

# Utjecaj natrijeva acetata na rast mikroorganizama koji akumuliraju fosfor iz otpadne vode

---

Filipović, Ana

Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:344562>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2018.

Ana Filipović

796/MB

**Utjecaj natrijeva acetata na rast  
mikroorganizama koji akumuliraju  
fosfor iz otpadne vode**

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju tehnologiju vode na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom i stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marina Matošića, te uz pomoć doc. dr. sc. Josipa Ćurka i Vlade Crneka, mag.ing.

## **ZAHVALA**

Veliko hvala mojem mentoru prof. dr. sc. Marinu Matošiću, na stručnim savjetima, strpljenju, potpori i ukazanom povjerenju čije znanje i iskustvo mi je pomoglo pri izradi ovog rada. Također se zahvaljujem asistentu Vladi Crneku, mag. ing. na pomoći i savjetima kod izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Uz to, htjela bih se zahvaliti svojoj obitelji na potpori i razumijevanju tijekom izrade diplomskog rada i tijekom studiranja te kolegama i prijateljima na nesebičnom razumijevanju i potpori. Osobito se želim zahvaliti svojoj najboljoj prijateljici i kolegici Liridone Fejzuli bez čije potpore, prijateljstva i humora ne bi toliko uživala u svojim studentskim danima kao što sam ovih 5 godina uživala. Uspjele smo Dona!

Posebno se želim zahvaliti svojoj majci Ljiljani, kojoj ovaj rad i posvećujem i bez čije podrške, ljubavi, savjeta i upornosti tijekom cijelog moga školovanja, ne bih uspjela savladati sve prepreke tijekom studiranja. Hvala ti mama što si uvijek uz mene jer bez tebe sve ovo ne bi bilo moguće.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vode

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

### Utjecaj natrijeva acetata na rast mikroorganizama koji akumuliraju fosfor iz otpadne vode

Ana Filipović, 796/MB

**Sažetak:** *Uklanjanje fosfora iz otpadnih voda u posljednje je vrijeme radi ljudske aktivnosti postalo sve važnije kako bi se izbjeglo preopterećivanje prirodnih recipijenata. Napredno biološko uklanjanje fosfora često se koristi u praksi i stalno se usavršava i istražuje. U ovome je radu praćena obrada sintetičke otpadne vode u laboratorijskom SBR uređaju s naglaskom na uklanjanje spojeva s fosforom, a cilj rada bio je ispitati utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata na uspješnost procesa obrade i na preživljavanje i aktivnost mikroorganizama koji akumuliraju fosfor (PAO). Provedena su dva pokusa u kojima su korištene različite koncentracije natrijeva acetata ( $3400 \text{ mgL}^{-1}$  i  $1200 \text{ mgL}^{-1}$ ). Usklađene su faze obrade uz aeraciju i bez aeracije radi propagiranja rasta PAO u aktivnome mulju. SBR uređaj je radio u ciklusima obrade od 24 sata pri čemu se svaki ciklus sastojao od 6 faza: punjenje, anaerobna faza obrade, aerobna faza obrade, i uzimanje mulja, taloženje mulja i uzimanje efluenta. Uvjeti rada uređaja bili su prilagođeni rastu PAO ( $\text{pH} = 8$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ ) te su praćeni različiti parametri poput uklanjanja ugljika, dušika i fosfora kako bi se iz dobivenih rezultata mogla procijeniti kvaliteta pročišćene vode i efikasnost primijenjene metode obrade. SRT oba pokusa je bio 10 dana. Rezultati su pokazali da u prvom pokusu nisu bili prisutni PAO, najvjerojatnije zbog previsoke koncentracije natrijeva acetata, dok je u drugom pokusu zabilježena veća aktivnost PAO.*

**Glavne riječi:** *mikroorganizmi koji akumuliraju fosfor (PAO), natrijev acetat, otpadna voda, fosfor*

**Rad sadrži:** 62 str, 29 slika, 4 tablica, 80 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** prof.dr.sc. *Marin Matošić*

**Pomoć pri izradi:**

Doc. dr. sc. *Josip Ćurko*

*Vlado Crnek, mag.ing*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

Doc. dr. sc. *Josip Ćurko*

Prof. dr. sc. *Marin Matošić*

Prof. dr. sc. *Tibela Landeka Dragičević*

**Datum obrane:** 28.02.2018

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Water Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

### **Influence of sodium acetate on the growth of microorganisms that accumulate phosphorus from waste water**

*Ana Filipović, 796/MB*

**Abstract:** *Removing phosphorus from wastewater has recently become increasingly important for human activity to avoid overburdening natural recipients. Enhanced biological phosphorus removal is often used in practice and is constantly being refined and explored. This paper deals with the treatment of synthetic wastewater in a laboratory SBR with the emphasis on removal of phosphorous compounds. The aim of this study was to investigate the effect of high concentration of sodium acetate on the processing, survival and activity of phosphorus accumulating microorganisms (PAO). Two experiments were carried out using different concentrations of sodium acetate ( $3400 \text{ mgL}^{-1}$  and  $1200 \text{ mgL}^{-1}$ ). The treatment phases with and without aeration were aligned to allow the PAO present in the active sludge to proliferate. The SBR worked in 24-hour treatment cycles, which consisted of 6 phases: filling, anaerobic treatment, aerobic treatment, sludge settling, sludge and effluent removal. The operating conditions of the device were adjusted to PAO growth ( $\text{pH} = 8$ ;  $T = 20^\circ\text{C}$ ) and various parameters such as carbon, nitrogen and phosphorus removal were monitored to estimate the quality of the purified water and the efficiency of the applied processing method. The SRT for both experiments was 10 days. The results showed that PAO was not present in the first experiment, probably due to the excessive sodium acetate concentration and the treatment process was not successful while the second experiment had a higher activity of PAO.*

**Keywords:** *phosphorus accumulating microorganisms (PAO), sodium acetate, wastewater, phosphorus*

**Thesis contains:** 62 pages, 29 pictures, 4 tables, 80 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD *Marin Matošić*, Full professor

**Technical support and assistance:**

PhD. *Josip Ćurko*, Assistant professor  
*Vlado Crnek*, mag.eng.

**Reviewers:**

PhD. *Josip Ćurko*, Assistant professor  
PhD. *Marin Matošić*, Full professor  
PhD. *Tibela Landeka Dragičević*, Full professor

**Thesis defended:** On 28 February 2018

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Otpadne vode .....	3
2.2. Biološka obrada otpadne vode .....	4
2.3. Biološko uklanjanje fosfora .....	7
2.3.1. Mikroorganizmi koji akumuliraju fosfor (PAO).....	9
2.3.2. Utjecaj različitih čimbenika na PAO.....	11
2.4. SBR uređaj .....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
3.1. Obrada sintetičke vode u laboratorijskom SBR uređaju .....	19
3.2. Karakteristike i sastav influenta .....	21
3.3. Određivanje pH vrijednosti .....	24
3.4. Određivanje koncentracije otopljenog kisika.....	24
3.5. Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS) i ukupne organske suspendirane tvari (VSS).....	25
3.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK) .....	25
3.7. Određivanje koncentracije amonijaka .....	26
3.8. Određivanje koncentracije ukupnog dušika .....	26
3.9. Određivanje koncentracije nitrata .....	27
3.10. Određivanje koncentracije ukupnog fosfora .....	27
3.11. Određivanje koncentracije otopljenog fosfora .....	28
3.12. Određivanje maksimalne brzine anaerobnog otpuštanja fosfora, maksimalne specifične brzine asimilacije KPK i neto uklonjenog fosfora.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	29
4.1. Pokus 1 – visoka koncentracija acetata .....	31
4.2. Pokus 2 – niska koncentracija acetata .....	44
5. ZAKLJUČCI.....	53
6. LITERATURA.....	55



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Ime i prezime studenta

## 1. UVOD

Čovjekov utjecaj na okoliš prilikom iskorištavanja prirodnih resursa kao što je voda, je bila jedna od prvih i danas najvećih posljedica pojave i širenja industrijalizacije i urbanizacije. Zato je danas jedan od najvećih problema nekontrolirano ispuštanje otpadnih voda gradova i industrije u prirodne vodotokove. Pošto se otpadne vode svojim fizikalnim, kemijskim i biološkim sastavom razlikuju od prirodnih voda, njihovim ispuštanjem bez prethodne obrade unose se velike količine organskih i anorganskih tvari koje narušavaju prirodnu ravnotežu vodenih eko-sustava i međudjelovanje organizama što može dovesti do uništenja određene populacije. Stoga je potrebno tu vodu na određen način sakupiti i obraditi.

Zadnjih nekoliko godina brojni znanstvenici svojim istraživanjima na području zaštite okoliša daju moguća rješenja na probleme obrade otpadnih voda. Osnovni cilj obrade otpadnih voda je različitim metodama utjecati na njihov sastav kako bi se što manje razlikovale od onih voda koje smo uzeli iz prirode. Primjenjuju se brojni fizikalni, biološki i kemijski postupci, a obrada se vrši sve dok se ne postigne kvaliteta obrađene vode koja ne uzrokuje nepoželjne promjene u okolišu. Postupak obrade otpadnih voda mora biti visoko efikasan i ekonomičan uz niske troškove i nizak utrošak energije, materijala i vremena. Ovim kriterijima od svih znanih postupaka obrade otpadnih voda najviše zadovoljavajućom se pokazala biološka obrada otpadne vode aktivnim muljem.

Pažljivim i racionalnim gospodarenjem prirodnim izvorima vode te motrenjem djelovanja onečistila na okoliš od osobite je važnosti za budućnost i opstanka cjelokupnog života na zemlji. Stoga obrada otpadnih voda treba biti ne samo potreba za uklanjanjem potencijalnih opasnih tvari nego i zakonska obveza u svim zemljama svijeta. Ta svijest o važnosti obrade otpadnih voda je danas jako razvijena i sve više zemalja ulaže svoje resurse u razvoj postupaka obrade.

Zakoni i propisi za visokom kakvoćom obrađene otpadne vode su sve stroži i osim ugljika i dušika zahtijevaju i dodatno uklanjanje fosfora zbog čega su postavljeni novi izazovi pred razvojem tehnologije. Potrebno je postojeće uređaje koji nisu predviđeni za uklanjanje fosfora iz otpadnih voda, prilagoditi novim zahtjevima korištenjem novih tehnologija. Cilj je pronaći metodu s kojom će se postići visok stupanj pročišćenosti uz niske troškove.

Kontroliranje fosfora u otpadnim vodama je važan dio zaštite prirodnih voda koje su, uz sustave za javnu odvodnju, glavni recipijenti. Pod prirodnim uvjetima, fosfor je obično oskudan u jezerima i potocima, ali posljednjih 100 godina ljudske aktivnosti rezultiralo je prekomjernim opterećenjem fosfora u mnogim slatkovodnim sustavima. Fosfor potiče rast suspendiranih algi, osobito u jezerima i većim rijekama, zbog čega u ozbiljnim slučajevima dolazi do gušenja riba i odumiranja morskih biljaka stoga veće koncentracije fosfora predstavljaju veliki rizik za vodeni ekosustav. Kako bi se razina fosfora u prirodnim vodama kontrolirala, potrebna je biološka obrada otpadne vode s naprednim uklanjanjem fosfora. Biološko uklanjanje fosfora istraživano u ovom radu temeljilo se na procesima adsorpcije i ugradnje fosfora u biomasu, a provodilo se anaerobnim i aerobnim postupkom uz pomoć mikroorganizama koji akumuliraju fosfor (PAO) čija je prisutnost nužna za uspjeh procesa obrade pošto mogu akumulirati veće koncentracije fosfora. U ovome je radu praćena obrada pripremljene sintetičke otpadne vode u laboratorijskom SBR uređaju s ciljem uklanjanja visokih koncentracija fosfora pomoću PAO prisutnih u aktivnome mulju. Pošto su organski supstrati neophodni za rast i metabolizam PAO, kao izvor ugljika je korišten natrijev acetat kojeg su brojne studije predložile kao jedan od najboljih supstrata. No, malo je studija koje su ispitivale utjecaj visokih koncentracija natrijeva acetata na rast PAO i uspješnost uklanjanja fosfora tijekom biološke obrade otpadne vode. Stoga je cilj ovoga rada pratiti utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata na aktivnost i preživljavanje PAO te uklanjanje fosfora iz otpadnih voda praćenjem različitih parametara kako bi se procijenila kvaliteta dobivene obrađene vode i efikasnost uklanjanja fosfora.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Otpadne vode**

Otpadne vode su onečišćene vode podrijetlom iz kućanstva, industrije, stočnih uzgajališta te odlagališta smeća (Glancer - Šoljan i sur.,2000). Bogate su organskim ugljikom, spojevima s dušikom i fosforom. Također mogu biti prisutni teški metali i toksini koji štetno djeluju na biljni i životinjski svijet, a razvojem kemijske industrije prisutne su i tvari vrlo složene kemijske strukture za čiju razgradnju u prirodi ne postoje (mikro)organizmi i njihovo gomilanje remeti kruženje biogenih elementa u okolišu. Kada ovakva neobrađena otpadna voda dospije u vodene sustave, dolazi do fizičkih i kemijskih promjena ekosustava što se može vidjeti na Tablici 1.

Otpuštanjem neobrađenih otpadnih voda u okoliš dolazi do razgradnje otopljenih sastojaka otpadnih voda što dovodi do smanjenja koncentracije otopljenog kisika uz nastajanje brojnih plinova neugodnog mirisa. Sve to uzrokuje odumiranje različitih vrsta živih organizama vodenog ekosustava. Nekontroliranim ispuštanje otpadnih voda u vodene sustave, može uzrokovati eutrofikaciju što je pojava povećanja primarne proizvodnje organske tvari u odnosu na tipičnu razinu zbog stalnog vanjskog unosa hranjivih soli odnosno spojeva s ugljikom, dušikom i fosforom. U otpadnim vodama mogu biti prisutni i patogeni mikroorganizmi koji su opasni po život i zdravlje ljudi i životinja. Osim toga, vodene biljke i alge mogu sastojke otpadnih voda koristiti kao hranjivo što ubrzava njihov rast i odgovorne su za pojavu „cvjetanja mora“.

**Tablica 1.** Popratne pojave izazvane različitim kontaminantima u otpadnoj vodi (Glancer-Šoljan i sur., 2000).

<b>GRUPE KONTAMINANATA</b>	<b>POJAVE KOJE IZAZIVAJU</b>
<b>KEMIJSKI KONTAMINANTI</b>	
<b>1.</b> Razgradivi organski sastojci (bjelančevine, ugljikohidrati, masti)	zmanjenje koncentracije otopljenog kisika
<b>2.</b> Hranjivi sastojci (dušik i fosfor)	eutrofikacija i pojava cvjetanja algi
<b>3.</b> Opasna onečistila (kemijski spojevi vrlo složenih struktura)	rak i promjena genetičkog sastava
<b>4.</b> Teško biorazgradivi organski sastojci (fenoli, detergents, pesticidi)	djeluju kao otrovi i inhibitori za većinu mikroorganizama u aktivnom mulju ili drugom prirodnom staništu
<b>5.</b> Kovine	koče rast i aktivnost mikroorganizama
<b>6.</b> Plivajuće čestice (ulja i suspendirane čestice)	zamućenje otpadne vode, loš izgled pročišćene vode, sprečavaju otapanje kisika
<b>7.</b> Topljivi anorganski sastojci s $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ , $\text{SO}_4^{2-}$ i drugim ionima	taloženje na površinu stanica mikroorganizama
<b>BIOLOŠKI KONTAMINANTI</b>	
patogeni mikroorganizmi i virusi	bolesti ljudi i životinja

## **2.2. Biološka obrada otpadne vode**

Biološki procesi obrade otpadnih voda obuhvaćaju razgradnju organskih otpadnih tvari s pomoću mikroorganizama koji te tvari koriste za rast biomase. Najzastupljenija metoda biološke obrade, koja se koristi od 20-ih godina prošlog stoljeća, je obrada otpadnih voda aktivnim muljem. Idealna je metoda zbog niske cijene i visoke učinkovitosti. Proces obrade se

provodi u aeracijskom bioreaktoru gdje aerobni mikroorganizmi svojom biokemijskom aktivnošću oksidiraju organske tvari prisutne u otpadnoj vodi (Matošić, 2015).

Aktivni mulj je mješovita kultura bakterija, protozoa, algi, kvasaca i metazoa povezanih sa suspendiranim česticama u nakupine koje se zovu pahuljice ili flokule. Za potrebe svog rasta, navedeni mikroorganizmi koriste organske tvari iz otpadne vode pri čemu se ugljik iz organskih tvari prevodi do ugljikovog dioksida, dušik u nitrata, sumpor u sulfata i fosfor u fosfate

Prema istraživanju Chuehtai i Ahmed iz 1991. godine, postupak uklanjanja organskih sastojaka iz otpadne vode primjenom biološke razgradnje prate tri uzastopne reakcije: oksidacija, sinteza mikrobne biomase i endogena respiracija. Ukupna reakcija biološke razgradnje može se prikazati ovako:

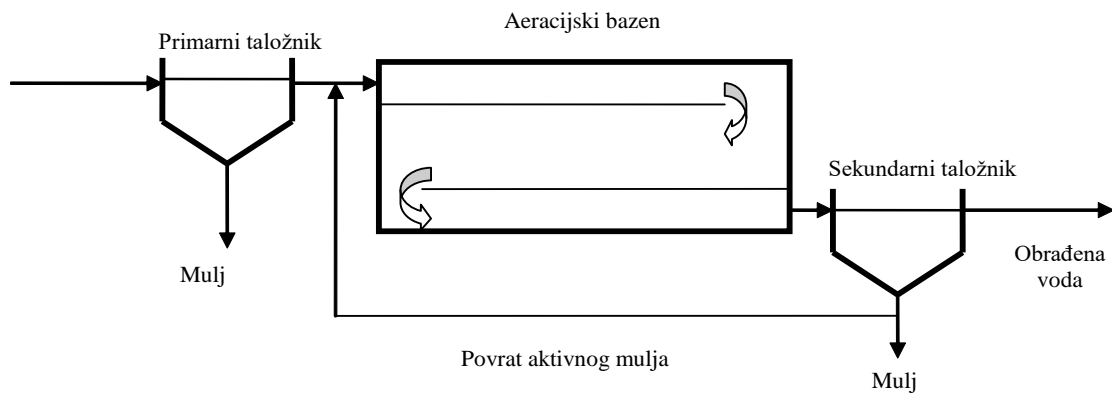
organski sastojci + O<sub>2</sub> + mikroorganizmi → produkti + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + biomasa

Konačni produkti spomenutog procesa su pročišćena voda i višak mulja koji se tijekom procesa uklanjanja, dok se istaloženi mulj vraća u bioreaktor. Dobivena pročišćena voda se najčešće vraća u prirodne vodotokove (jezera, rijeke ili mora) dok se višak mulja zbrinjava odlaganjem na deponije ili se koristi kao gnojivo u poljoprivredi, a često se i spaljuje s drugim otpadom u spalionicama.

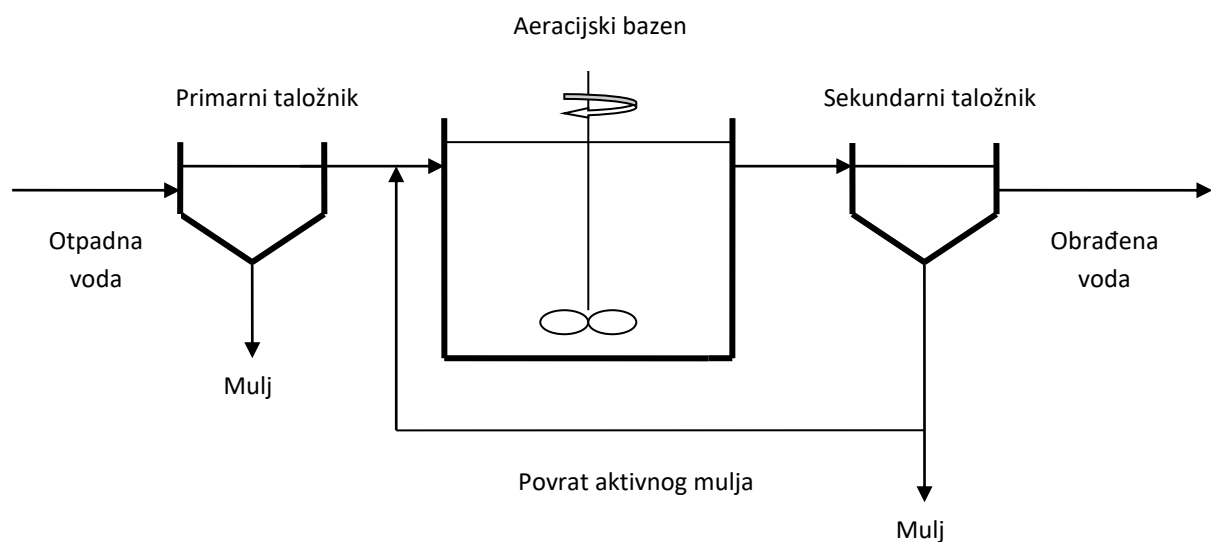
Danas se procesom biološke obrade aktivnim muljem, osim klasične biološke obrade, vrše i procesi biološkog uklanjanja dušika nitrifikacijom i denitrifikacijom te biološko uklanjanje fosfora. Ti se procesi odvijaju u bioreaktorima, koji su serijski spojeni pri aerobnim, anoksičnim ili anaerobnim uvjetima te se mogu koristiti pumpe za međusobnu recirkulaciju.

U početku se najviše koristio reaktor sa čepolikim strujanjem (Slika 1.) no razvojem industrije počinju se miješati komunalne i otpadne vode i ovaj proces postaje neučinkovit zbog toksičnih sastojaka prisutnih u industrijskoj otpadnoj vodi. Kako bi se uspješno uklonili toksičnih sastojci, razvijen je bioreaktor većeg volumena u kojem se postiglo veće razrjeđenje toksičnih sastojaka i time se smanjio njihov udio u otpadnoj vodi. Reaktor koji je u pitanju je reaktor sa potpunim miješanjem (Slika 2.). Razvojem metoda i tehnologije biološke obrade otpadnih voda, počeo se sve češće koristiti šaržni bioreaktor sa pritokom supstrata ili SBR (Slika 3.). SBR je bioreaktor pogodan za manja naseljena mjesta i industrije koji radi na principu napuni – isprazni (engl. „fill and draw“) i uključuje jedan bioreaktor s potpunim

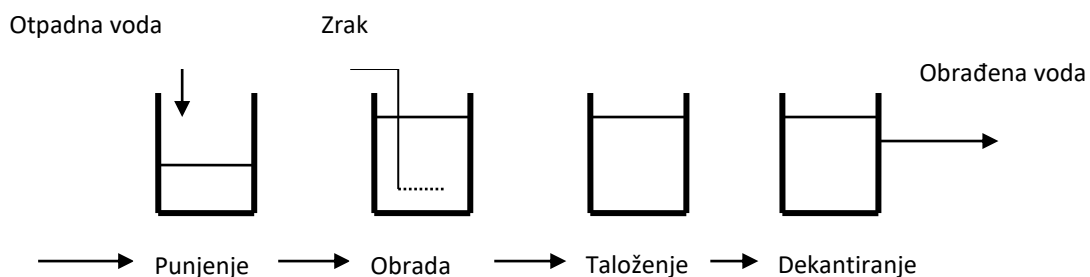
miješanjem u kojem se odvijaju sve faze obrade sa aktivnim muljem, što znači da uvijek ostaje mulja u biorektoru kroz sve faze obrade pa nema potrebe za taložnicima.



**Slika 1.** Bioreaktor s čepolikim strujanjem (Tchobanoglous, 2003)



**Slika 2.** Bioreaktor s potpunim miješanjem (Tchobanoglous, 2003)



**Slika 3.** Šaržni bioreaktor s pritokom supstrata (SBR) (Tchobanoglous, 2003)

Kod biološke obrade otpadnih voda razlikujemo tri stupnja obrade:

1. Primarna obrada otpadnih voda - cilj je da se iz otpadne vode odstrane zrnate, pahuljaste i druge čestice. Čestice veće gustoće se talože dok se čestice manje gustoće nakupljaju na površini prirodnim ili umjetno izazvanim putem. Primarna obrada otpadne vode je neophodna jer se njome smanjuje ukupno organsko onečišćenje za oko 30-50 % (Glancer-Šoljan i sur., 2001).
2. Sekundarna obrada otpadnih voda - biološki postupci koji slijede nakon provedenih primarnih postupaka (Johanides i sur., 1984).
3. Tercijarna obrada otpadnih voda - obrada komunalnih otpadnih voda postupkom kojim se uz drugi stupanj pročišćavanja još dodatno uklanja fosfor za 80% i/ili dušik za 70 – 80% (Pravilnik, 2013).

Tijekom provođenja biološke obrade otpadnih voda važno je praćenje starosti mulja odnosno SRT vrijednosti (engl. sludge retention time). SRT je definiran kao omjer mase mulja u bioreaktoru i mase mulja odvedene iz sustava na dan. Utječe na broj i stabilnost populacije spororastućih mikroorganizama. Starost mulja kod klasičnih uređaja je između 3 i 30 dana ovisno o tipu uređaja. Pri radu sa starijim muljem doći će do stvaranja velike mase mulja u bioreaktoru što zahtijeva veliki bioreaktor te taloženje mulja može biti otežano, a aktivnost biomase i udio aktivnih stanica u mulju je manja. S druge strane, ni mala starost mulja nije poželjna jer uzrokuje ispiranje spororastućih mikroorganizama iz bioreaktora, budući da im je brzina rasta manja od brzine kojom ih se odvodi u otpadni mulj. Uspješnost procesa nitrifikacije i uklanjanja dušika iz otpadne vode ovisi o vrijednostima SRT-a pošto su sve nitrificirajuće bakterije spororastuće.

