



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΠΑΤΡΩΝ  
UNIVERSITY OF PATRAS

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΛΙΕΙΑΣ ΚΑΙ**  
**ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

(πρώην Τμήμα Τεχνολογίας Αλιείας – Υδατοκαλλιέργειών)

**ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ο λόγος C/N και οι επιδράσεις του στη ρυθμιστική και  
νιτροποιητική ικανότητα του βιολογικό φίλτρο ενός κλειστού  
συστήματος εκτροφής ψαριών»**

**Αντώνιος Λίτινας**

**Διονύσιος Κάνδυλας**

**Επιβλέπων: Νικόλαος Βλάχος**

**ΜΕΣΟΛΟΓΓΙ 2021**

**«Ο λόγος C/N και οι επιδράσεις του στη ρυθμιστική και νιτροποιητική  
ικανότητα του βιολογικού φίλτρου ενός κλειστού συστήματος εκτροφής  
ψαριών»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή :**

- 1) **Νικόλαος Βλάχος:** Ε.ΔΙ.Π, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Επιβλέπων.
- 2) **Κοσμάς Βιδάλης:** Καθηγητής, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Μέλος.
- 3) **Κωνσταντίνος Πούλος:** Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής Αλιείας & Υδατοκαλλιεργειών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Επιβλέπων. Μέλος.

*Στις Οικογένειές μας*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ειλικρινείς μας ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλαν στο να φέρουμε εις πέρας την παρούσα προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία.

Ιδιαίτερα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον Δρ Νικόλαο Βλάχο επιβλέπων της πτυχιακής εργασίας για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση που μας προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης, επεξεργασίας και συγγραφής της παρούσης διπλωματικής προπτυχιακής εργασίας.

Επίσης, ευχαριστούμε τους Κοσμά Βιδάλη και Κωνσταντίνο Πούλο, μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για την βοήθεια και την καθοδήγηση που μας προσέφεραν καθ' όλη τη διάρκεια συγγραφής της παρούσης προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις ευχαριστίες μας στις οικογένειες μας για την αμέριστη στήριξή τους, τόσο κατά τη διάρκεια των σπουδών μας και περάτωσης της παρούσης διπλωματικής προπτυχιακής εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία πραγματεύεται τις επιδράσεις του λόγου C/N στη ρυθμιστική και νιτροποιητική ικανότητα του βιολογικού φίλτρου ενός ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής ψαριών. Γίνεται αναφορά στη ρύθμιση και τη νιτροποίηση των συστημάτων και παρουσιάζεται ο σκοπός της εργασίας. Στη συνέχεια, μελετάται η ικανότητα ρύθμισης ενός ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής ψαριών, αναλύοντας τους παράγοντες που επηρεάζουν τη ρύθμιση ενός συστήματος RAS καθώς και τους παράγοντες που επηρεάζουν τη δυναμική των βακτηρίων στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής. Μελετώνται τα οργανικά και ανόργανα θρεπτικά συστατικά, ο λόγος C/N και οι δείκτες βιοαποικοδόμησης, η σύσταση τροφής και τα τεχνικά χαρακτηριστικά των ανακυκλούμενων συστημάτων. Στο επόμενο κεφάλαιο αναλύεται η νιτροποιητική ικανότητα του ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής. Παρατίθεται το εννοιολογικό περιεχόμενο της νιτροποίησης, αναλύεται η απορρόφηση της αμμωνίας και η μείωση των νιτρικών ιόντων και μελετώνται οι πρακτικές διαχείρισης που επηρεάζουν την διαθεσιμότητα του αζώτου.

**Λέξεις κλειδιά:** Λόγος C/N, Ρύθμιση Βιολογικού φίλτρου, Ενεργοποίηση βιολογικού φίλτρου, Νιτροποιητική ικανότητα, Κλειστό σύστημα εκτροφής.

## ABSTRACT

The present study deals with the effects of the C / N ratio on the regulatory and nitrifying capacity of the biological filter of a closed fish farming system. Introductory reference is made to the regulation and nitrification of the systems and the purpose of the work is presented. Next, the regulatory capacity of a recycled fish farming system is studied. In this context, the conceptual content of RAS system regulation and the factors that influence the dynamics of bacteria in recycled breeding systems are analyzed. Then the functional characteristics of the recycled breeding system are discussed. Organic and inorganic nutrients, C / N ratio and biodegradation indices, feed composition and technical characteristics of recycled systems are studied. The next chapter analyzes the nitrifying capacity of the recycled breeding system. The conceptual content of nitrification is presented, the absorption of ammonium and the reduction of nitrates are analyzed and the management practices that affect the availability of nitrogen are studied.

**Keywords:** Ratio C/N, conditioned of biological filter, nitrification processes, recirculating system.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1 .....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	11
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία .....	11
1.2. Ρύθμιση και Νιτροποίηση συστήματος .....	15
1.3 Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας .....	19
Κεφάλαιο 2. ....	19
Ρυθμιστική ικανότητα ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής ψαριών .....	19
2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη δυναμική των βακτηρίων στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής .....	19
2.2. Βακτήρια στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής .....	20
2.3.1. Επιφάνεια ανάπτυξης βακτηρίων .....	22
2.3.2. Νερό εκτροφής στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής .....	23
2.3.3. Δυναμική Βακτηρίων .....	25
Κεφάλαιο 3. ....	28
Λειτουργικά χαρακτηριστικά ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής .....	28
3.1. Οργανικά και ανόργανα θρεπτικά .....	28
3.2. Λόγος C/N .....	30
3.3. Δείκτες Βιοαποικοδόμησης .....	31
3.4. Σύσταση τροφής .....	31
3.5. Περιβαλλοντικοί παράγοντες .....	32
3.5.1. Οξυγόνο .....	32
3.5.2. Θερμοκρασία .....	33
3.5.3. pH –Αλκαλικότητα .....	33



3.6. Τεχνικά χαρακτηριστικά ανακυκλούμενων συστημάτων.....	34
3.6.1. Απομάκρυνση στερεών αποβλήτων.....	34
3.6.2. Βιοφίλτρο.....	35
3.7. Απολύμανση .....	39
3.8. Τεχνικές διαχείρισης Βακτηρίων στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής ....	42
Κεφάλαιο 4. ....	45
Νιτροποιητική ικανότητα ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής .....	45
4.1. Εννοιολογικό περιεχόμενο Νιτροποίησης .....	45
4.2. Απορρόφηση αμμονίου .....	51
4.3. Μείωση Νιτρικών .....	52
4.4. Πρακτικές διαχείρισης που επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα αζώτου.....	54
4.4.1. Τροφές και τεχνικές ταΐσματος.....	54
4.4.2. Αλλαγές νερού .....	55
4.4.3. Ανακύκλωση νερού και αερισμός .....	55
4.4.4. βάθος δεξαμενής.....	56
4.4.5. Προσθήκη Οργανικού άνθρακα.....	57
4.4.6. Μικροβιακή αύξηση .....	57
4.4.7. Διαχείριση ιζημάτων.....	58
Κεφάλαιο 5 .....	59
Συμπεράσματα .....	59
Κεφάλαιο 6 .....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	61
6.1. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	61



## Κεφάλαιο 1

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η ποιότητα του νερού μπορεί να εκτιμηθεί σύμφωνα με χημικά, φυσικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά. Οι χημικές και φυσικές παράμετροι χαρακτηρίζουν τη φυσικοχημική ποιότητα του νερού, η ποιότητα του μικροβιακού νερού περιλαμβάνει τη μέτρηση των μικροοργανισμών όπως π.χ. βακτήρια, φύκια, πρωτόζωα και άλλους οργανισμούς στο νερό (Gerardi et al., 2016). Η αξιολόγηση της ποιότητας του νερού γίνεται σε συνάρτηση με την αφθονία, τη βιωσιμότητα, τη δραστηριότητα ή τη σύνθεση και τη δομή της αφθονίας των βακτηρίων (Attramadal et al., 2012b, Arvin & Pedersen, 2015, Perst et al., 2016a). Στα ανακυκλούμενα συστήματα υδατοκαλλιέργειας (RAS) η διαχείριση της ποιότητας του νερού είναι ευρέως μελετημένη στη διεθνή βιβλιογραφία (Bergheim et al., 2009, Timmons et al., 2007, Dalsgaard et al., 2013). Δεν έχουν καθοριστεί κριτήρια ποιότητας μικροβίων νερού και προς το παρόν δεν υπάρχουν καθορισμένες παράμετροι που θα πρέπει να ελέγχονται σε ημερήσια βάση.

Το κύριο ενδιαφέρον για την ποιότητα του νερού στο RAS οφείλεται στη συνεχή διοχέτευση που προκαλείται από υψηλά οργανικά φορτία κατά την είσοδο του νερού στο σύστημα. Τα βακτήρια διαδραματίζουν βασικό ρόλο στις διάφορες βιολογικές διεργασίες στο RAS (Blancheton et al., 2013, Rurangwa & Verdegem, 2015). Αρκετοί παράγοντες επηρεάζουν αυτές τις διεργασίες και ρυθμίζουν την ανάπτυξη βακτηρίων όπως η διαθεσιμότητα οργανικών και ανόργανων θρεπτικών ουσιών (Avnimelech, 1999, Zhu & Chen, 2001, Leonard et al., 2002, Michaud et al., 2006), οι περιβαλλοντικές συνθήκες όπως το pH, το οξυγόνο και η θερμοκρασία (Zhu & Chen, 2002, Prest et al., 2016a), η χωρική διαθεσιμότητα όπως π.χ. τα σωματίδια, η στήλη νερού, τα ιζήματα ή βιοφίλμ (McDougald et al., 2011, Fernandes et al., 2017, Pedersen et al., 2017) και η παρουσία οργανισμών όπως τα πρωτόζωα και άλλα ασπόνδυλα (Hahn & Höfle, 2001). Οι μονάδες επεξεργασίας συστήματος, οι συνθήκες διαχείρισης και διανομής νερού (π.χ υδραυλικός χρόνος παραμονής) επηρεάζουν καθέναν από αυτούς τους παράγοντες και συμβάλλει στη διαμόρφωση

των χαρακτηριστικών της βακτηριακής κοινότητας (Nogueira et al., 2002, Attramadal et al., 2014).

Δύο σημαντικές ομάδες βακτηρίων υπάρχουν στο RAS. Αυτοί είναι τα αυτότροφα νιτροποιητικά βακτήρια που οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρικά ιόντα (Hagopian & Riley 1998) και ετερότροφα βακτήρια που αποικοδομούν την οργανική ύλη. Υπό οικολογική έννοια, τα περισσότερα ετεροτροφικά βακτήρια είναι «ουδέτερα μικρόβια» που συμβάλλουν στην ποιότητα του νερού χρησιμοποιώντας πόρους και αποτρέποντας τη δημιουργία επιβλαβών ειδών (Vadstein et al., 2004, Attramadal et al., 2012a,b, Blancheton et al., 2013). Ο υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης (κατά πέντε φορές περισσότερο) των ετερότροφων βακτηρίων σε σύγκριση με τα αυτότροφα βακτήρια (Ebeling et al., 2006) μπορεί να είναι ένα μειονέκτημα όταν τα συστήματα αντιμετωπίζουν απότομες αλλαγές στο οργανικό φορτίο, όπου μπορούν να ανταγωνιστούν τα αυτότροφα βακτήρια και να επηρεάσουν την απόδοση του βιολογικού φίλτρου ή να γίνουν ανταγωνιστικά ως προς το οξυγόνο με το είδος που εκτρέφεται. Μεταξύ των ετερότροφων ταχέως αναπτυσσόμενων βακτηρίων, μπορεί να βρεθούν επιβλαβή και παθογόνα είδη (Allen et al., 2004). Οι ανεπιθύμητες αλλαγές στην ποιότητα των μικροβίων στο RAS θα μπορούσαν να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στα είδη που εκτρέφονται, επομένως οι σταθερές συνθήκες σε αντίθεση με τις κυμαινόμενες συνθήκες θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη βιολογική σταθερότητα (Attramadal et al., 2012a, Prest et al., 2016a). Αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί μόνο με τον έλεγχο της ποιότητας του χημικού και του μικροβιακού νερού σύμφωνα με την ορθή διαχείριση του RAS.

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας επεκτείνεται προς τα υπερεντατικά συστήματα εκτροφής (RAS) αντιμετωπίζοντας νέες προκλήσεις σε σχέση με τη διαχείριση της ποιότητας του νερού λόγω της περιορισμένης χρήσης του νερού που χρησιμοποιείται (make-up water) και οδηγεί σε συσσώρευση αποβλήτων, ανάλογη με τους μεγάλους όγκους παραγωγής (Dalsgaard et al., 2013). Για το λόγο αυτό, ο μικροβιακός έλεγχος θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ως βασικός παράγοντας ή ως ένα αναπτυσσόμενο εργαλείο διαχείρισης των συστημάτων. Επομένως, δεν υπάρχουν δεδομένα που να εξάγονται από βάσεις δεδομένων αναφορικά με τους παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και να μετριοούνται. Τα δεδομένα θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως κατευθυντήρια γραμμή ώστε να καθορίζουν «αποδεκτά» επιπέδα ελέγχου της ποιότητας του νερού εκτροφής.

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για την αξιολόγηση των βακτηριακών ιδιοτήτων που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του νερού για την υποστήριξη των υπηρεσιών κοινής ωφελείας (Prest et al., 2016a). Τώρα, έχει δοθεί έμφαση στην ανάπτυξη μεθόδων ταχείας καλλιέργειας ανεξάρτητων για την βακτηριακή απαρίθμηση που επιτρέπει την ακριβή και γρήγορη ανάλυση της γενικής ποιότητας του μικροβιολογικού νερού (Berney et al., 2008, Reeslev et al., 2011, Besmer & Hammes, 2016, Besmer et al. 2014).

Η καλή ποιότητα του νερού είναι ζωτικής σημασίας για την εξασφάλιση βέλτιστων συνθηκών εκτροφής στην υδατοκαλλιέργεια προάγοντας υγιή ψάρια και τη βέλτιστη ανάπτυξη (Eding et al., 2006, Timmons et al., 2007). Η εκτίμηση της ποιότητας του νερού περιορίζεται σε ένα σύνολο φυσικόχημικών παραμέτρων όπως η θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο και η αλατότητα. Τα ανακυκλούμενα συστήματα υδατοκαλλιέργειας (RAS) λειτουργούν με υψηλό φορτίο που προέρχεται κυρίως από τις τροφές και τις υψηλές πυκνότητες ψαριών που απαιτούν τακτική παρακολούθηση παραμέτρων όπως η ολική αμμωνία, τα νιτρώδη ιόντα, τα νιτρικά ιόντα, το pH, το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα (Dalsgaard et al., 2013).

Στο νερό των RAS, συσσωρεύονται μικρά στερεά και αιωρούμενα σωματίδια (Patterson et al., 1999, Fernandes et al., 2014) λόγω της περιορισμένης μηχανικής απομάκρυνσης και μερικής αποσύνθεσης μεταβάλλοντας την ανάπτυξη των μικροβίων (Gerardi, 2006). Το υψηλό φορτίο επιβάρυνσης και ο αυξημένος χρόνος παραμονής ευνοεί επίσης την ανάπτυξη του μικροβιακού φορτίου (Blancheton et al., 2013, Rurangwa & Verdegem, 2015). Οι επιπτώσεις των ταυτόχρονων αλλαγών στην ποιότητα του βακτηριακού νερού δεν έχουν περιγραφεί και μελετηθεί διεξοδικά. Οι Vadstein et al., (2004), αναφέρουν ότι η «μικροβιακή ωρίμανση» του νερού συσχετίζεται σύμφωνα με τη «θεωρία επιλογής r και K» που διατυπώθηκε από τους Andrews & Harris (1986), και διακρίνει τα ευκαιριακά (r-στρατηγικοί, ταχεία ωρίμανση) και τα μη ευκαιριακά μικρόβια (K-στρατηγικοί, αργή ωρίμανση) στην ανάπτυξη ενός οικοσυστήματος. Η έννοια του ώριμου νερού προϋποθέτει ότι το νερό διέπετε και ακολουθείται από την K στρατηγική ανάπτυξης των βακτηρίων αναστέλλοντας την εμφάνιση και ανάπτυξη της r-στρατηγικής στο δέρμα και στην επιφάνεια του εντέρου των λαρβών των ψαριών. Σύμφωνα με μελέτες το RAS η σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας συνδέεται σταθερά με την αργή ανάπτυξη των ανταγωνιστικών βακτηρίων (K-στρατηγική) (Attramadal et al., 2012a).

Η διαθεσιμότητα των βιοαποικοδομήσιμων υποστρωμάτων ευνοεί τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη και την αφθονία των βακτηρίων δημιουργώντας άμεσες ή έμμεσες (διακυμάνσεις O<sub>2</sub> / CO<sub>2</sub>) επιβλαβείς επιπτώσεις στα εκτρεφόμενα είδη (Wold et al., 2014). Η μικροβιακή ποιότητα του νερού από την άποψη της αφθονίας και της δραστηριότητας των βακτηρίων θεωρείται σημαντικός παράγοντας για τη διαχείριση και την απόδοση του RAS (Michaud et al., 2009).

Ο έλεγχος και η αξιολόγηση της ποιότητας των βακτηρίων αποτελεί από τους βασικούς παράγοντες διαχείρισης ενός συστήματος RAS. Η αξιολόγηση της υποβάθμισης της μικροβιακής ποιότητας του νερού βασίζεται σε απλές παρατηρήσεις διαχείρισης, όπως η διακοπή της διατροφικής συμπεριφοράς ή οι θνησιμότητες, οι οποίες συχνά παρέχουν καθυστερημένη ανταπόκριση σε παρατεταμένες συνθήκες χαμηλής ποιότητας του νερού (Fu et al., 2015).

Δύο βασικές μικροβιακές κατηγορίες υπάρχουν στο RAS: σταθερή ανάπτυξη συνδεδεμένη στην επιφάνεια (μέσα μεταφοράς βιολογικού φίλτρου και επιφάνειες δεξαμενής). και εναιωρημένους μικροοργανισμούς στη στήλη νερού (Crab et al., 2007, Blancheton et al., 2013). Τα βακτήρια διακρίνονται στα αυτότροφα και τα ετερότροφα. Τα αυτότροφα βακτήρια αναπτύσσονται στο βιολογικό φίλτρο και είναι υπεύθυνα για την οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρώδη ιόντα και αυτά με τη σειρά τους οξειδώνονται σε νιτρικά ιόντα σε αντίθεση με τα ετερότροφα βακτήρια τα οποία αναπτύσσονται στο φίλτρο αλλά και σε αιωρούμενα σωματίδια στο νερό, αποικοδομώντας διαλυμένες και σωματιδιακές οργανικές ύλες (Blancheton et al., 2013, Rurangwa & Verdegem 2015).

Οι Michaud et al., (2009) ανέλυσαν γονιδιακά τα ελεύθερα βακτήρια σε επίπεδο φύλου και τάξης. Επίσης, άλλες μελέτες αναφέρουν ότι τα ετερότροφα βακτήρια (Cytryn et al., 2003) καθώς και τα αυτότροφα βακτήρια (Blancheton & Canaguier 1995) είναι δέκτες και δότες ηλεκτρονίων.

Πρόσφατες μελέτες έχουν διερευνήσει εναιωρημένα, ελεύθερα ζωντανά βακτήρια σε class-level (Michaud et al., 2009), phyla-level (Cytryn et al., 2003), ή σύμφωνα με τους ρόλους τους να δέχονται ή να δίνουν ηλεκτρονία (Gerardi, 2006) ως ετερότροφα (Leonard et al., 2000) και αυτότροφα (Blancheton & Canaguier, 1995). Άλλες μελέτες που σχετίζονται με την υδατοκαλλιέργεια εξέτασαν τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα και ενέργειας για τα μικρόβια στο RAS και τις επιπτώσεις στην ποιότητα του νερού.

Οι Zhu & Chen (2001) και οι Michaud et al. (2006) αναφέρουν ότι η αύξηση του λόγου C/N, υποδηλώνει αύξηση των βακτηρίων που απαντώνται στην υδάτινη στήλη. Ομοίως, οι Fu et al. (2015) έδειξαν ότι αυξημένος ρυθμός ανάπτυξης των βακτηριακών ειδών μεταβάλλει τη συγκέντρωση του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου (COD) προκειμένου να οξειδώσει το οργανικό φορτίο μεταβάλλοντας τον λόγο C/N με αποτέλεσμα να αυξάνεται η μικροβιακή επιβάρυνση του νερού με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης των θρεπτικών ουσιών.

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών στην υδατοκαλλιέργεια έχουν βασισθεί σε τεχνικές, όπως η καλλιέργεια βακτηρίων για τον έλεγχο και εκτίμηση της αφθονίας των βακτηρίων (Leonard et al., 2002, Sugita et al., 2005, Michaud et al., 2009, Attramadal et al., 2012b). Βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ο χρόνος που απαιτείται για να ωριμάσει η καλλιέργεια των βακτηρίων (2 έως 3 εβδομάδες) ώστε ο συνολικός αριθμός των βακτηρίων να είναι αντιπροσωπευτικός (Attramadal et al., 2014).

