



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΜΕΤΑΛΛΕΙΟΛΟΓΩΝ-ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΜΕΤΑΛΛΟΥΡΓΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΛΙΚΩΝ

Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας του Περιβάλλοντος στη
Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών

Διδακτορική Διατριβή

Βιολογικοί Αντιδραστήρες για την Επεξεργασία Υγρών

Αποβλήτων Επιβαρυσμένων με Μέταλλα

Παναγιώτα Μενδρινού

Διπλωματούχος Πολιτικός Μηχανικός ΕΜΠ
Μ. Sc. Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων ΕΜΠ

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια
Εμμανουέλλα Ρεμουντάκη

Αθήνα, Οκτώβριος 2023

Η Διδακτορική Διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το ΙΚΥ με στόχο την επιτυχή περάτωσή της. Η ολοποίηση της Διδακτορικής Διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψήφιους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας»



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



© Παναγιώτα Μενδρινού, 2023

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή μέρους ή του συνόλου της παρούσας διατριβής για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσεως, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης.

Ευχαριστίες

Το νήμα της εκπόνησης της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ξεκίνησε πριν από περίπου πέντε χρόνια, κάπως αναπάντεχα, αλλά ομολογουμένως ευπρόσδεκτα. Κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών σπουδών μου στη Σχολή Πολιτικών Μηχανικών του ΕΜΠ, ένας τέτοιος στόχος φάνταζε ουτοπικός. Η επαφή μου με το αντικείμενο του Υδραυλικού Μηχανικού, το ουσιαστικό ενδιαφέρον των καθηγητών μου για την επιστήμη, καθώς και η διδακτική τους μεταδοτικότητα, αποτέλεσαν τον σπόρο για να προσεγγίσω το επιστημονικό αυτό πεδίο στην ουσία του και σε βάθος. Η περάτωση της παρούσας Διατριβής σηματοδοτεί το τέλος ενός πολυετούς ταξιδιού, την πολυπόθητη Ιθάκη, και αποτελεί τεράστια προσωπική, επιστημονική και ηθική ανταμοιβή. Για όλο αυτό το ταξίδι, που ήταν αδιαμφισβήτητα γεμάτο γνώση, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά, έναν προς έναν, τους ανθρώπους που βοήθησαν, ώστε να έχει προορισμό.

Ξεκινάω από την Επιβλέπουσά μου, Καθηγήτρια κ. Εμμανουέλλα Ρεμουντάκη, που μου εμπιστεύθηκε το θέμα της Διδακτορικής Διατριβής. Το θέμα εντάσσεται στην πολυετή προσπάθεια του Εργαστηρίου Επιστήμης & Τεχ/γιας Προστασίας του Περ/ντος της Σχολής Μεταλλειολόγων – Μεταλλουργών Μηχανικών του για ανάπτυξη, πειραματική μελέτη και μαθηματική προσομοίωση βιοαντιδραστήρων ακινητοποιημένης μικροβιακής βιομάζας για την επεξεργασία υγρών βιομηχανικών αποβλήτων επιβαρυσμένων με μέταλλα. Η πολυετής εμπειρία του Εργαστηρίου και η εξειδίκευσή του στα αντικείμενα αυτά εξασφάλισαν την άρτια ενημέρωσή και καθοδήγησή μου, προκειμένου να ανταποκριθώ στο θέμα με επιτυχία. Η επιστημονική καθοδήγηση της κ. Ρεμουντάκη ήταν πάντα κρίσιμης σημασίας για τη διαχείριση και επίλυση κάθε δυσκολίας που προέκυπτε. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν, επίσης, η ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω επικουρικά στο διδακτικό έργο του εργαστηρίου, γεγονός που συντέλεσε στο να αναπτύξω νέες δεξιότητες και να ανακαλύψω την ικανοποίηση που προσφέρει η αλληλεπίδραση με τους σπουδαστές στη μετάδοση της γνώσης. Τέλος, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για όλες τις πολύτιμες συμβουλές και επισημάνσεις της για τη συγγραφή του κειμένου και για το χρόνο που αφιέρωσε στην τελική διαμόρφωσή του. Η Διδακτορική μου Διατριβή χρηματοδοτήθηκε αρχικά από ερευνητικό πρόγραμμα που προέβλεπε ανταποδοτική υποτροφία και μετά το πέρας του, από το ΙΚΥ. Είναι προφανές πόσο σημαντική ήταν για μένα η βοήθεια της κ. Ρεμουντάκη και σε αυτό το επίπεδο, καθώς η εξασφάλιση χρηματοδότησης σε όλη τη διάρκεια της διατριβής επέτρεψε την πλήρη αφοσίωσή μου σε αυτή.

Στη συνέχεια, θέλω να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αρτίν Χατζηκιοσεγιάν, για την άριστη συνεργασία που είχαμε. Οι κατευθύνσεις που μου έδωσε και η γνώση που μου μετάδωσε σχετικά με

την ανάπτυξη του βιολογικού αντιδραστήρα και την πειραματική μεθοδολογία, με βοήθησαν από την πρώτη μέρα και αποτέλεσαν πολύτιμο γνώμονα μέχρι την ολοκλήρωση των εργαστηριακών δοκιμών. Επίσης, τον ευχαριστώ θερμά για τη διδασκαλία των βασικών αρχών αλλά και της εξειδικευμένης γνώσης που αφορά το πεδίο της μαθηματικής προσομοίωσης. Η μαθητεία μου κατά την ανάπτυξη της μαθηματικής προσομοίωσης με βοήθησε να κατανοήσω σε βάθος τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την αλληλεπίδραση της μικροβιακής βιομάζας με τα μέταλλα, συμβάλλοντας σημαντικά στην προσπάθεια για ένα πιο ολοκληρωμένο αποτέλεσμα. Τέλος, τον ευχαριστώ για τη βοήθεια στον χειρισμό των αναλυτικών οργάνων και, γενικότερα, του εργαστηριακού εξοπλισμού, και, ιδιαίτερα, για τη συνδρομή του κάθε φορά που παρουσιαζόταν πρόβλημα κατά τη λειτουργία τους.

Από τις ευχαριστίες δεν μπορώ να παραλείψω την Δρ. Παυλίνα Κούση, η οποία, ως μέλος του Εργαστηρίου Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας Περιβάλλοντος στη Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών, συνέβαλε σημαντικά με την εμπειρία και τις γνώσεις της στην εξασφάλιση της συνεχούς λειτουργίας και πειραματικής παρακολούθησης του βιολογικού συστήματος. Η πολυετής εμπειρία της στην ανάπτυξη και λειτουργία βιολογικών συστημάτων σταθερής κλίνης, καθώς και η επιστημονική της κατάρτιση στο αντικείμενο της Μεταλλουργίας, ήταν πάντα πολύτιμες για την ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων και τη λειτουργία του συστήματος που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής. Επίσης, την ευχαριστώ για τη συνδρομή της στην επίλυση των προβλημάτων που παρουσιάζονταν κατά τη λειτουργία του εργαστηριακού εξοπλισμού, αλλά και για το ειλικρινές ενδιαφέρον που έδειχνε πάντα για την πορεία όλων των πτυχών της Διατριβής.

Πέραν των ανθρώπων που στελεχώνουν το Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνολογίας Προστασίας Περιβάλλοντος στη Μεταλλουργία και Τεχνολογία Υλικών της Σχολής Μεταλλειολόγων-Μεταλλουργών Μηχανικών, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ και:

- στο Εργαστήριο Μεταλλουργίας και συγκεκριμένα στον Δρ. κ. Πασχάλη Ουσταδάκη, για την εξασφάλιση πρόσβασης στο φασματοφωτόμετρο ατομικής απορρόφησης (AAS), για τη γρήγορη ανταπόκριση και την άμεση, πολύτιμη και πραγματικά καταλυτική συνδρομή του σε ζητήματα που αφορούσαν τη λειτουργία του οργάνου. Τέλος, τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων διαλυτών μετάλλων με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS) σε δείγματα του αντιδραστήρα.
- στο Εργαστήριο Μεταλλογνωσίας και συγκεκριμένα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Πέτρο Τσακιρίδη, για την εξασφάλιση πρόσβασης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και τη μελέτη δειγμάτων του αντιδραστήρα στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.
- στον Υποψήφιο Διδάκτορα της Σχολής Μεταλλειολόγων-Μεταλλουργών Δημήτρη Βλασόπουλο, για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων διαλυτών μετάλλων με φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS) σε δείγματα του αντιδραστήρα, καθώς και για την κατανόηση και υπομονή που έδειξε όσον αφορά το μεγάλο πλήθος των δειγμάτων. Επίσης, θέλω να τον

ευχαριστήσω για τη συνεργασία που είχαμε στο πλαίσιο του Ερευνητικού Προγράμματος ΥΔΡΟΜΕΤΚΥ. Πέρα από αυτό, όμως, απέκτησα και έναν πολύτιμο φίλο. Η πορεία μας ήταν κοινή από την πρώτη έως την τελευταία μέρα του ακαδημαϊκού αυτού κύκλου: ξεκινήσαμε και ολοκληρώνουμε, σχεδόν ταυτόχρονα, τη διαδρομή μας ως Υποψήφιοι Διδάκτορες, κατά τη διάρκεια της οποίας μοιραστήκαμε όλες τις χαρές, τους ενθουσιασμούς, αλλά και τις δυσκολίες και τις ανησυχίες που, αναπόφευκτα, προέκυπταν από την πρωτόγνωρη αυτή εμπειρία.

- στον Δρ. της Σχολής Χημικών Μηχανικών Θεόφιλο Καμπερίδη, για τη χημική ανάλυση δειγμάτων του βιολογικού αντιδραστήρα σε οργανικό και ανόργανο άνθρακα και ολικό άζωτο.

Η παρούσα Διατριβή ξεκίνησε και υλοποιήθηκε κατά το μεγαλύτερο μέρος της στο πλαίσιο του Ερευνητικού Έργου ΥΔΡΟΜΕΤΚΥ (Ανάπτυξη Υδρομεταλλουργικής Διεργασίας Ανάκτησης Μετάλλων από Πλακέτες Τυπωμένων Κυκλωμάτων-Πιλοτική Εφαρμογή: Διεργασία Μηδενικών Αποβλητων), με σύμπραξη της Σχολής Μεταλλειολόγων και Μεταλλουργών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου και των Εταιρειών BIANATT ABEE και ECORESET AE και συγχρηματοδοτήθηκε από πόρους της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ-ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ-ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ (ΕΠΑνΕΚ 2014-2020) με Κωδ. Έργου: Τ1ΕΔΚ-00219.

Μετά το πέρας της χρηματοδότησης από το ΥΔΡΟΜΕΤΚΥ, η Διδακτορική Διατριβή χρηματοδοτήθηκε προκειμένου να ολοκληρωθεί από το ΙΚΥ. Η υλοποίηση της Διδακτορικής Διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψήφιους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».

Κλείνοντας, θέλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που μου ενέπνευσαν τις αξίες της προσπάθειας, της επιμονής και της πίστης, οι οποίες υπήρξαν και συνεχίζουν να είναι κινητήριος δύναμη για να θέτω νέους στόχους και να αντιμετωπίζω τις προκλήσεις που εμφανίζονται. Ο σημαντικότερος από αυτούς είναι η μητέρα μου, την οποία ευχαριστώ ολόψυχα για την αμέριστη στήριξή της σε όλη τη διάρκεια της προσπάθειας αυτής, αλλά και για την απεριόριστη υπομονή της, ιδιαίτερα κατά τις τελευταίες μέρες της συγγραφής του κειμένου. Τέλος, θέλω να αφιερώσω την παρούσα Διατριβή στον άνθρωπο που θα ήθελε να βρίσκεται κοντά μου μέχρι το τέλος αυτής της προσπάθειας, νιώθοντας περήφανη για εμένα, όπως πάντα άλλωστε, αλλά δεν τα κατάφερε: στην πολυαγαπημένη μου γιαγιά, που μας βλέπει από ψηλά.

Περίληψη

Η παρουσία των νιτρικών ιόντων στα υγρά ρεύματα υποβαθμίζει την ποιότητά τους, με σοβαρές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία και στα οικοσυστήματα. Η προέλευση του μεγαλύτερου μέρους των νιτρικών ιόντων που καταλήγει στους υδάτινους αποδέκτες προέρχεται από ανθρώπινες δραστηριότητες του πρωτογενούς και δευτερογενούς τομέα παραγωγής, όπως τη γεωργία, την κτηνοτροφία και τη βιομηχανία. Βιομηχανικές δραστηριότητες που σχετίζονται με τη μεταλλευτική και τη μεταλλουργία παράγουν απόβλητα που περιέχουν συχνά σημαντικές συγκεντρώσεις διαλυτών ειδών μετάλλων.

Τα απόβλητα ηλεκτρικού και ηλεκτρονικού εξοπλισμού (ΑΗΗΕ ή e-waste) αποτελούν την κατηγορία αποβλήτων με τον ταχύτερο ρυθμό αύξησης ετησίως σε παγκόσμια κλίμακα. Η περιεκτικότητά τους σε μέταλλα είναι συχνά μεγαλύτερη ακόμη και από αυτή των συμβατικών μεταλλευμάτων. Μια τέτοια περίπτωση αποβλήτων είναι οι πλακέτες τυπωμένων κυκλωμάτων (ΠΤΚ ή PCBs), για την κατασκευή των οποίων χρησιμοποιούνται βασικά μέταλλα, όπως χαλκός και κασσίτερος, σε σημαντικές ποσότητες, αλλά και πολύτιμα, όπως χρυσός και άργυρος. Έτσι, οι ΠΤΚ είναι ελκυστικός πόρος για την ανάκτηση μετάλλων. Οι υδρομεταλλουργικές διεργασίες κερδίζουν διαρκώς έδαφος, διότι είναι περιβαλλοντικά φιλικές, κυρίως ως προς την εξοικονόμηση ενέργειας και την αποφυγή αερίων εκπομπών, και πιο ευέλικτες για εφαρμογές σε εγκαταστάσεις μικρής κλίμακας και σε τοπικό επίπεδο. Κατά τις διεργασίες αυτές χρησιμοποιούνται ως εκχυλιστικά μέσα ισχυρά οξέα, όπως νιτρικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ και βασιλικό νερό, τα οποία οδηγούν σε υψηλές υπολειμματικές συγκεντρώσεις νιτρικών και χλωριόντων, αλλά και διαλυτών μετάλλων στα υγρά τους απόβλητα.

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή πραγματεύεται την επεξεργασία υγρών αποβλήτων που προέρχονται από την υδρομεταλλουργική ανάκτηση βασικών και πολύτιμων μετάλλων από ΠΤΚ. Πιο συγκεκριμένα, σκοπός της Διατριβής είναι η πειραματική διερεύνηση της δυνατότητας για μικροβιακή απονιτροποίηση σε υγρά απόβλητα που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, χλωριόντων και διαλυτών ειδών μετάλλων.

Η αναγκαιότητα για την ανάπτυξη συστημάτων παρόμοιων με αυτό που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής παρατίθεται στο Κεφάλαιο 1. Συνοπτικά, το Κεφάλαιο αυτό περιγράφει την προέλευση των νιτρικών ιόντων με έμφαση στις περιπτώσεις στις οποίες αυτά συνυπάρχουν με διαλυτά μέταλλα, τις επιπτώσεις τους στην υγεία των έμβιων όντων και στα οικοσυστήματα και τον τρόπο με τον οποίο διαχειρίζεται και αντιμετωπίζει το εθνικό και υπερεθνικό νομοθετικό και κανονιστικό πλαίσιο την παρουσία τους στα επιφανειακά και υπόγεια νερά.

Στο Κεφάλαιο 2 αναπτύσσονται οι βασικές αρχές των διεργασιών απονιτροποίησης στα υγρά απόβλητα και οι λόγοι για τους οποίους η βιολογική επεξεργασία υπερέχει έναντι των υπολοίπων. Επίσης, παρουσιάζεται ο ρόλος των παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροβιακή απονιτροποίηση, όπως η πηγή άνθρακα, ο λόγος άνθρακα υποστρώματος και αζώτου νιτρικών (C/N), η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου, το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών ιόντων, η αλατότητα, η παρουσία και η συγκέντρωση διαλυτών ειδών μετάλλων και η προσαρμογή της βιομάζας στις εκάστοτε συνθήκες.

Στο Κεφάλαιο 3 παρουσιάζονται τα είδη των βιολογικών αντιδραστήρων και οι κύριες παράμετροι σχεδιασμού τους. Επιπρόσθετα, στο Κεφάλαιο αυτό παρατίθενται οι κύριες παράμετροι που καθορίζουν την ανάπτυξη των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών, καθώς και τα κυριότερα λογισμικά που έχουν χρησιμοποιηθεί, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, για την προσομοίωση των μικροβιακών διεργασιών.

Λαμβάνοντας υπόψη τα βιβλιογραφικά δεδομένα και για την επίτευξη του σκοπού της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, σχεδιάστηκε, κατασκευάστηκε και τέθηκε σε λειτουργία πρωτότυπος βιολογικός απονιτροποιητικός αντιδραστήρας σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής. Επιλέχθηκε να αναπτυχθεί σε αυτόν καλλιέργεια *Halomonas denitrificans* (Kim et al., 2007) για την απονιτροποιητική της ικανότητα σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας. Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν πειραματικά οι κύριες παράμετροι λειτουργίας του συστήματος με συνθετικά διαλύματα. Τα συνθετικά διαλύματα περιείχαν τέσσερα μέταλλα, σίδηρο, χαλκό, ψευδάργυρο και νικέλιο, που είναι αντιπροσωπευτικά της σύστασης των ΠΤΚ, στις οποίες περιέχονται σε σημαντικά ποσοστά, και αναμένεται να είναι παρόντα και στα υγρά απόβλητα της υδρομεταλλουργικής διεργασίας. Η απόδοση του βιολογικού αντιδραστήρα δοκιμάστηκε και σε πραγματικά υγρά υδρομεταλλουργικά απόβλητα, αποτελώντας μέρος του διαγράμματος ροής πιλοτικής εφαρμογής για την επεξεργασία ΠΤΚ με στόχο την ανάκτηση χαλκού, κασσιτέρου, χρυσού και αργύρου. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μαθηματική προσομοίωση για την εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων της απονιτροποίησης μέσω προσαρμογής στα πειραματικά αποτελέσματα, με στόχο την κατανόηση των διεργασιών και τη δυνατότητα βελτιστοποίησης της λειτουργίας του βιολογικού αντιδραστήρα. Τα υλικά και οι μέθοδοι για όλα τα παραπάνω περιλαμβάνονται στο Κεφάλαιο 4.

Στα Κεφάλαια 5 και 6 παρουσιάζονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη των παραμέτρων λειτουργίας του βιολογικού αντιδραστήρα. Εν συντομία, το σύστημα μίας βαθμίδας αντιδραστήρα σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής εμβολιασμένο με το στέλεχος *Halomonas denitrificans* λειτούργησε σε ένα εύρος αρχικών τιμών των παραμέτρων: pH (3-8), συγκέντρωσης νιτρικών (έως 6 000 mg/L), αλατότητας (5%-10%), συγκέντρωσης των διαλυτών μετάλλων σιδήρου, χαλκού, ψευδαργύρου και νικελίου μεμονωμένα (έως 100 mg/L) και ταυτόχρονα (έως 50 mg/L), συγκέντρωσης θειικών ιόντων (έως 2 000 mg/L) και λόγου C/N (2.07 g C/g NO₃⁻-N-5.18 g C/g NO₃⁻-N)

για συγκεντρώσεις νιτρικών έως 14 000 mg/L. Η συστηματική παρακολούθηση της λειτουργίας του βιοαντιδραστήρα έδειξε ότι η απονιτροποίηση πραγματοποιείται με εξουδετέρωση του διαλύματος και μέσω της ενδιάμεσης παραγωγής νιτρικών προς αέριο άζωτο, χωρίς υπολειμματικές μορφές ανηγμένου αζώτου στην εκροή.

Από τις δοκιμές σχετικά με τη μελέτη της επίδρασης της παρουσίας των μετάλλων προέκυψε ότι τα μέταλλα δεν αναχαιτίζουν την απονιτροποίηση σε συγκεντρώσεις μέχρι 100 mg/L. Ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και ο σίδηρος απομακρύνονται από το διάλυμα σχηματίζοντας αδιάλυτα άλατα υδροξειδίων και ανθρακικών αλάτων των μετάλλων κατά την αναγωγή των νιτρικών. Η παρουσία θεικών ιόντων στην τροφοδοσία του βιολογικού αντιδραστήρα οδηγεί σε μερική αναγωγή τους σε θειούχα ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση, με αποτέλεσμα να είναι διαθέσιμα για την καταβύθιση των μετάλλων. Το νικέλιο είναι το μόνο από τα μέταλλα που μελετήθηκαν που δημιουργεί σύμπλοκα με υποκαταστάτες χλωριόντα και οργανικά μόρια, παραμένοντας διαλυτό. Η καταβύθισή του πραγματοποιείται κυρίως μέσω του σχηματισμού θειούχου νικελίου, καθιστώντας απαραίτητη την προσθήκη ανάλογης ποσότητας θεικών ιόντων στο διάλυμα.

Η διερεύνηση για τη βελτιστοποίηση της διεργασίας με αντικατάσταση της πεπτόνης από απλά οργανικά μόρια (οξικού νατρίου και αιθανόλης) ως πηγές άνθρακα, έδειξε, αρχικά, ότι η βιομάζα αναπτύσσεται σε πλαγκτονική μορφή τόσο με οξικό νάτριο, όσο και με αιθανόλη. Σε επίπεδο βιοαντιδραστήρα, η πεπτόνη μπορεί να αντικατασταθεί τόσο από οξικό νάτριο σε συνδυασμό με εκχύλισμα ζύμης (yeast), όσο και από αιθανόλη, χωρίς να επιβαρυνθεί η εκροή με υπολειμματικές συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρικών ιόντων. Η μελέτη σχετικά με την επίδραση που έχει η παρουσία εκχυλίσματος ζύμης στη διεργασία οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αυτό επιδρά θετικά στην απονιτροποίηση.

Στο Κεφάλαιο 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη μαθηματική προσομοίωση του απονιτροποιητικού συστήματος. Η προσομοίωση επιτυγχάνει να επιβεβαιώσει τόσο το προφίλ της κινητικής της απονιτροποίησης μέσω της παραγωγής νιτρικών και της παραγωγής αλκαλικότητας, όσο και τους μηχανισμούς βιοκαταβύθισης των μετάλλων, συμπεριλαμβανομένου του ασβεστίου, παρά τις αβεβαιότητες σχετικά με τις παραμέτρους των βιοτικών και αβιοτικών σχέσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατάστρωση του μοντέλου.

Στο Κεφάλαιο 8 συνοψίζονται τα κύρια συμπεράσματα της Διατριβής που αφορούν την περιγραφή του συστήματος απονιτροποιητικού αντιδραστήρα, την πειραματική διερεύνηση των κύριων παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροβιακή απονιτροποίηση και των δυνατοτήτων του συστήματος να λειτουργεί αποδοτικά παρουσία μετάλλων, απομακρύνοντάς τα μέσω βιοκαταβύθισης. Τέλος, η μαθηματική προσομοίωση επέτρεψε την εκτίμηση των παραμέτρων της απονιτροποιητικής διεργασίας και την περιγραφή των μηχανισμών που ελέγχουν τη μείωση της τοξικότητας του αποβλήτου μέσω βιολογικής

καταβύθισης των μετάλλων. Τα παραπάνω έχουν παρουσιαστεί σε τρία διεθνή Συνέδρια και αποτελούν το αντικείμενο τριών δημοσιεύσεων σε έγκυρα επιστημονικά περιοδικά:

Παρουσιάσεις σε διεθνή Συνέδρια:

- Mendrinou P., Hatzikioseyan A., Kousi P. & Remoundaki E., Biological denitrification in saline environment in the presence of metal ions, *7th International Conference on Research Frontiers in Chalcogen Cycle Science & Technology*, Online Conference by the Department of Microbiology of the National University of Ireland Galway, December 10th – 11th, 2020
- Hatzikioseyan A., Mendrinou P., Datsika E. & Remoundaki E., Modeling metal bioprecipitation in a packed-bed denitrifying bioreactor”, *1st International Conference on Sustainable Chemical and Environmental Engineering (SUSTENG)*, Rethymno, Crete, Greece, August 31st – September 4th, 2022
- Vlasopoulos D., Mendrinou P., Oustadakis P., Karampelas A., Kousi P., Stergiou A., Karamoutsos S., Hatzikioseyan A., Tsakiridis P. E., Agatzini-Leonardou S., Anastasakis G.N. & Remoundaki E., Hydrometallurgical recovery of Ag and Au from printed circuit boards coupled with a novel bioreactor for the treatment of wastewater: a zero-discharge scheme, *1st International Conference on Sustainable Chemical and Environmental Engineering (SUSTENG)*, Rethymno, Crete, Greece, August 31st – September 4th, 2022

Δημοσιευμένες εργασίες σε επιστημονικά Περιοδικά:

- Mendrinou P., Hatzikioseyan A., Kousi P., Oustadakis P., Tsakiridis P. & Remoundaki E., Simultaneous Removal of Soluble Metal Species and Nitrate from Acidic and Saline Industrial Wastewater in a Pilot Scale Biofilm Reactor, *Environmental Processes*, Volume 8, Issue 4, Pages 1481 – 1499, 2021
- Hatzikioseyan A., Mendrinou P., Kousi P. & Remoundaki E., Modeling biological denitrification in the presence of metal ions and elevated chloride content: Insights into abiotic and biotic mechanisms regulating metal bioprecipitation, *Journal of Environmental Management*, Volume 342, 2023
- Vlasopoulos D., Mendrinou P., Oustadakis P., Kousi P., Stergiou A., Karamoutsos S., Hatzikioseyan A., Tsakiridis P., Remoundaki E. & Agatzini-Leonardou S., Hydrometallurgical recovery of silver and gold from waste printed circuit boards and treatment of the wastewater in a biofilm reactor: An integrated pilot application, *Journal of Environmental Management*, Volume 344, 2023

Η παρούσα Διατριβή παρουσιάζει μια ολοκληρωμένη προσπάθεια ανάπτυξης μικροβιακού απονιτροποιητικού συστήματος και επιβεβαίωσης της αποδοτικότητάς του μέσα από συστηματική

πειραματική παρακολούθηση. Η επεξεργασία πραγματικών υδρομεταλλουργικών αποβλήτων, που περιέχουν πλήθος μετάλλων με δυνητικά συνεργιστική τοξική επίδραση στην απονιτροποίηση, έγινε δυνατή μετά από την επιτυχή εφαρμογή πρωτοκόλλου προεπεξεργασίας τους. Οι δοκιμές του απονιτροποιητικού συστήματος σε πιλοτική κλίμακα, ως μέρος του διαγράμματος ροής της υδρομεταλλουργικής διεργασίας, απέδειξαν την ικανότητά του να αντεπεξέρχεται σταθερά και με υψηλές αποδόσεις στην εισροή των αποβλήτων.

Κύρια προοπτική είναι η αξιοποίηση του συστήματος που αναπτύχθηκε και σε άλλες εφαρμογές, όπου η απονιτροποίηση είναι επιτακτική για την επεξεργασία υγρών ρευμάτων, όπως για παράδειγμα, αυτών που απαντώνται σε υποβαθμισμένους υπόγειους υδροφορείς στους οποίους παρατηρείται ταυτόχρονα το φαινόμενο της υφαλμύρινσης. Παρόλα αυτά, όπως σε κάθε ερευνητική δουλειά, έτσι και στην παρούσα Διατριβή, υπάρχουν περιθώρια για περαιτέρω έρευνα. Η πειραματική παρακολούθηση της εξέλιξης της πηγής άνθρακα μέσω ποσοτικού προσδιορισμού απλών μορίων θα παρέχει πολύτιμη πληροφορία για τη μέγιστη δυνατή αξιοποίηση του οργανικού υποστρώματος. Τέλος, περαιτέρω εξέλιξη της μαθηματικής προσομοίωσης θα μπορούσε να αποτελέσει η εισαγωγή αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην κλίση του αντιδραστήρα σε επίπεδο βιολογικής στιβάδας μικροοργανισμών.

Extended Abstract

Nitrate is one of the most common pollutants present in aquatic environments. In high concentrations it becomes toxic, with negative impact on public health and ecosystems. Human activities of the primary and secondary production sector, such as agriculture, livestock and industry, are main sources of nitrate released in the environment. Mining and metallurgy are among the main industrial sectors, producing wastewater containing soluble metal species.

Waste Electrical and Electronic Equipment (WEEE or e-waste) is considered as one of the fastest-growing waste categories worldwide. Waste Printed Circuit Boards (PCBs) are about 3% by weight of the total amount of WEEEs, with considerable economic value arising from their metal content, which is often higher than that of conventionally mined ores. They contain a wide variety of basic and precious metals, such as copper, tin, gold and silver. Thus, PCBs are an attractive source for metal recovery.

Hydrometallurgical processing of PCBs offers attractive alternatives, as it can be established in local WEEE recycling industries, permitting the decentralized “green” production of pure metals compared to pyrometallurgy, which is by far more energy intensive, requiring expensive and complicated facilities. These processes include the use of acids, such as nitric and hydrochloric and mixtures of them (e.g. aqua regia), as lixiviants. Hence, their effluents may be rich in nitrates, chlorides and may contain residual metal ions.

The present thesis deals with the biological treatment of wastewater originating from the hydrometallurgical recovery of basic (copper, tin) and precious (silver, gold) metals from PCBs. The purpose of the present work is to experimentally investigate and demonstrate the feasibility of biological denitrification of the wastewater via studying the effects of key factors, such as acidity, salinity and metal content, which generally stress bacteria and limit the microbial activity, leading to nitrate reduction.

To this end, a pilot-scale packed-bed biofilm reactor was set up with a novel porous packing material which embeds trace elements for supporting the micronutrient requirements of an active biofilm. The bioreactor was inoculated with *Halomonas denitrificans*, a halophilic denitrifier capable of completely reducing nitrate to elemental nitrogen in the presence of high chloride content. The proposed single-stage process should meet three essential goals: (a) effluent neutralization; (b) nitrate removal; and (c) soluble metal species sequestering. Such results have not been reported in the literature at the beginning of and, during this work.

The denitrifying capacity of the reactor was tested at different initial nitrate concentrations and pH and salinity values. The effect of soluble metal ions on denitrification was initially tested in synthetic

wastewater containing iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn) and nickel (Ni). These metals are always present in the metallic fraction of PCBs in significant percentage and thus, are expected to be present in the wastewater of the hydrometallurgical process. The effect of carbon to nitrate nitrogen ratio (C/N) on denitrification was also experimentally tested in presence of the four metals.

Following the experimental study of the system by using synthetic wastewater, the denitrification capacity of the bioreactor was confirmed by the treatment of 'real' wastewater produced from a hydrometallurgical process, developed for the recovery of tin (Sn), copper (Cu), gold (Au) and silver (Ag). This acidic wastewater contains a variety of soluble metals, with potentially synergistic negative effects on denitrification. A pretreatment process was developed and applied to ensure successful denitrification. The pretreatment protocol included: (a) mixing of equal volumes of the waste streams, (b) neutralization, (c) precipitation, (d) filtration and (e) dilution of the filtrate by a factor of about 5 with the nutrient solution. Following pretreatment, the effluent was successfully treated in the bioreactor.

The effect of different electron donors on denitrification was furthermore investigated, including peptone, acetate and ethanol, while the effect of the presence of yeast extract was studied for the case of ethanol as electron donor.

Finally, a mathematical model of biological denitrification in the presence of metals was developed, for the estimation of basic kinetic parameters, by fitting the experimental results. The model provides a valuable tool for understanding the behavior of denitrification systems in the presence of metal ions and can be used for optimization of the biological wastewater treatment.

The results have shown that denitrification is achieved in the packed-bed bioreactor for a wide range of values of the initial parameters in the synthetic wastewater: (a) pH, from 3 to 8, (b) nitrate concentration, up to 6 000 mg/L, (c) salinity, from 5% to 10%, (d) soluble metal concentrations (Cu, Zn, Fe, Ni) up to 100 mg/L, and up to 50 mg/L, when the metals are simultaneously present, (e) sulfate concentrations, up to 2 000 mg/L, (d) C/N ratio, from 2.07 g C/g NO_3^- -N to 5.18 g C/g NO_3^- -N, and nitrate concentration, up to 14 000 mg/L. Nitrate is completely reduced through the formation of nitrite and the effluent becomes neutral.

The presence of iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn) and nickel (Ni) does not inhibit denitrification, when present at concentrations up to 100 mg/L in the solution. Zinc (Zn), copper (Cu) and iron (Fe) are sequestered from the solution via the formation of insoluble metal hydroxides and carbonates, released during the reduction of nitrates to nitrogen gas. When sulphate is present in the metal bearing wastewater, partial sulphate reduction occurs simultaneously with denitrification. Thus, sulphide is available for metal precipitation. Nickel (Ni) has the ability to form inorganic and organic metal complexes with chlorides and organic molecules, respectively, remaining soluble in the reactor's

effluent. Nickel may be sequestered from solution via the formation of nickel sulphide. Thus, the presence of sulphate in the feed solution is necessary for nickel bioprecipitation.

The results concerning the substitution of peptone by simple organic molecules show that denitrification is accomplished by planktonic cells of *H. denitrificans* using acetate and ethanol as electron donors. Similar experiments in the bioreactor show that the attached biomass is capable of complete denitrification with both organic substrates. Although yeast extract is not necessary for complete reduction of nitrates to nitrogen gas in the case of ethanol, its presence enhances bacterial activity and accelerates the denitrification process.

The mathematical model simulates successfully the nitrate and nitrite kinetic profiles of the denitrification process in the presence of metal ions. Moreover, it predicts the bioprecipitation of the soluble metal species due to pH shift and alkalinity production during the microbial metabolic activity. Mechanisms regulating metal detoxification are also described, including those relative to calcium precipitation. However, the accuracy of the model depends on uncertainties included in both biotic and abiotic reactions and should be taken into account during the model development and implementation.

Based on the above findings, the proposed system could be efficient for the treatment of water streams of similar composition, such as those originating from aquifers suffering simultaneously from nitrate and metal contamination and seawater intrusion. Further research could focus on the monitoring of simple organic molecules/electron donors during denitrification to optimize system parameters. Mathematical simulation of the processes in the biofilm layer could provide valuable and detailed information about the utilization of the organic substrate by microorganisms and the processes related to the attached microbial activity, respectively.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	i
Περίληψη.....	v
Extended Abstract.....	xi
Κατάλογος Εικόνων.....	7
Κατάλογος Πινάκων.....	9
Κατάλογος Σχημάτων.....	13
1 Τα νιτρικά ιόντα ως παράγοντας ρύπανσης.....	17
1.1 Διαθεσιμότητα νερού και νιτρικά ιόντα	17
1.2 Πηγές προέλευσης και επίπεδα συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων	18
1.2.1 Αγροτική δραστηριότητα	18
1.2.2 Βιομηχανική δραστηριότητα.....	23
1.2.3 Μεταλλουργία/Υδρομεταλλουργία: HNO ₃ /HCl ως εκχυλιστικά μέσα	25
1.2.4 Άλλες πηγές.....	28
1.3 Επιπτώσεις: Υγεία – Οικοσυστήματα	29
1.4 Νομοθεσία.....	31
1.4.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία.....	32
1.4.2 Εθνική νομοθεσία	39
2 Διεργασίες απονιτροποίησης	47
2.1 Μέθοδοι απονιτροποίησης.....	47
2.1.1 Χημικές μέθοδοι	47
2.1.2 Φυσικές μέθοδοι	49
2.1.3 Βιολογικές μέθοδοι.....	53
2.2 Μικροβιακή απονιτροποίηση.....	54
2.2.1 Ο Κύκλος του αζώτου	54
2.2.2 Η βιοχημεία της απονιτροποίησης.....	57
2.2.3 Πηγή άνθρακα	60

2.2.3.1	Απλά οργανικά μόρια	65
2.2.3.2	Σύνθετα οργανικά μόρια	73
2.2.4	Ο λόγος C/N	84
2.2.5	Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την απονιτροποίηση	86
2.2.5.1	Συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (DO)	86
2.2.5.2	pH	87
2.2.5.3	Θερμοκρασία.....	89
2.2.5.4	Συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών ιόντων	93
2.2.5.5	Αλατότητα	94
2.2.5.6	Διαλυτά μέταλλα	97
2.2.5.7	Προσαρμογή της βιομάζας	103
3	Βιολογικοί απονιτροποιητικοί αντιδραστήρες.....	107
3.1.	Τύποι βιολογικών αντιδραστήρων	107
3.1.1.	Αντιδραστήρες αιωρούμενης/πλαγκτονικής βιομάζας (Suspended growth reactors) .	107
3.1.2.	Αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας (Biofilm reactors).....	109
3.1.3.	Αντιδραστήρες μεμβρανών (MBR-Membrane Biological Reactors)	117
3.2.	Παράμετροι σχεδιασμού διεργασίας.....	120
3.2.1.	Πηγή άνθρακα	120
3.2.2.	Λόγος C/N	124
3.2.3.	Συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (DO).....	125
3.2.4.	pH.....	125
3.2.5.	Θερμοκρασία	126
3.2.6.	Συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών ιόντων	127
3.2.7.	Αλατότητα.....	128
3.2.8.	Διαλυτά μέταλλα	129
3.2.9.	Προσαρμογή της βιομάζας.....	129
3.2.10.	Υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT)	129
3.3.	Μαθηματική προσομοίωση βιολογικών αντιδραστήρων	143
3.4.	Αντικείμενο και σκοπός της παρούσας Διατριβής	148

4	Υλικά και Μέθοδοι.....	151
4.1.	Πειραματική διάταξη, εμβολιασμός και θέση βιολογικού αντιδραστήρα σε λειτουργία ...	151
4.1.1	Πειραματική διάταξη	151
4.1.2	Επιλογή μικροβιακής καλλιέργειας	153
4.1.3	Εμβολιασμός και θέση του βιολογικού αντιδραστήρα σε λειτουργία	155
4.2	Πειραματικές δοκιμές.....	155
4.2.1	Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την απονιτροποίηση	155
4.2.2	Βιολογική απονιτροποίηση σε υγρά απόβλητα υδρομεταλλουργίας.....	160
4.2.3	Επίδραση της πηγής του οργανικού άνθρακα	162
4.2.3.1	Δοκιμές ανάπτυξης του <i>Halomonas denitrificans</i> σε οξικό νάτριο και αιθανόλη	163
4.2.3.2	Δοκιμές λειτουργίας του αντιδραστήρα.....	163
4.3	Δειγματοληψία και παρακολούθηση των παραμέτρων λειτουργίας.....	165
4.3.1	Προσδιορισμός pH.....	165
4.3.2	Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας (Optical Density-OD).....	165
4.3.3	Προσδιορισμός νιτρικών (NO_3^-) και νιτρωδών ιόντων (NO_2^-).....	166
4.3.4	Προσδιορισμός ολικού αζώτου (TN).....	167
4.3.5	Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (TOC).....	168
4.3.6	Προσδιορισμός ανόργανου άνθρακα (IC)	169
4.3.7	Προσδιορισμοί διαλυτών μετάλλων	169
4.3.8	Προσδιορισμός χλωριόντων	170
4.3.9	Προσδιορισμός ολικών (TSS) και πτητικών αιωρούμενων στερεών (VSS).....	172
4.3.10	Μορφολογικός χαρακτηρισμός στερεών δειγμάτων	173
4.4	Μαθηματική προσομοίωση βιολογικού αντιδραστήρα.....	173
4.4.1	Βιολογικές διεργασίες.....	174
4.4.2	Κινητική ανάπτυξης μικροοργανισμών	176
4.4.3	Αβιοτικές διεργασίες.....	177
4.4.3.1	Μη μεταλλικές χημικές ενώσεις	178
4.4.3.2	Διαλυτά είδη μετάλλων	180
4.4.4	Εφαρμογή του μοντέλου	183

4.4.5	Βαθμονόμηση του μοντέλου	185
5	Πειραματική μελέτη των κύριων παραμέτρων μικροβιακής απονιτροποίησης	195
5.1.	Μελέτη της κινητικής της απονιτροποίησης	196
5.2.	Επίδραση του αρχικού pH στην απονιτροποίηση	198
5.3.	Επίδραση της αλατότητας στην απονιτροποίηση	201
5.4	Επίδραση των μετάλλων Zn, Cu, Fe και Ni στην απονιτροποίηση	202
5.5	Επίδραση των θειικών ιόντων στην απονιτροποίηση	207
5.6	Βιοκαταβύθιση μετάλλων	208
5.7	Επίδραση του λόγου C/N στην απονιτροποίηση	220
5.8	Επεξεργασία υγρών υδρομεταλλουργικών αποβλήτων	224
5.8.1	Προεπεξεργασία υδρομεταλλουργικών αποβλήτων	228
5.8.2	Βιολογική επεξεργασία αποβλήτων	230
6	Πειραματική διερεύνηση απλών μορίων ως πηγής άνθρακα στη μικροβιακή απονιτροποίηση	233
6.1	Ανάπτυξη του <i>Halomonas denitrificans</i> σε οξικό νάτριο και αιθανόλη	234
6.2	Λειτουργία του βιοαντιδραστήρα με οξικό νάτριο και αιθανόλη	236
6.2.1	Επίδραση του οξικού νατρίου ως πηγής άνθρακα κατά την απονιτροποίηση	237
6.2.2	Επίδραση της αιθανόλης ως πηγής άνθρακα κατά την απονιτροποίηση	239
6.2.3	Βιοκαταβύθιση μετάλλων	242
7	Μαθηματική προσομοίωση της βιολογικής απονιτροποίησης παρουσία μεταλλικών ιόντων και χλωριόντων	247
7.1	Εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης της βιομάζας	248
7.2	Προσομοίωση της κινητικής της απονιτροποίησης	251
7.3	Τελική τύχη και κινητικότητα των μεταλλικών ιόντων	256
8	Συμπεράσματα και προοπτικές	267
8.1	Συμπεράσματα	267
8.1.1	Διαμόρφωση συστήματος απονιτροποιητικού αντιδραστήρα	268
8.1.2	Πειραματική διερεύνηση των κύριων παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροβιακή απονιτροποίηση	268

8.1.3	Δυνατότητες του συστήματος να λειτουργεί αποδοτικά παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων και να τα απομακρύνει μέσω βιοκαταβύθισης	269
8.1.4	Διερεύνηση βελτιστοποίησης της διεργασίας χρησιμοποιώντας απλά οργανικά μόρια ως πηγή άνθρακα	270
8.1.5	Μαθηματική προσομοίωση βιολογικής απονιτροποίησης παρουσία μετάλλων και υψηλών συγκεντρώσεων χλωριόντων	271
8.2	Προοπτικές	271
Βιβλιογραφία.....		273
☪	Εθνική Νομοθεσία.....	273
☪	Ευρωπαϊκή Νομοθεσία.....	278
☪	Ελληνική Βιβλιογραφία.....	281
☪	Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	281
Παράρτημα.....		315

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2.1: Ο κύκλος του αζώτου από τη σκοπιά της Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας (Πηγή: Rittmann & McCarty, 2020)	55
Εικόνα 2.2: Η βιοχημεία της απονιτροποίησης – καταβολισμός/αναπνοή (Πηγή: Schaechter, 2009) ..	57
Εικόνα 2.3: Η βιοχημεία της απονιτροποίησης – αναβολισμός (Πηγή: Schaechter, 2009)	60
Εικόνα 2.4: Διάκριση των οργανισμών ανάλογα με την πηγή ενέργειας και την πηγή άνθρακα που καταναλώνουν (Πηγή: Tortora et al., 2021)	61
Εικόνα 2.5: Ο κύκλος του Calvin (Πηγή: Madigan et al., 2018)	63
Εικόνα 2.6: Ο κύκλος του κιτρικού οξέος ή τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) ή Krebs (Πηγή: Madigan et al., 2018).....	66
Εικόνα 2.7: Ο κύκλος του γλυοξυλικού οξέος (Πηγή: Madigan et al., 2018)	67
Εικόνα 2.8: Ο καταβολισμός της αιθανόλης (Πηγή: Constantin & Fick, 1997)	69
Εικόνα 2.9: Οι αναβολικές οδοί της Ρ-ριβουλόζης (αριστερά) και της σερίνης (δεξιά) (Πηγή: Madigan et al., 2018).....	71
Εικόνα 2.10: Η οδός Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ή Γλυκόλυση (Πηγή: Madigan et al., 2018)	72
Εικόνα 2.11: Η οδός των φωσφοπεντοζών: (α) οξειδωτική φάση και (β) μη οξειδωτική φάση (Πηγή: Madigan et al., 2018).....	72
Εικόνα 2.12: Ρυθμοί ανάπτυξης διαφορετικών κατηγοριών μικροοργανισμών ανάλογα με τη θερμοκρασία (Πηγή: Tortora et al., 2021).....	90
Εικόνα 2.13: Κατηγοριοποίηση μικροοργανισμών ανάλογα με την αλατότητα στην οποία παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη (Πηγή: Madigan et al., 2018).....	95
Εικόνα 3.1: Τύποι βιολογικών αντιδραστήρων	107
Εικόνα 3.2: Παραδείγματα βιολογικών αντιδραστήρων προσκολλημένης βιομάζας που χρησιμοποιούνται συνθηθέστερα με σκοπό την απονιτροποίηση: (α) σταθερής κλίνης, καθοδικής ροής, (β) σταθερής κλίνης, ανοδικής ροής, (γ) ρευστοποιημένης κλίνης, ανοδικής ροής και (δ) εμβαπτιζόμενοι περιστρεφόμενοι βιολογικοί δίσκοι (Πηγή: Metcalf & Eddy, 2017)	117

Εικόνα 3.3: Διάταξη των βιολογικών αντιδραστήρων μεμβρανών: ολοκληρωμένο MBR με βυθισμένο σύστημα μεμβρανών (επάνω) και βιολογικός αντιδραστήρας με εξωτερική μονάδα διαχωρισμού μεμβρανών (κάτω) (Πηγή: Metcalf & Eddy, 2017).....	118
Εικόνα 3.4: Δομή του βιοφίλμ σε απονιτροποιητικό αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας (MMBR) με δότη ηλεκτρονίων (α) οξικά ιόντα, (β) γλυκόζη, (γ) μεθανόλη, (δ) αιθανόλη (Πηγή: Srinandan et al., 2012).....	123
Εικόνα 3.5: Σχηματισμός βιοφίλμ σε απονιτροποιητικό αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας (RBC) με δότη ηλεκτρονίων (α) οξικό οξύ, (β) κιτρικό οξύ, (γ) μύρα (Πηγή: Mielcarek et al., 2020)..	124
Εικόνα 4.1: (α) Σχηματική απεικόνιση του βιοαντιδραστήρα: (1) εισροή από τον αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης (CSTR), (2) περισταλτική αντλία, (3) αντιδραστήρας σταθερής κλίνης, (4) εκροή αντιδραστήρα, (5) & (6) θύρες δειγματοληψίας και (7) στόμιο εξαερισμού, και (β) ο απονιτροποιητικός βιολογικός αντιδραστήρας σε εργαστηριακή κλίμακα.....	151
Εικόνα 4.2: (α) Το πληρωτικό υλικό Biohome Supergravel, (β) η μορφολογία του με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), (γ) το φάσμα EDS σε επιλεγμένο σημείο της επιφάνειάς του και (δ) Το πληρωτικό υλικό Biohome Ultimate, (ε) η μορφολογία του με χρήση SEM και (στ) το φάσμα EDS σε επιλεγμένο σημείο της επιφάνειάς του	153
Εικόνα 4.3: Διάγραμμα ροής υδρομεταλλουργικής διεργασίας	161
Εικόνα 4.4: Σταδιακή προσαρμογή του βιολογικού αντιδραστήρα σε διάλυμα τροφοδοσίας με πηγή οργανικού άνθρακα (α) οξικό νάτριο και (β) αιθανόλη	164
Εικόνα 4.5: Ενδεικτικές καμπύλες βαθμονόμησης (α) νιτρικών ιόντων και (β) νιτρωδών ιόντων	167
Εικόνα 4.6: Περιβάλλον λογισμικού AQUASIM: (1.) Ορισμός μεταβλητών (variables), (2.) Ορισμός διεργασιών (processes), (3.) Ορισμός μονάδων (compartments), (4.) Ορισμός συνδέσεων (links)	184
Εικόνα 5.1: Εικόνες SEM (αριστερά) που αντιστοιχούν στο φάσμα EDS (δεξιά) επιλεγμένων σημείων των κατακρημνισμάτων που περιέχονται σε δείγματα λάσπης από τον βιολογικό αντιδραστήρα	211

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων αγροτικής προέλευσης που έχουν παρατηρηθεί σε επιφανειακούς αποδέκτες ανά τον κόσμο	21
Πίνακας 1.2: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων αγροτικής προέλευσης που έχουν παρατηρηθεί σε υπόγειους υδροφορείς ανά τον κόσμο	22
Πίνακας 1.3: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που προέρχονται από τη γαλακτοβιομηχανία	24
Πίνακας 1.4: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που προέρχονται από τη βιομηχανία επιμετάλλωσης και τη βιομηχανία όπλων	25
Πίνακας 1.5: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που προέρχονται από μεταλλευτικές και εξορυκτικές δραστηριότητες σε υπόγειους υδροφορείς	25
Πίνακας 1.6: Σύσταση αποβλήτων που προέρχονται από υδρομεταλλουργικές διεργασίες.....	28
Πίνακας 1.7: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που προέρχονται από δραστηριότητες πλην των αγροτικών και των βιομηχανικών.....	29
Πίνακας 1.8: Ενδεικτικά όρια συγκέντρωσης νιτρικού αζώτου στο πόσιμο νερό σύμφωνα με διεθνείς και εθνικούς οργανισμούς.....	32
Πίνακας 1.9: Όρια παραμέτρων για απορρίψεις από σταθμούς επεξεργασίας αστικών λυμάτων (Οδηγία 91/271/ΕΟΚ).....	34
Πίνακας 1.10: Όρια ενδεικτικών παραμέτρων σε επιφανειακά νερά που προορίζονται για κατανάλωση σύμφωνα με την Οδηγία 75/440/ΕΟΚ	36
Πίνακας 1.11: Όρια ενδεικτικών παραμέτρων που θεσπίστηκαν διαχρονικά στο πόσιμο νερό (Οδηγία 80/778/ΕΟΚ, Οδηγία 98/83/ΕΚ, Οδηγία 2020/2184/ΕΕ)	38
Πίνακας 1.12: Εθνική νομοθεσία με σκοπό την εναρμόνιση με τις αντίστοιχες ευρωπαϊκές Οδηγίες .	40
Πίνακας 1.13: Ζώνες ευπρόσβλητες για νιτρορρύπανση στην Ελλάδα	41
Πίνακας 1.14: Κατάλογος ευαίσθητων περιοχών της Ελλάδας (ΚΥΑ 19661/1982/1999 και ΚΥΑ 48392/939/2002)	43
Πίνακας 1.15: Ανώτατο όριο της συγκέντρωσης αζώτου, ανάλογα με τον τρόπο επαναχρησιμοποίησης των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων (ΚΥΑ 145116/2011)	45

Πίνακας 2.1: Γένη βακτηρίων ικανών για απονιτροποίηση (Πηγή: Sanmugasunderam et al., 1987; Hillel et al., 2005)	56
Πίνακας 2.2: Λόγοι C/N, όπως προέκυψαν ύστερα από πειραματικές δοκιμές στην αρχή (αρχικό C/N) και στο τέλος της απονιτροποίησης (πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N) σε σύγκριση με τη θεωρητική στοιχειομετρική απαίτηση, και ειδική ταχύτητα απονιτροποίησης για διαφορετικά οργανικά υποστρώματα και μικροβιακές καλλιέργειες (θερμοκρασία 20°C-27°C)	77
Πίνακας 2.3: Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενος λόγος C/N που προορίζεται για κυτταρική αναπνοή με οργανικό υπόστρωμα τα οξικά ιόντα, την αιθανόλη, τη μεθανόλη και τη γλυκόζη	84
Πίνακας 2.4: Κατηγοριοποίηση μικροοργανισμών ανάλογα με το pH βέλτιστης ανάπτυξης (Dworkin et al., 2006; Ge et al., 2012; Huang et al., 2015; Rafrafi et al., 2015; Imhoff et al., 2018).....	87
Πίνακας 2.5: Θερμοκρασιακοί συντελεστές θ σε διαφορετικά συστήματα	92
Πίνακας 2.6: Βακτήρια ικανά για απονιτροποίηση σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας.....	96
Πίνακας 3.1: Παράμετροι λειτουργίας (HRT, συγκέντρωση οργανικού άνθρακα, NO ₃ -N, C/N, αλατότητα, pH, T) και ποιότητα εκροής (συγκέντρωση οργανικού άνθρακα, NO ₃ -N, NO ₂ -N) σε βιολογικούς απονιτροποιητικούς αντιδραστήρες, με έμφαση σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας και σε αντιδραστήρες που λειτουργούν σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας	132
Πίνακας 3.2: Κινητικές παράμετροι κατά την απονιτροποίηση (μ_{max} : μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών, K: σταθερές ημικορεσμού για το εκάστοτε οργανικό υπόστρωμα, νιτρικά και νιτρώδη).....	144
Πίνακας 4.1: Θρεπτικό μέσο Bacto Marine Broth (DSMZ medium 514 + 10% NaCl)	154
Πίνακας 4.2: Αρχικές τιμές pH, αλατότητας και συγκεντρώσεων θειικών ιόντων και ιόντων μετάλλων (Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺) κατά τη μελέτη της αρχικής συγκέντρωσης του δέκτη ηλεκτρονίων (νιτρικών και νιτρωδών)	156
Πίνακας 4.3: Αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, αλατότητας, θειικών ιόντων και ιόντων μετάλλων (Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺) κατά τη μελέτη των αρχικών τιμών pH	156
Πίνακας 4.4: Αρχική τιμή pH και αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, θειικών ιόντων και ιόντων μετάλλων (Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺) κατά τη μελέτη της αλατότητας	157
Πίνακας 4.5: Ποσοστιαία (%) σύσταση των Πλακετών Τυπωμένων Κυκλωμάτων (ΠΤΚ) σε μέταλλα ..	157
Πίνακας 4.6: Αρχική τιμή pH και αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, αλατότητας και θειικών ιόντων κατά τη μελέτη της παρουσίας διαλυτών μετάλλων (Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺)	158

Πίνακας 4.7: Αρχική τιμή pH και αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών, αλατότητας και διαλυτών μετάλλων (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) κατά τη μελέτη της παρουσίας θειικών ιόντων	158
Πίνακας 4.8: Τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Bacto Marine Broth	159
Πίνακας 4.9: Σύσταση των αποβλήτων που προέρχονται από την υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων σε Πλακέτες Τυπωμένων Κυκλωμάτων (ΠΤΚ)	161
Πίνακας 4.10: Σύσταση πεπτόνης (bacto peptone) και εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) σε άνθρακα και άζωτο	162
Πίνακας 4.11: Συγκεντρώσεις οξικού νατρίου-εκχυλίσματος ζύμης κατά τις δοκιμές στον βιολογικό αντιδραστήρα, με σκοπό την αντικατάσταση της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης (όπως περιγράφεται στον πίνακα-Πίνακας 4.8), και οι αντίστοιχοι λόγοι C/N.....	164
Πίνακας 4.12: Συγκεντρώσεις αιθανόλης-εκχυλίσματος ζύμης κατά τις δοκιμές στον βιολογικό αντιδραστήρα, με σκοπό την αντικατάσταση της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης (όπως περιγράφεται στον πίνακα-Πίνακας 4.8), και οι αντίστοιχοι λόγοι C/N.....	165
Πίνακας 4.13: Παράμετροι φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού και γραμμική περιοχή για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης νιτρικών (NO_3^-), νιτρωδών (NO_2^-) και ολικού οργανικού άνθρακα (TOC).....	168
Πίνακας 4.14: Γραμμική περιοχή για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μετάλλων (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}) με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS)	170
Πίνακας 4.15: Περιπτώσεις οργανικών υποστρωμάτων που μελετήθηκαν κατά την προσομοίωση .	174
Πίνακας 4.16: Σταθερές του γινομένου διαλυτότητας κατά τη χημική ισορροπία μεταξύ των μεταλλικών ιόντων (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) και των υδροξειδίων και ανθρακικών αλάτων των μετάλλων.....	181
Πίνακας 4.17: Πίνακας Petersen με τις βιολογικές διεργασίες που συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο	182
Πίνακας 4.18: Πίνακας Petersen με τις αβιοτικές διεργασίες που συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο	182
Πίνακας 4.19: Μεταβλητές που ορίστηκαν για την προσομοίωση του βιολογικού συστήματος με χρήση του λογισμικού AQUASIM 2.0	187
Πίνακας 5.1: Λόγος C/N και χρόνος πλήρους απονιτροποίησης για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων και οργανικού άνθρακα	221

Πίνακας 5.2: Χημική σύσταση του μεταλλικού κλάσματος της σκόνης ΠΤΚ, κοκκομετρίας μικρότερης από 0.6 mm, που χρησιμοποιήθηκε στην υδρομεταλλουργία με σκοπό την ανάκτηση βασικών και πολύτιμων μετάλλων	225
Πίνακας 5.3: Χημική σύσταση του μίγματος υδρομεταλλουργικών αποβλήτων που έχει υποστεί χημική προεπεξεργασία και βιολογική επεξεργασία	229
Πίνακας 6.1: Συνεισφορά του οξικού και του εκχυλίσματος ζύμης στον λόγο C/N, χρόνος απονιτροποίησης και μέγιστη συγκέντρωση νιτρωδών κατά τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα τα οξικά στον βιοαντιδραστήρα	238
Πίνακας 6.2: Συνεισφορά της αιθανόλης και του εκχυλίσματος ζύμης στον λόγο C/N, χρόνος απονιτροποίησης και μέγιστη συγκέντρωση νιτρωδών κατά τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα τα οξικά στον βιοαντιδραστήρα	240
Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα προσομοίωσης για τις κινητικές παραμέτρους μ_{max,NO_3} , μ_{max,NO_2} , $K_{s,org}$, K_{NO_3} , K_{NO_2} , f_s και X για απονιτροποίηση με πηγή άνθρακα την πεπτόνη και το οξικό νάτριο παρουσία εκχυλίσματος ζύμης και την αιθανόλη απουσία εκχυλίσματος ζύμης (αρχική συγκέντρωση νιτρικών: 6 000 mg/L για πεπτόνη-εκχ. ζύμης και 3 000 mg/L για οξικό-εκχ. Ζύμης και αιθανόλη)	249
Πίνακας 7.2: Επίδραση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος στην τιμή του δείκτη κορεσμού των πιθανών κατακρημνισμάτων των μετάλλων σιδήρου, χαλκού, ψευδαργύρου, νικελίου και ασβεστίου κατά την απονιτροποίηση, βάση προσομοίωση στο λογισμικό Visual MINTEQ.....	264

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 5.1: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων, και (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων 750 mg/L, 2 750 mg/L και 5 750 mg/L και νιτρωδών ιόντων 2 000 mg/L	198
Σχήμα 5.2: (α)-(β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (γ)-(δ) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, και (ε)-(στ) Μεταβολή του pH, για αρχικές τιμές pH 3, 4, 5 και 6, 6.8, 8, αντίστοιχα, σε συνάρτηση με τον χρόνο	199
Σχήμα 5.3: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων, και (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, για τιμές αλατότητας 5%, 7.5% και 10%	202
Σχήμα 5.4: (α)-(β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (γ)-(δ) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, και (ε)-(στ) Μεταβολή του pH, για αρχικές συγκεντρώσεις Zn, Cu, Fe και Ni 50 mg/L και 100 mg/L, αντίστοιχα, σε συνάρτηση με τον χρόνο και σε σύγκριση με την επίδραση στην εξέλιξη της απονιτροποίησης για μηδενικές αρχικές συγκεντρώσεις αυτών	203
Σχήμα 5.5: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, για μίγμα Zn, Cu, Fe και Ni σε συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L, σε συνάρτηση με τον χρόνο και σε σύγκριση με την επίδραση στην εξέλιξη της απονιτροποίησης για μηδενικές αρχικές συγκεντρώσεις αυτών	206
Σχήμα 5.6: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, απουσία θειικών ιόντων και για συγκέντρωση θειικών ιόντων 2 000 mg/L	208
Σχήμα 5.7: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, όταν μελετάται η επίδραση στην απονιτροποίηση καθενός από αυτά ξεχωριστά, σε αρχικές συγκεντρώσεις 50 mg/L και 100 mg/L	209
Σχήμα 5.8: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, όταν μελετάται η επίδραση της ταυτόχρονης παρουσίας των μετάλλων αυτών στην απονιτροποίηση, σε αρχικές συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L	210

Σχήμα 5.9: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης θειικών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο, όταν μελετάται η επίδραση της ταυτόχρονης παρουσίας των μετάλλων Zn, Cu, Fe και Ni στην απονιτροποίηση, σε αρχικές συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L.....	212
Σχήμα 5.10: Διαλυτότητα του νικελίου σε συνάρτηση με το pH παρουσία χλωριούχου νατρίου (NaCl) σε περιεκτικότητα 1% και 5%, σε σύγκριση με τη διαλυτότητα του νικελίου σε καθαρό υδατικό διάλυμα νικελίου	213
Σχήμα 5.11: Διαλυτότητα νικελίου σε συνάρτηση με το pH, σε υδατικό διάλυμα νικελίου (καμπύλη Ni), σε διάλυμα νικελίου με αλατότητα 5% (καμπύλη Ni-Cl) και σε διάλυμα νικελίου με αλατότητα 5% και παρουσία θειούχων (καμπύλη Ni-Cl-S), σύμφωνα με προσομοίωση στο λογισμικό Visual MINTEQ..	214
Σχήμα 5.12: (α) Καμπύλες διαλυτότητας των χημικών ειδών νικελίου και (β) Δείκτες κορεσμού των κατακρημνισμάτων, σε υδατικό διάλυμα νικελίου, (γ) Καμπύλες διαλυτότητας των χημικών ειδών νικελίου και (δ) Δείκτες κορεσμού των κατακρημνισμάτων, σε διάλυμα νικελίου παρουσία χλωριόντων (αλατότητα 5%) και (ε) Δείκτες κορεσμού των κατακρημνισμάτων, σε διάλυμα νικελίου παρουσία χλωριόντων (αλατότητα 5%) και θειούχων, όπως προέκυψαν ύστερα από προσομοίωση στο λογισμικό Visual MINTEQ.....	215
Σχήμα 5.13: Διαλυτότητα του νικελίου σε συνάρτηση με το pH παρουσία οργανικών θρεπτικών συστατικών (πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης), σε σύγκριση με τη διαλυτότητα του νικελίου σε καθαρό υδατικό διάλυμα νικελίου	218
Σχήμα 5.14: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, όταν τα μέταλλα αυτά προστίθενται ταυτόχρονα στο διάλυμα σε συγκεντρώσεις 50 mg/L, απουσία και παρουσία 2 200 mg/L θειικών ιόντων	219
Σχήμα 5.15: Τιμές του λόγου C/N και χρόνος απονιτροποίησης.....	221
Σχήμα 5.16: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων 6 000 mg/L, 9 000 mg/L και 14 000 mg/L, για τιμή του λόγου C/N 3.11 g C/g NO ₃ ⁻ -N	222
Σχήμα 5.17: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων 6 000 mg/L, 9 000 mg/L και 14 000 mg/L, για τιμή του λόγου C/N 3.11 g C/g NO ₃ ⁻ -N.....	223
Σχήμα 5.18: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή του pH, (γ) Μεταβολή της συγκέντρωσης ψευδαργύρου και χαλκού και (δ) Μεταβολή της συγκέντρωσης σιδήρου και νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την επεξεργασία προεπεξεργασμένων υγρών αποβλήτων που προέρχονται από υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων σε ΠΤΚ	230

Σχήμα 6.1: Δοκιμές σε κωνικές φιάλες: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, (δ) Μεταβολή της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 nm, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την πεπτόνη, το οξικό νάτριο και την αιθανόλη με C/N=5.18	235
Σχήμα 6.2: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο για τιμές C/N 5.18, 2.95 και 2.40 και σε σύγκριση με την πεπτόνη	237
Σχήμα 6.3: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την αιθανόλη για τιμές C/N 5.18 παρουσία εκχυλίσματος ζύμης, 1.44 χωρίς εκχύλισμα ζύμης και 1.84 παρουσία και απουσία εκχυλίσματος ζύμης και σε σύγκριση με την πεπτόνη	240
Σχήμα 6.4: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο για τιμές C/N 5.18, 2.95 και 2.40 και σε σύγκριση με την πεπτόνη	243
Σχήμα 6.5: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την αιθανόλη για τιμές C/N 5.18 παρουσία εκχυλίσματος ζύμης, 1.44 χωρίς εκχύλισμα ζύμης και 1.84 παρουσία και απουσία εκχυλίσματος ζύμης και σε σύγκριση με την πεπτόνη	244
Σχήμα 7.1: Προσομοίωση της (α) μεταβολής της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων και αερίου αζώτου και της (β) μεταβολής του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (C ₁₈ H ₂₄ O ₅ N ₃), στο λογισμικό AQUASIM 2.0	252
Σχήμα 7.2: Προσομοίωση της (α) μεταβολής της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων και αερίου αζώτου και της (β) μεταβολής του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (C ₈ H ₂₄ O ₅ N ₃), στο λογισμικό AQUASIM 2.0.....	252
Σχήμα 7.3: Προσομοίωση της (α) μεταβολής της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων και αερίου αζώτου και της (β) μεταβολής του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα οξικό και εκχύλισμα ζύμης (C ₃ H _{10.5} O ₃ N _{0.5}), στο λογισμικό AQUASIM 2.0.....	254
Σχήμα 7.4: Προσομοίωση της (α) μεταβολής της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων και αερίου αζώτου και της (β) μεταβολής του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την αιθανόλη (C ₂ H ₆ O), στο λογισμικό AQUASIM 2.0	255

Σχήμα 7.5: Προσομοίωση της μεταβολής της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου, (δ) νικελίου και (ε) ασβεστίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (C ₁₈ H ₂₄ O ₅ N ₃), στο λογισμικό AQUASIM 2.0	258
Σχήμα 7.6: Προσομοίωση της μεταβολής της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου, (δ) νικελίου και (ε) ασβεστίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (C ₈ H ₂₄ O ₅ N ₃), στο λογισμικό AQUASIM 2.0	259
Σχήμα 7.7: Δείκτες κορεσμού των κατακρημνισμάτων σιδήρων, χαλκού, ψευδαργύρου, νικελίου και ασβεστίου που μπορεί να σχηματίζονται κατά την απονιτροποίηση, βάση προσομοίωσης στο λογισμικό Visual MINTEQ.....	263

1 |

Τα νιτρικά ιόντα ως παράγοντας ρύπανσης

1.1 Διαθεσιμότητα νερού και νιτρικά ιόντα

Η σύγχρονη εξέλιξη των πόλεων βασίζεται στη βιομηχανία, στην αστικοποίηση και στην ανάγκη για οικονομική ανάπτυξη, ενώ ο πληθυσμός συνεχίζει να αυξάνεται, ταυτόχρονα με τη ζήτηση για νερό (World bank, 2018). Η ανάγκη για κάλυψη των διατροφικών αναγκών του πληθυσμού οδηγεί σε μεγέθυνση της αγροτικής δραστηριότητας (Godfray et al., 2010), η οποία αφομοιώνει περίπου το 70% της παγκόσμιας κατανάλωσης νερού (FAO, 2012; FAO, 2017). Σύμφωνα με τον Οργανισμό Ηνωμένων Εθνών, η παγκόσμια ζήτηση σε νερό αναμένεται να αυξηθεί κατά ένα τρίτο μέχρι το 2050 (UN, 2018), ενώ σύμφωνα με άλλες προβλέψεις, ο αστικός πληθυσμός που θα αντιμετωπίζει πρόβλημα έλλειψης νερού στις περισσότερες αναπτυσσόμενες και αναπτυσσόμενες χώρες σε Ευρώπη, ΗΠΑ, Ασία, Ωκεανία και Αφρική πρόκειται να αυξηθεί κατά μέσο όρο κατά 121.3%, σε σύγκριση με το 2016 (He et al., 2021). Ταυτόχρονα, η κλιματική αλλαγή ασκεί ακόμη μεγαλύτερη πίεση στα διαθέσιμα αποθέματα νερού (Pimentel et al., 2004).

Τα νιτρικά ιόντα (NO_3^-) είναι διαλυτά στο νερό, χαρακτηρίζονται από υψηλή κινητικότητα και αποτελούν την πλέον σταθερή μορφή αζώτου στο περιβάλλον (DeSimone & Howes, 1998; Singh & Tripathi, 2007). Εξαιτίας των ιδιοτήτων τους αυτών, τα νιτρικά ιόντα του εδάφους μεταφέρονται μέσω της ροής του νερού στους υδάτινους αποδέκτες (DeSimone & Howes, 1998; Debernardi et al., 2008; Rahmati et al., 2014), όπου απαντούν συχνά σε υψηλές συγκεντρώσεις, και προκαλούν φαινόμενα ρύπανσης τόσο στα επιφανειακά, όσο και στα υπόγεια νερά, με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται η ποιότητά τους (Singh & Tripathi, 2007; Moloantoa et al., 2022). Στους γεωλογικούς σχηματισμούς σπάνια απαντώνται νιτρικά και, γενικότερα, αζωτούχες ενώσεις. Επομένως, η παρουσία τους στο περιβάλλον (έδαφος και νερά) προέρχεται κυρίως από ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως η απόρριψη λιπασμάτων ή η χρήση λιπασμάτων (Maila et al., 2004). Έτσι, τα νιτρικά ιόντα είναι ο δεύτερος βασικότερος ρύπος ανθρωπογενούς προέλευσης που περιέχεται στα υπόγεια νερά, μετά τα φυτοφάρμακα (Singh & Tripathi, 2007). Η ποιοτική υποβάθμιση, σε συνδυασμό με τον περιορισμό των διαθέσιμων αποθεμάτων νερού, όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, οδηγεί σε ακόμη μεγαλύτερη μείωση της διαθεσιμότητάς του για την κάλυψη των αναγκών του ολοένα αυξανόμενου πληθυσμού.

Η ρύπανση των υπογείων νερών από νιτρικά μπορεί να προέρχεται είτε από σημειακές, είτε από μη σημειακές πηγές. Η βιομηχανική δραστηριότητα και η εντατική κτηνοτροφία αποτελούν παραδείγματα σημειακής ρύπανσης. Αντίθετα, η χρήση αζωτούχων λιπασμάτων και κόπρου στον αγροτικό τομέα, οι

αποστραγγίσεις των αρδευόμενων καλλιεργημένων εκτάσεων και η υγρή και ξηρή απόθεση είναι παραδείγματα μη σημειακής ρύπανσης (Almasri, 2007). Μεταξύ όλων, οι κυριότερες πηγές νιτρικών ιόντων είναι τα απόβλητα κτηνοτροφίας και, γενικότερα, τα λύματα που δεν έχουν υποστεί κατάλληλη επεξεργασία πριν τη διάθεσή τους στο περιβάλλον, καθώς και η χρήση αζωτούχων λιπασμάτων (Burkholder et al., 2007; Adimalla & Qian, 2019).

1.2 Πηγές προέλευσης και επίπεδα συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων

Η ρύπανση του νερού με νιτρικά ιόντα αποτελεί παγκόσμιο φαινόμενο (Abascal et al., 2022). Σύμφωνα με δεδομένα που συλλέχθηκαν από βιβλιογραφικές πηγές στο διάστημα 2014-2022 για 292 περιοχές της Ασίας, της Αμερικής, της Ευρώπης, της Αφρικής και της Ωκεανίας, η μέση συγκέντρωση νιτρικών στα υπόγεια νερά είναι υψηλότερη από 50 mg/L σε 60 από αυτές (30 στην Αφρική, 20 στην Ασία, 9 στην Ευρώπη, 1 στην Αμερική). Η κυριότερη ανθρωπογενής δραστηριότητα που επιβαρύνει τους υδάτινους αποδέκτες με νιτρικά σε παγκόσμια κλίμακα, αλλά και στην Ελλάδα, είναι η αγροτική και συγκεκριμένα η γεωργία (Abascal et al., 2022). Πέραν της γεωργίας, άλλες αγροτικές δραστηριότητες που μπορούν να συνεισφέρουν στη ρύπανση με νιτρικά είναι η κτηνοτροφία (Singh & Tripathi, 2007; Debernardi et al., 2008; Reddy et al., 2009; Hamed et al., 2013) και οι ιχθυοκαλλιέργειες (Egbi et al., 2019). Τέλος, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις νιτρορύπανσης από αστικές (απόρριψη αστικών λυμάτων, παρουσία σηπτικών δεξαμενών), βιομηχανικές και τουριστικές δραστηριότητες, καθώς και από τη διάθεση των απορριμμάτων σε χωματερές (Egbi et al., 2019; Abascal et al., 2022).

1.2.1 Αγροτική δραστηριότητα

Τα αζωτούχα φυτοφάρμακα, τα λιπάσματα και η κόπρος που χρησιμοποιούνται στη γεωργία περιέχουν σημαντικές συγκεντρώσεις αμμωνιακών και νιτρικών που ευνοούν την φυτική παραγωγή. Τα φυτοφάρμακα χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια πολλών ειδών φρούτων και λαχανικών, όπως σόγιας, καλαμποκιού, σιταριού, καρότου, τομάτας, κρεμμυδιού, σκόρδου, ελιάς, λεμονιού, μήλου, αχλαδιού και ροδάκινου (Hamed et al., 2013). Η εντατική καλλιέργεια ευνοεί τη χρήση φυτοφαρμάκων, λιπασμάτων και κόπρου, συχνά με αλόγιστο τρόπο, ώστε να επιτευχθεί μεγιστοποίηση της παραγωγής, οδηγώντας σε επιφανειακή και υπόγεια νιτρορύπανση (Böhlke, 2002; Babiker et al., 2004; Almasri, 2007; Singh & Tripathi, 2007; Reddy et al., 2009; Hamed et al., 2013; Pang et al., 2013; Pisciotta et al., 2015; Adimalla, 2019). Επίσης, έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας λιπασμάτων που εφαρμόζεται στις γεωργικές εκτάσεις και της συγκέντρωσης νιτρικών στα υπόγεια νερά (Rahmati et al., 2014). Σε περιοχές της Ιαπωνίας και της Κίνας παρατηρήθηκε ότι, η χρήση χημικών λιπασμάτων σε καλλιέργειες λαχανικών μεγάλων εκτάσεων επιβάρυνε τους υδροφορείς με νιτρικά και υποβάθμισε την ποιότητα του νερού τους (Babiker et al., 2004; Pang et al., 2013).

Εκτός από τη γεωργία, η κτηνοτροφία αποτελεί επίσης σημαντική πηγή απελευθέρωσης αζώτου στο περιβάλλον μέσω των αποβλήτων που παράγονται (Singh & Tripathi, 2007; Debernardi et al., 2008; Reddy et al., 2009; Hamed et al., 2013). Οι πιθανές διαρροές και κακοτεχνίες στις δεξαμενές συλλογής αποβλήτων και οι κατακρημνίσεις ευνοούν τη ρύπανση των επιφανειακών και υπογείων νερών. Ενδεικτικά, διαρροές από δεξαμενές κόπρου στην Καλιφόρνια οδήγησαν σε συγκεντρώσεις αζώτου μεγαλύτερες από 120 mg N/L ή 531 mg NO₃⁻/L σε νερά γεωτρήσεων της γύρω περιοχής (Westerman et al., 1995).

Ο μηχανισμός μέσω του οποίου το άζωτο των κτηνοτροφικών αποβλήτων μετατρέπεται σε νιτρικά περιγράφεται από τις αντιδράσεις (A.1) έως (A.5). Αρχικά, το οργανικό άζωτο των αποβλήτων που καταλήγουν στην ακόρεστη ζώνη του εδάφους μετατρέπεται σε αμμωνιακό άζωτο, μέσω διεργασιών αμμωνιοποίησης (DeSimone & Howes, 1998) και υδρόλυσης (Singh & Tripathi, 2007). Η ουρία (CO(NH₂)₂) είναι η κύρια αζωτούχος ουσία στα ούρα των θηλαστικών. Η υδρόλυσή της σε υδροξείδιο του αμμωνίου (NH₄OH), μέσω του σχηματισμού ανθρακικού αμμωνίου ((NH₄)₂CO₃), περιγράφεται από τις αντιδράσεις (A.1) έως (A.3) (Singh & Tripathi, 2007).

ΥΔΡΟΛΥΣΗ



Τα αμμωνιακά ιόντα που περιέχονται στην κόπρη, τα φυτοφάρμακα και τα λιπάσματα οξειδώνονται υπό αερόβιες συνθήκες σε νιτρικά (νιτροποίηση), με τη βοήθεια των βακτηρίων *Nitrosomonas* και *Nitrobacter*, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (A.4) και (A.5), αντίστοιχα (Singh & Tripathi, 2007).

ΝΙΤΡΟΠΟΙΗΣΗ



Σύμφωνα με τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η συνολική συγκέντρωση νιτρικών ιόντων που καταλήγουν στους υδάτινους αποδέκτες προκύπτει, όχι μόνο από την αρχική συγκέντρωση των φυτοφαρμάκων, των λιπασμάτων και της κόπρου σε νιτρικά, αλλά και από τη συγκέντρωση που προέρχεται από τη νιτροποίηση του οργανικού και αμμωνιακού αζώτου που περιέχουν (DeSimone & Howes, 1998; Singh & Tripathi, 2007).

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα νιτρικά ιόντα παρασύρονται μέσω της ροής του νερού, διηθούνται διαμέσου του εδάφους και καταλήγουν στους υπόγειους υδροφορείς (DeSimone & Howes, 1998; Debernardi et al., 2008; Rahmati et al., 2014). Παράμετροι όπως το είδος του γεωλογικού υποβάθρου, η μεταβιβασιμότητα του υδροφορέα (όγκος νερού ανά μονάδα διατομής) και το βάθος των γεωτρήσεων/δειγματοληψιών επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων στα υπόγεια νερά. Το είδος του γεωλογικού υποβάθρου μπορεί να ευνοεί τη διήθηση των νιτρικών σε βαθύτερα στρώματα, όπως στις περιπτώσεις των αμμωδών, των καρστικών και των γρανιτικών πετρωμάτων, ή να την παρεμποδίζει, όπως στις περιπτώσεις των ιζηματογενών και των αλλουβιακών σχηματισμών (Westerman et al., 1995; Liu et al., 2006; Reddy et al., 2009; Rahmati et al., 2014). Σε υδροφορείς με υψηλή μεταβιβασιμότητα επιτυγχάνεται ταχεία αραίωση των νιτρικών, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται χαμηλές συγκεντρώσεις (Debernardi et al., 2008). Το μεγάλο βάθος της δειγματοληψίας/γεώτρησης συνδέεται με χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ή, αντίστοιχα, οι επιφανειακές γεωτρήσεις συνδέονται με υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων (Debernardi et al., 2008; Reddy et al., 2009; Dragon, 2013; Hamed et al., 2013; Re et al., 2017). Εξαιρέση αποτελούν οι περιπτώσεις όπου οι πιεζομετρικές κλίσεις είναι υψηλές, για παράδειγμα λόγω υπεράντλησης, οπότε παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ακόμη και σε μεγαλύτερα βάθη (Dragon, 2013). Αξίζει να σημειωθεί ότι, αφότου τα νιτρικά καταλήξουν στην κορεσμένη ζώνη του εδάφους, παρά τις ανοξικές συνθήκες που ευνοούν την αναγωγή των νιτρικών ιόντων, η έλλειψη οργανικού άνθρακα καθιστά την αναγωγή τους περιορισμένη (DeSimone & Howes, 1998). Μάλιστα, όσο πιο βαθιά βρίσκεται ένας υπόγειος υδροφορέας, τόσο εκλείπουν οι διεργασίες απονιτροποίησης (Dragon, 2013; Pang et al., 2013).

Οι αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων στα υπόγεια νερά παρουσιάζουν θετική συσχέτιση με άλλες παραμέτρους που υποβαθμίζουν την ποιότητα του νερού, όπως τα χλωριόντα, είτε εξαιτίας της φύσης των διηθούμενων ρυπαντών (DeSimone & Howes, 1998; Babiker et al., 2004; Reddy et al., 2009; Jalali & Tabar, 2011; Zhang et al., 2015; Re et al., 2017; Egbi et al., 2019; Adimalla & Qian, 2019; Yu et al., 2020), είτε εξαιτίας φαινομένων υπεράντλησης, που οδηγούν σε συσσώρευση των ρυπαντών αυτών σε σημεία με χαμηλή πιεζομετρία (Dragon, 2013). Σε υπόγεια νερά όπου έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ νιτρικών και χλωριόντων, η συγκέντρωση χλωριόντων προσδιορίστηκε έως και 9 175 mg/L (Egbi et al., 2019) και οφείλεται συχνά σε κτηνοτροφικά απόβλητα (Jalali & Tabar, 2011). Σε πολλές περιπτώσεις ο λόγος των συγκεντρώσεων νιτρικών και χλωριόντων ($\text{NO}_3^-/\text{Cl}^-$) χρησιμοποιείται ως δείκτης ανθρωπογενούς ρύπανσης, πχ εξαιτίας της αγροτικής δραστηριότητας (Liu et al., 2006; Romanelli et al., 2020). Η συσχέτιση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων με τη συγκέντρωση διαλυτών στερεών (TDS) και την ολική σκληρότητα στα υπόγεια νερά οφείλεται κυρίως στη χρήση λιπασμάτων και στη φύση του γεωλογικού υποβάθρου της περιοχής (Nakagawa et al., 2016; Yu et al., 2020). Η συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων νιτρικών και βαρέων μετάλλων, κυρίως

χαλκού και ψευδαργύρου, οφείλεται συνήθως σε απόβλητα κτηνοτροφίας (Barker & Zublena, 1995). Τέλος, παρόλο που τα νιτρικά ιόντα αποτελούν την πλέον σταθερή οξειδωμένη μορφή αζώτου στη φύση, η παρουσία τους στα νερά μπορεί να συνδέεται με ταυτόχρονη παρουσία νιτρωδών ιόντων (αντιδράσεις (A.4) και (A.5)) (WHO, 2017).

Εκτός από τη ρύπανση που προκαλείται άμεσα από την παρουσία νιτρικών ιόντων στα υπόγεια νερά, είναι δυνατόν να παρατηρούνται και φαινόμενα δευτερογενούς ρύπανσης. Συγκριμένα, αυξημένες συγκεντρώσεις θειικών ιόντων και διαλυτών ειδών μετάλλων, όπως αρσενικού και χρωμίου, σε υπόγεια νερά είναι δυνατόν να σχετίζονται με υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών. Τα νιτρικά ιόντα μπορούν να οξειδώσουν το θείο που περιέχεται σε θειούχα ορυκτά, όπως στον θειούχο σίδηρο (FeS), οδηγώντας σε διαλυτοποίηση άλλων χημικών ειδών, όπως αρσενικού (As) (Böhlke, 2002; Dragon, 2013; Stuyfzand & Bonte, 2023), και να ευνοήσουν την κινητικότητα των μετάλλων, όπως στην περίπτωση του χρωμίου (Dermatas et al., 2015; Remoundaki et al., 2016). Επίσης, η μικροβιακή αποικοδόμηση των νιτρικών μπορεί να δημιουργήσει ανοξικές συνθήκες στους υδάτινους αποδέκτες, ευνοώντας την επιβίωση και ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, όπως οι *Clostridium perfringens*, *E.Coli* και *Enterococcus spp* (Burkholder et al., 1997; Hamed et al., 2013).

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 1.1 και Πίνακας 1.2) παρουσιάζονται ενδεικτικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που περιέχονται σε νερά υπόγειων και επιφανειακών αποδεκτών διαφορετικών χωρών, αντίστοιχα, η παρουσία των οποίων οφείλεται σε αγροτικές δραστηριότητες.

Πίνακας 1.1: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων αγροτικής προέλευσης που έχουν παρατηρηθεί σε επιφανειακούς αποδέκτες ανά τον κόσμο (*)

Γεωγραφική τοποθεσία	Αποδέκτης/Εποχή	[NO ₃ ⁻ -N]	[NO ₃ ⁻]	Βιβλιογραφική Πηγή	
		(mg/L)			
Γκάνα	Λεκάνη απορροής ποταμού	0.00-1.20 (0.305)	0.03-5.33 (1.35)	Egbi et al. (2019)	
Κίνα	Ποταμοί	0.28-7.34	1.24-32.5	Liu et al. (2006)	
Αργεντινή	Λίμνη	Άνοιξη	1.58	7.0	Romanelli et al. (2020)
		Φθινόπωρο	1.29	5.7	
	Λίμνη	Άνοιξη	4.00	17.7	
		Φθινόπωρο	3.39	15.0	
Ισπανία	Ποταμός	Άνοιξη	0.010-30.0	0.044-133	Monteagudo et al. (2012)
		Φθινόπωρο	0.010-10.9	0.044-48.3	

(*) Με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι συγκεντρώσεις σε όρους αζώτου ή νιτρικών, ακριβώς όπως αναφέρονται στην εκάστοτε βιβλιογραφική πηγή, ενώ με γκρι χρώμα σημειώνονται σε όρους νιτρικών ή αζώτου, αντίστοιχα. Σε παρένθεση φαίνεται η μέση τιμή.

Πίνακας 1.2: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων αγροτικής προέλευσης που έχουν παρατηρηθεί σε υπόγειους υδροφορείς ανά τον κόσμο (*)

Γεωγραφική τοποθεσία	[NO ₃ ⁻ -N]	[NO ₃ ⁻]	Βιβλιογραφική Πηγή
	(mg/L)		
Κίνα	21.9	97.0	Yu et al. (2020)
Ιράν	2.8-25.2 (7.26)	12.4-111.6 (32.15)	Rahmati et al. (2014)
Πολωνία	0.006-7.57	0.025-33.5	Dragon (2021)
Πολωνία	0-27.1	0-120	Dragon (2013)
Κίνα	0.158-58.3	0.7-258	Pang et al. (2013)
Ινδία	0.677-155	3-684	Reddy et al. (2009)
Ιταλία	7.34-46.6	32.5-206.4	Debernardi et al. (2008)
Ιαπωνία	0.497-26.7 (9.1)	2.2-118.4 (40.3)	Babiker et al. (2004)
Τυνησία	1.4-99.4 (37.9)	6.2-440 (168)	Hamed et al. (2013)
ΗΠΑ	27.4	121	Knobeloch et al., (2000)
Ινδία	66.14	293	Adimalla & Qian (2019)
Σλοβακία	έως 59.6	έως 264	Tajtáková et al. (2006)
ΗΠΑ	0.00-1.85	0-8.2	Kostraba et al. (1992)
Καναδάς	> 5.88	> 26.03	Arbuckle et al. (1988)
ΗΠΑ	30.0	133	Evans et al. (1984)
Γκάνα	0-237	0-1050	Egbi et al. (2019)
Κίνα	0.00-11.7	0.00-51.8	Liu et al. (2006)
Τυνησία	1.09-135 (16.6)	4.83-596 (73.5)	Ferchichi et al. (2018)
Τυνησία	0-116 (33.4)	0-515 (148)	Re et al. (2017)
	0.452-52.2 (12.6)	2-231 (55.7)	
Αργεντινή	10.8	48.0	Romanelli et al., 2020
	5.74	25.4	
	13.1	57.9	
Ελλάδα (Βεργίνα)	0.565-18.0	2.5-79.6	Dermatas et al. (2015)
Ελλάδα (Εύβοια)	0.836-102	3.70-452	Remoundaki et al. (2016)
Ελλάδα (Κοζάνη)	0.725-31.2 (7.38)	3.21-138 (32.7)	Vasileiou et al. (2019)
Ελλάδα (Μαραθώνας)	0.903-39.5 (9.97)	4.00-175 (44.2)	Papazotos et al. (2019)
Ελλάδα (Θεσσαλία)	1.40-30.5	6.20-135	Charizopoulos et al. (2018)

(*) Με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι συγκεντρώσεις σε όρους αζώτου ή νιτρικών, ακριβώς όπως αναφέρονται στην εκάστοτε βιβλιογραφική πηγή, ενώ με γκρι χρώμα σημειώνονται σε όρους νιτρικών ή αζώτου, αντίστοιχα. Σε παρένθεση φαίνεται η μέση τιμή.

Το γεωλογικό υπόβαθρο της κάθε περιοχής είναι σημαντική παράμετρος για την έκταση και ένταση της ρύπανσης, διότι καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο τα επιφανειακά νερά τροφοδοτούν τα υπόγεια ή το αντίστροφο, καθώς και τον βαθμό αραίωσής τους (Egbi et al., 2019; Romanelli et al., 2020). Η ρύπανση των υπογείων υδροφορέων αποτελεί περίπλοκο φαινόμενο που είναι δύσκολο να μελετηθεί και έχει συχνά μακροχρόνιες επιπτώσεις στο περιβάλλον (Thirumalaivasan & Karmegan, 2001; Shrestha et al., 2016). Έτσι, σε σύγκριση με τα επιφανειακά νερά, η αποκατάσταση της ποιότητας των υπογείων νερών παρουσιάζει αυξημένο βαθμό δυσκολίας (Rahmati et al., 2014).

1.2.2 Βιομηχανική δραστηριότητα

Η συμβολή της βιομηχανικής δραστηριότητας στη ρύπανση του νερού από νιτρικά είναι μικρότερη σε σύγκριση με της γεωργικής και οφείλεται συνήθως σε διαρροές αποβλήτων από τις εγκαταστάσεις (Debernardi et al., 2008). Η γαλακτοβιομηχανία, η βιομηχανία επιμεταλλώσεων, όπλων και εκρηκτικών και η εξορυκτική και λατομική δραστηριότητα αποτελούν κλάδους της βιομηχανίας που μπορούν να επιβαρύνουν σημαντικά τα επιφανειακά και υπόγεια νερά με νιτρικά. Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 1.3, Πίνακας 1.4, Πίνακας 1.5) παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που περιέχονται σε υγρά απόβλητα ή σε υδάτινους αποδέκτες που δέχονται απόβλητα που προέρχονται από τη γαλακτοβιομηχανία, τη βιομηχανία όπλων και εκρηκτικών και τη μεταλλευτική και λατομική δραστηριότητα, αντίστοιχα.

Τα απόβλητα της βιομηχανίας γάλακτος προέρχονται από τα γαλακτοκομεία, το πλύσιμο των αρμεκτηρίων και τις απορροές από τις φάρμες, τα σιλό και τους χώρους ενσίρωσης (Rodgers et al., 2003; Hasan, 2023). Μεταξύ των γαλακτοκομικών προϊόντων, ο γλυκός ορός γάλακτος μπορεί να γίνει 60 έως 80 φορές πιο ρυπογόνος σε σύγκριση με τα αστικά λύματα, εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε λακτόζη, πρωτεΐνες, φώσφορο, νιτρικά και ολικό άζωτο (Bharati & Shinkar, 2013). Επίσης, συχνά χρησιμοποιείται νιτρικό οξύ για τον καθαρισμό των εγκαταστάσεων, το οποίο οδηγεί σε επιπλέον επιβάρυνση των αποβλήτων με νιτρικά (Hamdani et al., 2018).

Νιτρικό οξύ χρησιμοποιείται, επίσης, σε επιμεταλλώσεις αντικειμένων και στην παραγωγή εκρηκτικών. Έτσι, τα απόβλητα που προέρχονται από τις διεργασίες αυτές περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων (Gabaladón et al., 2007; Cyplik et al., 2012). Το νιτρικό αμμώνιο (AN) είναι το κύριο οξειδωτικό συστατικό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή δυναμίτη, σκόνης TNT και NG (νιτρογλυκερίνης), καθώς και άλλων εκρηκτικών που χρησιμοποιούνται στη μεταλλευτική δραστηριότητα, όπως ANFO, Slurry (πολτωδών μιγμάτων), Emulsion (γαλακτωμάτων) και Heavy ANFO (μίγματος ANFO με γαλάκτωμα) (Negovanoní et al., 2015). Τα αμμωνιακά ιόντα των εκρηκτικών υλών οξειδώνονται εύκολα σε νιτρικά, όταν απελευθερώνονται στο περιβάλλον, σύμφωνα με τους

μηχανισμούς που περιγράφονται στις αντιδράσεις (A.4) και (A.5) (Singh & Tripathi, 2007; Bosman, 2009).

Κατά τη μεταλλευτική δραστηριότητα τα νιτρικά ιόντα μπορεί να προέρχονται από (Bosman, 2009):

- την επαφή του αζώτου που περιέχεται στα πετρώματα με τον ατμοσφαιρικό αέρα, κυρίως κατά την επιφανειακή εκμετάλλευση (open-pit mining). Οι εξορυκτικές και λατομικές δραστηριότητες δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για την οξείδωση του αζώτου των πετρωμάτων σε νιτρικά.
- τα υπολείμματα εκρηκτικών που πιθανώς χρησιμοποιήθηκαν.

Στις επιφανειακές εκμεταλλεύσεις, στον πυθμένα των εκσκαφών, συσσωρεύεται συνήθως νερό (pitwater) το οποίο προέρχεται είτε από επιφανειακές απορροές, είτε από την πιεζομετρία του υπόγειου νερού. Το νιτρικά ιόντα που σχηματίζονται μετά τη νιτροποίηση του αζώτου των πετρωμάτων ή και των εκρηκτικών διαχέονται προς τους υπόγειους υδροφορείς, επιβαρύνοντας την ποιότητα του νερού όπου καταλήγουν (Bosman, 2009). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η νότια Αφρική, όπου η νιτρορρύπανση οφείλεται κυρίως στη μεταλλευτική και λατομική δραστηριότητα (Bosman, 2009; Maherry et al., 2010). Τέλος, η μεταλλευτική δραστηριότητα μπορεί να μεταβάλει τη μορφολογία του εδάφους έτσι, ώστε να ευνοείται η απορροή και συσσώρευση νιτρικών ιόντων στην περιοχή εκμετάλλευσης. Σε ανθρακωρυχείο της Κίνας διαπιστώθηκε ότι η εξορυκτική δραστηριότητα συντέλεσε σε καθίζηση του εδάφους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υγροβιότοπου, εξαιτίας των επιφανειακών απορροών των παρακείμενων αγροτικών εκτάσεων. Υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων περιείχαν τόσο τα ιζήματα του υγροβιότοπου (23.13-44.85 mg N/kg ή 102-199 mg NO₃⁻/kg), όσο και τα εδάφη τριγύρω από αυτόν (1.23-42.27 mg N/kg ή 5.45-187 mg NO₃⁻/kg) (Qing-jun et al., 2009).

Πίνακας 1.3: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που προέρχονται από τη γαλακτοβιομηχανία (*)

Γεωγραφική τοποθεσία	Προέλευση δείγματος	[NO ₃ ⁻ -N]	[NO ₃ ⁻]	Βιβλιογραφική Πηγή
		(mg/L)		
Ιράκ	Υγρά απόβλητα	0.361	1.60	Hasan (2023)
Ιρλανδία	Υγρά απόβλητα	20.9	92.4	Kiani et al. (2023)
Ινδία	Υγρά απόβλητα	31.4	139	Biswas et al. (2021)
Μαρόκο	Υγρά απόβλητα	675	2 989	Hamdani et al. (2018)
Γερμανία	Υγρά απόβλητα	250	1 107	Zayed & Winter (1998)
Ιρλανδία	Υδροφορέας που δέχεται υγρά απόβλητα	11.3-100	50.0-443	Rodgers et al. (2003)

(*) Με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι συγκεντρώσεις σε όρους αζώτου ή νιτρικών, ακριβώς όπως αναφέρονται στην εκάστοτε βιβλιογραφική πηγή, ενώ με γκρι χρώμα σημειώνονται σε όρους νιτρικών ή αζώτου, αντίστοιχα.

Πίνακας 1.4: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που προέρχονται από τη βιομηχανία επιμετάλλωσης και τη βιομηχανία όπλων (*)

Γεωγραφική τοποθεσία	Βιομηχανία	[NO ₃ ⁻ -N]	[NO ₃ ⁻]	Βιβλιογραφική Πηγή
		(mg/L)		
Ισπανία	Βιομηχανία επιμετάλλωσης	700-1 000	3 100-4 429	Gabaldón et al. (2007)
Πολωνία	Βιομηχανία όπλων	3 000	13 286	Cyplik et al. (2012)

(*) Με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι συγκεντρώσεις σε όρους αζώτου ή νιτρικών, ακριβώς όπως αναφέρονται στην εκάστοτε βιβλιογραφική πηγή, ενώ με γκρι χρώμα σημειώνονται σε όρους νιτρικών ή αζώτου, αντίστοιχα.

Πίνακας 1.5: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που προέρχονται από μεταλλευτικές και εξορυκτικές δραστηριότητες σε υπόγειους υδροφορείς (*)

Γεωγραφική τοποθεσία	Μεταλλεύματα/ Λατομικά ορυκτά	[NO ₃ ⁻ -N]	[NO ₃ ⁻]	Βιβλιογραφική Πηγή
		(mg/L)		
Αφρική	Λευκόχρυσος	20.9-57.6	92.3-255	Bosman (2009)
Φινλανδία	Χρυσός	15.5	68.6	Mattila et al. (2007)
Φινλανδία	Χρώμιο	20.3	89.9	Mattila et al. (2007)
Καναδάς	Χαλκός-Μολυβδαίνιο	15-30	66.4-133	Pommen (1983)
Ελλάδα	Νικελιούχος Λειμωνίτης	0.971-1.67	4.30-7.40	Remoundaki et al. (2016)
Καναδάς	Ουράνιο	53-350	234-1 550	Pommen (1983)
Καναδάς	Άνθρακας	>90	>398	Pommen (1983)
ΗΠΑ	Άνθρακας	0.3-2.1	1.3-9.3	Pommen (1983)
ΗΠΑ, Μεξικό	Άνθρακας	20	88.6	Pommen (1983)
Φινλανδία	Απατίτης-Ασβεστόλιθος-Μίκα	44.0	195	Mattila et al. (2007)

(*) Με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι συγκεντρώσεις σε όρους αζώτου ή νιτρικών, ακριβώς όπως αναφέρονται στην εκάστοτε βιβλιογραφική πηγή, ενώ με γκρι χρώμα σημειώνονται σε όρους νιτρικών ή αζώτου, αντίστοιχα.

1.2.3 Μεταλλουργία/Υδρομεταλλουργία: HNO₃/HCl ως εκχυλιστικά μέσα

Η σύγχρονη τάση στον τομέα της υδρομεταλλουργίας είναι η ανάκτηση μετάλλων από απόβλητα ηλεκτρικού και ηλεκτρονικού εξοπλισμού (ΑΗΗΕ ή e-waste ή WEEE -Waste Electrical and Electronic Equipment) (Tuncuk et al., 2012; Akcil et al., 2015; Birloaga & Vegliò, 2016; Chagnes et al., 2016; Birloaga & Vegliò, 2018; Vegliò & Birloaga, 2018; Goodship et al., 2019; Tolio et al., 2019; Rao et al., 2020; Birloaga & Vegliò, 2022; Mir & Dhawan, 2022; Do et al. 2023). Ως ΑΗΗΕ ορίζεται κάθε απόβλητο

εξοπλισμού του οποίου η ορθή λειτουργία εξαρτάται από ηλεκτρικά ρεύματα ή ηλεκτρομαγνητικά πεδία και κάθε απόβλητο εξοπλισμού χρήσιμου για την παραγωγή, τη μεταφορά και τη μέτρηση των ρευμάτων και των πεδίων αυτών, συμπεριλαμβανομένων όλων των κατασκευαστικών στοιχείων, των συναρμολογημένων μερών και των αναλωσίμων, που συνιστούν τμήμα του προϊόντος κατά τον χρόνο απόρριψής του (Οδηγία 2012/19/ΕΕ). Τα ΗΗΕ περιλαμβάνουν οικιακές συσκευές (πχ ψυγεία, ηλεκτρικές σκούπες), εξοπλισμό τεχνολογίας πληροφοριών και επικοινωνιών (πχ Η/Υ, τηλέφωνα), καταναλωτικά είδη και φωτοβολταϊκά πλαίσια (πχ τηλεοράσεις, ραδιόφωνα), είδη φωτισμού, εργαλεία (πχ τρυπάνια), παιχνίδια και εξοπλισμό αναψυχής και αθλητισμού (πχ βιντεοπαιχνίδια), ιατρικά βοηθήματα (πχ καρδιολογικός εξοπλισμός), όργανα παρακολούθησης και ελέγχου (πχ θερμοστάτες) και αυτόματοι διανομείς (πχ ΑΤΜ) (Οδηγία 2012/19/ΕΕ).

Τα ΑΗΗΕ αποτελούν την κατηγορία αποβλήτων με τον ταχύτερο ρυθμό ετήσιας αύξησης (3%-5%) σε παγκόσμιο επίπεδο (Widmer et al., 2005; Hankoon et al., 2018). Η μειωμένη διάρκεια ζωής των τεχνολογικών προϊόντων που αποτελούν πλέον μέρος της καθημερινότητας, όπως τηλεφώνων και Η/Υ, η έλλειψη ενιαίας στρατηγικής για τη διαχείριση των ΑΗΗΕ σε διεθνές επίπεδο (Hankoon et al., 2018; Isildar et al., 2019) και το χαμηλό ποσοστό ανακύκλωσης (Forti et al., 2020) σχετίζονται με τη διαχρονική συσσώρευσή τους (Krausmann et al., 2017; Rauch, 2009). Ενδεικτικά, το 1992 τα παραγόμενα ΑΗΗΕ εκτιμάται ότι ζύγιζαν 14 Mt, το 2016 47.7 Mt και αναμένεται ότι το 2030 θα φθάσουν τους 74.7 Mt, αριθμός που αντιστοιχεί σε 9 kg/άτομο (Hao et al., 2020; Forti et al., 2020). Σε ευρωπαϊκό επίπεδο η ποσότητα ΑΗΗΕ που παράγεται ακολουθεί παρόμοια τάση: από το 2005 έως το 2019 αυξήθηκε από 7 Mt σε 12 Mt που αντιστοιχούν στο 22.4% της παγκόσμιας παραγωγής (Zoeteman et al., 2010; Forti et al., 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα κράτη της βόρειας Ευρώπης κατέχουν το υψηλότερο ποσοστό ανακύκλωσης ΑΗΗΕ παγκοσμίως που φθάνει το 59% (Forti et al., 2020).

Η ανάκτηση μετάλλων από ΑΗΗΕ έχει πληθώρα οικονομικών και περιβαλλοντικών πλεονεκτημάτων που διασφαλίζουν τη δημόσια υγεία και ασφάλεια και συμβαδίζουν με τις αρχές της αστικής μεταλλευτικής (urban mining) και της κυκλικής οικονομίας (circular economy) (Jacobs, 1970; Zhang et al., 2012; Kaya, 2016; Kumar et al., 2017; COM(2020) 474, 2020). Τα οικονομικά οφέλη σχετίζονται με την ανάγκη για ολοένα και μικρότερη εξόρυξη νέων πρώτων υλών από τα μεταλλεύματα, τα οποία συχνά περιέχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλων σε σύγκριση με τα ΑΗΗΕ, ενώ η πρόσβαση της Ευρώπης σε αυτά είναι περιορισμένη (Kumar et al., 2017, COM(2020) 474, 2020). Τα περιβαλλοντικά οφέλη σχετίζονται με τον περιορισμό τόσο των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου που απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα κατά την κατεργασία των φυσικών μεταλλευμάτων, όσο και των επικίνδυνων και τοξικών μετάλλων που μπορούν να καταλήξουν στο περιβάλλον και στα οικοσυστήματα, θέτοντας ταυτόχρονα σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία και ασφάλεια (Kumar et al., 2017).

Το πλέον αξιοποιήσιμο κλάσμα των ΑΗΗΕ είναι οι πλακέτες τυπωμένων κυκλωμάτων (ΠΤΚ ή PCBs). Αποτελούν περίπου το 3% του βάρους των ΑΗΗΕ (Goodship et al., 2019), περιέχουν έως και το 30% του

βάρους τους σε μέταλλα (Οδηγία 2012/19/ΕΕ) και η περιεκτικότητά τους σε μέταλλα μπορεί να υπερβαίνει κατά 10 έως 100 φορές αυτή των συμβατικών μεταλλευμάτων (Rao et al., 2020). Περιέχουν κυρίως χαλκό (Cu), ψευδάργυρο (Zn), κασσίτερο (Sn), μόλυβδο (Pb), σίδηρο (Fe), νικέλιο (Ni), χρυσό (Au), άργυρο (Ag) και παλλάδιο (Pd) (Καγα, 2016). Το μεταλλικό περιεχόμενο των ΠΤΚ μπορεί να ανακτηθεί εφαρμόζοντας πυρομεταλλουργικές, υδρομεταλλουργικές, ηλεκτρομεταλλουργικές και βιο-υδρομεταλλουργικές διεργασίες (Birloaga & Vegliò, 2018; Vegliò & Birloaga, 2018; Johnson et al., 2023; Καγα, 2016). Οι υδρομεταλλουργικές διεργασίες (Birloaga & Vegliò, 2016, 2022) μπορούν να εφαρμοστούν σε βιομηχανίες ανακύκλωσης ΑΗΗΕ μικρής κλίμακας, ευνοούν την αποκεντρωμένη και βιώσιμη ανάκτηση καθαρών μετάλλων (Tuncuk et al., 2012; Chagnes et al., 2016) ενώ αποφεύγονται οι υψηλές απαιτήσεις σε ενέργεια και οι σύνθετες εγκαταστάσεις όπως συμβαίνει στην περίπτωση της πυρομεταλλουργίας (Tolio et al., 2019). Η υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων περιλαμβάνει δύο στάδια, πρώτον, την εκχύλιση των μετάλλων και, δεύτερον, τον διαχωρισμό/εκλεκτική καταβύθιση των μετάλλων από το κυοφορούν διάλυμα (Pregnant Leaching Solution - PLS).

Οι υδρομεταλλουργικές διεργασίες περιλαμβάνουν, μεταξύ άλλων, την εκχύλιση των μετάλλων με ισχυρά οξειδωτικά μέσα, όπως το νιτρικό οξύ (HNO_3), το υδροχλωρικό οξύ (HCl), το βασιλικό νερό (aqua regia-μίγμα HNO_3 και HCl) και άλλες ενώσεις, όπως το χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) (Bosman, 2009). Ειδικά σε ότι αφορά την εκχύλιση χρυσού από ΠΤΚ, και γενικότερα ΑΗΗΕ, προτιμάται η χρήση βασιλικού νερού (3:1, HCl:HNO₃), εξαιτίας της υψηλής αποτελεσματικότητας, της εύκολης και ευέλικτης διαχείρισης και της οικονομίας που προσφέρει σε σύγκριση με άλλα εκχυλιστικά μέσα, όπως το κυάνιο και τα αλογόνα (Akcil et al. 2015; Rao et al. 2020; Mir & Dhawan 2022; Do et al. 2023; Vlasopoulos et al., 2023). Αντίστοιχα, για την εκχύλιση αργύρου χρησιμοποιείται νιτρικό οξύ (Sadrnezhad et al. 2006; Birloaga & Vegliò 2018; Vlasopoulos et al., 2023). Μετά την εκχύλιση των μετάλλων, η εκλεκτική καταβύθισή τους πραγματοποιείται με χημικές ενώσεις, όπως ο χλωριούχος σίδηρος (FeCl_2) για την καταβύθιση του χρυσού, το χλωριούχο νάτριο (NaCl) για την καταβύθιση του αργύρου με τη μορφή χλωριούχου αργύρου (AgCl) και το υδροξείδιο του αμμωνίου (NH_4OH) για την καταβύθιση της πλατίνας με τη μορφή εξαχλωρολευκοχρυσικού αμμωνίου ($(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$), οι οποίες περιέχουν ιόντα χλωρίου και αμμωνίου (Bosman, 2009). Ειδικότερα, για την ανάκτηση αργύρου από ΠΤΚ, και γενικότερα ΑΗΗΕ, βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν τη χρήση χλωριούχου νατρίου (Theocharis et al. 2022; Vlasopoulos et al., 2023).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.6) παρουσιάζονται βιβλιογραφικές αναφορές που αναφέρουν τη σύσταση αποβλήτων που προέρχονται από υδρομεταλλουργικές διεργασίες. Σύμφωνα με τον πίνακα αυτόν, είναι δυνατόν να παράγονται ροές με υψηλές συγκεντρώσεις σε νιτρικά ιόντα, χλωριόντα και διαλυτά είδη μετάλλων. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα αμμωνιακά ιόντα που περιέχουν, εάν απελευθερωθούν στο περιβάλλον, μπορούν εύκολα να καταλήξουν στους υδροφορείς, εξαιτίας της

υψηλής τους διαλυτότητάς του και, στη συνέχεια, να οξειδωθούν σε νιτρικά, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (A.4) και (A.5).

Πίνακας 1.6: Σύσταση αποβλήτων που προέρχονται από υδρομεταλλουργικές διεργασίες (*)

Παράμετρος	Ανάκτηση αργύρου από σκραπ		Ανάκτηση πολύτιμων μετάλλων		Αποσκωρίωση ανοξειδωτού χάλυβα
	Gomółka et al. (1988)	Hirata et al. (2001)	Yoshie et al. (2002)	Ramírez et al. (2017)	
[NO ₃ ⁻ -N]	1 950	2 200	1 000-4 000	457.5	
[NO ₃ ⁻]	8 636	9 743	4 428-17 715	2 026	
[NO ₂ ⁻ -N]				1.7	
[NH ₃ -N]				9.5	
pH	(-)	9.12		3.17	
Cu ²⁺	700	✓			
Fe ²⁺	0	✓		133.2	
Zn ²⁺	2.7	✓			
Ni ²⁺				30.3	
Sn ²⁺	(mg/L)			26.3	
Pb ²⁺	1.9	✓			
Ag ²⁺	7.0				
Na ⁺	2 480	✓			
Cl ⁻	3 830	✓	2%-5% NaCl		

(*) Με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι συγκεντρώσεις σε όρους αζώτου ή νιτρικών, ακριβώς όπως αναφέρονται στην εκάστοτε βιβλιογραφική πηγή, ενώ με γκρι χρώμα σημειώνονται σε όρους νιτρικών ή αζώτου, αντίστοιχα.

1.2.4 Άλλες πηγές

Εκτός από την αγροτική και τη βιομηχανική δραστηριότητα, η νιτρορρύπανση μπορεί να οφείλεται και στην αστική δραστηριότητα (πχ πρατήρια καυσίμων, μηχανουργεία, σηπτικές δεξαμενές), την τουριστική ανάπτυξη και τις χωματερές (Zhang et al., 2015; Rezende et al., 2019; da Silva Peixoto et al., 2020). Επιπρόσθετα, οι Romanelli et al. (2020) εκτιμούν ότι η ατμοσφαιρική εναπόθεση μπορεί να συντελέσει στη ρύπανση των υδάτινων αποδεκτών από νιτρικά σε ποσοστό 5%-15%.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.7) παρουσιάζονται ενδεικτικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων στα υπόγεια νερά, ανάλογα με την προέλευσή τους, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Πίνακας 1.7: Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που προέρχονται από δραστηριότητες πλην των αγροτικών και των βιομηχανικών (*)

Γεωγραφική τοποθεσία	Δραστηριότητα	[NO ₃ ⁻ -N]	[NO ₃ ⁻]	Βιβλιογραφική Πηγή
		(mg/L)		
Βραζιλία	Αστική	0.1-33.2 (11.6)	0.44-147 (51.4)	da Silva Peixoto et al. (2020)
		0.4-35.6 (10.6)	1.77-158 (46.9)	
Βραζιλία	Αστική-Πρατήρια καυσίμων-Μηχανουργεία	0.427-17.5 (8.97)	1.89-77.4 (39.7)	Rezende et al. (2019)
Κίνα	Χωματερή	8.61	38.1	Zhang et al. (2015)

(*) Με μαύρο χρώμα σημειώνονται οι συγκεντρώσεις σε όρους αζώτου ή νιτρικών, ακριβώς όπως αναφέρονται στην εκάστοτε βιβλιογραφική πηγή, ενώ με γκρι χρώμα σημειώνονται σε όρους νιτρικών ή αζώτου, αντίστοιχα. Σε παρένθεση φαίνεται η μέση τιμή.

1.3 Επιπτώσεις: Υγεία – Οικοσυστήματα

Σε πολλές περιοχές του κόσμου οι άνθρωποι καλύπτουν ανάγκες τους σε πόσιμο νερό αντλώντας νερό από γεωργήσεις, τις περισσότερες φορές χωρίς να προηγηθεί κατάλληλη επεξεργασία σε αυτό (Reddy et al., 2009; Yu et al., 2020). Μάλιστα, ενώ συνήθως δίνεται έμφαση στην εκτίμηση του κινδύνου που προκαλεί στην ανθρώπινη υγεία η παρουσία ουσιών όπως βαρέων μετάλλων, οργανικών ρυπαντών και φυτοφαρμάκων, η παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων νιτρικών δεν αξιολογείται (Yu et al., 2020). Ενδεικτικά, οι Parslow et al. (1997) αναφέρουν συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων 40 mg/L ή 9.04 mg N/L σε δίκτυο διανομής νερού στο Γιορκσάιρ της Αγγλίας και οι van Maanen et al. (2000) συγκεντρώσεις 41.19 mg/L ή 9.30 mg N/L σε δίκτυο διανομής νερού στην Ολλανδία.

Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές που μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία. Τα νεογνά είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στην κατανάλωση αυξημένων συγκεντρώσεων νιτρικών που έχει ως συνέπειες μεθαιμογλοβιναιμία ή κυάνωση (blue baby syndrome). Η ασθένεια αυτή προσβάλλει κυρίως βρέφη κάτω των 6 μηνών, δημιουργεί όψη μπλεγκρίζου χρώματος, προκαλεί εκνευρισμό ή λήθαργο, ενώ σε προχωρημένη κατάσταση μπορεί να οδηγήσει σε κώμα ή ακόμη και σε θάνατο (Knobeloch et al., 2000; WHO, 2017). Οι λόγοι εμφάνισης μεθαιμογλοβιναιμίας, συνηθέστερα στα νεογνά, σχετίζονται με το χαμηλό τους βάρος, τη χαμηλή οξύτητα στομάχου και την έλλειψη ειδικών ενζύμων που μπορούν να αντιστρέψουν την τοξικότητα που προκαλεί η παρουσία των νιτρικών στο οργανισμό (Fuquay et al., 2011; WHO, 2017). Η μακροχρόνια κατανάλωση νιτρικών (έως 264 mg/L) μέσω πόσης ή παρασκευής φαγητού σχετίζεται με προβλήματα του θυρεοειδούς αδένα, όπως αυξημένο όγκο θυρεοειδούς, αυξημένα επίπεδα

θυρεοειδοτρόπου ορμόνης και παρουσία θυρεοειδικών αντισωμάτων σε ενήλικους (Tajtakóna et al., 2006; WHO, 2017).

Μελέτες έχουν δείξει ότι συγκεντρώσεις νιτρικών περίπου 26 mg/L στο νερό που καταναλώνουν έγκυες γυναίκες σχετίζονται με βλάβες στο κεντρικό νευρικό σύστημα των νεογνών (Arbuckle et al., 1988). Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η συστηματική κατανάλωση νερού που περιέχει συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων υψηλότερες από 5 mg/L κατά το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης σχετίζονται με συγγενείς ανωμαλίες στα νεογνά, όπως ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα, σχιστία χείλους και ελλείψεις των άκρων (Brender et al., 2013). Επίσης, έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων και της εμφάνισης παιδικού διαβήτη και επιπτώσεων στο πάγκρεας (Parslow et al., 1997; van Maanen et al., 2000). Οι van Maanen et al. (2000) εντοπίζουν την κρίσιμη συγκέντρωση νιτρικών που μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση παιδικού διαβήτη σε 25 mg/L, οι Parslow et al. (1997) σε 14.85 mg/L και οι Kostraba et al. (1992) σε ακόμη χαμηλότερη τιμή, δηλαδή έως 8.2 mg/L. Άλλες έρευνες συσχετίζουν την παρουσία νιτρικών με την εμφάνιση καρκίνου, κυρίως στο γαστρεντερικό (Ward et al., 2018). Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν συγγενείς δυσπλασίες, εμφάνιση παιδικού διαβήτη και διάφορους τύπους καρκίνου παραμένουν ανεπαρκή για την εξαγωγή οριστικών συμπερασμάτων (WHO, 2017).

Η εκτίμηση του κινδύνου από τη χρήση νερού που περιέχει νιτρικά και, γενικότερα, τοξίνες από τον άνθρωπο πραγματοποιείται με τη βοήθεια δεικτών όπως ο CDI (Chronic Daily Intake) και ο DAD (Daily Absorbed Dose). Οι δείκτες αυτοί λαμβάνουν υπόψη τη συγκέντρωση νιτρικών στο πόσιμο νερό και δείχνουν την ποσότητα αυτής (ανά μονάδα ανθρώπινου βάρους) που μπορεί να απορροφηθεί από τον οργανισμό μέσω της κατανάλωσης νερού και φαγητού και μέσω επαφής με το δέρμα, αντίστοιχα. Βάση αυτών, μπορεί να υπολογιστεί ο βαθμός έκθεσης του ανθρώπου σε συγκεκριμένη συγκέντρωση νιτρικών σε συνάρτηση με τα όρια που τίθενται από τους αρμόδιους οργανισμούς (Yu et al., 2020). Ο κίνδυνος έκθεσης των ανηλίκων στην κατανάλωση ρυπασμένου νερού με νιτρικά είναι υψηλότερος σε σχέση με των ενηλίκων, εξαιτίας της αυξημένης απορρόφησης συγκεκριμένων ουσιών από το γαστρεντερικό τους σύστημα (Chen et al., 2016). Επίσης, ο κίνδυνος έκθεσης που προκύπτει από την κατανάλωση ρυπασμένου νερού είναι υψηλότερος, σε σύγκριση με τη δερματική επαφή με αυτό (Yu et al., 2020). Η USEPA (2001) θέτει ως ανώτατο όριο για την κατανάλωση νιτρικών τα 1.6 mg/kg/d.

Εκτός από τις επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία, η παρουσία νιτρικών ιόντων μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και στην ισορροπία των οικοσυστημάτων. Για παράδειγμα, αγελάδες που καταναλώναν νερό με νιτρικά παρουσίασαν συμπτώματα, όπως δυσκολία στην αναπνοή, ρίγος, αποχρωματισμό των βλεννογόνων, πνευμονική συμφόρηση και συμφόρηση μεγάλης κοιλίας, καρδιακή αιμορραγία, οίδημα και υπεραϊμία του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου, ακόμη και θάνατο (Al-Qudah et al., 2009). Όσον αφορά στα οικοσυστήματα, τα νιτρικά ιόντα μπορούν να συμβάλλουν

στη δημιουργία όξινης βροχής και στο φαινόμενο του θερμοκηπίου (Boningari & Smirniotis, 2016; Hillel et al., 2005). Η παρουσία νιτρικών ιόντων στους υδάτινους αποδέκτες μπορεί να οδηγήσει στο φαινόμενο του ευτροφισμού. Ο ευτροφισμός οφείλεται στις υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων που αποτελούν πηγή αζώτου για τη σύνθεση πρωτεϊνών και χλωροφύλλης από τα υδρόβια φυτά και τα άλγη με σκοπό τη φωτοσύνθεση (Moloantoa et al., 2022), με αποτέλεσμα να ευνοείται η ανάπτυξη φυτοπλαγκτού στην επιφάνεια του αποδέκτη, καθώς και βενθικών οργανισμών, και να υποβαθμίζεται η ποιότητα του νερού (Karydis and Kitsiou, 2012; Rittmann & McCarty, 2020; Moloantoa et al., 2022). Κάποια από τα άλγη αυτά, που ανήκουν στις ομάδες των κυανοβακτηρίων, των απτοφύτων και των δινομαστιγωτών, αλλά και ουσίες που αυτά παράγουν, είναι τοξικά για πολλούς υδρόβιους οργανισμούς, όπως τα ψάρια του γλυκού νερού, και μπορούν να προκαλέσουν ακόμη και θάνατο (Burkholder et al., 1997; Burkholder et al., 2007; Karydis and Kitsiou, 2012). Μάλιστα, έχουν καταγραφεί περιστατικά δηλητηρίασης σε ανθρώπους που κατανάλωσαν οστρακόδερμα που περιείχαν τοξίνες δινομαστογωτών (Karydis and Kitsiou, 2012). Ευτροφισμός μπορεί να παρατηρηθεί σε ποτάμια, λίμνες, παράκτια νερά, όπως κλειστούς κόλπους και λιμάνια, αλλά και στους ωκεανούς (Monteagudo et al., 2012; Karydis & Kitsiou, 2012; Laffoley & Baxter, 2019; Romanelli et al., 2020).

Η σημαντικότερη επίπτωση του ευτροφισμού στους αποδέκτες είναι η μείωση του διαλυτού οξυγόνου (αποξυγόνωση ή υποξία) που οφείλεται στη δέσμευση του διαλυτού οξυγόνου κατά τη οξείδωση/νιτροποίηση του αμμωνιακού αζώτου (Rittmann & McCarty, 2020). Η αποξυγόνωση οδηγεί σε διαταραχή της ισορροπίας των οικοσυστημάτων (πχ περιορισμένη τροφή, διαταραχές στην ανάπτυξη, μετανάστευση ειδών) και σε περιορισμό της βιοποικιλότητας, για παράδειγμα μέσω της μείωσης του βενθικού πληθυσμού και της εξαφάνισης ειδών, με αντίκτυπο στην αλιεία της περιοχής (Karydis, 2009; Karydis and Kitsiou, 2012; Laffoley & Baxter, 2019). Η δυσάρεστη οσμή που εκλύεται από τις διεργασίες σήψης καθιστούν τα νερά μη ελκυστικά για τουρισμό, κολύμβηση και αθλητικές δραστηριότητες (πχ Αδριατική), γεγονός που, σε συνδυασμό με την αισθητική υποβάθμιση του τοπίου, μπορεί να πλήξει την οικονομία της περιοχής (Karydis and Kitsiou, 2012).

1.4 Νομοθεσία

Οι σοβαρές επιπτώσεις που προκαλούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων στην υγεία και στα οικοσυστήματα οδήγησαν στη θέσπιση ορίων από διεθνείς (πχ Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας-ΠΟΥ) και εθνικούς οργανισμούς (πχ Εθνικό Πρότυπο για την Υγιεινή του Πόσιμου Νερού, Κίνα). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.8) παρουσιάζονται ενδεικτικά όρια νιτρικών ιόντων στο πόσιμο νερό, ώστε αυτό να καθίσταται ασφαλές προς κατανάλωση. Επίσης, στις παραγράφους που ακολουθούν παρουσιάζεται η ευρωπαϊκή και εθνική νομοθεσία που στοχεύει στον περιορισμό των επιπτώσεων που προκαλεί η παρουσία νιτρικών στους φυσικούς αποδέκτες και τη δημόσια υγεία.

Πίνακας 1.8: Ενδεικτικά όρια συγκέντρωσης νιτρικού αζώτου στο πόσιμο νερό σύμφωνα με διεθνείς και εθνικούς οργανισμούς

Οργανισμός	[NO ₃ ⁻ -N] (mg/L)	[NO ₃ ⁻] (mg/L)
	11.3	50
Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) (WHO, 2017)	με $C_{NO_3-N}/11.3 + C_{NO_2-N}/0.913 \leq 1$, όπου, C_{NO_3-N} , η συγκέντρωση νιτρικών σε όρους αζώτου C_{NO_2-N} , η συγκέντρωση νιτρωδών σε όρους αζώτου	με $C_{NO_3}/50 + C_{NO_2}/3 \leq 1$, όπου, C_{NO_3} , η συγκέντρωση νιτρικών C_{NO_2} , η συγκέντρωση νιτρωδών
Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος ΗΠΑ (USEPA, 2009)	10	44.3
Εθνικό Πρότυπο για την Υγιεινή του Πόσιμου Νερού της Κίνας (China CDC, 2006)	20	88,6

1.4.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Η ευρωπαϊκή νομοθεσία που έχει ως στόχο τον περιορισμό των αρνητικών επιπτώσεων που προκαλούνται εξαιτίας της παρουσίας νιτρικών και νιτρωδών ιόντων τόσο στους φυσικούς αποδέκτες, όσο και στην ανθρώπινη υγεία περιλαμβάνει:

- Την Οδηγία 91/676/ΕΟΚ «για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορύπανση γεωργικής προέλευσης», όπως τροποποιήθηκε από τον Κανονισμό αριθμ. 1882/2003 και τον Κανονισμό αριθμ. 1137/2008.
- Την Οδηγία 91/271/ΕΟΚ «για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων», όπως τροποποιήθηκε από την Οδηγία 98/15/ΕΚ, τον Κανονισμό αριθμ. 1882/2003, τον Κανονισμό αριθμ. 1137/2008 και την Οδηγία 2013/64/ΕΕ και όπως διορθώθηκε σύμφωνα με το ΕΕ L 237 του 2016.
- Την Οδηγία 2000/60/ΕΚ «για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων», όπως τροποποιήθηκε από την Απόφαση αριθ. 2455/2001/ΕΚ, την Οδηγία 2008/32/ΕΚ, την Οδηγία 2008/105/ΕΚ, την Οδηγία 2009/31/ΕΚ, την Οδηγία 2013/39/ΕΕ, την Οδηγία 2013/64/ΕΕ και την Οδηγία 2014/101/ΕΕ.
- Την Οδηγία 2006/118/ΕΚ «σχετικά με την προστασία των υπογείων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση», όπως τροποποιήθηκε από την Οδηγία 2014/80/ΕΕ.
- Η Οδηγία 2010/75/ΕΕ «περί βιομηχανικών εκπομπών – ολοκληρωμένη πρόληψη και έλεγχος της ρύπανσης», όπως διορθώθηκε σύμφωνα με το ΕΕ L 158 του 2012.
- Η Οδηγία 2020/2184/ΕΕ «σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης».

Οδηγία 91/676/ΕΟΚ «για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης»

Κατά τις πρώτες δεκαετίες θέσπισης της ευρωπαϊκής νομοθεσίας για την προστασία του νερού (1970-1990) πραγματοποιήθηκε συστηματική παρακολούθηση της συγκέντρωσης νιτρικών σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων σε ορισμένες περιοχές των κρατών μελών και υπέρμετρη χρήση αζωτούχων λιπασμάτων και κόπρου. Διαπιστώθηκε ότι η κύρια αιτία για τη διάχυτη ρύπανση του νερού στην Κοινότητα ήταν τα νιτρικά ιόντα γεωργικής προέλευσης. Όλα τα παραπάνω οδήγησαν στην έκδοση της Οδηγίας 91/676/ΕΟΚ «για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης». Στόχος της Οδηγίας αυτής είναι η μείωση της ρύπανσης του νερού που προκαλείται άμεσα ή έμμεσα από νιτρικά ιόντα γεωργικής προέλευσης στα κράτη μέλη και η πρόληψη της περαιτέρω ρύπανσης αυτού του είδους, με τους εξής τρόπους:

- Καθορισμός των ευπρόσβλητων ζωνών για νιτρορρύπανση (ZEN) σε κάθε κράτος μέλος, τουλάχιστον ανά τέσσερα έτη. ZEN δύναται να αποτελούν περιοχές ξηράς που απορρέουν σε επιφανειακά νερά με συγκεντρώσεις νιτρικών άνω των 25 mg/L, σε υπόγεια νερά με συγκεντρώσεις νιτρικών άνω των 50 mg/L και σε νερά (λιμναία, ποτάμια, παράκτια, θαλάσσια) όπου διαπιστώνεται ότι αντιμετωπίζουν ή μπορεί να αντιμετωπίσουν ευτροφισμό στο άμεσο μέλλον. Οι ZEN είναι δυνατό να αναθεωρούνται ανά τέσσερα έτη.
- Θέσπιση ενός ή περισσότερων κωδικών ορθής γεωργικής πρακτικής και διαμόρφωση προγράμματος προώθησής τους. Οι κώδικες ορθής γεωργικής πρακτικής περιλαμβάνουν κυρίως κανόνες σχετικά με το χρόνο και τρόπο διασποράς και αποθήκευσης λιπασμάτων και κόπρου, καθώς και τη διαχείριση της γης, της χρήσης γης και των αρδευτικών συστημάτων.
- Εκπόνηση προγραμμάτων δράσης στις ZEN, ώστε να επιταχυνθούν οι στόχοι της Οδηγίας. Τα προγράμματα δράσης λαμβάνουν υπόψη τις εισροές αζώτου, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τους κώδικες ορθής γεωργικής πρακτικής στις ZEN και περιλαμβάνουν υποχρεωτικά μέτρα για τον χρόνο διασποράς, την αποθήκευση και τις ποσότητες διασποράς λιπασμάτων και κόπρου. Τα προγράμματα δράσης παρακολουθούνται και αξιολογούνται τουλάχιστον ανά τέσσερα έτη. Επίσης, παρακολουθείται η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στους επιφανειακούς και υπόγειους αποδέκτες σε επιλεγμένα σημεία, ώστε να προσδιορίζεται η έκταση της νιτρορρύπανσης.

Οδηγία 91/271/ΕΟΚ «για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων»

Η Οδηγία 91/271/ΕΟΚ «για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων» που αφορά τη συλλογή, την επεξεργασία και την απόρριψη αστικών λυμάτων και την επεξεργασία και την απόρριψη λυμάτων από ορισμένους βιομηχανικούς τομείς του πρωτογενούς τομέα, με στόχο την προστασία του περιβάλλοντος από τις αρνητικές επιπτώσεις της απόρριψης των λυμάτων αυτών. Ενδεικτικά, έως τότε είχε παρατηρηθεί ότι η ρύπανση που οφείλεται σε ανεπαρκή επεξεργασία των λυμάτων σε ένα κράτος

μέλος συχνά επηρεάζει τα νερά άλλων κρατών μελών, ότι συχνά παραλείπεται η δευτεροβάθμια επεξεργασία¹ των λυμάτων αν και αναγκαία και ότι βιομηχανικά λύματα διατίθονταν ανεξέλεγκτα στο αποχετευτικό δίκτυο. Πρωταρχικό μέλημα αποτέλεσε η κατασκευή δικτύου αποχέτευσης για οικισμούς με ισοδύναμο πληθυσμό (ι.π.)² άνω των 2 000 που θα καταλήγουν σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων όπου υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία (δευτεροβάθμια ή μη) και η οποία εξασφαλίζει ότι οι παράμετροι ελέγχου της εκροής ικανοποιούν τα όρια που έχουν τεθεί ανάλογα με το είδος του αποδέκτη (ευαίσθητος ή λιγότερο ευαίσθητος) (Πίνακας 1.9). Ένας αποδέκτης ορίζεται ως ευαίσθητος όταν παρουσιάζει ή μπορεί στο άμεσο μέλλον να παρουσιάσει ευτροφισμό. Ο κατάλογος των ευαίσθητων και λιγότερο ευαίσθητων περιοχών επανεξετάζεται τουλάχιστον ανά τετραετία. Στην Οδηγία αναφέρεται για πρώτη φορά η επαναχρησιμοποίηση των επεξεργασμένων λυμάτων και της λυματολάσπης.

Πίνακας 1.9: Όρια παραμέτρων για απορρίψεις από σταθμούς επεξεργασίας αστικών λυμάτων (Οδηγία 91/271/ΕΟΚ)

Παράμετρος		Συγκέντρωση		Ελάχιστη μείωση σε σχέση με την εισροή (%)
	BOD5	25	mg/L O ₂	70-90
	COD	125	mg/L O ₂	75
	Ολικά αιωρούμενα στερεά (προαιρετικά)	35	mg/L	90
Σε ευαίσθητους αποδέκτες	Ολικός φώσφορος	1	mg/L P (ι.π. >100 000)	80
		2	mg/L P (ι.π. 10 000-100 000)	
	Ολικό άζωτο	10	mg/L N (ι.π. >100 000)	70-80
		15	mg/L N (ι.π. 10 000-100 000)	

Οδηγία 2000/60/ΕΚ «για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων»

Η Οδηγία 2000/60/ΕΚ αποτέλεσε εξέλιξη και σύμπτυξη των πρώτων Οδηγιών της τότε Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας που αφορούσαν την προστασία του νερού από φαινόμενα ρύπανσης. Πιο συγκεκριμένα, η ευρωπαϊκή πολιτική για το περιβάλλον ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970 με την Οδηγία 75/440/ΕΟΚ: «περί της απαιτούμενης ποιότητας των υδάτων επιφανείας που προορίζονται για την παραγωγή πόσιμου νερού στα κράτη μέλη» η οποία είχε βασικούς στόχους τη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος και της περαιτέρω υποβάθμισής του, την προστασία της δημόσιας υγείας και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής στο πλαίσιο των τότε νέων τεχνικών και επιστημονικών γνώσεων. Η Οδηγία αυτή έθετε ελάχιστες απαιτήσεις σε φυσικές, χημικές και μικροβιολογικές παραμέτρους που έπρεπε να ικανοποιούνται στα επιφανειακά νερά που προορίζονταν για ανθρώπινη κατανάλωση και

καθόριζε τον τρόπο επεξεργασίας τους, σε περίπτωση που οι ελάχιστες αυτές απαιτήσεις δεν ικανοποιούνταν. Όριζε τρεις κατηγορίες για τους επιφανειακούς υδάτινους αποδέκτες (A1, A2, A3), ανάλογα με τις τιμές των παραμέτρων ελέγχου και την επεξεργασία που πρέπει να υποστεί το νερό, ώστε να καταστεί κατάλληλο προς ανθρώπινη κατανάλωση. Οι επιτρεπόμενες τιμές των παραμέτρων ελέγχου σύμφωνα με την Οδηγία 75/440/ΕΟΚ καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.10), από τον οποίο προκύπτει ότι η αυξημένη συγκέντρωση νιτρικών άνω των 25 mg/L, παρόλο που δεν αποτελούσε ανασταλτικό παράγοντα για την παραγωγή πόσιμου νερού από κάποιον αποδέκτη, εντούτοις τον καθιστούσε περισσότερο ρυπασμένο και λιγότερο ελκυστικό για τον σκοπό αυτό. Έναν χρόνο αργότερα εκδόθηκε η Οδηγία 76/464/ΕΟΚ: «περί ρυπάνσεως που προκαλείται από ορισμένες επικίνδυνες ουσίες που εκχέονται στο υδάτινο περιβάλλον» και καθιστούσε υποχρεωτική την αδειοδότηση όσων απορρίπτουν απόβλητα με επικίνδυνες ουσίες, όπως διάφορα είδη οργανικών ενώσεων, μεταλλοειδή και μέταλλα (πχ υδράργυρος, κάδμιο, χαλκός, νικέλιο, ψευδάργυρος) και άλλες ουσίες (πχ νιτρώδη), στα εσωτερικά επιφανειακά, παράκτια και υπόγεια νερά. Στη συνέχεια εκδόθηκε η Οδηγία 80/68/ΕΟΚ «περί προστασίας των υπογείων υδάτων από τη ρύπανση που προέρχεται από ορισμένες επικίνδυνες ουσίες» με αντικείμενο την πρόληψη της ρύπανσης του υπόγειου νερού από ορισμένες ουσίες, όπως διάφορα είδη οργανικών ενώσεων, μεταλλοειδή και μέταλλα (πχ υδράργυρος, κάδμιο, χαλκός, νικέλιο, ψευδάργυρος) και άλλες ουσίες (πχ νιτρώδη), και τη μείωση ή τη διάθεση των συνεπειών της ρύπανσής τους και η οποία απαγορεύει ρητά κάθε άμεση απόρριψη αυτών στα υπόγεια νερά, χωρίς όμως να τίθεται όριο στις συγκεντρώσεις τους.

