

Denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita u anoksičnim uvjetima: Učinak omjera C/P

Bošnjak, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:416433>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Dora Bošnjak

7273/PT

**DENITRIFICIRAJUĆA DEFOSFATACIJA PREKO
NITRITA U ANOKSIČNIM UVJETIMA: UČINAK
OMJERA C/P
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Biotehnologija u zaštiti okoliša

Mentor: Prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita u anoksičnim uvjetima:

Učinak omjera C/P

Dora Bošnjak, 0058209062

Sažetak: Istražena je denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita pri anoksičnim uvjetima. Denitrificirajuća defosfatacija je istražena pri početnoj koncentraciji 15 mg PO₄-P/L uz nitrit kao akceptor elektrona pri omjeru N/P 2, te uz natrijev acetat kao izvor C dodan u omjeru C/N 0,5, 1, 2, 3, 4, i 7 (ekvivalent omjeru C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14). Nije kontroliran pH. Dokazan je unutarstanično pohranjen poliP. Povećanjem omjera C/N povećava se učinkovitost uklanjanja i PO₄-P i NO₂-N do omjera C/N 4 koji predstavlja minimalnu količinu C iz natrijeva acetata potrebnu za potpunu denitrifikaciju i pri tome ostvaren unos P (77%). Pri omjeru C/N 7 proces denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita je rezultirao potpunom denitrifikacijom i učinkovitosti uklanjanja PO₄-P 72%, i samo 37% redukciju KPK.

Ključne riječi: anoksični uvjet, C/P, DPAOs, natrijev acetat, NO₂-N

Rad sadrži: 34 stranice, 6 slika, 5 tablica, 57 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Pomoć pri izradi: dr.sc. Dijana Grgas , prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Datum obrane: 9. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food technology

Department of Food-technology engineering

Laboratory for biological wastewater treatment

Scientific area: Biotechnical Science

Scientific field: Food Technology

Denitrifying dephosphatation via nitrite at anoxic conditions:

The effect of ratio C/P

Dora Bošnjak, 0058209062

Abstract: Denitrifying dephosphatation via nitrite at anoxic conditions was investigated. The denitrifying dephosphatation of an initial concentration of 15 mg PO₄-P/L with nitrite as an electron acceptor at a ratio of N/P 2 and with sodium acetate as a source of C added at a C/N ratio of 0.5, 1, 2, 3, 4, and 7 (equivalent to ratio C/P 1, 2, 4, 6, 8 and 14). No pH was controlled. Intracellularly stored polyP was proven. Increasing the C/P (C/N) ratio increases the efficiency of PO₄-P and NO₂-N removal to a C/N 4 which represents the minimum amount of C required for full denitrification and P uptake of 77%. At the ratio C/N 7 the denitrification dephosphatation process via nitrite resulted in the complete denitrification and a PO₄-P removal efficiency of 72%, and COD was reduced only 37%.

Keywords: anoxic, C/P, DPAOs, NO₂-N, sodium acetate

Thesis contains: 34 pages, 6 figures, 5 tables, 57 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10000 Zagreb

Mentor: PhD Tibela Landeka Dragičević, Full Professor

Technical support and assistance: PhD Dijana Grgas, PhD Tibela Landeka Dragičević, Full Professor

Defence date: July 9th 2019

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Fosfor u okolišu	2
2.2. Proces biološkog uklanjanja fosfora.....	2
2.3. Biološko uklanjanje fosfora – mehanizam procesa	2
2.4. Mikroorganizmi u uklanjanju fosfora	4
2.5. Zakonodavstvo u obradi otpadnih voda.....	5
2.6. Čimbenici procesa denitrificirajuće defosfatacije	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJALI I METODE	11
3.1.1. Izvor PO_4 -P, elektron akceptor – NO_2 N i elektron donor – $NaC_2H_3O_2$	11
3.1.2. Dizajn pokusa	11
3.1.3. Aparatura, instrumenti, pribor i kemikalije	12
3.2. ANALITIČKE METODE	13
3.2.1. Određivanje koncentracije fosfata.....	13
3.2.2. Određivanje koncentracije nitrita.....	14
3.2.3. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)	14
3.2.4. Određivanje pH vrijednosti	15
3.2.5. Određivanje koncentracije otopljenog kisika	16
3.2.6. Određivanje temperature.....	16
3.2.7. Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS) i ukupne organske suspendirane tvari (VSS).....	16
3.3. MIKROBIOLOŠKE METODE.....	18
3.3.1. Metoda bojanja po Neisseru – određivanje poliP	18
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	20
4.1. Učinkovitost uklanjanja PO_4 -P u ovisnosti o omjeru KPK/P u procesu denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita	21
4.2. Učinak pH na proces anoksičnog uklanjanja PO_4 -P	27
4.3. Dokazivanje poliP bojanjem po Neisseru	28
5. ZAKLJUČCI.....	29
6. POPIS LITERATURE	30

1. UVOD

Kontrolom dostupnosti hranjivih tvari (N i P) u vodnim tijelima sprječava se eutrofikacija koja je uzrok brojnih ekoloških problema. U konvencionalnom sustavu poboljšanog biološkog uklanjanja fosfora (EBPR, engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*) fosfat akumulirajući organizmi (PAOs, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*) u naizmjeničnim anaerobnim i aerobnim uvjetima provode uklanjanje P iz otpadne vode, unoseći $PO_4\text{-P}$ u mikrobnu stanicu i odvođenjem viška mulja uklanja se i P iz otpadne vode (Metcalf & Eddy, 2003). Denitrificirajući fosfat akumulirajući organizmi (DPAOs, engl. *Denitrifying Phosphorus Accumulating Organisms*), slično kao PAOs, u mikrobnom metabolizmu u anaerobnim uvjetima koriste vanjski izvor ugljika za pohranu polihidroksialkanoata (PHA, engl. *Polyhydroxyalkanoates*), uključujući polihidroksibutirat (PHB, engl. *Polyhydroxybutyrate*) i polihidroksivalerat (PHV, engl. *Polyhydroxyvalerate*). Nakon toga koriste $NO_2\text{-N}$ i $NO_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona, umjesto kisika, za unos P u stanicu oksidacijom PHA (Kapagiannidis i sur., 2013; Peng i sur., 2011). DPAOs se mogu podijeliti u dvije skupine: (i) DPAO- $NO_3\text{-N}$ (denitrificirajući organizmi koji nakupljaju P preko nitrata) koji koriste kisik i $NO_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona, i (ii) DPAO- $NO_2\text{-N}$ (denitrificirajući organizmi koji nakupljaju P preko nitrita) u kojima su kisik, $NO_2\text{-N}$ i $NO_3\text{-N}$ akceptori elektrona (Hu i sur., 2003).

PAO koji ima sposobnost akumuliranja P i denitrifikacije je *Candidatus Accumilibacter phosphatis*. Njegove dvije glavne skupine su PAOI i PAOII. PAOI mogu koristiti nitrit i/ili nitrat kao akceptor elektrona, dok PAOII ne mogu koristiti nitrat kao akceptor elektrona jer im nedostaju enzimi nitratne reduktaze. U konvencionalnom EBPR, denitrificirajuće uklanjanje P može smanjiti do 30% potražnju za aeracijom, 50% potrebu za izvorom ugljika i 50% proizvodnju mulja (Wang i sur., 2015). DPAOs su oko 40% manje učinkoviti u smislu generiranja energije od PAOs i imaju 20-30% niži prinos stanica (Murnleitner i sur., 1997). Brojni čimbenici mogu imati učinka na denitrificirajuće uklanjanje P, poput anaerobno/aerobno vrijeme reakcije, izvor C, pH, otopljeni kisik (DO, engl. *Dissolved Oxygen*), temperatura i dr. (Li i sur., 2017; Jena i sur., 2016; Liu i sur., 2014; Tayà i sur., 2013; Frison i sur., 2013; Wang i sur., 2011; Freitas i sur., 2009; Hu i sur., 2002).

Potencijalni problem u procesu denitrificirajuće defosfatacije je izloženost DPAOs visokoj koncentraciji $NO_2\text{-N}$ koja može inhibirati aktivnost DPAOs. Istaknuto je nekoliko graničnih vrijednosti $NO_2\text{-N}$ u rasponu od 3-93,7 mg $NO_2\text{-N/L}$ (Peng i sur. 2011; Zhou i sur., 2007; Saito i sur., 2004; Meinhold i sur., 1999).

U ovom radu istražen je učinak organskog ugljika – donora elektrona (natrijev acetat) pri omjeru C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14 u procesu denitrificirajuće defosfatacije 15 ± 1 mg $PO_4\text{-P}$ uz $NO_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona pri N/P 2, pri anoksičnim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Fosfor u okolišu

Fosfor je neobnovljivi izvor energije. Smatra se da će od 2035. godine potreba za fosforom biti veća od raspoloživih zaliha fosfata u stijenama (Cordell i sur., 2009).

U okolišu, u otpadnoj vodi, fosfor dopijeva putem umjetnih gnojiva, pesticida, organofosfornih insekticida, boja, septičkih jama, kanalizacije, kućanskog i industrijskog otpada i drugo. U otpadnoj vodi fosfor je prisutan u nekoliko oblika, uključujući orto-, poli- i organo-fosfate. Fosfati u vodnim tijelima doprinose pojavi eutrofikacije (Conley i sur., 2009).

2.2. Proces biološkog uklanjanja fosfora

Tijekom godina razvijane su različite konfiguracije procesa biološkog uklanjanja fosfora, a sve uključuju korak anaerobne zone koju slijedi aerobna zona.

EBPR proces je prvi puta uporabljen i opisan 1974. godine (Barnard, 1974) i od tada se istražuje. *Phoredox* opisuje proces s anaerobnim i aerobnim slijedom koji potiče biološko uklanjanje fosfora (BPR, engl. *Biological Phosphorus Removal*), (Barnard, 1975). Drugi procesi imenovani su s ciljem da se istakne specifična konfiguracija procesa, poput A/O (anaerobno/aerobno) ili A²O (anaerobno/anoksično/aerobno). A/O je sličan Phoredox procesu. Glavna razlika Phoredox (A/O) procesa i A²O procesa je da se u Phoredox (A/O) procesu ne zbiva nitrifikacija. Proces A²O i UCT (University of Cape Town) su dva uobičajena sustava koja se koriste za uklanjanje nitrata sa BPR procesom (Metcalf & Eddy, 2003).

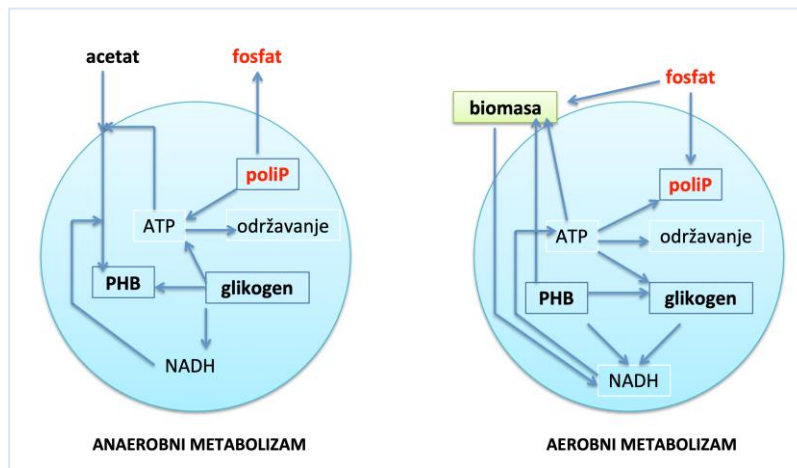
U konvencionalnom sustavu obrade otpadne vode sa aktivnim muljem uklanja se mala količina P koja se zbiva zbog mikrobnog rasta. Uobičajeno, u suhoj tvari biomase sadržaj P dostiže samo 1,5-2%, što predstavlja zahtjev za P za uobičajeni bakterijski rast (Schlegel, 1993). U EBPR sustavu obrade otpadne vode sadržaj fosfora može doseći 4-5% suhe tvari mulja, a istraživanje EBPR procesa u laboratorijskom mjerilu ističe i do 15% P u suhoj tvari mulja (Crocetti i sur., 2000).

