

Utjecaj otopljenog kisika na autotrofnu nitrifikaciju

Pavković, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:981048>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij: Prehrambena tehnologija

Nikolina Pavković

6843/PT

UTJECAJ OTOPLJENOG KISIKA NA AUTOTROFNU NITRIFIKACIJU

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija u zaštiti okoliša

Mentor: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Utjecaj otopljenog kisika na autotrofnu nitrifikaciju

Nikolina Pavković, 0058204638

Sažetak: U ovom radu istražen je učinak koncentracije otopljenog kisika (DO) na brzinu autotrofne nitrifikacije u ovisnosti o pH, koncentraciji mikrobne biomase i opterećenja s $\text{NH}_4\text{-N}$. Provedeni su diskontinuirani pokusi, pri $\text{DO} > 2 \text{ mg/L}$, $\text{DO} < 1 \text{ mg/L}$ i $\text{DO} > 2 \text{ mg/L}$, pri $\text{pH} 7,3\text{-}7,4$ i $\text{pH} 7,9\text{-}8,0$, te uz 1 g MLSS/L , $2,8 \text{ g MLSS/L}$ i $3,8 \text{ g MLSS/L}$. Provedena je autotrofna nitrifikacija $30 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$, $50 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ i $80 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$. U nitrifikaciji $50 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ najveća brzina autotrofne nitrifikacije od $19 \text{ mg NH}_4\text{-N/Lh}$ je postignuta pri $\text{DO} > 2 \text{ mg/L}$ i pri $\text{pH} 7,9\text{-}8,0$ i s $2,8 \text{ g MLSS/L}$ i s $3,8 \text{ g MLSS/L}$. Brzina autotrofne nitrifikacije raste s porastom opterećenja s $\text{NH}_4\text{-N}$ i pri $\text{pH} 7,3\text{-}7,4$ i pri $\text{pH} 7,9\text{-}8,0$ za istraženih $30\text{-}80 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$. Veće brzine autotrofne nitrifikacije se postižu pri $\text{pH} 7,9\text{-}8,0$ u usporedbi s $\text{pH} 7,3\text{-}7,4$ neovisno o DO.

Ključne riječi: autotrofna nitrifikacija, DO, pH, MLSS

Rad sadrži: 30 stranica, 7 slika, 4 tablica, 39 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici

**Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva
23, 10 000 Zagreb**

Mentor: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Pomoć pri izradi: Tea Štefanac, mag.ing.biotechn.

Datum obrane: 19. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Food Technology

Laboratory for biological wastewater treatment

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

The effect of dissolved oxygen on autotrophic nitrification

Nikolina Pavković, 0058204638

Abstract: In this paper, the effect of dissolved oxygen concentration (DO) on the autotrophic nitrification velocity, depending on the pH, the concentration of microbial biomass (MLSS) and the load with $\text{NH}_4\text{-N}$, was studied. Discontinuous experiments were performed at DO 2 mg/L, $\text{DO} < 1$ mg/L and $\text{DO} > 2$ mg/L at pH 7.3-7.4 and pH 7.9-8.0 and with 1 g MLSS /L, 2.8 g MLSS/L and 3.8 g MLSS/L. Autotrophic nitrification of 30 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, 50 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ and 80 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ was performed. In the nitrification of 50 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, the maximum autotrophic nitrification rate of 19 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ was reached at DO 2 mg/L and at pH 7.9-8.0 and 2.8 g MLSS/L and with 3.8 g MLSS/L. The rate of autotrophic nitrification increases with the increase in loading with $\text{NH}_4\text{-N}$ and at pH 7.3-7.4 and at pH 7.9-8.0 for the investigated 30-80 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$. Greater autotrophic nitrification rates are achieved at pH 7.9-8.0 compared to the pH 7.3-7.4 irrespective of DO.

Keywords: autotrophic nitrification, DO, pH, MLSS

Thesis contains: 30 pages, 7 figures, 4 tables, 39 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD. Tibela Landeka Dragičević, Full Professor

Technical support and assistance: Tea Štefanac, MSc, Scientific Assistant

Defence date: 19th September 2018

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Kemija i biokemija nitrifikacije – stehiometrija nitrifikacije.....	2
2.2. Amonijak oksidirajuće bakterije	4
2.3. Nitrit oksidirajuće bakterije	5
2.4. Čimbenici procesa nitrifikacije	6
2.4.1. Koncentracija otopljenog kisika (DO).....	6
2.4.2. Temperatura.....	6
2.4.3. pH-vrijednost	7
2.4.4. Količina mikroorganizama	7
2.5. Inhibicija nitrifikacije	8
2.6. Zakonska regulativa o uklanjanju N u obradi otpadnih voda	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Reaktor i uvjeti rada.....	10
3.1.1. Sintetski medij – mineralna podloga za nitrifikaciju	10
3.1.2. Instrumenti i pribor	10
3.2. Analitičke metode	11
3.2.1. Određivanje amonijakalnog dušika	11
3.2.2. Određivanje koncentracije nitrita	12
3.2.3. Određivanje koncentracije nitrata.....	12
3.2.4. Određivanje pH vrijednosti.....	13
3.2.5. Određivanje koncentracije otopljenog kisika	13
3.2.6. Određivanje temperature.....	13
3.2.7. Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS) i ukupne organske suspendirane tvari (VSS)	13
3.3. Statistička obrada podataka	15
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
5. ZAKLJUČAK.....	25
6. LITERATURA	26

Zahvaljujem prof. dr. sc. Tibili Landeka Dragičević na stručnim komentarima u analiziranju rezultata, pomoći u provođenju pokusa kao i pri pisanju rada.

Zahvaljujem Tei Štefanac, mag. ing. biotechn. za pomoć pri provođenju eksperimentalnog dijela rada i pri pisanju rada.

1. UVOD

U obradi otpadnih voda zadatak inženjera je dizajniranje učinkovitih i ekonomski održivih procesa uklanjanja onečišćenja, što zahtijeva razumijevanje fizikalnih, kemijskih i biokemijskih mehanizama procesa.

Nužno je provoditi uklanjanje dušika iz otpadnih voda da bi se spriječio toksični učinak na vodene organizme, smanjenje koncentracije otopljenog kisika u vodenom mediju, eutrofikacija vodnih tijela, globalno zatopljenje i drugo (Ward i sur., 2011; Tchobanoglous i sur., 2004).

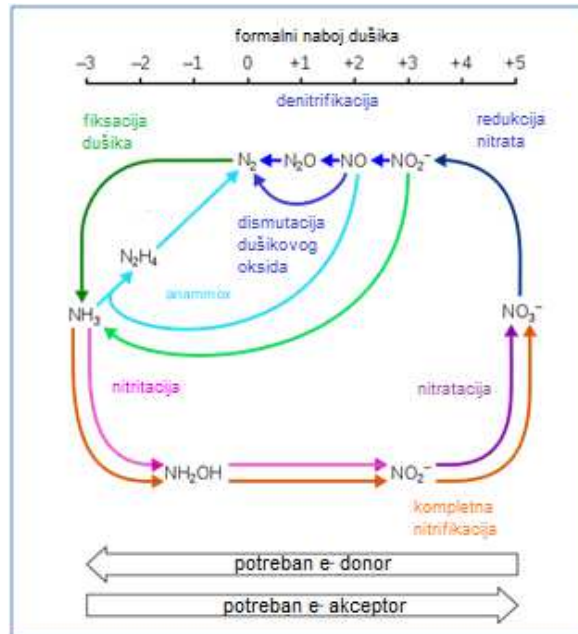
Kao najučinkovitiji ističe se biološki pristup uklanjanju dušikovitih spojeva iz otpadnih voda (Zhu i sur., 2008), a temelji se na mikrobnom ciklusu dušika i sposobnosti određenih rodova bakterija da metaboliziraju anorganske dušikove spojeve. Biološko uklanjanje dušika iz otpadne vode se postiže kombinacijom procesa nitrifikacije (aerobno prevođenje amonijakalnog dušika u nitratni dušik djelovanjem amonijak- i nitrit- oksidirajućih bakterija, AOB i NOB) i denitrifikacije (redukcije nitrata do plinovitog dušika) (Zhu i sur., 2008; Tchobanoglous i sur., 2004; Henze i sur. 2002). Nitrificirajuće bakterije su obligatne kemolitoautotrofne vrste, koje potrebu za ugljikom za biosintezu organskog ugljika (auto-) ostvaruju fiksacijom CO₂ putem Calvin-ovog ciklusa, a energiju potrebnu za rast dobivaju oksidacijom amonijaka ili nitrita kao jedinog izvora energije (kemolito-) (Tchobanoglous i sur., 2004; Rittmann i McCarty, 2001; Bock i sur., 1991). Najviše istraživane AOB su *Nitrosomonas* i *Nitrosospira*, a NOB *Nitrobacter* i *Nitrospira*. I jedne i druge su osjetljive na procesne uvjete, poput koncentracije otopljenog kisika, pH, temperature, alkaliteta i prisustva toksičnih sastojaka.

Cilj ovog rada je istražiti aktivnost nitrificirajuće mikrobne biomase u ovisnosti o pH (pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0), koncentraciji mikrobne biomase (1 g MLSS/L, 2,8 g MLSS/L i 3,8 g MLSS/L) i koncentraciji amonijakalnog dušika (30 mg NH₄-N/L, 50 mg NH₄-N/L i 80 mg NH₄-N/L), provođenjem autotrofne nitrifikacije pri DO 2 mg/L, DO<1 mg/L i DO>2 mg/L.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kemija i biokemija nitrifikacije – stehiometrija nitrifikacije

Nitrifikacija je u ciklusu kruženja dušika u okolišu (Slika 1) jedan od ključnih procesa.



