμμα εντοπίσει ένα σημείο διακλάδωσης, για τη χάραξη της καμπύλης της διακλάδωσης πραγματοποιεί συνέχιση του σημείου μεταβάλλοντας και τη δεύτερη παράμετρο του συστήματος (συγκέντρωση τροφοδοσίας). Έτσι με το πρόγραμμα υπολογίζονται οι μόνιμες καταστάσεις, οι διακλαδώσεις που χωρίζουν περιοχές στο λειτουργικό διάγραμμα που διαφέρουν ως προς την ποιότητα ή την ποσότητα των μόνιμων καταστάσεων και τέλος προσδιορίζει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των καταστάσεων αυτών (ευστάθεια, αστάθεια).

Σημειώνεται ότι οι κυριότερες στοιχειώδεις διακλαδώσεις είναι:

1. Μετακρίσιμη διακλάδωση, όπου δύο μόνιμες καταστάσεις ανταλλάσσουν ευστάθεια. Δηλαδή, για παράδειγμα η μόνιμη κατάσταση της έκπλυσης περνώντας τη μετακρίσιμη διακλάδωση από ευσταθής γίνεται ασταθής και η μόνιμη κατάσταση της επιβίωσης του μικροοργανισμού από ευσταθής γίνεται ασταθής.
2. Διακλάδωση οριακού σημείου, στην οποία δημιουργούνται δύο νέες μόνιμες καταστάσεις.
3. Διακλάδωση Hopf, στην οποία από μία ευσταθή μόνιμη κατάσταση δημιουργείται μία περιοδική κατάσταση (Pavlou, 1999).

1.8. Αντικείμενο και συμβολή της διδακτορικής διατριβής

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε μία προσπάθεια να εξεταστεί σε βάθος η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση πόσιμου νερού, έτσι ώστε να καταστεί μία βιώσιμη



και ανταγωνιστική μέθοδος. Επίσης, μελετήθηκε διεξοδικά η συμπεριφορά της μικτής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας με σκοπό την ανάπτυξη αξιόπιστου μαθηματικού μοντέλου, το οποίο θα χρησιμεύσει στην κατασκευή αποδοτικών αντιδραστήρων.

Για πρώτη φορά στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση μελετάται η συμπεριφορά της υδρογονοτροφικής καλλιέργειας σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων νιτρικού αζώτου (7-200 mg/L). Πρώτη φορά αναπτύσσεται μαθηματικό μοντέλο το οποίο περιλαμβάνει την ανάπτυξη της βιομάζας, τη μείωση της επιθυμίας των νιτρικών από τα βακτήρια, λόγω της ύπαρξης των νιτρώδων και αντίστροφα και αντιμετωπίζει την απονιτροποίηση σαν διαδικασία δύο σταδίων. Η διδακτορική διατριβή αυτή είχε σαν στόχο την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σε ότι αφορά τη συμπεριφορά μιας υδρογονοτροφικής καλλιέργειας και τη βελτιστοποίηση ενός αποδοτικού αντιδραστήρα επεξεργασίας πόσιμου νερού.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως στο Κεφάλαιο αυτό, στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση η έρευνα έχει στραφεί στη χρήση μεμβρανών για την επίτευξη υψηλών ρυθμών απονιτροποίησης. Αυτό βέβαια αυξάνει το κόστος της μεθόδου. Επίσης, κατά τη χρήση άλλων υλικών (άμμος, πολυουρεθάνιο PU, πολυπροπυλένιο, πολυακρυλαμίδιο) σαν υλικά πλήρωσης των αντιδραστήρων δεν έχει μελετηθεί η επίδραση του μεγέθους αυτών στην απόδοση των συστημάτων επεξεργασίας. Δεδομένου ότι τα αυτότροφα βακτήρια χαρακτηρίζονται από μικρούς ρυθμούς ανάπτυξης της τάξης του 0.0042-0.012 (1/h) (Gros et al., 1988), η επιφάνεια που προσφέρεται σε αυτά μέσω του πληρωτικού υλικού του αντιδραστήρα, για την ανάπτυξη και προσκόλλησή τους αποτελεί σημαντικό παράγοντα της απόδοσης του συστήματος. Χρησιμοποιώντας ένα μικρού μεγέθους πληρωτικό υλικό αυξάνεται η επιφάνεια στον αντιδραστήρα. Ωστόσο, το μέγεθος είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει και την καλή ή όχι (φράξιμο των πόρων) λειτουργία ενός αντιδραστήρα.

Οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, η ανάπτυξη των βακτηρίων, καθώς και οι αναλυτικές μέθοδοι με τις οποίες πραγματοποιήθηκαν όλες οι απαραίτητες μετρήσεις περιγράφονται στο Δεύτερο Κεφάλαιο.

Στο Τρίτο Κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε η μελέτη της συμπεριφοράς μικτής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Μετά τη διαδικασία ανάπτυξης της μικτής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο, πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων 1) πείραμα άντλησης-πλήρωσης, για τη μελέτη του μέγιστου ρυθμού απομάκρυνσης των νιτρικών και 2)



πειράματα κινητικής για διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικών. Στόχος ήταν να μελετηθεί η ικανότητα της μικτής καλλιέργειας για απονιτροποίηση και η συμπεριφορά της καλλιέργειας σε ένα υδρογονοτροφικό περιβάλλον με διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου, έτσι ώστε να διαπιστωθεί η τυχόν επίδραση της συγκέντρωσης του ρύπου στην απόδοση των βακτηρίων. Τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν, χρησίμευσαν στην ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου, κατάλληλου να περιγράφει τη διεργασία της αυτότροφης υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης.

Στο Τέταρτο Κεφάλαιο μελετήθηκε η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση πόσιμου νερού σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης εργαστηριακής κλίμακας. Η αρχή της προσκολλημένης ανάπτυξης, επιτρέπει τη διατήρηση πολύ μεγάλων συγκεντρώσεων βιομάζας στους αντιδραστήρες αυτού του τύπου. Η χρήση κατάλληλου μεγέθους πληρωτικού υλικού και κατάλληλης λειτουργίας των συστημάτων αυτών επιτρέπει την επίτευξη μεγάλων ρυθμών απομάκρυνσης ρύπων. Στη μελέτη αυτή επιλέχθηκε χαλίκι ως πληρωτικό υλικό που είναι φθινό και ανενεργό υλικό. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις αντιδραστήρες με διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό ο καθένας.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του μεγέθους του πληρωτικού υλικού σε πειράματα άντλησης-πλήρωσης, έτσι ώστε να επιτευχθεί μέγιστη απόδοση με τα λιγότερα λειτουργικά προβλήματα. Στη συνέχεια μελετήθηκε η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση κατά τη συνεχή λειτουργία, για διάφορες λειτουργικές παραμέτρους. Ακολούθησε σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο λειτουργιών με βασικό κριτήριο τη μέγιστη απόδοση. Με βάση τα συμπεράσματα των δύο προηγούμενων λειτουργιών, πραγματοποιήθηκε μελέτη της συνεχούς λειτουργίας τριών αντιδραστήρων σε σειρά με διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό ο καθένας. Στόχος στο κεφάλαιο αυτό ήταν η ανάπτυξη της κατάλληλης διάταξης επεξεργασίας πόσιμου νερού και ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των λειτουργικών παραμέτρων αυτής.

Τέλος, αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο το οποίο περιγράφει τη διαδικασία της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης για διαφορετικές λειτουργικές συνθήκες και συγκεντρώσεις NO_3^- -N. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι κατά τη συνεχή λειτουργία κάθε συνδυασμός ογκομετρικής παροχής και συγκέντρωσης έπρεπε να προσομοιωθεί με διαφορετικού πάχους βιοφίλμ, το οποίο μεταβάλλονταν επίσης και κατά μήκος του αντιδραστήρα.

Στο Πέμπτο Κεφάλαιο πραγματοποιήθηκε πειραματική και θεωρητική μελέτη της συμπεριφοράς καθαρών και συνδυασμένων καλλιεργειών υδρογονοτροφικών βακτηρίων. Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η απομόνωση και η ταυτοποίηση



βακτηρίων από τη μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια. Τρία βακτηριακά είδη ικανά για υδρονοτροφική απονιτροποίηση υπό ανοξικές συνθήκες, μελετήθηκαν σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και αναπτύχθηκαν μοντέλα ικανά να περιγράφουν τη συμπεριφορά τους. Έπειτα, σε μία προσπάθεια κατανόησης των αλληλεπιδράσεων των απονιτροποιητικών βακτηρίων όταν αυτά συνυπάρχουν στο ίδιο περιβάλλον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής με μικτές καλλιέργειες, οι οποίες αποτελούνταν από δύο ή τρία βακτηριακά είδη. Για την προσομοίωση της συμπεριφορά των συνδυασμένων καλλιεργειών, έγινε συνδυασμός των μαθηματικών μοντέλων των καθαρών καλλιεργειών.

Στόχος ήταν η καλύτερη κατανόηση των κινητικών που περιγράφουν κάθε βακτηριακό είδος χωριστά, αλλά και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ειδών, οι οποίες αναπτύσσονται σε συνδυασμένες/μικτές καλλιέργειες. Η γνώση των μηχανισμών που αναπτύσσονται σε μία μικτή καλλιέργεια αποτελεί πλεονέκτημα στο σχεδιασμό συστημάτων υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης και στην ανάπτυξη στρατηγικών λειτουργίας αυτών.

Στο Έκτο Κεφάλαιο μελετήθηκε θεωρητικά ο συναγωνισμός μεταξύ υδρογονοτροφικών βακτηριακών πληθυσμών, όταν αυτά αναπτύσσονται σε συνδυασμένες καλλιέργειες σε έναν αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης, συνεχούς λειτουργίας. Χρησιμοποιήθηκε η θεωρία των διακλαδώσεων για την ανάλυση της δυναμικής συμπεριφοράς συνδυασμένων καλλιεργειών υδρογονοτροφικών βακτηρίων. Μελετήθηκε η σύνθεση των πληθυσμών υπό τις αλλαγές των λειτουργικών παραμέτρων του κάθε συστήματος, δηλαδή συγκέντρωσης τροφοδοσίας και ογκομετρικής παροχής του χημοστάτη και κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα λειτουργίας. Επίσης, υπολογίστηκε ο ρυθμός απονιτροποίησης και η συσσώρευση των νιτρωδών σε διάφορες λειτουργικές συνθήκες, για κάθε μία από τις μικτές καλλιέργειες που αναλύθηκε. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή λειτουργικών διαγραμμάτων. Βάση αυτών καθορίζεται η περιοχή των λειτουργικών παραμέτρων στην οποία παρατηρείται βέλτιστη λειτουργία της κάθε μικτής καλλιέργειας.

Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η γνώση της δυναμικής συμπεριφοράς θα μπορούσε να βοηθήσει στον κατάλληλο σχεδιασμό αντιδραστήρων και στρατηγικών λειτουργίας για τα συστήματα υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης.

Στο έβδομο και τελευταίο κεφάλαιο συνοψίζονται τα γενικά συμπεράσματα που προέκυψαν από τη διατριβή αυτή και προτείνονται επόμενα βήματα για μελλοντική εργασία.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικά συστήματα

Όλα τα πειράματα σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου πραγματοποιήθηκαν σε κωνικές φιάλες (3 L) λειτουργικού όγκου 2 L (Σχήμα 2.1(α)). Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων διοχετεύονταν συνεχώς CO_2 (50 mL/min) και H_2 (150 mL/min). Η διανομή των αερίων γινόταν διαμέσου βιομηχανικών κρουνών πίνακος με ακίδα και ροόμετρων φουσαλίδας, με πίεση 100 KPa. Το συνθετικά παραγόμενο ρυπασμένο νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα περιείχε πόσιμο νερό, KNO_3 (0.051-1.44 g/L), KH_2PO_4 (3.39 g/L) και Na_2HPO_4 (3.53 g/L). Τα χαρακτηριστικά του πόσιμου νερού που χρησιμοποιήθηκε δίνονται στον Πίνακα 2.1. Το ελαιώρημα των αντιδραστήρων βρίσκονταν σε συνεχή ανάδευση στις 600 στροφές/λεπτό (rpm) σε όλα τα πειράματα. Η προσθήκη των φωσφορικών αλάτων (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4) πραγματοποιήθηκε για τη διατήρηση του pH σε ουδέτερο επίπεδο, αλλά και για την παροχή της απαραίτητης για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ποσότητας φωσφόρου.

Οι Germonpre et al. (1992) βρήκαν ότι απαιτούνται 0.49 mg φωσφόρου για την απομάκρυνση 75 mg νιτρικών, αποδεικνύοντας έτσι ότι ο φώσφορος είναι απαραίτητο συστατικό για το σύστημα. Οι Chang et al. (1999) βρήκαν ότι τα φωσφορικά άλατα παίζουν σημαντικό ρόλο στη συσσώρευση των νιτρικών, αλλά η επίδρασή τους στην απομάκρυνση των νιτρικών είναι μικρότερη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.5 mgP/L.

Οι Mansell and Schroeder (2002) πρότειναν ότι για τη διατήρηση του pH σε ουδέτερες τιμές (pH=7) χρειάζεται προσθήκη φωσφορικών αλάτων της τάξης του 1.74 g/L KH_2PO_4 και 2.14 g/L K_2HPO_4 ανά 100 mg/L NO_3^- -N. Όπως αναφέρθηκε, απαραίτητη είναι η προσθήκη μεταλλικών στοιχείων και ιχνοστοιχείων για τους μικροοργανισμούς. Στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση τα στοιχεία αυτά προστίθενται στο συνθετικά παραγόμενο ρυπασμένο νερό σε συγκεντρώσεις $2.13 \cdot 10^{-3}$ g Mg/L, $2.23 \cdot 10^{-3}$ g Ca, 10^{-3} g Fe/L και $0.92 \cdot 10^{-3}$ g Mn/L, $0.75 \cdot 10^{-3}$ g Zn/L, $0.08 \cdot 10^{-3}$ g Cu/L, $0.189 \cdot 10^{-3}$ g Co/L, $0.28 \cdot 10^{-3}$ g Mo/L και αμμωνιακό άζωτο για να αφομοιωθεί κατά τη βακτηριακή σύνθεση $0.035 \cdot 10^{-3}$ g N/L (Chang et al., 1999; Ho et al., 2001), ωστόσο άλλοι ερευνητές χρησιμοποιούν συνθετικά παραγόμενο ρυπασμένο νερό μόνο κατασκευασμένο από πόσιμο νερό, την πηγή των νιτρικών και φωσφορικά άλατα (Lee and Rittmann, 2002; Ergas and Reuss, 2001; Mansell and Schroeder, 2002).



Πίνακας 2.1. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού δικτύου πόλεως.

Παράμετρος	Τιμή
Αγωγιμότητα	330 $\mu\text{S}/\text{cm}$
pH	7.2
Ολική σκληρότητα	180 mg/L CaCO_3
$[\text{NH}_4^+]$	0.0 mg/L
$[\text{NO}_3^-]$	0.25 mg/L
$[\text{NO}_2^-]$	0.0 mg/L
Fe	0.01 mg/L
Mn	0.0 mg/L

Για τα πειράματα σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης χρησιμοποιήθηκαν τρεις αντιδραστήρες που αποτελούνταν από ένα σωλήνα Plexiglas, ύψους 52 cm και εσωτερικής διαμέτρου 4 cm (Σχήμα 2.1(β) και 2.1(γ)). Ο συνολικός όγκος κάθε αντιδραστήρα ήταν 650 mL. Το πληρωτικό υλικό ήταν πυριτικό χαλίκι σε τρία διαφορετικά μεγέθη μέσης διαμέτρου (αντιδραστήρας 1) $d_1=4.03$ mm, (αντιδραστήρας 2) $d_2=2.41$ mm και (αντιδραστήρας 3) $d_3=1.75$ mm, αντίστοιχα, και κάλυπτε ύψος 40 cm.

Η ειδική επιφάνεια και το πορώδες των πληρωτικών υλικών των φίλτρων ήταν $14.16 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ και $0.42 - 22.74 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ και $0.4 - 32.07 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$ και 0.39, αντίστοιχα. Κατά μήκος των φίλτρων υπήρχαν 4 δειγματοληπτικά σημεία για τη μελέτη της μεταβολής της συγκέντρωσης του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ και του $\text{NO}_2^- \text{-N}$ στο εσωτερικό του κάθε φίλτρου. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην πειραματική διάταξη του Σχήματος 2.1(β), διοχετεύονταν συνεχώς από τη βάση των φίλτρων, CO_2 (30 mL/min) και H_2 (90 mL/min). Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στην πειραματική διάταξη του Σχήματος 2.1(γ), διοχετεύονταν συνεχώς από τη βάση των φίλτρων, CO_2 (7 mL/min) και H_2 (20 mL/min). Η διανομή των αερίων γινόταν από το κάτω μέρος του φίλτρου, διαμέσου ροόμετρων (Flowmeter kit 0-256 mL/min, Supelco) και με πίεση 100 KPa. Το συνθετικά παραγόμενο ρυπασμένο νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα περιείχε πόσιμο νερό, KNO_3 (0.072-2.16 g/L), KH_2PO_4 (3.39 g/L) και Na_2HPO_4 (3.53 g/L). Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της συνεχούς λειτουργίας των φίλτρων, η διανομή του ρυπασμένου νερού γίνονταν από το κάτω μέρος των φίλτρων (ανοδική ροή) με τη χρήση δοσομετρικής αντλίας ρυθμιζόμενης παροχής (DCL 601, Tekna). Η ανοδική ροή του νερού



στα φίλτρα επιλέχθηκε για την επίτευξη μεγάλων ποσοτήτων διαλυμένων αερίων στο υγρό ρεύμα (μεγαλύτερος χρόνος παραμονής των αερίων στο υγρό ρεύμα). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία $28 \pm 2^\circ\text{C}$, ενώ το pH κυμαίνονταν μεταξύ 6.8 ± 0.2 .

2.2. Πληρωτικό υλικό

Ως πληρωτικό υλικό σε όλα τα πειράματα στους αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, χρησιμοποιήθηκε πυριτικό χαλίκι με βάση τις εργαστηριακές αναλύσεις τύπου XRD (X-Ray Diffraction analysis, Πανεπιστήμιο Πατρών). Το πληρωτικό αυτό υλικό είναι ένα φυσικό, ανενεργό και φτηνό υλικό. Για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ιδίων των χαλικιών, όπως η μέση διάμετρος, η ειδική επιφάνεια, αλλά και αυτών που προσδίδουν στους αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, όπως το πορώδες, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι:

- Υπολογισμός μέσης διαμέτρου: Τα χαλίκια που χρησιμοποιήθηκαν κατατάσσονται σε τρεις τάξεις μεγέθους με ένα εύρος 1-2 mm, 2-2.8 mm και 4 mm. Ο διαχωρισμός των χαλικιών στις παραπάνω τάξεις μεγέθους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κόσκινων με διάμετρο οπών από 1 έως 4 mm. Από κάθε τάξη μεγέθους των χαλικιών που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκαν τυχαία τρία σείτ των 100 χαλικιών. Για τον προσδιορισμό της μέσης διαμέτρου των χαλικιών μετρήθηκαν σε κάθε χαλίκι (με ακανόνιστο σχήμα) με χρήση παχυμέτρου τρεις διαφορετικές διαμέτροι ως προς διάφορες κατευθύνσεις και υπολογίστηκε μία μέση διάμετρος για κάθε χαλίκι. Ο μέσος όρος των τιμών αυτών προσδίδει τη μέση διάμετρο των χαλικιών για κάθε εύρος μεγέθους.

Μέτρηση Ειδικής Επιφάνειας (A_s): Χρησιμοποιήθηκε δείγμα 100 χαλικιών. Αρχικά υπολογίστηκε ο συνολικός όγκος των χαλικιών μετρώντας τον όγκο του υγρού που εκτοπίζουν σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο. Στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της συνολικής επιφάνειας κάθε χαλίκι θεωρήθηκε σαν σφαίρα με γνωστή μέση διάμετρο. Η ειδική επιφάνεια είναι το πηλίκο της συνολικής επιφάνειας των 100 χαλικιών διά του συνολικού τους όγκου. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε ένα από τα τρία μεγέθη χαλικιών.

$$A_s = \frac{\text{Συνολική επιφάνεια 100 χαλικιών}}{\text{Όγκος που εκτοπίζεται}} = \frac{100 \cdot 4\pi r^2}{V_{\text{εκτοπ.}}} \quad (2.1)$$



Μέτρηση Πορώδους (ε): Χρησιμοποιήθηκε δείγμα χαλικιών συνολικού όγκου 250 mL. Ο όγκος αυτός είναι το άθροισμα του πραγματικού όγκου των χαλικιών και του πορώδους χώρου. Στη συνέχεια τα χαλίκια αυτά τοποθετήθηκαν σε έναν άλλο κύλινδρο με νερό και μετρήθηκε ο όγκος του νερού που εκτοπίζουν, δηλαδή μετρήθηκε ο πραγματικός όγκος των χαλικιών. Η διαφορά του συνολικού όγκου από τον πραγματικό όγκο των χαλικιών δίνει τον όγκο του κενού χώρου μεταξύ των χαλικιών. Κατά συνέπεια το πηλίκο της διαφοράς του συνολικού μείον τον πραγματικό όγκο δια τον συνολικό όγκο δίνει το πορώδες του αντιδραστήρα σταθερής κλίνης. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές για κάθε ένα από τα τρία μεγέθη χαλικιών.

$$\varepsilon = \frac{V_{ολικ\acute{o}} - V_{χαλικι\acute{o}ν}}{V_{ολικ\acute{o}}} \quad (2.2)$$

2.3. Αναλυτικές μέθοδοι

Για τη μελέτη της μεταβολής των συγκεντρώσεων του νιτρικού- και του νιτρώδους- αζώτου, δείγματα λαμβάνονταν από τους αντιδραστήρες κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων και αναλύονταν αμέσως. Όλα τα δείγματα προτού οδηγηθούν για ανάλυση διηθούνταν από πορώδη μεμβράνη (0.45 μm , Milipore filters-GN 6 Merticel Grid 47mm, Pall corporation), έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα σωματίδια (π.χ. βιομάζα) που τυχόν να υπήρχαν σε αυτά. Για όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης V-530 (Jasco Corporation).

Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του νιτρικού αζώτου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 4500- NO_3^- -B σύμφωνα με το *Standards Methods For The Examination Of Water And Waste Water* (APHA et al., 1989). Με βάση τη μέθοδο αυτή τα νιτρικά ιόντα (NO_3^- -N) προσδιορίστηκαν με άμεση φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 220 nm. Η καμπύλη βαθμονόμησης του NO_3^- -N ακολουθεί τον νόμο του Beer έως τα 11 mgN/L (Παράρτημα).

Για τον υπολογισμό της πραγματικής συγκέντρωσης του NO_3^- -N των δειγμάτων λαμβανόταν υπόψη και η συγκέντρωση του NO_2^- -N που περιείχε το δείγμα, η οποία επηρέαζε αυξητικά την ένδειξη του φασματοφωτόμετρου. Κατασκευάστηκε έτσι καμπύλη βαθμονόμησης του NO_2^- -N στα 220 nm. Η πραγματική συγκέντρωση προκύπτει από τη διαφορά των απορροφήσεων: $(\text{O.A.}_{220\text{nm}} \text{ δείγματος προσδιορισμού } \text{NO}_3^- \text{-N}) - (\text{O.A.}_{220\text{nm}} \text{ NO}_2^- \text{-N}) = \text{Πραγματική O.A.}_{220\text{nm}} \text{ NO}_3^- \text{-N}$ (Παράρτημα).

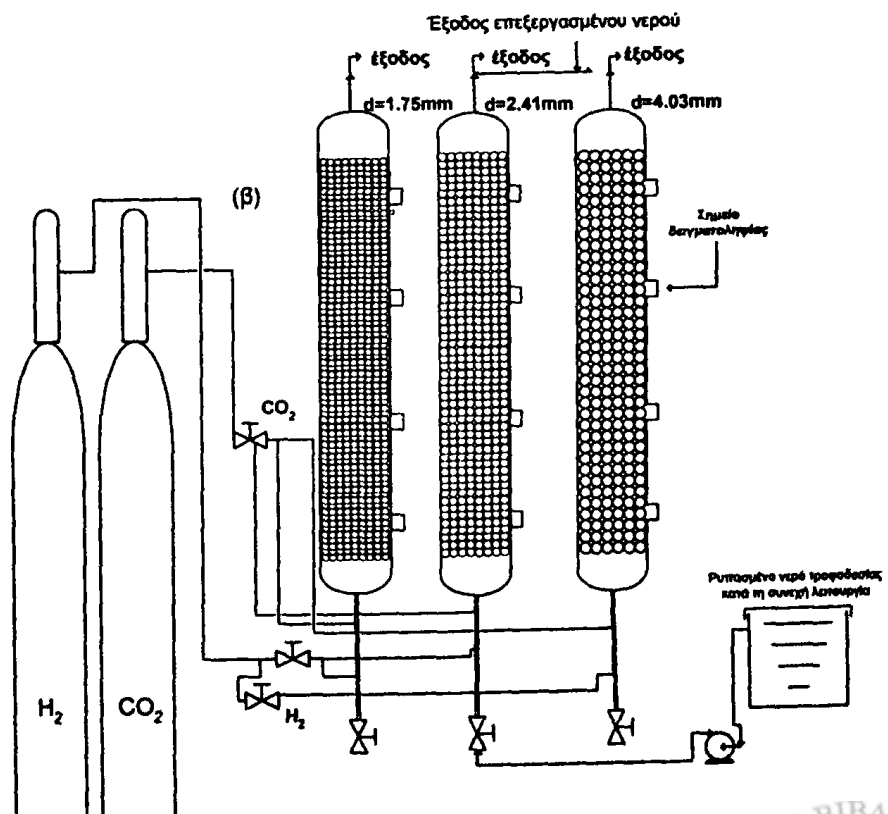
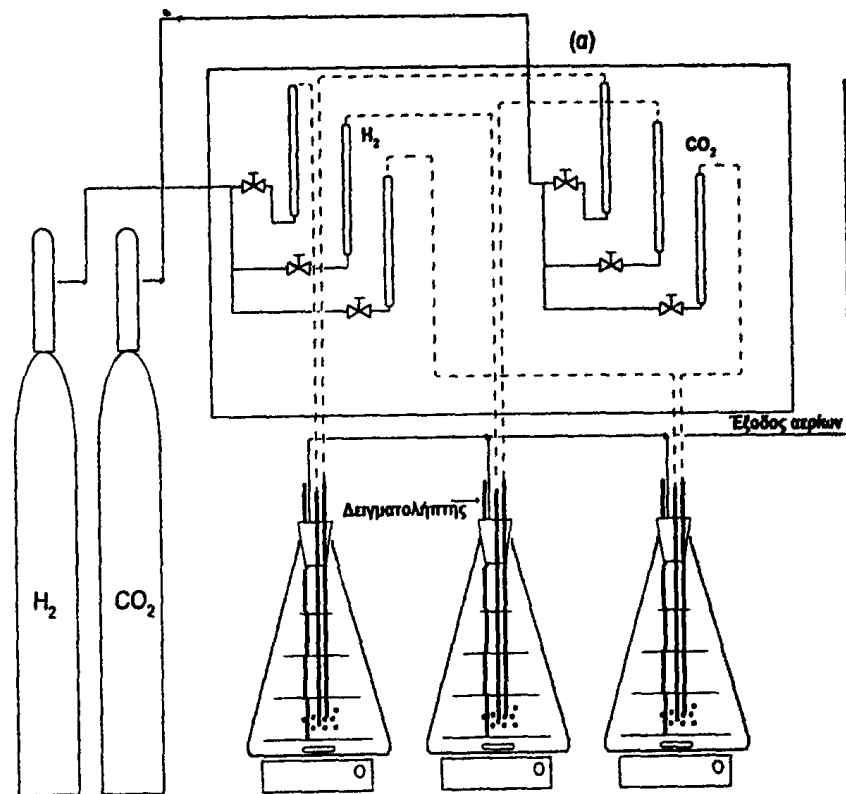


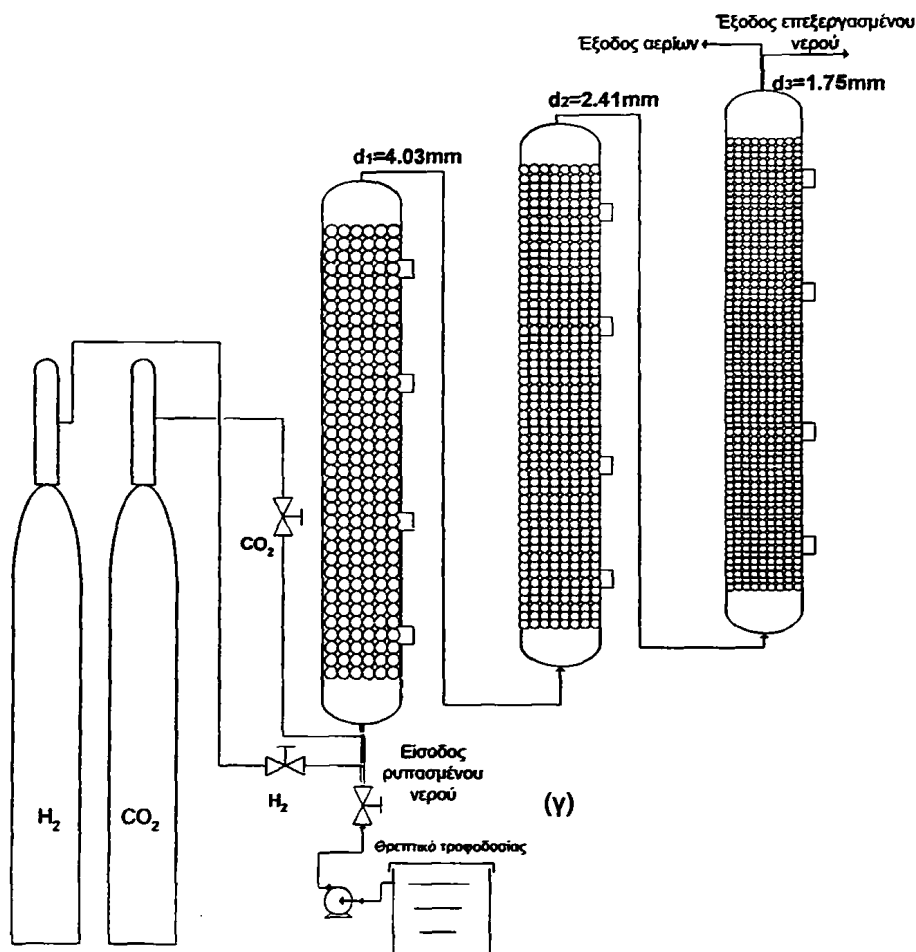
Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του νιτρώδους αζώτου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 4500-NO₂⁻-B σύμφωνα με το *Standards Methods For The Examination Of Water And Waste Water* (APHA et al., 1989). Με βάση τη μέθοδο αυτή τα νιτρώδη ιόντα (NO₂⁻-N) προσδιορίστηκαν με την προσθήκη αντιδραστήριου (Color reagent) στα δείγματα, το οποίο προσδίδει ένα ερυθρό/πορφυρό χρώμα, λόγω της ένωσης του διαζωτομένου σουλφαναμιδίου με N-(1-ναφθυλ-)-αιθυλενοδιάμνο διυδροχλωρίδιο. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε pH 2-2.5. Η μέθοδος έχει ως ανώτατο όριο προσδιορισμού το 1 mg NO₂⁻-N/L (Παράρτημα).

Για τη μελέτη της μεταβολής των συγκεντρώσεων της βιομάζας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων στους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος 2540D σύμφωνα με το *Standards Methods For The Examination Of Water And Waste Water* (APHA et al., 1989). Με βάση τη μέθοδο αυτή τα δείγματα φωτομετρούνταν, χωρίς να έχουν υποστεί προηγουμένως διήθηση, στα 600 nm. Στη συνέχεια η οπτική απορρόφηση μεταφράζεται σε (βάρος ξηρής βιομάζας)/(όγκος διαλύματος) μέσω καμπύλης βαθμονόμησης (Παράρτημα).

- Για τον προσδιορισμό του pH των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε συσκευή μέτρησης pH εργαστηριακού τύπου (Hanna Instruments) 210 microprocessor pH meter. Οι μετρήσεις του δυναμικού οξειδοαναγωγής πραγματοποιήθηκαν με ηλεκτρόδιο Ag/AgCl. Για τον υπολογισμό του δυναμικού ενός δείγματος πραγματοποιείται μέτρηση του δυναμικού του δείγματος και ενός πρότυπου διαλύματος (ZoBell solution) στην ίδια θερμοκρασία. Το πρότυπο διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με την προσθήκη των εξής αντιδραστηρίων σε νερό : 1.408 g/L potassium ferrocyanide (K₄Fe(CN)₆·3H₂O), 1.0975 g/L potassium ferricyanide (K₃Fe(CN)₆) και 7.455 g/L χλωριούχο κάλιο (KCl). Στη συνέχεια υπολογίζεται η τιμή του δυναμικού του δείγματος ως εξής: $Eh_{\text{πραγματικό δείγματος}} = Eh_{\text{μέτρησης δείγματος}} + Eh_{\text{θεωρητικό του ZoBell}} - Eh_{\text{μέτρησης του ZoBell}}$. Η θεωρητική τιμή του πρότυπου ZoBell στους 26-30°C είναι 0.426-0.417 V.







Σχήμα 2.1. Πειραματική διάταξη αντιδραστήρων α) διαλείποντος έργου, β) σταθερής κλίνης και γ) σταθερής κλίνης σε σειρά.

Τέλος, για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του διαλυμένου υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Διαλυμένο υδρογόνο. Για τη μέτρηση του διαλυμένου υδρογόνου χρησιμοποιήθηκε η headspace-GC/TCD τεχνική που αναπτύχθηκε από τους Shizas and Bagley (2004), της οποίας το όριο ανίχνευσης είναι 0.02 mg διαλυμένου H_2/L . Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή 2 mL υγρού δείγματος μεταφέρονται από το σημείο δειγματοληψίας του αντιδραστήρα και εγχέονται (αδιήθητα) σε δοχεία των 50 mL (vial). Τα δοχεία αυτά είχαν υποστεί προηγουμένως την εξής επεξεργασία: 5 mL H_2SO_4 6 N (για την αντιμετώπιση της κατανάλωσης του υδρογόνου από τα βακτήρια) προστίθενται σε κάθε δοχείο, απαερώνονται για 2 min με 99.999% N_2 και κλείνονται με λαστιχένια καπάκια (rubber septa). Στη συνέχεια και αφού έχει προστεθεί το δείγμα ανακινούνται για 5 sec και αφήνονται να ισορροπήσουν για 1 ώρα στους $21^\circ C$. Αέριο

δείγμα (250 μl) λαμβάνεται από την κορυφή των δοχείων με σύριγγα και αναλύεται σε GC αναλυτή με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (TCD). Ο προσδιορισμός της σύστασης του αερίου σε υδρογόνο πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογράφου αερίων (Varian Star 3600), εξοπλισμένο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και πακτωμένη στήλη (Poropak Q, 80/100-mesh). Για τη μέτρηση των άγνωστων δειγμάτων και για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής τους χωρίς να χρειάζεται ο νόμος του Henry κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη (Παράρτημα).

Διαλυμένο διοξείδιου του άνθρακα (OECD, 1992). Σε 20 mL δείγματος ρίχνονται 78.88 mg $\text{BA}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (0.0125M) για την παγίδευση του διοξειδίου του άνθρακα. Στη συνέχεια προστίθενται 1-2 σταγόνες δείκτη φαινολοφθαλεΐνη (80mg σε 100 mL MeOH). Το δείγμα χρωματίζεται (ροζ χρώμα) και στη συνέχεια τιτλοδοτείται με HCl (0.1N ή 8.3 mL σε 1 L). Το δείγμα αναδεύεται συνεχώς. Εάν παρατηρηθεί ότι το βάριο παγιδεύει το CO_2 δημιουργώντας πολύ ίζημα, με αποτέλεσμα να μην χρωματίζεται με τον δείκτη, τότε χρειάζεται να γίνει αραίωση του δείγματος. Για τον υπολογισμό των mg του CO_2 στα 20 mL δείγματος χρησιμοποιείται ο τύπος: $(0.1 \cdot (5.2 - \text{mLHCl}) \cdot 44) / 2$. Το 5.2 αντιστοιχεί στα mL HCl που χρειάζονται για τον αποχρωματισμό του τυφλού δείγματος. Το τυφλό περιείχε 19.5 mL απιονισμένο και 0.5 mL υγρό θρεπτικό με νιτρικά (εκτός αντιδραστήρα). Σημειώνεται ότι για τη μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν αραίωση 1/40 με 19.5 mL απιονισμένο νερό και 0.5 mL δείγματος.

2.4. Ανάπτυξη μικροοργανισμών

Η υδρογονοτροφική καλλιέργεια βακτηρίων, με την οποία πραγματοποιήθηκαν όλα τα πειράματα, προήλθε από τη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων του δήμου Αγρινίου. Η μαγιά επιλέχθηκε να προέρχεται από την ανοξική ζώνη της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας του βιολογικού καθαρισμού, έτσι ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες εύρεσης κάποιου μικροοργανισμού που δύναται να λειτουργήσει υπό ανοξικές συνθήκες. Η μαγιά αφέθηκε να καθιζάνει και 100 mL από το υπερκείμενο υγρό χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό τριών αντιδραστήρων διαλείποντος έργου (Σχήμα 2.1(α)) που περιείχαν υγρό θρεπτικό 1900 mL. Το θρεπτικό περιείχε νερό βρύσης, KNO_3 (0.72 g/L), KH_2PO_4 (3.39 g/L) και Na_2HPO_4 (3.53 g/L) και γλυκόζη $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (0.5 g/L) ως οργανική πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών έγινε παρουσία πόσιμου και όχι



απεσταγμένου νερού, ώστε να αποφευχθεί η χρήση ιχνοστοιχείων που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη τους.

Μετά από 24 ώρες ετερότροφης απονιτροποίησης οι τρεις χρονικά παράλληλες καλλιέργειες τέθηκαν σε διαδικασία αυτότροφης απονιτροποίησης με προσθήκη H_2 σαν δότη ηλεκτρονίων και CO_2 ως πηγή άνθρακα για τη βακτηριακή ανάπτυξη.

Οι καλλιέργειες επωάστηκαν υπό ανοξικές συνθήκες χρησιμοποιώντας θρεπτικό σε υγρή μορφή. Το θρεπτικό περιείχε νερό βρύσης, KNO_3 (0.72 g/L), KH_2PO_4 (3.39 g/L) και Na_2HPO_4 (3.53 g/L). Στις καλλιέργειες διοχετεύονταν συνεχώς CO_2 και H_2 . Οι αντιδραστήρες βρίσκονταν σε συνεχή ανάδευση στις 600 στροφές/λεπτό (rpm) σε θερμοκρασία $26^\circ C$, ενώ το pH κυμαίνονταν από 6.8-7. Οι συγκεντρώσεις του νιτρικού-, του νιτρώδους- αζώτου και της βιομάζας προσδιορίζονταν σε καθημερινή βάση.

Κάθε φορά που μειωνόταν η συγκέντρωση του $NO_3^- - N$ σε κάθε αντιδραστήρα, απομακρύνονταν 20 mL καλλιέργειας και προσθέτονταν 20 mL φρέσκου θρεπτικού, έτσι ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση στα 100 mg $NO_3^- - N/L$. Η εξάτμιση του νερού εξαιτίας της εξόδου των αερίων από τους αντιδραστήρες ελεγχόταν προσθέτοντας την απαιτούμενη κάθε φορά ποσότητα νερού βρύσης. Τέλος, κάθε φορά που κρινόταν απαραίτητο, για παράδειγμα όταν σταματούσε η απομάκρυνση των νιτρικών ή όταν παρατηρούνταν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις νιτρώδους αζώτου, η καλλιέργεια ανανεωνόταν με την κράτηση 200 mL από την ήδη υπάρχουσα και την προσθήκη 1800 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου.

Με τον τρόπο αυτό και με διαδικασίες φυσικής επιλογής απέκτησαν πλεονέκτημα οι μικροοργανισμοί που ήταν ικανοί για υδρογονοτροφική απονιτροποίηση.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ ΚΑΙ
ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΜΙΚΤΗΣ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**



3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΔΙΑΛΕΙΠΟΝΤΟΣ ΕΡΓΟΥ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΗΣ ΜΙΚΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

3.1. Εισαγωγή

Ο αρχικός στόχος της εργασίας ήταν να εξεταστεί το εφικτό ή μη της ανάπτυξης μικτής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας, από μία καλλιέργεια (μαγιά) που προήλθε από βιολογικό καθαρισμό, και η ικανότητα αυτής για αυτότροφη απονιτροποίηση.

Προκειμένου να μελετηθεί η ικανότητα της μικτής καλλιέργειας για απονιτροποίηση και να μελετηθεί πειραματικά και θεωρητικά, η συμπεριφορά της καλλιέργειας σε ένα υδρογονοτροφικό περιβάλλον με διάφορες συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου, πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου:

1) πείραμα άντλησης-πλήρωσης με συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mg/L, για να μελετηθεί η δυνατότητα πραγματοποίησης της αυτότροφης υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης και η απόδοση της καλλιέργειας. Ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης στη συγκέντρωση αυτή βρέθηκε ότι ήταν 0.076 gNO₃⁻-N/Ld.

2) πειράματα κινητικής για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων νιτρικού αζώτου (7-200 mg/L). Από τα πειραματικά δεδομένα παρατηρήθηκε ότι η υψηλή συγκέντρωση νιτρικού αζώτου, μεγαλύτερη των 40 mg/L, παρεμποδίζει τη διαδικασία της απονιτροποίησης. Τα πειράματα κινητικής χρησίμευσαν στον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων και στην εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση από τα νιτρικά, κατάλληλο για την περιγραφή της διεργασίας της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη που απεικονίζεται στο Σχήμα 2.1(α).

3.2. Πείραμα άντλησης - πλήρωσης

Μετά τη διαδικασία ανάπτυξης της μικτής καλλιέργειας (Κεφάλαιο 2, ενot. 2.4), πραγματοποιήθηκε πείραμα άντλησης-πλήρωσης σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου με αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mgNO₃⁻-N/L (Σχήμα 3.1), για να



μελετηθεί ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης που μπορεί να επιτευχθεί στη συγκέντρωση αυτή ($80 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$) με αυτή τη μικτή καλλιέργεια.

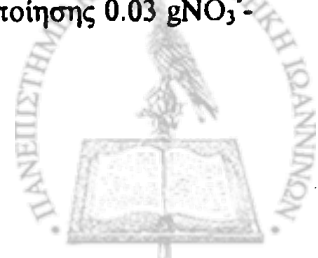
Μετά από 40 ημέρες συνεχούς προσθήκης H_2 στους τρεις αντιδραστήρες όπου λάμβανε χώρα η ανάπτυξη της μικτής καλλιέργειας, παρατηρήθηκε ένας ικανοποιητικός ρυθμός ($0.055 \text{ gNO}_3^- \text{-N/Ld}$) με αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου $100 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$ απονιτροποίησης σε μία από τις τρεις καλλιέργειες, χωρίς συσσώρευση νιτρώδων. Η υδρογονοτροφική αυτή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση του πειράματος άντλησης-πλήρωσης.

Εμβόλιο 40 mL από την καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό αντιδραστήρα διαλείποντος έργου που περιείχε φρέσκο συνθετικά παραγόμενο ρυπασμένο νερό 1960 mL. Το συνθετικά παραγόμενο ρυπασμένο νερό περιείχε νερό βρύσης, KNO_3 (0.58 g/L), KH_2PO_4 (3.39 g/L) και Na_2HPO_4 (3.53 g/L). Η αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στον αντιδραστήρα ήταν $80 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$.

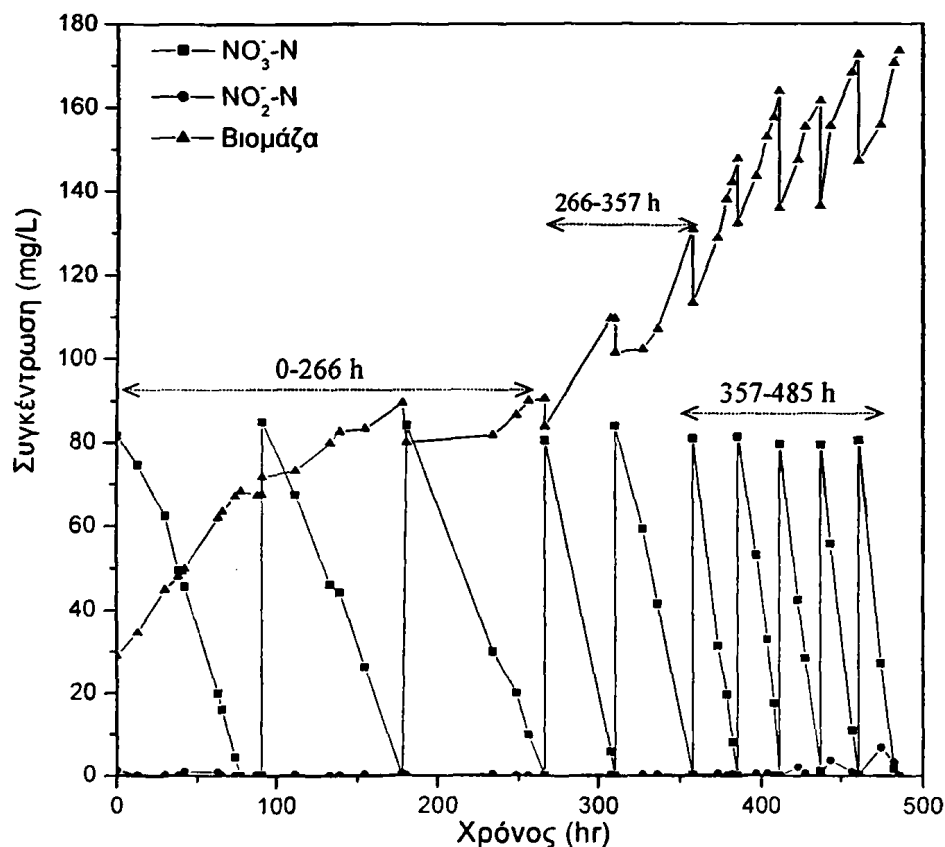
Κάθε φορά που μειωνόταν η συγκέντρωση του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ στον αντιδραστήρα, απομακρύνονταν 300 mL καλλιέργειας και προσθέτονταν 300 mL φρέσκου ρυπασμένου νερού, έτσι ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση και πάλι στα $80 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$. Η διαδικασία αυτή αποτελεί έναν λειτουργικό κύκλο. Οι κύκλοι αυτοί επαναλήφθηκαν έως ότου επιτευχθεί ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης, με έναν αντίστοιχα μέγιστο ρυθμό ανάπτυξης της βιομάζας, για τουλάχιστον τέσσερις λειτουργικούς κύκλους.

Κατά τη διάρκεια της χρονικής περιόδου 0-266 h (0-11 d) (Σχήμα 3.1) παρατηρήθηκε ένας μικρός ρυθμός απονιτροποίησης ($0.024 \text{ gNO}_3^- \text{-N/Ld}$) για τους τρεις πρώτους λειτουργικούς κύκλους. Στην περίοδο 266-357 h, ο ρυθμός απονιτροποίησης αυξήθηκε σε $0.043 \text{ gNO}_3^- \text{-N/Ld}$. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1, μετά από 15 ημέρες (χρονικό διάστημα 357-485 h) το σύστημα απέκτησε σταθερή συμπεριφορά, δηλαδή για την απομάκρυνση των νιτρικών απαιτούνταν το ίδιο χρονικό διάστημα σε κάθε λειτουργικό κύκλο (5 τελευταίοι λειτουργικοί κύκλοι). Η διάρκεια των σταθερών κύκλων ήταν 26 ώρες. Ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης βρέθηκε ότι ήταν $0.076 \text{ gNO}_3^- \text{-N/Ld}$, με μία απομάκρυνση νιτρικού αζώτου $2.64 \text{ gNO}_3^- \text{-N/gβιομάζας}$. Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης βιομάζας ήταν $0.028 \text{ gβιομάζας/Ld}$. Κατά τη διάρκεια του πειράματος οι συγκεντρώσεις του $\text{NO}_2^- \text{-N}$ κυμαίνονταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Οι Ergas and Reuss (2001) πραγματοποίησαν πειράματα σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου χρησιμοποιώντας μικτές καλλιέργειες προερχόμενες από απόβλητα. Μελέτησαν τη διαφορά στο ρυθμό απονιτροποίησης ετερότροφων και υδρογονοτροφικών συστημάτων, πετυχαίνοντας ρυθμούς απονιτροποίησης 0.03 gNO_3^-



N/L d (με αρχική συγκέντρωση $75 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$) κατά την ετερότροφη απονιτροποίηση και $0.018 \text{ gNO}_3^- \text{-N/L d}$ (με αρχική συγκέντρωση $80\text{-}100 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$) κατά την υδρογονοτροφική. Οι Rezania et al. (2005) χρησιμοποίησαν, επίσης, μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια βακτηρίων για την διεξαγωγή πειραμάτων σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Από τα πειραματικά δεδομένα προέκυψε ότι ο λόγος νιτρικού αζώτου που απομακρύνεται ως προς τη βιομάζα ήταν $0.38 \text{ gNO}_3^- \text{-N/gβιομάζας d}$.



Σχήμα 3.1. Πειραματική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους-αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mg/L .

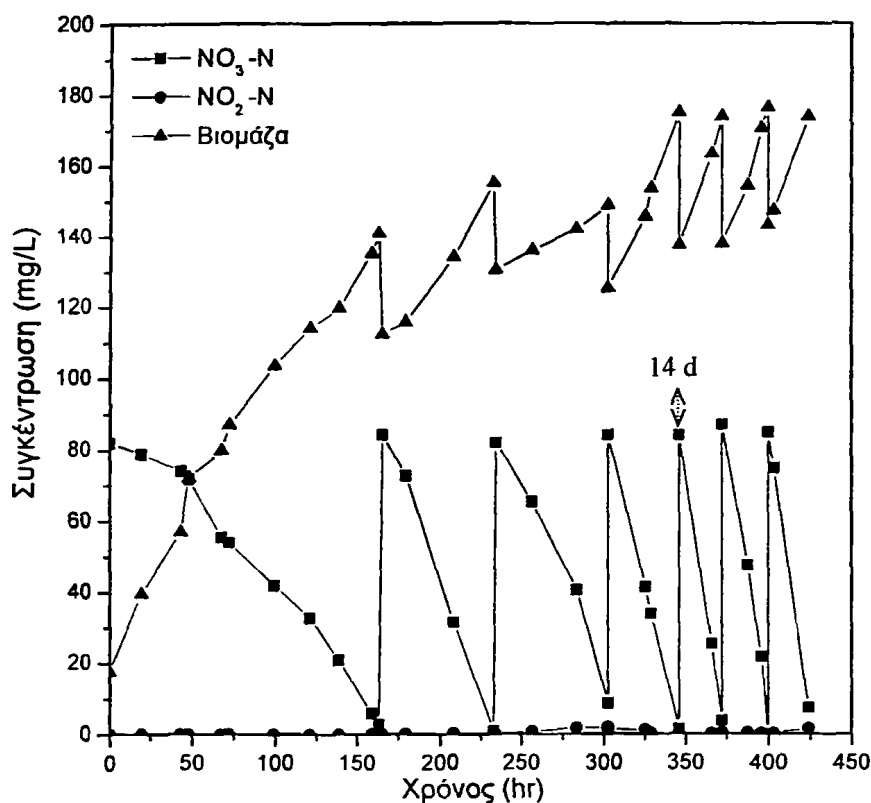
Ο ρυθμός απονιτροποίησης των $0.076 \text{ gNO}_3^- \text{-N/L d}$ όπως προέκυψε από το πείραμα της άντλησης-πλήρωσης, είναι πιο υψηλός από αυτόν που παρατηρήθηκε από τους Ergas and Reuss (2001). Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν μικτές καλλιέργειες, αλλά η έλλειψη δεδομένων για τη συγκέντρωση βιομάζας περιορίζει την αξιοπιστία της άμεσης σύγκρισης των δύο ρυθμών υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης. Όμως, ο ρυθμός των $0.03 \text{ gNO}_3^- \text{-N/L d}$ που παρατήρησαν κατά την

ετερότροφη απονιτροποίηση δείχνει ότι, υπό τις κατάλληλες συνθήκες, η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση μπορεί να είναι συγκρίσιμη και ανταγωνιστική της ετερότροφης απονιτροποίησης. Επιπλέον, όσον αφορά στη βιομάζα, ο λόγος νιτρικού αζώτου που απομακρύνεται ως προς τη βιομάζα που παράγεται των $2.5 \text{ gNO}_3^- \text{-N/gβιομάζας d}$ που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία είναι μεγαλύτερος από αυτόν των $0.38 \text{ gNO}_3^- \text{-N/gβιομάζας d}$ που παρατηρήθηκε από τους Rezanian et al. (2005).

Η χρήση μικτών καλλιεργειών, αποδείχτηκε πολύ αποτελεσματική, καθώς είναι πολύ εύκολος ο εμπλουτισμός, από διάφορες πηγές, των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιήσουν το υδρογόνο σαν δότη ηλεκτρονίων. Η μικτή καλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία αυτή αποδείχτηκε ικανή για απονιτροποίηση πετυχαίνοντας υψηλούς ρυθμούς και η συμπεριφορά της παρέμεινε σταθερή για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό επιβεβαιώθηκε με ένα παρόμοιο πείραμα άντλησης-πλήρωσης, το οποίο πραγματοποιήθηκε με την ίδια υδρογονοτροφική καλλιέργεια μετά από χρονικό διάστημα περίπου 10 μηνών. Παρατηρήθηκε ότι η συμπεριφορά της καλλιέργειας ήταν ίδια με αυτή του προηγούμενου πειράματος του Σχήματος 3.1.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2, μετά από 14 ημέρες το σύστημα απέκτησε σταθερή συμπεριφορά. Η διάρκεια των σταθερών κύκλων ήταν επίσης 26 ώρες. Ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης βρέθηκε ότι είναι $0.075 \text{ gNO}_3^- \text{-N/L d}$, με κατανάλωση νιτρικού αζώτου $2.31 \text{ gNO}_3^- \text{-N/gβιομάζας}$. Κατά τη διάρκεια του πειράματος οι συγκεντρώσεις του $\text{NO}_2^- \text{-N}$ ήταν σχεδόν μηδενικές.





Σχήμα 3.2. Επιβεβαίωση της σταθερής συμπεριφοράς της καλλιέργειας. Πειραματική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους-αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mg/L.

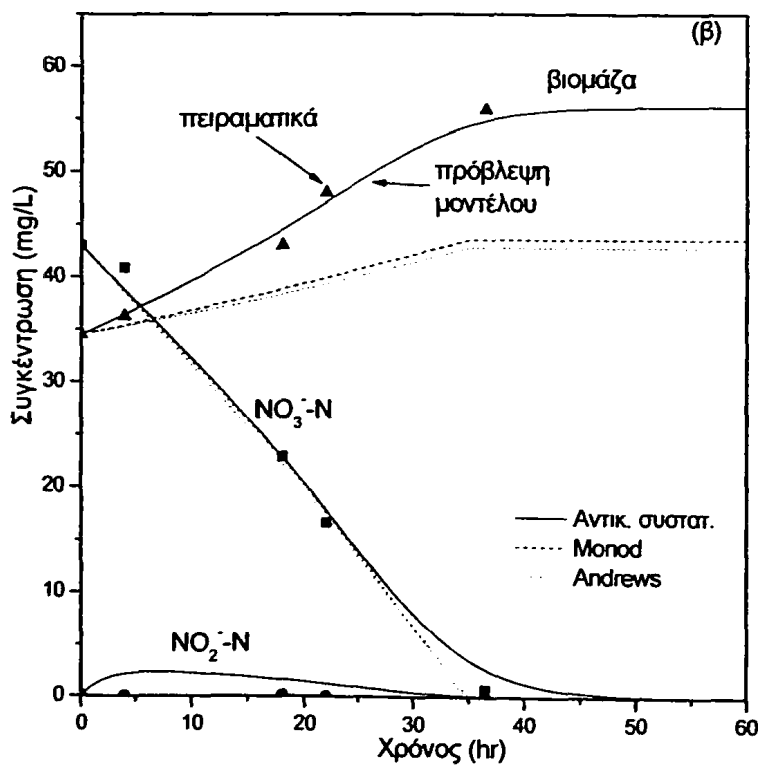
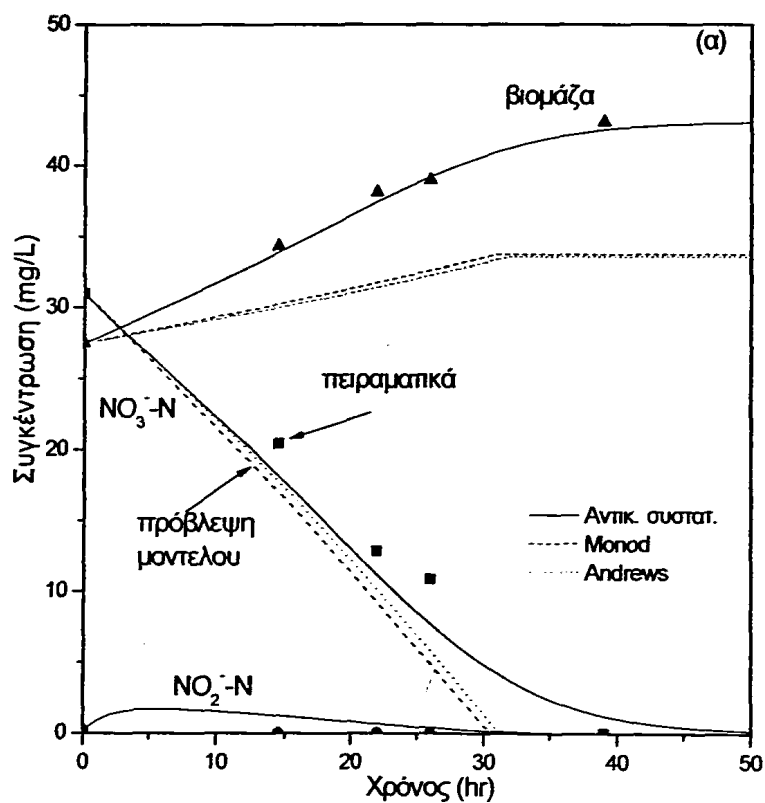
3.3. Εφαρμογή και πιστοποίηση μαθηματικού μοντέλου

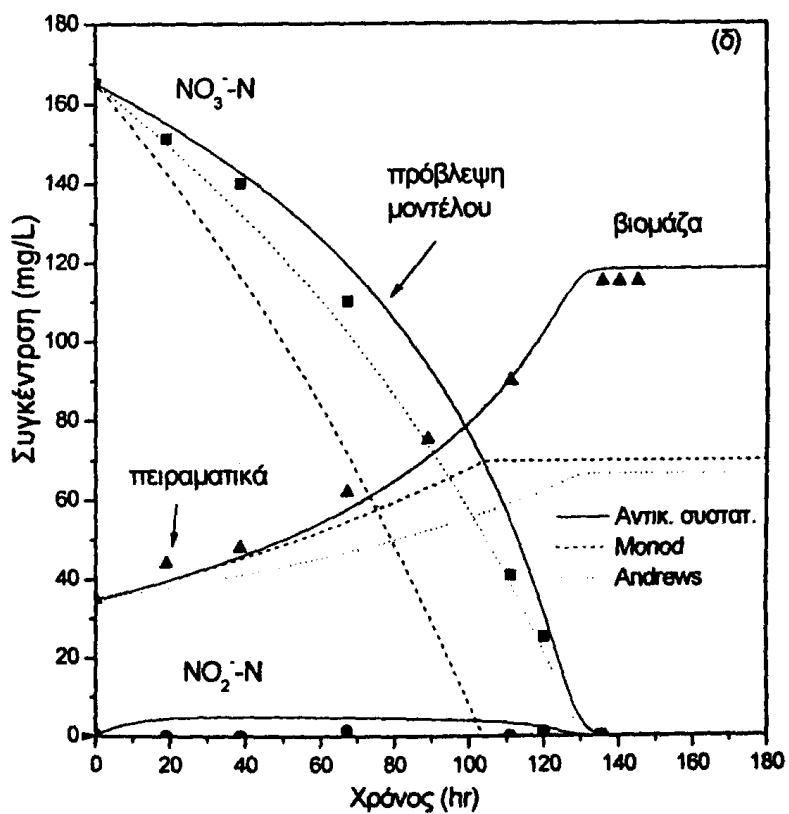
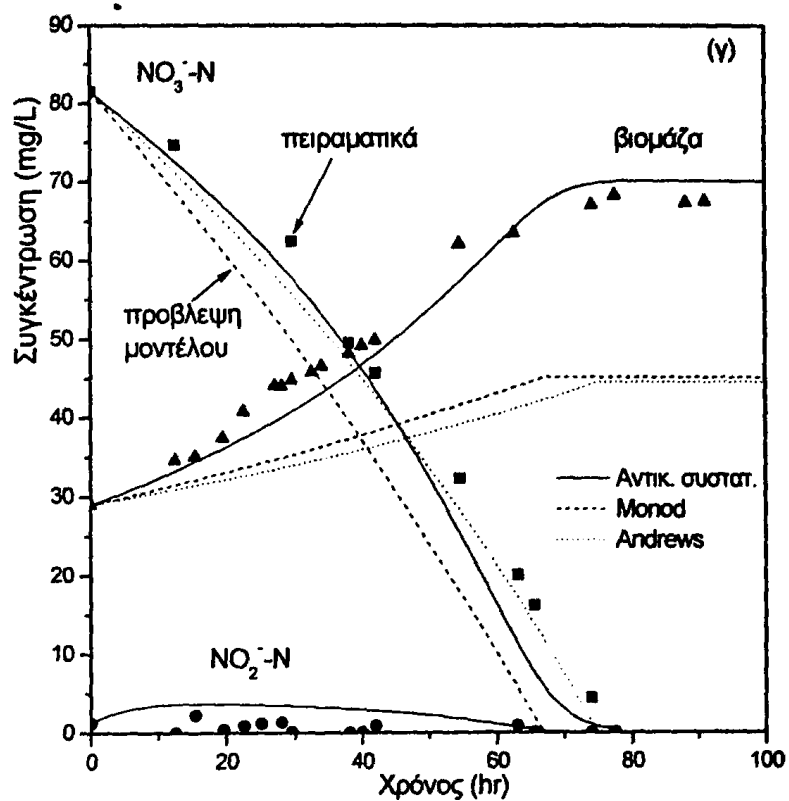
Για την εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου ικανού να περιγράφει την συμπεριφορά της υδρογονοτροφικής καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκαν δύο σει πειραμάτων κινητικής σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Το πρώτο σει χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η επίδραση ενός εκ των περιοριστικών υποστρωμάτων (νιτρικά) στη συμπεριφορά της καλλιέργειας και για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων του μοντέλου. Το δεύτερο σει χρησιμοποιήθηκε για την πιστοποίηση του μοντέλου. Όλα τα πειράματα εμβολιάστηκαν με μικτή καλλιέργεια απονιτροποιητικών βακτηρίων από τον αντιδραστήρα του πειράματος άντλησης-πλήρωσης (Σχήμα 3.1), αφού πρώτα το σύστημα απέκτησε σταθερή συμπεριφορά.

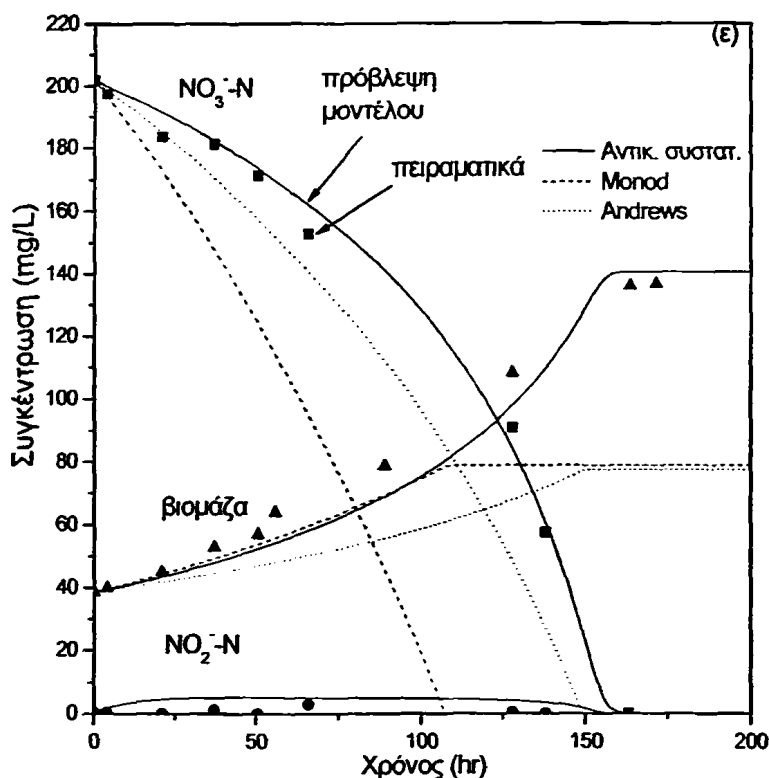
3.3.1. Υπολογισμός κινητικών παραμέτρων

Στο πρώτο σετ, που περιελάμβανε πέντε πειράματα (Σχήμα 3.3), στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της παρουσίας διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων νιτρικού αζώτου στην απόδοση/συμπεριφορά της βιομάζας και στο ρυθμό απονιτροποίησης. Για τα πέντε αυτά πειράματα κινητικής χρησιμοποιήθηκε εμβόλιο τέτοιο ώστε η αρχική συγκέντρωση βιομάζας στους αντιδραστήρες να είναι να είναι περίπου ίδια. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η πιθανότητα, οι αλλαγές στη συμπεριφορά της καλλιέργειας να οφείλονται σε κάτι άλλο από την συγκέντρωση του περιοριστικού υποστρώματος των νιτρικών ιόντων. Η αρχική συγκέντρωση $\text{NO}_3^- \text{-N}$ και της βιομάζας για κάθε ένα πείραμα κινητικής ήταν $31 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$, $27.5 \text{ mgβιομάζας/L}$ (Σχήμα 3.3α), $42.96 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$, $34.48 \text{ mgβιομάζας/L}$ (Σχήμα 3.3β), $81.46 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$, 29 mgβιομάζας/L (Σχήμα 3.3γ), $165.14 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$, $34.87 \text{ mgβιομάζας/L}$ (Σχήμα 3.3δ) και $201.7 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$, $38.6 \text{ mgβιομάζας/L}$ (Σχήμα 3.3ε). Τα σύμβολα στο Σχήμα 3.3 αντιπροσωπεύουν τα πειραματικά δεδομένα. Οι καμπύλες στο Σχήμα 3.3 αντιπροσωπεύουν τις προβλέψεις τριών διαφορετικών μοντέλων τα οποία εφαρμόστηκαν για την προσομοίωση της διαδικασίας της απονιτροποίησης.









