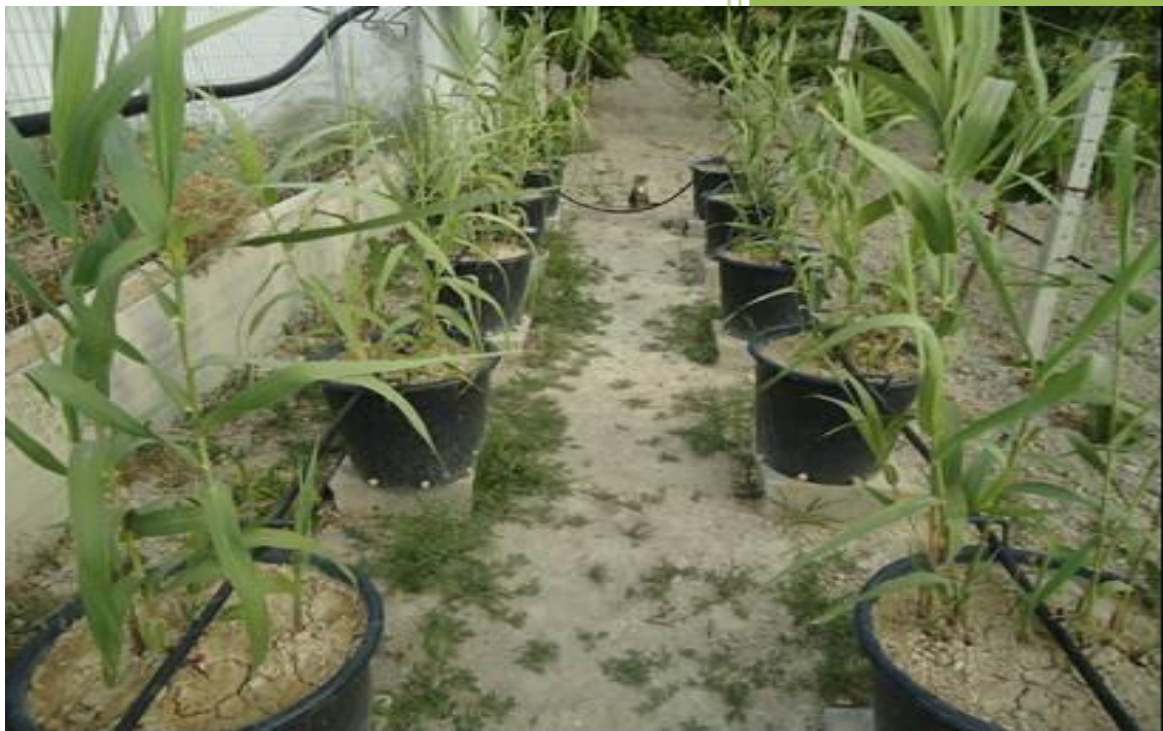




ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

Διερεύνηση του Γίνεσθαι του Αζώτου κατά την Εφαρμογή Υγρών Αποβλήτων στο Έδαφος



Μεταπτυχιακή Διατριβή
Τσιγκιά Μυρτώ
Επιβλέπων : Παρανυχιανάκης Νικόλαος
ΧΑΝΙΑ 2011

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω αρχικά τον κ. Παρανυχιανάκη Νικόλαο, για την επίβλεψη, την άριστη συνεργασία και τον χρόνο που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της εργασίας και κυρίως γιατί μου έδωσε την ευκαιρία να επεκτείνω τους γνωστικούς και επιστημονικούς μου ορίζοντες. Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον Δρ. Β. Τζανακάκη ο οποίος σχεδίασε, εγκατέστησε το πείραμα και πραγματοποίησε τις δειγματοληψίες στις οποίες έγιναν οι μετρήσεις που αναφέρονται στην παρούσα εργασία. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Νικόλαο Νικολαΐδη και τον Καθηγητή Νικόλαο Καλογεράκη για τη συμμετοχή, την ανάγνωση, αλλά και την αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Στο σημείο αυτό επιθυμώ να ευχαριστήσω θερμά του συναδέλφους και φίλους μου Γιαννάκη Γιώργο και Παπαγεωργίου Ναυσικά για την ουσιαστική βοήθεια και στήριξη που μου πρόσφεραν αυτά τα 2 χρόνια τόσο στο κομμάτι της συνεργασίας μας στο εργαστήριο όσο και έξω από αυτό. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Βαγιάκη Ιωάννη για την άψογη συνεργασία μας κατά την εκπόνηση της πτυχιακής του μελέτης στο εργαστήριο της Γεωργικής Μηχανικής. Ευχαριστώ επίσης την Υποψήφια Διδάκτορα Σταμάτη Φωτεινή, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω για την ουσιαστική στήριξη, κατανόηση και δύναμη που μου έδιναν όλο αυτό το καιρό την οικογένειά μου και τους φίλους μου Κώστα, Ελένη και Μαρία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
SUMMARY.....	5
ΕΝΟΤΗΤΑ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Εδαφικά Συστήματα Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων.....	7
1.2 Συστήματα Βραδείας Εφαρμογής (Slow Rate Systems).....	7
1.2.1 Ιστορική εξέλιξη	8
1.2.2 Κατηγορίες Συστημάτων Βραδείας Εφαρμογής	9
1.3 Ο Βιογεωχημικός Κύκλος του N	11
1.4 Διεργασίες που καθορίζουν το γίνεσθαι του N στα ΣΒΕ.....	13
1.5 Πρόσληψη N από τα Φυτά.....	22
1.6 Στόχος – Σκοπός της εργασίας	24
ΕΝΟΤΗΤΑ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	25
2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	26
2.2 Πρωτόκολλα Μετρήσεων.....	28
ΕΝΟΤΗΤΑ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
3.1 Ρυθμός Εφαρμογής Αποβλήτου.....	33
3.2 Παραγωγή Βιομάζας και Συσσώρευση N.....	33
3.2. Η Επίδραση στο οργανικό υλικό και το ολικό άζωτο του εδάφους	35
3.3 Συγκέντρωση $\text{NO}_3\text{-N}$ και $\text{NH}_4\text{-N}$ στο Έδαφος και στην Εδαφική διάλυση.....	37
3.4 Δυναμικός Ρυθμός Νιτροποίησης (PNR).....	39
3.5 Ενζυμική Δραστηριότητα στο έδαφος.	40
3.6 Αμμωνιο-οξειδωτικά βακτήρια (AOB) και αρχαία (AOA)	42
ΕΝΟΤΗΤΑ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
4.1 Παραγωγή Βιομάζας και Συσσώρευση N σε αυτή.	45
4.2. Η Επίδραση στο Οργανικό Υλικό του Εδάφους.	45
4.3 $\text{NO}_3\text{-N}$ και $\text{NH}_4\text{-N}$ του εδάφους.	46
4.4 Δυναμικός Ρυθμός Νιτροποίησης (Potential Nitrification Rate – PNR).....	47
4.5 Αμμωνιο-οξειδωτικά βακτήρια (AOB) και αρχαία (AOA)	48
ΕΝΟΤΗΤΑ 5 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	49
ΕΝΟΤΗΤΑ 6 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία εξετάζει την επίδραση του είδους του φυτού (*Eucalyptus camaldulensis* και *Arundo donax*) στον κύκλο του N κατά την διάρκεια εφαρμογής υγρού αποβλήτου πρωτοβάθμιας επεξεργασίας. Η εργασία πραγματοποιήθηκε κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες και ο ρυθμός εφαρμογής του αποβλήτου βασίστηκε στις ανάγκες εξατμισοδιαπνοής των φυτών. Τα αποτελέσματα της έδειξαν ότι υπάρχει ισχυρή επίδραση του φυτικού είδους στην πρόσληψη N συγκρίσει με την παραγόμενη φυτική βιομάζα, καθώς και στον δυναμικό ρυθμό νιτροποίησης. Ειδικότερα το *E. camaldulensis* συσσωρεύει μεγαλύτερη ποσότητα N στη βιομάζα του από το *A. donax*. Όσον αφορά την συγκέντρωση του $\text{NH}_4\text{-N}$ στο έδαφος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των *E. camaldulensis* και *A. donax*. Αντίθετα στο *A. donax* μετά το τέλος του Ιουλίου η συγκέντρωση του $\text{NO}_3^- \text{-N}$ στο έδαφος παρουσίασε σημαντική πτώση, σε σχέση με αυτήν του *E. camaldulensis* που συνέχισε να αυξάνει, υποδηλώνοντας μεγαλύτερες απώλειες N, πιθανότατα λόγω της επικράτησης αυξημένων ρυθμών απονιτροποίησης. Διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης και στο ρυθμό δυναμικής νιτροποίησης με το *E. Camaldulensis* να παρουσιάζει τους υψηλότερους. Τα αποτελέσματα της εργασίας καταδεικνύουν ένα βασικό ρόλο για το φυτικό είδος στον κύκλο του N στα χερσαία οικοσυστήματα, με σημαντικές προεκτάσεις στην διαχείριση/αποκατάσταση μολυσμένων με N περιοχών, όπως παρόχθιες ζώνες, εδαφικά συστήματα επεξεργασίας και υδροβιότοπους.

SUMMARY

This work investigates the effect of plant species (*Eucalyptus camaldulensis* and *Arundo donax*) on N cycling during land application of pre-treated wastewater. The study was performed under controlled conditions, the effluent was applied at rates to meet ET and revealed strong effects of plant species on nutrient uptake, potential nitrification rate and aerial losses of N. More detailed, *E. camaldulensis* accumulated more N in its biomass compared to *A. donax*. Despite the greater potential nitrification rates assessed in pots planted with *E. camaldulensis*, no differences were assessed in soil $\text{NH}_4\text{-N}$ content between plant species, suggesting that the lower nitrification rates measured in *A. donax* planted pots in fact did not retard the oxidation of $\text{NH}_4\text{-N}$ to $\text{NO}_3^-\text{-N}$ at the rates it was applied in the soil. However, decreased concentration of $\text{NO}_3\text{-N}$ was assessed in pots planted with *A. donax* after the end of June. This effect probably suggests increased losses of N through denitrification. Our findings reveal an important role of plant species on N cycling in terrestrial environments with important implications on the management/restoration of N-polluted areas, e.g riparian zones, land treatment systems, and wetlands.

ΕΝΟΤΗΤΑ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εδαφικά Συστήματα Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων

Τα εδαφικά συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Land treatment system), αποτελούν κατηγορία των Φυσικών Συστημάτων Επεξεργασίας (ΦΣΕ) υγρών αποβλήτων και συνδυάζουν φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η επεξεργασία των εφαρμοζόμενων αποβλήτων στο σύστημα έδαφος – φυτό – ατμόσφαιρα (Αγγελάκης, 1995). Αναφέρεται χαρακτηριστικά από τους Metcalf & Eddy, (2007) πως η αποδοτικότητα επεξεργασίας των αποβλήτων με τα συστήματα αυτά είναι ανάλογη ή ακόμη και καλύτερη από την αντίστοιχη από προχωρημένη επεξεργασία υγρών αποβλήτων. Τα συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων που βασίζονται στο έδαφος (ΕΣΕΥΑ) αποτελούν ιδανική λύση για μικρές πόλεις και κοινότητες και μικρές βιομηχανικές μονάδες λόγω του χαμηλού κόστους κατασκευής, λειτουργίας και συντήρησης (Paranychianakis et al., 2006).

Από τις πιο επικρατέστερες κατηγορίες φυσικών συστημάτων επεξεργασίας σήμερα είναι τα συστήματα βραδείας εφαρμογής (ΣΒΕ - Slow Rate System). Συνοπτικά, στα ΣΒΕ ο ρυθμός εφαρμογής υγρών αποβλήτων βασίζεται στις ανάγκες της βλάστησης σε εξατμισοδιαπνοή (ET). Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνουμε περαιτέρω επεξεργασία του αποβλήτου καθώς και την κάλυψη των αναγκών (ET, θρεπτικά στοιχεία, κ.ά.) για την ανάπτυξη της υπάρχουσας βλάστησης. Οι περισσότερες διεργασίες λαμβάνουν χώρα στους ανώτερους εδαφικούς ορίζοντες και στην ακόρεστη ζώνη όπου το δυναμικό αφομοίωσης C και θρεπτικών στοιχείων είναι υψηλότερο λόγω των μεγαλύτερων πληθυσμών μικροοργανισμών. Συμπληρωματικά, σε αυτά τα εδαφικά στρώματα, και ιδιαίτερα στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας παρατηρείται η μεγαλύτερη μικροβιακή δραστηριότητα που εμπλέκονται στους βιογεωχημικούς κύκλους του C και των θρεπτικών στοιχείων. Τέλος πολύ σημαντική παράμετρος για την λειτουργία των ΣΒΕ είναι η εφαρμογή αποβλήτου κατάλληλου επιπέδου προεπεξεργασίας. Με αυτόν τον τρόπο περιορίζονται οι κίνδυνοι για τη δημόσια υγεία, επιτυγχάνεται μείωση του ρυπαντικού φορτίου και ελαχιστοποιούνται τα προβλήματα στους αγωγούς μεταφοράς και εφαρμογής των αποβλήτων (Crites et al., 2000).

1.2 Συστήματα Βραδείας Εφαρμογής (Slow Rate Systems)

Τα ΣΒΕ έχουν περάσει διάφορα στάδια εξέλιξης κατά τη διάρκεια της μεγάλης ιστορίας τους (US.EPA, 1979). Με το πέρασμα του χρόνου, η κατανόηση των βασικών

διεργασιών που καθορίζουν την απομάκρυνση, τη μεταφορά και το γίνεσθαι των ρύπων αλλά και των παθογόνων μικροοργανισμών παρείχε πολύτιμες πληροφορίες για την ανάπτυξη των βασικών αρχών σχεδιασμού, λειτουργίας και συντήρησης τους. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες τα ΣΒΕ έχουν κερδίσει την ευρεία αποδοχή ως εναλλακτική τεχνολογία διαχείρισης αστικών και όχι μόνο υγρών αποβλήτων, ιδιαίτερα σε μικρούς οικισμούς (<10.000 ι.κ.) ή απομονωμένες κατοικίες και ομάδες κατοικιών. Την τρέχουσα περίοδο, τα ΣΒΕ σχεδιάζονται και λειτουργούν ως συστήματα επαναχρησιμοποίησης στοχεύοντας στη βελτιστοποίηση της χρήσης νερού και της ανακύκλωσης θρεπτικών στοιχείων που περιέχονται στις εκροές υγρών αποβλήτων, στη φυτική παραγωγή (Paranychianakis et al., 2006). Κριτήρια τα οποία δημιουργήθηκαν εστιάζουν πρωτίστως στην προστασία της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος.

1.2.1 Ιστορική εξέλιξη

Κατά τη διάρκεια των περασμένων αιώνων αναπτύχθηκε ένας μεγάλος αριθμός ερευνητικών έργων και εφαρμογών σχετικά με την ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του νερού ως συνέπεια των αυξανόμενων αναγκών για την ορθολογικότερη διαχείριση υδατικών πόρων (Metcalf & Eddy, 2007).

Παρόλο που από το 1530 μ.Χ. περίπου, εκροές υγρών αποβλήτων χρησιμοποιούνταν σε κάποιες περιοχές την Ευρώπης για άρδευση (Γερμανία, Σκωτία), μόνο μετά τα μέσα του 1800 μ.Χ. η πρακτική της επεξεργασίας εδάφους διαδόθηκε ευρέως. Εκείνη την εποχή, παρουσιάστηκαν στην Αγγλία μεγάλες επιδημίες χολέρας με αποτέλεσμα να γίνει επιτακτική η ανάγκη ασφαλούς διαχείρισης των αποβλήτων (Gehard, 1909). Η ελεγχόμενη εφαρμογή των υγρών αποβλήτων στο έδαφος γνωστή ως “sewage farming”, (ο παλαιότερος όρος που συναντάται στη βιβλιογραφία) αποτέλεσε μια σχετικά κοινή πρακτική που αναγνωρίζεται ως η πρώτη προσπάθεια προστασίας της δημόσιας υγείας και για τον έλεγχο της ρύπανσης των υδάτων.

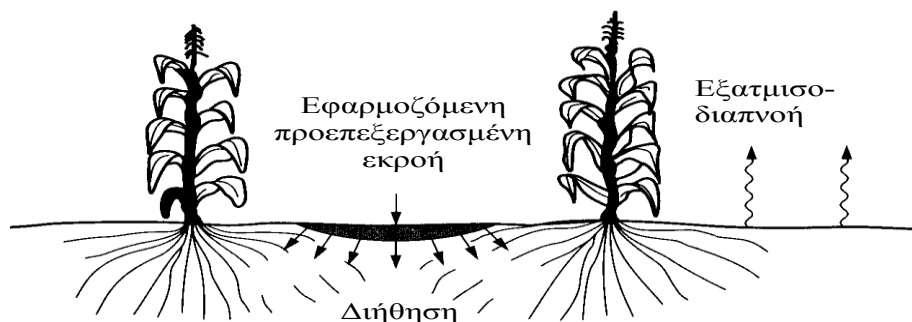
Αυτή η τεχνολογία αναπτύχθηκε κυρίως από το 1850 έως το 1890 στην Αγγλία (Folsom, 1876; Stanbridge, 1976), ενώ την ίδια περίοδο τα πρώτα ΣΒΕ στο έδαφος γνωστά ως slow_rate systems (SRS) εμφανίζονταν στο Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γαλλία και τη Γερμανία (Reed et al., 1995; U.S. EPA, 1979). Στις Η.Π.Α. οι πρώτες αναφορές για την σημασία των ΣΒΕ έγιναν από τον Rafter (1899) στο τέλος τους 19ου αιώνα. Σε μια από αυτές, ο Rafter κατέγραψε πάνω 143 μονάδες ΣΒΕ στις Η.Π.Α και τον Καναδά. Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, παρατηρήθηκε μείωση του ενδιαφέροντος για ανάπτυξη τέτοιων συστημάτων

λόγω των μεγάλων απαιτήσεων σε γη, αλλά κυρίως λόγω της ανάπτυξης και διάδοσης των συμβατικών συστημάτων επεξεργασίας αποβλήτων.

Την περίοδο 1920 έως 1960, τα ΣΒΕ συνέχισαν να εφαρμόζονται στις Η.Π.Α αλλά με μειωμένο ρυθμό. Το 1973 το 84% αυτών των συστημάτων παρέμενε ακόμη σε λειτουργία. Από αυτά που είχαν αναστείλει την λειτουργία τους, τα περισσότερα κατέληξαν σε αυτό εξαιτίας της πληθυσμιακής αύξησης και της επέκτασης των αστικών κέντρων. Σχετικά πρόσφατες προσπάθειες καταγραφής των ΣΒΕ ανέφεραν ότι μέχρι το 1973 υπήρχαν 3.400 συστήματα, το 10 - 20% επί του συνόλου των συστημάτων στις Η.Π.Α., ενώ υπό κατασκευή ήταν ακόμη 1.650. Οι Reed and Crites (1984), αναφέρουν ότι μέχρι το 1984 λειτουργούσαν στην επικράτεια των Η.Π.Α. 1200 ΣΒΕ. Με βάση τα τελευταία επιτεύγματα στην τεχνολογία των εδαφικών συστημάτων, προβλέπεται αύξηση της εφαρμογής τους πάνω από το 50%.

