

# Potencijal Tetrasphaera sp. u naprednom biološkom uklanjanju fosfora

---

**Vlahović, Dora**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*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:159:307966>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Dora Vlahović**

7367/PT

**POTENCIJAL *TETRASPHERA SP.* U NAPREDNOM  
BIOLOŠKOM UKLANJANJU FOSFORA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Tehnologija vode**

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

**Zagreb, 2020.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vode

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**Potencijal *Tetrasphaera sp.* u naprednom biološkom uklanjanju fosfora**

***Dora Vlahović, 0058210390***

**Sažetak:** Prevelika količina fosfora ispuštenog u hidrosferu antropogenom aktivnošću predstavlja jedan od glavnih ekoloških problema današnjice. U mnogim je zemljama postalo obvezatno smanjiti količinu fosfora u otpadnim vodama, bilo kemijskim, bilo biološkim načinom. Napredno biološko uklanjanje fosfora (EBPR) proces je koji se zasniva na aktivnosti i međudjelovanju mikroorganizama sposobnih za skladištenje viška fosfora iz vode – fosfor akumulirajućih organizama (PAO). Rod *Tetrasphaera* jedan je od tih organizama koji je zadnjih desetljeća privukao pažnju znanstvenika uslijed svojih fermentabilnih i denitrificirajućih sposobnosti, morfoloških i metaboličkih različitosti među vrstama i izobilju u kojem se nalazi u postrojenjima za obradu voda. Također, mulj koji se dobiva kao nusprodukt EBPR procesa posjeduje potencijal vrijednog alternativnog izvora fosfora.

**Ključne riječi:** fosfor, fosfor akumulirajući organizmi (PAO), napredno biološko uklanjanje fosfora (EBPR), *Tetrasphaera sp.*

**Rad sadrži:** 20 stranica, 1 tablicu, 28 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** prof.dr.sc. Marin Matošić

**Rad predan:** lipanj, 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Water Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

**The potential of *Tetrasphaera sp.* in enhanced biological phosphorus removal**

***Dora Vlahović*, 0058210390**

**Abstract:** Anthropogenic activities resulting in a considerable release of phosphorus into the hydrosphere represent one of the biggest ecological problems nowadays. In many countries it has become mandatory to reduce the amount of phosphorus in wastewater, either chemically or biologically. Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) is a process based on the activities and interactions of microorganisms capable of storing excess phosphorus from water – the phosphorus accumulating organisms (PAO). The genus *Tetrasphaera* is one of these organisms and has attracted the attention of scientists in recent decades due to its fermentable and denitrifying abilities, morphological and metabolic differences between species and abundance in wastewater treatment plants. Furthermore, the sludge obtained as a byproduct of the EBPR process has the potential to be a valuable alternative phosphorus source.

**Keywords:** enhanced biological phosphorus removal (EBPR), phosphorus, phosphorus accumulating organisms (PAO), *Tetrasphaera sp.*

**Thesis contains:** 20 pages, 1 table, 28 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Professor Marin Matošić, PhD

**Thesis delivered:** June 2020

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Teorijski dio .....	2
2.1.  Pristupi uklanjanju fosfora .....	2
2.2.  EBPR .....	3
2.2.1.  Biokemija i mikrobiologija procesa: metabolizam PAO.....	4
2.3.  Tetrasphaera .....	6
2.3.1. <i>Tetrasphaera</i> kroz povijest .....	6
2.3.2.  Metabolizam roda <i>Tetrasphaera</i> .....	7
2.3.2.1.  Izvori ugljika.....	7
2.3.2.2.  Sposobnost fermentacije.....	9
2.3.2.3.  Metabolizam glikogena.....	10
2.3.2.4.  Sposobnost denitrifikacije.....	11
2.3.3.  Inkonzistencija rezultata i kako ih interpretirati .....	12
2.3.4.  Pregled potencijala <i>Tetrasphaera sp.</i> u EBPR-u .....	14
2.4.  Obnova fosfora u procesu EBPR-a .....	15
3. Zaključak .....	17
4. Literatura.....	18

## 1. Uvod

Fosfor predstavlja jedan od elemenata ključne važnosti za sav život na Zemlji. Još je u dalekoj Zemljinoj prošlosti služio kao kemijska okosnica prvim spojevima, a danas je prijeko potreban za rast i razvoj svega što je živo. Također je ključan element gnojiva koji doprinosi održavanju visokih prinosa usjeva, te ujedno nema zamjene u čitavom lancu proizvodnje hrane (Cordell i sur., 2011). Međutim, on je neobnovljivi element koji je k tome (u obliku fosfatne rude kao izvora) neravnomjerno raspodijeljen po zemlji, a njegova potrošnja raste iz dana u dan. Najveći problem ipak predstavlja količina fosfora koja se, iz istih fosfatnih ruda, antropogenim aktivnostima ispustila u hidrosferu uzrokujući mnoge slučajeve eutrofikacije. Eutrofikacija indirektno dovodi do trošenja dostupnog kisika a time i pojave „mrtvih zona“ na Zemlji, koje ekosustavu nanose permanentnu štetu. Kontrola količine fosfora u hidrosferi igra ključan element u rješavanju ovog globalnog problema.

Danas postoje dva glavna pristupa uklanjanja fosfora iz otpadnih voda: kemijski i biološki. Biološko uklanjanje fosfora, točnije EBPR (eng. *Enhanced biological phosphorus removal*) proces, predmet je izdašnih studija u zadnjih par desetljeća, budući da omogućuje efikasno uklanjanje fosfora iz voda bez uporabe kemikalija. Budući da se EBPR zasniva na aktivnosti i međudjelovanju mikroorganizama sposobnih za skladištenje viška fosfata iz vode (Filipe i sur., 2001; Marques i sur., 2017), mnogo je istraživanja zadnjih desetljeća provedeno s ciljem boljeg razumijevanja mikrobiološkog i biokemijskog modela istih, no potrebno ih je još. Najnovije studije poljuljale su dosad utvrđene mikrobiološke dogme procesa, te ih je potrebno nanovo ispitati. Točnije, dugo se godina vjerovalo kako su bakterije roda *Accumulibacter* najzastupljenije i najvažnije od svih PAO (fosfor akumulirajući organizmi) za proces, dok nije utvrđeno nekoliko slučajeva prevladavanja roda *Tetrasphaera* koji, k tome, ne posjeduje ni metabolizam tradicionalnih PAO. Budući da se uspješnost EBPR procesa temelji upravo na predviđanju ponašanja PAO, te osiguravanju optimalnih uvjeta za njihov rast i razvoj, od otkrića roda *Tetrasphaera* do danas provedena su mnoga istraživanja koja evaluiraju njenu ulogu u procesu. Bitan čimbenik ovdje igra razumijevanje njenog metabolizma, koji ipak još uvijek nije dovoljno istraženo te mnogim znanstvenicima stvara nedoumice.

Cilj ovog rada jest proučiti potencijal metabolizma roda *Tetrasphaera* i donijeti određene zaključke koje mogu pomoći pri optimizaciji EBPR procesa za što bolje rezultate uklanjanja fosfora kao i objasniti potencijal mulja EBPR-a kao alternativnog izvora fosfora.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. pristupi uklanjanju fosfora

Kao što je već spomenuto, eutrofikacija predstavlja globalni problem koji je posljedica ljudske interferencije u prirodne cikluse pojedinih elemenata na Zemlji. Narušavanje homeostaze oligotrofnih vodenih sustava, u kojem potom dolazi do masovnog razmnožavanja cijanobakterija i eukariotskih algi, događa se kontinuiranim onečišćenjem nutrijentima poput dušika i fosfora u koncentracijama koje umnogome premašuju potrebne. Cvjetanje toksičnih fitoplanktonskih organizama, koji svojim masovnim razmnožavanjem povećano troše kisik te mogu biti uzrok masovnom trovanju riba, ptica pa čak i ljudi, danas privlače sve veću pažnju znanstvenika širom svijeta. Budući da su većina cijanobakterija diazotrofi, odnosno potrebu za dušikom zadovoljavaju fiksirajući atmosferski dušik, upravo se fosfor smatra kritičnim i limitirajućim faktorom ovog procesa čije se koncentracije moraju kontrolirati. Poželjno je – a u mnogim zemljama i obvezatno – da postrojenja za pročišćavanje voda uklone fosfor iz otpadnih voda prije no što se one ispuste u okoliš (Seviour i sur., 2003; Bashan i de-Bashan, 2004).