Σχήμα 3.3. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους- αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου όπως προέκυψαν από τα πειράματα κινητικής. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του NO_3^- -N ήταν: α) 31 mg NO_3^- -N/L, β) 42.96 mg NO_3^- -N/L, γ) 81.46 mg NO_3^- -N/L, δ) 165.14 mg NO_3^- -N/L, ε) 201.7 mg NO_3^- -N/L.

Πρέπει να σημειωθεί ότι καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων και για όλα τα πειράματα κινητικής, οι συγκεντρώσεις του NO_2^- -N παρέμειναν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Για το λόγο αυτό, υποτέθηκε, εξαιτίας του ότι τα νιτρώδη μετατρέπονται πολύ γρήγορα σε αέριο άζωτο, ότι αυτό το ενδιάμεσο στάδιο της απονιτροποίησης θα έπρεπε να παραβλεφθεί από το μοντέλο που περιγράφει αυτή τη διαδικασία. Με βάση την υπόθεση αυτή, η οξείδωση του υδρογόνου από τα βακτήρια περιορίζεται μόνο από τα νιτρικά ιόντα. Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα νιτρικά σαν περιοριστικό υπόστρωμα) υπολογίστηκε ότι ήταν 0.0066 1/h (Σχήμα 3.4α) χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Dikshitulu et al. (1993). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή κατασκευάστηκαν ημιλογαριθμικά διαγράμματα της συγκέντρωσης της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για κάθε πείραμα κινητικής. Τα πειραματικά σημεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν για ένα χρονικό διάστημα 40 ωρών

για κάθε πείραμα κινητικής. Τα διαγράμματα έδειξαν ότι πριν την εξάντληση (μηδενισμό) των νιτρικών τα λογαριθμικά υπολογισμένα σημεία της βιομάζας σχημάτιζαν ευθεία γραμμή (Σχήμα 3.4β).

Από την κλίση της ευθείας αυτής υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της βιομάζας για κάθε μία από τις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών. Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης παρατηρήθηκε για την αρχική συγκέντρωση των 40 mg/L.

Το επόμενο βήμα ήταν η εφαρμογή /επιλογή του κατάλληλου μαθηματικού μοντέλου που να περιγράφει επαρκώς την πιο πάνω αναφερόμενη διαδικασία. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκαν οι κινητικές εκφράσεις των Monod και Andrews, με βάση τις οποίες τα ισοζύγια μάζας για τη βιομάζα δίνονται από τις σχέσεις:

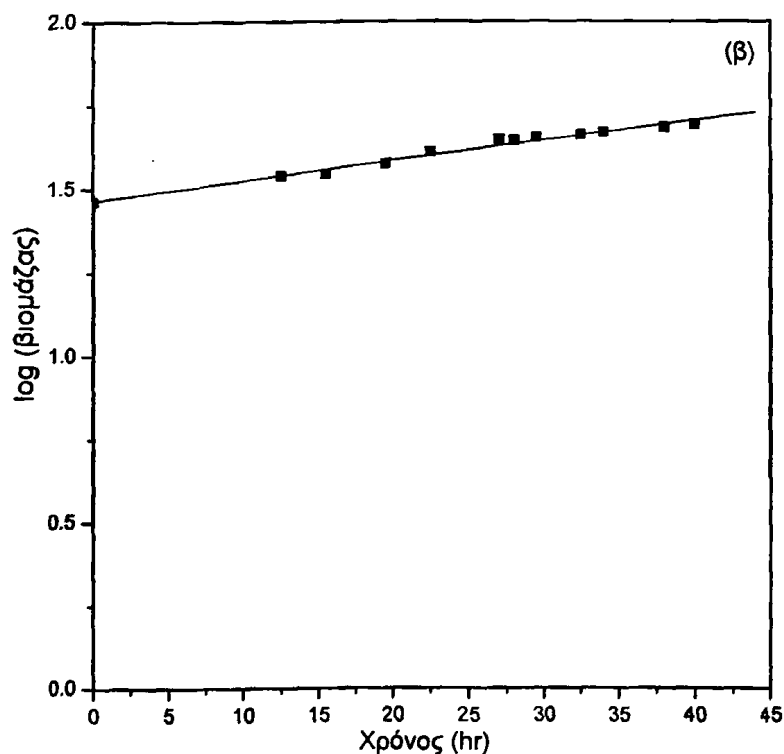
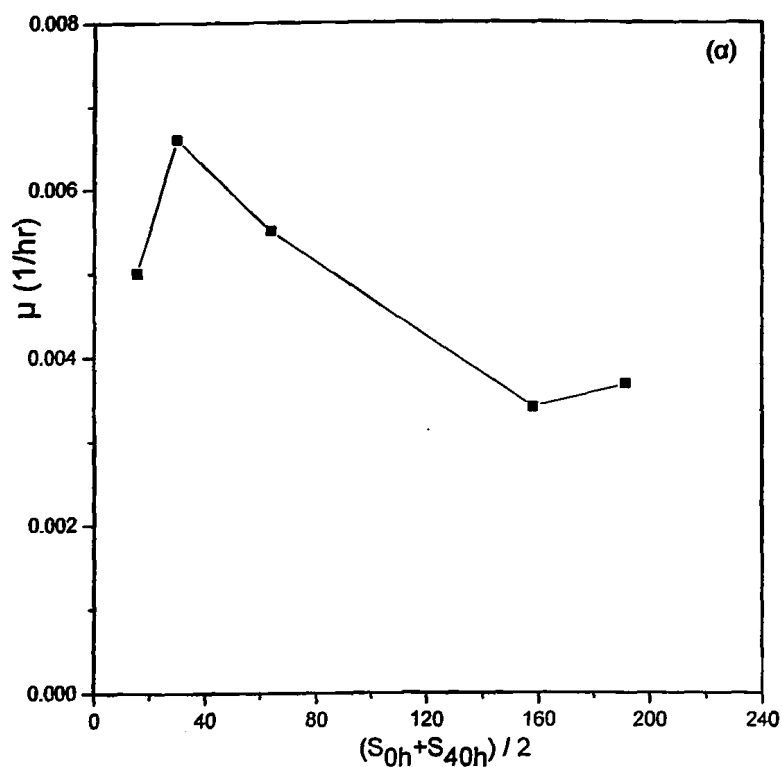
$$\frac{dX}{dt} = \frac{r_{\max} N_1}{K_s + N_1} X - k_d X \quad (\text{κινητική τύπου Monod}) \quad (3.1)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{r_{\max} N_1}{K_s + N_1 + (N_1^2 / K_i)} X - k_d X \quad (\text{κινητική τύπου Andrews}) \quad (3.2)$$

όπου N_1 είναι η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου (mg/L), X η συγκέντρωση της βιομάζας (mg/L), $r_{\max}$ ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης για τα νιτρικά (1/h), K_s η σταθερά κορεσμού για τα νιτρικά (mg/L), K_i η σταθερά παρεμπόδισης για τα νιτρικά (mg/L) και k_d είναι η σταθερά του ρυθμού θνησιμότητας (1/h).

Για τον προσδιορισμό των τιμών των κινητικών παραμέτρων και δεδομένου ότι η τιμή του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης προσδιορίστηκε από τα πειραματικά δεδομένα, όλες οι άλλες κινητικές παράμετροι εκτιμήθηκαν από την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων. Τα πειραματικά δεδομένα των πέντε πειραμάτων κινητικής χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού τιμών των κινητικών παραμέτρων για τα δύο παραπάνω μοντέλα. Η εύρεση του καταλληλότερου συνδυασμού τιμών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Aquasim (έκδοση 2.1d). Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων φαίνονται στον Πίνακα 3.1.





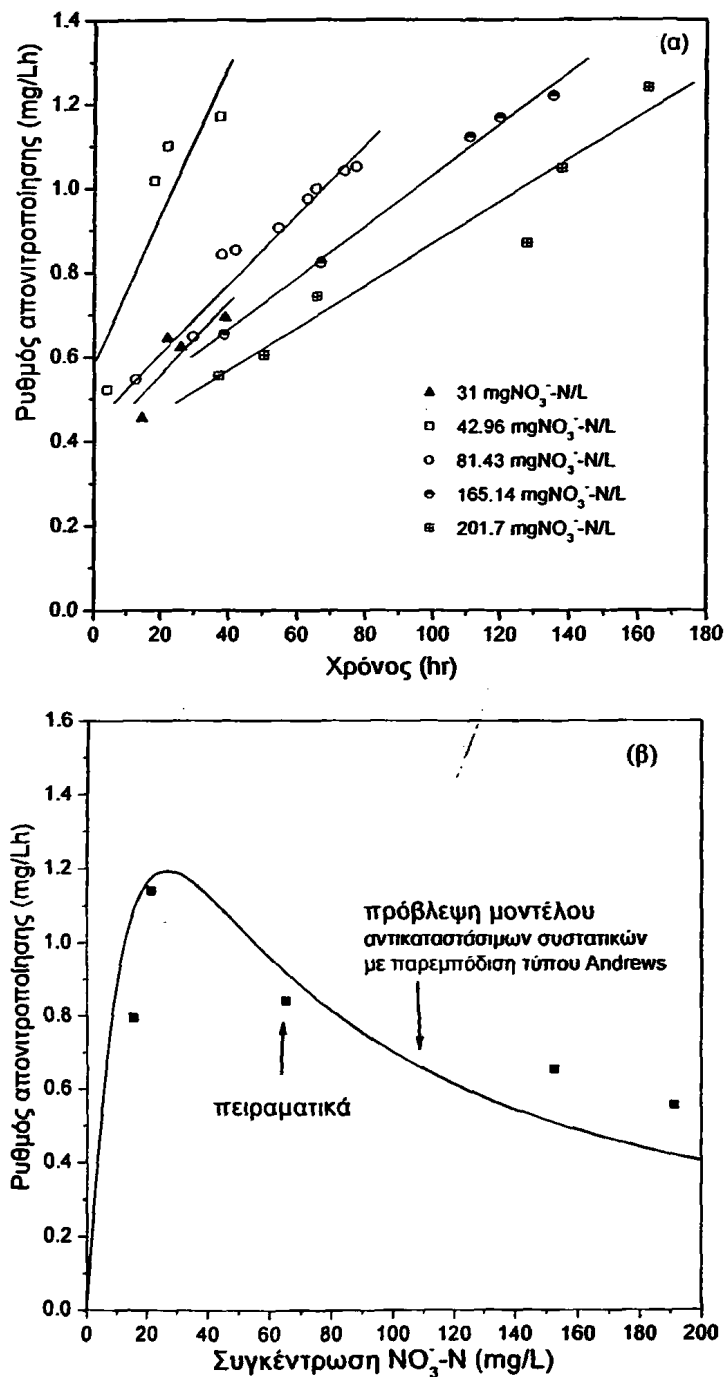
Σχήμα 3.4. α) Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης για τα πειράματα κινητικής με τις διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις από 30 έως 200 mg/L και β) ημιλογαριθμικό διάγραμμα της συγκέντρωσης της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου για το πείραμα κινητικής των 80 mgNO₃⁻-N/L.

Στο Σχήμα 3.3 φαίνονται οι προβλέψεις της κινητικής έκφρασης Monod (διακεκομμένες καμπύλες) και της κινητικής έκφρασης Andrews (στιγμένες καμπύλες). Η έκφραση Monod αστοχεί στο να προβλέψει την ανάπτυξη βιομάζας και στα πέντε πειράματα κινητικής, ενώ για μεγάλες συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου ($> 40 \text{ mg/L}$) δεν μπορεί να προβλέψει ούτε το ρυθμό απομάκρυνσης των νιτρικών. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση του Andrews προβλέπει με αρκετή ακρίβεια την παρεμποδιστική δράση που προκαλούν οι υψηλές συγκεντρώσεις του νιτρικού αζώτου στο ρυθμό μείωσής του, αλλά αποτυγχάνει να προβλέψει την ανάπτυξη της βιομάζας.

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε η παρεμπόδιση της βακτηριακής ανάπτυξης και του ρυθμού απονιτροποίησης για συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου υψηλότερες των 40 mg/L , ενώ η υπόθεση ότι τα νιτρώδη δεν επηρεάζουν την όλη διαδικασία φαίνεται να είναι αναληθής. Η πολύ γρήγορη κατανάλωση των νιτρωδών έχει σαν αποτέλεσμα την πολύ μικρή συγκέντρωση νιτρωδών στο διάλυμα, αλλά την ίδια στιγμή φαίνεται να επηρεάζει δραστικά την ανάπτυξη βιομάζας. Έτσι, για την προσομοίωση της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης χρησιμοποιήθηκε το μαθηματικό μοντέλο των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση τύπου Andrews από τα νιτρικά. Η παρεμποδιστική δράση των νιτρικών αποδείχτηκε και πειραματικά τόσο όσο αναφορά στο ρυθμό ανάπτυξης της βιομάζας (Σχήμα 3.4α), όσο και στο ρυθμό απονιτροποίησης (Σχήμα 3.5). Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των νιτρικών γίνεται παρεμποδιστική μετά τη συγκέντρωση των 40 mg/L .

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.5(α), η κλίση της ευθείας που περιγράφει την χρονική εξέλιξη του ρυθμού κατά τη διάρκεια του κάθε πειράματος μειώνεται καθώς η συγκέντρωση του νιτρικού αζώτου αυξάνεται από τα 40 στα 80 , στα 160 και τέλος στα 200 mg/L .





Σχήμα 3.5. α) Ρυθμοί απονιτροποίησης κατά τη χρονική διάρκεια των πειραμάτων κινητικής και β) ρυθμοί απονιτροποίησης όπως υπολογίστηκαν για το χρονικό διάστημα των πρώτων 40 ωρών των πειραμάτων κινητικής όπου η παρεμπόδιση είναι πιο έντονη.

Το μαθηματικό μοντέλο των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση τύπου Andrews από τα νιτρικά, επιλέχθηκε για την περιγραφή της εξάρτησης του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης από τις συγκεντρώσεις δύο αντικαταστάσιμων συστατικών (νιτρικά, νιτρώδη) που καταναλώνονται ταυτόχρονα (Παύλου, 2000). Θεωρώντας την απονιτροποίηση σαν μια διαδικασία δύο σταδίων, με τη διαδοχική αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και έπειτα σε αέριο άζωτο χωρίς συσσώρευση ενδιάμεσων αέριων προϊόντων, η κινητική ανάπτυξης των βακτηρίων σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, είναι αντικείμενο περιορισμού από δύο υποστρώματα, τα νιτρικά και τα νιτρώδη, με παρεμπόδιση από τα νιτρικά. Τα ισοζύγια μάζας για έναν αντιδραστήρα διαλείποντος έργου είναι τα εξής:

Βιομάζα

$$\frac{dX}{dt} = \frac{r_{\max 1} N_1}{K_s + N_1 + k_{d2} N_2 + (N_1^2 / K_i)} X + \frac{r_{\max 2} N_2}{K_n + N_2 + k_{d1} N_1} X - k_d X \quad (3.3)$$

Νιτρικά

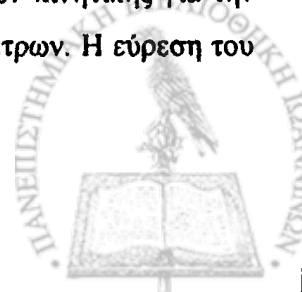
$$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{1}{Y_s} X \frac{r_{\max 1} N_1}{K_s + N_1 + k_{d2} N_2 + (N_1^2 / K_i)} \quad (3.4)$$

Νιτρώδη

$$\frac{dN_2}{dt} = -\frac{1}{Y_n} X \frac{r_{\max 2} N_2}{K_n + N_2 + k_{d1} N_1} + \frac{1}{Y_s} X \frac{r_{\max 1} N_1}{K_s + N_1 + k_{d2} N_2 + (N_1^2 / K_i)} \quad (3.5)$$

όπου N_2 είναι η συγκέντρωση του νιτρώδους αζώτου (mg/L), $r_{\max 2}$ είναι ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης για τα νιτρώδη (l/h), K_n είναι η σταθερά κορεσμού για τα νιτρώδη (mg/L), Y_s είναι ο συντελεστής απόδοσης για τα νιτρικά (mg βιομάζας/mgNO₃⁻-N), Y_n είναι ο συντελεστής απόδοσης για τα νιτρώδη (mgβιομάζας/mgNO₂⁻-N), k_{d1} είναι σταθερά συνεισφοράς του N_1 στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των νιτρωδών (mgNO₂⁻-N/mgNO₃⁻-N) και k_{d2} είναι σταθερά συνεισφοράς του N_2 στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των νιτρικών (mgNO₃⁻-N/mgNO₂⁻-N).

Για την προσομοίωση της διαδικασίας της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης, χρησιμοποιήθηκαν τα πειραματικά δεδομένα των πέντε πειραμάτων κινητικής για την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού τιμών των κινητικών παραμέτρων. Η εύρεση του



καταλληλότερου συνδυασμού τιμών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Aquasim (έκδοση 2.1d). Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων φαίνονται στον Πίνακα 3.1.

Η πειραματική και η θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους- αζώτου και της βιομάζας φαίνονται στο Σχήμα 3.3 (συνεχείς καμπύλες, το Αντικ. συστατ. αντιστοιχεί στο μοντέλο των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση Andrews). Στο Σχήμα 3.5(β) φαίνεται η πρόβλεψη του μοντέλου των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση Andrews, της παρεμπόδισης των νιτρικών στο ρυθμό απονιτροποίησης. Η χρήση του μαθηματικού μοντέλου των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση τύπου Andrews από τα νιτρικά είχε ως αποτέλεσμα την πολύ καλή συμφωνία μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των θεωρητικών προβλέψεων του μοντέλου.

Πίνακας 3.1. Τιμές κινητικών παραμέτρων

Παράμετρος	Monod	Andrews	Αντικ. Συστατ. με παρεμπόδιση από τα νιτρικά
$r_{\max 1}$ (1/h)	0.0066	0.0066	0.0485
K_s (mg/L)	0.0001	0.0001	28.63
Y_s (mgβιομάζας/mgNO ₃ ⁻ -N)	0.1975	0.19	0.4207
k_d (1/h)	0.00003	0.00003	0.00003
K_i (mg/L)		263	24.284
$r_{\max 2}$ (1/h)			0.55
K_n (mg/L)			4.79
Y_n (mgβιομάζας/mgNO ₂ ⁻ -N)			0.084
k_{d1} (mgNO ₂ ⁻ -N/mgNO ₃ ⁻ -N)			15.055
k_{d2} (mgNO ₃ ⁻ -N/mgNO ₂ ⁻ -N)			13.18

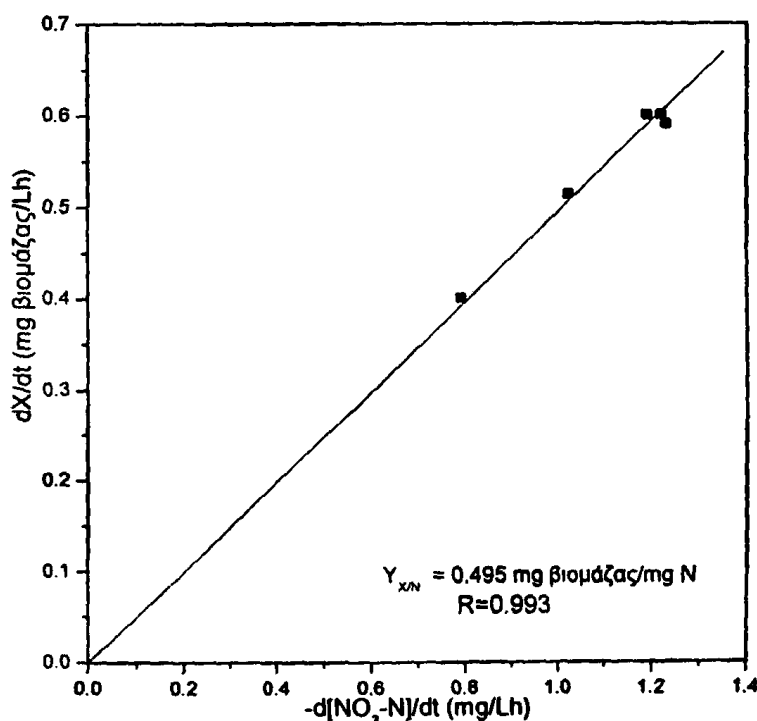
Σημειώνεται ότι ο συντελεστής απόδοσης υπολογίστηκε και πειραματικά εφαρμόζοντας γραμμική παλινδρόμηση στην παρακάτω εξίσωση (Dikshitulu et al., 1993):



$$X - X_0 = Y_{X/N}(N_0 - N) \quad (3.6)$$

όπου X (mg/L) η συγκέντρωση της βιομάζας σε χρόνο t , X_0 (mg/L) η αρχική συγκέντρωση της βιομάζας, N (mg/L) η συγκέντρωση του ολικού αζώτου (νιτρικό και νιτρώδες) σε χρόνο t και N_0 (mg/L) η αρχική συγκέντρωση του ολικού αζώτου (νιτρικό και νιτρώδες).

Η τιμή του συντελεστή απόδοσης $Y_{X/N}$ (mg βιομάζας/mg αζώτου) υπολογίστηκε για κάθε ένα από τα πέντε πειράματα ξεχωριστά και αφορά την παραγωγή βιομάζας ως προς το ολικό άζωτο που απομακρύνεται. Ο μέσος όρος των συντελεστών απόδοσης είναι 0.495 (mg βιομάζας/mg αζώτου) (Σχήμα 3.6). Από την θεωρητική προσομοίωση των πειραμάτων κινητικής προέκυψαν οι συντελεστές απόδοσης για το νιτρικό άζωτο $Y_S = 0.4207$ (mgβιομάζας/mgNO₃⁻-N) και το νιτρώδες άζωτο $Y_n = 0.084$ (mgβιομάζας/mgNO₂⁻-N). Το άθροισμα των δύο συντελεστών είναι 0.5047. Η θεωρητική αυτή τιμή είναι πολύ κοντά στην υπολογισμένη πειραματικά τιμή.



Σχήμα 3.6. Υπολογισμός συντελεστή απόδοσης $Y_{X/N}$ (mg βιομάζας/mg αζώτου).

3.3.2. Πιστοποίηση του μοντέλου

Ένα δεύτερο σετ, που αποτελείται από τρία πειράματα κινητικής, πραγματοποιήθηκε για την πιστοποίηση του μοντέλου. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν εμβόλια

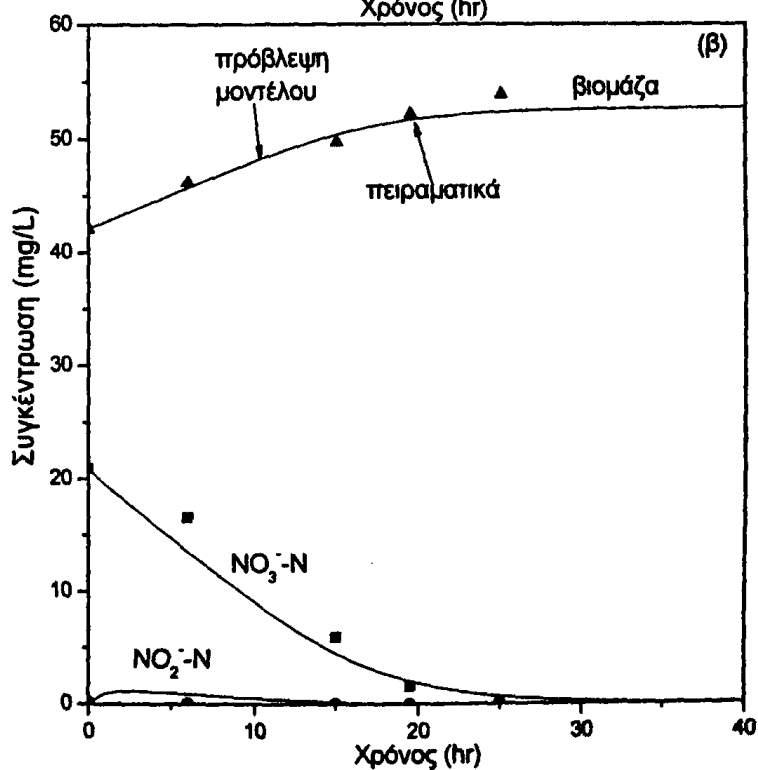
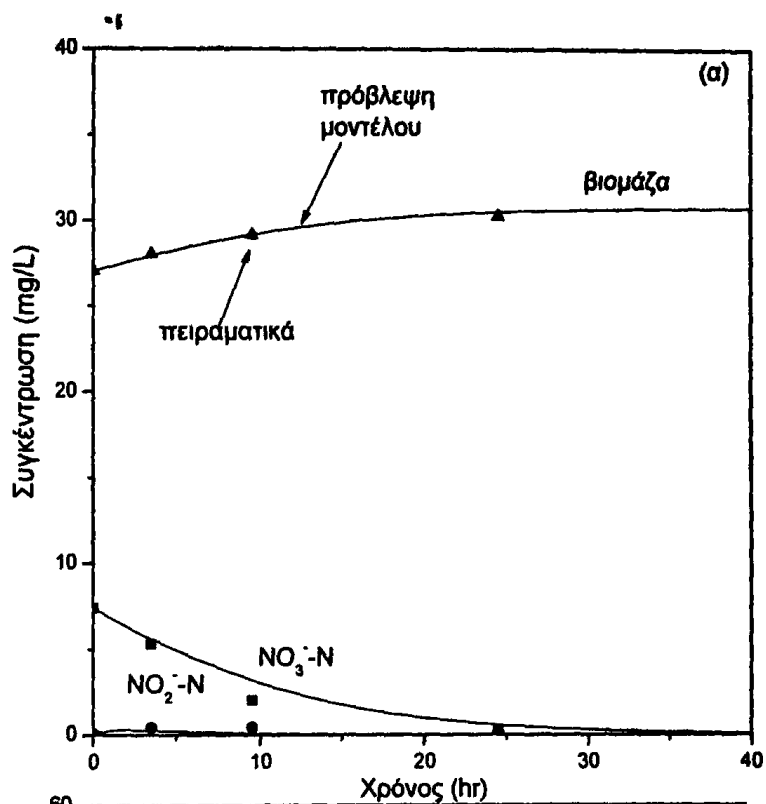


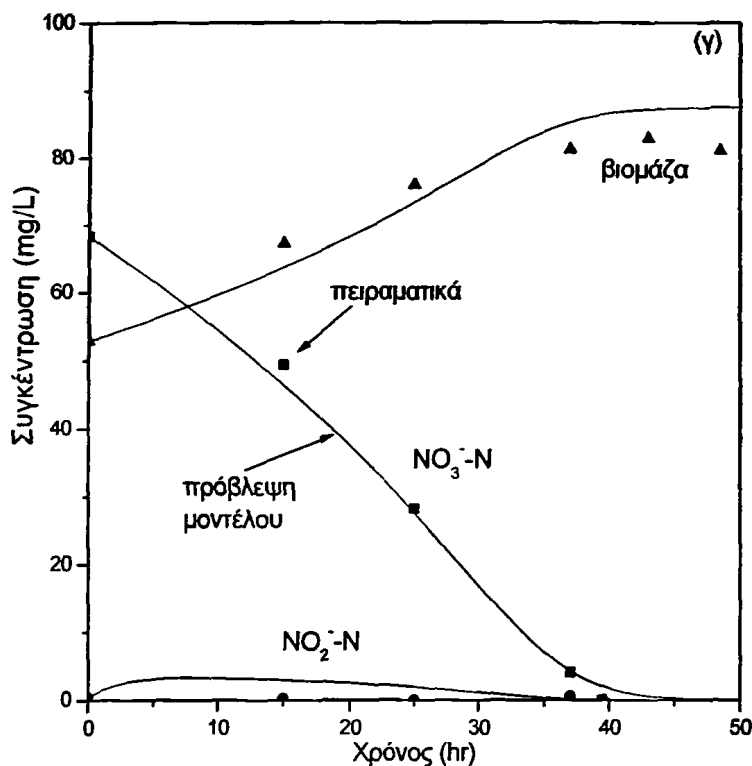
βακτηρίων διαφορετικού όγκου, έτσι ώστε να επιτευχθούν διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις βιομάζας. Η αρχική συγκέντρωση NO_3^- -N και βιομάζας για κάθε ένα πείραμα κινητικής ήταν 7.4 mgNO_3^- -N/L και $27.02 \text{ mgβιομάζας/L}$ (Σχήμα 3.7α), 20.91 mgNO_3^- -N/L και $42.06 \text{ mgβιομάζας/L}$ (Σχήμα 3.7β) και 68.39 mgNO_3^- -N/L και $52.91 \text{ mgβιομάζας/L}$ (Σχήμα 3.7γ).

Η πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους- αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου όπως προέκυψαν από τα πειράματα κινητικής φαίνονται στο Σχήμα 3.7. Παρατηρήθηκε ότι οι προβλέψεις του μοντέλου περιγράφουν πολύ καλά τη συμπεριφορά της μικτής καλλιέργειας υπό τις συνθήκες διαφορετικών αρχικών συγκεντρώσεων του περιοριστικού υποστρώματος των νιτρικών ιόντων. Η συμπεριφορά του συστήματος των υδρογονοτροφικών βακτηρίων όπως προβλέφθηκε από το μοντέλο φαίνεται να βρίσκεται σε συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα (Σχήμα 3.7).

Το μοντέλο αυτό των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση από τα νιτρικά περιλαμβάνει τις παραπάνω πειραματικές παρατηρήσεις, όπως την παρεμπόδιση του ρυθμού απονιτροποίησης σε μεγάλες συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και την καθοριστική επίδραση/συμβολή των νιτρωδών στην ανάπτυξη της βιομάζας. Όλες οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου προσδιορίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα των πειραμάτων κινητικής σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Η εφαρμογή και η ακρίβεια του μοντέλου των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση τύπου Andrews πιστοποιήθηκε συγκρίνοντας τα προφίλ που προβλέφθηκαν από το μοντέλο με τα πειραματικά δεδομένα της ανάπτυξη της βιομάζας, της μείωσης των νιτρικών και των νιτρωδών. Το προτεινόμενο μοντέλο των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση τύπου Andrews είναι απλό και αξιόπιστο και αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για το σχεδιασμό κατάλληλων αντιδραστήρων για την επεξεργασία του ρυπασμένου πόσιμου νερού με παρουσία συγκεντρώσεων από 7 έως 200 mgNO_3^- -N/L.







Σχήμα 3.7. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού-, του νιτρώδους- αζώτου και της βιομάζας συναρτήσει του χρόνου όπως προέκυψαν από τα πειράματα κινητικής. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ και της βιομάζας ήταν: α) 7.4 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$, 27.02 mgβιομάζας/L; β) 20.91 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$, 42.06 mgβιομάζας/L; γ) 68.39 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$, 52.91 mgβιομάζας/L.

3.4. Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται μία πρώτη προσπάθεια κατανόησης της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης και προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Αναπτύχθηκε και απομονώθηκε με ευκολία μικτή καλλιέργεια ικανή για υδρογονοτροφική απονιτροποίηση.
- Μελετήθηκε η απόδοση των υδρογονοτροφικών βακτηρίων σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου και βρέθηκε ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης 0.076 g $\text{NO}_3^- \text{-N/Ld}$ για αρχική συγκέντρωση 80 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$.

- Μελετήθηκε πειραματικά και θεωρητικά η συμπεριφορά της καλλιέργειας για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων νιτρικού αζώτου (7-200 mg/L) σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου.
- Από τα πειραματικά δεδομένα παρατηρήθηκε ότι η υψηλή συγκέντρωση νιτρικού αζώτου, μεγαλύτερη των 40 mg/L, παρεμποδίζει τη διαδικασία της απονιτροποίησης.
- Αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο (αντικαταστάσιμων συστατικών) και υπολογίστηκαν οι κινητικές του παράμετροι χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα.
- Το μοντέλο περιγράφει με μεγάλη ακρίβεια τη συμπεριφορά της υδρογονοτροφικής καλλιέργειας κατά τη διαδικασία της απονιτροποίησης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που αναπτύσσεται μοντέλο το οποίο περιλαμβάνει την ανάπτυξη της βιομάζας στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση και κατά συνέπεια θεωρεί ότι η μείωση των νιτρικών και των νιτρωδών εξαρτάται τόσο από τις συγκεντρώσεις των δύο προαναφερθέντων όσο και από τη συγκέντρωση της βιομάζας. Επίσης, το μοντέλο αντιμετωπίζει τα νιτρικά και νιτρώδη ως δύο αντικαταστάσιμα συστατικά, δηλαδή σαν δύο συστατικά που καλύπτουν ακριβώς την ίδια ανάγκη (δέκτες ηλεκτρονίων) των μικροοργανισμών και καταναλώνονται/χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΚΛΙΝΗΣ



4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΗΣ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΕ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΚΛΙΝΗΣ

4.1. Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η εφαρμογή αντιδραστήρων σταθερής κλίνης εργαστηριακής κλίμακας για την επεξεργασία ρυπασμένου από νιτρικά νερού. Η αρχή της προσκολλημένης ανάπτυξης, επιτρέπει τη διατήρηση πολύ μεγάλων συγκεντρώσεων βιομάζας στους αντιδραστήρες αυτού του τύπου και το χειρισμό υψηλών οργανικών και υδραυλικών φορτίσεων. Η χρήση κατάλληλου πληρωτικού υλικού και κατάλληλης λειτουργίας των συστημάτων αυτών επιτρέπει την επίτευξη μεγάλων ρυθμών απομάκρυνσης ρύπων. Το μέγεθος, το σχήμα και το είδος του υλικού μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργία ενός αντιδραστήρα. Στη μελέτη αυτή επιλέχθηκε πυριτικό χαλίκι ως πληρωτικό υλικό που είναι φθινό και σχετικά αδρανές υλικό.

Στόχος ήταν η μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης. Μελετήθηκε η επίδραση του μεγέθους του πληρωτικού υλικού (χαλίκι) σε πειράματα άντλησης - πλήρωσης, με γνώμονα τη μέγιστη απόδοση του αντιδραστήρα και την αποφυγή λειτουργικών προβλημάτων. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις αντιδραστήρες με διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό ο καθένας. Η μέση διάμετρος των πληρωτικών ήταν 1.75, 2.41 και 4.03 mm. Το επόμενο βήμα ήταν να βρεθεί ο κατάλληλος τρόπος λειτουργίας (συνεχής και λειτουργία άντλησης-πλήρωσης) ενός αντιδραστήρα υπό διάφορες λειτουργικές παραμέτρους (συγκέντρωση NO_3^- -N και ογκομετρική παροχή). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα δύο προηγούμενα βήματα, οδήγησαν στο σχεδιασμό συστήματος αντιδραστήρων σε σειρά με διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό ο κάθε ένας. Τέλος, πραγματοποιήθηκε θεωρητική μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης και προσομοιώθηκε η διαδικασία για κάθε ένα από τα παραπάνω συστήματα.

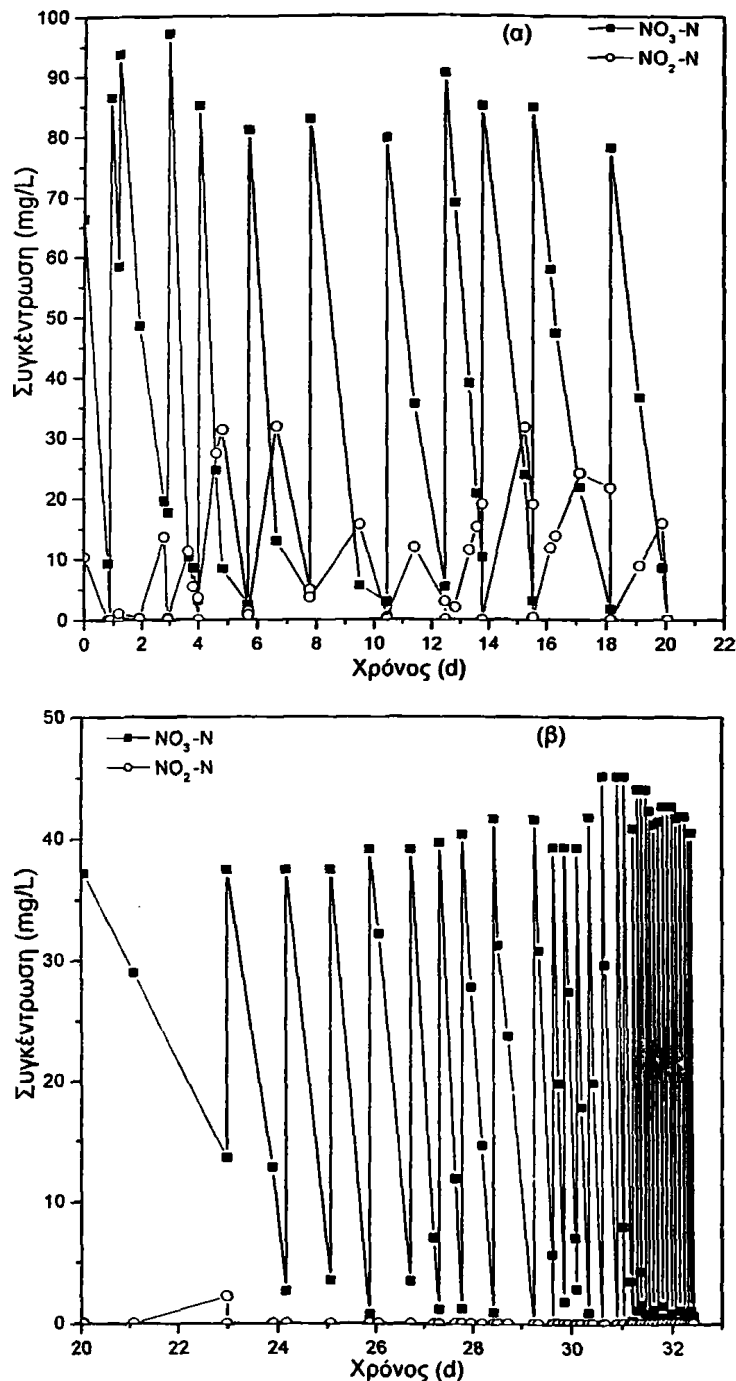
Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν οι πειραματικές διατάξεις που απεικονίζονται στο Σχήμα 2.1(β) και στο Σχήμα 2.1(γ).



4.2. Εγκλιματισμός αντιδραστήρων - ανάπτυξη βιοφίλμ

Για τον εμβολιασμό όλων των αντιδραστήρων σταθερής κλίνης χρησιμοποιήθηκε καλλιέργεια απονιτροποιητικών βακτηρίων από τον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου του πειράματος άντλησης-πλήρωσης, (Σχήμα 3.2). Κατά την περίοδο εγκλιματισμού, διάρκειας 3 μηνών, τα φίλτρα λειτουργούσαν σαν αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (με λειτουργικό όγκο 250 mL) για να εξασφαλιστεί η προσκόλληση των βακτηρίων στο πληρωτικό υλικό και η δημιουργία βιοφίλμ. Ο εγκλιματισμός των βακτηρίων στους αντιδραστήρες πραγματοποιήθηκε σε συγκέντρωση $\text{NO}_3^- \text{-N}$ ~80 mg/L. Κάθε φορά που μειωνόταν η συγκέντρωση του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ σε κάθε αντιδραστήρα, προσθέτονταν 50 mL φρέσκου ρυπασμένου νερού, έτσι ώστε να αυξηθεί η συγκέντρωση και πάλι στα 80 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$. Τα 50 mL του συνθετικά παραγόμενου ρυπασμένου νερού, περιείχαν KNO_3 (2.9 g/L), KH_2PO_4 (17 g/L) και Na_2HPO_4 (17.65 g/L). Κάθε φορά που κρινόταν απαραίτητο, για παράδειγμα όταν σταματούσε η απομάκρυνση των νιτρικών ή όταν παρατηρούνταν πολύ υψηλές συγκεντρώσεις νιτρώδους αζώτου, η καλλιέργεια ανανεωνόταν με την κράτηση 100 mL από την ήδη υπάρχουσα και την προσθήκη 150 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου. Τέλος, μετά από ένα διάστημα διαλείπουσας λειτουργίας 40 ημερών και αφού παρατηρήθηκε οπτικά προσκόλληση των βακτηρίων στο πληρωτικό υλικό του κάθε αντιδραστήρα, άρχισε η αντικατάσταση της καλλιέργειας στους αντιδραστήρες με φρέσκο συνθετικά παραγόμενο ρυπασμένο νερό. Δηλαδή, η καλλιέργεια ανανεωνόταν με την κράτηση 50 mL από την ήδη υπάρχουσα και την προσθήκη 200 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου, στη συνέχεια ανανεωνόταν με την κράτηση 25 mL από την ήδη υπάρχουσα και την προσθήκη 225 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου, ώσπου αντικαταστάθηκε πλήρως.





Σχήμα 4.1. Εγκλιματισμός αντιδραστήρα 3 ($d_3=1.75$ mm). Πειραματική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού- και του νιτρώδους- αζώτου συναρτήσει του χρόνου α) για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mg/L για χρονικό διάστημα 20 ημερών και β) για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 40 mg/L για χρονικό διάστημα από την 20^η έως την 33^η ημέρα.

Στο Σχήμα 4.1(α), φαίνεται η πορεία του εγκλιματισμού του αντιδραστήρα 3 ($d_3=1.75$ mm) για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 80 mg/L, αφού είχε γίνει η αντικατάσταση της καλλιέργειας με φρέσκο ρυπασμένο νερό. Κάθε φορά που μηδενιζόταν η συγκέντρωση των NO_3^- -N στον αντιδραστήρα, απομακρύνονταν τα 250 mL του επεξεργασμένου νερού και προσθέτονταν 250 mL φρέσκου θρεπτικού, με την επιθυμητή κάθε φορά συγκέντρωση νιτρικών. Κατά το χρονικό διάστημα των είκοσι ημερών κατά την τροφοδοσία με συγκέντρωση 80 mg/L παρατηρήθηκαν σημαντικές ποσότητες νιτρωδών (μικρότερες βέβαια σε σχέση με την αρχική λειτουργία του φίλτρου). Το επόμενο βήμα ήταν να μειωθεί η συγκέντρωση του NO_3^- -N στα 40 mg/L (την 20 ημέρα), έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν οι συγκεντρώσεις αυτές των νιτρωδών οφείλονταν στην υψηλή συγκέντρωση των νιτρικών, στο ότι δεν είχαν εγκλιματιστεί ακόμη τα βακτήρια ή στον τρόπο με τον οποίο πραγματοποιεί την απονιτροποίηση η καλλιέργεια.

Στο Σχήμα 4.1(β) φαίνεται η πειραματική μεταβολή της συγκέντρωσης του νιτρικού- και του νιτρώδους- αζώτου συναρτήσει του χρόνου για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 40 mg/L, για το χρονικό διάστημα από την 20^η έως την 33^η ημέρα. Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση των νιτρωδών σταδιακά μειωνόταν παίρνοντας κάποια στιγμή μηδενικές τιμές. Επίσης, ο ρυθμός απονιτροποίησης ήταν αρκετά ικανοποιητικός και ίσος με 0.64 g/Ld. Μετά από τη συγκέντρωση των 40 mg/L εφαρμόστηκε ξανά στο φίλτρο η συγκέντρωση των 80 mg/L και παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των νιτρωδών ήταν και πάλι μηδενικές με έναν ρυθμό απονιτροποίησης 1.4 g/Ld. Με τον τρόπο αυτό απαντάται ο παραπάνω προβληματισμός και καταλήγει κανείς στο ότι οι συγκεντρώσεις των νιτρωδών (Σχήμα 4.1(α)) οφείλονταν στο ότι δεν είχαν εγκλιματιστεί ακόμη τα βακτήρια και ότι η υδρογονοτροφική καλλιέργεια πραγματοποιεί την απονιτροποίηση χωρίς συσσώρευση του ενδιάμεσου προϊόντος των νιτρωδών. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τον εγκλιματισμό, εκτός του αντιδραστήρα 3, και των άλλων δύο αντιδραστήρων (αντιδραστήρας 1, $d_1=4.03$ mm και αντιδραστήρας 2, $d_2=2.41$ mm).

Έπειτα, από την παραπάνω προετοιμασία τα φίλτρα ήταν έτοιμα για την πειραματική και θεωρητική μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης κατά τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης αυτών.



4.3. Πειραματική και θεωρητική μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, σε λειτουργία άντλησης πλήρωσης.

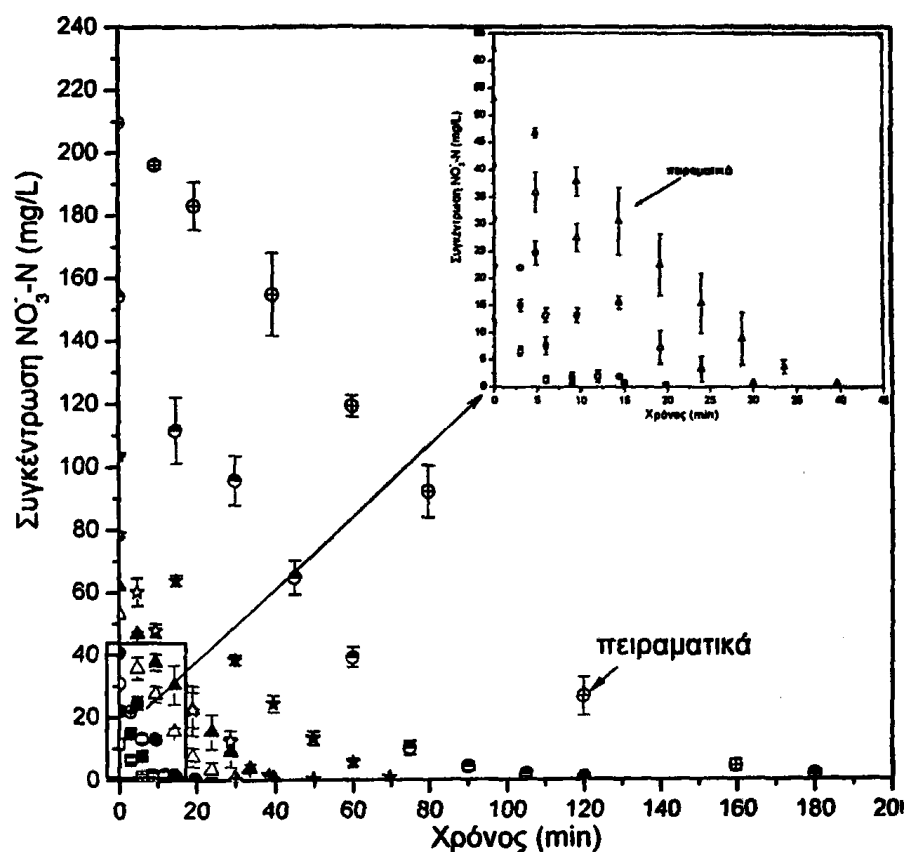
Αφού είχε επιτευχθεί η προσκόλληση της βιομάζας στο πληρωτικό υλικό των αντιδραστήρων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα άντλησης-πλήρωσης. Στόχος ήταν η εύρεση του κατάλληλου μεγέθους πληρωτικού υλικού, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση του φίλτρου χωρίς λειτουργικά προβλήματα. Μελετήθηκε ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης για κάθε ένα από τα τρία διαφορετικά μεγέθη πληρωτικού υλικού που δοκιμάστηκαν, για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων και εφαρμόστηκε μοντέλο ικανό να περιγράψει την υδρογονοτροφική απονιτροποίηση σε αυτή τη λειτουργία.

4.3.1. Λειτουργία άντλησης-πλήρωσης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης με διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό.

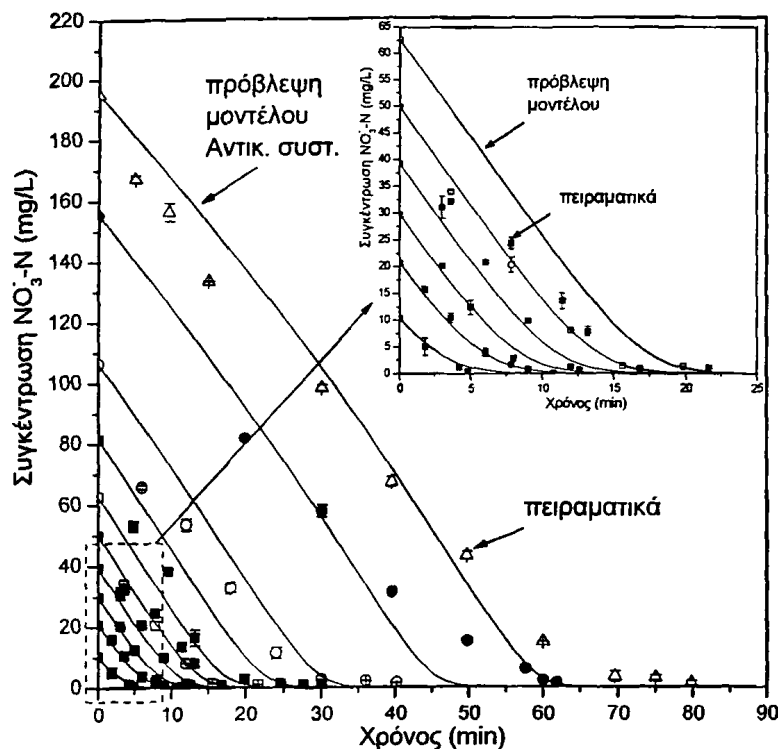
Κατά τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης χρησιμοποιήθηκε διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό (χαλίκι), με τρεις διαφορετικές κοκκομετρίες με μία μέση διάμετρο 1.75, 2.41 και 4.03 mm. Για κάθε ένα από τρία μεγέθη πληρωτικού υλικού μελετήθηκε ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης του αντιδραστήρα σταθερής κλίνης, για ένα εύρος συγκεντρώσεων από 10 έως 200 mgNO₃⁻-N/L (Σχήματα 4.2, 4.3 και 4.4).

Ο λειτουργικός όγκος των αντιδραστήρων ήταν 250 mL. Τα φίλτρα πληρώνονταν με 250 mL ρυπασμένου νερού συγκεντρώσεως από 10 έως 200 mg/L. Κάθε φορά που μηδενιζόταν η συγκέντρωση του NO₃⁻-N στον κάθε αντιδραστήρα, απομακρύνονταν/αντλούνταν τα 250 mL του επεξεργασμένου νερού και προσθέτονταν 250 mL φρέσκου ρυπασμένου νερού, με την επιθυμητή κάθε φορά συγκέντρωση νιτρικών. Η διαδικασία αυτή αποτελούσε έναν λειτουργικό κύκλο. Οι κύκλοι αυτοί επαναλήφθηκαν έως ότου να επιτευχθεί ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης, για κάθε συγκέντρωση νιτρικού αζώτου, για τουλάχιστον τέσσερις λειτουργικούς κύκλους. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων οι συγκεντρώσεις των NO₂⁻-N ήταν μηδενικές. Οι λειτουργικοί κύκλοι που αντιπροσωπεύουν το μέγιστο ρυθμό απονιτροποίησης για κάθε συγκέντρωση νιτρικών για κάθε έναν από τους αντιδραστήρες φαίνονται στο Σχήμα 4.2 για τον αντιδραστήρα 3 (d₃=1.75 mm), στο Σχήμα 4.3 για τον αντιδραστήρα 2 (d₂=2.41 mm) και στο Σχήμα 4.4 για τον αντιδραστήρα 1 (d₁=4.03 mm).





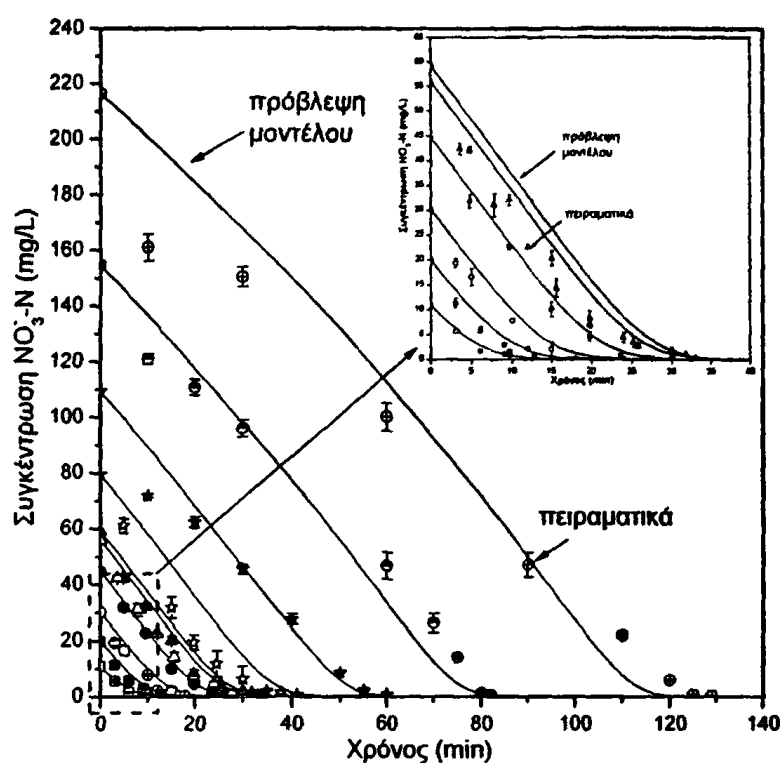
Σήμα 4.2. Πειραματικοί λειτουργικοί κύκλοι όπως προέκυψαν από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης του αντιδραστήρα 3 με χαλίκι μέσης διαμέτρου 1.75 mm, για συγκεντρώσεις $\text{NO}_3\text{-N}$ από 10 έως 200 mg/L.



Σχήμα 4.3. Πειραματικοί και θεωρητικοί λειτουργικοί κύκλοι όπως προέκυψαν από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης του αντιδραστήρα 2 με χαλίκι μέσης διαμέτρου 2.41 mm, για συγκεντρώσεις NO_3^- -N από 10 έως 200 mg/L.

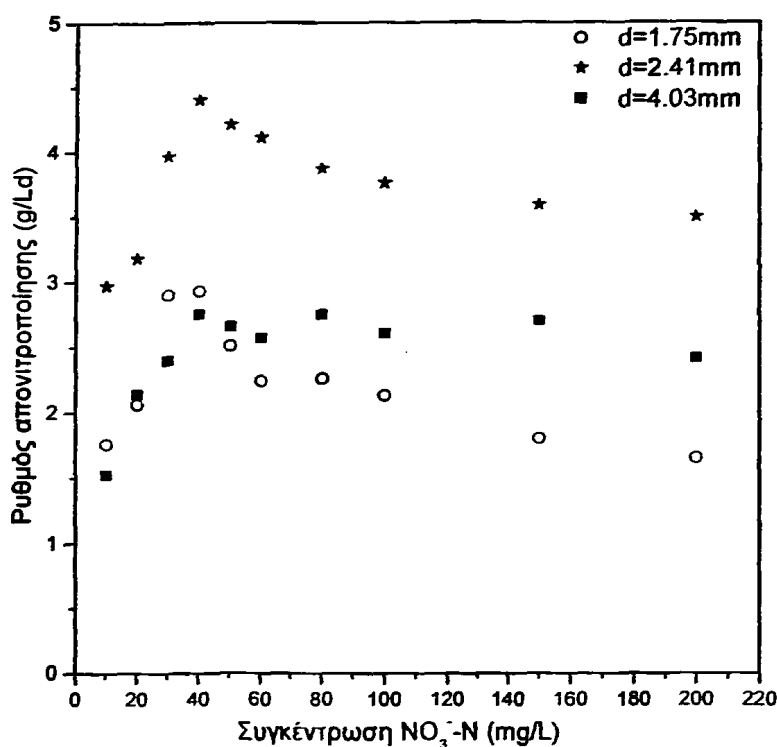
Από την επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων της λειτουργίας των τριών φίλτρων με τη διαφορετική κοκκομετρία πληρωτικού υλικού, προέκυψαν οι εξής παρατηρήσεις:

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.5 ο ρυθμός απονιτροποίησης μειωνόταν καθώς αυξανόταν η συγκέντρωση των νιτρικών πέρα από τη συγκέντρωση των 40 mgNO_3^- -N/L, εξαιτίας της ανασταλτικής επίδρασης των νιτρικών (Vasiliadou et al., 2006a). Παρατηρήθηκε επίσης ότι οι ρυθμοί απονιτροποίησης (Σχήμα 4.5) του αντιδραστήρα 3 ήταν μικρότεροι από αυτούς του αντιδραστήρα 2, κάτι που δεν ήταν αναμενόμενο λόγω της μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας στον αντιδραστήρα 3. Το φαινόμενο αυτό προφανώς οφείλεται στο φράξιμο των πόρων του αντιδραστήρα 3 ($d=1.75$ mm) από τη βιομάζα, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται λειτουργικά προβλήματα (μη καλή κυκλοφορία αερίων) και να μην έχει το φίλτρο τη μέγιστη απόδοση που θα αναμενόταν να έχει.



Σχήμα 4.4. Πειραματικοί και θεωρητικοί λειτουργικοί κύκλοι όπως προέκυψαν από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης του αντιδραστήρα 1 με χαλίκι μέσης διαμέτρου 4.03 mm, για συγκεντρώσεις NO_3^- -N από 10 έως 200 mg/L.

Μια σύγκριση της απόδοσης των αντιδραστήρων 1 και 2, δείχνει καθαρά τη μείωση της διάρκειας των λειτουργικών κύκλων χρησιμοποιώντας τον αντιδραστήρα 2, για την απομάκρυνση ίδιων αρχικών συγκεντρώσεων νιτρικού αζώτου. Για παράδειγμα σχεδόν 40 λεπτά χρειαζόταν για την αποδόμηση των 80 mgNO_3^- -N/L στον αντιδραστήρα 1 (Σχήμα 4.4), με χαλίκι διαμέτρου 4.03 mm, ενώ για την ίδια συγκέντρωση νιτρικών στον αντιδραστήρα 2 (Σχήμα 4.3), με χαλίκι διαμέτρου 2.41 mm, ο χρόνος αυτός μειωνόταν μόλις στα 30 λεπτά της ώρας. Ο αντιδραστήρας 2, παρουσίασε μεγαλύτερους ρυθμούς απονιτροποίησης, σε σχέση με τον αντιδραστήρα 1. Συγκεκριμένα, για αρχική συγκέντρωση 40 mg/L στον αντιδραστήρα 2, ο ρυθμός απονιτροποίησης ήταν 4.4 gNO_3^- -N/Ld, ενώ στον αντιδραστήρα 1, ο ρυθμός ήταν 2.7 gNO_3^- -N/Ld (Πίνακας 4.1.). Αυτό οφείλεται στη μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια που προσφέρεται για την προσκόλληση της βιομάζας από το μικρότερο χαλίκι στον αντιδραστήρα 2 και τελικά στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της βιομάζας στον αντιδραστήρα.



Σήμα 4.5. Ρυθμοί απονιτροποίησης σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου όπως προέκυψαν από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των αντιδραστήρων 1 ($d_1=4.03\text{mm}$), 2 ($d_2=2.41\text{mm}$) και 3 ($d_3=1.75\text{mm}$) για συγκεντρώσεις $\text{NO}_3^- \text{-N}$ από 10 έως 200 mg/L.

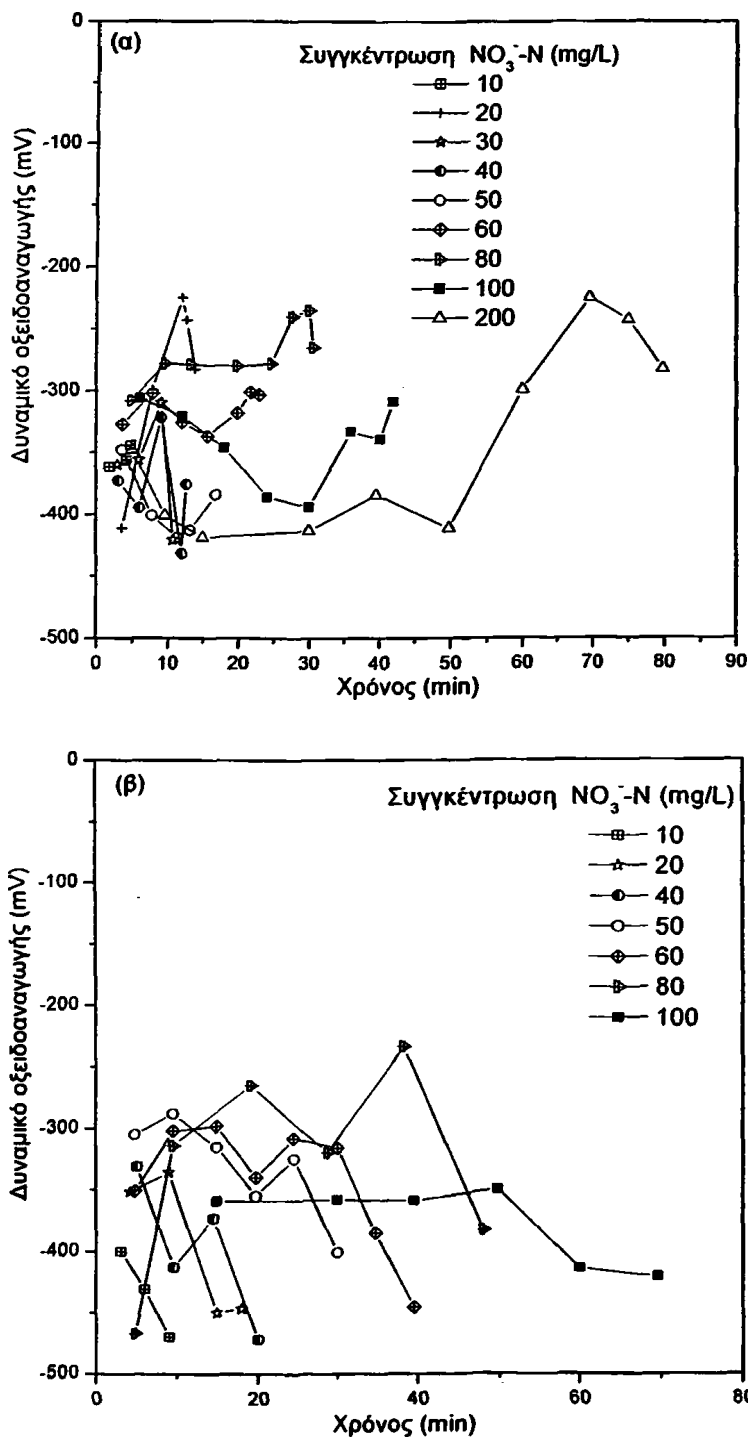
Επίσης, παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός απονιτροποίησης στους αντιδραστήρες σταθερής κλίνης ήταν πολύ μεγαλύτερος από τον διαλείποντος έργου αιωρούμενης ανάπτυξης (Κεφάλαιο 3, Σχήμα 3.1) για την ίδια αρχική συγκέντρωση $\text{NO}_3^- \text{-N}$ (80 mg/L) (Πίνακας 4.1), εξαιτίας της διατήρησης πολύ μεγαλύτερων συγκεντρώσεων βιομάζας που αναπτύσσονται στο πληρωτικό υλικό.

Πίνακας 4.1. Ρυθμοί απονιτροποίησης για τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των φίλτρων, για ένα εύρος συγκεντρώσεων NO_3^- -N από 10 έως 200 mg/L.