Οι Οδηγίες 75/440/ΕΟΚ, 76/464/ΕΟΚ και 80/68/ΕΟΚ καταργήθηκαν και αντικαταστάθηκαν από την Οδηγία 2000/60/ΕΚ «για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων», η οποία αντιμετωπίζει με σφαιρικότερο και πιο ολοκληρωμένο τρόπο την κατάσταση της ποιότητας των υδατικών συστημάτων. Βασικός στόχος της Οδηγίας 2000/60/ΕΚ είναι η θέσπιση πλαισίου με στόχο την προστασία του επιφανειακού και υπόγειου νερού που προστατεύει και βελτιώνει την κατάσταση του υδάτινου περιβάλλοντος (πχ ανάγκες σε νερό και οικοσυστήματα), διασφαλίζει την προοδευτική μείωση της ρύπανσης και αποτρέπει τη μόλυνση στους υπόγειους υδροφορείς και προωθεί τη βιώσιμη χρήση νερού μακροπρόθεσμα. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται επαρκής παροχή επιφανειακού και υπόγειου νερού καλής ποιότητας. Τα επιφανειακά νερά περιλαμβάνουν τα ποτάμια, τις λίμνες, τα μεταβατικά και παράκτια νερά, τα τεχνητά υδατικά συστήματα και τα ιδιαιτέρως τροποποιημένα υδατικά συστήματα, δηλαδή εκείνα των οποίων ο χαρακτήρας έχει μεταβληθεί ουσιαστικά λόγω φυσικών αλλοιώσεων από τις δραστηριότητες του ανθρώπου. Η καλή κατάσταση του επιφανειακού νερού εξασφαλίζεται μέσω της τουλάχιστον καλής οικολογικής και χημικής κατάστασής του: η οικολογική κατάσταση περιλαμβάνει την εκτίμηση βιολογικών, υδρομορφολογικών και φυσικοχημικών παραμέτρων, όπως η κατάσταση οξίνισης (μόνο για λίμνες και ποτάμια), η αλατότητα και οι συνθήκες θρεπτικών ουσιών, και η χημική κατάσταση

προϋποθέτει τη θέσπιση προτύπων χημικής ποιότητας στα οποία συμπεριλαμβάνονται ρύποι, όπως ουσίες που συμβάλλουν στον ευτροφισμό (πχ νιτρικά και φωσφορικά), ουσίες που επηρεάζουν δυσμενώς το ισοζύγιο οξυγόνου (πχ BOD₅, COD), μέταλλα και ενώσεις αυτών. Οι ρύποι αυτοί λαμβάνονται υπόψη και ως παράμετροι πιέσεων, σημειακών και διάχυτων, στα επιφανειακά νερά και προέρχονται από αστικές, βιομηχανικές, γεωργικές και άλλες εγκαταστάσεις και δραστηριότητες. Σε αντίθεση με τα επιφανειακά νερά, η καλή κατάσταση των υπογείων νερών εξασφαλίζεται μέσω της τουλάχιστον καλής ποσοτικής και χημικής κατάστασής τους. Το pH, η αγωγιμότητα, η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων και αμμωνίου αποτελούν παραμέτρους της χημικής παρακολούθησης σε όλα τα συστήματα υπογείων νερών.

Πίνακας 1.10: Όρια ενδεικτικών παραμέτρων σε επιφανειακά νερά που προορίζονται για κατανάλωση σύμφωνα με την Οδηγία 75/440/ΕΟΚ

Παράμετρος	Μονάδες μέτρησης	Οδηγία 75/440/ΕΟΚ		
		A1	A2	A3
pH	-	6.5-8.5	5.5-9	5.5-9
Χρώμα	mg/L	10	50	50
Θερμοκρασία	°C	22	22	22
Αγωγιμότητα	μS/cm (20°C)	1 000	1 000	1 000
Νιτρικά		25	-	-
Νιτρώδη		-	-	-
Σίδηρος		0.3	2	1
Χαλκός		0.02	0.05	1
Ψευδάργυρος		3	5	5
Νικέλιο	mg/L	-	-	-
Μόλυβδος		0.05	0.05	0.05
Νάτριο		-	-	-
Θειικά		250	150	150
Χλωριούχα		200	200	200
Ανθρακούχα		0.0002	0.0002	0.001
COD		-	-	30
Ποσοστό κορεσμού σε διαλυμένο O ₂	% O ₂	>70	>50	>30
BOD ₅		<3	<5	<7
Άζωτο Kjeldahl	mg/L	1	2	3
Αμμωνία		0.05	1.5	2

Οδηγία 2006/118/ΕΚ «σχετικά με την προστασία των υπογείων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση»

Οι στόχοι της Οδηγίας 2006/118/ΕΚ «σχετικά με την προστασία των υπογείων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση» είναι εναρμονισμένοι με τους στόχους των Οδηγιών 2000/60/ΕΚ, 91/271/ΕΟΚ και 98/83/ΕΚ (η τελευταία ισχύει ως 2020/2184/ΕΕ και αναλύεται στη συνέχεια). Η Οδηγία 2006/118/ΕΚ θεσπίζει ειδικά μέτρα για την πρόληψη, τον περιορισμό και τον έλεγχο της ρύπανσης του υπόγειου νερού. Τα μέτρα αυτά περιλαμβάνουν κυρίως κριτήρια για την αξιολόγηση της καλής χημικής κατάστασης του υπόγειου νερού, για τον εντοπισμό και την αναστροφή σημαντικών και διατηρούμενων ανοδικών τάσεων και για τον καθορισμό σημείων εκκίνησης για την αναστροφή των τάσεων. Τα κριτήρια για την αξιολόγηση της χημικής κατάστασης καθορίζονται από τα κράτη μέλη και πρέπει να περιλαμβάνουν ποιοτικά πρότυπα και, για πρώτη φορά, ανώτερες αποδεκτές τιμές σε συγκεκριμένες παραμέτρους. Τα εν λόγω ποιοτικά πρότυπα ορίζουν συγκέντρωση νιτρικών αλάτων 50 mg/L, ενώ ενδεικτικές παράμετροι για τις οποίες τα κράτη μέλη οφείλουν να καθορίσουν ανώτερες αποδεκτές τιμές είναι τα νιτρώδη, τα χλωριούχα και τα θειικά ιόντα καθώς και παράμετροι που υποδηλώνουν θαλάσσιες ή άλλες διεισδύσεις, όπως η αλατότητα και η αγωγιμότητα.

Οδηγία 2010/75/ΕΕ «περί βιομηχανικών εκπομπών – ολοκληρωμένη πρόληψη και έλεγχος της ρύπανσης»

Η Οδηγία 2010/75/ΕΕ «περί βιομηχανικών εκπομπών – ολοκληρωμένη πρόληψη και έλεγχος της ρύπανσης» θεσπίζει κανόνες σχετικά με την πρόληψη και τον έλεγχο της ρύπανσης που προκαλούν οι βιομηχανικές δραστηριότητες. Επίσης, προβλέπει κανόνες για την αποφυγή και, όταν αυτό δεν είναι δυνατόν, τη μείωση των εκπομπών στην ατμόσφαιρα, τα νερά και το έδαφος, καθώς και για την πρόληψη της παραγωγής αποβλήτων, ώστε να επιτευχθεί υψηλό επίπεδο προστασίας του περιβάλλοντος στο σύνολό του. Οι βιομηχανικές δραστηριότητες στις οποίες αναφέρεται περιλαμβάνουν ενεργειακές βιομηχανίες (πχ διύλιση πετρελαίου), παραγωγή και επεξεργασία μετάλλων (πχ επεξεργασία σιδηρούχων μετάλλων), βιομηχανία ορυκτών πόρων (πχ παραγωγή τσιμέντου), χημική βιομηχανία (πχ παραγωγή οργανικών χημικών προϊόντων, όπως αζωτούχοι υδρογονάνθρακες, δηλαδή αμίνες, αμίδια και νιτρώδεις και νιτρικές ενώσεις), διαχείριση αποβλήτων (πχ διάθεση ή ανάκτηση επικίνδυνων που προέρχονται από δραστηριότητες όπως η βιολογική κατεργασία) και άλλες δραστηριότητες (πχ παραγωγή χαρτοπολτού, διάθεση ζωικών απορριμμάτων κλπ). Τα κράτη μέλη οφείλουν να εξασφαλίζουν ότι καμία εγκατάσταση δεν λειτουργεί χωρίς άδεια η οποία πρέπει να περιλαμβάνει όλα τα αναγκαία μέτρα, ώστε να περιορίζονται και να παρακολουθούνται συστηματικά οι εκπομπές ρύπων στην ατμόσφαιρα (πχ μονοξείδιο του άνθρακα) και στα νερά (πχ νιτρικών και άλλων ενώσεων που συμβάλλουν στον ευτροφισμό, μετάλλων, COD, BOD₅), να εξασφαλίζεται η προστασία του εδάφους και του υπόγειου νερού και να λαμβάνονται μέτρα

για την παρακολούθηση και τη διαχείριση των αποβλήτων των εγκαταστάσεων. Σημειώνεται ότι η εν λόγω Οδηγία δίνει ιδιαίτερη έμφαση στην ατμοσφαιρική ρύπανση και στα όρια εκπομπών ανάλογα με τη βιομηχανική δραστηριότητα, χωρίς να θέτει σαφή όρια για τις συγκεντρώσεις των ρύπων που καταλήγουν στα νερά.

Οδηγία 2020/2184/ΕΕ «σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης»

Σύμφωνα με την παραπάνω Οδηγία 2000/60/ΕΚ τα νερά που προορίζονται για πόση είναι υποχρεωτικό να υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία, ώστε να ικανοποιούνται οι απαιτήσεις της Οδηγίας 80/778/ΕΟΚ, όπως τροποποιήθηκε από την Οδηγία 98/83/ΕΚ και αργότερα αναδιατυπώθηκε ως Οδηγία 2020/2184/ΕΕ. Η Οδηγία 80/778/ΕΟΚ «περί της ποιότητας του πόσιμου νερού» όρισε σαφώς τις παραμέτρους που πρέπει να ελέγχονται στο πόσιμο νερό, τις αναλυτικές μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό τους, καθώς και τη συχνότητα δειγματοληψιών. Ενδεικτικές τιμές των παραμέτρων αυτών καταγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.11).

Πίνακας 1.11: Όρια ενδεικτικών παραμέτρων που θεσπίστηκαν διαχρονικά στο πόσιμο νερό (Οδηγία 80/778/ΕΟΚ, Οδηγία 98/83/ΕΚ, Οδηγία 2020/2184/ΕΕ)

Παράμετρος	Μονάδες μέτρησης	Οδηγία		
		80/778/ΕΟΚ	98/83/ΕΚ	2020/2184/ΕΕ
ρΗ	-	6.5-8.5	6.5-9.5	6.5-9.5
Χρώμα	mg/L	20	Αποδεκτό	Αποδεκτό
Αγωγιμότητα	μS/cm (20°C)	400	2 500	2 500
Νιτρικά		50	50	50
Νιτρώδη		0.1	0.5	0.5
Σίδηρος		0.2	0.2	0.2
Χαλκός		3	2	2
Ψευδάργυρος		5	-	
Νικέλιο	mg/L	0.05	0.02	0.02
Μόλυβδος		0.05	0.01	0.005
Νάτριο		175	200	200
Θειικά		250	250	250
Χλωριούχα		200	250	250
Ποσοστό κορεσμού σε διαλυμένο O ₂	% O ₂	>75 πλην υπογείων	-	-
Άζωτο Kjeldahl		-	-	-
Αμμώνιο	mg/L	0.5	0.5	0.5

Η Οδηγία 80/778/ΕΟΚ αντικαταστάθηκε από την Οδηγία 98/83/ΕΚ, η οποία ήταν πιο εκσυγχρονισμένη και περισσότερο λεπτομερής και εξειδικευμένη. Ενδεικτικά, ορίστηκαν επιπλέον μικροβιολογικές παράμετροι ελέγχου ανάλογα με τον τρόπο διάθεσης του νερού (πχ *Pseudomonas aeruginosa*, για ύδωρ που πωλείται σε φιάλες) και αυστηροποιήθηκαν όρια συγκεκριμένων παραμέτρων, πχ στο φθόριο, στο νικέλιο και στους αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1.11) καταγράφονται τα όρια ενδεικτικών παραμέτρων σύμφωνα με την 80/778/ΕΟΚ. Παρόλο που η πρόσφατη Οδηγία 2020/2184/ΕΕ πραγματεύεται πληθώρα επίκαιρων θεμάτων που αφορούν στην κατανάλωση νερού (πχ έλαβε υπόψη συστάσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) σχετικά με ζητήματα, όπως η παρουσία και τα όρια για τον μόλυβδο, και πρόσθεσε ως παράμετρο παρακολούθησης τα μικροπλαστικά και τη *Legionella*), τα όρια των νιτρικών και των νιτρωδών ιόντων και του αμμωνίου παρέμειναν ίδια (Πίνακας 1.11).

1.4.2 Εθνική νομοθεσία

Η αποφυγή των επιπτώσεων που προκαλούνται εξαιτίας της παρουσίας υψηλών συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων στο περιβάλλον και στα οικοσυστήματα και που μπορούν να οδηγήσουν σε μη αναστρέψιμα προβλήματα υγείας εάν καταναλωθούν από τον άνθρωπο και τα ζώα επιτυγχάνεται με σειρά Νομοθετημάτων του Εθνικού μας Δικαίου (Νόμους, Υπουργικές ή Κοινές Υπουργικές Αποφάσεις (ΚΥΑ), Προεδρικά Διατάγματα (ΠΔ) και Εγκυκλίους). Τα Νομοθετήματα αυτά αποτελούν είτε εναρμόνιση της εγχώριας νομοθεσίας με το ευρωπαϊκό Δίκαιο, όπως στην περίπτωση των ευρωπαϊκών Οδηγιών (Πίνακας 1.12), είτε νομικές οντότητες που συντάχθηκαν πρωτογενώς σε εθνικό επίπεδο και είναι σύμφωνες με το εθνικό και ευρωπαϊκό Δίκαιο, όπως στην περίπτωση της νομοθεσίας για την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων αποβλήτων. Η εθνική νομοθεσία που σχετίζεται με την παρουσία νιτρικών ιόντων στο περιβάλλον και στα οικοσυστήματα περιλαμβάνει:

- την ΚΥΑ 16190/1335/1997 (ΦΕΚ 519Β/25-6-1997) «Μέτρα και όροι για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης», όπως τροποποιήθηκε από τις ΚΥΑ 19652/1906/1999 (ΦΕΚ 1575Β/5-8-1999), 20419/2522/2001 (ΦΕΚ 1212Β/18-9-2001), 24838/1400/Ε103/2008 (ΦΕΚ 1132Β/19-6-2008), 106253/2010 (ΦΕΚ 1843/Β/24-11-2010), 190126/2013 (ΦΕΚ 983Β/23-4-2013), 147070/2014 (ΦΕΚ 3224Β/2-12-2014), ΥΠΕΝ/ΓΡΕΓΥ/38552/265/2019 (ΦΕΚ 1496Β/3-5-2019) και την ΥΑ 1848/278812/2021 (ΦΕΚ 4855Β/20-10-2021).
- την ΚΥΑ 5673/400/1997 (ΦΕΚ 192Β/14-3-1997) «Μέτρα και όροι για την επεξεργασία αστικών λυμάτων», όπως τροποποιήθηκε από τις ΚΥΑ 19661/1982/1999 (ΦΕΚ 1811Β/29-9-1999) και 48392/939/2002 (ΦΕΚ 405Β/3-4-2002).

- τον Νόμο 3199/2003 (ΦΕΚ 280Α/9-12-2003) «Προστασία και διαχείριση των υδάτων», όπως τροποποιήθηκε σύμφωνα με τους Νόμους 3481/2003 (ΦΕΚ 162Α/2-8-2006), 4315/2014 (ΦΕΚ 269Α/24-12-2014), 4519/2018 (ΦΕΚ 25Α/20-2-2018) και 5037/2023 (ΦΕΚ 78Α/28-3-2023).
- το ΠΔ 51/2007 (ΦΕΚ 54Α/8-3-2007) «Καθορισμός μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη προστασία και διαχείριση των υδάτων σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της Οδηγίας 2000/60/ΕΚ», όπως τροποποιήθηκε από τις ΚΥΑ 51354/2641/Ε103 (ΦΕΚ 1909Β/8-12-2010), 48416/2037/Ε103 (ΦΕΚ 2516Β/7-11-2011) και 170766/2016 (ΦΕΚ 69Β/22-1-2016) και τον Νόμο 5037/2023 (ΦΕΚ 78Α/28-3-2023).
- την ΚΥΑ 39626/2208/Ε130/2009 (ΦΕΚ 2075Β/25-9-2009) «Καθορισμός μέτρων για την προστασία των υπόγειων νερών από την ρύπανση και την υποβάθμιση, σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της οδηγίας 2006/118/ΕΚ», όπως τροποποιήθηκε σύμφωνα με την ΚΥΑ 182314/1241/2016 (ΦΕΚ 2888Β/12-9-2016).
- την ΚΥΑ 145116/2011 (ΦΕΚ 354Β/8-3-2011) «Καθορισμός μέτρων, όρων και διαδικασιών για την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων και άλλες διατάξεις», όπως τροποποιήθηκε από τις ΚΥΑ 191002/2013 (ΦΕΚ 2220Β/9-9-2013) και ΚΥΑ 100079/2015 (ΦΕΚ 135Β/22-1-2015) και συμπληρώθηκε από τις Εγκυκλίους 145447/2011 και 1589/2011.
- την ΚΥΑ 36060/1155/Ε103/2013 (ΦΕΚ 1450Β/14-6-2013) «Καθορισμός πλαισίου κανόνων, μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη πρόληψη και τον έλεγχο της ρύπανσης του περιβάλλοντος από βιομηχανικές δραστηριότητες, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 2010/75/ΕΕ», όπως τροποποιήθηκε από τις ΚΥΑ 44105/1398/Ε103/2013 (ΦΕΚ 1890Β/1-8-2013), ΗΠ 34062/957/Ε103/2015 (ΦΕΚ 1793Β/20-8-2015) και ΥΠΕΝ/ΔΔΕΔ/46424/1134/2021 (ΦΕΚ 2185Α/26-5-2021), τους Νόμους 4342/2015 (ΦΕΚ 143Α/9-11-2015), 4351/2015 (ΦΕΚ 164Α/4-12-2015), 4685/2020 (ΦΕΚ 92Α/7-5-2020), 4843/2021 (ΦΕΚ 193Α/ 20-10-2021) και 4964/2022 (ΦΕΚ (150Α/30-7-2022), και όπως συμπληρώθηκε σύμφωνα με την Εγκύκλιο ΥΠΕΝ/ΔΙΠΑ/33038/2252/2022, την ΚΥΑ 181627/1185/2016 (ΦΕΚ 2494Α/12-8-2016) και τον Νόμο 4819/2021 (ΦΕΚ 129Α/23-7-2021).

Πίνακας 1.12: Εθνική νομοθεσία με σκοπό την εναρμόνιση με τις αντίστοιχες ευρωπαϊκές Οδηγίες

Οδηγία	Νομοθέτημα
91/676/ΕΟΚ	ΚΥΑ 16190/1335/1997
91/271/ΕΟΚ	ΚΥΑ 5673/400/1997
2000/60/ΕΚ	Ν. 3199/2003 και ΠΔ 51/2007
2006/118/ΕΚ	ΚΥΑ 39626/2208/Ε130
2010/75/ΕΕ	ΚΥΑ 36060/1155/Ε103
2020/2184/ΕΕ	Προσωρινά χωρίς εναρμόνιση

ΚΥΑ 16190/1335/1997 «Μέτρα και όροι για την προστασία των νερών από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης»

Η Οδηγία 91/676/ΕΟΚ «για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης» εναρμονίστηκε με την ελληνική νομοθεσία με την ΚΥΑ 16190/1335/1997 «Μέτρα και όροι για την προστασία των νερών από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης». Στη συνέχεια καθορίστηκαν οι συνολικά τριάντα (30) ζώνες ευπρόσβλητες για νιτρορρύπανση (ZEN) που φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1.13).

Πίνακας 1.13: Ζώνες ευπρόσβλητες για νιτρορρύπανση στην Ελλάδα

Ευπρόσβλητη Ζώνη (ZEN)	ΚΥΑ
Θεσσαλικό Πεδίο	
Κωπαϊδικό Πεδίο	19652/1906/1999
Αργολικό Πεδίο	24838/1400/Ε103/2008
Λεκάνη Πηνειού Ηλείας	
Κάμπος Θεσ/νίκης Πέλλας Ημαθίας	
Λεκάνη Στρυμόνα	20419/2522/2001
Πεδιάδα Άρτας Πρέβεζας	
ΛΑΠ ¹ Ασωπού Βοιωτίας	106253/2010
Νότιο Τμήμα Ποταμού Έβρου	
Πεδιάδα Ανατολικά-Δυτικά Λίμνης Βιστωνίδας	
ΛΑΠ ¹ Αγγίτη	
Βόρια Κορινθία	
Οροπέδιο Τρίπολης	190126/2013
Φιλιατρά Κυπαρισσίας	
Λαρισσός Αχαΐας	
Λεωνίδιο Αρκαδίας	
Μεσογαία Αττικής	
Μαραθώνας Αττικής	
Βόρειο Τμήμα Ποταμού Έβρου	
Σπερχειός Φθιώτιδας	
Πάμισος Μεσσηνίας	
Τροιζηνία	
Άστρος-Άγιος Ανδρέας Αρκαδίας	
Μέγαρα Αλεποχώρι Αττικής	147070/2014
Αταλάντη Φθιώτιδας	
Αλμυρός Μαγνησίας	
Πτολεμαΐδα Κοζάνης	
Επανομή-Μουδανιά Χαλκιδικής	
Γεροπόταμος-Μεσσαράς	
Αρτάκη Ευβοίας	

¹:Λεκάνη Απορροής Ποταμού

Ο «Κώδικας ορθής γεωργικής πρακτικής για την προστασία των νερών από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης» θεσμοθετήθηκε για πρώτη φορά με την ΥΑ 1420/82031/2015 που αντικαταστάθηκε από την ΥΑ 1848/278812/2021. Στόχος του είναι η αποτροπή της ρύπανσης των υπόγειων και επιφανειακών νερών από τα νιτρικά ιόντα, που προέρχονται από αγρούς όπου έχει εφαρμοστεί λίπανση με αζωτούχες ενώσεις ή επεξεργασμένα κτηνοτροφικά απόβλητα και βοσκοτόπους όπου έχουν βοσκήσει ζώα αποθέτοντας ζωική κόπρο μέσω διήθησης διαμέσου του ριζοστρώματος ή επιφανειακής απορροής, χωρίς ταυτόχρονα να διαταραχθεί η ικανοποίηση των αναγκών των φυτών σε άζωτο. Ο Κώδικας περιλαμβάνει ορθές γεωργικές πρακτικές για την εφαρμογή αζωτούχων λιπασμάτων, την αποθήκευση και μεταφορά αζωτούχων λιπασμάτων, τη διαχείριση κτηνοτροφικών αποβλήτων στις κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις, την εφαρμογή κτηνοτροφικών αποβλήτων στα εδάφη, την άρδευση και λοιπές περιπτώσεις.

Το Πρόγραμμα Δράσης αφορά τις περιοχές που έχουν χαρακτηριστεί ως ευπρόσβλητες ζώνες από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης (ZEN) και θεσμοθετήθηκε με την ΚΥΑ ΥΠΕΝ/ΓρΕΓΥ/38552/265/2019 «Πρόγραμμα Δράσης περιοχών που έχουν χαρακτηριστεί ως ευπρόσβλητες ζώνες από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης». Περιγράφει μέτρα, δράσεις και πρακτικές, όπως ο καθορισμός του μέγιστου φορτίου και του είδους της λίπανσης και του τρόπου αποθήκευσης λιπασμάτων και κόπρου, με σκοπό την προστασία των επιφανειακών και των υπόγειων νερών από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης, λαμβάνοντας υπόψη τις ιδιαίτερες ανάγκες και προτεραιότητες των ευπρόσβλητων ζωνών, όπως τα χαρακτηριστικά του εδάφους και το είδος των καλλιεργειών.

ΚΥΑ 5673/400/1997 «Μέτρα και όροι για την επεξεργασία αστικών λυμάτων»

Η Οδηγία 91/271/ΕΟΚ «για επεξεργασία αστικών λυμάτων» εναρμονίστηκε με την ελληνική νομοθεσία με την ΚΥΑ 5673/400/1997 και στην οποία ορίζεται ο κατάλογος των ευαίσθητων περιοχών της Ελλάδας (Πίνακας 1.14)

Νόμος 3199/2003 «Προστασία και διαχείριση των υδάτων»

Ο Νόμος 3199/2003 έχει ως στόχο την εναρμόνιση της ελληνικής νομοθεσίας με την ευρωπαϊκή Οδηγία 2000/60/ΕΚ. Ο Νόμος αυτός κατανέμει αρμοδιότητες που αφορούν στην προστασία και διαχείριση του νερού μεταξύ των διοικητικών οργάνων, ορίζει τη σύσταση οργάνων όπως της Διεύθυνσης Υδάτων και του Συμβουλίου Υδάτων σε κάθε Αποκεντρωμένη Διοίκηση και θεσπίζει την εκπόνηση Εθνικής Στρατηγικής για τα Ύδατα. Τα αποκεντρωμένα όργανα ασκούν αρμοδιότητες σχετικά με την πρόληψη της υποβάθμισης, την αναβάθμιση και αποκατάσταση του νερού στο εύρος αρμοδιότητάς τους. Για παράδειγμα, καταρτίζουν το Μητρώο Προστατευόμενων Περιοχών, δηλαδή περιοχών με ανάγκη

ειδικής προστασίας, και συντάσσουν Σχέδια Διαχείρισης των λεκανών απορροής των ποταμών, τα οποία εμπεριέχουν Προγράμματα Μέτρων και Παρακολούθησης της κατάστασης του νερού, Προγράμματα Ειδικών Μέτρων κατά της ρύπανσης και κανόνες για την εξορθολογισμένη χρήση του νερού.

Πίνακας 1.14: Κατάλογος ευαίσθητων περιοχών της Ελλάδας (ΚΥΑ 19661/1982/1999 και ΚΥΑ 48392/939/2002)

Κόλπος/Όρμος/Δέλτα/Λίμνη/Λιμνοθάλασσα	Παραπόταμος
Αμβρακικός κόλπος	Γρεβενίτης (Αλιάκμονας)
Δέλτα Αχελώου	Βαρδαρόβασης (Αξιός)
Δέλτα Έβρου	Πορόια (Αξιός)
Λίμνη Βιστωνίδα	Σακουλέβας (Αξιός-Άραχθος)
Λίμνη Βόλβη	Μετσοβίτικος (Άραχθος-Αχελώος)
Λίμνη Μητρικού	Δυτικός Παραπόταμος (Βοζβόζης)
Λίμνη Λαγκαδά	Έρκυνα (Βοιωτικός Κηφισός)
Λίμνη Πετρών	Μέλανας (Βοιωτικός Κηφισός)
Λιμνοθάλασσα Μεσολογγίου-Αιτωλικού	Ερυθροπόταμος (Έβρος)
Όρμος Θεσσαλονίκης	Αγγίτης (Στρυμόνας)
Κόλπος Ελευσίνας	Χρυσορρόης (Στρυμόνας)
Στενό Λευκάδας	
Περιοχή Σαρωνικού	
Περιοχή Κόλπου Θεσσαλονίκης	

ΠΔ 51/2007 «Καθορισμός μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη προστασία και διαχείριση των υδάτων σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της Οδηγίας 2000/60/ΕΚ»

Με το ΠΔ 51/2007 εφαρμόζονται οι σχετικές διατάξεις του Νόμου 3199/2003 σε συμμόρφωση με την Οδηγία 2000/60/ΕΚ, ώστε με τη θέσπιση του αναγκαίου πλαισίου μέτρων και διαδικασιών να επιτυγχάνεται η ολοκληρωμένη προστασία και ορθολογική διαχείριση των εσωτερικών επιφανειακών, των μεταβατικών, των παράκτιων και υπογείων νερών. Εξειδικεύονται και αποσαφηνίζονται άρθρα του Νόμου 3199/2003, όπως αυτά που αφορούν το Μητρώο Προστατευόμενων Περιοχών, τα Προγράμματα Μέτρων και Παρακολούθησης της κατάστασης του νερού και τα Προγράμματα Ειδικών Μέτρων κατά της ρύπανσης.

ΚΥΑ 39626/2208/Ε130/2009 «Καθορισμός μέτρων για την προστασία των υπόγειων νερών από την ρύπανση και την υποβάθμιση, σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της οδηγίας 2006/118/ ΕΚ»

Η ΚΥΑ 39626/2208/Ε130/2009, λαμβάνοντας υπόψη τον Νόμο 3199/2003 και το ΠΔ 51/2007, καθορίζει τα κριτήρια για την αξιολόγηση της χημικής κατάστασης στους υπόγειους υδροφορείς, τα οποία αποτελούνται από ποιοτικά πρότυπα και ανώτερες αποδεκτές τιμές για ρύπους, ομάδες ρύπων και δείκτες ρύπανσης. Επίσης, περιγράφει τη διαδικασία αξιολόγησης της χημικής κατάστασης του νερού, τον καθορισμό των σημείων εκκίνησης για την αναστροφή των ανοδικών τάσεων που παρατηρούνται σε συγκεντρώσεις ρύπων και τα μέτρα πρόληψης ή περιορισμού της εισαγωγής των ρύπων στα υπόγεια νερά. Τα εν λόγω ποιοτικά πρότυπα ορίζουν συγκέντρωση νιτρικών αλάτων 50 mg/L. Με την τροποποιητική ΚΥΑ 182314/1241/2016 αποφασίστηκε ότι στον κατάλογο των ρύπων για τους οποίους ενδέχεται να οριστούν ανώτερες αποδεκτές τιμές είναι τα νιτρώδη ιόντα.

ΚΥΑ 145116/2011 «Καθορισμός μέτρων, όρων και διαδικασιών για την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων και άλλες διατάξεις»

Η ΚΥΑ 145116/2011 έχει ως στόχους την αξιοποίηση των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων και τη μέσω αυτής εξοικονόμηση υδατικών πόρων, καθώς και τη βελτίωση του υδατικού ισοζυγίου μέσω τροφοδότησης των υπογείων υδροφορέων. Έτσι μπορούν να αντιμετωπισθούν οι επιπτώσεις από φαινόμενα όπως η λειψυδρία, η ξηρασία, η έντονη ταπείνωση ή/και υφαλμύριση των υπόγειων υδροφορέων και η είσοδος του θαλάσσιου μετώπου σε παραλιακές περιοχές στο πλαίσιο διασφάλισης της της Δημόσιας Υγείας. Σύμφωνα με την ΚΥΑ 145116/2011 επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση με σκοπό την άρδευση, την τροφοδότηση ή εμπλουτισμό των υπόγειων υδροφορέων, την αστική ή περιαστική χρήση και τη βιομηχανική χρήση. Για κάθε μία από τις χρήσεις αυτές τίθεται ανώτατο όριο στη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων και ολικού αζώτου (Πίνακας 1.15). Επίσης, η εν λόγω ΚΥΑ συμπεριλαμβάνει τα νιτρικά ιόντα που περιέχονται στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα ως αγρονομικό χαρακτηριστικό που, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους, επηρεάζουν τον βαθμό περιορισμών κατά την εφαρμογή.

ΚΥΑ 36060/1155/Ε103/2013 «Καθορισμός πλαισίου κανόνων, μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη πρόληψη και τον έλεγχο της ρύπανσης του περιβάλλοντος από βιομηχανικές δραστηριότητες, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 2010/75/ΕΕ.»

Μέσω της ΚΥΑ 36060/1155/Ε103 εναρμονίζεται το εθνικό Δίκαιο με την Οδηγία 2010/75/ΕΕ. Βασικοί στόχοι της εν λόγω ΚΥΑ είναι η ολοκληρωμένη πρόληψη και ο έλεγχος της ρύπανσης από βιομηχανικές δραστηριότητες, η αποφυγή και, όταν αυτό δεν είναι δυνατόν, η μείωση των εκπομπών στην ατμόσφαιρα, τα νερά και το έδαφος, και η πρόληψη της παραγωγής αποβλήτων, ώστε να

επιτυγχάνεται υψηλό επίπεδο προστασίας του περιβάλλοντος στο σύνολό του. Ορίζονται σε αυτή οι προϋποθέσεις και η διαδικασία για την έκδοση περιβαλλοντικής άδειας ΑΕΠΟ (Απόφαση Έγκρισης Περιβαλλοντικών Όρων), καθώς και το περιεχόμενο αυτής, η οποία αφορά όλες τις βιομηχανικές δραστηριότητες που εντάσσονται στο πεδίο εφαρμογής της και περιλαμβάνουν, ενδεικτικά, ενεργειακές βιομηχανίες, παραγωγή και επεξεργασία μετάλλων, βιομηχανία ορυκτών πόρων, χημική βιομηχανία και διαχείριση αποβλήτων. Ο κατάλογος ρύπων της ΚΥΑ 36060/1155/Ε103 περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, νιτρικές και άλλες ενώσεις που συμβάλλουν στον ευτροφισμό, μέταλλα, και ουσίες που διαταράσσουν το ισοζύγιο οξυγόνου, όπως COD και BOD₅.

Πίνακας 1.15: Ανώτατο όριο της συγκέντρωσης αζώτου, ανάλογα με τον τρόπο επαναχρησιμοποίησης των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων (ΚΥΑ 145116/2011)

Ανώτατο όριο	Τρόπος επαναχρησιμοποίησης
<ul style="list-style-type: none"> • Ολικό άζωτο < 15 mg/L, στις περιπτώσεις μεγάλης διάρκειας αποθήκευσης των αποβλήτων σε ταμιευτήρες, άρδευσης σε ZEN και εμπλουτισμού υπόγειων υδροφορέων • Ολικό άζωτο < 45 mg/L, για όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις 	<p style="text-align: center;">Άρδευση, περιορισμένη</p> <p style="text-align: center;">Βιομηχανική χρήση, ως νερό ψύξης</p> <p style="text-align: center;">Εμπλουτισμό υπόγειων υδροφορέων που δεν εμπίπτουν στις διατάξεις του άρθρου 7 του ΠΔ 51/2007, με διήθηση διαμέσου εδαφικού στρώματος</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Ολικό άζωτο < 15 mg/L Αμμωνιακό άζωτο < 2 mg/L, στις περιπτώσεις άρδευσης σε ZEN και εμπλουτισμό υπόγειων υδροφορέων • Ολικό άζωτο < 15 mg/L, στις περιπτώσεις μεγάλης διάρκειας αποθήκευσης των αποβλήτων σε ταμιευτήρες και εμπλουτισμού υπόγειων υδροφορέων • Ολικό άζωτο < 45 mg/L, για όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις 	<p style="text-align: center;">Άρδευση, απεριόριστη</p> <p style="text-align: center;">Βιομηχανική χρήση, πλην νερού ψύξης</p> <p style="text-align: center;">Εμπλουτισμό υπόγειων υδροφορέων που δεν εμπίπτουν στις διατάξεις του άρθρου 7 του ΠΔ 51/2007, με γεωτρήσεις</p> <p style="text-align: center;">Αστική και Περιαστική χρήση</p>

2 | Διεργασίες απονιτροποίησης

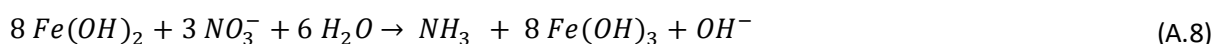
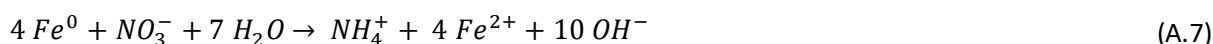
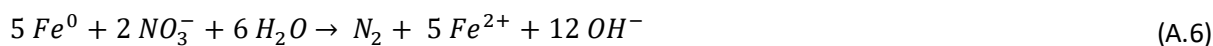
2.1 Μέθοδοι απονιτροποίησης

Η απονιτροποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο διαφορετικούς τρόπους: (α) με τη μετατροπή των νιτρικών ιόντων σε άλλα χημικά είδη, όπως αέριο άζωτο, που επιτυγχάνεται με χημικές και βιολογικές μεθόδους και, (β) με τον διαχωρισμό των νιτρικών ιόντων από το διάλυμα, που επιτυγχάνεται με φυσικές μεθόδους, όπως αυτές της αντίστροφης ώσμωσης, της ιοντοανταλλαγής και της ηλεκτροδιάλυσης (Abascal et al., 2022). Στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά οι χημικές, φυσικές και βιολογικές μέθοδοι με σκοπό την απομάκρυνση των νιτρικών ιόντων από το διάλυμα.

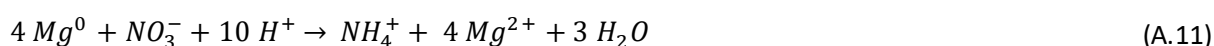
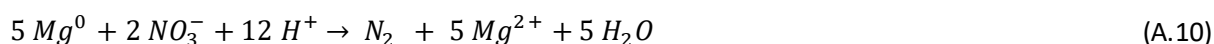
2.1.1 Χημικές μέθοδοι

Η χημική απονιτροποίηση βασίζεται στην οξειδοαναγωγή: τα νιτρικά ιόντα ανάγονται και άλλα χημικά είδη, όπως ο στοιχειακός σίδηρος, το αργίλιο, το μαγνήσιο, το θείο, ο ψευδάργυρος, το κάδμιο και ο μόλυβδος, οξειδώνονται (Mohsenipour et al., 2014; Moloantoa et al., 2022; Singh et al., 2022).

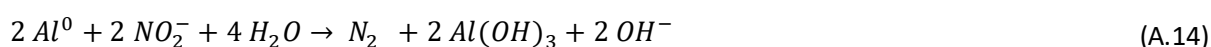
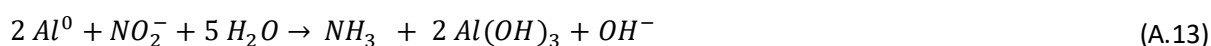
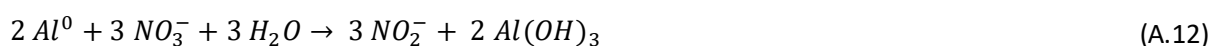
Σε όξινο περιβάλλον, η απονιτροποίηση που πραγματοποιείται με οξείδωση του σιδήρου οδηγεί σε παραγωγή νιτρωδών ιόντων, αερίου αζώτου και αμμωνιακών, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (A.6) και (A.7). Ο βαθμός απομάκρυνσης των νιτρικών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το pH, το μέγεθος των νανοσωματιδίων των χημικών ειδών, τη συγκέντρωσή τους και τον χρόνο επαφής (Mohsenipour et al., 2014). Για παράδειγμα, νιτρικά σε συγκέντρωση 150 mg/L ανάγονται πλήρως ύστερα από προσθήκη 2 g/L στοιχειακού σιδήρου σε pH 3 και εντός 45 λεπτών, ενώ το 83% αυτών ύστερα από προσθήκη 1 g/L στοιχειακού σιδήρου σε pH 3 και εντός 1 ώρας (Yang & Lee, 2005). Σε βασικό περιβάλλον, η απονιτροποίηση πραγματοποιείται σύμφωνα με την αντίδραση (A.8). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αναγωγή νιτρικών μπορεί να πραγματοποιείται παρουσία χαλκού (Cu) ως καταλύτη, όταν ο λόγος των συγκεντρώσεων σιδήρου και νιτρικών είναι περίπου 15. Η διεργασία αυτή οδηγεί σε παραγωγή μεγάλου όγκου κατακρημνισμάτων που περιέχουν σίδηρο και σε σχηματισμό αμμωνίας, η οποία μπορεί να απομακρυνθεί από το διάλυμα με εμφύσηση αέρα (Archana et al., 2012).



Παρόμοια με τον σίδηρο, η οξειδωση του μαγνησίου κατά την απονιτροποίηση οδηγεί σε παραγωγή νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (A.9) έως (A.11). Έχει βρεθεί πειραματικά ότι γραμμομοριακή αναλογία μαγνησίου και νιτρικών ίση με 5.8 σε pH 2 οδηγεί σε 84% απομάκρυνση νιτρικών (Archna et al., 2012). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον βαθμό απομάκρυνσης νιτρικών είναι ο χρόνος επαφής, η αρχική συγκέντρωση νιτρικών, ο λόγος της συγκέντρωσης νιτρικών και μαγνησίου και η συγκέντρωση μαγνησίου (Mohsenipour et al., 2014).



Η οξειδωση του αργιλίου κατά την απονιτροποίηση οδηγεί σε σχηματισμό αμμωνιακών ιόντων και μικρής συγκέντρωσης νιτρικών και αζώτου, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (A.12) έως (A.14). Ο απαιτούμενος λόγος συγκέντρωσης αργιλίου και νιτρικών είναι 1.16 gr, σύμφωνα με τους Archna et al. (2012). Σε αντίθεση με τον στοιχειακό σίδηρο και το μαγνήσιο, η βέλτιστη απόδοση της απονιτροποίησης με δότη ηλεκτρονίων το αργίλιο πραγματοποιείται σε pH 10.25-10.5 (Archna et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014). Η απονιτροποίηση επηρεάζεται από πληθώρα παραμέτρων, ενώ ο βαθμός απομάκρυνσης νιτρικών κυμαίνεται μεταξύ 60% και 95% (Mohsenipour et al., 2014). Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στοιχειακό αργίλιο σε συνδυασμό με σίδηρο, ώστε να βελτιωθεί η αποτελεσματικότητα της διεργασίας (Singh et al., 2022). Για παράδειγμα, οι Bao et al. (2017) έδειξαν ότι η αναγωγή 50 mg/L νιτρικών σε όρους αζώτου είναι επιτυχής χρησιμοποιώντας κράμα σιδήρου-αργιλίου σε συγκέντρωση 5 g/L. Η προσθήκη συνδυασμού μολύβδου και χαλκού ως καταλυτών μπορεί να οδηγήσει σε μεγιστοποίηση της παραγωγής αερίου αζώτου και σε απόδοση απονιτροποίησης υψηλότερη από 80%. (Archna et al., 2012).



Η απονιτροποίηση με καταλύτες, όπως το παλλάδιο (Pd) και το οξείδιο του αργιλίου (Al₂O₃), παρουσία υδρογόνου, μπορεί να οδηγήσει σε αναγωγή των νιτρικών προς αέριο άζωτο (98%) και αμμωνιακά. Άλλοι καταλύτες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές απονιτροποίησης, σύμφωνα με τη

βιβλιογραφία, είναι ο χαλκός (Cu), ο μόλυβδος (Pb), η πλατίνα (Pt), το ρόδιο (Rh) και το διοξείδιο του τιτανίου (TiO₂) (Archna et al., 2012; Moloantoa et al., 2022).

Οι χημικές μέθοδοι έχουν αυξημένο κόστος, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στη διαχείριση και διάθεση των παραπροϊόντων που παράγονται, ώστε να αποφεύγονται τόσο η δευτερογενής ρύπανση προς στο περιβάλλον, όσο και η εκ νέου επιβάρυνση της εκροής του συστήματος. Τέλος, προκειμένου να επιτευχθεί χημική αναγωγή των νιτρικών σε αέριο άζωτο χωρίς την παρουσία ενδιάμεσων, λιγότερο οξειδωμένων, χημικών ειδών, απαιτείται περίπλοκο πρωτόκολλο διεργασιών, με αυξημένο κόστος, γεγονός που καθιστά τις χημικές μεθόδους μη επιλέξιμες σε βιομηχανική κλίμακα (Moloantoa et al., 2022).

2.1.2 Φυσικές μέθοδοι

Οι σημαντικότερες φυσικές μέθοδοι απονιτροποίησης είναι η αντίστροφη ώσμωση, η ιοντοανταλλαγή, η προσρόφηση, η ηλεκτροδιάλυση και η διήθηση με μεμβράνες. Σε αρκετές περιπτώσεις, η προσθήκη χημικών μπορεί να βελτιώσει την απόδοση των φυσικών μεθόδων απονιτροποίησης (Moloantoa et al., 2022). Στη συνέχεια, δίνονται οι βασικότερες πληροφορίες για καθεμιά από τις φυσικές μεθόδους απομάκρυνσης νιτρικών, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

- Αντίστροφη ώσμωση (RO-Reverse Osmosis)

Η αντίστροφη ώσμωση χρησιμοποιείται συνήθως για την απομάκρυνση νιτρικών ιόντων ταυτόχρονα με άλλα χημικά είδη. Η αρχή της αντίστροφης ώσμωσης βασίζεται στην εκλεκτική διαπερατότητα των μεμβρανών, οι οποίες κατακρατούν χημικά είδη, όπως τα νιτρικά ιόντα, το χλώριο, το φθόριο και το νάτριο, και επιτρέπουν μόνο στα μόρια του νερού να διέλθουν με πίεση από 200 έως 1 500 psi (Archna et al., 2012; Moloantoa et al., 2022; Singh et al., 2022). Βιβλιογραφικά, έχει καταγραφεί βαθμός απομάκρυνσης νιτρικών ιόντων υψηλότερος από 93%, ο οποίος μειώνεται καθώς αυξάνεται η αρχική συγκέντρωσή τους. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι αρχική συγκέντρωση νιτρικών είναι δυνατόν να μειωθεί από 42.5 mg/L σε 0.9 mg/L μέσω αντίστροφης ώσμωσης, και ότι αύξηση στην αρχική συγκέντρωση νιτρικών από 25 mg/L σε 200 mg/L μπορεί αν οδηγήσει σε μείωση του βαθμού απομάκρυνσής τους από 93.5% σε 82.5% (Schoeman & Steyn, 2003; Mohsenipour et al., 2014). Τα μειονεκτήματα που σχετίζονται με την εφαρμογή μεμβρανών αντίστροφης ώσμωσης περιλαμβάνουν την έμφραξη (fouling) και τη συμπίεση (compaction) των μεμβρανών, την ανάγκη για διαχείριση των παραγόμενων αποβλήτων και τη χαμηλή απόδοση σε περιπτώσεις βεβαρημένης εισροής αποβλήτων (Archna et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014). Οι πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές τιμές pH και η υψηλή συγκέντρωση διαλυτών στερεών, νιτρικών και μετάλλων στα βιομηχανικά απόβλητα, εντείνουν την εμφάνιση των μειονεκτημάτων αυτών (Moloantoa et al., 2022). Συνεπώς, η αντίστροφη ώσμωση εφαρμόζεται με προϋπόθεση την κατάλληλη προεπεξεργασία των βιομηχανικών αποβλήτων, η οποία συνήθως

περιλαμβάνει χημική εξουδετέρωση, σε συνδυασμό με διήθηση για την απομάκρυνση των διαλυτών στερεών (Moloantoa et al., 2022).

- Διήθηση με μεμβράνες

Η νανοδιήθηση (nanofiltration-NF) διάμεσου κατιονικά φορτισμένων μεμβρανών μπορεί να οδηγήσει σε απομάκρυνση νιτρικών που κυμαίνεται από 60% έως 80% (Archna et al., 2012; Moloantoa et al., 2022). Τα θεϊκά ιόντα, όταν συνυπάρχουν με νιτρικά σε απόβλητα μεταλλευτικών δραστηριοτήτων, έχουν την ιδιότητα να προσκολλώνται στις μεμβράνες, αναχαιτίζοντας την συγκράτηση νιτρικών. Προκειμένου να αποφευχθούν τέτοια φαινόμενα, χρησιμοποιούνται αρνητικά φορτισμένα προσροφητικά υλικά που λειτουργούν ως φραγμός, ώστε τα νιτρικά ιόντα να μην διέρχονται από τους πόρους της μεμβράνης. Η μέθοδος αυτή μπορεί να αυξήσει την απόδοση της απονιτροποίησης σε 88.8% (Moloantoa et al., 2022).

- Ιοντοανταλλαγή

Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η αντικατάσταση των χλωριόντων και των ανθρακικών ιόντων που βρίσκονται στην επιφάνεια ισχυρών ανιονικών ρητινών (Strong Base Anion (SBA) Exchange Resins) από ανεπιθύμητους ρύπους, όπως τα νιτρικά (πχ αντίδραση (A.15)) (Archna et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014; Singh et al., 2022). Η ιοντοανταλλαγή πραγματοποιείται μέχρι την εξάντληση των διαθέσιμων ιόντων της ρητίνης, οπότε και μπορεί να αναγεννηθεί με διαλύματα, όπως πυκνό διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl), όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃) και διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Τα διαλύματα αυτά έχουν την ιδιότητα να αποδεσμεύουν τα νιτρικά ιόντα από τη ρητίνη και να αντικαθιστούν εκ νέου τα ιόντα χλωρίου και τα ανθρακικά ιόντα σε αυτή (Archna et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014). Η αναγέννηση των ρητινών μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση νιτρικών ιόντων στο περιβάλλον (Mohsenipour et al., 2014).



Η αρχική συγκέντρωση νιτρικών, η συγκέντρωση στερεών (διαλυτών και αδιάλυτων, όπως σιδήρου και αργιλίου), η παρουσία θεϊκών ιόντων, το είδος της ρητίνης και οι διακυμάνσεις στην παροχή είναι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της απονιτροποίησης (Archna et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014; Singh et al., 2022). Οι ρητίνες έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν τα θεϊκά ιόντα κατά προτεραιότητα σε σύγκριση με τα νιτρικά (Moloantoa et al., 2022). Επίσης, η παρουσία διαλυτών στερεών μπορεί να καταστήσει τη μέθοδο μη αποτελεσματική. Για παράδειγμα, η απομάκρυνση 25 mg/L NO₃⁻ παρουσία 400 mg/L διαλυτών στερεών μπορεί να φθάσει το 99.8%, ενώ

η απομάκρυνση της ίδιας συγκέντρωσης νιτρικών παρουσία 530 mg/L διαλυτών στερεών και 43 mg/L θειικών, το 45%-60% (Mohsenipour et al., 2014).

- Προσρόφηση

Η μέθοδος της προσρόφησης έχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως απλή και εύκολη εφαρμογή, χαμηλό κόστος και ποικιλία στην επιλογή προσροφητικών υλικών. Τέτοια υλικά μπορεί να είναι κατασκευασμένα με βάση τον άνθρακα, φυσικά υλικά, αγροτικά παραπροϊόντα, βιομηχανικά παραπροϊόντα, βιοροφητικά υλικά, νανοσωματίδια ή και συνδυασμό των παραπάνω (Mohsenipour et al., 2014; Singh et al., 2022):

Τα προσροφητικά υλικά με βάση τον άνθρακα μπορεί να περιέχουν ενεργό άνθρακα (εμπορικό, σε σκόνη ή παρασκευασμένο από φυτικά υλικά, πχ κέλυφος καρύδας), ίνες άνθρακα και άλλα υλικά, όπως κάρβουνο από καλαμπόκι και μπαμπού. Παρά το γεγονός ότι ο ενεργός άνθρακας είναι αποτελεσματικός στην απομάκρυνση οργανικών ουσιών, η προσροφητική του ικανότητα είναι περιορισμένη όταν πρόκειται για απομάκρυνση ιόντων από το διάλυμα. Παρόλα αυτά, η κατάλληλη προεπεξεργασία των υλικών με οξέα και χλωριούχο ψευδάργυρο, καθώς και η παρουσία οξειδίων του σιδήρου, μπορεί να βελτιώσει την απόδοση της απονιτροποίησης (Mohsenipour et al., 2014; Singh et al., 2022).

Φυσικά υλικά που χρησιμοποιούνται στην απονιτροποίηση είναι η άργιλος, ο ζεόλιθος, ο σεπτόλιθος, ο λεοναρδίτης, ο μοντμοριλλονίτης, ο καολίνης και ο ιλλίτης. Οι μηχανισμοί απομάκρυνσης των ρύπων περιλαμβάνουν τόσο την ιοντοανταλλαγή, όσο και την προσρόφηση. Η κατάλληλη επεξεργασία των υλικών αυτών, όπως του μοντμοριλλονίτη με υδροχλωρικό οξύ, του σεπτόλιθου με DEDMA (Dodecyl ethyl dimethyl ammonium bromide) και του ζεόλιθου με CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide ή Hexadecyltrimethyl ammonium bromide), μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα της απονιτροποίησης (Mohsenipour et al., 2014; Singh et al., 2022).

Τα αγροτικά παραπροϊόντα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομάκρυνση νιτρικών, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, είναι υλικά, όπως άχυρο σιταριού, υπολείμματα και πολτός από ζαχαρότευτλα, φλοιός ρυζιού, κελύφη καρύδας και τσόφλια αμυγδάλων. Για τη βελτίωση της προσροφητικής ικανότητας των υλικών αυτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν χημικές ενώσεις, όπως ο στοιχειακός ψευδάργυρος (για τα τσόφλια αμυγδάλων), η επιχλωρυδρίνη και η διμεθυλαμίνη (για τα άχυρα σιταριού), το ζirkόνιο (Zr^{+4}) (για τον πολτό ζαχαρότευτλων) και ο χλωριούχος ψευδάργυρος ($ZnCl_2$) (για τα υπολείμματα ζαχαρότευτλων) (Mohsenipour et al., 2014).

Τα νανοσωματίδια, ως προσροφητικά υλικά, χαρακτηρίζονται από αυξημένη προσροφητική ικανότητα, ενώ αποτελούν μια οικονομική και περιβαλλοντικά φιλική πρώτη ύλη. Μπορεί να έχουν φυσική προέλευση (πράσινα νανοσωματίδια ή green nanoparticles), όπως τα νανοσωματίδια φυτικής σύστασης (πχ *Mimosa pudica* και *Lantana camara*), ή και όχι. Η χρήση πράσινων νανοσωματιδίων

συνήθως δεν απαιτεί προσθήκη χημικών για να επιτευχθούν υψηλές αποδόσεις στην απονιτροποίηση, η οποία μπορεί να κυμαίνεται από 41.4% έως 65.2%. Τα νανοσωματίδια μη φυσικής προέλευσης, όπως τα νανοσωματίδια στοιχειακού σιδήρου και κλινοπτιλόλιθου, είναι δυνατόν να παρουσιάζουν απόδοση απονιτροποίησης υψηλότερη από 95%. Ενδεικτικά, νιτρικά ιόντα σε συγκέντρωση 100 mg/L μπορεί να απομακρυνθούν κατά 99% παρουσία νανοσωματίδιων στοιχειακού σιδήρου σε συγκέντρωση 1.25 g/L. (Singh et al., 2022).

Άλλα υλικά με προσροφητικές ικανότητες που έχουν μελετηθεί κατά την απονιτροποίηση είναι η χιτοσύνη και η ερυθρά ιλύς (Mohsenipour et al., 2014).

- Ηλεκτροδιάλυση

Η ηλεκτροδιάλυση βασίζεται στη διαβίβαση ηλεκτρικού ρεύματος με ηλεκτρόδια, με σκοπό τη δημιουργία διαφοράς δυναμικού (τάσης) σε συστήματα που αποτελούνται από καθοδικές και ανιονικές ημιπερατές μεμβράνες (Mohsenipour et al., 2014). Η αγωγιμότητα που αναπτύσσεται, εξαιτίας της διαφοράς δυναμικού, κατευθύνει τα κατιόντα και τα ανιόντα έτσι, ώστε να διαπερνούν εκλεκτικά τις καθοδικές και ανοδικές μεμβράνες, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δύο υγρά ρεύματα: ένα συμπυκνωμένο, το οποίο περιέχει τα ιόντα που απομακρύνονται από το σύστημα και ένα λιγότερο συμπυκνωμένο (απιονισμένο), το οποίο διαρρέει το σύστημα (Archana et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014; Singh et al., 2022).

Η απόδοση της απονιτροποίησης κυμαίνεται μεταξύ 50% και 99% και εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση νιτρικών, την τάση που εφαρμόζεται, τη θερμοκρασία και το pH (Mohsenipour et al., 2014; Singh et al., 2022). Η αύξηση της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων και της διαφοράς δυναμικού μπορεί να βελτιώσει την απόδοση της απονιτροποίησης. Για παράδειγμα, μεταβολή της τάσης από 5 V σε 10 V και σε 15 V μπορεί να βελτιώσει την απομάκρυνση νιτρικών από 61.8% σε 86.7% και σε 92.5%, αντίστοιχα, και μεταβολή της αρχικής συγκέντρωσης νιτρικών από 100 mg/L σε 600 mg/L, από 81.5% σε 97.7%, αντίστοιχα. Επίσης, η αύξηση της θερμοκρασίας, οι χαμηλές τιμές pH, και η εφαρμογή ηλεκτροκατάλυσης, που αποτελεί εφαρμογή της ηλεκτροδιάλυσης (φυσική μέθοδος) παρουσία καταλύτη (χημική μέθοδος), ευνοούν την απονιτροποίηση (Archana et al., 2012; Singh et al., 2022).

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της ηλεκτροδιάλυσης είναι η περιπλοκότητα των συστημάτων, που αυξάνει τον βαθμό δυσκολίας της λειτουργίας και συντήρησής τους, οι αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις και η ανάγκη για διαχείριση των παραγόμενων αποβλήτων (Mohsenipour et al., 2014). Τέλος, το πρόβλημα της γρήγορης έμφραξης των μεμβρανών μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη μέθοδο της αντίστροφης ηλεκτροδιάλυσης, κατά την οποία η πολικότητα των ηλεκτροδίων αντιστρέφεται με συχνότητα δύο με τέσσερις φορές την ώρα (Archana et al., 2012).

2.1.3 Βιολογικές μέθοδοι

Η βιολογική απονιτροποίηση πραγματοποιείται χάρη στην μεταβολική ικανότητα των οργανισμών να μετατρέπουν τα νιτρικά ιόντα σε λιγότερο οξειδωμένες μορφές αζώτου, όπως αέριο άζωτο. Τέτοιοι οργανισμοί μπορεί να είναι ευκαρυωτικοί, όπως φυτά, μύκητες και άλγη, και προκαρυωτικοί, όπως βακτήρια και αρχαία (Molantoa et al., 2022). Ευκαρυωτικοί οργανισμοί όπως οι μύκητες, τα διάτομα και τα βλεφαριδωτά αποθηκεύουν τα νιτρικά που βρίσκονται στο περιβάλλον τους και, όταν δημιουργηθούν κατάλληλες συνθήκες για παραγωγή ενέργειας, τα ανάγουν σε νιτρώδη (NO_2), υποξείδιο του αζώτου (N_2O) και αμμωνία (NH_3). Τα χημικά αυτά είδη, παρουσία οξυγόνου, οξειδώνονται και πάλι σε νιτρικά από τους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, καθιστώντας τους συνήθως μη επιλέξιμους για μικροβιακή απονιτροποίηση (Moloantoa et al., 2022).

Η απονιτροποίηση με υδρόβια ή χερσαία είδη φυτών (phytoremediation) μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην περίπτωση στάσιμων ροών ή ροών χαμηλής ταχύτητας. Η αποτελεσματικότητα αυτής της μεθόδου μπορεί να είναι υψηλή (επάνω από 90%) με την επιλογή του κατάλληλου φυτικού είδους, αλλά μπορεί να αναχαιτιστεί σημαντικά από την παρουσία διαλυτών μετάλλων. Αντίθετα, φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, όπως τα μικροάλγη και τα κυανοβακτήρια, μπορούν να απονιτροποιήσουν παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων μετάλλων. Παρόλα αυτά, είναι ευαίσθητοι σε παραμέτρους όπως το pH, η θερμοκρασία και η παρουσία φωτεινής ενέργειας, γεγονός που τους καθιστά συχνά μη επιλέξιμους σε εφαρμογές βιομηχανικών αποβλήτων (Moloantoa et al., 2022).

Η βακτηριακή απονιτροποίηση αποτελεί την πλέον αποτελεσματική και αξιόπιστη μέθοδο απομάκρυνσης νιτρικών, η οποία προκαλεί την ελάχιστη δυνατή δευτερογενή ρύπανση (Moloantoa et al., 2022). Βασίζεται στην μικροβιακή αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αέριο άζωτο απουσία οξυγόνου. Τα νιτρικά αποτελούν δέκτη ηλεκτρονίων για να επιτευχθούν οι μεταβολικές διεργασίες των βακτηρίων, με σκοπό τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού και τη συντήρηση των κυττάρων. Συνοπτικά, η βιολογική απονιτροποίηση περιγράφεται από τη σχέση (Σ.1) (Archna et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014).



Μεταξύ των μεθόδων, η ιοντοανταλλαγή, η αντίστροφη ώσμωση και η βιολογική αναγωγή νιτρικών είναι οι πλέον αποτελεσματικές μέθοδοι απονιτροποίησης (Mohsenipour et al., 2014) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκτεταμένα σε μεγάλη κλίμακα, χωρίς περιορισμό στο πεδίο εφαρμογής τους (Archna et al., 2012). Η αποτελεσματικότητα τόσο της ιοντοανταλλαγής, όσο και της αντίστροφης ώσμωσης, επηρεάζονται από τη σύσταση των αποβλήτων (pH, συγκέντρωση νιτρικών ιόντων, διαλυτά και αδιάλυτα μεταλλικά και μη μεταλλικά στερεά), με αποτέλεσμα να καθίσταται αναγκαία η

προεπεξεργασία τους, εφαρμόζοντας επιπλέον διεργασίες, όπως χημική εξουδετέρωση και διήθηση (Archana et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014; Moloantoa et al., 2022; Singh et al., 2022). Αντίθετα, η βακτηριακή απονιτροποίηση είναι η πλέον αποτελεσματική και αξιόπιστη μέθοδος απονιτροποίησης, μέσω της οποίας τα νιτρικά ιόντα μπορούν να αναχθούν σε αέριο άζωτο που είναι αβλαβές για το περιβάλλον, περιορίζοντας στο μέγιστο δυνατό τη δευτερογενή ρύπανση (Moloantoa et al., 2022). Τέλος, σε αντίθεση με την αυτοτροφική, η ετεροτροφική απονιτροποίηση μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτερη αναγωγή υψηλότερης συγκέντρωσης νιτρικών, με αποτέλεσμα να απαιτείται λιγότερος χώρος και χρόνος για να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα (Moloantoa et al., 2022).

2.2 Μικροβιακή απονιτροποίηση

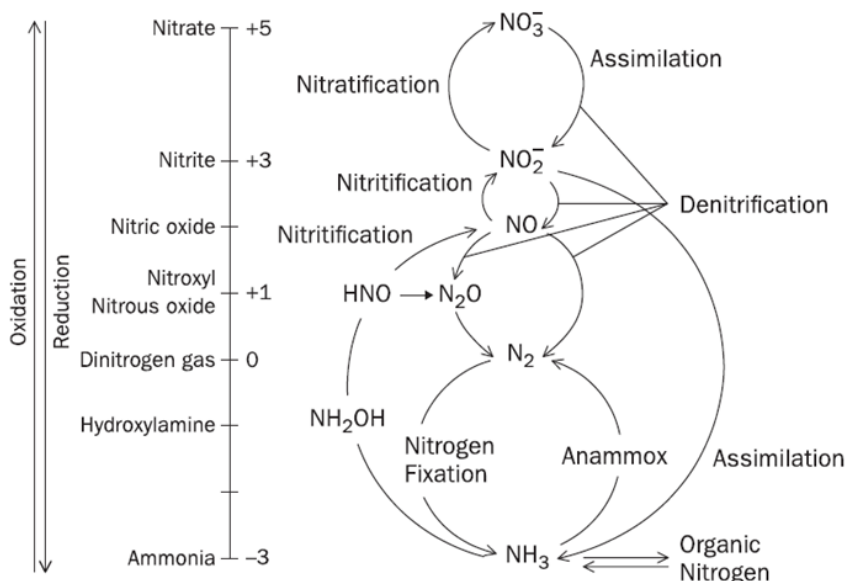
2.2.1 Ο Κύκλος του αζώτου

Το άζωτο (N) είναι ένα στοιχείο απαραίτητο για τη ζωή, καθώς απαντάται με τη μορφή οργανικού αζώτου σε πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και πληθώρα βιομορίων, αποτελώντας κατά μέσο όρο το 6% του ξηρού βάρους των οργανισμών (Schaechter, 2009). Για τον λόγο αυτό, αποτελεί ένα από τα μακροθρεπτικά συστατικά για τους μικροοργανισμούς, μαζί με τον άνθρακα, το οξυγόνο, το υδρογόνο, τον φώσφορο, το θείο και το σελήνιο (Madigan et al., 2018). Εκτός από την οργανική μορφή, το άζωτο συναντάται στα οικοσυστήματα και σε ανόργανη μορφή. Το περίπλοκο σύστημα ανταλλαγής αζώτου μεταξύ της ατμόσφαιρας, του εδάφους/υπόγειων νερών και της βιομάζας ονομάζεται Κύκλος του Αζώτου (Schaechter, 2009; Rittmann & McCarty, 2020) και απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 2.1, από τη σκοπιά της Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας.

Το άζωτο εμφανίζει συνολικά οκτώ αριθμούς οξείδωσης (Εικόνα 2.1). Οι ανηγμένες μορφές του είναι το αμμωνιακό άζωτο (NH_4^+ , αριθμός οξείδωσης: -3) και το άζωτο που περιέχεται σε οργανικές ενώσεις (orgN), ενώ η πλέον οξειδωμένη μορφή του είναι το νιτρικό άζωτο (NO_3^- , αριθμός οξείδωσης: +5). Ενδιάμεσες οξειδωτικές καταστάσεις του αζώτου είναι +3 ως άζωτο νιτωδών (NO_2^-), 0 ως αέριο άζωτο (N_2), +1 ως υποοξείδιο του αζώτου (N_2O) και +2 ως μονοοξείδιο του αζώτου (NO) (Schaechter, 2009; Kuypers et al, 2018; Rittmann & McCarty, 2020).

Το άζωτο (N_2) της ατμόσφαιρας είναι η πλέον διαθέσιμη μορφή αζώτου και είναι χρήσιμη μόνο για ορισμένους μικροοργανισμούς, όπως τα αζωτοδεσμευτικά βακτήρια και τα αρχαία, που μπορούν να το εκμεταλλευθούν βιολογικά μέσω της διαδικασίας της αζωτοδέσμευσης (nitrogen Fixation). Οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί πρέπει να χρησιμοποιήσουν το άζωτο σε διαφορετικές, περισσότερο βιο-διαθέσιμες μορφές (πχ NH_4^+ , NO_3^-) για να μπορέσουν να αναπτυχθούν. Ο αριθμός οξείδωσης του αζώτου μεταβάλλεται κυρίως μέσω της μικροβιακής δράσης, η οποία τελικά καθορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα των διάφορων μορφών αζώτου, καθιστώντας τις ή μη περιοριστικούς παράγοντες για την ανάπτυξη των οικοσυστημάτων (Kuypers et al, 2018). Για παράδειγμα, κατά την αζωτοδέσμευση πρέπει να σπάσει ο τριπλός δεσμός του αερίου αζώτου (N_2) και το άζωτο να αναχθεί

σε αμμωνιακό (NH_4^+). Αυτή η διαδικασία έχει ως στόχο την παραγωγή αμμωνιακού αζώτου, δηλαδή της μοναδικής μορφής αζώτου που μπορεί να ενσωματωθεί στο κυτταρικό υλικό, με στόχο την αύξηση της κυτταρικής βιομάζας του μικροοργανισμού (αναβολισμός - assimilation) (Schaechter, 2009).



Εικόνα 2.1: Ο κύκλος του αζώτου από τη σκοπιά της Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας (Πηγή: Rittmann & McCarty, 2020)

Εκτός από την αζωτοδέσμευση (nitrogen fixation), άλλες αναβολικές διεργασίες είναι η απευθείας αφομοίωση των αμμωνιακών (ammonium assimilation), η απονιτροποίηση με σκοπό την παραγωγή αμμωνιακών (assimilatory nitrate reduction) και η αμμωνιοποίηση (ammonification). Απονιτροποίηση είναι η εξώθερμη διαδικασία κατά την οποία τα νιτρικά και νιτρώδη ιόντα καθίστανται δέκτες των ηλεκτρονίων στην βιοχημική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και, έτσι, ανάγονται. Αμμωνιοποίηση είναι η παραγωγή αμμωνιακών που πραγματοποιείται κατά την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης (mineralization) (Schaechter, 2009; Kuypers et al, 2018).

Όλες οι μη αναβολικές διεργασίες που επιτελεί ένας μικροοργανισμός είναι, *sensu stricto*, είτε διαδικασίες αναπνοής (respiration), όταν οδηγούν σε παραγωγή πρωτονιεγερτικής δύναμης (παραγωγή ATP), είτε άλλες καταβολικές διεργασίες (dissimilation), όταν δεν οδηγούν στην παραγωγή πρωτονιεγερτικής δύναμης, αλλά εξυπηρετούν άλλους σκοπούς όπως η εξισορρόπηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Η απονιτροποίηση (denitrification), η νιτροποίηση (nitrification) και η anammox διαδικασία είναι μη αναβολικές βιοχημικές διεργασίες. Μέσω της απονιτροποίησης τα νιτρικά ιόντα, τα νιτρώδη ιόντα, το μονοξείδιο του αζώτου και το διοξείδιο του αζώτου λειτουργούν ως εναλλακτικοί δέκτες ηλεκτρονίων κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, σχηματίζοντας ως τελικό προϊόν αέριο άζωτο (Schaechter, 2009). Τα βακτήρια που είναι ικανά για

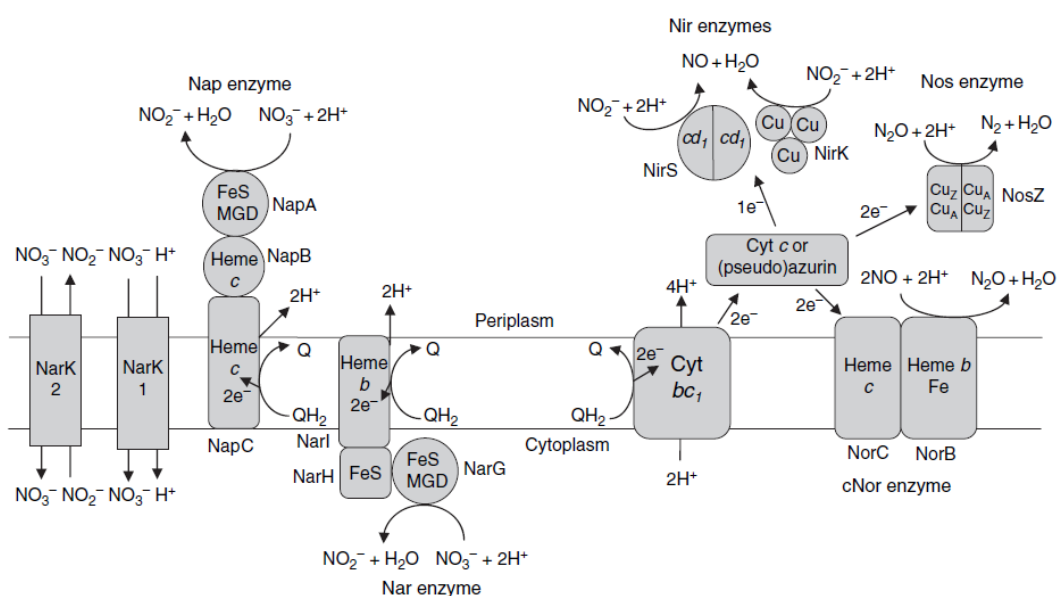
απονιτροποίηση ανήκουν συνολικά σε 32 γένη, για τα 13 από τα οποία υπάρχει επιβεβαιωμένη και πολλαπλά τεκμηριωμένη απονιτροποιητική δραστηριότητα και σημειώνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1) με τα κυριότερα χαρακτηριστικά τους (Hillel et al., 2005). Η νιτροποίηση περιλαμβάνει την αερόβια οξείδωση του αμμωνιακού αζώτου σε νιτρικό άζωτο. Η διαδικασία αναπνοοσ συνδυάζει την οξείδωση του αμμωνιακού αζώτου (δότης ηλεκτρονίων) με την αναγωγή των νιτρωδών ιόντων (δέκτης ηλεκτρονίων) οδηγώντας σε παραγωγή αερίου αζώτου (Schaechter, 2009).

Πίνακας 2.1: Γένη βακτηρίων ικανών για απονιτροποίηση (Πηγή: Sanmugasunderam et al., 1987; Hillel et al., 2005)

Γένος	Χαρακτηριστικά	Γένος	Χαρακτηριστικά
<i>Achromobacter</i>		<i>Janthinobacterium</i>	
<i>Acinetobacter</i>		<i>Kingella</i>	
<i>Agrobacterium</i>	Περιλαμβάνει είδη παθογόνα για τα φυτά	<i>Lysobacter</i>	
<i>Alcaligenes</i>	Απαντάται ευρέως στα εδάφη	<i>Moraxella</i>	
<i>Aquaspirillum</i>		<i>Neisseria</i>	
<i>Azospirillum</i>	Ικανά για αζωτοδέσμευση σε είδη γρασιδιού	<i>Paracoccus</i>	Περιλαμβάνει λιθότροφα και ετερότροφα είδη
<i>Arthrobacter</i>		<i>Propionobacterium</i>	Ικανά για ζύμωση και απονιτροποίηση
<i>Bacillus</i>	Περιλαμβάνει θερμόφιλα είδη	<i>Pseudomonas</i>	Απαντάται ευρέως στα εδάφη
<i>Branhamella</i>		<i>Rhizobium</i>	Ικανά για αζωτοδέσμευση σε όσπρια
<i>Chromobacterium</i>		<i>Rhodopseudomonas</i>	Ικανά για φωτοσύνθεση
<i>Corynebacterium</i>		<i>Simonsiella</i>	
<i>Cytophaga</i>		<i>Thermotrix</i>	
<i>Flavobacterium</i>	Πρόσφατα αποδεδειγμένη απονιτροποιητική ικανότητα	<i>Thiobacillus</i>	Περιλαμβάνει χημειο-αυτότροφα είδη
<i>Gluconobacter</i>		<i>Thiomicrospora</i>	
<i>Halobacterium</i>	Ανάπτυξη σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (NaCl)	<i>Vibrio</i>	
<i>Hyphomicrobium</i>	Ανάπτυξη σε υποστρώματα με μοναδική πηγή άνθρακα	<i>Xanthomonas</i>	

2.2.2 Η βιοχημεία της απονιτροποίησης

Η αναγωγή του νιτρικού αζώτου προς λιγότερο οξειδωμένες μορφές πραγματοποιείται με στόχο, τόσο τη συντήρηση του κυττάρου και την παραγωγή ενέργειας (dissimilation/respiration), όσο και τη σύνθεση νέας βιομάζας (assimilation), σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους (Schaechter, 2009; Kuypers et al, 2018). Σε κάθε περίπτωση, προκειμένου να επιτευχθεί απονιτροποίηση, πρέπει να πληρούνται οι εξής συνθήκες: (1) πηγή άνθρακα (C), (2) χαμηλή συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (O_2), και (3) επαρκής συγκέντρωση NO_3^- (Hillel et al., 2005; Jørgensen & Fath, 2008). Κάθε μεταβολή στον αριθμό οξείδωσης του αζώτου επιτελείται χάρη σε εξειδικευμένα ένζυμα (metal-activated enzymes) και μεταλλοένζυμα (metalloenzymes) που είναι υπεύθυνα για τις εκάστοτε μεταφορές των ηλεκτρονίων (Schaechter, 2009; Kuypers et al, 2018). Η βιοχημεία της απονιτροποίησης κατά τον καταβολισμό/αναπνοή των μικροοργανισμών (dissimilation/respiration) απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 2.2 και εκφράζεται μέσω των αντιδράσεων (A.16) έως (A.20) (pH 7) (Schultz & Zabel, 2013 ; Jørgensen & Fath, 2008; Hemp et al., 2016; Holmes et al., 2019; Rittmann & McCarty, 2020; Besson et al., 2022).



Εικόνα 2.2: Η βιοχημεία της απονιτροποίησης – καταβολισμός/αναπνοή (Πηγή: Schaechter, 2009)

ΚΑΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ/ΑΝΑΠΝΟΗ



Σύμφωνα με τις (A.16) έως (A.20), τα νιτρικά ιόντα ανάγονται διαδοχικά σε νιτρώδη, μονοξειδίο του αζώτου, υποξειδίο του αζώτου και τελικά σε αέριο άζωτο με το αντίστοιχο δυναμικό αναγωγής. Κάθε στάδιο της απονιτροποίησης είναι δυνατόν να ολοκληρωθεί παρουσία εξειδικευμένων ενζύμων, ανάλογα με τη φυσιολογία κάθε απονιτροποιητικού μικροοργανισμού. Σε περίπτωση απουσίας ορισμένων ενζύμων, πραγματοποιείται το στάδιο εκείνο της απονιτροποίησης για το οποίο ο μικροοργανισμός διαθέτει τα αντίστοιχα ένζυμα (Holmes et al., 2019). Για παράδειγμα, ορισμένοι απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί μπορούν να ανάγουν τα νιτρικά έως το στάδιο παραγωγής νιτρωδών (αντίδραση (A.16)), τα νιτρώδη έως το στάδιο παραγωγής οξειδίου του αζώτου (αντίδραση (A.17)) ή το υποξειδίο του αζώτου προς αέριο άζωτο (αντίδραση (A.19)). Η αντίδραση (A.20) εκφράζει την πλήρη απονιτροποίηση, δηλαδή την αναγωγή των νιτρικών σε αέριο άζωτο.

Η αναγωγή των νιτρικών (NO_3^-) σε νιτρώδη (NO_2^-) (αντίδραση (A.16)) καταλύεται από ένζυμα που ονομάζονται αναγωγάσες των νιτρικών (Nitrate Reductases – NR). Τα ένζυμα NR ανήκουν στην οικογένεια των DSMO (DiMethylSulfOxide) αναγωγασών, μιας ομάδας ενζύμων που περιέχουν συμπαραγοντες του μολυβδαινίου (Mo). Το μολυβδαίνιο είναι το μοναδικό μέταλλο της δεύτερης γραμμής των μετάλλων μετάπτωσης του περιοδικού πίνακα που απαντάται κατά κόρον στη φύση και στα έμβια όντα, εξαιτίας της υψηλής διαλυτότητας που παρουσιάζουν τα είδη υψηλού σθένους του (Coelho & Romão, 2015). Οι αναγωγάσες νιτρικών κατηγοριοποιούνται σε δύο διαφορετικές κατηγορίες (Schaechter, 2009; Coelho & Romão, 2015):

(1) την αναγωγή νιτρικών (Nar): Βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο και καταλύει καταβολικές αντιδράσεις, χωρίς να οδηγεί σε παραγωγή πρωτονιεργετικής δύναμης. Οι συνηθέστερες υποομάδες Nar που συναντώνται κυρίως στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι οι NarA, NarB και NarC. Τα ένζυμα αυτά δρουν με συμπαραγοντες ενώσεις σιδήρου – θείου (Fe-S clusters).

(2) την αναγωγή νιτρικών (Nar): Είναι προσδεσμένη στην κυτταρικοπλασματική μεμβράνη (Nar) και καταλύει αντιδράσεις αναπνοής, οδηγώντας σε παραγωγή πρωτονιεργετικής δύναμης. Απαρτίζεται από τις υποομάδες NarG, NarH και NarI. Η συνισταμένη δράση των NarG, NarH και NarI οδηγεί σε απελευθέρωση ηλεκτρονίων μέσω της οξειδωσης της ουβικινόλης (QH_2) σε ουβικινόνη (Q) που στη συνέχεια δεσμεύονται για την αναγωγή νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη. Επειδή η αναγωγή των νιτρικών ιόντων πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα, απαιτείται η μεταφορά των νιτρικών ιόντων προς το εσωτερικό τμήμα του κυττάρου με τη βοήθεια μεταφορικών πρωτεϊνών της οικογένειας NarK. Οι συμπαραγοντες των ενζύμων NarG και NarH είναι ενώσεις σιδήρου – θείου (Fe-S clusters), ενώ των ενζύμων NarI ενώσεις που περιέχουν σίδηρο, όπως η αίμη.

Το δεύτερο βήμα της απονιτροποίησης είναι η αναγωγή του νιτρώδους αζώτου (NO_2^-) σε μονοξειδίο του αζώτου (NO), όπως διατυπώνεται στην αντίδραση (A.17). Η διαδικασία αυτή ολοκληρώνεται με τη συνδρομή ενζύμων που ονομάζονται αναγωγάσες των νιτρωδών (Nitrite Reductases – NiR) (Besson et

al., 2022). Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες που δεν απαντώνται ποτέ ταυτόχρονα στο ίδιο βακτήριο (Schaechter, 2009):

- (1) στις αναγωγάσες κυτοχρώματος *cd1*, NirS, που περιέχουν σίδηρο.
- (2) στις αναγωγάσες NirK, που περιέχουν χαλκό.

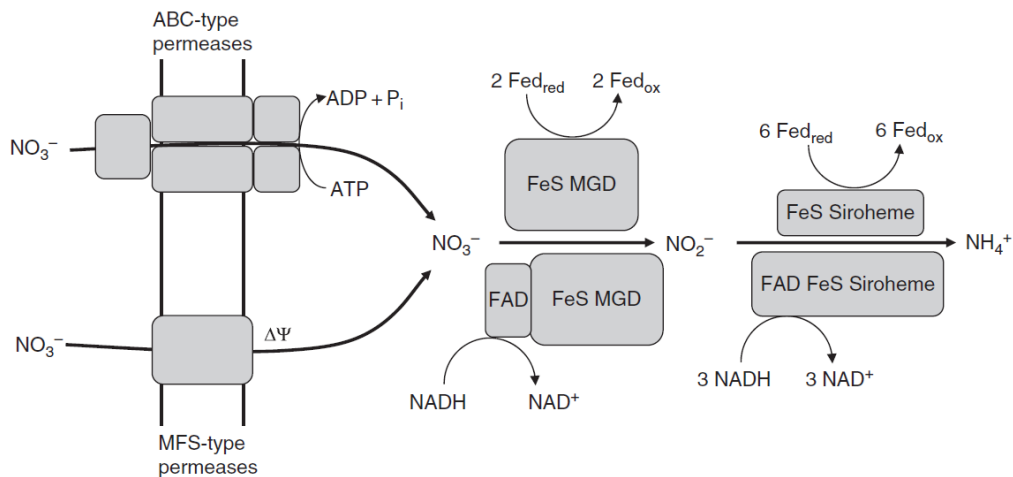
Οι τελευταίες ανήκουν συνήθως σε βακτήρια του εδάφους που ανάγουν πλήρως τα νιτρικά ιόντα σε αέριο άζωτο (Horrell et al., 2017).

Η αναγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) σε υποξείδιο του αζώτου (N₂O) είναι το τρίτο βήμα της απονιτροποίησης, όπως φαίνεται στην αντίδραση (A.18), και πραγματοποιείται από τα ένζυμα Nor που βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Οι τρεις τύποι Nor που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι οι cNor, qNor και qCu_ANor και περιέχουν σίδηρο ή και χαλκό (qCu_ANor). Τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την αναγωγή του νιτρώδους αζώτου προέρχονται από το περιπλασμικό κυτόχρωμα τύπου *c*, την αζουρίνη ή την ψευδοαζουρίνη στην περίπτωση του ενζύμου cNor, από την οξειδωση της ουβικινόλης (QH₂) ή της μενακινόλης στην περίπτωση του ενζύμου qNor και από το κυτόχρωμα *c₅₅₁* και την οξειδωση της μενακινόλης στην περίπτωση του ενζύμου qCu_ANor (Schaechter, 2009; Hino et al., 2010; Spiro, 2012).

Το τελευταίο στάδιο της απονιτροποίησης (αντίδραση (A.19)) καταλύεται από το ένζυμο Nos που απαντάται στον περιπλασματικό χώρο του κυττάρου και αποτελείται από δύο «πόλους», έναν υπεύθυνο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων (Cu_A) και έναν υπεύθυνο για τη δράση ως καταλύτη (Cu_Z). Τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την αναγωγή του οξειδίου του αζώτου προέρχονται από την οξειδωση της ουβικινόλης (QH₂) (Schaechter, 2009; Pomowski et al., 2011).

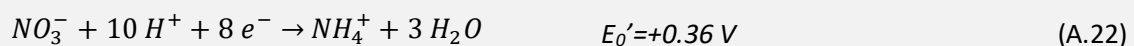
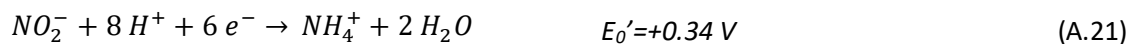
Η βιοχημεία της απονιτροποίησης κατά τον αναβολισμό των μικροοργανισμών απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 2.3 και εκφράζεται μέσω των αντιδράσεων (A.16) και (A.21) (pH 7) (Schultz & Zabel, 2013 ; Jørgensen & Fath, 2008; Hemp et al., 2016; Rittmann & McCarty, 2020; Besson et al., 2022). Η αντίδραση (A.22) εκφράζει τη συνολική αντίδραση αναγωγής των νιτρικών σε αμμωνιακό άζωτο. Κατά τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού η βιοχημική αντίδραση (A.16) πραγματοποιείται μέσω της δράσης της κυτοπλασματικής αναγωγάσας των νιτρικών (Nas). Παρόλο που η Nas διαφέρει δομικά και λειτουργικά από τις αναγωγάσες νιτρικών Nar και Nar, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται ο καταβολισμός και η αναπνοή των μικροοργανισμών, αντίστοιχα, και οι τρεις αναγωγάσες νιτρικών δρουν με συμπαραγόντες ενώσεις μολυβδαινίου (MGD) και σιδήρου – θείου (Fe-S cluster). Σε κυανοβακτήρια και αρχαία η Nas απαντάται με τη μορφή ενζύμου εξαρτώμενου από τη φερρεδοξίνη ή τη φλαβοδοξίνη, ενώ σε ετερότροφα βακτήρια απαντάται ως ένζυμο εξαρτώμενο από το NADH (Schaechter, 2009). Το δεύτερο στάδιο της αναγωγής των νιτρωδών σε αμμωνιακό άζωτο (αντίδραση (A.21)) πραγματοποιείται χάρη στις αναγωγάσες νιτρωδών Nir, οι οποίες διαφέρουν δομικά και

λειτουργικά από τα ένζυμα Nir κατά τον καταβολισμό/αναπνοή. Λειτουργούν με προσθετική ομάδα την αίμη και με συμπαραγόντες ενώσεις σιδήρου – θείου (Fe-S cluster) (Schaechter, 2009).



Εικόνα 2.3: Η βιοχημεία της απονιτροποίησης – αναβολισμός (Πηγή: Schaechter, 2009)

ΑΝΑΒΟΛΙΣΜΟΣ

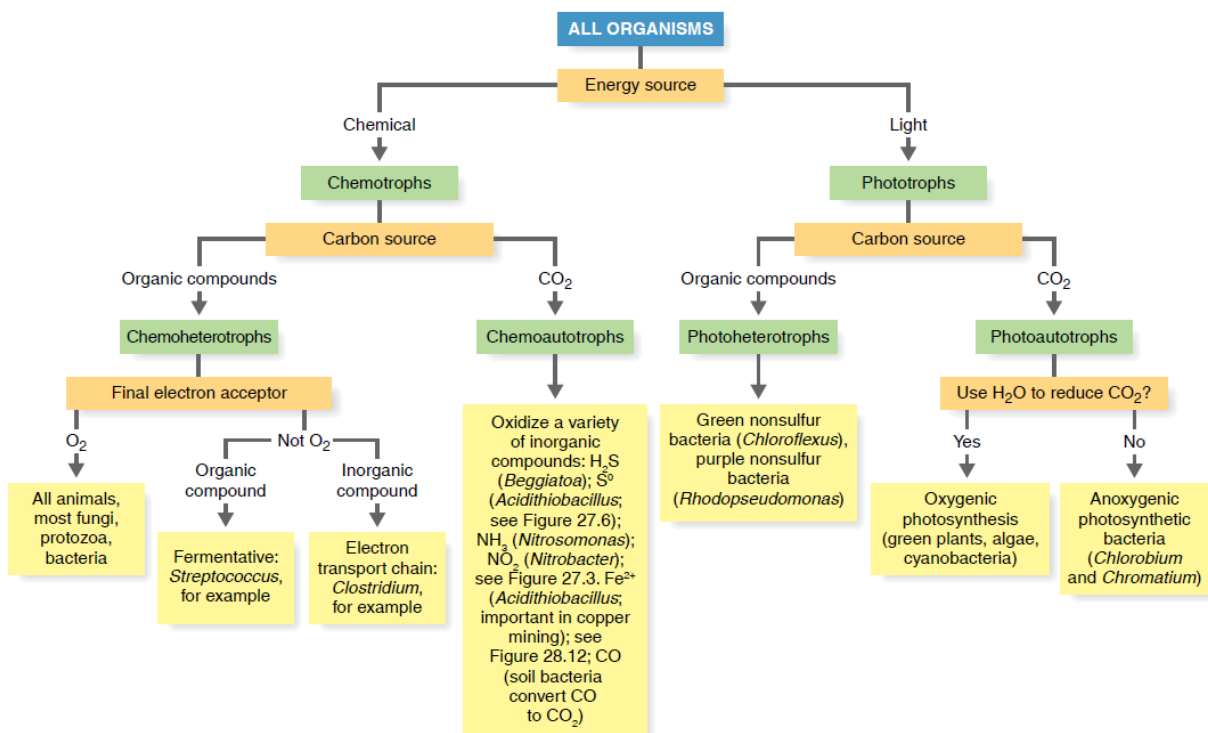


Από τις βιοχημικές διεργασίες καταβολισμού και αναβολισμού που αναλύθηκαν προκύπτει η εξέχουσα σημασία των μετάλλων ως ιχνοστοιχείων κατά τον κυτταρικό μεταβολισμό. Εκτός από τον σίδηρο (Fe), τον χαλκό (Cu) και το μολυβδαίνιο (Mo), , πληθώρα άλλων μετάλλων, όπως το βόριο (B), το κοβάλτιο (Co), το μαγγάνιο (Mn), το νικέλιο (Ni), το βολφράμιο (W), το βανάδιο (V) και ο ψευδάργυρος (Zn), ενεργοποιούν κυτταρικά ένζυμα ή περιέχονται σε αυτά και σε συμπαραγόντες τους ή άλλους παράγοντες ανάπτυξης, όπως οι βιταμίνες (Madigan et al., 2018).

2.2.3 Πηγή άνθρακα

Στην Εικόνα 2.4 παρουσιάζεται η ταξινόμηση των οργανισμών με βάση τον απαραίτητο άνθρακα για τον μεταβολισμό τους. Από το σχήμα αυτό φαίνεται ότι οι οργανισμοί, είτε αντλούν ενέργεια από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, είτε από το φως, όταν χρησιμοποιούν οργανικό άνθρακα για τον μεταβολισμό τους ονομάζονται ετερότροφοι (χημειο-ετερότροφοι και φωτο-ετερότροφοι, αντίστοιχα) και όταν χρησιμοποιούν ανόργανο άνθρακα ονομάζονται αυτότροφοι (χημειο-αυτότροφοι και φωτο-αυτότροφοι, αντίστοιχα) (Archana et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014; Tortora et al., 2021). Παρόλο που πολλές φορές οι όροι «ετερότροφος» και «οργανότροφος» και οι όροι «αυτότροφος» και

«λιθότροφος» ταυτίζονται μεταξύ τους, περιγράφουν διαφορετικές κατηγορίες μικροοργανισμών (Madigan et al., 2018).



Εικόνα 2.4: Διάκριση των οργανισμών ανάλογα με την πηγή ενέργειας και την πηγή άνθρακα που καταναλώνουν (Πηγή: Tortora et al., 2021)

Οι οργανισμοί μπορούν να αντλούν τον άνθρακα που χρειάζονται για παραγωγή ενέργειας και σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού από χημικές ενώσεις που περιέχουν άτομα άνθρακα στη δομή τους. Όταν αντλείται ενέργεια από τις μεταβολικές αντιδράσεις και ανάλογα με τον δότη ηλεκτρονίων, που μπορεί να είναι οργανική ή ανόργανη ένωση, οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε «οργανότροφους» και «λιθότροφους», αντίστοιχα. Οι οργανότροφοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν οργανικές ενώσεις τόσο για σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού, όσο και για παραγωγή ενέργειας, αποτελώντας ταυτόχρονα ετερότροφους μικροοργανισμούς. Αντίθετα, οι λιθότροφοι μικροοργανισμοί συνθέτουν κυτταρικό υλικό τόσο μέσω οργανικών, όσο και μέσω ανόργανων ενώσεων, ανήκοντας στην κατηγορία είτε των ετερότροφων, είτε των αυτότροφων οργανισμών, αντίστοιχα (Madigan et al., 2018). Στη συνέχεια θα συζητηθεί η πηγή του δότη ηλεκτρονίων εστιάζοντας στα απονιτροποιητικά βακτήρια.

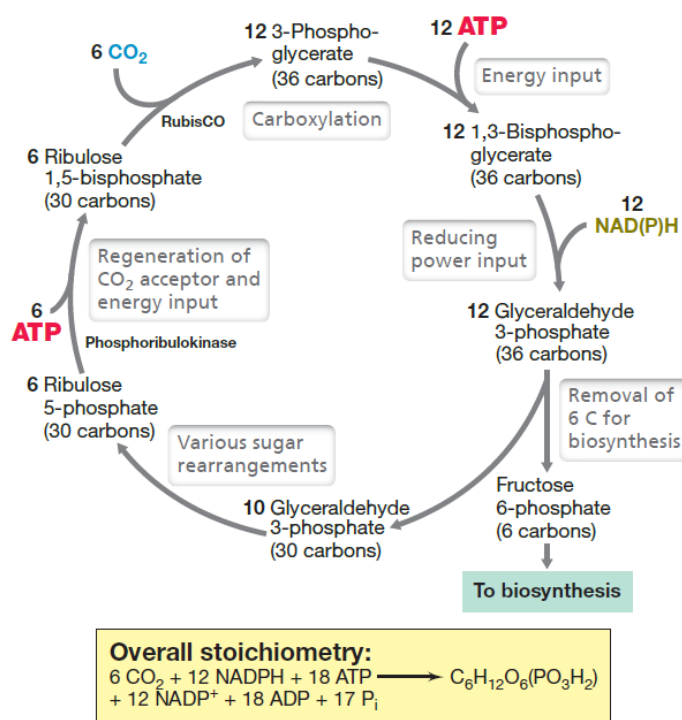
Οι ανόργανες ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως πηγή ηλεκτρονίων κατά την αυτότροφη απονιτροποίηση περιλαμβάνουν το υδρογόνο (H_2), ενώσεις του θείου (S^0 , S^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-}), δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}), θειούχο σίδηρο (FeS_2) και αρσενικόδεις και μαγγανιούχες ενώσεις (Di Carua et al., 2019;

Pang & Wang, 2021). Μεταξύ αυτών τα βακτήρια χρησιμοποιούν συνηθέστερα το υδρογόνο και ενώσεις του θείου (Archna et al., 2012; Albina et al., 2019). Οι αυτότροφοι απονιτροποιητές παρουσιάζουν χαμηλότερους ρυθμούς απονιτροποίησης και ανάπτυξης σε σύγκριση με τις ετερότροφες καλλιέργειες, με αποτέλεσμα να απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος παραμονής, χώρος και κόστος (Archna et al., 2012; Albina et al., 2019). Αυτό οφείλεται, πρώτον, στην επιπλέον ενέργεια που απαιτείται για την αφομοίωση του ανόργανου άνθρακα σε σύγκριση με την αφομοίωση οργανικού άνθρακα και, δεύτερον, στη χαμηλή διαλυτότητα του αερίου υδρογόνου (0.74 mM, 30°C) που επηρεάζει την κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών και το καθιστά εύκολα περιοριστικό παράγοντα ανάπτυξης. Για παράδειγμα, ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης που έχει καταγραφεί για τους υδρογόνο-αυτότροφους απονιτροποιητές είναι 365.4 mM/d, ενώ για τους ετερότροφους 4 887 mM/d (Albina et al., 2019). Πολλοί αυτότροφοι μικροοργανισμοί, όπως τα υδρογόνο-αυτότροφα βακτήρια, είναι ευαίσθητα στις μεταβολές του pH και έχουν την τάση να προκαλούν μεγαλύτερη συσσώρευση νιτρικών σε σύγκριση με τα ετερότροφα, ενώ η επιτυχία της απονιτροποίησης εξαρτάται από παραμέτρους όπως ο υδραυλικός χρόνος παραμονής ακόμη και όταν η συγκέντρωση νιτρικών είναι χαμηλότερη από 500 mg/L (Zhou et al., 2011; Albina et al., 2019).

Κατά την αυτότροφη απονιτροποίηση, οι ανόργανες μορφές άνθρακα, όπως το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και τα ανθρακικά ιόντα (HCO₃⁻), αφομοιώνονται από τα κύτταρα μέσω ειδικών ενζύμων που ονομάζονται καρβοξυλάσες. Ο συνηθέστερος βιοχημικός κύκλος που χρησιμοποιούν οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί είναι ο Κύκλος του Calvin (Εικόνα 2.5) (Madigan et al., 2018). Η αναλογία άνθρακα – αζώτου (C/N) πρέπει να επιλέγεται με προσοχή, καθώς πολύ υψηλές τιμές μπορεί να οδηγήσουν σε βιοχημικά μονοπάτια αναγωγής νιτρικών διαφορετικά από τα επιθυμητά, όπως αναγωγή των νιτρικών σε αμμωνιακά, ενώ πολύ χαμηλές τιμές αναχαιτίζουν την απονιτροποίηση (Albina et al., 2019). Οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί που απαντώνται συχνότερα στη βιβλιογραφία ανήκουν στα γένη *Paracoccus spp.*, *Thiobacillus spp.*, *Thiosphaera spp.*, *Ferrobacillus spp.*, *Gallionella spp.*, *Leptothrix spp.*, *Sphaerotillus spp.*, *Dechloromonas spp.* και *Hydrogenophaga spp.* (Archna et al., 2012; Singh et al., 2022). Υδρογόνο-αυτότροφοι μικροοργανισμοί απαντώνται σπάνια στη φύση εξαιτίας των περιορισμένων συγκεντρώσεων υδρογόνου, η παρουσία του οποίου προϋποθέτει έλλειψη οργανικών υποστρωμάτων και επικράτηση ιδιαίτερων συνθηκών, όπως υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης (Albina et al., 2019).

Τα περισσότερα απονιτροποιητικά βακτήρια είναι ετερότροφα και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τόσο απλά οργανικά μόρια, όσο και σύνθετη οργανική ύλη, με αποτέλεσμα την παραγωγή αλκαλικότητας και αύξηση των τιμών pH του διαλύματος, η οποία σχετίζεται θετικά με τη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων που ανάγονται (Hamlin et al., 2008; Mielcarek et al., 2020). Τα απλά οργανικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται συνηθέστερα με σκοπό τη μελέτη της απονιτροποίησης και περιλαμβάνουν τα οξικά ιόντα (ως οξικό νάτριο ή οξικό οξύ), την αιθανόλη, τη μεθανόλη και το μεθάνιο

(Gerber et al., 1986; Hamlin et al., 2008; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Cherchi et al., 2009; Burghate & Ingole, 2013; Mohsenipour et al., 2014; Lee et al., 2019; Wang et al., 2021). Λιγότερο συχνά απαντώνται στη βιβλιογραφία τα προπιονικά ιόντα (ως προπιονικό νάτριο), η γλυκόζη, η γλυκερόλη, τα γαλακτικά, βουτυρικά, ηλεκτρικά, φορμικά, κιτρικά και μημμυκικά ιόντα, το ασπαραγινικό οξύ και η 2,3-βουτανοδιόλη. (Gerber et al., 1986; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Burghate & Ingole, 2013; Lee et al., 2019). Όσον αφορά τη σύνθετη οργανική ύλη, αυτή μπορεί να περιλαμβάνει ουσίες όπως εκχύλισμα ζύμης (yeast), τα εμπορικά προϊόντα με εμπορική ονομασία MicroC™ (προϊόν οικολογικό, μη εύφλεκτο, με συγκέντρωση άμεσα βιοδιασπάσιμου άνθρακα περίπου 500 mg/L) και Cerelose™ (βασικό συστατικό η γλυκόζη) και ροές που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα, όπως βιομηχανικά απόβλητα (πχ μελάσα, απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας, οινοποιίας και ζυθοποιίας) (Lee & Welander, 1996; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Cherchi et al., 2009; Burghate & Ingole, 2013).



Εικόνα 2.5: Ο κύκλος του Calvin (Πηγή: Madigan et al., 2018)

Το είδος του οργανικού άνθρακα μπορεί να επηρεάσει:

- την ταχύτητα απονιτροποίησης (Fu et al., 2022; Singh et al., 2022)

Οργανικές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους οδηγούν συνήθως σε βραδύτερη απονιτροποίηση σε σύγκριση με ενώσεις χαμηλότερου μοριακού βάρους (Fu et al., 2022; Singh et al., 2022). Για παράδειγμα, η μεθανόλη, το οξικό νάτριο/οξικό οξύ και η αιθανόλη, είναι εύκολα αφομοιώσιμες από τους μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται υψηλοί ρυθμοί απονιτροποίησης (Fu et al., 2022).

- τη μικροβιακή ποικιλότητα (Cherchi et al., 2009; Srinandan et al., 2012; Xu et al., 2018; Wang et al., 2021; Jiang et al., 2022a)

Περίπλοκες στη σύνθεσή τους πηγές οργανικού άνθρακα, όπως η MicroC™ και φυσικά υλικά (πχ αγροτικά προϊόντα και βιοδιασπάσιμα πολυμερή), μπορούν να οδηγήσουν σε ευρύτερη μικροβιακή ποικιλότητα, εξαιτίας της πληθώρας των διαθέσιμων εναλλακτικών μεταβολικών οδών που μπορούν να ακολουθήσουν οι μικροοργανισμοί και της πολυπλοκότητας των διεργασιών (πχ υδρόλυση) (Cherchi et al., 2009; Wang et al., 2021). Από την άλλη πλευρά, οι διεργασίες αυτές μπορεί να είναι ανεπιθύμητες όταν συντελούνται ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση (πχ ζύμωση), ιδιαίτερα όταν οδηγούν σε συσσώρευση νιτρωδών ιόντων. Τα προβλήματα αυτά μπορούν να αποφευχθούν επιλέγοντας απλά οργανικά μόρια, όπως μεθανόλη και οξικό (Lee & Welander, 1996). Ακόμη, όμως, και η εναλλαγή μεταξύ των απλών οργανικών μορίων μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού. Για παράδειγμα, έχει παρατηρηθεί μεταβολή στη σύνθεση του μικροβιακού πληθυσμού κατά 27% όταν τα οξικά ιόντα αντικαταστάθηκαν από γλυκόζη, 71.5% όταν η γλυκόζη αντικαταστάθηκε από μεθανόλη και 64% όταν η μεθανόλη αντικαταστάθηκε από αιθανόλη (Srinandan et al., 2012). Τα οξικά ιόντα σχετίζονται με πτωχή μικροβιακή ποικιλότητα (Srinandan et al., 2012; Jiang et al., 2022a), σε αντίθεση με τη μεθανόλη και τη γλυκόζη, για την οποία έχει παρατηρηθεί πλούσια μικροβιακή ποικιλότητα που σχετίζεται με τη συνύπαρξη μικροοργανισμών που επιτελούν διεργασίες απονιτροποίησης και ζύμωσης (Srinandan et al., 2012; Xu et al., 2018; Jiang et al., 2022a). Σε αντιδιαστολή με τη μικροβιακή ποικιλότητα, η αφθονία σε απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς έχει παρατηρηθεί υψηλότερη για τα οξικά ιόντα και την αιθανόλη (Srinandan et al., 2012; Xu et al., 2018).

- τη συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων κατά την απονιτροποίηση, όπως νιτρωδών ιόντων (Albina et al., 2019; Wang et al., 2021)

Η συσσώρευση αυτή οφείλεται στον διαφορετικό αριθμό ηλεκτρονίων που λαμβάνουν μέρος στις βιοχημικές αντιδράσεις οξειδοαναγωγής (Albina et al., 2019; Wang et al., 2021). Για παράδειγμα, τα βουτυρικά ιόντα απελευθερώνουν 20 ηλεκτρόνια κατά την οξείδωσή τους, παρέχοντας αφθονία ηλεκτρονίων, ενώ τα οξικά ιόντα απελευθερώνουν μόλις 8, δημιουργώντας ανταγωνισμό μεταξύ των αναγωγασών για πρόσληψη ηλεκτρονίων. Ο ανταγωνισμός αυτός ευνοεί τη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων στο εσωτερικό του κυττάρου και τα οποία στη συνέχεια αποβάλλονται από τα κύτταρα με τη βοήθεια μεταφορέων, όπως το NarK (Albina et al., 2019). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι Lee & Welander (1996), διερευνώντας την επίδραση της παρουσίας εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) στην απονιτροποίηση με κύριους δότες ηλεκτρονίων οξικό οξύ, μεθανόλη, υδρολυμένο άμυλο και ακατέργαστο σιρόπι που προέρχεται από την επεξεργασία ζάχαρης, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία εκχυλίσματος ζύμης μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις νιτρωδών ιόντων στην εκροή, χωρίς να επηρεάζει με άλλο τρόπο την απονιτροποίηση.

- τη συσσώρευση αμμωνιακών ιόντων στο διάλυμα (Akunna et al., 1993; Hamlin et al., 2008; Jiang et al., 2022a)

Έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις αμμωνιακών ιόντων με δότες ηλεκτρονίων τη γλυκόζη, τη γλυκερόλη, τη σουκρόζη και οργανικές ουσίες με βασικό συστατικό αυτές, όπως η μελάσα και το προϊόν Cerelose™, σε σύγκριση με άλλες, όπως τα οξικά ιόντα και η μεθανόλη. Το φαινόμενο αυτό έχει συνδεθεί με διεργασίες ζύμωσης που πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση και ευνοούνται παρουσία των παραπάνω πηγών οργανικού άνθρακα (Akunna et al., 1993; Hamlin et al., 2008; Jiang et al., 2022a).

- τη συσσώρευση άλλων διαλυτών προϊόντων που απελευθερώνονται κατά τον μικροβιακό μεταβολισμό (SMP-soluble microbial products) (Soh et al., 2020; Jiang et al., 2022)

Τέτοιες ουσίες είναι οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες, τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και άλλες, όπως φθορίζοντα διαλυτά παραπροϊόντα και απελευθερώνονται ανεξάρτητα από την πηγή οργανικού άνθρακα, αλλά η συσσώρευσή τους εξαρτάται από αυτή (Soh et al., 2020; Jiang et al., 2022a). Για παράδειγμα, οι συγκεντρώσεις SMP έχουν παρατηρηθεί υψηλότερες για την γλυκόζη (87.4%) σε σύγκριση με τα οξικά ιόντα (58.1%) και τη μεθανόλη (64.3%), με αποτέλεσμα την επιβάρυνση της ποιότητας της εκροής (Jiang et al., 2022a). Οι διεργασίες ζύμωσης των SMP που μπορούν να λαμβάνουν χώρα κατά την απονιτροποίηση οδηγούν σε απελευθέρωση χημικών ουσιών, όπως φουλβικών και χουμικών οξέων, και μπορούν να επιδράσουν θετικά στην απονιτροποίηση, όπως στην περίπτωση των οξικών ιόντων και της μεθανόλης, αλλά όχι της γλυκόζης. Αντίθετα, τα φθορίζοντα συστατικά των SMP μπορούν να προκαλέσουν αναχαίτιση της απονιτροποίησης. Συνεπώς, η συνολική επίδραση των SMP εξαρτάται από τη συνισταμένη επίδραση των επιμέρους συστατικών τους (Jiang et al., 2022a).

- την παραγωγή βιομάζας (Hamlin et al., 2008)

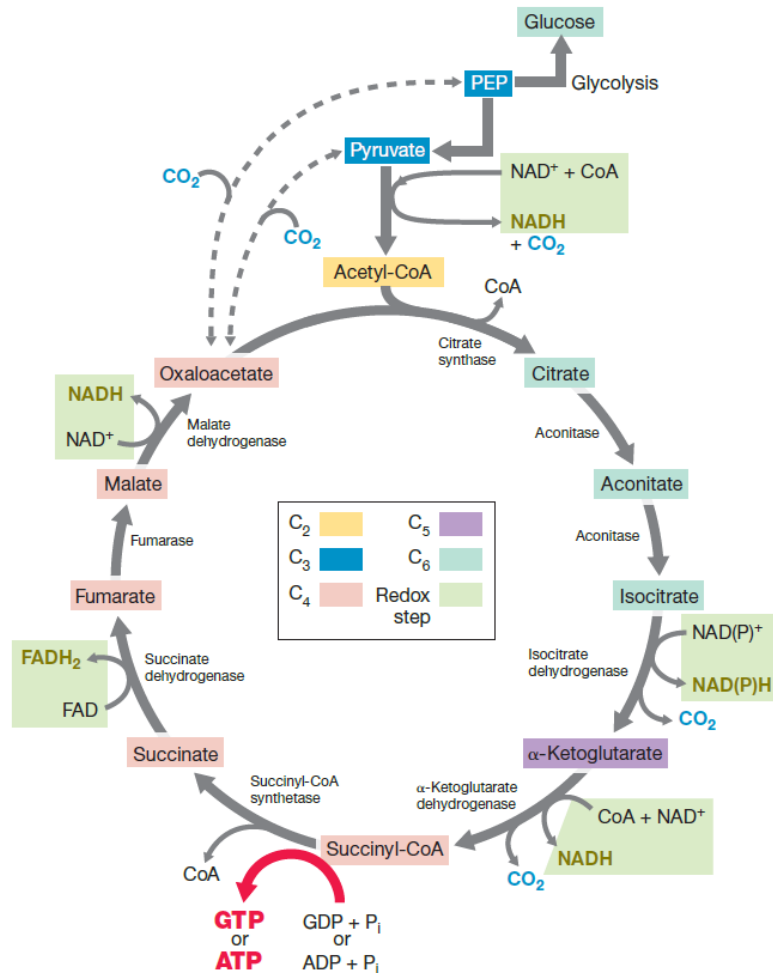
Έχει παρατηρηθεί ότι οργανικές ουσίες με βασικό συστατικό τη γλυκόζη και τη σουκρόζη, όπως το εμπορικό προϊόν Cerelose™ και η μελάσα, αντίστοιχα, ευνοούν τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού, σε σύγκριση με άλλες οργανικές ουσίες, όπως τα οξικά ιόντα και η μεθανόλη (Hamlin et al., 2008).

2.2.3.1 Απλά οργανικά μόρια

Τα οξικά ιόντα που προέρχονται από τη διάσπαση του οξικού οξέος και του οξικού νατρίου χρησιμοποιούνται απευθείας από τους μικροοργανισμούς στο ακετυλοσυνένζυμο Α (acetyl-CoA) στον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (Κύκλος TCA ή Κύκλος Krebs ή Κύκλος του κιτρικού οξέος-Εικόνα 2.6), μέσω του οποίου (Αγγελής, 2017; Constantin & Fick, 1997):

- παράγεται ενέργεια με τη μορφή ATP, ύστερα από επανοξειδωση των ανηγμένων συνενζύμων NADH και FADH₂ (το NADH παράγει 3 μόρια ATP ανά μόριο και το FADH₂ 2 μόρια ATP ανά μόριο).

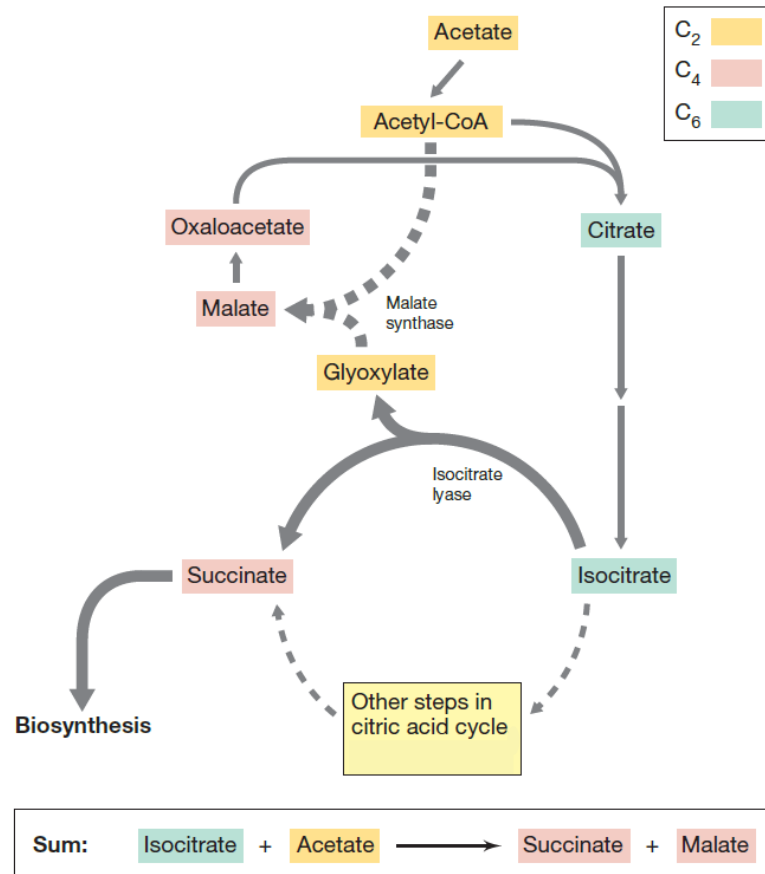
- Παράγονται ενδιάμεσοι μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ουσίες στη βιοσύνθεση κυτταρικών υλικών. Για παράδειγμα, οι κυριότερες οδοί αφομοίωσης των αμμωνιακών περιλαμβάνουν το α-ακετογλουταρικό οξύ που μετατρέπεται σε γλουταμικό (πρόδρομο μόριο του γλουταμινικού και του φολικού οξέος και δομικό συστατικό των πρωτεϊνών) και το οξαλοξικό οξύ που μετατρέπεται σε ασπαρτικό.



Εικόνα 2.6: Ο κύκλος του κιτρικού οξέος ή τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) ή Krebs (Πηγή: Madigan et al., 2018)

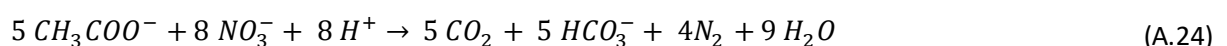
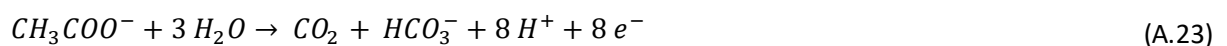
Οι οργανικές πηγές που περιέχουν δύο άτομα άνθρακα, όπως τα οξικά ιόντα, δεν είναι δυνατό να οξειδώνονται χρησιμοποιώντας τον κύκλο του κιτρικού οξέος με τη μορφή που περιγράφεται στην Εικόνα 2.6. Το ακετυλοσυνένζυμο-A (acetyl-CoA) μπορεί να εισέλθει στον κύκλο του κιτρικού οξέος και να σχηματίσει κιτρικό οξύ (citrate) αντιδρώντας με οξαλοξικό οξύ, διαδικασία που επαναλαμβάνεται μόνο εφόσον πραγματοποιείται αναγέννηση οξαλοξικού μέσω του κύκλου. Όμως, εάν το οξαλοξικό χρησιμοποιείται για παραγωγή πρόδρομων ουσιών, όπως γλυκόζης και αμινοξέων, στη βιοσύνθεση κυτταρικών υλικών, ο κύκλος παύει να επαναλαμβάνεται. Προκειμένου να αποτραπεί το φαινόμενο

αυτό, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει έναν μηχανισμό μέσω του οποίου εξασφαλίζεται η παραγωγή οξαλοξικού από μηλικό οξύ με ενδιάμεσο προϊόν το γλυοξυλικό οξύ, παρακάμπτοντας τα στάδια εκείνα που αφαιρούν άνθρακα από τον κύκλο του κιτρικού οξέος με τη μορφή διοξειδίου (CO₂). Ο μηχανισμός αυτός περιγράφεται στην Εικόνα 2.7 και ονομάζεται κύκλος του γλυοξυλικού οξέος (Αγγελής, 2017; Madigan et al., 2018).



Εικόνα 2.7: Ο κύκλος του γλυοξυλικού οξέος (Πηγή: Madigan et al., 2018)

Η ημιαντίδραση οξείδωσης των οξικών ιόντων περιγράφεται από την αντίδραση (A.23) (Rittmann & McCarty, 2020) που σε συνδυασμό με την ημιαντίδραση αναγωγής νιτρικών (A.20) οδηγεί στην αντίδραση απονιτροποίησης (A.24) που περιγράφει την κυτταρική αναπνοή.



Ο ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης με δότη ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα κυμαίνεται μεταξύ 0.091 mg N/gr VSS/h (Lee et al., 2019) έως 76 mg N/gr VSS/h (Lee & Welander, 1996), όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2). Το οξικά μπορούν να επιτύχουν διαδοχικά ταχύτερη απονιτροποίηση σε σύγκριση με τα γαλακτικά και τα βουτυρικά ιόντα, την αιθανόλη, τα προπιονικά, ηλεκτρικά και φορμικά ιόντα, τη 2,3-βουτανοδιόλη, τη μεθανόλη, τη γλυκόζη και τα κιτρικά ιόντα (Gerber et al., 1986; Tam et al., 1992; Lee & Welander, 1996; Elefsiniotis & Li, 2006; Shen et al., 2009). Η επιλογή οξικού νατρίου ως πηγής άνθρακα μπορεί να σχετίζεται με μη πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων (Tam et al., 1992; Constantin & Fick, 1997; Lee et al., 2019), παρουσία νιτρικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Akunna et al., 1993; Srinandan et al., 2012; Lee et al., 2019), αυξημένη συσσώρευση υποξειδίου του αζώτου (N₂O), σχεδόν μηδενική παραγωγή αερίου αζώτου (van Rijn et al., 1996; Lee et al., 2019), περιορισμένη παραγωγή αμμωνιακών (Akunna et al., 1993; Srinandan et al., 2012; Lee et al., 2019) και απελευθέρωση ορθοφωσφορικών κατά την απονιτροποίηση ακόμη και παρουσία νιτρικών ιόντων στο διάλυμα (Gerber et al., 1986; Tam et al., 1992). Όταν τα οξικά ιόντα προέρχονται από την προσθήκη οξικού οξέος στο διάλυμα, τότε το pH του διαλύματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση οξικού οξέος σε αυτό ($pK_a=4,756$ (Speight, 2017)) (Elefsiniotis & Li, 2006). Συγκεντρώσεις οξικών ιόντων υψηλότερες από 100 mg/L μπορούν να οδηγήσουν σε μείωση των τιμών pH (Osaka et al., 2008). Το pH του διαλύματος μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση (Σ.2), με την προϋπόθεση ότι το σύνολο του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και των όξινων ανθρακικών ιόντων (HCO₃⁻) αντιπροσωπεύονται εξ ολοκλήρου από τη συγκέντρωση ανθρακικών ιόντων (CO₃²⁻) (Albina et al., 2019). Από την (Σ.2) προκύπτει ότι για πολύ υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων το pH τείνει στο 10. Επομένως, το pH μπορεί να γίνει πιο όξινο, όταν το αρχικό pH είναι υψηλότερο από 10 και πιο βασικό, όταν είναι χαμηλότερο από 10, φαινόμενο που απαντάται βιβλιογραφικά ως «αυτό-αλκάλωση» ή «αυτό-οξίνιση», αντίστοιχα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η παραγωγή βιομάζας με δότη ηλεκτρονίων τα οξικά μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0.35 g VSS/g COD (Onnis-Hayden & Gu, 2008; Cherchi et al., 2009) και 0.65 g VSS/g COD (Peng et al., 2007).

$$pH = 10.32 + \log \left(\frac{[CO_3^{2-}]_{\text{αρχικό}} + \frac{3}{8} [NO_3^-]}{[HCO_3^-]_{\text{αρχικό}} + \frac{7}{8} [NO_3^-]} \right) \quad (\Sigma.2)$$

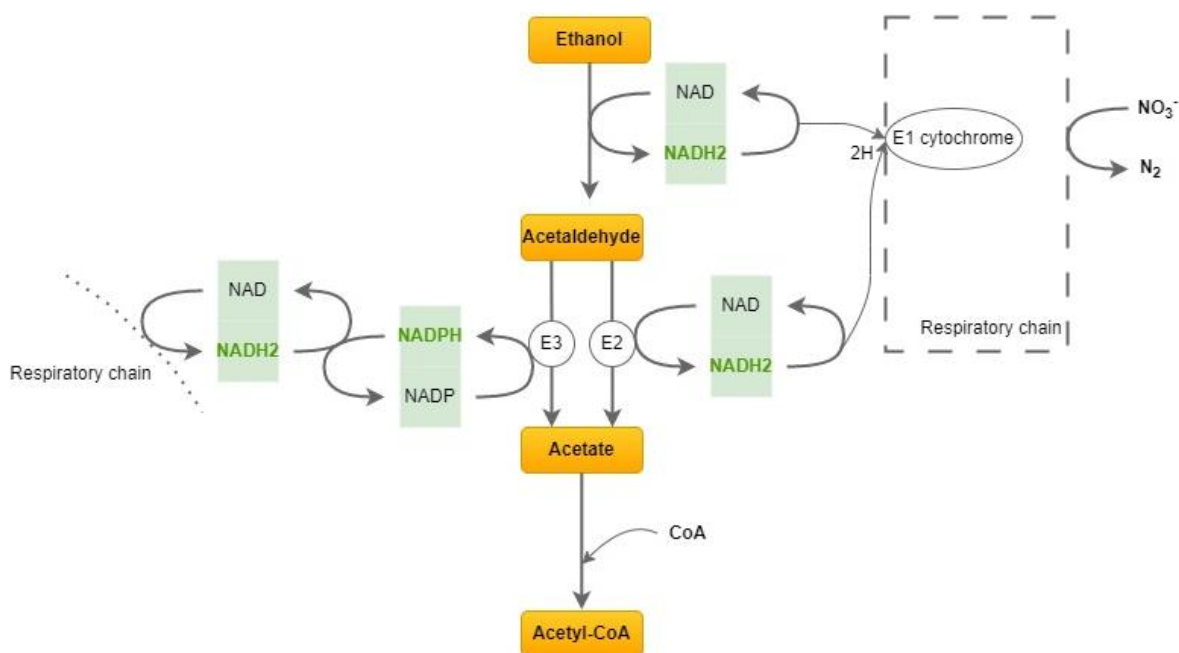
όπου,

[CO₃²⁻] η αρχική συγκέντρωση ανθρακικών ιόντων

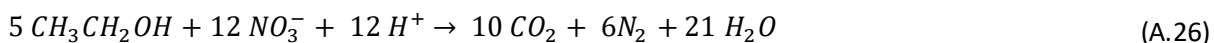
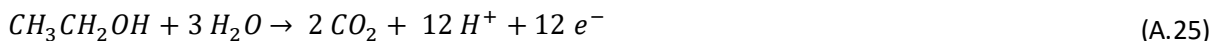
[HCO₃⁻] η αρχική συγκέντρωση όξινων ανθρακικών ιόντων

[NO₃⁻] η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων

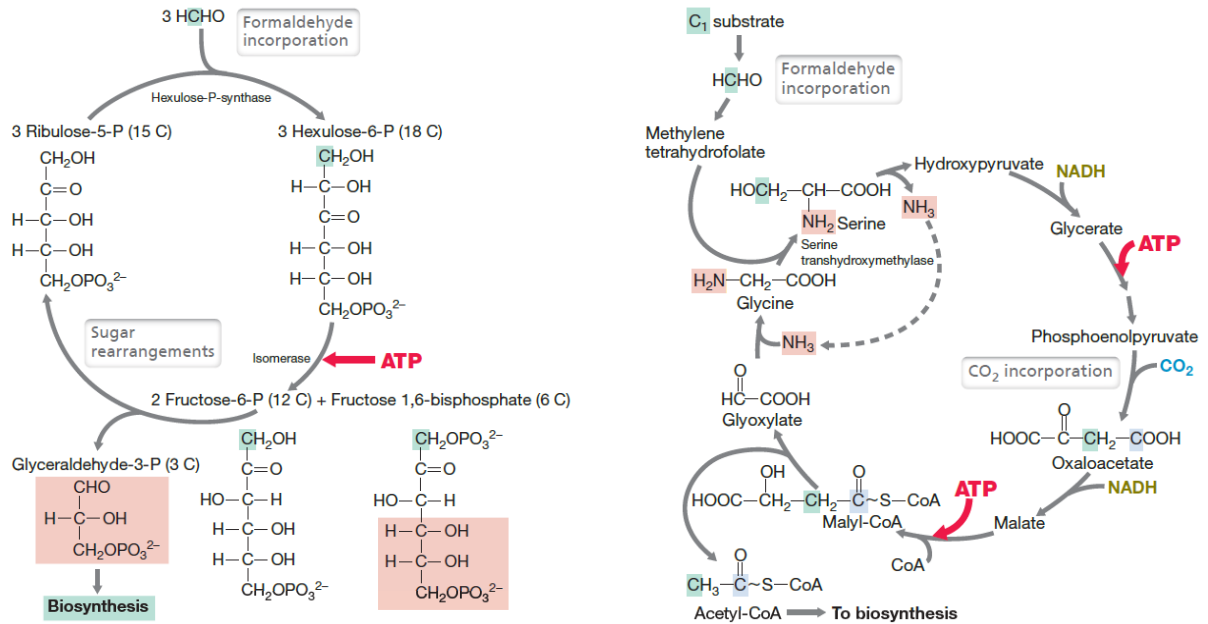
Η αιθανόλη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.8, αρχικά οξειδώνεται σε ακεταλδεΐδη με τη βοήθεια του ενζύμου αλκοολική αφυδρογονάση (E1) και έπειτα σε οξικό οξύ μέσω αλδεϊδικών αφυδρογονασών (E2 και E3), σε ποσοστό περίπου 75%, (Constantin & Fick, 1997). Ο σχηματισμός NADH₂ μπορεί να οδηγήσει σε εκ νέου παραγωγή ενέργειας από τους μικροοργανισμούς (Constantin & Fick, 1997). Η ημιαντίδραση οξείδωσης της αιθανόλης περιγράφεται από την αντίδραση (A.32) (Rittmann & McCarty, 2020) που σε συνδυασμό με την ημιαντίδραση αναγωγής νιτρικών (A.20) οδηγεί στην αντίδραση απονιτροποίησης (A.33) που περιγράφει την κυτταρική αναπνοή. Ο ρυθμός απονιτροποίησης με δότη ηλεκτρονίων την αιθανόλη μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0.071 mg N/gr VSS/h (Lee et al., 2008) και 139 mg N/gr VSS/h (Christensson et al., 1994) (Πίνακας 2.2). Έχει παρατηρηθεί υψηλότερος ρυθμός απονιτροποίησης για την αιθανόλη σε σύγκριση με τη μεθανόλη (Christensson et al., 1994; Nyberg et al., 1996; Lee et al., 2019), τη γλυκερόλη, το προπιονικό νάτριο, το οξικό νάτριο και τη γλυκόζη διαδοχικά. Η αιθανόλη έχει συσχετιστεί με πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων, σε αντίθεση με άλλες πηγές άνθρακα για τις οποίες έχει παρατηρηθεί χαμηλότερη ικανότητα αναγωγής νιτρικών, όπως 31.1% για τη γλυκόζη, 47.9% για το οξικό και έως 80.8% για τη γλυκερόλη (Lee et al., 2019). Επίσης, η αιθανόλη μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση ορθοφωσφορικών μόνο μετά από την πλήρη αναγωγή των νιτρικών (Gerber et al., 1986). Η παραγωγή βιομάζας με δότη ηλεκτρονίων την αιθανόλη μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 0.28 g VSS/g COD (Fillos & Ramalingam, 2007) και 0.42 g VSS/g COD (Peng et al., 2007).



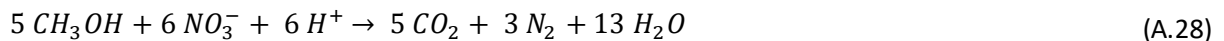
Εικόνα 2.8: Ο καταβολισμός της αιθανόλης (Πηγή: Constantin & Fick, 1997)



Η ημιαντίδραση οξείδωσης της μεθανόλης περιγράφεται από την αντίδραση (A.27) (Rittmann & McCarty, 2020) που σε συνδυασμό με την ημιαντίδραση αναγωγής νιτρικών (A.20) οδηγεί στην αντίδραση απονιτροποίησης (A.28) η οποία περιγράφει την κυτταρική αναπνοή (A.33). Η μεθανόλη αποτελεί δότη ηλεκτρονίων για συγκεκριμένη ομάδα μικροοργανισμών που ονομάζονται μεθυλότροφοι και έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν και να αφομοιώνουν οργανικές ενώσεις με ένα άτομο άνθρακα (Αγγελής, 2017; Madigan et al., 2018). Απουσία μεθυλότροφων μικροοργανισμών και με οργανική πηγή άνθρακα τη μεθανόλη, δεν παρατηρείται απονιτροποίηση (Akunna et al., 1993). Κομβικό σημείο για τον μεταβολισμό της μεθανόλης αποτελεί ο σχηματισμός φορμαλδεΐδης ή μυρμηκικής αλδεΐδης (CH₂O) (Αγγελής, 2017). Ο αναβολισμός της μεθανόλης πραγματοποιείται ακολουθώντας είτε την οδό της Ρ-ριβουλόζης, είτε την οδό της σερίνης (Εικόνα 2.9) (Αγγελής, 2017; Madigan et al., 2018). Για τη μεθανόλη έχει παρατηρηθεί χαμηλή αναλογία μεθανόλης/αζώτου σε σύγκριση με άλλες πηγές άνθρακα (Cherchi et al., 2009; Christensson et al., 1994) (Πίνακας 2.2) και περιορισμένη έκλυση πτητικών οργανικών ενώσεων (VOC) (Wang et al., 2021). Ο ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης παρουσιάζει μεγάλο εύρος διακύμανσης, μεταξύ 0.034 mg N/gr VSS/h (Lee et al., 2019) και 91 mg N/gr VSS/h (Christensson et al., 1994) (Πίνακας 2.2), και οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες διεξαγωγής των δοκιμών και στο είδος της μικροβιακής καλλιέργειας. Αν και κάποιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η μεθανόλη μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αέριο άζωτο χωρίς συσσώρευση νιτρωδών και έκλυση N₂O (Cherchi et al., 2009; Lee et al., 2019), άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η μεθανόλη μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη αναγωγή νιτρικών και συσσώρευση νιτρωδών ιόντων (Gerber et al., 1986; Srinandan et al., 2012). Επίσης, η αιθανόλη μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση ορθοφωσφορικών μόνο μετά από πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων (Gerber et al., 1986). Η παραγωγή λάσπης/βιομάζας ανά μονάδα υποστρώματος που καταναλώνεται είναι χαμηλότερη για την ομάδα των μεθυλότροφων μικροοργανισμών (Rittmann & McCarty, 2020), με τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 0.10 g VSS/g COD (Fillos & Ramalingam, 2007) και 0.40 g VSS/g COD (Peng et al., 2007) (οι Onnis-Hayden & Gu (2008) και Cherchi et al. (2009) προσδιορίζουν την παραγωγή βιομάζας σε 0.29 g VSS/g COD). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι, όταν η μεθανόλη χρησιμοποιείται ως αποκλειστική πηγή άνθρακα, θα πρέπει να αποφεύγονται υπολειμματικές συγκεντρώσεις, εξαιτίας της δυνητικής της τοξικότητας (Wang et al., 2021).

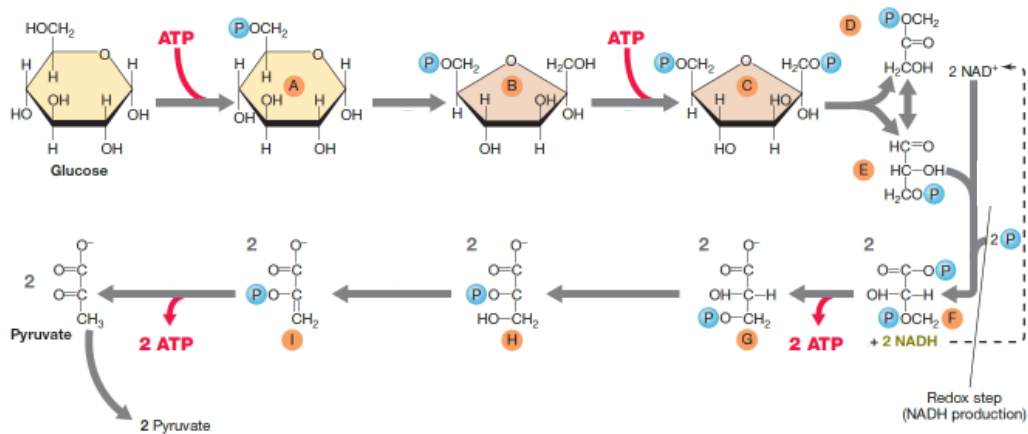


Εικόνα 2.9: Οι αναβολικές οδοί της Ρ-ριβουλόζης (αριστερά) και της σερίνης (δεξιά)
(Πηγή: Madigan et al., 2018)

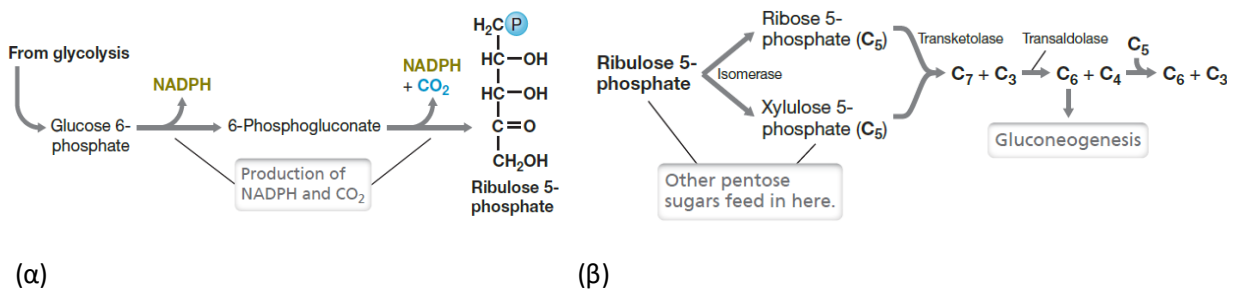


Οι σπουδαιότερες καταβολικές οδοί της γλυκόζης είναι η οδός Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) και η οξειδωτική οδός των φωσφοπεντοζών (Εικόνα 2.10 και Εικόνα 2.11), οι οποίες αλληλεξαρτώνται και συχνά πραγματοποιούνται συγχρόνως (Αγγελής, 2017). Η ημιαντίδραση οξείδωσης της γλυκόζης περιγράφεται από την αντίδραση (A.29)/(A.32) (Rittmann & McCarty, 2020) που σε συνδυασμό με την ημιαντίδραση αναγωγής νιτρικών (A.20) οδηγεί στην αντίδραση απονιτροποίησης (A.30) για την κυτταρική αναπνοή. Ο ρυθμός απονιτροποίησης μπορεί να κυμαίνεται από 0.043 mg N/gr VSS/h (Lee et al., 2019) έως 2.7 mg N/gr VSS/h (Akunna et al., 1993) (Πίνακας 2.2). Η γλυκόζη μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του pH κατά την απονιτροποίηση, εξαιτίας των όξινων προϊόντων που παράγονται κατά τον μεταβολισμό της (Xu et al., 2018). Η γλυκόζη σχετίζεται με την ανάπτυξη βακτηρίων που καταναλώνουν τα νιτρικά ιόντα προς αμμωνιακά, ενώ ταυτόχρονα μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση νιτρικών (Paul & Beauchamp, 1989; Akunna et al., 1993; Kelso et al., 1999; Hamlin et al., 2008; Shen et al., 2009; Ge et al., 2012; Xu et al., 2018; Srinandan et al., 2012; Jiang et al., 2022a). Οι Srinandan et al. (2012) συνέδεσαν το φαινόμενο αυτό με την παρουσία του βακτηρίου *Enterobacter spp.* Άλλοι ερευνητές

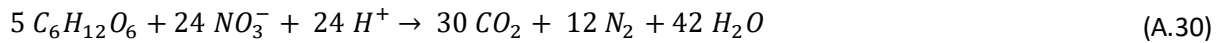
απέδωσαν το φαινόμενο αυτό στην τοξική επίδραση που μπορεί να προκαλέσει στους απονιτροποιητές ο συνδυασμός αυξημένων συγκεντρώσεων νιτρωδών και χαμηλού pH (~6.7) (Akunna et al., 1993), καθώς και σε διεργασίες χώνευσης κατά τις οποίες μέρος της γλυκόζης μπορεί να καταναλώνεται από αναερόβιους μικροοργανισμούς (Akunna et al., 1993; Jiang et al., 2022a). Αντίθετα, κάποιοι ερευνητές διαπίστωσαν χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρωδών ιόντων για τη γλυκόζη, σε αντίθεση με τα οξικά και προπιονικά ιόντα, και συνέδεσαν την παρατήρηση αυτή με τον βραδύτερο μεταβολισμό της γλυκόζης από τους μικροοργανισμούς σε σύγκριση με άλλες πηγές άνθρακα (Zhang et al., 2022b). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι η γλυκόζη μπορεί να οδηγήσει σε απελευθέρωση ορθοφωσφορικών μετά την ολοκλήρωση της απονιτροποίησης (Gerber et al., 1986). Τέλος, η γλυκόζη ως πηγή άνθρακα έχει συσχετιστεί με αυξημένες συγκεντρώσεις διαλυτών μικροβιακών προϊόντων (SMP-soluble microbial products), γεγονός που αποδόθηκε σε αυξημένη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού σε σύγκριση με άλλες πηγές άνθρακα, όπως τα οξικά ιόντα και η μεθανόλη (Ly et al., 2019; Jiang et al., 2022a).