1.2.2 Κατηγορίες Συστημάτων Βραδείας Εφαρμογής

Τα συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων με βραδεία εφαρμογή στο έδαφος (ΣΒΕ) θεωρούνται στις μέρες μας ως τα επικρατέστερα μεταξύ των υπολοίπων φυσικών συστημάτων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Σε αυτά τα συστήματα η επεξεργασία του εφαρμοζόμενου αποβλήτου γίνεται μέσω φυσικών, χημικών και βιολογικών μηχανισμών/διεργασιών που λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα στο σύστημα εδάφους-νερού. Στους σημαντικότερους μηχανισμούς/διεργασίες συμπεριλαμβάνονται η διήθηση, η προσρόφηση στο έδαφος, η αποδόμηση των οργανικών ενώσεων, η νιτροποίηση, η εξάέρωση NH_3 , η απονιτροποίηση, η χημική κατακρήμνιση και η πρόσληψη από τα φυτά. Η βλάστηση παίζει σημαντικό ρόλο στην απόδοση των συστημάτων επεξεργασίας εδάφους μέσω της επίδρασης της, στο εφαρμοζόμενο υδραυλικό φορτίο, στην ποσότητα των προσλαμβανόμενων θρεπτικών συστατικών, στην ποσότητα και την κατανομή της παραγόμενης βιομάζας, της μικροβιακής κοινότητας (διάρθρωση πληθυσμών και δραστηριότητες), καθώς και άλλων λειτουργιών. Το εφαρμοζόμενο απόβλητο είτε διαπνέεται ή διηθείται στο έδαφος και κατεισδύει σε βαθύτερους γεωλογικούς σχηματισμούς (Εικ. 1.1).



Εικόνα 1.1 Σχηματική παράσταση επεξεργασίας λυμάτων με την μέθοδο βραδείας εφαρμογής (Angelakis, 1989)

Τα ΣΒΕ συνεπάγονται την εφαρμογή προ-επεξεργασμένων αποβλήτων σε εδάφη με βλάστηση προκειμένου να ικανοποιήσουν τις απαιτήσεις για άρδευση και/ή λίπανση. Ανάλογα με τους στόχους του σχεδιασμού τα συστήματα μπορούν να ταξινομηθούν ως εξής:

Τύπου Α: τα συστήματα αυτά σχεδιάζονται με στόχο την επαναχρησιμοποίηση των λυμάτων μέσω της άρδευσης καλλιεργειών ή βλάστησης (συμπεριλαμβανομένων των δασικών εκτάσεων και των βοσκοτόπων). Ο υπολογισμός του υδραυλικού φορτίου εφαρμογής των υγρών απόβλητων βασίζεται στην ικανοποίηση των εξατμισοδιαπνευστικών αναγκών της δεδομένης καλλιέργειας ή και άλλων αναγκών (π.χ. έκπλυση αλάτων). Η εφαρμογή των υγρών αποβλήτων στο έδαφος μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας μια ποικιλία εφαρμογών, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η επιφανειακή εφαρμογή με τις ανάλογες μεθόδους (κατάκλιση, αυλάκια) και ο καταιονισμός.

Τύπου Β: τα συστήματα αυτά είναι σχεδιασμένα με βάση τον περιοριστικό παράγοντα. Σε αυτά τα συστήματα εφαρμόζεται ο μέγιστος δυνατός ρυθμός υδραυλικού φορτίου στη μικρότερη δυνατή έκταση, διασφαλίζοντας όμως την οριακή ανάπτυξη της χρησιμοποιούμενης βλάστησης. Περιοριστικοί παράγοντες που καθορίζουν το ύψος του υδραυλικού φορτίου είναι συνήθως η υδραυλική αγωγιμότητα του εδάφους, η συσσώρευση του Ν στο έδαφος ή και η παρουσία διαφόρων άλλων τοξικών ρυπαντών. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε υγρές περιοχές.

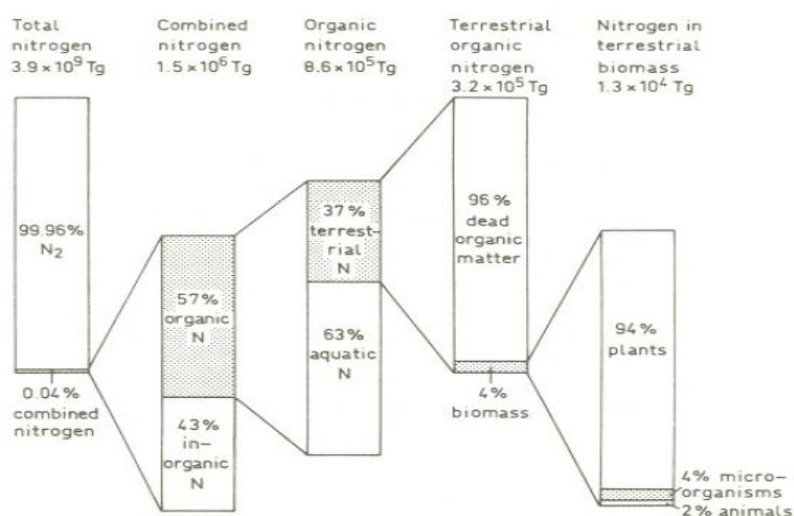
Τύπου Γ: τα συστήματα αυτά έχουν σχεδιαστεί για την εφαρμογή λυμάτων σε κλίνες με τη μέθοδο της κατάκλισης και τη συλλογή του διηθημένου αποβλήτου από ένα εκτεταμένο στραγγιστικό δίκτυο. Τα συστήματα τύπου Γ είναι αποτελεσματικά στην απομάκρυνση των θρεπτικών συστατικών από τα λύματα που διηθούνται, τα οποία εν

τέλει απορρίπτονται σε επιφανειακά ύδατα ή χρησιμοποιούνται για άλλους σκοπούς. Αυτού του τύπου συστήματα είναι κατάλληλα για υψηλής αξίας περιοχές, όπως περιοχές γύρω από αστικά κέντρα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για επεξεργασία λυμάτων ακόμη και τη χειμερινή περίοδο. Τέλος, τα συστήματα αυτά με κατάλληλες τροποποιήσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάφορους τύπους αποβλήτων, όπως τα βιομηχανικά απόβλητα και τα απόβλητα από χοιροστάσια ή γαλακτοκομεία (Jayawardane et al., 1997).

Η επεξεργασία λαμβάνει κυρίως χώρα στους ανώτερους εδαφικούς ορίζοντες και στην ακόρεστη ζώνη, όπου παρατηρείται έντονη δραστηριότητα των μικροοργανισμών του εδάφους. Επιπλέον το οργανικό υλικό και τα θρεπτικά στοιχεία που παρέχονται μπορούν να έχουν ευεργετικές επιδράσεις στα οικοσυστήματα αν εφαρμόζονται σε ισορροπημένες αναλογίες. Στην παρούσα μελετήθηκαν τα συστήματα Τύπου Α τα οποία αποτελούν τον κυρίαρχο τύπο ΣΒΕ σε περιοχές με θερμά ως πολύ ξηρά κλίματα (Al-Jamal et al., 2002).

1.3 Ο Βιογεωχημικός Κύκλος του N

Το N είναι ένα από τα βασικότερα στοιχεία στην φύση, το οποίο ελέγχει τον κύκλο του οργανικού υλικού στην βιόσφαιρα. Η συγκέντρωση και η διαθεσιμότητα των οργανικών και ανόργανων ενώσεων του N συνδέεται άμεσα με την παρουσία, ανάπτυξη και παραγωγικότητα όλων των οργανισμών σε χερσαία και υδάτινα οικοσυστήματα (Knicker, 2011).

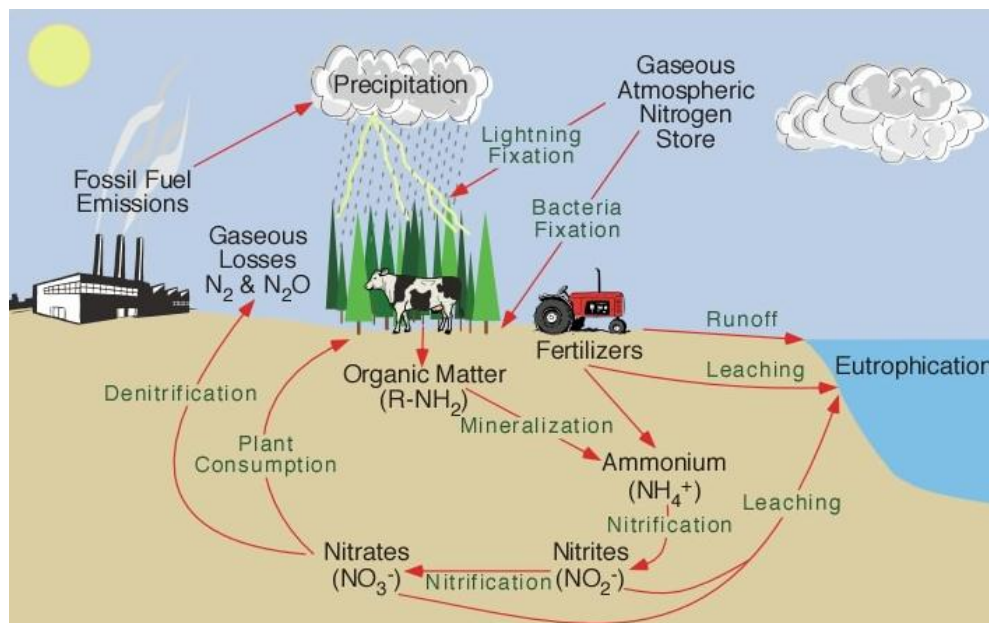


Εικόνα 1.3 Κατανομή του αζώτου στην βιόσφαιρα (Rosswall, 1979a)

Οι διαδικασίες που καθιστούν το N διαθέσιμο είναι:

- ❖ Η δέσμευση του N_2 της ατμόσφαιρας (N_2 fixation) από μικροοργανισμούς (ανήκουν στο γένος *Rhizobium* spp) που συμβιώνουν στις ρίζες των ψυχανθών (leguminosae) σχηματίζοντας τα φυμάτια.
- ❖ Η δέσμευση N_2 από μη συμβιωτικούς μικροοργανισμούς που ζουν ελεύθεροι στο έδαφος και τα νερά (αερόβια βακτήρια του γένους *Clostridium* και μερικά κυανοφύκη, της οικογένειας *Nostocaceae*)
- ❖ Η μετατροπή του N_2 σε οξείδια, από τις ηλεκτρικές εκκενώσεις της ατμόσφαιρας και η μεταφορά αυτών στο έδαφος μέσω της βροχής κυρίως υπό την μορφή NO_3^- . Η βιομηχανική δέσμευση υπό μορφή NO_2 , CN , NH_3 , κατά την παρασκευή N-λιπασμάτων.

Διαμορφώνεται λοιπόν ένας βιογεωχημικός κύκλος N στο οικοσύστημα (Εικ. 2.1) με αμφίδρομη αλληλεπίδραση μεταξύ ατμόσφαιρας – εδάφους – οργανισμών (Ρουμπελάκη – Αγγελάκη, 2003).



Εικόνα 1.4 Συνοπτική παρουσίαση του βιογεωχημικού κύκλου του N σε χερσαία οικοσυστήματα. (<http://www.physicalgeography.net>)

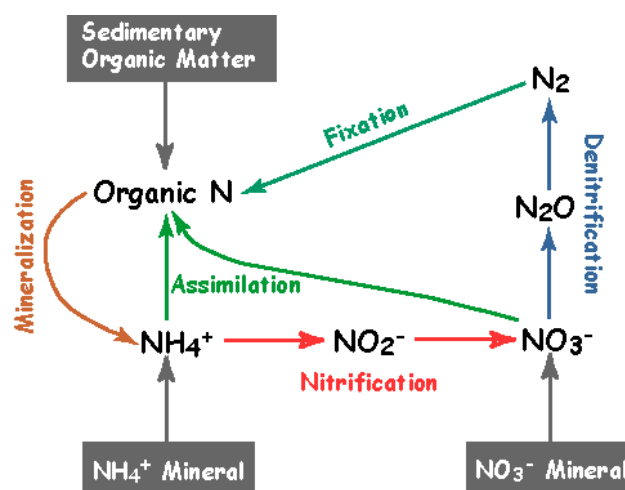
Το 98% περίπου του εδαφικού N βρίσκεται ενσωματωμένο σε οργανικές ενώσεις, κυρίως υπό αμινική μορφή (NH_2). Σήμερα πολλές είναι οι μελέτες που καταδεικνύουν τόσο την άμεση δέσμευση τέτοιων ενώσεων από το φυτό (Neff et al., 2003; Näsholm et al., 2008), ως πηγή N για την θρέψη του, όσο και την έμμεση δέσμευση μέσω των μυκόρριζων που αναπτύσσουν (Finlay et al., 1992; Turnbull et al., 1995). Το ανόργανο N

αποτελεί περίπου το 2% του εδαφικού N. Οι κυριότερες ανόργανες μορφές είναι η αμμωνιακή (NH_4^+), η νιτρική (NO_3^-) και υπό ορισμένες συνθήκες η νιτρώδη (NO_2^-) μορφή. Οι κυριότερες διεργασίες που καθορίζουν το γίνεσθαι και τη διαθεσιμότητα N στο έδαφος συνοψίζονται στις παρακάτω:

- ❖ Ανοργανοποίηση (Mineralization)
- ❖ Ακινητοποίηση (Immobilization)
- ❖ Νιτροποίηση (Nitrification)
- ❖ Απονιτροποίηση (Denitrification)
- ❖ Εξαέρωση (Volatilization)
- ❖ Προσρόφηση (Sorption)

1.4 Διεργασίες που καθορίζουν το γίνεσθαι του N στα ΣΒΕ

Η τύχη των θρεπτικών στοιχείων, και ειδικότερα του N, στα ΣΒΕ, είναι ιδιαίτερης σημασίας λόγω των περιβαλλοντολογικών επιπτώσεων που έχουν οι διάφορες μορφές του στα επιφανειακά και υπόγεια νερά αλλά και της παραγωγής N_xO που συνδέονται με το φαινόμενο του θερμοκηπίου (Paranychiakis et al., 2006). Στα ΣΒΕ το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στους τρόπους περιορισμού των διαθέσιμων θρεπτικών (Εικ. 2.2).



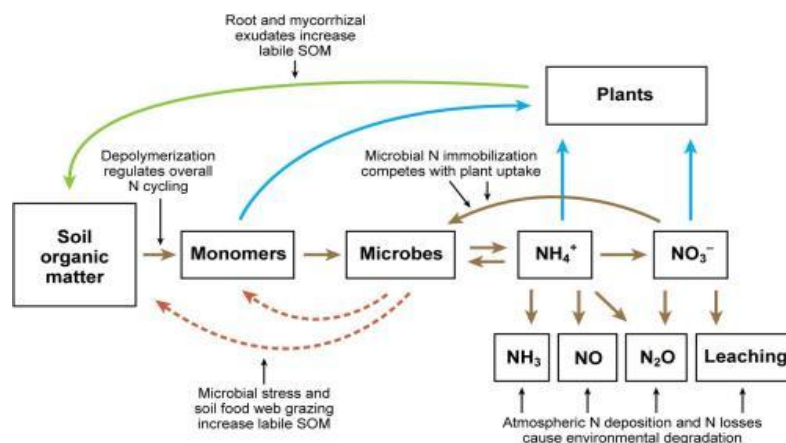
Εικόνα 1.5 Οι κυριότερες διεργασίες που καθορίζουν το γίνεσθαι και τη διαθεσιμότητα N στο έδαφος (<http://www.brr.cr.usgs.gov>)

1.4.1 Ανοργανοποίηση / Ακίνητοποίηση

Η *ανοργανοποίηση* του N είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς διεργασιών που συμβαίνουν κατά την αποδόμηση της οργανικής ουσίας, οι οποίες οδηγούν στην μετατροπή των οργανικών μορφών του N σε ανόργανες, συνήθως σε NH_4^+ . Πραγματοποιείται από μικροοργανισμούς οι οποίοι ελευθερώνουν ή ανοργανοποιούν N ως παραπροϊόν της αποδόμησης της νεκρής οργανικής ύλης. Αυτή η διεργασία αποτελεί πηγή ενέργειας και C για τους μικροοργανισμούς, καθώς επίσης και πηγή θρεπτικών, κυρίως N, έτσι ώστε να μπορούν να συνθέσουν πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και άλλα κυτταρικά συστατικά (Robertson & Groffman, 2007).

Η ανοργανοποίηση του N στο έδαφος αποτελεί μια από τις βασικές διεργασίες με την οποία αυξάνεται το ποσό του N που είναι διαθέσιμο στα φυτά.

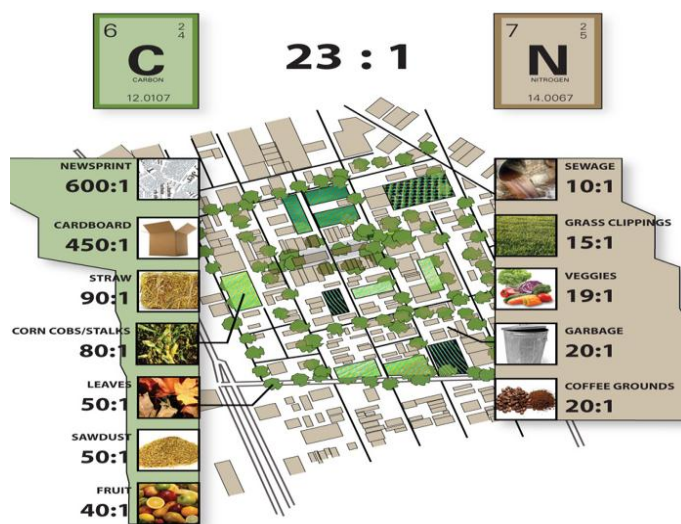
Όταν η νεκρή οργανική ύλη είναι πλούσια σε N τότε οι ανάγκες των μικροοργανισμών για N καλύπτονται και πραγματοποιείται ανοργανοποίηση. Όταν όμως έχουμε νεκρή οργανική ύλη φτωχή σε N τότε οι μικροοργανισμοί το ενσωματώνουν σε οργανικά μόρια για δική τους κατανάλωση. Πραγματοποιείται δηλαδή η αντίθετη διεργασία της ανοργανοποίησης, η *ακίνητοποίηση*.



Εικόνα 1.6 Σχηματική απεικόνιση των διεργασιών Ανοργανοποίησης / Ακίνητοποίησης (Jackson et al., 2008)

Τι είναι όμως αυτό που ελέγχει την ισορροπία μεταξύ ανοργανοποίησης και ακίνητοποίηση; Η απάντηση βρίσκεται στην ποιότητα του οργανικού υλικού και ιδιαίτερα στον διαθέσιμο C σε σχέση με το διαθέσιμο N, δηλαδή στον λόγο C:N. Σαν γενικός κανόνας όταν αυτός ο λόγος παίρνει τιμές $>25:1$ οι μικροοργανισμοί ακίνητοποιούν το N και σαν αποτέλεσμα μειώνεται το ποσοστό που είναι διαθέσιμο στα φυτά. Αντιθέτως, όταν ο λόγος παίρνει τιμές $<25:1$ τότε οι μικροοργανισμοί

ανοργανοποιούν το N και η ποσότητα του διαθέσιμου για τα φυτά N αυξάνεται. Εξαίρεση σε αυτόν τον κανόνα αποτελούν τα ιδιαίτερα αποσυντεθημένα υποστρώματα, όπως ο χούμος ή η κομπόστα, όπου περιέχουν σύνθετα οργανικά μόρια τα οποία δύσκολα αποσυντίθεται με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η ανοργανοποίηση του N (Robertson & Groffman, 2007). Για τα αστικά υγρά απόβλητα, όπως αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, ο λόγος C:N είναι γύρω στο 10:1 (Εικ. 1.7), γεγονός που ευνοεί την ελευθέρωση ανόργανων μορφών N.



Εικόνα 1.7 Ενδεικτικές τιμές του λόγου C:N για διάφορα είδη απορριμμάτων/αποβλήτων (πηγή http://www.carlsterner.com/research/images/2010_green_city)

1.4.2 Νιτροποίηση

Η νιτροποίηση είναι η διαδικασία της βιολογικής οξείδωσης της NH_3 σε $\text{NO}_3^- \text{N}$ και πραγματοποιείται από αυτότροφους, αλλά και από ετερότροφους αερόβιους μικροοργανισμούς (Braker and Conrad, 2011).

