

Učinak omjera C/N na uklanjanje nutrijenata pomoću aerobnih granula

Biškup, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:548732>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Marija Biškup

UČINAK OMJERA C/N NA
UKLANJANJE NUTRIJENATA
POMOĆU AEROBNIH GRANULA

Rad je izrađen u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Dijane Grgas.

Hvala mentorici doc. dr. sc. Dijani Grgas na mentorstvu, susretljivosti, savjetima i pomoći tijekom izrade diplomskog rada. Hvala i prof. dr. sc. Tibli Landeka Dragičević te asistentici Tei Štefanac, mag. ing., na stručnoj podršci, razumijevanju i motivaciji.

Hvala svim nastavnicima studija Bioproceno inženjerstvo na prilikama da zaista zavolim ono što studiram.

Hvala Ani Mariji i Marini na moralnoj podršci tijekom izrade rada.

Hvala obitelji, prijateljima i kolegama.

Hvala Bogu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

UČINAK OMJERA C/N NA UKLANJANJE NUTRIJENATA POMOĆU AEROBNIH GRANULA

Marija Biškup, univ. bacc. ing. biotechn.
0058212283

Sažetak: Granulirani mulj spontano je oblikovana kompaktna mikrobn biomasa nastala samoimobilizacijom mješovitih mikrobnih zajednica u matriksu izvanstaničnih polimernih tvari u stresnim uvjetima. U ovom je radu ispitan utjecaj različitih C/N omjera (4, 8 i 12) u otpadnoj vodi na učinkovitost istovremenog uklanjanja organskih sastojaka, amonijaka, ukupnog dušika i ortofosfata iz sintetske otpadne vode s natrijevim acetatom kao izvorom ugljika te s početnom vrijednosti amonijakalnog dušika 70 ± 10 mg/L, pomoću aerobnih granula. Povećanje omjera C/N od 4 do 12 povoljno je djelovalo na učinkovitost uklanjanja svih ispitanih sastojaka. Nakon obrade, kvaliteta sintetske vode bila je zadovoljavajuća za ispust u površinske vode obzirom na KPK vrijednost i amonijakalni dušik, odnosno zadovoljavajuća za ispust u sustav javne odvodnje obzirom na ukupni dušik i ortofosfat, pri svim istraživanim omjerima C/N.

Ključne riječi: *aerobne granule, biološka obrada otpadnih voda, istovremeno uklanjanje hranjivih sastojaka, sekvencijalni šaržni reaktor*

Rad sadrži: 44 stranice, 12 slika, 52 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Dijana Grgas

Pomoć pri izradi:

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Dijana Grgas (mentor)
3. doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (član)
4. izv. prof. dr. sc. Davor Valinger (zamjenski član)

Datum obrane: 21. rujna, 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for the Biological Wastewater Treatment

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

THE EFFECT OF C/N RATIO ON NUTRIENT REMOVAL BY AEROBIC GRANULES

Marija Biškup, univ. bacc. ing. biotechn.
0058212283

Abstract: Granular sludge is a compact microbial biomass spontaneously formed by self-immobilized mixed microbial communities in a matrix of extracellular polymeric substances under stressful conditions. This thesis examined the effect of different C/N ratios (4, 8 and 12) in wastewater on the efficiency of the simultaneous removal of organic compounds, ammonia, total nitrogen and orthophosphate from synthetic wastewater, with sodium acetate as a carbon source and with an initial ammoniacal nitrogen of 70 ± 10 mg/L, by aerobic granules. The increase of the C/N ratio from 4 to 12 had a favorable effect on the removal efficiency of all tested pollutants. After treatment, the quality of the synthetic water was satisfactory for discharge into surface waters in terms of COD value and ammoniacal nitrogen, i.e. satisfactory for discharge into the public drainage system in terms of total nitrogen and orthophosphate at all investigated C/N ratios.

Keywords: *aerobic granules, biological wastewater treatment, simultaneous nutrient removal, sequencing batch reactor*

Thesis contains: 44 pages, 12 figures, 52 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD, Dijana Grgas, Assistant Professor

Technical support and assistance:

Reviewers:

1. Tibela Landeka Dragičević, PhD, Full professor (president)
2. Dijana Grgas, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Assistant professor (member)
4. Davor Valinger, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 21st September, 2022

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. AEROBNE GRANULE | 3 |
| 2.1.1. Definicija aerobnih granula..... | 3 |
| 2.1.2. Prednosti primjene aerobnih granula | 3 |
| 2.2. SEKVENCIJALNI ŠARŽNI REAKTOR..... | 4 |
| 2.3. PROCES AEROBNE GRANULACIJE..... | 6 |
| 2.4. STABILNOST AEROBNIH GRANULA | 8 |
| 2.4.1. Veličina granula i rast filamentoznih organizama | 9 |
| 2.4.2. Specifična brzina rasta mikroorganizama | 10 |
| 2.4.3. Sastav EPS-a | 11 |
| 2.4.4. <i>Quorum sensing</i> | 12 |
| 2.4.5. Mineralni kompleksi | 12 |
| 2.5. MIKROBNI SASTAV AEROBNIH GRANULA..... | 12 |
| 2.5.1. Mikrobni sastav u procesu granulacije..... | 13 |
| 2.5.2. Mikrobni sastav aerobnih granula u procesima uklanjanja otpadnih tvari | 13 |
| 2.5.3. Dinamika mikrobne populacije i njihovi međudnosi..... | 17 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 18 |
| 3.1. OTPADNA VODA | 18 |
| 3.2. POSTAVKE SBR REAKTORA | 18 |
| 3.3. AEROBNI GRANULIRANI MULJ | 18 |
| 3.4. ANALITIČKI POSTUPCI | 19 |
| 3.4.1. Određivanje ukupnog dušika..... | 19 |
| 3.4.2. Određivanje amonijakalnog dušika..... | 20 |
| 3.4.3. Određivanje koncentracije nitrata | 20 |
| 3.4.4. Određivanje koncentracije nitrita..... | 21 |
| 3.4.5. Određivanje koncentracije fosfata..... | 21 |
| 3.4.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika | 22 |
| 3.4.7. Određivanje MLSS | 23 |
| 3.4.8. Određivanje temperature | 24 |
| 3.4.9. Određivanje koncentracije otopljenog kisika..... | 25 |
| 3.4.10. Određivanje vrijednosti pH | 25 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 26 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 5. ZAKLJUČCI..... | 38 |
| 6. LITERATURA..... | 39 |

1. UVOD

Zbog kontinuiranog globalnog gospodarskog razvoja te rasta svjetskog stanovništva, potražnja za vodom sve više raste. Intenzivan industrijski razvoj (naročito tekstilne industrije, industrije papira i boja i dr.) uzrokuje značajno onečišćenje vode različitim fenolnim spojevima, teškim metalima i drugim spojevima koji negativno djeluju na zdravlje te okoliš. Da bi se smanjilo onečišćenje u otpadnim vodama, otpadne vode se podvrgavaju obradi. Obrada otpadne vode vrlo je složen proces jer kvalitativni i kvantitativni sastav otpadne vode bitno varira ovisno o industriji, odnosno specifičnom proizvodnom postupku iz kojeg potječe. Razvijene su različite metode pročišćavanja otpadnih voda koje se mogu podijeliti u tri kategorije:

- i. Fizikalne metode (npr. adsorpcija)
- ii. Kemijske metode (npr. oksidacija)
- iii. Biološke metode (npr. obrada pomoću aktivnog mulja)

Među biološkim metodama, najraširenija je tehnologija obrade vode konvencionalnim aktivnim muljem koja se temelji na mikrobnjoj razgradnji otpadne organske tvari u aerobnim uvjetima. Međutim, ova tehnologija pokazuje ograničenja kao što su velike količine proizvedenog otpadnog mulja kojeg opet treba obraditi i odlagati, velika potrošnja energije i sl. (Mao i sur., 2021).

Posljednjih nekoliko desetljeća razvija se obećavajuća tehnologija biološke obrade otpadnih industrijskih i komunalnih voda 21. stoljeća – tehnologija aerobnog granuliranog mulja, odnosno aerobnih granula, kojom bi se trebali prevladati izazovi primjene tehnologije konvencionalnog aktivnog mulja. Osim poboljšanja u pročišćavanju voda, biomasa aerobnih granula može poslužiti kao izvor za obnavljanje različitih resursa, primjerice biopolimera, bioplastike, celuloze, fosfora. Navedeni biorafinerijski pristup potiče kružno gospodarstvo te postrojenja za obradu otpadnih voda tako postaju postrojenja za obnovu vodnih resursa. Osim iskorištavanja spomenutih sirovina iz granulirane biomase, ova tehnologija nudi i mogućnost iskorištavanja energije iz bioplina nastalog anaerobnom digestijom otpadnih granula (Hamza i sur., 2021; Mao i sur., 2021; Nancharaiah i Sarvajith, 2019).

Razvoj postrojenja za obradu otpadnih voda koji se temelje na tehnologiji aerobnog granuliranog mulja vrlo je brz, što potvrđuje činjenica da je širom svijeta do sredine 2021. godine broj ovakvih postrojenja u punom mjerilu iznosio 88 – više nego dvostruko u odnosu na 2018. godinu (Hamza i sur., 2021).

Svrha ovog rada jest ispitati učinkovitost istovremenog uklanjanja organskih sastojaka,

amonijakalnog i ukupnog dušika te ortofosfata aerobnim granulama u sintetskoj otpadnoj vodi koja sastavom oponaša komunalnu otpadnu vodu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. AEROBNE GRANULE

2.1.1. Definicija aerobnih granula

U procesu biološke obrade otpadnih voda mikroorganizmi aktivnog mulja se mogu nalaziti u tri oblika: aktivni mulj u suspendiranom obliku (pahuljice ili flokule aktivnog mulja), biofilm te granulirani mulj. I aerobni i anaerobni mulj je moguće granulirati pa tako postoji aerobni granulirani mulj (engl. *Aerobic Granulated Sludge, AGS*) odnosno anaerobni granulirani mulj (Long i sur., 2019). Granulirani mulj je spontano oblikovana kompaktna mikrobna biomasa nastala samoimobilizacijom mješovitih mikrobnih zajednica u matriksu izvanstaničnih polimernih tvari (engl. *Extracellular Polymeric Substances, EPS*) u stresnim uvjetima (Long i sur., 2019; Gonzalez-Gil i Holliger, 2014).

2.1.2. Prednosti primjene aerobnih granula

U usporedbi s anaerobnim granulama koje imaju široku primjenu te dobre rezultate u procesima obrade otpadnih voda koje karakterizira visoka koncentracija organskih tvari, razvoj primjene aerobnih granula krenuo je kasnije – prije dvadesetak godina, no brzo se razvija zahvaljujući dobrim svojstvima aerobnih granula kao što su pravilan kvazisferičan oblik, dobro taloženje, visoka tolerancija prema toksičnim spojevima i dr. (Hamza i sur., 2021; Long i sur., 2019; Zhang i sur., 2019; Gonzalez-Gil i Holliger, 2014). Aerobne granule, za razliku od anaerobnih, omogućuju primjenu nižih temperatura, imaju višestruke biološke funkcije, tj. mogu istovremeno uklanjati različite nutrijente iz vode te imaju kraće vrijeme pokretanja (engl. *Start up*) (Liu i Tay, 2007).

U odnosu na konvencionalne postupke obrade otpadnih voda pomoću aktivnog mulja kod kojih su prisutni nedostaci kao što su niska učinkovitost obrade, visoka proizvodnja viška aktivnog mulja te relativno veliki otisak, tehnologija aerobnih granula donosi brojna poboljšanja (Desireddy i Sabumon, 2021). Prednosti procesa koji uključuju primjenu aerobnih granula su mogućnost brzog izdvajanja granula od obrađene vode gravitacijskim taloženjem, odnosno korištenje istog spremnika za obradu otpadne vode i taloženje mulja. Nasuprot tome, kod procesa s aktivnim muljem, za razdvajanje obrađene vode i aktivnog mulja nakon obrade potrebno je korištenje sekundarnih taložnica (Sarma i Tay, 2018). Osim toga, pomoću aerobnih granula moguće je imati pet puta veću koncentraciju mikrobne biomase u usporedbi s aktivnim

muljem te smanjuju količinu proizvedenog mulja čime se omogućava smanjenje veličine postrojenja obrade otpadnih voda (Sarma i Tay, 2018; Gonzalez-Gil i Holliger, 2014). Robusna i višeslojna struktura mikrobne granule, sposobnost istovremenog uklanjanja dušika i fosfora, brzo taloženje, dugo vrijeme zadržavanja biomase u sustavu, dobra otpornost na inhibitorne tvari te visoke brzine organskog opterećenja (engl. *Organic Loading Rate, OLR*) i smanjenje energetske potrošnje za 30-ak % u odnosu na sustave s aktivnim muljem također su prednosti primjene tehnologije aerobnih granula. Sve navedeno dovodi do smanjenja početnih ulaganja u infrastrukturu, ali i smanjenja troškova procesa obrade. Usprkos tome, odgovarajući procesni čimbenici za provođenje procesa s primjenom tehnologije aerobnih granula nisu još u potpunosti razjašnjeni (He i sur., 2018; Sarma i Tay, 2018).

Za formiranje AGS-a iz inokuluma aktivnog mulja u obliku flokula potrebno je primijeniti optimalne uvjete koji pogoduju granulaciji, a istovremeno ne ometaju biološku aktivnost. Neki od uvjeta su visoko smično naprezanje, kratko vrijeme taloženja te izmjena režima hranjenja u aerobnim i anaerobnim fazama (Adler i Holliger, 2020). Glavni izazov kod praktične primjene AGS-a je nestabilnost aerobnih granula tijekom dugotrajnog vođenja procesa (Franca i sur., 2018).

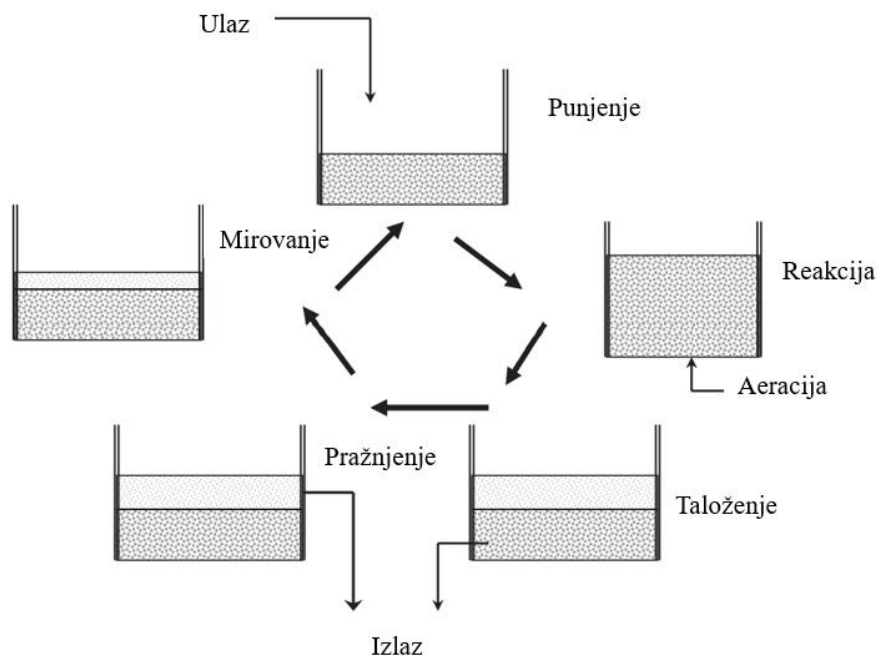
2.2. SEKVENCIJALNI ŠARŽNI REAKTOR

Za uzgoj AGS-a uglavnom se koristi sekvencijalni šaržni reaktor (engl. *Sequencing Batch Reactor, SBR*) zbog karakteristika potpunog taloženja, relativno niskih početnih kapitalnih troškova, mogućnosti jednostavne implementacije u starija postrojenja, visoke razine automatizacije te malog zahtjeva za prostorom (Gerardi, 2010). Ciklus SBR-a, prikazan na slici 1, sastoji se od pet faza: punjenje, reakcija, taloženje, pražnjenje te mirovanje.

