

# Biološko uklanjanje dušika i fosfora u anaerobno-aerobno-anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju iz otpadne vode niskoga omjera ugljika i dušika

---

Štefanac, Tea

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:971610>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-06**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Tea Štefanac

**BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA I  
FOSFORA U ANAEROBNO-AEROBNO-  
ANOKSIČNOM PROCESU UZ  
ENDOGENU DENITRIFIKACIJU IZ  
OTPADNE VODE NISKOGA OMJERA  
UGLJIKA I DUŠIKA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Tea Štefanac

**BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA I  
FOSFORA U ANAEROBNO-AEROBNO-  
ANOKSIČNOM PROCESU UZ  
ENDOGENU DENITRIFIKACIJU IZ  
OTPADNE VODE NISKOGA OMJERA  
UGLJIKA I DUŠIKA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Tea Štefanac

**BIOLOGICAL REMOVAL OF NITROGEN  
AND PHOSPHORUS IN AN ANAEROBIC-  
OXIC-ANOXIC PROCESS WITH  
ENDOGENOUS DENITRIFICATION  
FROM WASTEWATER WITH A LOW  
CARBON-TO-NITROGEN RATIO**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: PhD Tibela Landeka Dragičević, Full Professor

Zagreb, 2024

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Doktorski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK:

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

### BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA I FOSFORA U ANAEROBNO-AEROBNO- ANOKSIČNOM PROCESU UZ ENDOGENU DENITRIFIKACIJU IZ OTPADNE VODE NISKOGA OMJERA UGLJIKA I DUŠIKA

Tea Štefanac, mag. ing. biotechn.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda

**Mentor:** prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

**Sažetak:** Aktivni mulj iz sustava za pročišćavanje otpadne vode, koji ne provodi napredno biološko uklanjanje fosfora, obogaćen je fosfat akumulirajućim organizmima. Anoksično-aerobno uklanjanje ugljika, dušika i fosfora uz natrijev acetat kao izvor ugljika i C/P 1, 3, 5, 7, 10, rezultiralo je odabirom duljine trajanja anoksične faze procesa od 2 sata, i u aerobnoj fazi daljnjom oksidacijom KPK, 51,9% uklanjanjem fosfora i potpunim uklanjanjem dušika. U anaerobno-aerobno-anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju uz natrijev acetat kao izvor ugljika postignuto je uklanjanje P od 78,5% i uklanjanje N od 76,6% (pri DO  $\geq 2$  mg/L), te uklanjanje P od 77,9% i uklanjanje N od 95,3% (pri DO  $\sim 1$  mg/L). Endogena denitrifikacija je doprinijela uklanjanju NO<sub>x</sub>, te je uklonjeno 73% N, odnosno 97% N. FISH metodom dokazani su klasteri funkcionalnih mikroorganizama (AOB, NOB, DNI, PAOs/DPAOs, GAOs/DGAOs).

**Broj stranica:** 134

**Broj slika:** 37

**Broj tablica:** 11

**Broj literaturnih navoda:** 242

**Broj priloga:** /

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** acetat, anaerobno-aerobno-anoksični proces, DPAOs, endogena denitrifikacija, PAOs

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr. sc. Dijana Grgas, docent

2. dr. sc. Ksenija Durgo, redoviti profesor u trajnom zvanju

3. dr. sc. Mirna Habuda-Stanić, redoviti profesor u trajnom zvanju

**Rad je pohranjen** u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Ph.D. thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition  
UDK:

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

### BIOLOGICAL REMOVAL OF NITROGEN AND PHOSPHORUS IN AN ANAEROBIC- OXIC-ANOXIC PROCESS WITH ENDOGENOUS DENITRIFICATION FROM WASTEWATER WITH A LOW CARBON-TO-NITROGEN RATIO

Tea Štefanac, *MSc*

**Thesis performed** in Laboratory for the Biological Waste Water Treatment, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb

**Supervisors:** PhD Tibela Landeka Dragičević, Full Professor

**Abstract:** Activated sludge from wastewater treatment systems that do not conduct advanced biological phosphorus removal was enriched with phosphate-accumulating organisms. Anoxic-aerobic removal of carbon, nitrogen, and phosphorus, using sodium acetate as the carbon source and varying C/P ratios (1, 3, 5, 7, 10), resulted in the selection of a 2-hour anoxic phase duration. In the aerobic phase, further chemical oxygen demand (COD) oxidation was achieved, 51.9% phosphorus and complete nitrogen removed. In the anaerobic-aerobic-anoxic process with endogenous denitrification, using sodium acetate as the carbon source, phosphorus removal reached 78.5% and nitrogen removal 76.6% (at  $DO \geq 2$  mg/L), and phosphorus removal was 77.9% with nitrogen removal at 95.3% (at  $DO \sim 1$  mg/L). Endogenous denitrification contributed to  $NO_x$  removal, achieving nitrogen removal rates of 73% and 97%, respectively. Functional microorganism clusters (AOB, NOB, DNI, PAOs/DPAOs, GAOs/DGAOs) were confirmed using the FISH method.

**Number of pages:** 134

**Number of figures:** 37

**Number of tables:** 11

**Number of references:** 242

**Number of supplements:** /

**Original in:** Croatian

**Key words:** acetate, anaerobic-oxic-anoxic process, denitrifying phosphate-accumulating organisms (DPAOs), endogenous denitrification, phosphate-accumulating organisms (PAOs)

**Date of the thesis defense:**

**Reviewers:**

1. PhD Dijana Grgas, Assistant Professor
2. PhD Ksenija Durgo, Full Professor
3. PhD Mirna Habuda-Stanić, Full Professor

**Thesis deposited** in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Fakultetsko vijeće Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prihvatilo je temu ovog doktorskog rada pod naslovom „Biološko uklanjanje dušika i fosfora u anaerobno-aerobno-anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju iz otpadne vode niskog omjera ugljika i dušika“ temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanjem mentora na sjednici održanoj 28. veljače 2024., a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 9. srpnja 2024.

## **Informacije o mentoru:**

### **dr. sc. Tibela Landeka Dragičević, redoviti profesor u trajnom zvanju**

Dr. sc. Tibela Landeka Dragičević je redovita profesorica u trajnom zvanju na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, gdje je i doktorirala. Pročelnica je Laboratorija za biološku obradu otpadnih voda. Znanstveno područje rada prof. dr. sc. Landeka Dragičević fokusirano je na mikrobnu ekologiju, biološku obradu otpadnih voda, bioremedijaciju, mikrobiologiju biološkog uklanjanja dušika i fosfora, istraživanje strukture mikrobnih populacija i metaboličke značajke bakterija odgovornih za uklanjanje dušika i fosfora i zaštitu okoliša. Na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu izvodi nastavu na preddiplomskim, diplomskim i doktorskom studiju te je mentorirala brojne završne i diplomske radove, te doktorske disertacije.

Rezultati njezinih istraživanja objavljeni su u znanstvenim časopisima i predstavljeni na međunarodnim konferencijama u obliku postera, usmenih priopćenja i pozvanih predavanja. Stručno se usavršavala na uređajima za obradu otpadnih voda u Austriji, Češkoj i Sloveniji. Sudjelovala je u domaćim i međunarodnim znanstveno-istraživačkim projektima kao voditeljica ili suradnica.



Mentorici, profesorici Tibeli Landeka Dragičević, zahvaljujem na svojoj pomoći i podršci u izradi ove disertacije, kao i u cijelom radnom stažu. Hvala za ideje, poticaje i razumijevanje.

Kolegici doc. dr. sc. Dijani Grgas hvala na pomoći prilikom izrade rada, kao i na ugodnom društvu u Laboratoriju i uredu.

Velika zahvala ide mojoj obitelji, posebno roditeljima Siniši i Zdravki, bez kojih ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Hvala vam što ste uvijek tu uz mene, što podržavate sve moje ideje i što vjerujete u mene od prvoga dana. Hvala i Lani i Matku za svu pomoć i sve naše obiteljske trenutke.

Najveće zahvale upućujem Ivanu i Petri. Ivanu za svu vjeru u mene, za svu pomoć i za beskonačno strpljenje u cijelom ovom procesu. Hvala što si bio uz mene cijelim putem. Petri veliko hvala za to što mi svakog dana pokazuje što znači biti svoja. Volim vas najviše i veselim se svemu što je ispred nas.

## Sažetak:

Biološko uklanjanje dušika i fosfora iz otpadne vode niskoga omjera ugljika i dušika predstavlja izazov zbog potrebe za usklađivanjem različitih metaboličkih zahtjeva funkcionalnih mikroorganizama osiguravanjem odgovarajućih procesnih čimbenika. Vođenje procesa obrade otpadne vode u anaerobno-aerobno-anoksičnim uvjetima uz endogenu denitrifikaciju predstavlja učinkovitu alternativu biološkoj obradi za uklanjanje dušika i fosfora.

Istraživanja disertacije provedena su u anaerobno-aerobno-anoksičnoj konfiguraciji šaržnog reaktora s pritokom supstrata (SBR) uz endogenu denitrifikaciju s ciljem učinkovitog uklanjanja dušika i fosfora iz otpadne vode niskoga omjera ugljika i dušika.

Aktivni mulj iz ne-EBPR sustava obogaćen je fosfat akumulirajućim organizmima (PAOs) prilagodbom procesnih čimbenika njihovim metaboličkim potrebama. U anoksično-aerobnom režimu rada reaktora, s acetatom kao izvorom ugljika, istražena je duljina trajanja anoksične faze procesa za uspješno unutarstanično pohranjivanje polihidroksialkanoata (PHA) u PAOs. Odabrano je vrijeme trajanja anoksične faze od 2 sata. U slijednoj aerobnoj fazi procesa postignuto je uklanjanje preostalog KPK u pokusima pri  $C/P \geq 3$ , potpuna oksidacija amonijaka, nakupljanje  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  (u količinama koje odstupaju od sehiometrijski očekivanih) i aerobni unos fosfata od 51,9%. Povoljni omjer hranjivih tvari za učinkovitost procesa identificiraj je kao  $C/N/P = 10:1:1$ .

Implementacija anoksične faze s endogenom denitrifikacijom omogućila je dodatno uklanjanje  $\text{NO}_x$  bez dodatka vanjskog izvora ugljika. Anaerobno-aerobno-anoksični proces obrade otpadne vode niskoga omjera C/N pri  $\text{DO} \geq 2$  mg/L i  $\text{DO} \sim 1$  mg/L osigurao je uklanjanje  $\text{NH}_4\text{-N}$  brzinom od 11,2 mg/Lh i 9,4 mg/Lh, te unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  brzinom od 9 mg/Lh i 9,4 mg/Lh. Uklonjeno je 78,5% P i 76,6% N pri  $\text{DO} \geq 2$  mg/L, odnosno 77,9% P i 95,3% N pri  $\text{DO} \sim 1$  mg/L.

Prisutnost ključnih mikroorganizama za uspješan rad sustava, uključujući bakterije za oksidaciju amonijaka (AOB), oksidaciju nitrita (NOB), denitrifikaciju (DNI), PAOs, denitrificirajuće fosfat-akumulirajuće organizme (DPAOs), glikogen-akumulirajuće organizme (GAOs) te denitrificirajuće GAO (DGAOs), dokazani su metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH).

Ovi rezultati ukazuju na učinkovitost anaerobno-aerobno-anoksičnog režima uz endogenu denitrifikaciju kao održivog pristupa za obradu otpadnih voda niskoga omjera C/N, pružajući značajan doprinos razvoju naprednih bioloških metoda obrade otpadnih voda.

**Ključne riječi:** acetat, anaerobno-aerobno-anoksični proces, DPAOs, endogena denitrifikacija, PAOs

## Summary:

Biological removal of nitrogen and phosphorus from wastewater with a low carbon-to-nitrogen (C/N) ratio poses a challenge due to the diverse metabolic demands of functional microorganisms and need for ensuring optimal process conditions. Wastewater treatment under anaerobic-aerobic-anoxic conditions with endogenous denitrification represents an effective alternative for biological nitrogen and phosphorus removal.

The research presented in this dissertation was conducted in a sequencing batch reactor (SBR) configured for anaerobic-aerobic-anoxic conditions with endogenous denitrification, aiming to achieve effective nitrogen and phosphorus removal from wastewater with a low C/N ratio.

Activated sludge from a non-EBPR system was enriched with phosphate-accumulating organisms (PAOs) through the adaptation of process factors to their metabolic requirements. In the anaerobic-aerobic operating mode of the reactor, with acetate as the carbon source, the duration of the anaerobic phase was investigated to enable successful intracellular storage of polyhydroxyalkanoates (PHA) in PAOs. An anaerobic phase duration of 2 hours was determined to be optimal. In the subsequent aerobic phase, complete removal of residual chemical oxygen demand (COD) was achieved in experiments with a C/P ratio  $\geq 3$ , along with full ammonia oxidation, accumulation of  $\text{NO}_2\text{-N}$  and  $\text{NO}_3\text{-N}$  (in amounts deviating from stoichiometric expectations), and aerobic phosphate uptake of 51.9%. The optimal nutrient ratio for process efficiency was identified as C/N/P = 10:1:1.

The implementation of an anoxic phase with endogenous denitrification enabled additional  $\text{NO}_x$  removal without the addition of an external carbon source. The anaerobic-aerobic-anoxic wastewater treatment process at a low C/N ratio, with  $\text{DO} \geq 2$  mg/L and  $\text{DO} \sim 1$  mg/L, achieved  $\text{NH}_4\text{-N}$  removal rates of 11.2 mg/Lh and 9.4 mg/Lh, respectively, along with  $\text{PO}_4\text{-P}$  uptake rates of 9 mg/Lh and 9.4 mg/Lh. Phosphorus removal of 78.5% and nitrogen removal of 76.6% were achieved at  $\text{DO} \geq 2$  mg/L, while phosphorus removal of 77.9% and nitrogen removal of 95.3% were achieved at  $\text{DO} \sim 1$  mg/L. The presence of key microorganisms necessary for the successful operation of the system, including ammonia-oxidizing bacteria (AOB), nitrite-oxidizing bacteria (NOB), denitrifying organisms, PAOs, denitrifying phosphate-accumulating organisms (DPAOs), glycogen-accumulating organisms (GAOs), and denitrifying GAOs (DGAOs), was confirmed using fluorescent in situ hybridization (FISH).

These results demonstrate the effectiveness of the anaerobic-aerobic-anoxic regime with endogenous denitrification as a sustainable approach to treating wastewater with a low C/N ratio, contributing significantly to the development of advanced biological wastewater treatment methods.

**Keywords:** acetate, anaerobic-oxic-anoxic process, denitrifying phosphate-accumulating organisms (DPAOs), endogenous denitrification, phosphate-accumulating organisms (PAOs)

## Sadržaj:

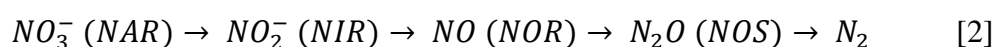
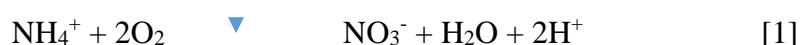
1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Napredno biološko uklanjanje fosfora i metabolizam PAOs .....	3
2.2. Čimbenici EBPR procesa .....	11
2.2.1. Temperatura .....	11
2.2.2. Vrijeme zadržavanja mulja i hidrauličko vrijeme zadržavanja .....	12
2.2.3. Izvor ugljika .....	13
2.2.4. Koncentracija otopljenog kisika .....	14
2.2.5. C/N omjer .....	15
2.2.6. pH .....	15
2.3. Uloga mikrobnih zajednica i procesnih čimbenika u istovremenom uklanjanju dušika i fosfora .....	16
2.4. Utjecaj akceptora elektrona i izvora ugljika na denitrificirajuću defosfataciju .....	20
2.5. Kompetitivna dinamika između PAOs i GAOs mikroorganizama .....	23
2.6. Endogena denitrifikacija .....	25
3. MATERIJALI I METODE .....	30
3.1. Materijali .....	30
3.1.1. Aktivni mulj .....	30
3.1.2. Otpadna voda – sintetska podloga .....	30
3.1.3. Donori i akceptori elektrona – izvor ugljika i NO <sub>2</sub> -N i NO <sub>3</sub> -N .....	31
3.1.4. Aparatura i pribor .....	31
3.2. Metode rada .....	37
3.2.1. Pokusi karakterizacije aktivnog mulja za uklanjanje C, N i P .....	37
3.2.2. Obogaćivanje aktivnog mulja PAOs/ DPAOs/DNPAOs vrstama .....	38
3.2.3. Odabir konfiguracije A-O-A procesa s endogenom denitrifikacijom probirom procesnih čimbenika i kinetika/aktivnost DPAOs i DGAOs u uklanjanju N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju .....	39
3.2.4. FISH analiza aktivnog mulja obogaćenog PAOs-ima za pokuse uklanjanja N i P u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju .....	40
3.3. Analitičke metode .....	43
3.3.1. Određivanje amonijakalnog dušika .....	43
3.3.2. Određivanje koncentracije nitrata .....	43
3.3.3. Određivanje koncentracije nitrita .....	44
3.3.4. Određivanje koncentracije fosfata .....	44

3.3.5. Određivanje ukupnog dušika.....	45
3.3.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK).....	45
3.3.7. Određivanje temperature .....	47
3.3.8. Određivanje pH vrijednosti .....	47
3.3.9. Određivanje koncentracije otopljenog kisika.....	47
3.3.10. Određivanje MLSS.....	47
3.4. Mikrobiološke metode.....	48
3.4.1. Metoda bojanja po Neisseru za određivanje poliP .....	48
3.4.2. Metoda fluorescencijskog bojanja PHB s Nile blue A.....	49
3.5. Određivanje PHA .....	50
3.6. Određivanje acetata .....	50
3.7. Određivanje glikogena .....	51
4. REZULTATI.....	53
4.1. Karakterizacija aktivnog mulja – aktivnost za uklanjanje C, N i P.....	53
4.2. Aktivnost mulja obogaćenog PAOs-ima za uklanjanje N i P .....	63
4.2.1. Rezultati pokusa istovremenog uklanjanja C, N i P s aktivnim muljem obogaćenim PAOs .....	65
4.3. Odabir konfiguracije A-O-A procesa s endogenom denitrifikacijom probirom procesnih čimbenika i kinetika/aktivnost DPAOs i DGAOs u uklanjanju N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju .....	73
4.4. FISH analiza mikrobnih zajednica za uklanjanje N i P.....	76
5. RASPRAVA.....	80
5.1. Učinkovitost aktivnog mulja za uklanjanje C, N i P – karakterizacija aktivnog mulja	80
5.2. Aktivnost mulja obogaćenog PAOs .....	91
5.2.1. Istovremeno uklanjanje C, N i P s aktivnim muljem obogaćenim PAOs .....	94
5.3. Aktivnost DPAOs i DGAOs u uklanjanju N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju .....	98
5.4. Mikroorganizmi u aktivnom mulju – FISH analiza .....	101
6. ZAKLJUČCI .....	103
7. LITERATURA .....	104

## 1. UVOD

Učinkovito biološko uklanjanje dušika i fosfora iz otpadne vode niskoga omjera ugljika i dušika predstavlja dugotrajan izazov u području obrade otpadnih voda (Dorofeev i sur., 2020). Sukladno važećem zakonodavstvu (NN 26/2020) utvrđene su maksimalno dopuštene koncentracije hranjivih tvari u pročišćenim otpadnim vodama koje služe kao standardi za uređaje za pročišćavanje otpadnih voda. Stoga su istraživanja usmjerena na razumijevanje procesa biološke obrade otpadnih voda, razvoj novih tehnologija i poboljšanje postojećih procesa biološke obrade otpadnih voda. Problem proizlazi iz potreba za osiguravanjem odgovarajućih procesnih čimbenika koji omogućuju koegzistenciju i učinkovito djelovanje različitih funkcionalnih mikroorganizama. Učinkovita alternativa biološkoj obradi otpadnih voda za istovremeno uklanjanje dušika i fosfora je vođenje procesa u anaerobno-aerobno-anoksičnoj (engl. Anaerobic-Oxic-Anoxic, A-O-A) konfiguraciji uz endogenu denitrifikaciju.

Uklanjanje dušika iz otpadnih voda ostvaruje se kroz procese nitrifikacije i denitrifikacije, koji se odvijaju u aerobnim, odnosno anoksičnim uvjetima. Dušik u otpadne dospijeva industrijskim procesima, otpadom, gnojivima ili ostacima hrane. U procesu nitrifikacije dolazi do oksidacije amonijaka ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) do nitrata ( $\text{NO}_3$ ) djelovanjem nitrificirajućih bakterija (NI), a procesom denitrifikacije dobiveni  $\text{NO}_3$  reducira se do plinovitog dušika ( $\text{N}_2$ ) djelovanjem denitrificirajućih bakterija (DNI) uz osigurane donore elektrona (Metcalf & Eddy, 2003), prikazano jednadžbama 1 i 2.



Nitrifikacija je dvostupanjski proces. U koraku nitritacije, bakterije koje oksidiraju amonijak (AOB) oksidiraju amonijeve ione u nitrit preko hidroksilamina uz djelovanje enzima amonij-monooksigenaza (AMO) i hidroksilamin-oksidoreduktaza (HAO). U koraku nitratacije, bakterije koje oksidiraju nitrit (NOB) oksidiraju nitrit u nitrat uz pomoć enzima nitrit-oksidoreduktaze (NOR) (Metcalf & Eddy, 2003; Zhu i sur., 2008). U procesu denitrifikacije,  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  se reduciraju u plinovite oblike dušika korištenjem elektron donora poput metanola, acetata i organskih komponenti iz otpadnih voda (Miao i Liu, 2018). Biološka denitrifikacija odvija se u četiri koraka (jednadžba 2): (i) redukcija  $\text{NO}_3\text{-N}$  u  $\text{NO}_2\text{-N}$



uz pomoć enzima nitrat-reduktaze (NAR); (ii) redukcija  $\text{NO}_2\text{-N}$  u dušikov oksid (NO) uz pomoć enzima nitrit-reduktaze (NIR); (iii) redukcija NO u didušikov oksid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) uz pomoć enzima dušikov oksid-reduktaze (NOR); (iv) redukcija  $\text{N}_2\text{O}$  u molekularni dušik ( $\text{N}_2$ ) uz pomoć enzima didušikov oksid-reduktaze (NOS), koji se potom ispušta u atmosferu (Parés & Juárez, 1997; Rajta i sur., 2019).

U otpadnim vodama fosfor se pojavljuje u tri oblika: (i) ortofosfat, (ii) polifosfat i (iii) organski fosfat. Ukupni fosfor (TP) u otpadnoj vodi uobičajeno se kreće između 4 i 8 mg/L (3 - 4 mg/L fosfata, 2-3 mg/L polifosfata i 1 mg/L organski vezanog fosfata) (Moore, 2009). Fosfor u otpadne vode ulazi putem sintetičkih gnojiva, industrijskog ili kućnog otpada, pesticida, erozijom tla i drugo. Uklanjanje fosfora iz otpadnih voda provodi se naprednim biološkim uklanjanjem fosfora i temelji se na djelovanju fosfat akumulirajućih organizama (engl. Phosphate Accumulating Organisms, PAOs) i denitrificirajućih fosfat akumulirajućih organizama (engl. Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms, DPAOs). PAOs i DPAOs uklanjanju fosfor u naizmjenično slijednim anaerobnim i potom aerobnim ili anoksičnim uvjetima uz različite donore elektrona (kisik ili nitrat i/ili nitrit) (Zheng i sur., 2014; Li i sur., 2019). Fosfor se uklanja odvođenjem viška mulja bogatog fosforom.

Endogena denitrifikacija, kao inovativan pristup, omogućuje mikroorganizmima korištenje unutarstanično pohranjenih zaliha ugljika kao donora elektrona i  $\text{NO}_2\text{-N}$  ili  $\text{NO}_3\text{-N}$  kao akceptore elektrona u odsutnosti kisika. Ovaj proces smanjuje potrebu za vanjskim izvorima ugljika, čime se smanjuju operativni troškovi i povećava učinkovitost sustava (Wang i sur., 2015; Zhao i sur., 2019). Za postizanje učinkovitih rezultata nužno je osigurati zadovoljavajuće procesne uvjete poput temperature, pH vrijednosti i trajanja procesa.

Ciljevi ove disertacije definirani su s ciljem rješavanja izazova vezanih uz obradu otpadnih voda s niskim omjerom ugljika i dušika te uključuju:

- istraživanje doprinosa produžene anoksične zone koja omogućava provođenje endogene denitrifikacije, kao i doprinos duže anaerobne zone na unutarstaničnu pohranu hlapljivih masnih kiselina (engl. Volatile Fatty Acid, VFA) i njihovo skladištenje u obliku polifosfata, te otpuštanje fosfata iz PAOs,
- istraživanje aerobnog i anoksičnog unosa fosfata u stanice u obliku polifosfata i
- istraživanje učinkovitosti simultanog uklanjanja ugljika, dušika i fosfora pri odabranoj konfiguraciji procesa pomoću odabira odgovarajućih procesnih čimbenika i njihovu ulogu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Napredno biološko uklanjanje fosfora i metabolizam PAOs

Uklanjanje fosfora iz otpadne vode danas predstavlja potrebu, a ne luksuz. Stroge zakonske regulative imaju u cilju sprječavanje ispuštanja nedovoljno obrađenih otpadnih voda u okoliš zbog negativnog utjecaja na ljude, životinje i okoliš (NN 26/2020). Eutrofikacija kao proces obogaćivanja vode hranjivim tvarima, što dovodi do prekomjernog rasta algi i drugih biljnih vrsta, nedostatka kisika u vodenom mediju i smanjenja kvalitete vode, je globalni problem, a upravo se fosfor smatra kritičnim faktorom (Bennett i sur., 2001). U tablici 1 dane su granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama, za odabrane pokazatelje.

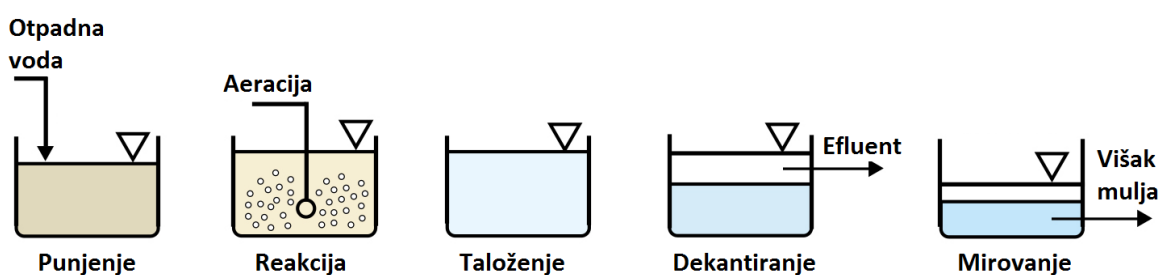
Tablica 1. Granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama, za odabrane pokazatelje (NN 26/2020)

Pokazatelji i mjerne jedinice	Izraženi kao	Jedinica	Površinske vode	Sustav javne odvodnje
<b>ANORGANSKI POKAZATELJI</b>				
<b>Ukupni fosfor</b>	P	mg/L	2,0 (1,0 jezera)	10,0
<b>Ukupni dušik</b>	N	mg/L	15,0	50,0
<b>Amonij</b>	N	mg/L	10,0	–
<b>Nitriti</b>	N	mg/L	1,0	10,0
<b>Nitrati</b>	N	mg/L	2,0	–

Napredno biološko uklanjanje fosfora (engl. Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) je najekonomičniji način uklanjanja fosfora jer omogućuje učinkovito uklanjanje bez korištenja dodatnih kemikalija poput spojeva željeza, aluminija, kalcija ili magnezija koje su nužne kod kemijskog uklanjanja fosfora (Long i sur., 2021). Prednost EBPR procesa je i dobivanje mulja bogatog fosforom koji može služiti pri uporabi fosfora obzirom da on predstavlja neobnovljivi element u prirodi čija potrošnja raste svakodnevno. Intenzivno se

istražuje zadnjih desetljeća, ali detaljan sastav zajednice mikroorganizama zaslužnih za uklanjanje fosfora iz otpadne vode i dalje djelomično predstavlja nepoznanicu. Temelj klasičnog EBPR procesa je kombinacija anaerobnih i aerobnih uvjeta rada reaktora i formiranje mikrobne biomase s naglaskom na rast bakterija sa sposobnošću akumuliranja fosfora u količinama većima od bazične potrebe (Comeau i sur., 1986). Te bakterije nazvane su fosfat akumulirajućim organizmima (engl. Polyphosphate Accumulating Organisms, PAOs) i istražuju se više od 50 godina (Nielsen i sur., 2019).

Biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode provodi se anaerobnim i aerobnim uvjetima s PAOs koji mogu akumulirati više od 0,38 mgP/mgVSS. U EBPR procesu količina unesenog fosfora povećana je s 0,02 mgP/mgVSS koji se postižu u aerobnim sustavima s aktivnim muljem, na 0,06 – 0,15 mgP/mgVSS odnosno 0,05 – 0,10 mgP/mgTSS (Wentzel i sur., 2008). Uspješnost EBPR procesa ovisi o strukturi i funkcionalnosti prisutnih mikroorganizama u aktivnom mulju, sastavu otpadne vode, te procesnim čimbenicima (izvor ugljika, temperatura, pH, DO (engl. Dissolved Oxygen)). Često se za uklanjanje fosfora ili simultano uklanjanje dušika i fosfora koristi šaržni reaktor s pritokom supstrata (engl. Sequencing Batch Reactor, SBR) (slika 1) zbog svojih prednosti odvijanja reakcije i sedimentacije u istom reaktoru, fleksibilnosti operacijskih čimbenika i ekonomičnosti. Rad SBR odvija se u ciklusima koji uključuju punjenje otpadne vode u reaktor, reakciju, taloženje aktivnog mulja, odvođenje obrađene otpadne vode i viška mulja.

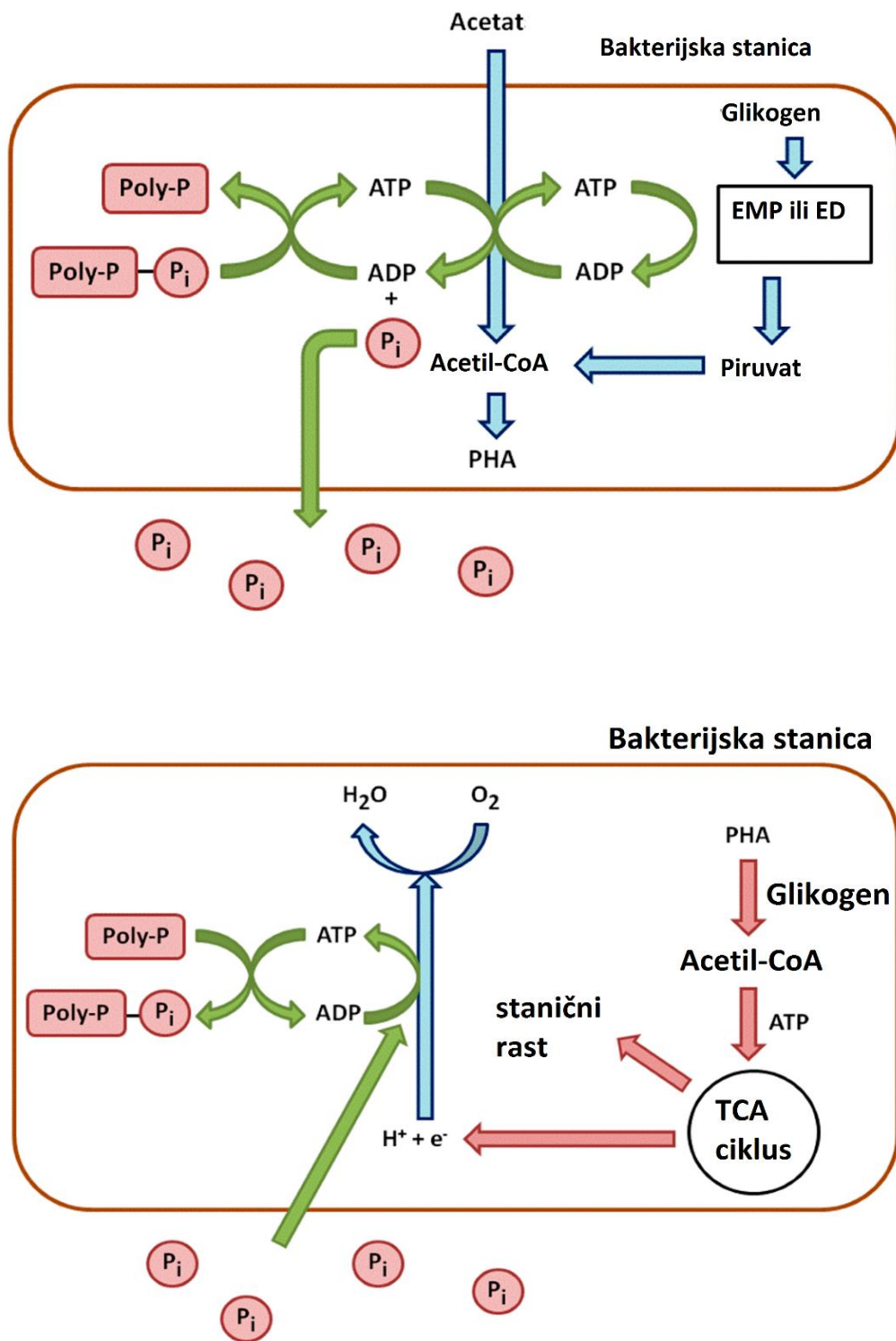


Slika 1: Shematski prikaz rada SBR reaktora (preuzeto i prerađeno s Elysian, 2024)

Zbog kompleksnosti influenta EBPR proces podložan je inhibiciji sastojcima otpadne vode inhibicijom PAOs. Postoji nekoliko tvari u otpadnim vodama koji inhibiraju biološki

proces uklanjanja fosfora — farmaceutici (doksiciklin, tetraciklin, diklofenak), teški metali (bakar, kositar, srebro, krom), soli, H<sub>2</sub>S i nanomaterijali (Tsai i Chen, 2011; Welles i sur., 2014; Zhao i sur., 2020). Ponekad zbog nedostatka izvora ugljika ili kratkog hidrauličkog vremena zadržavanja, dolazi do akumulacije nitrita tijekom procesa denitrifikacije, što se naziva djelomična/parcijalna denitrifikacija (engl. Partial Denitrification, PD) (Peng i sur., 2021). U usporedbi s potpunom denitrifikacijom, primjena PD-ANAMMOX tehnologije u urbanim postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda može uštedjeti oko 80% izvora ugljika i 50% potrošnje energije za prozračivanje (Saunders i sur., 2003).

PAOs vrste specifične su u odnosu na druge vrste zbog specifičnosti metabolizma u anaerobnim i aerobnim/anoksičnim uvjetima (slika 2). U anaerobnim uvjetima PAOs skladišti organske tvari iz otpadne vode u obliku polifosfata (polihidroksialkanoata, PHA ili polihidroksibutirata, PHB) koristeći energiju dobivenu hidrolizom glikogena i polifosfata. U anaerobnom dijelu dolazi do otpuštanja ortofosfata van stanice i povećanja koncentracije fosfora u otopini. Prelaskom na aerobne/anoksične uvjete dolazi do unošenja fosfata energijom dobivenom razgradnjom PHA. Unos fosfata u aerobnoj fazi veći je od otpuštanja u anaerobnoj fazi čime se omogućuju uklanjanje fosfora iz otpadne vode odvođenjem mulja. Brzina asimilacije kratkolančanih masnih kiselina (engl. Volatile Fatty Acids, VFA), najčešće propionata ili acetata u anaerobnim uvjetima omogućava kompetitivnu prednost PAOs nad ostalim mikroorganizmima u aktivnom mulju (Zheng i sur., 2014). Međutim, PAOs mogu asimilirati i karboksilne kiseline, šećere i aminokiseline uz veliku uspješnost procesa (Nielsen i sur., 2010). Potpuni unos VFA tijekom anaerobne faze ključan je za uspješan EBPR proces, a učinkovito uklanjanje fosfora postiže se pri KPK (kemijska potrošnja kisika)/P omjeru najmanje 35 i BPK (biokemijska potrošnja kisika )/P omjeru 20 (Moore, 2009).



Slika 2: Metabolizam PAOs u anaerobnim i aerobnim uvjetima (preuzeto i prerađeno od Tarayre i sur., 2016)

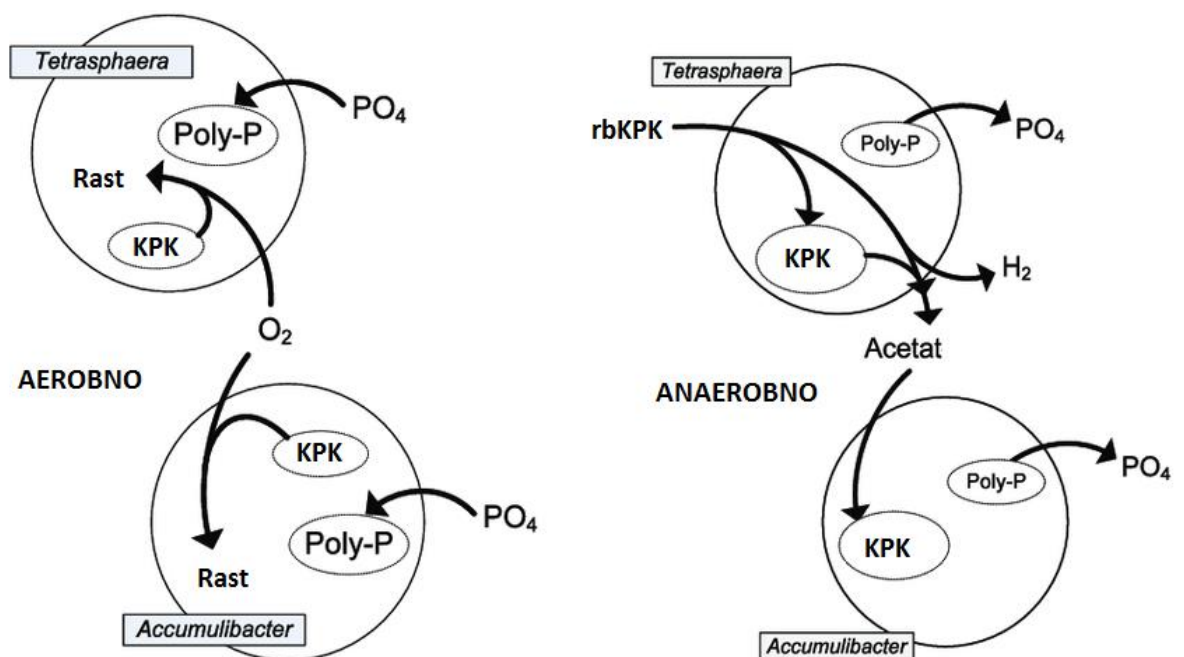
Dugo vremena je modelnim organizmom EBPR procesa i jedinim odgovornim za učinkovito uklanjanje fosfora smatran *Candidatus Accumulibacter phosphatis* kao predstavnik

PAOs bakterija. Detaljnijim i novijim istraživanjima otkriven je rod *Tetrasphaera* koji ne posjeduje isti metabolizam, ali pokazuje veliku uspješnost u uklanjanju fosfora kao i zastupljenost od do 30% u uređajima za obradu otpadnih voda koji provode EBPR proces (Nguyen i sur., 2011). Specifičnost roda *Tetrasphaera* očituje se u sposobnosti iskorištavanja različitih supstrata te varijabilnim mehanizmima generiranja energije, čime se učinkovito prilagođava dinamičnim uvjetima u sustavu obrade otpadnih voda. Istaknuta fermentacijska aktivnost ovog roda naročito je važna u slučajevima kada otpadna voda nije prirodno bogata hlapljivim masnim kiselinama (VFA). Kroz fermentacijske procese *Tetrasphaera* pretvara aminokiseline i glukozu u VFA, koje zatim postaju dostupan izvor ugljika za vrste iz roda *Accumulibacter*, čime se ukupno povećava efikasnost biološkog uklanjanja fosfora iz otpadnih voda. Glukoza, aspartat, glicin i glutamat smatraju se poželjnim izvorom ugljika za nakupljanje *Tetrasphaera* u mulju (Marques i sur., 2017).

*Tetrasphaera* je prvi put izolirana tek 1996. godine (Kataoka i sur., 1996), a njena sposobnost akumulacije fosfora opisana je 2000. godine (Maszenan i sur., 2000). Do 2002. godine identificirana su tri soja – *T. australiensis*, *T. elongata* i *T. japonica*. Danas se rod *Tetrasphaera* svrstava porodici Intrasporangiaceae, odjeljka Actinobacteria. Poznato je osam vrsta roda *Tetrasphaera*: *T. australiensis*, *T. duodecedis*, *T. elongata*, *T. japonica*, *T. jenkinsii*, *T. remsis*, *T. vanvenii* te *T. veronensis* koji se razlikuju morfološki, po metabolizmu, i u zastupljenosti u aktivnom mulju. Razvrstani su u 3 grane: (i) grana I (*T. duodecedis* i *T. elongata*), (ii) grana II (*T. australiensis*, *T. jenkinsii* i *T. veronensis*), i (iii) grana III (*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). Singleton i sur. (2022) zaključili su da grana III zapravo predstavlja dva različita roda – *Ca. Phosphoribacter* i *Ca. Lutibacillus* i istaknuli da je *Ca. Phosphoribacter* zapravo najzastupljenija PAOs vrsta u EBPR sustavima Danske i globalno. Grana III pod oksičnim i anoksičnim uvjetima pokazuje sposobnost korištenja različitih izvora ugljika, šećera i aminokiselina, sposobnost fermentacije do acetata ili alanina, i korištenje nitrata ili nitrita kao akceptora elektrona. Prepreka detaljnijim istraživanjima i zaključcima je nemogućnost izolacije i kultivacije ovih vrsta.

Metabolizam *Tetrasphaera* (slika 3) još uvijek nije u potpunosti istražen, ali razlikuje se od „klasičnog“ metabolizma PAOs vrsta opisanog ranije na primjeru *Ca. Accumulibacter*, iako se uklanjanje fosfora iz otpadne vode postiže u oba slučaja. Energija za skladištenje polifosfata osigurava se denitrifikacijom ili fermentacijom. Kod najistraživijeg roda *Tetrasphaera* – *T. elongata* unošenje polifosfata u stanice odvija se pod aerobnim uvjetima, a

otpuštanje pri anoksičnim uvjetima. Određene vrste *Tetrasphaera*, poput *T. elongata*, koriste VFA (acetat i propionat), ali u manjoj mjeri od *Accumulibacter* vrsta, dok su aminokiseline i glukoza češći izvori ugljika. Korištenje hidrolizata kazeina i glutamata kao jedinih izvora ugljika omogućilo je uklanjanje fosfora >99% (Rey i sur., (2016), Marques i sur. (2017)). U slučajevima kada je otpadna voda siromašna na VFA, sposobnost *Tetrasphaera* da izvrši fermentaciju supstrata do acetata služi kao izvor acetata za druge PAOs vrste i izvor energije za *Tetrasphaera*. Uz prisustvo *Tetrasphaera* dolazi do uklanjanja fosfora i u anaerobnoj fazi procesa uz energiju iz fermentacije glukoze i aminokiselina (Marques i sur., 2017).

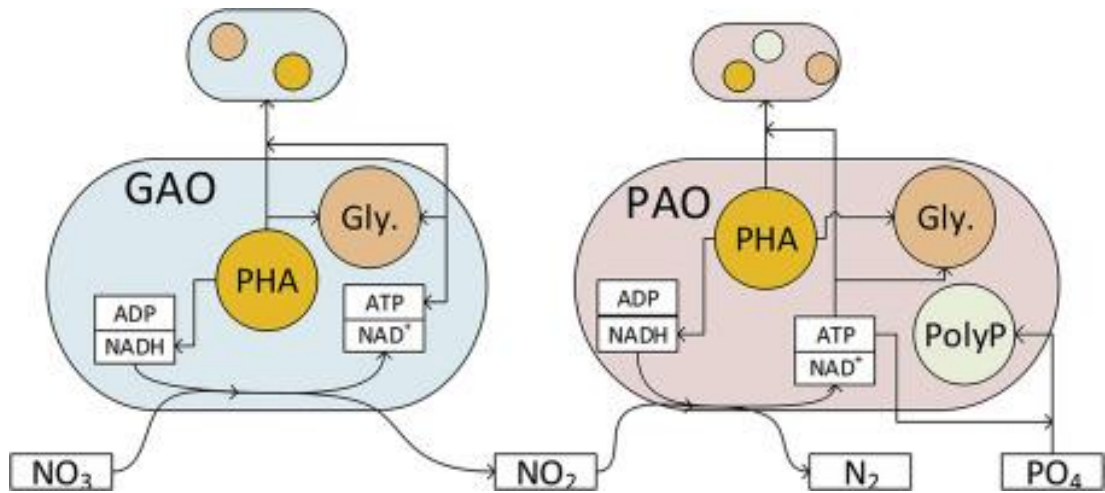


Slika 3. Metabolizam *Tetrasphaera* pod anaerobnim i aerobnim uvjetima (preuzeto i prilagođeno od Dunlap i sur., 2016)

Istraživanje metabolizma glikogena kod *Tetrasphaera* posebno je izazovno zbog kontradiktornih rezultata koje znanstvenici dobivaju. Raznolikost rezultata povezanih s metabolizmom *Tetrasphaera* može se objasniti utjecajem faktora temperature, izvora ugljika, pH vrijednosti i prisutnih makronutrijenata (Nielsen i sur., 2010). Također, razlike mogu nastati zbog upotrebe različitih molekularnih tehnika, koje je teško prilagoditi širokoj morfološkoj i metaboličkoj raznolikosti ovih vrsta. Marques i sur. (2017) zaključili su da *Tetrasphaera* preferira glikogen kao primarni izvor energije, što znači da se on u anaerobnim uvjetima troši,

a aerobnim obnavlja. S druge strane, Kristiansen i sur. (2013) sintezu glikogena u anaerobnim uvjetima i njegovo korištenje u aerobnim uvjetima pripisuju potrebi za energijom za asimilaciju ortofosfata i sintezu unutarstaničnih polifosfata. Međutim, Fernando i sur. (2019) nisu u stanicama uopće identificirali glikogen čime se otvara prostor za mogućnost anaerobnog održavanja *Tetrasphaera* energijom dobivenom hidrolizom polifosfata i fermentacijom glukoze i aminokiselina. Za obnavljanje unutarstaničnih polifosfata *Tetrasphaera* u sljedećoj fazi koristi nusproizvode fermentacije (Fernando i sur., 2019). Rubio-Rincón i sur. (2019) istraživali su utjecaj laktata kao izvora ugljika na mikrobnu selekciju i učinkovitost EBPR procesa u SBR reaktoru radnog volumena 2,5 L uz anaerobno-aerobne cikluse u trajanju 6 sati i vrijeme zadržavanja mulja (engl. Sludge Retention Time, SRT) 15 dana. Fermentacijom laktata nastaju propionat i acetat koji su izvori za rast PAOs poput *Tetrasphaera* i *Ca. Accumulibacter*. Izvor ugljika bio je kombinacija acetata, propionata i laktata (1210 mg/L, 70 mg/L i 120 mg/L) ili sam laktat (3400 mg/L) u fazama I i II procesa. Udio *Ca. Accumulibacter phosphatis* bio je veći su fazi I nego u fazi II, dok su GAOs vrste činile <1% tijekom cijelog procesa, neovisno o izvoru ugljika. Dominantni organizam bio je *Tetrasphaera*, međutim niti on niti *Ca. Accumulibacter* nisu provodili uklanjanje fosfora uz laktat kao jedini izvor ugljika. Aktivni mulj u EBPR procesu je složen sustav i istraživanja usmjerena samo na jednu vrstu unutar sustava mogu dovesti do nepotpunih zaključaka. Iako je dugo smatrano da GAOs vrste ne bi trebale biti zastupljene u postrojenjima za obradu otpadnih voda zbog kompeticije s PAOs vrstama za VFA, pokazano je da su za uspješnu provedbu EBPR procesa važni suodnosi između različitih PAOs i GAOs (glikogen akumulirajućih organizama, engl. Glycogen Accumulating Organisms) vrsta. Razlika u metabolizmu između PAOs i GAOs prikazana je na slici 4. U anaerobnim uvjetima GAOs hidroliziraju glikogen kako bi dobili energiju potrebnu za unos VFA i sintezu PHA. U narednoj aerobnoj fazi, PHA se oksidira kako bi se dobila energija za obnavljanje zaliha glikogena (iz PHA) i za rast stanica (Zeng i sur., 2002). GAO mogu unositi VFA bez anaerobnog oslobađanja fosfora i naknadnog aerobnog preuzimanja fosfora.