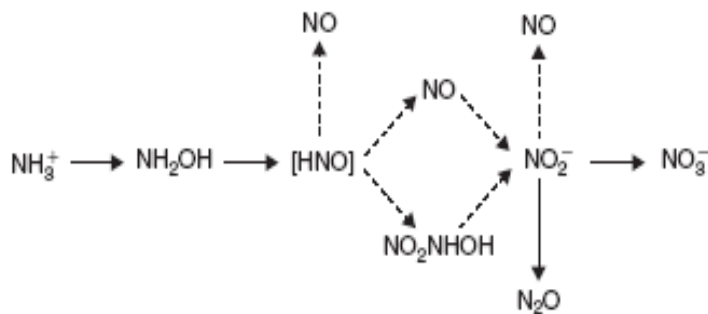
Νιτροποίηση από αυτότροφους μικροοργανισμούς

Η διεργασία της νιτροποίησης που πραγματοποιείται από αυτότροφους μικροοργανισμούς διεξάγεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έχουμε την οξείδωση της NH_4^+ σε NO_2^- , η οποία καταλύεται από αμμωνι-οξειδωτικά βακτήρια (AOB) των γενών *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* και *Nitrosospira*. Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η οξείδωση των NO_2^- σε NO_3^- που καταλύεται από νιτρο-οξειδωτικά βακτήρια (NOB) του γένους *Nitrobacter*. το βασικό λειτουργικό ένζυμο για το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης είναι η μονο-οξυγενάση της αμμωνίας (AMO). Πρόσφατα, ωστόσο

ανακαλύφθηκε πως τα βακτήρια δεν είναι οι μόνοι μικροοργανισμοί που πραγματοποιούν την οξείδωση της NH_3 σε NO_2 αλλά σε αυτή εμπλέκονται και μικροοργανισμοί του φύλου των Thaumarchaeota της Τάξης των Αρχαίων και έχουν ταυτοποιηθεί σε χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα (Konneke et al. 2005; Treusch et al. 2005). Τα είδη αυτά επίσης διαθέτουν το ένζυμο AMO, ωστόσο ο πλήρης μηχανισμός της οξείδωσης της NH_3 δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί, καθώς σε όλα τα είδη που έχουν διαβαστεί οι αλληλουχίες τους ως σήμερα δεν διαπιστώνεται η ύπαρξη ενζύμου ομόλογου της οξειδάσης της υδροξυλαμίνης που είναι υπεύθυνη για την οξείδωση της υδροξυλαμίνης προς NO_2 (Kim et al., 2011; Blainey et al., 2011). Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα παρουσιάζουν μια εμφανή υπεροχή του πληθυσμού των AOA σε σχέση με τα AOB, η οποία μπορεί να θεωρηθεί ως στοιχείο ενός ίσως πιο αναβαθμισμένου ρόλου των AOA στην νιτροποίηση. Μια τέτοια υπόθεση όμως χρειάζεται ακόμα περισσότερο έρευνα ταυτόχρονα σε γονιδιακό και λειτουργικό επίπεδο ώστε να αποδειχθεί ότι η πληθυσμιακή τους υπεροχή συμβαδίζει με λειτουργική υπεροχή στην νιτροποίηση (Prosser et al., 2008).

Ενδιάμεσα προϊόντα που παράγονται κατά το πρώτο στάδιο της νιτροποίησης μπορεί να δώσουν αέριες ενώσεις του N της γενικής μορφής N_xO , οι οποίες ελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα και αποτελούν αέριες ενώσεις του φαινομένου του θερμοκηπίου (Martikainen, 1985; Lipschultz et al., 1981).

Εδάφη τα οποία αρδεύονται με υγρά απόβλητα δίνουν και αυξημένους ρυθμούς νιτροποίησης. Οι Sparling et al. (2001) μέτρησαν υψηλότερο δυναμικό ρυθμό νιτροποίησης σε έδαφος στο οποίο εφαρμόζονταν γαλακτοκομικά απόβλητα (3.03 έως $4.21 \text{ g N/cm}^3 \cdot \text{h}$) συγκρίσει με έδαφος που δεν είχε δεχθεί εφαρμογή (0.09 έως $0.28 \text{ g N/cm}^3 \cdot \text{h}$). Επιπλέον, οι Tzanakakis et al. (2003) παρατήρησαν ραγδαία μετατροπή της αμμωνίας σε νιτρικά αμέσως μετά την εφαρμογή αποβλήτου στο έδαφος. Πιθανολογείται λοιπόν πως οι υδρολογικές συνθήκες που διασφαλίζουν αύξηση του διαθέσιμου οξυγόνου, υψηλή περιεκτικότητα υγρασίας στο έδαφος και διαθεσιμότητα οργανικού άνθρακα είναι οι βασικοί παράγοντες που ευθύνονται για την ταχεία πραγματοποίηση της νιτροποίησης στα εδαφικά συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων.



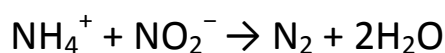
Εικόνα 1.8 Τα μονοπάτια της νιτροποίησης από τους αυτοτροφικούς μικροοργανισμούς. Οι διακεκομμένες γραμμές αναφέρονται σε μη επιβεβαιωμένα μονοπάτια (Firestone and Davidson, 1989)

Νιτροποίηση από ετερότροφους μικροοργανισμούς

Μια μεγάλη ποικιλία ετερότροφων βακτηρίων και μυκήτων έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν την αμμωνία είτε από οργανικά μόρια είτε από ανόργανα. Οι μικροοργανισμοί αυτοί οξειδώνουν την αμμωνία ή μετατρέπουν το N οργανικών μορίων σε υδροξυλαμίνη, νιτρώδη και νιτρικά, καθώς χρησιμοποιούν τα οργανικά μόρια στον μεταβολισμό τους. Σε σύγκριση με την αυτοτροφική νιτροποίηση, στην ετεροτροφική νιτροποίηση η οξείδωση της αμμωνίας δεν πραγματοποιείται για την διατήρηση της ενέργειας καθώς επίσης σε αυτήν εμπλέκονται διαφορετικά ένζυμα από αυτά των αυτότροφων νιτροποιητών. Οι ρυθμοί νιτροποίησης των ετερότροφων νιτροποιητών είναι σημαντικά χαμηλότεροι από των αυτότροφων (Braker and Conrad, 2011). Στα όξινα δασικά εδάφη η νιτροποίηση από ετερότροφους μικροοργανισμούς αποτελεί το κυρίαρχο μονοπάτι νιτροποίησης (Cai et al., 2010).

ANAMMOX

Την τελευταία εικοσαετία οι μελέτες γύρω από την διεργασία της νιτροποίησης έχουν αναδείξει την παρουσία και συνεισφορά σε αυτήν μιας κατηγορίας αναερόβιων βακτηρίων. Οι Mulder et al. το 1995 ανακαλύπτουν απώλειες αμμωνίας κάτω από αναερόβιες συνθήκες μέσα σε έναν αντιδραστήρα απονιτροποίησης. Η αναερόβια οξείδωση της αμμωνίας (**AN**aerobic **AMM**onium **OX**idation) αποτελεί την διεργασία κατά την οποία η αμμωνία NH_4^+ μετατρέπεται απευθείας σε αέριο άζωτο N_2 σύμφωνα με την χημική εξίσωση :



Πολλές είναι οι μελέτες που έχουν καταδείξει την παρουσία των αναπνοοχ βακτηρίων στα υδάτινα οικοσυστήματα (Dale et al., 2009; Jaeschke et al., 2009; Penton et al., 2006). Αυτή η ανακάλυψη έκανε αντιληπτό πως πάνω το 50% των απωλειών του κύκλου του N προερχόταν από τα υδάτινα οικοσυστήματα, λόγω της δράσης των αναπνοοχ βακτηρίων (Arrigo, 2005). Ελάχιστες όμως είναι οι μελέτες που έχουν διερευνήσει την παρουσία αυτών των βακτηρίων στα χερσαία οικοσυστήματα (Li et al. 2011; Humbert et al, 2010).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες οι επηρεάζουν την νιτροποίηση

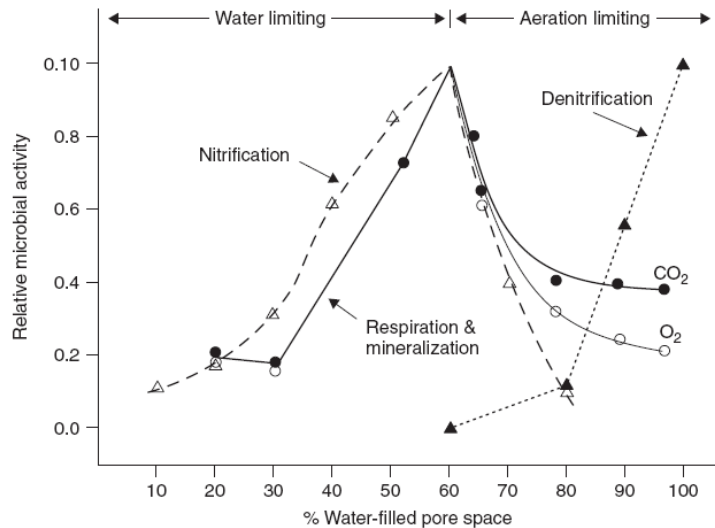
Ο ποιο σημαντικός παράγοντας που καθορίζει την νιτροποίηση στην πλειοψηφία των εδαφών είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος (NH_3). Όταν σε ένα χερσαίο οικοσύστημα για κάποιο λόγο παρατηρείται αύξηση της διαθέσιμης αμμωνίας τότε συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση του ρυθμού νιτροποίησης (Prosser, 2011).

Το διαθέσιμο οξυγόνο αποτελεί επίσης παράγοντας που καθορίζει την νιτροποίηση καθώς, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι νιτροποιητές είναι αερόβιοι μικροοργανισμοί. Επίσης η υγρασία του εδάφους επηρεάζει την νιτροποίηση καθώς αυτή μειώνονται σε εδάφη με αυξημένη υγρασία. Ακολούθως και η θερμοκρασία επηρεάζει και συγκεκριμένα αύξηση της οδηγεί σε αύξηση της νιτροποίησης.

Τέλος το pH του εδάφους δεν αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα καθώς η νιτροποίηση λαμβάνει χώρα σε ένα ευρύ φάσμα pH(4.5-10), παρόλο που το βέλτιστο είναι το 8.5.

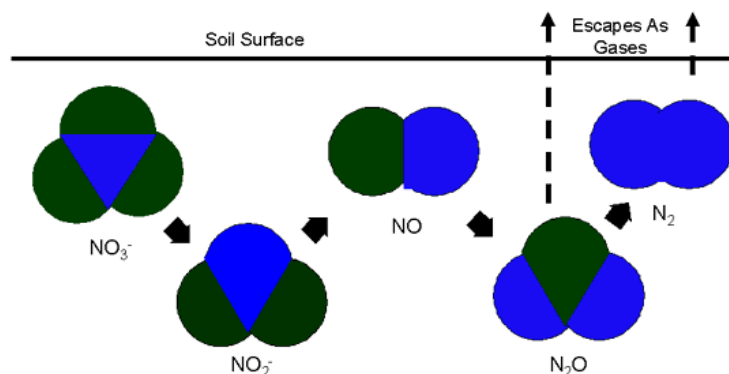
1.4.3 Απονιτροποίηση

Απονιτροποίηση ονομάζεται η αναγωγή των νιτρικών σε αέριες μορφές του N (NO , N_2O , N_2). Ένα μεγάλο εύρος, κυρίως ετερότροφων βακτηρίων κατέχουν μεταβολικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην απονιτροποίηση η οποία πραγματοποιείται μόνο κάτω από συνθήκες έλλειψης O_2 . Στα εδάφη η απονιτροποίηση παρατηρείται συνήθως μετά από βροχοπτώσεις, όπου οι εδαφικοί πόροι έχουν κορεστεί από το νερό και το διαθέσιμο O_2 μειώνεται. Τυπικά η απονιτροποίηση ξεκινά όταν το 60% και πάνω των εδαφικών πόρων έχει πληρωθεί με νερό. (Εικ 1.9) και αποτελεί σημαντική πηγή N_2O στην ατμόσφαιρα (Robertson & Groffman, 2007).



Εικόνα 1.9 Η σχέση μεταξύ της περιεκτικότητας των εδαφικών πόρων σε νερό και της σχετικής μικροβιακής δραστηριότητας (Linn and Doran, 1984).

Η απομάκρυνση των NO_3^- από τα ΣΒΕ μέσω της διεργασίας της απονιτροποίησης αποτελεί μια ευεργετική διαδικασία, μέσω της οποίας αποτρέπεται η μόλυνση των υπόγειων και επιφανειακών υδάτων. Υπολογίζεται πως η απομάκρυνση N μέσω της απονιτροποίησης αποτελεί περίπου 25% του εφαρμόσιμου N στα ΣΒΕ (U.S. EPA, 1981). Παρόλα αυτά αρκετά μεγάλες είναι οι αποκλίσεις (από 2 έως 239 kg N/ha • yr) που έχουν αναφερθεί στον ρυθμό απονιτροποίησης κατά την εφαρμογή υγρών αποβλήτων στο έδαφος (Lowrance et al., 1998; Smith and Bond, 1999; Meding et al., 2001). Σε παγκόσμια κλίμακα η απονιτροποίηση έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια 1 έως 14 *10⁶ t N/yr (Μουστάκας, 2006).



Εικόνα 1.10 Τα στάδια της απονιτροποίησης
(<http://attila.sdsu.edu/~wei/nitrogen>, created by J.Stock)

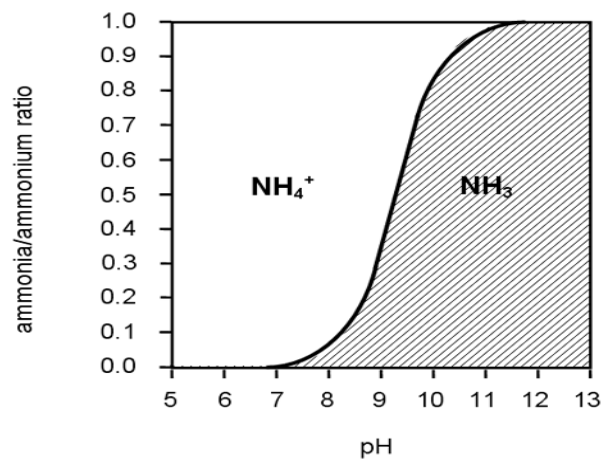
Παράγοντες που επηρεάζουν την απονιτροποίηση

Οι αποκλίσεις του ρυθμού απονιτροποίησης οφείλονται κυρίως σε διαφορές στην υφή του εδάφους, στις κλιματικές συνθήκες, στο pH, στην συγκέντρωση των NO_3^- καθώς και στην διαθεσιμότητα σε οργανικό-C. Η υφή του εδάφους επηρεάζει τον ρυθμό απονιτροποίησης μέσω της επίδρασης που έχει στην εδαφική υγρασία και την διαθεσιμότητα O_2 . Οι Smith and Bond (1999) απέδωσαν τους χαμηλούς ρυθμούς απονιτροποίησης, που παρατήρησαν σε καλλιέργεια με *P. radiata*, στην υφή του εδάφους (αμμοπηλώδη), λόγω της οποίας ευνοήθηκε η αποστράγγιση και ο αερισμός. Αντίθετα, οι αέριες απώλειες που οφείλονταν στην απονιτροποίηση υπολογίστηκαν σε 77 kg N/ha•yr σε αργιλώδες έδαφος, με καλλιέργεια *Eucalyptus spp.*, στο οποίο εφαρμόστηκε αστικό υγρό απόβλητο (Hooda et al., 2003). Ο ρυθμός απονιτροποίησης μπορεί να παρουσιάσει μεγάλες χρονικές και χωρικές παραλλαγές, ακόμα και μέσα σε μια συγκεκριμένη περιοχή, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη την ακριβή εκτίμηση των απωλειών του N. Σημαντικές διαφορές στον ρυθμό απονιτροποίησης παρατηρήθηκαν στην κορυφή του λόφου, στην πλαγιά και στην παρόχθια ζώνη ενός εδαφικού συστήματος επεξεργασίας με δασική βλάστηση, οι οποίες ελάχιστα συσχετίζονται με τις φυσικές ιδιότητες του εδάφους (Meding et al., 2001). Η διαθεσιμότητα NO_3^- στο έδαφος έχει δείχθει ότι έχει θετική επίδραση στον ρυθμό απονιτροποίησης (Barton et al., 1999). Όμως οι Hooda et al. (2003) διαπίστωσαν ότι μια τέτοια σχέση μπορεί να τεκμηριωθεί μόνο την πρώτη ημέρα μετά την εφαρμογή του αποβλήτου καθώς στις επόμενες μέρες δεν παρατηρήθηκε κάτι ανάλογο, γεγονός που αποδίδεται στην περιοριστική επίδραση που έχει η εδαφική υγρασία ή η διαθεσιμότητα O_2 στον ρυθμό της απονιτροποίησης. Θετική είναι επίσης η επίδραση του οργανικού άνθρακα στον ρυθμό της απονιτροποίησης. Όμως δεν υπάρχει κάποιο όριο τιμών για τον οργανικό άνθρακα που να διατηρήσει ή να αυξήσει την διεργασία της απονιτροποίησης. Η έλλειψη μιας οριακής τιμής μπορεί να οφείλεται στον διπλό ρόλο του C στην απονιτροποίηση (δότης ηλεκτρονίων και μέσω της επίδρασης του διαθεσιμότητα O_2 του εδάφους) και στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση του οργανικού-C του εδάφους (Barton et al., 1999). Συνήθως, ένα λόγος C:N μεγαλύτερος του 3:1 σε υγρά απόβλητα θεωρείται επαρκής για τη διατήρηση της απονιτροποίησης (Reed et al., 1995). Τα περισσότερα αστικά υγρά απόβλητα που έχουν δεχθεί πρωτοβάθμια επεξεργασία χαρακτηρίζονται από λόγο C:N μεγαλύτερο του 3.

1.4.5 Εξαέρωση

Εξαέρωση είναι η διαδικασία σχηματισμού αέριας αμμωνίας (NH_3) από NH_4^+ . Απώλειες N, κυρίως υπό την μορφή αέριας αμμωνίας έχουμε κατά την προσθήκη αμμωνιακών λιπασμάτων σε εδάφη που περιέχουν CaCO_3 . Οι απώλειες N εξαρτώνται από το pH, την περιεκτικότητα σε CaCO_3 , την μηχανική σύσταση του εδάφους, την υγρασία και την θερμοκρασία.

Ο Nelson (1982) αναφέρει πώς πάνω από το 50% του προστιθέμενου N, εξαερώνεται, αν γίνει επιφανειακή εφαρμογή αμμωνιακού λιπάσματος σε αλκαλικά εδάφη με $\text{pH} > 7.2$. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι σε αυξημένο pH η αμμωνία NH_4^+ διίσταται σε NH_3 (Εικ 1.11).



