

»Mladi za napredek Maribora 2013«

30. srečanje

**VPLIV pH, KONCENTRACIJE RAZTOPLJENEGA KISIKA
IN RAZLIČNIH FILTRIRNIH MATERIALOV NA
HITROST NITRIFIKACIJE V SLADKOVODNEM AKVARIJU**

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno področje

Biologija in kemija, kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

OPREDELITEV VPLIVA

PH, KONCENTRACIJE RAZTOPLJENEGA KISIKA

IN RAZLIČNIH FILTRIRNIH MATERIALOV NA

Maribor, februar 2013

»Mladi za napredek Maribora 2013«

30. srečanje

**VPLIV pH, KONCENTRACIJE RAZTOPLJENEGA KISIKA
IN RAZLIČNIH FILTRIRNIH MATERIALOV NA
HITROST NITRIFIKACIJE V SLADKOVODNEM AKVARIJU**

Raziskovalno področje: Interdisciplinarno področje

Biologija in kemija, kemijska tehnologija

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO



Maribor, februar 2013

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	5
1 UVOD	6
1. 1 Namen raziskovalne naloge.....	6
1. 2 Hipoteze in njihove razlage	7
2 PREGLED OBJAV.....	8
2. 1 Kroženje dušika v naravi	8
2. 1. 1 Fiksacija dušika	9
2. 1. 2 Amonifikacija	10
2. 1. 3 Nitrifikacija.....	10
2. 1. 4 Denitrifikacija.....	12
2. 2 Kroženje dušika v sladkovodnem akvariju.....	15
2. 2. 1 Fiksacija dušika	15
2. 2. 2 Amonijak.....	15
2. 2. 3 Nitrifikacija.....	17
2. 2. 3. 1 Ciklanje ali vtekanje akvarija.....	18
2. 3 Filtriranje akvarijske vode	20
2. 4 Vpliv temperature na hitrost nitrifikacije	21
2. 5 Vpliv pH na hitrost nitrifikacije	21
2. 6 Vpliv raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije.....	22
3 PRAKTIČNO DELO	23
3. 1. Materiali in kemikalije	23
3. 2 Metode dela	24
3. 2. 1 Načrtovanje eksperimenta	24
3. 3 Postavitev akvarijev.....	25
3. 4 Vpliv različnih filtrirnih materialov na hitrost nitrifikacije.....	27
3. 5 Določanje koncentracije amonijaka s spektrofotometrom Vernier	29
3. 6 Vpliv pH in koncentracije raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije	31
4 REZULTATI.....	33
4. 1 Vpliv različnih filtrirnih materialov na hitrost nitrifikacije.....	33
4. 2 Vpliv pH in koncentracije raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije	35

5 RAZPRAVA.....	37
6 ZAKLJUČEK.....	41
7 PRILOGE.....	42
8 SEZNAM VIROV IN LITERATURE.....	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Grafični prikaz kroženja dušika s posameznimi procesi.....	9
Slika 2: Dvoprekatni filter (lasten vir).....	25
Slika 3: Akvarijski filter (lasten vir).....	26
Slika 4: Akvarijski filter (lasten vir).....	26
Slika 5: Postavitev eksperimenta (lasten vir).....	27
Slika 7: kremenčev pesek.....	28
Slika 6: modra goba.....	28
Slika 8: keramični obročki.....	28

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Razmerje med ioniziranim in neioniziranim amonijakom pri različnih vrednostih pH.....	16
Graf 2: Ciklanje akvarija po dnevih.....	19
Graf 3: Vpliv raztopljenega kisika (mg/L) na hitrost nitrifikacije (%).....	22
Graf 4: λ_{\max} za vodno raztopino amonijaka.....	30
Graf 5: umeritvena a premica za amonijak.....	31
Graf 6: Vpliv treh različnih filtrirnih materialov na hitrost nitrifikacije.....	33
Graf 8: Vpliv različne vrednosti pH na hitrost nitrifikacije.....	35
Graf 9: Vpliv prisotnosti zračne črpalke oz. koncentracije raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije.....	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Meritve absorbance in izračun koncentracije amonijaka pri posameznih akvarijih z različnim filtrirnim materialom.....	34
Preglednica 2: Meritve absorbance in izračun koncentracije amonijaka pri posameznih akvarijih z različnim pH in koncentracijo raztopljenega kisika.....	36

POVZETEK

Nitrifikacija je proces, pri katerem nitrifikatorji (bakterije in arheje) oksidirajo, za organizme toksičen amonijak, NH_3 , najprej v manj toksičen nitratni(III) ion, NO_2^- in tega v še manj toksičen nitratni(V) ion, NO_3^- . Z nalogo sem želel ugotoviti, kako na hitrost nitrifikacije v sladkovodnem akvariju vplivajo različni filtrirni materiali, vrednost pH in koncentracija raztopljenega kisika. Izvedel sem eksperiment, pri katerem sem spektrofotometrično meril spreminjanje koncentracije amonijevega iona (NH_4^+) v akvarijih z različnimi filtrirnimi materiali. Med tremi testiranimi filtrirnimi materiali se je za najboljšega izkazal kremenčev pesek, sledili so keramični obročki, najslabše rezultate je dala modra plastična filtrirna goba. Ugotovljeno je bilo, da je za delovanje nitrifikatorjev optimalna vrednost pH med 6 in 8,5. Povišanje koncentracije kisika v akvarijski vodi ni bistveno pospešilo procesa nitrifikacije.

1 UVOD

Največja napaka, ki jo lahko naredimo ob postavitvi novega akvarija, je takojšnja naselitev vodnih organizmov (rib). Najprej je v akvariju potrebno vzpostaviti biološko ravnovesje, čemur akvaristi pravijo ciklanje ali vtekanje akvarija. To pomeni vzpostavitev stabilnih parametrov akvarijske vode in »čakanje«, da se v akvariju razvijejo nitrifikacijske bakterije in arheje, ki bodo, ko bo akvarijski sistem že obremenjen z organizmi, uspešno odstranjevale organske odpadke v obliki amonijaka, ki je za vodne organizme toksičen. Amonijak se v prvi fazi nitrifikacije pretvori v manj toksičen nitratni(III) ion ali nitrit, ta pa se oksidira dalje v še manj toksičen nitratni(V) ion. Opisan proces imenujemo nitrifikacija in je ena izmed faz v kroženju dušika v naravi.

Za razvoj nitrifikatorjev v novo postavljenem akvariju je potreben določen čas. Da pospešimo hitrost nitrifikacije in zagotovimo trajno kolonijo nitrifikatorjev, na akvarij priključimo akvarijski filter. V filter namestimo filtrirne medije oz. materiale, ki so porozni in imajo veliko površino, na katero se nitrifikatorji lahko naselijo. Na trgu je veliko različnih filtrirnih materialov, ki pa so različno učinkoviti.

Odstranitev amonijaka je tako eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na optimalno delovanje akvarija in življenje akvarijskih organizmov. Hitrost nitrifikacije je odvisna od dejavnikov, kot so: temperatura, koncentracija amonijaka, pH akvarijske vode, aktivna površina filtrirnega medija ter koncentracije raztopljenega kisika. Seveda je nitrifikacija proces, ki je odvisen tudi vrste organizmov, ki jih naselimo v akvariju.

1. 1 Namen raziskovalne naloge

Z raziskovalno nalogo sem želel ugotoviti, kako na hitrost in učinkovitost nitrifikacije v sladkovodnem akvariju vplivajo:

- A) različni filtrirni materiali,
- B) vrednost pH akvarijske vode
- C) koncentracija v vodi raztopljenega kisika oz. prisotnost zračne črpalke.

V nalogi bom preučil naslednje filtrirne materiale:

1. Modra filtrirna goba,
2. Keramični obročki,
3. kremenčev pesek.

Na osnovi spremljanja koncentracij skupnega amonijaka bom določil najučinkovitejši filtrirni material.

Drugi cilj naloge je določiti optimalen pH za proces nitrifikacije; to pomeni, da je hitrost pri tem pH najvišja.

Tretji cilj naloge je preveriti ali je zračna res črpalka nujen element akvarija.

1. 2 Hipoteze in njihove razlage

V nalogi sem postavil štiri hipoteze:

1. Med testiranimi filtrirnimi materiali bodo najboljši keramični obročki, ker so najbolj porozni izmed testiranih medijev in imajo tako največjo aktivno površino za naselitev nitrifikacijskih organizmov.
2. Kot najslabši filtrirni material se bo pokazal kremenčev pesek, ker se je uporabljal predvsem v preteklosti, ko drugih filtrirnih medijev še niso poznali. Ker je dajal slabše rezultate su začeli uporabljati keramične obročke in filtrirno gobo.
3. Najbolj optimalna pH vrednost za nitrifikatorje je med pH 6.0 in 8.5 saj je to območje pH tisto v katerem se nitrifikacijski mikroorganizmi najhitreje razmnožujejo. Ker zračna črpalka omogoča stalen dovod svežega, s kisikom obogatnega zraka, bo proces nitrifikacije z zračno črpalko hitrejši.

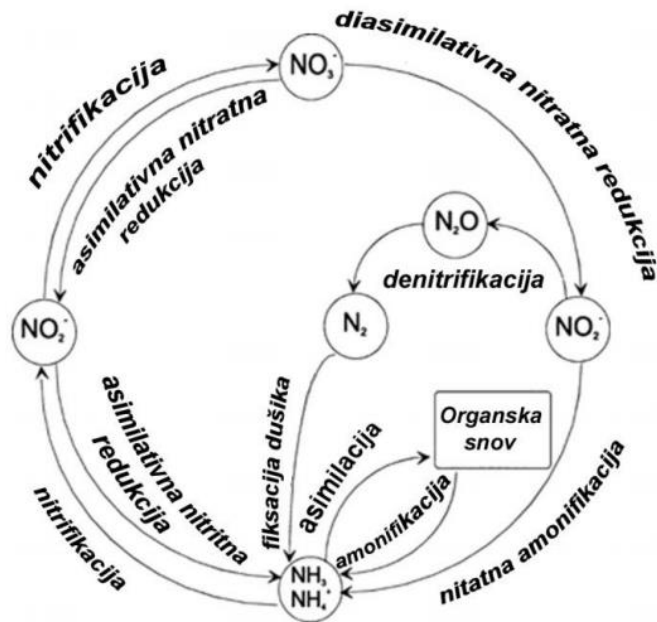
2 PREGLED OBJAV

2. 1 Kroženje dušika v naravi

Dušik je kemijski element s simbolom »N« in atomskim (vrstnim) številom 7. Elementarni dušik je pri standardnih pogojih brezbarven, nereaktiven dvoatomni plin brez vonja in okusa. Sestavlja 78,09 % zemeljske atmosfere in je pomemben gradnik organskih molekul, kot so nukleinske kisline, vitamini in beljakovine.

Odkritje dušika formalno pripisujemo škotskemu fiziku Danielu Rutherfordu, ki ga je leta 1772 tudi prvi izoliral. V poznem 18. stoletju so dušik skoraj sočasno preučevali tudi Carl Wilhelm Scheele, Henry Cavendish, in Joseph Priestley, ki ga je imenoval zgoreli zrak ali nevnetljivi zrak. Dušik je bil dovolj neaktiven, da ga je Antoine Lavoisier imenoval *azote*, kar v francoščini pomeni brez življenja (Povzeto po Kostič, 1980, str. 64)

Dušikov cikel opisuje pretok dušika med atmosfero in biosfero in je eden najpomembnejših biokemičnih kroženj v naravi. Znotraj dušikovega cikla poteka fiksacija dušika, amonifikacija, nitrifikacija in denitrifikacija dušika.