- **Punjenje**, koje se primjenjuje prilikom pokretanja SBR-a, praćenja rasta filamentoznih mikroorganizama te kod malih protoka, je statično, tj. bez aeracije i miješanja. Osim statičnog, punjenje može biti uz miješanje bez aeracije, a primjenjuje se primjerice za odvijanje procesa denitrifikacije, te punjenje uz aeraciju i miješanje, koje primjenu, između ostalog, nalazi u procesima uklanjanja biološke potrošnje kisika (BPK). SBR se u jednom ciklusu može napuniti jednokratno, ili višekratno, pri čemu se prilikom višekratnog punjenja do postizanja konačnog volumena neprestano izmjenjuju faze punjenja i reakcije, a nakon posljednje prihrane slijede ostale faze.
- Nakon punjenja slijedi faza **reakcije** koja se odnosi na aerobno uklanjanje BPK i nitrifikaciju i/ili biološko uklanjanje fosfora, a ukoliko se odvija denitrifikacija, tada se

sustav ne aerira kontinuirano već povremeno kako bi se uspostavio gradijent ili odsustvo otopljenog kisika.

- Fazu reakcije slijedi **taloženje** u SBR-u tijekom kojeg se prekidaju aeracija i miješanje dok se biomasa odvaja od supernatanta.
- Obađeni se supernatant iz sustava izdvaja **dekantiranjem** npr. pomoću izljevne cijevi koja se nalazi na odgovarajućoj razini ili pumpe do trenutka kada razina tekućine u SBR-u padne ispod minimalne.
- **Mirovanje** je završna faza ciklusa SBR-a koja označava razdoblje između dekantiranja te ponovnog punjenja reaktora tijekom koje je mikrobna aktivnost zanemariva. Ukoliko uvjeti procesa dozvoljavaju, ova faza ciklusa može se izostaviti (Gerardi, 2010).



Slika 1. Faze rada SBR-a (prema Gerardi, 2010)

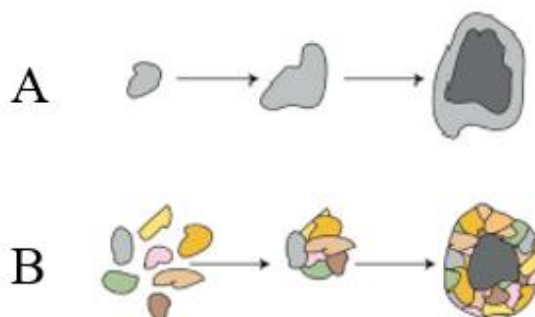
Postrojenja za obradu otpadnih voda se uglavnom sastoje od paralelnih SBR-ova pri čemu tijekom punjenja jednog SBR-a drugi prolazi faze reakcije, taloženja i dekantiranja. Osim jednokratnog i višekratnog punjenja reaktora, ulazni tok u reaktor (influent), odnosno izlazni tok (efluent) iz reaktora može biti i kontinuiran, no tada se ciklus sastoji samo od faza reakcije, taloženja i dekantiranja te može doći do problema ispiranja biomase, prelijevanja, lošije kvalitete obrađene vode i dr. (Gerardi, 2010).

2.3. PROCES AEROBNE GRANULACIJE

Aerobna granulacija je složen proces formiranja aerobnih granula iz aktivnog mulja u obliku flokula i ovisi o nizu fizikalno-kemijskih i bioloških čimbenika, a događa se kao posljedica stresnih uvjeta u okolini. Pretpostavlja se da uspješnost aerobne granulacije najviše ovisi o procesnim čimbenicima bioreaktora (Franca i sur., 2018; Liu i Tay, 2007). Osim najčešćeg dobivanja AGS-a nacjepljivanjem fokaliranog mulja u SBR, aerobne granule se mogu uzgojiti nacjepljivanjem anaerobnih granula u SBR ili u reaktore s kontinuiranim načinom rada, odnosno nacjepljivanjem pojedinačnih mikrobnih vrsta sa sposobnošću samo- ili koagregacije. Također, isti reaktor se može nacijepiti i drobljenim granulama i flokulirajućim muljem, a ovakvim mješovitim nacjepljivanjem moguće je postići bržu granulaciju (Xia i sur., 2018).

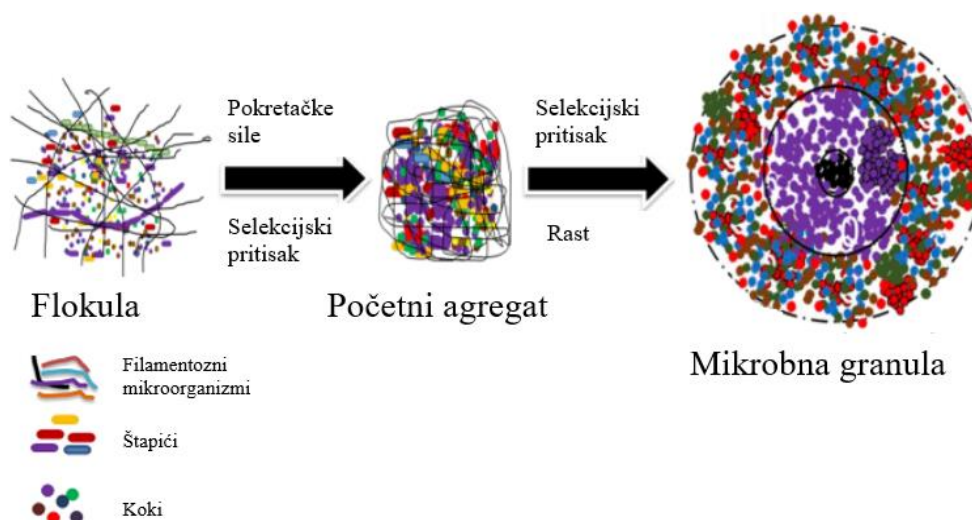
Mehanizam granulacije iz aktivnog mulja nije u potpunosti poznat, no pretpostavlja se da granulacija kreće rastom jedne kolonije, odnosno agregacije kolonija čime nastaju veće nakupine koje se nastavljaju sudarati i agregirati te dalje rasti (Franca i sur., 2018). Drugi predloženi mehanizmi uključuju povezivanje filamentoznih (mikro)organizama s ulogom nosača za formiranje granula (Beun i sur., 1999), te se pretpostavlja da glavnu ulogu u granulaciji imaju agregirajući sojevi (Ivanov i sur., 2006).

Barr i sur. (2010) su predložili dva nova mehanizma formiranja granula (slika 2). Jedan od pretpostavljenih mehanizama u početnoj fazi granulacije uključuje rast mikrokolonije jednog tipa bakterije prema van čime formira granulu. Tako formirana granula gusta je i homogena te je karakterizira bijelo obojenje (slika 2A). Drugi mehanizam kojim u početku granulacije nastaju žute granule temelji se na agregaciji mikrogranula koje sadrže brojne različite bakterijske vrste. Ove bakterije rastu kao cjelina, a rezultat takvog mikrobnog sastava i rasta je labava, hrapava, i nepravilna visokosegregirana žuta granula (slika 2B) (Barr i sur., 2010).



Slika 2. Pretpostavljeni mehanizmi granulacije. A) Rast bijelih granula, B) Formiranje žutih granula (*prema* Barr i sur., 2010).

Brojne pretpostavke nisu potkrijepljene eksperimentalnim istraživanjima, stoga ne postoje izravni dokazi jesu li ili nisu ispravne. Mehanizam granulacije istraživana je i prilikom kokultivacije segmenata granula s aerobnim flokulama u kojoj je zapažen kontakt stanica-stanica kao prva faza granulacije nakon čega slijedi početno povezivanje odabranih mikroorganizama u agregate. Nakon nastanka početnih mikrobnih agregata, mikroorganizmi proizvode veću količinu EPS-a što pospješuje pojačano vezanje mikroorganizama u granule, a u zadnjem koraku granule se oblikuju hidrodinamičkim smičnim silama. Prva dva koraka događaju se samo u slučaju iniciranja granulacije iz pojedinačnih bakterijskih kultura, dok se prilikom granulacije iz formiranih flokula događaju posljednja dva koraka. Na slici 3 dat je prikaz formiranja aerobnih granula iz flokula aktivnog mulja (Nancharaiah i Reddy, 2018).



Slika 3. Mehanizam aerobne granulacije (prema Nancharaiah i Reddy, 2018)

Vrlo važan čimbenik za početak granulacije i selekciju spororastućih agregirajućih vrsta je vrijeme taloženja AGS-a koje je potrebno što više skratiti s obzirom na to da se nakupine koje se sporo talože ispiru iz sustava. Zbog toga je vrijeme taloženja u SBR-u uglavnom kratko te traje 2-10 min (Nancharaiah i Reddy, 2018; Franca i sur., 2018).

Nadalje, promjene režima hranjenja koje uključuje povremeno gladovanje u aerobnim uvjetima također doprinose početku granulacije. Naime, smatra se da povremeno gladovanje utječe na izlučivanje EPS-a koji povećavaju hidrofobnost površine stanice, a hidrofobnost povećava interakcije stanica-stanica te doprinosi ubrzavanju agregacije stanične biomase. Iniciranje granulacije može se, također, postići režimom hranjenja koji potiče uklanjanje ugljika

tijekom anaerobne faze rada SBR-a (Nancharaiah i Reddy, 2018; Franca i sur., 2018). S druge strane, dugačak period gladovanja može rezultirati višim energetske troškovima, većom potrošnjom EPS-a te može doći do smanjenja obrađenog volumena otpadne vode u reaktoru. Ukoliko vrijeme gladovanja iznosi manje od 40 % vremena aeracije, formiraju se granule koje se brzo talože te pokazuju dobru stabilnost. Osim toga, formiranju granula doprinosi brzina ulaznog toka zraka veća od 2,5 cm/s (de Sousa Rollemberg i sur., 2018).

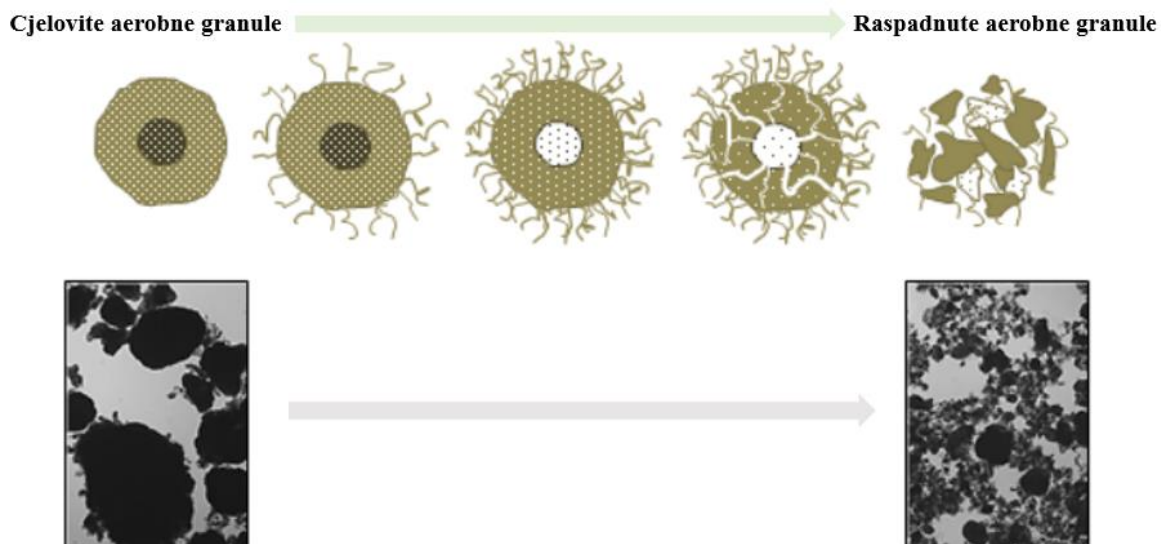
Jedan od važnih čimbenika koji utječe na aerobnu granulaciju je intenzitet aeracije o kojem ovise količina otopljenog kisika te hidrodinamička smična sila koja, što je veća, omogućava formiranje manjih i kompaktnijih granula veće gustoće odvajajući slabo pričvršćene mikroorganizme od vanjske površine granule. Također, veća smična sila povećava količinu EPS-a, odnosno hidrofobnost površine mikrobne biomase koja je u pozitivnoj korelaciji s fizičkom jakosti aerobnih granula. Suprotno, mala smična naprezanja u reaktoru rezultiraju nestabilnim velikim granulama porozne strukture (Gao i sur., 2013; Chen i sur., 2007). Nancharaiah i Reddy (2018) sugeriraju da je granulaciju moguće ostvariti i pri slabijoj aeraciji, tj. manjoj brzini uzlaznog zraka. Devlin i sur. (2017) su uspjeli formirati AGS pri uzlaznoj brzini zraka od 0,41 cm/s za obradu vode s malim KPK (300 mg/L), što ukazuje na složenost procesa granulacije i utjecaj drugih čimbenika na proces granulacije.

Hidrauličko vrijeme zadržavanja i brzina organskog opterećenja ostali su čimbenici koji utječu na formiranja aerobnih granula (Liu i Tay, 2007).

Stanične interakcije u procesu aerobne granulacije još su nedovoljno istražene no istraživanja se najčešće temelje na detekciji vrsta koje sintetiziraju *quorum sensing* molekule, *quorum quenching* enzime, te antiinduktorske molekule (Nancharaiah i Reddy, 2018).

2.4. STABILNOST AEROBNIH GRANULA

Nakon uspješno provedene granulacije potrebno je spriječiti raspadanje aerobnih granula, prikazano na slici 4, tj. cilj je održati granule stabilnima, a stabilnost aerobnih granula je relativno niska u usporedbi sa stabilnosti anaerobnih granula te ograničava njihovu primjenu. Već tijekom aerobne granulacije neki čimbenici, kao što su sastav otpadne vode, omjer hrane i mikroorganizama, vrijeme zadržavanja mulja (engl. *Solid Retention Time, SRT*), temperatura, te pH vrijednost, u značajnoj mjeri utječu na stabilnost formiranih granula (Yuan i sur., 2019; de Sousa Rollemberg i sur., 2018).