### **2.3. Biološko uklanjanje fosfora**

Fosfor je bitan nutrijent za biljke, životinje i ljude te spada u jedan od 20 najraširenijih elemenata u Sunčevom sustavu i 11. na Zemlji. Pod prirodnim uvjetima fosfor (P) je obično oskudan u vodi. No ljudske aktivnosti su dovele do pretjeranog opterećenja fosfora u mnogim slatkovodnim sustavima. To može uzrokovati onečišćenje vode promicanjem prekomjernog rasta algi, osobito u jezerima. Jezera koja se u proljeće čine relativno bistrim i čistim, mogu nalikovati na zelenu juhu u kasno ljeto zbog cvjetanja alga potaknutih fosforom. Kakvoća vode može se dodatno oštetiti kada bakterije konzumiraju mrtve alge i iskoriste otopljeni kisik pa dolazi do umiranja riba i drugih vodenih života gušenjem.



Glavni izvori visokih koncentracija fosfora u prirodnim vodama su gnojiva s poljoprivrednih zemljišta, komunalni i industrijski objekti i fosfati u otpadnim vodama dok je otapanje plinovitog fosfora iz atmosfere u prirodnim recipijentima zanemarivo. Prilikom biološke obrade otpadne vode je bitno uklanjanje fosfora kojeg je potrebno ukloniti iz vodenih sustava koji završavaju u prirodnim recipijentima pošto potiče rast biljaka i algi odnosno eutrofikaciju. Komunalne otpadne vode mogu sadržavati od 5 do 20 mgL<sup>-1</sup> ukupnog fosfora, od čega je od 1 do 5 mgL<sup>-1</sup> organskog podrijetla, a ostatak anorganskog. Sekundarna obrada otpadnih voda može ukloniti 1 – 2 mgL<sup>-1</sup> fosfora, a ostatak odlazi u efluent te se ispušta u prirodni recipijent što može uzrokovati pojačanu eutrofikaciju.

Fosfor se može ukloniti iz otpadnih voda kemijskim i biološkim procesima obrade. Uklanjanje fosfora iz otpadnih voda uključuje ugradnju fosfata u ukupnu suspendiranu tvar (TSS) te zatim uklanjanje iz iste. Fosfor se može ugraditi u biološku suspendiranu tvar odnosno mikroorganizme ili kemijske taloge. Kemijsko taloženje upotrebljava se za uklanjanje anorganskih fosfata dodatkom koagulanta i miješanjem sa otpadnom vodom. Pri tome se najčešće koriste viševalentni metalni ioni poput kalcija, aluminijski i željeza (Tchobanoglous i sur., 2003). Nakon kemijskih taloženja često je potrebna neutralizacija prije naknadne obrade ili ispuštanja obrađene otpadne vode.

Biološko uklanjanje fosfora temelji se na procesima adsorpcije i ugradnje fosfora u biomasu. Fosfor se u otpadnim vodama pojavljuje kao organski fosfor i fosfat PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode provodi se anaerobnim i aerobnim postupkom uz pomoć PAO koji mogu akumulirati veće koncentracije fosfora, odnosno više od 0,38 mgP/mgVSS. Inače je količina inkorporiranog fosfora u biomasu u normalnim aerobnim sustavima s aktivnim muljem otprilike 0,02 mgP/mgVSS (0,015 mgP) (Wentzel i sur., 2008). No, kod poboljšanog biološkog uklanjanja fosfora (eng. enhanced biologicalphosphorus removal – EBPR) uz pomoć PAO, količina inkorporiranog fosfora u biomasu je povećana sa 0,02 mgP/mgVSS na 0,06 – 0,15 mgP/mgVSS odnosno 0,05 – 0,10 mgP/mgTSS (Wentzel i sur., 2008).

Poboljšano biološko uklanjanje fosfora (EBPR) široko se primjenjuje u mnogim postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda kao ekonomična i održiva metoda uklanjanja fosfora (Liu i sur., 2007). Djelovanje EBPR-a se temelji na aktivnosti PAO u aktivnom mulju pošto mogu akumulirati unutarstanične rezerve polifosfata (poli-P) kako bi uklonili fosfor kojeg ima daleko više od anaboličkih zahtjeva s izmjenama anaerobnih i aerobnih/anoksičnih uvjeta (Zuthi i sur., 2013). Postoje dokazi da je mikrobna zajednica EBPR procesa raznolika. Liu (1995) je otkrio da mulj s vrlo visokim kapacitetom za uklanjanje fosfora sadrži najmanje

tri različita dominantna soja mikroorganizma koji se morfološki razlikuju. Tehnike genske sonde su ukazale da se EBPR-ovi filogenetski sastoje od nekoliko različitih mikrobnih populacija (Wagner i sur., 1994; Bond i sur., 1995; Kampfer i sur., 1996). Stoga se može zaključiti da aktivni muljevi nisu dominirani jednom bakterijskom vrstom već ih čini nekoliko različitih bakterijskih sojeva i grupa. Također u različitim procesima, pa tako i u EBPR, mikrobna zajednica mulja može se mijenjati zavisno od tipa procesa, klime i okoliša.

Poznato je da su mikroorganizmi koji akumuliraju glikogen (GAO) usko povezani s PAO u njihovom metabolizmu. U EBPR procesu, prisutnost GAO smatra se štetnim jer ne doprinose uklanjanju fosfora, ali se natječu za supstrat s PAO te su time jedan od glavnih razloga opadanja funkcionalnosti EBPR-a (Lopez-Vazquez i sur., 2008). Uspješan rad EBPR također ovisi o mnogim operativnim čimbenicima procesa.

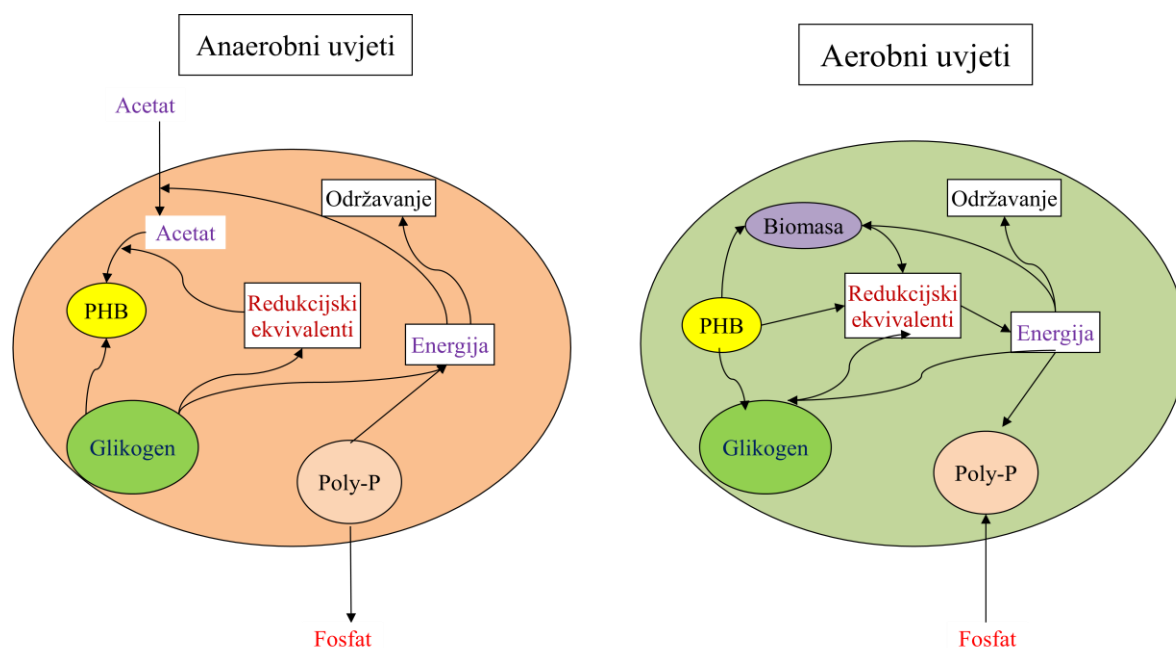
Biološki sustav uklanjanja fosfora s obzirom na kemijsko odstranjivanje fosfora ima nekoliko prednosti kao što su: ne dolazi do povećanja saliniteta tretirane vode, proizvodnja mulja raste samo između 10 do 15%, sustav je jednostavniji i cijena prihvatljiva. Međutim, kao i svaki sustav i biološko uklanjanje fosfora također ima svoje nedostatke kao što su manja pouzdanost i varijabilnost u usporedbi sa kemijskim odstranjivanjem dok su nedostaci kemijskog uklanjanja: povećanje saliniteta obrađene vode, povećanje produkcije mulja zbog nastalih anorganskih krutih tvari te složenost i troškovi postrojenja.

Proces biološkog uklanjanja fosfora se odvija u bioreaktorima uz anaerobne odnosno anoksično-aerobne uvjete. U aerobnim uvjetima fosfat se nagomilava u mikrobnim stanicama, a u anaerobnim uvjetima se otpušta iz stanica. Proces je detaljnije opisan u sljedećem ulomku (2.3.1.).

### **2.3.1. Organizmi koji akumuliraju fosfor (PAO)**

Organizmi koji akumuliraju fosfor (PAO) su prvenstveno bakterije aktivnog mulja koje imaju sposobnost akumuliranja većih koncentracija fosfora. Ovisno o koncentraciji otopljenog kisika i raspoloživog izvora ugljika (npr. natrijev acetat) u otpadnoj vodi, nagomilavaju ili otpuštaju fosfat. PAO su nepokretni Gram pozitivni štapići ili koki koji žive u klasterima (Mino i sur., 1998). Vjeruje se da PAO sadrže visoki G+C udio (Wagner i sur., 1994). Zasadu jedini poznati i identificirani PAO su bakterije grupe *Acinetobacter* spp. (Fhus i Chen, 1975; Mino i sur., 1998), *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (Lu i sur., 2007), *Microlunatus phosphovor* NM-1 (Nakamura i sur., 1991, 1995; Mino i sur., 1998), *Lamproedia* spp. (Stante i sur., 1996; Mino i sur., 1998) te neki sojevi denitrificirajućih PAO (Meinhold i sur., 1998).

Metabolizam PAO o kojem ovisi uspješno biološko uklanjanje fosfora iz otpadnih voda je prikazan na slici 4. U anaerobnoj fazi, PAO asimiliraju hlapive masne kiseline uz razgradnju glikogena čime se dobiva ATP, NADH, acetil-CoA ili propionil-CoA koji se pohranjuju u obliku poli- $\beta$ -hidroksialkanoata (PHA) te se iz stanice PAO, na račun energije dobivene razgradnjom glikogena, ispušta fosfor u obliku ortofosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Comeau i sur., 1986; Wentzel i sur., 1986; Mino i sur., 1998; Smolders i sur., 1994; Martin i sur., 2006; Oehmen i sur., 2007; Saunders i sur., 2007). U aerobnoj fazi, PAO koriste pohranjene poli- $\beta$ -hidroksialkanoate kao izvore ugljika i energije potrebne za rast novih stanica. Poli- $\beta$ -hidroksialkanoati (PHA) se koriste i kao izvor energije za asimilaciju fosfora iz vode te nastajanje polifosfata. Treba naglasiti da se u aerobnoj fazi unosi više fosfora za stvaranje polifosfata nego što je otpušteno u anaerobnoj fazi pa se na taj način fosfor uklanja iz vode (Oehmen i sur, 2007).



**Slika 4.** Metabolizam PAO u anaerobnim i aerobnim uvjetima (Henze i sur., 2008)

PAO s asimiliranim fosforom u obliku polifosfata, uklanjaju se iz reaktora izbacivanjem viška mulja. Kada se postigne ustaljeno stanje, masa PAO koja izlazi je jednaka masi PAO koji nastanu. Uklanjanje fosfora ugradnjom u aktivni mulj ograničeno je na oko 0,006 – 0,004 mgP/mgKPK (Wentzel i sur., 2008).

Pod aerobnim i anoksičnim uvjetima rada prisutnost izvora ugljika i fosfora u isto vrijeme izaziva negativan utjecaj na asimilaciju fosfora (Smolders i sur., 1994; Kuba i sur., 1994; Brdjanovic i sur., 1998). Izvori ugljika dostupni pod navedenim uvjetima bit će

primarno iskorišteni za nastajanje PHA. Najčešće prisutni su poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB) i polihidroksivalerat (PHV), ali također u manjoj količini mogu biti prisutni poli- $\beta$ -hidroksimetilbutirat i poli- $\beta$ -hidrometilbutirat. Samo kada se iscrpi vanjski izvor ugljika, dolazi do korištenja fosfora (Mino i sur., 1998). Treba također naglasiti da nitrat prisutan u otpadnoj vodi negativno utječe na uspješno odvijanje procesa biološkog uklanjanja fosfora jer se u anaerobnoj fazi izvor ugljika troši za denitrifikaciju, koja je brži proces od procesa asimilacije acetata koji provode PAO, pa je iz tih razloga njihov rast usporen. Zbog toga su uređaji za biološko uklanjanje fosfora izvedeni tako da PAO dobiju dovoljno izvora ugljika i da se minimalizira povrat nitrata u anaerobnu fazu procesa. Time je spriječena potrošnja izvora ugljika od strane mikroorganizama koji vrše denitrifikaciju (Wentzel i sur., 2008). Osim nitrata, na provedbu procesa biološkog uklanjanja fosfora iz otpadne vode utječu i pH vrijednost vodenog okoliša, temperatura i otopljeni kisik u aerobnoj zoni.

### **2.3.2. Utjecaj različitih čimbenika na PAO**

Kako bi PAO mogli uspješno uklanjati fosfor iz otpadnih voda u EBPR sustavu, uvjeti obrade i rada sustava moraju biti prilagođeni njihovim zahtjevima da bi se izbjegao gubitak aktivnosti i apoptoza mikrobne PAO zajednice. Stoga su provedena brojna ispitivanja s ciljem spoznaje koji su to odlučujući čimbenici o kojima ovisi rad EBPR sustava i uspješnost uklanjanja fosfora iz otpadnih voda.

Nedavno je proučeno djelovanje nitrita/ $\text{HNO}_2$  na biološko uklanjanje dušika i fosfora. Nedisocirana dušikasta kiselina ( $\text{HNO}_2$ ) je protonirani oblik nitrita i smatra se pravim inhibitorom mikroorganizama naspram nitritnog aniona (Freitas i sur., 2009, Zhou i sur., 2007, Zhou i sur., 2008, Zhou i sur., 2011, Pijuan i sur., 2010). Nitrit je međuprodukt procesa nitrifikacije i denitrifikacije, a zbog svoje toksičnosti njegova akumulacija ima ozbiljni utjecaj na kvalitetu efluenta. U nekim slučajevima može smanjiti ili čak potpuno prekinuti aktivnost mikroorganizama i smanjiti mikrobnu populaciju (Hu i sur., 2012, Zhou i sur., 2012). Stoga je akumulacija nitrita nepovoljna u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda. Istraživanja su pokazala da nitrit/ $\text{HNO}_2$  može pružiti kompetativni nedostatak PAO nad GAO u EBPR sustavima i bio je ključni faktor odabira u konkurenciji PAO/GAO (Ye i sur., 2010). Međutim, Tayr i sur. (2013) su dobili suprotne rezultate prema prethodnim radovima. Korištena je SBR konfiguracija s anaerobnim/anoksično-nitritnim fazama pri čemu se dobila zajednica mikroorganizama obogaćena s PAO. Glavni razlog tome je to što kombinacija EBPR-nitrit puta s propionatom kao izvorom ugljika, daje kompetativnu prednost PAO naspram GAO. Zhou i sur. (2011) su sugerirali da je mehanizam toksičnosti nedisocirane

dušikaste kiseline ( $\text{HNO}_2$ ) povezano s njenim utjecajem na bakterijske membrane i unutarstaničnu proizvodnju energije. Razine intracelularnog adenozin trifosfata (ATP) je oštro smanjena tijekom punjenja s  $\text{HNO}_2$  i stopa redukcije je bila proporcionalna s rastućom koncentracijom  $\text{HNO}_2$  (Zhou i sur., 2010). Osim toga, za akumulaciju nitrita/ $\text{HNO}_2$  je poznato da inhibira unos fosfora što je vjerojatno posljedica negativnog utjecaja na aktivnost polifosfat kinaze (PPK) ili potrošnje PHA kao što je opisao Wang i sur. (2011). Također, Saito i sur. (2004) su objavili da  $\text{HNO}_2$  negativno utječe na unos fosfora i formiranje poli-P u određenom enzimskom sustavu dok su Zeng i sur. (2011, 2011a) pokazali da je učinkovita metoda za ublažavanje štetnog djelovanja nakupljanja  $\text{HNO}_2$  u EBPR sustavima bila odgovarajuća opskrba izvorom ugljika. Iako određena koncentracija  $\text{HNO}_2$  inhibira u aerobnim uvjetima unos fosfora u PAO, razine inhibicije se u velikom rasponu razlikuju zbog razlika u granuliranosti mulja, načinu rada, konfiguraciji reaktora i sastavu otpadnih voda. Pravi sustavi za pročišćavanje otpadnih voda, naročito oni s eng. nitrite-pathway nitritizacijom, pokazali su veću toleranciju prema  $\text{HNO}_2$  od sintetičkog sustava za pročišćavanje otpadnih voda (Zeng i sur., 2013). Također, čini se da granulirani mulj ima veću toleranciju na  $\text{HNO}_2$  od konvencionalnog aktivnog mulja što je vjerojatno zbog njegove jače granularne strukture za dostavu nitrita u bakterijske agregate (Zhou i sur., 2007). Nitrit može biti inhibitor za neaklimatizirane kulture, no može se koristiti kao akceptor elektrona ako se održavaju ispravni radni uvjeti.

Prisutnost nitrata anaerobno u komunalnim postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, koji imaju za cilj istodobno uklanjanje ugljika, dušika i fosfora, obično dovodi do neuspješnog rada EBPR. Prisutnost nitrata u anaerobnim uvjetima može inhibirati PAO aktivnost ili aktivirati konkurenciju između PAO i denitrificirajućih bakterija za organski supstrat (Guerrero i sur., 2011). Simulacijske studije su pokazale da je dostupnost VFA u anaerobnoj fazi neophodna za održavanje funkcija EBPR. Kada izvor ugljika ima visok sadržaj VFA, PAO bi mogli nadjačati obične heterotrofne organizme (OHO) čak i pod anoksično-aerobnom uvjetima. Kod rada s niskim KPK influenta, aktivnost heterotrofne denitrifikacije bila je više pogođena nego EBPR. Stoga je ključna točka za aktiviranje EBPR-a bila prisutnost VFA. Ako je punjenje nitrata manje od potencijala OHO za denitrifikaciju, OHO mogu nadjačati PAO za korištenje ograničene količine nitrata. Ako opterećenje nitratom premašuje potencijal OHO za denitrifikaciju, PAO će imati prilike koristiti "višak" nitrata da proliferiraju u reaktoru (Hu i sur., 2002).

Amonijak također može remetiti funkcionalnost EBPR sustava. U SBR uređaju dolazilo je do potpunog popuštanja u uklanjanju fosfora zbog naglog pada pH pri  $\text{NH}_4^+\text{-N}$

koncentraciji od  $80 \text{ mgL}^{-1}$  (Kim i sur.,2008). Zaključeno je da kod niskog pH dolazi do inhibicije rasta PAO dok bi rast GAO bio neznatno pogođen. Stoga, GAO mogu biti konkurenti u EBPR sustavima (Kim i sur., 2008). Freitas i sur. (2009) sugeriraju da povećanom koncentracijom amonijaka se može uzrokovati pogoršanje učinkovitog uklanjanja fosfora. Nadalje, Zheng i sur. (2013) su ispitali inhibiciju nedisociranog amonijaka ( $\text{NH}_3$ ) na granulirani EBPR mulj i regresivnost od makro- na mikroskalu. Nađeno je da je nedisocirani  $\text{NH}_3$  ozbiljno pogoršao performanse EBPR i karakteristike granuliranog mulja (taloživost i morfologija). Toksična koncentracija nedisociranog  $\text{NH}_3$  za metabolizam uklanjanja fosfora bila je  $17,76 \text{ mgNL}^{-1}$ . Aklimatizacijski fenomen dogodio se kada su PAO bili izloženi konstantnoj koncentraciji  $\text{NH}_3$  ( $8,88 \text{ mgNL}^{-1}$ ) kroz dulji vremenski period. Molekularna analiza je pokazala da nedisocirani  $\text{NH}_3$  ima značajan utjecaj na mikrobne zajednice te inhibicija njime može pružiti kompetitivni nedostatak PAO u odnosu na GAO.

Osim nitrita, nitrata i bakra, na EBPR rad također može utjecati organski i anorganski kositar (Sn). Rayne i sur. (2005) su pokazali da je do smanjenja EBPR funkcije dolazilo kada je ukupna koncentracija kositra bila veća od  $4 \text{ gL}^{-1}$  u MLSS (eng. mixed liquor suspended solids). Poznato je da organski kositar u velikoj mjeri doprinosi ukupnom kositru u mulju iz drugih postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, i ove supstance snažno inhibiraju uklanjanje fosfora što upućuje na to da su povišene razine organskog kositra odgovorne za primijećeno pogoršanje EBPR funkcije.

Pošto je bakar jedan najčešćih teških metala u okolišu, Wang i sur. (2011) su ispitali njegov utjecaj na ponašanje i djelovanje PAO. Prvenstveno je ispitan utjecaj  $\text{Cu(II)}$  na spojeve dobivene intracelularnim transformacijama koji pohranjuju energiju, uključujući poli-P, PHA i glikogen. PAO su bili izloženi različitoj dozi  $\text{Cu(II)}$  s različitim razinama biomase i pH. Eksperimentalni rezultati su pokazali da povećanjem MLSS se može povećati tolerancija PAO biomase na visoke koncentracije  $\text{Cu(II)}$ . Osim toga, primijećeno je da inhibirajući učinak  $\text{Cu(II)}$  je ublažen povišenjem pH vrijednosti kako bi se smanjila dostupnost teških metalnih frakcija. Inhibicija degradacije poli-P može smanjiti raspoloživu energiju za redukciju PHA i time uzrokovati slabo uklanjanje fosfora. Slično tome je pokazalo ispitivanje Tsai sur. (2013) koji su utvrdili da PAO u prisutnosti  $\text{Cu(II)}$  nije mogao sintetizirati PHA u anaerobnoj fazi i da je to zbog inhibicije enzimske aktivnosti acetil-CoA sintaze (ACS). Također ne mogu uzimati fosfor u aerobnoj fazi uslijed inhibicije enzimske aktivnosti PPK.

Chen i sur. (2012) proučavali su učinke  $\text{Ag}^+$  ( $0 - 5 \text{ mgL}^{-1}$ ) na EBPR proces i pokazalo se da je učinkovitost EBPR smanjena na 48,8% pri  $\text{Ag}^+$  koncentraciji od  $1 \text{ mgL}^{-1}$ , a uklanjanje neto fosfora je zaustavljeno pri  $\text{Ag}^+$  koncentracijama većim od  $2 \text{ mgL}^{-1}$ .  $\text{Ag}^+$  inhibira

uzimanje izvora ugljika kako u otopini tako i u anaerobnim i aerobnim transformacijama intracelularnih metaboličkih međuprodukata, uključujući PHA, glikogen i fosfor. Štoviše,  $Ag^+$  je pokazao nižu toksičnost na GAO nego PAO. Daljnje ispitivanje je pokazalo da je smanjenje anaerobnog otpuštanja fosfora u prisutnosti  $Ag^+$  uzrokovano supresijom aktivnosti adenilat kinaze (ADK) i eksopolifosfataze (PPX), dok je smanjenje aerobnog unosa fosfora uzrokovano inhibicijom metabolizma proizvodnje energije. Međutim,  $Ag^+$  nije dovodio do oštećenja membrane i istjecanja citoplazmatskog sadržaja.

Krom se smatra otrovnim i štetnim za vodeni okoliš te ga se često nalazi u otpadnoj vodi koja se ispušta iz kromove elektroforeze, čeličana, kožne i kemijske industrije (Fang i sur., 2012). Cr(VI) može se lako transportirati u stanice zbog njegove velike topivosti. Kao rezultat, mnogo je toksičniji od Cr(III). Utjecaj Cr(VI) na EBPR sustav istraživali su Fang i sur. (2012) i pokazali su da Cr(VI) potpuno inhibira proces uklanjanja fosfora pri koncentracijama većim od  $5 \text{ mgL}^{-1}$ . Također su pokazali da su GAO i druge bakterije bile više neosjetljive na Cr(VI) nego PAO.

Osim teških metala i drugih sastojaka influenta, na aktivnost PAO i rad EBPR sustav utječe i odabir izvora ugljika odnosno supstrata. Pa su tako za kompleksni izvor ugljika (npr. saharoza), istraživači tvrdili da prisutnost NOX (nitrita ili nitrata) ima inhibicijski učinak u EBPR sustavima, a ne da suzbija sposobnost samog otpuštanja fosfora već da spriječi fermentacijski proces proizvodnje VFA (Guerrero i sur., 2011). Provedena su istraživanja učinka glukoze na aktivni mulj EBPR (Gebremariam i sur., 2012). U eksperimentalni reaktor su serijski dodane smjese glukoza/acetata u različitim omjerima: 25%/75%, 50%/50% i 75%/25%, a rad EBPR je uspoređen s kontrolnim procesom hranjen samo acetatom. Rad EBPR u eksperimentalnim skupinama se pogoršavao kada je odnos glukoza/acetata bio 75%/25% i kada je kontrola prešla naglo na 100% glukoze. PAO nisu mogli unijeti glukozu prije nego što se fermentacijskim bakterijama prevela u VFA. Drugi razlog je da se GAO mogu natjecati s PAO za glukozu i VFA. Mulj zahtjeva određeno vrijeme za rast fermentativnih bakterija kako bi se aklimatizirao na glukozu. Također je otkriveno da PAO mulj još uvijek može dobro obavljati EBPR u prisutnosti glukoze, ali samo kada ne služi kao dominantni supstrat. Ovi rezultati, nasuprot konvencionalne teorije o EBPR, sugeriraju da dodavanje glukoze u otpadnim vodama u umjerenim razinama ne ometa ili čak može poboljšati funkciju EBPR te da treba istraživati otpadne iz proizvodnje glukoze kao održive alternativne i jeftinije hranjive izvore osobito kada je potrebno poboljšanje KPK u EBPR sustavima.