Danas postoje dva glavna pristupa uklanjanju fosfora iz otpadnih voda. To su kemijski te biološki način.

Kemijsko taloženje fosfora najstariji je i još uvijek najrašireniji način njegovog uklanjanja iz voda. Najkorištenije kemikalije za provedbu precipitacije predstavljaju spojevi željeza, aluminija te kalcija, dok se rjeđe koristi i magnezij. Pritom razlikujemo pred-precipitaciju, gdje se kemikalije doziraju u sirovu otpadnu vodu ili prilikom primarnog taloženja; koprecipitaciju, odnosno doziranje kemikalija tijekom sekundarne i tercijarne obrade vode; te post-precipitaciju, u kojoj se kemikalije dodaju prije ili tijekom konačne klarifikacije (Yeoman i sur., 1988). Fosfor se u gotovo svim slučajevima taloži u obliku netopljivih fosfata. Najučinkovitijima su se pokazali oksidi željeza i kalcija te sitnozrnati aktivirani aluminijev oksid. Ti su materijali unutar sat vremena uspjeli ukloniti više od 99% fosfata iz efluenta. Snažnim adsorbentom za ortofosfate i kondenzirane fosfate pokazao se aluminijev hidroksid. On ih taloži gotovo trenutačno. Međutim, uspješnost taloženja aluminijevim spojevima uvelike ovisi o organskoj tvari prisutnoj u vodi. Ona, uz naglasak na taninsku kiselinu, inhibira proces taloženja, pri čemu je inhibicija jača povećanjem količine organske tvari. Precipitacija kalcijem poprilično je učestala metoda uklanjanja fosfora, budući da je jeftinija i jednostavnija za korištenje. Fosfor se iz vode uklanja dodatkom kalcita što rezultira formacijom hidroksiapatita. Iskorištenje procesa ove metode varira od 75 do 85%, a predložena

je i kao predtretman za biološko uklanjanje fosfora (Bashan i de-Bashan, 2004). Iako izrazito visoke efikasnosti, kemijsko taloženje ima i negativne strane. Osim viših operativnih troškova (zbog utroška kemikalija), problem predstavlja i povećanje proizvodnje viška mulja, koji je, iako je stabilan, teže zbrinuti. Konačno, u većini je slučajeva fosfor uklonjen ovim putem nemoguće obnoviti i reciklirati.

S druge strane, biološko uklanjanje fosfora intenzivno je istraživano područje zadnjih desetljeća, budući da predstavlja zeleniju i jeftiniju alternativu. Priroda procesa ne zahtjeva znatan (ako i ikakav) utrošak kemikalija, a višak mulja obogaćen fosforom dobiven na kraju procesa smatra se vrijednom, održivom i ekonomičnijom alternativom izvora fosfora (Stockholm-Bjerregard i sur., 2017). Međutim, potrošnja energije dosta je značajna uslijed potrebe za konstantnom aeracijom aerobnog tanka (više u idućem poglavlju). Također, iako je efikasnost procesa relativno visoka (>90%), i dalje je kemijskim putem moguće ukloniti više fosfora no biološkim. To je jedan od razloga zašto se danas, u većini slučajeva, za optimalne rezultate, ova dva procesa kombiniraju (Zheng i sur., 2014).

Za maksimalno iskorištenje biološkog procesa uklanjanja fosfora, budući da se provodi djelovanjem mikroorganizama, potrebno je temeljito poznavanje njihovog mikrobiološkog i biokemijskog profila te njima optimalnih uvjeta kako bi se što uspješnije predvidjelo njihovo ponašanje i iskoristio maksimalni kapacitet uklanjanja.

## **2.2. EBPR**

Prema nekim radovima, do razvitka EBPR tehnologije došlo je slučajnim otkrićem, dizajniranjem postrojenja koje bi bilo učinkovitije u uklanjanju dušika od dotad postojećih konfiguracija, i to još prije kakvih 60-ak godina. Nakon tog se otkrića mnogo različitih full-scale postrojenja dizajniralo i gradilo, no svi su oni bili temeljeni na svojedobnim empirijskim spoznajama s vrlo malo, ako i uopće, znanja o mikrobiologiji procesa koja je zapravo ključ uspjeha (Seviour i sur., 2003; Nielsen i sur., 2010). Međutim, fundamentalni modeli za proces postavljeni još 70-tih godina i dan su danas temelj za isti. Oni su nastali spoznajom da se kombinacijom anaerobnog i aerobnog tanka pri obradi voda favorizira rast bakterija sposobnih za akumulaciju fosfora u obliku polifosfatnih granula (Comeau i sur., 1986). Te su bakterije danas poznate kao PAO – fosfor akumulirajući organizmi.



Temelj za uklanjanje fosfora iz voda proizlazi iz cirkulacije aktivnog mulja obogaćenog PAO, odnosno periodičke izmjene između striktno anaerobne faze (niti kisik niti nitrati su prisutni) u kojoj je voda bogata na izvorima ugljika te aerobne ili anoksične faze inkubacije, gdje je voda siromašna ugljikovim spojevima. U suštini, u aerobnoj se fazi konzumiraju različiti izvori ugljika (oni dostupni u influentu) te se, za potrebe metabolizma, u vodu ispuštaju ortofosfati ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). U sljedećoj je fazi fosfor potreban za rast i razvoj mikroorganizama, pri čemu ih PAO „konzumiraju“ u puno većim količinama od potrebnih, a koje također premašuju količinu ispuštenih ortofosfata u anaerobnoj fazi procesa. Takav slijed događaja otpadnu vodu ostavlja siromašnom na fosforu, a u slučaju i potpunog uspjeha EBPR procesa, potpuno bez fosfora (Bashian i de-Bashian, 2004).

Naravno, proces je puno kompleksniji od onoga što se na prvu čini. Godine i godine su uložene u ekstenzivna istraživanja biokemije i mikrobiologije procesa jednom kad se shvatilo da je funkcionalnost postrojenja uvjetovana strukturom i funkcijom prisutnih mikrobnih zajednica (Nielsen i sur., 2010), s naglaskom na dokučivanje faktora koji će stimulirati najveći rast i razvoj PAO kao favoriziranih organizama.

### **2.2.1. Biokemija i mikrobiologija procesa: metabolizam PAO**

Prije svega, bitno je shvatiti da kvaliteta i sastav ulazne otpadne uvelike utječu na strukturu i mikrobnu zajednicu aktivnog mulja. Točnije, dostupni izvori ugljika, kao i sadržaj ukupnog dušika i fosfora u influentu, uvjetuju količinu biomase koja se uopće može namnožiti, kao i zastupljenost i raznolikost pojedinih organizama. Od velike je važnosti da u otpadnoj vodi bude odgovarajuća količina fosfora, jer bi okoliš siromašan na fosforu najvjerojatnije uspostavio mikrobnu zajednicu s jako malo do nikakve sposobnosti za uklanjanje fosfora (Bashian i de-Bashian, 2004; Nielsen i sur., 2010). Kao što je već spomenuto, ključ su postići dominaciju upravo PAO.