Εικόνα 1.11 Η κατανομή του λόγου $\text{NH}_4^+ / \text{NH}_3$ σε συνάρτηση με το pH
(<https://secure.hosting.vt.edu/>)

Η εξαέρωση της NH_3 συμβάλλει στην απομάκρυνση του N κατά την εφαρμογή υγρών αποβλήτων στο έδαφος, μόνο στην περίπτωση που το N του αποβλήτου είναι στην μορφή NH_3 και το pH του αποβλήτου και του εδάφους είναι υψηλό. Στην περίπτωση της εφαρμογής αστικών υγρών αποβλήτων έχει εκτιμηθεί πως η εξαέρωση της NH_3 αποτελεί ένα πολύ μικρό ποσοστό του ολικού N όταν αυτό εφαρμόζεται στο έδαφος (Smith et al., 1996). Οι Sharpe and Harper (2002) αναφέρουν απώλειες της τάξης του 35 % σε χωράφι που αρδεύονταν με υγρό απόβλητο από χοιροστάσιο με την μέθοδο του καταιονισμού. Συγκεκριμένα, το 12% των απωλειών σημειώθηκε κατά την διάρκεια της άρδευσης, ενώ το υπόλοιπο 23% εξαερώθηκε από την επιφάνεια του εδάφους μέσα σε 48h από την άρδευση. Βρέθηκε επίσης πως η εξαέρωση της NH_3 επηρεάστηκε θετικά από την ταχύτητα του ανέμου και την θερμοκρασία. Παρόμοια αποτελέσματα

εξαέρωσης NH_3 έχουν αναφερθεί και σε άλλες εργασίες, με το ποσοστό αυτής να παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση, από 10% έως ακόμα και 70% του συνολικού N που εφαρμόστηκε στο έδαφος (Whalen & DeBerardini, 2007; Sharpe and Harper 1997, 2002)

Δεν υπάρχουν διαθέσιμες εκτιμήσεις για την εξαέρωση της NH_3 όταν η εφαρμογή απόβλητου πραγματοποιείται μέσω επιτόπιων μεθόδων άρδευσης. Μπορεί όμως να θεωρηθεί ότι μειώνονται αναλογικά με τη νωπή επιφάνεια του εδάφους. Ανάλογη έλλειψη πληροφοριών έχουμε και για τα ΣΒΕ στα οποία χρησιμοποιούνται δενδρώδης καλλιέργειες. Στην περίπτωση αυτή, η κόμη των δένδρων, μέσω της επίδρασης που έχει στην ταχύτητα του ανέμου, την θερμοκρασία και στην ηλιακή ακτινοβολία, μπορεί να ασκήσει μεγαλύτερη επίδραση στον ρυθμό εξαέρωσης της NH_3 , συγκρίσει με την χρήση μη δενδρωδών καλλιεργειών σε ένα ΣΒΕ.

1.5 Πρόσληψη N από τα Φυτά

Η πρόσληψη θρεπτικών από τα φυτά και η αποθήκευσή τους στην υπέργεια βιομάζα αποτελεί ένα από τους βασικούς μηχανισμούς απομάκρυνσης N στα ΣΒΕ σε συνδυασμό με τη συγκομιδή της βιομάζας. Έχει αναφερθεί ανάκτηση έως και 650 και 100 kg/ha για N και P αντίστοιχα στην βιομάζα ετήσιων δενδρωδών ειδών (Geber, 2000). Η ικανότητα της βλάστησης στην απομάκρυνση θρεπτικών διαφοροποιείται μεταξύ των φυτικών ειδών και διαφορετικών περιοχών και εξαρτάται από την ικανότητα του φυτού να δεσμεύει θρεπτικά και να τα συσσωρεύει στην υπέργεια βιομάζα του, από τον ρυθμό χορήγησης των θρεπτικών, την περιεκτικότητά τους στο απόβλητο, τη χρονική περίοδο που θα γίνει η εφαρμογή του αποβλήτου και τέλος την επιλογή του χρόνου συγκομιδής (Woodard et al., 2002; Adeli et al., 2003). Η ποσότητα της υπέργειας βιομάζας και/ή περιεκτικότητας των διαφόρων φυτικών ιστών σε θρεπτικά, είναι βασικοί παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν στην επιλογή φυτικού είδους, όταν είναι επιθυμητή η μέγιστη απομάκρυνση θρεπτικών από ένα ΣΒΕ. Η επιλογή ενός φυτικού είδους με υψηλή παραγωγή βιομάζας και/ή ανάπτυξη κατάλληλων διαχειριστικών πρακτικών που επάγουν την παραγωγή της φυτικής βιομάζας, μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένες αποδόσεις απομάκρυνσης θρεπτικών στοιχείων (Paranychianakis et al., 2006a). Η κατανομή της βιομάζας ανάμεσα στα διάφορα φυτικά όργανα μπορεί να έχει ισχυρή επίδραση στην ανάκτηση των θρεπτικών στοιχείων λόγω των διαφορών που παρατηρούνται στην κατανομή τους στους ιστούς (Guo et al., 2002; Day et al., 1979).

Οι φυτικοί ιστοί του τρέχοντος έτους , όπως τα φύλλα, παρουσιάζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε θρεπτικά από ιστούς μεγαλύτερων ετών (κορμός, ρίζα). Έτσι φυτικά είδη τα οποία κατανέμουν μεγαλύτερη αναλογία της συνολικής τους βιομάζας στο φύλλωμα τους έχουν υψηλότερο δυναμικό απομάκρυνσης θρεπτικών στοιχείων (Paranychianakis et al., 2006a).

Ακόμη, η βλάστηση μέσω της επίδρασης στην κατανάλωση νερού, επηρεάζει και το ρυθμό εφαρμογής θρεπτικών στοιχείων στα ΣΒΕ. Η εφαρμογή υδραυλικών φορτίων που ισούνται με τις υδατικές ανάγκες των καλλιεργειών έχει ως συνέπεια την εφαρμογή θρεπτικών στοιχείων στο σύστημα τα οποία υπερβαίνουν την ικανότητά της βλάστησης για πρόσληψη (Paranychianakis et al., 2006). Αυτή η ανισορροπία επιδεινώνεται σε ξηρές και ημίξηρες περιοχές όπου υπάρχουν και αυξημένοι ρυθμοί ΕΤο. Το βασικό θέμα για αυτά τα συστήματα είναι να συνδυαστούν οι ΕΤ ανάγκες της βλάστησης με την ικανότητά της να απομακρύνει θρεπτικά. Κάτι τέτοιο μπορεί να επιτευχθεί με την επιλογή φυτικών ειδών με υψηλή αποδοτικότητα χρήσης νερού (WUE) και χαμηλή αποδοτικότητα χρήσης θρεπτικών (NUE). Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αναφορές που να λαμβάνουν υπ' όψιν εξίσου την WUE και NUE του φυτού ώστε να βελτιστοποιηθεί η ανάκτηση των θρεπτικών (Tzanakakis et al., 2009)

1.6 Στόχος – Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης του φυτικού είδους (*Arundo donax* vs *Eucalyptus camaldulensis*) στις διεργασίες που καθορίζουν την ανακύκλωση N στα συστήματα βραδείας εφαρμογής. Αναλυτικότερα διερευνάται η επίδραση του φυτικού είδους σε πιλοτικά ΣΒΕ:

- i) στην πρόσληψη και συσσώρευση N στη βιομάζα,
- ii) στην ανοργανοποίηση του οργανικού-N του εδάφους,
- iii) στη διεργασία της νιτροποίησης και ειδικότερα στο πληθυσμό αρχαίων και βακτηρίων
- iv) στις απώλειες N από το σύστημα με τη μορφή N_2O , NH_3 και N_2 .

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η κατανόηση των διεργασιών που ρυθμίζουν το γίνεσθαι του N στα ΣΒΕ και η αξιοποίηση τους για την ανάπτυξη ενδεδειγμένων πρακτικών λειτουργίας και τη διαχείρισης, καθώς και κριτηρίων σχεδιασμού και επιλογής βλάστησης για τη μεγιστοποίηση της απομάκρυνσης N.

ΕΝΟΤΗΤΑ 2 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου του φυτικού είδους στον κύκλο του αζώτου (N) κατά την εφαρμογή στο έδαφος υγρών αποβλήτων πρωτοβάθμιας επεξεργασίας. Το απόβλητο προέρχονταν από τη μονάδα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της πόλης του Ηρακλείου. Για την επίτευξη του στόχου αυτού προσδιορίστηκαν το pH, η ηλεκτρική αγωγιμότητα (EC), η συγκέντρωση $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, και ολικού αζώτου (TN), το οργανικό υλικό του εδάφους (SOM), ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης (Potential Nitrification Rate, PNR), και τέλος η συνολική βιομάζα που παράχθηκε και η περιεκτικότητα της σε άζωτο (TKN). Επίσης έγινε ποσοτικός προσδιορισμός του *amoA* γονιδίου των AOA και AOB νιτροποιητών με qRT-PCR ανάλυση.

Τα φυτικά είδη που διερευνήθηκαν ήταν το *Eucalyptus camaldulensis* και το *Arundo donax* (κοινό καλάμι). Η φύτευση των παραπάνω ειδών πραγματοποιήθηκε τον Απρίλιο του 2010 σε δοχεία χωρητικότητας 40 L (Εικ. 1.2).

Η εφαρμογή αποβλήτου ξεκίνησε το Μάιο και συνεχίστηκε ως το τέλος Οκτωβρίου. Ο ρυθμός εφαρμογής βασίστηκε στις ανάγκες των καλλιεργειών για άρδευση και υπολογίστηκε με την βοήθεια τενσιομέτρων που τοποθετήθηκαν στα δοχεία. Ακόμη, στον πειραματικό σχεδιασμό συμπεριλήφθηκαν και μεταχειρίσεις με φυσικό αρδευτικό νερό που χρησιμοποιήθηκαν ως controls για τις μετρήσεις του PNR και της ανοργανοποίησης του οργανικού υλικού.



Εικόνα 2.2 Δοχεία που εμφανίζονται τα τενσιόμετρα και οι δειγματολήπτες εδαφικού διαλύματος

Στον Πίν. 1 παρουσιάζονται η σύνθεση του αποβλήτου και οι αρχικές χημικές ιδιότητες του εδάφους πριν την φύτευση των *Eucalyptus camaldulensis* και *Arundo donax*.

Πίνακας 1. Σύνθεση αποβλήτου και οι χημικές ιδιότητες του εδάφους

	Σύνθεση Αποβλήτου	Χημικές ιδιότητες εδάφους
pH	7.5	7.59
EC (dS/cm)	0.355	0.35
NO ₃ – N (ppm)	23.08	--
NH ₄ – N (ppm)	24.48	--
TKN (%)	0.15 (% dw)	0.046
COD (mg/L)	746	--
CaCO ₃ (%)	--	55
Olsen-P (mg/kg)	--	13.5
OM (%)	--	1.15

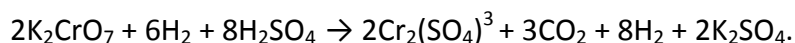
Οι δειγματοληψίες εδάφους ξεκίνησαν αρχές Ιουνίου 2010 και ολοκληρώθηκαν τον Οκτώβριο του ίδιου έτους. Αρχικά επαναλαμβάνονταν κάθε 15 ημέρες και από 3 διαφορετικά βάθη (0-10, 10-20, 20-30cm) και από την 4^η δειγματοληψία (Αύγουστος) πραγματοποιούνταν μηνιαία. Επειδή δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του βάθους του εδάφους στις παραμέτρους που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην επόμενη ενότητα δεν εμφανίζεται ο παράγοντας «βάθος εδάφους». Επίσης λήφθηκαν δείγματα εδαφικού διαλύματος με την βοήθεια δειγματοληπτών εδαφικού διαλύματος τα οποία επίσης αναλύθηκαν για στην συγκέντρωση NO₃-N και NH₄-N.

2.2 Πρωτόκολλα Μετρήσεων

Στην συνέχεια περιγράφονται συνοπτικά οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση των παραμέτρων που προαναφέρθηκαν.

Νιτρικό- και αμμωνιακό- N : Το NH_4^+ -N στο έδαφος βρίσκεται σε ανταλλάξιμη μορφή και μπορεί να εκχυλιστεί σε θερμοκρασία δωματίου με ένα ουδέτερο διάλυμα άλατος καλίου. Τα νιτρικά ιόντα είναι υδροδιαλυτά και μπορούν να εκχυλιστούν με το ίδιο διάλυμα (Soil Sampling and Methods of Analysis, 2008). Η εκχύλιση έγινε σε φρέσκο έδαφος με διάλυμα KCl 2,0 M σε θερμοκρασία δωματίου και αναλογία εδάφους:KCl 1/10 . Η αναλυτική διαδικασία έγινε βάση της μεθοδολογίας που αναφέρεται στο βιβλίο Soil Sampling and Methods of Analysis (chapter 6.2). Ο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του NO_3^- -N χρησιμοποιήθηκε το NitraVer® 5, Powder Pillows της εταιρείας HACH με εύρος προσδιορισμού τα 0 - 30 mg/L. Η μέτρηση έγινε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 540nm. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του NH_4^+ -N έγινε φωτομετρικά με το αντιδραστήριο Nessler σε μήκος κύματος 425nm. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης νιτρικών και αμμωνίας χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο τύπου Perkin-Elmer UV/VIS Lambda 25. Για τον προσδιορισμό του NO_3^- -N και NH_4^+ -N από τα δείγματα των εδαφικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες μέθοδοι.

Οργανικό υλικό εδάφους (SOM): Το έδαφος αρχικά ξηράνθηκε στους 60 °C μέχρι να αποκτήσει σταθερό βάρος και στην συνέχεια πέρασε από κόσκινο διαμέτρου πόρων 250 μm . Ο προσδιορισμός του έγινε με τη μέθοδο Walkley – Black. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξειδωτική δράση του K_2CrO_7 , παρουσία H_2SO_4 σε αναλογία όγκου 1:2. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα κατά την επίδραση του K_2CrO_7 επί του άνθρακα της οργανικής ουσίας του εδάφους είναι:



Η περίσσεια K_2CrO_7 μετά την αντίδραση με το OM τιτλοδοτείται με θειικό σίδηρο (FeSO_4). Θεωρείται ότι με τη μέθοδο αυτή οξειδώνεται περίπου το 70% του οργανικού άνθρακα, οπότε και χρησιμοποιείται ένας συντελεστής διόρθωσης. (Recommended Chemical Soil Test Procedures for the North Central Region, North Central Regional Research Publication No. 221)

Δυναμικός Ρυθμός Νιτροποίησης (PNR): Ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης αναφέρεται στο ρυθμό νιτροποίησης υπό ιδανικές συνθήκες, όπως παρουσία άφθονου υποστρώματος η διάχυση του οποίου δεν περιορίζεται και υπό άριστες συνθήκες

αερισμού. Το έδαφος τοποθετήθηκε σε κωνικές φιάλες παρουσία διαλύματος που περιείχε NH_4^+ σε θάλαμο επώασης (σε θερμοκρασία 20°C) για 24 h υπό συνεχή ανάδευση. Η αναλυτική διαδικασία έγινε βάση τη μεθοδολογίας που αναφέρεται των Hart et al., (2003).

Ολικό Άζωτο (TKN): Το έδαφος καθώς και τα φυτικά μέρη (φύλλα – βλαστός – ρίζα) αρχικά ξήρανθηκαν και στην συνέχεια αλέστηκαν και πέρασαν από κόσκινο διαμέτρου πόρων $250\mu\text{m}$. Στην συνέχεια έγινε χώνευση του δείγματος με πυκνό θειικό οξύ βάση της μεθόδου Kjeldahl. Ο προσδιορισμός του TKN πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά με την μέθοδο της υδροφαινώλης.

Μέτρηση Βιομάζας : Στο τέλος του πειράματος συλλέχτηκαν τα υπέργεια τμήματα των φυτών καθώς και οι ρίζες τους. Μετρήθηκε το βάρος τους πριν και μετά από ξήρανση.

Ενζυμική δραστηριότητα : Μετρήθηκαν οι ενζυμικές δραστηριότητες τριών ενζύμων, της προτεάσης, της ουρεάσης, και της β-γλουσαμινιδάσης.

Ουρεάση: Η ουρεάση είναι ένα ένζυμο το ποίο καταλύει την υδρόλυση της ουρίας σε CO_2 και αέρια NH_3 , διαδικασία που εμπλέκεται στην διεργασία της εξαέρωσης της NH_4^+ . Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε είναι των Kandeler and Gerber (1988). Συνοπτικά 1g χώματος τοποθετήθηκε σε 15-ml falcon σωλήνες και προστέθηκαν 0.5 ml διάλυμα ουρίας ($4,8\text{ g/L}$). Οι σωλήνες στην συνέχεια καλύφθηκαν με καπάκι και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για 2 h . Μετά την επώαση στους σωλήνες προστέθηκαν 10 ml $\text{KCl } 2.0\text{ M}$ και ακολουθήθηκε η διαδικασία προσδιορισμού της συγκέντρωσης του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ με το αντιδραστήριο Nessler σε μήκος κύματος 425 nm . Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε για τα control εδάφη, όπου στην θέση του διαλύματος ουρίας προστέθηκε dH_2O και μετά την επώαση και πριν το KCl προστέθηκε η ουρία. Η δραστηριότητα της ουρεάσης εκφράστηκε ως $\text{mg/L NH}_4\text{-N/g soil} \cdot 2\text{h}$.

β-γλουκοσαμινιδάση: Η β-γλουκοσαμινιδάση ανήκει στην κατηγορία των χιτινολυτικών ενζύμων. Λόγο της δομής της η χιτίνη αποτελεί σημαντική πηγή C και N στο έδαφος, έτσι η β-γλουκοσαμινιδάση θεωρείται ότι παίζει έναν βασικό ρόλο στους βιογεωχημικούς κύκλους του C και N καθώς συμβάλει στην ανοργανοποίηση του N. Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε είναι των Parham and Deng (2000). Συνοπτικά 1 g χώματος τοποθετήθηκε σε 15-ml falcon σωλήνες και προστέθηκαν 4 ml 0.1M acetate buffer ($\text{pH } 5,5$) και 1ml 10mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide, ως

υπόστρωμα. Οι σωλήνες στην συνέχεια καλύφθηκαν με καπάκι και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37 °C για 1 h. Μετά την επώαση στους σωλήνες προστέθηκαν 1 ml 0.5 M CaCl₂ και 4ml 0.5 M NaOH για να σταματήσει η ενζυμική δραστηριότητα. Στην συνέχεια τα δείγματα αναδεύτηκαν και φιλτραρίστηκαν με filter paper Whatman No.40. Χρησιμοποιήθηκαν 2 είδη control ,εδάφη στα οποία προστέθηκε υποστρώμα μετά το σταμάτημα της ενζυμικής δραστηριότητας και control που δεν περιείχε έδαφος. Ο προσδιορισμός έγινε με φωτομέτρηση στα 405 nm. Η δραστηριότητα της β-γλουκοσαμινιδάσης εκφράστηκε ως mg/L p-nitrophenol/g soil *h.

Απομόνωση DNA από το έδαφος : Για την απομόνωση του ολικού γενωμικού DNA ζυγίστηκαν 0,6gr εδάφους το οποίο αρχικά είχαμε παγώσει και υγρό άζωτο και ομογενοποιήσε σε γουδί. Για την διαδικασία της απομόνωσης χρησιμοποιήθηκε το UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, CA, USA) και ακολουθήθηκε το προτεινόμενο πρωτόκολλο. Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε ελέγχθηκε σε gel αγαρόζης και η ποσότητα του προσδιορίστηκε φωτομετρικά.

Δημιουργία αντιγράφων του amoA γονιδίου των AOB και AOA : Με απλή αντίδραση PCR εντοπίστηκαν και δημιουργήθηκαν αντίγραφα του amoA από το απομονωμένο γενωμικό DNA. Στην αντίδραση της PCR για τα AOB και AOA χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα ζευγάρια εκκινητών (primers) :

amoA-1F/amoA-2R (5-GGGGTTTCTACTGGTGGT-3/5- CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC-3) και amoA19F/amo643R (5'-ATGGTCTGGCTWAGACG-3/5-TCCCACTTWGACCARGCGGCCATCC A-3)

Το μέγεθος και η ποιότητα του προϊόντος της PCR ελέγχτηκε σε gel αγαρόζης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με 1 μl DNA, 1 U KAPA 2G Robust Hot Start Taq πολυμεράση (Kapa Biosystems), 250 nM εκκινητές, 10 nM κάθε dNTP, 1x PCR buffer (KAPA 2G Robust Hot Start; buffer A), και αποστειρωμένο νερό με τελικό όγκο αντίδρασης τα 25 μl. Το πρωτόκολλο των θερμοδυναμικών κύκλων το οποίο ακολουθήθηκε είναι : 3 min στους 95 oC, στην συνέχεια 35 κύκλοι : 30 s στους 95 oC, 35 s στους 57.5 oC (62 oC για τα AOA) and 5 s στους 72 oC, και τελικό στάδιο επιμήκυνσης για 10 min στους 72 oC. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή reqSTAR 96 Universal Gradient (PEQLAB Biotechnologie GmbH).