Slika 1. Shematski prikaz mikrobnog ciklusa dušika

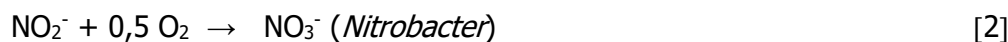
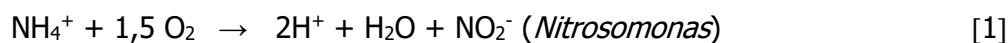
Proces nitrifikacije zbiva se u dva koraka:

- (i) oksidacija amonijaka ($\text{NH}_4\text{-N}$) do nitrita ($\text{NO}_2\text{-N}$) \rightarrow nitritacija
- (ii) oksidacija nitrita ($\text{NO}_2\text{-N}$) do nitrata ($\text{NO}_3\text{-N}$) \rightarrow nitratacija

Nitrifikaciju provode dvije fiziološki i evolucijski različite grupe kemolitoautotrofnih bakterija: amonijak oksidirajuće bakterije (AOB, engl. *Ammonium Oxidizing Bacteria*), koje provode nitritaciju, i nitrit oksidirajuće bakterije (NOB, engl. *Nitrite Oxidizing Bacteria*) koje provode nitrataciju.

Prvi korak nitrifikacije, nitritacija (oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$), provodi se pomoću AOB u dva koraka: oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$ u hidroksilamin (NH_2OH) katalizirana amonijak monooksigenazom (AMO, engl. *Ammonia Monooxygenase*), i oksidaciju NH_2OH u $\text{NO}_2\text{-N}$ koju katalizira hidroksilamin oksidoreduktaza (HAO, engl. *Hydroxylamine Oxidoreductase*). Pri tome dolazi do otpuštanja H^+ iona i snižavanja pH, jednačba [1].

Nitratacija, drugi korak nitrifikacije (oksidacija nitrita u nitrat) se provodi aktivnošću NOB, jednažba [2], (Wrage i sur., 2001; Hooper, 1989).



Ukupna reakcija nitrifikacije, jednažba [3]:



Za potpunu oksidaciju amonijaka, prema ukupnoj reakciji oksidacije (jedn. [3]), zahtjev za kisikom iznosi 4,57 g O₂/g N oksidiranog (3,43 g O₂/g proizvedenog NO₂-N i 1,14 g O₂/g NO₂-N oksidiranog). Manje je zahtjevana količina kisika od 4,57 g O₂/g N kada se uzme u obzir i sinteza. Za pretvorbu svakog grama NH₄-N potrebno je 4,25 g O₂, nastane 0,16 g novih stanica, 7,07 g alkaliteta kao CaCO₃ se ukloni i 0,08 g anorganskog ugljika se upotrebi za stvaranje novih stanica (Tchobanoglous i sur., 2004). Nitrificirajuće bakterije trebaju CO₂ i fosfor za stanični rast kao i elemente u tragovima. Uz malo stanično iskorištenje nitrificirajućih bakterija, CO₂ u zraku je zadovoljavajući, a fosfor je rijetko limitirajući faktor. Elementi u tragovima i njihove koncentracije za koje je istraženo da stimuliraju nitrifikaciju su: Ca = 0,50 mg/L; Cu = 0,01 mg/L; Mg = 0,03 mg/L; Mo = 0,001 mg/L; Ni = 0,10 mg/L i Zn = 1,0 mg/L.

Nitrifikacija se s obzirom na način dobivanja energije za rast nitrificirajućih vrsta dijeli na autotrofnu, heterotrofnu i miksotrofnu (Tchobanoglous i sur., 2004).

- Autotrofna nitrifikacija je proces u kojem autotrofne bakterije provode nitrifikaciju koristeći CO₂ (ugljičikov(IV) oksid) kao izvor ugljika, a anorganski dušik kao izvor energije. Vodeni okoliš u kojem se nalaze autotrofne nitrificirajuće bakterije mora osiguravati sljedeće čimbenike: pH-vrijednost 7,5-8,0, temperatura 25-30°C, prisutnost CO₂, koncentracija nitrita 28-420 mgNO₂-N/L.
- Heterotrofna nitrifikaciju provode heterotrofne nitrificirajuće bakterije koje organske sastojke koriste kao izvor ugljika i energije. Heterotrofnom nitrifikacijom se uklanja dušik organskog podrijetla, tj. dušik se prevodi u nitrit i nitrat. Heterotrofne nitrificirajuće bakterije se dijele na amonijak oksidirajuće bakterije koje amonijak oksidiraju u nitrit i potom nitrit u nitrat, te na bakterije koje otpuštajući dušik u obliku nitrita ili nitrata i oksidiraju amino i nitro grupe organskih i dušikovih spojeva.

- Miksotrofnu nitrifikaciju provode mikroorganizmi koji mogu metabolizirati organske spojeve, primjerice acetat i piruvat, tako što koriste anorganske izvore energije.

2.2 Amonijak oksidirajuće bakterije

Amonijak oksidirajuće bakterije pripadaju kemolitotrofnim mikroorganizmima, koriste amonijev ion kao izvor energije i elektrona i ugljikov-dioksid (CO₂) kao izvor ugljika u kemোসинтези (Bock i sur., 1986). Gram-negativni su obligatni aerobi, iako su Bodelier i sur. (1996) dokazali da neke vrste mogu tolerirati nisku koncentraciju otopljenog kisika ili čak anoksični okoliš. Prisutni su u tlu, svježoj i slanoj vodi kao i u uređajima za obradu otpadnih voda. AOB proizvode staklenički plin (Zart i sur., 2000), rastu sporo, imaju ograničen raspon prepoznatljivih fenotipskih svojstava (Chu i sur., 2007) i osjetljivi su na promjene temperature, pH, inhibitore i toksične sastojke (Kelly i sur., 2005; Luxmy i sur., 2000). Učinkovitost nitrifikacije izravno je povezana s bioraznilokošću nitrifikanata.

Do danas je izolirano 25 vrsta AOB. Pet je priznatih rodova amonijak oksidirajućih bakterija (Tablica 1), s nekoliko vrsta u svakome (Koops i Pommerening-Roser, 2001; Purkhold i sur., 2000). Najistraživanija i u zemlji najzastupljenija je *Nitrosomonas*, dok je u vodi najzastupljenija amonijak oksidirajuća vrsta *Nitrospira*. Svih do danas poznatih 25 mikrobnih vrsta AOB imaju različite zahtjeve za solima i različit supstratni afinitet za amonijak i/ili ureu.

Tablica 1. Karakteristike rodova amonijak oksidirajućih bakterija (Koops i Pommerening-Roser, 2001).

	Oblik stanica	Veličina stanica (µm)	Sustav pokretljivosti stanica	Raspored unutar citoplazmatskih membrana
<i>Nitrosococcus</i>	sferičan do elipsoidan	1,5-1,8x1,7-2,5	čuperak flagela	periferne ili središnje naslage vezikula
<i>Nitrosolobus</i>	pleomorfne	1,0-1,5x1,0-2,5	peritrihe	invaginacija
<i>Nitrosomonas</i>	ravni štapići	0,7-1,5x1,0-2,4	polarni do subpolarni	periferne spljoštene vezikule
<i>Nitrospira</i>	čvrsto smotane spirale	0,3-0,8x1,0-8,0	peritrihe	invaginacija
<i>Nitrosovibrio</i>	tanki zakrivljeni štapići	0,3-0,4x1,1-3,0	polarni do subpolarni	invaginacija

2.3. Nitrit oksidirajuće bakterije

Nitrit oksidirajuće bakterije provode drugi stupanj nitrifikacije, oksidaciju nitrita do nitrata, od kojih egzistira osam čistih kultra (Koops i Pommerening-Roser, 2001), različitih u ekofiziološkim zahtjevima.

Opisane su četiri filogenetički različite grupe NOB, Tablica 2 (Koops i Pommerening-Roser, 2001).

U sustavima obrade otpadne vode članovi *Nitrospira* su najzastupljeniji od nitrit oksidirajućih vrsta, obligatni su kemolitotrofi, preferiraju relativno malu koncentraciju nitrita (Ehrich i sur., 1995), a članovi *Nitrobacter* mogu nakupljati energiju i iz organskih sastojaka (Bock i sur., 1991).

Tablica 2. Karakteristike rodova nitrit oksidirajućih bakterija (Koops i Pommerening-Roser, 2001).

	Oblik stanica	Veličina stanica (µm)	Sustav pokretljivosti stanica	Raspored unutar citoplazmatskih membrana/sposobnost uporabe organskih sastojaka
<i>Nitrobacter</i>	oblika bisera-pleomirfni štapići	0,5-0,8x1,0-2,0	polarno do lateralne	polarne vezikule/heterotrofni rast
<i>Nitrococcus</i>	sferični	1,5	polarne	slučajno raspoređene tubule/nema
<i>Nitrospina</i>	tanki ravni štapići	0,3-0,4x1,7-6,6	nije zabilježeno	nema/nema
<i>Nitrospira</i>	lagano namotane spirale	0,3-0,4x0,8-1,0	nije zabilježeno	invaginacija/miksotrofni rast

Za održavanje velike populacije nitrificirajućih organizama od velike je važnosti pažljiva kontrola svih nutrijenata jer u potrebama za anorganskim hranjivom nitrificirajuće bakterije su vrlo zahtijevne i varijacije u koncentraciji bilo kojeg elementa mogu dovesti do poremećaja u radu organizama. Posebice se to odnosi na mikronutrijente: bakar (Cu), mangan, (Mn), molibden (Mo) i zink (Zn). Bakar je neophodan za aktivaciju enzima uključenih u prvi stupanj oksidacije amonijaka, dok molibden stimulira aktivnost *Nitrobacter*.