Σε κάθε σύστημα RAS, το αρχικό μικροβιακό αποτύπωμα παρατηρείται κατά τη διάρκεια της βιολογικής εκκίνησης έως ότου χρονικά το σύστημα εκτροφής να ρυθμιστεί με ικανοποιητικό αριθμό βακτηρίων να αποικίσουν στο βιολογικό υλικό πλήρωσης του φίλτρου. Η διάρκεια της περιόδου αυτής είναι 4-6 εβδομάδες ενώ τα βακτήρια που κυριαρχούν είναι τα ετερότροφα νιτροποιητικά βακτήρια (Hagopian & Riley 1998). Ο αποικισμός των νιτροποιητών βακτηρίων στο RAS οδηγεί παροδική αύξηση της συγκέντρωσης της ολικής αμμωνίας (TAN) και των νιτροδών ιόντων η οποία ακολουθείται από συσσώρευση νιτρικών ιόντων (Timmons et al., 2009).

Σε αυτήν τη φάση, ο αποικισμός από ετερότροφα βακτήρια προκαλεί αποικοδόμηση και συσσώρευση διαφόρων σωματιδίων και διαλυμένων οργανικών ουσιών. Ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων, η διακύμανση του αριθμού τους και το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να φθάσουν σε μια σταθερή κατάσταση (εάν επιτευχθεί) δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά.

## **1.2. Ρύθμιση και Νιτροποίηση συστήματος**

Η δυνατότητα εκτροφής διαφόρων ειδών ιχθύων γλυκού νερού σε συστήματα ανακύκλωσης είναι αποδεδειγμένη. Τα συστήματα RAS παρουσιάζουν το πλεονέκτημα ελέγχου της θερμοκρασίας που επηρεάζει την παραγωγική διαδικασία

του συστήματος εκτροφής (Eding et al. 2006). Η ανακυκλοφορία του νερού είναι μια οικονομική εναλλακτική λύση όταν το κόστος της ενέργειας που δαπανάται σχετίζεται αποκλειστικά με τον έλεγχο θερμοκρασίας και τις απαιτήσεις άντλησης του νερού. Οι Bessmer et al. (2014) αναφέρουν ότι η μέση εξοικονόμηση ενέργειας σε ένα σύστημα RAS για θέρμανση και άντληση είναι 0,96 δολάρια ΗΠΑ ανά kg ψαριού που παράγεται.

Οι τεχνολογίες βιολογικού φίλτρου RAS μπορούν να χωριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες: σταθερή μεμβράνη (attached growth) στην οποία παρέχεται ένα μέσο για την προσκόλληση και ανάπτυξη των μικροοργανισμών, και βιολογικά φίλτρα αναστολής ανάπτυξης στα οποία οι μικροοργανισμοί διατηρούνται σε εναιώρημα. Το μεγαλύτερο μέρος της βιοδιήθησης σε συστήματα ανακυκλοφορίας έχει επικεντρωθεί σε αερόβια, φίλτρα σταθερής μεμβράνης (Vadstein et al. 1993, De Schryver & Vadstein, 2014) στα οποία παρέχεται ένα υπόστρωμα για την ανάπτυξη ενός βιοφίλμ που χρησιμοποιεί οξυγόνο για τη μετατροπή της αμμωνίας και των νιτροδών σε νιτρικά άλατα, και οξειδώνει την οργανική ύλη. Πρόσφατα, το ενδιαφέρον για άλλες εναλλακτικές λύσεις βιοδιήθησης, όπως τα συστήματα αναστολής ανάπτυξης (Avnimelech, 1999, Au et al. 2004) έχει αυξηθεί. Αυτά τα συστήματα χρησιμοποιούνται εκτενώς στην επεξεργασία λυμάτων, αλλά το υψηλότερο επίπεδο διαχείρισης που απαιτείται για τη λειτουργία τους έχει επιβραδύνει την ενσωμάτωσή τους στην υδατοκαλλιέργεια. Τα αιωρούμενα συστήματα ανάπτυξης έχουν θεωρηθεί ασταθή και σχετίζονται με την κακή ποιότητα του νερού από τη γενική κοινότητα υδατοκαλλιέργειας. Η αδυναμία των συστημάτων σταθερής μεμβράνης να ανταποκριθούν στις οικονομικές προσδοκίες, ωστόσο, θα επιβάλει την επανεπικύρωση αυτών των συμπερασμάτων, ιδίως όταν ισχύουν για την παραγωγή βασικών προϊόντων από ανθεκτικά είδη.

Παρόλο που η βιομηχανία βιολογικού φίλτρου RAS γλυκού νερού πρέπει να θεωρηθεί αρκετά ώριμη, αναμένεται να συνεχιστεί η εισαγωγή τεχνολογιών βιοδιήθησης από την πολύ μεγαλύτερη βιομηχανία νερού και λυμάτων. Αυτό αποδείχθηκε πρόσφατα με αρκετά ταχεία διάδοση των αντιδραστήρων κινούμενης κλίνης στη βιομηχανία RAS, μια τεχνολογία της οποίας η ανάπτυξη υποστηρίχθηκε σε μεγάλο βαθμό από τη βιομηχανία νερού και λυμάτων (Zhu & Chen, 2001).

Η ικανότητα νιτροποίησης ενός βιολογικού φίλτρου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ολικής αμμωνίας TAN η οποία θα πρέπει να κυμαίνεται κάτω από



1,0 mg / L (Zhu & Chen, 2001). Τα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής λαρβών των θαλάσσιων ειδών απαιτούν επίπεδα TAN και νιτρωδών ιόντων κάτω από 0,1 mg/L πολύ μικρότερο από το μέγιστο όριο που ισχύει για τα oligotροφικά ύδατα (0,3 mg N/L) που ισχύει για τα γλυκά νερά (Chen et al. 2006). Η μεταβολή των ποιοτικών χαρακτηριστικών του νερού προϋποθέτει αυξημένο έλεγχο των κριτηρίων ελέγχου του βιολογικού φίλτρου, μια μεταβολή που δικαιολογεί πλήρως την καθιέρωση μιας νέας «ολιγοτροφικής» κατηγορίας ποιότητας των υδάτων. Η έρευνα επικεντρώνεται στην αξιολόγηση και τον επανασχεδιασμό των βιολογικών φίλτρων προκειμένου να διασφαλίζεται η ικανοποιητική λειτουργία τους σύμφωνα με όσα προβλέπονται από τους κανονισμούς για τα oligotροφικά νερά.

Η ρύθμιση και η λειτουργία ενός κλειστού συστήματος εκτροφής εξαρτάται από τον υδραυλικό χρόνο παραμονής (HRT) του νερού στο φίλτρο και καθορίζει την αποτελεσματικότητα του ανακυκλωμένου συστήματος εκτροφής καθώς και την νιτροποιητική διεργασία του συστήματος.

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος είναι η απονιτροποίηση, μια διαδικασία που απομακρύνει το άζωτο από το σύστημα, ενώ αναπληρώνει την αλκαλικότητα που μεταβάλλεται κατά τη διαδικασία της βιοχημικής διεργασίας της νιτροποίησης (Chen et al. 1993, Chen et al. 2006).

Τα νιτρικά ιόντα έχει αποδειχθεί ότι σε αυξημένες συγκεντρώσεις επηρεάζει την επιβίωση των ψαριών τόσο του γλυκού όσο και του θαλασσινού νερού. Για παράδειγμα συγκέντρωση αζώτου στα νιτρικά ιόντα ίση με 50 mg N/L είναι ένα αποδεκτό όριο ασφάλειας για την εκτροφή των ψαριών το οποίο ποικίλλει για τα διάφορα είδη και στάδια ανάπτυξης. Οι επιπτώσεις της περίσσειας των νιτρικών ιόντων μπορεί να υποδηλώνει αργή ανάπτυξη, ευαισθησία στις ασθένειες, μειωμένη γονιμότητα και μειωμένη επιβίωση. Η LC50 συγκέντρωση του αζώτου στα νιτρικά για τους οργανισμούς του γλυκού νερού κυμαίνεται από 5 έως 2107 mg N/L νιτρικών-άζωτο, με τα αμφίβια και τα ασπόνδυλα να συγκαταλέγονται στις ευαίσθητες ομάδες. Στα θαλάσσια είδη, η συγκέντρωση κυμαίνεται από 2,2 έως 5050 mg N/L στα νιτρικά.

Η θαλάσσια λευκή κηλίδα (white spot disease) έχει συνδεθεί με συγκεντρώσεις νιτρικών άνω των 30 mg N / l (Bitton 2011, Billund 2014). Μια συγκέντρωση νιτρικών 100 mg N / l ήταν σαφώς θανατηφόρα για τα ψάρια medaka (*Oryzias latipes*) όταν εκτέθηκαν σε νιτρικά τόσο σε ενήλικες όσο και σε φάσεις ανάπτυξης. Μια συγκέντρωση νιτρικών 75 mg N / l μείωσε το ρυθμό γονιμοποίησης,

καθυστέρησε το χρόνο εκκόλαψης, μείωσε το ρυθμό επώασης των αυγών και μείωσε τον ρυθμό ανάπτυξης των ανηλίκων. Επιπλέον, η συσσώρευση νιτρικών αλάτων τόσο χαμηλά όσο 50 mg N / l καθυστέρησε σημαντικά την ωστοκία και μείωσε τον αριθμό των ωαρίων που έβαλαν τα ψάρια που εκτέθηκαν στη νεανική φάση.

Η απονιτροποίηση χρησιμοποιείται για τη μείωση των νιτρικών σε αγροτικές, οικιακές και βιομηχανικές ροές λυμάτων που απειλούν ευτροφισμό των επιφανειακών υδάτων. Η βακτηριακή απονιτροποίηση είναι μια μορφή αναπνοής στην οποία τα βακτήρια χρησιμοποιούν οξείδια του αζώτου ως πηγή οξυγόνου. Τα περισσότερα από τα βακτήρια που εκτελούν αυτή τη διαδικασία είναι ετερότροφα και συνήθως αναισθητικά αναερόβια, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιούν οξείδια όταν δεν υπάρχει ελεύθερο οξυγόνο. Μέσω αυτής της διαδικασίας, η οποία απαιτεί διαφορετικά ένζυμα και κυτοχρώματα που δεν υπάρχουν κατά την αερόβια αναπνοή, τα οξείδια του αζώτου μπορούν να αναχθούν σε μια τελική μορφή N<sub>2</sub> (Becke et al. 2017b).

Στα κλειστά κυκλώματα εκτροφής η απονιτροποίηση λαμβάνει χώρα στο βιολογικό φίλτρο. Πραγματοποιείται κατά 20% στο μέρος του φίλτρου όπου συσσωρεύεται λάσπη οργανικών αποβλήτων και επικρατούν αναερόβιες συνθήκες (Vang et al. 2014). Η εκτροφή προνυμφών θαλασσιών ιχθύων σε κλειστά συστήματα εκτροφής (RAS) οφείλει την ύπαρξή της στην αύξηση του χρόνου παραμονής του νερού στο φίλτρο, επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό υψηλότερο HRT στα πιο ευαίσθητα είδη ψαριών. Μελέτες έχουν δείξει ότι μια περίοδος εγκλιματισμού είναι απαραίτητη πριν το βιολογικό φίλτρο αρχίσει να λειτουργεί ικανοποιητικά και αποδοτικά (Wietz et al. 2009). Η ρύθμιση του βιολογικού φίλτρου μπορεί να επιτευχθεί με προσθήκη οργανισμών στο σύστημα με αυξημένη προσαρμοστική ικανότητα ή με προσθήκη αμμωνίας στο σύστημα και συχνούς ελέγχους. Ο χρόνος ρύθμισης του φίλτρου κυμαίνεται μεταξύ 2-3 εβδομάδες για τα συστήματα του γλυκού νερού (Vadstein & Leiknes 2014), σε αντίθεση με τα θαλασσινά όπου η διάρκεια του χρόνου ρύθμισης αυξάνεται στους 3 έως 4 μήνες μιας και στα θαλασσινά συστήματα εκτροφής η νιτροποιητική ικανότητα που παρουσιάζει το σύστημα επηρεάζεται αρνητικά από την οξειδωτική πορεία της αμμωνίας με την αύξηση της συγκέντρωσης των νιτροδών ιόντων (Michaud et al. 2014). Η αιτία για αυτά τα προβλήματα παραμένει μέχρι σήμερα άγνωστη και έχει αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, όπως το υψηλό οργανικό φορτίο (Pedersen et al. 2012), ή

μεταβολή της αλατότητας ή σε παραμέτρους που αφορούν τη λειτουργία του συστήματος.

### **1.3 Σκοπός Διπλωματικής Εργασίας**

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής προπτυχιακής εργασίας είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση για το ρόλο και τις επιδράσεις του λόγου C/N στη ρυθμιστική και νιτροποιητική ικανότητα ενός βιολογικό φίλτρο στα κλειστά κυκλώματα εκτροφής ψαριών (RAS).

## **Κεφάλαιο 2.**

### **Ρυθμιστική ικανότητα ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής ψαριών**

#### **2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη δυναμική των βακτηρίων στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής**

Οι Vadstein et al. (1993) χρησιμοποίησαν την οικολογική θεωρία της στρατηγικής r / k για να περιγράψουν τους παράγοντες που εμπλέκονται στην επίτευξη της μικροβιακής σταθεροποίησης στο νερό ενός ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής (RAS), εστιάζοντας στην αλληλεπίδραση της φέρουσας ικανότητας με τη στρατηγική r/k. Η φέρουσα ικανότητα ορίζεται ως ο αριθμός των βακτηρίων που μπορούν να διατηρηθούν εντός συστήματος με την πάροδο του χρόνου. Τα ταχέως αναπτυσσόμενα (ευκαιριακά) βακτήρια ορίζονται ως «r-στρατηγικά» (π.χ. ετερότροφα) ενώ τα «k-στρατηγικά» (εξειδικευμένα βακτήρια π.χ. νιτροποιητές) χαρακτηρίζονται από το ότι έχουν βραδύτερο ρυθμό ανάπτυξης. Η παροχή οργανικής ύλης εντός ενός RAS είναι συνήθως ο παράγοντας που περιορίζει την ανάπτυξη και καθορίζει τη φέρουσα ικανότητα. Τα r-στρατηγικά είναι ευκαιριακά βακτήρια που συνήθως προτιμούν ασταθή περιβάλλοντα με μικρό ανταγωνισμό όπου γρήγορα μπορούν να καταλάβουν νέες διαθέσιμες θέσεις. Τα K-στρατηγικά βακτήρια έχουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε περιβάλλοντα περιορισμένου με περιορισμένο υπόστρωμα που λειτουργούν κοντά στη φέρουσα ικανότητα (Vadstein et al., 1993, Attramadal 2012a, b). Σ' ένα ανακυκλούμενο σύστημα εκτροφής, το μικροβιακό περιβάλλον είναι περίπλοκο και διάφοροι

παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη φέρουσα ικανότητα ενός συστήματος, προάγοντας την ανισορροπία στην ποιότητα των μικροβιακών υδάτων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την φέρουσα ικανότητα του συστήματος απεικονίζονται στην Εικόνα 1.



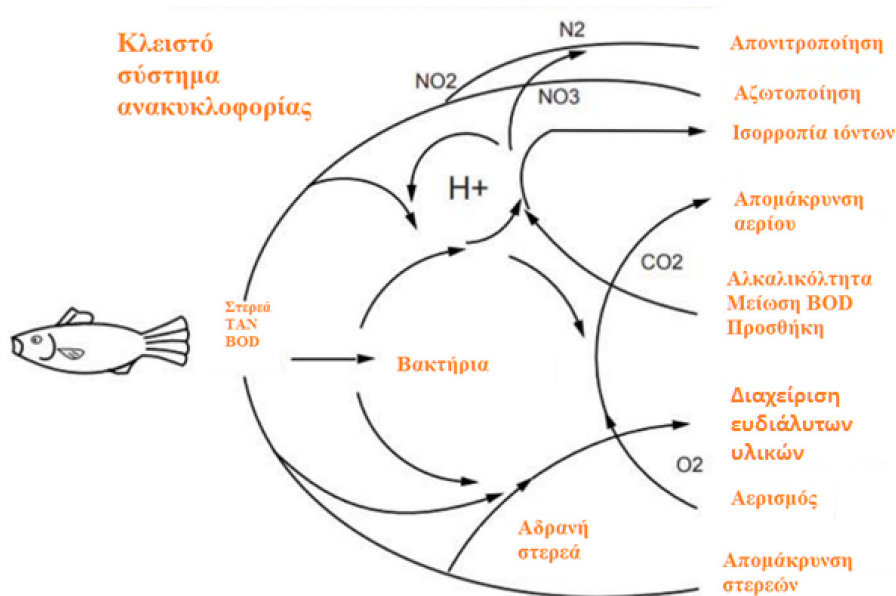
Εικόνα 1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ικανότητα μεταφοράς νερού RAS (Πηγή: Rojas-Tirado et. al. 2017)

## 2.2. Βακτήρια στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής

Το βιολογικό φίλτρο αποτελεί την πρωτοβάθμια επεξεργασία του απορρέοντος νερού και δέχεται ουσιαστικά νερό με υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών και ανόργανων θρεπτικών συστατικών από τη μονάδα εκτροφής. Το υλικό πλήρωσης του βιολογικού φίλτρου εξασφαλίζει αύξηση της επιφάνειας ανάπτυξης των βακτηρίων (Polanco et al., 2000, Fernandes et al., 2017). Σ' ένα κλειστό κύκλωμα RAS, υπάρχουν δύο κύριες ομάδες βακτηρίων: τα αυτότροφα και τα

ετερότροφα βακτήρια (Hagopian & Riley, 1998). Τα αυτότροφα βακτήρια είναι υπεύθυνα για τη βιοχημική διεργασία της νιτροποίησης, όπου η πρώτη ομάδα βακτηρίων (AOB: ammonia-oxidizing bacteria) και τα οξειδωτικά αρχαιοβακτήρια αμμωνίας οξειδώνουν την αμμωνία σε νιτρώδη ιόντα και τα οξειδωτικά βακτήρια νιτρωδών (NOB: nitrite oxidizing bacteria) οξειδώνουν τα νιτρώδη ιόντα σε νιτρικά (Hagopian & Riley, 1998, Fernades et al. 2015). Τα βακτηρίδια νιτροποίησης αναπτύσσονται σε συστάδες και προσκολλώνται στα υλικά πλήρωσης των φίλτρων (Jenkins & Kemp, 1984).

Η διαδικασία της νιτροποίησης είναι ζωτικής σημασίας επειδή διατηρεί την αμμωνία σε μη τοξικά επίπεδα (Timmons et al., 2009). Αυτή η διαδικασία μπορεί επίσης να επηρεάσει αρνητικά την ποιότητα του νερού λόγω της βακτηριακής κατανάλωσης οξυγόνου και της μείωσης του pH λόγω μείωσης της αλκαλικότητας. Η ταχύτητα νιτροποίησης μπορεί να επηρεασθεί σε μεγάλο βαθμό (μειωθεί) από τις μεταβολές που παρατηρούνται στις συνθήκες εκτροφής όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία, η αλκαλικότητα, η οργανική ύλη, το διαλυμένο οξυγόνο, ο υπερβολικός αερισμός, η αλατότητα και οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας (Davies 2011, Zhu & Chen, 2001, Chen et al., 2006, Timmons et al., 2009). Λόγω του περιορισμένου κέρδους ενέργειας, τα αυτότροφα βακτήρια έχουν σχετικά χαμηλότερο ρυθμό ανάπτυξης από τα ετέροτροφα βακτήρια. Εάν οι συνθήκες δεν είναι ιδανικές, τα αυτότροφα βακτήρια μπορεί να διακινδυνεύσουν να μην ανταγωνιστούν τα ετερότροφα βακτήρια (r-strategists), τα οποία έχουν ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης (0,1 έναντι 0,5 /ημέρα ανά ημέρα (Ebeling et al., 2006). Τα ετεροτροφικά βακτήρια είναι η πιο άφθονη ομάδα στο RAS (Leonard et al., 2000, Michaud et al., 2009, Michaud et al., 2014, Rud et al., 2017). Υπό οικολογική έννοια, τα περισσότερα ετεροτροφικά ετερότροφα βακτήρια θεωρούνται «ουδέτερα» καθώς συμβάλλουν μερικώς στη διατήρηση της καλής ποιότητας του μικροβιακού φορτίου υποβαθμίζοντας την οργανική ύλη από την οποία λαμβάνουν την ενέργειά τους (Bitton, 2011) και ταυτόχρονα καταλαμβάνουν εξειδικευμένες και μπορεί να αποτρέψει τον πολλαπλασιασμό των επιβλαβών βακτηρίων (Attramadal 2012a). Η Εικόνα 2 απεικονίζει τη συμβολή τόσο των αυτότροφων όσο και των ετερότροφων βακτηρίων στην ποιότητα του νερού ενός RAS, και την πολυπλοκότητα των διαφορετικών διαδικασιών που επηρεάζουν την ποιότητα του νερού.



Εικόνα 2. Διάγραμμα βακτηριακής και χημικής αλληλεπίδρασης που σχετίζεται με την είσοδο αποβλήτων στο RAS (Πηγή: Rojas-Tirado et al.2017).

### 2.3.1. Επιφάνεια ανάπτυξης βακτηρίων

Ένα πολύ γνωστό χαρακτηριστικό των βακτηρίων είναι η τάση τους να σχηματίζουν βιοφίλμ (McDaugald et al., 2011). Τα βακτήρια σχηματίζουν βιοφίλμ για διάφορους λόγους (Pedersen et al. 2016):

- 1) Χρησιμεύει ως μηχανισμός αυτοάμυνας, παρέχοντας προστασία από φυσικοχημικές διαταραχές και έτσι αυξάνεται η επιβίωση.
- 2) Τα κύτταρα παραμένουν σε μια ευνοϊκή θέση όπου τα θρεπτικά συστατικά μπορεί να είναι πιο άφθονα ή συνεχώς να αναπληρώνονται.
- 3) Διευκολύνει την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων και υπάρχουν περισσότερες ευκαιρίες για ανταλλαγή θρεπτικών και γενετικών, αυξάνοντας τις πιθανότητες επιβίωσης.