Κλωνοποίηση και αλληλούχηση : Αρχικά έγινε έκλωση των επιλεγμένων προϊόντων της αντίδραση PCR από το gel αγαρόζης. Έγινε εισαγωγή των amoA γονιδίων στον

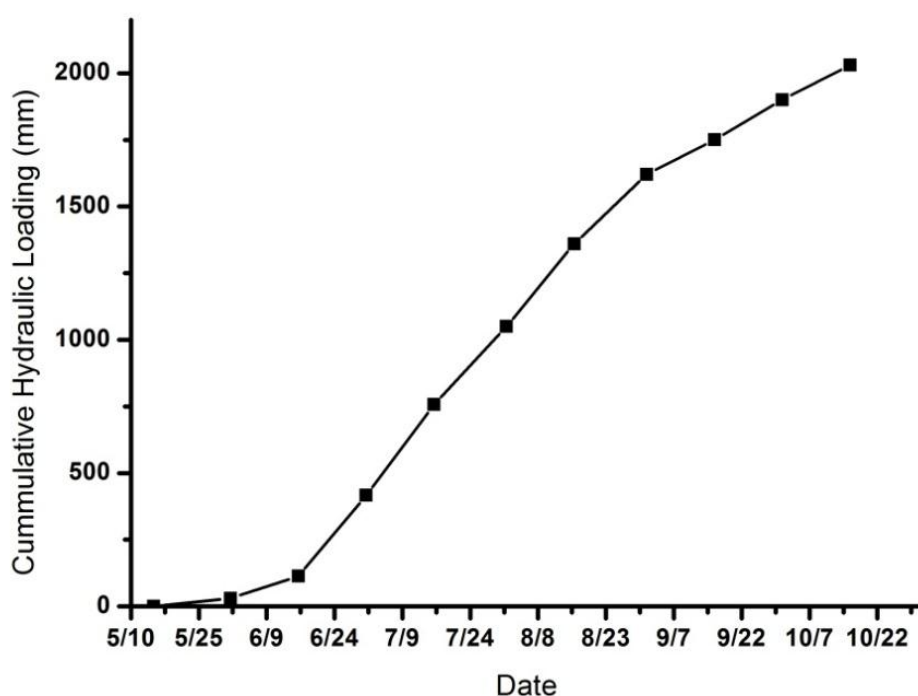
φορέα κλωνοποίησης pGEM-T Easy vector και χρησιμοποιήθηκαν τα E. coli JM109-competent cells (Promega). Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πακέτο DNASTar.

q real-time PCR : Οι εκκινητές και το πρωτόκολλο της θερμικής αντίδρασης το οποίο περιγράφηκε προηγουμένως χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση του *amoA* γονιδίου των αμμωνι-οξειδοτικών βακτηρίων (AOB) και αρχαίων (AOA). Η αντίδραση έγινε με φθορίζουσα SYBR Green και πραγματοποιήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 20 μ l και χρησιμοποιήθηκε το KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) qRT-PCR Kit (KAPA Biosystems), 0.5 μ M από κάθε εκκινητή, και 2 μ l υποστρώματος (DNA εδάφους) που είχε αρχικά γίνει 1/10 αραιώση. Τα δεδομένα από κάθε κύκλο λήφθηκαν στο στάδιο της τελικής επιμήκυνσης (extension phase) το οποίο αντιστοιχούσε στους 81 $^{\circ}$ C για το βακτηριακό *amoA* και στους 76 $^{\circ}$ C για των αρχαίων. Όλες οι αντιδράσεις ακολουθήθηκαν από την κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve analysis) ώστε να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature ή T_m) των προϊόντων της αντίδρασης και στην προκειμένη, η θερμοκρασία ξεκίνησε από τους 60 $^{\circ}$ C και με αύξηση κατά 0.5 $^{\circ}$ C μέχρι τους 95 $^{\circ}$ C. Οι καμπύλες αναφοράς (Standard curves) για τα AOB και τα AOA κατασκευαστήκανε με διαδοχικές αραιώσεις 10^3 - 10^8 του γραμμικοποιημένου πλασμιδίου (pGEM-T, Promega) που είχε ενσωματώσει τα γονίδια *amoA* τα οποία είχαν ενισχυθεί από τα περιβαλλοντικά δείγματα. Στους αρνητικούς μάρτυρες (χωρίς υπόστρωμα DNA) δεν ανιχνεύτηκε προϊόν και η μη επίδραση παρεμποδιστών κατά την αντίδραση εξασφαλίστηκε μέσω της αραιώσης 1/10 των εδαφικών δειγμάτων. Η efficiency ήταν 78% και 90% για τα AOB και AOA αντίστοιχα και οι τιμές του R^2 κυμάνθηκαν μεταξύ 0.99 και 1.00.

ΕΝΟΤΗΤΑ 3 : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ρυθμός Εφαρμογής Αποβλήτου.

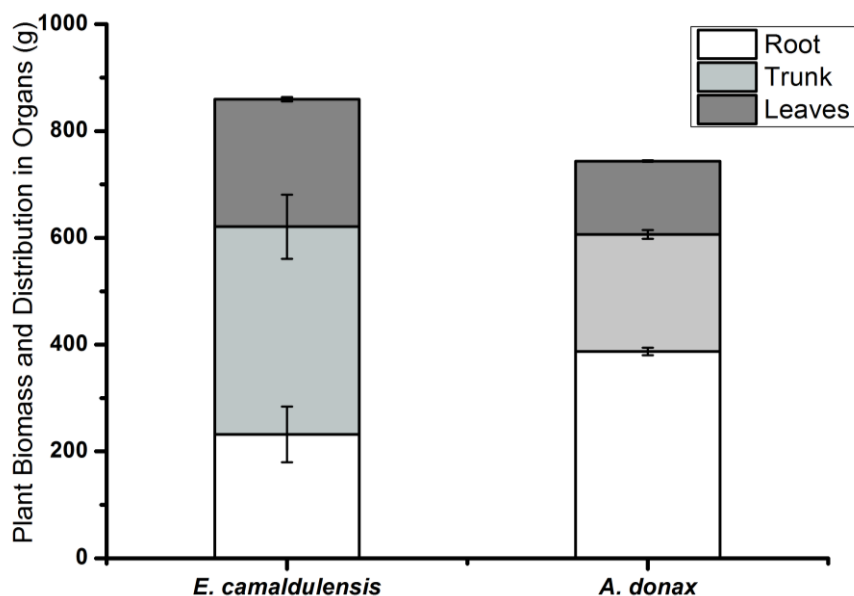
Το υδραυλικό φορτίο που εφαρμόσθηκε κατά την διάρκεια της μελέτης εμφανίζεται στο Σχήμα 3.1 και προσέγγισε τα 2000 mm. Όπως διακρίνεται στο Σχήμα 3.1 χαμηλοί ρυθμοί εφαρμογής υδραυλικού φορτίου επικράτησαν κατά την περίοδο Μαΐου-Ιουνίου λόγω των κλιματικών συνθηκών και της μικρής φυλλικής επιφάνειας της βλάστησης. Μετά τα μέσα Ιουνίου ωστόσο ο ρυθμός υδραυλικού φορτίου αυξήθηκε και παρέμεινε σταθερός ως τις αρχές Σεπτεμβρίου όπου παρατηρήθηκε μία μείωσης λόγω της πτώσης της θερμοκρασίας και της γήρανσης των φύλλων. Κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στις αρδευτικές απαιτήσεις μεταξύ των φυτικών ειδών.



Σχήμα 3.1 Ο ρυθμός εφαρμογής του απόβλητου καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος

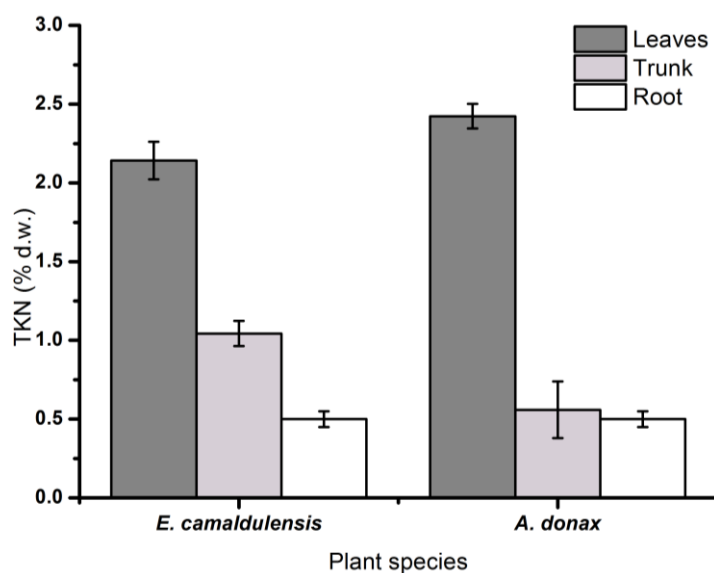
3.2 Παραγωγή Βιομάζας και Συσσώρευση N.

Παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη παραγωγή βιομάζας και στην κατανομή αυτής ανάμεσα στα φυτικά όργανα μεταξύ των φυτικών ειδών που διερευνήθηκαν στην παρούσα εργασία (Σχ. 3.2). Συνολικά το *E. camaldulensis* παρήγαγε 15% παραπάνω βιομάζα από το *A. donax*. Στα επιμέρους φυτικά τμήματα, το *E. camaldulensis* είχε μεγαλύτερη παραγωγή στον κορμό και τα φύλλα, ενώ το *A. donax* στις ρίζες. (Σχ. 3.2).

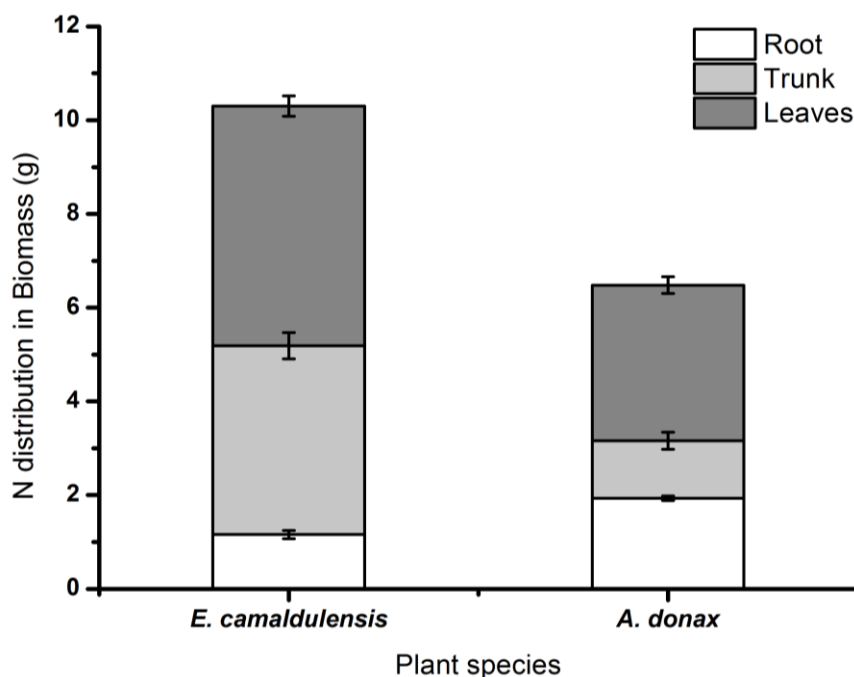


Σχήμα 3.2 Παραγωγή βιομάζας (g) και κατανομή αυτής της αύξησης ανάμεσα στα φυτικά μέρη στο *E. Camaldulensis* και το *A. donax* που είχαν αρδευτεί με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας.

Η συγκέντρωση N στους ιστούς των φυτών που διερευνήθηκαν στην παρούσα εργασία φαίνεται στο Σχήμα 3.3. Διαπιστώθηκε ότι το *A. donax* παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση N στα φύλλα, ενώ το *E. camaldulensis* είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση N στα στελέχη. Δεν διαπιστώθηκε σημαντική επίδραση μεταξύ των φυτικών ειδών στη ρίζα.



Σχήμα 3.3 Η % περιεκτικότητα του N ανάμεσα στα φυτικά μέρη του *E. Camaldulensis* και *A. donax* που είχαν αρδευτεί με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας, μετά από την μέτρηση του TKN.

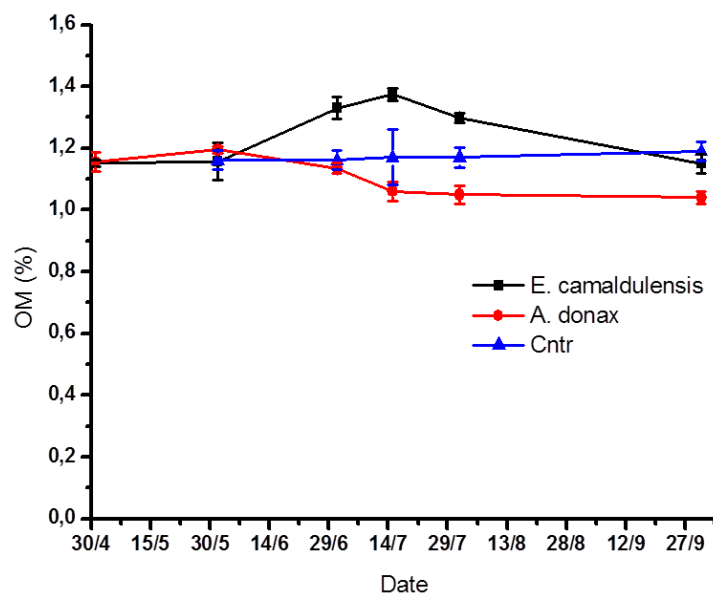


Σχήμα 3.4 Συσσώρευση και κατανομή N (gr) ανάμεσα στα φυτικά μέρη στο *E. Camaldulensis* και το *A. donax* που είχαν αρδευτεί με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας

Συμπερασματικά, σχετίζοντας τις διαφορές στην παραγωγή της βιομάζας, την κατανομή της στα φυτικά όργανα και τη συγκέντρωση N στα φυτικά όργανα ανάμεσα στο *E. camaldulensis* και *A. donax*, διαπιστώνεται μια ισχυρή επίδραση του είδους του φυτού στην συσσώρευση N στη βιομάζα. Όπως λοιπόν προκύπτει το *E. camaldulensis* συσσώρευσε 38% περισσότερο N στη βιομάζα του συγκρίσει με το *A. donax* (Σχ. 3.4).

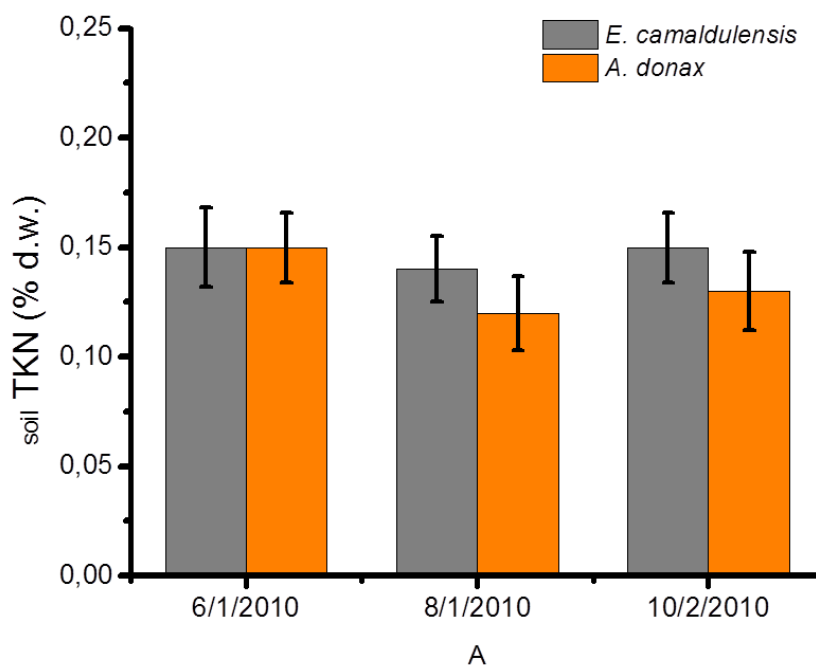
3.2. Η Επίδραση στο οργανικό υλικό και το ολικό άζωτο του εδάφους

Η συγκέντρωση του οργανικού υλικού στο έδαφος (SOM) των δοχείων που αρδεύονταν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας παρέμεινε σχεδόν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στα δοχεία με το *E. camaldulensis* παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση, όπου στα μέσα Ιουλίου(16/7) φτάνει στην μέγιστη τιμή του (1.37%). Στην συνέχεια η συγκέντρωση του SOM μειώθηκε σταδιακά επιστρέφοντας αρχικά επίπεδα. Σε δοχεία με *A. donax* διαπιστώθηκε αντίθετα, μία πιο απότομη μείωση από τα αρχικά επίπεδα ως τα μέσα Ιουλίου (1.05%), όπου διατηρήθηκε σταθερή ως το τέλος του πειράματος. (Σχ.3.5). Γενικά η συγκέντρωση οργανικού υλικού στα δοχεία με το *A. donax* ήταν ελαφρώς μικρότερη από αυτήν στα *E. camaldulensis*.



Σχήμα 3.5 Η % περιεκτικότητα οργανικού υλικού στα *E. Camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας

Όσον αφορά την πορεία της συγκέντρωσης του TN στο έδαφος που εφαρμόστηκε απόβλητο, παρατηρούμε στο τέλος του πειράματος δεν μεταβλήθηκε σχεδόν καθόλου σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των φυτικών ειδών (Σχ. 3.6).