Slika 1: Grafični prikaz kroženja dušika s posameznimi procesi (Roškar, 2012, str. 9)

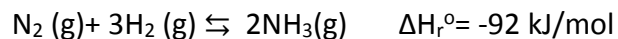
2. 1. 1 Fiksacija dušika

Čeprav dušik (N₂) sestavlja kar 78,09 % atmosfere, je atmosferski dušik v zelo stabilni, dvoatomni obliki in tako nedostopen za večino biokemijskih reakcij v okolju. Povprečna vezna entalpija vezi med atomoma dušika v molekuli dušika je kar 944kJ/mol (Stark in Wallace, 1996, str. 36), kar predstavlja eno najvišjih vrednosti za razcep vezi.

Procesu pretvorbe plinastega atmosferskega dušika v, za organizme uporabno obliko, pravimo fiksacija.

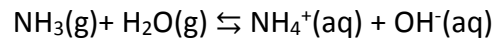
Proces fiksacije dušika lahko prikažemo s spodnjo kemijsko enačbo:

Enačba 1:



Bakterije reducirajo N₂ v NH₃, iz katerega v prisotnosti vode nastane amonijev ion, NH₄⁺ (enačba kemijske reakcije 2)

Enačba 2:



Najbolj znani fiksatorji dušika so cianobakterije, ki nitrogenaznim encimskim kompleksom (t.i.nitrogenazo) znotraj heterocist pretvarjajo dušik v amonijak. Drugi znani fiksatorji so bakterije iz rodu *Frankia* in *Rhizobia* ter družine *Azotobacteraceae* (Hayatsu, 2008, str. 1, 2).

2. 1. 2 Amonifikacija

Ko organizmi izločajo odpadne snovi ali odmrjejo, mikroorganizmi te, z dušikom bogate organske molekule, pretvarjajo v amonijak oz. amonijeve ione. Proces imenujemo amonifikacija

Med amonifikacijo organizmi, ob pomoči hidroliznih encimov, hidrolitično razgradijo polimere v njihove osnovne enote. Tako pri razgradnjo nukleotidov nastaja sečnina, ki jo bakterije, s pomočjo ureaze, hidrolizirajo v amonijev ion, NH_4^+ . Proteinaze proteine razgradijo v peptide, le-te pa s pomočjo peptidaz v aminokislino; če se le-te deaminirajo, se pretvorijo v karboksilne kisline in NH_4^+ ione. Amonijev ion postane dostopen tudi drugim (mikro)organizmom. (Univerza v Ljubljani, Metabolizem aminokislin)

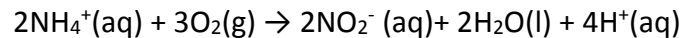
2. 1. 3 Nitrifikacija

Nitrifikacija je proces, pri katerem največkrat avtotrofni mikroorganizmi pretvarjajo oz. oksidirajo amonijeve ione (NH_4^+) najprej s pomočjo bakterij *Nitrosomonas* v nitratne(III) ione, NO_2^- , in te nato s pomočjo mikroorganizmov *Nitrobacter* v nitratne(V) ione, NO_3^- . Produkti nitrifikacije (NO_2^- oz. NO_3^-) so bistven vir energije za vse denitrifikacijske mikroorganizme. Pomembno je, da se nitriti v čim večji meri pretvorijo v nitratne ione, ker je akumulacija nitritov toksična ne samo za živali ampak tudi za rastline (Gerardi, 2002, str.12).¹

¹ Vir: Gerardi, M.H. (2002). *Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

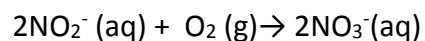
Nitrifikacija oz. oksidacija amonijaka je tako dvodelen proces. Mikroorganizmi najprej oksidirajo amonijak v nitratni(III) ion.

Enačba 3:



V drugem koraku se nastali nitrat(III) oksidira v nitrat(V) (NO_3^-), kar prikazuje enačba 4.

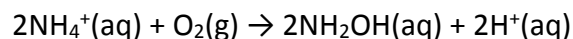
Enačba 4:



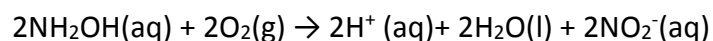
V prvem delu oksidacije sta udeleženi dve skupini aerobnih avtotrofnih organizmov, amonij-oksidiacijske bakterije (AOB) in amonij-oksidiacijske arheje (AOA). Leta 2005 je bila izolirana in opisana le ene AOA, *Nitrosopumilus maritimus*. Biologi domnevajo, da bi lahko AOA celo dominirale nad AOB oz. imele večjo vlogo v procesu nitrifikacije v prsti, a tega z gotovostjo, dokler ne uspe njihova izolacija in okarakterizacija, še ne moremo trditi (Hayatsu, 2008, str. 1).

Med AOB prevladujejo bakterije iz rodov *Nitrosomonas*, *Nitrospira* in *Nitrosococcus*. V AOB je za katalizo oksidacije odgovoren gen *amoA*, ki kodira podenoto A encima, imenovanega amonijeva monooksiganaza (AMO), ta pa oksidira amonijak v intermediat hidroksilamin, NH_2OH , (enačba 5), ki ga pa hidroksilamin-oksidoreduktaza pretvori v NO_2 (enačba 6)

Enačba 5:



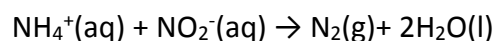
Enačba 6:



Z genom (*amoA*) danes označujemo vse pomembne nitrifikatorje (tudi AOA), ki so odgovorni za prvo fazo nitrifikacije.

Raziskave (Hayatsu, 2008, str. 37) so pokazale, da imajo tudi anaerobne amonij-oksidacijske bakterije veliko vlogo v procesu nitrifikacije, predvsem v vodnem (morskem) okolju. Proces se imenuje anaerobna oksidacija amonijaka ali »anammox« (krajšava iz angleščine za anaerobic ammonium oxidation). Ta vrsta nitrifikacije poteka brez prisotnosti kisika, tako kot prikazuje enačba 7.

Enačba 7:



Poznamo tudi heterotrofne organizme, ki so odgovorni za nitrifikacijo.). Nekatere vrste teh nedavno odkritih mikroorganizmov (Hayatsu, 2008, str. 40) so *Bacillus badius*, *Burkholderia cepacia* (bakterije) in *Aspergillus wentii*, *Penicillium spp.* (glive).

Za drugo fazo nitrifikacije so odgovorne predvsem nitritne oksidacijske bakterije (NOB); nitritno oksidacijskih arhej zaenkrat še niso odkrili. Oksidatorji nitritnega (nitrat (III)) iona v nitratni(V) ion, opravljajo oksidacijo s pomočjo encima imenovanega nitritna oksidoreduktaza in zelo kratke elektronske transportne verige. V tem koraku transformacije dušika so udeleženi štiri rodovi bakterij: *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrospira* in *Nitrococcus* (Hayatsu, 2008, str. 38, 39).

Avtotrofni nitrifikatorji so kemoavtotrofi, ki izkoriščajo ogljikov dioksid kot izvor ogljika za njihovo rast (Wikipedia, 2012).

2. 1. 4 Denitrifikacija

Denitrifikacija je proces, pri katerem mikroorganizmi pretvarjajo nitrat(III) ali nitrat(V) v dušikov oksid (NO) in didušikov oksid (N₂O). Oba se v nadaljevanju zreducirata do atmosferskega dušika

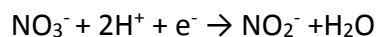
(N₂). V proces denitrifikacije so vključeni tudi različni kofaktorji (npr. piridinski nukleotidi) in proteini oz. druge organske molekule, ki delujejo kot elektronski prenašalci oz. donorji elektronov (Wikipedia, 2013).

Denitrifikacijo izvajajo predvsem anaerobne heterotrofne bakterije (npr. *Paracoccus denitrificans* in druge bakterije iz družine Pseudomonadaceae), izoliranih je bilo tudi nekaj avtotrofnih denitrifikatorjev (npr. *Thiobacillus denitrificans*). Denitrifikatoji so tudi glive (npr. *Cylindrocarpon tonkinense* in *Gibberella fujikuroii*), pri čemer denitrifikacija pri njih, kot anaerobno dihanje, poteka v mitohondrijih. Poznamo tudi nekaj aerobnih bakterij, ki jo izvajajo. To so *Paracoccus denitrificans*, *Mesorhizobium sp.*, *Burkholderia cepacia*. Podobno kot bakterije v nitrifikaciji sodelujejo tudi arheje (*Pyrobaculum Aerophilum*, *Haloferax denitrificans*) (Hayatsu, 2008, str. 35).

Denitrifikacijo lahko opišemo kot štiristopenjsko reakcijo:

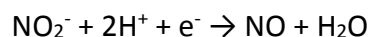
1. faza je redukcija nitrata(V) v nitrat(III). Reakcija je katalizirana z nitratno reduktazo (Nar, iz angleščine nitrate reductase)

Enačba 8:



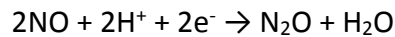
2. faza je redukcija nitrata(III) v dušikov(II) oksid, katalizirana z encimom nitritno reduktazo (Nir, iz angleščine nitrite reductase)(enačba 9).

Enačba 9:



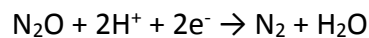
3. faza predstavlja redukcijo dušikovega(II) oksida v didušikov oksid, ob prisotnosti encima dušikov oksidna NO-reduktaza (Nor, iz angleščine nitric oxid reductase)(enačba 10).

Enačba 10:



4. faza reducira didušikov oksid v atmosferski dušik z encimom didušikov oksidno N₂O-reduktazo (Nos, iz angleščine nitrous oxide reductase)(enačba 11).

Enačba 11:



Reakcija poteka ob celični membrani bakterije. Energija se skladišči v obliki protonskega gradienta (razlike v koncentraciji protonov na obeh straneh membrane). V celicah bakterij nitratne ione prenašajo specializirani prenašalci (Wikipedia, 2012).

S procesom denitrifikacije se kroženje dušika v naravi zaključí. Elementarnega dušik se vrne nazaj v atmosfero. Denitrifikacija je bistvenega pomena za vračanje dušika nazaj v ozračje in je edini način za zagotavljanje vsebnosti dušika v morju in na kopnem. S tem je preprečeno, da bi se ves dušik iz atmosfere raztopil v morju, kar bi onemogočilo življenje na kopnem. Danes se denitrifikacija uporablja kot tehnični postopek nadzorovanega ekološkega čiščenja odpadne vode in odstranjevanja nitratov, katerih prisotnost spodbuja evtrofikacijo in zmanjšanje pitnosti vode (Wikipedia, 2012).

2. 2 Kroženje dušika v sladkovodnem akvariju

Tako kot v naravi, kroženje dušika poteka tudi v akvariju. Podobno kot v naravi, ga lahko razdelimo na fiksacijo, amonifikacijo, nitrifikacijo in denitrifikacijo.