Slika 4. Razlike metabolizma PAOs i GAOs (preuzeto od Rubio-Rincón i sur., 2017)

U postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda, dominantna EBPR zajednica sadrži *Candidatus Accumulibacter*, *Tetrasphaera*, *Nitrosomonas* i denitrifikante kao što su *Zooglea*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* s proteobacteria, bacteroidota i actinobacteria (Zheng i sur., 2014). Utvrđeno je da je održavanje uvjeta koji podržavaju proliferaciju PAOs u odnosu na GAOs ključno za stabilnost EBPR sustava (Oehmen i sur., 2007; Zhao i sur., 2020). *Tetrasphaera* može unijeti različite organske tvari kao što su aminokiseline i/ili glukozu i pohraniti ih u različitim oblicima ili proizvesti druge produkti fermentacije kao što su hlapljive masne kiseline (VFA) (Kong i sur., 2005; Kristiansen i sur., 2013; Marques i sur., 2017). Oni mogu služiti kao izvori ugljika i energije za aerobni unos P. *Tetrasphaera* može anaerobno opskrbljivati druge PAOs vrste s VFA (Nguyen i sur., 2015; Herbst i sur., 2019). Iako su metabolizam i fiziologija bakterije *Accumulibacter* dobro poznati, metabolizam bakterije *Tetrasphaera* i njezina reakcija na različite operativne uvjete EBPR manje su poznati (Liu i sur., 2019; Rubio-Rincón i sur., 2019) zbog raznolike fiziologije i značajno drugačijeg metabolizma. U istraživanjima o *Tetrasphaeri* u usporedbi s *Accumulibacter* opaža se niži omjer otpuštanja P/unosa C (Kristiansen i sur., 2013; Nguyen i sur., 2015; Marques i sur., 2017; Nielsen i sur., 2019), što sugerira manji zahtjev za ATP iz hidrolize polifosfata za anaerobni unos C. Uočeno je da aktivni mulj obogaćen *Tetrasphaera* i *Accumulibacter* vrstama pokazuje značajno bolju učinkovitost uklanjanja P u usporedbi s kulturama koji su visoko obogaćeni samom *Tetrasphaerom* (Close et al., 2021) što podupire hipotezu da je obogaćivanje više PAOs skupina korisno za učinak EBPR.

Da bi se razumjela metabolička karakterizacija PAOs, potrebno je izvršiti mjerenje enzima povezanih sa sintezom PHA. Sinteza PHA glavni je dio uključen u proces EBPR. Osam enzima ima vitalne uloge u putu sinteze PHA, a poznati su kao beta-ketotiolaza, NADH-vezana acetoacetyl-CoA reduktaza, NADPH-vezana acetoacetyl-CoA reduktaza, piruvat kinaza, piruvat karboksilaza, fosfoenolpiruvat karboksilaza, malat dehidrogenaza i laktat dehidrogenaza (Mino et al., 1998). Uočeno je da je među osam enzima koncentracija enzima odgovornih za redukciju acetoacetyl-CoA u hidroksibutiril-CoA, enzima odgovornog za dimerizaciju acetyl-CoA u acetoacetyl-CoA i za pretvorbu oksaloacetata u malat veća u laboratorijskim reaktorima s otpadnom vodom bogatom acetatom. Stoga je acetoacetyl-CoA reduktaza vjerojatno esencijalni enzim koji igra vitalnu ulogu u sintezi PHA i može se smatrati ključnim enzimom u EBPR sustavu. Fluorescentna in situ hibridizacija korištenjem 16S-rRNA proba metoda je bojenja koja pomaže identificirati filogenetiku bakterija (Pernthaler i sur., 2002).

## **2.2. Čimbenici EBPR procesa**

### **2.2.1. Temperatura**

Povećanje temperature otpadne vode utječe na topivost kisika u vodi, proces adsorpcije kisika i koeficijent reaeracije (Alisawi, 2020). Mikrobne zajednice dijele se na mezofile (optimalna temperatura rasta mikroorganizama je 32,5 °C), termofile (optimalna temperatura 60,0 °C), psihrofile (optimalna temperatura 12,5 °C) i hipotermofile koji rastu na temperaturama iznad 100 °C (Eckenfelder, 1980). Temperatura utječe i na učinkovitost procesa uklanjanja dušika i fosfora iz otpadne vode.

Dugo je smatrano je da temperatura ispod 20°C pogodna za EBPR proces (Oehmen i sur., 2007), dok temperatura iznad 25°C pogoduje GAOs vrstama u odnosu na PAOs vrste i time onemogućava uspješan EBPR proces (Qiu i sur., 2019). Optimalnom temperaturom za unos fosfora smatrana je temperatura 20°C uz pH 8 i DO 2 mg/L (Nittami i sur., 2011). Novija istraživanja pokazuju da je moguće voditi učinkoviti EBPR proces i pri temperaturama u rasponu 24-32°C (Ong i sur., 2014).

Ong i sur. (2014) postigli su uklanjanje >95% fosfora pri 28°C u SBR reaktoru s acetatom kao jedinim izvorom ugljika (50 mgC/L i C:P 3:1) s finalnim koncentracijama P u efluentu ispod 1,0 mg/L. Udio *Accumulibacter* vrsta (PAOs) u populaciji bakterija smanjuje se s povećanjem temperature (s 64% pri 24°C na 19% pri 32°C), a udio *Competibacter* vrsta (GAOs) raste (s <10% pri 24°C na 40% pri 32°C), ali ne ometa rad sustava. Učinkovitost

uklanjanja fosfora u svim pokusima bila je u rasponu 95 do 99%, a stopa uklanjanja u rasponu od 1,9 do 2,5 mgP/gVSS h. Uspješno uklanjanje fosfora pri višim temperaturama (28,7 – 31,6°C) provodili su i Qiu i sur. (2019) uz 24 različita izvora ugljika (šećeri, alkoholi, VFA, aminokiseline i karboksilne kiseline) s početnim KPK 300 mg/L i koncentracijom aktivnog mulja (engl. Mixed Liquor Suspended Solids, MLSS) 2,0 g/L. VFA su se pokazali kao najučinkovitiji izvori ugljika za unos P u stanice, a najdominantniji PAOs bio je *Ca. Accumulibacter*. S njima u suglasju su i Shen i sur. (2017) koji su pokazali da je u pokusima pri višoj temperaturi (30-32°C) acetat zaslužan za stabilni EBPR proces i stabilnu mikrobnu zajednicu s *Accumulibacter* Clade IIC kao najzastupljenijim PAOs. Pokazano je da niže temperature negativno utječu na aktivnost mikrobne zajednice, pogotovo autotrofnih nitrifikanata (Yao i sur., 2013), i da su amonijak oksidirajuće bakterije (engl. Ammonium Oxidizing Bacteria, AOB) i nitrit oksidirajuće bakterije (engl. Nitrite Oxidizing Bacteria, NOB) inhibirane pri temperaturi od 10 °C (Kim i sur., 2006). Ipak, Zou i sur. (2014) proveli su uspješno uklanjanje dušika pri nižim temperaturama (10 °C) s muljem aklimatiziranim na niske temperature i uz dodatak vanjskog izvora ugljika. Uklanjanje fosfora bez nitrifikacije pri temperaturi od 20 °C zahtijeva SRT (engl. Sludge Retention Time) od 2,5 dana, a pri duplo nižoj temperaturi 4,5 dana (Nielsen i sur., 1999). Huang i sur. (2019) istraživali su biološko uklanjanje nutrijenata u SBR reaktoru pri 10 °C i postigli uklanjanje amonijaka, ukupnog dušika (TN, engl. Total Nitrogen) i ukupnog fosfora (TP, engl. Total Phosphorus) od 98,82%, 94,12% i 96,04% pri SRT 60 dana uz *Ca. Accumulibacter*, *Dechloromonas*, *Haliangium* i *Candidatus Contendobacter* s zastupljenošću od 12,18%, 7,54%, 6,69% i 3,40%, te *Nitrosomonas* i *Nitrosopumilus* s zastupljenošću od 0,36% i 0,0005%. Duži SRT omogućuje obogaćivanje mulja denitrificirajućim fosfat akumulirajućim organizmima (engl. Denitrifying Polyphosphate Accumulating Organisms, DPAOs) i učinkovitu obradu pri nižim temperaturama. Li i sur. (2019) također su postigli uspješnu simultanu nitrifikaciju, denitrifikaciju i uklanjanje fosfora u SBR reaktoru radnog volumena 5 L s ciklusom trajanja 6 sati i s KPK/N omjerom 6 pri temperaturi 10 ± 1 °C. Postigli su uklanjanje 89,6% TN i 97,5% TP uz SRT 25 dana i MLSS 3000 mg/L. Sposobnost PAOs (i to PAOII grupe) da provode denitrificirajuće uklanjanje fosfora nitritnim putem omogućila je uspješnost procesa.

#### 2.2.2. Vrijeme zadržavanja mulja i hidrauličko vrijeme zadržavanja

SRT se prvenstveno smatra važnim čimbenikom koji utječe na učinkovitost uklanjanja hranjivih tvari (dušika i fosfora) i na karakteristike mulja, te na proizvodnju sekundarnih onečišćujućih tvari (npr. dušikov oksid) u procesima biološkog uklanjanja hranjivih tvari (engl.

Biological Nutrient Removal, BNR). U literaturi je navedeno da visoki SRT (>30 dana) dovodi do povećane potrebe za kisikom i povećane potrošnje energije, dok vrlo niski SRT (<5 dana) utječe na povišeni amonijak i povišeni BPK u pročišćenom efluentu (Srivastava i sur., 2023). Stoga je uspostavljanje optimalnog SRT krajnji uvjet za zadovoljavanje svih kriterija, uključujući učinkovitu simultanu nitrifikaciju i denitrifikaciju (engl. Simultaneous Nitrification-Denitrification, SND), konvencionalnu nitrifikaciju i denitrifikaciju, EBPR, taloženje, uklanjanje KPK, smanjenu potrošnju energije i nisku proizvodnju mulja.

Vrijeme zadržavanja mulja (engl. Sludge Retention Time, SRT) utječe na učinkovitost EBPR procesa jer se uklanjanjem mulja s akumuliranim fosforom postiže uklanjanje fosfora iz otpadne vode. SRT potreban za uspješan EBPR proces iznosi 10 dana (Carrera i sur., 2001), a učinkovitost procesa pada rastom SRT (Ersu i sur., 2010) jer duži SRT pogoduje GAOs vrstama što može negativno utjecati na učinkovitost EBPR procesa. Ukoliko se osim uklanjanja fosfora provodi i uklanjanje dušika, SRT će ovisiti o spororastućim nitrifikantima, jer smanjenjem SRT dolazi i do smanjenja učinkovitosti uklanjanja dušika. Whang i sur. (2006) zaključili su da GAOs imaju nižu stopu rasta biomase od PAOs te stoga prevladavaju pri višim SRT vrijednostima.

Hidrauličko vrijeme zadržavanja (engl. Hydraulic Retention Time, HRT) kao parametar koji utječe na EBPR proces trebao bi iznositi 0,5-2 h u anaerobnom dijelu, 1-4h u anoksičnom dijelu i 4-12 h u aerobnom dijelu za omogućavanje procesa otpuštanja fosfora, denitrifikacije i simultane nitrifikacije i unosa fosfora u stanice (Zhang i sur., 2016).

### 2.2.3. Izvor ugljika

Izvor ugljika utječe na sastav mikrobne zajednice što ga čini važnim čimbenikom u uklanjanju dušika i fosfora. PAOs vrste imaju sposobnost unosa VFA u stanice u anaerobnim uvjetima što im daje prednost nad običnim heterotrofnim mikroorganizmima (engl. Ordinary Heterotrophic Organisms, OHOs), te VFA (pogotovo acetat i propionat) čini esencijalnim za uspješan EBPR proces (Barnard, 2014). Fermentacija otpadne vode pogoduje PAOs vrstama zbog povoljnog omjera acetata i propionata (Oehmen i sur., 2005). Također, vrste izvora ugljika utječu na kompeticiju između PAOs i GAOs vrsti. Najčešće korišten izvor ugljika u laboratorijskim pokusima je acetat i pokazano je da daje najveći učinak uklanjanja P po jedinici KPK (Hood i Randal, 2001). Prema PAOs modelu, potrebno je 24 mg acetata za prevođenje 1 mg fosfora u polifosfat (Smolders i sur., 1994), dok eksperimentalni podaci variraju od 8 do 25 mg. Inhibitorno djelovanje acetata na PAOs uočeno je u koncentracijama KPK višima od 700 mgO<sub>2</sub>/L na početku anaerobne faze u SBR reaktoru s trajanjem ciklusa 6 h jer ne dolazi do

uklanjanja svog acetata u anaerobnoj fazi, te u aerobnoj fazi umjesto unosa fosfora u stanice dolazi do trošenja acetata zbog čega ne dolazi do smanjenja koncentracije fosfora na kraju procesa (Mrkonjić, 2018). Acetat kao izvor ugljika koristi se često u laboratorijskim pokusima jer je on najčešća VFA u uređajima za obradu otpadne vode. Razgradnjom glikogena i prijenosom fosfatne skupine s polifosfata na adenzin difosfat (ADP) nastaje adenzin trifosfat (ATP) koji služi kao energija za aktivaciju acetata u PAOs stanici. Hidrolizom polifosfata dolazi do otpuštanja  $H_2PO_4^-$ ,  $K^+$  i  $Mg^{2+}$  u medij. Redukcijom acetoacetyl-CoA pomoću nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) formira se 3-hidroksibutiril-CoA. Obzirom na različite VFA dostupne PAO vrstama kao izvori ugljika, dolazi i do formiranja različitih PHA: poli- $\beta$ -hidroksibutirat (PHB), poli-hidroksivalerat (PHV) ili poli- $\beta$ -hidroksi-2-metilvalerat (PH<sub>2</sub>MV). Energija dobivena oksidacijom PHA u aerobnoj ili anoksičnoj zoni koristi se za rast stanica, formiranje glikogena i plifosfata. PAO mogu koristiti i ciklus trikarboksilnih kiselina (TCA ciklus) i glikolizu kao izvor reducirajućih ekvivalenata (Zhou i sur., 2009).

Učinkovito uklanjanje dušika i fosfora (88,8% i 99,3%) u anaerobno-aerobno-anoksičnom (engl. Anaerobic-Oxic-Anoxic, A-O-A) SBR reaktoru omogućeno je s produktima fermentacije kao izvorima ugljika pri  $C/N < 4$ . *Nitrosomonas* vrste zaslužne su za parcijalnu nitrifikaciju, a *Accumulibacter* sudjeluju u uklanjanju fosfora iz otpadne vode (Liu i sur., 2017). Propionat kao izvor ugljika pogoduje PAOs koji ga unose u stanice brže od GAOs vrsta i jednostavnije prilagođavaju svoj metabolizam. U slučajevima kada je u otpadnoj vodi prisutna kombinacija propionata i acetata PAOs vrste uspješno unose oba izvora ugljika, dok GAOs preferiraju jedan izvor VFA. Osim VFA (acetat, propionat, butirat, valerat), PAOs kao izvor ugljika mogu koristiti i druge organske supstance poput karboksilnih kiselina, šećera i aminokiselina uz zadovoljavajuću učinkovitost procesa (Nielsen i sur., 2010). Provedena su brojna istraživanja utjecaja koncentracije natrijeva acetata kao izvora ugljika na uklanjanje fosfora iz otpadne vode (Randal i Chapin, 1997; Oehmen i sur., 2005; Lopez-Vasquez i sur., 2009).

#### 2.2.4. Koncentracija otopljenog kisika

Koncentracija otopljenog kisika (DO, engl. Dissolved Oxygen) utječe na učinkovitost uklanjanja onečišćenja iz otpadne vode utjecajem na mikrobn metabolizam i sastav mikrobn zajednice. Postizanje učinkovite obrade otpadne vode sa što manjim troškovima aeracije i bez negativnog utjecaja na mikrobn zajednicu ciljevi su brojnih istraživanja. Koncentracija otopljenog kisika utječe na kompeticiju između PAOs i GAOs jer PAOs zbog većeg afiniteta prema kisiku imaju prednost nad GAOs pri niskim razinama DO (Carvalho i sur., 2014).

Ginige i sur. (2013) pokazali su da je smanjenje koncentracije DO s 2 na 0,8 mg/L povećalo učinkovitost uklanjanja fosfora te smanjilo stopu nitrifikacije zbog ograničenja kisika. DO < 1 mg/L je povoljan za provođenje istovremene nitrifikacije i denitrifikacije, ali i aktivnost PAOs (Kuba, 1993; Hu i sur., 2002; Zhou i sur., 2010).

#### 2.2.5. C/N omjer

Optimalni C/N omjer za simultano uklanjanje dušika i fosfora prema literaturnim navodima varira od 7 do 20 (Meng i sur., 2008; Guo i sur., 2010; Lackner i sur., 2010; Mansouri i Zinatizadeh, 2017). Otpadna voda s C/N omjerom većim od 10 smatra se pogodnom za simultanu nitrifikaciju i denitrifikaciju (Masoudi i sur., 2018), dok niži omjer može dovesti do manjka ugljika i negativnog utjecaja na proces (Kumari i sur., 2021). EBPR proces može biti korišten za uspješno uklanjanje fosfora (> 70%) i u otpadnim vodama visokog opterećenja (KPK/P omjeri 25:1 do 10:1) (Bickers i sur., 2003; Broughton i sur., 2008). Nakupljanje GAOs mikroorganizama pri KPK/P > 50:1 u otpadnim vodama niskog opterećenja dovode do manje uspješnosti EBPR procesa (Oehmen i sur., 2007).

#### 2.2.6. pH

Rezultati dosadašnjih istraživanja potvrđuju utjecaj pH na učinkovitost EBPR procesa, odnosno na kompeticiju između PAOs i GAOs vrsti. Smolders i sur. (1994) uočili su povezanost promjene pH vrijednosti s anaerobnim otpuštanjem fosfora i unosom acetata. Otpuštanje fosfora u odnosu na unos acetata rastao je s 0,25 na 0,75 P-mol/C-mol kada je pH rastao s 5,5 na 8,8 jer pri višem pH postoji veća potreba za energijom za transport acetata koja se dobiva hidrolizom polifosfata. Filipe i sur. (2001a) nisu uočili utjecaj pH (6,5 – 8,0) na unos acetata, hidrolizu glikogena i akumulaciju PHA. pH raspon 6,5 – 8,0 pogoduje otpuštanju fosfora, dok vrijednosti iznad 8,0 negativno utječu na učinkovitost procesa. Kao kritična vrijednost određen je pH 7,25 (Filipe i sur., 2001b) zbog sastava mikrobnog biomase u procesu. Vrijednosti niže od 7,25 pogoduju GAOs u odnosu na PAOs, dok više vrijednosti idu u korist PAOs. Povećanjem pH sa 6,5 na 8,0 unos acetata u GAOs opada s 0,21 na 0,11 mmol-C/mmol-C h. Pri pH 7,0 Zhang i sur. (2005) pokazali su uklanjanje 99,9% fosfora u SBR reaktoru s ciklusima od 8 h i SRT 9 dana, dok pri pH 6,5 vrijednost uklanjanja P pada na 14%. Pad učinkovitosti povezan je s nedostatkom mikrobnih vrsti pri pH 6,5 koje su bile prisutne pri pH 7,0 (*β-Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes/Chlorobi* grupa, fotosintetske bakterije i *Deffluvicoccus*).

Nguyen i sur. (2023) ispitivali su utjecaj pH na kulturu obogaćenu *Tetrasphaera* PAO, u rasponu pH od 6,0 do 8,0 u anaerobnim i aerobnim uvjetima u SBR uz natrijev kazein kao

izvor ugljika. Otkriveno je da su stope unosa i otpuštanja fosfora rasle s porastom pH unutar testiranog raspona, dok su proizvodnja PHA, potrošnja glikogena i stopa unosa supstrata bili manje osjetljivi na promjene pH.

### **2.3.Uloga mikrobnih zajednica i procesnih čimbenika u istovremenom uklanjanju dušika i fosfora**

Udio i vrste PAOs, DPAOs, GAOs, DGAOs, nitrificirajućih i denitrificirajućih bakterija ključni su za uspješno istovremeno uklanjanje dušika i fosfora iz otpadne vode. Promjenom procesnih čimbenika moguće je utjecati na funkcionalne mikroorganizme, a time i uspješnost i stabilnost procesa (Wang i sur., 2021). U tablici 2 prikazani su funkcionalni mikroorganizmi i njihove karakteristike.

Tablica 2: Funkcionalni mikroorganizmi u uklanjanju N i P

	<b>Akseptori elektrona</b>	<b>Unos C u stanicu</b>	<b>Uklanjanje P iz otpadne vode</b>	<b>Uklanjanje N iz otpadne vode</b>	<b>Literatura</b>
<b>PAOs</b>	Kisik, nitrit, nitrat	VFA, PHA	Da	Ne	Oehmen i sur. (2007), Seviour i sur. (2008)
<b>GAOs</b>	Kisik	VFA, PHA	Ne	Ne	Liu i sur. (1996), Seviour i sur. (2008)
<b>DPAOs</b>	Nitrit, nitrat	VFA, PHA	Da	Da	Zeng i sur. (2003), Oehmen i sur. (2007)
<b>DGAOs</b>	Nitrit, nitrat	VFA, PHA	Ne	Da	Lopez-Vazquez i sur. (2009)
<b>AOB</b>	Kisik	/	Ne	Da	Prosser (1989), Schmidt i sur. (2003)
<b>NOB</b>	Kisik	/	Ne	Da	Watson i sur. (1981), Daims i sur. (2001)



U istraživanju simultanog uklanjanja dušika i fosfora postignuto je prosječno uklanjanje fosfora i dušika od 78 % i 72 % (Arbabi i sur., 2012) uz optimalni KPK/TP 40. Tchobanoglous i sur. (2004) kao optimalan omjer predlažu KPK/TP 33 jer pri niskom KPK dolazi do kompeticije u anaerobnom reaktoru između heterotrofa i PAOs za elektron donore čime se smanjuje učinkovitost procesa. Vanjski izvor ugljika dodan u anaerobni reaktor poboljšava uklanjanje fosfora i denitrifikaciju (Olsson i sur., 2005). Anaerobno/anoksična faza u SBR reaktoru u istraživanju Akin i Ugurlu (2004) rezultirala je uklanjanjem oko 80 % PO<sub>4</sub>-P, 98 % NH<sub>4</sub>-N i 97 % KPK tijekom 25 dana procesa i zaključkom da je za učinkovito uklanjanje dušika i fosfora neophodna kratka anoksična faza prije anaerobne. Denitrifikacija i uklanjanje fosfora pri aerobnim i anoksičnim uvjetima uz različite izvore ugljika (etanol, acetat) i akceptore elektrona (nitrat, nitrit i otopljeni kisik) istražili su Hu i sur. (2018). Najveća brzina denitrifikacije postignuta je s acetatom (1,4 i 0,8 mg N/ g MLVSS h) u usporedbi s etanolom (1,1 i 0,7 mg N/g MLVSS h) za NO<sub>3</sub>-N odnosno NO<sub>2</sub>-N kao akceptore elektrona. Uz acetat kao elektron donor postignute su brzine otpuštanja fosfora od 1,7, 7,8 i 3,5 mg P/g MLVSS h uz kisik, NO<sub>3</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N. Aktivnost PAOs vrsti u anoksičnim i aerobnim uvjetima inhibirana je prisutnošću NO<sub>2</sub>-N. Meinhold i sur. (1999) pokazali su potpunu inhibiciju anoksičnog unosa fosfora pri 6-8 mg NO<sub>2</sub>-N/L, a 65% smanjenje brzine unosa fosfora u anoksičnim uvjetima pri koncentracijama NO<sub>2</sub>-N većima od 12 mg/L uočeno je u istraživanju Saito i sur. (2004). S druge strane Ahn i sur. (2001), Hu i sur. (2003) i Sin i sur. (2008) nisu uočili inhibiciju pri koncentracijama 40, 35 i 25 mg/L.

Promjene u koncentracijama KPK, dušika i fosfora utječu na proces obrade otpadne vode što su pokazali Wang i sur. (2021) u svom istraživanju u SBR reaktoru radnog volumena 4 L pod A-O-A načinom rada i ciklusima od 6,5 sati. Pokusi su provedeni u tri faze uz SRT 20 dana i sintetičku otpadnu vodu. Postignuto je istovremeno uklanjanje ugljika, dušika i fosfora (91,46 ± 1,35%, 84,52 ± 4,91% i 90,38 ± 3,63%) čak i uz visoke početne koncentracije nutrijenata. Povećanje koncentracije KPK, dušika i fosfora (400-800 mg/L, 40-80 mg/L i 20-4 mg/L) nije utjecalo na uklanjanje KPK, ali je smanjilo učinkovitost uklanjanja N i P. Razlog tome može biti inhibicija sinteze PHA pri visokim koncentracijama fosfora u anaerobnom dijelu i time nedostatkom izvora energije za unos fosfora i denitrifikaciju u aerobnom dijelu. Analiza mulja pokazala je prisutnost Proteobacteria i Bacteroidetes vrsti u pokusima što je u suglasju s ostalom literaturom (Zhang i sur., 2016; Hu i sur., 2018). Na razini roda dolazi do promjena u ovisnosti o početnim koncentracijama KPK, dušika i fosfora. Iako je dominiralo istih 10 vrsti (*Candidatus Accumulibacter*, *Acinetobacter*, *Dechloromonas*, *Thauera*, *Zoogloea*,

*Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Ferribacterium*, *Lactococcus* i *Ferruginibacter*), njihova se zastupljenost mijenjala u fazama pokusa. Obogaćivanje mulja denitrificirajućim bakterijama, PAOs i GAOs provedeno je s ciljem simultanog uklanjanja C, N i P u A-O-A vođenom režimu SBR reaktora (Liu i sur. (2020)). Sastav mikrobne zajednice u sastavu Proteobacteria i Bacteroidetes dokazano uklanja organske spojeve, provodi denitrifikaciju i uklanjanje fosfora (Liu i sur., 2017; He i sur., 2018), dok *Candidatus Saccharibacteria* dokazano uklanja organske spojeve i provodi redukciju nitrata (Kindaichi i sur., 2016; Yan i sur., 2019). Učinkovitost uklanjanja KPK također je uvjetovano trajanjem ciklusa, a prekratki (4 sata) i predugi (12 sati) ciklusi nisu povoljni za uklanjanje ugljika. Skraćivanjem ciklusa s 12 na 8 sati dolazi do manje učinkovitosti uklanjanja TN (s 84,64% na 80,95%) zbog smanjenje denitrifikacije. Utjecaj duljine trajanja ciklusa (3 i 9 sati) u kombinaciji s različitim C:N:P omjerima (100:5:2, 100:5:1, 100:10:1 i 100:10:2) na istovremeno uklanjanje ugljika, dušika i fosfora u 4 SBR reaktora (R1, R2, R3 i R4) sa sintetičkom otpadnom vodom, granuliranim muljem i glukozom kao izvorom ugljika istraživali su Sharma i Bhatti (2022). Najoptimalnija kombinacija obrade otpadne vode pokazana je pri ciklusu od 9 sati i omjeru C:N:P 100:5:1 gdje je postignuto uklanjanje KPK, NH<sub>3</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P od 95,7%, 99,6% i 90,31%. Pri istom omjeru uz kraće trajanje ciklusa (3 sata) također su postignuti zadovoljavajući rezultati uklanjanja ugljika, dušika i fosfora (90%, 98,5% i 84,5%). Pri svim C:N:P omjerima uz trajanje ciklusa 9 sati postignuto je zadovoljavajuće uklanjanje NH<sub>3</sub>-N od prosječno 93%. Prijašnja istraživanja kao optimalne duljine trajanja ciklusa izdvajaju cikluse u trajanju 3-12 sati uz C/N 5-20 i C/P 25-100. Dobiveni rezultati u suglasju su s rezultatima drugih istraživača poput Mansouri i Zinatizadeh (2017) koji su postigli uklanjanje KPK, dušika i fosfora od 93,5%, 79,2% i 63,75% u otpadnoj vodi početnog KPK 1000 mg/L i vremenu trajanja ciklusa 6,5 sati. Za otpadne vode nižeg opterećenja (KPK oko 500 mg/L) zaključeno je da su potrebni duži ciklusi trajanja 10-12 sati (Zinatizadeh i sur., 2015; Jaafari i sur., 2017).

Li i sur. (2020) istraživali su interakcije između PAOs i DPAOs vrsti s ciljem optimiziranja efikasnosti uklanjanje dušika i fosfora. Aklimatizaciju mikroorganizama provodili su u SBR reaktoru pri anaerobno-aerobnim (engl. Anaerobic-Oxic, A-O) i anaerobno-anoksičnim (engl. Anaerobic-Anoxic, A-A) ciklusima (29 ciklusa u fazi I i 59 ciklusa faze II) i nakon aklimatizacije postigli zadovoljavajuće uklanjanje KPK, PO<sub>4</sub>-P i NO<sub>3</sub>-N od 85,34%, 93,64% i 92,34%. Identifikacijom mikroorganizama pokazano je da je DPAOs zastupljen s *Accumulibacter*, a PAOs s *Acinetobacter* vrstama. DPAOs vrste sudjelovale su u uklanjanju PO<sub>4</sub>-P i NO<sub>3</sub>-N, PAOs u uklanjanju PO<sub>4</sub>-P, a denitrifikanti u uklanjanju NO<sub>3</sub>-N. Anaerobno-

anoksično-aerobne (engl. Anaerobic-Anoxic-Aerobic, A<sup>2</sup>/O) konfiguracije reaktora za provedbu EBPR procesa daju uspješne rezultate uklanjanja fosfora ili istovremenog uklanjanja dušika i fosfora. Temelje se na dodatku anaerobne zone ispred aerobne u A/O konfiguraciji što pogoduje PAOs vrstama ili dodatku anoksične zone između anaerobne i aerobne čime dolazi do simultanog uklanjanja dušika i fosfora (Izadi i sur., 2020). Aktivnost DPAOs koji koriste nitrate ili nitrite kao akceptore elektrona omogućava istovremeno uklanjanje dušika i fosfora uz uštedu na energiji i smanjenom zahtjevu na KPK, te smanjenoj produkciji mulja (Zeng i sur., 2011). Dostupnost elektron akceptora u mediju kritična je za uspješno uklanjanje fosfora. Korištenje SBR pogodno je za uspješno provođenje uklanjanja fosfora, kao i istovremeno uklanjanje dušika i fosfora. Lee i sur. (2001) postigli su 92% uklanjanja ukupnog organskog ugljika (engl. Total organic carbon, TOC), 88% uklanjanja dušika i 100% uklanjanja fosfora dodatkom anoksične faze u sredinu aerobne faze ((AO)<sub>2</sub>SBR). Zaključili su da koncentracije do 10 mgNO<sub>2</sub>-N/L ne utječe negativno na unos fosfata jer nitrit služi kao akceptor elektrona.

#### **2.4. Utjecaj akceptora elektrona i izvora ugljika na denitrificirajuću defosfataciju**

Osim kisika, kao akceptori elektrona u EBPR procesu mogu služiti nitriti odnosno nitriti uz anaerobno-anoksične uvjete rada i prisutnost DPAOs vrsta u mulju. Oni omogućavaju istovremenu denitrifikaciju i uklanjanje fosfora (Ahn i sur., 2002; Freitas i sur., 2005). Za uspješan proces potrebni su anoksični uvjeti i aktivnost enzima nitrat reduktaze. Još jedna prednost anaerobno-anoksičnog načina rada u odnosu na anaerobno-aeroban način je u smanjenoj potrebi na aeraciji i uštedi financijskih sredstava. Također, takav način rada generira manju količinu biomase aktivnog mulja zbog niže brzina rasta mikroorganizama i zahtijeva manju količinu organskih spojeva. Istraživanja pokazuju da je nitrit preferirani akceptor elektrona u odnosu na nitrat zbog kraćeg trajanja procesa i manje potrebe na organskim sastojcima, ali on također djeluje kao inhibitor na određene mikroorganizme prisutne u aktivnom mulju (Saito i sur., 2004; Wang i sur., 2007). Inhibicija ovisi o njegovoj koncentraciji, načinu dodavanja u reaktor i sposobnosti adaptacije aktivnog mulja na nitrit. Kuba i sur. (1993) zabilježili su inhibiciju unosa fosfata pri koncentracijama nitrita 5-10 mg/L, ali su Ahn i sur. (2001) pobili tu tvrdnju pokusima s 20-40 mg/L nitrata. Wang i sur. (2007) dokazali su inhibitorno djelovanje 15 mg/L nitrita na anoksičan unos fosfora u stanice, a Saito i sur. (2004) pokazali su veću inhibiciju PAOs vrsti u aerobnim nego u anoksičnim uvjetima. Zhang i sur. (2010) nisu uočili inhibiciju nitritima niti pri 45 mg/L uz acetat kao izvor ugljika, te je u toj

situaciji zabilježen unos 12,9 mgP/gMLSS. Udio slobodne nitritne kiseline iznosio je 0,007 mg/L, a autori su zaključili da je pokus bio uspješan zbog dugotrajne kultivacije mulja s nitritom kao jedinim elektron akceptorom. Iako koncentracija nitrita od 45 mg/L nije djelovala inhibirajuće, kao optimalna koncentracija za uspješan proces denitrificirajuće defosfatacije istaknuta je koncentracija od 35 mg/L za početni KPK i fosfor 350 mg/L i 8,5 mg/L. Zhou i sur. (2010) postigli su maksimalnu brzinu unosa fosfora u stanice (8,76 mgP/gMLSS h) i denitrifikacije nitrita (10,57 mgN/gMLSS h) pri početnoj koncentraciji nitrita 20 mg/L, a najnižu (3,65 mgP/gMLSS h i 4,39 mgN/gMLSS h) pri 80 mg/L. Provedena su istraživanja uklanjanja fosfora uz početnu koncentraciju od 20 mgNO<sub>3</sub>-N/L i 20 mgNO<sub>2</sub>-N/L u anoksičnim uvjetima pri anaerobno-anoksično-aerobnoj konfiguraciji u kojima je N bio akceptor elektrona (Jabari i sur., 2014). Uklanjanje dušika i fosfora bilo je uspješno u oba slučaja (aktivnošću PAOs/DPAOs i AOB), no u pokusima s nitritom kao akceptorom elektrona postignut je veći anoksični unos fosfora u stanice, u odnosu na pokuse s nitratom. Početni KPK iznosio je 300 mg/L, TN 30 mg/L i P 9 mg/L, a SRT je iznosio 9 dana. Nitrat u EBPR procesu služi kao akceptor elektrona za denitrificirajuću defosfataciju, ali uzrokuje i inhibiciju otpuštanja fosfora u anaerobnim uvjetima.

PAOs koji kao akceptore elektrona koriste kisik i oni koji koriste kisik i nitrat dijele se u dvije skupine: (i) aerobni PAOs i (ii) denitrificirajući PAOs (DPAOs) (Hu i sur., 2002). Iako je nitrat mogući akceptor elektrona, rast PAOs je u tom slučaju manji za 70% u odnosu na rast uz kisik kao akceptor elektrona. Da bi se DPAOs akumulirali u suvišku NO<sub>3</sub>-N nužno je da opterećenje nitratom premašuje denitrifikacijski potencijal uobičajenih heterotrofnih organizama. DPAOs vrste unose fosfor u stanice u obliku polifosfata u anoksičnim uvjetima (Vargas i sur., 2011). Hu i sur. (2003) podijelili su ih u dvije skupine ovisno o akceptoru elektrona. Prva skupina može koristiti kisik i nitrat, a druga kisik, nitrat i nitrit kao akceptore. Osim DPAOs vrsta u anaerobno-anoksičnim sustavima prisutne su i denitrificirajući glikogen akumulirajući organizmi (engl. Denitrifying Glycogen Accumulating Organisms, DGAOs (Rubio-Rincón i sur., 2017). Povoljnom koncentracijom aktivnog mulja za provođenje procesa denitrificirajuće defosfatacije pokazana je koncentracija od 3-4 g/L, a povoljnim pH vrijednostima vrijednosti ispod 8 kako bi se spriječilo taloženje fosfora (Wang i sur., 2007).

Acetat i propionat najčešći su izvori ugljika u pokusima denitrificirajuće defosfatacije jer predstavljaju najzastupljenije VFA u otpadnim vodama (Vargas i sur., 2011). Brzina unosa fosfata 1,5 puta je veća uz acetat u odnosu na propionat kao izvor ugljika u pokusima Vargas i sur. (2011) što se pripisuje različitom sastavu PHA u ovisnosti od VFA. Također, izvori ugljika

utječu i na unutarstanične rezerve glikogena koje su veće u pokusima s propionatom u odnosu na acetat. Objašnjenje leži u razlici u razgradnji glikogena koja iznosi 0,5 C-mol/C-mol za acetat i 0,23 C-mol/C-mol za propionat (Oehmen i sur., 2010). Različiti izvori ugljika usmjeravaju mikrobnu zajednicu na različitu zastupljenost određenih PAOs vrsti s različitim učinkovitosti. Iako je proces uklanjanja fosfora u anaerobno-aerobnim uvjetima najučestaliji i najistraživaniji, proces bez anaerobne faze također je moguć i provode se brojna istraživanja na tu temu (Ahn i sur., 2002; Pijuan i sur., 2005; Pijuan i sur., 2006; Wang i sur., 2008; Vargas i sur., 2009). Pokazano je da PAOs unose VFA u stanicu u aerobnim uvjetima istovremeno otpuštajući fosfat van stanice. Nakon iscrpljivanja VFA dolazi do unosa fosfata u stanice i rasta PAOs. Istovremeno prisustvo elektron donora i akceptora u formi VFA i kisika dijeli proces na dvije faze – fazu obilja i fazu gladovanja. U prvoj je vanjski supstrat dostupan, a u drugoj nije (Beun i sur., 2000; Dircks i sur., 2001). Spomenute dvije faze su prema promjenama u koncentraciji VFA, fosfata, PHA i glikogena istovjetne anaerobno-aerobnim fazama EBPR procesa (Guisasola i sur., 2004). Nekonvencionalni PAOs poput *Microthrix parvicella* vjerojatno je zaslužan za aerobno uklanjanje fosfora iz otpadne vode.

Nittami i sur. (2011) su istražili kako različita temperatura (10, 15, 20, 25 i 30 °C), pH (6, 7, 8 i 9) i koncentracija otopljenog kisika (0,5, 2,0 i 3,5 mg/L) djeluju na sposobnost uklanjanja fosfora pri aerobnim uvjetima, uz acetat kao izvor ugljika. Optimalni rezultati unosa fosfora u stanice postignuti su pri 25 °C i pH 8, a otpuštanje fosfora pri 20 °C. Koncentracija DO od 0,5 mg/L i 2,0 mg/L rezultirala je s maksimalnom količinom otpuštenog i unesenog fosfora, dok su minimalne količine zabilježene pri koncentraciji 3,5 mg/L. Izvor ugljika iznimno je važan za uspješnost procesa i većina istraživanja se provode s acetatom, glukozom i propionatom. Pijuan i sur. (2006) istraživali su sposobnost PAOs vrsti uz acetat kao izvor ugljika i aerobne uvjete u trajanju od 11 dana. Fluorescencijska in situ hibridizacija (engl. Fluorescence In Situ Hybridization, FISH) analizom ustanovili su da je zastupljenost PAOs i GAOs vrsti jednaka kao i u anaerobno-aerobnim pokusima. Tijekom 11 dana aerobnih pokusa proizvodnja PHB je bila konstantna, a razgradnja i formiranje glikogena je smanjena što pokazuje da PAOs u aerobnim uvjetima mogu sintetizirati sličnu količinu PHB bez korištenja iste količine glikogena kao u anaerobnim uvjetima u konvencionalnom EBPR procesu. U aerobnim uvjetima PAOs više koriste ciklus trikarboksilnih kiselina. Iako je uz acetat kao izvor ugljika omogućeno uklanjanje fosfora, sposobnost PAOs je opadala s vremenom. Osim acetata, i glukoza se koristi kao izvor ugljika. Ipak, korištenjem glukoze dolazi do prekomjernog nagomilavanja GAOs u odnosu na PAOs i time narušavanja učinkovitosti uklanjanja fosfora

(Zhang i sur., 2005). Razlika između acetata i propionata kao izvora ugljika je sastav PHA: acetat se uglavnom skladišti u obliku polihidroksi butirata (PHB), dok se propionat skladišti kao polihidroksi valerata (PHV) i poli- $\beta$ -hidroksi-2-metilbutirat (PH2MV) (Randall i Liu., 2002). Propionat se pokazao kao povoljan izvor ugljika za uklanjanje fosfora pri striktno aerobnim uvjetima. Vargas i sur. (2009) proveli su istraživanje u striktno aerobnim uvjetima nakon 5 mjeseci anaerobno-aerobnih uvjeta rada i postigli su stabilno uklanjanje fosfora kroz 46 dana. Zabilježili su faze obilja i gladovanja, te smanjeno korištenje glikogena u odnosu na anaerobno-aerobne cikluse. FISH analizom ustanovljena je manja zastupljenost *Accumulibacter* vrsti (50% u odnosu na 70% u anaerobno-aerobnim uvjetima), dok je udio *Competibacter* ostao isti (manje od 1%).

## **2.5. Kompetitivna dinamika između PAOs i GAOs mikroorganizama**

PAOs odlikuje dobro taloženje u aktivnom mulju uz klustere veće od 0,5  $\mu\text{m}$  (Ujang i sur., 2002). Najpoznatiji PAOs – *Candidatus Accumulibacter* još uvijek nije izoliran kao čista kultura (Dorofeev i sur., 2020). Iako se dugo vremena smatralo da prisustvo GAOs vrsti onemogućava učinkovito uklanjanje fosfora, novija istraživanja ukazuju na slučajeve u kojima je uspješno provođenje stabilnog EBPR procesa omogućeno i uz visoku zastupljenost GAOs (Nielsen i sur., 2019). GAOs vrste značajnije utječu na ishode EBPR procesa u laboratorijskim uvjetima, nego na rezultate s uređaja za obradu otpadnih voda. Hipoteza je da će GAOs biti prisutni u slučajevima s visokim C/P omjerom. Osim aerobnih PAOs koji koriste kisik kao akceptor elektrona u procesu uklanjanja fosfora, postoje i DPAOs koji mogu koristiti i nitrat/nitrit kao elektron akceptore, te su iznimno bitni u istovremenom uklanjanju dušika i fosfora bez potrebe za dodatnim vanjskim izvorom ugljika i uz manju aeraciju što značajno utječe na ekonomsku računnicu (Dorofeev i sur., 2020). Također, anoksični uvjeti pogoduju DPAOs vrstama zbog aktivacije enzima nitrat reduktaze.

Ukoliko su uvjeti za to omogućeni, PAOs u stanice mogu unijeti do 0,38 mgP/mgVSS (Lopez-Vasquez i sur., 2020), u odnosu na OHO koji unose 0,023 mgP/mgVSS (Metcalf i Eddy, 2003). Potrebno je osigurati anaerobne uvjete na početku procesa s dovoljnom koncentracijom VFA u otpadnoj vodi, te aerobnu/anoksičnu zonu nakon toga. Međutim, te vrijednosti se u praksi kreću između 0,06 i 0,15 mgP/mgVSS zbog koegzistencije PAOs, OHO i GAOs (Henze i sur., 2008). Specifični uvjeti za rast PAOs potrebni su i zbog 13% manjeg prinosa PAOs u usporedbi s OHO. Ukoliko su uvjeti povoljni PAOs čine i do 40% organizama prisutnih u

aktivnom mulju, te imaju sposobnost uklanjanja 10-12 mgP/L po 500 mgKPK/L u influentu (Henze i sur., 2008). Brojni su čimbenici koji utječu na zastupljenost PAOs i GAOs vrsti u aktivnom mulju (Zhang i sur., 2011) – temperatura, izvor ugljika, pH vrijednost, SRT, DO. Niža temperatura (5-20°C) pogoduje PAOs, a temperature iznad 25°C pogoduje GAOs i njihovom učinkovitijem korištenju glikolitičkog puta. Mješovit izvor ugljika (acetat + propionat u omjeru 50-50 ili 75-25%) pogoduje PAOs, kao i niži omjer KPK/P (10-20 mg/mg) (Lopez-Vasquez i sur., 2009). Pri pH vrijednostima iznad 7,25 prednost pri unošenju VFA pokazuju PAOs, a vrijednosti ispod 6,5 djeluju inhibitory na njihov rast. Visoki SRT pogoduje GAOs vrstama i nitrifikantima u odnosu na PAOs vrste. Vrijednosti otopljenog kisika manje od 3 mg/L pogoduju PAOs. Prisustvo GAOs vrsti ne mora nužno značiti neuspješno provođenje naprednog uklanjanja fosfora. Problem predstavlja njihovo unošenje VFA u stanice u anaerobnim uvjetima bez akumulacije poliP u aerobnim uvjetima u suvišku. Ipak, na uređajima za pročišćavanje otpadnih voda prisustvo GAOs vrsti ukazuje na prisutnost fermentabilnog supstrata i suviška kratkolančanih masnih kiselina, te su bitni za redukciju NO<sub>3</sub>-N. Općenito govoreći, sustav s acetatom kao izvorom ugljika, s pH vrijednostima ispod 7 i temperaturom iznad 30°C pogoduje rastu GAOs (Izadi i sur., 2020).

Uspješan EBPR proces ovisi o prisutnosti PAOs vrsti. Najistraženiji PAOs je *Candidatus Accumulibacter phosphatis*. Identificirano je 14 „clades“ na temelju molekularnih analiza *ppk1* gena (polyphosphate kinase 1) (Roy i sur., 2021). Naprednim molekularnim tehnikama identificirani su i drugi navodni PAOs poput *Tetraspharea*, *Dechloromonas*, *Microalunatus phosphorus*, *Tessaracoccus*, *Candidatus Obscuribacter* koji se razlikuju po morfologiji, poželjnim izvorima ugljika i brzini rasta. Uočena je važnost mikroorganizama bitnih za fermentaciju, hidrolizu, nitrifikaciju i denitrifikaciju u EBPR procesima, međutim potrebna je njihova detaljnija analiza. Njihova prisutnost u uređajima za obradu otpadnih voda nije značajna što otežava identifikaciju i istraživanje utjecaja na proces, kao i utjecaja čimbenika procesa na mikroorganizme (Lawson i sur., 2015). Sekvencioniranje omogućava identifikaciju onih mikroorganizama za koje nije moguće kultiviranje. Ipak, ni te metode nisu bez ograničenja. Uobičajeno korišteni primeri (početnice) za određivanje PAOs i GAOs pokazuju malu specifičnost za *Micropruina* i *Microalunatus* vrste (Roy i sur., 2021).

Iako je metabolizam PAOs povezan s anaerobnim unosom ugljika, provedena su istraživanja koja su dokazala unos VFA u anoksičnim uvjetima, odnosno provođenje uspješnog EBPR procesa pod anoksičnim/aerobnim uvjetima uz acetat ili propionat kao izvore ugljika (Cokro i sur., 2017). Potrebno je provoditi daljnja istraživanje biokemijskih puteva

mikroorganizama bitnih za EBPR proces kako bi se omogućilo optimiziranje uvjeta rada u skladu s željenim ishodom procesa. Za uspješnu optimizaciju i stabilnost EBPR procesa ključno je uzeti u obzir sve prisutne vrste mikroorganizama, njihove međusobne interakcije, različite izvore ugljika koje koriste, različite akceptore elektrona i uvjete rada.

## **2.6. Endogena denitrifikacija**

U biološkim sustavima za obradu otpadnih voda, denitrifikacija se obično odvija aerobno (s kisikom) ili anoksično (bez kisika) pomoću denitrificirajućih bakterija. Međutim, u endogenoj denitrifikaciji, denitrifikacija se odvija pod anaerobnim uvjetima koristeći unutarstanično pohranjenu organsku tvar koja služi kao donor elektrona za denitrifikaciju kada su vanjski izvori ugljika ograničeni. Unutarstanični izvori ugljika poput PHA i glikogena smatraju se prikladnima za endogenu denitrifikaciju (Vocks i sur., 2005; Lu i sur., 2021). Endogena denitrifikacija pruža nekoliko prednosti u biološkim sustavima za obradu otpadnih voda (Liu i sur., 2021; Li i sur., 2022):

- (i) omogućuje uklanjanje dušika čak i kada su vanjski izvori ugljika ograničeni,
- (ii) povećava ukupnu učinkovitost uklanjanja dušika u postrojenjima za obradu otpadnih voda i
- (iii) pomaže u smanjenju operativnih troškova povezanih s osiguravanjem vanjskih izvora ugljika za denitrifikaciju.