Do sada je spomenut utjecaj komponenata otpadne vode na aktivnost PAO i uspješno uklanjanje fosfora tijekom obrade. No osim komponenata, na PAO i uklanjanje fosfora utječu i postavljeni uvjeti rada EBPR te odabrana metoda obrade. Kemijska obrada otpadnih voda je alternativna metoda uklanjanja fosfora pri kojoj se primjenjuju različiti kemijski reagensi, po najviše soli metala. Često se primjenjuje u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda kao dodatno uklanjanje fosfora prije otpuštanja obrađene vode u prirodne vodotokove ili se provodi paralelno s biološkom obradom otpadne vode. Stoga su Liu i sur. (2011) ispitali učinak tipičnih kemijskih doza na proces biološkog uklanjanja fosfora. Rezultati su pokazali da aluminijeva sol ( $\text{Al}^{3+}$ ) značajno utječe na proces oslobađanja i unosa fosfora, dok željezna sol ( $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ ) inhibira uklanjanje fosfora samo kada je njena doza dovoljno velika. Akumulirane kemijske soli u masi mulja imaju postojan i značajan utjecaj na biološko uklanjanje fosfora. Stoga je intermedijalno doziranje visoko preporučljivo i optimalno za skupni rad biološkog i kemijskog uklanjanja fosfora. Istraživanje Schönborn i sur. (2001) dokazao je da ako se neuspjeh EBPR procesa dogodio u punoj mjeri, treba uz ostale čimbenike uzeti u obzir udjel magnezija i Mg/Ca omjer u otpadnim vodama.

Temperatura se smatra važnim čimbenikom koji utječe na konkurenciju PAO/GAO te proces obrade (Oehmen i sur., 2007). Proučavani su učinci temperature u širokom rasponu (od  $10^{\circ}\text{C}$  do  $40^{\circ}\text{C}$ ) na metabolizam PAO i GAO u anaerobnim i aerobnim fazama (Lopez-Vazquez i sur., 2007). Otkriveno je da su GAO imali očite konkurentske prednosti u odnosu na PAO za unos ugljikovih izvora pri temperaturama većim od  $20^{\circ}\text{C}$ . Time se zaključilo da su PAO vrste većinom psihrofilne bakterije dok se GAO vrste mogu smatrati mezofilnim bakterijama. Ovi rezultati pridonose objašnjenju proliferacije GAO što uzrokuje nestabilnost EBPR procesa u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda u tropskim regijama ili pri tretiranju industrijskih efluenata s visokom temperaturom. Također je bilo značajno da su Bassin i sur. (2012) usporedili učinkovitost uklanjanja fosfora u dva SBR uređaja laboratorijskih mjerila za aerobni granulirani mulj koji su radili na  $20^{\circ}\text{C}$  i  $30^{\circ}\text{C}$ . Učinkovitost uklanjanja fosfora na  $20^{\circ}\text{C}$  ( $> 90\%$ ) bila je veća od one na  $30^{\circ}\text{C}$  ( $60\%$ ) s vremena zadržavanja mulja (SRT) od 30 dana.

U posljednjem desetljeću nekoliko istraživačkih skupina je objavilo da je promjena parametara rada jedan od uobičajenih uzroka neuspjeha EBPR. Freitas i sur. (2009) podvrgnuli su SBR uređaj povećanim koncentracijama KPK, dušika i fosfora. Pokazano je da SBR s kratkim ciklusima može odabrati i održavati robusnu i aktivnu biomasu koja može odoljeti tipičnim šokovima koji se javljaju u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda i brzo se oporave. Stoga je starost mulja bila ograničavajući faktor za postizanje istodobnog



biološkog sustava za uklanjanje dušika i fosfora. Predloženo je da duga SRT kontrola dovodi do smanjenja uklanjanja fosfora dok je povećana potrošnja energije kako bi se održavala visoka koncentracija biomase (Yoon i sur., 2004). Ova studija zabilježila je smanjenje uspješnog uklanjanja fosfora na SRT vrijednostima dužim od 20 dana što je najvjerojatnije zbog mogućnosti PAO/GAO kompetitivnih uvjeta pri duljem SRT. Stoga se za SRT u EBPR sustavima preporuča vrijednost oko 10 dana (Carrera i sur., 2001). Ako se primjenjuje izuzetno visoki SRT, GAO će pod istim uvjetima biti konkurentniji od PAO, a ako je SRT prenizak PAO će se isprati iz sustava, a u mikrobnoj zajednici će dominirati heterotrofne bakterije.

Song i sur. (2009) su proveli pokus s anoksičnim/anaerobnim MBR procesom kako bi procijenili utjecaji hidrauličkog retencijskog vremena (HRT) i unutarnjeg vremena recikliranja (eng. internal recycling time mode) na uklanjanje nutrijenata. Učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora poboljšana je smanjenjem HRT pri čemu se omjer raspoloživog supstrata i koncentracije biomase povećao i time je povećana sposobnost biološkog tretmana i aktivnosti denitrificirajućih bakterija. Zbog povećanog vremenskog omjera anoksičnog/anaerobnog procesa, povećana je brzina uklanjanja dušika, ali se smanjuje stopa uklanjanja fosfora jer se više organskih supstrata trošilo za proces denitrifikacije, a ne za otpuštanje fosfora pri ograničenoj količini povoljnog izvora ugljika. Promjena HRT vrijednosti i anoksičnog/anaerobnog vremenskog omjera utječe na uklanjanje dušika manje nego na uklanjanje fosfora zbog limitacije lakorazgradivog supstrata za PAO. Na temelju navedenih otkrića, Zhang i sur. (2011) preporučuju integrirani pristup za poboljšanje učinkovitosti i djelotvornosti EBPR procesa u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, uključujući povećanje razine VFA influenta, povećanje anaerobne KPK biodegradacije, produljenje anaerobnog HRT, povećanje MLSS vrijednosti i produljenje SRT.

## **2.4. SBR uređaj**

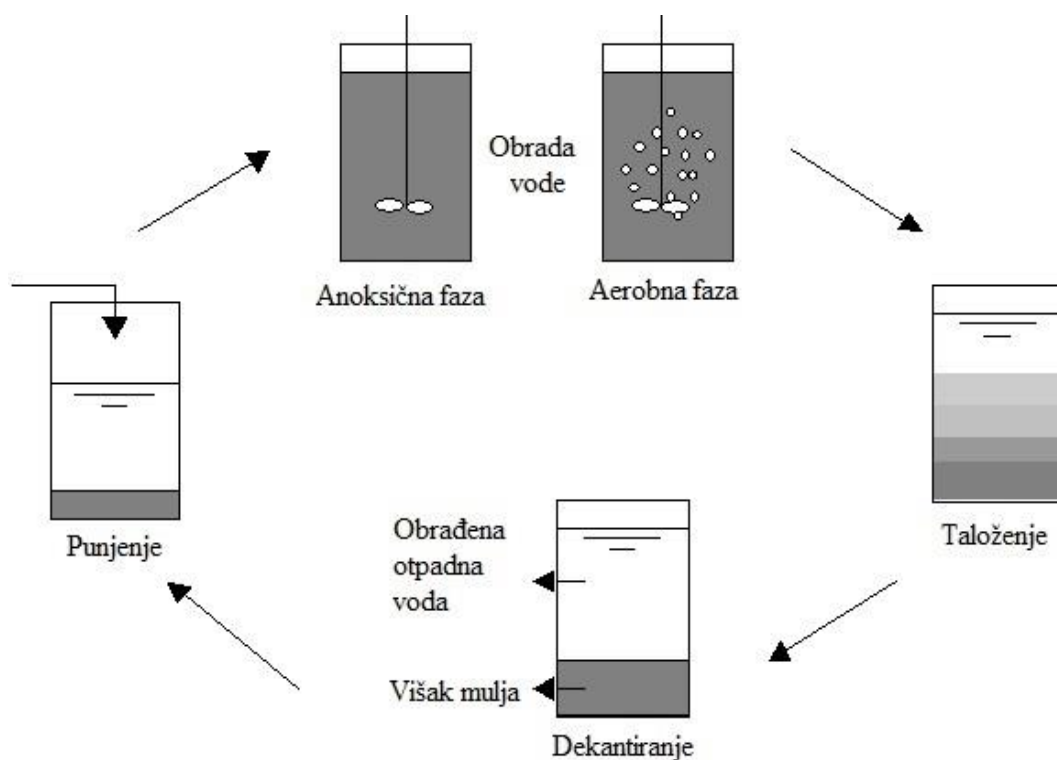
Biološka obrada otpadne vode aktivnim muljem može se provoditi pomoću različitih tipova tehnologije, ovisno o karakteristikama, tipu i porijeklu otpadne vode. Jedna od tih tehnologija je SBR (eng. sequencing batch reactor) tehnologija.

SBR uređaj je tzv. napuni i isprazni (fill-and-draw) tip reaktora koji se razlikuje od ostalih postrojenja za biološku obradu otpadne vode, koji se sastoje od više bazena ili reaktora i taložnika, po tome što provodi sve korake obrade u jednom bioreaktoru i obrada vode se vrši šaržno. U SBR uređaju bioreaktor i taložnik nisu prostorno odvojeni, svi koraci obrade, aerobne i anaerobne, se provode u jednom bioreaktoru koji služi i kao taložnica nakon

prestanka rada, a obrada otpadne vode se vrši šaržnim postupkom. U reaktoru uvijek ostaje mulj tijekom svih koraka obrade, pa nema potrebe za taložnicama. Međutim, faze obrade otpadne vode vremenski su odvojene. Tako je moguće regulacijom aeracije u jednom bioreaktoru, provoditi uklanjanje dušika nitrifikacijom i denitrifikacijom, paljenjem i gašenjem sustava za aeraciju, te je moguće biološki ukloniti fosfor. Vremenski i funkcionalni slijed obrade otpadne vode naziva se SBR ciklus i kontrolira se putem računalnog programa koji upravlja pojedinim fazama obrade i njihovom trajanju, sve u skladu s posebnim zahtjevima procesa koji se odvijaju u SBR uređaju.

Pošto se obrada vrši šaržno, uređaj ove vrste pogodan je za manje jedinice. No, s obzirom da je dotok otpadne vode kontinuiran, potrebno je postavljanje više SBR reaktora u istom uređaju i to tako da se u jednom reaktoru vrši punjenje, a u drugom obrada otpadne vode odnosno u svakom reaktoru se odvijaju različite faze obrade (Poltak, 2005). Paralelno postavljanje više SBR uređaja koji mogu raditi naizmjenično omogućuje modularnu izgradnju postrojenja za obradu otpadne vode i time prilagođavanje na izmjenična i naknadna opterećenja.

SBR uređaj ima 5 faza rada (punjenje, obrada, taloženje, dekantiranje i mirovanje) koje su prikazane na slici 5. Proces obrade otpadne vode u SBR – uređaju započinje fazom punjenja pri kojoj se influent, koji sadrži hranjive organske tvari za mikroorganizme aktivnog mulja, dovodi u uređaj i uspostavljaju se povoljni uvjeti za provođenje procesa. Nakon punjenja, započinje proces obrade koji se provodi miješanjem i izmjenom aerobne i anaerobne faze obrade pri čemu aktivni mikroorganizmi razgrađuju organske tvari iz influenta te reduciraju parametre otpadne vode. Faza taloženja nastupa poslije obrade i karakteristična je po uspostavljanju uvjeta mirovanja, prekidu dotoka influenta te prestanku aeracije i miješanja. Aktivni mulj se taloži na dnu uređaja, a iznad mulja nastaje sloj čiste vode. Ova faza je važna zbog brzine taloženja mulja jer ako se mulj ne taloži dovoljno brzo, može izaći zajedno sa efluentom u slijedećoj fazi i time smanjiti kvalitetu efluenta. Po završetku taloženja, započinje faza dekantiranja pri kojoj se razdvaja tekuća faza od čvrste faze odnosno čista voda se odvaja od aktivnog mulja pomoću crpki. Nakon dekantiranja SBR je spreman za novi ciklus. Prije nego što započne novi ciklus, mora još završiti zadnja faza prethodnog ciklusa, a to je faza mirovanja koja služi za uklanjanje viška mulja radi održavanja odabrane SRT vrijednosti koji ima utjecaj na obradu otpadne vode.



**Slika 5.** Faze obrade otpadne vode u SBR uređaju.

Prednosti korištenja SBR uređaja:

- + obrada otpadne vode odvija se u jednom spremniku pa zauzima manje prostora
- + moguće je postići aerobne, anaerobne i anoksične uvjete za biološko uklanjanje dušika i fosfora s ciljem postizanja zakonski odobrenih vrijednosti u izlaznoj vodi
- + programsko upravljanje osigurava potpunu automatizaciju procesa te omogućuje ponovljivost procesnih parametara i smanjuje utjecaj ljudske pogreške
- + postavljanjem više paralelnih SBR- uređaja postiže se kontinuirana obrada, ali sustav nije osjetljiv na nagle promjene u sastavu otpadne vode jer su lako podesive faze unutar ciklusa.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

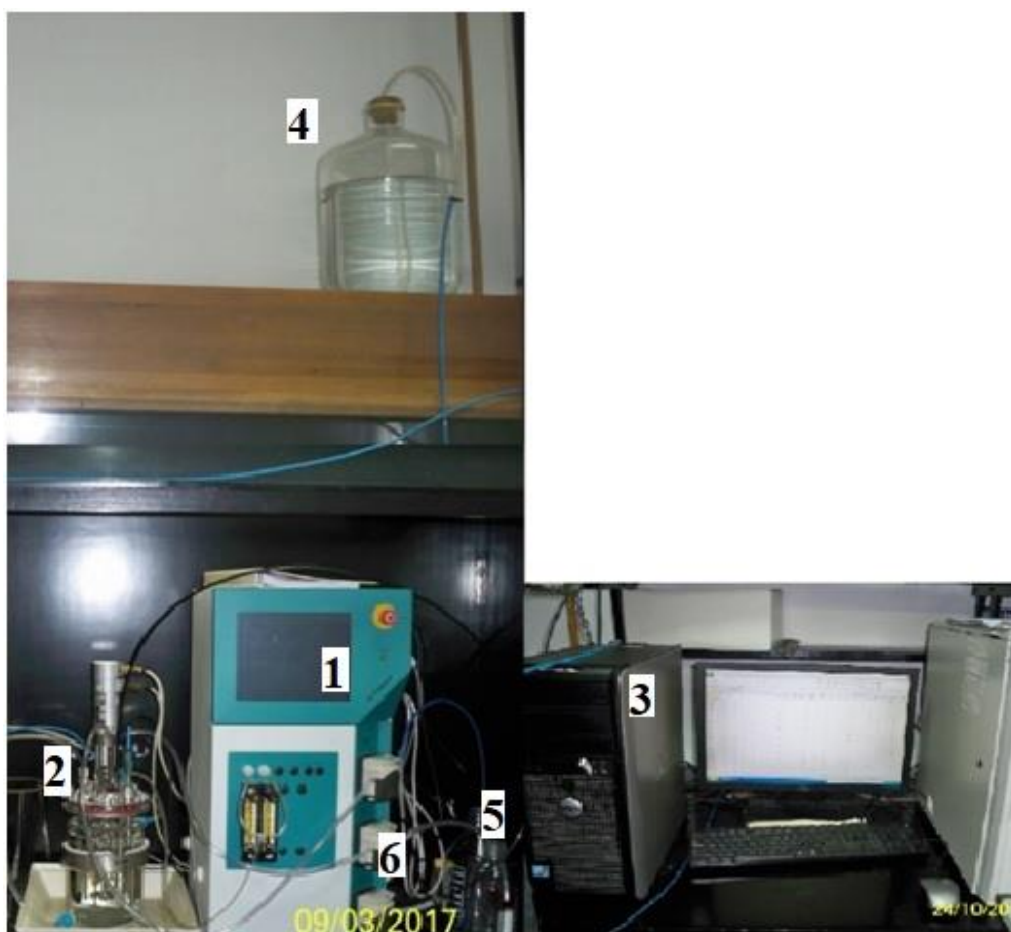
#### **3.1. Obrada sintetičke vode u laboratorijskom SBR uređaju**

Provođena su dva pokusa (Pokus 1 i Pokus 2) obrade sintetičke vode u SBR uređaju tvrtke Applikon (Slika 6). Pripremljene su sintetičke otpadne vode čije su karakteristike opisane u tablici 3. Volumen reaktora iznosio je 2 L. Sintetička voda je pripremana u zasebnoj boci iz koje se odvodila u SBR uređaj pomoću peristaltičke pumpe gdje je potom provedena obrada. Dnevni protok sintetičke vode je namješten na 1 L dnevno. U uređaju za Pokus 1 se nalazio aktivni mulj dopremljen iz uređaja za obradu otpadnih voda grada Zagreba i Velike Gorice dok se u uređaju za Pokus 2 nalazio aktivni mulj dopremljen iz uređaja za obradu otpadnih voda grada Sarajeva (Bosna i Hercegovina).

Procesi u reaktoru su bili pod kontrolom zadanog računalnog programa. Kako bi se proces obrade sintetičke otpadne vode mogao pratiti, u reaktor su ugrađene pH elektroda i kisikova elektroda te senzor za mjerenje temperature. Elektrode i senzor su bile spojene na računalni sustav preko kontrolno-upravljačke jedinice. Na temelju izmjerenih vrijednosti otopljenog kisika preko kontrolno-upravljačke jedinice se regulirala aeracija zrakom. Dnevno se odvijao jedan ciklus u trajanju od 24 sata. Svaki ciklus sastojao se od šest faza te je trajanje svake faza ciklusa prikazano u tablici 2. Zavisno koja je faza ciklusa miješalica je radila pri različitim brzinama pa je tako tijekom aeracije bila postavljena na 300 okretaja u minuti, a tijekom procesa bez aeracije na 100 okretaja u minuti. Po završetku procesa obrade u jednom ciklusu, obrađena voda odnosno efluent nakon faze taloženja mulja, pomoću crpke, je odvođen u predviđenu bocu iz koje se uzimao uzorak za daljnju analizu. Dnevno je na kraju aerobne faze odvođeno 800 mL efluenta te 200 mL miješane suspenzije mulja za održavanje stalne starosti mulja (SRT) koja je u oba pokusa iznosi 10 dana s time da se s održavanjem SRT-a u Pokusu 2 započelo 31. dan kako bi se mulj prilagodio na novi okoliš i uvjete.

**Tablica 2.** Trajanje faza u ciklusu obrade sintetičke otpadne vode

<b>FAZE OBRADE</b>	<b>TRAJANJE</b>
1. Punjenje SBR–uređaja influentom	120 min
2. Anaerobna faza obrade	570 min
3. Aerobna faza obrade	600 min
4. Uzimanje mulja	30 min
5. Taloženje	90 min
6. Uzimanje efluenta	30 min
<b><u>UKUPNO:</u></b>	1440 min (24 h)



**Slika 6.** Laboratorijski SBR – uređaj

Laboratorijski SBR – uređaj (Slika 6) se sastoji od nekoliko dijelova. Kontrolna upravljačka jedinica (1) je ključna za funkcioniranje uređaja. Služila je za vođenje procesa obrade te radi praćenja parametara kao što su: pH, temperatura, brzina miješanja i aeracija. Navedene parametre bilo je potrebno pratiti radi neprestanog uvida o stanju u SBR – uređaju jer su se svakih nekoliko sati izmjenjivale faze rada. SBR - uređaj (2) je služio za odvijanje procesa obrade sintetičke otpadne vode. Radi regulacije temperature procesa obrade, uređaj je imao dupli plašt kroz koji je stalno ulazila vodovodna voda za održavanje temperature. Miješanje se provodilo upotrebom dvostruke lopataste miješalice. Računalni program za kontrolu i vođenje procesa je instaliran na računalu (3) na kojem su se pohranjivale povratne informacije o stanju u SBR - uređaju te je izvodilo analizu podataka dobivenih na temelju tih informacija. Influent, koji se obrađivao biološkim procesom obrade u SBR uređaju, je čuvan u spremniku (4) te je periodički pomoću peristaltičke pumpe (6) odvođen u uređaj. Influent je prije prethodne upotrebe, autoklaviran kako ne bi došlo do promjene njegova sastava zbog utjecaja mogućih prisutnih kontaminanata. Obrađena sintetička otpadna voda odnosno efluent je dnevno skupljan u zasebnoj boci (5) te je korišten za analize.

### **3.2. Karakteristike i sastav influenta**

Svakih tjedan dana pripremano je zasebno 9 L influenta za svaki SBR uređaj. Sastav influenta je naveden u tablici 3, a njene karakteristike se mogu naći u tablici 4. Vrijednosti i sastav su odabrane pomoću usporedbe komponenta i priprema sintetičke otpadne vode prema: Smolders i sur., (1994), Oehmen i sur., (2005) i Jing Feng i sur., (2015). Radi lakše pripreme, unaprijed je pripremljeno po jedna litra šest koncentriranih mineralnih otopina koje su potom u određenom volumenu dodavane u bocu za pripremu influenta koja je prethodno napunjene s oko 8 L destilirane vode. Ukupno je napravljeno po 9 L influenta koji se koristio tijekom 9 dana. Zadnji sastojci kod pripreme influenta su kvašćev ekstrakt (Biolife, Milano, Italija) i natrijev acetat (bezvodni, Fisher Bioreagents, Fisher Scientific International Inc., New Jersey, SAD) kojeg dodajemo u obliku krutine izravno u bocu s prethodno dodanim mineralnim otopinama i destiliranom vodom. Influent je prije upotrebe autoklaviran.

Treba naglasiti kako se tijekom provođenja biološke obrade pripremljenog influenta, svaki dan direktno u reaktor dodavalo 2 mL alil-N tiouree (98 % ATU; Acros organics, Fisher Scientific International Inc., Pittsburgh, SAD), inhibitor rasta i aktivnosti nitrificirajućih bakterija.

**Tablica 3.** Komponente sintetičke otpadne vode

Komponente	Koncentracija spoja u sintetičkoj vodi $\gamma$ (mgL <sup>-1</sup> )	
	Pokus 1	Pokus 2
CH <sub>3</sub> COONa	3400	1200
NaHCO <sub>3</sub>	30	
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	80	
CaCl <sub>2</sub>	20	
NH <sub>4</sub> Cl	167,99	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	131,81	
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,6	
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,048	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,024	
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,012	
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,048	
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,06	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06	
KI	0,072	
EDTA	4	

**Tablica 4.** Karakteristike sintetičke otpadne vode

Karakteristike	Pokus 1		Pokus 2		
	0-18	19-43	0-26	27-34	35-54
Dan pokusa					
pH	6,22		6,32		
KPK (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	2449,82		529,8	956,25	
Ukupni fosfor (TP; mg PL <sup>-1</sup> )	152,114		30,66		
PO <sub>4</sub> -P (mg PL <sup>-1</sup> )	155,773		32,38		
Ukupni dušik (TN; mg NL <sup>-1</sup> )	97,084		23,3		
NH <sub>4</sub> -N(mg NL <sup>-1</sup> )	75,47	105,5	21,87		40,28

Sadržaj šest koncentriranih mineralnih otopina:

Otopina 1 - Elementi u tragovima:

FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O ili FeCl<sub>3</sub>x2H<sub>2</sub>O (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

NiSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

CuSO<sub>4</sub> p.a. (Merck – Alkaloid, Skopje, Makedonija)

MnCl<sub>2</sub>x4H<sub>2</sub>O p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

CoCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> p.a. (Gram – mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

KI (Gram – mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

EDTA (Acros organics, Fisher Scientific International Inc., New Jersey, SAD)

Otopina 2: FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Otopina 3: NH<sub>4</sub>Cl p.a. (Gram – mol d.o.o., Črnovečka 4, Zagreb, Hrvatska)

Otopina 4: NaHCO<sub>3</sub> p.a. (Lach-Ner, Tovarni 157 ·277 11 Neratovice, Češka)

Otopina 5: CaCl<sub>2</sub> p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

Otopina 6: MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska)



### 3.3. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost vode određivana je pomoću staklene elektrode tipa AppliSens pH+, spojene na kontrolno upravljačku jedinicu laboratorijskog SBR- uređaja. Elektroda je konstantno uronjena u reaktor te je pH vrijednost stalno mjerena i praćena. Kalibracija elektrode je provođena uranjanjem u pufer otopinu pH 7.

*Pribor :* AppliSens pH+ elektroda , Applikon

*Kemikalije :* Pufer otopina CertiPUR, Buffer solution pH 7, Merck



**Slika 7.** AppliSens pH+ elektroda

### 3.4. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Koncentracija otopljenog kisika je određivana pomoću elektrode tipa Applisens DO, tvrtke Applikon, spojene na kontrolno upravljačku jedinicu laboratorijskog SBR-uređaja. Elektroda je konstantno uronjena u reaktor te je koncentracija otopljenog kisika stalno mjerena i praćene su eventualne promjene. Kalibracija elektrode je provođena uranjanjem elektrode u otopinu kroz koju je propuhivan zrak pa je otopina zasićena kisikom.

*Pribor:* AppliSens DO elektroda, Applikon



**Slika 8.** AppliSens DO elektroda

### **3.5. Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS) i ukupne organske suspendirane tvari (VSS)**

Potrebno je prije određivanja ukupne suspendirane tvari (eng. total suspended solids - TSS) uzorak profiltrirati. Filtracija je provedena na staklenom filter papiru (1 $\mu$ m, GF/C, Whatman),no prije same filtracije na analitičkoj vagi (Mettler, Type H 15)je određena masa čistog filter papira. Nakon filtracije, filter s uzrokom je sušen u sušioniku na 105°C do konstante mase potom je osušeni filter s talogom izvagan te je iz razlike mase čistog filtra i filtra s talogom izračunata TSS vrijednost.

Ukupna organska suspendirana tvar (eng. volatile suspended solids – VSS) se određuje nakon što je određena TSS vrijednost. Koristio se isti filter papir s talogom od određivanja TSS pri čemu je talog spaljen na plameniku te žaren u mufolnoj peći na 500°C približno 3 sata. Nakon žarenja u peći, filter papir je potrebno ohladiti u eksikatoru prije samog vaganja kako ne bi povukao vlagu iz zraka. Razlika masa čistog filtra i filtra s talogom nakon žarenja jednaka je ukupnoj anorganskoj suspendiranoj tvari (ISS). Ukupna organska suspendirana tvar (VSS) jednaka je razlici dobivenih koncentracija TSS i ISS.