PAO su primarno karakterizirani sposobnošću da u anaerobnim uvjetima iz vode „izuzmu“ organske tvari te ih skladište u obliku polihidroksialkanoata (PHA). Za to im je, naravno, potrebna energija. Energiju pribavljaju dvama načinima – korištenjem zaliha glikogena te hidrolizom unutarstaničnih polifosfata, koji se onda u obliku ortofosfata ispuštaju u vodenu otopinu (iako se u većini literature hidroliza polifosfata spominje kao glavni izvor energije, suštinski su oba bitna, budući da glikogen, osim što opskrbljuje energijom, predstavlja i izvor reducirajuće snage kojom se održava redoks ravnoteža PAO). Organizmi s pohranjenim PHA sposobni su ih koristiti za

razmnožavanje i rast u anaerobnim uvjetima (što predstavlja iduću fazu procesa) u odsutnosti ikakvih egzogenih izvora ugljika ili energije, što im daje kompetitivnu prednost pred ostalim organizmima. Za razlaganje PHA i korištenje istog u energetske svrhe potreban im je kisik (eventualno neki drugi elektron akceptor), koji se iz istog razloga sustavno troši i tank je potrebno kontinuirano aerirati (Mino i sur., 1998; Filipe i sur., 2001; Nielsen i sur., 2010; Zheng i sur., 2014).

Mnoga su istraživanja provedena s ciljem saznanja koji su to izvori ugljika najpogodniji za PAO. Više je studija naglasilo kako najbolje „uspijevaju“ konzumirajući hlapljive odnosno kratkolančane masne kiseline (u nastavku teksta VFA, eng. *volatile fatty acids*), od čega su najbitniji acetat i propionat. Čak štoviše, pokazalo se kako je dostupnost VFA neizostavna za održavanje EBPR procesa, i kako je ključ aktivacije istog njihova prisutnost. Također, generalni zaključak više različitih studija bio jest kako PAO najbrže i najbolje asimiliraju upravo VFA, a ta brza asimilacija u anaerobnim uvjetima osigurava im kompetitivnu prednost nad drugim mikroorganizmima aktivnog mulja (Filipe i sur., 2001; Seviour i sur., 2003; Zheng i sur., 2014). Naravno, otpadna voda ne sadrži samo ove spojeve – sastoji se od makromolekula, koje zahtijevaju hidrolizu prije no što se mogu konzumirati (proteini, polisaharidi, lipidi, nukleinske kiseline) te tzv. *pravih topivih tvari*, gdje spadaju VFA (kao i aminokiseline, glukoza, glicerol, kratki polipeptidi i oligosaharidi). Iako su VFA najpoželjniji izvor ugljika, postoje rezultati koji upućuju kako su PAO anaerobno konzumirali puno širi spektar organskih supstanci, kao što su karboksilne kiseline, šećeri te aminokiseline, i to uz visoku efikasnost procesa (Seviour i sur., 2003; Nielsen i sur., 2010). Međutim, kako PAO osigurati dostatnu količinu VFA u otpadnim vodama, ukoliko ona nije prirodno u njoj prisutna (što ne mora uvijek biti slučaj)?

Dugo se smatralo kako je jedna određena vrsta PAO najviše odgovorna za procese uklanjanja fosfora u EBPR postrojenjima, a to je *Candidatus Accumulibacter*. Ona je, u nedavnoj prošlosti, smatrana organizmom koji posjeduje fenotip očekivan za fosfor akumulirajući organizam – što uključuje i korištenje acetata i propionata (te, u manjoj mjeri, nekih aminokiselina) kao primarnih supstrata te njihovo skladištenje u obliku PHA. Shodno tome, najveći broj istraživanja bila su upravo lab-scale tipa gdje se u bioreaktorima koristila umjetna tj. sintetička otpadna voda bogata na VFA, u kojem bi se ispitala djelovanja ponajviše *Ca. Accumulibacter*. Međutim, u full-scale postrojenjima s pravim otpadnim vodama, stvari su poprilično drugačije. Također, mnoge su čiste kulture iz EBPR procesa izolirane kako bi se ispitivale njihove karakteristike, ali ni jedna čista kultura nije posjedovala sve potrebne koje bi aktivni mulj EBPR-a trebao posjedovati. Novija su

otkrića pokazala kako zapravo svaki aktivni mulj s visokom efikasnošću uklanjanja fosfora sadrži barem tri dominantne vrste PAO, od kojih su sve morfološki razlučive. Čak se pretpostavlja kako PAO uopće ne mogu rasti kao čiste kulture jer su za njihov opstanak potrebne međusobne interakcije različitih vrsta, kao što je već slučaj u mnogim poznatim mikrobiološkim sustavima (Mino i sur., 1998; Seviour i sur., 2003; Bashian i de-Bashian, 2004; Nielsen i sur., 2010; Zheng i sur., 2014).

U trenutku kad su se počela raditi opsežnija istraživanja mikrobne zajednice određenih full-scale postrojenja i s pravim otpadnim vodama, uočeno je kako je najzastupljeniji organizam zapravo *Tetrasphaera sp.* koji je činio čak i do 30% ukupne biomase EBPR aktivnog mulja, te je različitog metabolizma od klasičnih PAO (Nguyen i sur., 2010). Ubrzo su se mnoga istraživanja usmjerila ka promatranju tog roda kako bi se ispitao njihov doprinos EBPR-u.

## **2.3. Tetrasphaera**

### **2.3.1. Tetrasphaera kroz povijest**

Tetrasphaera je prvi puta uspješno izolirana od strane japanskih znanstvenika još 1996., a nazvana je T1-X7. Tada se još mislilo kako se radi o vrsti roda *Micrococcus* (Kataoka i sur., 1996). Četiri godine kasnije, australijski su stručnjaci uspjeli izolirati dva gram-pozitivna koka iz biomase aktivnog mulja. Uspoređivanjem biokemijskih analiza i mapa gena, ustvrdili su kako ta dva izolata, zajedno s T1-X7, zapravo pripadaju novom (neispitanom) rodu, te je za isti predloženo ime *Tetrasphaera*. Soj T1-X7 je sukladno tome nazvan *Tetrasphaera japonica*, dok je australijski soj nazvan *Tetrasphaera australiensis* (Maszenan i sur., 2000). To je istraživanje ujedno i prvo koje opisuje sposobnost *Tetrasphaera* za akumulaciju fosfora, te njihovu morfološku i biokemijsku fizionomiju (Maszenan i sur., 2000). Dvije godine nakon toga identificiran je još jedan soj nazvan *Tetrasphaera elongata*. U narednim godinama istraživanja su se ili otkrivali novi sojevi roda, ili reklasificirale vrste koje su prvotno bile pogrešno kategorizirane.

Rod *Tetrasphaera* pripada porodici *Intrasporangiaceae*, odjeljka *Actinobacteria*. Danas razlikujemo osam vrsta roda *Tetrasphaera*: *T. japonica*, *T. australiensis*, *T. elongata*, *T. remsis*, *T. jenkinsii*, *T. duodecadis*, *T. veronensis* te *T. vanvenii*. Međutim, *T. remsis* i *T. duodecadis* nikad nisu izolirana iz aktivnog mulja postrojenja za obradu otpadnih voda, stoga su jako rijetko dio istraživanja EBPR procesa.