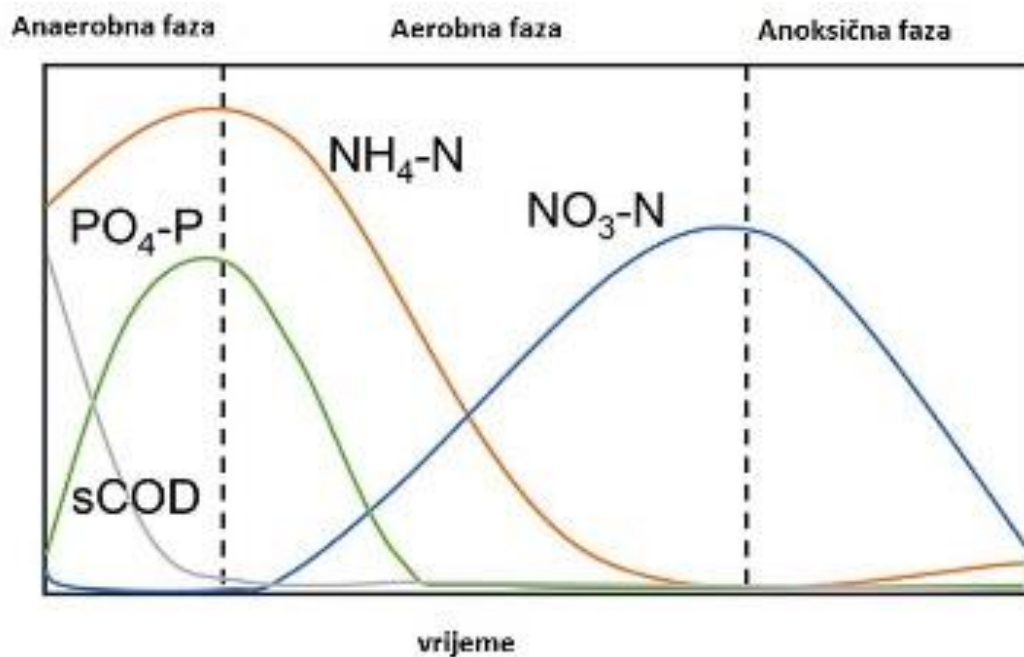
Međutim, učinkovitost endogene denitrifikacije može biti ograničena raspoloživošću intracelularnih organskih supstrata te osjetljiva na varijacije u sastavu otpadnih voda, temperaturne uvjete i hidrauličko vrijeme zadržavanja. Optimizacijom trajanja anaerobne faze, kojom se povećava unutarstanično skladištenje ugljika pomoću GAOs, moguće je značajno poboljšati učinkovitost endogene denitrifikacije. Preporučuje se završetak anaerobne faze pri najvišoj koncentraciji PHA kako bi se postigao maksimalni denitrifikacijski potencijal bez vanjskih izvora ugljika (Ding i sur., 2022).

Prethodna istraživanja pokazala su da se u sustavima koji se oslanjaju na endogenu denitrifikaciju, bilo da se radi o šaržnim (SBR) ili kontinuiranim protočnim reaktorima, može postići više od 90% uklanjanja ukupnog anorganskog dušika (TIN) iz različitih vrsta otpadnih voda, uključujući komunalne otpadne vode i procjedne vode deponija. Ovakva visoka učinkovitost zabilježena je čak i pri niskom omjeru ugljik/dušik ( $C/N = 1-6$ ) (Miao i sur., 2015;



Miao i sur., 2016; Zhang i sur., 2018). Brzina endogene denitrifikacije ( $0,2-0,6 \text{ mgN}/(\text{gVSS}\cdot\text{h})$ ) niža je u usporedbi s denitrifikacijom potaknutom vanjskim izvorima ugljika (Gao i sur., 2020). Zbog toga je u postojećim sustavima s endogenom denitrifikacijom potrebno hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT) od 7 do 16 sati u anoksičnim zonama (Feng i sur., 2021; Gao i sur., 2020).

Anaerobno-aerobno-anoksični proces (Gao i sur., 2020; Li i sur., 2014; Zhao i sur., 2018), u kombinaciji s „feast-famine“ (hranjenje-gladovanje) ciklusom, potiče endogenu denitrifikaciju pospješujući skladištenje i iskorištavanje unutarstaničnih izvora ugljika (Bernat i sur., 2008). Uloga DGAOs posebno je važna više od 80% vanjskog organskog ugljika iz otpadne vode GAOs učinkovito skladište u anaerobnoj fazi (Zhang i sur., 2018). U post-anoksičnim fazama A-O-A procesa, endogena denitrifikacija postiže više od 85% učinkovitosti uklanjanja dušika smanjujući koncentracije nitrata i nitrita nastalih u aerobnoj zoni (Miao i sur., 2016). Detalji A-O-A procesa dani su u tablici 3. Prednosti A-O-A procesa posebno su izražene pri niskom omjeru C/N (1–4), čime se osigurava djelotvorno uklanjanje dušika i u uvjetima ograničene dostupnosti ugljika (Zhao i sur., 2019; Gao i sur., 2022). „Feast-famine“ ciklus u A-O-A procesu također pogoduje učinkovitoj defosfataciji (Oehmen i sur., 2007). Prikaz promjena koncentracija KPK,  $\text{PO}_4\text{-P}$ ,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$  u A-O-A procesu dan je na slici 5.



Slika 5. Prikaz promjena koncentracija C, N i P (preuzeto i prilagođeno od (Bai i sur., 2023))

Tablica 3: Mikroorganizmi, glavne aktivnosti i spojevi/metaboliti u anaerobno-aerobno-anoksičnom procesu (preuzeto i prilagođeno od Luan i sur., 2024)

Uvjeti	Mikroorganizmi	Glavne aktivnosti	Ključni spojevi/metaboliti
Anaerobni	PAOs, DPAOs	Akumulacija unutarstaničnog C, otpuštanje PO <sub>4</sub> -P	Ugljik, ATP, glikogen, PHA, fosfati
	GAOs, DGAOs	Akumulacija unutarstaničnog C	Ugljik, ATP, glikogen, PHA
Aerobni	PAOs, DPAOs	Uklanjanje PO <sub>4</sub> -P iz vode	Fosfati, PHA, polifosfati
	GAOs, DGAOs	Trošenje PHA za rast i obnavljanje zaliha glikogena	PHA, glikogen
	AOB/NOB	Nitrifikacija (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> → NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Amonijak (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ), nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), nitrat (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
	Aerobni denitrifikanti	Denitrifikacija (redukcija NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> do N <sub>2</sub> ) pod aerobnim uvjetima	Nitrat (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), kisik, dušik (N <sub>2</sub> )
Anoksični	DPAOs	Denitrifikacija i uklanjanje fosfata	Nitrat (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), fosfati, PHA
	DGAOs	Denitrifikacija (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → N <sub>2</sub> )	Nitrat (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), PHA, glikogen
	Anoksični denitrifikanti	Potpuna denitrifikacija (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → N <sub>2</sub> )	Nitrat (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ), nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ), ugljik, dušik (N <sub>2</sub> )

Glavni mikroorganizmi zaslužni za proces endogene denitrifikacije su bakterije koje pripadaju rodovima poput *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Achromobacter* i drugi. Ove bakterije

posjeduju enzime potrebne za denitrifikaciju i mogu koristiti unutarstanične zalihe organske tvari za energiju. Glavni unutarstanični izvori ugljika koje mikroorganizmi koriste za denitrifikaciju su intracelularni polimeri, poput polihidroksialkanoata (PHA) i glikogena. Ovi polimeri nastaju tijekom različitih bioloških procesa, poput anaerobne fermentacije organskih tvari. Endogena denitrifikacija najčešće se javlja u anaerobnim uvjetima, kada je koncentracija kisika u vodi niska ili odsutna. Također, prisutnost nitrata i unutarnjih izvora ugljika ključna su za poticanje ovog procesa.

Proces parcijalne nitrifikacije endogene denitrifikacije i uklanjanja fosfora (engl. Partial Nitrification Endogenous Denitrification and Phosphorus Removal, PNEDPR) postiže učinkovito uklanjanje nutrijenata iz komunalne otpadne vode niskog C/N omjera bez dodavanja vanjskog izvora ugljika. Ipak, limitiran je dugačkim HRT i niskom brzinom specifične endogene denitrifikacije ( $r_{NO_2}$ ) (Zhao i sur., 2019). Denitrifikacijskim uklanjanjem fosfora (engl. Denitrification Phosphorus Removal, DPR) sa simultanom parcijalnom nitrifikacijom-endogenom denitrifikacijom (engl. Simultaneous Partial Nitrification- Endogenous Denitrification, SPNED) u single-sludge SBR postignuto je uklanjanje TN (90,8%) pri niskim DO (Du i sur., 2019). Mikroorganizmi *Dechloromonas* (6,7%) dominirali su u DPR procesu, a *Nitrosomonas* (4,5%), *Candidatus Competibacter* (6,8%) i *Nitrospirae* (1,4%) u SPNED procesu. Kako bi se postigao DPR-SPNED pokusi su vođeni pod anaerobnim (180 min) i niskom aerobnim uvjetima (150 min,  $DO \leq 1,0$  mg/L). KPK uklanjanje većinom je završeno u anaerobnoj fazi.  $KPK_{intra}$  efikasnost je iznosila u prosjeku 86,5% što pokazuje da je osigurano dovoljno ugljika za endogenu denitrifikaciju i uklanjanje P.  $PO_4-P$  u efluentu pao je s 3,0 na 0,1 mg/L. Aerobnom nitrifikacijom i endogenom denitrifikacijom postignuto je uklanjanje TN od 88,7% (SND efikasnost od  $69,0 \pm 6,6\%$ ). Brzina akumulacije nitrata iznosila je 31,8%, vjerojatno zbog prevladavajućih AOB, a ne NOB organizama. Uvođenjem anoksične faze došlo je do poboljšanog uklanjanja nutrijenata. DPR-SPNED omogućava smanjenje potrošnje energije za oksidaciju KPK i nitrifikaciju, te izbjegavanje dodavanja dodatnog ugljika.

Istraživano je uklanjanje dušika u šaržnom biofilm reaktoru s pritokom supstrata (engl. Sequencing Batch Biofilm Reactor, SBBR) reaktoru pod A-O-A načinom rada (Zhang i sur., 2019). A/O/A način rada pogoduje anammox bakterijama u konkurenciji s heterotrofnim bakterijama zbog unošenja organskih tvari u obliku PHA tijekom anaerobne faze. C/N omjer bio je  $2,8 \pm 0,5$ . Mikroorganizmi sa sposobnošću transformacije organskih tvari tijekom anaerobne faze mogu provoditi i endogenu denitrifikaciju u anoksičnoj fazi. Anaerobni predtretman bitan je za proces parcijalne nitrifikacije-anammox (engl. Partial Nitrification-

Anammox, PNA) jer se tijekom njega KPK pohranjuje u obliku PHA, ograničavajući kompeticiju denitrificirajućih bakterija i anammox bakterija za nitrit. Tijekom aerobne faze dolazi do stvaranja oksično-anoksičnog mikro okoliša unutra biofilma čime se poboljšava PNA. Anoksična faza inhibira NOB, dok aktivnost AOB ostaje konstantna. Također, pod anoksičnim uvjetima dolazi do endogene denifikacije.

Zhao i sur. (2019) proučavali su kompeticiju između PAOs i GAOs i uklanjanje N i P. Nakon balansiranja odnosa PAOs-GAOs omogućeno je učinkovito uklanjanje nutrijenata u PNEDPR-SBR s reakcijskim vremenom 7 h. Visoke koncentracije PHA u GAOs skladištene u anaerobnoj fazi služe kao izvor ugljika za endogenu denitrifikaciju. Za provođenje endogene denitrifikacije zaduženi su *Candidatus Competibacter*, a za uklanjanje P *Candidatus Accumulibacter* i *Tetrasphaera*. Peng i sur. (2021) istraživali su parcijalnu/djelomičnu koja je bila učinkovita kada je C/N bio manji od 5,50, a inhibirana kada je C/N bio veći od 8,25. Rezultati su pokazali da je povećanje C/N štetno za PD. Promatrane su varijacije u unosu i otpuštanju fosfora pod različitim C/N omjerima. Kada je C/N bio niži od 4,13, nedostatak izvora ugljika doveo je do nepovoljnog položaja PAOs u konkurenciji s denitrificirajućim bakterijama, što je rezultiralo time da gotovo ne dolazi do uklanjanja fosfora. S druge strane, kada je C/N bio veći od 4,13, inhibicija slobodne nitratne kiseline (engl. Free Nitrous Acid, FNA) na PAOs utjecala je na performanse uklanjanja fosfora. Osim toga, sposobnost otpuštanja fosfora bila je inhibirana kod svih C/N omjera, ali je primijećena slaba inhibicija PAO-a s porastom C/N, što je rezultiralo značajno većom količinom oslobođenog  $PO_4-P$  pri višim C/N omjerima. Gao i sur. (2020) istraživali su uklanjanje dušika endogenom denitrifikacijom u komunalnoj otpadnoj vodi s niskim C/N omjerom uz anaerobno-aerobno-anoksičan proces. Smanjenje koncentracije KPK većinom se događalo u anaerobnoj i aerobnoj zoni. Uočeno je i povećanje koncentracije PHA i smanjenje koncentracije glikogena što ukazuje na GAOs organizme koji skladište PHA konzumiranjem glikogena i KPK u anaerobnoj zoni. U aerobnoj zoni koncentracija KPK nastavljala je padati, a glikogena rasti. Amonijak se oksidirao do nitrata i nitrita. U anoksičnoj zoni ukupna količina intracelularno pohranjenog KPK je padala, kao i  $NO_2-N$  što ukazuje na ED. Visoka učinkovitost unošenja KPK imala je pozitivan učinak na SND i ED što je rezultiralo niskom koncentracijom  $NO_x-N$  u efluentu.

Nedavna istraživanja ukazuju da u post-anoksičnim zonama velikih postrojenja za obradu otpadnih voda dušik uklonjen uz pomoć unutarstaničnih izvora ugljika doprinosi približno 30% ukupnoj učinkovitosti uklanjanja, čime se značajno smanjuje potreba za dodatnim vanjskim izvorima ugljika (Liu i sur., 2021; Li i sur., 2022).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Aktivni mulj

Aktivni mulj s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada nakon obogaćivanja s fosfat akumulirajućim vrstama (engl. *Phosphate Accumulating Organisms*, PAOs) uporabljen je za istraživanje uklanjanja C, N i P iz otpadne vode niskog omjera C/N u anaerobno-aerobno-anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju. FISH metodom dokazana je prisutnost funkcionalnih mikroorganizama u aklimatiziranom mulju.

Pokusi uklanjanja C, N i P u anaerobno-aerobno-anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju provedeni su s ciljem da se definira:

- uloga – doprinos duže anaerobne zone, ili potpuni izostanak, u kojoj se zbiva unutarstanični unos hlapljivih masnih kiselina iz vodenog medija i pohranjivanje u obliku skladišnih polimera – polihidroksialkanoata (engl. *polyhydroxyalkanoates*, PHAs), kao i otpuštanje fosfata iz PAOs u vodeni medij
- unutarstanični aerobni i anoksični unos fosfata i pohranjivanje u obliku polifosfata
- uloga – doprinos produžene anoksične zone u kojoj se zbiva post-denitrifikacija odnosno endogena denitrifikacija
- učinkovitost uklanjanja C, N i P pri odabranom režimu rada – konfiguraciji procesa
- režim rada/konfiguracija procesa za učinkovito uklanjanje C, N i P kroz probir procesnih čimbenika
- uloga procesnih čimbenika, poput: raspoloživi elektron donori – natrijev acetat, i elektron akceptori – NO<sub>2</sub>-N i/ili NO<sub>3</sub>-N na učinkovitost procesa uklanjanja C, N i P

##### 3.1.2. Otpadna voda – sintetska podloga

U pokusima je korištena sintetska podloga – sintetska otpadna voda priređena otapanjem soli u vodovodnoj vodi: 2 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,4 g/L FeSO<sub>4</sub>; 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>; 0,4 g/L NaCl; 1 g/L MgCO<sub>3</sub>; 1 g/L CaCO<sub>3</sub> (sve soli proizvod tvrtke Merck, Njemačka). Sintetska

otpadna voda je nakon 24 sata stajanja pri sobnoj temperaturi filtrirana kroz filter papir veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ , čuvana u plastičnom spremniku i korištena u pokusima.

Za potrebe korekcije pH dodavani su 2M NaOH ili 2M HCl, priređene od kemikalija p.a. čistoće, proizvod tvrtke Kemika.

Otopina elemenata u tragovima, dodana u količini 1 mL/L, načinjena je od: EDTA 10 g/L,  $\text{FeCl}_3$  1,5 g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,15 g/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,15 g/L,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,03 g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,06 g/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,06 g/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,12 g L<sup>-1</sup>, KI 0,18 g/L.

### 3.1.3. Donori i akceptori elektrona – izvor ugljika i $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$

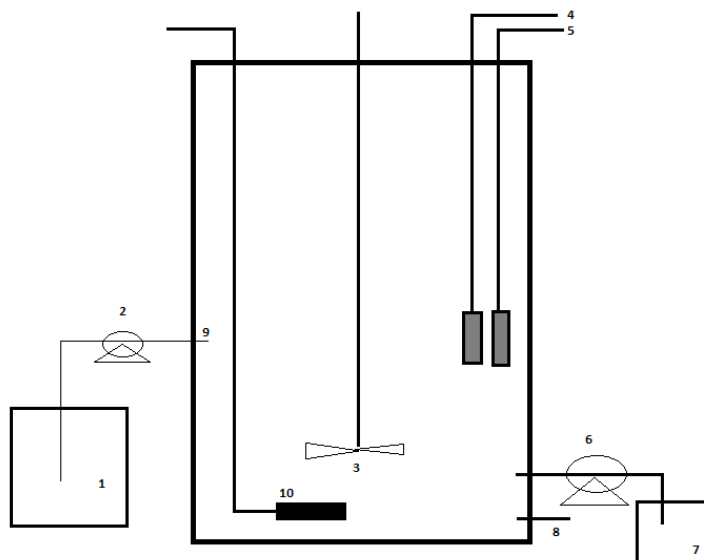
Pokusi su provedeni uz natrijev acetat kao izvor ugljika, koji je dodan u odgovarajućoj količini za odabrani ciljani omjer C/N, odnosno C/P. Natrijev acetat p.a., proizvod je tvrtke Merck, Njemačka.

Za odabrani omjer C/N odnosno N/P kao elektron akceptori dodani su  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  u odgovarajućoj količini pripremljeni kao otopine  $\text{KNO}_3$  i  $\text{NaNO}_2$  (proizvodi tvrtke Merck, Njemačka).

### 3.1.4. Aparatura i pribor

Pokusi karakterizacije aktivnog mulja s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada provedeni su u SBR reaktoru laboratorijskog mjerila (Slika 6), radnog volumena 2 L. Bioreaktor je opremljen miješalicom, a pri dnu reaktora nalazi se difuzor preko kojeg se upuhuje zrak, za opskrbu otopljenim kisikom. Na poklopcu reaktora nalaze se otvori za kisikovu i pH elektrodu, za doziranje kiseline ili lužine u svrhu korekcije pH vrijednosti, kao i otvori za uzimanje uzoraka i dodavanje otpadne vode ili drugih supstrata, te otvor za izlaz plinova.

Nitrifikacija je provedena u aerobnim uvjetima pri  $\text{DO} \geq 2$  mg/L, a denitrifikacija u anoksičnim uvjetima pri  $0,5 < \text{DO} < 1$  mg/L. U pokusima anaerobnog unosa organskih sastojaka i otpuštanja  $\text{PO}_4\text{-P}$ , anaerobni uvjeti ostvareni su propuhivanjem plina dušika.



Slika 6. Shematski prikaz bioreaktora za pokuse karakterizacije aktivnog mulja s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadne vode grada (1 – spremnik influenta, 2 – pumpa influenta, 3 – miješalica, 4 – pH metar, 5 – DO metar, 6 – pumpa efluenta, 7 – spremin influenta, 8 – mjesto uzorkovanja, 9 – ulaz influenta, 10 – difuzor za zrak)

U laboratorijskom SBR reaktoru radnog volumena 5 L, u anaerobno-aerobnom režimu rada provedeno je obogaćivanje mulja PAOs vrstama uz odabir povoljnih procesnih uvjeta. Omjer ugljika i fosfora bio je u rasponu 10-20, pH vrijednost bila je između 7,25 i 8,0, a temperatura između 10-20 °C, uz acetat kao izvor ugljika, vrijeme zadržavanja mulja  $\leq 10$  dana i otopljeni kisik u rasponu 0,15-3 mg/L.

Pokusi uklanjanja C, N i P u anaerobno-aerobno-anoksičnom režimu uz endogenu denitrifikaciju provedeni su u SBR reaktoru radnog volumena 2 L, pri odabranim režimima rada.

Pokusi u kojima je određena kinetika aktivnosti mikrobnih vrsta za uklanjanje C, N i P za odabrani režim rada – konfiguraciju sustava anaerobno-aerobno-anoksičnog vođenja procesa uz endogenu denitrifikaciju provedeni su u laboratorijskim čašama volumena 800 mL, radnog volumena 600 mL, kao šaržni pokusi (Slika 7) u aerobnim uvjetima za nitrifikaciju i unos

fosfata, anoksičnim uvjetima za denitrificirajuću defosfataciju i endogenu denitrifikaciju, te anaerobnim uvjetima za otpuštanje fosfata i unos acetata.

Laboratorijske čaše su postavljene na magnetske miješalice i stalno je motrena vrijednost pH, temperature i koncentracije otopljenog kisika na način da su u laboratorijsku čašu uronjene kisikova i pH elektroda. U aerobnim uvjetima održavana je vrijednost otopljenog kisika  $DO \geq 2 \text{ mg/L}$  ostvareno propuhivanjem zraka iz kompresora kroz mjerač protoka zraka preko filtera za zrak do sintera uronjenog u tekući medij u laboratorijskoj čaši, a u anoksičnim uvjetima održavana je vrijednost koncentracije otopljenog kisika  $0,5 \text{ mg/L} \leq DO \leq 1 \text{ mg/L}$  ostvarena miješanjem sadržaja u laboratorijskim čašama na magnetskoj mješalici pri 80-100 o/min.

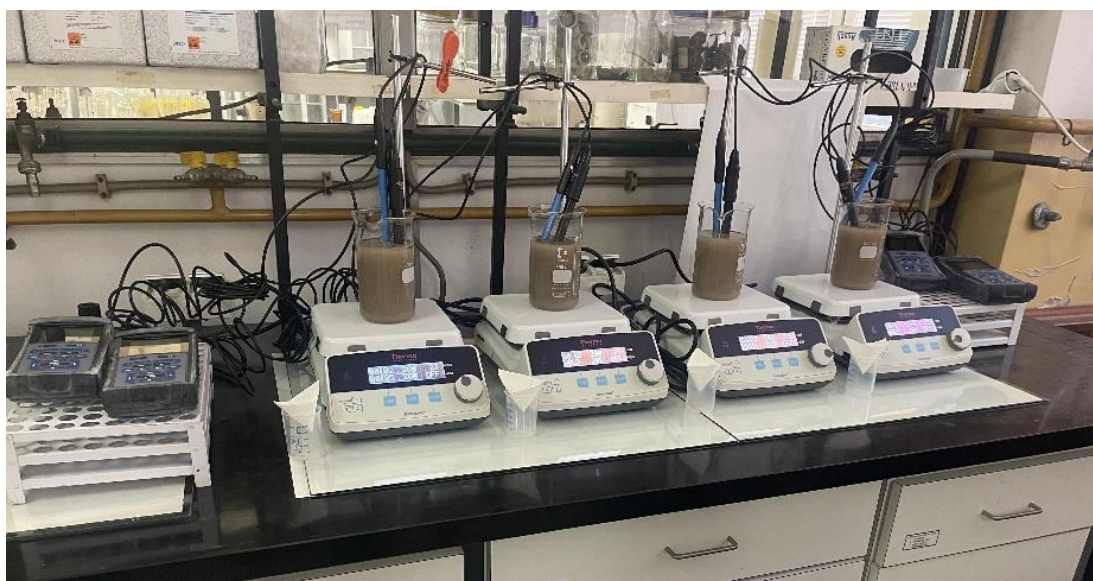
Za analitičko određivanje tijeka mikrobnih procesa uklanjanja C, N i P, provođenjem mikrobnih reakcija nitrifikacije, denitrifikacije i unutarstaničnog unosa fosfata kao i unosa hlapljivih masnih kiselina iz tekućeg medija i unutarstanično skladištenje u obliku PHA, uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima te je nakon filtriranja uzoraka preko staklenih filtera  $0,2 \mu\text{m}$  provedeno analitičko određivanje TOC, KPK,  $\Sigma\text{N}$ ,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\Sigma\text{P}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , koncentracija mikrobne biomase izražena kao MLSS i MLVSS, te PHA, glikogen i acetati.

U svim pokusima u kojima je bilo potrebno osigurati elektron donore dodan je natrijev acetat kao izvor ugljika u odgovarajućoj količini za određeni odabrani omjer C/N (KPK/N), odnosno KPK/P, a za dodavanje elektron akceptora za odgovarajući odabrani omjer C/P (KPK/P) dodane su u odgovarajućoj količini otopine  $\text{KNO}_3$  odnosno  $\text{NaNO}_2$  te  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Svi pokusi načinjeni su u 4 ponavljanja, a prikazani rezultati čine srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

U tablici 4 i 5 dani su popisi kemikalija i aparature uporabljenih u izradi disertacije.





Slika 7. Aparatura u kojoj su provedeni šaržni pokusi određivanja kinetike mikrobnih procesa uklanjanja C, N i P za svaki odabrani režim rada – konfiguraciju anaerobno-aerobno-anoksičnog procesa uz endogenu denitrifikaciju u ustaljenom stanju odabrane konfiguracije procesa

Tablica 4. Popis kemikalija uporabljenih u izradi disertacije:

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvođač</b>
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Kemika
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck
1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat	Kemika
$\text{Ag}_2\text{SO}_4$	Kemika
$\text{CaCO}_3$	Merck
DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol)	BioChemica
Etanol	Kemika
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
Formamid	Merck
$\text{H}_2\text{SO}_4$	GRAM-MOL

HCl	Kemika
HgSO <sub>4</sub>	Kemika
Imerziona ulje	Merck
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Kemika
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
KCl	Alkaloid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
K-Na-C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> × 4H <sub>2</sub> O	GRAM-MOL
KNO <sub>3</sub>	Merck
Krisiodin	SIGMA-ALDRICH
Kristal violet	SIGMA-ALDRICH
MgCO <sub>3</sub>	Kemika
MgSO <sub>4</sub>	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fisher Scientific
NaCl	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	Merck
NH <sub>4</sub> Cl	Merck
NaOH	Kemika
NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Merck
Metilen plavo	SIGMA-ALDRICH
Nesslerov reagens	Kemika
Nile Blue	Merck
Octena kiselina	Merck
Paraformaldehid	Merck

Probe FISH	GOREA PLUS
ProLong Gold antifade mountant	Biosistemi
SDS (natrijev dodecil-sulfat)	Merck
Tris/HCl	Merck
NaNO <sub>2</sub>	Merck

Tablica 5. Aparatura uporabljena u izradi disertacije je:

<b>Aparat</b>	<b>Proizvođač</b>
Autoklav	Inako
Bioreaktor	
Centrifuga	Beckman
Fotometar	SQ 200 Merck
Kisikova elektroda i mjerni aparat	DurOx, WTW Oxi3210
Kompresor	HIBLOW HP 40
Konfokalni laser skenirajući mikroskop	Leica
KPK reaktor	HACH COD Reactor
Magnetska miješalica	IKAMAG RET
Mjerač protoka zraka	
pH elektroda i mjerni aparat	SenTix41, WTW 330i
Spektrofotometar	Spectroquant VEGA 400 Merck
Sterilizator/ Sušionik	Instrumentaria ST-05
Svjetlosni mikroskop	Carl Zeiss Jena
Termo blok	Thermoreactor, Merck
Termostat	Sutjeska
Vaga	METTLER AJ150

Vodena kupelj	Hum Aqua 5
Vortex	BIOSAN

### 3.2. Metode rada

#### 3.2.1. Pokusi karakterizacije aktivnog mulja za uklanjanje C, N i P

Da bi se u aktivnom mulju s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadne vode grada koji je uporabljen za provođenje ciljanih pokusa disertacije, usmjerene na uklanjanje C, N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N, za što su odgovorni funkcionalni mikroorganizmi i odabrani procesni čimbenici, dokazala prisutnost/zastupljenost i aktivnost odgovornih mikroorganizama za procese uklanjanja C, N i P provedeni su šaržni pokusi karakterizacije aktivnog mulja: nitrifikacija i denitrifikacija, anaerobni unos hlapljivih masnih kiselina i otpuštanje fosfata iz stanica PAOs, te aerobni i anoksični unos fosfata.

Tim pokusima određena je aktivnost fosfat akumulirajućih organizama (engl. *Phosphate Accumulating Organisms*, PAOs), denitrificirajućih fosfat akumulirajućih organizama (engl. *Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms*, DPAOs), nitrifikanata (amonijak oksidirajućih bakterija, engl. *Ammonia Oxidizing Bacteria*, AOB i nitrit oksidirajućih bakterija, engl. *Nitrite Oxidizing Bacteria*, NOB), kao i denitrificirajućih običnih heterotrofnih organizama (engl. *denitrifying Ordinary Heterotrophic Organisms*, dOHOs).

15 L uzorka aktivnog mulja uzeto je iz aerobnog bioreaktora lokalnog postrojenja – uređaja za pročišćavanje otpadne vode, te je na hladnom dopremljen u Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda na Sveučilištu u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Dio mulja je odmah po dopremanju u Laboratorij uporabljen u ciljanim šaržnim pokusima karakterizacije mulja, a dio pohranjen na +4 °C. Prije provedbe ciljanih šaržnih pokusa uzorci mulja su 3-4 puta isprani vodovodnom vodom kako bi se uklonila eventualna otopljena faza influenta kao i eventualni međuprodukti mikrobne reakcije. Potom je dodana mineralna podloga sastava: FeCl<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> kako bi se osigurali svi potrebni elementi u tragovima za rast biomase aktivnog mulja tijekom provođenja ciljanih šaržnih pokusa.

Pokusi su provedeni pri ambijentalnim uvjetima temperature, pri 22-26 °C, a vrijednost pH je kontrolirana i održavana na 7,2±0,2 dodavanjem 1M NaOH ili 1M HCl. Određene su

vrijednosti suspendiranih čestica u miješanoj tekućini (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*, MLSS) iz četiri usporedna uzorka aktivnog mulja i izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, te je za pokuse nitrifikacije i denitrifikacije iznosila  $3,2 \pm 0,5$  g MLSS/L, odnosno  $3,4 \pm 0,2$  g MLSS/L za pokuse otpuštanja i unosa P. Mulj koji je prije provođenja pokusa čuvan pri  $+4$  °C, temperiran je uz prozračivanje u laboratorijskom reaktoru do postizanja sobne temperature.

Pri provođenju šaržnih pokusa nitrifikacije održavana je vrijednost otopljenog kisika (engl. *Dissolved Oxygen*, DO) pri  $DO \geq 2$  mg/L, odnosno u pokusima denitrifikacije održavana je vrijednost  $0,5 < DO \leq 1$  mg/L. Također u šaržnim pokusima anerobnog unosa organskih sastojaka i otpuštanja  $PO_4\text{-P}$ , anaerobni uvjeti ostvareni su propuhivanjem plina dušika.

Svaki od ciljanih šaržnih pokusa načinjen je u četiri ponavljanja, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Pri provođenju pokusa karakterizacije aktivnog mulja provedene su fizikalno-kemijske analize kojima su određivani: ukupni organski ugljik (engl. *Total Organic Carbon*, TOC) na TOC Analyzer Shimadzu 5000A i primjenom test kitova, KPK titrimetrijski – otvorenom refluks metodom / zatvorenom refluks metodom, prema Standardnim metodama (APHA, 2005) kao i primjenom kivetnog testa Merck, ukupni dušik,  $NH_4\text{-N}$ ,  $NO_3\text{-N}$ ,  $NO_2\text{-N}$ , ukupni fosfor, orto-fosfati primjenom kivetnih testova Merck, te acetat primjenom enzimskog kit testa Megazyme Acetic Acid.

Za provedbu analitičkih metoda uzorci su filtrirani kroz filter papir veličine pora  $0,45$   $\mu\text{m}$ , stakleni filter papir a u filtratu su provedene ciljane analize.

### 3.2.2. Obogaćivanje aktivnog mulja PAOs/ DPAOs/DNPAOs vrstama

Identifikacija fosfat-akumulirajućih organizama (PAOs) i denitrificirajućih fosfat-akumulirajućih organizama (DPAOs) te razumijevanje njihovog međusobnog odnosa predstavlja ključan korak za optimizaciju učinkovitosti uklanjanja nitrata i fosfora u otpadnoj vodi. Dinamika bakterijskih zajednica tijekom procesa aklimatizacije povezana je s učinkovitošću uklanjanja hranjivih tvari.

Za obogaćivanje aktivnog mulja vrstama PAOs/DPAOs/DNPAOs za učinkovito uklanjanje N i P, provedeni su pokusi u laboratorijskim SBR reaktorima radnog volumena **5L** (**SBR<sub>PAOs</sub>** i **SBR<sub>DPAOs-DNPAOs</sub>**), pri naizmjeničnim anaerobno-aerobnim uvjetima odnosno

anaerobno-anoksičnim, pri režimu rada  $SBR_{PAOs}$ : 0,5 sati punjenje, 15 h aeracija, 8 sati taloženje, 0,5 sati odlijevanje supernatanta, odnosno režim rada  $SBR_{DPAOs-DNPAOs}$ : 0,5 sati punjenje, 15 h aeracija, 8 sati taloženje, 0,5 sati odlijevanje supernatanta. Pokusi su provedeni na sobnoj temperaturi (22-25 °C) i pri pH 7,0.

Zastupljenost PAOs/DPAOs/DNPAOs vrsta u aktivnom mulju dokazana je provođenjem šaržnih testova anaerobnog otpuštanja  $PO_4-P$  i unosa hlapljivih masnih kiselina – organskih sastojaka, ili izostanka unosa izvora C, odnosno acetata kao odabranog izvora ugljika, te aerobno-anoksičnim unosom  $PO_4-P$ , kao i dokazivanjem unutarstanično pohranjenog polifosfata bojanjem po Neisseru. Svi uzorci filtrirani su kroz filter papir veličine pora 0,45  $\mu m$ , a u filtratu su provedene ciljane analize u 4 ponavljanja. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Glavna razlika između PAOs i DPAOs (DNPAOs) je korištenje akceptora elektrona. PAOs koristi kisik u aerobnim uvjetima, a DPAOs koristi nitrat u anoksičnim uvjetima. Kao rezultat toga, sustav koji koristi DPAOs ne samo da može smanjiti potrebu za kisikom za oksidaciju poli- $\beta$ -hidroksialkanoata (PHA) u aerobnoj zoni, već i uštedjeti korištenje kemijske potrošnje kisika (KPK) (Lee i Yun, 2014). DPAO ima prednost za istovremeno uklanjanje i N i P uz minimizirano korištenje KPK. Murnleitner i sur. (1997) i Kuba i sur. (1996) sugeriraju da DPAO proizvodi 20%-30% manje mulja od PAO, a Brdjanović i sur. (1998) da DPAOs mogu ukloniti 4-5 g  $NO_3-N$  / g uklonjenog P, bez dodatnih izvora organskog ugljika.

Nakon provedenog obogaćivanja mulja s PAOs i DPAOs FISH metodom dokazano je prisustvo PAOs i DPAOs u mulju, kao i nakupljeni poliP bojanjem po Neisseru.

3.2.3. Odabir konfiguracije A-O-A procesa s endogenom denitrifikacijom probirom procesnih čimbenika i kinetika/aktivnost DPAOs i DGAOs u uklanjanju N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju

Pokusi istraživanja utjecaja DO na uklanjanje N i P iz otpadne vode C/N  $\sim 4$  u A/O/A procesu s endogenom denitrifikacijom provedeni su u SBR reaktoru volumena 6 L, koji je bio inokuliran muljem obogaćenim PAOs. Eksperimenti su trajali 30 dana za svaku konfiguraciju sustava, pri čemu je ulazna koncentracija amonijaka iznosila  $30 \pm 2$  mg  $NH_4-N/L$ , a MLSS  $3.0 \pm 0.2$  g/L.

Sintetska otpadna voda (2 L) dodavala se tijekom prvih 10 minuta anaerobne faze procesa (trajanja 2 sata). Aerobna faza (3 sata) provedena je u dva režima: s koncentracijom DO  $\geq 2$  mg/L i s DO  $\sim 1$  mg/L. Nakon aerobne slijedila je anoksična faza (3 sata), tijekom koje se odvijala endogena denitrifikacija. Tijekom anaerobne i anoksične faze, sadržaj reaktora miješan je mehaničkim miješalom, dok je u aerobnoj fazi koncentracija DO regulirana opskrbom zraka putem kompresora (HIBLOW HP 40, Njemačka), mjerača protoka i difuzora na dnu reaktora.

Sustav je radio na sobnoj temperaturi bez korekcije pH vrijednosti. Temperatura, koncentracija DO i pH kontinuirano su praćeni uređajem WTW Multi 3420 SET KS1 (pH elektroda SenTix 940-3 i elektroda za otopljeni kisik WTW FDO 925, Njemačka). Uzorci su uzimani u redovitim vremenskim intervalima, filtrirani kroz stakleni filter (Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, Njemačka), a alikvot je korišten za analizu KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P i TN. Talog na filter papiru korišten je za određivanje MLSS i PHA.

Osim biološkog unosa, fosfor se može adsorbirati na površinu čestica aktivnog mulja. Ovo je fizikalno-kemijski proces u kojem se fosfatni ioni vežu za površinu čestica mulja, uglavnom zbog elektrostatskih interakcija i vezanja na metalne ione prisutne u mulju. Ova adsorpcija osigurava dodatni put uklanjanja fosfora (Smith i sur. 2008).

Za provedbu analitičkih metoda kojima su motrene i određene mikrobne aktivnosti za uklanjanje C, N i P kao rezultat mikrobnih reakcija pri odabranim procesnim – operativnim čimbenicima za pojedini ciljani pokus, uzorci miješane tekućine/mulja nakon uzorkovanja su filtrirani kroz Whatman GF/C stakleni filter papir (1,2  $\mu$ m).

U filtratu je analiziran: ukupni organski ugljik (TOC), KPK, ukupni P (TP), PO<sub>4</sub>-P, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i TP. Filter papir s talogom je uporabljen za određivanje MLSS, MLVSS, glikogena i PHA.

#### 3.2.4. FISH analiza aktivnog mulja obogaćenog PAOs-ima za pokuse uklanjanja N i P u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju

Za analizu mikrobne populacije u pokusima nitrifikacije, denitrifikacije i uklanjanja fosfora korištena je FISH metoda prema Amann (1995). Korišteno je 13 oligonukleotidnih proba označenih fluorescentnim bojama cianin 3 i 5 koje su sintetizirane po naruždbi od firme GOREA PLUS (Hrvatska). Oligonukleotidne probe korištene u FISH analizi su prikazane u tablici 6.

Uzorci mulja su uzeti na kraju aerobnog perioda u pokusima nitrifikacije odnosno na kraju anoksičnog perioda u pokusima denitrifikacije i uklanjanja fosfora i analizirani FISH metodom za određivanje AOB, NOB, denitrifikanata, PAOs, DPAOs i GAOs u ukupnim bakterijama aktivnog mulja. FISH preparati su vizualizirani sa konfokalnim laserskim skenirajućim mikroskopom (CLSM).

U svim pokusima ciljana molekula je bila 16S rRNA i temperatura hibridizacije 46 °C. Zajedno su korištene probe EUB338, EUB338-II i EUB338-III (EUBmix, označavale su sve bakterije) koje su bile označene Cianin 5 bojom na 5' kraju. Probe PAO462, PAO651 i PAO846 (PAOmix, fosfor akumulirajući organizmi), Acc-I-444 i Acc-II-444 (DPAOmix, denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi), GAOQ431 i GAOQ989 (GAOmix, glikogen akumulirajući organizmi). EUBmix probe su bile označene Cianin 3 bojom također na 5' kraju.

FISH metoda sastoji se od četiri koraka:

(i) Priprema fiksativa (4% paraformaldehid)

Postupak: 65 mL destilirane vode zagrijati na temperaturu od 60 °C i dodati 4 g paraformaldehida i jednu kap 2M NaOH te brzo miješati 1-2 minute, dok otopina ne postane gotovo prozirna. Ukloniti izvor topline, dodati 33 mL 3× PBS (fosfatni puferirani fiziološki rastvor). Prilagoditi pH na 7,2 pomoću HCl. Filtrirati otopinu kroz 0,2 µm filter. Brzo ohladiti na 4 °C i pohraniti u hladnjaku.

(ii) Fiksacija mikrobnih stanica s 4% paraformaldehidom

Postupak: Pomiješajti tri volumena fiksativa paraformaldehida s jednim volumenom uzorka. Inkubirati 1-3 sata na 4 °C. Nakon toga centrifugirati fiksirane stanice na 5000 g i ukloniti fiksativ. Stanice isprati u 1× PBS i resuspendirati ih u 1× PBS do konačne koncentracije od 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> stanica/mL. Dodati jedan volumen ledeno hladnog etanola te promiješati. Fiksirane stanice nanijeti na stakalca ili pohraniti na -20 °C za višemjesečno čuvanje.

(iii) Imobilizacija fiksiranih mikrobnih stanica na stakalca

Postupak: Nanjeti otprilike 3 µL suspenzije fiksiranih stanica na stakalce u krugu promjera oko 5 mm. Ostaviti da se osuši na zraku, zatim dehidrirati stanice uranjanjem u etanol različitih koncentracija (50%, 80% i 98%) po 3 minute za svaku. Tako pripremljena stakalca mogu se čuvati suha na sobnoj temperaturi na neograničeno vrijeme.

(iv) Hibridizacija



Postupak: Namočiti Whatman 3MM papir u hibridizacijski pufer te ga staviti u tubu od 50 mL. Tubu temperirati nekoliko minuta na hibridizacijskoj temperaturi od 46 °C. Za svako mjesto za hibridizaciju pripremiti 1 µL fluorescentne probe i 8 µL hibridizacijskog pufera te staviti 9 µL mješavine na mjesto s fiksiranim stanicama. Stakalce staviti u prethodno ugrijanu vlažnu tubu i inkubirati 2 sata na 46 °C. Nakon hibridizacije, stakalce odmah isprati toplim hibridizacijskim puferom kako bi se zaustavio proces. Staviti stakalce u tubu s 50 mL hibridizacijskog pufera i inkubirati još 20 minuta na hibridizacijskoj temperaturi. Ukloniti soli kratkim umakanjem stakalca u destiliranu vodu. Ostaviti da se osuši na zraku. Na preparat dodati kap mountanta i pokriti pokrovnicom te ostaviti na ravnoj površini, u mraku, 24 sata na sobnoj temperaturi.

Tablica 6. Probe korištene za FISH

Naziv probe		Ciljana skupina	Sekvenca (5'-3')	Formamid %	Literatura
Nso190		AOB	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	55	Viancelli i sur. (2011)
NIT3		NOB	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	
DEN124		DEN	CGACATGGGCGCGTTCCG AT	40	Ginige i sur. (2005)
PAO462	PAOmix	PAOs	CCGTCATCTACWCAGGGT ATTAAC	35	Crocetti i sur. (2000)
PAO651			CCCTCTGCCAAACTCCAG	35	
PAO846			GTTAGCTACGGCACTAAA AGG	35	
Acc-I-444	DPAOmix	DPAOs	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	35	Flowers i sur. (2009)
Acc-II-444			CCCGTGCAATTTCTTCCCC	35	
G AOQ431	GAOmix	GAOs	TCCCCGCCTAAAGGGCTT	35	Crocetti i sur. (2002)

GAOQ989			TTCCCCGGATGTCAAGGC	35	
EUB338	EUBmix	Sve bakterije	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50	Amann i sur. (1990)
EUB338-II			GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50	Daims i sur. (1999)
EUB338-III			GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50	

### 3.3. Analitičke metode

#### 3.3.1. Određivanje amonijakalnog dušika

Amonijakalni dušik ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) određivan je metodom po Nessleru. Dodavanjem Nesslerovog reagensa u uzorak dolazi do formiranja žuto smeđeg obojenja, u intenzitetu ovisnom o koncentraciji prisutnog  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  u uzorku određuje se mjerenjem absorbance pri 425 nm uz baždarni dijagram dobiven određivanjem absorbancijskih vrijednosti pri 425 nm poznatih koncentracija standardne otopine  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Postupak: 50 mL filtriranog uzorka (razrijeđenog po potrebi do koncentracijskog raspona metode) i 2 kapi K-Na-tartarata dodaju se u odmjernu tikvicu od 50 mL. Uzorak se promiješa, doda se 1 mL Nesslerovog reagensa i ponovno promiješa. Nakon 10 min uzorak se prelije u kivetu i mjeri se absorbanca na fotometru pri 425 nm.

#### 3.3.2. Određivanje koncentracije nitrata

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

Postupak: 1,5 mL filtriranog uzorka (razrijeđenog po potrebi do koncentracijskog raspona metode) i jedna žličica praškastog  $\text{NO}_3\text{-1}$  reagensa dodaju se u staklenu kivetu i miješaju do otapanja reagensa. Zatim se dodaje 5 mL koncentrirane sumporne kiseline i promiješa (dolazi do zagrijavanja uzorka). Nakon 10 minuta reakcijskog vremena absorbanca se mjeri fotometrom.

### 3.3.3. Određivanje koncentracije nitrita

Metoda određivanja NO<sub>2</sub>-N pomoću Merck Spectroquant 1.14776 seta temelji se na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli. Ona reagira s N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorom i tvori crveno-ljubičastu azo boju čije obojenje se mjeri fotometrijski. Ova metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500-NO<sub>2</sub>-B, i EN 26 777.

Postupak: 5 mL filtriranog uzorka (razrijeđenog po potrebi do koncentracijskog raspona metode) i jedna žličica praškastog NO<sub>2</sub>-1 reagensa dodaju se u staklenu kivetu i miješaju do otapanja reagensa. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena apsorbancu se mjeri fotometrom.

FA i FNA su računati prema Anthonisen i sur. (1976), jednadžbe 3 i 4.

$$\text{FA kao NH}_3 \left( \frac{\text{mg N}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{ukupni amonijak kao N (mg/L)} \times 10^{\text{pH}}}{\frac{6344}{e^{273+T(^{\circ}\text{C})}} + 10^{\text{pH}}} \quad (\text{jdb. 3})$$

$$\text{FNA} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{[\text{NO}_2^- - \text{N}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{\frac{-2300}{e^{273+T(^{\circ}\text{C})}} \times 10^{\text{pH}}} \quad (\text{jdb. 4})$$

### 3.3.4. Određivanje koncentracije fosfata

Metoda određivanja fosfata u obliku ortofosfata (PO<sub>4</sub>-P) pomoću Merck Spectroquant 1.14842 seta temelji se na reakciji iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom pri čemu nastaje žuto obojeni molibdovanadat fosforne kiseline čija se koncentracija određuje fotometrijski. Ova metoda je analogna APHA 4500-P C.

Postupak: 5 mL filtriranog uzorka (razrijeđenog po potrebi do koncentracijskog raspona metode) i 1,2 mL PO<sub>4</sub>-1 reagensa dodaju se u staklenu kivetu i promiješaju. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena apsorbancu se mjeri fotometrom.

### 3.3.5. Određivanje ukupnog dušika

Metoda određivanja ukupnog dušika pomoću Merck Spectroquant 1.14763 seta temelji se na transformaciji organskih i anorganskih dušikovih spojeva u nitrat prema Koroleff-ovoj metodi u reakciji s oksidirajućim reagensom u termoreaktoru. U otopini zakiseljenoj sumpornom i fosfornom kiselinom, nitrati reagiraju s 2,6-dimetilfenolom i tvore 4-nitro-2,6-dimetilfenol koji se određuje fotometrijski. Digestija je analogna EN ISO 11905-1, a određivanje nitrata je analogno ISO 7890/1.