2.4. Čimbenici procesa nitrifikacije

Neki od glavnih čimbenika nitrifikacije su: koncentracija otopljenog kisika, temperatura vode, pH vrijednost, koncentracija supstrata i populacija bakterija koje provode nitrifikaciju (Le i sur., 2018; Tchobanoglous, 2004).

2.4.1. Koncentracija otopljenog kisika (DO)

Brzina nitrifikacije ovisi o koncentraciji otopljenog kisika (DO, engl. *Dissolved Oxygen*) jer nitrificirajuće bakterije imaju veliku potrebu za kisikom. Nitrifikacija se gotovo i ne odvija pri koncentraciji $DO < 0,5$ mg/L. Tako niska koncentracija DO više utječe na aktivnost NOB nego AOB, te dolazi do nepotpune nitrifikacije uz porast koncentracije nitrita. Pri koncentraciji DO u rasponu 0,5-1,9 mg/L nitrifikacija se ubrzava, u rasponu 2-2,9 mg/L dolazi do značajnog ubrzanja, a pri koncentraciji od 3 mg/L odvija se maksimalna nitrifikacija (Tchobanoglous, 2004).

2.4.2. Temperatura

Optimalni raspon temperature za proces nitrifikacije je od 28°C do 32°C. Nitrifikacija se pri 5°C ne događa, pri 10°C brzina nitrifikacije iznosi oko 20% od brzine nitrifikacije pri 30°C, dok pri 16°C brzina nitrifikacije iznosi oko 50% od maksimalne brzine (Tchobanoglous, 2004). Grunditz i Dalhammar (2001) su u svom istraživanju potvrdili da je optimalna temperatura za rast nitrificirajućih bakterija između 30°C i 40°C.

Jedan od bitnih faktora koji utječe na učinkovitost i stabilnost nitrifikacije je pad temperature za vrijeme hladnijih godišnjih doba (Hoang i sur., 2014; Ducey i sur., 2010). Niska temperatura najviše utječe na metabolizam mikroorganizama koji provode nitrifikaciju što znatno umanjuje učinak nitrifikacije (Hulsen i sur., 2016; Hoang i sur., 2014). Hoang i sur. (2014) su svojim istraživanjem dokazali pad učinkovitosti nitrifikacije sniženjem temperature vode s 20°C (6 mjeseci pri toj temperaturi) na 1°C (također 6 mjeseci pri toj temperaturi). Pad učinkovitosti je iznosio $18 \pm 5,1\%$. Niska temperatura tijekom nitrifikacije utječe na metaboličku i antioksidativnu aktivnost enzima te utječe na mikroorganizme koji sudjeluju u nitrifikaciji (Chen i sur., 2018). Također, Chen i sur. (2018) dokazali su da je za rast bakterija roda *Nitrosospira* pogodnije postupno snižavanje temperature, a bakterije roda *Nitrosomonas* su se više prilagodile srednjm temperaturama, oko 20°C. Na nagli pad temperature najviše su se prilagodile bakterije roda *Nitrospira*.

2.4.3. pH-vrijednost

Vrijednost pH kao bitan čimbenik procesa nitrifikacije, osim što utječe na rast bakterija koje provode nitrifikaciju, utječe i na kiselinsko-baznu ravnotežu $\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$ i $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ i time na dostupnost supstrata za AOB i NOB (Jiménez i sur., 2011). Prema Jiménez i sur. (2011) optimalan pH za AOB, kao i za NOB, iznosi 8,6. Grunditz i Dalhammar (2001) tvrde da je za AOB optimalan pH 8,1, a za NOB 7,9.

Pri niskim vrijednostima pH inhibira se enzimsko aktivnost nitrificirajućih bakterija. Do ubrzanja nitrifikacije dolazi kada pH poraste iznad 6,7. Optimalan pH za proces nitrifikacije je u rasponu pH 7,2 do pH 8,0 i u tom rasponu brzina nitrifikacije je konstantna (Tchobanoglous, 2004).

Vrijednost pH utječe na enzimsku aktivnost jer utječe na koncentraciju slobodnog amonijaka i nitritne kiseline, koji su snažni inhibitori bakterijske aktivnosti. Slobodni amonijak pri koncentraciji manjoj od 10 mg/L može inhibirati aktivnost *Nitrosomonas*, a pri koncentraciji manjoj od 0,1 mg/L i aktivnost *Nitrobacter*. *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* može inhibirati nitritna kiselina pri koncentraciji manjoj od 1 mg/L (Tchobanoglous, 2004).

2.4.4. Količina mikroorganizama

Koncentracija suspendiranih čestica u spremniku za pročišćavanje otpadne vode se izražava kao MLSS (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*). MLSS se uglavnom sastoji od mikroorganizama i suspendiranih čestica koje nisu biorazgradive. MLSS ima vrlo bitnu ulogu u pročišćavanju vode jer osigurava dovoljnu količinu aktivne biomase u svakom trenutku. Mjerenje koncentracije MLSS je vrlo bitno u područjima koja se bave zaštitom okoliša jer se fokusiraju na suspendirane čestice u vodi i time se pokušavaju primjenjivati prikladni uređaji za pročišćavanje.

Kako bi proces nitrifikacije bio proveden što učinkovitije bitna je koncentracija MLSS u vodi za pročišćavanje. Ako je koncentracija MLSS u vodi previsoka dolazi do nakupljanja krutih čestica, te može doći do preopterećenja sustava za obradu vode. U takvom slučaju zasićenost s DO opada i potrebno je povećati protok kisika što uzrokuje visoku potrošnju energije i stvaranje velike količine pjene na površini sustava. S druge strane, ako je koncentracija MLSS preniska to će onemogućiti uklanjanje organskog onečišćenja iz vode. Raspon MLSS koji se najčešće primjenjuje za konvencionalne sustave obrade otpadne vode je 2-4 g MLSS/L, a za membranske bioreaktore se koristi čak i do 15 g MLSS/L (Gray, 2004).

MLVSS (engl. *Mixed Liquor Volatile Suspended Solids*) je dio MLSS, ekvivalent je ukupnim mikroorganizmima u vodi i može se koristiti kao parametar koji određuje potrebnu količinu mikroorganizama za pročišćavanje vode (Gray, 2004).

2.5. Inhibicija nitrifikacije

Većina inhibitora inhibira reakciju oksidacije amonijaka, iako isti ti inhibitori u visokim koncentracijama inhibiraju i reakciju oksidacije nitrita. Najčešće korišten komercijalni inhibitor je nitrapirin. Koristi se u svrhu ekoloških istraživanja i specifičniji je za inhibiciju autotrofne nitrifikacije. Etritiazol i DCD (dicijandiamid) su također komercijalni inhibitori. Etritiazol ima fungicidna svojstva, a DCD služi kao dušično gnojivo s postupnim otpuštanjem.

Inhibitorom oksidacije nitrita se smatrao klorat, ali je dokazano da je inhibitor klorit (ClO). Klorat je inhibitor nitratne reduktaze, enzima u bakterijama vrste *Nitrobacter*, koji u odsutnosti kisika može biti terminalni akceptor elektrona pri oksidaciji nitrita. Prilikom te oksidacije klorat se reducira u klorit koji zatim inhibira oksidaciju nitrita (Prosser, 1990).

Samo klorat, cijanid, azid i hidrazin imaju veći inhibicijski učinak na oksidaciju nitrita u odnosu na inhibiciju slobodnim amonijakom (Phillips i sur., 2002). Prema Bertinu (2010) pojedini teški metali (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Pb^{2+} , Ni^{2+}) također mogu imati inhibitorno djelovanje na proces nitrifikacije počevši od koncentracije 1 mg/L.

2.6. Zakonska regulativa o uklanjanju N u obradi otpadnih voda

Pravilnikom o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 80/2013; NN 3/2016) definirane su granične vrijednosti pokazatelja onečišćenja iz skupine fizikalno-kemijskih, anorganskih, organskih i bioloških pokazatelja. U tablici 3 prikazane su granične vrijednosti nekih odabranih pokazatelja kakvoće motrenih u ovom radu, a definirane Pravilnikom (NN 80/2013).

Tablica 3. Granične vrijednosti nekih od pokazatelja kakvoće definiranih Pravilnikom (NN 80/2013), a motreni u ovom radu.