Također, danas se zna da se pojedine vrste razlikuju i morfološki, i u stopama rasta, metabolizmu te izdašnosti u aktivnom mulju postrojenja. Shodno tome, razvrstane su u 3 svojevrsne grane: grana I obuhvaća *T. elongatu* i *T. duodecedis*; u granu II svrstane su *T. jenkinsii*, *T. australiensis* i *T. veronensis*, dok grani III pripadaju *Tetrasphaera* koje nisu uzgojene u kulturi. Ostale vrste nisu uspješno svrstane ni u kakve klastere ili grane (Kristiansen i sur., 2013; Marques i sur., 2017).

### **2.3.2. Metabolizam roda *Tetrasphaera***

Kao što je već spomenuto, otkriveno je kako *Tetrasphaera* ima drugačiji metabolizam od klasičnog predstavnika PAO, *Ca. Accumulibacter*. Zajedničke su im karakteristike mogućnost izuzimanja fosfata iz vode kao i njihovo skladištenje u obliku unutarstaničnih polifosfata, te asimilacija određenog spektra organskih supstanci u anaerobnim uvjetima. Međutim, *Tetrasphaera* PAO nemaju mogućnost skladištenja asimiliranih supstanci u obliku PHA, te im isti kasnije iz tog razloga ni ne služe kao izvor energije za izuzimanje fosfata i tvorbu polifosfata. Jedina vrsta kod koje je pronađen enzim PHA sintaza jest *T. japonica* te neki nitasti sojevi, što tek daje mogućnost upotrebe PHA (što obuhvaća i sintezu i njihovu oksidaciju s ciljem dobivanja energije) (Ngyuen i sur., 2010; Rey i sur., 2016; Marques i sur., 2017). Prirodno pitanje koje se ovdje postavlja jest, od kuda rodu *Tetrasphaera* onda glavna energija potrebna za skladištenje polifosfata? Pa, postoji još jedna karakteristika u kojoj se ovaj rod bitno razlikuje od *Ca. Accumulibacter*, a to je njihova sposobnost fermentacije. Također, za određene se vrste ovog roda smatra i kako imaju sposobnost denitrifikacije. Time se ujedno da pretpostaviti da su i preferabilni izvori ugljika, kao i oni koje su uopće u mogućnosti asimilirati, za ovaj rod nešto raznovrsniji, pa krenimo redom.

#### **2.3.2.1. Izvori ugljika**

Mnogim je istraživanjima glede roda *Tetrasphaera* primarni fokus bio upravo koje su organske tvari najpogodnije kako bi one što uspješnije odradile svoju zadaću u EBPR-u. Ono što iznenađuje jest činjenica da se i dalje mnogi znanstvenici ne mogu složiti za koje tvari i na koji način ove bakterije uopće imaju sposobnost metaboliziranja.

Primjerice, Kong i sur. (2005) priopćili su kako *Tetrasphaera* uopće ne mogu koristiti VFA – specifičnije, acetat i propionat – kao izvore ugljika u anaerobnim uvjetima, što čini još jednu razliku od metabolizma klasičnih PAO. Međutim, Nguyen i sur. (2010) su par godina kasnije izvijestili kako je acetat ipak, iako u dosta manjoj količini od *Ca. Accumulibacter*, kozumiran. Kasnija istraživanja dala su u konačnici malo jasniju sliku: naime, neke vrste roda *Tetrasphaera* (npr. *T. elongata*) uistinu mogu koristiti acetat i propionat kao izvore ugljika, iako za njih nisu nimalo kompetitivne (poglavito kad se u aktivnom mulju nalazi i *Accumulibacter*). U (laboratorijskim) istraživanjima u kojima je acetat bio jedini izvor ugljika, stopa rasta *Tetrasphaera* bila je poprilično niska, budući da im nedostaju određeni enzimi za provođenje gliksilatnog ciklusa<sup>1</sup> (Nguyen i sur., 2010; Kristiansen i sur., 2013; Nguyen i sur., 2016; Marques i sur., 2017).

Favorizirani su izvori ugljika za ovaj rod određene aminokiseline. Mnoga su istraživanja potvrdila kako *Tetrasphaera* uspješno koristi glutamat, aspartat, a neki i glicin, od kojih je on ipak energetski najmanje povoljan (Kristiansen i sur., 2013; Nguyen i sur., 2016; Rey i sur., 2016; Marques i sur., 2017). Rey i sur. (2016) po prvi su puta u svom istraživanju uspješno obogatili aktivni mulj s *Tetrasphaera sp.* koristeći glutamat kao jedini izvor ugljika. U istraživanju Marques i sur. (2017) kao jedini izvor ugljika korišten je hidrolizat kazeina, pri čemu se aktivnim muljem obogaćenim s *Ca. Accumulibacter* i *Tetrasphaera sp.* uspjela postići efikasnost EBPR-a od preko 99%, pri čemu je *Tetrasphaera* bila primarno zaslužna za uklanjanje fosfora. Budući da oko 30% KPK otpadnih voda domaćinstava čine upravo aminokiseline i bjelančevine, *Tetrasphaera* PAO bi mogli znatno doprinijeti uklanjanju fosfora u EBPR procesima.

Osim aminokiselina, višestruko je dokazano kako *Tetrasphaera* kao izvor ugljika u anaerobnim uvjetima koristi i glukozu, i to u dosta velikim mjerama (Kristiansen i sur., 2013; Marques i sur., 2017; Herbst i sur., 2019). Iako se u dosta znanstvenih radova navodi kako su sposobni „metabolizirati šećere“, *Tetrasphaera* PAO ipak ne mogu koristiti, primjerice, manozu i galaktozu (Nguyen i sur., 2010).

Također je izvješteno kako, koristeći laktat kao jedini izvor u ugljika za biomasu aktivnog mulja, dolazi do velikog povećanja postotka *Tetrasphaera* PAO u odnosu ostale organizme. Laktat, međutim, nije toliko poželjna komponenta otpadnih voda budući da, u njegovu izobilju, performanse EBPR procesa opadaju (Rubio-Rincón i sur., 2019).

---

<sup>1</sup> Gliksilatni ciklus omogućuje stanicama korištenje spojeva s dva ugljikova atoma (kao što je acetat) kako bi zadovoljili stanične potrebe za ugljikom kada jednostavni šećeri kao što su glukozu ili fruktozu nisu dostupni.

### 2.3.2.2. Sposobnost fermentacije

Shodno činjenici da rodu kao izvori ugljika služe, između ostalog, glukoza i neke aminokiseline, fermentabilna sposobnost *Tetrasphaera sp.* je neupitna. Upravo fermentacija spomenutih supstrata, po nekolicini znanstvenika, predstavlja alternativni izvor energije za ove organizme koji, prisjetimo se, ne mogu stvarati PHA čija razgradnja, u aerobnim uvjetima, klasičnim PAO osigurava energiju za skladištenje polifosfata (Kristiansen i sur., 2013; Marques i sur., 2017). K tome, njihova sposobnost fermentacije može bitno doprinijeti ukupnoj mikrobnj zajednici aktivnog mulja EBPR-a. Krajnji i nusproizvodi fermentabilnog metabolizma *Tetrasphaera* uključuju alanin, sukcinat i, najvažnije, VFA, a ponajviše acetat. Acetat se smatra krajnjim produktom fermentacije aminokiselina u svrhu energetske bilance procesa. Glutamat, na primjer, može biti razložen kao jedini izvor ugljika ili kroz metabolički put koji izravno generira acetat, ili kroz put koji uključuje formiranje piruvata koji je potom konvertiran u acetat (Marques i sur., 2017). Time ostatku PAO pruža dodatne iskoristive izvore ugljika, pogotovo *Ca. Accumulibacter*, što predstavlja veliku prednost ukoliko otpadna voda prirodno ne sadrži znatne količine VFA. Još su davno Mino i sur. (1998) naglasili kako prefermentacija primarnog mulja znatno pridonosi uspješnosti EBPR procesa povećavajući količinu VFA. Pritom navode da ukoliko se otpadna voda zadržava u kanalizacijskim cijevima dovoljno dugo da bi se odvila fermentacija, znatan će se dio organske materije konvertirati u VFA, poglavito acetat, najvažniji izvor ugljika za tada klasični PAO, *Accumulibacter*. Kako dugotrajno odstajanje vode u kanalizacijskim cijevima nije uvijek moguće, dobro je znati da se isti učinak za dobrobit mikrobne zajednice EBPR-a postiže produljenjem vremena zadržavanja organizama u bioreaktoru (Nguyen i sur., 2010). Iako određeni (stariji) radovi spominju kako prevelika količina organske materije u vodi može imati inhibirajući učinak na mikroorganizme, vjerojatno uslijed proliferacije običnih heterotrofnih bakterija koje rastu mnogo brže od PAO, ova se nedavna otkrića suprotstavljaju toj činjenici. Mogućnost da veće koncentracije organske materije povoljno djeluju na mehanizam EBPR-a kroz fermentabilni metabolizam roda *Tetrasphaera* svakako može voditi ka novim, ekonomičnijim strategijama za optimizaciju procesa (Zheng i sur., 2014; Marques i sur., 2017).