Εικόνα 2.10: Η οδός Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ή Γλυκόλυση (Πηγή: Madigan et al., 2018)



Εικόνα 2.11: Η οδός των φωσφοπεντοζών: (α) οξειδωτική φάση και (β) μη οξειδωτική φάση (Πηγή: Madigan et al., 2018)



Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2) φαίνεται ο ρυθμός απονιτροποίησης και οι αντίστοιχοι λόγοι C/N με πηγές άνθρακα τη γλυκερόλη, τα γαλακτικά, προπιονικά, βουτυρικά, φορμικά, κιτρικά και ηλεκτρικά ιόντα, τη 2,3-βουτανοδιόλη, το MicroC™ και άλλες ενώσεις βιομηχανικής προέλευσης όπως τα γαλακτοκομικά απόβλητα, τα απόβλητα ζυθοποιίας, το υδρολυμένο άμυλο και το ακατέργαστο σιρόπι που προέρχεται από την επεξεργασία ζάχαρης. Η γλυκερόλη συνδέεται με μη πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων προς νιτρώδη σε καλλιέργεια που προήλθε από χωνεμένη ιλύ με δότη ηλεκτρονίων τη γλυκερόλη, ενώ τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχετικά με την εξέλιξη της απονιτροποίησης είναι παρόμοια με αυτά της γλυκόζης (Akunna et al., 1993). Τόσο η γλυκερόλη, όσο και το γαλακτικό οξύ μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση νιτρωδών ιόντων (Akunna et al., 1993; Lee et al., 2019). Το γαλακτικό οξύ δεν οδηγεί σε παραγωγή αμμωνιακού αζώτου κατά την απονιτροποίηση (Akunna et al., 1993). Τα προπιονικά και φορμικά ιόντα συντελούν σε παραγωγή ορθοφωσφορικών κατά την απονιτροποίηση ακόμη και παρουσία νιτρικών ιόντων στο διάλυμα. Αντίθετα, η απονιτροποίηση με πηγή άνθρακα τα βουτυρικά, γαλακτικά, κιτρικά, ηλεκτρικά ιόντα και τη 2,3-βουτανοδιόλη μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ορθοφωσφορικών, μόνο όταν εξαντληθούν τα νιτρικά ιόντα και επιτευχθούν αναερόβιες συνθήκες (Gerber et al., 1986).

Όπως συμπεραίνεται από τα παραπάνω, η πηγή οργανικού άνθρακα καθορίζει όχι μόνο τη μεταβολική οδό, αλλά και την ταχύτητα της ροής ηλεκτρονίων στα κύτταρα, οδηγώντας σε διαφορετικούς ρυθμούς αναγωγής νιτρικών και νιτρωδών ιόντων (Ge et al., 2012). Επίσης, η πηγή άνθρακα μπορεί να καθορίζει τον τρόπο αφομοίωσης και απελευθέρωσης φωσφόρου κατά τη διάρκεια και μετά το πέρας της απονιτροποίησης, καθιστώντας τον ρόλο των απονιτροποιητικών βακτηρίων ουσιαστικό ακόμη και στην περίπτωση της απομάκρυνσης φωσφόρου (Gerber et al., 1986).

2.2.3.2 Σύνθετα οργανικά μόρια

Οι κύριες κατηγορίες αποβλήτων που περιέχουν σύνθετα οργανικά μόρια και έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την απονιτροποίηση είναι τα φυσικά υλικά και αγροτικά προϊόντα σε στερεή μορφή με κύριο συστατικό την κυτταρίνη, οι βιοδιασπάσιμες πολυμερείς ενώσεις (Biodegradable Polymers - BDPs), τα υγρά παραπροϊόντα και απόβλητα του γεωργικού και βιομηχανικού τομέα, καθώς και προϊόντα που προέρχονται από τη ζύμωση των παραπάνω (Wang et al., 2021; Fu et al., 2022). Τα υλικά αυτά, κυρίως

όσα προέρχονται από διεργασίες χώνευσης, μπορούν να προσφέρουν στους απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, εκτός από τον απαραίτητο δότη ηλεκτρονίων, όλα εκείνα τα ιχνοστοιχεία που είναι απαραίτητα για να ολοκληρώσουν τις μεταβολικές τους διεργασίες. Η παρουσία των ιχνοστοιχείων αυτών μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλή συσσώρευση νιτρικών ιόντων μέσω της θετικής επίδρασης στη λειτουργία των ενζύμων NiR, να βελτιώσει την ταχύτητα απονιτροποίησης και να ευνοήσει την προσαρμογή των μικροοργανισμών στις μεταβολές του περιβάλλοντος (Wang et al., 2021). Επίσης, η χρήση αποβλήτων που περιέχουν υψηλό οργανικό φορτίο και αποτελούν παραπροϊόντα του πρωτογενούς και δευτερογενούς τομέα παραγωγής (πχ γεωργία, κτηνοτροφία, βιομηχανία) είναι οικονομικά συμφέρουσα, περιβαλλοντικά φιλική και μπορεί να συμβάλει στην εξοικονόμηση πόρων: ο κύκλος του άνθρακα συναντά τον κύκλο του αζώτου, με αποτέλεσμα οι οργανικές ενώσεις να μετασχηματίζονται σε περισσότερο σταθερές (οξειδωμένες) ενώσεις άνθρακα και τα νιτρικά ιόντα να απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα με τη μορφή αζώτου, ελαχιστοποιώντας τους περιβαλλοντικούς κινδύνους (Xu et al., 2018; Wang et al., 2021). Βέβαια, αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση τέτοιων πηγών άνθρακα σε εφαρμογές απονιτροποίησης μπορεί να οδηγήσει σε δευτερογενή ρύπανση, εξαιτίας της πολύπλοκης και συχνά ετερογενούς σύστασής τους (πχ παρουσία αμμωνιακού αζώτου, κυρίως σε απόβλητα που περιέχουν πρωτεΐνες, και υπολειμματικών συγκεντρώσεων διαλυτού άνθρακα) (Wang et al., 2021; Fu et al., 2022).

Τα πιο διαδεδομένα φυσικά υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα με σκοπό την απονιτροποίηση είναι η ξυλεία και παράγωγα ή απόβλητα αυτής (πχ πριονίδια) και φυτικά αγροτικά προϊόντα (πχ ρύζι, σιτάρι, κριθάρι, άχυρα και φλοιούς αυτών). Τα υλικά αυτά αποτελούνται κυρίως από κυτταρίνη (μακρομοριακός πολυσακχαρίτης που περιέχει γλυκόζη, βασικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος στα φυτά), ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Ο βαθμός βιοδιαθεσιμότητας του άνθρακα που χαρακτηρίζει κάθε φυσικό υλικό μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τον απαιτούμενο λόγο C/N, τον ρυθμό απονιτροποίησης και τη συσσώρευση νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων (Wang et al., 2021; Fu et al., 2022; Wang et al., 2022). Η ποιότητα εκροής μπορεί να επηρεάζεται από τη σύσταση της πηγής άνθρακα που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα, η χρήση μίγματος από σκόνη θείου-οστράκων-φλοιών ρυζιού/φυστικιών οδήγησε σε αυξημένες συγκεντρώσεις θειικών και θειούχων ενώσεων στην εκροή απονιτροποιητικού αντιδραστήρα (Wang et al., 2022). Τέλος, η προεπεξεργασία των φυσικών υλικών με φυσικές (πχ θέρμανση, σύνθλιψη, ακτινοβολία) και χημικές μεθόδους (πχ προσθήκη υπεροξικού/υπεροξυαιθανοϊκού οξέος και υδρασβέστου), μπορούν να συμβάλλουν στη βελτίωση της απόδοσης της απονιτροποίησης, ιδιαίτερα στην περίπτωση που περιέχονται σε αυτά αυξημένες συγκεντρώσεις λιγνίνης, η οποία μπορεί να αναχαιτίσει την αφομοίωση θρεπτικών συστατικών από τους μικροοργανισμούς (Wang et al., 2021; Fu et al., 2022).

Οι βιοδιασπάσιμες πολυμερείς ενώσεις (BDPs) έχουν σύνθετη δομή και αποτελούνται από μονομερείς ενώσεις συνδεδεμένες μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς (Fu et al., 2022). Προέρχονται είτε από φυσικά υλικά (πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, πολυγαλακτικό οξύ (PLA)) και πετροχημικά προϊόντα (πολυκαπρολακτόνη-PCL, πολυγλυκολικό οξύ-PGA, πολυβουτένιο, πολυβινιλική αλκοόλη-PVA, ηλεκτρικό πολυβουτυλένιο-PBS), είτε από δράση των μικροοργανισμών, πχ ζύμωση (πολυϋδροξυαλκανοϊκά-PHA, πολυϋδροξυβουτυρικά-PHB και ο συμπολυεστέρας του με υδροξυβαλερικό-PHBV) (Wang et al., 2021; Xu et al., 2018). Η μικροβιακή αποικοδόμηση επιδρά στα στερεά πολυμερή αυξάνοντας την τραχύτητα της επιφάνειάς τους και το πορώδες τους, μειώνοντας το μοριακό τους βάρος και περιορίζοντας την κρυσταλλική τους φάση, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η υδροφιλικότητά τους και εν γένει η δομή τους (Fu et al., 2022). Πιο συγκεκριμένα, τα οργανικά πολυμερή αρχικά μετατρέπονται από τους μικροοργανισμούς σε ολιγομερή, διμερή και μονομερή με τη βοήθεια ειδικών μικροβιακών ενζύμων και στη συνέχεια μεταβολίζονται και μετατρέπονται σε ανόργανες ενώσεις (διοξείδιο του άνθρακα και νερό) (Wang et al., 2021). Τα προϊόντα της διαδικασίας αυτής είναι διαλυτές ή αδιάλυτες ενώσεις, όπως οξικό οξύ και πρωτεΐνες, και άλλα διαλυτά μικροβιακά παραπροϊόντα που μπορούν να μειώσουν το pH του διαλύματος και να καταστήσουν το ρυπαντικό φορτίο της εκροής υψηλό (Xu et al., 2018; Wang et al., 2021). Αν και οι πολυμερείς ενώσεις δεν χρησιμοποιούνται ευρέως στην πράξη, εξαιτίας του υψηλού τους κόστους, εξαίρεση αποτελούν βιβλιογραφικά οι περιπτώσεις επεξεργασία αποβλήτων που προέρχονται από νερά ανακυκλοφορίας σε θαλασσοκαλλιέργειες, καθώς και οι περιπτώσεις στις οποίες απαιτείται εκροή με αυστηρούς περιορισμούς ως προς την ποιότητα, όπως στο πόσιμο νερό και στα υπόγεια νερά, επειδή αποφεύγεται η προσθήκη υψηλής περιόσεως οργανικού άνθρακα (Wang et al., 2021; Fu et al., 2022). Η απλή χημική σύσταση των βιοδιασπάσιμων πολυμερών μπορεί να οδηγήσει στην ανάγκη για προσθήκη ιχνοστοιχείων, όπως μολυβδαινίου (Mo), μαγγανίου (Mn) και κοβαλτίου (Co), ώστε να ολοκληρωθεί με επιτυχία η απονιτροποίηση. Η προσθήκη ιχνοστοιχείων μπορεί να αποφευχθεί συνδυάζοντας τα πολυμερή με άλλες πηγές οργανικού άνθρακα, όπως φυσικά υλικά (πχ άμυλο) (Fu et al., 2022). Γενικά, παρόλο που η πορεία της απονιτροποίησης εξαρτάται από τη σύστασή τους, η χρήση βιοδιασπάσιμων πολυμερών ως πηγής οργανικού άνθρακα μπορεί να οδηγήσει σε απονιτροποίηση με υψηλότερη απόδοση και σταθερότητα σε σύγκριση με τα φυσικά υλικά (Wang et al., 2021; Fu et al., 2022).

Τα παραπροϊόντα και απόβλητα που προέρχονται από τους τομείς της γεωργίας και της βιομηχανίας τροφίμων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα κατά την απονιτροποίηση, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, περιλαμβάνουν ενδεικτικά απόβλητα γαλακτοκομείων, ζυθοποιείων, οινοποιείων, βιομηχανιών σόγιας και ζάχαρης, απόβλητα θαλασσοκαλλιεργειών, ακόμη και απόβλητα από τη βιομηχανία χημικών και φαρμακευτικών ειδών που περιέχουν αιθανόλη (Nyberg et al., 1996; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Letelier-Gordo et al., 2020; Fu et al., 2022). Σε αρκετές περιπτώσεις, όπως σε αυτές της υδρολυμένης μελάσας και των αποβλήτων κασάβας, έχει αναφερθεί υψηλότερη απόδοση

απονιτροποίησης ακόμη και από απλά οργανικά μόρια, όπως αυτά της μεθανόλης και του οξικού νατρίου, αντίστοιχα (Fu et al., 2022). Αντίθετα, σε άλλες περιπτώσεις, όπως σε αυτές χωνεμένων και μη αποβλήτων θαλασσοκαλλιεργειών, έχουν παρατηρηθεί χαμηλότεροι ρυθμοί απονιτροποίησης σε σύγκριση με απλά οργανικά μόρια, όπως τα οξικά και προπιονικά ιόντα και η αιθανόλη (Letelier-Gordo et al., 2020).

Παραπροϊόντα που προέρχονται από την υγρή ζύμωση αποβλήτων με υψηλό οργανικό φορτίο, όπως στραγγίδια από χωνεμένη λύ εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ως δότες ηλεκτρονίων κατά την απονιτροποίηση. Η εφαρμογή διεργασιών χώνευσης σε απόβλητα με υψηλό οργανικό φορτίο και συγκεκριμένα τα στάδια της υδρόλυσης και της οξεοπαραγωγής αποσκοπούν στην παραγωγή σύνθετων οργανικών ενώσεων με ταυτόχρονη απελευθέρωση ιχνοστοιχείων, που είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών. Κατά την αναερόβια χώνευση οι σύνθετες οργανικές ενώσεις υφίστανται τις εξής διεργασίες: (α) υδρόλυση των αδιάλυτων ενώσεων προς απλούστερες διαλυτές ενώσεις, όπως αμινοξέα, πολυσακχαρίτες και λιπαρά οξέα, (β) ζύμωση, κατά την οποία οι διαλυτές ενώσεις μετατρέπονται σε μικρότερες αλυσίδες λιπαρών οξέων με κυρίαρχα τα πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs), όπως το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ, και άλλα παραπροϊόντα, (γ) μετατροπή σε οξικό οξύ μέσω της δράσης των οξεοπαραγωγών βακτηρίων, η οποία συνοδεύεται από παραγωγή υδρογόνου, ανθρακικού οξέος και νέου κυτταρικού υλικού και (δ) παραγωγή μεθανίου και διοξειδίου του άνθρακα (Wang et al., 2021). Οι απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν σύνθετες ή απλές οργανικές ενώσεις από τη διαδικασία της χώνευσης, κυρίως τα VFAs, ως δότες ηλεκτρονίων κατά την απονιτροποίηση. Μάλιστα, η χρήση των εν λόγω πηγών οργανικού άνθρακα μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένη απονιτροποίηση και αυξημένη βακτηριακή ποικιλότητα ακόμη και σε σύγκριση με το οξικό νάτριο, όπως έχει παρατηρηθεί σε περιπτώσεις αποβλήτων φαγητού και λάσπης από λύματα. Τέλος, όταν η χώνευση πραγματοποιείται με αύξηση της θερμοκρασίας, μειώνονται τα παθογόνα βακτήρια με αποτέλεσμα να υιοθετούνται βελτιωμένες υγειονομικές πρακτικές (Fu et al., 2022).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2) δίνεται όλη η σχετική πληροφορία που συλλέχθηκε βιβλιογραφικά και αφορά τη μελέτη των διαφόρων πηγών άνθρακα ως προς την απονιτροποιητική δραστηριότητα.

Πίνακας 2.2: Λόγοι C/N, όπως προέκυψαν ύστερα από πειραματικές δοκιμές στην αρχή (αρχικό C/N) και στο τέλος της απονιτροποίησης (πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N) σε σύγκριση με τη θεωρητική στοιχειομετρική απαίτηση, και ειδική ταχύτητα απονιτροποίησης για διαφορετικά οργανικά υποστρώματα και μικροβιακές καλλιέργειες (θερμοκρασία 20°C-27°C)(*)

Οργανικό υπόστρωμα	Μικροβιακή καλλιέργεια	Αρχικό C/N		Πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης (mg N/g SS/h)	Βιβλιογραφική Πηγή
		(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)		
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)							2.51	Gerber et al. (1986)
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)	5.0	1.9					3.2	Karlsson (1990)
	-					3.75	1.4(**)		Matějík et al. (1992)
	Χωνεμένη ιλύς	4.8	1.8					27.8	Akunna et al. (1993)
	Μικτή							10-20	Henze et al. (1994)
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)	2.9, 4.2, 7.5	1.1, 1.6, 2.9 (**)					7.6, 10.4, 11.8	Tam et al. (1994)
Οξικά ιόντα	Μικτή (ενεργός ιλύς)	0.8-2, 14-27, 40(**)	0.30-0.75, 5.2-10.1, 14.9(**)					1.8-1.9, 2.1-2.4, 3.4	Isaacs & Hence (1995)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)							4-14	Hallin et al. (1996)
	Μικτή <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> (επικρατέστεροι)	~5.0(**)	~1.9(**)					76	Lee & Welander (1996)
	Μικτή καλλιέργεια			6.9	2.6(**)				Majone et al. (1998)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)	2	0.75					4.4-7.3	Naidoo et al. (1998)

Οργανικό υπόστρωμα	Μικροβιακή καλλιέργεια	Αρχικό C/N		Πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης (mg N/g SS/h)	Βιβλιογραφική Πηγή
		(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)		
Οξικά ιόντα	Μικτή (Κροκίδες ανάμικτου υγρού)	5.1-5.4	1.90-2.00					9.5-9.9 (ανοξία)	
	Μικτή (Κροκίδες ανάμικτου υγρού)	5.4-5.6(**)	2.00-2.08					11.5-19.8 (αεροβίωση-ανοξία εναλλάξ)	Bilanovic et al. (1999)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)	4.0(**)	1.5					19-50 (NO ₃ ⁻) 6.3-20 (NO ₂ ⁻)	Glass & Silverstein (1999)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)							1-3	Kujawa & Klapwijk (1999)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)	6.0	2.3	3.2-3.7	1.2-1.4	3.50	1.3		Mokhayeri et al. (2006)
	Μικτή (πρωτοβάθμια ιλύς)	5.4-10.7(**)	2-4			4.9	1.82	0.30-0.92	Elefsiniotis & Li (2006)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)							12	Peng et al. (2007)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)							13.6	Onnis-Hayden & Gu (2008)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)			5.7	2.1			13.6	Cherchi et al. (2009)
	Μικτή (χουμικό έδαφος)	1.28, 2.57, 5.14, 12.85	0.48, 0.96, 1.9, 4.8	5.14	1.9			0.091, 0.058, 0.13, 0.098	Lee et al. (2019)
Αιθανόλη	Μικτή (ανάμικτο υγρό)							1.79	Gerber et al. (1986)
	-					4.2	1.05		Matějů et al. (1992)
	<i>Hyphomicrobium spp.</i>			5.81-6.06	1.5			139	Christensson et al. (1994)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)			3.85	0.97				Christensson et al. (1994)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)							10	Nyberg et al. (1996)

Οργανικό υπόστρωμα	Μικροβιακή καλλιέργεια	Αρχικό C/N		Πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης (mg N/g SS/h)	Βιβλιογραφική Πηγή
		(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)		
Αιθανόλη	Μικτή (ενεργός ιλύς)	4.0	1.0(**)						dos Santos et al. (2004)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)						9.6		Peng et al. (2007)
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)			2.67-4.64	0.67-1.2		5.7-9.6		Fillos & Ramalingam (2007)
	Μικτή (χουμικό έδαφος)	26.4(**)	6.6				0.071		Lee et al. (2019)
Μεθανόλη	Μικτή (ενεργός ιλύς)						4.2-5.5		Monteith et al. (1981)
	Αιωρούμενη βιομάζα			4.2	1.05		12.5-18.8		Beccari et al. (1983)
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)						1.12		Gerber et al. (1986)
	-					3.7	0.93		Matějů et al. (1992)
	<i>Hyphomicrobium spp.</i>			4.00-4.16	1.0-1.1		91		Christensson et al. (1994)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)			4.45	1.1				Christensson et al. (1994)
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)	2.9, 4.2, 7.5	0.73, 1.1, 1.9 (**)				5.8, 8.4, 9.9		Tam et al. (1994)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)						8-32		Hallin et al. (1996)
	<i>Hyphomicrobium spp.</i> <i>Pseudomonas delafieldii</i> <i>Coryneform bacterium</i> <i>Comamonas acidovorans</i> (επικρατέστεροι)	~5.0					30-45		Lee & Welander (1996)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)						3.2		Nyberg et al. (1996)

Οργανικό υπόστρωμα	Μικροβιακή καλλιέργεια	Αρχικό C/N		Πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης (mg N/g SS/h)	Βιβλιογραφική Πηγή
		(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)		
Μεθανόλη	Μικτή (Κροκίδες ανάμικτου υγρού)	1.11-1.15 (ανοξικές συνθήκες)	0.23-0.29 (**)					4.0-4.3	Bilanovic et al. (1999)
		1.16-1.20 (εναλλαγή αερόβιων-ανοξικών)	0.29-0.30 (**)					5.0-5.4	
	Μικτή (ενεργός ιλύς)	~3.7	~0.93(**)	3.7	0.93			7.5-11.7	Carrera et al. (2003)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)	4.0(**)	1.0					1.3	dos Santos et al. (2004)
	-					4.70	1.2		Mokhayeri et al. (2006)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)							3.2	Peng et al. (2007)
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)			3.17-4.24	0.79-1.1			3.8-4.7	Fillos & Ramalingam (2007)
	Μικτή (χουμικό έδαφος)	26.4(**)	6.60					0.034	Lee et al. (2019)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)							6.07	Onnis-Hayden & Gu (2008)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)			4.8	1.2			6.1	Cherchi et al. (2009)
Γλυκόζη	Μικτή (ανάμικτο υγρό)							0.92	Gerber et al. (1986)
	-					4.9	1.8		Matějů et al. (1992)
	Χωνεμένη ιλύς	5.4	2.0(**)					2.7	Akunna et al. (1993)
	Μικτή (χουμικό έδαφος)	17.7(**)	6.6					0.043	Lee et al. (2019)

Οργανικό υπόστρωμα	Μικροβιακή καλλιέργεια	Αρχικό C/N		Πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης (mg N/g SS/h)	Βιβλιογραφική Πηγή
		(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)		
Γλυκόζη	Μικτή <i>Verrucomicrobia</i> <i>Patescibacteria</i> <i>Bacteroidetes</i> (επικρατέστεροι)	Δέκτης ηλεκτρονίων NO_3^- NO_2^- NO_3^- , NO_2^- (1:1)	3	1.1(**)				1.3-15.38	Zeng et al. (2023)
			5	1.9(**)				0.50-21.92	
			3	1.1(**)				1.2-6.96	
			5	1.9(**)				1.82-7.52	
			3	1.1(**)				1.48-3.63 (NO_3^-) 1.05-3.44 (NO_2^-)	
			5	1.9(**)				0.30-21.92 (NO_3^-) 0.20-3.17 (NO_2^-)	
Γλυκερόλη	Χωνεμένη ιλύς	4.8	1.5(**)				7.4	Akunna et al. (1993)	
	Μικτή (χουμικό έδαφος)	20.6(**)	6.6				0.019	Lee et al. (2019)	
Γαλακτικά ιόντα	Χωνεμένη ιλύς	5.0					27.8	Akunna et al. (1993)	
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)						2.17	Gerber et al. (1986)	
	Μικτή (ανάμικτο υγρό)						1.68	Gerber et al. (1986)	
Προπιονικά ιόντα	Μικτή (ανάμικτο υγρό)	2.9, 4.2, 7.5	0.82, 1.4, 2.5 (**)				8.5, 10.4, 11.8	Tam et al. (1994)	
	Μικτή (πρωτοβάθμια ιλύς)	2-4					0.23-0.41	Elefsiniotis & Li (2006)	
	Μικτή (χουμικό έδαφος)	20.5(**)					0.063	Lee et al. (2019)	
Βουτυρικά ιόντα	Μικτή (ανάμικτο υγρό)						2.13	Gerber et al. (1986)	

Οργανικό υπόστρωμα	Μικροβιακή καλλιέργεια	Αρχικό C/N		Πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης (mg N/g SS/h)	Βιβλιογραφική Πηγή
		(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)		
Φορμικά ιόντα	Μικτή (ανάμικτο υγρό)							1.51	Gerber et al. (1986)
Κιτρικά ιόντα	Μικτή (ανάμικτο υγρό)							0.61	Gerber et al. (1986)
Ηλεκτρικά ιόντα	Μικτή (ανάμικτο υγρό)							1.58	Gerber et al. (1986)
2,3-βουτανοδιόλη	Μικτή (ανάμικτο υγρό)							1.22	Gerber et al. (1986)
MicroC™	Μικτή							2.5-6.37	Onnis-Hayden & Gu (2008)
	Μικτή (ενεργός ιλύς)			6.5	-			6.4	Cherchi et al. (2009)
TSB (Tryptic Soy Broth)	<i>P. pseudoalcaligenes</i>							10.1 (NO ₃ ⁻) 16.9 (NO ₂ ⁻)	Martienssen & Schöps (1999)
	<i>B. niacini</i>							17.9 (NO ₃ ⁻) 2.5 (NO ₂ ⁻)	Martienssen & Schöps (1999)
	<i>Staphylococcus</i>							3.7 (NO ₃ ⁻) 0 (NO ₂ ⁻)	Martienssen & Schöps (1999)
Γαλακτοκομικά απόβλητα	Μικτή							6.21	Onnis-Hayden & Gu (2008)
Απόβλητα οινοποιείου	Μικτή							6.8	Onnis-Hayden & Gu (2008)
Απόβλητα ζυθοποιίας	Μικτή							8.18	Onnis-Hayden & Gu (2008)

Οργανικό υπόστρωμα	Μικροβιακή καλλιέργεια	Αρχικό C/N		Πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N		Ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης (mg N/g SS/h)	Βιβλιογραφική Πηγή
		(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)	(g COD/g N)	(g C/g N)		
Υδρολυμένο άμυλο	Μικτή	~5						42	Lee & Welander (1996)
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>								
	<i>Pseudomonas corrugataca</i>								
	<i>Aeromonas hydrophila</i>								
	<i>Enterobacter asburiae</i>								
<i>Kiebsiella ozaenae</i> (επικρατέστεροι)									
Ακατέργαστο σιρόπι	Μικτή	~5						48	Lee & Welander (1996)
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>								
	<i>Pseudomonas corrugataca</i>								
	<i>Enterobacter asburiae</i>								
	<i>Kiebsiella ozaenae</i> (επικρατέστεροι)								

(*) με γκρι χρώμα σημειώνονται οι τιμές, όπως προέκυψαν ύστερα από επεξεργασία των δεδομένων που παρατίθενται στις βιβλιογραφικές αναφορές, (**) όπως προέκυψε από σχετικούς υπολογισμούς για 1.07 g COD/g οξικού, 2.08 g COD/g αιθανόλης, 1.50 g COD/g μεθανόλης, 1.07 g COD/g γλυκόζης, 1.22 g COD/g γλυκερόλης και 1.51 g COD/g προπιονικού οξέος

2.2.4 Ο λόγος C/N

Εκτός από το είδος του οργανικού άνθρακα που αναλύθηκε προηγουμένως, άλλες παράμετροι που συνδέονται με αυτόν και επηρεάζουν την εξέλιξη της απονιτροποίησης είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος και, επομένως, η αναλογία άνθρακα και αζώτου (C/N) (Mohsenipour et al., 2014). Ο λόγος C/N μπορεί να εκφράζει:

- Τον θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο οργανικό άνθρακα που απαιτείται για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων, όπως προκύπτει μέσω της εφαρμογής κινητικών ανάπτυξης για τους μικροοργανισμούς (Mokhayeri et al., 2006) ή μέσω των βιοχημικών αντιδράσεων μεταβολισμού (Matějů et al., 1992). Από τη στοιχειομετρία των αντιδράσεων (A.24), (A.26), (A.28) και (A.30) μπορεί να υπολογιστεί ο απαραίτητος λόγος C/N για την κυτταρική αναπνοή (Πίνακας 2.3). Η στοιχειομετρική απαίτηση που αναφέρεται στη βιβλιογραφία με δότες ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα, την αιθανόλη, τη μεθανόλη και τη γλυκόζη φαίνεται στον σχετικό πίνακα (Πίνακας 2.2). Το ποσοστό του οργανικού άνθρακα που προορίζεται για σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού (εμπειρικός τύπος $C_5H_7O_2N$) εξαρτάται από τη φύση του οργανικού υποστρώματος και του δέκτη ηλεκτρονίων. Με βάση τους σχετικούς πίνακες (Πίνακας 2.2 και Πίνακας 2.3) μπορεί να προσδιοριστεί το ποσοστό του οργανικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού και προκύπτει περίπου 18%-41% για τα οξικά ιόντα, 32% για την αιθανόλη, 23%-39% για τη μεθανόλη και 42% για τη γλυκόζη. Επίσης, στην περίπτωση της μεθανόλης, το ποσοστό αυτό μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 25% και 52% σύμφωνα με τους Matějů et al. (1992) και Rittmann & McCarty (2020).

Πίνακας 2.3: Θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενος λόγος C/N που προορίζεται για κυτταρική αναπνοή με οργανικό υπόστρωμα τα οξικά ιόντα, την αιθανόλη, τη μεθανόλη και τη γλυκόζη

Οργανικό υπόστρωμα	Βιοχημική αντίδραση	g COD/ g υποστρώματος	C/N	
			(g COD/g N)	(g C/g N)
Οξικό οξύ	(A.24)	1.07	2.86	1.07
Αιθανόλη	(A.26)	2.08	2.86	0.715
Μεθανόλη	(A.28)	1.50	2.86	0.715
Γλυκόζη	(A.30)	1.07	2.86	1.07

- Τον οργανικό άνθρακα που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων κατά την απονιτροποίηση. Υπολογίζεται στο τέλος της απονιτροποίησης, ύστερα

από πειραματικές δοκιμές (Πίνακας 2.2, Πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο C/N) (Beccari et al., 1983; Matějů et al., 1992; Carrera et al., 2003; Mokhayeri et al., 2006; Cherchi et al., 2009). Για παράδειγμα, ύστερα από πειραματικές δοκιμές οι Mohan et al. (2016) αναφέρουν βέλτιστο λόγο C/N ίσο με 1.5 g C/g N ή 4.0 g COD/g N με δότη ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα.

- Τον οργανικό άνθρακα που προορίζεται για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων στην απονιτροποίηση (Πίνακας 2.2, Αρχικό C/N). Υπολογίζεται στην αρχή της απονιτροποίησης και επηρεάζει την εξέλιξη της απονιτροποίησης (Elefsiniotis & Li, 2006; Ge et al., 2012; Mohan et al., 2016; Lee et al., 2019; Zeng et al., 2023).

Οι πιθανές αιτίες για τις οποίες η τιμή του λόγου C/N που προσδιορίζεται πειραματικά (Πίνακας 2.2) μπορεί να είναι μεγαλύτερη από τη θεωρητικά στοιχειομετρικά απαιτούμενη (Πίνακας 2.3) είναι:

- Η αυξημένη παραγωγή βιομάζας (Hirata et al., 2001).
- Ο ανταγωνισμός μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών (Matějů et al., 1992; Christensson et al., 1994; Lee et al., 2019). Για παράδειγμα, ετερότροφα βακτήρια με την ικανότητα να συσσωρεύουν φώσφορο υπό ανοξικές συνθήκες (polyphosphorus-accumulating bacteria-PAOs) ανταγωνίζονται τα απονιτροποιητικά βακτήρια στην κατανάλωση των άμεσα βιοδιασπάσιμων οργανικών ενώσεων (Naidoo & Buckley, 1999).
- Η παρουσία διαλυτού οξυγόνου. Η συγκέντρωση οξυγόνου επηρεάζει την απονιτροποίηση (Fu et al., 2022). Περισσότερες λεπτομέρειες δίνονται σε επόμενες παραγράφους.
- Η αφομοίωση (δέσμευση) μέρους του οργανικού άνθρακα ως αποθεματικού υλικού (luxury uptake), για παράδειγμα με τη μορφή πολύ(3-υδροξυβουτυρικού) εστέρων (PHBs), που παρατηρείται όταν η βιομάζα έρχεται σε επαφή με το οργανικό υπόστρωμα. Μετά την εξάντληση του υποστρώματος, οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς με σκοπό την ανάπτυξη και συντήρηση των μικροβιακών κυττάρων (Majone et al., 1998). Μάλιστα, οι Majone et al. (1998) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι περισσότεροι αερόβιοι ετερότροφοι (90%) με την ικανότητα αυτή είναι ταυτόχρονα ικανοί για απονιτροποίηση. Επίσης, στην περίπτωση της γλυκόζης έχει παρατηρηθεί ότι οι μικροοργανισμοί καταναλώνουν υψηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που απαιτούνται στοιχειομετρικά για την αναγωγή των νιτρικών, επειδή ευνοείται η αποθήκευση ενέργειας στα κύτταρα μέσω του μεταβολισμού και της σύνθεσης γλυκογόνου (Zhang et al., 2022b).

Παρόλο που η αύξηση του λόγου C/N μπορεί να επιδράσει είτε θετικά, είτε αρνητικά στην ταχύτητα απονιτροποίησης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σε κάθε περίπτωση έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις οργανικού άνθρακα στην εκροή, ενώ είναι πιθανή η συσσώρευση νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων και η επικράτηση μικροβιακών ειδών με δυσμενείς επιπτώσεις στην απονιτροποίηση, ιδιαίτερα στην περίπτωση μικτών απονιτροποιητικών καλλιεργειών (Mohan et al.,

2016; Fu et al., 2022; Wang et al., 2022; Zeng et al., 2023). Για παράδειγμα, λόγοι υψηλότεροι από 5 g COD/g N μπορούν να οδηγήσουν σε επικράτηση του βακτηρίου *Thauera spp.*, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση νιτρικών (Zeng et al., 2023). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι λόγοι C/N σημαντικά υψηλότεροι από τη στοιχειομετρία (πχ στο εύρος 25-60 g COD/g N) μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση της συγκέντρωσης και του ρυθμού συσσώρευσης νιτρικών ιόντων και σε φαινόμενα αναχαίτισης ή παύσης της απονιτροποίησης, φαινόμενο που αποδίδεται στη βιβλιογραφία με τον όρο «carbon breakthrough» (Her & Huang, 1995; Ge et al., 2012; Zhang et al., 2022b).

Χαμηλοί λόγοι C/N μπορούν να οδηγήσουν σε παύση της απονιτροποίησης, σε συσσώρευση ανεπιθύμητων ουσιών στην εκροή, όπως N_2O και, παρόμοια με τους υψηλούς λόγους, σε επικράτηση μικροβιακών πληθυσμών που επιδρούν αρνητικά στην αποτελεσματικότητα της απονιτροποίησης (Martienssen & Schöps, 1999; Lee et al., 2019; Fu et al., 2022). Για παράδειγμα, λόγοι χαμηλότεροι από 2.5 μπορούν να οδηγήσουν σε επικράτηση του είδους *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση νιτρικών (Martienssen & Schöps, 1999). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι όσο χαμηλότερος είναι ο λόγος C/N, τόσο νωρίτερα σχηματίζεται σημείο καμψής στην καμπύλη νιτρικών ιόντων. Το κρίσιμο αυτό σημείο καμψής δείχνει τη μετάβαση του συστήματος από συνθήκες αφθονίας τροφής (feast) σε συνθήκες πείνας (famine) ή, με άλλα λόγια, την εξάντληση της εξωτερικής πηγής οργανικού άνθρακα και την οξείδωση των ενδογενών/ενδοκυτταρικών πηγών οργανικού άνθρακα («feast-famine cycle») (Zhang et al., 2022b). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η επιλογή του κατάλληλου λόγου C/N είναι απαραίτητη προϋπόθεση για αποτελεσματική απονιτροποίηση (Fu et al., 2022).

2.2.5 Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την απονιτροποίηση

2.2.5.1 Συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (DO)

Οι περισσότεροι απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί είναι προαιρετικά αναερόβιοι, γεγονός που σημαίνει ότι προτιμούν να χρησιμοποιούν το οξυγόνο έναντι των νιτρικών ως δέκτη ηλεκτρονίων, επειδή αποδίδει περισσότερη ενέργεια κατά τη μικροβιακή αναπνοή (Fu et al., 2022). Παρόλα αυτά, ο τρόπος που ανταποκρίνονται οι απονιτροποιητικές καλλιέργειες στην παρουσία και συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου διαφέρει. Για παράδειγμα, καθαρή καλλιέργεια *Pseudomonas pseudoalcaligenes* μπορεί να επιτυγχάνει 90% απονιτροποίηση χωρίς συσσώρευση νιτρικών, όταν η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου είναι χαμηλότερη από 5 mg/L, ενώ καθαρή καλλιέργεια *Bacillus niacini* μπορεί να καταναλώνει οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων ταχύτερα σε σύγκριση με νιτρικά ιόντα, οδηγώντας σε συσσώρευση νιτρικών ιόντων και σε συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου 0.2 mg/L στο διάλυμα (Martienssen & Schöps, 1999). Η αύξηση της συγκέντρωσης διαλυτού οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ρυθμού απονιτροποίησης, ενώ η συσσώρευση νιτρικών ιόντων που παρατηρείται

σχετίζεται με την αναχαίτιση της δράσης της αναγωγάσης των νιτρικών (Fu et al., 2022). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η απονιτροποίηση μπορεί να ολοκληρωθεί αποτελεσματικά, εφόσον η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου είναι χαμηλότερη από 2 mg/L (Fu et al., 2022).

2.2.5.2 pH

Κάθε μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώνει σε συγκεκριμένο εύρος pH, συνήθως 2 έως 3 μονάδων, ενώ η βέλτιστη ανάπτυξή του πραγματοποιείται σε συγκεκριμένη τιμή pH. Στα περισσότερα φυσικά οικοσυστήματα οι τιμές pH κυμαίνονται μεταξύ 3 και 9, επομένως, η πλειονότητα των μικροοργανισμών αναπτύσσεται κατά το βέλτιστο τρόπο στο εύρος αυτό. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.4) φαίνεται η κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών ανάλογα με το εύρος pH στο οποίο μπορούν να αναπτύσσονται (Madigan et al., 2018), καθώς και παραδείγματα αντίστοιχων απονιτροποιητικών βακτηρίων. Όταν το ευνοϊκό pH ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι χαμηλότερο από 5.5 πρόκειται για «οξεόφιλους» μικροοργανισμούς και όταν είναι υψηλότερο από 8, πρόκειται για «αλκαλίφιλους». Στις ενδιάμεσες τιμές pH (5.5-7.9) αναπτύσσονται οι «ουδετερόφιλοι» μικροοργανισμοί.

Πίνακας 2.4: Κατηγοριοποίηση μικροοργανισμών ανάλογα με το pH βέλτιστης ανάπτυξης (Dworkin et al., 2006; Ge et al., 2012; Huang et al., 2015; Rafrafi et al., 2015; Imhoff et al., 2018)

Κατηγορία μικροοργανισμών	Εύρος pH	Βέλτιστη τιμή pH (κατά προσέγγιση)	Παράδειγμα απονιτροποιητικού μικροοργανισμού
Οξεόφιλοι	< 5.5	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
Ουδετερόφιλοι	5.5 – 7.9	6.5-7.5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
		7.0-7.5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
Αλκαλίφιλοι	≥ 8	12	<i>Halomonas desirata</i>

Το pH είναι μια παράμετρος που επηρεάζει και επηρεάζεται από τη διεργασία της απονιτροποίησης, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για ουδετερόφιλους μικροοργανισμούς. Από τις αντιδράσεις (A.16) έως (A.22) προκύπτει ότι κατά την απονιτροποίηση καταναλώνονται υδρογονοκατιόντα (H^+), με αποτέλεσμα την αύξηση του pH. Επίσης, εξαιτίας του σχηματισμού νιτρικών ιόντων (Αντίδραση (A.17)) και ιδιαίτερα όταν το pH είναι χαμηλό ευνοείται ο σχηματισμός νιτρικών οξέος, ($pK_a=3.34$ (Speight, 2017)), ουσίας κυτταροτοξικής με την ιδιότητα να διαπερνά με ευκολία το κυτταρικό περίβλημα. Επίσης, η αύξηση των τιμών του pH συμβάλλει στον σχηματισμό και καταβύθιση

αδιάλυτων ενώσεων ανάλογα με τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται για τον μικροβιακό μεταβολισμό. Για παράδειγμα, η παρουσία ασβεστίου, ανθρακικών και φωσφορικών ιόντων μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3), όξινου φωσφορικού ασβεστίου (CaHPO_4), δισόξινου φωσφορικού ασβεστίου (CaH_2PO_4) και φωσφορικού ασβεστίου ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Συνεπώς, τα φαινόμενα αυτά μπορούν να περιορίσουν τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την απονιτροποίηση (Albina et al., 2019).

Οι μεταβολές στις τιμές του pH μπορούν να οδηγήσουν σε επικράτηση διαφορετικών μικροβιακών καλλιεργειών και να επιδράσουν στη λειτουργία των ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στην απονιτροποίηση (Osaka et al., 2008; Albina et al., 2019). Η πλειονότητα των ουδετερόφιλων βακτηρίων παρουσιάζουν βέλτιστη απονιτροποιητική δραστηριότητα και πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αέριο άζωτο σε εύρος pH μεταξύ 7.0 και 8.0 (Glass & Silverstein, 1998; Hillel et al., 2005; Jørgensen & Fath, 2008; Pan et al., 2012; Albina et al., 2019). Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι αύξηση του pH από 5 σε 9 μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη και ταχύτερη απονιτροποίηση κατά περίπου 50% (Lee et al., 2019), ενώ σε εύρος pH μεταξύ 6 και 8 η επίδραση του pH στην απονιτροποίηση είναι περιορισμένη (Hillel et al., 2005). Πέραν των βέλτιστων τιμών pH που αναφέρθηκαν η απονιτροποίηση επιβραδύνεται, καθώς οι φορείς ηλεκτρονίων μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια εκλεκτικά προς τις αναγωγάσες (Saleh-Lakha et al., 2009; Pan et al., 2012; Albina et al., 2019). Για παράδειγμα, διαπιστώθηκε μείωση του ρυθμού απονιτροποίησης και ενζυμικής δράσης κατά 2 με 3 φορές, ύστερα από μείωση του pH από 6.02 σε 4.08 (Parkin et al., 1985). Επίσης, σε pH 5.5 παρατηρήθηκε συσσώρευση νιτρικών ιόντων και υποξειδίου του αζώτου σε καλλιέργεια *P. denitrificans* εξαιτίας της εκλεκτικής μεταφοράς ηλεκτρονίων στις αναγωγάσες, γεγονός που δεν παρατηρήθηκε σε pH 8.5 (Thomsen et al., 1994). Παρόμοια, μεταβολή του pH από 6.7 σε 5.2 οδήγησε σε συσσώρευση N_2O , δηλαδή σε δυσμενείς επιπτώσεις στη δράση της αναγωγάσας του υποξειδίου του αζώτου (Nos) (Hillel et al., 2005). Ακόμη, μελέτη της επίδρασης του pH στην απονιτροποίηση για εύρος pH μεταξύ 5 και 8 έδειξε ότι σε pH 5 παρατηρείται μειωμένος ρυθμός απονιτροποίησης και διαφοροποιημένη έκφραση γονιδίων (Saleh-Lakha et al., 2009). Οι Kučera et al. (1986) μελέτησαν τη δραστηριότητα των αναγωγασών των νιτρικών και του υποξειδίου του αζώτου σε εύρος pH από 6.4 σε 9.2 και παρατήρησαν ότι για τιμές pH χαμηλότερες από 7.3 το κυτόχρωμα c οξειδώνεται περισσότερο από την αναγωγή των νιτρικών και λιγότερο από την αναγωγή του υποξειδίου του αζώτου, ενώ το αντίθετο συμβαίνει για τιμές pH χαμηλότερες από 7.3. Παρόλα αυτά, έρευνες σχετικά με τη μεταβολή του pH σε εδάφη έχουν δείξει ότι ένας απονιτροποιητικός μικροβιακός πληθυσμός μπορεί να είναι αυτόχθονας, ακόμη και όταν οι συνθήκες ανάπτυξης που επικρατούν δεν είναι οι βέλτιστες (Hillel et al., 2005).

Σε αντίθεση με την προσπάθεια των ουδετερόφιλων μικροοργανισμών να προσαρμοστούν στις μεταβολές του pH, οι αλκαλίφιλοι μικροοργανισμοί, όπως οι *Bacillus spp.*, έχουν αναπτύξει γονιδιακά πληθώρα χαρακτηριστικών και μηχανισμών, όπως πρόσθετα πολυμερή και πεπτιδογλυκάνες στο

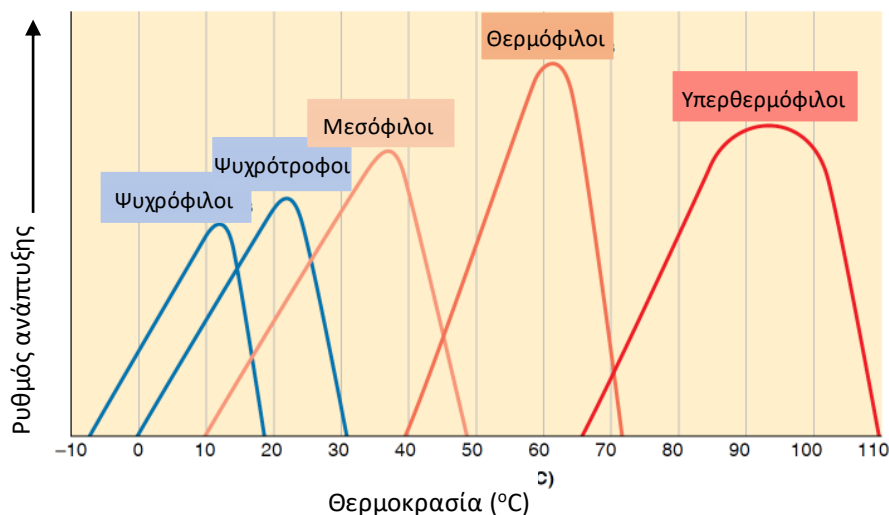
κυτταρικό τοίχωμα και ειδικούς μεταφορείς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν και να διατηρούν το pH στο κυτταρόπλασμα τους κατά δύο μονάδες χαμηλότερο από το pH του περιβάλλοντός. Σε ουδέτερο pH κυριαρχεί η διαφορά στη συγκέντρωση κατιόντων υδρογόνου (H^+) εκατέρωθεν της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (μεγαλύτερη συγκέντρωση εκτός του κυττάρου), με αποτέλεσμα την ανάπτυξη πρωτονιενεργτικής δύναμης που χρησιμοποιείται από το κύτταρο κυρίως για τον σχηματισμό ATP και τη διαμεμβρανική μεταφορά μορίων (χημική ώσμωση). Σε αλκαλικό pH η διαμεμβρανική διαφορά στη συγκέντρωση υδρογονοκατιόντων αντιστρέφεται και οι αλκαλόφιλοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει την ικανότητα να εκμεταλλεύονται τη διαμεμβρανική διαφορά στη συγκέντρωση ιόντων νατρίου (Na^+) (Albina et al., 2019). Ο μηχανισμός αυτός καθιστά πολλούς αλκαλίφιλους μικροοργανισμούς αλατόφιλους, δηλαδή ικανούς να αναπτύσσονται σε περιβάλλοντα με αλατότητα έως και 12% (Madigan et al., 2018), γεγονός που έχει παρατηρηθεί και σε μικροοργανισμούς που μπορούν να επιτελέσουν τη διεργασία της απονιτροποίησης (Glass & Silverstein, 1999). Επίσης, έχουν παρατηρηθεί διεργασίες υποκατάστασης αμινοξέων σε ένζυμα, ώστε να λειτουργούν αποτελεσματικά σε υψηλά pH, καθώς και δομικές μεταβολές σε πρωτεΐνες, ώστε να έχουν περισσότερους δεσμούς υδρογόνου ή υδρόφοβους δεσμούς. Παρόλο που τα παραπάνω έχουν διερευνηθεί για τους μικροοργανισμούς *Bacillus spp.*, η αντοχή άλλων μικροοργανισμών σε τιμές pH υψηλότερες από 10, όπως του απονιτροποιητή *Halomonas desirata*, δείχνει την πιθανή ικανότητα τους να χρησιμοποιούν παρόμοιους μηχανισμούς επιβίωσης σε αλκαλικά pH (Albina et al., 2019). Οι Albina et al. (2019) αναφέρουν ότι η μέγιστη τιμή pH για την οποία έχει παρατηρηθεί απονιτροποίηση είναι μεταξύ 11.5 και 12 και πέραν αυτής διαταράσσεται η φυσιολογία του κυττάρου.

Παρόλο που οι αλκαλίφιλοι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς προσαρμογής και επιβίωσης σε αλκαλικά περιβάλλοντα, οι οξεόφιλοι μικροοργανισμοί δεν φαίνεται να είναι εξίσου προσαρμοστικοί. Ο κρίσιμος παράγοντας που καθορίζει την επιβίωσή τους είναι η σταθερότητα της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης. Όταν το pH τείνει προς ουδέτερο, η κυτταροπλασματική μεμβράνη καταστρέφεται και το μικροβιακό κύτταρο λύεται. Αυτό αποδεικνύει ότι οι οξεόφιλοι μικροοργανισμοί δεν είναι απλά ανεκτικοί σε όξινες συνθήκες περιβάλλοντος, αλλά έχουν ανάγκη την αυξημένη συγκέντρωση πρωτονίων στο περιβάλλον τους, ώστε να διατηρηθεί η σταθερότητα της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης και να επιβιώσουν (Madigan et al., 2018).

2.2.5.3 Θερμοκρασία

Οι μικροοργανισμοί ταξινομούνται σε τρεις βασικές κατηγορίες, ανάλογα με τη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται με τον βέλτιστο ρυθμό: τους «ψυχρόφιλους», τους «μεσόφιλους» και τους «θερμόφιλους». Οι ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί απαντώνται συνήθως στα βάθη των ωκεανών και σε πολικές περιοχές, αναπτύσσονται στους 0°C και παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 15 °C. Η υποκατηγορία των ψυχρόφιλων μικροοργανισμών που ονομάζονται «ψυχρότροφοι» (psychrotrophs)

απαντώνται συνήθως σε αλλοιωμένα τρόφιμα, αναπτύσσονται στους 0°C και παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 20°C-30°C (Εικόνα 2.12). Οι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί (mesophiles) απαντώνται συνηθέστερα στη φύση και παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 25°C-40°C. Οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί (thermophiles) συνήθως εμφανίζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 50°C-60°C, απαντώνται σε θερμά νερά και στην επιφάνεια του εδάφους και δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασία χαμηλότερη από 45°C. Οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην κατηγορία των αρχαίων, παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους 80°C και απαντώνται συνήθως σε θερμές πηγές που σχετίζονται με ηφαιστειακή δραστηριότητα ονομάζονται «υπερθερμοφιλοι» (hyperthermophiles ή extreme thermophiles) (Εικόνα 2.12). Αξίζει να σημειωθεί ότι, ανεξάρτητα από την κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών με κριτήριο της θερμοκρασίας, η ελάχιστη και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους απέχουν μεταξύ τους περίπου 30°C και η μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης σηματοδοτεί το όριο πέραν του οποίου απενεργοποιείται η δυνατότητα ενζυμικής δράσης στα κύτταρα (Tortora et al., 2021).



Εικόνα 2.12: Ρυθμοί ανάπτυξης διαφορετικών κατηγοριών μικροοργανισμών ανάλογα με τη θερμοκρασία (Πηγή: Tortora et al., 2021)

Η θερμοκρασία επηρεάζει τη ταχύτητα απονιτροποίησης σύμφωνα με τη σχέση του Arrhenius (Σ.3). Ο θερμοκρασιακός συντελεστής θ δείχνει πως επηρεάζει η μεταβολή της θερμοκρασίας την ταχύτητα απονιτροποίησης και όσο υψηλότερη τιμή έχει, τόσο περισσότερο την επηρεάζει (Carrera et al., 2004; Elefsiniotis & Li, 2006; Lee et al., 2019).

$$r_{D,T1} = r_{D,T2} * \theta^{(T1-T2)} \quad (\Sigma.3)$$

όπου,

$r_{D,Ti}$, ο ρυθμός απονιτροποίησης σε θερμοκρασία T_i σε (mg NO₃-N/mg VSS/d)

T_i , η θερμοκρασία σε °C

θ , ο θερμοκρασιακός συντελεστής

Οι Carrera et al. (2003) παρατήρησαν ότι ο θερμοκρασιακός συντελεστής είναι ίσος με 1.06 για τα συστήματα συνδυασμένης οξείδωσης οργανικού άνθρακα με νιτροποίηση και απονιτροποίηση, ανεξάρτητα από την πηγή οργανικού άνθρακα σε εύρος θερμοκρασίας από 7°C έως 17°C (Πίνακας 2.5). Ο θερμοκρασιακός συντελεστής για καθαρές καλλιέργειες και για τη λάσπη από συστήματα ενεργού ιλύος κυμαίνεται μεταξύ 1.10 και 1.13, ανεξάρτητα από την πηγή οργανικού άνθρακα, σε εύρος θερμοκρασίας από 10°C έως 30°C, γεγονός που δείχνει ότι η μεταβολή της θερμοκρασίας επηρεάζει περισσότερο τον ρυθμό απονιτροποίησης των μικροοργανισμών καθαρών καλλιεργειών και συστημάτων ενεργού ιλύος σε σύγκριση με τον ρυθμό απονιτροποίησης των καλλιεργειών που προέρχονται από συστήματα συνδυασμένης οξείδωσης οργανικού άνθρακα με νιτροποίηση και απονιτροποίηση. Παρόλα αυτά, στα συστήματα μικτών καλλιεργειών, είτε πρόκειται για συστήματα ενεργού ιλύος, είτε όχι, παρατηρούνται αυξημένοι θερμοκρασιακοί συντελεστές σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 7°C-10°C. Σε θερμοκρασία κάτω των 3°C η απονιτροποίηση αναχαιτίζεται πλήρως (Fu et al., 2022).

Σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 25°C οι Lee et al. (2019) υπολόγισαν θερμοκρασιακό συντελεστή 1.00, ενώ σε θερμοκρασίες από 15°C έως 25°C υπολόγισαν συντελεστή 1.16 (Πίνακας 2.5). Συμπέραναν ότι ο ρυθμός απονιτροποίησης επηρεάζεται σημαντικά από οποιαδήποτε μεταβολή της θερμοκρασίας όταν αυτή είναι κάτω από 25°C, αλλά όχι από μεταβολές αυτής άνω των 25 °C έως τους 35°C. Οι Elefsiniotis & Li (2006) κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα για το οξικό οξύ, αλλά για θερμοκρασιακό εύρος από 10°C έως 20°C και από 20°C έως 30°C. Τέλος, με δότη ηλεκτρονίων το προπιονικό οξύ δεν παρατηρείται αξιόλογη διακύμανση της απονιτροποίησης εξαιτίας θερμοκρασιακών μεταβολών μεταξύ 10°C και 30°C (Elefsiniotis & Li, 2006).

Οι αυξημένοι θερμοκρασιακοί συντελεστές που παρατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες δείχνουν ότι όσο μειώνεται η θερμοκρασία, τόσο πιο έντονα μειώνεται ο ρυθμός απονιτροποίησης. Αυτό οφείλεται στην αναχαιτίση που επιφέρει η πτώση της θερμοκρασίας στη δράση ορισμένων ενζύμων, όπως της αναγωγάσης των νιτρικών, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι μεταβολικοί ρυθμοί (Lee et al., 2019; Fu et al., 2022). Ακόμη, επηρεάζεται ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών και η

υδρόλυση των ενώσεων που συμμετέχουν στην απονιτροποίηση (Fu et al., 2022). Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι πτώση της θερμοκρασίας από τους 20°C στους 10°C μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση νιτρικών ιόντων και σε μη πλήρη αναγωγή νιτρικών με δότη ηλεκτρονίων το οξικό νάτριο, ενώ ο ρυθμός απονιτροποίησης υποτετραπλασιάζεται (Cherchi et al., 2009). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η πτώση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του χρόνου προσαρμογής/υστέρησης (lag phase) (Elefsiniotis & Li, 2006). Αντίθετα, αύξηση της θερμοκρασίας στο διάστημα μεταξύ 15°C και 35°C μπορεί να οδηγήσει σε ταχύτερη αναγωγή νιτρικών ιόντων και σε ταχύτερη παραγωγή νιτρικών και υποξειδίου του αζώτου (Elefsiniotis & Li, 2006; Lee et al., 2019). Τέλος, οι Lee et al. (2019) παρατήρησαν ότι στους 15°C πραγματοποιείται πλήρης αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αέριο άζωτο χωρίς συσσώρευση νιτρικών ιόντων και υποξειδίου του αζώτου.

Πίνακας 2.5: Θερμοκρασιακοί συντελεστές θ σε διαφορετικά συστήματα (*)

Πρόελευση μικροβιακής καλλιέργειας	θ (-)	Πηγή άνθρακα	Θερμοκρασία (°C)	Βιβλιογραφική αναφορά	
Καλλιέργεια από χουμικό έδαφος	1.16	Οξικό νάτριο	15-25	Lee et al. (2019)	
	1.00		25-35		
Λάσπη από σύστημα ενεργού ιλύος	1.21	Οξικό οξύ	10-20	Elefsiniotis & Li (2006)	
	1.07		20-30		
	1.16	Προπιονικό οξύ	10-20		
	1.11		20-30		
	1.37	Μεθανόλη	6-10		Carrera et al. (2003)
	1.10		10-25		
Λάσπη από σύστημα συνδυασμένης οξειδωσης οργανικού άνθρακα με νιτροποίηση - απονιτροποίηση	1.06	Μεθανόλη	7-17	Nyberg et al. (1996)	
	1.06	Αιθανόλη	9-17		
	1.06	Υδρολυμένη λάσπη	-	Barlindhaug & Ødegaard (1996)	
	1.06	-	7-15	Oleszkiewicz & Berquist (1988)	
	1.30	-	2-7		
Καθαρή απονιτροποιητική καλλιέργεια	1.11	Μεθανόλη	15-25	Christensson et al. (1994)	
	1.12	Αιθανόλη			
	1.13	Μεθανόλη	6-30	Timmermans & Van Haute (1983)	

(*) με γκρι χρώμα σημειώνονται οι τιμές, όπως προέκυψαν ύστερα από επεξεργασία των δεδομένων που παρατίθενται στις βιβλιογραφικές αναφορές

Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι το βέλτιστο θερμοκρασιακό εύρος για την απονιτροποίηση είναι μεταξύ 15 °C και 35 °C. Όταν η θερμοκρασία μειώνεται κάτω από 10 °C ή ανεβαίνει άνω των 30 °C, περιορίζεται η υδρόλυση των οργανικών ενώσεων και η μικροβιακή δραστηριότητα, με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού απονιτροποίησης ή ακόμη και την παύση της απονιτροποίησης. Τέλος, η επίδραση της θερμοκρασίας στην απονιτροποίηση σχετίζεται άμεσα με την πηγή οργανικού άνθρακα που χρησιμοποιείται και η δόση αυτού μπορεί να ρυθμίζεται ανάλογα με τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις (Fu et al., 2022).

2.2.5.4 Συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών ιόντων

Η αρχική συγκέντρωση νιτρικών ιόντων μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη της απονιτροποίησης, επιβραδύνοντας την ταχύτητα αναγωγής των νιτρικών και νιτρωδών (Glass & Silverstein, 1999; Elefsiniotis & Li, 2006; Ge et al., 2012; Mohan et al., 2016). Όταν η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων είναι υψηλή, δημιουργείται ανταγωνισμός μεταξύ της αναγωγής νιτρικών και της αναγωγής νιτρωδών στη μεταφορά ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η δράση της αναγωγής των νιτρωδών, να επιβραδύνεται η αναγωγή τους και να παρατηρούνται αυξημένες συγκεντρώσεις και συσσώρευση τους στο διάλυμα (Glass & Silverstein, 1999; Ge et al., 2012; Zhang et al., 2022b). Αντίθετα, καθώς η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων εξαντλείται κατά την απονιτροποίηση, μειώνεται ο ανταγωνισμός μεταξύ των αναγωγών νιτρικών και νιτρωδών και επιταχύνεται η περαιτέρω αναγωγή των νιτρωδών (Ge et al., 2012). Συνεπώς, στην πράξη παρατηρείται ότι οι απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί προτιμούν να χρησιμοποιήσουν ως δέκτη ηλεκτρονίων τα νιτρικά ιόντα έναντι των νιτρωδών, όταν τα δύο αυτά χημικά είδη συνυπάρχουν στο διάλυμα (Mohan et al., 2016).

Εκτός από τη λειτουργία των ενζύμων που λαμβάνουν μέρος στην απονιτροποίηση, η αρχική συγκέντρωση νιτρικών μπορεί να καθορίσει και το είδος των μικροοργανισμών που κυριαρχεί σε έναν μικροβιακό πληθυσμό. Στις μικτές απονιτροποιητικές καλλιέργειες συνυπάρχουν συνήθως δύο ομάδες απονιτροποιητικών βακτηρίων, μία που αποτελείται από βακτήρια με την ικανότητα να επιτελούν μερική απονιτροποίηση και αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη (nitrate respiring bacteria) και μια δεύτερη, που απαρτίζεται από βακτήρια που μπορούν να ανάγουν πλήρως τα νιτρικά σε αέριο άζωτο (true denitrifying bacteria). Η πρώτη ομάδα έχει έως και τρεις φορές υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με τη δεύτερη, με αποτέλεσμα να κυριαρχεί ταχύτατα εντός του μικροβιακού πληθυσμού. Έτσι, παρουσία υψηλής συγκέντρωσης νιτρικών επικρατούν συνήθως τα βακτήρια που επιτελούν μερική απονιτροποίηση, με αποτέλεσμα αρχικά να παρατηρείται συσσώρευση νιτρωδών ιόντων, ενώ στη συνέχεια, καθώς η συγκέντρωση νιτρικών μειώνεται, να επικρατεί η ομάδα βακτηρίων που απονιτροποιεί πλήρως τα νιτρώδη σε αέριο άζωτο (Albina et al., 2019).

Συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων χαμηλότερες από 100 mM (6 200 mg/L) μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση νιτρικών χαμηλότερη από το 10% της αρχικής συγκέντρωσης αζώτου νιτρικών, ενώ συγκεντρώσεις από 100 mM-300 mM (6 200 mg/L-18 600 mg/L) μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση νιτρικών από 35% έως 70%. Για συγκεντρώσεις νιτρικών υψηλότερες από 300 mM (18 600 mg/L) η συσσώρευση νιτρικών στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές αντιστοιχεί στο 100% της αρχικής συγκέντρωσης νιτρικών, γεγονός που δείχνει αναχαίτιση της απονιτροποίησης (Albina et al., 2019). Το φαινόμενο αυτό εντείνεται ή καταστέλλεται ανάλογα με την πηγή άνθρακα/ηλεκτρονίων που διαθέτουν οι μικροοργανισμοί και τον λόγο C/N (Ge et al., 2012).

Τα νιτρώδη ιόντα και το οξείδιο του αζώτου αποτελούν κυτταροτοξικές ενώσεις για τα βακτήρια (Albina et al., 2019). Έχει παρατηρηθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων μπορούν να οδηγήσουν σε επιβράδυνση της περαιτέρω αναγωγής τους ή ακόμη και σε αναχαίτιση της απονιτροποίησης και άλλων διεργασιών, όπως της νιτροποίησης και της μεθανογένεσης (Martienssen & Schöps, 1999; Albina et al., 2019). Νιτρώδη ιόντα σε συγκεντρώσεις μερικών δεκάδων mM, για παράδειγμα από 10 mM-100 mM (620 mg/L-6 200 mg/L), σχετίζονται με αναχαίτιση της οξειδωτικής φωσφορλίωσης, σύνθεση βακτηριοστατικών μορίων σε απονιτροποιητικά βακτήρια, όπως στον *Bacillus cereus*, και επιπτώσεις στη διαμόρφωση του mRNA στα κύτταρα (Albina et al., 2019).

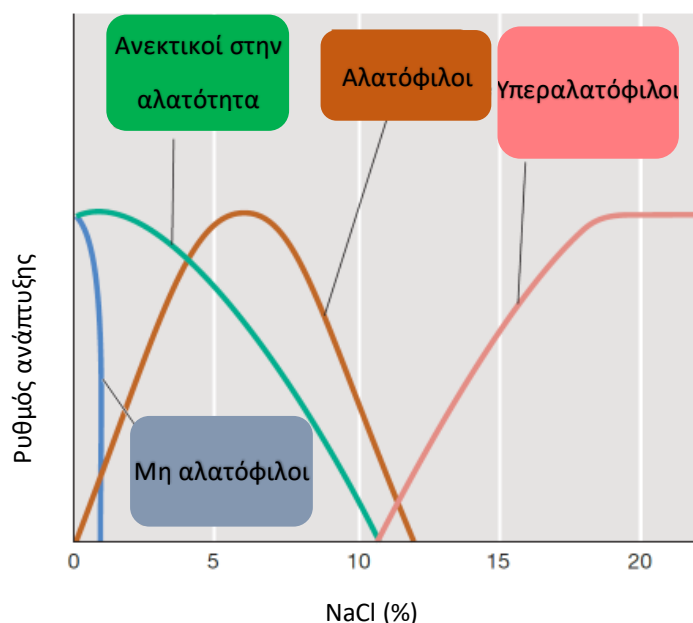
Τα απονιτροποιητικά βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμό σε γονιδιακό επίπεδο, μέσω του οποίου επιτυγχάνεται εξισορρόπηση μεταξύ των συγκεντρώσεων νιτρικών του υποστρώματος και των κυτταροτοξικών προϊόντων (νιτρικών, οξειδίου του αζώτου) κατά την απονιτροποίηση. Έτσι, παρά την τοξική τους δράση, τα νιτρώδη ιόντα απαντώνται στο εσωτερικό των κυττάρων σε συγκεντρώσεις της τάξης μερικών mM. Όταν επικρατούν συνθήκες ευνοϊκές για τη μικροβιακή ανάπτυξη, δεν αναμένεται συσσώρευση νιτρικών ή οξειδίου του αζώτου. Αντίθετα, όταν δεν επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες, όπως αυξημένη συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου και πολύ υψηλοί ή χαμηλοί λόγοι C/N, προκειμένου να αποφευχθεί η συσσώρευση νιτρικών ιόντων εντός του κυττάρου, ένζυμα όπως το narK απεκκρίνουν τα νιτρώδη προς τον εξωκυττάριο χώρο (Martienssen & Schöps, 1999; Albina et al., 2019; Fu et al., 2022; Zeng et al., 2023).

2.2.5.5 Αλατότητα

Πληθώρα ερευνητών έχει μελετήσει την επίδραση της συγκέντρωσης χλωριούχου νατρίου (NaCl) στην απονιτροποίηση. Κάποιοι ερευνητές συσχετίζουν την αλατότητα σε τιμές έως 10% με τα οξικά ιόντα ως προτιμότερη πηγή άνθρακα σε σύγκριση με τη μεθανόλη (Osaka et al., 2008). Άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η αύξηση της αλατότητας μπορεί να οδηγήσει σε αναχαίτιση της απονιτροποίησης και εντοπίζουν τη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου (NaCl) στο εύρος 1.46%-24.8% (0.25 M-4.25 M)

(Albina et al., 2019; Zhu, 2017), ενώ άλλοι παρατηρούν βελτίωση της απονιτροποίησης σε συγκεντρώσεις NaCl 0.04%-10% (6.8 mM-1.7 M) (Albina et al., 2019).

Στην πραγματικότητα οι βέλτιστες συνθήκες αλατότητας για έναν μικροοργανισμό εξαρτώνται από το ενδιαίτημα στο οποίο αποικεί. Για παράδειγμα, το θαλασσινό νερό έχει αλατότητα περίπου 3% και οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε αλατότητα από 1% έως 4%. Μικροοργανισμοί που απομονώνονται από ενδιαίτηματα με συνθήκες αυξημένης αλατότητας, όπως αλυκές, μπορούν να αναπτυχθούν σε αλατότητα από 3% έως 12%. Το σύνολο των παραπάνω μικροοργανισμών ονομάζονται «αλατόφιλοι» (halophile) (Εικόνα 2.13) (Madigan et al., 2018). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αλατόφιλων απονιτροποιητικών μικροοργανισμών ανήκουν στο γένος *Halomonas spp.*, όπως οι *Halomonas denitrificans* και *Halomonas desiderata* (Kim et al., 2007). Οι εν λόγω μικροοργανισμοί έχουν απόλυτη απαίτηση σε NaCl, δηλαδή το NaCl δεν μπορεί να υποκατασταθεί από άλλα άλατα, όπως το χλωριούχο κάλιο (KCl), το χλωριούχο ασβέστιο (CaCl₂) και το χλωριούχο μαγνήσιο (MgCl₂). Οι αλατόφιλοι μικροοργανισμοί διαφέρουν από αυτούς που είναι ανεκτικοί στην αλατότητα (halotolerant) και οι οποίοι να μην μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας, αλλά παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη απουσία NaCl. Τέλος, οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται ταχύτερα σε αλατότητα από 10% έως 30% ονομάζονται «υπεραλατόφιλοι» (extreme halophile) (Madigan et al., 2018).



Εικόνα 2.13: Κατηγοριοποίηση μικροοργανισμών ανάλογα με την αλατότητα στην οποία παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη (Πηγή: Madigan et al., 2018)

Η αύξηση της αλατότητας μπορεί να οδηγήσει σε επιβράδυνση της απονιτροποίησης (Glass & Silverstein, 1999; Mattila et al., 2007). Ενδεικτικά, η απονιτροποιητική ικανότητα μεθυλότροφης

βιομάζας μειώθηκε από 22 g NO₃-N/m³/kg VSS/d σε λιγότερο από 3 g NO₃-N/m³/kg VSS/d ύστερα από αύξηση της αλατότητας από 0.5% σε 8% (Mattila et al., 2007). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι συγκεντρώσεις NaCl υψηλότερες από 5% μπορεί να οδηγήσουν σε επικράτηση αλατόφιλων μικροοργανισμών, όπως *Halomonas spp.* και *Marinobacter spp.* σε ποσοστά 52% και 45.3%, και σε συσσώρευση νιτρικών ιόντων (Osaka et al., 2008). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2) παρατίθενται οι μικροοργανισμοί που είναι ικανοί για απονιτροποίηση σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας.

Πίνακας 2.6: Βακτήρια ικανά για απονιτροποίηση σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας

Γένος	Είδος	Εύρος αλατότητας	Βέλτιστη αλατότητα	Βιβλιογραφική Αναφορά
<i>γ-Proteobacteria</i>				
<i>Halomonas</i>	<i>campisalis</i> sp. Nov.	1.3-26.3%	8.8%	Mormile et al. (1999)
<i>Halomonas</i>	<i>denitrificans</i>	2.0-20.0%	-	Kim et al. (2007)
<i>Halomonas</i>	<i>daqingensis</i> sp. nov.	1.0-15.0%	5.0-10.0%	Wu et al. (2008)
<i>Halomonas</i>	<i>maura</i>	1.0-15.0%	7.5-10.0%	Bouchotroch et al. (2001)
<i>Halomonas</i>	<i>ventosae</i> sp. nov.	1.0-15.0%	8.0%	Martínez-Cánovas et al. (2004)
<i>Halomonas</i>	<i>chromatireducens</i> sp. nov.	0.59-23.4%	2.9%	Shapovalova et al. (2009)
<i>Halomonas</i>	<i>desiderata</i> sp. nov.	έως 18.0%	-	Berendes et al. (1996)
<i>Marinobacter</i>	<i>aquaeolei</i> sp. nov.	έως 20.0%	5.0%	Huu et al. (1999)
<i>Marinobacter</i>	PAD-2 (closely related to <i>M.alkaliphilus</i>)	3.0-18.0%	3.0-6.0%	Nakano et al. (2010)
<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>	1.0-4.0%	-	Rezaee et al. (2012)
<i>Pseudomonas</i>	<i>pantotrophus</i>	έως 5.8%	-	Trögl et al. (2012)
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>		-	
<i>β-Proteobacteria</i>				
<i>Azoarcus</i>	<i>Azoarcus</i> -like species	1.80%	-	Ikeda et al. (2013)

2.2.5.6 Διαλυτά μέταλλα

Μέταλλα όπως ο χαλκός (Cu), ο σίδηρος (Fe), το μολυβδαίνιο (Mo), το νικέλιο (Ni), ο ψευδάργυρος (Zn), το μαγνήσιο (Mg) και το μαγγάνιο (Mn) αποτελούν απαραίτητα ιχνοστοιχεία και δρουν ωφέλιμα για τον μικροβιακό μεταβολισμό, σχηματίζοντας απαραίτητους συμπράγοντες και συνένζυμα για τις βιοχημικές διεργασίες, σύμφωνα με όσα έχουν περιγραφεί αναλυτικά στο υποεδάφιο 2.2.2 (Singh & Tripathy, 2007; Schaechter, 2009; Madigan et al., 2018; Liu et al., 2022). Για παράδειγμα, η απουσία χαλκού έχει συνδεθεί με συσσώρευση υποξειδίου του αζώτου κατά την απονιτροποίηση, εξαιτίας των επιπτώσεων στη δομή και λειτουργία του ενζύμου Nos (Granger & Ward, 2003; Woolfenden et al., 2013). Στα άτομα των μετάλλων τα μη πλήρη d τροχιακά δίνουν τη δυνατότητα σχηματισμού απαραίτητων και σύνθετων ενώσεων μεταξύ μετάλλων και οργανικών συμπλόκων, όπως πρωτεϊνών, τα νουκλεϊκών οξέων και συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών (Singh & Tripathy, 2007). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, άλλα μέταλλα, όπως ο μόλυβδος (Pb), ο υδράργυρος (Hg), το κάδμιο (Cd) και ο άργυρος (Ag), καθώς και τα ίδια τα ωφέλιμα μέταλλα υπό προϋποθέσεις μπορούν να δράσουν τοξικά για τους μικροοργανισμούς. Τα πρώτα έχουν την τάση να δημιουργούν ισχυρούς δεσμούς με τα οργανικά σύμπλοκα, με αποτέλεσμα σπάνια να συμμετάσχουν στις βιοχημικές διεργασίες και τα δεύτερα, όταν απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να σχηματίσουν μη καθορισμένα χημικά είδη με οργανικά σύμπλοκα και να αναχαιτίσουν τη μικροβιακή δράση (Singh & Tripathy, 2007).

Η τοξικότητα των μετάλλων εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους. Βιοδιαθεσιμότητα ονομάζεται η ικανότητα των χημικών ειδών ενός μετάλλου να προσπελάζει ενεργά κέντρα, για παράδειγμα ενζύμων, και να δημιουργεί βιοχημικούς δεσμούς με αυτά, ενεργοποιώντας βιολογικές αποκρίσεις. Τα πλέον βιοδιαθέσιμα χημικά είδη μετάλλων που προκαλούν τοξικότητα είναι τα διαλυτά είδη αυτών και περιλαμβάνουν τα ελεύθερα ιόντα σε όλους τους δυνατούς βαθμούς οξειδωσης, τις υδροξυενώσεις και τα οργανικά ή ανόργανα σύμπλοκα αυτών. Σε αρκετές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι, όταν εκλείπει ο παράγοντας που έχει προκαλέσει φαινόμενα τοξικότητας, είναι δυνατό να ανασταλεί η τοξική του επίδραση. Για παράδειγμα, η ακινητοποίηση ιόντων χαλκού από την άργιλο και τα ανθρακικά ιόντα του εδάφους μπορεί να συντελέσει σε αναστολή της τοξικής επίδρασης που προκαλούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις χαλκού στην απονιτροποιητική μικροβιακή δράση (Jacinthe & Tedesco, 2009).

Το pH και η σύσταση του διαλύματος είναι οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα. Σε όξινες συνθήκες (χαμηλές τιμές pH) τα χημικά είδη που επικρατούν είναι τα ελεύθερα κατιόντα των μετάλλων, εξαιτίας του κορεσμού των θέσεων πρόσδεσής τους σε υδρογονοκατιόντα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να περιορίζονται οι πιθανές αλληλεπιδράσεις των μετάλλων με συμπλοκοποιητές που μπορούν να τα καταστήσουν λιγότερο τοξικά. Αντίθετα, σε βασικές τιμές pH τα μέταλλα τείνουν να σχηματίζουν ενώσεις υδροξειδίων, οι οποίες μπορεί να είναι είτε

διαλυτές (πχ NiOH^+ , ZnOH^+), είτε αδιάλυτες (πχ $\text{Fe}(\text{OH})_3$) ανάλογα με τη φύση κάθε μετάλλου (Singh & Tripathy, 2007). Συγκεκριμένα κατά την απονιτροποίηση, η αύξηση του pH μπορεί να οδηγήσει σε καταβύθιση του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) ως αιματίτη (Fe_2O_3), υδροξειδίου του σιδήρου ($\text{Fe}(\text{OH})_2$ και $\text{Fe}(\text{OH})_3$) και ανθρακικού σιδήρου ($\text{Fe}(\text{CO}_3)_2$) και του νικελίου (Ni^{2+}) ως ανθρακικού νικελίου (NiCO_3) και υδροξειδίου του νικελίου ($\text{Ni}(\text{OH})_2$) (Ramírez et al., 2017). Επίσης, έχει παρατηρηθεί καταβύθιση του 47% και 25% της αρχικής συγκέντρωσης νικελίου (Ni), για συγκεντρώσεις 50 mg/L και 100 mg/L, αντίστοιχα (Zou et al., 2014).

Η μικροβιακή δράση (πχ μικροβιακή παραγωγή καλσίτη, σχηματισμός θειούχων ενώσεων των μετάλλων κ.ά.), καθώς και η δυνατότητα σχηματισμού συμπλόκων μεταξύ των μετάλλων και άλλων χημικών ειδών, όπως οργανικών ενώσεων, επιδρά στη βιοδιαθεσιμότητα των μετάλλων. Για παράδειγμα, μέσω της μικροβιακής παραγωγής καλσίτη (MICP-microbial induced calcite precipitation) (Li et al., 2014; Liu et al., 2021; Rajasekar et al., 2021; Ren et al., 2023) σχηματίζονται ιζήματα ασβεστίου, όπως CaCO_3 , CdCO_3 και $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (Ren et al., 2023) ή ακόμη και άλατα ασβεστίου που μπορούν να συγκαταβυθιστούν με NiCO_3 , απομακρύνοντας ταυτόχρονα νιτρικά ιόντα από το διάλυμα (Liu et al., 2021). Η αναγωγή θειικών ιόντων ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση που οδηγεί σε παραγωγή υδροθείου (H_2S) μπορεί να ευνοήσει την καταβύθιση των διαλυτών ιόντων ψευδαργύρου και νικελίου με τη μορφή θειούχων αλάτων (πχ NiS_2 , ZnS) (Remoundaki et al., 2003a; Zou et al., 2015). Αντίθετα, η απουσία θειούχων ιόντων έχει παρατηρηθεί ότι μπορεί να προκαλέσει αυξημένες συγκεντρώσεις διαλυτού νικελίου κατά περίπου 5.6%-12.3% κατά την απονιτροποίηση και καταβύθισή του κυρίως με τη μορφή ανθρακικού νικελίου (NiCO_3) (Zou et al., 2015) και υδροξειδίου του νικελίου (Remoundaki et al., 2003a). Επίσης, έρευνες έχουν δείξει ότι τόσο το νικέλιο, όσο και ο σίδηρος μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα με οργανικές ενώσεις, όπως το κιτρικό οξύ. Στην περίπτωση του σιδήρου αυτό μπορεί να συντελέσει σε επαναδιαλυτοποίηση αδιάλυτων ενώσεών του. Στην περίπτωση του νικελίου τα σύμπλοκα αυτά τείνουν να γίνονται ισχυρότερα με την αύξηση των τιμών του pH, γεγονός που μπορεί να καταστήσει τις συμπλοκοποιημένες οργανικές ενώσεις λιγότερο βιοδιαθέσιμες, να παρεμποδίσει τη βιοαποικοδόμησή τους και να οδηγήσει σε μεγαλύτερη συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων, όπως νιτρωδών ιόντων (NO_2^-) και υποξειδίου του αζώτου (N_2O), κατά την απονιτροποίηση (Ramírez et al., 2017).

Η τοξική επίδραση των μετάλλων στη δράση των απονιτροποιητικών βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση νιτρωδών ιόντων και σε αναγωγή των νιτρικών σε αμμωνιακά (Bollag & Barabasz, 1979; Sakadevan et al., 1999; Zou et al., 2013; Zou et al., 2014). Για τον χαλκό (Cu) έχει παρατηρηθεί υψηλότερη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων σε σύγκριση με το νικέλιο (Ni) και τον σίδηρο (Fe) (Zou et al., 2013). Για το κάδμιο (Cd), τον χαλκό (Cu) και τον ψευδάργυρο (Zn) έχει παρατηρηθεί αναγωγή των νιτρικών σε αμμωνιακά (Sakadevan et al., 1999). Οι μηχανισμοί με τους οποίους τα μέταλλα μπορούν να προκαλέσουν φαινόμενα τοξικότητας στους αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς είναι:

- Η συγκράτηση των μετάλλων στην επιφάνεια του κυττάρου, δηλαδή στην εξωτερική μεμβράνη και στο στρώμα πεπτιδογλυκάνης, προτού καταφέρουν να εισέλθουν στο κύτταρο (συχνά εκφράζεται με τον όρο «ρόφηση»). Τέτοια μέταλλα είναι το νάτριο (Na), το ασβέστιο (Ca), το στρόντιο (Sr), το νικέλιο (Ni), ο μόλυβδος (Pb) και ο σίδηρος (Fe). Το φαινόμενο αυτό προκαλείται εξαιτίας του αρνητικού φορτίου της επιφάνειας των κυττάρων, σε τιμές pH που ευνοούν την κυτταρική ανάπτυξη, ως αποτέλεσμα της παρουσίας φωσφορικών και υδροξυλομάδων στα μόρια των λιποπολυσακχαριτών. Όσο πιο αρνητικά φορτισμένη είναι η κυτταρική επιφάνεια, τόσο πιο έντονα είναι τα φαινόμενα τοξικότητας που παρατηρούνται (Singh & Tripathy, 2007). Για παράδειγμα, η ικανότητα βιορόφησης απονιτροποιητικής καλλιέργειας έχει παρατηρηθεί υψηλότερη για το κάδμιο (Cd) και τον μόλυβδο (Pb) σε σύγκριση με το νικέλιο (Ni) και μπορεί να αυξηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης των μετάλλων αυτών (You et al., 2009).
- Το οξειδωτικό στρες. Τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να αντιδράσουν με δύο μόρια γλουταθειόνης σχηματίζοντας ένα μόριο διθειούχου γλουταθειόνης που, αντιδρώντας με τον εκάστοτε δότη ηλεκτρονίων, πχ το οξυγόνο, οδηγούν στην παραγωγή οξειδωμένης διθειούχου γλουταθειόνης, μεταλλικών ιόντων και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η οξειδωμένη διθειούχος γλουταθειόνη μπορεί να αναχθεί μέσω του NADPH, ενώ τα μεταλλικά ιόντα που απελευθερώθηκαν μπορούν να εκκινήσουν τη διαδικασία από την αρχή, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες (Singh & Tripathy, 2007).
- Η πρόσληψη των μετάλλων από το κύτταρο. Η διαδικασία αυτή είναι σύνθετη για τους μικροοργανισμούς, καθώς η δομή πολλών μετάλλων είναι πανομοιότυπη (πχ η ιονική διάμετρος του σιδήρου (Fe), του νικελίου (Ni), του χαλκού (Cu) και του ψευδαργύρου (Zn) διαφέρει λιγότερο από 14%) και τα χημικά είδη που δημιουργούν, κυρίως με το οξυγόνο, μοιάζουν με αβλαβή χημικά είδη για τα κύτταρα (πχ το AsO_4^{3-} με το PO_4^{3-} και το SO_4^{2-} με το CrO_4^{2-}). Η διάκριση των τοξικών και των μη τοξικών μεταλλικών ειδών πραγματοποιείται μέσω ειδικών μηχανισμών που έχουν αναπτύξει οι μικροοργανισμοί και είναι είτε εκλεκτικοί-ενεργητικοί, που απαιτούν χρόνο και δαπάνη ενέργειας από τα κύτταρα, είτε μη εκλεκτικοί-παθητικοί, που δεν απαιτούν χρόνο και βασίζονται στο φαινόμενο της χημικής ώσμωσης. Για παράδειγμα, το νικέλιο (Ni) και ο ψευδάργυρος (Zn) μπορούν να δεσμευθούν μέσω των πρωτεϊνών CorA, που είναι κυρίως υπεύθυνες για την ταχεία μεταφορά του μαγνησίου (Mg) ενδοκυτταρικά, ενώ ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn) και ο μόλυβδος (Pb) μέσω ΑΤΡασών τύπου P, που είναι αργές και εκλεκτικές (Singh & Tripathy, 2007).

Μόλις τα μέταλλα εισέλθουν στο κύτταρο δημιουργούν ενώσεις με οργανικά σύμπλοκα, όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα, οι οποίες μπορούν να γίνουν τοξικές για το κύτταρο. Για παράδειγμα, ο ψευδάργυρος (Zn) και ο χαλκός (Cu) μπορούν να διαταράξουν τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών. Τα μέταλλα που συνδέονται με λειτουργικές ομάδες βιολογικών μορίων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν

σε «σκληρά» (hard) και «μαλακά» (soft). Τα σκληρά μέταλλα, όπως το νάτριο (Na), το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg) και ο σίδηρος (Fe) είναι μικρά κατιόντα που δεν μπορούν να πολωθούν εύκολα και έχουν την τάση να δημιουργούν δεσμούς με σύμπλοκα που περιέχουν οξυγόνο, όπως καρβοξυλικό οξύ και θειικές και φωσφορικές ομάδες. Τα μαλακά μέταλλα, όπως ο χαλκός (Cu), ο μόλυβδος (Pb), το νικέλιο (Ni), το κάδμιο (Cd), ο ψευδάργυρος (Zn), ο υδράργυρος (Hg) και ο άργυρος (Ag) είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος κατιόντα που πολώνονται εύκολα εξαιτίας του πλήθους των ηλεκτρονίων τους και έχουν την τάση να δημιουργούν δεσμούς με σύμπλοκα που περιέχουν άζωτο και θείο, όπως οι πρωτεϊνικές ομάδες $-NH_2$ και $-SH_2$. Μαλακά μέταλλα, όπως ο μόλυβδος (Pb), δημιουργούν εύκολα ενώσεις με την πρωτεϊνική ομάδα $-SH_2$, επηρεάζοντας τη δομή και τη λειτουργία των πρωτεϊνών. Επίσης, έχουν την τάση να υποκαθιστούν τα σκληρά μέταλλα στα χημικά σύμπλοκα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μετατροπή απαραίτητων μεταβολιτών σε τοξικές ουσίες. Για παράδειγμα, το νικέλιο (Ni) μπορεί να υποκαταστήσει τον σίδηρο (Fe) και ο ψευδάργυρος (Zn) το μαγνήσιο (Mg) (Singh & Tripathy, 2007).

Έχει παρατηρηθεί ότι ο υδράργυρος (Hg) είναι διαδοχικά πιο τοξικός από το κάδμιο (Cd) και τον ψευδάργυρο (Zn), το νικέλιο (Ni) και τον μόλυβδο (Pb) (Dancka-Bialek & Romka, 1991; Seifert & Domka, 2005), με τις συγκεντρώσεις ψευδαργύρου (Zn) και νικελίου (Ni) που μπορούν να προκαλέσουν αναχαίτιση της απονιτροποίησης να προσδιορίζονται σε 1.5 mg/L και 40 mg/L, αντίστοιχα (Seifert & Domka, 2005). Το κάδμιο (Cd) και το νικέλιο (Ni) μπορούν να προκαλέσουν μεγαλύτερη αναχαίτιση στην απονιτροποίηση σε σύγκριση με τον μόλυβδο (Pb). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι 10 mg/L Cd οδηγούν σε μείωση της ταχύτητας αναγωγής νιτρικών κατά 80%, ενώ ίδια συγκέντρωση Ni κατά 40% (You et al., 2009). Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι το κάδμιο (Cd) είναι πιο τοξικό από τον χαλκό (Cu), τον ψευδάργυρο (Zn) και τον μόλυβδο (Pb) (Bollag & Barabasz, 1979; Sakadevan et al., 1999). Όσον αφορά στον σίδηρο (Fe), βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι μπορεί να έχει ήπια αρνητική ή ακόμη και ελαφρά θετική επίδραση στην απονιτροποίηση, επιβεβαιώνοντας τη διάκριση και τις ιδιότητες των μαλακών και σκληρών μετάλλων που περιγράφηκαν παραπάνω. Για παράδειγμα, σε ετεροτροφική απονιτροποιητική καλλιέργεια (επικρατούσες καλλιέργειες: *Dechloromonas denitrificans*, *Hydrogenophaga caeni*) παρατηρήθηκε ότι ο σίδηρος (Fe) μπορεί να αναχαίσει την απονιτροποίηση σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (1.67 mg/L Fe^{2+}) σε σύγκριση με το νικέλιο (Ni) και τον χαλκό (Cu) διαδοχικά.

Αυξημένες συγκεντρώσεις χαλκού (Cu^{2+}) έχουν συνδεθεί με αναχαίτιση της δράσης των αναγωγασών των νιτρικών και του υποξειδίου του αζώτου κατά 21.1%-42.1% και 10.3%-16.3%, αντίστοιχα (Zhao et al., 2020). Συγκεντρώσεις 0.18 mg/L και 0.7 mg/L μπορούν να οδηγήσουν σε ποσοστά απομάκρυνσης νιτρικών 94.1% και 52.2%, αντίστοιχα (Zou et al., 2013). Συγκεντρώσεις μεταξύ 2 και 5 mg/L έχουν συνδεθεί με συσσώρευση υποξειδίου του αζώτου (Chen et al., 2019; Zhu et al., 2013). Σε συγκεντρώσεις 5 mg/L και με τη μορφή νανοσωματιδίων ο χαλκός μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμό

της αφθονίας των απονιτροποιητικών βακτηρίων, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί αναχαίτιση του ειδικού ρυθμού απονιτροποίησης κατά 44% και της συγκέντρωσης εξωκυτταρικών πολυμερών κατά 15.2% (Cheng et al., 2019). Τέλος, οι Wang et al. (2018) αναφέρουν ότι 100 mg/L χαλκού μπορούν να αναστείλουν κατά 52% την αναγωγή νιτρικών, προκαλώντας μη αναστρέψιμη αναχαίτιση σε εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια ένζυμα. Τόσο ο χαλκός, όσο και ο σίδηρος (Fe) μπορούν να επιδράσουν στη σύνθεση και κατανάλωση του ενδοκυτταρικού άνθρακα που καταναλώνεται κατά τη διαδικασία της ενδοκυτταρικής απονιτροποίησης, απομειώνοντας την εξωγενή απαίτηση σε άνθρακα (Chen et al., 2019). Οι Ramírez et al. (2017) παρατήρησαν ότι συγκεντρώσεις τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}) έως 151.2 mg/L μπορούν να οδηγήσουν σε μικρή αναχαίτιση (έως 30%) ή ακόμη και βελτίωση της απονιτροποίησης σε pH 6-7, ενώ συγκεντρώσεις νικελίου (Ni^{2+}) έως 10.2 mg/L και 60.5 mg/L σε αναχαίτιση της απονιτροποίησης έως 95% και 60% με δότες ηλεκτρονίων την αιθανόλη και το κιτρικό οξύ, αντίστοιχα. Συγκεντρώσεις νικελίου (Ni^{2+}) έως 10.2 mg/L και 60.5 mg/L οδηγούν σε αναχαίτιση της απονιτροποίησης έως 95% και 60%, αντίστοιχα, με δότη ηλεκτρονίων το κιτρικό οξύ (Ramírez et al., 2017). Συγκεντρώσεις 50 mg/L και 100 mg/L μπορεί να προκαλέσουν αναχαίτιση της απονιτροποίησης κατά 18% και 65%, αντίστοιχα (Zou et al., 2014). Άλλοι ερευνητές διαπίστωσαν ότι οι ίδιες συγκεντρώσεις νικελίου μπορούν να οδηγήσουν σε ποσοστά απομάκρυνσης νιτρικών 90% και 30%, αντίστοιχα (Zou et al., 2013). Η παρουσία ψευδαργύρου με τη μορφή νανοσωματιδίων έχει συνδεθεί με αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων και υποξειδίου του αζώτου, με μεταβολές στη διεργασία της γλυκόλυσης και της σύνθεσης PHB και παρεμπόδιση της έκφρασης γονιδίων και της δράσης απονιτροποιητικών ενζύμων (Zheng et al., 2014). Τέλος, όσον αφορά στο ασβέστιο, έχει παρατηρηθεί ότι η παρουσία του μπορεί να οδηγήσει σε επιβράδυνση ή ακόμη και σε παύση της απονιτροποίησης (Fernández-Nava et al., 2008; Cyplik et al., 2012). Οι Fernández-Nava et al. (2008) προσδιόρισαν την κρίσιμη συγκέντρωση διαλυτού ασβεστίου, πέραν της οποίας μπορεί να παρατηρηθεί αναχαίτιση της απονιτροποίησης, σε 150 mg/L και επισήμαναν την αρνητική επίδραση που μπορεί να έχει ακόμη και στον ρυθμό ανάπτυξης της βιομάζας (Fernández-Nava et al., 2008). Από την παράθεση των παραπάνω βιβλιογραφικών αναφορών προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο σίδηρος (Fe) και ο μόλυβδος (Pb) είναι τα λιγότερο τοξικά σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέταλλα που μελετήθηκαν κατά την απονιτροποίηση, ενώ ο υδράργυρος (Hg) και το κάδμιο (Cd) τα περισσότερο τοξικά.

Εκτός από την επίδραση καθενός μετάλλου ξεχωριστά, έμφαση έχει δοθεί στη συνεργιστική δράση των διαλυτών μετάλλων κατά την απονιτροποίηση. Η ταυτόχρονη παρουσία μετάλλων (πχ χαλκού (Cu), ψευδαργύρου (Zn) και καδμίου (Cd)) μπορεί να επηρεάσει διαφορετικά την αναγωγή του N_2O (nosZ) σε σύγκριση με καθένα μέταλλο ξεχωριστά (Holtan-Hartwig et al., 2002). Επίσης, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί ότι η συνεργιστική δράση του νικελίου (Ni), του μόλυβδου (Pb) και του καδμίου (Cd) είναι υψηλότερη σε σχέση με κάθε ένα από τα μέταλλα αυτά (You et al., 2009). Οι Ramírez et al. (2017) κατέληξαν στο ίδιο συμπέρασμα μόνο στην περίπτωση που τα μέταλλα βρίσκονται

στο διάλυμα σε χαμηλές συγκεντρώσεις (έως 20 mg/L Fe³⁺, 8 mg/L Ni²⁺ και 5 mg/L Cr³⁺). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (έως 103 mg/L Fe³⁺, 40 mg/L Ni²⁺ και 122 mg/L Cr³⁺) παρατήρησαν αναχαίτιση ηπιότερη από την αθροιστική και απέδωσαν το φαινόμενο αυτό στις αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται μεταξύ των μετάλλων (πχ συγκαταβύθισης) και περιορίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα και την τοξική επίδραση που μπορούν αυτά να παρουσιάσουν μεμονωμένα (Ramírez et al., 2017). Όσον αφορά την ικανότητα βιορόφησης, αυτή μπορεί να αυξηθεί εξαιτίας της ταυτόχρονης παρουσίας διαλυτών ειδών μετάλλων στο διάλυμα, όπως στις περιπτώσεις του καδμίου (Cd), του μόλυβδου (Pb) και του νικελίου (Ni) (You et al., 2009).

Βέβαια, τα συμπεράσματα σχετικά με τις επιπτώσεις που έχουν βαρέα μέταλλα, όπως το κάδμιο (Cd), ο μόλυβδος (Pb), ο χαλκός (Cu) και ο ψευδάργυρος (Zn) στα απονιτροποιητικά ένζυμα NarG, nirK-nirS και nosZ, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε νιτρώδη, των νιτρωδών σε οξειδίο του αζώτου και του υποξειδίου του αζώτου σε αέριο άζωτο, αντίστοιχα, δεν είναι ξεκάθαρα. Κάποιοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα NarG, NirK και NosZ δεν επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία μετάλλων, όπως το νικέλιο (Ni) και ο χαλκός (Cu) (Deng et al., 2018), άλλοι ερευνητές ότι μέταλλα, όπως ο χαλκός (Cu), το αρσενικό (As), ο μόλυβδος (Pb) και ο ψευδάργυρος (Zn) μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στα NirK και NirS και καθόλου ή θετικά στο NosZ (Granger & Ward, 2003; Li et al., 2018; Chen et al., 2019; Ke et al., 2021;) και άλλοι ότι τα NirK και NosZ επηρεάζονται αρνητικά από την παρουσία μετάλλων, όπως το κάδμιο (Cd), ο μόλυβδος (Pb), ο χαλκός (Cu) και ο ψευδάργυρος (Zn) (Holtan-Hartwig et al., 2002; Liu et al., 2016). Οι Cheng et al. (2019) έδειξαν ότι η παρουσία νανοσωματιδίων χαλκού σε συγκεντρώσεις 5 mg/L μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμό της αφθονίας των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τα διαδοχικά στάδια της απονιτροποίησης (NirK, NarA, NarG, Nos). Τέλος, οι Chen et al. (2019) αναφέρουν ότι συγκεντρώσεις χαλκού (Cu) χαμηλότερες από 2 mg/L μπορούν να ενισχύσουν της δράσης του ενζύμου NirK, με αποτέλεσμα αύξηση στην απονιτροποιητική ικανότητα. Σε κάθε περίπτωση είναι κοινά αποδεκτό ότι τα βαρέα μέταλλα μπορούν να επηρεάσουν τον πληθυσμό και την ποικιλότητα των απονιτροποιητικών βακτηρίων (Deng et al., 2018; Lu et al., 2022) και να αναχαιτίσουν τη μικροβιακή απονιτροποιητική δραστηριότητα (You et al., 2009; Li et al., 2018). Παρά την τοξική επίδραση των μετάλλων στην απονιτροποιητική μικροβιακή δράση, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς μέσω των οποίων υποδεικνύουν ανοχή σε συγκεντρώσεις διαλυτών μετάλλων, όπως ο χαλκός (Cu) και το χρώμιο (Cr). Όσον αφορά στον χαλκό (Cu), οι μηχανισμοί αυτοί είναι (Liu et al., 2022):

- Η παραγωγή και έκκριση εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS) με ιδιότητες προσαρμοσμένες στον εκάστοτε τοξικό παράγοντα. Τα EPS είναι βιοπολυμερή που αποτελούνται από επιμέρους ουσίες, όπως πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες και νουκλεϊκά οξέα.
- Την ενεργοποίηση γονιδίων που οδηγούν σε μεγαλύτερη ανοχή σε συγκεντρώσεις χαλκού, ταυτόχρονα με παραγωγή EPS, ύστερα από μακροχρόνια έκθεση σε αυτόν.

Όσον αφορά το τρισθενές (Cr^{3+}) και το τοξικό εξασθενές χρώμιο (Cr^{6+}), οι μηχανισμοί που οδηγούν σε ανοχή της παρουσίας του από τα απονιτροποιητικά βακτήρια μπορεί να είναι αποτέλεσμα (Liu et al., 2022):

- Της παρουσίας γονιδίων με τη βοήθεια των οποίων το εξασθενές χρώμιο (Cr^{6+}) ανάγεται ταυτόχρονα με το οξυγόνο και τα νιτρικά, όπως στην περίπτωση των *Pseudomonas aeruginosa* PCN-2 και G12. Παρόλα αυτά, δεν αποφεύγεται η συσσώρευση υποξειδίου του αζώτου (N_2O).
- Της παρουσίας των χαρακτηριστικών ομάδων $-\text{OH}$, $-\text{NH}$, $-\text{CHO}$ και $-\text{CONH}$ στην επιφάνεια των κυττάρων που μπορούν να οδηγήσουν σε αναγωγή του εξασθενούς χρωμίου (Cr^{6+}) σε τρισθενές (Cr^{3+}).
- Της δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων και ουρεάσης που ευνοούν την καταβύθιση των μετάλλων με τη μορφή ανθρακικών αλάτων.

Η προσαρμογή του μικροβιακού πληθυσμού σε συγκεντρώσεις διαλυτών ειδών μετάλλων μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμό της αναχαίτισης της αναγωγής νιτρικών (Sakadevan et al., 1999; Holtan-Hartwig et al., 2002).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η τοξικότητα που οφείλεται στην παρουσία μετάλλων μπορεί να οδηγήσει σε μη σταθερή, περιορισμένη δράση των κυτταρικών ενζύμων και άλλων βιολογικών μορίων ή ακόμη και σε παύση της λειτουργικότητάς τους, με απώτερο αποτέλεσμα την αναχαίτιση της μικροβιακής δράσης (Holtan-Hartwig et al., 2002; Singh & Tripathy, 2007; Liu et al., 2016; Deng et al., 2018; Li et al., 2018; Lu et al., 2022). Η αναχαίτιση αυτή γίνεται εμφανής μέσω της επιβράδυνσης της αναγωγής νιτρικών και της πιθανής συσσώρευσης νιτροδών και αμμωνιακών ιόντων κατά την απονιτροποίηση (Bollag & Barabasz, 1979; Sakadevan et al., 1999; You et al., 2009; Zou et al., 2013; Zou et al., 2014; Ramírez et al., 2017). Παρόλα αυτά, τα απονιτροποιητικά βακτήρια μπορούν να αναπτύξουν μηχανισμούς, όπως έκκριση ουσιών (πχ EPS) και ενεργοποίηση εξειδικευμένων γονιδίων, μέσω των οποίων η αναχαίτιση αυτή περιορίζεται άμεσα ή μετά την προσαρμογή της βιομάζας στις επιθυμητές συγκεντρώσεις διαλυτών ειδών μετάλλων (Sakadevan et al., 1999; Holtan-Hartwig et al., 2002; Liu et al., 2022).

2.2.5.7 Προσαρμογή της βιομάζας

Η προσαρμογή των μικροβιακών καλλιεργειών σε συγκεκριμένη πηγή οργανικού άνθρακα/ηλεκτρονίων μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη της απονιτροποίησης (Hallin & Pell, 1998; Mokhayeri et al., 2006; Cherchi et al., 2009). Η απόκριση των μικροβιακών πληθυσμών σε νέα πηγή άνθρακα εξαρτάται από:

- Το είδος της μικροβιακής καλλιέργειας

Πειραματικές δοκιμές έχουν δείξει ότι απαιτείται μακρύς χρόνος προσαρμογής προκειμένου να αναπτυχθεί ένας εύρωστος μεθυλότροφος πληθυσμός, γεγονός που οφείλεται στον χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης των μεθυλότροφων βακτηρίων (Hallin & Pell, 1998). Επίσης, έχουν παρατηρηθεί φαινόμενα τοξικότητας σε μικροοργανισμούς του γένους *Bacteroides spp.* με δότη ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα σε συγκέντρωση υψηλότερη από 100 mg/L TOC, σε αντίθεση με βακτήρια του γένους *Azoarcus spp.* (Osaka et al., 2008).

- Την αρχική πηγή οργανικού άνθρακα

Τα οξικά ιόντα μπορούν να εισέλθουν εύκολα στον Κύκλο του κιτρικού οξέος (Cherchi et al., 2009). Έχει παρατηρηθεί ότι κάθε οργανική ένωση που κατά τον μεταβολισμό της καταλήγει σε ακετυλοσυνένζυμο-A (οξικά ιόντα), όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, η γλυκόζη και τα βουτυρικά ιόντα, μπορεί να αντικατασταθεί από οξικά (Nyberg et al., 1996; Hallin & Pell, 1998; Mokhayeri et al., 2006; Cherchi et al., 2009). Για παράδειγμα, οι μεθυλότροφοι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα οξικά ιόντα ως δότη ηλεκτρονίων, αν και με μεγαλύτερο χρόνο υστέρησης σε σύγκριση με τη μεθανόλη (Mokhayeri et al., 2006; Cherchi et al., 2009). Αυτό συμβαίνει διότι οι μεθυλότροφοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα τα οξικά ιόντα μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα ένζυμα για την αναγέννηση της γλυκίνης και το μονοπάτι σερίνης – γλυοξυλικού οξέος, προκειμένου να ενεργοποιήσουν την αναπληρωτική ιδιότητα του Κύκλου του γλυοξυλικού οξέος στον Κύκλο του κιτρικού οξέος και να συνθέσουν νέο κυτταρικό υλικό (Cherchi et al., 2009). Αντίθετα, βιομάζα που έχει εγκλιματιστεί σε οξικά ιόντα ως πηγή άνθρακα, δεν μπορεί να μεταβολίσει τη μεθανόλη, την αιθανόλη και τη γλυκόζη (Cherchi et al., 2009). Για παράδειγμα, ο μεταβολισμός της μεθανόλης απαιτεί τον σχηματισμό ενώσεων με τρία ή τέσσερα άτομα άνθρακα πριν την είσοδο στον Κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος (Cherchi et al., 2009). Παρόλα αυτά, όταν η μικροβιακή ποικιλότητα και ο χρόνος προσαρμογής το επιτρέψουν, είναι δυνατό να παρατηρηθεί επιτυχημένη απονιτροποίηση με δότη ηλεκτρονίων τη γλυκόζη από βιομάζα που προηγουμένως χρησιμοποιούσε οξικά ιόντα (Srinandan et al., 2012).

Παρατηρήθηκε ότι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούσαν ως δότη ηλεκτρονίων αιθανόλη μπορούν να μεταβολίσουν με επιτυχία μεθανόλη και, μάλιστα, με υψηλότερη ταχύτητα απονιτροποίησης, αποφεύγοντας τον μακρύ χρόνο προσαρμογής σε μεθανόλη (Nyberg et al., 1996). Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιήσουν αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως βενζοϊκά ιόντα, φαινόλη και τολουόλιο, ως εναλλακτικές πηγές άνθρακα (Hallin & Pell, 1998).

Έχει παρατηρηθεί ότι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούσαν ως δότη ηλεκτρονίων μεθανόλη, μπορούν να χρησιμοποιήσουν με επιτυχία αιθανόλη, αν και με μικρότερη ταχύτητα

απονιτροποίησης (Nyberg et al., 1996; Hallin & Pell, 1998; Srinandan et al., 2012). Επίσης, η εναλλαγή μεταξύ μεθανόλης και MicroC™, που περιέχει στη σύστασή του 5% μεθανόλη δεν απαιτεί μακρύ χρόνο προσαρμογής της βιομάζας (Cherchi et al., 2009). Αντίθετα, μεθυλότροφοι μικροοργανισμοί δεν έχουν καταφέρει να αναπτύξουν τους μηχανισμούς για να φέρουν σε πέρας την περίπλοκη διαδικασία της γλυκόλυσης, η οποία είναι απαραίτητη για τον μικροβιακό μεταβολισμό της γλυκόζης (Cherchi et al., 2009). Τέλος, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην απονιτροποιητική ικανότητα της με δότες ηλεκτρονίων αρωματικούς υδρογονάνθρακες, όπως βενζοϊκά ιόντα, φαινόλη και τολουόλιο (Hallin & Pell, 1998).

Το πλήθος των εναλλακτικών μεταβολικών οδών που παρέχει μια περίπλοκη στη σύνθεσή της πηγή οργανικού άνθρακα την καθιστά εύκολα αντικαταστάσιμη από χημικά απλούστερες ενώσεις, χωρίς να απαιτείται προσαρμογή της βιομάζας σε αυτές (Cherchi et al., 2009). Ειδικότερα, οι Cherchi et al. (2009) έδειξαν ότι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούσαν ως πηγή οργανικού άνθρακα το MicroC™ μπορούν να μεταβολίσουν επιτυχημένα οξικά ιόντα, αιθανόλη και γλυκόζη, χωρίς να απαιτείται χρόνος προσαρμογής (Cherchi et al., 2009).

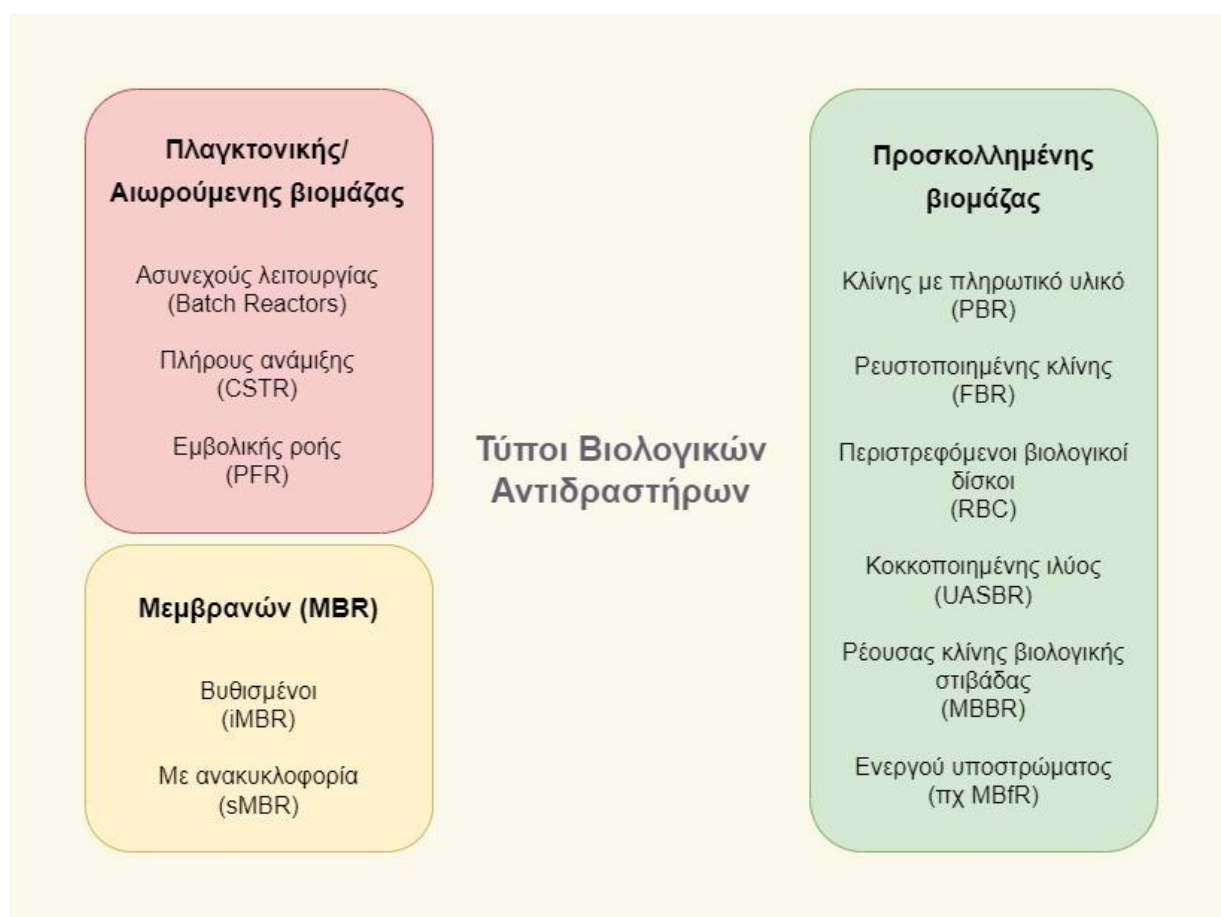
- Την ηλικία της λάσπης

Ο εγκλιματισμός απονιτροποιητικής βιομάζας προερχόμενης από επεξεργασία αστικών λυμάτων σε μεθανόλη εξαρτάται από την ηλικία της λάσπης και ολοκληρώνεται σταδιακά σε χρόνο που είναι τουλάχιστον ίσος με αυτή (Nyberg et al., 1996; Hallin & Pell, 1998).

3 | Βιολογικοί απονιτροποιητικοί αντιδραστήρες

3.1. Τύποι βιολογικών αντιδραστήρων

Η επιλογή του κατάλληλου τύπου βιολογικού αντιδραστήρα για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων εξαρτάται από πλήθος παραγόντων, όπως τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά των αποβλήτων, τη συγκέντρωση των ρύπων σε αυτά, το είδος και το πλήθος των βιολογικών διεργασιών, την επιθυμητή αποτελεσματικότητα και αξιοπιστία της διεργασίας, τις κλιματικές συνθήκες, τις δεξιότητες και την εμπειρία του ανθρώπινου δυναμικού που είναι υπεύθυνο για τη λειτουργία τους και, τέλος, το κόστος κατασκευής και λειτουργίας των εναλλακτικών διατάξεων (Rittmann & McCarty, 2020).



Εικόνα 3.1: Τύποι βιολογικών αντιδραστήρων

3.1.1. Αντιδραστήρες αιωρούμενης/πλαγκτονικής βιομάζας (Suspended growth reactors)

Οι αντιδραστήρες πλαγκτονικής βιομάζας απαντώνται βιβλιογραφικά με τους όρους «Suspended growth» ή «Suspended floc» ή «Dispersed growth» ή «Slurry» Reactors.

Ο πιο απλός τύπος αντιδραστήρα αιωρούμενης βιομάζας είναι οι αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας (Batch Reactors). Στους αντιδραστήρες αυτούς προστίθενται το προς επεξεργασία υγρό μέσο, η μικροβιακή καλλιέργεια και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τη διεργασία, όπως άζωτο ή φώσφορος (Rittmann & McCarty, 2020). Ο αντιδραστήρας διατηρείται υπό ανάδευση. Μέχρι την ολοκλήρωση της διεργασίας δεν πραγματοποιείται προσθήκη επιπλέον συστατικών και δεν υπάρχει εισροή και εκροή από αυτόν. Η λειτουργία των αντιδραστήρων Batch πραγματοποιείται με επαναλαμβανόμενους κύκλους όμοιων ή διαφορετικών μεταξύ τους πειραμάτων, ενώ η διεργασία εξελίσσεται σε συνάρτηση με τον χρόνο (Metcalf & Eddy, 2017; Rittmann & McCarty, 2020). Τέτοιοι αντιδραστήρες χρησιμοποιούνται συνήθως σε εργαστηριακή κλίμακα στο πλαίσιο προκαταρκτικών ερευνητικών δοκιμών, εξαιτίας της απλής διάταξης και λειτουργίας τους. Η εύκολη παρακολούθηση της εξέλιξης των διεργασιών στους αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας οδήγησε στην ιδέα λειτουργίας πολλών τέτοιων αντιδραστήρων παράλληλα, ως σύστημα SBR (sequencing batch reactor) (Rittmann & McCarty, 2020). Μεμονωμένοι αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας τύπου Batch και αντιδραστήρες SBR χρησιμοποιούνται ευρέως για την παρακολούθηση των διεργασιών της απονιτροποίησης (Gerber et al., 1986; Akunna et al., 1993; Glass & Silverstein, 1999; Martiensen & Schöps, 1999; Elefsiniotis & Li, 2006; Fillos & Ramalingam, 2007; Peng et al., 2007; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Cherchi et al., 2009; Lee et al., 2019 ; Letelier-Gordo et al., 2020; Zeng et al., 2023).

Ένας άλλος τύπος αντιδραστήρα πλαγκτονικής βιομάζας είναι οι αντιδραστήρες πλήρους ανάμιξης ή συνεχούς ροής πλήρους ανάμιξης (CSTR-Continuous-flow Stirred-Tank Reactors ή Completely Mixed Reactors ή Complete-mix Reactors). Η παροχή εισροής και εκροής στους αντιδραστήρες CSTR είναι διαρκώς σταθερή. Το βασικό χαρακτηριστικό τους είναι ότι, οι συγκεντρώσεις των ουσιών στο ανάμικτο υγρό είναι ίσες με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στην εκροή του αντιδραστήρα (Metcalf & Eddy, 2017; Rittmann & McCarty, 2020). Αντιδραστήρες CSTR χρησιμοποιούνται για την αερόβια, ανοξική και αναερόβια επεξεργασία αποβλήτων με υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών, όπως η πρωτοβάθμια και βιολογική ιλύς, για την επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων, αλλά και για την καλλιέργεια μικροβιακών καλλιεργειών ή με σκοπό την παρακολούθηση βιοχημικών διεργασιών σε εργαστηριακή κλίμακα, οπότε απαντώνται βιβλιογραφικά με τον όρο «χημειοστάτες» (Osaka et al., 2008; Rittmann & McCarty, 2020).

Οι αντιδραστήρες εμβολικής ή αυλωτής ροής (PFR-Plug-Flow Reactors ή Tubular Reactors ή Piston-Flow Reactors) λειτουργούν με σταθερή παροχή εισροής και εκροής, παρόμοια με τους αντιδραστήρες πλήρους ανάμιξης (CSTR), με τη διαφορά ότι δεν υπάρχει επαρκής ανάμιξη που να εξασφαλίζει ότι οι συγκεντρώσεις των ουσιών στο εσωτερικό του αντιδραστήρα είναι ίσες με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις στην εκροή του. Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις των ουσιών στην εισροή των αντιδραστήρων PFR μεταβάλλονται κατά τη διεύθυνση ροής, σαν να επρόκειτο για έμβολο. Επομένως, γνωρίζοντας την παροχή και τις διαστάσεις του αντιδραστήρα, είναι δυνατόν να υπολογιστούν οι

συγκεντρώσεις των ουσιών σε κάθε σημείο κατά μήκος αυτού. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα που μπορεί να προσομοιάσει σε διεργασία PFR είναι η βιολογική αποικοδόμηση σε υπόγεια εδάφη. Παρόλα αυτά, στην πράξη δεν απαντώνται ιδανικοί PFR, επειδή πρακτικά είναι αδύνατο να αποφευχθεί η ανάμιξη κατά τη διεύθυνση της ροής (Rittmann & McCarty, 2020).

3.1.2. Αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας (Biofilm reactors)

Οι αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας απαντώνται βιβλιογραφικά με τους όρους Biofilm Reactors ή Attached growth Reactors ή Immobilized-cell Reactors (Rittmann & McCarty, 2020). Ο όρος «biofilm» περιλαμβάνει τους μικροβιακούς πληθυσμούς που είναι προσκολλημένοι σε επιφάνειες, όπως πλαστικό, γυαλί, αφρό, άμμο, τύρφη, χαλίκι, ακόμη και ύφασμα, ή και μεταξύ τους, συμπεριλαμβανομένων των μικροβιακών συσσωματωμάτων και κροκίδων και των μικροβιακών πληθυσμών που καταλαμβάνουν τα κενά υλικών υψηλού πορώδους (Costerton et al., 1995; Kumar & Sekaran, 2013). Οι μικροοργανισμοί που αποκολλώνται από το βιοφίλμ είναι δυνατό να αναπτύσσονται σε πλαγκτονική μορφή, συμμετέχοντας στις διεργασίες, αλλά διαδραματίζοντας λιγότερο σημαντικό ρόλο σε αυτές. Έτσι, οι αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας μπορούν να συγκεντρώνουν χαρακτηριστικά και από τους αντιδραστήρες πλαγκτονικής βιομάζας. (Rittmann & McCarty, 2020).

Ο σχηματισμός βιολογικής στιβάδας μικροοργανισμών (Biofilm) βασίζεται στις παρακάτω αρχές (Costerton et al., 1995):

- Τα μεταβολικά ενεργά βακτήρια, ιδιαίτερα όσα απαντώνται στη φύση, έχουν την τάση να προσκολλώνται σε επιφάνειες.
- Η ανάπτυξη μικροβιακής στιβάδας εξαρτάται από τα θρεπτικά συστατικά που είναι διαθέσιμα για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Κατά τον μικροβιακό μεταβολισμό παράγονται ουσίες που συμβάλλουν στη διατήρηση της σταθερότητας της δομής της και είναι οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS).
- Σε ολιγοτροφικά περιβάλλοντα τα βακτήρια τείνουν να προσκολλώνται σε επιφάνειες όπου υπάρχει διαθεσιμότητα οργανικών θρεπτικών συστατικών. Παρόλα αυτά, περιβάλλοντα πολύ φτωχά σε θρεπτικά συστατικά δεν ευνοούν τον σχηματισμό μικροβιακής στιβάδας.

Σύμφωνα με τη χημεία των επιφανειών, τα οργανικά μόρια που περιέχονται στα νερά έχουν την τάση να συσσωρεύονται σε συγκεκριμένα σημεία ή περιοχές, ανάλογα με την τραχύτητα των επιφανειών. Αυτό συντελεί στη μικροβιακή αποίκηση των σημείων ή περιοχών αυτών κατά προτεραιότητα, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ολιγοτροφικών οικοσυστημάτων. Η αποίκηση συνοδεύεται από παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) που αποτελούν δομικό συστατικό της μικροβιακής στιβάδας (Biofilm) και από ανάπτυξη σχέσεων ανταγωνισμού - συνύπαρξης (ταυτόχρονα) μεταξύ των βακτηρίων. Καθώς η

μικροβιακή στιβάδα ωριμάζει, λαμβάνει την τελική της μορφή: επιμέρους μικροβιακές αποικίες περιβάλλονται από στρώματα EPS και επικοινωνούν με το περιβάλλον τους μέσω του πορώδους που δημιουργείται. Το πορώδες αυτό εξασφαλίζει τη διείσδυση θρεπτικών και άλλων συστατικών στα εσωτερικά τμήματα της μικροβιακής στιβάδας με φαινόμενα μεταφοράς και διάχυσης, ενώ η τραχύτητα της μικροβιακής στιβάδας μπορεί να εντείνει τη διείσδυση αυτή. Οι μικρότεροι πόροι του Biofilm, που συνήθως αποτελούν δίκτυο των κυτταρικών συσσωματωμάτων και των EPS, μπορούν να τροφοδοτήσουν τους μικροοργανισμούς αποκλειστικά μέσω διάχυσης. Εκτός από την ικανότητα σίτισης των μικροοργανισμών, η δομή της μικροβιακής στιβάδας, και κυρίως τα EPS, μπορούν να προστατεύουν τους μικροοργανισμούς από τις μεταβολές του περιβάλλοντος (πχ έλλειψη υγρασίας), από αντιμικροβιακούς ή τοξικούς παράγοντες και από εισβολείς μικροοργανισμούς, όπως τα πρωτόζωα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόλο που η δομή του Biofilm μπορεί να επηρεάζεται από την παρουσία τοξικών ουσιών, η μικροβιακή στιβάδα συνεχίζει να αναπτύσσεται, έως ότου υπάρξουν άλλοι περιοριστικοί παράγοντες, όπως η ένδεια χώρου (Costerton et al., 1995).

Η βιολογική στιβάδα μικροοργανισμών (Biofilm) παρουσιάζει ανομοιογένειες ως προς τις φυσικές και χημικές της ιδιότητες, εξαιτίας τόσο της ίδιας της φύσης των EPS, όσο και του μηχανισμού της διάχυσης, ο οποίος πολλές φορές είναι ανεπαρκής να προσφέρει στα κύτταρα (κυρίως σε αυτά που βρίσκονται βαθύτερα στη στιβάδα) τα απαραίτητα διαλυτά συστατικά για τον μεταβολισμό τους (πχ οξυγόνο). Σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν υπερμικροκύτταρα (UMB-ultramicrobacteria), τα οποία τους επιτρέπουν να επανέλθουν στην αρχική τους λειτουργικότητα, μόλις οι συνθήκες γίνουν ευνοϊκές. Τα UMB δεν παράγουν EPS, τα οποία αποτελούν, όπως αναφέρθηκε, βασικό δομικό συστατικό για την προσκόλληση των μικροοργανισμών και τη συγκράτηση της δομής της μικροβιακής στιβάδας, με αποτέλεσμα στρώματα του Biofilm να αποκολλώνται, ενώ τα UMB παραμένουν σε αιώρηση. Μόλις τα θρεπτικά συστατικά καταστούν εκ νέου διαθέσιμα, τα βακτήρια μπορούν να γίνουν εκ νέου λειτουργικά και να επανασχηματίσουν βιολογική στιβάδα. Οι ανομοιογένειες που παρατηρούνται στα διάφορα σημεία του Biofilm μπορεί να οδηγήσουν σε συνύπαρξη πολλών διαφορετικών μικροβιακών ειδών με εξειδικευμένες μεταβολικές ικανότητες, όπως βακτήρια ικανά για διεργασίες χώνευσης ταυτόχρονα με αερόβια βακτήρια. Ακόμη, η συνύπαρξη μικροβιακών ειδών που μπορούν να βρίσκονται σε διαφορετικές μεταβολικές καταστάσεις μπορεί να ενισχύσει την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε αντίξοες για αυτά συνθήκες. Για παράδειγμα, βακτήρια που παρουσιάζουν αυξημένους ρυθμούς ανάπτυξης μπορεί να γίνουν περισσότερο επιρρεπή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες (Costerton et al., 1995).

Οι παραπάνω μηχανισμοί μπορούν να διαφοροποιήσουν τα χαρακτηριστικά των προσκολλημένων κυττάρων από τα αντίστοιχα αιωρούμενα. Τα μικροβιακά κύτταρα που είναι οργανωμένα σε Biofilm μπορούν να παρουσιάσουν τουλάχιστον 500 φορές υψηλότερη αντοχή σε βιολογικούς και χημικούς

αντιβακτηριακούς παράγοντες. Επίσης, η λειτουργία των γονιδίων που σχετίζονται με την παραγωγή αλγινικού οξέος (το οποίο συμβάλλει στον σχηματισμό Biofilm) διαφοροποιείται στα προσκολλημένα κύτταρα, με αποτέλεσμα να διαφέρουν φαινοτυπικά από τα αντίστοιχα κύτταρα σε πλαγκτονική μορφή. Τέλος, μικροοργανισμοί που σχηματίζουν προσκολλημένες καλλιέργειες μπορούν να εμφανίσουν διαφορετική πρωτεϊνική σύσταση στις μεμβράνες των κυττάρων τους, πχ στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, σε σύγκριση με αντίστοιχους σε πλαγκτονική μορφή. Συνεπώς, οι προσκολλημένες καλλιέργειες υπερέχουν έναντι των πλαγκτονικών στα εξής:

- (α) τα μικροβιακά κύτταρα προστατεύονται από τις μεταβολές που συντελούνται στο περιβάλλον τους, όπως έλλειψη υγρασίας και παρουσία τοξικών/αντιμικροβιακών παραγόντων,
- (β) επιτυγχάνεται καλύτερη έκφραση του γονιδιώματος των κυττάρων, και
- (γ) παράγονται κύτταρα σε αιώρηση που είναι ικανά να οδηγήσουν σε επέκταση του Biofilm σε ευνοϊκές συνθήκες.

Έτσι, η προσκολλημένη βιομάζα μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη και επιβίωση των μικροοργανισμών, ενώ η αιωρούμενη βιομάζα στη διασπορά τους με σκοπό την εκ νέου ανάπτυξη βιολογικής στιβάδας μικροοργανισμών (Costerton et al., 1995).

Οι αντιδραστήρες κλίνης έχουν μεγάλο εύρος εφαρμογών, όπως αερόβια ή αναερόβια επεξεργασία αποβλήτων (πχ trickling filters/biological towers, anaerobic filters, αντίστοιχα) και απονιτροποίηση σε νερά, αστικά και βιομηχανικά απόβλητα. Οι διεργασίες σε αυτούς μπορεί να είναι είτε εμβαπτιζόμενες, είτε μη εμβαπτιζόμενες. Η λειτουργία των πιο απλών, κλασικών και παλιών αντιδραστήρων προσκολλημένης βιομάζας, δηλαδή των βιολογικών φίλτρων, βασίζεται σε μη εμβαπτιζόμενες διεργασίες. Στους αντιδραστήρες αυτούς, οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε σταθερό-ακινητοποιημένο μέσο που αποτελείται από χαλίκια ή πλαστικό, επάνω στο οποίο ρέουν τα προς επεξεργασία απόβλητα (Metcalf & Eddy, 2017). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτού του τύπου αντιδραστήρων είναι:

- (α) οι χαμηλές απαιτήσεις σε ενέργεια,
- (β) οι περιορισμένες απαιτήσεις για συντήρηση του εξοπλισμού,
- (γ) η απλή λειτουργία, από την οποία απουσιάζουν ο έλεγχος του ανάμικτου υγρού και της απώλειας ιλύος,
- (δ) η ευκολία για διαχείριση της ιλύος (πχ εξαιτίας των βελτιωμένων χαρακτηριστικών πάχυνσης), και
- (ε) η γρήγορη αποκατάσταση της απόδοσης των διεργασιών, έπειτα από έκθεση σε τοξικά φορτία (Metcalf & Eddy, 2017).

Βιολογικά φίλτρα έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε εφαρμογές απονιτροποίησης (Hamlin et al., 2008; Jiang et al., 2022b).

Η εξέλιξη των βιολογικών φίλτρων οδήγησε στον σχεδιασμό αντιδραστήρων με πληρωτικό υλικό (PBR-packed-bed reactor), που είναι οι πλέον διαδεδομένοι αντιδραστήρες εμβαπτιζόμενης διεργασίας (Metcalf & Eddy, 2017; Rittmann & McCarty, 2020). Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως σφαιρικού σχήματος, μικρά σε μέγεθος, με υψηλό πορώδες και μεγάλη ειδική επιφάνεια. Η εισροή του αντιδραστήρα κατανέμεται ομοιόμορφα στην επιφάνεια της κλίνης, συνήθως μέσω φυσικής ροής, με αποτέλεσμα η ροή να προσομοιάζει σε εμβολική (αντιδραστήρες PFR). Ο σχηματισμός περίσσειας βιομάζας στο εσωτερικό της κλίνης μπορεί να οδηγήσει σε πτώση πίεσης, επηρεάζοντας τη λειτουργία του αντιδραστήρα και τον ρυθμό απονιτροποίησης (Æsø et al., 1998). Για τον λόγο αυτό απαιτείται τακτικός καθαρισμός μέσω αντίστροφης έκπλυσης (Rittmann & McCarty, 2020). Το σημαντικότερο πλεονέκτημά της τεχνολογίας αυτής είναι η μικρή χωρητικότητα (Metcalf & Eddy, 2017). Αντιδραστήρες τύπου PBR έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε εφαρμογές απονιτροποίησης (Æsø et al., 1998; Lee et al., 2004; Gabaldón et al., 2007; Mattila et al., 2007; Zaitsev et al., 2008; Sun et al., 2016b; Hamdani et al., 2018; Pérez-Marín et al., 2018; Xu et al., 2018; Duarte et al., 2021; Wang et al., 2022).

Ένας άλλος τύπος αντιδραστήρα προσκολλημένης βιομάζας είναι οι αντιδραστήρες ρευστοποιημένης κλίνης (FBR-Fluidized Bed Reactors) (Nelson et al., 2017). Ρευστοποίηση είναι η διεργασία κατά την οποία η ανοδική ροή ενός υγρού οδηγεί σε αιώρηση/συμπαράσυρση μια κλίνη στερεών, με ή χωρίς τη βοήθεια ρεύματος αέρα (Nelson et al., 2017; Rittmann & McCarty, 2020). Στους αντιδραστήρες ρευστοποιημένης κλίνης οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε πληρωτικό υλικό που παραμένει σε αιώρηση, μέσω της ανοδικής ροής του προς επεξεργασία αποβλήτου, η οποία πρέπει να ρυθμίζεται κατάλληλα, ώστε να αποφεύγεται η συμπαράσυρση του πληρωτικού υλικού στην εκροή. Το πληρωτικό αυτό υλικό συχνά απαντάται στη βιβλιογραφία με τον όρο «βιο-φορείς» (bio-carriers) και μπορεί να αποτελείται από άμμο, ενεργό άνθρακα (GAC), γη διατόμων, πλαστικά τεμάχια και οποιοδήποτε άλλο υλικό ανθεκτικό στη διάβρωση και στην τύρβη. Ως πληρωτικά υλικά μπορούν να λειτουργήσουν και τα μικροβιακά συσσωματώματα υψηλής πυκνότητας (Rittmann & McCarty, 2020). Παρόλο που υπάρχουν πολλές διατάξεις συστημάτων ρευστοποιημένης κλίνης, στην επεξεργασία αποβλήτων χρησιμοποιούνται δύο: τα συμβατικά συστήματα και τα συστήματα με ανακυκλοφορία. Στα συμβατικά συστήματα η ανοδική ταχύτητα ροής του ρευστού δεν επαρκεί, για να οδηγήσει σε υπερχείλιση των στερεών της κλίνης. Αντίθετα, στα συστήματα με ανακυκλοφορία, η ταχύτητα ροής του ρευστού μπορεί να συμπαράσσει τα στερεά προς την κορυφή της στήλης, τα οποία στη συνέχεια οδηγούνται πίσω στον πυθμένα του αντιδραστήρα, μέσω γραμμής ή στήλης ανακυκλοφορίας (Nelson et al., 2017). Οι αντιδραστήρες ρευστοποιημένης κλίνης μπορούν να λειτουργήσουν τόσο ως πλήρους ανάμιξης

(CSTR), όσο και ως εμβολικής ροής (PFR) (Rittmann & McCarty, 2020). Τα πλεονεκτήματα των FBR περιλαμβάνουν:

- (α) περιορισμένες απαιτήσεις σε υψηλούς χρόνους παραμονής και όγκους δεξαμενών,
- (β) παράληψη του σταδίου της πρωτοβάθμιας καθίζησης κατά την επεξεργασία αστικών υγρών αποβλήτων,
- (γ) χαμηλότερη παραγωγή βιομάζας, που μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω μείωση των όγκων των δεξαμενών κατά τη διεργασία της καθίζησης ή ακόμη και σε παράλειψη αυτής,
- (δ) μείωση του περιβαλλοντικού αποτυπώματος,
- (ε) άριστη ανάδευση, μεταφορά μάζας, αυξημένη ειδική επιφάνεια και ομοιόμορφη κατανομή στερεών και θερμοκρασίας, που μπορούν να οδηγήσουν σε αποτελεσματική επεξεργασία των αστικών και βιομηχανικών αποβλήτων, καθώς και των αποβλήτων με υψηλή συγκέντρωση οργανικών, και
- (στ) μεγαλύτερη ευελιξία σε εισροές με αυξημένη παροχή και αυξημένο ή μειωμένο ρυπαντικό φορτίο.