### 2.3.2. Νερό εκτροφής στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής

Η στήλη του νερού είναι ένας άλλος σημαντικός βιότοπος για τα βακτήρια. Στην υδάτινη φάση, τα βακτήρια μπορούν να ζουν προσκολλημένα σε σωματίδια ή στην επιφάνεια οργανισμών ανώτερης τάξης ή μπορεί να είναι ελεύθερα ζωντανά (αιωρούμενα). Η δυναμική και η σύνθεση των πλαγκτονικών βακτηρίων στο RAS δεν είναι πλήρως κατανοητή. Στη μικροβιολογία, η πλαγκτονική ανάπτυξη ορίζεται για εκείνα τα βακτήρια που είναι προσαρμοσμένα να ζουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών (Pedersen et al. 2016).

Στο RAS, η απομάκρυνση της βιοαποικοδομήσιμης οργανικής ύλης προκαλείται κυρίως από τη βακτηριακή κοινότητα μέσα στο βιολογικό φίλτρο (Blancheton et al., 2013). Η ποιότητα του νερού στην εξόδο από το βιολογικό φίλτρο διαθέτει διαφορετικά χαρακτηριστικά από το νερό στην είσοδο, λόγω της δράσης των βακτηρίων και του σχεδιασμού του βιολογικού φίλτρου. Η αμμωνία μετατρέπεται σε νιτρικά, η βιοδιαθέσιμη οργανική ύλη μεταβολίζεται σε λιγότερο αποικοδομήσιμες ενώσεις άνθρακα και οι συγκεντρώσεις οξυγόνου μειώνονται.

Πρόσθετη αποικοδόμηση της οργανικής ύλης θα συμβεί μετά το νερό που διέρχεται από τη μονάδα αερισμού. Όλοι αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν τη φέρουσα ικανότητα του συστήματος και την ποιότητα του νερού. Παρά τη μείωση των σωματιδιακών και διαλυμένων θρεπτικών ουσιών μετά τις μονάδες επεξεργασίας, τα μικροσωματίδια συσσωρεύονται στη μονάδα εκτροφής συμβάλλοντας στη διατήρηση της μικροβιακής ανάπτυξης (Blancheton & Canaguier, 1995, Wold et al., 2014). Τα βακτήρια που συνδέονται με σωματίδια και επωφελούνται από την προστασία από το σωματίδιο (Hambly et al. 2015) και από τα θρεπτικά συστατικά που διατίθενται εντός / πάνω στο σωματίδιο.

Τα προσκολλημένα σε σωματίδια βακτήρια μετατρέπουν την σωματιδιακή ύλη σε διαλυμένη ύλη, και έτσι υποστηρίζουν το ρυθμό παραγωγής των ελεύθερων ζωντανών βακτηρίων (Colt et al. 2006). Τα βακτήρια που συνδέονται με τα σωματίδια εκκρίνουν ένζυμα που υδρολύουν την επιφάνεια των σωματιδίων προκειμένου να προσληφθούν τα θρεπτικά συστατικά (Chróst, 1991, Besmer et al. 2014). Αυτά τα βακτήρια έχουν σημαντικά υψηλότερη εξωκυτταρική ενζυματική δραστηριότητα ανά κύτταρο από τα ελεύθερα βακτήρια. Οι Brinker & Rosch (2005) αναφέρουν ότι η οργανική ύλη υδρολύεται με γρηγορότερο ρυθμό από ότι

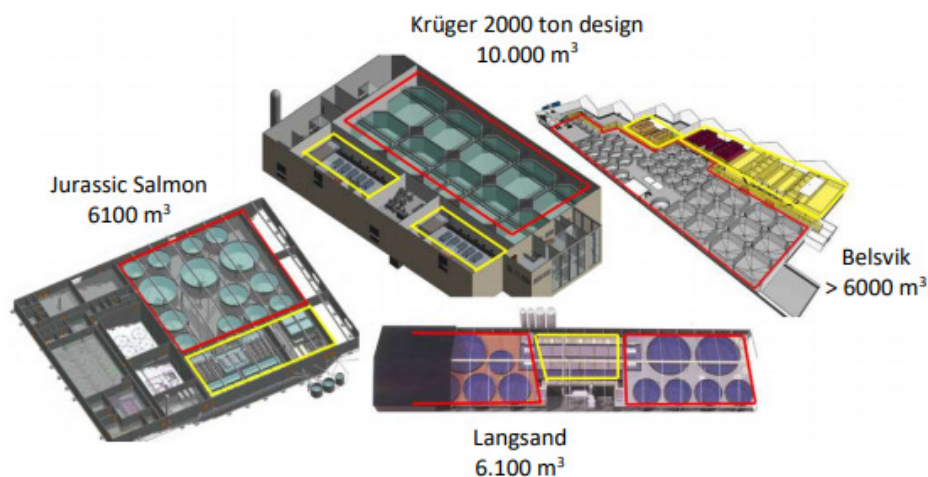
προσλαμβάνεται. Με βάση αυτό, μπορεί να υποθεθεί ότι εκτός από την περιορισμένη διαθεσιμότητα οργανικού άνθρακα στα ελεύθερα ζωντανά βακτήρια παρέχονται πρόσθετο φορτίο από την υδρολυτική δραστηριότητα των βακτηρίων που συνδέονται με σωματίδια.

Επιπλέον, τα βακτήρια χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μικρών κυττάρων (μικρότερη από 1  $\mu\text{m}$  σε διάμετρο σύμφωνα με τους Azam & Hodson (1977), το οποίο είναι συνήθως χαρακτηριστικό των οργανισμών που ζουν σε περιβάλλον με θρεπτικά συστατικά. Το μέγεθος είναι ένα προσαρμοστικό χαρακτηριστικό για μικροοργανισμούς με περιορισμένα θρεπτικά συστατικά λόγω των μειωμένων ενεργειακών απαιτήσεων για κυτταρική συντήρηση (Attramadal et al. 2016).

Υπάρχουν περιορισμένος αριθμός δεδομένων σχετικά με τον αριθμό των βακτηρίων στη υδατική φάση ενός μεγάλου εμπορικού RAS υπό κανονικές συνθήκες. Πειράματα με προνύμφες που εκτράφηκαν σε RAS αναφέρουν τιμές που κυμαίνονται από 10<sup>6</sup> έως 10<sup>7</sup> κύτταρα / ml (Attramadal et al., 2014, Wold et al., 2014). Το θαλασσινό νερό περιείχε 10<sup>6</sup> κύτταρα / ml (Attramadal et al. 2016, Besmer et al. 2016) και το νερό βρύσης 10<sup>3</sup> έως 10<sup>6</sup> κύτταρα / ml (Prest et al., 2016a).

Μεγάλα εμπορικά κλειστά συστήματα εκτροφής (RAS) με δεξαμενές όγκου 1000  $\text{m}^3$  περιέχουν 50 tn ψάρια και κάθε εγκατάσταση RAS αποτελούνται δεξαμενές συνδεδεμένες με φίλτρα (μονάδες επεξεργασίας νερού). Τα βακτήρια έχουν έναν χώρο για να ζουν ως ελεύθερα ζωντανά βακτήρια ή προσκολλημένα σε αιωρούμενα σωματίδια, που μοιράζονται ταυτόχρονα χώρο με τα είδη εκτροφής υψηλής αξίας. Το εμβαδόν επιφανείας που παρέχεται από τα σωματίδια που υπάρχουν στη στήλη νερού, λαμβάνοντας υπόψη τον όγκο του νερού εκτροφής όπως φαίνεται στην Εικόνα 3. Σε δείγμα νερού από ένα εμπορικό σύστημα RAS, ο αριθμός των σωματιδίων μπορεί να είναι περίπου 10<sup>6</sup> σωματίδια /ml που κυμαίνονται από 1 έως 30  $\mu\text{m}$  ενώ η υπολογιζόμενη επιφάνεια σωματιδίων ανέρχεται σε 17  $\text{m}^2 / \text{m}^3$  νερό. Αυτό αποτυπώνει την αυξημένη επιφάνεια ανά κυβικό μέτρο που διατίθεται για την ανάπτυξη βακτηρίων στο σύστημα. Το πλεονέκτημα είναι ότι η λειτουργία του RAS με ομοιόμορφη παροχή οργανικής ύλης ασκεί ισχυρότερη πίεση επιλογής στα μικρόβια, και επομένως μπορεί να επιτευχθεί σταθερή μικροβιακή ποιότητα νερού (Attramadal et al., 2012a). Προφανώς, αυτό συμβάλλει στη δημιουργία μεγαλύτερης ποικιλίας ωφέλιμων βακτηριακών κοινοτήτων στο νερό.





Εικόνα 3. Συστήματα ανακυκλοφορίας νερού στην υδατοκαλλιέργεια που σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν σε συνδυασμό με την ογκομετρική τους ικανότητα από την άποψη της εκτροφής νερού. Οι κόκκινες περιοχές είναι τα συστήματα εκτροφής και οι κίτρινες περιοχές είναι οι μονάδες θεραπείας (Πηγή: Rojas-Tirado et.al. 2017).

### 2.3.3. Δυναμική Βακτηρίων

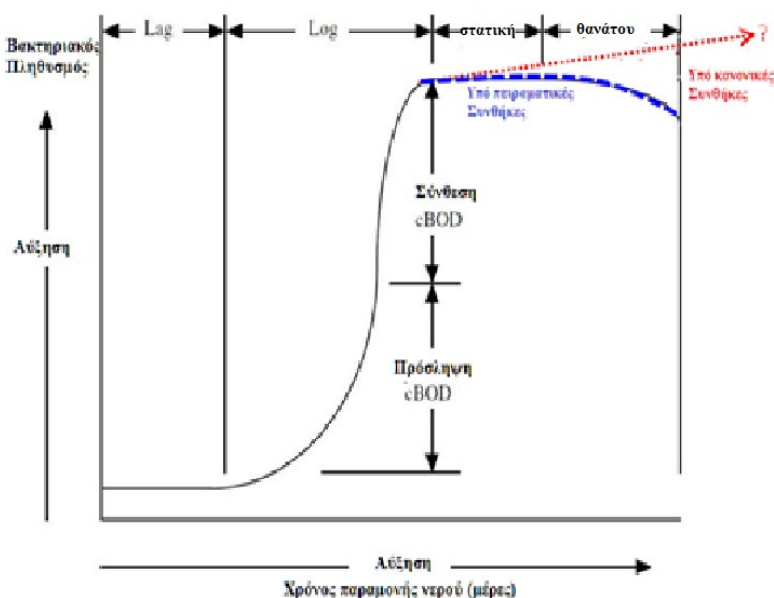
Η εκτίμηση της ποιότητας του νερού πραγματοποιείται κυρίως σε ένα RAS που λειτουργεί υπό σταθερές συνθήκες (όσον αφορά την ποσότητα και την παροχή νερού) για μεγάλη (παρατεταμένη) χρονική περίοδο. Η ανάπτυξη των βακτηρίων σε ένα RAS σχετίζεται με την καμπύλη ανάπτυξης των βακτηρίων όπως φαίνεται στην Εικόνα 4., η οποία χωρίζεται σύμφωνα με τους Gerardi (2006), στις ακόλουθες φάσεις:

- Λανθάνουσα Φάση: Η φάση καθυστέρησης της ανάπτυξης εμφανίζεται κατά την εκκίνηση και επίσης σε κατάσταση ανάκαμψης. Η διάρκεια της φάσης αυτής καθορίζεται από τις συνθήκες του νέου περιβάλλοντος και τα είδη βακτηρίων που υπάρχουν. Εδώ, τα βακτήρια δεν αναπαράγονται αλλά συνθέτουν ένζυμα για την αποικοδόμηση του υποστρώματος στο νέο περιβάλλον.

- Εκθετική-Λογαριθμική φάση ανάπτυξης: Η Φάση αυτή σχετίζεται με το βακτηριακό χαρακτηριστικό που αναπτύσσεται με λογαριθμικό ρυθμό. Μπορεί να

χωριστεί σε τρεις καταστάσεις: i) ανάπτυξη και πρόσληψη υποστρώματος, ii) σύνθεση κυττάρων και ταχεία ανάπτυξη, iii) σύνθεση κυττάρων και φθίνουσα πορεία θανάτου. Κατά την πρόσληψη υποστρώματος, τα βακτήρια αναπτύσσονται και η βιομάζα αυξάνεται. Λόγω του βελτιωμένου ενζυματικού μηχανισμού κατά τη διάρκεια της φάσης καθυστέρησης, τα βακτήρια μπορούν να αποικοδομήσουν το υπόστρωμα και έτσι να αναπαραχθούν. Στο στάδιο της σύνθεσης των κυττάρων και της μείωσης της ανάπτυξης, ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται επειδή τα βακτήρια περιορίζονται από το διαθέσιμο υπόστρωμα. Σε αυτό το σημείο, ο πληθυσμός των βακτηρίων φτάνει τη φέρουσα ικανότητα ή το μέγιστο αριθμό οργανισμών που μπορεί να υποστηρίξει ένα σύστημα.

- Στατική φάση & Φάση Θανάτου: Τέλος, η στατική φάση θεωρείται όταν τα βακτήρια έχουν φθάσει τη φέρουσα ικανότητα του συστήματος. Εδώ, είναι σημαντικό να διαφοροποιηθεί το RAS υπό πειραματικές συνθήκες και το RAS υπό κανονικές εργασίες εκτροφής. Υπό κανονικές συνθήκες λειτουργίας ενός RAS, η ικανότητα μεταφοράς τους εξαρτάται από τη ροή του νερού. Η ροή μπορεί να αυξηθεί για να επιτευχθεί η επιθυμητή ανάπτυξη και, θεωρητικά, η ικανότητα μεταφοράς θα πρέπει συνεπώς να επεκταθεί με αυξημένη παροχή.



Εικόνα 4. Καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης σε συνεχή καλλιέργεια / αντιδραστήρα για εξήγηση της βακτηριακής ανάπτυξης σε RAS υπό φυσιολογικές και πειραματικές συνθήκες (Πηγή: Rojas-Tirado et. al. 2017).

Αρχικά το βακτηριακό αποτύπωμα σε κάθε RAS συμβαίνει κατά την εκκίνηση του συστήματος όπου το νερό και τα μέσα φίλτρανσης αποικίζονται από βακτήρια (φάση υστέρησης). Τα βακτήρια μπορούν να εισαχθούν από το νερό εισόδου στο σύστημα, από το μικροβίωμα των ψαριών (Sugita et al., 2005, Giatsis et al., 2015) και τις ζωοτροφές, εξοπλισμός, προσωπικό κ.λπ. (Blancheton et al., 2013). Κατά την εκκίνηση της διαδικασίας, η οργανική ύλη συσσωρεύεται και τα βακτήρια αυξάνουν σε αφθονία και δραστηριοποιούνται. Η εκκίνηση του RAS είναι μια επισφαλής φάση όπου τα βακτήρια εκτίθενται σε επιλεκτικές διεργασίες λόγω του υποστρώματος. Εάν η συγκέντρωση της οργανικής ύλης δεν ελέγχεται σωστά, τα ετερότροφα βακτήρια επικρατούν και θα είναι οι πρώτοι που θα αποικίσουν τις ελεύθερες θέσεις και έτσι καθυστερήσουν την απόδοση εκκίνησης του βιολογικού φίλτρου.

Απαιτούνται ημέρες για να φτάσει το βιολογικό φίλτρο του RAS σε σταθερή κατάσταση (Timmons et al., 2009). Σε συνθήκες λειτουργίας, η σταθερή κατάσταση του συστήματος αντιπροσωπεύεται από χαμηλές συγκεντρώσεις TAN και νιτρωδών ιόντων, και από τη συσσώρευση νιτρικών ιόντων (Colt et al., 2006).

Τα συστήματα που λειτουργούν υπό συνεχή ανακυκλοφορία και ανταλλαγή νερού, υποδεικνύουν ότι κατά την παρακολούθηση των διαφόρων κλασμάτων οργανικής ύλης στην υδατική φάση (σωματιδιακή και διαλυμένη COD,  $COD_{TOT} = COD_{DISS} + COD_{PART}$ ), αρχικά και τα δύο συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου. Επιπλέον, το διαλυμένο κλάσμα σταματά να μειώνεται μετά από περίπου 60 ημέρες ενώ το σωματιδιακό κλάσμα συνεχίζει να αυξάνεται.

Τα ελεύθερα ζωντανά βακτήρια αυξάνονται εντός των πρώτων τριάντα ημερών και στη συνέχεια σταθεροποιούνται σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ  $0,8 - 3 \times 10^4$  κύτταρα / μλ. Επιπλέον, η βακτηριακή δραστηριότητα που σχετίζεται με την επιφάνεια των σωματιδίων αυξάνεται σταθερά με τον σωματιδιακό COD. Η παρουσία των βακτηρίων που ζουν ελεύθερα και των σωματιδίων που σχετίζονται με τα σωματίδια στο νερό του RAS ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση του βιοφίλμ στο βιολογικό φίλτρο και το νερό (Leonard, et al., 2000) αλλά εντός της υδατικής φάσης, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.

## Κεφάλαιο 3.

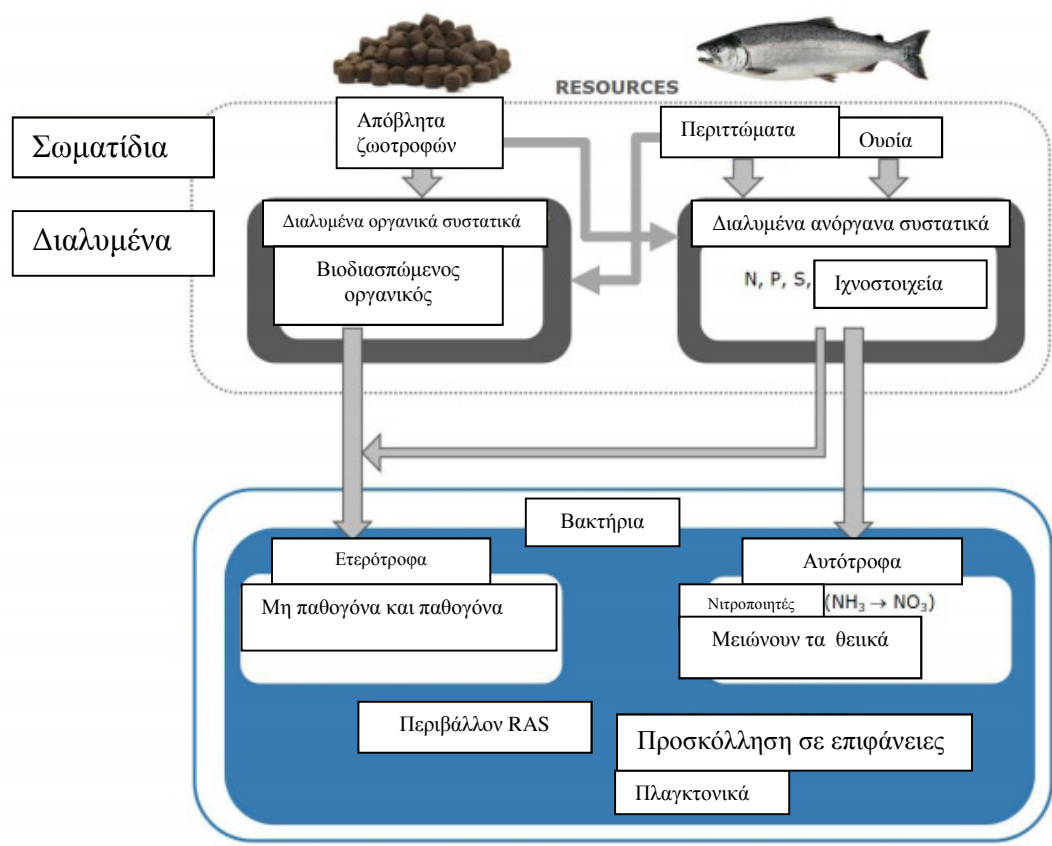
### Λειτουργικά χαρακτηριστικά ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής

#### 3.1. Οργανικά και ανόργανα θρεπτικά

Η τροφή είναι η κύρια πηγή εισόδου της οργανικής ύλης στο νερό του RAS. Η ακατωνάλλωτη τροφή και οι απέκκρισεις των ψαριών συνιστούν την κύρια πηγή αζώτου για την ανάπτυξη των βακτηρίων στο νερό ενός RAS (Εικ. 5). Η σωματιδιακή οργανική ύλη που δεν απομακρύνεται κατά τη μηχανική φίλτρανση επεξεργάζεται περαιτέρω έως ότου τελικά συμβάλει στο διαλυμένο κλάσμα της οργανικής ύλης. Το διαλυμένο κλάσμα μπορεί να χωριστεί σε δύο κατηγορίες, τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά και τα οργανικά θρεπτικά συστατικά (Εικ. 5). Τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά είναι κυρίως ενώσεις όπως το άζωτο, ο φώσφορος ή ιχνοστοιχεία και τα οργανικά θρεπτικά συστατικά περιλαμβάνουν τον οργανικό άνθρακα σε όλες τις μορφές (Prest et al., 2016a). Ο κύκλος του αζώτου πραγματοποιείται από νιτροποιητικά βακτήρια, τα οποία αποκτούν την ενέργειά τους οξειδώνοντας το άζωτο και καταναλώνοντας ανόργανο άνθρακα (CO<sub>2</sub>) για την κυτταρική σύνθεση (Gerardi, 2006).