2.3. Biološko uklanjanje fosfora – mehanizam procesa

Biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode temelji se na mikrobnom metabolizmu fosfat akumulirajućih organizama (PAOs), koji unose fosfor u stanice i odvođenjem mulja iz sustava se uklanja fosfor.

Proces se provodi u anaerobnim i aerobnim/anoksičnim uvjetima. Većina PAOs može koristiti nitrit umjesto kisika za oksidaciju pohranjenog izvora ugljika (Jena i sur., 2016; Wang i sur., 2015; Blackall i sur., 2002; Kuba i sur., 1994).

Mikrobni metabolizam uklanjanja P dan je slikom 1.



Slika 1. Mehanizam mikrobnog metabolizma uklanjanja P (Blackall i sur., 2002)

U anaerobnoj zoni (Metcalf & Eddy, 2003; Blackall i sur., 2002) zbiva se:

- (i) asimilacija acetata u stanicu, koji je nastao fermentacijom biorazgradivog organskog materijala i prevođenje u unutarstanično pohranjene PHAs (PHB);
- (ii) otpuštanje $O-PO_4$ iz stanice iz nagomilanog poliP u miješanu tekućinu, te produkcija energije i korištenje te energije nastale otpuštanjem $O-PO_4-P$ za asimilaciju acetata i proizvodnju i unutarstanično skadištenje polihidroksibutirata (PHB);
- (iii) pohranjeni glikogen se metabolizira glikolizom i proizvodi ATP i reducirajuće ekvivalente (NADH);
- (iv) uzimanje acetata povezano je sa otpuštanjem orto-fosfata ($O-PO_4$), kao i magnezijvim, kalijevim i kalcijevim kationima;
- (v) u PAOs stanicama raste PHB a smanjuje se poliP.

U aerobnoj/anoksičnoj zoni (Metcalf & Eddy, 2003; Blackall i sur., 2002) se zbiva:

- (i) unos orto-fosfata ($O-PO_4$) u stanicu i pohranjivanje u obliku poliP
- (ii) unutarstanično pohranjeni PHB se metabolizira dajući energiju za rast novih stanica i obnavljanje rezervi glikogena;
- (iii) odvođenjem viška biomase pohranjeni poliP se uklanja iz sustava.

U EBPR procesu, u uklanjanju P, transformacije P i C (ugljika) se zbivaju i u anaerobnoj i u aerobnoj zoni, a sve se zbivaju u istom organizmu – PAOs.

Anaerobna zona u anaerobno/aerobnom procesu se naziva "selektor" jer osigurava uvjete povoljne za proliferaciju PAOs zbog činjenice da dio biorazgradivog KPK uporabe PAOs umjesto ostalih heterotrofa. Budući da PAOs preferiraju fermentacijske produkte male molekulske mase ta preferirana hrana ne bi bila dostupna bez anaerobne zone u kojoj se fermentira ulazni biorazgradivi KPK (bKPK) do acetata. Kako PAOs imaju pohranjen poliP, otpuštanjem O-PO₄ ostvaruju energiju za asimilaciju acetata u anaerobnoj zoni. Ostali aerobni heterotrofi nemaju mehanizam za uzimanje acetata. PAOs formiraju guste, dobro taložive flokule u aktivnom mulju (Metcalf & Eddy, 2003).

U anoksičnim uvjetima uz nitrat kao akceptor elektrona, DPAOs umjesto kisika koriste nitrate kao akceptor elektrone za dobivanje energije i akumulaciju P i tako istovremeno uklanjaju nitrate i fosfate iz otpadnih voda (Jena i sur., 2016).

U aerobnoj/anoksičnoj fazi, PAOs koriste kisik/nitrat kao elektron akceptor te PHA za dobivanje energije za stanični rast, sintezu glikogena i unos P. Unutarstanično pohranjeni P u obliku poliP se odvodi iz sustava sa otpadnim muljem. Alternativno, kao elektron akceptori se mogu koristiti nitrati ili nitriti (anoksični uvjeti) umjesto kisika (aerobni uvjeti), što čini prednost jer se i N i P uklanjaju u istom procesu (Kuba i sur., 1994).

U usporedbi s konvencionalnim naprednim biološkim procesom uklanjanja P (EBPR), proces denitrificirajuće defosfatacije (DPR, denitrificirajuće uklanjanje fosfora, engl. *Denitrifying phosphorus removal*) može smanjiti potrebu za aeracijom za 30%, zahtjeve za izvorom ugljika za 50% i produkciju mulja za 50% (Wang i sur., 2015).

2.4. Mikroorganizmi u uklanjanju fosfora

Brojni mikroorganizmi su sposobni pohraniti (skladištiti) višak fosfora u svoje stanice. Mikroorganizmi u EBPR procesu su PAOs, GAOs i DPAOs, (Seviour i McIlroy, 2008).

Fosfor pohranjujući organizmi su prvi put izolirani iz mulja Back River (Baltimor) i Seneca Falls (New York) uređaja na kojima se zbivalo uklanjanje fosfora, a identificirani su kao *Acinetobacter* (Fuhs i Chen, 1975). Te bakterije su kratki, debeli, gram-negativni štapići veličine 1-1,5 µm. Pojavljuju se u parovima, kratkim lancima ili klasterima.

Druge bakterije koje se često mogu pronaći u sustavima za uklanjanje fosfora su vrste *Pseudomonas* i *Aeromonas*. *Pseudomonas* su odgovorni za uzimanje/unos P, a *Aeromonas* su povezani s fermentacijom i produkcijom hlapivih masnih kiselina (VFA, engl. *volatile fatty acid*) (Sedlak, 1991).

Skupine bakterija *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Candidatus accumulibacter phosphatis* se smatraju predstavnicima PAOs i predominantne su vrste za uklanjanje P u cijeloj populaciji aktivnog mulja (Ahn i sur., 2007; Lin i sur., 2003).

Činjenica da fosfor uklanjajući organizmi mogu asimilirati produkte fermentacije u anaerobnoj zoni daje im kompetitivnu prednost pred drugim mikroorganizmima aktivnog mulja. Tako, anaerobna faza rezultira u selekciji i razvoju populacije fosfor akumulirajućih organizama. Istaknuto je da je *Acinetobacter* relativno spororastuća vrsta i preferira lako razgradiv izvor C (Rensink i sur., 1981).

2.5. Zakonodavstvo u obradi otpadnih voda

Istraživanja u području obrade otpadnih voda imaju za cilj postići učinkovitu obradu, nisku cijenu izvedbe procesa i održavanja i vođenja procesa obrade, a usmjerena su ka boljem razumijevanju bioloških procesa, metaboličkih aktivnosti odgovornih vrsta mikroorganizama, razvoju novih i poboljšanju postojećih bioloških procesa obrade otpadne vode.

Zakonskim propisima (NN 80/13; NN3/16) definirane su maksimalne dopuštene koncentracije sastojaka u obrađenoj otpadnoj vodi. Granične vrijednosti nekih odabranih pokazatelja kakvoće prema NN80/13 i NN3/16, a važne za razmatranje rezultata ovog rada su prikazane u Tablici 1.

Tablica 1. Granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama (NN80/13), za neke odabrane pokazatelje

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

2.6. Čimbenici procesa denitrificirajuće defosfatacije

Brojni čimbenici imaju učinka na proces denitrificirajuće defosfatacije, poput anaerobno/aerobno vrijeme reakcije, izvor C, pH, otopljeni kisik (DO), temperatura i dr.

P uklanjanje je visoko ovisno o koncentraciji organskih sastojaka, a njihova prekomjerna koncentracija inhibira P unos u stanice PAOs. Ukoliko je prisutna prekomjerna koncentracija organskih sastojaka u anaerobnoj zoni organski sastojci će dospjeti u aerobnu zonu, što rezultira proliferacijom uobičajenih heterotrofnih organizama i inhibicijom P unosa u PAOs stanice (Freitas i sur., 2009). Kao najčešći supstrat u EBPR procesima navodi se acetat, no istražuju se i drugi izvori C. Iako je acetat u istraživanjima pokazivao dobra iskorištenja i stabilno izdvajanje fosfora, mikrobiološko nadmetanje PAO i GAO narušava pouzdanost procesa. Unatoč povremenim inhibicijama, visoko uklanjanje fosfora zabilježeno je u kulturama koje koriste acetat kao jedini izvor ugljika, a obogaćene su s *Accumulibacter* kulturom uz manju prisutnost GAOs (He i sur., 2006; McMahon i sur., 2002; Hesselmann i sur., 1999).

Ulazno organsko šok opterećenje značajno utječe na N i P uklanjanje, a veće organsko ulazno šok opterećenje značajno smanjuje uklanjanje P u procesu denitrificirajuće defosfatacije (Li i sur., 2013).

Smanjenje anaerobnog reakcijskog vremena sa 150 na 90 min rezultira obogaćivanjem PAOs populacije sa *Accumulibacter* i promovira provođenje denitrificirajuće defosfatacije (Wang i sur., 2011).

Hu i sur. (2002) su istaknuli da je glavni čimbenik koji utječe na pojavu DPAOs, i posljedično anoksični P unos, koncentracija nitrata (elektron akceptora) u anoksičnom reaktoru, koja bi trebala biti dovoljno visoka, ili da premašuje denitrifikacijski potencijal uobičajenih heterotrofnih organizama u svrhu stimuliranja DPAOs jer je specifična brzina denitrifikacije DPAOs značajno manja od specifične brzine rasta uobičajenih heterotrofnih organizama. Zbog te kompeticije, ukoliko koncentracija nitrata u anoksičnom reaktoru premašuje denitrificirajući potencijal uobičajenih heterotrofnih organizama, DPAOs će moći koristiti "višak" nitrata, i razviti se u sustavu. U anaerobnim uvjetima je nepoželjna prisutnost nitrata jer nitrati uzrokuju kompeticiju između denitrifikanata i PAOs za organske sastojke, što rezultira manjim unosom organskih sastojaka u PAOs i manjim otpuštanjem P u anaerobnim uvjetima, te zatim manjim unosom P u aerobnim uvjetima (Guerrero i sur., 2011).

U radu Katsou i sur. (2014) istražen je učinak početne koncentracije nitrata na brzinu unosa-uzimanja fosfora (PUR, engl. *Phosphorus Uptake Rate*) uz fermentiranu tekućinu proizvedenu iz otpadnog voća i povrća kao izvor ugljika, pri 20 °C, uz početnih 32,5 mg NO₂-N/L, 66,1 mg NO₂-N/L i 99,2 mg NO₂-N/L. Povećanje koncentracije NO₂-N sa 32,5 na 66,1 mg NO₂-N/L nema učinka na unos P, ali povećanje na 99,2 mg NO₂-N/L se odražava na proces unosa P na način

da se smanjuje PUR za 17% u odnosu na početnih 32,5 mg NO₂-N/L, odnosno za 24% u odnosu na početnu koncentraciju 66,1 mg NO₂-N/L. Pri tome je određena brzina unosa P (PUR) od 2,22 mgP/gVSS,h, 2,41 mgP/gVSS,h i 1,84 mgP/gVSS,h uz NO₂-N od manje prema većoj koncentraciji. Povećanje koncentracije nitrita nije imalo učinka na brzinu denitrifikacije, ostvarena je brzina denitrifikacije od 2,44 mg NO₂-N/L,h, 3,17 mg NO₂-N/L,h i 3,60 mg NO₂-N/L,h (Katsou i sur., 2014)

U paralelnim pokusima, pri 20 °C, u kojima je kao izvor ugljika poslužila fermentirana tekućina proizvedena iz otpadnog voća i povrća obogaćena sa propionskom i butiričnom kiselinom, uz početnih 26 mg NO₂-N/L, 52,9 mg NO₂-N/L i 119,4 mg NO₂-N/L je rezultirala smanjenjem unosa P. Određena je brzina unosa P od 4,64 mgP/gVSS,h, 4,14 mgP/gVSS,h i 2,97 mgP/gVSS,h, a istovremeno postignuta je denitrifikacija od 3,24 mg NO₂-N/L,h, 3,51 mg NO₂-N/L,h i 4,08 mg NO₂-N/L,h s povećanjem početne koncentracije NO₂-N (Katsou i sur., 2014). Limitirana raspoloživost sa nitratom i nitritom inhibira anoksičan unos P zbog odsustva elektron akceptora. Primjenom strategije intermitentne aeracije postiže se denitrificirajuća defosfatacija i pri nižoj temperaturi (Pan i sur., 2013).