Συνοπτικά, η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία μεγάλων όγκων αποβλήτων σε δεξαμενές μικρής χωρητικότητας και με μικρότερο χρόνο παραμονής (Nelson et al., 2017; Rittmann & McCarty, 2020). Αντιδραστήρες FBR χρησιμοποιούνται συνήθως σε αναερόβιες διεργασίες και διεργασίες απονιτροποίησης (Labbé et al., 2007), επειδή η ανάπτυξη βιοφίλμ στην επιφάνεια του πληρωτικού υλικού μπορεί να εμποδίσει τη διάχυση οξυγόνου σε όλο το πάχος του (Rittmann & McCarty, 2020). Παρόλα αυτά, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την αερόβια επεξεργασία αποβλήτων με χαμηλό οργανικό φορτίο, όπως στις περιπτώσεις της απομάκρυνσης αρωματικών υδρογονανθράκων από υπόγεια ύδατα (Rittmann & McCarty, 2020).

Οι περιστρεφόμενοι βιολογικοί δίσκοι (RBC-Rotating Biological Contactors) αποτελούνται από πλαστικά μέρη σε σχήμα δίσκου ή σπирάλ, που είναι τοποθετημένα σε περιστρεφόμενο άξονα (Rittmann & McCarty, 2020). Ο άξονας περιστροφής μπορεί να βρίσκεται μέσα ή έξω από τη μάζα των αποβλήτων. Η περιστροφή του μπορεί να επιτυγχάνεται είτε μέσω της μηχανικής περιστροφής του ίδιου του άξονα, είτε παθητικά, εξαιτίας του αερισμού που παρέχουν μονάδες πεπιεσμένου αέρα. Στην τελευταία περίπτωση, μάλιστα, έχουν παρατηρηθεί μειωμένα φορτία στον άξονα περιστροφής και στα ρουλεμάν, καλύτερος έλεγχος της βιομάζας και αποφυγή εμφράξεων (Metcalf & Eddy, 2017). Το τμήμα του δίσκου/σπирάλ που έρχεται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό ή πεπιεσμένο αέρα δίνει στους μικροοργανισμούς τη δυνατότητα αφομοίωσης οξυγόνου, ενώ το τμήμα που είναι βυθισμένο στο υγρό, τους παρέχει όλες τις υπόλοιπες ουσίες που είναι απαραίτητες για τον μεταβολισμό τους (Metcalf & Eddy, 2017; Rittmann & McCarty, 2020). Οι RBC μπορούν να λειτουργούν είτε με πλήρη ανάμιξη, είτε με εμβολική ροής (Rittmann & McCarty, 2020). Η εφαρμογή περιστρεφόμενων

βιολογικών δίσκων απαιτεί, τόσο προεπεξεργασία των αποβλήτων, όσο και διαχωρισμό υγρών και στερεών στα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι παρόμοια με αυτά των βιολογικών φίλτρων (Metcalf & Eddy, 2017). Αντιδραστήρες RBC χρησιμοποιούνται και σε αναερόβιες διεργασίες και διεργασίες απονιτροποίησης (Mielcarek et al., 2020), αρκεί τα τμήματα τους να μην έρχονται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα (πλήρως εμβαπτισμένοι δίσκοι) (Metcalf & Eddy, 2017; Rittmann & McCarty, 2020).

Οι αντιδραστήρες κοκκοποιημένης υλύος (UASBR-Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactors) συνδυάζουν χαρακτηριστικά από των αντιδραστήρων πλήρους ανάμιξης και ρευστοποιημένης κλίνης. Χρησιμοποιούνται συνήθως για την αναερόβια επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων. Η λειτουργία τους βασίζεται στον βιολογικό σχηματισμό κοκκιωδών συσσωματωμάτων (granules) από τους μικροοργανισμούς του συστήματος, που μπορούν να λειτουργήσουν ως μέσο για περαιτέρω μικροβιακή ανάπτυξη (Rittmann & McCarty, 2020). Η ανάπτυξη κοκκώδους υλύος επηρεάζεται από τα χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων. Ενδεικτικά, η δημιουργία κόκκων είναι ικανοποιητική, όταν τα απόβλητα περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις υδατανθράκων και σακχάρων, και μειωμένα, όταν αυτά περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεϊνών. Είναι πιθανό να απαιτούνται αρκετοί μήνες για την ανάπτυξη κοκκώδους υλύος, ενώ συχνά είναι απαραίτητη η τροφοδότηση των αντιδραστήρων με υλύ από άλλες εγκαταστάσεις, ώστε να αυτή να επιταχυνθεί (Metcalf & Eddy, 2017). Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιείται συνήθως σε αναερόβιες διεργασίες μεθανογένεσης, όπου το παραγόμενο μεθάνιο συμπαρασύρει τα συσσωματώματα σε αιώρηση (Rittmann & McCarty, 2020). Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί έμφαση στη μελέτη της λειτουργίας των αντιδραστήρων UASBR με σκοπό την απονιτροποίηση και έχει παρατηρηθεί επιτυχημένη αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αυτούς (Lopes et al., 2001; Isoldi et al., 2005; de Sousa et al., 2008; Duarte et al., 2021). Η ανάπτυξη κοκκιωδών συσσωματωμάτων μπορεί να επιταχύνει την απονιτροποίηση, ανεξάρτητα από το είδος του αντιδραστήρα (Mohan et al., 2016).

Οι βιολογικοί αντιδραστήρες είναι συχνά επιθυμητό να καταλαμβάνουν όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο, για λόγους περιορισμένης χωρητικότητας. Η προσθήκη υλικών πλήρωσης σε αντιδραστήρες αιωρούμενης βιομάζας εξασφαλίζει την ανάπτυξη βιομάζας σε μορφή βιοφίλμ, ταυτόχρονα με την πλαγκτονική, μειώνοντας τον όγκο που απαιτείται για την επίτευξη των διεργασιών. Χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα είναι οι αντιδραστήρες ρέουσας κλίνης βιολογικής στιβάδας (MBBR-Moving-Bed Biofilm Reactors) (Metcalf & Eddy, 2017). Οι MBBR περιλαμβάνουν έναν ή περισσότερους αντιδραστήρες, μέσα στους οποίους αιωρούνται άτακτα πλαστικά τεμάχια εμποτισμένα με ιχνοστοιχεία, επάνω στα οποία προσκολλάται βιομάζα (carriers). Τα πλαστικά τεμάχια/φορείς ιχνοστοιχείων καταλαμβάνουν συνήθως το 25% έως 67% του όγκου του αντιδραστήρα και παραμένουν σε αιώρηση, είτε μέσω εμφύσησης αέρα, στην περίπτωση που εφαρμόζονται αερόβιες διεργασίες, είτε μέσω μηχανικών μέσων/αναμικτήρων, όπως στην περίπτωση της απονιτροποίησης (McQuarrie &

Boltz, 2011; Metcalf & Eddy, 2017). Αντιδραστήρες MBBR έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως με σκοπό την απονιτροποίηση (Mattila et al., 2007; McQuarrie & Boltz, 2011; Srinandan et al., 2012; Wang et al., 2020). Το πάχος του στρώματος ακινητοποιημένης βιομάζας (biofilm) περιορίζεται μέσω της τύρβης που δημιουργείται σε καθεμιά από τις παραπάνω περιπτώσεις. Τα πλαστικά τεμάχια είναι συνήθως κατασκευασμένα από πολυστυρένιο και πολυαιθυλένιο υψηλής πυκνότητας ($\sim 0.94-0.96 \text{ gr/cm}^3$) και η δομή τους είναι τέτοια, που προστατεύει το biofilm (ειδική επιφάνεια: $400-1200 \text{ m}^2/\text{m}^3$). (McQuarrie & Boltz, 2011; Srinandan et al., 2012). Τα πλεονεκτήματα των MBBR είναι τα εξής (McQuarrie & Boltz, 2011; Metcalf & Eddy, 2017):

- (α) επιτυγχάνεται απομάκρυνση του οργανικού φορτίου (BOD_5) και του φορτίου αζώτου παρόμοια με αυτή των συστημάτων ενεργού ιλύος, αλλά απαιτούνται μικρότεροι υδραυλικοί χρόνοι παραμονής (HRT) και όγκοι δεξαμενών,
- (β) επιτυγχάνεται μείωση του φορτίου στερεών στις δεξαμενές καθίζησης, επειδή η παραμονή της βιομάζας στο σύστημα δεν εξαρτάται από τη διεργασία της καθίζησης και η λάσπη που συγκεντρώνεται στη μονάδα διαχωρισμού υγρών – στερεών έχει μικρότερο όγκο,
- (γ) δεν απαιτείται ροή ανακυκλοφορίας ή έκπλυση,
- (δ) δεν απαιτείται έλεγχος του πάχους του στρώματος ακινητοποιημένης βιομάζας (biofilm),
- (ε) μπορεί να εφαρμοσθεί ένα πλήθος διαφορετικών μεθόδων διαχωρισμού υγρών και στερεών, όπως καθίζηση, επίπλευση, συσσωμάτωση και διήθηση (πχ διαμέσου φίλτρων ή μεμβρανών υπερδιήθησης – μικροδιήθησης (UF/MF)),
- (στ) υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής της τεχνολογίας αυτής σε υφιστάμενα συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων, και
- (ζ) στην περίπτωση αερόβιων διεργασιών μπορεί να αποφευχθεί η χρήση εξοπλισμού αερισμού μικρών φυσαλίδων, που απαιτεί καθαρισμό με περιοδική αποστράγγιση και απομάκρυνση του υλικού πλήρωσης.

Η σύγχρονη εξέλιξη των βιολογικών αντιδραστήρων προσκολλημένης βιομάζας είναι οι αντιδραστήρες ενεργού υποστρώματος. Η αρχή στην οποία βασίζονται είναι η εξής: οι μικροοργανισμοί αντλούν τον δότη ή τον δέκτη ηλεκτρονίων για τον μικροβιακό μεταβολισμό από το υπόστρωμα στο οποίο βρίσκονται ακινητοποιημένοι. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα μικροβιακά κελιά και οι αντιδραστήρες μεμβρανών προσκολλημένης βιομάζας (MBfR-Membrane Biofilm Reactors ή MABR-Membrane-Aerated Biofilm Reactors) (Martin & Nerenberg, 2012; Rittmann & McCarty, 2020). Οι τελευταίοι αποτελούνται από μη πορώδεις μεμβράνες που παρέχουν στην προσκολλημένη βιομάζα τον απαραίτητο δότη (πχ υδρογόνο, μεθάνιο) ή δέκτη (πχ οξυγόνο) ηλεκτρονίων σε αέρια μορφή (Martin & Nerenberg, 2012; Rittmann & McCarty, 2020). Με τη διαδικασία αυτή αποφεύγεται ο σχηματισμός φυσαλίδων, ενώ η παροχή αερίων μπορεί να ρυθμίζεται ανάλογα με τις ανάγκες των

μικροοργανισμών (Martin & Nerenberg, 2012; Mao et al., 2020; Rittmann & McCarty, 2020) και να είναι έως και 100% αποτελεσματική (Mao et al., 2020). Άλλα πλεονεκτήματα των MBfR είναι:

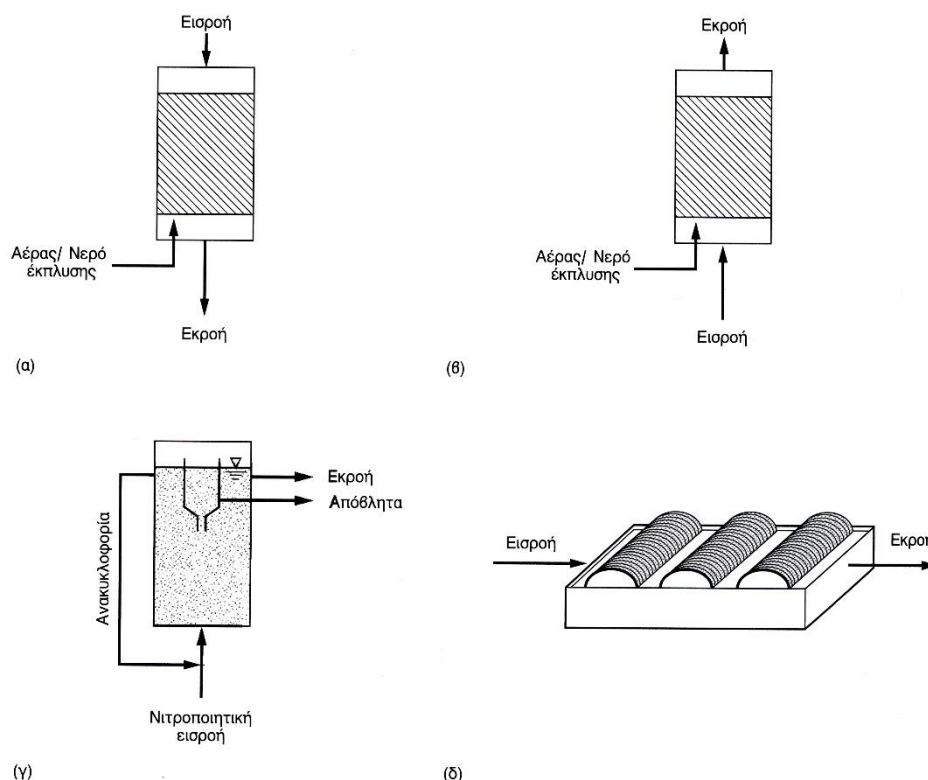
(α) η χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, και

(β) το μικρό περιβαλλοντικό αποτύπωμα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα χαρακτηριστικά της στιβάδας μικροοργανισμών (Biofilm) στους αντιδραστήρες MBfR διαφέρουν από αυτά των υπολοίπων αντιδραστήρων προσκολλημένης βιομάζας: στους περισσότερους αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας η μέγιστη μικροβιακή δραστηριότητα παρατηρείται στην επιφάνεια του Biofilm, επειδή το υγρό μέσο παρέχει ταυτόχρονα τον δότη και τον δέκτη ηλεκτρονίων για τον μικροβιακό μεταβολισμό. Αντίθετα, στους MBfR η μέγιστη δραστηριότητα παρατηρείται σε κάθε σημείο του πάχους του Biofilm, επειδή ο μεν δότης/δέκτης ηλεκτρονίων παρέχεται στους μικροοργανισμούς μέσω του υγρού μέσου, ενώ, αντίστοιχα, ο δέκτης/δότης τους παρέχεται από την αντίθετη κατεύθυνση, μέσω των μεμβρανών. Αυτή η ιδιαιτερότητα των MBfR καθιστά τη βιομάζα περισσότερο ανθεκτική σε τοξικούς παράγοντες, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους τύπους αντιδραστήρων ακινητοποιημένης βιομάζας. Εξαιτίας της φύσης των εν λόγω αντιδραστήρων, η απονιτροποίηση συνδυάζεται συνήθως με διεργασίες νιτροποίησης (Martin & Nerenberg, 2012). Η τεχνολογία ενεργού υποστρώματος με σκοπό την απονιτροποίηση μπορεί να συνδυαστεί με διεργασίες ηλεκτράνακτησης σε απόβλητα που περιέχουν βαρέα μέταλλα σε διαλυτή μορφή, όπως χαλκό (Watanabe et al., 2001). Επίσης, μπορεί να εφαρμοσθεί σε οποιονδήποτε τύπο αντιδραστήρα (πχ FBR, PBR), με χρήση στερεών υποστρωμάτων κατά την απονιτροποίηση, όπως βιοδιασπάσιμα πολυμερή και φυσικά υλικά, σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν στο Εδάφιο 2.2.3.2 (Mao et al., 2020; Wang et al., 2022). Τα υλικά αυτά αποτελούν, ταυτόχρονα, δότες ηλεκτρονίων και φορείς για τους απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι βρίσκονται καλά προστατευμένοι από δυσμενείς μεταβολές του περιβάλλοντός τους (πχ pH και DO) (Wang et al., 2021; Xu et al., 2018; Fu et al., 2022). Επίσης, η χρήση ενεργών υποστρωμάτων μπορεί να απλοποιήσει τον έλεγχο της απονιτροποίησης, διότι ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο έλλειψης ή περίσσειας οργανικού άνθρακα, που μπορεί να προκαλέσει παύση της διεργασίας και να επιβαρύνει την ποιότητα εκροής, αντίστοιχα (Mao et al., 2020; Wang et al., 2022).

Αντιδραστήρες αιωρούμενης και προσκολλημένης βιομάζας έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία, με σκοπό, είτε αποκλειστικά την απονιτροποίηση, είτε την απονιτροποίηση σε συνδυασμό με νιτροποίηση σε προ-ανοξικό στάδιο (τα υγρά απόβλητα έρχονται σε επαφή με την ανακυκλοφορία στην ανοξική ζώνη), μετα-ανοξικό στάδιο (η ανοξική διεργασία ακολουθεί την αερόβια νιτροποίηση) ή και ταυτόχρονα (νιτροποίηση και απονιτροποίηση στην ίδια δεξαμενή). Συνήθως απαιτείται προσθήκη κάποιου πηγής άνθρακα (πχ μεθανόλης) ως δότη ηλεκτρονίων, που μπορεί να οξειδωθεί βιολογικά με χρήση νιτρικών ή νιτρωδών ιόντων, όπως στην περίπτωση των μετα-ανοξικών διεργασιών. Οι μετα-ανοξικές διεργασίες προσκολλημένης βιομάζας περιλαμβάνουν συνηθέστερα (α) αντιδραστήρες

ανοδικής και καθοδικής ροής σταθερής κλίνης, (β) αντιδραστήρες ανοδικής ροής ρευστοποιημένης κλίνης και (γ) εμβαπτιζόμενους περιστρεφόμενους βιολογικούς δίσκους (Εικόνα 3.2) (Metcalf & Eddy, 2017).



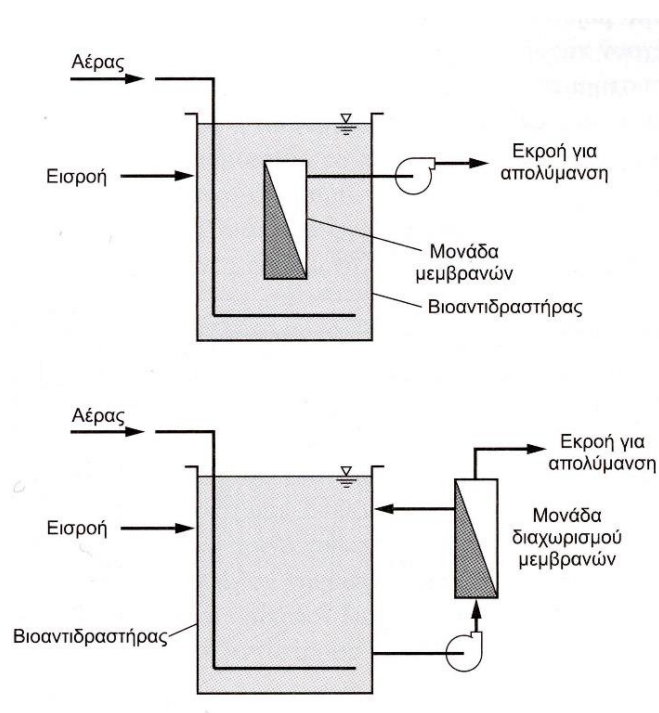
Εικόνα 3.2: Παραδείγματα βιολογικών αντιδραστήρων προσκολλημένης βιομάζας που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα με σκοπό την απονιτροποίηση: (α) σταθερής κλίνης, καθοδικής ροής, (β) σταθερής κλίνης, ανοδικής ροής, (γ) ρευστοποιημένης κλίνης, ανοδικής ροής και (δ) εμβαπτιζόμενοι περιστρεφόμενοι βιολογικοί δίσκοι (Πηγή: Metcalf & Eddy, 2017)

3.1.3. Αντιδραστήρες μεμβρανών (MBR-Membrane Biological Reactors)

Οι αντιδραστήρες MBR αποτελούνται από (α) έναν ή περισσότερους βιολογικούς αντιδραστήρες, όπου λαμβάνουν χώρα οι μικροβιακές διεργασίες (αερόβιες, αναερόβιες, απονιτροποίησης), και (β) τη διαδικασία διήθησης διαμέσου των μεμβρανών υπό κενό, που στοχεύει στη συγκράτησή των μικροοργανισμών και άλλων αιωρούμενων στερεών της λάσπης από τους πόρους των μεμβρανών και στον διαχωρισμό τους από την εκροή (Metcalf & Eddy, 2017; Mao et al., 2020; Rittmann & McCarty, 2020). Η ποιότητα εκροής ισοδυναμεί με εφαρμογή δευτεροβάθμιας καθίζησης και, ταυτόχρονα, διήθησης (Metcalf & Eddy, 2017; Rittmann & McCarty, 2020).

Οι μεμβράνες διήθησης μπορεί να βρίσκονται, είτε βυθισμένες μέσα στους απονιτροποιητικούς αντιδραστήρες (iMBR-immersed MBR), είτε έξω από αυτούς (sMBR-side-stream MBR). Στη δεύτερη

περίπτωση η υδραυλική επικοινωνία πραγματοποιείται μέσω ανακυκλοφορίας (Metcalf & Eddy, 2017; Mao et al., 2020). Τα συστήματα iMBR συνδυάζονται συνήθως με αερόβιες διεργασίες, επειδή η παροχή αέρα είναι απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθούν προβλήματα απόφραξης. Στα συστήματα sMBR, η ταχύτητα εγκάρσιας ροής (cross-flow velocity) αποτελεί τον κύριο μηχανισμό, μέσω του οποίου αποφεύγονται προβλήματα έμφραξης από τον σχηματισμό στρώματος στερεών (cake layer) στην επιφάνεια των μεμβρανών. Τα συστήματα sMBR έχουν μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων φαρμακοβιομηχανιών, γαλακτοβιομηχανιών, χαρτοβιομηχανιών και στραγγισμάτων χωματερών (Mao et al., 2020).



Εικόνα 3.3: Διάταξη των βιολογικών αντιδραστήρων μεμβρανών: ολοκληρωμένο MBR με βυθισμένο σύστημα μεμβρανών (επάνω) και βιολογικός αντιδραστήρας με εξωτερική μονάδα διαχωρισμού μεμβρανών (κάτω) (Πηγή: Metcalf & Eddy, 2017)

Τα είδη των μεμβρανών περιλαμβάνουν: επίπεδες μεμβράνες (FS-flat sheet), δέσμες κοίλων ινών (HF-hollow fiber) και πολυσωληνοειδείς μεμβράνες (MT-multitubular). Το μέγεθος των πόρων τους καθορίζεται από το μέγεθος των μικροοργανισμών (συνήθως μεγαλύτερο από 1 μm). Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται συνήθως μεμβράνες μικροδιήθησης (microfiltration, πόροι: 0.1-1 μm) ή υπερδιήθησης (ultrafiltration, πόροι: 0.01-0.1 μm) (Rittmann & McCarty, 2020).

Το υλικό κατασκευής τους είναι μπορεί να είναι οργανικά πολυμερή, όπως PEC (polyelectrolyte complex) ή κεραμικά υλικά. Το πλέον διαδεδομένο οργανικό πολυμερές είναι το φθοριούχο

πολυβινυλιδένιο (PVDF), εξαιτίας των μηχανικών του ιδιοτήτων, που επιτρέπουν τον καθαρισμό με αέρα. Άλλα πολυμερή που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μεμβρανών είναι η πολυαιθυλοσουλφόνη, το πολυπροπυλένιο, το πολυαιθεριμίδιο και η οξική κυτταρίνη. Τα κεραμικά υλικά κατασκευάζονται κυρίως από οξειδία του αργιλίου. Τα πολυμερή χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ευελιξία στην διαμόρφωση των μεμβρανών (πχ δέσμες, επίπεδες μεμβράνες, σπινάλ) σε σύγκριση με τα κεραμικά υλικά. Τα κεραμικά υλικά παρουσιάζουν αντοχή στον χρόνο και σε χαμηλές ή υψηλές τιμές pH, υψηλές θερμοκρασίες (100°C) και υψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου (<100 mg/L), αλλά έχουν υψηλό κόστος και αυξημένες ανάγκες καθαρισμού. Ο καθαρισμός των μεμβρανών πρέπει να πραγματοποιείται συστηματικά, με συχνότητα περίπου μία φορά την εβδομάδα, αλλά όχι σχολαστικά, έτσι ώστε να διατηρείται υψηλή παροχή διηθήματος και χαμηλή διαμεμβρανική πίεση (Rittmann & McCarty, 2020).

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της τεχνολογίας των μεμβρανών είναι το αυξημένο κόστος κατασκευής και λειτουργίας, η περιπλοκότητα στη λειτουργία και τα προβλήματα απόφραξης (fouling), όπως απόφραξη πόρων (pore clogging) και σχηματισμός στρώματος στερεών στην επιφάνεια των μεμβρανών (cake-layer formation). Παρόλα αυτά, η χρήση συστημάτων MBR έχει πλήθος πλεονεκτημάτων, τα βασικότερα των οποίων είναι (Metcalf & Eddy, 2017; Mao et al., 2020; Rittmann & McCarty, 2020):

- (α) η παράλειψη της βαθμίδας της καθίζησης και της χρήσης φίλτρων άμμου ή ενεργού άνθρακα,
- (β) οι υψηλοί χρόνοι παραμονής στερεών (SRT), που μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένες ταχύτητες διεργασιών, μικρότερους όγκους αντιδραστήρων, μειωμένους χρόνους παραμονής (HRT) και μικρότερο όγκο παραγόμενης λάσπης,
- (γ) η δυνατότητα ταυτόχρονης νιτροποίησης και απονιτροποίησης, εξαιτίας των χαμηλών συγκεντρώσεων διαλυτού οξυγόνου
- (δ) η βελτιωμένη ποιότητα εκροής, όσον αφορά τη θολότητα και τη συγκέντρωση μικροοργανισμών, ολικών στερεών και οργανικών (BOD₅),
- (ε) η δυνατότητα διαμόρφωσης διεργασιών που συνδυάζουν την τεχνολογία μεμβρανών με άλλες τεχνολογίες, όπως ρευστοποιημένη κλίνης και μικροβιακών κελιών (Mao et al., 2020; Di Carua et al., 2022). Ενδεικτικά, ο συνδυασμός MBR και MBBR (MBB-MBR) μπορεί να οδηγήσει σε μικρούς υδραυλικούς χρόνους παραμονής (HRT), περιορισμό των προβλημάτων απόφραξης των μεμβρανών, αποφυγή επανακυκλοφορίας της ενεργού ιλύος, προστασία της βιομάζας σε περιπτώσεις αυξημένου ρυπαντικού φορτίου στην εισροή και γρήγορη ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού (Mao et al., 2020),
- (ε) το μειωμένο περιβαλλοντικό αποτύπωμα κατά 30%-50%, σε σύγκριση με τα συμβατικά συστήματα.

Η κύρια παράμετρος που επηρεάζει τη λειτουργία των αντιδραστήρων MBR, την αποτελεσματική απομάκρυνση αζώτου και την αποφυγή αποφράξεων είναι ο λόγος C/N (Mao et al., 2020). Αν και οι αντιδραστήρες MBR μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αερόβιες, αναερόβιες και διεργασίες απονιτροποίησης, η λειτουργία τους σε αναερόβιες συνθήκες συνδυάζεται με συχνά προβλήματα έμφραξης (Mao et al., 2020). Πρόσφατα, δόθηκε έμφαση στη χρήση μεμβρανών με σκοπό την απομάκρυνση αζώτου, τόσο σε αστικά και βιομηχανικά απόβλητα, όσο και για την επεξεργασία νερού, συνδυάζοντας διεργασίες νιτροποίησης και απονιτροποίησης στην ίδια διάταξη (Li et al., 2008; Fu et al., 2009; Chang et al., 2011; Khan et al., 2011; Wang et al., 2012; Metcalf & Eddy, 2017; Mao et al., 2020; Huang et al., 2022).

3.2. Παράμετροι σχεδιασμού διεργασίας

Στις παραγράφους 2.2.3 έως 2.2.5 παρουσιάστηκαν με λεπτομέρεια οι παράμετροι που επηρεάζουν τη διεργασία της απονιτροποίησης, που είναι η πηγή οργανικού άνθρακα, ο λόγος C/N, η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου, το pH, η θερμοκρασία, η αρχική συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών ιόντων, η αλατότητα, οι συγκεντρώσεις διαλυτών μετάλλων και η προσαρμογή της βιομάζας στις εκάστοτε συνθήκες. Οι ίδιες παράμετροι καθορίζουν την εξέλιξη της απονιτροποίησης και όταν αυτή πραγματοποιείται σε συστήματα βιολογικών αντιδραστήρων. Στην περίπτωση αυτή, θα πρέπει να λαμβάνονται, επιπρόσθετα, υπόψη οι ιδιαίτερες συνθήκες που επικρατούν κατά τη διεργασία και οφείλονται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του τύπου του αντιδραστήρα, όπως αυτά περιγράφηκαν στην παράγραφο 3.1 (πχ αντιδραστήρες αιωρούμενης ή προσκολλημένης βιομάζας, υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT)).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι παράμετροι που επηρεάζουν την απονιτροποίηση σε επίπεδο βιολογικού αντιδραστήρα και δίνονται σχετικά παραδείγματα για διαφορετικούς τύπους βιοαντιδραστήρων, με έμφαση στην τεχνολογία προσκολλημένης βιομάζας και σε εισροές με αυξημένη αλατότητα.

3.2.1. Πηγή άνθρακα

Σύμφωνα με όσα συζητήθηκαν στο Εδάφιο 2.2.3, οι περισσότεροι απονιτροποιητές είναι ετερότροφοι, δηλαδή απαιτείται παρουσία οργανικής πηγής άνθρακα για την αναγωγή των νιτρικών (Madigan et al., 2018; Albina et al., 2019). Η πηγή αυτή μπορεί να είναι είτε απλά οργανικά μόρια (πχ οξικό οξύ, αιθανόλη), είτε σύνθετη οργανική ύλη φυσικής (πχ ξυλεία, ρύζι, σιτάρι) ή βιομηχανικής προέλευσης (πχ απόβλητα γαλακτοκομείων). Τα οργανικά μόρια μεταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς ακολουθώντας τους αντίστοιχους βιοχημικούς κύκλους (πχ Κύκλος κιτρικού οξέος, Κύκλος γλυοξυλικού οξέος, Γλυκόλυση) (Αγγελής, 2017; Constantin & Fick, 1997; Madigan et al., 2018). Η πηγή άνθρακα

επηρεάζει τον απαιτούμενο λόγο C/N, τον ρυθμό απονιτροποίησης, τη μικροβιακή ποικιλότητα, την παραγωγή βιομάζας και τις συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, αμμωνιακών ιόντων και άλλων διαλυτών προϊόντων, που απελευθερώνονται από τα κύτταρα κατά την απονιτροποίηση (πχ SMP) (Gerber et al., 1986; van Rijn et al., 1996; Matějů et al., 1992; Tam et al., 1992; Akunna et al., 1993; Christensson et al., 1994; Lee & Welander, 1996; Nyberg et al., 1996; Elefsiniotis & Li, 2006; Mokhayeri et al., 2006; Fillos & Ramalingam, 2007; Peng et al., 2007; Hamlin et al., 2008; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Osaka et al., 2008; Cherchi et al., 2009; Shen et al., 2009; Srinandan et al., 2012; Lee et al., 2019; Xu et al., 2018; Albina et al., 2019; Ly et al., 2019; Rittmann & McCarty, 2020; Wang et al., 2021; Fu et al., 2022; Jiang et al., 2022a; Singh et al., 2022; Zhang et al., 2022b).

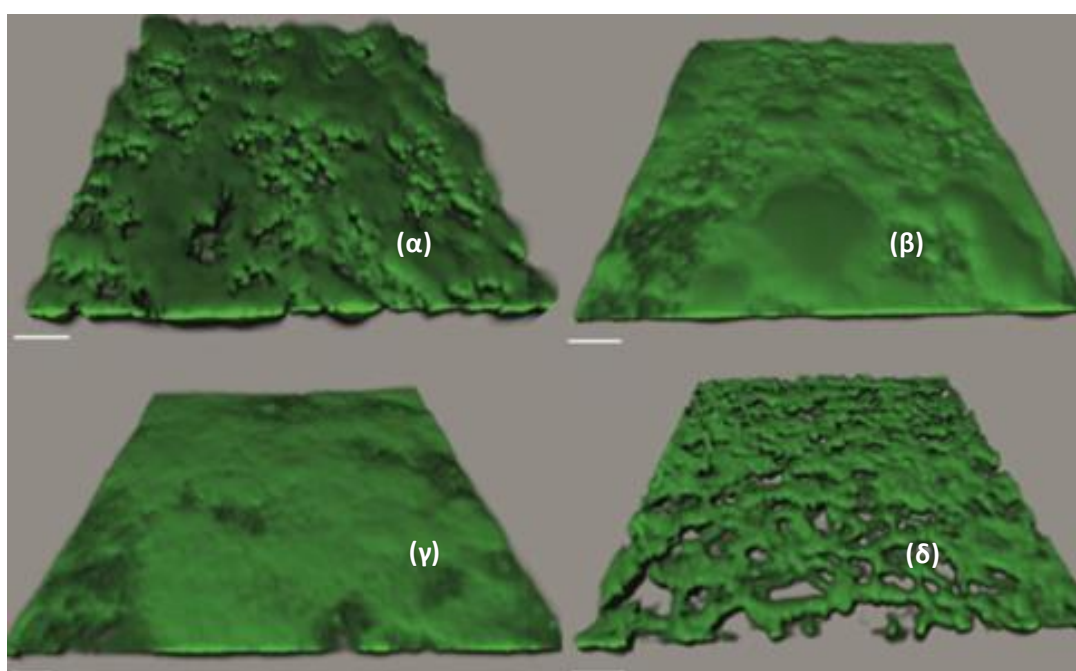
Σε βιολογικούς αντιδραστήρες αιωρούμενης και προσκολλημένης βιομάζας η πηγή οργανικού άνθρακα μπορεί να επηρεάσει τον ρυθμό απονιτροποίησης. Σε αντιδραστήρες αιωρούμενης βιομάζας τύπου Batch (FBR-Fed Batch Reactor) έχει παρατηρηθεί υψηλότερος ρυθμός απονιτροποίησης με πηγή άνθρακα τα οξικά ιόντα, σε σύγκριση με τα προπιονικά ιόντα και την αιθανόλη, διαδοχικά (Πίνακας 3.1) (Letelier-Gordo et al., 2020). Σε βιολογικά φίλτρα έχει παρατηρηθεί ταχύτερη απονιτροποίηση για τη μεθανόλη, σε σύγκριση διαδοχικά με τα οξικά ιόντα και τη γλυκόζη (Jiang et al., 2022a), και για τη μύρα, σε σύγκριση με τα οξικά και κιτρικά ιόντα (Mielcarek et al., 2020). Σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας (PBR), η ταχύτητα απονιτροποίησης έχει βρεθεί μεγαλύτερη με δότη ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα, σε σύγκριση με άλλους δότες, όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη (Sun et al., 2016b) και σύνθετα οργανικά μόρια (πχ πολυμερή PHBV/PLA, απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας) (Hamdani et al., 2018; Xu et al., 2018; Wang et al., 2022). Οι Sun et al. (2016) προσδιόρισαν τους ρυθμούς αναγωγής νιτρικών σε 2.4 g NO₃-N/L/d για τα οξικά ιόντα, 2.29 g NO₃-N/L/d για την αιθανόλη και 2.01 g NO₃-N/L/d για τη μεθανόλη. Οι *Æsøϋ* et al. (1998) παρατήρησαν υψηλότερες ταχύτητες απονιτροποίησης για την αιθανόλη και υδρολυμένα υγρά και στερεά απόβλητα (2.5 g NO₃-N/L/d), σε σύγκριση με τα οξικά ιόντα (<2 g NO₃-N/L/d), και επισήμαναν αστάθεια στην αποτελεσματικότητα της απονιτροποίησης για την περίπτωση των οξικών ιόντων. Οι Zaitsev et al. (2008) προσδιόρισαν τον ρυθμό απονιτροποίησης σε 0.91 g NO₃-N/L/d κατά τη βιολογική επεξεργασία απορροών μεταλλείων με πηγή άνθρακα τη μεθανόλη. Σε απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας, ο ρυθμός αναγωγής των νιτρικών βρέθηκε 0.345 g NO₃-N/L/d (Hamdani et al., 2018). Σε αντιδραστήρες PBR με ενεργό υπόστρωμα μίγμα σκόνης θείου-οστράκων-φλοιών ρυζιού/φυστικιών, ο μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης ήταν 0.723 g NO₃-N/L/d (ή 0.723 g NO₃-N/m³/d) (Wang et al., 2022). Σύμφωνα με τους τελευταίους, ο ρυθμός αναγωγής των νιτρικών για το ενεργό αυτό υπόστρωμα ήταν υψηλότερος, σε σύγκριση με άλλα υποστρώματα που είχαν μελετηθεί ως τότε, όπως μίγμα από θείο-ασβεστόλιθο και PHBV-πριονίδια. Σε αντιδραστήρες FBR, με σκοπό την απονιτροποίηση μεταλλουργικών αποβλήτων που προέρχονταν από ανάκτηση πολύτιμων μετάλλων από βιομηχανικά απόβλητα, τα οξικά ιόντα ως πηγή ηλεκτρονίων οδήγησαν σε ρυθμό απομάκρυνσης νιτρικών ίσο με 240 mg NO₃-N/L/d (Hirata et al., 2001). Τέλος, σε

αντιδραστήρες MBR με σκοπό την απονιτροποίηση σε απόβλητα που προέρχονται από τη βιομηχανία εκρηκτικών, η μέγιστη ταχύτητα αναγωγής νιτρικών βρέθηκε 160 mg NO₃-N/g VSS/h, για υδραυλικό χρόνο παραμονής (HRT) ίσο με 44 h, και 324 mg NO₃-N/g VSS/h, για HRT ίσο με 30 h (Shen et al., 2009). Στον σχετικό πίνακα (Πίνακας 3.1) παρουσιάζονται οι παράμετροι λειτουργίας (HRT, συγκέντρωση οργανικού άνθρακα, C/N, αλατότητα, pH, θερμοκρασία) και η ποιότητα εκροής (συγκέντρωση οργανικού άνθρακα, νιτρικών και νιτρωδών) βιοαντιδραστήρων προσκολλημένης βιομάζας που μελέτησε πλήθος ερευνητών, μεταξύ των οποίων οι Hirata et al. (2001) και Shen et al. (2009).

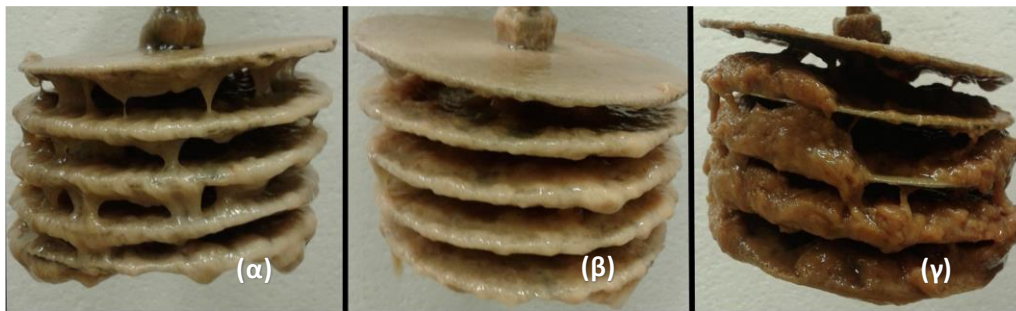
Η πηγή οργανικού άνθρακα μπορεί να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων στην εκροή και τη συσσώρευση νιτρωδών στο διάλυμα. Σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας (MBBR) έχουν παρατηρηθεί υπολειμματικές συγκεντρώσεις νιτρικών που έφθαναν το 39% και 28% της αρχικής συγκέντρωσής τους, με δότες ηλεκτρονίων την αιθανόλη και τη μεθανόλη, αντίστοιχα, ενώ για τη γλυκόζη και τα οξικά ιόντα, η αναγωγή των νιτρικών ήταν πλήρης (Srinandan et al., 2012). Οι Jiang et al. (2022a), οι Mielcarek et al. (2020) και οι Sun et al. (2016) παρατήρησαν πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας (βιολογικά φίλτρα και PBR) με πηγές οργανικού άνθρακα τα οξικά ιόντα, την αιθανόλη, τη μεθανόλη, τη γλυκόζη, το κιτρικό οξύ και τη μπύρα. Τέλος, σε βιολογικά φίλτρα (RBC) έχει παρατηρηθεί υψηλότερη συγκέντρωση νιτρωδών ιόντων κατά την απονιτροποίηση με δότη ηλεκτρονίων τη μπύρα, σε σύγκριση με τα οξικά και κιτρικά ιόντα, και σε αντιδραστήρα PBR έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρωδών στην εκροή, με δότη ηλεκτρονίων τη μεθανόλη, σε σύγκριση με τα οξικά ιόντα και την αιθανόλη (Πίνακας 3.1) (Sun et al., 2016b; Mielcarek et al., 2020).

Στους αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας η πηγή οργανικού άνθρακα μπορεί να επηρεάσει τόσο τη δομή του μικροβιακού βιολογικού στρώματος, όσο και τη μικροβιακή ποικιλότητα. Σε αντιδραστήρα ρέουσας κλίνης προσκολλημένης βιομάζας (MBBR), όπου χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά τέσσερις διαφορετικές πηγές άνθρακα (οξικά ιόντα, αιθανόλη, μεθανόλη, γλυκόζη), παρατηρήθηκε μεταβολή στην αρχιτεκτονική του βιοφίλμ. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4, τα οξικά ιόντα και η αιθανόλη οδήγησαν σε σχηματισμό βιολογικής στιβάδας με ασυνέχειες στη δομή και αυξημένη τραχύτητα (υφή μωσαϊκού), σε αντίθεση με τη γλυκόζη και τη μεθανόλη, που οδήγησαν σε συμπαγή μικροβιακή στιβάδα, χωρίς κενά και ασυνέχειες. Το πάχος του βιοφίλμ παρατηρήθηκε μεγαλύτερο στην περίπτωση των οξικών ιόντων και μικρότερο στην περίπτωση της μεθανόλης. (Srinandan et al., 2012). Σε αντιδραστήρες FBR με πηγή άνθρακα τη μεθανόλη, η δομή του βιοφίλμ παρουσίασε μεταβλητό πάχος και τραχιά επιφάνεια, με εξογκώματα και κοιλάτες, γεγονός που αποδόθηκε στη συνεχόμενη αναδιαμόρφωση του βιοφίλμ, εξαιτίας της ρευστοποίησης της κλίνης (Labbé et al., 2007). Οι Mielcarek et al. (2020) μελέτησαν τη δομή του βιοφίλμ σε περιστρεφόμενα βιολογικά φίλτρα (RBC) με δότες ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα, κιτρικό οξύ και μπύρα και συσχέτισαν το πάχος των βιολογικών στιβάδων με την παραγωγή EPS και το pH της εισροής. Ο μέγιστος όγκος βιομάζας και το μέγιστο πάχος

βιολογικού στρώματος παρατηρήθηκαν για την περίπτωση της μύρας, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.5 (Mielcarek et al., 2020). Η συγκέντρωση EPS, ως η συνισταμένη συγκέντρωση των διαλυτών EPS και των EPS που συνδέονται με ασθενείς (LB EPS-loosely bound EPS) και ισχυρούς δεσμούς (TB EPS-tightly bound EPS) με τα κύτταρα, παρουσίασε μέγιστη τιμή, επίσης για την περίπτωση της μύρας, ενώ ελάχιστη ήταν για την περίπτωση των οξικών ιόντων. Όπως σχολίασαν οι ίδιοι, η αυξημένη περιεκτικότητα της μύρας σε σάκχαρα μπορεί να ευνοήσει την παραγωγή EPS. Αντίθετα, χαμηλές τιμές pH στην εισροή, ως αποτέλεσμα της παρουσίας οξικού και κιτρικού οξέος, μπορεί να οδηγήσουν σε εξουδετέρωση των αρνητικά φορτισμένων EPS και σε συμπαγή δομή στο βιοφίλμ, ενώ, ταυτόχρονα, η παραγωγή PHA, που ευνοείται από τον μεταβολισμό των οξικών ιόντων, μπορεί να αναστείλει την παραγωγή EPS, οδηγώντας σε μικρότερο πάχος βιοφίλμ. Παρατήρησαν, επίσης, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό EPS βρισκόταν σε διαλυτή μορφή και το χαμηλότερο σε μορφή LB EPS, ανεξάρτητα από την πηγή οργανικού άνθρακα. Όσον αφορά τη μικροβιακή ποικιλότητα σε αντιδραστήρες PBR, αυτή έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερη με δότη ηλεκτρονίων την αιθανόλη και περιορισμένη με δότη τη μεθανόλη. Η αιθανόλη φάνηκε ότι ευνοεί την ομοιομορφία μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών, ενώ η μεθανόλη ότι μειώνει τη μικροβιακή αφθονία (Sun et al., 2016b). Για τα οξικά ιόντα διαπιστώθηκε μέγιστη μικροβιακή ποικιλότητα στη βάση της κλίνης του ίδιου αντιδραστήρα, γεγονός που αποδόθηκε στην υψηλότερη ταχύτητα απονιτροποίησης ($2.4 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\text{/d}$), σε σύγκριση με την αιθανόλη ($2.29 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\text{/d}$) και τη μεθανόλη ($2.01 \text{ kg NO}_3\text{-N/m}^3\text{/d}$) (Sun et al., 2016b).



Εικόνα 3.4: Δομή του βιοφίλμ σε απονιτροποιητικό αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας (MMBR) με δότη ηλεκτρονίων (α) οξικά ιόντα, (β) γλυκόζη, (γ) μεθανόλη, (δ) αιθανόλη (Πηγή: Srinandan et al., 2012)



Εικόνα 3.5: Σχηματισμός βιοφίλμ σε απονιτροποιητικό αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας (RBC) με δότη ηλεκτρονίων (α) οξικό οξύ, (β) κιτρικό οξύ, (γ) μύρα (Πηγή: Mielcarek et al., 2020)

3.2.2. Λόγος C/N

Η επιλογή του κατάλληλου λόγου C/N είναι απαραίτητη προϋπόθεση για αποτελεσματική απονιτροποίηση (Beccari et al., 1983; Matějů et al., 1992; Carrera et al., 2003; Mokhayeri et al., 2006; Cherchi et al., 2009; Mohan et al., 2016; Fu et al., 2022). Συνοπτικά, και σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν στο Εδάφιο 2.2.4., αυξημένοι ή χαμηλοί λόγοι C/N μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση ανεπιθύμητων ουσιών στην εκροή (πχ οργανικού άνθρακα και N_2O , αντίστοιχα), σε επικράτηση μικροβιακών ειδών με δυσμενείς επιπτώσεις στην απονιτροποίηση (πχ *Thauera spp.*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*), όπως συσσώρευση νιτρωδών, και σε άλλα φαινόμενα που μπορούν να επιδράσουν αρνητικά στην απονιτροποίηση και περιγράφονται στη βιβλιογραφία με τους όρους carbon breakthrough και feast-famine cycle (Her & Huang, 1995; Martienssen & Schöps, 1999; Ge et al., 2012; Mohan et al., 2016; Lee et al., 2019; Fu et al., 2022; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2022b; Zeng et al., 2023).

Σε αντιδραστήρες αιωρούμενης βιομάζας ο πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενος λόγος C/N μπορεί να κυμαίνεται από 3.2 g COD/g N έως 6.9 g COD/g N (ή 1.2 g C/g N -2.6 g C/g N) με δότη ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα (Πίνακας 2.2). Σε αντιδραστήρα FBR, ο ίδιος λόγος βρέθηκε 3.0 g COD/g N (ή 1.32 g C/g N) με πηγή άνθρακα οξικά ιόντα, σε περιβάλλον μεταλλουργικών αποβλήτων που προέρχονταν από ανάκτηση πολύτιμων μετάλλων σε βιομηχανικά απόβλητα (Hirata et al., 2001). Επίσης, σε αντιδραστήρες FBR με δότη ηλεκτρονίων την αιθανόλη, παρατηρήθηκε ότι η μείωση του λόγου C/N στην τιμή 2.9 g COD/g N οδήγησε σε αυξημένες υπολειμματικές συγκεντρώσεις νιτρικών (Papirio et al., 2014). Σε αντιδραστήρες PBR (Πίνακας 3.1) ο λόγος C/N (πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενος) έχει προσδιοριστεί:

- 4.9 g COD/g N (ή 1.86 g C/g N) για τα οξικά ιόντα (Sun et al., 2016b)
- 4.3 g COD/g N (ή 1.08 g C/g N) για την αιθανόλη (Æsøly et al., 1998; Sun et al., 2016b)
- 2.9-3.4 g COD/g N (ή 0.725-0.848 g C/g N) για τη μεθανόλη (Gabaldón et al., 2007; Sun et al., 2016b)

- 6.1 g COD/g NO₃-N για υδρολυμένα απόβλητα (Æsøϕ et al., 1998)
- 3.3 g COD/g NO₃-N για μίγμα αποβλήτων από βιομηχανία επιμετάλλωσης και αστικών αποβλήτων σε αναλογία 1:4 (Gabaldón et al., 2007)

Η απονιτροποίηση έχει παρατηρηθεί ταχύτερη για αρχικούς λόγους C/N υψηλότερους από 4.5 g COD/g NO₃-N για την αιθανόλη και 8-10 g COD/g NO₃-N για υδρολυμένα απόβλητα (Æsøϕ et al., 1998). Τέλος, με πηγή άνθρακα προεπεξεργασμένα αστικά λύματα, έχει παρατηρηθεί επιτυχημένη απονιτροποίηση για λόγους C/N μεταξύ 3.88-13.2 g COD/g N, ενώ λόγοι υψηλότεροι από 7.7 g COD/g N μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένες συγκεντρώσεις διαλυτού οργανικού άνθρακα στην εκροή και υποβάθμιση της ποιότητάς της (Pérez-Marín et al., 2018).

3.2.3. Συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου (DO)

Παρόλο που οι περισσότεροι απονιτροποιητικοί μικροοργανισμοί είναι προαιρετικά αναερόβιοι (Εδάφιο 2.2.5.1), ο τρόπος απόκρισης των απονιτροποιητικών καλλιεργειών (ταχύτητα απονιτροποίησης, ποσοστό αναγωγής νιτρικών, συσσώρευση νιτρικών ιόντων) στην παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων διαλυτού οξυγόνου ποικίλει (Martienssen & Schöps, 1999). Σε κάθε περίπτωση, η απονιτροποίηση μπορεί να ολοκληρωθεί αποτελεσματικά, όταν η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου παραμένει χαμηλότερη από 2 mg/L (Fu et al., 2022).

3.2.4. pH

Η τιμή του pH επηρεάζει την απονιτροποίηση, καθώς επιδρά στη λειτουργία όλων των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτή, σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν στο Εδάφιο 2.5.5.2. Συνοπτικά, οι περισσότεροι ερευνητές εντοπίζουν τις τιμές pH για τις οποίες παρατηρείται βέλτιστη απονιτροποιητική ικανότητα και πλήρης αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αέριο άζωτο σε εύρος μεταξύ 7.0 και 8.0 για την πλειονότητα των ουδετερόφιλων βακτηρίων (Glass & Silverstein, 1998; Hillel et al., 2005; Jørgensen & Fath, 2008; Pan et al., 2012; Albina et al., 2019). Όταν η βέλτιστη απονιτροποίηση παρατηρείται σε υψηλότερες τιμές pH, τα βακτήρια είναι ικανά να εκμεταλλεύονται τη διαμεμβρανική διαφορά στη συγκέντρωση ιόντων νατρίου, αντί των υδρογονοκατιόντων, για την επιβίωσή τους, με αποτέλεσμα πολλά από αυτά να είναι ταυτόχρονα αλατόφιλα (Madigan et al., 2018; Albina et al., 2019). Η μέγιστη τιμή pH για την οποία έχει παρατηρηθεί απονιτροποίηση κυμαίνεται μεταξύ 11.5 και 12 (Albina et al., 2019).

Το pH μπορεί να επιδράσει στην εξέλιξη της απονιτροποίησης, επηρεάζοντας την ταχύτητα απονιτροποίησης, την ενζυμική δράση και τη συσσώρευση νιτρικών ιόντων και υποξειδίου του αζώτου (Parkin et al., 1985; Kučera et al., 1986; Thomsen et al., 1994; Hillel et al., 2005; Saleh-Lakha et

al., 2009; Pan et al., 2012; Lee et al., 2019; Albina et al., 2019). Για τον λόγο αυτό, πολλοί ερευνητές επιλέγουν να διατηρούν σταθερές τις τιμές pH κοντά στο 7.0 κατά τη μελέτη της απονιτροποίησης (Christensson et al., 1994; Tam et al., 1994; Constantin & Fick, 1997; Mokhayeri et al., 2006; Cherchi et al., 2009; Srinandan et al., 2012).

Σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας (PBR) παρατηρήθηκε ότι ο ρυθμός απονιτροποίησης μπορεί να αυξηθεί με αύξηση των τιμών του pH μεταξύ των τιμών 6.5-7.5 στην εισροή, ενώ για pH 8.0 δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη μεταβολή. Το εύρος της ταχύτητας απονιτροποίησης προσδιορίστηκε 190-370 mg NO₃-N/L/d (ή 0.190-0.370 kg NO₃-N/m³/d) για pH 6.5 και 320-433 mg NO₃-N/L/d (ή 0.320-0.433 kg NO₃-N/m³/d) για pH 7.0-8.0 (Wang et al., 2022). Σε pH 4.0, με πηγή άνθρακα τη μεθανόλη και αρχική συγκέντρωση νιτρικών 1 450-1 990 mg NO₃⁻, παρατηρήθηκε ταχύτητα απομάκρυνσης νιτρικών 79-445 mg NO₃-N/m³/d (ή 0.079-0.445*10⁻³ kg NO₃-N/m³/d) (Ugurly & Ozturkcu, 2018). Σε αντιδραστήρες FBR τιμές pH κοντά στο 3 οδήγησαν σε παύση της απονιτροποίησης, χωρίς παραγωγή νιτρικών ιόντων (Pariño et al., 2014). Σε αντιδραστήρες MBR παρατηρήθηκε πλήρης αναγωγή νιτρικών και νιτρικών ιόντων σε εύρος pH 7.5-8.5. Σε pH 9.5 παρατηρήθηκε πλήρης αναγωγή των νιτρικών και νιτρικών ιόντων, αλλά με υψηλότερη συσσώρευση νιτρικών κατά την απονιτροποίηση, ενώ σε pH 6.5 παρατηρήθηκε αναχαίτιση της απονιτροποίησης (Shen et al., 2009).

3.2.5. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία επηρεάζει τη διεργασία της απονιτροποίησης, σύμφωνα με όσα παρουσιάστηκαν στο Εδάφιο 2.2.5.3. Συνοπτικά, το βέλτιστο εύρος θερμοκρασιών για την απονιτροποίηση κυμαίνεται μεταξύ 15°C-35°C. Σε θερμοκρασίες υψηλότερες ή χαμηλότερες από αυτές περιορίζεται όχι μόνο η μικροβιακή δραστηριότητα (πχ λόγω της αναχαίτισης της δράσης εξειδικευμένων ενζύμων), αλλά και η υδρόλυση των οργανικών και άλλων ενώσεων, με αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού ή ακόμη και την παύση της απονιτροποίησης (Carrera et al., 2003; Elefsiniotis & Li, 2006; Lee et al., 2019; Fu et al., 2022). Για τους λόγους αυτούς, πολλοί ερευνητές διατηρούν τη θερμοκρασία σε μικρό εύρος διακύμανσης όταν μελετούν διαφορετικές παραμέτρους κατά την απονιτροποίηση (Æsøly et al., 1998; Lee et al., 2004; Labbé et al., 2007; Shen et al., 2009; Shrinandan et al., 2012; Sun et al., 2016b; Hamdani et al., 2018; Xu et al., 2018; Letelier-Gordo et al., 2020; Mielcarek et al., 2020; Jiang et al., 2022). Αντίθετα, όταν το θερμοκρασιακό εύρος είναι μεγάλο, η θερμοκρασία πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ως παράμετρος που επηρεάζει την απονιτροποίηση (Πίνακας 3.1) (Wang et al., 2022).

Εκτός από τη διεργασία της απονιτροποίησης, η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τις παραμέτρους σχεδιασμού των απονιτροποιητικών αντιδραστήρων, όπως τον υδραυλικό χρόνο παραμονής (HRT). Συγκεκριμένα, στην ανοξική βαθμίδα των βιολογικών συστημάτων ενεργού ιλύος, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής μπορεί να εκφρασθεί σύμφωνα με τη Σχέση (Σ.4), ως συνάρτηση της θερμοκρασίας

και της συγκέντρωσης νιτρικών που πρέπει να αναχθούν, και τη Σχέση (Σ.5), ως συνάρτηση της θερμοκρασίας (Carrera et al., 2003). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι οι αντιδραστήρες FBR μπορούν να ανταπεξέρχονται ταχύτερα σε μεταβολές του HRT, όταν λειτουργούν σε θερμοκρασίες περίπου 22°C, σε σύγκριση χαμηλότερες θερμοκρασίες (~7-8°C) (Papiro et al., 2014).

$$HRT = \frac{[NO_3^- - N]}{[VSS] * r_{D,T}} \quad (\Sigma.4)$$

όπου,

HRT, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής σε (d)

[NO₃⁻ - N], η συγκέντρωση αζώτου νιτρικών σε (mg/L)

[VSS], η συγκέντρωση βιομάζας στον αντιδραστήρα σε (mg/L)

r_{D,T}, ο ρυθμός απονιτροποίησης στη θερμοκρασία σχεδιασμού T σε (mg NO₃-N/mg VSS/d)

$$HRT = 0.51 * e^{\frac{20.2}{T+0.29}} \quad (\Sigma.5)$$

όπου,

HRT, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής σε (d)

T, η θερμοκρασία σε °C

3.2.6. Συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών ιόντων

Όπως αναλύθηκε στο Εδάφιο 2.2.5.4, οι αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων στην εισροή μπορούν να οδηγήσουν σε:

- συσσώρευση νιτρωδών, εξαιτίας του ανταγωνισμού που δημιουργείται μεταξύ της αναγωγής των νιτρικών και της αναγωγής των νιτρωδών (Glass & Silverstein, 1999; Ge et al., 2012; Mohan et al., 2016; Zhang et al., 2022b).
- επικράτηση βακτηριακών πληθυσμών που μπορούν να επιτελέσουν μερική απονιτροποίηση των νιτρικών προς νιτρώδη έναντι αυτών που μπορούν να ανάξουν πλήρως τα νιτρικά ιόντα σε αέριο άζωτο, όταν πρόκειται για μικτές μικροβιακές καλλιέργειες (Albina et al., 2019).

Τα νιτρώδη ιόντα είναι κυτταροτοξικές ενώσεις που μπορούν να επιβραδύνουν την περαιτέρω αναγωγή τους προς αέριο άζωτο και να οδηγήσουν σε αναχαίτιση της απονιτροποίησης (Albina et al., 2019). Παρόλα αυτά, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει όλους τους κατάλληλους μηχανισμούς προκειμένου να εξασφαλίζουν χαμηλή συγκέντρωση νιτρωδών στο εσωτερικό του κυττάρου (της τάξης των mM), διοχετεύοντας τις πλεονάζουσες συγκεντρώσεις νιτρωδών ιόντων εξωκυτταρικά, με τη βοήθεια ειδικών ενζύμων (Martienssen & Schöps, 1999; Albina et al., 2019; Fu et al., 2022; Zeng et al., 2023).

3.2.7. Αλατότητα

Η αλατότητα επηρεάζει την απονιτροποίηση ανάλογα με τις ανάγκες των μικροοργανισμών σε NaCl (Εδάφια 2.2.5.5 και 2.2.5.2). Οι ανάγκες αυτές μπορεί να κυμαίνονται μεταξύ πλήρους απουσίας NaCl, όταν πρόκειται για μη αλατόφιλους, έως απόλυτης απαίτησης σε NaCl, όταν πρόκειται για αλατόφιλους και υπεραλατόφιλους μικροοργανισμούς (Berendes et al., 1996; Huu et al., 1999; Mormile et al., 1999; Bouchotroch et al., 2001; Martínez Cánovas et al., 2004; Kim et al., 2007; Wu et al., 2008; Sharovalova et al., 2009; Nakano et al., 2010; Rezaee et al., 2012; Trögl et al., 2012; Ikeda et al., 2013; Madigan et al., 2018; Albina et al., 2019). Όπως έχει παρατηρηθεί σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας, τιμές αλατότητας έως 11.6% ευνοούν την επικράτηση των γονιδίων που σχετίζονται με την αναγωγή των νιτρικών έναντι των υπολοίπων γονιδίων που λαμβάνουν μέρος στην απονιτροποιητική διαδικασία, ενώ τα γονίδια NirS που σχετίζονται με την αναγωγή των νιτρωδών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε σύγκριση με τα NirK. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl μπορούν να ευνοήσουν την αύξηση της μικροβιακής ποικιλότητας (Miao et al., 2015). Παρόλο που τα ερευνητικά συμπεράσματα που συσχετίζουν την αύξηση της αλατότητας και την επιτάχυνση της απονιτροποίησης δίστανται, αρκετοί ερευνητές συσχετίζουν την επικράτηση αλατόφιλων μικροοργανισμών με συσσώρευση νιτρωδών ιόντων κατά την απονιτροποίηση (Miao et al., 2015; Osaka et al., 2018; Albina et al., 2019). Σε αντιδραστήρες PBR και FBR, τιμές αλατότητας υψηλότερες από 5% μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση νιτρωδών ιόντων, η συγκέντρωση των οποίων μπορεί να καθορίσει την ταχύτητα απονιτροποίησης και η οποία μπορεί να παρατηρηθεί μειωμένη σε σύγκριση με χαμηλότερες τιμές αλατότητας (Yoshie et al., 2002; Miao et al., 2015). Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι, για τις τιμές αυτές, επικρατούν βακτήρια του γένους *Marinobacter spp.*, σε αντίθεση με χαμηλότερες τιμές αλατότητας, στις οποίες επικρατούν βακτήρια του γένους *Halomonas spp.* (Miao et al., 2015). Άλλες έρευνες σε αντιδραστήρες PBR έχουν δείξει ότι μπορεί να επιτευχθεί ταχύτερη απονιτροποίηση (2.5 kg N/m³/d) με δότη ηλεκτρονίων το οξικό οξύ για αλατότητα 10%, σε σύγκριση με αλατότητα 2% (Yoshie et al., 2006). Επίσης, σε αντιδραστήρες PBR με πηγή άνθρακα τη μεθανόλη, η ταχύτητα αναγωγής νιτρικών βρέθηκε 0.169 g NO₃-N/L/d και 0.084 g NO₃-N/L/d σε απόβλητα που περιείχαν αλατότητα 0.3% και 1.7%, αντίστοιχα (Mattila et al., 2007).

3.2.8. Διαλυτά μέταλλα

Τα διαλυτά μέταλλα (βλ. Εδάφιο 2.2.5.6) μπορούν να επηρεάσουν την απονιτροποίηση (συσσώρευση νιτρωδών ιόντων, αναγωγή των νιτρικών προς αμμωνιακά) ανάλογα με τη συγκέντρωση και τη βιοδιαθεσιμότητά τους, προκαλώντας φαινόμενα τοξικότητας μέσω μηχανισμών, όπως η ρόφηση, το οξειδωτικό στρες και η πρόσληψή τους στο εσωτερικό των κυττάρων (Bollag & Barabasz, 1979; Sakadevan, 1999; Holtan-Hartwig et al., 2002; Granger & Ward, 2003; Singh & Tripathy, 2007; Fernández-Nava et al., 2008; You et al., 2009; Zou et al., 2013; Zou et al., 2014; Liu et al., 2016; Ramírez et al., 2017; Deng et al., 2018; Li et al., 2018; Chen et al., 2019; Lu et al., 2022). Για παράδειγμα, σε αντιδραστήρες FBR με αρχικές συγκεντρώσεις διαλυτού σιδήρου 1-100 mg/L (pH=7) και υπολειμματικές συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 1.6 mg/L παρατηρήθηκε επιτάχυνση της απονιτροποίησης. Αντίθετα, αρχικές συγκεντρώσεις διαλυτού χαλκού 1 000 mg/L (pH=7) οδήγησαν σε υπολειμματικές συγκεντρώσεις χαλκού 0.7 mg/L, επιβράδυνση της απονιτροποίησης κατά τουλάχιστον 50% και συσσώρευση νιτρωδών στην εκροή σε συγκέντρωση περίπου 10 mg/L (Papirio et al., 2014). Όσον αφορά το νικέλιο, σε αντιδραστήρες FBR με αρχική συγκέντρωση διαλυτού νικελίου έως 500 mg/L έχει παρατηρηθεί πλήρης αναγωγή των νιτρικών και νιτρωδών ιόντων κατά την απονιτροποίηση (Zou et al., 2015).

3.2.9. Προσαρμογή της βιομάζας

Η προσαρμογή των μικροβιακών καλλιεργειών σε συγκεκριμένη πηγή οργανικού άνθρακα (Εδάφιο 2.2.5.7) μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη της απονιτροποίησης και εξαρτάται από το είδος της μικροβιακής καλλιέργειας, την αρχική πηγή οργανικού άνθρακα και την ηλικία της λάσπης (Nyberg et al., 1996; Hallin & Pell, 1998; Mokhayeri et al., 2006; Osaka et al., 2008; Cherchi et al., 2009).

3.2.10. Υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT)

Ο υδραυλικός χρόνος παραμονής αποτελεί παράμετρο λειτουργίας των απονιτροποιητικών και, γενικότερα, των βιολογικών αντιδραστήρων (Πίνακας 3.1) (Æsøly et al., 1998; Xu et al., 2018; Jiang et al., 2022b; Wang et al., 2022). Η επιλογή του κατάλληλου HRT εξαρτάται από τη μικροβιακή ανάπτυξη, την αρχική συγκέντρωση νιτρικών, τη θερμοκρασία και την παρουσία παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν αναχαίτιση της απονιτροποίησης (Fu et al., 2022).

Σε αντιδραστήρες σταθερής κλίνης με πληρωτικό υλικό (PBR) ο υδραυλικός χρόνος παραμονής υπολογίζεται σύμφωνα με τη Σχέση (Σ.6) (Wang et al., 2022) και επηρεάζει τόσο τη φόρτιση των αντιδραστήρων με νιτρικά ιόντα (NLR-nitrate loading rate) (Σχέση (Σ.7)), όσο και τον ρυθμό απομάκρυνσης νιτρικών από το διάλυμα (NRR-nitrate removal rate) (Σχέση (Σ.8)) (Gabaldón et al., 2007;

Wang et al., 2022). Ένας βιολογικός αντιδραστήρας λειτουργεί κατά τον βέλτιστο τρόπο, όταν ο υδραυλικός χρόνος παραμονής (HRT) μπορεί να εξασφαλίσει ότι η φόρτιση του αντιδραστήρα με νιτρικά ιόντα (NLR) είναι ίση με τον ρυθμό απομάκρυνσής τους (NRR). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι συνθήκες αυτές δεν οδηγούν απαραίτητα και στη μέγιστο/η ρυθμό/ταχύτητα απονιτροποίησης. Ενδεικτικά, σε αντιδραστήρα PBR με HRT=1.28 h, παρατηρήθηκε μέγιστος ρυθμός απονιτροποίησης ίσος με 200-230 mg NO₃-N/L/h, για φόρτιση νιτρικών 250-300 mg NO₃-N/L/h, ενώ πλήρης απονιτροποίηση παρατηρήθηκε για ρυθμό αναγωγής και φόρτιση νιτρικών ίσα με 130 mg NO₃-N/L/h (Gabaldón et al., 2007).

$$HRT = \frac{R_v}{S_p} * 24 \quad (\Sigma.6)$$

όπου,

HRT, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής σε (d)

R_v, ο όγκος των κενών στην κλίνη του βιολογικού αντιδραστήρα σε (m³) ή (L)

S_p, η παροχή εισροής στον βιολογικό αντιδραστήρα σε (m³/h) ή (L/h), αντίστοιχα

$$NLR = \frac{[NO_3 - N]_{in}}{HRT} \quad (\Sigma.7)$$

όπου,

NLR, η φόρτιση του βιολογικού αντιδραστήρα με νιτρικά σε (mg N/L/d)

[NO₃⁻ - N]_{in}, η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στην εισροή σε (mg/L)

HRT, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής σε (d)

$$NRR = \frac{[NO_3 - N]_{in} - [NO_3 - N]_{out}}{HRT} \quad (\Sigma.8)$$

όπου,

NRR, η φόρτιση του βιολογικού αντιδραστήρα με νιτρικά σε (mg N/L/d)

$[\text{NO}_3^- - \text{N}]_{\text{in}}$, η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στην εισροή σε (mg/L)

$[\text{NO}_3^- - \text{N}]_{\text{out}}$, η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στην εκροή σε (mg/L)

HRT, ο υδραυλικός χρόνος παραμονής σε (d)

Από τη (Σ.7) προκύπτει ότι η επιλογή χαμηλών HRT οδηγεί σε αυξημένη φόρτιση των αντιδραστήρων με νιτρικά (NLR), με αποτέλεσμα να απαιτούνται αυξημένοι ρυθμοί απονιτροποίησης της βιομάζας, ώστε να επιτευχθεί πλήρης αναγωγή των νιτρικών ιόντων (Σχέση (Σ.8)). Πράγματι, τόσο σε συστήματα αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας (πχ PBR), όσο και σε αντιδραστήρες αιωρούμενης βιομάζας (πχ MBR), έχει παρατηρηθεί ότι χαμηλοί HRT μπορούν να οδηγήσουν σε συσσώρευση νιτρωδών ιόντων και σε αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρικών και διαλυτού οργανικού άνθρακα στην εκροή. Αντίστοιχα, αυξημένοι HRT μπορούν να οδηγήσουν σε βελτίωση της απονιτροποίησης, με αποτέλεσμα χαμηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων και οργανικού άνθρακα στην εκροή (Gabaldón et al., 2007; Shen et al., 2009; Xu et al., 2018; Fu et al., 2022). Οι Gabaldón et al. (2007) παρατήρησαν ότι χαμηλοί HRT (<2 h), σε αντιδραστήρα PBR, οδήγησαν σε μειωμένη απομάκρυνση νιτρικών της τάξης του 45%-55%, και σε ρυθμούς απονιτροποίησης χαμηλότερους από τη φόρτιση με νιτρικά (πχ 135 mg NO₃-N/L/h έναντι 250 mg NO₃-N/L/h, αντίστοιχα), (Πίνακας 3.1). Υψηλότεροι HRT (>2 h) οδήγησαν σε σχεδόν μηδενικές υπολειμματικές συγκεντρώσεις και σε ρυθμό απονιτροποίησης ίσο με τη φόρτιση με νιτρικά (πχ 100 mg NO₃-N/L/h). Σε αντίθεση με τα παραπάνω, άλλοι ερευνητές έχουν δείξει ότι αύξηση του HRT σε αντιδραστήρες αιωρούμενης βιομάζας τύπου batch (FBR-Fed Batch Reactor) μπορεί να οδηγήσει σε επιβράδυνση της αναγωγής νιτρικών από 98.7 mg N/g VSS/h (HRT=2.5 h), σε λιγότερο από 40 mg N/g VSS/h (HRT=7.5 h) (Letelier-Gordo et al., 2020). Τέλος, σε περίπτωση που χρησιμοποιούνται σύνθετες οργανικές ενώσεις ως δότες ηλεκτρονίων, όπως οργανικά πολυμερή, η μείωση του HRT μπορεί να περιορίσει την απελευθέρωση διαλυτών οργανικών ουσιών, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ποιότητας εκροής (Xu et al., 2018).

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.1) παρατίθενται παραδείγματα των παραμέτρων μελέτης και λειτουργίας βιολογικών αντιδραστήρων με σκοπό την απονιτροποίηση, καθώς και οι συγκεντρώσεις επιλεγμένων παραμέτρων στην εκροή τους (COD, NO₃-N, NO₂-N), με έμφαση στην τεχνολογία προσκολλημένης βιομάζας και σε εισροές με αυξημένη αλατότητα.

Πίνακας 3.1: Παράμετροι λειτουργίας (HRT, συγκέντρωση οργανικού άνθρακα, NO₃-N, C/N, αλατότητα, pH, T) και ποιότητα εκροής (συγκέντρωση οργανικού άνθρακα, NO₃-N, NO₂-N) σε βιολογικούς απονιτροποιητικούς αντιδραστήρες, με έμφαση σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας και σε αντιδραστήρες που λειτουργούν σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας (*)

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση απόβλητων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)	
Αιωρούμενης βιομάζας	Συνθετικά απόβλητα από βιομηχανία πυρηνικών όπλων	Μικτή	Οξικά ιόντα		5 600 (**)	1 400	4.0	pH=7.5 3.6% NaCl	-	~0	~0	Glass & Silverstein (1999)
								pH=9 3.6% NaCl	-	~0	~0	
								pH=9.0 7.1% NaCl	-	~0	~0	
								pH=9.0 7.1% NaCl	-	~0	~0	
Αιωρούμενης βιομάζας	Απόβλητα θαλ/γειών	Μικτή	Οξικά ιόντα	5	300	50	6.0	3.5% NaCl	106.7			Letelier-Gordo et al. (2020)
			Προπιονικά ιόντα						25.1			
			Αιθανόλη						67.4			
			Απόβλητα θαλ/γειών						2.2			
			Χωνεμένα απόβλητα θαλ/γειών					5.4				

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)	
					2 681 (**)	677				789		
					5 366 (**)	1 355				1 315		
							4.0					
					8 047 (**)	2 032				2 104		
					10 732 (**)	2 710				2 630		
					3 588 (**)	677				1 052		
Αιωρούμενης βιομάζας κοκκώδους ιλύος	Συνθετικά απόβλητα	Μικτή	Οξικά ιόντα		7 182 (**)	1 355				1 578		
					10 770 (**)	2 032		5.3		<10	<1	Mohan et al. (2016)
					14 363 (**)	2 710						
					5 348 (**)	677						
					10 705 (**)	1 355						
								7.9				
					16 053 (**)	2 032						
					21 409 (**)	2 710						

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής			Άλλες παράμετροι	Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά		
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)		[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)			
CSTR	Συνθετικά απόβλητα	<i>Azoarcus spp.</i> <i>Firmicutes spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικά ιόντα	5 918 (**)	4.0	0% NaCl	<270	~0	~0	Osaka et al. (2008)				
		<i>Halomonas spp.</i> <i>Marinobacter spp.</i> (επικρατέστεροι)									10% NaCl	<530	~0	~0
		<i>Hyphomicrobium spp.</i> <i>Bacteroidetes spp.</i> <i>Firmicutes spp.</i> <i>Methylophaga spp.</i> (επικρατέστεροι)	Μεθανόλη	9 000 (**)	6.0	0% NaCl	<1 000	~0	~0					
		<i>Bacteroidetes spp.</i> <i>Paracoccus spp.</i> <i>Hyphomicrobium spp.</i> <i>Methylophaga spp.</i> (επικρατέστεροι)									4% NaCl	<3 200	<1 100	~0
Βιολογικά φίλτρα (Biofilm)	Απόβλητα υδατ/ειών	Μικτή	Οξικά ιόντα	93.5 (**)	1.7		~110			Hamlin et al. (2008)				
			Μεθανόλη	110 (**)	2.0		~60	0.97	~0					
			Μελάσα	137.5 (**)	2.5		~115							
			Cerelose™	137.5 (**)	2.5		~120							

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)	
		<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Thauera spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικά ιόντα	3.0					45.1			
Βιολογικά φίλτρα (Biofilm)	Συνθετικά απόβλητα	<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Hyphomicrobium spp.</i> (επικρατέστεροι)	Μεθανόλη	3.0	120	15	8.0		38.8	<0.15	<0.08	Jiang et al. (2022a)
		<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Azospira spp.</i> <i>Denitratisoma spp.</i> (επικρατέστεροι)	Γλυκόζη	3.0					32.1			
			Οξικά ιόντα		-		-		-	-	4.4	
			Αιθανόλη		50-150		2-6		8-56	<16	1.1	
PBR (Biofilm)	Συνθετικά απόβλητα	Μικτή	Υδρολυμένη λάσπη	0.042-0.067	75-325	25	3-13		50-200	-	-	Æsøly et al. (1998)
			Υδρολυμένα στερεά απόβλητα		20-450		1-18		20-410	-	-	

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)	
			Οργανικό περιεχόμενο αποβλήτων		500 g C/L	1 000-4 000	0.125-0.50 g C/g N	2%-5%	-		<120	
PBR (Biofilm)	Απόβλητα υδρομεταλλουργίας	<i>Alcaligenes defragrans</i> <i>Pseudomonas spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικά ιόντα	-				0.43% NaCl 2.0% NaCl 5.0% NaCl 8.4% NaCl	-	~0 ~0 ~0 ~0	~0 ~0 <10 <10	Yoshie et al. (2002)
PBR (Biofilm)	Συνθετικά απόβλητα	Μικτή	Οξικά ιόντα	3.8	1 144-3 432	376-972	4.0	-	68.4-698	4.1-96.9	<26.7	Lee et al. (2004)
		<i>Alcaligenes spp.</i> <i>Vibrio spp.</i>		4.0					-	~0	~0	
		<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Halomonas spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικό οξύ	3.0	6 076(**)	1 540	4.0	2% NaCl	-	0-150	0-400	
	Απόβλητα από βιομηχανία ανάκτησης πολύτιμων μετάλλων			2.0					-	500-1 000	0-500	
PBR (Biofilm)				4.0					-	0-700	0-1 100	Yoshie et al. (2005)
		<i>Halomonas spp.</i> <i>Marinobacter spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικό οξύ	3.0					-	~0	~0	
				2.0	5 958(**)	1 510	4.0	10% NaCl	-	~0	~0	
				1.5					-	~0	~0	
				1.2					-	~0	~0	

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)	
				0.8					50-250	<110		
	Μίγμα: 20% βιομηγ/κών (διεργασίες επιμετάλλωσης) – 80% αστικών αποβλήτων	Μικτή	Οργανικό περιεχόμενο αποβλήτων	1.1					100-350	<100		
1.3				210-320	140-210	~1.5	[Cu]= 1.06-1.51 [Ni]= 0.03-0.13 [Zn]= 0.65-2.13 [Pb]= 0.10-0.12 (mg/L)	50-250	<60	-		
1.6									<50			
2.1									25-125	<20		Gabaldón et al. (2007)
3.5										<20		
	Συνθετικά απόβλητα	Μικτή	Μεθανόλη		200-350	50-80			<100			
				1.28	750-880	160-200	3.7	-	<420	<20	-	
					1 000-1 250	320-400			<420			
PBR (Biofilm)	Συμπύκνωμα RO απορροών μεταλλείων	<i>Methylophilus spp.</i> <i>Methylobacillus spp.</i> (επικρατέστεροι)	Μεθανόλη	40	-	157	-	1.7% NaCl	-	<60		Mattila et al. (2007)
					-	262		0.3% NaCl	-	<70		

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά	
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)		
PBR (Biofilm)	Συνθετικά απόβλητα	<i>Thauera spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικά ιόντα	-	230-380	33.1	7.0-11.5		~120	0.33	0.16	Sun et al. (2016)	
		<i>Thauera spp.</i> <i>Dechloromonas spp.</i> (επικρατέστεροι)	Αιθανόλη			33.6	6.9-11.3		~130	0.59	1.34		
		<i>Methyloversatilis spp.</i> <i>Methyloversatilis spp.</i> <i>Thauera spp.</i> (επικρατέστεροι)	Μεθανόλη			30.1	7.6-12.6		~210	2.28	5.11		
PBR (Biofilm)	Απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας	-	-	72	5 865	1 150	5	-	~400	~0	~0	Hamdani et al. (2018)	
PBR (Biofilm)	Συνθετικά απόβλητα	<i>Thauera spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικά ιόντα		82.1-168 (**)	16.0-27.5	~6.0		46.0-94.7	0.42-1.14	0.16-0.41	Xu et al. (2018)	
					2	168 (**)	50.4		~3.6	16.1	15.5		1.80
					2.5	168 (**)	49.1		~3.6	24.8	7.96		2.17
					70.1-141 (**)	15.6-26.7	~6		21.3-37.7	2.01-0.62	0.21-0.69		
					2	<i>Tolomonas spp.</i> <i>Thauera spp.</i> <i>Dechloromonas spp.</i> (επικρατέστεροι)	Γλυκόζη		141 (**)	49.0	~3.6		32.6
2.5	141 (**)	50.6	~3.6	32.4	2.38	1.38							

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)	
PBR (Biofilm)	Συνθετικά απόβλητα	<i>Brevinema spp.</i> <i>Thauera spp.</i> <i>Dechloromonas spp.</i> (επικρατέστεροι)	PHBV/PHA	0.5	-	16.4	-		6.92 mg C/L	10.8	0.37	Xu et al. (2018) (συνέχεια)
				1	-	16.1	-		7.18 mg C/L	7.61	0.95	
				1.5	-	15.8	-		14.0 mg C/L	5.13	0.47	
				2	-	15.6-27.1	-		14.5-9.72 mg C/L	1.08-11.1	0.17-1.03	
				2.5	-	15.5-49.9	-		55.6-11.7 mg C/L	0.12-11.3	0.00-0.55	
PBR (Biofilm) ενεργού υποστρώματος	Συνθετικά απόβλητα	<i>Ferritrophicum spp.</i> <i>Simplicispira spp.</i> <i>Thermotomonas spp.</i> (επικρατέστεροι)	Μίγμα από σκόνη θείου-οστράκων-φλοιών ρυζιού/φυστικιών	6.0				T=12°C	70-110	0-4	0.2-0.6	Wang et al. (2022)
				4.0				T=13°C	37-95	4-9	0.2-0.6	
				3.0	-	50	-	T=18°C	16-60	4-9	0.6-1.3	
				2.0				T=19°C	16-55	10-24	0.4-1.4	
				1.0				T=23°C	7-68	25-37	0.4-1.2	
				1.0		30		T=26°C	0-68	8-19	0.4-2.1	

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)	
FBR	Απόβλητα από βιομηχανία ανάκτησης πολύτιμων μετάλλων	Μικτή	Οξικά ιόντα	-	4 200-9 740 (**)	1 100-3 100	2.3-3.4	-	<800	~0		Hirata et al. (2001)
FBR	Υδατα ενυδρείου	<i>Methylophaga spp.</i> <i>Hyphomicrobium spp.</i> (επικρατέστεροι)	Μεθανόλη					2.8% NaCl				Labbé et al. (2007)
FBR	Συνθετικά απόβλητα	<i>Dechloromonas denitrificans</i> <i>Hydrogenophaga caeni</i> <i>Nitrospirae spp.</i> (επικρατέστεροι)	Αιθανόλη (7-22°C)	9	130		2.87	pH=7.0 (7-22°C)	20-100	-		Papirio et al. (2014)
				9	256	45.2	5.67	pH=7.0 (7-22°C)	~0	-		
				6	256		5.67	pH=4.0-7.0 (7-22°C)	~0	-		
				5.4	256		5.67	pH=2.5-3.5 (7-22°C)	0-20	-		
FBR	Συνθετικά απόβλητα	<i>Marinobacter spp.</i> <i>Halomonas spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικά ιόντα	24	7 000-8 000	6 000	4.5(**)	11.6%	~0	1 000-1 200		Miao et al. (2015)
					7 000-8 000			4.6%	~0	~0		
					7 000-8 000			1.6%	~0	~0		
					6 000-7 000	5 000-6 000		0.6%	~0	~0		

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)	
			Οξικά ιόντα						33.3	<0.86		
RBC	Συνθετικά απόβλητα	Μικτή	Κιτρικό οξύ	12	788	70	11.3		89.6	<0.97		Mielcarek et al. (2020)
			Μπύρα						74.2	<1.04		
MBBR (Biofilm)	Απόβλητα βιομηχανίας εκρηκτικών	<i>Methylophilus spp.</i> <i>Methylobacillus spp.</i> (επικρατέστεροι)	Μεθανόλη	22	-	1 150	-	0.67% NaCl	-	<100		Mattila et al. (2007)
				12	-	2 230	-	>0.67% NaCl	-	<1 100		
MBBR (Biofilm)	Συνθετικά απόβλητα	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Alcaligenes spp.</i> (επικρατέστεροι)	Οξικά ιόντα			92.1 (**)		6.6		~0	~0	
			Αιθανόλη			140.2 (**)		10		~5.5	0.534	
			Μεθανόλη	8.3		14		10		~4	2.2	
			Γλυκόζη			93.6 (**)		6.7		~0	1.8	

Είδος βιολογικού αντιδραστήρα	Προέλευση αποβλήτων	Μικροβιακή καλλιέργεια	Πηγή άνθρακα	HRT (h)	Χαρακτηριστικά εισροής				Χαρακτηριστικά εκροής			Βιβλιογραφική αναφορά	
					[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	C/N (g COD/g N)	Άλλες παράμετροι	[C] (mg COD/L)	[NO ₃ -N] (mg/L)	[NO ₂ -N] (mg/L)		
					18 550- 19 610		4.5			-	~0	~0	
MBR	Απόβλητα βιομηχανίας εκρηκτικών	Μικτή	Οξικά ιόντα	44	12 250- 12 950	3 500- 3 700	3.5	3.1%-3.3% NaCl		-	<3.22	0.78	Shen et al. (2009)
					11 550- 12 210		3.3			-	11.9	37.5	

(*) με γκρι χρώμα σημειώνονται οι τιμές, όπως προέκυψαν ύστερα από επεξεργασία των δεδομένων που παρατίθενται στις βιβλιογραφικές αναφορές, (**) όπως προέκυψε από σχετικούς υπολογισμούς για 1.07 g COD/g οξικού, 2.08 g COD/g αιθανόλης, 1.50 g COD/g μεθανόλης, 1.07 g COD/g γλυκόζης, 1.22 g COD/g γλυκερόλης και 1.51 g COD/g προπιονικού οξέος

3.3. Μαθηματική προσομοίωση βιολογικών αντιδραστήρων

Μέσω της μαθηματικής προσομοίωσης επιτυγχάνεται η αποτύπωση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στους βιολογικούς αντιδραστήρες σε μαθηματικές σχέσεις, καθώς και η σύγκριση των αποτελεσμάτων τους με πειραματικά δεδομένα, με σκοπό την πρόβλεψη της απόκρισης των αντιδραστήρων στις μεταβολές των συνθηκών λειτουργίας τους. Μεταξύ άλλων, η μαθηματική προσομοίωση έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την περιγραφή βιοτικών (βιολογικών) και αβιοτικών (χημικών, φυσικών) διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε αντιδραστήρες με σκοπό την απονιτροποίηση (Timmermans & Van Haute, 1983; *Æsøy & Ødegaard*, 1994; Christensson et al., 1994; Gujer et al., 1995; Lee & Welander, 1996; Nyberg et al., 1996, Kujawa & Klapwijk, 1999; Martienssen & Schöps, 1999; Stensel & Horne, 2000; Hirata et al., 2001; Foglar et al., 2004; Dold et al., 2005; Walter et al., 2005; Mokhayeri et al., 2006; Gabaldón et al., 2007; Gu et al., 2007; Matsumoto et al., 2007; Ni and Yu, 2008; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Cherchi et al., 2009; Phillips et al., 2009; Eldyasti et al., 2011; Grady et al., 2011; Martin and Nerenberg, 2012; Ni et al., 2014; Petrović et al., 2015; Nelson et al., 2017; Pan et al., 2019; Elawwad et al., 2019; Ji et al., 2019; Lin & Gu, 2020; Rittmann & McCarty, 2020; Hu et al., 2021; Peng et al., 2021; Fan et al., 2022; Deng et al., 2023; Tu et al., 2023). Οι βιολογικές διεργασίες ανάπτυξης των μικροοργανισμών περιγράφονται συνηθέστερα μέσω κινητικών τύπου Monod. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.2) περιλαμβάνονται ενδεικτικές τιμές των παραμέτρων του μοντέλου Monod με σκοπό την απονιτροποίηση.

Συχνά οι μαθηματικές σχέσεις που περιγράφουν τις βιολογικές διεργασίες είναι πολύπλοκες και χρονοβόρες στην επίλυσή τους, με αποτέλεσμα να απαιτείται η χρήση εξειδικευμένων υπολογιστικών λογισμικών. Τα λογισμικά που απαντώνται συνηθέστερα στη βιβλιογραφία και χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν τη συμπεριφορά αντιδραστήρων με σκοπό την απονιτροποίηση, είναι τα BioWin, AQUASIM και AQUIFAS (Koch et al., 2000; Walter et al., 2005; Matsumoto et al., 2007; Ni and Yu, 2008; Eldyasti et al., 2011; Ni et al., 2014; Pan et al., 2019; Elawwad et al., 2019; Ji et al., 2019; Hu et al., 2021; Fan et al., 2022; Deng et al., 2023; Tu et al., 2023). Τα λογισμικά αυτά δίνουν τη δυνατότητα προσομοίωσης αντιδραστήρων (πχ αιωρούμενης και προσκολλημένης βιομάζας) όπου μπορούν να λαμβάνουν χώρα φυσικοχημικές και βιολογικές διεργασίες, ανάλογα με τις ανάγκες του χρήστη (<https://envirosim.com/>; <https://www.eawag.ch/en/>; <http://www.aquifas.com/>).

Πίνακας 3.2: Κινητικές παράμετροι κατά την απονιτροποίηση (μ_{max} : μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης για την αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών, K_s : σταθερές ημικορεσμού για το εκάστοτε οργανικό υπόστρωμα, νιτρικά και νιτρώδη)(*)

Πηγή άνθρακα	μ_{max}		$K_{s,org}$		K_{NO_3} (mg N/L)	K_{NO_2} (mg N/L)	Βιβλιογραφική Πηγή
	$\mu_{max}^{NO_3}$ (1/d)	$\mu_{max}^{NO_2}$ (1/d)	(mg COD/L)	(mg C/L)			
	0.852 (25°C)						Timmermans & Van Haute (1983)
	0.77 (15°C) – 2.06 (25°C)						Christensson et al. (1994)
	0.67-1 (15°C)						Lee & Welander (1996)
	0.4-0.5 (13°C)						Nyberg et al. (1996)
	0.5 (με εκχύλισμα ζύμης)				0.003		Foglar et al. (2004)
	0.56 (13°C) – 6.29 (20°C)						Dold et al. (2005)
Μεθανόλη	0.4-0.5 (13°C) – 1.0 (19°C)						Mokhayeri et al. (2006)
					112		Gabaldón et al. (2007)
	0.34 (10°C) – 1.2 (20°C)		5	1.3(**)			Onnis-Hayden & Gu (2008)
	0.3 (10°C) – 1.3 (20°C)		15.6	3.9(**)			Cherchi et al. (2009)
	7.92		6.6	1.7(**)	0.1-0.2		Grady et al. (2011)
	1.86		13.7	3.4(**)			Rittmann & McCarty (2020)

Πηγή άνθρακα	μ_{max}		$K_{s,org}$		K_{NO3} (mg N/L)	K_{NO2} (mg N/L)	Βιβλιογραφική Πηγή
	μ_{max}^{NO3}	μ_{max}^{NO2}	(mg COD/L)	(mg C/L)			
	(1/d)	(1/d)					
Αιθανόλη	1.9 (15°C) – 4.8 (25°C)						Christensson et al. (1994)
	1-1.3 (13°C) – 3.7 (19°C)						Nyberg et al. (1996)
	2.18 (15°C)						Lee & Welander (1996)
			1.0	0.38(**)			Kujawa & Klapwijk (1999)
Οξικά ιόντα	3.12-4.8		176-197(**)	67-75			Martienssen & Schöps (1999)
	1.2 (13°C) – 3.5 (19°C)						Mokhayeri et al. (2006)
			38.1	14.5(**)			Cherchi et al. (2009)
	0.434	0.121			226.35	4.23	Lin & Gu (2020)
Σουκρόζη	7.4		5.4				Petrović et al. (2015)
MicroC™	3.66		20				Onnis-Hayden & Gu (2008)
	1.2 (10°C) – 3.7 (20°C)		38.6				Cherchi et al. (2009)
TSB (Tryptic Soy Broth)	7.44-13.9			107-187			Martienssen & Schöps (1999)
Σιρόπι καλαμποκιού	1.3-1.4 (13°C) – 3.5 (19°C)						Nyberg et al. (1996)
	1.3 (13°C) – 3.7 (19°C)						Mokhayeri et al. (2006)

Πηγή άνθρακα	μ_{\max}		$K_{s,org}$		K_{NO_3} (mg N/L)	K_{NO_2} (mg N/L)	Βιβλιογραφική Πηγή
	$\mu_{\max}^{NO_3}$	$\mu_{\max}^{NO_2}$	(mg COD/L)	(mg C/L)			
	(1/d)	(1/d)					
Γαλακτοκομικά απόβλητα	1.91						Onnis-Hayden & Gu (2008)
Απόβλητα οινοποιείου	1.43						Onnis-Hayden & Gu (2008)
Απόβλητα ζυθοποιίας	1.08						Onnis-Hayden & Gu (2008)
Απόβλητα επεξεργασίας ζάχαρης	1.89						Onnis-Hayden & Gu (2008)
Αστικά λύματα					0.50		Gujer et al. (1995)
	3.2		5		0.1		Phillips et al. (2009)
	3.6		8.6				Stensel & Horne (2000)
	3.12		1				Rittmann & McCarty (2020)
Υδρολυμένη λάσπη	0.61		3		1.4		Æsøy & Ødegaard (1994)
Παράκτια ιζήματα	38.4			1.0	2		Gu et al. (2007)
PVA-SA				75.10			Peng et al. (2021)
PS				38.30			Peng et al. (2021)
PBS				24.22			Peng et al. (2021)

Πηγή άνθρακα	μ_{max}		$K_{s,org}$		K_{NO_3}	K_{NO_2}	Βιβλιογραφική Πηγή
	$\mu_{max}^{NO_3}$	$\mu_{max}^{NO_2}$	(mg COD/L)	(mg C/L)	(mg N/L)	(mg N/L)	
	(1/d)	(1/d)					
3P				21.28			Peng et al. (2021)
Υδρογόνο	1.36						Rittmann & McCarty (2020)
Θείο	0.81						Rittmann & McCarty (2020)

(*) με γκρι χρώμα σημειώνονται οι τιμές, όπως προέκυψαν ύστερα από επεξεργασία των δεδομένων που παρατίθενται στις βιβλιογραφικές αναφορές, (**) όπως προέκυψε από σχετικούς υπολογισμούς για 1.07 g COD/g οξικού, 2.08 g COD/g αιθανόλης, 1.50 g COD/g μεθανόλης, 1.07 g COD/g γλυκόζης, 1.22 g COD/g γλυκερόλης και 1.51 g COD/g προπιονικού οξέος

3.4. Αντικείμενο και σκοπός της παρούσας Διατριβής

Αντικείμενο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής είναι η ανάπτυξη βιολογικού απονιτροποιητικού αντιδραστήρα σταθερής κλίνης και η πειραματική διερεύνηση των κύριων παραμέτρων λειτουργίας του συστήματος, προκειμένου ο αντιδραστήρας αυτός να ανταποκρίνεται, με υψηλές αποδόσεις, στην επεξεργασία υγρών βιομηχανικών αποβλήτων που περιέχουν μέταλλα.

Τα ηλεκτρονικά απόβλητα είναι η κατηγορία των αποβλήτων με τον ταχύτερο ρυθμό ετήσιας αύξησης σε παγκόσμιο επίπεδο (Widmer et al., 2005; Ilankoon et al., 2018). Μέρη αυτών, όπως οι Πλακέτες Τυπωμένων Κυκλωμάτων (ΠΤΚ), περιέχουν συχνά μέταλλα σε σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά από τα συμβατικά μεταλλεύματα (Rao et al., 2020). Έτσι, τα ηλεκτρονικά απόβλητα είναι ελκυστικοί πόροι για την ανάκτηση μετάλλων χρησιμοποιώντας υδρομεταλλουργικές διεργασίες (Tuncuk et al., 2012; Chagnes et al., 2016; Birloaga & Vegliò, 2016, 2022).

Επειδή οι ΠΤΚ εμφανίζουν υψηλές περιεκτικότητες σε σίδηρο (Fe), χαλκό(Cu), ψευδάργυρο (Zn) και (Ni) (Kaya et al., 2016), ταυτόχρονα με άλλα βασικά και πολύτιμα μέταλλα προς ανάκτηση, το σύστημα που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής μελετήθηκε παρουσία των μετάλλων αυτών σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/L. Επίσης, η παρούσα Διατριβή εστιάζει σε υγρά βιομηχανικά απόβλητα που περιέχουν ταυτόχρονα νιτρικά και χλωριόντα σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα οποία είναι δυνατόν να προέρχονται από τα εκχυλιστικά μέσα, όπως το υδροχλωρικό οξύ, το νιτρικό οξύ και το βασιλικό νερό, κατά την υδρομεταλλουργική ανάκτηση βασικών και πολύτιμων μετάλλων (Sadrnezhad et al, 2006; Bosman, 2009; Akcil et al., 2015; Birloaga & Vegliò, 2018; Rao et al., 2020; Mir & Dhawan, 2022; Do et al., 2023; Vlasopoulos et al., 2023).

Ο σκοπός της παρούσας Διατριβής είναι να διερευνήσει πειραματικά και να αποδείξει τη δυνατότητα μικροβιακής απονιτροποίησης σε υγρά βιομηχανικά απόβλητα που προέρχονται από υδρομεταλλουργική διεργασία. Τα υγρά αυτά απόβλητα περιέχουν συνήθως υπολείμματα εκχυλιστικών μέσων, όπως το νιτρικό και το υδροχλωρικό οξύ, καθώς και διαλυτά είδη μετάλλων. Η προτεινόμενη διαδικασία οφείλει να ικανοποιεί ταυτόχρονα τρεις στόχους: (1) εξουδετέρωση της εκροής, (2) απομάκρυνση των νιτρικών ιόντων και, (3) απομάκρυνση των διαλυτών ειδών μετάλλων με μηχανισμούς βιοκαταβύθισης. Κατά τη χρονική στιγμή που τέθηκαν οι παραπάνω στόχοι, αλλά και κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διατριβής, δεν υπήρχαν στη βιβλιογραφία τέτοια αντίστοιχα αποτελέσματα.

Για τους σκοπούς αυτούς, σχεδιάστηκε, κατασκευάστηκε και τέθηκε σε λειτουργία βιολογικός αντιδραστήρας προσκολλημένης βιομάζας με πορώδες πληρωτικό υλικό που ευνοεί την ανάπτυξη βιολογικής στιβάδας μικροοργανισμών (Biofilm) στους πόρους και στην επιφάνειά του και, ταυτόχρονα, παρέχει τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία για τον μικροβιακό μεταβολισμό. Ο αντιδραστήρας εμβολιάστηκε με το στέλεχος *Halomonas denitrificans* που είναι ικανό να ανάγει πλήρως τα νιτρικά

ιόντα σε αέριο άζωτο (González-Domenech et al., 2010; Felgate et al., 2012; Wang & Shao, 2021) και παρουσιάζει αντοχή σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας, δηλαδή υψηλής συγκέντρωσης χλωριόντων (Miao et al., 2015).

Ο βιολογικός αντιδραστήρας, αφότου δοκιμάστηκε πειραματικά αρχικά σε συνθετικά απόβλητα, αποτέλεσε μέρος του διαγράμματος ροής πιλοτικής εφαρμογής για την επεξεργασία ΠΤΚ με στόχο την ανάκτηση χαλκού (Cu), κασσιτέρου (Sn), χρυσού (Au) και αργύρου (Ag). Οι πιλοτικές δοκιμές σε πραγματικά απόβλητα υδρομεταλλουργικής κατεργασίας ΠΤΚ είχαν ως στόχο τη διερεύνηση της απόδοσης του απονιτροποιητικού συστήματος παρουσία και άλλων μετάλλων που περιέχονται στις ΠΤΚ, όπως για παράδειγμα μολύβδου (Pb), κοβαλτίου (Co) και χρωμίου (Cr), και μπορούν να υπάρχουν σε διαλυτές μορφές στα υγρά απόβλητα της υδρομεταλλουργικής διεργασίας. Συνεπώς, η ενδεχόμενη αρνητική επίδραση τέτοιων μετάλλων στην απονιτροποιητική διεργασία θα έπρεπε να διερευνηθεί πειραματικά.

Τέλος, η μαθηματική προσομοίωση του συστήματος αποτελεί πρόκληση και επιχειρήθηκε με το λογισμικό AQUASIM 2.0, προκειμένου αρχικά να εξεταστεί εάν μπορεί να υπάρξει ικανοποιητική συμφωνία μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης. Η προσομοίωση αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο που συνεισφέρει στην κατανόηση της απονιτροποιητικής διεργασίας παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση της λειτουργίας του απονιτροποιητικού αντιδραστήρα. Έτσι, η βιολογική επεξεργασία βιομηχανικών υγρών αποβλήτων μπορεί να γίνει αποδοτικότερη και αποτελεσματικότερη.

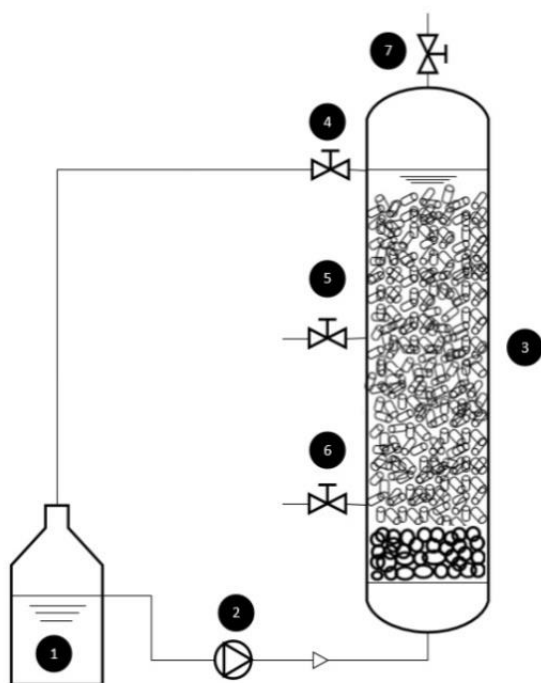
4 | Υλικά και Μέθοδοι

4.1. Πειραματική διάταξη, εμβολιασμός και θέση βιολογικού αντιδραστήρα σε λειτουργία

Στα εδάφια που ακολουθούν περιγράφεται αναλυτικά η διάταξη που περιλαμβάνει τον βιολογικό αντιδραστήρα σε εργαστηριακή κλίμακα, καθώς και η διαδικασία θέσης αυτού σε λειτουργία.

4.1.1 Πειραματική διάταξη

Επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί βιολογικός αντιδραστήρας σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής, η λειτουργία του οποίου βασίζεται στην ανάπτυξη και ακινητοποίηση λεπτού βιολογικού στρώματος στην ενεργή επιφάνεια του πληρωτικού υλικού. Παρόμοιοι βιολογικοί αντιδραστήρες έχουν χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία όξινων αποβλήτων που περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων και μετάλλων (Kousi et al., 2007; Kousi et al., 2011). Η διάταξη του απονιτροποιητικού συστήματος φαίνεται στην Εικόνα 4.1(α) και η υλοποίηση αυτής στην Εικόνα 4.1(β).



(α)



(β)

Εικόνα 4.1: (α) Σχηματική απεικόνιση του βιοαντιδραστήρα: (1) εισροή από τον αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης (CSTR), (2) περισταλτική αντλία, (3) αντιδραστήρας σταθερής κλίνης, (4) εκροή αντιδραστήρα, (5) & (6) θύρες δειγματοληψίας και (7) στόμιο εξαερισμού, και (β) ο απονιτροποιητικός βιολογικός αντιδραστήρας σε εργαστηριακή κλίμακα

Ο βιολογικός αντιδραστήρας κυλινδρικού σχήματος είναι κατασκευασμένος από διάφανο PVC και έχει συνολικό ύψος 45 cm. Η κλίνη του αντιδραστήρα έχει συνολικό ύψος 40 cm και αποτελείται από αδρανή πληρωτικά υλικά υψηλού πορώδους, ώστε να ευνοείται η εγκατάσταση βιομάζας στους πόρους τους. Υλικά που ευνοούν την ανάπτυξη μικροβιακού φιλμ κατασκευάζονται ειδικά και διατίθενται πλέον προς χρήση σε τέτοια συστήματα (<https://filterpro.co.uk/>). Τα 5 cm που απομένουν στην κορυφή της κυλινδρικής στήλης παρέμειναν κενά, ώστε να διασφαλίζεται η ομαλή λειτουργία του αντιδραστήρα σε περιπτώσεις υπερχειλίσσης υγρών και έκλυσης αερίων, πχ αερίου αζώτου, διοξειδίου του άνθρακα, που προέρχονται από την απονιτροποιητική διαδικασία.

Η κλίνη του βιολογικού αντιδραστήρα αποτελείται από δύο στρώματα με διαφορετικό πληρωτικό υλικό πυριτικής σύστασης. Το πρώτο στρώμα απαρτίζεται από το σφαιρικό υλικό Biohome Supergravel που φαίνεται στην Εικόνα 4.2(α), έχει διάμετρο από 1.5 cm έως 3.5 cm, βρίσκεται στη βάση του αντιδραστήρα και καταλαμβάνει ύψος περίπου 7 cm. Το δεύτερο στρώμα απαρτίζεται από το κυλινδρικό υλικό Biohome Ultimate Marine που φαίνεται στην Εικόνα 4.2(δ) και αποτελείται από τεμάχια με μήκος από 2.5 cm έως 3.5 cm και μέση διάμετρο 1 cm. Και τα δύο υλικά είναι τυποποιημένα, κατασκευάζονται από την εταιρία AquaBio UK Ltd. (<https://filterpro.co.uk/>) και επιλέχθηκαν με βάση τις παρακάτω προδιαγραφές: διαθέτουν υψηλή αντοχή στο χρόνο, επιτυγχάνουν χαμηλή πτώση πίεσης, έχουν υψηλό πορώδες (περίπου 50%, σύμφωνα με τις τεχνικές προδιαγραφές του κατασκευαστή), χαρακτηρίζονται από υψηλή ικανότητα διαβροχής και είναι εμποτισμένα με ιχνοστοιχεία, όπως σίδηρο και μαγγάνιο, δημιουργώντας ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η μικροσκοπική δομή των Biohome Supergravel και Biohome Ultimate Marine φαίνεται στην Εικόνα 4.2(β) και (ε), αντίστοιχα. Τα σχετικά φάσματα EDS (Εικόνα 4.2(γ), (στ)) παρουσιάζουν χαρακτηριστικές κορυφές στο πυρίτιο (Si) και στο οξυγόνο (O), προς επιβεβαίωση της πυριτικής τους σύστασης, καθώς και σε άλλα στοιχεία, όπως στον σίδηρο (Fe), στο ασβέστιο (Ca), στο μαγγάνιο (Mn), στο μαγνήσιο (Mg), στο αργίλιο (Al), στο βρώμιο (Br) και στο νάτριο (Na).

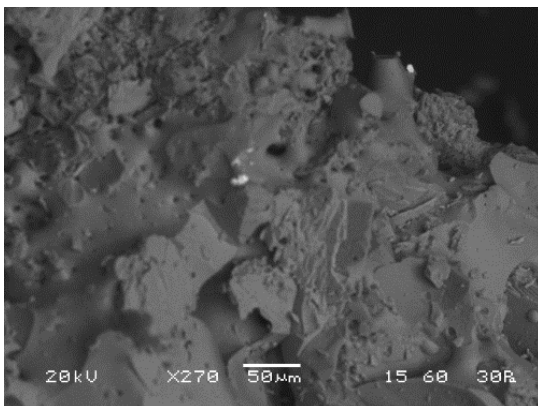
Ο αντιδραστήρας λειτουργεί σε κατάσταση διαλείποντος έργου όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1(β). Ο αντιδραστήρας τροφοδοτείται από μίγμα θρεπτικού μέσου και αρχικά συνθετικού αποβλήτου ορισμένης σύστασης (Πίνακας 4.1) μέσω περισταλτικής αντλίας (Shenchen LabM6). Στην ίδια εικόνα (Εικόνα 4.1(β)) φαίνεται ότι η εκροή του αντιδραστήρα καταλήγει στο δοχείο τροφοδοσίας το οποίο αποτελεί ταυτόχρονα αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης (CSTR) χωρητικότητας 1 L και επανατροφοδοτεί τον βιολογικό αντιδραστήρα με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας. Ο κύκλος της συνεχούς τροφοδοσίας διαρκεί συνήθως μερικές ημέρες, έτσι ώστε ο χρόνος αυτός να επιτρέπει την παρακολούθηση τόσο της εξέλιξης της απονιτροποίησης, όσο και των υπολοίπων παραμέτρων, όπως θα μελετηθεί σε επόμενες παραγράφους. Ο ωφέλιμος όγκος του βιολογικού αντιδραστήρα είναι 1.7 L και αντιστοιχεί σε πορώδες 53%. Έτσι, για κάθε πειραματική δοκιμή απαιτείται συνολικός όγκος διαλύματος 2.7 L.



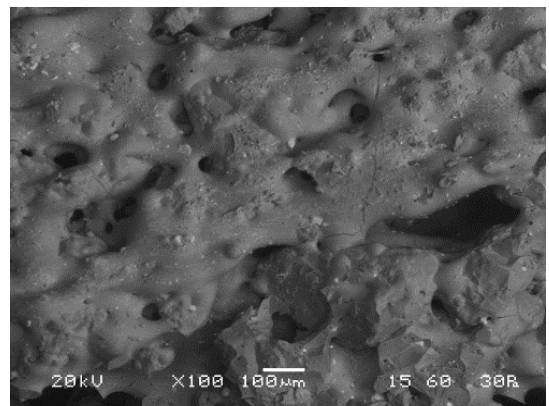
(α)



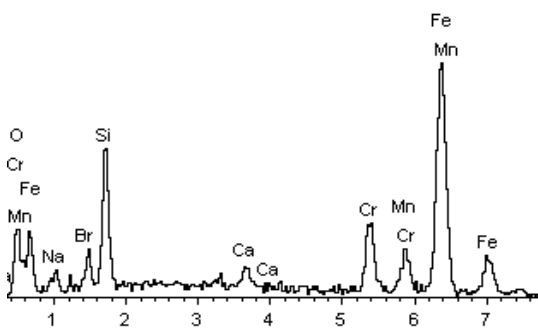
(δ)



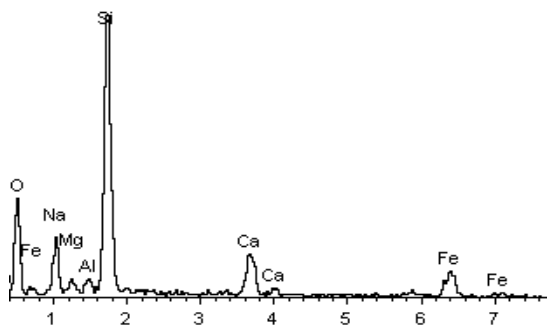
(β)



(ε)



(γ)



(στ)

Εικόνα 4.2: (α) Το πληρωτικό υλικό Biohome Supergavel, (β) η μορφολογία του με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM), (γ) το φάσμα EDS σε επιλεγμένο σημείο της επιφάνειάς του και (δ) Το πληρωτικό υλικό Biohome Ultimate, (ε) η μορφολογία του με χρήση SEM και (στ) το φάσμα EDS σε επιλεγμένο σημείο της επιφάνειάς του

4.1.2 Επιλογή μικροβιακής καλλιέργειας

Η επιλογή της μικροβιακής καλλιέργειας έγινε με τα εξής κριτήρια: (α) αντοχή σε περιβάλλον με υψηλή αλατότητα/συγκέντρωση χλωριόντων (Miao et al., 2015), δηλαδή να ανήκει στην κατηγορία των αλατόφιλων μικροοργανισμών, (β) ικανότητα πλήρους αναγωγής των νιτρικών ιόντων σε αέριο άζωτο (González-Domenech et al., 2010; Felgate et al., 2012; Wang & Shao, 2021) και (γ) μη παθογόνος δράση

στον άνθρωπο. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο μικροοργανισμός του *Halomonas denitrificans* συγκεντρώνει όλα τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Μάλιστα, μέχρι τη σύνταξη της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής δεν έχει καταγραφεί βιβλιογραφικά η παρουσία του μικροοργανισμού *Halomonas denitrificans* σε απονιτροποιητικά συστήματα εργαστηριακής ή πιλοτικής κλίμακας.

Το βακτήριο *Halomonas denitrificans* είναι αερόβιο, αρνητικό κατά Gram, μη σπορογόνο, που απομονώθηκε και καταγράφηκε για πρώτη φορά σε θαλασσινό νερό στο Anmyeondo της Κορέας το 2007 (Kim et al., 2007). Τα κύτταρα έχουν σχήμα βάκιλου (πλάτος 0.6–0.8 μm, μήκος 1.2–1.6 μm) και είναι κινητά με περίτριχα μαστίγια. Οι αποικίες είναι καφέ-κίτρινες και κυκλικού σχήματος. Μπορεί να αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασίας από 5°C έως 50°C (βέλτιστη ανάπτυξη: 25°C–35°C), σε εύρος pH από 7 έως 10 (βέλτιστη ανάπτυξη: pH 8–9) και σε συγκέντρωση NaCl από 2% έως 20% (βέλτιστη ανάπτυξη: 8%–10%). Επίσης, έχει την ικανότητα να ανάγει πλήρως τα νιτρικά ιόντα σε αέριο άζωτο (González-Domenech et al., 2010; Felgate et al., 2012; Wang & Shao, 2021) διαμέσου της παραγωγής νιτρικών ιόντων (Kim et al., 2007).

Η προμήθεια του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε από το Γερμανικό Ινστιτούτο Μικροοργανισμών και Κυτταρικών καλλιεργειών DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) με τη μορφή καλλιέργειας σε στερεό μέσο (DSM-18045). Το DSMZ προτείνει το θρεπτικό μέσο Bacto Marine Broth (DSMZ medium 514 + 10% NaCl – Πίνακας 4.1) για την ανάπτυξη καλλιέργειας του *Halomonas denitrificans* σε υγρό μέσο.

Πίνακας 4.1: Θρεπτικό μέσο Bacto Marine Broth (DSMZ medium 514 + 10% NaCl)

Ουσία	Συγκέντρωση (g/L)
Πεπτόνη (Bacto peptone)	5.0
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	1.0
Κιτρικός σίδηρος (III)	0.10
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12.61
NaCl	100
Na ₂ SO ₄	3.24
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.66
KCl	0.55
NaHCO ₃	0.16
KBr	0.08
H ₃ BO ₃	0.022
NH ₄ NO ₃	0.0016
Na ₂ HPO ₄	0.008

4.1.3 Εμβολιασμός και θέση του βιολογικού αντιδραστήρα σε λειτουργία

Πριν τον εμβολιασμό του βιολογικού αντιδραστήρα με το στέλεχος *Halomonas denitrificans* πραγματοποιήθηκε απολύμανση της κλίνης του βιολογικού αντιδραστήρα (στήλη PVC, πληρωτικό υλικό), των σωλήνων και των συνδέσεων με ανακυκλοφορία διαλύματος αιθανόλης 70% κ.ό. για 3 ώρες σε αυτό. Ακολούθως, το βιολογικό σύστημα ξεπλύθηκε επιμελώς με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό.

Για τον εμβολιασμό του βιολογικού αντιδραστήρα με καθαρή καλλιέργεια του *Halomonas denitrificans* πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη 3 L υγρής καλλιέργειας σε Bacto Marine Broth (Πίνακας 4.1) με προσθήκη 10% NaCl και 1 000 mg/L NO_3^- . Η διαδικασία του εμβολιασμού επαναλήφθηκε τέσσερις φορές και ανά 5 ημέρες, ενώ ο βιολογικός αντιδραστήρας ήταν σε λειτουργία διαλείποντος έργου, με στόχο την ανάπτυξη στρώματος ακινητοποιημένης βιομάζας (βιοφίλμ) στην επιφάνεια και στους πόρους του πληρωτικού υλικού. Η αναγωγή των νιτρικών ιόντων του θρεπτικού μέσου, χωρίς επιπλέον προσθήκη υγρής καλλιέργειας, παρατηρήθηκε 21 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό, γεγονός που αποδεικνύει την επιτυχημένη εγκατάσταση ακινητοποιημένης βιομάζας του στελέχους *Halomonas denitrificans* στον αντιδραστήρα. Μετά την επιβεβαιωμένη επιτυχή ανάπτυξη του βιοφίλμ στον αντιδραστήρα, οι κύκλοι πειραμάτων που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν σε μη στείρες συνθήκες.

4.2 Πειραματικές δοκιμές

Το σύνολο των δοκιμών πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα δείγματα λαμβάνονταν από την εκροή του βιολογικού αντιδραστήρα, προτού αυτή καταλήξει στον αντιδραστήρα πλήρους ανάμιξης (CSTR) (Εικόνα 4.1(α), σημείο 4). Οι δοκιμές πραγματοποιούνταν μετά από αποστράγγιση της στήλης και τροφοδοσία με νέο διάλυμα που περιείχε και το θρεπτικό μέσο.

4.2.1 Μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την απονιτροποίηση

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 2, οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν τη μικροβιακή απονιτροποίηση είναι η πηγή οργανικού άνθρακα, η τιμή του λόγου άνθρακα υποστρώματος και αζώτου νιτρικών (C/N), η αρχική συγκέντρωση νιτρικών, η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στην τροφοδοσία ή κατά την εξέλιξη της απονιτροποίησης, το αρχικό pH, η συγκέντρωση χλωριόντων (αλατότητα), η παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων και η παρουσία θεικών ιόντων (Singh & Tripathy, 2007; Osaka et al., 2008; Ge et al., 2012; Srinandan et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014; Lee et al., 2019; Madigan et al., 2018; Xu et al., 2018; Albina et al., 2019; Rittmann & McCarty, 2020; Wang et al., 2021; Fu et al., 2022; Zhang et al., 2022b; Zeng et al., 2023).

Έτσι, πραγματοποιήθηκαν κύκλοι λειτουργίας του αντιδραστήρα με στόχο να μελετηθεί η επίδραση καθεμιάς από τις παραμέτρους αυτές και ειδικότερα:

- (1) Τα νιτρικά ιόντα, σε αρχικές συγκεντρώσεις 750 mg/L, 2 750 mg/L και 5 750 mg/L NO_3^- . Οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων παραμέτρων στο διάλυμα (pH, NaCl, SO_4^{2-} και διαλυτά μέταλλα: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.2).
- (2) Τα νιτρωδή ιόντα, ως αποκλειστικός δέκτης ηλεκτρονίων, σε αρχική συγκέντρωση 2 000 mg/L NO_2^- ως NaNO_2 . Οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων παραμέτρων στο διάλυμα (pH, NaCl, SO_4^{2-} και διαλυτά μέταλλα: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Αρχικές τιμές pH, αλατότητας και συγκεντρώσεων θειικών ιόντων και ιόντων μετάλλων (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) κατά τη μελέτη της αρχικής συγκέντρωσης του δέκτη ηλεκτρονίων (νιτρικών και νιτρωδών)

Εξεταζόμενη παράμετρος	pH (-)	NaCl (%)	SO_4^{2-} (mg/L)	Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} (mg/L)
Δέκτης ηλεκτρονίων (NO_3^- , NO_2^-)	6.0-6.5	10	2 200	-

- (3) Το αρχικό pH, σε τιμές 3, 4, 5, 6, 6.8 και 8. Η ρύθμιση του pH πραγματοποιούνταν με χρήση πρότυπων διαλυμάτων HCl 0.1 N (pH 3, 4, 5, 6) και NaOH 0.1 N (pH 8). Οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων παραμέτρων στο διάλυμα (NO_3^- , NaCl, SO_4^{2-} και διαλυτά μέταλλα: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.3: Αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, αλατότητας, θειικών ιόντων και ιόντων μετάλλων (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) κατά τη μελέτη των αρχικών τιμών pH

Εξεταζόμενη παράμετρος	NO_3^- (mg/L)	NaCl (%)	SO_4^{2-} (mg/L)	Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} (mg/L)
pH	1 250	10	2 200	-

- (4) Τα χλωριόντα, σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις αλατότητας 5%, 7.5% και 10% NaCl, σε αρχικό pH 3 και με αντίστοιχες αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 1 250 mg/L, 2 750 mg/L και 3 250 mg/L NO_3^- . Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών και των υπολοίπων παραμέτρων στο διάλυμα (pH, SO_4^{2-} και διαλυτά μέταλλα: Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) για κάθε εξεταζόμενη συγκέντρωση αλατότητας φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4: Αρχική τιμή pH και αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, θειικών ιόντων και ιόντων μετάλλων (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) κατά τη μελέτη της αλατότητας

Εξεταζόμενη παράμετρος	pH (-)	NO_3^- (mg/L)	SO_4^{2-} (mg/L)	Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} (mg/L)
NaCl 10%		1 250		
NaCl 7.5%	3.0	2 750	2 200	-
NaCl 5%		3 250		

(5) Η παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων.

Η χρήση οξέων ως εκχυλιστικών μέσων κατά την υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων από ΠΤΚ οδηγεί σε παρουσία υπολειμματικών συγκεντρώσεων μετάλλων στα υγρά απόβλητα της υδρομεταλλουργίας (Πίνακας 1.6). Για τον λόγο αυτό, η επιλογή των μετάλλων που προστίθονταν στο θρεπτικό μέσο του βιολογικού αντιδραστήρα βασίστηκε σε βιβλιογραφικά δεδομένα, σχετικά με το μεταλλικό περιεχόμενο των ΠΤΚ, όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.5).

Πίνακας 4.5: Ποσοστιαία (%) σύσταση των Πλακετών Τυπωμένων Κυκλωμάτων (ΠΤΚ) σε μέταλλα

Μέταλλο	Βιβλιογραφική Πηγή			
	Goodship et al. (2019)		Kaya (2016)	
Cu	21.62	9.7	10-20	6-27
Sn	10.12	2.15	-	1.0-5.6
Fe	0.21	9.2	1-3	1.2-8.0
Ni	0.036	0.69	1-3	0.3-5.4
Pb	3.20	2.24	1-5	1.0-4.2
Al	1.36	5.8	-	2.0-7.2
Zn	0.056	-	-	0.2-2.2
Pd	-	0.01	0.01	<1
Sb	0.001	-	-	0.1-0.4
Cr	0.027	-	-	-
Cd	-	-	-	-
Au	-	0.023	0.03	<1
Ag	-	0.06	0.05	<1
Μεταλλικό περιεχόμενο	36.63	29.87	~30	~40

Σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 4.5), οι ΠΤΚ περιέχουν, σε υψηλά ποσοστά, τα εξής μέταλλα: χαλκό (Cu) από 6% έως 27%, κασσίτερο (Sn) έως 10.12%, σίδηρο (Fe) από 0.21% έως 9.2%, νικέλιο (Ni) από 0.036% έως 5.4%, μόλυβδο (Pb) από 1% έως 5%, αργίλιο (Al) από 1.36% έως 7.2% και ψευδάργυρο (Zn) από 0.056% έως 2.2% (Καγα, 2016; Goodship et al., 2019). Μεταξύ των μετάλλων αυτών, η μικροβιακή απονιτροποιητική δραστηριότητα είναι δυνατόν να επηρεάζεται από την παρουσία του χαλκού (Cu), του σιδήρου (Fe), του νικελίου (Ni), του μολύβδου (Pb) και του ψευδαργύρου (Zn), σύμφωνα με τη θεωρία της παραγράφου 2.2.5.6. Εξαιτίας της μικρότερης επίδρασης του μολύβδου στη μικροβιακή απονιτροποίηση σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέταλλα, επιλέχθηκε να μελετηθεί η εξέλιξη της απονιτροποίησης παρουσία χαλκού (Cu), σιδήρου (Fe), νικελίου (Ni) και ψευδαργύρου (Zn).

Η παρουσία των διαλυτών μετάλλων χαλκού (Cu^{2+}), σιδήρου (Fe^{2+}), νικελίου (Ni^{2+}) και ψευδαργύρου (Zn^{2+}) μελετήθηκε μεμονωμένα, σε συγκεντρώσεις 50 mg/L και 100 mg/L, και ως μίγμα σε συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L. Τα μέταλλα προστίθονταν στο διάλυμα τροφοδοσίας ως $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και ZnCl_2 , αντίστοιχα. Το σύνολο των δοκιμών πραγματοποιήθηκε με αρχική συγκέντρωση νιτρικών ιόντων 2 750 mg/L-3 250 mg/L, αρχική τιμή pH 3 και 5% NaCl, παρουσία 2 200 mg/L θειικών ιόντων (Πίνακας 4.6).

Πίνακας 4.6: Αρχική τιμή pH και αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, αλατότητας και θειικών ιόντων κατά τη μελέτη της παρουσίας διαλυτών μετάλλων (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+})

Εξεταζόμενη παράμετρος	pH (-)	NO_3^- (mg/L)	NaCl (%)	SO_4^{2-} (mg/L)
Διαλυτά μέταλλα (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+})	3.0	2 750-3 250	5	2 200

- (6) Η παρουσία θειικών ιόντων (SO_4^{2-}), με αρχική συγκέντρωση νιτρικών ιόντων 2 750 mg/L-3 250 mg/L, αρχικό pH 3, 5% NaCl και παρουσία διαλυτών μετάλλων ως μίγμα σε συγκέντρωση 50 mg/L το καθένα.

Πίνακας 4.7: Αρχική τιμή pH και αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών, αλατότητας και διαλυτών μετάλλων (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) κατά τη μελέτη της παρουσίας θειικών ιόντων

Εξεταζόμενη παράμετρος	pH (-)	NO_3^- (mg/L)	NaCl (%)	Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} (mg/L)
SO_4^{2-}	3.0	2 750-3 250	5	50

Η μελέτη των παραμέτρων που επιδρούν στην απονιτροποίηση οδήγησε στην ανάγκη αφαίρεσης των θειικών αλάτων (Na_2SO_4) από το διάλυμα τροφοδοσίας Bacto Marine Broth (Πίνακας 4.1) και σε μείωση της αλατότητας στην ελάχιστη τιμή για την οποία μελετήθηκε (5% NaCl). Επίσης, η ανάγκη επεξεργασίας πραγματικών αποβλήτων που προέρχονται από την υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων από πλακέτες τυπωμένων κυκλωμάτων (ΠΤΚ) και περιέχουν υπολειμματικές συγκεντρώσεις μετάλλων οδήγησε σε συστηματική τροφοδοσία του αντιδραστήρα με μίγμα διαλυτών μετάλλων (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). Ο αντιδραστήρας επιλέχθηκε να τροφοδοτείται με διάλυμα που περιείχε μίγμα μετάλλων σε συγκέντρωση 20 mg/L το καθένα. Η προσθήκη κάθε μετάλλου στο διάλυμα τροφοδοσίας πραγματοποιούνταν χρησιμοποιώντας αντίστοιχα πυκνά διαλύματα συγκέντρωσης 50 000 mg/L. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονταν διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα χλωριούχου άλατος του μετάλλου ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2) σε μίγμα υπερκάθαρου νερού 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3) και υδροχλωρικού οξέος (HCl) αναλυτικής καθαρότητας (αναλογία: 1 μέρος HCl σε 9 μέρη υπερκάθαρου νερού). Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, το διάλυμα τροφοδοσίας του αντιδραστήρα τροποποιήθηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.8).

Πίνακας 4.8: Τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Bacto Marine Broth

Ουσία	Συγκέντρωση (g/L)
Πεπτόνη (Bacto Peptone)	5.0
Εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)	1.0
NaNO_3 (NO_3^- 2 000 mg/L)	2.74
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.61
NaCl	50
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.66
KCl	0.55
NaHCO_3	0.16
KBr	0.08
H_3BO_3	0.022
NH_4NO_3	0.0016
Na_2HPO_4	0.008
Διάλυμα $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 50 g/L Cu^{2+}	0.40 mL/L
Διάλυμα $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 g/L Fe^{2+}	0.40 mL/L
Διάλυμα $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50 g/L Ni^{2+}	0.40 mL/L
Διάλυμα ZnCl_2 50 g/L Zn^{2+}	0.40 mL/L

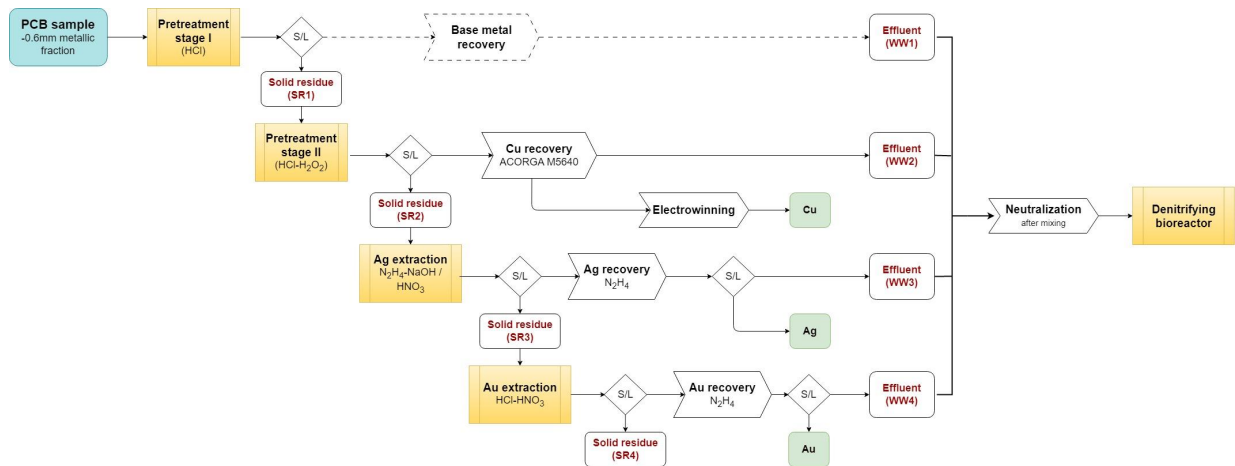
(7) Μελετήθηκε η επίδραση του λόγου C/N, δηλαδή του λόγου της συγκέντρωσης άνθρακα οργανικού υποστρώματος και αζώτου νιτρικών που περιέχονται στο θρεπτικό μέσο του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 4.8), στην απονιτροποίηση. Επίσης, μελετήθηκε η μέγιστη ανοχή του αντιδραστήρα σε νιτρικά ιόντα παρουσία μετάλλων για επιλεγμένο λόγο C/N. Για τους παραπάνω σκοπούς πραγματοποιήθηκαν οι εξής δοκιμές στον βιολογικό αντιδραστήρα:

- Η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων αυξήθηκε από 2 000 mg/L σε 5 000 mg/L στο διάλυμα τροφοδοσίας (Πίνακας 4.8), με βήμα 1 000 mg/L.
- Η συγκέντρωση οργανικού υποστρώματος αυξήθηκε κατά 20% και 50% στο διάλυμα τροφοδοσίας (Πίνακας 4.8), με συγκέντρωση νιτρικών ιόντων 5 000 mg/L.
- Για επιλεγμένη τιμή C/N η συγκέντρωση νιτρικών αυξήθηκε από 5 000 mg/L σε 6 000 mg/L, σε 9 000 mg/L και τελικά σε 14 000 mg/L.

Οι δοκιμές πραγματοποιούνταν μετά από αποστράγγιση της στήλης και τροφοδοσία με νέο θρεπτικό μέσο. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιούνταν με τρόπο ώστε να καλύπτεται κατά το δυνατόν το διάστημα διεξαγωγής του πειράματος μέχρι την ολοκλήρωση της απονιτροποίησης.

4.2.2 Βιολογική απονιτροποίηση σε υγρά απόβλητα υδρομεταλλουργίας

Τα απόβλητα υδρομεταλλουργίας προέρχονται από την ανάκτηση βασικών (όπως χαλκός και κασσίτερος) και πολύτιμων μετάλλων (όπως άργυρος και χρυσός) από Πλακέτες Τυπωμένων Κυκλωμάτων (ΠΤΚ) (Vlasopoulos et al., 2023). Το διάγραμμα ροής της υδρομεταλλουργικής διεργασίας απεικονίζεται στην Εικόνα 4.3. Οι τέσσερις ροές αποβλήτων που προκύπτουν (WW1 – WW4) διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους και εξαρτώνται από τα εκχυλιστικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν. Για την εκχύλιση κασσιτέρου και χαλκού χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρικό οξύ (HCl). Συνεπώς, οι αντίστοιχες ροές αποβλήτων WW1 και WW2 περιείχαν υψηλές συγκεντρώσεις χλωριόντων, έως και 102 g/L Cl⁻ (Πίνακας 4.9). Αντίθετα, η εκχύλιση αργύρου πραγματοποιήθηκε με νιτρικό οξύ και προσθήκη 0.05 M NaCl, με αποτέλεσμα το απόβλητο WW3 να περιέχει αυξημένη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων, έως και 223 mg/L NO₃⁻, και χαμηλή συγκέντρωση χλωριόντων (Πίνακας 4.9). Τέλος, η ανάκτηση του χρυσού προϋποθέτει την εκχύλιση με βασιλικό νερό (μίγμα HCl και HNO₃ σε αναλογία 3:1), γεγονός που οδηγεί σε ροή αποβλήτων (WW4) με αυξημένες συγκεντρώσεις τόσο σε νιτρικά ιόντα (έως 173 g/L NO₃⁻), όσο και σε χλωριόντα (Cl⁻) (Πίνακας 4.9).