Ker je kroženje dušika in z njim predvsem nitrifikacija eden ključnih biokemičnih procesov v akvariju, je poznavanje le-tega izrednega pomena za pravilno vzdrževanje akvarija in zagotovitev optimalnih pogojev za akvarijske organizme.

Cilj "biotop akvaristov", ki želijo ustvariti čim bolj naravne pogoje, se je približati naravnim ravnotežjem in naravnemu habitatnemu mikrokolju (Dolenc B., Akvazin, 2011)

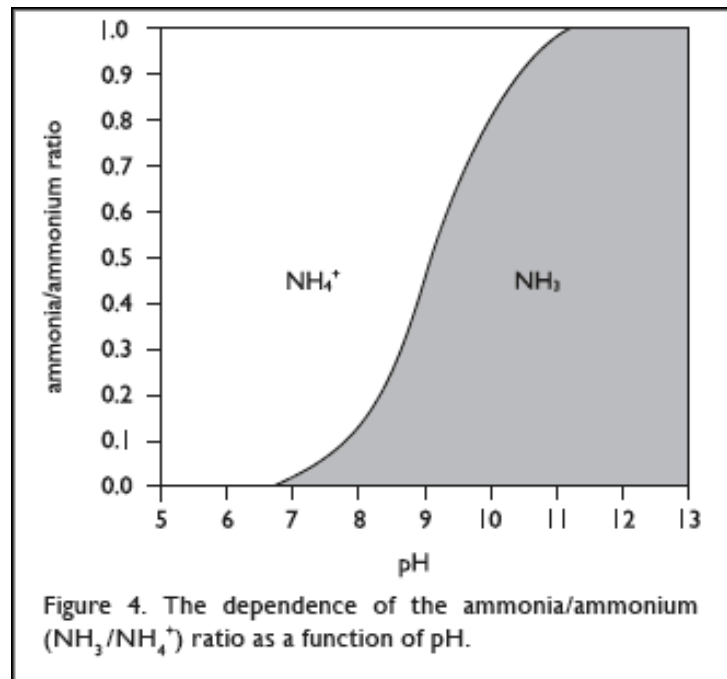
2. 2. 1 Fiksacija dušika

Fiksacija v akvariju ni edini vir amonijaka. Relativno velika količina amonijaka se pri sladkovodnih ribah iz organizma izloči s pasivno difuzijo amonijaka skozi škrge. Amonijak v akvariju nastane tudi z amonifikacijo, z gnitjem organskih snovi (npr. hrane za akvarijske organizme, iztrebkov akvarijskih živali, sečnine, odmrlih delov rastlin, ribje sluzi, odmrlih lusk).

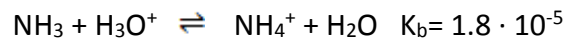
2. 2. 2 Amonijak

Amonijak je v akvariju raztopljen v vodi in je tako v dinamičnem ravnotežju z amonijevim ionom (enačba 2). Na ravnotežje imata velik vpliv temperatura in pH vode. Višji kot je pH (bolj kot je voda bazična), bolj je ravnotežje pomaknjeno v levo (več neionizirane oblike), koncentracija amonijaka je višja. Čim nižji je pH (bolj kot je voda kislja), tem bolj je ravnotežje pomaknjeno v desno (več amonijevega iona). Vpliv pH na pomik ravnotežja v sladki vodi prikazuje graf 1, iz grafa vidimo, da je nad $\text{pH} = 7$ v vodnih raztopinah v vedno večji delež amonijevega iona. V rahlo kislem okolju pa prevladuje slabo disociiran amonijak.

Graf 1: Razmerje med ioniziranim in neioniziranim amonijakom pri različnih vrednostih pH



(Vir: <http://pubs.ext.vt.edu/442/442-110/442-110.html>, [Citirano 30. 11. 2012, 23:17])



Koncentracija nedosiciiranega amonijaka je nižja ob nižjih temperaturah, saj je reakcija v desno smer endotermna. Pri višji temperaturi sistem torej absorbira energijo, ravnotežje se premakne v desno.

To dinamično ravnotežje je izrednega pomena, saj je neionizirana oblika amonijaka (NH_3) bistveno bolj toksična kot ionizirana oblika (amonijev ion – NH_4^+).

Amonijak (NH_3) v koncentracijah 0,6 ppm (0,6 mg /L) lahko povzroči pogin sladkovodnih alg (Bretthauer, 1978), koncentracije NH_3 v območju 0,04 ppm pa povzročajo poškodbe škrg in ledvic, v kolikor so živali (manjše ribe) tem koncentracijamf izpostavljene dalj časa (Thurston in

sod., 1984). Prisotnost amonijaka prav tako upočasnjuje rast rib, povzroči izgubo apetita in znižuje uspešnost razmnoževanja.

2. 2. 3 Nitrifikacija

V eni izmed novejših raziskav (Sauder, 2011, str. 6) je bilo ugotovljeno da AOA v sladkovodnem akvarijskem okolju resnično dominirajo nad AOB (predvsem že omenjena *Nitrosopumilus maritimus* in pred kratkim izolirana *Nitrosopumilus gargensis*).

Najpogostejše nitrifikacije bakterije, ki jih lahko najdemo v bioloških filtrih so iz rodu *Nitrosomonas* in *Nitrospira* (H. Urakawa, 2007, str. 5)

NOB so počasi »rastoči« organizmi, ki se podvojijo na vsakih 12-32h (Hovanec, 1997, str. 1).

Bakterije *Nitrosomonas* se podvojijo po približno 12 h; *Nitrospira* potrebujejo več časa -do 32 h. V novo postavljenem akvariju lahko mine kar 8 tednov, preden je populacija bakterij zmožna nitrifikacije.

Amonijak lahko inhibitorško deluje tudi na nitrifikacijske bakterije. NOB so bolj občutljive na koncentracije amonijaka od 0,1 do 1,0 mg/L, med tem, ko na AOB inhibitorno vplivajo koncentracije od 10 do 150 mg/L (K. DJ, 2005, str. 5).

V mediju, ki vsebuje nizko koncentracijo amonijaka (do 10 mg/L), je veliko bolj verjetno, da se v njem razvije večje število AOB, kot v mediju z visoko koncentracijo amonijaka. (Prinčič , 1998, str. 1)

Končni produkt nitrifikacije so nitratni(V) ioni, ki so za akvarijske organizme v primerjavi z nitratnimi(III) ioni veliko manj strupeni in bistveno manj toksični kot amonijak.

V povprečju naj bi sladkovodne ribe prenesle dokaj visoko koncentracijo nitrata(V), to je med 100 in 500 mg/L, vendar sladkovodni akvaristi poskušajo vzdrževati koncentracijo teh ionov pod 50 mg/L. Osnovni razlog je občutljivost ribjih jajčec, ki se lahko deformirajo že pri koncentracijah od 20 mg/L navzgor. Tako odrasle ribe kot mladice rastejo boljše, če je koncentracija nižja od 38 mg/L (T. Hrubec, 1996, str. 3).

Toksičnost nitrata(III) je močno povezana z koncentracijo kloridnih (Cl^-) ionov v vodi. Višja koncentracija kloridnih ionov, zviša toksičnost nitratnih(III) ionov (Kroupova, 2005, str. 462).

2. 2. 3. 1 Ciklanje ali vtekanje akvarija

Ciklanje ali vtekanje akvarija v akvaristiki pomeni biološki zagon akvarija oz. vzpostavitev biološkega ravnovesja v akvariju. To pomeni, da so vsi parametri akvarijske vode bolj ali manj stabilni (pH, trdota), še posebej se to navezuje na koncentracijo skupnega amonijaka (koncentracije neioniziranega amonijaka in ioniziranega amonijaka) in koncentracijo nitrata(III), ki morata biti pod zaznavno mejo, torej okoli 0 mg/L

Ciklanje je pravzaprav »čakanje« da se v akvarij naselijo nitrifikacijske bakterije (Ker v začetku postavitve akvarija, v akvarijski vodi ni organskih spojin, amonifikacija, ki je pogoj za nitrifikacijo, ne more potekati. Amonifikacijo akvaristi navadno »sprožijo« z dodajanjem hrane za ribe v akvarij, ki je še brez vodnih brez organizmov.

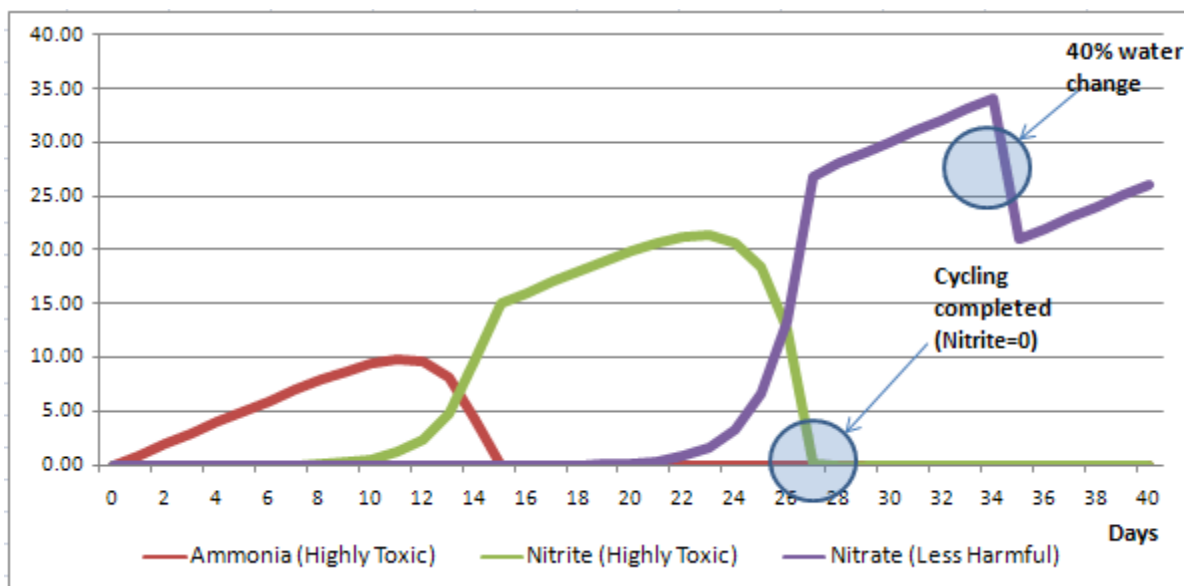
»Prve dni delovanja akvarija vsi koristni biološki procesi še ne delujejo in bi prekmalu naseljene in hranjene ribe v takih pogojih zbolele ali celo poginile, saj se v tem obdobju pojavijo v vodi previsoke, za ribe (lahko tudi) smrtne koncentracije amonijevih ionov ter nitrita; šele optimalno delujoč biološki filter pretvori te toksične snovi v manj strupene nitrate(V), ki ne povzročajo tako eksplozivne rasti alg in niso akutno strupene za ribe. Največja možna napaka (ki se žal dogaja) bi bila, če bi dali v tako neuravnovešen akvarij ribe, po obolele zaradi transporta, še antibiotike, ki direktno škodujejo koristnim bakterijam. Zato rib najmanj 10 -14 dni po zagonu akvarija ne dajemo v akvarij. Da bi pa biološki procesi zaživel, s čimer bi se koristne kolonije nitrifikacijskih

bakterij optimalno razvile, je bistveno, da v akvarij v začetni fazi, v zelo majhnih količinah, dodajamo hrano za ribe« (Dolenc, Akvazin)

Y. H. Bae (2009) opisuje ciklanje , kot kaže graf 2.

Graf 2: Ciklanje akvarija po dnevih

(rdeče črta predstavlja koncentracijo amonijaka, zelena nitrata(III), vijolična nitrata(V))



(Vir: <http://aqadvisor.com/articles/Cycling.php>), povzeto dne...