*Pribor:*                   analitička vaga, Mettler, Type H 15  
                              porculanska zdjelica  
                              papirić (1 $\mu$ m, GF/C, Whatman)  
                              vakuum sisaljka  
                              sušionik  
                              eksikator

### **3.6.Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)**

Kemijska potrošnja kisika odnosno KPK je određivan pomoću kivetnih testova LCK 514 i LCK 314 tvrtke Hach Lange. U kivetu je varijabilnom ručnom pipetom (tvrtka Eppendorf) s nastavcima dodano 2 mL uzorka te je dobro zatvorena čepom i pomiješana. Provedena je digestija u digestoru tvrtke Hach Lange kroz 15 minuta pri temperaturi od 175°C. Nakon završene digestije, kiveta je dobro promiješana i ostavljena da se dobro ohladi, potom je određena KPK vrijednost pomoću spektrofotometra HACH Lange DR900.

*Pribor:*                   kivetni testovi LCK 514 (100 – 2000 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>) i LCK 314 (15 – 150 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>)  
                              za mjerenje KPK, tvrtka Hach Lange  
                              varijabilna ručna pipeta tvrtke Eppendorf s nastavcima  
                              digestor, tvrtka Hach Lange  
                              spektrofotometar HACH Lange DR900

### 3.7. Određivanje koncentracije amonijaka

Koncentracija amonijevih iona odnosno amonija određivala se pomoću kivetnog testa LCK 304 tvrtke Hach Lange. Amonijevi ioni u uzorku, reagiraju s hipokloritnim ionima pri pH 12,6 u prisutnosti natrijeva nitroprusida i tvore plavo obojenje.

U kivetu s natrijevim hidroksidom je dodano varijabilnom ručnom pipetom (tvrtka Eppendorf) s nastavcima, 0,2 mL uzorka i zatvoreno s DosiCap Zip čepom u kojem se nalaze reagensi troklozen natrij i natrijev nitroprusid. Nakon 15 minuta mirovanja, pomoću spektrofotometra HACH Lange DR900, očitana je koncentracija amonijaka.

*Pribor:* kivetni test LCK 304 ( $0,015 - 2 \text{ mgL}^{-1}\text{NH}_4 - \text{N}$ ) za mjerenje koncentracije amonijaka, tvrtka Hach Lange  
varijabilna ručna pipeta tvrtke Eppendorf s nastavcima  
spektrofotometar HACH Lange DR900

### 3.8. Određivanje koncentracije ukupnog dušika

Ukupni dušik je određivan pomoću kivetnog testa LCK 238 LATON tvrtke Hach Lange. Pri tome se provodi proces digestije i prevođenje organskog i anorganskog dušika do nitrata pomoću preoksidisulfata kao oksidansa. Nitratni ioni reagiraju s 2,6 – dimetilfenolom u otopini sumporne i fosfatne kiseline te nastaju nitrofenoli koji daju crveno obojenje.

U reakcijsku kivetu dodano je varijabilnom ručnom pipetom (tvrtka Eppendorf) s nastavcima 0,5 mL uzorka, 2 mL reagensa A (natrijev hidroksid) i jedna tableta B (dinatrijev peroksidisulfat, dinatrijev tetraborat). Digestija se odvija u reakcijskoj kiveti kroz 15 minuta pri temperaturi od  $175^{\circ}\text{C}$  u digestoru tvrtke Hach Lange. Nakon digestije reakcijska kiveta je ohlađena na sobnu temperaturu, te je u nju dodan MicroCap C, čep s natrijevim azidom. Iz reakcijske kivete je uzeto 0,5 mL digestiranog uzorka i otpipetirano u kivetu (60% sumporna kiselina, 33% fosfatna kiselina) zajedno s reagensom D (2 - propanol). Nakon 15 minuta mirovanja, na spektrofotometru HACH Lange DR900 očitana je koncentracija ukupnog dušika.

*Pribor:* kivetni test LCK 238 LATON ( $5-40 \text{ mgNL}^{-1}$ ) za mjerenje koncentracije ukupnog dušika, tvrtka Hach Lange  
varijabilna ručna pipeta tvrtke Eppendorf s nastavcima  
digestor, tvrtka Hach Lange  
spektrofotometar HACH Lange DR900

### 3.9. Određivanje koncentracije nitrata

Nitratni ioni uzorka određivani su pomoću kivetnog testa LCK 339 tvrtke Hach Lange. Nitratni ioni u otopini sumporne i fosfatne kiseline, reagiraju s 2,6 – dimetilfenolom i tvore 4 – nitro – 2,6 dimetilfenol koji daje crveno obojenje.

Uzeto je 1 mL uzorka varijabilnom ručnom pipetom (tvrtka Eppendorf) s nastavcima, i zajedno s 0,2 mL reagensa A (2 - propanol) otpipetirano u kivetu. Koncentracija nitrata očitana je pomoću spektrofotometra HACH Lange DR900 nakon 15 minuta mirovanja.

*Pribor:* kivetni test LCK 339 (0,23 – 13,50 mgL<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub> – N) za mjerenje koncentracije nitrata, tvrtka Hach Lange  
varijabilna ručna pipeta tvrtke Eppendorf s nastavcima  
spektrofotometar HACH Lange DR900

### 3.10. Određivanje koncentracije ukupnog fosfora

Fosfatni ioni uzorka se određuje kivetnim testom LCK 350. Fosfatni ioni reagiraju s molibdatom i antimonijским ionima u kiselj otopini kako bi se formirao kompleks antimon fosfomolibdat koji se reducira askorbinskom kiselinom do fosfomolibden plave boje.

0,4 mL razrijeđenog uzorka otpipetirano je u kivetu, LCK 350 tvrtke Hach Lange, varijabilnom ručnom pipetom (tvrtka Eppendorf) s nastavcima i zatvoreno s DosiCap Zip čepom i dobro pomiješano. Digestija se odvija u kiveti kroz 15 minuta pri temperaturi od 175°C u digestoru tvrtke Hach Lange. Nakon digestije, reakcijska kiveta je odstajala da se ohladi i potom je dodano 0,5 mL reagensa B i zatvorena je DosiCap čepom te je nakon dobrog miješanja ostavljena na 10 minuta mirovanja. Na spektrofotometru HACH Lange DR900 očitana je koncentracija ukupnog fosfora.

*Pribor:* kivetni test LCK 350 (2.0 -20.0 mgPL<sup>-1</sup>) za mjerenje koncentracije ukupnog fosfora i otopljenog fosfora, tvrtka Hach Lange  
varijabilna ručna pipeta tvrtke Eppendorf s nastavcima  
digestor, tvrtka Hach Lange  
spektrofotometar HACH Lange DR900

### 3.11. Određivanje koncentracije otopljenog fosfora

Otopljeni fosfor se određuje pomoću kivetnog testa LCK 350 tvrtke Hach Lange. Varijabilnom ručnom pipetom (tvrtka Eppendorf) s nastavcima otpipetirano je 0,4 mL razrijeđenog uzorka u kivetu, a potom je dodano 0,5 mL reagensa B i zatvorena je DosiCap čepom te je nakon dobrog miješanja ostavljena na 10 minuta mirovanja. Koncentracija otopljenog fosfora je očitana pomoću spektrofotometru HACH Lange DR900.

*Pribor:* kivetni test LCK 350 (2.0 -20.0 mgPL<sup>-1</sup>) za mjerenje koncentracije ukupnog fosfora i otopljenog fosfora, tvrtka Hach Lange  
varijabilna ručna pipeta tvrtke Eppendorf s nastavcima  
spektrofotometar HACH Lange DR900

### 3.12. Određivanje maksimalne brzine anaerobnog otpuštanja fosfora, maksimalne specifične brzine asimilacije KPK i neto uklonjenog fosfora

Provedeno je testiranje pri kojem se odabranih dana uzimao svakih sat vremena uzorak mulja izravno iz SBR bioreaktora, u kojem se određivala VSS vrijednost te u filtriranom uzorku KPK vrijednost i vrijednost ortofosfata (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Iz grafičkog prikaza ovisnosti koncentracije fosfora u suspenziji mulja o vremenu, računalnim programom MS Excel je izračunat koeficijent smjera krivulje iz podataka na početku mjerenja otpuštanja fosfora kada je brzina bila najveća. Tako dobivena maksimalna brzina anaerobnog otpuštanja fosfora u mgP-PO<sub>4</sub>L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> podijeljena je s koncentracijom VSS da se dobije specifična maksimalna brzina anaerobnog otpuštanja fosfora u mg P-PO<sub>4</sub>/gVSSh. Na isti opisan način je dobivena i maksimalna specifična brzina asimilacije KPK u mgKPKL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> koja je podijeljena s koncentracijom VSS da se dobije maksimalna specifična brzina asimilacije KPK u mgKPK/gVSSh. Vrijednost NETO uklonjenog fosfora se dobila iz razlike početne koncentracije fosfora po dodatku acetata za taj dan testiranja i konačne koncentracije na kraju aerobne faze u mgP-PO<sub>4</sub>/L te je tako dobivena vrijednost podijeljena s koncentracijom VSS da bi se dobila vrijednost NETO uklonjenog fosfora u mgP-PO<sub>4</sub>/gVSS.

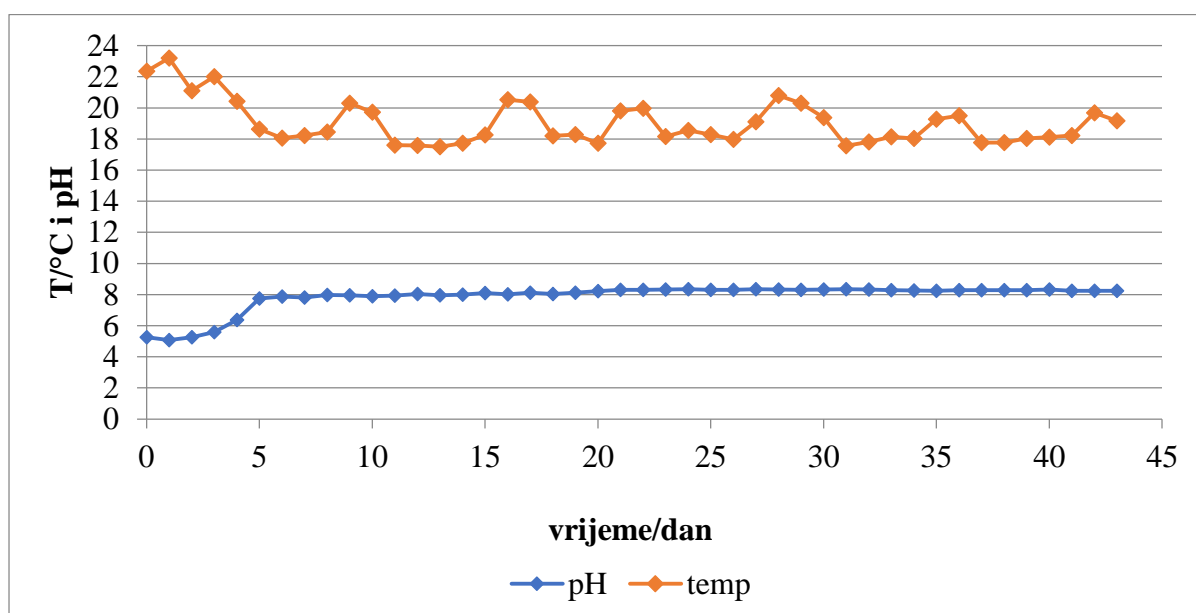
#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Fosfor se u otpadnim vodama pojavljuje kao organski fosfor i ortofosfat  $\text{PO}_4^{3-}$ . Pri biološkoj obradi otpadne vode je važno uklanjanje fosfora pošto potiče rast algi odnosno eutrofikaciju u prirodnim recipijentima. Biološko uklanjanje fosfora istraživano u ovom radu temeljilo se na procesima adsorpcije i ugradnje fosfora u biomasu, a provodilo se anaerobnim i aerobnim postupkom uz pomoć PAO koji mogu akumulirati veće koncentracije fosfora. U ovome je radu praćena obrada pripremljene sintetičke otpadne vode odnosno influenta u laboratorijskom SBR uređaju usklađivanjem procesa aeracije i procesa bez aeracije s ciljem uklanjanja visokih koncentracija fosfora pomoću PAO prisutnih u aktivnome mulju. Provedena su dva pokusa: Pokus 1 u kojemu je koncentracija acetata bila visoka ( $3400 \text{ mgL}^{-1}$ ) i Pokus 2 u kojem je koncentracija acetata bila znatno niža ( $1200 \text{ mgL}^{-1}$ ). SRT oba pokusa je bio 10 dana, a uvjeti procesa SBR uređaja bili su isti u oba pokusa i prilagođeni rastu PAO. Sam uređaj je radio u ciklusima obrade od 24 sata pri čemu se svaki ciklus sastojao od 6 faza: punjenje SBR-uređaja influentom, anaerobna faza obrade, aerobna faza obrade, uzimanje mulja, taloženje mulja i uzimanje efluenta za analize. Cilj rada je bilo pratiti utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata na aktivnost i preživljavanje PAO kako bi se odgovorilo kako odabrana koncentracija supstrata, utječe na metabolizam PAO i na uklanjanje fosfora iz otpadnih voda.

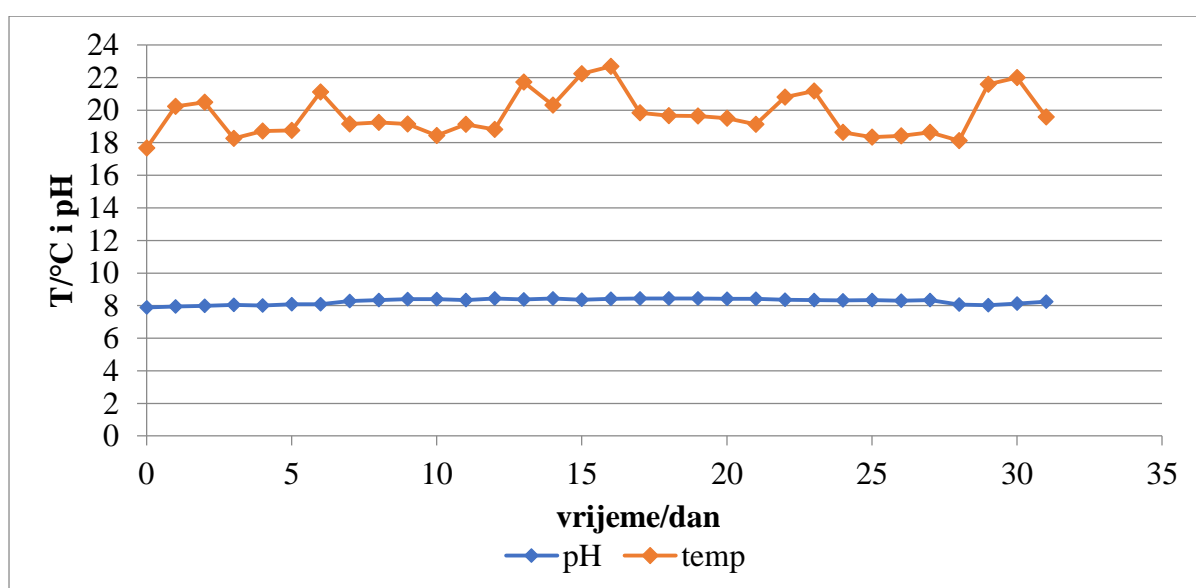
Brojne studije su pokazale da visoki omjer KPK/P ( $> 50 \text{ mgKPK/mgP}$ ) u influentu ima tendenciju da favorizira rast GAO umjesto PAO dok nizak omjer KPK/P ( $10\text{-}20 \text{ mgKPK/mgP}$ ) je povoljniji za rast PAO (Mino i sur.,1998). Dakle, kada je omjer KPK/P kontroliran u rasponu od 18 do 20  $\text{mgKPK/mgP}$ , uz dovoljnu količinu hlapivih masnih kiselina (VFA) u anaerobnoj fazi kako bi se potaknulo oslobađanje fosfora i postizanje dobrog uklanjanja fosfora, aklimatizirani mulj je pokazao visok stupanj uklanjanja fosfora (Chuang i sur., 2011). U Pokusu 1 u ovom radu omjer KPK/P je bio oko 16  $\text{mgKPK/mgP}$  da bi se favorizirao rast PAO dok je u Pokusu 2 omjer KPK/P bio oko 18  $\text{mgKPK/mgP}$  što je također u preporučenim granicama.

Uvjeti Pokusa 1 i 2 su bili postavljeni da bi bili što bolji za rast PAO. Temperatura mulja u oba pokusa bila je između  $17^\circ\text{C}$  i  $22^\circ\text{C}$  (Slika 9 i 10) što je idealno za rast PAO i njihovo favoriziranje u odnosu na GAO s obzirom da GAO odgovaraju više temperature (Lopez-Vazquez i sur., 2009) pa zato u toplijim predjelima svijeta imaju problema s ispravnim radom SBR sustava obrade otpadnih voda. pH vrijednost je prva 4 dana u oba pokusa bila oko 5 zbog toga što se proces obrade u početku nije prilagodio na nove uvjete. Od

5.dana pH vrijednost u Pokusu 1 (slika 9) je bila između 6,4 i 8,6 što je dobro jer su Lopez-Vazquez i sur. (2009) pokazali da kod SBR procesa s natrijevim acetatom kao jedinim izvorom ugljika, koji se odvijaju pri temperaturi od oko 20°C, mora biti pH procesa obrade veći kako bi u aktivnom mulju, pa tako i u procesu obrade, dominirali PAO. Također, Filipe i sur. (2001) su pokazali da visoki pH može biti štetan za GAO, pogotovo u anaerobnoj fazi pa se sugerira da pH može biti parametar kojim se može manipulirati (ne)prisutnost GAO u SBR sustavima. pH vrijednost je od 5.dana u Pokusu 2 bila između 7,9 i 8,5 što bi također trebalo odgovarati favoriziranju PAO nad GAO.



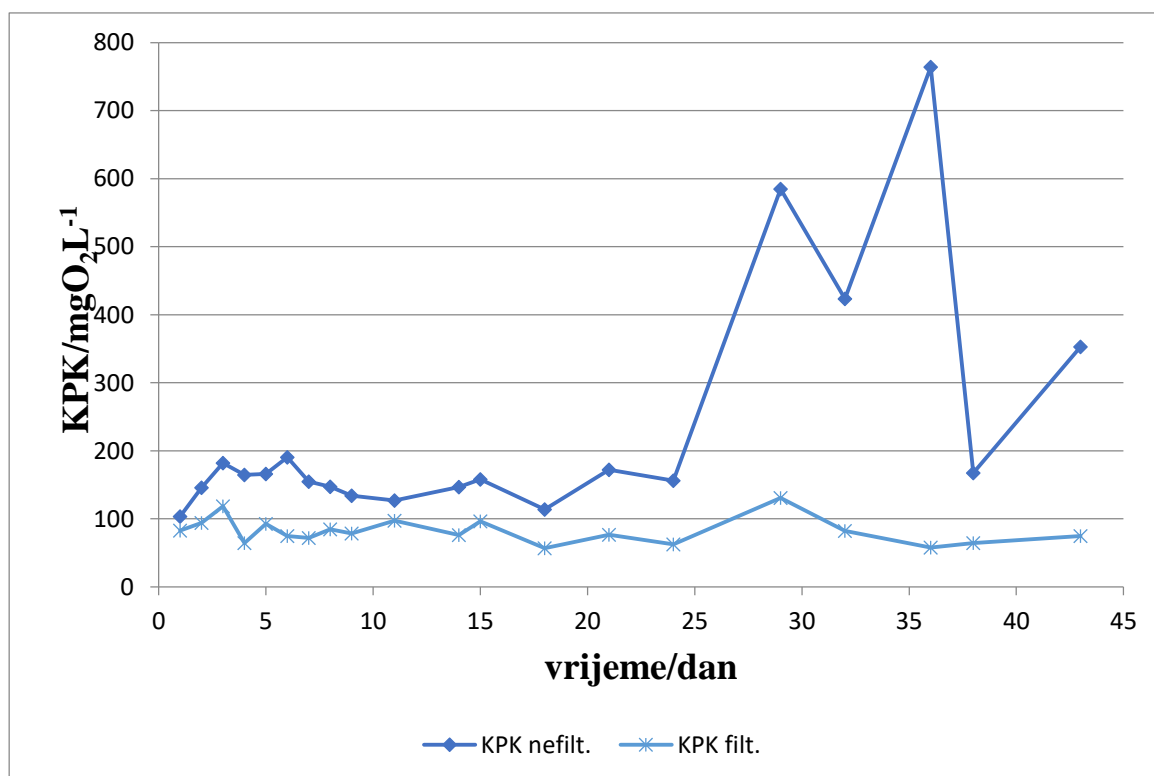
Slika 9. Temperatura i pH mulja u Pokusu 1



Slika 10. Temperatura i pH mulja u Pokusu 2

#### 4.1. Pokus 1 – visoka koncentracija acetata

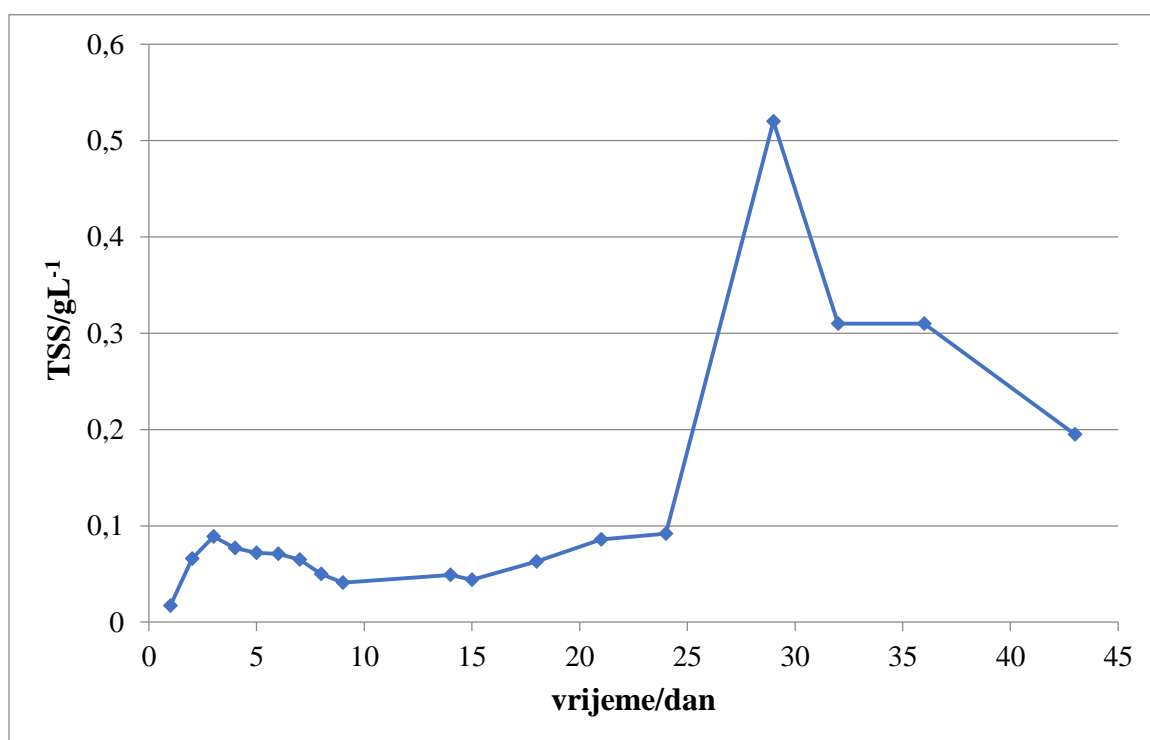
Kemijska potrošnja kisika (KPK) indikativna je mjera količine kisika koja se može potrošiti za kemijsku oksidaciju organskih zagađivača vode u anorganske krajnje proizvode u analiziranoj otopini i koristi se za jednostavno kvantificiranje količine organskih tvari te za kvantificiranje količine oksidirajućih zagađivača koji se nalaze u površinskoj ili otpadnoj vodi stoga je korisna mjera kakvoće vode. Neki uzorci vode sadrže visoke razine oksidirajućih anorganskih materijala koji mogu ometati određivanje KPK. Zbog velike koncentracije u većini otpadnih voda, klorid je najčešći izvor smetnji pa u tom slučaju se u uzorak može dodati živin sulfat kako bi se uklonile kloridne smetnje. Visoka razina KPK znači veća količina oksidirajućeg organskog materijala u uzorku što će smanjiti razinu otopljenog kisika, a smanjenje razine otopljenog kisika može dovesti do anaerobnih uvjeta što je štetno za veće oblike života u vodi. Stoga je u otpadnim vodama potrebno smanjiti KPK vrijednost prije ispuštanja u prirodu.