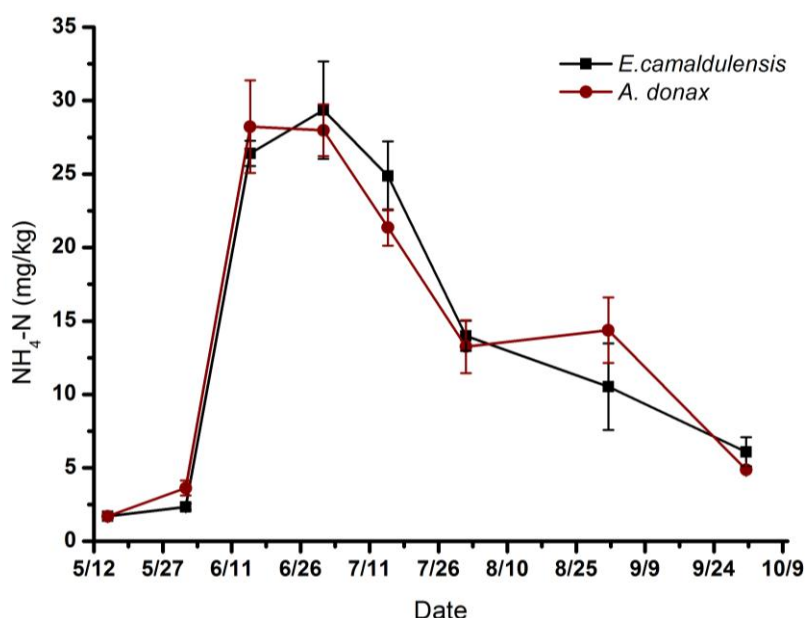


Σχήμα 3.6 Η % περιεκτικότητα του εδάφους σε ολικό N υλικού στα *E. Camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας

3.3 Συγκέντρωση $\text{NO}_3\text{-N}$ και $\text{NH}_4\text{-N}$ στο Έδαφος και στην Εδαφική

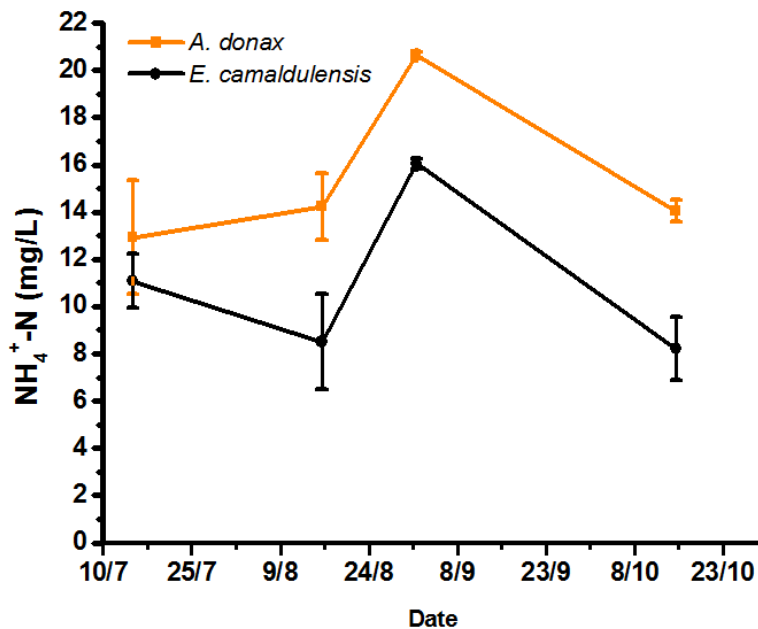
διάλυση

Τα δοχεία που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας παρουσίασαν απότομη αύξηση στη συγκέντρωση του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ του εδάφους, η οποία έφτασε στην μέγιστη τιμή της στις 30 Ιουνίου (Σχ. 3.7), παρά το γεγονός ότι ο ρυθμός εφαρμογής υγρών αποβλήτων κατά την περίοδο αυτή ήταν σε χαμηλά επίπεδα (Σχ. 3.1). Μεταγενέστερα και παρά την σημαντική αύξηση του ρυθμού εφαρμογής υγρών αποβλήτων στα δοχεία, η συγκέντρωση του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ μειωνόταν, ώσπου προσέγγισε τα επίπεδα πριν την έναρξη εφαρμογής αποβλήτων (Σχ. 3.6). Καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του είδους του φυτού στη συγκέντρωση του $\text{NH}_4^+\text{-N}$ στο εδάφος (Σχ.3.7).



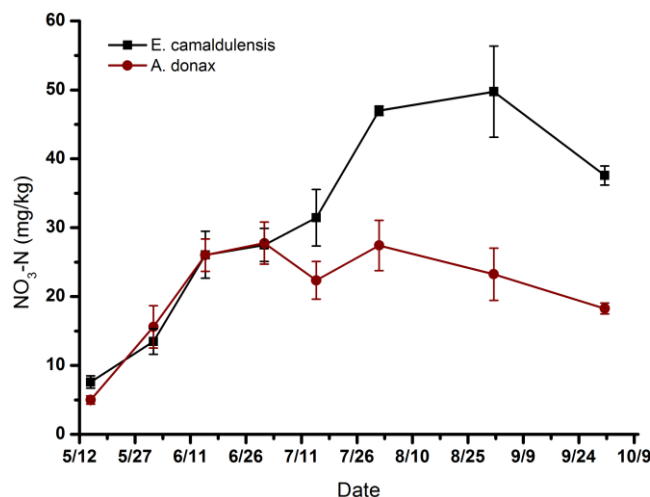
Σχήμα 3.7 Η συγκέντρωση του $\text{NH}_4\text{-N}$ στα *E. camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας

Αντίθετα, σημαντική επίδραση του φυτικού είδους διαπιστώθηκε στη συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ σε δείγματα εδαφικής διάλυσης τα οποία επαναλαμβάνονταν εντός 4 h από την εφαρμογή του αποβλήτου. Η συγκέντρωση $\text{NH}_4^+\text{-N}$ σε δοχεία με *A. donax* διατηρήθηκε υψηλότερη σε σχέση με την αντίστοιχη σε δοχεία με *E. Camaldulensis* (Σχ.3.8).



Σχήμα 3.8 Η συγκέντρωση του NH₄-N στα *E. Camaldulensis* και *A.donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας από τα εδαφικά δείγματα (soil solution samples)

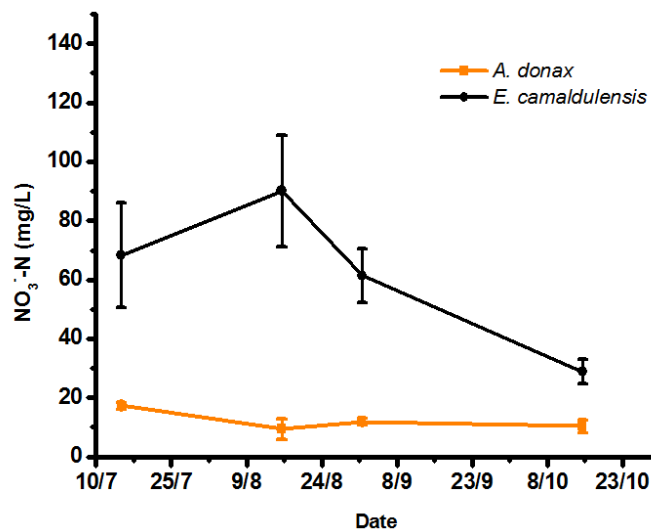
Η συγκέντρωση του NO₃-N εδάφους στα δοχεία που αρδεύτηκαν με εκροές αποβλήτων που είχαν δεχθεί πρωτοβάθμια επεξεργασία παρουσίασε γραμμική αύξηση μέχρι τα τέλη Ιουνίου και για τα δύο φυτικά είδη. Στους επόμενους μήνες αυτή η αύξηση συνεχίστηκε μόνο για τα δοχεία με *E. Camaldulensis*, ενώ για το *A.donax* έμεινε περίπου σταθερή, με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί αρκετά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των φυτικών ειδών (Σχ.3.9).



Σχήμα 3.9 Η συγκέντρωση του NO₃-N στα *E. camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας

Ακολουθώντας οι μετρήσεις από την εδαφική διάλυση έρχονται να ενισχύσουν την διαφοροποίηση στην συγκέντρωση των NO₃-N μεταξύ *E. camaldulensis* και *A. donax*

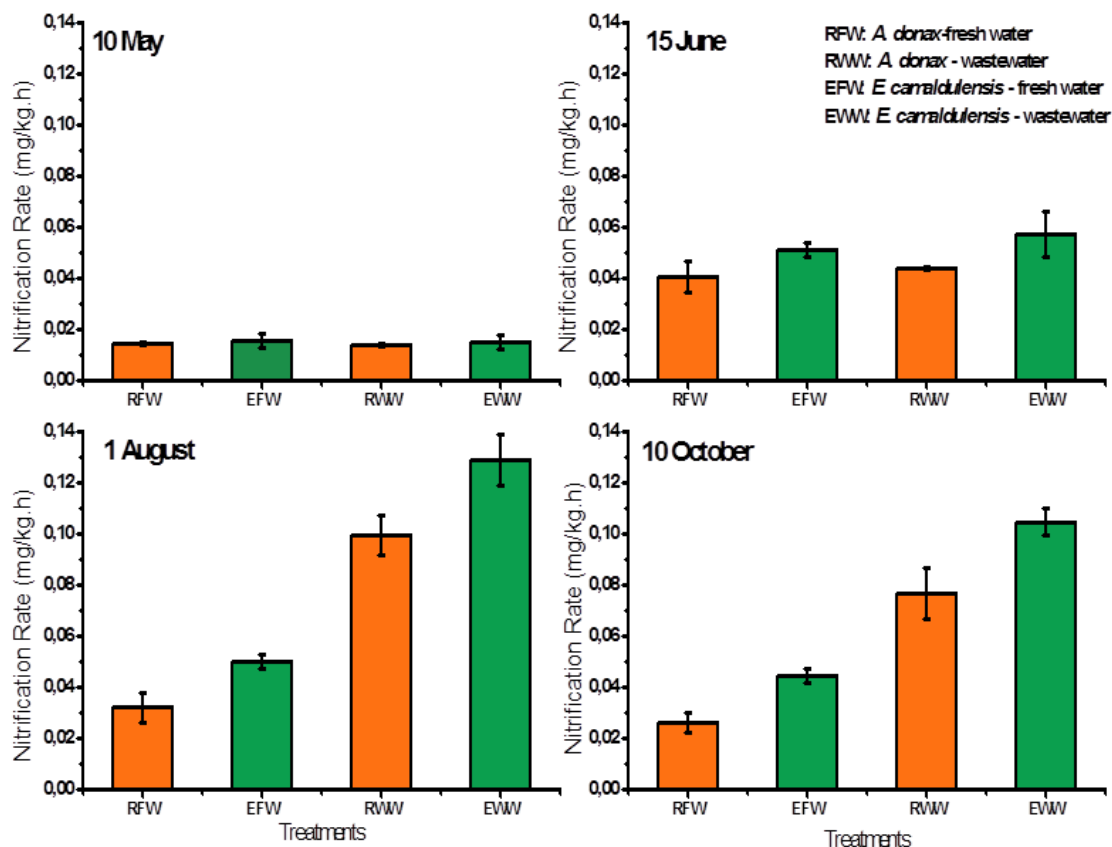
που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας, με αυτή των *E. camaldulensis* να είναι μεγαλύτερη καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Σχ. 3.10).



Σχήμα 3.10 Η συγκέντρωση του $\text{NO}_3\text{-N}$ στα *E. Camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας από τα εδαφικά δείγματα (soil solution samples)

3.4 Δυναμικός Ρυθμός Νιτροποίησης (PNR)

Ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης μετρήθηκε σε 4 χρονικές περιόδους καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στην έναρξη του πειράματος πριν εφαρμογή αποβλήτου (10 Μαΐου), στην μέση (15 Ιουνίου και 1 Αυγούστου), όπου η συγκέντρωση του $\text{NO}_3\text{-N}$ στο έδαφος είχε πιάσει τις μέγιστες τιμές της (Σχ. 3.9) και στο τέλος της βλαστικής περιόδου (10 Οκτωβρίου). Τα ευρήματα των μετρήσεων αυτών έδειξαν πως το φυτικό είδος έχει σημαντική επίδραση στον δυναμικό ρυθμό νιτροποίησης, γεγονός που καταδεικνύει διαφορές τόσο στο μικροβιακό πληθυσμό των νιτροποιητών, όσο και στην ενεργότητα τους. Στα δοχεία με *E. camaldulensis* μετρήθηκαν μεγαλύτεροι δυναμικοί ρυθμοί νιτροποίησης σε σύγκριση με αυτούς του *A. donax* (Σχ. 3.11). Διαφορές επίσης παρατηρήθηκαν και μεταξύ των ποιοτήτων νερού. Αυξημένοι κατά 155 και 250% ήταν οι ρυθμοί για το *E. camaldulensis* και *A. donax* αντίστοιχα στα δοχεία που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας σε σχέση με αυτά που αρδεύτηκαν με φυσικό νερό μεταξύ της 15 Ιουνίου και 1 Αυγούστου (Σχ. 3.11).

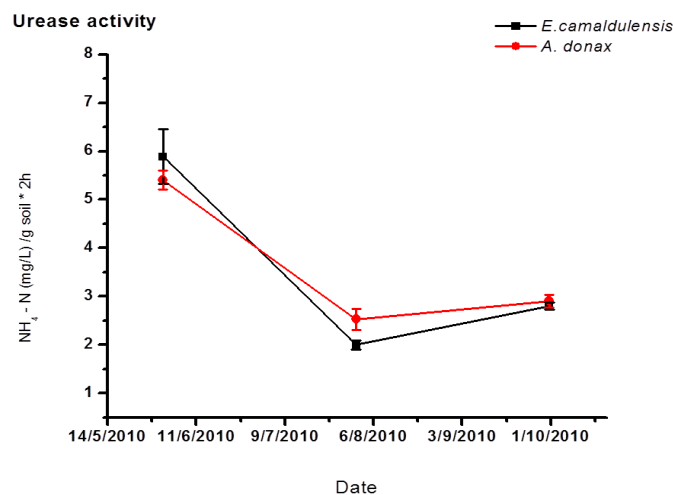


Σχήμα 3.11 Ο δυναμικός ρυθμός νιτροποίησης καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. RFW : *A. donax* που αρδευόταν με φυσικό νερό , RWV : *A. donax* που αρδευόταν με απόβλητο, EFW : *E. Camaldulensis* που αρδευόταν με φυσικό νερό , EVW : *E. Camaldulensis* που αρδευόταν με απόβλητο

3.5 Ενζυμική Δραστηριότητα στο έδαφος.

Ουρεάση

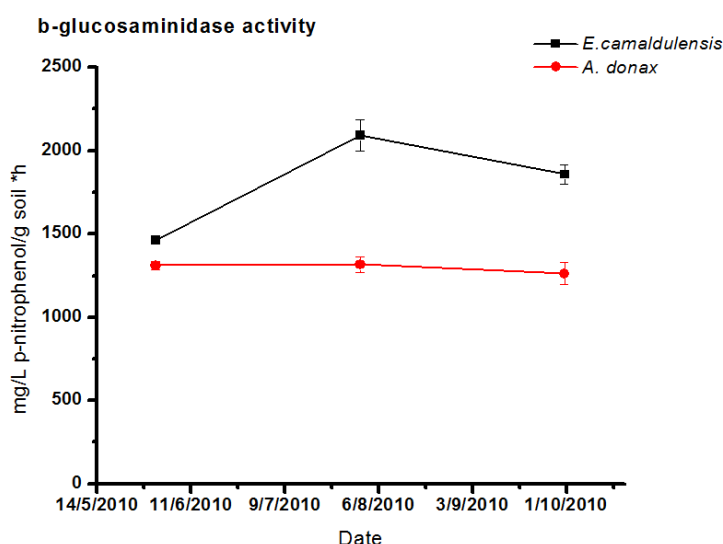
Η ουρεάση όπως αναφέρθηκε και στο 2^ο Κεφάλαιο είναι ένα ένζυμο το ποίο καταλύει την υδρόλυση της ουρίας σε CO₂ και αέρια NH₃, διαδικασία που εμπλέκεται στην διεργασία της εξαέρωσης της NH₄⁺. Στην αρχή του πειράματος (αρχές Ιουνίου) και στα δυο φυτικά είδη που είχαν δεχθεί άρδευση με απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας η τιμή της ουρεάσης διατηρήθηκε σε παρόμοια επίπεδα, ενώ διαπιστώθηκε μία μείωσης της ενεργότητας της συναρτήσει του χρόνου ως το μέσο της βλαστικής περιόδου (αρχές Αυγούστου) (Σχ. 3.12), όπου και διατηρήθηκε σταθερή .



Σχήμα 3.12 Η δράση της ουρεάσης εκφρασμένη ως mg/L NH₄-N/g soil *2h στα *E. Camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας

β-γλουκοσαμινιδάση

Η β-γλουκοσαμινιδάση ανήκει στην κατηγορία των χιτινολυτικών ενζύμων και συμβάλει στην ανοργανοποίηση του N. Παρατηρείται σημαντική διαφορά στην τιμή της ανάμεσα στα *E. Camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας, από την αρχή του πειράματος, η οποία διαφορά παραμένει σταθερή μέχρι το τέλος. Στο *A. donax* παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ενώ στο *E. Camaldulensis* έχει μια σταδιακή αύξηση μέχρι τις αρχές Αυγούστου, όπου παρέμεινε σταθερή ως το τέλος του πειράματος (Σχ.3.13).

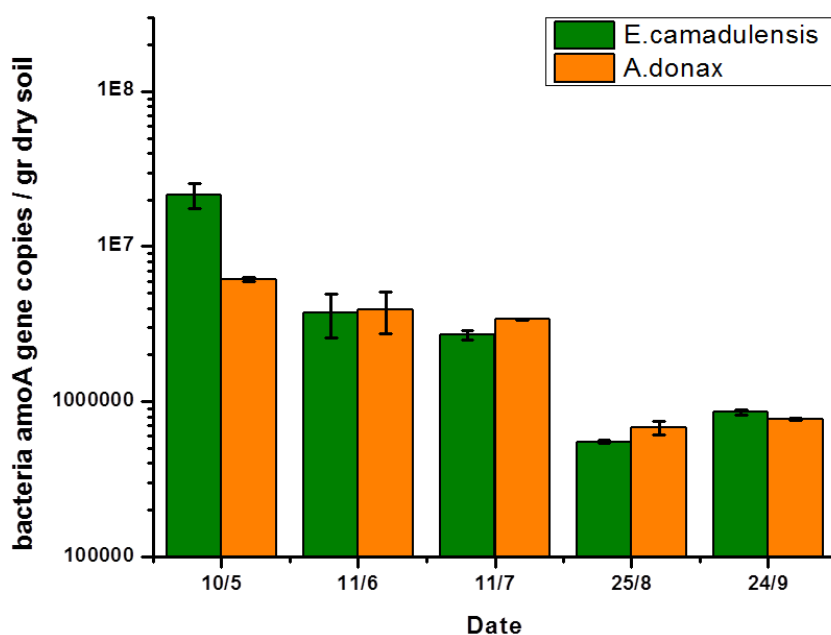


Σχήμα 3.13 Η δράση της β-γλουκοσαμινιδάσης εκφρασμένη mg/L p-nitrophenol/g soil *h. στα *E. Camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας

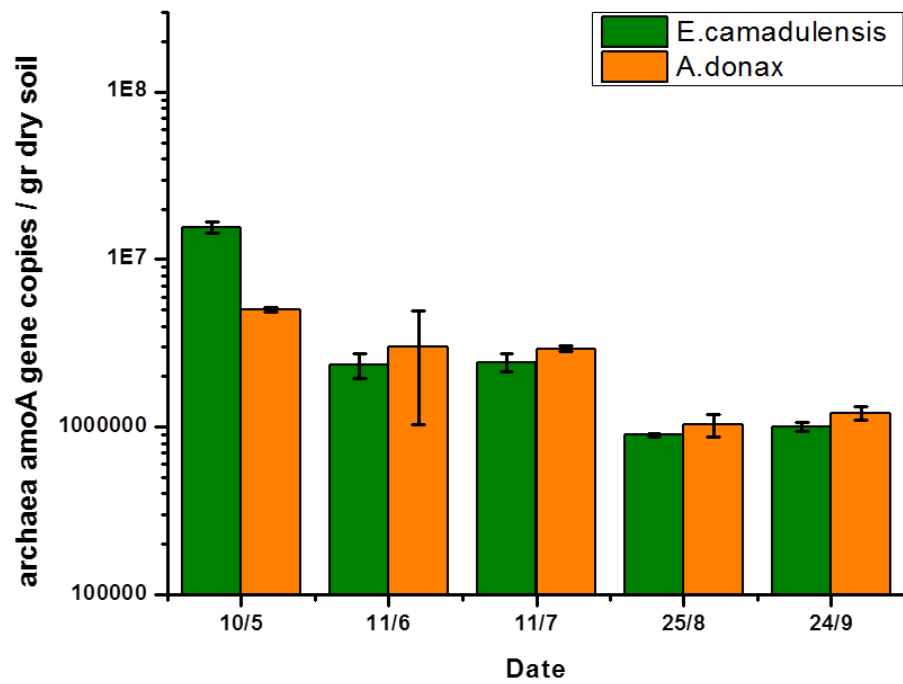
3.6 Αμμωνιο-οξειδωτικά βακτήρια (ΑΟΒ) και αρχαία (ΑΟΑ)

Τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν από την qRT-PCR (Σχ. 3.14) για το γονίδιο *amoA* των βακτηρίων αναδεικνύουν μια εμφανή επίδραση του φυτικού είδους στον αριθμό του πληθυσμού στην αρχή του πειράματος, πριν ξεκινήσει η εφαρμογή αποβλήτου. Βλέπουμε όμως ότι στην συνέχεια και μέχρι το τέλος των μετρήσεων η επίδραση αυτή έπαψε να υφίσταται. Επίσης παρατηρούμε ότι υπήρξε μια σταδιακή μείωση του πληθυσμού. Δηλαδή από τιμές της τάξης του 10^7 αρχικά, να φτάνει σε τιμές της τάξης των 10^6 στο τέλος της πειραματικής περιόδου.