Učinak pH vrijednosti, pH 6, 7 i 8, na denitrificirajuću defosfataciju preko nitrita istraživali su Zhang i sur. (2010). Pokusi su vođeni s početnih 360 mg KPK/L, 32 mg NO₂-N/L i 9,6 mg P/L. U anaerobnim uvjetima, s porastom pH vrijednosti, rasla je i količina otpuštenog P, a najveća količina otpuštenog P je postignuta pri pH 8. U anoksičnim uvjetima, pri pH 7 je postignuto najveći unos P, sa konačnom koncentracijom 2,9 mg P/L.

pH (visoka i niska vrijednost pH) ima učinka na anaerobno otpuštanje i anoksični unos P. Pri anoksičnim uvjetima niski pH može utjecati na smanjenje otpuštanja P, kao i inhibirati anoksični unos P. Porastom pH anoksični unos P se povećava, ali pri visokom pH neučinkovito je otpuštanje P, količina PHB kao elektron donora se smanjuje i inhibira se anoksični unos P. Također, PO₄-P se pri visokom pH taloži na površini micela, inhibira adsorpciju ugljika i anaerobno otpuštanje P. Kao optimalna vrijednost pH se navodi pH 7,0-8,0 odnosno 6,0-8,5 (Li i sur., 2017).

U radu Ya-yi i sur. (2007) istražen je proces anaerobno-anoksičnog uklanjanja P u SBR u ovisnosti o početnoj koncentraciji NO₂-N (5,5, 9,5 i 15 mg NO₂-N/L) i MLSS (1844, 3231, 6730 mg/L). Utvrđeno je da su NO₂-N, MLSS i pH ključni čimbenici u procesa anaerobnog otpuštanja i anoksičnog unosa P u procesu biološkog uklanjanja P. Inhibicija denitrifikacije i defosfatacije se zbivala se pri 15 mg NO₂-N. Povećanjem koncentracije biomase sa 1844 mg MLSS/L na 6730 mg MLSS/L povećava se brzina denitrifikacije i brzina anoksičnog P unosa. Ipak, prosječan $P_{unos}/N_{reduciran}$ denitrifikacijom je smanjen sa 2,1 na 1,57 mg PO₄-P/mg NO₃-N. Zaključili su da povećanje MLSS skraćuje vrijeme reakcije P otpuštanja i anoks P unosa, ali istovremeno

veća koncentracija MLSS smanjuje brzinu denitrifikacije. Isto tako, naglo povećanje pH tijekom anoksičnog perioda je rezultat denitrifikacije i anoksičnog unosa P. Brzina anaerobnog otpuštanja P raste s povećanjem pH, ali pri $\text{pH} > 8$ u miješanoj tekućini smanjuje se koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$ kao rezultat reakcije kemijskog taloženja $\text{PO}_4\text{-P}$ pa autori sugeriraju strogu kontrolu pH ispod pH 8,0 da se izbjegne kemijsko taloženje P.

O kemijskom taloženju P pri $\text{pH} > 8,0$ ističe i Vargas i sur. (2009).

U biološkom uklanjanju fosfora mora biti dostupno suvišak kationa što jer povezano sa pohranjivanjem poliP. Preporučeni molarni omjer za Mg, K i Ca prema P je 0,71, 0,50 i 0,25.

U procesu denitrificirajuće defosfatacije više od 80% P se uklanja pri temperaturi u rasponu 20-30 °C, a učinkovitost uklanjanja P se smanjuje pri temperaturi iznad 35 °C i ispod 10 °C (Liu i sur., 2014). Li i sur. (2010) su istaknuli da je najveće uklanjanje fosfora od 95% postignuto pri 15 °C, od istraženih temperatura 5, 15 i 25 °C. Pokusi su vođeni u anaerobno-aerobnom režimu sa početnih 20 mg P/L. Bassin i sur. (2012) su pokazali da se pri 20 °C postiže više od 90% učinkovitosti uklanjanja P, u odnosu na 60% pri 30 °C.

Učinak kisika, nitrata i nitrita, kao elektron akceptora, na DPAOs anoksičan unos P, s acetatom kao izvorom ugljika istraživali su Zhou i sur. (2010). Pokazali su da je, među istraživanim, kisik najbolji elektron akceptor za P uklanjanje. Sa nitritom kao akceptorom elektrona najveća brzina P unosa i denitrifikacije postignuta je pri početnoj koncentraciji nitrita 20 mg N/L, od istraženih koncentracija 4, 6, 8, 16, 20, 40 i 80 mg N/L, a optimalan omjer N/P je iznosio 0,60, od istraženih N/P omjera 0,09, 0,13, 0,18, 0,36, 0,60, 1,19 i 2,38. Sa nitratom kao akceptorom elektrona postignuta je najveća brzina unosa P i denitrifikacija pri početnoj koncentraciji nitrata 30 mg N/L, od istraženih koncentracija 5, 10, 20, 30, 60 i 120 mg N/L, a optimalan N/P omjer se pokazao 0,89, od istraženih omjera N/P 0,12, 0,24, 0,49, 0,89, 1,79 i 3,58.

Učinak omjera KPK/N na istovremeno uklanjanje KPK i nutrijenata pri anoksičnim uvjetima sa acetatom kao izvorom ugljika u šaržnim pokusima istražili su Jena i sur. (2013). Provedeni su pokusi pri omjeru KPK/N 0,36, 0,97, 1,36, 1,62, 4,06 i 6,37 a rezultirali uklanjanjem $\text{PO}_4\text{-P}$ 77,6%, 88,7%, 90,5%, 95,9%, 93,1% i 93,2%. Optimalan omjer KPK/N se pokazao 1,62, koji je osigurao uklanjanje KPK 93%, nitrata 98% i $\text{PO}_4\text{-P}$ 96%. S porastom omjera KPK/N od 0,36 do 1,62 rasla je brzina denitrifikacije i unosa P, a pri omjeru KPK/N 1,62 je postignuta maksimalna brzina denitrifikacije od 0,4 mg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{mg VSS}$, dan, i unosa P. Daljnji porast omjera KPK/N je negativno utjecao na brzinu denitrifikacije. Istraženi omjeri KPK/N imali su mali učinak na brzinu unosa P, koja je bila u rasponu 0,007-0,014 mg $\text{PO}_4/\text{mg VSS}$, dan. Autori (Jena i sur., 2013) sugeriraju da omjer KPK/N ima veći učinak na denitrifikaciju nego na brzinu uklanjanja PO_4 .

Kompeticiju između PAOs i GAOs, s naglaskom na učinak nitrita su istražili Tayà i sur. (2013). Pokuse su vodili u SBR, sa propionskom kiselinom kao izvorom ugljika, pri početnoj vrijednosti 5 mg P/L i KPK/P omjerom 20, a nitrit je dodan u dva pulsa po 30 mg N/L. Njihovi rezultati sugeriraju da nitrit može omogućiti obogaćivanje PAOs. Pokazali su da je moguće iz GAOs-obogaćene biomase (88% *Deftuviicoccus* i 10% PAOs) tijekom vođenja procesa više od 50 dana sa propionatom kao izvorom ugljika, i nitritom kao akceptorom elektrona u anaerobno-anoksičnim uvjetima postići 85% PAOs u mulju i <10% GAOs.

Prekretnicu u denitrificirajućoj defosfataciji su napravili Jena i sur. (2016), koji su prvi objavili "long-term" vođenje procesa bez anaerobne faze. Uklanjanje fosfora su vodili u anoksično-aerobnom SBR sa acetatom kao izvorom ugljika, pri omjeru KPK/nitrat 4 i KPK/fosfat 137, sa početnih 4000 mg KPK/L i 1000 mg NO₃-N/L. Izostavljena je anaerobna faza procesa zbog dostupnosti NO₃-N i kisika kao akceptora elektrona u anoksičnoj odnosno aerobnoj fazi. Vrijednost pH nisu kontrolirali. U anoksičnoj fazi su zabilježili istovremeno uklanjanje KPK 72%, nitrata 98% i fosfata 86%. U aerobnoj fazi su postigli još 26% uklanjanje preostalog KPK uz otpuštanje P, pri čemu je sveukupno uklanjanje P bilo 76%. Istaknuli su da je obogaćivanju DPAOs u odnosu na uobičajene heterotrofne organizme pogodovao suvišak elektron donora i akceptora u anoksičnoj fazi, a u aerobnoj fazi iscrpljenje nitrata je omogućilo dovoljne uvjete gladovanja za održavanje dominacije DPAOs. Otpuštanje P u aerobnim uvjetima su pripisali stresnim uvjetima za DPAOs (Barak i Rijn, 2000), a dva su moguća razloga. Prvo, budući da dominantni mikroorganizmi ne mogu koristiti kisik kao elektron akceptor a nitrat je utrošen u prethodnoj anoksičnoj fazi dolazi do raskidanja poliP zbog osiguravanja energije za održavanje stanice (Jena i sur., 2015). Drugo, aerobna faza je započela s pH vrijednosti 8,5, kao rezultat denitrifikacije u anoksičnoj fazi, a pri višem pH veća je potreba za energijom za korištenje supstrata, što je rezultiralo otpuštanjem P iz stanica (Jeon i sur., 2001). Nadalje, istaknuli su (Jena i sur., 2016) da je unatoč otpuštanju P u aerobnim uvjetima, aerobna faza nužna jer osigurava DPAOs dominaciju nad heterotrofnim denitrifikantima jer omogućava važan uvjet gladovanja, kao što je anaerobna faza u konvencionalnom EBPR sustav. Istaknuli su, također, da je u prisutnosti acetata i nitrata značajan unos P u anoksičnim uvjetima pokazatelj da se redukcijski ekvivalenti za korištenje ugljika primarno koriste iz TCA ciklusa a ne iz glikolize. Nadalje, sugeriraju da se dio KPK koristi za akumulaciju PHB unutar mikrobnih stanica, a dio za redukciju nitrata, za rast i održavanje stanica. Zatim, ukazali su da je u anoksičnim uvjetima akumulacija fosfata neovisna o metabolizmu PHB, i pripisali takvo ponašanje adaptaciji obogaćene mikrobne populacije na prisutnost elektron akceptora i donora.

U radu Jena i sur. (2015) istraženo je i vrednovano je istovremeno uklanjanje NO₂-N, PO₄-P i KPK iz sintetske otpadne vode pomoću mješovitog mikorbnog konzorcija u anoksičnim uvjetima

pri različitom početnom opterećenju sa ugljikom u batch reaktorskom sustavu. Tijekom 6 sati inkubacije obogaćeni DPAOs su bili sposobni ukloniti 87% KPK od početnog opterećenja sa ugljikom 2 g/L, dok je postignuto uklanjanje 97% NO₂-N i 87% PO₄-P uz akumulaciju PHB (49 mg/L) pri početnom opterećenju sa ugljikom od 8 g/L. Iscrpljivanje nitrata nakon 6 sati imalo je negativan učinak na brzinu uklanjanja KPK i PO₄-P. No, ponovnim dodavanje NO₂-N je doprinijelo većem uklanjanju KPK i PO₄-P. Osiguravanje raspoloživog NO₂-N je osiguralo provođenje procesa. Jedinstvenost ovog procesa, za razliku od konvencionalnog EBPR, je PHB akumulacija zajedno sa unosom PO₄-P i utroškom NO₂-N u anoksičnim uvjetima.