Ο λόγος της σύνθεσης των βακτηρίων άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου (C: N: P) είναι 100 : 10: 1 και ο άνθρακας είναι συνήθως η ένωση που περιορίζει την ανάπτυξη τους στο νερό RAS (Leonard et al., 2002). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, συγκέντρωση διαλυμένου άνθρακα 1 μg C / L είναι αρκετή για να προάγει την ανάπτυξη 10<sup>3</sup> - 10<sup>5</sup> κύτταρα / ml (Prest et al., 2016a). Οι Dalsgaard et al. (2013) αναφέρουν ότι 81 mg COD ανά g τροφής παράγονται στην υδατική φάση μετά τη σίτιση των ψαριών. Λαμβάνοντας υπόψη την αναλογία άνθρακα προς οξυγόνο: 12 g mol άνθρακα προς 32 g mol οξυγόνου (Ebeling et al., 2006), η συγκέντρωση του άνθρακα στο νερό θα είναι 30,37 mg άνθρακα ανά g παροχής τροφής. Ως εκ τούτου, παράγεται αρκετός οργανικός άνθρακας για να διατηρηθεί μια περιορισμένη ανάπτυξη ετερότροφων βακτηρίων στο νερό ενός RAS κάτω από συνθήκες λειτουργίας όπου το άζωτο (N) και ο φώσφορος (P) κυμαίνονται περίπου ~ 130 mg N / L και ~ 3 mg P / L.

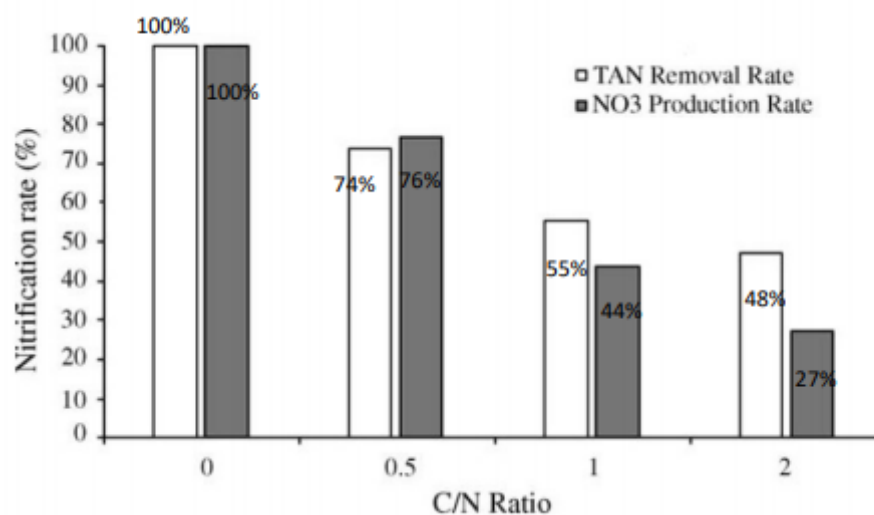
Η οργανική ύλη θέτει σε κίνδυνο ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών οργανικών ενώσεων άνθρακα που κυμαίνονται από απλά οργανικά έως πιο πολύπλοκες πολυμερείς ουσίες όπως π.χ. χουμικές ενώσεις (Prest et al., 2016a, Hambly et al., 2015). Επομένως, μόνο ένα κλάσμα βιοαποικοδομήσιμης της οργανικής ύλης μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί για βακτηριακή ανάπτυξη. Στο πόσιμο νερό, εκτιμάται ότι 0,1 και 30% του συνολικού DOC μπορεί να αφομοιωθεί από βακτήρια (Prest et al., 2016a). Το εύρος του διαθέσιμου αφομοιώσιμου άνθρακα στο νερό του RAS δεν είναι σαφές.



Εικόνα 5. Πηγές θρεπτικών συστατικών σε ένα σύστημα ανακυκλοφορίας νερού RAS (Πηγή: Rojas-Tirado et. al. 2017).

### 3.2. Λόγος C/N

Αρκετές μελέτες έχουν εστιάσει στην αναλογία άνθρακα / ανόργανου αζώτου (C / N) ως παράγοντα που επηρεάζει την απόδοση των βιολογικών φίλτρων. Σε υψηλή αναλογία C / N, τα ετερότροφα βακτήρια ανταγωνίζονται τα νιτροποιητικά για το διαθέσιμο οξυγόνο και περιβάλλον ανάπτυξης (Avnimelech, 1999, Zhu & Chen, 2001, Nogueira et al., 2002, Michaud et al., 2006, Michaud et al., 2014), προκαλώντας δυνητικά μείωση του ρυθμού νιτροποίησης (Εικ. 6). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες αλληλεπιδράσεις όπως για παράδειγμα υδραυλικό φορτίο που θα μπορούσε να προκαλέσει υπερεκτίμηση του λόγου C / N.



Εικόνα 6. Σχέση της αναλογίας C/N σε συνάρτηση με το ρυθμό νιτροποίησης (Πηγή: Rojas-Tirado et.al 2017).

### 3.3. Δείκτες Βιοαποικοδόμησης

Ως δείκτης βιοαποικοδόμησης ορίζεται ο λόγος μεταξύ BOD και COD (BOD / COD) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της βιοαποικοδομησιμότητας της οργανικής ύλης στο νερό. Οι Dalsgaard et al. (2013) χαρακτήρισαν την παραγωγή αποβλήτων από την πέστροφα και περιέγραψαν τα χαρακτηριστικά απομάκρυνσης των στερεών και της αιωρούμενης / διαλυμένης οργανικής ύλης που παραμένουν στο νερό. Διευκρίνισαν ότι υπάρχει υψηλότερος βιοαποικοδομήσιμος δείκτης εντός της οργανικής ύλης που διατηρήθηκε στη φάση του νερού σε σχέση με εκείνον στα περιττώματα.

Στα λύματα, αυτός ο δείκτης χρησιμοποιείται ευρέως για την εκτίμηση της βιοαποικοδόμησης των οικιακών αποβλήτων και ως εκ τούτου υποδηλώνει την καταλληλότητα των αποβλήτων για βιολογική επεξεργασία. Η ακόλουθη ταξινόμηση προτείνεται σύμφωνα με τους Rojas-Tirado et.al (2017): εάν ο λόγος BOD / COD είναι  $> 0,6$  η οργανική ύλη είναι βιοαποικοδομήσιμη, εάν το BOD / COD είναι μεταξύ 0,3 και 0,6, η οργανική ύλη είναι ενδιάμεσα βιοαποικοδομήσιμη και εάν το BOD / COD είναι  $< 0,3$  η οργανική ύλη δεν είναι βιοαποικοδομήσιμη. Σε συστήματα RAS που λειτουργούν υπό σταθερές συνθήκες για μεγάλο χρονικό διάστημα ( $\geq 3$  μήνες) οι δείκτες βιοαποικοδόμησης κυμαίνονται από 0,08 έως 0,1 (Fernandes et al., 2015).

### 3.4. Σύσταση τροφής

Οι παραδοσιακές δίαιτες ζωοτροφών υδατοκαλλιέργειας βασίζονται στο ιχθυάλευρο ως πηγή πρωτεΐνης. Λόγω οικονομικών ζητημάτων και της πίεσης που ασκείται καθημερινά στο απόθεμα άγριων ψαριών, η διατροφή των ψαριών χωρίς να περιέχει ως συστατικό τα ιχθυάλευρα έχει καταστεί μία εναλλακτική και βιώσιμη λύση. Μελέτες έδειξαν ότι οι εναλλακτικές και παραδοσιακές δίαιτες μπορεί να προκαλέσουν εντερικές διαταραχές (Baeverfjord & Krogdahl, 1996) και ενδεχομένως να επηρεάζουν την ποιότητα του νερού. Έχουν επίσης αντιμετωπιστεί οι ανησυχίες σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο τα εναλλακτικά συστατικά που χρησιμοποιούνται

στην παρασκευή ιχθυοτροφών επηρεάζουν την βακτηριακή αφθονία στο νερό ενός RAS. Οι Vadstein et al. (2014) έδειξαν ότι οι δίαιτες χωρίς ιχθυάλευρα επέδρασαν το μικροβίωμα του εντέρου στο σολομό.

### **3.5.Περιβαλλοντικοί παράγοντες**

Ο έλεγχος των περιβαλλοντικών συνθηκών αποτελεί από τα βασικά λειτουργικά χαρακτηριστικά στο RAS. Ο έλεγχος του pH, της αλκαλικότητας, του οξυγόνου και της θερμοκρασίας είναι από τις βασικές μεταβλητές που θα πρέπει να ελέγχονται σε ημερήσια βάση. Οι αλλαγές στις μεταβλητές της ποιότητας του νερού επηρεάζουν την ποιότητα του νερού και κατ' επέκταση και την καταλληλότητά του για χρήση στο ανακυκλούμενο RAS.

#### **3.5.1.Οξυγόνο**

Το διαλυμένο οξυγόνο στο RAS είναι μια κρίσιμη και σημαντική παράμετρος λόγω των απαιτήσεων των εκτρεφόμενων ειδών (Timmons et al., 2009) και των απαιτήσεων των βακτηρίων στο βιολογικό φίλτρο. Λόγω αυτού, το οξυγόνο είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη παράμετρος στο RAS και διατηρείται σύμφωνα με τα επιθυμητά επίπεδα. Το βιολογικό φίλτρο έχει συχνά μια επιπλέον παροχή οξυγόνου για τη διατήρηση της σωστής λειτουργίας. Οι διεργασίες της νιτροποίησης σύμφωνα με τον Timmons et al., (2009) επηρεάζεται σε συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου μικρότερες από 2 mg / L. Ωστόσο, για τη λειτουργία ενός βιολογικού φίλτρου με τόσο χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, παράγοντες όπως η καλή ροή εντός της μονάδας βιολογικού του φίλτρου, η δομική κατάσταση του βιοφίλμ, η συγκέντρωση της TAN και των νιτρώδων ιόντων και ο σχεδιασμός του βιολογικού φίλτρου, θα πρέπει να πληρή τις σωστές προϋποθέσεις κυρίως ως προς τον όγκο και την επιφάνεια που καλύπτει το φίλτρο.



### 3.5.2. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι μια σημαντική παράμετρος για τα εκτρεφόμενα είδη, αλλά και ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των βακτηρίων, την κινητική και τις βιοχημικές διεργασίες της νιτροποίησης (Prest et al., 2016a). Η θερμοκρασία επηρεάζει τους βακτηριακούς πληθυσμούς: i) επηρεάζει το ρυθμό διάχυσης των οργανικών και ανόργανων θρεπτικών ουσιών στα βακτηριακά κύτταρα και ii) επηρεάζει το ρυθμό της ενζυματικής δραστηριότητας. Με τις αυξανόμενες θερμοκρασίες, ο ρυθμός διάχυσης του υποστρώματος σε βακτηριακά κύτταρα αυξάνεται και ο ρυθμός της ενζυματικής δραστηριότητας αυξάνεται (Gerardi, 2006). Μεταβολές στη θερμοκρασία προκαλούν δραστηριότητα των ετερότροφων βακτηρίων που αυξάνει την υποβάθμιση της οργανικής ύλης επηρεάζοντας το λόγο BOD : COD. Ο ρυθμός νιτροποίησης είναι μια ευαίσθητη διαδικασία ανάλογα με τη θερμοκρασία, όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο υψηλότερος είναι ο ρυθμός του κύκλου εργασιών.

### 3.5.3. pH –Αλκαλικότητα

Οι απαιτήσεις της ποιότητας του νερού στο RAS θα πρέπει να αντικατοπτρίζουν τις απαιτήσεις των εκτρεφόμενων ειδών. Η σχετική αναλογία αμμωνίας ( $\text{NH}_3$ ) και αμμωνίου ( $\text{NH}_4^+$ ) αλλάζει σε διαφορετικές τιμές pH (Allison & Prosser, 1993). Σε υψηλότερο pH, η συγκέντρωση της  $\text{NH}_3$  αυξάνεται στο νερό. Καθώς η  $\text{NH}_3$  είναι τοξική σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ο έλεγχος του pH είναι ζωτικής σημασίας στη διαχείριση της ποιότητας του νερού στο RAS (Timmons et al., 2009, Colt, 2006). Απαιτείται ουδέτερο pH για να ταιριάζει με τις βέλτιστες απαιτήσεις τόσο για τη νιτροποίηση όσο και για την υγεία / απόδοση των περισσότερων εμπορικών ειδών (Chen et al., 2006). Η μείωση του pH κάτω από 6,8 προκαλεί ανησυχία στα συστήματα που λειτουργούν με θαλασσινό νερό λόγω των σουλφιδίων του σιδήρου, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν τα αυτότροφα βακτήρια και να παράξουν  $\text{H}_2\text{S}$  (υδρόθειο) (Gerardi, 2006). Το υδρόθειο είναι τοξικό για τα ψάρια ακόμη και σε μη ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις.

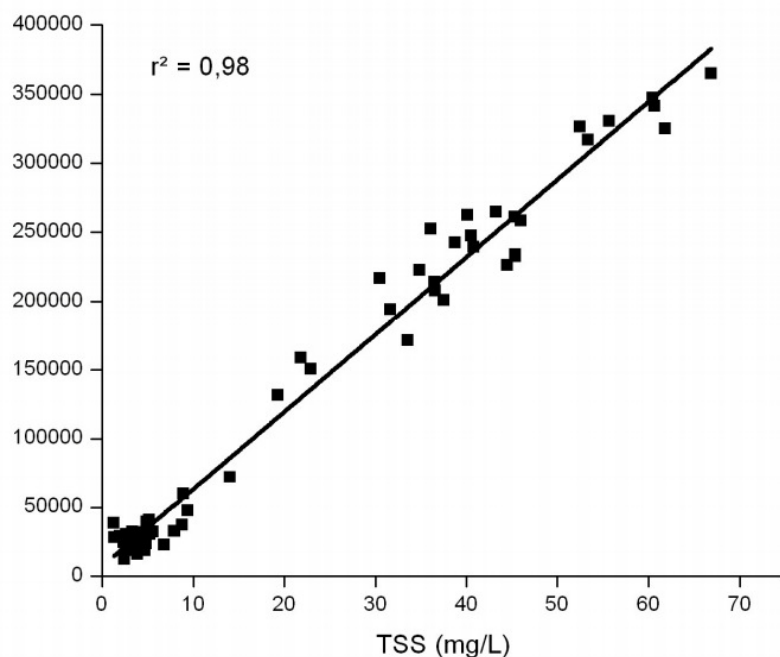
### **3.6.Τεχνικά χαρακτηριστικά ανακυκλούμενων συστημάτων**

Η συσσώρευση των στερεών στο RAS μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της φυσικοχημικής και μικροβιακής ποιότητας του νερού και μπορεί να επηρεάσει την υγεία των εκτρεφόμενων οργανισμών. προκαλώντας σημαντικές επιπτώσεις στην ποιότητα του νερού.

#### **3.6.1. Απομάκρυνση στερεών αποβλήτων**

Η απομάκρυνση των στερεών αποβλήτων είναι υψηλής προτεραιότητας εντός του RAS. Μεγάλα σωματίδια μπορούν να αφαιρεθούν από το RAS με τη χρήση διαφορετικών τεχνολογιών, όπως φίλτρα, υδατοσυλλογές / δεξαμενές καθίζησης, διαχωριστές στροβιλισμού, φίλτρο άμμου κ.λπ. (Timmons et al., 2009). Η επιλεγμένη τεχνολογία για την απομάκρυνση των στερεών καθορίζει το μέγεθος των στερεών που συσσωρεύονται μέσα στο RAS. Τα πιο συνηθισμένα μηχανικά φίλτρα που χρησιμοποιείται είναι τα φίλτρα τυμπάνου (Fernandes et al, 2015). Μικρότερα σωματίδια τείνουν να παραμένουν εντός του συστήματος, συσσωρεύονται με την πάροδο του χρόνου (Chen et al., 1993, Fernandes et al., 2014, 2015, Becke et al., 2017b) και υφίστανται περαιτέρω αποσύνθεση λόγω των δυνάμεων τριβής που αναπτύσσονται όπως για παράδειγμα από τις αντλίες, τη ροή του νερού, τη βιολογική αποσύνθεση (Wold et al., 2014).

Τα αιωρούμενα σωματίδια στο RAS προέρχονται από μεγαλύτερα σωματίδια των ζωοτροφών (Dalsgaard et al.2013, Pedersen et al., 2017). Οι Becke et al. (2017) βρήκαν μια άμεση συσχέτιση μεταξύ των ολικών αιωρούμενων στερεών από την αντίστροφη πλύση του φίλτρου τυμπάνου και τη βακτηριακή δραστηριότητα (Εικ. 7) που υποδηλώνει ότι τα σωματίδια αποικίζονται σε υψηλό βαθμό από βακτήρια δυνητικά, πριν από τον αποικισμό εντός του πεπτικού σωλήνα των ψαριών. Ο χρόνος παραμονής των σωματιδίων στα συστήματα αυξάνει τις αποικίες των βακτηρίων σε ενεργά ή ανενεργά σωματίδια (Pedersen et al., 2017).



Εικόνα 7. Συσχέτιση μεταξύ ολικών αιωρούμενων στερεών που προέρχονται από το φίλτρο τυμπάνου και της βακτηριακής αφθονίας (Πηγή:Rojas-Tirado et al. 2017).

### 3.6.2. Βιοφίλτρο

Οι βακτηριακές κοινότητες των βιολογικών φίλτρων έχουν άμεση και έμμεση επίδραση στην αφθονία των βακτηρίων στην υδατική φάση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αφθονία των ελεύθερων βακτηρίων στο νερό εκτροφής RAS συσχετίζεται με την αφθονία των προσκολλημένων βακτηρίων στα μέσα βιοδιήθησης (Leonard et al., 2000, Michaud et al., 2006). Η διασπορά τους στο βιοφίλμ αποτελεί ένα καλά αναγνωρισμένο φυσικό τρόπο σύνδεσης του τελικού σταδίου ανάπτυξης των βακτηρίων στο βιοφίλμ και περιγράφει τη διαδικασία για τη ρύθμιση του βιοφίλμ (Davies, 2011, McDougald et al, 2012). Υπάρχουν δύο τρόποι διαφυγής από τα βιοφίλμ:

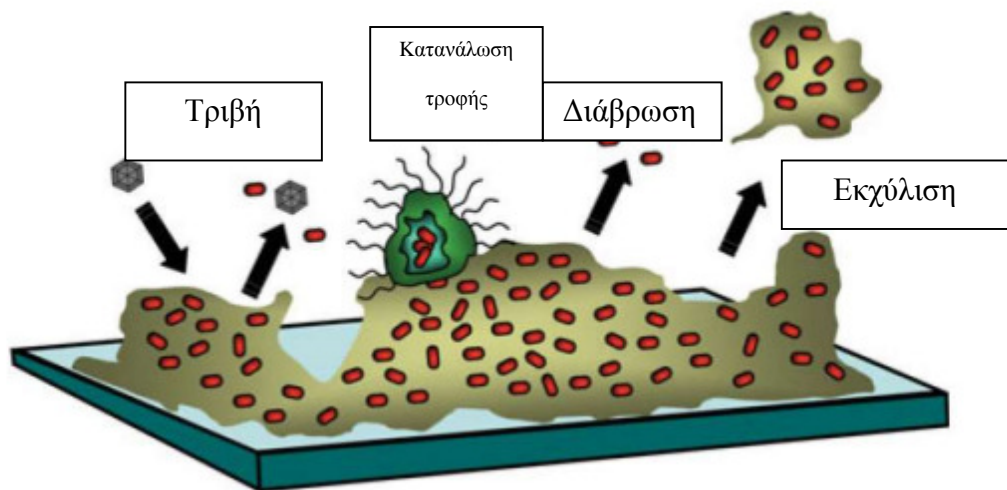
i) Απελευθέρωση μεμονωμένων κυττάρων ή ομάδων από τη διεπαφή με το υγρό μέσο ή από την εξωτερική στοιβάδα που δημιουργείται στο βιοφίλμ. Κύτταρα ή

συστάδες κυττάρων έχουν την δυνατότητα να μεταβαίνουν απευθείας από το βιοφίλμ στο νερό, δράση που ορίζεται ως «απόσπαση».

ii) τα κύτταρα διαφεύγουν από το εσωτερικό του βιοφίλμ όπου δεν έρχονται σε άμεση επαφή με υγρό μέσο (νερό). Στην περίπτωση αυτή τα βακτήρια λειτουργούν διαμέσου των ζωνών που δημιουργούνται (υπερκείμενες ή γειτονικές) συμβάλλοντας στη διαφυγή τους από το βιοφίλμ. Αυτός ο τύπος διαφυγής αναφέρεται ως «διασπορά».

Η απόσπαση των κυττάρων από το βιοφίλμ μπορεί να συμβεί μέσω τεσσάρων διαφορετικών μηχανισμών, όπως για παράδειγμα η τριβή, η της κατανάλωση τροφής , η διάβρωση και η εκχύλιση (Εικ. 8). Με την τριβή απελευθερώνονται κύτταρα από το βιοφίλμ λόγω της σύγκρουσης των μεγάλων σωματιδίων που προέρχονται από το νερό. Αυτός ο τύπος φυσικού διαχωρισμού παρατηρείται στα βιολογικά φίλτρα άμμου και αποτελεί τον βασικό παράγοντα που αποτρέπει τη συσσώρευση βιοφίλμ. με την κατανάλωση τροφής προκαλείται απομάκρυνση από το βιοφίλμ προκαλείται από τη δραστηριότητα διατροφής των οργανισμών υψηλότερου τροφικού επιπέδου.