### 2.3.2.3. Metabolizam glikogena

Već je spomenuto kako je, izuzev *T. japonica* i određenih nitastih sojeva, općeprihvaćeno kako rod *Tetrasphaera* nije u mogućnosti skladištiti PHA anaerobno kako bi im u idućoj fazi oni služili kao izvor energije za apsorpciju fosfata iz vode. Mnogo je pažnje posvećeno istraživanju koje tvari ovim vrstama zapravo igraju ulogu PHA za potrebe uklanjanja fosfata, a glikogen se, uz primjerice aminokiseline, često smatra jednom od najbitnijih tvari za pohranu energije (Liu i sur., 2019). Međutim, višebrojne studije o metabolizmu glikogena roda *Tetrasphaera* iznose različite rezultate. Iako se kod klasičnih PAO glikogen anaerobno konzumira pružajući, kao što je već spomenuto, reducirajuću snagu kao i dodatan izvor energije za asimilaciju organskih tvari, određena istraživanja pokazuju kako je kod *Tetrasphaera* taj proces obrnut. Primjerice, Kristiansen i sur. (2013) predlažu kako se glikogen u anaerobnim uvjetima sintetizira kako bi u aerobnoj fazi bio iskorišten u svrhu suplementacije energije potrebne za asimilaciju ortofosfata i sintezu unutarstaničnih polifosfata, budući da nisu sposobni formirati PHA. S druge strane, Marques i sur. (2017) došli su do zaključka kako *Tetrasphaera*, za anaerobno održavanje, preferira koristiti upravo glikogen kao primarni izvor energije, umjesto degradacije unutarstaničnog polifosfata i, shodno tome, ispuštanja ortofosfata u influent u prvoj fazi procesa, što znači da se on u anaerobnim uvjetima troši, a aerobnim obnavlja. Također navode da se glikogen može obnavljati različitim metaboličkim putevima iz glukoneogeneze, ovisno o supstratima (aminokiseline) - kao na primjer putem ciklusa limunske kiseline ukoliko je supstrat glutamat. Kao razlog ovako suprotnim rezultatima ujedno navode mogućnost utjecaja vrste izvora ugljika kao faktora koji određuje hoće li proces teći u smjeru sinteze glikogena ili glikogenolize. Naime, Kristiansen i sur. (2013) kao primarni izvor ugljika u bioreaktoru koristili su glukozu, koja može biti pohranjena u obliku glikogena uz hidrolizu unutarstaničnih polifosfata; dok su Marques i sur. (2017) koristili hidrolat kazeina, odnosno kazaminokiseline, supstrat koji iziskuje energetski različit metabolički put.

Međutim, Fernando i sur. (2019) objavili su skroz suprotne rezultate u kojima, koristeći spektroskopsku analizu čiste kulture *T. elongata*, nisu u stanicama uopće identificirali glikogen. Time su pretpostavili da postoji mogućnost kako se *Tetrasphaera* za anaerobno održavanje služi energijom dobavljenom hidrolizom polifosfata uz onu generiranu fermentacijom glukoze i aminokiselina. Kako su sposobni i skladištiti (nus)proizvode fermentacije, nadodali su da se njima i služe za obnavljanje unutarstaničnih polifosfata u sljedećoj fazi (Fernando i sur., 2019).



#### 2.3.2.4. Sposobnost denitrifikacije

Već je poznato kako određen dio PAO posjeduje mogućnost denitrifikacije (sjetimo se da je EBPR fenomen slučajno otkriven u postrojenju inicijalno konfiguriranom za uklanjanje dušika). Izvijesteno je i kako su mikroorganizmi kultivirani u prisustvu nitrata i dušika postigli veće iskorištenje uklanjanja fosfora u anoksičnim uvjetima nego što bi to bilo u aerobnim. Ti rezultati zasigurno podupiru hipotezu da se PAO u EBPR sustavima dijele na dvije velike grupe; 1) denitrificirajućih PAO koji su sposobni kao krajnje akceptore elektrona koristiti i kisik i nitrate te 2) PAO koji su sposobni koristiti samo kisik, znači ne-denitrificirajućih (Bashan i de-Bashan, 2004). Za rod *Tetrasphaera* više je puta naglašeno kako posjeduje potencijal za metabolizam denitrifikacije.

Međutim, bitno je napomenuti kako EBPR procesi znatno doprinose emisiji  $N_2O$ , stakleničkog plina koji je pretekao i ugljični monoksid po razarajućem učinku ozona. Inače, potpuna denitrifikacija se odvija u četiri koraka te je jedan od obvezatnih intermedijera u procesu i  $N_2O$ . Ukoliko do dođe do disbalansa denitrifikacije, moguće je da taj plin akumulira, a kasnije i emitira u okoliš. Znatno ispuštanje  $N_2O$  je, čak štoviše, zapaženo u EBPR postrojenjima koja su sadržavala denitrificirajuće PAO (dPAO) te denitrificirajuće glukoza akumulirajuće organizme (dGAO), a poglavito ukoliko su PHA korišteni kao elektron donori tijekom procesa denitrifikacije. Budući da *Tetrasphaera* nema sposobnost akumulacije PHA, već skladišti glikogen i aminokiseline, njihova konzumacija mogla bi voditi ka drugačijem obrascu formacije  $N_2O$  nego kod ostalih klasičnih dPAO (Marques i sur., 2018).

Kristiansen i sur. (2013) proveli su istraživanje koje je uključivalo 4 izolata: *T. australiensis*, *T. elongata*, *T. japonica* te *T. jenkinsii*, od kojih su sva 4 posjedovala potencijal za iskorištavanje nitrata i/ili nitrita kao krajnjih akceptora elektrona u anaerobnoj respiraciji ili denitrifikaciji. Međutim, setovi gena koji inače omogućuju potpunu denitrifikaciju u ovim izolatima ipak nisu pronađeni. Ujedno su i naveli kako *T. japonica* ima sposobnost redukcije nitrata u amonijak. (Kristiansen i sur., 2013).