Συγκέντρωση NO_3^- -N (mg/L)	Αντιδραστήρας 3 (d=1.75 mm)	Αντιδραστήρας 2 (d=2.41 mm)	Αντιδραστήρας 1 (d=4.03 mm)	Αντιδραστήρας αιωρούμενης ανάπτυξης
	Ρυθμός απονιτροποίησης g/Ld	Ρυθμός απονιτροποίησης g/Ld	Ρυθμός απονιτροποίησης g/Ld	Ρυθμός απονιτροποίησης g/Ld
10	1.76	2.973	1.526	
20	2.06	3.183	2.14	
30	2.9	3.967	2.4	
40	2.93	4.4	2.75	
50	2.51	4.209	2.655	
60	2.24	4.11	2.568	
80	2.26	3.872	2.75	0.076
100	2.13	3.762	2.605	
150	1.8	3.59	2.7	
200	1.65	3.496	2.412	

Σημειώνεται ότι οι μετρήσεις που έγιναν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του διαλυμένου υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα έδειξαν ότι ακόμα και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση νιτρικού αζώτου (200 mg/L), τα αέρια ήταν σε περίσσεια κάθε χρονική στιγμή στους αντιδραστήρες. Η συγκέντρωση του διαλυμένου υδρογόνου παρέμεινε στο 1 mg/L, ενώ του διοξειδίου του άνθρακα στο 1.3-1.5 g/L.

Τέλος, πριν κλείσει η ενότητα αυτή πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια των πειραμάτων το δυναμικό οξειδοαναγωγής κυμαινόταν από -250 έως -450 (Σχήμα 4.6). Οι τιμές αυτές του δυναμικού οφείλονται στην προσθήκη του υδρογόνου που δημιουργεί ένα αναγωγικό περιβάλλον μειώνοντας το δυναμικό οξειδοαναγωγής.



Σχήμα 4.6. Δυναμικό οξειδοαναγωγής σε σχέση με το χρόνο όπως προέκυψε από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης α) του αντιδραστήρα 2 και β) του αντιδραστήρα 3 για διάφορες συγκεντρώσεις $\text{NO}_3^- \text{-N}$.

4.3.2. Εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου για την προσομοίωση της λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης.

Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης βασίστηκε στο μοντέλο που αναπτύχθηκε από τους Wanner and Reichert (1996). Το μοντέλο αυτό διακρίνει τα δύο διαδοχικά βήματα της αναγωγής των νιτρικών σε νιτρώδη και των νιτρωδών στη συνέχεια σε αέριο άζωτο. Το μοντέλο μπορεί να προβλέπει τις κατανομές των συγκεντρώσεων των νιτρικών και των νιτρωδών και το πάχος του βιοφίλμ, καθώς και τις κατανομές των συγκεντρώσεων κατά βάθος του βιολογικού στρώματος (βιοφίλμ).

Για την εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου ικανού να προβλέπει τη λειτουργία των φίλτρων, θεωρήθηκε ότι στα φίλτρα επικρατούν ομοιογενείς συνθήκες, δεδομένου ότι τα αέρια που χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία, εξασφαλίζουν την πλήρη ανάμιξη του υγρού όγκο του αντιδραστήρα. Η μεταβολή των συγκεντρώσεων των νιτρικών και νιτρωδών μέσα στο βιοφίλμ περιγράφεται από τις ακόλουθες εξισώσεις διάχυσης:

$$-D_{NO_3} \phi \frac{\partial^2 C_{NO_3}}{\partial z^2} + \phi \frac{\partial C_{NO_3}}{\partial t} + \frac{1}{Y_s} \mu(C_{NO_3}) X = 0 \quad (4.1)$$

$$-D_{NO_2} \phi \frac{\partial^2 C_{NO_2}}{\partial z^2} + \phi \frac{\partial C_{NO_2}}{\partial t} + \frac{1}{Y_n} \mu(C_{NO_2}) X - \frac{1}{Y_s} \mu(C_{NO_3}) X = 0 \quad (4.2)$$

όπου C_{NO_3} είναι η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου (mg/cm^3), C_{NO_2} είναι η συγκέντρωση νιτρώδους αζώτου (mg/cm^3), X είναι η πυκνότητα της βιομάζας (mg/cm^3), ϕ το πορώδες του βιοφίλμ, D ο συντελεστής διάχυσης (cm^2/h), Y_s είναι ο συντελεστής απόδοσης των νιτρικών ($\text{mgβιομάζας}/\text{mgNO}_3^- \text{-N}$), Y_n είναι ο συντελεστής απόδοσης των νιτρωδών ($\text{mgβιομάζας}/\text{mgNO}_2^- \text{-N}$).

Οι εξισώσεις (4.1) και (4.2) προκύπτουν λαμβάνοντας υπόψη τις διαδικασίες της διάχυσης των νιτρικών και νιτρωδών και της κατανάλωσης ή /και της παραγωγής μέσα στο βιοφίλμ.

Για την προσομοίωση της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το μαθηματικό μοντέλο των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση από τα νιτρικά. Οι κινητικές εκφράσεις του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των νιτρικών και των νιτρωδών είναι:



$$\mu(C_{NO_3}) = \frac{r_{\max 1} C_{NO_3}}{K_s + C_{NO_3} + k_{d2} C_{NO_2} + \frac{C_{NO_3}^2}{K_i}} \quad (4.3)$$

$$\mu(C_{NO_2}) = \frac{r_{\max 2} C_{NO_2}}{K_n + C_{NO_2} + k_{d1} C_{NO_3}} \quad (4.4)$$

όπου $r_{\max 1}$ και $r_{\max 2}$ (1/h) είναι οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης στα νιτρικά και στα νιτρώδη, αντίστοιχα, K_s και K_n (mg/cm³) είναι η σταθερά κορεσμού για τα νιτρικά και τα νιτρώδη, αντίστοιχα, K_i (mg/cm³) είναι η σταθερά παρεμπόδισης των νιτρικών, k_{d1} είναι σταθερά του μοντέλου στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των νιτρωδών (mgNO₂⁻-N/mgNO₃⁻-N) και k_{d2} είναι σταθερά του μοντέλου στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των νιτρικών (mgNO₃⁻-N/mgNO₂⁻-N).

Τα ισοζύγια μάζας για τα νιτρικά και τα νιτρώδη στο υγρό ρεύμα για τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης, δίνονται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\varepsilon \frac{dC_{NO_3 B}}{dt} = -A_s (1 - \varepsilon) D_{NO_3} \phi \frac{\partial C_{NO_3}}{\partial z} \Big|_{z=L} - A_s (1 - \varepsilon) u_L \phi C_{NO_3} \quad (4.5)$$

$$\varepsilon \frac{dC_{NO_2 B}}{dt} = -A_s (1 - \varepsilon) D_{NO_2} \phi \frac{\partial C_{NO_2}}{\partial z} \Big|_{z=L} - A_s (1 - \varepsilon) u_L \phi C_{NO_2} \quad (4.6)$$

όπου ε είναι το πορώδες του αντιδραστήρα, $C_{NO_3 B}$ και $C_{NO_2 B}$ είναι οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων στο υγρό ρεύμα (mg/cm³), ϕ το πορώδες του βιοφίλμ, A_s είναι η ειδική επιφάνεια του πληρωτικού υλικού (cm²/cm³) και L είναι το πάχος (cm) του βιοφίλμ. Οι όροι στη δεξιά πλευρά των εξισώσεων (4.5) - (4.6) αντιπροσωπεύουν τη διάχυση των νιτρικών και των νιτρωδών, αντίστοιχα, από το υγρό ρεύμα στο βιοφίλμ.

Η ταχύτητα ανάπτυξης u_f (cm/h) του βιοφίλμ δίνεται από τη σχέση:

$$u_f = \int_0^L \frac{\mu(C_{NO_3})X + \mu(C_{NO_2})X - k_d X}{(1 - \phi)\rho_c} dz \quad (4.7)$$

Η ταχύτητα μετακίνησης της εξωτερικής επιφάνειας του βιοφίλμ u_L (cm/h) δίνεται από τη σχέση:

$$u_L = u_f - u_{det} \quad (4.8)$$

Όταν στο υγρό ρεύμα του βιοφίλμ δεν υπάρχει αιωρούμενη βιομάζα τότε

$$\phi = 1 - \frac{X}{\rho_c} \quad (4.9)$$

όπου ρ_c (mg/cm³) είναι η πυκνότητα κυττάρων.

Θεωρώντας ότι πραγματοποιείται αποκόλληση από την επιφάνεια του βιοφίλμ, η ταχύτητα αποκόλλησης u_{det} (cm/h) δίνεται από τη σχέση:

$$u_{det} = \frac{r_{det}}{(1-\phi)\rho_c} \quad (4.10)$$

όπου r_{det} ρυθμός αποκόλλησης βιομάζας από την επιφάνεια του βιοφίλμ (mg/cm²h):

$$r_{det} = K_{det} \cdot X \quad (4.11)$$

όπου K_{det} συντελεστής αποκόλλησης (cm/h).

Υποθέτοντας ότι το πάχος του βιοφίλμ αυξάνεται λόγω της βακτηριακής ανάπτυξης και μειώνεται με κινητική πρώτης τάξης λόγω της βακτηριακής αποσύνθεσης ή λόγω της αποκόλλησης της βιομάζας από την επιφάνεια του βιοφίλμ, η μεταβολή του πάχους του βιοφίλμ δίνεται από την εξίσωση:

$$\frac{dL}{dt} = \int_0^L \frac{(\mu(C_{NO_3})X + \mu(C_{NO_2})X - k_d X)}{(1-\phi)\rho_c} dz - \frac{K_{det}X}{(1-\phi)\rho_c} \quad (4.12)$$

όπου L είναι το συνολικό πάχος του βιοφίλμ, που μετρείται από την επιφάνεια του χαλικιού, k_d (1/h) είναι η σταθερά θνησιμότητας και K_{det} (cm/h) είναι ο συντελεστής αποκόλλησης βιομάζας.

Το ισοζύγιο μάζας για τη βιομάζα στο υγρό ρεύμα για τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης, δίνεται από την εξίσωση:

$$\varepsilon \frac{dX_B}{dt} = (\mu(C_{NO_3})X_B + \mu(C_{NO_2})X_B - k_d X_B) \cdot \varepsilon + A_s(1-\varepsilon)u_{det}X \quad (4.13)$$

όπου X_B η συγκέντρωση της αποκολλημένης βιομάζας στο υγρό ρεύμα του αντιδραστήρα.



Οι συνοριακές συνθήκες για το σύστημα των εξισώσεων (4.1)-(4.2) και (4.5)-(4.13) είναι:

$$(α) \text{ Ο.Σ.1: } \frac{\partial C_{NO_3}(0,t)}{\partial z} = 0 \quad (4.14)$$

$$\text{Ο.Σ.2: } \frac{\partial C_{NO_2}(0,t)}{\partial z} = 0 \quad (4.15)$$

(δεν υπάρχει καμία αλλαγή των συγκεντρώσεων των νιτρικών και νιτρωδών στη διεπιφάνεια χαλικιού-βιοφίλμ) και

$$(β) \text{ Ο.Σ.3: } C_{NO_3}(L,t) = C_{NO_3,B} \quad (4.16)$$

$$\text{Ο.Σ.4: } C_{NO_2}(L,t) = C_{NO_2,B} \quad (4.17)$$

(στη διεπιφάνεια βιοφίλμ-υγρού ρεύματος οι συγκεντρώσεις των νιτρικών και των νιτρωδών είναι ίσες με τις συγκεντρώσεις αυτών στο υγρό ρεύμα), λαμβάνοντας υπόψη ότι οι αρχικές συνθήκες είναι:

$$(α) \text{ Α.Σ.1: } C_{NO_3,B}(0) = C_{NO_3,in} \quad (4.18)$$

$$\text{Α.Σ.2: } C_{NO_2,B}(0) = C_{NO_2,in} \quad (4.19)$$

όπου: C_{in} είναι η αρχική συγκέντρωση υποστρώματος στο φίλτρο (mg/cm^3), (οι συγκεντρώσεις των νιτρικών και των νιτρωδών στο υγρό ρεύμα θεωρούνται ίσες με τις αρχικές συγκεντρώσεις αυτών),

$$(β) \text{ Α.Σ.3: } C_{NO_3}(z,0) = C_{NO_3,in} \quad (4.20)$$

$$\text{Α.Σ.4: } C_{NO_2}(z,0) = C_{NO_2,in} \quad (4.21)$$

(οι αρχικές συγκεντρώσεις των νιτρικών και νιτρωδών μέσα στο βιοφίλμ, είναι ίσες με τις αρχικές συγκεντρώσεις των νιτρικών και των νιτρωδών στο υγρό ρεύμα) και

$$(γ) \text{ Α.Σ.5: } L(0) = L_{init} \quad (4.22)$$

(αρχικά υπάρχει ένα πάχος βιοφίλμ L_{init}).

Θεωρείται ότι όταν το βιοφίλμ βρίσκεται σε μόνιμη κατάσταση, η βιομάζα ανά μονάδα επιφάνειας παραμένει σταθερή σε σχέση με το χρόνο (Zeng and Zhang, 2005). Το πάχος του βιοφίλμ αυξάνεται λόγω της βακτηριακής ανάπτυξης, καθώς η πυκνότητα της βιομάζας, X παραμένει σταθερή (Vayenas and Lyberatos, 1994).

Οι συντελεστές διάχυσης των νιτρικών και των νιτρωδών (D_{NO_3} , D_{NO_2}) λήφθηκαν και οι δύο ίσοι με $0.0683 \text{ cm}^2/\text{h}$ (Sakakibara et al., 1994). Η πυκνότητα κυττάρων (ρ_c) θεωρήθηκε ίση με 160 mg/cm^3 (Montras et al., 2008).

Για την προσομοίωση της απονιτροποίησης σε λειτουργία άντλησης-πλήρωσης στους αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, πρώτα εξετάστηκαν οι τιμές των κινητικών παραμέτρων, που είχαν καθοριστεί από τα πειράματα κινητικής σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (Κεφάλαιο 3). Παρατηρήθηκε ότι, οι τιμές που περιγράφουν την απονιτροποίηση σε αντιδραστήρες όπου η βιομάζα βρίσκεται σε αιώρηση, απέτυχαν στο να περιγράψουν τη συμπεριφορά της προσκολλημένης βιομάζας και κατ' επέκταση τη διαδικασία της απονιτροποίησης στους αντιδραστήρες σταθερής κλίνης. Αυτό οφείλεται πιθανό στις αλλαγές της βακτηριακής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης των βακτηρίων στο πληρωτικό υλικό. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από άλλους ερευνητές (Carrera et al., 2004).

Οι Carrera et al. (2004) μελέτησαν τη νιτρωδοποίηση και τη νιτρικοποίηση σε αντιδραστήρες αιωρούμενης και σταθεροποιημένης βιομάζας. Έδειξαν ότι ήταν αναγκαία η αλλαγή των τιμών των κινητικών παραμέτρων, έτσι ώστε να επιτευχθεί η προσομοίωση των δύο παραπάνω συστημάτων με τα ίδια μαθηματικά μοντέλα.

Οι αλλαγές της βακτηριακής δραστηριότητας οφείλονται σε αλλαγές που υφίστανται τα βακτήρια στη φυσιολογία τους κατά τη διάρκεια της σταθεροποίησής τους και του σχηματισμού βιοφίλμ (Nikolov and Karamanev, 1992).

Ερευνητές έχουν δείξει ότι τα βιοφίλμ δεν είναι απλά συστήματα οργανισμών που περιέχουν στρώσεις βακτηρίων, αλλά αντιπροσωπεύουν βιολογικά συστήματα με ένα υψηλό επίπεδο οργάνωσης όπου η μορφή δόμησης των βακτηρίων, συντονίζει τη λειτουργία της κάθε κοινότητας. Μεταξύ των βακτηρίων της κοινότητας ενός βιοφίλμ, υπάρχουν σύνθετες αλληλεπιδράσεις που αποτελούν τη βάση της συνύπαρξης σε αυτά τα συστήματα (Davey and O'toole, 2000).

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, για την προσομοίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων της λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης, έπρεπε να υπολογιστούν νέες τιμές κινητικών παραμέτρων. Τα πειραματικά δεδομένα από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των αντιδραστήρων 1 (Σχήμα 4.4) και 2 (Σχήμα 4.3), χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού τιμών των κινητικών παραμέτρων του μοντέλου, αλλά και για τον υπολογισμό του πάχους του βιοφίλμ και της πυκνότητας της βιομάζας. Η εύρεση του



καταλληλότερου συνδυασμού τιμών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Aquasim (έκδοση 2.1d). Ο βέλτιστος συνδυασμός τιμών των κινητικών παραμέτρων δίνεται στον Πίνακα 4.2.

Στο Σχήμα 4.3 παρουσιάζεται η πρόβλεψη του μαθηματικού μοντέλου για τον αντιδραστήρα 2 και παρατηρείται ότι περιγράφει ικανοποιητικά τη διαδικασία της απονιτροποίησης, ωστόσο στις δύο τελευταίες συγκεντρώσεις (150 και 200 mg/L) υπάρχει απόκλιση του μοντέλου, πιθανώς εξαιτίας του φραξίματος των πόρων του φίλτρου, που είχε σαν αποτέλεσμα τη μη καλή λειτουργία αυτού. Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζεται η πρόβλεψη του μαθηματικού μοντέλου για τον αντιδραστήρα 1. Παρατηρείται ότι η θεωρητική πρόβλεψη βρίσκεται σε πολύ καλή συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα για όλες τις συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου που εφαρμόστηκαν.

Σημειώνεται ότι σύμφωνα με την πρόβλεψη του μοντέλου η βιομάζα που αποκολλάται από την επιφάνεια του βιοφίλμ κυμαίνεται από 0.3 έως 6.3 mg/L για τον αντιδραστήρα 2 και από 0.35 έως 6.96 mg/L για τον αντιδραστήρα 1, για τις συγκεντρώσεις τροφοδοσίας από 10 έως 200 mg/L. Τέλος, αναφέρεται ότι το αρχικό πάχος του βιοφίλμ θεωρήθηκε σταθερό για όλες τις συγκεντρώσεις τροφοδοσίας και για τους δύο αντιδραστήρες, εξαιτίας της μηχανικής αποκόλλησης της βιομάζας κατά την άντληση και πλήρωση των φίλτρων με το υγρό θρεπτικό. Με τον τρόπο αυτό το πάχος του βιοφίλμ αυξανόταν κατά την απομάκρυνση των νιτρικών σε κάθε λειτουργικό κύκλο (από 0.06 έως 0.84%), αλλά επανερχόταν πάλι στο αρχικό πάχος του βιοφίλμ λόγω της μηχανικής αποκόλλησης της βιομάζας. Έτσι, οι τέσσερις λειτουργικοί κύκλοι που πραγματοποιήθηκαν για κάθε συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στα δύο φίλτρα, θεωρήθηκε ότι έχουν το ίδιο αρχικό πάχος βιοφίλμ.



Πίνακας 4.2. Τιμές κινητικών παραμέτρων όπως προέκυψαν από την προσομοίωση της απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και σταθερής κλίνης.

Παράμετρος	Σύστημα σταθεροποιημένης βιομάζας	Σύστημα αιωρούμενης βιομάζας
$r_{\max 1}$ (1/h)	0.01146	0.0485
K_s (mg/cm ³)	0.0091	0.0286
Y_s (mgβιομάζας/mgNO ₃ ⁻ -N)	0.132	0.4207
K_i (mg/cm ³)	0.178	0.0242
$r_{\max 2}$ (1/h)	0.91	0.55
K_n (mg/cm ³)	0.0391	0.00479
Y_n (mgβιομάζας/mgNO ₂ ⁻ -N)	0.00806	0.084
k_d (1/h)	$1.46 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$
K_{d1} (mgNO ₂ ⁻ -N/mgNO ₃ ⁻ -N)	16.98	15.055
K_{d2} (mgNO ₃ ⁻ -N/mgNO ₂ ⁻ -N)	29.27	13.18
φ (πορώδες βιοφίλμ)	0.4957	
L (cm)	0.00151	
X (mg/cm ³)	80.64	
U_L (cm/h)	$7 \cdot 10^{-6}$ - $8.5 \cdot 10^{-6}$	
U_f (cm/h)	$9 \cdot 10^{-6}$ - $10.9 \cdot 10^{-6}$	
U_{det} (cm/h) = 0.2254 U_f	$2 \cdot 10^{-6}$ - $2.45 \cdot 10^{-6}$	



4.4. Πειραματική και θεωρητική μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, συνεχούς λειτουργίας

Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων της λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης, ο αντιδραστήρας 2 ($d=2.41$ mm) χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης, κατά τη συνεχή λειτουργία (ανοδικής ροής), για διάφορες λειτουργικές παραμέτρους (συγκέντρωση τροφοδοσίας νιτρικών και ογκομετρική παροχή). Πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων, εφαρμόζοντας ογκομετρική παροχή 5, 10 και 20 mL/min και συγκέντρωση τροφοδοσίας από 20 έως 200 mgNO₃⁻-N/L. Επίσης, μελετήθηκε η απονιτροποίηση σε σύστημα τριών αντιδραστήρων σε σειρά (αντιδραστήρες 1, 2 και 3) εφαρμόζοντας ογκομετρική παροχή 10, 15 και 20 mL/min και συγκέντρωση τροφοδοσίας από 100 έως 340 mgNO₃⁻-N/L. Στόχος ήταν η μελέτη του μέγιστου ρυθμού απονιτροποίησης για κάθε έναν από τους συνδυασμούς παροχής και συγκέντρωσης και στα δύο συστήματα και η ασφαλής (<11.3 mgNO₃⁻-N/L) επεξεργασία ρυπασμένου νερού για μεγάλες οργανικές φορτίσεις. Τέλος, εφαρμόστηκε μαθηματικό μοντέλο για την προσομοίωση της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αυτή τη λειτουργία.

4.4.1. Μελέτη συνεχούς λειτουργίας του αντιδραστήρα 2 ($d_2=2.41$ mm)

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το ιδανικότερο μέγεθος για το πληρωτικό υλικό βρέθηκε ότι είναι αυτό των 2.41 mm, δεδομένης της μεγάλης απόδοσης του αντιδραστήρα χωρίς λειτουργικά προβλήματα. Για το λόγο αυτό το φίλτρο με χαλίκι μέσης διαμέτρου 2.41 mm χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση, κατά τη συνεχή λειτουργία (πειραματική διάταξη Σχήματος 2.1(β)). Ο λειτουργικός όγκος του αντιδραστήρα ήταν 250 mL. Το φίλτρο λειτούργησε σε συνεχή λειτουργία για περίπου 3 μήνες, προτού διεξαχθούν σειρές πειραμάτων, με σκοπό να διασφαλιστεί η μόνιμη κατάσταση, όσον αφορά στο βιοφίλμ. Κατά τη διάρκεια της συνεχούς λειτουργίας, εφαρμόστηκαν παροχές με ανοδική ροή: 5, 10 και 20 mL/min, με συγκέντρωση τροφοδοσίας νιτρικού αζώτου μεταξύ των 20 και 200 mg/L.

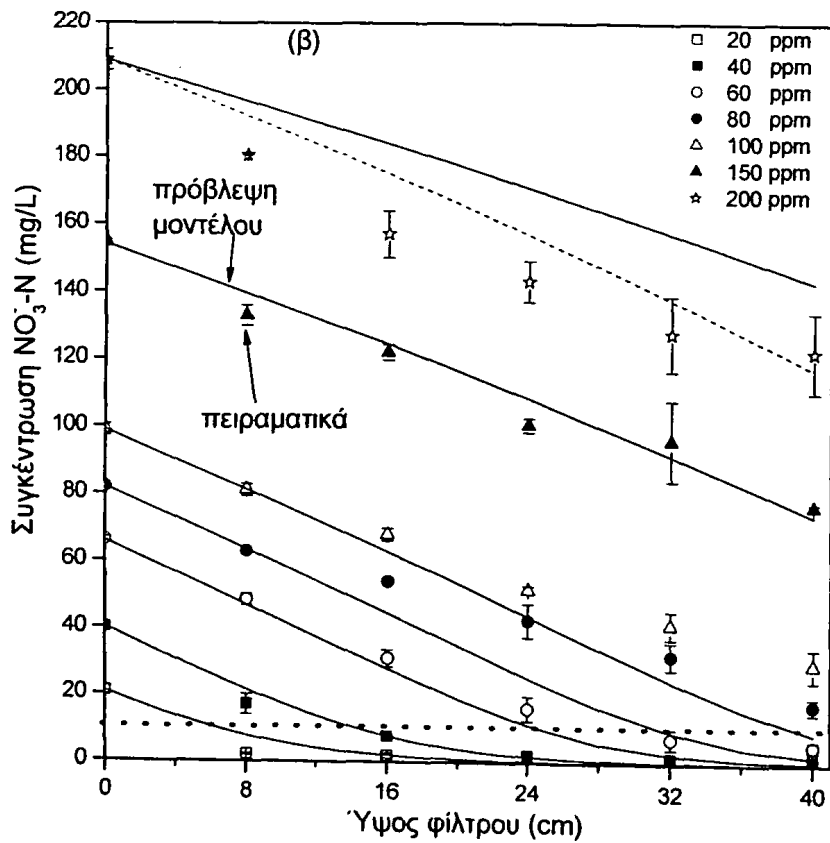
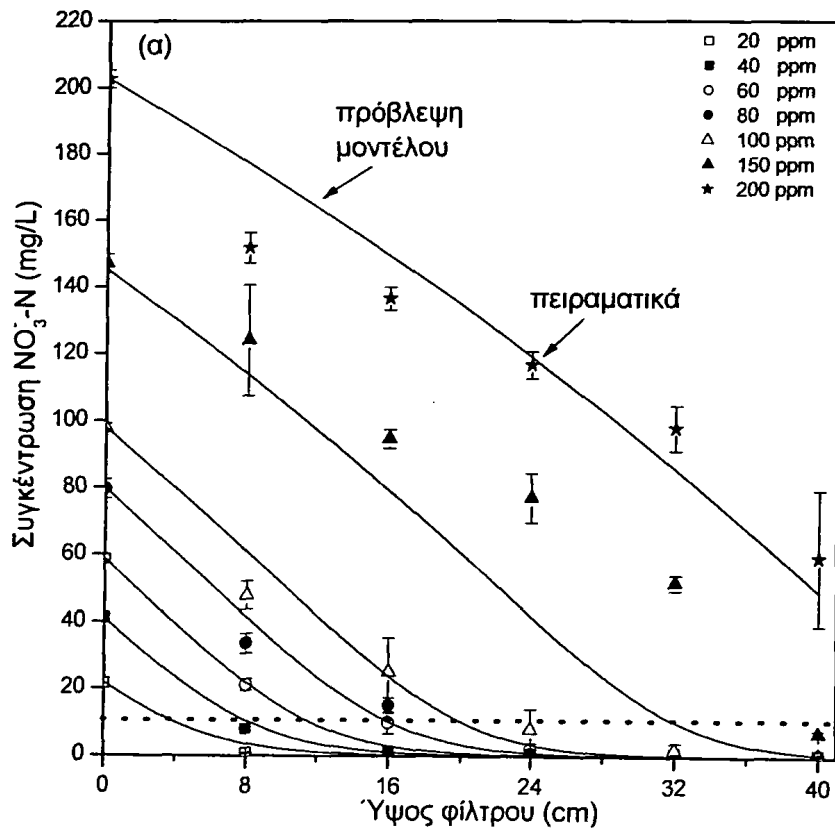
Η πλύση του φίλτρου ήταν απαραίτητη, εξαιτίας του φραξίματος των πόρων από την ανάπτυξη της βιομάζας, με σκοπό την αποφυγή λειτουργικών προβλημάτων (π.χ. μη καλή κυκλοφορία των αερίων, H₂ και CO₂ στον αντιδραστήρα). Η αντίστροφη πλύση

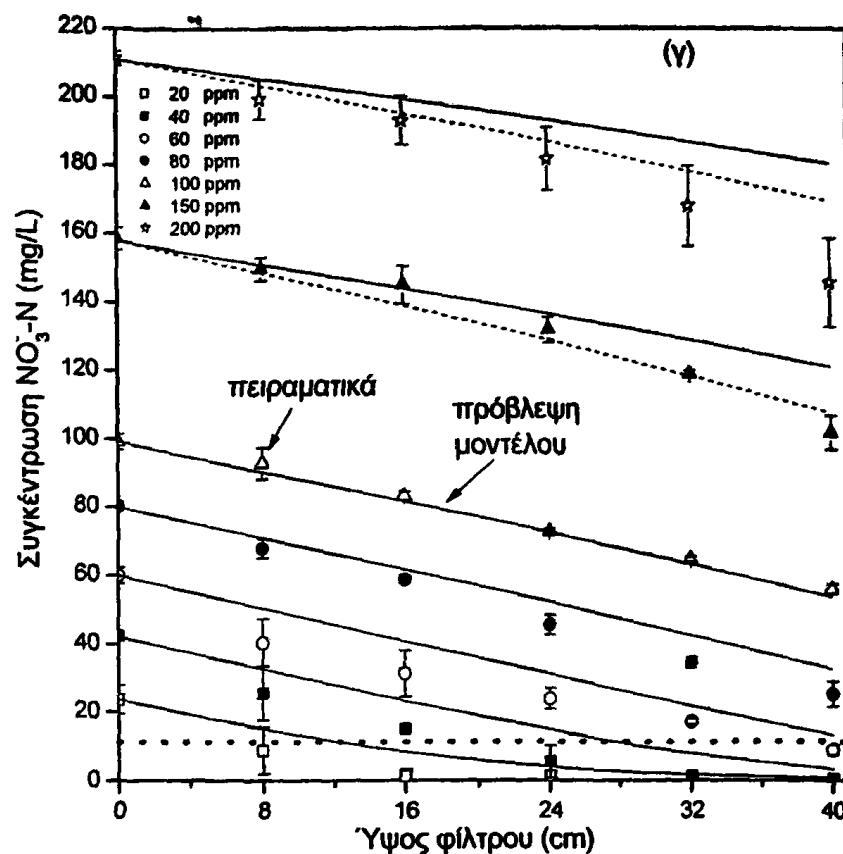


πραγματοποιούνταν μια φορά ανά 5 μέρες με 2 L νερού, χρησιμοποιώντας παροχές νερού και αερίων με 4 L/min και 300 mL/min, αντίστοιχα. Πριν τη δειγματοληψία, το φίλτρο πλενόταν αντίστροφα και μετά λειτουργούσε σε συνεχή λειτουργία με σταθερή κάθε φορά την εκάστοτε παροχή και συγκέντρωση για δύο μέρες, με σκοπό να επικρατήσει ψευδο - μόνιμη κατάσταση. Η δειγματοληψία γινόταν μεταξύ της τρίτης και της πέμπτης μέρας, για κάθε λειτουργική συνθήκη. Η διαδικασία της δειγματοληψίας ήταν η ακόλουθη: σε κάθε δειγματοληπτικό σημείο, υπήρχαν σύριγγες που έφταναν ως το κέντρο του φίλτρου. Τα πειραματικά δεδομένα για κάθε συνδυασμό συγκέντρωσης και παροχής, ήταν το αποτέλεσμα τριών διαφορετικών δειγματοληψιών (3^{ης}, 4^{ης} και 5^{ης} μέρας), έτσι ώστε να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των μετρήσεων κατά την ψευδο - μόνιμη κατάσταση του φίλτρου. Την έκτη μέρα η απόδοση του φίλτρου μειωνόταν.

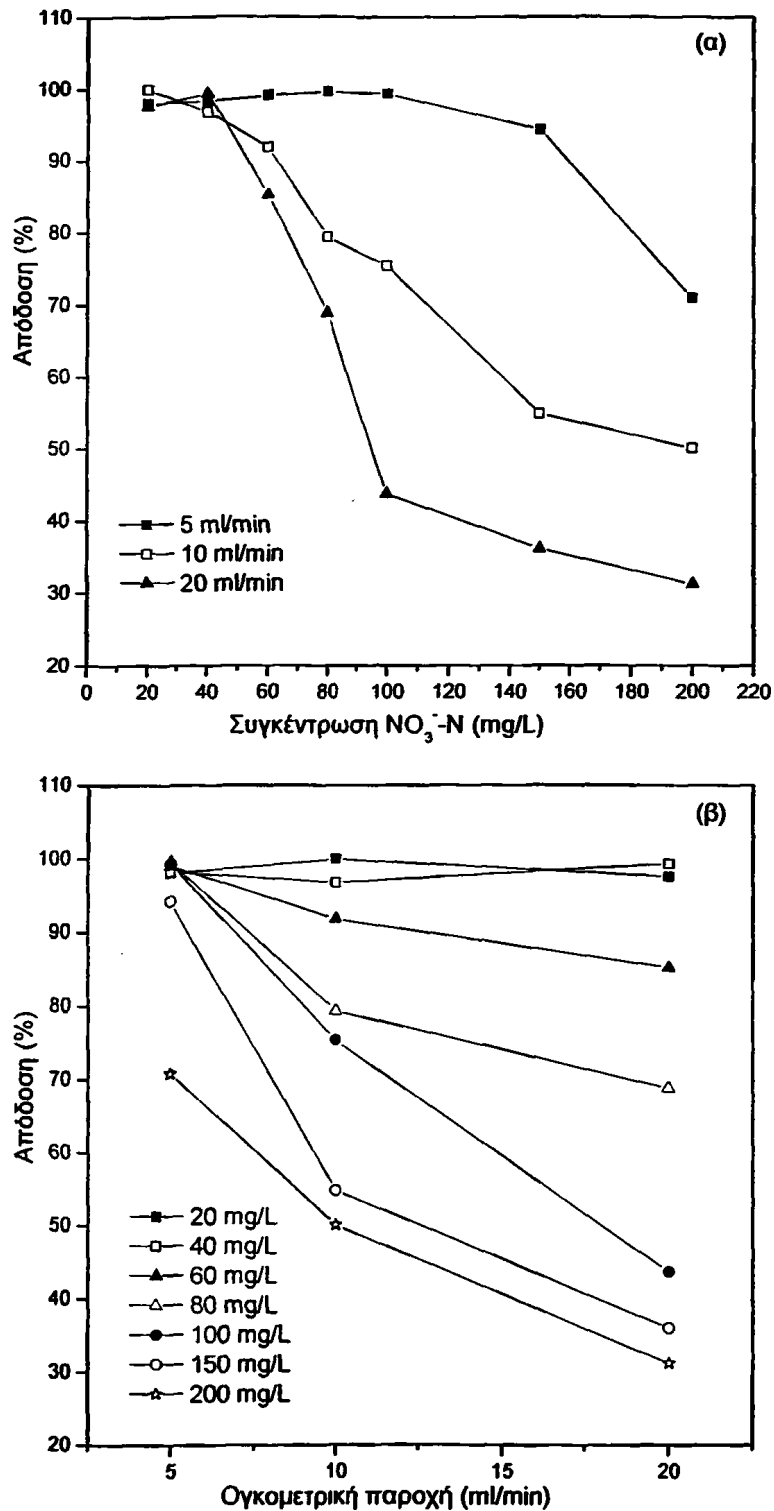
Στο Σχήμα 4.7 απεικονίζεται η μεταβολή των συγκεντρώσεων του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ κατά μήκος του φίλτρου. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων οι συγκεντρώσεις των $\text{NO}_2^- \text{-N}$ ήταν σχεδόν μηδενικές. Η συγκέντρωση τροφοδοσίας κυμαινόταν μεταξύ 20-200 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$, καθώς η ογκομετρική παροχή αυξανόταν από 5 mL/min (Σχήμα 4.7(α)) σε 10 mL/min (Σχήμα 4.7(β)) και τέλος στα 20 mL/min (Σχήμα 4.7(γ)). Ο αντίστοιχος υδραυλικός φορτίσις ήταν 5.7, 11.4 και 22.8 $\text{m}^3/\text{m}^2\text{d}$. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή δείχνει το ανώτατο επιτρεπτό όριο συγκέντρωσης του νιτρικού αζώτου των 11.3 mg/L. Από τα πειραματικά δεδομένα προέκυψε ότι η αύξηση της παροχής επιδρά πιο δραστικά στην απόδοση του φίλτρου, από ότι η αύξηση της συγκέντρωσης. Για παράδειγμα, για σταθερή παροχή 5 mL/min, μία αύξηση κατά δέκα φορές της συγκέντρωσης τροφοδοσίας (από 20 σε 200 mg/L) μειώνει την απόδοση του φίλτρου από 100 σε 70% (Σχήμα 4.8(α)). Σε αντίθεση, για σταθερή συγκέντρωση τροφοδοσίας 100 mg/L, μία αύξηση κατά δύο φορές της παροχής (από 5 σε 10 mL/min) μειώνει την απόδοση του φίλτρου από 99 σε 70% (Σχήμα 4.8(β)).







Σχήμα 4.7. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του $\text{NO}_3\text{-N}$ κατά μήκος του φίλτρου με χαλίκι μέσης διαμέτρου 2.41 mm, κατά τη συνεχή λειτουργία με παροχή α) 5, β) 10 και γ) 20 mL/min.



Σχήμα 4.8. Επί της εκατό απόδοση του φίλτρου α) για σταθερή παροχή και διαφορετική συγκέντρωση τροφοδοσίας και β) για σταθερή συγκέντρωση τροφοδοσίας και διαφορετική παροχή.

Οι ρυθμοί απονιτροποίησης όπως προέκυψαν από τη λειτουργία αυτή του φίλτρου δίνονται στον Πίνακα 4.3. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο διπλασιασμός της ογκομετρικής παροχής αυξάνει το ρυθμό απονιτροποίησης. Όμως, καθώς αυξανόταν η ογκομετρική παροχή, η συγκέντρωση του NO_3^- -N που μπορούσε να απομακρυνθεί έτσι ώστε το επεξεργασμένο νερό να περιέχει συγκεντρώσεις σε ασφαλή επίπεδα (δηλαδή κάτω από το ανώτατο όριο), μειωνόταν. Για παράδειγμα, για τις παροχές 5, 10 και 20 mL/min, μπορούσαν να απομακρυνθούν με ασφάλεια συγκεντρώσεις μέχρι τα 150, 65 και 60 mgNO_3^- -N/L, αντίστοιχα.

Σημειώνεται ότι οι μετρήσεις που έγιναν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του διαλυμένου υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα έδειξαν ότι ακόμα και στην μεγαλύτερη συγκέντρωση νιτρικού αζώτου (200 mg/L) και παροχή 20 mL/min, τα αέρια ήταν σε περίσσεια κάθε χρονική στιγμή στον αντιδραστήρα. Η συγκέντρωση του διαλυμένου υδρογόνου κατά μήκος των φίλτρων κυμάνθηκε μεταξύ του 0.5 και 0.8 mg/L , ενώ του διοξειδίου του άνθρακα στο 1.3 g/L .

4.4.2. Μελέτη συνεχούς λειτουργίας σε σύστημα τριών αντιδραστήρων σε σειρά

Στη συνέχεια και με βάση την τελευταία παρατήρηση στην προηγούμενη ενότητα, στόχος ήταν η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης του νιτρικού αζώτου που θα μπορούσε να απομακρυνθεί με ασφάλεια από το ρυπασμένο νερό.

Για την πραγματοποίηση αυτού του στόχου, τρία φίλτρα με πληρωτικό υλικό διαφορετικής κοκκομετρίας τοποθετήθηκαν σε σειρά. Ο συνολικός λειτουργικός όγκος του αντιδραστήρα 1, 2 και 3 ήταν 280, 260 και 250 mL, αντίστοιχα. Τα φίλτρα τοποθετήθηκαν έτσι ώστε το πληρωτικό υλικό του πρώτου ($d=4.03 \text{ mm}$) να είναι μεγαλύτερο από του δεύτερου ($d=2.41 \text{ mm}$) και αυτό με τη σειρά του από του τρίτου ($d=1.75 \text{ mm}$) (Σχήμα 2.1(γ)).

Η επιλογή της σειράς των αντιδραστήρων έγινε με γνώμονα την αποφυγή των λειτουργικών προβλημάτων. Για παράδειγμα, ο αντιδραστήρας 1 τοποθετήθηκε πρώτος γιατί θα δεχόταν μεγαλύτερες οργανικές φορτίσεις σε σχέση με άλλα δύο φίλτρα. Η επιλογή όμως του μεγαλύτερου χαλικιού στη θέση εκείνη απέτρεπε το φράξιμο των πόρων από τη μεγάλη ανάπτυξη της βιομάζας. Ο αντιδραστήρας 3 τοποθετήθηκε στο τέλος έτσι ώστε να δέχεται τις μικρότερες οργανικές φορτίσεις σε σχέση με άλλα δύο φίλτρα και να αποφευχθεί το φράξιμο των πόρων.



Το σύστημα των τριών φίλτρων σε σειρά λειτούργησε σε συνεχή λειτουργία για περίπου 2 μήνες, προτού διεξαχθούν σειρές πειραμάτων, με σκοπό να διασφαλιστεί η ψευδο - μόνιμη κατάσταση, όσον αφορά στο βιοφίλμ. Κατά τη διάρκεια της συνεχούς λειτουργίας, εφαρμόστηκαν παροχές με ανοδική ροή: 10, 15 και 20 mL/min, με συγκέντρωση τροφοδοσίας νιτρικού αζώτου από 100 έως 340 mg/L.

Η διαδικασία της πλύσης και της δειγματοληψίας ήταν ίδια με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως. Τα πειραματικά δεδομένα για κάθε συνδυασμό συγκέντρωσης και παροχής, ήταν αποτέλεσμα τριών διαφορετικών δειγματοληψιών, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Οι παροχές των αερίων στο σύστημα ($\text{CO}_2=7$ mL/min, $\text{H}_2=20$ mL/min) ήταν κατά πολύ μικρότερες από τις παροχές ($\text{CO}_2=30$ mL/min, $\text{H}_2=90$ mL/min) στη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης και στη συνεχή λειτουργία του αντιδραστήρα 2. Για το σύστημα των τριών αντιδραστήρων επιλέχθηκαν μικρότερες παροχές αερίων επειδή λόγω του μεγαλύτερου μήκους του συστήματος αυξανόταν ο χρόνος παραμονής των αερίων με αποτέλεσμα να διαλύονται οι απαραίτητες ποσότητες ακόμα και σε αυτές τις μικρές παροχές.

Οι μετρήσεις που έγιναν για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων του διαλυμένου υδρογόνου και διοξειδίου του άνθρακα έδειξαν ότι ακόμα και στη μεγαλύτερη συγκέντρωση νιτρικού αζώτου (200 mg/L) και παροχή 20 mL/min, τα αέρια ήταν σε περίσσεια κάθε χρονική στιγμή στους τρεις αντιδραστήρες. Η συγκέντρωση του διαλυμένου υδρογόνου κατά μήκος των φίλτρων κυμάνθηκε μεταξύ του 0.8 και 1.2 mg/L, ενώ του διοξειδίου του άνθρακα στο 1.3-1.4 g/L.



Πίνακας 4.3. Ρυθμοί απονιτροποίησης κατά τη συνεχή και τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των αντιδραστήρων σταθερής κλίνης.

Συγκέντρωση NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	Λειτουργία άντλησης-πλήρωσης		Συνεχής λειτουργία					
	Αντιδραστήρας 2 (d=2.41 mm)	Αντιδραστήρας 1 (d=4.03 mm)	Αντιδραστήρας 2 (d=2.41 mm)			Σύστημα τριών αντιδραστήρων σε σειρά		
	Ρυθμός απονιτροποίησης g/Ld	Ρυθμός απονιτροποίησης g/Ld	Ρυθμός απονιτροποίησης g/Ld			Ρυθμός απονιτροποίησης g/Ld		
			5mL/min	10mL/min	20mL/min	10mL/min	15mL/min	20mL/min
10	2.97	1.526						
20	3.18	2.14	0.56±0.007	1±0.005	2.5±0.08			
30	3.96	2.4						
40	4.4	2.75	1.08±0.008	2.07±0.002	4.67±0.009			
50	4.21	2.65						
60	4.11	2.56	1.55±0.003	3.23±0.085	5.65±0.18			
80	3.87	2.75	2.1±0.01	3.54±0.14	6.06±0.42			
100	3.762	2.605	2.58±0.008	3.7±0.27	4.71±0.16	1.97±0		3.83±0.016
150	3.59	2.7	4±0.11	4.51±0.047	6.3±0.58			
200	3.49	2.412	3.82±0.58	4.98±0.73	7.21±1.49	3.94±0	5.8±0.13	
340						6.2±0.015		

Στο Σχήμα 4.9 απεικονίζεται η μεταβολή των συγκεντρώσεων του $\text{NO}_3^- \text{-N}$, του συστήματος των αντιδραστήρων 1, 2 και 3. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων οι συγκεντρώσεις των $\text{NO}_2^- \text{-N}$ ήταν σχεδόν μηδενικές. Η συγκέντρωση τροφοδοσίας κυμαίνονταν από 100-340 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, καθώς η ογκομετρική παροχή αυξανόταν από 10 mL/min (Σχήμα 4.9(α)), σε 15 και 20 mL/min (Σχήμα 4.9(β)). Ο αντίστοιχος υδραυλικός φορτίσιος ήταν 11.4, 17.1 και 22.8 $\text{m}^3/\text{m}^2\text{d}$. Η οριζόντια διακεκομμένη γραμμή δείχνει το ανώτατο επιτρεπτό όριο συγκέντρωσης του νιτρικού αζώτου των 11.3 mg/L .

Καθώς αυξανόταν η ογκομετρική παροχή, η συγκέντρωση του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ που μπορούσε να απομακρυνθεί έτσι ώστε το επεξεργασμένο νερό να περιέχει συγκεντρώσεις σε ασφαλή επίπεδα (δηλαδή κάτω από το ανώτατο όριο), μειωνόταν. Για παράδειγμα, για τις παροχές, 10 και 20 mL/min , μπορούσαν να απομακρυνθούν με ασφάλεια συγκεντρώσεις μέχρι τα 340 και 100 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, αντίστοιχα. Για παροχή 20 mL/min και συγκέντρωση 200 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, η συγκέντρωση του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ στην έξοδο του τρίτου φίλτρου (αντιδραστήρας 3) ήταν σχεδόν ίση με 35 $\text{mg/L} > 11.3 \text{ mg/L}$. Επίσης κατά την οργανική φόρτιση αυτή παρατηρήθηκε δυσλειτουργία του φίλτρου λόγω λειτουργικών προβλημάτων. Αυτό προφανώς συνέβη λόγω τη μη καλής λειτουργίας του αντιδραστήρα 3 ($d=1.75 \text{ mm}$) από το φράξιμο των πόρων. Σημειώνεται ότι η συγκέντρωση στη είσοδο του αντιδραστήρα και η παροχή των 20 mL/min αντιστοιχούν σε μία μεγάλη οργανική φόρτιση (3 g/d) για τους μικρούς πόρους του αντιδραστήρα.

Για το λόγο αυτό και με σκοπό την εύρεση του συνδυασμού της παροχής και της συγκέντρωσης που θα αποτελούσε το οριακό σημείο λειτουργίας του συστήματος, για την ασφαλή απομάκρυνση των νιτρικών, η παροχή μειώθηκε από 20 στα 15 mL/min . Η μείωση αυτή επέτρεψε την ασφαλή απομάκρυνση των 200 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$, με μία συγκέντρωση εξόδου των 5 mg/L .

Οι ρυθμοί απονιτροποίησης όπως προέκυψαν από τη λειτουργία αυτή των φίλτρων δίνονται στον Πίνακα 4.3. Το σύστημα αυτό των τριών αντιδραστήρων σε σειρά πέτυχε μεγαλύτερους ρυθμούς απονιτροποίησης, συγκρίνοντάς το με την απόδοση του αντιδραστήρα 2 κατά τη συνεχή του λειτουργία. Επιπλέον, η συγκέντρωση του $\text{NO}_3^- \text{-N}$, που μπορούσε να υποστεί επεξεργασία με ασφάλεια από το σύστημα αυξήθηκε από τα 130 mg/L , στον αντιδραστήρα 2, με το σύστημα των αντιδραστήρων στα 340 mg/L .

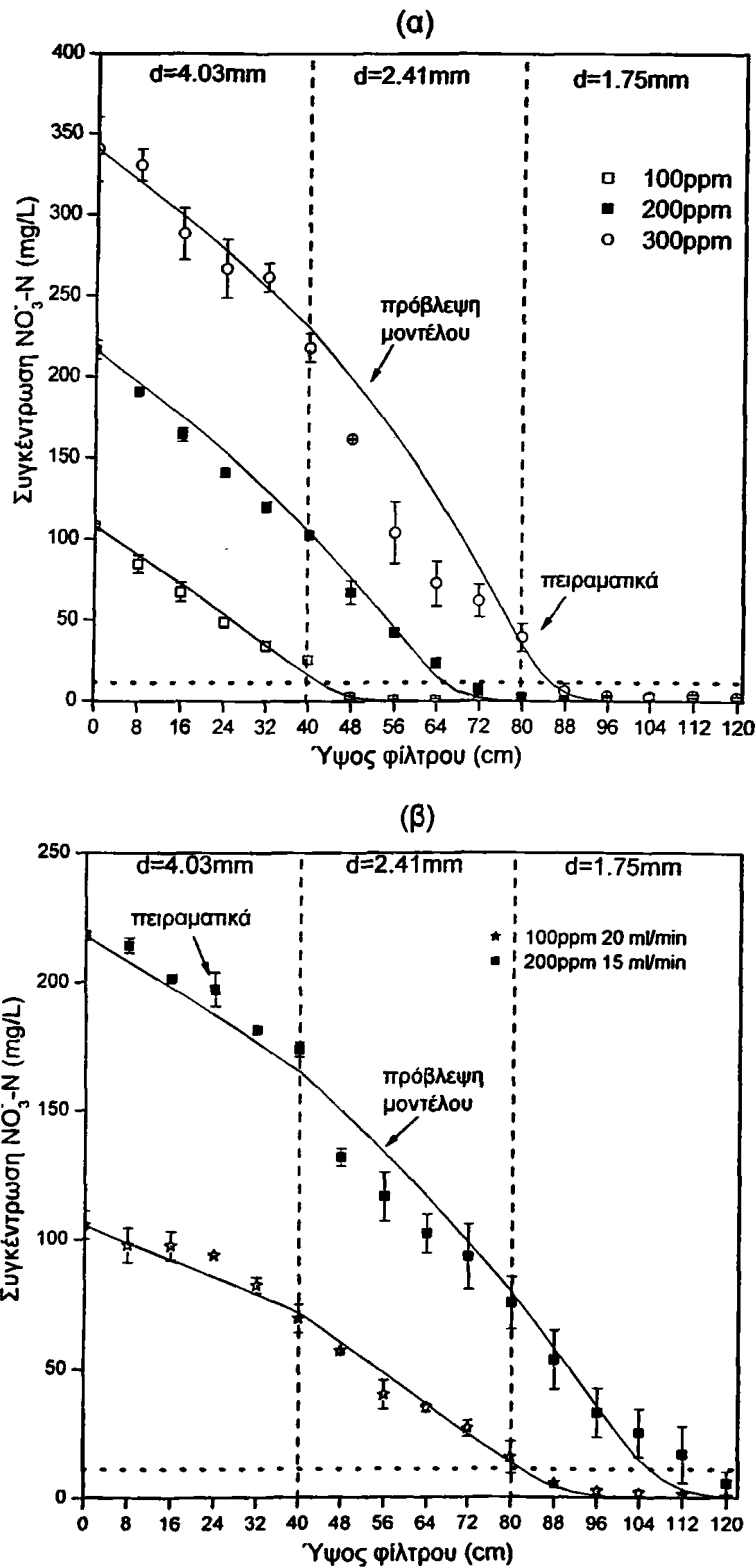
Στο Σχήμα 4.10 φαίνονται οι οργανικές φορτίσεις που εφαρμόστηκαν κατά τη συνεχή λειτουργία του αντιδραστήρα 2 ($d=2.41 \text{ mm}$) (κλειστά σύμβολα) και του συστήματος των



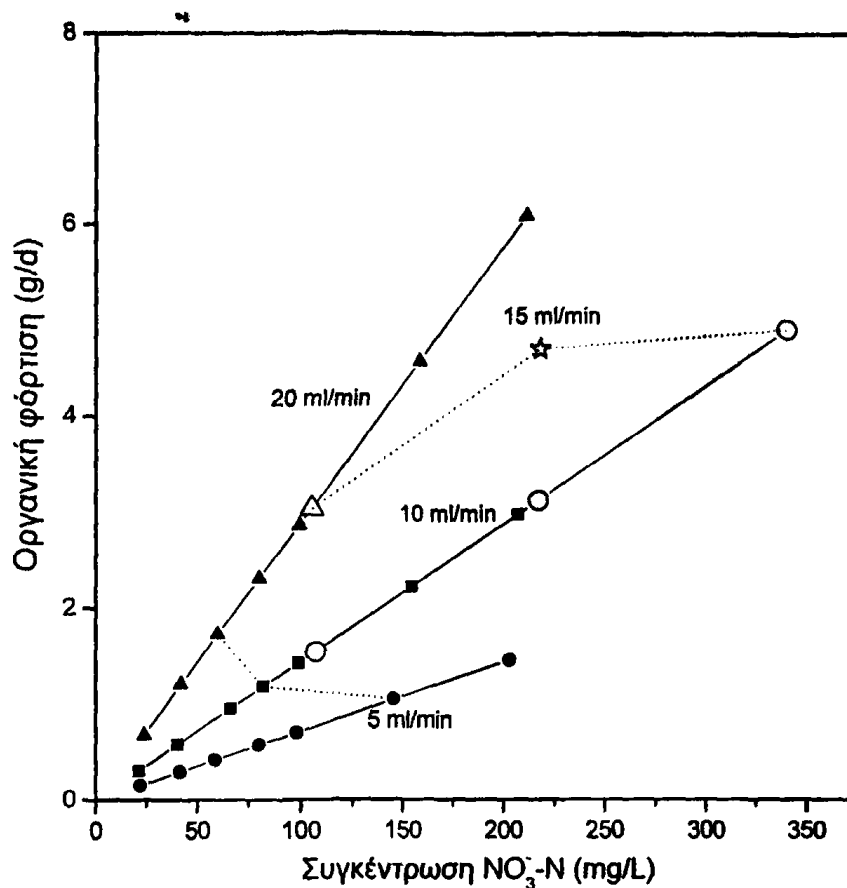
τριών αντιδραστήρων σε σειρά (ανοιχτά σύμβολα). Η διακεκομμένη γραμμή ενώνει τα σύμβολα εκείνα που αντιπροσωπεύουν τις οριακές/ανώτατες φορτίσεις στις οποίες επιτυγχάνεται ασφαλής απομάκρυνση νιτρικών, για το κάθε σύστημα συνεχούς λειτουργίας αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι με το σύστημα των τριών αντιδραστήρων η οργανική φόρτιση, που μπορούσε να εφαρμοστεί με ασφάλεια, αυξήθηκε από 1.7 g/d (του αντιδραστήρα 2) σε 4.9 g/d.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι η απόδοση του δεύτερου φίλτρου του συστήματος σε σειρά (αντιδραστήρας 2) ήταν καλύτερη σε σχέση με αυτή του αντιδραστήρα 2 όταν λειτουργούσε μόνος του σε συνεχή λειτουργία. Για παράδειγμα, η επί τοις εκατό απόδοση του αντιδραστήρα 2 κατά τη συνεχή του λειτουργία με συγκέντρωση 200 mg/L και παροχή 10 mL/min, ήταν 50% (Σχήμα 4.8). Η επί τοις εκατό απόδοση του αντιδραστήρα 2 κατά τη συνεχή του λειτουργία στο σύστημα των τριών αντιδραστήρων για τις ίδιες λειτουργικές συνθήκες (Σχήμα 4.9(α)) ήταν 82%. Αυτό οφείλεται στο μεγαλύτερο πάχος του βιοφίλμ που δημιουργήθηκε στον αντιδραστήρα στο σύστημα σε σειρά, εξαιτίας της μικρότερης αποκόλλησης της βιομάζας από τις μικρότερες πιέσεις των χαμηλότερων παροχών των αερίων ($\text{CO}_2=7 \text{ mL/min}$, $\text{H}_2=20 \text{ mL/min}$).





Σχήμα 4.9. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή της συγκέντρωσης του $\text{NO}_3\text{-N}$ κατά μήκος του συστήματος των τριών αντιδραστήρων 1, 2 και 3, κατά τη συνεχή λειτουργία με παροχή α) 10, β) 15 και 20 mL/min.



Σχήμα 4.10. Οργανικές φορτίσεις που εφαρμόστηκαν κατά τη συνεχή λειτουργία του αντιδραστήρα 2 ($d=2.41$ mm) (κλειστά σύμβολα) και του συστήματος των τριών αντιδραστήρων σε σειρά (ανοιχτά σύμβολα).

4.4.3. Η επίδραση του τρόπου λειτουργίας - Σύγκριση συνεχούς και λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης

Στον Πίνακα 4.3. παρουσιάζονται οι ρυθμοί απονιτροποίησης κατά τη συνεχή και τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των αντιδραστήρων σταθερής κλίνης, για διάφορες λειτουργικές παραμέτρους. Στον Πίνακα 4.3. οι ρυθμοί που έχουν σημειωθεί με έντονη γραφή αντιπροσωπεύουν τους συνδυασμούς παροχής και συγκέντρωσης για τους οποίους η συνεχής λειτουργία επέτυχε μείωση των νιτρικών κάτω από το ανώτατο επιτρεπτό όριο.

Κατά τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης των αντιδραστήρων πραγματοποιούνταν πάντα ολοκλήρωση της απονιτροποίησης (100% απομάκρυνση) ακόμα και για μεγάλες αρχικές συγκεντρώσεις (200 mg/L). Ο ρυθμός απονιτροποίησης κατά τη λειτουργία άντλησης-

πλήρωσης του αντιδραστήρα 2 παρέμενε πάντα μεγαλύτερος από 3 $\text{gNO}_3^- \text{-N/Ld}$ σε όλο το εύρος των αρχικών συγκεντρώσεων. Σε αντίθεση, κατά τη συνεχή λειτουργία του αντιδραστήρα 2, ασφαλής απονιτροποίηση παρατηρήθηκε για συγκεντρώσεις μέχρι τα 150, 65 και 60 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$ για παροχή 5, 10 and 20 mL/min , αντίστοιχα.

Η λειτουργία άντλησης-πλήρωσης αποδείχθηκε ότι ήταν ο πιο αποδοτικός τρόπος υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης, από ότι η συνεχής λειτουργία του αντιδραστήρα 2 για τις μικρές παροχές των 5 και 10 mL/min . Εξαίρεση αποτελεί ο συνδυασμός παροχής και συγκέντρωσης 5 mL/min και 150 mg/L , αντίστοιχα, στον οποίο ο ρυθμός απονιτροποίησης είναι μεγαλύτερος από αυτόν της άντλησης-πλήρωσης. Όσο αφορά στην παροχή των 20 mL/min , όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.3, οι ρυθμοί απονιτροποίησης ήταν μεγαλύτεροι από αυτούς της λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης. Πιο συγκεκριμένα, η σύγκριση μεταξύ της λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης και της συνεχούς λειτουργίας του αντιδραστήρα 2, με γνώμονα πάντα την ασφαλή απομάκρυνση του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ από το πόσιμο νερό έδειξε ότι για χαμηλές συγκεντρώσεις τροφοδοσίας ($\sim 20 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$) η λειτουργία άντλησης-πλήρωσης πέτυχε μεγαλύτερους ρυθμούς απονιτροποίησης και για τις τρεις παροχές. Στην περίπτωση ενδιάμεσων συγκεντρώσεων (40-60 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$) η συνεχής λειτουργία (20 mL/min) πέτυχε μεγαλύτερους ρυθμούς απονιτροποίησης. Τέλος, για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (80-200 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$) η λειτουργία άντλησης-πλήρωσης αποδείχθηκε πιο κατάλληλη (συγκρινόμενη και με τις τρεις ογκομετρικές παροχές) αφού επιτυγχάνονταν μεγαλύτεροι ρυθμοί και πραγματοποιούνταν ασφαλής απομάκρυνση.

Η σύγκριση της συνεχούς και της λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης του αντιδραστήρα 2, με τη συνεχή λειτουργία του συστήματος των τριών αντιδραστήρων σε σειρά, έδειξε ότι μόνο ο ρυθμός απονιτροποίησης του συνδυασμού συγκέντρωσης και παροχής των 100 $\text{mgNO}_3^- \text{-N/L}$ και 10 mL/min , ήταν μικρότερος σε σχέση με αυτούς της ίδιας συγκέντρωσης τροφοδοσίας. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η συνεχής λειτουργία του συστήματος των αντιδραστήρων πέτυχε πολύ υψηλούς ρυθμούς και αποδείχθηκε ο πιο κατάλληλος τρόπος για την υδρογονοτροφική απονιτροποίηση σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης.

Συγκρινόμενοι με προηγούμενες μελέτες (Πίνακας 4.4), οι ρυθμοί που επιτεύχθηκαν σε αυτήν εργασία μπορούν να ανταγωνιστούν αυτούς άλλων συστημάτων, είτε σταθερής είτε ρευστοποιημένης κλίνης ή ακόμα και μεμβρανών, υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης. Για παράδειγμα, ο ρυθμός απονιτροποίησης της παρούσας εργασίας για την ίδια παροχή και συγκέντρωση τροφοδοσίας ήταν κατά 30% μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν των Chang et al.



(1999) και 45% μεγαλύτερος σε σχέση με τους Kurt et al. (1987). Επίσης, ο ρυθμός απονιτροποίησης της παρούσας εργασίας ήταν κατά 93% μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν των Dries et al. (1988). Οι Ho et al. (2001) για την απομάκρυνση 120mg/L πέτυχαν ρυθμό ίσο με 0.131 g/Ld κατά τη διαλείπουσα λειτουργία του αντιδραστήρα. Κατά τη λειτουργία του αντιδραστήρα 2 σε συγκέντρωση 150 mg/L κατά τη λειτουργία άντλησης πλήρωσης ο ρυθμός απονιτροποίησης ήταν 96% μεγαλύτερος.

Πίνακας 4.4. Σύγκριση ρυθμών απονιτροποίησης της εργασίας αυτής με άλλα συστήματα υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης.

Τύπος αντιδραστήρα	Θερμοκρασία (°C)	Λειτουργία	Συγκέντρωση τροφοδοσίας $\text{NO}_3^- \text{--N}$	Ρυθμός απομάκρυνσης (g/Ld)	Αναφορά
ρευστοποιημένης κλίνης	30	διαλείπουσα συνεχής (10mL/min)	15 mg/L 25 mg/L	0.09 g/Ld 0.552 g/Ld	Kurt et al. (1987)
σταθερής κλίνης	12-20	συνεχής (14mL/min)	50 mg/L 15 mg/L	0.2 g/Ld 0.5 g/Ld	Dries et al. (1988)
σταθερής κλίνης	10	συνεχής (50 m ³ /h)	17 mg/L	0.25 g/Ld	Gros et al. (1988)
ρευστοποιημένης κλίνης	30	συνεχής	22-25 mg/L	0.6-0.7 g/Ld	Chang et al. (1999)
μεμβράνη	--	συνεχής (17m/d, rt 4h)	145 mg/L	0.77 g/Ld	Ergas and Reuss (2001)
μεμβράνη	--	διαλείπουσα συνεχής (3 mL/min)	120mg/L 120mg/L	0.131 g/Ld 5.4 g/m ² d	Ho et al. (2001)
μεμβράνη	--	συνεχής (10mL/min)	5-15mg/L	0.25-0.552 g/Ld	Lee and Rittman (2002)
μεμβράνη	21	συνεχής (0.4mL/min)	20, 30, 40 mg/L	2.7 – 5.3 g/m ² d	Mansell and Schroeder (2002)
μεμβράνη	25	συνεχής	100 mg/L	6.58 g/m ² d	Terada et. al. (2006)
σταθερής κλίνης	28±2	άντλησης-πλήρωσης συνεχής (ενός φίλτρου) (20mL/min)	40 mg/L 40-60 mg/L	4.4 g/Ld 1.93 g/m ² d 4.67-5.65 g/Ld 2.04-2.48 g/m ² d	Παρούσα εργασία
		συνεχής (τρία φίλτρα) (10mL/min)	340 mg/L	6.2 g/Ld 9.47 g/m ²	

4.4.4. Εφαρμογή μαθηματικού μοντέλου για την προσομοίωση της συνεχούς λειτουργίας

Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της συνεχούς λειτουργίας σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης βασίστηκε στο μοντέλο που αναπτύχθηκε από τους Wanner and Reichert. (1996). Το μοντέλο μπορεί να προβλέπει τις κατανομές των συγκεντρώσεων των νιτρικών και των νιτρώδων και το πάχος του βιοφίλμ κατά μήκος του φίλτρου, καθώς και τις κατανομές των συγκεντρώσεων κατά βάθος του βιολογικού στρώματος (βιοφίλμ).

Η εφαρμογή του μοντέλου βασίστηκε στις ακόλουθες παραδοχές (Vayenas et al., 1997):

- (1) Ο αντιδραστήρας χωρίζεται σε έναν αριθμό από ίσου μεγέθους τμήματα (10), για καθένα από τα οποία θεωρούνται ομοιογενείς συνθήκες.
- (2) Τα νιτρικά και τα νιτρώδη μεταφέρονται παράλληλα από την επιφάνεια του χαλικιού στο υγρό ρεύμα.
- (3) Τα νιτρικά και τα νιτρώδη διαχέονται από το υγρό ρεύμα στο βιολογικό στρώμα (βιοφίλμ).
- (4) Η ανάπτυξη της βιομάζας περιορίζεται μόνο από τα νιτρικά και τα νιτρώδη με κινητική του μοντέλου των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση από τα νιτρικά.
- (5) Η απομάκρυνση των νιτρικών και των νιτρώδων πραγματοποιείται εξολοκλήρου μέσα στο βιοφίλμ.
- (6) Η πυκνότητα της βιομάζας (X) παραμένει σταθερή με την πάροδο του χρόνου.