Slika 4. Shematski (gore) i mikroskopski (dolje) prikaz slijeda događaja tijekom raspadanja aerobnih granula (prema Franca i sur., 2018)

2.4.1. Veličina granula i rast filamentoznih organizama

Unutrašnja struktura, koju određuju primjerice gustoća, veličina i raspodjela pora, je uz veličinu vrlo važan čimbenik stabilnosti granula zbog izravnog utjecaja na prijenos mase supstrata. Budući da rastom granule konverzija supstrata postaje ograničena prijenosom mase, dolazi do kompeticije mikroorganizama za supstrat. Zbog toga, u vanjskom dijelu, blizu površine aerobne granule, zadržavaju se aktivni mikroorganizmi, dok unutrašnjost, tj. jezgru granule čini uglavnom EPS. S obzirom na ograničenje prijenosa mase kod velikih granula, važno je optimirati procesne čimbenike kod granulacije koji utječu na njihovu veličinu, a to su koncentracija otopljenog kisika (engl. *Dissolved Oxygen*, *DO*), vrijeme taloženja, trajanje perioda gladovanja i obilja, vrsta supstrata i dr. (Franca i sur., 2018). Gao i sur. (2013) ispitali su utjecaj intenziteta aeracije 0,8 i 0,2 m³/h na stabilnost zrelih aerobnih granula te su zaključili da se aerobne granule podvrgnute snažnijoj aeraciji (0,8 m³/h) lakše talože te pokazuju bolje fizikalne karakteristike. He i sur. (2019) su u eksperimentima s otpadnom vodom s malim omjerom C/N (<4) primijetili da umjereni intenzitet (0,9 L/min) te vrijeme aeracije (90 min) rezultiraju najboljim granularnim karakteristikama i pogoduju sintezi vrlo hidrofobnog EPS-a. Prerastanje površine granule filamentoznim mikroorganizmima, koji zbog velikog omjera površine i volumena mogu primiti više supstrata od nefilamentoznih vrsta u uvjetima niske koncentracije supstrata, temperature procesa niže od raspona sobne temperature te niske

vrijednosti pH, također utječe na stabilnost aerobnih granula promjenom strukture te ometanjem taloženja što može dovesti do ispiranja biomase iz sustava. Prerastanje filamentoznih organizama može se spriječiti izbjegavanjem visokih koncentracija sporo razgradivih supstrata u ulaznom toku i radom u uvjetima veće brzine organskog opterećenja. De Kreuk i sur. (2005) sugeriraju pokretanje sustava na 20 °C koje slijedi snižavanje temperature na 15-18 °C. Yang i sur. (2008) ostvarili su razvoj stabilnijih granula u blago lužnatom okruženju (pH 8,1) u usporedbi s kiselim okruženjem (pH 3) u kojem je dominirao rast funga. Optimalna veličina granula ovisi o nizu različitih fizikalnih karakteristika granula te o uvjetima u reaktoru (de Sousa Rollemberg i sur., 2018; Franca i sur., 2018; Yang i sur., 2008; de Kreuk i sur., 2005).

Liu i Tay (2007) proveli su istraživanje stabilnosti granula uzgojenih u reaktorima s različitim trajanjem perioda gladovanja (0,8 h, 3,3 h i 7,3 h). Rezultati su pokazali da je dulje vrijeme gladovanja (3,3 h i 7,3 h) povoljnije od kratkog (0,3 h) sa stajališta dugoročne stabilnosti granula, no najdulje primijenjeno vrijeme gladovanja (7,3 h) nije preporučljivo zbog smanjenja učinkovitosti procesa (Liu i Tay, 2007).

2.4.2. Specifična brzina rasta mikroorganizama

Maksimalna specifična brzina rasta mikroorganizama također je važna veličina s aspekta održavanja dugoročne stabilnosti granula. Granule sastavljene od mikrobne populacije koju karakteriziraju niže vrijednosti maksimalne specifične brzine rasta, poput primjerice nitrifikanata, pokazuju bolju stabilnost. Nadalje, rast spororastućih organizama, za razliku od rasta brzorastućih, smanjuje potrebe za visokom koncentracijom kisika i velikim smičnim naprezanjima čime se, osim dobivanja stabilnijih granula, štedi energija potrebna za aeraciju sustava (Franca i sur., 2018).

Velika smična naprezanja uz malu gustoću stanica u granulama, čiju unutrašnjost čine uglavnom mrtve, a perifernu zonu žive stanice, snažno doprinosi propadanju granula zbog ograničenja prijenosa mase. Općenito, raspadanje strukture aerobne granule nastupa kada čvrstoću vezanja stanica nadvlada primijenjeno naprezanje. S druge strane, granule koje se koriste u procesu istovremene nitrifikacije i denitrifikacije pokazuju dobru stabilnost i u uvjetima većih smičnih naprezanja. Zbog postojanja aerobnih vanjskih zona u kojima se odvija nitrifikacija te unutrašnjih slojeva u kojima se biomasa nalazi u anoksičnim uvjetima, ovakve granule mogu provoditi denitrifikaciju, a na učinkovitost ovih istovremenih procesa utječe veličina granule, odnosno veličina anoksičnog volumena (Franca i sur., 2018).

2.4.3. Sastav EPS-a

Izvanstanični polimerni matriks (EPS), bitan čimbenik koji utječe na formiranje granula, utječe i na održavanje njihove stabilnosti. Uglavnom se sastoji od polisaharida i proteina (ostatak čine nukleinske kiseline te tvari slične humusu) koji stupaju u ionske te hidrofobne interakcije s mikroorganizmima te ih tako održavaju blizu i omogućuju njihovu komunikaciju (Franca i sur., 2018; Kocaturk i Erguder, 2016). Ukoliko se EPS u blizini jezgre granule potroši, struktura granule postaje lomljiva i šuplja zbog lize stanica uzrokovane difuzijskim ograničenjima, odnosno otežanim prijenosom mase supstrata u jezgru. Primijećeno je da povećanje udjela proteina u EPS-u ima važnu ulogu u procesu granulacije, ali i u održavanju dugoročne stabilnosti već formiranih agregata. Pretpostavlja se da je upravo smanjenje koncentracije proteina i povećavanje koncentracije polisaharida u EPS-u pri uvjetima visoke koncentracije kemijske potrošnje kisika (KPK) koje rezultira smanjenjem hidrofobnosti strukture, uzrok raspadanja aerobnih granula (Franca i sur., 2018). S druge strane, Tay i sur. (2001) navode da povećanje udjela polisaharida u EPS-u povećava stabilnost granula, no ovi kontradiktorni rezultati su neusporedivi zbog korištenja nestandardiziranih analitičkih postupaka, ispitivanja granula različitih sastava, odnosno primjene različitih kolorimetrijskih metoda na čije rezultate može utjecati niz interferirajućih tvari (Franca i sur., 2018). Chen i sur. (2010) ističu da najbolju stabilnost pokazuju granule koje u središtu imaju velik, a na površini malen omjer proteina i polisaharida u čvrsto vezanom EPS-u koji pogoduje taloživosti granula, ali i u slabo vezanom EPS-u. Kocaturk i Erguder (2016) sugeriraju da je minimalan omjer polisaharida i proteina u izvanstaničnom matriksu potreban za stabilnu granulaciju 0,6. Na omjer proteina i polisaharida u EPS-u te njegovu koncentraciju utječe i omjer C/N u mediju u kojem se nalaze granule. Naime, Kim i sur. (2021) primijetili su povećanje omjera polisaharida i proteina od 0,55 do 0,79 s povećanjem C/N omjera od 5 do 20. Uz to, C/N omjer ima važnu ulogu u rastu mikroorganizama i dovodi do mikrobnog selekcijskog pritiska sa svrhom obogaćivanja granula vrstama koje pozitivno djeluju na granulaciju, te utječe na učinkovitost uklanjanja nutrijenata iz otpadnih voda (Kim i sur., 2021; Kocaturk i Erguder, 2016). Osim smjene dominantnih mikrobnih zajednica, Luo i sur. (2014) navode da je smanjenje proizvodnje tirozina u izvanstaničnom matriksu drugi mogući uzrok raspada granula koja je glavni uzrok nestabilnosti, tj. naglašavaju potencijalnu važnost tirozina u poboljšanju stabilnosti granula.

2.4.4. *Quorum sensing*

Još jedna uloga EPS-a sa stajališta održavanja stabilnosti granula je i u potencijalnoj međustaničnoj bakterijskoj komunikaciji putem *quorum sensinga* s obzirom na to da su identificirani mnogi geni koji su uključeni u proces sinteze EPS-a, a koji se reguliraju pomoću istog sustava. Pretpostavlja se da je ciklički diguanilat (c-di-GMP) jedan od sekundarnih glasnika koji je odgovoran za posredno smanjenje udjela polisaharida u EPS-u te bi njegova stimulacija sinteze mogla doprinijeti bržoj granulaciji, odnosno dugotrajnijoj stabilnosti granula (Franca i sur., 2018). Usprkos tome, ukoliko dođe do prekomjerne sinteze ovih izvanstaničnih tvari, one mogu začepiti pore u unutrašnjosti i na površini granula te tako dolazi do ograničavajućeg prijenosa mase što smanjuje bioaktivnost prisutnih organizama, odnosno destabilizira granule (Gao i sur., 2013).

2.4.5. Mineralni kompleksi

Prisutnost metalnih iona, kao što su kalcijevi, magnezijevi i željezovi dvo- i trovalentni kationi, isto tako pokazuje pozitivan učinak na dugotrajnost AGS-a. Primjerice, kalcijev karbonat pruža strukturi granule veću čvrstoću, dok se prisutnost željeza i magnezija povezuje uz bolja svojstva taloženja granule. Istraživanja sugeriraju da je nakupljanje navedenih kationa povezano s povećanjem prinosa u proizvodnji EPS-a, odnosno da otapanje njihovih metalnih kompleksa u uskoj vezi s raspadom granula pa ih je poželjno održavati u okolini u kojoj odgovarajući kompleksi nisu topljivi. Osim toga, amonijeve, karbonatne i fosfatne soli također su važne jer pozitivno doprinose puferskom kapacitetu ili stvaranju taloga s metalnim kationima, iako se u određenim uvjetima nakupljanje anorganskih soli, primjerice u obliku apatita, povezuje s narušavanjem stabilnosti aerobnih granula (Franca i sur., 2018).

2.5. MIKROBNI SASTAV AEROBNIH GRANULA

Aerobni granulirani mulj predstavlja složeni mini ekosustav jer sadrži milijune različitih mikroorganizama po gramu biomase koji su odgovorni za formiranje, održavanje granula, odnosno učinkovitu razgradnju otpadnih tvari, a znanje o njihovoj raznolikosti kod primjene različitih procesnih uvjeta pomaže predvidjeti stabilnost funkcija bioreaktorskog sustava u različitim fazama procesa (de Sousa Rollemberg i sur., 2018; Xia i sur., 2018; Szabó i sur., 2017).

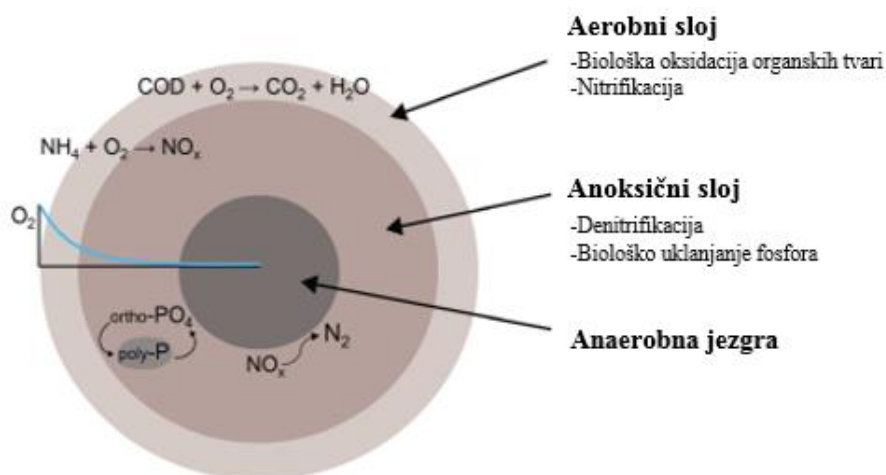
2.5.1. Mikrobni sastav u procesu granulacije

Mikrobni sastav aerobnih granula već kod granulacije prilično varira što značajno ovisi o uvjetima u reaktoru. Kod formiranja granula bitnu ulogu imaju filamentozni organizmi, odnosno štapičaste bakterije koje daju kostur granuli (npr. *Rhodocylus*), ali i bakterije koje sintetiziraju EPS važan za adheziju na granule (npr. *Zoogloea*, *Thaurea*, *Acidovorax*). Nakon dozrijevanja granula, zrele granule, koje su otporne na hidrodinamički selekcijski pritisak, služe kao zaklon za rast mikroorganizama te se često rastom same granule, povećava i njezina biološka raznolikost (Xia i sur., 2018). Utjecaj granulacije na mikrobnu dinamiku, odnosno na promjene u raznolikosti mikrobnih zajednica u granulama vidljiv je na primjeru istraživanja Weissbrodt i sur. (2013). U početku procesa granulacije u sintetskoj vodi na bazi hlapivih masnih kiselina (engl. *Volatile Fatty Acids*, *VFA*) dominantan rod bakterija u SBR-u bio je *Zooglea* koji formira homogene biofilmove za razvoj kolonija mikroorganizama čija je zadaća uklanjanje hranjivih tvari. Dozrijevanjem aerobnih granula brojnost *Zooglea* se smanjuje, a zastupljeniji postaju rodovi npr. *Accumulibacter* i *Competibacter* koji potpomažu heterogenu agregaciju dotad oblikovanih manjih gustih nakupina u zrele granule koje se odlikuju složenom unutrašnjom arhitekturom (Weissbrodt i sur., 2013).

Osim što imaju ulogu izgradnje kostura aerobnih granula, prekomjerni rast određenih filamentoznih mikroba (npr. *Chloroflexi*, *Sphaerotilus*, *Thiothrix*) koji potječu iz ulazne otpadne vode, u određenim uvjetima destabiliziraju AGS (Figueroa i sur., 2015), dok, suprotno tome, antagonistička aktivnost *Chitinophaga* prema filamentoznoj *Auxenochlorella* stabilizira granule (Aqeel i sur., 2016).

2.5.2. Mikrobni sastav aerobnih granula u procesima uklanjanja otpadnih tvari

Zahvaljujući slojevitoj strukturi, prikazanoj na slici 5, koja je rezultat ograničenja u prijenosu kisika i ostalih supstrata, sferne granule imaju različite ekološke niše (Wilén i sur., 2018).