Po dodatku hrane, v roku nekaj ur, začne naraščati koncentracija amonijaka. AOB in AOA se razmnožijo in začnejo pretvarjati amonijak v nitrat(III). Po približno dvanajstih dnevih je AOB in AOA dovolj, da lahko razgradijo ves amonijak, koncentracija nitrata(III) začne naraščati. Po približno dvajsetih dnevih se začnejo razmnoževati tudi NOB, ki pretvarjajo nitrat(III) v nitrat(V). Ko nitrat(III) po približno sedemindvajsetih dneh pade na koncentracijo pod mejo zaznave, je ciklanje končano. Narašča le še nitrat(V), ki ga lahko iz vode odstranimo z delno menjavo vode (približno tretjin na enkrat), nekaj nitrata(V) pa porabijo tudi hitro rastoče rastline in denitrifikacijske bakterije, ki pa jih je premalo, da bi odstranile vso količino nitrata(V).

Nitrifikacije bakterije so v akvariju skoraj na vseh površinah (steklu, pesku, plastičnih ceveh, koreninah, kamnih), vendar jih še vedno ni dovolj za optimalen potek nitrifikacije v povprečno obremenjenem akvariju.

Da bi v akvariju imeli dovolj površine, ki jo ti enoceličarji naseljujejo, uporabljamo biološke filtre. To so posode, napolnjene s filtrirnim materialom (peno, keramičnimi obročki, plastičnimi biokroglicami, ...), preko katerih teče voda. Obstaja več vrst akvarijskih filtrov (notranji filtri – enojni filtri, prekatni filtri; filtri »na gobico«; zunanji filtri - prekatni filtri, »kanistrski« ali enojni filtri; talni filtri, zračni filtri in denitratorji); med akvaristi so med bolj priljubljenimi zunanji filtri (Povzeto po Akvazin)

2.3 Filtranje akvarijske vode

Filtriranje vode delimo na:

- Mehansko filtracijo.
- Biološko filtracijo.
- Kemično filtracijo.

Mehanska filtracija označuje filtracijo (odstranitev) organskih ostankov, kot so ostanki hrane, odmrlih delov rastlin, živalskih iztrebkov in drugih trdnih delcev.) S pomočjo precejalnih materialov, kot so vata, filtrirna modra goba, bio vlakna in podobno, se mehanska filtracija zaključí.

Z biološko filtracijo, a nitrifikacijske bakterije razgradijo amonijak in ga pretvorijo v končni produkt - nitrat(V). Za naselitev nitrifikacijskih bakterij v filtru potrebujemo filtrirne medije z veliko porozno površino (keramični obročki, bio žogice, biobox kocke, keramični obročki, lava, kremenčev granulati, modra filtrirna goba).vir

»Filtriranje vode z ogljem, šoto, zeoliti ali posebnimi smolami imenujemo kemično filtriranje, saj z njimi spreminjamo kemične lastnosti vode« (Gril , 2004).

Aktivno oglje običajno uporabljamo, ko želimo iz vode odstraniti antibiotike, barvila, fosfate, kloridne ione, brom, arzen, vodikov peroksid, hipermangan in nekatere druge težke kovine ter strupe.

Ko je akvarij utečen, moramo poskrbeti, da se biološko ravnovesje, ki se je vzpostavilo, ne poruši. Tako je priporočeno, da naenkrat ne menjamo več kot tretjine akvarijske vode. Vodovodno vodo, ki jo dodajamo v akvarij, moramo prav tako pustiti v odprti posodi vsaj 24h pred izlivom v akvarij, da iz nje izhlapi večina klora. Klor je toksičen za nitrifikacijske bakterije. Za nitrifikacije bakterije so lahko usodne tudi večje in nenadne spremembe pH. Akvarij ne sme biti prenaseljen z organizmi, saj lahko njihovi organski odpadki zvišajo koncentracijo amonijaka na raven, ki je previsoka za bakterije.

»Najbolj pomembno pa je, da biološkega filtrirnega medija nikoli ne spiramo v vodovodni vodi in preveč temeljito, ampak ga le poplaknemo v umazani akvarijski vodi. S tem preprečimo, da bi z medija temeljito sprali bakterije, ki so na njem naseljene.« (Gril., 2004)

2. 4 Vpliv temperature na hitrost nitrifikacije

Literatura (HØLLING-SØRENSEN, 1993, str. 71) navaja optimalno temperaturo za rast nitrifikacijskih bakterij med 28 °C in 36 °C; za bakterije iz rodu *Nitrobacter* je objavljena jele-ta tudi do 42 °C (Painter, 1970). Temperatura, pri kateri je hitrost nitrifikacije največja, je okoli 30°C. Pri temperaturi pod 15°C hitrost nitrifikacije znatno upade, pri 12 °C pa pade na 50 % optimalne. Za bakterije iz rodu *Nitrosomonas* je smrtna točka med 54 in 58 °C ter mraz okoli 4 °C (Hølling-Sørensen, Jørgensen S., 1993, str. 71).

2. 5 Vpliv pH na hitrost nitrifikacije

A. Prinčič (1998) navaja optimalen pH za AOB med 5,8 in 8,5, za NOB pa med 6,5 in 8,5. Pod vrednostjo pH 5,8 se hitrost nitrifikacije začne zniževati.

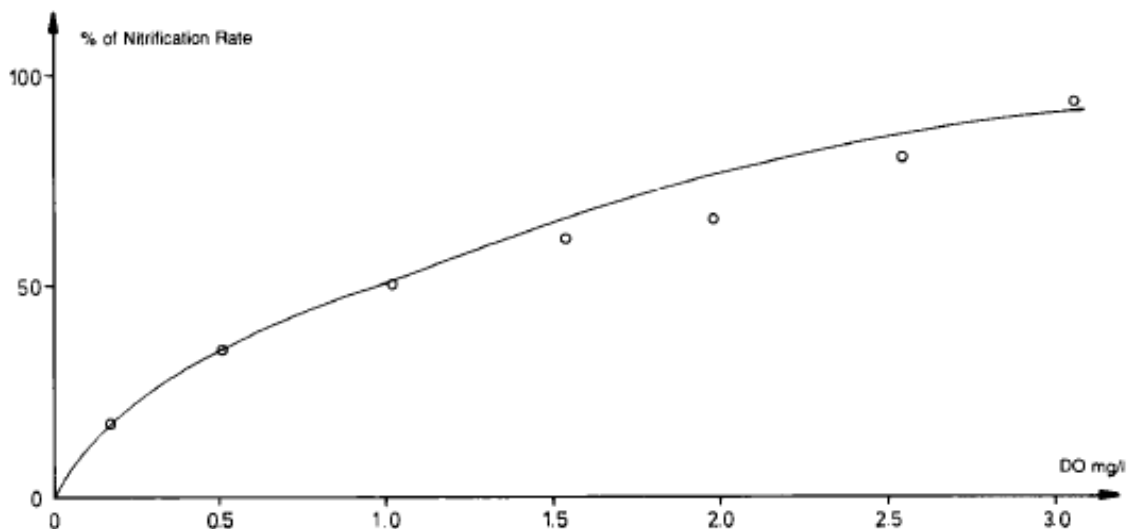
Nekoliko starejše objave (Hølling-Sørensen, 1993, str. 87) navajajo da optimalen pH za nitrifikacijo variira med 8 in 9. Za bakterije Nitrosomonas med 8,5 in 8,8 in za Nitrobacter med 8,3 in 9,3. Po podatkih Hofman (1973) je optimalen pH za bakterije Nitrobacter 7,7.

Pri pH 9,6 in 5-5,5 naj bi hitrost nitrifikacije padla skoraj na ničlo.

2. 6 Vpliv raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije

Po izračunih naj bi bilo za oksidacijo 1 mg NH^+ v prvi fazi nitrifikacije bilo potrebnih 4, 6 mg raztopljenega kisika na liter vode. Inhibitorsko naj bi delovala koncentracija raztopljenega kisika nižja od 2 mg/L; pri koncentraciji 1, 3 mg O_2 /L hitrost nitrifikacije pade na 60 % začetne hitrosti. Vpliv koncentracije raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije je prikazan na grafu 3 (Hølling-Sørensen, 1993, str. 84)

Graf 3: Vpliv raztopljenega kisika (mg/L) na hitrost nitrifikacije (%)



(Vir: Hølling-Sørensen B., 1993, str. 86)

3 PRAKTIČNO DELO

3. 1. Materiali in kemikalije

Pri laboratorijskem delu sem uporabil naslednje kemikalije:

- 1 mol/L raztopina NaOH
- 98% raztopina metanojske kisline (mravljične kisline)
- 25% raztopina amonijaka
- VISOCOLOR reagent za:
 - Amonijeve ione
 - Nitratne(III) ione
 - Nitratne(V) ione
- Pufer pH 4
- Pufer pH 7
- Destilirana voda

Pri laboratorijskem delu sem uporabil naslednje aparature:

- Spektrofotometer SpectroVis Plus (Vernier), 380 nm–950 nm, resolucija ~ 2.5 nm
- Vmesnik Vernier LabQuest 1 in senzorje za:
 - temperaturo (razpon: –40 do 135 °C, natančnost: ±0.2 °C pri 0 °C, ±0.5 °C pri 100 °C)
 - pH (razpon: pH 0-14)
 - koncentracijo raztopljenega kisika (razpon 0-15 mg/L, natančnost: ±0.2 mg/L)

Pri laboratorijskem delu sem uporabil naslednji laboratorijski pribor:

- Avtomatske pipete (0,5 µL – 10 µL, 100 µL – 1000 µL, 1 mL – 10 mL)
- Plastične pipete

- Graduirane pipete
- Čaše
- Puhalke
- Steklene palčke
- Spatule
- Epruvete

Za izvedbo eksperimenta sem uporabil še:

- 4 potopne črpalke s pretokom 300 L/h
- 4 steklene akvarijske posode
- Plastične cevi
- 4 dvo-prekatne posode
- Filtrirni material:
 - Fina modra plastična filtrirna goba
 - Beli keramični obročki
 - Kremenčev pesek

3. 2 Metode dela

3. 2. 1 Načrtovanje eksperimenta

v nalogi bom preučeval vpliv naslednjih dejavnikov na hitrost nitrifikacije v sladkovodnem akvariju:

1. pH akvarijske vode,
2. koncentracijo raztopljenega kisika,
3. vpliv različnih filtrirnih materialov

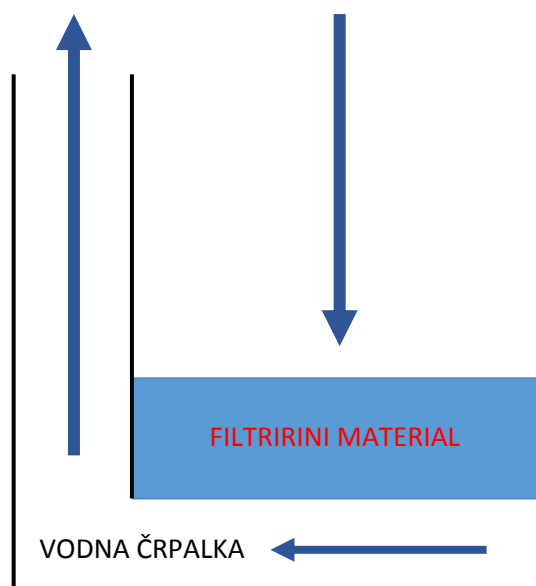
Eksperiment je bil razdeljen na dva dela. V prvem delu sem preučeval vpliv treh različnih filtrirnih materialov na hitrost nitrifikacije, nato sem izbral najboljši filtrirni material, ki je bil uporabljen v drugem delu eksperimenta.