Στη συνέχεια περιγράφονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την εφαρμογή του μοντέλου. Τα ισοζύγια μάζας για τα νιτρικά και τα νιτρώδη μέσα στο βιοφίλμ στο τμήμα NI του αντιδραστήρα δίνονται από τις παρακάτω εξισώσεις:

$$-D_{NO_3} \phi \frac{\partial^2 C_{NO_3,NI}}{\partial z^2} + \phi \frac{\partial C_{NO_3,NI}}{\partial t} + \frac{1}{Y_s} \mu(C_{NO_3,NI}) X = 0 \quad (4.23)$$

$$-D_{NO_2} \phi \frac{\partial^2 C_{NO_2,NI}}{\partial z^2} + \phi \frac{\partial C_{NO_2,NI}}{\partial t} + \frac{1}{Y_n} \mu(C_{NO_2,NI}) X - \frac{1}{Y_s} \mu(C_{NO_3,NI}) X = 0 \quad (4.24)$$

Οι εξισώσεις (4.23) και (4.24) προκύπτουν λαμβάνοντας υπόψη τις διαδικασίες της διάχυσης των νιτρικών και νιτρώδων και της κατανάλωσης ή/και της παραγωγής μέσα στο βιοφίλμ στο τμήμα NI του αντιδραστήρα. Οι κινητικές εκφράσεις του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης των νιτρικών και των νιτρώδων δίνονται από εξισώσεις παρόμοιες των εξισώσεων (4.3) και (4.4) :



$$\mu(C_{NO_3,NI}) = \frac{r_{\max 1} C_{NO_3,NI}}{K_s + C_{NO_3,NI} + k_{d2} C_{NO_2,NI} + \frac{C_{NO_3,NI}^2}{K_i}} \quad (4.25)$$

$$\mu(C_{NO_2,NI}) = \frac{r_{\max 2} C_{NO_2,NI}}{K_n + C_{NO_2,NI} + k_{d1} C_{NO_3,NI}} \quad (4.26)$$

Τα ισοζύγια μάζας για τα νιτρικά και τα νιτρώδη στο υγρό ρεύμα, στο τμήμα ΝΙ του αντιδραστήρα, δίνονται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\varepsilon \frac{dC_{NO_3,BNI}}{dt} = \frac{Q}{V_{NI}} (C_{NO_3,B NI-1} - C_{NO_3,B NI}) - A_s (1-\varepsilon) D_{NO_3} \phi \frac{\partial C_{NO_3,NI}}{\partial z} \Big|_{z=L} - A_s (1-\varepsilon) u_L \phi C_{NO_3} \quad (4.27)$$

$$\varepsilon \frac{dC_{NO_2,BNI}}{dt} = \frac{Q}{V_{NI}} (C_{NO_2,B NI-1} - C_{NO_2,B NI}) - A_s (1-\varepsilon) D_{NO_2} \phi \frac{\partial C_{NO_2,NI}}{\partial z} \Big|_{z=L} - A_s (1-\varepsilon) u_L \phi C_{NO_2} \quad (4.28)$$

όπου Q είναι η ογκομετρική παροχή (cm³/min) και V_{NI} είναι ο όγκος κάθε τμήματος του αντιδραστήρα (cm³).

Οι πρώτοι όροι στη δεξιά πλευρά των εξισώσεων (4.28) και (4.29) παριστάνουν τη διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων του υγρού ρεύματος των νιτρικών και των νιτρωδών στην είσοδο και την έξοδο του τμήματος ΝΙ του αντιδραστήρα, καθώς οι δεύτεροι όροι σε αυτήν την πλευρά παριστάνουν τη διάχυση των νιτρικών και των νιτρωδών, αντίστοιχα, από το υγρό ρεύμα στο βιοφίλμ στο ίδιο τμήμα.

Το ισοζύγιο μάζας για τη βιομάζα στο υγρό ρεύμα για τη συνεχή λειτουργία, δίνεται από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$\varepsilon \frac{dX_B}{dt} = -\frac{Q}{V_{NI}} (X_{BNI-1} - X_{BNI}) + (\mu(C_{NO_3}) X_B + \mu(C_{NO_2}) X_B - k_d X_B) \cdot \varepsilon + A_s (1-\varepsilon) u_{del} X \quad (4.29)$$

Σημειώνεται ότι όπως και στην περίπτωση της λειτουργίας άντλησης πλήρωσης έτσι και εδώ ισχύουν οι εξισώσεις (4.7)-(4.12).

Οι συνοριακές συνθήκες για το σύστημα των εξισώσεων (4.23)-(4.24) και (4.27)-(4.29) είναι:

$$(α) \text{ Ο.Σ.1: } \frac{\partial C_{NO_3,NI}(0,t)}{\partial z} = 0 \quad (4.30)$$



$$\text{Ο.Σ.2: } \frac{\partial C_{NO_2,NI}(0,t)}{\partial z} = 0 \quad (4.31)$$

(δεν υπάρχει καμία αλλαγή των συγκεντρώσεων των νιτρικών και νιτρωδών στη διεπιφάνεια χαλικιού-βιοφίλμ) και

$$(\beta) \text{ Ο.Σ.3: } C_{NO_2,NI}(L,t) = C_{NO_2,BNI} \quad (4.32)$$

$$\text{Ο.Σ.4: } C_{NO_2,NI}(L,t) = C_{NO_2,BNI} \quad (4.33)$$

(στη διεπιφάνεια βιοφίλμ-υγρού ρεύματος οι συγκεντρώσεις των νιτρικών και των νιτρωδών είναι ίσες με τις συγκεντρώσεις αυτών στο υγρό ρεύμα), λαμβάνοντας υπόψη ότι οι αρχικές συνθήκες είναι:

$$(\alpha) \text{ Α.Σ.1: } C_{NO_2,BNI}(0) = C_{NO_2,entrance} \quad (4.34)$$

$$\text{Α.Σ.2: } C_{NO_2,BNI}(0) = C_{NO_2,entrance} \quad (4.35)$$

όπου: $C_{entrance}$ είναι η συγκέντρωση τροφοδοσίας του υποστρώματος στο κάθε τμήμα του αντιδραστήρα (mg/L), (οι αρχικές συγκεντρώσεις των νιτρικών και των νιτρωδών στο υγρό ρεύμα είναι ίσες με τις συγκεντρώσεις τροφοδοσίας),

$$(\beta) \text{ Α.Σ.3: } C_{NO_2}(z,0) = C_{NO_2,entrance} \quad (4.36)$$

$$\text{Α.Σ.4: } C_{NO_2}(z,0) = C_{NO_2,entrance} \quad (4.37)$$

(οι αρχικές συγκεντρώσεις των νιτρικών και νιτρωδών μέσα στο βιοφίλμ, είναι ίσες με τις αρχικές συγκεντρώσεις των νιτρικών και των νιτρωδών στο υγρό ρεύμα) και

$$(\gamma) \text{ Α.Σ.5: } X_{B_{entrance}} = 0 \quad (4.38)$$

(η συγκέντρωση εισόδου της αποκολλημένης βιομάζας στο υγρό ρεύμα είναι μηδέν).

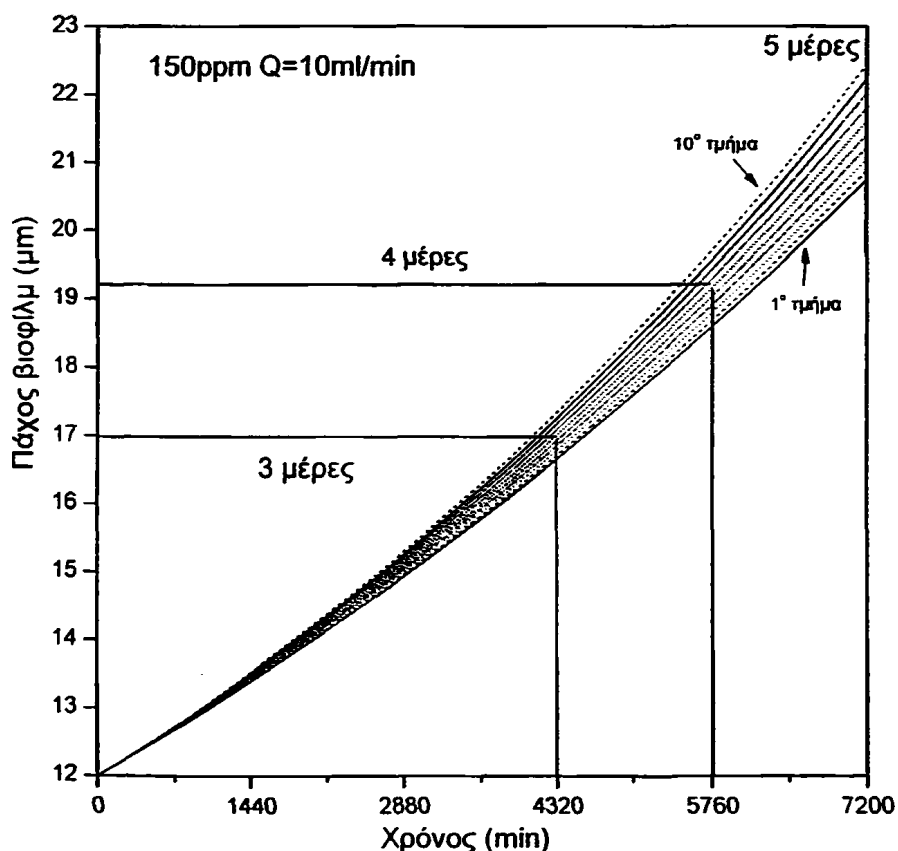
Η πυκνότητα της βιομάζας διατήρησε την ίδια τιμή με τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης, $X=80.64 \text{ mg/cm}^3$. Όλες οι παράμετροι διατήρησαν τις ίδιες τιμές με αυτές της προσομοίωσης της λειτουργίας άντλησης-πλήρωσης.

Για την προσομοίωση της συνεχούς λειτουργίας για όλους τους συνδυασμούς ογκομετρικής παροχής και συγκέντρωσης, βρέθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων το βέλτιστο αρχικό πάχος του βιοφίλμ. Πιο συγκεκριμένα αφού η δειγματοληψία πραγματοποιούνταν κατά την τρίτη, τέταρτη και πέμπτη μέρα (μετά το πλύσιμο των φίλτρων) βρέθηκε το πάχος του βιοφίλμ της χρονικής στιγμής μηδέν (αμέσως μετά το πλύσιμο των



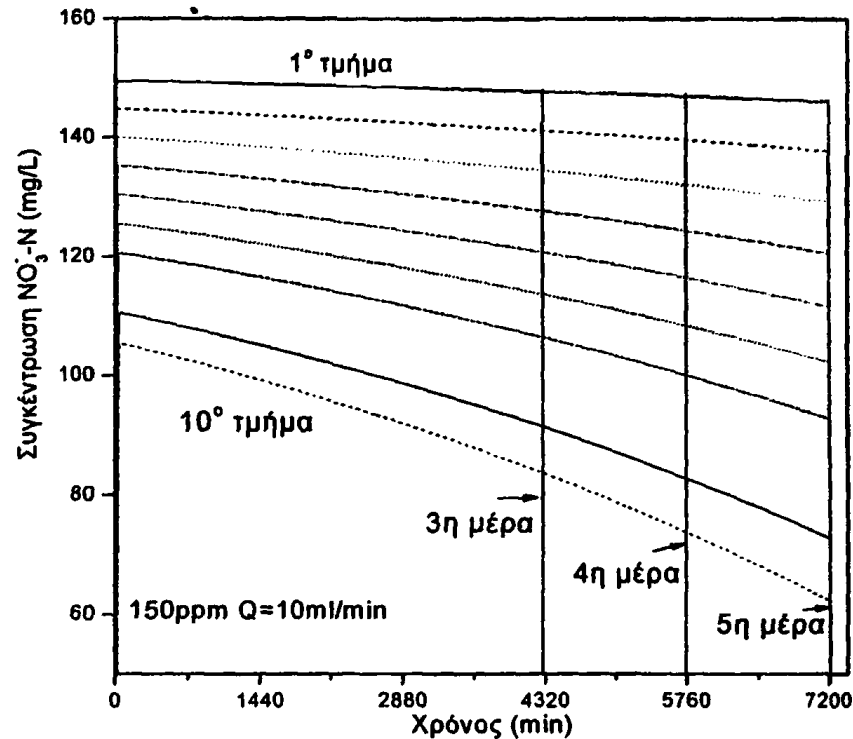
φίλτρων). Χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Aquasim (έκδοση 2.1d), για τη συνεχή λειτουργία του ενός αντιδραστήρα το αρχικό πάχος βρέθηκε ότι είναι 0.0012 cm.

Στο Σχήμα 4.11 απεικονίζεται η μεταβολή του πάχους του βιοφίλμ σε σχέση με το χρόνο για παροχή και συγκέντρωση π.χ. 10 mL/min και 150 mg/L.



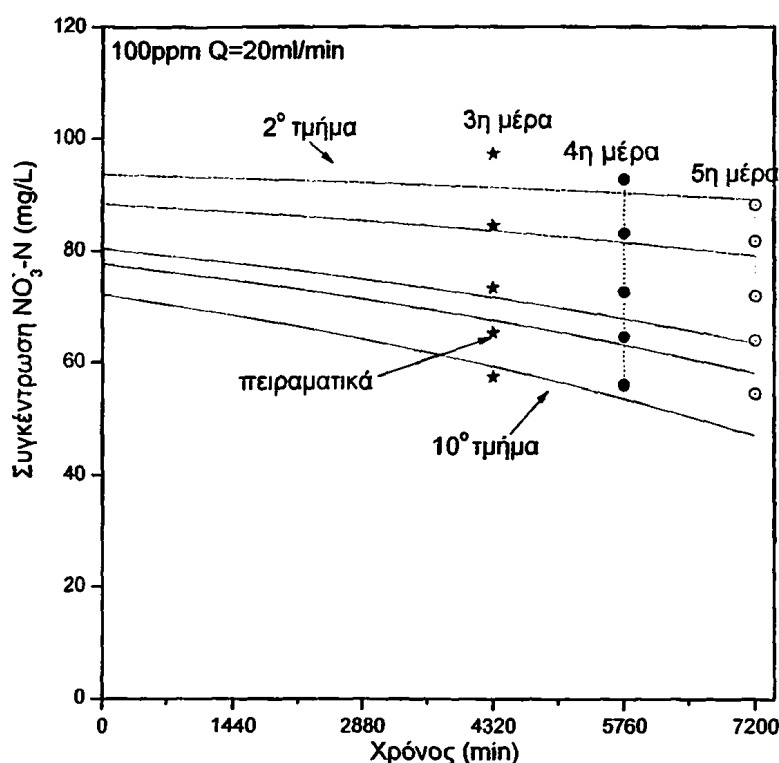
Σχήμα 4.11. Διαμόρφωση πάχους βιοφίλμ για τα δέκα τμήματα του αντιδραστήρα σε σχέση με το χρόνο από τη στιγμή της πλύσης μέχρι τη στιγμή της τελευταίας δειγματοληψίας.

Στο Σχήμα 4.12 απεικονίζεται η μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το χρόνο για τα δέκα τμήματα του αντιδραστήρα, από τη στιγμή της πλύσης μέχρι τη στιγμή της τελευταίας δειγματοληψίας, για παροχή και συγκέντρωση π.χ. 10 mL/min και 150 mg/L.



Σχήμα 4.12. Διαμόρφωση των συγκεντρώσεων του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το χρόνο για τα δέκα τμήματα του αντιδραστήρα από τη στιγμή της πλύσης μέχρι τη στιγμή της τελευταίας δειγματοληψίας.

Σχήμα 4.13 απεικονίζεται η διαμόρφωση των συγκεντρώσεων του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το χρόνο για τα τμήματα που αντιστοιχούν στα δειγματοληπτικά σημεία του αντιδραστήρα, για παροχή και συγκέντρωση π.χ. 20 mL/min και 100 mg/L . Για τη θεωρητική πρόβλεψη ο αντιδραστήρας χωρίστηκε σε 10 τμήματα που το καθένα αντιστοιχεί σε 4 cm του αντιδραστήρα. Τα δειγματοληπτικά σημεία του αντιδραστήρα απέχουν κατά 8 cm μεταξύ τους. Έτσι το δεύτερο τμήμα της θεωρητικής πρόβλεψης αντιστοιχεί στο πρώτο πειραματικό σημείο. Στο Σχήμα 4.13 φαίνονται τα πειραματικά δεδομένα των τριών ημερών (σύμβολα) και οι θεωρητικές προβλέψεις του μοντέλου των τμημάτων που αντιστοιχούν στα σημεία δειγματοληψίας. Από το παρακάτω διάγραμμα χρησιμοποιήθηκαν τα πειραματικά δεδομένα των τριών ημερών (Σχήμα 4.7(γ)). Για την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των θεωρητικών προβλέψεων των τριών ημερών.



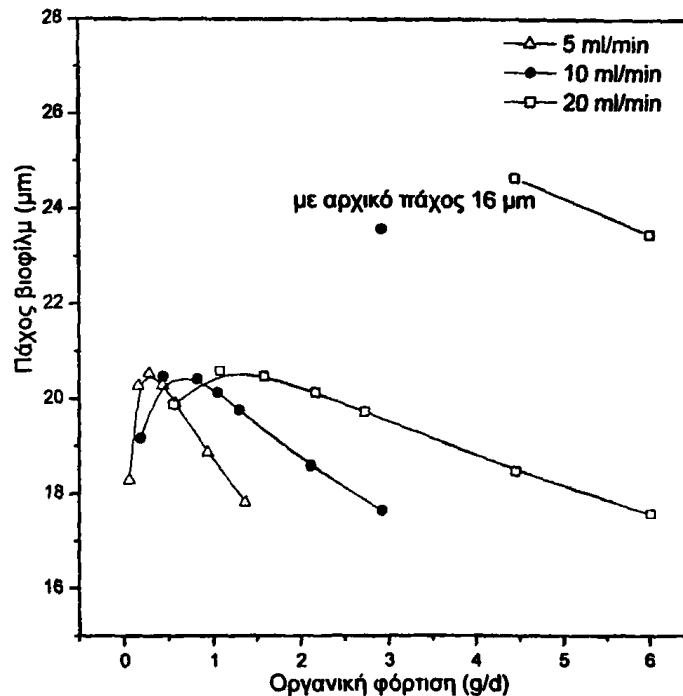
Σχήμα 4.13. Διαμόρφωση των συγκεντρώσεων του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το χρόνο για τα τμήματα που αντιστοιχούν στα δειγματοληπτικά σημεία του αντιδραστήρα.

Στα Σχήματα 4.7 και 4.9, παρουσιάζεται η πρόβλεψη του μαθηματικού μοντέλου όπως προέκυψε από την προσομοίωση της συνεχούς λειτουργίας του αντιδραστήρα 2 και του συστήματος των αντιδραστήρων, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι η θεωρητική πρόβλεψη βρίσκεται σε πολύ καλή συμφωνία με τα πειραματικά δεδομένα για τις περισσότερες παροχές και συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου που εφαρμόστηκαν.

Στο Σχήμα 4.7 παρατηρείται αστοχία του μοντέλου στην περιγραφή των συνδυασμών παροχής και συγκεντρώσεως 10 mL/min και 200 mg/L (Σχήμα 4.7(β)), 20 mL/min και 150 mg/L και 20 mL/min και 200 mg/L (Σχήμα 4.7(γ)). Η αστοχία αυτή οφείλεται στο ότι η αρχική τιμή του πάχους του βιοφίλμ είναι μικρή για να περιγράψει τη μεγάλη απομάκρυνση των νιτρικών. Σε αυτές τις περιπτώσεις βρέθηκε με τη χρήση του Aquasim (έκδοση 2.1d), ότι το αρχικό πάχος του βιοφίλμ έπρεπε να είναι 0.0016 cm. Αυτό οφείλεται στη μεγάλη ανάπτυξη της βιομάζας που προκαλείται από τη μεγαλύτερη οργανική φόρτιση στον αντιδραστήρα, η οποία παραμένει στο βιοφίλμ και δεν αποκολλάται με το πλύσιμο. Οι

θεωρητικές προβλέψεις των συγκεντρώσεων όπως προέκυψαν με αρχικό πάχος βιοφίλμ 0.0016 cm, απεικονίζονται στο Σχήμα 4.7 με διακεκομμένες καμπύλες.

Στο Σχήμα 4.14 φαίνεται η διαμόρφωση του πάχους του βιοφίλμ σε σχέση με την οργανική φόρτιση, όπως διαμορφώθηκε μετά την τέταρτη μέρα με αρχικό πάχος βιοφίλμ 0.0012 cm και 0.0016 cm (για τις τρεις περιπτώσεις με μεγάλη οργανική φόρτιση).



Σχήμα 4.14. Διαμόρφωση πάχους βιοφίλμ σε σχέση με την οργανική φόρτιση, όπως διαμορφώθηκε μετά την τέταρτη μέρα με αρχικό πάχος βιοφίλμ 0.0012 cm και 0.0016 cm.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η αδυναμία του μοντέλου να περιγράψει επακριβώς τις μεταβολές των συγκεντρώσεων τόσο στη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης όσο και στη συνεχή λειτουργία θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι το μοντέλο δεν περιλαμβάνει τη γεωμετρία των χαλικιών πάνω στα οποία αναπτύσσεται το βιοφίλμ, ούτε τις αλληλεπιδράσεις που τυχόν αναπτύσσονται μεταξύ των πληθυσμών μιας μικτής καλλιέργειας.

4.4.5. Μεταβολή του πάχους του βιοφίλμ

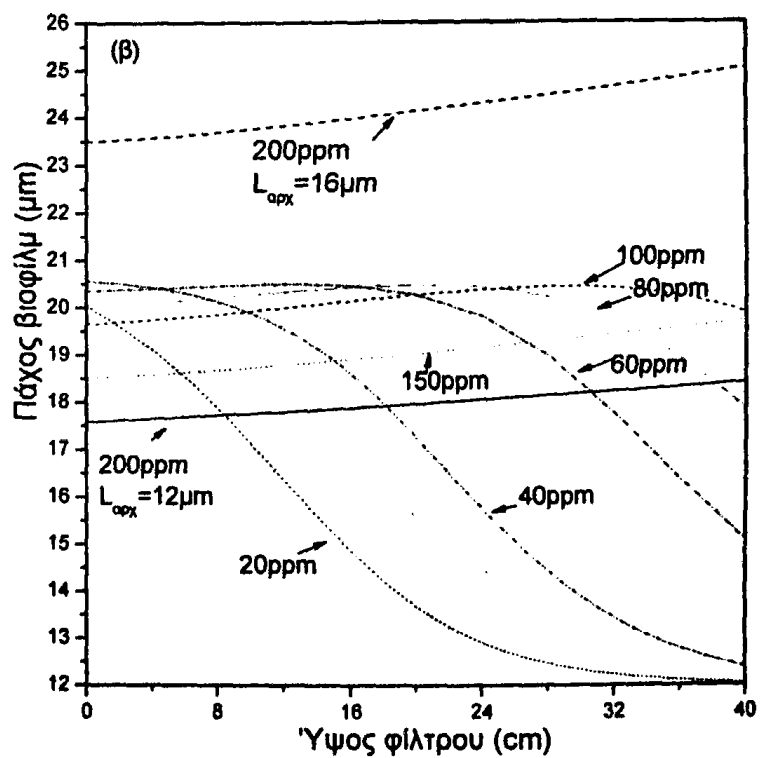
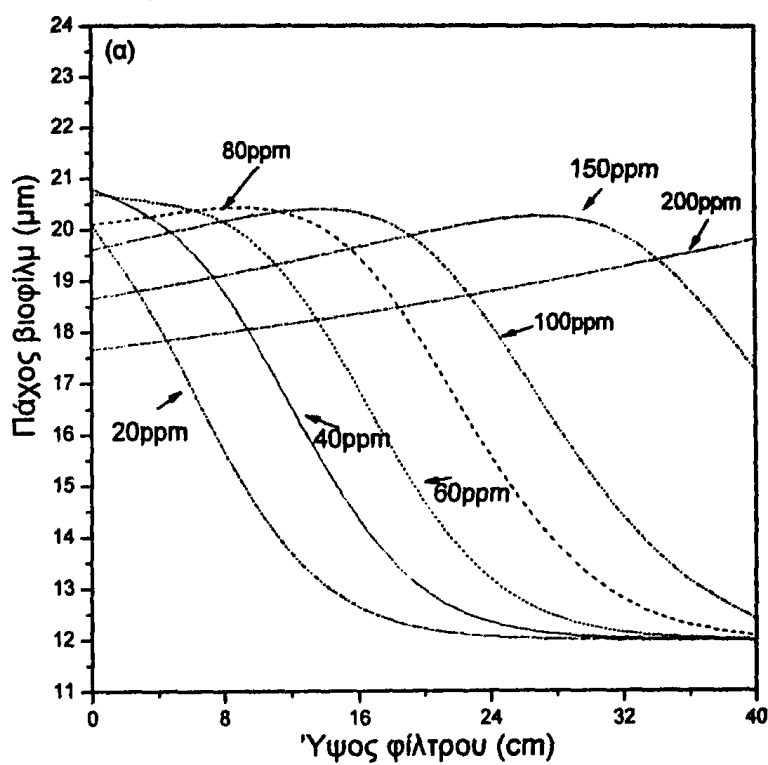
Στο Σχήμα 4.15 φαίνεται η διαμόρφωση του πάχους του βιοφίλμ κατά μήκος του φίλτρου την τέταρτη μέρα με αρχικό πάχος βιοφίλμ 12 μm, όπως προέκυψε από την προσομοίωση των

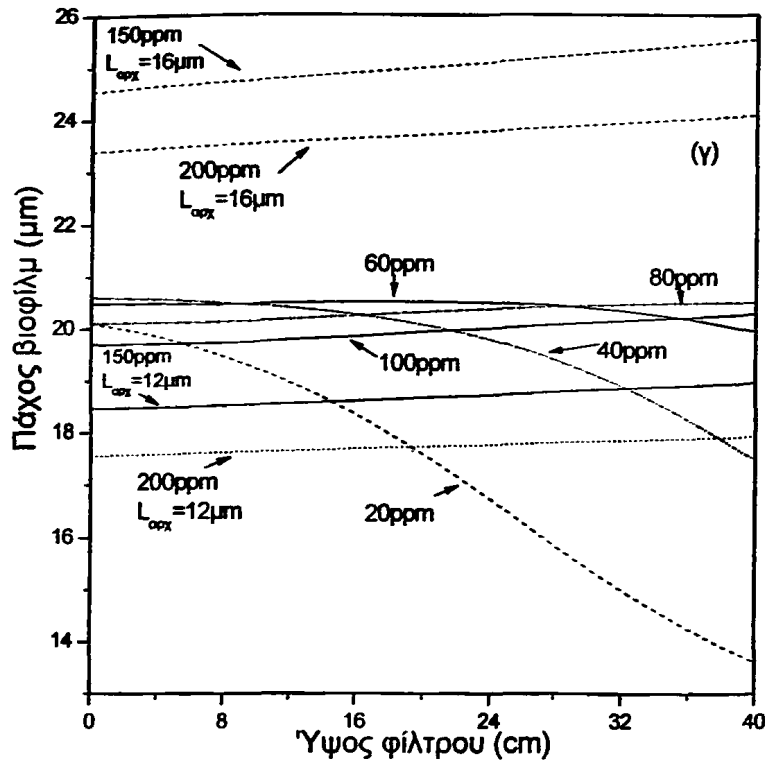


πειραματικών δεδομένων της συνεχούς λειτουργίας του αντιδραστήρα με χαλίκι μέσης διαμέτρου 2.41 mm, για συγκέντρωση τροφοδοσίας από 20 έως 200 mg NO_3^- -N/L και ογκομετρική παροχή: 5 mL/min (Σχήμα 4.15(α)), 10 mL/min (Σχήμα 4.15(β)) και 20 mL/min (Σχήμα 4.15(γ)).

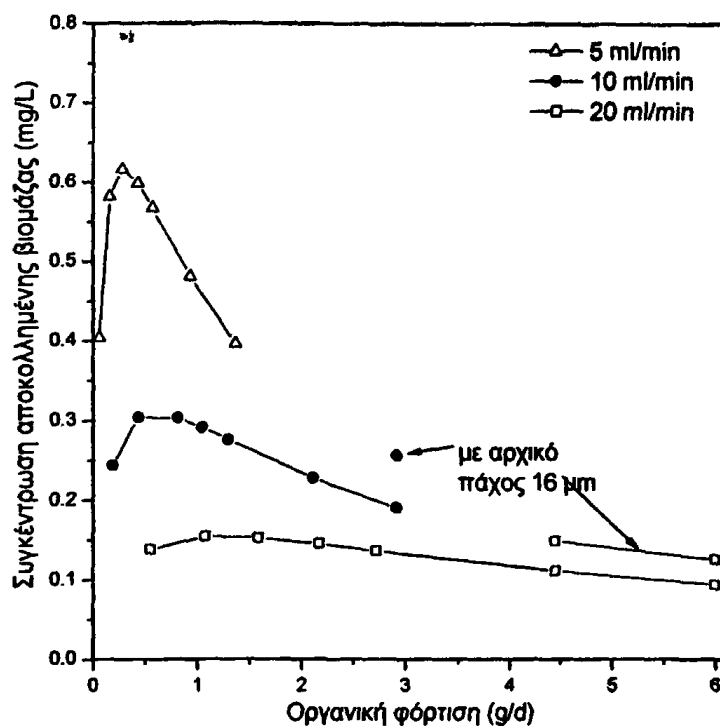
Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση NO_3^- -N στην τροφοδοσία από 20 σε 40 mg/L το πάχος του βιοφίλμ αυξάνεται. Το πάχος του βιοφίλμ μειώνεται στα πρώτα τμήματα του αντιδραστήρα καθώς η συγκέντρωση NO_3^- -N αυξάνεται από 60 - 200 mg/L, εξαιτίας της παρεμποδιστικής δράσης των νιτρικών. Παρατηρήθηκε ότι το πάχος του βιοφίλμ μειώνεται με τη μείωση της συγκέντρωσης NO_3^- -N κατά μήκος του φίλτρου. Τέλος, σε περιπτώσεις όπως στα τελευταία τμήματα του φίλτρου η συγκέντρωση διατηρείται υψηλή αλλά λιγότερο παρεμποδιστική, παρατηρείται μία μικρή αύξηση του πάχους του βιοφίλμ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο συνδυασμός παροχής και συγκέντρωσης των 5 mL/min και 200 mg/L (Σχήμα 4.15(α)).

Σημειώνεται ότι το πώς θα διαμορφωθεί το πάχος του βιοφίλμ, εξαρτάται από την οργανική φόρτιση του κάθε τμήματος του αντιδραστήρα, από την ογκομετρική παροχή και από τη βιομάζα που αποκολλάται κάθε φορά από την επιφάνεια του βιοφίλμ. Στο Σχήμα 4.16 φαίνεται η συγκέντρωση της αποκολλημένης βιομάζας σε σχέση με την οργανική φόρτιση, όπως προέκυψε κατά την τέταρτη μέρα για τις τρεις διαφορετικές παροχές με αρχικό πάχος βιοφίλμ 12 μm .



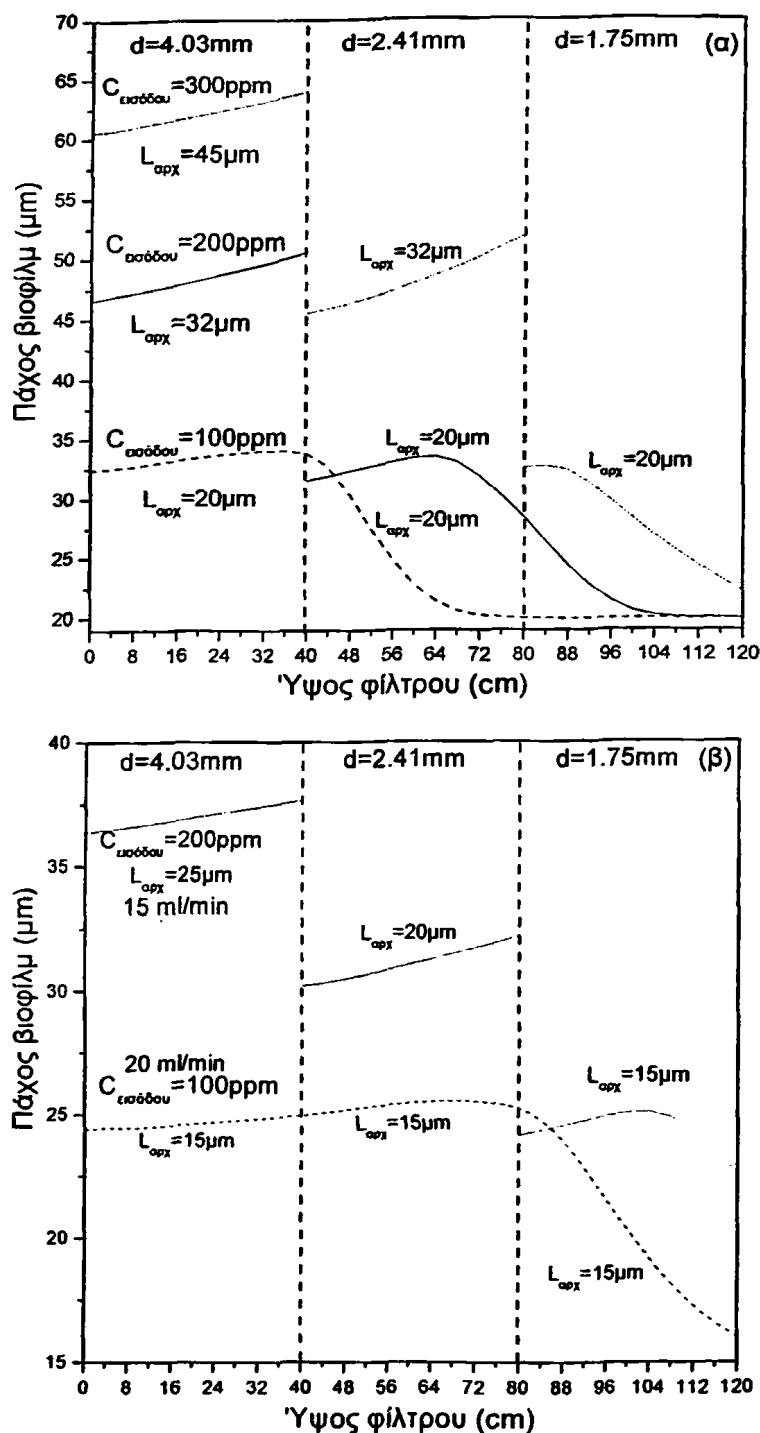


Σχήμα 4.15. Θεωρητική μεταβολή του πάχους του βιοφίλμ κατά μήκος του αντιδραστήρα 2 ($d=2.41$ mm), κατά τη συνεχή λειτουργία με συγκέντρωση τροφοδοσίας από 20 μέχρι $200 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$, και παροχή α) 5 mL/min , β) 10 mL/min , και γ) 20 mL/min .



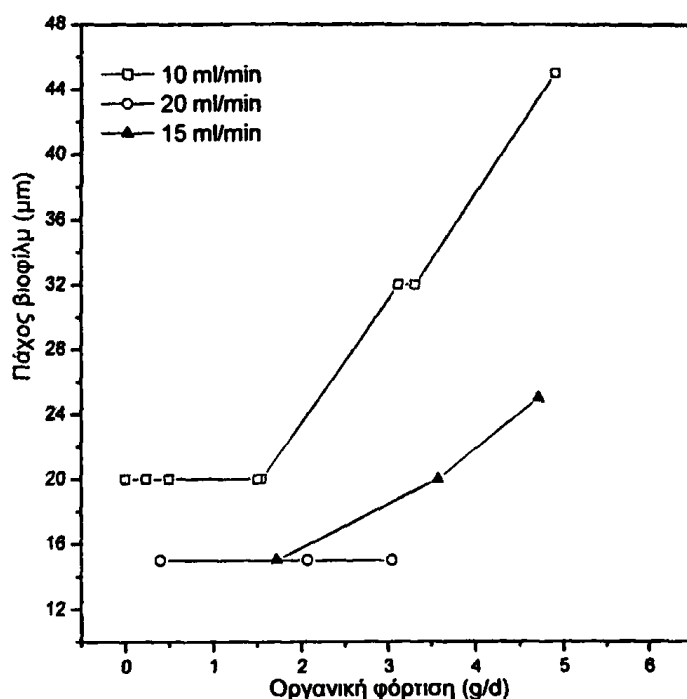
Σχήμα 4.16. Συγκέντρωση αποκολλημένης βιομάζας σε σχέση με την οργανική φόρτιση, όπως διαμορφώθηκε μετά την τέταρτη μέρα με αρχικό πάχος βιοφίλμ 0.0012 cm και 0.0016 cm.

Στο Σχήμα 4.17 φαίνονται οι μεταβολές του πάχους του βιοφίλμ κατά μήκος του φίλτρου, όπως προέκυψαν από την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων της συνεχούς λειτουργίας του συστήματος των τριών αντιδραστήρων σε σειρά, για συγκέντρωση τροφοδοσίας από 100 έως 340 mg/L και ογκομετρική παροχή: 5 mL/min (Σχήμα 4.17(α)), 15 και 20 mL/min (Σχήμα 4.17(β)). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.17 για την προσομοίωση της συνεχούς λειτουργίας του τριπλού φίλτρου, βρέθηκε με τη χρήση του Aquasim, ότι το αρχικό πάχος του βιοφίλμ έπρεπε να είναι διαφορετικό για κάθε φίλτρο ξεχωριστά. Αυτό οφείλεται στο διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό του κάθε φίλτρου και στη διαφορετική συγκέντρωση εισόδου που δέχεται το καθένα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη διαμόρφωση διαφορετικού πάχους βιοφίλμ στους αντιδραστήρες.



Σχήμα 4.17. Θεωρητική μεταβολή του πάχους του βιοφίλμ κατά μήκος των τριών αντιδραστήρων σε σειρά, κατά τη συνεχή λειτουργία με συγκέντρωση τροφοδοσίας από 100 μέχρι $340\text{ mgNO}_3^-/\text{L}$, και παροχή α) 10 mL/min, β) 15 και 20 mL/min.

Πιο συγκεκριμένα για την ογκομετρική παροχή των 10 mL/min, (Σχήμα 4.17(α)) παρατηρείται ότι το αρχικό πάχος διατηρεί την τιμή των 20 μm για οργανικές φορτίσεις > 3 g/d (Σχήμα 4.18) και στη συνέχεια αυξάνεται. Για την ογκομετρική παροχή των 20 mL/min, (Σχήμα 4.17(β)) παρατηρείται ότι το αρχικό πάχος διατηρεί την τιμή των 15 μm για οργανικές φορτίσεις > 3 g/d (Σχήμα 4.18) και στη συνέχεια αυξάνεται.



Σχήμα 4.18. Αρχική τιμή πάχους βιοφίλμ σε σχέση με την οργανική φόρτιση, όπως προκύπτει από την πρόβλεψη του μοντέλου για τη συνεχή λειτουργία των τριών αντιδραστήρων σε σειρά.

4.5. Συμπεράσματα

Από τη μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- ο ρυθμός απονιτροποίησης στους αντιδραστήρες σταθερής κλίνης είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου.
- ο αντιδραστήρας σταθερής κλίνης με το μεσαίου μεγέθους πληρωτικό υλικό ($d=2.41\text{ mm}$), κατά τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης, πέτυχε μεγαλύτερους ρυθμούς απονιτροποίησης, λόγω της μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας από το πληρωτικό υλικό των



4.03 mm και της αποφυγής των λειτουργικών προβλημάτων συγκρινόμενο με το πληρωτικό υλικό των 1.75 mm.

- Η συνεχής λειτουργία του ενός αντιδραστήρα αποδείχθηκε πιο αποδοτική από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης για την ογκομετρική παροχή των 20 mL/min.
- Η συνεχής λειτουργία των τριών αντιδραστήρων σε σειρά, πέτυχε μεγαλύτερους ρυθμούς απονιτροποίησης, από τη συνεχή λειτουργία του ενός αντιδραστήρα και τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης. Επίσης η χρήση του συστήματος αυτού αύξησε τη συγκέντρωση που μπορεί να υποστεί επεξεργασία με ασφάλεια στα 340 mgNO₃⁻-N /L.
- Εφαρμόστηκε μαθηματικό μοντέλο το οποίο περιγράφει τη διαδικασία της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων NO₃⁻-N (10-340 mg/L) σε διαφορετικές λειτουργίες (συνεχής, άντλησης-πλήρωσης).
- Υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου αυτού έτσι ώστε να περιγράφουν τη συμπεριφορά της βιομάζας όταν είναι σταθεροποιημένη σε πληρωτικό υλικό.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΘΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ
ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΕ ΜΙΚΤΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ**



5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΚΑΘΑΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΕ ΜΙΚΤΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

5.1. Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η απομόνωση και η ταυτοποίηση τεσσάρων βακτηρίων από μκτική υδρογονοτροφική καλλιέργεια. Τα βακτηριακά είδη που απομονώθηκαν ήταν το *Acidovarax sp.* strain Ic3, *Paracoccus sp.* strain Ic1, *Acinetobacter sp.* strain Ic2 και το *Alcaligenes sp.* strain Ic4. Στόχος ήταν ο χαρακτηρισμός των βακτηριακών ειδών ως απονιτροποιητικών βακτηρίων που χρησιμοποιούν το υδρογόνο σαν δότη ηλεκτρονίων και η μελέτη της συμπεριφοράς τους, καθώς αναπτύσσονταν σε καθαρές καλλιέργειες κάτω από υδρογονοτροφικές συνθήκες. Τρία από τα βακτηριακά αυτά είδη ήταν ικανά για υδρονοτροφική απονιτροποίηση υπό ανοξικές συνθήκες. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο ικανό να περιγράφει την υδρογονοτροφική απονιτροποίηση και τη συμπεριφορά κάθε βακτηριακού είδους και υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι για κάθε ένα είδος ξεχωριστά.

Έπειτα, σε μία προσπάθεια κατανόησης των απονιτροποιητικών χαρακτηριστικών και των αλληλεπιδράσεων των παραπάνω τριών απονιτροποιητικών βακτηρίων (*Acidovarax sp.* strain Ic3, *Paracoccus sp.* strain Ic1, *Acinetobacter sp.* strain Ic2), όταν αυτά συνυπάρχουν στο ίδιο περιβάλλον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής με συνδυασμένες (μικτές) καλλιέργειες του *Acidovarax sp.* strain Ic3 και του *Acinetobacter sp.* strain Ic2, του *Paracoccus sp.* strain Ic1 και του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 και των *Acidovarax sp.* strain Ic3, *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 μαζί. Για την προσομοίωση της συμπεριφορά των συνδυασμένων καλλιεργειών, έγινε συνδυασμός των μαθηματικών μοντέλων των καθαρών καλλιεργειών. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκε η πειραματική διάταξη που απεικονίζεται στο Σχήμα 2.1(α).

Η πειραματική και θεωρητική μελέτη της συμπεριφοράς των καθαρών και των συνδυασμένων καλλιεργειών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως οδηγός στο σχεδιασμό και την αξιολόγηση των συνθηκών, κάτω από τις οποίες θα αποφεύγεται για παράδειγμα η συσσώρευση νιτρωδών ή θα αυξάνεται ο ρυθμός απονιτροποίησης ενός συστήματος επεξεργασίας νερού ρυπασμένου από νιτρικά. Τα μοντέλα αυτά μπορούν να ενσωματωθούν



μέσα σε ένα γενικευμένο μοντέλο για τη βελτίωση της ακρίβειας και της δυνατότητας εφαρμογής του στην επεξεργασία του πόσιμου νερού.

Παρόλο που έχουν γίνει προσπάθειες για την εφαρμογή κινητικών μοντέλων στην υδρογονοτροφική απονιτροποίηση (Sakakibara et al., 1994; Haugen et al., 2002; Rezaei et al., 2005), όπως αναφέρθηκε (πιο αναλυτικά) και στο Κεφάλαιο 1, αυτά αναφέρονται σε μικτές καλλιέργειες απονιτροποιητικών βακτηρίων. Οι μαθηματικές εκφράσεις που περιγράφουν την συμπεριφορά των μικτών καλλιεργειών είναι συνδεδεμένες με τη δομή του πληθυσμού της καλλιέργειας και με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων.

Έχουν γίνει μελέτες για τον χαρακτηρισμό της μικροβιακής σύνθεσης σε υδρογονοτροφικά συστήματα απονιτροποίησης, όπου απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν βακτηριακοί πληθυσμοί από συστήματα επεξεργασίας ρυπασμένου από νιτρικά νερού (Liessens et al., 1992; Mansell and Schroeder, 2002; Szekeres et al., 2002; Vanbrabant et al., 1993).

Οι αναφορές για τη μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης με καθαρές καλλιέργειες βακτηρίων είναι ελάχιστες (Chang et al., 1999; Ho et al., 2001; Smith et al., 2005). Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει μερικές προσπάθειες να εξεταστούν καθαρές καλλιέργειες υδρογονοτροφικών βακτηρίων με σκοπό τη μελέτη της οξείδωσης του υδρογόνου (Haring and Conrad, 1991; Smith et al., 1994). Δεν υπάρχει, όμως, καμία πειραματική ή θεωρητική μελέτη της απονιτροποιητικής συμπεριφοράς καθαρών καλλιεργειών υδρογονοτροφικών βακτηρίων και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ δύο ή τριών βακτηριακών πληθυσμών. Τέλος, κατάλληλα μαθηματικά μοντέλα έχουν εφαρμοστεί σε συστήματα ετερότροφης απονιτροποίησης και απονιτροποίησης με θείο, για την περιγραφή της συμπεριφοράς βακτηριακών ειδών καθώς αυτά αναπτύσσονται μόνα τους ή συνυπάρχουν με άλλα είδη (Kornaros and Lyberatos, 1997 και 1998; Marazioti et al., 2003; Koenig and Liu, 2001).

Η καλύτερη κατανόηση των κινητικών που περιγράφουν κάθε βακτηριακό είδος χωριστά, αλλά και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών, που τυχόν αναπτύσσονται στις συνδυασμένες καλλιέργειες, αποτελεί πλεονέκτημα στο σχεδιασμό συστημάτων υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης και στην ανάπτυξη στρατηγικών λειτουργίας αυτών.



5.2. Απομόνωση απονιτροποιητικών βακτηρίων

Η απομόνωση και ταυτοποίηση των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο 'Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας' του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δείγμα 1 mL μικτής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας πάρθηκε από αντιδραστήρα διαλείποντος έργου όπου διεξάγονταν πείραμα άντλησης-πλήρωσης (Κεφάλαιο 3, Σχήμα 3.1), για τη μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης. Το δείγμα αραιώθηκε διαδοχικά σε υγρό θρεπτικό μέσο και η κάθε αραιώση επιστρώθηκε σε ξεχωριστό τρυβλίο.

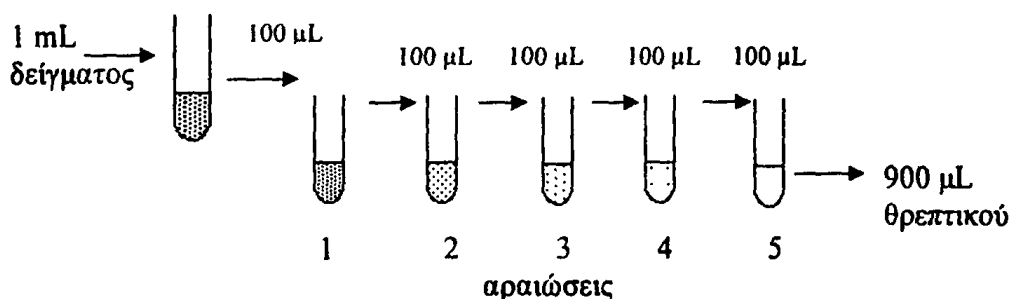
Το υγρό θρεπτικό μέσο περιείχε πόσιμο νερό, KNO_3 (0.36 g/L), KH_2PO_4 (3.39 g/L) και Na_2HPO_4 (3.53 g/L). Το θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε στις διαδοχικές αραιώσεις ήταν αποστειρωμένο. Πρέπει να σημειωθεί ότι το κάθε συστατικό αποστειρωνόταν ξεχωριστά έτσι ώστε να αποφευχθεί η αντίδραση μεταξύ των παραπάνω συστατικών, η οποία προκαλούσε θολότητα στο θρεπτικό. Για παράδειγμα, για την παρασκευή 100 mL θρεπτικού για αραιώσεις αποστειρώνονταν 80 mL πόσιμο νερό με το KNO_3 (σε μία κωνική φιάλη), 10 mL απιονισμένου νερού με KH_2PO_4 (το απιονισμένο νερό χρησιμοποιήθηκε εδώ για την αποφυγή της αντίδρασης του άλατος με τα συστατικά του νερού) και 10 mL απιονισμένου νερού με Na_2HPO_4 (σε διαφορετικά δοχεία). Τα τρία θρεπτικά αφήνονταν να κρυώσουν και έπειτα αναμιγνύονταν μεταξύ τους στην κωνική φιάλη.

Τα τρυβλία περιείχαν στερεό θρεπτικό μέσο. Το στερεό θρεπτικό περιείχε απιονισμένο νερό, KNO_3 (0.36 g/L), KH_2PO_4 (3.39 g/L), Na_2HPO_4 (3.53 g/L) και 15 g άγαρ (Oxoid) για 1 L θρεπτικού. Το θρεπτικό που χρησιμοποιούνταν στα τρυβλία ήταν αποστειρωμένο. Για την παρασκευή του θρεπτικού αυτού το κάθε συστατικό αποστειρωνόταν ξεχωριστά. Για την παρασκευή 1000 mL θρεπτικού αποστειρώνονταν 960 mL απιονισμένου νερού με KNO_3 και το άγαρ (σε μία κωνική φιάλη), 20 mL απιονισμένου νερού με KH_2PO_4 και 20 mL απιονισμένου νερού με Na_2HPO_4 (σε διαφορετικά δοχεία). Τα τρία θρεπτικά αναμιγνύονταν μεταξύ τους, χωρίς να κρυώσουν, στην κωνική φιάλη. Στη συνέχεια γεμίζονταν τα τρυβλία με το θρεπτικό και αφήνονταν για 20 ώρες έτσι ώστε να σταθεροποιηθεί το θρεπτικό. Στη συνέχεια αποθηκεύονταν στο ψυγείο. Εδώ χρησιμοποιήθηκε εξολοκλήρου απιονισμένο νερό για την αποφυγή της αντίδρασης των αλάτων με τα συστατικά του νερού, καθώς η ανάμιξη πραγματοποιείται όταν επικρατούν ακόμα υψηλές θερμοκρασίες. Με τον τρόπο αυτό



αποφεύγεται η θολότητα στα τρυβλία, έτσι ώστε να είναι ευδιάκριτες οι αποικίες των μικροοργανισμών.

Η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων είχε ως εξής: σε πλαστικά δοχεία των 1.5 mL (tubes) τοποθετούνταν 900 μ L υγρού θρεπτικού (Σχήμα 5.1). 100 μ L δείγματος μεταφέρονταν σε δοχείο που περιείχε 900 μ L υγρού θρεπτικού και ακολουθούσε ανάδευση. Στη συνέχεια 100 μ L της πρώτης αραιώσης μεταφέρονταν σε καινούργιο δοχείο με 900 μ L υγρού θρεπτικού και ακολουθούσε ανάδευση. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για την 3^η, την 4^η και 5^η αραιώση. Στη συνέχεια το υγρό κάθε αραιώσης επιστρώθηκε σε ξεχωριστό τρυβλίο.



Σχήμα 5.1. Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων.

Τα τρυβλία επώστηκαν υπό αερόβιες συνθήκες στους 28°C. Έπειτα από 2-3 μέρες, αναπτύχθηκαν ξεχωριστές αποικίες οι οποίες διέφεραν ως προς τη μορφολογία τους. Μία αποικία από κάθε είδος επιλέχθηκε (από το τρυβλίο της αραιώσης στο οποίο ήταν πιο απομονωμένη από τα άλλα είδη αποικιών), μεταφέρθηκε σε καινούργιο τρυβλίο με φρέσκο θρεπτικό και επώστηκε κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Η διαδικασία αυτή των διαδοχικών επιστρώσεων των αποικιών συνεχίστηκε εφόσον να δημιουργηθούν καθαρές αποικίες που να ανήκουν σε ένα μόνο είδος μορφολογικά σε κάθε τρυβλίο. Απομονώθηκαν έτσι τέσσερα διαφορετικά είδη καθαρών αποικιών. Αποικίες από κάθε είδος επώστηκαν σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) στους 28°C στις 200 rpm. Για την παρασκευή 100 mL LB χρειάζονται, 1 g peptone, 0.5 g yeast, 1 g NaCl. Τα συστατικά διαλύονται σε 50 mL απιονισμένου νερού και στη συνέχεια συμπληρώνεται νερό έως τα 100 mL. Η επώση συνεχίστηκε μέχρι που παρατηρήθηκε ανάπτυξη της κάθε είδους καλλιέργειας στο θρεπτικό. Ένα μέρος από κάθε μία από τις παραπάνω καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε για τη εξαγωγή του γονιδιωματικού / γενωμικού DNA ενώ το υπόλοιπο αποθηκεύτηκε για να χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο στα πειράματα κινητικής προκειμένου να



μελετηθεί το εάν οι μικροοργανισμοί ήταν ικανοί για υδρογονοτροφική απονιτροποίηση υπό ανοξικές συνθήκες. Η καλλιέργειες αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Για την αποθήκευσή τους 0.6 mL καλλιέργειας αναμίχθηκαν με 0.6 mL γλυκερόλη 40% σε δοχεία των 1.5 mL (tubes) και στη συνέχεια καταψύχθηκαν ακαριαία σε υγρό άζωτο. Τέλος τοποθετήθηκαν για να διατηρηθούν στους -80°C .

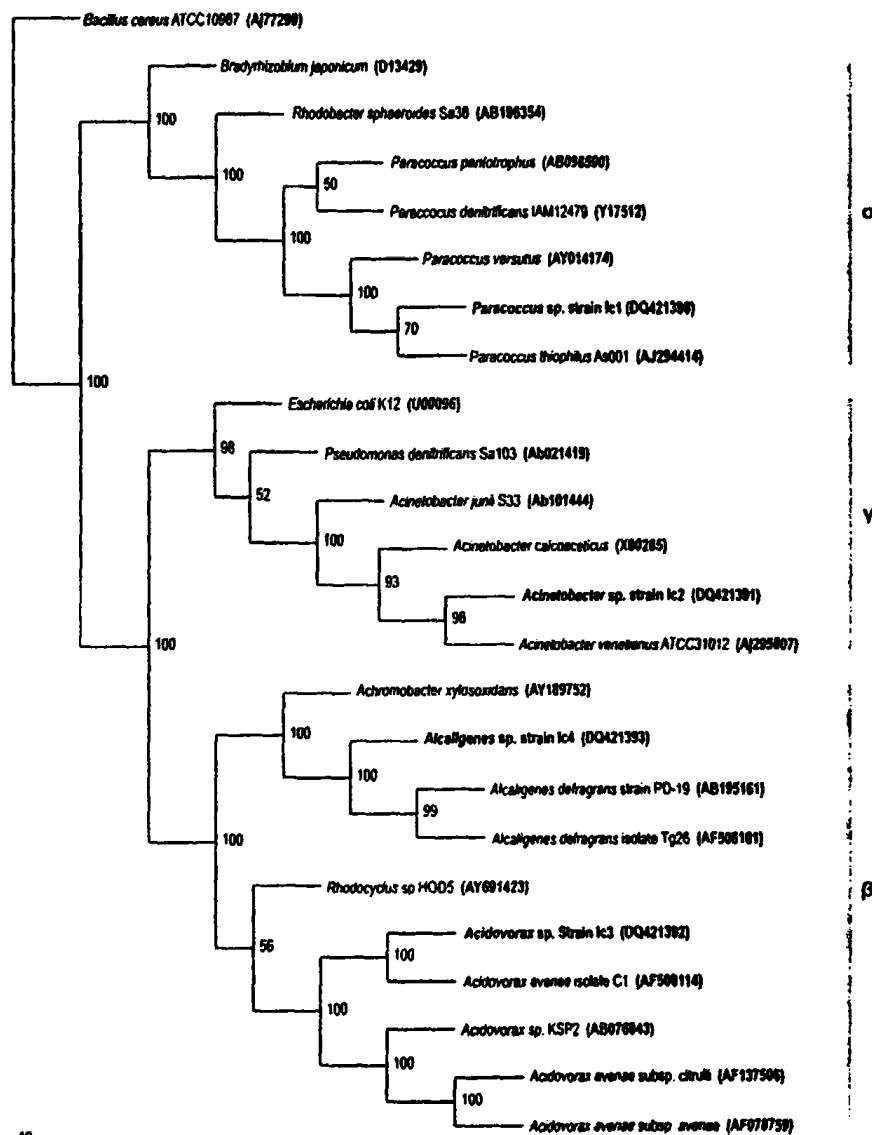
5.2.1 Απομόνωση DNA - αλληλούχιση και ανάλυση του γονιδίου 16S rDNA

Γενωμικό/Γονιδιωματικό DNA από κάθε καθαρή καλλιέργεια, απομονώθηκε με το DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια από το τελικό εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκαν 2 μL ως υπόστρωμα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Ο συνολικός όγκος κάθε αντίδρασης PCR ήταν 50 μL . Οι γενικοί εκκινητές ευβακτηρίων, 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') και 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Cole et al., 2003), χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rDNA. Η ενίσχυση του DNA, πραγματοποιήθηκε σε έναν θερμοκυκλοποιητή PTC-200 (MJ Research Inc.) χρησιμοποιώντας τις ακόλουθες συνθήκες: 4 λεπτά στους 94°C για την αρχική αποδιάταξη, 35 κύκλους αποδιάταξης (1 λεπτό στους 94°C), υβριδοποίησης (1 λεπτό στους 50°C) και επιμήκυνσης (2 λεπτά στους 72°C). Τέλος, έλαβε χώρα η τελική επιμήκυνση για 10 λεπτά στους 72°C .

Το Qiagen® Nucleotide Removal Kit χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR. Η αλληλούχιση έγινε από την εταιρία MACROGEN χρησιμοποιώντας τους εσωτερικούς εκκινητές 536f (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'), 1114f (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'), 519r (5'-GAATTAAGTGGGCGTAAAGAGT-3'), 960r (5'-GCTTGTGCGGGYCCCCG-3'). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από την αλληλούχιση, ευθυγραμμίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος CLUSTAL X (Thompson et al., 1997), μαζί με τις ήδη γνωστές αλληλουχίες συγγενικών οργανισμών οι οποίες λήφθηκαν από την βάση δεδομένων GeneBank χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα αναζήτησης BLAST (Altschul et al., 1990). Ο πίνακας των αποστάσεων υπολογίστηκε με βάση τον αλγόριθμο Jukes and Cantor χρησιμοποιώντας 1298 αναμφισβήτητα ευθυγραμμισμένες θέσεις και το φυλογενετικό δέντρο δημιουργήθηκε με βάση τη μέθοδο neighbor-joining, χρησιμοποιώντας το πακέτο PHYLIP (Felsenstein, 1993). Η ανάλυση bootstrap πραγματοποιήθηκε σε 100 επαναλήψεις



χρησιμοποιώντας το ίδιο πακέτο προγραμμάτων. Οι αλληλουχίες του γονιδίου 16S rDNA που βρέθηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης, έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων EMBL και έχουν αριθμούς πρόσβασης από DQ421390 μέχρι DQ421393.



Σχήμα 5.2. Φυλογενετικό δέντρο που υποδεικνύει τις φυλογενετικές σχέσεις των στελεχών Ic1, Ic2, Ic3 και Ic4 σε σχέση με συγγενικά είδη από τις ομάδες α, β και γ των πρωτεοβακτηρίων. Το δέντρο είναι βασισμένο στο γονίδιο 16S rDNA και ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο neighbour-joining. Σαν παραομάδα χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ATCC *Bacillus cereus*. Οι αριθμοί στα σημεία διακλάδωσης αναπαριστούν τιμές bootstrap (ο αριθμός των επαναλήψεων είναι 100). Οι αριθμοί πρόσβασης των αλληλουχιών του 16S rDNA φαίνονται σε παρένθεση.

5.3. Απομόνωση και ταυτοποίηση απονιτροποιητικών βακτηρίων

Μετά τον εμπλουτισμό της καλλιέργειας, τέσσερα στελέχη (Ic1, Ic2, Ic3 και Ic4) διαφορετικής μορφολογίας απομονώθηκαν από το στερεό θρεπτικό μέσο. Η αλληλουχία του γονιδίου 16S rDNA ενισχύθηκε και αλληλουχήθηκε επιτυχώς και από τα τέσσερα στελέχη. Οι αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν με τις περισσότερο όμοιες, ήδη γνωστές αλληλουχίες 16S rDNA που βρίσκονταν στην GenBank και χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων που φαίνονται στο Σχήμα 5.2.

Το στέλεχος Ic1 ανήκει στην α υποομάδα των Πρωτεοβακτηρίων και τοποθετείται στο γένος *Paracoccus* παρουσιάζοντας 100% ομοιότητα με το στέλεχος *Paracoccus thiophilus* AS001 (AJ294414). Το στέλεχος Ic2 τοποθετείται στη γ υποομάδα των Πρωτεοβακτηρίων, στο γένος *Acinetobacter* και παρουσιάζει 100% ομοιότητα με το στέλεχος *Acinetobacter venetianus* ATCC 31012 (AJ295007). Τα στελέχη Ic3 και Ic4 ανήκουν στη β υποομάδα των Πρωτεοβακτηρίων και τοποθετούνται στα γένη *Acidovorax* και *Alcaligenes*, αντίστοιχα. Το στέλεχος Ic3 παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομοιότητα (99.5%) με το *Acidovorax avenae* C1 (Seung-Hun et al., 2003), ενώ το στέλεχος Ic4 παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα (99.3% και 99.2%) με τα *Alcaligenes defragrans* PD-19 (AB195161) και *Alcaligenes defragrans* TG26 (AJ295007), αντίστοιχα.

5.4. Πειραματική και θεωρητική μελέτη καθαρών καλλιεργειών

Για τη μελέτη της συμπεριφοράς και το χαρακτηρισμό κάθε βακτηριακού είδους κάτω από ανοξικές υδρογονοτροφικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής για κάθε ένα είδος χωριστά. Κάθε πείραμα κινητικής εμβολιάστηκε με το αντίστοιχο βακτηριακό είδος. 2 L συνθετικά παραγόμενου ρυπασμένου νερού εμβολιάστηκαν με 2.4 mL καθαρής καλλιέργειας (2 tubes), αφού πρώτα αποψύχονταν από τους -80°C. Το ρυπασμένο νερό περιείχε πόσιμο νερό, KNO₃, KH₂PO₄ (3.39 g/L) και Na₂HPO₄ (3.53 g/L). Το ρυπασμένο νερό που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα κινητικής ήταν αποστειρωμένο. Κάθε συστατικό αποστειρωνόταν ξεχωριστά έτσι ώστε να αποφευχθεί η αντίδραση μεταξύ των παραπάνω συστατικών.