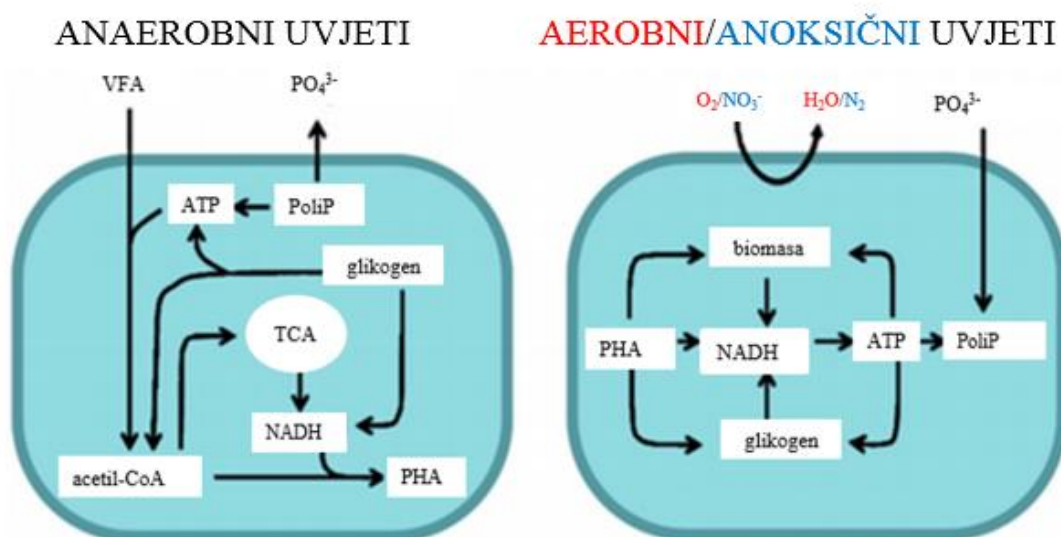


Slika 5. Prikaz slojevite strukture aerobne granule s različitim redoks zonama (prema Wilén i sur., 2018)

Mogući mehanizmi uklanjanja dušika iz sustava pomoću aerobnih granula su asimilacija, istovremena nitrifikacija i denitrifikacija te anaerobna oksidacija amonijaka (Sarma i Tay, 2018). Nitrificirajuće bakterije, koje za svoju aktivnost trebaju kisik, zastupljene su u vanjskim slojevima AGS-a. Suprotno tome, denitrificirajuće bakterije, kojima kisik nije potreban, nalaze se u središtu granule (Wilén i sur., 2018). Bitne skupine nitrificirajućih bakterija su nitrit oksidirajuće bakterije (engl. *Nitrite Oxidizing Bacteria*, *NOB*), među kojima se ističu *Nitrobacter* i *Nitrospira*, te amonijak oksidirajuće bakterije (engl. *Ammonia Oxidizing Bacteria*, *AOB*), čiji je značajan predstavnik *Nitrosomonas*. Na dinamiku, odnosno natjecanje ovih dviju skupina utječe stupanj granulacije, uvjeti u reaktoru (koncentracija otopljenog kisika, omjer KPK/N) i drugo. Naime, smanjenje omjera KPK/N, koncentracije otopljenog kisika, te površinske brzine plina (engl., *Superficial Gas Velocity*, *SGV*) više pogoduju prisustvu AOB u odnosu na NOB. Dok se NOB i AOB natječu za otopljeni kisik, NOB konkurira za dušik bakterijama čija je funkcija anaerobna oksidacija amonijaka (engl. *Anaerobic Ammonia Oxidizing Bacteria*, *ANAMOX*) i koje se odlikuju najmanjom specifičnom brzinom rasta u AGS-u (oko $0,065 \text{ dan}^{-1}$). Nitrificirajuće bakterije također imaju relativno malu specifičnu brzinu rasta ($0,62-0,92 \text{ dan}^{-1}$) u odnosu na heterotrofne bakterije ($4-13,2 \text{ dan}^{-1}$) zbog čega se smatra da pomažu povećanju gustoće i stabilizaciji granula. Zbog relativno velike specifične brzine rasta heterotrofnih mikroorganizama prisutnih u aerobnim granulama, heterotrofni bi se rast trebao nastojati što više smanjiti kako bi prevladali spororastući stabilizirajući mikroorganizmi koji provode ciljane funkcije. Da bi se omogućilo potpuno uklanjanje dušika pomoću AGS-a, potrebno je provesti denitrifikaciju, a najzastupljenije denitrificirajuće vrste u

granulama pripadaju rodovima *Thauera*, *Zoogloea*, *Meganema*, *Devosia*, *Stenotrophomonas*. Potonje, osim što provode denitrifikaciju, povezuju se i s proizvodnjom EPS-a (de Sousa Rollemberg i sur., 2018; Xia i sur., 2018). Zbog postojanja i aerobne i anoksične zone u aerobnim granulama, moguća je istovremena nitrifikacija i denitrifikacija u istom reaktoru (Sarma i Tay, 2018).

Biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode provodi se akumulacijom fosfata unutar mikroorganizama u obliku polimera polifosfata (PoliP), akumulacijom u EPS te taloženjem unutar granule (Sarma i Tay, 2018). Akumulaciju fosfata provode polifosfat akumulirajući organizmi (engl. *Polyphosphate Accumulating Organisms*, PAO), koji su prisutni u unutrašnjosti granula, čiji je anaerobni i aerobni/anoksični metabolizam prikazan na slici 6. Anaerobni metabolizam PAO uključuje unos supstrata – VFA u stanicu te njegovu pohranu u obliku polihidroksialkanoata (PHA) uz posredovanje NADH iz glikolize/citratnog ciklusa (engl. *Tricarboxylic Acid Cycle*, TCA) te energiju pohranjenu u adenzin trifosfatu (ATP) dobivenu hidrolizom polifosfata, pri čemu se nastali ortofosfati oslobađaju iz stanice u miješanu tekućinu, ili razgradnjom glikogena. Zatim, u aerobnim/anoksičnim uvjetima se pohranjeni PHA oksidira uz kisik/drugi akceptor elektrona (npr. nitrat ili nitrit), čime se oslobađa energija koja se koristi za unos fosfata u stanicu i sintezu glikogena. S obzirom na to da se u aerobnim/anoksičnim uvjetima u stanicu unese više fosfata nego se u anaerobnim uvjetima oslobodi iz stanice, na ovaj je način moguće ostvariti uspješnu akumulaciju fosfata (Bunce i sur., 2018).



Slika 6. Metabolički put polifosfat akumulirajućih organizama u anaerobnim i aerobnim/anoksičnim uvjetima (prema Bunce i sur., 2018)

Glikogen akumulirajući organizmi (engl. *Glycogen Accumulating Organisms*, GAO) predstavljaju konkurente PAO zbog natjecanja za supstrat (npr. hlapive masne kiseline, glukoza) i vrlo sličnog metabolizma te njihova prisutnost zbog nemogućnosti pohranjivanja fosfata zapravo smanjuje učinkovitost uklanjanja fosfora iz otpadnih voda. Karakteristični GAO koji se pojavljuju u AGS-u su bakterije iz porodice *Competibacter*, dok je karakteristična porodica PAO *Accumulibacter*. Osim *Accumulibacter*, druge značajna skupine koje mogu doprinijeti pohranjivanju (poli)fosfata koje mogu biti prisutne u aerobnim granulama su bakterije rodova *Rhodocyclus* te *Thiothrix* (He i sur., 2018; Xia i sur., 2018). Sastav otpadne vode znatno utječe na mikrobnii sastav aerobne granule, tako porast omjera KPK/N, povećanje koncentracije otopljenog kisika te povećavanje intenziteta i vremena aeracije dovodi do prevladavanja GAO u odnosu na PAO (de Sousa Rollemberg i sur., 2018).

Na mikrobnu populaciju u aerobnim granulama u značajnoj mjeri utječe i odvijanje različitih metaboličkih procesa uklanjanja organskog ugljika, kao što su aerobna respiracija, asimilacija, proizvodnja PHA, proizvodnja EPS-a, denitrifikacija. Primjerice, višekratno prihranjivanje tijekom anaerobnih uvjeta u bioreaktoru pogoduje selekciji mikroorganizama koji imaju sposobnost pohranjivanja polimera, dok se izmjenjivanjem aerobnih i anoksičnih/anaerobnih faza favorizira rast miksotrofnih bakterija, npr. onih s denitrificirajućom aktivnosti. Neki primjeri bakterijskih rodova koji mogu proizvoditi skladišne polimere, među kojima su mnogi denitrificirajući, jesu *Acidovorax*, *Flavobacterium*, *Thaurea*, *Zoogloea*, *Phingopyxis*, *Paracoccus*, *Chryseobacterium*, *Comamonas* i drugi (Szabó i sur., 2017).

U istraživanjima provedenima u laboratorijskom mjerilu sa sintetskom otpadnom vodom i acetatom kao glavnim izvorom ugljika, Szabó i sur. (2017) očitili su relativno sličnu brojnost hidrolizirajućih bakterija (oko 10 %) u granulama kao i inokulumu mulja u sustavima s otpadnim vodama grada u kojima je organski ugljik često prisutan u obliku složenih spojeva – polisaharida, lipida, proteina. Pretpostavlja se da je razlog tome mogućnost bakterijskog korištenja egzopolisaharida, mrtve biomase i topivih mikrobnih proizvoda kao alternativnog izvora ugljika u tranutcima kada je iscrpljen vanjski izvor ugljika. Prema tome, ovi mini ekosustavi sadrže i mikroorganizme proizvođače i potrošače (npr. *Sphingobacteriales* i *Cytophage*) određenih sastojaka kao što je EPS, a njihova relativna brojnost, odnosno ekološka ravnoteža ima velik utjecaj na postojanost granula i učinkovitost funkcija populacija koje ih čine (Xia i sur., 2018; Szabó i sur., 2017).

Zajednica mikroorganizama prisutna u AGS-u u određenoj mjeri može tolerirati određene

toksične spojeve, primjerice fenole, amine ili boje, a za otpornost prema toksičnim sastojcima odgovoran je selekcijski pritisak koji rezultira obogaćivanjem granule bakterijskim vrstama koje sintetiziraju EPS čineći površinu granula slabo propusnom za prodor toksina (Xia i sur., 2018). Gómez-Acata i sur. (2018) uspješno su u SBR-u proveli uzgoj granula uz prisustvo toksičnog 4-klorfenola, spoja koji je prisutan u otpadnim vodama kozmetičke i farmaceutske industrije, pri čemu su dominantne vrste odgovorne za uklanjanje ovog spoja bile iz rodova *Parococcus* i *Sphingobium*. Zhu i sur. (2013) su također postigli uspješnu granulaciju s otpadnom vodom koja je sadržavala visoke koncentracije 4-kloranilina te se smatra da je glavna bakterija zaslužna za njegovo uklanjanje *Thauera* iz razreda β -*Proteobacteria*.

2.5.3. Dinamika mikrobne populacije i njihovi međuodnosi

Szabó i sur. (2017) proveli su istraživanje o populaciji mikroorganizama u granuliranom mulju pri tri različite vrijednosti OLR-a (0,9 kg/m³ d; 1,0 kg/m³ d; i 3,7 kg/m³ d) te su zapazili da se sličnost među populacijama već nakon šest dana u SBR-u smanjila za više od 50 %. Mikroorganizmi koji su ostali dominantni kod različitih OLR-a, tj. u različitim reaktorima pripadaju rodovima *Zoogloea*, *Parococcus*, *Thaurea*, *Meganema*, dakle uglavnom bakterijama proizvođačima egzopolisaharida, odnosno bakterijama koje provode denitrifikaciju i imaju sposobnost skladištiti PHA. Naime, skupine bakterija pokazale su značajnu funkcionalnu redundantnost bez obzira na primijenjeni OLR. Važno je napomenuti kako među navedenim najzastupljenijim rodovima u reaktorima nije bilo onih koji provode izuzetno bitan proces – nitrifikaciju, stoga je vidljivo kako i malo zastupljene skupine mogu biti neproporcionalno aktivne. Kod održavanja sustava u stacionarnom stanju i dalje je bila prisutna promjena u relativnoj brojnosti prisutnih mikroorganizama, no njihov identitet ostao je relativno nepromijenjen zahvaljujući redundantnom mikrobiomu (Szabó i sur., 2017).

Konkurencija između određenih populacija u AGS-u nije jedini značajan mikrobni međuodnos. Bitan utjecaj na funkcionalnost i strukturu zajednice te učinkovitost uklanjanja nutrijenata ima predatorstvo, pri čemu se kao česti mikrobni predatori ističu bakteriofagi, protisti te bakterije. Negativan utjecaj bakteriofaga zapažen je kod smanjenja učinkovitosti uklanjanja fosfata u bakteriofagom bogatim AGS sustavima. Protisti se mogu hraniti bakterijama prisutnim u granulama, a mogu uzrokovati i razgradnju bakterijskih biofilmova. Predatorske bakterije također mogu biti prisutne u granuliranom mulju, no njihov negativan utjecaj na strukturu i dinamiku mikrobne zajednice granuliranog mulja nije sasvim razjašnjen (Wilén i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. OTPADNA VODA

Pokusi u ovom radu provedeni su sa sintetskom otpadnom vodom koja svojim sastavom oponaša komunalnu otpadnu vodu. Kao izvor ugljika korišten je natrijev acetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, GRAM-MOL) dodan u odgovarajućoj količini za postizanje omjera C/N 4, 8 i 12.

Sintetska otpadna voda je pripremljena otapanjem soli u vodovodnoj vodi: 2 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{L}$ (Merck), 1 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$ (Merck), 0,4 mg FeSO_4/L (Kemika), 0,5 mg MgSO_4/L (Merck), 0,4 mg NaCl/L (Merck), 1 mg MgCO_3/L (Kemika), 1 mg CaCO_3/L (Kemika). Nakon stajanja na sobnoj temperaturi tijekom 24 h filtrirana je kroz grubi filter papir veličine pora 0,45 μm . Sintetska otpadna voda je dodana u bioreaktor u odgovarajućoj količini da se osigura 70 ± 10 mg $\text{NH}_4\text{-N}/\text{L}$.

Pokusi pri svakom ispitivanom omjeru su vođeni tijekom 50 dana.

3.2. POSTAVKE SBR REAKTORA

SBR reaktor je radio 2 ciklusa na dan, a ciklus se sastojao od faze punjenja bioreaktora sintetskom otpadnom vodom tijekom 20 min, zatim faza reakcije tijekom 11 h i 10 min, faza taloženja 10 min i odlijevanje supernatanta tijekom 20 min.

SBR je bio radnog volumena 2 L. Pokusi su vođeni pri koncentraciji otopljenog kisika 2 mg DO/L , temperaturi 22 ± 2 °C i vrijednosti pH 7-8. Aeracija je imala ulogu osiguravanja željene koncentracije otopljenog kisika i miješanja reaktorskog sadržaja. U reaktor je upuhivan zrak s donje strane reaktora preko kompresora (HIBLOW HP 40). Reaktor je bio opremljen elektrodama za praćenje koncentracije otopljenog kisika, vrijednosti pH i temperature.

3.3. AEROBNI GRANULIRANI MULJ

Za provedbu pokusa korišten je zreli granulirani aerobni mulj koncentracije 3 g MLSS/L . Mulj je porijeklom s uređaja za biološku obradu otpadne vode grada i granuliran je. Tijekom granulacije aktivnog mulja, vrijeme taloženja je postepeno skraćeno s početnih 30 min na 10 min.

3.4. ANALITIČKI POSTUPCI

Uzorci za analizu uzimani su svakih 5 dana, i filtrirani kroz grubi filter papir veličine pora 0,45 µm prije analize za određivanje KPK, ukupnog dušika (engl. *Total Nitrogen, TN*), NH₄-N, NO₃-N, NO₂-N, PO₄-P, a za analizu MLSS (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*, hrv. *miješana tekućina suspendiranih čestica*) uzorak se ne filtrira.

3.4.1. Određivanje ukupnog dušika

Za određivanje ukupnog dušika korišteni su kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14763 i 1.14537. Prema Koroleff-ovoj metodi organski i anorganski dušikovi spojevi se provode u nitrat u reakciji s oksidirajućim reagensom u termoreaktoru. U otopini zakiseljenoj sumpornom i fosfornom kiselinom, nitrati reagiraju s 2,6-dimetilfenolom i tvore 4-nitro-2,6-dimetilfenol i određuje se fotometrijski. Digestija je analogna EN ISO 11905-1, a određivanje nitrata je analogno ISO 7890/1.