V drugem delu eksperimenta sem preučeval vpliv pH in vpliv koncentracije raztopljenega kisika oz. uporabe zračne črpalke na hitrost nitrifikacije v akvarijih z istim filtrirnim materialom. V obeh delih eksperimenta, je bil en akvarij prisoten kot kontrolni akvarij.

Temperatura akvarijske vode je bila čez dan v povprečju 20,08 °C, ponoči pa se je spustila na 18,02°C.

3. 3 Postavitev akvarijev

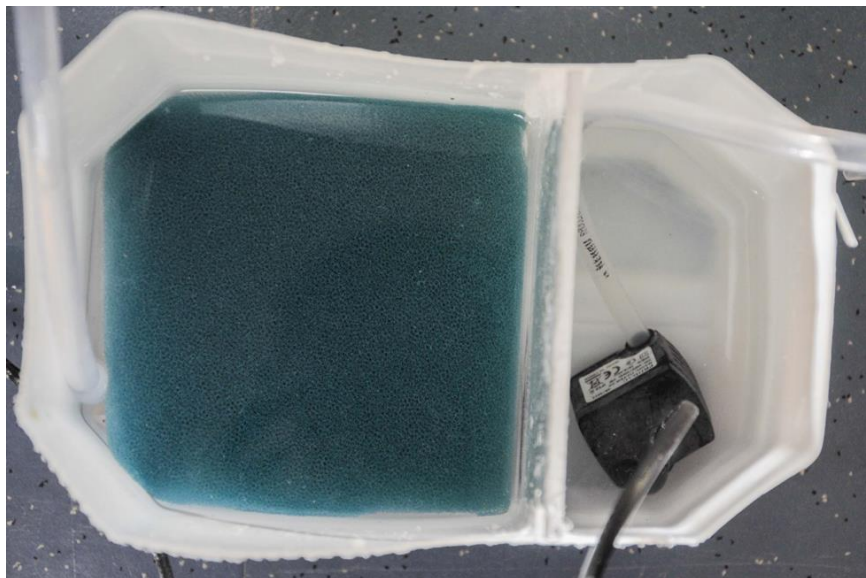
Za postavitev akvarijev sem uporabil štiri steklene (25 cm * 40 cm * 25 cm), 25 L akvarijske posode, ki sem jih napolnil z 20 L vodovodne vode. Iz štirih pet literskih plastičnih posod sem sestavil štiri preproste dvoprekatne filtre, kot prikazujejo slike 2-4. Voda iz akvarija se je s pomočjo natege oz. razlike v gladini vode po plastični cevi spuščala v filter, nato potovala skozi filtrirni material in se s pomočjo potopne vodne črpalke vračala vrne nazaj v akvarij.



Slika 2: Dvoprekatni filter (lasten vir)



Slika 3: Akvarijski filter (lasten vir)



Slika 4: Akvarijski filter (lasten vir)

Celotno postavitve prikazuje slika 5.



Slika 5: Postavitve eksperimenta (lasten vir)

3. 4 Vpliv različnih filtrirnih materialov na hitrost nitrifikacije

V prvem delu eksperimenta sem preučeval vpliv treh različnih filtrirnih materialov, ki so v poskusu predstavljali neodvisno spremenljivko. V filtru za prvi akvarij sem uporabil fino modro plastično filtrirno gobo, ki je eden izmed najpogosteje uporabljenih filtrirnih medijev. V drugem keramični obročke, ki bi naj imeli večjo efektivno površino kot modra goba, v tretjem pa sem uporabil »naravni« filtrirni material, kremenčev pesek, ki je bil najpogosteje uporabljen filtrirni medij, preden so začeli uporabljati keramične obročke in plastični filtrirni material. Volumen vseh filtrirnih materialov je bil enak (1 L).

Četrty akvarij je bil kontrolni akvarij in je bil brez filtrirnega materiala.



Slika 7: modra goba



Slika 6: kremenčev pesek



Slika 8: keramični obročki

Začetna koncentracija amonijaka v vodi, je bila zelo nizka oz. pod mejo zaznave (glej parametri vodovodne vode), zato sem v vsak akvarij dodal 0,879 mL oz. 879 μ L 25 % raztopine amonijaka in s tem dosegel željeno začetno koncentracijo 10 mg/L. Izračun je prikazan spodaj.

$$V(\text{akvarija}) = 20 \text{ L}$$

$$\gamma(\text{akvarija}) = 10 \text{ mg/L}$$

$$w(\text{raztopine amonijaka}) = 25\%$$

$$1 \text{ L (raztopine amonijaka)} \approx 0,91 \text{ kg} \rightarrow \rho(\text{raztopine}) \approx 0,91 \text{ kg/L}$$

$$\gamma = \frac{m}{V} \rightarrow m = \gamma * V = 10 \text{ mg L}^{-1} * 20 \text{ L} = 200 \text{ mg}$$

$$w = \frac{\text{masa topljenca}}{\text{masa raztopine}} = \frac{m(\text{NH}_3)}{m(\text{raz.})} \rightarrow m(\text{raz.}) = \frac{m(\text{NH}_3)}{w} = \frac{200 \text{ mg}}{0,25} = 800 \text{ mg}$$

$$1 \text{ L} \approx 0,91 \text{ kg} \rightarrow 800 \text{ mg} \approx 879 \mu\text{L}$$

Začetno koncentracijo 10 mg/L sem izbral zato, ker Prinčič (1998) navaja, da je v mediju, ki vsebuje nižjo koncentracijo amonijaka (10 mg/L) veliko bolj verjetno, da se v njem razvije bistveno večje število AOB, kot v mediju z visoko koncentracijo amonijaka.

Skozi obdobje sedmih tednov sem nato 1-krat tedensko opravljal meritve koncentracije amonijaka.

3.5 Določanje koncentracije amonijaka s spektrofotometrom Vernier

Pripravil sem štiri standardne raztopine amonijaka:

C1= 0,45 mg/L,

C2= 1 mg/L,

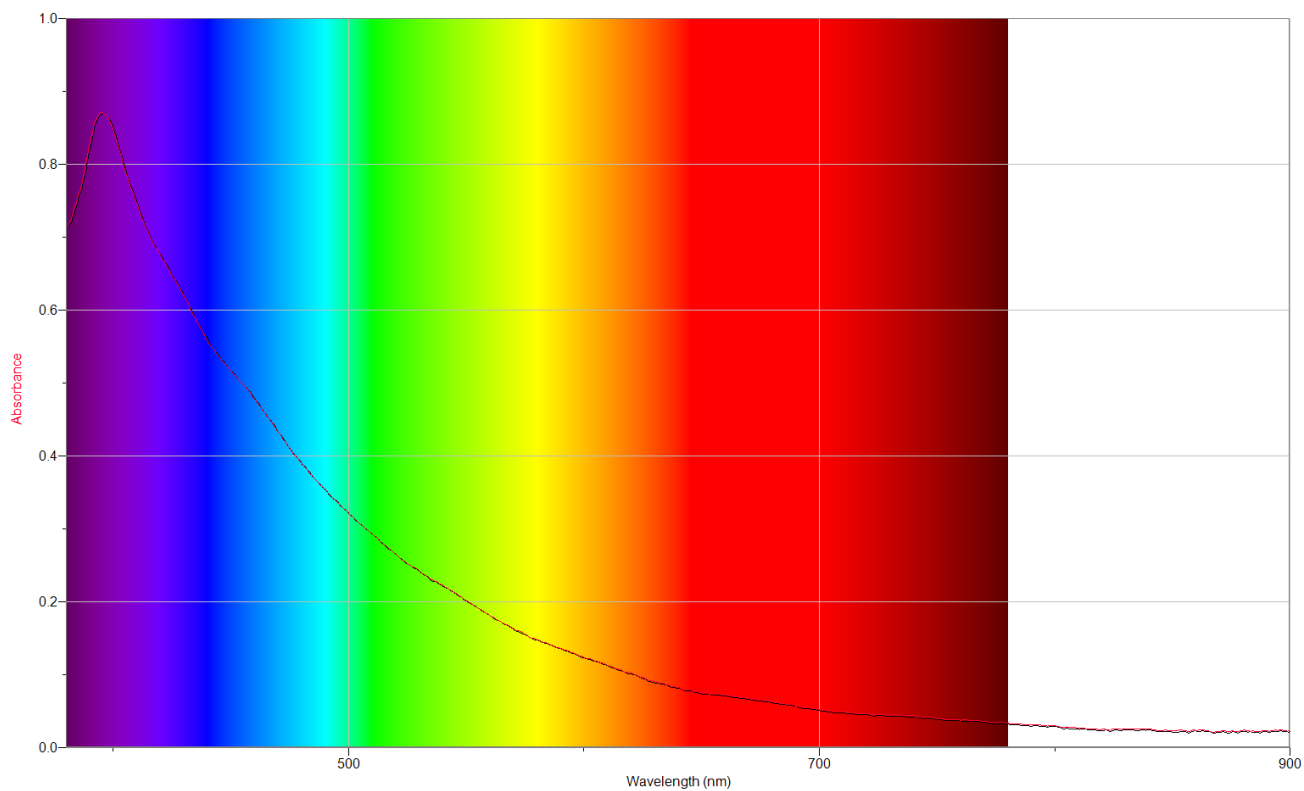
C3= 3 mg/L in

C4= 5 mg/L).

C0 je bila slepa proba.

S spektrofotometrom sem z vzorcem s koncentracijo 5 mg/L najprej določil tisto valovno dolžino, pri kateri absorbanca doseže maksimum. Ta je bilo pri 395,5 nm (Graf 4).