Pokazatelji i mjerne jedinice	Izraženi kao	Jedinica	Površinske vode	Sustav javne odvodnje
FIZIKALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI				
1. pH vrijednost		°C	6,5-9,0	6,5-9,5
2. Temperatura			30,0	40,0
4. Boja			bez	–
5. Miris			bez	–
ORGANSKI POKAZATELJI				
11. KPK _{Cr}	O ₂	mg/L	125,0	članak 5. ovoga Pravilnika
ANORGANSKI POKAZATELJI				
56. Ukupni fosfor	P	mg/L	2,0 (1,0 jezera)	sukladno članku 5. ovoga Pravilnika
59. Ortofosfati	P	mg/L	1,0 (0,5 jezera)	–
60. Ukupni dušik	N	mg/L	15,0	sukladno članku 5. ovoga Pravilnika
61. Amonij	N	mg/L	10,0	–
62. Nitriti	N	mg/L	1,0	10,0
63. Nitrati	N	mg/L	2,0	–

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Reaktor i uvjeti rada

Pokusi su provedeni kao diskontinuirani u laboratorijskom reaktoru radnog volumena 2 L s aktivnim muljem podrijetlom s uređaja za obradu otpadne vode grada Velika Gorica koji je uzgojen u SBR reaktoru.

Tijekom svih pokusa kontinuirano su motreni pH, DO i temperatura putem pH i DO elektroda postavljenih u reaktor.

Otopljeni kisik (DO, engl. *Dissolved Oxygen*) u procesu osiguran je upuhivanjem zraka iz kompresora preko filtera za zrak te je putem difuzora s donje strane reaktora unesen u sustav.

Svi eksperimenti su provedeni u 3 ponavljanja, a rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna devijacija.

U određenim vremenskim intervalima iz reaktora je tijekom pokusa uzimana određena količina ML (engl. *Mixed Liquor*), filtrirana kroz filter papir pora 0,45 μm kako bi se odijelila biomasa, te se analitički određivalo $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$. Stalno su motreni pH, DO i temperatura, a koncentracija biomase izražena kao MLSS (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*) određivana je povremeno.

Odabrani pH održavan je u odabranom rasponu s 2M NaOH.

3.1.1. Sintetski medij – mineralna podloga za nitrifikaciju

Mineralna podloga za nitrifikaciju je priređena kao vodena otopina soli, (mg/L): 2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 KH_2PO_4 , 0,4 FeSO_4 , 0,5 MgSO_4 , 0,4 NaCl, 1 MgCO_3 , 1 CaCO_3 . Nakon 24 sata pri sobnoj temperaturi otopina je filtrirana kroz grubi filter papir (0,45 μm), te tijekom pokusa čuvana na sobnoj temperaturi. Priređena mineralna podloga za nitrifikaciju dodavana je na početku procesa u odgovarajućoj količini za ciljanu odabranu početnu vrijednost 30 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, 50 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, odnosno 80 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$.

3.1.2. Instrumenti i pribor

Upokusima je korištena slijedeća aparatura:

Spektrofotometar – Spectroquant VEGA 400 Merck

Fotometar – Photometer SQ 200 Merck

Kvarcne kivete – Merck

Termo blok – Thermoreactor TR 300, Merck

Bioreaktor

Kisikova elektroda i mjeri aparat – DurOx, WTW Oxi3210

pH elektroda i mjerni aparat – SenTix41, WTW 330i

Kompresor – HIBLOW HP 40; Hagen Model40 A-10011

Mjerač protoka zraka

Vlagomjer – Kern MLS-D

Sustav za vakuum filtraciju – Sartorius

U pokusima su korištene kemikalije p.a. čistoće (Tablica 4):

Tablica 4. Kemikalije korištene u provođenju pokusa

Kemikalija	Proizvođač
H ₂ SO ₄	GRAM-MOL
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
FeSO ₄ ×7H ₂ O.....	Kemika
K ₂ HPO ₄	Kemika
MgSO ₄	Merck
NaCl.....	Merck
MgCO ₃	Kemika
CaCO ₃	Kemika
KH ₂ PO ₄	Merck
KCl.....	Alkaloid
Nesslerov reagens.....	Kemika
K-Na-C ₄ H ₄ O ₆ × 4H ₂ O.....	GRAM-MOL
HCl.....	Merck
NaOH.....	Kemika

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Određivanje amonijakalnog dušika

Metoda po Nessleru prema Standardnim metodama (APHA 4500-NH₃ C) je korištena za određivanje amonijakalnog dušika (NH₄-N). U prisustvu NH₄-N dodatkom Nesslerovog reagensa nastaje žuta do žuto smeđa boja, ovisno o količini prisutnog NH₄-N, čiji se intenzitet određuje mjerenjem absorbance pri valnoj duljini 425 nm, te iz baždarnog dijagrama očita vrijednost NH₄-N u mg/L. Baždarni dijagram načinjen je

određivanjem absorbancijskih vrijednosti poznatih koncentracija standardne otopine NH_4Cl pri 425 nm.

Postupak: U odmjernu tikvicu od 50 mL doda se 50 mL filtriranog uzorka (po potrebi razrijeđenog) i 2 kapi K-Na-tartarata te promiješa, i doda 1 mL Nesslerovog reagensa i promiješa. Nakon 10 min izmjeri se absorbanca pri 425 nm.

Pribor: odmjerne tikvice od 50 mL

varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

fotometar, SQ 200, Merck

3.2.2. Određivanje koncentracije nitrita

Metoda za određivanje nitrita pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14776, temelji se na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli, koja reagira s N-(1-naftil)etilendiamindihidroklorom i tvori crveno-ljubičastu azo boju. Fotometrijski se određuje intenzitet obojenja. Ova metoda analogna je EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500- $\text{NO}_2\text{-B}$, i EN 26 777.

Postupak: U staklenu kivetu doda se 5 mL uzorka (filtriran i po potrebi razrijeđen) i jedna žličica $\text{NO}_2\text{-1}$ reagensa, kiveta se zatvori i miješa dok se reagens ne otopi. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena izmjeri se koncentracija $\text{NO}_2\text{-N}$ u mg/L.

Pribor: Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776 (0,002-1 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$)

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

Kvarcne kivete, Merck

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

3.2.3. Određivanje koncentracije nitrata

Pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14773. provedeno je određivanje $\text{NO}_3\text{-N}$. Metoda se temelji na reakciji nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline uz nastanak nitro spoja koji je crvene boje i određuje se fotometrijski.

Postupak: U staklenu kivetu doda se 1,5 mL uzorka (filtriran i po potrebi razrijeđen) i žličica $\text{NO}_3\text{-1}$ reagensa. Kiveta se dobro zatvori i miješa dok se reagens ne otopi. Zatim se doda 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, kiveta se pažljivo zatvori i promiješa. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena izmjeri se vrijednost $\text{NO}_3\text{-N}$ u mg/L.

Pribor: Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14773 (0,2-20 mg NO₃-N/L)

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

Kvarcne kivete, Merck

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

Za motrenje i određivanje pH vrijednosti tijekom mikrobnih procesa uporabljen je pH-metar WTW 330i i pH elektroda SenTix41.

pH elektroda je tijekom pokusa bila uronjena u bioreaktor, te je očitavana vrijednost prikazana na zaslonu pH-metra. Svakodnevno, prije uporabe pH elektrode, provedeno je umjeravanje elektrode (kalibracija) uranjanjem pH elektrode u pufer otopinu s pH 4, pH 7 i pH 10 prema uputama proizvođača. Nakon završetka mjerenja elektroda je isprana destiliranom vodom te čuvana u otopini elektrolita, zasićenoj otopini kalijeva klorida.

Pribor: pH-metar WTW 330i i pH elektroda WTW SenTix41

Kemikalije: Puffer otopina, WTW, Buffersolution pH 4, pH 7 i pH 10

3.2.5. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Koncentracija otopljenog kisika određivana je pomoću kisikove elektrode DurOx i mjerača otopljenog kisika WTW Oxi3210. Instrument je prije upotrebe umjeren prema uputama proizvođača. Elektroda je tijekom trajanja mikrobnog procesa bila uronjena u bioreaktor te je vrijednost koncentracije otopljenog kisika prikazana na zaslonu uređaja, u mg/L ili % zasićenja.

Pribor: mjerač otopljenog kisika WTW Oxi3210 i kisikova-elektroda WTW DurOx

3.2.6. Određivanje temperature

Temperatura je tijekom procesa određivana pomoću temperaturnog senzora s kisikove elektrode (DurOx) i pH elektrode (WTWSenTix41) očitavanjem sa zaslona uređaja (WTW Oxi3210 ili WTW 330i).

3.2.7. Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS) i ukupne organske suspendirane tvari (VSS)

Ukupne suspendirane čestice (TSS, engl. *Total Suspended Solids*) predstavljaju dio ukupnih čestica (TS, engl. *Total Solids*) koji se zadržao na filter papiru specifične

veliĉine pora, i sušenog do konstantne mase pri 105 °C. Filter papir, najĉešće korišten za odreĉivanje TSS je Whatmanov filter od staklenih vlakana (engl. *Whatman glass fiber filter*) veliĉine pora oko 1,58 µm.

Hlapive suspendirane ĉestice odnosno ukupne organske suspendirane ĉestice (VSS, engl. *Volatile Suspended Solids* VSS) predstavljaju one ĉestice koje su hlapive i izgorene pri spaljivanju TSS (pri 500 ± 50 °C).