Ipak, Marques i sur. (2018) proveli su istraživanje čiji rezultati pokazuju kako se u aktivnom mulju obogaćenom *Tetrasphaera* kulturom s aminokiselinama kao izvorima ugljika uistinu akumulira manje  $N_2O$  u usporedbi s muljem koji sadržava dPAO i dGAO. Ujedno, *Tetrasphaera* PAO u ovom su procesu bili zaslužni za više od 80% provedene denitrifikacije. To je testiranje, međutim, bilo provedeno kroz ciklus aerobnih, potom anoksičnih i na kraju aerobnih uvjeta; gdje je



*Tetrasphaera sp.*, iako dobro denitrificirala, veoma slabo anoksično uklanjala fosfor iz vode. To navodi na sugestiju kako joj asimilirani izvori ugljika pružaju dovoljno energije ili za anoksičnu denitrifikaciju, ili aerobno uklanjanje fosfora, ali ne i oboje istovremeno. Doduše, u kombinaciji s *Ca. Accumulibacter*, kojima bi fermentacijom aminokiselina *Tetrasphaera* organizmi osiguravali dovoljno VFA, ovaj proces postiže uistinu zadovoljavajuću količinu uklonjenog dušika i fosfora istovremeno (Marques i sur., 2018).

### **2.3.3. Inkonzistencija rezultata i kako ih interpretirati**

Kao što je vidljivo iz predstavljenih istraživanja, mnogi rezultati stvaraju nedoumice glede metabolizma *Tetrasphaera sp.* i njezine egzaktnije funkcije u biološkim sustavima za uklanjanje fosfora. Osim činjenice da su sve bakterije podložne djelovanju različitih abiotičkih faktora koji djeluju na ispitivani medij, poput pH, temperature, saliniteta ili prisustva makronutrijenata (koji posljedično mogu izazvati aktivatorski/inhibirajući učinak), nekolicina je još razloga zbog kojih je moglo doći do tako suprotnih interpretacija (Nielsen i sur., 2010). Na početku, velik se broj različitih molekularnih tehnika koristi pri identifikaciji i kvantifikaciji organizama u određenom mediju – primjerice fluorescencijska *in situ* hibridizacija (FISH; identifikacija) koja može biti u kombinaciji s mikroautoradiografijom (MAR; kvantifikacija), određene spektroskopske tehnike... ponekad neke metode traže specifične supstrate, čime izvori ugljika postaju pristraniji eksperimentalnoj metodi nego samim potrebama mikroorganizama (nesuglasice, primjerice, oko acetata kao izvora ugljika). Liu i sur. (2019) također iznose kako rezultati tzv. *amplicon sequencing-a*, odnosno svojevrsne oligonukleotidne dijagnostike, dizajnirane i korištene za specifičnu identifikaciju roda *Tetrasphaera*, u literaturi često nisu dosljedni te kako pokriće tehnike znatno varira. Tako postoji i mogućnost da su se određena molekularna ispitivanja dizajnirana specifično za jednu vrstu (npr. *T. elongata*) pogrešno koristila pri analizi drugih vrsta (npr. *T. japonica*), što je u konačnici dovelo do poteškoća pri interpretaciji rezultata. Pouzdane i validirane metode i alati svakako su temelj uspješnih istraživanja, međutim bioraznolikost roda *Tetrasphaera* kao takvog mora se također uzeti u obzir. *T. elongata* je, primjerice, identificirana kao najzastupljenija vrsta u nekim full-scale postrojenjima za obradu voda (Danska), ujedno i s najbržom stopom rasta. Kao takva, često je izolirana i proučavana kao reprezentativna vrsta, no njih postoji još pet (prisutnih u EBPR-u). Nguyen i sur. (2010) navode kako sve vrste *Tetrasphaera* u full-scale EBPR postrojenjima još uvijek nisu dovoljno dobro opisane: on je, naime, radio

filogenetsku analizu kultura izoliranih iz full-scale postrojenja, koje su pokazivale mnogo veću raznolikost od one koja se do tada mogla naći u literaturi. Znači, rod *Tetrasphaera* iznimno se odlikuje morfološkom i metaboličkom raznolikošću među vrstama (sjetimo se i da postoje 3 grane roda temeljene upravo na tim različitostima). To znači da i preferirani izvori ugljika za svaki od izolata, kako bi postigli odgovarajući omjer ispuštanja i asimilacije fosfora, dosta variraju, što posljedično opet otežava interpretaciju rezultata. K tome, budući da imaju puno raznolikiji spektar supstrata koje mogu koristiti i metaboličkih puteva kojima mogu generirati energiju, pripadnici roda *Tetrasphaera* (u usporedbi s primjerice *Ca. Accumulibacter*) također imaju i puno više alternativa za preživjeti u dinamičnom okruženju kao što je EBPR. Na primjer, prisjetimo se kako Fernando i sur. (2019) uopće nisu identificirali unutarstanični glikogen u čistoj kulturi *T. elongata*. To nikako ne znači da im glikogen inače uopće ne služi kao rezervna tvar, već su možda pripadnici vrste jednostavno koristili druge, za taj slučaj povoljnije izvore energije i sinteza glikogena stanici uopće nije bila potrebna (Liu i sur., 2019).

Svojevrsno slaganje rezultata u metaboličkim putevima pojedine vrste roda *Tetrasphaera* među znanstvenicima generalno ipak postoji te su njihova obilježja, u usporedbi s *Accumulibacter*, opisana u Tablici 1.

**Tablica 1.** Pregled metaboličkih značajki značajnih vrsta roda *Tetrasphaera*

Metabolički put	<i>Accumulibacter</i>	<i>T. australiensis</i>	<i>T. japonica</i>	<i>T. elongata</i>	<i>T. jenkinsii</i>	<i>T. veronensis</i>	<i>T. vanvenii</i>
Glikoliza	Da	Da	Da	Da	Da	/	/
Glukoneogeneza	Da	Da	Da	Da	Da	/	/
Sinteza glikogena	Da	Da	Da	Da	Da	/	/
Glikogenoliza	Da	Da	Da	Da	Da	/	/
Krebsov ciklus	Da	Da	Da	Da	Da	/	/
Gliksilatni ciklus	Da	Ne	Ne	Ne	Ne	/	/
Sinteza PHA	Da	Ne	Da	Ne	Da/Ne <sup>2</sup>	Da	Da
Polifosfatni metabolizam	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da
Asimilacija acetata	Da	Da	Da	Da	Da	/	/
Asimilacija glukoze	Ne	Da	Da	Da	Da	/	/
Asimilacija Glu/Asp	Ne	Da	Da	Da	Da	/	/

(McKenzie i sur., 2006; Nguyen i sur., 2010; Kristiansen i sur., 2013; Liu i sur., 2019); / - nisu pronađeni podaci

<sup>2</sup> McKenzie i sur. (2006) navode kako *T. jenkinsii* posjeduju mogućnost za sintezu PHA, dok Kristiansen i sur. (2013) navode suprotno