Slika 11. KPK efluenta Pokusa 1

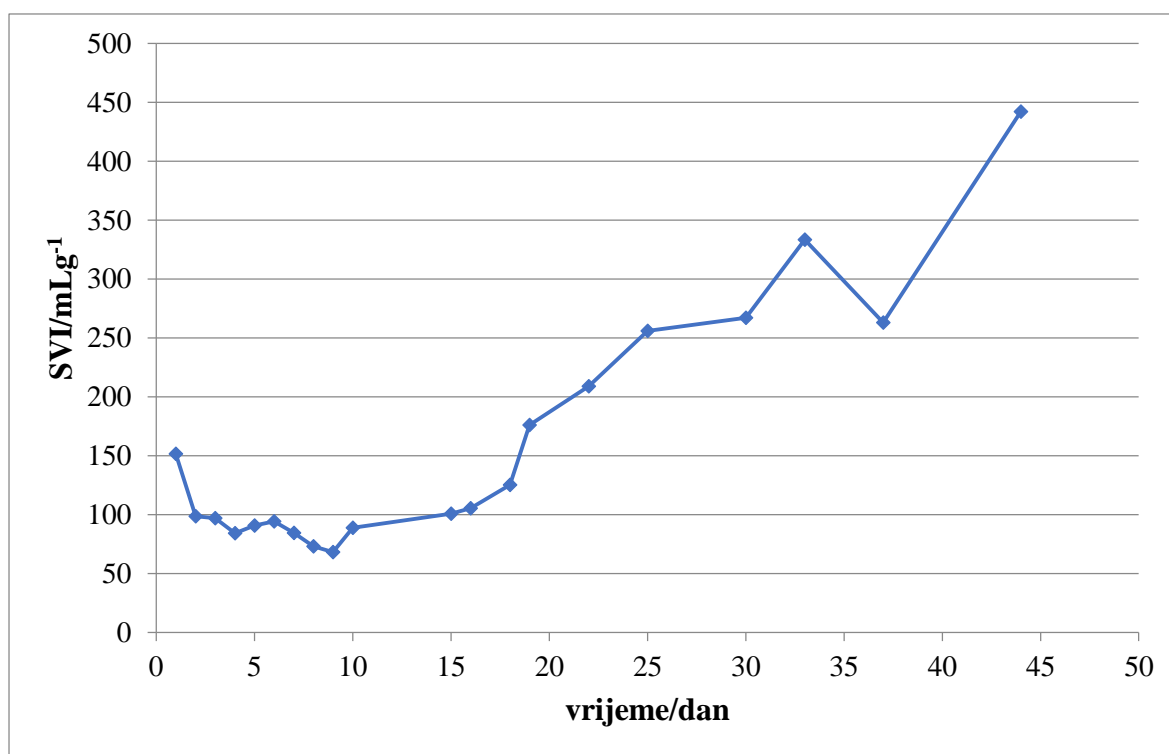


Prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (Narodne novine, 2013) dozvoljena koncentracija KPK u obrađenoj otpadnoj vodi varira zavisno od recipijenta u koji se otpušta – ako su površinske vode, dozvoljena KPK vrijednost je do  $125 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ , a ako je recipijent sustav javne odvodnje odnosno kanalizacija, dozvoljena je KPK do  $700 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ . Sintetička otpadna voda odnosno influent Pokusa 1 imao je KPK vrijednost oko  $2500 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  što je očito značajno više od dozvoljene koncentracije za ispuštanja. U Pokusu 1 prema priloženim rezultatima (Slika 11) može se vidjeti da je KPK vrijednost u nefiltriranom i filtriranom efluentu nakon biološke obrade prvih 25 dana bila ispod  $125 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  što znači da je zadovoljila zakonske regulative. Od 25.dana pa do 43.dana (kraj Pokusa 1) KPK vrijednost ne filtriranog efluenta bila je od  $156 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  do  $764 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ , a filtriranog efluenta ispod  $100 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ . Uzrok ovoj razlici u KPK vrijednostima ne filtriranog i filtriranog efluenta je ta da su u ne nefiltriranom efluentu bile prisutne suspendirane čestice mulja koje se loše taložio u toj fazi pokusa kao što je vidljivo iz koncentracije suspendirane tvari u efluentu na slici 12, a s obzirom da je mulj građen od organske tvari, onda se i on oksidira pri određivanju KPK. KPK u efluentu se mogao trošiti za rast OHO ili PAO. Kasnije u raspravi i rezultatima će se vidjeti da je u Pokusu 1 KPK trošen samo za OHO.



**Slika 12.** TSS efluenta Pokusa 1

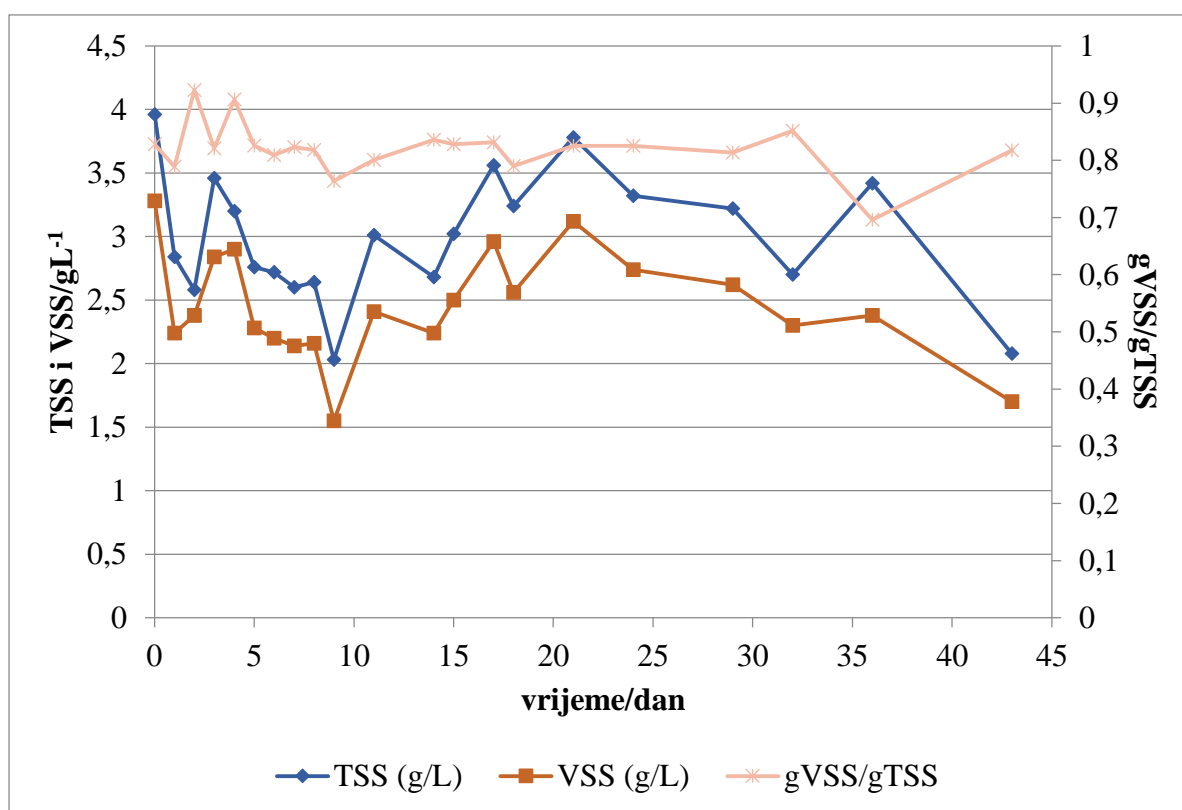
Indeks mulja ili eng. sludge volume indeks (SVI) je parametar kontrole procesa koji određuje brzinu recikliranja mulja i služi za procjenu sposobnosti taloženja taloga mulja u biološkim procesima obrade otpadnih voda pomoću aktivnog mulja. Standardna je mjera fizikalnih svojstava procesa aktivnog mulja i određuje se kao volumen (u mL) zauzet s 1 gram aktivnog mulja nakon taloženja tekućine 30 minuta. Važno je dopustiti talogu da se smiri i istaloži pa je preporučljivo SVI analizu provoditi u mirnoj okolini, izvan izravnog sunčevog svjetla, gdje neće doći do naglih udarača ili vibracija koji bi mogli poremetiti točnost mjerenja. Preporučena SVI vrijednost je od 50 do 150 mLg<sup>-1</sup> ili manje. SVI je vrlo važan parametar jer bez dobre taloživosti mulja ne može biti učinkovite obrade u SBR uređaju što je vidljivo i iz rezultata na slikama 11 i 12.



**Slika 13.** SVI mulja Pokusa 1

Rezultati na slici 13 prikazuju da prvih 20 dana Pokusa 1 vrijednosti SVI su bile u preporučenim vrijednostima. Efluent pri ovim SVI vrijednostima je bistar i dobre kvalitete, a mulj se obično polagano ustaljuje i zarobljuje više čestica tvori, budući da formira jedinstveni sloj prije taloženja. Uobičajeno, ovakav mulj čine nepravilno oblikovane flokule s par filamenata koji svojom čvrstoćom omogućuju bakterijama koje stvaraju flokule da se međusobno prilipe i koloniziraju svoju okolinu. Od 21.dan pa do kraja Pokusa 1, SVI vrijednosti su proporcionalno rasle i dosegnule vrijednost od 442 mLg<sup>-1</sup>. Na ovom povišenom

SVI, mulj se sporo ustaljuje i slabo se zbija te je niske gustoće i izgleda lagano i pahuljasto. Postoji nekoliko razloga zbog kojih SVI može biti visok. U ovom slučaju, vjeruje se da je visoki SVI posljedica raspršivanja vlaknastog mulja. Pri tome je mulj sačinjen od laganih flokula koje sadrže duge niti odnosno filamente koji se protežu iz čestice i dodiruju filamente drugih čestica. Ili, filamenti mogu biti unutar flokula uzrokujući raspršenu, otvorenu flokularnu strukturu pa tekućina iznad sloja mulja je obično vrlo čista dok mulju treba dugo da se ustali ili se uopće ne ustali niti se istaloži. Dobro je poznato da su filamentozne flokule mulja slabije aktivnosti pa Pokus 1 nije bio provodjen maksimalnom kvalitetom. Stoga, prema ovim rezultatima može se ustanoviti da je aktivni mulj najvjerojatnije počeo odumirati pa je i zbog toga došlo do formiranja neprikladnih flokula aktivnog mulja i proces biološkog uklanjanja KPK je bio ugrožen.



**Slika 14.** TSS, VSS i omjer gVSS/gTSS mulja u Pokusu 1

Na slici 14 prikazano je kretanje koncentracije mulja i njegovih frakcija tijekom Pokusa 1. Koncentracija mulja ovisi o nekoliko faktora: volumen bioreaktora, učinkovitost biološke obrade i prijenos kisika (Matošić, 2015). Ako je veća koncentracija mulja, volumen bioreaktora u kojem se provodi proces obrade je manji. Primijećeno je da pri višim koncentracijama mulja učinkovitost biološkog procesa obrade vode je veća pošto kod većih

koncentracija je veća i brzina difuzije otpadnih tvari u bakterijsku stanicu, a ako se radi u manjem bioreaktoru i koncentracija otopljenih organskih tvari je veća pa je difuzija brža. Što znači da ako je cilj procesa obrade veća učinkovitost onda mora koncentracija mulja biti veća no do određene vrijednosti jer je zapaženo da daljnje povećanje koncentracije mulja nema gotovo nikakav utjecaj na daljnje povećanje učinkovitosti. Kisik je neophodan za odvijanje procesa obrade stoga je njegov prijenos ključan faktor o kojem ovisi koncentracija mulja. Problem kod prijenosa kisika u procesu obrade je taj da aktivni mulj i njegove komponente negativno utječu na njegovu brzinu što znači da će za otapanje iste količine kisika trebati više zraka za njegovo otapanje u mulju nego u vodi stoga za veću koncentraciju mulja treba više zraka za aeraciju (Matošić, 2015). Volumen bioreaktora Pokusa 1 je bio 2 L, a koncentracija mulja  $5,68 \text{ gL}^{-1}$ , a aktivni mulj je u aerobnoj fazi imao koncentraciju kisika preko  $2 \text{ mgL}^{-1}$  pa su stoga zadovoljeni predloženi uvjetii osigurana je učinkovitost procesa obrade.

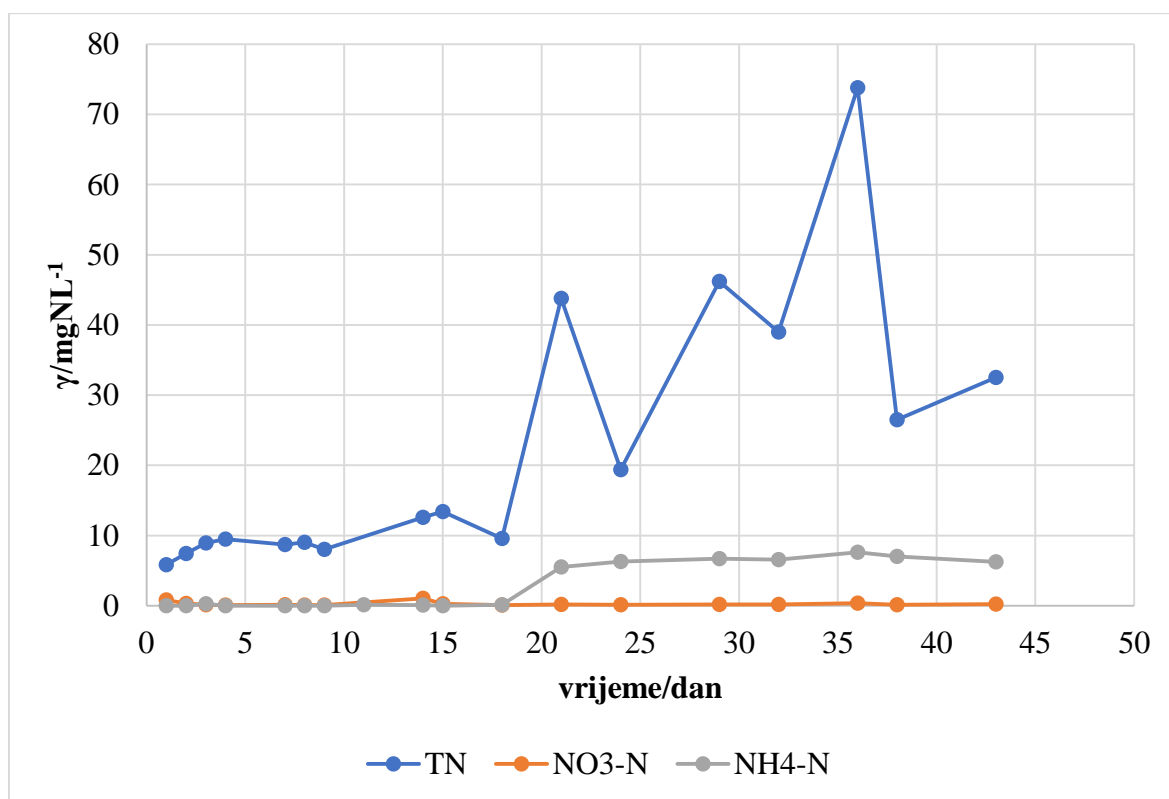
TSS (eng. total suspended solids) se koristi za označavanje koncentracije ukupne suspendirane tvari u aktivnom mulju te za procjenu koncentracije biomase jer bi trebala biti proporcionalna koncentraciji biomase u mulju procesa obrade (Cano i sur, 2014). Pod TSS spadaju sve suspendirane organske razgradive i nerazgradive tvari koje su došle otpadnom vodom, žive bakterije, ostaci odumrlih bakterija i anorganske suspendirane tvari koje su došle otpadnom vodom (Matošić, 2015). VSS (eng. volatile suspended solids) je organski dio ukupne suspendirane tvari. Određuje se jer predstavlja točniju koncentraciju biomase u aktivnom mulju od TSS. U VSS spadaju žive bakterije, ostaci odumrlih bakterija i organske razgradive i nerazgradive tvari koje su došle otpadnom vodom (Matošić, 2015).

TSS vrijednost je važan dio procesa obrade aktivnim muljem kako bi se osiguralo da postoji dostatna količina aktivne biomase koja će trošiti organske sastojke otpadne vode i time provoditi uspješnu obradu. Ako je vrijednost TSS previsoka znači da je proces sklon nakupljanju krutih tvari i sustav za obradu se preopterećuje, može uzrokovati pad prijenosa kisika što smanjuje učinkovitost uklanjanja fosfora i taloženje mulja. Osim toga, potrebna je prekomjerna aeracija koja troši električnu energiju i stvara se debela pjenu u gornjem sloju. Ako je TSS prenizak, proces obrade nije uklonio dovoljno organske tvari iz otpadnih voda, a starost mulja je preniska kako bi se omogućila obrada. Poželjna koncentracija TSS u otpadnim vodama je  $2 \text{ gL}^{-1}$  do  $4 \text{ gL}^{-1}$ .

Vrijednost TSS Pokusa 1 je prema rezultatima na slici 14 bila prvih 20 dana između  $2 \text{ gL}^{-1}$  i  $3 \text{ gL}^{-1}$ , a potom je do kraja pokusa vrijednost bila na oko  $3,5 \text{ gL}^{-1}$  što znači da je bilo dovoljno aktivne biomase koja je trošila organske sastojke influenta. Kako bi se znala točna koncentracija biomase u aktivnome mulju Pokusa 1, izračunata je vrijednost VSS koja je

tijekom pokusa bila oko  $2,5 \text{ gL}^{-1}$ . Omjer  $\text{gVSS/gTSS}$  govori koliko organske tvari čini ukupnu suspendiranu tvar. Udio organske tvari u TSS je bila oko 80%.

Pošto su u ovome radu uvjeti sustava prilagođeni uspješnom rastu PAO, nitrificirajuće bakterije nisu bile u mogućnosti uspješno rasti i povećati svoju biomasu kao što se može i vidjeti na slici 15. Njihova prisutnost u aktivnome mulju je bila neizbježna zbog relativno visokog SRT pri kojemu se nitrificirajuće bakterije stignu namnožiti u bioreaktoru, pa se njihova aktivnost sprečavala dodatkom inhibitora alil-N tiouree (ATU) koji djeluje inhibirajuće na rast i metabolizam nitrificirajuće bakterije stoga nema nitrata u efluentu što se može i vidjeti iz priloženih rezultata na slici 15. Nepostojanje nitrata je odlično za rast PAO jer nitrat negativno utječe na uspješno odvijanje procesa biološkog uklanjanja fosfora zato što se u anaerobnoj fazi izvor ugljika (acetat u ovom slučaju) troši za denitrifikaciju koja je brži proces od procesa asimilacije acetata koji provode PAO. Pošto se denitrifikacija odvija samo u prisutnosti nitrata kojeg u influentu i efluentu nije bilo, moglo se ustanoviti da nije došlo ni do denitrifikacije pa je sav dodani acetat u anaerobnoj fazi mogao poslužiti za asimilaciju od strane PAO. No, ostali rezultati Pokusa 1 dali su naslutiti da su OHO najvjerojatnije rasle u aktivnom mulju pri čemu su za Krebsov ciklus koristile kisik u aerobnoj fazi, a ne nitrat u anaerobnoj jer ga zbog inhibicije s ATU nije ni bilo. Rast OHO se mogao jedino spriječiti samo ako su PAO asimilirali sav acetat u anaerobnoj fazi. S obzirom da svi rezultati pokazuju da je PAO bilo jako malo u mulju te da do kraja Pokusa 1 ih uopće nije bilo, može se ustanoviti da su OHO trošile acetat kao izvor ugljika (Wentzel i sur., 2008) i bile dominantni mikroorganizmi mulja.

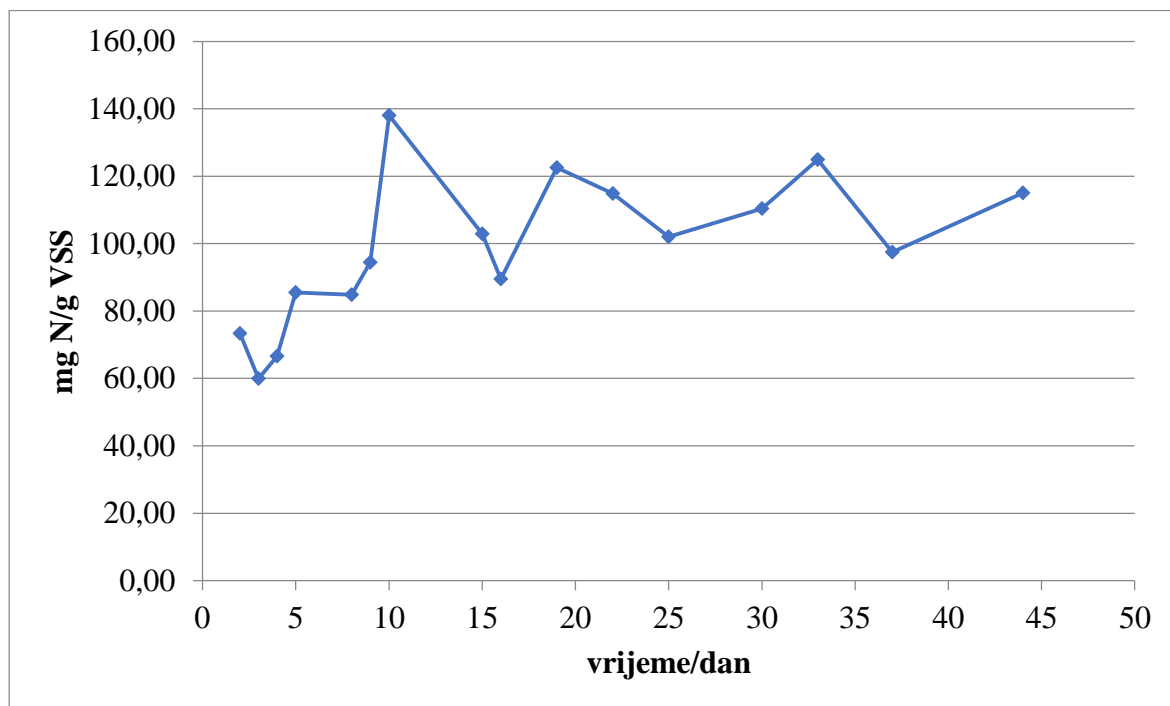


**Slika 15.** Koncentracija ukupnog dušika, amonija i nitrata u efluentu Pokusa 1

Koncentracija amonija u efluentu je bila minimalna do 20.dana Pokusa 1, potom je porasla na  $6,5 \text{ mgNL}^{-1}$  zadržala se na toj koncentraciji do kraja Pokusa 1. (Slika 15). Taj mali porast u koncentraciji amonija je bio posljedica povećanja koncentracije amonija u influentu sa  $70 \text{ mgNL}^{-1}$  na  $100 \text{ mgNL}^{-1}$ . Koncentracija amonija je povećana jer je u influentu koncentracija amonija bila dosta niska pa se željelo PAO dati dovoljno dušika za rast.

Koncentracija ukupnog dušika (eng. total nitrogen, TN) u influentu je bila između  $65 \text{ mgNL}^{-1}$  i  $120 \text{ mgNL}^{-1}$ . U prvih 20 dana pokusa TN je u efluentu smanjen na oko  $7 \text{ mgNL}^{-1}$ , a do kraja pokusa vrijednosti su varirale i bile čak  $73,8 \text{ mgNL}^{-1}$ . Razlog tome je što je za rast PAO i OHO potreban dušik pošto je on neophodan za neke ključne biološke procese kao sinteza aminokiselina, proteina, nukleotida, nukleinskih kiselina itd. Pošto svi rezultati ukazuju da u Pokusu 1 je bilo malo PAO ili ih uopće nije bilo, većinu je ukupnog dušika iz influenta trošio OHO za preživljavanje i rast biomase i zato su koncentracije TN u efluentu bile niske ( $5 - 15 \text{ mgNL}^{-1}$ ). No od 21.dana pa do 43.dana Pokusa 1, koncentracije TN u efluentu su bile visoke i moguće je da su posljedica većeg odumiranja biomase u mulju nego njenog rasta pa stoga nije bilo prisutno dovoljno živih, aktivnih mikroorganizama koji bi većinu TN influenta trošili na rast. Također je vjerojatno da je ta visoka koncentracija TN u efluentu posljedica izlivanja citoplazmatskog sadržaja liziranih stanica. Udio dušika u mulju

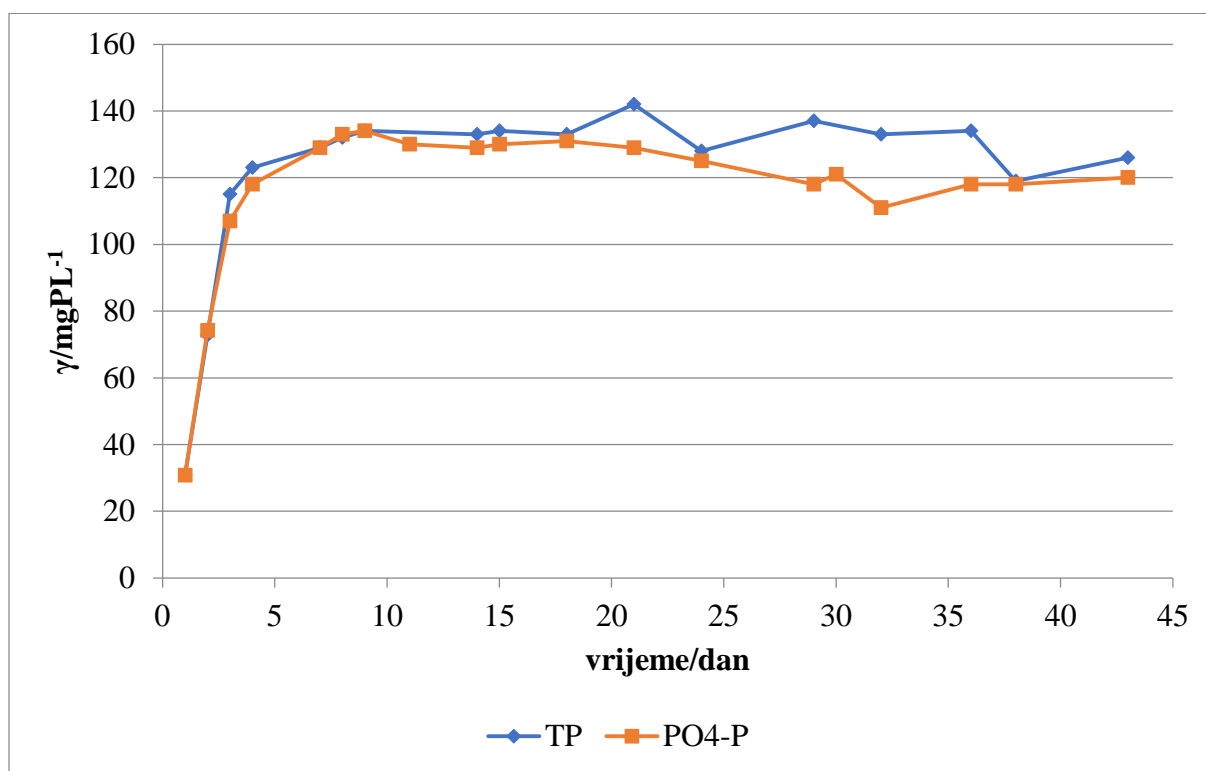
koji je prema literaturi oko 10% po VSS (Henze i sur., 2008), bio je u Pokusu 1 oko 100 mgN/gVSS (Slika 16) što odgovara poznatim podacima za bakterijske stanice. Dobiveni efluent ne bi zadovoljavao zakonske odredbe za maksimalnu koncentraciju TN u obrađenoj otpadnoj vodi uređaja 3. stupnja pročišćavanja za otpuštanje u površinske vode od 15 mgL<sup>-1</sup> dok je za otpuštanje u sustav javne odvodnje odnosno kanalizacije 50 mgL<sup>-1</sup> (Pravilnik, 2013), ali bi za uređaje kojima je propisan 2. stupanj pročišćavanja bez ograničenja za dušik i fosfor zadovoljio odredbe.