Εικόνα 4.3: Διάγραμμα ροής υδρομεταλλουργικής διεργασίας

Πίνακας 4.9: Σύσταση των αποβλήτων που προέρχονται από την υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων σε Πλακέτες Τυπωμένων Κυκλωμάτων (ΠΤΚ)

Ροή αποβλήτων	pH	NO ₃ ⁻ (g/L)	Cl ⁻ (g/L)	Concentration (mg/L)				
				Fe ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺
WW1	1.74-2.10	0	56-102	1 310-7 500	140-142	180-700	3 030-3 500	730-1 300
WW2	~0	0	30-78	845-1 500	440-1 950	750-920	490-970	600-1 250
WW3	~0	190-223	0.5-1.2	15-20	5-10	15-20	5-10	1-5
WW4	~0	48.3-173	49-102	230-290	430-510	30-50	35-130	12-1 380

Όπως προκύπτει από τον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 4.9), οι συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, χλωριόντων και διαλυτών μετάλλων υπερβαίνουν πολλαπλάσια τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις για τις οποίες έχει επιβεβαιωθεί η επιτυχής λειτουργία του βιολογικού αντιδραστήρα και αντιστοιχούν σε 10 g/L NO₃⁻, 60.6 g/L Cl⁻ ή 10% NaCl και 100 mg/L διαλυτών μετάλλων (Fe²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺). Για τον λόγο αυτό, οι δοκιμές στον βιολογικό αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκαν ύστερα από διερεύνηση της κατάλληλης προ-επεξεργασίας στην οποία πρέπει να υποβληθούν τα υγρά απόβλητα, ώστε οι συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, χλωριόντων και διαλυτών μετάλλων να είναι ανεκτές από αυτόν. Οι δοκιμές πραγματοποιούνταν έπειτα από αποστράγγιση της στήλης και τροφοδοσία με νέο μέσο που περιείχε την κατάλληλη αναλογία C/N. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιούνταν με τρόπο ώστε να καλύπτεται κατά το δυνατόν το διάστημα διεξαγωγής του πειράματος μέχρι την ολοκλήρωση της απονιτροποίησης.

4.2.3 Επίδραση της πηγής του οργανικού άνθρακα

Η πεπτόνη (bacto peptone) και το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) προτείνονται από το Ινστιτούτο DSMZ ως οι καταλληλότερες πηγές οργανικού άνθρακα για τον μεταβολισμό των *Halomonas denitrificans* (Πίνακας 4.1, Πίνακας 4.8). Επειδή δεν αποτελούν οργανικά μόρια με συγκεκριμένη δομή, αρχικά έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του περιεχόμενου άνθρακα σε αυτά. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.10). Λαμβάνοντας υπόψη την αναλογία πεπτόνης (bacto peptone) και εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) στο θρεπτικό μέσο (Πίνακας 4.8) προκύπτει ότι η συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα σε αυτό είναι 2 340 mg/L και προέρχεται κατά 85% από την πεπτόνη και κατά 14% από το εκχύλισμα ζύμης.

Πίνακας 4.10: Σύσταση πεπτόνης (bacto peptone) και εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) σε άνθρακα και άζωτο

Ουσία	Bacto peptone	Yeast extract
Άνθρακας	Οργανικός (g C/gr υποστρώματος)	0.401
	Ανόργανος (g C/gr υποστρώματος)	0.000
Άζωτο (g N/gr υποστρώματος)	0.155	0.115

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια αντικατάστασης της πεπτόνης από εναλλακτική πηγή οργανικού άνθρακα με συγκεκριμένο οργανικό μόριο, ώστε να καταστεί δυνατή η μελέτη της στοιχειομετρίας της απονιτροποίησης, αλλά και η πιθανή ταχύτερη κατανάλωση του οργανικού άνθρακα, χωρίς υπολειμματική συγκέντρωση στην εκροή στο τέλος της απονιτροποίησης. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε κωνικές φιάλες, τα αποτελέσματα των οποίων συγκρίθηκαν αργότερα με αντίστοιχες δοκιμές στον αντιδραστήρα.

Η πλέον μελετημένη οργανική ένωση που έχει χρησιμοποιηθεί σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας από στελέχη του βακτηρίου *Halomonas spp.* με σκοπό την απονιτροποίηση είναι τα οξικά ιόντα (οξικό οξύ ή οξικό νάτριο) (Yoshie et al., 2005; Osaka et al., 2008; Miao et al., 2015-Πίνακας 3.1). Επίσης, η αιθανόλη έχει μελετηθεί συστηματικά ως δότης ηλεκτρονίων κατά την απονιτροποίηση, χωρίς να περιορίζει τη μικροβιακή ποικιλότητα, όπως η μεθανόλη (Srinandan et al., 2012; Papirio et al., 2014; Sun et al., 2016b; Letelier-Gordo et al., 2020-Πίνακας 3.1). Έτσι, στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής επιλέχθηκε να μελετηθούν δύο οργανικές πηγές άνθρακα εναλλακτικές του συνδυασμού πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης: τα οξικά ιόντα (ως οξικό νάτριο) και η αιθανόλη. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) στην απονιτροποίηση.

4.2.3.1 Δοκιμές ανάπτυξης του *Halomonas denitrificans* σε οξικό νάτριο και αιθανόλη

Διερευνήθηκε η δυνατότητα απονιτροποίησης ύστερα από αντικατάσταση της πεπτόνης από οξικό νάτριο και αιθανόλη στο τροποποιημένο θρεπτικό μέσο (Πίνακας 4.8), απουσία μετάλλων και θειικών ιόντων. Οι δοκιμές πραγματοποιούνταν ύστερα από ανάμιξη 250 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου με 10 mL λάσπης από τον αντιδραστήρα. Η λάσπη λαμβάνονταν από τα πρώτα 10 cm του αντιδραστήρα, 24 ώρες μετά την πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων στο διάλυμα τροφοδοσίας. Τα οξικά ιόντα προστίθονταν στο θρεπτικό μέσο ως οξικό νάτριο (CH_3COONa) και η αιθανόλη ως διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) καθαρότητας υψηλότερης από 95%, σε συγκεντρώσεις 6.83 g $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{L}$ (ή 4.9 g $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{L}$) και 3.83 g $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{L}$, ώστε η τιμή του λόγου C/N να είναι 5.18 g C/g $\text{NO}_3\text{-N}$ (δηλαδή ίση με αυτή στο τροποποιημένο θρεπτικό μέσο, Πίνακας 4.8). Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιούνταν ανά 24 ώρες, μέχρι να ολοκληρωθεί η αναγωγή των νιτρικών ιόντων ή να παρατηρηθεί αναχαίτιση της απονιτροποίησης.

Για κάθε δοκιμή υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης (αναγωγής νιτρικών) σύμφωνα με τη Σχέση (Σ.9). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν σχετικά με τις τρεις διαφορετικές πηγές άνθρακα (πεπτόνη, οξικό νάτριο, αιθανόλη) συγκρίθηκαν μεταξύ τους.

$$q = \frac{\Delta C_{\text{NO}_3\text{-N}}}{\Delta t * [\text{VSS}]} \quad (\Sigma.9)$$

όπου,

$\Delta C_{\text{NO}_3\text{-N}}$, η μεταβολή στη συγκέντρωση αζώτου νιτρικών

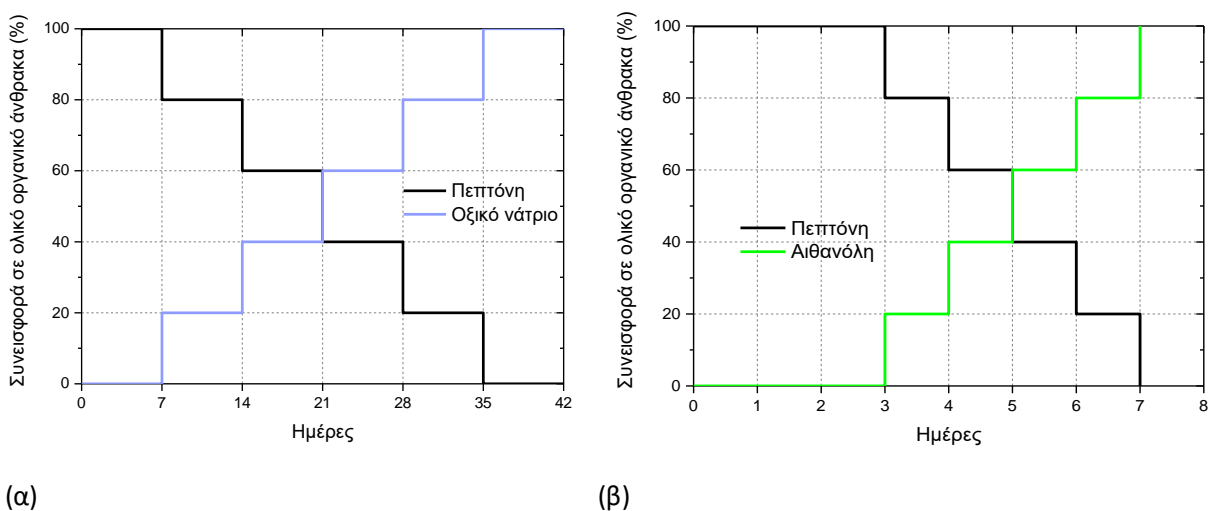
Δt , η μεταβολή του χρόνου

[VSS], η συγκέντρωση πτητικών αιωρούμενων στερεών στο διάλυμα

4.2.3.2 Δοκιμές λειτουργίας του αντιδραστήρα

Η μετάβαση σε διαφορετική πηγή οργανικού άνθρακα/ηλεκτρονίων κατά την ετεροτροφική απονιτροποίηση μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ρυθμού απονιτροποίησης. Προκειμένου να αποτραπεί το φαινόμενο αυτό, απαιτείται σταδιακή μετάβαση και επαρκής χρόνος εγκλιματισμού της βιομάζας στη νέα πηγή οργανικού άνθρακα (Nyberg et al., 1996; Hallin & Pell, 1998; Mokhayeri et al., 2006; Cherchi et al., 2009). Δεδομένου ότι δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για την αντικατάσταση της πεπτόνης από εναλλακτική πηγή οργανικού άνθρακα ή το αντίστροφο, πραγματοποιήθηκε σταδιακή αντικατάσταση του 20% του οργανικού άνθρακα της πεπτόνης με

αντίστοιχη συγκέντρωση οργανικού άνθρακα οξικού νατρίου ή αιθανόλης. Έτσι, η πλήρης μετάβαση σε οξικό νάτριο ολοκληρώθηκε εντός 35 ημερών και σε αιθανόλη εντός 7 ημερών (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4: Σταδιακή προσαρμογή του βιολογικού αντιδραστήρα σε διάλυμα τροφοδοσίας με πηγή οργανικού άνθρακα (α) οξικό νάτριο και (β) αιθανόλη

Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για διαφορετικούς λόγους C/N με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο και την αιθανόλη. Η επίδραση της παρουσίας εκχυλίσματος ζύμης στην απονιτροποίηση μελετήθηκε μόνο για την περίπτωση της αιθανόλης. Σε κάθε περίπτωση ο αντιδραστήρας τροφοδοτούνταν με τροποποιημένο θρεπτικό μέσο (Πίνακας 4.8) στο οποίο η πεπτόνη είχε αντικατασταθεί από οξικό νάτριο (CH_3COONa) ή αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης καθαρότητας υψηλότερης από 95%). Οι τιμές του λόγου C/N και οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις οξικού νατρίου-εκχυλίσματος ζύμης και αιθανόλης-εκχυλίσματος ζύμης φαίνονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 4.11, Πίνακας 4.12).

Πίνακας 4.11: Συγκεντρώσεις οξικού νατρίου-εκχυλίσματος ζύμης κατά τις δοκιμές στον βιολογικό αντιδραστήρα, με σκοπό την αντικατάσταση της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης (όπως περιγράφεται στον πίνακα-Πίνακας 4.8), και οι αντίστοιχοι λόγοι C/N

α/α δοκιμής	Οξικό νάτριο			Εκχύλισμα ζύμης		C/N g C/g $\text{NO}_3\text{-N}$
	g $\text{CH}_3\text{COONa/L}$	g $\text{CH}_3\text{COO}^-/\text{L}$	mg C/L	g yeast/L	mg C/L	
1.	6.83	4.92	2 000			5.18
2.	3.42	2.46	1 000	1.00	330	2.95
3.	2.56	1.84	750			2.40

Πίνακας 4.12: Συγκεντρώσεις αιθανόλης-εκχυλίσματος ζύμης κατά τις δοκιμές στον βιολογικό αντιδραστήρα, με σκοπό την αντικατάσταση της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης (όπως περιγράφεται στον πίνακα-Πίνακας 4.8), και οι αντίστοιχοι λόγοι C/N

α/α δοκιμής	Οξικό νάτριο		Εκχύλισμα ζύμης		C/N
	g C ₂ H ₅ OH/L	mg C/L	g yeast/L	mg C/L	g C/g NO ₃ -N
1.	3.83	2 000	1.00	330	5.18
2.	1.25	650	-	-	1.44
3.	0.96	500	1.00	330	1.84
4.	0.96	500	-	-	1.11

Οι δοκιμές πραγματοποιούνταν μετά από αποστράγγιση της στήλης και τροφοδοσία με νέο θρεπτικό μέσο. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιούνταν ανά μία ώρα για τις τέσσερις πρώτες ώρες και με τρόπο ώστε να καλύπτεται κατά το δυνατόν το διάστημα διεξαγωγής του πειράματος μέχρι την πλήρη απονιτροποίηση.

4.3 Δειγματοληψία και παρακολούθηση των παραμέτρων λειτουργίας

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των παραμέτρων στα δείγματα περιγράφονται παρακάτω:

4.3.1 Προσδιορισμός pH

Ο προσδιορισμός του pH στα δείγματα πραγματοποιούνταν ευθύς αμέσως μετά τη δειγματοληψία σε pH-μετρο Hach sensION™ με ηλεκτρόδιο HACH 51910. Η βαθμονόμηση του οργάνου πραγματοποιούνταν καθημερινά πριν την έναρξη των δειγματοληψιών, με χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων Hach σε pH 4 και 7, έτσι ώστε η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης του οργάνου να βρίσκεται στο εύρος 58±3 mV, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

4.3.2 Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας (Optical Density-OD)

Η οπτική πυκνότητα αποτελεί ένδειξη της συγκέντρωσης των μικροβιακών κυττάρων σε ένα δείγμα. Ο προσδιορισμός της οπτικής πυκνότητας στα δείγματα πραγματοποιούνταν αμέσως μετά τη δειγματοληψία, με φασματοφωτομετρία ορατού - υπεριώδους (UV-VIS) σε φασματοφωτόμετρο HACH DR 6000 και σε μήκος κύματος 600 nm. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στον Νόμο Lambert-Beer της Σχέσης (Σ.10) (Οξενκιουν-Πετροπούλου, 2012).

$$A = \varepsilon * b * c$$

(Σ.10)

όπου,

A, η απορρόφηση ή οπτική πυκνότητα

ε , η μοριακή απορροφητικότητα, σε μονάδες αντίστροφου μήκους επί αντίστροφης συγκέντρωσης

b, η οπτική διαδρομή, σε μονάδες μήκους

c, η συγκέντρωση της απορροφούσας ουσίας

Ο μηδενισμός του οργάνου πραγματοποιούνταν με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3).

4.3.3 Προσδιορισμός νιτρικών (NO_3^-) και νιτρωδών ιόντων (NO_2^-)

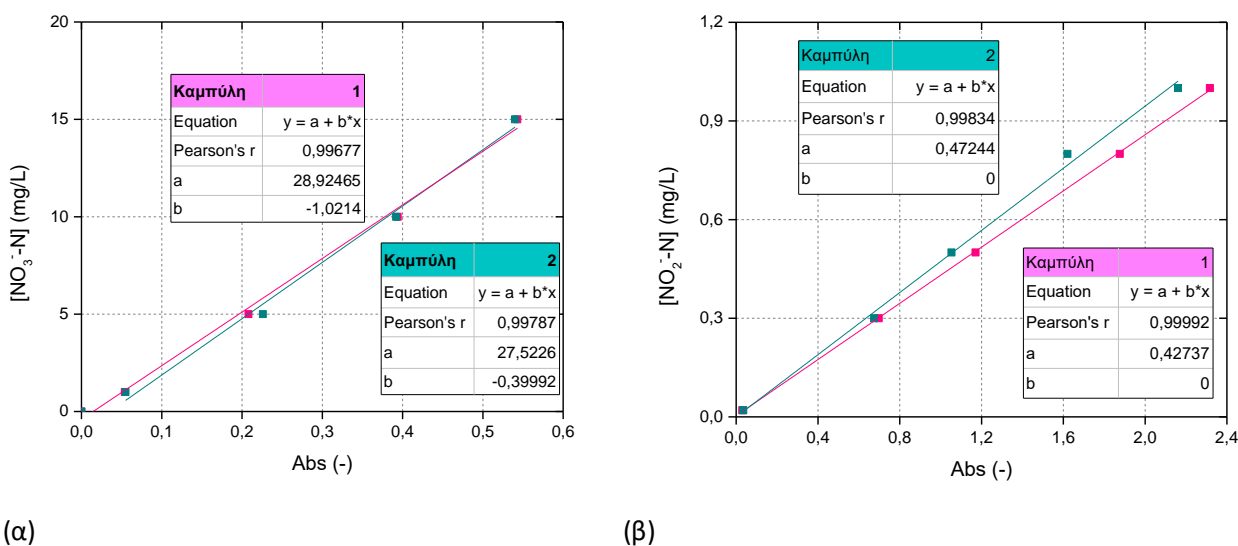
Αρχικά τα δείγματα διηθούνταν με τη βοήθεια αντλίας κενού διαμέσου στείρων μεμβρανών με πόρους 0.20 μm (Whatman™ ME 24/21 ST). Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης NO_3^- και NO_2^- πραγματοποιούνταν σε πρόσφατα ληφθέντα δείγματα με φασματοφωτομετρία ορατού - υπεριώδους (UV-VIS) σε φασματοφωτόμετρο HACH DR 6000.

Η συγκέντρωση NO_3^- προσδιοριζόταν με τη μέθοδο MERCK 1.09713.0001 προσαρμοσμένη στο φασματοφωτόμετρο DR 6000 σε μήκος κύματος 340 nm (Πίνακας 4.13). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη χημική αντίδραση των νιτρικών ιόντων με την ένωση 2,6-dimethylphenol (DMP) από την οποία σχηματίζεται η χημική ένωση 4-nitro-2,6-dimethylphenol παρουσία φωσφορικών και θειικών ιόντων.

Η συγκέντρωση NO_2^- προσδιοριζόταν με τη μέθοδο MERCK 1.14776.0002 προσαρμοσμένη στο φασματοφωτόμετρο HACH DR 6000 σε μήκος κύματος 525 nm (Πίνακας 4.13). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη χημική αντίδραση των νιτρωδών ιόντων με το σουλφανλικό οξύ σε όξινο περιβάλλον, από την οποία σχηματίζεται άλας διαζωνίου, που με τη σειρά του αντιδρά με το N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, προσδίδοντας στο διάλυμα ερυθροβιολετί χρώμα.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης NO_3^- και NO_2^- λαμβάνονταν από πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων. Τα διαλύματα παρασκευάζονταν από το θρεπτικό μέσο Bacto Marine Broth (Πίνακας 4.1) με συγκέντρωση 500 mg/L NO_3^- ως NaNO_3 ή 500 mg/L NO_2^- ως NaNO_2 , αντίστοιχα, και με αλατότητα προσαρμοσμένη στις εκάστοτε συνθήκες των δοκιμών, έπειτα από κατάλληλες αραιώσεις με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3). Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνονταν υπόψη οι παρεμβολές που πιθανώς δημιουργούνταν κατά τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων εξαιτίας φύσης του θρεπτικού μέσου. Μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης κάθε ένδειξη απορρόφησης ακτινοβολίας στο φασματοφωτόμετρο (Abs)

αντιστοιχίζεται στη συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών ιόντων του διαλύματος. Η γραμμική περιοχή καθορίστηκε σε 0-20 mg/L NO₃⁻-N για τα νιτρικά και σε 0.02-1 mg/L NO₂⁻-N για τα νιτρώδη ιόντα. Ενδεικτικές καμπύλες βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.5 Ο μηδενισμός του οργάνου πραγματοποιούνταν με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3). Σε περίπτωση που η συγκέντρωση νιτρικών ή νιτρωδών ιόντων ήταν υψηλότερη από αυτή που καθόριζε το αντίστοιχο εύρος μέτρησης, πραγματοποιούνταν κατάλληλη αραιώση με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3) και επανάληψη της διαδικασίας.



Εικόνα 4.5: Ενδεικτικές καμπύλες βαθμονόμησης (α) νιτρικών ιόντων και (β) νιτρωδών ιόντων

4.3.4 Προσδιορισμός ολικού αζώτου (TN)

Η συγκέντρωση ολικού αζώτου προσδιορίστηκε για δείγματα πεπτόνης (bacto peptone) και εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) σε διηθημένα (διήθηση σε φίλτρα σύριγγας Whatman™ 0.22 μm pore size/25 mm diameter) δείγματα υδατικών διαλυμάτων (υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3)) γνωστής συγκέντρωσης σε πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης, μέσω θερμικής αποσύνθεσης/χημειοφωταύγειας (thermal decomposition/chemiluminescence) σε όργανο Shimadzu TOC-L. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αποσύνθεση των ενώσεων αζώτου μέσω καύσης στους 720°C και στον σχηματισμό μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο, αφότου ψυχθεί και απαλλαγεί από την υγρασία, αντιδρά με το όζον κατά τη διέλευσή του από τον αναλυτή χημειοφωταύγειας, σχηματίζοντας μίγμα υποξειδίου του αζώτου (N₂O) και διεγερμένου οξειδίου του αζώτου. Καθώς το διεγερμένο οξύδιο του αζώτου μεταβαίνει στη θεμελιώδη κατάσταση εκπέμπεται ακτινοβολία, η οποία προσδιορίζεται φωτοηλεκτρικά. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε μίγμα οξυγόνου (20%) και

αζώτου (80%) (υπερκάθαρος αέρας). Τα διαλύματα παρασκευάζονταν με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3).

4.3.5 Προσδιορισμός ολικού οργανικού άνθρακα (TOC)

Η συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα προσδιοριζόταν σε πρόσφατα ληφθέντα διηθημένα δείγματα (διήθηση υπό κενό διαμέσου στείων μεμβρανών Whatman™ ME 24/21 ST πόρων 0.20 μm) με φασματοφωτομετρία ορατού σε φασματοφωτόμετρο HACH DR 2500 (Πίνακας 4.13). Χρησιμοποιούνταν η μέθοδος HACH 10129. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μεταβολή του χρώματος δείκτη pH που προκαλείται από το διοξείδιο του άνθρακα που εκλύεται, όταν ο οργανικός άνθρακας του διαλύματος οξειδώνεται παρουσία υπερθεικών ιόντων σε υψηλή θερμοκρασία (103°C-105°C). Προϋπόθεση αποτελεί η απομάκρυνση του ανόργανου άνθρακα του διαλύματος (ανθρακικών ιόντων) σε pH 2. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν με χρήση της καμπύλης του οργάνου σε μήκος κύματος 430 nm ή, εναλλακτικά, στα 598 nm, με γραμμική περιοχή 0-20 mg/L TOC (Πίνακας 4.13). Η αξιοπιστία της χρήσης της καμπύλης του οργάνου ελεγχόταν ανά μήνα, χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα HACH 1 000 mg/L C. Ο μηδενισμός του οργάνου πραγματοποιούνταν με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3). Τέλος, σε περίπτωση που η συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα των δειγμάτων ήταν υψηλότερη από αυτή που καθόριζε το εύρος μέτρησης, πραγματοποιούνταν κατάλληλη αραιώση με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3) και επανάληψη της διαδικασίας.

Πίνακας 4.13: Παράμετροι φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού και γραμμική περιοχή για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης νιτρικών (NO_3^-), νιτρωδών (NO_2^-) και ολικού οργανικού άνθρακα (TOC)

Παράμετρος	NO_3^- -N	NO_2^- -N	TOC
Φασματοφωτόμετρο	HACH DR 6000		HACH DR 2500
Μέθοδος	MERCK 1.09713.0001	MERCK 1.14776.0002	HACH 10129
Μήκος κύματος	340 nm	525 nm	430 nm/580 nm
Οπτική διαδρομή	1 cm		1 cm
Όγκος κυψελίδας	15 mL		5 mL
Γραμμική περιοχή	0-20 mg/L	0.02-1 mg/L	0-20 mg/L

Η συγκέντρωση ολικού οργανικού άνθρακα προσδιορίστηκε για δείγματα πεπτόνης (bacto peptone) και εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) σε διηθημένα (διήθηση σε φίλτρα σύριγγας Whatman™

0.22 µm pore size/25 mm diameter) δείγματα υδατικών διαλυμάτων (υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3)) γνωστής συγκέντρωσης σε πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε όργανο Shimadzu TOC-L. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται σε οξίνιση των δειγμάτων με προσθήκη HCl 2 N αναλυτικής καθαρότητας και σε απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται από τα ανθρακικά άλατα με διαβίβαση φέροντος αερίου (υπερκάθαρος αέρας, μίγμα οξυγόνου (20%) και αζώτου (80%)). Ακολούθως το δείγμα, το οποίο περιέχει μόνο οργανικό μη πτητικό άνθρακα, εισάγεται σε σωλήνα καύσης όπου πραγματοποιείται οξειδωτική κατάλυση του άνθρακα και σχηματισμός διοξειδίου του άνθρακα (CO₂). Το φέρον αέριο μεταφέρει το σύνολο των προϊόντων της καύσης σε αφυγραντή, σε παγίδα αλογόνων και, τελικά, σε κυψελίδα ανιχνευτή NDIR (Non Dispersive Infra-Red gas analyzer), όπου ανιχνεύεται το διοξείδιο του άνθρακα.

4.3.6 Προσδιορισμός ανόργανου άνθρακα (IC)

Η συγκέντρωση ανόργανου άνθρακα προσδιορίστηκε για δείγματα πεπτόνης (bacto peptone) και εκχυλίσματος ζύμης (yeast extract) σε διηθημένα (διήθηση σε φίλτρα σύριγγας Whatman™ 0.22 µm pore size/25 mm diameter) δείγματα υδατικών διαλυμάτων (υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3)) γνωστής συγκέντρωσης σε πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης σε όργανο Shimadzu TOC-L. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οξίνιση του δείγματος με φωσφορικό οξύ (H₃PO₄) αναλυτικής καθαρότητας και στη μετατροπή της συνολικής συγκέντρωσης ανθρακικών αλάτων σε διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο οδηγείται μέσω του φέροντος αερίου (υπερκάθαρος αέρας, μίγμα οξυγόνου (20%) και αζώτου (80%)) σε αφυγραντή, σε παγίδα αλογόνων και, τελικά, σε κυψελίδα ανιχνευτή NDIR (Non Dispersive Infra-Red gas analyzer), όπου ανιχνεύεται το διοξείδιο του άνθρακα.

4.3.7 Προσδιορισμοί διαλυτών μετάλλων

Οι συγκεντρώσεις των μετάλλων χαλκού (Cu²⁺), νικελίου (Ni²⁺), σιδήρου (Fe²⁺), ψευδαργύρου (Zn²⁺) και μολύβδου (Pb²⁺) προσδιορίζονταν σε διηθημένα δείγματα (διήθηση υπό κενό διαμέσου στείων μεμβρανών Whatman™ ME 24/21 ST πόρων 0.20 µm), ύστερα από οξίνιση με νιτρικό οξύ (HNO₃) αναλυτικής καθαρότητας.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS) με φλόγα (PerkinElmer AAS 4100). Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στην ατομοποίηση των μετάλλων στο προς ανάλυση δείγμα με τη βοήθεια φλόγας και στην απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας μονοχρωματικής ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος από τα άτομα, τα οποία παύουν να βρίσκονται στη θεμελιώδη κατάσταση και διεγείρονται. Η ατομοποίηση των στοιχείων πραγματοποιείται σε θάλαμο ατομοποίησης. Ο συνδυασμός αερίων για το μίγμα της φλόγας είναι ακετυλένιο και αέρας. Η μονοχρωματική ακτινοβολία εκπέμπεται από λυχνίες κοίλης καθόδου στο

κατάλληλο μήκος κύματος, στο οποίο η απορρόφηση παρουσιάζει μέγιστη τιμή στο διάγραμμα πλήρους φάσματος του εκάστοτε χημικού στοιχείου. Για την απορρόφηση της ακτινοβολίας ισχύει ο Νόμος Lambert-Beer της Σχέσης (Σ.10). Η εξερχόμενη ακτινοβολία προσπίπτει σε πρίσμα και στη συνέχεια οδηγείται σε ανιχνευτή. Ο Η/Υ που συνδέεται με το όργανο ελέγχει όλα τα μέρη του οργάνου, αποθηκεύει και επεξεργάζεται αναλυτικά τα δεδομένα και υπολογίζει την τελική συγκέντρωση του δείγματος.

Το όργανο βαθμονομούνταν με σειρά πρότυπων διαλυμάτων χαλκού (Cu^{2+}), νικελίου (Ni^{2+}), σιδήρου (Fe^{2+}), ψευδαργύρου (Zn^{2+}) και μολύβδου (Pb^{2+}). Η γραμμική περιοχή για κάθε μέταλλο φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.14). Σε περίπτωση που η συγκέντρωση των μετάλλων στα δείγματα ήταν υψηλότερη από αυτή που καθόριζε η γραμμική περιοχή, πραγματοποιούνταν κατάλληλη αραιώση με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3) οξιμισμένο με HNO_3 αναλυτικής καθαρότητας και επανάληψη της διαδικασίας.

Πίνακας 4.14: Γραμμική περιοχή για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης μετάλλων (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}) με φασματομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS)

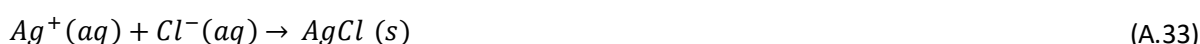
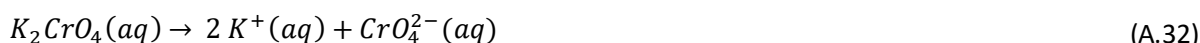
Μέταλλο	Γραμμική περιοχή (mg/L)
Cu^{2+}	0-5
Ni^{2+}	2-4
Fe^{2+}	0-5
Zn^{2+}	1-2
Pb^{2+}	1-20

4.3.8 Προσδιορισμός χλωριόντων

Η συγκέντρωση χλωριόντων (Cl^-) προσδιοριζόνταν με τιτλοδότηση με τη μέθοδο Mohr (Sheen & Kahler, 1938; Harvey, 2000; Skoog et al., 2013) σε διηθημένα δείγματα (διήθηση υπό κενό διαμέσου στειρών μεμβρανών Whatman™ ME 24/21 ST πόρων 0.20 μm).

Η μέθοδος Mohr είναι μέθοδος αργυρομετρικής τιτλοδότησης, δηλαδή πραγματοποιείται με προσθήκη ιόντων αργύρου με τη μορφή νιτρικού αργύρου (AgNO_3) στο προς ανάλυση διάλυμα (αντίδραση (A.31)). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κατανάλωση των ιόντων χλωρίου του διαλύματος από τα ιόντα αργύρου παρουσία χρωμικού καλίου (K_2CrO_4), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο αδιάλυτων ενώσεων: πρώτον, χλωριούχου αργύρου (AgCl), και, δεύτερον, χρωμικού

αργύρου (Ag_2CrO_4), που αποτελεί τον δείκτη της μεθόδου στο ισοδύναμο σημείο (χημικές αντιδράσεις (A.32) έως (A.34)). Ο σχηματισμός Ag_2CrO_4 πραγματοποιείται μετά την πλήρη κατανάλωση των ιόντων χλωρίου από τα ιόντα αργύρου και προσδίδει στο διάλυμα ερυθροκαφέ χρώμα. Η αξιόπιστη εφαρμογή της Μεθόδου Mohr προϋποθέτει εύρος pH 7-10.



Κατά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης χλωριόντων τα δείγματα βρίσκονταν υπό συνεχή ανάδευση σε πλάκα ανάδευσης (OHAUS). Σε περίπτωση pH χαμηλότερου από 7-10 πραγματοποιούνταν εξουδετέρωση με πρότυπο διάλυμα καυστικού νατρίου (NaOH) 0.1 N. Στα δείγματα προστίθονταν αρχικά 1 mL πρότυπου διαλύματος K_2CrO_4 10% (w/v). Στη συνέχεια προστίθονταν πρότυπο διάλυμα AgNO_3 0.1 M στάγδην με τη βοήθεια προχοΐδας, μέχρις ότου παρατηρούνταν αλλαγή του χρώματος του δείγματος σε ερυθροκαφέ εξαιτίας του σχηματισμού Ag_2CrO_4 . Η συγκέντρωση χλωριόντων του δείγματος υπολογίζεται από τη σχέση (Σ.11).

$$[\text{Cl}^-] = \frac{(H_1 - H_2) * 35\,450 * M}{V} \quad (\Sigma.11)$$

όπου,

$[\text{Cl}^-]$, η συγκέντρωση χλωριόντων στο δείγμα σε (mg/L)

H_1 , η αρχική ένδειξη της στάθμης AgNO_3 στην προχοΐδα

H_2 , η ένδειξη της στάθμης AgNO_3 στην προχοΐδα στο τέλος της τιτλοδότησης

M , η συγκέντρωση του διαλύματος AgNO_3 σε (mol/L)

V , ο όγκος του δείγματος σε (mL)

Σε περίπτωση αραιώσης του δείγματος με υπερκάθαρο νερό 18 ΜΩ (ELGA PURELAB flex 3), λαμβάνεται υπόψη ο συντελεστής αραιώσης για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης ιόντων χλωρίου της σχέσης (Σ.11).

4.3.9 Προσδιορισμός ολικών (TSS) και πτητικών αιωρούμενων στερεών (VSS)

Εφαρμόστηκαν οι μέθοδοι που προτείνονται στο Standard Methods for the examination of water and wastewater (Baird et al., 2017). Τα ολικά και πτητικά αιωρούμενα στερεά προσδιορίστηκαν με διήθηση όγκου δείγματος διαμέσου φίλτρων Whatman™ GF/C με τη βοήθεια αντλίας κενού. Προτού χρησιμοποιηθούν, τα φίλτρα προξηραίνονταν για 15' στους 550°C, στη συνέχεια αφήνονταν σε ξηραντήρα, ώστε να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 15' και ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας (ADAM EQUIPMENT ADA 120). Μετά τη διήθηση του υγρού δείγματος το φίλτρο ξηραινόταν σε κλίβανο στους 105°C (Mettler UBF 400) για τουλάχιστον 1 ώρα και έπειτα παρέμενε για τουλάχιστον 15' σε ξηραντήρα. Η συγκέντρωση ολικών αιωρούμενων στερεών υπολογίζεται από τη σχέση (Σ.12). Στη συνέχεια το φίλτρο ξηραινόταν σε κλίβανο υψηλών θερμοκρασιών στους 550°C (THERMAWATT) για 15' και έπειτα παρέμενε για τουλάχιστον 15' σε ξηραντήρα. Η συγκέντρωση πτητικών αιωρούμενων στερεών υπολογίζεται από τη σχέση (Σ.13).

$$[TSS] = \frac{(m_{105} - m_0)}{V} \quad (\Sigma.12)$$

όπου,

[TSS], η συγκέντρωση ολικών αιωρούμενων στερεών

m_{105} , η μάζα του φίλτρου μετά την ξήρανση στους 105°C

m_0 , η μάζα του ξηρού καθαρού φίλτρου

V, ο όγκος του δείγματος

$$[VSS] = \frac{(m_{105} - m_{550})}{V} \quad (\Sigma.13)$$

όπου,

[VSS], η συγκέντρωση πτητικών αιωρούμενων στερεών

m_{105} , η μάζα του φίλτρου μετά την ξήρανση στους 105°C

m_{550} , η μάζα του φίλτρου μετά την ξήρανση στους 550°C

V, ο όγκος του δείγματος

Οι προσδιορισμοί αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για να βρεθεί η συγκέντρωση της αιωρούμενης βιομάζας σε υγρά δείγματα που προέρχονταν από τον βιολογικό αντιδραστήρα.

4.3.10 Μορφολογικός χαρακτηρισμός στερεών δειγμάτων

Η μορφολογία των στερεών δειγμάτων πραγματοποιούνταν σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) FEI Quanta 200 με ανιχνευτή JEOL JSM 6380-LV (15 kV) υπό κενό (30 Pa). Η ημιποσοτική στοιχειακή ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιούνταν με σύστημα EDS INCA Energy 250 της Oxford Instruments με ανιχνευτή υγρού αζώτου.

Η λειτουργία του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) βασίζεται στη σάρωση της επιφάνειας του δείγματος από εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων και στην αλληλεπίδραση του δείγματος με αυτή. Μετά την πρόσπτωση της δέσμης ηλεκτρονίων στο δείγμα, μέρος των ηλεκτρονίων αυτών, καθώς και ηλεκτρόνια των ίδιων των στοιχείων του δείγματος εκπέμπονται από το δείγμα. Οι ανιχνευτές του οργάνου συλλέγουν και επεξεργάζονται τα σήματα αυτά, επιτρέποντας την οπτικοποίηση της επιφάνειας του δείγματος. Επίσης, κατά την αποδέσμευση ηλεκτρονίων από τα άτομα του δείγματος εκπέμπεται ενέργεια με τη μορφή ακτίνων X, η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε στοιχείο του περιοδικού πίνακα. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να προσδιοριστεί η χημική σύσταση του δείγματος (φασματομετρική μέθοδος ακτίνων X διεσπαρμένης ενέργειας, EDS) (Goldstein et al., 2003).

Τα δείγματα εξετάζονταν μετά τον εμποτισμό με εποξειδική ρητίνη χαμηλού ιξώδους, λείανση της επιφάνειας και επίστρωση με πάστα στίλβωσης με διαμάντι κοκκομετρίας 1μm.

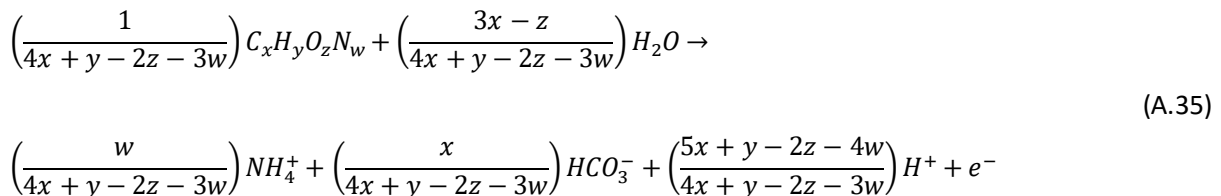
4.4 Μαθηματική προσομοίωση βιολογικού αντιδραστήρα

Η μαθηματική προσομοίωση της απονιτροποίησης παρουσία μετάλλων στον βιολογικό αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού AQUASIM 2.0. Η ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου βασίστηκε στις βιολογικές και χημικές διεργασίες που πραγματοποιούνται κατά την απονιτροποίηση στον βιολογικό αντιδραστήρα προσκολλημένης βιομάζας. Σκοπός της προσομοίωσης είναι η πρόβλεψη, πρώτον, της απόκρισης του αντιδραστήρα σε εισροή αποβλήτων διαφορετικής σύστασης και, δεύτερον, της χημικής συμπεριφοράς των διαλυτών μετάλλων που περιέχονται σε αυτά κατά την απονιτροποίηση.

4.4.1 Βιολογικές διεργασίες

Για την περιγραφή της βιολογικής δράσης των μικροοργανισμών συνδυάστηκαν οι ημι-αντιδράσεις του δότη ηλεκτρονίων (A.35), του δέκτη ηλεκτρονίων και της σύνθεσης νέου κυτταρικού υλικού (Rittmann & McCarty, 2020).

Η οξείδωση ενός οργανικού υποστρώματος/δότη ηλεκτρονίων με γενικευμένο χημικό τύπο $C_xH_yO_zN_w$ εκφράζεται μέσω της βιοχημικής ημι-αντίδρασης (A.35).



Κατά τη μελέτη του βιολογικού αντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε προσομοίωση για τρεις περιπτώσεις δότη ηλεκτρονίων σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις: (1) συνδυασμός πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης, σε συγκεντρώσεις 5 g/L και 1 g/L, αντίστοιχα, (2) συνδυασμός οξικού και εκχυλίσματος ζύμης, σε συγκεντρώσεις 1.8 g/L και 1 g/L, αντίστοιχα και (3) αιθανόλης (απουσία εκχυλίσματος ζύμης) σε συγκέντρωση 1.25 g/L (Πίνακας 4.15). Στον ίδιο πίνακα φαίνεται ο χημικός τύπος που έγινε η παραδοχή ότι περιγράφει καθένα από τα υποστρώματα (1)-(3).

Πίνακας 4.15: Περιπτώσεις οργανικών υποστρωμάτων που μελετήθηκαν κατά την προσομοίωση

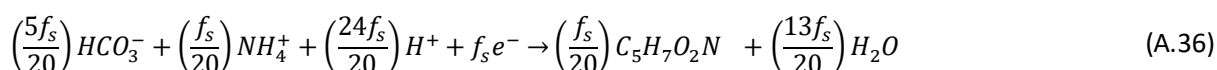
	Πηγή άνθρακα				
	(1)	(2)	(3)		
	Πεπτόνη	Εκχύλισμα ζύμης	Οξικό	Εκχύλισμα ζύμης	Αιθανόλη
Συγκέντρωση υποστρώματος (g/L)	5.0	1.0	1.8	1.0	1.25
		6.0		2.8	1.25
Συμπεριληπτικός χημικός τύπος	(α) $C_{16}H_{24}O_5N_4$			$C_3H_{10.5}O_3N_{0.5}$	C_2H_5OH
	(β) $C_8H_{24}O_5N_3$				

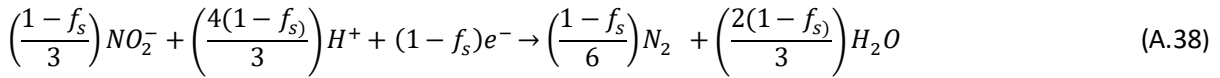
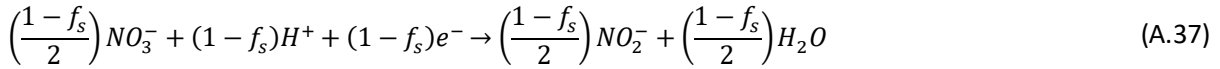
Εξαιτίας της σύνθετης δομής και της μη καθορισμένης χημικής σύστασης της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης, η εκτίμηση του χημικού τύπου των μορίων τους χαρακτηρίζεται από αυξημένη αβεβαιότητα. Για τον λόγο αυτό, έγινε η παραδοχή ότι ο χημικός τύπος που αντιπροσωπεύει το οργανικό υπόστρωμα της περίπτωσης (1) (Πίνακας 4.15) μπορεί να ακολουθεί δύο διαφορετικές προσεγγίσεις, μια (α) θεωρητική και μια (β) πειραματική:

- (α) Σύμφωνα με τους Rittmann & McCarty (2020), τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες και οι αζωτούχες ενώσεις, όπως η πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης, έχουν εμπειρικό χημικό τύπο $C_{16}H_{24}O_5N_4$.
- (β) Ο Πίνακας 4.10 παρουσιάζει την περιεκτικότητα της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης σε άνθρακα και άζωτο. Διατηρώντας σταθερό τον αριθμό των ατόμων υδρογόνου και οξυγόνου στον τύπο που προτείνουν οι Rittmann & McCarty (2020) (δηλ. $\gamma=24$ και $z=5$) και λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα (Πίνακας 4.10), όσο και την αναλογία πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης στο υπόστρωμα (Πίνακας 4.8). η σύσταση του οργανικού υποστρώματος για τον συνδυασμό πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης μπορεί να περιγραφεί από τον χημικό τύπο $C_8H_{24}O_5N_3$.

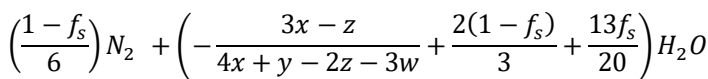
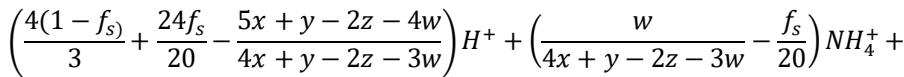
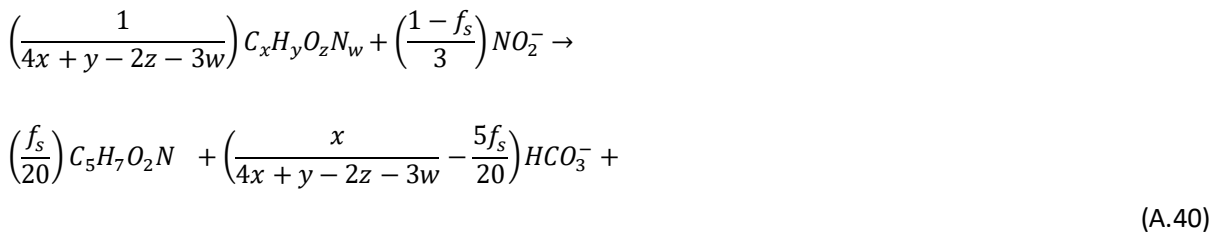
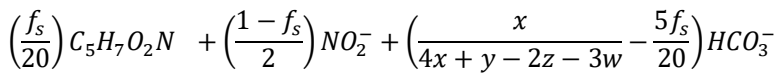
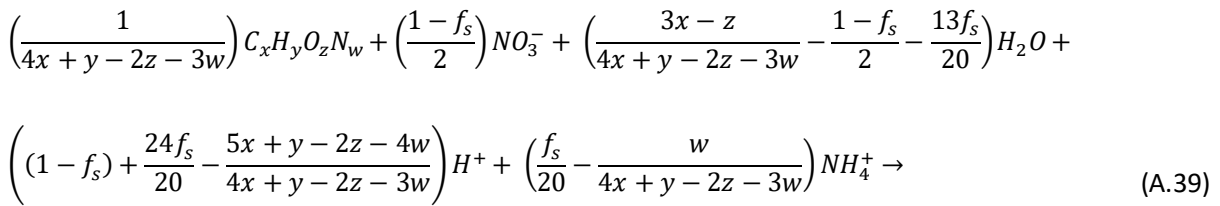
Παρόμοια με την περίπτωση (1-β), αλλά με δότες ηλεκτρονίων το οξικό και το εκχύλισμα ζύμης (περίπτωση (2)), η σύσταση του οργανικού υποστρώματος μπορεί να περιγραφεί από τον χημικό τύπο $C_3H_{10.5}O_3N_{0.5}$. Τέλος, ο χημικός τύπος της αιθανόλης (περίπτωση (3)) είναι C_2H_5OH . Σύμφωνα με τα παραπάνω, η μαθηματική προσομοίωση με πηγή άνθρακα τον συνδυασμό πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης πραγματοποιήθηκε για $x=8$, $\gamma=24$, $z=5$ και $w=3$, με πηγή άνθρακα τον συνδυασμό οξικού και εκχυλίσματος ζύμης για $x=3$, $\gamma=10.5$, $z=3$ και $w=0.5$ και με πηγή άνθρακα την αιθανόλη για $x=2$, $\gamma=6$ και $z=1$.

Από το σύνολο των διαθέσιμων ηλεκτρονίων εξαιτίας της βιοχημικής οξειδωσης του οργανικού άνθρακα, ένα μέρος (f_s) χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς για σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού. Η σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού σύστασης $C_5H_7O_2N$ περιγράφεται από την ημι-αντίδραση (A.36) (Rittmann & McCarty, 2020). Οι τιμές f_s εξαρτώνται από τη φύση της οργανικής πηγής άνθρακα και του δέκτη ηλεκτρονίων. Για δότες ηλεκτρονίων όπως η μεθανόλη και το βιοδιασπάσιμο κλάσμα (BOD) των αστικών λυμάτων, η μέγιστη τιμή του f_s εκτιμώνται σε 0.36 και 0.52, αντίστοιχα (Rittmann & McCarty, 2020). Τα ηλεκτρόνια που απομένουν διαθέσιμα ($1-f_s$) χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς για να καλύψουν τις ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων τους. Ο μικροοργανισμός *Halomonas denitrificans* έχει την ικανότητα να ανάγει πλήρως τα νιτρικά ιόντα σε αέριο άζωτο (González-Domenech et al., 2010; Felgate et al., 2012; Wang & Shao, 2021) διαμέσου της παραγωγής νιτρωδών ιόντων (Kim et al., 2007). Επομένως, η απονιτροποίηση, ως διεργασία παραγωγής ενέργειας, μπορεί να περιγραφεί ως διαδικασία δύο σταδίων: πρώτον, της αναγωγής των νιτρικών ιόντων προς νιτρώδη, όπως περιγράφεται από την ημι-αντίδραση (A.37) και, δεύτερον, της αναγωγής των νιτρωδών ιόντων προς αέριο άζωτο, όπως περιγράφεται από την ημι-αντίδραση (A.37).





Λαμβάνοντας υπόψη τις ημι-αντιδράσεις (A.35) έως (A.38), προκύπτουν οι πλήρεις αντιδράσεις (A.39) και (A.40), που περιγράφουν την αναγωγή των νιτρικών ιόντων προς νιτρώδη και την αναγωγή των νιτρωδών προς αέριο άζωτο, αντίστοιχα. Το σύνολο των βιολογικών διεργασιών συνοψίζεται στον σχετικό πίνακα Petersen (Πίνακας 4.17).



4.4.2 Κινητική ανάπτυξης μικροοργανισμών

Έγινε η παραδοχή ότι η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ακολουθεί κινητική Monod, με περιοριστικούς παράγοντες το οργανικό υπόστρωμα (δότης ηλεκτρονίων) και τα νιτρικά και νιτρώδη ιόντα (δέκτες ηλεκτρονίων). Η κινητική περιγράφεται από τις σχέσεις (Σ.14) και (Σ.15), για την περίπτωση που τα

νιτρικά ιόντα ανάγονται σε νιτρώδη και για την περίπτωση που τα νιτρώδη ιόντα ανάγονται προς αέριο άζωτο, αντίστοιχα.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max,NO3} * \frac{C_{org}}{K_{s,org} + C_{org}} * \frac{C_{NO3}}{K_{NO3} + C_{NO3}} * X \quad (\Sigma.14)$$

όπου,

$\mu_{max,NO3}$, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

C_{org} , η συγκέντρωση οργανικού υποστρώματος

C_{NO3} , η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων

$K_{s,org}$, η σταθερά ημικορεσμού για το οργανικό υπόστρωμα

K_{NO3} , η σταθερά ημικορεσμού για τα νιτρικά ιόντα

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max,NO2} * \frac{C_{org}}{K_{s,org} + C_{org}} * \frac{C_{NO2}}{K_{NO2} + C_{NO2}} * X \quad (\Sigma.15)$$

όπου,

$\mu_{max,NO2}$, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

C_{org} , η συγκέντρωση οργανικού υποστρώματος

C_{NO2} , η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων

$K_{s,org}$, η σταθερά ημικορεσμού για το οργανικό υπόστρωμα

K_{NO2} , η σταθερά ημικορεσμού για τα νιτρικά ιόντα

Στον σχετικό πίνακα Petersen (Πίνακας 4.17) έχει συμπεριληφθεί ο ρυθμός της ανάπτυξης των μικροοργανισμών για τα δύο στάδια της απονιτροποίησης.

4.4.3 Αβιοτικές διεργασίες

Οι διεργασίες που περιγράφονται από τις αντιδράσεις (A.39) και (A.40) καθορίζουν τη συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων (H^+), των κατιόντων αμμωνίας (NH_4^+) και των όξινων ανθρακικών ιόντων (HCO_3^-) που παράγονται ή καταναλώνονται κατά την απονιτροποίηση. Η μεταβολή στη συγκέντρωση

υδρογονοκατιόντων και όξινων ανθρακικών κατά την απονιτροποίηση οδηγεί σε αύξηση του pH και της αλκαλικότητας του διαλύματος.

4.4.3.1 Μη μεταλλικές χημικές ενώσεις

Το pH επηρεάζει τη χημική ισορροπία των αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν τα ανόργανα ιόντα του διαλύματος (H^+ , NH_4^+ , HCO_3^-). Οι χημικές αντιδράσεις που λήφθηκαν υπόψη για την κατάστροψη του μοντέλου περιγράφουν τη χημική ισορροπία μεταξύ των $H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$ ((A.41) και (A.42)), των NH_4^+/NH_3 (A.43) και της διάστασης του νερού (A.44), με τις αντίστοιχες σταθερές χημικής ισορροπίας $K_{\alpha_1(H_2CO_3)}$ (Σ.16), $K_{\alpha_2(H_2CO_3)}$ (Σ.17), $K_{\alpha_1NH_4}$ (Σ.18) και K_w (Σ.19) (Stumm & Morgan, 1996).



$$K_{\alpha_1(H_2CO_3)} = \frac{H^+ * HCO_3^-}{H_2CO_3} = 4.45 * 10^{-7} \quad (\Sigma.16)$$

$$K_{\alpha_2(H_2CO_3)} = \frac{H^+ * CO_3^{2-}}{HCO_3^-} = 4.69 * 10^{-11} \quad (\Sigma.17)$$

$$K_{\alpha_1(NH_4^+)} = \frac{H^+ * NH_3}{NH_4^+} = 5.62 * 10^{-10} \quad (\Sigma.18)$$

$$K_w = H^+ * OH^- = 10^{-14} \quad (\Sigma.19)$$

Η συγκέντρωση ολικού ανόργανου άνθρακα (Total Inorganic Carbon-TIC) διατυπώνεται μέσω της σχέσης (Σ.20). Λαμβάνοντας υπόψη τις σχέσεις (Σ.16) και (Σ.17), η συμμετοχή των επιμέρους ειδών ανόργανου άνθρακα ($H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$) στη συνολική συγκέντρωση TIC συναρτήσει της συγκέντρωσης υδρογονοκατιόντων υπολογίζεται από τις σχέσεις (Σ.21) έως (Σ.23).

$$TIC = H_2CO_3 + HCO_3^- + CO_3^{2-} \quad (\Sigma.20)$$

$$a_0 = \frac{(H^+)^2}{(H^+)^2 + K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * H^+ + K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * K_{\alpha_2(H_2CO_3)}} = \frac{H_2CO_3}{TIC} \quad (\Sigma.21)$$

$$a_1 = \frac{K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * H^+}{(H^+)^2 + K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * H^+ + K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * K_{\alpha_2(H_2CO_3)}} = \frac{HCO_3^-}{TIC} \quad (\Sigma.22)$$

$$a_2 = \frac{K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * K_{\alpha_2(H_2CO_3)}}{(H^+)^2 + K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * H^+ + K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * K_{\alpha_2(H_2CO_3)}} = \frac{CO_3^{2-}}{TIC} \quad (\Sigma.23)$$

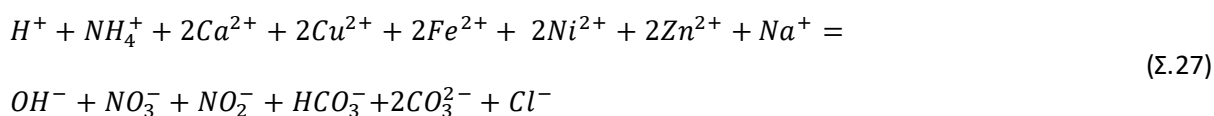
Η συγκέντρωση ολικού ανόργανου αζώτου (Total Inorganic Nitrogen-TIN) διατυπώνεται μέσω της σχέσης (Σ.24). Λαμβάνοντας υπόψη τη σχέση (Σ.18), η συμμετοχή των κατιόντων αμμωνίου και του αμμωνιακού αζώτου στη συνολική συγκέντρωση TIN συναρτήσει της συγκέντρωσης υδρογονοκατιόντων υπολογίζεται από τις σχέσεις (Σ.25) και (Σ.26), αντίστοιχα.

$$TIN = NH_3 + NH_4^+ \quad (\Sigma.24)$$

$$a_0 = \frac{H^+}{H^+ + K_{a_1(NH_4^+)}} = \frac{NH_4^+}{TIN} \quad (\Sigma.25)$$

$$a_1 = \frac{K_{a_1(NH_4^+)}}{H^+ + K_{a_1(NH_4^+)}} = \frac{NH_3}{TIN} \quad (\Sigma.26)$$

Το ισοζύγιο φορτίων στο διάλυμα ικανοποιείται μέσω της σχέσης (Σ.27). Τα ιόντα νατρίου (Na^+) και χλωρίου (Cl^-) ισοσταθμίζουν το έλλειμμα φορτίου στο διάλυμα, με την παραδοχή ότι όλα τα άλατα προστίθενται σε αυτό ως άλατα νατρίου και χλωριούχα άλατα.



4.4.3.2 Διαλυτά είδη μετάλλων

Η μεταβολή του pH και η χημική ισορροπία των μη μεταλλικών ιόντων που καταναλώνονται ή παράγονται εξαιτίας της οξειδωσης του οργανικού άνθρακα κατά την απονιτροποίηση οδηγεί στον σχηματισμό χημικών ειδών που επηρεάζουν την κινητικότητα των μετάλλων στο διάλυμα, όπως τα υδροξύλια (OH^-) και τα ανθρακικά ιόντα (CO_3^{2-}). Συνεπώς, στο διάλυμα λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις χημικής ισορροπίας μεταξύ των μεταλλικών ιόντων (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) και των αδιάλυτων ενώσεών τους με υδροξύλια ($\text{Me}(\text{OH})_2$) (A.45) και ανθρακικά ιόντα (MeCO_3) (A.46). Οι αντίστοιχες σταθερές του γινομένου διαλυτότητας υπολογίζονται από τις σχέσεις (Σ.28) και (Σ.29), και η τιμή τους για κάθε μέταλλο (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) δίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.16).



$$K_{sp, \text{Me}(\text{OH})_2} = \text{Me}^{2+} * (\text{OH}^-)^2
 \tag{\Sigma.28}$$

$$K_{sp, \text{MeCO}_3} = \text{Me}^{2+} * \text{CO}_3^{2-}
 \tag{\Sigma.29}$$

Πίνακας 4.16: Σταθερές του γινομένου διαλυτότητας κατά τη χημική ισορροπία μεταξύ των μεταλλικών ιόντων (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) και των υδροξειδίων και ανθρακικών αλάτων των μετάλλων

Μεταλλικό ιόν	$Me(OH)_2$	$MeCO_3$
Ca^{2+}	$5.50 \cdot 10^{-6}$	$2.80 \cdot 10^{-9}$
Cu^{2+}	$2.20 \cdot 10^{-20}$	$1.40 \cdot 10^{-10}$
Fe^{2+}	$4.87 \cdot 10^{-17}$	$3.13 \cdot 10^{-11}$
Ni^{2+}	$5.48 \cdot 10^{-16}$	$1.42 \cdot 10^{-7}$
Zn^{2+}	$3.00 \cdot 10^{-17}$	$1.46 \cdot 10^{-10}$

Τα διαλυτά μέταλλα καταβυθίζονται ως αδιάλυτες ενώσεις $Me(OH)_2$ και $MeCO_3$, όσο ο συντελεστής κορεσμού (Saturation Index - SI) που εκφράζεται από τις σχέσεις (Σ.30) και (Σ.31), αντίστοιχα, υπερβαίνει τη μονάδα. Αντίθετα, εάν ο συντελεστής κορεσμού SI μειωθεί σε τιμές χαμηλότερες της μονάδας, οι αντίστοιχες αδιάλυτες ενώσεις των μετάλλων θα επαναδιαλυτοποιηθούν.

$$SI_{Me(OH)_2} = \frac{Me^{2+} * (OH^-)^2}{K_{sp,Me(OH)_2}} > 1 \quad (\Sigma.30)$$

$$SI_{MeCO_3} = \frac{Me^{2+} * CO_3^{2-}}{K_{sp,MeCO_3}} > 1 \quad (\Sigma.31)$$

Πίνακας 4.17: Πίνακας Petersen με τις βιολογικές διεργασίες που συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο

	Παράμετρος								
	Οργανικό υπόστρωμα $C_xH_yO_zN_w$	NO_3^-	NO_2^-	H^+	NH_4^+	Βιομάζα $C_5H_7O_2N$	HCO_3^-	N_2	Ρυθμός αντίδρασης
$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$ (A.39)	$-\frac{1}{4x+y-2z-3w}$	$-\frac{1-f_s}{2}$	$-\frac{1-f_s}{2}$	$-\left((1-f_s) + \frac{24f_s}{20} - \frac{5x+y-2z-4w}{4x+y-2z-3w}\right)$	$-\left(\frac{f_s}{20} - \frac{w}{4x+y-2z-3w}\right)$	$\frac{f_s}{20}$	$\frac{x}{4x+y-2z-3w} - \frac{5f_s}{20}$		$\mu_{max,NO_3} * \frac{C_{org}}{K_{s,org} + C_{org}} * \frac{C_{NO_3}}{K_{NO_3} + C_{NO_3}} * X$
$NO_2^- \rightarrow N_2$ (A.40)	$-\frac{1}{4x+y-2z-3w}$		$-\frac{1-f_s}{3}$	$\frac{4(1-f_s)}{3} + \frac{24f_s}{20} - \frac{5x+y-2z-4w}{4x+y-2z-3w}$	$\frac{w}{4x+y-2z-3w} - \frac{f_s}{20}$	$\frac{f_s}{20}$	$\frac{x}{4x+y-2z-3w} - \frac{5f_s}{20}$	$\frac{1-f_s}{6}$	$\mu_{max,NO_2} * \frac{C_{org}}{K_{s,org} + C_{org}} * \frac{C_{NO_2}}{K_{NO_2} + C_{NO_2}} * X$

Πίνακας 4.18: Πίνακας Petersen με τις αβιοτικές διεργασίες που συμπεριλαμβάνονται στο μοντέλο

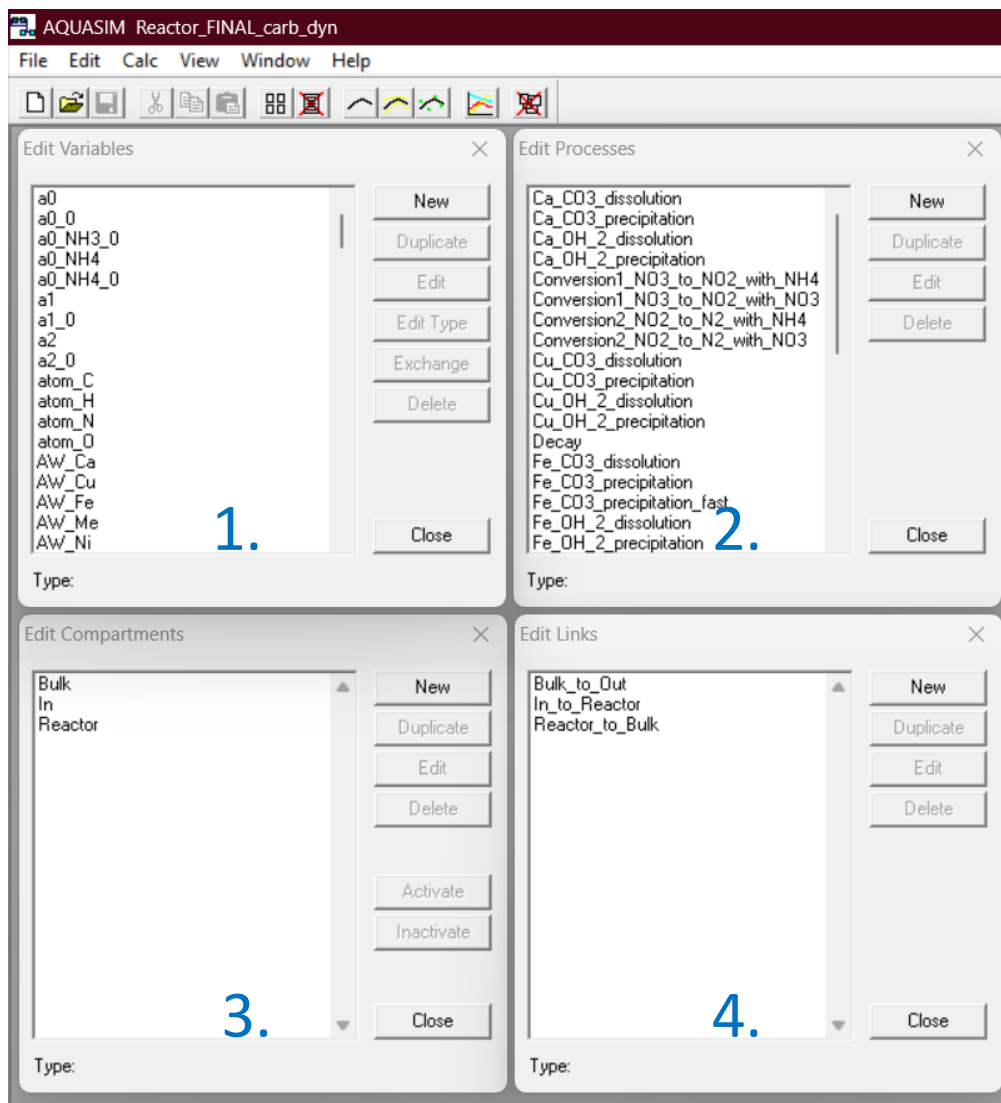
	Παράμετρος											Ρυθμός αντίδρασης
	H_2CO_3	HCO_3^-	CO_3^{2-}	H^+	NH_4^+	NH_3	OH^-	H_2O	Me^{2+}	$Me(OH)_2$	$MeCO_3$	
$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$ (A.41)	-1	+1		+1								$k_{H_2CO_3} * (K_{\alpha_1(H_2CO_3)} * H_2CO_3 - H^+ * HCO_3^-)$
$HCO_3^- \rightleftharpoons H^+ + CO_3^{2-}$ (A.42)		-1	+1	+1								$k_{HCO_3^-} * (K_{\alpha_2(H_2CO_3)} * HCO_3^- - H^+ * CO_3^{2-})$
$NH_4^+ \rightleftharpoons H^+ + NH_3$ (A.43)				+1	-1	+1						$k_{NH_4^+} * (K_{a_1(NH_4^+)} * NH_4^+ - H^+ * NH_3)$
$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$ (A.44)				+1			+1	-1				$k_{H_2O} * (K_w - H^+ * OH^-)$
$Me^{2+} + 2OH^- \rightarrow Me(OH)_2$ (A.45)							-2		-1	+1		$k_{Me(OH)_2,precip} * (Me^{2+} * (OH^-)^2 - K_{sp,Me(OH)_2})$
$Me(OH)_2 \rightarrow Me^{2+} + 2OH^-$							+2		+1	-1		$k_{Me(OH)_2,dissol} * (K_{sp,Me(OH)_2} - Me^{2+} * (OH^-)^2)$
$Me^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow MeCO_3$ (A.46)			-1						-1		+1	$k_{MeCO_3,precip} * (Me^{2+} * CO_3^{2-} - K_{sp,MeCO_3})$
$MeCO_3 \rightarrow Me^{2+} + CO_3^{2-}$			+1						+1		-1	$k_{MeCO_3,dissol} * (K_{sp,MeCO_3} - Me^{2+} * CO_3^{2-})$

4.4.4 Εφαρμογή του μοντέλου

Το σύνολο των βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών που περιγράφηκαν στα Εδάφια 4.6.1 έως 4.6.3 αποτελούν ένα σύστημα διαφορικών αλγεβρικών εξισώσεων (ΔΑΕ) που πρέπει να επιλυθεί. Το μοντέλο υλοποιήθηκε με το λογισμικό AQUASIM 2.0 (Reichert, 1994), το οποίο παρέχεται στους χρήστες δωρεάν. Το AQUASIM παρέχει τη δυνατότητα προσομοίωσης βιολογικών και χημικών διεργασιών σε διαφορετικές μονάδες (compartments), όπως αντιδραστήρες πλήρους ανάμιξης, αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας, στήλες κορεσμένων εδαφών, ποτάμια, λίμνες κ.ά. (Reichert, 1998). Στις μονάδες που επιλέγονται κατά περίπτωση επιτελείται ένα σύνολο διεργασιών (processes) που είναι είτε δυναμικές (dynamic), είτε βρίσκονται σε ισορροπία (equilibrium). Οι παράμετροι που περιγράφουν τις διεργασίες ορίζονται ως μεταβλητές (variables). Οι μεταβλητές που αποτελούν τη λύση του συστήματος των διαφορικών εξισώσεων ορίζονται ως μεταβλητές κατάστασης (state variables), ενώ οι υπόλοιπες ανήκουν στις κατηγορίες των υπολογιστικών μεταβλητών (formula variables), των σταθερών μεταβλητών (constant variables) και των μεταβλητών που δίνονται ως χρονοσειρά (real list variables) κ.ά. Τέλος, οι διαφορετικές μονάδες (compartments) που επιλέγονται μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους με συνδέσμους (links) καθορισμένης παροχής, στις οποίες λαμβάνουν χώρα φαινόμενα μαζικής μεταφοράς (advective links) ή διάχυσης (diffusive links). Το περιβάλλον AQUASIM φαίνεται στην Εικόνα 4.6.

Η προσομοίωση του βιολογικού συστήματος (Εικόνα 4.1) πραγματοποιήθηκε ορίζοντας αρχικά τις μεταβλητές και τις δομικές μονάδες του συστήματος. Το σύνολο των μεταβλητών που ορίστηκαν για το βιολογικό σύστημα, το είδος τους (πχ μεταβλητές κατάσταση, υπολογιστικές μεταβλητές κλπ), η περιγραφή τους και οι μονάδες μέτρησής τους καταγράφονται αναλυτικά παρακάτω (Πίνακας 4.19). Οι κύριες μονάδες του βιολογικού συστήματος είναι ο αντιδραστήρας ακινητοποιημένης βιομάζας (Εικόνα 4.1α(3)) και το δοχείο εισροής σε αυτόν (Εικόνα 4.1α(1)) και ορίστηκαν ως αντιδραστήρες πλήρους ανάμιξης (CSTR compartments). Παρόλα αυτά, στο δοχείο εισροής δεν λήφθηκαν υπόψη βιοτικές και αβιοτικές διεργασίες, καθώς η απονιτροποίηση και οι μεταβολές που αυτή προκαλεί στη σύσταση του διαλύματος πραγματοποιούνται αποκλειστικά στον αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας. Οι δυο μονάδες ενώθηκαν μεταξύ τους με δύο συνδέσμους, στους οποίους πραγματοποιούνται μόνο φαινόμενα μεταφοράς (advective links). Ο πρώτος σύνδεσμος αποτελεί την τροφοδοσία του βιολογικού αντιδραστήρα από το δοχείο εισροής προς τον αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας. Ο δεύτερος σύνδεσμος αποτελεί την εκροή του αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας και πάλι πίσω στο δοχείο. Συνεπώς, η εκροή του αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας επηρεάζει τη σύσταση του διαλύματος στο δοχείο εισροής και το διάλυμα στο δοχείο εισροής επηρεάζει εκ νέου την τροφοδοσία του αντιδραστήρα. Το κλειστό αυτό σύστημα προκαλεί σημαντικά προβλήματα στον ορισμό των αρχικών συνθηκών που είναι αναγκαίο να οριστούν, ώστε να ευρεθούν οι λύσεις των παραμέτρων από τον αλγόριθμο του λογισμικού. Το ζήτημα

αυτό αντιμετωπίστηκε προσθέτοντας μια επιπλέον ψευδο-μονάδα (compartment) που συνδέεται με τον αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας, έχει πολύ μικρή παροχή εισροής σε σύγκριση με την πραγματική παροχή στον αντιδραστήρα (πχ $Q/10^6$) και δεν πραγματοποιείται σε αυτή καμία διεργασία. Αντίστοιχα, ορίστηκε μια επιπλέον ψευδο-εκροή ίσης παροχής από τον αντιδραστήρα ακινητοποιημένης βιομάζας, ώστε η παροχή σε αυτόν να είναι τελικά ίση με την πραγματική.



Εικόνα 4.6: Περιβάλλον λογισμικού AQUASIM: (1.) Ορισμός μεταβλητών (variables), (2.) Ορισμός διεργασιών (processes), (3.) Ορισμός μονάδων (compartments), (4.) Ορισμός συνδέσεων (links)

Ένα ακόμη ζήτημα που έχρηζε επίλυσης και είναι σύνηθες στα συστήματα διαφορικών αλγεβρικών εξισώσεων (ΔΑΕ) είναι η αριθμητική αστάθεια του αλγορίθμου. Η αστάθεια αυτή δημιουργήθηκε εξαιτίας της ασυνέχειας μεταξύ των αργών βιολογικών διεργασιών και των ταχύτατων αβιοτικών (χημικών) αντιδράσεων ισορροπίας. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε επιτυχώς προσομοιάζοντας τις αβιοτικές/χημικές αντιδράσεις ισορροπίας (equilibrium processes) με δυναμικές διεργασίες

(dynamic processes) οι οποίες πραγματοποιούνται με ταχύτητα αρκετές φορές υψηλότερη από αυτή των αργών βιολογικών διεργασιών. Συνεπώς, η ταχύτητα των βιολογικών διεργασιών καθορίζει την ταχύτητα του συνόλου των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στον βιολογικό αντιδραστήρα. Ο ρυθμός με τον οποίο εξελίσσονται όλες οι αβιοτικές διεργασίες στον βιολογικό αντιδραστήρα συμπεριλαμβάνεται στον σχετικό πίνακα Petersen (Πίνακας 4.18). Οι τιμές των εκάστοτε κινητικών σταθερών k_i που επιλέχθηκαν καταγράφονται κυμαίνονται μεταξύ 10^7 - 10^{11} για τις αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν μεταλλικά ιόντα και μεταξύ 10^{12} - 10^{18} για τις υπόλοιπες αβιοτικές αντιδράσεις. Το σύνολο των μεταβλητών που ορίστηκαν με πηγή άνθρακα τον συνδυασμό πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης (ενδεικτικά) περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.19).

4.4.5 Βαθμονόμηση του μοντέλου

Η βαθμονόμηση του μοντέλου επιτρέπει την πλέον αντιπροσωπευτική αναπαράσταση των πραγματικών διεργασιών και συστημάτων. Στόχος της βαθμονόμησης που βασίζεται στη βελτιστοποίηση των αποτελεσμάτων είναι η ανίχνευση των τιμών ή του εύρους των τιμών των παραμέτρων που οδηγούν στη βέλτιστη προσομοίωση μεταξύ της πρόβλεψης του μοντέλου και των πειραματικών δεδομένων. Οι δυσκολίες που απαντώνται συχνά κατά τη βαθμονόμηση των μοντέλων με στόχο τη βελτιστοποίηση αφορούν (Dochain & Vanrolleghem, 2001; Marsili-Libelli, 2018):

- Τα τοπικά ακρότατα: σε περίπτωση που οι αλγόριθμοι βελτιστοποίησης εγκλωβιστούν σε τοπικά ακρότατα που δεν αποτελούν τη βέλτιστη λύση, η εκτίμηση των παραμέτρων είναι η μη βέλτιστη.
- Ευαισθησία στις αρχικές συνθήκες: η αποτελεσματικότητα των αλγορίθμων βελτιστοποίησης εξαρτάται από τις αρχικές συνθήκες, οι οποίες, εάν δεν επιλεγούν με προσοχή, η βελτιστοποίηση μπορεί να συγκλίνει προς μη βέλτιστες λύσεις.
- Υπολογιστικός χρόνος: οι αλγόριθμοι βελτιστοποίησης απαιτούν εντατικούς υπολογισμούς, συχνά χρονοβόρους, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για σύνθετα μοντέλα με πολλές παραμέτρους.
- Αριθμητική αστάθεια: οι αλγόριθμοι βελτιστοποίησης είναι επιρρεπείς στην αριθμητική αστάθεια, με αποτέλεσμα η βελτιστοποίηση να αποτυγχάνει ή να παράγονται αναξιόπιστα αποτελέσματα.
- Υπερπροσαρμογή (overfitting) στα πειραματικά δεδομένα: μοντέλα περίπλοκα και με πολλές παραμέτρους οδηγούν στο φαινόμενο της υπερπροσαρμογής (overfitting), δηλαδή στην απόδοση του θορύβου κατά την προσομοίωση και όχι των πραγματικών σχέσεων μεταξύ των μεταβλητών.
- Ελλιπής ποσοτικοποίηση της αβεβαιότητας: πολλές μέθοδοι βελτιστοποίησης δεν ποσοτικοποιούν την αβεβαιότητα των παραμέτρων του μοντέλου.

Το λογισμικό AQUASIM παρέχει το κατάλληλο περιβάλλον για την προσομοίωση των παραμέτρων και την ανάλυση ευαισθησίας. Παρόλα αυτά, τα πολυπαραμετρικά μοντέλα ενέχουν τον κίνδυνο για μη εξακρίβωση/διάκριση των παραμέτρων, καθώς πολλά διαφορετικά σύνολα παραμέτρων προσομοιάζουν εξίσου καλά τα πειραματικά δεδομένα (Reichert, 1994; Reichert, 1998).

Πίνακας 4.19: Μεταβλητές που ορίστηκαν για την προσομοίωση του βιολογικού συστήματος με χρήση του λογισμικού AQUASIM 2.0

Ονομασία μεταβλητής	Περιγραφή μεταβλητής	Έκφραση	Μονάδες μέτρησης	Είδος*
a0	Fraction of H ₂ CO ₃ over total inorganic carbon (excluding metal carbonates)	$C_H^2/((C_H^2)+K1_H2CO3*C_H+K1_H2CO3*K2_H2CO3)$	-	F.V.
a0_0	Initial fraction of H ₂ CO ₃ over total inorganic carbon (excluding metal carbonates)	$C_H_0^2/(C_H_0^2+K1_H2CO3*C_H_0+K1_H2CO3*K2_H2CO3)$	-	F.V.
a0_NH3_0	Initial fraction of NH ₃ in the equilibrium of NH ₄ ⁺ /NH ₃	1-a0_NH4_0	-	F.V.
a0_NH4	Fraction of NH ₄ ⁺ in the equilibrium of NH ₄ ⁺ /NH ₃	$C_H/(C_H+K_NH4)$	-	F.V.
a0_NH4_0	Initial fraction of NH ₄ ⁺ in the equilibrium of NH ₄ ⁺ /NH ₃	$C_H_0/(C_H_0+K_NH4)$	-	F.V.
a1	Fraction of HCO ₃ ⁻ over total inorganic carbon (excluding metal carbonates)	$K1_H2CO3*C_H/(C_H^2+K1_H2CO3*C_H+K1_H2CO3*K2_H2CO3)$	-	F.V.
a1_0	Initial fraction of HCO ₃ ⁻ over total inorganic carbon (excluding metal carbonates)	$K1_H2CO3*C_H_0/(C_H_0^2+K1_H2CO3*C_H_0+K1_H2CO3*K2_H2CO3)$	-	F.V.
a2	Fraction of CO ₃ ²⁻ over total inorganic carbon (excluding metal carbonates)	$K1_H2CO3*K2_H2CO3/(C_H^2+K1_H2CO3*C_H+K1_H2CO3*K2_H2CO3)$	-	F.V.
a2_0	Initial fraction of CO ₃ ²⁻ over total inorganic carbon (excluding metal carbonates)	$K1_H2CO3*K2_H2CO3/(C_H_0^2+K1_H2CO3*C_H_0+K1_H2CO3*K2_H2CO3)$	-	F.V.
atom_C	Number of carbon atoms in the substrate	18	-	C.V.
atom_H	Number of hydrogen atoms in the substrate	24	-	C.V.
atom_N	Number of nitrogen atoms in the substrate	4	-	C.V.
atom_O	Number of oxygen atoms in the substrate	5	-	C.V.
AW_Ca	Atomic weight of Ca	40.08	g/mol	C.V.
AW_Cu	Atomic weight of Cu	63.5	g/mol	C.V.

Όνομασία μεταβλητής	Περιγραφή μεταβλητής	Έκφραση	Μονάδες μέτρησης	Είδος*
AW_Fe	Atomic weight of Fe	55.85	g/mol	C.V.
AW_Me	Atomic weight of Me	63.5	g/mol	C.V.
AW_Ni	Atomic weight of Ni	58.69	g/mol	C.V.
AW_Zn	Atomic weight of Zn	65.38	g/mol	C.V.
b	Decay coefficient	0.1	h ⁻¹	C.V.
Balance_Charge	Charge balance	$C_Cations - C_Anions - (10^{-(pH_Initial)} - Kw / 10^{-(pH_Initial)})$	eq/L	F.V.
Balance_C_mol_L	Carbon balance	$atom_C * (C_Org_0 - C_Org) - 5 * (X_C5H7O2N - X_C5H7O2N_0) - (C_CO3 - C_CO3_0) - (C_HCO3 - C_HCO3_0) - (C_H2CO3 - C_H2CO3_0) - X_Me_CO3 - X_Fe_CO3 - X_Zn_CO3 - X_Ni_CO3 - X_Cu_CO3 - X_Ca_CO3$	mol/L	F.V.
Balance_N_mol_L	Nitrogen balance	$atom_N * (C_Org_0 - C_Org) + (C_NO3_0 - C_NO3) - (X_C5H7O2N - X_C5H7O2N_0) - (C_NO2 - C_NO2_0) - (C_NH4 - C_NH4_0) - (C_NH3 - C_NH3_0) - 2 * C_N2$	mol/L	F.V.
check_first_H2CO3		$K1_H2CO3 * C_H2CO3 - C_HCO3 * C_H$	-	F.V.
check_second_H2CO3		$K2_H2CO3 * C_HCO3 - C_CO3 * C_H$	-	F.V.
C_Anions	Anions equivalents	$C_Cl + C_NO3 + C_NO2 + C_HCO3 + 2 * C_CO3 + C_OH$	eq/L	F.V.
C_Ca	Calcium concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Cations	Cations equivalents	$C_Na + C_NH4 + C_H + 2 * C_Me + 2 * C_Cu + 2 * C_Zn + 2 * C_Ni + 2 * C_Fe + 2 * C_Ca$	eq/L	F.V.
C_Ca_0	Initial calcium concentration	$C_Ca_0_mg_L / (1000 * AW_Ca)$	mol/L	F.V.
C_Ca_0_mg_L	Initial calcium concentration in mg/L	725	mg/L	C.V.
C_Cl	Chloride concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Cl_0	Initial chloride concentration	$C_NH4_0 + 2 * C_Me_0 + 2 * C_Cu_0 + 2 * C_Zn_0 + 2 * C_Ni_0 + 2 * C_Fe_0 + 2 * C_Ca_0$	mol/L	F.V.
C_CO3	Carbonate concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.

Όνομασία μεταβλητής	Περιγραφή μεταβλητής	Έκφραση	Μονάδες μέτρησης	Είδος*
C_CO3_0	Initial Carbonate concentration	$a2 \cdot C_Inorganic_0$	mol/L	F.V.
C_Cu	Copper concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Cu_0	Initial copper concentration	$C_Cu_0_mg_L / (1000 \cdot AW_Cu)$	mol/L	F.V.
C_Cu_0_mg_L	Initial copper concentration in mg/L	0-100	mg/L	C.V.
C_Fe	Iron concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Fe_0	Initial iron concentration	$C_Fe_0_mg_L / (1000 \cdot AW_Fe)$	mol/L	F.V.
C_Fe_0_mg_L	Initial iron concentration in mg/L	0-100	mg/L	C.V.
C_H	Protons concentration	Equilibrium State Variable	mol/L	S.V.
C_H2CO3	Carbonic acid concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_H2CO3_0	Initial carbonic acid concentration	$a0 \cdot C_Inorganic_0$	mol/L	F.V.
C_H2O	Water concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_HCO3	Bicarbonate concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_HCO3_0	Initial bicarbonate concentration	$a1 \cdot C_Inorganic_0$	mol/L	F.V.
C_H_0	Initial protons concentration	$10^{(-pH_Initial)}$	mol/L	F.V.
C_Inorganic	Inorganic carbon concentration in the system $H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$	$C_H2CO3 + C_HCO3 + C_CO3$	mol/L	F.V.
C_Inorganic_0	Initial inorganic carbon concentration in the system $H_2CO_3/HCO_3^-/CO_3^{2-}$	0	mol/L	C.V.
C_Me	Sample metal concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Me_0	Initial sample metal concentration	$C_Me_0_mg_L / (1000 \cdot AW_Me)$	mol/L	F.V.
C_Me_0_mg_L	Initial sample metal concentration in mg/L	0-100	mg/L	C.V.
C_N2	Nitrogen concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.

Ονομασία μεταβλητής	Περιγραφή μεταβλητής	Έκφραση	Μονάδες μέτρησης	Είδος*
C_N2_mg_L	Nitrogen concentration in mg/L	$C_{N2} * MW_{N2} * 1000$	mg/L	F.V.
C_Na	Sodium concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Na_0	Initial sodium concentration	$C_{NO3_0} + C_{NO2_0} + C_{HCO3_0} + 2 * C_{CO3_0}$	mol/L	F.V.
C_NH3	Ammonia concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_NH3_0	Initial ammonia concentration	$a0_{NH3_0} * C_{N_ammonium_0}$	mol/L	F.V.
C_NH4	Ammonium concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_NH4_0	Initial ammonium concentration	$a0_{NH4_0} * C_{N_ammonium_0}$	mol/L	F.V.
C_NH4_mg_L	Ammonium concentration in mg/L	$C_{NH4} * MW_{NH4} * 1000$	mg/L	F.V.
C_Ni	Nickel concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Ni_0	Initial nickel concentration	$C_{Ni_0_mg_L} / (1000 * AW_{Ni})$	mol/L	F.V.
C_Ni_0_mg_L	Initial nickel concentration in mg/L	0-100	mg/L	C.V.
C_NO2	Nitrite concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_NO2_0	Initial nitrite concentration	0	mol/L	C.V.
C_NO2_mg_L	Initial nitrite concentration in mg/L	$C_{NO2} * MW_{NO2} * 1000$	mg/L	F.V.
C_NO3	Nitrate concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_NO3_0	Initial nitrate concentration	$C_{NO3_0_mg_L} / (1000 * MW_{NO3})$	mol/L	F.V.
C_NO3_0_mg_L	Initial nitrate concentration in mg/L	6000	mg/L	C.V.
C_NO3_mg_L	Nitrate concentration in mg/L	$C_{NO3} * MW_{NO3} * 1000$	mg/L	F.V.
C_N_ammonium	Total nitrogen concentration in the system NH_4^+ / NH_3	$C_{NH4} + C_{NH3}$	mol/L	F.V.
C_N_ammonium_0	Initial total nitrogen concentration in the system NH_4^+ / NH_3	0.01	mg/L	C.V.

Ονομασία μεταβλητής	Περιγραφή μεταβλητής	Έκφραση	Μονάδες μέτρησης	Είδος*
C_OH	Hydroxyl concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_OH_0	Initial hydroxyl concentration	$10^{-(14-pH_Initial)}$	mol/L	F.V.
C_Org	Organic substrate concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Org_0	Initial organic substrate concentration	$C_Org_0_mg_L/(1000*MW_Org)$	mol/L	F.V.
C_Org_0_mg_L	Initial organic substrate concentration in mg/L	6000	mg/L	C.V.
C_Org_mg_L	Organic substrate concentration in mg/L	$C_Org*MW_Org*1000$	mg/L	F.V.
C_TOC	Total organic carbon concentration	$atom_C*C_Org$	mol/L	F.V.
C_TOC_mg_L	Total organic carbon concentration in mg/L	$C_TOC*1000*12$	mg/L	F.V.
C_Zn	Zinc concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
C_Zn_0	Initial zinc concentration	$C_Zn_0_mg_L/(1000*AW_Zn)$	mol/L	F.V.
C_Zn_0_mg_L	Initial zinc concentration in mg/L	0-100	mg/L	C.V.
d	Substrate reduction degree	$4*atom_C+atom_H-2*atom_O-3*atom_N$	-	F.V.
Experimental_NO2	Experimental values of nitrite	Real List Variable vs. Time	mg/L	R.L.V.
Experimental_NO3	Experimental values of nitrate	Real List Variable vs. Time	mg/L	R.L.V.
fs	Fraction of electrons captured for biomass synthesis	0.5	-	C.V.
μ_{maxNO3}	Maximum specific growth rate of nitrate reduction to nitrite	0.35	h^{-1}	C.V.
K1_H2CO3	First equilibrium constant for the composite $H_2CO_3^*$	4.45E-07	-	C.V.
μ_{maxNO2}	Maximum specific growth rate of nitrite reduction to nitrogen	0.55	h^{-1}	C.V.

Όνομασία μεταβλητής	Περιγραφή μεταβλητής	Έκφραση	Μονάδες μέτρησης	Είδος*
K2_H2CO3	Second equilibrium constant for the composite H ₂ CO ₃ *	4.68E-11	-	C.V.
Ksp_Ca_CO3	Solubility constant of CaCO ₃	2.8e-009	-	C.V.
Ksp_Ca_OH_2	Solubility constant of Ca(OH) ₂	5.5e-006	-	C.V.
Ksp_Cu_CO3	Solubility constant of CuCO ₃	1.4e-010	-	C.V.
Ksp_Cu_OH_2	Solubility constant of Cu(OH) ₂	2.2e-020	-	C.V.
Ksp_Fe_CO3	Solubility constant of FeCO ₃	3.13e-011	-	C.V.
Ksp_Fe_OH_2	Solubility constant of Fe(OH) ₂	4.87e-017	-	C.V.
Ksp_Me_CO3	Solubility constant of MeCO ₃	1.00E-12	-	C.V.
Ksp_Me_OH_2	Solubility constant of Me(OH) ₂	1.00E-08	-	C.V.
Ksp_Ni_CO3	Solubility constant of NiCO ₃	1.42e-007	-	C.V.
Ksp_Ni_OH_2	Solubility constant of Ni(OH) ₂	5.48e-016	-	C.V.
Ksp_Zn_CO3	Solubility constant of ZnCO ₃	1.46e-010	-	C.V.
Ksp_Zn_OH_2	Solubility constant of Zn(OH) ₂	3,00E-17	-	C.V.
Kw	Water dissociation constant	1E-14	-	C.V.
k_Me_CO3	Apparent kinetic constant for MeCO ₃ formation	6E+07	h ⁻¹	C.V.
k_Me_OH_2	Apparent kinetic constant for Me(OH) ₂ formation	1E+08	h ⁻¹	C.V.
K_NH4	Half saturation constants of ammonium	10 ^{^(-9.246)}	mol/L	C.V.
K_NO2	Half saturation constants of nitrite	0.02	mol/L	C.V.
K_NO3	Half saturation constants of nitrate	0.02	mol/L	C.V.
K_Org	Half saturation constants of organic substrate	0.002	mol/L	C.V.

Ονομασία μεταβλητής	Περιγραφή μεταβλητής	Έκφραση	Μονάδες μέτρησης	Είδος*
MW_C5H7O2N	Molecular weight of biomass	113	g/mol	C.V.
MW_N2	Molecular weight of nitrogen	28	g/mol	C.V.
MW_NH4	Molecular weight of ammonium	18	g/mol	C.V.
MW_NO2	Molecular weight of nitrite	46	g/mol	C.V.
MW_NO3	Molecular weight of nitrate	62	g/mol	C.V.
MW_Org	Molecular weight of organic substrate	$\text{atom_C} \cdot 12 + \text{atom_H} \cdot 1 + \text{atom_O} \cdot 16 + \text{atom_N} \cdot 14$	g/mol	F.V.
pH	Calculation of pH	$-\log_{10}(C_H)$	-	F.V.
pH_Initial	Initial pH of wastewater	3.5	-	C.V.
Qin	Volumetric flow rate	Real List Variable vs. Time	L/h	R.L.V.
Qrec	Recirculation flow rate	Real List Variable vs. Time	L/h	R.L.V.
Q_discharge	Discharge flow rate	Discharge	L/h	R.L.V.
SI_CaCO3	Saturation index of CaCO ₃	$C_Ca \cdot C_CO3 / Ksp_Ca_CO3$	-	F.V.
SI_CaOH2	Saturation index of Ca(OH) ₂	$C_Ca \cdot C_OH^2 / Ksp_Ca_OH_2$	-	F.V.
SI_CuCO3	Saturation index of CuCO ₃	$C_Cu \cdot C_CO3 / Ksp_Cu_CO3$	-	F.V.
SI_CuOH2	Saturation index of Cu(OH) ₂	$C_Cu \cdot C_OH^2 / Ksp_Cu_OH_2$	-	F.V.
SI_FeCO3	Saturation index of FeCO ₃	$C_Fe \cdot C_CO3 / Ksp_Fe_CO3$	-	F.V.
SI_FeOH2	Saturation index of Fe(OH) ₂	$C_Fe \cdot C_OH^2 / Ksp_Fe_OH_2$	-	F.V.
SI_MeCO3	Saturation index of MeCO ₃	$C_Me \cdot C_CO3 / Ksp_Me_CO3$	-	F.V.
SI_MeOH2	Saturation index of Me(OH) ₂	$C_Me \cdot C_OH^2 / Ksp_Me_OH_2$	-	F.V.
SI_NiCO3	Saturation index of NiCO ₃	$C_Ni \cdot C_CO3 / Ksp_Ni_CO3$	-	F.V.
SI_NiOH2	Saturation index of Ni(OH) ₂	$C_Ni \cdot C_OH^2 / Ksp_Ni_OH_2$	-	F.V.
SI_ZnCO3	Saturation index of ZnCO ₃	$C_Zn \cdot C_CO3 / Ksp_Zn_CO3$	-	F.V.

Όνομασία μεταβλητής	Περιγραφή μεταβλητής	Έκφραση	Μονάδες μέτρησης	Είδος*
SI_ZnOH2	Saturation index of Zn(OH) ₂	$C_{Zn} * C_{OH}^2 / K_{sp_Zn_OH_2}$	-	F.V.
Time	Time	System variable	h	Sys.V.
X_C5H7O2N	Biomass concentration	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_C5H7O2N_0	Initial biomass concentration in mol/L	$X_{C5H7O2N_0_mg_L} / (1000 * MW_{C5H7O2N})$	mol/L	F.V.
X_C5H7O2N_0_mg_L	Initial biomass concentration in mg/L	3500	mg/L	C.V.
X_C5H7O2N_mg_L	Concentration of biomass in mg/L	$X_{C5H7O2N} * MW_{C5H7O2N} * 1000$	mg/L	F.V.
X_Ca_CO3	Concentration of CaCO ₃	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Ca_OH_2	Concentration of Ca(OH) ₂	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Cu_CO3	Concentration of CaCO ₃	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Cu_OH_2	Concentration of Cu(OH) ₂	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Fe_CO3	Concentration of FeCO ₃	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Fe_OH_2	Concentration of Fe(OH) ₂	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Me_CO3	Concentration of MeCO ₃	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Me_OH_2	Concentration of Me(OH) ₂	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Ni_CO3	Concentration of NiCO ₃	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Ni_OH_2	Concentration of Ni(OH) ₂	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Zn_CO3	Concentration of ZnCO ₃	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.
X_Zn_OH_2	Concentration of Zn(OH) ₂	Dynamic volume state variable	mol/L	S.V.

5 | Πειραματική μελέτη των κύριων παραμέτρων μικροβιακής απονιτροποίησης

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν στα Κεφάλαια 2 και 3, οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν τη μικροβιακή απονιτροποίηση είναι:

- η πηγή οργανικού άνθρακα

Αγγελής, 2017; Gerber et al., 1986; Matějů et al., 1992; Tam et al., 1992; Akunna et al., 1993; Christenson et al., 1994; Lee & Welandar, 1996; Nyberg et al., 1996; *Æsøly* et al., 1998; Gavazza dos Santos et al., 2004; Elefsiniotis & Li, 2006; Mokhayeri et al., 2006; Fillos & Ramalingam, 2007; Labbé et al., 2007; Peng et al., 2007; Hamlin et al., 2008; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Cherchi et al., 2009; Shen et al., 2009; Srinandan et al., 2012; Sun et al., 2016b; Madigan et al., 2018; Xu et al., 2018; Albina et al., 2019; Lee et al., 2019; Ly et al., 2019; Letelier-Gordo et al., 2020; Mielcarek et al., 2020; Rittmann & McCarty, 2020; Soh et al., 2020; Wang et al., 2021; Fu et al., 2022; Jiang et al., 2022a; Singh et al., 2022

- η τιμή του λόγου άνθρακα υποστρώματος και αζώτου νιτρικών (C/N)

Beccari et al., 1983; Matějů et al., 1992; Her & Huang, 1995; *Æsøly* et al., 1998; Martienssen & Schöps, 1999; Elefsiniotis & Li, 2006; Mokhayeri et al., 2006; Gabaldón et al., 2007; Cherchi et al., 2009; Ge et al., 2012; Mohsenipour et al., 2014; Mohan et al., 2016; Sun et al., 2016b; Pérez-Marín et al., 2018; Lee et al., 2019; Fu et al., 2022; Wang et al., 2022; Zhang et al., 2022b; Zeng et al., 2023

- το αρχικό pH

Parkin et al., 1985; Kučera et al., 1986; Thomsen et al., 1994; Glass & Silverstein, 1998; Hillel et al., 2005; Jørgensen & Fath, 2008; Osaka et al., 2008; Saleh-Lakha et al., 2009; Shen et al., 2009; Pan et al., 2012; Papirio et al., 2014; Madigan et al., 2018; Albina et al., 2019; Lee et al., 2019; Wang et al., 2022

- η συγκέντρωση νιτρικών ιόντων στην τροφοδοσία ή κατά την εξέλιξη της απονιτροποίησης

Glass & Silverstein, 1999; Martienssen & Schöps, 1999; Elefsiniotis & Li, 2006; Ge et al., 2012; Mohan et al., 2016; Albina et al., 2019; Zhang et al., 2022b

- η συγκέντρωση χλωριόντων (αλατότητα)

Glass & Silverstein, 1999; Huu et al., 1999; Mormile et al., 1999; Bouchotroch et al., 2001; Martínez-Cánovas et al., 2004; Mattila et al., 2007; Osaka et al., 2008; Wu et al., 2008; Sapovalova et al., 2009; Nakano et al., 2010; Miao et al., 2015; Albina et al., 2019; Zhu, 2017; Madigan et al., 2018; Yoshie et al., 2022

- η παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων

Bollag & Barabasz, 1979; Danecka-Bialek & Romka, 1991; Sakadevan et al., 1999; Holtan-Hartwig et al., 2002; Granger & Ward, 2003; Remoundaki et al., 2003a; Seifert & Domka, 2005; Singh & Tripathy, 2007; Fernández-Nava et al., 2008; Jacinthe & Tedesco, 2009; Schaechter, 2009; You et al., 2009; Cyplik et al., 2012; Woolfenden et al., 2013; Zhu et al., 2013; Zou et al., 2013; Li et al., 2014; Papirio et al., 2014; Zou et al., 2014; Zou et al., 2015; Ramírez et al., 2017; Deng et al., 2018; Madigan et al., 2018; Wang et al., 2018; Chen et al., 2019; Cheng et al., 2019; Zhao et al., 2020; Ke et al., 2021; Liu et al., 2021; Rajasekar et al., 2021; Liu et al., 2022; Lu et al., 2022; Ren et al., 2023

- η παρουσία θειικών ιόντων

Remoundaki et al., 2003a; Zou et al., 2015

Στη συνέχεια παρουσιάζονται και συζητούνται τα πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης της καθεμίας από τις παραμέτρους αυτές.

5.1. Μελέτη της κινητικής της απονιτροποίησης

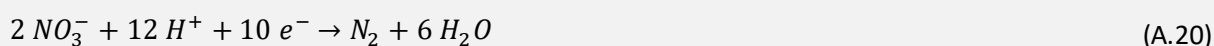
Η χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων νιτρικών και νιτρωδών ιόντων καθώς και η μεταβολή των τιμών του pH για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρωδών, όταν το σύστημα λειτουργεί σε κατάσταση διαλείποντος έργου, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.1(α)-(γ).

Σύμφωνα με το Σχήμα 5.1(α)-(β), παρατηρείται πλήρης απονιτροποίηση εντός 4 (τεσσάρων), 6 (έξι) και 24 (εικοσιτεσσάρων) ωρών, όταν η αρχική συγκέντρωση νιτρικών είναι 750 mg/L, 2 750 mg/L και 5 750 mg/L, αντίστοιχα. Για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 750 mg/L και 2 750 mg/L, ο ρυθμός αναγωγής νιτρικών είναι 1 000 mg NO₃-N/L/d και 2 500 mg NO₃-N/L/d, αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.1(β), η αναγωγή των νιτρικών πραγματοποιείται μέσω της παραγωγής νιτρωδών. Η μορφή των καμπυλών των νιτρωδών ακολουθεί την τυπική μορφή που παρατηρείται, όταν τα νιτρώδη, ως ενδιάμεσα προϊόντα κατά την απονιτροποίηση, ανάγονται περαιτέρω μέσω της μικροβιακής δράσης (Glass & Silverstein, 1999; Yoshie et al., 2002; Ge et al., 2012; Mohan et al., 2016; Sun et al., 2016a; Hamdani et al., 2018). Συνεπώς, οι κορυφές των καμπυλών αντιστοιχούν στη χρονική στιγμή κατά την οποία η αναγωγή/κατανάλωση των νιτρωδών είναι ταχύτερη από την παραγωγή τους. Οι ίδιες καμπύλες δείχνουν ότι η μέγιστη συγκέντρωση νιτρωδών είναι υψηλότερη, όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση νιτρικών. Συγκεκριμένα, οι μέγιστες συγκεντρώσεις νιτρωδών που παρατηρούνται είναι 200 mg/L στις 2 (δύο) ώρες, 580 mg/L στις 4 (τέσσερις) ώρες και 1 000 mg/L στις 5 (πέντε) ώρες από την έναρξη του πειράματος, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 750 mg/L, 2 750 mg/L και 5 750 mg/L, αντίστοιχα. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται εξαιτίας του ανταγωνισμού μεταξύ των αναγωγασών των νιτρικών και νιτρωδών ιόντων για τη μεταφορά ηλεκτρονίων και έχει ως αποτέλεσμα καταστολή της δράσης της αναγωγάσης των νιτρωδών, επιβράδυνση της αναγωγής νιτρωδών και συσσώρευσή τους στο διάλυμα (Glass & Silverstein, 1999; Ge et al., 2012; Zhang et al., 2022b). Πλήρης αναγωγή των νιτρωδών παρατηρείται σε 4 (τέσσερις) και σε λιγότερο από 24 (εικοσιτέσσερις) ώρες, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 750 mg/L και 2 750 mg/L και 5 750 mg/L, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την υψηλή απονιτροποιητική ικανότητα του βιολογικού αντιδραστήρα προσκολλημένης βιομάζας που έχει εμβολιαστεί με το στέλεχος *Halomonas denitrificans*. Τα διαλυτά χημικά είδη αζώτου (NO₃⁻, NO₂⁻) απομακρύνονται από το διάλυμα εντός 24 (εικοσιτεσσάρων) ωρών και ικανοποιούν τα όρια που θέτει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) (Πίνακας 1.8), ακόμη και για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων κοντά στα 6 g/L. Με τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρες προσκολλημένης

βιομάζας (Hirata et al., 2001; Mattila et al., 2007; Hamlin et al., 2008; Hamdani et al., 2018; Xu et al., 2018; Jiang et al., 2022b).

Σχετικά με την καταγραφή των τιμών του pH κατά την κινητική μελέτη της απονιτροποίησης, όπως αυτές παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.1(γ), σε όλους τους κύκλους δοκιμών παρατηρείται αύξηση των τιμών του pH. Η αύξηση των τιμών του pH κατά την απονιτροποίηση δείχνει την κατανάλωση υδρογονοκατιόντων κατά την κυτταρική αναπνοή, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (A.16) έως (A.20):

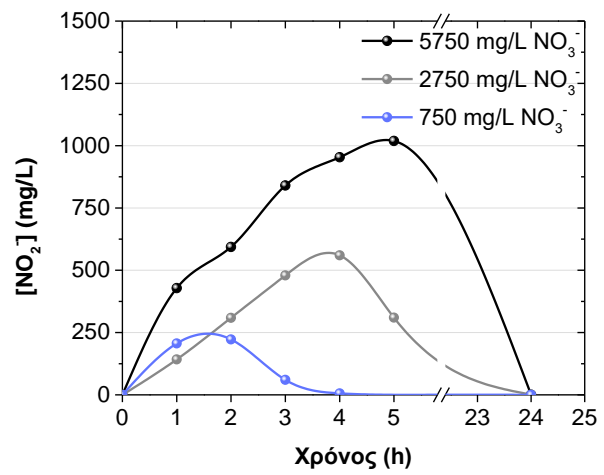
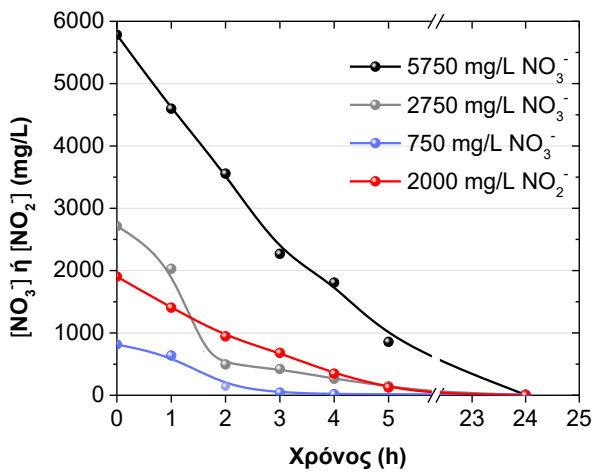


Επίσης, παρατηρείται ότι όσο υψηλότερη είναι η αρχική συγκέντρωση νιτρικών, άρα και η συγκέντρωση νιτρικών που ανάγεται, τόσο περισσότερο αυξάνονται οι τιμές pH. Το μοτίβο που ακολουθούν οι καμπύλες στο Σχήμα 5.1(γ) είναι το εξής: το pH ξεκινά από αρχικές τιμές στο εύρος 6.2-7.2, οι οποίες στη συνέχεια αυξάνονται έως ότου φθάσουν τη μέγιστη τιμή τους και ακολούθως μειώνονται προς την τιμή ισορροπίας τους. Οι μέγιστες τιμές pH είναι 7.6, 8.3 και 8.6 για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 750 mg/L, 2 750 mg/L και 5 750 mg/L, αντίστοιχα, και αντιστοιχούν σε μειωμένη υπολειμματική συγκέντρωση νιτρικών.

Η ικανότητα του *H. denitrificans* να χρησιμοποιεί τα νιτρώδη ιόντα ως μοναδικό δέκτη ηλεκτρονίων κατά την απονιτροποίηση απουσία νιτρικών διερευνήθηκε για συγκέντρωση νιτρώδων 2 000 mg/L (Σχήμα 5.1(α)). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η καλλιέργεια *H. denitrificans* μπορεί να ανάγει τα πλήρως τα νιτρώδη απουσία νιτρικών εντός 6 (έξι) ωρών, χωρίς σημαντική καθυστέρηση σε σύγκριση με την αναγωγή συγκέντρωσης 2 750 mg/L νιτρικών, στην οποία τα νιτρικά και τα νιτρώδη έχουν περίπου ίση γραμμομοριακότητα αζώτου κατ' όγκο. Παρόλα αυτά, η αναγωγή 2 000 mg/L νιτρώδων οδηγεί σε μέγιστη τιμή pH 8.8 και σε pH ισορροπίας 8.3 (Σχήμα 5.1(γ)), τιμές υψηλότερες από όσες αντιστοιχούν σε αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών έως 5 750 mg/L.

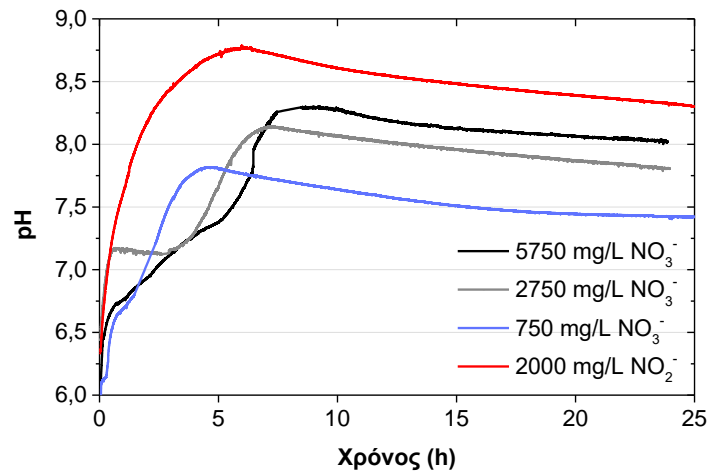
Το σύνολο των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τη μελέτη της κινητικής της απονιτροποίησης δείχνουν την ικανότητα του βιολογικού αντιδραστήρα να ανάγει πλήρως τα νιτρικά ιόντα προς αέριο άζωτο διαμέσου της παραγωγής νιτρώδων. Επίσης, αν και η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης νιτρικών επιβραδύνει τον χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση της απονιτροποίησης, η απόδοση του βιολογικού αντιδραστήρα ως προς την απομάκρυνση αζώτου (νιτρικών και νιτρώδων) είναι

σταθερή και η εκροή παραμένει απαλλαγμένη από υπολειμματικές συγκεντρώσεις αζώτου (Mendrinou et al., 2020; 2021).



(α)

(β)

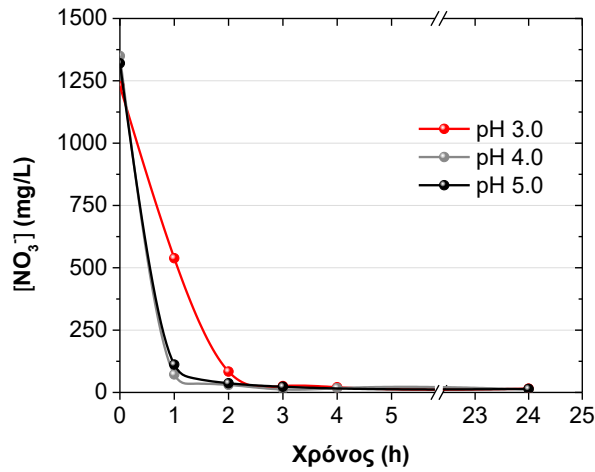


(γ)

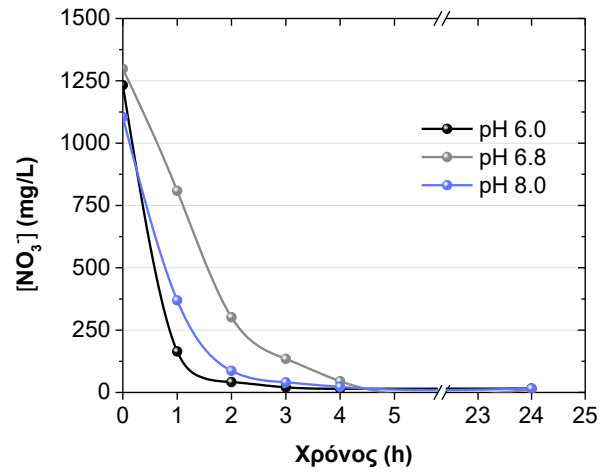
Σχήμα 5.1: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων, και (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων 750 mg/L, 2 750 mg/L και 5 750 mg/L και νιτρωδών ιόντων 2 000 mg/L

5.2. Επίδραση του αρχικού pH στην απονιτροποίηση

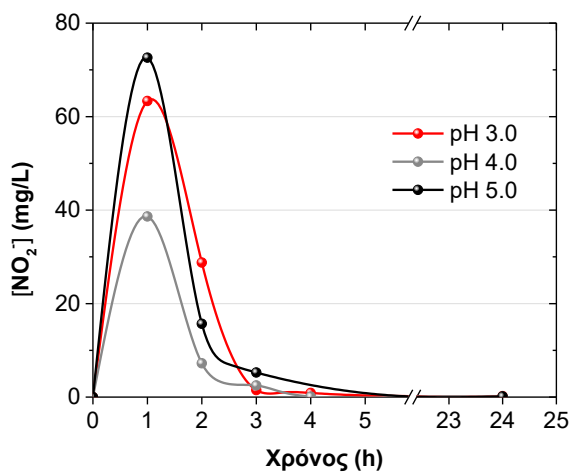
Η επίδραση του αρχικού pH στην απονιτροποίηση μελετήθηκε πειραματικά για εύρος pH 3-8, ύστερα από ρύθμιση στις τιμές 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 και 8.0, αλλά και χωρίς ρύθμιση της τιμής του pH στο θρεπτικό μέσο (pH=6.8). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.2(α)-(στ).



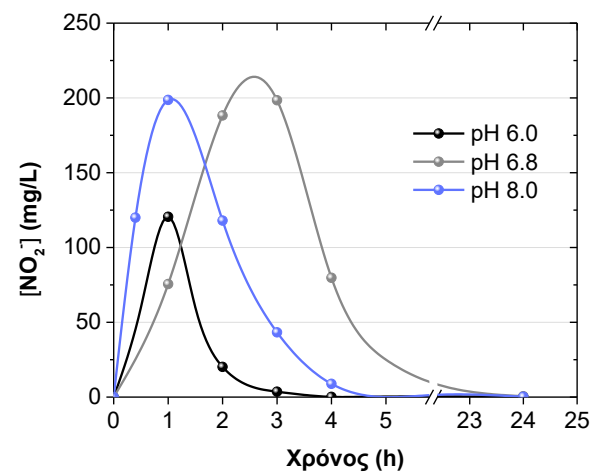
(α)



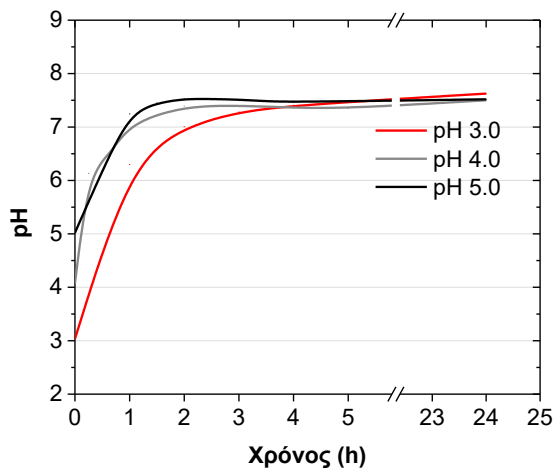
(β)



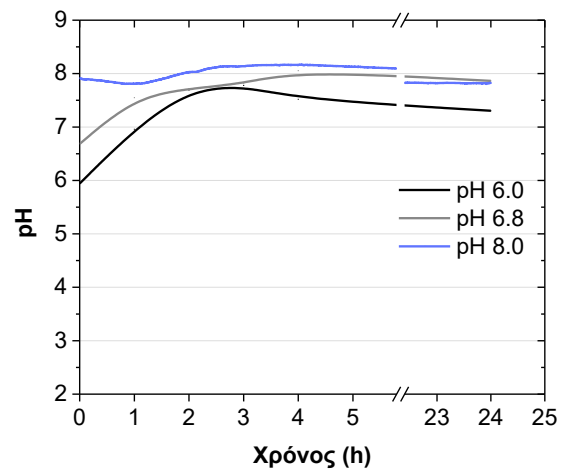
(γ)



(δ)



(ε)



(στ)

Σχήμα 5.2: (α)-(β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (γ)-(δ) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, και (ε)-(στ) Μεταβολή του pH, για αρχικές τιμές pH 3, 4, 5 και 6, 6.8, 8, αντίστοιχα, σε συνάρτηση με τον χρόνο

Τα νιτρικά (1 250 mg/L) ανάγονται προς αέριο άζωτο εντός 5 (πέντε) ωρών, όταν οι αρχικές τιμές pH είναι χαμηλότερες από 5.0, εντός 4 (τεσσάρων) έως 5 (πέντε) ωρών, όταν το pH έχει τιμές pH 6.0 και 6.8 και εντός 24 (εικοσιτεσσάρων) ωρών, όταν το pH είναι βασικό (τιμή pH 8.0) (Σχήμα 5.2(α)-(δ)). Οι αντίστοιχες μέγιστες τιμές νιτρωδών ιόντων είναι χαμηλότερες από 80 mg/L (pH<5), μεταξύ 120 mg/L και 200 mg/L (6.0<pH<6.8) και υψηλότερες από 200 mg/L (pH=8) (Σχήμα 5.2(γ)-(δ)). Τα ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η αρχική τιμή pH επηρεάζει τη συσσώρευση νιτρωδών ιόντων: όξινο pH οδηγεί σε μικρότερη συσσώρευση νιτρωδών σε σύγκριση με βασικό pH, γεγονός που οφείλεται σε αυξημένο ρυθμό κατανάλωσης νιτρωδών ή σε μειωμένο ρυθμό αναγωγής νιτρικών. Ο ρυθμός αναγωγής νιτρικών κυμαίνεται μεταξύ 1 700 mg NO₃-N/L/d και 2 300 mg NO₃-N/L/d για τιμές pH χαμηλότερες από 4 και υψηλότερες από 5 και περίπου 3 500 mg NO₃-N/L/d για τιμές pH 4 και 5. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν την ικανότητα του *H. denitrificans* για απονιτροποίηση σε όξινες συνθήκες, διατηρώντας χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρωδών ιόντων στο διάλυμα.

Σε τιμές pH χαμηλότερες από 6.5 η τιμή pH ισορροπίας κυμαίνεται μεταξύ 7.3 και 7.6, ενώ σε τιμές pH υψηλότερες από 6.5 είναι 7.8 (Σχήμα 5.2(ε)-(στ)). Τα ευρήματα αυτά, σε συνδυασμό με τις υψηλές ταχύτητες απονιτροποίησης που παρατηρούνται σε όξινες τιμές pH, δείχνουν την ικανότητα των βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Halomonas* να διατηρούν υψηλούς ρυθμούς απονιτροποίησης σε μεγάλο εύρος τιμών pH, γεγονός που συμφωνεί και με τη βιβλιογραφία (Peyton et al., 2001; Osaka et al., 2008; Zhu, 2017). Η μεγάλη αύξηση στις τιμές του pH, ιδιαίτερα όσον αφορά τις αρχικά όξινες τιμές του, αποδεικνύει την ικανότητα του βιολογικού αντιδραστήρα να ανέχεται και να εξουδετερώνει όξινα υγρά απόβλητα, όπως αυτά που προέρχονται από υδρομεταλλουργικές διεργασίες για ανάκτηση μετάλλων. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας μπορούν να απονιτροποιούν τροφοδοσία με pH 2.5 (Papirio et al., 2014) και 4.0 (Ugurly & Ozturkcü, 2018), χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στην απονιτροποίηση.

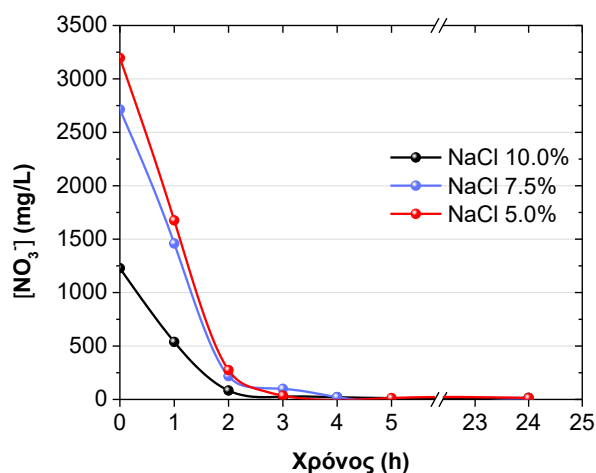
Το σύνολο των αποτελεσμάτων σχετικά με την επίδραση του αρχικού pH στην απονιτροποίηση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αναγωγή των νιτρικών προς αέριο άζωτο είναι δυνατή για εύρος pH μεταξύ των τιμών 3.0 και 8.0. Ο βιολογικός αντιδραστήρας καταφέρνει να διατηρήσει σταθερή την απόδοσή του, τόσο σε εισροή όξινων υγρών αποβλήτων, επιτυγχάνοντας την εξουδετέρωσή τους, όσο και σε εισροή ελαφρά αλκαλικών αποβλήτων που οδηγεί σε αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρωδών κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης, χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητα της εκροής από υπολειμματικές συγκεντρώσεις (Mendrinou et al., 2020; 2021).

5.3. Επίδραση της αλατότητας στην απονιτροποίηση

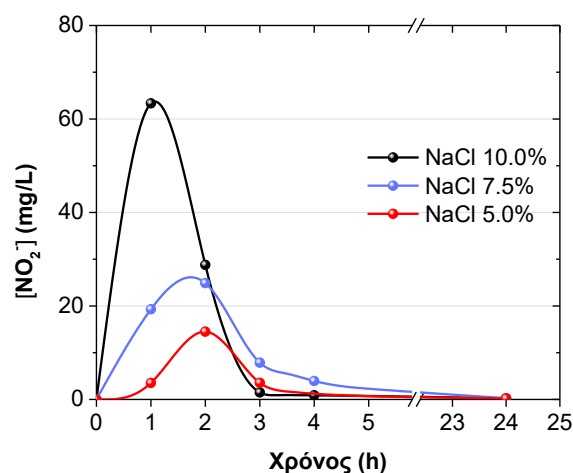
Τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν για τιμές αλατότητας 10%, 7.5% και 5%, με αντίστοιχες συγκεντρώσεις νιτρικών 1 250 mg/L, 2 750 mg/L και 3 250 mg/L, παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.3(α)-(γ).

Σύμφωνα με το Σχήμα 5.3(α)-(β), η μεταβολή στη συγκέντρωση NaCl στην τροφοδοσία δεν επιδρά στον χρόνο ολοκλήρωσης της απονιτροποίησης ο οποίος είναι 4 (τέσσερις) ώρες. Παρόλα αυτά, όσο αυξάνονται οι τιμές αλατότητας, τόσο αυξάνεται η συσσώρευση νιτρωδών ιόντων και μειώνεται η ταχύτητα αναγωγής νιτρικών. Συγκεκριμένα, η ταχύτητα αναγωγής νιτρικών υπολογίζεται σε 5 900 mg NO₃-N/L/d για αλατότητα 5%, 5 000 mg NO₃-N/L/d για 7.5% και 3 400 mg NO₃-N/L/d για 10%. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται βιβλιογραφικά: οι Glass & Silverstein (1999) και Mattila et al. (2007) αναφέρουν ότι η αύξηση της αλατότητας σε τιμές έως 8% μπορεί να οδηγήσει σε επιβράδυνση της απονιτροποίησης· οι Yoshie et al. (2002) μελέτησαν την επεξεργασία μεταλλουργικών αποβλήτων με αυξημένη αλατότητα σε αντιδραστήρα προσκολλημένης βιομάζας (Πίνακας 3.1) και απέδωσαν τη συσσώρευση νιτρωδών στον περιορισμό του αριθμού των διαφορετικών γονιδίων που κωδικοποιούν τις αναγωγάσες των νιτρωδών καθώς η αλατότητα αυξάνεται· οι Miao et al. (2015) αναφέρουν ότι αυξημένες τιμές αλατότητας μπορούν να έχουν άμεση επίδραση στη φυσιολογία των κυττάρων και να ενισχύσουν την ποικιλότητα των απονιτροποιητικών βακτηρίων. Όσον αφορά τα είδη του γένους *Halomonas*, οι Peyton et al. (2001) έδειξαν ότι καλλιέργεια του βακτηρίου *H. campisalis* μπορεί να ανάγει πλήρως τα νιτρικά ιόντα σε αλατότητα 12.5% (pH 9) και οι Wang et al. (2019) έδειξαν ότι η ικανότητα απομάκρυνσης αζώτου σε συνθήκες αλατότητας 6% είναι κοινή ιδιότητα μεταξύ των βακτηρίων που ανήκουν στο γένος *Halomonas*. Παρόλο που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πολλά βακτήρια που ανήκουν στο γένος μπορούν να αναπτύσσονται σε τιμές αλατότητας μεταξύ 0.59%-26.3% (βέλτιστη αλατότητα στο εύρος 3.0%-10%) (Berendes et al., 1996; Mormile et al., 1999; Bouchotroch et al., 2001; Martinez-Canovas et al., 2004; Kim et al., 2007; Wu et al., 2008; Sharovalova et al., 2009), στην πράξη μπορούν να επικρατήσουν έναντι άλλων απονιτροποιητών σε μικτές καλλιέργειες σε αλατότητα υψηλότερη από 5% (Yoshie et al., 2005; Osaka et al., 2008; Miao et al., 2015). Τέλος, το Σχήμα 5.3(γ) δείχνει ότι το pH ξεκινά από την τιμή 3 και αυξάνεται σε ουδέτερες τιμές (7.0-7.7) εντός δύο ωρών από την έναρξη του πειράματος, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση αλατότητας.

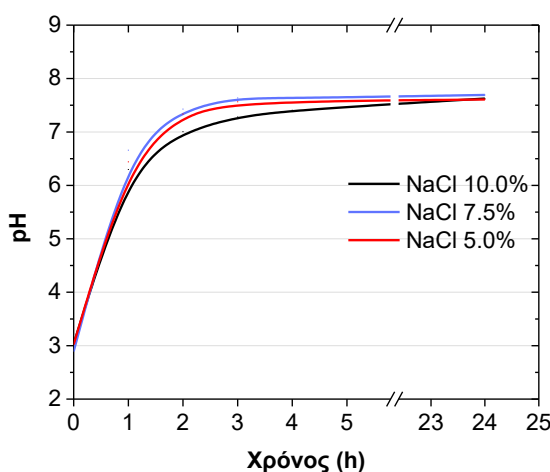
Από την παράθεση των αποτελεσμάτων που αφορούν την επίδραση της αλατότητας στην απονιτροποίηση φαίνεται ότι ο βιολογικός αντιδραστήρας προσκολλημένης βιομάζας επιτυγχάνει πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων προς αέριο άζωτο, καθώς και εξουδετέρωση των όξινων υγρών αποβλήτων, ανεξάρτητα από την τιμή της αλατότητας, όταν αυτή βρίσκεται στο εύρος 5%-10% (Mendrinou et al., 2020; 2021).



(α)



(β)

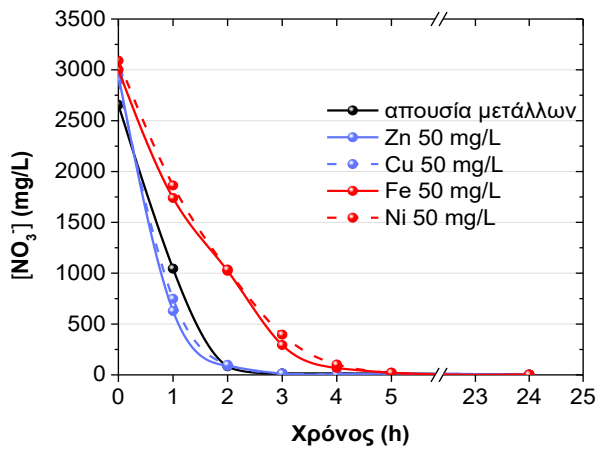


(γ)

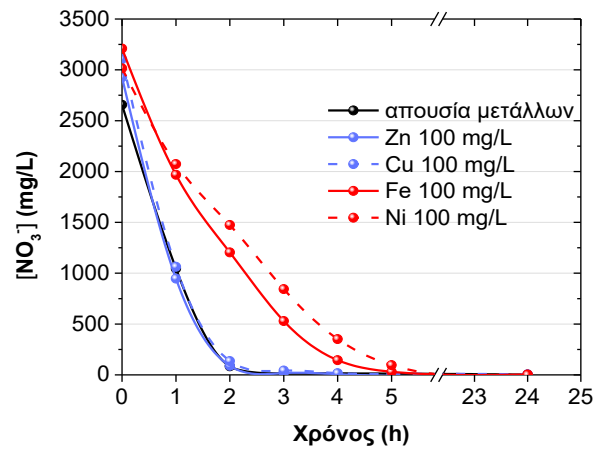
Σχήμα 5.3: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης των παραγόμενων νιτρωδών ιόντων, και (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, για τιμές αλατότητας 5%, 7.5% και 10%

5.4 Επίδραση των μετάλλων Zn, Cu, Fe και Ni στην απονιτροποίηση

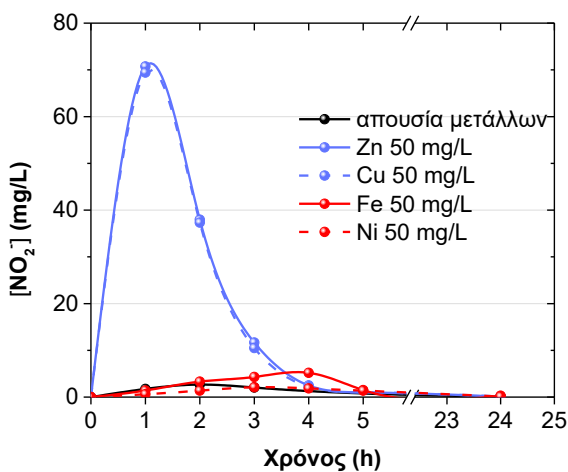
Η επίδραση του ψευδαργύρου (Zn), του χαλκού (Cu), του σιδήρου (Fe) και του νικελίου (Ni) στην απονιτροποίηση μελετήθηκε αρχικά για κάθε μέταλλο ξεχωριστά σε αρχικές συγκεντρώσεις 50 mg/L και 100 mg/L και παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.4(α)-(στ). Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της ταυτόχρονης παρουσίας των μετάλλων αυτών στο ρεύμα τροφοδοσίας σε συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L (Σχήμα 5.5(α)-(γ)). Οι αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών και θειικών ιόντων ήταν 2 750 mg/L-3 250 mg/L και 2 200 mg/L, αντίστοιχα, το αρχικό pH 3.0 και η αλατότητα 5%.



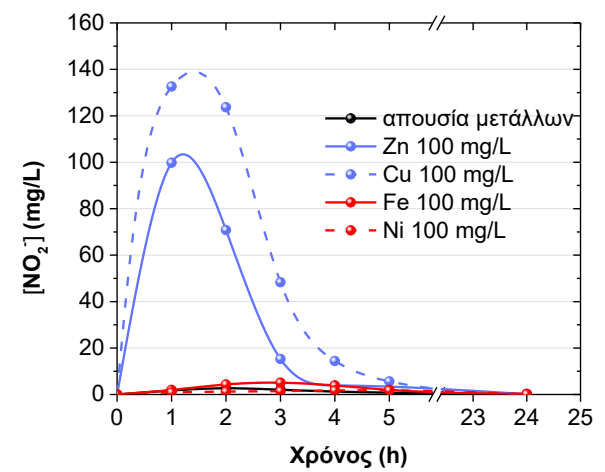
(α)



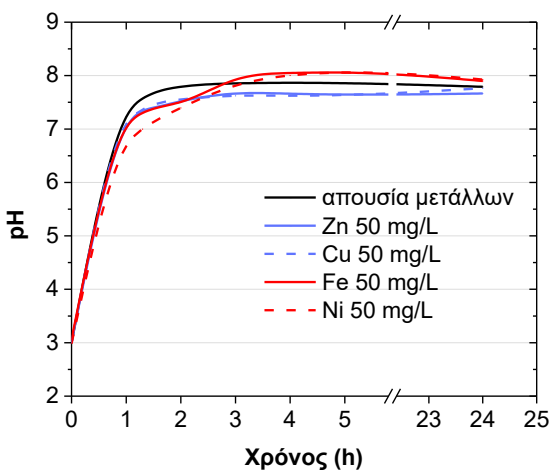
(β)



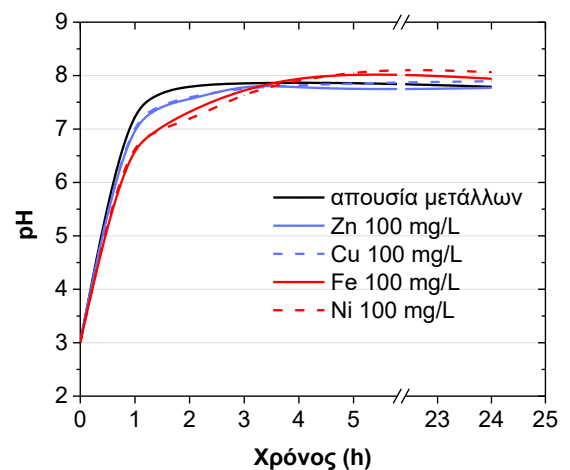
(γ)



(δ)



(ε)

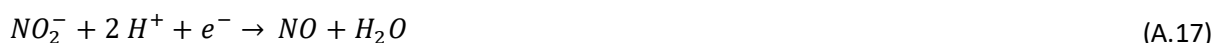


(στ)

Σχήμα 5.4: (α)-(β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (γ)-(δ) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, και (ε)-(στ) Μεταβολή του pH, για αρχικές συγκεντρώσεις Zn, Cu, Fe και Ni 50 mg/L και 100 mg/L, αντίστοιχα, σε συνάρτηση με τον χρόνο και σε σύγκριση με την επίδραση στην εξέλιξη της απονιτροποίησης για μηδενικές αρχικές συγκεντρώσεις αυτών

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.4(α)-(δ), η παρουσία μετάλλων σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/L δεν προκαλεί αναχαίτιση στην απονιτροποίηση. Συγκεκριμένα, η αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών ιόντων ολοκληρώνεται εντός 5 (πέντε) ωρών από την έναρξη του πειράματος. Το Σχήμα 5.4(ε)-(στ) δείχνει ότι το pH αυξάνεται από την αρχική τιμή 3 σε ουδέτερες τιμές (7.2-7.5) εντός 2 (δύο) ωρών και η τιμή pH ισορροπίας είναι περίπου 8.0. Ανάλογα με την επίδραση τους στον μικροβιακό μεταβολισμό, τα μέταλλα μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: (i) Zn και Cu (ii) Fe και Ni. Συγκεκριμένα, παρουσία Zn και Cu σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/L η αναγωγή των νιτρικών διαρκεί 3 (τρεις) ώρες, όσο και στην περίπτωση απουσίας μετάλλων, ενώ παρουσία Fe και Ni διαρκεί 5 (πέντε) ώρες (Σχήμα 5.4(α)-(β)). Ο ρυθμός αναγωγής νιτρικών στην περίπτωση απουσίας μετάλλων είναι 4 900 mg NO₃-N/L/d, στις περιπτώσεις του ψευδαργύρου και του χαλκού είναι αυξημένος, δηλαδή 5 300 mg NO₃-N/L/d, και στις περιπτώσεις του σιδήρου και του νικελίου μειωμένος και ίσος με 3 300-3 500 mg NO₃-N/L/d, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση των μετάλλων στο διάλυμα. Συνεπώς, η παρουσία ψευδαργύρου και χαλκού σε συγκεντρώσεις έως 100 mg/L ευνοεί την αναγωγή νιτρικών, ενώ παρουσία σιδήρου και νικελίου η απονιτροποίηση επιβραδύνεται. Επίσης, σύμφωνα με το Σχήμα 5.4(γ)-(δ), για αρχικές συγκεντρώσεις Zn και Cu 50 mg/L και 100 mg/L παρατηρούνται συγκεντρώσεις νιτρωδών έως 75 mg/L και 100-150 mg/L, αντίστοιχα. Αντίθετα, αρχικές συγκεντρώσεις Fe και Ni έως 100 mg/L οδηγούν σε συγκεντρώσεις νιτρωδών χαμηλότερες από 10 mg/L, παρόμοια με την περίπτωση απουσίας μετάλλων. Πράγματι, οι Gang et al. (2013) παρατήρησαν ότι η παρουσία χαλκού οδηγεί σε υψηλότερη συσσώρευση νιτρωδών σε σύγκριση με το νικέλιο και τον σίδηρο. Επομένως, η παρουσία Ni και Fe φαίνεται ότι επιδρά στον μικροβιακό μεταβολισμό επιβραδύνοντας την αναγωγή νιτρικών, σε αντίθεση με την παρουσία Zn και Cu, που οδηγούν σε επιβράδυνση της αναγωγής νιτρωδών.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο Cu και ο Fe αναμένεται να επηρεάζουν θετικά κάθε στάδιο της απονιτροποίησης, επειδή είναι απαραίτητα ιχνοστοιχεία για τη δράση της αναγωγάσης των νιτρωδών NiR, της αναγωγάσης του μονοξειδίου του αζώτου NoR και της αναγωγάσης του υποξειδίου του αζώτου Nos που καταλύουν, αντίστοιχα, τις αντιδράσεις (A.17), (A.18) και (A.19):



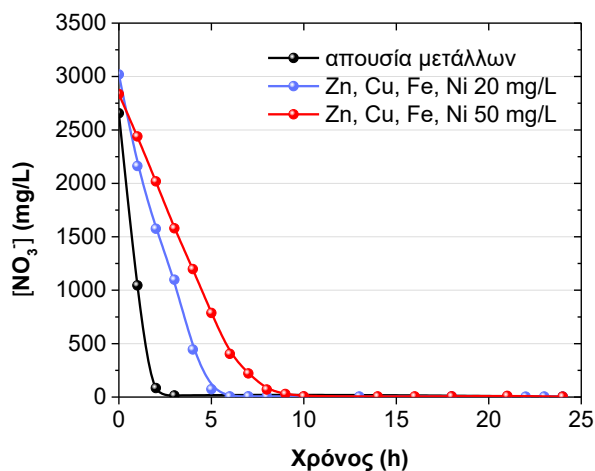
Η παρουσία χαλκού μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη και δραστηριότητα των απονιτροποιητικών βακτηρίων, ενώ η απουσία του μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση οξειδίων του αζώτου (Granger & Ward, 2003; Woolfenden et al., 2013). Αντίθετα, η παρουσία χαλκού σε υψηλές συγκεντρώσεις, περίπου 5 mg/L, μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση νιτρωδών (Cheng et al., 2019) και σε μειωμένη

δράση της αναγωγής των νιτρικών και του οξειδίου του αζώτου (Zhao et al., 2020). Οι Papirio et al. (2014) και Wang et al. (2018) έδειξαν ότι ο χαλκός σε συγκεντρώσεις 1 000 mg/L και 100 mg/L μπορεί να αναχαιτίσει την απομάκρυνση νιτρικών σε αντιδραστήρα προσκολλημένης βιομάζας. Η απονιτροποιητική ικανότητα των μικροοργανισμών είναι δυνατόν να αποκατασταθεί μετά την απομάκρυνση του βιοδιαθέσιμου χαλκού μέσω ακινητοποίησης (Jacinthe & Tedesco, 2009). Σε αντίθεση με τα ευρήματα αυτά και σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, συγκεντρώσεις χαλκού έως 100 mg/L μπορούν να επιταχύνουν την αναγωγή νιτρικών κατά περίπου 10%. Όσον αφορά τον σίδηρο, οι Papirio et al. (2014) έδειξαν ότι μπορεί να ευνοήσει την απονιτροποιητική δραστηριότητα σε αντιδραστήρα προσκολλημένης βιομάζας, αυξάνοντας τον ρυθμό απονιτροποίησης. Τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι συγκεντρώσεις σιδήρου έως 100 mg/L μπορούν να προκαλέσουν επιβράδυνση της απονιτροποίησης, αλλά όχι αναχαίτιση αυτής.