Postupak: 1 mL filtriranog uzorka (razrijeđenog po potrebi do koncentracijskog raspona metode), 9 mL destilirane vode i jedna žličica praškastog N-1K reagensa dodaju se u staklenu kivetu i miješaju do otapanja reagensa. Potom se dodaje 6 kapi reagensa N-2K i kiveta se spaljuje jedan sat na 120 °C. Nakon spaljivanja kiveta se vadi iz termoreaktora i ostavi da se hladi na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta se promućka kiveta. Zatim se 1 mL bistrog supernatant ili filtrata u slučaju mutnoće ili taloga otpipetira u reakcijsku kivetu i dodaje se 1 mL reagensa N-3K i promiješa. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena apsorbancu se mjeri spektrofotometrom.

### 3.3.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

Količina oksidansa utrošenih za oksidaciju organskih sastojaka u uzorku odnosno utrošak kalijeva bikromata ( $K_2Cr_2O_7$ ) potrebnog za oksidaciju organske stvari izražene kao mg  $O_2/L$  izražava se kao KPK vrijednost. Srebro-sulfat ( $Ag_2SO_4$ ) služi kao katalizator potpune oksidacije organskih spojeva. Za sprečavanje oksidacije nekih anorganskih spojeva (poput klorida) dodaje se živin sulfat ( $HgSO_4$ ). Višak kalijeva bikromata preostao nakon oksidacije titrira se otopinom feroamonijeva sulfata (FAS) ( $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ) kao što je prikazano u jednadžbi 5.



Prije određivanja KPK potrebno je odrediti faktor otopine titracijom standardne otopine kalijeva bikromata s feroamonijevim sulfatom zbog nestabilnosti otopine feroamonijeva sulfata. Faktor otopine (f) je omjer volumena otopine  $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$  i  $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ .

Postupak: 2 mL destilirane vode, 1,2 mL otopine kalijeva bikromata + HgSO<sub>4</sub> i 2,8 mL otopine Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dodaju se u staklenu kivetu i promiješaju. Kiveta se hladi na tamnom mjestu i nakon hlađenja titrira otopinom feroamonijeva sulfata uz dodatak feroin indikatora do promjene boje iz plavo/zelene do smeđe/crvene. Faktor otopine se računa prema jednadžbi 6.

$$f = \frac{1,2}{V_{\text{fas}}} \quad (\text{jdb. 6})$$

gdje je:

1,2 - volumen (mL) otopine K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + HgSO<sub>4</sub>

V<sub>fas</sub> - volumen (mL) otopine feroamonijevog sulfata utrošene za titraciju

Postupak: 2 mL filtriranog uzorka (razrijeđenog po potrebi do koncentracijskog raspona metode), 1,2 mL otopine K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + HgSO<sub>4</sub> i 2,8 mL otopine Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dodaju se u staklenu kivetu i promiješaju. Kiveta se zatim spaljuje u termoreaktoru na 150 °C sat vremena. Nakon isteka tog vremena, kiveta se izvadi iz termoreaktora i stavlja na tamno do hlađenja na sobnu temperaturu. Nakon toga se uzorak titrira otopinom feroamonijevog sulfata (c = 0,1 mol/L) uz feroin kao indikator do promjene boje iz plavo/zelene do smeđe/crvene.

Slijepa proba se priprema istim postupkom kao uzorak, osim što se umjesto 2 mL uzorka dodaje 2 mL destilirane vode.

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi 7.

$$\text{KPK} \left[ \frac{\text{mgO}_2}{\text{L}} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times f \times 8000}{V_{\text{uzorka}}} \quad (\text{jdb. 7})$$

gdje je:

V<sub>1</sub>-volumen [mL] FAS utrošen za titraciju slijepa probe

V<sub>2</sub>-volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

c-koncentracija FAS (0,1 mol/L)

f-faktor otopine FAS

### 3.3.7. Određivanje temperature

Tijekom procesa temperatura je motrena pomoću temperaturnog senzora s kisikove elektrode (WTW Oxi3210 i DurOx) i pH elektrode (WTW 330i i SenTix41) očitavanjem sa zaslona elektroda.

### 3.3.8. Određivanje pH vrijednosti

Vrijednost pH mjerena je pH-metrom WTW 330i i pH elektrodom SenTix41. pH elektroda je tijekom pokusa bila uronjena u bioreaktor te je očitavana vrijednost prikazana na zaslonu pH-metra. Prije mjerenja pH vrijednosti svakodnevno je provođeno umjeravanje elektrode uranjanjem u pufer otopinu s pH 4 i 7 prema uputama proizvođača. Nakon završetka mjerenja elektroda je isprana destiliranom vodom te čuvana u zasićenoj otopini kalijeva klorida.

### 3.3.9. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Koncentracija otopljenog kisika određivana je pomoću kisikove elektrode DurOx i mjerača otopljenog kisika WTW Oxi3210. Elektroda je tijekom pokusa bila uronjena u bioreaktor te je očitavana vrijednost prikazana na zaslonu uređaja. Instrument je umjeren prema uputama proizvođača.

### 3.3.10. Određivanje MLSS

Koncentracija biomase određivana je kao MLSS (suspendirana tvar u miješanom bioreaktoru) što predstavlja najbolju mjeru za koncentraciju biomase aktivnog mulja. Prije pokusa uzorak homogenizirane suspenzije aktivnog mulja filtriran je kroz čisti, osušeni i prethodno izvagani filter papir. Filter papir sa suspenzijom aktivnog mulja poznatog volumena se sušio na 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja ohlađen je u eksikatoru te izvagan. Iz razlike mase čistog suhog filter papira i osušenog taloga aktivnog mulja na filter papiru podijeljene s volumenom uzete suspenzije aktivnog mulja, dobivena je koncentracija biomase izražena u g/L. Račun je prikazan na jednadžbi 8.

$$\text{MLSS} \left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right] = \frac{m_{\text{om}} - m_{\text{f}}}{\text{mL uzorka}} \times 1000 \quad (\text{jdb. 8})$$

gdje je:

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

$m_f [g]$ =masa čistog filter papira

### 3.4. Mikrobiološke metode

#### 3.4.1. Metoda bojanja po Neisseru za određivanje poliP (Eikelboom i van Buijsen, 1983)

Kapljica aktivnog mulja stavlja se na čisto i odmašćeno predmetno stakalce te se preparat suši na sobnoj temperaturi. Osušeni razmaz na predmetnici provlači se tri puta kroz plamen i na taj način fiksira. Zatim se nanese mješavina 2 dijela otopine A i 1 dio otopine B 10-15 sekundi. Višak boje na stakalcu potrebno je pustiti da oteče. Nakon toga se nanese otopina C na 45 sekundi te ispere vodom. Stakalce se ostavi da se osuši i gleda se pod svjetlosnim mikroskopom. Sastav otopina prikazan je u tablici 7.

Nakupljeni polifosfati se vide kao tamno-ljubičasto obojana volutinska zrnca unutar bakterijske stanice.

Tablica 7. Reagensi korišteni za metodu bojanja po Neisseru:

<b>Otopina A</b>	
Metilen plavo	0,1 g
Etanol 96%	5,0 mL
Octena kiselina (glaciale)	5,0 mL
Destilirana voda	100,0 mL
<b>Otopina B</b>	
Kristal-violet (10% u 96% etanolu)	3,3 mL
Etanol 96%	6,7 mL
Destilirana voda	100,0 mL
Nakon pripreme pomiješati dva dijela otopine A i jedan dio otopine B	
<b>Otopina C</b>	
Krisoidin Y (1% vodena otopina)	33,3 mL
Destilirana voda	100,0 mL

### 3.4.2. Metoda fluorescencijskog bojanja PHB s Nile blue A (Ostle i Holt, 1982)

Kapljica aktivnog mulja stavlja se na čisto i odmašćeno predmetno stakalce te se preparat suši na sobnoj temperaturi. Osušeni razmaz na predmetnici provlači se tri puta kroz plamen i na taj način fiksira. Preparat se boja otopinom A 10 minuta na 55 °C i ispere vodom i otopinom B 1 minutu i ispere vodom. Stavi se pokrovnica i na imerziono ulje. Reagensi za bojanje prikazani su u tablici 8.

Obojana zrnca PHB unutar bakterijskih stanica pobuđenih svjetlošću valne duljine 460 nm emitiraju sjajnu narančastu svjetlost i takvi se mogu pregledavati pod fluorescencijskim mikroskopom.

Tablica 8. Reagensi za metodu bojanja s Nile blue A:

<b>Otopina A</b>	
Nile blue A	1 g
Destilirana voda	100 mL
<b>Otopina B</b>	
Octena kiselina	8 mL
Destilirana voda	92 mL

Napomena: Obzirom da imerziono ulje izaziva žutu fluorescenciju što ometa gledanje preparata pod mikroskopom, potrebno je koristiti pokrovnicu koja se stavi na obojani preparat pomoću kapljice vode.

Nile blue A bojanje se može koristiti u kombinaciji s FISH. Nakon Nile blue A bojanja, stakalca se umoče u apsolutni alkohol 30 minuta. Nakon toga slijedi postupak za FISH prema metodi.

#### **Izračuni:**

SND je računata na način da je od početne koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N}$  oduzeta nastala koncentracija  $\text{NO}_x\text{-N}$ , podijeljena s početnom koncentracijom  $\text{NH}_4\text{-N}$  i pomnožena sa 100. Izražava se u %.



Brzina uklanjanja KPK, N i P je računata na način da je od početne vrijednosti oduzeta konačna vrijednost i podijeljena s vremenom trajanja procesa. Izražava se u mg/Lh.

Specifična brzina je izračunata tako što je brzina podijeljena sa koncentracijom MLSS. Izražava se u mg/gh.

### **3.5. Određivanje PHA**

Uzorci mulja iz SBR reaktora pomiješani su s formaldehidom u omjeru od približno 1% formaldehida po volumenu uzorka kako bi se inhibirala aktivnost biomase u mulju. Uzorci su centrifugirani i supernatant je uklonjen, zatim isprani s fosfatnim puferom, ponovno centrifugirani i supernatant je ponovno dekantiran. Svi uzorci su zatim liofilizirani uređajem (FTS, Queensland, Australija) koji je radio na  $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 0,1 mbar najmanje 20 sati. Približno 20 mg liofiliziranog mulja dodano je u 2 mL kloroforma i 2 mL acidificirane otopine metanola (koja je sadržavala ili 3%, 10% ili 20% sumporne kiseline po volumenu, kao i približno 100 mg/L natrijevog benzoata). Šest standardnih otopina sastojalo se od 0-3 mg kopolimera R-3-hidroksibutirne kiseline (3HB) i R-3-hidroksivalerne kiseline (3HV) (7:3) (Fluka, Melbourne, Victoria, Australija) i 0-3 mg 2-hidroksikaproične kiseline (Sigma–Aldrich, Melbourne, Victoria, Australija). Uzorci i standardi su zatim digestirani u čvrsto zatvorenim staklenim bočicama od 10 mL na  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 2, 6 ili 20 sati, i ohlađeni na sobnu temperaturu. Destilirana voda (1 mL) je zatim dodana i snažno pomiješana sa svakim uzorkom kako bi se uklonili čestice iz kloroformne faze i spriječila degradacija GC kolone. Nakon miješanja, dopušteno je 1 sat za razdvajanje faza. Kloroformna (donja) faza je zatim prenesena u drugu bočicu, osušena s približno 0,5-1 g granularnih natrijevih sulfata peleta, i odvojena od čvrste faze. Tri mikrolitra kloroformne faze analizirana su pomoću Perkin-Elmer plinskog kromatografa. Kromatograf je radio s DB-5 kolonom (30 m dužina  $\times$  0,25 mm unutarnji promjer  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  film), s omjerom injekcije 1:15 i helijem kao plinom nosačem (1,5 mL/min). Jedinica za detekciju plamene ionizacije (FID) radila je na  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  s temperaturom injekcijskog porta od  $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Temperatura pećnice bila je postavljena na  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 minutu, povećavana je za  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a zatim do  $270\text{ }^{\circ}\text{C}$  pri  $45\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  i držana 3 minute.

### **3.6. Određivanje acetata**

Acetat je određen korištenjem Megazyme kita (K-ACETRM) koji radi na principu pretvorbe acetata u acetil-fosfat i ADP djelovanjem acetat kinaze uz prisutnost ATP-a. Ova reakcija se ubrzava djelovanjem fosfotransacetilaze (PTA), koja pretvara acetil-fosfat i koenzim

A u acetil-CoA i anorganski fosfat (Pi). Proizvedeni ADP se zatim ponovno pretvara u ATP i piruvat pomoću fosfoenolpiruvata (PEP) u prisutnosti piruvat kinaze (PK). Piruvat se zatim reducira u D-laktat pomoću D-laktat dehidrogenaze (D-LDH) koristeći NADH, pri čemu se proizvodi NAD<sup>+</sup>. Potrošnja NADH, koja je stehiometrijska s količinom octene kiseline, mjeri se smanjenjem apsorbance na 340 nm.

#### Postupak:

0,1 ml uzorka i 2 ml destilirane vode pomiješaju se u kivetu s 0,3 ml otopine 1, 0,2 ml otopine 2, 0,02 ml otopine 3 i 0,02 ml otopine 4. Sadržaj se promiješa i nakon 2 minute se očita absorbanca A1 pri 340 nm, te doda 0,02 ml otopine 5. Ponovno se promiješa i nakon 4 minute očita absorbanca A2 pri 340 nm. Korištenjem proračuna dobije se vrijednost acetata u uzorku.

### **3.7. Određivanje glikogena**

#### Metoda prema Bondu (1999):

Glikogen je određen modificiranom metodom prema Bondu i suradnicima (1999). Pet mililitara 0,6 M HCl dodano je u izmjerenu, liofiliziranu biomasu u staklenim epruvetama s navojem, zatim zagrijavano na 100 °C tijekom 5 sati. Nakon hlađenja i centrifugiranja, 1 mL supernatanta prenesen je u bočicu za analizu glukoze tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (engl. High Performance liquid chromatography, HPLC). Pedeset mikrolitara je ubrizgano u Hewlett-Packard X-87H 300 mm × 7,8 mm, BioRad Aminex ion-isključujuću HPLC kolonu na 65 °C. Kao nosivi fluent korišten je 0,008 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pročišćen helijem, pri brzini protoka od 0,6 mL/min. Koristio se Perkin-Elmer detektor refrakcijskog indeksa koji je radio na 35 °C.

#### Anthrone metoda:

Pripremljena je standardna krivulja apsorbancije pipetiranjem različitih volumena otopine glukoze u epruvete i nadopunjavanjem volumena do 1 mL destiliranom vodom. U epruvete je dodano 5 mL reagensa i promiješano na vorteksu, te ohlađeno. Epruvete su pokrivene mramornim kuglicama ili poklopljene poklopcima i inkubirane 90°C 17 minuta ili u kipućoj vodenoj kupelji 10 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu izmjerena je gustoća na 620 nm u odnosu na slijepu probu.

Reagens je pripremljen otapanjem 2g Anthrone u 1 L koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a glukozna otopina otapanjem 200 µg u mL destilirane vode.

Uzorak je pripremljen stavljanjem uzorka i nadopunjavanjem epruvete destiliranom vodom do 1 mL, te dodatkom 5 mL reagensa. Nakon miješanja na vorteksu epruveta je ohlađena, poklopljena i inkubirana na 90°C 17 minuta ili u kipućoj vodenoj kupelji 10 minuta. Nakon hlađenja mjerena je optičku gustoću na 620 nm u odnosu na slijepu probu.

Količina glikogena očitava se iz standardne krivulje s  $A_{620}$  na Y-osi i  $\mu\text{g}$  glukoze na X-osi.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakterizacija aktivnog mulja – aktivnost za uklanjanje C, N i P

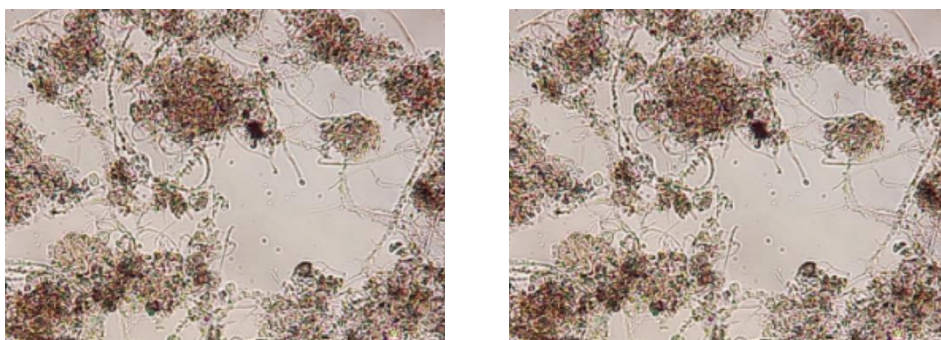
Dobra mikrobiološka aktivnost aktivnog mulja pripisuje se prisutnosti funkcionalnih mikroorganizama odgovornih za uklanjanje C, N i P kao i uspostavljenim procesnim – operativnim čimbenicima. Na taj način postiže se učinkoviti proces uklanjanja onečišćenja uz što niže operativne troškove (za proces opskrbe kisikom – osiguravanje potrebnog DO, i s obzirom na raspoloživi C iz otpadne vode dodani vanjski izvor ugljika za osiguravanje nužnog omjera C/N odnosno C/P) s ciljem postizanja zakonom propisanih normi obrađene vode (NN 66/19, 84/21, 26/20).

Kakvoća mulja određena je kroz niz pokazatelja, poput izgleda flokula, mikroskopske slike aktivnog mulja, brzine taloženja, određivanja-izračuna indeksa taloživosti mulja, kao i određivanjem učinkovitost uklanjanja C, N i P.

Izgled flokula aktivnog mulja i mikroskopski izgled aktivnog mulja s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadne vode grada prikazan je Slikama 8 i 9.



Slika 8. Izgled flokula aktivnog mulja iz bioeracijskog bazena lokalnog uređaja za biološku obradu otpadnih voda grada



Slika 9. Mikroskopski izgled aktivnog mulja (svjetlosni mikroskop, povećanje 400x)

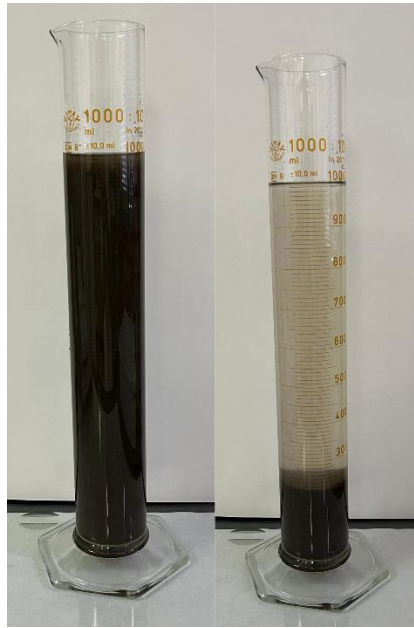
Aktivni mulj je podrijetlom s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadne vode grada, a otpadne vode grada karakterizira niski omjer C/N odnosno KPK/N. U literaturi je istaknuto da je za uklanjanje organskih sastojaka u aerobnim uvjetima potrebno osigurati omjer C/N/P 100/5/1 (Tchobanoglous i sur., 2003) Također, minimalna vrijednost omjera fosfora u influentu i KPK iz acetata za neograničenu aktivnost fosfor-akumulirajuće mase iznosi približno 0,12 mg P/mg KPK acetata, što je ujedno i maksimalna vrijednost omjera za potpuno uklanjanje fosfora (Schuler i Jenkins, 2003).

Uobičajene vrijednosti omjera KPK/BPK<sub>5</sub>, KPK/TN, KPK/TP, BPK<sub>5</sub>/TN i BPK<sub>5</sub>/TP u komunalnim otpadnim vodama prikazane su u tablici 9 (Henze i sur., 2008).

Tablica 9. Vrijednosti omjera organskih i anorganskih sastojaka u komunalnoj otpadnoj vodi (preuzeto i prilagođeno iz Henze i sur., 2008)

Omjer	Visoko opterećenje	Srednje opterećenje	Nisko opterećenje
<b>KPK/BPK<sub>5</sub></b>	2,5-3,5	2,0-2,5	1,5-2
<b>KPK/TN</b>	12-16	8-12	6-8
<b>KPK/TP</b>	45-60	35-45	20-35
<b>BPK<sub>5</sub>/TN</b>	6-8	4-6	3-4
<b>BPK<sub>5</sub>/TP</b>	20-30	15-20	10-15

Brzina taloženja aktivnog mulja s lokalnog uređaja za obradu otpadne vode grada prikazana je slikom 10.



Slika 10. Volumen aktivnog mulja određen šaržnim taloženjem mulja

Volumni indeks mulja (engl. Sludge Volume Indeks, SVI) empirijska je mjera koja povezuje karakteristike mulja i dizajn taložnika. Ključni je parametar u pročišćavanju otpadnih voda jer pruža uvid u karakteristike taloženja aktivnog mulja. Izračunava se jednadžbom 9. Vrijednosti manje od 100 mL/g ukazuju na mulj dobre taloživosti, vrijednosti između 100 i 150 mL/g su prihvatljive, ali mogu indicirati rane znakove pjenjenja. SVI iznad 150 mL/g ukazuje na mulj u kojem je došlo do pretjeranog rasta filamentoznih bakterija što uzrokuje probleme u procesima pročišćavanja otpadnih voda (Szelag i sur., 2018).

$$SVI = \frac{SSV \left[ \frac{mL}{L} \right]}{MLSS \left[ \frac{mg}{L} \right]} \times 1000 \quad \text{jedn. 9}$$

Gdje je:

SSV [mL/L] = volumen istaloženog mulja nakon 30 minuta

MLSS [mg/L] = koncentracija mikrobne biomase

Uzorak mulja prebačen je u mjerni cilindar od 1 L i nakon početnog miješanja ostavljen je da se taloži 30 minuta. SVI opisuje volumen koji jedan gram mulja zauzima nakon 30 minuta taloženja. U aktivnom mulju s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadne vode grada SVI vrijednost iznosila 73,3 mL/g. Vrijednost ispod 100 mL/g pokazuje da je ispitivani mulj dobre kakvoće za provođenje daljnjih pokusa.

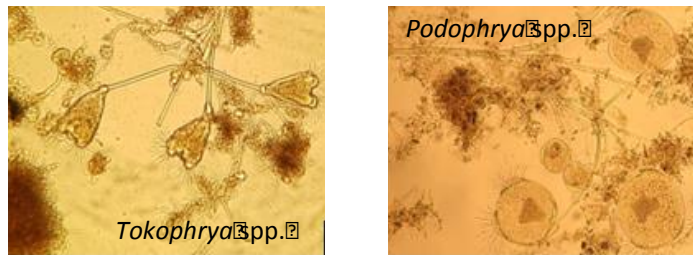
Mikroorganizmi zastupljeni u aktivnom mulju – najčešće opaženi mikroskopiranjem svjetlosnim mikroskopom, prikazani su slikom 11-16



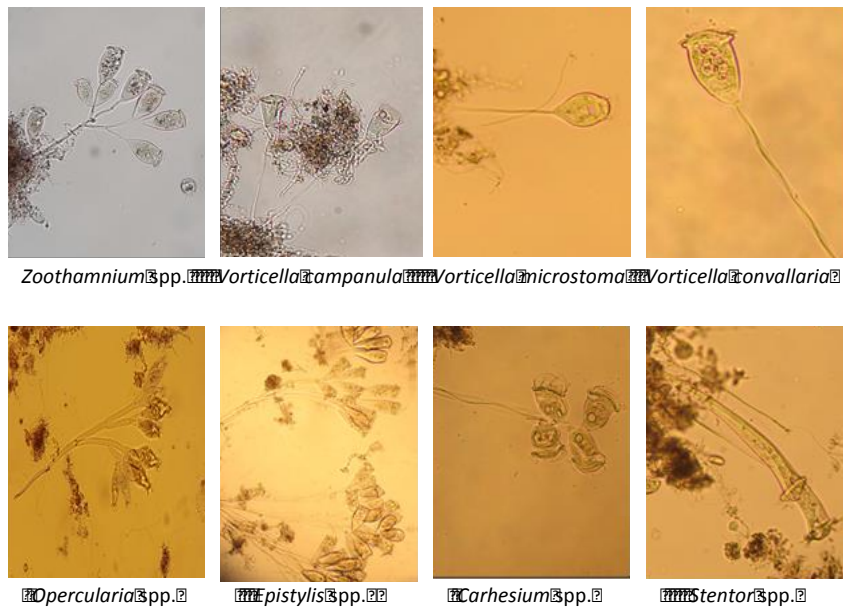
Slika 11. Bakterijske vrste prisutne u aktivnom mulju, svjetlosni mikroskop, P400x



Slika 12. Vrste slobodnih cilijata prisutne u aktivnom mulju, svjetlosni mikroskopi, P400x



Slika 13. Vrste suctoriora prisutne u aktivnom mulju, svjetlosni mikroskop, P400x

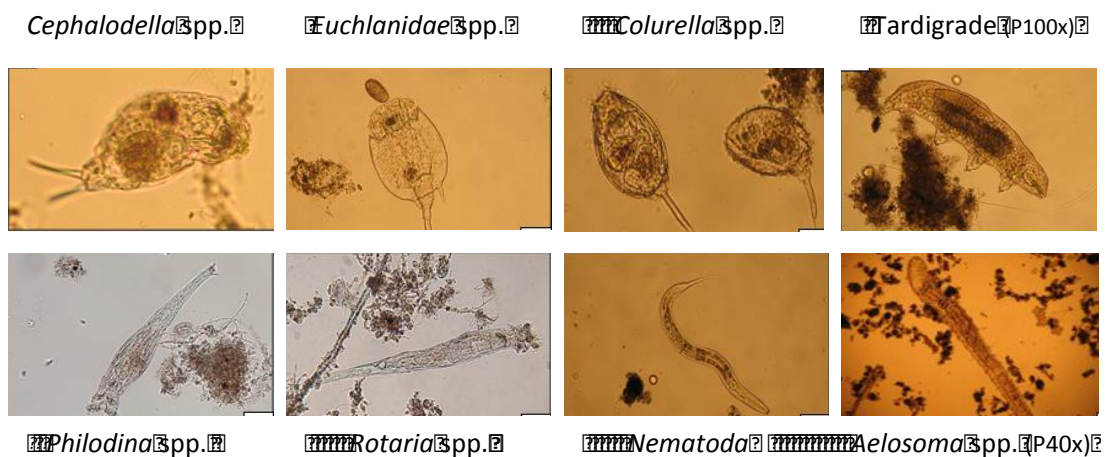


Slika 14. Vezane cilijate prisutne u aktivnom mulju, svjetlosni mikroskop, P400x



Slika 15. Vrste ameba prisutne u aktivnom mulju, svjetlosni mikroskop, P400x





Slika 16. Vrste metazoa prisutne u aktivnom mulju, svjetlosni mikroskop, P=400x, 100x i 40x

Na dobru mikrobiološku i biokemijsku aktivnost aktivnog mulja utječe niz čimbenika, poput koncentracija mikrobne biomase (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*, MLSS), koncentracija otopljenog kisika (engl. *Dissolved Oxygen*, DO), omjer hrana/mikroorganizam (engl. *Food/Microorganisms*, F/M), starost mulja ili vrijeme zadržavanja mulja (engl. *Solid Retention Time*, SRT), kakvoća otpadne vode, volumni indeks mulja (engl. *Sludge Volume Index*, SVI) i drugi (Gerba i Pepper, 2019; Boujelben i sur., 2017).

Karakterizacija aktivnog mulja provedena je s ciljem da se odredi aktivnost aktivnog mulja s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadne vode grada za uklanjanje C, N i P, odnosno brzine nitrifikacije, denitrifikacije, oksidacije  $\text{NH}_4\text{-N}$ , otpuštanja  $\text{PO}_4\text{-P}$  te unosa C i  $\text{PO}_4\text{-P}$  uz određivanje prisutnosti i aktivnosti nitrifikanata, denitrifikanata i fosfat akumulirajućih vrsta/denitrificirajućih fosfat akumulirajućih vrsta provedbom ciljanih šaržnih pokusa.

Aktivni mulj s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada pokazao je sposobnost uklanjanja dušikovih spojeva u procesima nitrifikacije (brzina  $5 \text{ mg NH}_4\text{-N/L h}$ ) i denitrifikacije (brzina  $3 \text{ mg NO}_3\text{-N/L h}$ ). Međutim, nije zabilježena aktivnost mulja u uklanjanju fosfora. Za učinkovito provođenje denitrifikacije bilo je potrebno prilagoditi aktivni mulj na acetat kao izvor ugljika. Iz tog razloga, provedeni su eksperimenti prilagodbe aktivnog mulja za uklanjanje dušikovih spojeva, kroz niz uzastopnih ciklusa nitrifikacije i denitrifikacije, pri čemu je acetat korišten kao izvor ugljika.

Kakvoća aktivnog mulja – karakterizacija aktivnog mulja s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda za uklanjanje sastojaka s C, N i P nakon prilagodbe za uklanjanje

N određena je provođenjem šaržnih pokusa u laboratorijskom reaktoru radnog volumena 3L, u kojima je istražen učinak koncentracije mikrobnе biomase, početne koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N}$  (25 ili 40 mg/L), kao i vrijednost pH (pH 7,2 i pH 8,0) u pokusima nitrifikacije pri  $\text{DO} \geq 2$  mg DO/L i pri ambijentalnoj temperaturi ( $22 \pm 2$  °C), odnosno u kojima je istražen učinak omjera C/N iz natrijeva acetata u pokusima denitrifikacije, pri  $\text{DO} < 0,5$  mg DO/L pri ambijentalnoj temperaturi ( $22 \pm 2$  °C) i pri nekontroliranom pH. Procesi unutar reaktora praćeni su pomoću kisikove elektrode za mjerenje otopljenog kisika (DO) i temperature. Zrak je u reaktor upuhivan iz kompresora preko difuzora smještenog na dnu reaktora, uz filter za zrak i mjerač protoka zraka. Otopljeni kisik osiguravan je aeracijom zrakom iz kompresora. U određenim vremenskim razmacima (svakih 20 ili 30 minuta) uzimani su uzorci miješane tekućine (engl. Mixed Liquor, ML) iz reaktora kako bi se analitički odredile koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{PO}_4\text{-P}$ . Parametri pH, DO i temperatura kontinuirano su praćeni pomoću elektroda uronjenih u reaktor. Na početku eksperimenta, sintetska otpadna voda dodana je u količini potrebnoj za postizanje željene početne koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  u pokusima nitrifikacije, a acetat za postizanje željenog C/N u pokusima denitrifikacije. Svi eksperimenti provedeni su u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Rezultati pokusa nitrifikacije dani su tablicom 10.

Tablica 10: Brzine i specifične brzine nitrifikacije u ovisnosti o pH, početnoj koncentraciji NH<sub>4</sub>-N i količini mikrobne biomase

	NH <sub>4</sub> -N <sub>poč</sub> [mg/L]	NH <sub>4</sub> -N <sub>kraj</sub> [mg/L]	Vrijeme [h]	pH	MLSS [g/L]	NO <sub>3</sub> -N <sub>kraj</sub> [mg/L]	NO <sub>2</sub> -N <sub>kraj</sub> [mg/L]	r <sub>NI</sub> [mg NH <sub>4</sub> -N /Lh]	Specif. r <sub>NI</sub>
<b>A</b>	25,2	3,65	1,66	8,0	3,3	31,5	0,8	12,9	3,9
<b>B</b>	23,9	3,8	2,33	7,2		38,4	0,2	8,6	2,6
<b>C</b>	40,5	3,75	4,0	8,0		47,5	0,04	9,2	2,8
<b>D</b>	39,6	4,14	5,5	7,2		42,0	0,1	6,4	1,9
<b>E</b>	36,19	3,8	4,5	8,0	2	46,5	1,7	7,2	3,6
<b>F</b>	37,2	4,1	6,0	7,2		47,5	0,25	5,5	2,8
<b>G</b>	29,6	3,7	3,66	8,0		55,5	1,6	7,1	3,6
<b>H</b>	28,2	3,95	3,0	7,2		52,0	0,7	8,1	4,1

Nitrifikacija 25,2 mg NH<sub>4</sub>-N/L u pokusu pri pH 8,0, pri  $\geq 2$  mg DO/L i ambijentalnoj temperaturi (22 $\pm$ 2 °C) provedena je tijekom 1,66 sati. Nitrifikacijom je NH<sub>4</sub>-N preveden u NO<sub>3</sub>-N, i vrlo malo NO<sub>2</sub>-N (<1 mg NO<sub>2</sub>-N/L). Tijekom pokusa nitrifikacije troši se otopljeni kisik koji značajno poraste nakon završenog pokusa nitrifikacije (pokus A).

Pokus nitrifikacije pri pH 7,2, pri  $\geq 2$  mg DO/L i ambijentalnoj temperaturi (22 $\pm$ 2 °C), od početnih 23,9 mg NH<sub>4</sub>-N/L rezultirao je nakupljanjem 37,8 mg NO<sub>3</sub>-N bez nakupljanja NO<sub>2</sub>-N, tijekom 2,33 sati (pokus B).

Nitrifikacija 29,6 mg NH<sub>4</sub>-N/L provedena je u pokusu pri pH 8,0, temperaturi 22 $\pm$ 2°C i aerobnim uvjetima (DO $\geq$ 2 mg/L). U vremenu od 3,66 h došlo je do potpune oksidacije amonijaka uz nakupljanje 55,5 mg NO<sub>3</sub>-N. Uočen je porast koncentracije kisika na kraju pokusa koji ukazuje na završetak procesa nitrifikacije. Iz rezultata je vidljivo da je nakupljena niska koncentracija NO<sub>2</sub>-N (~1,5 mg/L) te da je sav NH<sub>4</sub>-N preveden u NO<sub>3</sub>-N. (pokus G)

Pokusi provedeni pri 28,2 mg/L  $\text{NH}_4\text{-N}$  i pH 7,2 uz MLSS 2 g/L dovode do potpunog prevođenja  $\text{NH}_4\text{-N}$  u  $\text{NO}_3\text{-N}$  bez nakupljanja  $\text{NO}_2\text{-N}$  (<1 mg/L) nakon 3 sata. Koncentracija  $\text{NO}_3\text{-N}$  na kraju pokusa iznosila je 52 mg/L (pokus H).

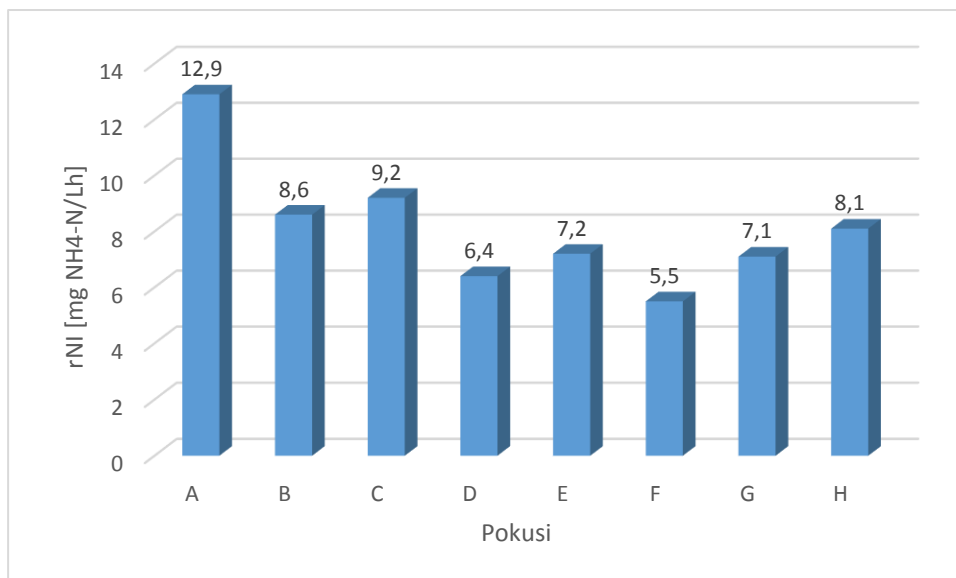
Do potpune oksidacije  $\text{NH}_4\text{-N}$  i nakupljanja  $\text{NO}_3\text{-N}$ , a bez nakupljanja  $\text{NO}_2\text{-N}$  (<0,5 mg/L) došlo je u 4 sata pri odabranim uvjetima – početna koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  40,5 mg/L, pH 8,0 i MLSS 3,3 g/L. Na kraju pokusa koncentracija  $\text{NO}_3\text{-N}$  iznosila je 47,5 mg/L, a porast DO sugerira na kraj procesa nitrifikacije (pokus C).

Uz početnu koncentraciju  $\text{NH}_4\text{-N}$  39,6 mg/L i pH 7,2, te MLSS 3,3 g/L, do potpune oksidacije amonijaka dolazi nakon 5,5 sati. Nije uočeno nakupljanje  $\text{NO}_2\text{-N}$  i na kraju pokusa je njegova koncentracija iznosila 0,1 mg/L, dok je koncentracija  $\text{NO}_3\text{-N}$  iznosila 42 mg/L (pokus D).

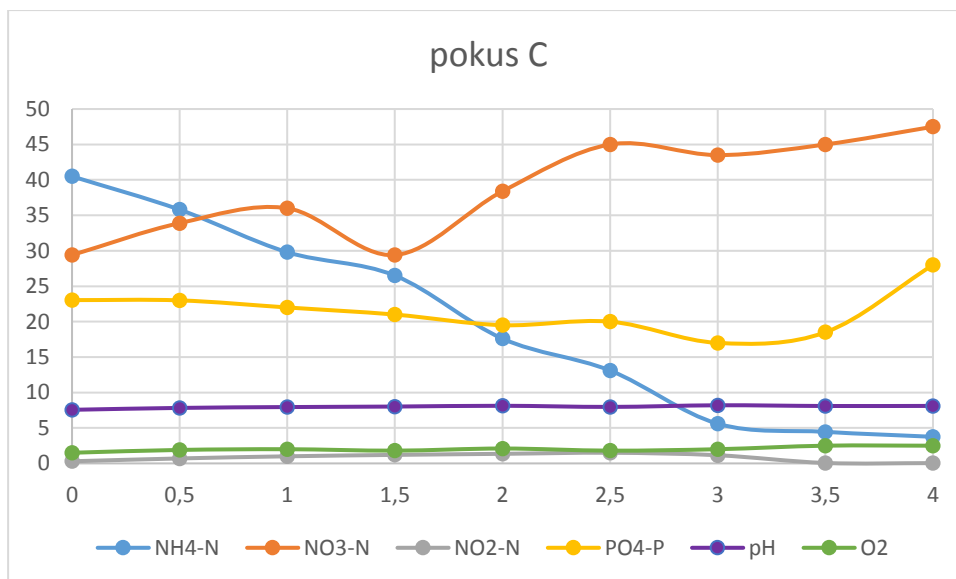
Proces nitrifikacije proveden pri početnoj koncentraciji  $\text{NH}_4\text{-N}$  36,19 mg/L i pH 8,0 što je vidljivo iz uklanjanja  $\text{NH}_4\text{-N}$  uz nakupljanje  $\text{NO}_3\text{-N}$  i bez nakupljanja  $\text{NO}_2\text{-N}$ . Nakon 4,5 sata koncentracija  $\text{NO}_3\text{-N}$  porasla je na 46,5 mg/L, te je došlo do potpune oksidacije amonijaka (pokus E). Koncentracija MLSS iznosila je 2 g/L.

Nakon 6 sati došlo je do potpune oksidacije amonijaka u pokusu uz pH 7,2 i početnu koncentraciju  $\text{NH}_4\text{-N}$  37,2 mg/L. Koncentracija nakupljenog  $\text{NO}_3\text{-N}$  na kraju pokusa iznosila je 47,5 mg/L (pokus F). Pokus je proveden pri pH 7,2 uz MLSS 2 g/L.

Rezultati brzina nitrifikacije pokusa A-H prikazani su slikom 17, a uobičajene promjene motrenih pokazatelja kakvoće kao odraz mikrobnih aktivnosti prikazane su za odabrani pokus nitrifikacije početne vrijednosti 40,5 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  pri pH 8,0, ambijentalnoj temperaturi i 3,3 g MLSS/L slikom 18. Rezultati pokazuju da viši pH i veća koncentracija biomase povećavaju brzinu nitrifikacije, dok niži pH i manja količina biomase usporavaju proces.



Slika 17. Brzine nitrifikacije tijekom pokusa s 25 mg NH<sub>4</sub>-N/L i 40 mg NH<sub>4</sub>-N/L (za pokuse A, B, G i H, te C, D, E i F) pri pH 7,2 i 8,0 (pokusi B, D, F i H, odnosno A, C, E i G), ambijentalnoj temperaturi i 3,3 g MLSS/L za pokuse A-D, te 2 g MLSS/L za pokuse E-H



Slika 18. NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, DO, pH i temperatura tijekom procesa nitrifikacije 40,5 mg NH<sub>4</sub>-N/L pri pH 8,0, ambijentalnoj temperaturi i 3,3 g MLSS/L.

Veće brzine nitrifikacije postižu se pri pH 8,0 u usporedbi s pH 7,2 za istražene početne koncentracije 25 mg NH<sub>4</sub>-N/L i 40 mg NH<sub>4</sub>-N/L. Povećanje koncentracije NH<sub>4</sub>-N rezultira smanjenjem brzine nitrifikacije, a povećanjem koncentracije mikrobnog biomase postižu se veće brzine nitrifikacije neovisno o odabranom pH.

Provedbom pokusa karakterizacije mulja određena je aktivnost mulja za procese uklanjanja dušika (nitrifikacija i denitrifikacija, tablica 10 i 11), dok je aktivnost za uklanjanje P očekivano izostala budući da sustav za obradu otpadne vode – lokalni uređaj nije projektiran za uklanjanje P. Iako mulj s lokalnog uređaja nije EBPR mulj, kako su u muljevima uobičajeno prisutni i PAOs, provedeni su i pokusi anaerobnog otpuštanja PO<sub>4</sub>-P i unosa KPK, te aerobnog i anoksičnog unosa PO<sub>4</sub>-P.

Dobro razumijevanje dinamike ciljanih bioloških procesa obrade otpadne vode nužno je za postizanje učinkovite obrade, a ovisi o procesnim čimbenicima i funkcionalnim mikroorganizmima.

Aktivni mulj ima kakvoću za uklanjanje organskih sastojaka i sastojaka s dušikom, dok je mala aktivnost za uklanjanje P.

Kako aktivni mulj nema aktivnost za uklanjanje P provedeni su pokusi obogaćivanja aktivnog mulja s PAOs-ima.

#### **4.2. Aktivnost mulja obogaćenog PAOs-ima za uklanjanje N i P**

Kako aktivni mulj nije pokazao aktivnost za uklanjanje P provedeno je obogaćivanje aktivnog mulja s PAOs. Postupak obogaćivanja mulja u SBR reaktoru provedeno je pri naizmjenično anaerobno-aerobnim uvjetima uz ciklus od 24 sata (0,5 sati punjenje, 15 sati aeracija, 8 sati taloženje i 0,5 sati dekantiranje) i radni volumen 5 L. Tijekom anaerobne faze procesa, miješalice su miješale tekućinu brzinom od 40 okretaja/min kako bi se osiguralo učinkovito miješanje. Aerobna faza uključivala je upuhivanje zraka u reaktor. Zrak se opskrbljivao brzinom protoka od 1,5 dm<sup>3</sup>/min, održavajući koncentraciju otopljenog kisika (DO) iznad 2 mg/L tijekom aerobnog perioda. pH se održavao na 7,0±0,2, uz dodatak 2 M HCl ili 2 M NaOH. Vrijeme zadržavanja mulja (SRT) u sustavu održavalo se između 10 i 15 dana. Na kraju svakog ciklusa dio supernatanta bilo je zamijenjen istim volumenom sintetičke otpadne vode kako bi se zadržali stabilni uvjeti u reaktoru. U početku je KPK/P omjer iznosio 20:1, čime se osiguravalo visoko opterećenje supstratom za poticanje brzog rasta

mikroorganizama odgovornih za uklanjanje fosfora. Smanjenjem omjera na 15:1 nastavljen je pokus do uspostavljanja stacionarnog stanja. Nakon 40 dana rada, sustav je dosegao stacionarno stanje rada, što je bilo vidljivo kroz promjenu koncentracije fosfora u efluentu. Uočena je i stabilna koncentracija MLVSS i MLSS te njihov omjer u reaktoru što ukazuje na mulj obogaćen PAOs vrstama. Količina fosfora pohranjena u mikroorganizmima poput PAO i DPAO općenito se može zaključiti na temelju omjera MLVSS prema MLSS. Niži omjer sugerira veću količinu fosfora pohranjenog u mikroorganizmima odgovornim za uklanjanje fosfora.

Iako EBPR ima mnoge prednosti, njegova primjena u obradi otpadnih voda niskoga C/N omjera je otežana zbog konkurencije za izvore C između otpuštanja P i denitrifikacije (Ahn i sur., 2002). Kao rješenje se ističu DPAOs organizmi. Denitrificirajuća defosfatacija temelji se na aktivnosti denitrificirajućih fosfat akumulirajućih organizama, koji se mogu podijeliti u dvije skupine: (i) denitrificirajući fosfat akumulirajući organizmi preko nitrata (engl. *denitrifying phosphate accumulating organisms over nitrate*, DPAOs) koji mogu koristiti-uporabiti kisik i nitrat kao akceptore elektrona, i (ii) denitrificirajući fosfat akumulirajući organizmi preko nitrita (engl. *denitrifying phosphate accumulating organisms over nitrite*, DNPAOs) koji mogu koristiti kisik, nitrat i nitrit kao akceptore elektrona (Hu i sur., 2003). Prednost korištenja DPAOs u procesima uklanjanja P u odnosu na PAOs je izostanak konkurencije s heterotrofnim denitrificirajućim bakterijama za izvore ugljika. Time je omogućeno istovremeno uklanjanje N i P uz niske zahtjeve za ugljikom i energijom (Bassin i sur., 2012). Denitrificirajuća defosfatacija zahtijeva 30% manje aeracije zbog nitrata kao elektron donora umjesto kisika i 50% manje KPK (Kuba i sur., 1996).

DPAOs i DNPAOs imaju metabolizam sličan fosfat akumulirajućim organizmima. Pri naizmjeničnim anaerobnim i anoksičnim uvjetima DNPAOs uzimaju vanjske izvore ugljika i pohranjuju ih unutarstanično u obliku polihidroksilakanoata (engl. *polyhydroxyalkanoates*, PHAs) a potrebnu energiju osiguravaju kroz otpuštanje fosfata iz stanice i razgradnju glikogena u anaerobnim uvjetima. U slijednim anoksičnim uvjetima, DNPAOs uporabljaju nitrit umjesto kisika ili nitrata, kao elektron akceptore za anoksični unos  $PO_4\text{-P}$ , pri čemu se energija osigurava oksidacijom PHA, i zbiva se i regeneracija glikogena i rast stanica (Peng i Zhu, 2006; Kuba i sur., 1996b).

Za uspješnu provedbu denitrificirajuće defosfatacije nužno je osigurati SRT vrijednost koja neće izazivati uklanjanje funkcionalnih mikroorganizama ispuštanjem mulja (kratki SRT) ili starenje mulja uslijed predugog SRT. Ma Fang i sur. (xx) kao optimalni SRT pokazali su vrijednost od 18 dana. Dulje vrijeme zadržavanja mulja može smanjiti potrebu za C čime se

pogoduje obradi otpadnih voda niskoga C/N omjera. Osim SRT, i DO vrijednost važan je čimbenik učinkovitosti procesa. Visoki DO u anaerobnoj fazi inhibira otpuštanje fosfora i sintezu PHB, dok u anoksičnoj fazi dovodi do kompeticije između kisika i  $\text{NO}_3\text{-N}$  kao akceptora elektrona.

Iz literature je poznato da se anaerobno otpuštanje fosfata smanjuje s anaerobnim povećanjem koncentracije  $\text{NO}_2\text{-N}$ , i da za učinkovito otpuštanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  i anoksični unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  treba osigurati u anaerobnim uvjetima  $\text{NO}_2\text{-N}$  manji od 2 mgN/L (Zhang i sur., 2010). Također, u literaturi je istaknuto da je pH povoljan za anaerobno otpuštanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  i anoksični unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  oko pH 7,0, odnosno pH 8,0 (Zhang i sur., 2010). Iz tog razloga šaržni pokusi su u anaerobnim uvjetima provedeni pri pH oko 7,0 i  $\text{NO}_2\text{-N} < 2$  mg/L, odnosno pri pH oko 8,0 u anoksičnim uvjetima.