**Slika 16.** Udio dušika u VSS mulja Pokusa 1

Prisutnost PAO u aktivnom mulju je ključna za uspješno uklanjanje fosfora tijekom obrade otpadne vode jer mogu akumulirati veće koncentracije fosfora. Fosfor iz otpadne vode PAO uklanjaju tako da u aerobnoj fazi unose više fosfora za stvaranje polifosfata nego što su otpuštali u anaerobnoj fazi pa se na taj način koncentracija fosfora u efluentu smanjuje (Oehmen i sur., 2007). Fosfor se iz procesa uklanja tako da se mulj stalno odvodi, a s njim i fosfor. Mulj se treba odvajati na kraju aerobne faze kad PAO asimiliraju fosfor. Treba naglasiti da je bolje imati niži SRT jer se pri tome odvodi više mulja, a s njim i više fosfora dok pri višem SRT je omogućeno veće odumiranje PAO koji onda otpuste fosfor nazad u otopljenu fazu. Optimalna SRT vrijednost je 10 dana pri čemu se PAO mogu zadržavati u uređaju, a ujedno se odvodi veće koncentracije fosfora stoga je bitno stalno odvoditi mulj (Carrera i sur., 2001).

Fosfor se u influentu Pokusa 1 može pojaviti kao organski fosfor (eng. total phosphate; TP) i ortofosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) stoga su se pratila oba parametra. Koncentracija TP i  $\text{PO}_4^{3-}$  u influentu je bila oko  $150 \text{ mgPL}^{-1}$  pa prema zakonskim odredbama (Pravilnik, 2013) za uređaje 3. stupnja pročišćavanja ovakvoj otpadnoj vodi nije dopušteno otpuštanje u površinske vode i sustave za javno odvodnjavanje. Dobiveni rezultati prikazani na slici 17 upućuju na to da su u početku Pokusa 1 koncentracije TP i  $\text{PO}_4^{3-}$  bile gotovo identične te je prvih 20 dana obrade koncentracija TP i  $\text{PO}_4^{3-}$  pala na vrijednosti od  $30 \text{ mgPL}^{-1}$  do  $120 \text{ mgPL}^{-1}$  ( $30 \text{ mgP/gVSS}$  –  $60 \text{ mgP/gVSS}$ ). No, od 21. dana do kraja Pokusa 1 uklanjanje fosfora se usporilo na svega  $20 \text{ mgPL}^{-1}$  ( $30 \text{ mgP/gVSS}$ ) da bi pri kraju u potpunosti stagniralo. Očito se nešto dogodilo s bakterijskim stanicama u mulju što se vidi iz više razine organskog dušika (Slika 15) i organskog fosfora (Slika 17) u mulju što upućuje na odumiranje stanica.

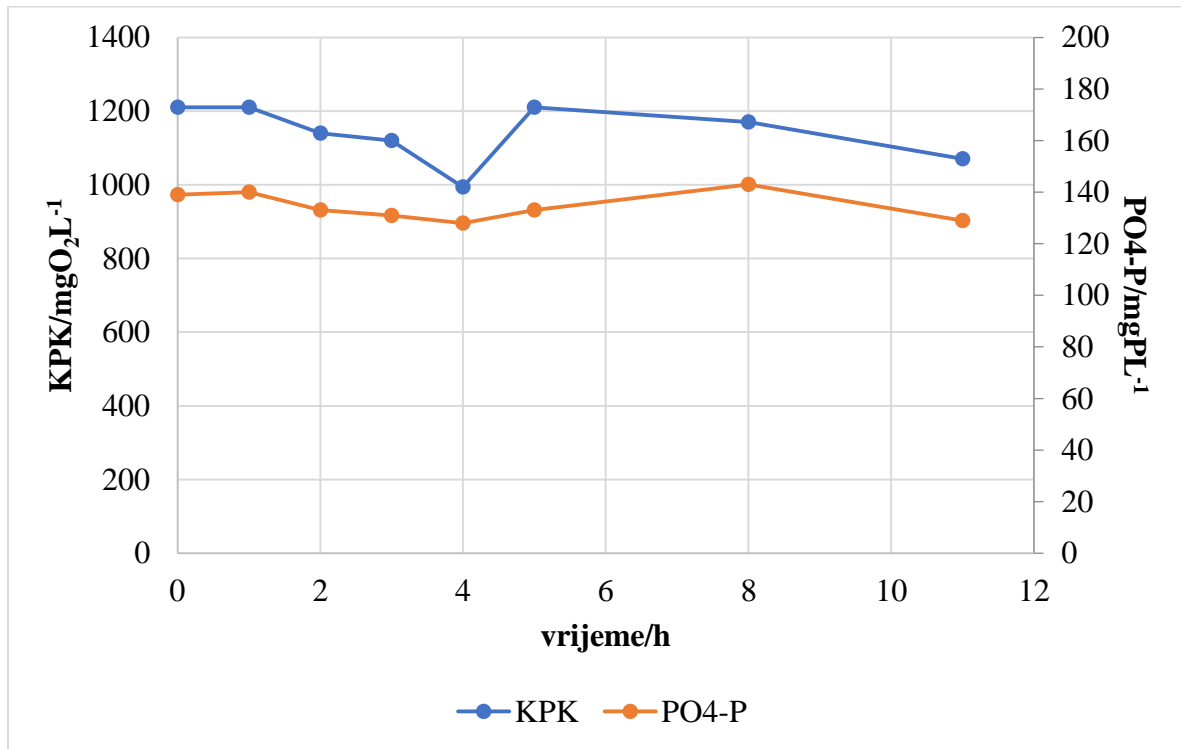


**Slika 17.** Koncentracija ukupnog fosfora i fosfata u efluentu Pokusa 1

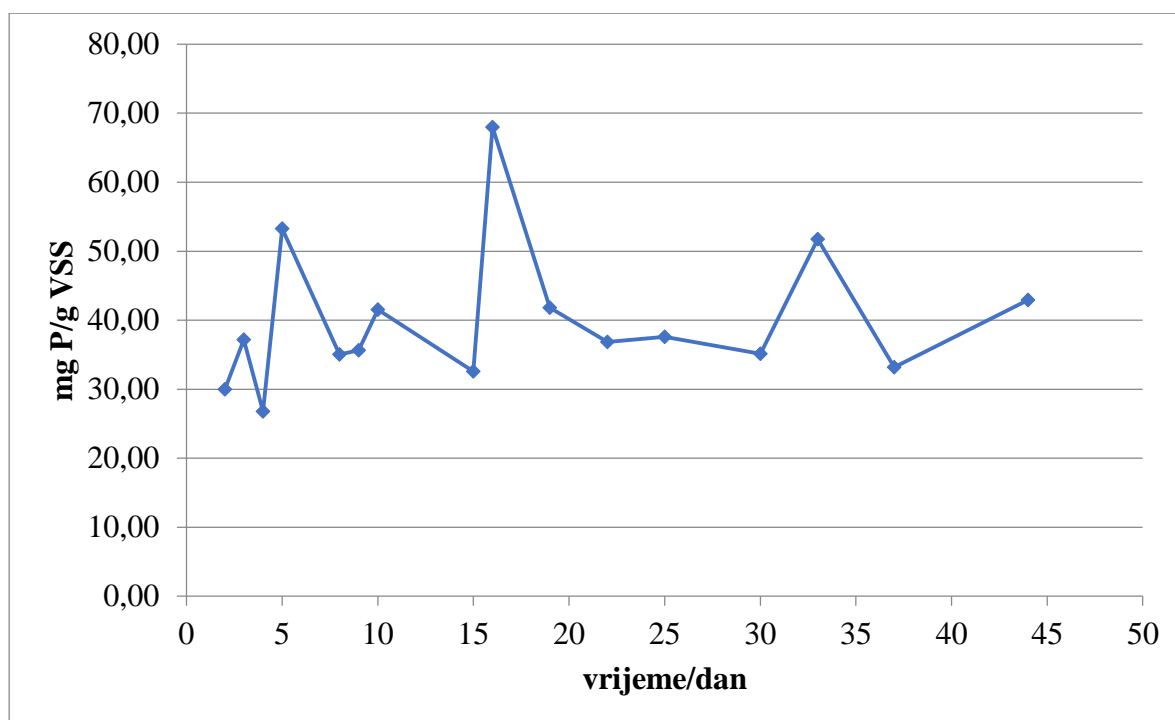
Tijekom Pokusa 1 je provedeno pet testiranja anaerobne aktivnosti PAO: 3., 10., 24., 30. i 45. dana pokusa. Rezultati svih testiranja bila su slična kao ovo pokazano na slici 18 i potvrđuju gubitak aktivnosti PAO ili inhibicije njihova rasta. Testiranje anaerobne aktivnosti PAO je provedeno s ciljem da se odrede maksimalne specifične brzine otpuštanja fosfora, asimilacije KPK i neto uklonjenog fosfora te je provedeno tijekom anaerobne faze i prema rezultatima nije bilo uspješno pa se željeni parametri nisu dobili. Pošto je uzorkovano i



analizirano tijekom trajanja anerobne faze, očekivano je da će koncentracija ortofosfata rasti zbog metabolizma PAO. Na slici 18 niti u bilo kojem provedenom testiranju u Pokusu 1 nema porasta u koncentraciji ortofosfata dok KPK vrijednost neznatno opada ili se stabilizira te nema promjena u njenoj vrijednosti karakterističnih za PAO. Prema ovim rezultatima, očito je da PAO nije tijekom anaerobne faze otpuštao ortofosfate što znači da najvjerojatnije nije bio ni prisutan u SBR bioraktoru pa nije dolazilo ni do asimilacije fosfora stoga prema ovim rezultatima SBR proces uklanjanja fosfora iz otpadne vode nije bio uspješan.



**Slika 18.** Rezultati testiranja anaerobne aktivnosti PAO 30.dana Pokusa 1



**Slika 19.** Udio fosfora u VSS mulja Pokusa 1

Analizom ostalih rezultata Pokusa 1, eliminirani su temperatura i pH procesa, prisutnost GAO, koncentracija amonijaka, nitrata, KPK i omjer KPK/P kao mogući inhibitori aktivnosti PAO. Uvjeti procesa su bili prilagođeni optimalnom rastu PAO te su ujedno izbjegnuti uvjeti idealni za rast organizama koji akumuliraju glikogen (GAO) koji su glavni konkurenti za PAO pošto troše isti izvor ugljika, a ne pridonose uklanjanju fosfora prilikom obrade otpadne vode pa mogu remetiti uspješnost procesa (Lopez-Vazquez i sur., 2008). Koncentracija amonija nije dostizala visoke vrijednosti, a pH nije bio nizak pa stoga vjerojatno amonijak nije utjecao na preživljavanje PAO niti na uspješnost uklanjanja fosfora. Istraživanje Zhang i sur. (2011) sa četiri uzorka otpadnih voda domaćinstva s različitim KPK koncentracijama koje je bilo provedeno na početku aerobne faze, otkrilo je da je brzina uzimanja fosfora od strane PAO negativno reagirala na visoku KPK koncentraciju u aerobnoj fazi. Stopa uzimanja fosfora od strane PAO bila je negativna u odnosu na KPK vrijednost veću od  $200 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  u aerobnoj fazi te pri tim koncentracijama OHO imaju očitu prednost u konkurenciji s PAO. To može biti zbog činjenice da višak dostupnog KPK pod aerobnim uvjetima može dovesti do oslobađanja fosfora umjesto uzimanja (Guisasola i sur., 2004, Pijuan i sur., 2005). U Pokusu 1 KPK vrijednosti su na početku aerobne faze bile visoke pošto se KPK u anaerobnoj fazi nije trošio (Slika 18) stoga su moguće prisutne OHO predstavljale prijetnju PAO. Svi ostali rezultati također pokazuju da su OHO bile dominantne u aktivnome mulju Pokusa 1.

Promatranjem svih rezultata, najvjerojatniji uzročnik gubitka aktivnosti ili odumiranja biomase PAO je visoka koncentracija izvora ugljika odnosno natrijeva acetata u sintetičkoj otpadnoj vodi. Organski supstrati su neophodni za rast i metabolizam PAO. Brojne studije predlažu da su za uspješan proces uklanjanja fosfora, najbolji izvori ugljika natrijev acetat i propionat pa je za sintetičku otpadnu vodu u ovom radu odabran natrijev acetat. Hollender i sur. (2002) su ustanovili da je učinkovitost eliminacije biološkog fosfora najbolja s acetatom kao izvorom ugljika jer je bilo primijećeno najveće oslobađanje ortofosfata po molu ugljika te najviše skladištenje PHA, polifosfata i glikogena tijekom anaerobnih i aerobnih faza procesa obrade. Druga studija je dokazala da kada proces obrade u SBR uređaju traje do 50 dana, uklanjanje fosfora je bilo učinkovitije sa acetatom kao izvorom ugljika nego propionatom (Zeng i sur., 2013). Utvrđeno je da je  $30 \text{ mgL}^{-1}$  natrijeva acetata optimalna doza za biološko otpuštanje i uzimanje fosfora i dodavanje bilo koje veće koncentracije imalo je marginalni učinak na krajnje uklanjanje fosfora (Jones i sur., 1987) jer je povećanje doze natrijevog acetata s  $30$  do  $50 \text{ mgL}^{-1}$  rezultiralo samo neznatnim povećanjem (od 69 do 73%) u krajnjem uklanjanju fosfora.

Prekomjerno opterećenje organskim supstratima može biti inhibitorno na aktivnost i rast PAO pri čemu uzroci inhibicije mogu biti različiti. Randall i Chapin (1997) su među prvima primijetili inhibicijski efekt acetat na biološki proces uklanjanja fosfora. Rezultati su pokazali da visoke koncentracije bilo octene kiseline ili natrijeva acetata mogu uzrokovati neuspjeh procesa tipičan za bakterijsko ispiranje iz sustava zbog sporog rasta. Neuspjeh procesa rezultirao je prijenosom visokih koncentracija octene kiseline ( $200 \text{ mgL}^{-1}$ ) ili natrijeva acetat ( $800 \text{ mgL}^{-1}$ ) iz anaerobne zone, kroz anoksičnu zonu, do aerobne zone. Ove visoke koncentracije biorazgradivih organskih tvari u potpuno miješanoj aerobnoj zoni očigledno su bile odgovorne za proliferaciju filamentoznih mikroorganizma. Također se čini da visoka koncentracija supstrata pogoduju rastu bakterija koje ne uklanjaju fosfor kao što su OHO nego što pogoduje rastu PAO. Pokazali su da se kvaliteta procesa postupno smanjuje, a ne naglo. To podrazumijeva da je inhibicija procesa uzrokovana ispiranjem PAO iz aktivnog mulja, a ne gubitkom njihove aktivnosti ili smrti. Oni su i dalje obavljali proces uklanjanja fosfora dok god su u sustavu, a neuspjeh se javljao kad im je broj opao. Vjerojatno je visoka koncentracija acetata bila odgovorna za slab rast PAO u Pokusu 1.

Freitas i sur. (2009) su izvijestili da je uklanjanje fosfora pod jakim utjecajem dodatka acetata i da je povećana koncentracija acetata brzo povećala anaerobno otpuštanje fosfora kojeg PAO nisu naknadno aerobno uzimali. Posljedično tome, došlo je do smanjenja sposobnosti PAO da preuzmu acetat u sljedećim ciklusima. Inhibicija uzimanja fosfora nakon

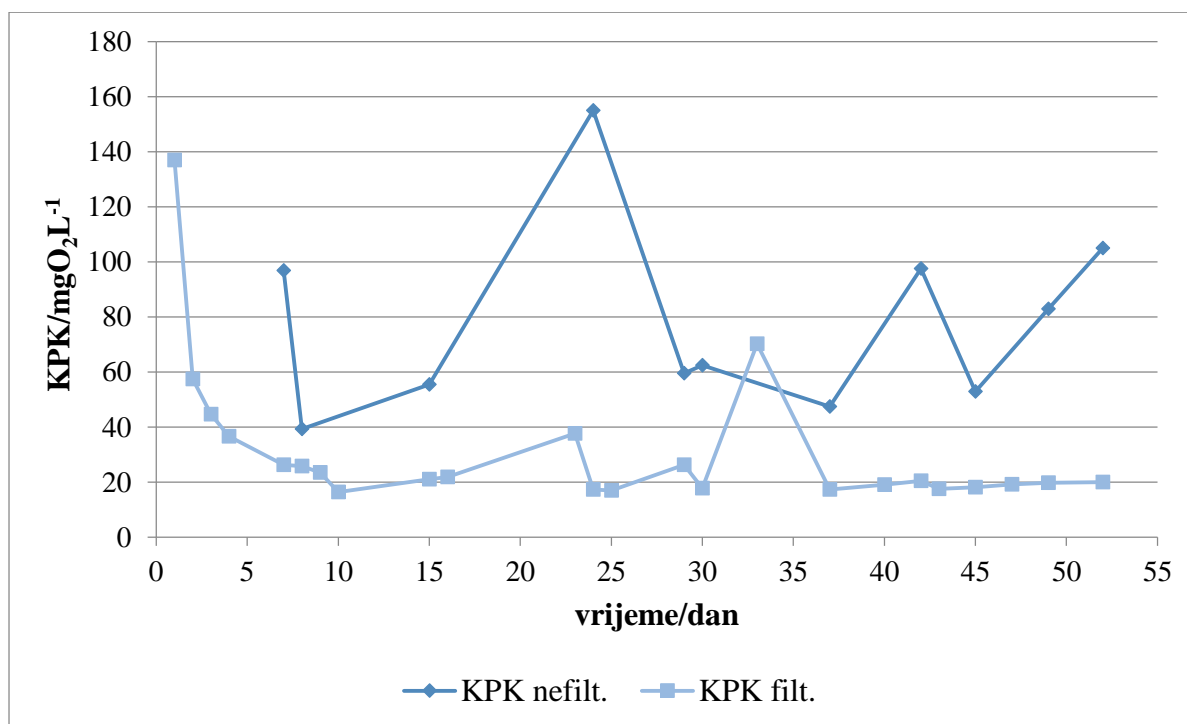
dotatka veće koncentracije acetata je vjerojatno i posljedica proliferacija OHO. Opisana je situacija moguća i u Pokusu 1 budući da je influent imao  $3400 \text{ mgL}^{-1}$  natrijeva acetata pa je u aerobnoj fazi bila prisutna velika količina organskog supstrata, a OHO imaju veću brzinu rasta od PAO. Moguće je i da je znatan dio populacije PAO ispran zbog njihove nemogućnosti da se dobije anaerobno otpuštanje fosfora i uzimanje aerobnog fosfora te zbog visoke stope ispiranja mulja zbog slabog taloženja mulja (Slika 13).

Treća mogućnost gubitka aktivnosti, smanjene razine uklanjanja fosfora i pad rasta PAO je inhibicija transportnih sustava stanica PAO. Fosfor može ući u stanicu pomoću jednog od dva moguća mehanizma (Carberry i Tenney, 1973; Jones i sur., 1987): mehanizam kontroliran difuzijom potaknut pozitivnim gradijentom koncentracije između vanjske i unutarnje stanice, ili aktivni transport. Da bi došlo do difuzije, mora postojati koncentracijski gradijent pri čemu se fosfor prenosi s veće koncentracije na nižu koncentraciju. Stoga ako je koncentracija fosfora u mediju za rast veća od one unutar bakterijske stanice, fosfor će difundirati u stanicu. Aktivni transport ovisi o energiji (ATP) dobivenoj iz metaboličkih procesa unutar stanice koja pokreće transportni mehanizam koji uzrokuje da fosfor ulazi u stanicu protiv negativnog gradijenta koncentracije odnosno s područja niže koncentracije u područje više koncentracije. Natrijev acetat se prema istraživanjima Tu i Schulera (2013) u PAO transportira aktivnim transportom te ovisi o proton-motornoj sili i ATPazi, enzimu oksidativne fosforilacije, a neovisan je od vanjskog pH. Ono što se moglo dogoditi, da je uzrokovalo pad aktivnosti PAO, njihovu inhibiciju rasta i smanjenu razinu uklanjanja fosfora, su mutacije u genima koji kodiraju za proteine koji sudjeluju u aktivnom transport i oksidativnoj fosforilaciji. Zbog toga PAO ne bi imao dovoljno energije niti hranjiva koju ne bi mogao ni transportirati i došlo bi do njihovog odumiranja pa bi OHO bili jedini mikroorganizmi u mulju. No, ova hipoteza je najmanje vjerojatna i trebale bi opsežne genetičke analize kako bi se mogla potvrditi.

Čini se da je najvjerojatnija hipoteza koja se dogodila u Pokusu 1 ona koju su zamijetili i Randall i Chapin (1997). Dakle, visoke koncentracije natrijeva acetata uzrokovale su inhibiciju procesa uklanjanja fosfora slabim rastom i ispiranjem PAO iz aktivnog mulja, a ne gubitkom njihove aktivnosti ili smrti. Također je dolazilo do proliferacije filamentoznih mikroorganizma na što upućuju i rezultati slike 13, a očito je po svim rezultatima da su visoke koncentracije natrijeva acetata pogodovale rastu OHO pa su one bile dominantni mikroorganizmi aktivnog mulja.

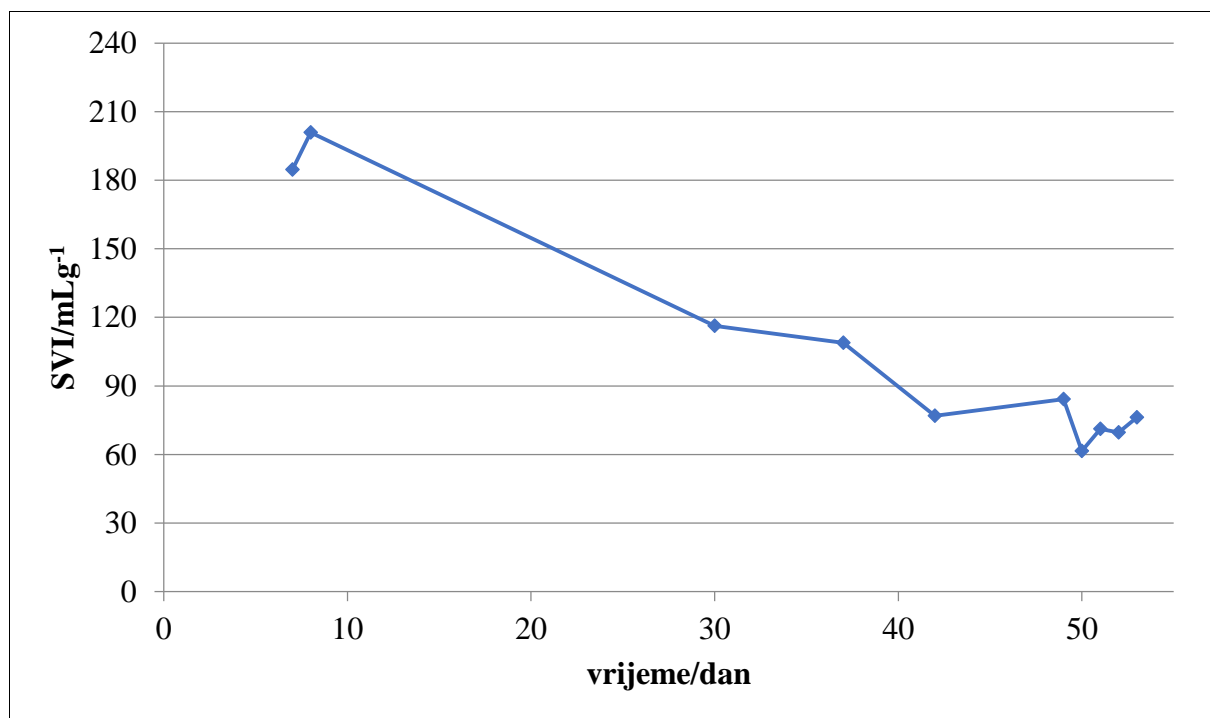
## 4.2. Pokus 2 – niska koncentracija acetata

Kako je spomenuto u Pokusu 1, kemijska potrošnja kisika (KPK) je korisna mjera kakvoće vode i koristi se za jednostavno kvantificiranje količine oksidirajućih zagađivača koji se nalaze u površinskoj ili otpadnoj vodi. Ako je razina KPK viša znači da je veća količina oksidirajućeg organskog materijala u otpadnoj vodi pa je manja razina otopljenog kisika stoga treba smanjiti KPK vrijednost u takvoj otpadnoj vodi prije ispuštanja u prirodu. Influent Pokusa 2 imao je KPK vrijednost od  $500 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  do  $1000 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  što znači da se prema zakonskim odredbama navedenim u Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (Narodne novine, 2013) ne bi smio otpuštati u površinske vode i u sustave javne odvodnje pa je prema tome potrebna obrada influenta prije ispuštanja. U Pokusu 2 prema rezultatima (Slika 20), KPK vrijednost u ne filtriranom i filtriranom efluentu je nakon 52 dana (kraj Pokusa 2) biološke obrade influenta bila ispod  $120 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$  što znači da je zadovoljila zakonske regulative. Vrijednosti su iz dana u dan oscilirale, no nisu nikada prešle gornju granicu, stoga se može ustanoviti da je uspješno smanjena količina oksidirajućeg organskog materijala pa time nije došlo do smanjene razine otopljenog kisika, što znači da se trošio za rast PAO ili OHO. Ti su mikroorganizmi bili aktivni i imali su dovoljno kisika na raspolaganju za rast biomase u aerobnoj fazi, a prema rezultatima koji slijede će se vidjeti da su PAO bili prisutni u aktivnome mulju i da se odvijao proces uklanjanja fosfora.