Rubio-Rincón i sur. (2017) su proučavali sposobnost PAOI da koriste nitrat kao elektron akceptor u denitrificirajućoj defosfataciji. Njihovi rezultati sugeriraju da PAOI ne mogu koristiti nitrat za anoksičan P unos. Druge mikrobne populacije, poput GAOs, su reducirale nitrat do nitrita, a PAOI su koristili nitrit za anoksičan P unos. Ukazali su da osim što su GAOs i PAOs u natjecateljskom odnosu, oni su i u sintrofiniji.

Učinak koncentracije nitrita, organskog ugljika i pH na denitrificirajuću defosfataciju preko nitrita u batch eksperimentima su istražili Zhang i sur. (2010). Rezultati su pokazali da povećanjem koncentracije nitrita se povećava i brzina anoksičnog unosa P. Pri tome najbolji rezultat je ostvaren pri početnoj koncentraciji 8,5 mg PO₄-P, početnih 350 mg KPK/L i 15,2 mg NO₂-N/L. Anaerobno otpuštanje P se smanjivalo sa povećanjem koncentracije NO₂-N dodane u anaerobnoj zoni. Dobiveni rezultati sugeriraju da kako bi se osiguralo učinkovito otpuštanje P i potom unos P, u anaerobnoj zoni treba biti manje od 2 mg NO₂-N/L. Vrlo visoka i niska početna koncentracija KPK ima negativan učinak na denitrificirajuću defosfataciju. Različiti izvori C imaju učinak na anaerobno otpuštanje P u slijedu acetat>butirična kiselina>glukoza. Povoljni pH za anaerobno otpuštanje P i anoksični unos P je oko pH 7,0, odnosno oko pH 8,0 (Zhang i sur., 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Izvor PO₄-P, elektron akceptor – NO₂-N i elektron donor – NaC₂H₃O₂

Fosfat je priređen kao vodena otopina kalijeva dihidrogen fosfata (KH₂PO₄), te u odgovarajućoj količini dodana neposredno pred početak ciljanog pokusa. Elektron akceptor, NO₂-N, je priređen kao vodena otopina NaNO₂, te je u odgovarajućoj količini dodana na početku ciljanog pokusa. Elektron donor, izvor ugljika (KPK) je natrijev acetat (NaC₂H₃O₂), odvagano u odgovarajućoj količini za odabrani omjer C/N, te dodan u planirani pokus istovremeno sa NO₂-N i PO₄-P. Pokusi su vođeni uz početnu koncentraciju 15±1 mg PO₄-P/L, pri omjeru N/P 2 i C/N 0,5, 1, 2, 3, 4 i 7 a što je ekvivalent omjeru C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14. Na početku ciljanog pokusa dodana je i otopina 0,3 ml/L elemenata u tragovima, sastava EDTA (10 g/L), FeSO₄ 7H₂O (1,54 g/L), H₃BO₃ (150 mg/L), CuSO₄ 7H₂O (30 mg/L), MnCl₂ 4H₂O (120 mg/L), KI (180 mg/L), Na₂MoO₄ 2H₂O (60 mg/L), ZnSO₄ 7H₂O (120 mg/L), CoCl₂ 6H₂O (150 mg/L).

3.1.2. Dizajn pokusa

U istraživanju uklanjanja PO₄-P u anoksičnim uvjetima uporabljen je mulj iz SBR reaktora tijekom "steady state" na kraju aerobne faze procesa. Mulj je prije provođenja pokusa u anoksičnim uvjetima opran vodovodnom vodom u tri uzastopna ponavljanja. Pokusi su provedeni diskontinuirano, u laboratorijskim čašama radnog volumena 500 mL, pri 100 o/min i 22±2 °C. pH nije kontroliran. Na početku ciljanog pokusa u laboratorijske čaše u mixed liquor (ML, engl. *Mixed liquor*) dodan je izvor ugljika – elektron donor (natrijev acetat), elektron akceptor (NO₂-N) i PO₄-P (vodena otopina KH₂PO₄). Tijekom pokusa u određenim vremenskim intervalima uzimana je određena količina miješane tekućine (ML) za analitičko određivanje koncentracije KPK, NO₂-N i PO₄-P. Koncentracija biomase izražena kao TSS (engl. *Total Suspended Solids*) i VSS (engl. *Volatile Suspended Solids*) određivana je povremeno. U laboratorijske čaše su postavljene elektrode za motrenje koncentracije otopljenog kisika (DO), temperature i pH. Metoda bojanja po Neisseru (Eikelboom i van Buijsen, 1983) uporabljena je za dokazivanje polifosfata. Pokusi su vođeni u tri paralele. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost ±standardna devijacija.

3.1.3. Aparatura, instrumenti, pribor i kemikalije

Popis kemikalija korištenih u provedbi pokusa dan je u tablici 2. Sve kemikalije su p.a. čistoće.

Tablica 2. Kemikalije korištene u provedbi eksperimenata (sve p.a. čistoće):

Kemikalija	Proizvođač
KH_2PO_4	Merck
NaNO_2	Merck
$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	GRAM-MOL
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Kemika
H_2SO_4	GRAM-MOL
Ag_2SO_4	Kemika
HgSO_4	Kemika
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Kemika
1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat	Kemika
Nesslerov reagens	Kemika
$\text{K-Na-C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$	GRAM-MOL
KCl	Alkaloid
EDTA	Merck
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
H_3BO_3	Merck
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
KI	Merck
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck
Metilen plavo	Merck
Etanol, 96%	Merck
Octena kiselina (glaciale)	Merck
Kristal-violet	Merck
Krisoidin y	Merck

U provedbi pokusa anoksičnog uklanjanja $\text{PO}_4\text{-P}$ uporabljena je aparatura navedena u tablici 3.

Također, uporabljeno je i standardno laboratorijsko posuđe, pribor i materijal, poput laboratorijske staklene čaše, pincete, stalci, kleme, pipete, silikonske cijevi, filter papr i drugo.

Tablica 3. Aparatura uporabljena u pokusima anoksičnog uklanjanja PO₄-P

Aparat	Proizvođač
Magnetske mješalice	Thermo Scientific, Supernuova
Kisikova elektroda i mjerni aparat	DurOx, WTW Oxi3210
pH elektroda i mjerni aparat	SenTix41, WTW 330i
SBR reaktor	
Spektrofotometar	Spectroquant VEGA 400 Merck
Kompresor	HIBLOW HP 40; Hagen Model40 A-10011
Mjerač protoka zraka	
Fotometar	Photometer SQ 200 Merck
Grijače tijelo - termoblok	Thermoreactor TR 300 Merck
Kvarcne kivete	Merck
Vlagomjer	Kern MLS-D
Sustav za vakuum filtraciju	Sartorius
Svjetlosni mikroskop	Meiji
Analitička vaga	METTLER AJ150
Sterilizator/Sušionik	Instrumentaria ST-05
Titratore – digitalna bireta	Solarus, Hirschman-Laborgeräte
Dispenzeri	Ceramus Classic, Hirschman-Laborgeräte
laboratorijski stakleni, metalni i plastični pribor	

3.2. ANALITIČKE METODE

Uzorci su prije provođenja analitičkih metoda filtrirani kroz filter papir veličine pora 0,45 µm. Uzorkovanje je provedeno u određenim vremenskim intervalima.

3.2.1. Određivanje koncentracije fosfata

Fosfat u obliku ortofosfata (PO₄-P) je određivan pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14842 i 1.00673.0001.

Fotometrijski se određuje koncentracija žuto obojenog molibdovanadat fosforne kiseline nastao reakcijom iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom. Metoda je analogna APHA 4500-P C.

Postupak: U staklenu kivetu otpipetira se 5 mL prethodno filtriranog i po potrebi razrijeđenog uzorka te doda 1,2 mL $\text{PO}_4\text{-P}$ reagensa. Kiveta se zatvori i promiješa. Koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$ u mg/L izmjeri se nakon 10 minuta reakcijskog vremena.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14842 (0,5-30 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$) i 1.00673.0001 (3-100 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$)

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

Kvarcne kivete, Merck

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

3.2.2. Određivanje koncentracije nitrita

Metoda za određivanje nitrita pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14776, se temelji na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli, koja reagira s N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorom i tvori crveno-ljubičastu azo boju.

Fotometrijski se određuje intenzitet obojenja. Metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500- $\text{NO}_2\text{-B}$, i EN 26 777.

Postupak: U staklenu kivetu doda se 5 mL uzorka prethodno filtriranog i po potrebi razrijeđenog i jedna žličica $\text{NO}_2\text{-P}$ reagensa. Kiveta se zatvori i miješa dok se reagens ne otopi. Koncentracija $\text{NO}_2\text{-N}$ u mg/L izmjeri se nakon 10 minuta reakcijskog vremena.

Pribor:

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

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

Kvarcne kivete, Merck

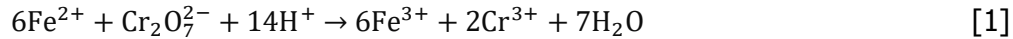
Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

3.2.3. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

Za određivanje KPK uporabljena je titrimetrijska metoda 5220C (Closed Reflux, Titrimetric method), prema Standard Methods (APHA 1995).

Uzorak se spaljuje u kiseloj sredini uz srebro sulfat (Ag_2SO_4) kao katalizator i živin sulfat (HgSO_4) za izbjegavanje interferencije nekih anorganskih spojeva poput klorida. Suvišak kalijeva bikromata titrira se otopinom feroamonijeva sulfata (FAS), $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$, uz dodatak ferroina kao indikatora, [jednadžba 1].



Postupak: U staklenu kivetu otpipetira se uzorak (2 mL), doda otopina $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HgSO}_4$ (1,2 mL) i otopina $\text{Ag}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$, (2,8 mL) te pažljivo zatvori, promiješa, i spaljuje u termoreaktoru pri 150 °C/1h. Na tamnom se ostavi da se ohladi na sobnu temperaturu. Titrira se otopinom FAS (0,1 mol/L), uz ferroin kao indikator, do promjene boje iz plavo/zelene u smeđe/crvenu. Na isti način se radi slijepa proba, a uzorak je destilirana voda. Faktor otopine feroamonijeva sulfata se odredi poput slijepa probe, ali se ne digestira.

Faktor otopine računa se prema jednadžbi [2].

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

gdje je:

1,2 - volumen (mL) otopine $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HgSO}_4$

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

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi [3].

$$\text{KPK} \left[\frac{\text{mgO}_2}{\text{L}} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times f \times 8000}{V_{\text{uzorka}}} \quad [3]$$

gdje je:

V_1 -volumen [mL] FAS utrošen za titraciju slijepa probe

V_2 -volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

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

f-faktor otopine FAS

Pribor:

Digestor, Merck Thermoreactor TR 300

Staklene kivete s čepovima

Dispenseri

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Titratore - Digitalna bireta Solarus, Hirschman-Laborgeräte

3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednost tijekom mikrobnih procesa motrena je pomoću pH-metra WTW 330i i pH elektrode SenTix41.

Tijekom pokusa pH elektroda je bila uronjena u ML, vrijednost pH je očitavana sa zaslona mjernog aparata. Umjeravanje elektrode (kalibracija) uranjanjem pH elektrode u pufer otopinu s pH 4, pH 7 i pH 10 prema uputama proizvođača provedena je svakodnevno prije uporabe pH elektrode. Nakon završetka mjerenja elektroda je isprana destiliranom vodom te čuvana u otopini elektrolita, zasićenoj otopini kalijeva klorida.