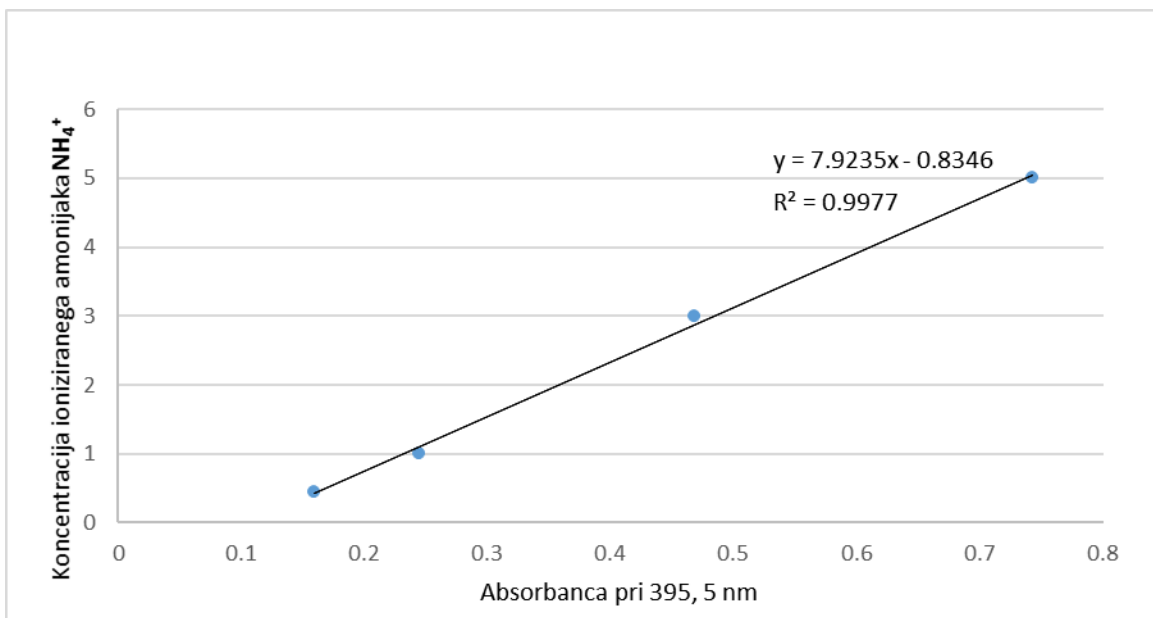
Graf 4: λ_{\max} za vodno raztopino amonijaka



Sledila je meritev absorbance standardnim raztopinam. Iz podatkov sem izrisal umeritveno premico. Enačba premice je $7.9235x - 0.8346$.

Na podlagi enačbe premice sem v nadaljevanju izračunal koncentracijo raztopljenega amonijaka V vzorcih akvarijskih vod.

Graf 5: umeritvena a premica za amonijak



Iz grafa je razvidno, da je linearno ujemanje meritev zadostno ($R^2=0,9977$).

3. 6 Vpliv pH in koncentracije raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije

V drugem delu eksperimenta sem preverjal vpliv različnih vrednosti pH na hitrost nitrifikacije in poskušal ugotoviti, če uporaba zračne črpalke v akvariju poviša hitrost nitrifikacije (vpliv raztopljenega kisika).

Vsi akvariji so bili izpraznjeni, očiščeni z vodovodno vodo in ponovno napolnjeni, vsak z 20 L vode.

Izpraznjeni in očiščeni so bili tudi filtri, vodne črpalke in plastične cevi.

V prvem akvariju sem z dodajanjem NaOH, 1,00 mol/L pH dvignil na vrednost 8,87. S procesom nitrifikacije je le-ta začela padati, saj se je amonijak pretvarjal v nitrit.

V drugem akvariju sem z dodajanjem metanojske kisline, pH akvarijske vode znižal na 7,43. Ob koncu meritev, po enem tednu je pH znašal le 4,93.

Tretjemu akvariju sem z zračno črpalko dodajal zrak oz. z zrakom obogaten kisik, četrti akvarij je bil ponovno kontrolni akvarij z začetno vrednostjo pH 8,09.

Tokrat sem v akvarije dodal 528 μ L amonijaka, začetna koncentracija amonijaka v akvariju je tako bila 6 mg/L.

V vsakem izmed filtrov je bilo 30 keramičnih obročkov, ki so bili filtrirni medij. Keramične obročke sem izbral zato, ker se lahko najbolj enakomerno razdelijo (preštejejo) med akvariji.

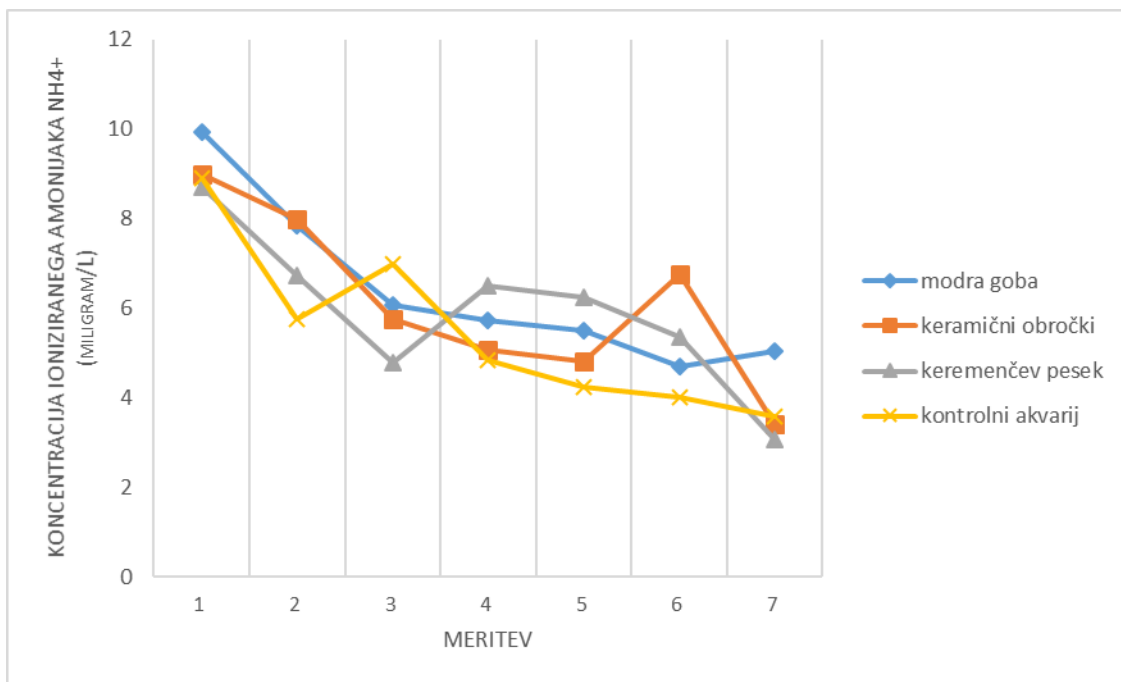
4 REZULTATI

4.1 Vpliv različnih filtrirnih materialov na hitrost nitrifikacije

Opravil sem sedem meritev, ki so prikazane v preglednici 1.

Grafično so rezultati prikazani na grafu 6. Pri tretji meritvi je bil v akvariju z kremenčevim peskom zaznan padec koncentracije amonijaka, ki zelo odstopa od ostalih meritev, saj je koncentracija pri tretji meritvi najnižja od izmerjenih koncentracijah pri vseh meritvah. Podobno se je zgodilo pri šesti meritvi za akvarij s keramičnimi obročki, pri čemer tu lahko opazimo sunkovito naraščanje koncentracije amonijaka, ki odstopa od ostalih meritev.

Graf 6: Vpliv treh različnih filtrirnih materialov na hitrost nitrifikacije



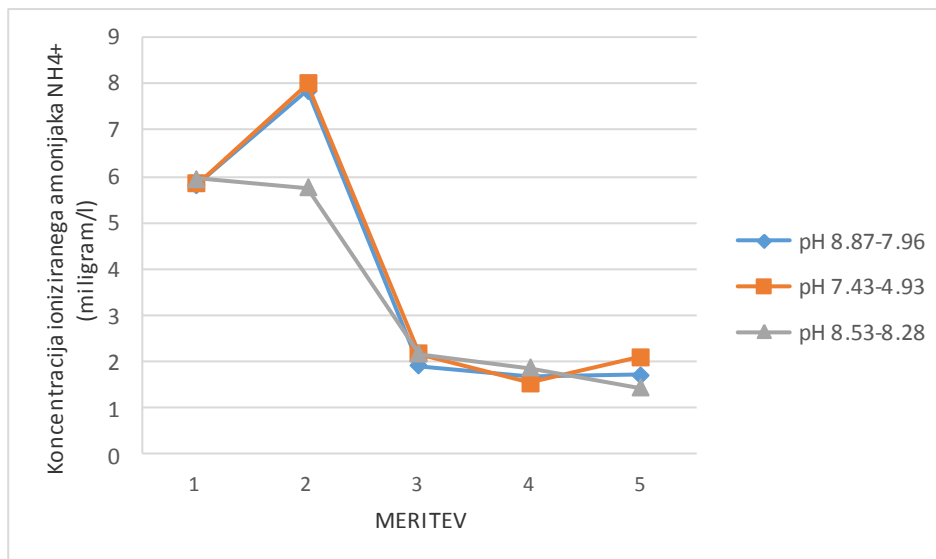
Preglednica 1: Meritve absorbance in izračun koncentracije amonijaka pri posameznih akvarijih z različnim filtrirnim materialom

Številka akvarija	1							2						
Filtrirni material	Modra goba							Keramični obročki						
Št. meritve	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Absorbanca pri 395, 5 nm	1,360	1,097	0,871	0,827	0,799	0,699	0,742	1,240	1,116	0,831	0,745	0,712	0,580	0,537
Koncentracija NH ₄ ⁺ (mg/L)	9,94	7,86	6,07	5,72	5,50	4,70	5,04	8,99	8,00	5,75	5,07	4,80	6,76	3,42
Številka akvarija	3							4						
Filtrirni material	Kremenčev pesek							/ (kontrolni akvarij)						
Št. meritve	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Absorbanca pri 395, 5 nm	1,205	0,953	0,708	0,927	0,894	0,782	0,491	1,520	0,832	0,989	0,718	0,642	0,610	0,557
Koncentracija NH ₄ ⁺ (mg/L)	8,71	6,72	4,77	6,51	6,25	5,36	3,06	8,9	5,76	7	4,85	4,25	4,00	3,58

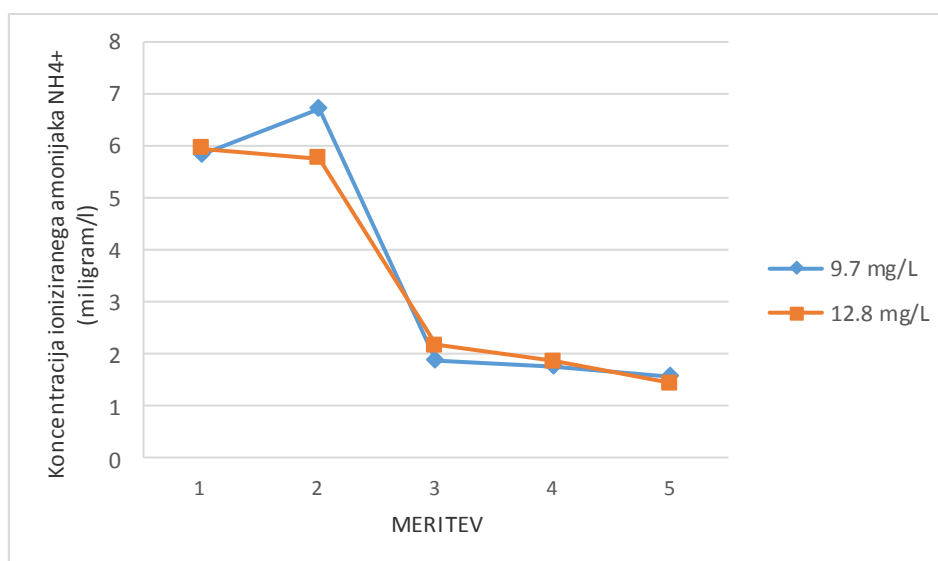
4. 2 Vpliv pH in koncentracije raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije

Opravil sem 5 meritev, katerih rezultati so prikazani v preglednici 2. Vpliv različne vrednosti pH je prikazan na grafu 8, na grafu 9 pa je prikazan vpliv prisotnosti zračne črpalke oz. koncentracije raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije.