Postupak:

U praznu kivetu se doda 9 mL destilirane vode, 1 mL filtriranog uzorka, i promiješa se. Doda se 1 žličica reagensa N-1K i promiješa, zatim 6 kapi reagensa N-2K, dobro se zatvori, promiješa i spaljuje tijekom 1 h na 120 °C. Nakon toga se kiveta izvadi iz termoreaktora (Thermoreactor, Merck), zatim nakon 10 min promiješa, i hladi na sobnoj temperaturi. U reakcijsku kivetu se otpipetira 1 mL ohlađenog spaljenog uzorka (koristi se bistri supernatant ili filtrat u slučaju mutnoće ili taloga), doda se 1 mL reagensa N-3K, zatvori se kiveta i promućka. Po isteku reakcijskog vremena od 10 min, u spektrofotometru (Spectroquant VEGA 400, Merck) se očita vrijednost ukupnog dušika u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.1457 za raspon koncentracija 0,5-15 mg N/L i 1.14763 za raspon koncentracija 10-150 mg N/L

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Termoreaktor

Spektrofotometar

3.4.2. Određivanje amonijakalnog dušika

Amonijakalan dušik, $\text{NH}_4\text{-N}$, je određivan metodom po Nessleru. U prisustvu $\text{NH}_4\text{-N}$ dodatkom Nesslerovog reagensa (Kemika) razvija se žuta do žuto smeđa boja, ovisno o koncentraciji prisutnog $\text{NH}_4\text{-N}$, a intenzitet obojenja se određuje mjerenjem absorbancije pri valnoj duljini 425 nm, te iz baždarnog dijagrama se očitava koncentracija $\text{NH}_4\text{-N}$ u mg/L.

Baždarni dijagram je načinjen na način da su određivane absorpcijske vrijednosti poznatih koncentracija standardne otopine NH_4Cl pri 425 nm.

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL doda se 50 mL filtriranog uzorka, razrijeđenog po potrebi, zatim 2 kapi K-Na-tartarata (GRAM-MOL), promiješa se, doda se 1 mL Nesslerovog reagensa i promiješa. Nakon reakcijskog vremena od 10 min izmjeri se absorbancija pri 425 nm na fotometru (SQ 200, Merck).

Pribor:

Odmjerne tikvice od 50 mL s čepovima

Pipete

Fotometar

3.4.3. Određivanje koncentracije nitrata

Koncentracija nitrata ($\text{NO}_3\text{-N}$) se određuje pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14773. Temelj metode je reakcija nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline uz nastanak nitro spoja koji je crvene boje i određuje se spektrofotometrijski.

Postupak:

U staklenu kivetu se doda 1,5 mL uzorka i žličica reagensa $\text{NO}_3\text{-1}$. Kiveta se dobro zatvori i miješa do potpunog otapanja reagensa. Zatim se doda 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, kiveta se pažljivo zatvori i promiješa. Nakon reakcijskog vremena od 10 minuta, na spektrofotometru (Spectroquant VEGA 400, Merck) se očitava koncentracija $\text{NO}_3\text{-N}$ u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14773 za raspon koncentracija 0,2-20 mg NO₃-N/L

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Kvarcne kivete, Merck

Spektrofotometar

3.4.4. Određivanje koncentracije nitrita

Za određivanje nitrita (NO₂-N) korišteni su kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776, a metoda se temelji na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli, koja reagira s N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorom pri čemu nastaje crveno-ljubičasta azo boja. Intenzitet obojenja se mjeri fotometrijski. Ova metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500-NO₂-B, i EN 26 777.

Postupak:

U staklenu kivetu doda se 5 mL uzorka i jedna žličica NO₂-1 reagensa, kiveta se zatvori i miješa dok se ne otopi reagens. Nakon reakcijskog vremena od 10 minuta u fotometru (Spectroquant VEGA 400, Merck) se izmjeri koncentracija NO₂-N u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776 za raspon koncentracija 0,002-1 mg NO₂-N/L

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Kvarcne kivete, Merck

Spektrofotometar

3.4.5. Određivanje koncentracije fosfata

Za određivanje fosfata u obliku ortofosfata (PO₄-P) korišteni su kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14842, 1.00673.0001 i 1.14729.0001. Temelj metode je reakcija iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom pri čemu se razvija žuto

obojena molibdovanadat fosforna kiselina, čija se koncentracija određuje fotometrijski. Ova metoda je analogna APHA 4500-P C.

Postupak:

U staklenu kivetu se otpipetira 5 mL uzorka, doda se 1,2 mL reagensa PO₄-1, kiveta se zatvori i promiješa. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena u spektrofotometru (Spectroquant VEGA 400, Merck) se izmjeri koncentracija PO₄-P u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1,14842 za raspon koncentracija 0,5-30 mg PO₄-P/L, 1.00673.0001 za raspon koncentracija 3-100 mg PO₄-P/L i 1.14729.0001 za raspon koncentracija 0,5-25 mg PO₄-P/L

Staklene kivete s čepovima

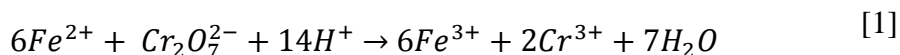
Pipete

Kvarcne kivete, Merck

Spektrofotometar

3.4.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika

Vrijednost KPK određivana je titrimetrijski prema Standard Methods (APHA, 2005), po metodi 5220C (Closed Reflux, Titrimetric method). Uzorak se spaljuje u kiseloj sredini uz srebrov sulfat (Ag₂SO₄, Kemika) kao katalizator i živin sulfat (HgSO₄, Kemika) da bi se izbjegle interferencije nekih anorganskih spojeva, primjerice klorida. Suvišak kalijeva bikromata (K₂Cr₂O₇, Kemika) se titrira otopinom feroamonijeva sulfata, FAS ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, Kemika), uz dodatak ferroina kao indikatora [jednadžba 1]



Postupak:

U staklenu pipetu otpipetira se 2 mL uzorka, doda se 1,2 mL otopine K₂Cr₂O₇ + HgSO₄, i 2,8 mL otopine Ag₂SO₄ + H₂SO₄ (GRAM-MOL), zatvori se čepom, promiješa i spaljuje u termoreaktoru (Thermoreactor TR 300, Merck) na 150 °C tijekom 1 h. Zatim se uzorak hladi na sobnoj temperaturi u tami. Ohlađeni uzorak se titrira (Digitalna bireta Solarus,

Hirschman-Laborgeräte) otopinom FAS (0,1 mol/L) uz dodatak ferroina kao indikatora. Prilikom titracije boja otopine se mijenja iz plavo-zelene do smeđe-crvene. Slijepa proba se određuje na isti način uz razliku da je dodani uzorak destilirana voda. Faktor otopine ferroamonijevog sulfata se određuje na isti način kao i slijepa proba, s razlikom da se uzorak ne spaljuje. Faktor otopine se računa prema jednadžbi 2:

$$f = \frac{1,2}{V_{fas}} \quad [2]$$

gdje je:

1,2 – volumen (mL) otopine $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$

V_{fas} – volumen (mL) FAS otopine utrošene za titraciju

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi 3:

$$KPK \left[\frac{mgO_2}{L} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \cdot f \cdot 8000}{V_{uzorka}} \quad [3]$$

gdje je:

V_1 – volumen [mL] FAS utrošen za filtraciju slijepa probe

V_2 – volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

c – koncentracija FAS (0,1 mol/L)

f – faktor otopine FAS

Pribor:

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Digestor

Dispenser

Titратор

3.4.7. Određivanje MLSS

MLSS je korišten kao mjera koncentracije aktivnog mulja, a određuje se na način da se

izračuna razlika filter papira s talogom aktivnog mulja i čistog suhog filter papira, oba sušena do konstantne mase na 105 °C u sušioniku (Instrumentaria ST-05).

Postupak:

Prilikom postavljanja pokusa određivana je koncentracija aktivnog mulja na način da je uzet poznati volumen homogene suspenzije aktivnog mulja i filtriran kroz čist, osušen i prethodno izvagan filter papir. Filter papir s uzorkom aktivnog mulja je sušen na 105 °C do konstantne mase, i zatim ostavljen u eksikatoru na hlađenje. Ohlađeni suhi filter papir s uzorkom mulja je izvagan i iz razlike mase suhog filter papira s uzorkom aktivnog mulja i čistog, suhog filter papira, podijeljene s volumenom uzete suspenzije aktivnog mulja dobije se koncentracija aktivnog mulja, izražene u g/L.

Formula (4) za računanje MLSS:

$$MLSS \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{m_{om} - m_f}{mL \text{ uzorka}} \cdot 1000 \quad [4]$$

gdje je:

m_{om} [g] – masa osušenog filter papira s uzorkom aktivnog mulja

m_f [g] – masa čistog osušenog filter papira

mL uzorka – volumen suspenzije aktivnog mulja

Pribor:

Pipeta

Lijevak

Čašica

Osušeni i izvagani filter papir

Sušionik

Eksikator

3.4.8. Određivanje temperature

Tijekom pokusa denitrifikacije temperatura je motrena očitavanjem sa zaslona uređaja pomoću temperaturnog senzora na pH elektrodi (WTW 330i i SenTix 41) i kisikovojoj elektrodi (WTW Oxi3210 i DurOx) uronjenih u miješanu tekućinu.

3.4.9. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Za određivanje koncentracije otopljenog kisika korišten je mjerač otopljenog kisika (WTW Oxi3210) i kisikova elektroda (DurOx). Prije pokusa instrument je umjeren prema uputama proizvođača. Tijekom pokusa elektroda je bila uronjena u miješanu tekućinu i koncentracija otopljenog kisika je očitavana sa zaslona uređaja izražena u mg/L.

3.4.10. Određivanje vrijednosti pH

Za određivanje vrijednosti pH korišten je pH metar (WTW 330i) i pH elektroda (SenTix41). Prije pokusa napravljena je kalibracija tako što se pH elektroda uranjala u pufer otopine s pH 4, pH 7 i pH 10 prema uputama proizvođača. Tijekom pokusa pH elektroda je bila uronjena u miješanu tekućinu i vrijednost pH je očitavana sa zaslona pH metra. Nakon završetka mjerenja, pH elektroda je isprana destiliranom vodom i čuvana u otopini elektrolita, zasićenoj otopini kalijeva klorida, KCl (Alkaloid).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Obrada otpadne vode koja svojim sastavom oponaša komunalnu otpadnu vodu istražena je primjenom aerobnih granula, uz dodani vanjski izvor ugljika, natrijev acetat. Komunalnu otpadnu vodu karakterizira nizak omjer KPK/N, 3,7-5,1, i upravo se omjer KPK/N navodi kao ograničavajući čimbenik učinkovite obrade (Wagner i sur., 2015). Zbog toga se često dodaje vanjski izvor ugljika, da bi se postigao zadovoljavajući stupanj obrade otpadne vode za ispuštanje obrađene vode u vodna tijela.

U Republici Hrvatskoj maksimalne dopuštene vrijednosti za ispust u površinske vode iznose 125 mg KPK/L, 25 mg BPK₅/L, 15 mg ukupni N/L, 10 mg amonij-N/L, 2 mg NO₃-N/L, 1 mg NO₂-N/L i 2 mg ukupni P/L. Te vrijednosti za ispust u sustav javne odvodnje su više i iznose 700 mg KPK/L, 250 mg BPK₅/L, 50 mg TN/L, 10 mg NO₂-N/L, 10 mg ukupni P/L (Pravilnik, 2020).

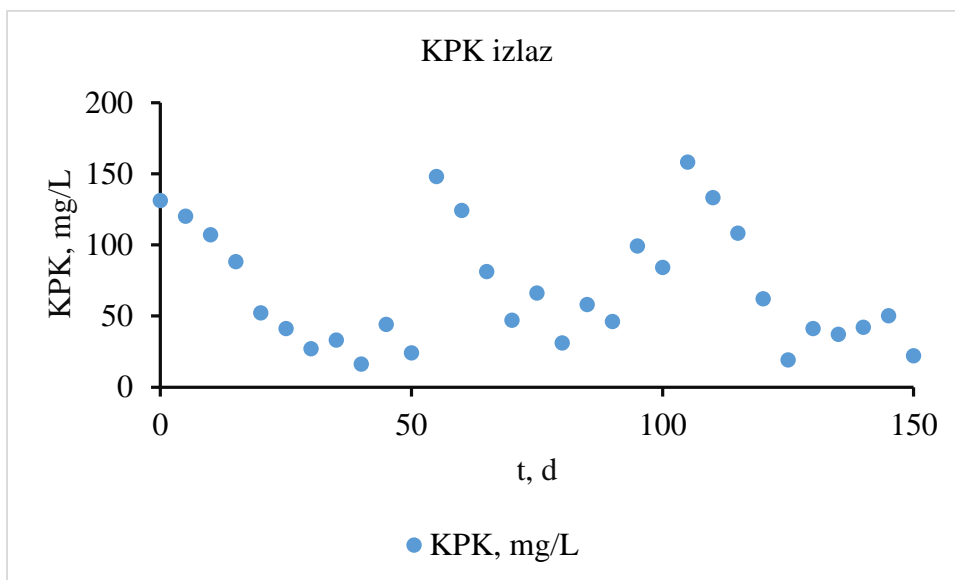
Acetat je vanjski izvor ugljika koji se učestalo koristi za podešavanje omjera C/N za učinkovito uklanjanje nutrijenata (dušika i fosfora), pa je zato korišten i u ovim pokusima. Prednost acetata kao izvora ugljika je to što ga mikroorganizmi aktivnog mulja mogu vrlo jednostavno koristiti, postižu se veće brzine uklanjanja N i P s acetatom kao izvorom ugljika u odnosu na druge vanjske izvore ugljika poput metanola ili etanola te je potrebno vrlo kratko vrijeme prilagodbe mikroorganizama aktivnog mulja na acetat. Nedostatak acetata kao vanjskog izvora ugljika je to što je skuplji od primjerice etanola ili metanola (Osaka i sur., 2008; Peng i sur., 2007).

Karakteristične vrijednosti komunalne otpadne vode su 304,4±82,2 mg KPK/L, 83,2±18,3 mg TN/L, 82,2±17,8 mg NH₄-N/L (Wagner i sur., 2015), 0-1 mg NO₃-N/L, i 4-15 mg PO₄-P/L (Metcalf i Eddy, 2003).