#### 4.2.1. Rezultati pokusa istovremenog uklanjanja C, N i P s aktivnim muljem obogaćenim PAOs

U provedbi istovremenog uklanjanja C, N i P izazov je usklađivanje procesnih čimbenika budući da su zahtijevani aerobni i anoksični uvjeti za funkcionalne organizme za ciljanje biološke procese uklanjanja C, N i P. Mikrobne vrste za uklanjanje hranjivih tvari uključuju obične heterotrofe (OHO), nitrifikante, fosfat akumulirajuće organizme (PAO) i glikogen akumulirajuće organizme (GAO). Denitrificirajući PAOs (DPAOs), podskupina PAOs, pokazuju ključnu ulogu u uklanjanju dušika (N) i fosfora (P) zbog sposobnosti korištenja nitrata i nitrita kao akceptora elektrona (Zaman i sur., 2020). Različiti zahtjevi za potrebnom koncentracijom otopljenog kisika kao i konkurencija za organski supstrat među različitim funkcionalnim mikroorganizmima predstavljaju veliki izazov u postizanju maksimalne učinkovitosti istovremenog uklanjanja N i P u postrojenjima za obradu otpadnih voda.

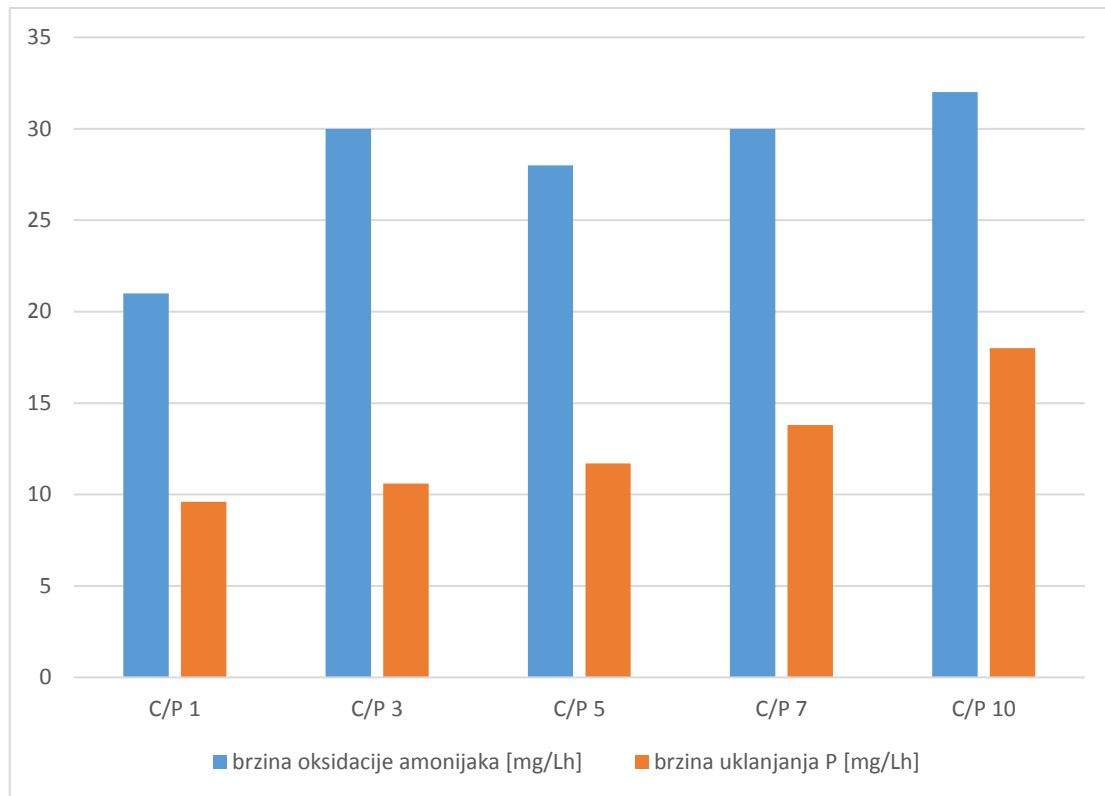
U šaržnim pokusima provedeno je simultano uklanjanje C, N i P u anoksično-aerobno vođenom SBR reaktoru s ciljem istraživanja učinka različitog omjera C/P na uklanjanje P bez anaerobnog dijela procesa čime se pojednostavljuje sam proces. Odabir poželjnog C/P omjera nužan je za uspješan rad sustava za uklanjanje P. Istražena je i potreba na KPK za unos P (mgKPK/mgP). Pokusi su provedeni i s ciljem istraživanja konkurentnosti funkcionalnih mikroorganizama (NI, DNI, PAOs, DPAOs, GAOs, OHOs) za  $\text{O}_2$  i raspoložive organske sastojke.

Pokusi su provedeni u anoksično-aerobnom slijedu uz natrijev acetat kao jedini izvor ugljika i N/P 1. Istraživani C/P omjeri bili su 1, 3, 5, 7 i 10 uz početnu koncentraciju 30 mg



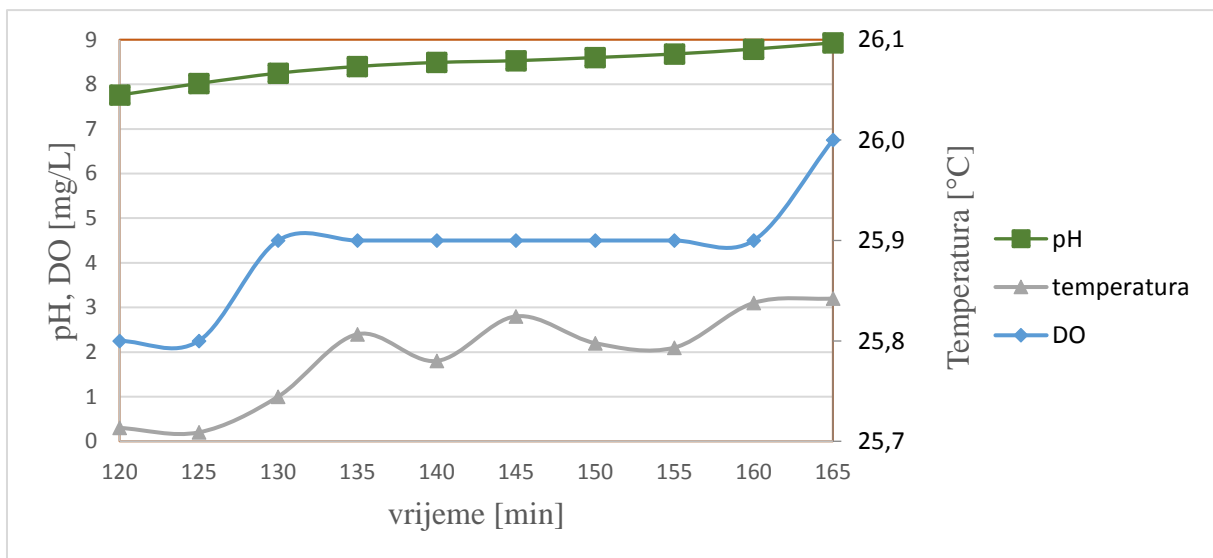
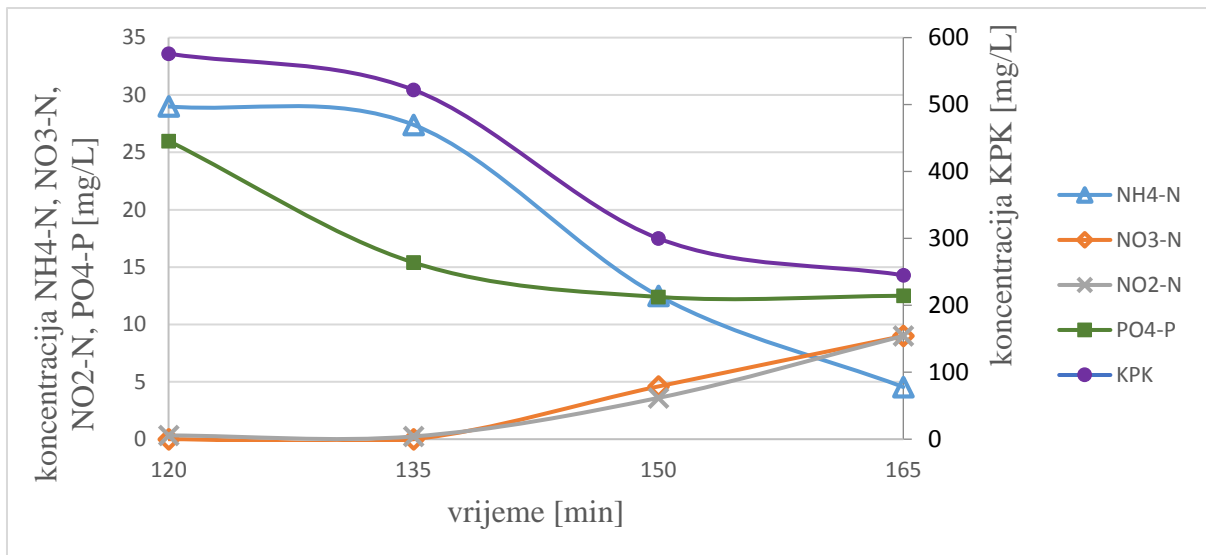
$\text{PO}_4\text{-P/L}$  i  $30 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  kako bi se definirala potreba na KPK za unos P. Odabrano trajanje anoksične faze bilo je 2 sata u svim pokusima jer je uklanjanje KPK u tom vremenskom intervalu zadovoljavajuće, bez potrebe za duljim ili kraćim trajanjem. Svi pokusi provedeni su pri ambijentalnoj temperaturi ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) koja nije nepovoljno utjecala na aktivnost PAOs, nekontroliranom pH i  $\text{DO} \leq 0,3 \text{ mg/L}$  u anoksičnim uvjetima i  $\text{DO} > 2 \text{ mg/L}$  u aerobnim uvjetima. Obzirom na nekontrolirani pH, promjene u vrijednostima pH odraz su mikrobnih reakcija u pokusima i aktivnosti OHO, nitrificirajućih/denitrificirajućih vrsti i PAOs. Porast pH u početku procesa odraz je aktivnosti OHO vrsti koje provode oksidaciju organskih sastojaka. Pad pH vrijednosti nakon oksidacije KPK u pokusima pri C/P 1, 3 i 5 ukazuje na proces oksidacije  $\text{NH}_4\text{-N}$  i nakupljanje  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$ . U pokusima pri C/P 7 i 10 ne dolazi do smanjenja vrijednosti pH kao rezultat oksidacije KPK koji je preostao nakon anoksičnog dijela procesa, unatoč procesu nitrifikacije. Vođenje pokusa pri  $\text{DO} \leq 0,3 \text{ mg/L}$  u anoksičnim uvjetima uz miješanje na magnetskoj miješalici, omogućilo je unos organskih sastojaka u stanice PAOs u obliku PHB što se očituje smanjenjem koncentracije KPK u mediju. Proces denitrifikacije u anoksičnim uvjetima spriječen je pranjem biomase čime su se uklonili N oksidi iz medija, te je omogućeno korištenje KPK od strane PAOs.

Rezultati brzine oksidacije amonijaka i uklanjanja P za pokuse C/N 1-10 prikazani su na slici 20, a uobičajene promjene motrenih pokazatelja kakvoće kao odraz mikrobnih aktivnosti za odabrani pokus pri C/P 10 u aerobnim uvjetima prikazane su slikom 21. U pokusima pri svim odabranim omjerima C/P zbivala se potpuna oksidacija  $\text{NH}_4\text{-N}$  koja nije rezultirala nakupljanjem  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  u ekvivalentnoj (stehiometrijskoj) količini.



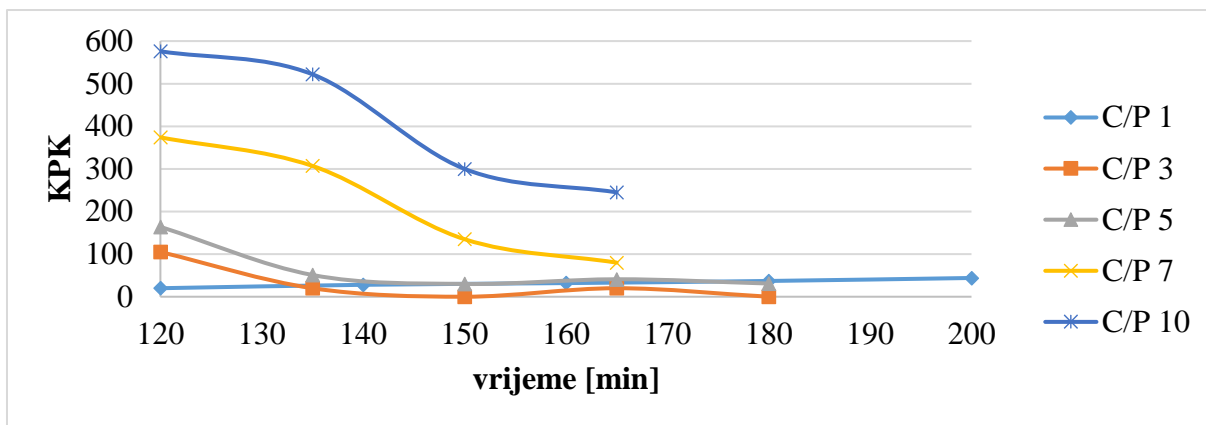
Slika 20. Brzine oksidacije amonijaka i uklanjanja P za pokuse C/P 1, 3, 5, 7 i 10

U aerobnom dijelu provedena je istovremena oksidacija KPK, oksidacija  $\text{NH}_4\text{-N}$ , te uklanjanje P u pokusima pri C/P 10. Profil pH odraz je aktivnosti funkcionalnih mikroorganizama prisutnih u procesu.

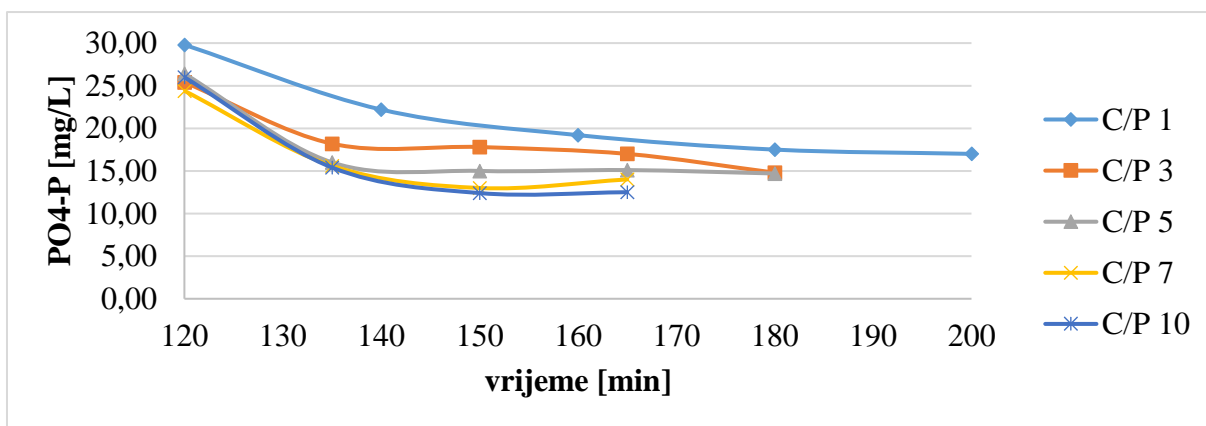


Slika 21. Promjene KPK, PO<sub>4</sub>-P, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, te pH, DO i temperature tijekom aerobnog perioda pokusa pri C/P 10

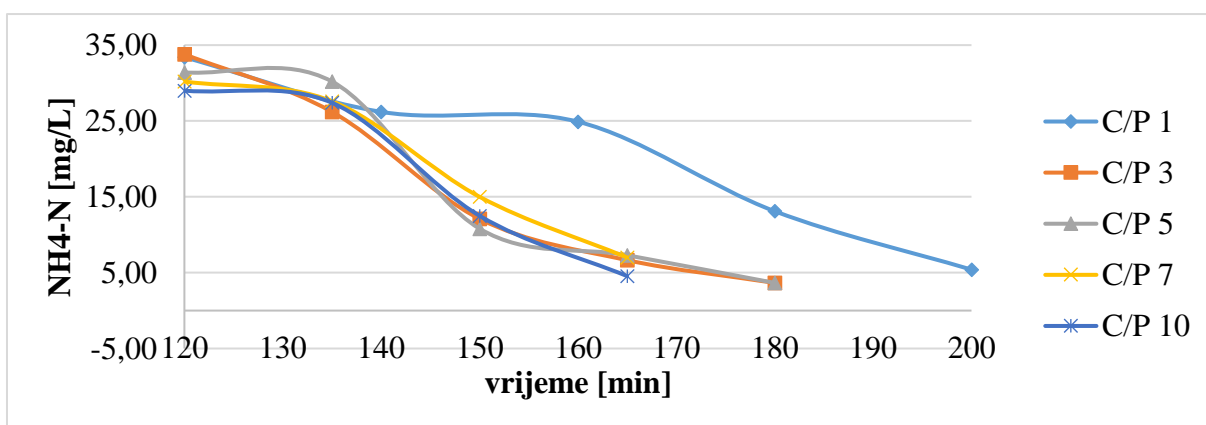
Promjene u koncentraciji NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P i KPK, u različitim procesnim uvjetima i okolišnim čimbenicima, prikazane su na slikama 22-26 za omjere C/P od 1, 3, 5, 7 i 10.



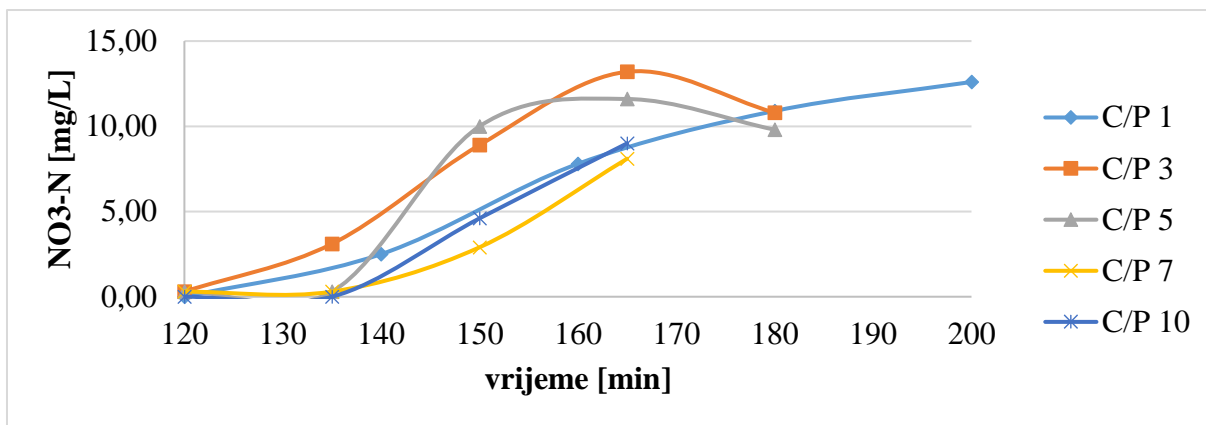
Slika 22. Promjene KPK tijekom aerobnog perioda pokusa pri C/P 1-10



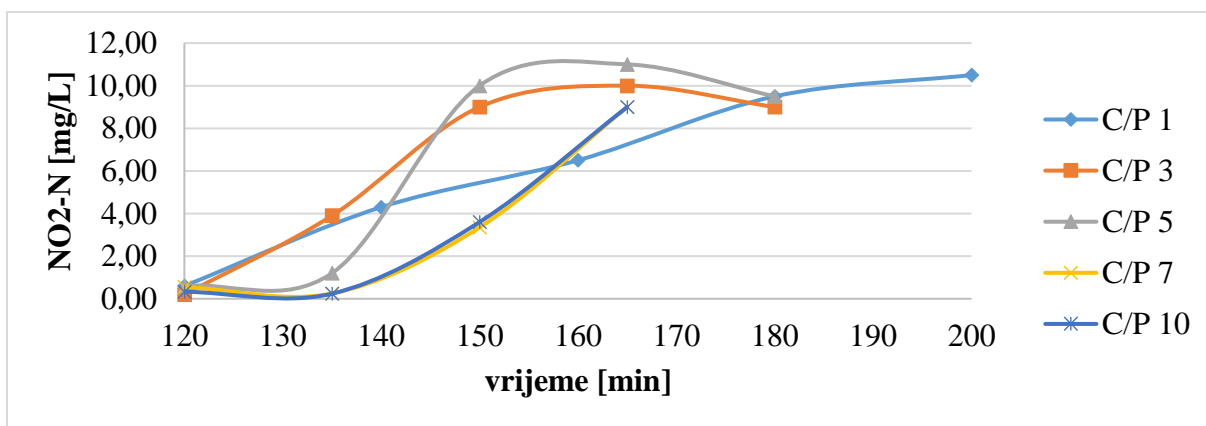
Slika 23. Promjene PO<sub>4</sub>-P tijekom aerobnog perioda pokusa pri C/P 1-10



Slika 24. Promjene NH<sub>4</sub>-N tijekom aerobnog perioda pokusa pri C/P 1-10



Slika 25. Promjene NO<sub>3</sub>-N tijekom aerobnog perioda pokusa pri C/P 1-10



Slika 26. Promjene NO<sub>2</sub>-N tijekom aerobnog perioda pokusa pri C/P 1-10

Pri C/P 1 utrošen je sav raspoloživi KPK pri anoksičnim uvjetima. Prelaskom na aerobne uvjete rada došlo je do akumulacije P i istovremene oksidacije NH<sub>4</sub>-N. U aerobnim uvjetima uklonjeno je 29% PO<sub>4</sub>-P tijekom 80 minuta.

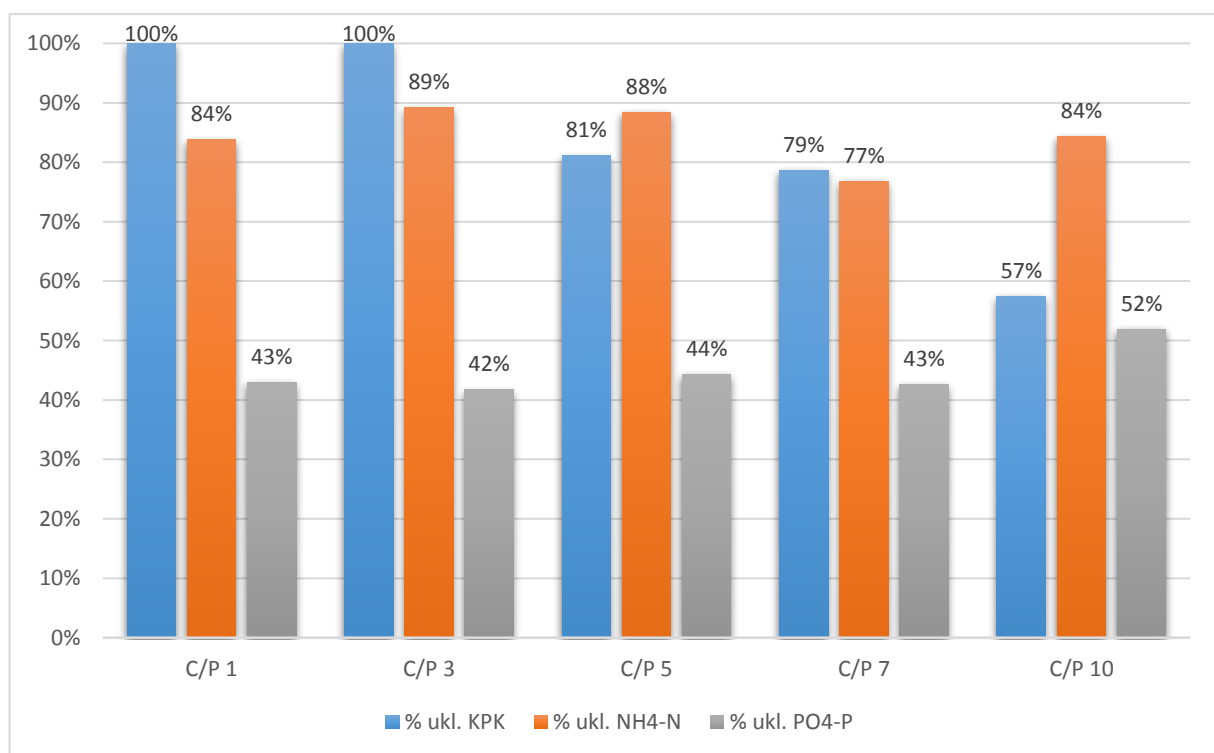
U pokusima pri C/P 3 nakon anoksične faze preostaje KPK koji se oksidira u aerobnom dijelu pokusa. Oksidirano je preostalih 103 mg KPK/L i uklonjeno 42% PO<sub>4</sub>-P tijekom 60 minuta aerobne faze.

Pri C/P 5 dolazi do uklanjanja 44% PO<sub>4</sub>-P u aerobnim uvjetima i oksidacije preostalog KPK (131 mg KPK/L).

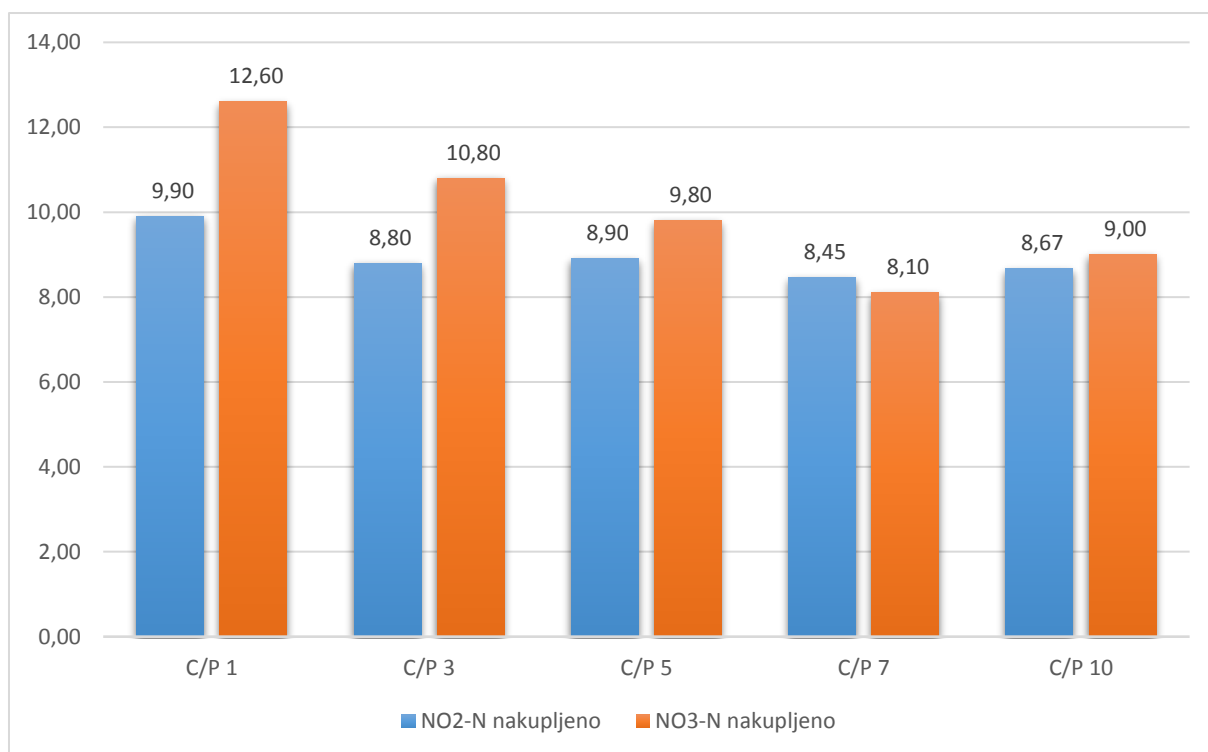
Uvjeti pokusa pri C/P 7 omogućili su potpunu oksidaciju HN<sub>4</sub>-N u aerobnim uvjetima, uklanjanje preostalog KPK i uklanjanje 42,6% PO<sub>4</sub>-P.

Svaki pokus uključivao je anoksičnu fazu u trajanju od 2 sata, nakon koje su uslijedile aerobne faze različitog trajanja, s maksimalnim trajanjem od 200 minuta za C/P 1 te minimalno 165 minuta za C/P 7 i 10. Potrošnja KPK tijekom anoksične faze varirala je među pokusima: (i) u pokusu 1 uklonjen je sav dostupni KPK; (ii) u pokusu 2 KPK se smanjio za 85 mg/L; (iii) u pokusu 3 uklonjeno je 112 mg/L KPK; (iv) u pokusu 4 uklonjeno je 76 mg/L KPK; te (v) u pokusu 5 uklonjeno je 130 mg/L KPK. Tijekom aerobne faze, preostali KPK (ukoliko ga je bilo) oksidiran je zajedno s  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Mikrobna aktivnost tijekom ove faze rezultirala je oksidacijom amonijaka i uklanjanjem fosfora, prikazano na slici 20. Postotak uklonjenog  $\text{PO}_4\text{-P}$  varirao je među pokusima tijekom aerobne faze: (i) 29% u roku od 80 minuta, (ii) 42% u roku od 60 minuta, (iii) 44% u roku od 60 minuta, (iv) 42,6% u roku od 45 minuta te (v) 51% u roku od 45 minuta.

Na slikama 27 i 28 prikazani su rezultati uklanjanja KPK,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , te nakupljanje  $\text{NO}_x\text{-N}$ .

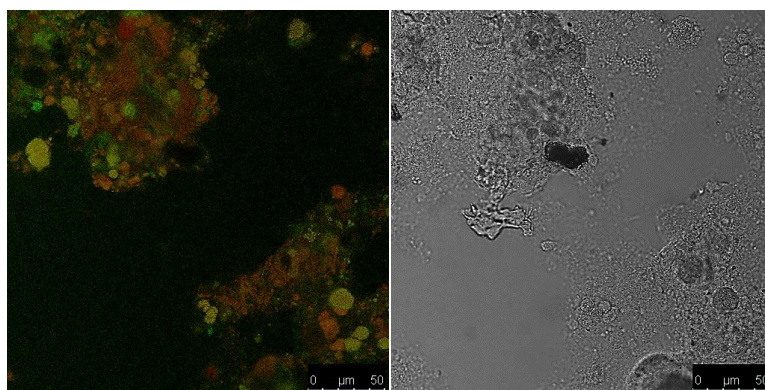


Slika 27: Udio uklonjenog KPK,  $\text{NH}_4\text{-N}$  i  $\text{PO}_4\text{-P}$  pri istraživanjima C/P 1-10



Slika 28: Koncentracija nakupljenog NO<sub>2</sub>-N i NO<sub>3</sub>-N pri istraživanim C/P 1-10

Prisutne PAOs vrste identificirane su korištenjem FISH metode (Amann, 1995), a unutarstanično nakupljanje polifosfata potvrđeno je bojanjem po Neisseru (Eikelboom i van Bujisen, 1983). Korištene su probe EUBmix za detekciju svih bakterija (Daims i sur., 1999; Amann i sur., 1990), i PAOmix probe za detekciju *Accumulibacter* (Crocetti i sur., 2000), jer je zabilježeno aerobno uklanjanje P. Na CLSM mikrografima dokazana je prisutnost PAOs vezanih PAOmix probama (Slika 29). Nagomilani poliP u mikrobnim stanicama prikazan je slikom 30.



Slika 29. CLSM aktivnog mulja hibridiziranog sa Cy3 označenim PAOmix probama i Cy5 označenim EUBmix probama. PAOs su prikazani crveno, sve bakterije zeleno



Slika 30. Aktivni mulj obojan po Neisseru za dokazivanja poliP, povećanje 400x

#### **4.3. Odabir konfiguracije A-O-A procesa s endogenom denitrifikacijom probirom procesnih čimbenika i kinetika/aktivnost DPAOs i DGAOs u uklanjanju N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju**

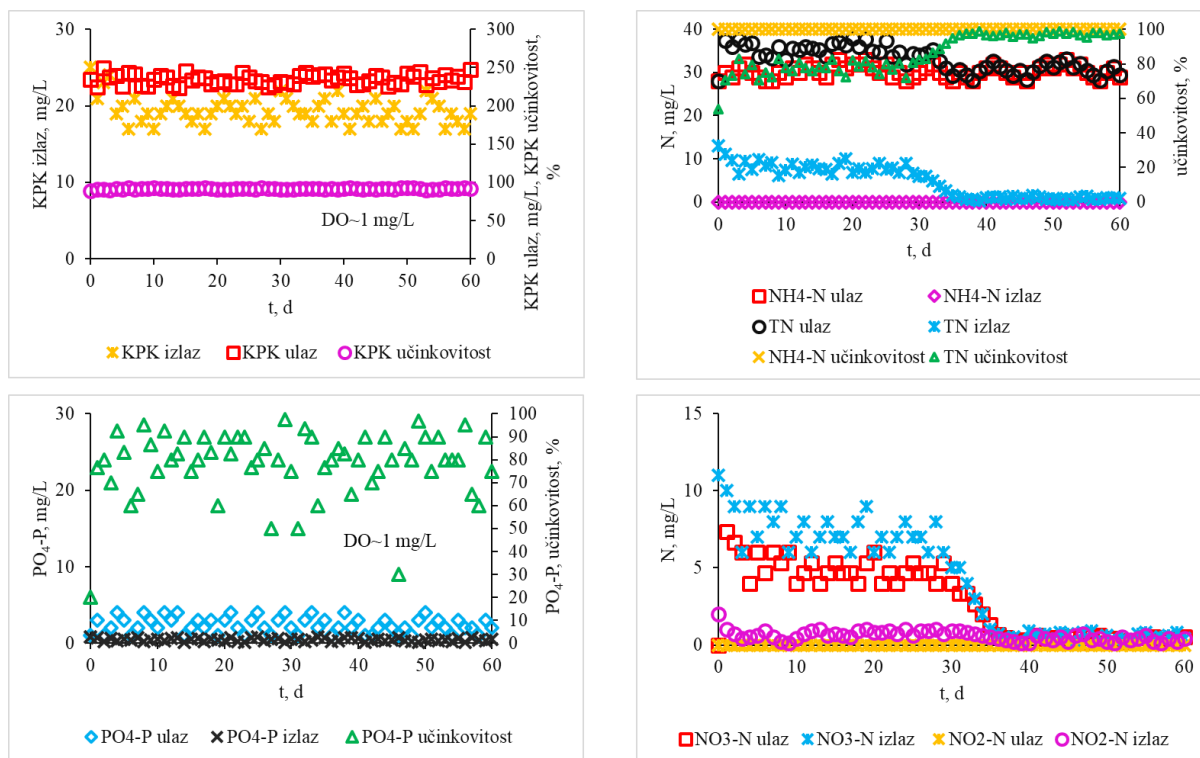
Pokusi uklanjanja N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N ( $C/N \sim 4$ ) u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju provedeni su s ciljem istraživanja:

- i. utjecaja koncentracije DO na učinkovitost uklanjanja N i P i
- ii. moguće uštede operativnih troškova.

Pokusi su provedeni u SBR radnog volumena 6 L s aktivnim muljem obogaćenim PAOs vrstama, bez kontrole pH vrijednosti i uz ambijentalnu temperaturu. Početne koncentracije  $NH_4-N$  u pokusima iznosile su  $30 \pm 2$  mg  $NH_4-N/L$ , a MLSS je bio održavan na  $3,0 \pm 0,2$  g MLSS/L. Anaerobno-aerobno-anoksični proces uključivao je 2 sata anaerobnih uvjeta (uz dodatak 2 L sintetske otpadne vode u prvih 10 minuta), 3 sata aerobnih uvjeta uz  $DO \geq 2$  mg/L ili  $DO \sim 1$  mg/L, te anoksičnu fazu u trajanju od 3 sata. Obje konfiguracije ( $DO \geq 2$  mg/L i  $DO \sim 1$  mg/L) vođene su 30 dana. Anaerobna faza osigurava unutarstaničnu pohranu ugljika, unos P i denitrifikaciju, aerobna faza omogućava unos P i SND, a anoksična faza endogenu denitrifikaciju.

Rezultati uklanjanja N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju pri  $DO \geq 2$  mg/L i  $DO \sim 1$  mg/L prikazani su na slici 30.





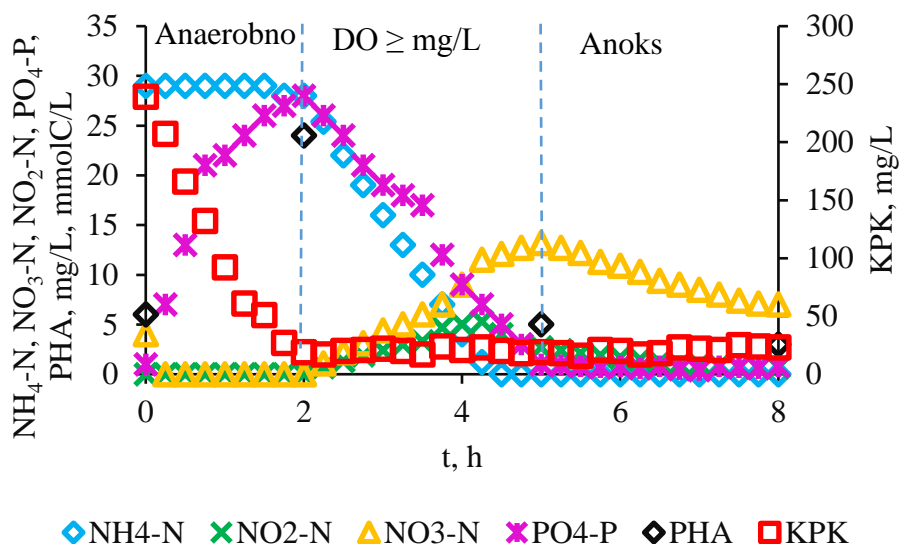
Slika 30. a) ulaz, izlaz i učinkovitost uklanjanja KPK, b) ulaz, izlaz i učinkovitost uklanjanja  $\text{NH}_4\text{-N}$  i ukupnog dušika, c) ulaz, izlaz i učinkovitost uklanjanja  $\text{PO}_4\text{-P}$  i d) ulaz i izlaz  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  u A/O/A procesu uz endogenu denitrifikaciju pri  $\text{DO} \geq 2$  mg/L i  $\text{DO} \sim 1$  mg/L

Pokusi provedeni pri  $\text{DO} \geq 2$  mg/L rezultirali su prosječnim uklanjanjem KPK od 91,6% uz koncentraciju KPK od 19,7 mg KPK/L u efluentu. Provedena je potpuna oksidacija  $\text{NH}_4\text{-N}$  bez nakupljanja nitrata. Prosječna koncentracija  $\text{NO}_3\text{-N}$  u efluentu bila je 7,4 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  (i 4,8 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  u influentu anaerobne faze), a  $\text{NO}_2\text{-N}$  0,8 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ . Prosječna koncentracija TN u efluentu iznosila je 8,2 mg TN/L što je rezultat učinkovitosti uklanjanja od 76,6%. Uklanjanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  iznosilo je 78,5% uz koncentraciju  $< 0,5$  mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  u efluentu (slika 30).

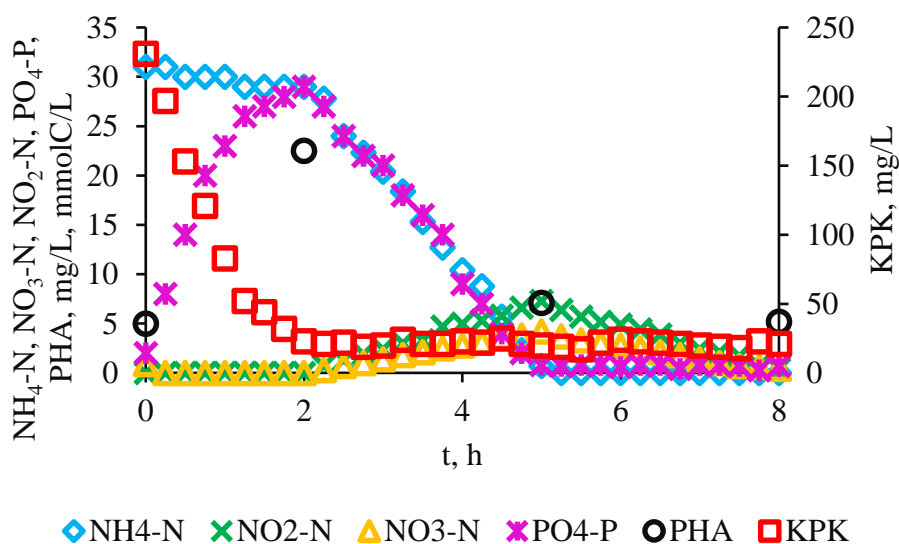
Prosječno uklanjanje KPK u pokusima pri  $\text{DO} \sim 1$  mg/L iznosilo je 91,8%, a koncentracija u efluentu iznosila je 19,2 mg KPK/L. Došlo je do potpune oksidacije  $\text{NH}_4\text{-N}$  bez nakupljanja nitrata. Prosječne koncentracije  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  u efluentu iznosile su 1,1 mg  $\text{NO}_3\text{-N}$  i 0,4 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , uz uklanjanje TN od 95,3% i njegovu koncentraciju 1,5 mg TN/L u efluentu. Koncentracija  $\text{NO}_3\text{-N}$  u influentu anaerobne faze iznosila je 0,9 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ .

Prosječno uklanjanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  bilo je 77,9% što je rezultiralo koncentracijom  $\text{PO}_4\text{-P}$  u efluentu  $<0,5 \text{ mg PO}_4\text{-P/L}$  (slika 30).

Kako bi se stekao dublji uvid u mikrobnе procese koji se odvijaju u svakoj fazi A-O-A procesa, provedeni su šaržni pokusi 21. dana uz  $\text{DO} \geq 2 \text{ mg/L}$  (slika 31) te 24. dana uz  $\text{DO} \sim 1 \text{ mg/L}$  (slika 32).



Slika 31. Promjene koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , KPK i PHA u šaržnom pokusu A/O/A procesa uz endogenu denitrifikaciju pri  $\text{DO} \geq 2 \text{ mg/L}$ , 21. dan pokusa



Slika 32. Promjene koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{PO}_4\text{-P}$ , KPK i PHA u šaržnom pokusu A/O/A procesa uz endogenu denitrifikaciju pri  $\text{DO} \sim 1 \text{ mg/L}$ , 24. dan pokusa

Pokusi na 21. dan rezultirali su brzinom oksidacije KPK od 110 mg KPK/Lh i utrošak PHA u aerobnoj fazi od 19 mmol C/L. Dio PHA utrošen je u anoksičnoj fazi procesom endogene denitrifikacije. Brzina oksidacije amonijaka u aerobnoj fazi iznosila je 11,2 mg NH<sub>4</sub>-N/L, a koncentracije NO<sub>3</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N bile su 13,2 mg NO<sub>3</sub>-N/L i 2,7 mg NO<sub>2</sub>-N/L. Gubitak TN iznosio je 43% u aerobnoj fazi. Anoksična faza rezultirala je ukupnim gubitkom N od 73%. Otpuštanje P uz istovremeni unos acetata i nakupljanje PHA odvijalo se u anaerobnoj fazi, dok je u aerobnoj fazi postignuto gotovo potpuno uklanjanje P uz brzinu unosa od 9 mg PO<sub>4</sub>-P/Lh (slika 31).

Brzina oksidacije KPK u šaržnom pokusu na 24. dan iznosila je 104 mg KPK/Lh, a potrošnja PHA 15,4 mmol C/L. Koncentracije nitrata i nitrita u aerobnoj fazi iznosile su 4,2 mg NO<sub>3</sub>-N/L i 7,3 mg NO<sub>2</sub>-N/L, uz brzinu oksidacije amonijaka 9,4 mg NH<sub>4</sub>-N/L te gubitak N od 71%. Anoksična faza omogućava 97% gubitka N. Brzina unosa PO<sub>4</sub>-P u aerobnoj fazi iznosila je 9,4 mg PO<sub>4</sub>-P/Lh (slika 32).

#### **4.4. FISH analiza mikrobnih zajednica za uklanjanje N i P**

Aktivni mulj obogaćen PAOs vrstama analiziran je FISH metodom za dokazivanje skupina mikroorganizama koji provode procese nitrifikacije – amonijak i nitrit oksidirajuće bakterije (engl. *Ammonium Oxidizing Bacteria*, AOB i engl. *Nitrite Oxidizing Bacteria*, NOB) koje provode oksidaciju NH<sub>4</sub>-N do NO<sub>2</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N do NO<sub>3</sub>-N, denitrifikacije (uobičajene heterotrofne denitrifikante za redukciju NO<sub>3</sub>-N u plinoviti dušik) i denitrificirajuće defosfatacije – fosfat akumulirajuće organizme (engl. *Phosphate Accumulating Organisms*, PAOs), denitrificirajuće fosfat akumulirajuće organizme (engl. *Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms*, DPAOs), kao i glikogen akumulirajuće organizme (engl. *Glycogen Accumulating Organisms*, GAOs). Vizualizacija i dokumentiranje analiziranih uzoraka primjenom FISH metode je učinjena na konfokalnom laser skenirajućem mikroskopu (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM). Sve bakterije su označene probom EEUBmix i prikazane zeleno, dok su pojedini mikrobn klasteri obojani odgovarajućim probama i prikazani crveno.

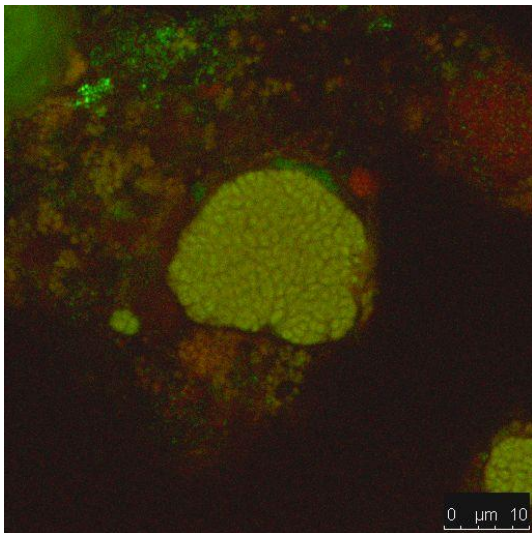
Mikrobni klasteri AOB označeni su probom Nso 190, te vizualizirani i dokumentirani na slici 33.

Mikrobni klasteri NOB označeni su probom NIT3, te vizualizirani i dokumentirani na slici 34.

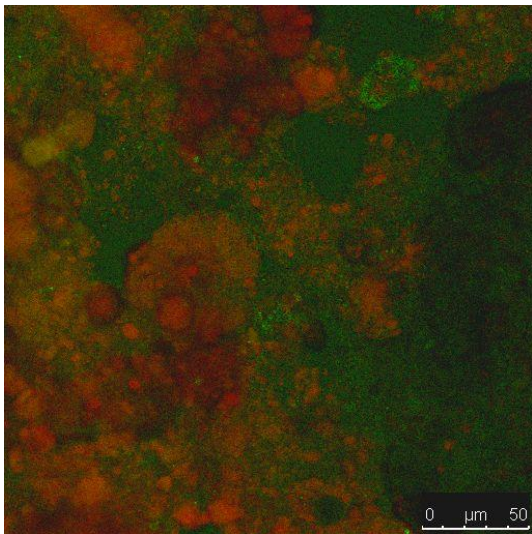
Mikrobni klasteri denitrificirajućih organizama označeni su probom DEN124, te vizualizirani i dokumentirani na slici 35.

Mikrobni klasteri denitrificirajućih fosfor akumulirajućih organizama označeni su probom DPAOmix, te vizualizirani i dokumentirani na slici 36.

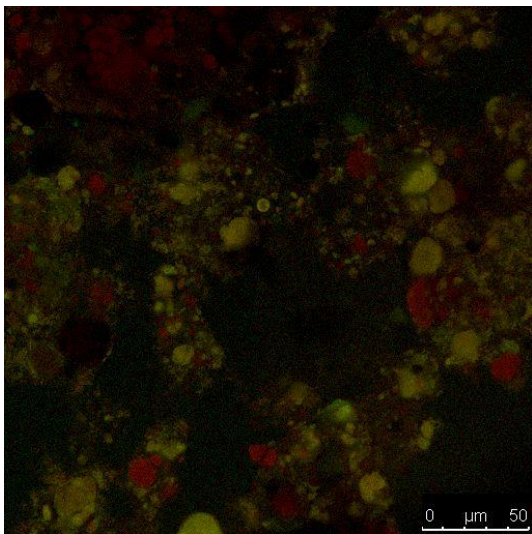
Mikrobni klasteri glikogen akumulirajućih organizama označeni su probom GAOmix, te vizualizirani i dokumentirani na slici 37.