#### 2.3.4. Pregled potencijala *Tetrasphaera sp.* u EBPR-u

*Tetrasphaera sp.* može, kao sastavan dio mikrobne zajednice aktivnog mulja u EBPR procesima, znatno doprinijeti njihovoj uspješnosti. Budući da vrste pokazuju visok stupanj raznolikosti metaboličkih puteva, mogućnost korištenja različitih supstrata (glukoza, aminokiseline, acetat...) i generiranja energije na različite načine čine ih jednim od najrobustnijih i najobilnijih organizama aktivnog mulja, koji se relativno jednostavno mogu prilagoditi uvjetima u dinamičnom okruženju kao što je EBPR. Marques i sur. (2017) navode kako određene izvore ugljika *Tetrasphaera* može metabolizirati na način da čak i u anaerobnoj fazi dođe do uklanjanja fosfora iz vode (za što bi se, kako oni zaključuju, koristila energija dobivena fermentacijom glukoze i/ili aminokiselina). To je svakako od interesa budući da se time smanjuje količina fosfora koja bi se trebala ukloniti aerobno, a posljedično se smanjuje i potreba za aeracijom, čime se štedi na energiji. Time je moguće umnogome sniziti operativne troškove samog procesa, kao i indirektno smanjiti količinu emisije CO<sub>2</sub>, koja je povezana s potrošnjom energije, u atmosferu. Nadalje, fermentabilne sposobnosti ovog roda, kao što je već spomenuto, mogu biti od znatne koristi čitavoj mikrobnoj zajednici. Ukoliko se *Tetrasphaera sp.* i *Ca. Accumulibacter* nalaze u istom aktivnom mulju, ova dva mikroorganizma zauzimaju različite ekološke niše uslijed čega se može postići mnogo veća efikasnost procesa od uobičajene (>99% u istraživanju Marques i sur., 2017). Naime, otpadne vode domaćinstava najčešće sadrže oko 25-35% proteina i 15-25% polisaharida, koje u anaerobnom tanku najvjerojatnije hidroliziraju hidrolizirajuće bakterije pri čemu kao krajnji produkti nastaju aminokiseline i glukoza. Aminokiseline i glukozu fermentira *Tetrasphaera*, a najčešći krajnji produkti mogu biti upravo acetati i ostale VFA, čime se *Ca. Accumulibacter* (kao i ostalim PAO) pružaju dodatni izvori ugljika i posljedično povećava iskorištenje uklanjanja fosfora iz vode. Shodno tome, sposobnost fermentacije je posebice od značaja ukoliko otpadna voda prirodno nije bogata na VFA. Denitrificirajuća sposobnost *Tetrasphaera* također može biti od velikog značaja za biološke sustave obrade otpadnih voda. Iako je u istraživanju Marques i sur. (2018) dokazano kako će ovaj rod bakterija ili efikasno denitrificirati u anoksičnim uvjetima ili uklanjati fosfor u aerobnim, ali ne oboje, ovu je karakteristiku dobro uzeti u obzir pri razvijanju i optimizaciji postrojenja kojima je za cilj uspješno uklanjanje i dušika i fosfora istovremeno.

## 2.4. Obnova fosfora u procesu EBPR-a

Danas se preko 95% fosfora za potrebe čovječanstva, pri čemu glavnina otpada na proizvodnju mineralnih gnojiva, dobiva iz fosfatnih ruda, koje su neobnovljiv izvor. Fosfatne rude međutim, osim fosfora, sadrže i povećani udio kadmija i radioaktivnog urana. Ujedno se tek malen postotak iskorištenog fosfora obnavlja i ponovno koristi u, primjerice, agrikulturi – dok ostatak završava zakopan u deponijama ili kao dio metalnih precipitata ili različitih biomasa, gdje se nalazi s različitim toksičnim otpadnim (i netopljivim) produktima što onemogućuje njegovu reciklaciju i novu uporabu. (Bashan i de-Bashan, 2004; Cordell i sur., 2011). Stoga se u zadnje vrijeme potiče sve veći broj inicijativa usmjerenih prema pronalasku i iskorištavanju alternativnih izvora fosfora, u što spada i njegova reciklacija. Upravo je aktivni mulj tercijarne obrade otpadnih voda (u našem slučaju, EBPR) jedan od razmatranih alternativnih izvora fosfora.

Budući da proces uklanjanja (za sada) 90-95% ukupnog fosfora iz otpadnih voda (ovisno naravno o procesnim parametrima), aktivni mulj izrazito je bogat na fosforu, koji se nalazi unutar mikroorganizama mulja. Sâm aktivni mulj kao sirovina (za primjerice mineralna gnojiva) može se koristiti isključivo ukoliko isti prođe određene predtretmane (izjednačavanje, prosijavanje, zgušnjavanje...) te stabilizaciju. Razlog tome su različiti patogeni i toksične tvari koje bi mulj mogao sadržavati, no na to uvelike utječe sastav otpadne vode. Ali, postoje i specifični postupci izdvajanja fosfora iz mulja. Fosfor se iz mulja može dobiti na dva glavna načina: izdvajanjem fosfora iz organizama mulja (PAO), s tim da mulj prethodno mora biti osušen i dehidriran, ili izdvajanjem iz pepela mulja. Hidrotermalna obrada aktivnog mulja EBPR-a mogla bi biti od koristi, budući da tada dolazi do lize stanica mulja te oksidacije biogenih polifosfata, čime se pospješuje njegovo izdvajanje. Spaljivanjem mulja, osim što dolazi do potpunog uništavanja svih nečistoća i patogena, sav se fosfor prevodi u topljivi, anorganski oblik, te se potom može izdvojiti iz pepela mulja (Kovačić, 2020).

Razvijene su različite tehnologije izdvajanja fosfora iz mulja, koji se kao takav pokazuje prosperitetnim alternativnim izvorom fosfora, k tome ekološki prihvatljivim, jer se njegovom reciklacijom zapravo zatvara ciklus kruženja fosfora u prirodi. Ovakvi postupci obrade i zbrinjavanja, doduše, zahtijevaju veliku investiciju u procesnu opremu i visoke operativne troškove (višestruko su skuplji obzirom na cijenu fosfora dobivenog iz fosfatne rude). Stoga su, s financijskog aspekta, poprilično neatraktivni. Ipak, na iskorištavanje mulja treba gledati s aspekta rješavanja globalnog ekološkog problema, umjesto financijskog; a i njegovom uporabom prije

konačnog zbrinjavanja mogli bi se umanjiti ukupni materijalni troškovi cjelokupnog procesa rješavanja problematike mulja (Banić, 2017; Kovačić, 2020).

Postoje, međutim, i drugi načini za oporavak fosfora prilikom izvođenja EBPR procesa. Oni su trenutno i rašireniji od prethodno spomenutih, a radi se o izdvajanju fosfora u obliku struvita (magnezijev amonijev fosfat;  $\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ili hidroksiapatita ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ). Dodatak soli ovih spojeva u vodenu fazu nakon završetka anaerobne digestije kombinacija je EBPR-a i kemijskog tretmana koja se uspješno koristi zadnjih desetljeća (Cornel i Schaum, 2009; Zou i Wang, 2016). Čak štoviše, Zou i Wang (2016) u svome radu naglašavaju kako oporavak fosfora putem kristalizacije može značajno unaprijediti sam EBPR proces, odnosno povećati njegovu efikasnost. U njihovom je slučaju ovakvom kombinacijom iz otpadne vode uklonjeno približno 90% fosfora, pri čemu se približno 60% obnovilo u obliku hidroksiapatita, koji gotovo izravno može parirati fosfatnoj rudi (Cornel i Schaum, 2009). Takvi rezultati upućuju kako bi se provedbom ovakvih procesa ne samo povećala efikasnost uklanjanja fosfora iz voda već i pružio resurs koji može olakšati predstojeću fosforu krizu.

### 3. Zaključak

Paradoks fosfora već je određeno vrijeme jedna od glavnih ekoloških problematika današnjice. EBPR procesi mogu ponuditi rješenja koja idu u oba smjera. Osim što su široko prepoznati kao ključna strategija (kao tome održiva i ekonomična) u prevenciji eutrofikacije i napredujuća fronta istraživanja u procesima obrade voda, mulj dobiven kao nusprodukt ovih procesa predstavlja, iako skup, vrijedan alternativni izvor fosfora.