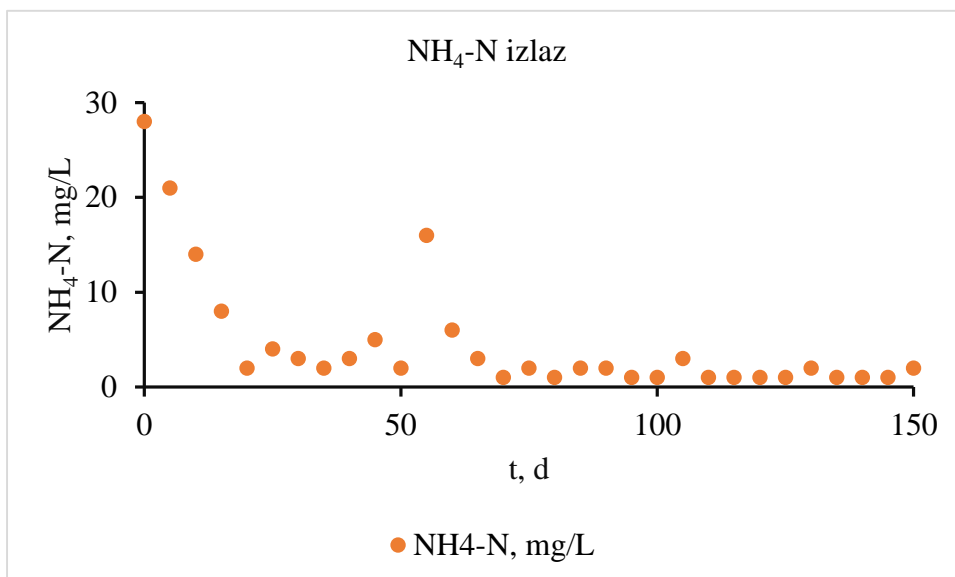
Kako je uobičajeni omjer KPK/N u komunalnim otpadnim vodama 3,7-5,1 (Wagner i sur., 2015) pokusi u ovom radu su započeli s omjerom C/N 4, zatim je omjer C/N iznosio 8 i konačno C/N 12. Pokusi u ovom radu su provedeni sa sintetskom otpadnom vodom koja svojim sastavom oponaša komunalnu otpadnu vodu. Kao izvor ugljika je korišten lako razgradiv izvor ugljika, acetat. Svaki omjer C/N je vođen tijekom 50 dana, a pokusi su sveukupno trajali 150 dana.

Postignuti rezultati u izlazu tijekom 150 dana za vrijednosti KPK su prikazani na slici 7, za NH₄-N na slici 8, za TN na slici 9, za PO₄-P na slici 10, a promjene koncentracije aktivnog mulja izražene kao MLSS su prikazane na slici 11. Također, na slici 12 je prikazana postignuta učinkovitost uklanjanja KPK, TN, NH₄-N i PO₄-P pri istraživanjima

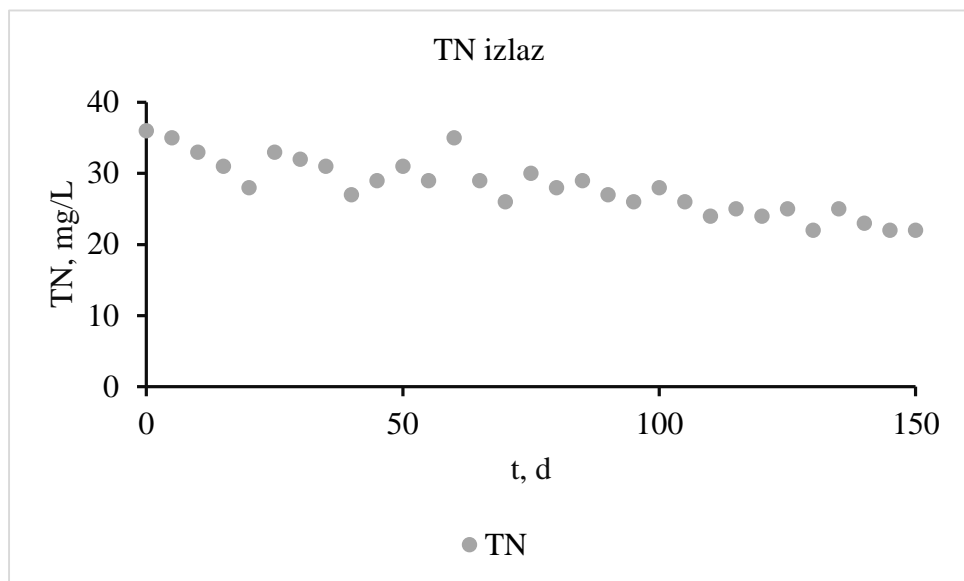
omjerima C/N 4, 8 i 12.



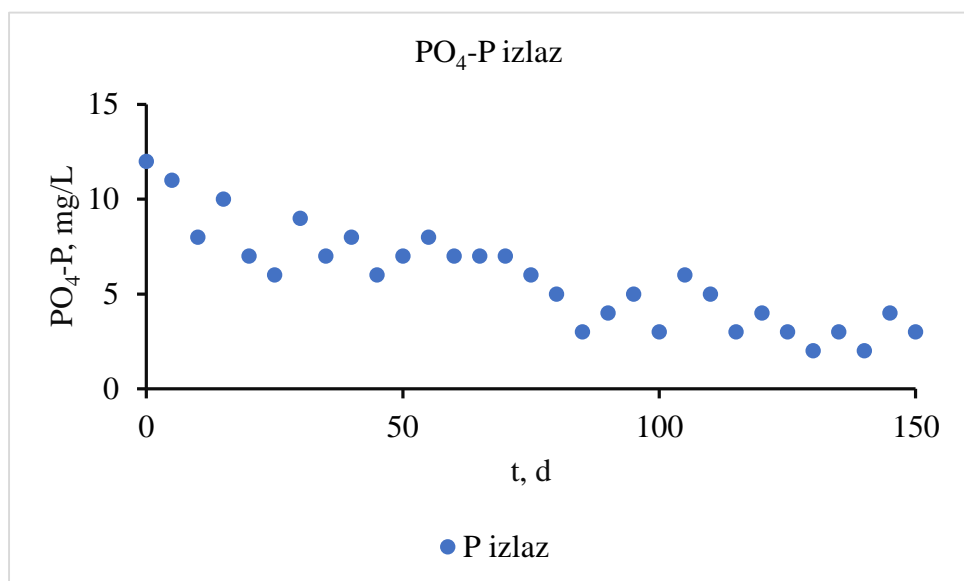
Slika 7. KPK vrijednosti u izlazu u pokusima uklanjanja nutrijenata s aerobnim granulama pri omjerima C/N 4, 8 i 12



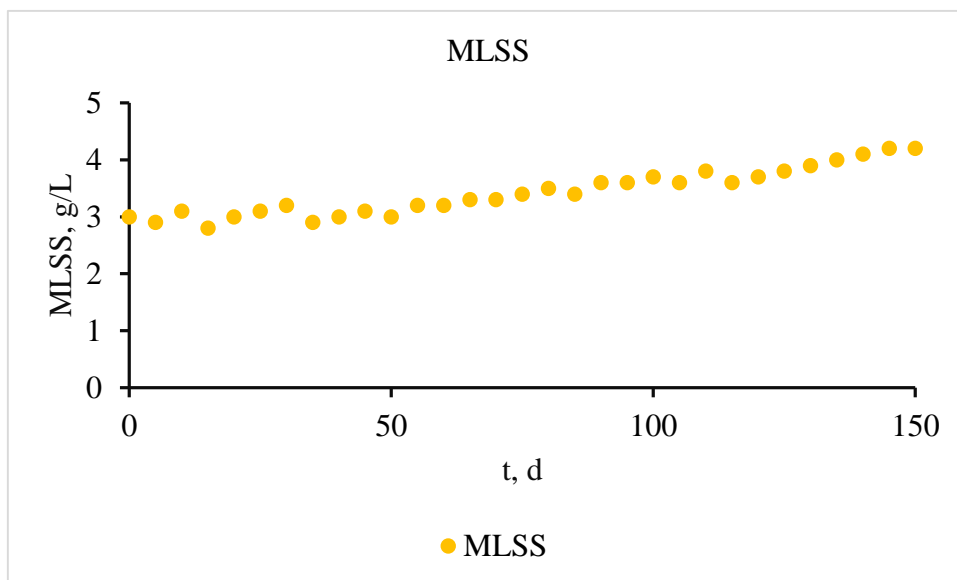
Slika 8. NH₄-N vrijednosti u izlazu u pokusima uklanjanja nutrijenata s aerobnim granulama pri omjerima C/N 4, 8 i 12



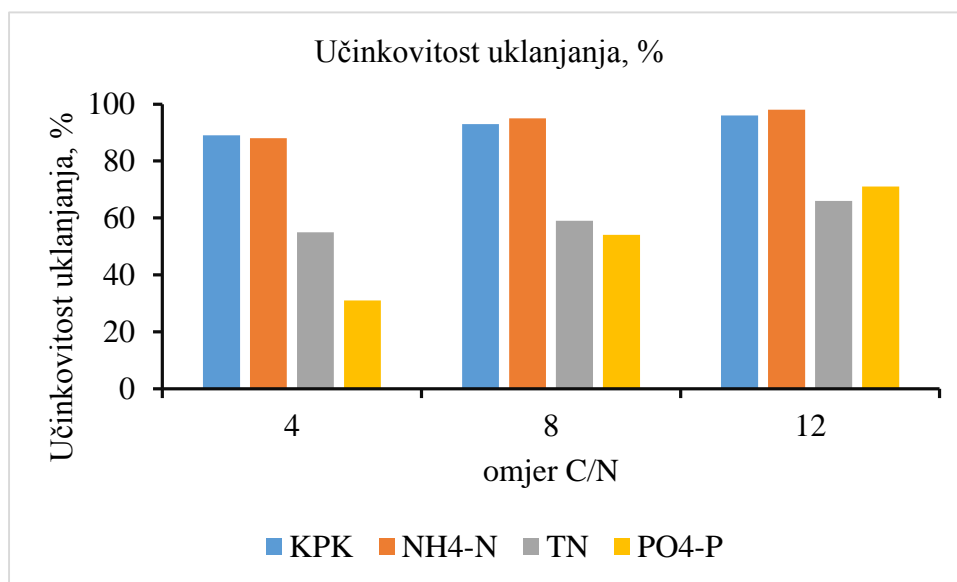
Slika 9. TN vrijednosti vrijednosti u izlazu u pokusima uklanjanja nutrijenata s aerobnim granulama pri omjerima C/N 4, 8 i 12



Slika 10. PO₄-P vrijednosti u izlazu u pokusima uklanjanja nutrijenata s aerobnim granulama pri omjerima C/N 4, 8 i 12



Slika 11. MLSS vrijednosti u pokusima uklanjanja nutrijenata s aerobnim granulama pri omjerima C/N 4, 8 i 12



Slika 12. Učinkovitost uklanjanja KPK, NH₄-N, TN i PO₄-P u pokusima uklanjanja nutrijenata s aerobnim granulama pri omjerima C/N 4, 8 i 12

Pri omjeru C/N 4 za početnih 70 ± 10 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ početna koncentracija organskih sastojaka izražena kao KPK vrijednost je iznosila oko 563 mg KPK/L. Tijekom 50 dana prosječna vrijednost KPK u izlazu je iznosila oko 62 mg KPK/L, s vrijednostima koje su varirale od 16 mg KPK/L do 131 mg KPK/L (slika 7).

S povećanjem omjera C/N na 8, početna vrijednost KPK u ulazu je iznosila oko 1108 mg KPK/L. Pri tom omjeru tijekom 50 dana prosječna vrijednost KPK u izlazu je iznosila oko 78 mg KPK/L, pri čemu su vrijednosti u izlazu varirale od 31 mg KPK/L do 148 mg KPK/L. Također, s povećanjem omjera C/N na 8 vidljivo je da je vrijednost KPK u izlazu bila viša u početnim danima, te se tijekom narednih dana postepeno smanjivala i ustabilila (slika 7).

Omjer C/N 12 je rezultirao početnim KPK vrijednosti oko 1672 mg KPK/L, i tijekom narednih 50 dana pokusa prosječna vrijednost KPK u izlazu je iznosila oko 67 mg KPK/L, s najnižom zabilježenom vrijednosti 19 mg KPK/L i najvišom zabilježenom KPK vrijednosti 158 mg KPK/L (slika 7).

Isti trend ponašanja krivulje KPK u izlazu se može zapaziti pri sva tri ispitivana omjera C/N, tijekom nekoliko početnih dana novog, višeg omjera C/N, vrijednost KPK u izlazu je bila viša, i zatim se tijekom vremena smanjivala i konačno ustabilila (slika 7).

Krivulja KPK je odraz mikrobnog metabolizma heterotrofa (Kocaturk i Erguder, 2016), i sa svakim početnim omjerom C/N, mikroorganizmi aktivnog mulja su dobivali veću raspoloživu koncentraciju organskih sastojaka (slika 7). Više vrijednosti KPK u izlazu su pokazatelj početka prilagodbe mikroorganizama na višu koncentraciju organskog supstrata, a postupan pad koncentracije KPK u izlazu te stabilne vrijednosti u izlazu su pokazatelj da su se mikroorganizmi prilagodili na nove, više koncentracije organskih sastojaka (slika 7). Povećanje omjera KPK/N postupno dovodi do dominacije heterotrofnih bakterija, a samim time postupno i opada raznolikost i brojnost mikroorganizama zastupljenih u granulama (Zhao i sur., 2013).

Za smanjenje vrijednosti KPK su odgovorne heterotrofne vrste prisutne u aktivnom mulju koje troše organske sastojke kao izvor ugljika i energije (Kocaturk i Erguder, 2016).

Kako su ovi pokusi vođeni sa zrelim aerobnim granuliranim muljem, i budući da su granule kompaktne strukture u kojoj dolazi do gradijenta supstrata idući od površine granule prema središtu granule, tako unutar granule postoje aerobne, anoksične i anaerobne zone (Chen i sur., 2007; Gonzalez-Gil i Holliger, 2014). Zbog toga su heterotrofi aktivni u ovim pokusima odgovorni za uklanjanje organskih sastojaka vjerojatno bili i aerobni i anoksični heterotrofi (Desireddy i Sabumon, 2021; He i sur., 2019; He i sur., 2018; Sarma i Tay, 2018;

Xia i sur., 2018), unatoč tome što su pokusi vođeni u aerobnim uvjetima pri koncentraciji otopljenog kisika 2 mg DO/L.

Stabilan i dugotrajan rad uređaja za biološku obradu otpadnih voda je u ovisnosti o primjerenom omjeru KPK/N, a koji utječe i na učinkovitost biološke obrade otpadne vode, sastav mikrobiološke zajednice unutar granula i na održavanje integriteta granula (He i sur., 2017). Kocaturk i Erguder (2016) ističu omjer KPK/N 7,5 za održavanje stabilnosti aerobnih granula, i za učinkovitu obradu KPK i nutrijenata, pri čemu niži omjeri $\text{KPK/N} \leq 3,3$ pogoduju nitrifikantima, a veći omjeri ≥ 20 pogoduju heterotrofima (Kim i sur., 2021; Kocaturk i Erguder, 2016).

Pri omjerima C/N 4, 8 i 12 pri početnih 70 ± 10 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ postignute su vrijednosti KPK niže od maksimalne dopuštene koncentracije 125 mg KPK/L (prosječne vrijednosti u izlazu su iznosile 62 mg KPK/L, 78 mg KPK/L i 67 mg KPK/L pri omjerima C/N 4, 8 i 12) za ispust u površinske vode (slika 7). Također, kvaliteta obrađene vode obzirom na KPK vrijednost je bila zadovoljavajuća i za ispust u sustav javne odvodnje jer je u tom slučaju maksimalna dopuštena koncentracija 700 mg KPK/L (Pravilnik, 2020).

Dinamika promjene koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ u izlazu pri omjerima C/N 4, 8 i 12 tijekom 150 dana je prikazana na slici 8. U ulazu je koncentracija $\text{NH}_4\text{-N}$ bila konstantna, 70 ± 10 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, a koncentracija organskih sastojaka rasla je s porastom omjera C/N.