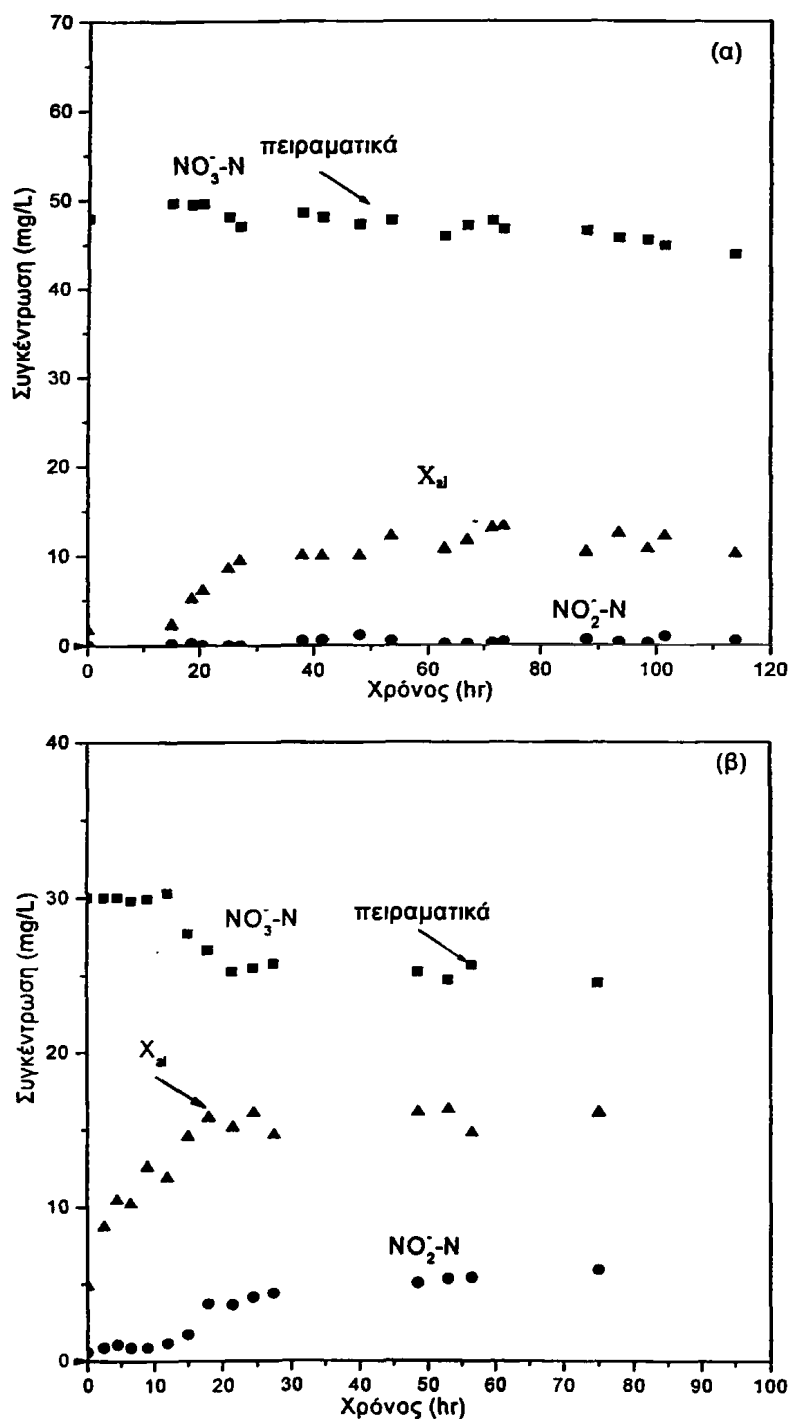
Από τα πειράματα κινητικής που πραγματοποιήθηκαν για το κάθε ένα βακτηριακό είδος προέκυψαν ορισμένα συμπεράσματα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.3(α) το βακτηριακό είδος



Alcaligenes sp. strain Ic4 αποδείχτηκε ότι δεν ήταν ικανό να χρησιμοποιήσει τα νιτρικά ιόντα σαν δέκτη ηλεκτρονίων χρησιμοποιώντας το υδρογόνο ως δότη. Για την επιβεβαίωση της μη υδρογονοτροφικής συμπεριφοράς του βακτηριακού αυτού είδους πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα κινητικής (Σχήμα 5.3(β)) με μικρότερη συγκέντρωση νιτρικών και μεγαλύτερη συγκέντρωση βιομάζας (για να βοηθηθεί η ανάπτυξη του βακτηριακού είδους) με τα ίδια σχεδόν αποτελέσματα. Η μικρή αύξηση της βιομάζας και η ελάχιστη μείωση των νιτρικών στην αρχή των δύο πειραμάτων (Σχήμα 5.3) οφείλεται στην μικρή ποσότητα οργανικού άνθρακα που βρίσκονταν στο εμβόλιο της καλλιέργειας (0.6 mL γλυκερόλη 40%) και είχε χρησιμοποιηθεί για το θρεπτικό μέσο κατά την προετοιμασία καλλιέργειας για την αποθήκευση της στους -80°C (LB, γλυκερόλη). Παρατηρείται ότι αφού καταναλώθηκε η οργανική πηγή άνθρακα το είδος *Alcaligenes sp.* strain Ic4 σταματούσε την διαδικασία της απονιτροποίησης και οι συγκεντρώσεις νιτρικών, νιτρωδών και βιομάζας παρέμεναν σταθερές. Άρα το βακτηριακό αυτό είδος θα μπορούσε μάλλον να χαρακτηριστεί ως ικανό για ετερότροφη απονιτροποίηση και όχι για υδρογονοτροφική.

Στα Σχήματα 5.4, 5.5, και 5.6 απεικονίζονται τα πειράματα κινητικής που πραγματοποιήθηκαν για τα βακτηριακά είδη *Acidovorax sp.* strain Ic3, *Acinetobacter sp.* strain Ic2 και *Paracoccus sp.* strain Ic1, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε ότι και τα τρία αυτά βακτηριακά είδη μπορούσαν να πραγματοποιήσουν την απονιτροποίηση, με διαφορετικό τρόπο το κάθε ένα, κάτω από υδρογονοτροφικές συνθήκες. Σε όλα τα πειράματα κινητικής τα πειραματικά δεδομένα δίνονται από το χρόνο που παρατηρήθηκε η εκθετική φάση ανάπτυξης της καθαρής καλλιέργειας. Για παράδειγμα, στο Σχήμα 5.4 φαίνεται ότι η εκθετική φάση της καλλιέργειας του είδους *Acidovorax sp.* strain Ic3 άρχισε έπειτα από 63 ώρες λειτουργίας του αντιδραστήρα. Τις πρώτες 63 ώρες η καλλιέργεια βρισκόταν στη λανθάνουσα φάση (εγκλιματισμός βακτηρίων), που σημαίνει ότι δεν υπήρχε μεγάλη ανάπτυξη της βιομάζας, ούτε σημαντική μείωση των νιτρικών. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι αρχικές τιμές των συγκεντρώσεων που δίνονται για κάθε πείραμα κινητικής, αναφέρονται στις τιμές εκείνες των συγκεντρώσεων που μετρήθηκαν τη στιγμή της λήξης της λανθάνουσας και της αρχής της εκθετικής φάσης. Επίσης, οι τιμές των συγκεντρώσεων της βιομάζας κάθε βακτηριακού είδους προέκυψαν από τη συσχέτιση της οπτικής πυκνότητας του κάθε είδους με τη συγκέντρωση της βιομάζας (βάρος ξηρής βιομάζας)/(όγκος διαλύματος) μέσο καμπύλων βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν για κάθε είδος ξεχωριστά (Κεφάλαιο 2, ενότ. 2.3).





Σχήμα 5.3. Πειραματική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της καθαρής καλλιέργειας του βακτηριακού είδους *Alcaligenes* sp. strain Ic4 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και βιομάζας ήταν: α) 47.1 mg NO_3^- -N/L και 1.7 mgβιομάζας/L και β) 30 mg NO_3^- -N/L και 4.86 mgβιομάζας/L. Το σύμβολο ' X_{al} ' υποδεικνύει τη συγκέντρωση της βιομάζας του *Alcaligenes* sp. strain Ic4.

Όπως φαίνεται στα Σχήματα 5.4 και 5.6 τα βακτηριακά είδη *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Paracoccus sp. strain Ic1* πραγματοποίησαν την απονιτροποίηση καταναλώνοντας πλήρως τα νιτρικά ιόντα χωρίς να συσσωρευτούν σημαντικές ποσότητες νιτρώδων. Το Σχήμα 5.5 δείχνει ότι το είδος *Acinetobacter sp. strain Ic2*, κατά τη διάρκεια της μείωσης των νιτρικών ιόντων συσσωρεύσε αρκετά μεγάλη ποσότητα νιτρώδων, ως ενδιάμεσο προϊόν. Το 84.1% της αρχικής συγκέντρωσης του νιτρικού αζώτου, συσσωρεύτηκε στον αντιδραστήρα με τη μορφή νιτρώδους αζώτου και στη συνέχεια καταναλώθηκε πλήρως υπό αυτή τη μορφή. Παρατηρήθηκε ότι μετά την πλήρη κατανάλωση/μετατροπή του νιτρικού αζώτου, η ποσότητα της βιομάζας που παράγεται αυξήθηκε από 33 mg/L σε 39 mg/L, καταναλώνοντας/μετατρέποντας λιγότερη ποσότητα αζώτου με τη μορφή των νιτρώδων, κάτι που είναι εμφανές στο Σχήμα 5.5.

Οι ρυθμοί απονιτροποίησης των τριών αυτών βακτηριακών ειδών ήταν για το είδος *Acidovorax sp. strain Ic3*: 1.54 mg/Lh, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 21.5 h, για το είδος *Acinetobacter sp. strain Ic2*: 3 mg/Lh που αναφέρεται στην απομάκρυνση των νιτρικών και 1.4 mg/Lh που αναφέρεται στην απομάκρυνση του ολικού αζώτου, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 24.5 h, τέλος για το είδος *Paracoccus sp. strain Ic1*: 1 mg/Lh, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 36.5 h.

Για την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων ικανών να περιγράψουν τη συμπεριφορά της κάθε καθαρής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας, η απονιτροποίηση θεωρήθηκε σαν μια διαδικασία δύο βημάτων, με τη διαδοχική αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και έπειτα σε αέριο άζωτο χωρίς συσσωρευση ενδιάμεσων αέριων προϊόντων. Η κινητική ανάπτυξης του κάθε βακτηριακού πληθυσμού, θεωρήθηκε ότι περιορίζεται από δύο υποστρώματα, τα νιτρικά και τα νιτρώδη, με παρεμπόδιση από τα νιτρικά και τα νιτρώδη.

Η παρεμπόδιση από τα νιτρικά και τα νιτρώδη μοντελοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την έκφραση Andrews. Η παρεμποδιστική δράση των νιτρικών και των νιτρώδων στην ανάπτυξη των βακτηρίων έχει αναφερθεί και από τους Kornaros and Lyberatos (1998 and 1997), καθώς επίσης και από τους Vasiliadou et al. (2006a), (Κεφάλαιο 3, ενότ. 3.3.1).

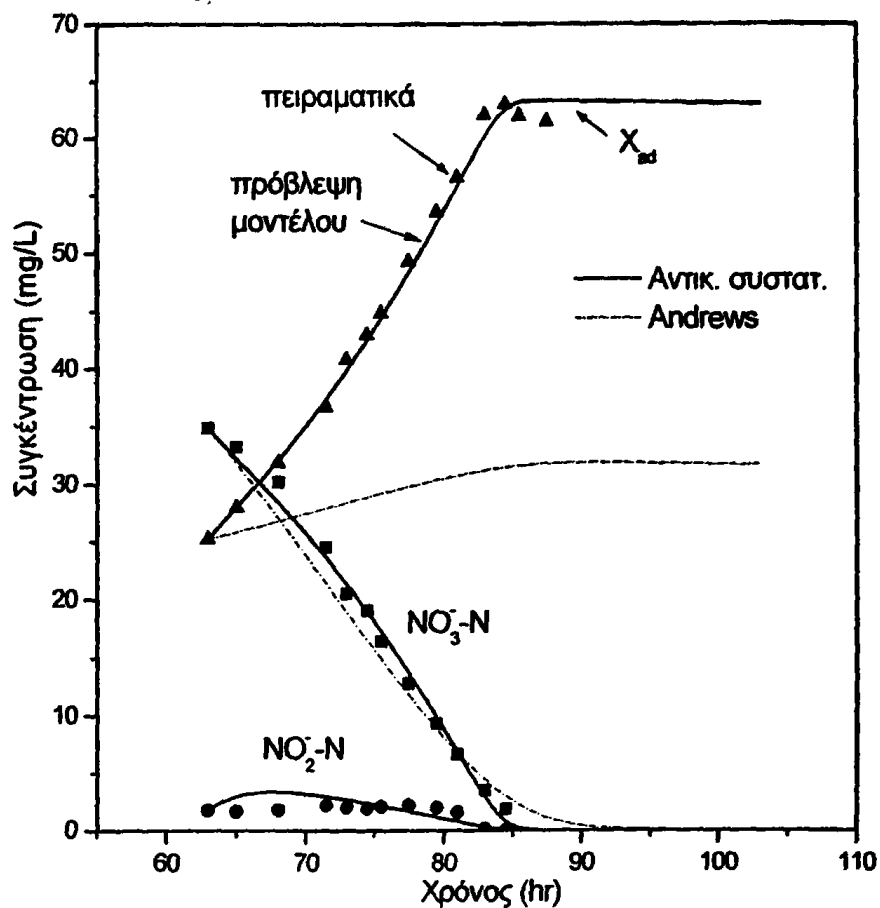
Επίσης, στα μοντέλα περιέχονται εκφράσεις που δηλώνουν την κατανάλωση των νιτρικών και νιτρώδων για τις απαιτήσεις της συντήρησης των βακτηριακών κυττάρων, με τη μορφή των ρυθμών διατήρησης (Marazioti et al., 2003). Δεδομένης της παρατεταμένης διάρκειας αυτών των πειραμάτων κινητικής, θεωρήθηκε σωστό να ενταχθούν αυτοί οι όροι της συντήρησης στα μοντέλα της περιγραφής των τριών βακτηριακών ειδών.



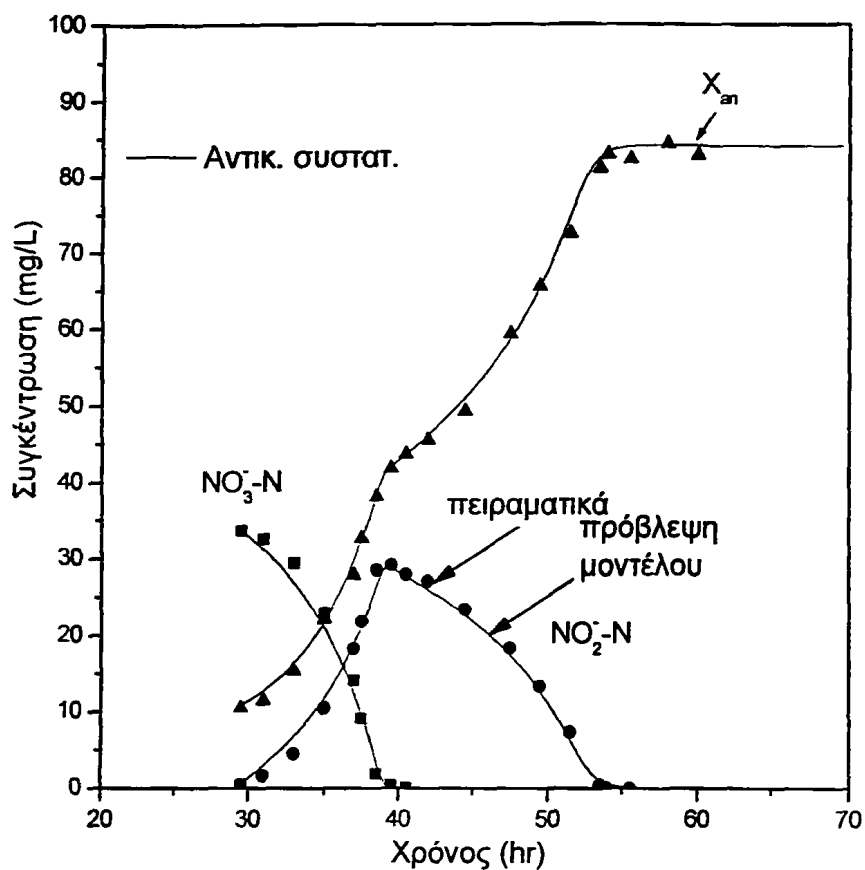
Παρόλο που είναι εμφανές, στο πείραμα κινητικής του είδους *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (Σχήμα 5.5), ότι η απονιτροποίηση είναι διαδικασία δύο βημάτων (αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και έπειτα σε αέριο άζωτο) και θεωρείται ότι η ανάπτυξη των βακτηριών περιορίζεται από δύο υποστρώματα, κάτι τέτοιο δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο για τα είδη *Acidovorax sp.* strain Ic3 (Σχήμα 5.4) και *Paracoccus sp.* strain Ic1 (Σχήμα 5.6).

Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια των πειραμάτων κινητικής του είδους *Acidovorax sp.* strain Ic3 (Σχήμα 5.4) και *Paracoccus sp.* strain Ic1 (Σχήμα 5.6), οι συγκεντρώσεις του NO_2^- -N παρέμειναν σε πολύ χαμηλά επίπεδα και ήταν σχεδόν μηδενικές. Για το λόγο αυτό, υποτέθηκε, εξαιτίας του ότι τα νιτρώδη μετατρέπονται πολύ γρήγορα σε αέριο άζωτο, ότι αυτό το ενδιάμεσο στάδιο της απονιτροποίησης θα έπρεπε να παραβλεφθεί από το μοντέλο που περιγράφει τη διαδικασία της απονιτροποίησης. Με βάση την υπόθεση αυτή, η ανάπτυξη των βακτηριών περιορίζεται μόνο από τα νιτρικά. Οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης (λαμβάνοντας υπόψη μόνο τα νιτρικά σαν περιοριστικό υπόστρωμα) υπολογίστηκαν ότι ήταν 0.0162 1/h για τον *Acidovorax sp.* strain Ic3 και 0.0125 1/h για τον *Paracoccus sp.* strain Ic1, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Dikshitulu et al. (1993).

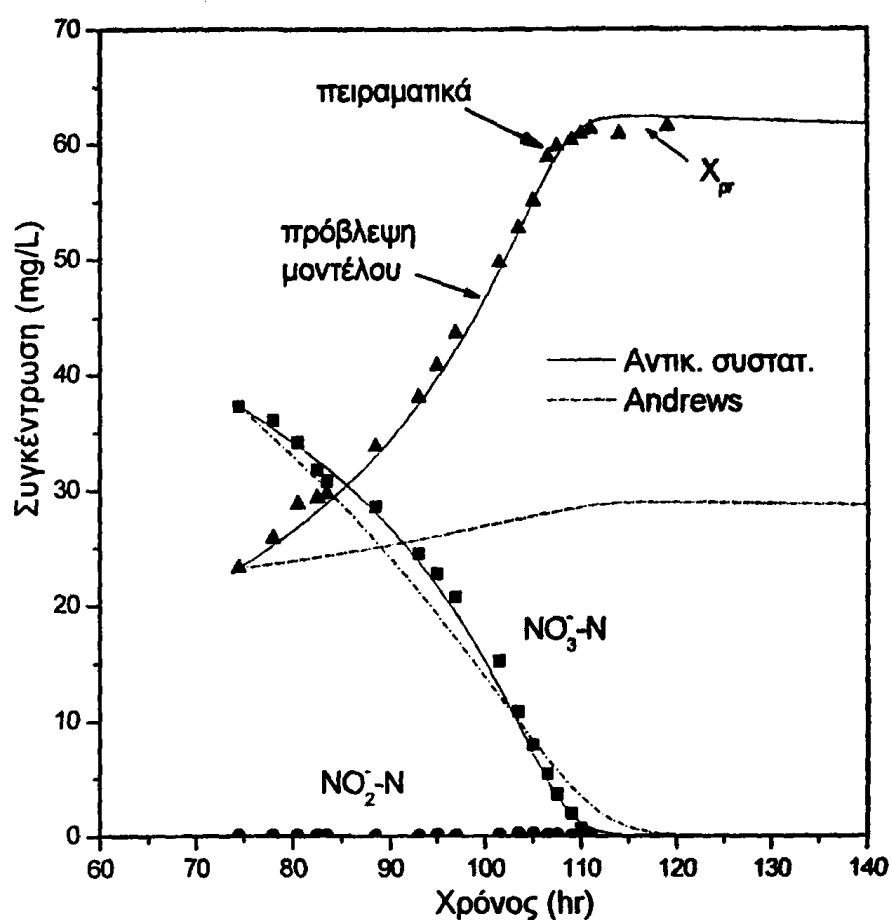




Σχήμα 5.4. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της καθαρής καλλιέργειας του βακτηριακού είδους *Acidovorax sp.* strain Ic3 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και βιομάζας ήταν: 34.92 mg NO_3^- -N/L και 25.26 mgβιομάζας/L. Το σύμβολο ' X_{bd} ' υποδεικνύει τη συγκέντρωση της βιομάζας του *Acidovorax sp.* strain Ic3.



Σχήμα 5.5. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της καθαρής καλλιέργειας του βακτηριακού είδους *Acinetobacter sp.* strain Ic2 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και βιομάζας ήταν: $33.67 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$ και $10.55 \text{ mgβιομάζας/L}$. Το σύμβολο ' X_{an} ' υποδεικνύει τη συγκέντρωση της βιομάζας του *Acinetobacter sp.* strain Ic2.



Σχήμα 5.6. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της καθαρής καλλιέργειας του βακτηριακού είδους *Paracoccus sp.* strain Ic1 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικού αζώτου και βιομάζας ήταν: 37.21 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ και 23.18 mgβιομάζας/L. Το σύμβολο ' X_{pr} ' υποδεικνύει τη συγκέντρωση της βιομάζας του *Paracoccus sp.* strain Ic1.

Το επόμενο βήμα ήταν η ανάπτυξη του κατάλληλου μαθηματικού μοντέλου που να περιγράφει επαρκώς την πιο πάνω αναφερόμενη διαδικασία. Για το λόγο αυτό εφαρμόστηκε η κινητική έκφραση του Andrews με εκφράσεις για τη συντήρηση των κυττάρων, με βάση την οποία τα ισοζύγια μάζας για τη βιομάζα για τα είδη *Acidovorax sp.* strain Ic3 και *Paracoccus sp.* strain Ic1 δίνονται από τις σχέσεις:

(*Acidovorax sp.* strain Ic3)

$$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{sad}} \cdot \frac{r_{\max ad} N_1}{K_{sad} + N_1 + \frac{N_1^2}{K_{iad}}} X_{ad} - \frac{m_{lad} N_1}{K_{sad} + N_1 + \frac{N_1^2}{K_{iad}}} X_{ad} \quad (5.1)$$

(*Paracoccus sp.* strain Ic1)

$$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{spr}} \cdot \frac{r_{\max pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + \frac{N_1^2}{K_{ipr}}} X_{pr} - \frac{m_{1pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + \frac{N_1^2}{K_{ipr}}} X_{pr} \quad (5.2)$$

όπου m_1 = ειδικός ρυθμός συντήρησης νιτρικών ($\text{mgNO}_3^- \text{-N/h mg βιομάζας}$) και m_{2ad} = ειδικός ρυθμός συντήρησης νιτρωδών ($\text{mgNO}_2^- \text{-N/h mg βιομάζας}$).

Για τον προσδιορισμό των τιμών των κινητικών παραμέτρων και δεδομένου ότι οι τιμές των μέγιστων ειδικών ρυθμών ανάπτυξης των δύο βακτηριακών ειδών προσδιορίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα, όλες οι άλλες κινητικές παράμετροι εκτιμήθηκαν από την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων. Τα πειραματικά δεδομένα των πειραμάτων κινητικής χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού τιμών των κινητικών παραμέτρων που περιγράφουν το κάθε είδος ξεχωριστά. Η εύρεση του καταλληλότερου συνδυασμού τιμών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Aquasim (έκδοση 2.1d). Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων φαίνονται στον Πίνακα 5.5.

Στα Σχήματα 5.4 και 5.6 φαίνονται οι προβλέψεις του μοντέλου Andrews (διακεκομμένες γραμμές) όπως προέκυψαν από την προσομοίωση της συμπεριφοράς του κάθε είδους. Παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του Andrews προβλέπει με αρκετή ακρίβεια τη μείωση του νιτρικού αζώτου, αλλά αποτυγχάνει να προβλέψει την ανάπτυξη της βιομάζας.



Συμπερασματικά, η υπόθεση ότι τα νιτρώδη δεν επηρεάζουν την όλη διαδικασία φαίνεται να είναι αναληθής. Η πολύ γρήγορη κατανάλωση των νιτρωδών από τα βακτηριακά είδη του *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Paracoccus sp. strain Ic1*, έχει σαν αποτέλεσμα την πολύ μικρή συγκέντρωση νιτρωδών στο διάλυμα, αλλά την ίδια στιγμή φαίνεται να επηρεάζει δραστικά την ανάπτυξη βιομάζας. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε το μαθηματικό μοντέλο των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση τύπου Andrews από τα νιτρικά και τα νιτρώδη για την προσομοίωση της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης και για τα τρία βακτηριακά είδη είτε συσσωρεύουν είτε όχι νιτρώδη.

Τα ισοζύγια μάζας για κάθε μία από τις τρεις καθαρές καλλιέργειες δίνονται στον πίνακα 5.1. Τα πειραματικά και τα θεωρητικά δεδομένα (συνεχής γραμμές) για το κάθε είδος *Acidovorax sp. strain Ic3*, *Acinetobacter sp. strain Ic2* και *Paracoccus sp. strain Ic1*, φαίνονται στα σχήματα 5.4, 5.5 και 5.6, αντίστοιχα. Τα πειραματικά δεδομένα των πειραμάτων κινητικής (από την αρχή της εκθετικής φάσης) χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του κατάλληλου συνδυασμού τιμών των κινητικών παραμέτρων που περιγράφουν το κάθε είδος ξεχωριστά. Η εύρεση του καταλληλότερου συνδυασμού τιμών, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Aquasim (έκδοση 2.1d). Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων φαίνονται στον Πίνακα 5.5.

Παρατηρείται ότι υπάρχει πολύ καλή συμφωνία μεταξύ πειραματικών δεδομένων και θεωρητικών προβλέψεων.

5.5. Πειραματική και θεωρητική μελέτη μικτών καλλιεργειών

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής για την μελέτη της συμπεριφοράς μικτών καλλιεργειών αποτελούμενες από τα είδη *Acidovorax sp. strain Ic3*, *Acinetobacter sp. strain Ic2* και *Paracoccus sp. strain Ic1*, υπό ανοξικές υδρογονοτροφικές συνθήκες σε συνθετικό υγρό μέσο ανάπτυξης. Αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα ικανά να περιγράφουν τη διαδικασία της απονιτροποίησης, όπως αυτή πραγματοποιείται από τις μικτές καλλιέργειες. Τα μοντέλα αυτά ήταν αποτέλεσμα συνδυασμού των μοντέλων που αναπτύχθηκαν για κάθε μία καθαρή καλλιέργεια και περιέγραψαν αρκετά καλά την απονιτροποιητική συμπεριφορά των μικτών καλλιεργειών αποτελούμενων κάθε φορά από τα είδη '*Acidovorax sp. strain Ic3* και *Acinetobacter sp. strain Ic2*', '*Acinetobacter sp. strain Ic2* και *Paracoccus sp. strain Ic1*' και '*Acidovorax sp. strain Ic3*, *Acinetobacter sp. strain Ic2* και *Paracoccus sp. strain Ic1*'. Οι



τρεις αυτοί συνδυασμοί για τις μικτές καλλιέργειες επιλέχθηκαν με γνώμονα την ανάγκη για τον περιορισμό της συσσώρευσης των νιτρωδών. Από τα παραπάνω είναι γνωστό ότι το είδος *Acinetobacter sp. strain Ic2* συσσωρεύει αρκετά μεγάλες ποσότητες νιτρωδών κάτι που δεν παρατηρείται στα είδη *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Paracoccus sp. strain Ic1*. Θα ήταν λοιπόν φρόνιμο να εξεταστεί εάν η συνύπαρξη στον ίδιο αντιδραστήρα του είδους *Acinetobacter sp. strain Ic2* με το είδος *Acidovorax sp. strain Ic3* ή με το είδος *Paracoccus sp. strain Ic1* ή και τα δύο αυτά είδη μαζί, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συσσώρευσης των νιτρωδών.

5.5.1. Μικτή / συνδυασμένη καλλιέργεια των *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Acinetobacter sp. strain Ic2*

Μελετήθηκε η συμπεριφορά της μικτής καλλιέργειας των *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Acinetobacter sp. strain Ic2* υπό ανοξικές υδρογονοτροφικές συνθήκες με περιοριστικό υπόστρωμα τα νιτρικά. Οι συγκεντρώσεις του νιτρικού, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας ελέγχονταν καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης της καλλιέργειας. Στην αρχή της εκθετικής φάσης της καλλιέργειας, οι συγκεντρώσεις των *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Acinetobacter sp. strain Ic2* ήταν 11.18 mg/L και 5.15 mg/L, αντίστοιχα. Εκείνη τη χρονική στιγμή ο αριθμός των κυττάρων των βακτηριακών ειδών βρέθηκε ότι ήταν 8.19×10^5 κύτταρα/mL για το είδος *Acidovorax sp. strain Ic3* και 2.48×10^3 κύτταρα/mL για το *Acinetobacter sp. strain Ic2*. Ο αριθμός των κυττάρων στη συνέχεια μεταφράστηκε σε ξηρό βάρος/L μέσω καμπύλων βαθμονόμησης.

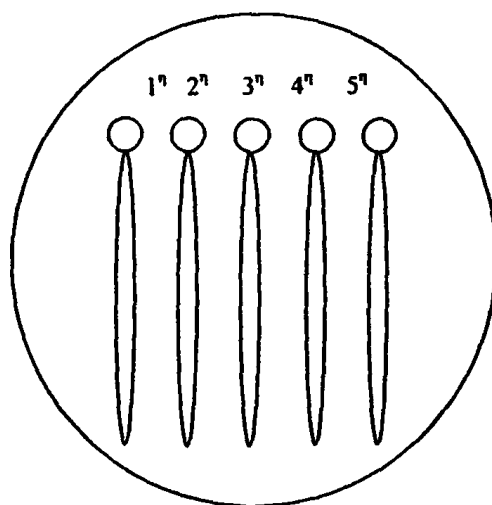
Για τον υπολογισμό των κυττάρων του κάθε είδους πραγματοποιούταν επίστρωση του δείγματος σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο. Δείγμα από τη μικτή καλλιέργεια (μιας συγκεκριμένης χρονικής στιγμής) αραιωνόταν με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων (Σχήμα 5.1). Στη συνέχεια, η επίστρωση στα τρυβλία γινόταν με τη μέθοδο της σταγόνας. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή η κάθε αραιώση του δείγματος από την 1^η έως την 5^η επιστρωνόταν στο ίδιο τρυβλίο. Από την κάθε αραιώση λαμβάνονταν μία σταγόνα (10 μ l) και αφηνόταν στην κορυφή του τρυβλίου. Με κίνηση του τρυβλίου η κάθε σταγόνα δημιουργούσε το δικό της διάδρομο στο τρυβλίο (Σχήμα 5.7).

Έπειτα από δύο μέρες επώασης στους 28°C, οι αποικίες του κάθε βακτηριακού είδους σε κάθε αραιώση ήταν εμφανείς. Σημειώνεται ότι οι αποικίες και των τριών βακτηριακών ειδών



διέφεραν μορφολογικά με αποτέλεσμα να είναι εύκολος ο διαχωρισμός τους και κατά συνέπεια η καταμέτρησή τους. Το κριτήριο για το ποια αραιώση θα επιλεγεί για να μετρηθούν οι αποικίες της γινόταν με βάση το πόσο ευδιάκριτες και απομονωμένες ήταν οι αποικίες (δηλαδή να μην ενώνονται μεταξύ τους) και ποιος ήταν ο αριθμός των αποικιών (επιλέγονταν η αραιώση με το μεγαλύτερο αριθμό αποικιών). Για τον υπολογισμό των κυττάρων/mL κάθε είδους χρησιμοποιούταν ο τύπος $N \text{ κύτταρα/mL} = \text{αριθμός αποικιών} \cdot 10^{\text{νούμερο αραιώσης} + 2}$. Δηλαδή, αν μετρήθηκαν 5 αποικίες του είδους *Acinetobacter sp. strain Ic2* στη 2^η αραιώση τότε ο αριθμός των κυττάρων είναι $5 \cdot 10^4$ κύτταρα/mL.

Στο Σχήμα 5.8. απεικονίζεται η διαδικασία της απονιτροποίησης όπως πραγματοποιήθηκε από τη μικτή αυτή καλλιέργεια. Παρατηρήθηκε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των ειδών *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Acinetobacter sp. strain Ic2* επηρέασε τη συσσώρευση των νιτρωδών. Κατά την ανάπτυξη του *Acidovorax sp. strain Ic3* σε καθαρή καλλιέργεια δεν πραγματοποιείται συσσώρευση νιτρωδών (Σχήμα 5.4), όμως η ανάπτυξη του *Acinetobacter sp. strain Ic2* είχε σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση του 84% του νιτρικού αζώτου υπό τη μορφή των νιτρωδών (Σχήμα 5.5). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.8, τα νιτρικά απομακρύνθηκαν πλήρως κατά την ανάπτυξη της μικτής καλλιέργειας, συσσωρεύοντας μία σημαντική ποσότητα νιτρωδών. Όμως λιγότερο από το 42% του αρχικού νιτρικού αζώτου συσσωρεύτηκε στον αντιδραστήρα ως νιτρώδες άζωτο και στη συνέχεια καταναλώθηκε πλήρως υπό αυτή τη μορφή. Μετά την απομάκρυνση του αζώτου δεν παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας.



Σχήμα 5.7. Επίστρωση σε τρυβλίο με τη μέθοδο της σταγόνας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το είδος *Acidovorax sp. strain Ic3* βοηθάει κατά κάποιο τρόπο το είδος *Acinetobacter sp. strain Ic2* στην κατανάλωση μεγαλύτερης ποσότητας νιτρωδών, ενώ το είδος *Acinetobacter sp. strain Ic2* μειώνει την ικανότητα του *Acidovorax sp. strain Ic3* του να απομακρύνει τα νιτρικά χωρίς να συσσωρεύει ποσότητα νιτρωδών σαν ενδιάμεσο προϊόν.

Οι ρυθμοί απονιτροποίησης των δύο αυτών βακτηριακών ειδών καθώς αναπτύσσονταν σε καθαρές καλλιέργειες ήταν: για το είδος *Acidovorax sp. strain Ic3*: 1.54 mg/L/h, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 21.5 h, για το είδος *Acinetobacter sp. strain Ic2*: 3 mg/L/h που αναφέρεται στην απομάκρυνση των νιτρικών και 1.4 mg/L/h που αναφέρεται στην απομάκρυνση του ολικού αζώτου, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 24.5 h, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Ο ρυθμός απονιτροποίησης της μικτής καλλιέργειας είναι 2.3 mg/L/h που αναφέρεται στην απομάκρυνση των νιτρικών και 1.4 mg/L/h που αναφέρεται στην απομάκρυνση του ολικού αζώτου, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 30 h. Δηλαδή παρατηρείται μία ενδιάμεση κατάσταση στην απομάκρυνση των νιτρικών.

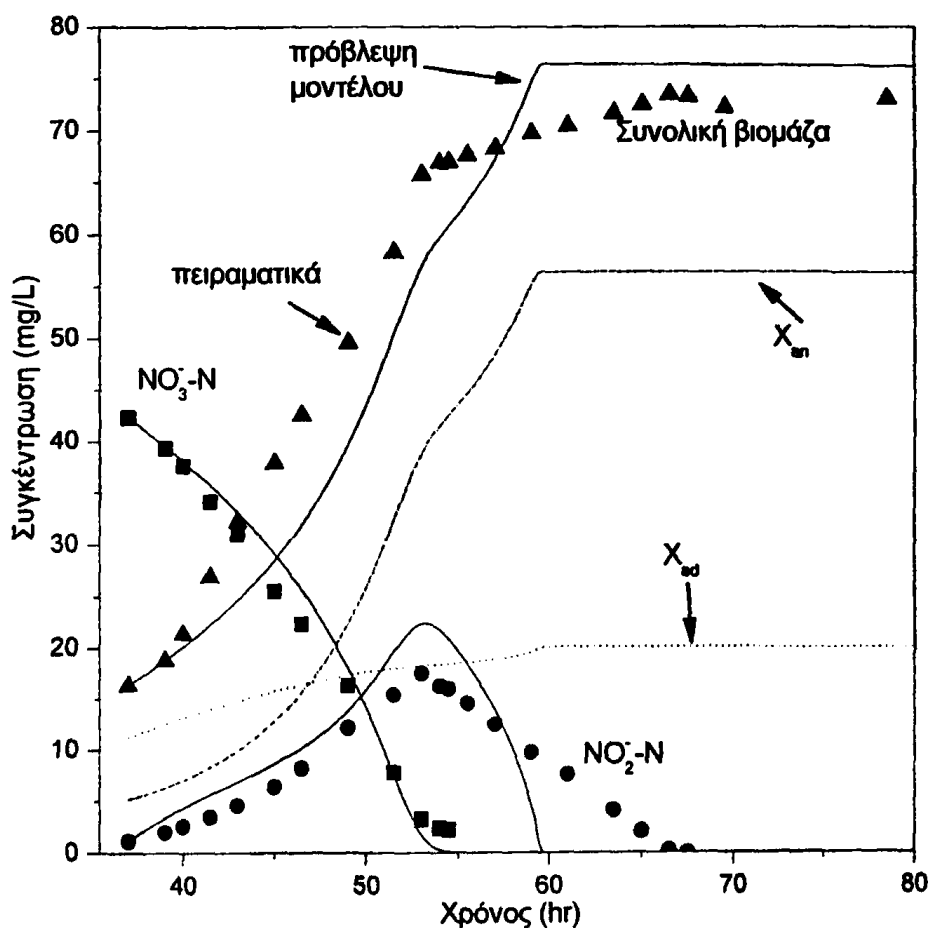
Επιπρόσθετα, η ποσότητα αυτή των νιτρωδών που παράγεται στον αντιδραστήρα της μικτής καλλιέργειας (και είναι μεγαλύτερη από αυτή της καθαρής καλλιέργειας του *Acidovorax sp. strain Ic3*) παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *Acidovorax sp. strain Ic3* στη μικτή καλλιέργεια και αυτό εκφράζεται με τη μείωση της τιμής του συντελεστή παρεμπόδισης των νιτρωδών, από αυτή στο μαθηματικό μοντέλο της καθαρής καλλιέργειας του *Acidovorax sp. strain Ic3*.

Για την περιγραφή της συμπεριφοράς της μικτής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο που δίνεται στο Πίνακα 5.2. Το μαθηματικό μοντέλο αυτό βασίστηκε στα δύο επιμέρους μοντέλα που περιγράφουν τις καθαρές καλλιέργειες του κάθε βακτηριακού είδους ξεχωριστά, καθώς είναι ο συνδυασμός αυτών των δύο. Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων παρέμειναν ίδιες με αυτές των μοντέλων των καθαρών καλλιεργειών που δίνονται στον Πίνακα 5.5, εκτός από αυτή του συντελεστή παρεμπόδισης των νιτρωδών του *Acidovorax sp. strain Ic3* (K_{mad} , mg/L) και από την τιμή της σταθερά στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Acinetobacter sp. strain Ic2* (k_{d2an} , mg NO_3^- -N/mg NO_2^- -N). Οι καινούριες τιμές των δύο αυτών παραμέτρων, δίνονται στον Πίνακα 5.5. και υπολογίστηκαν με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα του πειράματος κινητικής του Σχήματος 5.8. Ενώ, η τιμή του K_{mad} , μειώνεται για το λόγο που αναφέρεται πιο πάνω, η



τιμή kd_{2an} αυξάνεται. Η αύξηση αυτή περιγράφει τη μείωση της ικανότητας του *Acinetobacter sp. strain Ic2* να απομακρύνει με γρήγορους ρυθμούς τα νιτρικά.

Στο Σχήμα 5.8 φαίνονται τα πειραματικά δεδομένα και οι θεωρητικές προβλέψεις όπως προέκυψαν από την προσομοίωση της απονιτροποιητικής συμπεριφοράς της μικτής καλλιέργειας και παρατηρείται αρκετά καλή συμφωνία μεταξύ αυτών.



Σχήμα 5.8. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Acinetobacter sp. strain Ic2* σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του νιτρικού αζώτου και της συνολικής βιομάζας ήταν: 42.28 mgNO₃⁻-N/L και 16.3 mgβιομάζας/L. Τα σύμβολα ' X_{ad} ' και ' X_{an} ' υποδεικνύουν τις θεωρητικά υπολογισμένες τιμές των συγκεντρώσεων των *Acidovorax sp. strain Ic3* και *Acinetobacter sp. strain Ic2*, αντίστοιχα, σε σχέση με το χρόνο.

5.5.2. Μικτή / συνδυασμένη καλλιέργεια των *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2

Μελετήθηκε η συμπεριφορά της μικτής καλλιέργειας των *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 υπό ανοξικές υδρογονοτροφικές συνθήκες με περιοριστικό υπόστρωμα τα νιτρικά. Οι συγκεντρώσεις του νιτρικού, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας ελέγχονταν καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης της καλλιέργειας. Στην αρχή της εκθετικής φάσης της καλλιέργειας, οι συγκεντρώσεις των *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 ήταν 4.37 mg/L και 8.9 mg/L, αντίστοιχα, όπως προέκυψαν από τη μέτρηση των αποικιών σε τρυβλία.

Όπως και στην προηγούμενη συνδυασμένη καλλιέργεια, έτσι και εδώ παρατηρήθηκε ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ των ειδών *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 επηρέασε τη συσσώρευση των νιτρώδων. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.9, τα νιτρικά απομακρύνθηκαν πλήρως κατά την ανάπτυξη της μικτής καλλιέργειας, συσσωρεύοντας μία αρκετά μεγάλη ποσότητα νιτρώδων. Περισσότερο από το 70% του αρχικού νιτρικού αζώτου συσσωρεύτηκε στον αντιδραστήρα ως νιτρώδες άζωτο και στη συνέχεια καταναλώθηκε πλήρως. Μετά την απομάκρυνση του αζώτου δεν παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το είδος *Paracoccus sp.* strain Ic1 βοηθάει το είδος *Acinetobacter sp.* strain Ic2 στο να συσσωρεύσει μικρότερο ποσοστό νιτρώδων από αυτό της καθαρής του καλλιέργειας. Το είδος *Acinetobacter sp.* strain Ic2 μειώνει την ικανότητα του *Paracoccus sp.* strain Ic1 του να απομακρύνει τα νιτρικά χωρίς να συσσωρεύει ποσότητα νιτρώδων σαν ενδιάμεσο προϊόν.

Οι ρυθμοί απονιτροποίησης των δύο αυτών βακτηριακών ειδών καθώς αναπτύσσονταν σε καθαρές καλλιέργειες ήταν: για το είδος *Paracoccus sp.* strain Ic1: 1 mg/L h, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 36.5 h, για το είδος *Acinetobacter sp.* strain Ic2: 3 mg/L h που αναφέρεται στην απομάκρυνση των νιτρικών και 1.4 mg/L h που αναφέρεται στην απομάκρυνση του ολικού αζώτου, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 24.5 h, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Ο ρυθμός απονιτροποίησης της μικτής καλλιέργειας ήταν 1.22 mg/L h που αναφέρεται στην απομάκρυνση των νιτρικών και 0.66 mg/L h που αναφέρεται στην απομάκρυνση του ολικού αζώτου, με χρόνο απομάκρυνσης του αζώτου 70 h. Δηλαδή παρατηρείται μία μείωση του ρυθμού απομάκρυνσης των νιτρικών σε σχέση με την καθαρή καλλιέργεια του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 και μία μείωση στην ικανότητα των δύο ειδών να απομακρύνουν γρήγορα τα νιτρώδη στη μικτή καλλιέργεια.



Επιπρόσθετα, η ποσότητα αυτή των νιτρωδών που παράγεται στον αντιδραστήρα της μικτής καλλιέργειας (και είναι μεγαλύτερη από αυτή των καθαρών καλλιεργειών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 και του *Acinetobacter sp.* strain Ic2) παρεμποδίζει την ανάπτυξη των βακτηριακών ειδών στη μικτή καλλιέργεια και αυτό εκφράζεται με τη μείωση της τιμής των συντελεστών παρεμπόδισης των νιτρωδών, από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα μαθηματικά μοντέλα των καθαρών καλλιεργειών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 και του *Acinetobacter sp.* strain Ic2.

Για την περιγραφή της συμπεριφοράς της μικτής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο που δίνεται στον Πίνακα 5.3. Το μαθηματικό αυτό μοντέλο βασίστηκε στα δύο επιμέρους μοντέλα που περιγράφουν τις καθαρές καλλιέργειες του κάθε βακτηριακού είδους ξεχωριστά, και προέκυψε από την ένωση τους. Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων παρέμειναν ίδιες με αυτές των μοντέλων των καθαρών καλλιεργειών που δίνονται στον Πίνακα 5.5., εκτός από αυτές των συντελεστών παρεμπόδισης των νιτρωδών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 και του *Acinetobacter sp.* strain Ic2. (K_{man} , K_{mpr} , mg/L) και από την τιμή της σταθεράς στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (k_{d2an} , mg NO_3^- -N/mg NO_2^- -N). Οι καινούριες τιμές των δύο αυτών παραμέτρων, δίνονται στον Πίνακα 5.5. και υπολογίστηκαν με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα του πειράματος κινητικής του Σχήματος 5.9. Ενώ, οι τιμές των K_{man} και K_{mpr} μειώνονται για το λόγο που αναφέρεται πιο πάνω, η τιμή του k_{d2an} αυξάνεται. Η αύξηση αυτή περιγράφει την μείωση της ικανότητας του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 να απομακρύνει με γρήγορους ρυθμούς τα νιτρικά.

Στο Σχήμα 5.9. φαίνονται τα πειραματικά δεδομένα και οι θεωρητικές προβλέψεις όπως προέκυψαν από την προσομοίωση της απονιτροποιητικής συμπεριφοράς της μικτής καλλιέργειας. Το μαθηματικό μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά τη συμπεριφορά αυτής της καλλιέργειας.

5.5.3. Μικτή / συνδυασμένη καλλιέργεια των *Acidovorax sp.* strain Ic3, *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2

Πραγματοποιήθηκε πείραμα κινητικής για τη μελέτη της συμπεριφοράς της μικτής καλλιέργειας των *Acidovorax sp.* strain Ic3, *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 υπό ανοξικές υδρογονοτροφικές συνθήκες με περιοριστικό υπόστρωμα τα νιτρικά.

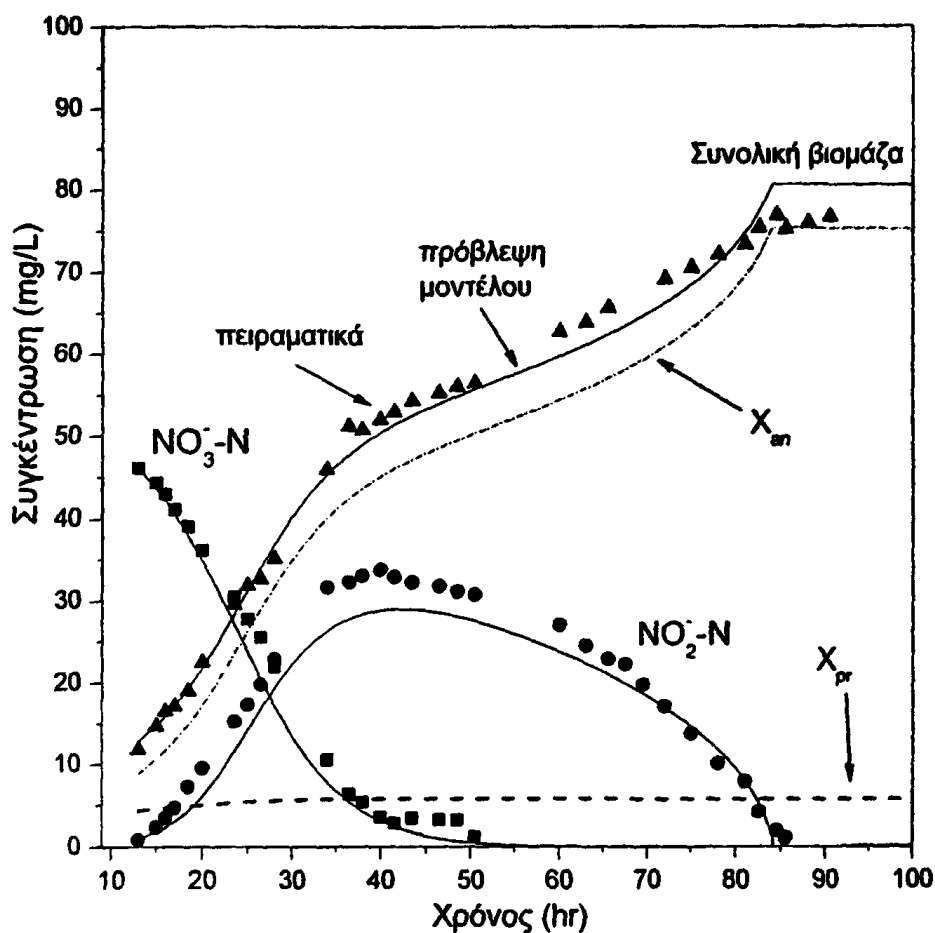


Οι συγκεντρώσεις του νιτρικού, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας ελέγχονταν καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Στην αρχή της εκθετικής φάσης της καλλιέργειας, ο αριθμός των κυττάρων των βακτηριακών ειδών βρέθηκε ότι ήταν 4.1×10^7 κύτταρα/mL του *Acidovorax* sp. strain Ic3, 4×10^5 κύτταρα/mL του *Acinetobacter* sp. strain Ic2 και 1.4×10^7 κύτταρα/mL του *Paracoccus* sp. strain Ic1. Οι τιμές αυτές των κυττάρων αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις βιομάζας των *Acidovorax* sp. strain Ic3, *Acinetobacter* sp. strain Ic2 και *Paracoccus* sp. strain Ic1: 25.42 mg/L, 8.28 mg/L and 12.3 mg/L, αντίστοιχα.

Και σε αυτή τη μικτή καλλιέργεια η συσσώρευση των νιτρώδων επηρεάστηκε από την αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηριακών ειδών. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.10., τα νιτρικά απομακρύνθηκαν πλήρως κατά την ανάπτυξη της μικτής καλλιέργειας, συσσωρεύοντας μία αρκετά μεγάλη ποσότητα νιτρώδων. Μικρότερο ποσοστό από το 68% του αρχικού νιτρικού αζώτου συσσωρεύτηκε στον αντιδραστήρα ως νιτρώδες άζωτο και στη συνέχεια καταναλώθηκε. Μετά τη μείωση του νιτρώδους αζώτου δεν παρατηρήθηκε αύξηση της βιομάζας.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα είδη *Acidovorax* sp. strain Ic3 και *Paracoccus* sp. strain Ic1 βοηθούν το είδος *Acinetobacter* sp. strain Ic2 στο να συσσωρεύσει μικρότερο ποσοστό νιτρώδων από αυτή της καθαρής του καλλιέργειας. Το είδος *Acinetobacter* sp. strain Ic2 με τη σειρά του επιδρά αρνητικά στην ικανότητα του *Acidovorax* sp. strain Ic3 και του *Paracoccus* sp. strain Ic1 να απομακρύνουν τα νιτρικά χωρίς τη συσσώρευση νιτρώδων σαν ενδιάμεσο προϊόν. Η ποσότητα αυτή των νιτρώδων που παράγεται στον αντιδραστήρα της μικτής καλλιέργειας (και είναι μεγαλύτερη από αυτή των καθαρών καλλιεργειών του *Paracoccus* sp. strain Ic1 και του *Acidovorax* sp. strain Ic3) παρεμποδίζει την ανάπτυξη των δύο αυτών βακτηριακών ειδών στη μικτή καλλιέργεια και αυτό εκφράζεται με τη μείωση της τιμής των συντελεστών παρεμπόδισης των νιτρώδων, από αυτές που χρησιμοποιήθηκαν στα μαθηματικά μοντέλα των καθαρών καλλιεργειών του *Paracoccus* sp. strain Ic1 και του *Acidovorax* sp. strain Ic3.



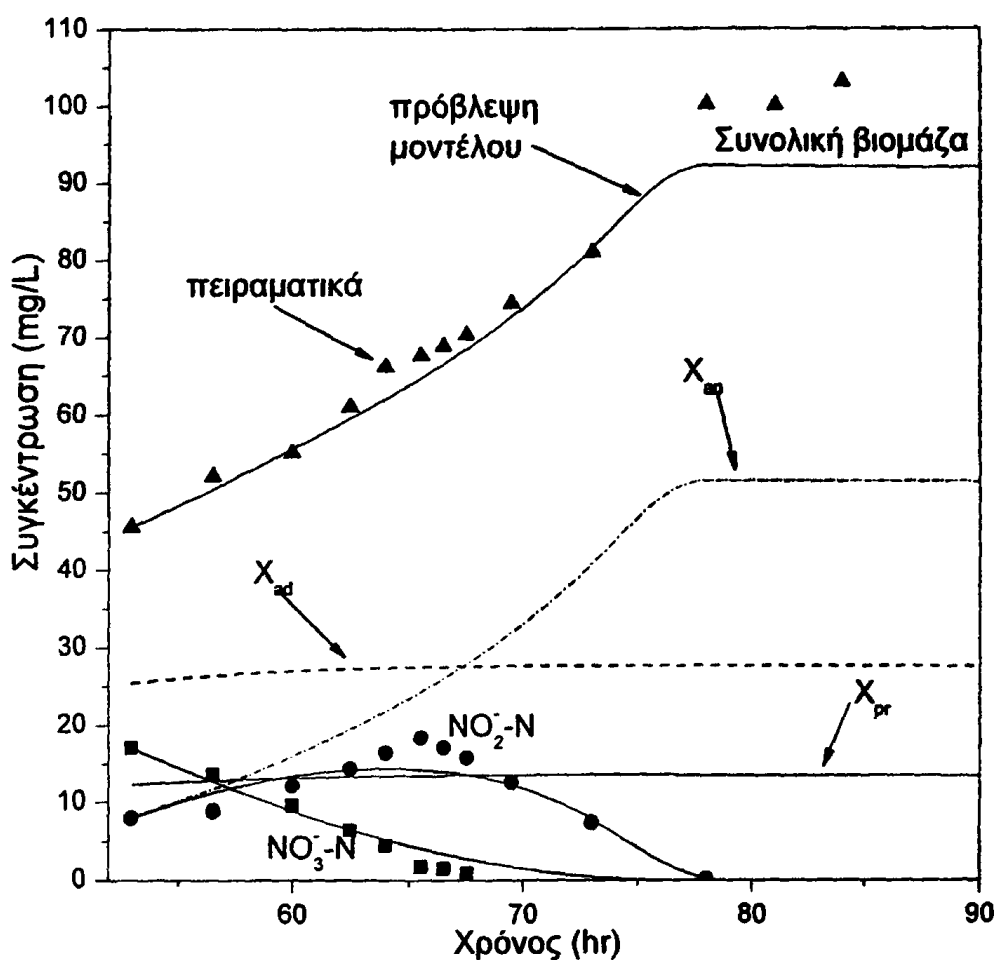


Σχήμα 5.9. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Paracoccus* sp. strain Ic1 και *Acinetobacter* sp. strain Ic2 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του νιτρικού αζώτου και της συνολικής βιομάζας ήταν: 46.1 mgNO₃⁻-N/L και 11.82 mgβιομάζας/L. Τα σύμβολα 'X_{pr}' και 'X_{an}' υποδεικνύουν τις θεωρητικά υπολογισμένες τιμές των συγκεντρώσεων των *Paracoccus* sp. strain Ic1 και *Acinetobacter* sp. strain Ic2, αντίστοιχα, σε σχέση με το χρόνο.

Το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση της μικτής καλλιέργειας δίνεται στον Πίνακα 5.4. Το μαθηματικό μοντέλο αυτό βασίστηκε στα τρία επιμέρους μοντέλα που περιγράφουν τις καθαρές καλλιέργειες του κάθε βακτηριακού είδους ξεχωριστά, και προέκυψε από την ένωση αυτών. Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων παρέμειναν ίδιες με αυτές των μοντέλων των καθαρών καλλιεργειών που δίνονται στον Πίνακα 5.5, εκτός από αυτές των συντελεστών παρεμπόδισης των νιτρωδών του *Paracoccus sp.* strain Ic1 και του *Acidovorax sp.* strain Ic3 (K_{mad} , K_{mpr} , mg/L) και από την τιμή της σταθεράς του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 (k_{dam} , mg NO_3^- -N/mg NO_2^- -N). Οι καινούριες τιμές των δύο αυτών παραμέτρων, δίνονται στον Πίνακα 5.5. και υπολογίστηκαν με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα του πειράματος κινητικής του Σχήματος 5.10. Ενώ, οι τιμές των K_{man} και K_{mpr} , μειώνονται για το λόγο που αναφέρεται πιο πάνω, η τιμή k_{dam} αυξάνεται. Η αύξηση αυτή περιγράφει τη μείωση της ικανότητας του *Acinetobacter sp.* strain Ic2 να απομακρύνει με γρήγορους ρυθμούς τα νιτρικά.

Στο Σχήμα 5.10 φαίνονται τα πειραματικά δεδομένα και οι θεωρητικές προβλέψεις όπως προέκυψαν από την προσομοίωση της απονιτροποιητικής συμπεριφοράς της μικτής καλλιέργειας. Η ικανότητα του μαθηματικού μοντέλου να περιγράφει τη συμπεριφορά αυτής της καλλιέργειας, είναι πολύ καλή.





Σχήμα 5.10. Πειραματική και θεωρητική μεταβολή των συγκεντρώσεων του νιτρικού-, του νιτρώδους αζώτου και της βιομάζας της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Acidovorax sp.* strain Ic3, *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2 σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Οι αρχικές συγκεντρώσεις του νιτρικού αζώτου και της συνολικής βιομάζας ήταν: 17.02 mgNO₃⁻-N/L και 45.54 mgβιομάζας/L. Τα σύμβολα 'X_{ad}', 'X_{pr}' και 'X_{an}' υποδεικνύουν τις θεωρητικά υπολογισμένες τιμές των συγκεντρώσεων των *Acidovorax sp.* strain Ic3, *Paracoccus sp.* strain Ic1 και *Acinetobacter sp.* strain Ic2, αντίστοιχα, σε σχέση με το χρόνο.

5.6. Συμπεράσματα

Απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τέσσερα βακτηριακά είδη από μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια. Τα τρία στελέχη Ic1, Ic2, Ic3 βρέθηκε ότι ήταν ικανά να μειώσουν τα νιτρικά υπό υδρογονοτροφικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης του γονιδίου 16S rDNA έδειξαν ότι το στέλεχος Ic1 ανήκει στην α υποομάδα των Πρωτεοβακτηρίων και τοποθετείται στο γένος *Paracoccus*, παρουσιάζοντας 100% ομοιότητα με το στέλεχος *Paracoccus thiophilus* AS001 (AJ294414) και 99.5% με το *Paracoccus denitrificans*. Πρέπει να σημειωθεί ότι το είδος *P. denitrificans* έχει μελετηθεί εκτενώς ως απονιτροποιητικό βακτήριο και έχει χαρακτηριστεί ως ικανό για αυτότροφη απονιτροποίηση, όπως η υδρογονοτροφική (Liessens et al., 1992; Smith et al., 1994). Το στέλεχος Ic2 τοποθετείται στο γένος *Acinetobacter* (*Acinetobacter* sp. strain Ic2). Μέλη του γένους *Acinetobacter* sp. έχουν βρεθεί να είναι ικανά για μείωση των νιτρικών σε νιτρώδη υπό ανοξικές συνθήκες, ωστόσο κάτω από μεγάλες συγκεντρώσεις νιτρώδων το ένζυμο αναγωγή των νιτρώδων μπορεί να καταλύσει την διαδικασία της μείωσης των νιτρώδων (Arquiaga et al., 1993). Η παραπάνω παρατήρηση επιβεβαιώνεται στην παρούσα εργασία (Σχήμα 5.5). Το στέλεχος Ic3 τοποθετείται στο γένος *Acidovorax* (*Acidovorax* sp. strain Ic3) παρουσιάζοντας 99.5% ομοιότητα με το *Acidovorax avenae* C1 το οποίο βρέθηκε να είναι ικανό να αποικοδομεί ταυτόχρονα τη φαινόλη μειώνοντας τα νιτρικά υπό ανοξικές συνθήκες (Seung-Hun et al., 2003). Τέλος το τέταρτο στέλεχος, Ic4, τοποθετείται στο γένος *Alcaligenes* (*Alcaligenes* sp. strain Ic4) παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με το *Alcaligenes defragrans*. Το *A. defragrans* έχει χαρακτηριστεί ως ετερότροφο απονιτροποιητικό βακτήριο (Seung-Hun et al., 2003) κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας στην οποία το είδος *Alcaligenes* sp. strain Ic4 δεν πραγματοποίησε την αυτότροφη απονιτροποίηση (Σχήμα 5.3). Για το λόγο αυτό η παρουσία του *Alcaligenes* sp. strain Ic4 στο δείγμα της μικτής καλλιέργειας δημιουργεί ερωτηματικά. Μία εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι αυτό το είδος βρισκόταν στην καλλιέργεια συντηρούμενο από τα μεταβολικά προϊόντα των άλλων βακτηριακών ειδών, χωρίς όμως να παίρνει μέρος στην απονιτροποίηση.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής καθαρών καλλιεργειών για κάθε ένα από τα τέσσερα βακτηριακά είδη, *Acidovorax* sp. strain Ic3, *Acinetobacter* sp. strain Ic2, *Paracoccus* sp. strain Ic1 και *Alcaligenes* sp. strain Ic4. Το τελευταίο είδος απέτυχε να πραγματοποιήσει υδρογονοτροφική απονιτροποίηση. Αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα ικανά να



περιγράφουν τη συμπεριφορά των τριών βακτηριακών ειδών καθώς αυτά αναπτύσσονται σε καθαρές καλλιέργειες και υπολογίστηκαν οι κινητικές τους παράμετροι. Η απονιτροποίηση θεωρήθηκε σαν μια διαδικασία δύο βημάτων, με τη διαδοχική αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και έπειτα σε αέριο άζωτο χωρίς συσσώρευση ενδιάμεσων αέριων προϊόντων. Η κινητική ανάπτυξης του κάθε βακτηριακού πληθυσμού, θεωρήθηκε ότι περιορίζεται από δύο υποστρώματα, τα νιτρικά και τα νιτρώδη, με παρεμπόδιση από τα νιτρικά και τα νιτρώδη. Έτσι χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο των αντικαταστάσιμων συστατικών και η παρεμπόδιση από τα νιτρικά και τα νιτρώδη μοντελοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την έκφραση Andrews. Στα μοντέλα περιέχονται εκφράσεις που δηλώνουν την κατανάλωση των νιτρικών και νιτρώδων για τις απαιτήσεις της συντήρησης των βακτηριακών κυττάρων, με τη μορφή των ρυθμών διατήρησης.

Τέλος, μελετήθηκε η συμπεριφορά τριών μικτών καλλιεργειών αποτελούμενων από τα είδη *Acidovorax* sp. strain Ic3 – *Acinetobacter* sp. strain Ic2, *Acinetobacter* sp. strain Ic2 – *Paracoccus* sp. strain Ic1, και *Acidovorax* sp. strain Ic3 – *Acinetobacter* sp. strain Ic2 – *Paracoccus* sp. strain Ic1, αντίστοιχα. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι με τις συνδυασμένες καλλιέργειες μπορεί να επιτευχθεί η μείωση της συσσώρευσης των νιτρώδων σε έναν αντιδραστήρα, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ των ειδών καθώς συνυπάρχουν. Τα μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν τη συμπεριφορά της κάθε συνδυασμένης καλλιέργειας βασίστηκαν στα τρία επιμέρους μοντέλα που περιγράφουν τις καθαρές καλλιέργειες του κάθε βακτηριακού είδους ξεχωριστά, και προέκυψαν από την ένωση αυτών. Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων παρέμειναν ίδιες με αυτές των μοντέλων των καθαρών καλλιεργειών, εκτός από αυτές των συντελεστών παρεμπόδισης των νιτρώδων και της τιμής της σταθεράς του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του *Acinetobacter* sp. strain Ic2 (k_{d2an} , mg NO₃⁻-N/mg NO₂⁻-N). Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ειδών σε μία μικτή καλλιέργεια μπορεί να φανεί χρήσιμη στο σχεδιασμό αντιδραστήρων έτσι ώστε να περιοριστεί η συσσώρευση ανεπιθύμητων προϊόντων, όπως τα νιτρώδη, με τον περιορισμό ή με την εύνοια της δράσης κάποιου είδους.



Διαδικασία	Εξίσωση ρυθμού της διαδικασίας
<i>Acidovorax</i> sp. strain Ic3	
Ανάπτυξη του X_{ad} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{ad}}{dt} = \frac{r_{max1ad}N_1}{K_{s1ad} + N_1 + k_{d2ad}N_2 + \frac{N_1}{K_{i1ad}}} X_{ad} + \frac{r_{max2ad}N_2}{K_{s2ad} + N_2 + k_{d1ad}N_1 + \frac{N_2}{K_{i2ad}}} X_{ad} - k_{d3ad}X_{ad}$
Αποικοδόμηση του N_1 από X_{ad}	$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{s1ad}} \cdot \frac{r_{max1ad}N_1}{K_{s1ad} + N_1 + k_{d2ad}N_2 + \frac{N_1}{K_{i1ad}}} X_{ad} - \frac{m_{1ad}N_1}{K_{s1ad} + N_1 + k_{d2ad}N_2 + \frac{N_1}{K_{i1ad}}} X_{ad}$
Αποικοδόμηση του N_2 από X_{ad}	$\frac{dN_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{s2ad}} \cdot \frac{r_{max2ad}N_2}{K_{s2ad} + N_2 + k_{d1ad}N_1 + \frac{N_2}{K_{i2ad}}} X_{ad} - \frac{1}{Y_{m2ad}} \cdot \frac{r_{max2ad}N_2}{K_{s2ad} + N_2 + k_{d1ad}N_1 + \frac{N_2}{K_{i2ad}}} X_{ad} - \frac{m_{2ad}N_2}{K_{s2ad} + N_2 + k_{d1ad}N_1 + \frac{N_2}{K_{i2ad}}} X_{ad}$
<i>Acinetobacter</i> sp. strain Ic2	
Ανάπτυξη του X_{an} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{an}}{dt} = \frac{r_{max1an}N_1}{K_{s1an} + N_1 + k_{d2an}N_2 + \frac{N_1}{K_{i1an}}} X_{an} + \frac{r_{max2an}N_2}{K_{s2an} + N_2 + k_{d1an}N_1 + \frac{N_2}{K_{i2an}}} X_{an} - k_{d3an}X_{an}$

Αποικοδόμηση του N_1 από X_{an}	$\frac{dN_1}{dt} = \frac{1}{Y_{sun}} \cdot \frac{r_{max1pr} N_1}{K_{sun} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{1an}}} X_{an} - \frac{m_{1un} N_1}{K_{sun} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{1an}}} X_{an}$
Αποικοδόμηση του N_2 από X_{an}	$\frac{dN_2}{dt} = \frac{1}{Y_{sun}} \cdot \frac{r_{max2pr} N_2}{K_{sun} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{1an}}} X_{an} - \frac{m_{2an} N_2}{K_{sun} + N_2 + k_{d1an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} X_{an}$
<i>Paracoccus</i> sp. strain Ic1	
Ανάπτυξη του X_{pr} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{pr}}{dt} = \frac{r_{max1pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{1pr}}} X_{pr} + \frac{r_{max2pr} N_2}{K_{npr} + N_2 + k_{d1pr} N_1 + \frac{N_2}{K_{mpr}}} X_{pr} - k_{dpr} X_{pr}$
Αποικοδόμηση του N_1 από X_{pr}	$\frac{dN_1}{dt} = \frac{1}{Y_{spr}} \cdot \frac{r_{max1pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{1pr}}} X_{pr} - \frac{m_{1pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{1pr}}} X_{pr}$
Αποικοδόμηση του N_2 από X_{pr}	$\frac{dN_2}{dt} = \frac{1}{Y_{spr}} \cdot \frac{r_{max2pr} N_2}{K_{spr} + N_1 + k_{d2pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{1pr}}} X_{pr} - \frac{m_{2pr} N_2}{K_{npr} + N_2 + k_{d1pr} N_1 + \frac{N_2}{K_{mpr}}} X_{pr}$

Πίνακας 5.2. Μαθηματικό μοντέλο για την απονιτροποίηση της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Acidovorax sp. strain* Ic3 και *Acinetobacter sp. strain* Ic2.