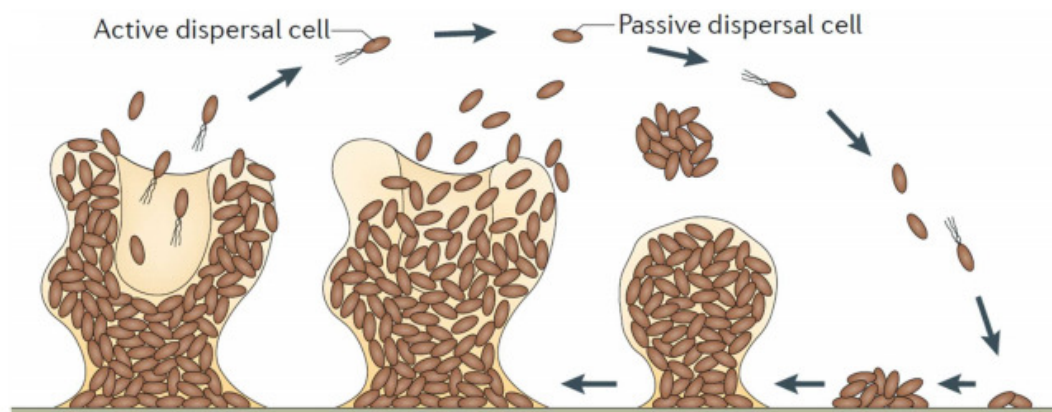
Η διάβρωση είναι η συνεχής απώλεια μικρών τμημάτων του βιοφίλμ λόγω της δύναμης της διάτμησης που παρατηρείται στο υπερκείμενο νερό στο βιολογικό φίλτρο. Η διάβρωση μπορεί επίσης να προκληθεί από τη διάτμηση του αερίου ή των φυσαλίδων αέρα που μεταφέρονται μέσω των στρωμάτων του βιοφίλμ ή προέρχονται από το υγρό. Τέλος, η εκχύλιση (sloughing) είναι το αποτέλεσμα της αφαίρεσης μεγαλύτερων τμημάτων από το βιοφίλμ λόγω π.χ. υγρής διάτμησης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ολόκληρο το βιοφίλμ αποσπάται και εισέρχεται στο υγρό (Davies, 2011).



Εικόνα 8. Μηχανισμοί που επηρεάζουν την απόσπαση τμήματος από το βιοφίλμ: τριβή, κατανάλωση τροφής, διάβρωση και εκχύλιση (Πηγή: McDougald et al., 2012).

Καθώς η απόσπαση περιλαμβάνει απελευθέρωση κυττάρων λόγω φυσικών δυνάμεων, η διασπορά είναι η απελευθέρωση ζώντων βακτηρίων από ένα βιοφίλμ ως αποτέλεσμα φυσιολογικών αποκρίσεων σε εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα. Η διασπορά βακτηριακών κυττάρων από το βιοφίλμ είναι μια διαδικασία σποράς που οδηγεί σε μετατόπιση βακτηριδίων για τον αποικισμό νέων ενδιδαιτημάτων. Η διασπορά μπορεί επίσης να είναι ένας μηχανισμός απόκρισης υπό δυσμενείς συνθήκες, δηλαδή εξάντληση πόρων και ανταγωνισμός (λιμοκτονία), γήρανση / ωρίμανση του βιοφίλμ, παρουσία βακτηριοφάγων ή / και τοξικότητας (Davies, 2011, McDougald et al., 2011). Τα κύρια πλεονεκτήματα που προκύπτουν, είναι η διαθεσιμότητα για αποικισμό ενός μεγαλύτερου εύρους τύπων ενδιδαιτημάτων. Δεύτερον, η διασπορά αποφεύγει την αναπαραγωγή, κυριαρχώντας έτσι την καταλληλότητα και τη δημιουργία ή τη διατήρηση γενετικών παραλλαγών (McDougald et al., 2011). Διασπορά σε έναν ουσιαστικό μηχανισμό εντός του κύκλου ζωής ενός βιοφίλμ (Εικ. 9) όπου η διασπορά των κυττάρων μπορεί να χαρακτηριστεί ως ενεργή ή παθητική. Η ενεργή διασπορά των κυττάρων είναι η φυσιολογική απόκριση των βακτηρίων στο βιοφίλμ σε εξωτερικά / εσωτερικά ερεθίσματα ενώ η παθητική διασπορά λόγω του μηχανισμού αποκόλλησης. Και οι δύο τύποι απόκρισης διασποράς οδηγούν στην απελευθέρωση ελεύθερων ζωντανών

βακτηρίων που μπορεί να υποστούν προσκόλληση και να σχηματίσουν περαιτέρω μικροαποικίες (Davies, 2011, McDougald et al., 2011)



Εικόνα 9. Ο κύκλος ζωής του βιοφίλμ εξετάζει την ενεργό και παθητική διασπορά (Πηγή: McDougald et al., 2011).

Κατά το σχεδιασμό ενός RAS, το βιολογικό φίλτρο έχει διαστάσεις για να υποστηρίξει τη μέγιστη χωρητικότητα ανά ημέρα εντός του κύκλου παραγωγής. Υπό αυτήν την έννοια, αναμένεται ότι ο όγκος δεν αποτελεί πρόβλημα για την ανάπτυξη / αποικία των βακτηρίων, ειδικά όταν η τροφοδοσία του συστήματος γίνεται με ελεγχόμενες συνθήκες. Υπάρχουν τρεις τύποι βιολογικού φίλτρου που χρησιμοποιούνται συνήθως στο RAS, αυτοί είναι: σταθερό φίλτρο σταθερής κλίνης, φίλτρο ρευστοποιημένης κλίνης. Αυτοί οι τύποι βιολογικών φίλτρων μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα και την επιβάρυνση του συστήματος με διαφορετικούς τρόπους.

#### Βιο-φίλτρο σταθερής κλίνης

Τα βιολογικά φίλτρα σταθερής κλίνης γενικά συμβάλλουν στην απομάκρυνση των σωματιδίων παγιδεύοντάς τα, αλλά τα σωματίδια μπορούν επίσης να απελευθερωθούν λόγω παραγόντων όπως η γήρανση του βιοφίλμ. Τα βιολογικά φίλτρα σταθερής κλίνης χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση της βιοαποικοδομήσιμης οργανικής ύλης (Fernandes et al., 2017).

### 3.7. Απολύμανση

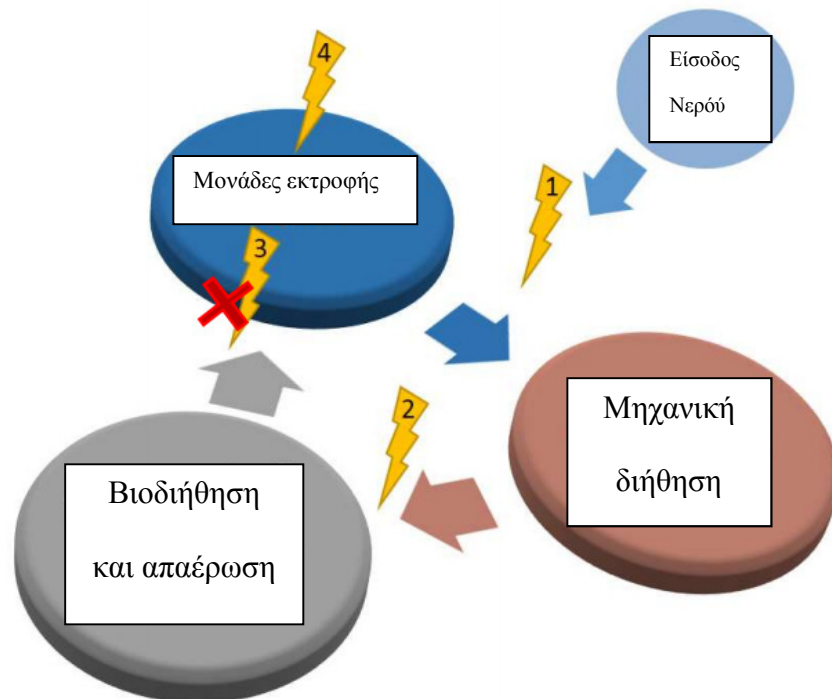
Στα περισσότερα RAS, εφαρμόζονται μόνιμες ή περιοδικές μέθοδοι απολύμανσης του νερού ως μέρος της διαχείρισης συστημάτων ελέγχου ή εξάλειψης παθογόνων οργανισμών (Pedersen et al., 2012a) και για τη βελτίωση της ποιότητας του νερού.

Τα συστήματα ανακυκλοφορίας νερού έχουν καθορισμένη ικανότητα μεταφοράς και υδραυλικό χρόνο παραμονής του νερού στο φίλτρο (Hydraulic retention time) που παρέχει μια σταθερή μικροβιακή διαδοχή με την πάροδο του χρόνου. Αυτό παρέχει τις ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη ειδών βακτηρίων που επιλέγονται από  $k$  και έτσι επιτυγχάνεται ευκολότερη βιολογική σταθεροποίηση. Αυτό, ωστόσο, αμφισβητείται από πρακτικές απολύμανσης, οι οποίες ενδέχεται να αποσταθεροποιούν κατά διαστήματα την ποιότητα των μικροβιακών υδάτων (Attramadal et al., 2012b).

Οι διαδικασίες απολύμανσης στο RAS βασίζονται συχνά σε οξειδωτικούς παράγοντες όπως π.χ. οζονισμός, υπεροξικό οξύ, προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου ή άλλους τύπους απολύμανσης όπως ακτινοβολία UV, η χλωραμίνη - T και η φορμαλίνη (Pedersen et al., 2010, Attramadal et al., 2012b, Pedersen & Pedersen, 2012, Pedersen et al., 2017). Αυτά τα απολυμαντικά μπορούν να δημιουργήσουν αλλαγές στην ποιότητα των μικροβίων λόγω συνδυασμένων επιπτώσεων i) αυξημένης διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και ii) εξάλειψης και / ή απενεργοποίησης βακτηριακών κυττάρων, δημιουργώντας έτσι μια νέα θέση για την ανάπτυξη βακτηρίων (δυναμικό αναγέννησης για r-στρατηγική) (Attramadal et al., 2012b, Prest et al., 2016a).

Η απολύμανση μπορεί να εφαρμοστεί στο RAS σε διαφορετικά σημεία του συστήματος. Παραδοσιακά, το νερό εισαγωγής απολυμαίνεται (σημείο , Εικ. 10) με την εφαρμογή ακτινοβολίας υπεριώδους ακτινοβολίας προκειμένου να αποφευχθεί η είσοδος πιθανών παθογόνων οργανισμών από την εξωτερική πηγή του νερού (Timmons et al., 2009). Η απολύμανση μπορεί να εφαρμοστεί πριν το νερό εισέλθει στο βιολογικό φίλτρο με τη χρήση υπεριώδους ή οζονισμού (Attramadal et al., 2012b). Η απολύμανση πριν από το βιολογικό φίλτρο επιτρέπει στη βακτηριακή κοινότητα μέσα στο βιολογικό φίλτρο να αντιμετωπίσει τον διαθέσιμο ενεργό παράγοντα (σημείο 2, Εικ.10). Η απολύμανση πριν από τις δεξαμενές εκτροφής

(σημείο 3, Εικ. 10) έχει αποδειχθεί ότι επιλέγει ενδεχομένως για ευκαιριακά βακτήρια στις μονάδες εκτροφής. Τέλος, η απολύμανση απευθείας στις δεξαμενές εκτροφής γίνεται με την προσθήκη θεραπευτικών παραγόντων (π.χ. υπεροξικό οξύ, υπεροξείδιο του υδρογόνου, φορμαλίνη και χλωραμίνη-T) απευθείας στις μονάδες εκτροφής για την άμεση αντιμετώπιση των εκτρεφόμενων ειδών (σημείο 4, Εικ. 10) (Pedersen et al., 2012, Pedersen & Pedersen, 2012, Pedersen et al., 2017).

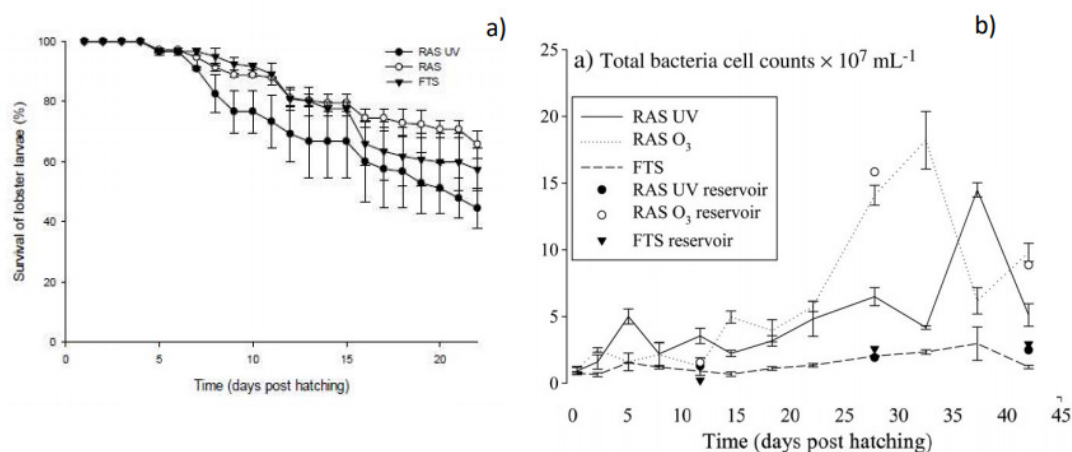


Εικόνα 10. Διαδικασία πολύμανσης στο RAS, όταν εφαρμόζεται σε διαφορετικά σημεία του συστήματος RAS: 1) σημείο εισόδου νερού στο σύστημα, 2) πριν από το βιολογικό φίλτρο, 3) πριν από δεξαμενές εκτροφής και 4) δεξαμενές εκτροφής (Πηγή: Rojas-Tirado et. al. 2017).



Η απολύμανση πριν από τις δεξαμενές εκτροφής έχει αποδειχθεί ανεπαρκής και μη αποτελεσματική. Οι Rojas-Tirado et. al. 2017 αναφέρουν ότι η απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία πριν το νερό εισέλθει στις δεξαμενές εκτροφής ενός RAS σε προνύμφες αστακού, η οποία είχε ως αποτέλεσμα τη χαμηλότερη επιβίωση στις προνύμφες σε σύγκριση με ένα σύστημα κλειστό RAS χωρίς να γίνεται απολύμανση σ' ένα σύστημα ροής (Εικ. 11α). Επιπλέον, η εκτίμηση της βακτηριακής αφθονίας έδειξε ότι στο RAS χωρίς απολύμανση είχε μεγαλύτερη ποικιλία σε σύγκριση με τα συστήματα RAS που δεν απολυμαίνονται. Σύμφωνα με μελέτες η απολύμανση επηρεάζει τον επανακαθορισμό του μικροβιώματος στο νερό και επομένως τη μικροβιακή κοινότητα.

Οι Attramadal et al. (2012b), αναφέρουν ότι ο επαναποικισμός και η ανάπτυξη της μικροβιακής κοινότητας σε θαλάσσιες προνύμφες που εκτρέφονται σε σύστημα RAS επηρεάστηκε κατά την εφαρμογή απολύμανσης με υπεριώδη ακτινοβολία και όζον (και οι δύο μονάδες απολύμανσης τοποθετήθηκαν πριν από το βιολογικό φίλτρο). Η αφθονία των βακτηρίων στα συστήματα που εφαρμόζεται απολύμανση παρουσιάζουν διαφορές, υποδηλώνοντας ότι η διαφορά μεταξύ της μικροβιακής αφθονίας και των κοινοτήτων οφείλεται στη διατάραξη της ισοροπίας της φέρουσας ικανότητας του φίλτρου και της συγκέντρωσης των βακτηρίων που ανταγωνίζονται ώστε να αυξηθούν σε αριθμό στο υπόστρωμα (υλικό πλήρωσης του φίλτρου).



Εικόνα 11. Επίδραση της απολύμανσης στην επιβίωση των προνυμφών αστακού που εκτρέφονται στο RAS με UV πριν το νερό εισέλθει στις δεξαμενές εκτροφής (Øien, 2014). β) επίδραση της απολύμανσης στην μικροβιακή αφθονία των προνυμφών αστακού που εκτρέφονται στο RAS (Attramadal et al., 2012b)

Οι συνιστώμενες συγκεντρώσεις των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της θεραπείας στο σύστημα RAS, θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη την απόδοση του βιολογικού φίλτρου και συνεπώς ενδέχεται να μην επαρκούν για την απομάκρυνση όλων των παθογόνων οργανισμών από το νερό και να διαταράξουν την ισορροπία του βακτηριακού πληθυσμού. Σε μονάδες εκτροφής σε συστήματα RAS στη Δανία, η εφαρμογή αυτών των χημικών απολύμανσης χρησιμοποιείται ευρέως, αλλά η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας αυτών των θεραπειών βασίζεται συχνά σε παρατήρηση σχετικά με την ποιότητα του νερού και στις βελτιώσεις στην υγεία των ψαριών. Οι επιπτώσεις της χημικής απολύμανσης στην ποιότητα του νερού στο RAS θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα του βιολογικού φίλτρου.

### **3.8. Τεχνικές διαχείρισης Βακτηρίων στα ανακυκλούμενα συστήματα εκτροφής**

Τα συστήματα επανακυκλοφορίας νερού είναι πολύπλοκα και διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά την αφθονία και τη σύνθεση των βακτηρίων (Blancheton et al., 2013). Η λειτουργία ενός συστήματος RAS απαιτεί γνώση και εμπειρία, καλή ικανότητα παρατήρησης και έλεγχο διαχείρισης των εργασιών. Για τη διατήρηση της ποιότητας του νερού σε ό, τι αφορά τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών και την αφθονία των βακτηρίων μπορούν να εφαρμοστούν διαφορετικές στρατηγικές.

#### **Εκκίνηση σε RAS**

Η εκκίνηση της λειτουργίας ενός συστήματος RAS είναι σημαντική λόγω της ιδιαιτερότητας που παρουσιάζει η ρύθμιση του συστήματος ως προς την ανάπτυξη των νιτροποιητικών βακτηρίων τα οποία χρησιμοποιούνται στην όξείδωση της τοξικής αμμωνίας σε με τοξικά νιτρικά ιόντα. Ο έλεγχος της ρύθισης και της ισορροπίας του συστήματος θα πρέπει να πραγματοποιείται με καθημερινές μετρήσεις της TAN (ολικής αμμωνίας), και των αζωτούχων παραγώγων των νιτρωδών και νιτρικών ιόντων ώστε να μπορεί να προσδιοριστεί η εκκίνηση της

διαδικασίας νιτροποίησης στο βιολογικό φίλτρο. Η προσθήκη  $\text{NH}_4\text{Cl}$  μπορεί να γίνει πριν από την εισαγωγή ψαριών προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος ανάπτυξης της αφθονίας του βακτηριακού πληθυσμού, επιταχύνοντας με τον τρόπο αυτό την ωρίμανση του βιολογικού φίλτρου (Rojas-Tirado et.al. 2017).

### **Διαχείριση ποιότητας νερού**

Η παρακολούθηση και η διαχείριση της ποιότητας του νερού είναι ζωτικής σημασίας για το σύστημα RAS, επηρεάζοντας την ανάπτυξη των ειδών που εκτρέφονται στο σύστημα. Η βέλτιστη λειτουργία του συστήματος RAS επιτυγχάνεται διαμέσου της ρύθμισης και ισορροπίας του φίλτρου λαμβάνοντας υπόψη τις βέλτιστες τιμές για την ποιότητα του νερού για το κάθε ζωικό οργανισμό που εκτρέφεται στο σύστημα RAS. Μεταβολές στο pH (και επομένως στην αλκαλικότητα), στον κορεσμό του οξυγόνου ή στην αλατότητα θα αποσταθεροποιήσει την αφθονία των βακτηρίων στο βιολογικό φίλτρο και κατ' επέκταση στο νερό.

### **Πρακτικές συντήρησης**

Οι πρακτικές συντήρησης που εφαρμόζονται στα συστήματα RAS, επιδρούν στη διατήρηση της ποιότητας του νερού περιορίζοντας τη μεταβολή στα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Η γρήγορη απομάκρυνση των άρρωστων ή νεκρών ψαριών, καθώς και των υπολειμάτων των τροφών, μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης δυνητικά παθογόνων βακτηρίων. Για παράδειγμα, ο έγκαιρος καθαρισμός (backwash) του βιολογικού φίλτρου διασφαλίζει την βέλτιστη λειτουργία στο σύστημα και εξασφαλίζει τη βέλτιστη απόδοση του φίλτρου που υπάρχουν στο σύστημα RAS.

Η ανάπτυξη βιοφίλμ σε επιφάνειες, δηλαδή σωλήνες και δεξαμενές, μπορεί να δημιουργήσει μακροπρόθεσμες βλάβες για ένα RAS και να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτες πηγές οργανικής ύλης και περιορισμένη μικροβιακή κοινότητα.