Pri omjeru C/N 4 prosječna koncentracija $\text{NH}_4\text{-N}$ u izlazu je iznosila 8,4 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, unutar raspona vrijednosti 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 28 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ (slika 8).

Manje koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ u izlazu su postignute pri omjeru C/N 8, a prosječna koncentracija $\text{NH}_4\text{-N}$ je iznosila 3,5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, u rasponu od 1 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ do 16 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ (slika 8).

Omjer C/N 12 je rezultirao još manjom prosječnom koncentracijom $\text{NH}_4\text{-N}$ u izlazu od 1,4 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri čemu su najniža i najviša vrijednost iznosile 1 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 3 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ (slika 8).

Smanjenje koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ je rezultat procesa nitrifikacije – oksidacije amonijaka do nitrita i zatim oksidacije nitrita do nitrata. Proces nitrifikacije provode aerobne autotrofne bakterije nitrifikanti, koji se sastoje od dvije skupine (Desireddy i Sabumon, 2021; Yuan i sur., 2019; He i sur., 2018; Metcalf i Eddy, 2003; Gerardi, 2002):

- (i) amonijak oksidirajućih bakterija (AOB) koje provode oksidaciju amonijaka do nitrita
- (ii) nitrit oksidirajućih bakterija (NOB) koje provode oksidaciju nitrita do nitrata.

U SBR reaktoru vladali su aerobni uvjeti, pri čemu je koncentracija otopljenog kisika iznosila 2 mg DO/L, a za raspoloživu koncentraciju otopljenog kisika natjecale su se aerobne vrste prisutne u aktivnom mulju – heterotrofi (provode proces aerobne razgradnje organskih sastojaka) (slika 7) i nitrifikanti (provode nitrifikaciju) (slika 8). Iako su aerobni heterotrofi znatno nadmoćniji u kompeticiji za otopljeni kisik od nitrifikanata (Desireddy i Sabumon, 2021; Yuan i sur., 2019; He i sur., 2018; Metcalf i Eddy, 2003; Gerardi, 2002), u reaktoru je bilo dovoljno otopljenog kisika za oksidaciju amonijaka, te je amonijak preostao u izlazu pri svim istraživanim C/N omjerima (slika 8) bio u rasponu vrijednosti koje su dopuštene za ispušt u površinske vode (10 mg N/L) (Pravilnik, 2020). Postignute prosječne koncentracije NH₄-N u izlazu su iznosile 8,4 mg NH₄-N/L, 3,5 mg NH₄-N/L i 1,4 mg NH₄-N/L pri omjerima C/N 4, 8 i 12 (slika 8).

Ravnoteža između ionskog oblika NH₄-N i molekularnog oblika NH₃ je u ovisnosti o vrijednosti pH u miješanoj tekućini. Što je viša vrijednost pH, to je ravnoteža više pomaknuta prema molekularnom obliku kojeg nitrifikanti ne mogu koristiti kao supstrat, i molekularni oblik amonijaka se otplinjuje i tako odlazi iz reaktora. Niža vrijednost pH pomiče ravnotežu između NH₄-N i NH₃ prema ionskom obliku, NH₄-N, kojeg nitrifikanti mogu koristiti, te se provodi proces nitrifikacije (Gerardi, 2002; Anthonisen i sur., 1976).

Isto tako, ravnoteža između NO₂-N (ionski oblik) i HNO₂ (molekularni oblik) je također u ovisnosti o vrijednosti pH, ali u ovom slučaju niža vrijednost pH pomoće ravnotežu prema HNO₂, slobodnoj nitritnoj kiselini, koja je inhibitor brojnih vrsta prisutnih u aktivnom mulju (Anthonisen i sur., 1976).

Vrijednost pH utječe na metabolizam nitrifikanata, i optimalna vrijednost pH za proces nitrifikacije je 7,2-8 (Gerardi, 2002). Vrijednost pH u ovom radu je bila u rasponu 7-8, pogodna za metabolizam nitrifikanata, te nije dolazilo niti do otplinjavanja NH₃ iz sustava, niti do nakupljanja HNO₂, i posljedično, inhibicije mikroorganizama, te se proces nitrifikacije odvijao neometano (slika 8).

Nepovoljan učinak smanjenja omjera KPK/N sa 4 na 1 na smanjenje brzine i učinkovitosti nitrifikacije su objavili Luo i sur. (2014), što autori tumače pomakom u sastavu mikrobne zajednice i smanjenju sadržaja EPS-a, a što je posljedično dovelo do smanjenja fizičke snage aerobnih granula, narušavanja taloživosti i smanjenja veličine aerobnih granula.

Povećanje omjera C/N u ovom radu je povoljno djelovalo na postignute prosječne vrijednosti TN u izlazu, koje su iznosile 31,5 mg TN/L, 29 mg TN/L i 24 mg N/L pri

omjerima C/N 4, 8 i 12. Pri omjeru C/N 4 najniža i najviša zabilježena vrijednost su iznosile 27 mg TN/L i 36 mg TN/L, pri omjeru C/N 8 su bile u rasponu 26 mg TN/L i 35 mg TN/L, a pri omjeru C/N 12 su bile u rasponu 22 mg TN/L i 26 mg TN/L (slika 9).

Dušik se iz otpadne vode uklanja kombinacijom procesa nitrifikacije i denitrifikacije. U procesu nitrifikacije se amonijak oksidira do nitrata, i zatim u procesu denitrifikacije nitrati se reduciraju do plinovitog dušika (Metcalf i Eddy, 2003; Gerardi, 2002).

Proces denitrifikacije provode heterotrofne anoksične bakterije – denitrifikanti pomoću niza enzima – denitrificirajućih reduktaza. Da bi se denitrifikacija mogla odvijati, denitrifikantima je nužan donor elektrona – organski sastojci. Količina potrebnih organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju je u ovisnosti o odabranom izvoru ugljika. Nedovoljna količina organskih sastojaka rezultira nepotpunom denitrifikacijom, što znači da su utrošeni organski sastojci, a u obrađenoj vodi preostaju nitriti odnosno nitrati. Obrnuto, prevelika količina organskih sastojaka osigurava potpunu denitrifikaciju, međutim, a u obrađenoj vodi preostaju organski sastojci koje je potrebno ukloniti iz vode naknadnim stupnjevima obrade. Zbog toga je poželjno dodati minimalnu potrebnu količinu organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju kako bi rezultat procesa denitrifikacije bio uklonjeni (denitrificirani) nitrati odnosno nitriti te izostanak organskih sastojaka u izlazu (Metcalf i Eddy, 2003; Gerardi, 2002).

Denitrifikanti kao izvor ugljika mogu koristiti (Metcalf i Eddy, 2003; Gerardi, 2002):

- prisutne biološki razgradive organske spojeve u otpadnoj vodi
- vanjski dodani izvor ugljika, poput acetata, metanola, propionata, glukoze
- unutarstanične rezerve ugljika.

Budući da su pokusi u ovom radu vođeni u SBR reaktoru u aerobnim uvjetima i sa zrelim aerobnim granulama, proces denitrifikacije je bio omogućen, zahvaljujući slojevitoj i kompaktnoj strukturi granula. Tako na površini granule obitavaju aerobne vrste, poput nitrifikanata, a u dubljim slojevima granule obitavaju anoksične vrste, poput denitrifikanata. Na taj način se odvija istovremena nitrifikacija i denitrifikacija u jednom bioreaktoru (Szabó i sur., 2017; Chen i sur., 2007; Beun i sur., 1999).

Zabilježene prosječne vrijednosti ukupnog dušika (slika 9) su više od prosječnih vrijednosti amonijaka (slika 8), zato što se nisu svi nakupljeni nitriti i nitrati uspjeli denitrificirati.

Tri su moguća razloga:

- (i) Moguće je da je koncentracija otopljenog kisika unutar granule bila viša od

- vrijednosti koja je potrebna za provedbu procesa denitrifikacije pa je došlo do djelomične inhibicije denitrificirajućih reduktaza (Wang i Chu, 2016)
- (ii) Moguće je da su dio organskih sastojaka utrošili aerobni heterotrofi pa nije preostalo dovoljno organskih sastojaka za denitrifikaciju nakupljenih nitrata i nitrita (Gutierrez-Wing i sur., 2012)
 - (iii) Moguće je da je tijekom faze punjenja koja je trajala 20 min, i koja se odvijala bez aeracije, dio mikroorganizama prisutnih u aktivnom mulju, poput PAO i GAO, pospremio dio ugljika kao unutarstanične rezerve, a poznato je da je denitrifikacija s unutarstaničnim rezervama ugljika znatno sporiji proces od denitrifikacije s vanjskim, lakorazgradivim izvorom ugljika poput primjerice acetata (Karahani i sur., 2008).

Autori Kocaturk i Erguder (2016) i Yuan i sur. (2019) ukazuju na ulogu anaerobne faze tijekom faze punjenja reaktora zato što se pri takvim uvjetima ostvaruje veća učinkovitost uklanjanja N.

U granulama su najčešće detektirani denitrifikanti slijedećih rodova: *Thauera*, *Zoogloea*, *Meganema*, *Devosia*, *Stenotrophomonas*, a potonje imaju sposobnost i proizvodnje EPS-a (de Sousa Rollemberg i sur., 2018; Xia i sur., 2018).

Niti pri jednom od istraživanih omjera C/N nije postignuta koncentracija TN (slika 9) za ispušt u površinske vode (15 mg TN/L), ali su sve vrijednosti bile zadovoljavajuće za ispušt u sustav javne odvodnje (50 mg TN/L) (Pravilnik, 2020).

Za biološko uklanjanje fosfata pomoću aerobnih granula bilo je povoljno povećanje omjera C/N jer su s povećanjem omjera C/N postignute niže vrijednosti koncentracije PO₄-P u izlazu. Postignute prosječne koncentracije PO₄-P u izlazu iznosile 8,3 mg PO₄-P/L, 5,5 mg PO₄-P/L i 3,5 mg PO₄-P/L pri omjerima C/N 4, 8 i 12. Pri tome, rasponi zabilježenih koncentracija su iznosili 6 mg PO₄-P/L-12 mg PO₄-P/L, 3 mg PO₄-P/L-8 mg PO₄-P/L i 2 mg PO₄-P/L-6 mg PO₄-P/L pri omjerima C/N 4, 8 i 12 (slika 10).

Fosfor se iz otpadne vode uklanja pomoću procesa naprednog biološkog uklanjanja fosfora, a provode ga fosfor akumulirajući organizmi (PAO). Da bi PAO mogli uklanjati P, potrebni su im naizmjenični anaerobni i aerobni (anoksični) uvjeti. U anaerobnim uvjetima PAO unose organske sastojke i pohranjuju ih kao PHA i pri tome otpuštaju fosfate iz svojih stanica u miješanu tekućinu. Zatim, u aerobnim (anoksičnim) uvjetima, PAO koriste unutarstanične zalihe PHA za unos fosfata unutar svojih stanica s kisikom (nitratom) kao akceptorom elektrona (Bunce i sur., 2018; He i sur., 2018; Barr i sur., 2010).

U ovim pokusima povećanje omjera C/N je osiguralo veću količinu organskih sastojaka za pohranu kao PHA, pa su zato s porastom omjera C/N zabilježene niže vrijednosti koncentracije PO₄-P u izlazu (slika 10). Ipak, ovi pokusi su se vodili u aerobnim uvjetima (faza reakcije), a faza punjenja se odvijala bez aeracije, pa je koncentracija otopljenog kisika u tom periodu bila vrlo niska. Vjerojatno su PAO tijekom faze punjenja unijeli dio acetata u svoje stanice i pohranili ga kao PHA kojeg su kasnije koristili za unos PO₄-P u stanice. Međutim, vjerojatno je faza punjenja koja je trajala 20 minuta bila prekratka za značajnije nakupljanje PHA u stanicama pa je to mogući razlog što je u miješanoj tekućini preostalo PO₄-P pri sva tri istraživana omjera C/N. Također, u aerobnoj fazi su i PAO koristili kisik kao krajnji akceptor elektrona, te su se i oni natjecali za otopljeni kisik, skupa s aerobnim heterotrofima i nitrifikantima. Moguće je i da je dio PAO koji imaju sposobnost korištenja NO₂-N i NO₃-N kao krajnjeg akceptora elektrona bio prisutan i u dubljim slojevima granule, te su i oni vjerojatno doprinijeli uklanjanju PO₄-P.

Kako su u aktivnom mulju prisutni i PAO i GAO, tijekom anaerobne faze dolazi do kompeticije za acetat između PAO i GAO. Ukoliko je narušena ravnoteža brojnosti PAO i GAO, te dođe do proliferacije GAO, GAO će tijekom anaerobne faze unijeti u svoje stanice više acetata od PAO, te u narednoj aerobnoj (anoksičnoj) fazi PAO neće imati dovoljno unutarstaničnih zaliha PHA za unos ortofosfata u svoje stanice i pohranu u obliku polifosfata, što posljedično dovodi do narušavanja učinkovitosti uklanjanja P iz otpadne vode (Bunce i sur., 2018; de Sousa Rollemberg i sur., 2018; He i sur., 2018; Xia i sur., 2018; Sarma i Tay, 2018).

Obrada otpadne vode aerobnim granulama pri omjerima C/N 4, 8 i 12 nije rezultirala zadovoljavajućim vrijednostima PO₄-P (slika 10) za ispust u površinske vode, ali je postignuta kvaliteta obrađene vode obzirom na koncentraciju PO₄-P zadovoljavajuće kvalitete za ispust u sustav javne odvodnje (10 mg P/L) (Pravilnik, 2020).

Učinak povećanja omjera C/N na MLSS tijekom 150 dana pokusa je prikazan na slici 11. Pri omjeru C/N 4 koncentracija MLSS je bila u uskom rasponu vrijednosti, i nakon 50 dana vođenja procesa nije zabilježena promjena koncentracije. Pri omjeru C/N 8 tijekom narednih 50 dana vođenja procesa koncentracija MLSS je narasla za 0,7 g/L, a tijekom vođenja procesa pri omjeru C/N 12 za još 0,5 g/L. Sveukupno povećanje koncentracije MLSS tijekom 150 dana vođenja procesa je iznosilo 1,2 g/L i na kraju procesa je iznosila 4,2 g/L (slika 11). Sličan trend povećanja koncentracije biomase u reaktoru s povećanjem omjera KPK/N su zabilježili i Kim i Ahn (2019), Yuan i sur. (2019) i Kocaturk i Erguder

(2016). Kocaturk i Erguder (2016) tumače porast koncentracije MLSS s porastom omjera C/N povećanjem udjela heterotrofnih bakterija u granulama.

Niske vrijednosti omjera KPK/N, kao što su omjeri KPK/N 1-5 se povezuju s raspadanjem granula zbog nedovoljne količine organskih spojeva, te onda dolazi do ispiranja mikrobnog biomase iz sustava i koncentracija MLSS opada (Kim i sur., 2021; Kim i Ahn, 2019; Kocaturk i Erguder, 2016; Luo i sur., 2014). Odabrani izvor organskih sastojaka i omjer KPK/N imaju izravan učinak na koncentraciju MLSS u bioreaktoru (Kim i sur., 2021; Kim i Ahn, 2019; Yuan i sur., 2019; Kocaturk i Erguder, 2016).