Slika 20. KPK efluenta Pokusa 2

Važan parametar SBR procesa je indeks mulja (SVI) koji služi za procjenu sposobnosti taloženja mulja u biološkim procesima obrade otpadnih voda te bez dobre taloživosti mulja ne može biti učinkovite obrade. Preporučena SVI vrijednost je od 50 do 150 mLg<sup>-1</sup> ili manje. Rezultati na slici 21 prikazuju da tijekom Pokusa 2 vrijednosti SVI su bile ispod 150 mLg<sup>-1</sup>. Mulj se taložio brzo nakon početka ispitivanja SVI te je bio izvrsne kvalitete s dobrim balansom između žive i mrtve biomase. Za razliku od efluenta Pokusa 1, efluent Pokusa 2 je pri ovim SVI vrijednostima je bio bistar i dobre kvalitete, mulj je bio gust i imao je karakteristiku brzog taloženja, a flokule su bile granulirane. Po ovim rezultatima, očito je da su PAO bili u povoljnom okruženju i da nije bilo većih prijetnji uspješnosti procesa uklanjanja fosfora.

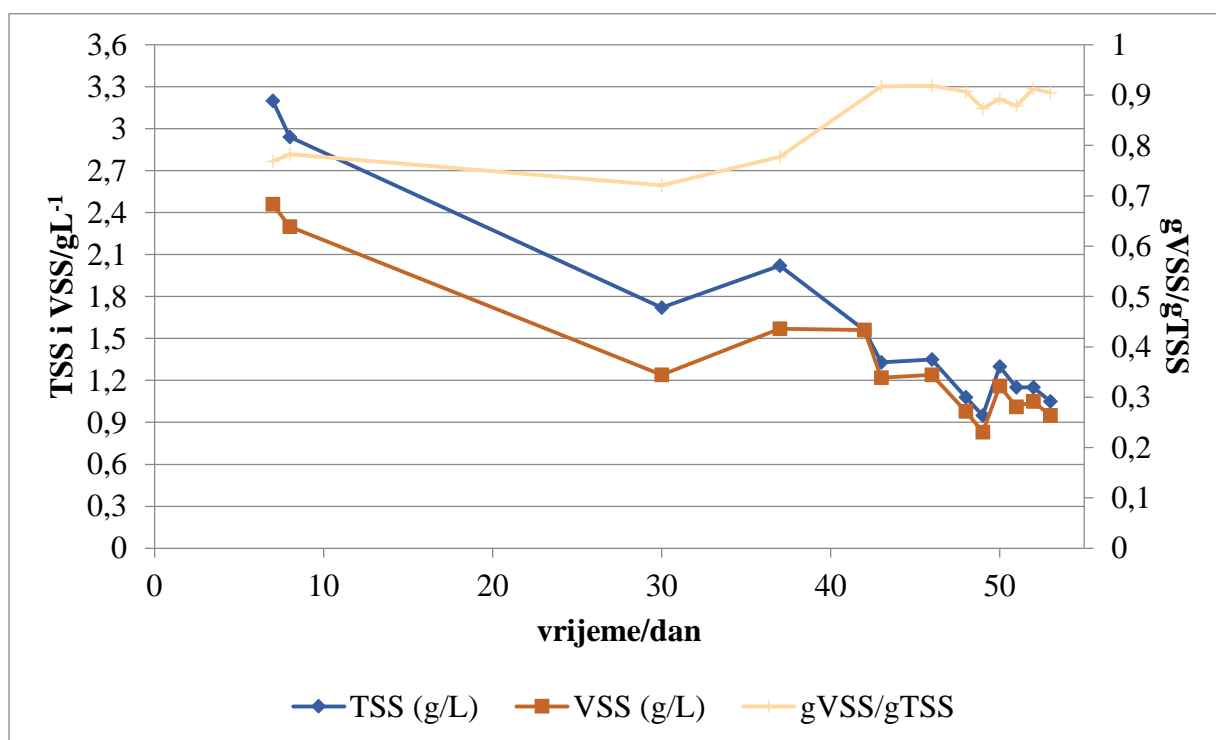


**Slika 21.** SVI mulja Pokusa 2

Kretanje koncentracije mulja i njegovih frakcija tijekom Pokusa 2 je prikazano na slici 22. Kako je spomenuto u Pokusu 1 koncentracija mulja ovisi o nekoliko faktora: volumen bioreaktora, učinkovitost biološke obrade i prijenos kisika (Matošić, 2015). Pošto je cilj ovog procesa obrade veća učinkovitost obrade onda je koncentracija mulja morala biti veća, a ako je veća koncentracija mulja, volumen bioreaktora u kojem se provodi proces obrade bio bi manji. Također je prijenos kisika ključan faktor jer je kisik neophodan za rast i preživljavanje biomase. Volumen bioreaktora Pokusa 2 je bio 2 L, koncentracija mulja 5,68 gL<sup>-1</sup>, a aktivni

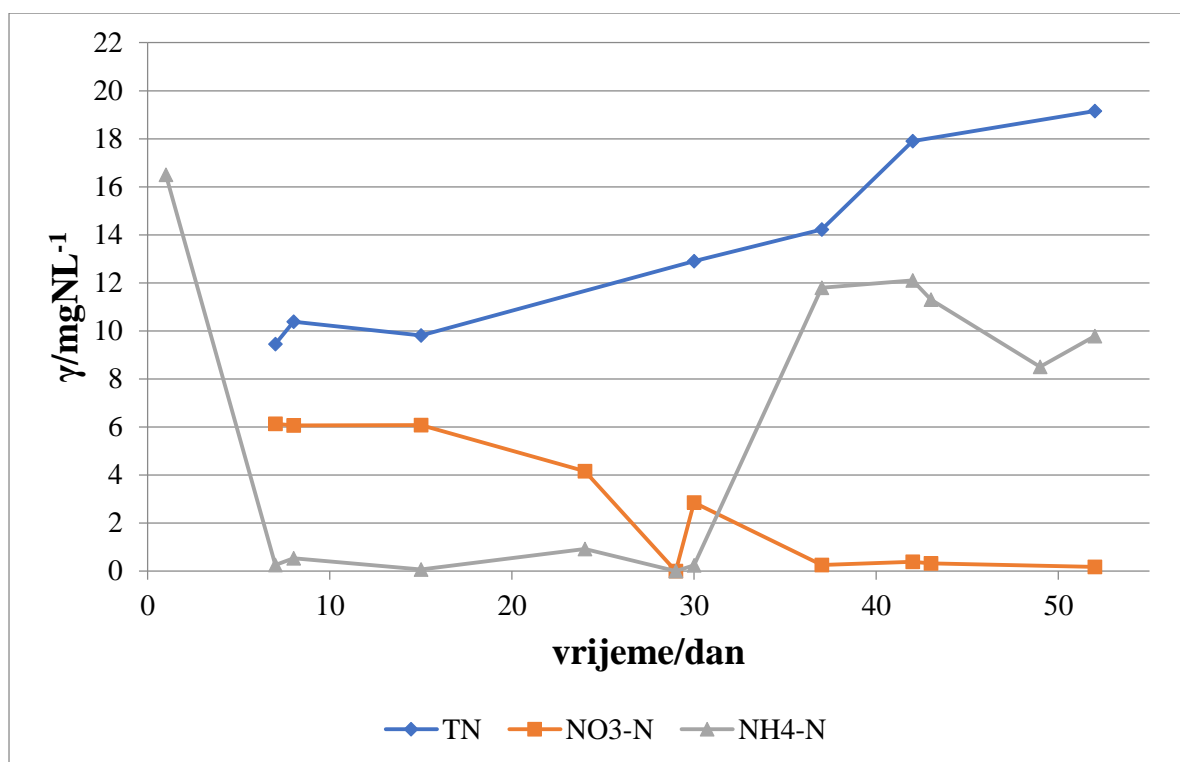
mulj je u aerobnoj fazi imao koncentraciju kisika preko 2 mg/L što znači da su bili zadovoljeni predloženi uvjeti za učinkovit procesa obrade.

Važan parametar procesa obrade aktivnim muljem je TSS vrijednost jer omogućuje da se prati dostatna količina aktivne biomase u mulju koja će trošiti organske sastojke otpadne vode i time provoditi uspješnu biološku obradu influenta. Optimalna koncentracija TSS u otpadnim vodama je između 2 gL<sup>-1</sup> i 4 gL<sup>-1</sup>. U Pokusu 2 TSS vrijednost je prema rezultatima na slici 22 bila prvih 30 dana između 2,1 i 3 gL<sup>-1</sup>, a potom je opala na oko 1,3 gL<sup>-1</sup> i ta se vrijednost zadržala do kraja pokusa. Razlog ovom nižem TSS je taj što prvih mjesec dana nije odvođen višak mulja iz bioreaktora nego se dopustilo mulju da se aklimatizira na nove uvjete u okolini. Određivana je i vrijednost VSS kako bi se znala točnija koncentracija biomase u aktivnome mulju i ta je vrijednost pala nakon 30 dana s 2,4 gL<sup>-1</sup> na 1,2 gL<sup>-1</sup> iz istih razloga kao i TSS. Udio organske tvari u TSS (gVSS/gTSS) je na početku Pokusa 2 bila oko 70%, a kasnije je porasla na oko 90%. Niži udio VSS u prvoj fazi može se pripisati većoj količini anorganske suspendirane tvari koja je došla zajedno s muljem iz sarajevskog uređaja i tipična je za mulj koji obrađuje komunalne otpadne vode. Nakon što se višak mulja počeo odvoditi nakon 31. dana da bi se održavao SRT od 10 dana, udio VSS je rastao jer je anorganska suspendirana tvar odvođena, a umjesto nje su u mulju rasle žive bakterije čiji je udio VSS u TSS oko 87% (Henze i sur., 2008).



**Slika 22.** TSS, VSS i omjer gVSS/gTSS mulja u Pokusu 2

Kao u Pokusu 1, i u Pokusu 2 su uvjeti prilagođeni rastu PAO, no pošto u aklimatizacijskom periodu u trajanju od 30 dana nije odvođen mulj rezultati na slici 23 prikazuju nešto drugačiju situaciju za koncentracije dušika u efluentu od rezultata slike 15. Može se vidjeti da je u prvih 31 dan bilo prisutnih nitrificirajućih bakterija koje su se stigle s originalnim muljem i koje su provodile nitrifikaciju što se vidi iz koncentracije nitrata od oko  $6 \text{ mgL}^{-1}$ .



**Slika 23.** Koncentracija ukupnog dušika, amonijaka i nitrata u efluentu Pokusa 2

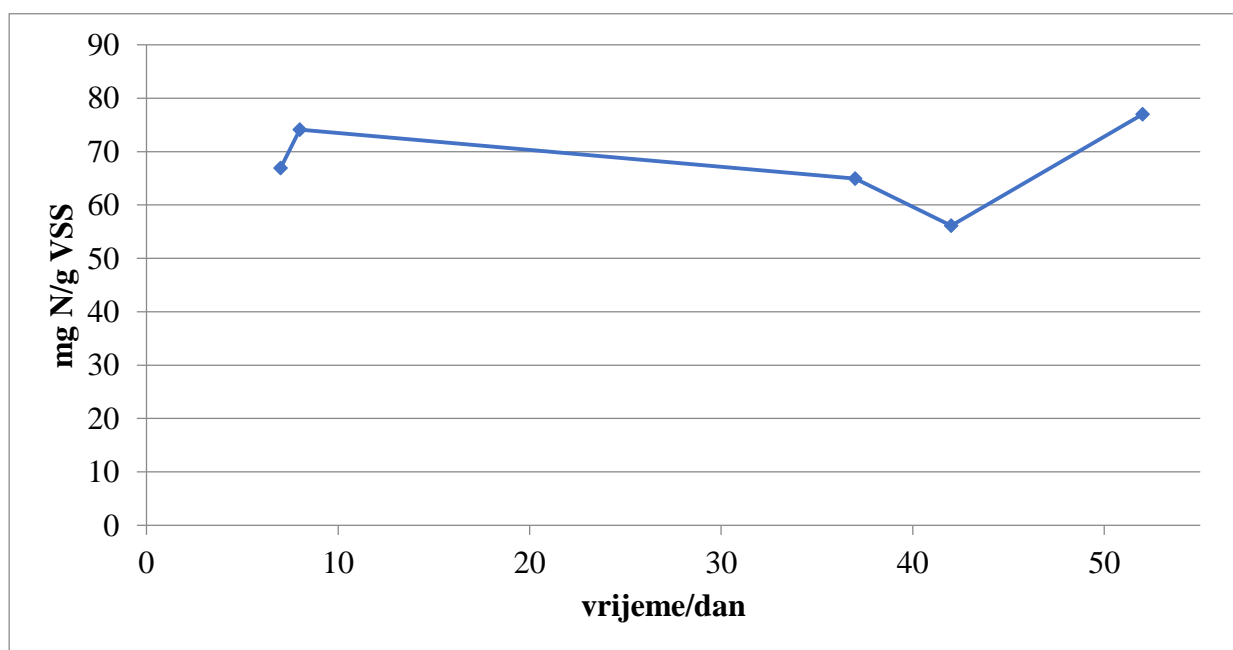
Kako je bilo nitrata onda se može ustanoviti da je bilo i OHO koje su u anaerobnoj fazi izvor ugljika – natrijev acetat trošile za denitrifikaciju koja je brži proces od procesa asimilacije acetata koji provode PAO kojih je također bilo u mulju (Slika 25 i 26). Kada je aklimatizacijski period završio i započelo se s održavanjem SRT, nitrificirajuće bakterije su se uklanjale iz procesa što se vidi po padu koncentracije nitrata na ispod  $1 \text{ mgNL}^{-1}$ , a da bi se zaustavio rast onih koje su preostale u aktivnom mulju dodavao se inhibitora alil-N tiouree (ATU) stoga do kraja Pokusa 2 više nije bilo nitrata u efluentu što se može i vidjeti iz priloženih rezultata. OHO su se također uklanjali, no oni sojevi koji su se zadržali u aktivnome mulju su rasli i asimilirali jedan dio natrijeva acetata kao izvor ugljika (Wentzel i sur., 2008) pri čemu su za Krebsov ciklus koristili kisik u aerobnoj fazi, a ne više nitrat u anaerobnoj. Samo ako su PAO asimilirali sav acetat u anaerobnoj fazi, tada bi se rast OHO



mogao spriječiti i iako rezultati na slikama 25 i 26 pokazuju da PAO jesu bili prisutni u aktivnome mulju, nije ih bilo dovoljno da bi provodili napredno uklanjanje fosfora odnosno njihova koncentracija nije bila prevelika pa nisu asimilirale sav acetat u anaerobnoj fazi i stoga je ostalo viška na raspolaganju za OHO.

Do kraja aklimatizacijskog perioda je koncentracija amonija u efluentu bila minimalna, a potom je porasla na oko  $12 \text{ mgNL}^{-1}$  (Slika 23). U početku je koncentracija amonija bila obrnuto proporcionalna koncentraciji nitrata odnosno sav amonij se trošio pri oksidaciji koju su provodile nitrificirajuće bakterije proizvodeći nitrata. Naravno, sigurno je da se jedan dio tog amonija trošio i za rast OHO i PAO. Porast u koncentraciji amonija nakon aklimatizacijskog perioda je bio posljedica povećanja koncentracije amonija u influentu sa  $20 \text{ mgNL}^{-1}$  na  $40 \text{ mgNL}^{-1}$  pošto se željelo PAO dati na raspolaganju dovoljno dušika za rast jer je amonija u efluentu do tada bilo premalo.

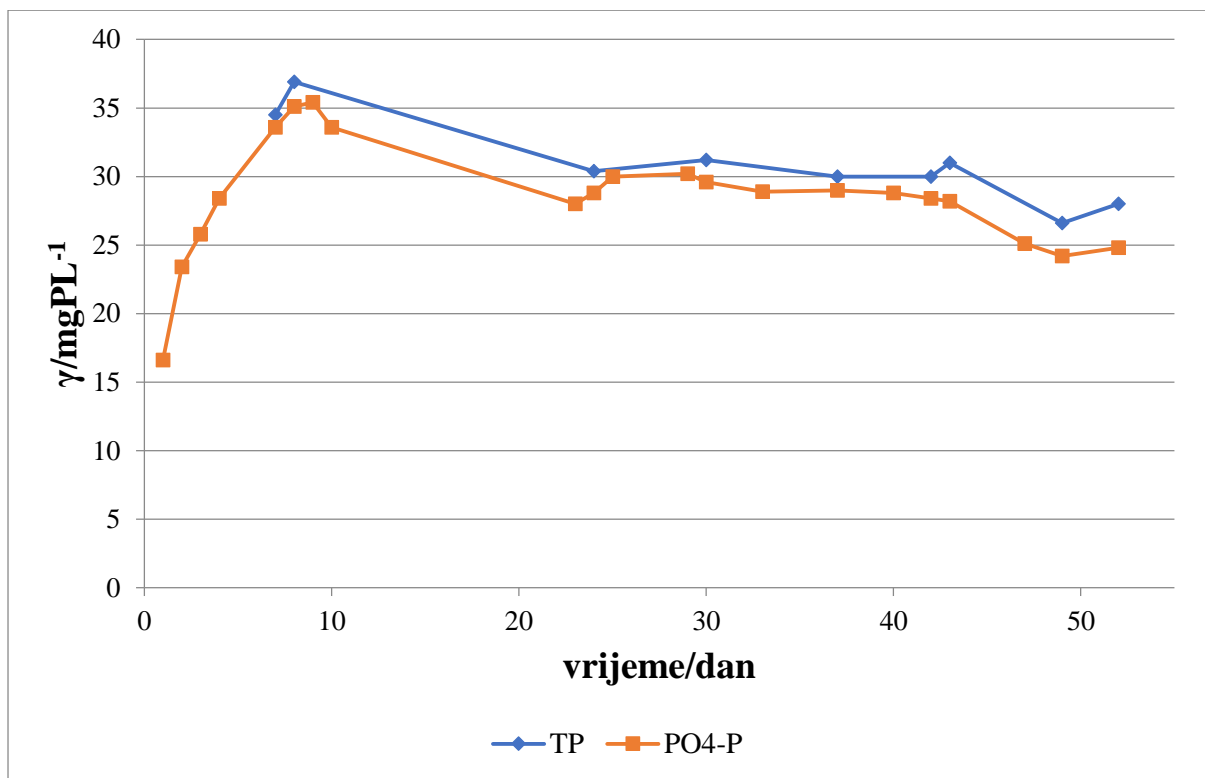
Koncentracija ukupnog dušika (eng. total nitrogen, TN) u influentu je bila između  $20 \text{ mgNL}^{-1}$  i  $40 \text{ mgNL}^{-1}$ . Za razliku od koncentracije TN Pokusa 1 (Slika 15), koncentracija TN je tijekom cijelog Pokusa 2 rasla što je najvjerojatnije bilo prvenstveno zbog povećanja koncentracije amonija, ali iz zbog organskog dušika prisutnog u mulju. Udio dušika u mulju je u Pokusu 2 bio oko  $80 \text{ mgN/gVSS}$  (Slika 24) što odgovara poznatim podacima za bakterijske stanice koje su prema literaturi oko 10% po VSS (Henze i sur., 2008).



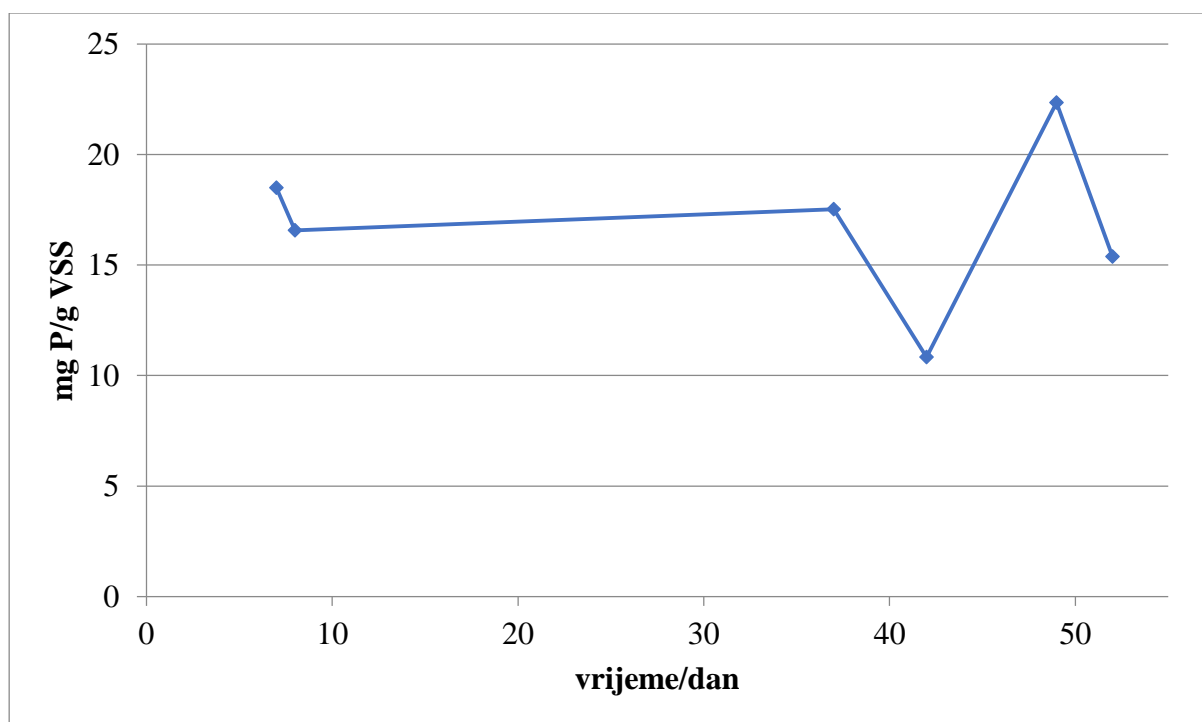
**Slika 24.**Udio dušika u VSS mulja Pokusa 2

Prisutnost PAO u aktivnom mulju ključna je za uspješno uklanjanje fosfora tijekom obrade otpadne vode jer mogu akumulirati veće koncentracije fosfora. U influentu Pokusa 2 se fosfor, kao i u influentu Pokusa 1, pojavljuje kao organski fosfor (total phosphate; TP) i ortofosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) pa su se pratila oba parametra.

Koncentracija TP i  $\text{PO}_4^{3-}$  u influentu je bila oko  $40 \text{ mgPL}^{-1}$  pa rezultati prikazani na slici 25 upućuju da je u početku procesa obrade uklanjano i do  $20 \text{ mgPL}^{-1}$  fosfora (razlika između  $40$  i  $20 \text{ mgPL}^{-1}$ ). Od 10. dana nadalje uklanjanje fosfora je bilo manje i u prosjeku se uklanjalo oko  $10 \text{ mgPL}^{-1}$  (razlika između  $40 \text{ mgPL}^{-1}$  u influentu i  $30 \text{ mgPL}^{-1}$  u efluentu). Parametri procesa bili su optimalno postavljeni za rast PAO: KPK vrijednost je bila optimalna stoga je razina kisika bila idealna za rast PAO biomase; temperatura i pH procesa su bili optimalni za rast i metabolizam PAO, a također je inhibiran rast GAO; SVI vrijednosti su pokazale da nije bilo filamentoznih bakterija u mulju i bilo je očito da su PAO bili u povoljnom okruženju. Pošto je proces u SBR trajao 54 dana, odabir natrijeva acetata kao jedini izvor ugljika je pogodovao rastu i aktivnosti PAO (Zeng i sur., 2013). Također je rastu PAO odgovarala odabrana koncentracija natrijeva acetata od  $1200 \text{ mgL}^{-1}$  u influentu. Samo koncentracija fosfora u efluentu nije dovoljan dokaz za prisutnost PAO zato što i OHO trebaju fosfor za svoj rast pa se smanjenje koncentracije fosfora u procesu može objasniti i rastom OHO. Zbog toga je napravljena analiza udjela fosfora u aktivnom mulju da se utvrdi koliko ima PAO. Iz literature je poznato (Henze i sur., 2008) da OHO imaju oko 2% fosfora u VSS dok PAO mogu imati i do 13%. Iz rezultata na slici 26 vidljivo je da je udio fosfora u VSS i nešto manji od 2% pa to upućuje da je OHO činio većinu biomase.