Postupak I – odreĉivanje TSS:

Kroz prethodno izvagani stakleni filter papir filtrira se odreĉeni poznati volumen uzorka, te suši pri 105 °C do konstantne mase, te opet vaŹe. Iz razlike mase filter papira s talogom i ĉistog filter papira izraĉuna se TSS vrijednost, prema jednadŹbi[4].

$$\text{TSS} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] = \frac{m_{\text{om}} - m_{\text{f}}}{\text{mL uzorka}} \times 1000 \quad [4]$$

gdje je:

m_{om} [g] = masa osušenog aktivnog mulja na filter papiru

m_{f} [g] = masa ĉistog filter papira

Postupak II – odreĉivanje TSS:

Pri korištenju vlagomjera u odreĉivanju TSS, poznati volumen uzorka se filtrira kroz prethodno izvagani stakleni filter papir primjenom vakuum sisaljke, filter papir s talogom se stavlja u aluminijsku posudicu za sušenje te nakon završenog procesa na displeju oĉita koliĉina suhe tvari u g/L.

Postupak odreĉivanja VSS

Ukupna organska suspendirana tvar (VSS) se odreĉuje spaljivanjem na plamenu filter papira s talogom nakon odreĉivanja TSS, te potom Źarenjem u mufolnoj peći na 500 °C cca 3h. Nakon Źarenja, ostatak (pepeo) se hladi u eksikatoru prije vaganja. Razlika mase filter papira nakon Źarenja i ĉistog filter papira predstavlja ukupnu anorgansku suspendiranu tvaru (ISS, engl. *Inorganic Suspended Solids*), prema jednadŹbi [5].

$$\text{ISS} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] = \frac{m_{\text{Źareni}} - m_{\text{ĉisti f}}}{V (\text{mL}) \text{ uzorka}} \times 1000 \quad [5]$$

VSS predstavlja razliku TSS i ISS, prema jednadŹbi [6]

$$\text{VSS} = \text{TSS} - \text{ISS} \quad [\text{g L}^{-1}] \quad [6]$$

Pribor: Filter papir (1,6 μm , GF/A, Whatman)

Porculanska zdjelica

Sustav za vakuum filtraciju, Sartorius

Alumijske posudice, KERN MLB-A01

Vlagomjer, Kern MLS-D

Analitička vaga

Sušionik

Eksikator

Mufolna peć

3.3. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini, jednadžba [7]:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [7]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$, jednadžba [8]:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [8]$$

N = ukupan broj mjerenja

x_i = pojedinačne vrijednosti mjerenja

Statistički značajnim smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,05$. Statistička analiza podataka je provedena koristeći Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjene Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulsa, Sjedinjene Američke Države). Dobiveni podatci su izraženi u obliku srednja vrijednost \pm standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba provedena je ANOVA analizom varijance s određenim intervalom pouzdanosti $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Brojni čimbenici poput koncentracije otopljenog kisika, pH vrijednosti, temperature, opterećenja s $\text{NH}_4\text{-N}$, koncentracije mikrobne biomase i drugo imaju utjecaj na učinkovitost uklanjanja dušika (Tchobanoglous, 2004).

U provođenju biološkog procesa uklanjanja dušika, i učinkovitost procesa i troškovi obrade ovise o odabranim procesnim čimbenicima, vođenju sustava kao i okolišnim čimbenicima (Jaramillo i sur., 2018).

Nitrificirajuće bakterije koriste kisik kao akceptor elektrona, te je otopljeni kisik vrlo važan čimbenik procesa i kontrolni parameter. Pri tome, niska koncentracija otopljenog kisika može inhibirati proces nitrifikacije, a visoka koncentracija otopljenog kisika znači veliku potrošnju energije.

Budući se za aeraciju troši energija (za osiguravanje otopljenog kisika za biološke procese) glavni cilj kontrole aeracije je minimizirati aeraciju (time i troškove rada sustava) uz postizanje zahtijevane izlazne kakvoće obrađene vode.

Ključno je optimizirati rad sustava za prozračivanje (aeraciju) kako bi se uz održavanje dinamike minimalnog DO postigla zahtijevana kakvoća izlaznog toka (obrađene vode – efluenta), a time sačuvala energija i troškovi rada sustava.

Potrebu na kisiku u biološkom procesu definira količina onečišćenja i proizvedene mikrobne biomase, a učinkovitost prijenosa kisika ovisi o svojstvima biomase, koncentraciji biomase, temperaturi, zahtijevanom DO i drugo (Metcalf & Eddy, 2003). Treba povećati učinkovitost prijenosa kisika a smanjiti potrebu na kisiku da bi se smanjila aeracija. Teoretski, u aeracijskom spremniku smanjenjem DO s 2 mg/L na 0,5 mg/L učinak prijenosa kisika bi se povećao 16% (Metcalf & Eddy, 2003).

Prema Downing i Scragg (1958) potrebno je osigurati DO od najmanje 0,3 mg/L da bi se zbivala nitrifikacija. Također, istaknuto je da na brzinu nitrifikacije nema učinka koncentracija $\text{DO} > 1$ mg/L (Wild i sur., 1971), dok Nagel i Haworth (1969) ističu da se brzina nitrifikacije udvostruči kada DO poraste od DO 1 mg/L na DO 3 mg/L.

U literaturi se navodi da je potrebno osigurati DO 2 mg/L za proces nitrifikacije (Metcalf & Eddy, 2003).

Da bi se istražio učinak DO na nitrifikaciju provedena su istraživanja pri:

- (i) DO 2 mg/L, uz različite koncentracije MLSS, odabrane raspone pH (pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0) pri početnih 50 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$

- (ii) $DO < 1$ mg/L (DO oko 0,5 mg/L) i $DO > 2$ mg/L uz različite odabrane raspone pH (pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0) i različita opterećenja s NH_4-N (30 mg NH_4-N/L , 50 mg NH_4-N/L i 80 mg NH_4-N/L).

Istraživanje je provedeno sa sintetskom otpadnom vodom – mineralnim medijem za nitrifikaciju, pri odabranim vrijednostima DO. Početne odabrane vrijednosti mg NH_4-N/L postignute su dodavanjem određene količine priređene mineralne podloge na početku svakog ciljanog pokusa. Provedeni su diskontinuirani pokusi u uvjetima ambijentalne temperature 23 ± 3 °C. Biomasa za sve procese je uzeta iz SBR reaktora na kraju aerobne faze procesa, te je u svim motrenim pokusima već na početku pokusa prisutna određena količina NO_3-N i NO_2-N (kao rezultat nitrifikacije).

Ovi pokusi, u kojima se istraživao učinak DO u ovisnosti o koncentraciji MLSS, pH i početnoj koncentraciji NH_4-N na proces autotrofne nitrifikacije, razmatrani su s ciljem:

- *određivanja učinka koncentracije MLSS na brzinu nitrifikacije pri DO 2 mg/L*

U ovim pokusima odabrana je koncentracija DO 2 mg/L za koju je dokazano da je optimalna za provođenje nitrifikacije, kako se ne bi favorizirao proces nitritacije ili nitratacije u sprezi odabranog DO i pH.

Istraživanja su pokazala da povećanje koncentracije mikrobne biomase s 2 g/L na 3 g/L ubrzava uklanjanje NH_4-N , dok daljnje povećanje na 4 g/L ne pridonosi značajno brzini procesa. U pokusima s koncentracijom mikrobne biomase od 6 g/L rezultati su lošiji od prethodnih (Alattabi i sur., 2017). Alattabi i suradnici (2017) su zaključili da je optimalna koncentracija MLSS 3-4 g/L.

Istraživanje učinka koncentracije MLVSS, pH i temperature na brzinu nitrifikacije u SBR sustavu provedeno je u 45 pokusa u tri serije različitih koncentracija MLVSS i pH vrijednosti, a te tri serije su podjeljene u skupine po 5 pokusa pri 4°, 10°, 17°, 25°, i 33 °C. Najbolja izvedba nitrifikacije je pri pH 8,3 i temperaturi između 25° i 33 °C. Nije bilo interakcije između učinka pH i temperature. Međutim, promjene u koncentraciji biomase u procesu nitrifikacije pokazale su ovisnost i o pH i o temperaturi (Shammas, 1986).

- *određivanja učinka odabranog pH na proces nitrifikacije i u sprezi s odabranim DO ($DO < 1$ mg/L i $DO > 2$ mg/L) za usmjeravanje procesa nitrifikacije u nakupljanje NO_2-N odnosno NO_3-N*

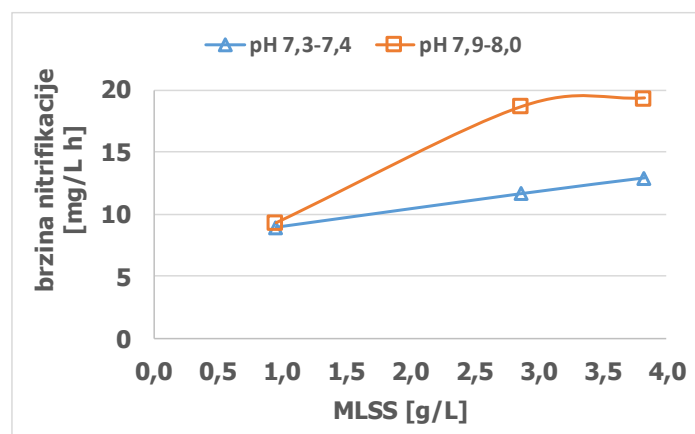
U literaturi je istaknuta vrijednost pH u rasponu 7,2 - 8,5 kao optimalna pH vrijednost za provođenje procesa nitrifikacije (Metcalf&Eddy, 2003). Pri nižem pH (pH 5,8-6,0) brzina nitrifikacije je na 10-20% od maksimalne brzine. Isto tako, visoki pH (pH>9) ne pogoduje nitrifikaciji.