Εξίσωση ρυθμού της διαδικασίας	
Ανάπτυξη του X_{ad} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{ad}}{dt} = \frac{r_{\max 1ad} N_1}{K_{sad} + N_1 + k_{d2ad} N_2 + \frac{N_1}{K_{iad}}} X_{ad} + \frac{r_{\max 2ad} N_2}{K_{nad} + N_2 + k_{d1ad} N_1 + \frac{N_2}{K_{mad}}} X_{ad} - k_{dad} X_{ad}$
Ανάπτυξη του X_{an} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{an}}{dt} = \frac{r_{\max 1an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{ian}}} X_{an} + \frac{r_{\max 2an} N_2}{K_{nan} + N_2 + k_{d1an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} X_{an} - k_{dan} X_{an}$
Αποικοδόμηση του N_1 από X_{ad} και X_{an}	$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{sad}} \cdot \frac{r_{\max 1ad} N_1}{K_{sad} + N_1 + k_{d2ad} N_2 + \frac{N_1}{K_{iad}}} X_{ad} - \frac{m_{1ad} N_1}{K_{sad} + N_1 + k_{d2ad} N_2 + \frac{N_1}{K_{iad}}} X_{ad} - \frac{1}{Y_{san}} \cdot \frac{r_{\max 1an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{ian}}} X_{an} - \frac{m_{1an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{ian}}} X_{an}$
Αποικοδόμηση του N_2 από X_{ad} και X_{an}	$\frac{dN_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{sad}} \cdot \frac{r_{\max 1ad} N_1}{K_{sad} + N_1 + k_{d2ad} N_2 + \frac{N_1}{K_{iad}}} X_{ad} - \frac{1}{Y_{nad}} \cdot \frac{r_{\max 2ad} N_2}{K_{nad} + N_2 + k_{d1ad} N_1 + \frac{N_2}{K_{mad}}} X_{ad} - \frac{m_{2ad} N_2}{K_{nad} + N_2 + k_{d1ad} N_1 + \frac{N_2}{K_{mad}}} X_{ad} + \frac{1}{Y_{san}} \cdot \frac{r_{\max 1an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{ian}}} X_{an} - \frac{1}{Y_{nan}} \cdot \frac{r_{\max 2an} N_2}{K_{nan} + N_2 + k_{d1an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} X_{an} - \frac{m_{2an} N_2}{K_{nan} + N_2 + k_{d1an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} X_{an}$



Καθαρές καλλιέργειες
- Αντιδραστήρες διαλείποντος έργου

Πίνακας 5.3. Μαθηματικό μοντέλο για την απονιτροποίηση της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Acinetobacter sp.* strain lc2 και *Paracoccus sp.* strain lc1.

Διαδικασία	Εξίσωση ρυθμού της διαδικασίας
Ανάπτυξη του X_{pr} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{pr}}{dt} = \frac{r_{max1pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{1pr}}} X_{pr} + \frac{r_{max2pr} N_2}{K_{spr} + N_2 + k_{d1pr} N_1 + \frac{N_2}{K_{mpr}}} X_{pr} - k_{dpr} X_{pr}$
Ανάπτυξη του X_{an} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{an}}{dt} = \frac{r_{max1an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{1an}}} X_{an} + \frac{r_{max2an} N_2}{K_{san} + N_2 + k_{d1an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} X_{an} - k_{dan} X_{an}$
Αποικοδόμηση του N_1 από X_{pr} και X_{an}	$\frac{dN_1}{dt} = \frac{1}{Y_{spr}} \frac{r_{max1pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{1pr}}} X_{pr} - \frac{m_{1pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{1pr}}} X_{pr}^2$ $- \frac{1}{Y_{san}} \frac{r_{max1an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{1an}}} X_{an} - \frac{m_{1an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{1an}}} X_{an}^2$

Καθαρές καλλιέργειες
- Αντιδραστήρες διαλείποντος έργου

Αποικοδόμηση του N_2 από X_{pr} και X_{an}	$\frac{dN_2}{dt} = \frac{1}{Y_{spr}} \cdot \frac{r_{max1pr} N_1}{K_{s,pr} + N_1 + k_{d2pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{lpr}}} \cdot X_{pr}^2 - \frac{1}{Y_{npr}} \cdot \frac{r_{max2pr} N_2}{K_{n,pr} + N_2 + k_{d1pr} N_1 + \frac{N_2}{K_{m,pr}}} \cdot X_{pr}^2 - \frac{m_{2pr} N_2}{K_{n,pr} + N_2 + k_{d1pr} N_1 + \frac{N_2}{K_{m,pr}}} \cdot X_{pr}^2$ $+ \frac{1}{Y_{san}} \cdot \frac{r_{max1an} N_1}{K_{s,an} + N_1 + k_{d2an} N_2 + \frac{N_1}{K_{lan}}} \cdot X_{an}^2 - \frac{1}{Y_{nan}} \cdot \frac{r_{max2an} N_2}{K_{n,an} + N_2 + k_{d1an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} \cdot X_{an}^2 - \frac{m_{2an} N_2}{K_{n,an} + N_2 + k_{d1an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} \cdot X_{an}^2$
---	---

Καθαρές καλλιέργειες
- Αντιδραστήρες διαλείποντος έργου

Πίνακας 5.4. Μαθηματικό μοντέλο για την απονιτροποίηση της συνδυασμένης καλλιέργειας των βακτηριακών ειδών *Acidovorax sp.* strain Ic3, *Acinetobacter sp.* strain Ic2 και *Paracoccus sp.* strain Ic1.

Διαδικασία	Εξίσωση ρυθμού της διαδικασίας
Ανάπτυξη του X_{ad} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{ad}}{dt} = \frac{r_{max 1 ad} N_1}{K_{s ad} + N_1 + k_{d 2 ad} N_2 + \frac{N_1}{K_{i ad}}} X_{ad} + \frac{r_{max 2 ad} N_2}{K_{n ad} + N_2 + k_{d 1 ad} N_1 + \frac{N_2}{K_{m ad}}} X_{ad} - k_{d ad} X_{ad}$
Ανάπτυξη του X_{pr} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{pr}}{dt} = \frac{r_{max 1 pr} N_1}{K_{s pr} + N_1 + k_{d 2 pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{i pr}}} X_{pr} + \frac{r_{max 2 pr} N_2}{K_{n pr} + N_2 + k_{d 1 pr} N_1 + \frac{N_2}{K_{m pr}}} X_{pr} - k_{d pr} X_{pr}$
Ανάπτυξη του X_{an} με N_1 και N_2	$\frac{dX_{an}}{dt} = \frac{r_{max 1 an} N_1}{K_{s an} + N_1 + k_{d 2 an} N_2 + \frac{N_1}{K_{i an}}} X_{an} + \frac{r_{max 2 an} N_2}{K_{n an} + N_2 + k_{d 1 an} N_1 + \frac{N_2}{K_{m an}}} X_{an} - k_{d an} X_{an}$

Αποικοδόμηση
του N_1 από X_{ad} ,
 X_{pr} και X_{an}

$$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{sad}} \cdot \frac{r_{\max 1 ad} N_1}{K_{sad} + N_1 + k_{d2 ad} N_2 + \frac{N_1}{K_{lad}}} X_{ad}^2 - \frac{m_{1 ad} N_1}{K_{sad} + N_1 + k_{d2 ad} N_2 + \frac{N_1}{K_{lad}}} X_{ad}^2$$

$$-\frac{1}{Y_{spr}} \cdot \frac{r_{\max 1 pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2 pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{lpr}}} X_{pr}^2 - \frac{m_{1 pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2 pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{lpr}}} X_{pr}^2$$

$$-\frac{1}{Y_{san}} \cdot \frac{r_{\max 1 an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2 an} N_2 + \frac{N_1}{K_{lan}}} X_{an}^2 - \frac{m_{1 an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2 an} N_2 + \frac{N_1}{K_{lan}}} X_{an}^2$$

Αποικοδόμηση
του N_2 από X_{ad} ,
 X_{pr} και X_{an}

$$\frac{dN_2}{dt} = \frac{1}{Y_{sad}} \cdot \frac{r_{\max 1 ad} N_1}{K_{sad} + N_1 + k_{d2 ad} N_2 + \frac{N_1}{K_{lad}}} X_{ad}^2 - \frac{1}{Y_{nad}} \cdot \frac{r_{\max 2 ad} N_2}{K_{nad} + N_2 + k_{d1 ad} N_1 + \frac{N_2}{K_{mad}}} X_{ad}^2 - \frac{m_{2 ad} N_2}{K_{nad} + N_2 + k_{d1 ad} N_1 + \frac{N_2}{K_{mad}}} X_{ad}^2$$

$$+ \frac{1}{Y_{spr}} \cdot \frac{r_{\max 1 pr} N_1}{K_{spr} + N_1 + k_{d2 pr} N_2 + \frac{N_1}{K_{lpr}}} X_{pr}^2 - \frac{1}{Y_{npr}} \cdot \frac{r_{\max 2 pr} N_2}{K_{npr} + N_2 + k_{d1 pr} N_1 + \frac{N_2}{K_{mpr}}} X_{pr}^2 - \frac{m_{2 pr} N_2}{K_{npr} + N_2 + k_{d1 pr} N_1 + \frac{N_2}{K_{mpr}}} X_{pr}^2$$

$$+ \frac{1}{Y_{san}} \cdot \frac{r_{\max 1 an} N_1}{K_{san} + N_1 + k_{d2 an} N_2 + \frac{N_1}{K_{lan}}} X_{an}^2 - \frac{1}{Y_{nan}} \cdot \frac{r_{\max 2 an} N_2}{K_{nan} + N_2 + k_{d1 an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} X_{an}^2 - \frac{m_{2 an} N_2}{K_{nan} + N_2 + k_{d1 an} N_1 + \frac{N_2}{K_{man}}} X_{an}^2$$



Καθαρές καλλιέργειες
- Αντιδραστικές διαλείποντος έργου

Πίνακας 5.5. Τιμές κινητικών παραμέτρων.

Παράμετροι	Acidov Andrews	Acidov Αντικ. συστατ.	Acinetob Αντικ. συστατ.	Paracoc Andrews	Paracoc Αντικ. συστατ.	Acidov & Acinetob Αντικ. συστατ.	Acinetob & Paracoc Αντικ. συστατ.	Acidov& Acinetob & Paracoc Αντικ. συστατ.
						ACIDOV	ACINET	ACIDOV ACINE PARAC
r_{max1} (1/h)	0.0162	0.109	0.155	0.0125	0.0876			
K_1 (mg/L)	5.65	4.464	0.5	5.14	8.82			
Y_1 (mgβιομάζας/mgNO ₃ ·-N)	0.214	0.967	0.7192	0.171	1.077			
K_2 (mg/L)	280.87	211.11	63.64	33	15.22			
r_{max2} (1/h)		0.868	0.608		0.4547			
K_m (mg/L)		8.673	28.45		0.778			
Y_m (mgβιομάζας/mgNO ₂ ·-N)		0.147	1.4668		0.00471			
K_m (mg/L)		0.211	1.886		3.8	0.192	1.886	5.25*10 ⁻⁴ 1.886 1.9*10 ⁻⁴
k_{d1} (mgNO ₂ ·-N / mgNO ₃ ·-N)		15.055	3.689		11.158			
k_{d2} (mgNO ₃ ·-N / mgNO ₂ ·-N)		13.18	0.0125		7.73	0.153	1.976	2.125
k_d (1/h)	0.0003	0.0003	0.0001	0.00047	0.00047			
m_1 (mgNO ₃ ·-N /h mgβιομάζας)	0.0024	0.0024	0.00291	3.25*10 ⁻⁴	3.25*10 ⁻⁴			
m_2 (mgNO ₂ ·-N /h mgbiomass)		0.0001	0.000126		0.0003			

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ**



6. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΥΔΡΟΓΟΝΟΤΡΟΦΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ

6.1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες έχει παρατηρηθεί ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον ως προς τις μικτές καλλιέργειες μικροοργανισμών. Οι μικτοί πληθυσμοί παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα λειτουργίας σε ευρύτερη περιοχή περιβαλλοντικών συνθηκών σε σχέση με τις καθαρές καλλιέργειες, προσαρμόζονται πιο εύκολα στα διάφορα περιβάλλοντα, αναπτύσσονται σε απλούστερα και επομένως φθηνότερα μέσα, έχουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έναντι μολύνσεων και επιτελούν σειρές χημικών μετασχηματισμών, που καμία καθαρή καλλιέργεια δεν μπορεί να επιτύχει (Παύλου, 2000). Δεδομένου ότι τα φυσικά οικοσυστήματα αποτελούνται κυρίως από μικτούς πληθυσμούς μικροοργανισμών, η λεπτομερής μελέτη της συμπεριφοράς αυτών των συστημάτων μπορεί να ενισχύσει / βοηθήσει την κατανόηση πολλών φαινομένων.

Οι διάφορες μορφές αζώτου (αμμωνιακό, νιτρικό και νιτρώδες άζωτο) στα φυσικά οικοσυστήματα αποτελούν αφορμή για σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα, συμπεριλαμβανομένου του ευτροφισμού, της μείωσης της ποιότητας νερού και των πιθανών κινδύνων στην ανθρώπινη υγεία. Η κατανόηση λοιπόν της συμπεριφοράς με την εξέλιξη του χρόνου, δηλαδή της δυναμικής συμπεριφοράς των συστημάτων μικτών καλλιεργειών αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα στο σχεδιασμό και την επιλογή της λειτουργίας, των συστημάτων επεξεργασίας πόσιμου νερού και στην περίπτωση της έρευνας αυτής, των συστημάτων υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης.

Η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση έχει μελετηθεί εκτενώς στα προηγούμενα Κεφάλαια (3 και 5) σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (Vasiliadou et al., 2006 α και β). Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα με μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια προερχόμενη από μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων του δήμου Αγρινίου. Αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο το οποίο περιέγραφε τη συμπεριφορά της και τη διαδικασία της απονιτροποίησης και υπολογίστηκαν οι κινητικές του παράμετροι. Στη συνέχεια απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τρία βακτηριακά είδη από τη μικτή καλλιέργεια (*Acidovorax* sp. strain Ic3, *Acinetobacter* sp. strain Ic2, *Paracoccus* sp. strain Ic1) και μελετήθηκε η ανάπτυξη του κάθε



είδους σε καθαρές καλλιέργειες υπό υδρογονοτροφικές συνθήκες. Αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα που περιέγραφαν τη συμπεριφορά του κάθε είδους ξεχωριστά και υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι για το κάθε μοντέλο. Τέλος, μελετήθηκε η απονιτροποιητική ικανότητα, σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, τριών συνδυασμένων (μικτών) καλλιεργειών αποτελούμενων κάθε φορά: από τα δύο βακτηριακά είδη *Acidovorax* sp. strain Ic3 – *Acinetobacter* sp. strain Ic2 (Σύστημα I), από τα δύο βακτηριακά είδη *Acinetobacter* sp. strain Ic2 – *Paracoccus* sp. strain Ic1 (Σύστημα II), από τα τρία βακτηριακά είδη *Acidovorax* sp. strain Ic3 – *Acinetobacter* sp. strain Ic2 – *Paracoccus* sp. strain Ic1 (Σύστημα III). Τα μαθηματικά μοντέλα που αναπτύχθηκαν για την προσομοίωση των μικτών αυτών καλλιεργειών προέκυψαν από την ένωση των επιμέρους κάθε φορά μοντέλων των καθαρών καλλιεργειών.

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε ο αμιγής και ολικός συναγωνισμός για δύο υποστρώματα (νιτρικό, νιτρώδες άζωτο) μεταξύ δύο ή τριών υδρογονοτροφικών απονιτροποιητικών βακτηριακών πληθυσμών σε έναν αντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας (χημοστάτη), μέσω της ανάλυσης των αντίστοιχων μαθηματικών μοντέλων. Αναλύθηκε η δυναμική συμπεριφορά τριών συστημάτων στα οποία αναπτύσσονταν μαζί σε χημοστάτη τα εξής βακτηριακά είδη: α) Σύστημα I: *Acidovorax* sp. strain Ic3 και *Acinetobacter* sp. strain Ic2, β) Σύστημα II: *Paracoccus* sp. strain Ic1 και *Acinetobacter* sp. strain Ic2 και γ) Σύστημα III: *Acinetobacter* sp. strain Ic2, *Acidovorax* sp. strain Ic3 και *Paracoccus* sp. strain Ic1.

Η μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των παραπάνω συστημάτων πραγματοποιήθηκε με την περιγραφή των συστημάτων με μαθηματικά μοντέλα και με εφαρμογή σε αυτά των μεθόδων της δυναμικής ανάλυσης συστημάτων διαφορικών εξισώσεων (θεωρία διακλαδώσεων). Ένα δυναμικό σύστημα είναι ένα σύστημα διαφορικών εξισώσεων, που περιγράφει τη χρονική εξέλιξη ενός φαινομένου.

Η θεωρία των διακλαδώσεων χρησιμοποιήθηκε, προκειμένου να καθοριστεί η επίδραση των λειτουργικών παραμέτρων (συγκέντρωση τροφοδοσίας και ογκομετρική παροχή) στην επιβίωση και την ανάπτυξη των βακτηριακών ειδών στα τρία συστήματα σε βιοαντιδραστήρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τη μορφή λειτουργικών διαγραμμάτων. Επίσης, χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο υπολογίστηκε ο ρυθμός απονιτροποίησης και εκτιμήθηκε η συσσώρευση των νιτρωδών σε έναν χημοστάτη για διάφορες λειτουργικές παραμέτρους για κάθε ένα από τα τρία αυτά συστήματα των μικτών καλλιεργειών. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται επίσης με τη μορφή λειτουργικών



διαγραμμάτων. Σημειώνεται ότι είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιείται αυτή η ανάλυση για τη διεξαγωγή συμπερασμάτων για το ρυθμό απονιτροποίησης και τη συσσώρευση των νιτρωδών, στην επεξεργασία νερού.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο σχεδιασμό και την αξιολόγηση των συνθηκών κάτω από τις οποίες επιτυγχάνονται υψηλοί ρυθμοί απονιτροποίησης, συσσωρεύοντας μικρές ποσότητες νιτρωδών. Αυτή η μελέτη, δηλαδή της συμπεριφοράς των μικτών καλλιεργειών, μπορεί να χρησιμεύσει στη σωστή λειτουργία υδρογονοτροφικών απονιτροποιητικών συστημάτων επεξεργασίας πόσιμου νερού.

6.2. Εφαρμογή μαθηματικών μοντέλων

Ο συναγωνισμός μεταξύ υδρογονοτροφικών βακτηριακών πληθυσμών μελετήθηκε σε ένα ομοιογενές και χρονικά αμετάβλητο περιβάλλον ενός χημοστάτη. Μελετήθηκε η συμπεριφορά τριών συστημάτων:

Σύστημα I: *Acidovorax* sp. strain Ic3 – *Acinetobacter* sp. strain Ic2 και οι πληθυσμοί των ειδών αυτών από εδώ και στο εξής θα αναφέρονται ως X_1 και X_3 , αντίστοιχα.

Σύστημα II: *Acinetobacter* sp. strain Ic2 – *Paracoccus* sp. strain Ic1 και οι πληθυσμοί των ειδών αυτών από εδώ και στο εξής θα αναφέρονται ως X_3 και X_2 , αντίστοιχα.

Σύστημα III: *Acidovorax* sp. strain Ic3 – *Acinetobacter* sp. strain Ic2 – *Paracoccus* sp. strain Ic1 και οι πληθυσμοί των ειδών αυτών από εδώ και στο εξής θα αναφέρονται ως X_1 , X_3 και X_2 , αντίστοιχα.

6.2.1. Μοντελοποίηση του Συστήματος I.

Για το πρώτο μοντέλο θεωρείται ότι δύο βακτηριακοί πληθυσμοί (X_1 και X_3) αναπτύσσονται μαζί σε ένα χημοστάτη, χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ τους εκτός του συναγωνισμού για τα δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικά και νιτρώδη). Οι εξισώσεις του μοντέλου είναι:

Ισοζύγια μάζας για τους πληθυσμούς X_1 και X_3 :

$$\frac{dX_1}{dt} = r_1 X_1 + r_2 X_1 - k_{dead} X_1 - DX_1 \quad (6.1)$$



$$\frac{dX_3}{dt} = r_3 X_3 + r_4 X_3 - k_{dan} X_3 - DX_3 \quad (6.2)$$

όπου D ($1/h$) είναι ο ρυθμός αραίωσης του χημοστάτη και προκύπτει από το λόγο της ογκομετρικής παροχής που εφαρμόζεται σε αυτόν ως προς τον λειτουργικό όγκο του χημοστάτη. Επίσης, r_1 και r_2 είναι οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης στα νιτρικά και τα νιτρώδη, αντίστοιχα για τον X_1 και r_3 και r_4 είναι οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης στα νιτρικά και τα νιτρώδη, αντίστοιχα για τον X_3 .

Ισοζύγια μάζας υποστρωμάτων (N_1 νιτρικό άζωτο και N_2 νιτρώδες άζωτο):

$$\frac{dN_1}{dt} = D(N_{1f} - N_1) - \frac{1}{Y_{sad}} \cdot r_1 X_1 - q_1 X_1 - \frac{1}{Y_{san}} \cdot r_3 X_3 - q_3 X_3 \quad (6.3)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = \frac{1}{Y_{sad}} \cdot r_1 X_1 - \frac{1}{Y_{nad}} \cdot r_2 X_1 - q_2 X_1 + \frac{1}{Y_{san}} \cdot r_3 X_3 - \frac{1}{Y_{nan}} \cdot r_4 X_3 - q_4 X_3 - DN_2 \quad (6.4)$$

όπου N_{1f} συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στην τροφοδοσία, q_1 και q_2 είναι οι ειδικοί ρυθμοί συντήρησης των νιτρικών και των νιτρώδων, αντίστοιχα για τον X_1 και q_3 και q_4 είναι οι ειδικοί ρυθμοί συντήρησης των νιτρικών και των νιτρώδων, αντίστοιχα για τον X_3 .

6.2.2. Μοντελοποίηση του Συστήματος II.

Όπως και στο πρώτο μοντέλο έτσι και εδώ θεωρείται ότι δύο βακτηριακοί πληθυσμοί (X_2 και X_3) αναπτύσσονται μαζί σε ένα χημοστάτη, χωρίς καμία αλληλεπίδραση μεταξύ τους εκτός του συναγωνισμού για τα δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικά και νιτρώδη). Οι εξισώσεις του μοντέλου είναι:

Ισοζύγια μάζας για τους πληθυσμούς X_2 και X_3 :

$$\frac{dX_2}{dt} = r_5 X_2 + r_6 X_2 - k_{dpr} X_2 - DX_2 \quad (6.5)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = r_3 X_3 + r_4 X_3 - k_{dan} X_3 - DX_3 \quad (6.6)$$

όπου r_5 και r_6 είναι οι ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης στα νιτρικά και τα νιτρώδη, αντίστοιχα για τον X_2 .



Ισοζύγια μάζας υποστρωμάτων (N_1 νιτρικό άζωτο και N_2 νιτρώδες άζωτο):

$$\frac{dN_1}{dt} = D(N_{1f} - N_1) - \frac{1}{Y_{spr}} \cdot r_5 X_2 - q_5 X_2 - \frac{1}{Y_{san}} \cdot r_3 X_3 - q_3 X_3 \quad (6.7)$$

$$\frac{dN_2}{dt} = \frac{1}{Y_{spr}} \cdot r_5 X_2 - \frac{1}{Y_{npr}} \cdot r_6 X_2 - q_6 X_2 + \frac{1}{Y_{san}} \cdot r_3 X_3 - \frac{1}{Y_{nan}} \cdot r_4 X_3 - q_4 X_3 - DN_2 \quad (6.8)$$

όπου q_5 και q_6 είναι οι ειδικοί ρυθμοί συντήρησης των νιτρικών και των νιτρώδων, αντίστοιχα για τον X_2 .

6.2.3. Μοντελοποίηση του Συστήματος ΙΙΙ.

Στην τελευταία περίπτωση θεωρείται ότι τρεις βακτηριακοί πληθυσμοί (X_1 , X_2 , X_3) αναπτύσσονται μαζί σε ένα χημοστάτη, χωρίς καμία άλλη αλληλεπίδραση μεταξύ τους εκτός του συναγωνισμού για τα δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικά και νιτρώδη). Οι εξισώσεις του μοντέλου είναι:

Ισοζύγια μάζας για τους πληθυσμούς X_1 , X_2 και X_3 :

$$\frac{dX_1}{dt} = r_1 X_1 + r_2 X_1 - k_{dad} X_1 - DX_1 \quad (6.9)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = r_5 X_2 + r_6 X_2 - k_{dpr} X_2 - DX_2 \quad (6.10)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = r_3 X_3 + r_4 X_3 - k_{dan} X_3 - DX_3 \quad (6.11)$$

Ισοζύγια μάζας υποστρωμάτων (N_1 νιτρικό άζωτο και N_2 νιτρώδες άζωτο):

$$\frac{dN_1}{dt} = D(N_{1f} - N_1) - \frac{1}{Y_{sad}} \cdot r_1 X_1 - q_1 X_1 - \frac{1}{Y_{spr}} \cdot r_5 X_2 - q_5 X_2 - \frac{1}{Y_{san}} \cdot r_3 X_3 - q_3 X_3 \quad (6.12)$$

$$\begin{aligned} \frac{dN_2}{dt} = & \frac{1}{Y_{sad}} \cdot r_1 X_1 - \frac{1}{Y_{nud}} \cdot r_2 X_1 - q_2 X_1 + \frac{1}{Y_{spr}} \cdot r_5 X_2 - \frac{1}{Y_{npr}} \cdot r_6 X_2 - q_6 X_2 \\ & + \frac{1}{Y_{san}} \cdot r_3 X_3 - \frac{1}{Y_{nan}} \cdot r_4 X_3 - q_4 X_3 - DN_2 \end{aligned} \quad (6.13)$$



-*

Οι μαθηματικές εκφράσεις των ειδικών ρυθμών ανάπτυξης ($r_1, r_2, r_3, r_4, r_5, r_6$) και συντήρησης ($q_1, q_2, q_3, q_4, q_5, q_6$) (Πίνακας 6.1) όπως επίσης και οι τιμές των κινητικών παραμέτρων (Πίνακας 6.2) έχουν ήδη προσδιοριστεί στο Κεφάλαιο 5, από τη πειραματική και θεωρητική μελέτη των τριών συστημάτων (I, II, III) σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου.



Πίνακας 6.1. Ειδικοί ρυθμοί ανάπτυξης και ρυθμοί διατήρησης των τριών βακτηριακών πληθυσμών

Διαδικασία	Εξίσωση ρυθμού της διαδικασίας
Ρυθμός ανάπτυξης και διατήρησης του X_1	$r_1 = \frac{r_{\max 1 ad} N_1}{K_{s ad} + N_1 + k_{d 2 ad} N_2 + \frac{N_1^2}{K_{l ad}}}$ $q_1 = \frac{m_{1 ad} N_1}{K_{s ad} + N_1 + k_{d 2 ad} N_2 + \frac{N_1^2}{K_{l ad}}}$ $r_2 = \frac{r_{\max 2 ad} N_2}{K_{n ad} + N_2 + k_{d 1 ad} N_1 + \frac{N_2^2}{K_{m ad}}}$ $q_2 = \frac{m_{2 ad} N_2}{K_{n ad} + N_2 + k_{d 1 ad} N_1 + \frac{N_2^2}{K_{m ad}}}$
Ρυθμός ανάπτυξης και διατήρησης του X_2	$r_5 = \frac{r_{\max 1 pr} N_1}{K_{s pr} + N_1 + k_{d 2 pr} N_2 + \frac{N_1^2}{K_{l pr}}}$ $q_5 = \frac{m_{1 pr} N_1}{K_{s pr} + N_1 + k_{d 2 pr} N_2 + \frac{N_1^2}{K_{l pr}}}$ $r_6 = \frac{r_{\max 2 pr} N_2}{K_{n pr} + N_2 + k_{d 1 pr} N_1 + \frac{N_2^2}{K_{m pr}}}$ $q_6 = \frac{m_{2 pr} N_2}{K_{n pr} + N_2 + k_{d 1 pr} N_1 + \frac{N_2^2}{K_{m pr}}}$
Ρυθμός ανάπτυξης και διατήρησης του X_3	$r_3 = \frac{r_{\max 1 an} N_1}{K_{s an} + N_1 + k_{d 2 an} N_2 + \frac{N_1^2}{K_{l an}}}$ $q_3 = \frac{m_{1 an} N_1}{K_{s an} + N_1 + k_{d 2 an} N_2 + \frac{N_1^2}{K_{l an}}}$ $r_4 = \frac{r_{\max 2 an} N_2}{K_{n an} + N_2 + k_{d 1 an} N_1 + \frac{N_2^2}{K_{m an}}}$ $q_4 = \frac{m_{2 an} N_2}{K_{n an} + N_2 + k_{d 1 an} N_1 + \frac{N_2^2}{K_{m an}}}$

6.3. Μεθοδολογία

Μελετήθηκε η επίδραση των τιμών των παραμέτρων στη μακροπρόθεσμη (long-term) συμπεριφορά του κάθε συστήματος. Οι κύριες παράμετροι ενός χημοστάτη είναι οι λειτουργικές παράμετροι, δηλαδή ο ρυθμός αραίωσης που ρυθμίζεται από την ογκομετρική παροχή του αντιδραστήρα και η συγκέντρωση του υποστρώματος στην τροφοδοσία (νιτρικό άζωτο).

Τα λειτουργικά διαγράμματα (διαγράμματα διακλαδώσεων) που κατασκευάζονται με την επίλυση των εξισώσεων των συστημάτων με βάση τη θεωρία των διακλαδώσεων, αποτελούν έναν τρόπο παρουσίασης της επίδρασης των λειτουργικών παραμέτρων σε δισδιάστατα διαγράμματα. Αυτά τα διαγράμματα αποτελούνται από περιοχές που περιλαμβάνουν ένα συγκεκριμένο εύρος τιμών των λειτουργικών παραμέτρων, για τις οποίες το σύστημα παρουσιάζει μια συγκεκριμένη δυναμική συμπεριφορά. Σε κάθε μία από τις περιοχές επικρατούν μία ή περισσότερες μόνιμες ή περιοδικές καταστάσεις των βακτηριακών πληθυσμών. Οι διακλαδώσεις εμφανίζονται στα όρια αυτών των περιοχών και το σύστημα υποβάλλεται σε μια αλλαγή του αριθμού ή της ποιότητας των μόνιμων και περιοδικών καταστάσεων (δηλαδή παρατηρείται μεταβολή στην ποιότητα ή στο πλήθος των λύσεων του συστήματος των διαφορικών εξισώσεων).

Η εμφάνιση των αλλαγών της δυναμικής συμπεριφοράς του συστήματος επιτυγχάνεται με την επισήμανση της θέσης των διακλαδώσεων στο χώρο των δύο παραμέτρων. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί αριθμητικοί αλγόριθμοι που είναι βασισμένοι στον αλγόριθμο συνέχισης (continuation algorithm) AUTO (Doedel et al., 1997).

Οι μικτές καλλιέργειες των βακτηριακών πληθυσμών μπορούν σε κάθε περιοχή του λειτουργικού τους διαγράμματος να εμφανίζουν κάποιες μόνιμες καταστάσεις. Αυτές μπορεί να υπάρχουν ταυτόχρονα σε μία περιοχή. Τα συστήματα I και II διαθέτουν από τέσσερις δυνατές μόνιμες καταστάσεις, ενώ το σύστημα III διαθέτει επτά δυνατές μόνιμες καταστάσεις.

Σύστημα I - X_1X_3

- (1) Ολική έκπλυση: $X_1=X_3=0$ (μόνιμη κατάσταση έκπλυσης).
- (2) Έκπλυση του πληθυσμού X_3 : $X_1>0$, $X_3=0$ (μόνιμη κατάσταση X_1).
- (3) Έκπλυση του πληθυσμού X_1 : $X_3>0$, $X_1=0$ (μόνιμη κατάσταση X_3).



- (4) Συνύπαρξη των δύο μικροβιακών πληθυσμών: $X_1 > 0, X_3 > 0$ (μόνιμη κατάσταση $X_1 X_3$).

Σύστημα II - $X_2 X_3$

- (1) Ολική έκπλυση: $X_2 = X_3 = 0$ (μόνιμη κατάσταση έκπλυσης).
 (2) Έκπλυση του πληθυσμού X_3 : $X_2 > 0, X_3 = 0$ (μόνιμη κατάσταση X_2).
 (3) Έκπλυση του πληθυσμού X_2 : $X_3 > 0, X_2 = 0$ (μόνιμη κατάσταση X_3).
 (4) Συνύπαρξη των δύο μικροβιακών πληθυσμών: $X_2 > 0, X_3 > 0$ (μόνιμη κατάσταση $X_2 X_3$).

Σύστημα III - $X_1 X_2 X_3$

- (1) Ολική έκπλυση: $X_1 = X_2 = X_3 = 0$ (μόνιμη κατάσταση έκπλυσης).
 (2) Έκπλυση των πληθυσμών X_2 και X_3 : $X_1 > 0, X_2 = X_3 = 0$ (μόνιμη κατάσταση X_1).
 - (3) Έκπλυση των πληθυσμών X_1 και X_3 : $X_2 > 0, X_1 = X_3 = 0$ (μόνιμη κατάσταση X_2).
 (4) Έκπλυση των πληθυσμών X_1 και X_2 : $X_3 > 0, X_1 = X_2 = 0$ (μόνιμη κατάσταση X_3).
 (5) Συνύπαρξη των δύο μικροβιακών πληθυσμών X_1 και X_3 : $X_1 > 0, X_3 > 0, X_2 = 0$ (μόνιμη κατάσταση $X_1 X_3$).
 (6) Συνύπαρξη των δύο μικροβιακών πληθυσμών X_2 και X_3 : $X_2 > 0, X_3 > 0, X_1 = 0$ (μόνιμη κατάσταση $X_2 X_3$).
 (7) Συνύπαρξη των δύο μικροβιακών πληθυσμών X_1 και X_2 : $X_1 > 0, X_2 > 0, X_3 = 0$ (μόνιμη κατάσταση $X_1 X_2$).

Σε όλες τις περιπτώσεις εκτός της ολικής έκπλυσης ($N_{if} = N_1$), πρέπει να ισχύει $N_{if} > N_1 > 0$. Πρέπει να σημειωθεί ότι για ένα σύστημα δύο μικροβιακών πληθυσμών που συναγωνίζονται για δύο υποστρώματα σε ένα χημοστάτη έχει αποδειχθεί τόσο θεωρητικά (Taylor and Williams, 1975) όσο και πειραματικά (Yoon et al., 1977; Gottschal and Thingstad, 1982), ότι μπορεί να παρατηρηθεί συνύπαρξη των δύο πληθυσμών σε μόνιμη κατάσταση, σε μία ευρεία περιοχή τιμών του ρυθμού αραίωσης. Η περίπτωση του συναγωνισμού τριών μικροβιακών πληθυσμών για δύο υποστρώματα έχει ερευνηθεί θεωρητικά και πειραματικά από τους Gottschal and Thingstad (1982) και βρέθηκε ότι η συνύπαρξη των τριών πληθυσμών δεν υφίσταται σε αυτήν την περίπτωση σε μόνιμη κατάσταση, παρά μόνο των δύο εξ αυτών. Εκτός των μονίμων καταστάσεων, υπάρχει και η



περίπτωση της ευσταθούς περιοδικής κατάστασης στην οποία η συνύπαρξη των πληθυσμών ανά ζεύγη μεταβάλλεται περιοδικά με το χρόνο. Η μορφή των λειτουργικών διαγραμμάτων των συστημάτων εξαρτάται από τις τιμές των κινητικών παραμέτρων των ρυθμών ανάπτυξης της κάθε συνδυασμένης καλλιέργειας (Πίνακας 6.2).

6.4. Ανάλυση της δυναμικής συμπεριφοράς των συστημάτων

6.4.1. Σύστημα I. Δυναμική συμπεριφορά δύο απονιτροποιητικών πληθυσμών X_1 και X_3

Το διάγραμμα λειτουργίας της συγκέντρωσης τροφοδοσίας του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης του Συστήματος I, δίνεται στο Σχήμα 6.1. Το διάγραμμα αποτελείται από πέντε καμπύλες μετακρίσιμης διακλάδωσης (σημειωμένες ως T_1 , T_3 , T^1_3 , T^2_3 , T^1_{13}) στις οποίες δύο μόνιμες καταστάσεις ανταλλάσσουν χαρακτηριστικά ευστάθειας, από τέσσερις καμπύλες διακλάδωσης οριακού σημείου (σημειωμένες ως L^1_1 , L^1_3 , L^2_3 , L^1_{13}) στις οποίες δημιουργούνται δύο νέες μόνιμες καταστάσεις, και από μία Hopf καμπύλη διακλάδωσης (σημειωμένη ως H_{13}) στην οποία δημιουργείται μία ευσταθής περιοδική κατάσταση συνύπαρξης των $X_1 X_3$.

Το πλήθος και ο χαρακτήρας των μονίμων καταστάσεων κάθε περιοχής του διαγράμματος, καθώς επίσης και των υπόλοιπων περιοχών των λειτουργικών διαγραμμάτων που παρουσιάζονται παρακάτω, παρατίθενται στον Πίνακα 6.3. Με S συμβολίζεται η ευσταθής μόνιμη κατάσταση. Αυτό συμβαίνει όταν και οι τέσσερις ιδιοτιμές του συστήματος είναι αρνητικές. Με U1 συμβολίζεται η ασταθής μόνιμη κατάσταση που έχει μία θετική ιδιοτιμή, με U2 η ασταθής μόνιμη κατάσταση που έχει δύο θετικές ιδιοτιμές, κλπ. Στην περιοχή 1 του διαγράμματος (Σχήμα 6.1) η μόνη δυνατή κατάσταση είναι η ολική έκπλυση και των δύο πληθυσμών, αφού η ολική έκπλυση εκεί είναι η μόνη μόνιμη κατάσταση του συστήματος και είναι ευσταθής. Στις περιοχές 2 και 5, δύο μόνιμες καταστάσεις είναι ευσταθείς, η ολική έκπλυση και η μόνιμη κατάσταση επικράτησης/επιβίωσης του πληθυσμού X_3 (πολυ-ευστάθεια). Στην περιοχή 11, δύο μόνιμες καταστάσεις είναι ευσταθείς, η μόνιμη κατάσταση επικράτησης/επιβίωσης του πληθυσμού X_1 και η μόνιμη κατάσταση επικράτησης/επιβίωσης του πληθυσμού X_3 . Στις περιοχές 12 και 13, τρεις μόνιμες καταστάσεις είναι ευσταθείς, η ολική έκπλυση, η μόνιμη κατάσταση επικράτησης του πληθυσμού X_3 και η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των δύο πληθυσμών $X_1 X_3$. Στις περιοχές



19, 26 και 32, τρεις μόνιμες καταστάσεις είναι ευσταθείς, η μόνιμη κατάσταση επικράτησης του πληθυσμού X_1 , η μόνιμη κατάσταση επικράτησης του πληθυσμού X_3 και η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των δύο πληθυσμών X_1X_3 . Πολυ-ευστάθεια επίσης παρατηρείται και στις περιοχές 9, 14-18, 22-25, 28-31, καθώς τόσο η μόνιμη κατάσταση επικράτησης του πληθυσμού X_3 όσο και η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των δύο πληθυσμών X_1X_3 παρουσιάζουν ευστάθεια. Στις περιπτώσεις όπου οι περιοχές παρουσιάζουν πολυ-ευστάθεια, το σε ποια κατάσταση θα καταλήξει τελικά το σύστημα, εξαρτάται από τις αρχικές τιμές συγκεντρώσεων των δύο πληθυσμών (λειτουργώντας το χημοστάτη στις ίδιες λειτουργικές παραμέτρους). Στις περιοχές 3, 4, 6, 7, 8, 10, ο πληθυσμός X_3 υπερισχύει έναντι του X_1 , αφού η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του πληθυσμού X_3 είναι η μόνη ευσταθής στο σύστημα. Στις περιοχές 20, 21, 27, η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των δύο πληθυσμών X_1X_3 είναι η μόνη ευσταθής στο σύστημα.

Σημειώνεται ότι όταν υπάρχουν ασταθείς και ευσταθείς μόνιμες καταστάσεις σε μία περιοχή το σύστημα θα καταλήξει σε μία από τις ευσταθείς καταστάσεις, ανάλογα με τις αρχικές συνθήκες που επικρατούν στο χημοστάτη. Σε κάθε περιοχή του διαγράμματος, ο ρυθμός απονιτροποίησης και η συσσώρευση των νιτρωδών καθορίζεται από το ποια μόνιμη κατάσταση είναι ευσταθής στην εκάστοτε περιοχή και στην περίπτωση της πολυ-ευστάθειας από την μόνιμη κατάσταση στην οποία θα καταλήξει το σύστημα.

Πιο συγκεκριμένα, όταν ο πληθυσμός X_1 είναι ο μόνος που επικρατεί σε μια περιοχή, τότε κατά τη λειτουργία του χημοστάτη σε έναν από τους συνδυασμούς συγκέντρωσης και ρυθμού αραίωσης εντός της περιοχής αυτής, δεν θα υπάρχουν στη έξοδο αυτού σημαντικές ποσότητες νιτρωδών και θα παρατηρηθούν μικροί ρυθμοί απονιτροποίησης. Σε μία περιοχή όπου επικρατεί μόνο ο πληθυσμός X_3 , κατά τη λειτουργία του χημοστάτη σε έναν από τους συνδυασμούς συγκέντρωσης και ρυθμού αραίωσης εντός της περιοχής, θα παρατηρηθούν σημαντικές ποσότητες νιτρωδών και μεγάλοι ρυθμοί απονιτροποίησης. Επιπρόσθετα, σε περιοχές που η μόνη ευσταθής κατάσταση είναι αυτή της συνύπαρξης των δύο πληθυσμών, κατά τη λειτουργία του χημοστάτη αναμένεται μια ενδιάμεση κατάσταση: μία αξιόλογη ποσότητα συσσωρευμένων νιτρωδών (μεγαλύτερη από αυτή που παράγεται από τον πληθυσμό X_1 και μικρότερη από αυτή που παράγεται από τον πληθυσμό X_3) και σε έναν ενδιάμεσο ρυθμό απονιτροποίησης. Οι παραπάνω προβλέψεις έγιναν με βάση τα συμπεράσματα που προέκυψαν στο Κεφάλαιο 5 από τη μελέτη της συμπεριφοράς του συστήματος I σε αντιδραστικές διαλείποντος έργου.

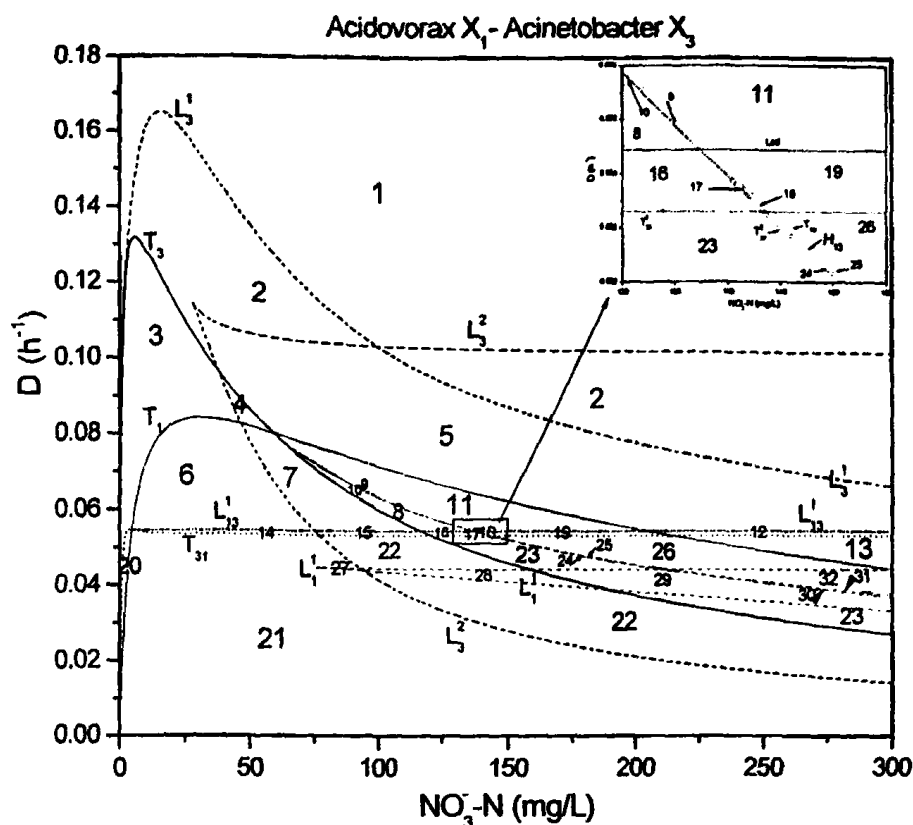


Κατά συνέπεια, στις περιοχές όπου επικρατεί ο πληθυσμός X_3 έναντι του X_1 (ευσταθής η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του X_3), το σύστημα θα παράγει μεγάλες ποσότητες νιτρώδους αζώτου, ενώ ο ρυθμός απονιτροποίησης θα είναι ικανοποιητικός. Από την άλλη πλευρά σε περιοχές όπου η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης είναι ευσταθής, αναμένεται η συσσώρευση των νιτρωδών να είναι μικρότερη και ο ρυθμός απονιτροποίησης μικρότερος από αυτόν του πληθυσμού X_3 . Για παράδειγμα, οι περιοχές 6 (ευσταθής η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του X_3) και 21 (ευσταθής η συνύπαρξη X_1X_3) θα διαφέρουν στην ποσότητα των νιτρωδών που παράγεται.



Πίνακας 6.2. Τιμές κινητικών παραμέτρων.

Παράμετροι	Acidovorax & Acinetobacter		Acinetobacter & Paracoccus		Acidovorax & Acinetobacter & Paracoccus	
	Acidovorax	Acinetobacter	Acinetobacter	Paracoccus	Acidovorax	Acinetobacter & Paracoccus
r_{max1} (1/h)	0.109	0.155	0.155	0.0876	0.109	0.155 0.0876
K_s (mg/L)	4.464	0.5	0.5	8.82	4.464	0.5 8.82
Y_{ad} (mgbiomass/mgNO ₃ -N)	0.967	0.7192	0.7192	1.077	0.967	0.7192 1.077
K_i (mg/L)	211.11	63.64	63.64	15.22	211.11	63.64 15.22
r_{max2} (1/h)	0.868	0.608	0.608	0.4547	0.868	0.608 0.4547
K_{nad} (mg/L)	8.673	28.45	28.45	0.778	8.673	28.45 0.778
Y_n (mgbiomass/mgNO ₂ -N)	0.147	1.4668	1.4668	0.00471	0.147	1.4668 0.00471
K_m (mg/L)	0.192	1.886	0.332	0.00747	5.25*10 ⁻⁴	1.886 1.9*10 ⁻⁴
k_{d1} (mgNO ₂ -N / mgNO ₃ -N)	15.055	3.689	3.689	11.158	15.055	3.689 11.158
k_{d2} (mgNO ₃ -N / mgNO ₂ -N)	13.18	0.153	1.976	7.73	13.18	2.125 7.73
k_d (1/h)	0.0003	0.0001	0.0001	0.00047	0.0003	0.0001 0.00047
m_1 (mgNO ₃ -N /h mgbiomass)	0.0024	0.00291	0.00291	3.25*10 ⁻⁴	0.0024	0.00291 3.25*10 ⁻⁴
m_2 (mgNO ₂ -N /h mgbiomass)	0.0001	0.000126	0.000126	0.0003	0.0001	0.000126 0.0003



Σχήμα 6.1. Διάγραμμα λειτουργίας (D ως προς $\text{NO}_3^- \text{-N}$) ενός χημοστάτη (Σύστημα Ι) στον οποίο δύο απονιτροποιητικοί βακτηριακοί πληθυσμοί αναπτύσσονται μαζί, έχοντας συναγωνισμό για δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικό, νιτρώδες άζωτο). Συμβολισμός καμπυλών: T_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_1 ; T_3 μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_3 ; T_1^1 και T_3^1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; T_1^2 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_1 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; L_1^1 και L_3^1 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_3 ; L_1^2 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_1 ; L_{13}^1 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; H_{13} , Hopf διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 . Ο χαρακτήρας κάθε μόνιμης κατάστασης στις διάφορες περιοχές του διαγράμματος λειτουργίας δίνεται στον Πίνακα 6.3.

6.4.2. Σύστημα II. Δυναμική συμπεριφορά δύο απονιτροποιητικών πληθυσμών X_2 και X_3

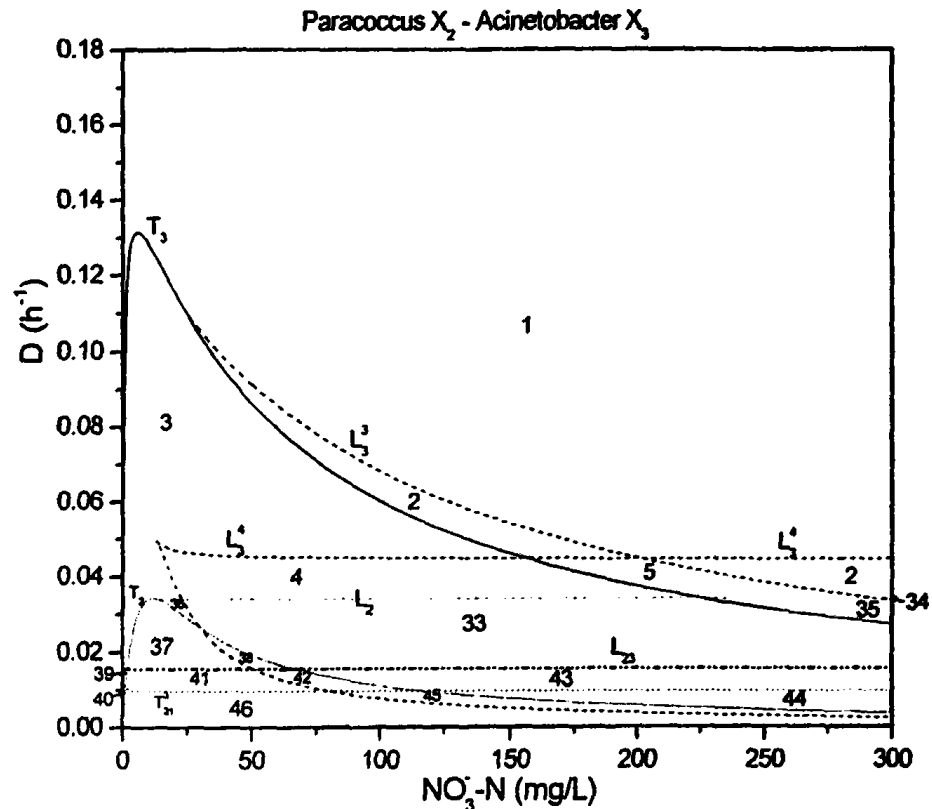
Το διάγραμμα λειτουργίας της συγκέντρωσης τροφοδοσίας του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης του Συστήματος II, δίνεται στο Σχήμα 6.2. Το διάγραμμα αποτελείται από τρεις καμπύλες μετακρίσιμης διακλάδωσης (σημειωμένες ως T_2 , T_3 , T_3^3) στις οποίες δύο μόνιμες καταστάσεις ανταλλάσσουν χαρακτηριστικά ευστάθειας και από τέσσερις καμπύλες οριακού σημείου διακλάδωσης (σημειωμένες ως L_2^1 , L_3^3 , L_3^4 , L_{23}^1) στις οποίες δημιουργούνται δύο νέες μόνιμες καταστάσεις.

Το διάγραμμα αυτό έχει μόνο πέντε κοινές περιοχές (1-5) με το διάγραμμα του Συστήματος I. Εμφανίζονται 14 νέες περιοχές (33-46, Πίνακας 6.3). Στις περιοχές 34 και 35, δύο μόνιμες καταστάσεις είναι ευσταθείς, η ολική έκπλυση και η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του πληθυσμού X_3 . Πολυ-ευστάθεια επίσης παρατηρείται και στις περιοχές 39, 41-45, καθώς η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του πληθυσμού X_3 και η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των πληθυσμών X_2 και X_3 , είναι ευσταθείς. Στις περιοχές 33, 36, 37, 38, ο πληθυσμός X_3 υπερισχύει έναντι του X_2 , η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του πληθυσμού X_3 είναι η μόνη ευσταθής στο σύστημα. Στις περιοχές 40, 46, η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των πληθυσμών X_2 και X_3 είναι η μόνη ευσταθής.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, ο ρυθμός απονιτροποίησης και η συσσώρευση των νιτρικών κάθε περιοχής του διαγράμματος, καθορίζεται από το ποια μόνιμη κατάσταση είναι ευσταθής στην εκάστοτε περιοχή και στην περίπτωση της πολυ-ευστάθειας από τη μόνιμη κατάσταση στην οποία θα καταλήξει το σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, όταν ο πληθυσμός X_2 είναι ο μόνος που επικρατεί σε μια περιοχή, τότε κατά τη λειτουργία του χημοστάτη εντός της περιοχής αυτής, θα υπάρχουν στην έξοδο αυτού ασήμαντες ποσότητες νιτρικών και θα παρατηρηθούν μικροί ρυθμοί απονιτροποίησης. Σε μία περιοχή όπου επικρατεί μόνο ο πληθυσμός X_3 , κατά τη λειτουργία του χημοστάτη, θα παρατηρηθούν σημαντικές ποσότητες νιτρικών και μεγάλοι ρυθμοί απονιτροποίησης. Επιπρόσθετα, σε περιοχές που η μόνη ευσταθής κατάσταση είναι αυτή της συνύπαρξης των δύο πληθυσμών, κατά τη λειτουργία του χημοστάτη αναμένεται μια ενδιάμεση κατάσταση: μία σημαντική ποσότητα συσσωρευμένων νιτρικών (μεγαλύτερη σε ποσοστό από αυτή που παράγεται από τον πληθυσμό X_2 και μικρότερη από αυτή που παράγεται από τον πληθυσμό X_3) και σε έναν ενδιάμεσο ρυθμό απονιτροποίησης. Οι παραπάνω προβλέψεις έγιναν με βάση τα



συμπεράσματα που προέκυψαν στο Κεφαλαίο 5 από τη μελέτη της συμπεριφοράς του Συστήματος II σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου.



Σχήμα 6.2. Διάγραμμα λειτουργίας (D ως προς $\text{NO}_3^- \text{-N}$) ενός χημοστάτη (Σύστημα II) στον οποίο δύο απονιτροποιητικοί βακτηριακοί πληθυσμοί αναπτύσσονται μαζί, έχοντας συναγωνισμό για δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικό, νιτρώδες άζωτο). Συμβολισμός καμπυλών: T_2 , διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_2 ; T_3 μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_3 ; T_3' , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 ; L_3 και L_3' , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_3 ; L_2 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_2 ; L_{23}' , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 . Ο χαρακτήρας κάθε μόνιμης κατάστασης στις διάφορες περιοχές του διαγράμματος λειτουργίας δίνεται στον Πίνακα 6.3.



Κατά συνέπεια, στις περιοχές όπου επικρατεί ο πληθυσμός X_3 έναντι του X_2 (ευσταθής η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του X_3), το σύστημα θα παράγει μεγάλες ποσότητες νιτρώδους αζώτου, ενώ ο ρυθμός απονιτροποίησης θα είναι αρκετά μεγάλος. Από την άλλη πλευρά σε περιοχές όπου η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης είναι ευσταθής, αναμένεται η συσσώρευση των νιτρωδών και ο ρυθμός απονιτροποίησης να είναι μικρότερα από ότι του πληθυσμού X_3 . Ο πληθυσμός X_2 όπως παρατηρείται από τις μόνιμες καταστάσεις των περιοχών δεν παρουσιάζει ποτέ ευστάθεια. Με βάση τα παραπάνω, η περιοχή 46 (ευσταθής η συνύπαρξη X_1X_3) θα παρουσιάζει μικρότερες ποσότητες νιτρωδών από την περιοχή 45 (εάν σε αυτή το σύστημα καταλήξει στη μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του X_3). Σε περίπτωση πολυευστάθειας, η συσσώρευση των νιτρωδών και ο ρυθμός απονιτροποίησης εξαρτάται από το σε ποια κατάσταση θα καταλήξει τελικά το σύστημα, ανάλογα με τις αρχικές συνθήκες του χημοστάτη.

Μία σύγκριση μεταξύ των Συστημάτων I και II, δείχνει ότι Σύστημα I μπορεί να λειτουργήσει σε μεγαλύτερους ρυθμούς αραίωσης (μέχρι 0.166 1/h) σε σχέση με το Σύστημα II (ρυθμός αραίωσης μέχρι 0.133 1/h). Αυτό είναι ένα αποτέλεσμα του μεγαλύτερου ποσού νιτρώδους αζώτου που παράγεται από το Σύστημα II έναντι αυτού που παράγεται από το Σύστημα I, δεδομένου ότι η αύξηση των βακτηρίων εμποδίζεται από τα νιτρώδη περισσότερο στο Σύστημα II απ' ότι στο Σύστημα I. Για παράδειγμα, εάν οι χημοστάτες των δύο συστημάτων λειτουργήσουν με τις ίδιες λειτουργικές παραμέτρους: $D=0.06$ 1/h και $N_{1f}=50\text{mg/L}$, αναμένεται υψηλότερος ρυθμός απονιτροποίησης και μικρότερη συσσώρευση νιτρωδών (περιοχή 6 του Συστήματος I) στο Σύστημα I, απ' ότι στο Σύστημα II (περιοχή 3 του Συστήματος II). Οι παραπάνω παρατηρήσεις γίνονται με βάση τα συμπεράσματα που προέκυψαν στο Κεφαλαίο 5 από τη μελέτη της συμπεριφοράς των Συστημάτων I και II σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου.

6.4.3. Σύστημα III. Δυναμική συμπεριφορά τριών απονιτροποιητικών πληθυσμών X_1 , X_2 και X_3

Το λειτουργικό διάγραμμα της συγκέντρωσης τροφοδοσίας του νιτρικού αζώτου σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης του Συστήματος III, δίνεται στο Σχήμα 6.3. Το διάγραμμα αποτελείται από 13 καμπύλες μετακρίσιμης διακλάδωσης (σημειωμένες ως T_1 , T_2 , T_3 , T_1^2 , T_1^3 , T_1^4 , T_3^5 , T_3^6 , T_1^2 , T_2^2 , T_{13} , T_{23}) στις οποίες δύο μόνιμες καταστάσεις ανταλλάσσουν



χαρακτηριστικά ευστάθειας, από επτά καμπύλες οριακού σημείου διακλάδωσης (σημειωμένες ως L^6_3 , L^5_3 , L^2_1 , L^2_2 , L^3_2 , L^2_{13} , L^2_{23}) στις οποίες δημιουργούνται δύο νέες μόνιμες καταστάσεις, και από τρεις Hopf καμπύλες διακλάδωσης (σημειωμένη ως H^2_{13} , H_{12} , H_2) στις οποίες δημιουργείται μία ευσταθής περιοδική κατάσταση συνύπαρξης των X_1X_3 , X_1X_2 και X_2X_3 .

Στο διάγραμμα αυτό εμφανίζονται 11 κοινές περιοχές (1-11) με το διάγραμμα του Συστήματος I. Επιπρόσθετα, εμφανίζονται 53 καινούριες περιοχές (47-100) (Πίνακας 6.3). Στην περιοχή 47, δύο μόνιμες καταστάσεις είναι ευσταθείς, η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του πληθυσμού X_1 και η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του πληθυσμού X_3 . Στις περιοχές 48-73, όπου ο πληθυσμός X_3 επικρατεί έναντι των X_1 και X_2 , η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του πληθυσμού X_3 είναι η μόνη ευσταθής. Στις περιοχές 74-80, τόσο η μόνιμη κατάσταση επιβίωσης του πληθυσμού X_3 όσο και η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των πληθυσμών X_1 και X_3 παρουσιάζουν ευστάθεια. Στις περιοχές 85-89 δύο μόνιμες καταστάσεις είναι ευσταθείς, η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των πληθυσμών X_1 και X_3 και η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των πληθυσμών X_2 και X_3 . Στις περιοχές 81-84, η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των πληθυσμών X_1 και X_3 είναι η μόνη ευσταθής, καθώς στις περιοχές 90-100, η μόνη ευσταθής είναι η μόνιμη κατάσταση συνύπαρξης των πληθυσμών X_2 και X_3 .

Ο ρυθμός απονιτροποίησης και η συσσώρευση των νιτρικών κάθε περιοχής του διαγράμματος, καθορίζεται από το ποια μόνιμη κατάσταση βρίσκεται σε ευστάθεια και στην περίπτωση της πολυ-ευστάθειας από τη μόνιμη κατάσταση στην οποία θα καταλήξει το σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί X_1 και X_2 όταν αναπτύσσονται μόνοι τους σε καθαρές καλλιέργειες (Κεφάλαιο 5) απομακρύνουν το νιτρικό άζωτο χωρίς να συσσωρεύουν το ενδιάμεσο προϊόν των νιτρικών. Δηλαδή, σε περιοχές όπου ο X_1 είναι ο μόνος που επικρατεί (ο X_2 δεν εμφανίζει ευστάθεια σε καμία περιοχή), τότε κατά τη λειτουργία του χημοστάτη εντός των περιοχών, στο σύστημα θα παραχθούν ασήμαντες ποσότητες νιτρικών και θα παρατηρηθούν μικροί ρυθμοί απονιτροποίησης. Σε μία περιοχή όπου επικρατεί μόνο ο πληθυσμός X_3 , κατά τη λειτουργία του χημοστάτη, θα παρατηρηθούν σημαντικές ποσότητες νιτρικών και μεγάλοι ρυθμοί απονιτροποίησης. Επιπρόσθετα, σε περιοχές που η μόνη ευσταθής κατάσταση είναι αυτή της συνύπαρξης των πληθυσμών X_1 και X_3 , κατά τη λειτουργία του χημοστάτη αναμένεται μια ενδιάμεση κατάσταση: μία σημαντική ποσότητα συσσωρευμένων νιτρικών (μεγαλύτερη σε ποσοστό από αυτή που παράγεται από τους πληθυσμούς X_1 και X_2 και μικρότερη από αυτή που παράγεται από τον πληθυσμό X_3) και σε



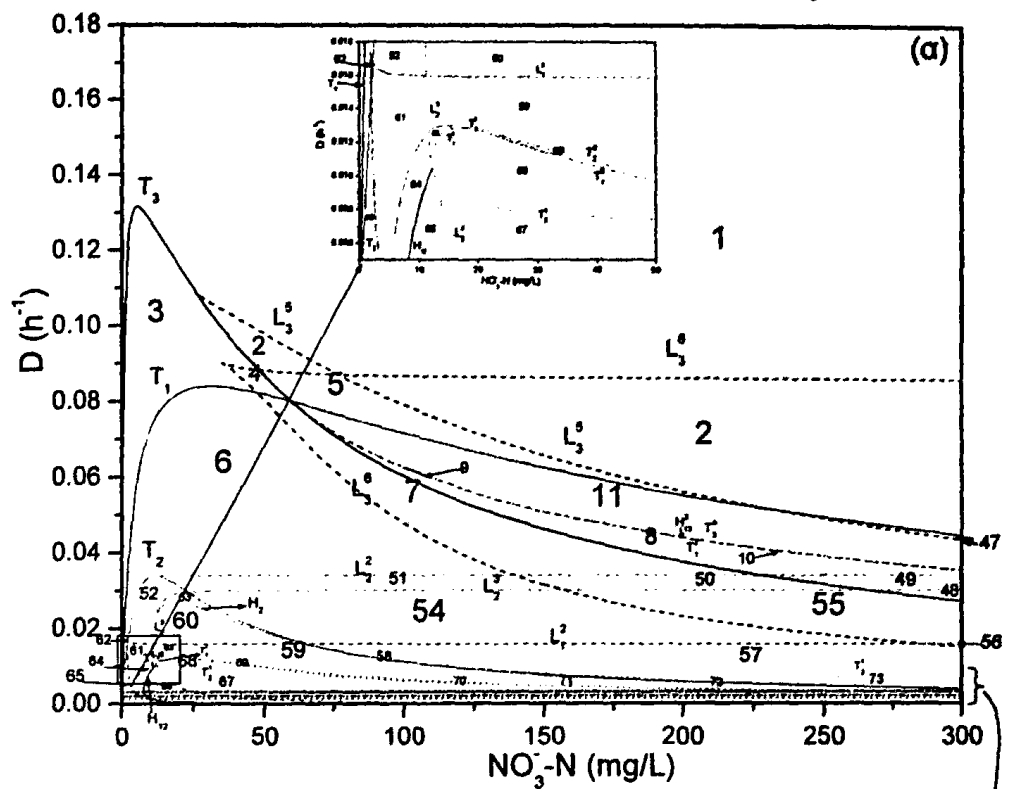
έναν ενδιάμεσο ρυθμό απονιτροποίησης. Στις περιοχές όπου η μόνη ευσταθής κατάσταση είναι αυτή της συνύπαρξης των πληθυσμών X_2 και X_3 , κατά τη λειτουργία του χημοστάτη αναμένεται μια ενδιάμεση κατάσταση: μία σημαντική ποσότητα συσσωρευμένων νιτρικών (μεγαλύτερη σε ποσοστό από αυτή που παράγεται από τους πληθυσμούς X_1 και X_2 και μικρότερη από αυτή που παράγεται από τον πληθυσμό X_3) και σε έναν ενδιάμεσο ρυθμό απονιτροποίησης.