Rod *Tetrasphaera* pokazao je mnoštvo obilježja koja mogu uvelike biti od koristi pri optimizaciji EBPR procesa. Međutim, treba izbjeći pogrešku fokusiranja na samo jedan rod mikrobne zajednice koji se u datom trenutku, iz zaključaka provedenih istraživanja, čini najodgovornijim za proces uklanjanja fosfora (kao što je primjerice bilo s *Accumulibacter*). Aktivni mulj EBPR-a izrazito je kompleksan svojevrsni ekosistem i ukoliko se sva pažnja skrene samo na istraživanje i ispitivanje jednog organizma unutar istog, mogući su brojni propusti. Više je puta naglašeno da se rod *Tetrasphaera*, osim što se pokazao najzastupljenijim mikroorganizmom aktivnog mulja EBPR-a, odlikuje iznimnom morfološkom i metaboličkom raznolikošću. Iz istog je razloga potrebno provesti više istraživanja nad svakom vrstom (koja posjeduje značajke bitne za EBPR) tog roda, umjesto samo odabrati reprezentativni primjerak (*T. elongata*), čiji se metabolizam i ponašanje u sustavu EBPR-a može razlikovati od ostalih vrsta. Isto tako, naglašeno je kako se mulj s visokom efikasnošću uklanjanja fosfora sastoji od najmanje tri dominantna roda, i zato je također bitno promatrati međudjelovanje *Tetrasphaera* organizama s ostalim organizmima mulja i istražiti koja mjesta u ekološkoj niši sustava oni zauzimaju. Razumijevanje njihove sinergije i uvjeta u kojima dosežu svoj puni potencijal uklanjanja nutrijenata temelj su za povećanje efikasnosti EBPR-a, kao i općenito tercijarne obrade otpadnih voda. Shodno tome, iako se generalni zaključci mogu izvući iz istraživanja provedenim nad sintetičkim otpadnim vodama, za pravo razumijevanje svega navedenog poželjno je istraživanja provoditi u pravim full-scale sustavima s pravim otpadnim vodama, ili barem osigurati umjetan medij koji što je više moguće slični onom pravom u smislu kompleksnog kemijskog sastava. Takvi bi uvjeti u konačnici mogli ponuditi bolji uvid u ponašanje organizama *Tetrasphaera* i razumijevanje u svestranost njihovog metabolizma.

#### 4. Literatura

- Acevedo B, Murgui M, Borrás L, Barat R (2017) New insights in the metabolic behaviour of PAO under negligible poly-P reserves. *Chem Eng J* 311:82-90.
- Banić, I (2017) Obrada i zbrinjavanje mulja s uređaja za pročišćavanje otpadnih voda.
- Comeau Y, Hall K, Hancock R, Oldham W (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res* 20 (12):1511-1521.
- Cordell D, Rosemarin A, Schröder J, Smit A (2011) Towards global phosphorus security: a systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere* 84:747-58.
- Cornel P, Schaum C (2009) Phosphorus recovery from wastewater: needs, technologies and costs. *Water Science & Technology—WST*: 1069-1076.
- de-Bashan LE, Bashan Y (2004) Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997– 2003). *Water Res* 38:4222-46.
- Dodds WK, Whiles MR (2020) Nitrogen, sulfur, phosphorus, and other nutrients. *Freshwater Ecology*:395-424.
- Filipe CDM, Daigger GT, Grady CPL (2001) Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs. *Biotechnol Bioeng* 76 (1):32-43.
- Fernando EY, McIlroy SJ, Nierychlo M, Herbst FA, Petriglieri F, Schmid MC, Wagner M, Nielsen JP, Nielsen PH (2019) Resolving the individual contribution of key microbial populations to enhanced biological removal with Raman-FISH. *ISME J* 13:1933-1946
- Herbst FA, Duehlom MS, Wimmer R, Nielsen PH (2019) The proteome of *Tetrasphaera elongata* is adapted to changing conditions in wastewater treatment plants. *Proteomes* <https://doi.org/10.1101/513143>
- Kataoka N, Tokiwa Y, Tanaka Y, Takeda K, Suzuki T (1996) Enrichment culture and isolation of slow-growing bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:771-777.
- Kong Y, Nielsen JP, Nielsen PH (2005) Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl Environ Microbiol* 71 (7):4076-4085.

Kovačić M (2020) Predstoji li nam fosforna kriza? Tehnološke zabilješke, Kem. Ind. 69 (1-2) (2020) 52–53.

Kristiansen R, Nguyen HTT, Saunders AM, Nielsen JL, Wimmer R, Le VQ, McIlroy J, Petrovski S, Seviour RJ, Calteau A, Nielsen KL, Nielsen PH (2013) A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal. ISME J 7:543-554.

Liu R, Hao X, Chen Q, Li J (2019) Research advances of *Tetrasphaera* in enhanced biological phosphorus removal: a review. Water Res 166:115003.

Marques R, Santos J, Nguyen H, Carvalho G, Noronha JP, Nielsen HP, Reis MAM, Ohemen A (2017) Metabolism and ecological niche of *Tetrasphaera* and *Ca. Accumulibacter* in enhanced biological phosphorus removal. Water Res 122:159-171.

Marques R, Ribera-Guardia A, Santos J, Carvalho G, Reis MAM, Pijuan M, Oehmen A (2018) Denitrifying capabilities of *Tetrasphaera* and their contribution towards nitrous oxide production in enhanced biological phosphorus removal processes. Water Res 137:262-272.

Maszenan AM, Seviour RJ, Patel BKC, Schumann P, Burghardt J, Tokiwa Y, Stratton HM (2000) Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 50:593-603.

McKenzie CM, Seviour EM, Schumann P, Maszenan M, Liu JR, Webb R, Monis P, Saint CP, Steiner U, Seviour RJ (2006) Isolates of '*Candidatus Nostocoida limicola*' Blackall et al. 2000 should be described as three novel species of the genus *Tetrasphaera*, as *Tetrasphaera jenkinsii* sp. nov., *Tetrasphaera vanveenii* sp. nov. and *Tetrasphaera veronensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 56:2279-2290.

Mino T, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. Water Res 32 (11): 3193-3207.

Nguyen HTT, Le VQ, Hansen AA, Nielsen JL, Nielsen PH (2011) High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating *Tetrasphaera*-related bacteria in activated sludge systems. FEMS Microbiol Ecol 76:256-267.



Nguyen HTT, Nierychlo M, Wimmer R, Nielsen PH (2016) Intracellular accumulation of acetate in *Tetrasphaera elongata* and activated sludge during dynamic anaerobic-aerobic conditions. IWA Specialist Conference Microbial Ecology and Water Engineering 2016: A joint conference of the MEWE and Biofilm specialist groups.

Nielsen PH, Mielczarek AT, Kragelund C, Nielsen JL, Saunders AM, Kong Y, Hansen AA, Vollertsen J (2010) A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Res.* 44:5070-5088.

Rey N, Badia M, Guisasola A, Baeza JA (2016) Understanding the role of *Tetrasphaera* in enhanced biological phosphorus removal. *GENOCOV*.

Rubio-Rincón F, Welles L, Lopez-Vazquez CM, Abbas B, van Loosdrecht MCM, Brdjanovic D (2019) Effect of lactate on the microbial community and process performance of an EBPR system. *Front Microbiol* 10:1-11.

Seviour RJ, Mino T, Onuki M (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol Rev* 27:99-127.

Stokholm-Bjerregaard M, McIlroy SJ, Nierchylo M, Karst SM, Albertsen M, Nielsen PH (2017) A critical assessment of the microorganisms proposed to be important to enhanced biological phosphorus removal in full-scale wastewater treatment systems. *Front Microbiol* 8:1-18.

Yeoman S, Stephenson T, Lester JN, Perry R (1988) The removal of phosphorus during wastewater treatment: A review. *Environmental Pollution* 49:183-233.

Zheng X, Sun O, Han J, Song Y, Hu Z, Lv S (2014) Inhibitory factors affecting the process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) – a mini review. *Process Biochem* 49:2207-2213.

Zou H, Wang Y (2016) Phosphorus removal and recovery from domestic wastewater in a novel process of enhanced biological phosphorus removal coupled with crystallization. *Bioresource Technology*.

Izjava o izvornosti

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

Dora Vlahović

ime i prezime studenta