### *Αξιολόγηση ποιότητας νερού*

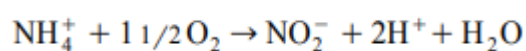
Για να εκτιμηθούν οι αλλαγές στην αφθονία των βακτηρίων, το πρώτο βήμα είναι να καθορισθεί ένα πρωτόκολλο τυποποιημένων μετρήσεων όπως για παράδειγμα μετρήσεις θολότητας χρησιμοποιώντας το δίσκο του secchi για μεγάλο χρονικό διάστημα (Besmer & Hammes, 2016). Απαιτείται η εφαρμογή και τήρηση αξιόπιστων μεθοδολογιών ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση της απολύμανσης στη βελτιστοποίηση της ποιότητας του νερού στο σύστημα.

## Κεφάλαιο 4.

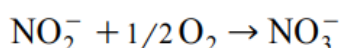
### Νιτροποιητική ικανότητα ανακυκλούμενου συστήματος εκτροφής

#### 4.1. Εννοιολογικό περιεχόμενο Νιτροποίησης

Η νιτροποίηση είναι η διαδοχική οξείδωση της αμμωνίας σε νιτρικά ιόντα και λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Η διαδικασία πραγματοποιείται με δύο γένη βακτηρίων, τα *Nitrosomonas sp.*, και τα *Nitrobacter sp.*, τα οποία οξειδώνουν διαδοχικά την αμμωνία σε νιτρώδη και νιτρικά ιόντα σύμφωνα με τις αντιδράσεις που περιγράφονται παρακάτω. Τα νιτροποιητικά βακτήρια είναι είναι αυτότροφοι οργανισμοί χημειοτροφικοί κατά gram, με μεγάλους χρόνους γενιάς (20 έως 40 ώρες).



και



Έτσι, απαιτούνται δύο γραμμομόρια οξυγόνου για κάθε γραμμομόριο  $\text{NH}_4^+$ .

Τα βακτήρια αυτά λαμβάνουν ενέργεια από την οξείδωση των  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{NO}_2^-$ . Η διαφορά θερμικού δυναμικού ( $\Delta G$ ) που προκύπτει από την οξείδωση του  $\text{NH}_4^+$  είναι περίπου  $-65 \text{ kcal mole}^{-1}$ , και από την οξείδωση των  $\text{NO}_2^-$  είναι περίπου  $-18 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Συνεπώς, θα πρέπει να οξειδωθεί περισσότερο από τρεις φορές από την οξείδωση των  $\text{NO}_2^-$  για να υποστηρίξει μια ισοδύναμη ανάπτυξη μικροβίων με αυτήν που προέρχεται από την οξείδωση του  $\text{NH}_4^+$ . Ο ρυθμός νιτροποίησης σε ιζήματα εκβολών κυμαίνονται από 15 έως 25  $\text{mg N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  και είναι πιθανώς αντιπροσωπευτικοί σε σχέση με τα ιζήματα που λαμβάνονται από τις φυσικές υδατοσυλλογές (Πίν.1).

Υποθέτοντας ότι 5 έως 10% του οξυγόνου χρησιμοποιείται για νιτροποίηση τότε περίπου 25 έως 50  $\text{mg N m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  οξειδώνεται, που ισοδυναμεί με 5 έως 10% της ημερήσιας εισόδου N στο σύστημα. Το μέγεθος της νιτροποίησης είναι σχετικά μικρό σε σχέση με το ρυθμό N που παράγεται άλλες μορφές αζώτου που προκύπτουν κατά τη διάρκεια του κύκλου παραγωγής. Ο ρυθμός νιτροποίησης αυξάνεται μόνο κατά τη διάρκεια μεταξύ των κύκλων καλλιέργειας όταν τα εδάφη της υδατοσυλλογής

αερίζονται καθώς στεγνώνουν. Η νιτροποίηση επηρεάζεται από τη συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση υποστρώματος, το pH, τον αριθμό των βακτηρίων νιτροποίησης και τη διαθεσιμότητα επιφανειών. Πολλοί από αυτούς τους παράγοντες είναι αλληλένδετοι επηρεάζοντας τη διεργασία της νιτροποίησης.

Τα βακτηρίδια νιτροποίησης απαιτούν οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας από μειωμένο N. Η  $K_m$  για το οξυγόνο κυμαίνεται από 0,3 έως 0,9 mg l<sup>-1</sup> και σχετίζεται άμεσα με τη θερμοκρασία. Το  $K_m$  για το οξυγόνο είναι υψηλότερο για τα βακτήρια Nitrobacter σε σχέση με τα βακτήρια Nitrosomonas στους 30 °C, γεγονός που υποδηλώνει ότι η οξείδωση των νιτρωδών ιόντων είναι πιο ευαίσθητη σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και υψηλή θερμοκρασία. Διατηρώντας τις συνθήκες εκτροφής σε σταθερά επίπεδα ο ρυθμός νιτροποίησης θα διατηρείται σε σταθερά επίπεδα και θα είναι επαρκής σε συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου μεγαλύτερες από 2 mg l<sup>-1</sup>.

Πίνακας 1. Ρυθμός νιτροποίησης σε  $\text{mg N m}^{-2} \text{d}^{-1}$  σε συστήματα θαλάσσιων και γλυκών υδάτων.

Nitrification rate	Refs.	Location/Comments
0	Blackburn et al., 1988	tropical marine fish pond
0.4–0.9 (mean = 0.5)	Acosta-Nassar et al., 1994	tropical freshwater fish pond
1–35	Riise and Roos, 1997	polyculture fish pond, Thailand
0–42	Henriksen, 1980	Danish coast
4–18	Henriksen et al., 1981	Danish coast
3–48	Billen, 1978	Belgian coast (North Sea)
11	Blackburn and Henriksen, 1983	Danish coast
11	Lindau et al., 1988b	rice soil
13	DeLaune and Lindau, 1989	Lac des Allemands, LA
15		Little Lake, LA
	Henriksen et al., 1980	Danish coast
16		without fauna
28–35		with fauna
7–37 (mean = 20)	Hansen et al., 1981	Danish coast
7–45 (mean = 20)	MacFarlane and Herbert, 1984	Scottish estuary
8–34 (mean = 22)	Nishio et al., 1983	Japanese coast
24	Boynton et al., 1980	Patuxent River estuary
26–30	Jenkins and Kemp, 1984	Patuxent River estuary
30	DeLaune and Smith, 1987	Lake Verret, LA
7–45 (mean = 39)	Seitzinger et al., 1984	Narragansett Bay
27–67 (mean = 45)	Koike and Hattori, 1978	Japanese coast
59–76	Jensen et al., 1994	freshwater lake sediment
	Chaterpaul et al., 1980	freshwater stream sediment
29		without fauna
69		with fauna
63	Vanderborght et al., 1977	Belgian coast (North Sea)
67	Rysgaard et al., 1994	freshwater lake sediment
60–152	DeLaune et al., 1991	Calcasieu River, LA

Το οξυγόνο που καταναλώνουν τα νιτροποιητικά βακτήρια είναι αρκετές τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο από εκείνο των ετερότροφων αερόβιων βακτηρίων, υποδηλώνοντας ότι τα ετερότροφα βακτήρια είναι ανταγωνιστικά από τα βακτήρια νιτροποίησης σε χαμηλές συγκέντρωσεις οξυγόνου.

Το οξυγόνο στο ίζημα είναι ένας βασικός παράγοντας που ρυθμίζει τη διαδικασία νιτροποίηση, εξαρτάται από το βάθος το οποίο είναι συνήθως της τάξης των 1 έως 5 mm και σχετίζεται αντιστρόφως με τη θερμοκρασία. Η νιτροποίηση αυξάνεται σε σχέση με τη θερμοκρασία, ο όγκος των ιζημάτων που εμπλέκονται στη νιτροποίηση περιορίζεται από το βάθος της διείσδυσης οξυγόνου, το οποίο ασκεί έλεγχο στο συνολικό ρυθμό νιτροποίησης. Το δυναμικό νιτροποίησης αποδείχθηκε σε μειωμένο ίζημα βάθους 6 έως 8 cm, δείχνοντας την ικανότητα των βακτηρίων νιτροποίησης να επιβιώσουν σε αναερόβια περιβάλλοντα, αν και η πραγματική

νιτροποίηση περιορίστηκε στην επιφάνεια του ιζήματος. Τα νιτροποιητικά βακτήρια σε στρώματα ανοξικών ιζημάτων θα αυξηθούν γρήγορα εντός ωρών σε απόκριση στην έκθεση σε οξυγόνο σε υπερκείμενο νερό. Το δυναμικό νιτροποίησης ήταν ελάχιστο κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, που συμπίπτει με την ελάχιστη διείσδυση οξυγόνου ιζημάτων. Το βάθος διείσδυσης του οξυγόνου, και κατά συνέπεια ο ρυθμός νιτροποίησης, σχετίζεται επίσης αντίστροφα με την καθίζηση της οργανικής ύλης, η οποία είναι μέγιστη στους θερμότερους μήνες.

Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας για την ανάπτυξη καθαρών καλλιεργειών βακτηριδίων νιτροποίησης κυμαίνεται από 25 έως 35°C. Το  $Q_{10}$  της νιτροποίησης κυμαίνεται από 1,7 έως 3,3 μεταξύ 20 και 30°C. Τα κύρια γένη βακτηρίων νιτροποίησης παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία ανάλογα με τη θερμοκρασία, που έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνει την ευαισθησία οξείδωσης των νιτρικών ιόντων ιδιαίτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε τιμές pH εκτός του βέλτιστου εύρους.

Οι περιβαλλοντικές και κλιματολογικές συνθήκες ασκούν έντονες πιέσεις επηρεάζοντας τους βακτηριακούς νιτροποιητικούς πληθυσμούς και ως εκ τούτου σύμφωνα με εργαστηριακές μελέτες χρησιμοποιούνται βακτηριακοί πληθυσμοί που προέρχονται από καθαρές καλλιέργειες προκειμένου να εμπολισθεί το φίλτρο και να ωριμάσει ταχύτερα. Ο ρυθμός νιτροποίησης επηρεάζεται από τον τύπο του υποστρώματος (υλικό πλήρωσης φίλτρου). Στα ιζήματα που προέρχονται από την υδατοκαλλιέργεια, η αμμωνία παράγεται διαμέσου της ανοργανοποίησης του οργανικού N στο ίζημα, της διεπαφής με το νερό, της διάχυσης της αμμωνίας και από το περιβάλλον της καλλιέργειας.

Η σταθερά Km για υποστρώματα ανάπτυξης βακτηρίων με θερμοκρασία 20 έως 32°C κυμαίνεται από 1 έως 10 mg N l<sup>-1</sup> για οξείδωση αμμωνίας και από 5 έως 9 mg N l<sup>-1</sup> για οξείδωση των νιτρικών ιόντων. Οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας σε υδατοσυλλογές είναι συνήθως < 3 mg N l<sup>-1</sup> και οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εμφανίζονται κατά τη διάρκεια του χειμώνα όταν η βιομάζα φυτοπλαγκτού είναι ελάχιστη. Οι συγκεντρώσεις νιτρικών ιόντων για εκτροφή γατόψαρου είναι συνήθως < 0,2 mg N l<sup>-1</sup> με εποχικά μέγιστα την άνοιξη και το φθινόπωρο. Χαμηλές συγκεντρώσεις στο νερό επιβάλλουν περιορισμό χρήσης του υποστρώματος νιτροποίησης σε υδατοσυλλογές, υποδηλώνοντας ότι η κινητική της αντίδρασης νιτροποίησης είναι πρώτης τάξης σε σχέση με τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

Τα βακτηρίδια νιτροποίησης απαιτούν ελαφρώς αλκαλικό pH που κυμαίνεται από 7 έως 8,5 για βέλτιστη ανάπτυξη. Σε pH > 8,5, τα βακτήρια Nitrobacter μπορεί



να αναστείλουν περισσότερο την ανάπτυξή τους σε σχέση με τα Nitrosomonas, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση νιτροδών ιόντων. Αυξημένη νιτροποιητική ικανότητα σε αλκαλικό pH υποδηλώνει ότι η  $\text{NH}_3$  είναι στη βασική της μορφή για νιτροποίηση. Επίσης, η ενοποιημένη αμμωνία αναστέλλει την οξείδωση των νιτροδών ιόντων σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0,1 έως 1,0 mg  $\text{NH}_3\text{-N l}^{-1}$ . Τέλος, το pH είναι σημαντικό επειδή δύο ιόντα υδρογόνου απελευθερώνονται για κάθε γραμμομόριο οξειδωμένης αμμωνίας. Τα φυσικά νερά συνήθως περιέχουν επαρκή αλκαλικότητα για να ρυθμίσουν την αύξηση της συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου από νιτροποίηση.

Οι νιτροποιητές είναι λιθοτροφικοί, απαιτώντας οργανικές ή μεταλλικές επιφάνειες για προσκόλληση. Η πυκνότητα των νιτροποιητών στο έδαφος στην επιφάνεια του ιζήματος είναι περίπου τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη από εκείνη στη στήλη νερού. Η αφθονία οξειδωτικών αμμωνίας στο ίζημα είναι μεγαλύτερη από αυτήν των οξειδωτικών νιτροδών. Η επιφάνεια ιζημάτων είναι ο τόπος ανοργανοποίησης σωματιδιακής οργανικής ύλης που καθιζάνει από τη στήλη νερού. Επιπλέον, το αμμώνιο μπορεί να συγκεντρωθεί σε μάζες ιζήματος ως μέρος του συμπλόκου ανταλλαγής κατιόντων. Ο συναγωνισμός για επιφάνειες μεταξύ ετεροτροφικών και νιτροποιητικών βακτηρίων μπορεί να συμβάλει στον περιορισμό της πυκνότητας πληθυσμού της τελευταίας ομάδας.

Η νιτροποίηση στη διεπαφή ιζήματος-νερού είναι πιο σημαντική από την νιτροποίηση στη στήλη νερού σε στρωματοποιημένες ή περιοδικά μικτές δεξαμενές ψαριών. Η νιτροποίηση στη στήλη νερού περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα επιφανειών και πιθανώς από την αναστολή του φωτός. Η νιτροποίηση μπορεί να αυξηθεί προσωρινά μετά από πτώσεις φυτοπλαγκτού σε απόκριση σε αυξημένη συγκέντρωση αμμωνίας. Η νιτροποίηση στήλης νερού είναι ένας σημαντικός μηχανισμός μετασχηματισμού αμμωνίας σε συστήματα λίμνης υψηλής έντασης στα οποία σωματίδια που αιωρούνται με μηχανικό αερισμό είναι θέσεις ενεργού ανοργανοποίησης και νιτροποίησης.

Σε πλημμυρισμένα εδάφη, η νιτροποίηση και η απονιτροποίηση συνδέονται άμεσα. Ένα μοντέλο δύο επιπέδων έχει αναπτυχθεί για να περιγράψει την αλληλεξάρτηση αυτών των δύο διαδικασιών. Με το μοντέλο δύο στρωμάτων, η αμμωνία διαχέεται από το μειωμένο στρώμα ιζήματος κατά μήκος μιας κλίσης συγκέντρωσης στην επιφάνεια, όπου οξειδώνεται από βακτηρίδια νιτροποίησης. Το νιτρικό άλας διαχέεται σε απόκριση μίας βαθμίδας συγκέντρωσης στο στρώμα μειωμένου ιζήματος, όπου απονιτροποιείται σε αέριο δινιτρογόνου που εκλύεται στην

ατμόσφαιρα μέσω εκροής αερίου. Έτσι, αν και το οξυγόνο αναστέλλει την απονιτροποίηση, η αντίδραση απαιτεί έμμεσα οξυγόνο για την παραγωγή νιτρικών.

Μια συμπληρωματική θεωρία έχει αναπτυχθεί για να εξηγήσει την φαινομενικά αντιφατική συνύπαρξη των τοξικών και των ανοξικών διεργασιών σε ένα τοξικό περιβάλλον. Μελέτες έδειξαν ότι αιωρούμενα σωματίδια από 100 μm έως αρκετά mm μπορεί να δημιουργούν ανοξικές συνθήκες. Οι Rojas-Tirado et. al. (2017) υποστήριξαν ότι ο υπολογισμός διάχυσης νιτρικών υποδηλώνει ότι η απονιτροποίηση πρέπει να συνδέεται στενά με την νιτροποίηση και να εμφανίζεται σε μικροπεριοχές εντός της οξειδωμένης στιβάδας της επιφάνειας του ιζήματος εναπόθεσης. Οι περιοχές αυτές εξαρτώνται από το ρυθμό κατανάλωσης οξυγόνου, το ρυθμό διάχυσης του οξυγόνου και το σχήμα των σωματιδίων.

Το πρότυπο νιτροποίησης μετά τον καθορισμό ευνοϊκών συνθηκών για την ανάπτυξη της διαδικασίας χαρακτηρίζεται από την ταχεία οξείδωση της αμμωνίας, και συσσώρευση νιτρώδων ιόντων. Η ερμηνεία της ανάλυσης παραγόντων των δεδομένων έδειξε ότι η οξυγόνωση του ιζήματος της λάσπης είναι ο σημαντικός ρυθμιστής της βιοχημικής διεργασίας της νιτροποίησης (Rojas-Tirado et. al. 2017).

Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, η νιτροποίηση σε ιζήματα περιορίζεται πιθανότατα από το βάθος διείσδυσης του οξυγόνου που κυμαίνεται από 1 έως 5 mm. Στα ιζήματα εκβολών, η θερινή μείωση του ρυθμού νιτροποίησης έχει αποδοθεί στην περιορισμένη διάχυση του οξυγόνου στο ίζημα. Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, ο ρυθμός εναπόθεσης της οργανικής ύλης αυξάνει εξαιτίας των μέγιστων ποσοστών υπολλειμάτων τροφής και περττωμάτων που εναποτίθενται και των μέγιστων εποχιακών θερμοκρασιών που παρατηρούνται.

Η αποσύνθεση της οργανικής ύλης που έχει κατατεθεί πρόσφατα από μεγάλους και ενεργούς πληθυσμούς αερόβιων, ετερότροφων βακτηρίων περιορίζει τη διάχυση του οξυγόνου στο ίζημα. Παρόλο που η λειτουργία των αεραντλιών μπορεί να αποτρέψει τη μείωση του διαλυμένου οξυγόνου σε συγκεντρώσεις  $< 2 \text{ mg l}^{-1}$ , είναι πιθανό ένα στρώμα βενθικού οριακού στρώματος εξαντλημένο από διαλυμένο οξυγόνο να αναπτύσσεται στη διεπαφή ιζήματος-νερού το καλοκαίρι.

Η ανάδευση ιζημάτων μέσω αερισμού μπορεί να αυξήσει το βάθος διάχυσης του οξυγόνου. Στο στήλη του νερού, η νιτροποίηση είναι χαμηλή επειδή η αμμωνία υπάρχει σε συγκεντρώσεις που περιορίζουν το υπόστρωμα λόγω της ταχείας πρόσληψης από μεγάλους και ενεργά αναπτυσσόμενους φυτοπλαγκτονικών πληθυσμών. Καθώς η θερμοκρασία μειώνεται η συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου

στη στήλη του νερού αυξάνεται λόγω του μειωμένου ρυθμού παροχής, της αναπνοής και της αυξημένης διαλυτότητας του οξυγόνου (Rojas-Tirado et. al. 2017).

Ο ρυθμός νιτροποίησης μειώνεται κατά τη διάρκεια του χειμώνα λόγω των εποχιακά ελάχιστων θερμοκρασιών που παρουσιάζονται. Την άνοιξη, καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, το οργανικό N που συσσωρεύεται μεταλλοποιείται γρήγορα σε αμμωνία και ο ρυθμός νιτροποίησης αυξάνει, προκαλώντας μια άλλη απότομη αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών στη στήλη του νερού. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται περαιτέρω, μειώνεται το διαλυμένο οξυγόνο στη στήλη νερού, με αποτέλεσμα να μειώνονται η διάχυση του οξυγόνου και ο ρυθμός νιτροποίησης.

Συνοπτικά, η αλληλεπίδραση μεταξύ θερμοκρασίας και βάθους διάχυσης του οξυγόνου στο ίζημα επηρεάζει την νιτροποιητική ικανότητα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ θερμοκρασίας και συγκέντρωσης υποστρώματος ελέγχει τη νιτροποίηση στη στήλη του νερού. Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού η νιτροποίηση ελέγχεται (περιορίζεται) από τη διάχυση του οξυγόνου στο ίζημα και τις χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος στη στήλη νερού, παρά τις εποχικά μέγιστες θερμοκρασίες. Κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, ο έλεγχος της νιτροποίησης μετατοπίζεται από τη διεύδυση οξυγόνου ή τη συγκέντρωση υποστρώματος (στη στήλη νερού) στη θερμοκρασία. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα, η χαμηλή θερμοκρασία περιορίζει το ρυθμό νιτροποίησης. Κατά τη διάρκεια της άνοιξης, ο ρυθμός της νιτροποίησης μεταβάλλεται εξαιτίας της θερμοκρασίας και του ρυθμού διάχυσης του οξυγόνου στο ίζημα (Rojas-Tirado et. al. 2017).