O odabranoj pH vrijednosti ovisi i aktivnost prisutnih mikrobnih vrsta u aktivnom mulju. Pri pH 7,8 - 8,0 povećana je aktivnost *Nitrosomonas* vrsta, dok pH 7,3 - 7,5 pogoduje *Nitrobacter* vrstama (Le i sur., 2018). Također, zbog povećane aktivnosti spomenutih vrsta pri odabranim rasponima pH očekuje se nakupljanje međuprodukata nitrifikacije. pH 7,3 - 7,5 omogućava nakupljanje NO₃-N odnosno nitrataciju, dok pH 7,8 - 8,0 pogoduje nakupljanju NO₂-N, odnosno nitritaciji.

- određivanja učinka opterećenja s NH₄-N na aktivnost nitrifikanata pri DO<1 mg/L i DO>2 mg/L

U pokusima u kojima je cilj bio odrediti brzinu nitrifikacije u ovisnosti o koncentraciji MLSS i pH provedena je nitrifikacija pri DO 2 mg/L koji se navodi kao optimalan DO za nitrifikaciju (Metcalf & Eddy, 2003).

Rezultati pokusa autotrofne nitrifikacije pri 1 g MLSS/L, 2,8 g MLSS/L i 3,8 g MLSS/L pri pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0 i pri početnoj koncentraciji 50±5 mg NH₄-N/L, te pri DO 2 mg/L prikazani su slikom 2.



Slika 2. Brzina autotrofne nitrifikacije 50±5 mg NH₄-N/L u ovisnosti o pH (pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0) i koncentraciji mikrobne biomase nitrifikanata (1 g MLSS/L, 2,8 g MLSS/L i 3,8 g MLSS/L) pri DO 2 mg/L

Rezultati brzine autotrofne nitrifikacije u ovisnosti o pH i koncentraciji mikrobne biomase (Slika 2) pokazuju trend povećanja brzine nitrifikacije s povećanjem količine mikrobne biomase, puno značajnije izraženo pri većem odabranom pH (pH 7,9-8,0) u usporedbi s pH 7,3-7,4. Linearan je porast brzine nitrifikacije pri pH 7,3-7,4, dok je pri pH 7,9-8,0 značajan porast brzine nitrifikacije pri povećanju MLSS od 1 g MLSS/L na 2,8 g MLSS/L, a daljnje povećanje količine mikrobne biomase do 3,8 g MLSS/L nema znatnog učinka na brzinu procesa nitrifikacije.

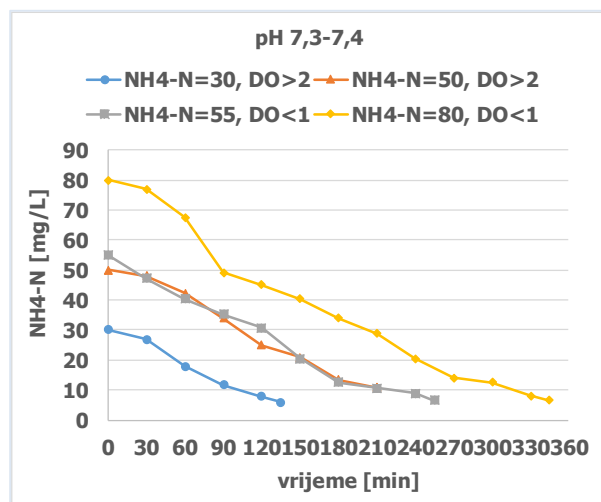
U svim pokusima nitrifikacija početnih 50 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri DO 2 mg/L (Slika 2) rezultirala je potpunim prevođenjem $\text{NH}_4\text{-N}$ u $\text{NO}_3\text{-N} + \text{NO}_2\text{-N}$ u gotovo ekvivalentnoj količini. Brzina nitrifikacije 50 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri pH 7,3-7,4 i pri DO 2 mg/L najveća je uz 3,8 g MLSS/L i iznosi 13 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$, dok pri pH 7,9-8,0 i uz 2,8 g MLSS/L i 3,8 g MLSS/L iznosi 19 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ (Slika 2).

Rezultati ovih istraživanja (Slika 2) su u suglasju s literaturom (Alattabi i sur., 2017) u kojoj je istaknuto da je optimalna koncentracija MLSS 3 do 4 g/L i da se pri toj koncentraciji uklanja i do 95% amonijaka. Također, u literaturi (Peng i Zhu, 2006) je istaknuto da je pogodna koncentracija otopljenog kisika za uspješnu nitrifikaciju iznad 1,7 mg/L.

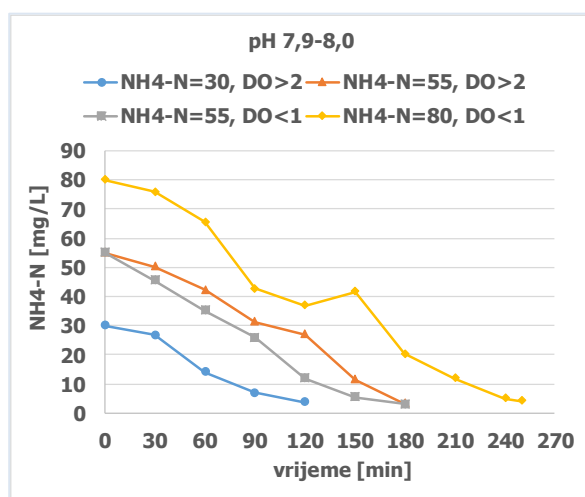
Pokusi u kojima je istražen učinak odabranog $\text{DO} < 1$ mg/L i $\text{DO} > 2$ mg/L su provedeni s ciljem da se odredi aktivnost mikrobne biomase u uvjetima niske koncentracije DO čime se ostvaruje manji utrošak energije (redukcija aeracije) i u uvjetima veće koncentracije DO koja znači veće troškove vođenja procesa i koja bi mogla imati učinka na aktivnost mikrobne biomase.

Rezultati vremenskog tijeka mikrobnih procesa nitrifikacije

- ovisnosti odabranog početnog pH 7,3-7,4 i odabrane početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ pri $\text{DO} > 2$ mg/L i $\text{DO} < 1$ mg/L, prikazani su kao usporedne vrijednosti promjena istraženih koncentracija $\text{NH}_4\text{-N}$ slikom 3;
- ovisnosti odabranog početnog pH 7,9-8,0 i odabrane početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ pri $\text{DO} > 2$ mg/L i $\text{DO} < 1$ mg/L, prikazani su kao usporedne vrijednosti promjena istraženih koncentracija $\text{NH}_4\text{-N}$ slikom 4;
- odabranog ciljanog pokusa nitrifikacije 80 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri $\text{DO} < 1$ mg/L, i pH 7,3-7,4 prikazan je slikom 5
- odabranog ciljanog pokusa nitrifikacije 50 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri $\text{DO} > 2$ mg/L i pH 7,9-8,0 prikazan je slikom 6



Slika 3. Usporedne vrijednosti promjena koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ u autotrofnoj nitrifikaciji 30 – 80 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri $\text{DO}<1$ mg/L i $\text{DO}>2$ mg/L i pri pH 7,3-7,4



Slika 4. Usporedne vrijednosti promjena koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ u autotrofnoj nitrifikaciji 30 – 80 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri $\text{DO}<1$ mg/L i $\text{DO}>2$ mg/L i pri pH 7,9-8,0

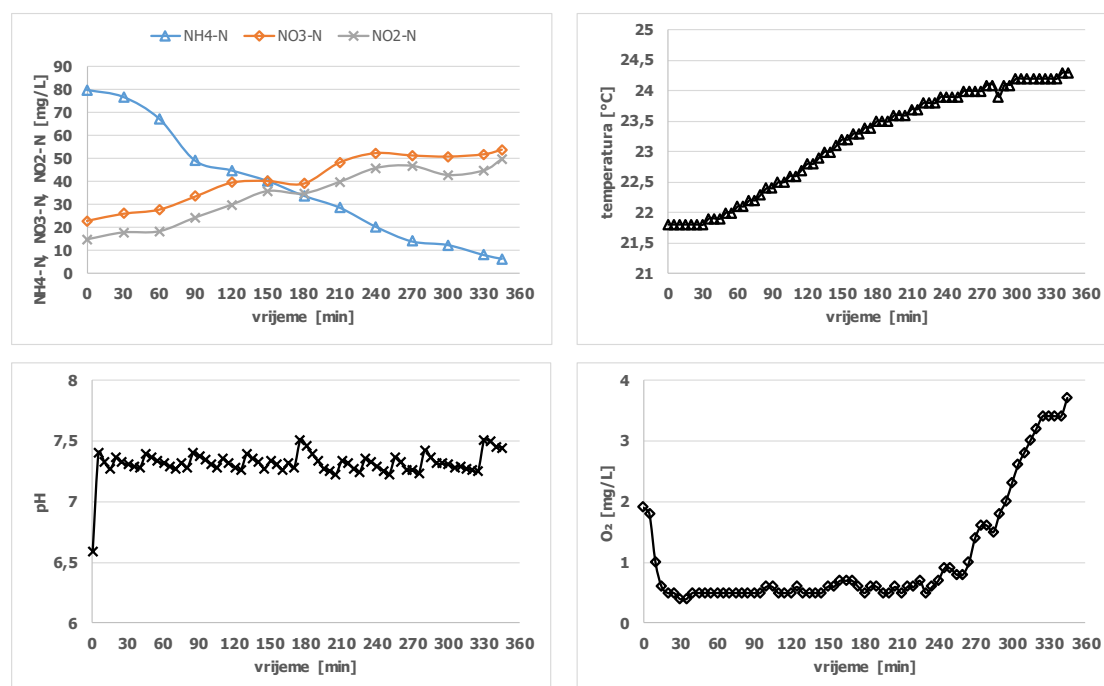
U pokusima nitrifikacije 30 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, 50 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 80 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i pri pH 7,3-7,4 (Slika 3) i pH 7,9-8,0 (Slika 4) rezultati pokazuju duže trajanje procesa s povećanjem opterećenja s $\text{NH}_4\text{-N}$, ali veće brzine procesa se postižu pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s rezultatima pri pH 7,3-7,4 (pokusi pri pH 7,9-8,0 traju kraće vrijeme u usporedbi s pokusima pri pH 7,3-7,4).