Na slici 12 su prikazane ostvarene učinkovitosti uklanjanja KPK, NH₄-N, TN i PO₄-P pri istraživanim omjerima C/N 4, 8 i 12. Povećanje omjera C/N je povoljno djelovalo na učinkovitost uklanjanja svih istraživanih sastojaka. Tako je s porastom omjera C/N 4, 8 i 12 ostvarena učinkovitost uklanjanja KPK 89 %, 93 % i 96 % (slika 12).

Slično rezultatima postignutim u ovom radu, Kocaturk i Erguder (2016) su pri omjerima KPK/N 7,5 i manjim ostvarili učinkovitost uklanjanja KPK 63-79 %, omjer KPK/N 10 je rezultirao 76-90 % učinkovitosti uklanjanja, a omjer KPK/N 20 je bio dovoljan za učinkovitost uklanjanja KPK 94 %. Također, slične rezultate su postigli i Kim i Ahn (2019), koji su zabilježili učinkovitost uklanjanja KPK 93,7 %, 90,8 %, 82,4 % i 70,7 % pri omjerima KPK/N 10, 7,5, 5 i 2,5.

Autori Kocaturk i Erguder (2016) objašnjavaju povećanje učinkovitosti uklanjanja organskih spojeva s porastom omjera KPK/N dominacijom heterotrofnih bakterija. Ipak, pri omjeru KPK/N 30 Kocaturk i Erguder (2016) su zabilježili smanjenje učinkovitosti uklanjanja KPK sa 95 % na 87 %, a razlog je proliferacija filamentoznih bakterija i narušavanje strukture granule.

Ostvarena učinkovitost uklanjanja NH₄-N je iznosila 88 %, 95 % i 98 % pri omjerima C/N 4, 8 i 12. Porast omjera C/N 4, 8 i 12 je rezultirao učinkovitosti uklanjanja ukupnog dušika 55 %, 59 % i 66 %, a PO₄-P 31%, 54 % i 71 % (slika 12). Kim i sur. (2021) su postigli slične rezultate, te su zabilježili uklanjanje N 57,5 %, 61,6 %, 69,6 % i 79,1 % pri omjerima KPK/N 5, 10, 15 i 20. Rezultati postignuti u ovom radu (slika 12) su u suglasju i s Kim i Ahn (2019), koji su ostvarili N uklanjanje 72,3 %, 65,3 %, 61,7 % i 52,3 % pri omjerima KPK/N 10, 7,5, 5 i 2,5. Kocaturk i Erguder (2016) su pri omjeru KPK/N 1 zabilježili 75 % uklanjanje amonijaka i 26 % uklanjanje N, pri omjerima KPK/N 2-7,5 postigli su više od 90 % uklanjanje amonijaka, a uklanjanje N 35-54 %, a pri KPK/N omjerima 7,5-30 učinkovitost uklanjanja amonijaka se smanjivala i na kraju je iznosila 37 %, a uklanjanje N 17-18 %. Ovi

su autori pokuse vodili u anoksično-aerobnom režimu pri omjerima KPK/N 7,5-30, a zabilježeni pad učinkovitosti uklanjanja amonijaka objašnjavaju porastom vrijednosti pH preko 8,6, pri čemu su vrijednosti NH₃ bile u toksičnim vrijednostima za obje skupine nitrifikanata, i AOB, i NOB (Kocaturk i Erguder, 2016).

U ovim pokusima sa zrelim aerobnim granulama je postignuto istovremeno uklanjanje organskih sastojaka, amonijaka, ukupnog dušika i ortofosfata iz sintetske otpadne vode (slike 7-12) zbog strukture granula koja se sastoji od slojeva – aerobni, anoksični i anaerobni – zahvaljujući otporu difuzije otopljenog kisika, a u slojevima su prisutne različite skupine mikroorganizama – amonijak i nitrit oksidirajuće bakterije, denitrificirajuće bakterije i fosfor akumulirajući organizmi (Chen i sur., 2007; Gonzalez-Gil i Holliger, 2014; Desireddy i Sabumon, 2021; He i sur., 2019; He i sur., 2018; Sarma i Tay, 2018; Xia i sur., 2018).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih iz provedenog eksperimentalnog dijela izvode se sljedeći zaključci:

1. Pomoću zrelih aerobnih granula postignuto je istovremeno uklanjanje organskih sastojaka, amonijaka, ukupnog dušika i ortofosfata iz sintetske otpadne vode.
2. Povećanje omjera C/N od 4 do 12 povoljno je djelovalo na učinkovitost uklanjanja svih istraživanih sastojaka.
3. Kvaliteta obrađene vode obzirom na KPK vrijednosti i amonijakalni dušik pri svim ispitanim omjerima C/N 4, 8 i 12 bila je zadovoljavajuća za ispust u površinske vode i sustav javne odvodnje.
4. Obrada otpadne vode aerobnim granulama pri omjerima C/N 4, 8 i 12 nije rezultirala zadovoljavajućim vrijednostima ukupnog dušika i ortofosfata za ispust u površinske vode, ali je postignuta, obzirom na navedene nutrijente, zadovoljavajuća kvaliteta obrađene vode za ispust u sustav javne odvodnje.
5. Ukupno povećanje koncentracije MLSS tijekom 150 dana vođenja procesa je iznosilo 1,2 g/L što se može povezati s povećanjem udjela hetrotrofnih bakterija u granulama.

6. LITERATURA

- Adler A, Holliger C (2020) Multistability and reversibility of aerobic granular sludge microbial communities upon changes from simple to complex synthetic wastewater and Back. *Front Microbiol* **11**, 574361. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574361>
- Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TB, Srinath EG (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* **48**, 835-852.
- Aqeel H, Basuvaraj M, Hall M, Neufeld JD, Liss SN (2016) Microbial dynamics and properties of aerobic granules developed in a laboratory-scale sequencing batch reactor with an intermediate filamentous bulking stage. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 447-460. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6981-7>
- Barr JJ, Cook AE, Bond PL (2010) Granule formation mechanisms within an aerobic wastewater system for phosphorus removal. *Appl Environ Microb* **76**, 7588-7597. <https://doi.org/10.1128/AEM.00864-10>
- Beun JJ, Hendriks A, van Loosdrecht MCM, Morgenroth E, Wilderer PA, Heijnen JJ (1999) Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res* **33**, 2283-2290. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00463-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00463-1)
- Bunce JT, Ndam E, Ofiteru ID, Moore A, Graham DW (2018) A review of phosphorus removal technologies and their applicability to small-scale domestic wastewater treatment systems. *Front Environ Sci* **6**, 8. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00008>
- Chen H, Zhou S, Li T (2010) Impact of extracellular polymeric substances on the settlement ability of aerobic granular sludge. *Environ Technol* **31**, 1601-1612. <https://doi.org/10.1080/09593330.2010.482146>
- Chen Y, Jiang W, Liang DT, Tay JH (2007) Structure and stability of aerobic granules cultivated under different shear force in sequencing batch reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**, 1199-1208. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1085-7>
- de Kreuk MK, Pronk M, van Loosdrecht MCM (2005) Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. *Water Res* **39**, 4476-4484. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.08.031>
- de Sousa Rollemberg SL, Barros ARM, Firmino PIM, Dos Santos AB (2018) Aerobic granular

- sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms. *Bioresour Technol*, **270**, 678-688. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.130>
- Desireddy S, Sabumon PC (2021) Development of aerobic granulation system for simultaneous removal of C, N, and P in sequencing batch airlift reactor. *J Environ Chem Eng* **9**, 106100. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106100>
- Devlin TR, di Biase A, Kowalski M, Oleszkiewicz JA (2017) Granulation of activated sludge under low hydrodynamic shear and different wastewater characteristics. *Bioresour Technol* **224**, 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.005>
- Figueroa M, Val del Rio A, Campos JL, Mendez R, Mosquera-Corral A (2015) Filamentous bacteria existence in aerobic granular reactors. *Bioprocess Biosyst Eng* **38**, 841-851. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1327-x>
- Franca RD, Pinheiro HM, van Loosdrecht MC, Lourenço ND (2018) Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. *Biotechnol Adv* **36**, 228-246. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.005>
- Gao DW, Liu L, Liang H (2013) Influence of aeration intensity on mature aerobic granules in sequencing batch reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 4213-4219. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4226-6>
- Gerardi MH (2002) Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Gerardi MH (2010) Troubleshooting the sequencing batch reactor, John Willey & Sons. Inc., Hoboken, New Jersey. str. 17-28.
- Gómez-Acata S, Vital-Jácome M, Pérez-Sandoval M V, Navarro-Noya Y E, Thalasso F, Luna-Guido, M., i sur. (2018) Microbial community structure in aerobic and fluffy granules formed in a sequencing batch reactor supplied with 4-chlorophenol at different settling times. *J Hazard Mater* **342**, 606-616. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.073>
- Gonzalez-Gil G, Holliger C (2014) Aerobic granules: microbial landscape and architecture, stages, and practical implications. *Appl Environ Microb* **80**, 3433-3441. <https://doi.org/10.1128/AEM.00250-14>
- Gutierrez-Wing MT, Malone RF, Rusch KA (2012) Evaluation of polyhydroxybutyrate as a carbon source for recirculating aquaculture water denitrification. *Aquac Eng* **51**, 36-43.

<https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.002>

Hamza R, Rabii A, Ezzahraoui FZ, Morgan G, Iorhemen OT (2021) A review of the state of development of aerobic granular sludge technology over the last 20 years: Full-scale applications and resource recovery. *Case Stud Chem Environ Eng* 100173.

<https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100173>

He Q, Chen L, Zhang S, Chen R, Wang H (2019) Hydrodynamic shear force shaped the microbial community and function in the aerobic granular sequencing batch reactors for low carbon to nitrogen (C/N) municipal wastewater treatment. *Bioresour Technol* **271**, 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.102>

He Q, Chen L, Zhang S, Wang L, Liang J, Xia W, i sur. (2018) Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in aerobic granular sequencing batch reactors with high aeration intensity: Impact of aeration time. *Bioresour Technol* **263**, 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.007>

He Q, Zhang W, Zhang S, Wang H (2017) Enhanced nitrogen removal in an aerobic granular sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, endogenous denitrification and phosphorus removal with low superficial gas velocity. *Chem Eng J* **326**, 1223-1231. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.071>

Ivanov V, Wang XH, Tay ST, Tay JH (2006) Bioaugmentation and enhanced formation of microbial granules used in aerobic wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**, 374-381. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0088-5>

Karahan O, Orhon D., Van Loosdrecht MCM (2008) Simultaneous storage and utilization of polyhydroxyalkanoates and glycogen under aerobic conditions. *Water Sci Technol* **58**, 945-951. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.403>

Kim HG, Ahn DH (2019) Effects on the stability of aerobic granular sludge (AGS) at different carbon/nitrogen ratio. *J Environ Sci Int* **28**, 719-727. <https://doi.org/10.5322/JESI.2019.28.9.719>

Kim HG, Kim JT, Ahn, DH (2021) Effects of carbon to nitrogen ratio on the performance and stability of aerobic granular sludge. *Environ Eng Res* **26**, 190284. <https://doi.org/10.4491/eer.2019.284>

Kocaturk I, Erguder TH (2016) Influent COD/TAN ratio affects the carbon and nitrogen removal efficiency and stability of aerobic granules. *Ecol Eng* **90**, 12-24.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.077>

- Liu YQ, Tay JH (2007) Characteristics and stability of aerobic granules cultivated with different starvation time. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 205-210. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0797-4>
- Long B, Xuan X, Yang C, Zhang L, Cheng Y, Wang J (2019) Stability of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor enhanced by granular particle size control. *Chemosphere* **225**, 460-469. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.048>
- Luo J, Hao T, Wei L, Mackey HR, Lin Z, Chen GH (2014) Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge. *Water Res* **62**, 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.05.037>
- Mao G, Hu H, Liu X, Crittenden J, Huang N (2021) A bibliometric analysis of industrial wastewater treatments from 1998 to 2019. *Environ Pollut* **275**, 115785. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115785>
- Metcalf & Eddy (2003) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4. izd., Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (ured.), McGraw-Hill Education, New York.
- Nancharaiah YV, Reddy GKK (2018) Aerobic granular sludge technology: mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresour Technol* **247**, 1128-1143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.131>
- Nancharaiah YV, Sarvajith M (2019) Aerobic granular sludge process: a fast growing biological treatment for sustainable wastewater treatment. *Curr Opin Environ Sci Health* **12**, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.09.011>
- Osaka T, Shirotani K, Yoshie S, Tsuneda S (2008) Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. *Water Res* **42**, 3709-3718. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.06.007>
- Peng Y, Ma Y, Wang S (2007) Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process. *J Environ Sci* **19**, 284-289. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60046-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60046-1)
- Pravilnik (2020) Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. Narodne Novine **26**, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_03_26_622.html

Pristupljeno 23. kolovoza 2022.

- Sarma SJ, Tay JH (2018) Carbon, nitrogen and phosphorus removal mechanisms of aerobic granules. *Crit Rev Biotechnol* **38**, 1077-1088. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1451481>
- Szabó E, Liébana R, Hermansson M, Modin O, Persson F, Wilén BM (2017) Microbial population dynamics and ecosystem functions of anoxic/aerobic granular sludge in sequencing batch reactors operated at different organic loading rates. *Front Microbiol* **8**, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00770>
- Tay JH, Liu QS, Liu Y (2001) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Lett Appl Microbiol* **33**, 222-226. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00986.x>
- Wagner J, Guimaraes LB, Akaboci TRV, Costa RHR (2015) Aerobic granular sludge technology and nitrogen removal for domestic wastewater treatment. *Water Sci Technol* **71**, 1040-1046. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.064>
- Wang J, Chu L (2016) Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnol Adv* **34**, 1103-1112. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.07.001>
- Weissbrodt DG, Neu TR, Kuhlicke U, Rappaz Y, Holliger C (2013) Assessment of bacterial and structural dynamics in aerobic granular biofilms. *Front Microbiol* **4**, 175. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00175>
- Wilén BM, Liéban R, Persson F, Modin O, Hermansson M (2018) The mechanisms of granulation of activated sludge in wastewater treatment, its optimization, and impact on effluent quality. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 5005-5020. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8990-9>
- Xia J, Ye L, Ren H, Zhang XX (2018) Microbial community structure and function in aerobic granular sludge. *Appl Microbiol Biotechnol* **102**, 3967-3979. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8905-9>
- Yang SF, Li XY, Yu HQ (2008) Formation and characterisation of fungal and bacterial granules under different feeding alkalinity and pH conditions. *Process Biochem* **43**, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.10.008>

- Yuan Q, Gong H, Xi H, Xu H, Jin Z, Ali N, Wang K (2019) Strategies to improve aerobic granular sludge stability and nitrogen removal based on feeding mode and substrate. *J Environ Sci* **84**, 144-154. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.04.006>
- Zhang L, Long B, Wu J, Cheng Y, Zhang B, Zeng Y, i sur. (2019) Evolution of microbial community during dry storage and recovery of aerobic granular sludge. *Heliyon* **5**, e03023. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03023>
- Zhao Y, Huang J, Zhao H, Yang H (2013) Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates. *Bioresour Technol* **143**, 439-446. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.020>
- Zhu L, Dai X, Xu X, Lv M, Cao D (2013) Microbial community analysis for aerobic granular sludge reactor treating high-level 4-chloroaniline wastewater. *Int J Environ Sci Te* **11**, 1845-1854. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0380-3>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MARIJA BIŠKUP izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Marija Biškup