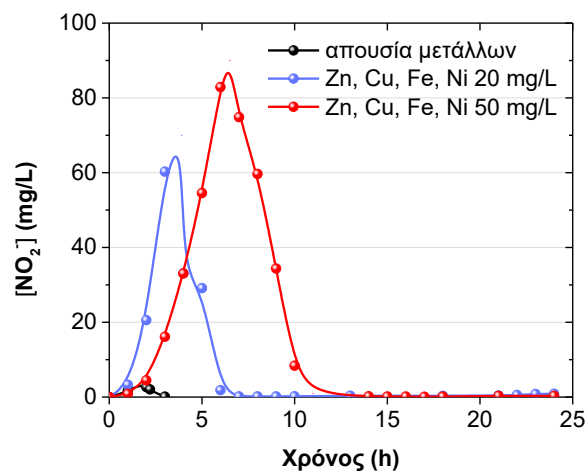
Ο Zn είναι δυνατόν να επιδράσει αρνητικά στα στάδια της αναγωγής νιτρικών και υποξειδίου του αζώτου (Zheng et al., 2014). Παρόμοια, το Ni έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να αναχαιτίσει την απονιτροποίηση σε συγκεντρώσεις 50 mg/L και 100 mg/L και συγκεκριμένα τα δύο τελευταία στάδια αυτής (αντιδράσεις (A.18) και (A.19)) (Zou et al., 2013; Zou et al., 2014) ή να προκαλέσει συσσώρευση ενδιάμεσων προϊόντων (Ramírez et al., 2018). Τα παραπάνω συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, σύμφωνα με τα οποία συγκεντρώσεις νικελίου έως 100 mg/L μπορούν να επιβραδύνουν την απονιτροποίηση. Αντίθετα, οι Zou et al. (2013) παρατήρησαν ότι η παρουσία νικελίου σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες των 50 mg/L και σε pH 7 δεν αναστέλλει την απονιτροποίηση, ενώ συγκεντρώσεις νικελίου 100 mg/L μπορούν να οδηγήσουν σε απομάκρυνση νιτρικών μόνο κατά 30%, 6 ώρες μετά την έναρξη του πειράματος.

Το Σχήμα 5.5(α)-(γ) δείχνει ότι η ταυτόχρονη παρουσία των μετάλλων σε συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L επιβραδύνουν την αναγωγή νιτρικών και νιτρικών ιόντων σε σχέση με τους ρυθμούς που παρατηρήθηκαν για τα μεμονωμένα μέταλλα. Επίσης, παρατηρείται ότι, όσο μεγαλύτερη είναι η αρχική συγκέντρωση των μετάλλων, τόσο περισσότερο επιβραδύνεται η απονιτροποίηση. Η αναγωγή νιτρικών ολοκληρώνεται εντός 3 (τριών) και 6 (έξι) ωρών, με ταχύτητα 2 700 mg NO₃-N/L/d και 1 700 mg NO₃-N/L/d, για συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L, αντίστοιχα. Οι ταχύτητες αυτές είναι χαμηλότερες από την ταχύτητα που παρατηρείται απουσία μετάλλων (4 900 mg NO₃-N/L/d). Η αναγωγή των νιτρικών ιόντων ολοκληρώνεται εντός 7 (επτά) και 13 (δεκατριών) ωρών για συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L, αντίστοιχα. Η μέγιστη συγκέντρωση νιτρικών είναι 60 mg/L για συγκεντρώσεις 20 mg/L μετάλλων και περίπου 80 mg/L για συγκεντρώσεις 50 mg/L. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η ταυτόχρονη παρουσία των μετάλλων σε συγκεντρώσεις 50 mg/L οδηγεί σε καμπύλες νιτρικών με μέγιστα όμοια με αυτά που παρατηρούνται για 50 mg/L ψευδαργύρου ή χαλκού (Σχήμα 5.4(γ)).

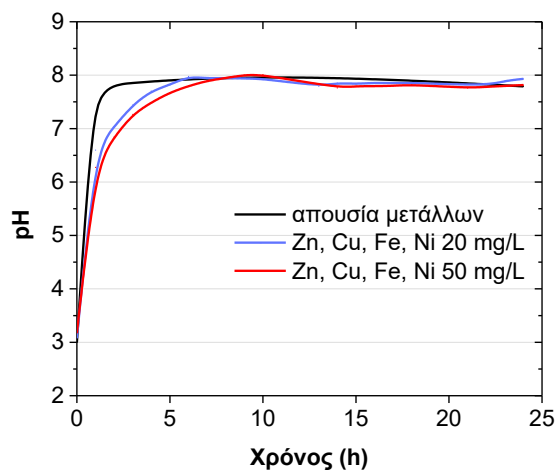
Στο Σχήμα 5.5(γ) το pH αυξάνεται από την αρχική τιμή 3 σε ουδέτερες τιμές (7.2-7.5) εντός 2 (δύο) ωρών στην περίπτωση απουσίας μετάλλων και εντός 3 (τριών) έως 4 (τεσσάρων) ωρών για συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L. Η τιμή pH ισορροπίας σε κάθε περίπτωση είναι περίπου 8.0.



(α)



(β)



(γ)

Σχήμα 5.5: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, για μίγμα Zn, Cu, Fe και Ni σε συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L, σε συνάρτηση με τον χρόνο και σε σύγκριση με την επίδραση στην εξέλιξη της απονιτροποίησης για μηδενικές αρχικές συγκεντρώσεις αυτών

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης της επίδρασης των μετάλλων Zn, Cu, Fe και Ni στην απονιτροποιητική ικανότητα του συστήματος δείχνουν ότι το σύστημα μπορεί να αποδίδει ικανοποιητικά όχι μόνο παρουσία των μετάλλων αυτών μεμονωμένα, αλλά ακόμα και με την ταυτόχρονη παρουσία τους σε συγκεντρώσεις έως 50 mg/L (Mendrinou et al., 2020; 2021).

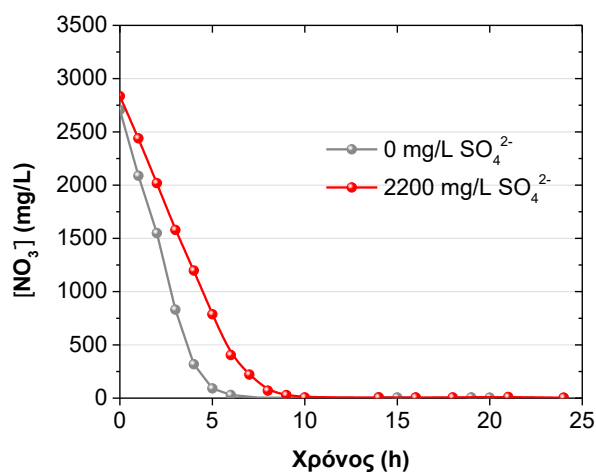
5.5 Επίδραση των θειικών ιόντων στην απονιτροποίηση

Η συνιστώμενη σύσταση του θρεπτικού μέσου Bacto Marine Broth για το βακτήριο *Halomonas denitrificans* (Πίνακας 4.1) περιλάμβανε θειικά ιόντα σε συγκέντρωση 2 200 mg/L. Η εξασφάλιση όσο το δυνατόν χαμηλότερων συγκεντρώσεων διαλυτού οξυγόνου με σκοπό τη βέλτιστη απονιτροποίηση (Martienssen & Schöps, 1999; Fu et al., 2022) οδηγεί σε επικράτηση αναερόβιων συνθηκών και πιθανή κατανάλωση μέρους των θειικών ιόντων από τους μικροοργανισμούς ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση. Η εξάντληση των νιτρικών ιόντων κατά μήκος του πάχους της βιολογικής στιβάδας των μικροοργανισμών και η αναζήτηση νέου διαθέσιμου δέκτη ηλεκτρονίων, όπως τα θειικά, είναι δυνατόν να εντείνει την αναγωγή θειικών. Εξάλλου, σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας απαντάται συχνά η συνύπαρξη πολλών διαφορετικών μεταβολικών διεργασιών ταυτόχρονα, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (Costerton et al., 1995; Rittman & Mc Carty, 2020).

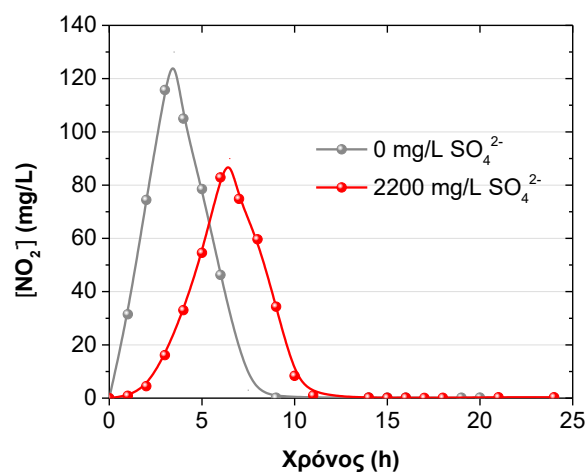
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των θειικών ιόντων στην απονιτροποίηση, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές παρουσία θειικών ιόντων σε συγκέντρωση 2 200 mg/L και απουσία θειικών, με αρχική συγκέντρωση νιτρικών 2 750-2 320 mg/L, pH 3, αλατότητα 5% και παρουσία των μετάλλων Zn, Cu, Fe και Ni ταυτόχρονα σε συγκεντρώσεις 50 mg/L. Στο Σχήμα 5.6(α)-(γ) φαίνεται η επίδραση που έχει η παρουσία 2 200 mg/L θειικών ιόντων στην απονιτροποίηση και συγκεκριμένα στη χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων και του pH.

Σύμφωνα με το Σχήμα 5.6(α)-(β), η παρουσία θειικών επιβραδύνει τον ρυθμό αναγωγής νιτρικών από 2 400 mg NO₃-N/L/d σε 1 500 mg NO₃-N/L/d και καθυστερεί την απονιτροποίηση (χρόνος αναγωγής νιτρωδών) από 9 (εννέα) σε 11 (έντεκα) ώρες. Επίσης, παρατηρούνται χαμηλότερες συγκεντρώσεις νιτρωδών (80-85 mg/L), σε σύγκριση με την περίπτωση απουσίας θειικών (120 mg/L) (Σχήμα 5.6(β)). Τέλος, σύμφωνα με το (Σχήμα 5.6(γ)) και ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση θειικών, το pH φθάνει σε ουδέτερες τιμές εντός 4 (τεσσάρων) έως 5 (πέντε) ωρών και οι τιμές pH ισορροπίας κυμαίνονται μεταξύ 7.5-8.0.

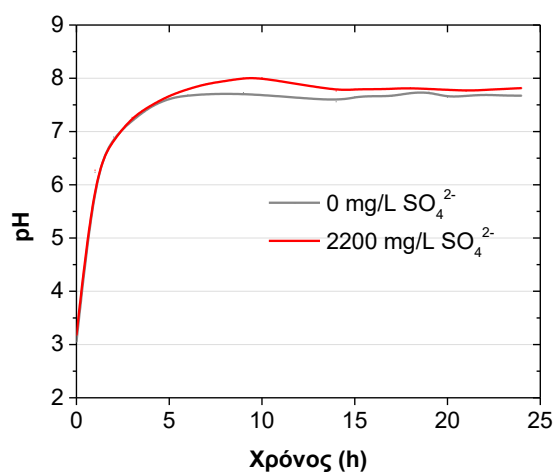
Τα αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση των θειικών ιόντων στην απονιτροποίηση σε συγκέντρωση 2200 mg/L οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία θειικών επιβραδύνει την απονιτροποίηση, χωρίς όμως να οδηγεί σε αναχαίτιση αυτής.



(α)



(β)

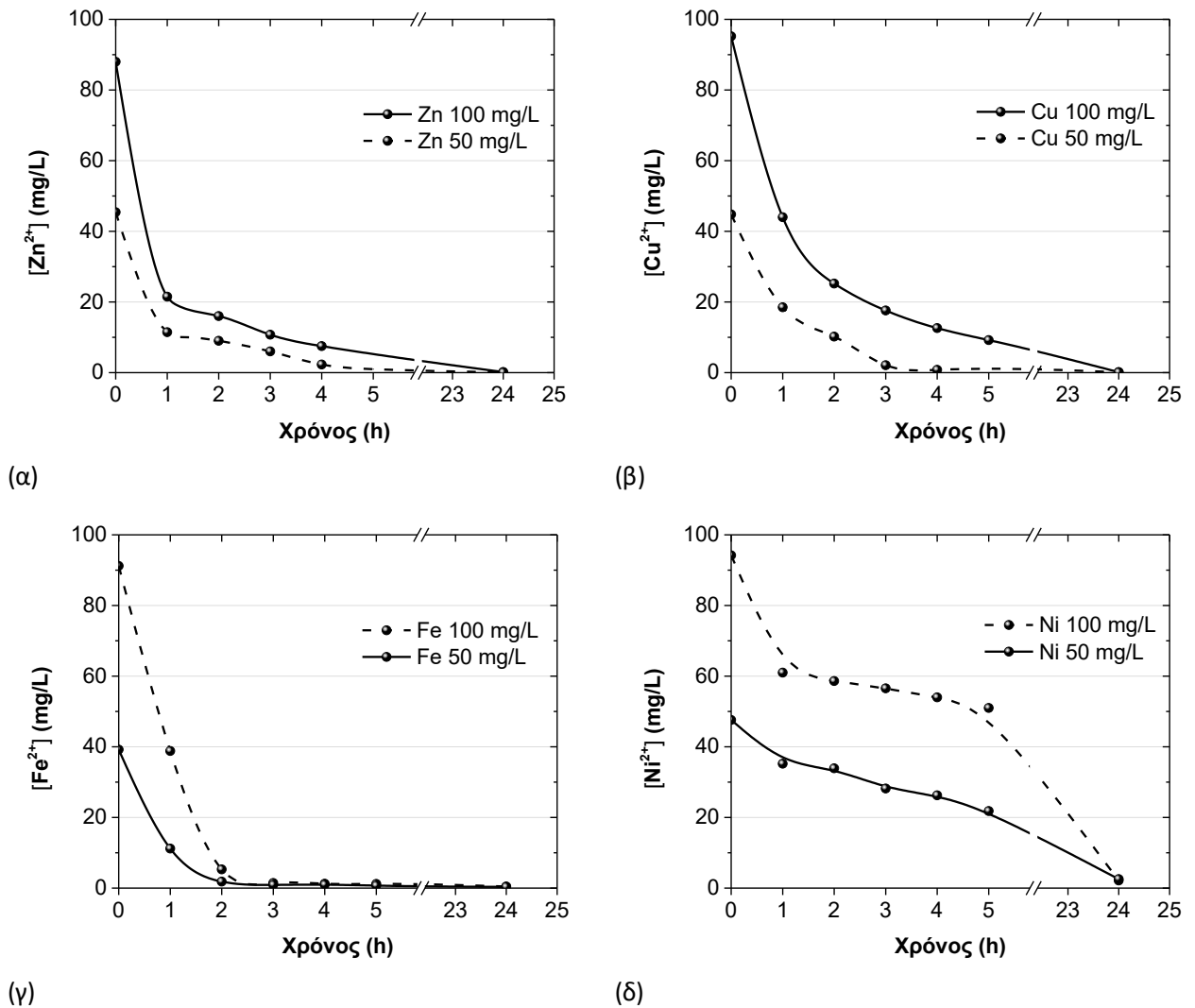


(γ)

Σχήμα 5.6: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, απουσία θειικών ιόντων και για συγκέντρωση θειικών ιόντων 2 000 mg/L

5.6 Βιοκαταβύθιση μετάλλων

Στο Σχήμα 5.7(α)-(δ) παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων των μετάλλων Zn, Cu, Fe και Ni στο διάλυμα, όταν μελετάται η παρουσία καθενός από αυτά ξεχωριστά σε αρχικές συγκεντρώσεις 50 mg/L και 100 mg/L. Στο Σχήμα 5.8(α)-(δ) παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα, όταν τα μέταλλα αυτά προστίθενται ταυτόχρονα στο διάλυμα σε συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L. Τα παραπάνω σχήματα δείχνουν ότι ο αντιδραστήρας έχει την ικανότητα να απομακρύνει τα διαλυτά είδη μετάλλων που μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις μέχρι 100 mg/L.



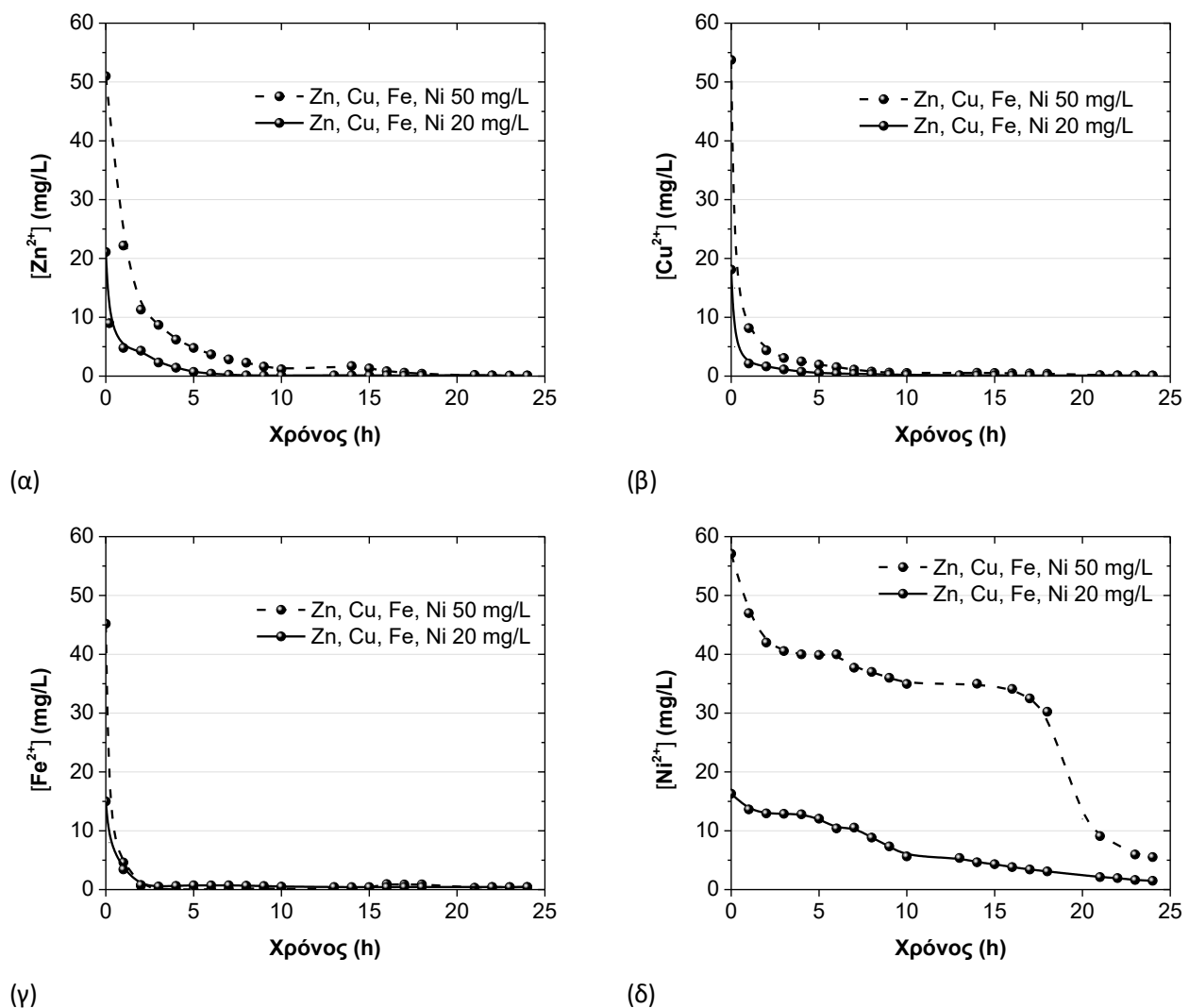
Σχήμα 5.7: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, όταν μελετάται η επίδραση στην απονιτροποίηση καθενός από αυτά ξεχωριστά, σε αρχικές συγκεντρώσεις 50 mg/L και 100 mg/L

Οι συνθήκες που ευνοούν την καταβύθιση των μετάλλων στον αντιδραστήρα είναι κυρίως η αύξηση του pH και ο σχηματισμός ανθρακικών. Στη συνέχεια παρουσιάζεται καθεμιά από τις κατηγορίες αντιδράσεων καταβύθισης των μετάλλων, οι οποίες είναι δυνατόν να συμβαίνουν και ταυτόχρονα.

Σύμφωνα με το Σχήμα 5.4(ε)-(στ) και το Σχήμα 5.5(δ), το pH γίνεται ουδέτερο (7.5-8.0) το πολύ εντός 4 (τεσσάρων) ωρών από την έναρξη του πειράματος, εξαιτίας της κατανάλωσης υδρογονοκατιόντων κατά τη μικροβιακή αναγωγή των νιτρικών προς αέριο άζωτο, σύμφωνα με την αντίδραση (A.20):



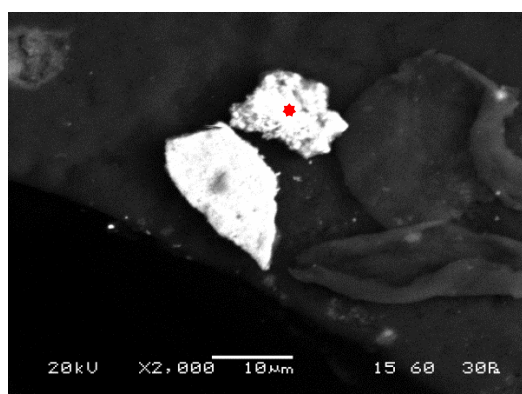
Η περίσσεια ελεύθερων υδροξυλίων (OH^-) μπορεί να αντιδράσει με τα διαλυτά είδη μετάλλων, σχηματίζοντας τα αντίστοιχα αδιάλυτα υδροξείδια των μετάλλων που μπορούν να καταβυθιστούν ως ίζημα. Είναι, επίσης, δυνατός ο σχηματισμός όξινων ανθρακικών αλάτων των μετάλλων, τα οποία προέρχονται από την οξείδωση της πηγής οργανικού άνθρακα. Ακόμη, όταν στο ρεύμα τροφοδοσίας υπάρχουν θειικά ιόντα, τότε είναι δυνατόν να ανάγονται και αυτά στην κλίση του αντιδραστήρα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αδιάλυτων θειούχων ενώσεων των μετάλλων. Μάλιστα, τα θειούχα άλατα έχουν μικρότερη διαλυτότητα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα άλατα των υδροξειδίων και των όξινων ανθρακικών αλάτων και, επομένως, μπορούν να καταβυθίζονται ταχύτερα (Lewis, 2010). Όλοι οι μηχανισμοί βιοκαταβύθισης που αναφέρθηκαν έχουν παρατηρηθεί για τα μέταλλα Zn, Cu, Fe και Ni σε απονιτροποιητικούς αντιδραστήρες αιωρούμενης και προσκολλημένης βιομάζας (Remoundaki et al., 2003a; Zou et al., 2014; Zou et al., 2015; Ramírez et al., 2017).



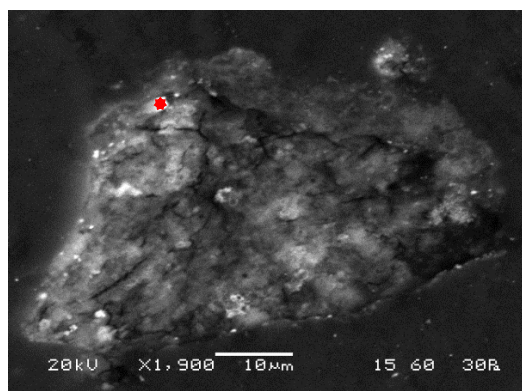
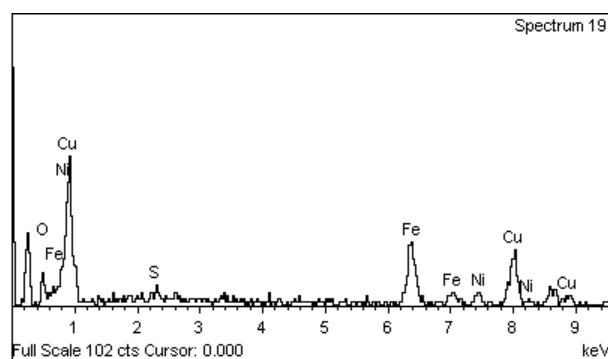
Σχήμα 5.8: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, όταν μελετάται η επίδραση της ταυτόχρονης παρουσίας των μετάλλων αυτών στην απονιτροποίηση, σε αρχικές συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L

Τα παραπάνω ευρήματα σχετικά με τους μηχανισμούς βιολογικής καταβύθισης ενισχύονται:

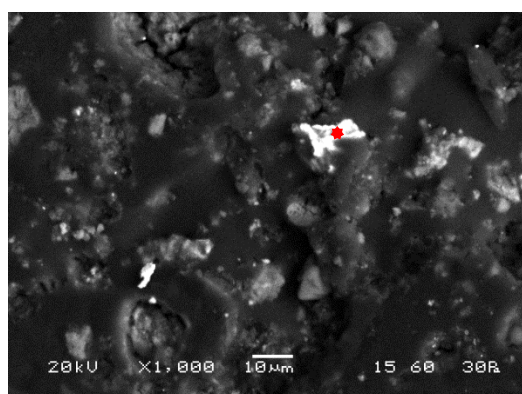
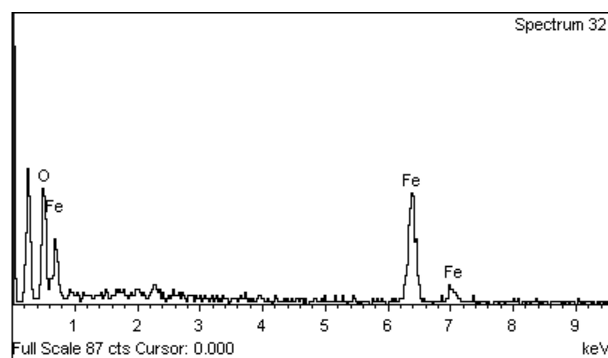
1. από τις εικόνες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης που συνοδεύονται από τα φάσματα EDS που λήφθηκαν από δείγματα λάσπης του βιοαντιδραστήρα και παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.1(α)-(γ). Στην εικόνα αυτή φαίνονται τα κατακρημνίσματα στα δείγματα λάσπης που περιέχουν τα μέταλλα Zn, Cu, Fe και Ni. Επισημαίνεται ότι, στην Εικόνα 5.1(γ) φαίνεται καθαρά ο σχηματισμός θειούχων ενώσεων του χαλκού, γεγονός που ενισχύει την πιθανότητα σχηματισμού θειούχων αλάτων και των υπολοίπων μετάλλων.



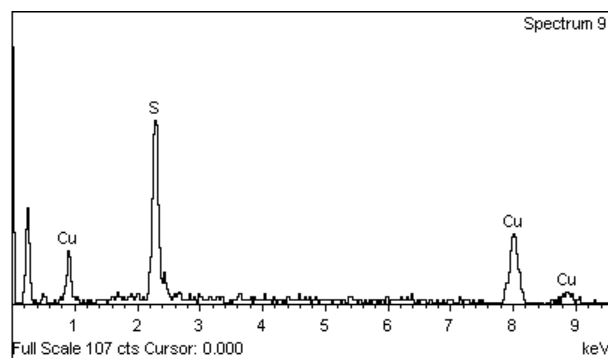
(α)



(β)

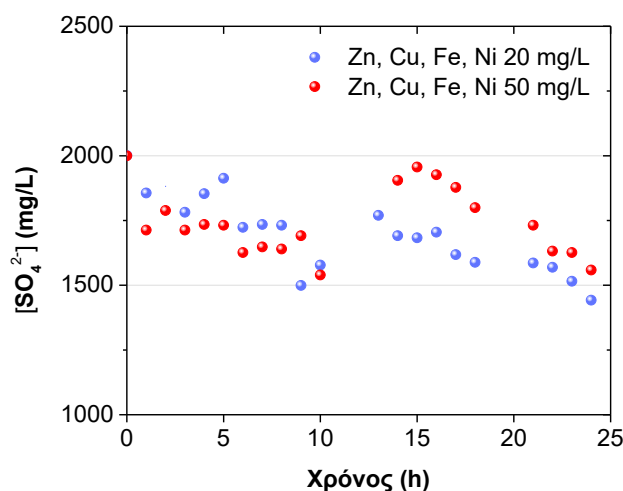


(γ)



Εικόνα 5.1: Εικόνες SEM (αριστερά) που αντιστοιχούν στο φάσμα EDS (δεξιά) επιλεγμένων σημείων των κατακρημνισμάτων που περιέχονται σε δείγματα λάσπης από τον βιολογικό αντιδραστήρα

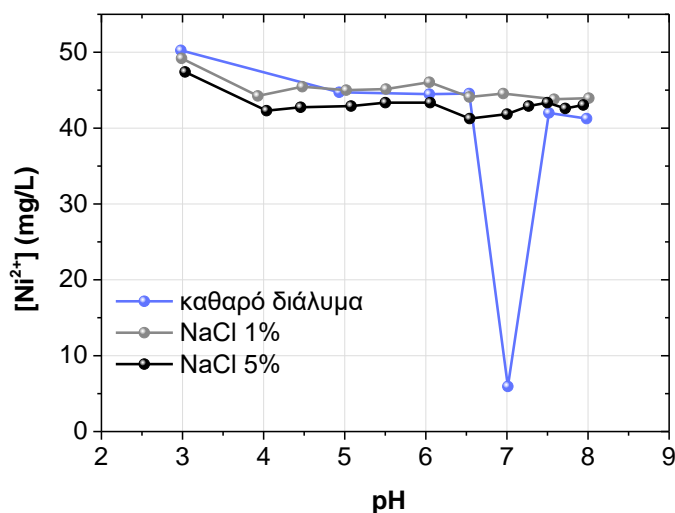
2. από τη μείωση της συγκέντρωσης θειικών ιόντων στην εκροή του αντιδραστήρα, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.9(α). Στο εσωτερικό της βιολογικής στιβάδας μικροοργανισμών (Biofilm), όπου τα νιτρικά ιόντα έχουν καταναλωθεί, οι μικροοργανισμοί είναι πιθανό να αναζητούν εναλλακτικό δέκτη ηλεκτρονίων για τον μικροβιακό μεταβολισμό, όπως τα θειικά (Remoundaki et al., 2003a; Zou et al., 2015). Η αναγωγή των θειικών ιόντων οδηγεί στον σχηματισμό ανηγμένων ενώσεων του θείου, όπως θειούχων, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αδιάλυτων θειούχων ενώσεων των μετάλλων (Kousi et al., 2007; 2011).



Σχήμα 5.9: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης θειικών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο, όταν μελετάται η επίδραση της ταυτόχρονης παρουσίας των μετάλλων Zn, Cu, Fe και Ni στην απονιτροποίηση, σε αρχικές συγκεντρώσεις 20 mg/L και 50 mg/L

Από τα παραπάνω αποτελέσματα και συγκεκριμένα από το Σχήμα 5.7(δ) και το Σχήμα 5.8(δ) φαίνεται ότι το νικέλιο παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά κατά την απομάκρυνσή του από το διάλυμα σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέταλλα. Η μορφή της καμπύλης βιοκαταβύθισης του νικελίου δείχνει ότι το νικέλιο απομακρύνεται αργά από το διάλυμα (περίπου 24 ώρες), παραμένοντας για μεγάλο διάστημα διαλυτό. Στη συνέχεια θα γίνει προσπάθεια ερμηνείας της συμπεριφοράς του νικελίου, με βάση τόσο τη θεωρία, όσο και πειραματικές δοκιμές. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το νικέλιο έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα τόσο με ανόργανους υποκαταστάτες, όπως το χλώριο (Sadiq, 1989), όσο και με οργανικούς, όπως το κιτρικό οξύ (Ramírez et al., 2017). Έτσι, οι πειραματικές δοκιμές περιλαμβάνουν δοκιμές χημικής καταβύθισης του νικελίου σε συγκέντρωση 50 mg/L, σε εύρος pH 3-8 και παρουσία (1) χλωριούχου νατρίου (NaCl) και, (2) των οργανικών συστατικών που περιέχονται στο θρεπτικό μέσο του *H. denitrificans*, δηλαδή πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης.

Οι δοκιμές χημικής καταβύθισης του νικελίου παρουσία χλωριούχου νατρίου πραγματοποιήθηκαν σε διαλύματα περιεκτικότητας 1% και 5% σε NaCl και συγκρίθηκαν με τη διαλυτότητα του νικελίου σε καθαρό υδατικό διάλυμα ($[Ni^{2+}] = 50 \text{ mg/L}$, $pH = 3-8$). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.10. Σύμφωνα με το σχήμα αυτό, απουσία χλωριόντων, δηλαδή σε καθαρό υδατικό διάλυμα, το νικέλιο καταβυθίζεται σε $pH 7$. Αντίθετα, παρουσία χλωριόντων σε συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε αλατότητα 1% και 5%, το νικέλιο παραμένει διαλυτό σε όλο το εύρος των τιμών pH από 3 έως 8.

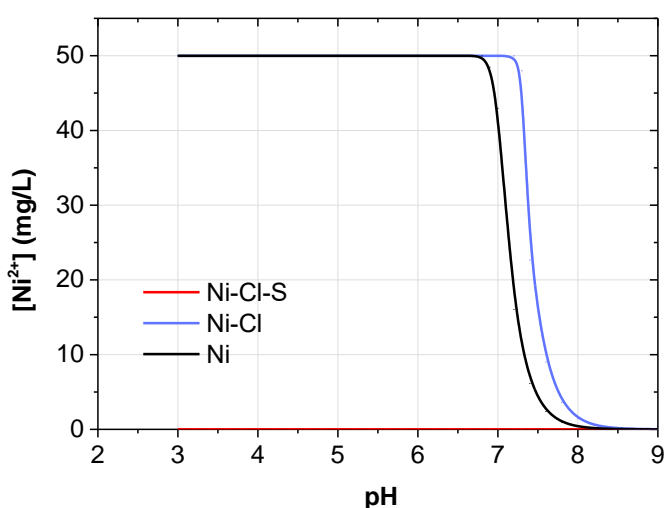


Σχήμα 5.10: Διαλυτότητα του νικελίου σε συνάρτηση με το pH παρουσία χλωριούχου νατρίου (NaCl) σε περιεκτικότητα 1% και 5%, σε σύγκριση με τη διαλυτότητα του νικελίου σε καθαρό υδατικό διάλυμα νικελίου

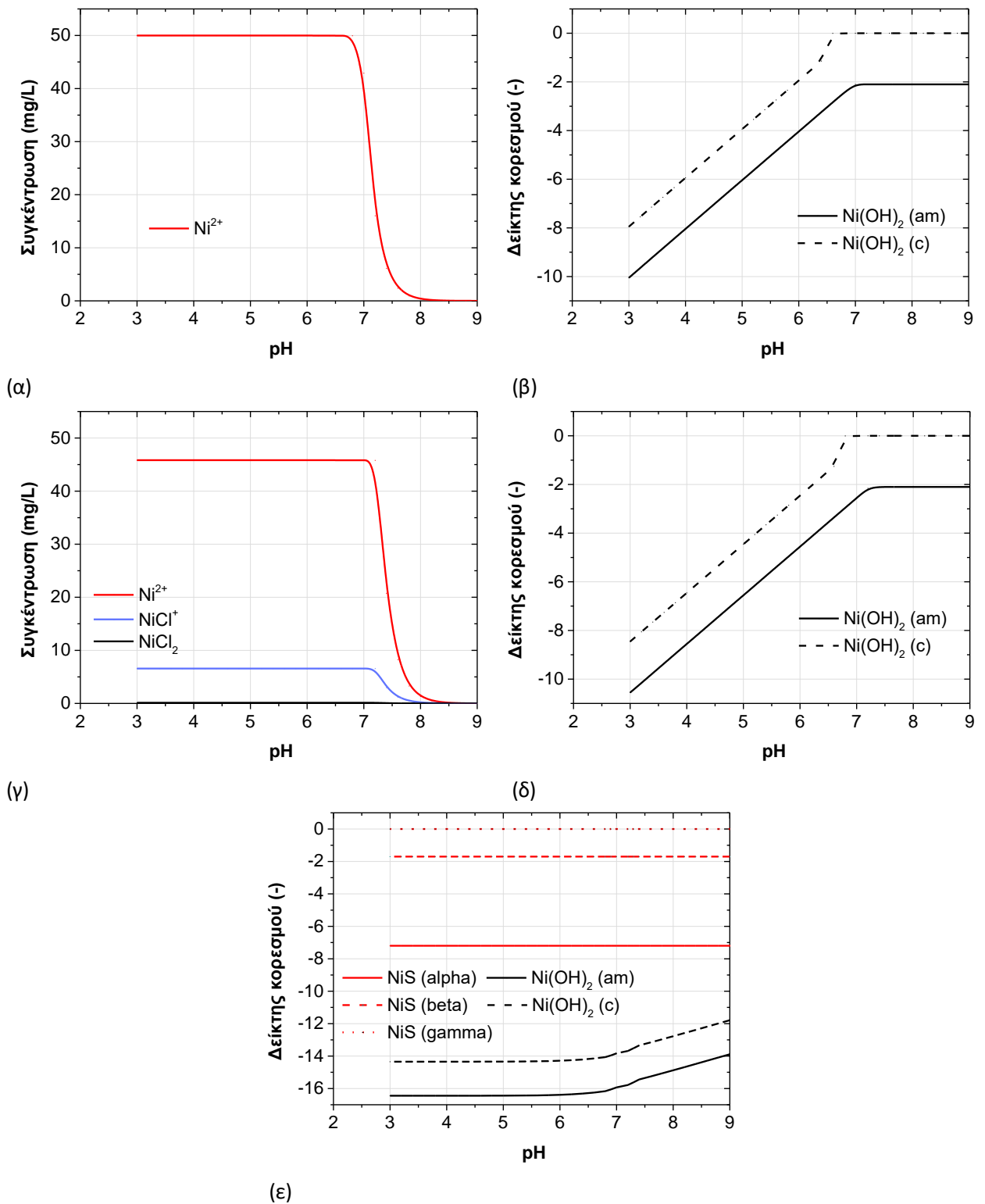
Το λογισμικό Visual MINTEQ χρησιμοποιείται για τη μοντελοποίηση της χημικής σύστασης διαλυμάτων με χημικά είδη που βρίσκονται σε χημική ισορροπία και αλληλεπιδρούν μεταξύ της υγρής, της αέριας και της στερεής φάσης (<https://vminteq.com/>). Με αφορμή τόσο τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.10, όσο και τις ενδείξεις σχετικά με την καταβύθιση του νικελίου με τη μορφή θειούχων ενώσεων (Εικόνα 5.1, Σχήμα 5.9), πραγματοποιήθηκε προσομοίωση της χημικής σύστασης τριών ειδών διαλυμάτων με τη βοήθεια του λογισμικού αυτού (version 4). Τα διαλύματα αυτά είναι: (1) καθαρό υδατικό διάλυμα νικελίου (Ni^{2+}) σε συγκέντρωση 50 mg/L , (2) διάλυμα νικελίου (Ni^{2+}) σε συγκέντρωση 50 mg/L και αλατότητα 5%, δηλαδή συγκέντρωση χλωριόντων (Cl^-) περίπου $30\,000 \text{ mg/L}$, και (3) διάλυμα νικελίου (Ni^{2+}) σε συγκέντρωση 50 mg/L , αλατότητα 5% και συγκέντρωση θειούχων (S^{2-}) 250 mg/L . Η συγκέντρωση των θειούχων αντιστοιχεί στην αναγωγή θειικών ιόντων που παρατηρείται στον βιολογικό αντιδραστήρα κατά την απονιτροποίηση, όπως συζητήθηκε στις προηγούμενες παραγράφους και σύμφωνα με το Σχήμα 5.9.

Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης περιγράφουν τη συγκέντρωση των χημικών ειδών νικελίου που βρίσκονται σε ισορροπία στο διάλυμα, καθώς και τα πιθανά κατακρημνίσματα που σχηματίζονται, άμορφης και κρυσταλλικής δομής (Σχήμα 5.11 και Σχήμα 5.12). Στο Σχήμα 5.11 παρουσιάζεται η συγκέντρωση διαλυτού νικελίου σε συνάρτηση με το pH για τα τρία διαφορετικά σενάρια προσομοίωσης που πραγματοποιήθηκαν στο λογισμικό Visual MINTEQ. Στο Σχήμα 5.12 παρουσιάζεται η συγκέντρωση των διαλυτών ειδών νικελίου και ο δείκτης κορεσμού των άμορφων και κρυσταλλικών κατακρημνισμάτων σε συνάρτηση με το pH, για τις περιπτώσεις καθαρού υδατικού διαλύματος νικελίου (απουσία χλωριόντων και θειούχων) (Σχήμα 5.12(α) και (β), αντίστοιχα) και παρουσίας χλωριόντων (Σχήμα 5.12(γ) και (δ), αντίστοιχα). Για την περίπτωση ταυτόχρονης παρουσίας χλωριόντων και θειούχων παρουσιάζεται μόνο το διάγραμμα του δείκτη κορεσμού σε συνάρτηση με το pH (Σχήμα 5.12(ε)), επειδή οι εκτιμήσεις του λογισμικού δείχνουν ότι δεν υπάρχει νικέλιο στη διαλυτή φάση σε όλο το εύρος pH από 3 έως 8.

Όταν πρόκειται για καθαρό υδατικό διάλυμα νικελίου, δηλαδή απουσία χλωριόντων και θειούχων, σύμφωνα με το Σχήμα 5.11, το νικέλιο καταβυθίζεται σε τιμή pH ίση με 8. Μέχρι την τιμή 8, το νικέλιο βρίσκεται στο διάλυμα με τη μορφή ελεύθερων ιόντων νικελίου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.12 (α). Η τιμή αυτή (pH=8) διαφέρει κατά περίπου μία μονάδα από αυτή που παρατηρήθηκε πειραματικά (pH=7) και φαίνεται στο Σχήμα 5.10, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε αργές αντιδράσεις υδρόλυσης που δεν λαμβάνονται υπόψη από το λογισμικό, καθώς και στις συνθήκες διεξαγωγής των δοκιμών (πχ διακυμάνσεις της θερμοκρασίας κοντά στους 25°C και της ιοντικής ισχύος). Τα κατακρημνίσματα νικελίου, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προσομοίωσης, αποτελούνται από άμορφο υδροξείδιο του νικελίου (Ni(OH)_2 (am)), όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.12(β).



Σχήμα 5.11: Διαλυτότητα νικελίου σε συνάρτηση με το pH, σε υδατικό διάλυμα νικελίου (καμπύλη Ni), σε διάλυμα νικελίου με αλατότητα 5% (καμπύλη Ni-Cl) και σε διάλυμα νικελίου με αλατότητα 5% και παρουσία θειούχων (καμπύλη Ni-Cl-S), σύμφωνα με προσομοίωση στο λογισμικό Visual MINTEQ



Σχήμα 5.12: (α) Καμπύλες διαλυτότητας των χημικών ειδών νικελίου και (β) Δείκτες κορεσμού των κατακρημνισμάτων, σε υδατικό διάλυμα νικελίου, (γ) Καμπύλες διαλυτότητας των χημικών ειδών νικελίου και (δ) Δείκτες κορεσμού των κατακρημνισμάτων, σε διάλυμα νικελίου παρουσία χλωριόντων (αλατότητα 5%) και (ε) Δείκτες κορεσμού των κατακρημνισμάτων, σε διάλυμα νικελίου παρουσία χλωριόντων (αλατότητα 5%) και θειούχων, όπως προέκυψαν ύστερα από προσομοίωση στο λογισμικό Visual MINTEQ

Η παρουσία ιόντων χλωρίου ευνοεί τον σχηματισμό διαλυτών συμπλόκων τους με τα ιόντα του νικελίου. Σύμφωνα με το Σχήμα 5.12(γ), φαίνεται να σχηματίζονται σύμπλοκα NiCl^+ και μόρια NiCl_2 , ενώ η επικρατέστερη μορφή διαλυτού νικελίου είναι τα ελεύθερα ιόντα του. Επομένως, η συνολική συγκέντρωση διαλυτού νικελίου (Σχήμα 5.11), εκτιμάται ότι αποτελείται κατά 91.7% από Ni^{2+} , κατά 8.2% από NiCl^+ και κατά 0.1% από NiCl_2 . Επίσης, η παρουσία χλωριόντων είναι δυνατόν να μετατοπίσει την καμπύλη διαλυτότητας του νικελίου κατά περίπου μισή μονάδα, με αποτέλεσμα η τιμή pH στην οποία καταβυθίζεται το νικέλιο να είναι περίπου 8.5, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα 5.11. Η υπολογιστική προσομοίωση (Σχήμα 5.12(δ)) δείχνει ότι τα κατακρημνίσματα του νικελίου αποτελούνται από άμορφο υδροξείδιο του νικελίου (NiOH_2 (am)).

Τα παραπάνω αποτελέσματα σχετικά με τη διαλυτότητα του νικελίου και τη σύσταση των κατακρημνισμάτων σε περιβάλλον υψηλής αλατότητας συμφωνούν απόλυτα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Ο Sadiq (1989) μελέτησε τα χημικά είδη νικελίου που σχηματίζονται, ύστερα από προσθήκη νικελίου σε δείγματα θαλασσινών ιζημάτων (αλατότητα 3.5%) και διαπίστωσε ότι, το νικέλιο βρίσκεται στο διάλυμα με τη μορφή ελεύθερων ιόντων νικελίου (Ni^{2+}) σε ποσοστό υψηλότερο από 50%. Στο διάλυμα παρατηρήθηκαν και άλλα χημικά είδη του νικελίου σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, κυρίως σύμπλοκα με ιόντα χλωρίου (NiCl^+), τα οποία, παρόμοια με όλα τα σύμπλοκα του νικελίου, περιορίζουν την τοξική επίδραση των ελεύθερων ιόντων του στους ζωντανούς οργανισμούς. Ο σχηματισμός χλωριούχου νικελίου (NiCl_2) και θειικού νικελίου (NiSO_4) είναι εξίσου σημαντικός, σε αντίθεση με τον σχηματισμό συμπλόκων νικελίου με υδροξύλια και ανθρακικά ιόντα, τα οποία δεν παρατηρήθηκαν στα αλατούχα διαλύματα που μελέτησε ο Sadiq (1989). Τέλος, διαπιστώθηκε ότι η αύξηση της αλατότητας οδηγεί (1) σε αύξηση της συνολικής συγκέντρωσης διαλυτού νικελίου, (2) σε αύξηση των συγκεντρώσεων των συμπλόκων ενώσεων του νικελίου με το χλώριο και, (3) σε μείωση των συγκεντρώσεων ελεύθερου διαλυτού νικελίου (Sadiq, 1989).

Πράγματι, στην πράξη, η παρουσία χλωριούχου νατρίου σε συγκέντρωση 5% δεν φαίνεται να ευνοεί την καταβύθιση του νικελίου (Σχήμα 5.10). Οι πειραματικές δοκιμές παρουσία χλωριόντων, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στο Σχήμα 5.10, δείχνουν ότι το νικέλιο παραμένει διαλυτό ανεξάρτητα από την τιμή pH, για εύρος pH από 3 έως 8. Τόσο τα βιβλιογραφικά αυτά δεδομένα, όσο και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις δοκιμές στο Visual MINTEQ για διαλύματα νικελίου πλούσια σε ιόντα χλωρίου (Σχήμα 5.11 και Σχήμα 5.12), μπορούν να αιτιολογήσουν τη μορφή της καμπύλης διαλυτότητας του νικελίου κατά τις πειραματικές δοκιμές: Η παραμονή του νικελίου σε διαλυτή μορφή οφείλεται στην παρουσία χλωριούχου νατρίου, η οποία μπορεί να οδηγήσει: (1) σε αύξηση των συγκεντρώσεων διαλυτού νικελίου και, (2) στον σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ του νικελίου και των ιόντων χλωρίου, όπως NiCl^+ , και διαλυτών χλωριούχων ενώσεων του νικελίου, όπως NiCl_2 (Sadiq, 1989).

Σε αντίθεση με τις παραπάνω περιπτώσεις, η παρουσία θειούχων σε διαλύματα νικελίου φαίνεται ότι ευνοεί την καταβύθιση του νικελίου, ανεξάρτητα από την τιμή του pH, για εύρος τιμών από 3 έως 8 (Σχήμα 5.11). Έτσι, οι συγκεντρώσεις του διαλυτού νικελίου είναι κοντά στο μηδέν. Η σύσταση των κατακρημνισμάτων που σχηματίζονται εξαιτίας της παρουσίας θειούχων εκτιμάται ότι είναι θειούχο νικέλιο (NiS) γ (gamma) φάσης, όπως δείχνει το Σχήμα 5.12(ε). Επομένως, η παρουσία θειούχων μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό αδιάλυτων κατακρημνισμάτων, παρά την παρουσία ιόντων χλωρίου, τα οποία, σε διαφορετική περίπτωση, θα συνέβαλαν ώστε το νικέλιο να παραμείνει διαλυτό.

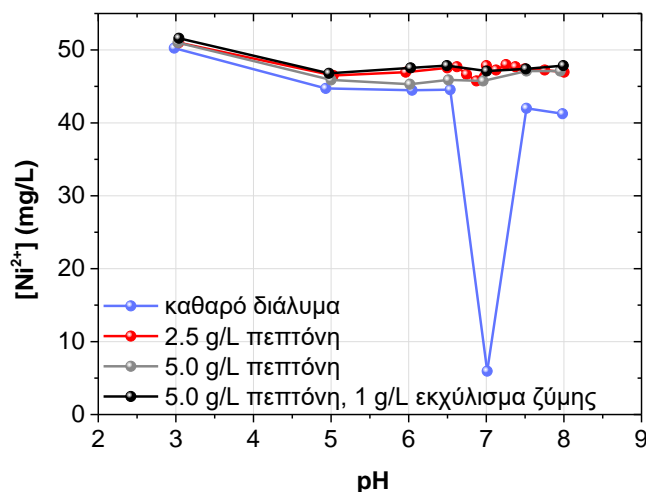
Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το σύνολο των δοκιμών σε εργαστηριακό επίπεδο, ύστερα από τις δοκιμές προσομοίωσης στο λογισμικό Visual MINTEQ και λαμβάνοντας υπόψη τη βιβλιογραφία, δείχνουν ότι:

- Όταν το διάλυμα είναι πλούσιο σε χλωριόντα, το νικέλιο έχει την ικανότητα να σχηματίζει σύμπλοκα, όπως $NiCl^+$, και διαλυτές ενώσεις, όπως $NiCl_2$, με τα ιόντα χλωρίου. Αυτό έχει ως πιθανό αποτέλεσμα τόσο την αύξηση της συνολικής συγκέντρωσης διαλυτού νικελίου, όσο και την αύξηση της τιμής του pH στην οποία καταβυθίζεται.
- Όταν, ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση, πραγματοποιείται αναγωγή θεικών προς θειούχα, είναι δυνατόν να σχηματίζονται αδιάλυτες θειούχες ενώσεις του νικελίου. Η τιμή του pH (εύρος 3-8) και η παρουσία χλωριόντων δεν φαίνεται να επιδρούν σε αυτό. Επομένως, παρά την ικανότητα του νικελίου να συμπλοκοποιείται με το χλώριο παραμένοντας διαλυτό σε εύρος pH 3-8, ο σχηματισμός αδιάλυτου θειούχου νικελίου φαίνεται να υπερτερεί ως μηχανισμός βιοκαταβύθισης του νικελίου.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, εκτός από ανόργανα σύμπλοκα, το νικέλιο έχει την ιδιότητα να σχηματίζει και οργανικά σύμπλοκα με μόρια, όπως το κιτρικό οξύ (Ramírez et al., 2017). Παρόμοια συμπεριφορά με αυτή του νικελίου έχει παρατηρηθεί για τον σίδηρο (Ramírez et al., 2017), αλλά και για το χρώμιο (Remoundaki et al., 2003b; Remoundaki et al., 2007). Συνεπώς, η μορφή της καμπύλης που αναπαριστά τη χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης νικελίου κατά την απονιτροποίηση (Σχήμα 5.7(δ), Σχήμα 5.8(δ)) μπορεί να αποδοθεί στον σχηματισμό αδιάλυτων οργανικών συμπλόκων (Mendrinou et al., 2020; 2021). Κατά συνέπεια, ελαττώνεται η βιοδιαθεσιμότητα και η τοξική του επίδραση στους μικροοργανισμούς (Ramírez et al., 2017), αυξάνοντας την ανοχή του *H. denitrificans* σε υψηλότερες συγκεντρώσεις νικελίου.

Σε πειραματικό επίπεδο και όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.13, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές χημικής καταβύθισης του νικελίου σε συγκέντρωση 50 mg/L και σε εύρος pH 3-8. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για 5 g/L πεπτόνης και 1 g/L εκχυλίσματος ζύμης, που αντιστοιχούν στις περιεκτικότητές τους στο θρεπτικό μέσο (Πίνακας 4.1), και για 2.5 g/L και 5 g/L πεπτόνης, απουσία

εκχυλίσματος ζύμης. Σύμφωνα με το Σχήμα 5.9, όταν η συγκέντρωση πεπτόνης σε διαλύματα νικελίου είναι υψηλή (μεγαλύτερη από 2.5 g/L), το νικέλιο παραμένει διαλυτό. Επομένως, το νικέλιο μπορεί να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με την πεπτόνη παραμένοντας σε διαλυτή μορφή, χωρίς να καταβυθίζεται με τη μορφή αδιάλυτων υδροξειδίων και παρά το βασικό περιβάλλον (τιμές pH έως 8).

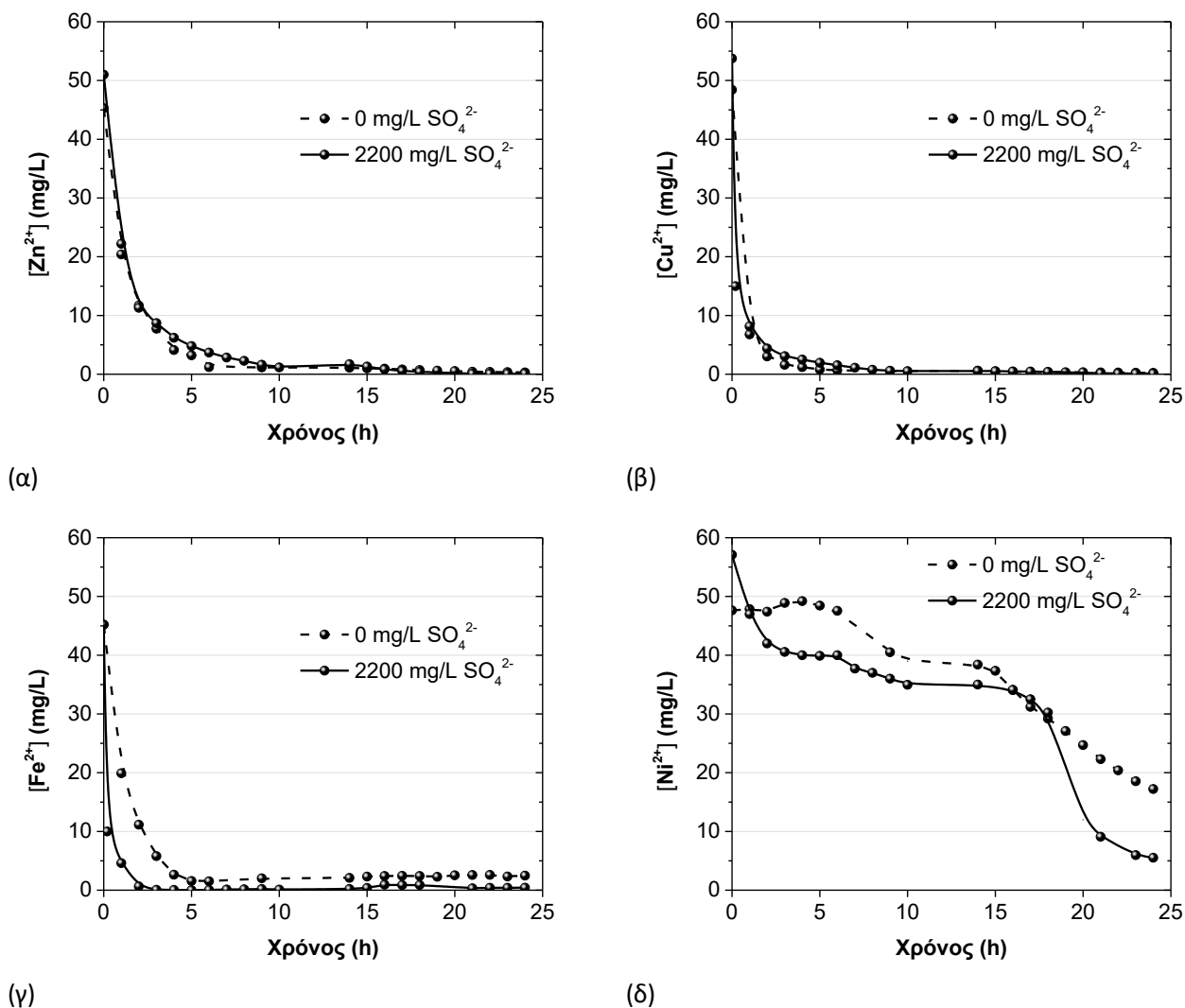


Σχήμα 5.13: Διαλυτότητα του νικελίου σε συνάρτηση με το pH παρουσία οργανικών θρεπτικών συστατικών (πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης), σε σύγκριση με τη διαλυτότητα του νικελίου σε καθαρό υδατικό διάλυμα νικελίου

Από τα παραπάνω μπορεί να υποστηριχθεί ότι, καθώς καταναλώνεται το οργανικό υπόστρωμα κατά την απονιτροποίηση, τα ιόντα νικελίου απελευθερώνονται και μπορεί να είναι διαθέσιμα για τον σχηματισμό αδιάλυτων ενώσεων του νικελίου με άλλα χημικά είδη, όπως θειούχα. Επομένως, με τον μηχανισμό αυτόν, είναι δυνατή η απομάκρυνση του νικελίου από το διάλυμα (Σχήμα 5.7(δ), Σχήμα 5.8(δ)) (Mendrinou et al., 2020; 2021).

Στο Σχήμα 5.14(α)-(δ) παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης ψευδαργύρου, χαλκού, σιδήρου και νικελίου, όταν τα μέταλλα προστίθενται στο διάλυμα σε συγκεντρώσεις 50 mg/L, για συγκέντρωση θειικών ιόντων 2 200 mg/L και σε σύγκριση με την περίπτωση απουσίας θειικών. Τα προφίλ των συγκεντρώσεων ψευδαργύρου και χαλκού δεν παρουσιάζουν διαφοροποίηση για διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικών ιόντων στο διάλυμα. Οι συγκεντρώσεις σιδήρου μειώνονται πιο αργά και οι υπολειμματικές συγκεντρώσεις είναι ελαφρά υψηλότερες όταν η συγκέντρωση θειικών είναι μηδενική, σε σύγκριση με την παρουσία 2 200 mg/L θειικών. Επίσης, σύμφωνα με το Σχήμα 5.14(δ), οι αντίστοιχες υπολειμματικές συγκεντρώσεις νικελίου αποτελούν το 32% και 9% της αρχικής συγκέντρωσης νικελίου. Τα παραπάνω δείχνουν ότι, παρουσία θειικών ιόντων, η ταχύτερη καταβύθιση

του σιδήρου και η απομάκρυνση νικελίου και σιδήρου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οφείλονται στη μερική μικροβιακή αναγωγή των θειικών προς θειούχα, που είναι διαθέσιμα για τον σχηματισμό αδιάλυτων θειούχων αλάτων των μετάλλων αυτών.



Σχήμα 5.14: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, όταν τα μέταλλα αυτά προστίθενται ταυτόχρονα στο διάλυμα σε συγκεντρώσεις 50 mg/L, απουσία και παρουσία 2 200 mg/L θειικών ιόντων

Σε παρόμοια συμπεράσματα έχουν καταλήξει οι Remoundaki et al. (2003a) και Zou et al. (2015). Συγκεκριμένα, παρατήρησαν ότι η αναγωγή θειικών ιόντων ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση οδηγεί σε παραγωγή θειούχων που ευνοούν την καταβύθιση των διαλυτών ιόντων ψευδαργύρου και νικελίου με τη μορφή θειούχων αλάτων (πχ NiS₂, ZnS). Αντίθετα, απουσία θειούχων ιόντων οι συγκεντρώσεις διαλυτού νικελίου βρέθηκαν αυξημένες κατά περίπου 5.6%-12.3% κατά την απονιτροποίηση και το νικέλιο καταβυθίστηκε κυρίως με τη μορφή ανθρακικών αλάτων (NiCO₃) (Zou et al., 2015).

Όπως προκύπτει από το σύνολο των αποτελεσμάτων που αφορούν τους μηχανισμούς βιολογικής καταβύθισης των μετάλλων, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και ο σίδηρος καταβυθίζονται σχηματίζοντας αδιάλυτα άλατα υδροξειδίων και ανθρακικών αλάτων των μετάλλων κατά την αναγωγή των νιτρικών. Όταν στο ρεύμα τροφοδοσίας του βιολογικού αντιδραστήρα προστίθενται θειικά ιόντα, αποδείχθηκε πειραματικά ότι μέρος αυτών ανάγονται προς θειούχα. Τα θειούχα είναι επίσης διαθέσιμα για την καταβύθιση διαλυτών ειδών μετάλλων (Mendrinou et al., 2020; 2021). Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι το νικέλιο είναι το μόνο από τα τέσσερα μέταλλα που μελετήθηκαν που μπορεί να συμπλοκοποιηθεί, τόσο από τα χλωριόντα που βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στο διάλυμα όσο και από οργανικά μόρια που περιέχονται σε αυτό. Για τον λόγο αυτόν, δεν καταβυθίζεται και εμφανίζεται συστηματικά στην εκροή του βιολογικού αντιδραστήρα. Αντίθετα, η καταβύθισή του φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού θειούχου νικελίου, όταν στο διάλυμα περιέχονται θειικά.

5.7 Επίδραση του λόγου C/N στην απονιτροποίηση

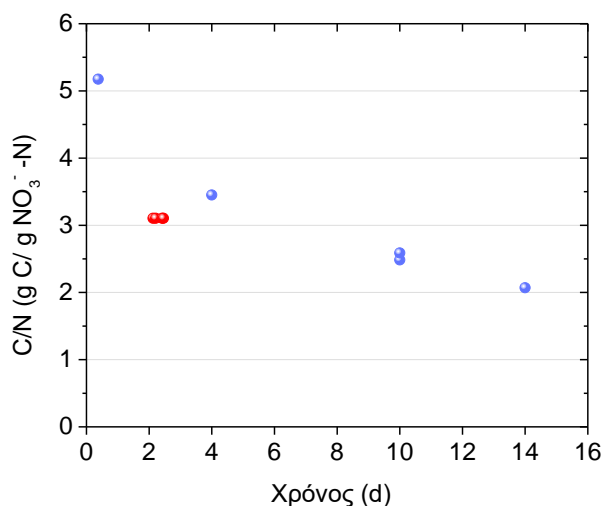
Η καλλιέργεια *Halomonas denitrificans* αναπτύχθηκε σύμφωνα με τη συνιστώμενη σύσταση θρεπτικού, όπως ήδη αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 4. Με βάση τη σύσταση αυτή, ο λόγος άνθρακα του οργανικού υποστρώματος και αζώτου νιτρικών (C/N) υπολογίζεται σε 5.18 g C/g NO₃⁻-N. Σημειώνεται ότι η τιμή αυτή είναι υπερδιπλάσια από τις περισσότερες τιμές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και αφορούν απλά οργανικά μόρια (Πίνακας 2.2, Πίνακας 3.1).

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.1) φαίνεται το σύνολο των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών και μίγματος πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης, καθώς και ο χρόνος απονιτροποίησης για κάθε δοκιμή. Οι τιμές των λόγων C/N και οι αντίστοιχοι χρόνοι απονιτροποίησης φαίνονται συνοπτικά και στο Σχήμα 5.15.

Σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 5.1) και το Σχήμα 5.15, ο λόγος C/N που οδηγεί στην ταχύτερη δυνατή απονιτροποίηση (κόκκινα σημεία στο Σχήμα 5.15), εξασφαλίζοντας αναγωγή των νιτρικών και νιτρικών, είναι ίσος με 3.11 g C/g NO₃⁻-N, σημαντικά μικρότερος από τον αρχικό (5.18 g C/g NO₃⁻-N). Η τιμή αυτή μελετήθηκε για συγκεντρώσεις νιτρικών στο εύρος 5 000-14 000 mg/L, αναλογία πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης 5:1 και οδηγεί σε χρόνο απονιτροποίησης από 2.1 έως 2.5 ημέρες. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν βρέθηκαν βιβλιογραφικές αναφορές που να αφορούν τη μελέτη της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης ως δοτών ηλεκτρονίων κατά την ετερότροφη απονιτροποίηση. Παρόλα αυτά, τιμές C/N κοντά στην τιμή 3.11 g C/g NO₃⁻-N χρησιμοποιούνται, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, με δότη ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα (Πίνακας 2.2, Πίνακας 3.1).

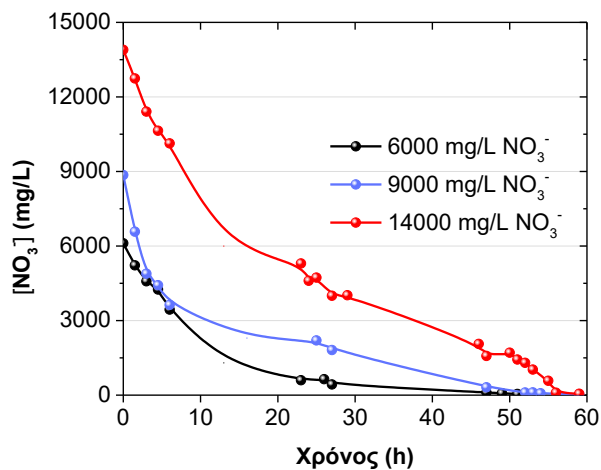
Πίνακας 5.1: Λόγος C/N και χρόνος πλήρους απονιτροποίησης για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων και οργανικού άνθρακα

Οργανικός άνθρακας			Άζωτο		C/N	Χρόνος απονιτροποίησης	
Πεπτόνη	Εκχύλισμα ζύμης	[C]	[NO ₃ ⁻]	[N]		(h)	(d)
	(g/L)		(mg/L)	(g/L)	(g C/g NO ₃ -N)		
5.0	1.0	2.3	2 000	0.45	5.18	9	0.38
5.0	1.0	2.3	3 000	0.68	3.45	96	4.0
5.0	1.0	2.3	4 000	0.90	2.59	240	10
5.0	1.0	2.3	5 000	1.13	2.07	336	14
6.0	1.2	2.8	5 000	1.13	2.48	240	10
7.5	1.5	3.5	5 000	1.13	3.11	51	2.1
9.0	1.8	4.2	6 000	1.36	3.11	53	2.2
13.5	2.7	6.3	9 000	2.03	3.11	58	2.4
21.0	4.2	9.8	14 000	3.16	3.11	59	2.5

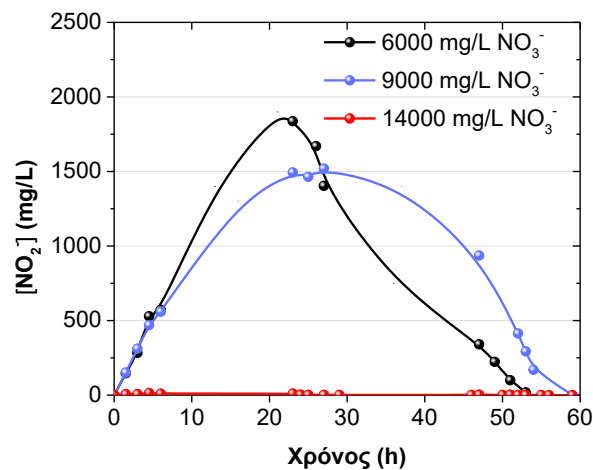


Σχήμα 5.15: Τιμές του λόγου C/N και χρόνος απονιτροποίησης

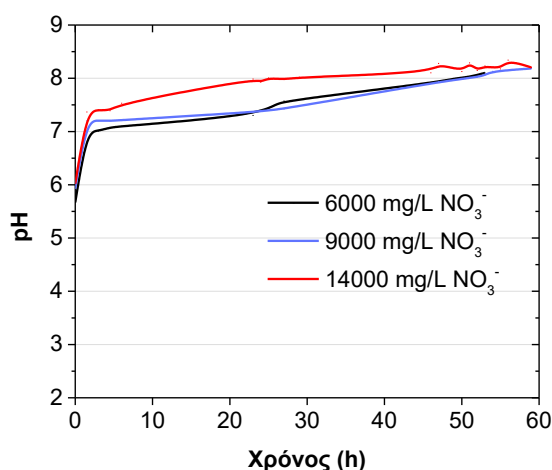
Στο Σχήμα 5.16(α)-(γ) φαίνεται η πορεία της απονιτροποίησης και συγκεκριμένα οι συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, νιτρικών ιόντων και του pH για τιμή C/N ίση με 3.11 g C/g NO₃⁻-N και αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 6 000 mg/L, 9 000 mg/L και 14 000 mg/L. Η μεταβολή των συγκεντρώσεων των διαλυτών μετάλλων (Zn, Cu, Fe, Ni) φαίνεται στο Σχήμα 5.17(α)-(δ).



(α)



(β)



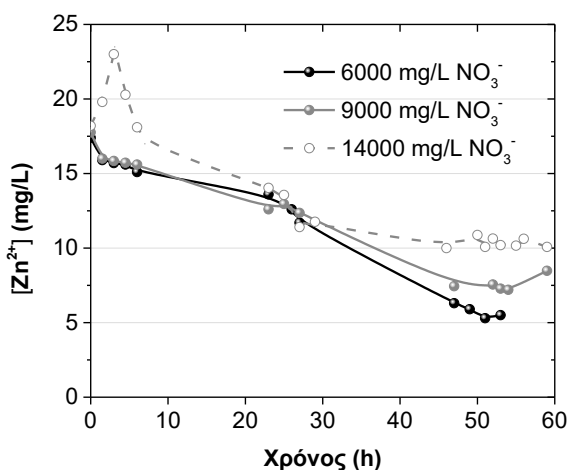
(γ)

Σχήμα 5.16: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων 6 000 mg/L, 9 000 mg/L και 14 000 mg/L, για τιμή του λόγου C/N 3.11 g C/g NO₃⁻-N

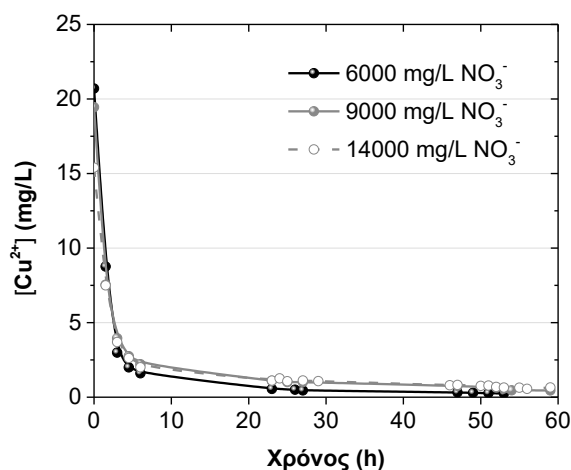
Από το Σχήμα 5.16(α) προκύπτει ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης νιτρικών από 6 000 mg/L σε 14 000 mg/L οδηγεί σε περίπου ίδιο χρόνο αναγωγής νιτρικών (50-56 ώρες). Οι αντίστοιχες ταχύτητες αναγωγής νιτρικών είναι 650 mg NO₃-N/L/d, 960 mg NO₃-N/L/d και 1 350 mg NO₃-N/L/d. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη της απονιτροποίησης για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων έως 5 750 mg/L στην παράγραφο 5.1, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αρχική συγκέντρωση νιτρικών φαίνεται να επιδρά στο στάδιο της αναγωγής νιτρωδών. Συγκεκριμένα, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών έως 5 750 mg/L (Σχήμα 5.1) και όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση νιτρικών, επιταχύνεται η αναγωγή νιτρικών ιόντων και παρατηρούνται υψηλότερες μέγιστες συγκεντρώσεις νιτρωδών. Για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών μεταξύ 6 000 mg/L και 14 000 mg/L η ταχύτητα αναγωγής νιτρικών ακολουθεί το ίδιο μοτίβο, δηλαδή επιταχύνεται καθώς αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση νιτρικών. Παρόλα αυτά, οι μέγιστες συγκεντρώσεις νιτρωδών είναι

ολοένα και χαμηλότερες, δηλαδή 1 800 mg/L και 1 500 mg/L για συγκεντρώσεις νιτρικών 6 000 mg/L και 9 000 mg/L, αντίστοιχα, ενώ για αρχική συκέντρωση νιτρικών 14 000 mg/L δεν παρατηρείται συσσώρευσή τους στο διάλυμα. Επομένως, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών υψηλότερες από 6 000 mg/L φαίνεται ότι ο μικροβιακός μεταβολισμός αρχίζει να μεταβάλλεται, μέχρι την παράλειψη του σταδίου της αναγωγής νιτρικών για αρχικές συγκεντρώσεις 14 000 mg/L (Σχήμα 5.16(β)).

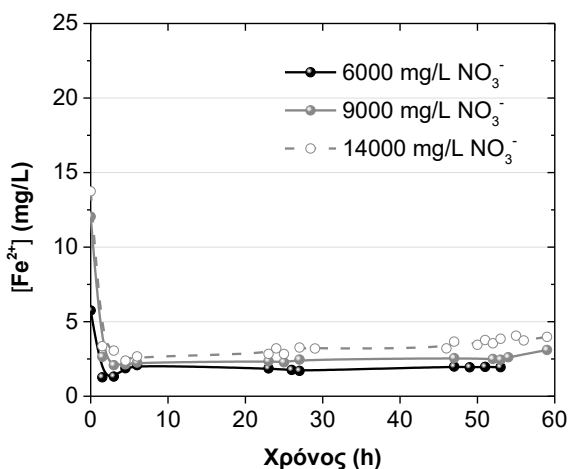
Τέλος, στο Σχήμα 5.16(γ) δεν παρατηρείται αξιόλογη διαφορά στη διακύμανση των τιμών του pH για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 6 000 mg/L και 9 000 mg/L: το pH αγγίζει την τιμή 7.0 2 (δύο) ώρες μετά την έναρξη των δοκιμών. Αντίθετα, για αρχική συκέντρωση νιτρικών 14 000 mg/L το pH αυξάνεται ταχύτερα σε ουδέτερες τιμές (7.2-7.5), σε 3 (τρεις) ώρες μετά την έναρξη των δοκιμών και ξεπερνώντας την τιμή 8 στο τέλος της απονιτροποίησης.



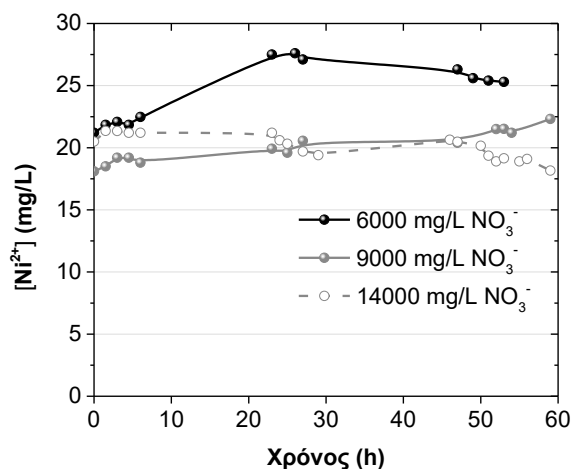
(α)



(β)



(γ)



(δ)

Σχήμα 5.17: Μεταβολή της συκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων 6 000 mg/L, 9 000 mg/L και 14 000 mg/L, για τιμή του λόγου C/N 3.11 g C/g NO₃⁻-N

Σύμφωνα με το Σχήμα 5.17(α)-(δ), για τον Zn παρατηρείται διαλυτοποίηση των καταβυθισμένων αλάτων ψευδαργύρου που προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης διαλυτού ψευδαργύρου περίπου 5 mg/L κατά τις πρώτες ώρες της απονιτροποίησης και για αρχική συγκέντρωση νιτρικών 14 000 mg/L νιτρικών. Το γεγονός αυτό δεν επηρεάζει σημαντικά τις συγκεντρώσεις διαλυτού ψευδαργύρου στη τέλος της απονιτροποίησης, οι οποίες κυμαίνονται μεταξύ 6 mg/L και 10 mg/L. Οι συγκεντρώσεις χαλκού και σιδήρου εμφανίζουν παρόμοια συμπεριφορά μεταξύ τους για διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών, με τη διαφορά ότι για τον χαλκό παρατηρούνται σχεδόν μηδενικές συγκεντρώσεις στην εκροή, ενώ για τον σίδηρο παρατηρούνται συγκεντρώσεις 2.5 mg/L-4 mg/L. Συνεπώς, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και ο σίδηρος απομακρύνονται με επιτυχία μέσω του σχηματισμού αδιάλυτων υδροξειδίων και ανθρακικών αλάτων, με τους μηχανισμούς που αναλύθηκαν στην παράγραφο 5.6. Εξάιρεση αποτελεί το νικέλιο, του οποίου η συγκέντρωση διατηρείται σταθερή και περίπου ίση με τη συγκέντρωση στην εισροή, παρά την αλκαλικότητα που παράγεται κατά την απονιτροποίηση (pH κοντά στο 8.0). Σύμφωνα με όσα συζητήθηκαν αναλυτικά σχετικά με το νικέλιο στην παράγραφο 5.6, απουσία θειικών ιόντων στο θρεπτικό μέσο, δεν μπορεί να επιτευχθεί απομάκρυνσή του από το διάλυμα. Επομένως, η καταβύθιση του νικελίου με τη μορφή θειούχων ενώσεων είναι ο επιθυμητός μηχανισμός καταβύθισης και απομάκρυνσής του από τη διαλυτή φάση.

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων σχετικά με την επίδραση του λόγου C/N στην απονιτροποίηση, προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο λόγος C/N είναι δυνατόν να ελαττωθεί από την τιμή 5.18 g C/g NO₃⁻-N, που είναι η αρχικά συνιστώμενη στο θρεπτικό μέσο, στην τιμή 3.11 g C/g NO₃⁻-N, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του βιολογικού αντιδραστήρα. Για την τιμή αυτή, η καλλιέργεια *Halomonas denitrificans* είναι ικανή να ανάγει πλήρως νιτρικά ιόντα σε αρχικές συγκεντρώσεις έως 14 000 mg/L, επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα απομάκρυνση του ψευδαργύρου, του χαλκού και του σιδήρου από το διάλυμα, μέσω βιολογικής καταβύθισής τους στην κλίση του αντιδραστήρα.

5.8 Επεξεργασία υγρών υδρομεταλλουργικών αποβλήτων

Όπως ήδη αναφέρθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, οι ΠΤΚ περιέχουν μέταλλα, συχνά σε ποσοστά υψηλότερα από τα συμβατικά μεταλλεύματα (Rao et al., 2020), με αποτέλεσμα να αποτελούν ελκυστικούς πόρους για την ανάκτηση των μετάλλων αυτών. Επίσης, οι σύγχρονες τάσεις στον τομέα της μεταλλουργίας στρέφονται προς υδρομεταλλουργικές διεργασίες, μέσω των οποίων είναι δυνατή η ανάκτηση μετάλλων σε εγκαταστάσεις μικρής κλίμακας – τοπικά (Tuncuk et al., 2012; Chagnes et al., 2016) και έχουν χαμηλότερες απαιτήσεις σε ενέργεια σε σύγκριση με τις πυρομεταλλουργικές διεργασίες (Tolio et al., 2019).

Μια τέτοια διεργασία αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε σε πιλοτική κλίμακα, με σκοπό την ανάκτηση βασικών και πολύτιμων μετάλλων από ΠΤΚ (Vlasopoulos et al., 2021; 2023). Ως πρώτη ύλη

χρησιμοποιήθηκε το υλικό που συγκρατούνταν σε σακόφιλτρα κατά τη θραύση ΠΤΚ σε τοπική μονάδα ανακύκλωσης ηλεκτρονικών αποβλήτων (Ecoreset, Ελλάδα) και, μάλιστα, το κλάσμα αυτού με μέγεθος μικρότερο από 0.6 mm. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.2) φαίνεται η σύσταση του μεταλλικού κλάσματος, που αποτελεί το 73.92% κ.β. του αρχικού υλικού. Σύμφωνα με τον πίνακα, το μεταλλικό κλάσμα περιείχε κυρίως βασικά μέταλλα, όπως χαλκό (Cu) και κασσίτερο (Sn), σε περιεκτικότητες 54.01% και 10.20% κ.β., αντίστοιχα, και άλλα, όπως σίδηρο (Fe) και μόλυβδο (Pb), σε περιεκτικότητες χαμηλότερες από 4% κ. β.. Επίσης, περιείχε πολύτιμα μέταλλα, όπως άργυρο (Ag) και χρυσό (Au), σε περιεκτικότητες 0.04-0.07% κ.β., αντίστοιχα (Vlasopoulos et al., 2023). Επιπλέον, το υλικό αυτό περιείχε πλήθος μετάλλων που δεν περιλαμβάνεται στο πίνακα (Πίνακας 5.2) και έχει κατά καιρούς προσδιοριστεί σε αυτό και σε άλλα παρόμοια υλικά κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της υδρομεταλλουργικής διεργασίας. Για τα υπόλοιπα μέταλλα δεν παρατίθενται ποσοτικά στοιχεία, διότι ο ποσοτικός προσδιορισμός τους καθ' όλα τα στάδια και για όλα τα δείγματα της υδρομεταλλουργικής διεργασίας, υγρά και στερεά, ήταν απαγορευτικός, για λόγους κόστους και χρόνου.

Πίνακας 5.2: Χημική σύσταση του μεταλλικού κλάσματος της σκόνης ΠΤΚ, κοκκομετρίας μικρότερης από 0.6 mm, που χρησιμοποιήθηκε στην υδρομεταλλουργία με σκοπό την ανάκτηση βασικών και πολύτιμων μετάλλων

Μέταλλο	Περιεκτικότητα (% κ.β)
Au	0.04
Ag	0.07
Cu	54.01
Fe	3.86
Zn	1.00
Sn	10.20
Pb	3.81
Ni	0.93
Σύνολο	73.92

Παρόλα αυτά, έγινε ημιοσοτικός προσδιορισμός των μετάλλων αυτών στα αρχικά δείγματα του υλικού με WD-XRF. Στο Παράρτημα (Εικόνα Π.1) παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της σύστασης της σκόνης που χρησιμοποιήθηκε στην υδρομεταλλουργική διεργασία, όπου φαίνεται η ταυτόχρονη παρουσία περίπου 28 (εικοσιοκτώ) μετάλλων επιπλέον αυτών που μελετώνται στην παρούσα Διατριβή (Fe, Cu, Zn, Ni). Από το σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκαν, αναφέρεται,

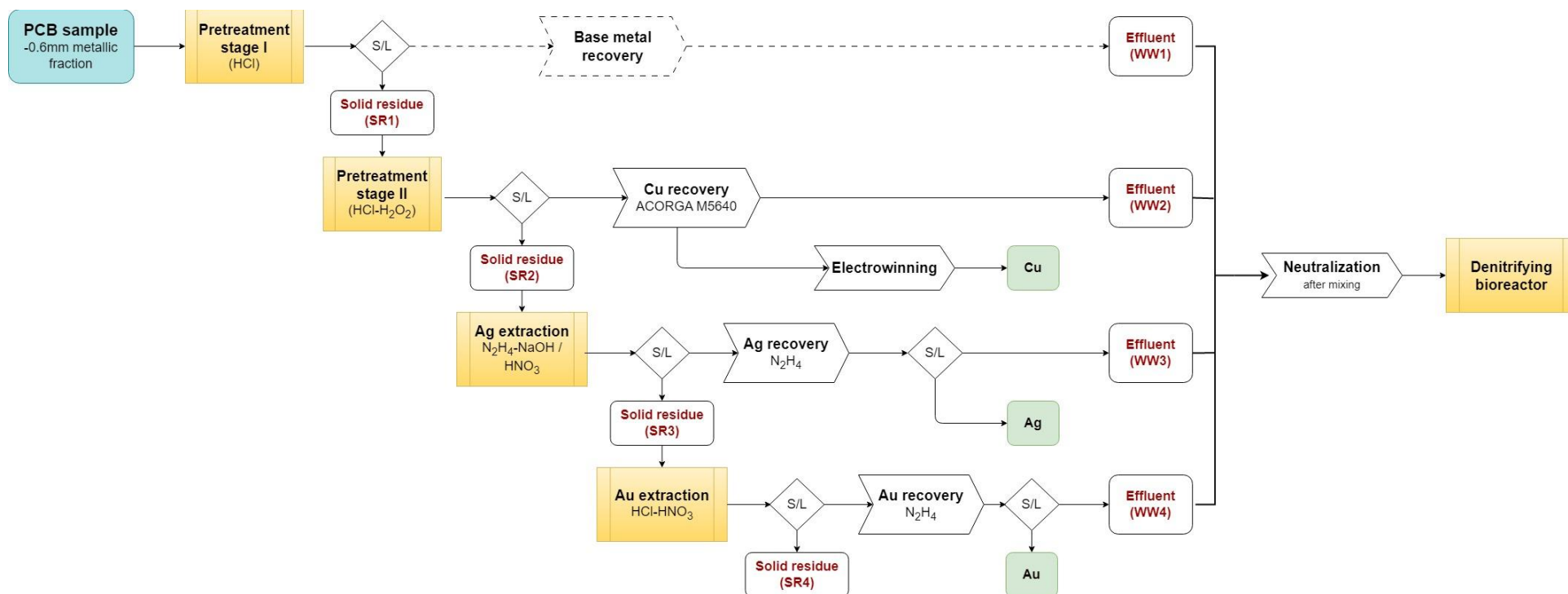
ενδεικτικά, ότι στο αρχικό υλικό μπορεί να περιέχονται μέταλλα όπως: αργίλιο (Al) ~ 4%, πυρίτιο (Si) ~ 9%, τιτάνιο (Ti) ~ 1%, χρώμιο (Cr) ~ 0.1%, μαγγάνιο (Mn) ~ 2%, κοβάλτιο (Co) ~ 0.2%, βρώμιο (Br) ~ 5%, στρόντιο (Sr) ~ 0.2%, ζirkόνιο (Zr) ~ 0.2%, αντιμόνιο (Sb) ~ 0.1%, βάριο (Ba) ~ 3%. Όπως είναι αναμενόμενο, μέρος από τα παραπάνω μέταλλα θα βρεθεί διαλυτό στα υγρά εκχυλίσματα και τελικά στα υγρά απόβλητα της διεργασίας. Αυτό σημαίνει ότι ενδέχεται να αυξάνεται η τοξικότητα των αποβλήτων, λόγω της ταυτόχρονης παρουσίας τέτοιων διαλυτών μεταλλικών ειδών που ενδεχόμενα να έχουν συνεργιστική τοξική επίδραση στην απονιτροποίηση. Αυτός είναι και ο κύριος λόγος για τον οποίο κρίθηκε απαραίτητη η πειραματική διερεύνηση της απονιτροποιητικής ικανότητας του βιοαντιδραστήρα, όταν σε αυτόν εισάγονται πραγματικά απόβλητα από τις πιλοτικές δοκιμές της υδρομεταλλουργικής διεργασίας.

Το διάγραμμα ροής της υδρομεταλλουργικής διεργασίας φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4.3). Σύμφωνα με το διάγραμμα ροής, αρχικά πραγματοποιείται εκχύλιση του κασσιτέρου με υδροχλωρικό οξύ (HCl) (base metal recovery). Από το υδρομεταλλουργικό αυτό στάδιο προκύπτει η όξινη ροή αποβλήτων WW1 (pH 1.74-2.10), η οποία περιέχει χλωριόντα σε σημαντικές συγκεντρώσεις (56-102 g/L) και διαλυτά μέταλλα, κυρίως Fe, Zn και Pb, σε συγκεντρώσεις έως 7.5 g/L, 3.5 g/L και 1.3 g/L, αντίστοιχα. Η σύσταση της ροής WW1 παρουσιάζεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.9). Το στερεό υπόλειμμα από την ανάκτηση του κασσιτέρου (SR1) είναι πλούσιο σε χαλκό και οδηγείται στο επόμενο υδρομεταλλουργικό στάδιο που είναι η ανάκτηση του χαλκού (Cu recovery).

Το εκχυλιστικό μέσο που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση του χαλκού από το στερεό υπόλειμμα (SR1) είναι συνδυασμός υδροχλωρικού οξέος (HCl) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Μετά την ανάκτηση του χαλκού από το διάλυμα, η όξινη ροή αποβλήτων που δημιουργείται (WW2) περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις χλωριόντων (56-102 g/L) και διαλυτών μετάλλων (έως 1.95 g/L) (Πίνακας 4.9). Το στερεό υπόλειμμα που απομένει (SR2) περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις βασικών μετάλλων, εξαιτίας της απομάκρυνσής τους κατά τα προηγούμενα υδρομεταλλουργικά στάδια, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό την ανάκτηση αργύρου (Ag recovery) και χρυσού (Au recovery), δηλαδή των πολύτιμων μετάλλων.

Για τη διαλυτοποίηση (εκχύλιση) του αργύρου από το στερεό υπόλειμμα (SR2) μπορεί να χρησιμοποιηθεί νιτρικό οξύ (HNO₃) ως εκχυλιστικό μέσο, όπως φαίνεται στο διάγραμμα ροής. Η αναγωγή του αργύρου σε στοιχειακή μορφή από το μεταλλοφόρο διάλυμα, επιτυγχάνεται με την προσθήκη υδραζίνης (N₂H₄) και ακολουθεί η οξειδωσή του με νιτρικό οξύ (HNO₃). Επομένως, μετά την ανάκτηση του αργύρου, η όξινη ροή αποβλήτων WW3 είναι δυνατόν να περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, εξαιτίας της χρήσης νιτρικού οξέος ως εκχυλιστικού μέσου, και χαμηλές συγκεντρώσεις χλωριόντων, μετά την απελευθέρωσή τους από τον χλωριούχο άργυρο (AgCl). Οι συγκεντρώσεις νιτρικών (190-223 g/L) και χλωριόντων (0.5-1.2 g/L), το pH και οι συγκεντρώσεις διαλυτών μετάλλων (<20 mg/L) που προέρχονται από το υδρομεταλλουργικό αυτό στάδιο παρουσιάζ-

Διάγραμμα ροής της υδρομεταλλουργικής διεργασίας ανάκτησης Cu, Sn, Ag και Au σε ΠTK (επάνω-Εικόνα 4.3) και σύσταση των παραγόμενων αποβλήτων (κάτω-Πίνακας 4.9)



Ροή αποβλήτων	pH	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	Fe ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺
	(-)	(g/L)	(g/L)	(mg/L)				
WW1	1.74-2.10	0	56-102	1 310-7 500	140-142	180-700	3 030-3 500	730-1 300
WW2	~0	0	30-78	845-1 500	440-1 950	750-920	490-970	600-1 250
WW3	~0	190-223	0.5-1.2	15-20	5-10	15-20	5-10	1-5
WW4	~0	48.3-173	49-102	230-290	430-510	30-50	35-130	12-1 380

ζονται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 4.9). Τέλος, το στερεό υπόλειμμα (SR3) χρησιμοποιείται για την ανάκτηση του χρυσού από αυτό.

Η εκχύλιση του χρυσού από το στερεό υπόλειμμα SR3 πραγματοποιείται με βασιλικό νερό, δηλαδή με μίγμα υδροχλωρικού και νιτρικού οξέος σε αναλογία 3:1. Συνεπώς, η όξινη ροή αποβλήτων που δημιουργείται μετά την ανάκτηση του χρυσού σε στοιχειακή μορφή (WW4) περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις τόσο χλωριόντων (49-102 g/L), όσο και νιτρικών ιόντων (48-173 g/L). Ταυτόχρονα, οι ισχυρές οξειδωτικές συνθήκες που οφείλονται στην παρουσία βασιλικού νερού, οδηγούν σε διαλυτοποίηση μεγαλύτερου μέρους των μετάλλων που έχουν απομείνει στο στερεό υπόλειμμα SR3, οδηγώντας σε αυξημένες συγκεντρώσεις σιδήρου, χαλκού, ψευδαργύρου και μολύβδου στο διάλυμα, σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις που παρατηρήθηκαν στη ροή WW3, όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 4.9).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι, οι όξινες ροές αποβλήτων που προέρχονται από τα διαδοχικά υδρομεταλλουργικά στάδια ανάκτησης κασσιτέρου, χαλκού, αργύρου και χρυσού περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις χλωριόντων (έως 102 g/L) και νιτρικών ιόντων (έως 223 g/L), ανάλογα με τα εκχυλιστικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, οι ροές αυτές είναι επιβαρυνμένες με μέταλλα σε συγκεντρώσεις που μπορεί να φθάσουν ακόμη και τα 3.5 g/L. Επειδή οι συγκεντρώσεις νιτρικών, χλωριόντων και μετάλλων είναι υψηλότερες από αυτές για τις οποίες έχει επιβεβαιωθεί η επιτυχής λειτουργία του βιολογικού αντιδραστήρα (pH 3, 14 g/L NO₃⁻, 100 mg/L διαλυτά μέταλλα), είναι αναγκαίο να διαμορφωθεί κατάλληλο πρωτόκολλο προεπεξεργασίας των WW1-WW4, ώστε τα υδρομεταλλουργικά απόβλητα όχι μόνο να είναι «ανεκτά» από τον βιολογικό αντιδραστήρα, αλλά και η επεξεργασία τους να οδηγεί στην απονιτροποίηση.

5.8.1 Προεπεξεργασία υδρομεταλλουργικών αποβλήτων

Από τα στάδια της υδρομεταλλουργικής ανάκτησης κασσιτέρου, χαλκού, αργύρου και χρυσού που περιγράφηκαν αναλυτικά και φαίνονται στο διάγραμμα ροής της παραπάνω εικόνας (Εικόνα 4.3), προκύπτουν οι όξινες ροές αποβλήτων WW1-WW4, με τη σύσταση που παρουσιάζεται στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 4.9). Από τα στοιχεία που περιλαμβάνονται στον πίνακα αυτόν φαίνεται ότι τα υγρά απόβλητα θα μπορούσαν αρχικά να αναμιχθούν και στη συνέχεια να εφαρμοστεί σε αυτά η προεπεξεργασία. Επίσης, φαίνεται ότι θα πρέπει να αραιωθούν με στόχο τη μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών και των χλωριόντων σε επίπεδα ανεκτά από τον βιοαντιδραστήρα. Όμως, ο παράγοντας της αραιώσης, που φαίνεται ότι μπορεί να είναι γύρω στο 10, δεν εξασφαλίζει την αντίστοιχη αύξηση του pH και μείωση των συγκεντρώσεων των μετάλλων. Έτσι, φαίνεται ότι είναι απαραίτητο ένα στάδιο προεπεξεργασίας που αποσκοπεί στην εξουδετέρωση του μίγματος των αποβλήτων. Το στάδιο αυτό θα εξασφαλίσει και την ταυτόχρονη

μείωση των συγκεντρώσεων των διαλυτών μετάλλων σε επίπεδα της τάξης του mg/L. Το πρωτόκολλο προεπεξεργασίας των ροών αποβλήτων WW1-WW4 που διαμορφώθηκε περιλαμβάνει τα εξής διαδοχικά στάδια:

- Ανάμιξη ίσων όγκων από τα WW1-WW4
Μέσω της ανάμιξης επιτυγχάνεται μείωση της συγκέντρωσης των νιτρικών ιόντων στο μίγμα.
- Εξουδετέρωση με χρήση καυστικού νατρίου (NaOH) 5 M
Η προσθήκη στο μίγμα υδροξυλίων με τη μορφή NaOH οδηγεί σε σχηματισμό αδιάλυτων υδροξειδίων των μετάλλων, τα οποία απομακρύνονται από το διάλυμα μέσω χημικής καταβύθισης, με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης των διαλυτών μετάλλων.
- Καθίζηση διάρκειας 24 h
Η διάρκεια της καθίζησης εξασφαλίζει την αποτελεσματική διαύγαση του υπερκείμενου διαλύματος.
- Μικροδιήθηση διαμέσου μεμβρανών με πόρους 0.20 μm (Whatman™ ME 24/21 ST):
Προκύπτει το διάλυμα **mixW** (Το βήμα αυτό είναι δυνατόν να παραλειφθεί).
- Αραίωση με το θρεπτικό μέσο:
Προκύπτει το διάλυμα **PR-mixW**

Η αραίωση πρέπει να είναι οπωσδήποτε μεγαλύτερη από 1:3 (1 μέρος mixW και 2 μέρη θρεπτικού). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.3) φαίνεται ένα παράδειγμα μικρής σχετικά αραίωσης (1:6, δηλαδή 1 μέρος mixW και 5 μέρη θρεπτικού μέσου), που οδηγεί σε συγκέντρωση νιτρικών και χλωριόντων που εξασφαλίζουν την αποτελεσματική λειτουργία του βιοαντιδραστήρα (διάλυμα PR-mixW). Χρησιμοποιείται το τροποποιημένο θρεπτικό μέσο (Πίνακας 4.8), απουσία NaNO₃, με πεπτόνη 1.5 g/g NO₃⁻ και εκχύλισμα ζύμης 0.3 g/g NO₃⁻, ώστε η τιμή C/N να είναι ίση με 3.11 g C/g NO₃⁻-N.

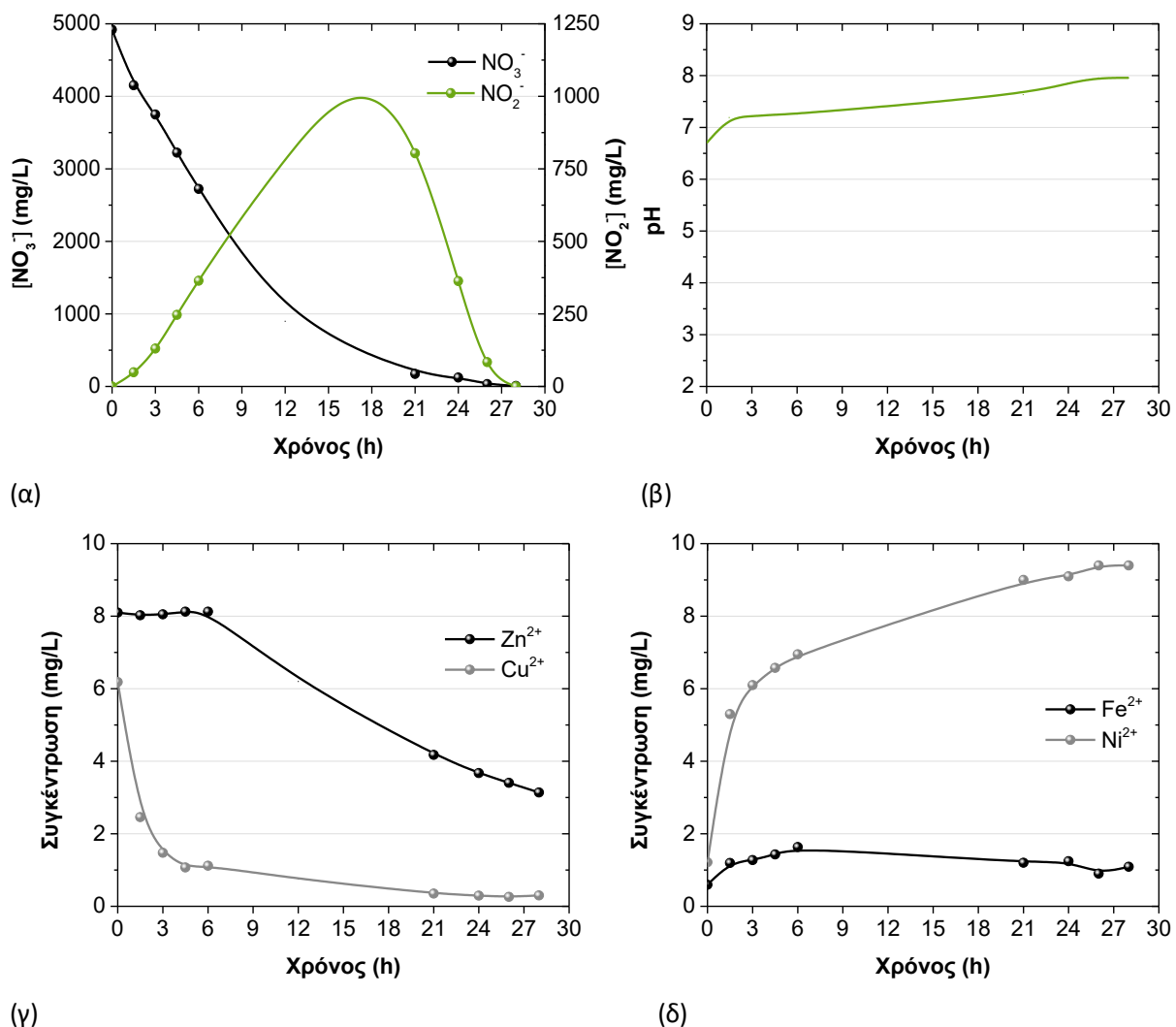
Πίνακας 5.3: Χημική σύσταση του μίγματος υδρομεταλλουργικών αποβλήτων που έχει υποστεί χημική προεπεξεργασία και βιολογική επεξεργασία

Διάλυμα	pH	NO ₃ ⁻	Cl ⁻	Fe ²⁺	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺
	(-)	(g/L)	(g/L)	(mg/L)				
mixW	~0.20	15.6-75.5	54-90	2 900-5 800	810-1 830	320-860	1 330-1 540	900-1 120
PR-mixW	6.70	4.9	50	1.60	6.19	1.22	8.06	<1
Treated	7.96	0.008	50	1.09	0.30	9.40	3.14	<1

Η συγκέντρωση χλωριόντων στο μίχW είναι χαμηλότερη από αυτή που αντιστοιχεί σε αλατότητα 5%, που είναι η ελάχιστη τιμή αλατότητας για την οποία έχει επιβεβαιωθεί η επιτυχημένη λειτουργία του βιολογικού αντιδραστήρα. Συνεπώς, στο θρεπτικό μέσο προστίθεται τόση συγκέντρωση NaCl, ώστε να καλύπτεται η διαφορά μέχρι την τιμή αλατότητας 5%.

5.8.2 Βιολογική επεξεργασία αποβλήτων

Η παρακολούθηση των παραμέτρων (συγκέντρωση νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων, pH, διαλυτών μετάλλων) κατά τη βιολογική απονιτροποίηση των προεπεξεργασμένων υδρομεταλλουργικών αποβλήτων φαίνεται στο Σχήμα 5.18(α)-(δ).



Σχήμα 5.18: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων, (β) Μεταβολή του pH, (γ) Μεταβολή της συγκέντρωσης ψευδαργύρου και χαλκού και (δ) Μεταβολή της συγκέντρωσης σιδήρου και νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την επεξεργασία προεπεξεργασμένων υγρών αποβλήτων που προέρχονται από υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων σε ΠΤΚ

Η παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων (ψευδαργύρου, χαλκού, σιδήρου και νικελίου) δεν επηρεάζουν την απόδοση της απονιτροποίησης (Πίνακας 5.3). Σύμφωνα με τον πίνακα αυτόν και το Σχήμα 5.18, αρχική συγκέντρωση 4 900 mg/L νιτρικών ιόντων ανάγεται πλήρως (99.8%) εντός 28 ωρών από την έναρξη της δοκιμής. Οι συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρωδών ιόντων στο τέλος της απονιτροποίησης είναι 7.77 mg/L και 0.3 mg/L, αντίστοιχα. Η ταχύτητα αναγωγής νιτρικών (950 mg NO₃-N/L/d) δεν διαφέρει σημαντικά από αυτή των συνθετικών αποβλήτων για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 6 000 mg/L-9 000 mg/L. Αντίθετα, οι μέγιστες συγκεντρώσεις νιτρωδών στα προεπεξεργασμένα απόβλητα της υδρομεταλλουργίας είναι πολλαπλάσιες από αυτές των συνθετικών αποβλήτων (1 500 mg/L-1 800 mg/L). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές, οι αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρωδών ιόντων μπορεί να οφείλονται σε επικράτηση δυσμενών συνθηκών για τον μικροβιακό μεταβολισμό (Albina et al., 2019) και είναι δυνατόν να συνδέονται με τη σύνθετη σύσταση των υδρομεταλλουργικών αποβλήτων.

Η απονιτροποίηση οδηγεί σε αύξηση του pH από την τιμή 6.70 σε 7.96 (Σχήμα 5.18(β)). Η αλκαλικότητα που παράγεται κατά την οξειδωση του οργανικού άνθρακα οδηγεί στον σχηματισμό υδροξειδίων και ανθρακικών αλάτων των μετάλλων, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις του ψευδαργύρου, του χαλκού και του σιδήρου στο τέλος της απονιτροποίησης να είναι σχεδόν 3 mg/L, 1 mg/L και χαμηλότερες από 0.50 mg/L, αντίστοιχα (Σχήμα 5.18(γ)-(δ)). Όπως και στην περίπτωση των συνθετικών διαλυμάτων, το νικέλιο αποτελεί εξαίρεση (Σχήμα 5.18(δ)), με αποτέλεσμα η αρχική συγκέντρωση νικελίου να αυξάνεται από 1.22 mg/L σε 9.40 mg/L στην εκροή του βιολογικού αντιδραστήρα. Αυτό θα μπορούσε να καταβυθιστεί, εάν στο θρεπτικό μέσο περιέχονταν θειικά ιόντα σε συγκέντρωση ελαφρά υψηλότερη από τη στοιχειομετρικά απαιτούμενη.

Από το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων προκύπτει ότι ο βιολογικός αντιδραστήρας είναι ικανός να ανάγει πλήρως τα νιτρικά ιόντα και να απομακρύνει ταυτόχρονα τα υπολείμματα από τα διαλυτά είδη μετάλλων που περιέχονται σε προεπεξεργασμένα υγρά απόβλητα υδρομεταλλουργικής ανάκτησης μετάλλων σε ΠΤΚ, με μηχανισμούς βιοκαταβύθισης. Η προεπεξεργασία αυτή περιλαμβάνει ανάμιξη ίσων όγκων των ροών των υδρομεταλλουργικών αποβλήτων, εξουδετέρωση, καθίζηση και αραίωση με θρεπτικό μέσο και πραγματοποιείται, με σκοπό οι συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων, χλωριόντων και διαλυτών μετάλλων να εξασφαλίζουν επιτυχημένη απονιτροποίηση. Επομένως, ο βιολογικός αντιδραστήρας προσκολλημένης βιομάζας (PBR) που έχει εμβολιαστεί με την καλλιέργεια *Halomonas denitrificans*. λειτουργεί με επιτυχία σε πιλοτική κλίμακα ως μέρος ολοκληρωμένου συστήματος που περιλαμβάνει: (1) υδρομεταλλουργική ανάκτηση βασικών (κασσιτέρου, χαλκού) και πολύτιμων μετάλλων (αργύρου, χρυσού) από ΠΤΚ, (2) προεπεξεργασία των αποβλήτων της υδρομεταλλουργικής διεργασίας, και (3) βιολογική επεξεργασία των αποβλήτων αυτών (Vlasopoulos et al., 2023).

6 | Πειραματική διερεύνηση απλών μορίων ως πηγής άνθρακα στη μικροβιακή απονιτροποίηση

Τα σύνθετα οργανικά μόρια έχουν σύσταση χωρίς καθορισμένο χημικό τύπο και είναι δυνατόν να αποτελούνται, μεταξύ άλλων, από απλούστερα οργανικά μόρια, όπως γλυκόζη, τα οποία έχουν διαφορετική βιοδιαθεσιμότητα μεταξύ τους (Wang et al., 2021; Fu et al., 2022). Έτσι, όταν τα σύνθετα οργανικά μόρια χρησιμοποιούνται ως δότες ηλεκτρονίων κατά την απονιτροποίηση, η μελέτη της στοιχειομετρίας της διεργασίας και η εύρεση του κατάλληλου λόγου άνθρακα υποστρώματος και αζώτου νιτρικών (C/N) καθίστανται περίπλοκες, τόσο σε πειραματική-εργαστηριακή κλίμακα, όσο και κατά την πιθανή μαθηματική προσομοίωση της διεργασίας.

Σε εργαστηριακό επίπεδο, τα παραπάνω μπορούν να οδηγήσουν σε ένδεια ή περίσσεια οργανικού άνθρακα στην εισροή, επιβαρύνοντας την εκροή με άζωτο νιτρικών ή οργανικό φορτίο, αντίστοιχα (Her & Huang, 1995; Ge et al., 2012; Fu et al., 2022; Zhang et al., 2022b), με αποτέλεσμα να επηρεάζεται πιθανώς αρνητικά και η απόδοση των βιολογικών αντιδραστών. Επίσης, όταν πραγματοποιείται μαθηματική προσομοίωση με σκοπό τη μελέτη της απονιτροποίησης, η μη καθορισμένη, συχνά εμπειρική σύσταση των σύνθετων οργανικών μορίων, μπορεί να μειώσει την ακρίβεια των υπολογισμών και να οδηγήσει σε αβέβαια συμπεράσματα σχετικά με την εξέλιξη της διεργασίας.

Σε αντίθεση με τα σύνθετα οργανικά μόρια, όταν κατά την απονιτροποίηση χρησιμοποιούνται απλά οργανικά μόρια ως δότες ηλεκτρονίων, διευκολύνεται η βιολογική επεξεργασία των αποβλήτων σε εργαστηριακή, πιλοτική και βιομηχανική κλίμακα: οι απλές χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα κατά την απονιτροποίηση, όπως το οξικό οξύ/νάτριο, η αιθανόλη και η μεθανόλη (Πίνακας 2.2 και Πίνακας 3.1), έχουν μελετηθεί περισσότερο ως πηγές άνθρακα κατά την ετερότροφη απονιτροποίηση, έχουν σταθερή σύσταση που δεν επηρεάζεται από τον τρόπο παραγωγής τους, βρίσκονται εύκολα στο εμπόριο και είναι συχνά οικονομικότερες, σε σύγκριση με σύνθετα οργανικά μόρια (Wang et al., 2021; Fu et al., 2022).

Σύμφωνα με το Γερμανικό Ινστιτούτο Μικροοργανισμών και Κυτταρικών Καλλιεργειών DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), οι συνιστώμενες πηγές οργανικού άνθρακα για την καλλιέργεια του βακτηρίου *Halomonas denitrificans* είναι η πεπτόνη (bacto peptone) και το εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) (Πίνακας 4.1, Πίνακας 4.8), δηλαδή σύνθετα οργανικά μόρια, χωρίς καθορισμένο χημικό τύπο. Η βελτιστοποίηση της απόδοσης του βιολογικού αντιδραστήρα προϋποθέτει τη μελέτη της στοιχειομετρίας της απονιτροποίησης, με εργαλεία τόσο

εργαστηριακές δοκιμές, όσο και τη μαθηματική προσομοίωση της διεργασίας. Τα πλεονεκτήματα που έχουν τα απλά οργανικά μόρια έναντι των σύνθετων, σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν, οδήγησαν στη διερεύνηση της δυνατότητας αντικατάστασης της πεπτόνης από απλούστερα οργανικά μόρια που έχουν χρησιμοποιηθεί συστηματικά στην απονιτροποίηση.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο πλέον μελετημένος δότης ηλεκτρονίων σε απονιτροποιητικές καλλιέργειες του γένους *Halomonas* είναι τα οξικά ιόντα, με τη μορφή οξικού οξέος ή οξικού νατρίου (Yoshie et al., 2005; Osaka et al., 2008; Miao et al., 2015; Zhang et al., 2002a). Επίσης, η αιθανόλη χρησιμοποιείται συχνά ως πηγή άνθρακα κατά την απονιτροποίηση (Srinandan et al., 2012; Papirio et al., 2014; Sun et al., 2016b; Letelier-Gordo et al., 2020) από τα περισσότερα είδη βακτηρίων, σε αντίθεση με τη μεθανόλη, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο από μεθυλότροφους μικροοργανισμούς (Αγγελής, 2017 Madigan et al., 2018).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, το οξικό νάτριο/οξύ και η αιθανόλη είναι δυνατόν να αντικαταστήσουν την πεπτόνη ή και το εκχύλισμα ζύμης ως πηγές άνθρακα. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν αρχικά προκαταρκτικές δοκιμές σε κωνικές φιάλες, κατά τις οποίες ο άνθρακας της πεπτόνης αντικαταστάθηκε από ίση συγκέντρωση άνθρακα οξικού νατρίου και αιθανόλης. Όλες οι δοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν παρουσία ίσης συγκέντρωσης εκχυλίσματος ζύμης. Μετά την ολοκλήρωση των δοκιμών στις φιάλες και, αφότου διαπιστώθηκε ότι είναι εφικτή η αντικατάσταση της πεπτόνης από οξικό ή και αιθανόλη, μελετήθηκε η απόδοση του βιολογικού αντιδραστήρα με εναλλακτικό δότη ηλεκτρονίων, για διαφορετικούς λόγους C/N. Επίσης, στον βιολογικό αντιδραστήρα μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας εκχυλίσματος ζύμης στην απονιτροποίηση με δότη ηλεκτρονίων την αιθανόλη.

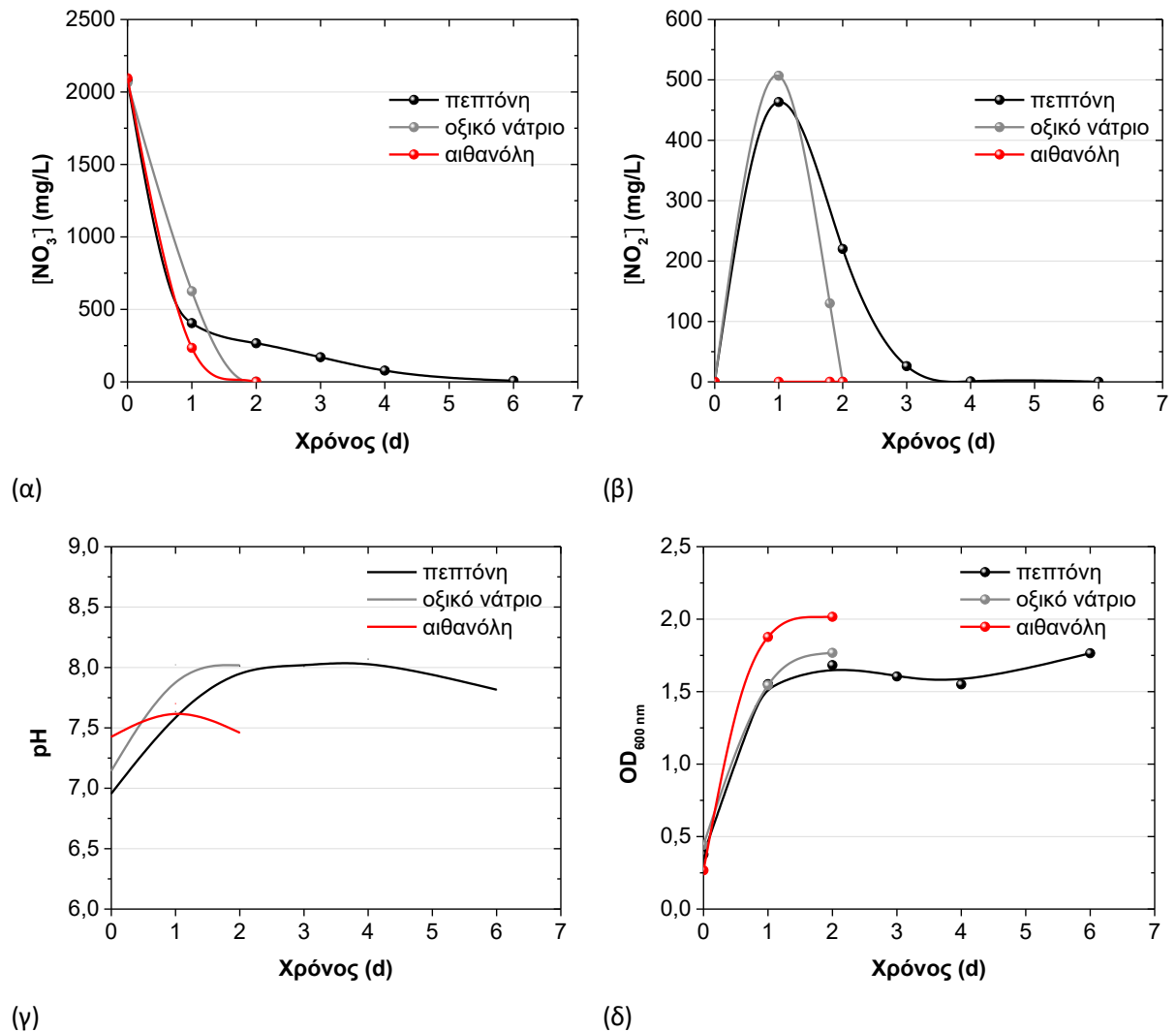
Στη συνέχεια ακολουθούν τα αποτελέσματα τόσο των προκαταρκτικών δοκιμών σε κωνικές φιάλες, όσο και των δοκιμών στον βιολογικό αντιδραστήρα με πηγή άνθρακα τα οξικά ιόντα και την αιθανόλη.

6.1 Ανάπτυξη του *Halomonas denitrificans* σε οξικό νάτριο και αιθανόλη

Στο Σχήμα 6.1 φαίνεται η μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων, του pH και της οπτικής πυκνότητας σε συνάρτηση με τον χρόνο, με δότες ηλεκτρονίων την πεπτόνη το οξικό νάτριο και την αιθανόλη (C/N=5.18). Η αρχική συγκέντρωση οργανικών πτητικών στερεών (MLVSS) στις φιάλες προσδιορίστηκε ίση με 20-21 mg/L για την πεπτόνη και την αιθανόλη και 17 mg/L για το οξικό νάτριο.

Σύμφωνα με το Σχήμα 6.1(α)-(β), παρατηρείται πλήρης αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών ιόντων και για τους δύο, εναλλακτικούς της πεπτόνης, δότες ηλεκτρονίων (οξικό νάτριο, αιθανόλη). Ο

μεταβολισμός του οξικού νατρίου πραγματοποιείται μέσω της παραγωγής νιτρωδών ιόντων, σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές της πεπτόνης (450 mg/L -500 mg/L). Αντίθετα, για την αιθανόλη δεν σχηματίζεται καμπύλη νιτρωδών. Στο Σχήμα 6.1(α) φαίνεται ότι δεν υπάρχει αξιόλογη διαφορά στην ταχύτητα αναγωγής νιτρικών για το οξικό νάτριο, την αιθανόλη και την πρώτη ώρα κατανάλωσης της πεπτόνης. Οι ειδικοί ρυθμοί απονιτροποίησης είναι 800 mg NO₃-N/g VSS/h για την πεπτόνη(πρώτη ώρα) και το οξικό νάτριο και 880 mg NO₃-N/g VSS/h για την αιθανόλη.



Σχήμα 6.1: Δοκιμές ανάπτυξης του *H. denitrificans* σε οξικό νάτριο και αιθανόλη: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, (δ) Μεταβολή της οπτικής πυκνότητας σε μήκος κύματος 600 nm, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την πεπτόνη, το οξικό νάτριο και την αιθανόλη με C/N=5.18

Οι παραπάνω τιμές είναι πολλαπλάσια υψηλότερες από αυτές που καταγράφονται στη βιβλιογραφία για τα οξικά ιόντα και την αιθανόλη (Πίνακας 2.2), γεγονός που μπορεί οφείλεται στη

φυσιολογία του *H. denitrificans*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί ότι καθαρές καλλιέργειες απονιτροποιητικών βακτηρίων, όπως των *Hyphomicrobium spp.*, μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένους ρυθμούς απονιτροποίησης, περίπου 140 mg N/g VSS/h (Christensson et al., 1994). Στη συνέχεια της δοκιμής (1^η έως 6^η ώρα) (Σχήμα 6.1(α)), παρατηρείται επιβράδυνση του ρυθμού αναγωγής νιτρικών με πηγή άνθρακα την πεπτόνη, που αντιστοιχεί σε ειδικό ρυθμό αναγωγής νιτρικών 45 mg NO₃-N/g VSS/h. Επομένως, είναι δυνατόν να θεωρηθεί ότι η πεπτόνη αποτελείται από δύο επιμέρους οργανικά κλάσματα, ανάλογα με τον βαθμό βιοδιασπασιμότητάς της: (1) το εύκολα βιοδιασπασίμο κλάσμα, το οποίο καταναλώνεται από τον *H. denitrificans* με ειδικό ρυθμό απονιτροποίησης 800 mg NO₃-N/g VSS/h, παρόμοια με το οξικό νάτριο και, (2) το δύσκολα βιοδιασπασίμο κλάσμα, το οποίο καταναλώνεται από τα βακτήρια με χαμηλότερο ειδικό ρυθμό απονιτροποίησης 45 mg NO₃-N/g VSS/h. Η δυσκολία των μικροοργανισμών να καταναλώσουν την πεπτόνη οδηγεί σε επιβράδυνση του χρόνου αναγωγής νιτρικών και νιτρωδών. Έτσι, με πηγή άνθρακα την πεπτόνη η απονιτροποίηση διαρκεί τον διπλάσιο χρόνο σε σύγκριση με το οξικό οξύ και την αιθανόλη, δηλαδή 4 (τέσσερις) ώρες έναντι 2 (δύο) ωρών, αντίστοιχα.

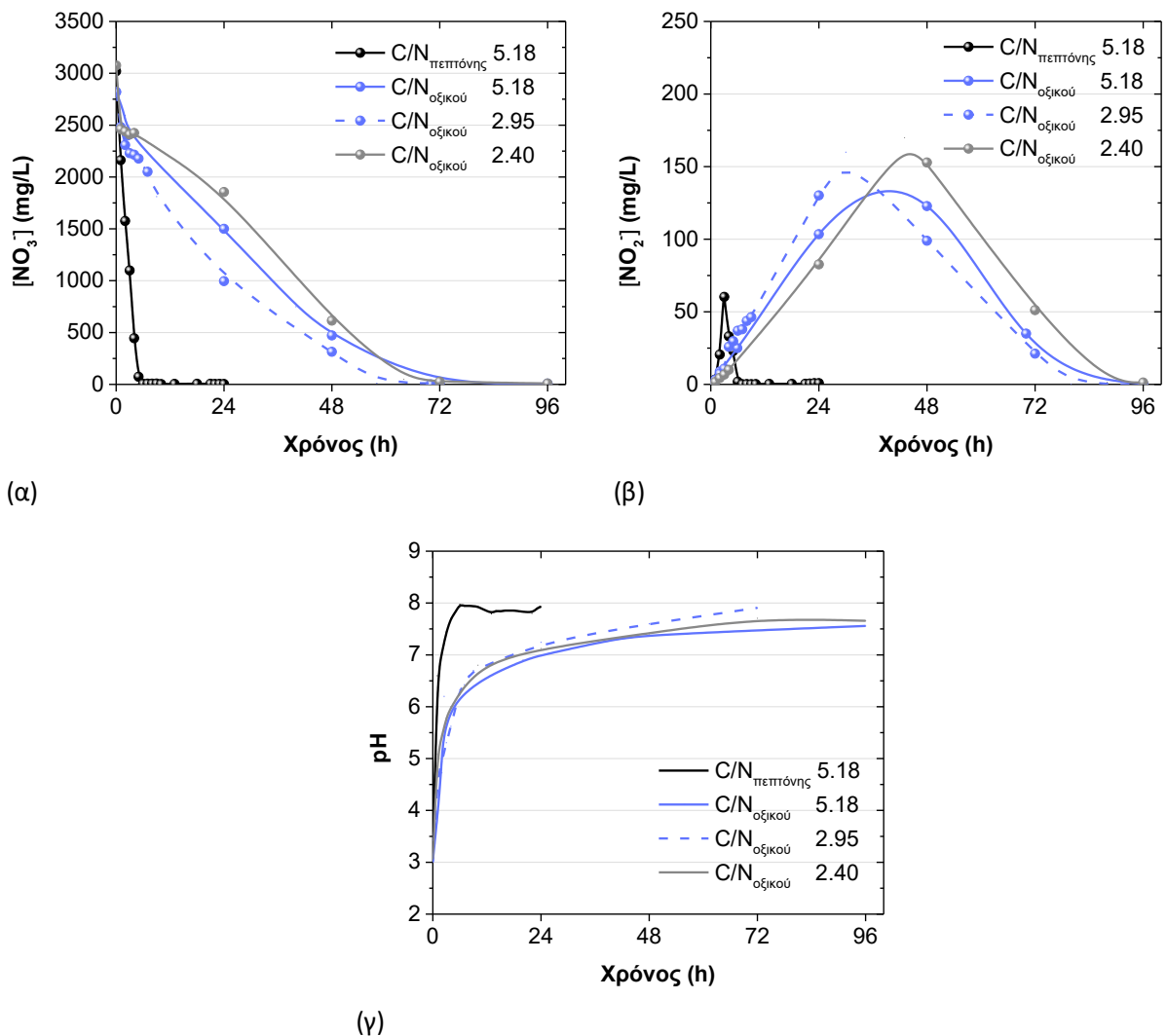
Οι αρχικές τιμές pH (Σχήμα 6.1(γ)) με δότες ηλεκτρονίων την πεπτόνη και το οξικό νάτριο κυμαίνονται μεταξύ 6.9-7.2 και η παραγωγή αλκαλικότητας κατά την απονιτροποίηση οδηγεί σε μέγιστες τιμές pH περίπου 8.0. Αντίθετα, η οξείδωση της αιθανόλης δεν οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή αλκαλικότητας, με αποτέλεσμα οι τιμές pH να αυξάνονται από την αρχική τιμή 7.4 σε περίπου 7.6 στο τέλος της απονιτροποίησης. Επίσης, σύμφωνα με το Σχήμα 6.1(δ), προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αιθανόλη μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες τιμές οπτικής πυκνότητας (OD_{600 nm} = 2.00) σε σύγκριση με το οξικό νάτριο (OD_{600 nm} = 1.75) και την πεπτόνη (OD_{600 nm} = 1.77), γεγονός που μπορεί να συνδέεται με αυξημένη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού για την περίπτωση της αιθανόλης.

6.2 Λειτουργία του βιοαντιδραστήρα με οξικό νάτριο και αιθανόλη

Στον βιολογικό αντιδραστήρα, η δυνατότητα αντικατάστασης της πεπτόνης, ως βασικής πηγής οργανικού άνθρακα σε συνδυασμό με το εκχύλισμα ζύμης, διερευνήθηκε με δόση ηλεκτρονίων το οξικό νάτριο και την αιθανόλη. Για την περίπτωση της αιθανόλης, μελετήθηκε επιπλέον η επίδραση της παρουσίας εκχυλίσματος ζύμης. Σημειώνεται ότι για τον υπολογισμό των τιμών των λόγων C/N λαμβάνεται υπόψη η συνεισφορά του εκχυλίσματος ζύμης.

6.2.1 Επίδραση του οξικού νατρίου ως πηγής άνθρακα κατά την απονιτροποίηση

Το οξικό νάτριο μελετήθηκε για τιμές του λόγου C/N ίσες με 5.18, 2.95 και 2.40 (Σχήμα 6.2). Στο Σχήμα 6.2(α)-(γ) παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων νιτρικών και νιτρωδών ιόντων και των τιμών pH, με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο παρουσία εκχυλίσματος ζύμης. Η συνεισφορά του οξικού και του εκχυλίσματος ζύμης στον λόγο C/N, ο χρόνος απονιτροποίησης και η μέγιστη συγκέντρωση νιτρωδών κατά τη διάρκεια των δοκιμών παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.1).



Σχήμα 6.2: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο για τιμές C/N 5.18, 2.95 και 2.40 και σε σύγκριση με την πεπτόνη

Σύμφωνα με το Σχήμα 6.2(α)-(γ), το οξικό νάτριο μπορεί να λειτουργήσει ως πηγή άνθρακα, οδηγώντας σε πλήρη αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών ιόντων. Επομένως, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα για τον μεταβολισμό του μικροοργανισμού *Halomonas denitrificans* εναλλακτικά της πεπτόνης. Η μεταβολή του λόγου C/N εντός του εύρους 2.95-5.18 δεν επηρεάζει το προφίλ αναγωγής νιτρικών και νιτρωδών ιόντων κατά την απονιτροποίηση, η οποία παρατηρείται επιβραδυσμένη σε σύγκριση με την πεπτόνη. Συγκεκριμένα, η αναγωγή των νιτρικών ιόντων με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο ολοκληρώνεται εντός 72 ωρών με ταχύτητα 160 mg NO₃-N/L/d-220 mg NO₃-N/L/d (Σχήμα 6.2(α)), ενώ με πηγή άνθρακα την πεπτόνη εντός 5 ωρών με ταχύτητα 2 400 mg NO₃-N/L/d. Από τις δοκιμές ανάπτυξης του *H. denitrificans* με δότες ηλεκτρονίων την πεπτόνη και το οξικό νάτριο, παρατηρήθηκε ότι ο ειδικός ρυθμός απονιτροποίησης είναι περίπου ο ίδιος για τους δύο αυτούς δότες ηλεκτρονίων. Η διαφορετική συμπεριφορά της προσκολλημένης βιομάζας του βιολογικού αντιδραστήρα σε σχέση με την αιωρούμενη στις κωνικές φιάλες είναι δυνατόν να οφείλεται σε μεταβολές στην αρχιτεκτονική της βιολογικής στιβάδας μικροοργανισμών (Biofilm), η δομή της οποίας καθορίζεται, μεταξύ άλλων, από τον δότη ηλεκτρονίων (Srinandan et al., 2012; Mielcarek et al., 2020).

Πίνακας 6.1: Συνεισφορά του οξικού και του εκχυλίσματος ζύμης στον λόγο C/N, χρόνος απονιτροποίησης και μέγιστη συγκέντρωση νιτρωδών κατά τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα τα οξικά στον βιοαντιδραστήρα

C/N (g C/g NO ₃ -N)			Χρόνος απονιτροποίησης (h)	Μέγιστη [NO ₂ ⁻] (mg/L)
Οξικά ιόντα	Εκχύλισμα ζύμης	Συνολικό C/N		
4.44		5.18		120
2.21	0.74	2.95	96	150
1.66		2.40		160

Η αναγωγή των νιτρικών ιόντων προκαλεί μέγιστες συγκεντρώσεις νιτρωδών που κυμαίνονται μεταξύ 120 mg/L-160 mg/L, οδηγώντας σε συνολικό χρόνο απονιτροποίησης 96 ωρών, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση οξικού νατρίου και τον χρόνο πλήρους αναγωγής νιτρικών (Σχήμα 6.2(β)).

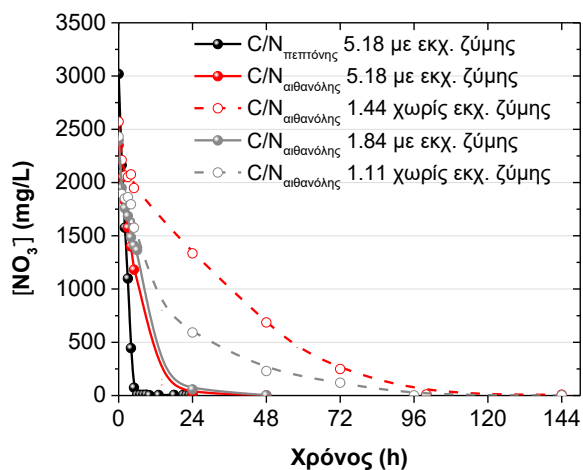
Το pH, ξεκινώντας από την αρχική τιμή 3.0, φθάνει σε ουδέτερες τιμές (7.2-7.5) σε 30-72 ώρες μετά την έναρξη των δοκιμών, με μέγιστες τιμές ισορροπίας στο εύρος 7.5-8.0, ανεξάρτητα από την αρχική συγκέντρωση οξικού νατρίου (Σχήμα 6.3(γ)).