Graf 7: Vpliv različne vrednosti pH na hitrost nitrifikacije



Graf 8: Vpliv prisotnosti zračne črpalke oz. koncentracije raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije



Preglednica 2: Meritve absorbance in izračun koncentracije amonijaka pri posameznih akvarijih z različnim pH in koncentracijoraztopljenega kisika

Številka akvarija	1					2				
pH	8,87-7,96					7,43-4,93				
Št. meritve	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Absorbanca pri 395, 5 nm	0,840	0,767	0,346	0,316	0,322	0,887	0,865	0,378	0,300	0,370
Koncentracija NH ₄ ⁺ (mg/L)	5,82	7,86	1,91	1,67	1,72	5,85	8,00	2,16	1,54	2,10
Številka akvarija	3					4				
Koncentracija raztopljenega kisika (mg/L)	9,7					12,8 pH: 8,53-8,28				
Št. meritve	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Absorbanca pri 395, 5 nm	0,879	0,876	0,344	0,330	0,305	0,857	0,806	0,379	0,340	0,287
Koncentracija NH ₄ ⁺ (mg/L)	5,85	6,72	1,89	1,78	1,58	5,96	5,76	2,17	1,86	1,44

5 RAZPRAVA

Odstranitev amonijaka, ki je za večino akvarijskih organizmov zelo toksičen, je dosežena z biološko nitrifikacijo, ki praviloma poteka v akvarijskih filtrih. Bakterije, ki se naselijo na porozen filtrirni medij v filtru, pretvarjajo amonijak v manj toksičen nitrat(III), le tega pa v še manj toksičen nitrat(V), ki ga odstranimo z menjavo akvarijske vode. Odstranitev amonijaka je tako eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na optimalno delovanje akvarija in življenje akvarijskih organizmov. Hitrost nitrifikacije je odvisna od dejavnikov, ki sem jih preučeval v nalogi. To so: temperatura, koncentracije amonijaka, vrednosti pH, aktivne površine filtrirnega medija, koncentracije raztopljenega kisika

Z izjemo članka Sajuni N. R. (2010) nisem zasledil nobenih drugih objav, ki bi preučevale vpliv različnih filtrirnih materialov (za akvarijske filtre) na hitrost nitrifikacije v sladkovodnem akvariju. Znanstveni članki, v katerih so se avtorji lotevali preučevanja vrednosti pH, temperature in koncentracije raztopljenega kisika, pa so predvsem iz konca prejšnjega stoletja, npr. Hølling-Sørensen B. (1993) in Prinčič A. (1998). V teh člankih so na splošno obravnavani različni vplivi na odstranitev amonijaka (nitrifikacijo) iz odpadnih vod in niso osredotočeni na sladkovodni akvarijski sistem.

Rezultati sedmih meritev koncentracije amonijaka oz. ioniziranega amonijaka NH_4^+ v testiranih akvarijih nakazujejo, da izbira filtrirnega materiala ima vpliv na hitrost nitrifikacije, vendar razlike v koncentraciji amonijaka pri posameznih meritvah, med različnimi filtrirnimi materiali niso velike. Največja razlika 2,76 mg/L pri meritvi 6. Iz tega lahko zaključim, da bistvenih razlik v učinkovitosti med testiranimi filtri ni. Iz grafa 6 so razvidna nihanja koncentracije amonijaka (največja se pojavijo pri tretji in šesti meritvi). Razlog za to, bi lahko bil zmanjšanje števila bakterij, zaradi predolge izpostavljenosti visoki koncentraciji amonijaka (7 mg/L) čeprav avtorji, kot npr. DJ K. (2005) kot toksično vrednost navajajo koncentracijo med 10-150 mg/L.

Najbolj presenetljivi so bili rezultati meritev za kontrolni akvarij. Iz rezultatov je razvidno, da je bila koncentracija amonijaka pri drugi ter četrti, peti in šesti meritvi najnižja prav v kontrolnem akvariju, ki filtrirnega materiala sploh ni vseboval in v katerem bi morala biti koncentracija amonijaka teoretično najvišja. Ob končanem eksperimentu (ob zadnji, sedmi meritvi) kontrolni akvarij prav tako ni bil na mestu z najvišjo koncentracijo, ampak je bil drugi, za akvarijem št. 1., katerega filter je vseboval modro filtrirno gobo. Predvidevam, da so bakterije v kontrolnem akvariju bolje »naselile« stekleno površino akvarija in notranjost plastičnih cevi, vodne črpalke in filtra (plastične posode), saj filtrirnega materiala ni bilo. Mojo predpostavko bi lahko potrdilo tudi opažanje večje površine bio-filma na gladini vode (priloga 3-5) v kontrolnem akvariju in na površini stekla, kot je to razvidno na slikah 1-5, dodanih v prilogi. Dno akvarija sploh ni mogoče videti (priloga 1). V drugih akvarijih tako velike površine bio-filma ni bilo.

Med tremi filtrirnimi mediji sta se kot najboljša pokazala kremenčev pesek in keramični obročki. Koncentracija amonijaka v akvariju 3, s kremenčevim peskom, je bila po drugi meritvi najnižja med testnimi akvariji. Ob tretji meritvi je bila razlika v koncentraciji v primerjavi z drugimi akvariji še večja, pri četrti meritvi pa se je koncentracija zvišala na raven koncentracije ob drugi meritvi (za 1,74 mg/L). Koncentracija je ponovno precej padla pri zadnji (sedmi) meritvi, kjer je bila najnižja med vsemi akvariji.

Koncentracija v akvariju s keramični obročki (akvarij 2) je bila ob koncu druga najnižja med vsemi akvariji. Prav tako je bila v drugem akvariju druga najnižja koncentracija pri tretji ter četrti in peti meritvi, ko je bila nižja tudi od koncentracije v akvariju 3 (kremenčev pesek).

Modra filtrirna goba se je izkazala za najslabši filtrirni material med testiranimi. Najvišja koncentracija pri akvariju z modro gobo (akvarij 1) je bila ob prvem, tretjem in zadnjem testiranju (kjer je bila razlika z akvarijem s keramični obročki 1,62 mg/L). V ostalih primerih, razen pri 6 testiranju, je bila koncentracija amonijaka druga najvišja med vsemi akvariji.

Podobne rezultate omenja tudi Sajuni N. R. (2010), ki je primerjal keramične obročke in japonski mat filtrirni material, ki je podoben modri filtrirni gobi. Ta se je pokazal za slabši filtrirni material kot keramični obročki.

Če povzamem, naravni filtrirni material – kremenčev pesek, ki so ga uporabljali akvaristi, preden so na tržišče prispeli sodobni filtrirni mediji, se je izkazal za dober filtrirni material, glede na rezultate poskusov, kot najboljši med testiranimi Keramični obročki so po učinkovitosti primerljivi s kremenčevim peskom, filtrirna goba pa se je izkazala za najslabši filtrirni material med testiranimi.

Ker obstaja veliko več različnih filtrirnih materialov, tudi več različnih modrih gob (ki se v glavnem delijo na fino, srednje grobo in grobo), veliko vrst različnih keramičnih obročkov,... bi bilo potrebno za natančnejšo in bolj splošno razvrstitev filtrirnih materialov glede na učinkovitost, med seboj primerjati veliko več le - teh. Rezultati bi bili bolj natančni, če bi opazovali tudi drugo fazo nitrifikacije, ki jo opravljajo NOB, ki pretvarjajo nitrat(III) v nitrat(V). Tako bi spremljali oz. testirali tudi koncentracije nitratnih(V) ionov.

Za tako raziskavo bi bila potrebna večja denarna sredstva, saj bi morali zagotoviti večje število akvarijev in s tem tudi večje število črpalk oz. filtrov z filtrirnim materialom. Meritve bi bilo potrebno opravljati redno, v enakih časovnih presledkih in bolj pogosto.

V drugem delu eksperimenta sem preverjal vpliv vrednosti pH in koncentracije v vodi raztopljenega kisika na hitrost nitrifikacije, ob istem filtrirnem materialu (keramičnih obročkih).

Na podlagi rezultatov lahko trdim, da nitrifikacija najhitreje poteka pri pH vrednosti nekje med pH 6 in pH 8,5. Podobne ugotovitve navaja tudi Prinčič A. (1998), ki ugotavlja, da je najbolj optimalen pH za AOB med 5,8 in 8,5. Pod vrednostjo pH 5,8 naj bi se hitrost nitrifikacije začela manjšati. Podobno je mogoče sklepati tudi na podlagi dobljenih rezultatov, saj je bila pri peti meritvi najvišja koncentracija skupnega amonijaka (če upoštevamo razmerje NH_4^+ in NH_3 iz grafa 1, je bil prisoten samo v ionizirani obliki) v akvariju št. 2, s pH vrednostjo 4,93. Preden se je vrednost pH v drugem akvariju spustila pod 6 (v času četrte meritve), je bila koncentracija amonijaka v tem akvariju najnižja. Ob koncu eksperimenta je najnižjo koncentracijo amonijaka imel kontrolni akvarij s pH vrednostjo 8,28. Do druge meritve je koncentracija amonija naraščala, najverjetneje zaradi šoka bakterij ob nenadni spremembi vrednosti pH ob dodatku

metanojske kisline in natrijevega hidroksida. Druga možnost je nastanek pufra, v priemru metanojske kisline, ki je »porabil« določen del amonijaka.

Iz rezultatov poskusov vidimo, da dodatek zračne črpalke v akvarijski vodi ne pospeši nitrifikacije, v kolikor je v akvarijski vodi raztopljenega kisika dovolj. Po podatkih B. Hølling-Sørensen (1993) in A. Prinčič (1998) naj bi nitrifikacijo začela upočasnjevati koncentracija pod 3-2 mg/L. Koncentracija raztopljenega kisika je tako v kontrolnem (9,7 mg/L) kakor v eksperimentalnem (12,8 mg/L) akvariju presegala to vrednost.

Pri drugi meritvi je bila razlika v koncentraciji amonijaka 1,04 mg/L, vendar se je do zadnje (pete) meritve znižala le na 0,14 mg/L.

Do boljših rezultatov pri ugotavljanju vpliva vrednosti pH in koncentracije raztopljenega kisika na nitrifikacijo bi prišli z rednim testiranjem skozi daljše časovno obdobje, pri čemer bi lahko pH vrednost v eksperimentalnih akvarijih ohranjali konstantno z uporabo avtomatskih pH kontrolorjev, ki bi po potrebi zniževali oz. višali pH.