Pribor:

pH-metar WTW 330i

pH elektroda WTW SenTix41

Kemikalije:

Puffer otopina, WTW, Buffer solution pH 4, pH 7 i pH 10

3.2.5. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

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

3.2.6. Određivanje temperature

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

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

Biomasa se u bioreaktoru uobičajeno određuje kao (i) ukupne suspendirane čestice (TSS, engl. *Total Suspended Solids*) koje predstavljaju dio ukupnih čestica (TS, engl. *Total Solids*) i (ii) hlapive suspendirane čestice odnosno ukupne organske suspendirane čestice (VSS, engl. *Volatile Suspended Solids*).

TS je ostatak nakon uparavanja uzorka i sušenja pri 103-105 °C. TSS je dio TS koji se zadržao na filter papiru specifične veličine pora, i sušen do konstantne mase pri 105 °C. Za određivanje TSS najčešće korišteni filter je Whatmanov filter od staklenih vlakana (engl. *Whatman glass fiber filter*) kojemu je veličina pora oko 1,58 µm. VSS su čestice koje su hlapive i izgorene pri spaljivanju TSS (pri 500 ± 50 °C).

Postupak I:

Kroz prethodno izvagani stakleni filter papir filtrira se određeni poznati volumen uzorka, te suši pri 105 °C do konstantne mase i važe. Iz razlike mase filter papira s talogom i čistog filter papira izračuna se TSS vrijednost, prema jednadžbi [4].

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

gdje je:

$m_{f+\text{talog}}$ [g] = masa osušenog aktivnog mulja i filter papira

m_f [g] = masa čistog filter papira

Postupak II:

U određivanju TSS korištenjem vlagomjera, nakon filtriranja poznatog volumena uzorka primjenom vakuum sisaljke kroz prethodno izvagani stakleni filter papir, filter papir sa talogom se stavlja u aluminijsku posudicu za sušenje te nakon završenog procesa na displeju očitava količina suhe tvari u g/L.

Ukupna organska suspendirana tvar (VSS) se određuje spaljivanjem na plamenu filter papira s talogom nakon određivanja TSS, te nakon toga žarenjem u mufolnoj peći na 500 °C cca 3h. Nakon žarenja, ostatak (pepeo) se hladi u eksikatoru prije vaganja.

Razlika mase filter papira s talogom nakon žarenja i čistog filter papira predstavlja ukupnu anorgansku suspendiranu tvaru (ISS, engl. *Inorganic Suspended Solids*), prema jednadžbi [5].

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

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

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

Pribor:

Vlagomjer, Kern MLS-D

Sustav za vakuum filtraciju, Sartorius

Filter papir (1,6 μm, GF/A, Whatman)

Aluminijske posudice, KERN MLB-A01

Porculanske zdjelice

Eksikator

Sušionik

Mufolna peć

Analitička vaga

3.3. MIKROBIOLOŠKE METODE

3.3.1. Metoda bojanja po Neisseru – određivanje poliP

Na predmetno stakalce, čisto i odmašćeno provlačenjem predmetnice kroz plamen, stavi se kapljica aktivnog mulja. Preparat se osuši na sobnoj temperaturi. Osušeni razmaz fiksira se provlačenjem predmetnice tri puta kroz plamen. Na fiksirani razmaz nanese se svježe pripremljena mješavina 2 dijela otopine A i 1 dio otopine B 10-15 sekundi. Višak boje pustiti da oteče sa stakalca. Nakon toga nanese se otopina C na 45 sekundi te ispere vodom. Stakalce se ostavi da se osuši. Promatra se pod svjetlosnim mikroskopom.

Nakupljeni poliP se vide kao tamno-ljubičasto obojana volutinska zrnca unutar bakterijske stanice. Metoda bojanja po Neisseru za određivanje poliP provedena je po metodi Eikelboom i van Buijsen, 1983.

U tablici 4 navedeni su reagensi potrebni za provedbu bojanja po Neisseru

Tablica 4. Reagensi korišteni za metodu bojanja po Neisseru

Otopina A	
Metilen plavo	0,1 g
Etanol 96%	5,0 mL
Octena kiselina (glaciale)	5,0 mL
Destilirana voda	100,0 mL
Otopina 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	
Otopina C	
Krisoidin Y (1% vodena otopina)	33,3 mL
Destilirana voda	100,0 mL

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost (\bar{x}) pojedinačnog parametra, prema jednadžbi [7]:

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

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

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

N = ukupan broj mjerenja

x_i = pojedinačne vrijednosti mjerenja

Statistički značajnim smatrane su razlike za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,05$.

Statistička analiza podataka provedena je koristeći Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjene Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulsa, Sjedinjene Američke Države).

Dobiveni podatci su izraženi u obliku srednja vrijednost ± standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba provedena je ANOVA analizom varijance s određenim intervalom pouzdanosti $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Anoksično uklanjanje $\text{PO}_4\text{-P}$ istraženo je uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona pri omjeru N/P 2 i natrijev acetat kao izvor ugljika pri C/N 0,5, 1, 2, 3, 4 i 7, odnosno C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14. Pokusi su vođeni s ciljem da se istraži učinak velikog raspona raspoloživog C, od niskih limitirajućih vrijednosti do koncentracije C dodane u suvišku potreba, te da se odredi minimalna potreba na C pri odabranom omjeru N/P 2 za početnu koncentraciju 15 ± 1 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$. pH nije kontroliran.

Izgled – dizajn pokusa je prikazan na slici 2.



Slika 2. Izgled pokusa denitritirajuće defosfatacije u anoksičnim uvjetima

Mikroorganizmi uključeni u proces biološkog uklanjanja fosfora su sposobni unositi fosfor u stanice u suvišku njihovih metaboličkih potreba i pohranjivati ga unutarstanično u obliku polifosfatnog polimera (poliP). Odvođenjem iz sustava viška mulja bogatog sa poliP i fosfor se uklanja iz sustava. Biološko uklanjanje fosfora je jeftinija alternativa u odnosu na kemijski postupak (Jena i sur., 2016; Wang i sur., 2015; Metcalf & Eddy, 2003; Blackall i sur., 2002; Kuba i sur., 1994).

U obradi otpadnih voda proces denitrificirajuće defosfatacije predstavlja održiv proces u kojem se rješava problem kompeticije za organskim supstatom (izvorom ugljika), smanjuje produkcija

mulja i vrijeme reakcije (Wang i sur., 2015).

Brojni čimbenici utječu na proces denitrificirajuće defosfatacije, poput koncentracije i vrste izvora ugljika, pH, koncentracije $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptora elektrona, DO, koncentracije GAOs vrsta, vremena zadržavanja mulja (SRT, engl. *Sludge retention time*), (Li i sur., 2017; Jena i sur., 2016; Liu i sur., 2014; Tayà i sur., 2013; Frison i sur., 2013; Pan i sur., 2013; Wang i sur., 2011; Freitas i sur., 2009; Ya-yi i sur., 2007; Hu i sur., 2002).

4.1. Učinkovitost uklanjanja $\text{PO}_4\text{-P}$ u ovisnosti o omjeru KPK/P u procesu denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita

U svim pokusima akceptor elektrona – $\text{NO}_2\text{-N}$ je dodan u količini da je početna koncentracija $30 \pm 0,5$ mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, za odabrani omjer N/P 2.

Dodatkom izvora ugljika, natrijeva acetata, na početku pokusa za odabrani omjer C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14, pokusi denitrificirajuće defosfatacije preko $\text{NO}_2\text{-N}$ u anoksičnim uvjetima su vođeni uz početni KPK koji je odgovarao omjeru KPK/P 9-30 (Tablica 5).

Tablica 5. Početni omjer KPK/P za ciljane pokuse denitrificirajuće defosfatacije preko $\text{NO}_2\text{-N}$ u anoksičnim uvjetima pri odabranom početnom omjeru C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14.

N/P	C/P	C/N	početni omjer KPK/P	učinkovitost unosa $\text{PO}_4\text{-P}$
2	1	0,5	9	20%
2	2	1	10	50%
2	4	2	13	60%
2	6	3	16	70%
2	8	4	19	77%
2	14	7	30	72%

U literaturi se navode različiti izvori ugljika uporabljeni u istraživanju procesa denitrificirajuće defosfatacije, poput acetata, propionata, glukoze, fermentirane tekućine od ostataka voća i povrća i drugo (Jena i sur., 2016; Jena i sur., 2013; Tayà i sur., 2013; Zhang i sur., 2010).

Omjer KPK/P se navodi kao bitan čimbenik u procesu denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita. Istaknuto je da se najbolji rezultat anoksičnog unosa P preko nitrita u procesu denitrificirajuće defosfatacije ostvaruje pri početnoj koncentraciji 8,5 mg $\text{PO}_4\text{-P}$, početnih 350 mg KPK/L i 15,2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (Zhang i sur., 2010). Dakle, u tom istraživanju denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita za najučinkovitiji unos $\text{PO}_4\text{-P}$ nužno je osigurati omjer KPK/P 41 uz omjer N/P 2 što je odgovoralo omjeru KPK/N 23 (Zhang i sur., 2010). U ovom završnom radu,

u istraživanju denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita početne koncentracije 15 mg PO₄-P i pri omjeru N/P 2 iz nitrita, potrebno je osigurati omjer KPK/P 19 (što odgovara omjeru C/N 4) pri kojem se postiže potpuna denitrifikacija i maksimalno uklanjanje PO₄-P 77% (Tablica 5).

U završnom radu istražen je proces denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona koncentracije 30±0,5 mg NO₂-N/L, a u literaturi je istaknuto da NO₂-N može imati i inhibicijski učinak na proces denitrificirajuće defosfatacije za veliki raspon koncentracije od 3-93,7 mg NO₂-N/L (Peng i sur. 2011; Zhou i sur., 2007; Saito i sur., 2004; Meinhold i sur., 1999). Istaknuto je da NO₂-N utječe i na anaerobno otpuštanje P koje se smanjivalo sa povećanjem koncentracije NO₂-N dodane u anaerobnoj zoni. Dobiveni rezultati sugeriraju da kako bi se osiguralo učinkovito otpuštanje P i potom unos P, u anaerobnoj zoni treba biti manje od 2 mg NO₂-N/L (Zhang i sur., 2010).

U ovom završnom radu nije zapažen inhibicijski učinak NO₂-N koji je dodan u svim pokusima u koncentraciji 30±0,5 mg NO₂-N/L, na unos P (Tablica 5).

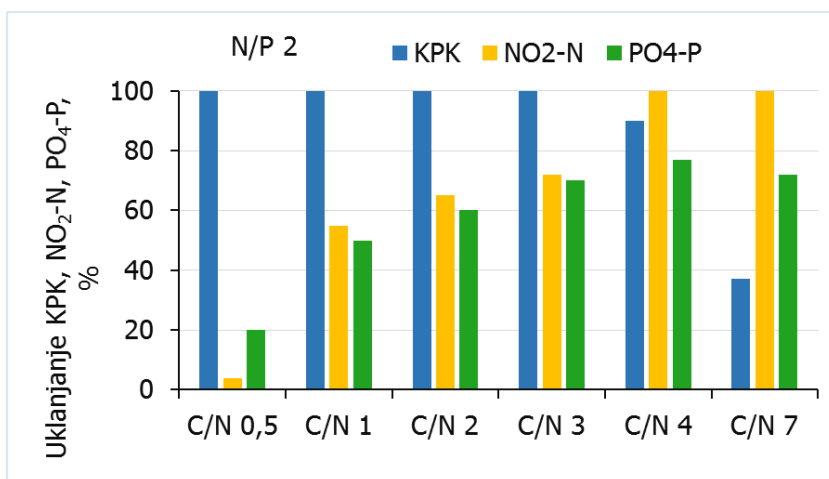
U istraživanju učinka koncentracije nitrita kao akceptora elektrona na unos P u procesu denitrificirajuće defosfatacije istaknuto je da se značajno smanjuje unos P pri početnih 99,2 mg NO₂-N/L (od istraženih početnih 32,5 mg NO₂-N/L, 66,1 mg NO₂-N/L i 99,2 mg NO₂-N/L), uz fermentiranu tekućinu proizvedenu iz otpadnog voća i povrća kao izvor ugljika, pri 20 °C (Katsou i sur., 2014).