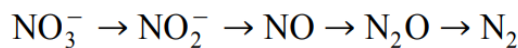
#### **4.2. Απορρόφηση αμμωνίου**

Το αμμώνιο προσροφάτε σε αρνητικά φορτισμένες περιοχές ανταλλαγής κατιόντων στην επιφάνεια των αργιλικών ορυκτών ή στο ίζημα της οργανικής ύλης. Οι Rojas-Tirado et. al. 2017 αναφέρουν ότι περίπου το 2% του N που παρέχεται σε ψάρια γλυκού νερού, προήλθε από την ανοργανοποίηση του αζώτου ή από άλλα οργανικά υλικά. Το προσροφημένο αμμώνιο και η αμμωνία βρίσκονται σε ισορροπία, οπότε το προφίλ του προσροφημένου αμμωνίου και της αμμωνίας από το νερό είναι παρόμοια. Ο λόγος προσρόφησης μεταβάλλεται, και λαμβάνει τιμές μεγαλύτερες του 1.

Ομοίως, ο ρυθμός απελευθέρωσης της αμμωνίας σε ιζήματα και κυμαίνονταν από 67 έως 85 mg N<sup>-1</sup> m<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (Rojas-Tirado et. al. 2017)

### 4.3. Μείωση Νιτρικών

Τα νιτρικά ιόντα είναι το τελικό προϊόν που προκύπτουν κατά την βιοχημική διεργασία της νιτροποίησης. Τα φυτά και τα βακτήρια συμβάλλουν στη μείωση των νιτρικών ιόντων διαμέσου διαδοχικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα παράγοντας αέριο άζωτο εξαιτίας του αναγωγικού περιβάλλοντος που δημιουργείται. Τα νιτρικά ιόντα χαρακτηρίζονται ως δέκτης ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση της οργανικής ύλης και έτσι παρέχει ενέργεια για μικροβιακή ανάπτυξη. Τα νιτρικά ανάγονται νιτρώδη ιόντα και σε οξειδίο του αζώτου και υποοξειδίο του αζώτου ή αέριο άζωτο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το οξυγόνο χαρακτηρίζεται ως δέκτης ηλεκτρονίων για την οξείδωση της οργανικής ύλης. Ωστόσο, όταν η συγκέντρωση οξυγόνου μειώνεται, τα ετερότροφα βακτήρια ενεργοποιούνται. Η ενεργειακή απόδοση από την οξείδωση του οργανικού άνθρακα από τα νιτρικά ιόντα είναι ελαφρώς μικρότερη από αυτήν του οξυγόνου (Gerardi 2006).

Σε αντίθεση με τον περιορισμένο αριθμό ειδών βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για τη νιτροποίηση, τουλάχιστον 14 γένη βακτηρίων συμβάλλουν στη μείωση των νιτρικών ιόντων. Τα κυριότερα γένη είναι *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp* και *Alcaligenes sp*. Επίσης, η ανάπτυξη, η δραστηριότητα και η πυκνότητα του πληθυσμού των βακτηρίων απονιτροποίησης είναι μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη των βακτηρίων νιτροποίησης. Τα περισσότερα βακτηρίδια απονιτροποίησης είναι αναερόβια, παρόλο που η απονιτροποίηση αναστέλλεται από την παρουσία οξυγόνου, η αντίδραση λαμβάνει χώρα κυρίως κοντά στην επιφάνεια του ιζήματος εναπόθεσης, δημιουργώντας μειωμένες υποξικές μικροζώνες-περιοχές στο επιφανειακό υπόστρωμα του ιζήματος εναπόθεσης.

Ο ρυθμός απονιτροποίησης εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη συγκεντρώση νιτρικών ιόντων, τον οργανικό άνθρακα και το οξυγόνο και από την πυκνότητα πληθυσμού των βακτηρίων απονιτροποίησης. Τα ποσοστά απονιτροποίησης

αυξάνονται με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Ωστόσο, οι ρυθμοί απονιτροποίησης στα περισσότερα φυσικά υδρόβια συστήματα είναι πρώτης τάξεως σε σχέση με τη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων και μπορεί να θεωρηθεί περιορισμένο υπόστρωμα. Στις δεξαμενές εκτροφής, τα νιτρικά ιόντα είναι  $<0,5 \text{ mg N l}^{-1}$ . Οι συγκεντρώσεις των νιτρικών ιόντων σε συστήματα με αυξημένη θερμοκρασία είναι μέγιστες κατά τη διάρκεια του χειμώνα, όταν το φυτοπλαγκτόν είναι ελάχιστο (Rojas-Tirado et. al. 2017).

Οι κινητικές σταθερές ποικίλλουν ανάλογα με τον διαθέσιμο άνθρακα. Οι αναφερόμενες τιμές Km κυμαίνονται από 0,1 έως  $170 \text{ mg N l}^{-1}$  και αυξάνονται σε άμεση σχέση με τον άνθρακα. Σε ένα μοντέλο πολλαπλής σταδιακής παλινδρόμησης, η συγκέντρωση του διαλυμένου οργανικού άνθρακα ήταν ο πιο σημαντικός παράγοντας πρόβλεψης της αφθονίας των βακτηριδίων σε δεξαμενές ψαριών με αυξημένη θερμοκρασία. Η μεγάλη ποσότητα και η μικρή αναλογία C:N της οργανικής ύλης που έχει καθιερωθεί στις δεξαμενές εκτροφής υποδηλώνει ότι δεν απαιτείται περισσότερο οξυγόνο για την βιοαποικοδόμηση του οργανικού άνθρακα (Gerardi 2006).

Παρόλο που η απονιτροποίηση είναι μια αναερόβια διαδικασία, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση του οξυγόνου για την παραγωγή νιτρικών ιόντων μέσω της νιτροποίησης. Παράγοντες που επηρεάζουν τη νιτροποίηση είναι η αυξημένη θερμοκρασία και το διαλυμένο οξυγόνο και ως εκ τούτου επηρεάζουν την παραγωγή των νιτρικών ιόντων τα οποία με τη σειρά τους επηρεάζουν τον ρυθμό απονιτροποίησης. Σε υδρόβια ιζήματα στα οποία η συγκέντρωση νιτρικών στο υπερκείμενο νερό είναι χαμηλή, ο ρυθμός απονιτροποίησης περιορίζεται σε σχέση με το ρυθμό νιτροποίησης, ο οποίος με τη σειρά του ρυθμίζεται από το βαθμό διάχυσης του οξυγόνου στο ίζημα (Gerardi 2006).

Έχει αναφερθεί ένα ευρύ φάσμα τιμών  $Q_{10}$ , πιθανόν να αντικατοπτρίζει τον ευρύ αριθμό βακτηρίων απονιτροποίησης. Οι τιμές του  $Q_{10}$  κυμαίνονται από 1,4 έως 3,4 για θερμοκρασίες 15 και  $35^{\circ}\text{C}$ . Η δραστηριότητα της απονιτροποίησης περιορίζεται απότομα σε θερμοκρασίες μικρότερες από  $15^{\circ}\text{C}$ . Οι τιμές  $Q_{10}$  επηρεάζονται από τη συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων, του οργανικού άνθρακα (αναγωγικό περιβάλλον) και από τη συγκέντρωση του οξυγόνου. Μελέτες έδειξαν ότι στους  $34^{\circ}\text{C}$  ο ρυθμός απονιτροποίησης επηρεάζεται πολύ λιγότερο από τη συγκέντρωση οξυγόνου σε σχέση χαμηλότερες θερμοκρασίες,  $19^{\circ}\text{C}$ . Η αφθονία των βακτηρίων απονιτροποίησης σε ιζήματα ήταν μέγιστη κατά τη διάρκεια του

καλοκαιριού και ελάχιστη κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Στη στήλη του νερού παρατηρήθηκε συγκρίσιμη αφθονία βακτηρίων.

Πίνακας 2. Ρυθμός απονιτροποίησης εκφρασμένος σε  $\text{mg N m}^{-2} \text{d}^{-1}$  όπως έχει απολογιστεί σε διάφορα συστήματα εκτροφής ψαριών γλυκού και θαλασσινού νερού.

Denitrification rate	Refs.	Location/Comments
1.4–3.6	Messer and Brezonik, 1983	Lake Okeechobee acetylene blockage mass balance
3.6–7.1		
0.1–7.4	Acosta-Nassar et al., 1994	tropical freshwater fish pond
2.3	Oren and Blackburn, 1979	Kysing Fjord, Denmark ( $\sim 0.15 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_3^- \text{-N}$ )
2.7–10.9	Kaspar, 1982	intertidal mud flat
3.6–7.2	Chan and Knowles, 1979	eutrophic ponds
5	Tirén, 1977	oligotrophic Swedish lake
3.4–13	Nishio et al., 1983	Japanese coast
3.6–18	Sweerts and de Beer, 1989	eutrophic lake (Vechten)
3.8	Smith and DeLaune, 1983	freshwater/estuarine eutrophic lake sediments
0–29	Billen, 1978	Belgian coast
4–55	Cerco, 1989	Potomac River ( $10\text{--}30^\circ\text{C}$ , $8 \text{ mg l}^{-1} \text{ DO}$ , $0.21\text{--}0.63 \text{ mg l}^{-1} \text{ NO}_3^- \text{-N}$ )
4–71	Andersen et al., 1984	Danish estuary; seasonal variation
10–40	Henriksen et al., 1980	Danish coast
14	Sørensen, 1978	Danish coast
14–20	Chan and Campbell, 1980	eutrophic Canadian lake
18–35	Nielsen, 1992	eutrophic stream bed
17–34	Seitzinger et al., 1984	Narragansett Bay
< 25	Rysgaard et al., 1994	freshwater sediment
25–40	Tirén, 1977	3 eutrophic Swedish lakes
26–30	Jenkins and Kemp, 1984	Patuxent River estuary (spring)
29	Vanderborgh et al., 1977	Belgian coast
1.5–57	Lindau et al., 1990	urea-treated rice plot
47–81	Roos and Eriksen, 1995	semi-intensive polyculture pond
	Blackburn et al., 1988	marine fish ponds
14–25		acetylene blockage
71–119		nitrite + nitrate reduction
56–69	Krom, unpublished (cited in Blackburn et al., 1988)	marine fish ponds
52	D'Angelo and D'Angelo, 1993	Lake Okeechobee
57	Riise and Roos, 1997	polyculture fish ponds, Thailand
58	Andersen, 1977	Byrup Langsø (lab cores)
110		Byrup Langsø (mass balance)
34		Kvind Sø (lab cores)
85		Kvind Sø (mass balance)
100–500		enriched lake sediment
45	DeLaune and Smith, 1987	Lake Verret, LA—nitrate reduction
34–52	DeLaune et al., 1991	Calcasieu River, LA
95–160	van Kessel, 1977	enriched ditch sediment
100–200	Nishio et al., 1982	polluted estuary, Japan
101–296	Seitzinger and Nixon, 1985	enriched marine mesocosm
367	Lindau et al., 1988a	enriched bottomland hard-wood forest swamp plot
33–342	Lindau et al., 1990	$\text{KNO}_3$ -treated rice plots
420–490	Binnerup et al., 1992	enriched, bioturbated marine sediment

#### 4.4. Πρακτικές διαχείρισης που επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα αζώτου

##### 4.4.1. Τροφές και τεχνικές τσίσηματος

Οι ζωοτροφές και οι πρακτικές τεχνικές διατροφής που εφαρμόζονται επηρεάζουν στην συγκέντρωση της αμμωνίας στο νερό ης δεξαμενής εκτροφής σε ψάρια γλυκού νερού.

Η αμμωνία συσχετίζεται έντονα με τον ημερήσιο ρυθμό σίτισης σε συστήματα εκτροφής γατόψαρου και κυμαίνεται από 0 έως 224 kg ha<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. Η αμμωνία αυξάνει εξαιτίας της περιεκτικότητας της τροφής σε πρωτεΐνη που κυμαίνεται από 24% έως 40%. Ωστόσο, η συγκέντρωση της μη ιονισμένης αμμωνίας δεν επηρεάστηκε από την περιεκτικότητα της τροφής σε πρωτεΐνη. Η μείωση χορήγησης της τροφής για διάστημα 9 ημερών δεν μείωσε τον ρυθμό παραγωγής αμμωνίας στις δεξαμενές εκτροφής του γατόψαρου στο RAS. Η συγκέντρωση της αμμωνίας δεν ήταν διαφορετική στις δεξαμενές εκτροφής γατόψαρου στις οποίες τα ψάρια σιτίζονταν μέχρι κορεσμού μία φορά την ημέρα στις 08:30 ώρες, 16:00 ώρες, και 20:00 ώρες.

#### **4.4.2. Αλλαγές νερού**

Έχουν αξιολογηθεί διάφορες πρακτικές διαχείρισης νερού για τη μείωση της συγκέντρωσης αμμωνίας στις δεξαμενές εκτροφής των ψαριών στο RAS. Αλλαγές νερού σε 1, 2 ή 4 L για τρεις μήνες ήταν ανεπαρκείς για να επηρεάσουν την ποιότητα του νερού στις δεξαμενές εκτροφής του γατόψαρου. Ένα μοντέλο προσομοίωσης εκτροφής γαρίδας προέβλεψε ότι οι συγκεντρώσεις αμμωνίας θα ήταν ελάχιστες χωρίς την αύξηση των αλλαγών νερού, στο μέγιστο τους ρυθμό και με επίπεδα αλλαγής νερού που κυμαίνονταν από 0,2 έως 0,4 L d<sup>-1</sup>, και μειώνεται για ρυθμούς μεγαλύτερους από 0,4 λίτρα d<sup>-1</sup>. Αλλαγές νερού της τάξης των 0,025 d<sup>-1</sup> μείωσαν τη συγκέντρωση αμμωνίας στις δεξαμενές εκτροφής της γαρίδας σε σύγκριση με τις δεξαμενές όπου δεν έγινε αλλαγή νερού.

Σε υψηλή βιομάζα ο υδραυλικός χρόνος παραμονής νερού στο σύστημα > 24 ώρες σε μονάδες εκτροφής ήταν απαραίτητες για να λάβει χώρα η νιτροποίηση και να ολοκληρωθεί. Μεγαλύτεροι ρυθμοί αλλαγών νερού οδήγησαν στην μείωση των βακτηρίων νιτροποίησης.

#### **4.4.3. Ανακύκλωση νερού και αερισμός**

Τα αποτελέσματα του αερισμού και της κυκλοφορίας του νερού στις συγκεντρώσεις του ανόργανου αζώτου είναι μια συνάρτηση του ρυθμού παροχής τροφής, της εναπόθεσης ιζήματος, της διάρκειας αερισμού και της πυκνότητας του φυτοπλαγκτού. Η συγκέντρωση της αμμωνίας εμφανίστηκε να είναι ελαφρώς χαμηλότερη και τη συγκέντρωση νιτρικών ιόντων και υψηλότερη στις δεξαμενές εκτροφής του γατόψαρου που αερίζονταν για 6 ώρες κατά τη διάρκεια της νύχτας σε σύγκριση με τις δεξαμενές που αερίζονται κατά περίπτωση. Η συγκέντρωση της αμμωνίας αυξήθηκε ελάχιστα και η συγκέντρωση των νιτρικών ιόντων αυξήθηκε σημαντικά στις δεξαμενές του γατόψαρου που χορηγούνταν αέρας κάθε βράδυ σε σύγκριση με εκείνες που δεν παρέχονταν αέρας.

Ομοίως, οι συγκεντρώσεις της αμμωνίας, των νιτρικών και των νιτρικών ιόντων συνδέθηκε άμεσα με τη διάρκεια αερισμού, στις δεξαμενές εκτροφής γατόψαρου. Η εναπόθεση σωματιδίων ιζημάτων κατά τον αερισμό μπορεί να έχει προκαλέσει ταχεία εκρόφιση ανταλλάξιμου αμμωνίου και νιτροποίηση στη στήλη του νερού. Ο συνεχής αερισμός στις υδατοσυλλογές μείωσε τις συγκεντρώσεις αμμωνίας ελάχιστα στις δεξαμενές εκτροφής γαρίδας με υφάλμυρο νερό, χωρίς οι συγκεντρώσεις αυτές να παρουσιάζουν διαφορές από τις δεξαμενές που δεν παρέχονταν αερισμός. Οι συγκεντρώσεις της μη ιονισμένης αμμωνίας δεν επηρεάστηκαν από τον συνεχή αερισμό στις υδατοσυλλογές εκτροφής τιλάπιας ( $3000 \text{ kg y}^{-1} \text{ ha}^{-1}$ ).

Σε περιοχές όπως η Ταϊβάν, το Ισραήλ και η Χαβάη, έχουν αναπτυχθεί συστήματα εντατικής καλλιέργειας στα οποία το νερό κυκλοφορεί συνεχώς με αεριστήρες τύπου τυμπάνου με αποτέλεσμα το νερό και τα οργανικά υλικά να απομακρύνονται περιοδικά ή συνεχόμενα. Η συσσώρευση των νιτρικών ιόντων στο νερό ανακυκλούμενων συστημάτων, το ιζήμα είναι ο βασικός παράγοντας απονιτροποίησης. Το συνολικό N μπορεί να υπερβεί τα  $30 \text{ mg N l}^{-1}$ . Η επεξεργασία των αποβλήτων που απορρίπτονται από τα συστήματα εντατικής κυκλοφορίας νερού πρέπει να καλούνται στερεά (φυτοπλαγκτόν) και διαλυμένα (θρεπτικά) συστατικά. Ο αυξημένος υδραυλικός χρόνος παραμονής στα συστήματα συμβάλλει στην πραγματοποίηση της διεργασίας της νιτροποίησης. Τα απόβλητα που εναποτίθενται στις δεξαμενές δημιουργείται αναγωγικό περιβάλλον και απονιτροποιούνται.

#### 4.4.4. βάθος δεξαμενής



Στις δεξαμενές (υδατοσυλλογές) εκτροφής γαρίδας, η συγκέντρωση της αμμωνίας δεν επηρεάστηκε σημαντικά από το βάθος της δεξαμενής, παρόλο που τα νιτρώδη και νιτρικά ιόντα είναι αντιστρόφως του βάθους της υδατοσυλλογής. Πιθανώς, μείωση του βάθους του νερού στην υδατοσυλλογή με υψηλή πυκνότητα φυτοπλαγκτού περιορίζει τη διεισδυτική ικανότητα του φωτός εξαιτίας της ανάπτυξης φυτοπλαγκτόν επηρεάζοντας την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών.

#### **4.4.5. Προσθήκη Οργανικού άνθρακα**

Ο Avnimelech (1999) επέδειξαν μια πρακτική τεχνική για την ανακύκλωση της περίσσειας N στα ψάρια. Ο περιορισμός του διαλυμένου ανόργανου αζώτου μπορεί να καθοριστεί σε εντατικές λίμνες ψαριών με ανακυκλοφορία νερού προσθέτοντας ένα πλούσιο σε άνθρακα υπόστρωμα π.χ., κυτταρίνη, και προωθεί το σχηματισμό μικροβιακής βιομάζας. Η παραγωγή φυτοπλαγκτόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή τροφής από είδη που εκτρέφονται όπως ο κυπρίνο και η τιλάπια (Boenigk et al. 2014).

#### **4.4.6. Μικροβιακή αύξηση**

Η μικροβιακή αύξηση αναφέρεται στη προσθήκη νερού στις δεξαμενές εκτροφής με νερό που περιέχει συμπυκνωμένα βακτηριακά εναιωρήματα με στόχο τη μείωση της οργανικής ύλης, τη βελτίωση της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου και την απομάκρυνση της αμμωνίας. Σε μελέτες που διεξήχθησαν σε υδατοσυλλογές εκτροφής γατόψαρου και γαρίδας, που είχαν υποστεί επεξεργασία, οι διαφορές που δημιουργούνται στην παραγωγή γαρίδων ή ψαριών, στην αμμωνία, στις συγκεντρώσεις νιτρωδών και νιτρικών ιόντων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορετικές από εκείνες που δεν έχουν υποστεί επεξεργασία (Atlas & Bartha 2015).

#### 4.4.7. Διαχείριση ιζημάτων

Οι περισσότερες τεχνικές διαχείρισης ιζημάτων που εναποτίθενται στα συστήματα εκτροφής εστιάζουν στην ξήρανση, η οποία προάγει την οξείδωση της συσσωρευμένης οργανικής ύλης και τη νιτροποίηση των ανόργανων μορφών N, με τη βέλτιστη περιεκτικότητα σε υγρασία για την αποσύνθεση της οργανικής ύλης είναι περίπου 20%.

Η οργανική ύλη μπορεί να απομακρυνθεί από τις δεξαμενές εκτροφής της γαρίδας με τον κατάλληλο εξοπλισμό, παρόλο που οι πρακτικές αυτές δημιουργούν δυνητικά αρνητικές περιβαλλοντικές επιπτώσεις που σχετίζονται με την απόρριψη βιολογικά εμπλουτισμένων αποβλήτων και επιπλέον, η αποτελεσματικότητα αυτών των πρακτικών είναι αμφισβητήσιμη (Boenigk et al. 2014). Η πλέον συνήθης τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως είναι η αποστράγγιση και η ξήρανση των δεξαμενών αυτών προκειμένου να αυξηθεί το pH, ιδιαίτερα σε υδατοσυλλογές με υφάλμυρο νερού οι οποίοι κατασκευάζονται με όξινο θειικό έδαφος και σε νερά χαμηλής αλκαλικότητας (Rojas-Tirado et. al. 2017).