6 ZAKLJUČEK

Hitrost nitrifikacije je odvisna od dejavnikov, ki sem jih preučeval v tej nalogi. To so temperatura vode v akvariju, koncentracija amonijaka, vrednosti pH, aktivne površine filtrirnega medija in koncentracije raztopljenega kisika.

Z meritvami sem ugotovil, da se je med tremi testiranimi filtrirnimi materiali, za najboljšega izkazal kremenčev pesek, ki so ga akvaristi v večji meri uporabljali včasih. Sledili so keramični obročki, kot najslabši filtrirni medij se je pokazala modra plastična filtrirna goba. Ker obstaja veliko več različnih filtrirnih materialov, bi bilo za natančnejšo in bolj splošno razvrstitev filtrirnih materialov glede na njihovo učinkovitost, potrebno med seboj primerjati večje število le teh.

Na podlagi rezultatov lahko zaključim, da nitrifikacija najhitreje poteka pri pH vrednosti med 6 in 8,5. Podobne ugotovitve podajajo tudi drugi avtorji (Prinčič A., 1998).

Povišanje koncentracije kisika v akvarijski vodi bistveno ne pospeši nitrifikacije, če je v akvarijski vodi že raztopljenega dovolj kisika, ki ga bakterije potrebujejo za nitrifikacijo. To pomeni, da zračna črpalka, v ne preveč obremenjenih akvarijih, z nekaj rastlinske mase, ni nujno potrebna.

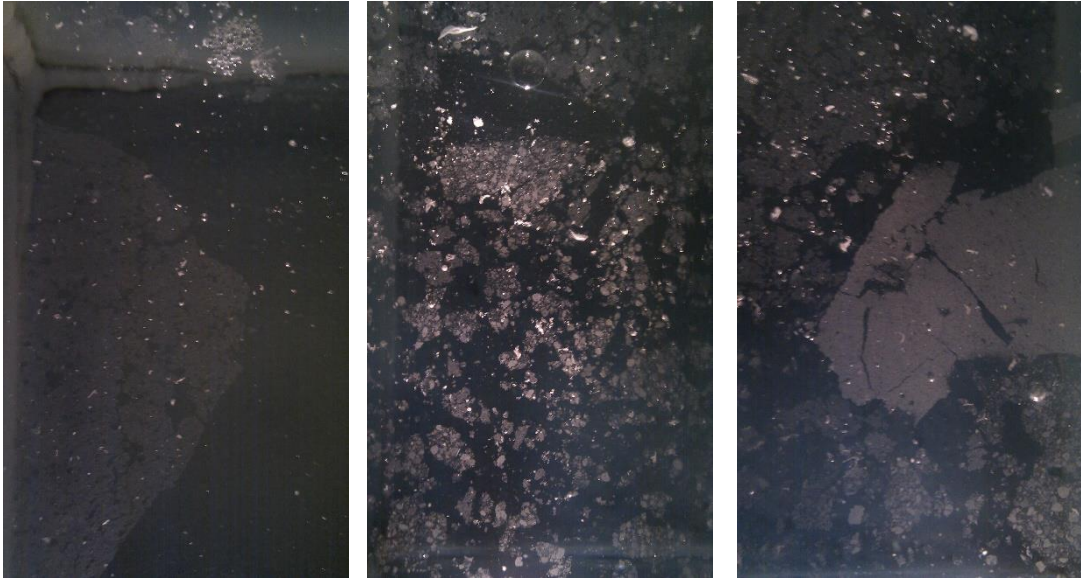
7 PRILOGE



Priloga 1: slika 8: Dno kontrolnega akvarija



Priloga 2: Slika 9: Stranica akvarijske posode kontrolnega akvarija



Priloga 3, 4, 5: Slika 10, 11, 12: Gladina vode kontrolnega akvarija



Priloga 6: Slika 13: Spektrofotometer

8 SEZNAM VIROV IN LITERATURE

1. Aquanubis. 2010. Kdaj je akvarij vtečen in kako to storimo? [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.aquanubis.com/forum/ciklanje-akvarija/topic12147.html> [Citirano 21. 11. 2012, 19:45]
2. AROGO, J. Ammonia Emissions and Animal Agriculture. 2009. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://pubs.ext.vt.edu/442/442-110/442-110.html> [Citirano 30. 11. 2012, 23:17]
3. Bretthauer, R. (1978). Some ecological limits of tolerance to *Ochromonas sociabilis*. *VIVL* 20(3); 1850-1854.
4. BURELL, C. P., PHALEN M. C., HOVANEC A. T. Identification of Bacteria Responsible for Ammonia Oxidation in Freshwater Aquaria. 2001. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(12):5791
5. Ceresana, Market Study Ammonia. Retrieved from: <http://www.ceresana.com/en/market-studies/chemicals/ammonia/> (07.11.2012)
6. COLASANTI, M. 2011. Aquarium Chemistry: The Nitrogen Cycle: New Developments and New Prospects. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.advancedaquarist.com/2011/4/chemistry> [Citirano 3. 2. 2013, 15:18]
7. DJ K., DI L., KELLER J. 2005. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresource Technology*, str. 459-468.
8. DOLENC, B. Akvarijski filtri. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.akvazin.si/default.cfm?kat=0201&ID=1356&noextra> [Citirano 12. 1. 2013, 16:35]
9. DOLENC, B. Biološko ravnovesje v akvariju. 2011. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.akvazin.si/default.cfm?kat=0201&ID=1540&noextra> [Citirano 18. 11. 2012, 23:07]
10. GRIL, R. 2011. Ciklanje novo postavljenega akvarija. [Online]. Dostopno na URL naslovu: http://www.diskus.slohost.net/cgi-bin/stran.pl?id=11&izris=izpisiNovico&st_pod=70&jezik=slo&templ=0 [Citirano 21. 11. 2012, 19:22]

11. GRIL, R. 2011. Filtri. [Online]. Dostopno na URL naslovu: http://www.diskus.slohost.net/cgi-bin/stran.pl?id=5&izris=pisiHTML&st_strani=2&templ=3&jezik=slo [Citirano 22. 11. 2012, 21:03]
12. GRIL, R. 2011. Filtriranje vode. [Online]. Dostopno na URL naslovu: http://www.diskus.slohost.net/cgi-bin/stran.pl?id=5&izris=pisiHTML&st_strani=1&templ=3&jezik=slo [Citirano 21. 11. 2012, 19:28]
13. H. KROUPOVA, J. MACHOVA, Z. SVOBODOVA. 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Vet. Med. – Czech*, 50, str. 461–471.
14. HAYATSU, M., TAGO, K., SAITO, M. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. 2008. *Soil Science and Plant Nutrition* 54, 33–45.
15. HØLLING-SØRENSEN B., JØRGENSEN S. E. 1993. Studies in Environmental Science 54. The removal of nitrogen compounds from wastewater. Danska.
16. HOVANEK A. T., TAYLOR T. L., BLAKIS A., DELONG F. E. Nitrospira-Like Bacteria Associated with Nitrite Oxidation in Freshwater Aquaria. 1998. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1):258.
17. HOVANEK, T., DELONG, F. E. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(8):2888
18. HRUBEC, C. T. 1996. Nitrate Toxicity: A Potential Problem of Recirculating Systems. Virginia Polytechnic Institute and State University
19. LEWIS, M. W. JR., MORRIS, P. D. 1986. Toxicity of Nitrite to Fish: A review. *Transactions of the American Fisheries Society*, str. 183-195.
20. MATIC. Akvazin. Osnove akvaristike. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.akvazin.si/default.cfm?kat=0201&ID=920&noextra> [Citirano 22. 11. 2012, 17:49]
21. MILLICHIP, I. G. 2012. Ammonia Calculations. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.irishfishkeepers.com/index.php/articles/28-health-water-and-illnesses/142-ammonia-calculations> [Citirano 4. 2. 2013, 21:59]

22. PRINČIČ, A., MAHNE, I., MEGUŠAR, F., ELDOR, P., TIEDJE, J. 1998. Effects of pH and Oxygen and Ammonium Concentrations on the Community Structure of Nitrifying Bacteria from Wastewater. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Oct. 1998, str. 3584–3590.
23. RANDALL, D. J., TSUI T. K. N. 2002. Ammonia toxicity in fish . *Marine Pollution Bulletin*, št. 45, str. 17-23.
24. RISGAARD-PETERSEN, N., NICOLAISEN H. M., REVSBECH P. N., LOMSTEIN A. B. Competition between Ammonia-Oxidizing Bacteria and Benthic Microalgae. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 70, št. 9, str. 5528-5537.
25. SAJUNI, N.R, AHMAD, AL., VADIVELU, V. M. Effect of Filter Media Characteristics, pH and Temperature on the Ammonia Removal in the Wastewater. 2010. *Journal of Applied Sciences* 10 (12), str. 1146-1150.
26. SAUDER A. L., ENGEL K., STEARNS C. J., P. MASELLA A., PAWLISZYN R., D. NEUFELD J. 2011. Aquarium Nitrification Revisited: Thaumarchaeota Are the Dominant Ammonia Oxidizers in Freshwater Aquarium Biofilters. *Plos one*.
27. Stark, G J, wallace, H G, (1997). Kemisjki podatkovnik za srednje, višje in visoke šole, DZS.
28. Thurston, R. V., Chakoumakos, C., Russo, C. R (1981). Effect of fluctuating exposures on the acute toxicity of ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cutthroat trout (*S. clarki*). *Water Res.* 15: 911-917.
29. Univerza v Ljubljani. Metabolizem amonikislin. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://web.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/studenti/Teze/BIKEGO/12-metabolizem%20aminokislin.pdf> [Citirano 30. 11. 2012, 23:09]
30. URAKAVA, H., TAJIMA, Y., NUMATA, Y., TSUENDA, S. Low Temperature Decreases the Phylogenetic Diversity of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Aquarium Biofiltration Systems. 2007. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(3):894
31. Wikipedia. Denitrification. 2013. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://en.wikipedia.org/wiki/Denitrification> [Citirano 30. 11. 2012, 23:10]
32. Wikipedia. Denitrifikacija. 2012. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Denitrifikacija> [Citirano 29. 11. 2012, 21:59]

33. Wikipedia. Kroženje dušika. 2012. [Online]. Dostopno na URL naslovu: http://sl.wikipedia.org/wiki/Kro%C5%BEenje_du%C5%A1ika [Citirano 18. 11. 2012, 00:49]
34. Wikipedia. Nitrification. 2013. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrification> [Citirano 29. 11. 2012, 23:12]
35. Wikipedia. Nitrogen cycle. 2013. [Online]. Dostopno na URL naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrogen_cycle [Citirano 29. 11. 2012, 23:56]
36. Wikipedia. Nitrogen. 2013. [Online]. Dostopno na URL naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrogen#cite_note-1 [Citirano 19. 11. 2012, 21:41]
37. Wikipedia. Sečnina. 2012. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://sl.wikipedia.org/wiki/Urea> [Citirano 29. 11. 2012, 21:55]
38. WILKIE, M. P. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. 2002. *J Exp Zool*, Aug 1, str. 284-301.
39. YEO-HOON BAE. 2009. Cycling a new tank. [Online]. Dostopno na URL naslovu: <http://aqadvisor.com/articles/Cycling.php> [Citirano 3. 2. 2013, 20:01]