Μία σύγκριση μεταξύ των Συστημάτων I, II και III, δείχνει ότι Σύστημα I μπορεί να λειτουργήσει σε μεγαλύτερους ρυθμούς αραίωσης (μέχρι 0.166 1/h) σε σχέση με τα Συστήματα II και III (ρυθμός αραίωσης μέχρι 0.133 1/h). Αυτό είναι ένα αποτέλεσμα του μεγαλύτερου ποσού νιτρικών αζώτου που παράγεται από τα Συστήματα II και III έναντι αυτού που παράγεται από το Σύστημα I, δεδομένου ότι η αύξηση των βακτηρίων εμποδίζεται από τα νιτρικά περισσότερο στο Σύστημα II ή III (που σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου έχουν μικρή διαφορά στη συσσώρευση των νιτρικών, Κεφάλαιο 5). Αυτό ισχύει για όλο το φάσμα της συγκέντρωσης τροφοδοσίας. Για αρχική συγκέντρωση νιτρικού αζώτου 300 mg/L, το Σύστημα I λειτουργεί σε ρυθμούς αραίωσης μέχρι 0.1 1/h, το Σύστημα II μέχρι 0.045 1/h, και το Σύστημα III μέχρι 0.087 1/h.

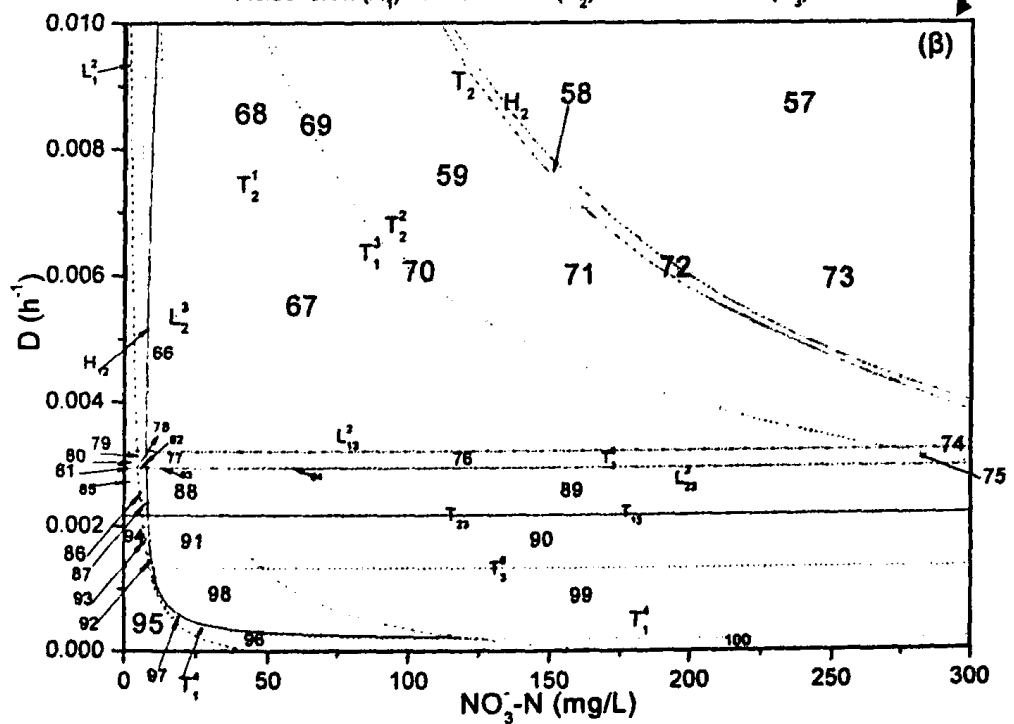
Γενικά, όπως παρατηρήθηκε πειραματικά στους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (Κεφάλαιο 5) το Σύστημα II συσσωρεύει τις μεγαλύτερες ποσότητες νιτρικών, το Σύστημα III συσσωρεύει μικρότερες ποσότητες, ενώ στο Σύστημα I παρατηρείται ακόμα μικρότερη συσσώρευση. Οι ποσότητες αυτές των νιτρικών καθώς και ο ανταγωνισμός για τα κοινά υποστρώματα επηρέασαν διαφορετικά τις τιμές των κινητικών παραμέτρων των μοντέλων του κάθε συστήματος. Για το λόγο αυτό στην περιοχή 3, για παράδειγμα, του Συστήματος I αναμένεται διαφορετικός ρυθμός απονιτροποίησης από αυτόν της ίδιας περιοχής του Συστήματος II, παρόλο που η μόνη ευσταθής κατάσταση είναι αυτή της επιβίωσης του X_3 . Σημειώνεται λοιπόν ότι οι τιμές των κινητικών παραμέτρων καθορίζουν τη δυναμική συμπεριφορά των συστημάτων, και κατ' επέκταση τη διαδικασία της απονιτροποίησης.



Acidovorax X_1 - Paracoccus X_2 - Acinetobacter X_3



Acidovorax (X_1) - Paracoccus (X_2) - Acinetobacter (X_3)



Σχήμα 6.3. Διάγραμμα λειτουργίας (D ως προς NO_3^- -N) ενός χημοστάτη (Σύστημα III) στον οποίο τρεις απονιτροποιητικοί βακτηριακοί πληθυσμοί αναπτύσσονται μαζί, έχοντας συναγωνισμό για δύο κοινά υποστρώματα (νιτρικό, νιτρώδες άζωτο). Συμβολισμός καμπυλών: T_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_1 ; T_2 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_2 ; T_3 μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της ολικής έκπλυσης και της μόνιμης κατάστασης X_3 ; T^2_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_1 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; T^3_1 , T^4_1 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_1 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_2 ; T^4_3 και T^5_3 , διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; T^6_3 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 ; T^1_2 και T^2_2 , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης X_2 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_2 ; T_{13} και T_{23} , μετακρίσιμη διακλάδωση μεταξύ της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 και της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_2 ; L^6_3 και L^5_3 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_3 ; L^2_1 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_1 ; L^2_2 και L^3_2 , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης X_2 ; L^2_{13} , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; L^2_{23} , οριακού σημείου διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2X_3 ; H^2_{13} , Hopf διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_3 ; H_{12} , Hopf διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_1X_2 ; H_2 , Hopf διακλάδωση της μόνιμης κατάστασης συνύπαρξης X_2 ; Ο χαρακτήρας κάθε μόνιμης κατάστασης στις διάφορες περιοχές του διαγράμματος λειτουργίας δίνεται στον Πίνακα 6.3.



6.5. Ρυθμός απονιτροποίησης και συσσώρευση νιτρώδους αζώτου για κάθε σύστημα σε χημοστάτη

Για την κατασκευή των διαγραμμάτων τα οποία θα απεικονίζουν το ρυθμό απονιτροποίησης και τη συσσωρευμένη ποσότητα νιτρώδων σε κάθε χημοστάτη των τριών συστημάτων, έπρεπε να γίνουν ορισμένες υποθέσεις:

1. Ο ρυθμός απονιτροποίησης κάθε συστήματος υπολογίστηκε ως $D(N_{If} - N_I)$ (μονάδες: $mg/L \cdot h$), δηλαδή η συγκέντρωση των νιτρικών που καταναλώθηκε πολλαπλασιασμένη με το ρυθμό αραίωσης. Οι τιμές των N_I και D , όπως επίσης και των νιτρώδων, παίρνονταν κάθε φορά από τις προβλέψεις του μοντέλου του κάθε συστήματος για τις διάφορες συγκεντρώσεις τροφοδοσίας.
2. Ο ρυθμός απονιτροποίησης και η συσσώρευση των νιτρώδων υπολογίστηκαν μόνο για όσες μόνιμες καταστάσεις ήταν ευσταθείς σε κάθε περιοχή.
3. Για ορισμένες λειτουργικές παραμέτρους υπήρχαν, όπως ειπώθηκε και παραπάνω, δύο ή τρεις ευσταθείς μόνιμες καταστάσεις, πχ. στην περιοχή 19 του Συστήματος I, υπήρχαν τρεις ευσταθείς καταστάσεις, η μόνιμη κατάσταση της επικράτησης του πληθυσμού X_1 , η μόνιμη κατάσταση της επικράτησης του πληθυσμού X_3 και η μόνιμη κατάσταση της συνύπαρξης των πληθυσμών X_1 και X_3 . Σε αυτές τις περιπτώσεις για την κατασκευή των διαγραμμάτων χρησιμοποιούταν ο ρυθμός απονιτροποίησης και η συσσώρευση των νιτρώδων των μόνιμων καταστάσεων που πετύχαιναν κάθε φορά τους υψηλότερους ρυθμούς απομάκρυνσης νιτρικών.

Για παράδειγμα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.4. (που αναφέρεται στο Σύστημα I) για $N_{If} = 100 \text{ mg/L}$ και ρυθμό αραίωσης 0.07 1/h (περιοχή 11) υπήρχαν τρεις ευσταθείς καταστάσεις, η μόνιμη κατάσταση της επικράτησης του πληθυσμού X_1 και δύο μόνιμες καταστάσεις της επικράτησης του πληθυσμού X_3 . Αυτές οι μόνιμες καταστάσεις δίνουν διαφορετικούς ρυθμούς απονιτροποίησης: ο πληθυσμός X_1 δίνει 0.027 mg/Lh , ο πληθυσμός X_3 πετυχαίνει 6.46 mg/Lh και 7 mg/Lh . Σε αυτήν την περίπτωση επιλέγεται για το διάγραμμα η τιμή 7 mg/Lh , που είναι ο μέγιστος ρυθμός.



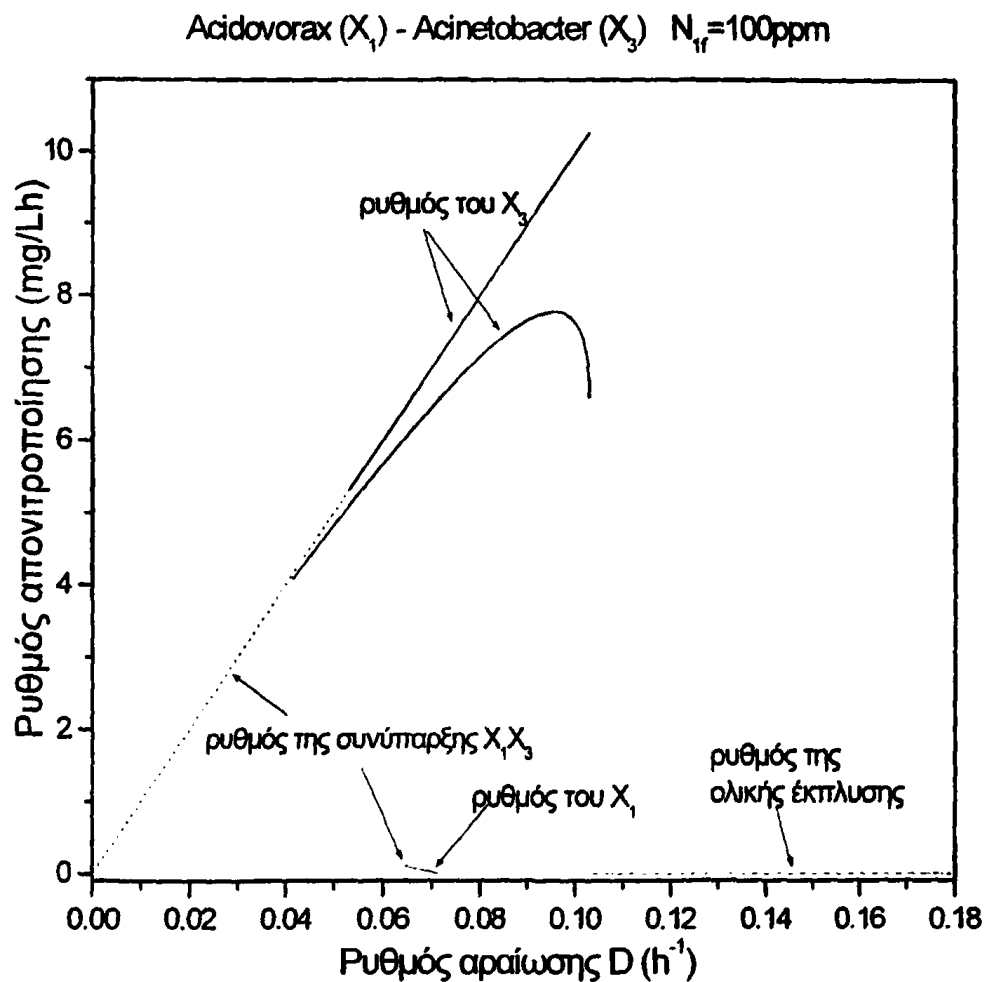
6.5.1. Ρυθμός απονιτροποίησης και συσσώρευση νιτρώδους αζώτου του Συστήματος I (X_1 και X_3)

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.5(α) ο ρυθμός απονιτροποίησης που επιτεύχθηκε από το Σύστημα I κυμαίνονταν από 0.3 μέχρι 28 mg/Lh, καθώς οι λειτουργικές παράμετροι, ο ρυθμός αραίωσης και η συγκέντρωση τροφοδοσίας, κυμαίνονταν από 0 μέχρι 0.166 1/h και από 0 μέχρι 300 mg/L, αντίστοιχα. Ο ρυθμός απονιτροποίησης εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην τροφοδοσία όσο και από το ρυθμό αραίωσης. Παρατηρήθηκε ότι μέχρι το ρυθμό αραίωσης 0.11 1/h η συσσώρευση των νιτρώδων δεν εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην είσοδο του χημοστάτη, αλλά μόνο από το ρυθμό αραίωσης. Για συγκέντρωση νιτρώδων στην έξοδο του χημοστάτη μικρότερη από το ανώτατο επιτρεπτό όριο των 0.03 mg/L (Σχήμα 6.5(β)), ο χημοστάτης πρέπει να λειτουργεί με ρυθμό αραίωσης μικρότερο του 0.002 1/h, με οποιαδήποτε συγκέντρωση τροφοδοσίας $\text{NO}_3^- \text{-N}$ μεταξύ 0 και 300 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$.

Επιπρόσθετα, καθώς ο ρυθμός αραίωσης αυξάνεται μέχρι το 0.0544 1/h, όπου η κατάσταση συνύπαρξης είναι η μόνη ευσταθής κατάσταση (Σχήμα 6.1), η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης, από ότι αυξάνεται στους ρυθμούς πάνω από 0.0544 1/h. Πιο συγκεκριμένα, κατά την αύξηση του ρυθμού αραίωσης από 0 σε 0.0544 1/h η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται από 0 στα 1.5 mg/L. Για μία αύξηση του ρυθμού αραίωσης από 0.0544 σε 0.11 1/h (ίδιου μεγέθους αύξηση), η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται από τα 1.5 στα 6 mg/L. Συμπερασματικά, η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται τέσσερις φορές πιο γρήγορα με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης σε περιοχές όπου, είναι ευσταθής η μόνιμη κατάσταση της επικράτησης του πληθυσμού X_3 , σε σχέση με αυτές που είναι ευσταθής η συνύπαρξη των δύο πληθυσμών (Σχήμα 6.1).

Τέλος, όταν ο ρυθμός αραίωσης κυμαίνεται από 0.11 1/h μέχρι 0.166 1/h, η συσσώρευση των νιτρώδων εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην τροφοδοσία όσο και από το ρυθμό αραίωσης.





Σχήμα 6.4. Ρυθμός απονιτροποίησης σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης όπως προέκυψε από τις προβλέψεις του μοντέλου κατά την ανάλυση της δυναμικής συμπεριφοράς του Συστήματος I, για συγκέντρωση τροφοδοσίας στο χημοστάτη $N_{if} = 100 \text{ mg/L}$.

Σημειώνεται ότι στο Σχήμα 6.5(α) η διακεκομμένη γραμμή αποτελεί το όριο των λειτουργικών παραμέτρων στις οποίες μπορεί να λειτουργήσει ο χημοστάτης και να πετύχει ασφαλή απομάκρυνση νιτρικού αζώτου. Δηλαδή, εάν ο χημοστάτης λειτουργήσει σε συνδυασμούς λειτουργικών παραμέτρων που βρίσκονται επάνω από τη διακεκομμένη γραμμή η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στην έξοδο θα είναι πάνω από το επιτρεπτό όριο των 11.3 (mg/L) . Αντίστοιχα αυτό ορίζεται και από τις διακεκομμένες γραμμές στα Σχήματα 6.6(α) και 6.7(α).

6.5.2. Ρυθμός απονιτροποίησης και συσσώρευση νιτρώδους αζώτου του Συστήματος II (X_2 και X_3)

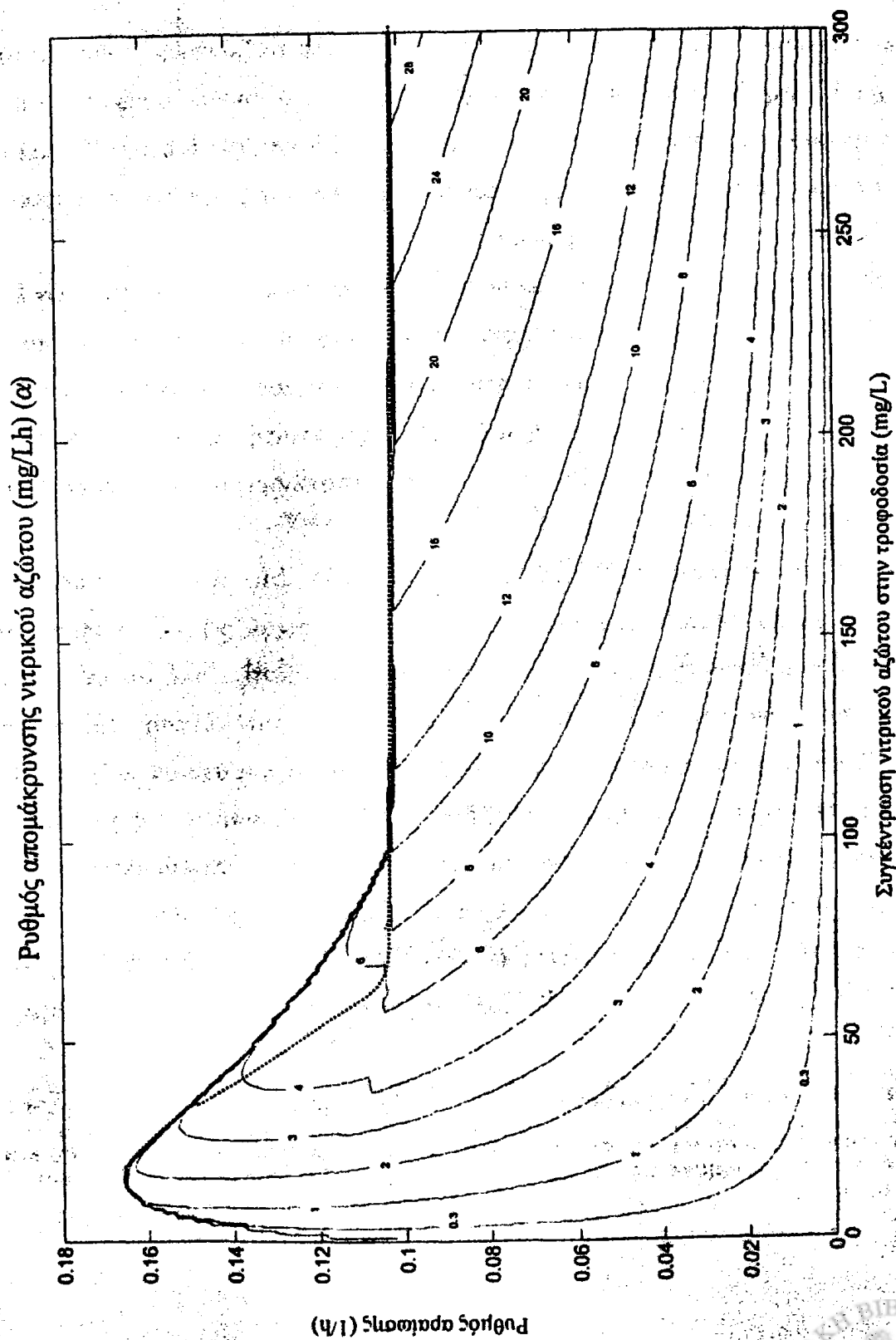
Ο ρυθμός απονιτροποίησης (Σχήμα 6.6(α)) που επιτεύχθηκε από το Σύστημα II κυμαινόταν από 0.05 μέχρι 12 mg/Lh, καθώς οι λειτουργικές παράμετροι, ο ρυθμός αραίωσης και η συγκέντρωση τροφοδοσίας, κυμαίνονταν από 0 μέχρι 0.133 1/h και από 0 μέχρι 300 mg/L, αντίστοιχα. Ο ρυθμός απονιτροποίησης εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην τροφοδοσία όσο και από το ρυθμό αραίωσης.

Παρατηρήθηκε ότι μέχρι το ρυθμό αραίωσης 0.05 1/h η συσσώρευση των νιτρώδων δεν εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην είσοδο του χημοστάτη, αλλά μόνο από το ρυθμό αραίωσης. Για συγκέντρωση νιτρώδων στην έξοδο του χημοστάτη μικρότερη από το ανώτατο επιτρεπτό όριο των 0.03 mg/L (Σχήμα 6.6(β)), ο χημοστάτης πρέπει να λειτουργεί με ρυθμό αραίωσης μικρότερο του 0.01 1/h, με οποιαδήποτε συγκέντρωση τροφοδοσίας NO_3^- -N μεταξύ 0 και 300 mg NO_3^- -N/L.

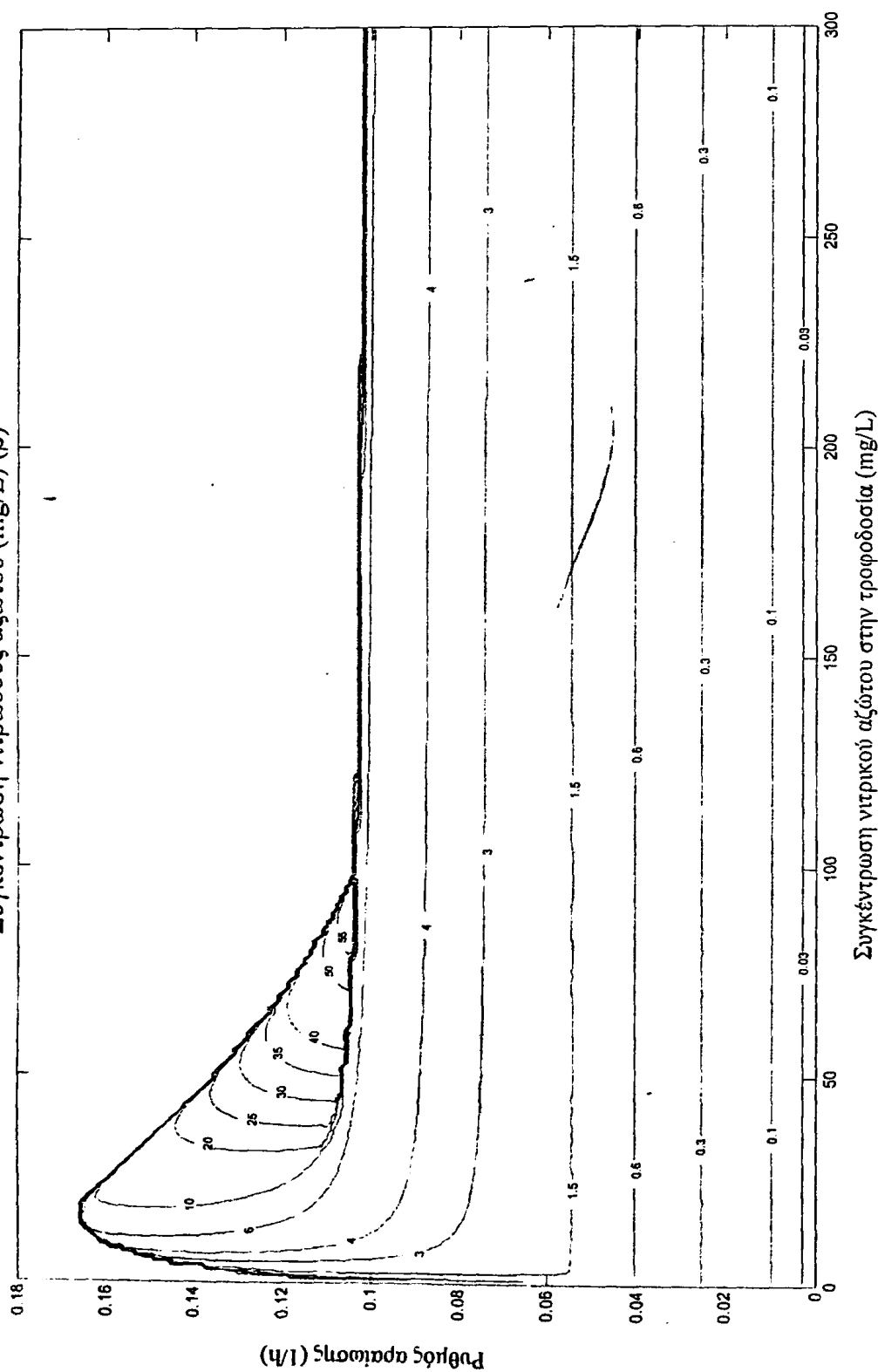
Καθώς ο ρυθμός αραίωσης αυξάνεται μέχρι το 0.0155 1/h, όπου η κατάσταση συνύπαρξης είναι η μόνη ευσταθής κατάσταση (Σχήμα 6.2), η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης, από ότι αυξάνεται στους ρυθμούς πάνω από 0.0155 1/h. Πιο συγκεκριμένα, κατά την αύξηση του ρυθμού αραίωσης από 0 σε 0.0155 1/h η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται από 0 στα 0.1 mg/L. Για μία αύξηση του ρυθμού αραίωσης από 0.0155 σε 0.03 1/h (ίδιου μεγέθους αύξηση), η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται από τα 0.1 στα 1.2 mg/L. Συμπερασματικά, η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται 12 φορές περισσότερο με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης σε περιοχές όπου, είναι ευσταθής η μόνιμη κατάσταση της επικράτησης του πληθυσμού X_3 , σε σχέση με αυτές που είναι ευσταθής η συνύπαρξη των δύο πληθυσμών (Σχήμα 6.2).

Τέλος, όταν ο ρυθμός αραίωσης κυμαίνεται από 0.05 1/h μέχρι 0.133 1/h, η συσσώρευση των νιτρώδων εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην τροφοδοσία όσο και από το ρυθμό αραίωσης.





Συγκέντρωση νιτρικών αζώτου (mg/L) (β)



Σχήμα 6.5. α) Ρυθμός απονιτροποίησης και β) συσσώρευση νιτρικών σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης και τη συγκέντρωση τροφοδοσίας για το σύστημα Ι.

6.5.3. Ρυθμός απονιτροποίησης και συσσώρευση νιτρώδους αζώτου του συστήματος III (X_1 , X_2 και X_3)

Ο ρυθμός απονιτροποίησης (Σχήμα 6.7(α)) που επιτεύχθηκε από το Σύστημα III κυμαινόταν από 0.1 μέχρι 24 mg/L·h, καθώς οι λειτουργικές παράμετροι, ο ρυθμός αραίωσης και η συγκέντρωση τροφοδοσίας, κυμαίνονταν από 0 μέχρι 0.133 1/h και από 0 μέχρι 300 mg/L, αντίστοιχα. Ο ρυθμός απονιτροποίησης εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην τροφοδοσία όσο και από το ρυθμό αραίωσης.

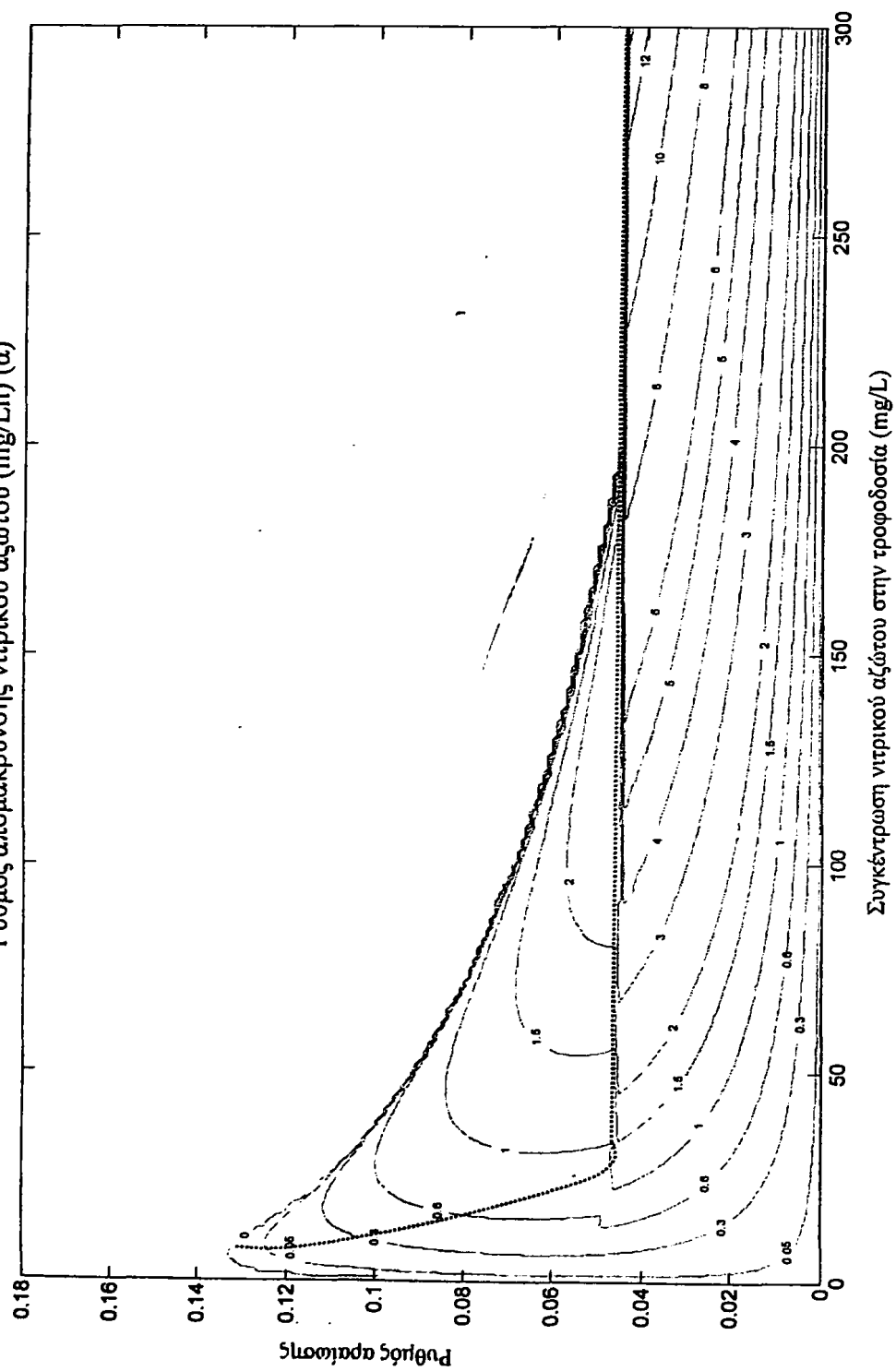
Παρατηρήθηκε ότι μέχρι το ρυθμό αραίωσης 0.09 1/h η συσσώρευση των νιτρώδων δεν εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην είσοδο του χημοστάτη, αλλά μόνο από το ρυθμό αραίωσης. Για συγκέντρωση νιτρώδων στην έξοδο του χημοστάτη μικρότερη από το ανώτατο επιτρεπτό όριο των 0.03 mg/L (Σχήμα 6.7(β)), ο χημοστάτης πρέπει να λειτουργεί με ρυθμό αραίωσης μικρότερο του 0.002 1/h, για οποιαδήποτε συγκέντρωση τροφοδοσίας $\text{NO}_3^- \text{-N}$ μεταξύ 0 και 300 mg $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$.

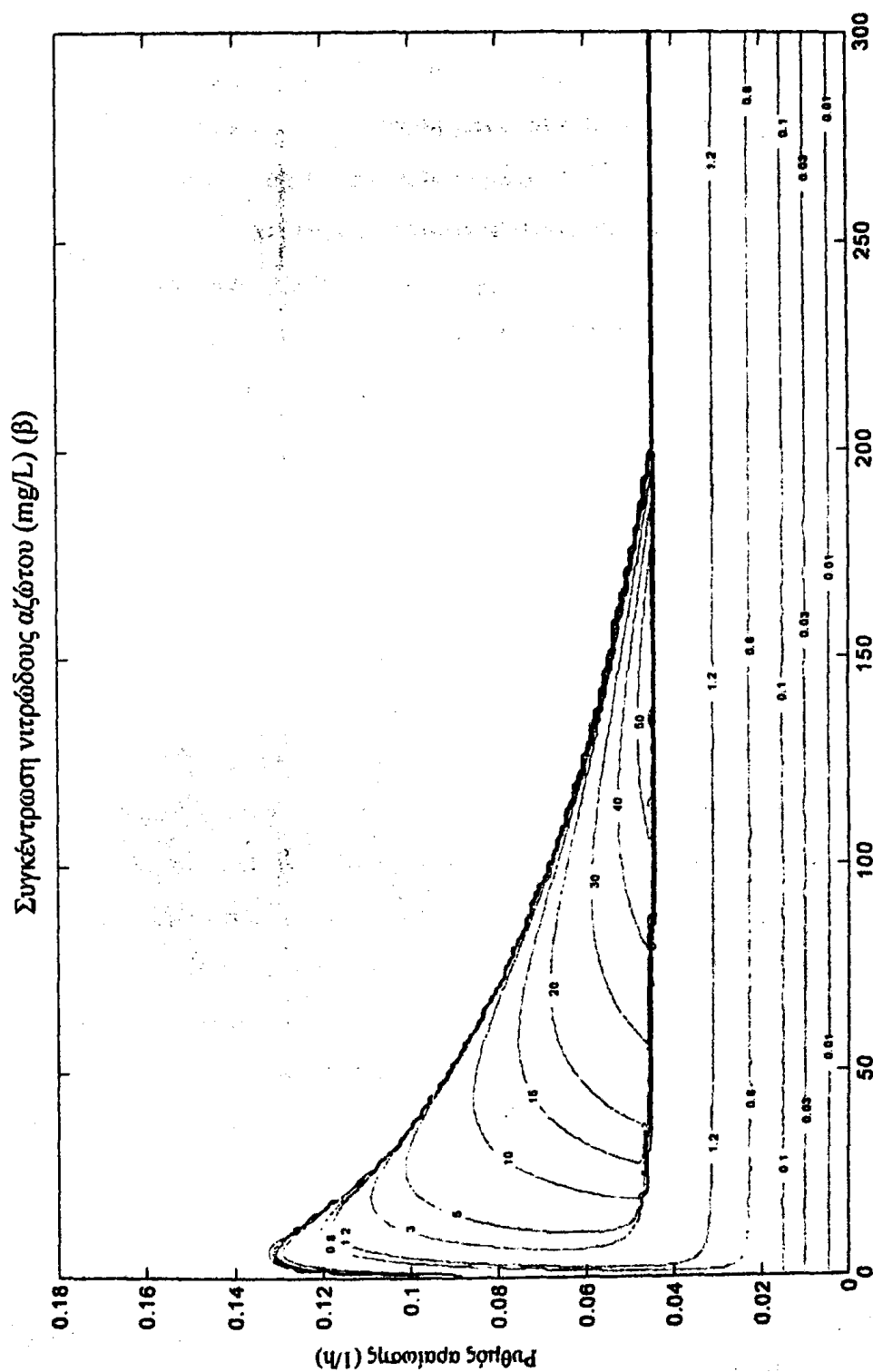
Καθώς ο ρυθμός αραίωσης αυξάνεται μέχρι το 0.0032 1/h, όπου η κατάσταση συνύπαρξης των X_2 και X_3 (0-0.0029 1/h) και των X_1 και X_3 (0.0029-0.0032 1/h) είναι ευσταθείς (Σχήμα 6.3(β)), η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται με μικρότερο ρυθμό με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης, από ότι αυξάνεται στους ρυθμούς πάνω από 0.0032 1/h. Για παράδειγμα, κατά την αύξηση του ρυθμού αραίωσης από 0 σε 0.0032 1/h η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται από 0 στα 0.05 mg/L. Για μία αύξηση του ρυθμού αραίωσης από 0.0032 σε 0.0064 1/h (ίδιου μεγέθους αύξηση), η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται από τα 0.05 στα 0.2 mg/L. Συμπερασματικά, η συσσώρευση των νιτρώδων αυξάνεται τέσσερις φορές περισσότερο με την αύξηση του ρυθμού αραίωσης σε περιοχές όπου, είναι ευσταθής η μόνιμη κατάσταση της επικράτησης του πληθυσμού X_3 , σε σχέση με αυτές που είναι ευσταθείς οι συνυπάρξεις δύο πληθυσμών.

Τέλος, όταν ο ρυθμός αραίωσης κυμαίνεται από 0.09 1/h μέχρι 0.133 1/h, η συσσώρευση των νιτρώδων εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των νιτρικών στην τροφοδοσία όσο και από το ρυθμό αραίωσης, με τη συγκέντρωση των νιτρικών να παίζει σημαντικότερο ρόλο.



Ρυθμός απομάκρυνσης νιτρικού αζώτου (mg/Lh) (α)





Συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στην τροφοδοσία (mg/L)

Σχήμα 6.6. α) Ρυθμός απονιτροποίησης και β) συσσώρευση νιτρικών σε σχέση με το ρυθμό αραίωσης και τη συγκέντρωση τροφοδοσίας για το σύστημα II.

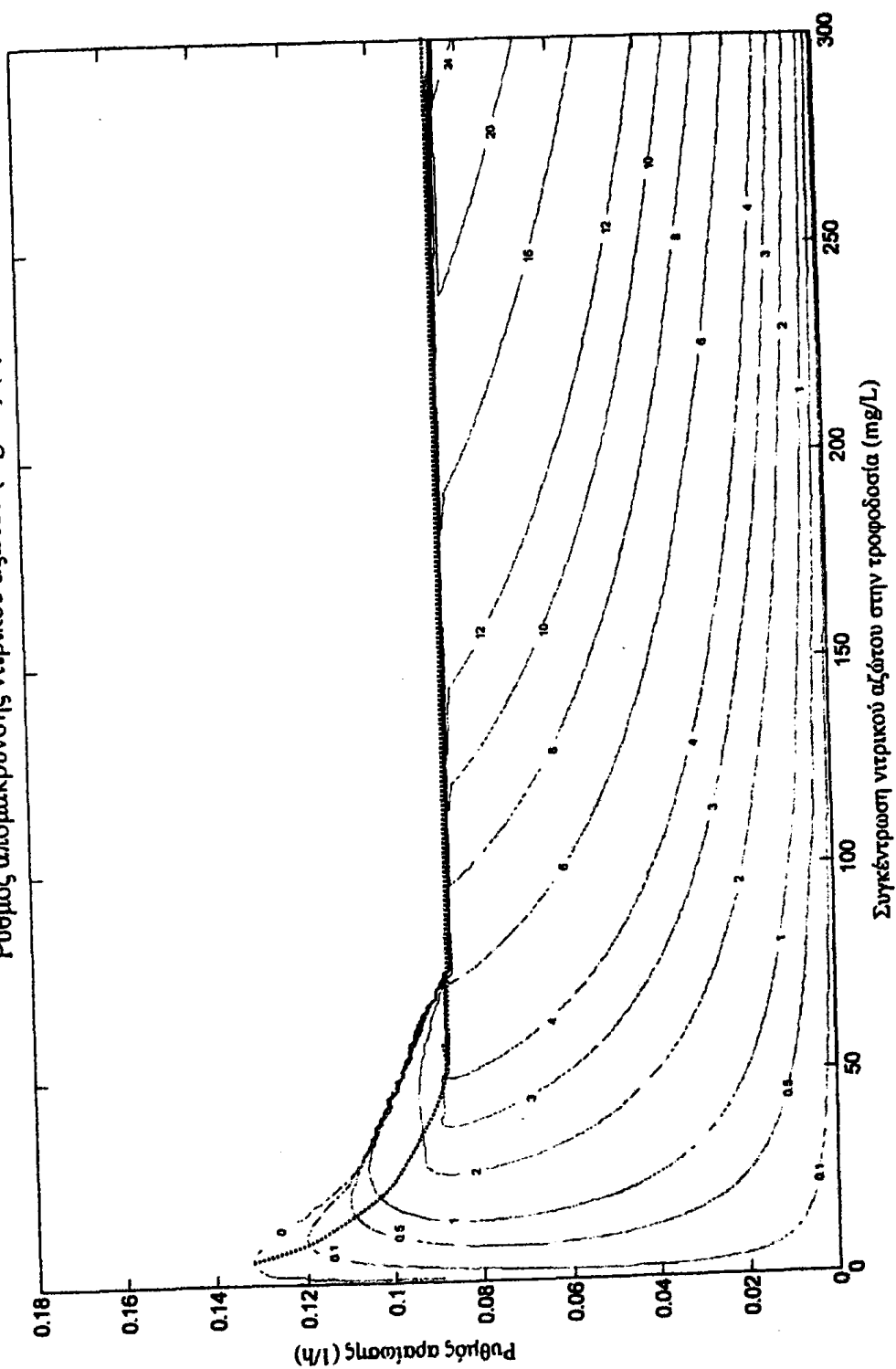
Για να γίνει σύγκριση των τριών συστημάτων (I, II και III), οι τρεις χημοστάτες πρέπει να λειτουργήσουν με τις ίδιες λειτουργικές παραμέτρους. Για παράδειγμα, εάν η συγκέντρωση τροφοδοσίας στον κάθε χημοστάτη ήταν $150 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$ με ένα ρυθμό αραίωσης 0.04 l/h , ο ρυθμός απονιτροποίησης και η συγκέντρωση των νιτρωδών θα ήταν: 6 mg/L h και 0.6 mg/L (Σχήμα 6.5), αντίστοιχα για το Σύστημα I, ενώ για το Σύστημα II ο ρυθμός θα ήταν μικρότερος (5 mg/L h) και στο χημοστάτη θα υπήρχαν περισσότερα από $1.5 \text{ mgNO}_2^- \text{-N/L}$ (Σχήμα 6.6). Κάτω από αυτές τις λειτουργικές συνθήκες, το Σύστημα III θα πετύχαινε ρυθμό απονιτροποίησης που θα πλησίαζε τα 6 mg/L h , ενώ η συγκέντρωση των νιτρωδών θα ήταν μικρότερη από $1.5 \text{ mg NO}_2^- \text{-N/L}$ (Σχήμα 6.7).

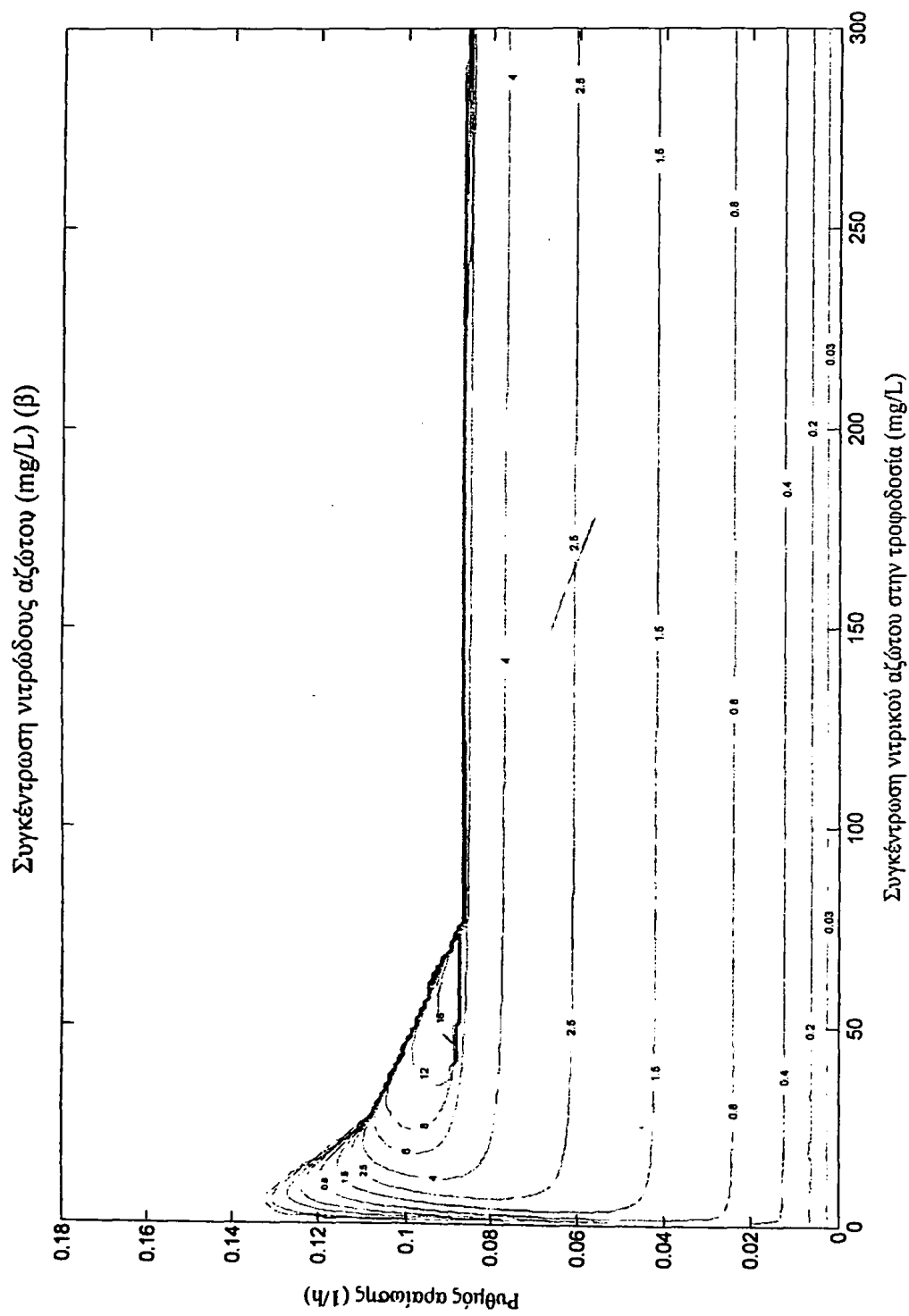
Επίσης, εάν η τροφοδοσία στους ήταν $50 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$ με ρυθμό αραίωσης 0.08 l/h , ο ρυθμός απονιτροποίησης και η συγκέντρωση των νιτρωδών θα ήταν: 3 mg/L h και περισσότερο από 3 mg/L (Σχήμα 6.5), αντίστοιχα για το Σύστημα I, ενώ για το Σύστημα II ο ρυθμός θα ήταν μικρότερος στο 1 mg/L h και στο χημοστάτη θα υπήρχαν περίπου $10 \text{ mgNO}_2^- \text{-N/L}$ (Σχήμα 6.6). Κάτω από αυτές τις λειτουργικές συνθήκες, το Σύστημα III θα πετύχαινε ρυθμό απονιτροποίησης 3 mg/L h , ενώ η συγκέντρωση των νιτρωδών θα ήταν στα $4 \text{ mgNO}_2^- \text{-N/L}$ (Σχήμα 6.7).

Γενικά, η συσσώρευση των νιτρωδών στο Σύστημα I, είναι μικρότερη από αυτή του Συστήματος III, ενώ τα δύο συστήματα επιτυγχάνουν περίπου τους ίδιους ρυθμούς απονιτροποίησης για τις ίδιες λειτουργικές συνθήκες. Ο μεγαλύτερος ρυθμός απονιτροποίησης επιτυγχάνεται από το Σύστημα I (28 mg/L h). Το Σύστημα II δίνει μικρότερους ρυθμούς απονιτροποίησης σε σύγκριση με τα άλλα δύο συστήματα. Όμως, με αυτό το σύστημα ο χημοστάτης μπορεί να λειτουργήσει με ασφάλεια σε ρυθμούς αραίωσης μέχρι τα 0.01 l/h . Πιο συγκεκριμένα, για συγκέντρωση νιτρωδών $0.03 \text{ mg mgNO}_2^- \text{-N/L}$, οι χημοστάτες των συστημάτων I και III πρέπει να λειτουργούν σε ρυθμούς αραίωσης μικρότερους από 0.002 l/h (Σχήματα 6.5(β) και 6.7(β)), ενώ ο χημοστάτης του συστήματος II μπορεί να λειτουργήσει μέχρι τα 0.01 l/h (Σχήμα 6.6(β)), για οποιαδήποτε συγκέντρωση τροφοδοσίας $\text{NO}_3^- \text{-N}$ μεταξύ 0 και $300 \text{ mgNO}_3^- \text{-N/L}$.



Ρυθμός απομάκρυνσης νιτρικού αζώτου (mg/Lh) (α)





Σχήμα 6.7. α) Ρυθμός απονιτροποίησης και β) συσσωρευση νιτρώδων σε σχέση με το ρυθμό αραιώσης και τη συγκέντρωση τροφοδοσίας για το σύστημα ΙΙΙ.

6.6. Συμπεράσματα

Η θεωρία των διακλαδώσεων χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της δυναμικής συμπεριφοράς των τριών μικτών καλλιιεργειών των υδρογονοτροφικών βακτηρίων. Κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα λειτουργίας και υπολογίστηκαν οι ρυθμοί απονιτροποίησης και η συσσώρευση των νιτρικών σε διάφορες λειτουργικές συνθήκες, για κάθε μία από τις μικτές καλλιιεργειες. Τα κυριότερα συμπεράσματα της εργασίας αυτής είναι:

- Το σύστημα του *Acidovorax sp. strain Ic3* και του *Acinetobacter sp. strain Ic2* (Σύστημα I) επιτυγχάνει μεγάλους ρυθμούς απονιτροποίησης. Όμως, για την ασφαλή απομάκρυνση των νιτρικών ($<0.03 \text{ mg/L}$) ο χημοστάτης πρέπει να λειτουργεί σε μικρούς ρυθμούς αραίωσης ($<0.002 \text{ l/h}$).
- Το σύστημα του *Acinetobacter sp. strain Ic2* και του *Paracoccus sp. strain Ic1* (Σύστημα II) επιτυγχάνει μικρότερους ρυθμούς απονιτροποίησης σε σχέση με το προηγούμενο σύστημα, όμως για την ασφαλή απομάκρυνση των νιτρικών ($<0.03 \text{ mg/L}$) μπορούν να εφαρμοστούν μεγαλύτεροι ρυθμοί αραίωσης ($<0.01 \text{ l/h}$). Για ρυθμούς όμως μεγαλύτερους από τον ρυθμό αραίωσης 0.01 l/h , η συσσώρευση αυξάνεται δραματικά.
- Στο σύστημα του *Acidovorax sp. strain Ic3*, του *Acinetobacter sp. strain Ic2* και του *Paracoccus sp. strain Ic1* (Σύστημα III) επιτυγχάνονται ενδιάμεσοι ρυθμοί απονιτροποίησης σε σχέση με τα προηγούμενα συστήματα, πλησιάζοντας τους ρυθμούς του Συστήματος I. Επιπρόσθετα, όπως και στο Σύστημα I, για την ασφαλή απομάκρυνση των νιτρικών ($<0.03 \text{ mg/L}$) ο χημοστάτης πρέπει να λειτουργεί σε μικρούς ρυθμούς αραίωσης ($<0.002 \text{ l/h}$).
- Ο ρυθμός αραίωσης επηρεάζει περισσότερο τη συσσώρευση των νιτρικών από ότι η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου στην τροφοδοσία.

Αυτή είναι η πρώτη φορά που γίνεται μια προσπάθεια για την τόσο λεπτομερή περιγραφή της δυναμικής συμπεριφοράς μικτών καλλιιεργειών. Η ανάλυση έδειξε ότι οι αλλαγές των λειτουργικών παραμέτρων του κάθε συστήματος, δηλαδή συγκέντρωση τροφοδοσίας και ο ρυθμός αραίωσης του χημοστάτη, έχουν επιπτώσεις στη σύνθεση των πληθυσμών και κατ' επέκταση στην αποδοτικότητα του συστήματος. Κατά συνέπεια, η γνώση της δυναμικής συμπεριφοράς θα μπορούσε να βοηθήσει στον κατάλληλο σχεδιασμό αντιδραστήρων και στην επιλογή των λειτουργικών τους παραμέτρων. Δηλαδή, γνωρίζοντας το ρυθμό



απονιτροποίησης και την ποσότητα των νιτρωδών για κάθε συνδυασμό συγκέντρωσης νιτρικού αζώτου και ρυθμού αραίωσης ενός χημοστάτη είναι δυνατόν να τεθεί σε λειτουργία ένα σύστημα στις πιο αποδοτικές λειτουργικές συνθήκες.

Τέλος, οι πολύ μικροί ρυθμοί αραίωσης που απαιτούνται έτσι ώστε να επιτευχθεί η ασφαλής απομάκρυνση των νιτρωδών δείχνουν ότι υψηλότερες συγκεντρώσεις βιομάζας απαιτούνται για να ενισχύσουν την απόδοση συστημάτων. Για την επεξεργασία ρυπασμένου από νιτρικά νερού η λύση βρίσκεται στα συστήματα σταθερής κλίνης, όπου η αρχή της προσκολλημένης ανάπτυξης επιτρέπει τη διατήρηση πολύ μεγάλων συγκεντρώσεων βιομάζας.



Πίνακα 6.3. Χαρακτήρας μονίμων* καταστάσεων των συστημάτων I, II και III, στις διάφορες περιοχές των διαγραμμάτων λειτουργίας.

Περιοχή	Ολική έκπλυση	Μόνιμη κατάσταση X_1	Μόνιμη κατάσταση X_3	Μόνιμη κατάσταση X_2	Μόνιμη κατάσταση $X_1 X_3$	Μόνιμη κατάσταση $X_2 X_3$	Μόνιμη κατάσταση $X_1 X_2$
1	S	-	-	-	-	-	-
2	S	-	U1,S	-	-	-	-
3	U1	-	S	-	-	-	-
4	U1	-	U1,S,S	-	-	-	-
5	S	-	U1,U1,S,S	-	-	-	-
6	U2	U1	S	-	-	-	-
7	U2	U1	U1,S,S	-	-	-	-
8	U1	U1	U2,U1,S,S	-	-	-	-
9	U1	U1	U1,U1,S,S	-	S	-	-
10	U1	U1	U1,U1,S,S	-	U2	-	-
11	U1	S	U1,U1,S,S	-	-	-	-
12	S	-	U1,U1,S,S	-	U1,S	-	-
13	S	-	U1,U1,U1,S	-	S	-	-
14	U2	U1	S	-	U1,S	-	-
15	U2	U1	U1,S,S	-	U1,S	-	-
16	U1	U1	U2,U1,S,S	-	U1,S	-	-
17	U1	U1	U1,U1,S,S	-	U2,U1,S	-	-
18	U1	U1	U1,U1,S,S	-	U1,S,S	-	-
19	U1	S	U1,U1,S,S	-	U1,S	-	-
20	U1	-	U1	-	S	-	-
21	U2	U1	U1	-	S	-	-
22	U2	U1	U1,U1,S	-	S	-	-
23	U1	U1	U2,U1,U1,S	-	S	-	-
24	U1	U1	U1,U1,U1,S	-	U2,S	-	-
25	U1	U1	U1,U1,U1,S	-	S,S	-	-
26	U1	S	U1,U1,U1,S	-	S	-	-
27	U2	U2,U1,U1	U1	-	S	-	-
28	U1	U2,U1,U1	U1,U1,S	-	S	-	-
29	U1	U2,U1,U1	U2,U1,U1,S	-	S	-	-
30	U1	U2,U1,U1	U1,U1,U1,S	-	U2,S	-	-
31	U1	U2,U1,U1	U1,U1,U1,S	-	S,S	-	-
32	U1	U2,U1,S	U1,U1,U1,S	-	S	-	-
33	U1	-	U1,S,S	U2,U1	-	-	-
34	S	-	U1,S	U2,U1	-	-	-
35	S	-	U1,U1,S,S	U2,U1	-	-	-
36	U1	-	S	U1,U2	-	-	-
37	U2	-	S	U1	-	-	-
38	U2	-	U1,S,S	U1	-	-	-
39	U1	-	S	-	-	U1,S	-
40	U1	-	U1	-	-	S	-



41	U2	-	S	U1	-	U1,S	-
42	U2	-	U1,S,S	U1	-	U1,S	-
43	U1	-	U1,S,S	U2,U1	-	U1,S	-
44	U1	-	U1,U1,S	U2,U1	-	S	-
45	U2	-	U1,U1,S	U1	-	S	-
46	U2	-	U1	U1	-	S	-
47	U1	S	U1,S	-	-	-	-
48	U1	U1	U1,U2,S,S	U3,U2,U3,U4	-	-	-
49	U1	U1	U1,U2,S,S	U3,U2	-	-	-
50	U2	U1	U1,S,S	U3,U2	-	-	-
51	U2	U1	S	U3,U2	-	-	-
52	U3	U1	S	U2	-	-	-
53	U3	U1	S	U2,U4,U3	-	-	-
54	U2	U1	S	U3,U2,U4,U3	-	-	-
55	U2	U1	U1,S,S	U3,U2,U4,U3	-	-	-
56	U2	U1,U2,U1	U1,S,S	U3,U2,U4,U3	-	-	-
57	U2	U1,U2,U1	S	U3,U2,U4,U3	-	-	-
58	U2	U1,U2,U1	S	U3,U2,U2,U3	-	-	-
59	U3	U1,U2,U1	S	U2,U2,U3	-	-	-
60	U3	U1	S	U2,U2,U3	-	-	-
61	U3	U1,U2,U1	S	U2	-	-	-
62	U2	U1,U2,U1	S	-	-	-	-
63	U3	U2,U1,U2	S	U2,U2,U3	-	-	U1
64	U3	U2,U1,U2	S	U2	-	-	U1
65	U3	U1	S	U2	-	-	-
66	U3	U2,U2,U1	S	U2	-	-	U3
67	U3	U2,U2,U1	S	U2,U2,U1	-	-	U3
68	U3	U2,U2,U1	S	U1,U1,U3	-	-	-
69	U3	U1,U2,U1	S	U2,U1,U3	-	-	U2
70	U3	U1,U2,U1	S	U2,U1,U2	-	-	U2,U3
71	U3	U1,U2,U1	S	U2,U2,U2	-	-	U3
72	U2	U1,U2,U1	S	U2,U2,U2,U3	-	-	U3
73	U2	U1,U2,U1	S	U2,U2,U4,U3	-	-	U3
74	U3	U1,U2,U1	S	U2,U2,U2	U1,S	-	U3
75	U3	U1,U2,U1	S	U2,U2,U1	U1,S	-	U2,U3
76	U3	U2,U2,U1	S	U2,U2,U1	U1,S	-	U3
77	U3	U2,U2,U1	S	U2	U1,S	-	U3
78	U3	U2,U1,U2	S	U2	U1,S	-	U1
79	U3	U1,U2,U1	S	U2	U1,S	-	-
80	U3	U1	S	U2	U1,S	-	-
81	U3	U1	U1	U2	S	-	-
82	U3	U2,U1,U2	U1	U2	S	-	U1
83	U3	U2,U2,U1	U1	U2	S	-	U3
84	U3	U2,U2,U1	U1	U2,U2,U1	S	-	U3
85	U3	U1	U1	U2	S	U1,S	-
86	U3	U1,U2,U1	U1	U2	S	U1,S	-



87	U3	U2,U2,U1	U1	U2	S	U1,S	U1
88	U3	U2,U2,U1	U1	U2	S	U1,S	U3
89	U3	U2,U2,U1	U1	U2,U2,U1	S	U1,S	U3
90	U3	U2,U2,U1	U1	U2,U2,U1	U1	U2,S	U3
91	U3	U2,U2,U1	U1	U2	U1	U2,S	U3
92	U3	U2,U2,U1	U1	U2	U1	U2,S	U1
93	U3	U1,U2,U1	U1	U2	U1	U2,S	-
94	U3	U1	U1	U2	U1	U2,S	-
95	U3	U1	U2	U2	U1	S	-
96	U3	U1,U2,U1	U2	U2	U1	S	-
97	U3	U2,U2,U1	U2	U2	U1	S	U1
98	U3	U2,U2,U1	U2	U2	U1	S	U3
99	U3	U2,U2,U1	U2	U2,U2,U1	U1	S	U3
100	U3	U1,U2,U1	U2	U2,U2,U1	U1	S	-

S, ευσταθής μόνιμη κατάσταση; U_i , ασταθής μόνιμη κατάσταση (i =αριθμός των ιδιοτιμών που έχουν θετικό το πραγματικό τους μέρος).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



7. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

7.1. Γενικά συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε διεξοδικά η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση με στόχο την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών αυτής και την ανάπτυξη κατάλληλης τεχνολογίας εφαρμόσιμης στην απορρύπανση του πόσιμου νερού. Η ύπαρξη νιτρικών στα αποθέματα του πόσιμου νερού αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα τόσο στην Ελλάδα όσο και διεθνώς. Η εφαρμογή κατάλληλης μεθόδου για την απομάκρυνση του νιτρικού αζώτου από το νερό αποτελεί τη λύση στο πρόβλημα αυτό. Η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση είναι μία πολλά υποσχόμενη βιολογική μέθοδος, η οποία υπερέχει έναντι των φυσικοχημικών μεθόδων και των άλλων βιολογικών μεθόδων απονιτροποίησης, στο ότι εξασφαλίζει υψηλές αποδόσεις, χαμηλό κόστος και δεν επιβαρύνει το επεξεργασμένο νερό με παραπροϊόντα. Για τη μελέτη και τη βελτιστοποίηση της μεθόδου αυτής, χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και σταθερής κλίνης εργαστηριακής κλίμακας.

Αρχικός στόχος ήταν να εξεταστεί το πόσο εύκολη ήταν η ανάπτυξη μικτής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας, από μία καλλιέργεια (μαγιά) που προήλθε από τη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων του δήμου Αγρινίου. Παρατηρήθηκε ότι μετά από μία περίοδο εγκλιματισμού της μαγιάς σε υδρογονοτροφικό περιβάλλον σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, απέκτησαν πλεονέκτημα εκείνοι οι μικροοργανισμοί που ήταν ικανοί για υδρογονοτροφική απονιτροποίηση.

Στη συνέχεια για τη μελέτη της υδρογονοτροφικής συμπεριφοράς της καλλιέργειας αυτής πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Μελετήθηκε η απόδοση των υδρογονοτροφικών βακτηρίων πραγματοποιώντας πείραμα άντλησης-πλήρωσης και βρέθηκε ένας αρκετά ικανοποιητικός ρυθμός απονιτροποίησης (0.076 g/L d). Στη συνέχεια μελετήθηκε πειραματικά και θεωρητικά η συμπεριφορά της καλλιέργειας για ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων νιτρικού αζώτου ($7\text{-}200 \text{ mg/L}$) σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Από τα πειραματικά δεδομένα παρατηρήθηκε ότι η υψηλή συκέντρωση νιτρικού αζώτου, μεγαλύτερη των 40 mg/L , παρεμποδίζει τη διαδικασία της απονιτροποίησης. Τέλος, αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο το οποίο περιέγραψε με μεγάλη ακρίβεια τη συμπεριφορά της υδρογονοτροφικής καλλιέργειας. Το μοντέλο που εφαρμόστηκε ήταν αυτό των



αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση από τα νιτρικά, του οποίου οι κινητικές παράμετροι υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τα πειραματικά δεδομένα.