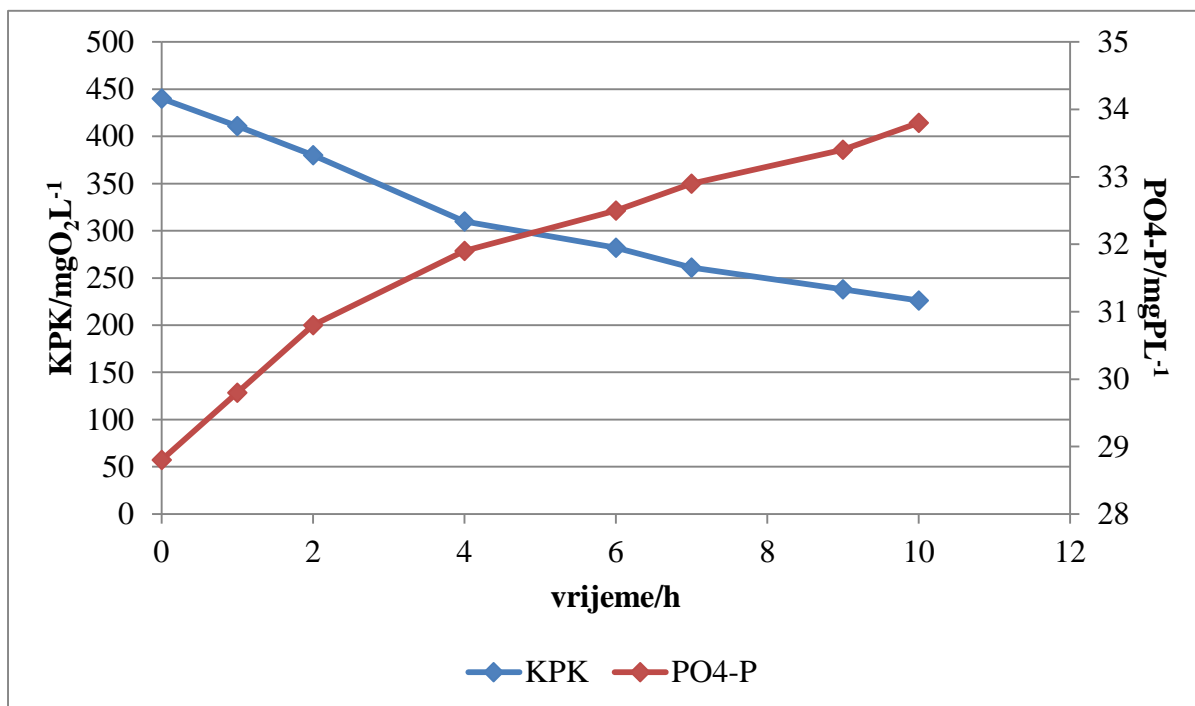


**Slika 25.** Koncentracija ukupnog fosfora i fosfata u efluentu Pokusa 2



**Slika 26.** Udio fosfora u VSS mulja Pokusa 2

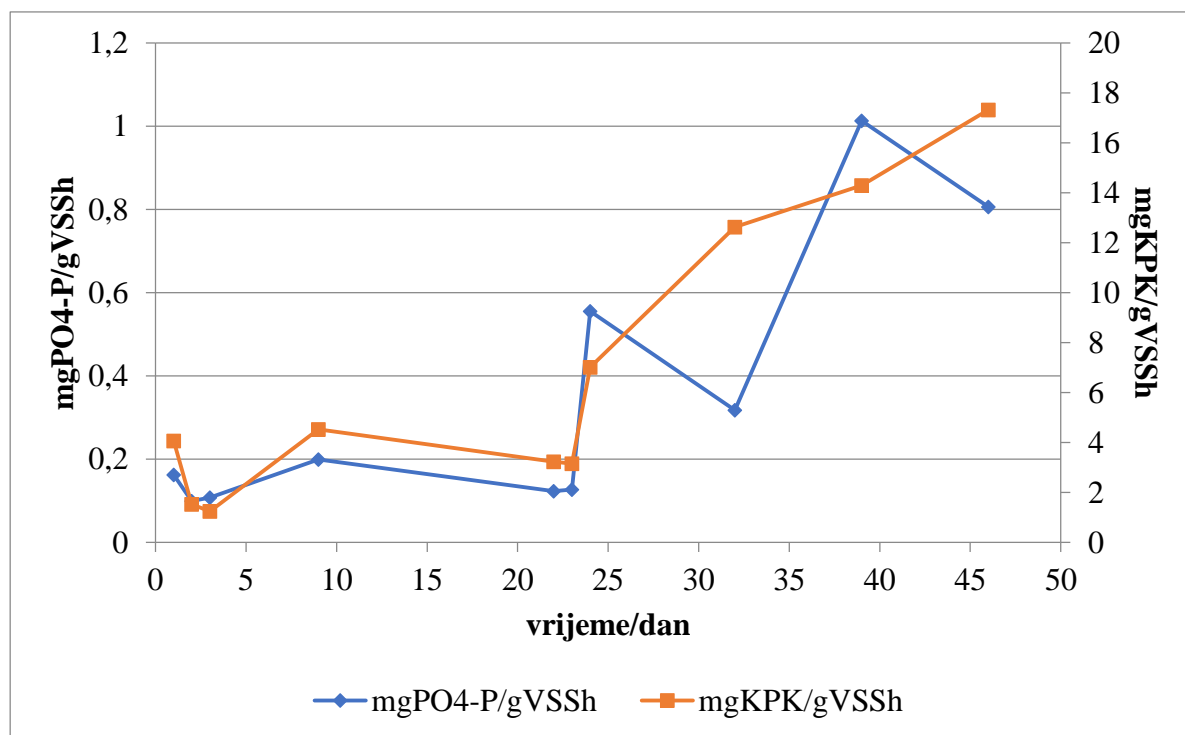
Da bi se ipak utvrdila i potvrdila aktivnost PAO u mulju napravljena su testiranja biološke aktivnosti PAO prikazana na slici 27. Kao u Pokusu 1 i u Pokusu 2 je provedeno testiranje kako bi se odredile maksimalne specifične brzine otpuštanja fosfora, asimilacije KPK i neto uklonjenog fosfora. Provedeno je ukupno devet testiranja: 1., 2., 3., 4., 9., 22., 32., 39. i 46.dana pokusa, a da bi se uštedjelo na prostoru, dobivene koncentracije u testiranju prikazane su samo za 46. dan, a ostala testiranja su prikazana sumarno kroz maksimalne specifične brzine anaerobnog otpuštanja fosfora i asimilacije KPK prikazane na slici 28. Pošto je uzorkovano i analizirano tijekom trajanja anerobne faze, aktivnost PAO trebala je pokazati rast koncentracije ortofosfata i pad koncentracije KPK. Na slici 27 je očititi porast u koncentraciji ortofosfata i pad u koncentraciji KPK vrijednost koji se trošio za rast PAO. Prema ovim rezultatima, ustanovljena je definitivno prisutnost PAO koji je otpuštao ortofosfat i pohranjivao acetat iz vode kao poli- $\beta$ -hidroksialkanoat (PHA). Zato je u aerobnoj fazi, PAO imao na raspolaganju dovoljno pohranjenog PHA koji mu je služio kao izvor ugljika i energije potrebnog za rast novih stanica, pa je biomasa rasla brže nego što je odumirala te je PAO asimilirao fosfor iz influenta kojeg je koristio za sintezu polifosfata. Iako aktivnost PAO nije bila jako izražena što se vidi po udjelu fosfora u VSS na slici 25 ipak je zabilježena aktivnost PAO.



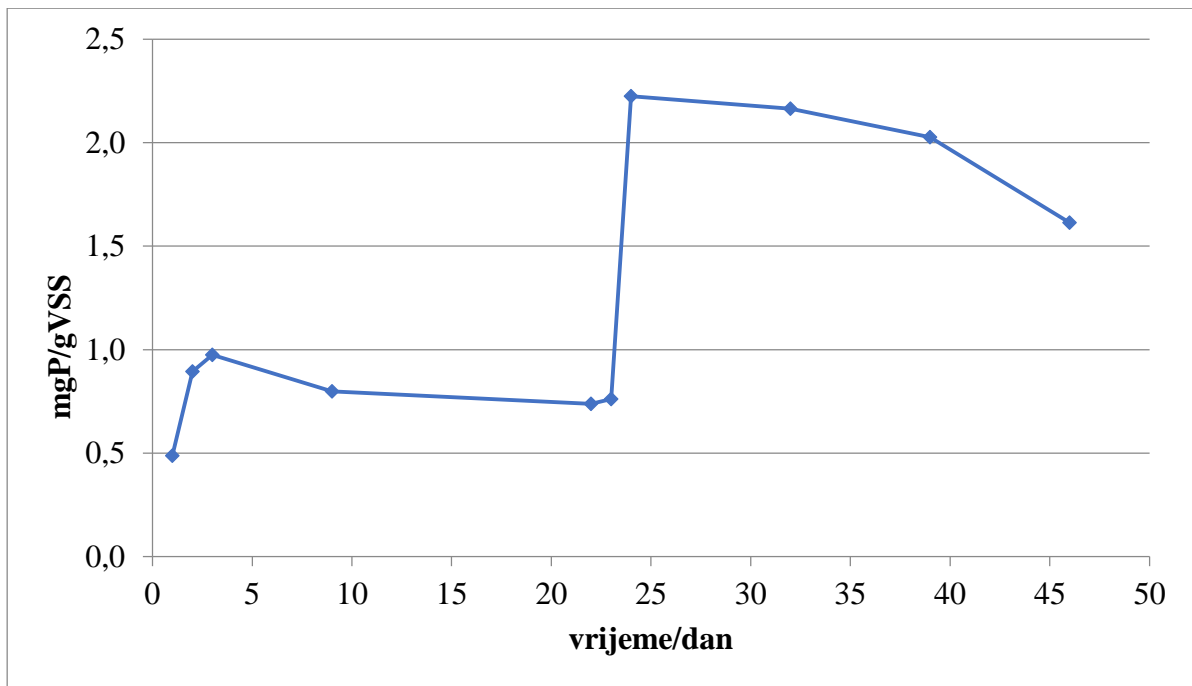
**Slika 27.** Rezultati testiranja biološke aktivnosti PAO 46.dana Pokusa 2

Na slici 28 gdje su grafički prikazane izračunate maksimalne specifične brzine otpuštanja fosfora i asimilacije KPK, očito je da je tijekom Pokusa 2 brzina otpuštanja fosfora i potrošnja KPK rasla tijekom pokusa i da je aktivnost i udio PAO u mulju bila sve veća. Da bi se provjerilo koliko fosfora je PAO uklanjao tijekom procesa izračunat je neto uklonjeni fosfor po gramu VSS mulja što je prikazano na slici 29. Vidi se da su prisutni PAO uklanjali na početku manje od 1 mg P po g VSS, a u drugom dijelu pokusa nešto više od 2 mgP. Ovaj rezultat je u skladu s zabilježenim brzinama asimilacije KPK u anaerobnoj fazi koja raste tijekom pokusa, ali je očito da PAO nije bilo mnogo u aktivnom mulju i da je većina bakterija bila iz grupe OHO.

U svakom slučaju, Pokus 2 je pokazao bolje rezultate od Pokusa 1 u smislu aktivnosti PAO što se može pripisati nižoj koncentraciji acetata koja nije inhibirala PAO što bi bilo u skladu s rezultatima koje su dobili Randall i Chapin (1997). Moguće je i da je duži period prilagodbe bez odvođenja mulja iz procesa u Pokusu 2 omogućio adaptaciju PAO koji su se onda stigli namnožiti u mulju, a moguće je i da je sarajevski mulj imao više PAO od zagrebačkog što je dovelo do njihovog boljeg zadržavanja i rasta u uređaju.



**Slika 28.** Maksimalna specifična brzina otpuštanja fosfora i asimilacije KPK



**Slika 29.**NETO uklonjeni fosfor

## 5. ZAKLJUČCI

1. U Pokusu 1 je bilo malo ili uopće nije bilo PAO u aktivnome mulju i njihova aktivnost nije detektirana pa možemo zaključiti da je biološki proces naprednog uklanjanja fosfora u SBR uređaju bio neuspješan, a dominantni mikroorganizmi su bili obični heterotrofni mikroorganizmi (OHO). Najvjerojatniji uzročnik slabe aktivnosti PAO je bila visoka koncentracija natrijeva acetata ( $3400 \text{ mgL}^{-1}$ ) koja je uzrokovala inhibiciju procesa uklanjanja fosfora slabim rastom i ispiranjem PAO iz aktivnog mulja.

2. U Pokusu 2 je detektirana prisutnost i aktivnost PAO koja je rasla tijekom pokusa pa je ova biološka obrada otpadne vode s naprednim uklanjanjem fosfora bila uspješnija. Aktivnost PAO nije bila velika pa su i u Pokusu 2 OHO bili dominantni u aktivnom mulju. Viša aktivnost PAO može se pripisati nižoj koncentraciji acetata ( $1200 \text{ mgL}^{-1}$ ), dužem periodu prilagodbe bez odvođenja mulja ili većoj početnoj koncentraciji PAO u mulju

## 6. LITERATURA

Bassin, J.P., Winkler, M.K.H., Kleerebezem, R., Dezotti, M., van Loosdrecht, M.C.M. (2012) Improved phosphate removal by selective sludge discharge in aerobic granular sludge reactors. *Biotechnol Bioeng* **109**, 1919–1928.

Blum, D. J. W. i Speece, R. E. (1991) A database of chemical toxicity to environmental bacteria and its use in interspecies comparison and correlations, *Res. J. WPCF* **63**, 198-207.

Bond P., Hugenholtz P., Keller J. and Blackall L. (1995) Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludge from sequencing batch reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1910-1916.

Brdjanovic, D., Slamet, A., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J., Heijnen, J.J. (1998) Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Wat. Res.* **31(1)**, 2000-2008.

Cano, G., Mouahid, A., Carretier, E., Moulin, P. (2014) Biomass concentration by density measurement: activated sludge and membrane bioreactor. *Journal of Water Sustainability* **4**, 49-61.

Carrera, J., Sarra, M., Lafuente, F., Vicent, T. (2001) Effect of different operational parameters in the enhanced biological phosphorus removal process. Experimental design and results. *Environ Technol* **22**, 1439–1446.

Chen, Y., Chen, H., Zheng, X., Mu, H. (2012) The impacts of silver nanoparticles and silver ions on wastewater biological phosphorous removal and the mechanisms. *J Hazard Mater*, 239–240, 88–94.

Chuang, S.H, Chang, W.C., Huang, Y.H, Tseng, C.C, Chia-Chuan Tai C.C (2011) Effects of different carbon supplements on phosphorus removal in low C/Pratio industrial wastewater. *Bioresour Technol* **102**, 5461-5465.

Chuehtai, M. I. D., Ahmed, K., (1991). Biological treatment of Liquid effluents, Biological Degradation of Wastes, Martin, A. M., Elsevier Applied Science, London, 47-84.

Comeau, Y., Hall, K.J., Hancock, R.E.W., Oldham, W.K. (1986) Biochemical model for biological enhanced phosphorus removal. *Wat. Res.* **20**, 1511-1521.



Fang, J., Sun, P., Xu, S., Luo, T., Lou, J., Han, J., et al. (2012) Impact of Cr(VI) on P removal performance in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) system based on the anaerobic and aerobic metabolism. *Bioresour Technol* **121**, 379–385.

Fang J., Su, B., Sun, P., Lou, J., Han, J. (2015) Long-term effect of low concentration Cr(VI) on P removal in granule-based enhanced biological phosphorus removal (EBPR) system. *Chemosphere* **121**, 76–83.

Filipe, C.D.M., Daigger, G.R., Grady Jr., C. P.L (2001) Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs. *John Wiley & Sons, Inc.*

Freitas, F., Temudo, M.F., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M.A. (2009) Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Bioresour Technol* **100**, 1969–1976.

Fuhs G. W. and Chen M. (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for treatment of wastewater. *Microbial. Ecol.* **2(2)**, 119-138.

Gebremariam, S.Y., Beutel, M.W., Christian, D., Hess, T.F. (2012) Effects of glucose on the performance of enhanced biological phosphorus removal activated sludge enriched with acetate. *Bioresour Technol* **121**, 19–24.

Glancer-Šoljan, M., Landeka Dragičević, T., Šoljan, V., Ban, S. (2001) Biološka obrada otpadnih voda – interna skripta, Kugler d.o.o., Zagreb.

Guerrero, J., Guisasola, A., Baeza, J.A. (2011) The nature of the carbon source rules the competition between PAO and denitrifiers in systems for simultaneous biological nitrogen and phosphorus removal. *Water Res* **45**, 4793–4802.

Guisasola, A., Pijuan, M., Baeza, J.A., Carrera, J., Casas, C., Lafuente, J. (2004) Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake in bio-P sludge: process modeling using oxygen uptake rate. *Biotechnol Bioeng* **85**, 722–33.

Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdanovic, D., (2008) Biological wastewater treatment: principles, modelling and design, IWA Publishing, London

- Hollender, J., van der Krol, D., Kornberger, L., Gierden, E., Dott, W. (2002) Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. *World J Microb Biot* **18**, 355-360.
- Hu, Z., Wentzel, M.C., Ekam, a G.A. (2002) Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. *Water Res* **36**, 4927–4937.
- Hu, Z., Houweling, D., Dold, P. (2012) Biological nutrient removal in municipal wastewater treatment: new directions in sustainability. *J Environ Eng* **138**, 307-317.
- Johanides, V., Divjak, S., Duvnjak, Z., Grba, S., Marić, V. Matošić, S. (1984) *Industrijska mikrobiologija*, Interna skripta PBF, Zagreb
- Jones, P. H., Tadwalkar, A. D., Hsu, C. L. (1987) Enhanced uptake of phosphorus by activated sludge – effect of substrate addition. *Water Res***21** (3), 301-308.
- Kampfer P., Erhart R., Beimfohr C., Bohringer J., Wagner M. and Amann R. (1996) Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbial. Ecol.***32**, 101-121.
- Kim, D.S., Jung, N.S., Park, Y.S. (2008) Characteristics of nitrogen and phosphorus removal in SBR and SBBR with different ammonium loading rates. *Korean J Chem Eng* **25**, 793–800.
- Kuba, T., Wachtmeiser, A., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1994) Effect of nitrate on phosphorus removal systems. *Wat. Sci. and Tech.* **30(6)**, 263-269.
- Liu W. T. (1995) Function, dynamics, and diversity of microbial population in anaerobic aerobic activated sludge processes for biological phosphate removal. Ph.D. thesis, University of Tokyo.
- Liu, Y., Chen, Y., Zhou, Q. (2007) Effect of initial pH control on enhanced biological phosphorus removal from wastewater containing acetic and propionic acids. *Chemosphere* **66**, 123-129.

- Liu, Y., Shi, H., Li, W., Hou, Y., He, M. (2011) Inhibition of chemical dose in biological phosphorus and nitrogen removal in simultaneous chemical precipitation for phosphorus removal. *Bioresour Technol* **102**, 4008–4012.
- Lu, H., Keller, J., Yuan, Z. (2007) Endogenous metabolism of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* under various starvation conditions. *Water Res* **41**, 4646 – 4656
- Lopez-Vazquez, C.M., Song, Y.I., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Moussa, M.S., Gijzen, H.J., et al. (2007) Short-term temperature effects on the anaerobic metabolism of glycogen accumulating organisms. *Biotechnol Bioeng* **97**, 483–495.
- Lopez-Vazquez, C.M., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2008) Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands. *Water Res* **42**, 2349-2360.
- Lopez-Vazquez, C. M., Oehmen, A., Hooijmans, C. M, Brdjanovic, D., Gijzen, H. J, Yuan, Z., van Loosdrecht M.C.M (2009) Modeling the PAO–GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature. *Wat. Res.***43**, 450-462.
- Martin, H.G., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K.W., McHardy, A.C., Yeates, C., He, S.M., Salamov, A.A., Szeto, E., Dalin, E., Putnam, N.H., Shapiro, H.J., Pangilinan, J.L., Rigoutsos, I., Kyrpides, N.C., Blackall, L.L., McMahon, K.D., Hugenholtz, P. (2006) Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature. Biotech.* **24(10)**, 1263-1269.
- Matošić, M. (2015) Membranski bioreaktori u zaštiti okoliša, Interna skripta PBF, Zagreb
- Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Wat. Res.* **32(11)**, 3193-3207.
- Meinhold, J. , Pedersen, H., Arnold, E., Isaacs, S., Henze, M. (1998) Effect of continuous addition of organic substrate to the anoxic phase on biological phosphorus removal. *Wat. Sci Tech.* **38**, 97-105.
- Nakamura K., Masuda K. and Mikami E. (1991) Isolation of a new type of polyphosphate accumulating bacteria and its phosphate removal characteristics. *J. Ferment. Bioeng.***71**, 258-263.

- Nakamura K., Hiraishi A., Yoshimi Y., Kawarasaki M., Masuda K. and Kamagata Y. (1995) *Microlunatus phosphovor* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive poly-phosphate accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 17-22.
- Oehmen A., Vives, M.T., Lu, H., Yuan, Z., Keller, J. (2005) The effect of pH on the competition between polyphosphateaccumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Research* **39**, 3727–3737.
- Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall; L.L., Reis, M.A.M. (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Wat. Res.* **41(11)**, 2271-2778.
- Pijuan M., Guisasola A., Baeza J.A., Carrera J., Casas C., Lafuente J. (2005) Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake: influence of PAO intracellular storage compounds. *Biochem Eng* **J26**, 184–90.
- Pijuan, M., Ye, L., Yuan, Z. (2010) Free nitrous acid inhibition on the aerobic metabolism of poly-phosphate accumulating organisms. *Water Res* **44**, 6063–6072.
- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće (2008) *Narodne novine* **47**, Zagreb.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013) *Narodne novine* **80**, Zagreb.
- Poltak, R.F. (2005) Sequencing Batch Reactor Design and Operational Considerations, NEIWPC, Massachusetts.
- Randall, C.W., Chapin, R.W. (1997) Acetic acid inhibition of biological phosphorus removal. *Water Environ. Res.* **69 (5)**, 955-960.
- Rayne, S., Carey, S., Forest, K. (2005) Evidence for tin inhibition of enhanced biological phosphorus removal at a municipal wastewater treatment plant. *J Environ Sci Health* **40**, 535–551.
- Saito, T., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Res* **38**, 3760–3768.

- Saunders, A.M., Mabbett, A.N., McEwan, A.G., Blackall, L.L. (2007) Proton motive force generation for the uptake of acetate under anaerobic conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **274(2)**, 245-251.
- Schönborn, C., Bauer, H-D, Röske, I. (2001) Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules. *Water Res* **35**, 3190–3196.
- Smolders, G.J.F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorous removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotech. Bioeng.* **43**, 461-470.
- Smolders, G. J. F., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., (1994) Stoichiometric Model of the Aerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process. *Biotechnology and Bioengineering* **44**, 837-848.
- Song, K.G., Cho, J., Ahn, K.H. (2009) Effects of internal recycling time mode and hydraulic retention time on biological nitrogen and phosphorus removal in a sequencing anoxic/anaerobic membrane bioreactor process. *Bioprocess Biosyst Eng* **32**, 135–142.
- Stante L., Cellamare C. M., Mamasina F. and Tilche A. (1996) Production of poly-beta-hydroxybutyrate by *Lamproedia* spp. isolated from activated sludge for phosphorus removal. Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent, 61/4b.
- Tayr, C., Garlapati, V.K., Guisasola, A., Baeza, J.A. (2013) The selective role of nitrite in the PAO/GAO competition. *Chemosphere* **93**, 612–618.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Stensel, H. D. (2003) Wastewater engineering : treatment and reuse, Metcalf & Eddy, Inc. 4<sup>th</sup> ed
- Tsai, Y.P., Tzeng, H.F., Lin, J.W., Lu, M.S., Lin, J.Y. (2013) Verification of enzymes deterioration due to Cu(II) presence in an enhanced biological phosphorus removal system. *Chemosphere* **91**, 602–607.
- Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D. and Schleifer K.-H. (1994) Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **60(3)**, 792-800.

- Wang Y., Geng J., Ren Z., He W., Xing M., Wu M., et al. (2011) Effect of anaerobic reaction time on denitrifying phosphorus removal and N<sub>2</sub>O production. *Bioresour Technol* **102**, 5674–5684.
- Wang, Y., Ren, Z., Jiang, F., Geng, J., He, W., Yang, J. (2011) Effect of copper ion on the anaerobic and aerobic metabolism of phosphorus-accumulating organisms linked to intracellular storage compounds. *J Hazard Mater* **186**, 313–319.
- Wentzel, M.C., Lotter, L.H., Loewenthal, R.E., Marais, G.v.R. (1986) Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal – A biochemical model. *Water SA*. **12**,209-224.
- Wentzel, M.C., Comeau, Y., Ekama, G., van Loosdrecht, C.M., Brdjanovic, D., (2008) Enhanced Biological Phosphorus Removal. U: *Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design*. IWA Publishing, London, 155-220
- Ye, L., Pijuan, M., Yuan, Z. (2010) The effect of free nitrous acid on the anabolic and catabolic processes of glycogen accumulating organisms. *Water Res* **44**, 2901–2909.
- Yoon, T.I., Lee, H.S., Kim, C.G. (2004) Comparison of pilot scale performances between membrane bioreactor and hybrid conventional wastewater treatment systems. *J Membr Sci* **242**, 5-12.
- Zeng, W., Li, L., Yang, Y., Wang, X., Peng, Y. (2011) Denitrifying phosphorus removal and impact of nitrite accumulation on phosphorus removal in a continuous anaerobic-anoxic-aerobic (A<sub>2</sub>O) process treating domestic wastewater. *Enzyme Microb Technol* **48**, 134-142.
- Zeng, W., Yang, Y., Li, L., Wang, X., Peng, Y. (2011) Effect of nitrite from nitrification on biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Bioresour Technol* **102**, 6657–6664.
- Zeng, W., Li, B., Yang, Y., Wang, X., Li, L., Peng, Y. (2013) Impact of nitrite on aerobic phosphorus uptake by poly-phosphate accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal sludges. *Bioprocess Biosyst Eng* , 1–11.
- Zeng, T., Wang, D., Li, X., Ding Y., DeXiang, L., Yanga, Q., Zeng, G. (2013) Comparison between acetate and propionate as carbon sources for phosphorus removal in the aerobic/extended-idle regime. *Biochem Eng J* **70**, 151-157.

- Zhang, Z., Li, H., Zhu, J., Weiping, L., Xin, X. (2011) Improvement strategy on enhanced biological phosphorus removal for municipal wastewater treatment plants: full-scale operating parameters, sludge activities, and microbial features. *Bioresour Technol* **102**, 4646–4653.
- Zhang, J., Peng Y., Tang, X (2011) Effect of COD on EBPR system and variation of OUR. In:IEEE International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring, 1120-1123.
- Zheng, X., Sun, P., Lou, J., Cai, J., Song, Y., Yu, S., et al. (2013) Inhibition of free ammonia to the granule-based enhanced biological phosphorus removal system and the recoverability. *Bioresour Technol* **148**, 343–351.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Yuan, Z. (2007) Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms. *Biotechnol Bioeng* **98**, 903–912.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Yuan, Z. (2008) Free nitrous acid inhibition on nitrous oxide reduction by a denitrifying-enhanced biological phosphorus removal sludge. *Environ Sci Technol* **42**, 8260–8265.
- Zhou, Y., Ganda, L., Lim, M., Yuan, Z., Kjelleberg, S., Ng, W.J. (2010) Free nitrous acid (FNA) inhibition on denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DPAOs). *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 359–369.
- Zhou, Y., Oehmen, A., Lim, M., Vadivelu, V., Ng, W.J. (2011) The role of nitrite and free nitrous acid (FNA) in wastewater treatment plants. *Water Res* **45**, 4672–4682.
- Zhou, Y., Ganda, L., Lim, M., Yuan, Z., Ng, W.J. (2012) Response of poly-phosphate accumulating organisms to free nitrous acid inhibition under anoxic and aerobic conditions. *Bioresour Technol* **116**, 340–347.
- Zuthi, M.F.R., Guo, W.S., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I. (2013) Enhanced biological phosphorus removal and its modeling for the activated sludge and membrane bioreactor processes. *Bioresour Technol* **139**, 363-374.