Također, u literaturi je istaknuto da limitirana raspoloživost sa nitratom i nitritom inhibira anoksičan unos P zbog odsustva elektron akceptora (Pan i sur., 2013).

U istraživanju Zhou i sur. (2010) o učinkovitosti DPAOs u anoksičnom unosu P, s acetatom kao izvorom ugljika i nitritom kao akceptorom elektrona najveća brzina P unosa i denitrifikacije postignuta je pri početnoj koncentraciji nitrita 20 mg N/L, od istraženih koncentracija 4, 6, 8, 16, 20, 40 i 80 mg N/L, a optimalan omjer N/P je iznosio 0,60, od istraženih N/P omjera 0,09, 0,13, 0,18, 0,36, 0,60, 1,19 i 2,38.

Jena i sur. (2013) sugeriraju da omjer KPK/N ima veći učinak na denitrifikaciju nego na brzinu uklanjanja PO₄. Istražili su učinak omjera KPK/N na istovremeno uklanjanje KPK i nutrijenata pri anoksičnim uvjetima sa acetatom kao izvorom ugljika u šaržnim pokusima. Optimalan omjer KPK/N se pokazao 1,62, pri kojem je ostvareno uklanjanje KPK 93%, nitrata 98% i PO₄-P 96%. Porastom omjera KPK/N >1,62 smanjivala se brzina denitrifikacije, dok su istraženi omjeri KPK/N imali mali učinak na brzinu unosa P, koja je bila u rasponu 0,007-0,014 mg PO₄/mg VSS,dan.

Učinak koncentracije ugljikovih spojeva – donora elektrona (acetata) na uklanjanje PO₄-P pri anoksičnim uvjetima i pri omjeru N/P 2, u procesu denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita, prikazana je slikom 3.



Slika 3. Učinkovitost uklanjanja KPK, NO₂-N i PO₄-P tijekom denitrificirajuće defosfatacije preko NO₂-N početnih 15±1 mg PO₄-P/L pri omjeru N/P 2, pri anoksičnim uvjetima. Omjer C/N 0,5, 1, 2, 3, 4, i 7 je ekvivalent omjera C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14

Rezultati prikazani Slikom 3 pokazuju ovisnost uklanjanja PO₄-P o NO₂-N i raspoloživom KPK, za početnu koncentraciju 15±1 mg PO₄-P/L i omjeru N/P 2, uz različite početne koncentracije KPK ostvarene odabranim omjerima C/N (Tablica 5). Učinkovitost uklanjanja KPK, NO₂-N i PO₄-P tijekom denitrificirajuće defosfatacije u anoksičnim uvjetima u ovisnosti o C/N omjeru je rezultat mikrobne aktivnosti DPAOs (Slika 3). Istaknuto je u literaturi (Pan i sur., 2013) da limitirana raspoloživost sa nitratom i nitritom inhibira anoksičan unos P zbog odsustva elektron akceptora, što nije slučaj u ovom završnom radu. Istaknuto je i da omjer KPK/N ima veći učinak na denitrifikaciju nego na brzinu uklanjanja PO₄ (Jena i sur., 2013).

U pokusima (Slika 3) pri omjeru C/N<4 (C/P<8) organski sastojci izraženi kao KPK su limitirajući čimbenik procesa denitrificirajuće defosfatacije preko NO₂-N u anoksičnim uvjetima. Tijekom tih pokusa sav KPK se utroši a preostaje NO₂-N i PO₄-P. U tim pokusima, pri odabranom omjeru C/N 0,5, 1, 2 i 3, tijekom pokusa sav raspoloživi KPK je utrošen a pri tome je ostvareno uklanjanje NO₂-N od 4%, 55%, 65% i 72%, i PO₄-P od 20%, 50%, 60% i 70%. Pri omjeru C/N 4 što odgovara omjeru C/P 8 (Slika 3) postignuta je potpuna denitrifikacija i pri tome unutarstanični unos PO₄-P od 77%, uz utrošak 90% KPK. KPK nije potpuno utrošen, preostaje ga u niskoj koncentraciji od 30 mg KPK/L koja je dopuštena za ispušt u okoliš (NN 80/13). Omjer C/N 4 je osigurao koncentraciju organskih sastojaka raspoloživu za potpuno uklanjanje elektron akceptora (potpuna denitrifikacija) i pri tome je ostvaren maksimalni unos PO₄-P u stanice od 77%.

Iz tih rezultata proizlazi da je minimalan omjer C/N potreban za potpunu denitrifikaciju i pri tome ostvareni unos PO₄-P od 77% pri 3<C/N≤4 (odnosno pri 6<C/P≤8) budući da pri omjeru

C/N 4 preostaje nešto KPK nakon potpunog uklanjanja $\text{NO}_2\text{-N}$, a pri C/N 3 se potpuno utroši KPK ali ga nedostaje za potpunu denitrifikaciju (preostaje $\text{NO}_2\text{-N}$), Slika 3. Omjer C/N 4 odnosno C/P 8 odgovara omjeru KPK/P 19 (Tablica 5).

Za pretpostaviti je da će omjer C/N 7 (C/P 14) osigurati organske sastojke dodane u suvišku metaboličkih potreba. Pri omjeru C/N 7 (Slika 3) potpuna denitrifikacija je ostvarena uz utrošak svega 37% KPK i pri tome je određen maksimalni unos $\text{PO}_4\text{-P}$ 72%.

U literaturi je istaknuto (Li i sur., 2014) da kada KPK premašuje 200 mg/L u anaerobnoj zoni preostaje tog organskog materijala u anoksičnoj zoni i inhibira se unos P. U anoksičnoj zoni učinak koncentracije izvora C na denitrificirajuću defosfataciju se reflektira na način: (i) brzina razgradnje PHB u denitrificirajućim fosfor uklanjajućim bakterijama je niža od učinkovitosti iskorištenja izvora ugljika od strane nitrificirajućih bakterija, što čini proces denitrifikacije preferirajućim; (ii) izvor C može reducirati $\text{NO}_2\text{-N}$ nakupljanje, te $\text{NO}_2\text{-N}$ djelovati inhibicijski na anoksični unos P (Li i sur., 2014).

Spoznaje i rezultati defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona u anoksičnim uvjetima su istaknute u literaturi (Jena i sur., 2017; Jena i sur., 2016; Tayà i sur., 2013; Zhang i sur., 2010), a prekretnicu u denitrificirajućoj defosfataciji su napravili Jena i sur. (2016), koji su prvi objavili "long-term" vođenje procesa bez anaerobne faze. Istaknuli su da je značajan unos P u anoksičnim uvjetima, u prisutnosti acetata i nitrata, pokazatelj da se redukcijski ekvivalenti za korištenje ugljika primarno koriste iz TCA ciklusa a ne iz glikolize (Jena i sur., 2016). Ukazali su da je u anoksičnim uvjetima akumulacija fosfata neovisna o metabolizmu PHB, i pripisali takvo ponašanje adaptaciji obogaćene mikrobne populacije na prisutnost elektron akceptora i donora.

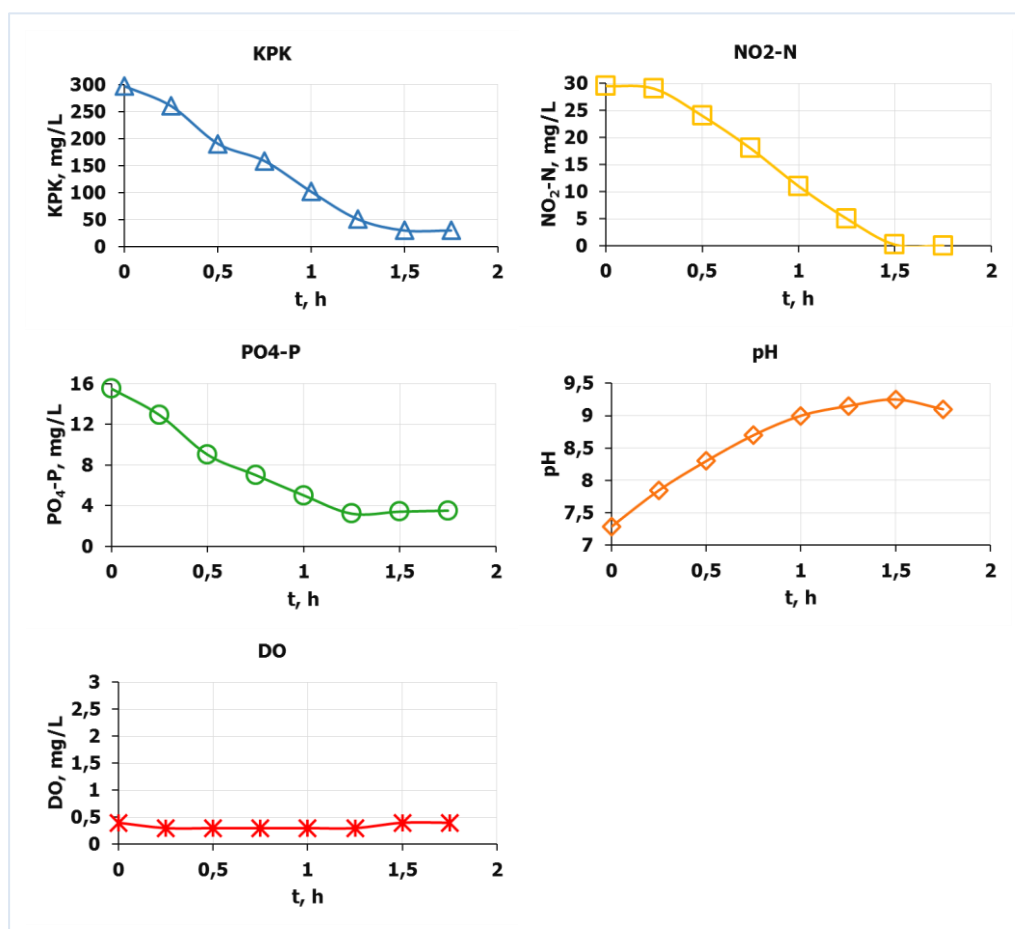
U završnom radu, raspoloživi izvor ugljika u procesu denitrificirajuće defosfatacije preko nitrata se odražavao i na učinkovitost procesa denitrifikacije i na učinkovitost unosa P. Kada je nedostatana raspoloživa koncentracija organskih sastojaka ($\text{C/P} < 8$ ili $\text{C/N} < 4$) preostaje i N i P, a kada su organski sastojci dodani u suvišku potreba ($\text{C/P} > 14$ ili $\text{C/N} > 7$) provede se potpuna denitrifikacija i određeni učinak biološkog uklanjanja P uz preostale organske sastojke (Slika 3, Tablica 5).

Jena i sur. (2013) sugeriraju da omjer KPK/N ima veći učinak na denitrifikaciju nego na brzinu uklanjanja PO_4 . Istražili su učinak omjera KPK/N na istovremeno uklanjanje KPK i nutrijenata pri anoksičnim uvjetima sa acetatom kao izvorom ugljika u šaržnim pokusima. Pokazali su da je optimalan omjer KPK/N 1,62, koji je osigurao uklanjanje KPK 93%, nitrata 98% i $\text{PO}_4\text{-P}$ 96%. Pri KPK/N 1,62 postignuta je maksimalna brzina denitrifikacije, 0,4 mg $\text{NO}_3\text{-N}/\text{mg VSS, dan}$, a daljnje povećanje omjera KPK/N je negativno utjecao na brzinu denitrifikacije.