Στη συνέχεια η μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό αντιδραστήρων σταθερής κλίνης, έτσι ώστε να μελετηθεί η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση πόσιμου νερού. Χρησιμοποιήθηκαν τρεις αντιδραστήρες με διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό (πυριτικό χαλίκι) ο καθένας. Η μέση διάμετρος των πληρωτικών υλικών ήταν 1.75, 2.41 και 4.03 mm.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του μεγέθους του πληρωτικού υλικού σε πειράματα άντλησης-πλήρωσης με συγκέντρωση νιτρικού αζώτου από 10 έως 200 mg/L, με γνώμονα τη μέγιστη απόδοση και την αποφυγή λειτουργικών προβλημάτων. Παρατηρήθηκε ότι ο αντιδραστήρας με το μεσαίου μεγέθους πληρωτικό υλικό (2.41 mm) πέτυχε μεγαλύτερους ρυθμούς απονιτροποίησης (4.4 g/L d), εξαιτίας της μεγαλύτερης ειδικής επιφάνειας από το πληρωτικό υλικό των 4.03 mm. Ο αντιδραστήρας με το πληρωτικό υλικό μεγέθους 1.75 mm παρουσίασε λειτουργικά προβλήματα εξαιτίας του φραξίματος των πόρων του φίλτρου. Αναπτύχθηκε μαθηματικό μοντέλο και υπολογίστηκαν οι κινητικές παράμετροι που περιγράφουν τη συμπεριφορά της υδρογονοτροφικής καλλιέργειας όπως αυτή λειτουργεί προσκολλημένη στο πληρωτικό υλικό. Σημειώνεται ότι αυτές οι παράμετροι έχουν διαφορετική τιμή από αυτές του μοντέλου που περιγράφει τη συμπεριφορά της υδρογονοτροφικής καλλιέργειας στους αντιδραστήρες διαλείποντος έργου.

Δεδομένης της μεγάλης απόδοσής του, το φίλτρο με χαλίκι μέσης διαμέτρου 2.41 mm, χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση κατά τη συνεχή λειτουργία. Στο φίλτρο εφαρμόστηκαν υδραυλικές φορτίσεις των 5.7, 11.4 και 22.8 m³/m²d, με συγκέντρωση νιτρικού αζώτου από 20 έως 200 mg/L. Η συνεχής λειτουργία αποδείχθηκε πιο αποδοτική από τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης για μεγάλες υδραυλικές φορτίσεις (22.8 m³/m²d) πετυχαίνοντας υψηλούς ρυθμούς απονιτροποίησης (5.65 g/L d).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα δύο προηγούμενα βήματα, οδήγησαν στο σχεδιασμό συστήματος αντιδραστήρων σε σειρά με διαφορετικού μεγέθους πληρωτικό υλικό ο καθένας (αρχίζοντας από το μεγαλύτερο χαλίκι και καταλήγοντας στο μικρότερο). Η συνεχής λειτουργία πέτυχε πολύ υψηλούς ρυθμούς απονιτροποίησης (6.2 g/L d) και η συγκέντρωση νιτρικού αζώτου που μπορούσε να υποστεί επεξεργασία με ασφάλεια έφθασε τα 340 mg/L.



Για την προσομοίωση της συνεχούς λειτουργίας χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μοντέλο με τη λειτουργία άντλησης-πλήρωσης με τις ίδιες κινητικές παραμέτρους. Ωστόσο παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται η υδραυλική φόρτιση το πάχος του βιοφίλμ κατά μήκος του αντιδραστήρα μειωνόταν, ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση τροφοδοσίας είχε σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερο πάχος βιοφίλμ. Τέλος, το πάχος του βιοφίλμ μειωνόταν καθώς μειωνόταν η συγκέντρωση του υποστρώματος κατά μήκος του αντιδραστήρα. Για κάθε συνδυασμό παροχής και συγκέντρωσης προσδιορίστηκε το πάχος του βιοφίλμ σε όλο το ύψος του φίλτρου, καθώς επίσης και το πως επιδρά η παρεμποδιστική δράση των νιτρικών στην ανάπτυξη αυτού.

Για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης πραγματοποιήθηκε η μελέτη της διαδικασίας με καθαρές καλλιέργειες υδρογονοτροφικών βακτηρίων. Χρησιμοποιώντας δείγμα από τη μικτή υδρογονοτροφική καλλιέργεια, απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τρία προαιρετικά αναερόβια υδρογονοτροφικά βακτήρια. Τα βακτηριακά είδη που απομονώθηκαν ήταν το *Acidovorax sp. strain Ic3*, *Paracoccus sp. strain Ic1*, *Acinetobacter sp. strain Ic2*. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κινητικής σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου για τον προσδιορισμό της απονιτροποιητικής συμπεριφοράς του κάθε βακτηριακού είδους. Παρατηρήθηκε ότι το είδος *Acinetobacter sp. strain Ic2* κατά την απονιτροποίηση συσσωρεύει μία σημαντική ποσότητα νιτρώδων, σε αντίθεση με τα άλλα δύο είδη τα οποία δεν παρουσίασαν παρά ελάχιστες ποσότητες απομακρύνοντας πλήρως τα νιτρικά. Αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα ικανά να περιγράφουν τη συμπεριφορά των τριών βακτηριακών ειδών καθώς αυτά αναπτύσσονται σε καθαρές καλλιέργειες και υπολογίστηκαν οι κινητικές τους παράμετροι. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο των αντικαταστάσιμων συστατικών με παρεμπόδιση από τα νιτρικά και τα νιτρώδη. Στα μοντέλα περιέχονται εκφράσεις που δηλώνουν την κατανάλωση των νιτρικών και νιτρώδων για τις απαιτήσεις της συντήρησης των βακτηριακών κυττάρων, με τη μορφή των ρυθμών συντήρησης.

Στη συνέχεια σε μία προσπάθεια κατανόησης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βακτηριακών αυτών ειδών, αλλά και εύρεσης λύσης στο πρόβλημα της συσσωρεύσης των νιτρώδων, μελετήθηκε η συμπεριφορά τριών μικτών καλλιεργειών αποτελούμενων κάθε φορά από τα είδη '*Acidovorax sp. strain Ic3 – Acinetobacter sp. strain Ic2*', '*Acinetobacter sp. strain Ic2 – Paracoccus sp. strain Ic1*', και '*Acidovorax sp. strain Ic3 – Acinetobacter sp. strain Ic2 – Paracoccus sp. strain Ic1*', αντίστοιχα. Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι με τις συνδυασμένες καλλιέργειες μπορεί να επιτευχθεί η μείωση



της συσσώρευσης των νιτρωδών (από το είδος *Acinetobacter*) σε έναν αντιδραστήρα, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ των ειδών καθώς συνυπάρχουν. Τα μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν τη συμπεριφορά της κάθε συνδυασμένης καλλιέργειας βασίστηκαν στα τρία επιμέρους μοντέλα που περιγράφουν τις καθαρές καλλιέργειες του κάθε βακτηριακού είδους ξεχωριστά, και προέκυψαν από την ένωση αυτών. Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ειδών σε μία μικτή καλλιέργεια μπορεί να αποτελέσει οδηγό στο σχεδιασμό αντιδραστήρων, με στόχο τη μείωση της παραγωγής ανεπιθύμητων προϊόντων, όπως τα νιτρώδη, με τον περιορισμό ή με την εύνοια της δράσης κάποιου είδους.

Τέλος, μελετήθηκε ο συναγωνισμός μεταξύ υδρογονοτροφικών βακτηριακών πληθυσμών σε ένα ομοιογενές και χρονικά αμετάβλητο περιβάλλον ενός χημοστάτη (αντιδραστήρας συνεχούς λειτουργίας). Χρησιμοποιήθηκε η θεωρία των διακλαδώσεων για την ανάλυση της συμπεριφοράς με την εξέλιξη του χρόνου (δυναμική συμπεριφορά) των τριών παραπάνω μικτών/συνδυασμένων καλλιεργειών υδρογονοτροφικών βακτηρίων. Κατασκευάστηκαν τα διαγράμματα λειτουργίας και υπολογίστηκαν οι ρυθμοί απονιτροποίησης και η συσσώρευση των νιτρωδών σε διάφορες λειτουργικές συνθήκες, για κάθε μία από τις μικτές καλλιέργειες.

Βρέθηκε ότι το σύστημα του *Acidovorax sp. strain Ic3* και του *Acinetobacter sp. strain Ic2* πέτυχε μεγαλύτερους ρυθμούς απονιτροποίησης συγκρινόμενο με τους άλλους δύο συνδυασμούς των μικτών καλλιεργειών. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι και στους τρεις συνδυασμούς των υδρογονοτροφικών βακτηρίων απαιτούνταν πολύ μικροί ρυθμοί αραίωσης, έτσι ώστε να επιτευχθεί ασφαλής απομάκρυνση των νιτρωδών.

Οι αλλαγές των λειτουργικών παραμέτρων του κάθε συστήματος, δηλαδή συγκέντρωση τροφοδοσίας και ογκομετρική παροχή του χημοστάτη, είχαν επιπτώσεις στη σύνθεση των πληθυσμών και κατ' επέκταση στην αποδοτικότητα του κάθε συστήματος. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η γνώση της δυναμικής συμπεριφοράς θα μπορούσε να βοηθήσει στον κατάλληλο σχεδιασμό αντιδραστήρων και στρατηγικών λειτουργίας για τα συστήματα υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης.

7.2. Προτάσεις για μελλοντική εργασία

Στόχος της διδακτορικής διατριβής ήταν η πειραματική και θεωρητική μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης πόσιμου νερού. Σημειώνεται ότι είναι η πρώτη φορά που μελετάται τόσο αναλυτικά η συμπεριφορά μικτής υδρογονοτροφικής



καλλιέργειας, η σύστασή της και η συμπεριφορά των βακτηρίων που την αποτελούν. Επίσης, έγινε σημαντική προσπάθεια για την εύρεση του πιο αποδοτικού τρόπου απομάκρυνσης των νιτρικών σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης με πληρωτικό υλικό πυριτικό χαλίκι. Στη συνέχεια αναφέρονται ορισμένες προτάσεις για μελλοντική εργασία έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η υδρογονοτροφική απονιτροποίηση και να αποτελέσει μία βιώσιμη μέθοδο επεξεργασίας πόσιμου νερού.

Μία από αυτές αποτελεί η εύρεση της μικρότερης παροχής υδρογόνου για την οποία επιτυγχάνεται η βέλτιστη διαλυτότητα αυτού στο σύστημα των τριών αντιδραστήρων σε σειρά. Με αυτόν τον τρόπο θα εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή απόδοση του συστήματος με το μικρότερο κόστος.

Για την κατανόηση της επίδρασης των λειτουργικών παραμέτρων (συγκέντρωση νιτρικών και ογκομετρική παροχή) στο πάχος του βιοφίλμ ενός αντιδραστήρα προτείνεται να γίνει μελέτη σε επίπεδο βιοφίλμ. Με αυτόν τον τρόπο θα γίνει κατανοητό ποιες αλλαγές επέρχονται στη δομή ή στην ποιότητα της κοινότητας των βακτηρίων του βιοφίλμ και ποιες είναι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών. Ενδιαφέρουσα θα ήταν η μελέτη της υδρογονοτροφικής απονιτροποίησης σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης χρησιμοποιώντας διαφορετικού τύπου πληρωτικά υλικά (π.χ. ενεργός άνθρακας).

Σχετικά με τη μελέτη των συνδυασμένων καλλιεργειών υδρογονοτροφικών βακτηρίων, ως επόμενο βήμα προτείνεται η πειραματική και θεωρητική μελέτη των τριών συστημάτων σε σειρά. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να είναι εφικτή η εφαρμογή στο σύστημα αντιδραστήρων (τρεις ή δύο χημοστάτες σε σειρά) μεγάλων ρυθμών αραίωσης, συνοδευόμενη από την ασφαλή απομάκρυνση τόσο των νιτρικών όσο και των νιτρωδών.

Τέλος, η μελέτη των συνδυασμένων καλλιεργειών σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης και η εύρεση του ποσοστού κάθε βακτηριακού πληθυσμού στον αντιδραστήρα σε διάφορες λειτουργικές συνθήκες, θα αποτελούσε έναν σημαντικό επόμενο βήμα.



Βιβλιογραφία

Ελληνική

- Η καθημερινή, Ημερομηνία δημοσίευσης: 24-06-2007.
Το Βήμα, Κυριακή 23 Ιανουαρίου 2000 - Αρ. Φύλλου 12824.
Η καθημερινή, Ημερομηνία δημοσίευσης: 30-09-2007.
Διαμαντίδης Γ. (1994), Εισαγωγή στη βιοχημεία. 2^η έκδοση, University studio press, Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών, Θεσσαλονίκη, 1994.
Ε.Υ. Κατευθύνσεις για μια αειφόρο γεωργία, (1999), /COM/99/0022/51999DC0022, Ανακοίνωση της Επιτροπής στο Συμβούλιο, στο Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο, στην Οικονομική και Κοινωνική Επιτροπή και στην Επιτροπή των Περιφερειών.
Κουϊμτζής Θ., Φυτιάνου Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ. (1998), Χημεία περιβάλλοντος. University studio press, Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών, Θεσσαλονίκη, 1998.
Όδηγία 91/676/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 12ης Δεκεμβρίου 1991 για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορύπανση γεωργικής προέλευσης.
Παύλου Σ. (2000), Μαθηματικά μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης σε βιοαντιδραστήρες. Πάτρα, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών.
Παύλου Σ. (2001), Δυναμική Συστημάτων. Πάτρα, Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών.

Ξενόγλωσση

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990), Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
Ahn H.Y. (2006), Sustainable nitrogen elimination biotechnologies: A review. *Process Biochemistry*, 41, 1709-1721.
Andrews J.F. (1968), A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and Bioengineering*, 10, 707-723.
APHA, AWWA and WPCF. (1989), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th edition. American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington, D.C.



- Arquiaga M.C., Center L.W. (1993), Microbiology of high-sodium-nitrate-wastewater treatment. *Environmental Pollution*, 31, 1-6.
- Baltzis C. and Fredrickson A.G. (1983), Competition of two microbial populations for a single resource in a chemostat when one of them exhibits wall attachment. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 2419-2439.
- Baltzis C. and Fredrickson A.G. (1988), Limitation of growth Rate by two complementary nutrients: some elementary but neglected considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 75-86.
- Banasiak L.J., Kruttschnitt T.W., Schafer A.I. (2007), Desalination using electrodialysis as a function of voltage and salt concentration. *Desalination*, 205, 38-46.
- Batchelor B., Lawrence A.W. (1978), A kinetic model for autotrophic denitrification using elemental sulfur. *Water Research*, 12, 1075-1084.
- Boley A., Muller W.R., Haider G. (2002), Biodegradable polymers as solid substrate and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems. *Aquacul. Eng.*, 22, 75-85.
- Bonin P., Gilewicz M., Bertrand J.C. (1989), Effects of oxygen on each step of denitrification on *Pseudomonas nautical*. *Canadian journal of microbiology*, 35, 1061-1064.
- Barreiros A.M., Rodrigues C.M., Crespo J.P.S.G., Reis M.A.M. (1998), Membrane bioreactor for drinking water denitrification. *Bioprocess Engineering*, 18, 297-302.
- Boumediene M. and Achour D. (2004), Denitrification of the underground waters by specific resin exchange of ion. *Desalination*, 168, 187-194.
- Camargo J., Alonso A. (2006), Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environmental International*, 32, 831-849.
- Campos J.L., Carvalho S., Portela R., Mosquera-Corral, Mendez R. (2007), Kinetics of denitrification using sulphur compounds: Effects of S/N ratio, endogenous and exogenous compounds. *Bioresource Technology*, (in press).
- Canadian Council of Ministers of the Environment. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: nitrate ion. Winnipeg, Canada: CCMI; 2003.
- Carrera J., Jubany I., Carvallo L., Chamy R., Lafuente J. (2004), Kinetics for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilized biomass systems. *Process Biochemistry*, 39, 1159-1165.



- Chang C.C., Tseng S.K., Huang H.K. (1999), Hydrogenotrophic denitrification with immobilized *Alcaligenes eutrophus* for drinking water treatment. *Bioresource Technology*, 69, 53-58.
- Claus G., Kutzner H.J. (1985), Physiology and kinetics of autotrophic denitrification by *Thiobacillus denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22, 283-288.
- Cole J.R., Chai B., Marsh T.L., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., Chandra S., McGarrell D.M., Schmidt T.M., Garrity G.M., Tiedje J.M. (2003), The ribosomal database project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 31, 442-443.
- Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. Official Journal of the European Communities, L330/32, 5/12/1998.
- Davey M.E. and O'toole G.A. (2000), Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 847-867.
- Delanghe B., Nakamura F., Myoga H., Magara Y., Guibal E. (1994), Drinking water denitrification in a membrane bioreactor. *Water Science Technology*, 30, 157-160.
- Della Rocca C., Belgiorno V., Meric S. (2007), Overview of *in-situ* applicable nitrate removal processes. *Desalination*, 204, 46-62.
- Dikshitulu S., Baltzis B.C., Lewandowski G.A., Pavlou S. (1993), Competition between 2 microbial-populations in a sequencing fed-batch reactor - theory, experimental-verification, and implications for waste treatment applications. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 643-656.
- Doedel E.J., Champneys A.R., Fairgrieve T.F., Kuznetsov Y.A., Sandstedt, B., Wang X. (1997), AUTO 97: Continuation and Bifurcation Software for Ordinary Differential Equations, User's Manual. Center for Research on Parallel Computing, California Institute of Technology, Pasadena.
- Dries D., Liessens J., Verstraete W., Stevens P., Vost P., Ley J. (1988), Nitrate removal from drinking water by means of hydrogenotrophic denitrifiers in a polyurethane carrier reactor. *Water Supply*, 6, 181-192.
- Dvorakova A., Demnerova K., Mackova M., Pazlarova J., Rauch P., Ferri E., Girotti S. (1998), Microbial nitrate reductase: Classification and determination. *Chemicke Listy*, 92, 126-132.



- Ergas S.J., Reuss A.F. (2001), Hydrogenotrophic denitrification of drinking water using a hollow fibre membrane bioreactor. *Journal of Water supply: Research and Technology-Aqua*, 50, 161-171.
- Esoy A., Odegaard H. (1994), Denitrification in biofilms with biological hydrolysed sludge as a carbon source. *Water Science and Technology*, 29, 93-100.
- Felsenstein J. (1993), Phylip (Phylogeny Inference Package) version 3.5. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA.
- Foglar L., Briski F. (2003), Wastewater denitrification process-the influence of methanol and kinetic analysis. *Process Biochemistry*, 39, 95-103.
- Fredrickson A.G. (1977), Behavior of mixed cultures of microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 31, 63-87
- Fredrickson A.G. and Tsuchiya H.M. (1977), Microbial kinetics and dynamics, in Chemical reactor theory: a review, N.R. Amundson, L. Lapidus, eds., Chap. 7, pp. 405-483, (Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1977).
- Furumai H., Tagui H., Fujita K. (1996), Effects of pH and alkalinity on sulphur-denitrification in a biological granular filter. *Water Science and Technology*, 34, 355-362.
- Germonpre R., Liessens J., Verstraete W., Beernaert S. (1992), Methylophilic and hydrogenotrophic denitrification at the blankart plant. *Water Supply*, 10, 53-64.
- Ghafari S., Hasan M., Aroua M.K. (2007), Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater- A review. *Bioresource Technology*, in press.
- Glass C., Silverstein J. (1998), Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research*, 32, 831-839.
- Gottschal C., Thingstad T.F. (1982), Mathematical description of competition between two and three bacterial species under dual substrate limitation in the chemostat: a comparison with experimental data. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1403-1418.
- Green M., Schnitzer M., Tarre S. (1995), Kinetics of a fluidized – bed reactor for ground water denitrification. *Applied Microbiology Biotechnology*, 43, 188-193.
- Gros H., Schnoor G., Rutten P. (1988), Biological denitrification process with hydrogen-oxidizing bacteria for drinking water treatment. *Water Supply*, 6, 193-198.



- Gu J.D., Qiu W., Koenig A., Fan Y. (2004), Removal of high NO₃- concentrations in saline water through autotrophic denitrification by the bacterium *Thiobacillus denitrificans* strain MP. *Water Science and Technology*, 49, 105-112.
- Haring V., Conrad R. (1991), Kinetics of H₂ oxidation in respiring and denitrifying *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiology Letters*, 78, 259-263.
- Haugen K.S., Semmens M.J., Novak P.J. (2002), A novel in situ technology for the treatment of nitrate contaminated ground water. *Water Research*, 36, 3497-3506.
- Hendriks J., Oubrie A., Castresana J., Urbani A., Gemeinhardt S., Saraste M. (2000), Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1459, 266-273.
- Hirata A., Meutia A.A. (1996), denitrification of nitrite in a two-phase fluidized bed bioreactor. *Water Science and Technology*, 34, 339-346.
- Hiscock K.M., Lloyd J.W., Lerner D.N. (1991), Review of natural and artificial denitrification of groundwater. *Water Research*, 25, 1099-1111.
- Ho C.M., Tseng S.K., Chang Y.J. (2001), Autotrophic denitrification via a novel membrane-attached biofilm reactor. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 201-205.
- Hoover S.R. and Progress N. (1952), Assimilation of dairy wastes by activated sludge. II. The equations of synthesis and rate of oxygen utilization. *Sewage Ind. Wastes*, 24, 306-312.
- Jost L.J., Drake J.F., Fredrickson A.G. and Tsuchiya H.M. (1973), Interactions of *Tetrahymena pyriformis*, *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and glucose in a minimal medium. *Journal of Bacteriology*, 113, 834-840.
- Kim Y., Nakano K., Lee T., Kanchanatawee S., Matsumura M. (2002), On-site nitrate removal of ground water by immobilized psychrophilic denitrifier using soluble starch as a carbon source. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 93, 303-308.
- Kim H.R., Lee I.S., Bae J.H. (2004), Performance of a sulphur-utilizing fluidized bed reactor for post-denitrification. *Process Biochemistry*, 39, 1591-1597.
- Knowles R. (1982), Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46, 43-70.
- Koenig A., Liu L.H. (1996), Autotrophic denitrification of landfill leachate using element sulphur. *Water Science and Technology*, 34, 469-476.
- Koenig A., Liu L.H. (2002), Kinetic model of autotrophic denitrification in sulphur packed-bed reactors. *Water Research*, 35, 1969-1978.
- Kornaros M., Lyberatos G. (1997), Kinetics of aerobic growth of denitrifying bacterium, *Pseudomonas denitrificans*, in the presence of nitrates and/or nitrites. *Water Research*, 31, 479-488.



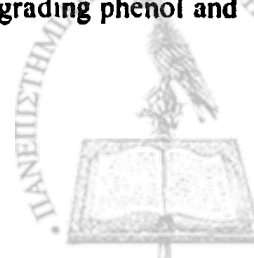
- Kornaros M., Lyberatos G. (1998), Kinetic modelling of *Pseudomonas denitrificans* growth and denitrification under aerobic, anoxic and transient operating conditions. *Water Research*, 32, 1912-1922.
- Korner H., Zumft W.G. (1989), Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1670-1676.
- Korom S.F. (1992), Natural denitrification in the saturated zone: A review. *Water Resources Research*, 28, 1657-1669.
- Kurt M., Dunn I.J., Bourne J.R. (1987) Biological denitrification of drinking water using autotrophic organisms with H₂ in a fluidized-bed biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 493-501.
- Lee K.C., Rittmann B.E. (2000), A novel hollow-fibre membrane biofilm reactor for autohydrogenotrophic denitrification of drinking water. *Water Science and Technology*, 41, 219-226.
- Lee K.C., Rittmann B.E. (2002), Applying a novel autohydrogenotrophic hollow-fiber membrane biofilm reactor for denitrification of drinking water. *Water Research*, 36, 2040-2052.
- Lee K.C., Rittmann B.E. (2003), Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using the hollow-fiber membrane biofilm reactor. *Water Research*, 37, 1551-1556.
- Liessens J., Vabrant J., De Vos P., Kersters K., Verstraete W. (1992), Mixed culture hydrogenotrophic nitrate reduction in drinking water. *Microbial Ecology*, 24, 271-290.
- Liou Y.H., Lo S.L., Lin C.J., Kuan W.H., Weng S.C. (2005), Chemical reduction of an unbuffered nitrate solution using catalyzed and uncatalyzed nanoscale iron particles. *Journal of Hazardous Materials*, B127, 102-110.
- Liu L.H., Koenig A. (2002), Use of limestone for pH control in autotrophic denitrification batch experiments. *Process Biochemistry*, 37, 885-893.
- Madigan M.T. and Martinko J.M. (2006), Brock, *Biology of microorganisms*. 11th edition, Pearson, Prentice Hall.
- Mansell B.O., Schroeder E.D. (2002), Hydrogenotrophic denitrification in a microporous membrane bioreactor. *Water Research*, 36, 4683-4690.



- Marazioti C., Kornaros M., Lyberatos G. (2003), Kinetic modelling of a mixed culture of *Pseudomonas Denitrificans* and *Bacillus subtilis* under aerobic and anoxic conditions. *Water Research*, 37, 1239-1251.
- Matezu V., Cizinska S., Krejci J., Janoch T. (1992), Biological water denitrification-A review. *Review*, 14, 170-183.
- McAdam E.J. and Judd S.J. (2006), A review of membrane bioreactor potential for nitrate removal from drinking water. *Desalination*, 196, 135-148.
- McIsaac G. (2003), Surface water pollution by nitrogen fertilizers. *Encyclopedia of Water Science*, 950-955.
- Mizuta K., Matsumoto T., Hatate Y., Nishihara K. and Nakanishi T. (2004), Removal of nitrate-nitrogen from drinking water using bamboo powder charcoal. *Bioresource Technology*, 95, 255-257.
- Mo H., Oleszkiewich J.A., Cicek N., Rezaia B. (2005), Incorporating membrane gas diffusion into a membrane bioreactor for hydrogenotrophic denitrification of groundwater. *Water Science and Technology*, 51, 357-364.
- Moon H.S., Ahn K.H., Lee S., Nam K., Kim J.Y. (2004), Use of autotrophic sulfur-oxidizers to remove nitrate from bank filtrate in a permeable reactive barrier system. *Environmental Pollution*, 129, 499-507.
- Montras A., Pycke B., Boon N., Godia F., Mergeay M., Hendrickx L., Perez J. (2008). Distribution of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in an autotrophic nitrifying biofilm reactor as depicted by molecular analyses and mathematical modelling. *Water Research*, in press.
- Nikolov L.N. and Karamanev D.G. (1992), Kinetics of the ferrous iron oxidation by Resuspended cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology Progress*, 8, 252-255.
- Novick A., Szilard L. (1950), Description of the chemostat. *Science*, 112, 715-716.
- OECD, Organization for Economic Cooperation and Development, Guideline for testing of chemicals. Adopted by the Council on 17/07/1992.
- Oh S.E., Kim K.S., Choi H.C., Cho J., Kim I.S. (2000), Kinetics and physiological characteristics of autotrophic denitrification by denitrifying sulphur bacteria. *Water Science and Technology*, 42, 59-68.
- Owen T.R., Jurgens-Gschwind S. (1986), Nitrates in drinking water: review. *Fertilizer research*, 10, 3-25.



- Ozturk N. and Bektas T.N. (2004), Nitrate removal from aqueous solution by absorption onto various materials. *Journal of Hazardous materials*, B112, 152-162.
- Payne W.J. (1973), Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. *Bacteriology Review*, 37, 409-452.
- Payne W.J. (1981), Denitrification. John Wiley and Sons, New York.
- Pavlou S. (1999), Computing operating diagrams of bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 71, 7-16.
- Pavlou S. (2006), Microbial competition in bioreactors. *CI&CEQ*, 12, 71-81.
- Pintar A., Jurka B., Musevic I. (2004), Palladium-copper and palladium-tin catalysts in the liquid phase nitrate hydrogenation in a batch-recycled reactor. *Applied Catalysis B: Environmental*, 52, 49-60.
- Prosnansky M., Sakakibara Y., Kuroda M. (2002), High-rate denitrification and SS rejection by biofilm electrode reactor (BER) combined with microfiltration. *Water Research*, 36, 4801-4810.
- Prüsse U. and Vorlop K.D. (2001), Supported bimetallic palladium catalysts for water-phase nitrate reduction. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 173, 313-328.
- Rezania B., Cicek N., Oleszkiewicz J.A. (2005), Kinetics of Hydrogen-Dependent Denitrification under varying pH and temperature conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 92, 900-906.
- Rijn vJ., Tal Y., Schreier H.J. (2006), Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacultural Engineering*, 34, 364-376.
- Sakakibara Y., Flora J.R.V., Suidan M.T., Kuroda M. (1994), Modeling electrochemically-activated denitrifying biofilms. *Water Research*, 28, 1077-1086.
- Sambanis A., Pavlou S., Fredrickson A.G. (1986), Analysis of the dynamics of ciliate-bacterial interactions in a CSTR. *Chemical Engineering Science*, 41, 1455-1469.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sato Y., Murayama K., Nakai T. and Takahashi N. (1995), Nitric acid adsorption by a phosphonic acid ester type adsorbent. *Water Research*, 29, 1267-1271.
- Schoeman J.J. and Steyn A. (2003), Nitrate removal with reverse osmosis in a rural area in South Africa. *Desalination*, 155, 15-26.
- Seung-Hun B., Kyoung-Ho Y., Che Ok J., Wan-Taek I., Kwang-Kyu K., Sung-Taik L. (2003), Isolation and characterization of bacteria capable of degrading phenol and



- reducing nitrate under low-oxygen conditions. *Current Microbiology*, 47, 462-466.
- Shrimali M., Singh K.P. (2001), New methods of nitrate removal from water. *Environmental Pollution*, 112, 351-359.
- Shizas I. and Bagley D.M. (2004), Measurement of dissolved hydrogen and hydrogen gas transfer in a hydrogen-producing reactor. *Anaerobic Digestion 10th World Congress, Montreal, Quebec, Canada. Sept. 2004*.
- Smith R.L., Ceazan M.L., Brooks M.H. (1994), Autotrophic Hydrogen-Oxidizing, denitrifying bacteria in groundwater, potential agents for bioremediation of nitrate contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1949-1955.
- Smith R.L., Buckwalter S.P., Repert D.A., Miller D.N. (2005), Small-scale, hydrogen-oxidizing-denitrifying bioreactor for treatment of nitrate-contaminated drinking water. *Water Research*, 39, 2014-2023.
- Szekeres S., Kiss I., Bejerano T.T., Soares M.I.M. (2001), Hydrogen-dependent denitrification in a two-reactor bio-electrochemical system. *Water Research*, 35, 715-719.
- Szekeres S., Kiss I., Kalman M., Soares M.I.M. (2002), Microbial population in a hydrogen-dependent denitrification reactor. *Water Research*, 36, 4088-4094.
- Soares M.I.M., Brenner A., Yevzori A., Messalem R., Leroux Y., Abeliovich A. (2000), Denitrification of ground water: pilot-plant testing of cotton-packed bioreactor and post-microfiltration. *Water Science and Technology*, 42, 353-359.
- Taylor A., Williams P.J.L. (1975), Theoretical studies on the coexistence of competing species under continuous-flow conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 21, 90-98.
- Terada A., Kaku S., Matsumoto S., Tsuneda S. (2006), Rapid autohydrogenotrophic denitrification by a membrane biofilm reactor equipped with a fibrous support around a gas-permeable membrane. *Biochemical Engineering Journal*, 31, 84-91.
- Tiemyer A., Link H., Weuster-Botz D. (2007), Kinetics studies on autohydrogenotrophic growth of *Ralstonia eutropha* with nitrate as terminal electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 75-81.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. (1997), The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acid Research*, 24, 4876-4882.



- Vanbrabant J., De Vos P., Vancanneyt M., Liessens J., Verstraete W., Kersters K. (1993), Isolation and identification of autotrophic and heterotrophic bacteria from autohydrogenotrophic pilot-plant for denitrification of drinking water. *Systematic and Applied Microbiology*, 16, 471-482.
- Vasiliadou I.A., Pavlou S., Vayenas D.V. (2006α), A kinetic study of hydrogenotrophic denitrification. *Process Biochemistry*, 41, 1401-1408.
- Vasiliadou I.A., Siozios S., Papadas I.T., Bourtzis K., Pavlou S., Vayenas D.V. (2006β), Kinetics of pure cultures of Hydrogen-Oxidizing denitrifying bacteria and modeling of the interactions among them in mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 513-525.
- Vayenas D.V. and Lyberatos G. (1994), A novel model for nitrifying trickling filters. *Water Research*, 28, 1275-1284.
- Vayenas D.V., Pavlou S., and Lyberatos G. (1997), Development of a dynamic model describing nitrification and nitrification in trickling filters. *Water Research*, 31, 1135-1147.
- Wanner O., Reichert P. (1996), Mathematical modeling of mixed-culture biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 172-184.
- WHO, Guidelines for drinking water quality, 3rd ed., World Health Organization Geneva, 2003.
- Yoon H., Klinzing G., Blanch H.W. (1977), Competition for mixed substrates by microbial populations. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 1193-1210.
- Zeng H. and Zhang C. (2005), Evaluation of kinetic parameters of a sulphur-limestone autotrophic denitrification biofilm process. *Water Research*, 39, 4941-4952.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



I. Καμπύλη βαθμονόμησης νιτρικού αζώτου.Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

α) Σε όλα τα διαλύματα χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό.

β) Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζεται ποσότητα 2 gr KNO_3 και τοποθετείται σε κλίβανο στους 105°C για 2 ώρες. Μετά την ξήρανση, ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας ποσότητα 0.7218 gr KNO_3 . Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται σε φιάλη των 1,000 ml και διαλύεται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τα 1,000 ml. Το διάλυμα έχει συγκέντρωση $100\mu\text{g NO}_3\text{-N/ml}$ (Stock nitrate solution).

γ) Στη συνέχεια ποσότητα 100 ml από το Stock nitrate solution αραιώνεται με απεσταγμένο νερό έως τα 1,000 ml. Το διάλυμα έχει συγκέντρωση $10\mu\text{g NO}_3\text{-N/ml}$, (Intermediate nitrate solution).

Διαδικασία

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του $\text{NO}_3\text{-N}$, παρασκευάζονται 12 πρότυπα διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης $\text{NO}_3\text{-N}$.

1) Πρότυπο Διάλυμα 1 συγκέντρωσης $0.196\text{ mgNO}_3\text{-N/L}$

1 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

Σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$10 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml} \cdot 1\text{ml} = C_2 \cdot 51\text{ml}$$

$$C_2 = 0.196 \text{ mgNO}_3\text{-N/L}$$

2) Πρότυπο Διάλυμα 2 συγκέντρωσης $0.3846 \text{ mgNO}_3\text{-N/L}$

2 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό. Σύμφωνα με

το νόμο της αραιώσης:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$10 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml} \cdot 2\text{ml} = C_2 \cdot 52\text{ml}$$

$$C_2 = 0.3846 \text{ mgNO}_3\text{-N/L}$$



3) Πρότυπο Διάλυμα 3 συγκέντρωσης 0.7407 mgNO₃-N/L

4 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό. Σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$10 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml} \cdot 4 \text{ ml} = C_2 \cdot 54 \text{ ml}$$

$$C_2 = 0.7407 \text{ mgNO}_3\text{-N/L}$$

4) Πρότυπο Διάλυμα 4 συγκέντρωσης 1.228 mgNO₃-N/L

7 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

5) Πρότυπο Διάλυμα 5 συγκέντρωσης 1.6666 mgNO₃-N/L

10 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

6) Πρότυπο Διάλυμα 6 συγκέντρωσης 2.8571 mgNO₃-N/L

20 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

7) Πρότυπο Διάλυμα 7 συγκέντρωσης 3.75 mgNO₃-N/L

30 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

8) Πρότυπο Διάλυμα 8 συγκέντρωσης 4.444 mgNO₃-N/L

40 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

9) Πρότυπο Διάλυμα 9 συγκέντρωσης 5 mgNO₃-N/L

50 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

10) Πρότυπο Διάλυμα 10 συγκέντρωσης 5.8333 mgNO₃-N/L

70 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

11) Πρότυπο Διάλυμα 11 συγκέντρωσης 6.6666 mgNO₃-N/L

100 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.

12) Πρότυπο Διάλυμα 12 συγκέντρωσης 7.5 mgNO₃-N/L

150 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 50 ml απεσταγμένο νερό.



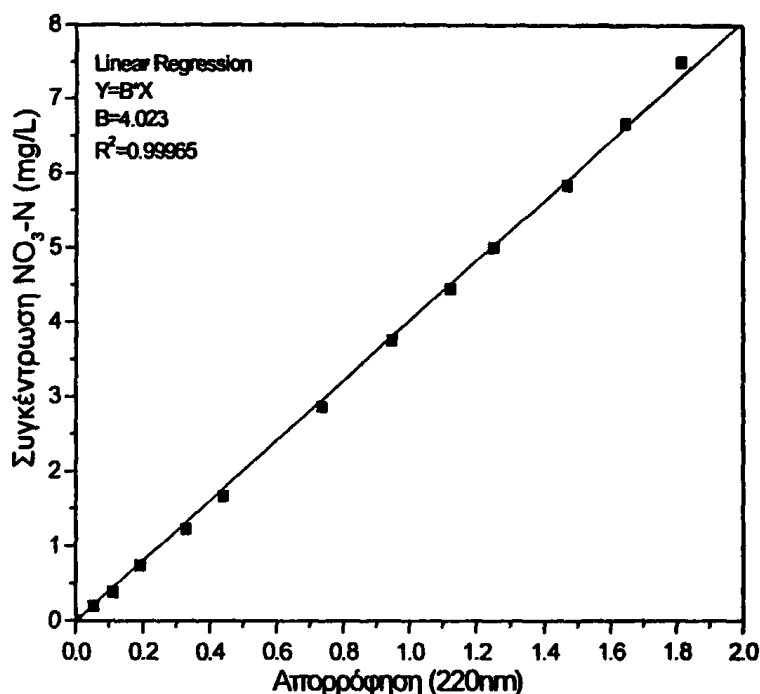
Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό.

Αφού παρασκευαστούν τα παραπάνω διαλύματα, ακολουθείται για αυτά μέτρηση στα 220nm με κυψελίδες Quartz. Η απορρόφηση του κάθε διαλύματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πρότυπα διαλύματα	
Απορρόφηση (220nm)	Συγκέντρωση (mgNO ₃ -N/L)
0	0
0.054	0.196
0.112	0.3846
0.192	0.7407
0.328	1.228
0.44	1.6666
0.734	2.8571
0.946	3.75
1.122	4.444
1.25	5
1.468	5.833
1.644	6.666
1.816	7.5

Στη συνέχεια κατασκευάζεται η γραφική παράσταση, έχοντας στον άξονα y τις τιμές των συγκεντρώσεων και στον άξονα x τις αντίστοιχες τιμές απορροφήσεων. Η ζητούμενη καμπύλη βαθμονόμησης είναι της μορφής $Y=B \cdot X$, με συντελεστή συσχέτισης R^2 να προσεγγίζει τη μονάδα.





II. Καμπύλη βαθμονόμησης νιτρώδους αζώτου.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων

α) Σε όλα τα διαλύματα χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό.

β) **Color reagent:** Σε 400 ml απεσταγμένο νερό προστίθενται 50ml 85% φωσφορικό οξύ και 5gr σουλφαναμίδη. Αφού διαλυθεί η σουλφαναμίδη προστίθενται 0.5gr N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride. Το διάλυμα αναδεύεται μέχρι να γίνει διαυγές και στη συνέχεια αραιώνεται μέχρι τα 500ml. Το διάλυμα τοποθετείται σε σκοτεινή φιάλη και διατηρείται στο ψυγείο για ένα μήνα.

γ) Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζεται ποσότητα 1.232 gr NaNO₂. Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται σε φιάλη των 1,000 ml και διαλύεται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τα 1,000 ml. Στο διάλυμα προστίθεται 1ml CHCl₃ για τη συντήρησή του. Το διάλυμα έχει συγκέντρωση 500μg NO₂-N/ml (Stock nitrite solution)

δ) Ποσότητα 50 ml από το Stock nitrite solution αραιώνεται με απεσταγμένο νερό έως τα 250 ml. Το διάλυμα έχει συγκέντρωση 50 μgNO₂-N/ml (Intermediate nitrate

solution). Το διάλυμα δεν συντηρείται, ετοιμάζεται κάθε φορά που γίνεται καμπύλη βαθμονόμησης.

ε) Ποσότητα 10ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται με απεσταγμένο νερό έως τα 1000ml. Το διάλυμα έχει συγκέντρωση 0.5μg/ml (Standard nitrite solution).

Διαδικασία

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του NO₂-N, παρασκευάζονται 11 πρότυπα διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης NO₂-N.

1) Πρότυπο Διάλυμα 1 συγκέντρωσης 0.8319 μgNO₂-N/L

0.5 ml Standard nitrite solution αραιώνεται σε 300 ml απεσταγμένο νερό. Σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$0.5\mu\text{g/ml} \cdot 0.5\text{ml} = C_2 \cdot 300.5\text{ml}$$

$$C_2 = 0.8319 \mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$$

2) Πρότυπο Διάλυμα 2 συγκέντρωσης 1.661 μgNO₂-N/L

1 ml Standard nitrite solution αραιώνεται σε 300 ml απεσταγμένο νερό.

3) Πρότυπο Διάλυμα 3 συγκέντρωσης 3.331 μgNO₂-N/L

2 ml Standard nitrite solution αραιώνεται σε 300 ml απεσταγμένο νερό.

4) Πρότυπο Διάλυμα 4 συγκέντρωσης 6.1728 μgNO₂-N/L

5 ml Standard nitrite solution αραιώνεται σε 400 ml απεσταγμένο νερό.

5) Πρότυπο Διάλυμα 5 συγκέντρωσης 8.197 μgNO₂-N/L

5 ml Standard nitrite solution αραιώνεται σε 300 ml απεσταγμένο νερό.

6) Πρότυπο Διάλυμα 6 συγκέντρωσης 12.195 μgNO₂-N/L

5 ml Standard nitrite solution αραιώνεται σε 200 ml απεσταγμένο νερό.

7) Πρότυπο Διάλυμα 7 συγκέντρωσης 16.129 μgNO₂-N/L

5 ml Standard nitrite solution αραιώνεται σε 150 ml απεσταγμένο νερό.



8) Πρότυπο Διάλυμα 8 συγκέντρωσης 23.8 $\mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$

5 ml Standard nitrite solution αραιώνεται σε 100 ml απεσταγμένο νερό.

9) Πρότυπο Διάλυμα 9 συγκέντρωσης 0.1 $\mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$

1 ml Intermediate nitrite solution αραιώνεται σε 499 ml απεσταγμένο νερό.

10) Πρότυπο Διάλυμα 10 συγκέντρωσης 0.5 $\text{mgNO}_2\text{-N/L}$

10 ml Intermediate nitrite solution αραιώνεται σε 990 ml απεσταγμένο νερό.

11) Πρότυπο Διάλυμα 11 συγκέντρωσης 1 $\text{mgNO}_2\text{-N/L}$

10 ml Intermediate nitrite solution αραιώνεται σε 490 ml απεσταγμένο νερό.

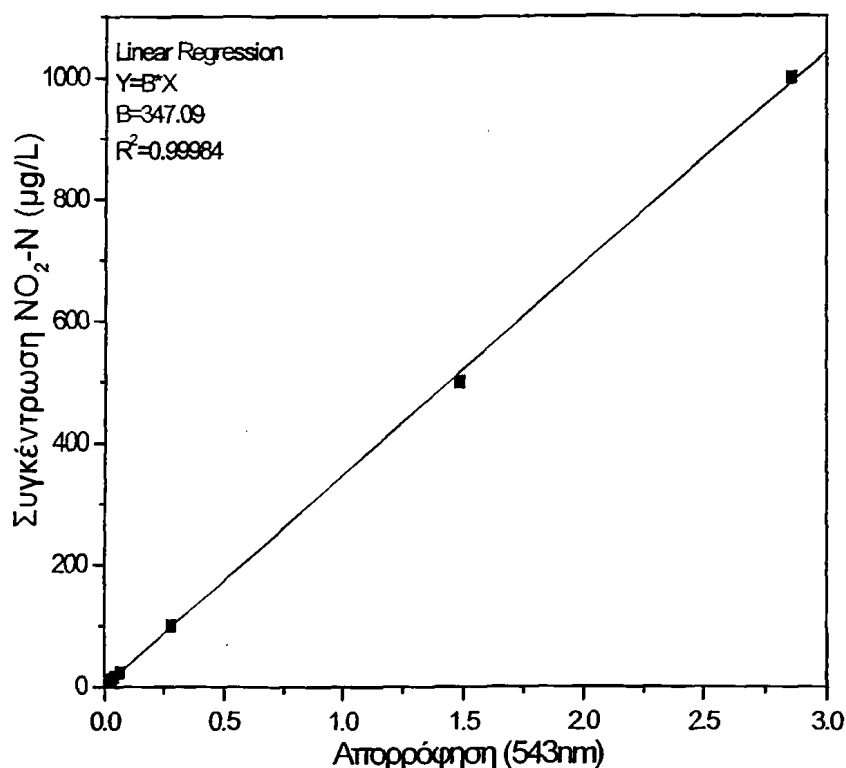
Από κάθε διάλυμα μεταφέρεται ποσότητα 50ml σε νέα φιάλη. Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό. Σε κάθε διάλυμα των 50ml προστίθενται 2ml Color reagent. Τα διαλύματα αναδεύονται για 10 λεπτά.

Αφού παρασκευαστούν τα παραπάνω διαλύματα, ακολουθείται για αυτά μέτρηση στα 543nm. Η απορρόφηση του κάθε διαλύματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πρότυπα διαλύματα	
Απορρόφηση (543nm)	Συγκέντρωση ($\mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$)
0	0
0	0.8319
0	1.6661
0.003	3.331
0.012	6.1728
0.019	8.197
0.032	12.195
0.044	16.129
0.067	23.8
0.284	100
1.486	500
2.858	1000



Στη συνέχεια κατασκευάζεται η γραφική παράσταση, έχοντας στον άξονα y τις τιμές των συγκεντρώσεων και στον άξονα x τις αντίστοιχες τιμές απορροφήσεων. Η ζητούμενη καμπύλη βαθμονόμησης είναι της μορφής $Y=B \cdot X$, με συντελεστή συσχέτισης R^2 να προσεγγίζει τη μονάδα.



III. Καμπύλη βαθμονόμησης νιτρώδους αζώτου στα 220nm για τον υπολογισμό της παρεμπόδισης στη μέτρηση των νιτρικών.

α) Σε ζυγό ακριβείας ζυγίζεται ποσότητα 1.232 gr NaNO_2 . Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται σε φιάλη των 1,000 ml και διαλύεται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τα 1,000 ml. Το διάλυμα έχει συγκέντρωση 500 $\mu\text{gNO}_2\text{-N/ml}$ (Stock nitrite solution).

β) Ποσότητα 50 ml από το Stock nitrite solution αραιώνεται με απεσταγμένο νερό έως τα 250 ml. Το διάλυμα έχει συγκέντρωση 50 $\mu\text{gNO}_2\text{-N/ml}$ (Intermediate nitrate solution).



Διαδικασία

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης του $\text{NO}_2\text{-N}$, παρασκευάζονται 4 πρότυπα διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης $\text{NO}_2\text{-N}$.

1) Πρότυπο Διάλυμα 1 συγκέντρωσης $2,000 \mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$

20 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 480 ml απεσταγμένο νερό. Σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$50 \mu\text{g/ml} \cdot 20\text{ml} = C_2 \cdot 500\text{ml}$$

$$C_2 = 2,000 \mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$$

2) Πρότυπο Διάλυμα 2 συγκέντρωσης $2,941 \mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$

30 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 480 ml απεσταγμένο νερό.

3) Πρότυπο Διάλυμα 3 συγκέντρωσης $4,545 \mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$

10 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 100 ml απεσταγμένο νερό.

4) Πρότυπο Διάλυμα 3 συγκέντρωσης $1,219 \mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$

2.5 ml Intermediate nitrate solution αραιώνεται σε 100 ml απεσταγμένο νερό.

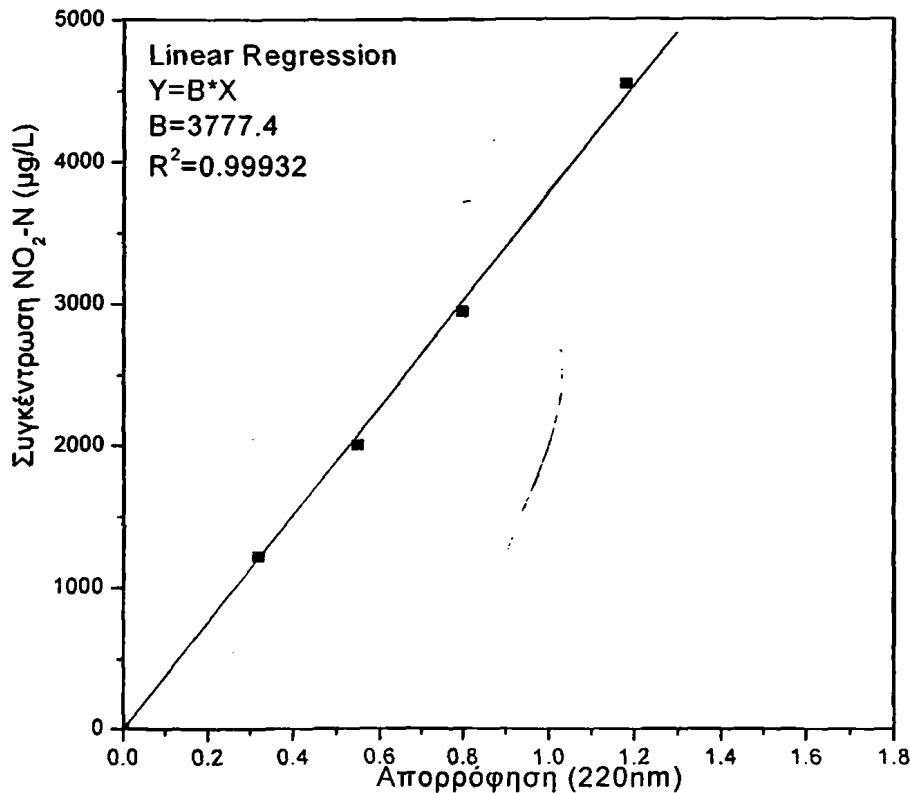
Ως τυφλό διάλυμα χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό.

Αφού παρασκευαστούν τα παραπάνω διαλύματα, ακολουθείται για αυτά μέτρηση στα 220nm με κυψελίδες Quartz. Η απορρόφηση του κάθε διαλύματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πρότυπα διαλύματα	
Απορρόφηση (543nm)	Συγκέντρωση ($\mu\text{gNO}_2\text{-N/L}$)
0	0
0.32	1,219
0.529	2.000
0.778	2,941
1.2	4,545



Στη συνέχεια κατασκευάζεται η γραφική παράσταση, έχοντας στον άξονα y τις τιμές των συγκεντρώσεων και στον άξονα x τις αντίστοιχες τιμές απορροφήσεων. Η ζητούμενη καμπύλη βαθμονόμησης είναι της μορφής $Y=B \cdot X$, με συντελεστή συσχέτισης R^2 να προσεγγίζει τη μονάδα.



Για τη σωστή μέτρηση των νιτρικών αφαιρείται η απορρόφηση των νιτρωδών (220nm) από την απορρόφηση των νιτρικών στα 220nm.

IV. Καμπύλη βαθμονόμησης βιομάζας στα 600nm.

Για τη μέτρηση της βιομάζας αρχικά τοποθετούνται φίλτρα (0.45 µm, Milipore filters-GN 6 Merticel Grid 47mm) σε κλίβανο στους 105°C για 8 ώρες. Μετά την ξήρανση, αφήνονται για 30 min σε ξηραντήρα για να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται διάφορες ποσότητες καλλιέργειας από φιάλη μικτής υδρογονοτροφικής καλλιέργειας με οπτική πυκνότητα 0.1222 και γίνονται αραιώσεις με απεσταγμένο νερό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. (Αργότερα προστέθηκε και ένα ακόμη πρότυπο με οπτική



πυκνότητα 0.2079.) Συγκεκριμένη ποσότητα από κάθε πρότυπο διάλυμα διηθείται σε κάθε προζυγισμένο φίλτρο, ενώ παράλληλα, ακολουθείται για αυτά μέτρηση στα 600nm με κυψελίδες Quartz. Η απορρόφηση του κάθε διαλύματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

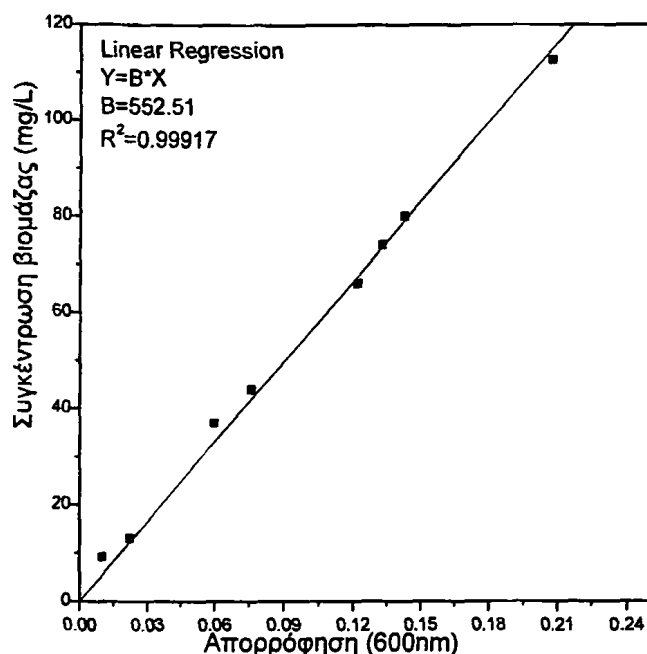
Τα φίλτρα τοποθετούνται πάλι σε κλίβανο στους 105°C για 8 ώρες. Μετά την ξήρανση, αφήνονται για 30 min σε ξηραντήρα και ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της βιομάζας σε mg ξηρού βάρους/L πραγματοποιείται με τη χρήση της σχέσης:

$$C_{\text{βιομάζας}}(\text{mg/L}) = \frac{(\text{Βάρος φίλτρου πριν τη δέηση (gr)} - \text{Βάρος φίλτρου μετά τη δέηση (gr)}) * 1000 \text{ ml} * 1000 \text{ mg}}{\text{Όγκος διηθημένου δάγματος (ml)} * 1 \text{ gr} * 1 \text{ L}}$$

Αραίωση	Ποσότητα καλλιέργειας (ml)	Ποσότητα νερού (ml)	Ποσότητα διηθήματος (ml)	Απορρόφηση στα 600nm	C βιομάζας mg/L
1/1	50	0	50	0.2079	112.6
1/1	50	0	50	0.1222	66
4.5/5	45	5	50	0.1055	74
4/5	40	10	50	0.143	80
6/10	60	40	100	0.076	44
5/10	50	50	100	0.0597	37
2/10	40	160	200	0.0221	13
1/10	20	180	200	0.010	9.25

Στη συνέχεια κατασκευάζεται η γραφική παράσταση, έχοντας στον άξονα y τις τιμές των συγκεντρώσεων και στον άξονα x τις αντίστοιχες τιμές απορροφήσεων. Η ζητούμενη καμπύλη βαθμονόμησης είναι της μορφής $Y=B*X$, με συντελεστή συσχέτισης R^2 να προσεγγίζει τη μονάδα.





V. Καμπύλη βαθμονόμησης διαλυμένου υδρογόνου.

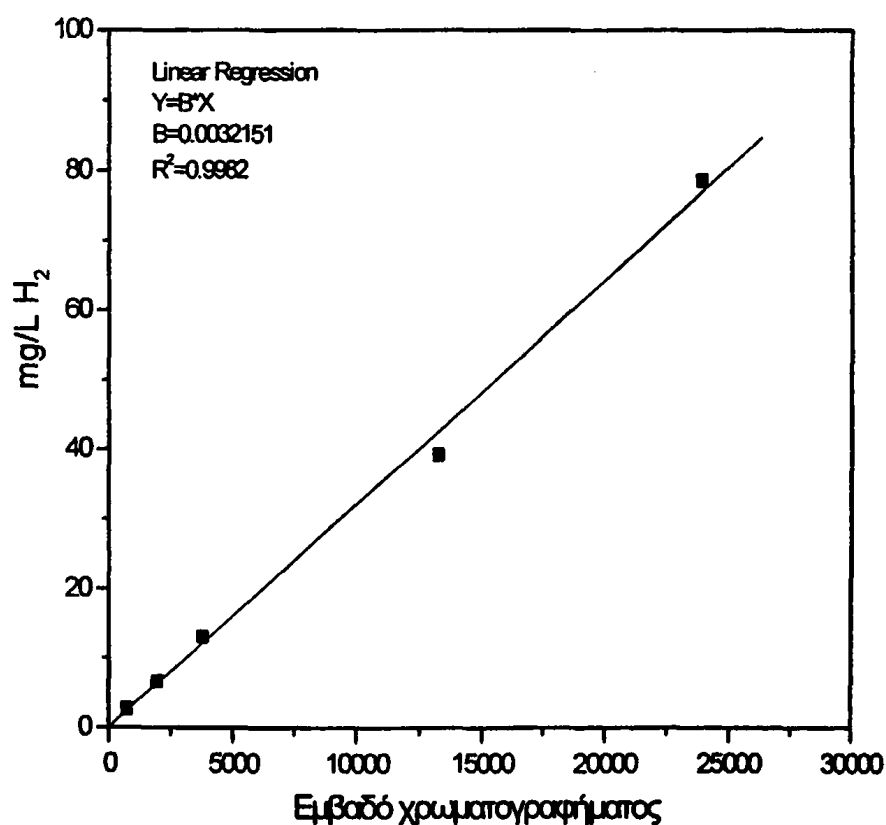
Για τη μέτρηση των άγνωστων δειγμάτων και για τον υπολογισμό της συγκέντρωσής τους χωρίς να χρειάζεται ο νόμος του Henry κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη. Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων προστίθενται 2 ml υγρού θρεπτικού με νιτρικά σε δοχεία των 50 ml τα οποία περιέχουν 5 ml H_2SO_4 6 N. Απαερώνονται για 2 min με 99.999% N_2 και κλείνονται με λαστιχένια καπάκια (rubber septa). Στη συνέχεια γνωστοί όγκοι αερίων εγχέονται με σύριγγα στα δοχεία. Επειδή στους αντιδραστήρες τα αέρια προστίθενται με μία αναλογία παροχών $1\text{CO}_2/3\text{H}_2$, για τα πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο αέρια σε αυτήν την αναλογία. Δηλαδή, στο πρότυπο διάλυμα 1 προστέθηκαν 0.2 ml H_2 και 0.07 ml CO_2 . Στη συνέχεια ανακινούνται για 5 sec και αφήνονται να ισορροπήσουν για 1 ώρα στους 21°C . Αέριο δείγμα (250 μl) παίρνεται από την κορυφή των δοχείων με σύριγγα και αναλύεται. Ο προσδιορισμός της σύστασης του αερίου σε υδρογόνο πραγματοποιήθηκε με χρήση χρωματογράφου αερίων (Varian Star 3600), εξοπλισμένο με ανιχνευτή θερμικής αγωγιμότητας (TCD) και πακτωμένη στήλη (Poropak Q, 80/100-mesh). Η εισαγωγή του αερίου δείγματος στον εισαγωγέα γίνεται με σύριγγα, μέσω ελαστικού διαφράγματος, με φέρον αέριο N_2 υψηλής καθαρότητας (99.999 % κ.ο.). Η θερμοκρασία της στήλης παραμένει σταθερή και ίση με 70°C , η θερμοκρασία του εισαγωγέα δείγματος είναι 80°C και η



θερμοκρασία του ανιχνευτή είναι 180°C. Η μέτρηση από τον αέριο όγκο του κάθε πρότυπου αντιστοιχεί στο γνωστό όγκο αυτού.

Πρότυπα	H ₂ (ml)	CO ₂ (ml)
1	0.2	0.07
2	0.5	0.17
3	1	0.33
4	3	1
5	6	2

Στη συνέχεια κατασκευάζεται η γραφική παράσταση, έχοντας στον άξονα x τις τιμές του εμβαδού του χρωματογραφήματος όπως προκύπτουν από τη μέτρηση των προτύπων και στον άξονα y τις αντίστοιχες τιμές του όγκου του H₂. Η ζητούμενη καμπύλη βαθμονόμησης είναι της μορφής $Y=B \cdot X$, με συντελεστή συσχέτισης R^2 να προσεγγίζει τη μονάδα.



ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο: Βασιλειάδου Ιωάννα
Όνομα Πατρός Αδάμ
Ημερομηνία γέννησης: 24 Οκτωβρίου 1980
Υπηκοότητα: Ελληνική
Διεύθυνση κατοικίας: Χ. Τρικούπη 69, Αργίνο 30100
Διεύθυνση εργασίας: Τμήμα Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων,
 Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Σεφέρη 2, Αργίνο 30100
Επικοινωνία: Τηλ.: 26410 74140
 e-mail:ivasilia@cc.uoi.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

(2004-2008): Υποψήφια διδάκτορας του τμήματος Διαχείρισης
 Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου
 Ιωαννίνων
 2004 Δίπλωμα του τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και
 Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
 2003-2004 Προπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Διαχείρισης
 Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων του Πανεπιστημίου
 Ιωαννίνων.
 Θέμα διπλωματικής: 'Βιολογική απομάκρυνση σιδήρου και
 μαγγανίου από το πόσιμο νερό με τη χρήση
 χαλικοδυλιστηρίου' με επιβλέποντα καθηγητή τον κ.
 Δημήτριο Βαγενά.



A. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

A1. Διδασκαλία Φροντιστηριακών Μαθημάτων 4^{ου} έτους, του Τμήματος Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων

- Αναβάθμιση και Αποκατάσταση Φυσικών Πόρων (1 εξάμηνο) - (2005-2006, 2006-2007, 2007-2008)

B. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

B1. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

1. I.A. Vasiliadou, S. Pavlou and D.V. Vayenas (2007) "Dynamics of a chemostat with three competitive hydrogen oxidizing denitrifying microbial populations and their efficiency for denitrification" *Ecological Modelling*, (submitted).
2. I.A. Vasiliadou, G. Tziotziou and D.V. Vayenas (2007) "A kinetic study of combined aerobic biological phenol and nitrate removal in batch suspended growth cultures" *International Biodeterioration & Biodegradation*, In Press, Corrected Proof.
3. A.G. Tekerlekopoulou, I.A. Vasiliadou and D.V. Vayenas (2007) "Biological manganese removal from potable water using trickling filters" *Biochemical Engineering Journal*, In Press, Corrected Proof.
4. I.A. Vasiliadou, S. Pavlou and D.V. Vayenas (2006) "A kinetic study of hydrogenotrophic denitrification" *Process Biochemistry* 41, 1401-1408.
5. I.A. Vasiliadou, S. Siozios, I.T. Papadas, K. Bourtzis, S. Pavlou, and D. V. Vayenas (2006) "Kinetics of pure cultures of hydrogen-oxidizing denitrifying bacteria and modeling of the interactions among them in mixed cultures" *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 513-525.
6. A.G. Tekerlekopoulou, I.A. Vasiliadou and D.V. Vayenas (2005) "Physicochemical and biological iron removal from potable water" *Biochemical Engineering Journal*, 31, 74-83.



B2. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΔΙΕΘΝΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- 1) I.A. Vasiliadou and D.V. Vayenas. (2007) "Hydrogenotrophic denitrification of drinking water: the effect of the operating mode using packed-bed reactors" 10th International Conference on the Environmental Science and Technology (CEST2007) 5 – 7 September 2007, Cos island, Greece.
- 2) I.A. Vasiliadou, K.A. Karanasios and D.V. Vayenas. (2007) "Hydrogenotrophic Denitrification of drinking water: the effect of support media using packed-bed reactors" International Conference on Environmental Management, CEMEPE Conference June 24 – 28, 2007, Skiathos, Greece.
- 3) I.A. Vasiliadou and D.V. Vayenas. (2006) "Hydrogenotrophic denitrification of drinking water using flasks and packed-bed reactors" International Conference, Protection and Restoration of the Environment VIII. Chania 3-7 July 2006, Greece.

B3. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΠΡΑΚΤΙΚΑ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

- 4) I.A. Βασιλειάδου, Δ.Β. Βαγενάς. (2007) "Υδρογονοτροφική απονιτροποίηση πόσιμου νερού" 6^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, Αθήνα 31 Μαΐου - 2 Ιουνίου 2007.
- 5) Τζιώτζιος Γ., Δέρμου Ε., Βασιλειάδου Ι.Α. και Βαγενάς Δ.Β. (2006) "Επεξεργασία υγρών αποβλήτων με τη χρήση αντιδραστήρων σταθερής κλίνης" 1^ο Πανελλήνιο Συνέδριο «Μονάδες Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων Μικρής Κλίμακας», Πορταριά Πηλίου, 8-9 Απριλίου 2006.
- 6) Τεκερλεκοπούλου Α., Δέρμου Ε., Τζιώτζιος Γ., Βασιλειάδου Ι.Α., Βαγενάς Δ.Β. (2005) "Εφαρμογές ετερογενών βιολογικών συστημάτων για την επεξεργασία πόσιμου νερού και υγρών αποβλήτων" 2^ο Περιβαλλοντικό Συνέδριο Μακεδονίας, Θεσσαλονίκη 2005.