Međutim, DO ($\text{DO}<1$ mg/L i $\text{DO}>2$ mg/L) za istražene početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ nema učinka na brzinu nitrifikacije iste početne količine $\text{NH}_4\text{-N}$ pri odabranim

rasponima pH (i pri pH 7,3-7,4 i pri pH 7,9-8,0) (Slike 3 i 4), nitrifikacija 50 mgNH₄-N/L, odnosno 55 mg NH₄-N/L, možda pri pH 7,9-8,0 neznatno brži proces pri DO<1 mg/L (Slika 4).

Dakle, manje početno opterećenje s NH₄-N rezultira kraćim vremenom trajanja procesa i ne ovisi o pH, ali veće su brzine nitrifikacije pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s pH 7,3-7,4 (Slike 3 i 4).

Kako bi se istaknuli učinci odabranih procesnih čimbenika na proces nitrifikacije i vidjele promjene motrenih pokazatelja kakvoće, a nastale kao rezultat mikrobnih reakcija slikama 5 i 6 dane su promjene NH₄-N, NO₃-N, NO₂-N, pH, temperature i DO za odabrane pokuse nitrifikacije, i to nitrifikacije 80 mg NH₄-N/L, pri DO<1 mg/L, i pH 7,3-7,4 (Slika 5) i 50 mg NH₄-N/L, pri DO>2 mg/L, i pH 7,9-8,0 (Slika 6).

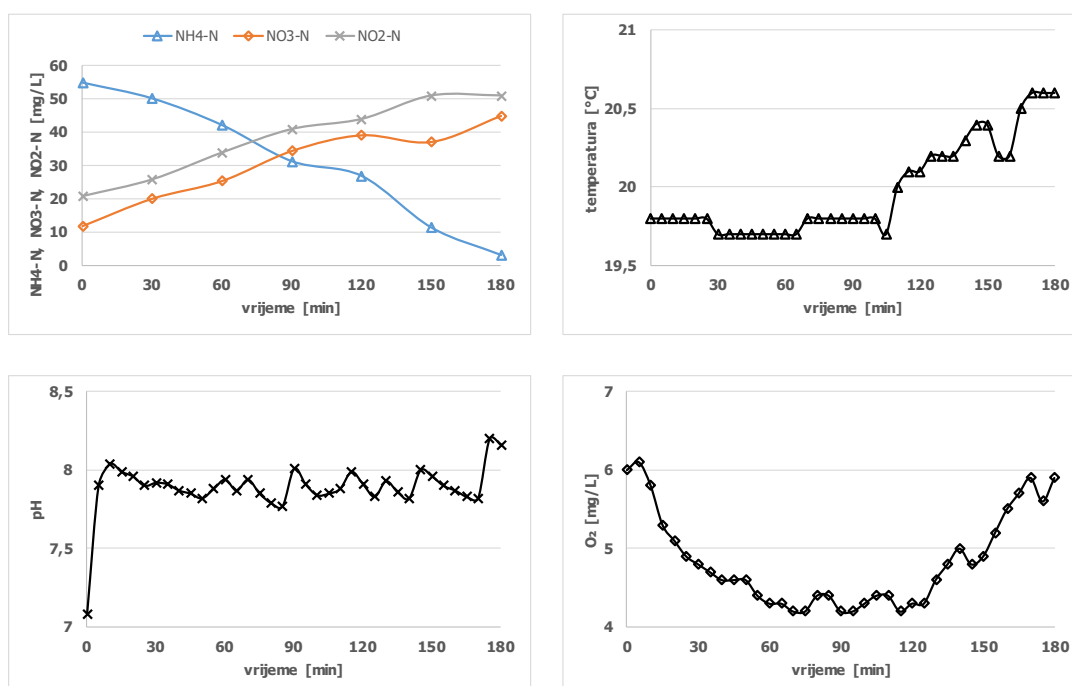


Slika 5. NH₄-N, NO₃-N i NO₂-N, pH, DO i temperatura u procesu autotrofne nitrifikacije 80 mg NH₄-N/L, pri DO<1 mg/L i pH 7,3-7,4

Autotrofna nitrifikacija 80 mg NH₄-N/L pri DO<1 mg/L i pH 7,3-7,4 (Slika 5) je provedena tijekom 5,5 sati. Tijekom cijelog procesa provođena je korekcija pH i održavan je pH u rasponu pH 7,3-7,4. Niska koncentracija otopljenog kisika (D<1 mg/L) se reflektira na proces u ustaljenoj brzini uklanjanja NH₄-N, koji se tijekom 5,5 sati prevodi u NO₃-N i NO₂-N. Nakupljeno je cca 30 mg NO₃-N/L i cca 25 mg NO₂-N/L

(Slika 5). Odabrani raspon pH 7,3-7,4 u kombinaciji s $DO < 1$ mg/L u provođenju ovog pokusa se reflektira u većem prevođenju NH_4-N u NO_3-N nego u NO_2-N .

U literaturi je istaknuto da je potrebno osigurati najmanje $DO > 0,3$ mg/L da bi se zbivala nitrifikacija (Downing i Scragg, 1958), kao i da koncentracija $DO > 1$ mg/L nema učinka na brzinu nitrifikacije (Wild i sur., 1971), dok se prema Nagel i Haworth (1969) brzina nitrifikacije udvostruči kada DO poraste od $DO > 1$ mg/L na $DO > 3$ mg/L. U literaturi je istaknuto da je potrebno osigurati $DO > 2$ mg/L za proces nitrifikacije (Metcalf & Eddy, 2003).

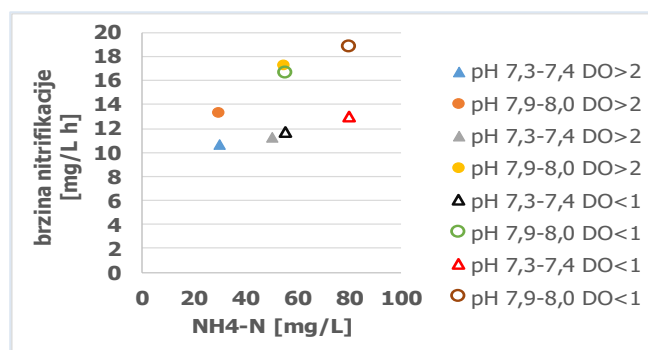


Slika 6. NH_4-N , NO_3-N i NO_2-N , pH, DO i temperatura u procesu autotrofne nitrifikacije 55 mg NH_4-N/L , pri $DO > 2$ mg/L i pH 7,9-8,0

Pokus autotrofne nitrifikacije 55 mg NH_4-N/L , pri $DO > 2$ mg/L i pH 7,9-8,0 je tijekom 180 minuta rezultirao potpunim prevođenjem NH_4-N u NO_3-N i NO_2-N (Slika 6). Nešto je više nakupljenog NO_2-N (nakupljeno je 30 mg NO_3-N/L i 36 mg NO_2-N/L) što se može pripisati odabranom pH 7,9-8,0. Tijekom cijelog procesa održavan je odabrani raspon pH.

Visoke vrijednosti DO usporavaju proces nitrifikacije kao što je rečeno u literaturi (EPA, 2003) jer odstupaju od optimalnih vrijednosti od $DO > 2-3$ mg/L.

Izračunate su brzine autotrofne nitrifikacije u ovisnosti o pH, DO i koncentraciji NH₄-N (slika 7).



Slika 7. Brzine autotrofne nitrifikacije u ovisnosti o pH (pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0), DO (DO<1 mg/L i DO>2 mg/L) i koncentraciji NH₄-N (30 mg NH₄-N/L, 50 mg NH₄-N/L i 80 mg NH₄-N/L)

Iz rezultata izračunatih brzina autotrofne nitrifikacije (Slika 7) može se opaziti trend povećanja brzine nitrifikacije s povećanjem opterećenja s NH₄-N za oba odabrana raspona DO i pH.

Veće brzine autotrofne nitrifikacije su postignute pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s brzinama autotrofne nitrifikacije pri pH 7,3-7,4, neovisno o DO.

Brzina autotrofne nitrifikacije 50 mg NH₄-N/L pri pH 7,3-7,4 je 11,3 mg NH₄-N/Lh pri DO>2 mg/L i 11,7 mg NH₄-N/Lh pri DO<1 mg/L. Također, brzina autotrofne nitrifikacije 50 mg NH₄-N/L pri pH 7,9-8,0 je 17,2 mg NH₄-N/Lh pri DO>2 mg/L i 16,7 mg NH₄-N/Lh pri DO<1 mg/L.