Παρόμοια πορεία ακολούθησε και ο πληθυσμός των αρχαίων, όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα για το αντίστοιχο *amoA* γονίδιο (Σχ.3.15). Αρχικά και σε αυτόν τον πληθυσμό είχαμε μια ισχυρή επίδραση του φυτικού είδους, πριν την εφαρμογή του αποβλήτου, η οποία στην συνέχεια εξαλείφθηκε. Ομοίως παρατηρείται σταδιακή μείωση του πληθυσμού, με την διαφορά πως ο αριθμός των αντιγράφων στα αρχαία φαίνεται να διατηρείται σε πιο ψηλά επίπεδα, από αυτόν των βακτηρίων στο τέλος του πειράματος.



Σχήμα 3.14 Ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *amoA* των βακτηρίων ανά gr νωπού εδάφους, συγκριτικά στο *E.camaldulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο, εκφρασμένο σε λογαριθμική κλίμακα



Σχήμα 3.15 Ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου amoA των αρχαίων ανά gr νωπού εδάφους, συγκριτικά στο *E.camadulensis* και *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο, εκφρασμένο σε λογαριθμική κλίμακα

ΕΝΟΤΗΤΑ 4 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Παραγωγή Βιομάζας και Συσσώρευση N σε αυτή.

Η εφαρμογή επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων στο έδαφος, αποτελεί μία συνήθη πρακτική διαχείρισης υγρών αποβλήτων και συμβάλει στην προστασίας της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος. Η πρακτική αυτή είναι κατάλληλη κυρίως για μικρούς οικισμούς και βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων (Crites et al., 2000). Ωστόσο, ένα από τα πιο σημαντικά θέματα που αφορούν την αποτελεσματικότητα των εδαφικών συστημάτων είναι η περίσσεια θρεπτικών στοιχείων, κυρίως N, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη για ανάπτυξη των κατάλληλων στρατηγικών για τη βελτίωση των δυνατοτήτων τους για θρεπτική αφομοίωση (Orwin et al., 2010). Ο έλεγχος της συσσώρευσης N εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση σε αυτά τα συστήματα.

Τα ευρήματά της παρούσας εργασίας αποκαλύπτουν μια ισχυρή επίδραση του φυτικού είδους τόσο στην παραγωγή της φυτικής βιομάζας και στην κατανομή αυτής της αύξησης μεταξύ των φυτικών μερών (Σχ.3.2), όσο στην περιεκτικότητα N στα διάφορα φυτικά μέρη καθώς και στην συνολική συσσώρευση N στην φυτική βιομάζα (Σχ. 3.3, 3.4). Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με πρόσφατες εργασίες, οι οποίες δείχνουν ότι η το φυτικό είδος που θα χρησιμοποιηθεί επηρεάζει σημαντικά την απόδοση των ΣΒΕ όσο αφορά την απομάκρυνση N, κυρίως μέσω της συσσώρευσης του στη βιομάζα (Tzanakakis et al., 2009 ; Whalen & De Berardini, 2007; Tozer et al, 2005).

4.2. Η Επίδραση στο Οργανικό Υλικό του Εδάφους.

Η συγκέντρωση του οργανικού υλικού του εδάφους δεν μεταβλήθηκε σημαντικά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην περιεκτικότητα του αποβλήτου σε εύκολα αποδομήσιμες οργανικές ενώσεις (Crites et al, 2000). Επίσης, διαπιστώθηκε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ του *E. Camaldulensis* και του *A. donax* (Σχ. 3.5). Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να αποδοθεί σε μια απ' ευθείας επίδραση του φυτικού είδους στην αφθονία, την δομή και την δραστηριότητα των ετερότροφων μικροοργανισμών που αποικούν στην ριζόσφαιρα των ειδών αυτών. Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται σε μεγάλο αριθμό εργασιών (Kisa et al., 2007; Zhang et al., 2011; Bertin et al., 2003). Σε πτυχιακή μελέτη που πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της ίδιας πειραματικής διάταξης (Βαγιάκης, 2010) μελετήθηκαν οι διεργασίες του κύκλου του C, όπως και η οξείδωση του οργανικού-C. Η συγκεκριμένη εργασία αποκάλυψε διαφορές μεταξύ των φυτικών ειδών στο ρυθμό αυτό, γεγονός που καταδεικνύει ότι η βλάστηση επηρεάζει ισχυρά την δραστηριότητα και/ή το μέγεθος του πληθυσμού των

ετερότροφων μικροοργανισμών που αποικούν στην ριζόσφαιρα. Τα αποτελέσματα της μέτρησης της ενεργότητας του ενζύμου β-γλουκοσαμινιδάση (Σχ. 3.13) ενισχύουν την παραδοχή αυτή. Η β-γλουκοσαμινιδάση αποτελεί ένα χιτινολυτικό ένζυμο και συμβάλει στην ανοργανοποίηση του N. Παρατηρήθηκε στο *E. Camaldulensis* η τιμή της να είναι αρκετά πιο υψηλή από του *A. donax* που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας, καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Συμπληρωματικά όμως η παρούσα εργασία έδειξε πως αυτή η διαφοροποίηση στον ρυθμό ανοργανοποίησης δεν μεταφράστηκε σε σημαντική μεταβολή της συγκέντρωσης του οργανικού υλικού στο έδαφος.

4.3 NO₃-N και NH₄⁺-N του εδάφους.

Η εφαρμογή υγρού αποβλήτου προμήθευσε το έδαφος με ένα σημαντικό ποσό οργανικού C, το οποίο θεωρείται ότι επέδρασε θετικά στη αύξηση του πληθυσμού αλλά και της μικροβιακής δραστηριότητας (Whalen & De Berardinis, 2007). Η παραπάνω υπόθεση επαληθεύεται από τους υψηλότερους ρυθμούς ανοργανοποίησης που μετρήθηκαν στα δοχεία που αρδεύονταν με υγρό απόβλητο σε σχέση με τα δοχεία που αρδεύονταν με φρέσκο νερό (Βαγιάκης, 2010). Αυτοί οι υψηλοί ρυθμοί ευνόησαν την παραγωγή NH₄⁺-N στο έδαφος που οδήγησε στη συσσώρευση του εκεί τις πρώτες βδομάδες του πειράματος παρόλο που ο ρυθμός εφαρμογής του αποβλήτου διατηρήθηκε σε χαμηλά επίπεδα την περίοδο αυτή (Σχ. 1). Στην συνέχεια, παρά τη σημαντική αύξηση του ρυθμού εφαρμογής του αποβλήτου, η συγκέντρωση του εδάφους σε NH₄⁺-N άρχισε να μειώνεται σταδιακά, μέχρι που έφτασε στις αρχικές του τιμές (Σχ. 3.7). Η πορεία που ακολούθησε η συγκέντρωση του NH₄⁺-N στο έδαφος κατά τη διάρκεια του πειράματος αποδίδεται στο ότι οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην νιτροποίηση χρειάζονται ένα χρονικό διάστημα τόσο για να εδραιωθούν στο έδαφος όσο και για να ανταποκριθούν στη μεταβολή της συγκέντρωσης του διαθέσιμου N (Nannipieri and Eldor, 2009). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται ακόμα περισσότερο από τα αποτελέσματα των μετρήσεων του δυναμικού ρυθμού νιτροποίησης, οι οποίες έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δοχείων που αρδεύονταν με απόβλητο και αυτών με φυσικό νερό στα οποία ο ρυθμός νιτροποίησης αυξήθηκε με την πάροδο του χρόνου. Στην συσσώρευση NH₄⁺-N στο έδαφος δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ειδών που να ενισχύουν τα αποτελέσματα του δυναμικού ρυθμού νιτροποίησης, όμως οι μετρήσεις στα εδαφικά διαλύματα, επιβεβαίωσαν αυτήν την διαφοροποίηση (Σχ 3.8). Λόγω του ότι τα δείγματα εδαφικής

διάλυσης λαμβάνονταν εντός 4 h από την εφαρμογή του αποβλήτου, έγινε δυνατό να διαπιστωθεί σημαντική επίδραση του φυτικού είδους.

Σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των φυτικών ειδών σε σχέση με την συγκέντρωση του NO_3^- -N στο έδαφος (Σχ. 3.9), οι οποίες ενισχύονται από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε εδαφικά διαλύματα, την περίοδο που ξεκίνησε και η διαφοροποίηση της συγκέντρωσης του NO_3^- -N στο έδαφος (Σχ. 3.10). Οι διαφορές αυτές ωστόσο δεν μπορούν να αποδοθούν στις διαφορές που παρατηρήθηκαν στη συσσώρευση N μεταξύ των φυτικών ειδών υποδεικνύοντας ότι το είδος της βλάστησης ασκεί επίδραση στους μικροοργανισμούς που εμπλέκονται στο βιογεωχημικό κύκλο του N στο έδαφος. Παρόμοια επίδραση αναφέρεται και σε εργασία των Tzanakakis, et al (2009) κάτω από συνθήκες αγρού. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις του εδαφικού NO_3^- -N στα δοχεία με το *A. donax*, πιθανώς να συνδέονται με αυξημένες απώλειες N μέσω της διεργασίας της απονιτροποίησης, που πραγματοποιείται ύστερα από αύξηση του πληθυσμού των απονιτροποιητών είτε από τόνωση της δραστηριότητάς τους, ίσως λόγω υψηλής υγρασίας στους εδαφικούς πόρους άρα μειωμένου διαθέσιμου O_2 . Πρόσφατες πάντως εργασίες ενισχύουν την άποψη πως η βλάστηση μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην μικροβιακή κοινότητα που εμπλέκεται στον κύκλο του N (Boyle et al, 2006). Σε πρόσφατη εργασία διαπιστώθηκε πράγματι αυξημένος πληθυσμός απονιτροποιητών σε τεχνητούς υγροβιότοπους με *Phragmites australis* σε σχέση με υγροβιότοπους με *Typha latifolia* (Ruiz-Rueda et al., 2009). Αυτή λοιπόν η διαπίστωση δίνει σημαντικές προεκτάσεις στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων, την εξυγίανση υδάτων από το N καθώς και την αποκατάσταση παρόχθιων ζωνών επιβαρυμένων με N. Απαιτείται βέβαια περισσότερη μελέτη και εμβάθυνση, προκειμένου να κατανοηθούν και να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή την διεργασία.

4.4 Δυναμικός Ρυθμός Νιτροποίησης (Potential Nitrification Rate – PNR)

Τα αποτελέσματα των PNR μετρήσεων ενισχύουν την υπόθεση πως οι νιτροποιητές χρειάζονται ένα χρονικό διάστημα ώστε να εγκατασταθούν στην ριζόσφαιρα και να ανταποκριθούν στην μεταβολή του διαθέσιμου N. Κάτι τέτοιο εξηγεί και το γεγονός ότι μετά τα μέσα του Ιουνίου άρχισαν να παρατηρούνται διαφορές μεταξύ της ποιότητας του νερού άρδευσης. Διαφορετικοί δυναμικοί ρυθμοί νιτροποίησης, παρατηρήθηκαν και μεταξύ των φυτικών ειδών, νωρίτερα κατά την περίοδο ανάπτυξης σε σχέση με τις

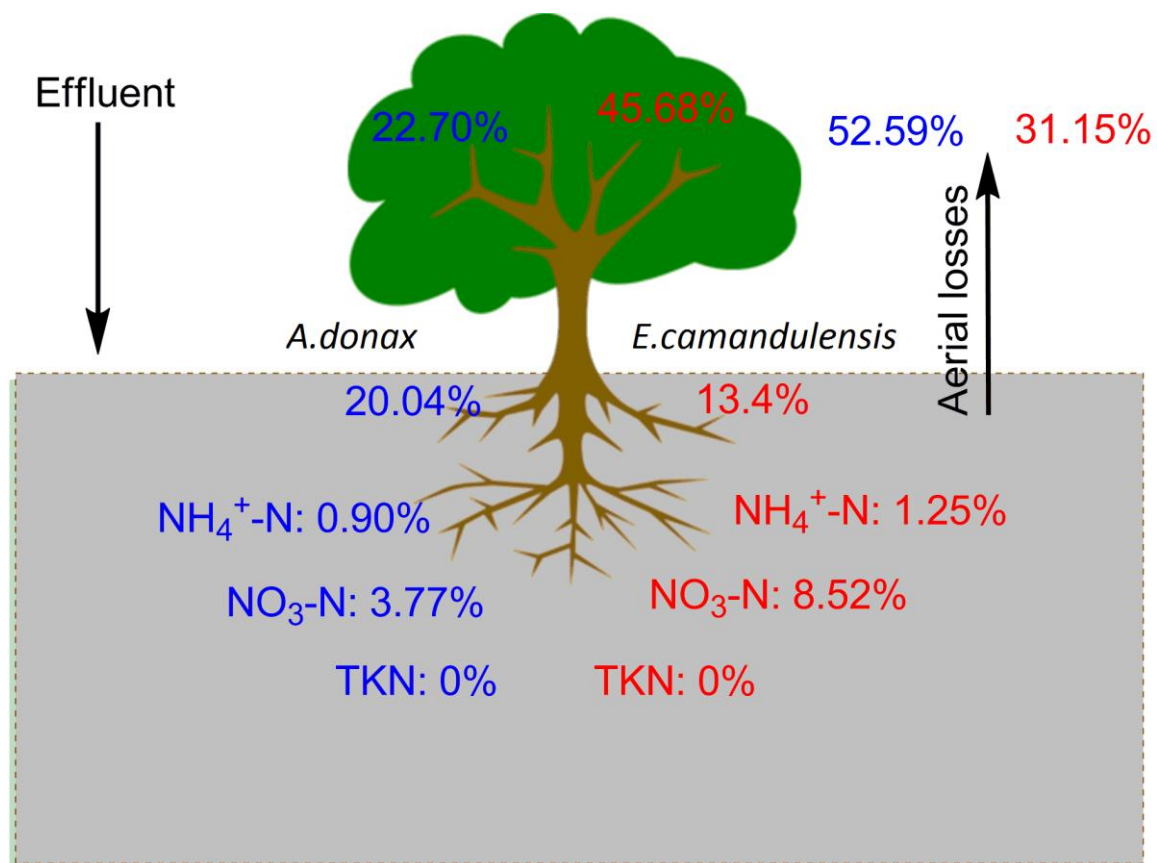
διαφορές μεταξύ της ποιότητας του νερού άρδευσης, γεγονός που ενισχύει την άποψη πως το είδος του φυτού έχει μεγάλη επίδραση στον έλεγχο της νιτροποίησης. Είναι πλούσια η βιβλιογραφία που δίνει στοιχεία την ικανότητα των φυτών είτε να καταστείλουν την νιτροποίηση ελευθερώνοντας στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας κάποιους παρεμποδιστές (Subbarao et al., 2009; Subbarao et al., 2007) είτε να την διεγείρουν. Παραμένει όμως αδιευκρίνιστο αν αυτή η επίδραση των φυτών είναι άμεση ή αποτελεί αποτέλεσμα επίδρασης του pH εδάφους, του λόγου C/N και του ρυθμού ανοργανοποίησης του N. Στην παρούσα εργασία, στα δοχεία με *E. Camaldulensis* μετρήθηκαν μεγαλύτεροι δυναμικοί ρυθμοί νιτροποίησης σε σύγκριση με αυτούς του *A. donax* και στους χειρισμούς με φυσικό νερό και με απόβλητο. Αυξημένοι κατά 155 και 250% ήταν οι ρυθμοί για το *E. camaldulensis* και *A. donax* αντίστοιχα στα δοχεία που αρδεύτηκαν με υγρό απόβλητο πρωτοβάθμιας επεξεργασίας σε σχέση με αυτά που αρδεύτηκαν με φρέσκο νερό μεταξύ της 15 Ιουνίου και 1 Αυγούστου (Σχ. 3.11).

4.5 Αμμωνιο-οξειδωτικά βακτηρία (AOB) και αρχαία (AOA)

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της qRT-PCR αναδεικνύουν αρχικά μια ισχυρή επίδραση του φυτικού είδους στον πληθυσμό των νιτροποιητών (βακτηρίων και αρχαίων) πριν ξεκινήσει η εφαρμογή του αποβλήτου, με το *E. camaldulensis* να έχει μεγαλύτερο πληθυσμό νιτροποιητών από το *A. donax*. Επίσης ο πληθυσμός των βακτηρίων παρουσιάζεται ελάχιστα αυξημένος σε σχέση με αυτόν των αρχαίων και στα δύο είδη φυτών. Η επίδραση αυτή που παρατηρήθηκε, αν και σύντομη, ενισχύει την υπόθεση το είδος του φυτού μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την μικροβιακή κοινότητα που εμπλέκεται στον κύκλο του N. Στην συνέχεια, η επίδραση αυτή του φυτικού είδους σταμάτησε να υπάρχει για όλη τη διάρκεια του πειράματος και παρατηρείται και μια μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων και των αρχαίων. Η μείωση αυτή μπορεί να αποδοθεί στον ανταγωνισμό των νιτροποιητών με ετερότροφους μικροοργανισμούς εμπλεκόμενοι στην ανοργανοποίηση του C και N. Τέλος, επιπλέον μείωση των πληθυσμών βακτηρίων και αρχαίων προς το τέλος του πειράματος μπορεί να αποδοθεί στην μείωση του ρυθμού εφαρμογής του αποβλήτου (Σχ. 3.1) που έγινε στις αρχές Σεπτεμβρίου λόγω της πτώσης της θερμοκρασίας και της γήρανσης των φύλλων.