## Κεφάλαιο 5

### Συμπεράσματα

Αν και υπάρχει πλήρης εικόνα σχετικά με τους διαφορετικούς παράγοντες, που επηρεάζουν την ποιότητα του νερού στα κλειστά συστήματα εκτροφής ψαριών, υπάρχει ακόμη έλλειψη γνώσης σχετικά με το πώς οι αλληλεπιδράσεις αυτών των παραγόντων επηρεάζουν τη δυναμική των βακτηρίων στο RAS. Τα κύρια συμπεράσματα είναι που εξάγονται από την παρούσα εργασία συνοψίζονται ως εξής:

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν τη δυνατότητα λειτουργίας πειραματικών συστημάτων σε σταθερή κατάσταση ως προς τα νιτρικά ιόντα, την οργανική ύλη και τα σωματίδια στο νερό υπό σταθερές συνθήκες. Ο αριθμός των βακτηρίων σχετίζεται ιδιαίτερα με τη συσσώρευση της οργανικής ύλης στα συστήματα, ενώ η σταθεροποίηση με βάση την παρουσία των ελεύθερων βακτηρίων αποτυπώνει μια υψηλή συσχέτιση με την σταθεροποίηση του κλάσματος της διαλυμένης οργανικής ύλης. Το μεγαλύτερο μέρος των βακτηρίων σχετίζεται πιθανώς με σωματίδια και σε εντατικά συστήματα RAS, τα σωματίδια δεν είναι μοναδικά, ή τα πιο σημαντικά για τη λειτουργία RAS. Το φορτίο ρύπανσης αποτελεί τη βασικότερη παράμετρο που επιδρά στην ποιότητα του νερού του RAS επηρεάζοντας τον αριθμό των βακτηρίων.

Η χορηγούμενη ποσότητα τροφής επηρεάζει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού και ιδιαίτερα την παραγωγή των νιτρικών ιόντων και την αφθονία των βακτηρίων. Η βακτηριακή κοινότητα ανταποκρίθηκε γρηγορότερα στην αύξηση της χορηγούμενης τροφής και συσχετίζεται με την εκδήλωση βακτηριακής δραστηριότητας. Καθυστέρηση της βακτηριακής δραστηριότητας πιθανά να οφείλεται στην παγίδευση σωματιδίων στο μηχανικό φίλτρο. Η βακτηριακή δραστηριότητα μειώνεται όταν ο ρυθμός χορήγησης της τροφής περιορίστηκε. Ωστόσο, μετά από επτά εβδομάδες, η συγκέντρωση βρέθηκε να είναι 10<sup>6</sup> κυττάρων ανά ml. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι η προσωρινή διακοπή παροχής της τροφής δεν έχει απαραίτητα υψηλή επίδραση στη μεταβολή του μικροβιακού φορτίου και στο ώριμο φίλτρο του RAS. Μελέτες έδειξαν, ότι η πρόσθετη παροχή άνθρακα επηρεάζει την ποιότητα των υδάτων και ιδιαίτερα στο RAS. Τα βακτήρια στην υδατική φάση αναπτύσσονται ανάλογα με την επέκταση της δυνατότητας, που τους παρέχεται να καταναλώνουν ένα υδατοδιαλυτό, εύκολα αποικοδομήσιμο φορτίο, ακόμη και σε βιολογικά φίλτρα που λειτουργούν ικανοποιητικά. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ικανότητα παρέμβασης στο βιολογικό φίλτρο, μέσω αύξησης της

συγκέντρωσης του άνθρακα στο σύστημα αφήνοντας τα βακτήρια στην υδατική φάση αμετάβλητα και ανεπηρέαστα.

Από την άλλη πλευρά, οι εκτιμήσεις για την αξιολόγηση της δυναμικής ανάπτυξης των βιολογικών φίλτρων, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε καλύτερη κατανόηση του ρυθμιστικού τους αποτελέσματος. Τα ώριμα βιολογικά φίλτρα συνεχίζουν να λειτουργούν σε περίπτωση υπολειμμάτων τροφής ή απομάκρυνσης των στερεών υπολειμμάτων (κόπρανα και υπολείμματα τροφής). Τα βιολογικά φίλτρα στο ανακυκλούμενα συστήματα RAS σχεδιάζονται σύμφωνα με τη μέγιστη φόρτιση του φίλτρου. Η μεθοδολογία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά για τον προσδιορισμό του αριθμού των βακτηρίων ακόμη και των ελεύθερων βακτηρίων που ζουν στο νερό. Η μικροβιακή φόρτιση αποτυπώνεται διαμέσου της μέτρησης του COD και του BOD<sub>5</sub>, όπου μετράται το οξυγόνο που καταναλώνεται προκειμένου να βιοποικοδομηθεί όλο το οργανικό φορτίο του συστήματος.

Πολλές μελέτες έχουν παράσχει πληροφορίες για να κατανοηθεί η σημασία των παραγόντων που επηρεάζουν τις γενικές μικροβιακές κοινότητες εντός του RAS. Οι βακτηριακές κοινότητες στο βιολογικό φίλτρο έχουν την ικανότητα να καταστείλουν την επίδραση των βακτηριδίων στο νερό, και την αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηριακών κοινοτήτων του βιολογικού φίλτρου και της υδατικής φάσης στην οποία βρίσκονται. Απαιτούνται δοκιμαστικές ρυθμίσεις με διαφορετικούς τύπους βιολογικών φίλτρων για τη μελέτη των επιπτώσεών τους στην υποβάθμιση της ποιότητας του νερού λόγω μικροβιακής αύξησης, και την αξιολόγηση στη στήλη νερού.

Αναγκαιότητα για τη βιομηχανία είναι η συνεχής ανάπτυξη βελτιωμένων πρακτικών για την απολύμανση του συστήματος. Η αποτελεσματικότητα στις διαδικασίες απολύμανσης μπορεί να επιτευχθεί μόνο με τη χρήση αξιόπιστων εργαλείων αξιολόγησης, για παράδειγμα εκείνων που προτείνονται σε αυτήν τη μελέτη. Επιπλέον, η μελλοντική έρευνα στα συστήματα RAS θα αυξήσει τη γνώση ώστε να εντοπίσει τους παράγοντες, που προκαλούν αλλαγές στη βακτηριακή αφθονία και τη σταθερότητα τους στο σύστημα. Επίσης δειγματοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα θα δώσουν πληροφορίες σχετικά με τις ημερήσιες διακυμάνσεις στην ποιότητα των μικροβιακών υδάτων στο RAS.

## Κεφάλαιο 6

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

#### 6.1. Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Allen, M.J., Edberg, S.C., Reasoner, D.J. 2004. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? *Int. J. Food Microbiol.* 92: 265 – 274.
- Allison, S.M., Prosser, J.I. 1993. Ammonia oxidation at low pH by attached populations of nitrifying bacteria. *Soil. Biol. Biochem.* 25 (7): 935 – 941.
- Andrew, J.H. and Harris, R.F. 1986. r- and K-selection in microbial ecology. *Advances in the Microbial Ecology* 9: 99 - 147.
- Arvin E., Pedersen, L-F. 2015. Hydrogen peroxide decomposition kinetics in aquaculture water. *Aquacultural Engineering* 64: 1 – 7.
- Atlas, R.M., Bartha, R. 1998. *Microbial ecology: fundamentals and applications.* Fourth edition. Benjamin Cummings, California. 694 p.
- Attramadal, K., Øie, G., Størseth, T., Alver, M., Vadstein, O., Olsen, Y. 2012b. The effects of moderate ozonation or high intensity UV-irradiation on the microbial environment in RAS for marine larvae. *Aquaculture* 330 – 333: 121 – 129.
- Attramadal, K., Salvesen, I., Xue, R., Øie, G., Størseth, T., Vadstein, O., Olsen, Y. 2012a. Recirculation as a possible microbial control strategy in the production of marine larvae. *Aquacultural Engineering* 46: 37 – 39.
- Attramadal, K.J.K., Minniti, G. Øie, G., Kjørsvik, E., Østensen, M-A., Bakke, I., Vadstein, O. 2016. Microbial maturation of intake water at different carrying capacities affects microbial control in rearing tanks for marine fish larvae. *Aquaculture* 457: 68-72.
- Attramadal, K.J.K., Truong, T.M.H., Bakke, I., Skjermo, J., Olsen, Y., Vadstein, O. 2014. RAS and microbial maturation as tools for K-selection of microbial communities improve survival in cod larvae. *Aquaculture* 432: 483-490.
- Au, D.W.T., Pollino, C.A., Shin, P.K.S., Lau, S.T.F., Tang, J.Y.M., 2004. Chronic effects of suspended solids on gill structure, osmoregulation, growth, and triiodothyronine in juvenile green grouper *Epinephelus coioides*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 266: 255–264.

- Avnimelech, Y. 1999. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176: 227 – 235.
- Azam, F., Hodson, R.E. 1977. Size distribution and activity of marine microheterotrophs. *Limnology and Oceanography* 22 (3): 492-501.
- Baeverfjord, G., Krogdahl, Å. 1996. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *J. Fish Dis.* 19: 375- 387.
- Becke, C., Schumann, M., Steinhagen, D., Geist, J., Brinker, A. 2017b. Physiological consequences of chronic exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to suspended solid load in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* (in press). DOI:10.1016/j.aquaculture.2017.11.030.
- Becke, C., Steinhagen, D., Schumann, M., Brinker, A. 2017. Physiological consequences for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of short-term exposure to increased suspended solid load. *Aquacultural Engineering* 78: 63-74.
- Bergheim, A., Drengstig, A., Ulgenes, Y., Fivelstad, S. 2009. Production of Atlantic salmon smolts in Europe – current characteristics and future trends. *Aquacultural Engineering* 41, 46–52.
- Berney, M., Vital, M., Hülshoff, I., Weilenmann, H.U., Egli, T., Hammes, F. 2008. Rapid, cultivation-independent assessment of microbial viability in drinking water. *Water Research* 42: 4010 - 4018.
- Besmer, M., Hammes, F. 2016. Short-term microbial dynamics in a drinking water plant treating groundwater with occasional high microbial loads. *Water Research* 107: 11 – 18.
- Besmer, M.D., Weissbrodt, D.G., Kratochvil, B.E., Sigrist, J.A., Weyland, M.S., Hammes, F. 2014. The feasibility of automated online flow cytometry for in-situ monitoring of microbial dynamic in aquatic ecosystems. *Front. Microbiol.* 5: 1-12. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00265.
- Billund Aquaculture AS. [Online] Available: Aquaculture Innovation Workshop 6 - Vancouver - 2014 [Accessed: November, 2017].
- Bitton, G. 2011. *Wastewater Microbiology*. Fourth edition. Wiley-Blackwell, NeJersey, 762 p.

- Blancheton, J.P., Attramadal, K.J.K., Michaud, L., Roque d'Orbcastel, Vadstein, O. 2013. Insight into bacterial population in aquaculture systems and its implication. *Aquacultural Engineering* 53: 30 – 39.
- Blancheton, J-P., Canaguier, B. 1995. Bacteria and particulate materials in recirculating seabass (*Dicentrarchus labrax*) production system. *Aquaculture* 133: 215-224.
- Boenigk, J., Stadler, P., Wiedroither, A., Hahn, M.W. 2004. Strain-Specific differences in the grazing sensitivities of closely related ultramicrobacteria affiliated with the Polynucleobacter cluster. *Appl. Env. Microbiol.* 70, 10:5787-5793.
- Brinker, A., Rösch, R. 2005. Factors determining the size of suspended solids in a flow-through fish farm. *Aquacultural Engineering* 33: 1–19.
- Canelhas, M.R., Andersson, M., Eiler, A., Lindström, E.S., Bertilsson, S. 2017. Influence of pulsed and continuous substrate inputs on freshwater bacterial community composition and functioning in bioreactors. *Env. Microbiol.* doi: 10.1111/1462-2920.13979
- Chen, S., Ling, J., Blancheton, J-P. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacultural Engineering* 34: 179-197.
- Chen, S., Timmons, M.B., Aneshansley, D.J., Bisogni, J.J. 1993. Suspended solids characteristics from recirculating aquacultural systems and design implications. *Aquaculture* 112: 143 – 155.
- Chróst, R.J. 1991. *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York Inc., USA. DOI:10.1007/978-1-4612-3090-8\_3.
- Colt, J., Lamoureux, J., Patterson, R., Rogers, G. 2006. Reporting standards for biofilter performance studies. *Aquacultural Engineering* 34: 377 - 388.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* 270: 1 - 14.
- Cytryn, E., Gelfand, I., Barak, Y., van Rijn, J., Minz, D. 2003. Diversity of microbial communities correlated to physiochemical parameters in a digestion basin of a zero-discharge mariculture system. *Environmental Microbiology* 5 (1): 55 - 63.
- Dalsgaard, J., Lund, I., Thorarinsdottir, R., Drengstig, A., Arvonen, K., Pedersen, P. 2013. Farming different species in RAS in Nordic countries: Current

- status and future perspectives. *Aquacultural Engineering* 53: 2 -13.
- Dalsgaard, J., Pedersen, P.B. 2011. Solid and suspended
- Davies, D. 2011. Biofilm Dispersion. In: Flemming, H-C, Wingender, J., Szewzyk, U. (eds). 2011. Biofilm highlights. Springer Series on Biofilms 5. DOI: 10.1007/978-3-642-19940-0\_1. Springer-Verlag, Berlin: 243 pp. Heidelberg.
- De Schryver, P., Vadstein, O. 2014. Ecological theory as a foundation to control pathogenic invasion in aquaculture. *The ISME Journal* 8 (12): 2360-2368.
- Ebeling, J., Timmons, M., Bisogni, J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture*: 346 - 358.
- Eding, E. H., Kamstra, A., Verreth, J. A. J., Huisman, E. A., & Klapwijk, A. (2006). Design and operation of nitrifying trickling filters in recirculating aquaculture: a review. *Aquacultural Engineering*, 34 (3): 234-260.
- Fernandes, P.M., Pedersen, L-F., Bovbjerg, P. 2014. Daily micro particle distribution of an experimental recirculating aquaculture system. A case study. *Aquacultural Engineering* 60: 28 - 34.
- Fernandes, P.M., Pedersen, L-F., Pedersen, P.B. 2015. Microscreen effects on water quality in replicated recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 65: 17-26.
- Fernandes, P.M., Pedersen, L-F., Bovbjerg, P. 2017. Influence of fixed and moving bed biofilters on micro particle dynamics in a recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 78: 32-41.
- Fernandes, P.M., Pedersen, L-F., Pedersen, P.B. 2015. Microscreen effects on water quality in replicated recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 65: 17-26.
- Fu, S., Liu, Y., Tu, J., Lan, R., Tian, H. 2015. A preliminary stochastic model for managing microorganisms in a recirculating aquaculture system. *Annals of Microbiology* 65: 1119 - 1129.
- Gerardi, M. 2006. Wastewater bacteria. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. 251 p.
- Hagopian, D., Riley, J.G. 1998. A closer look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural Engineering* 18: 223 - 244.
- Gerardi, M. 2006. Wastewater Bacteria. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 251 p.



- Giatsis Ch., D. Sipkema, H. Smidt, H. Heilig, G. Benvenuti, J. Verreth & M. Verdegem. 2015. The impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae. *Sci. Rep.* 5, 18206; doi: 10.1038/srep18206 (2015).
- Hahn, M.W., Höfle, M.G. 2001. Grazing of protozoa and its effects on population of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35: 113-121.
- Hambly, A.C., Arvin, E., Pedersen, L-F., Pedersen, P.B., Serendy ska-Sobecka, B. 2015. Characterising organic matter in recirculating aquaculture systems with fluorescence EEM spectroscopy. *Water Research* 83: 112 - 120.
- Jenkins, M.C., Kemp, W.M., 1984. The coupling of nitrification and denitrification in two estuarine sediments. *Limnol. Oceanog.* 29, 609–619
- Leonard, N., Blancheton, J.P., Guiraud, J.P. 2000. Populations of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. *Aquacultural Engineering* 22: 109 – 120.
- Leonard, N., Guiraud, J.P., Gasset, E., Cailleres, J.P., Blancheton, J.P. 2002. Bacteria and nutrients nitrogen and carbon in recirculating system for sea bass production. *Aquacultural Engineering* 26: 111 - 127.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S. 2011. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 39-50.
- Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., Piedrahita, R. 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural Engineering* 34: 224 - 233.
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Troussellier, M., Smedile, F., Bruni, V., Blancheton, J.P. 2009. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *Applied Microbiology* 107: 1935 - 1946.
- Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., Piedrahita, R. 2006. Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters. *Aquacultural Engineering* 34: 224-233.
- Michaud, L., Lo Giudice, A., Interdonato, F., Triplet, S., Ying, L., Blancheton, J.P. 2014. C/N ratio-induced structural shift of bacterial communities inside lab-scale aquaculture biofilters. *Aquacultural Engineering* 58: 77 – 87.

- Michaud, L., Lo Giudice, A., Troussellier, M., Smedile, F., Bruni, V., Blancheton, J.P. 2009. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. *App. Microbiol.* 107: 1935 – 1946.
- Nogueira, R., Melo, L.F., Purkhold, U., Wuertz, S., Wagner, M. 2002. Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Res.* 36: 469 – 481.
- Patterson, R.N., Watts, K.C., Timmons, M.B., 1999. The power law in particle size analysis for aquacultural facilities. *Aquacultural Engineering* 19: 259 - 273.
- Pedersen, L-F., Suhr, K., Dalsgaard, J., Pedersen, P., Arvin, E. 2012. Effect of feed loading on nitrogen balances and fish performance in replicated recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 338 (341): 237 - 245.
- Pedersen, L-F., Pedersen, P.B. 2012. Hydrogen peroxide application to a commercial recirculating aquaculture system. *Aquaculture Engineering* 46: 40 – 46.
- Pedersen, L-F., Suhr, K., Dalsgaard, J., Pedersen, P., Arvin, E. 2012. Effect of feed loading on nitrogen balances and fish performance in replicated recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 338 – 341: 237 – 245.
- Pedersen, P.B., von Ahnen, M., Fernandes, P., Naas, C.; Pedersen, L-F., Dalsgaard, J. 2016. Particle surface area and bacterial activity in recirculating aquaculture systems. Submitted to *Aquacultural Engineering*, this issue.
- Pedersen, P.B., von Ahnen, M., Fernandes, P., Naas, C.; Pedersen, L-F., Dalsgaard, J. 2017. Particle surface area and bacterial activity in recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering* 78: 18-23.
- Polanco, F. FDZ., Méndez, E., Urueña, M.A., Villaverde, S., García, P.A. 2000. Spatial distribution of heterotrophs and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification. *Water Res.* 34, 16: 4081 – 4089.
- Prest, E.I., Hammes, F., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S. 2016. Biological stability of drinking water: Controlling factors, methods and challenges. *Front. Microbiol.* 7: 45. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00045.
- Prest, E.I., Hammes, F., van Loosdrecht, M.C.M., Vrouwenvelder, J.S. 2016a. Biological stability of drinking water: Controlling factors, methods and challenges. *Front. Microbiol.* 7: 45. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00045.

- Reeslev, M., Nielsen, J., Rogers, L. 2011. Assessment of the bacterial contamination and remediation efficacy after flooding using fluorometric detection. *Journal of ASTM International* 8 (10): 1-5.
- Rojas-Tirado, P., Pedersen, P.B., Vadstein, O., Pedersen, L-F. 2018. Changes in RAS microbial water quality associated with changes in feed loading. Submitted to *Aquaculture Engineering*.
- Rud, I., Kolarevic, J., Holan, A., Berget, I., Calabrese, S., Terjesen, B. 2017. Deep-sequencing of the bacterial microbiota in commercial-scale recirculating and semi-closed aquaculture systems for Atlantic salmon post-smolt production. *Aquacultural Engineering* 78: 50-62.
- Rurangwa, E., Verdegem, M. 2015. Microorganisms in recirculating aquaculture systems and their management. *Reviews in Aquaculture* 7: 117 - 130.
- Sugita, H., Nakamura, H., Shimada, T. 2005. Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture* 243: 403 - 409.
- Timmons, M. B., and J. M. Ebeling. "Recirculating Aquaculture. NRAC Publication NO. 01-007". Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY (2007). 959 p.
- Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., Salvesen, I., Skjermo, J. And Skjåk-Bræk, G. 1993. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: *Proceedings of the First International Conference of Fish Farming Technology* (eds H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen and K., Tvinnereim). A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 69 - 75.
- Vadstein, O., Leiknes, T. 2014. Effects of membrane filtration on bacterial number and microbial diversity in marine recirculating aquaculture system (RAS) for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) production. *Aquaculture* 422 (423): 69 - 77.
- Vadstein, O., Mo, T.A., Bergh, Ø., 2004. Microbial interactions, prophylaxis and diseases. In: Moksness, E., Kjørsvik, E., Olsen, Y. (Eds.), *Culture of Cold-Water Marine Fish*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 28 -72.
- Vadstein, O., Øie, G., Olsen, Y., Salvesen, I., Skjermo, J., Skjåk-Bræk, G. 1993. A strategy to obtain microbial control during larval development of marine fish. In: *Fish Farming Technology* (eds. H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen & K. Tvinnereim). 69–75 pp.

- Vang, O., Corfitzen, C., Smith, C., Albrechtsen, H-J. 2014. Evaluation of ATP measurements to detect microbial ingress by wastewater and surface water in drinking water. *Water Research* 64: 309 - 320.
- Wietz, M., Hall, M.R., Høj, L. 2009. Effects of seawater ozonation on biofilm development in aquaculture tanks. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 266 - 277.
- Wold, P., Holan, A., Øie, G., Attramadal, K., Bakke, I., Vadstein, O., Leiknes, T. 2014. Effects of membrane filtration on bacterial number and microbial diversity in marine recirculating aquaculture system (RAS) for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) production. *Aquaculture* 422 – 423: 69 – 77.
- Zhu, S., Chen, S. 2001. Effects of organic carbon on nitrification rate in fixed film biofilters. *Aquacultural Engineering* 25: 1 – 11.