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το προφίλ αναγωγής νιτρικών και νιτρωδών είναι περίπου ίδιο για τιμές του λόγου C/N από 2.40 g C/g NO₃-N έως 5.18 g C/g NO₃-N, γεγονός που συμφωνεί με τη βιβλιογραφία. Οι Sun et al. (2016) προσδιόρισαν τον πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενο λόγο C/N με πηγή άνθρακα τα οξικά ιόντα σε αντιδραστήρες κλίνης με πληρωτικό υλικό (PBR) στην τιμή 1.86 g C/g N ή 4.9 g COD/g N. Σε άλλους αντιδραστήρες και σύμφωνα με προηγούμενο πίνακα (Πίνακας 3.1), οι τιμές του λόγου C/N για τις οποίες έχει παρατηρηθεί επιτυχημένη απονιτροποίηση ξεκινούν από 0.7 g C/g NO₃-N ή 1.7 g COD/g NO₃-N (Hamlin et al., 2008). Επίσης σε προηγούμενο πίνακα (Πίνακας 2.2) που περιλαμβάνει αποτελέσματα με δοκιμές τύπου batch, οι πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενες τιμές του λόγου C/N με πηγή άνθρακα τα οξικά ιόντα κυμαίνονται μεταξύ 1.2 g C/g NO₃-N (Mokhayeri et al., 2006) και 2.6 g C/g NO₃-N (Majone et al., 1992). Οι τιμές του λόγου C/N που αναφέρονται στη βιβλιογραφία αφορούν το οξικό νάτριο ως αποκλειστική πηγή άνθρακα. Αντίθετα, οι πειραματικές δοκιμές αφορούν τον συνδυασμό οξικού και εκχυλίσματος ζύμης, η συγκέντρωση άνθρακα του οποίου συμπεριλαμβάνεται στον υπολογισμό του C/N, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.1). Λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα βιβλιογραφικά δεδομένα, όσο και τα πειραματικά αποτελέσματα, από τα οποία προέκυψαν παρόμοια προφίλ απονιτροποίησης για τις τιμές C/N που μελετήθηκαν, ο λόγος C/N θα μπορούσε να μειωθεί περαιτέρω από την τιμή 2.40 g C/g NO₃-N ή, εναλλακτικά, να μειωθεί η περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου σε εκχύλισμα ζύμης.

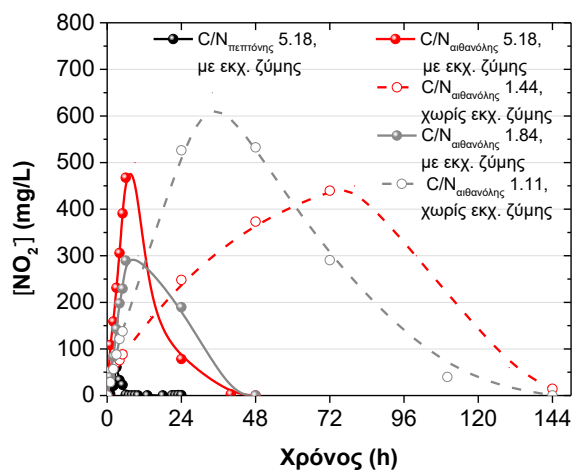
Από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στον βιολογικό αντιδραστήρα με πηγή άνθρακα οξικό νάτριο και εκχύλισμα ζύμης φαίνεται ότι, ο συνδυασμός αυτός μπορεί να αποτελέσει δότη ηλεκτρονίων εναλλακτικό της πεπτόνης για την καλλιέργεια *Halomonas denitrificans*, χωρίς να επιβαρυνθεί η εκροή με υπολειμματικές συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρωδών ιόντων. Ο λόγος άνθρακα οξικού-εκχυλίσματος ζύμης και αζώτου νιτρικών (C/N), όταν το εκχύλισμα ζύμης συνεισφέρει σε αυτόν κατά 0.74 g C/g NO₃-N, μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 2.40 g C/g NO₃-N έως 5.18 g C/g NO₃-N, ενώ είναι δυνατόν να μειωθεί περαιτέρω, σύμφωνα τόσο με τα πειραματικά αποτελέσματα, όσο και με βιβλιογραφικά δεδομένα.

6.2.2 Επίδραση της αιθανόλης ως πηγής άνθρακα κατά την απονιτροποίηση

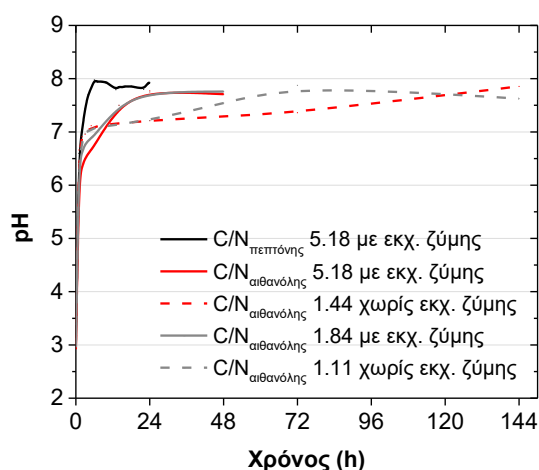
Η αιθανόλη μελετήθηκε για τιμές του λόγου C/N ίσες με C/N 5.18 και 1.84 g C/g NO₃-N, παρουσία εκχυλίσματος ζύμης, και 1.44 και 1.11 g C/g NO₃-N, απουσία εκχυλίσματος ζύμης (Σχήμα 6.3, Σχήμα 6.5). Στο Σχήμα 6.3(α)-(γ) παρουσιάζεται η μεταβολή των νιτρικών ιόντων, των νιτρωδών ιόντων και των τιμών pH σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η συνεισφορά της αιθανόλης και του εκχυλίσματος ζύμης στον λόγο C/N, ο χρόνος απονιτροποίησης και η μέγιστη συγκέντρωση νιτρωδών κατά τη διάρκεια των δοκιμών παρουσιάζονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.2).



(α)



(β)



(γ)

Σχήμα 6.3: (α) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, (β) Μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρωδών ιόντων, (γ) Μεταβολή του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την αιθανόλη για τιμές C/N 5.18 παρουσία εκχυλίσματος ζύμης, 1.44 χωρίς εκχύλισμα ζύμης και 1.84 παρουσία και απουσία εκχυλίσματος ζύμης και σε σύγκριση με την πεπτόνη

Πίνακας 6.2: Συνεισφορά της αιθανόλης και του εκχυλίσματος ζύμης στον λόγο C/N, χρόνος απονιτροποίησης και μέγιστη συγκέντρωση νιτρωδών κατά τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με πηγή άνθρακα τα οξικά στον βιοαντιδραστήρα

C/N (g C/g NO ₃ -N)			Χρόνος απονιτροποίησης (h)	Μέγιστη [NO ₂ ⁻] (mg/L)
Αιθανόλη	Εκχύλισμα ζύμης	Συνολικό C/N		
4.44	0.74	5.18	48	470
1.44	-	1.44	144	600
1.11	0.74	1.84	48	300
1.11	-	1.11	144	450

Όταν δότης ηλεκτρονίων είναι η αιθανόλη, τα αποτελέσματα (Σχήμα 6.3(α)-(γ)) δείχνουν ότι η απονιτροποίηση είναι επιτυχημένη και, επομένως, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά της πεπτόνης ως πηγή άνθρακα, με τιμές του λόγου C/N υψηλότερες από 1.11 g C/g NO₃-N. Για τιμές του λόγου C/N ίσους με 5.18 και 1.84 g C/g NO₃-N και παρουσία εκχυλίσματος ζύμης, οι ταχύτητες αναγωγής νιτρικών κυμαίνονται μεταξύ 400 mg NO₃-N/L/d και 500 mg NO₃-N/L/d, ενώ για τιμές 1.44 και 1.11 g C/g NO₃-N απουσία εκχυλίσματος ζύμης, οι ταχύτητες αναγωγής νιτρικών κυμαίνονται μεταξύ 120 mg NO₃-N/L/d και 140 mg NO₃-N/L/d (Σχήμα 6.3(α)). Οι αντίστοιχες μέγιστες συγκεντρώσεις νιτρικών (Σχήμα 6.3(β)) βρίσκονται μεταξύ 300 mg/L και 500 mg/L και 400 mg/L και 600 mg/L, οδηγώντας σε χρόνους απονιτροποίησης 48 ωρών και 144 ωρών, αντίστοιχα.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η παρουσία εκχυλίσματος ζύμης (διακεκομμένες γραμμές στο Σχήμα 6.3(α)-(γ)) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην απονιτροποίηση, οδηγώντας σε υψηλότερες ταχύτητες αναγωγής νιτρικών, σε μικρότερες μέγιστες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων και, τελικά, σε ταχύτερη απονιτροποίηση. Επίσης, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.2), φαίνεται ότι οι τιμές των λόγων C/N 1.84 g C/g NO₃-N και 1.11 g C/g NO₃-N έχουν προκύψει από την ίδια συγκέντρωση αιθανόλης και διαφοροποιούνται μόνο ως προς την παρουσία εκχυλίσματος ζύμης (Πίνακας 6.2). Τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα δείχνουν ότι ο τρόπος με τον οποίο το εκχύλισμα ζύμης μπορεί να επιδράσει στην απονιτροποίηση μπορεί να είναι διπλός: (1) παρέχει στους απονιτροποιητικούς μικροοργανισμούς τα ιχνοστοιχεία που τους είναι απαραίτητα για να επιτελέσουν τις μεταβολικές τους διεργασίες, οδηγώντας σε χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικών κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης, αυξάνοντας την ταχύτητα απονιτροποίησης και ευνοώντας την προσαρμογή τους στις μεταβολές του περιβάλλοντος (Wang et al., 2021), και (2) οδηγεί σε μικρή αύξηση του λόγου C/N και της συγκέντρωσης οργανικού άνθρακα που είναι διαθέσιμη για την αναγωγή των νιτρικών ιόντων, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της απονιτροποίησης, όπως φάνηκε και στο Σχήμα 5.15.

Τα προφίλ της απονιτροποίησης, σύμφωνα με το Σχήμα 6.3(α)-(γ), είναι περίπου ίδια για τα ζεύγη τιμών 5.18 – 1.84 g C/g NO₃-N και 1.44 – 1.11 g C/g NO₃-N, τα οποία αντιστοιχούν σε δοκιμές παρουσία και απουσία εκχυλίσματος ζύμης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η τιμή του πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενου λόγου C/N με πηγή άνθρακα την αιθανόλη σε αντιδραστήρες κλίνης με πληρωτικό υλικό (PBR) είναι 1.08 g C/g N ή 4.3 g COD/g N (Æsøϋ et al., 1998; Sun et al., 2016b). Επίσης, σε προηγούμενο πίνακα (Πίνακας 2.2) που περιλαμβάνει αποτελέσματα με δοκιμές τύπου batch, οι πειραματικά στοιχειομετρικά απαιτούμενες τιμές του λόγου C/N με πηγή άνθρακα την αιθανόλη προσδιορίστηκαν 0.67 g C/g N (Fillos & Ramalingam, 2007), 0.97 g C/g N (Christensson et al., 1994) και 1.05 g C/g N (Matějů et al., 1992). Οι βιβλιογραφικές αυτές τιμές είναι χαμηλότερες από την ελάχιστη τιμή για την οποία μελετήθηκε η λειτουργία του βιολογικού αντιδραστήρα

(1.11 g C/g NO₃-N). Φαίνεται, λοιπόν, ότι, η περιεκτικότητα του θρεπτικού μέσου σε αιθανόλη είναι δυνατόν να μειωθεί περαιτέρω από τις τιμές 1.84 g C/g NO₃-N, παρουσία εκχυλίσματος ζύμης, και 1.11 g C/g NO₃-N, απουσία εκχυλίσματος ζύμης, χωρίς να μεταβληθούν οι χρόνοι και η απόδοση απονιτροποίησης που παρατηρήθηκαν για καθεμιά από τις περιπτώσεις αυτές.

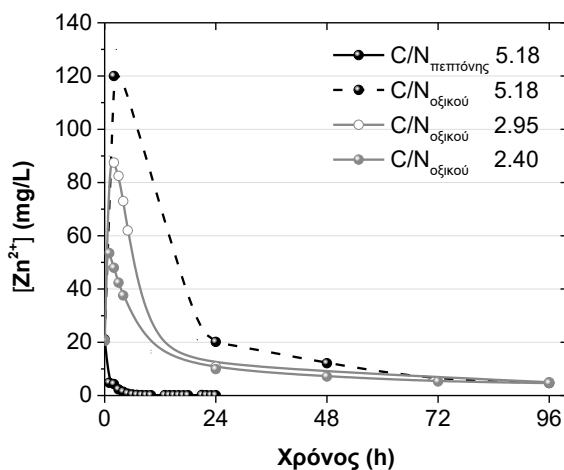
Η αιθανόλη μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερες ταχύτητες αναγωγής νιτρικών και μέγιστες συγκεντρώσεις νιτρικών, παρουσία εκχυλίσματος ζύμης, σε σύγκριση με το οξικό νάτριο, για το οποίο οι αντίστοιχες τιμές βρέθηκαν 160 mg NO₃-N/L/d-220 mg NO₃-N/L/d και 120 mg/L-170 mg/L NO₂⁻ (Σχήμα 6.2(α)-(β)). Σε κάθε περίπτωση, οι ρυθμοί αναγωγής νιτρικών παραμένουν χαμηλότεροι σε σύγκριση με την πεπτόνη (2 400 mg NO₃-N/L/d).

Τέλος, σύμφωνα με το Σχήμα 6.3(γ), η αιθανόλη οδηγεί σε χαμηλότερη μέγιστη τιμή pH και τιμή pH ισορροπίας (7.5-7.8) σε σύγκριση με την πεπτόνη (~8.0), ανεξάρτητα από την παρουσία εκχυλίσματος ζύμης και την αρχική συγκέντρωση αιθανόλης. Επίσης, στην περίπτωση της αιθανόλης το pH φθάνει σε ουδέτερες τιμές (7.2-7.5) εντός του πρώτου 12ώρου διεξαγωγής των δοκιμών, σε σύγκριση με το οξικό νάτριο, για το οποίο απαιτούνται τουλάχιστον 30 ώρες (Σχήμα 6.2(γ)).

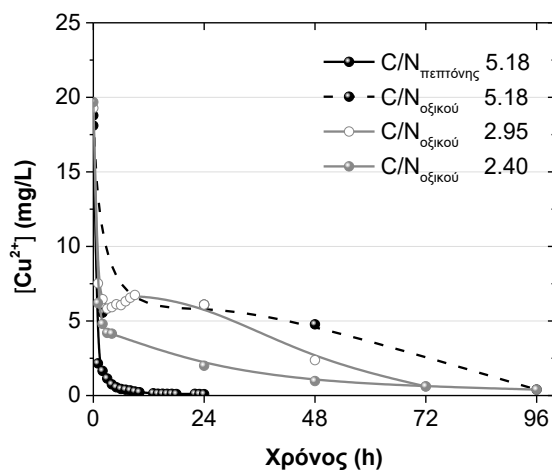
Από τα αποτελέσματα των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν στον βιολογικό αντιδραστήρα με δόση ηλεκτρονίων την αιθανόλη φαίνεται ότι, η αιθανόλη μπορεί να αντικαταστήσει την πεπτόνη ως δόση ηλεκτρονίων κατά την απονιτροποίηση, όταν η αναλογία άνθρακα που περιέχει και αζώτου νιτρικών είναι τουλάχιστον 1.11 g C/g NO₃-N. Λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα πειραματικά αποτελέσματα, όσο και τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η τιμή αυτή είναι δυνατόν να μειωθεί περαιτέρω. Η μελέτη σχετικά με την επίδραση που έχει η παρουσία εκχυλίσματος ζύμης στην απονιτροποίηση έδειξε ότι, η απονιτροποίηση ολοκληρώνεται ταχύτερα και συνοδεύεται από χαμηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων κατά τη διάρκεια αυτής, όταν το εκχύλισμα ζύμης συνεισφέρει κατά 0.74 g C/g NO₃-N στην τιμή του λόγου C/N.

6.2.3 Βιοκαταβύθιση μετάλλων

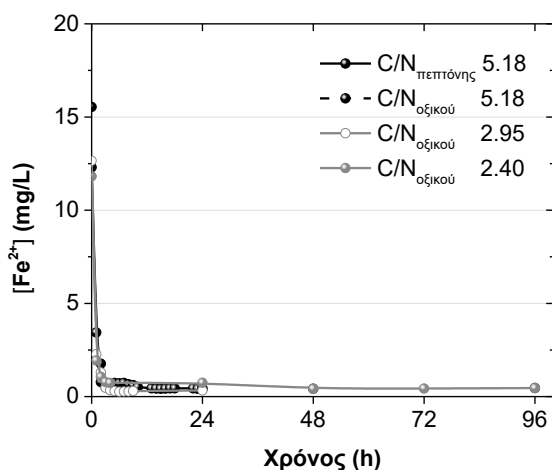
Όσον αφορά τη συμπεριφορά των μετάλλων κατά την απονιτροποίηση, στο Σχήμα 6.4(α)-(δ) και στο Σχήμα 6.5(α)-(δ) φαίνεται η συγκέντρωση διαλυτού ψευδαργύρου, χαλκού, σιδήρου και νικελίου κατά τις δοκιμές λειτουργίας του βιολογικού αντιδραστήρα με πηγή άνθρακα τα οξικά ιόντα και την αιθανόλη, αντίστοιχα. Οι χαμηλότερες ταχύτητες απονιτροποίησης με δότες ηλεκτρονίων τα οξικά ιόντα και την αιθανόλη σε σύγκριση με την πεπτόνη οδηγούν σε βραδύτερη καταβύθιση των διαλυτών μετάλλων.



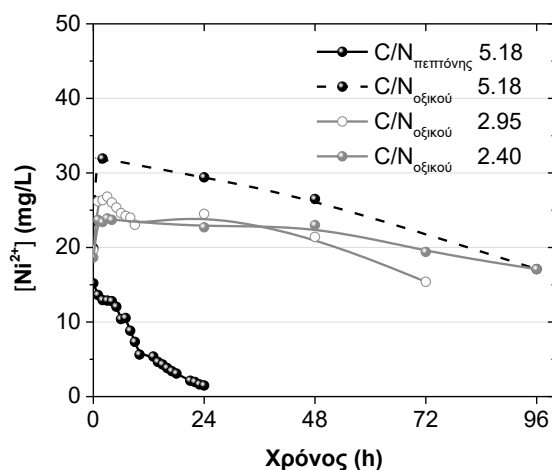
(α)



(β)



(γ)

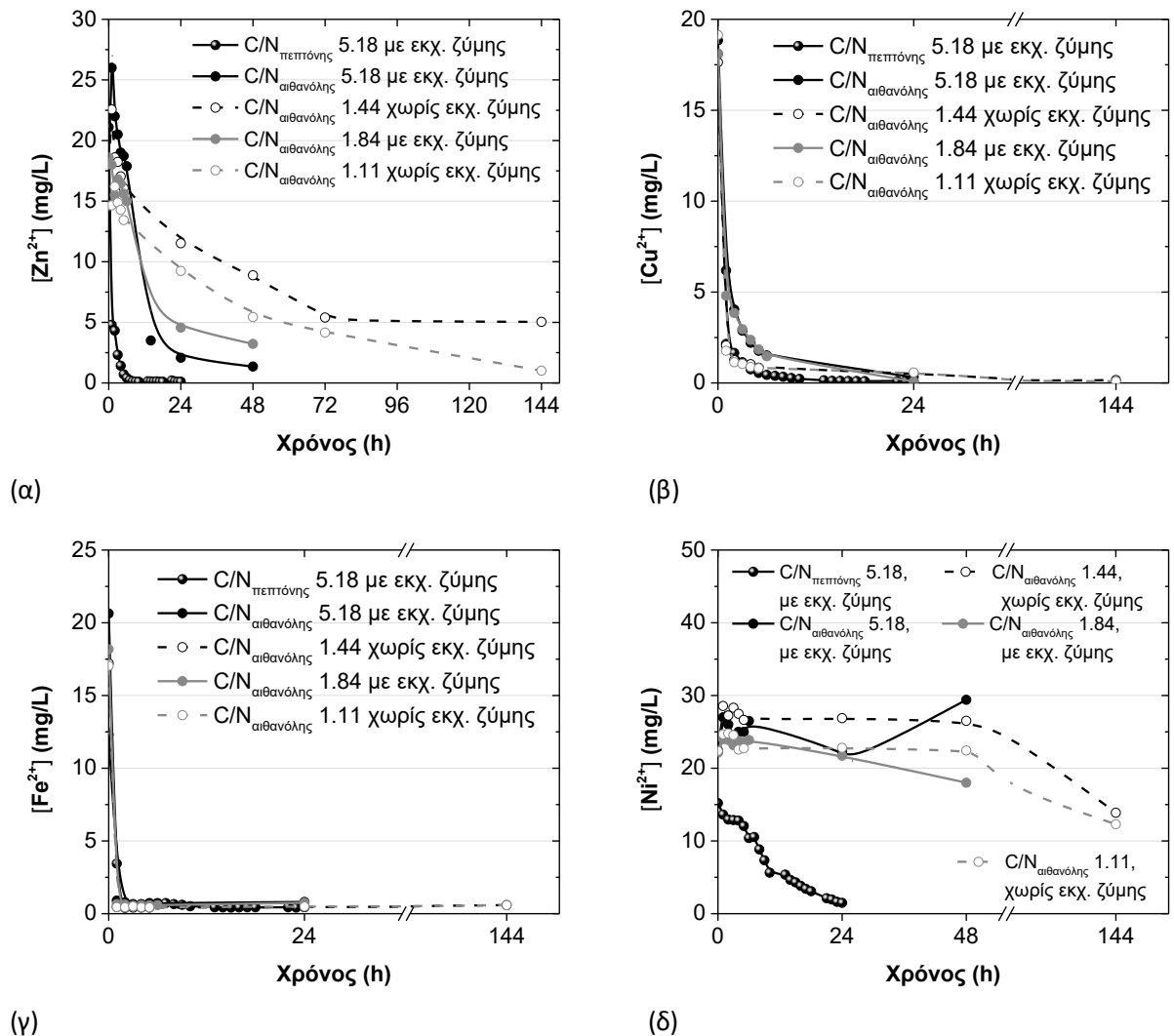


(δ)

Σχήμα 6.4: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο για τιμές C/N 5.18, 2.95 και 2.40 και σε σύγκριση με την πεπτόνη

Σύμφωνα με προηγούμενα σχήματα που δείχνουν τη χρονική μεταβολή των τιμών του pH για το οξικό νάτριο και την αιθανόλη (Σχήμα 6.2(γ), Σχήμα 6.3(γ), αντίστοιχα), το pH, από την αρχική τιμή 3.0, φθάνει σε ουδέτερες τιμές εντός 30 ωρών και 12 ωρών, αντίστοιχα. Οι ρυθμοί αύξησης των τιμών του pH είναι χαμηλότεροι με πηγή άνθρακα τα οξικά ιόντα σε σύγκριση, διαδοχικά, με την αιθανόλη απουσία εκχυλίσματος ζύμης και παρουσία εκχυλίσματος ζύμης. Λαμβάνοντας υπόψη τα πειραματικά αποτελέσματα αυτά, φαίνεται ότι η καταβύθιση του ψευδαργύρου (Σχήμα 6.4(α)-(β), Σχήμα 6.5(α)-(β)) ακολουθεί τον ρυθμό αύξησης των τιμών του pH από την αρχική τιμή 3.0, με πιθανότητα διαλυτοποίησης, όταν ο ρυθμός αύξησης του pH είναι χαμηλός (πχ οξικό νάτριο, pH = 3.0-6.5). Η καταβύθιση του χαλκού συνδέεται με την άνοδο του pH σε ουδέτερες τιμές (7.2-7.5). Έτσι, οι ελάχιστες συγκεντρώσεις ψευδαργύρου σε κάθε περίπτωση επιτυγχάνονται στο τέλος της

απονιτροποίησης, ενώ οι ελάχιστες συγκεντρώσεις χαλκού επιτυγχάνονται όταν οι τιμές του pH είναι κοντά στο 7.5. Οι υπολειμματικές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου και χαλκού είναι χαμηλότερες από 7.6 mg/L και 0.70 mg/L, αντίστοιχα, με δότη ηλεκτρονίων το οξικό νάτριο και χαμηλότερες από 5.0 mg/L και 0.25 mg/L με δότη ηλεκτρονίων την αιθανόλη.



Σχήμα 6.5: Μεταβολή της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου και (δ) νικελίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την αιθανόλη για τιμές C/N 5.18 παρουσία εκχυλίσματος ζύμης, 1.44 χωρίς εκχύλισμα ζύμης και 1.84 παρουσία και απουσία εκχυλίσματος ζύμης και σε σύγκριση με την πεπτόνη

Οι συγκεντρώσεις τόσο του διαλυτού σιδήρου, όσο και του νικελίου, δεν φαίνεται να επηρεάζονται από την φύση της πηγής οργανικού άνθρακα. Συγκεκριμένα, ο σίδηρος, καταβυθίζεται κατά τις πρώτες 6 ώρες διεξαγωγής των δοκιμών (Σχήμα 6.4(γ) Σχήμα 6.5(γ)), ανεξάρτητα από την πηγή οργανικού άνθρακα (πεπτόνη, οξικό νάτριο, αιθανόλη) και την αρχική συγκέντρωσή του. Οι

υπολειμματικές συγκεντρώσεις του είναι χαμηλότερες από 1 mg/L. Όσον αφορά στο νικέλιο, παρατηρείται διαλυτοποίηση των καταβυθισμένων αλάτων του κατά τις πρώτες ώρες διεξαγωγής των δοκιμών (Σχήμα 6.4(δ), Σχήμα 6.5(δ)), παρόμοια με τον ψευδάργυρο, χωρίς, όμως, αξιόλογη καταβύθιση της συγκέντρωσής του, ανεξάρτητα από τον δότη ηλεκτρονίων κατά την απονιτροποίηση. Η καταβύθιση του νικελίου με δότη ηλεκτρονίων την πεπτόνη αφορά δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν παρουσία θειικών ιόντων. Δεδομένου ότι ο επιθυμητός μηχανισμός απομάκρυνσης του νικελίου από τη διαλυτή φάση είναι ο σχηματισμός θειούχων αλάτων, τα αποτελέσματα που αφορούν την καταβύθιση του νικελίου για την πεπτόνη και το οξικό νάτριο και την αιθανόλη δεν είναι συγκρίσιμα μεταξύ τους.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα που αναλύθηκαν παραπάνω, φαίνεται ότι καταβύθιση του ψευδαργύρου συνδέεται με τη διακύμανση των τιμών του pH, ενώ η καταβύθιση του χαλκού με τις τελικές τιμές pH. Έτσι, η μείωση των συγκεντρώσεων των διαλυτών αυτών μετάλλων μπορεί να εξαρτάται από την πηγή οργανικού άνθρακα που επιλέγεται κατά την απονιτροποίηση. Αντίθετα, η καταβύθιση σιδήρου και νικελίου δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την πηγή άνθρακα. Πιθανότητα διαλυτοποίησης παρατηρήθηκε τόσο για τον ψευδάργυρο, όσο και για το νικέλιο. Η διαδοχική σειρά καταβύθισης των μετάλλων με τη μορφή αδιάλυτων υδροξειδίων και ανθρακικών αλάτων, ξεκινώντας από αυτό που καταβυθίζεται πρώτο, είναι: σίδηρος > χαλκός > ψευδάργυρος > νικέλιο. Η σειρά βοκαταβύθισης αυτή δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον δότη ηλεκτρονίων, τον λόγο άνθρακα υποστρώματος και αζώτου νιτρικών (C/N) και τη διακύμανση των τιμών pH που αυτά επιφέρουν.

7 |

Μαθηματική προσομοίωση της βιολογικής απονιτροποίησης παρουσία μεταλλικών ιόντων και χλωριόντων

Η απονιτροποίηση ως βιολογική διεργασία επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, όπως η πηγή οργανικού άνθρακα, ο λόγος άνθρακα υποστρώματος και αζώτου νιτρικών (C/N), η συγκέντρωση διαλυτού οξυγόνου, το pH, η θερμοκρασία, οι συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρωδών, η αλατότητα και οι συγκεντρώσεις τοξικών παραγόντων, όπως των διαλυτών μετάλλων (Κεφάλαια 2 και 3). Ιδιαίτερα όταν πρόκειται για υγρά βιομηχανικά απόβλητα υδρομεταλλουργικών διεργασιών, τα οποία μπορεί να περιέχουν, μεταξύ άλλων, σημαντικές συγκεντρώσεις μετάλλων (Gomolka et al., 1988; Hirata et al., 2001; Yoshie et al., 2002; Ramírez et al., 2017), είναι δυνατόν να παρατηρηθούν φαινόμενα τοξικότητας (Bollag & Barabasz, 1979; Sakadevan et al., 1999; Holtan-Hartwig et al., 2002; Singh & Tripathi, 2007; Jacinthe & Tedesco, 2009; Zou et al., 2013; Zou et al., 2014; Liu et al., 2016; Deng et al., 2018; Cheng et al., 2019; Ke et al., 2021), με πιθανό αποτέλεσμα την αναχαίτιση της απονιτροποίησης (Seifert & Domka, 2005; Fernández-Nava et al., 2008; You et al., 2009; Cyplik et al., 2012; Li et al., 2018; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2020). Η αναγνώριση και η μελέτη των μηχανισμών με τους οποίους οι μικροοργανισμοί μπορούν να ανταπεξέλθουν σε τέτοιες δυσμενείς συνθήκες είναι καθοριστικές για τη βελτίωση της απόδοσης της διεργασίας. Η μαθηματική προσομοίωση αποτελεί χρήσιμο εργαλείο προς αυτή την κατεύθυνση.

Στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής πραγματοποιήθηκε μαθηματική προσομοίωση της απονιτροποίησης παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων στο λογισμικό AQUASIM 2.0. Το μοντέλο βασίζεται τόσο σε βιοτικές, όσο και αβιοτικές διεργασίες και λαμβάνει υπόψη αποτελέσματα των εργαστηριακών δοκιμών που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 5. Το μοντέλο έχει την ικανότητα να προβλέπει τη βιοκαταβύθιση των διαλυτών ειδών μετάλλων που οφείλεται στην παραγωγή αλκαλικότητας και στην άνοδο των τιμών του pH κατά την ετερότροφη απονιτροποίηση. Η εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου πραγματοποιείται μέσω προσαρμογής (fitting) στα πειραματικά αποτελέσματα. Επίσης, διερευνήθηκαν, μελετήθηκαν και παρουσιάζονται οι μηχανισμοί που επηρεάζουν την απομάκρυνση των μετάλλων από τη διαλυτή φάση με το λογισμικό Visual MINTEQ. Συνοπτικά, το μοντέλο που αναπτύχθηκε αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο που συνεισφέρει στην κατανόηση των απονιτροποιητικής διεργασίας παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση της λειτουργίας του απονιτροποιητικού αντιδραστήρα. Έτσι, η βιολογική επεξεργασία των αποβλήτων μπορεί να γίνει αποδοτικότερη και αποτελεσματικότερη.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Αρτίν Χατζηκιοσεγιάν, που με μεγάλη προθυμία με μύησε στο, εντελώς πρωτόγνωρο για εμένα, αντικείμενο της μαθηματικής προσομοίωσης. Η βοήθειά του ήταν πολύτιμη για πολλούς λόγους: για την κατανόηση της «λογικής» της προσομοίωσης, την εξοικείωση με το περιβάλλον του λογισμικού AQUASIM και των δυνατοτήτων που αυτό έχει, την καθοριστική συμβολή του στην κατάστρωση των βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στον αντιδραστήρα και, τέλος, την ολοκλήρωση της προσομοίωσης χρησιμοποιώντας τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας. Η επιστημονική κατάρτιση και η εμπειρία του στο επιστημονικό αυτό πεδίο συνέβαλαν ουσιαστικά, ώστε να καταστεί λεπτομερής και ολοκληρωμένη η μελέτη της απονιτροποίησης στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής. Σε διαφορετική περίπτωση, η εξαγωγή συμπερασμάτων θα απαιτούσε από πλευράς μου πολύ περισσότερο κόπο και χρόνο, ώστε αυτά να καταστούν δημοσιεύσιμα.

7.1 Εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων ανάπτυξης της βιομάζας

Οι κινητικές παράμετροι της απονιτροποίησης μελετήθηκαν με δότες ηλεκτρονίων συνδυασμό πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης, οξικού και εκχυλίσματος ζύμης και αιθανόλης, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4 (παράγραφος 4.4.1). Υπενθυμίζεται ότι, εξαιτίας του μη καθορισμένου χημικού τύπου της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης, έγινε η παραδοχή ότι το οργανικό υπόστρωμα μπορεί να περιγραφεί από δύο εναλλακτικά οργανικά μόρια: (1) $C_{16}H_{24}O_5N_4$, λαμβάνοντας υπόψη τη βιβλιογραφία, και (2) $C_8H_{24}O_5N_3$, λαμβάνοντας υπόψη εργαστηριακά αποτελέσματα από τα οποία προέκυψε η περιεκτικότητα της πεπτόνης και του εκχυλίσματος ζύμης σε άνθρακα και άζωτο. Επίσης, για τη δομή του υποστρώματος στην περίπτωση που δότης ηλεκτρονίων είναι συνδυασμός οξικών ιόντων και εκχυλίσματος ζύμης χρησιμοποιήθηκε ο χημικός τύπος $C_3H_{10.5}O_3N_{0.5}$. Για την περίπτωση της αιθανόλης χρησιμοποιήθηκε ο χημικός τύπος της αιθανόλης (C_2H_6O) (Πίνακας 4.10).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Πίνακας 3.2), οι τιμές των κινητικών παραμέτρων, δηλαδή ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max}) και οι σταθερές ημικορεσμού (K) των αντιδράσεων τύπου Monod, εξαρτώνται από την πηγή οργανικού άνθρακα που χρησιμοποιούν οι ετερότροφοι απονιτροποιητές (Christensson et al., 1994; Lee & Welander, 1996; Nyberg et al., 1996; Mokhayeri et al., 2006; Onnis-Hayden & Gu, 2008; Cherchi et al., 2009; Rittmann & McCarty, 2020; Peng et al., 2021). Σύμφωνα με τον πίνακα, υπάρχουν ελάχιστα βιβλιογραφικά δεδομένα για τα ενδιάμεσα στάδια αναγωγής των νιτρικών προς αέριο άζωτο.

Οι παράμετροι που οδήγησαν στη βέλτιστη προσαρμογή του μοντέλου για αρχική συγκέντρωση νιτρικών 6 000 mg/L φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.1). Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ_{max,NO_3}) με πηγή άνθρακα πεπτόνη-εκχύλισμα ζύμης, οξικό νάτριο-εκχύλισμα ζύμης και

αιθανόλη βρέθηκε 5.28 (d⁻¹)-8.40 (d⁻¹), 3.768 (d⁻¹) και 2.88 (d⁻¹), αντίστοιχα. Παρόλο που δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να αφορούν την πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης, η προσομοίωση έδειξε ότι η τιμή μ_{\max,NO_3} είναι συγκρίσιμη με αυτές που προκύπτουν για μόρια που μπορούν να αποδώσουν υψηλά επίπεδα ενέργειας, όπως ο δισακχαρίτης σουκρόζη (Petroniĉ et al., 2015) και το πρωτεϊνικό TSB (Tryptic Soy Broth) (Martienssen and Schöps, 1999) (Πίνακας 3.2). Επίσης, η τιμή της παραμέτρου μ_{\max,NO_3} συμφωνεί με τα ερευνητικά αποτελέσματα των Nyberg et al. (1996), Martienssen and Schöps (1999) και Mokhayeri et al. (2006) για το οξικό νάτριο, αν και είναι ελάχιστα αυξημένη σε σύγκριση με αυτά. Η διαφορά αυτή είναι δυνατόν να οφείλεται στην επίδραση του εκχυλίσματος ζύμης, το οποίο, σε συνδυασμό με την πεπτόνη, μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης σε σύγκριση με το οξικό μεμονωμένα. Τέλος, όσον αφορά την αιθανόλη, η τιμή του μ_{\max,NO_3} βρίσκεται εντός του εύρους τιμών που αναφέρουν οι Christensson et al. (1994).

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα προσομοίωσης για τις κινητικές παραμέτρους μ_{\max,NO_3} , μ_{\max,NO_2} , $K_{s,org}$, K_{NO_3} , K_{NO_2} , f_s και X για απονιτροποίηση με πηγή άνθρακα την πεπτόνη και το οξικό νάτριο παρουσία εκχυλίσματος ζύμης και την αιθανόλη απουσία εκχυλίσματος ζύμης (αρχική συγκέντρωση νιτρικών: 6 000 mg/L για πεπτόνη-εκχ. ζύμης και 3 000 mg/L για οξικό-εκχ. ζύμης και αιθανόλη)

Παράμετρος	Οργανικό μόριο	Πεπτόνη, Εκχύλισμα ζύμης		Οξικό, Εκχύλισμα ζύμης	Αιθανόλη
		C ₁₆ H ₂₄ O ₅ N ₄	C ₈ H ₂₄ O ₅ N ₃	C ₃ H _{10.5} O ₃ N _{0.5}	C ₂ H ₆ O
μ_{\max,NO_3}	(h ⁻¹)	0.35	0.22	0.157	0.12
	(d ⁻¹)	8.40	5.28	3.768	2.88
μ_{\max,NO_2}	(h ⁻¹)	0.55	0.22	0.1	0.045
	(d ⁻¹)	13.2	5.28	2.4	1.08
$K_{s,org}$	(mol/L)	0.002	0.0001	0.04	0.07
K_{NO_3}	(mol/L)	0.02	0.0001	0.04	0.04
K_{NO_2}	(mol/L)	0.02	0.0002	0.0002	0.0001
f_s	(-)	0.50	0.50	0.40	0.40
X	(mg/L)	3 500	3 500	3 500	3 500

Συγκρίνοντας τις τιμές του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης μεταξύ τους για τους διαφορετικούς δότες ηλεκτρονίων (Πίνακας 7.1), φαίνεται ότι ο συνδυασμός πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη μικροβιακή ανάπτυξη σε σύγκριση με τους άλλους δύο δότες ηλεκτρονίων,

διότι: (1) ο συνδυασμός πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης είναι η προτεινόμενη από το DSMZ πηγή άνθρακα με σκοπό τη βέλτιστη ανάπτυξη του *Halomonas denitrificans* (Πίνακας 4.1) και, (2) ο βιοαντιδραστήρας λειτούργησε με συνθετικά απόβλητα που προσομοιάζουν σε απόβλητα υδρομεταλλουργίας για περισσότερα από 3 (τρία) έτη.

Όσον αφορά την εκτίμηση της τιμής του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για τα νιτρώδη (μ_{\max, NO_2}), η πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών δεν αναφέρει εκτιμώμενες τιμές, καθώς οι περισσότερες προσπάθειες προσομοίωσης πραγματοποιήθηκαν χωρίς να λαμβάνουν υπόψη τα ενδιάμεσα στάδια κατά την αναγωγή νιτρικών προς αέριο άζωτο (Πίνακας 3.2). Η μοναδική ερευνητική εργασία που μελετάει την προσομοίωση με ενδιάμεσο προϊόν τα νιτρώδη ιόντα αναφέρει τιμή μ_{\max, NO_2} ίση με $0.121 \text{ (d}^{-1}\text{)}$ (Lin & Gu, 2020), η οποία είναι χαμηλότερη από αυτή που προέκυψε στην παρούσα διατριβή ($2.4 \text{ (d}^{-1}\text{)}$).

Όσον αφορά τη σταθερά κορεσμού για το οργανικό υπόστρωμα ($K_{s, \text{org}}$) και σύμφωνα με τον σχετικό συγκεντρωτικό πίνακα (Πίνακας 3.2), η τιμή της κυμαίνεται από 5.0 mg COD/L έως 15.6 mg COD/L (ή 0.00010 mol/L - 0.00033 mol/L) για τη μεθανόλη, από 1 mg COD/L έως 197 mg COD/L (ή 0.00002 mol/L - 0.00313 mol/L) για τα οξικά ιόντα και από 1 mg COD/L έως 8.6 mg COD/L για τα αστικά λύματα. Στην παρούσα εργασία οι τιμές του $K_{s, \text{org}}$ προσδιορίστηκαν 0.0001 mol/L - 0.002 mol/L για την πεπτόνη-εκχύλισμα ζύμης, 0.04 mol/L για τα οξικά-εκχύλισμα ζύμης και 0.07 mol/L για την αιθανόλη. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, χαμηλές τιμές της σταθεράς κορεσμού, όπως στην περίπτωση της πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης (Πίνακας 3.2), οδηγούν σε αυξημένη σύνθεση κυτταρικού υλικού και δείχνουν ότι το υπόστρωμα ευνοεί τη μικροβιακή ανάπτυξη και δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα (Ugalde-Salas et al., 2020). Αντίθετα, οι τιμές της σταθεράς $K_{s, \text{org}}$ είναι υψηλές (πχ οξικό-εκχύλισμα ζύμης, αιθανόλη-Πίνακας 3.2), όταν το οργανικό υπόστρωμα δεν ευνοεί την κυτταρική ανάπτυξη.

Η σταθερά κορεσμού για τα νιτρικά (K_{NO_3}), σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές, λαμβάνει τιμές που κυμαίνονται από 0.003 mg N/L έως 112 mg N/L (ή $2.1 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$ - 0.008 mol/L) με πηγή άνθρακα τη μεθανόλη, 226 mg N/L (ή 0.016 mol/L) με πηγή άνθρακα τα οξικά ιόντα και 0.10 mg N/L έως 2 mg N/L (ή 0.00001 mol/L - 0.00014 mol/L) για άλλες πηγές άνθρακα, όπως αστικά λύματα και παράκτια ιζήματα (Πίνακας 3.2). Επίσης, η σταθερά κορεσμού για τα νιτρώδη (K_{NO_2}) αναφέρεται ίση με 4.23 mg N/L (ή 0.0003 mol/L) (Lin & Gu, 2020). Σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 7.1), οι τιμές των σταθερών K_{NO_3} υπολογίστηκαν 0.0001 mol/L - 0.02 mol/L για τον συνδυασμό πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης και 0.04 mol/L για τον συνδυασμό οξικού-εκχυλίσματος ζύμης και την αιθανόλη. Οι τιμές των σταθερών K_{NO_2} υπολογίστηκαν 0.0002 mol/L - 0.02 mol/L για την πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης, 0.0002 mol/L για το οξικό και το εκχύλισμα ζύμης και 0.0001 mol/L για την αιθανόλη.

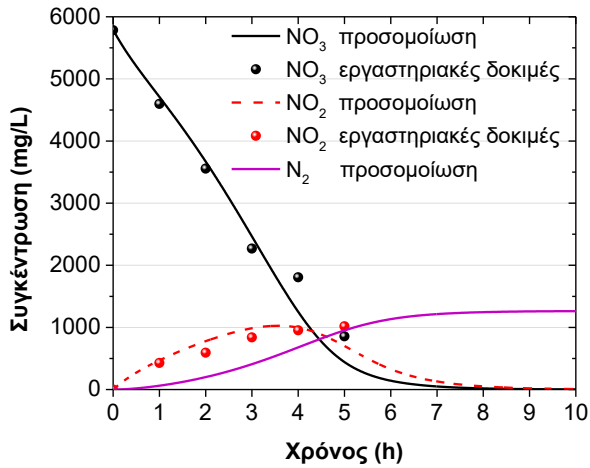
Τέλος, οι τιμές της παραμέτρου f_s που δείχνουν το ποσοστό του οργανικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται από τους μικροοργανισμούς με σκοπό τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού είναι υψηλότερες, δηλαδή 0.50 ή 50%, με πηγή άνθρακα την πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης και χαμηλότερες για τους άλλους δύο δότες ηλεκτρονίων, δηλαδή 0.40 ή 40%. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί ότι σύνθετες πηγές οργανικού άνθρακα και κυρίως αυτές που περιέχουν γλυκόζη και σουκρόζη, όπως το εμπορικό προϊόν Cerelose™ και η μελάσα, μπορούν να ευνοήσουν τη σύνθεση νέου κυτταρικού υλικού σε σύγκριση με άλλες οργανικές ουσίες, όπως τα οξικά ιόντα και η μεθανόλη (Hamlin et al., 2008).

7.2 Προσομοίωση της κινητικής της απονιτροποίησης

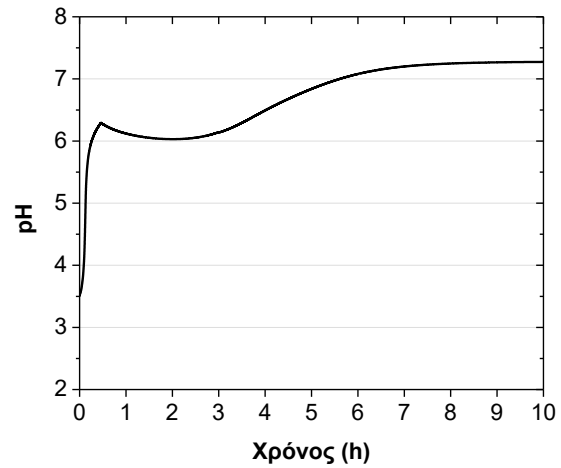
Όπως ήδη αναφέρθηκε στις παραγράφους 4.4.1 και 5.10.1, έχει γίνει η παραδοχή ότι τα οργανικά μόρια του υποστρώματος μπορεί να περιέχουν από 8 (οκτώ) έως 16 (δεκαέξι) άτομα άνθρακα και από 3 (τρία) έως 4 (τέσσερα) άτομα αζώτου (Πίνακας 4.10). Στο Σχήμα 7.1(α) και στο Σχήμα 7.2(α) παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων νιτρικών και νιτρωδών ιόντων και αερίου αζώτου κατά την απονιτροποίηση, όταν το οργανικό υπόστρωμα περιέχει 16 και 8 άτομα άνθρακα, αντίστοιχα. Επίσης, στο Σχήμα 7.1(β) και στο Σχήμα 7.2(β) φαίνεται, αντίστοιχα, η χρονική μεταβολή των τιμών του pH. Σε όλα τα διαγράμματα οι γραμμές αναπαριστούν τα αποτελέσματα της προσομοίωσης και τα μεμονωμένα σημεία τα πειραματικά δεδομένα.

Σύμφωνα με το Σχήμα 7.1(α) και το Σχήμα 7.2(α), τα νιτρικά ανάγονται πλήρως εντός 6 (έξι) και 8 (οκτώ) ωρών από την έναρξη της απονιτροποίησης, όταν το οργανικό υπόστρωμα έχει σύσταση $C_{16}H_{24}O_5N_4$ και $C_8H_{24}O_5N_3$, αντίστοιχα.

Η καμπύλη της μεταβολής της συγκέντρωσης των νιτρωδών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο ακολουθεί την τυπική μορφή που έχει μια καμπύλη, όταν τα προϊόντα από την αναγωγή των νιτρικών, δηλαδή τα νιτρώδη (NO_2^-), αποτελούν δότη ηλεκτρονίων για την ολοκλήρωση της απονιτροποίησης προς αέριο άζωτο από τους μικροοργανισμούς (Σχήμα 7.1(α), Σχήμα 7.2(α)). Συγκεκριμένα, όταν το οργανικό υπόστρωμα περιγράφεται από τον χημικό τύπο $C_{16}H_{24}O_5N_4$, κατά τις πρώτες 6 (έξι) ώρες της απονιτροποίησης πραγματοποιείται αναγωγή των νιτρικών προς νιτρώδη, σύμφωνα με την αντίδραση (A.16), και ταυτόχρονη αναγωγή των παραγόμενων νιτρωδών προς αέριο άζωτο, σύμφωνα με τις αντιδράσεις (A.17)-(A.19).

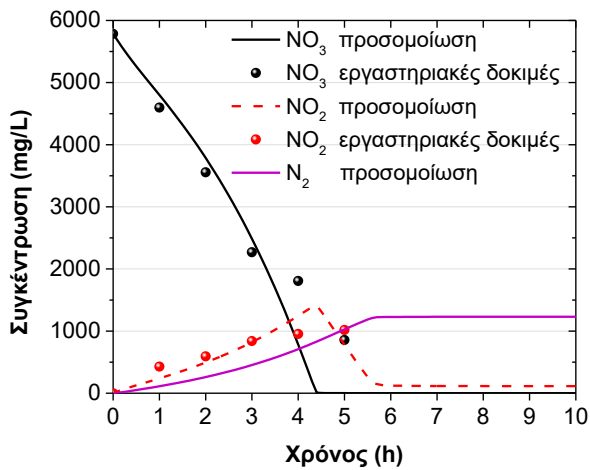


(α)

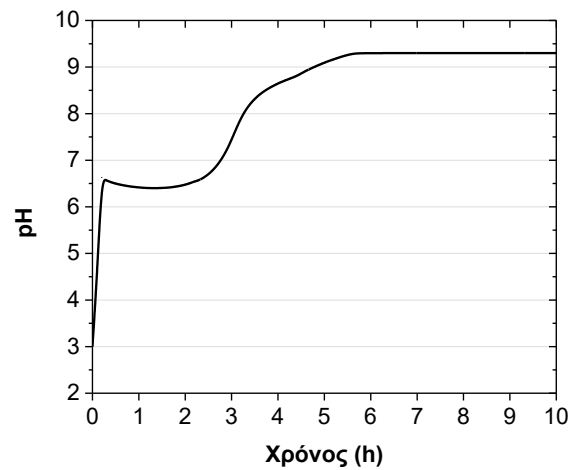


(β)

Σχήμα 7.1: Προσομοίωση της (α) μεταβολής της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων και αερίου αζώτου και της (β) μεταβολής του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (C₁₆H₂₄O₅N₄), στο λογισμικό AQUASIM 2.0

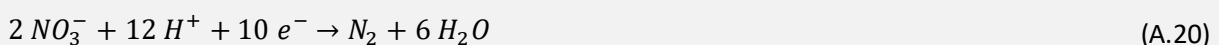
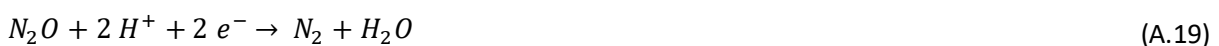


(α)



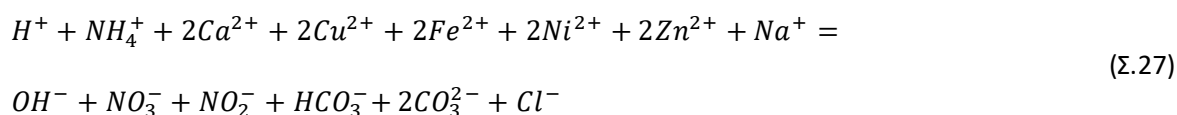
(β)

Σχήμα 7.2: Προσομοίωση της (α) μεταβολής της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων και αερίου αζώτου και της (β) μεταβολής του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (C₈H₂₄O₅N₃), στο λογισμικό AQUASIM 2.0



Μετά την εξάντληση των νιτρικών, ο μοναδικός διαθέσιμος δέκτης ηλεκτρονίων είναι τα νιτρώδη, με αποτέλεσμα η μορφή της καμπύλης των νιτρωδών να καθορίζεται αποκλειστικά από την κινητική της αναγωγής τους. Η μορφή της καμπύλης αυτής είναι παρόμοια για την περίπτωση που το υπόστρωμα περιγράφεται από τον χημικό τύπο $C_8H_{24}O_5N_3$, με τη διαφορά ότι τα νιτρικά ανάγονται πλήρως εντός 4.5 (τεσσερισήμισι) ωρών από την έναρξη της απονιτροποίησης. Έτσι, σύμφωνα με το Σχήμα 7.1(α), η απονιτροποίηση ολοκληρώνεται εντός 8 (οκτώ) ωρών από την έναρξη της απονιτροποίησης, και σύμφωνα με το Σχήμα 7.2(α), εντός 6 (έξι) ωρών, αντίστοιχα, για τις δύο περιπτώσεις οργανικού υποστρώματος. Πάντως, και στις δύο περιπτώσεις, η συγκέντρωση των νιτρωδών ιόντων κυμαίνεται από 1 000 mg/L έως 1 500 mg/L, γεγονός που επιβεβαιώνει την ικανότητα του μικροοργανισμού *Halomonas denitrificans* να ανάγει ταυτόχρονα τα νιτρικά και τα νιτρώδη ιόντα προς αέριο άζωτο κατά την απονιτροποίηση (González-Domenech et al., 2010; Felgate et al., 2012; Wang & Shao, 2021). Αξίζει να σημειωθεί ότι το μοντέλο μπορεί να προβλέπει την παραγωγή αερίου αζώτου, όπως φαίνεται Σχήμα 7.1(α) και στο Σχήμα 7.2(α), το οποίο είναι ακίνδυνο και μπορεί να διατεθεί με ασφάλεια στο περιβάλλον.

Η εξέλιξη των τιμών pH κατά την απονιτροποίηση δείχνει ότι, σε κάθε περίπτωση οργανικού υποστρώματος, το pH αυξάνεται από την αρχική τιμή 3.0 στην τιμή 6.5 σε λιγότερο από μισή ώρα (Σχήμα 7.1(β) και Σχήμα 7.2(β)). Αυτό οφείλεται στην κατανάλωση υδρογονοκατιόντων κατά την αναγωγή νιτρικών και νιτρωδών (αντιδράσεις (A.16) έως (A.19)) και στην παραγωγή αλκαλικότητας εξαιτίας της κατανάλωσης της πηγής οργανικού άνθρακα. Το ισοζύγιο κατιόντων και ανιόντων περιγράφεται από τη σχέση (Σ.27), όπως προέκυψε από το σύνολο των σχέσεων που περιγράφουν τις αβιοτικές διεργασίες και τις αντιδράσεις υδρόλυσης της παραγράφου 4.4.3 (αντιδράσεις (A.41)-(A.44) και (A.45)-(A.46)), και χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των τιμών του pH κατά την απονιτροποίηση.

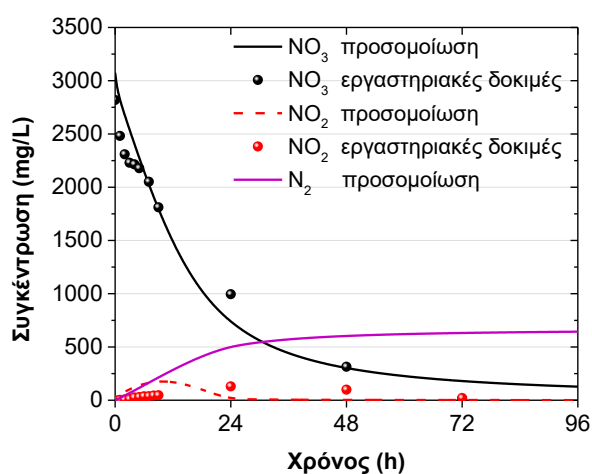


Η μέγιστη τιμή pH του είναι περίπου 7.5, σύμφωνα με το Σχήμα 7.1(β), και περίπου 9.5, σύμφωνα με το Σχήμα 7.2(β). Οι τιμές αυτές διαφέρουν από αυτές που παρατηρούνται σε πειραματικό επίπεδο (pH = 8.0-8.5) για αρχική συγκέντρωση νιτρικών 6 000 mg/L και με πηγή άνθρακα την πεπτόνη και το εκχύλισμα ζύμης (Σχήμα 5.1, Σχήμα 5.16). Η διαφορά αυτή είναι πιθανό να οφείλεται σε διεργασίες που δεν έχουν ληφθεί υπόψη για την κατάστρωση του μοντέλου, όπως χημικές

αντιδράσεις μεταξύ πρωτονίων και αμινομάδων των πεπτονών, και για τις οποίες οι σταθερές ισορροπίας είναι άγνωστες.

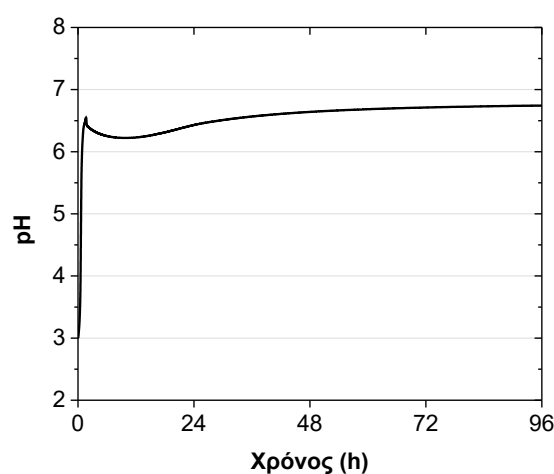
Από τα παραπάνω προκύπτει ότι, όταν το οργανικό μόριο του δότη ηλεκτρονίων περιέχει περισσότερα άτομα άνθρακα, η προσομοίωση οδηγεί σε μεγαλύτερο χρόνο ολοκλήρωσης της απονιτροποίησης και σε μεγαλύτερη μέγιστη τιμή pH. Η προσέγγιση αυτή προσομοιάζει καλύτερα στα πειραματικά αποτελέσματα των εργαστηριακών δοκιμών που αφορούν τη μεταβολή των νιτρικών ιόντων, των νιτρικών ιόντων και του pH σε συνάρτηση με τον χρόνο, για παρόμοιες αρχικές συνθήκες.

Η εξέλιξη της απονιτροποίησης με πηγή άνθρακα συνδυασμό οξικών και εκχυλίσματος ζύμης ($C_3H_{10.5}O_3N_{0.5}$) φαίνεται στο Σχήμα 7.3(α)-(β). Συγκεκριμένα, στο Σχήμα 7.3(α) παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή των συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων, νιτρικών ιόντων και αερίου αζώτου, όπως προέκυψε από τη μαθηματική προσομοίωση. Τα μεμονωμένα σημεία του διαγράμματος αναπαριστούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από εργαστηριακές δοκιμές. Στο Σχήμα 7.3(β) φαίνεται η μεταβολή των τιμών pH σε συνάρτηση με τον χρόνο, όπως προέκυψε ύστερα από τη μαθηματική προσομοίωση.



(α)

(β)



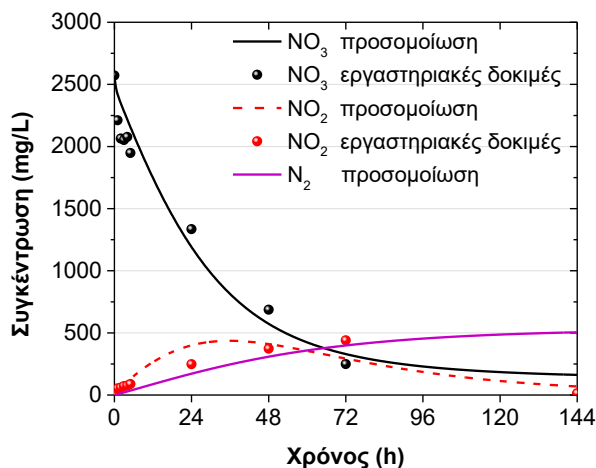
Σχήμα 7.3: Προσομοίωση της (α) μεταβολής της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρικών ιόντων και αερίου αζώτου και της (β) μεταβολής του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα οξικό και εκχύλισμα ζύμης ($C_3H_{10.5}O_3N_{0.5}$), στο λογισμικό AQUASIM 2.0

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.3(α) η αναγωγή νιτρικών ολοκληρώνεται εντός 72 ωρών από την έναρξη της απονιτροποίησης, με δότες ηλεκτρονίων το οξικό και το εκχύλισμα ζύμης. Η χαμηλή ταχύτητα αναγωγής των νιτρικών, όπως συζητήθηκε στην παράγραφο 5.3.2, οδηγεί σε μέγιστες

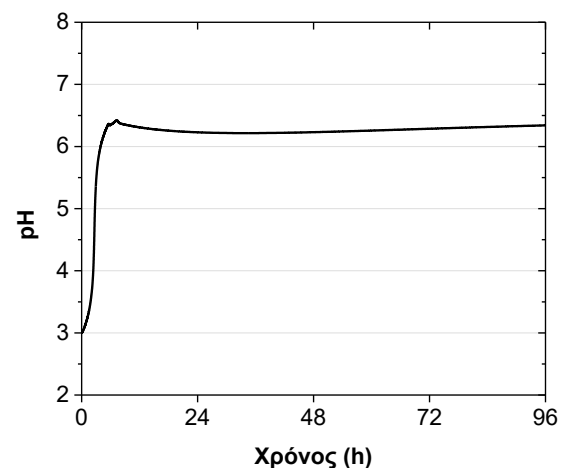
συγκεντρώσεις νιτρωδών χαμηλότερες από 200 mg/L. Το μοντέλο έχει την ικανότητα να προβλέπει την παραγωγή αερίου αζώτου, οι συγκεντρώσεις του οποίου φαίνονται στο Σχήμα 7.3(α).

Οι τιμές ισορροπίας pH, σύμφωνα με το Σχήμα 7.3(β), είναι περίπου 6.5-7.0 και διαφέρουν από αυτές που βρέθηκαν πειραματικά κατά περίπου μισή μονάδα (pH = 7.0-7.5), όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.2. Παρόμοια με την περίπτωση που πηγές άνθρακα είναι η πεπτόνη και το εκχυλίσμα ζύμης, η διαφορά αυτή είναι πιθανό να οφείλεται σε διεργασίες που δεν έχουν συμπεριληφθεί στο μοντέλο κατά την κατάστρωσή του. Παρόλα αυτά, το μοντέλο μπορεί με επιτυχία να προσομοιάσει τη χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων και pH με πηγή άνθρακα συνδυασμό οξικού και εκχυλίσματος ζύμης.

Η χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων και των τιμών pH με δότη ηλεκτρονίων την αιθανόλη (C_2H_6O) παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.4(α)-(β). Στο Σχήμα 7.4(α) φαίνεται η μεταβολή των συγκεντρώσεων νιτρικών ιόντων και νιτρωδών ιόντων και της συγκέντρωσης αερίου αζώτου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, όπως προέκυψε από τη μαθηματική προσομοίωση (συνεχείς γραμμές). Τα μεμονωμένα σημεία του διαγράμματος αναπαριστούν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από εργαστηριακές δοκιμές. Στο Σχήμα 7.4(β) φαίνεται η χρονική μεταβολή των τιμών pH, ως αποτέλεσμα της μαθηματικής προσομοίωσης.



(α)



(β)

Σχήμα 7.4: Προσομοίωση της (α) μεταβολής της συγκέντρωσης νιτρικών ιόντων, νιτρωδών ιόντων και αερίου αζώτου και της (β) μεταβολής του pH, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την αιθανόλη (C_2H_6O), στο λογισμικό AQUASIM 2.0

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.4(α) η αναγωγή νιτρικών ολοκληρώνεται εντός 144 ωρών από την έναρξη της απονιτροποίησης, με δότη ηλεκτρονίων την αιθανόλη. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις

νιτρωδών, ως αποτέλεσμα της προσομοίωσης, είναι περίπου 500 mg/L και συμφωνούν με τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις εργαστηριακές δοκιμές. Οι συγκεντρώσεις αερίου αζώτου που παράγονται, όπως περιγράφεται στην αντίδραση (A.20), προβλέπονται από το μοντέλο και παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.4(α).

Σύμφωνα με το Σχήμα 7.4(β), οι τιμές ισορροπίας pH είναι περίπου 6.5-7.0 και διαφέρουν από αυτές που βρέθηκαν πειραματικά κατά περίπου μία μονάδα (pH = 7.5-8.0), όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.3. Παρόμοια με τις δύο προηγούμενες περιπτώσεις οργανικών υποστρωμάτων, δηλαδή αυτές της πεπτόνης και του οξικού σε συνδυασμό με το εκχυλίσμα ζύμης, η διαφορά αυτή είναι πιθανό να οφείλεται σε διεργασίες που δεν έχουν ληφθεί υπόψη στο μοντέλο. Από το σύνολο των αποτελεσμάτων, βέβαια, φαίνεται ότι το μοντέλο μπορεί να προσομοιάσει με επιτυχία τη χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης νιτρικών και νιτρωδών ιόντων και pH με πηγή άνθρακα συνδυασμό οξικού και εκχυλίσματος ζύμης.

Από το σύνολο των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης με δότες ηλεκτρονίων τον συνδυασμό πεπτόνης-εκχυλίσματος ζύμης με 8 έως 16 άτομα άνθρακα στο μόριο του υποστρώματος, τον συνδυασμό οξικού-εκχυλίσματος ζύμης και την αιθανόλη, φαίνεται ότι το μοντέλο είναι ικανό να προβλέψει με επιτυχία την εξέλιξη της απονιτροποίησης. Τα εκτιμώμενα αποτελέσματα προσεγγίζουν ικανοποιητικά τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις εργαστηριακές δοκιμές και συγκεκριμένα τις συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρωδών ιόντων και τις τιμές pH. Τέλος, το μοντέλο μπορεί να προβλέψει την παραγωγή αερίου αζώτου, «κλείνοντας» έτσι το ισοζύγιο αζώτου μεταξύ εισροής και εκροής στον βιολογικό αντιδραστήρα και ολοκληρώνοντας τον Κύκλο του αζώτου που επιτελείται με τη βοήθεια του *Halomonas denitrificans* (Hatzikioseyan et al., 2022; 2023).

7.3 Τελική τύχη και κινητικότητα των μεταλλικών ιόντων

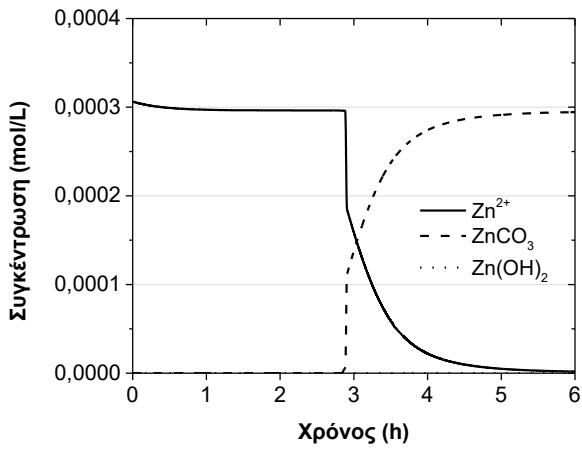
Μέσω της βιολογικής επεξεργασίας των υδρομεταλλουργικών αποβλήτων πρέπει να επιτυγχάνονται δύο στόχοι: (1) η πλήρης αναγωγή των νιτρικών ιόντων σε αέριο άζωτο παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων, τα οποία μπορεί να έχουν τοξική επίδραση στους μικροοργανισμούς και να αναχαιτίζουν τη μικροβιακή δράση, και (2) η ταυτόχρονη απομάκρυνση των μετάλλων από το διάλυμα με μηχανισμούς βιοκαταβύθισης. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν και συζητήθηκαν σε προηγούμενες παραγράφους, η απονιτροποίηση οδηγεί σε αύξηση των τιμών του pH και παραγωγή αλκαλικότητας (Mendrinou et al., 2021). Ο σχηματισμός αδιάλυτων ενώσεων των μετάλλων με τα ελεύθερα υδροξύλια και ανθρακικά ιόντα του διαλύματος

είναι βασικός μηχανισμός βιολογικής καταβύθισης των διαλυτών ειδών μετάλλων (Remoundaki et al., 2007; Gargaud et al., 2011; Reddy, 2013; Zou et al., 2015; Ramírez et al., 2017; Rajasekar et al., 2021; Ren et al., 2023) που μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα με μηχανισμούς ρόφησης (Schippers et al., 2014). Για παράδειγμα, σε αντιδραστήρες προσκολλημένης βιομάζας και συγκεκριμένα σε φίλτρο άμμου ρέουσας κλίνης παρατηρήθηκε ότι η απομάκρυνση των διαλυτών ειδών μετάλλων πραγματοποιείται τόσο με μηχανισμούς βιοκαταβύθισης, όσο και με μηχανισμούς βιορόφησης (Remoundaki et al., 2003a). Οι ίδιοι μηχανισμοί παρατηρήθηκαν και κατά τη βιολογική επεξεργασία όξινων αποβλήτων με υψηλές συγκεντρώσεις διαλυτών μετάλλων και θειικών ιόντων, τα οποία ανάγονταν σε HS^- μέσω της μικροβιακής δράσης (Kousi et al., 2011; Remoundaki et al., 2008).

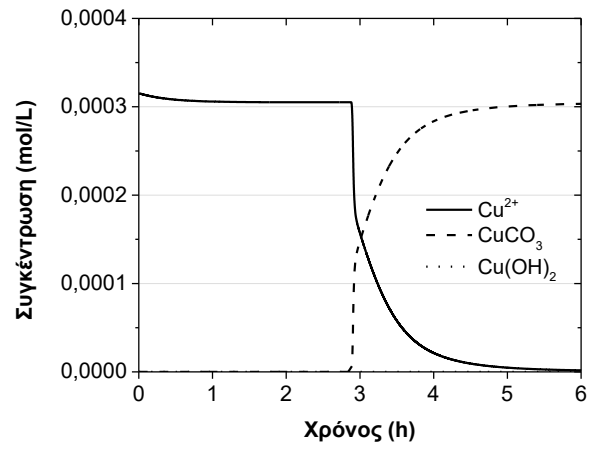
Ταυτόχρονα με την παρακολούθηση των συγκεντρώσεων των νιτρικών και νιτρωδών ιόντων κατά την απονιτροποίηση, παρακολουθούνταν συστηματικά και οι συγκεντρώσεις διαλυτών μετάλλων (Mendrinou et al., 2021). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και ο σίδηρος απομακρύνονται από το διάλυμα το πολύ εντός 24 ωρών από την έναρξη των δοκιμών για αρχικές συγκεντρώσεις διαλυτών μετάλλων έως 100 mg/L (Σχήμα 5.7, Σχήμα 5.8, Σχήμα 6.4, Σχήμα 6.5). Παρόλα αυτά, το νικέλιο παρέμενε διαλυτό απουσία θειικών ιόντων στο θρεπτικό μέσο, γεγονός που σχετίζεται με την παρουσία ανόργανων και οργανικών υποκαταστατών, όπως τα ιόντα χλωρίου και η πεπτόνη, αντίστοιχα (Κεφάλαιο 4, παράγραφος 5.6). Η περίσσεια υδροξυλίων και ανθρακικών ιόντων δεν φαίνεται να οδηγεί σε σχηματισμό ανόργανων κατακρημνισμάτων του νικελίου (Mendrinou et al., 2021).

Στο Σχήμα 7.5(α)-(ε) και στο Σχήμα 7.6(α)-(ε) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσομοίωσης σχετικά με τα διαλυτά μέταλλα, όταν ο συνδυασμός πεπτόνης και εκχυλίσματος ζύμης περιγράφεται ως ενιαίο υπόστρωμα από τους χημικούς τύπους $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_4$ και $\text{C}_8\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_3$, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των ελεύθερων ιόντων των μετάλλων ψευδαργύρου (Σχήμα 7.5(α), Σχήμα 7.6(α)), χαλκού (Σχήμα 7.5(β), Σχήμα 7.6(β)), σιδήρου (Σχήμα 7.5(γ), Σχήμα 7.6(γ)), νικελίου (Σχήμα 7.5(δ), Σχήμα 7.6(δ)) και ασβεστίου (Σχήμα 7.5(ε), Σχήμα 7.6(ε)), καθώς και των αντίστοιχων κατακρημνισμάτων που είναι δυνατό να δημιουργούνται μέσω μηχανισμών βιολογικής καταβύθισης.

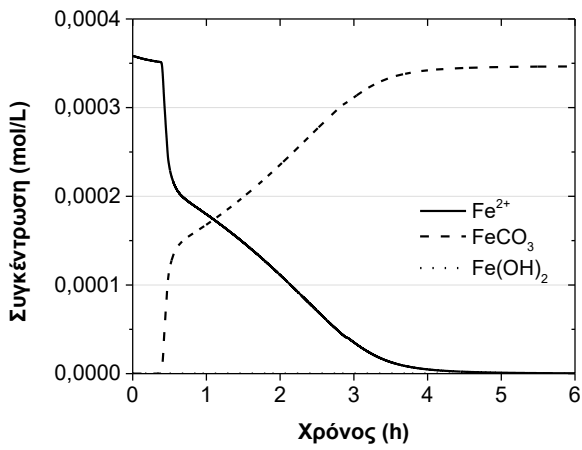
Σύμφωνα με τα σχήματα αυτά, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, ο σίδηρος και το ασβέστιο απομακρύνονται από τη διαλυτή φάση από τις πρώτες πέντε ώρες της απονιτροποίησης ανεξάρτητα από τον αριθμό ατόμων άνθρακα στο οργανικό μόριο. Παρουσία ανθρακικών ιόντων και σε τιμή pH περίπου 7, όταν η πηγή άνθρακα εκφράζεται μέσω του χημικού τύπου $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_4$, ή σε τιμή pH περίπου 9, όταν εκφράζεται μέσω του $\text{C}_8\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_3$, το σύνολο των μετάλλων καταβυθίζεται με τη μορφή ανθρακικών αλάτων. Δεν φαίνεται να σχηματίζονται κατακρημνίσματα από αδιάλυτα



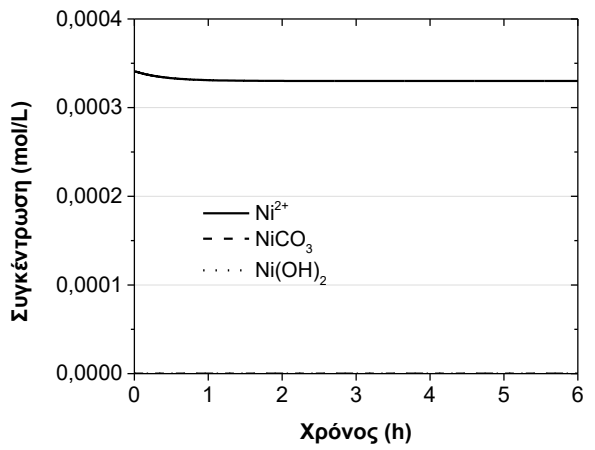
(α)



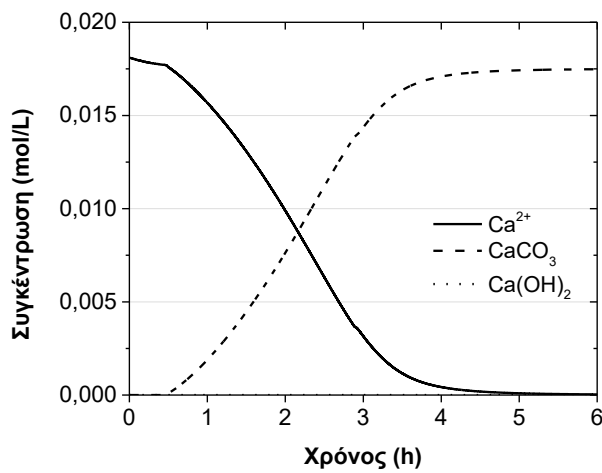
(β)



(γ)

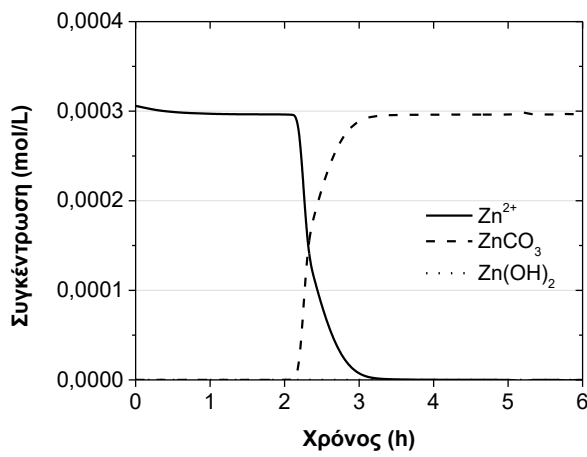


(δ)

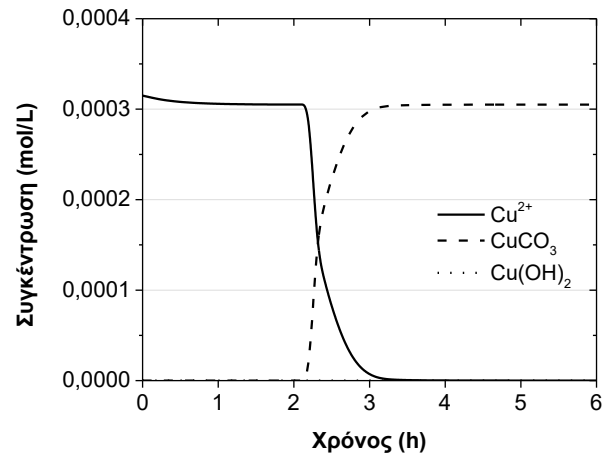


(ε)

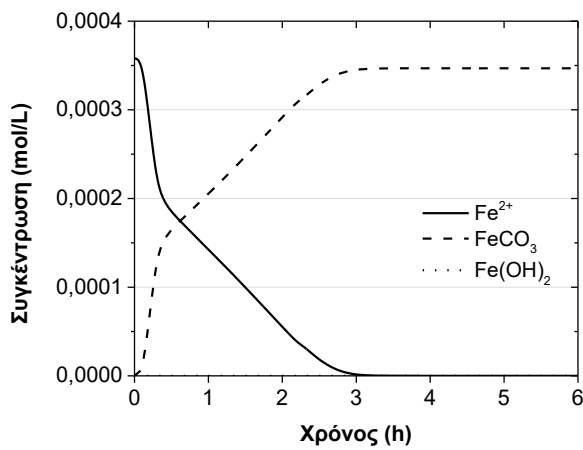
Σχήμα 7.5: Προσομοίωση της μεταβολής της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου, (δ) νικελίου και (ε) ασβεστίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης ($C_{16}H_{24}O_5N_4$), στο λογισμικό AQUASIM 2.0



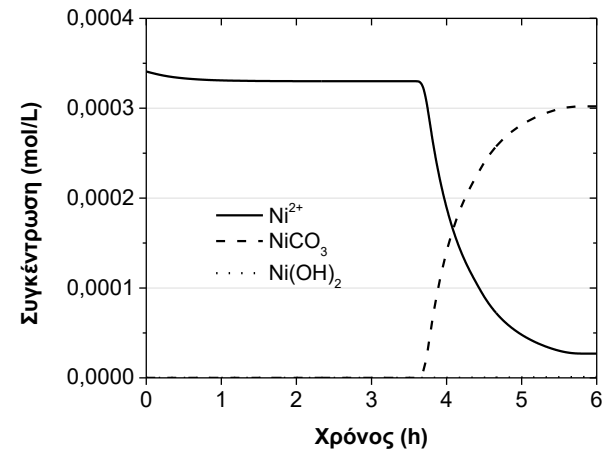
(α)



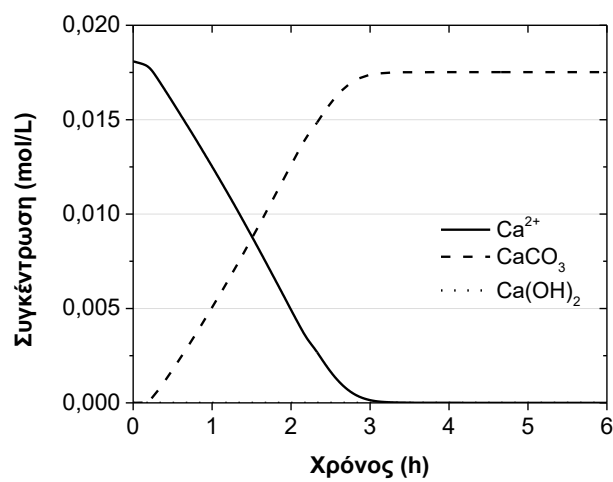
(β)



(γ)



(δ)



(ε)

Σχήμα 7.6: Προσομοίωση της μεταβολής της συγκέντρωσης (α) ψευδαργύρου, (β) χαλκού, (γ) σιδήρου, (δ) νικελίου και (ε) ασβεστίου, σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα πεπτόνη και εκχύλισμα ζύμης (C₈H₂₄O₅N₃), στο λογισμικό AQUASIM 2.0

υδροξείδια των μετάλλων αυτών. Επομένως, ο κυρίαρχος μηχανισμός καταβύθισης των μετάλλων, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προσομοίωσης, είναι ο σχηματισμός ανθρακικών αλάτων των μετάλλων.

Σύμφωνα με τον πίνακα (Πίνακας 4.16), οι τιμές των σταθερών χημικής ισορροπίας μεταξύ των ιόντων των μετάλλων Zn, Cu, Fe, Ni και Ca και των ανθρακικών αλάτων τους, όταν αυτά έχουν την ίδια γραμμομοριακότητα στα διαλύματα, δείχνουν ότι, η διαδοχική σειρά σχηματισμού ανθρακικών αλάτων είναι: $\text{FeCO}_3 > \text{ZnCO}_3 \sim \text{CuCO}_3 > \text{CaCO}_3 > \text{NiCO}_3$. Πράγματι, τα αποτελέσματα της προσομοίωσης επαληθεύουν την παρατήρηση αυτή για τις περιπτώσεις του σιδήρου, του ψευδαργύρου, του χαλκού και του νικελίου. Το ασβέστιο αποτελεί εξαίρεση και φαίνεται να καταβυθίζεται αμέσως μετά τον σίδηρο, προφανώς εξαιτίας της υψηλότερης συγκέντρωσής του στο θρεπτικό μέσο σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μέταλλα. Έτσι, η σειρά καταβύθισης των μετάλλων διαμορφώνεται ως εξής: $\text{FeCO}_3 > \text{CaCO}_3 > \text{ZnCO}_3 \sim \text{CuCO}_3 > \text{NiCO}_3$. Η διαδοχική αυτή σειρά συμφωνεί με αυτή που παρατηρήθηκε κατά τις εργαστηριακές δοκιμές με αρχική συγκέντρωση μετάλλων 20 mg/L (Σχήμα 5.7, Σχήμα 5.8 και Σχήμα 5.17). Παρόλα αυτά, η σειρά καταβύθισης των μεταλλικών αλάτων είναι δυνατόν να παρουσιάζει διαφοροποιήσεις, ανάλογα με παράγοντες, όπως ο σχηματισμός πυρήνων και η κρυστάλλωση των μορίων τους, η παρουσία άλλων διαλυτών ιόντων και οργανικών μορίων και η εκτίμηση των σταθερών χημικής ισορροπίας ανάλογα με το είδος και την κρυσταλλικότητα των ανθρακικών αλάτων. Για παράδειγμα, η σταθερά χημικής ισορροπίας για τον καλσίτη (calcite) είναι $3.36 \cdot 10^{-9}$ και για τον αραγωνίτη (aragonite) είναι $6 \cdot 10^{-9}$ (Speight, 2017).

Η παρουσία ασβεστίου μπορεί οδηγήσει σε φαινόμενα τοξικότητας στους μικροοργανισμούς, όπως επιβράδυνση ή και παύση της απονιτροποίησης (Fernández-Nava et al., 2008; Cyplik et al., 2012), ιδιαίτερα όταν πρόκειται για συγκεντρώσεις υψηλότερες από 150 mg/L (Fernández-Nava et al., 2008). Τις περισσότερες φορές, βέβαια, το ασβέστιο δεν αναφέρεται ως μέταλλο που μπορεί να προκαλέσει φαινόμενα τοξικότητας. Ακόμη και σε αυτή την περίπτωση, η παρουσία του στα υγρά απόβλητα, είτε επειδή αποτελεί απαραίτητο συστατικό για τη μικροβιακή ανάπτυξη, είτε εξαιτίας της φύσης των αποβλήτων, μπορεί προκαλέσει μακροχρόνια προβλήματα στη λειτουργία των βιολογικών συστημάτων. Ο σχηματισμός μεγάλων όγκων κατακρημνισμάτων ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει σε έμφραξη των πόρων, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για αντιδραστικές προσκολλημένης βιομάζας, και σε σχηματισμό κρούστας στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα παραπάνω είναι δυνατόν να μειώσουν την απόδοση των βιολογικών συστημάτων.

Η μικροβιακή δράση μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό αλάτων του ασβεστίου, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση του διαλυτού ασβεστίου, συχνά σε ποσοστά περίπου 90% (Li et al., 2014). Ερευνητές έχουν δείξει ότι η απονιτροποίηση είναι δυνατόν να πραγματοποιείται ταυτόχρονα με τον μηχανισμό αυτόν ή ακόμη και να ευνοείται από αυτόν. Οι Ren et al. (2023) μελέτησαν τη

μικροβιακή παραγωγή καλσίτη (MICP-microbial induced calcite precipitation) σε βιολογικό αντιδραστήρα όπου πραγματοποιούνται ταυτόχρονα με αναγωγή νιτρικών ιόντων. Οι ίδιοι συμπεράναν ότι τα κατακρημνίσματα που σχηματίζονταν αποτελούνταν από CaCO_3 , CdCO_3 και $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Παρόμοιες μελέτες έδειξαν ότι τα κατακρημνίσματα ασβεστίου μπορούν να συγκαταβυθιστούν με ανθρακικό νικέλιο (NiCO_3), απομακρύνοντας ταυτόχρονα νιτρικά ιόντα από το διάλυμα.

Σύμφωνα με το Σχήμα 7.5(δ) και το Σχήμα 7.6(δ), το νικέλιο δεν φαίνεται να καταβυθίζεται, όταν η πηγή άνθρακα εκφράζεται μέσω του χημικού τύπου $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_4$, ενώ καταβυθίζεται μερικώς, όταν εκφράζεται μέσω του τύπου $\text{C}_8\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_3$. Από τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τις πειραματικές δοκιμές (Σχήμα 5.7, Σχήμα 5.8 και Σχήμα 5.17) και, όπως συζητήθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, το νικέλιο παραμένει διαλυτό κατά την απονιτροποίηση. Η καταβύθιση του νικελίου, ως αποτέλεσμα της μαθηματικής προσομοίωσης στην περίπτωση του χημικού τύπου $\text{C}_8\text{H}_{24}\text{O}_5\text{N}_3$, συνδέεται με την άνοδο του pH σε υψηλές τιμές (περίπου 9.5) (Σχήμα 7.2(β)). Στην πράξη δεν παρατηρήθηκαν τιμές pH υψηλότερες από 8.5 κατά την απονιτροποίηση, ακόμη και όταν ήταν δυνατόν να παραχθεί αυξημένη αλκαλικότητα, εξαιτίας των αρχικά υψηλότερων τιμών pH ($\text{pH} = 5.5-6.0$) και της μεγαλύτερης συγκέντρωσης νιτρικών που ανάχθηκε ($14\ 000\ \text{mg/L}$) (Σχήμα 5.16). Συμπερασματικά, όσο πιο λίγα άτομα άνθρακα διαθέτει το μόριο του δότη ηλεκτρονίων, τόσο μικρότερη συγκέντρωση νικελίου αναμένεται ότι μπορεί να απομακρυνθεί από το διάλυμα.

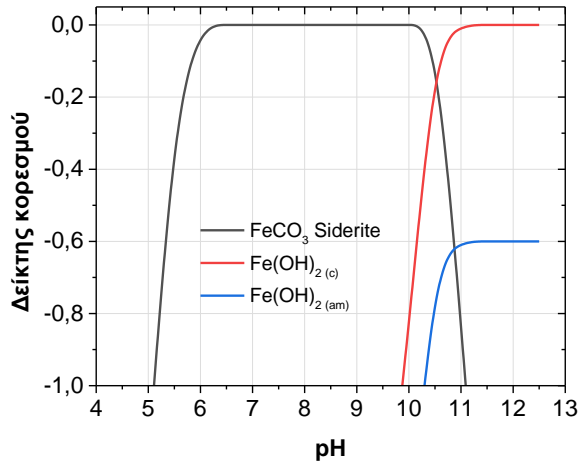
Το μοντέλο που αναπτύχθηκε με το λογισμικό AQUASIM 2.0 μπορεί να προσομοιάζει με ικανοποιητική ακρίβεια τα εργαστηριακά αποτελέσματα που αφορούν την καταβύθιση των διαλυτών μετάλλων. Επίσης, μπορεί να προβλέπει τον μηχανισμό καταβύθισης των μετάλλων αυτών. Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης έδειξαν ότι τα ιόντα σιδήρου, ασβεστίου, χαλκού και ψευδαργύρου καταβυθίζονται διαδοχικά κατά τη διάρκεια της απονιτροποίησης στην κλίση του αντιδραστήρα. Ο κυρίαρχος μηχανισμός καταβύθισης είναι ο σχηματισμός ανθρακικών αλάτων των μετάλλων αυτών. Εξαιρεση αποτελεί το νικέλιο, το οποίο παραμένει κατά το μεγαλύτερο μέρος της συγκέντρωσής του διαλυτό, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις πειραματικές δοκιμές.

Η διαλυτότητα του σιδήρου, του χαλκού, του ψευδαργύρου, του νικελίου και του ασβεστίου μελετήθηκε και με το λογισμικό Visual MINTEQ. Η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές τιμές pH, για συγκέντρωση καθενός από τα παραπάνω μέταλλα ίση με 1 mM και παρουσία 10 mM ανθρακικών ιόντων, τα οποία είναι δυνατόν να προέρχονται από την οξείδωση του οργανικού άνθρακα κατά την απονιτροποίηση. Η σύσταση αυτή είναι παρόμοια με τις συνθήκες διεξαγωγής των εργαστηριακών δοκιμών.

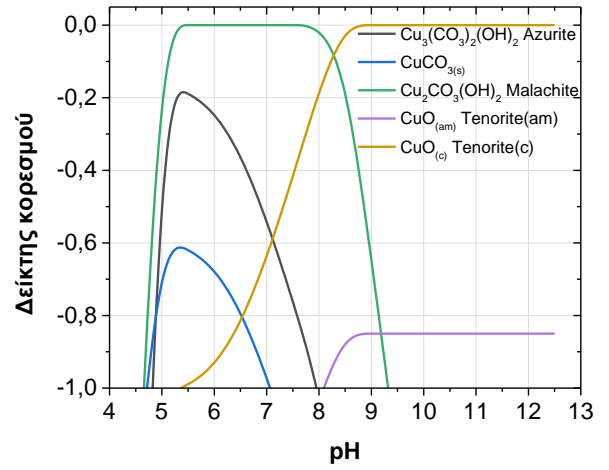
Οι δείκτες κορεσμού των πιθανών κατακρημνισμάτων σιδήρου, χαλκού, ψευδαργύρου, νικελίου και ασβεστίου που μπορεί να σχηματίζονται παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.7. Ο σίδηρος μπορεί να καταβυθίζεται ως σιδερίτης (siderite) (FeCO_3) σε εύρος τιμών pH από 6.5 έως 10. Για τιμές μεγαλύτερες από 11 η κυρίαρχη μορφή κατακρημνισμάτων του σιδήρου είναι η κρυσταλλική $\text{Fe}(\text{OH})_2$. Ο χαλκός μπορεί να καταβυθίζεται στην κλίση του αντιδραστήρα με τη μορφή μαλαχίτη (malachite) ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$) σε εύρος τιμών pH από 5.5 έως 8. Σε τιμές pH υψηλότερες από 9 κυριαρχεί η μορφή του οξειδίου του χαλκού (CuO). Σημειώνεται ότι, για την κατάστρωση του μοντέλου δεν λήφθηκαν υπόψη οι σύνθετες χημικές ενώσεις των μετάλλων, όπως αυτές του μαλαχίτη και του αζουρίτη. Όλες οι υπόλοιπες μορφές χαλκού δεν σχηματίζουν ιζήματα σε εύρος τιμών pH από 4.5-12. Ο ψευδάργυρος μπορεί να σχηματίζει πληθώρα ιζημάτων μεταξύ των οποίων είναι ο σμιθσονίτης (smithsonite) (ZnCO_3), σε τιμές pH από 6 έως 8, ο υδροψευδάργυρος (hydrozincite) ($\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6$), σε τιμές από 9.5 έως 10 και ο ψευδαργυρίτης (zincite) (ZnO), σε τιμές pH υψηλότερες από 11. Η καταβύθιση του ψευδαργύρου με τη μορφή υδροξειδίου ($\text{Zn}(\text{OH})_2$) δεν φαίνεται να ευνοείται. Το νικέλιο θα μπορούσε να καταβυθιστεί ως ανθρακικό νικέλιο (NiCO_3) ή υδροξείδιο του νικελίου ($\text{Ni}(\text{OH})_2$) σε τιμές pH από 6 έως 9 και πάνω από 10, αντίστοιχα. Τέλος, όσον αφορά στο ασβέστιο, ευνοείται η καταβύθισή του ως καλσίτη (CaCO_3) σε τιμές pH μεγαλύτερες από 7.5.

Η πιθανότητα καταβύθισης των διαλυτών ειδών μετάλλων κατά την απονιτροποίηση διερευνήθηκε περαιτέρω, μέσω της μελέτης της επίδρασης που έχει η παρουσία και η συγκέντρωση απλών οργανικών μορίων, όπως το κιτρικό οξύ, στους δείκτες κορεσμού των μεταλλικών αλάτων. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.2) παρουσιάζονται οι τιμές των δεικτών κορεσμού διαφορετικών κατακρημνισμάτων των μετάλλων, σε συνθήκες που προσομοιάζουν στις συνθήκες διεξαγωγής των πειραματικών δοκιμών (συγκεντρώσεις μετάλλων: 1 mM, συγκέντρωση ανθρακικών ιόντων: 10 mM) σε τιμή pH ίση με 7.5. Μελετήθηκαν συγκεντρώσεις κιτρικού οξέος ίσες με 1 mM, 5 mM και 10 mM και το. Με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι περιπτώσεις υπερκορεσμού.

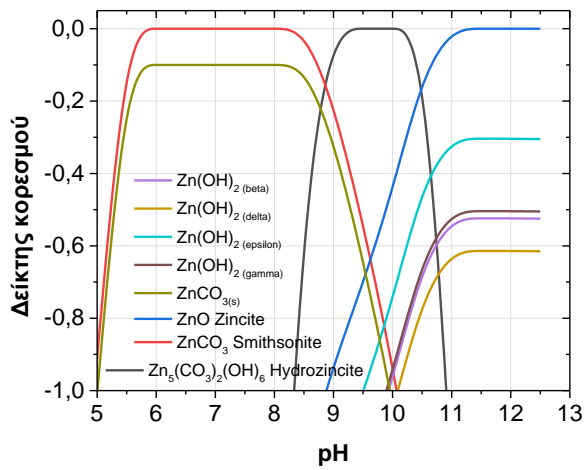
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη της επίδρασης των απλών οργανικών μορίων στη σύσταση των κατακρημνισμάτων κατά την απονιτροποίηση δείχνουν ότι, η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης κιτρικού οξέος μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των μεταλλικών αλάτων που μπορούν να καταβυθιστούν, εξαιτίας του σχηματισμού συμπλόκων μεγαλύτερου μέρους των μεταλλικών ιόντων με τον οργανικό υποκαταστάτη. Το φαινόμενο αυτό είναι δυνατόν να παρατηρηθεί και παρουσία άλλων οργανικών υποκαταστατών, όπως το γαλακτικό οξύ, τα αμινοξέα και οι πρωτεΐνες (Remoundaki et al., 2003b; 2007). Παρόλα αυτά, η μελέτη τέτοιων μηχανισμών συχνά παραλείπεται, εξαιτίας της αφθονίας των ειδών των οργανικών ενώσεων που μπορεί να περιέχονται στα υγρά απόβλητα, της άγνωστης προέλευσής τους και της αβεβαιότητας σχετικά με τη χημική τους σταθερότητα.



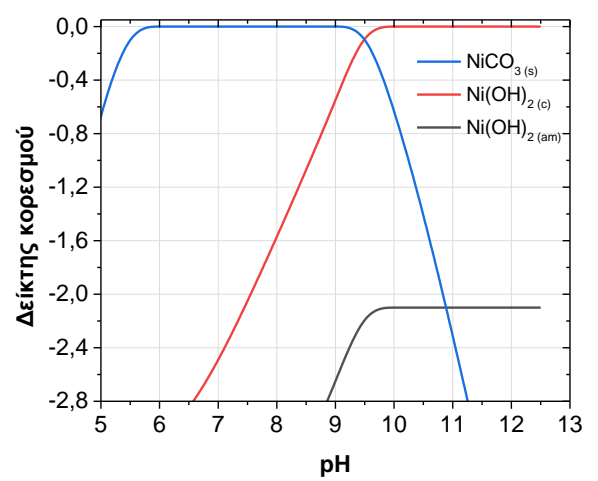
(α)



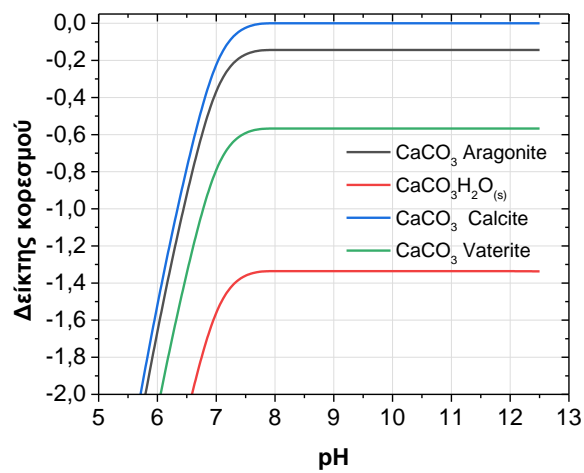
(β)



(γ)



(δ)



(ε)

Σχήμα 7.7: Δείκτες κορεσμού των κατακρημνισμάτων σιδήρων, χαλκού, ψευδαργύρου, νικελίου και ασβεστίου που μπορεί να σχηματίζονται κατά την απονιτροποίηση, βάση προσομοίωσης στο λογισμικό Visual MINTEQ

Πίνακας 7.2: Επίδραση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος στην τιμή του δείκτη κορεσμού των πιθανών κατακρημνισμάτων των μετάλλων σιδήρου, χαλκού, ψευδαργύρου, νικελίου και ασβεστίου κατά την απονιτροποίηση, βάση προσομοίωση στο λογισμικό Visual MINTEQ(*)

Without addition of citrate		In the presence of 1mM citrate		In the presence of 5mM citrate		In the presence of 10mM citrate	
Mineral	Sat. index	Mineral	Sat. index	Mineral	Sat. index	Mineral	Sat. index
Hydrozincite	9,414	Hydrozincite	9	Azurite	2,91	Malachite	0,149
Azurite	7,909	Azurite	7,616	Malachite	2,443	Smithsonite	-0,184
Malachite	5,806	Malachite	5,603	Hydrozincite	1,473	Siderite	-0,226
NiCO ₃ (s)	2,753	NiCO ₃ (s)	2,536	Smithsonite	0,993	ZnCO ₃ (s)	-0,284
Smithsonite	2,527	Smithsonite	2,458	ZnCO ₃ (s)	0,893	Tenorite(c)	-0,336
Tenorite(c)	2,525	Tenorite(c)	2,412	Siderite	0,857	Azurite	-0,545
ZnCO ₃ (s)	2,427	ZnCO ₃ (s)	2,358	Tenorite(c)	0,798	ZnCO ₃ :1H ₂ O(s)	-0,824
Siderite	2,384	Siderite	2,322	NiCO ₃ (s)	0,692	NiCO ₃ (s)	-0,901
ZnCO ₃ :1H ₂ O(s)	1,887	ZnCO ₃ :1H ₂ O(s)	1,818	ZnCO ₃ :1H ₂ O(s)	0,353	CuCO ₃ (s)	-1,124
Tenorite(am)	1,675	CuCO ₃ (s)	1,582	CuCO ₃ (s)	0,036	Tenorite(am)	-1,186
CuCO ₃ (s)	1,672	Tenorite(am)	1,562	Tenorite(am)	-0,052	Calcite	-1,327
Cu(OH)2(s)	0,875	Cu(OH)2(s)	0,762	Calcite	-0,322	Aragonite	-1,471
Ni(OH)2 (c)	0,756	Ni(OH)2 (c)	0,517	Aragonite	-0,466	Vaterite	-1,894
Zincite	0,39	Zincite	0,298	Cu(OH)2(s)	-0,852	Cu(OH)2(s)	-1,986
Calcite	0,273	Calcite	0,289	Vaterite	-0,889	Zincite	-2,385
Aragonite	0,129	Aragonite	0,145	Zincite	-1,234	CaCO ₃ xH ₂ O(s)	-2,664
Zn(OH)2 (epsilon)	0,086	Zn(OH)2 (epsilon)	-0,006	Ni(OH)2 (c)	-1,396	Zn(OH)2 (epsilon)	-2,69
Zn(OH)2 (gamma)	-0,114	Zn(OH)2 (gamma)	-0,206	Zn(OH)2 (epsilon)	-1,539	Zn(OH)2 (gamma)	-2,89
Zn(OH)2 (beta)	-0,134	Zn(OH)2 (beta)	-0,226	CaCO ₃ xH ₂ O(s)	-1,658	Zn(OH)2 (beta)	-2,91
Zn(OH)2 (delta)	-0,224	Vaterite	-0,278	Zn(OH)2 (gamma)	-1,739	Ni(OH)2 (c)	-2,963
Vaterite	-0,294	Zn(OH)2 (delta)	-0,316	Zn(OH)2 (beta)	-1,759	Zn(OH)2 (delta)	-3
Zn(OH)2 (am)	-0,854	Zn(OH)2 (am)	-0,946	Zn(OH)2 (delta)	-1,849	Zn(OH)2 (am)	-3,63
CaCO ₃ xH ₂ O(s)	-1,063	CaCO ₃ xH ₂ O(s)	-1,047	Zn(OH)2 (am)	-2,479	Fe(OH)2 (c)	-3,778
Fe(OH)2 (c)	-1,103	Fe(OH)2 (c)	-1,188	Fe(OH)2 (c)	-2,72	Hydrozincite	-4,335
Ni(OH)2 (am)	-1,344	Ni(OH)2 (am)	-1,583	Fe(OH)2 (am)	-3,32	Fe(OH)2 (am)	-4,378
Fe(OH)2 (am)	-1,703	Fe(OH)2 (am)	-1,788	Ni(OH)2 (am)	-3,496	Ni(OH)2 (am)	-5,063
Portlandite	-10,918	Portlandite	-10,925	Portlandite	-11,604	Portlandite	-12,583
Lime	-20,913	Lime	-20,92	Lime	-21,599	Lime	-22,578

(*) με κόκκινο χρώμα σημειώνονται οι περιπτώσεις υπερκορεσμού

Η κατανόηση και η πρόβλεψη της κινητικής της καταβύθισης των μετάλλων είναι, επίσης, απαραίτητη όταν τα μέταλλα συμμετέχουν στις διεργασίες των βιολογικών συστημάτων. Στο μοντέλο που αναπτύχθηκε χρησιμοποιήθηκε μια απλή γραμμική σχέση (Πίνακας 4.18, (A.46)), ώστε να είναι δυνατή η γρήγορη πρόβλεψη, τόσο της καταβύθισης των μετάλλων, όσο και της διαλυτοποίησης των κατακρημνισμάτων τους που βρίσκονται στην κλίση του αντιδραστήρα. Παρόλα αυτά, η προσέγγιση αυτή δεν αντικατοπτρίζει πάντα την πραγματικότητα, επειδή σε αρκετές περιπτώσεις η καταβύθιση των μετάλλων είναι αργή, δεν ακολουθεί γραμμικές σχέσεις και τα μέταλλα είναι δυνατόν να παραμένουν διαλυτά ακόμα και όταν ο δείκτης κορεσμού των ιζημάτων τους είναι υψηλότερος της μονάδας.

Στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής αναπτύχθηκε ένα βασικό μαθηματικό μοντέλο για τη βιολογική επεξεργασία συνθετικών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών, χλωριόντων και διαλυτών ειδών μετάλλων που προσομοιάζουν σε υδρομεταλλουργικά απόβλητα που προέρχονται από την ανάκτηση βασικών και πολύτιμων μετάλλων από ΠΤΚ (Hatzikioseyan et al., 2022; 2023). Για την κατάστρωση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τόσο αβιοτικές χημικές αντιδράσεις, όσο και σχέσεις που περιγράφουν τις βιοτικές διεργασίες, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και τελικά σε αέριο άζωτο. Η μικροβιακή

απονιτροποίηση μεταβάλλει τη σύσταση των αποβλήτων, γεγονός που έχει άμεση επίδραση στην κινητικότητα των μετάλλων. Με εξαίρεση το νικέλιο που παραμένει διαλυτό στο μεγαλύτερο μέρος του, μέταλλα όπως ο σίδηρος, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος, καθώς και μη τοξικά μέταλλα, όπως το ασβέστιο, απομακρύνονται από το διάλυμα με μηχανισμούς βιοκαταβύθισης. Η ακρίβεια του μοντέλου περιορίζεται από τις πληροφορίες που υπήρχαν διαθέσιμες και χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο, σχετικά με την κινητική και την ισορροπία των αβιοτικών αντιδράσεων. Επιπλέον, αβεβαιότητες συμπεριλαμβάνουν και οι βιολογικές διεργασίες, επειδή η απονιτροποίηση περιγράφεται από αντιδράσεις στοιχειομετρίας. Ωστόσο, το λογισμικό AQUASIM που επιτρέπει την ανάπτυξη μοντέλων, διευκολύνει την επέκταση του μοντέλου, καθώς επιτρέπει την προσομοίωση συγκεκριμένων πειραματικών φύλλων ροής, την ενσωμάτωση πρόσθετων βιολογικών ή φυσικών διεργασιών ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των δεδομένων, την προσαρμογή των παραμέτρων του μοντέλου σε πειραματικά δεδομένα και, τέλος, τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας των διαδικασιών (Hatzikioseyan et al., 2022; 2023).

8 | Συμπεράσματα και προοπτικές

8.1 Συμπεράσματα

Ο σκοπός της παρούσας Διατριβής ήταν να διερευνήσει πειραματικά και να αποδείξει τη δυνατότητα μικροβιακής απονιτροποίησης σε υγρά βιομηχανικά απόβλητα που προέρχονται από υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων από ΠΤΚ. Τα υγρά αυτά απόβλητα περιέχουν συνήθως υπολείμματα εκχυλιστικών μέσων, όπως το νιτρικό και το υδροχλωρικό οξύ, καθώς και διαλυτά είδη μετάλλων. Η προτεινόμενη διαδικασία οφείλει να ικανοποιεί ταυτόχρονα τρεις στόχους: (1) εξουδετέρωση της εκροής, (2) απομάκρυνση των νιτρικών ιόντων και, (3) απομάκρυνση των διαλυτών ειδών μετάλλων με μηχανισμούς βιοκαταβύθισης. Κατά τη χρονική στιγμή που τέθηκαν οι παραπάνω στόχοι, αλλά και κατά τη διάρκεια εκπόνησης της Διατριβής, δεν υπήρχαν στη βιβλιογραφία τέτοια αντίστοιχα αποτελέσματα. Για τους σκοπούς αυτούς, σχεδιάστηκε, κατασκευάστηκε και τέθηκε σε λειτουργία βιολογικός αντιδραστήρας σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής με πορώδες πληρωτικό υλικό. Για τον εμβολιασμό του αντιδραστήρα επιλέχθηκε το στέλεχος *Halomonas denitrificans*. Για την πειραματική μελέτη των κύριων παραμέτρων του συστήματος με συνθετικά διαλύματα επιλέχθηκαν ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn) και το νικέλιο (Ni) ως αντιπροσωπευτικά μέταλλα της σύστασης των ΠΤΚ.

Ο βιολογικός αντιδραστήρας, αφότου δοκιμάστηκε πειραματικά αρχικά σε συνθετικά απόβλητα, αποτέλεσε μέρος του διαγράμματος ροής πιλοτικής εφαρμογής υδρομεταλλουργικής διεργασίας με στόχο την ανάκτηση χαλκού (Cu), κασσιτέρου (Sn), χρυσού (Au) και αργύρου (Ag) από ΠΤΚ. Τα πραγματικά απόβλητα της υδρομεταλλουργικής διεργασίας περιέχουν, εκτός των μελετώμενων μετάλλων (Fe, Cu, Zn, Ni), και ένα πλήθος άλλων στοιχείων-μετάλλων με ενδεχόμενη αρνητική επίδραση στην απονιτροποίηση. Για τον λόγο αυτό, ήταν απαραίτητος ο σχεδιασμός, αλλά και η πειραματική επιβεβαίωση της διαδικασίας, για την επεξεργασία των πραγματικών αποβλήτων στον βιοαντιδραστήρα, ώστε η απονιτροποίηση να ολοκληρώνεται με υψηλές αποδόσεις.

Τέλος, η μαθηματική προσομοίωση του συστήματος επιχειρήθηκε με το λογισμικό AQUASIM 2.0. Η προσομοίωση αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο που συνεισφέρει στην κατανόηση της απονιτροποιητικής διεργασίας παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση της λειτουργίας του απονιτροποιητικού αντιδραστήρα. Έτσι, η βιολογική επεξεργασία βιομηχανικών υγρών αποβλήτων μπορεί να γίνει αποδοτικότερη και αποτελεσματικότερη.

Τα κύρια συμπεράσματα της παρούσας Διατριβής αφορούν:

- Τη διαμόρφωση του προτεινόμενου συστήματος απονιτροποιητικού αντιδραστήρα.
- Την πειραματική διερεύνηση των κύριων παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροβιακή απονιτροποίηση.
- Την πειραματική διερεύνηση για τις δυνατότητες του συστήματος (α) να λειτουργεί αποδοτικά παρουσία μετάλλων και, (β) να απομακρύνει διαλυτά είδη μετάλλων μέσω βιοκαταβύθισης.
- Τη διερεύνηση βελτιστοποίησης της διεργασίας χρησιμοποιώντας απλά οργανικά μόρια ως πηγή άνθρακα.
- Τη μαθηματική προσομοίωση για την εκτίμηση των παραμέτρων της απονιτροποιητικής διεργασίας και την περιγραφή των μηχανισμών που ελέγχουν τη μείωση της τοξικότητας του αποβλήτου μέσω βιολογικής καταβύθισης των μετάλλων.

8.1.1 Διαμόρφωση συστήματος απονιτροποιητικού αντιδραστήρα

Στο πλαίσιο της παρούσας Διατριβής σχεδιάστηκε, κατασκευάστηκε και δοκιμάστηκε πειραματικά ένα απλό σύστημα μίας βαθμίδας αντιδραστήρα σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής με αδρανές πληρωτικό υλικό. Το σύστημα, αφότου εμβολιάστηκε με το στέλεχος *Halomonas denitrificans* λειτούργησε σε ένα εύρος αρχικών τιμών των παραμέτρων: pH και συγκεντρώσεων νιτρικών, χλωριόντων και διαλυτών μετάλλων (Fe, Cu, Zn, Ni). Η συστηματική παρακολούθηση των απαραίτητων παραμέτρων κατά τη λειτουργία του βιοαντιδραστήρα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το σύστημα είναι αποτελεσματικό για την ταυτόχρονη απομάκρυνση μετάλλων και νιτρικών από όξινα υγρά απόβλητα υψηλής αλατότητας. Η σταθερότητα του συστήματος αποδείχθηκε με δοκιμή της λειτουργίας του σε συνθήκες αντίξοες για την απονιτροποιητική δραστηριότητα, επιδεικνύοντας υψηλή ανοχή σε όξινα pH, καθώς και σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων μετάλλων μεμονωμένα, αλλά και σε μίγματα, όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια.

8.1.2 Πειραματική διερεύνηση των κύριων παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροβιακή απονιτροποίηση

Ο βακτηριακός πληθυσμός δεν επηρεάστηκε αρνητικά, ούτε παρατηρήθηκε αναστολή της μεταβολικής δραστηριότητας κατά την τροφοδοσία του αντιδραστήρα με διαλύματα που περιέχουν νιτρικά σε αρχικές συγκεντρώσεις έως 6 000 mg/L και σε pH = 3. Αποδείχθηκε πειραματικά ότι η απονιτροποίηση πραγματοποιείται μέσω της ενδιάμεσης παραγωγής νιτρωδών, ολοκληρώνεται

εντός το πολύ 24 ωρών προς αέριο άζωτο και δεν αφήνει υπολειμματικές μορφές ανηγμένου αζώτου.

Το σύστημα επιτυγχάνει, επίσης, εξουδετέρωση του διαλύματος ταυτόχρονα με την απονιτροποίηση. Ο βιολογικός αντιδραστήρας καταφέρνει να διατηρήσει σταθερή την απόδοσή του σε εισροή όξινων και ελαφρά αλκαλικών αποβλήτων. Η αναγωγή των νιτρικών προς αέριο άζωτο είναι δυνατή για εύρος pH μεταξύ των τιμών 3.0 και 8.0.

Η επίδραση της αλατότητας στην απονιτροποίηση μελετήθηκε πειραματικά σε εύρος από 5% έως 10%. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι ο βιολογικός αντιδραστήρας επιτυγχάνει πλήρη αναγωγή των νιτρικών ιόντων προς αέριο άζωτο, καθώς και εξουδετέρωση των όξινων υγρών αποβλήτων, ανεξάρτητα από την τιμή της αλατότητας.

Τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης για την επίδραση των μετάλλων Zn, Cu, Fe και Ni στην απονιτροποίηση δείχνουν ότι το σύστημα αποδίδει ικανοποιητικά όχι μόνο παρουσία των μετάλλων αυτών μεμονωμένα έως 100 mg/L, αλλά ακόμα και με την ταυτόχρονη παρουσία τους σε συγκεντρώσεις έως 50 mg/L.

Σχετικά με την παρουσία θειικών ιόντων στο θρεπτικό μέσο, τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι θα μπορούσαν να προστίθενται σε ποσότητες της τάξης των 200 mg/L-300 mg/L, διότι υποβοηθούν τη βιοκαταβύθιση του νικελίου. Η παρουσία τους στο θρεπτικό μέσο σε συγκεντρώσεις 2 g/L επιβραδύνουν, αλλά δεν αναχαιτίζουν την απονιτροποίηση.

Ο λόγος C/N είναι δυνατόν να ελαττωθεί από την τιμή 5.18 g C/g NO₃⁻-N (αρχικά συνιστώμενη στο θρεπτικό μέσο) στην τιμή 3.11 g C/g NO₃⁻-N, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του βιολογικού αντιδραστήρα. Για την τιμή αυτή, η καλλιέργεια *Halomonas denitrificans* είναι ικανή να ανάγει πλήρως νιτρικά ιόντα σε αρχικές συγκεντρώσεις έως 14 000 mg/L, επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα απομάκρυνση του ψευδαργύρου, του χαλκού και του σιδήρου από το διάλυμα, μέσω βιοκαταβύθισης στην κλίση του αντιδραστήρα.

8.1.3 Δυνατότητες του συστήματος να λειτουργεί αποδοτικά παρουσία διαλυτών ειδών μετάλλων και να τα απομακρύνει μέσω βιοκαταβύθισης

Οι πειραματικές δοκιμές για τη μελέτη της επίδρασης του λόγου C/N και της αρχικής συγκέντρωσης νιτρικών στην απονιτροποίηση, καθώς και αυτές που αντιστοιχούν στα πραγματικά απόβλητα που προέρχονται από πιλοτικές δοκιμές υδρομεταλλουργικής ανάκτησης βασικών και πολύτιμων μετάλλων σε ΠΤΚ, έγιναν παρουσία μετάλλων. Το σύνολο των αποτελεσμάτων επιβεβαίωσε ότι τα μέταλλα στις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν δεν αναχαιτίζουν την απονιτροποίηση.

Όσον αφορά τους μηχανισμούς βιολογικής καταβύθισης των μετάλλων, το σύνολο των αποτελεσμάτων έδειξε ότι ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και ο σίδηρος απομακρύνονται από το διάλυμα σχηματίζοντας αδιάλυτα υδροξείδια και ανθρακικά άλατα των μετάλλων κατά την αναγωγή των νιτρικών.

Όταν στο ρεύμα τροφοδοσίας του βιολογικού αντιδραστήρα προστίθενται θειικά ιόντα, αποδείχθηκε πειραματικά ότι μέρος αυτών ανάγονται προς θειούχα. Τα θειούχα αυτά είναι διαθέσιμα για την καταβύθιση των διαλυτών ειδών των μετάλλων που μελετήθηκαν. Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι το νικέλιο είναι το μόνο από τα τέσσερα μέταλλα που μπορεί να συμπλοκοποιηθεί, τόσο από τα χλωριόντα που βρίσκονται σε υψηλή συγκέντρωση στο διάλυμα όσο και από οργανικά μόρια που περιέχονται σε αυτό. Αυτός είναι και ο λόγος που δεν καταβυθίζεται και εμφανίζεται συστηματικά στην εκροή του βιολογικού αντιδραστήρα. Αντίθετα, η καταβύθισή του και, κατά συνέπεια, η απομάκρυνσή του από το διάλυμα πραγματοποιείται μέσω του σχηματισμού θειούχου νικελίου, πράγμα που καθιστά απαραίτητη την προσθήκη θειικών στο θρεπτικό μέσο.

8.1.4 Διερεύνηση βελτιστοποίησης της διεργασίας χρησιμοποιώντας απλά οργανικά μόρια ως πηγή άνθρακα

Η πειραματική διερεύνηση χρήσης απλών μορίων ως πηγής άνθρακα πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια: αρχικά με την ανάπτυξη της βιολογικής καλλιέργειας σε πλαγκτονική μορφή και στη συνέχεια με την εισαγωγή των απλών αυτών μορίων στο θρεπτικό μέσο τροφοδοσίας του βιοαντιδραστήρα. Εξετάστηκαν ως πηγές άνθρακα εναλλακτικές της πεπτόνης το οξικό νάτριο και η αιθανόλη. Η βιομάζα αναπτύσσεται σε πλαγκτονική μορφή τόσο με οξικό νάτριο, όσο και με αιθανόλη.

Από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στον βιολογικό αντιδραστήρα με πηγή άνθρακα οξικό νάτριο και εκχύλισμα ζύμης φαίνεται ότι, ο συνδυασμός αυτός μπορεί να αποτελέσει δότη ηλεκτρονίων εναλλακτικό της πεπτόνης για την καλλιέργεια *Halomonas denitrificans*, χωρίς να επιβαρυνθεί η εκροή με υπολειμματικές συγκεντρώσεις νιτρικών και νιτρωδών ιόντων. Ο λόγος άνθρακα οξικού-εκχυλίσματος ζύμης και αζώτου νιτρικών (C/N), όταν το εκχύλισμα ζύμης συνεισφέρει σε αυτόν κατά 0.74 g C/g NO₃-N, μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 2.40 g C/g NO₃-N έως 5.18 g C/g NO₃-N, ενώ είναι δυνατόν να μειωθεί περαιτέρω.

Όσον αφορά την αιθανόλη, μπορεί να αντικαταστήσει την πεπτόνη ως δότη ηλεκτρονίων κατά την απονιτροποίηση, όταν η αναλογία άνθρακα και αζώτου νιτρικών είναι τουλάχιστον 1.11 g C/g NO₃-N και η τιμή αυτή είναι δυνατόν να μειωθεί περαιτέρω. Η μελέτη σχετικά με την επίδραση που έχει

η παρουσία εκχυλίσματος ζύμης στην απονιτροποίηση έδειξε ότι, η απονιτροποίηση ολοκληρώνεται ταχύτερα και συνοδεύεται από χαμηλότερες συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων κατά τη διάρκεια αυτής, όταν το εκχύλισμα ζύμης συνεισφέρει κατά 0.74 g C/g NO₃-N στην τιμή του λόγου C/N.

8.1.5 Μαθηματική προσομοίωση βιολογικής απονιτροποίησης παρουσία μετάλλων και υψηλών συγκεντρώσεων χλωριόντων

Τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν κατά τη λειτουργία του συστήματος με ένα πλήθος αρχικών τιμών των κύριων παραμέτρων, επέτρεψαν την προσομοίωση της βιολογικής επεξεργασίας συνθετικών αποβλήτων που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις νιτρικών, χλωριόντων και διαλυτών ειδών μετάλλων. Για την κατάστρωση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν τόσο αβιοτικές χημικές αντιδράσεις, όσο και σχέσεις που περιγράφουν τις βιοτικές διεργασίες, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη και, τελικά, σε αέριο άζωτο. Τα αποτελέσματα της μαθηματικής προσομοίωσης επιβεβαίωσαν ότι η μικροβιακή απονιτροποίηση μεταβάλλει τη σύσταση των αποβλήτων, γεγονός που έχει άμεση επίδραση στην κινητικότητα των μετάλλων. Μέταλλα όπως ο σίδηρος, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος, καθώς και μη τοξικά μέταλλα, όπως το ασβέστιο, απομακρύνονται από το διάλυμα με μηχανισμούς βιοκαταβύθισης. Η ακρίβεια του μοντέλου περιορίζεται από τις πληροφορίες που υπήρχαν διαθέσιμες και περιλαμβάνονται σε αυτό, σχετικά με την κινητική και την ισορροπία των αβιοτικών αντιδράσεων. Επιπλέον αβεβαιότητες θα μπορούσαν να αποδοθούν στις βιολογικές δράσεις, καθώς η διεργασία της απονιτροποίησης περιγράφεται από γενικές στοιχειομετρικές αντιδράσεις. Ωστόσο, το λογισμικό AQUASIM διευκολύνει την επέκταση του μοντέλου, καθώς επιτρέπει την προσομοίωση συγκεκριμένων πειραματικών διεργασιών, την ενσωμάτωση πρόσθετων βιολογικών ή φυσικών διεργασιών ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των δεδομένων, την προσαρμογή των παραμέτρων του μοντέλου σε πειραματικά δεδομένα και, τέλος, τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας των διεργασιών.

8.2 Προοπτικές

Με βάση τα συμπεράσματα της παρούσας Διατριβής, αλλά και τη διεθνή βιβλιογραφία, φαίνεται ότι το σύστημα που αναπτύχθηκε είναι κατάλληλο για επεξεργασία υγρών ρευμάτων που είναι επιβαρυσμένα ταυτόχρονα με χλωριόντα, νιτρικά και διαλυτά είδη μετάλλων. Πέρα από την εφαρμογή που μελετήθηκε στην παρούσα Διατριβή, υπάρχει δυνατότητα ευρύτερης εφαρμογής

του, όπως για παράδειγμα σε νερά που προέρχονται από υποβαθμισμένους υπόγειους υδροφορείς και εμφανίζουν ανάλογα χαρακτηριστικά.

Η περαιτέρω μελέτη του συστήματος μικροβιακής απονιτροποίησης θα πρέπει να στοχεύει στη βελτιστοποίηση της λειτουργίας του, για αποδοτική και βιώσιμη εφαρμογή του σε κλίμακα μεγαλύτερη της πιλοτικής. Άλλες κύριες περιοχές μελέτης που μπορούν να δώσουν πληρέστερες απαντήσεις ως προς την εξασφάλιση της στιβαρότητας, αλλά και της βιωσιμότητας ενός τέτοιου συστήματος είναι:

- η πειραματική διερεύνηση απλών μορίων ως πηγών άνθρακα με ποσοτικό προσδιορισμό των συγκεκριμένων μορίων στους κύκλους λειτουργίας του συστήματος.
- Η περαιτέρω ανάπτυξη της μαθηματικής προσομοίωσης για το σύστημα του βιοαντιδραστήρα σταθερής κλίνης και ανοδικής ροής με εισαγωγή των αλληλεπιδράσεων σε επίπεδο βιολογικής στιβάδας μικροοργανισμών που σχηματίζεται στην κλίνη. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο μιας νέας Διδακτορικής Διατριβής.