4.5 Ισοζύγιο Μάζας του N στο σύστημα

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα θα μπορούσε να σχεδιαστεί ένα ισοζύγιο μάζας για το N μέσα στο σύστημα έδαφος – φυτό της συγκεκριμένης πειραματικής διάταξης συγκριτικά για το *E. camandulensis* και *A. donax* (Σχ.1.14). Υπολογίστηκε πως το *E. camandulensis* συσώρευσε συνολικά στην υπέργεια και υπόγεια βιομάζα του (φύλλα, κορμός, ρίζες) το 59.08% του N που εφαρμόστηκε με την άρδευση, ενώ το *A. donax* το 42.74%. Οι Thompson et al. (1987) αναφέρουν πως σε 3 μηνών μελέτη με εφαρμογή αποβλήτων κτηνοτροφικής μονάδας σε χορτολιβαδική έκταση, το 49 – 109% του συνολικού N που εφαρμόστηκε στο έδαφος συσσωρεύτηκε στην φυτική βιομάζα, ενώ οι Estavillo et al. (1997) έδειξαν πως το 16 –70% του συνολικού N που εφαρμόστηκε στο έδαφος συσσωρεύτηκε στην φυτική βιομάζα. Όσον αφορά την κατανομή του N στο έδαφος, παρατηρούμε πως το $\text{NH}_4^+\text{-N}$ δεν διαφέρει για τα δύο είδη, συγκεκριμένα, αποτελεί το 0.9 % για το *A. donax* και το 1.25 % για το *E. Camaldulensis*. Το ποσοστό του $\text{NO}_3^-\text{-N}$ είναι πάνω από το διπλάσιο στο έδαφος του *E. Camaldulensis* (8.52%) από του *A. donax*, (3.77%) γεγονός που ενισχύει την άποψη πως η βλάστηση μπορεί να έχει σημαντικό αντίκτυπο στην μικροβιακή κοινότητα που εμπλέκεται στον κύκλο του N, όμως εξηγείται και από αυξημένες απώλειες N μέσω της διεργασίας της απονιτροποίησης. Το συνολικό N του εδάφους και των δύο φυτικών ειδών, δεν μεταβλήθηκε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος (Σχ 3.6). Οι αέριες απώλειες του N που εφαρμόστηκε με την άρδευση είναι της τάξης του 52.59 % για το *A. donax* και 31.15 % για το *E. Camaldulensis*, που οφείλονται στις διεργασίες της εξαέρωσης της NH_3 και της απονιτροποίησης. Λαμβάνοντας ωστόσο υπόψη τους πολύ υψηλούς ρυθμούς νιτροποίησης που προσδιορίστηκαν στην εργασία μας και για τα δύο είδη φυτών που διερευνήθηκαν στην παρούσα εργασία μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι απώλειες αυτές αποδίδονται κύρια στην ενεργότητα των απονιτροποιητικών μικροοργανισμών. Όπως αναφέρθηκε και στην αναδρομή στη σχετική βιβλιογραφία, η συνεισφορά της απονιτροποίησης στην απομάκρυνση N κατά την εφαρμογή υγρών αποβλήτων στο έδαφος παρουσιάζει μεγάλες αποκλίσεις. Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν ότι μέρος της παραλλακτικότητας αυτής μπορεί να αποδοθεί στο είδος της βλάστησης. Σχετικά με το εύρος των απωλειών που προσδιορίστηκαν έμμεσα στην παρούσα εργασία ήταν ανάλογες με αυτές που προσδιορίστηκαν από τους Beggs et al. (2011) (63-95%) και οι Hooda et al. (2003) (28-60%) σε ένα ΣΒΕ με βλάστηση *E. Globulus*.



Σχήμα 1.13 : Ισοζύγιο μάζας για το N συγκριτικά για το *E. camaldulensis* και *A. Donax*

ΕΝΟΤΗΤΑ 5 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα ευρήματα της παρούσας εργασίας μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Το είδος φυτού έχει σημαντική επίδραση στο ποσό του N που συσσωρεύεται στην υπέργεια βιομάζα και μπορεί να απομακρυνθεί με συγκομιδή τονίζοντας την κρισιμότητα επιλογής βλάστησης με υψηλό δυναμικό παραγωγής βιομάζας. .
- Το είδος της βλάστησης ασκεί σημαντική επίδραση σε διεργασίες που καθορίζουν την τύχη του N, όπως η νιτροποίηση και η απονιτροποίηση.. Αυτή λοιπόν η διαπίστωση οδηγεί σε σημαντικές προεκτάσεις για την επεξεργασία υγρών αποβλήτων με ΣΒΕ αλλά και την εξυγίανση υδάτων από το N, καθώς και την αποκατάσταση παρόχθιων ζωνών επιβαρυσμένων με N. Απαιτείται ωστόσο περισσότερη μελέτη και εμβάθυνση, προκειμένου να κατανοηθούν πλήρως οι μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτή την διεργασία.
- Εξίσου σημαντικό για την βελτιστοποίηση των αποδόσεων ενός ΣΒΕ, είναι η περαιτέρω ουσιαστική μελέτη του δικτύου των μικροοργανισμών και των αλληλεπιδράσεων τους, που αναπτύσσονται στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας και εμπλέκονται στον κύκλο του N. Ιδιαίτερα, ο ρόλος των μυκόριζων στην ανοργανοποίηση του N, οι σχέσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των νιτροποιητικών βακτηρίων και αρχαίων, καθώς και η σε βάθος μελέτη του ρόλου των βακτηρίων ANNAMOX στα χερσαία οικοσυστήματα και ιδιαίτερα στον κύκλο του N.

ΕΝΟΤΗΤΑ 6 : ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adeli, A., Varco, J.J., Rowe, D.E. (2003) "Swine effluent irrigation rate and timing effects on bermudagrass growth, nitrogen and phosphorus utilization, and residual soil nitrogen." *Journal of Environmental Quality*. 32 (2):681-686.

Al-Jamal, M.S., Sammis, T.W., Mexal, J.C., Picchioni, G.A., and Zachritz, W.H., (2002). "A growth irrigation-scheduling model for wastewater use in forest production". *Agric. Water Manage.* 56, 57.

Arrigo, K.R. (2005) "Marine microorganisms and global nutrient cycles." *Nature*. 437:349-355.

Barton, L., McLay, C.D.A., Schipper, L.A., Smith, C.T. (1999) "Annual denitrification rates in agricultural and forest soils: A review." *Australian Journal of Soil Research*. 37 (6):1073-1093.

Beggs, R.A., Hills, D.J., Tchobanoglous, G. and Hopmans, J.W. (2011) "Fate of nitrogen for subsurface drip dispersal of effluent from small wastewater systems". *Journal of Contaminant Hydrology*. *in press*

Bertin, C., X. Yang, L.A. Weston. (2000) "The role of root exudates and allelochemicals in the rizosphere." *Plant and Soil*. 256(1):67-83

Blainey PC, Mosier AC, Potanina A, Francis CA, Quake SR (2011) "Genome of a Low-Salinity Ammonia-Oxidizing Archaeon Determined by Single-Cell and Metagenomic Analysis". *PLoS ONE* 6(2): e16626. doi:10.1371/journal.pone.0016626

Boyle, S.A., J.J. Rich, P.J. Bottomley, K. Cromack Jr and D.D. Myrold. (2006)"Reciprocal transfer effects on denitrifying community composition and activity at forest and meadow sites in the Cascade Mountains of oregon." *Soil Biology and Biochemistry*. 38:870-878.

Braker R., and G. Conrad. (2011) "Diversity, Structure, and Size of N₂O-Producing Microbial Communities in Soils—What Matters for Their Functioning?" *Advances in Applied Microbiology* vol75. London: Elsevier Inc., 33-70.

Cai, Y., Ding, W., Zhang, X., Yu, H., and Wang, L. (2010) "Contribution of heterotrophic nitrification to nitrous oxide production in a long-term N-fertilized arable black soil." *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*. 41: 2264–2278.

Crites, R.W., S.C. Reed and R.K. Bastian. (2000) "Land treatment systems for municipal and industrial wastes". NY, USA: McGraw-Hill.

Crites, R.W., S.C. Reed, R.K. Bastian. (2000) "Land Treatment Systems for Municipal". New York, USA.: McGraw-Hill.

Czepiel, P.M., P.M. Crill and R.C. Harris. (1993) "Methane emissions from municipal wastewater treatment processes." *Environmental Science Technology*. 27:2472-2477.

- Dale, O.R., C.R. Tobias and B.K. Song. (2009) "Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear river Estuary." *Environmental Microbiology*. 11:1194-1207.
- Day, A.D. , J.A. McFadyen, T.C. Tucker and C.B.Cluff. (1979) "Commercial production of wheat grain irrigated with municipal wastewater and pump water." *Jurnal Environmental Quality*.
- Estavillo, J.M., M. Rodriguez, M. Lacuesta, C. Gonzalez-Murua. (1997) "Effects of cattle slurry and mineral N fertilizer applications on various components of nitrogen balance of mown grassland." *Plant Soil*. 188:49-58.
- Finlay, R.D., A. Frostegard, A.M. Sonnerfeldt. (1992) "Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud." *New Phytologist*. 120:105-115.
- Firestone, M. K., and Davidson, E. A. (1989). "Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil". In "Trace Gas Exchange between Terrestrial Ecosystems and the Atmosphere" (M. D. Andreae and D. S. Schimel, eds.), pp. 7–22. Wiley, Berlin.
- Folsom, C.F., (1876). *Seventh Annual Report of the State Board of the Health of Massachusetts*, Wright and Potter, Boston
- Francis, C.A., K.J. Roberts, J.M. Beman, A.E. Santoro and B.B. Oakley. (2005) "Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean." *PNAS* 102:14683-14688.
- Gerhard, W.P. (1909). *Sanitation and Sanitary Engineering*, New York,.
- Guo, L.B., Sims, R.E.H., Horne, D.J. (2002)"Biomass production and nutrient cycling in Eucalyptus short rotation energy forests in New Zealand. I: Biomass and nutrient accumulation." *Bioresource Technology*. 85 (3):273-283.
- Hargrove, W.L. (1988) "Evaluation of ammonia volatilization in the field." *J. Prod. Agric*. 2:104-111.
- He, J.Z., J.P. Shen, L.M. Zhang, Y.G. Zhu, Y.M. Zheng, M.G. Xu and H.J. Di. (2007)"Quantitative analyses of abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long term fertilization practices ." *Environmental Microbiology*. 9:2364-2374.
- Hooda, A.K., Weston, C.J., Chen, D. (2003)"Denitrification in effluent-irrigated clay soil under Eucalyptus globulus plantation in south-eastern Australia." *Forest Ecology and Management*. 179 (1-3):547-558.

- Humbert, S., S. Tarnawski, N. Fromin, M.F. Mallet, M. Aragno and J. Zopfi. (2010) "Molecular detection of anammox bacteria in terrestrial ecosystems: distribution and diversity." *The ISME Journal*. 4:450-454.
- Jackson, L. E., M. Burger, and T. R. Cavagnaro. (2008) "Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services." *Annual Review of Plant Biology*. 59: 341–363.
- Jaeschke, A., Opden Camp H.J., Harhangi H., Klimiuk A., Hopmans E.C., Jetten M.S., Schouten S., Sinninghe Damsté J.S. (2009) "16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs." *FEMS Microbiology Ecology*. 67:343-350.
- Jayawardane, N.S., Blackwell, J., Cook, F.J., Nicoll, G., and Wallet, D. (1997). "Final report on pollutant removal by the FILTER system during the period November 1994 to November 1996, Prepared for Griffith City Council, CSIRO Div". Land and Water Consultancy Report No. 97.
- Kim, B.K., M.Y. Jung, D.S. Yu, S.J. Park, T.K. Oh, S.K. Rhee and J.F. Kim. (2011) "Genome Sequence of an Ammonia-Oxidizing Soil Archaeon, "Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis" MY1." *Journal of Bacteriology*. 5539–5540.
- Kisa, M., Sanon, A., Thioulouse, J., Assigbetse, K., Sylla, S., Spichiger, R., Dieng, L., Berthelin, J., Prin, Y., Galiana, A., Lepage, M. and Duponnois, R. (2007) "Arbuscular mycorrhizal symbiosis can counterbalance the negative influence of the exotic tree species *Eucalyptus camaldulensis* on the structure and functioning of soil microbial communities in a sahelian soil". *FEMS Microbiology Ecology* 62, 32-44.
- Knicker, H. (2011). "Soil organic N – An under-rated player for C sequestration in soils?". *Soil Biology and Biochemistry* 43(6):1118-1129
- Konneke, M., A.E. Bernhard, J.R. de la Torre, C.B. Walker, J.B. Waterbury and D.A. Stahl (2005) "Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon." *Nature*. 437:543-546.
- Linn, D. M., and Doran, J. W. (1984). "Effect of water-filled pore space on CO₂ and N₂O production in tilled and non-tilled soils". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 1267–1272.
- Lipschultz, F., O.C. Zafiriou, F.C. Wofsy, M.B. McElroy, F.W. Valois and S.W. Watson. (1981) "Production of NO and N₂O by nitrifying bacteria." *Nature*. 294:641-643.
- Livesley, S.J., M.A. Adams and P.F. Grierson. (2007) "Soil water nitrate and ammonium dynamics under a sewage effluent-irrigated eucalypt plantation." *Journal Environmental Quality*. 36:1883-1894.
- Lowrance R., Johnson J.C. Jr., Newton G.L. and Williams R.G. (1998) "Denitrification from soils of a year-round forage production system fertilized with liquid dairy manure." *Journal of Environmental Quality*. 27 (6):1504-1511.

Martikainen, P.J. (1985)"Nitrous oxide emission associated with autotrophic ammonium oxidation in acid coniferous soil." *Applied and Environmental Microbiology*. 50(6): 1519-1525.

Master, Y., R.J. Laughlin, U. Shavit, R.J. Stevens and A. Shaviv. (2003) "Gaseous nitrogen emissions and mineral nitrogen transformations as affected by reclaimed effluent application." *Journal Environmental Quality*. 32:1204-1211.

Meding, S.M., Morris, L.A., Hoover, C.M., Nutter, W.L., Cabrera, M.L. (2001) "Denitrification at a long-term forested land treatment system in the Piedmont of Georgia." *Journal of Environmental Quality*. 30 (4):1411-1420.

Meng Li, Huiluo Cao, Yiguo Hong, Ji-Dong Gu. (2011) "Spatial distribution and abundances of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) in mangrove sediments." *Applied Microbiology Biotechnology*. 89:1243-1254.

Metcalf and Eddy Inc., (2007) "Wastewater Engineering: treatment, disposal, reuse." McGraw Hill, United States.

Mulder, A., A.A. van de Graaf, L.A. Robertson and J.G. Kuenen. (2006)"Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor." *FEMS Microbiology Ecology*. (16)3: 177–184.

Nannipieri, P., Eldor, P. (2009) "The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components." *Soil Biology and Biochemistry*. 41 (12):2357-2369.

Nasholm, T., A. Ekblad, A. Nordin, R. Giesler, M. Hogberg. (1998)"Boreal forest plants take up organic nitrogen." *Nature*. 392:914-916.

Neff JC, Chapin FS III, Vitousek PM. (2003). Breaks in the cycle: dissolved organic nitrogen in terrestrial ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 1: 205–211

Nelson, D.W. (1982)"Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification." In *Nitrogen in agricultural soils*. Madison: ASA,. 327-363.

Orwin, K.H., S.M. Buckland. (2010)"Linkages of plant traits to soil properties and the functioning of temperate grassland." *Journal of Ecology*. 98(5):1074-1083.

Penton, C.R., A.H. Devol and J.M. Tiedje. (2006)"Molecular evidence for the broad distribution of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria in freshwater and marine sediments." *Applied Environmental Microbiology*. 72:6829-6832.

Prosser, J.I., W.N. Graeme. (2008)"relative contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment." *Environmental Microbiology*. 10(11):2931-2941.

Prosser, James I. (2011)"Soil nitrifiers and nitrification." in *Nitrification*. Washington, DC: ASM press,. 347-383.

Reed, S.C., Crites, R.W. (1984). "Handbook of Land Treatment Systems for Industrial and Municipal Wastes". 1st Ed., Noyes Publications, New Jersey, USA

Reed, S.C., Crites, R.W., and Middlebrooks, E.J., (1995). "Natural Systems for Waste Management and Treatment". 2nd Ed., McGraw-Hill, New York, 433.

Robertson G. P., P. M. Groffman. (2007) "Nitrogen Transformations." in Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry, 3rd edition. Oxford, UK: Elsevier Inc., 341-364.

Rosswall, T. (1981) "The Biogeochemical Nitrogen Cycle." in Some Perspectives of the Major Biogeochemical Cycles. Stockholm, Sweden: John Wiley & Sons. 25-49.

Ruiz-Rueda, O., S. Hallin and L. Baneras. (2009) "Structure and function of denitrifying and nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland." FEMS Microbiology Ecology. 67:308-319.

Sharpe, R.R., Harper, L.A. (1997) "Ammonia and nitrous oxide emissions from sprinkler irrigation applications of swine effluent." Journal of Environmental Quality. 26 (6):1703-1706.

Sharpe, R.R., Harper, L.A. (2002) "Nitrous oxide and ammonia fluxes in a soybean field irrigated with swine effluent." Journal of Environmental Quality. 31 (2):524-532.

Smith, C.J. and Bond, W.J. (1999) "Losses of nitrogen from an effluent irrigation plantation." Australian Journal of Soil Research. 37 (2):371-389.

Smith, C.J., Freney, J.R. and Bond, W.J. (1996) "Ammonia volatilisation from soil irrigated with urban sewage effluent." Australian Journal of Soil Research. 34 (5):789 - 802.

Stanbridge, H.H. (1976). "History of Sewage Treatment in Britain", in Land Treatment, Institute of Water Pollution Control, Maidstone, Kent, England.

Subbarao, G.V., Nakahara, K., Hurtado, M.P., Ono, H., Moreta, D.E., Salcedo, A.F., Yoshihashi, A.T., Ishikawa, T., Ishitani, M., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Rondon, M., Rao, I.M., Lascano, C.E., Berry, W.L. and Ito, O. (2009) "Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 17302-17307.

Subbarao, G.V., Wang, H.Y., Ito, O., Nakahara, K. and Berry, W.L. (2007) " NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots". Plant and Soil 290, 245-257.

Thompson, R.B., J.C. Ryden and D.R. Lockyer. (1987) "Fate of nitrogen in cattle slurry following surface application or injection to grassland." Journal Soil Science. 38:689-700.

Tozer, W.C., K.J. Wilkins, H. Wang, M. van den Heuvel, T. Charleson and W.B. Silvester. (2005) "Using ^{15}N to determine a budget for effluent-derived nitrogen applied to forest." Isotopes in Environment and Health Studies 41(1):13-30.

Treusch, A.H., S. Leininger, A. Kletzin, S.C. Schuster, H.P. Klenk and C. Schleper. (2005) "Novel genes nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling." *Environmental Microbiology*. 7:1985-1995.

Turnbull, M.H., R. Goodball, G.R. Stewart. (1995) "The impact of mycorrhizal colonization upon nitrogen source utilization and metabolism in seedlings of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus maculata* Hook." *Plant, Cell and Environment*. 18:1386-1394.

Tzanakakis, V.E., N.V. Paranychianakis and A.N. Angelakis. (2009) "Nutrient removal and biomass production by different plant species irrigated with primary treated domestic effluent." *Ecological Engineering*. 35:1485-1492.

Tzanakakis, V.E., N.V., Paranychianakis and A.N., Angelakis. (2007) "Performance of slow rate systems for treatment of domestic wastewater." *Water Science Technology*. 55:139-147.

U.S. EPA, (1979). A History of Land Application as a Treatment Alternative, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Program Operations, Washington, DC

Whalen, S.C., DeBerardinis, J.T. (2007) "Nitrogen mass balance in fields irrigated with liquid swine waste." *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 78 (1):37-50.

Zhang, C.B., Ke, S.S., Wang, J., Ge, Y., Chang, S.X., Zhu, S.X. and Chang, J. (2011) "Responses of microbial activity and community metabolic profiles to plant functional group diversity in a full-scale constructed wetland". *Geoderma* 160, 503-508.

Αγγελάκης, Α.Ν. και G. Tchobanoglous. (1995) *Υγρά Απόβλητα : Φυσικά Συστήματα Επεξεργασίας και Ανάκτησης, Επεξεργασία και Διάθεση Εκρών*. Ηράκλειο, Κρήτη: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Βαγιάκης Ι. (2010). Διερεύνηση του γίνεσθαι του άνθρακα κατά την εφαρμογή υγρών αποβλήτων στο έδαφος. Πτυχιακή Μελέτη. Τμ. Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Μουστάκας, Ν.Κ. (2005). *Σημειώσεις Γενικής Εδαφολογίας*. Αθήνα: Εκδόσεις Γ.Π.Α.

Ρουμπελάκη - Αγγελάκη, Κ.Α. (2003). "Μεταβολισμός του Αζώτου." σε *Φυσιολογία Φυτών - απο το μόριο στο περιβάλλον*. Ηράκλειο, Κρήτη: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 259-308.