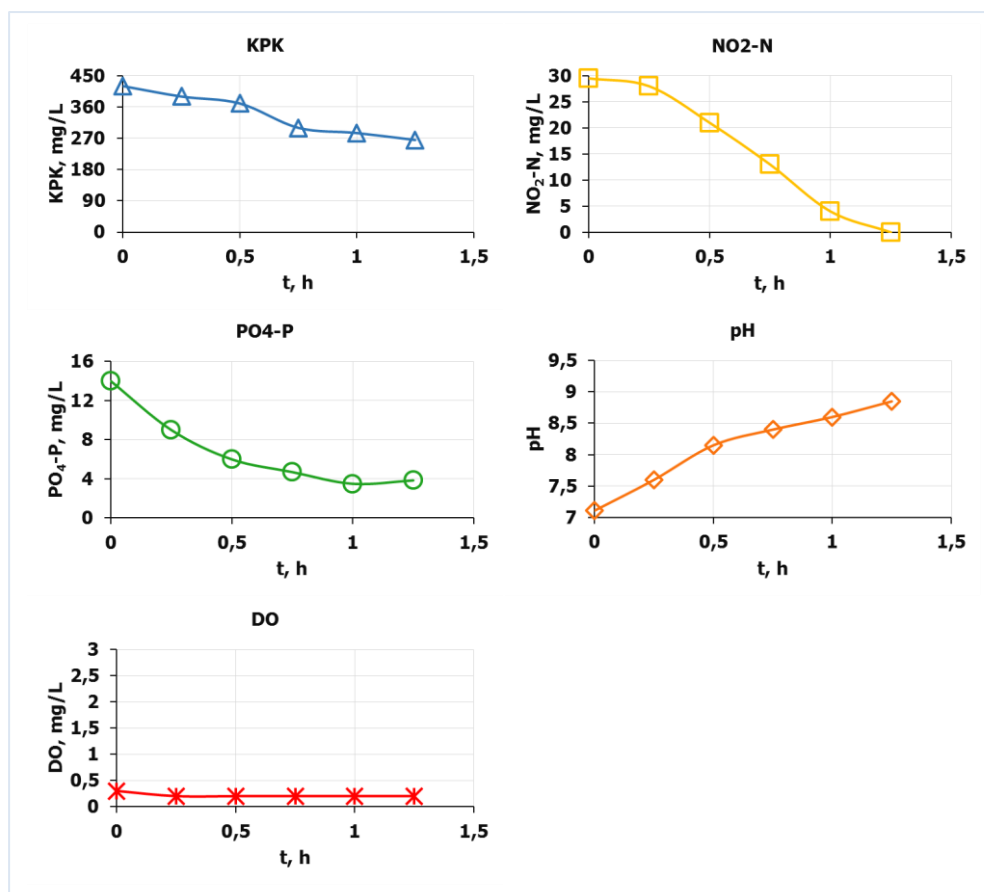
U ovom završnom radu najbolji učinak unosa P od 77% u procesu denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita je postignuto pri C/P 8 odnosno C/N 4 što odgovara omjeru KPK/P 19, odnosno odgovara omjeru KPK/N 10. Rezultati završnog rada su u suglasju s rezultatima Zhang i sur. (2010), dok su veće potrebe izražene kao KPK/N u odnosu na rezultate Jena i sur. (2013).

Mikrobna aktivnost DPAOs prikazana analitički određenim vrijednostima motrenih pokazatelja kakvoće za odabrani proces pri C/N 4 i C/N 7 je prikazana slikama 4 i 5.

Omjer C/N 4 odgovara omjeru KPK/P 19, dok omjer C/N 7 odgovara omjeru KPK/P 30 (Tablica 5).



Slika 4. KPK, NO₂-N, PO₄-P, pH i DO tijekom procesa denitrirajuće defosfatacije preko nitrita pri N/P 2 i C/P 8 odnosno C/N 4, pri početnoj koncentraciji 15±1 mg PO₄-P/L, u anoksičnim uvjetima



Slika 5. KPK, NO₂-N, PO₄-P, pH i DO tijekom procesa denitrirajuće defosfatacije preko nitrita pri N/P 2 i C/P 14 odnosno C/N 7, pri početnoj koncentraciji 15±1 mg PO₄-P/L, u anoksičnim uvjetima

Anoksičan uvjet ($DO \leq 0,5$ mg/L) tijekom procesa denitrificirajuće defosfatacije je ostvaren miješanjem ML na magnetskoj mješalici, pri 100 o/min (Slike 2, 4 i 5).

Rezultati (Slike 3-5, Tablica 5) pokazuju da se provodi anoksični unos PO₄-P u stanice dok ima raspoloživog KPK kao donora elektrona i NO₂-N kao akceptora elektrona. Iscrpljivanjem KPK, kada je C dodan u nedostatnoj količini, u pokusima pri C/N < 4, ovisno o raspoloživom KPK postiže se određeni učinak denitrifikacije i unosa P (Slika 3, Tablica 5).

Povećanjem raspoložive koncentracije organskih sastojaka (KPK), odnosno povećanjem omjera C/P (C/N) do približno minimalno potrebnog za postizanje potpune denitrifikacije (C/P 8 odnosno C/N 4) povećava se učinkovitost uklanjanja NO₂-N i PO₄-P (Tablica 5).

Pri C/P 8 (C/N 4), što odgovara omjeru KPK/P 19 i KPK/N 10, postignuta je potpuna denitrifikacija i najveća učinkovitost uklanjanja P od 77% (Slike 3 i 4), od istraženih omjera C/N 0,5, 1, 2, 3, 4 i 7 odnosno C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14 (Tablica 5).

No, kada su organski sastojci prisutni u suvišku metaboličkih potreba (C/P 14, odnosno C/N 7) zbiva se utrošak KPK i denitrifikacija koju prati i unos $\text{PO}_4\text{-P}$ u stanice sve dok se potpuno ne utroši $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona. U tom procesu (C/P 14 ili C/N 7) utrošeno je samo 37% KPK, preostaje KPK a postignuta je učinkovitost uklanjanja P od 72% (Slika 5). U procesu pri C/N 7 manja je učinkovitost uklanjanja $\text{PO}_4\text{-P}$, odnosno unos P u stanice, u odnosu na pokus u kojem je KPK prisutan u minimalno potrebnoj količini za potpunu denitrifikaciju (C/N 4), Slike 3-5.

Nakon utroška $\text{NO}_2\text{-N}$ u pokusu pri C/P 14 (C/N 7) ne zbiva se daljnji unos $\text{PO}_4\text{-P}$ iako ima na raspolaganju KPK, jer nedostaje elektron akceptora – $\text{NO}_2\text{-N}$ (Slika 5).

Istovremeno se provodi denitrifikacija, unos $\text{PO}_4\text{-P}$ u stanice DPAOs i smanjenje koncentracije organskih sastojaka (Slike 4 i 5).

4.2. Učinak pH na proces anoksičnog uklanjanja $\text{PO}_4\text{-P}$

U literaturi se navodi (Vargas i sur., 2009; Ya-yi i sur., 2007) da pri $\text{pH} > 8$ dolazi do reakcije kemijskog taloženja $\text{PO}_4\text{-P}$, te treba biti oprezan u tumačenju rezultata uklanjanja $\text{PO}_4\text{-P}$ koji bi se mogli pripisati aktivnosti mikroorganizama ili procesu taloženja.

Pokusi u završnom radu su vođeni bez kontrole pH vrijednosti. Vrijednosti $\text{pH} > 8,0$ su zabilježene rano u anoksičnim pokusima i pri C/N 4 i 7 (C/P ≥ 8) (Slike 4 i 5). U pokusima u kojima je bilo raspoloživog KPK, odnosno KPK nije limitirajući čimbenik, u kojima je provedena potpuna denitrifikacija (C/P ≥ 8 odnosno C/N ≥ 4), preostalo je na kraju pokusa oko $3,3 \pm 0,5$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ i učinkovitost uklanjanja $\text{PO}_4\text{-P}$ se pripisuje mikrobnj aktivnosti, a ne kemijskom taloženju.

U literaturi je istaknuto da je povoljni pH za anaerobno otpuštanje P oko pH 7,0, odnosno za anoksični unos P oko pH 8,0 (Zhang i sur., 2010).

Zhang i sur. (2010) istražili su učinak pH 6, 7 i 8, na denitrificirajuću defosfataciju preko nitrita. Pokusi su vođeni s početnih 9,6 mg P/L, 32 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ i 360 mg KPK/L. U anaerobnim uvjetima, s porastom pH vrijednosti, rasla je i količina otpuštenog P, a najveća količina otpuštenog P je postignuta pri pH 8. U anoksičnim uvjetima, pri pH 7 je postignuto najveći unos P, sa konačnom koncentracijom 2,9 mg P/L.

Ya-yi i sur., (2007) su istaknuli da naglo povećanje pH tijekom anoksičnog perioda je rezultat denitrifikacije i anoksičnog unosa P, kao i da se pri $\text{pH} > 8$ u miješanoj tekućini smanjuje koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$ kao rezultat reakcije kemijskog taloženja $\text{PO}_4\text{-P}$.

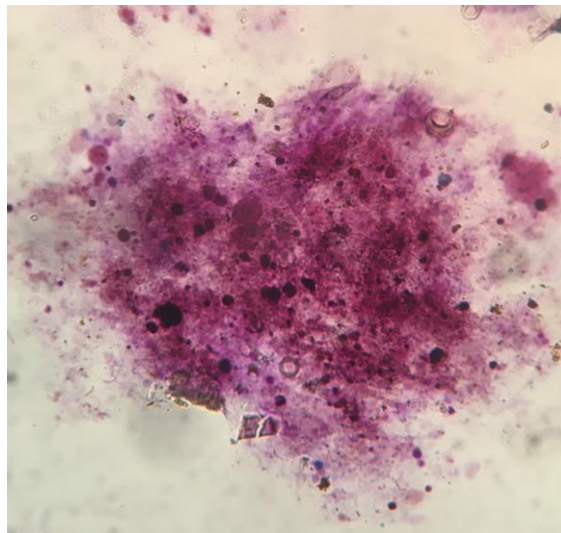
Kemijsko taloženje P pri $\text{pH} > 8,0$ navode i Vargas i sur. (2009).

4.3. Dokazivanje poliP bojanjem po Neisseru

Unutarstanično pohranjeni – skladišteni polimeri koji imaju važnu ulogu u metabolizmu PAOs su polifosfat (poliP), polihidroksialkanoati (PHAs) i glikogen. Za kvalitativnu vizualizaciju polimera optičkim mikroskopom uporabljaju se tehnike bojanja i kvantifikacijske metode koje primjenjuju molekularne alate za njihovu in-situ identifikaciju (Serafim i sur., 2002).

Bojanjem po Neisseru poliP se vidi ljubičasto a ostale stanične komponente su žućkasto-smeđe (Eikelboom i van Buijsen, 1983).

PoliP nakupljeni u stanicama PAOs, bojanjem po Neisseru, prikazani su slikom 6.