Βιβλιογραφία

Εθνική Νομοθεσία

Εγκύκλιος 145447/2011 «Διευκρινίσεις σχετικά με την ορθή εφαρμογή της ΚΥΑ 45116/02-02-2011 (ΦΕΚ Β' 354/2011) «Καθορισμός μέτρων, όρων και διαδικασιών για την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων και άλλες διατάξεις»

Εγκύκλιος 1589/2011 «Διευκρινίσεις σχετικά με την ορθή εφαρμογή της ΚΥΑ 45116/02-02-2011 (ΦΕΚ Β' 354/2011) «Καθορισμός μέτρων, όρων και διαδικασιών για την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων και άλλες διατάξεις» μετά την έκδοση του Ν. 4014/2011 (ΦΕΚ 209/21-09-2011)»

Εγκύκλιος ΥΠΕΝ/ΔΙΠΑ/33038/2252/2022 «Παροχή διευκρινίσεων σχετικά με την εφαρμογή των διατάξεων του άρθρου 5 παρ. 3 του Ν. 4819/2021 (Α 129)»

ΚΥΑ 100079/2015 (ΦΕΚ 135Β/22-1-2015) «Τροποποίηση της υπ' αριθμ. 20488/2010 κοινής υπουργικής απόφασης «Καθορισμός Ποιοτικών Περιβαλλοντικών Προτύπων στον ποταμό Ασωπό και Οριακών Τιμών Εκπομπών υγρών βιομηχανικών αποβλήτων στη λεκάνη απορροής του Ασωπού (Β' 749)» και συναφείς διατάξεις»

ΚΥΑ 106253/2010 (ΦΕΚ 1843/Β/24-11-2010) «Συμπλήρωση της οικ. 19652/1906/1999 κοινής υπουργικής απόφασης με θέμα «Προσδιορισμός των νερών που υφίστανται νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης-Κατάλογος ευπρόσβλητων ζωνών, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2 αντίστοιχα του άρθρου 4 της υπ' αριθμ. 16190/1335/1997 κοινής υπουργικής απόφασης» (Β' 519), όπως αυτή τροποποιήθηκε και ισχύει»

ΚΥΑ 145116/2011 (ΦΕΚ 354Β/8-3-2011) «Καθορισμός μέτρων, όρων και διαδικασιών για την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων και άλλες διατάξεις»

ΚΥΑ 147070/2014 (ΦΕΚ 3224Β/2-12-2014) «Τροποποίηση του άρθρου 2 της 19652/1906/1999 κοινής υπουργικής απόφασης «Προσδιορισμός των νερών που υφίστανται νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης – Κατάλογος ευπρόσβλητων ζωνών, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2 αντίστοιχα του άρθρου 4 της υπ' αριθμ. 16190/1335/1997 κοινής υπουργικής απόφασης» (Β' 519), όπως αυτή τροποποιήθηκε και ισχύει»

ΚΥΑ 16190/1335/1997 (ΦΕΚ 519Β/25-6-1997) «Μέτρα και όροι για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης»

- ΚΥΑ 170766/2016 (ΦΕΚ 69B/22-1-2016) «Τροποποίηση της υπ' αριθ. 51354/2641/Ε103/2010 κοινής υπουργικής απόφασης (Β' 1909), σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της οδηγίας 2013/39/ΕΕ «για την τροποποίηση των οδηγιών 2000/60/ΕΚ και 2008/105/ΕΚ όσον αφορά τις ουσίες προτεραιότητας στον τομέα της πολιτικής των υδάτων» του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 12ης Αυγούστου 2013 και άλλες συναφείς διατάξεις»»
- ΚΥΑ 181627/1185/2016 (ΦΕΚ 2494Α/12-8-2016) «Τροποποίηση του Παραρτήματος ΙΙ της Ενότητας Β' του άρθρου 60 του Ν.4042/2012 (Α'24), σε συμμόρφωση με την οδηγία 2015/1127/ΕΕ «για την τροποποίηση του παραρτήματος ΙΙ της οδηγίας 2008/98/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για τα απόβλητα και την κατάργηση ορισμένων οδηγιών» της Ευρωπαϊκής Επιτροπής της 10ης Ιουλίου 2015 και άλλες συναφείς διατάξεις»
- ΚΥΑ 182314/1241/2016 (ΦΕΚ 2888B/12-9-2016) «Τροποποίηση του Παραρτήματος ΙΙ του άρθρου 8 της υπ' αριθ. 39626/2208/2009 κοινής υπουργικής απόφασης (Β'2075), σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της οδηγίας 2014/80/ΕΕ «για την τροποποίηση του παραρτήματος ΙΙ της οδηγίας 2006/118/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σχετικά με την προστασία των υπόγειων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση» της Ευρωπαϊκής Επιτροπής της 20ης Ιουνίου 2014»
- ΚΥΑ 190126/2013 (ΦΕΚ 983B/23-4-2013) «Τροποποίηση του άρθρου 2 της 19652/1906/1999 κοινής υπουργικής απόφασης «Προσδιορισμός των νερών που υφίστανται νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης – Κατάλογος ευπρόσβλητων ζωνών, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2 αντίστοιχα του άρθρου 4 της υπ' αριθμ. 16190/1335/1997 κοινής υπουργικής απόφασης» (Β' 519), όπως αυτή τροποποιήθηκε και ισχύει»
- ΚΥΑ 191002/2013 (ΦΕΚ 2220B/9-9-2013) «Τροποποίηση της υπ' αριθ. 145116/2011 κοινής υπουργικής απόφασης «Καθορισμός μέτρων, όρων και διαδικασιών για την επαναχρησιμοποίηση επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων (Β' 354) και συναφείς διατάξεις»
- ΚΥΑ 19652/1906/1999 (ΦΕΚ 1575B/5-8-1999) «Προσδιορισμός των νερών που υφίστανται νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης-Κατάλογος ευπρόσβλητων ζωνών, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2 αντίστοιχα του άρθρου 4 της υπ' αριθμ. 16190/1335/1997 κοινής Υπουργικής Απόφασης «Μέτρα και όροι για την προστασία των νερών από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης (Β'519). Τροποποίηση των άρθρων 3, 4, 5 και 8 της απόφασης αυτής»
- ΚΥΑ 19661/1982/1999 (ΦΕΚ 1811B/29-9-1999) «Τροποποίηση της 5673/400/1997 κοινής Υπουργικής Απόφασης «Μέτρα και όροι για την επεξεργασία αστικών λυμάτων» (Β'192)- Κατάλογος ευαίσθητων περιοχών για την διάθεση αστικών λυμάτων σύμφωνα με το άρθρο 5 (παρ. 1) της απόφασης αυτής»

- ΚΥΑ 20419/2522/2001 (ΦΕΚ 1212Β/18-9-2001) «Συμπλήρωση της οικ. 19652/1906/1999 κοινής Υπουργικής Απόφασης με θέμα «Προσδιορισμός των νερών που υφίστανται νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης-Κατάλογος ευπρόσβλητων ζωνών, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2 αντίστοιχα του άρθρου 4 της υπ' αριθμ. 16190/1335/1997 κοινής Υπουργικής Απόφασης «Μέτρα και όροι για την προστασία των νερών από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης (Β'519). Τροποποίηση των άρθρων 3, 4, 5 και 8 της απόφασης αυτής (Β'575)»
- ΚΥΑ 24838/1400/Ε103/2008 (ΦΕΚ 1132Β/19-6-2008) «Τροποποίηση του άρθρου 2 (παραγ. Β) της υπ' αριθμ. 19652/1906/1999 κοινής υπουργικής απόφασης «Προσδιορισμός των νερών που υφίστανται νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης- Κατάλογος ευπρόσβλητων ζωνών, σύμφωνα με τις παραγράφους 1 και 2 αντίστοιχα του άρθρου 4 της υπ' αριθμ. 16190/1335/1997 κοινής υπουργικής απόφασης αυτής» (Β' 1575), όπως ισχύει»
- ΚΥΑ 34062/957/Ε103/2015 (ΦΕΚ 1793Β/20-8-2015) «Έγκριση Μεταβατικού Εθνικού Σχεδίου Μείωσης των Εκπομπών (ΜΕΣΜΕ), σύμφωνα με το άρθρο 28 της υπ' αριθμ. 36060/1155/2013 κοινής υπουργικής απόφασης «Καθορισμός πλαισίου κανόνων, μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη πρόληψη και τον έλεγχο της ρύπανσης του περιβάλλοντος από βιομηχανικές δραστηριότητες, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 2010/75/ΕΕ «περί βιομηχανικών εκπομπών (ολοκληρωμένη πρόληψη και έλεγχος της ρύπανσης)» του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 24ης Νοεμβρίου 2010» (Β' 1450), όπως ισχύει. Τροποποίηση της υπ' αριθμ. 36060/1155/2013 κοινής υπουργικής απόφασης (Β' 1450)»
- ΚΥΑ 36060/1155/Ε103/2013 (ΦΕΚ 1450Β/14-6-2013) «Καθορισμός πλαισίου κανόνων, μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη πρόληψη και τον έλεγχο της ρύπανσης του περιβάλλοντος από βιομηχανικές δραστηριότητες, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 2010/75/ΕΕ»
- ΚΥΑ 39626/2208/Ε130/2009 (ΦΕΚ 2075Β/25-9-2009) «Καθορισμός μέτρων για την προστασία των υπόγειων νερών από την ρύπανση και την υποβάθμιση, σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της οδηγίας 2006/118/ ΕΚ»
- ΚΥΑ 44105/1398/Ε103/2013 (ΦΕΚ 1890Β/1-8-2013) «Τροποποίηση της αριθ. 29459/1510/2005 Κοινής Υπουργικής Απόφασης «Καθορισμός εθνικών ανωτάτων ορίων εκπομπών για ορισμένους ατμοσφαιρικούς ρύπους» (Β' 992) και (Β' 1131), όπως τροποποιήθηκε με την αριθ. 14849/853/2008 ΚΥΑ (Β' 645) και της αριθ. 33318/3028/1998 Κοινής Υπουργικής Απόφασης « Καθορισμός μέτρων και διαδικασιών για τη διατήρηση των φυσικών οικοτόπων (ενδιαιτημάτων) καθώς και της άγριας πανίδας και χλωρίδας (Β' 1289), όπως τροποποιήθηκε με την αριθ. 14849/853/2008 ΚΥΑ (Β' 645), σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της οδηγίας

2013/17/ΕΕ του Συμβουλίου της 13ης Μαΐου 2013 της Ευρωπαϊκής Ένωσης και άλλες διατάξεις»

ΚΥΑ 48392/939/2002 (ΦΕΚ 405Β/3-4-2002) «Συμπλήρωση της 19661/1982/1999 κοινής υπουργικής απόφασης «Τροποποίηση της 5673/400/1997 κοινής υπουργικής απόφασης ... κλπ (Β'122) Κατάλογος ευαίσθητων περιοχών για τη διάθεση αστικών λυμάτων σύμφωνα με το άρθρο 5 (παρ. 1) της απόφασης αυτής (Β'1811) και ειδικότερα του άρθρου 2 (παραγ. Β) αυτής»

ΚΥΑ 48416/2037/Ε103 (ΦΕΚ 2516Β/7-11-2011) «Μέτρα και όροι για την αποθήκευση διοξειδίου του άνθρακα σε γεωλογικούς σχηματισμούς–Τροποποίηση της υπ' αριθμ. 29457/1511/2005 (Β' 992) κοινής υπουργικής απόφασης, του Π.Δ. 51/2007 (Α' 54) και του Π.Δ. 148/2009 (Α' 190), σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 2009/31/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 23ης Απριλίου 2009 «σχετικά με την αποθήκευση διοξειδίου του άνθρακα σε γεωλογικούς σχηματισμούς και για την τροποποίηση της Οδηγίας 85/337/ΕΟΚ του Συμβουλίου, των Οδηγιών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου 2000/60/ΕΚ, 2001/80/ΕΚ, 2004/35/ΕΚ και 2008/1/ΕΚ και του Κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1013/2006»

ΚΥΑ 51354/2641/Ε103 (ΦΕΚ 1909Β/8-12-2010) «Καθορισμός Προτύπων Ποιότητας Περιβάλλοντος (ΠΠΠ) για τις συγκεντρώσεις ορισμένων ρύπων και ουσιών προτεραιότητας στα επιφανειακά ύδατα, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 2008/105/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 16ης Δεκεμβρίου 2008 «σχετικά με Πρότυπα Ποιότητας Περιβάλλοντος (ΠΠΠ) στον τομέα της πολιτικής των υδάτων και σχετικά με την τροποποίηση και μετέπειτα κατάργηση των οδηγιών του Συμβουλίου 82/176/ΕΟΚ, 83/513/ΕΟΚ, 84/156/ΕΟΚ, 84/491/ΕΟΚ και 86/280/ΕΟΚ και την τροποποίηση της οδηγίας 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου», καθώς και για τις συγκεντρώσεις ειδικών ρύπων στα εσωτερικά επιφανειακά ύδατα και άλλες διατάξεις»

ΚΥΑ 5673/400/1997 (ΦΕΚ 192Β/14-3-1997) «Μέτρα και όροι για την επεξεργασία αστικών λυμάτων»

ΚΥΑ ΥΠΕΝ/ΓρεΓΥ/38552/265/2019 (ΦΕΚ 1496Β/3-5-2019) «Πρόγραμμα Δράσης περιοχών που έχουν χαρακτηρισθεί ως ευπρόσβλητες ζώνες από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης»

ΚΥΑ ΥΠΕΝ/ΔΔΕΔ/46424/1134/2021 (ΦΕΚ 2185Α/26-5-2021) «Τροποποίηση της υπ' αρ. 36060/1155/13.6.2013 κοινής υπουργικής απόφασης με θέμα: «Καθορισμός πλαισίου κανόνων, μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη πρόληψη και τον έλεγχο της ρύπανσης του περιβάλλοντος από βιομηχανικές δραστηριότητες, σε συμμόρφωση προς τις διατάξεις της οδηγίας 2010/75/ΕΕ “περί βιομηχανικών εκπομπών (ολοκληρωμένη πρόληψη

- και έλεγχος της ρύπανσης)» του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 24ης Νοεμβρίου 2010» (Β' 1450), όπως ισχύει»
- Νόμος 3199/2003 (ΦΕΚ 280Α/9-12-2003) «Προστασία και διαχείριση των υδάτων»
- Νόμος 3481/2003 (ΦΕΚ 162Α/2-8-2006) «Τροποποιήσεις στη νομοθεσία για το Εθνικό Κτηματολόγιο, την ανάθεση και εκτέλεση συμβάσεων έργων και μελετών και άλλες διατάξεις»
- Νόμος 4315/2014 (ΦΕΚ 269Α/24-12-2014) «Πράξεις εισφοράς σε γη και σε χρήμα – Ρυμοτομικές απαλλοτριώσεις και άλλες διατάξεις»
- Νόμος 4342/2015 (ΦΕΚ 143Α/9-11-2015) «Συνταξιοδοτικές ρυθμίσεις, ενσωμάτωση στο Ελληνικό Δίκαιο της Οδηγίας 2012/27/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 25ης Οκτωβρίου 2012 «Για την ενεργειακή απόδοση, την τροποποίηση των Οδηγιών 2009/125/ΕΚ και 2010/30/ΕΕ και την κατάργηση των Οδηγιών 2004/8/ΕΚ και 2006/32/ΕΚ», όπως τροποποιήθηκε από την Οδηγία 2013/12/ΕΕ του Συμβουλίου της 13ης Μαΐου 2013 «Για την προσαρμογή της Οδηγίας 2012/27/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για την ενεργειακή απόδοση, λόγω της προσχώρησης της Δημοκρατίας της Κροατίας» και άλλες διατάξεις»
- Νόμος 4351/2015 (ΦΕΚ 164Α/4-12-2015) «Βοσκήσιμες γαίες Ελλάδα και άλλες διατάξεις»
- Νόμος 4519/2018 (ΦΕΚ 25Α/20-2-2018) «Φορείς Διαχείρισης Προστατευόμενων Περιοχών και άλλες διατάξεις»
- Νόμος 4685/2020 (ΦΕΚ 92Α/7-5-2020) «Εκσυγχρονισμός περιβαλλοντικής νομοθεσίας, ενσωμάτωση στην ελληνική νομοθεσία των Οδηγιών 2018/844 και 2019/692 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου και λοιπές διατάξεις»
- Νόμος 4819/2021 (ΦΕΚ 129Α/23-7-2021) «Ολοκληρωμένο πλαίσιο για τη διαχείριση των αποβλήτων-Ενσωμάτωση των Οδηγιών 2018/851 και 2018/852 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 30ής Μαΐου 2018 για την τροποποίηση της Οδηγίας 2008/98/ΕΚ περί αποβλήτων και της Οδηγίας 94/62/ΕΚ περί συσκευασιών και απορριμμάτων συσκευασιών, πλαίσιο οργάνωσης του Ελληνικού Οργανισμού Ανακύκλωσης, διατάξεις για τα πλαστικά προϊόντα και την προστασία του φυσικού περιβάλλοντος, χωροταξικές - πολεοδομικές, ενεργειακές και συναφείς επείγουσες ρυθμίσεις»
- Νόμος 4843/2021 (ΦΕΚ 193Α/ 20-10-2021) «Ενσωμάτωση της Οδηγίας (ΕΕ) 2018/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 11ης Δεκεμβρίου 2018 «σχετικά με την τροποποίηση της Οδηγίας 2012/27/ΕΕ για την ενεργειακή απόδοση», προσαρμογή στον Κανονισμό 2018/1999/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 11ης

Δεκεμβρίου 2018 σχετικά με τη διακυβέρνηση της Ενεργειακής Ένωσης και της Δράσης για το Κλίμα και στον κατ' εξουσιοδότηση Κανονισμό 2019/826/ΕΕ της Επιτροπής, της 4ης Μαρτίου 2019, «για την τροποποίηση των Παραρτημάτων VIII και IX της Οδηγίας 2012/27/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σχετικά με το περιεχόμενο των περιεκτικών αξιολογήσεων του δυναμικού αποδοτικής θέρμανσης και ψύξης» και συναφείς ρυθμίσεις για την ενεργειακή απόδοση στον κτιριακό τομέα, καθώς και την ενίσχυση των Ανανεώσιμων Πηγών Ενέργειας και του ανταγωνισμού στην αγορά ηλεκτρικής ενέργειας, και άλλες επείγουσες διατάξεις»

Νόμος 4964/2022 (ΦΕΚ (150Α/30-7-2022) «Διατάξεις για την απλοποίηση της περιβαλλοντικής αδειοδότησης, θέσπιση πλαισίου για την ανάπτυξη των Υπεράκτιων Αιολικών Πάρκων, την αντιμετώπιση της ενεργειακής κρίσης, την προστασία του περιβάλλοντος και λοιπές διατάξεις»

Νόμος 5037/2023 (ΦΕΚ 78Α/28-3-2023) «Μετονομασία της Ρυθμιστικής Αρχής Ενέργειας σε Ρυθμιστική Αρχή Αποβλήτων, Ενέργειας και Υδάτων και διεύρυνση του αντικειμένου της με αρμοδιότητες επί των υπηρεσιών ύδατος και της διαχείρισης αστικών αποβλήτων, ενίσχυση της υδατικής πολιτικής-Εκσυγχρονισμός της νομοθεσίας για τη χρήση και παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές μέσω της ενσωμάτωσης των Οδηγιών ΕΕ 2018/2001 και 2019/944-Ειδικότερες διατάξεις για τις ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και την προστασία του περιβάλλοντος»

ΠΔ 51/2007 (ΦΕΚ 54Α/8-3-2007) «Καθορισμός μέτρων και διαδικασιών για την ολοκληρωμένη προστασία και διαχείριση των υδάτων σε συμμόρφωση με τις διατάξεις της Οδηγίας 2000/60/ΕΚ»

ΥΑ 1420/82031/2015 «Κώδικας ορθής γεωργικής πρακτικής για την Προστασία των Νερών από τη Νιτρορρύπανση Γεωργικής Προέλευσης»

ΥΑ 1848/278812/2021 (ΦΕΚ 4855Β/20-10-2021) «Κώδικας Ορθής Γεωργικής Πρακτικής για την Προστασία των Νερών από τη Νιτρορρύπανση Γεωργικής Προέλευσης»

Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Απόφαση αριθ. 2455/2001/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 20^{ης} Νοεμβρίου 2001, για τη θέσπιση του καταλόγου ουσιών προτεραιότητας στον τομέα της πολιτικής των υδάτων και τροποποίησης της οδηγίας 2000/60/ΕΚ

ΕΕ L 158 του 2012, διορθωτικό ης Οδηγίας 2010/75/ΕΕ (19.6.2012)

EE L 237 του 2016, διορθωτικό ης Οδηγίας 91/271/ΕΟΚ (3.9.2016)

Κανονισμός αριθμ. 1137/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 22^{ης} Οκτωβρίου 2008, για την προσαρμογή στην απόφαση 1999/468/ΕΚ του Συμβουλίου ορισμένων πράξεων που υπόκεινται στη διαδικασία του άρθρου 251 της συνθήκης, όσον αφορά την κανονιστική διαδικασία με έλεγχο — Προσαρμογή στην κανονιστική διαδικασία με έλεγχο — Μέρος Ι

Κανονισμός αριθμ. 1882/2003 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 29^{ης} Σεπτεμβρίου 2003, περί προσαρμογής στην απόφαση 1999/468/ΕΚ του Συμβουλίου των διατάξεων των σχετικών με τις επιτροπές που επικουρούν την Επιτροπή στην άσκηση των εκτελεστικών αρμοδιοτήτων της, οι οποίες προβλέπονται από πράξεις υποκείμενες στη διαδικασία του άρθρου 251 της συνθήκης ΕΚ

Οδηγία 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 23^{ης} Οκτωβρίου 2000, για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων

Οδηγία 2006/118/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 12^{ης} Δεκεμβρίου 2006, σχετικά με την προστασία των υπογείων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση»

Οδηγία 2008/105/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16^{ης} Δεκεμβρίου 2008, σχετικά με πρότυπα ποιότητας περιβάλλοντος στον τομέα της πολιτικής των υδάτων καθώς και σχετικά με την τροποποίηση και τη συνακόλουθη κατάργηση των οδηγιών του Συμβουλίου 82/176/ΕΟΚ, 83/513/ΕΟΚ, 84/156/ΕΟΚ, 84/491/ΕΟΚ και 86/280/ΕΟΚ και την τροποποίηση της οδηγίας 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου

Οδηγία 2008/32/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 11^{ης} Μαρτίου 2008, για την τροποποίηση της οδηγίας 2000/60/ΕΚ για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, όσον αφορά τις εκτελεστικές αρμοδιότητες που ανατίθενται στην Επιτροπή

Οδηγία 2009/31/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 23^{ης} Απριλίου 2009, σχετικά με την αποθήκευση διοξειδίου του άνθρακα σε γεωλογικούς σχηματισμούς και για την τροποποίηση της οδηγίας 85/337/ΕΟΚ του Συμβουλίου, των οδηγιών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου 2000/60/ΕΚ, 2001/80/ΕΚ, 2004/35/ΕΚ, 2006/12/ΕΚ και 2008/1/ΕΚ, και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1013/2006

Οδηγία 2010/75/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 24^{ης} Νοεμβρίου 2010, περί βιομηχανικών εκπομπών (ολοκληρωμένη πρόληψη και έλεγχος της ρύπανσης) (αναδιατύπωση)

Οδηγία 2012/19/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 4^{ης} Ιουλίου 2012 , σχετικά με τα απόβλητα ηλεκτρικού και ηλεκτρονικού εξοπλισμού (ΑΗΗΕ) (αναδιατύπωση)

Οδηγία 2013/39/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 12^{ης} Αυγούστου 2013, για την τροποποίηση των οδηγιών 2000/60/ΕΚ και 2008/105/ΕΚ όσον αφορά τις ουσίες προτεραιότητας στον τομέα της πολιτικής των υδάτων

Οδηγία 2013/64/ΕΕ του Συμβουλίου, της 17^{ης} Δεκεμβρίου 2013 , των οδηγιών 91/271/ΕΟΚ, 1999/74/ΕΚ του Συμβουλίου και των οδηγιών 2006/7/ΕΚ, 2006/25/ΕΚ και 2011/24/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου λόγω της αλλαγής του καθεστώτος της Μαγιότ έναντι της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Οδηγία 2014/101/ΕΕ της Επιτροπής, της 30^{ης} Οκτωβρίου 2014, για την τροποποίηση της οδηγίας 2000/60/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων

Οδηγία 2014/80/ΕΕ της Επιτροπής, της 20ης Ιουνίου 2014 , για την τροποποίηση του παραρτήματος ΙΙ της οδηγίας 2006/118/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σχετικά με την προστασία των υπόγειων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση

Οδηγία 2020/2184/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 16^{ης} Δεκεμβρίου 2020, σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης (αναδιατύπωση)

Οδηγία 75/440/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 16^{ης} Ιουνίου 1975, περί της απαιτούμενης ποιότητας των υδάτων επιφάνειας που προορίζονται για την παραγωγή ποσίμου ύδατος στα κράτη μέλη

Οδηγία 76/464/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 4^{ης} Μαΐου 1976, περί ρυπάνσεως που προκαλείται από ορισμένες επικίνδυνες ουσίες που εκχέονται στο υδάτινο περιβάλλον της Κοινότητας

Οδηγία 80/68/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 17^{ης} Δεκεμβρίου 1979, περί προστασίας των υπογείων υδάτων από τη ρύπανση που προέρχεται από ορισμένες επικίνδυνες ουσίες

Οδηγία 80/778/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 15^{ης} Ιουλίου 1980, περί της ποιότητας του πόσιμου νερού

Οδηγία 91/271/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 21^{ης} Μαΐου 1991, για την επεξεργασία των αστικών λυμάτων

Οδηγία 91/676/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 12^{ης} Δεκεμβρίου 1991, για την προστασία των υδάτων από τη νιτρορρύπανση γεωργικής προέλευσης

Οδηγία 92/82/ΕΚ του Συμβουλίου, της 22^{ας} Δεκεμβρίου 1994, για την τροποποίηση της οδηγίας 92/12/ΕΟΚ σχετικά με το γενικό καθεστώς, την κατοχή, την κυκλοφορία και τους ελέγχους των προϊόντων που υπόκεινται σε ειδικούς φόρους κατανάλωσης, της οδηγίας 92/81/ΕΟΚ για την εναρμόνιση των διαρθρώσεων των ειδικών φόρων κατανάλωσης που επιβάλλονται στα

πετρελαιοειδή καθώς και της οδηγίας 92/82/ΕΟΚ για την προσέγγιση των συντελεστών των ειδικών φόρων κατανάλωσης στα πετρελαιοειδή

Οδηγία 98/83/ΕΚ του Συμβουλίου, της 3^{ης} Νοεμβρίου 1998, σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης

Ελληνική Βιβλιογραφία

Αγγελής Γ., *Μικροβιολογία και Μικροβιακή Τεχνολογία*, 2^η Έκδοση, UNIBOOKS, Αθήνα, 2017

Όξενκιουν-Πετροπούλου Μ., *Φασματοφωτομετρικές Μέθοδοι*, 3^η Έκδοση, Εκδόσεις Συμμετρία, 2012

Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

Abascal E., Gómez-Coma L., Ortiz I. & Ortiz A., Global diagnosis of nitrate pollution in groundwater and review of removal technologies, *Science of the Total Environment*, Volume 810, 2022 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152233)

Adimalla N. & Qian H., Groundwater quality evaluation using water quality index (WQI) for drinking purposes and human health risk (HHR) assessment in an agricultural region of Nanganur, south India, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 176, pages 153-161, 2019 (DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.066)

Æsøy A. & Ødegaard H., Denitrification in biofilms with biologically hydrolysed sludge as carbon source, *Water Science and Technology*, Volume 29, Issue 10-11, pages 93-100, 1994

Æsøy A., Ødegaard H., Bach K., Pujol R. & Hamon M., Denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR)-Experiments with different carbon sources, *Water Research*, Volume 32, Issue 5, pages 1463-1470, 1998

Akcil A., Erust C., Gahan C. S., Ozgun M., Sahin M. & Tuncuk A., Precious metal recovery from waste printed circuit boards using cyanide and non-cyanide lixiviants – A review, *Waste Management*, 2015 (DOI: 10.1016/j.wasman.2015.01.017)

Akunna J. C., Bizeau C. & Moletta R., Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: glucose, glycerol, acetic acid, lactic-acid and methanol, *Water Research*, Volume 27, Issue 8, pages 1303-1312, 1993

Albina P., Durban N., Bertron A., Albrecht A., Robinet J.-C. & Erable B., Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review,

International Journal of Molecular Sciences, Volume 20, Issue 5163, 2019
(DOI: 10.3390/ijms20205163)

Almasri M., Nitrate contamination of groundwater: A conceptual management framework, *Environmental Impact Assessment Review*, Volume 27, pages 220–242, 2007
(DOI: 10.1016/j.eiar.2006.11.002)

Al-Qudah K. M., Rousan L. M. & Ereifej K.I., Nitrate/nitrite poisoning in dairy cattle associated with consumption of forages irrigated with municipally treated wastewater, *Toxicological & Environmental Chemistry*, Volume 91, Issue1, pages 163-170, 2009
(DOI: 10.1080/02772240802051205)

Alquier M., Kassim C., Bertron A., Sablayrolles C., Rafrafi Y., Albrecht A. & Erable B., *Halomonas desiderata* as a bacterial model to predict the possible biological nitrate reduction in concrete cells of nuclear waste disposals, *Journal of Environmental Management*, Volume 132, pages 32-41, 2014 (DOI: 10.1016/j.jenvman.2013.10.013)

Arbuckle T., Sherman G., Corey P., Walters D. & Lo B., Water nitrates and CNS birth defects: A population-based case-control study, *Archives of Environmental Health: An International Journal*, Volume 43, Issue 2, pages 162-167, 1988 (DOI: 10.1080/00039896.1988.9935846)

Archna, Sharma S. K. & Sobti R. C., Nitrate Removal from Ground Water: A Review, *E-Journal of Chemistry*, Volume 9, Issue 4, pages, 1667-1675, 2012 (DOI: 10.1155/2012/154616)

Arshadi M., Yaghmaei S. & Mousavi S.M., Content evaluation of different waste PCBs to enhance basic metals recycling, *Resources, Conservation & Recycling*, Volume 139, pages 298–306, 2018 (DOI: 10.1016/j.resconrec.2018.08.013)

Babiker I. S., Mohamed M. A. A., Terao H., Kato K. & Ohta K., Assessment of groundwater contamination by nitrate leaching from intensive vegetable cultivation using geographical information system, *Environment International*, Volume 29, pages 1 009-1 017, 2004
(DOI: 10.1016/S0160-4120(03)00095-3)

Baird R., Eaton A. & Rice. E., *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 23rd edition, 1 796 pages, American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF), Washington USA, 2017

Bao Z., Hu Q., Qi W., Tang Y., Wang W., Wan P., Chao J. & Yang X. J., Nitrate reduction in water by aluminum alloys particles, *Journal of Environmental Management*, Volume 196, pages 666-673, 2017 (DOI: 10.1016/j.jenvman.2017.03.080)

Barker J. C. & Zublena J. P., Livestock manure nutrient assessment in North Carolina, *Proceedings of the 7th International Symposium on Agricultural Wastes*, Illinois, Chicago, 1995

- Barlindhaug & Ødegaard, Thermal hydrolysate as a carbon source for denitrification, *Water Science and Technology*, Volume 33, Issue 12, pages 99-108, 1996
- Beauchamp E.G., Trevorst J. T.& Paul J. W., Carbon sources for bacterial denitrification, *Advances in Soil Science*, Volume 10, 1989
- Beccari M., Passino R., Ramadori R. & Tandoi V., Kinetics of dissimilatory nitrate and nitrite reduction in suspended growth culture, *Journal of the Water Pollution Control Federation*, Volume 55, Issue 1, pages 58-64, 1983
- Berendes F., Goitcshalk G., Heine-Dobbernack E., Moore E. R. B & Tindal B., *Halomonas desiderata* sp. nov., a new alkaliphilic, halotolerant and denitrifying bacterium isolated from a municipal sewage works, *Systematic and Applied Microbiology*, Volume 19, pages 158-167, 1996
- Besson S., Almeida M. G. & Silveira C. M., Nitrite reduction in bacteria: A comprehensive view of nitrite reductases, *Coordination Chemistry Reviews*, Volume 464, 2022
- Bharati S. S. & Shinkar N. P., Dairy Industry Wastewater Sources, Characteristics and its Effects on Environment, *International Journal of Current Engineering and Technology*, Volume 3, Issue 5, 2013
- Bilanovic D., Battistoni P., Cecchi F., Pavan P. & Mata-Alvarez J., Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions, *Water Research*, Volume 33, Issue 15, pages 3 311-3 320, 1999
- Birloaga I. & Vegliò F., Study of multi-step hydrometallurgical methods to extract the valuable content of gold, silver and copper from waste printed circuit boards, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 4, pages 20–29, 2016 (DOI: 10.1016/j.jece.2015.11.021)
- Birloaga I. & Vegliò F., Overview on hydrometallurgical procedures for silver recovery from various wastes, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 6, Issue 2, pages 2 932-2 938, 2018 (DOI: 10.1016/j.jece.2018.04.040)
- Birloaga I. & Vegliò F., An innovative hybrid hydrometallurgical approach for precious metals recovery from secondary resources, *Journal of Environmental Management*, Volume 307, 2022 (DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.114567)
- Biswas T., Bhushan S., Prajapati S. K. & Chaudhuri S. R., An eco-friendly strategy for dairy wastewater remediation with high lipid microalgae-bacterial biomass production, *Journal of Environmental Management*, Volume 286, 2021 (DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.112196)
- Böhlke J. K., Wanty R., Tuttle M., Delin G. & Landon M., Denitrification in the recharge area and discharge area of a transient agricultural nitrate plume in a glacial outwash sand aquifer,

Minnesota, *Water Resources Research*, Volume 38, Issue 7, 2002
(DOI: 10.1029/2001wr000663)

Bollag J.-M. & Barabasz W., Effect of Heavy Metals on the Denitrification Process in Soil, *Journal of Environmental Quality*, Volume 8, Issue 2, 1979

Boningari T. & Smirniotis P., Impact of nitrogen oxides on the environment and human health: Mn-based materials for the NO_x abatement, *Current Opinion in Chemical Engineering*, Volume 13, pages 133-141, 2016 (DOI: 10.1016/j.coche.2016.09.004)

Bosman C., The hidden dragon: Nitrate pollution from open-pit mines – A case study from the Limpopo Province South Africa, *Proceedings of the International Mine Water Conference*, Pretoria, South Africa, 2009

Bouchotroch S., Quesada E., del Moral A., Llamas I. & Bejar V., *Halomonas maura* sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volume 51, pages 1625–1632, 2001 (DOI: 10.1099/00207713-51-5-1625)

Brender J. D., Weyer P. J., Romitti P. A., Mohanty B. P., Shinde M. U., Vuong A. M., Sharkey J. R., Dwivedi D., Horel S. A., Kantamneni J., Huber J. C., Zheng Q., Werler M. M., Kelley K. E., Griesenbeck J. S., Zhan F. B., Langlois P. H., Suarez L., Canfield M. A. & National Birth Defects Prevention Study, Prenatal nitrate intake from drinking water and selected birth defects in offspring of participants in the National Birth Defects Prevention Study, *Environmental Health Perspectives*, Volume 121, pages 1 083–1 089, 2013 (DOI: 10.1289/ehp.1206249)

Burghate S. P. & Ingole N. W., Biological denitrification – A Review, *Journal of Environmental Science, Computer Science and Engineering and Technology*, Volume 3, Issue 1, pages 9-28, 2013

Burkholder J. M., Mallin M. A., Glasgow H. B., Larsen L. M., Mclver M. R., Shank G. C., Deamer-Melia N., Briley D. S., Springer J., Touchette B. W. & Hannon E. K., Impacts to a Coastal River and Estuary from Rupture of a Large Swine Waste Holding Lagoon, *Journal of Environmental Quality*, Volume 26, pages 1 451-1 466, 1997

Burkholder J., Libra B., Weyer P., Heathcote S., Kolpin D., Thorne P. S. & Wichman M., Impacts of Waste from Concentrated Animal Feeding Operations on Water Quality, *Environmental Health Perspectives*, Volume 115, Issue 2, 2007 (DOI: 10.1289/ehp.8839)

Carrera J., Vicent T. & Lafuente F. J., Influence of temperature on denitrification of an industrial high-strength nitrogen wastewater in a two-sludge system, *Water SA*, Volume 29, Issue 1, 2003 (DOI: 10.4314/wsa.v29i1.4939)

- Chagnes A., Cote G., Ekberg C., Nilsson M. & Retegan T., *WEEE Recycling: Research, Development and Policies*, 1st Edition, Elsevier, Amsterdam, 2016 (DOI: 10.1016/B978-0-12-803363-0.00001-8)
- Chang C.-Y., Tanong K., Xu J. & Shon H., Microbial community analysis of an aerobic nitrifying-denitrifying MBR treating ABS resin wastewater, *Bioresource Technology*, Volume 102, pages 5337–5344, 2011 (DOI: 10.1016/j.biortech.2010.12.045)
- Charizopoulos N., Zagana E. & Psilovikos A., Assessment of natural and anthropogenic impacts in groundwater, utilizing multivariate statistical analysis and inverse distance weighted interpolation modeling: the case of a Scopia basin (Central Greece), *Environmental Earth Sciences*, Volume 77, 2018 (DOI: 10.1007/s12665-018-7564-6)
- Chen J., Wu H., & Qian H., Groundwater nitrate contamination and associated health risk for the rural communities in an agricultural area of Ningxia, Northwest China, *Exposure and Health*, Volume 8, Issue 3, pages 349–359, 2016 (DOI: 10.1007/s12403-016-0208-8)
- Chen Y., Wang Q., Zhao S., Yang W., Wang H. & Jia W., Removal of nutrients and emission of nitrous oxide during simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal process with metal ions addition, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 142, pages 143–150, 2019 (DOI: 10.1016/j.ibiod.2019.05.016)
- Cheng Y.-F., Zhang Q., Li G.-F., Xue Y., Zheng X.-P., Cai S., Zhang Z.-Z., & Jin R.-C., Long-term effects of copper nanoparticles on granule-based denitrification systems: Performance, microbial communities, functional genes and sludge properties, *Bioresource Technology*, Volume 289, 2019 (DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121707)
- Cherchi C., Onnis-Hayden A., El-Shawabkeh I. & Gu A. Z., Implication of using different carbon sources for denitrification in wastewater treatments, *Water Environment Research*, Volume 81, Issue 8, 2009 (DOI: 10.2175/106143009x12465435982610)
- China CDC (Chinese Center for Disease Control and Prevention), *National Standard of the People's Republic of China (GB 5749-2006)*, China, 2006
- Christensson M., Lie E. & Welander T., A comparison between ethanol and methanol as carbon sources for denitrification, *Water Science and Technology*, Volume 30, Issue 6, pages 83-90, 1994
- Coelho C. & Romão M. J., Structural and mechanistic insights on nitrate reductases, *Protein Science*, Volume 24, pages 1 901-1 911, 2015 (DOI: 10.1002/pro.2801)
- COM(2020) 474, *Communication from the Commission to the European parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: Critical Raw*

Materials Resilience: Charting a Path towards greater Security and Sustainability, Brussels, 2020

- Constantin H. & Fick M., Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater, *Water Research*, Volume 31, Issue 3, pages 583-589, 1997
- Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott H. M., *Microbial Biofilms*, *Annual Review of Microbiology*, Volume 49, pages 711-745, 1995
- Cyplik P., Marecik R., Piotrowska-Cyplik A., Olejnik A., Drożdżyńska A., & Chrzanowski Ł., Biological denitrification of high nitrate processing wastewaters from explosives production plant, *Water, Air and Soil Pollution*, Volume 223, pages 1 791–1 800, 2012 (DOI: 10.1007/s11270-011-0984-5)
- da Silva Peixoto F., Cavalcante I. N. & Gomes D. F., Influence of land use and sanitation issues on water quality of an urban aquifer, *Water Resources Management*, Volume 34, pages 653–674, 2020 (DOI: 10.1007/s11269-019-02467-6)
- Danecka-Bialek M. & Romka F., The effect of heavy metal ions on the activity of denitrifiers from *Bacillus* genus, *Environment Protection Engineering*, Volume 17, Issues 3-4, 1991
- de Sousa J. T., Santos K. D., Henrique I. N., Brasil D. P. & Santos E. C., Anaerobic digestion and the denitrification in UASB reactor, *Journal of Urban and Environmental Engineering*, Volume 2, Issue 2, pages 63-67, 2008 (DOI: 10.4090/juee.2008.v2n2.063067)
- Debernardi L., De Luca D. A. & Lasagna M., Correlation between nitrate concentration in groundwater and parameters affecting aquifer intrinsic vulnerability, *Environmental Geology*, Volume 55, pages 539–558, 2007 (DOI: 10.1007/s00254-007-1006-1)
- Deng D., Hu M., Li L. & Huang Y., Denitrifying microbial communities in heavy-metal-contaminated paddy soils near electronic-waste processing centers, *Water, Air and Soil Pollution*, Volume 229, 2018 (DOI: 10.1007/s11270-018-3974-z)
- Deng R., Huo P., Chen X., Chen Z., Yang L., Liu Y., Wei W. & Ni B.-J., Towards efficient heterotrophic recovery of N₂O via Fe(II)EDTA-NO: A modeling study, *Science of the Total Environment*, Volume 859, 2023 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.160285)
- Dermatas D., Mpouras T., Chrysochoou M., Panagiotakis I., Vatsaris C., Linardos N., Theologou E., Boboti N., Xenidis A., Papassiopi N. & Sakellariou L., Origin and concentration profile of chromium in a Greek aquifer, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 281, pages 35–46, 2015 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.09.050)

- DeSimone L. & Howes B., Nitrogen transport and transformations in a shallow aquifer receiving wastewater discharge: A mass balance approach, *Water Resources Research*, Volume 34, Issue 2, pages 271-285, 1998
- Di Capua F., Pirozzi F., Lens P. N. L. & Esposito G., Electron donors for autotrophic denitrification, *Chemical Engineering Journal*, Volume 362, pages 922–937, 2019 (DOI: 10.1016/j.cej.2019.01.069)
- Di Capua F., Iannaccone F., Sabba F. & Esposito G., Simultaneous nitrification–denitrification in biofilm systems for wastewater treatment: Key factors, potential routes, and engineered applications, *Bioresource Technology*, Volume 361, 2022 (DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127702)
- Do M. H., Nguyen G. T., Thach U. D., Lee Y. & Bui T. H., Advances in hydrometallurgical approaches for gold recovery from E-waste: A comprehensive review and perspectives, *Minerals Engineering*, Volume 191, 2023 (DOI: 10.1016/j.mineng.2022.107977)
- Dochain D. & Vanrolleghem P., *Dynamical Modelling and Estimation in Wastewater Treatment Processes*, IWA Publishing, London, 2001
- Dold P., Murthy S., Takacs I. & Bye C., Batch test method for measuring methanol utilizer maximum specific growth rate, *Proceedings of the Water Environment Federation*, Volume 9, pages 5 911-5 932, 2005 (DOI:10.2175/193864705783814871)
- dos Santos S. G., Amâncio Varesche M. B., Zaiat M. & Foresti E., Comparison of methanol, ethanol and methane as electron donors for denitrification, *Environmental Engineering Science*, Volume 21, Issue 3, pages 313-320, 2004 (DOI: 10.1089/109287504323066950)
- Dragon K., Groundwater nitrate pollution in the recharge zone of a regional Quaternary flow system (Wielkopolska region, Poland), *Environmental Earth Sciences*, Volume 68, pages 2 099–2 109, 2013 (DOI: 10.1007/s12665-012-1895-5)
- Dragon K., Identification of groundwater conditions in the recharge zone of regionally extended aquifer system with use of water chemistry and isotopes (Lwówek region, Poland), *Journal of Hydrology: Regional Studies*, Volume 34, 2021 (DOI: 10.1016/j.ejrh.2021.100787)
- Duarte N. C., Barbosa A. C. Magalhães T. M., Montagner C. C., de Oliveira Cruz L. M. & Tonetti A. L., Conventional anaerobic reactors applied to denitrification: a comparison between packed bed and UASB reactors under low COD conditions, *Water, Air and Soil Pollution*, Volume 232, 2021 (DOI: 10.1007/s11270-021-05009-2)
- Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H. & Stackebrandt E., *The Prokaryotes* (Volume 5), 3rd Edition, Springer, Singapore, 2006 (DOI: 10.1007/0-387-30745-1)

- Egbi C. D., Anornu G., Appiah-Adjei E. K., Ganyaglo S. Y. & Dampare S. B., Evaluation of water quality using hydrochemistry, stable isotopes, and water quality indices in the Lower Volta River Basin of Ghana, *Environment, Development and Sustainability*, Volume 21, pages 3 033–3 063, 2019 (DOI: 10.1007/s10668-018-0180-5)
- Elawwad A., Matta M., Abo-Zaid M. & Abdel-Halim H., Plant-wide modeling and optimization of a large-scale WWTP using BioWin's ASDM model, *Journal of Water Process Engineering*, Volume 31, 2019 (DOI: 10.1016/j.jwpe.2019.100819)
- Eldyasti A., Andalib M., Hafez H., Nakhla G. & Zhu J., Comparative modeling of biological nutrient removal from landfill leachate using a circulating fluidized bed bioreactor (CFBBR), *Journal of Hazardous Materials*, Volume 187, pages 140–149, 2011 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.115)
- Elefsiniotis P. & Li D., The effect of temperature and carbon source on denitrification using volatile fatty acids, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 28, pages 148–155, 2006 (DOI: 10.1016/j.bej.2005.10.004)
- Evans R. O., Westerman P. W. & Overcash M. R., Subsurface drainage water quality from land application of swine lagoon effluent, *Transactions of the ASAE*, Volume 27, Issue 2, 1984 (DOI: 10.13031/2013.32813)
- Fan L., Li H., Chen Y., Jia F., Liu T., Guo J., & Yao H., Evaluation of the joint effects of Cu²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ on completely autotrophic nitrogen-removal over nitrite (CANON) process, *Chemosphere*, Volume 286, 2022 (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131896)
- FAO 2012, Irrigation water requirement and water withdrawal by country, *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) AQUASTAT Reports*, 2012
- FAO 2017, *Water for Sustainable Food and Agriculture: A report produced for the G20 Presidency of Germany*, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, 2017
- Felgate H., Giannopoulos G., Sullivan M. J., Gates A. J., Clarke T. A., Baggs E. & Richardson D. J., The impact of copper, nitrate and carbon status on the emission of nitrous oxide by two species of bacteria with biochemically distinct denitrification pathways, *Environmental Microbiology*, Volume 14, Issue 7, pages 1 788–1 800, 2012 (DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02789.x)
- Ferchichi H., Ben Hamouda M. F., Farhat B., & Ben Mammou A., Assessment of groundwater salinity using GIS and multivariate statistics in a coastal Mediterranean aquifer, *International Journal of Environmental Science and Technology*, Volume 15, Issue 11, pages 2 473-2 492, 2018 (DOI: 10.1007/s13762-018-1767-y)

- Fernández-Nava Y., Marañón E., Soons J. & Castrillón L., Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations, *Bioresource Technology*, Volume 99, pages 7 976–7 981, 2008 (DOI: :10.1016/j.biortech.2008.03.048)
- Fillos J. & Ramalingam K., Specific denitrification rates with ethanol and methanol as sources of organic carbon, *Proceedings of the Water Environment Federation*, Volume 2, pages 251-279, 2007 (DOI: 10.2175/193864707787976687)
- Foglar L., Briški F., Sipos L. & Vuković M., High nitrate removal from synthetic wastewater with the mixed bacterial culture, *Bioresource Technology*, Volume 96, Issue 8, pages 879-888, 2004 (DOI: 10.1016/j.biortech.2004.09.001)
- Forti V., Balde C.P., Kuehr R. & Bel G, *The Global E-waste Monitor 2020: Quantities, flows and the circular economy potential*, United Nations University (UNU)/United Nations Institute for Training and Research (UNITAR) – co-hosted SCYCLE Programme, International Telecommunication Union (ITU) & International Solid Waste Association (ISWA), Bonn/Geneva/Rotterdam, 2020
- Fu Z., Yang F., Zhou F. & Xue Y., Control of COD/N ratio for nutrient removal in a modified membrane bioreactor (MBR) treating high strength wastewater, *Bioresource Technology*, Volume 100, pages 136–141, 2009 (DOI: 10.1016/j.biortech.2008.06.006)
- Fu X., Hou R., Yang P., Qian S., Feng Z., Chen Z., Wang F., Yuan R., Chen H., & Zhou B., Application of external carbon source in heterotrophic denitrification of domestic sewage: A review, *Science of the Total Environment*, Volume 817, 2022 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.153061)
- Fuquay J., Fox P. & McSweeney, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd Edition, Academic Press-Elsevier, United Kingdom, 2011
- Gabaldón C., Izquierdo M., Martínez -Soria V., Marzal P., Peña-roja J.-M., Alvarez-Hornos F. J., Biological nitrate removal from wastewater of a metal-finishing industry, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 148, pages 485–490, 2007 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.02.071)
- Gargaud M., Amils R., Quintanilla J. C., Cleaves II H. J., Irvine W. M. Pinti D. L. & Viso M., *Encyclopedia of Astrobiology*, Springer, Berlin, 2011 (DOI: 10.1007/978-3-642-11274-4)
- Ge S., Peng Y., Wang S., Lu C., Cao X. & Zhu Y., Nitrite accumulation under constant temperature in anoxic denitrification process: The effects of carbon sources and COD/NO₃-N, *Bioresource Technology*, Volume 114, pages 137–143, 2012 (DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.016)
- Gerber A., Mostert E. S., Winter C. T. & de Villiers R. H., The effect of acetate and other short-chain carbon compounds on the kinetics of biological nutrient removal, *Water SA*, Volume 12, Issue 1, 1986

- Glass C. & Silverstein J., Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation, *Water Research*, Volume 32, Issue 3, pages 831-839, 1998
- Glass C. & Silverstein J., Denitrification of high nitrate, high salinity wastewater, *Water Research*, Volume 33, Issue 1, pages 223-229, 1999
- Godfray H. C. J., Beddington J. R., Crute I. R., Haddad L., Lawrence D., Muir J. F., Pretty J., Robinson S., Thomas S. M. & Toulmin C., Food Security: The challenge of feeding 9 billion people, *Science*, Volume 327, Issue 5 967, pages 812 – 818, 2010 (DOI: 10.1126/science.1185383)
- Goldstein J., Newbury D. E., Joy D. C., Lyman C. E., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L. & Michael J. R., *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, 3rd Edition, Springer New York, New York, 2003 (DOI: 10.1007/978-1-4615-0215-9)
- Gomółka E., Gomółka B. & Kowalski Z., Treatment of wastewater from hydrometallurgical refining of silver scrap, *Environment Protection Engineering*, Volume 14, Issue 1, 1988
- González-Domenech C. M., Martínez-Checa F., Béjar V. & Quesada E., Denitrification as an important taxonomic marker within the genus *Halomonas*, *Systematic and Applied Microbiology*, Volume 33, Issue 2, pages 85–93, 2010 (DOI: 10.1016/j.syapm.2009.12.001)
- Goodship V., Stevels A. B. & Huisman J., *Waste Electrical and Electronic Equipment (WEEE) Handbook*, 2nd Edition, Woodhead Publishing - Elsevier, United Kingdom, 2019 (DOI: 10.1016/C2016-0-03853-6)
- Grady C. P. L., Daigger G. T., Love N. G. & Filipe C. D. M., *Biological Wastewater Treatment*, 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, 2011 (DOI: 10.1201/b13775)
- Granger J. & Ward B., Accumulation of nitrogen oxides in copper-limited cultures of denitrifying bacteria, *Limnology and Oceanography*, Volume 48, Issue 1, pages 313-318, 2003 (DOI: 10.4319/lo.2003.48.1.0313)
- Gu C., Mills A. L., Hornberger G. M. & Herman J. S., Nitrate Reduction In Streambed Sediments: Effects Of Flow And Biogeochemical Kinetics, *Water Resources Research*, Volume 43, Issue 12, 2007 (DOI:10.1029/2007WR006027)
- Gujer W., Henze M., Mino T., Matsuo T., Wentzel M. C. & Marais G. v. R., The activated sludge model No. 2: Biological phosphorus removal, *Water Science and Technology*, Volume 31, Issue 2, pages 1-11, 1995 (DOI: 10.1016/0273-1223(95)00175-M)
- Hallin S. & Pell M., Metabolic properties of denitrifying bacteria adapting to methanol and ethanol in activated sludge, *Water Research*, Volume 32, Issue 1, pages 13-18, 1998 (DOI: 10.1016/S0043-1354(97)00199-1)

- Hallin S., Rothman M. & Pell M., Adaptation of denitrifying bacteria to acetate and methanol in activated sludge, *Water Research*, Volume 30, Issue 6, pages 1 445-1 450, 1996 (DOI: 10.1016/0043-1354(96)00033-4)
- Hamdani A., Mountadar M. & Assobhei O., Simultaneous nitrate and organic matter removal from a dairy effluent by bionitrification, *Revue des Sciences de l'Eau*, Volume 21, Issue 2, pages 97-107, 2018 (DOI: 10.7202/1051694ar)
- Hamed Y., Awad S. & Ben Saad A., Nitrate contamination in groundwater in the Sidi Aich–Gafsa oases region, Southern Tunisia, *Environmental Earth Sciences*, Volume 70, Issue 5, 2013 (DOI: 10.1007/s12665-013-2445-5)
- Hamlin H. J., Michaels J. T., Beaulaton C. M., Graham W. F., Dutt W., Steinbach P., Losordo T. M., Schrader K. K. & Main K. L., Comparing denitrification rates and carbon sources in commercial scale upflow denitrification biological filters in aquaculture, *Aquacultural Engineering*, Volume 38, pages 79–92, 2008 (DOI: 10.1016/j.aquaeng.2007.11.003)
- Hao J., Wang Y., Wu Y. & Guo F., Metal recovery from waste printed circuit boards: A review for current status and perspectives, *Resources, Conservation & Recycling*, Volume 157, 2020 (DOI: /10.1016/j.resconrec.2020.104787)
- Harvey D., *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill Companies, 2000
- Hasan A., Evaluation of nitrate removal from dairy wastewater by membrane distillation: a laboratory model approach, *Journal of Engineering and Sustainable Development*, Volume 27, Issue 1, 2023 (DOI: 10.31272/jeasd.27.1.11)
- Hatzikioseyan A., Mendrinou P., Datsika E. & Remoundaki E., Modeling metal bioprecipitation in a packed-bed denitrifying bioreactor”, *1st International Conference on Sustainable Chemical and Environmental Engineering (SUSTENG)*, Rethymno, Crete, Greece, 2022
- Hatzikioseyan A., Mendrinou P., Kousi P. & Remoundaki E., Modeling biological denitrification in the presence of metal ions and elevated chloride content: Insights into abiotic and biotic mechanisms regulating metal bioprecipitation, *Journal of Environmental Management*, Volume 342, 2023 (DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.118285)
- He C., Liu Z., Wu J., Pan X., Fang Z., Li J. & Bryan B. A., Future global urban water scarcity and potential solutions, *Nature Communications*, Volume 12, Issue 1, 2021 (DOI: 10.1038/s41467-021-25026-3)
- Hemp J., Lückner S., Schott J., Pace L. A., Johnson J. E., Schink B., Daims H. & Fischer W.W., Genomics of a phototrophic nitrite oxidizer: insights into the evolution of photosynthesis and

- nitrification, *The ISME Journal*, Volume 10, Issue 11, pages 2 669-2 678, 2016 (DOI: 10.1038/ismej.2016.56)
- Henze M., Kristensen G. H. & Strube R., Rate-capacity characterization of wastewater for nutrient removal processes, *Water Science and Technology*, Volume 29, Issue 7, pages 101-107, 1994 (DOI: 10.2166/wst.1994.0318)
- Her J.-J. & Huang J.-S., Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough, *Bioresource Technology*, Volume 54, Issue 1, pages 45-51, 1995 (DOI: 10.1016/0960-8524(95)00113-1)
- Hillel D., Hatfield J. H., Powlson D. S., Rosenzweig C., Scow K. M., Singer M. J. & Sparks D. L., *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Elsevier Academic Press, 2005
- Hino T., Matsumoto Y., Nagano S., Sugimoto H., Fukumori Y., Murata T., Iwata S. & Shiro Y., Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase, *Science*, Volume 330, page 1 666-1 670, 2010 (DOI: 10.1126/science.1195591)
- Hirata A., Nakamura Y. & Tsuneda S., Biological nitrogen removal from industrial wastewater discharged from metal recovery processes, *Water Science and Technology*, Volume 44, Issues 2–3, pages 171–179, 2001 (DOI: 10.2166/wst.2001.0767)
- Holmes D. E., Dang Y. & Smith J. A., Nitrogen cycling during wastewater treatment, *Advances in Applied Microbiology*, Volume 106, pages 113-192, 2019 (DOI: 10.1016/bs.aambs.2018.10.003)
- Holtan-Hartwig L., Bechman M., Høyås T. R., Linjordet R. & Bakken L. R., Heavy metals tolerance of soil denitrifying communities: N₂O dynamics, *Soil Biology and Biochemistry*, Volume 34, pages 1 181-1 190, 2002 (DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00055-X)
- Horrell S., Kekilli D., Strange R. W. & Hough M. A., Recent structural insights into the function of copper nitrite reductases, *Metallomics*, Volume 9, Issue 11, pages 1 470-1 482, 2017 (DOI: 10.1039/c7mt00146k)
- Hu B., Quan J., Huang K., Zhao J., Xing G., Wu P., Chen Y., Ding X. & Hu Y., Effects of C/N ratio and dissolved oxygen on aerobic denitrification process: A mathematical modeling study, *Chemosphere*, Volume 272, 2021 (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129521)
- Huang Y., Long X.-E., Chapman S. J. & Yao H., Acidophilic denitrifiers dominate the N₂O production in a 100-year-old tea orchard soil, *Environmental Science and Pollution Research*, Volume 22, Issue 6, pages 4 173-4 182, 2015 (DOI: 10.1007/s11356-014-3653-6)

- Huang R., Meng T., Liu G., Gao S. & Tian J., Simultaneous nitrification and denitrification in membrane bioreactor: Effect of dissolved oxygen, *Journal of Environmental Management*, Volume 323, 2022 (DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.116183)
- Huu N., Denner E. B. M., Ha D. T. C., Wanner G. & Stan-Lotter H., *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Volume 49, pages 367-375, 1999 (DOI: 10.1099/00207713-49-2-367)
- Ikeda N., Natori T., Okubo T., Sugo A., Aoki M., Kimura M., Yamaguchi T., Harada H., Ohashi A. & Uemura S., Enhancement of denitrification in a down-flow hanging sponge reactor by effluent recirculation, *Water Science and Technology*, Volume 68, Issue 3, pages 591-598, 2013 (DOI: 10.2166/wst.2013.235)
- Ilançon I. M. S. K., Ghorbani Y., Chong M. N., Herath G., Moyo T. & Petersen J., E-waste in the international context – A review of trade flows, regulations, hazards, waste management strategies and technologies for value recovery, *Waste Management*, Volume 82, pages 258–275, 2018 (DOI: 10.1016/j.wasman.2018.10.018)
- Imhoff J. F., Rahn T., Kónzel S. & Neuling S. C., New insights into the metabolic potential of the phototrophic purple bacterium *Rhodospira globiformis* DSM 161^T from its draft genome sequence and evidence for a vanadium-dependent nitrogenase, *Archives of Microbiology*, Volume 200, Issue 6, pages 847-857, 2018 (DOI: 10.1007/s00203-018-1489-z)
- Isaacs S. H. & Henze M., Controlled carbon source addition to an alternating nitrification-denitrification wastewater treatment process including biological P removal, *Water Research*, Volume 29, Issue 1, pages 79-89, 1995 (DOI: 10.1016/0043-1354(94)E0119-Q)
- Işildar A., van Hullebusch E. D., Lenz M., Du Laing G., Marra A., Cesaro A., Panda S., Akcil A., Kucuker M. A. & Kuchta K., Biotechnological strategies for the recovery of valuable and critical raw materials from waste electrical and electronic equipment (WEEE) – A review, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 362, pages 467-481, 2019 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.08.050)
- Isoldi L. A., Koetz P. R. & Isoldi L. A., Post-Treatment a nitrified parboiled rice wastewater using denitrification in UASB reactor, *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, Volume 10, Issue 4, pages 271-277, 2005 (DOI: 10.1590/S1413-41522005000400002)
- Jacinthe P.-A. & Tedesco L. P., Impact of Elevated Copper on the Rate and Gaseous Products of Denitrification in Freshwater Sediments, *Journal of Environmental Quality*, Volume 38, pages: 1 183–1 192, 2009 (DOI: 10.2134/jeq2007.0666)
- Jacobs J., *The Economy of Cities*, Vintage Books, New York, 1970

- Jalali M. & Tabar S. S., Chemical fractionation of phosphorus in calcareous soils of Hamedan, western Iran under different land use, *Journal of plant nutrition and soil science*, Volume 174, pages 523-531, 2011 (DOI: 10.1002/jpln.201000217)
- Ji X., Liu Y., Zhang J., Huang D., Zhou P. & Zheng Z., Development of model simulation based on BioWin and dynamic analyses on advanced nitrate nitrogen removal in deep bed denitrification filter, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Volume 42, Issue 2, pages 199-212, 2019 (DOI: 10.1007/s00449-018-2025-x)
- Jiang F., Qi Y. & Shi X., Effect of liquid carbon sources on nitrate removal, characteristics of soluble microbial products and microbial community in denitrification biofilters, *Journal of Cleaner Production*, Volume 339, 2022 (DOI: 10.1016/j.jclepro.2022.130776)
- Jiang L., Ji F., Liao Y., Mao Y., Shen Q., Zhuo Y. & Zhang Q., Denitrification performance and mechanism of denitrification biofilm reactor based on carbon-nitrate counter-diffusional, *Bioresource Technology*, Volume 348, 2022 (DOI: 10.1016/j.biortech.2022.126804)
- Johnson D. B., Bryan C. G., Schlömann M. & Roberto F. F., *Biomining Technologies: Extracting and Recovering Metals from Ores and Wastes*, Springer, Switzerland, 2023 (DOI: 10.1007/978-3-031-05382-5)
- Jørgensen S. E. & Fath B. D., *Encyclopedia of Ecology*, Elsevier, The Netherlands, 2008
- Karlsson I., Carbon source for denitrification from pre-precipitated sludge, *Proceedings of the 4th Gothenburg Symposium in Chemical Water and Wastewater Treatment*, Madrid, Spain, 1990
- Karydis M., Eutrophication assessment of coastal waters based on indicators: a literature review, *Global NEST Journal*, Volume 11, Issue 4, pages 373-390, 2009 (DOI: 10.30955/gnj.000626)
- Karydis M. & Kitsiou D., Eutrophication and environmental policy in the Mediterranean Sea: a review, *Environmental Monitoring and Assessment*, Volume 184, pages 4 931–4 984, 2012 (DOI: 10.1007/s10661-011-2313-2)
- Kaya M., Recovery of metals and nonmetals from electronic waste by physical and chemical recycling processes, *Waste Management*, Volume 57, pages 64–90, 2016 (DOI: 10.1016/j.wasman.2016.08.004)
- Kelso B. H. L., Smith R. V. & Laughlin R. J., Effects of Carbon Substrates on Nitrite Accumulation in Freshwater Sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 65, Issue 1, pages 61-66, 1999 (DOI: 10.1128/aem.65.1.61-66.1999)

- Khan S. J., Ilyas S., Javid S., Visvanathan C. & Jegatheesan V., Performance of suspended and attached growth MBR systems in treating high strength synthetic wastewater, *Bioresource Technology*, Volume 102, pages 5331–5336, 2011 (DOI: 10.1016/j.biortech.2010.09.100)
- Kiani H., Azimi Y., Li Y., Mousavi M., Cara F., Mulcahy S., McDonnell H., Blanco A. & Halim R., Nitrogen and phosphate removal from dairy processing side-streams by monocultures or consortium of microalgae, *Journal of Biotechnology*, Volume 361, pages 1–11, 2023 (DOI: 10.1016/j.jbiotec.2022.11.011)
- Kim K. K., Jin L., Yang H. C. & Lee S.-T., *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volume 57, pages 675–681, 2007 (DOI: 10.1099/ijms.0.64767-0)
- Knobeloch L., Salna B., Hogan A., Postle J. & Anderson H., Blue babies and nitrate-contaminated well water, *Environmental Health Perspectives*, Volume 108, Issue 7, 2000 (DOI: 10.1289/ehp.00108675)
- Koch G., Egli K., Van der Meer J. R. & Siegrist H., Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor, *Water Science and Technology*, Volume 41, Issues 4–5, pages 191–198, 2000 (DOI: 10.2166/wst.2000.0444)
- Kousi P., Remoundaki E., Hatzikioseyan A. & Tsezos M., A study of the operating parameters of a sulphate-reducing fixed-bed reactor for the treatment of metal-bearing wastewater, *Advanced Materials Research*, Volumes 20-21, pages 230-234, 2007 (DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.20-21.230)
- Kousi P., Remoundaki E., Hatzikioseyan A., Battaglia-Brunet F., Joulain C. Kousteni V. & Tsezos M., Metal precipitation in an ethanol-fed, fixed-bed sulphate-reducing bioreactor, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 189, Issue 3, pages 677–684 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.083)
- Kostraba J. N., Gay E. C., Rewers M. & Hamman R. F., Nitrate Levels in Community Drinking Waters and Risk of IPDM, An ecological analysis, *Diabetes Care*, Volume 15, Issue 11, pages 1 505-1 508 1995 (DOI: 10.2337/diacare.15.11.1505)
- Krausmann F., Wiedenhofer D., Lauk C., Haas W., Tanikawa H., Fishman T., Miatto A., Schandl H. & Haberl H., Global socioeconomic material stocks rise 23-fold over the 20th century and require half of annual resource use, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, Volume 114, Issue 8, 2017 (DOI: 10.1073/pnas.1613773114)

- Kučera I., Matyášek R. & Dadák V., The influence of the pH on the kinetics of dissimilatory nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*, *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 848, pages 1-7, 1986 (DOI: 10.1016/0005-2728(86)90153-2)
- Kujawa K. & Klapwijk B., A method to estimate denitrification potential for predenitrification systems using NUR batch test, *Water Research*, Volume 33, Issue 10, pages 2 291-2 300, 1999 (DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00459-X)
- Kumar K. P. & Sekaran A. S. J., Some natural fibers used in polymer composites and their extraction processes: A review, *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, Volume 33, Issue 20, pages 1 879–1 892, 2014 (DOI: 10.1177/0731684414548612)
- Kumar A., Holuszko M. & Espinosa D. C. R., E-waste: An overview on generation, collection, legislation and recycling practices, *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 122, pages 32–42, 2017 (DOI: 10.1016/j.resconrec.2017.01.018)
- Kuypers M. M. M., Marchant H. K. & Kartal B., The microbial nitrogen-cycling network, *Nature Reviews Microbiology*, Volume 16, Issue 5, pages 263-276, 2018 (DOI: 10.1038/nrmicro.2018.9.)
- Labbé N., Laurin V., Juteau P., Parent S. & Villemur R., Microbiological Community Structure of the Biofilm of a Methanol-Fed, Marine Denitrification System, and Identification of the Methanol-Utilizing Microorganisms, *Microbial Ecology*, Volume 53, pages 621-630, 2007 (DOI: 10.1007/s00248-006-9168-z)
- Laffoley D. & Baxter J. M., *Ocean deoxygenation: Everyone's problem - Causes, impacts, consequences and solutions (Full report)*, 580 pages, IUCN, Gland, Switzerland, 2019 (DOI: 10.2305/IUCN.CH.2019.13.en)
- Lee L. Y., Ong S. L. & Ng W. J., Denitrification of Nitrate Wastewater Using Packed-Bed Columns, *Water Environment Research*, Volume 76, Issue 5, pages 388-393, 2004 (DOI: 10.2175/106143004x151653)
- Lee N. & Weelander T., The Effect of Different Carbon Sources on Respiratory Denitrification in Biological Wastewater Treatment, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Volume 82, Issue 3, pages 277-285, 1996 (DOI: 10.1016/0922-338X(96)88820-9)
- Lee Y.-Y., Choi H. & Cho K.-S., Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N₂O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, Volume 54, Issue 1, pages 16-29, 2019 (DOI: 10.1080/10934529.2018.1503903)

- Letelier-Gordo C. O., Huang X., Aalto S. L. & Pedersen P. B., Activated sludge denitrification in marine recirculating aquaculture system effluent using external and internal carbon sources, *Aquacultural Engineering*, Volume 90, 2020 (DOI: 10.1016/j.aquaeng.2020.102096)
- Lewis A. E., Review of metal sulphide precipitation, *Hydrometallurgy*, Volume 104, Issue 2, pages 222–234, 2010 (DOI: 10.1016/j.hydromet.2010.06.010)
- Li Y. Z., He Y. L., Ohandja D. G., Ji J., Li J. F. & Zhou T., Simultaneous nitrification–denitrification achieved by an innovative internal-loop airlift MBR: Comparative study, *Bioresource Technology*, Volume 99, Issue 13, pages 5 867–5 872, 2008 (DOI: 10.1016/j.biortech.2007.10.001)
- Li Q., Csetenyi L. & Gadd G. M., Biomineralization of Metal Carbonates by *Neurospora crassa*, *Environmental Science and Technology*, Volume 48, Issue 24, pages 14 409–14 416, 2014 (DOI: 10.1021/es5042546)
- Li S., Yang X., Buchner D., Wang H., Xu H., Haderlein S. B. & Zhu Y., Earth Surface Processes and Environmental Sustainability in China: Increased copper levels inhibit denitrification in urban soils, *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, Volume 109, Issue 3-4, pages 421–427, 2018 (DOI: 10.1017/S1755691018000592)
- Lin Y.-H. & Gu Y.-J., Denitrification Kinetics of Nitrate by a Heterotrophic Culture in Batch and Fixed-Biofilm Reactors, *Processes*, Volume 8, Issue 5, 2020 (DOI: 10.3390/pr8050547)
- Liu C.-Q., Li S.-L., Lang Y.-C. & Xiao H.-Y., Using $\delta^{15}\text{N}$ - and $\delta^{18}\text{O}$ -values to identify nitrate sources in karst ground water, Guiyang, Southwest China, *Environmental Science and Technology*, Volume 40, pages 6 928–6 933, 2006 (DOI: 10.1021/es0610129)
- Liu Y., Liu Y., Zhou H., Li L., Zheng J., Zhang X., Zheng J. & Pan G., Abundance, composition and activity of denitrifier communities in metal polluted paddy soils, *Scientific Reports*, Volume 6, 2016 (DOI: 10.1038/srep19086)
- Liu J., Ali A., Su J., Wu Z., Zhang R. & Xiong R., Simultaneous removal of calcium, fluoride, nickel, and nitrate using microbial induced calcium precipitation in a biological immobilization reactor, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 416, 2021 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125776)
- Liu E., Fan C., Zhao M., Jiang S., Wang Z., Jin Z., Bei K., Zheng X., Wu S. & Zeng Q., Effects of heavy metals on denitrification processes in water treatment: A review, *Separation and Purification Technology*, Volume 299, 2022 (DOI: 10.1016/j.seppur.2022.121793)
- Lopes L. F., Koetz P. R. & Santos M. S., Denitrification on the top of UASB reactors of rice wastewaters, *Water Science and Technology*, Volume 44, Issue 4, pages 79–82, 2001 (DOI: 10.2166/wst.2001.0184)

- Lu L., Chen C., Ke T., Wang M., Sima M., & Huang S., Long-term metal pollution shifts microbial functional profiles of nitrification and denitrification in agricultural soils, *Science of the Total Environment*, Volume 830, 2022 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.154732)
- Ly Q. V., Nghiem L. D., Cho J., Maqbool T. & Hur J., Organic carbon source-dependent properties of soluble microbial products in sequencing batch reactors and its effects on membrane fouling, *Journal of Environmental Management*, Volume 244, pages 40–47, 2019 (DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.05.045)
- Madigan M., Bender K., Buckley D., Sattley M. & Stahl D., *Brock Biology of Microorganisms*, 15th Edition, Pearson, New York, 2018
- Maherry A., Tredoux G., Clarke S. & Engelbrecht P., State of Nitrate Pollution in Groundwater in South Africa, *Proceedings of the CSIR (Council of Scientific and Industrial Research) 3rd Biennial Conference: Science Real and Relevant*, South Africa, Pretoria, 2010
- Maila Y. A., El-Nahal I. & Al-Agha M. R., Seasonal variations and mechanisms of groundwater nitrate pollution in the Gaza Strip, *Environmental Geology*, Volume 47, pages 84–90, 2004 (DOI: 10.1007/s00254-004-1136-7)
- Majone M., Massanisso P. & Ramadori R., Comparison of carbon storage under aerobic and anoxic conditions, *Water Science and Technology*, Volume 38, Issue 8-9, pages 77-84, 1998 (DOI: 10.1016/S0273-1223(98)00680-5)
- Mao X., Myavagh P. H., Lotfikatouli S., Hsiao B. S. & Walker H. W., Membrane Bioreactors for Nitrogen Removal from Wastewater: A Review, *Journal of Environmental Engineering*, Volume 146, Issue 5, 2020 (DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001682)
- Marsili-Libelli S., *Environmental Systems Analysis with MATLAB®*, CRC Press, 2018
- Martienssen M. & Schöps R., Population dynamics of denitrifying bacteria in a model biocommunity, *Water Research*, Volume 33, Issue 3, pages 639-646, 1999 (DOI: 10.1016/S0043-1354(98)00222-X)
- Martin K. J. & Nerenberg R., The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: Principles, applications, and recent developments, *Bioresource Technology*, Volume 122, pages 83–94, 2012 (DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.110)
- Martínez-Cánovas M. J., Quesada E., Llamas I. & Béjar V., *Halomonas ventosae* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volume 54, pages 733–737, 2004 (DOI: 10.1099/ijs.0.02942-0)

- Matějů V., Čížinská S., Krejčí J. & Janoch T., Biological water denitrification—A review, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 14, Issue 3, pages 170-183, 1992 (10.1016/0141-0229(92)90062-S)
- Matsumoto S., Terada A. & Tsuneda S., Modeling of membrane-aerated biofilm: Effects of C/N ratio, biofilm thickness and surface loading of oxygen on feasibility of simultaneous nitrification and denitrification, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 37, pages 98–107, 2007 (DOI: 10.1016/j.bej.2007.03.013)
- Mattila K., Zaitsev G. & Langwaldt J., *Biological removal of nutrients from mine waters*, Final report of the Project “Biological removal of nutrients from mine water” funded by the European Regional Development Fund of the European Commission, Tekes the Finnish Funding Agency for Technology and Innovations and the industrial partners, 2007
- McQuarrie J. P. & Boltz J. P., Moving bed biofilm reactor technology: Process applications, design and performance, *Water Environment Research*, Volume 83, Issue 6, pages 560-576, 2011 (DOI: 10.2175/106143010x12851009156286)
- Mendrinou P., Hatzikioseyan A., Kousi P. & Remoundaki E., Biological denitrification in saline environment in the presence of metal ions, *7th International Conference on Research Frontiers in Chalcogen Cycle Science & Technology*, Online Conference by the Department of Microbiology of the National University of Ireland Galway, 2020
- Mendrinou P., Hatzikioseyan A., Kousi P., Oustadakis P., Tsakiridis P. & Remoundaki E., Simultaneous Removal of Soluble Metal Species and Nitrate from Acidic and Saline Industrial Wastewater in a Pilot Scale Biofilm Reactor, *Environmental Processes*, Volume 8, Issue 4, Pages 1 481 – 1 499, 2021 (DOI:10.1007/s40710-021-00536-w)
- Metcalf & Eddy (revised by George Tchobanoglous Franklin L. Burton & H. David Stensel), *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th Edition, McGraw-Hill Education, 2017
- Miao Y., Liao R., Zhang X.-X., Liu B., Li Y., Wu B. & Li A., Metagenomic insights into salinity effect on diversity and abundance of denitrifying bacteria and genes in an expanded granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater, *Chemical Engineering Journal*, Volume 277, pages 116-123, 2015 (DOI: 10.1016/j.cej.2015.04.125)
- Mielcarek A., Rodziewicz J., Janczukowicz W. & Struk-Sokołowska J., The impact of biodegradable carbon sources on nutrients removal in post-denitrification biofilm reactors, *Science of the Total Environment*, Volume 720, 2020 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137377)

- Mir S. & Dhawan N., A comprehensive review on the recycling of discarded printed circuit boards for resource recovery, *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 178, 2022 (DOI: 10.1016/j.resconrec.2021.106027)
- Mohan T. V. K., Nancharaiah Y. V., Venugopalan V. P. & Sai P. M. S., Effect of C/N ratio on denitrification of high-strength nitrate wastewater in anoxic granular sludge sequencing batch reactors, *Ecological Engineering*, Volume 91, pages 441–448, 2016 (DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.02.033)
- Mohsenipour M., Shahid S. & Ebrahimi K., Removal Techniques of Nitrate from Water, *Asian Journal of Chemistry*; Volume 26, Issue 23, pages 7 881-7 886, 2014
- Mokhayeri Y., Nichols A., Murthy S., Riffat R., Dold P. & Takacs I., Examining the influence of substrates and temperature on maximum specific growth rate of denitrifiers, *Water Science and Technology*, Volume 54, Issue 8, pages 155–162, 2006 (DOI: 10.2166/wst.2006.854)
- Moloantoa K. M., Khetsa Z. P., van Heerden E., Castillo J. C. & Cason E. D., Nitrate Water Contamination from Industrial Activities and Complete Denitrification as a Remediation Option, *Water*, Volume 14, Issue 5, 2022 (DOI: 10.3390/w14050799)
- Monteagudo L., Moreno J. L. & Picazo F., River eutrophication: Irrigated vs. non-irrigated agriculture through different spatial scales, *Water Research*, Volume 46, pages 2 759-2 771, 2012 (DOI: 10.1016/j.watres.2012.02.035)
- Monteith H. D., Bridle T. R. & Sutton P. M., Industrial waste carbon sources for biological denitrification, *Proceedings of a Conference Held in Toronto*, Volume 12, Pages 127-141, 1981 (DOI: 10.1016/B978-1-4832-8438-5.50014-5)
- Mormile M. R., Romine M. F., Garcia M. T., Ventosa A., Bailey T. J. & Peyton B. M., *Halomonas campisalis* sp. nov., a denitrifying, moderately haloalkaliphilic bacterium, Volume 22, Issue 4, pages 551-558, 1999 (DOI: 10.1016/S0723-2020(99)80008-3)
- Naidoo V. & Buckley C. A., *Municipal wastewater characterization: application of denitrification batch tests*, Report to Water Research Commission, Water Research Commission, 1999
- Naidoo V., Urbain V. & Buckley C. A., Characterization of wastewater and activated sludge from European municipal wastewater treatment plants using the NUR test, *Water Science and Technology*, Volume 38, Issue 1, Pages 303-310, 1998 (DOI: 10.1016/S0273-1223(98)00415-6)
- Nakagawa K., Amano H., Asakura H. & Berndtsson R., Spatial trends of nitrate pollution and groundwater chemistry in Shimabara, Nagasaki, Japan, *Environmental Earth Sciences*, Volume 75, Issue 3, 2016 (DOI: 10.1007/s12665-015-4971-9)

- Nakano M., Inagaki T., Okunishi S., Tanaka R. & Maeda H., Effect of salinity on denitrification under limited single carbon source by *Marinobacter* sp. isolated from marine sediment, *Journal of Basic Microbiology*, Volume 50, Issue 3, pages 285–289, 2010 (DOI: 10.1002/jobm.200900250)
- Negovanović M., Kričak L., Milanović S., Đokić N. & Simić N., Ammonium nitrate explosion hazards, *Underground Mining Engineering*, Volume 27, pages 49-63, 2015 (DOI: 10.5937/podrad1527049N)
- Nelson M. J., Nakhla G. & Zhu J., Fluidized-Bed Bioreactor Applications for Biological Wastewater Treatment: A Review of Research and Developments, *Engineering*, Volume 3, pages 330–342, 2017 (DOI: 10.1016/J.ENG.2017.03.021)
- Ni B.-J. & Yu H.-Q., Kinetic modeling microbial storage process in activated sludge under anoxic conditions, *Chemical Engineering Science*, Volume 63, pages 2 785–2 792, 2008 (DOI: 0.1016/j.ces.2008.02.031)
- Ni B.-J., Peng L., Law Y., Guo J. & Yuan Z., Modeling of Nitrous Oxide Production by Autotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria with Multiple Production Pathways, *Environmental Science and Technology*, Volume 48, pages 3 916–3 924, 2014 (DOI: 10.1021/es405592h)
- Nyberg U., Andersson B. & Aspegren H., Long-term experiences with external carbon sources for nitrogen removal, *Water Science and Technology*, Volume 33, Issue 12, pages 109-116, 1996 (DOI: 10.1016/0273-1223(96)00464-7)
- Oleszkiewicz J. A. & Berquist S. A., Low temperature nitrogen removal in sequencing batch reactors, *Water Research*, Volume 22, Issue 9, pages 1 163-1 171, 1988 (DOI: 10.1016/0043-1354(88)90012-7)
- Onnis-Hayden A. & Gu A. Z., Comparisons of Organic Sources for Denitrification: Biodegradability, Denitrification Rates, Kinetic Constants and Practical Implication for Their Application in WWTPs, *Proceedings of the Water Environment Federation*, Volume 17, pages 253-273, 2008 (DOI:10.2175/193864708788735510)
- Osaka T., Shirohani K., Yoshie S. & Tsuneda S., Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process, *Water Research*, Volume 42, pages 3 709-3 718, 2008 (DOI: 10.1016/j.watres.2008.06.007)
- Pan Y., Ye L., Ni B.-J. & Yuan Z., Effect of pH on N₂O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers, *Water Research*, Volume 46, pages 4 832-4 840, 2012 (DOI: 10.1016/j.watres.2012.06.003)
- Pan Y., Liu Y., Peng L., Ngo H. H., Guo W., Wei W., Wang D. & Ni B.-J., Substrate Diffusion within Biofilms Significantly Influencing the Electron Competition during Denitrification,

- Environmental Science and Technology*, Volume 53, Issue 1, pages 261-269, 2019 (DOI: 10.1021/acs.est.8b05476)
- Pang Y. & Wang J., Inhibition of ferrous iron (Fe²⁺) to sulfur-driven autotrophic denitrification: Insight into microbial community and functional genes, *Bioresource Technology*, Volume 342, 2021 (DOI: 10.1016/j.biortech.2021.125960)
- Pang Z., Yuan L., Huang T., Kong Y., Liu J. & Li Y., Impacts of human activities on the occurrence of groundwater nitrate in an alluvial plain: A multiple isotopic tracers approach, *Journal of Earth Science*, Volume 24, Issue 1, pages 111–124, 2013 (DOI: 10.1007/s12583-013-0310-9)
- Papazotos P., Koumantakis I. & Vasileiou E., Hydrogeochemical assessment and suitability of groundwater in a typical Mediterranean coastal area: A case study of the Marathon basin, NE Attica, Greece, *HydroResearch*, Volume 2, pages 49–59, 2019 (DOI: 10.1016/j.hydres.2019.11.002)
- Papirio S., Ylinen A., Zou G., Peltola M., Esposito G. & Puhakka J. A., Fluidized-bed denitrification for mine waters. Part I: low pH and temperature operation, *Biodegradation*, Volume 25, pages 425–435, 2014 (DOI: 10.1007/s10532-013-9671-0)
- Parkin T. B., Sexstone A. J. & Tiedje J. M., Adaptation of denitrifying populations to low soil pH, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 49, Issue 5, pages 1 053–1 056, 1985 (DOI: 10.1128/aem.49.5.1053-1056.1985)
- Parslow R. C., McKinney P. A., Law G. R., Staines A., Williams R. & Bodansky H. J., Incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis, *Diabetologia*, Volume 40, pages 550–556, 1997 (DOI: 10.1007/s001250050714)
- Paul J. W. & Beauchamp E. G., Denitrification and fermentation in plant-residue-amended soil, *Biology and Fertility of Soils*, Volume 7, pages 303–309, 1989 (DOI: 10.1007/BF00257824)
- Peng Y.-Z., Ma Y. & Wang S.-Y., Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process, *Journal of Environmental Sciences*, Volume 19, Issue 3, pages 284-289, 2007 (DOI: 10.1016/s1001-0742(07)60046-1)
- Peng Z., Jiang K., Lou T., Niu N. & Wang J., Enhanced denitrification of secondary effluent using composite solid carbon source based on agricultural wastes and synthetic polymers, *Water Science and Technology*, Volume 83, Issue 4, 2021 (DOI: 10.2166/wst.2021.023)
- Pérez-Marín A. B., Lloréns M., Aguilar M. I., Ortuño J. F., Meseguer V. F. & Lucas R., Denitrification in an upflow fixed bed reactor: a laboratory-scale study, *Book of Abstracts of the IWA Regional Conference on Water Reuse and Salinity Management*, Spain, 2018

- Petrovič A., Goršek A. & Simonič M., A kinetic study on drinking water denitrification using a membrane bioreactor, *Open Chemistry*, Volume 13, pages 901-909, 2015 (DOI: 10.1515/chem-2015-0112)
- Peyton B. M., Mormile M. R. & Petersen J. N., Nitrate reduction with *Halomonas campisalis*: Kinetics of denitrification at pH 9 and 12.5% NaCl, *Water research*, Volume 35, Issue 17, pages 4 237-4 242, 2001 (DOI: 10.1016/s0043-1354(01)00149-x)
- Phillips H. M., Barnard J. L., de Barbadillo C., Shaw A. R., Steichen M. T. & Wallis-Lage C., Denitrification rates: sampling, modeling and design considerations, *Proceedings of the Water Environment Federation*, Volume 4, pages 252-276, 2009 (DOI: 10.2175/193864709793901301)
- Pimentel D., Berger B., Filiberto D., Newton M., Wolfe B., Karabinakis E., Clark S., Poon E., Abbett E. & Nandagopal S., Water Resources: Agricultural and Environmental Issues, *BioScience*, Volume 54, Issue 10, pages 909-918, 2004 (DOI: 10.1641/0006-3568(2004)054[0909:WRAAEI]2.0.CO;2)
- Pisciotta A., Cusimano G. & Favara R., Groundwater nitrate risk assessment using intrinsic vulnerability methods: A comparative study of environmental impact by intensive farming in the Mediterranean region of Sicily, Italy, *Journal of Geochemical Exploration*, Volume 156, pages 89–100, 2015 (DOI: 10.1016/j.gexplo.2015.05.002)
- Pommen L. W., *The effect on water quality of explosives use in surface mining. Volume 1: Nitrogen sources, water quality and prediction and management of impacts (Technical Report)*, Ministry of Environment, British Columbia, 1983
- Pomowski A., Zumft W. G., Kroneck P. M. H. & Einsle O., N₂O binding at a [4Cu:2S] copper–sulphur cluster in nitrous oxide reductase, *Nature*, Volume 477, pages 234-238, 2011 (DOI: 10.1038/nature10332)
- Qing-jun M., Qi-yan F., Qing-qing W., Lei M. & Zhi-yang C., Distribution characteristics of nitrogen and phosphorus in mining induced subsidence wetland in Panbei coal mine, China, *Procedia Earth and Planetary Science*, Volume 1, Issue 1, pages 1 237–1 241, 2009 (DOI: 10.1016/j.proeps.2009.09.190)
- Rafrafi Y., Ranaivomanana H., Bertron A., Albrecht A. & Erable B., Surface and bacterial reduction of nitrate at alkaline pH: Conditions comparable to a nuclear waste repository, *International Biodeterioration and Biodegradation*, Volume 101, pages 12-22, 2015 (DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.03.013)

- Rahmati O., Samani A. N., Mahmoodi N. & Mahdavi M., Assessment of the Contribution of N-Fertilizers to Nitrate Pollution of Groundwater in Western Iran (Case Study: Ghorveh–Dehgelan Aquifer), *Water Quality, Exposure and Health*, Volume 7, pages 143-151, 2014 (DOI: 10.1007/s12403-014-0135-5)
- Rajasekar A., Wilkinson S. & Moy C. K. S., MICP as a potential sustainable technique to treat or entrap contaminants in the natural environment: A review, *Environmental Science and Ecotechnology*, Volume 6, 2021 (DOI: 10.1016/j.ese.2021.100096)
- Ramírez J. E., Rangel-Mendez J. R., Lopes K. L., Gomes S. D., Buitrón G. & Cervantes F. J., Denitrification of metallurgic wastewater: mechanisms of inhibition by Fe, Cr and Ni, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Volume 93, Issue 2, 2017 (DOI: 10.1002/jctb.5374)
- Rao M. D., Singh K. K., Morrison C. A. & Love J. B., Challenges and opportunities in the recovery of gold from electronic waste, *RSC Advances*, Volume 10, pages 4 300-4 309, 2020 (DOI: 10.1039/c9ra07607g)
- Rauch J. N., Global mapping of Al, Cu, Fe, and Zn in-use stocks and in-ground resources, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, Volume 106, Issue 45, pages 18 920-18 925, 2009 (DOI: 10.1073_pnas.0900658106)
- Re V., Sacchi E., Kammoun S., Tringali C., Trabelsi R., Zouari K. & Daniele S., Integrated socio-hydrogeological approach to tackle nitrate contamination in groundwater resources. The case of Grombalia Basin (Tunisia), *Science of the Total Environment*, Volume 593–594, pages 664–676, 2017 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.151)
- Reddy A. G. S., Kumar K. N., Rao D. S. & Rao S. S., Assessment of nitrate contamination due to groundwater pollution in north eastern part of Anantapur District, A.P. India, *Environmental Monitoring and Assessment*, Volume 148, pages 463–476, 2009 (DOI: 10.1007/s10661-008-0176-y)
- Reichert P., Aquasim-a tool for simulation and data analysis of aquatic systems, *Water Science and Technology*, Volume 30, Issue 2, pages 21-30, 1994 (DOI: 10.2166/wst.1994.0025)
- Reichert P., *Aquasim 2.0-user Manual*, Swiss Federal Institute for Environmental Science and Technology, Dübendorf, Switzerland, 1998
- Remoundaki E., Hatzikioseyan A., Kousi P. & Tsezos M., The mechanism of metals precipitation by biologically generated alkalinity in biofilm reactors, *Water Research*, Volume 37, pages 3 843–3 854, 2003a (DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00306-3)

- Remoundaki E., Hatzikioseyan A., Kaltsa F. & Tsezos M., The role of metal-organic complexes in the treatment of chromium containing effluents in biological reactors, *Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium (IBS 2003)*, Athens, 2003b
- Remoundaki E., Hatzikioseyan A. & Tsezos M., A systematic study of chromium solubility in the presence of organic matter: consequences for the treatment of chromium-containing wastewater, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volume 82, pages 802–808, 2007 (DOI: 10.1002/jctb)
- Remoundaki E., Kousi P., Jouliau C., Battaglia-Brunet F., Hatzikioseyan A. & Tsezos M., Characterization, morphology and composition of biofilm and precipitates from a sulphate-reducing fixed-bed reactor, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 153, Issue 1, pages 514–524, 2008 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.08.094)
- Remoundaki E., Vasileiou E., Philippou A., Perraki M., Kousi P., Hatzikioseyan A. & Stamatis G., Groundwater deterioration: The simultaneous effects of intense agricultural activity and heavy metals in soil, *Proceedings of 2nd EWaS International Conference*, Crete, 2016
- Ren Y., Su J., Wang Z. & Li Y., Hydrogel microbial reactor based on microbially induced calcium precipitation for the removal of calcium, cadmium and nitrate from groundwater, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, Volume 11, 2023 (DOI: 10.1016/j.jece.2023.109867)
- Rezaee A., Godini H., Soltani R. D. C., Hossini H. & Nili-Ahmadabadi A., Denitrification of high salinity, high nitrate wastewater using clinoptilite in a packed bed bioreactor, *Journal of Environmental Research and Management*, Volume 3, Issue 2, pages 31–36, 2012
- Rezende D., Nishi L., Coldebella P. F., Mantovani D., Soares P. F., Valim N. C. Junior, Vieira A. M. S. & Bergamasco R., Evaluation of the groundwater quality and hydrogeochemistry characterization using multivariate statistics methods: case study of a hydrographic basin in Brazil, *Desalination and Water Treatment*, Volume 161, pages 203–215, 2019 (DOI: 10.5004/dwt.2019.24269)
- Rittman B. E. & McCarty P. L., *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*, 2nd Edition, McGraw-Hill Education, 2020
- Rodgers M., Gibbons P. & Mulqueen J., Nitrate leaching on a sandy loam soil under different dairy wastewater applications, *Proceedings of the Diffuse Pollution Conference*, Dublin, 2003
- Romanelli A., Soto D. X., Matiatos I., Martínez D. E. & Esquius S., A biological and nitrate isotopic assessment framework to understand eutrophication in aquatic ecosystems, *Science of the Total Environment*, Volume 715, 2020 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.136909)

- Sadiq M., Nickel sorption and speciation in a marine environment, *Hydrobiologia*, Volume 176-177, pages 225-232, 1989
- Sadrnezhaad S.K., Ahmadi E. & Mozammel M., Kinetics of silver dissolution in nitric acid from Ag-Au_{0.04}-Cu_{0.10} and Ag-Cu_{0.23} scraps, *Journal of Materials Science and Technology*, Volume 22, Issue 5, pages 696–700, 2006 (DOI: 10.1016/S0273-1223(99)00471-0)
- Sakadevan K., Zheng H. & Bavor H. J., Impact of heavy metals on denitrification in surface wetland sediments receiving wastewater, *Water Science and Technology*, Volume 40, Issue 3, pages 349-355, 1999 (DOI: 10.1016/S0273-1223(99)00471-0)
- Saleh-Lakha S., Shannon K. E., Henderson S. L., Goyer C., Trevors J. T., Zebarth B. J. & Burton D. L., Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 75, Issue 12, pages 3 903-3 911, 2009 (DOI: 10.1128/AEM.00080-09)
- Sanmugasunderam V., Lakshmanan V. I., Christison J. & McKim M., Can microorganisms be used to control nitrate levels in mining process effluents?, *Hydrometallurgy*, Volume 18, Issue 3, pages 383-395, 1987 (DOI: 10.1016/0304-386X(87)90077-6)
- Schaechter M., *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd Edition, Academic Press, 2009 (DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00055-9)
- Schippers A., Glombitza F. & Sand W., *Geobiotechnology I: Metal-related Issues*, Springer, Berlin, 2014 (DOI: 10.1007/978-3-642-54710-2)
- Schoeman J. J. & Steyn A., Nitrate removal with reverse osmosis in a rural area in South Africa, *Desalination*, Volume 155, Issue 1, pages 15-26, 2003 (DOI: 10.1016/S0011-9164(03)00235-2)
- Schultz H. D. & Zabel M., *Marine Geochemistry*, Springer, Heidelberg, 2013 (DOI: 10.1007/978-3-662-04242-7)
- Seifert K. & Domka F., Inhibiting effect of surfactants and heavy metal ions on the denitrification process, *Polish Journal of Environmental Studies*, Volume 14, Issue 1, pages 87-93, 2005
- Shapovalova A. A., Khijniak T. V., Tourova T. P. & Sorokin D. Y., *Halomonas chromatireducens* sp. nov., a New Denitrifying Facultatively Haloalkaliphilic Bacterium from Solonchak Soil Capable of Aerobic Chromate Reduction, *Microbiology*, Volume 78, Issue 1, pages 102–111, 2009 (DOI: 10.1134/S0026261709010135)
- Sheen R. T. & Kahler H. L., Effect of Ions on Mohr Method for Chloride Determination: Hydrogen Peroxide Modification for Sulfite Elimination, *Industrial and Engineering Chemistry*, Volume 10, Issue 11, pages 628-629, 1938 (DOI: 10.1021/ac50127a004)

- Shen J., He R., Han W., Sun X. Li J. & Wang L., Biological denitrification of high-nitrate wastewater in a modified anoxic/oxic-membrane bioreactor (A/O-MBR), *Journal of Hazardous Materials*, Volume 172, pages 595–600, 2009 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.045)
- Shrestha S., Semkuyu D. J. & Pandey V. P., Assessment of groundwater vulnerability and risk to pollution in Kathmandu Valley, Nepal, *Science of The Total Environment*, Volume 556, pages 23–35, 2016 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.03.021)
- Singh S. N. & Tripathi R. D., *Environmental Bioremediation Technologies*, Springer, Heidelberg, 2007
- Singh S., Anil A. G., Kumar V., Kapoor D., Subramanian S., Singh J., Ramamurthy P. C., Nitrates in the environment: A critical review of their distribution, sensing techniques, ecological effects and remediation, *Chemosphere*, Volume 287, 2022 (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.131996)
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. & Crouch S. R., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th Edition, Brooks/Cole, 2013
- Soh Y. N. A., Kunacheva C., Webster R. D. & Stuckey D. C., Identification of the production and biotransformational changes of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment processes: A short review, *Chemosphere*, Volume 251, 2020 (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126391)
- Speight J., *Lange's Handbook of Chemistry*, 17th Edition, McGraw-Hill Education, 2017
- Spiro S., Nitrous oxide production and consumption: regulation of gene expression by gas-sensitive transcription factors, *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, Volume 367, pages 1 213-1 225, 2012 (DOI: 10.1098/rstb.2011.0309)
- Srinandan C.S., D'souza G., Srivastava N., Nayak B. B. & Nerurkar A. S., Carbon sources influence the nitrate removal activity, community structure and biofilm architecture, *Bioresource Technology*, Volume 117, pages 292–299, 2012 (DOI: 10.1016/j.biortech.2012.04.079)
- Stensel H. D. & Horne G., Evaluation of denitrification kinetics at wastewater treatment facilities, *Proceedings of the Water Environment Federation 73rd Technical Exposition on Water Quality and Wastewater Treatment & Annual Conference (WEFTEC 2000)*, Anaheim, California, USA, 2000
- Stumm W. & Morgan J. J., *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*, 3rd Edition, John Wiley & Sons, 1996
- Stuyfzand & Bonte, A critical review of arsenic occurrence, fate and transport in natural and modified groundwater systems in The Netherlands, *Applied Geochemistry*, Volume 150, 2023 (DOI: 10.1016/j.apgeochem.2023.105596)

- Sun Y., Shen D., Zhou X., Shi N. & Tian Y., Microbial diversity and community structure of denitrifying biological filters operated with different carbon sources, *Springerplus*, Volume 5, Issue 1, 2016a (DOI: 10.1186/s40064-016-3451-3)
- Sun Z., Lv Y., Liu Y. & Ren R., Removal of nitrogen by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a novel metal resistant bacterium *Cupriavidus sp. S1*, *Bioresource Technology*, Volume 220, pages 142-150, 2016b (DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.110)
- Tajtáková M., Semanová Z., Tomková Z., Szökeová E., Majoroš J., Rádiková Z., Šebóková E., Klimeš I. & Langer P., Increased thyroid volume and frequency of thyroid disorders signs in schoolchildren from nitrate polluted area, *Chemosphere*, Volume 62, Issue 4, pages 559–564, 2006 (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.030)
- Tam N. F. Y., Wong Y. S. & Leung G., Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrient by the nitrification-denitrification process, *Water Research*, Volume 26, Issue 9, pages 1 229-1 236, 1992 (DOI: 10.1016/0043-1354(92)90183-5)
- Tam N. F. Y., Leung G. & Wong Y. S., The effects of external carbon loading on nitrogen removal in sequencing batch reactors, *Water Science and Technology*, Volume 30, Issue 6, pages 73-81, 1994 (DOI: 10.2166/wst.1994.0254)
- Theocharis M., Pavlopoulos C., Kousi P., Hatzikioseyan A., Zarkadas I., Tsakiridis P. E., Remoundaki E., Zoumboulakis L., & Lyberatos G., An integrated thermal and hydrometallurgical process for the recovery of silicon and silver from end-of-life crystalline Si photovoltaic panels, *Waste and Biomass Valorization*, Volume 13, pages 4 027–4 041, 2022 (DOI: 10.1007/s12649-022-01754-5)
- Thirumalaivasan D. & Karmegan M., Aquifer vulnerability assessment using analytical hierarchy process and GIS for upper Polar Watershed, *Proceedings of the 22nd Asian Conference on Remote Sensing*, Singapore, 2001
- Thomsen J. K., Geest T. & Cox R. P., Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 60, Issue 2, pages 536-541, 1994 (DOI: 10.1128/aem.60.2.536-541.1994)
- Timmermans P & Van Haute A., Denitrification with methanol: fundamental study of the growth and denitrification capacity of *Hyphomicrobium sp.*, *Water Research*, Volume 17, Issue 10, pages 1 249-1 255, 1983 (DOI: 10.1016/0043-1354(83)90249-X)
- Tolio T., Copani G. & Terkaj W., *Factories of the Future, The Italian Flagship Initiative*, Springer Open, Switzerland, 2019 (DOI: 10.1007/978-3-319-94358-9)

- Tortora G. J., Funke B. R. & Case C. L., *Microbiology: An Introduction*, 13th Edition, Pearson, United Kingdom, 2021
- Trögl J., Krhůtková O., Pilařová V., Daňová P., Holíček R., Kohlová M., Hejda S., Smrčka J., Boušková A. & Křiklavová L., Removal of nitrates from high-salinity wastewaters from desulphurization process with denitrifying bacteria encapsulated in Lentikats Biocatalyst, *International Journal of Environmental Science and Technology*, Volume 9, Issue 3, pages 425-432, 2012 (DOI: 10.1007/s13762-012-0048-4)
- Tu Q., Hong Y., Zhu Y., Huangfu X. & He Q., Developing the mathematical model to predict the nitrogen removal and N₂O emission from the biological aerated filter, *Journal of Water Process Engineering*, Volume 53, 2023 (DOI: 10.1016/j.jwpe.2023.103796)
- Tuncuk A., Stazi V., Akcil A., Yazici E. Y. & Deveci H., Aqueous metal recovery techniques from e-scrap: Hydrometallurgy in recycling, *Minerals Engineering*, Volume 25, Issue 1, pages 28–37, 2012 (DOI: 10.1016/j.mineng.2011.09.019)
- Ugalde-Salas P., Quemener E. D.-L., Harmand J., Rapaport A. & Bouchez T., Insights from microbial transition state theory on Monod's affinity constant, *Scientific Reports*, Volume 10, 2020 (DOI: 10.1038/s41598-020-62213-6)
- Ugurlu A. & Ozturkcu S. D., Treatment of nitrocellulose industry wastewaters by upflow denitrification filter: effect of packing media and recirculation, *Environmental Processes*, Volume 5, Issue 1, pages 81-94, 2018 (DOI: 10.1007/s40710-017-0282-3)
- UN (United Nations), *The United Nations World Water Development Report 2018: Nature-Based Solutions for Water*, UNESCO, France, 2018
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *National Primary Drinking Water Regulations (EPA 816-F-09-004)*, USA, 2009
- van Maanen J. M. S., Albering H. J., de Kok T. M. C. M., van Breda S. G. J., Curfs D. M. J., Vermeer I. T. M., Ambergen A. W., Wolffenbuttel B. H. R., Kleinjans J. C. S. & Reeser H. M., Does the risk of childhood diabetes mellitus require revision of the guideline values for nitrate in drinking water?, *Environmental Health Perspectives*, Volume 108, Issue 5, pages 457-461, 2000 (DOI: 10.1289/ehp.00108457)
- van Rijn J. Tal Y. & Barak Y., Influence of Volatile Fatty Acids on Nitrite Accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* Strain Isolated from a Denitrifying Fluidized Bed Reactor, *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 62, Issue 7, pages 2 615–2 620, 1996 (DOI: 10.1128/aem.62.7.2615-2620.1996)

- Vasileiou E., Papazotos P., Dimitrakopoulos D. & Perraki M., Expounding the origin of chromium in groundwater of the Sarigkiol basin, Western Macedonia, Greece: a cohesive statistical approach and hydrochemical study, *Environmental Monitoring and Assessment*, Volume 191, 2019 (DOI: 10.1007/s10661-019-7655-1)
- Vegliò & Birloaga, *Waste Electrical and Electronic Equipment Recycling, Aqueous Recovery Methods*, Woodhead Publishing, 2018 (DOI: 10.1016/B978-0-08-102057-9.00004-4)
- Vlasopoulos D., Oustadakis P., Agatzini-Leonardou S., Tsakiridis P. & Remoundaki E., A Hydrometallurgical Process for Cu Recovery from Printed Circuit Boards, *Materials Proceedings*, Volume 5, Issue 1, 2021 (DOI: 10.3390/materproc2021005056)
- Vlasopoulos D., Mendrinou P., Oustadakis P., Kousi P., Stergiou A., Karamoutsos S.-D., Hatzikioseyan A., Tsakiridis P. E., Remoundaki E. & Agatzini-Leonardou S., Hydrometallurgical recovery of silver and gold from waste printed circuit boards and treatment of the wastewater in a biofilm reactor: an integrated pilot application, *Journal of Environmental Management*, Volume 344, 2023 (DOI: 10.1016/j.jenvman.2023.118334)
- Walter B., Haase C. & Rübiger N., Combined nitrification/denitrification in a membrane reactor, *Water Research*, Volume 39, Issue 3, pages 2 781–2 788, 2005 (DOI: 10.1016/j.watres.2005.04.027)
- Wang L. & Shao Z., Aerobic denitrification and heterotrophic sulfur oxidation in the genus *Halomonas* revealed by six novel species characterizations and genome-based analysis, *Frontiers in Microbiology*, Volume 12, 2021 (DOI: 10.3389/fmicb.2021.652766)
- Wang H., Chen N., Feng C. & Deng Y., Insights into heterotrophic denitrification diversity in wastewater treatment systems: Progress and future prospects based on different carbon sources, *Science of the Total Environment*, Volume 780, 2021 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146521)
- Wang T., Wu T., Wang H., Dong W., Zhao Y., Chu Z., Yan G. & Chang Y., Comparative study of denitrifying-MBBRs with different polyethylene carriers for advanced nitrogen removal of real reverse osmosis concentrate, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Volume 17, Issue 8, 2020 (DOI: 10.3390/ijerph17082667)
- Wang Y., Liang B., Kang F., Wang Y., Yuan Z., Lyu Z., Zhu T. & Zhang Z., Denitrification performance in packed-bed reactors using novel carbon-sulfur-based composite filters for treatment of synthetic wastewater and anaerobic ammonia oxidation effluent, *Frontiers in Microbiology*, Volume 13, 2022 (DOI: 10.3389/fmicb.2022.934441)

- Wang Z., Xu X., Gong Z. & Yang F., Removal of COD, phenols and ammonium from Lurgi coal gasification wastewater using A²O-MBR system, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 235–236, pages 78–84, 2012 (DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.07.012)
- Wang Z., Jiang Y., Awasthi M. K., Wang J., Yang X., Amjad A., Wang Q., Lahori A. H. & Zhang Z., Nitrate removal by combined heterotrophic and autotrophic denitrification processes: Impact of coexistent ions, *Bioresource Technology*, Volume 250, pages 838-845, 2017 (DOI: 10.1016/j.biortech.2017.12.009)
- Ward M. H., Jones R. R., Brender J. D., deKok T. M., Weyer P. J., Nolan B. T., Villanueva C. M. & van Breda S. G., Drinking Water Nitrate and Human Health: An Updated Review, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Volume 15, Issue 7, 2018 (DOI: 10.3390/ijerph15071557)
- Watanabe T., Motoyama H. & Kuroda M., Denitrification and neutralization treatment by direct feeding of an acidic wastewater containing copper ion and high-strength nitrate to a bio-electrochemical reactor process, *Water Research*, Volume 35, Issue 17, pages 4 102-4 110, 2001 (DOI: 10.1016/S0043-1354(01)00158-0)
- Westerman P. W., Huffman R. L. & Feng J. S., Swine-lagoon seepage in sandy soil, *Transaction of the ASAE*, Volume 38, Issue 6, pages 1 749-1 760, 1995 (DOI: 10.13031/2013.28002)
- WHO (World Health Organization), *Guidelines for drinking-water quality*, 4th Edition Incorporating the first addendum, World Health Organization, Geneva, 2017
- Widmer R., Oswald-Krapf H., Sinha-Khetriwal D., Schnellmann M. & Böni H., Global perspectives on e-waste, *Environmental Impact Assessment Review*, Volume 25, pages 436-458, 2005 (DOI: 10.1016/j.eiar.2005.04.001)
- Woolfenden H. C., Gates A. J., Bocking C., Blyth M. G., Richardson D. J. & Moulton V., Modeling the effect of copper availability on bacterial denitrification, *MicrobiologyOpen*, Volume 2, Issue 5, pages 756-765, 2013 (DOI: 10.1002/mbo3.111)
- World Bank, *Water scarce cities: Thriving in a finite world*, The World Bank, Washington, 2018
- Wu G., Wu X.-Q., Wang Y.-N., Chi C.-Q., Tang Y.-Q., Kida K., Wu X.-L. & Luan Z.-K., *Halomonas daqingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volume 58, pages 2 859–2 865, 2008 (DOI: 10.1099/ij.s.0.65746-0)
- Xu Z., Dai X. & Chai X., Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes, *Science of the Total Environment*, Volume 634, pages 195–204, 2018 (DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.348)

- Yang G. C. C. & Lee H.-L., Chemical reduction of nitrate by nanosized iron: kinetics and pathways, *Water Research*, Volume 39, pages 884–894, 2005 (DOI: 10.1016/j.watres.2004.11.030)
- Yoshie S., Noda N., Miyano T., Tsuneda S., Hirata A. & Inamori Y., Characterization of microbial community in nitrogen removal process of metallurgic wastewater by PCR-DGGE, *Water Science and Technology*, Volume 46, Issue 11–12, pages 93–98, 2002 (DOI: 10.2166/wst.2002.0722)
- Yoshie S., Ogawa T., Makino H., Hirotsawa H., Tsuneda S. & Hirata A., Characteristics of bacteria showing high denitrification activity in saline wastewater, *Letters in Applied Microbiology*, Volume 42, pages 277–283, 2006 (DOI: 10.1111/j.1472-765X.2005.01839.x)
- You S.-J., Tsai Y.-P. & Huang R.-Y., Effects of heavy metals on the specific ammonia and nitrate uptake rates in activated sludge, *Environmental Engineering Science*, Volume 26, Number 7, 2009 (DOI: 10.1089=ees.2008.0186)
- Yu G., Wang J., Liu L., Li Y., Zhang Y. & Wang S., The analysis of groundwater nitrate pollution and health risk assessment in rural areas of Yantai, China, *BMC Public Health*, Volume 20, Issue 1, 2020 (DOI: 10.1186/s12889-020-08583-y)
- Zaitsev G., Mettänen T. & Langwaldt J., Removal of ammonium and nitrate from cold inorganic mine water by fixed-bed biofilm reactors, *Minerals Engineering*, Volume 21, Issue 1, pages 10–15, 2008 (DOI: 10.1016/j.mineng.2007.08.014)
- Zayed G. & Winter J., Removal of organic pollutants and of nitrate from wastewater from the dairy industry by denitrification, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 49, pages 469–474, 1998
- Zeng Z., Wang Y., Zhu W., Xie T. & Li L., Effect of COD/ NO₃⁻-N ratio on nitrite accumulation and microbial behavior in glucose-driven partial denitrification system, *Heliyon*, Volume 9, Issue 4, 2023 (DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e14920)
- Zhang K., Schnoor J. L. & Zeng E. Y., E-Waste Recycling: Where Does It Go from Here?, *Environmental Science and Technology*, Volume 46, pages 10 861-10 867, 2012 (DOI: 10.1021/es303166s)
- Zhang Q., Sun J., Liu J., Huang G., Lu C. & Zhang Y., Driving mechanism and sources of groundwater nitrate contamination in the rapidly urbanized region of south China, *Journal of Contaminant Hydrology*, Volume 182, pages 221–230, 2015 (DOI: 10.1016/j.jconhyd.2015.09.009)
- Zhang N., Chen H., Lyu Y. & Wang Y., Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Volume 94, pages 1 165–1 175, 2019 (DOI: 10.1002/jctb.5863)

- Zhang J., Jin B., Fu J., Wang Z. & Chen T., Adaptive laboratory evolution of *Halomonas bluephagenesis* enhances acetate tolerance and utilization to produce poly(3-hydroxybutyrate), *Molecules*, Volume 27, Issue 9, 2022a (DOI: 10.3390/molecules27093022)
- Zhang M., Tan Y., Fan Y., Gao J., Liu Y., Lv X., Ge L. & Wu J., Nitrite accumulation, denitrification kinetic and microbial evolution in the partial denitrification process: The combined effects of carbon source and nitrate concentration, *Bioresource Technology*, Volume 361, Issue 11, 2022b (DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127604)
- Zhao S., Su X., Wang Y., Yang X., Bi M., He Q. & Chen Y., Copper oxide nanoparticles inhibited denitrifying enzymes and electron transport system activities to influence soil denitrification and N₂O emission, *Chemosphere*, Volume 245, 2020 (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125394)
- Zheng X., Su Y., Chen Y., Wan R., Liu K., Li M. & Yin D., Zinc oxide nanoparticles cause inhibition of microbial denitrification by affecting transcriptional regulation and enzyme activity, *Environmental Science and Technology*, Volume 48, pages 13 800–13 807, 2014 (DOI: 10.1021/es504251v)
- Zhou W., Sun Y., Wu B., Zhang Y., Huang M., Miyanaga T., Zhang Z., Autotrophic denitrification for nitrate and nitrite removal using sulfur-limestone, *Journal of Environmental Sciences*, Volume 23, Issue 11, pages 1 761–1 769, 2011 (DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60635-3)
- Zhu I. X., *Nitrification and Denitrification*, IntechOpen, 2017 (DOI: 10.5772/65170)
- Zhu X., Chen Y., Chen H., Li X., Peng Y. & Wang S., Minimizing nitrous oxide in biological nutrient removal from municipal wastewater by controlling copper ion concentrations, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 97, pages 1 325–1 334, 2013 (DOI: 10.1007/s00253-012-3988-1)
- Zoeteman B. C. J., Krikke H. R. & Venselaar J., Handling WEEE waste flows: on the effectiveness of producer responsibility in a globalizing world, *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, Volume 47, pages 415–436, 2010 (DOI: 10.1007/s00170-009-2358-3)
- Zou G., Ylinen A., Di Capua F., Papirio S., Lakaniemi A.-M. & Puhakka J., Impact of heavy metals on denitrification of simulated mining wastewaters, *Advanced Materials Research*, Volume 825, pages 500-503, 2013 (DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.825.500)
- Zou G., Papirio S., Ylinen A., Di Capua F., Lakaniemi A. M. & Puhakka J. A., Fluidized-bed denitrification for mine waters, Part II: effects of Ni and Co, *Biodegradation*, Volume 25, pages 417–423, 2014 (DOI: 10.1007/s10532-013-9670-1)

Zou G., Papirio S., van Hullebusch E. D. & Puhakka J. A., Fluidized-bed denitrification of mining water tolerates high nickel concentrations, *Bioresource Technology*, Volume 179, pages 284–290, 2015 (DOI: 10.1016/j.biortech.2014.12.044)

Παράρτημα

Εικόνων & Πινάκων

EΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα Π.1: Χαρακτηριστικό παράδειγμα σύστασης της σκόνης που χρησιμοποιείται κατά την υδρομεταλλουργική διεργασία ανάκτησης μετάλλων

2019-12-19 11:07

SQX Calculation Result

Sample: D1

Date analyzed: 2019-12-19 10:57

Application: Au_Pt_Pd FA

Sample type: Metal & Alloy

Στοιχείο	D1	D2	Ag1	Ag2	Sn1	Sn2
	w/o normal	w/o normal	w/o normal	w/o normal	w/o normal	w/o normal
Na	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Mg	0.1072	0.1063	0.1101	0.1028	0.1073	0.1155
Al	2.9986	2.9950	3.1135	3.4055	3.1150	3.1577
Si	3.2380	3.1169	2.9918	3.0039	3.0232	2.9967
P	0.0192	0.0188	0.0205	0.0210	0.0211	0.0189
S	0.0397	0.0543	0.0425	0.0406	0.0381	0.0418
Cl	0.0125	0.0302	0.0125	0.0101	0.0140	0.0137
K	0.0724	0.0717	0.0666	0.0643	0.0629	0.0620
Ca	1.1875	1.1683	0.9819	0.9618	0.9384	0.9333
Ti	1.5327	1.5263	1.3902	1.3719	1.3083	1.3294
Cr	0.2709	0.2483	0.2714	0.2657	0.2879	0.2949
Mn	2.8836	2.8006	2.6175	2.5767	2.6048	2.5262
Fe	25.8244	24.8553	24.5839	23.8797	24.4034	23.3335
Co	0.0508	0.0493	0.0682	0.0714	0.0554	0.0623
Ni	2.4703	2.4373	2.3352	2.3116	2.2970	2.1561
Cu	15.4272	17.0776	22.2407	22.3103	21.9781	22.9710
Zn	6.4829	6.3581	5.7593	5.5999	5.6685	5.3674
Br	1.0374	1.2444	0.8725	0.9559	0.9081	0.9271
Sr	0.2588	0.2611	0.2229	0.2178	0.2090	0.2069
Zr	0.2536	0.2432	0.2304	0.2204	0.2221	0.2162
Nb	0.0332	0.0338	0.0332	0.0291	0.0316	0.0220
Mo	0.0851	0.0845	0.0727	0.0775	0.0703	0.0686
Pd	0.0432	0.0435	0.0274	0.0264	0.0320	0.0298
Ag	0.6766	0.6596	0.8684	0.9289	0.6099	0.6521
Sn	11.5311	11.4209	11.6021	11.2819	13.3451	14.2652
Ba	4.1291	3.8308	3.5407	3.7484	3.4502	3.4977
Nd	0.0593	0.1661	0.1212	0.1506	0.1499	0.1297
Ta	0.6487	0.6394	0.7861	0.7850	0.7288	0.7635
Pt	0.0000	0.0058	0.0000	0.0008	0.0000	0.0000
Au	0.0324	0.0168	0.0387	0.0466	0.0335	0.0337
Pb	6.0673	6.2515	6.1131	6.1192	6.1218	5.8560
Bi	0.2059	0.1968	0.1743	0.1530	0.1655	0.1494
Σύνολο	87.6796	88.0125	91.3095	90.7387	92.0012	92.1983

ΠΙΝΑΚΕΣ - Πρωτογενή πειραματικά αποτελέσματα

Πίνακας Π.1: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών και νιτρωδών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων 750 mg/L, 2 750 mg/L και 5 750 mg/L και νιτρωδών ιόντων 2 000 mg/L

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)
Αρχική [NO ₃ ⁻]=750 mg/L			
0	6.032	813.4	0
1	6.690	636.9	206.3
2	7.050	139.2	222.4
3	7.541	42.14	60.28
4	7.776	17.14	5.757
6	7.766	14.66	0.3549
24	7.425	12.91	0.1441
Αρχική [NO ₃ ⁻]=2 750 mg/L			
0	6.441	2 713	0
1	7.164	2 029	142.2
2	7.146	494.4	308.9
3	7.161	420.8	479.2
4	7.294	263.5	560.2
5	7.657	143.7	309.9
6	8.012	51.54	126.8
24	7.803	4.472	0.8764
Αρχική [NO ₃ ⁻]=5 750 mg/L			
0	6.012	5 784	0
1	6.763	4 598	428.5
2	6.934	3 556	593.6
3	7.127	2 270	840.1
4	7.272	1 807	953.7
5	7.381	856.1	1 019
24	8.018	6.183	0.4850
Αρχική [NO ₂ ⁻]=2 000 mg/L			
0	6.366		1 904
1	7.619		1 406
2	8.172		944.9
3	8.442		679.6
4	8.612		347.3
5	8.717		124.8
6	8.784		29.01
24	8.321		0.1650

Πίνακας Π.2: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών και νιτρωδών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές τιμές pH 3, 4, 5 και 6, 6.8, 8

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)
Αρχικό pH=3			
0	3.036	1 229	0
1	6.300	538.3	63.35
2	7.008	83.69	28.79
3	7.283	25.33	1.496
4	7.407	20.94	0.8869
24	7.626	15.10	0.2119
Αρχικό pH=4			
0	4.077	1 349	0
1	7.075	72.06	38.64
2	7.393	30.20	7.229
3	7.404	11.78	2.484
4	7.360	16.85	0.1141
24	7.501	12.18	0.1067
Αρχικό pH=5			
0	5.020	1 320	0
1	7.248	112.0	72.61
2	7.529	36.91	15.69
3	7.513	23.14	5.250
24	7.518	13.93	0.1330
Αρχικό pH=6			
0	5.942	1 232	0
1	6.96	164.6	120.6
2	7.691	41.55	20.16
3	7.778	20.21	3.588
4	7.52	14.95	0.1267
24	7.305	15.68	0.1162
Αρχικό pH=6.8			
0	6.784	1 298	0
1	7.551	808.6	75.55
2	7.721	301.5	188.3
3	7.811	134.9	198.5
4	8.056	45.10	79.76
24	7.863	12.47	0.5336
Αρχικό pH=8			
0	7.92	1 105	0
1	7.812	369.2	198.7
2	8.029	86.61	118.0
3	8.138	40.53	43.30
4	8.16	22.11	8.848
24	7.827	15.83	0.1814

Πίνακας Π.3: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών και νιτρωδών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για τιμές αλατότητας 5%, 7.5% και 10%

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)
[NaCl]=5%			
0	3.026	3 196	0
1	6.441	1 676	3.528
2	7.337	275.1	14.50
3	7.566	35.30	3.562
24	7.607	12.47	0.2129
[NaCl]=7.5%			
0	2.897	2 713	0
1	6.661	1 459	19.30
2	7.429	218.2	24.89
3	7.637	98.89	7.868
4	7.631	21.97	3.934
24	7.693	9.544	0.2676
[NaCl]=10%			
0	3.036	1 229	0
1	6.3	538.3	63.35
2	7.008	83.69	28.79
3	7.283	25.33	1.496
4	7.407	20.94	0.8869
24	7.626	15.10	0.2119

Πίνακας Π.4: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών και νιτρωδών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις μετάλλων 50 mg/L, όταν αυτά προστίθενται ξεχωριστά στο θρεπτικό μέσο

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Me] (mg/L)
Χωρίς μέταλλα				
0	2.998	2 656	0	
1	7.225	1 045	1.740	
2	7.791	83.86	2.665	
3	7.853	15.28	2.044	
24	7.791	2.558	0.1135	
[Cu]=50 mg/L				
0	2.998	2 896	0	44.8
1	7.092	748.4	69.41	18.5
2	7.552	98.82	37.34	10.2
3	7.621	14.09	10.48	2.10
4	7.623	6.897	2.202	0.800
24	7.762	2.708	0.1376	0.120
[Zn]=50 mg/L				
0	3.008	2 948	0	45.4
1	7.024	628.8	70.74	11.4
2	7.518	88.35	37.97	9.00
3	7.664	13.20	11.67	6.00
4	7.662	6.448	2.484	2.30
24	7.665	2.110	0.09959	0.0820
[Fe]=50 mg/L				
0	3.060	3 001	0	39.2
1	7.019	1 740	1.400	11.2
2	7.507	1 024	3.300	1.83
3	7.923	293.4	4.300	0.910
4	8.048	68.15	5.200	0.950
5	8.057	21.56	1.500	0.720
24	7.899	2.858	0.3000	0.330
[Ni]=50 mg/L				
0	2.984	3 090	0	47.6
1	6.680	1 863	0.6229	35.2
2	7.396	1 037	1.372	33.9
3	7.812	395.1	2.101	28.2
4	8.002	102.6	1.864	26.3
5	8.058	20.51	1.377	21.8
24	7.927	2.708	0.1186	2.54

Πίνακας Π.5: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών, νιτρωδών ιόντων και μετάλλων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις μετάλλων 100 mg/L, όταν αυτά προστίθενται ξεχωριστά στο θρεπτικό μέσο

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Me] (mg/L)
[Cu]=100 mg/L				
0	3.023	3 105	0	95.2
1	7.007	1 063	132.6	44.0
2	7.592	136.3	123.7	25.2
3	7.754	42.52	48.33	17.6
4	7.817	16.47	14.40	12.6
5	7.850	10.04	5.627	9.20
24	7.896	5.845	0.2149	0.130
[Zn]=100 mg/L				
0	3.037	2 926	0	88.0
1	6.963	946.7	99.82	21.5
2	7.563	89.10	70.82	16.0
3	7.781	17.67	15.28	10.8
4	7.782	7.196	3.879	7.50
24	7.770	1.212	0.1427	0.170
[Fe]=100 mg/L				
0	3.017	3 210	0	91.2
1	6.579	1 968	1.946	38.8
2	7.321	1 205	4.327	5.30
3	7.721	529.8	5.066	1.45
4	7.940	144.5	3.833	1.24
5	8.012	31.14	2.013	1.20
24	7.942	4.204	0.2288	0.460
[Ni]=100 mg/L				
0	3.004	3 016	0	94.2
1	6.628	2 073	0.8434	61.0
2	7.193	1 474	1.245	58.6
3	7.636	844.0	1.429	56.6
4	7.901	351.7	1.738	54.0
5	8.051	95.83	1.768	51.0
24	8.065	0	0.1173	2.16

Πίνακας Π.6: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών, νιτρωδών, θειικών ιόντων και μετάλλων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις μετάλλων 20 mg/L, όταν αυτά προστίθενται ως μίγμα στο θρεπτικό μέσο

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[SO ₄ ²⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
[Me]=20 mg/L								
0	3.079	3 019	0	2 001	18.1	21.1	15.0	16.3
1	6.598	2 163	3.300	1 856	2.15	4.79	3.44	13.6
2	7.035	1 575	20.56	1 882	1.65	4.32	0.775	13.0
3	7.443	1 098	60.28	1 782	1.14	2.32	0.525	12.9
4	7.703	445.5	33.11	1 854	0.750	1.42	0.630	12.8
5	7.821	73.04	29.12	1 913	0.550	0.710	0.730	12.1
6	7.976	5.700	1.834	1 724	0.440	0.410	0.710	10.4
7	7.939	6.598	0.1680	1 735	0.390	0.230	0.730	10.5
8	7.950	6.448	0.1782	1 732	0.340	0.140	0.660	8.84
9	7.937	8.094	0.1680	1 499	0.270	0.110	0.610	7.34
10	7.935	3.307	0.1858	1 578	0.220	0.100	0.510	5.64
13	7.795	4.803	0.3492	1 770	0.150	0.140	0.440	5.37
14	7.854			1 691	0.120	0.130	0.43	4.64
15	7.836			1 683	0.120	0.110	0.420	4.31
16	7.858			1 705	0.110	0.130	0.430	3.82
17	7.852	6.149	0.3353	1 618	0.110	0.0900	0.440	3.42
18	7.860	6.000	0.4316	1 589	0.100	0.100	0.440	3.09
22	7.803	4.055	0.5355	1 586	0.110	0.200		2.12
23	7.893	4.653	0.8206	1 570	0.100	0.130	0.440	1.96
24	7.932	3.905	0.8839	1 516	0.0900	0.0900	0.420	1.63

Πίνακας Π.7: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών, νιτρωδών, θειικών ιόντων και μετάλλων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις μετάλλων 50 mg/L, όταν αυτά προστίθενται ως μίγμα στο θρεπτικό μέσο

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[SO ₄ ²⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
[Me]=50 mg/L								
0	3.173	2 836	0	2 000	53.8	51.0	45.2	57.1
1	6.275	2 440	0.8561	1 713	8.16	22.2	4.60	47.0
2	6.843	2 019	4.474	1 789	4.38	11.3	0.640	42.0
3	7.267	1 579	16.13	1 713	3.08	8.71	0.0700	40.6
4	7.488	1 198	33.02	1 735	2.50	6.21	0.0500	40.0
5	7.676	787.0	54.56	1 732	1.96	4.80	0	39.9
6	7.797	404.1	82.89	1 626	1.53	3.69	0.0500	40.0
7	7.896	220.8	74.84	1 648	1.11	2.84	0.120	37.7
8	7.947	70.39	59.67	1 640	0.770	2.28	0.150	37.0
9	8.002	29.04	34.36	1 691	0.590	1.62	0.210	36.0
10	8.013	7.047	8.382	1 540	0.530	1.15	0.110	35.0
14	7.762	5.700	0.1997	1 905	0.560	1.72	0.210	35.0
15	7.795		0.1338	1 956	0.530	1.31	0.380	--
16	7.794	6.149	0.1427	1 927	0.480	0.840	0.940	34.1
17	7.800		0.07679	1 878	0.460	0.570	0.870	32.5
18	7.822	6.448	0.1186	1 800	0.410	0.4	0.890	30.2
21	7.760	10.79	0.3036	1 732	0.170	0.0800	0.320	9.10
22	7.783			1 632	0.140	0.0900	0.400	--
23	7.799			1 626	0.120	0.0900	0.410	5.96
24	7.816	4.204	0.3049	1 559	0.120	0.110	0.420	5.52

Πίνακας Π.8: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών, νιτρωδών ιόντων και μετάλλων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για αρχικές συγκεντρώσεις μετάλλων 50 mg/L, απουσία θειικών ιόντων

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
[Me]=50 mg/L απουσία SO ₄ ²⁻							
0	3.048	2 706	0	48.4	45.3	45.2	47.6
1	6.235	2 088	31.51	6.78	20.4	19.9	47.9
2	6.899	1 549	74.43	3.02	11.7	11.2	47.4
3	7.205	831.1	115.7	1.60	7.75	5.80	48.9
4	7.476	318.3	105.0	1.20	4.12	2.64	49.2
5	7.621	91.34	78.51	0.800	3.22	1.56	48.5
6	7.687	29.94	46.29	0.660	1.21	1.52	47.6
9	7.733	4.204	0.1668	0.510	1.16	2.03	40.5
14	7.561	8.693	0.2225	0.610	1.11	2.09	38.4
15	7.653	5.700	0.1896	0.450	0.990	2.32	37.4
16	7.666	5.102	0.1896	0.410	0.950	2.42	34.1
17	7.661			0.370	0.820	2.45	31.2
18	7.729			0.350	0.710	2.42	29.2
19	7.741	7.047	0.1541	0.340	0.610	2.27	27.1
20	7.643	4.503	0.1807	0.340	0.540	2.53	24.7
21	7.670			0.300	0.430	2.58	22.3
22	7.693			0.290	0.390	2.60	20.4
23	7.676			0.260	0.360	2.33	18.6
24	7.673	3.905	0.1376	0.240	0.310	2.48	17.2

Πίνακας Π.9: Μεταβολή της συγκέντρωσης διαλυτού νικελίου σε συνάρτηση με το pH, για αρχική συγκέντρωση διαλυτού νικελίου 50 mg/L, σε καθαρό υδατικό διάλυμα νικελίου και σε διαλύματα που περιέχουν 5 g/L πεπτόνη, 5 g/L πεπτόνη και 1 g/L εκχύλισμα ζύμης, 2.5 g/L πεπτόνη, 1% NaCl και 5% NaCl

pH	[Ni ²⁺] (mg/L)	pH	[Ni ²⁺] (mg/L)	pH	[Ni ²⁺] (mg/L)
Υδατικό διάλυμα		5 g/L πεπτόνη		5 g/L πεπτόνη και 1 g/L εκχύλισμα ζύμης	
2.980	50.3	3.027	51.0	4.973	46.8
4.932	44.7	5.00	45.9	6.024	47.6
6.044	44.5	6.015	45.3	6.493	47.9
6.535	44.6	6.512	45.9	7.005	47.1
7.012	5.94	6.959	45.8	7.510	47.4
7.517	42.0	7.518	47.1	7.993	47.9
7.983	41.3	7.953	47.1		
2.5 g/L πεπτόνη		1% NaCl		5% NaCl	
3.038	51.0	2.989	49.2	3.032	47.4
5.029	46.5	3.929	44.3	4.036	42.3
5.962	47.0	4.477	45.5	4.456	42.8
6.497	47.6	5.019	45.0	5.079	42.9
6.622	47.7	5.509	45.2	5.501	43.4
6.746	46.7	6.043	46.1	6.054	43.4
6.873	45.8	6.537	44.1	6.540	41.3
7.001	47.9	6.955	44.6	7.002	41.9
7.126	47.3	7.581	43.8	7.267	42.9
7.254	48.0	8.010	44.0	7.499	43.4
7.375	47.7			7.719	42.6
7.496	47.4			7.942	43.1
7.753	47.3				
8.003	47.0				

Πίνακας Π.10: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών, νιτρωδών ιόντων και μετάλλων σε συνάρτηση με τον χρόνο, για λόγο C/N=3.11 g C/g NO₃-N στο θρεπτικό μέσο και για αρχικές συγκεντρώσεις νιτρικών 6 000 mg/L, 9 000 mg/L και 14 000 mg/L

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
Αρχική [NO ₃ ⁻]=6 000 mg/L							
0	5.668	6 109	0	20.7	17.4	5.75	21.2
1.5	7.001	5 222	146.4	8.76	15.9	1.27	21.8
3	7.012	4 582	283.5	2.99	15.7	1.32	22.1
4.5	7.077	4 249	529.0	2.00	15.6	1.88	21.8
6	7.099	3 442	571.3	1.60	15.1	2.08	22.5
23	7.302	601.1	1 837	0.550	13.6	1.86	27.5
26	7.506	640.1	1 670	0.500	12.6	1.76	27.6
27	7.574	430.0	1 404	0.450	11.7	1.70	27.1
47	7.929	108.0	340.8	0.320	6.30	1.99	26.3
49	7.997	76.27	223.2	0.290	5.90	1.94	25.6
51	8.025	47.87	99.59	0.270	5.30	1.97	25.4
53	8.101	13.15	18.32	0.250	5.50	1.95	25.3
Αρχική [NO ₃ ⁻]=9 000 mg/L							
0	5.930	8 854	0	19.5	17.8	12.1	18.1
1.5	7.201	6 576	151.2	7.54	16.0	2.64	18.5
3	7.205	4 885	311.5	3.95	15.8	2.08	19.2
4.5	7.200	4 424	469.4	2.75	15.7	2.14	19.2
6	7.215	3 630	559.7	2.21	15.6	2.26	18.8
23	7.365	--	1 494	1.10	12.6	2.35	19.9
25	7.400	2 200	1 464	1.01	13.0	2.27	19.6
27	7.424	1 816	1 519	1.01	12.4	2.46	20.6
47	7.936	312.8	936.6	0.760	7.44	2.56	20.4
52	8.022	105.9	413.3	0.650	7.56	2.50	21.5
53	8.062	110.6	293.0	0.580	7.28	2.45	21.5
54	8.132	74.73	170.1	0.460	7.20	2.61	21.2
59	8.184	16.23	0.09733	0.450	8.48	3.10	22.3

(συνέχεια του πίνακα στην επόμενη σελίδα)

(συνέχεια του πίνακα της προηγούμενης σελίδας)

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
Αρχική [NO ₃ ⁻]=14 000 mg/L							
0	6.020	13 895	0	15.4	18.2	13.8	20.5
1.5	7.368	12 742	6.982	7.50	19.8	3.36	21.4
3	7.408	11 410	7.070	3.70	23.0	3.06	21.4
4.5	7.391	10 642	14.25	2.63	20.3	2.39	21.2
6	7.532	10 129	10.25	2.01	18.1	2.67	21.2
23	7.986	5 300	10.44	1.11	14.0	2.84	21.2
24	7.927	4 600	3.879	1.26	--	3.21	20.6
25	8.007	4 732	1.799	1.07	13.6	2.83	20.3
27	7.976	4 000	1.815	1.12	11.4	3.27	19.7
29	8.021	4 018	1.193	1.08	11.8	3.20	19.4
46	8.104	2 060	1.255	0.800	10.0	3.21	20.6
47	8.281	1 575	3.188	0.820	--	3.66	20.5
50	8.127	1 708	1.312	0.760	10.9	3.45	20.2
51	8.290	1 431	3.682	0.780	10.1	3.77	19.4
52	8.148	1 298	0.8887	0.690	10.6	3.55	18.9
53	8.232	1 030	1.027	0.645	10.2	3.85	19.2
55	8.178	576.0	0.3738	0.640	10.2	4.06	18.9
56	8.341	96.51	0.3273	0.560	10.6	3.74	19.1
59	8.202	56.16	0.08604	0.650	10.1	3.98	18.2

Πίνακας Π.11: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών, νιτρωδών ιόντων και μετάλλων σε συνάρτηση με τον χρόνο, σε απόβλητα που προέρχονται από την υδρομεταλλουργική ανάκτηση μετάλλων από ΠTK (δοκιμές με διαφορετικούς συνδυασμούς των υδρομεταλλουργικών ροών WW1, WW2, WW3 και WW4 και για διαφορετικές αραιώσεις με θρεπτικό μέσο)

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
Ροές WW1, WW2, WW4, αραιώση 1:6							
0	6.685	4 364	0				
0	6.722	5 389	0	8.70	1.50	0.680	1.36
0	6.685	5 005	0	3.67	0.610	0.510	1.07
1.5	7.174	4 198	40.91	3.10	8.45	1.46	3.81
1.5	7.208	4 108	53.04	1.82	7.60	0.930	7.55
3	7.206	4 031	103.7	1.73	9.30	1.70	4.06
3	7.223	3 467	147.0	1.22	6.80	0.850	8.00
4.5	7.257	3 442	210.2	1.23	9.25	1.98	4.30
4.5	7.237	3 006	263.8	0.910	7.00	0.880	8.85
6	7.276	3 224	330.8	1.49	9.20	2.14	4.60
6	7.242	2 225	368.9	0.750	7.05	1.13	9.30
20	7.600	280.2	826.6	--	--	--	--
21	7.591	300.6	849.2	0.320	5.65	1.59	7.00
22	7.711	229.4	639.0	0.380	2.70	0.810	12.0
24	7.785	148.2	386.5	0.260	5.20	1.71	6.95
24	7.932	98.22	311.0	0.330	2.15	0.780	11.2
26	8.003	8.631	15.23	0.310	2.06	0.910	11.7
27	7.910	55.51	146.1	0.210	4.75	0.890	7.10
28	7.957	7.774	0.03103	0.300	1.90	1.09	11.4
45	7.800	7.262	0.06771	0.120	1.95	0.980	8.25
96	7.938	8.030	0.09028				
Ροές WW1, WW2, WW4, χωρίς αραιώση							
0	6.883	12 790	0	20.2	4.68	1.25	2.84
1.5	7.188	10 804	1.574	5.28	32.4	5.38	7.80
3	7.240	9 267	1.236	2.98	37.7	6.10	8.28
4.5	7.276	9 267	1.044	2.09	43.7	5.86	9.00
6	7.302	9 843	0.9705	1.72	47.5	5.70	9.24
23	7.336	9 843	0.6432	1.71	51.3	5.68	12.6

(συνέχεια του πίνακα στην επόμενη σελίδα)

(συνέχεια του πίνακα της προηγούμενης σελίδας)

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
Ροές WW1, WW2, WW4, αραιώση 1:3							
0	6.551	4 326	0	1.43	1.63	1.01	1.03
1.5	7.163	3 941	0.4796	0.38	10.0	4.78	5.01
3	7.200	3 327	0.4711	0.37	11.3	3.52	5.50
4.5	7.231	3 378	0.4655	0.22	12.5	4.40	5.75
6	7.252	3 544	0.4345	0.18	13.8	4.05	6.00
23	7.389	2 404	0.4175	0.21	18.5	2.58	7.25
Ροές WW1, WW2, WW4, αραιώση 1:10							
0	6.482	990.8	0	1.20	0.560	0.540	0.740
1.5	7.463	657.7	0.5304	0.460	5.90	1.38	3.55
3	7.534	414.3	0.3385	0.610	5.35	1.19	3.95
4.5	7.577	338.5	0.3724	0.320	5.70	1.08	4.00
6	7.638	237.9	0.2172	0.280	5.10	1.14	4.20
12	7.716	36.04	0.2708	0.250	0.650	0.610	5.05
Ροές WW1, WW2, WW3, WW4, αραιώση 1:10							
0	6.215	4 684	0	41.1	1.10	0.980	1.18
1.5	7.135	4 134	16.93	18.7	6.57	1.14	4.56
3	7.388	3 365	33.85	11.0	8.76	1.07	4.68
4.5	7.534	2 609	68.84	6.72	10.6	1.19	5.01
6	7.361	1 388	375.2	4.26	9.78	1.18	5.54
7.5	7.456	348.1	542.4	5.67	12.0	1.13	2.34
9	7.572	172.7	472.3	4.26	11.8	1.01	2.28
10.5	7.74	85.75	246.0	3.21	10.6	1.09	2.22
12	7.817	44.24	122.7	2.73	10.1	1.04	2.19
16	7.852	10.98	0.3639	2.60	9.84	1.09	2.19
23	7.769	7.390	0.1044	1.99	7.38	1.05	2.94

(συνέχεια του πίνακα στην επόμενη σελίδα)

(συνέχεια του πίνακα της προηγούμενης σελίδας)

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
Ροές WW1, WW2, WW4, αραιώση 1:7.5							
0	6.212	6 115	0	40.6	1.87	0.630	1.19
1.5	6.949	4 937	218.4	23.0	7.40	0.960	4.89
3	7.018	3 784	300.5	16.9	8.70	0.890	5.10
4.5	7.077	3 502	389.3	12.8	11.7	0.910	5.55
6	7.134	3 288	588.2	10.4	17.8	0.900	5.82
7.5	7.167	2 379	694.0	8.82	13.2	0.940	6.06
9	7.192	2 058	826.6	7.50	12.6	0.970	6.09
10.5	7.211	1 586	936.6	5.67	10.0	0.970	6.33
12	7.239	1 216	93.10	5.12	9.40	1.00	6.30
24	7.760	161.0	42.35	2.21	4.10	0.910	7.29
29	7.933	8.374	9.028	1.97	1.50	1.01	7.23
Ροές WW1, WW2, WW3, WW4, αραιώση 1:6							
0	6.697	4 919	0	6.19	8.10	0.595	1.22
1.5	7.191	4 153	46.97	2.46	8.03	1.20	5.30
3	7.215	3 749	125.3	1.48	8.05	1.28	6.10
4.5	7.247	3 224	237.0	1.07	8.13	1.43	6.58
6	7.259	2 725	349.8	1.12	8.13	1.64	6.95
21	7.634	172.1	771.6	0.350	4.18	1.20	9.00
24	7.859	123.2	348.8	0.295	3.68	1.25	9.10
26	7.957	32.07	80.68	0.260	3.41	0.900	9.40
28	7.957	7.774	0.03103	0.300	3.14	1.09	9.40

Πίνακας Π.12: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών και νιτρωδών ιόντων σε συνάρτηση με τον χρόνο, κατά την ανάπτυξη του *H. denitrificans* με δότες ηλεκτρονίων το οξικό νάτριο και την αιθανόλη και σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την πεπτόνη

Χρόνος (d)	pH	OD _{600 nm}	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)
Πεπτόνη				
0	6.956	0.377	2 080	0
1	7.636	1.552	405.2	463.4
2	8.011	1.683	266.1	220.2
3	8.009	1.605	169.7	26.06
4	8.07	1.550	77.93	0.7878
5	7.816	1.765	7.646	0.1847
6	6.956	0.377	2080	0
Οξικό νάτριο				
0	7.145	0.4430	2 064	0
1	8.023	1.544	625.4	506.9
2	8.018	1.768	1.774	0.1146
Αιθανόλη				
0	7.426	0.2670	2 095	0
1	7.701	1.877	234.3	0.1972
2	7.460	2.016	0.9175	0.09460

Πίνακας Π.13: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών, νιτρωδών ιόντων και μετάλλων σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα το οξικό νάτριο, για τιμές του λόγου C/N=5.18, 2.95, 2.40 g C/g NO₃-N

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
C/N=5.18 g C/g NO ₃ -N							
0	3.025	2 821	0	18.8	20.6	15.5	19.92
2	4.727	2 595	8.781	5.55	120	1.76	31.92
24	6.993	1 500	103.5	6.09	20.2	0.390	29.4
48	7.387	471.5	122.8	4.77	12.1	0.420	26.5
96	7.558	7.196	0.2859	0.400	4.68	0.460	17.1
C/N=2.95 g C/g NO ₃ -N							
0	3.000	2 819	0	19.3	20.8	12.7	19.7
1	4.633	2 482	3.146	7.52	90	2.27	26.2
2	4.938	2 309	7.408	6.46	87.5	1.29	26.3
3	5.308	2 230	10.83	5.83	82.5	0.475	26.82
4	5.622	2 215	25.90	5.93	73.0	0.345	26.0
5	5.956	2 178	29.73	6.12	62.0	0.297	25.4
6	6.328		36.95	6.06	--	0.260	24.6
7	6.427	2 051	37.96	6.32	--	0.270	24.2
8	6.605		43.66	6.56	--	0.270	24.0
9	6.700	1 811	46.33	6.74	--	0.300	23.0
24	7.244	995.2	130.2	6.10	10.8	0.330	24.5
48	7.600	314.3	98.94	2.37			21.4
72	7.907	10.49	21.14	0.610	4.96		15.4
C/N=2.40 g C/g NO ₃ -N							
0	3.063	3 075	0	19.7	20.5	11.8	18.7
1	5.083	2 462	1.617	6.2	53.5	1.94	23.7
2	5.422	2 440	4.422	4.8	48.0	1.06	23.4
3	5.784	2 410	6.703	4.2	42.4	0.780	23.9
4	6.000	2 425	10.06	4.15	37.6	0.730	23.7
24	7.125	1 856	82.65	2	9.90	0.740	22.7
48	7.420	614.3	152.8	0.97	7.12	0.420	23.0
72	7.707	25.49	51.14	0.61	5.28	0.430	19.4
96	7.658	9.196	1.286	0.4	4.68	0.460	17.1

Πίνακας Π.14: Μεταβολή των τιμών pH και των συγκεντρώσεων νιτρικών, νιτρωδών ιόντων και μετάλλων σε συνάρτηση με τον χρόνο, με πηγή άνθρακα την αιθανόλη, για τιμές του λόγου C/N=5.18, 1.44, 1.84, 1.11 g C/g NO₃-N

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
C/N=5.18 g C/g NO ₃ -N							
0	2.925	2 352	0	18.8	18.48	20.64	22.5
1	6.102	2 046	108.6	6.18	26	0.9	27
2	6.353	1 826	158.8	4.04	22	0.68	26
3	6.501	1 575	231.2	2.87	20.5	0.66	24.5
4	6.590	1 399	306.0	2.21	19	0.66	25
5	6.666	1 182	391.1	1.77	18.72	0.67	25
6	6.745	1 093	467.6	1.51	17.88	0.72	26.5
24	7.773	24.28	78.43	0.320	2.07	0.81	22.32
48	7.710	1.162	0.1384	0.230	1.35	0.9	29.4
C/N=1.44 g C/g NO ₃ -N							
0	3.016	2 572	0	17.6	18.0	17.2	22.2
1	6.662	2 211	53.47	2.06	22.6	0.450	28.6
2	6.911	2 064	59.64	1.25	18.6	0.400	27.2
3	6.957	2 052	71.47	1.10	18.2	0.420	28.3
4	7.025	2 077	75.73	1.03	17.0	0.420	27.5
5	7.118	1 948	88.49	0.840	16.1	0.420	26.6
24	7.214	1 335	248.2	0.520	11.5	0.450	26.9
48	7.293	686.6	373.2	0.220	8.88	0.470	26.5
72	7.362	249.0	439.6	0.120	5.40	0.520	25.0
144	7.855	7.768	14.55	0.160	5.04	0.590	13.9
C/N=1.84 g C/g NO ₃ -N							
0	3.024	2 395	0	18.1	18.6	18.2	22.2
1	6.410	1 948	40.27	4.80	18.0	0.660	24.0
2	6.622	1 759	83.44	3.84	15.5	0.620	23.9
3	6.770	1 685	142.7	2.96	16.8	0.550	23.2
4	6.831	1 485	197.8	2.37	16.4	0.590	23.8
5	6.888	1 408	229.4	1.84	15.6	0.580	23.5
6	6.933	1 366	289.7	1.47	15.0	0.590	23.9
24	7.749	57.80	189.8	0.080	4.56	0.750	21.7
48	7.759	3.364	0.1384	0	3.22	0.830	18.0

(συνέχεια του πίνακα στην επόμενη σελίδα)

(συνέχεια του πίνακα της προηγούμενης σελίδας)

Χρόνος (h)	pH	[NO ₃ ⁻] (mg/L)	[NO ₂ ⁻] (mg/L)	[Cu] (mg/L)	[Zn] (mg/L)	[Fe] (mg/L)	[Ni] (mg/L)
C/N=1.11 g C/g NO ₃ -N							
0	2.960	2 431	0	19.1	14.6	17.0	22.4
1	6.474	1 893	28.50	1.77	14.6	0.450	24.7
2	6.821	1 850	56.66	1.14	16.2	0.440	24.8
3	6.967	1 863	87.91	1.04	14.9	0.500	24.5
4	7.039	1 795	121.2	0.880	14.3	0.440	22.6
5	7.076	1 575	137.8	0.810	13.4	0.430	22.7
24	7.213	591.8	526.3	0.570	9.24	0.490	22.8
48	7.542	229.7	532.5	0.190	5.44	0.500	22.4
72	7.875	120.0	290.6	0.110	4.16	0.510	17.4
144	7.625	1.652	0.1296	0.0900	1.01	0.590	12.3