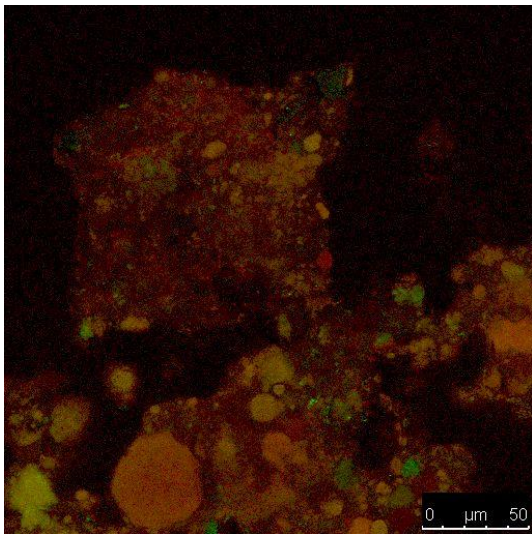
Slika 33. CLSM amonijak oksidirajućih bakterija označenih probom Nso190 prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno



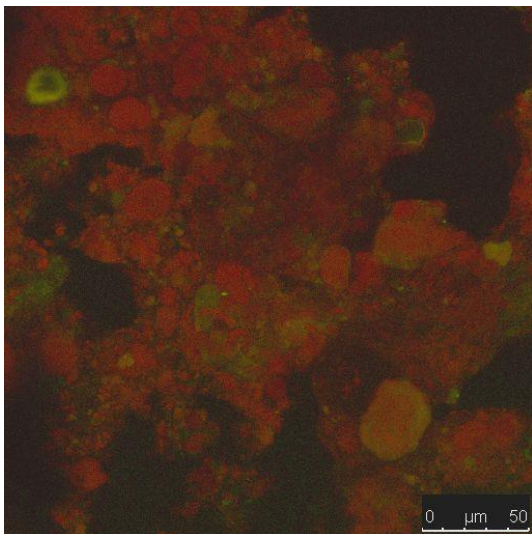
Slika 34. CLSM nitrit oksidirajućih bakterija označenih probom NIT3 prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno



Slika 35. CLSM denitrificirajućih bakterija označenih probom DEN124 prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno



Slika 36. CLSM denitrificirajućih fosfor akumulirajućih organizama označenih probom DPAOmix prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno



Slika 37. CLSM glikogen akumulirajućih organizama označenih probom GAOmix prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Učinkovitost aktivnog mulja za uklanjanje C, N i P – karakterizacija aktivnog mulja

Sastav mikrobne zajednice aktivnog mulja i biološka raznolikost na sustavima za obradu otpadnih voda razvijaju se i mijenjaju dinamično i ne nužno predvidljivo, ovisno o operativnim čimbenicima (Henze i sur., 2008). Aktivni mulj je mikrobna zajednica brojnih vrsta mikroorganizama koji formiraju nakupine – pahuljice ili flokule na način da se mikro-kolonije pričvršćuju na nitaste vrste bakterija koje čine okosnicu flokule, a izvanstanične polimerne tvari (engl. *Extracellular Polymeric Substances*, EPS) čine smještajnu matricu (Niselsen i sur., 2012). Uspješnost pročišćavanja otpadne vode ovisi o učinkovitosti kojom bakterije razgrađuju prisutan organski materijal te o njihovoj sposobnosti međusobnog prijanjanja, stvaranja flokula i taloženja iz otopine. Kako se poboljšavaju svojstva flokuliranja mikroorganizama u aktivnom mulju, tako se poboljšavaju i taloženje i učinkovitost pročišćavanja otpadne vode. Otpadne vode bogate toksičnim tvarima mogu poremetiti biološku aktivnost aktivnog mulja.

Aktivni mulj je taksonomski i metabolički raznolika mikrobna zajednica s kompleksnim odnosima među svojim članovima koja biorazgradive tvari u otpadnoj vodi koristi kao izvore hrane. Sastav mikrobne zajednice u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda razlikuje se obzirom na primijenjenu tehnologiju obrade vode (radne uvjete/procesne čimbenike) i karakteristike influenta (Begmatov i sur., 2022). Cilj je formiranje aktivnog mulja zadovoljavajućeg sastava i učinkovitosti za željene procese, te izbjegavanje izazova poput nakupljanja nitastih bakterija što dovodi do pjenjenja mulja. Dobro poznavanje čimbenika koji utječu na sastav i dinamiku mikrobne zajednice ključno je za upravljanje procesima obrade. Pokazalo se da postoji povezanost između raznolikosti i sastava mikrobne zajednice te učinkovitosti pročišćavanja (Kim i sur., 2019). Unatoč velikom napretku u molekularnim metodama proučavanja mikrobne zajednice aktivnog mulja zadnjih godina, dinamika i raznolikost unutar iste nisu u potpunosti shvaćeni, a nerazumijevanju doprinosi i nemogućnost kultivacije većine mikroorganizama aktivnog mulja (Begmatov i sur., 2022). Na sastav mikrobne zajednice utječu čimbenici poput temperature, sastava influenta (kemijski i biološki sastav ulazne otpadne vode), SRT, DO, odnosno okolišni uvjeti i način rada (Peces i sur., 2022).

U aeracijskom bazenu procesa s aktivnim muljem obično se susreće pet glavnih skupina mikroorganizama:

- (i) Bakterije koje su primarno odgovorne za uklanjanje organskih tvari iz otpadne vode

- (ii) Protozoe poput ameba i trepetljikaša koje uklanjaju i razgrađuju raspršene bakterije i suspendirane čestice
- (iii) Metazoe poput nematoda i rotifera koje prevladavaju u starijim sustavima
- (iv) Nitaste bakterije koje u velikoj zastupljenosti mogu uzrokovati probleme s taloženjem mulja
- (v) Alge i gljivice koje obično ukazuju na probleme vezane uz pH i starost mulja

U ukupnoj biomasi aktivnog mulja bakterije su zastupljene oko 95% a odgovorne su za oksidaciju i transformaciju većine organskih sastojaka, imaju najveću biokemijsku aktivnost zbog brzog staničnog rasta i raznolikog enzimskog potencijala i proizvode ekstracelularne polimerne tvari (engl. *Extracellular Polymeric Substances*, EPS) koje potpomažu i omogućuju formiranje flokula (Bitton, 2005).

U flokulama su prisutni različiti rodovi: (i) heterotrofnih bakterija, poput: *Zoogloea*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Comomonas*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*, *Bacillus spp.*, kao i nitasti mikroorganizmi, (ii) autotrofnih bakterija, poput: *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*, (iii) protozoa, poput: *Chilodonella*, *Colpidium*, *Blepharisma*, *Euplotes spp.*, *Paramecium*, *Litonotus*, *Trachelophyllum* i *Spirostomum*, *Vorticella*, *Carchesium*, *Opercularia*, *Epistylis* i *Zoothamium*, (iv) višestaničnih eukariotskih organizama, metazoa i to: rotifere, nematode, crvi (Bitton, 2005; Metcalf & Eddy, 2003; Eikelbloom, 2000).

I u aktivnom mulju s lokalnog uređaja za obradu otpadnih voda uporabljenom za provedbu pokusa disertacije određena i dokumentirana je prisutnost različitih mikrobnih vrsta, koje doprinose učinkovitosti procesa uklanjanja organskih i anorganskih sastojaka iz otpadne vode i čine flokule boljih ili lošijih karakteristika s obzirom na taloživost, indeks mulja i biokemijsku aktivnost u uklanjanju C, N i P (Slike **11-16**).

Aktivni mulj dobre mikrobiološko-biokemijske aktivnosti karakterizira dobro svojstvo taloživosti, svijetlosmeđa do sivosmeđa boja, svježi miris (po humusu) i bistro tekućina iznad istaloženog mulja (Daiger i sur., 2018; Roche i sur., 2022).

Mulj s lokalnog uređaja za obradu otpadne vode pokazao je dobra svojstva taloženja (Slika **10**), raznoliku mikrobnu zastupljenost (Slike **11-16**) i formirane nakupine – pahuljice ili flokule (Slike **8 i 9**).

Otpadne vode grada karakterizira mali omjer KPK/N (Tablica **9**), često nedostatan za uklanjanja N, proces denitrifikacije, te je potrebno za osiguravanje dostatne količine organskih



sastojaka kao donora elektrona dodavati vanjske izvore ugljika (poput acetata, metanola, hidroliziranog mulja ...) (Racys i sur., 2018; Monteith i sur., 1980; Gao i sur., 2011)

U izradi disertacije kao izvor ugljika poslužio je natrijev acetat dodan u odgovarajućoj količini za odabrani ciljani omjer C/N odnosno KPK/N ili KPK/P. Tu i Schuler proveli su istraživanje utjecaja koncentracije acetata i pH vrijednosti na PAOs i GAOs vrste te zaključili da je kombinacija visokih koncentracija acetata u reaktoru i niske pH vrijednosti dovela do smanjenja aktivnosti PAOs. Više koncentracije  $\text{CH}_3\text{COOH}$  pri nižim pH vrijednostima, zajedno s relativno visokim koncentracijama koje se pojavljuju prilikom brzog dodavanja acetata u SBR, može inhibirati PAOs, odnosno niže koncentracije acetata pogoduju PAOs u odnosu na GAOs. Yagci i sur. pokazali su da prisutnost acetata pozitivno utječe na učinkovitost EBPR. Primijećeno je da se učinkovitost EBPR pogoršava ukoliko je influent bogat glukozom, bez obzira na smanjeni unos  $\text{NO}_x\text{-N}$ . Niski omjeri KPK/TKN uzrokuje manju učinkovitost uklanjanja fosfora jer nitrat koji ulazi u anaerobnu zonu troši supstrat za denitrifikaciju. Rezultati su također pokazali da se anoksično uzimanje fosfata događa istovremeno s redukcijom nitrata kada nema vanjskog supstrata, što ukazuje da neki PAOs mogu denitrificirati i da se stopa otpuštanja fosfora smanjuje u anoksičnim uvjetima zbog korištenja acetata za denitrifikaciju i istovremenog uzimanja fosfora od strane DPAOs. Soejima i sur. proveli su tri vrste pokusa pri istraživanju efekta acetata i nitrita na uklanjanje N i P u A-O-A procesu. U prvoj vrsti pokusa dodan je natrijev acetat na početku anoksičnog stanja radi poticanja denitrifikacije heterotrofnim denitrifikantima. U ovom pokusu, PAOs su odgovorni za uklanjanje fosfata, dok su heterotrofni denitrifikanti odgovorni za uklanjanje dušika. Druga vrsta pokusa uključivala je dodavanje natrijevog acetata na početku aerobnog stanja za inhibiciju aerobnog uzimanja fosfata od strane PAOs. U ovom pokusu fosfat se uklanja pomoću PAOs i DNPAOs. Dodavanje nitrita na početku aerobnog stanja za inhibiciju uzimanja fosfata od strane PAOs bio je treći set pokusa. Pokazano je da je drugi pokus najučinkovitiji za poboljšanje aktivnosti DNPAOs i time za održavanje visoke učinkovitosti uklanjanja dušika i fosfora u A-O-A procesu.

Flokule male, zaobljene kompaktne strukture su karakteristične za sustave obrade otpadne vode niskog /malog opterećenja organskim sastojcima ( $\text{BPK} < 0,10 \text{ kg/kg,d}$ ), pri  $\text{DO} > 2 \text{ mg/L}$  i visokih vrijednosti SRT. Takvi sustavi obrade otpadne vode niskog opterećenja s organskim sastojcima imaju tendenciju povremenog pojavljivanja plivajućeg mulja i pjenjenja mulja čiji je glavni uzročnik hidrofobna nitasta vrsta bakterija *Michotrix parvicella*. Nastanku plivajućeg mulja u bioreaktorima i naknadnim taložnicama doprinosi niski omjer

F/M, a najčešće se javlja tijekom zimskih i proljetnih mjeseci, a kontrola se postiže smanjenjem koncentracije MLSS u aerobnim reaktorima - smanjenjem povrata mulja iz naknadnih taložnica u bioeracijske bazene čime se povećava omjer F/M (Abusam i sur., 2020; Eikelboom, 2000; Nierycho i sur., 2020). Međutim, smanjivanje vrijednosti MLSS može uzrokovati smanjenu aktivnost i gubitak sororastućih nitrificirajućih vrsta i povećanje proizvodnje otpadnog mulja (Jenkins i sur., 2003; Eikelboom, 2000).

Nagomilavanje/nakupljanje mulja (engl. *sludge bulking*) predstavlja glavni operativni problem sustava obrade otpadne vode kao rezultat nedostatka N, P i elemenata u tragovima i kao rezultat velikih fluktuacija DO, temperature i pH, a takav mulj karakterizira slaba taloživost i mala kompaktnost uzrokovana prekomjernim rastom i prisustvom nitastih vrsta (Metcalf & Eddy, 2003).

Konvencionalne sustave biološkog uklanjanja hranjivih tvari često karakteriziraju nedostaci poput zahtjeva za velikim prostorom, mala učinkovitosti obrade otpadne vode, proizvodnja viška mulja (McCarty, 2018; Rittmann i McCarty, 2001), te se istražuju različite konfiguracije mikrobnih procesa koji će rezultirati učinkovitom obradom otpadne vode uz manje troškove (proces A2O, AOA, UCT) (Rong i sur., 2020; Zhang i sur., 2013; Rong i sur., 2019; Zeng i sur., 2010).

Što su zahtjevi za kvalitetom pročišćene otpadne vode stroži u smislu koncentracija C, N i P, sustav s aktivnim muljem mora biti složeniji kako bi se postigla potrebna razina uklanjanja onečišćenja. Za sustave za biološko uklanjanje hranjivih tvari nužna je starost mulja (SRT) od približno 10 do 25 dana i HRT od približno 10 do 24 h. Nakon što je starost mulja dulja od otprilike 3 dana na 20 °C (4 na 14 °C), sporo biorazgradivi organski dijelovi gotovo su potpuno iskorišteni (Wentzel i sur., 2008). Na uspješnost sustava utječu ili previsoke ili preniske koncentracije DO u aerobnoj zoni. Previsoke koncentracije DO su nepotrebno skupe i rezultiraju recikliranjem kisika u anoksičnu (i anaerobnu zonu ako je EBPR uključen) zonu, čime se smanjuje mogućnost uklanjanja N i P; preniske koncentracije DO uzrokuju pad učinkovitosti nitrifikacije i mogući razvoj mulja lošee taloživosti.

Na uspješnost uklanjanja fosfora utječu izvori ugljika u otpadnim vodama (Oehmen i sur., 2007). U EBPR postrojenjima, acetat i glukoza predstavljaju najčešće prisutne lako hlapljive masne kiseline. Korištenje acetata ističe se po visokoj učinkovitosti uklanjanja ugljika i velikoj proizvodnji polihidroksialanoata (PHA) (Hollender i sur., 2002; Pijuan i sur., 2009). Proces EBPR snažno ovisi o temperaturi, što potvrđuju studije Brdjanovića i suradnika (1997, 1998) te López-Vázquez i suradnika (2009). Utvrđeno je da je pri temperaturi od 20 °C

oslobađanje i akumulacija fosfora optimalna, što pogoduje dominaciji PAOs-a među mikroorganizmima (Wei i sur., 2014). Također, prema López-Vázquez i sur. (2008), pri temperaturama ispod 20 °C favoriziran je rast PAOs nad GAOs. Za učinkovito biološko uklanjanje dušika i fosfora važan je omjer kemijske potrošnje kisika (KPK) i ukupnog fosfora (TP). Arbabi i suradnici (2012) navode da taj omjer iznosi 40, dok Tchobanoglous i sur. (2004) predlažu omjer KPK/TP od 33. Također, istraživanja su pokazala da visoke koncentracije otopljenog kisika (4,5-5 mg/L) u aerobnoj fazi smanjuju učinkovitost uklanjanja fosfora, dok niske koncentracije (2,5-3 mg/L) potiču povećanje udjela PAOs u aktivnom mulju (Brđanović i sur., 1998). Filipe i suradnici (2001) istaknuli su pH od 7,25 u anaerobnim uvjetima kao ključan: pri pH nižem od 7,25 GAOs brže apsorbiraju VFA od PAOs, dok je pri višem pH obrnuto.

Aktivni mulj s lokalnog uređaja za obradu otpadne vode grada pokazao je aktivnost za uklanjanje sastojaka s dušikom u procesima nitrifikacije uz brzinu 5 mg NH<sub>4</sub>-N/L h i denitrifikacije uz brzinu 3 mg NO<sub>3</sub>-N/L h. Aktivni mulj nije pokazao aktivnost za uklanjanje P. Za provođenje procesa denitrifikacije bila je nužna prilagodba aktivnog mulja na acetat kao izvor ugljika.

Iz tog razloga provedeni su pokusi prilagodbe aktivnog mulja za uklanjanje N u nizu naizmjeničnih pokusa nitrifikacije i denitrifikacije, uz acetat kao izvor ugljika.

Aktivni mulj s lokalnog uređaja za obradu otpadne vode grada poboljšane aktivnosti za uklanjanje N, pokazao je aktivnost i učinkovitosti uklanjanja C, N i P, kako slijedi:

a) U procesu nitrifikacije 25 mg NH<sub>4</sub>-N/L ostvarena je brzina oksidacije NH<sub>4</sub>-N 15,2 mg NH<sub>4</sub>-N/L h, bez nakupljanja NO<sub>2</sub>-N i uz nakupljanje 10 mg NO<sub>3</sub>-N/L (što čini 40% od početne vrijednosti NH<sub>4</sub>-N), odnosno brzini nitrifikacije 12,9 mg NH<sub>4</sub>-N/L h, pri čemu je izračunata specifična brzina nitrifikacije 3,9 mg NH<sub>4</sub>-N/gVSS h.

U procesu nitrifikacije aktivne su amonijak i nitrit oksidirajuće bakterije kao funkcionalni mikroorganizmi, za koje su povoljni odgovarajući operativni čimbenici: pH 7-8, DO<sub>2</sub> ≥ 2 mg/L, raspon koncentracije 5-100 mg NH<sub>4</sub>-N/L a inhibirajući učinak ima slobodni amonijak 10-150 mg NH<sub>3</sub>/L za AOB odnosno 0,1-1,0 mg/L NH<sub>3</sub>/L za NOB (Dinçer i Kargi, 2000; Anthonisen i sur., 1976). Također, pH vrijednost u rasponu 7 ≤ pH ≤ 8 i DO<sub>2</sub> ≥ 2 mg/L su povoljni za proces potpune nitrifikacije odnosno prevođenje NH<sub>4</sub>-N u NO<sub>3</sub>-N, a za proces djelomične ili parcijalne nitrifikacije povoljno su uvjeti pH > 8 i DO<sub>2</sub> ≤ 1 mg/L pri čemu je inhibirana aktivnost NOB a favorizirana aktivnost AOB i prevođenje NH<sub>4</sub>-N u NO<sub>2</sub>-N. Pri tome treba biti oprezan u vođenju procesa jer NO<sub>2</sub>-N ≥ 6 mg/L inhibira aktivnost AOB (proces

nitritacije) i  $\text{NO}_2\text{-N} \geq 15 \text{ mg/L}$  inhibira aktivnost NOB (proces nitratacije) (Soliman i sur., 2018; Komorowska-Kaufman i sur., 2006).

Omjer ugljika i dušika u otpadnoj vodi trebao bi biti manji od 0,25 kako bi se osigurala učinkovita nitrifikacija, a ograničenje otopljenog kisika postaje značajno kada je brzina opskrbe kisikom manja od  $2 \text{ g O}_2/\text{g NH}_4\text{-N}$ . (Dinçer i Kargi, 2000).

Bernata i sur. (2010) postigli su prosječnu brzinu nitrifikacije od  $8,56 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$  uz  $855 \text{ mg KPK/L}$  i  $\text{C/N}$  4 uz koncentracije  $\text{DO} < 0,7 \text{ mg/L}$ . Eksperiment je vođen u SBR reaktoru i efikasnost uklanjanja amonijaka iznosila je 96-98%. Li i suradnici (2010) istraživali su uklanjanje amonijaka u otpadnoj vodi visoke početne koncentracije amonijaka ( $300 \text{ mg/L}$ ) i pokazali da se promjenom procesnih parametara može osigurati učinkovita nitrifikacija s limitiranom koncentracijom otopljenog kisika. Chiu i sur. (2006) proveli su pokuse simultane nitrifikacije i denitrifikacije u SBR reaktoru s početnom koncentracijom  $\text{NH}_4\text{-N}$   $119 \text{ mg/L}$  uz  $\text{C/N}$  6,3, 11,7 i 19,1 i  $\text{DO}$   $0,64\text{-}0,68 \text{ mg/L}$ . Povećanjem  $\text{C/N}$  omjera dolazi do povećanja učinkovitosti procesa. Brzine nitrifikacije rastu s 3,45 na  $11,33 \text{ mg/gh}$ , a denitrifikacije s 9,62 na  $11,01 \text{ mg/gh}$ .

Eksperimentalni uvjeti provedenih pokusa disertacije razlikuju se na temelju dva ključna parametra: pH i koncentracije biomase. Pokusi A, C, E i G vođeni su pri pH 8,0, dok su B, D, F i H vođeni pri pH 7,2. Osim toga, MLSS je iznosio  $3,3 \text{ g/L}$  u pokusima A-D i  $2 \text{ g/L}$  u pokusima E-H (tablica 10). Pokazano je da ovi faktori značajno utječu na brzinu nitrifikacije i oksidacije nitrata.

Uspoređujući rezultate pokusa, obzirom na različite koncentracije biomase (2, odnosno  $3,3 \text{ g/L}$ ), mogu se jasno identificirati razlike u dinamici promjena koncentracija dušikovih spojeva. Pokusi s većom koncentracijom biomase pokazuju brže promjene, dok su promjene u pokusima s manjom koncentracijom biomase znatno sporije. U pokusima A i B, s višom koncentracijom biomase, početne koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N}$  su  $25 \pm 2 \text{ mg/L}$  ( $25,2 \text{ mg/L}$  i  $23,9 \text{ mg/L}$ ), i do potpune oksidacije dolazi za 1,66 odnosno 2,33 sata što ukazuje na prisutnost mikroorganizama koji povode proces nitrifikacije (bez nakupljanja  $\text{NO}_2\text{-N}$ ). U pokusima G i H do potpune oksidacije  $\text{NH}_4\text{-N}$  dolazi nakon 3,66 odnosno 3 sata, ponovno bez nakupljanja  $\text{NO}_2\text{-N}$ . Početni  $\text{NH}_4\text{-N}$  preveden je u  $\text{NO}_3\text{-N}$  uz porast koncentracije kisika na kraju procesa. Podaci dobiveni nakon provedenih pokusa pokazuju da veća koncentracija biomase dovodi do intenzivnije biološke aktivnosti, bržih promjena u koncentracijama dušikovih spojeva, bržeg pada  $\text{NH}_4\text{-N}$ , rasta  $\text{NO}_3\text{-N}$ , te veće potrošnje kisika. U pokusima s nižom koncentracijom

biomase promjene su sporije i manje izražene, što ukazuje na smanjenu nitrifikaciju i manju potrošnju kisika.

Eksperimenti provedeni pri pH 8 imaju veću brzinu nitrifikacije (tablica 10) u usporedbi s eksperimentima pri pH 7,2. To može sugerirati da viša pH vrijednost pozitivno utječe na brzinu oksidacije  $\text{NH}_4\text{-N}$  u ovim uvjetima.

Početne koncentracije amonijaka ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) u pokusima C-F iznosile su  $40 \pm 2$  mg/L, no brzina njihovog opadanja pokazuje jasne razlike ovisno o uvjetima. U pokusu C, pri pH 8,0 i većoj koncentraciji biomase, koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  smanjila se s početnih 40,4 mg/L na 3,75 mg/L unutar 4 sata. Ovaj brzi pad ukazuje na visoku brzinu nitrifikacije, koju podržava viši pH, optimalan za aktivnost nitrificirajućih bakterija, i veća koncentracija biomase koja ubrzava proces. Sličan pad primijećen je u pokusu E, koji je također vođen pri pH 8,0, no s manjom koncentracijom biomase. Početna koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  u pokusu E bila je 36,19 mg/L, nakon 4,5 sata smanjila se na 3,75 mg/L. Iako je brzina nitrifikacije bila nešto sporija u odnosu na pokus C, pH 8,0 omogućio je brzu konverziju amonijaka, unatoč manjoj količini biomase. U pokusu D, vođenom pri pH 7,2 i s većom koncentracijom biomase, koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  opadala je sporije. Početna vrijednost iznosila je 39,6 mg/L, a nakon 5,5 sati smanjila se na 4,14 mg/L. Niži pH usporava aktivnost nitrifikanata, što dovodi do sporijeg uklanjanja amonijaka u usporedbi s pokusima vođenima pri pH 8,0. U pokusu F pad  $\text{NH}_4\text{-N}$  bio je najslabiji. Ova sporija stopa nitrifikacije rezultat je kombinacije nižeg pH i smanjene koncentracije biomase u sustavu.

Nitrificirajuće bakterije (AOB i NOB), su autotrofi, kemolitotrofi i obvezni aerobi. Zbog toga imaju puno manju brzinu rasta u usporedbi s aerobnim heterotrofima. Također su poznate kao bakterije koje sporo rastu i osjetljive su na različite okolišne čimbenike, kao što su temperatura, pH, koncentracija otopljenog kisika (DO), omjer kemijske potrošnje kisika i ukupnog Kjeldahlovog dušika te prisutnost toksičnih kemikalija (Okabe i sur., 2011; Svenson i sur., 2000; Kim i sur., 2005). Literatura pokazuje da je optimalni pH za nitrificirajuće bakterije (posebno *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* vrste) između 7,2 i 8,9 (Tchobanoglous i sur., 2003). Pri pH iznad 9,0, nitrifikacija je inhibirana u istraživanju Ruiz i sur. (2003), dok su Yan i sur. (2013) u visoko opterećenoj otpadnoj vodi iz svinjogojstva postigli uklanjanje amonijaka iznad 90% pri pH 9,00-9,5. Pri pH nižem od 7,5, nitrifikacija usporava jer niske pH vrijednosti inhibiraju djelovanje nitrificirajućih mikroorganizama. Ruiz i sur. (2003) su pokazali da vrijednosti ispod 6,35 dovode do potpune inhibicije nitrifikacije. Rezultati provedenih pokusa koji pokazuju bržu oksidaciju amonijaka i nitrata pri pH 8,0 u odnosu na pH 7,2 u skladu su s literaturnim podacima (Amatya i sur., 2011; Cho i sur., 2014; Kim i sur., 2007).

Tian i suradnici (2018) pokazali su da povećanje koncentracije biomase do određene granice (7,5-8,0 g MLSS/L) dovodi do veće brzine nitrifikacije jer više nitrificirajućih bakterija može oksidirati amonijak u nitrite, a zatim u nitrate, bez utjecaja na prijenos kisika, dok je kod Alattabi i suradnika (2017) ta granica 3.0 g MLSS/L. Manja koncentracija biomase, kao što je to slučaj u pokusima s MLSS 2 g/L, prirodno usporava brzinu nitrifikacije. Literatura podržava ovu hipotezu, jer je pokazano da veća koncentracija MLSS pozitivno utječe na brzine nitrifikacije (Coskuner i sur., 2008; Hallin i sur., 2005). Literatura navodi da brzina oksidacije amonijaka u nitrate (nitrifikacija) može varirati ovisno o pH, temperaturi, prisutnosti kisika i biomasi (Jones i sur., 1980; Painter i sur., 1983; Shammass i sur., 1986; Antoniou i sur., 1990). Rezultati su u velikoj mjeri u skladu s literaturno dostupnim podacima. Utjecaj pH, koncentracije biomase i volumena na brzinu nitrifikacije dobro je dokumentiran u literaturi (Bhattacharya i Mazumder, 2020), a eksperimenti pružaju slične rezultate, posebno u pogledu brže nitrifikacije pri višem pH i s većom količinom biomase (Cho i sur., 2014).

b) U procesu denitrifikacije uz acetat kao izvor ugljika, ostvarena je brzina denitrifikacije  $xy \text{ mg NO}_3\text{-N/L h}$  za odabrani omjer C/N uz acetat kao izvor ugljika.

Proces denitrifikacije provode denitrificirajuće vrste za čiju aktivnost je nužno osigurati elektron donore – organske sastojke iz otpadne vode ili dodane kao vanjski izvor ugljika i elektron akceptore –  $\text{NO}_3\text{-N}$  i/ili  $\text{NO}_2\text{-N}$ . Zabilježeno je i da su denitrifikacijski organizmi inhibirani visokim koncentracijama nitrata i nitrita (Dinçer i Kargi, 2000). Zabilježeno je da je optimalni omjer C/N za denitrifikaciju  $C/N = 1,1$  kada se kao izvor ugljika koristi glicerol (Grabinska-Loniewska i sur. 1985). Denitrifikacijski organizmi mogu tolerirati pH između 6 i 9. Međutim, optimalni pH je  $\text{pH} = 7\text{-}8$  (Gumaelius, 1996).

Henze i sur. (1994) utvrdili su da je teoretski omjer C/N iznosio 3,5–4,5 g DKPK/g DN, no u sustavima s preddenitrifikacijom predložili su omjer C/N od 6–11 g DKPK/g DN za uspješno uklanjanje dušika. Brojni istraživači su pokazali da je najveći porast brzine denitrifikacije postignut nakon dodatka octene kiseline i metanola (Komorowska-Kaufman i sur., 2006). Koncentracija  $\text{NO}_x\text{-N}$  trebala bi biti niža od 200 mgN/L za postizanje učinkovite denitrifikacije (Dinçer i Kargi, 2000). Autotrofne nitrificirajuće bakterije za uspješnu provednu procesa zahtijevaju koncentraciju otopljenog kisika od 2-7 mg  $\text{O}_2\text{/L}$  (Henze i sur., 2002). Optimalna temperatura za rast nitrificirajućih bakterija je između 25 i 30°C.

Wang i sur. (2008) provodili su pokuse u SBR reaktoru s aerobnim granuliranim muljem uz sintetičku i realnu otpadnu vodu s vrijednostima početnog KPK od 400 odnosno 723 mg/L i  $\text{NH}_4\text{-N}$  od 35 i 71 mg/L pri različitim omjerima. S povećanjem omjera C/N s 2 na 3 dolazi do

smanjenja brzine denitrifikacije s 6,51 na 5,74 mg/gh. Zheng i sur. (2009) su u SBR reaktoru istraživali uspješnost uklanjanja spojeva s dušikom iz otpadne vode početne koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N}$  25-35 mg/L s različitim izvorima ugljika u anoksičnim uvjetima (DO 0,15-0,45 mg/L). Proces denitrifikacije učinkovitiji je uz dodavanje vanjskog izvora ugljika te se efikasnost uklanjanja ukupnog dušika povećava sa 61 % (bez vanjskog izvora ugljika) na 81 % (dodatak acetata) i 83 % (dodatak kratkolančanih masnih kiselina).

U istraživanju Gutiérrez i sur. (2024) u SBR reaktoru sa sintetičkom otpadnom vodom i aktivnim muljem omogućena je parcijalna nitrifikacija. Pri nižoj koncentraciji mikroorganizama (2688 mg VSS/L), denitrifikacija je bila značajno izraženija (56,4%) u odnosu na sintezu  $\text{NO}_3\text{-N}$  (38,1%). Suprotno tome, pri višoj koncentraciji mikroorganizama (5366 mg VSS/L), postignuta je veća učinkovitost pretvorbe  $\text{NH}_4\text{-N}$  u  $\text{NO}_3\text{-N}$  (72,6%), dok je denitrifikacija iznosila 23,1%. Istraživanja procesa nitrifikacije u SBR sustavima uz trajanje ciklusa 4 sata pokazala su da se najveća učinkovitost uklanjanja organskih tvari (do 90%) i amonijaka (do 80%) postiže pri pH vrijednosti blizu 8,0 (Quan i sur., 2023). Povećanje pH imalo je pozitivan učinak i na povećanje specifične brzine nitrifikacije. U drugoj fazi istraživanja razmatrao se proces denitrifikacije u SBR sustavima, pri čemu je trajanje ciklusa iznosilo 6,5 sati. Početne koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N}$  iznosile su 28-30 mg/L uz KPK 84-125 mg/L. Rodriguez i sur. (2011a) proveli su pokuse uklanjanja dušika iz otpadnih voda mesne industrije kroz 8 različitih faza s drugačijim organskim opterećenjem (engl. Organic Loading Rate, OLR) i vrijednostima opterećenja amonijakom (engl. Ammoniacal Loading Rate, ALR) u SBR reaktoru. Pokazano je da je za uspješan proces denitrifikacije potrebno osigurati otpadnu vodu više BPK vrijednosti ili dodati vanjske izvore ugljika. Uočena je jasna poveznica između koncentracije otopljenog kisika i uklanjanja  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Maksimalni DO postignut je u fazi 4 (3,9 mg/L), s uklanjanjem  $\text{NH}_4\text{-N}$  od 71% bez nakupljanja  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  u procesu. Zaključeno je da je SBR učinkovit u radu s otpadnim vodama koje pokazuju značajne varijacije u sastavu. U istraživanju Rodriguez i sur. (2011b) utvrđeno je da je najučinkovitije uklanjanje amonijaka i organskih tvari postignuto u uvjetima s maksimalnom zastupljenošću nitrificirajućih i denitrificirajućih bakterija u SBR reaktoru pri obradi otpadnih voda mesne industrije. Miješanjem različitih omjera otpadnih voda s visokim udjelom organske tvari i s visokim udjelom amonijaka određeni su najpovoljniji uvjeti za uklanjanje amonijaka i organske tvari. Najučinkovitije uklanjanje  $\text{NH}_4\text{-N}$  od 71% postignuto je pri gustoći mikrobne populacije od približno  $2,35 \times 10^7$  MPN/100 mL za nitrificirajuće bakterije i  $2,25 \times 10^7$  MPN/100 mL za denitrificirajuće bakterije. Li i sur. (2002) istraživali su obradu otpadnih voda mliječne

industrije s 10000 i 20000 mg KPK/L pri različitim HRT (1-4 dana). Pokazano je da HRT, SRT, konfiguracija reaktora i karakteristike influenta utječu na učinkovitost obrade otpadne vode. U pokusima s početnim KPK 10 000 mg/L nije uočena značajnija razlika u učinkovitosti uklanjanja KPK i dušika pri istraživanim HRT (1-3 dana). Učinkovita obrada otpadnih voda s 20 000 mg KPK/L koja omogućava potpunu oksidaciju amonijaka zahtijevala je HRT od 4 dana.

c) Aktivni mulj u ovim pokusima nije pokazao aktivnost za uklanjanje P što se povezuje s činjenicom da lokalni uređaj s kojeg je mulj uzet nije projektiran za uklanjanje P. Utrošak P pripisuje se ugradnji u staničnu biomasu, a ne aktivnosti PAOs.

Uklanjanje fosfora ugradnjom u aktivni mulj ograničeno je na oko 0,006 – 0,004 mgP/mgKPK (Wentzel i sur., 2008).

U sustavima za obradu otpadnih voda koji nemaju poboljšano biološko uklanjanje fosfora (ne-EBPR sustavi), PAOs vrste obično su puno manje zastupljene u usporedbi s EBPR sustavima. PAOs, poput *Accumulibacter*, uspijevaju u EBPR sustavima jer se oslanjaju na specifične uvjete (anaerobno-aerobne cikluse) koji potiču njihovu sposobnost skladištenja i uklanjanja fosfora. Bez tih ciljanih uvjeta, PAOs nisu u mogućnosti učinkovito ukloniti fosfor, pa stoga nisu dominantni u ne-EBPR sustavima.

U ne-EBPR sustavima, sastav mikrobne zajednice često uključuje (Wagner i sur., 2002; Cydzik-Kwiatkowska i Zielińska, 2016)

(i) heterotrofne bakterije: odgovorne su za razgradnju organskih tvari, što je glavni fokus u ne-EBPR sustavima. Često se nalaze rodovi *Pseudomonas*, *Acinetobacter* i *Bacteroides* jer mogu razgraditi širok raspon organskih spojeva.

(ii) nitrifikante: u sustavima s nitrifikacijom prevladavaju bakterije koje oksidiraju amonijak (npr. *Nitrosomonas*) i bakterije koje oksidiraju nitrit (npr. *Nitrobacter*). Ovi mikroorganizmi sudjeluju u pretvorbi amonijaka u nitrat.

(iii) denitrifikante: u sustavima s denitrifikacijom prisutne su bakterije poput *Paracoccus* i *Pseudomonas*. One reduciraju nitrat u plinoviti dušik, osobito u anoksičnim zonama.

(iv) flokulorajuće bakterije: doprinose stvaranju flokula, što je važno za procese taloženja i odvajanja u obradi otpadnih voda. Uobičajeni rodovi uključuju *Zoogloea* i *Flavobacterium*.



(v) filamentozne bakterije: bakterije poput *Sphaerotilus* i *Thiothrix* mogu se pronaći u ne-EBPR sustavima. Sudjeluju u održavanju strukture flokula ili, pak, mogu uzrokovati probleme poput pjenjena mulja.

U ne-EBPR sustavima naglasak je na uklanjanju organskih tvari, ciklusu dušika i održavanju stabilnih svojstava mulja, a ne na uklanjanju fosfora, pa se mikrobna zajednica u skladu s tim prilagođava. EBPR sustavi dizajnirani su s ciljem poticanja rasta specifičnih mikrobnih vrsta koje imaju sposobnost uklanjanja fosfora iz otpadnih voda. Ključni mikroorganizmi tih sustava su PAOs i GAOs vrste (Oehmen i sur., 2007; Begum i Batista, 2012). *Candidatus Accumulibacter phosphatis* jedan je od najbolje istraženih PAOs i modelni je organizam. Može koristiti niz ugljikovih spojeva, poput acetata i propionata, u anaerobnim uvjetima i pohraniti te spojeve kao polihidroksialkanoate (PHA), koje koristi kao izvor energije za rast uz kisik ili nitrat kao akceptor elektrona. Istraživanja ističu da *Accumulibacter* vrste sačinjavaju između 5 i 70% udjela u mikrobnj populaciji. Značajan je i broj fosfat akumulirajućih vrsta iz roda *Tetrasphaera* koji uključuje *T. japponica*, *T. australiensis*, *T. elongate*, *T. vanveenii*, *T. jenkinsii*, *T. veronensis* (Gebremariam i sur., 2011). GAOs vrste poput *Candidatus Competibacter phosphatis* natječe se s PAOs za izvore ugljika bez doprinosa uklanjanju fosfora. Pohranjuje ugljik kao glikogen, a ne polifosfat. Iz aktivnog mulja anaerobno-anoksičnog sustava s EBPR svojstvima izolirani su rodovi bakterija koji mogu koristiti nitrat kao terminalni akceptor elektrona i akumulirati P: *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Aquaspirillum*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Shewanella* i *Xantomonas* (Merzouki i sur., 1999). Stockholm-Bjerregaard i sur. (2017) procijenili su obilje i raznolikost predloženih PAOs i GAOs u EBPR sustavima, naglašavajući dominaciju *Tetrasphaera* (sada *Candidatus Phosphoribacter*) kao PAOs i prisutnost različitih GAOs, uključujući *Defluviicoccus* i *Competibacter*. Shen i Zhou (2016) istraživali su kako različiti izvori ugljika utječu na odabir i natjecanje između PAOs i GAOs u EBPR sustavima, naglašavajući važnost odabira izvora ugljika u održavanju učinkovitog uklanjanja fosfora. Razumijevanje ravnoteže između PAOs i GAOs ključno je za optimiziranje EBPR procesa, budući da proliferacija GAOs može dovesti do smanjene učinkovitosti uklanjanja fosfora. Operativni parametri, kao što su vrsta izvora ugljika, pH i temperatura, igraju značajnu ulogu u utjecanju na kompeticiju između ovih skupina mikroba.

Aktivni mulj nije pokazao aktivnost za uklanjanje P te je provedeno obogaćivanje mulja s PAOs.

## 5.2. Aktivnost mulja obogaćenog PAOs

Pokusi disertacije provedeni su u anaerobno-aerobnim uvjetima što je u skladu s drugim istraživačima i provedenim pokusima. Lv i sur. (2014) postigli su zadovoljavajuće vrijednosti P u efluentu, akumulaciju PAOs i uklanjanje P od 89% nakon 40 dana rada sustava u anaerobno-aerobnim uvjetima rada. Haiming i sur. (2014) provodili su obogaćivanje mulja u SBR reaktoru s trajanjem ciklusa 8 sati i anaerobno-aerobnim uvjetima, te postigli stabilne performanse uklanjanja fosfora nakon 40 dana. Rezultati pokusa pokazuju uspješno obogaćivanje mulja PAOs vrstama nakon 40 dana, što je vidljivo iz vrijednosti koncentracije P u efluentu, MLVSS, MLSS i njihovog omjera.

Ng i sur. (2001) pokazali su da anaerobno-anoksično vođenje procesa dovodi do akumulacije DPAOs koji u anoksičnim uvjetima koristeći nitrat kao akceptor elektrona unose P u stanice. Istovremeno je provođeno anoksično unošenje fosfora i denitrifikacija. Carvalho i sur. (2007) proveli su istraživanje s dva različita izvora ugljika – acetatom i propionatom. Reaktori su iz anaerobno-aerobnih uvjeta prilagođeni na anaerobno-anoksične uvjete. Mikrobna zajednica u reaktoru s propionatom kao izvorom ugljika učinkovito je provodila proces denitrificirajuće defosfatacije u anaerobno-anoksičnim uvjetima, dok u slučaju acetata kao izvora ugljika nije postignut stabilan proces. Ta razlika pripisuje se prisutnosti DPAOs odnosno DPAOs vrsta u reaktorima. Lv i sur. (2014) uspoređivali su učinkovitost EBPR procesa i denitrificirajuće defosfatacije. Proveli su aklimatizaciju aktivnog mulja pod anaerobno-anoksičnim uvjetima (za obogaćivanje DPAOs) i anaerobno-aerobnim uvjetima (za obogaćivanje PAOs). Uklanjanje fosfora u A-A reaktoru iznosilo je 87,9%, a u A-O reaktoru 89,0%. *Proteobacteria* su bile najzastupljenije u svim uzorcima, čineći 65,8%–91,8% ukupnih bakterijskih sekvenci. Ostali dominantni tipovi uključivali su *Chloroflexi* (1,27%–5,54%), *Chlorobi* (0,47%–5,27%), *Bacteroidetes* (0,97%–7,64%) i *Actinobacteria* (0,16%–11,4%).

Haiming i sur. (2014) utvrdili su da DPAOs izložen aerobnim uvjetima odmah pokazuje sposobnost uklanjanja P sličnu onoj pod anoksičnim uvjetima, dok PAOs pri anoksičnim uvjetima ima manju sposobnost uklanjanja P. Količina fosfora pohranjenog u mikroorganizmima kao što su PAOs i DPAOs može se općenito zaključiti na temelju omjera MLVSS prema MLSS: niži omjer implicira veću količinu fosfora pohranjenog u mikroorganizmima odgovornim za uklanjanje fosfora. U usporedbi s konvencionalnim EBPR procesom koji se provodi u anaerobno-aerobnim uvjetima, nitrat se može koristiti kao akceptor elektrona umjesto kisika za istovremeno uklanjanje fosfora i denitrifikaciju u anaerobno-anoksičnim uvjetima. Ovaj pristup omogućuje uštedu aeracije (30%), smanjenje proizvodnje

mulja (50%) i smanjenje potrebe za izvorima ugljika (50%) (Jiang i sur.,2010). Strategija obogaćivanja mulja PAOs i DPAOs vrstama u pokusima Haiming i sur (2014) temeljila se na odabiru anaerobno-aerobnih i anaerobno-anoksičnih uvjeta zbog saznanja da DPAOs koristi kisik kao akceptor elektrona za aerobni unos fosfata, ali i nitrat za anoksični unos fosfora, dok PAOs koristi samo kisik. Pri niskoj temperaturi odabranoj u pokusima (8-11 °C) veću aktivnost pokazuju PAOs vrste u odnosu na DPAOs što se pripisuje činjenice da je energija generirana oksidativnom fosforilacijom s  $\text{NO}_3\text{-N}$  približno 40% manja nego s  $\text{O}_2$ . Rezultati sugeriraju da DPAOs mogu lako proizvesti enzime slične onima za anoksični metabolizam koji su potrebni za aerobni metabolizam, dok PAOs nemaju enzime potrebne za anoksični metabolizam i korištenje nitrata umjesto kisika kao akceptora elektrona. FISH analiza pokazala je udio *Accumulibacter* od 61,6% u A-O i 79,3% u A-A reaktorima.

U aktivnom mulju P je prisutan u tri oblika (Janssen i sur., 2002):

(i) biološki P (bio-P) – neophodan za rast i metabolizam mikroorganizama, a prema Janssen i sur. (2002) u aktivnom mulju je omjer P/TSS 1-2% što pokazuje da je iskorištenje P za rast i metabolizam mikroorganizama ograničeno. Također, bio-P u aktivnom mulju je povezan s koncentracijom KPK, i u istraživanjima je pokazano da je za uobičajeni rast i metabolizam potrebno osigurati omjer KPK/P 200 (Janssen i sur. (2002).

(ii) metalni sedimenti P –  $\text{PO}_4\text{-P}$  može formirati metalne sedimente, poput:  $\text{MgHPO}_4$ ,  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  i druge, ako su u otpadnoj vodi prisutni metalni ioni poput  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i drugo, u fizikalno-kemijskim procesima pri  $\text{pH} > 7,5$  (Janssen i sur. 2002).

(iii) poli-P – ortofosfat u volutinskim zrnima unutarstanično pohranjen

Istraživanja su pokazala da se u anoksičnim uvjetima događa kompeticija za supstrate između denitrificirajućih bakterija i PAOs, što može rezultirati neto otpuštanjem fosfora umjesto unosa u anoksičnim zonama (Barker i Dold, 1996).

Uspješan EBPR proces zahtijeva obogaćivanje aktivnog mulja PAOs vrstama kroz izmjenu anaerobnih i aerobnih/anoksičnih uvjeta. Tijekom anaerobne faze, PAOs asimilira VFA u PHA unutar stanica energijom dobivenom hidrolizom unutarstaničnog poli-P, što dovodi do oslobađanja ortofosfata u okoliš. Unutarstanični glikogen se prevodi u PHA, energijom iz razgradnje pohranjenih polifosfata. Koncentracija PHA unutar PAOs raste, dok se sadržaj glikogena i polifosfata smanjuje. U sljedećoj aerobnoj/anoksičnoj fazi, PAOs oksidira pohranjeni PHA i proizvodi energiju i C za sintezu novih stanica, istovremeno sintetizirajući

glikogen (Winkler i sur., 2011). Oslobođena energija koristi se za sintezu polifosfatnih veza unutar stanica. Ortofosfat se uklanja iz otpadne vode i ugrađuje u mikrobne stanice kao poli-P. PAOs obično pohranjuju više poli-P-a u aerobnoj/anoksičnoj fazi nego što su ga oslobodili tijekom anaerobne faze (Li i sur., 2015). Pohranjeni poli-P uklanja se iz sustava obrade zajedno s uklonjenim muljem.

Prilagodba uvjeta procesa PAOs metabolizmu (anaerobno-aerobni uvjeti, optimalni pH i DO) omogućava akumuliranje PAOs vrsti u reaktoru. Jedan od faktora koji utječe na sposobnost uklanjanja P pomoću PAOs je utjecaj ekstracelularnih polimernih tvari (engl. *Extracellular Polymeric Substances*, EPS). EPS su biopolimeri gelaste strukture koje proizvode mikroorganizmi, a sastoje se od polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina, PHA, glikogena i polifosfata (Zang i sur., 2024). Nisu svi PAOs sposobni spontano izlučivati EPS, ali EPS ima ključan utjecaj na EBPR proces jer je pokazano da sadrži približno 30,0 % ukupnog fosfora u aktivnom mulju te istovremeno doprinosi brzini uklanjanja fosfora tijekom aerobnih procesa (Sheng i sur., 2010). U aktivnom mulju PAOs su okruženi EPS, a izmjena tvari između PAOs i vodenog medija tijekom biološkog procesa uklanjanja fosfora odvija se kroz EPS matricu (More i sur., 2014).

Mehanizam uklanjanja N i P pomoću DPAOs razlikuje se od tradicionalnog biološkog uklanjanja N i P. Denitrifikacijska defosfatacija temelji se na metaboličkoj funkciji DPAOs i može se primijeniti za pročišćavanje otpadnih voda niskog omjera C/N, jer može prevladati problem kompeticije izvora ugljika i proturječnosti starosti mulja u tradicionalnim biološkim procesima uklanjanja N i P.