Slika 6. PoliP nakupljeni u stanicama DPAOs, bojanjem po Neisseru

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata prikazanih u ovom radu i provedene rasprave, proizlaze zaključci:

1. Denitrificirajuća defosfatacija, unos $\text{PO}_4\text{-P}$ u stanice DPAOs uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona i natrijev acetat kao donor elektrona (izvor C), je provedena u anoksičnim uvjetima, izostavljena je anaerobna faza procesa
2. Dokazan je unutarstanično pohranjen poliP, bojanjem po Neisseru
3. Denitrificirajuća defosfatacija, anoksično uklanjanje 15 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz akceptor elektrona $\text{NO}_2\text{-N}$ početne koncentracije za omjer N/P 2, uz donor elektrona natrijev acetat pri omjeru C/N 0,5, 1, 2, 3, 4 i 7 što je ekvivalent omjeru C/P 1, 2, 4, 6, 8 i 14, rezultirala je određenim stupnjem uklanjanja i $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{PO}_4\text{-P}$, strogo ovisno o raspoloživom izvoru C (KPK)
4. Povećanjem omjera C/P odnosno C/N (KPK/P, odnosno KPK/N) raste učinkovitost uklanjanja i $\text{PO}_4\text{-P}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$ do omjera C/P 8 (C/N 4) koji predstavlja minimalnu količinu C iz natrijeva acetata potrebnu za potpunu denitrifikaciju i pri tome ostvaren unos P (77%), od početnih 15 mg $\text{PO}_4\text{-P}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$ dodan u omjeru N/P 2
5. Pri omjeru C/P 14 (C/N 7) izvor ugljika je dodan u suvišku potreba a rezultira u procesu denitrificirajuće defosfatacije potpunom denitrifikacijom i smanjenjem učinkovitosti uklanjanja $\text{PO}_4\text{-P}$ (72%), uz redukciju KPK od samo 37%, u usporedbi sa procesom pri C/P 8 (C/N 4)
6. pH nije imala učinka na proces unosa $\text{PO}_4\text{-P}$ u stanice PAOs. Na kraju procesa denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita u anoksičnim uvjetima u kojima C nije limitirajući čimbenik ($\text{C/N} \geq 4$) preostalo je $3,3 \pm 0,5$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$. Dakle, uklanjanje P je rezultat metabolizma DPAOs a ne reakcija kemijskog taloženja $\text{PO}_4\text{-P}$, iako je rano u procesu denitrificirajuće defosfatacije pri anoksičnim uvjetima $\text{pH} > 8,0$

6. POPIS LITERATURE

- Ahn, J., Schroeder, S., Beer, M., McIlroy, S., Bayly, R.C., May, J.W., Vasiliadis, G., Seviour, R.J. (2007) Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(7): 2257-2270.
- APHA (2005) Standard methods for the examination of water and waste water, 21st edn. American Public Health Association, Washington, DC
- Barak, Y., Rijn, J. (2000) A typical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1209-1212.
- Barnard, J.L. (1974) Cut P and N without chemicals. *Water Wastes Engineering* **11**: 33-44.
- Barnard, J.L. (1976) A review of biological phosphorus removal in the activated sludge process. *Water SA*, **2**: 136-144.
- Bassin, J.P., Winkler, M.K.H., Kleerebezem, R., Dezotti, M., van Loosdrecht, M.C.M. (2012) Improved phosphate removal by selective sludge discharge in aerobic granular sludge reactors. *Biotechnology Bioengineering* **109**: 1919-1928.
- Blackall, L.L., Crocetti, G.R., Saunders, A.M., Bond, P.L. (2002) A review and update of the microbiology of enhanced biological phosphorus removal in wastewater treatment plants. *Antoine van Leewenhoek* **81**: 681-691.
- Conley, D.J., Paerl, H.W., Howarth, R.W. i sur. (2009) Ecology – controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science* **323** **5917**: 1014-1015.
- Cordell, D., Drangert, J., White, S. (2009) The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environmental Change* **19**: 292-305.
- 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.
- Eikelboom D.H., van Buijsen H.J.J. (1983.): Microscopic sludge investigation manual. (2nd edn.) TNO Research Institute of Environmental Hygiene, Delft.
- Freitas, F., Temudo, M.F., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M.A. (2009) Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Bioresource Technology* **100**: 1969-1976.
- Frison, N., Di Fabio, S., Cavinato, C., Pavan, P., Fatone, F. (2013) Best available carbon source to enhance the via-nitrite biological nutrients removal from supernatants of anaerobic co-digestion. *The Chemical Engineering Journal* **215-216**: 15-22.

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

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

He, S., Gu, A. Z., McMahon, K.D. (2006) Fine-scale differences between *Accumulibacter*-like bacteria in enhanced biological phosphorus removal activated sludge. *Water Science and Technology* **54** (1): 111-117.

Hesselmann, R.P.X., Werlen, C., Hahn, D., van der Meer, J.R., Zehnder, A.J.B. (1999) Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* **22** (3): 454-465.

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 Research* **37**: 3463-3471.

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 Research* **36**: 4927-4937.

Jena, J., Kumar, R., Dixit, A., Pandey, S., Das, T. (2015) Evaluation of simultaneous nutrient and COD removal with polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation using mixed microbial consortia under anoxic condition and their bioinformatics analysis. *Plos One* **10**: 1-20.

Jena, J., Kumar, R., Saifuddin, M., Dixit, A., Das, T. (2016) Anoxic–aerobic SBR system for nitrate, phosphate and COD removal from high-strength wastewater and diversity study of microbial communities. *Biochemical Engineering Journal* **105**: 80-89.

Jena, J., Ray, S., Pandey, S., Das, T. (2013) Effect of COD/N ratio on simultaneous removal of nutrients and COD from synthetic high strength waste water under anoxic conditions. *Journal of Scientific & Industrial Research* **72**: 127-131.

Jeon, C.O., Lee, D.S., Lee, M.W., Park, J.M. (2001) Enhanced biological phosphorus removal in an anaerobic–aerobic sequencing batch reactor: effect of pH. *Water Environment Research* **73**: 301-306.

Kapagiannidis, A.G., Zafiriadis, I., Aivasidis, A (2013) Comparison between aerobic and anoxic metabolism of denitrifying-EBPR sludge: Effect of biomass poly-hydroxyalkanoates content. *New Biotechnology* **30**: 227-237.

- Katsou, E., Malamis, S., Frison, N., Fatone, F. (2014) Effect of nitrite and external carbon source on the via nitrite biological phosphorus removal. *Chemical Engineering Transactions*, **38**: 25-30.
- Kuba, T., Wachtmeister, A., Vanloosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1994) Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal systems. *Water Science and Technology* **30**(6): 263- 269.
- Li, C., Wang, T., Zheng, N., Zhang, J., Ngo, H.H., Guo, W., Liang, S. (2013) Influence of organic shock loads on the production of N₂O in denitrifying phosphorus removal process. *Bioresource Technology* **141**: 160–166.
- Li, N., Ren, N.Q., Wang, X.H., Han Kang, H. (2010) Effect of temperature on intracellular phosphorus absorption and extra-cellular phosphorus removal in EBPR process. *Bioresource Technology* **101**: 6265-6268.
- Li, W., Sun, H.Z., Wei, W., Liu, J., Fu, J.X., Wang, J. (2017) Study on denitrifying dephosphatation process, influence factors and mechanism. 3rd International Conference on Water Resource and Environment (WRE 2017), IOP Conf. Series: Earth and Environment Science 82 (2017) 012090.
- Li, X.F., Yan, B., Li, M. (2014) Research and development on the influencing factors in the process of denitrifying dephosphorization. *Industrial Water Treatment* **4**: 10-13.
- Lin, C.K., Katayama, Y., Hosomi, M., Murakami, A., Okada, M. (2003) The characteristics of the bacteria community structure and population dynamics for phosphorus removal in SBR activated sludge process. *Water Research* **37**: 2944-2952.
- Liu, Y., Li, X., Kang, X., Yuan, Y. (2014) Performance of denitrifying phosphorus removal of *Acinetobacteria* strain at low temperature. *International Biodeterioration Biodegradation* **2014**, *95*, 135–138.
- McMahon, K.D., Dojka, M.A., Pace, N.R., Jenkins, D., Keasling, J.D. (2002) Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (10): 4971-4978.
- Meinhold J., Arnold E., Isaacs S. (1999.): Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Research* **33**: 1871-1883.
- Metcalf & Eddy (2003) Wastewater Engineering, Treatment and Reuse, 4th edition, McGraw-Hill, USA.
- Murnleitner, E., Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen J.J. (1997) An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal. *Biotechnology and Bioengineering* **54**: 434-450.

- Pan, M., Chen, T., Hu, Z., Zhan, X. (2013) Assessment of nitrogen and phosphorus removal in an intermittently aeration sequencing batch reactor (IASBR) and a sequencing batch reactor (SBR). *Water Science and Technology*, **68**: 400–405.
- Peng, Y.Z., Wu, C.Y., Wang, R.D. and Li, X.L. (2011) Denitrifying phosphorus removal with nitrite by a real-time step feed sequencing batch reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **86**: 541–546.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2003) *Narodne novine* **16** (NN 3/16)
- Rensink, J.H., Donker, G.W., de Vries, H.P. (1981) Biological P removal in domestic wastewater by the activated sludge process. Proceedings 5th European Sewage and Refuse Symposium. Munich, Germany, June 1981, 487-502.
- Rubio-Rincón, F.J., C.M. Lopez-Vazquez, C.M., Welles, L., M.C.M. 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.
- Saito, T., Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Research* **38**: 3760-3768.
- Schlegel, H.G. (1993) General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sedlak, R. (1991) Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater. Principles and Practice. 2nd Edition. Lewis Publishers, Boca Raton, London, New York, Washington D.C.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Levantesi, C., Tandoi, V. (2002) Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms, *Journal of Microbiological Methods* **51**: 1-18.
- Seviour, R.J., McIlroy, S. (2008) The microbiology of phosphorus removal in activated sludge process – the current state of play. *Journal of Microbiology* **46**: 115-124.
- Tayà, C., Garlapati, V.K., Guisasola, A., Baeza, J.A. (2013) The selective role of nitrite in the PAO/GAO competition. *Chemosphere* **93**: 612-618.
- Vargas, M., Casas, C., Baeza, J.A. (2009) Maintenance of phosphorus removal in an EBPR system under permanent aerobic condition using propionate. *Biochemical Engineering Journal* **43**: 288-296.
- Wang, Y., Geng, J., Ren, Z., He, W., Xing, M., Wu, M., Chen, S. (2015) Effect of anaerobic reaction time on denitrifying phosphorus removal and N₂O production. *Bioresource Technology* **102**: 5674–5684.

- Wang, L., Liu, J., Li, X., Shi, J., Hu, J., Cui, R., Zhang, Z.L., Pang, D.W., Chen, Y. (2011) Growth propagation of yeast in linear arrays of microfluidic chambers over many generations. *Biomicrofluidics* **5**(4): 44118-441189.
- Wang, Z., Meng, Y., Fan, T., Du, Y., Tang, J., Fan, S. (2015) Phosphorus removal and NO₂O production in anaerobic/anoxic denitrifying phosphorus removal process: Long-term impact of influent phosphorus concentration. *Bioresource Technology* **179**: 585-594.
- Wentzel, M.C., Loewenthal, R.E., Ekama, G.A., Marais, G.v. R. (1988) Enhanced polyphosphate organism cultures in activated sludge systems – Part 1: Enhanced culture development. *Water SA* **14**: 81-92.
- Ya-yi, W., Mian-li, P., Yan Min, Y., Yong-zhen, P., Shu-ying, W. (2007) Characteristics of anoxic phosphorus removal in sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Science* **19**: 776-782.
- Zakon o zaštiti okoliša (2013) *Narodne novine* **88** (NN 80/13)
- Zhang, S.H., Huang, Y., Hua, Y.M. (2010) Denitrifying dephosphatation over nitrite: Effects of nitrite concentration, organic carbon, and pH. *Bioresource Technology* **101**: 3870-3875.
- Zhou, S., Zhang, X., Feng, L. (2010) Effect of different types of electron acceptors on the anoxic phosphorus uptake activity of denitrifying phosphorus removing bacteria. *Bioresource Technology* **101**: 1603-1610.
- Zhou, Y., Pijuan, M., Yuan, Z. (2007) Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering* **98**: 903-912.

Izjava o izvornosti

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

Dora Bošnjak

ime i prezime studenta