Najmanja brzina autotrofne nitrifikacije od 10,7 mg NH₄-N/Lh je postignuta u nitrifikaciji 30 mg NH₄-N/L pri DO>2 mg/L i pH 7,3-7,4, a najveća brzina nitrifikacije od 18,8 mg NH₄-N/Lh je postignuta u nitrifikaciji 80 mg NH₄-N/L pri DO<1 mg/L i pH 7,9-8,0 (Slika 7).

Kako bi se mogao tumačiti učinak DO na autotrofnu nitrifikaciju, uspoređeni su rezultati brzina autotrofne nitrifikacije 50±5 mg NH₄-N/L, i navedeni u nizu od najveće brzine autotrofne nitrifikacije prema najmanjoj, kako slijedi:

- o pri DO 2 mg/L i pri pH 7,9-8,0 i uz 2,8 g MLSS/L i 3,8 g MLSS/L brzina autotrofne nitrifikacije iznosi 19 mg NH₄-N/Lh (Slika 2).
- o pri DO>2 mg/L i pri pH 7,9-8,0 brzina autotrofne nitrifikacije iznosi 17,2 mg NH₄-N/Lh (Slika 7)

- pri DO < 1 mg/L i pri pH 7,9-8,0 brzina autotrofne nitrifikacije iznosi 16,7 mg NH₄-N/Lh (Slika 7)
- pri DO 2 mg/L i pri pH 7,3-7,4 uz 3,8 g MLSS/L brzina autotrofne nitrifikacije iznosi 13 mg NH₄-N/Lh (Slika 2)
- pri DO < 1 mg/L i pri pH 7,3-7,4 brzina autotrofne nitrifikacije iznosi 11,7 mg NH₄-N/Lh (Slika 7)
- pri DO > 2 mg/L i pri pH 7,3-7,4 brzina autotrofne nitrifikacije iznosi 11,3 mg NH₄-N/Lh (Slika 7)

Postignuti rezultati u suglasju su s citiranom literaturom (Jaramillo i sur., 2018; Jiménez i sur., 2011).

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata istraživanja proizlaze zaključci:

1. najveća brzina autotrofne nitrifikacije od 19 mg NH₄-N/Lh je postignuta pri DO 2 mg/L i pri pH 7,9-8,0 i s 2,8 g MLSS/L i s 3,8 g MLSS/L
2. brzina autotrofne nitrifikacije raste s porastom opterećenja s NH₄-N i pri pH 7,3-7,4 i pri pH 7,9-8,0 za istraženih 30 – 80 mg NH₄-N/L
3. veće brzine autotrofne nitrifikacije se postižu pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s pH 7,3-7,4 neovisno o DO

6. LITERATURA

Alattabi A. W., Harris C. B., Alkhaddar R. M., Ortoneda-Pedrola M., Alzeyadi A. T. (2017) An investigation into the effect of MLSS on the effluent quality and sludge settleability in an aerobic-anoxic sequencing batch reactor (AASBR). *Journal of Water Process Engineering*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.08.017>.

Bertino A. (2010) Study on one-stage partial Nitritation – Anammox process in moving bed biofilm reactors: a sustainable nitrogen removal - TRITA LWR Degree Project, Royal Institute of Technology, Stockholm.

Bock E., Koops H.P., Harms H, Ahlers B. (1991) The biochemistry of nitrifying organisms. U: Shivley, J.M. (izd.) Variations of autotrophic life. Academic Press, London, 171-200.

Bock E., Koops H.P., Harms H. (1986) Cell biology of nitrifying bacteria. U: Nitrification (Prosser, J.I., ured.) IRL Press, Oxford, str. 17-38.

Bodelier P.L.E., Libochant J.A., Blom C.W.P.M., Laanbroek H.J. (1996) Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammonia-oxidizing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 4100-4107.

Chen M., Chen Y., Dong S., Lan S., Zhou H., Tan Z., Li X. (2018) Mixed nitrifying bacteria culture under different temperature dropping strategies: Nitrification performance, activity, and community. *Chemosphere* **195**: 800-809.

Chu H., Fujii T., Morimoto S., Lin X., Yagi K., Hu J., Hang J. (2007) Community structure of ammonia-oxidising bacteria under long-term application of mineral fertilizer and organic manure in a sandy loam soil. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 485-491.

Downing A.L. i Scragg L.J. (1958) The effect of synthetic detergents on the rate of aeration in diffused air activated sludge plants. *Water Waste Treatment Journal* **7**:102.

Ducey T.F., Vanotti M.B., Shriner A.D., Szogi A.A., Ellison A.Q. (2010) Characterization of a microbial community capable of nitrification at cold temperature. *Bioresource Technology* **101**: 491-500.

Ehrich S., Behrens D., Lebedeva E., Ludwig W., Bock E. (1995) A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. Nov. And its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology* **164**: 16-23.

EPA (2003) Oxygencontrol. USEPA, Washington, DC.

Gray N. F. (2004) *Biology of Wastewater Treatment*. London: Imperial College.

Grunditz C. i Dalhammar G. (2001) Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of Nitrosomonas and Nitrobacter. *Water Research* **35**: 433–440.

Henze M., Harremoes P., Jansen J.C., Arvin E. (2002) *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*. Springer.

Hoang V., Delatolla R., Abujamel T., Mottawea W., Gadbois A., Laflamme E., Stintzi A. (2014) Nitrifying moving bed biofilm reactor (MBBR) biofilm and biomass response to long term exposure to 1°C. *Water Research* **49**: 215-224.

Hooper A.B. (1989) *Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria*. U: *Autotrophicbacteria* (Schlegel, H.G., Bowien, B., ured.), Springer, New York. str. 239-265.

Hulsen T., Barry E.M., Lu Y., Puyol D., Batstone D.J. (2016) Low temperature treatment of domestic wastewater by purple phototrophic bacteria: performance, activity, and community. *Water Research* **100**: 537-545.

Jaramillo F., Orchard M., Munoz C., Zamorano M., Antileo C. (2018) Advanced strategies to improve nitrification process in sequencing batch reactors – A review. *Journal of Environmental Management* **218**: 154-164.

Jiménez E., Giménez J.B., Ruano M.V., Ferrer J., Serralta J. (2011) Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate. *Bioresource Technology* **102**: 8741-8747.

Kelly J.J., Siripong S., McCormack J.S., Janus L.R., Urakawa H., Fantroussi S.E., Noble P.A., Sappelsa L., Rittmann B., Stahl D.A. (2005) DNA microarray detection of nitrifying bacterial 16S rRNA in wastewater treatment plant samples. *Water Research* **39**: 3229-3238.

Koops H.P., Pommerening-Roser A. (2001) Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species. *FEMS Microbiology ecology* **37**: 1-8.

Le T. T. H., Fettig J., Meon G. (2018) Kinetics and simulation of nitrification at various pH values of a polluted river in the tropics. *Ecohydrology & Hydrobiology* (in press).

Luxmy B.S., Nakajama F., Jamamoto K. (2000) Analysis of bacterial community in membrane-separation bioreactors by fluorescent in situ hybridization (FISH) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) techniques. *Water Science and Technology* **41**: 256-268.

Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4. izd., McGrawHill Inc., New York, NY.

Nagel C.A. i Haworth J.G. (1969) Operational factors affecting nitrification in the activated sludge process. *42nd Annual Conference WPCF*, Dallas, Texas.

Peng Y., Zhu G. (2006) Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**: 15-26.

Philips S., Hendrikus J. L., Verstraete W. (2002) Origin, causes and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **1**: 115-141.

Pravilnik graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013) *Narodne novine* **80** (NN 80/2016).

Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2016) *Narodne novine* **3** (NN 3/2016).

Prosser J.I. (1990) Autotrophic Nitrification in Bacteria, Department of Genetics and Microbiology, Marischal College. University of Aherdeen, Aherdeen AB9 IAS. U.K. str.125-129.

Purkhold U., Pommerening – Röser A., Juretschko S., Schmid M.C., Koops H.P., Wagner M. (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and AmoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5368-5382.

Rittmann B.E., McCarty P.L. (2001) Environmental biotechnology: principles and applications. Mc Graw Hill, New York.

Shammas N. (1986) Interactions of Temperature, pH, and Biomass on the Nitrification Process. *Water Pollution Control Federation* **58**: 52-59.

Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. (2004) Wastewater Engineering. Treatment and Reuse, Metcalf & Eddy, Inc., 4. Izd., Mc Graw Hill, New York.

Ward B.B., Arp D.J., Klotz M.G. (2011) Nitrification, American Society for Microbiology, Washington, DC.

Wild H.E., Sawyer C.N., McMahon T.C. (1971) Factors affecting nitrification kinetics. *Journal of Water Pollution Control Federation* **43**: 1845-1854.

Wrage N., Velthof G., van Beusichem M., Oenema O. (2001) Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 12-13.

Zart D., Schmidt I., Bock E. (2000) Significance of gaseous NO for ammonia oxidation by *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**: 49-55.

Zhu G., Peng Y., Li B., Guo J., Yang Q., Wang S. (2008) Biological removal of nitrogen from wastewater. *Reviews of environmental contamination and toxicology* **192**: 159-195.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Nikolina Pavković

ime i prezime studenta