Tradicionalno biološko uklanjanje N i P postiže se različitim funkcionalnim mikroorganizmi u anaerobnim/anoksičnim/aerobnim uvjetima koji zahtijevaju različite optimalne uvjete (temperatura, SRT, pH, DO) za rast i funkcioniranje, te pokazuju kompetitivne karakteristike (He i McMahon, 2011). Nitrifikanti su dominantni pri dugom SRT, koji ne pogoduje PAOs za uklanjanje P što predstavlja izazov za istovremeno uklanjanje N i P. Denitrifikantima i PAOs potreban je izvor C za rast i aktivnost stoga dolazi do kompeticije među mikroorganizmima. U anaerobnom/anoksičnom/aerobnom sustavu, PAOs preferirano koriste izvor C, što rezultira njegovim nedostatkom za denitrifikante u provedbi uklanjanja N u anoksičnom dijelu (Shi et al., 2012). Nepotpuna denitrifikacija dovodi do recikliranja  $\text{NO}_3\text{-N}$  povratnim muljem u anaerobni dio procesa. DPAOs s  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  kao akceptorima elektrona omogućavaju istovremeno uklanjanje N i P. Mikroorganizmi koji imaju tu sposobnost spadaju u rodove *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* i *Arthrobacter*. DPAOs zahtijevaju

aerobne uvjete za nitrifikaciju amonijaka. DPR proces kombinira dva procesa uklanjanja P i denitrifikacije, čime se postiže „dvostruka namjena jednog ugljika” i čuvaju se izvori ugljika (Liu et al., 2017; Wang et al., 2016b). Obzirom na niske C/N omjere u komunalnoj otpadnoj vodi „dvostruka namjena“ rješava problem nedovoljne količine ugljika.

Aktivni mulj obogaćen PAOs/DPAOs uporabljen je u provedbi pokusa disertacije s ciljem da se istraži uklanjanje C, N i P iz otpadne vode u anoksično-aerobnom procesu i anaerobno-aerobno-anoksičnom vođenju procesa uz endogenu denitrifikaciju.

### 5.2.1. Istovremeno uklanjanje C, N i P s aktivnim muljem obogaćenim PAOs

Različiti zahtjevi za koncentracijom otopljenog kisika i konkurencija za organski supstrat među različitim funkcionalnim mikroorganizmima predstavljaju značajan izazov u postizanju maksimalne učinkovitosti istovremenog uklanjanja ugljika, dušika i fosfora u postrojenjima za obradu otpadnih voda.

SBR reaktor, zbog fleksibilnosti rada pri različitim procesnim parametrima, pokazuje veliku učinkovitost, te je optimizacija ključnih parametara poput DO, pH, SRT, HRT, MLSS, C/N važna za učinkovito uklanjanje N i P. Nizak omjer biorazgradivog organskog supstrata i dušika i fosfora predstavlja ograničavajući faktor u biološkom uklanjanju dušika. Budući da denitrificirajuće bakterije konkuriraju za izvore ugljika s drugim heterotrofima, nizak omjer ugljika i dušika u ulaznoj vodi dovodi do brzog nedostatka ugljika, što uzrokuje manju učinkovitost istodobne nitrifikacije i denitrifikacije (Ghehi i sur., 2014). Acetat je preferirani izvor ugljika za uklanjanje P pomoću PAOs koji ga skladište u obliku PHB u stanicama.

Brojna istraživanja bavila su se uklanjanjem nutrijenata iz otpadnih voda primjenom SBR tehnologije. Chang i sur. (2000) proveli su uklanjanje nutrijenata u SBR sustavu malog mjerila. Maksimalno uklanjanje dušika i fosfata postignuto je s omjerom faza od 1/3/2 sata za anaerobnu/aerobnu/anoksičnu fazu. Su i sur. (2023) pokazali su da omjer C/N ima važnu ulogu u uklanjanju N i P u SBR reaktoru s granuliranim muljem. Veći utjecaj uočen je na učinkovitost uklanjanja N u odnosu na uklanjanje C i P. Kompaktna struktura granula primijećena je pri C/N 10 koji je pogodovao obogaćivanju AOB, NOB i PAOs vrsti za simultano uklanjanje N i P. Wang i sur. (2015, 2016) provodili su istraživanja pri DO 1 mg/L i KPK/N 4 te ukazali na nezadovoljavajuće učinke uklanjanja TN i TP pri odabranim uvjetima. Za postizanje učinkovitog procesa nužno je bilo dodavanje vanjskog izvora C i/ili dodatak post-denitrifikacijske faze. Slične rezultate dobili su i Zheng i sur. (2009) koji su povećanjem KPK/N

omjera s 6 na 15 dodatkom acetata ili fermentiranog izvora C postigli uspješnu simultanu nitrifikaciju-endogenu denitrifikaciju i uklanjanje fosfora (engl. Simultaneous Nitrification-Endogenous Denitrification and Phosphorous Removal, SNDPR).

Provedeni su pokusi u anoksično-aerobnim uvjetima pri N/P 1 s 30 mg PO<sub>4</sub>-P/L i 30 mg NH<sub>4</sub>-N/L pri različitim C/P omjerima (1, 3, 5, 7 i 10), a izostanak anaerobne faze pojednostavljuje proces. Količina uklonjenog KPK u anoksičnom dijelu provedenih pokusa raste povećanjem C/P i najveća je u pokusu pri C/P 10 u kojem iznosi 130 mg KPK/L. Tijekom 2 sata anoksičnog dijela procesa PAOs vrste unose organske sastojke (u obliku dodanog natrijevog acetata) u stanice i pohranjuju ih. U aerobnim uvjetima pokusa došlo je do istovremenog uklanjanja C (u pokusima u kojima je preostalo KPK nakon anoksične faze, C/P ≥ 3), N i P (slika 22-26). Intenzivno smanjenje DO vrijednosti na početku aerobnog dijela svih pokusa odraz je unosa P u stanice PAOs. Tek nakon usporavanja aktivnosti PAOs dolazi do intenzivnije aktivnosti ostalih skupina mikroorganizama (OHOs, nitrificirajuće i denitrificirajuće vrste). U pokusima pri C/P 1, 3 i 5 pH raste na početku aerobnog dijela procesa zbog oksidacije organskih sastojaka, a nakon potpune oksidacije KPK dolazi do pada pH zbog oksidacije NH<sub>4</sub>-N i nakupljanja NO<sub>x</sub>-N. U ostalim pokusima (C/P 7 i 10) ne dolazi do pada pH vrijednosti zbog oksidacije NH<sub>4</sub>-N i nakupljanja NO<sub>x</sub>-N iz razloga viška KPK koji nije oksidiran u anoksičnoj fazi.

Provedeni pokusi rezultirali su istovremenim uklanjanjem C, N i P u anoksično-aerobnim uvjetima. U provedenim pokusima, u aerobnim uvjetima PAOs vrste su bile dominantne po aktivnosti, potom OHO vrste koje su uklanjale KPK, a tek potom NI/DNI vrste koje su provodile uklanjanje N, a svima im je potreban kisik za aktivnost što dovodi do kompeticije među mikroorganizmima. Pri anoksičnim uvjetima dolazi do smanjenja koncentracije KPK kao rezultat aktivnosti PAOs vrsti, bez otpuštanja PO<sub>4</sub>-P zbog inhibitornog djelovanja prisutnog NO<sub>3</sub>-N. OHO, nitrificirajuće i denitrificirajuće vrste u aerobnim uvjetima pokazuju manju aktivnost od PAOs vrsti i provode istovremenu nitrifikaciju i denitrifikaciju (nitrificirajuće i denitrificirajuće vrste) te uklanjanje preostalog KPK (OHOs). Povećanjem C/P s 1 na 10 raste unos C i P u anoksičnom odnosno aerobnom dijelu procesa. Najučinkovitije uklanjanje PO<sub>4</sub>-P iznosilo je 13,8 mg P/Lh.

U svim pokusima po bilanci dušika nedostaje N (22% pri C/P 10) , što se pripisuje kompeticiji za raspoloživim DO između OHOs, PAOs i NI/DNI vrsta. U aerobnim uvjetima provodi se oksidacija KPK ukoliko ga je preostalo nakon anoksične faze. Heterotrofni organizmi imaju veći afinitet za otopljeni kisik u odnosu na autotrofe, te dolazi do intenzivnog

uklanjanja KPK tijekom prvih 15-30 minuta aerobnog procesa, ovisno o koncentraciji KPK preostaloj nakon anoksične faze. Tijekom tog perioda, istovremeno se odvija i oksidacija  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Nakupljanje  $\text{NO}_2\text{-N}$  kao rezultat nitrifikacije inhibira PAOs i smanjuje brzinu unosa P.  $\text{NO}_x\text{-N}$  dobiveni oksidacijom  $\text{NH}_4\text{-N}$  nisu prisutni u ekvivalentnoj količini (slika 28), te u svim pokusima nedostaje oko 10 mg  $\text{NO}_x\text{-N/L}$  što ukazuje na aerobnu denitrifikaciju.

Tijekom anoksičnog dijela procesa natrijev acetat unesen je u PAOs u obliku PHB, ali nije došlo do otpuštanja  $\text{PO}_4\text{-P}$  što se pripisuje inhibicijskom djelovanju  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Iz bilance P, neto unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  pri C/P 1 i 10 iznosi 3,61 i 4,86 mg $\text{PO}_4\text{-P/gVSS}$ . Pri većem omjeru C/P bolji je unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  u aerobnom dijelu kao i najbolje iskorištenje KPK u anoksičnom dijelu.

U AOA-SBR sustavu u pokusima Liu i sur. (2020) istražen je utjecaj sedam različitih duljina trajanja ciklusa na učinkovitost uklanjanja C, N i P. Prosječna učinkovitost uklanjanja KPK kretala se od 87,79% do 94,07%, pri čemu su najniže i najviše vrijednosti zabilježene pri trajanju ciklusa od 12 i 6 sati. Skraćivanje ciklusa na 4 sata dovelo je do smanjenja učinkovitosti uklanjanja KPK, što ukazuje da su i predugačka i prekratka duljina trajanja ciklusa nepovoljna za učinkovitost uklanjanja KPK u AOA-SBR sustavu. Prethodna istraživanja su izvijestila o maksimalnim učinkovitostima uklanjanja KPK od 85% i 88% pri vremenu ciklusa od 12 sati u reaktorima s pokretnim slojem biofilma (engl. Moving Bed Biofilm Reactor, MBBR) sustavima (Zinatizadeh i Ghaytooli, 2015). Prosječna učinkovitost uklanjanja ukupnog fosfora (TP) kretala se od 75,53% do 99,68%. Dodavanje ugljika rezultiralo je smanjenjem učinkovitosti uklanjanja TP. Uočeno je da prekratko vrijeme trajanja ciklusa smanjuje učinkovitost uklanjanja TP. Učinkovitosti uklanjanja  $\text{NH}_4\text{-N}$  u AOA-SBR sustavu varirale su tijekom različitih razdoblja. Prosječne učinkovitosti bile su visoke (>99%) u razdobljima T1 do T5, ali su pale na 72,97% u razdoblju T6, posebno pri vremenu ciklusa od 4 sata. Ovo smanjenje pripisano je nedostatku nitrifikacije tijekom skraćene aerobne faze. Učinkovitosti uklanjanja ukupnog dušika (TN) bile su značajno pod utjecajem vremena ciklusa. Skraćivanje vremena ciklusa s 12 sati na 8 sati dovelo je do blagog smanjenja učinkovitosti uklanjanja TN zbog smanjene denitrifikacije. Dodavanje ugljika u anoksičnoj fazi poboljšalo je denitrifikaciju, što je povećalo učinkovitost uklanjanja TN. Dodatno skraćivanje aerobne faze rezultira naglim povećanjem koncentracije  $\text{NO}_2\text{-N}$  u efluentu i smanjenjem stope uklanjanja  $\text{NO}_2\text{-N}$  u anoksičnoj fazi, što ukazuje na akumulaciju nitrita zbog nedovoljnog vremena aerobne reakcije i koncentracije otopljenog kisika (DO). Međutim, stopa proizvodnje  $\text{NO}_3\text{-N}$  u aerobnoj fazi se povećala, što sugerira da akumulirani nitrit nije inhibirao aktivnost bakterija koje oksidiraju nitrite (NOB). Općenito, promjene u vremenu trajanja ciklusa ili hidrauličkom zadržavanju

(HRT) utjecale su na učinkovitost uklanjanja dušika u AOA-SBR sustavu, naglašavajući važnost različitih anaerobnih, aerobnih i anoksičnih faza za postizanje učinkovite denitrifikacije i uklanjanja nutrijenata. Najbolji rezultati uklanjanja KPK, TN i TP postignuti su pri trajanju ciklusa od 6 sati. Analiza mikrobne zajednice pokazala je da su bakterije iz razreda *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* i *Candidatus Saccharibacteria* na razini koljena, te *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Sphingobacteriia*, *Deltaproteobacteria* i *Alphaproteobacteria* na razini razreda, pozitivno utjecale na učinkovitost AOA-SBR sustava.

Li i sur. (2019) istraživali su učinak niske temperature na istovremeno uklanjanje N i P u SBR reaktoru i postigli učinkovitosti uklanjanja TN i TP od 91,2% i 96,8%. U anaerobnoj fazi, rezidualni nitrat iz prethodnog ciklusa brzo se reducirao zbog ograničenih elektron donora u ulaznoj vodi, dok su koncentracije amonijaka ostale relativno stabilne. U aerobnoj fazi, amonijak se postupno smanjivao, bez akumulacije nitrita ili nitrata tijekom prva tri sata, što ukazuje na istovremenu nitrifikaciju i denitrifikaciju (SND). Tijekom anaerobnog razdoblja, koncentracije fosfata su porasle s  $5 \text{ mg L}^{-1}$  na vrhunac od  $60 \text{ mg L}^{-1}$ , što ukazuje na oslobađanje fosfora od strane PAOs. Omjer oslobađanja fosfora prema unosu KPK ukazivao je na dominaciju PAOs nad GAOs u sustavu. Nadalje, prisutnost DPAOs koji pohranjuju izvore ugljika u anoksičnim uvjetima ukazuje na denitrifikacijsko uklanjanje fosfora, potencijalno smanjujući potrebe za aeracijom u tradicionalnim anaerobnim/anoksičnim uvjetima. Iscrpljivanje P prije SND i odsutnost akumulacije nitrita ili nitrata sugerirali su simultano uklanjanje P i SND pri niskim koncentracijama DO. Procijenjeno je da anoksični unos P doprinosi 40% ukupnog uklonjenog P u ciklusu, što ukazuje na značajnu ulogu PAOs u provođenju denitrifikacije korištenjem nakupljenog PHA. Simultana nitrifikacija i denitrificirajuće uklanjanje fosfora istraženo je u SBR reaktoru pri niskoj koncentraciji DO i uz limitirane izvore C (Zaman i sur., 2020). Proces je uključivao produženo anaerobno razdoblje (180 minuta) nakon kojeg je slijedila faza simultane nitrifikacije i denitrifikacije fosfora pri niskim koncentracijama otopljenog kisika (DO) ( $0,3 \pm 0,05 \text{ mg/L}$ ). Pri KPK/N 5–10 i bez dodatka hlapljivih masnih kiselina (VFA), sustav je postigao visoke učinkovitosti uklanjanja dušika (N) i fosfora (P). Niske koncentracije DO tijekom aerobne faze pogodovale su denitrificirajućem uklanjanju fosfora bez značajne akumulacije nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) i nitrita ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) sve dok sav endogeni ugljik nije bio potrošen. DPAOs su igrali ključnu ulogu u simultanoj denitrifikaciji i uklanjanju fosfora, pri čemu je aerobno i anoksično uklanjanje P činilo otprilike 55% i 45% ukupnog uklanjanja fosfora. Pokazano je da su DPAOs imali konkurentsku prednost nad NOB u potrošnji nitrita pri niskim koncentracijama DO. Proces se pokazao učinkovitim u



pogledu uklanjanja ugljika. U usporedbi s tradicionalnim EBPR sustavima u kombinaciji s egzogenom denitrifikacijom, ovaj proces je smanjio potrebu za ugljikom i kisikom za kombinirano uklanjanje N i P iz komunalnih otpadnih voda za otprilike 45% i 35%.

### **5.3. Aktivnost DPAOs i DGAOs u uklanjanju N i P iz otpadne vode niskoga omjera C/N u A-O-A procesu uz endogenu denitrifikaciju**

Izazov uklanjanja N i P iz otpadnih voda niskoga C/N omjera leži u osiguravanju aktivnosti funkcionalnih mikroorganizama regulacijom procesnih parametara kako bi se očuvala konkurentnost mikrobnih skupina PAO-a, DPAO-a, GAO-a, DGAO-a, bakterija za AOB i NOB. Istovremena NI, DNI, uklanjanje P i ED omogućuju uklanjanje N i P uz malu potrošnju ugljika i energije, a ovise o:

- (i) funkcionalnim mikroorganizmima (nitrifikanti, denitrifikanti, PAOs, DPAOs, GAOs i DGAOs),
- (ii) trajanju anaerobne faze koja omogućava unutarstaničnu pohranu ugljika i izvore ugljika za unos fosfora i denitrifikaciju i
- (iii) trajanju aerobne faze i koncentraciji DO kako bi se osigurala nitrifikacija, denitrifikacija, unos fosfora i endogena denitrifikacija.

Koegzistencija DPAOs i DGAOs vrsti omogućava istovremeno uklanjanje N i P procesom simultane nitrifikacije, denitrifikacije i uklanjanja fosfora. DPAOs tijekom anaerobne faze pohranjuje organske tvari u stanicu u obliku PHA, istovremeno ispuštajući unutarstanični P u vodeni medij. U aerobnim uvjetima amonijak se oksidira u nitrite ili nitrata pomoću AOB vrsti, dok DPAOs unosi P u stanice. U anaerobnoj i aerobnoj fazi, DGAOs ispoljavaju sličan metabolizam kao DPAOs, ali bez akumulacije polifosfata (Wang i sur., 2020). Međutim, kompeticija za DO između PAOs, GAOs, AOB i NOB u aerobnoj fazi smanjuje oksidaciju amonijaka i doprinos endogene denitrifikacije (Wang i sur., 2015), te je optimizacija trajanja aerobne faze i koncentracije otopljenog kisika nužna za uspješan proces uklanjanja C, N i P. Sun i sur. (2020) pokazali su da uvođenje anoksičnih uvjeta u proces predstavlja strategiju za poboljšanje učinkovitosti uklanjanja N i P u sustavima za obradu otpadnih voda. Zaman i sur. (2021) su pokazali da DPAOs imaju ključnu ulogu u simultanoj denitrifikaciji i uklanjanju fosfora pri niskim koncentracijama otopljenog kisika ( $DO\ 0,3 \pm 0,05\ \text{mg/L}$ ) u otpadnim vodama s ograničenim izvorom ugljika. Brojna istraživanja u laboratorijskim SBR reaktorima pokazala

su sinergijski učinak PAOs, DPAOs i DGAOs na uklanjanje N i P (Ji i sur., 2020; Lu i sur., 2022). Ravnoteža između DPAOs i DGAOs omogućuje provođenje denitrifikacijskog uklanjanja fosfora i endogene denitrifikacije za uspješno uklanjanje C, N i P. Lin i sur. (2022) pokazali su da aktivnost DGAOs doprinosi uklanjanju dušika, bez negativnog utjecaja na uklanjanje fosfora.

Za ispoljavanje aktivnosti konkurentnih funkcionalnih mikroorganizama nužno je osigurati dovoljno dugu anaerobnu fazu kako bi PAOs/DPAOs i DGAOs mogli unutarstanično pohraniti ugljik. Aerobna faza ne smije biti preduga kako ne bi došlo do prekomjerne potrošnje PHA čim se smanjuje njegova dostupnost za korištenje u endogenoj denitrifikaciji. Važna je i duljinja trajanja post-anoksične faze jer je endogena denitrifikacija sporiji proces u odnosu na heterotrofnu denitrifikaciju (Zhao i sur., 2018; Gao i sur., 2022). Istraženi su utjecaji različite koncentracije DO ( $\sim 1$  mg/L i  $\geq 2$  mg/L) na učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora iz otpadnih voda s niskim C/N omjerom u anaerobnom/oksidacijskom/anoksičnom (A-O-A) procesu s endogenom denitrifikacijom.

Prosječno uklanjanje KPK u A-O-A procesu pri DO  $\geq 2$  mg/L iznosilo je 91,6%, a pri DO  $\sim 1$  mg/L 91,8% (slika 30). Tijekom anaerobne faze dolazi do kompeticije između DPAOs i DGAOs za izvore ugljika, kao i OHOs u slučaju prisutnosti nitrata/nitrita. Važnost duljine trajanja anaerobne faze za unutarstanični unos PHA istraživana je u radovima Wang i sur. (2015) i Zhao i sur. (2018), gdje su istražene duljine trajanja od 3 i 3,1 sat. Odabrana duljina trajanja anaerobne faze od 2 sata omogućila je skladištenje ugljika u obliku PHA u DPAOs i DGAOs vrstama, koji se koristi za uklanjanje N i P u aerobnoj fazi i poboljšano uklanjanje  $\text{NO}_x\text{-N}$  endogenom denitrifikacijom. Pri odabranim DO vrijednostima omogućena je potpuna oksidacija amonijaka bez nakupljanja nitrata. U provedenim pokusima koncentracija DO  $\sim 1$  mg/L pokazala se povoljnijim odabirom za uklanjanje N uz prosječnu učinkovitost uklanjanja TN od 95,3 % i prosječnu koncentraciju TN u efluentu od 1,5 mg TN/L od DO  $\geq 2$  mg/L s prosječnom učinkovitošću uklanjanja TN 76,6 %, i prosječnom koncentracijom TN u efluentu od 8,2 mg TN/L (slika 30). Dobiveni rezultati u suglasju su s drugim autorima koji su pokazali da smanjenje koncentracije DO u aerobnoj fazi procesa doprinosi uklanjanju N (Wang i sur., 2015; Wang i sur., 2016; Zhao i sur., 2018). Učinkovitije uklanjanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  postiže se pri DO  $\geq 2$  mg/L u usporedbi s DO  $\sim 1$  mg/L, a pri obje vrijednosti koncentracija  $\text{PO}_4\text{-P}$  u efluentu iznosila je  $< 0,5$  mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  što je u suglasju s Zhao i sur. (2018) koji su postigli koncentraciju  $\text{PO}_4\text{-P}$  u efluentu  $\leq 0,2$  mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ , Wang i sur. (2015) koji su postigli 0,2 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  i Wang i sur. (2016) s 0,4 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ .

Šaržni pokusi na dane 21 i 24 (slika 31 i 32) provedeni su s ciljem produblivanja saznanja o mikrobnim procesima u svakoj od A-O-A faza. Pokus 21. dana vođen je uz  $DO \geq 2$  mg/L pri čemu je u anaerobnoj fazi došlo do potpunog uklanjanja KPK. Manji dio KPK utrošen je za denitrifikaciju  $NO_2-N$  i/ili  $NO_3-N$  iz povrata, a ostatak je unesen unutarstanično i korišten za sintezu PHA. Većina PHA utrošena je tijekom aerobne faze, a ostatak je korišten u anoksičnom dijelu endogenom denitrifikacijom. Razlog niže učinkovitosti uklanjanja TN pri  $DO \geq 2$  mg/L može se pripisati izraženijoj degradaciji PHA tijekom aerobne faze u odnosu na  $DO \sim 1$  mg/L (19 mmol C/L u odnosu na 15,4 mmol C/L). Proizvodnja PHA potvrđuje aktivnost DPAOs i DGAOs (Zhao i sur., 2018; Xiang i sur., 2024). Tijekom anaerobne faze došlo je do zanemarivog smanjenja koncentracije  $NH_4-N$ , dok je potpuna oksidacija zabilježena u aerobnoj fazi uz brzinu oksidacije od 11,2 mg  $NH_4-N/L$  pri  $DO \geq 2$  mg/L koja se pokazala povoljnom za oksidaciju bez inhibicije aktivnosti AOB i NOB. SND u aerobnoj fazi rezultirao je gubitkom dušika od 43%. Kao donor elektrona za redukciju nitrata i nitrita korišten je unutarstanično pohranjeni PHA obzirom na nedostatak organskih spojeva utrošenih tijekom anaerobne faze. Brzina oksidacije amonijaka pri  $DO \sim 1$  mg/L (24. dan) iznosila je 9,4 mg  $NH_4-N/L$  uz gubitak N od 71% na kraju aerobne faze. Viša koncentracija nitrita u odnosu na nitrate potvrđuje tezu o tome da  $DO \sim 1$  mg/L pogoduje nitritaciji. Također, pogoduje SND jer više koncentracije DO inhibiraju reduktaze nužne za proces denitrifikacije i denitrifikanti koriste DO kao akceptore elektrona umjesto  $NO_2-N$  i  $NO_3-N$ . Unutarstanično pohranjeni PHA korišten je za denitrifikaciju  $NO_2-N$  i  $NO_3-N$ . Endogena denitrifikacija uz PHA kao elektron donore doprinijela je uklanjanju N u anoksičnoj fazi. Pri  $DO \geq 2$  mg/L došlo je do 73% gubitka N, dok je pri  $DO \sim 1$  mg/L gubitak iznosio 97%. Nedavna istraživanja su pokazala da se uspješnost endogene denitrifikacije može poboljšati (Ding i sur., 2022; Feng i sur., 2022; Gong i sur., 2023): (i) dugom anaerobnom fazom koja omogućava unutarstanični unos C u GAOs ili (ii) povećanjem koncentracije biomase. Neovisno o odabranoj koncentraciji DO, u anaerobnim uvjetima dolazi do otpuštanja  $PO_4-P$ , povezano s unosom acetata u stanice i sintetiziranjem PHA. U aerobnoj fazi postignuto je gotovo potpuno uklanjanje  $PO_4-P$  uz brzinu unosa 9 mg  $PO_4-P/Lh$  pri  $DO \geq 2$  mg/L i 9,4 mg  $PO_4-P/Lh$  pri  $DO \sim 1$  mg/L. Unos  $PO_4-P$  u stanice u anoksičnim uvjetima niži je od unosa u aerobnim uvjetima jer je učinkovitost proizvodnje energije s nitratima kao akceptorima elektrona oko 40 % manja u usporedbi s otopljenim kisikom kao akceptorom elektrona (Kuba i sur., 1996). Moguće je da je DO unutar flokule bio nizak zbog ograničenja difuzije, što je omogućilo da DPAOs koriste nitrate i nitrite kao akceptore elektrona uz degradaciju PHA što je pridonijelo uklanjanju N.

U A/O/A procesu s endogenom denitrifikacijom (pri DO 1 mg/L u aerobnoj fazi), uz trajanje anaerobne faze od 150 minuta, aerobne faze od 180 minuta i anoksične faze od 120 minuta, postignute su sljedeće učinkovitosti uklanjanja pri obradi otpadnih voda s niskim C/N omjerom ( $\leq 4$ ): 80,9 % za KPK, 96,6 % za  $\text{NH}_4\text{-N}$ , 77,2 % za TN, 95,1 % za  $\text{PO}_4\text{-P}$ , 46,7 % za SND (Wang i sur., 2016). U A/O procesu (pri DO  $1 \pm 0,3$  mg/L u aerobnoj fazi), uz trajanje anaerobne faze od 180 minuta i kratke aerobne faze od 150 minuta, pri obradi otpadnih voda s niskim C/N omjerom ( $\leq 3,5$ ), postignute su sljedeće učinkovitosti: 77,7 % za TN i 49,3 % za SND uz koncentraciju fosfora u efluentu: 0,2 mg/L (Wang i sur., 2015). U A/O/A procesu s endogenom denitrifikacijom (pri DO 1-2 mg/L u aerobnoj fazi), uz trajanje anaerobne faze od 3,1 sat, aerobne faze od 3,9 sati i duge anoksične faze od 7 sati, pri obradi otpadnih voda s niskim C/N omjerom (4,4), postignute su sljedeće učinkovitosti: 92,15 % za TN i 92,67 % za  $\text{PO}_4\text{-P}$  (Zhao i sur., 2018).

#### **5.4. Mikroorganizmi u aktivnom mulju – FISH analiza**

FISH analizom, molekularnom tehnikom koja povezuje strukturu mikrobne zajednice s funkcijom identificiranjem i kvantificiranjem populacija sa specifičnim metaboličkim značajkama (FISH, 2009), dokazani su, vizualizirani i dokumentirani, mikrobni klasteri funkcionalnih organizama za uklanjanje C, N i P, i to: mikrobni klasteri odgovorni za odvijanje procesa nitrifikacije – AOB i NOB (Slike 33 i 34), denitrifikacije – denitrifikanti (Slika 35), biološkog uklanjanja fosfata – PAOs i DPAOs (Slika 36), kao i glikogen akumulirajuće vrste – GAOs (Slika 37).

FISH analiza s rRNA-ciljanim probama je vrlo moćan alat i metoda izbora za detekciju i identifikaciju mikroorganizama u aktivnom mulju i biofilmu, neovisna o uzgoju iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. FISH analizom omogućena je izravna vizualnost i aktivno praćenje brojnosti i dinamike ciljane populacije u mulju.

Mikrobna raznolikost i funkcionalnost, kao i razumijevanje metaboličkih mehanizama procesa uklanjanja C, N i P ovisi o brojnim čimbenicima, poput: koncentracija otopljenog kisika, temperatura, pH, raspoloživi organski sastojci kao donori elektrona, raspoloživi akseptori elektrona, koncentracija mikrobne biomase, režim rada sustava (Dai i sur., 2022; Acevedo i sur., 2017; Lv i sur., 2014).

Glavni razlozi za korištenje molekularno bioloških metoda u mnogim područjima mikrobne ekologije i inženjerstva okoliša, pa tako i u istraživanjima povezanim s

pročišćavanjem otpadnih voda, su detekcija mikroorganizama neovisna o uzgoju i in-situ kvantifikacija nekultiviranih mikroorganizama (FIHS, 2009).

## 6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata postignutih u disertaciji i uspoređenih i kritički komentiranih s recentnim relevantnim radovima iz područja tematike, mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. aktivni mulj s lokalnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda pokazuje aktivnost za uklanjanje C i N, dok je aktivnost za uklanjanje P mala
2. aktivni mulj nakon prilagodbe za uklanjanje N i P učinkovito provodi procese nitrifikacije i denitrifikacije
3. u aktivnom mulju nakon obogaćivanja s PAOs vrstama dokazani su poli-P – unutarstanično pohranjeni polimeri.
4. aktivni mulj u anoksično-aerobnom režimu rada pokazuje aktivnost za anoksični unos i pohranu organskih sastojaka tijekom dvosatnog vođenja anoksičnog procesa, te u slijednom aerobnom procesu aktivnost za daljnju oksidaciju preostalih organskih spojeva, potpunu oksidaciju  $\text{NH}_4\text{-N}$  te nakupljanje  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  iako ne u stehiometrijskoj vrijednosti, kao i aerobni unos P uz učinkovitost od 51,9% uklanjanja P.
5. u anaerobno-aerobno-anoksičnom režimu rada uz endogenu denitrifikaciju u anaerobnoj fazi procesa raspoloživi organski sastojci se unose u stanice i pohranjuju u obliku polihidroksialkanoata, uz zanemarivo smanjenje  $\text{NH}_4\text{-N}$ . U slijednoj aerobnoj fazi procesa pri  $\text{DO} \geq 2 \text{ mg/L}$  i  $\sim 1 \text{ mg/L}$  dolazi do potpune oksidacije  $\text{NH}_4\text{-N}$  i do gotovo potpunog unosa  $\text{PO}_4\text{-P}$  u stanice. U slijednoj anoksičnoj fazi procesa dolazi do daljnje redukcije  $\text{NO}_2\text{-N}/\text{NO}_3\text{-N}$  korištenjem unutarstanično pohranjenih izvora ugljika – endogena denitrifikacija, bez potrebe za dodavanjem vanjskog izvora ugljika uz 73 i 97% gubitka N pri  $\text{DO} \geq 2 \text{ mg/L}$  i  $\sim 1 \text{ mg/L}$ .  
Postignuto je uklanjanje fosfora od 78,5 % i dušika od 76,6 % (u A-O-A procesu pri  $\text{DO} \geq 2 \text{ mg/L}$ ), te uklanjanje fosfora od 77,9 % i dušika od 95,3 % (u A-O-A procesu pri  $\text{DO} \sim 1 \text{ mg/L}$ ).
6. FISH metodom dokazani su mikrobni klasteri amonijak oksidirajućih bakterija, nitrit oksidirajućih bakterija, fosfat akumulirajućih organizama, denitrificirajućih fosfat akumulirajućih organizama, glikogen akumulirajućih organizama i denitrificirajućih glikogen akumulirajućih organizama.

## 7. LITERATURA

Acevedo, B., Murgui, M., Borrás, L., Barat, R. (2017) New insights in the metabolic behavior of PAO under negligible poly-P reserves. *Chemical Engineering Journal*, **311**, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.073>

Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2001) Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 442-446. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80293-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80293-0)

Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2002) Characterization of denitrifying phosphate-accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Res.* **36**(2), 403–412. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00222-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00222-6)

Akin, B. S., Ugurlu, A. (2004) The effect of an anoxic zone on biological phosphorus removal by a sequential batch reactor. *Bioresour. Technol.* **94**(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.022>

Alisawi, H. A. O. (2020) Performance of wastewater treatment during variable temperature. *Appl. Water Sci.* **10**(4). <https://doi.org/10.1007/s13201-020-1171-x>

Amann, R.I. (1995) Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology*, **4**, 543–554. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00255.x>

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 1919–1925.

Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B., Srinath, E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **48**, 835–852.

Arbabi, M., Akbarzadeh, A., Khodabakhshi, A. (2012) Optimization of SBR system for enhanced biological phosphorus and nitrogen removal. *Int. J. Env. Health Eng.* **1**, 21-26. <https://doi.org/10.4103/2277-9183.105348>

Bai, X., McKnight, M. M., Neufeld, J. D., & Parker, W. J. (2023) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from municipal wastewater at low temperature. *Bioresour. Technol.*, **368**, 128261. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128261>

- Barnard, J. L. (2014) Biological Nutrient Removal: Where we have been, Where we are going? *Proceedings of the Water Environment Federation*, 2006(13), 1–25. <https://doi.org/10.2175/193864706783710578>
- Begmatov, S., Dorofeev, A. G., Kadnikov, V. V., et al. (2022) The structure of microbial communities of activated sludge of large-scale wastewater treatment plants in the city of Moscow. *Scientific Reports*, **12**, 3458. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07132-4>
- Begum, S.A., Batista, J.R. (2012) Microbial selection on enhanced biological phosphorus removal systems fed exclusively with glucose. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**(5), 2181–2193. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1024-3>
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., & Welander, T. (2008) Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology*, **99**(3), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.020>
- Bennett, E. M., Carpenter, S. R., Caraco, N. F. (2001) Human Impact on Erodeable Phosphorus and Eutrophication: A Global Perspective. *BioSci.* **51**(3), 227. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[02](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[02)
- Bernat, K., Kulikowska, D., Zielinska, M., Cydzik-Kwiatkowska, M. (2010) Nitrogen removal from wastewater with a low COD/N ratio at a low oxygen concentration. *Bioresource Technology*, **102**, 4913–4916.
- Beun, J. J., Paletta, F., Van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (2000) Stoichiometry and kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **67**(4), 379–389. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000220\)67:4<379::AID-BIT1>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000220)67:4<379::AID-BIT1>3.0.CO;2-2)
- Bickers, P. O., Bhamidimarri, R., Shepherd, J., Russell, J. (2003) Biological phosphorus removal from a phosphorus-rich dairy processing wastewater. *Water Sci. Technol.* **48**(8), 43–51. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0451>
- Bond, P.L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J., Blackall, L.L. (1999) Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and non-efficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(9), 4077–4084. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.9.4077-4084.1999>
- Broughton, A., Pratt, S., Shilton, A. (2008) Enhanced biological phosphorus removal for high-strength wastewater with a low rbCOD:P ratio. *Bioresour. Technol.* **99**(5), 1236–1241.



<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.013>

Budde, C. F. (2010) Production of polyhydroxyalkanoate copolymers from plant oil. PhD thesis, Massachusetts Institute of Technology.

Carrera, J., Sarrà, M., Lafuente, F. J., Vicent, T. (2001) Effect of Different Operational Parameters in the Enhanced Biological Phosphorus Removal Process. *Experimental Design and Results. Environ. Technol.* **22**(12), 1439–1446. <https://doi.org/10.1080/09593332208618181>

Carvalho, M., Oehmen, A., Carvalho, G., Eusébio, M., Reis, M. A. M. (2014) The impact of aeration on the competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Res.* **66**, 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.033>

Chang, H.N., Ra, K.M., Byung, G.P., Seong-Jin, L., Dong, W.C., Woo, G.L., Seok, L.S., Yong, H.A. (2000) Simulation of sequential batch reactor (SBR) operation for simultaneous removal of nitrogen and phosphorus. *Bioprocess Engineering*, **23**, 513–521.

Chen, Y., Li, H., Zhou, Q., Zhang, S., & Wang, X. (2020) Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal (SNDPR) at low atmospheric pressure. *Biochemical Engineering Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107621>

Chiu, Y.C., Chung, M.S. (2006) Determination of optimal COD/Nitrate ratio for biological denitrification. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **51**, 43–49.

Close, K., Marques, R., Carvalho, V.C.F., Freitas, E.B., Reis, M.A.M., Carvalho, G., Oehmen, A. (2021) The storage compounds associated with Tetrasphaera PAO metabolism and the relationship between diversity and P removal. *Water Res.* **204**, 117621. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117621>

Coats, E. R., Mockos, A., & Loge, F. J. (2011) Post-anoxic denitrification driven by PHA and glycogen within enhanced biological phosphorus removal. *Bioresource Technology*, **102**(2), 1019–1027. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.104>

Cokro, A. A., Law, Y., Williams, R. B. H., Cao, Y., Nielsen, P. H., Wuertz, S. (2017) Non-denitrifying polyphosphate accumulating organisms obviate requirement for anaerobic condition. *Water Res.* **111**, 393–403. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.006>

Comeau, Y., Hall, K. J., Hancock, R. E. W., & Oldham, W. K. (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.* **20**(12), 1511-1521. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(86\)90115-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90115-6)

- Copelli, S., Raboni, M., Urbini, G. (2015) Water Pollution: Biological Oxidation and Natural Control Techniques. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.11419-2>
- Crocetti, G.R., Banfield, J.F., Keller, J., Bond, P.L., Blackall, L.L. (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology*, **148**, 3353–3364.
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackall, L.L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 1175–1182.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielińska, M. (2016) Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32(4)**. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2012-9>
- Dai, H., Sun, Y., Wan, D., Abbasi, H.N., Guo, Z., Geng, H., Wang, X., Chen, Y. (2022) Simultaneous denitrification and phosphorus removal: A review on the functional strains and activated sludge processes. *Science of The Total Environment*, **835**, 155409. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155409>
- Daigger, G.T., Redmond, E., Downing, L. (2018) Enhanced settling in activated sludge: design and operation considerations. *Water Science and Technology*, **wst2018287**. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.287>
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*, **22**, 434–444.
- Dinçer, A.R., Kargi, F. (2000) Effects of operating parameters on performances of nitrification and denitrification processes. *Bioprocess Engineering*, **23(1)**, 75–80. <https://doi.org/10.1007/s004499900126>
- Ding, J., Gao, X., Peng, Y., Zhang, Q., Li, X., & Wang, S. (2022) Anaerobic duration optimization improves endogenous denitrification efficiency by glycogen-accumulating organisms enhancement. *Bioresource Technology*, **348**, 126730. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126730>
- Dircks, K., Henze, M., Van Loosdrecht, M. C. M., Mosbæk, H., Aspegren, H. (2001) Storage

and degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in activated sludge under aerobic conditions. *Water Res.* **35**(9), 2277–2285. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00511-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00511-X)

Dorofeev, A. G., Nikolaev, Y. A., Mardanov, A. V., Pimenov, N. V. (2020) Role of Phosphate-Accumulating Bacteria in Biological Phosphorus Removal from Wastewater. *Appl. Biochem. Microbiol.* **56**(1), 1–14. <https://doi.org/10.1134/S0003683820010056>

Du, S., Yu, D., Zhao, J., Wang, X., Bi, C., Zhen, J., Yuan, M. (2019) Achieving deep-level nutrient removal via combined denitrifying phosphorus removal and simultaneous partial nitrification-endogenous denitrification process in a single-sludge sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* **289**, 121690. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121690>

Dunlap, P., Martin, K., Stevens, G., Tooker, N., Barnard, J., Gu, A., Takacs, I., Shaw, A., Onnis-Hayden, A., & Li, Y. (2016) Rethinking EBPR: What do you do when the model will not fit real-world evidence? *5th IWA/WEF Wastewater Treatment Modeling Seminar*, Annecy, France, 2016, 39–62.

Eckenfelder, W. (1980) Principles of Water Quality Management, Springer Dordrecht.

Eikelboom, D.H., van Buijsen, H.J.J. (1983) *Microscopic Sludge Investigation Manual*, 2nd ed. Delft: TNO Research Institute for Environmental Hygiene.

Ersu, C. B., Ong, S. K., Arslankaya, E., Lee, Y. W. (2010) Impact of solids residence time on biological nutrient removal performance of membrane bioreactor. *Water Res.* **44**(10), 3192–3202. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.02.036>

Feng, Y., Luo, S., Zhang, Y., Wang, S., & Peng, Y. (2022) Enhanced nutrient removal from mainstream sewage via denitrifying dephosphatation, endogenous denitrification and anammox in a novel continuous flow process. *Bioresour. Technol.* **351**, 127003. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127003>

Fernando, E. Y., McIlroy, S. J., Nierychlo, M., Herbst, F. A., Petriglieri, F., Schmid, M. C., Wagner, M., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2019) Resolving the individual contribution of key microbial populations to enhanced biological phosphorus removal with Raman-FISH. *ISME Journal* **13**(8), 1933–1946. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0399-7>

Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., & Grady, C. P. L. (2001) A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen-accumulating organisms: Stoichiometry, kinetics, and the effect of pH. *Biotechnology and Bioengineering*, **76**(1), 17–31.

Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001a) 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. <https://doi.org/10.1002/bit.1023>

Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001b) Effects of pH on the Rates of Aerobic Metabolism of Phosphate-Accumulating and Glycogen-Accumulating Organisms. *Water Environ. Res.* **73**(2), 213–222. <https://doi.org/10.2175/106143001x139191>

Flowers, J.J., He, S., Yilmaz, S., Noguera, D.R., McMahon, K.D. (2009) Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different ‘Candidatus accumulibacter’ clades. *Environmental Microbiology Reports*, **1**, 583–588.

Freitas, F., Temudo, M., Reis, M. A. M. (2005) Microbial population response to changes of the operating conditions in a dynamic nutrient-removal sequencing batch reactor. *Bioproc. Biosyst. Eng.* **28**(3), 199–209. <https://doi.org/10.1007/s00449-005-0029-9>

Gao, R., Peng, Y., Li, J., Liu, Y., Deng, L., Li, W., & Kao, C. (2022) Mainstream partial denitrification-anammox (PD/A) for municipal sewage treatment from moderate to low temperature: Reactor performance and bacterial structure. *Science of The Total Environment*, **806**, 150267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150267>

Gao, X., Zhang, L., Wang, Z., & Ma, C. (2022) Balanced nitrogen and phosphorus efficient removal under carbon limitation in pilot-scale demonstration of a novel anaerobic/aerobic/anoxic process. *Water Research*. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118795>

Gao, X., Zhang, T., Wang, B., Xu, Z., Zhang, L., Peng, Y. (2020) Advanced nitrogen removal of low C/N ratio sewage in an anaerobic/aerobic/anoxic process through enhanced post-endogenous denitrification. *Chemosphere*, **252**, 126624. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126624>

Gao, Y., Peng, Y., Zhang, J., Wang, S., Guo, J., Ye, L. (2011) Biological sludge reduction and enhanced nutrient removal in a pilot-scale system with 2-step sludge alkaline fermentation and A2O process. *Bioresource Technology*, **102**, 4091–4097.

Ge, Y., Zhao, L., Zhang, R., Chen, J. (2013) Study of Phosphorus Removal Efficiency in Enhanced Biological Phosphorus Removal Process. *Proceedings of the 2nd International Conference on Green Communications and Networks 2012*. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 525–532. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-35419-9\\_61](https://doi.org/10.1007/978-3-642-35419-9_61)

Gebremariam, Y.S., Beutel, M.W., Christian, D., Hess, T.F. (2011) Research Advances and Challenges in the Microbiology of Enhanced Biological Phosphorus Removal—A Critical Review. *Water Environment Research*, **83**, 195–219.

Ginige, M. P., Kayaalp, A. S., Cheng, K. Y., Wylie, J., Kaksonen, A. H. (2013) Biological phosphorus and nitrogen removal in sequencing batch reactors: Effects of cycle length, dissolved oxygen concentration and influent particulate matter. *Water Sci. Technol.* **68**(5), 982–990. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.324>

Ginige, M.P., Keller, J., Blackall, L.L. (2005) Investigation of an Acetate-Fed Denitrifying Microbial Community by Stable Isotope Probing, Full-Cycle rRNA Analysis, and Fluorescent In Situ Hybridization-Microautoradiography. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 8683–8691.

Gong, B., Duan, K., Chen, S., & Wang, Y. (2023) Enhanced nutrients removal and microbial mechanisms in a pilot-scale anaerobic-oxic-anoxic (A/O/A) system: Synergistic roles of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms and endogenous denitrifiers. *Process Safety and Environmental Protection*, **179**, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2023.08.085>

Gong, B., Duan, K., Chen, S., & Wang, Y. (2023) Enhanced nutrients removal and microbial mechanisms in a pilot-scale anaerobic-oxic-anoxic (A/O/A) system: Synergistic roles of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms and endogenous denitrifiers. *Process Safety and Environmental Protection*, **179**, 47–56. Available at: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Gong, B., Zhang, K., Su, M., Yang, J., Peng, C., & Wang, Y. (2024) Efficient nitrogen and phosphorus removal performance and microbial community in a pilot-scale anaerobic/anoxic/oxic (AOA) system with long sludge retention time: Significant roles of endogenous carbon source. *Environmental Research*, **263**, 120164. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.120164>

Grabinska-Loniewska, A., Slomezynska, T., Kanska, Z. (1985) Denitrification studies with glycerol as a carbon source. *Water Research*, **19**, 1471–1477.

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**(7), 722–733. <https://doi.org/10.1002/bit.10868>

- Gumaelius, L. (1996) Potential biomarker for denitrification of wastewaters: Effect of process variables and cadmium toxicity. *Water Research*, **30**, 3025–3031.
- Guo, W., Ngo, H. H., Dharmawan, F., Palmer, C. G. (2010) Roles of polyurethane foam in aerobic moving and fixed bed bioreactors. *Bioresour. Technol.* **101**(5), 1435–1439. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.062>
- He, Q., Song, Q., Zhang, S., Zhang, W., Wang, H. (2018) Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sequencing batch reactor with mixed carbon sources: reactor performance, extracellular polymeric substances and microbial successions. *J. Chem. Eng.* **331**, 841-849. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.060>
- He, Q., Yan, X., Wang, H., Ji, Y., Li, J., Liu, L., Bi, P., Xu, P., Xu, B., & Ma, J. (2023) Towards a better understanding of the anaerobic/oxic/anoxic-aerobic granular sludge process (AOA-AGS) for simultaneous low-strength wastewater treatment and in situ sludge reduction from ambient to winter temperatures. *Environmental Research*, **236**(2), 116822.
- Henze, M., Harremoës, P., La Cour Jansen, J., Arvin, E. (2002) *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*. 3rd ed. (Förstner, U., Murphy, R.J., Rulkens, W.H., eds). New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 89–108.
- Henze, M., Kristensen, G.H., Strube, R. (1994) Rate-capacity characterization of wastewater for nutrient removal processes. *Water Science and Technology*, **29**, 101–102.
- Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdanovic, D., (2008) *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*, IWA Publishing, London.
- Herbst, F.-A., Dueholm, M.S., Wimmer, R., Nielsen, P.H. (2019) The proteome of *tetrasphaera elongata* is adapted to changing conditions in wastewater treatment plants. *Proteomes* **7**(2), 16. <https://doi.org/10.3390/proteomes7020016>
- Hood, C. R., Randall, A. A. (2001) A biochemical hypothesis explaining the response of enhanced biological phosphorus removal biomass to organic substrates. *Wat. Res.* **35**(11), 2758–2766. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(00\)00573-x](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(00)00573-x).
- Hu, J. Y., Ong, S. L., Ng, W. J., Lu, F., Fan, X. J. (2003) A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Res.* **37**(14), 3463–3471. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00205-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00205-7)
- Hu, Z., Sun, P., Han, J., Wang, R., Jiao, L., Yang, P., Cai, J. (2018) The acute effects of erythromycin and oxytetracycline on enhanced biological phosphorus removal system: shift in

bacterial community structure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**(10), 9342–9350. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1221-1>

Hu, Z.-R., Wentzel, M. C., Ekama, G. A. (2002) Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. *Water Res.* **36**(19), 4927-4937. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00186-0](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00186-0)

Huang, W., Gong, B., He, L., Wang, Y., Zhou, J. (2019) Intensified nutrients removal in a modified sequencing batch reactor at low temperature: Metagenomic approach reveals the microbial community structure and mechanisms. *Chemosphere* 125513. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125513>

Huang, Y., Zhao, W., Wang, M., Pan, C., Li, X., Peng, Y., & Li, B. (2018) Post-endogenous denitrification and phosphorus removal in an alternating anaerobic/oxic/anoxic (AOA) system treating low carbon/nitrogen (C/N) domestic wastewater. *Chemical Engineering Journal.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.096>

Itokawa, H., Hanaki, K., Matsuo, T. Satoh, H. (2001) *Nitrous oxide production in high-loading biological nitrogen removal process under low COD/N ratio condition.* *Water Sci. Technol.* **43**(1), 205-208. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00309-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00309-2)

Izadi, P., Izadi, P., Eldyasti, A. (2020) Design, operation and technology configurations for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **19**(3), 561–593. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09538-w>

Jaafari, J., Seyedsalehi, M., Safari, G. H., Ebrahimi Arjestan, M., Barzanouni, H., Ghadimi, S., Kamani, H., Haratipour, P. (2017) Simultaneous biological organic matter and nutrient removal in an anaerobic/anoxic/oxic (A2O) moving bed biofilm reactor (MBBR) integrated system. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **14**(2), 291–304. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1206-x>

Jabari, P., Munz, G., Oleszkiewicz, J. A. (2014) Selection of denitrifying phosphorous accumulating organisms in IFAS systems: Comparison of nitrite with nitrate as an electron acceptor. *Chemosphere* **109**, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.002>

Jafarzadeh Ghehi et al. (2014) *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, **12**, 134.

Ji, J., Peng, Y., Wang, B., Li, X., Zhang, Q. (2019) A novel SNPR process for advanced nitrogen and phosphorus removal from mainstream wastewater based on anammox, endogenous partial-

denitrification and denitrifying dephosphatation. *Water Research*, **115363**.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115363>

Jiang, X. X., Yang, J. X., Ma, F., Yang, F. F., Wei, J., & Ying, J. (2010) Denitrifying phosphorous removal in anaerobic/anoxic SBR system with different startup operation mode. *Journal of Harbin Institute of Technology*, **17**(6), 824.

Kargi, F. (2003) Effect of carbon source on biological nutrient removal in a sequencing batch reactor. *Bioresource Technology*, **89**(1), 89–93. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(03\)00031-2](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(03)00031-2).

Kataoka, N., Tokiwa, Y., Tanaka, Y., Takeda, K., Suzuki, T. (1996) Enrichment culture and isolation of slow-growing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**(6), 771-777. <https://doi.org/10.1007/s002530050761>

Kim, D. J., Lee, D. I., Keller, J. (2006) Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresour. Technol.* **97**(3), 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.032>

Kim, Y. K., et al. (2019) The capacity of wastewater treatment plants drives bacterial community structure and its assembly. *Scientific Reports*, **9**, 14809. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51228-6>

Kindaichi, T., Yamaoka, S., Uehara, R., Ozaki, N., Ohashi, A., Albertsen, M., Nielsen, P. H., Nielsen, J. L. (2016) Phylogenetic diversity and ecophysiology of Candidate phylum Saccharibacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **92**(6), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw078>

Klein, K., Mandel, A., Lilleoja, H., Salmar, S., Tenno, T. (2020) Assessment of enhanced biological phosphorus removal process inhibition. *SN Appl. Sci.* **2**(9), 1489. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03281-1>

Komorowska-Kaufman, M., Majcherek, H., Klaczyński, E. (2006) Factors affecting the biological nitrogen removal from wastewater. *Process Biochemistry*, **41**(5), 1015–1021. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.11.001>

Kong, Y., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (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. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4076-4085.2005>



- Kristiansen, R., Nguyen, H. T. T., Saunders, A. M., Nielsen, J. L., Wimmer, R., Le, V. Q., McIlroy, S. J., Petrovski, S., Seviour, R. J., Calteau, A., Nielsen, K. L., Nielsen, P. H. (2013) A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal. *ISME Journal* **7**(3), 543–554. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.136>
- Kuba, T., Smolders, G., Van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1993) Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* **27**(5-6), 241-252. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0504>
- Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (1996) Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. *Water Research*, **30**, 1702–1710. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00050-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00050-4)
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M. (1996b) Effect of cyclic oxygen exposure on the activity of denitrifying phosphorus removing bacteria. *Water Science and Technology*, **34**(1-2), 33–40. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00492-1](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00492-1)
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1996a) Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. *Water Research*, **30**(7), 1702–1710. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00050-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00050-4)
- Kumari, R., Ankit, H., Basu, S. (2021) Reclamation of water from dairy wastewater using membrane bioreactor (MBR) - Membrane filtration processes. *Mater. Today* **47**, 1452–1456. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.452>
- Lackner, S., Terada, A., Horn, H., Henze, M., Smets, B. F. (2010) Nitritation performance in membrane-aerated biofilm reactors differs from conventional biofilm systems. *Water Res.* **44**(20), 6073–6084. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.074>
- Lawson, C. E., Strachan, B. J., Hanson, N. W., Hahn, A. S., Hall, E. R., Rabinowitz, B., Mavinic, D. S., Ramey, W. D., Hallam, S. J. (2015) Rare taxa have potential to make metabolic contributions in enhanced biological phosphorus removal ecosystems. *Environ. Microbiol.* **17**(12), 4979–4993. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12875>
- Lee, D. S., Jeon, C. O., Park, J. M. (2001) Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system. *Water Res.* **35**(16), 3968–3976. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00132-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00132-4)

- Lee, H., & Yun, Z. (2014) Comparison of biochemical characteristics between PAO and DPAO sludges. *Journal of Environmental Sciences*, **26**(6), 1340–1347. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(13\)60609-9](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(13)60609-9)
- Li, C., Liu, S., Ma, T., Zheng, M., Ni, J. (2019) Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in a sequencing batch reactor (SBR) under low temperature. *Chemosphere* **229**, 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.185>
- Li, H., Zhong, Y., Huang, H., Tan, Z., Sun, Y., Liu, H. (2020) Simultaneous nitrogen and phosphorus removal by interactions between phosphate accumulating organisms (PAOs) and denitrifying phosphate accumulating organisms (DPAOs) in a sequencing batch reactor. *Sci. Total Environ.* 140852 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140852>
- Li, J., Elliott, D., Nielsen, M., Healy, M.G. (2010) Long-term partial nitrification in an intermittently aerated sequencing batch reactor (SBR) treating ammonium-rich wastewater under controlled oxygen-limited conditions. *Biochemical Engineering Journal*, **55**, 215–222.
- Lin, Y., Sun, Y., Zhang, L., Zhang, Q., Li, X., Sui, J., Peng, Y. (2023) Balancing denitrifying phosphorus-accumulating organisms and denitrifying glycogen-accumulating organisms for advanced nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater. *Bioresour. Technology*, **369**, 128444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128444>
- Liu, J., Yuan, Y., Li, B., Zhang, Q., Wu, L., Li, X., Peng, Y. (2017) Enhanced nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater in an anaerobic-aerobic-anoxic sequencing batch reactor with sludge fermentation products as carbon source. *Bioresour. Technol.* **244**, 1158–1165. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.055>
- Liu, R., Hao, X., Chen, Q., & Li, J. (2019) Research advances of *Tetrasphaera* in enhanced biological phosphorus removal: A review. *Water Research*, **166**, 115003. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115003>
- Liu, R., Hao, X., Chen, Q., Li, J., 2019. Research advances of *Tetrasphaera* in enhanced biological phosphorus removal: a review. *Water Res.* **166**, 115003. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115003>
- Liu, S., Daigger, G. T., Liu, B., Zhao, W., Liu, J. (2020) Enhanced performance of simultaneous carbon, nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater in an anaerobic-aerobic-anoxic sequencing batch reactor (AOA-SBR) system by alternating the cycle times. *Bioresour. Technol.* 301, 122750. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122750>

- Long, X.-Y., Tang, R., Wang, T., Tao, G.-J., Wang, J.-Y., Zhou, H.-W., Xue, M., Yu, Y.-P. (2021) Characteristics of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process under the combined actions of intracellular and extracellular polyphosphate. *Chemosphere* **279**, 130912. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130>
- 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. *Water Res.* **43**(2), 450–462. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.032>
- Lopez-Vazquez, C. M., Wentzel, M. C., Comeau, Y., Ekama, G. A., van Loosdrecht, M. C. M., Brdjanovic, D., Oehmen, A. (2020) Enhanced biological phosphorus removal. U: *Biological Wastewater Treatment, 2. izd.*, (Chen, G., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G., Brdjanovic, D., ured.), IWA Publishing, London, str. 239-327.
- Lu, W., Zhang, X., Zhang, Y., Wang, Q., Wei, Y., Ma, B. (2022) Synergistic simultaneous endogenous partial denitrification/anammox (EPDA) and denitrifying dephosphatation for advanced nitrogen and phosphorus removal in a complete biofilm system. *Bioresource Technology*, **358**, 127378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127378>
- Lv, X.-M., Shao, M.-F., Li, C.-L., Li, J., Gao, X., & Sun, F.-Y. (2014) A comparative study of the bacterial community in denitrifying and traditional enhanced biological phosphorus removal processes. *Microbes and Environments*, **29**(3), 261–268. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me13132>
- Lv, X.M., Shao, M.F., Li, C.L., Li, J., Gao, X.I., Sun, F.Y. (2014) A comparative study of the biological community in denitrifying and traditional enhanced biological phosphorus removal process. *Microbes and Environments*, **29**(3), 261–268. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME13132>
- Mansouri, A. M., Zinatizadeh, A. A. (2017) A comparative study of an up-flow aerobic/anoxic sludge fixed film bioreactor and sequencing batch reactor with intermittent aeration in simultaneous nutrients (N, P) removal from synthetic wastewater. *Water Sci. Technol.* **76**(5), 1044–1058. <https://doi.org/10.2166/wst.2017.261>
- Marques, R., Santos, J., Nguyen, H., Carvalho, G., Noronha, J. P., Nielsen, P. H., Reis, M. A. M., Oehmen, A. (2017) Metabolism and ecological niche of *Tetrasphaera* and *Ca. Accumulibacter* in enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.* **122**, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.072>

- Masoudi, S. M. A., Hedayati Moghaddam, A., Sargolzaei, J., Darroudi, A., Zeynali, V. (2018). Investigation and optimization of the SND–SBR system for organic matter and ammonium nitrogen removal using the central composite design. *Environ. Prog. Sustain. Energy* **37**(5), 1638–1646. <https://doi.org/10.1002/ep.12847>
- Maszenan, A.M., Seviour, R.J., Patel, B.K.C., Schumann, P., Burghardt, J., Tokiwa, Y., Stratton, H.M. (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.* *IJSEM* **50**, 593-603. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-2-593>
- Meinhold, J., Arnold, E., Isaacs, S. (1999) Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Res.* **33**(8), 1871–1883. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00411-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00411-4)
- Meinhold, J., Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., & Isaacs, S. (1999) Characterization of the denitrifying fraction of phosphate-accumulating organisms in biological phosphate removal. *Water Science and Technology*, **39**(1), 31–42.
- Meng, Q., Fenglin, Y., Lifan, L., Fangang, M. (2008) Effects of COD/N ratio and DO concentration on simultaneous nitrification and denitrification in an airlift internal circulation membrane bioreactor. *J. Environ. Sci.* **20**(8), 933-939. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(08\)62189-0](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(08)62189-0).
- Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Shirley, S. N., & Jie, R. (2009) Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresource Technology*, **100**(3), 1399–1405. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.014>
- Merzouki, M., Delgenès, J.-P., Bernet, N., Moletta, R., & Benlemlih, M. (1999) Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Current Microbiology*, **38**(1), 9–17. <https://doi.org/10.1007/pl00006776>
- Merzouki, M., Delgenes, J.P., Bernet, N., Moletta, R., Benlemlih, M. (1999) Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors. *Current Microbiology*, **38**, 9–17.

Metcalf and Eddy (2003) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, fourth edition. New York: McGraw-Hill, 2003.

Meyer, R.L., Zeng, R.J., Giugliano, V., Blackall, L.L. (2005) Challenges for simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in microbial aggregates: Mass transfer limitation and nitrous oxide production. *FEMS Microbiology Ecology*, **52(3)**, 329–338.

Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M. & Heijnen, J.J. (1998) *Metabolic Characteristics of Phosphate-Accumulating Organisms in Activated Sludge Processes for Enhanced Biological Phosphorus Removal*. *Water Sci. Technol.* **37(4-5)**, 483–489.

Monteith, H.D., Bridle, T.R., Sutton, P.M. (1980) Industrial waste carbon sources for biological denitrification. *Progress in Water Technology*, **12(Tor)**, 127–141.

Moore, G. T. (2009) *Nutrient control design manual*, United States Environmental Protection Agency, Washington.

Mrkonjić, V. (2018) Utjecaj koncentracije natijeva acetata na metabolizam organizama koji akumuliraju polifosfat. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska

Nguyen, H. T. T., Le, V. Q., Hansen, A. A., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2011) High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating *Tetrasphaera*-related bacteria in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **76(2)**, 256–267. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01049.x>

Nguyen, H.T.T., Kristiansen, R., Vestergaard, M., Wimmer, R., Nielsen, P.H. (2015) Intracellular accumulation of glycine in polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge, a novel storage mechanism under dynamic anaerobic-aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **81(14)**, 4809–4818. <https://doi.org/10.1128/AEM.01012-15>

Nguyen, P.Y., Marques, R., Wang, H., Reis, M.A.M., Carvalho, G., Oehmen, A. (2023) The impact of pH on the anaerobic and aerobic metabolism of *Tetrasphaera*-enriched polyphosphate accumulating organisms. *Water Res.* **19**, 100177. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2023.100177>.

Nielsen, P. H., McIlroy, S. J., Albertsen, M., & Nierychlo, M. (2019) Re-evaluating the microbiology of the enhanced biological phosphorus removal process. *COBIOT* **57**, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.03.008>

Nielsen, P. H., Mielczarek, A. T., Kragelund, C., Nielsen, J. L., Saunders, A. M., Kong, Y., Hansen, A. A., Vollertsen, J. (2010) A conceptual ecosystem model of microbial communities

in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Res.* **44**(17), 5070–5088. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.036>

Nielsen, P.H. (1999) *Uptake of Phosphorus by Polyphosphate-Accumulating Organisms in Activated Sludge.* *Water Sci.Technol.* **39**(1), 107-114.

Nielsen, P.H., Daims, H., Lemmer, H. (eds.) (2009) *FISH Handbook for Biological Wastewater Treatment: Identification and quantification of microorganisms in activated sludge and biofilms by FISH.* IWA Publishing, London, UK.

Nittami, T., Oi, H., Matsumoto, K., Seviour, R. J. (2011) Influence of temperature, pH and dissolved oxygen concentration on enhanced biological phosphorus removal under strictly aerobic conditions. *N. Biotechnol.* **29**(1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.06.012>

Oehmen, A., Carvalho, G., Lopez-Vazquez, C. M., van Loosdrecht, M. C. M., Reis, M. A. M. (2010) Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Res.* **44**(17), 4992–5004. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.071>

Oehmen, Adrian, 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. *Water Res.* **41**(11), 2271–2300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.030>

Oehmen, Adrian, Yuan, Z., Blackall, L. L., Keller, J. (2005) Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **91**(2), 162–168. <https://doi.org/10.1002/bit.20500>

Olsson, G., Nielsen, M., Yuan, Z., Lynggaard-Jensen, A., Steyer, J. P. (2005) Scientific and Technical Report No. 11. U: Instrumentation, Control and Automation in Wastewater Systems, IWA Publishing, London.

Ong, Ying Hui, Chua, A. S. M., Fukushima, T., Ngoh, G. C., Shoji, T., Michinaka, A. (2014) High-temperature EBPR process: The performance, analysis of PAOs and GAOs and the fine-scale population study of *Candidatus "Accumulibacter phosphatis."* *Water Res.* **64**, 102–112. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.038>

Ostle, A.G., Holt, J.G. (1982) Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**, 238–241. <https://doi.org/10.1128/aem.44.1.238-241.1982>

- Peces, M., Dottorini, G., Nierychlo, M., et al. (2022) Microbial communities across activated sludge plants show recurring species-level seasonal patterns. *ISME Communications*, **2**, 18. <https://doi.org/10.1038/s43705-022-00098-4>
- Pei, R., Vicente-Venegas, G., Van Loosdrecht, M. C. M., Kleerebezem, R., & Werker, A. (2022) Quantification of polyhydroxyalkanoate accumulated in waste activated sludge. *Water Research*, **221**, 118795. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118795>
- Peng, Y., Zhu, G. (2006) Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**, 15–26.
- Peng, Z., Lou, T., Jiang, K., Niu, N., Wang, J., Liu, A. (2021) Characteristics of nutrients removal under partial denitrification initiated by different initial nitrate concentration. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **44**, 2051–2059. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02582-y>
- Pernthaler, J., Glockner, F.O., Schonhuber, W. & Amann, R. (2002) *Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Method. Microbiol.* **30**, 207–226. [https://doi.org/10.1016/s0580-9517\(01\)30046-6](https://doi.org/10.1016/s0580-9517(01)30046-6)
- 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. J.* **26**(2–3), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.014>
- Pijuan, M., Guisasola, A., Baeza, J. A., Carrera, J., Casas, C., Lafuente, J. (2006) Net P-removal deterioration in enriched PAO sludge subjected to permanent aerobic conditions. *J. Biotech.* **123**(1), 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.10.018>
- Qiu, G., Zuniga-Montanez, R., Law, Y., Thi, S. S., Nguyen, T. Q. N., Eganathan, K., Liu, X., Nielsen, P. H., Williams, R. B. H., Wuertz, S. (2019) Polyphosphate-accumulating organisms in full-scale tropical wastewater treatment plants use diverse carbon sources. *Water Res.* **149**, 496–510. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.011>
- Racys, V., Dapkiene, M., Bikulciene, L., Jankunaite, D., Vaiciukyniene, D. (2018) Effect of External Carbon Source on Municipal Wastewater at Low Temperatures. *Water, Air, & Soil Pollution*, **229**(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3812-3>
- Rahimi, S., Modin, O., Mijakovic, I. (2020) Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater. *Biotechnology Advances*, **107570**. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107570>
- Randall, A. A., Liu, Y. H. (2002) Polyhydroxyalkanoates form potentially a key aspect of

- aerobic phosphorus uptake in enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.* **36**(14), 3473–3478. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00047-7)
- Randall, C. W., Chapin, R. W. (1997) Acetic acid inhibition of biological phosphorus removal. *Water Environ. Res.* **69**(5), 955–960. <https://doi.org/10.2175/106143097x125641>
- Reis, M. A. M., Serafim, L. S., Lemos, P. C., Ramos, A. M., Aguiar, F. R., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2003) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **25**(6), 377–385. <https://doi.org/10.1007/s00449-003-0322-4>
- Rey, N., Badia, M., Guisasola, A., Genocov, J. A. B. (2016) Understanding the role of *Tetrasphaera* in enhanced biological phosphorus removal. *Proceedings of the IWA Specialized Conference on Small Water and Wastewater Systems*, Athens.
- Roche, C., Valle Medina, M.E., Schmitt, P., Pallarès, A., Pallarès, G., Meilliez, M., Laurent, J. (2022) Densification of activated sludge for better settling performances: experimental characterization in batch column and model parameters calibration. *Water Science and Technology*, **86**(1), 110–127. <https://doi.org/10.2166/wst.2022.192>
- Rong, Y., Chang, H.D., Wu, C.L., Zhang, W.S., Jin, P.K. (2019) Effects of aeration partition ratio on nitrogen removal performance and the microbial community in the A2/O process. *Desalination and Water Treatment*, **147**, 326–333.
- Rong, Y., Liu, X., Wen, L., Jin, X., Shi, X., Jin, P. (2020) Advanced nutrient removal in a continuous A2/O process based on partial nitrification-anammox and denitrifying phosphorus removal. *Journal of Water Process Engineering*, **36**, 101245. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101245>
- Roy, S., Guanglei, Q., Zuniga-Montanez, R., Williams, R. B., Wuertz, S. (2021) Recent advances in understanding the ecophysiology of enhanced biological phosphorus removal. *Curr. Opin. Biotechnol.* **67**, 66–174. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.01.011>
- Rubio-Rincón, F. J., Lopez-Vazquez, C. M., Welles, L., van Loosdrecht, M. C. M., & Brdjanovic, D. (2017) Cooperation between *Candidatus Competibacter* and *Candidatus Accumulibacter* clade I in denitrification and phosphate removal processes. *Water Research*, **120**, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.001>
- Rubio-Rincón, F. J., Lopez-Vazquez, C. M., Welles, L., van Loosdrecht, M. C. M., Brdjanovic, D. (2017) Cooperation between *Candidatus Competibacter* and *Candidatus Accumulibacter* clade I, in denitrification and phosphate removal processes. *Water Res.* **120**, 156–164.



<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.001>

Rubio-Rincón, F.J., Welles, L., Lopez-Vazquez, C.M., Abbas, B., van Loosdrecht, M.C.M., Brdjanovic, D. (2019) Effect of Lactate on the Microbial Community and Process Performance of an EBPR System. *Front. Microbiol.* **10**, 125. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00125>

Saito, T., Brdjanovic, D., Van Loosdrecht, M. C. M. (2004) Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Res.* **38**(17), 3760–3768. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.05.023>

Saunders, A. M., Oehmen, A., Blackall, L. L., Yuan, Z., Keller, J. (2003) The effect of GAOs (glycogen accumulating organisms) on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR (enhanced biological phosphorus removal) plants. *Water Sci. Technol.* **47**(11), 37–43. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0584>

Schuler, A. J., Jenkins, D. (2003) Enhanced Biological Phosphorus Removal from Wastewater by Biomass with Different Phosphorus Contents, Part I: Experimental Results and Comparison with Metabolic Models. *Water Environment Research*, **75**(6), 485–498. <https://doi.org/10.2175/106143003x141286>

Sharma, A., Bhatti, M. S. (2022). Simultaneous Removal of Organic Matter and Nutrients from High Strength Organic Wastewater Using Sequencing Batch Reactor (SBR). *Processes* **10**(10), 1903. <https://doi.org/10.3390/pr10101903>

Shen, N., Chen, Y., Zhou, Y. (2017) Multi-cycle operation of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) with different carbon sources under high temperature. *Water Res.* **114**, 308–315. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.051>

Shen, N., Zhou, Y. (2016) Enhanced biological phosphorus removal with different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100**(11), 4735–4745. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7518-4>

Shi, L., Ma, B., Li, X., Zhang, Q., & Peng, Y. (2019) Advanced nitrogen removal without addition of external carbon source in an anaerobic/aerobic/anoxic sequencing batch reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **42**(10), 1607–1617. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02148-z>

Sin, G., Niville, K., Bachis, G., Jiang, T., Nopens, I., Van Hulle, S., Vanrolleghem, P. A. (2008) Nitrite effect on the phosphorus uptake activity of phosphate accumulating organisms (PAOs) in pilot-scale SBR and MBR reactors. *Water SA.* **34**(2), 249.

<https://doi.org/10.4314/wsa.v34i2.183646>

Singleton, C. M., Petriglieri, F., Wasmund, K., Nierychlo, M., Kondrotaitė, Z., Petersen, J. F., Peces, M., Dueholm, M. S., Wagner, M., Nielsen, P. H. (2022) The novel genus, ‘*Candidatus* Phosphoribacter’, previously identified as *Tetrasphaera*, is the dominant polyphosphate accumulating lineage in EBPR wastewater treatment plants worldwide. *ISME Journal* **16**(6), 1605–1616. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01212-z>

Smith, S., Takács, I., Murthy, S., Daigger, G.T., Szabó, A. (2008) Phosphate Complexation Model and Its Implications for Chemical Phosphorus Removal. *Water Environment Research*, **80**(5), 428–438. <https://doi.org/10.1002/j.1554-7531.2008.tb003>

Smolders, G. J. F., Van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1994) pH: keyfactor in the biological phosphorus removal process. *Wat. Sci. Tech.* **29**(7), 71-74. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0310>

Soliman, M., Eldyasti, A. (2018) Ammonia-Oxidizing Bacteria (AOB): Opportunities and applications—a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **17**(2), 285–321. <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9463-4>

Song, X., Yu, D., Qiu, Y., Qiu, C., Xu, L., Zhao, J., & Wang, X. (2022) Unexpected phosphorus removal in a *Candidatus* *Competibacter* and *Defluviicoccus*-dominated reactor. *Bioresource Technology*, **345**, 126540. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126540>

Srivastava, G., Kapoor, A., Kazmi, A.A. (2023) Improved Biological Phosphorus Removal under Low Solid Retention Time Regime in Full-Scale Sequencing Batch Reactor. *Sustainability* **15**, 7918. <https://doi.org/10.3390/su15107918>

Stokholm-Bjerregaard, M., McIlroy, S.J., Nierychlo, M., Karst, S.M., Albertsen, M., Nielsen, P.H. (2017) A Critical Assessment of the Microorganisms Proposed to be Important to Enhanced Biological Phosphorus Removal in Full-Scale Wastewater Treatment Systems. *Frontiers in Microbiology*, **8**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00718>

Su, L., Li, Y., Chao, L., Li, Q., Hu, Z. (2023) Enhanced Simultaneous Nitrogen and Phosphorus Removal Performance of the AGS-SBR Reactor Based on the Effects of the C/N Ratio and Microbial Community Change. *Sustainability*, **15**, 7691. <https://doi.org/10.3390/su15097691>.

Sun, Y., Peng, Y., Zhang, J., Li, X., Zhang, Q., Zhang, L. (2020) Effect of endogenous metabolisms on survival and activities of denitrifying phosphorus removal sludge under various

starvation conditions. *Bioresource Technology*, **123839**.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123839>

Szeląg, B., Gawdzik, J., Studziński, J. (2018) Sludge Volume Index (SVI) Modelling: Data Mining Approach. In: Wilimowska, Z., Borzemski, L., Świątek, J. (eds) *Information Systems Architecture and Technology: Proceedings of 38th International Conference on Information Systems Architecture and Technology – ISAT 2017*. ISAT 2017. *Advances in Intelligent Systems and Computing*, **657**. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67223-6\\_31](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67223-6_31)

Takabatake, H., Satoh, H., Mino, T., & Matsuo, T. (2002) PHA (polyhydroxyalkanoate) production potential of activated sludge treating wastewater. *Water Science and Technology*, **45**(12), 119–126. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0417>

Tarayre, C., Nguyen, H.-T., Brognaux, A., Delepiere, A., De Clercq, L., Charlier, R., Delvigne, F. (2016) Characterisation of phosphate-accumulating organisms and techniques for polyphosphate detection: A review. *Sensors*, **16**(6), 797. <https://doi.org/10.3390/s16060797>

Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Stensel, H. D. (2004) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4. izd.( Za: Metcalh & Eddy Inc), McGraw-Hill, New York.

Tsai, Y.-P., Chen, H.-T. (2011) Influence of sludge retention time on tolerance of copper toxicity for polyphosphate accumulating organisms linked to polyhydroxyalkanoates metabolism and phosphate removal. *Bioresour. Technol.* **102**(23), 11043–11047. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.050>

Ujang, Z., Salim, M. R., Khor, S. L. (2002) The effect of aeration and non-aeration time on simultaneous organic, nitrogen and phosphorus removal using an intermittent aeration membrane bioreactor. *Water Sci. Technol.* **46**(9), 193–200. <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0237>

Umble, A.K., Ketchum, A.L. (1997) A strategy for coupling municipal wastewater treatment using the sequencing batch reactor with effluent nutrient recovery through aquaculture. *Water Science and Technology*, **35**(1), 177–184.

Vargas, M., Casas, C., Baeza, J. A. (2009) Maintenance of phosphorus removal in an EBPR system under permanent aerobic conditions using propionate. *Biochem. Eng. J.* **43**(3), 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.013>

Vargas, M., Guisasola, A., Artigues, A., Casas, C., Baeza, J. A. (2011) Comparison of a nitrite-based anaerobic-anoxic EBPR system with propionate or acetate as electron donors. *Process*

*Biochem.* **46**(3), 714–720. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.11.018>

Viancelli, A., Kunz, A., Esteves, P.A., Viçosa Bauermann, F., Furukawa, K., Fujii, T., Vasconcellos Antônio, R., Vanotti, M. (2011) Bacterial biodiversity from an anaerobic upflow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **54**, 1035–1041.

Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H. (2002) *Antonie van Leeuwenhoek*, **81**(1/4), 665–680. <https://doi.org/10.1023/a:1020586312170>

Wang, B., Jiao, E., Guo, Y., Zhang, L., Meng, Q., Zeng, W., Peng, Y. (2020) Investigation of the polyphosphate-accumulating organism population in the full-scale simultaneous chemical phosphorus removal system. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09912-9>

Wang, D.-B., Li, X.-M., Yang, Q., Zeng, G.-M., Liao, D.-X., Zhang, J. (2008) Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. *Bioresour. Technol.* **99**(13), 5466–5473. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.007>

Wang, F., Shang, L., Wei, Y., Ji, M. (2008) Characteristics of aerobic granule and nitrogen and phosphorus removal in a SBR. *Journal of Hazardous Materials*, **164**, 1223–1227.

Wang, Q., & He, J. (2020) Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate-accumulating *Thauera* sp. strain SND5. *Water Research*, 116300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116300>

Wang, R., Yang, C., Hu, H., Yang, Q., Du, B. (2021) The impact of the varying nutrient concentrations on the enhanced biological phosphorus removal performance and functional phosphorus-accumulating and denitrifying genes in an anaerobic–aerobic–anoxic sequencing batch reactor. *Environ. Technol. Innov.* 101256. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101256>

Wang, X., Wang, S., Xue, T., Li, B., Dai, X., & Peng, Y. (2015) Treating low carbon/nitrogen (C/N) wastewater in simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal (SNDPR) systems by strengthening anaerobic intracellular carbon storage. *Water Research*, **77**, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.019>

Wang, X., Wang, S., Xue, T., Li, B., Dai, X., Peng, Y. (2015) Treating low carbon/nitrogen (C/N) wastewater in simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal (SNDPR) systems by strengthening anaerobic intracellular carbon storage. *Water Research*, **77**, 191–200.

- Wang, X., Wang, S., Zhao, J., Dai, X., & Peng, Y. (2016) Combining simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal with post-denitrification for low carbon/nitrogen wastewater treatment. *Bioresource Technology*, **220**, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.132>
- Wang, X., Wang, S., Zhao, J., Dai, X., Li, B., Peng, Y. (2016) A novel stoichiometries methodology to quantify functional microorganisms in simultaneous (partial) nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal (SNEDPR). *Water Research*, **95**, 319–329.
- Wang, X., Wang, S., Zhao, J., Dai, X., Peng, Y. (2016) Combining simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal with post-denitrification for low carbon/nitrogen wastewater treatment. *Bioresource Technology*, **220**, 17–25.
- Wang, Y., Geng, J., Ren, Z., Guo, G., Wang, C., & Wang, H. (2012) Effect of COD/N and COD/P ratios on the PHA transformation and dynamics of microbial community structure in a denitrifying phosphorus removal process. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **88**(7), 1228–1236. <https://doi.org/10.1002/jctb.3962>
- Wang, Y., Geng, J., Ren, Z., He, W., Xing, M., Wu, M., & Chen, S. (2011) Effect of anaerobic reaction time on denitrifying phosphorus removal and N<sub>2</sub>O production. *Bioresource Technology*, **102**(10), 5674–5684. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.080>
- Wang, Y., Pan, M.-l., Yan, M., Peng, Y.-Z., Wang, S.-y. (2007) Characteristics of anoxic phosphorus removal in sequence batch reactor. *J. Environ. Sci.* **19**(7), 776–782. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60130-2](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60130-2)
- Welles, L., Lopez-Vazquez, C. M., Hooijmans, C. M., van Loosdrecht, M. C. M., Brdjanovic, D. (2014) Impact of salinity on the anaerobic metabolism of phosphate-accumulating organisms (PAO) and glycogen-accumulating organisms (GAO). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**(17), 7609–7622. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5778-4>
- Wentzel, M.C., Comeau, Y., Ekama, G.A., van Loosdrecht, M.C.M., Brdjanovic, D. (2008) *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*, IWA Publishing, London.
- Whang, L.-M., Park, J. K. (2006) Competition between Polyphosphate- and Glycogen-Accumulating Organisms in Enhanced-Biological-Phosphorus-Removal Systems: Effect of Temperature and Sludge Age. *Water Environ. Res.* **78**(1), 4–11. <https://doi.org/10.2175/106143005x84459>

- Xiang, H., Li, J., You, Z., Qiu, Y., Feng, J., Zhao, J., Chu, G., & Wang, X. (2024) Effect of carbon source on endogenous partial denitrification process: Characteristics of intracellular carbon transformation and nitrite accumulation. *Water*, **16**, 1645. <https://doi.org/10.3390/w16121645>
- Yan, L., Liu, S., Liu, Q., Zhang, M., Liu, Y., Wen, Y., Chen, Z., Zhang, Y., Yang, Q. (2019) Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen-limited SBR by alternating the DO. *Bioresour. Technol.* **275**, 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.054>
- Yao, S., Ni, J., Chen, Q., Borthwick, A. G. L. (2013) Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *Bioresour. Technol.* **127**, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.098>
- Yuan, C., Chen, X., Zhou, W., & Wu, Y. (2020) Enhanced nutrient removal of simultaneous partial nitrification, denitrification and phosphorus removal (SPNDPR) in a single-stage anaerobic/micro-aerobic sequencing batch reactor for treating real sewage with low carbon/nitrogen. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128457>
- Zahed, M.A., Salehi, S., Tabari, Y., Farraji, H., Ataei-Kachooei, S., Zinatizadeh, A.A., Kamali, N. Mahjouri, M. (2022) *Phosphorus removal and recovery: state of the science and challenges*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **29**(5), 1-29. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21637-5>
- Zaman, M., Ji, B., Lu, Y., Luo, G., Li, X. (2021) NADH accumulation during denitrifying phosphorus-accumulating organisms' activity in a simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal system. *Environmental Science: Water Research & Technology*, **7**(10), 1820–1830. <https://doi.org/10.1039/D1EW00198A>
- Zaman, M., Kim, M., Nakhla, G. (2020) Simultaneous Nitrification-Denitrifying Phosphorus Removal (SNDPR) at low DO for treating carbon-limited municipal wastewater. *Science of The Total Environment*, **143387**. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143387>
- Zekker, I., Mandel, A., Rikmann, E., Jaagura, M., Salmar, S., Ghangrekar, M. M., & Tenno, T. (2021) Ameliorating effect of nitrate on nitrite inhibition for denitrifying P-accumulating organisms. *Science of The Total Environment*, **797**, 149133. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149133>
- Zeng, R. J., van Loosdrecht, M. C. M., Yuan, Z., & Keller, J. (2002) Metabolic model for glycogen-accumulating organisms in anaerobic/aerobic activated sludge systems. *Biotechnology and Bioengineering*, **81**(1), 92–105. <https://doi.org/10.1002/bit.10455>

- Zeng, W., Li, L., Yang, Y. (2010) Nitritation and denitritation of domestic wastewater using a continuous anaerobic–anoxic–aerobic (A2/O) process at ambient temperatures. *Bioresource Technology*, **101**, 8074–8082.
- Zeng, W., Yang, Y., Li, L., Wang, X., Peng, Y. (2011) Effect of nitrite from nitritation on biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* **102**(12), 6657–6664. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.091>
- Zhang, J., Zhang, L., Miao, Y., Sun, Y., Zhang, Q., Wu, L., Peng, Y. (2019) Enhancing sewage nitrogen removal via anammox and endogenous denitrification: Significance of anaerobic/oxic/anoxic operation mode. *Bioresour. Technol.* **289**, 121665. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121665>
- Zhang, M., Peng, Y., Wang, C., Wang, C., Zhao, W., Zeng, W. (2016) Optimization denitrifying phosphorus removal at different hydraulic retention times in a novel anaerobic anoxic oxic-biological contact oxidation process. *Biochem. Eng. J.* **106**, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.10.027>
- Zhang, S. H., Huang, Y., Hua, Y. M. (2010) Denitrifying dephosphatation over nitrite: Effects of nitrite concentration, organic carbon, and pH. *Bioresour. Technol.* **101**(11), 3870–3875. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.134>
- Zhang, T., Liu, Y., Fang, H. H. P. (2005) Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process. *Biotechnol. Bioeng.* **92**(2), 173–182. <https://doi.org/10.1002/bit.20589>
- Zhang, W., Peng, Y., Ren, N., Liu, Q., Chen, Y. (2013) Improvement of nutrient removal by optimizing the volume ratio of anoxic to aerobic zone in AAO-BAF system. *Chemosphere*, **93**, 2859–2863.
- 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**(7), 4646–4653. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.017>
- Zhao, J., Wang, X., Li, X., Jia, S., Wang, Q., Peng, Y. (2019) Improvement of partial nitrification endogenous denitrification and phosphorus removal system: Balancing competition between phosphorus and glycogen accumulating organisms to enhance nitrogen removal without initiating phosphorus removal deterioration. *Bioresour. Technol.* **281**, 382–

391. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.109>

Zhao, J., Xie, S., Luo, Y., Li, X. (2021) NADH accumulation during DPAO denitrification in a simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal system. *Environmental Science: Water Research & Technology*, **7(10)**, 1819–1827. <https://doi.org/10.1039/d1ew00198a>

Zhao, J., Xin, M., Zhang, J., Sun, Y., Luo, S., Wang, H., Wang, Y., Bi, X. (2019) Diclofenac inhibited the biological phosphorus removal: Performance and mechanism. *Chemosphere* 125380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125>

Zhao, W., Huang, Y., Wang, M., Pan, C., Li, X., Peng, Y., & Li, B. (2018) Post-endogenous denitrification and phosphorus removal in an alternating anaerobic/oxic/anoxic (AOA) system treating low carbon/nitrogen (C/N) domestic wastewater. *Chemical Engineering Journal*, **339**, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.096>

Zhao, W., Huang, Y., Wang, M., Pan, C., Li, X., Peng, Y., & Li, B. (2018) Post-endogenous denitrification and phosphorus removal in an alternating anaerobic/oxic/anoxic (AOA) system treating low carbon/nitrogen (C/N) domestic wastewater. *Chemical Engineering Journal*, **339**, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.096>

Zheng, X., Sun, P., Han, J., Song, Y., Hu, Z., Fan, H., Lv, S. (2014) Inhibitory factors affecting the process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) - A mini-review. *Process Biochem.* **49**(12), 2207–2213. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.008>

Zheng, X., Tong, J., Li, H., Chen, Y. (2009) The investigation of effect of organic carbon sources addition in anaerobic-aerobic (low dissolved oxygen) sequencing batch reactor for nutrients removal from wastewaters. *Bioresource Technology*, **100(9)**, 2515–2520.

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**(1), 359–369. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2780-3>

Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R. J., Yuan, Z. (2009) Involvement of the TCA cycle in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water Res.* **43**(5), 1330–1340. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.008>

Zinatizadeh, A. A. L., Ghaytooli, E. (2015) Simultaneous nitrogen and carbon removal from wastewater at different operating conditions in a moving bed biofilm reactor (MBBR): Process modeling and optimization. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **53**, 98–111.



<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.02.034>.

Zou, S., Yao, S., Ni, J. (2014) High-efficient nitrogen removal by coupling enriched autotrophic-nitrification and aerobic-denitrification consortiums at cold temperature. *Bioresour. Technol.* **161**, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.066>

## Životopis

Tea Štefanac rođena je 9. veljače 1993. godine u Zagrebu. Akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke biotehnologije stekla je 2014. godine, a 2016. godine diplomirala je i stekla akademski naziv magistre inženjerke molekularne biotehnologije. Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2017. godine od kada je i zaposlena u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda. Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog mikrobiološkog društva i Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista. Godine 2024. prijavila je i uspješno obranila temu doktorskoga rada uz mentorstvo prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević. Autorica ili koautorica je više od 10 znanstvenih radova A1 i A2 kategorije, te je sudjelovala na više od 5 nacionalnih i međunarodnih znanstvenih skupova s usmenim i posterskim izlaganjima. Suradnica je na predmetima Biološka razgradnja organskih spojeva i Biotehnologija u zaštiti okoliša. Bila je pomoć pri izradi diplomskih i završnih radova. Sudjeluje na projektu INCTABioPack, te je vodila radionice na događanjima popularizacije znanosti poput Festivala znanosti.

Znanstveni radovi skupine:

### A1

1. Brozinčević A., Grgas, D., **Štefanac, T.**, Habuda-Stanić, M., Zelić, B., Landeka Dragičević, T. (2024) Cost Reduction in the Process of Biological Denitrification by Choosing Traditional or Alternative Carbon Sources. *Energies*, **17**(15), 3660. doi: [10.3390/en17153660](https://doi.org/10.3390/en17153660)
2. Grgas, D., Petrina, A., **Štefanac, T.**, Bešlo, D., Landeka Dragičević, T. (2023) A Review: Per- and Polyfluoroalkyl Substances – Biological Degradation. *Toxics*, **11** (5), 446. doi:[10.3390/toxics11050446](https://doi.org/10.3390/toxics11050446). IF=4.6 (Q2)
3. Grgas, D., Rukavina, M., Bešlo, D., **Štefanac, T.**, Crnek, V., Šikić, T., Habuda- Stanić, M., Landeka Dragičević, T. (2023) The Bacterial Degradation of Lignin—A Review. *Water*, **15** (7), 1272. doi:[10.3390/w15071272](https://doi.org/10.3390/w15071272). IF=3.4 (Q2)
4. **Štefanac, T.**, Grgas, D., Landeka Dragičević, T. (2021) Xenobiotics—Division and Methods of Detection: A Review. *J Xenobiot.*, **11** (4), 130-141. doi:[10.3390/jox11040009](https://doi.org/10.3390/jox11040009). IF= 6.0 (Q1)

5. Milun, V., Grgas, D., Radman, S., **Štefanac, T.**, Ibrahimpašić, J., Landeka Dragičević, T. (2020) Organochlorines Accumulation in Caged Mussels *Mytilus galloprovincialis* – Possible Influence of Biological Parameters. *Appl. Sci.*, **10** (11), 3830. doi:org/10.3390/app10113830. IF=2.838 (Q2)
6. Galant, M., Grgas, D., **Štefanac, T.**, Habuda-Stanić, M., Landeka Dragičević, T. (2023) Nitrogen Removal with Aerobic Granules – Effect of Dissolved Oxygen and Carbon/Nitrogen Ratio, *Kem. ind.*, **72** (1-2), 25-32. IF=0.7 (Q4)
7. Grgas, D., **Štefanac T.**, Barešić, M., Toromanović, M., Ibrahimpašić, J., Vukušić Pavičić, T., Habuda-Stanić, M., Herceg, Z., Landeka Dragičević, T. (2023) Co-composting of Sewage Sludge, Green Waste, and Food Waste. *J. Sustain. Dev. Energy Water Environ. Syst.*, **11** (1), 1100415. doi:10.13044/j.sdewes.d10.0415. IF=2.1 (Q3)
8. **Štefanac, T.**, Grgas, D., Marjanović, B; Landeka Dragičević, T. (2022) Primjena i modeliranje sustava s biofilmom u obradi otpadnih voda, *Kem. Ind.*, **71** (5-6), 317-325. IF=0.7 (Q4)

## A2

1. Grgas, D., Galant, M., **Štefanac, T.**, Ladavac, A., Brozinčević, A., Štrkalj, A., Landeka Dragičević, T. (2021) Aerobic granular sludge in wastewater treatment: granulation mechanism and properties of aerobic granules. *HČPTBN*, **16** (1-2), 20-27. CAB: Accession Number 20220034465
2. Grgas, D., **Štefanac, T.**, Galant, M., Brozinčević, A., Štrkalj, A., Landeka Dragičević, T. (2021) Biological denitrification. *HČPTBN*, **16** (1-2), 28-34. CAB: Accession Number 20220034466
3. **Štefanac, T.**, Grgas, D., Landeka Dragičević, T. (2021) Metode obrade otpadne vode mesne industrije. *Meso*, **23** (1), 54-66. CAB: Accession Number 20210074187

## A3

1. Grgas, D., Karličić, N., **Štefanac, T.**, Landeka Dragičević, T., Obradović, M., Todorović, D. (2024) Oporaba otpada u uklanjanju nutrijenata iz otpadnih voda, 37. Međunarodni kongres o procesnoj industriji (Procesing '24). (xx, ur.) 2024, str. 141-142.
2. Grgas, D., Biškup, M., Galant, M., **Štefanac, T.**, Ambrozić, K., Landeka Dragičević, T. (2023) Obrada otpadne vode aerobnim granulama mulja pri različitim omjerima C/N, *19th Ružička days („Today science – tomorrow industry“)* – *Proceedings*. (Babić, J.,

- Kučić Grgić, D., Očelić Bulatović, V., ur.) Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Croatia, 2023, str. 210-219, ISBN 2671-0668 (Online). 19th Ružička days („Today science – tomorrow industry), Vukovar, Croatia, 21-23 September 2022, European Chemical Society (EuChemS) i European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG).
3. Mikac, I., **Štefanac, T.**, Grgas, D., Radman, S., Habuda-Stanić, M., Landeka Dragičević, T. (2021) Statičko/anoksična konfiguracija procesa denitrificirajuće defosfatacije uz NO<sub>2</sub>-N i NO<sub>3</sub>-N kao akceptore elektrona, *18th Ružička Days “Today Science – Tomorrow Industry” – Proceedings*. (Jukić, A., Očelić Bulatović, V., Kučić Grgić, D., ur.) Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Croatia, 2021, str. 228-234, ISBN 2671-0668 (Online). 18th Ružička days („Today science – tomorrow industry), Vukovar, Croatia, 16-18 September 2020, European Chemical Society (EuChemS) i European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG).
  4. Grgas, D., Andrašec, F., Radman, S., Habuda-Stanić, M., **Štefanac, T.**, Landeka Dragičević, T. (2021) Učinkovitost uklanjanja P u anoksičnom uvjetu uz NO<sub>3</sub>-N kao akceptor elektrona, *18th Ružička Days “Today Science – Tomorrow Industry” – Proceedings*. (Jukić, A., Očelić Bulatović, V., Kučić Grgić, D., ur.) Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Croatia, 2021, str. 197-206, ISBN 2671-0668 (Online). 18th Ružička days („Today science – tomorrow industry), Vukovar, Croatia, 16-18 September 2020, European Chemical Society (EuChemS) i European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG).
  5. Grgas, D., **Štefanac, T.**, Marković, N., Šipalo, T., Radman, S., Landeka Dragičević, T. (2019) Denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita, *17th Ružička Days “Today Science – Tomorrow Industry” – Proceedings*. (Tomas, A., Ačkar, Đ. ur.) Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Croatia, 2019, str. 155-164, ISBN 2459-9387 (Tisak). 17th Ružička days („Today science – tomorrow industry), Vukovar, Croatia, 19-21 September 2018, European Chemical Society (EuChemS) i European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG).

6. **Štefanac, T.**, Grgas, D., Pavković, N., Radman, S., Landeka Dragičević, T. (2019) Učinak koncentracije otopljenog kisika na autotrofnu nitrifikaciju, *17th Ružička Days "Today Science – Tomorrow Industry" – Proceedings*. (Tomas, A., Ačkar, Đ. ur.) Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Croatia, 2019, str. 165-175, ISBN 2459-9387 (Tisak). 17th Ružička days („Today science – tomorrow industry), Vukovar, Croatia, 19-21 September 2018, European Chemical Society (EuChemS) i European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG).
7. Grgas, D., **Širac, T.**, Prodan, M., Brozinčević, A., Landeka Dragičević, T. (2017) Denitrifikacija: Učinak omjera C/N, *16th Ružička Days "Today Science – Tomorrow Industry" – Proceedings*. (Jukić, A., Šubarić, D. ur.) Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Zagreb, Croatia, 2017, str. 277-288, ISSN 2459-9387. 16th Ružička days („Today science – tomorrow industry), Vukovar, Croatia, 21-23 September 2016, European Federation of Food Science & Technology (EFFoST), European Association for Chemical and Molecular Science (EuChemS) i European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG).