

Denitrificirajuća defosfatacija uz NO₂-N i NO₃-N kao akceptore elektrona u konfiguraciji statički/anoksični uvjeti

Mikac, Ivan

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:159:094980>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Ivan Mikac

7427/PT

**DENITRIFICIRAJUĆA DEFOSFATACIJA UZ NO₂-N I
NO₃-N KAO AKCEPTORE ELEKTRONA U
KONFIGURACIJI STATIČKI/ANOKSIČNI UVJETI
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 uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona u konfiguraciji statički/anoksični uvjeti

Ivan Mikac, 0058210684

Sažetak: Denitrificirajuća defosfatacija uz nitrit i nitrat kao akceptore elektrona i natrijev acetat kao donor elektrona istražena je u konfiguraciji procesa statički/anoksični uvjeti. Pokusi su provedeni pri N/P 2 i početnoj koncentraciji 15 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona pri omjeru C/N 3, 5 i 7, odnosno pri početnoj koncentraciji 10 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona, pri C/N 5 i 7. Nije kontroliran pH. Dokazan je unutarstanično pohranjen poliP. Unos $\text{PO}_4\text{-P}$ i uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona je intenzivniji tijekom prvih 15-30 minuta anoksičnih uvjeta a zatim se uklanjanje P odvijalo manjim intenzitetom. Veće uklanjanje P od $75 \pm 1\%$ postignuto je s $\text{NO}_2\text{-N}$, dok je s $\text{NO}_3\text{-N}$ ostvareno 43,2%-50,9% uklanjanje P. U pokusima sa $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptorom elektrona su zabilježene veće brzine uklanjanja i N i P: 26,2 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, 26 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ i 23 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, te 11,9 $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$, 11,7 $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ i 9,2 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ pri istraženim odabranim omjerima C/N 3, 5 i 7, u odnosu na $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona kada je postignuto: 17,2 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ i 18 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$, te 6,9 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ i 4,8 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ za istražene odabrane omjere C/N 3 i 5.

Ključne riječi: DPAOs, natrijev acetat, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ statički/anoksični uvjeti

Rad sadrži: 29 stranica, 8 slika, 6 tablica, 39 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. rujna 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 and nitrate as electron acceptors, at static/anoxic configuration

Ivan Mikac, 0058210684

Abstract: Denitrifying dephosphatation via nitrite and nitrate as electron acceptors, and sodium acetate as electron donors at static/anoxic configuration of process was investigated. The experiments were carried out at ratio N/P 2, and at initial concentration of 15 mg PO₄-P and at ratios C/N 3, 5, 7 with NO₂-N as electron acceptors, and at initial concentration of 10 mg PO₄-P and at ratios C/N 3, 5 with NO₃-N as electron acceptors, respectively. pH was not controlled. Intracellular polyP was proven. The PO₄-P uptake by both NO₂-N and NO₃-N as electron acceptors was more intense during the first 15-30 minutes of anoxic conditions, and then P removal was less intense. A higher P removal of 75±1% was achieved with NO₂-N, while 43.2%-50.9% P removal was achieved with NO₃-N. In experiments with NO₂-N as electron acceptors, higher removal rates of both N and P were observed: 26.2 mg NO₂-N/Lh, 26 mg NO₂-N/Lh and 23 mg NO₂-N/Lh, and 11.9 mg PO₄-P/Lh, 11.7 mg PO₄-P/Lh and 9.2 mg PO₄-P/Lh at investigated selected C/N 3, 5 and 7 ratios relative to NO₃-N as electron acceptor when the following was achieved: 17.2 mg NO₃-N/Lh and 18 mg NO₃-N/Lh, and 6.9 mg PO₄-P/Lh and 4.8 mg PO₄-P/Lh for the investigated selected C/N 3 and 5 ratios.

Keywords: DPAOs, NO₂-N, NO₃-N, sodium acetate, static/anoxic condition

Thesis contains: 29 pages, 8 figures, 6 tables, 39 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: September 9. 2019

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Teorijski dio	2
2.1. Metabolizam DPAOs	2
2.2. Čimbenici procesa denitrificirajuće defosfatacije	3
2.3. Mikroorganizmi u procesu denitrificirajuće defosfatacije	4
2.4. Zakonska regulativa	5
3. EKSPERIMENTALNI DIO	6
3.1. MATERIJAL I METODE	6
3.1.1. Omjer C/N/P – elektron donor, elektron akceptori i fosfat	6
3.1.2. Batch pokusi denitrificirajuće defosfatacije u konfiguraciji procesa statički/anoksični uvjeti, uz NO₂-N i NO₃-N kao akceptore elektrona	6
3.1.3. Aparatura i pribor	7
3.2. ANALITIČKE METODE	8
3.2.1. Određivanje koncentracije fosfata	8
3.2.2. Određivanje koncentracije nitrata	9
3.2.3. Određivanje koncentracije nitrita	9
3.2.4. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)	10
3.2.4. Određivanje pH vrijednosti	11
3.2.5. Određivanje koncentracije otopljenog kisika	11
3.2.6. Određivanje temperature	11
3.2.7. Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS) i ukupne organske suspendirane tvari (VSS)	12
3.3. MIKROBIOLOŠKE METODE	12
3.3.1. Metoda bojanja po Neisseru – određivanje poliP	12
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Denitrificirajuća defosfatacija uz NO ₂ -N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu	16
4.2. Denitrificirajuća defosfatacija uz NO ₃ -N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu	20
4.3. Dokazivanje poliP – bojanjem po Neisseru	24
5. ZAKLJUČCI	25
6. POPIS LITERATURE	26

1. Uvod

Korištenjem nitrita kao akceptora elektrona denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (DPAOs, engl. *Denitrifying phosphorus accumulating organisms*) imaju znatno manju potrebu na energiji, u usporedbi sa nitratom kao akceptorom elektrona. Metabolizam DPAOs se temelji na anoksičnom unosu P u stanice DPAOs uz istovremenu denitrifikaciju. DPAOs, poput fosfat akumulirajućih organizama (PAOs, engl. *Phosphate accumulating organisms*), u anaerobnim uvjetima unutarstanično pohranjuju polihidroksialkanoate (PHA, engl. *Polyhydroxyalkanoates*), uključujući polihidroksibutirat (PHB, engl. *Polyhydroxybutyrate*) i polihidroksivalerat (PHV, engl. *Polyhydroxyvalerate*) korištenjem vanjskih izvora ugljika. Potom, u anoksičnim uvjetima koriste $\text{NO}_2\text{-N}$ i/ili $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona, umjesto kisika, za unos P u stanicu oksidacijom PHA (Kapagiannidis i sur., 2013; Peng i sur., 2011). Dvije su skupine DPAOs: (i) DPAO- $\text{NO}_2\text{-N}$ (denitrificirajući organizmi koji unose P preko nitrita) u kojima su kisik, $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ akceptori elektrona, i (ii) DPAO- $\text{NO}_3\text{-N}$ (denitrificirajući organizmi koji unose P preko nitrata) koji koriste kisik i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona (Hu i sur., 2003).

Brojni autori (Peng i sur. 2011; Zhou i sur., 2007; Saito i sur., 2004; Meinhold i sur., 1999) ukazuju na inhibirajući učinak nitrita u procesu denitrificirajućeg unosa P, u rasponu koncentracije 3-93,7 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$.

U ovom radu određena je brzina i učinkovitost denitrifikacije i anoksičnog unosa $\text{PO}_4\text{-P}$ u procesu denitrificirajuće defosfatacije u vođenju procesa u statičkim/anoksičnim uvjetima uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona, pri omjeru N/P 2 i uz natrijev acetat kao donor elektrona. Uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona početna koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$ je 15 mg/L, dok je početna koncentracija 10 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona.

Proces denitrificirajuće defosfatacije je vođen u konfiguraciji statički uvjet uz dodavanje izvora C i anoksični uvjet uz dodavanje akceptora elektrona, $\text{NO}_2\text{-N}$ ili $\text{NO}_3\text{-N}$, i izvora $\text{PO}_4\text{-P}$, s ciljem da se istraži:

- učinak uzimanja KPK i unutarstaničnog pohranjivanja u obliku PHB pri statičkom uvjetu vođenja procesa (tijekom 4 sata)
- učinak odabranog akceptora elektrona, $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ na učinkovitost uklanjanja P u anoksičnim uvjetima
- učinak odabranog omjera C/N (C/N 3, 5 i 7 uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i C/N 5 i 7 uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona) iz natrijeva acetat kao izvora C na učinkovitost procesa denitrifikacije i unosa P u stanice

2. Teorijski dio

2.1. Metabolizam DPAOs

DPAOs su odgovorni u procesu denitrificirajuće defosfatacije, a metabolizam DPAOs koji se temelji na anaerobno-anoksičnom uvjetu je prikazan slikom 1.

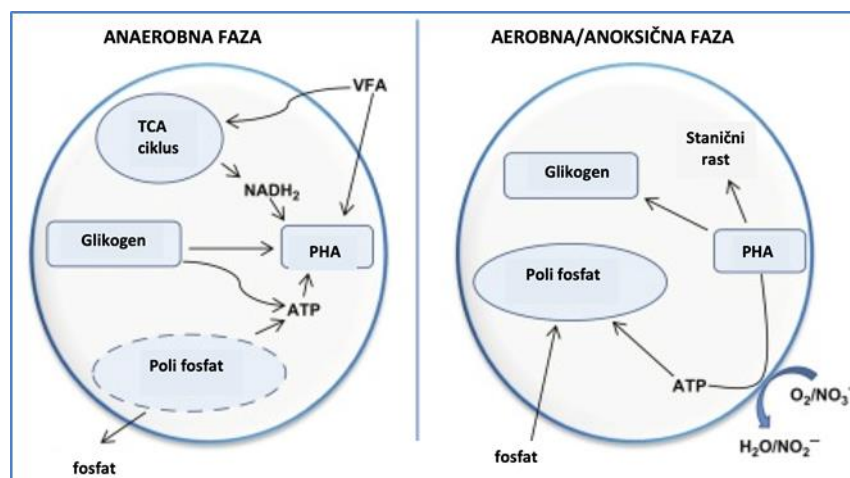
Pri anaerobnom uvjetu (Slika 1) zbiva se:

- otpuštanje orto-fosfata ($O-PO_4$) iz unutarstanično pohranjenog poliP u miješanu tekućinu (ML, engl. *Mixed liquor*) i produkcija energije kao i korištenje te energije za asimilaciju acetata iz ML i proizvodnju i unutarstanično skadištenje polihidroksibutirata (PHB);
- asimilacija acetata iz ML u stanicu, koji je nastao fermentacijom biorazgradivog organskog materijala i njegovo prevođenje u unutarstanično pohranjen PHAs (PHB);
- unutarstanično pohranjen glikogen se metabolizira glikolizom i proizvodi ATP i reducirajuće ekvivalente ($NADH_2$);
- uzimanje acetata povezano je sa otpuštanjem orto-fosfata ($O-PO_4$), kao i magnezijvim, kalijevim i kalcijevim kationima.

Pri aerobnom/anoksičnom uvjetu (Slika 1) zbiva se:

- unos $O-PO_4$ u stanicu i formiranje i pohranjivanje u obliku poliP;
- PHB se metabolizira dajući energiju za rast novih stanica, unos $O-PO_4$ kao i obnavljanje rezervi glikogena;
- pohranjeni poliP se uklanja iz sustava odvođenjem viška mikrobne biomase.

U aktivnom mulju PAOs formiraju guste, dobro taložive flokule (Metcalf & Eddy, 2003).



Slika 1. Metabolizam DPAOs

U anaerobno/aerobnom procesu anaerobna zona se naziva "selektor", budući da su osigurani uvjeti povoljni za proliferaciju PAOs zbog činjenice da dio biorazgradivog KPK uporabe PAOs. PAOs otpuštanjem $O-PO_4$ (orto fosfata) iz stanice, iz unutarstanično pohranjenog poliP, ostvaruju energiju za asimilaciju acetata u anaerobnoj zoni. Mehanizam za uzimanje acetata u anaerobnim uvjetima nemaju aerobni heterotrofi (Metcalf & Eddy, 2003).

DPAOs u anoksičnim uvjetima umjesto kisika koriste nitrat ili nitrit kao akceptor elektrona za dobivanje energije i akumulaciju P, i tako istovremeno uklanjaju nitrat/nitrit i fosfat iz otpadne vode (Jena i sur., 2016; Kuba i sur., 1994).

Prednosti procesa denitrificirajuće defosfatacije pred konvencionalnim naprednim biološkim procesom uklanjanja P (EBPR), je u manjoj potrebi za aeracijom za 30%, manjim zahtjevom za izvorom ugljika za 50% i manjom produkcijom mulja za 50% (Wang i sur., 2015).

2.2. Čimbenici procesa denitrificirajuće defosfatacije

Na aktivnost DPAOs utječu brojni čimbenici, poput anoks uvjet, koncentracija mikrobne biomase (MLSS, engl. *Mixed liquor suspended solids*), koncentracija otopljenog kisika (DO, engl. *Dissolved oxygen*), pH, temperatura, omjer C/P (Jena i sur., 2016; Wong i sur., 2013; Peng i sur. 2011; Zhou i sur., 2007; Oehmen i sur., 2006; Saito i sur., 2004; Meinhold i sur., 1999; Kuba i sur., 1994).

U istraživanju učinka koncentracije NO_2-N odnosno NO_3-N na proces unosa P istaknuto je da je NO_2-N inhibitor procesa u rasponu konc 3-93,7 mg NO_2-N/L (Peng i sur. 2011; Zhou i sur., 2007; Saito i sur., 2004; Meinhold i sur., 1999).

Strategija stupnjevito dodavanja nitrita (step-feed strategy) osigurava nisku koncentraciju nitrita kojom se izbjegava njegov inhibicijski učinak. Rezultati takvog stupnjevito dodavanja nitrita pokazuju da brzina denitrifikacije, brzina unosa fosfora kao i omjer unešenog P prema denitrificiranom nitritu (anoksični P/N omjer) se povećava pri stupnjevito dodavanoj koncentraciji nitrita 15 mg NO_2-N/L . Maksimalna brzina denitrifikacije je bila 12,73 mg $NO_2-N/gMLSS,h$ a maksimalna brzina unosa P je iznosila 18,75 mg $PO_4-P/gMLSS,h$. Maximalan anoksičan omjer P/N je bio 1,55 mg $PO_4-P/mg NO_2-N$. Vrijednosti maksimalne brzine denitrifikacije i unosa P su manje uz nitrat kao akceptor elektrona (15 mg NO_3-N/L). Međutim, inhibicija anoksičnog unosa P od 64,85% i denitrifikacije od 61,25% se zbivala kad je povećana koncentracija stupnjevito dodavanog nitrita sa 15 mg NO_2-N/L na 20 mg NO_2-N/L . Brzina denitrifikacije DPAOs se postupno smanjivala pri koncentraciji 20 mg NO_2-N/L . Autori su zaključili da strategija stupnjevito dodavanja nitrita kao elektron akceptora osigurava denitrificirajuću defosfataciju, ali je potrebno održavati nisku koncentracija NO_2-N (< 15 mg NO_2-N/L) (Ma i sur., 2013).

U istraživanju učinka omjera C/P ili C/N na proces unosa P istaknuta je ovisnost unosa P o koncentraciji elektron akceptora (kisik u aerobnim uvjetima, odnosno NO₂-N i NO₃-N u anoksičnom uvjetu) kao i raspoloživog KPK. Iscrpljivanjem elektron akceptora prestaje unos P i prestaje sinteza poliP te se zbiva unos organskih sastojaka iz okoline samih bakterijskih stanica. Energija za unos tih komponenti dobiva se iz razgradnje poliP (čime se dobiva energija u obliku ATP-a), ali koja također i služi za normalno funkcioniranje stanice. Unesene organske komponente pretvaraju se u unutarstanični PHB, koji u aerobnoj fazi služi kao izvor energije za rast novih stanica (Wong i sur., 2013).

Učinak koncentracije DPAOs i kompeticija PAOs i GAOs vrsta istaknuta je u istraživanju učinkovitosti procesa denitrificirajuće defosfatacije. PAOs tijekom anaerobnih uvjeta organske komponente iz okoline unose u stanice te pretvaraju u skladišni oblik energije (PHA). Energiju za taj unos stanice dobivaju iz razgradnje unutarstaničnog poliP. Tijekom aerobnih uvjeta PHAs se oksidiraju kako bi se dobila energija potrebna za stanični rast, obnovu glikogena i za unos fosfata iz okoline. GAOs također tijekom anaerobnih uvjeta iz okoline unose iste organske sastojke koje unose i PAOs, te ih također pretvaraju u unutarstanični PHA. GAOs ne otpuštaju fosfate u anaerobnim uvjetima, također ni ne unose fosfate tijekom aerobnih uvjeta te stoga ne doprinose uklanjanju fosfata iz otpadne vode. GAOs su u kompeticiji sa PAOs u EBPR sistemima (Oehmen i sur., 2006).

2.3. Mikroorganizmi u procesu denitrificirajuće defosfatacije

Proces biološkog uklanjanja fosfora provode mikroorganizmi koji su sposobni unositi fosfat u stanice u suvišku njihovih metaboličkih potreba i pohranjivati ga unutarstanično u obliku polifosfatnog polimera (poliP). Fosfor se iz sustava uklanja odvođenjem mulja sa poliP. Biološko uklanjanje fosfora je jeftinija alternativa u usporedbi sa kemijskim postupkom (Jena i sur., 2016; Wang i sur., 2015; Metcalf & Eddy, 2003; Blackall i sur., 2002; Kuba i sur., 1994). Predominantne vrste za uklanjanje P u cijeloj populaciji aktivnog mulja su skupine bakterija *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Candidatus accumulibacter phosphatis*, a koje se smatraju predstavnicima PAOs (Ahn i sur., 2007; Lin i sur., 2003).

PAOs formiraju guste, dobro taložive flokule u aktivnom mulju. Anaerobna zona u anaerobno/aerobnom procesu predstavlja "selektor" budući da osigurava uvjete povoljne za proliferaciju PAOs zbog činjenice da PAOs uporbave dio biorazgradivog KPK umjesto ostalih heterotrofa. Ulazni biorazgradivi KPK fermentira do acetata u anaerobnoj zoni, koji je potom raspoloživ PAOs vrstama koji za unos acetata i pohranjivanje PHB trebaju energiju koju dobiju otpuštanjem O-PO₄ iz poliP (Metcalf & Eddy, 2003). Iz razlike u bilanci manjeg anaerobnog

otpuštanja O-PO₄ i većeg aerobnog unosa O-PO₄ osigurava se odvođenjem viška mulja uklanjanje P iz sustava.

U anoksičnim uvjetima, DPAOs umjesto kisika koriste nitrat ili nitrit kao akceptor elektrona za dobivanje energije i akumulaciju P i tako istovremeno uklanjaju N i P iz otpadne vode (Jena i sur., 2016).

2.4. Zakonska regulativa

Maksimalne dopuštene koncentracije sastojaka u obrađenoj otpadnoj vodi definirane su zakonskim propisima (NN 80/13; NN3/16).

U Tablici 1 prikazani su neki odabrani pokazatelji kakvoće definirani prema NN80/13 i NN3/16, a važni za razmatranje rezultata ovog rada.

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	-

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL I METODE

3.1.1. Omjer C/N/P – elektron donor, elektron akceptori i fosfat

Izvor ugljika, donor elektrona, je natrijev acetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), odvagano u odgovarajućoj količini za odabrani omjer C/N i dodan na početku ciljanog pokusa, te je tijekom 4 sata statičkog perioda pokusa motrena koncentracija organskih sastojaka (KPK).

Izvor fosfata ($\text{PO}_4\text{-P}$) je vodena otopina kalijeva dihidrogen fosfata (KH_2PO_4). Nakon statičkog perioda od 4 sata pokusa, u ciljani pokus u odgovarajućoj količini dodana je vodena otopina sa $\text{PO}_4\text{-P}$ te je pri 100 rpm vođen proces u anoksičnim uvjetima.

Kao elektron akceptori uporabljeni su $\text{NO}_2\text{-N}$ odnosno $\text{NO}_3\text{-N}$, priređeni kao vodene otopine NaNO_2 i KNO_3 , te ovisno o ciljanom pokusu (denitrificirajuća defosfatacija preko nitrata ili preko nitrita) u odgovarajućoj količini dodana je otopina $\text{NO}_2\text{-N}$ odnosno $\text{NO}_3\text{-N}$ istovremeno kada i $\text{PO}_4\text{-P}$ i proces je vođen u anoksičnim uvjetima.

U pokuse u anoksičnom periodu je dodana i otopina 0,3 ml/L elemenata u tragovima, na početku pokusa, sastava: EDTA (10 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,54 g/L), H_3BO_3 (150 mg/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (30 mg/L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (120 mg/L), KI (180 mg/L), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (60 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (120 mg/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (150 mg/L).

U statičkom periodu pokusa motrena je koncentracija KPK, a u anoksičnom periodu procesa motrena je koncentracija KPK, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, te pH, otopljeni kisik (DO, engl. *Dissolved oxygen*) i temperatura.

Pokusi su vođeni uz početnu koncentraciju 15 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona, odnosno 10 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona, pri omjeru N/P 2, i pri omjerima C/N 3, 5 i 7.

Određena je koncentracija mikrobne biomase i iznosila je $3,8 \pm 0,2$ gMLSS/L.

3.1.2. Batch pokusi denitrificirajuće defosfatacije u konfiguraciji procesa statički/anoksični uvjeti, uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona

Pokusi denitrificirajuće defosfatacije su vođeni uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona, sa muljem uzetim iz SBR (engl. *Sequencing batch reactor*) tijekom "steady state" na kraju aerobne faze procesa. Mulj je prije provođenja pokusa opran vodovodnom vodom u tri uzastopna ponavljanja.

Diskontinuirani pokusi su provedeni u laboratorijskim čašama radnog volumena 500 mL, pri 100 o/min, pri temperaturi 25 ± 2 °C. Tijekom pokusa nije korigiran pH.

U laboratorijske čaše, na početku ciljanog pokusa, u miješanu tekućinu (ML, engl. *Mixed liquor*) dodan je izvor C (natrijev acetat) za odabrani ciljani omjer C/N te je tijekom 4 sata pokus

vođen u statičkim uvjetima uz promiješan sadržaj u čašama tijekom 5 s svakih 15 min. Nakon perioda 4 sata u statičkim uvjetima u ML je dodana odgovarajuća količina izvora P i N (ovisno o ciljanom pokusu otopina sa NO₂-N, odnosno NO₃-N) i otopina elemenata u tragovima, te je na magnetskoj mješalici pri 100 o/min vođen pokus pri anoksičnim uvjetima.

U odgovarajućim vremenskim intervalima, tijekom pokusa, uzimana je određena količina ML za analitičko određivanje koncentracije KPK, NO₃-N, NO₂-N i PO₄-P. Koncentracija mikrobne biomase izražena kao MLSS (engl. *Mixed liquor suspended solids*) određivana je povremeno. Stalno su motreni pH, DO i temperatura jer su u čaše postavljene elektrode za njihovo određivanje. Za dokazivanje polifosfata (poliP) uporabljena je metoda bojanja po Neisseru (Eikelboom i van Buijsen, 1983). Pokusi su vođeni u tri paralele. Rezultati predstavljaju srednju vrijednost ±standardna devijacija.

3.1.3. Aparatura i pribor

U provođenju pokusa denitrificirajuće defosfatacije u konfiguraciji procesa statički/anoksični uvjeti uz NO₂-N i NO₃-N kao akceptore elektrona uporabljena je aparatura navedena u tablici 2. U provođenju pokusa i analitičkih metoda uporabljeno je i standardno laboratorijsko posuđe, pribor i materijal, poput laboratorijske staklene čaše, pincete, stalci, kleme, pipete, silikonske cijevi, filter papir i drugo.

Tablica 2. Aparatura uporabljena u pokusima uklanjanja PO₄-P tijekom denitrificirajuće defosfatacije u konfiguraciji procesa statički/anoksični uvjeti uz NO₂-N i NO₃-N kao akceptore elektrona

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

Kemikalije uporabljene u provedbi pokusa prikazane su u tablici 3. Sve su kemikalije p.a. čistoće.

Tablica 3. Kemikalije uporabljene u provedbi pokusa (sve p.a. čistoće):

Kemikalija	Proizvođač
$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	GRAM-MOL
KH_2PO_4	Merck
KNO_3	Merck
NaNO_2	Merck
H_2SO_4	GRAM-MOL
Ag_2SO_4	Kemika
HgSO_4	Kemika
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	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
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

3.2. ANALITIČKE METODE

Prije provođenja analitičkih metoda uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima i filtrirani kroz filter papir veličine pora 0,45 μm .

3.2.1. Određivanje koncentracije fosfata

Fotometrijski, pomoću kivetnog testa Merck Spectroquant 1.14842, određivan je fosfat u obliku ortofosfata ($\text{PO}_4\text{-P}$). Metoda je analogna APHA 4500-P C.

Određuje se koncentracija žuto obojenog molibdovanadat fosforne kiseline nastao reakcijom iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom.

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

Pribor:

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

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

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

Kvarcne kivete, Merck

3.2.2. Određivanje koncentracije nitrata

Nitrat je određivan pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 114773. Primjena metode: U koncentriranoj sumpornoj kiseline ioni nitrata reagiraju s derivatima benzojeve kiseline i formiraju crvene nitro spojeve koji se određuju fotometrijski.

Postupak: 1,5 mL uzorka prethodno filtriranog i po potrebi razrijeđenog odpipetira se u staklenu kivetu i doda jedna žličica $\text{NO}_3\text{-1K}$ reagensa. Kiveta se zatvori i miješa dok se reagens ne otopi, te doda 5 mL konc. H_2SO_4 . Koncentracija $\text{NO}_3\text{-N}$ u mg/L određuje se mjerenjem na spektrofotometru, nakon 10 minuta reakcijskog vremena.

Pribor:

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Kivetni testovi Merck Spectroquant 114773 (0,2-20 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$)

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

Kvarcne kivete, Merck

3.2.3. Određivanje koncentracije nitrita

Nitrit je određivan pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14776. Metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500- $\text{NO}_2\text{-B}$, i EN 26 777.

Metoda 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 čiji intenzitet se određuje fotometrijski.

Postupak: 5 mL uzorka prethodno filtriranog i po potrebi razrijeđenog odpipetira se u staklenu kivetu i doda jedna žličica $\text{NO}_2\text{-1}$ reagensa. Kiveta se zatvori i miješa dok se reagens ne otopi.

Koncentracija NO₂-N u mg/L određuje se mjerenjem na spektrofotometru, nakon 10 minuta reakcijskog vremena.

Pribor:

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

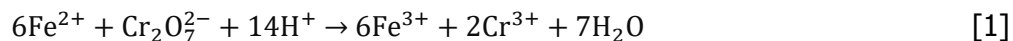
Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776 (0,002-1 mg NO₂-N/L)

Kvarcne kivete, Merck

3.2.4. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

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

Uzorak se spaljuje u kiseloj sredini, uz srebro sulfat (Ag₂SO₄) kao katalizator i živin sulfat (HgSO₄) za izbjegavanje interferencije nekih anorganskih spojeva poput klorida. Suvišak kalijeva bikromata titrira se otopinom feroamonijeva sulfata (FAS), ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O), uz dodatak ferroina kao indikatora, [jednadžba 1].



Postupak: Uzorak (2 mL) se odpipetira u staklenu kivetu, te doda otopina K₂Cr₂O₇ + HgSO₄ (1,2 mL) i otopina Ag₂SO₄ + H₂SO₄, (2,8 mL). Pažljivo se kiveta zatvori, promiješa, i sadržaj spaljuje u termoreaktoru pri 150 °C/1h. Ostavi se na tamnom 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. Slijepa proba se radi na isti način sa destiliranom vodom. Faktor otopine feroamonijeva sulfata se odredi poput slijepa probe, ali se uzorak 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 K₂Cr₂O₇ + HgSO₄

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:

V₁-volumen [mL] FAS utrošen za titraciju slijepa probe

V₂-volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

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

f-faktor otopine FAS

Pribor:

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Digestor, Merck Thermoreactor TR 300

Titratore - Digitalna bireta Solarus, Hirschman-Laborgeräte

3.2.4. Određivanje pH vrijednosti

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

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

Pribor:

pH elektroda WTW SenTix41

pH-metar WTW 330i

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. Instrument je prije upotrebe 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

Temperatura je tijekom procesa 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)

Postupak:

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 očita količina suhe tvari u g/L.

Najčešće korišteni filter za određivanje TSS 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).

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 [4].

$$ISS \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{m_{\text{žareni}} - m_{\text{čisti f}}}{V \text{ (mL) uzorka}} \times 1000 \quad [4]$$

VSS predstavlja razliku TSS i ISS, prema jednadžbi [5]

$$VSS = TSS - ISS \quad [g L^{-1}] \quad [5]$$

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

Metoda bojanja po Neisseru uporabljena je za određivanje poliP, po metodi Eikelboom i van Buijsen, 1983.

Kapljica aktivnog mulja stavi se na predmetno stakalce, čisto i odmašćeno provlačenjem predmetnice kroz plamen. 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 se pusti da oteče sa stakalca. Potom se nanese otopina C na 45 sekundi te ispere vodom. Stakalce se ostavi da se osuši. Promatra se pod svjetlosnim mikroskopom.

Unutarstanični poliP se vide kao tamno-ljubičasto obojana volutinska zrnca unutar bakterijske stanice.

Reagensi potrebni za provedbu bojanja po Neisseru navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Reagensi uporabljeni 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 [6]:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [6]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$, prema jednadžbi [7]:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [7]$$

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 \pm standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba provedena je ANOVA analizom varijance s određenim intervalom pouzdanosti $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Pokusi denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona, u konfiguraciji statički/anoksični uvjet, su provedeni s ciljem da se istraži:

- važnost i učinak statičkog perioda procesa – učinak uzimanja KPK i unutarstaničnog pohranjivanja u obliku PHB pri statičkom uvjetu vođenja procesa (tijekom 4 sata)
- učinak odabranog akceptora elektrona, $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ na učinkovitost uklanjanja P u anoksičnim uvjetima pri odabranom omjeru N/P 2
- učinak odabranog omjera C/N (C/N 3, 5 i 7) iz natrijeva acetata kao izvora C na učinkovitost procesa denitrifikacije i unosa P u stanice

Istaknuto je da brojni čimbenici utječu na proces denitrificirajuće defosfatacije, poput vrste i koncentracije izvora C, koncentracija $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$, pH, DO, vrijeme zadržavanja mulja (SRT, engl. *Sludge retention time*), koncentracija GAOs, anaerobna faza procesa, i drugo (Li i sur., 2017; Jena i sur., 2016; Wang i sur., 2015; Liu i sur., 2014; Tayà i sur., 2013; Frison i sur., 2013; Pan i sur., 2013; Freitas i sur., 2009; Ya-yi i sur., 2007; Hu i sur., 2002).

Proces denitrificirajuće defosfatacije u obradi otpadnih voda predstavlja održiv proces u kojem se rješava problem kompeticije za organskim supstatom (izvorom ugljika), smanjuje produkcija mulja i vrijeme reakcije (Wang i sur., 2015).

Dizajn pokusa denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektora u konfiguraciji statički/anoksični uvjet prikazan je slikom 2.



Slika 2. Dizajn pokusa denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektora u konfiguraciji statički/anoksični uvjet

4.1. Denitrificirajuća defosfatacija uz NO₂-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu

Tijekom statičkog uvjeta (4 sata) pokusa denitrificirajuće defosfatacije u konfiguraciji statički/anoksični uvjet, na početku pokusa uz odabrani početni omjer C/N 3, 5 i 7 ostvaren dodatkom odgovarajuće količine natrijeva acetata postignuto je tijekom statičkog perioda pokusa od 4 sata smanjenje KPK za oko 15-18% u odnosu na početnu vrijednost (Tablica 5). Pokusi denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona su provedeni pri omjeru N/P 2, uz početnu koncentraciju 15 mg PO₄-P/L. U svim pokusima NO₂-N, akceptor elektrona, je dodan u količini da odgovara početnoj koncentraciji 30 mg NO₂-N/L. Tijekom anoksičnog perioda procesa zbivalo se istovremeno unos P, denitrifikacija i smanjenje koncentracije KPK (Tablica 5).

Tablica 5. Uklanjanje C, N i P tijekom denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu

	statički uvjet	anoksičan uvjet – NO ₂ -N akceptor elektrona		
	KPK uklanjanje	P unos	N uklanjanje	KPK uklanjanje
C/N 3	18 %	75,8 %	100 %	70,3 %
C/N 5	15 %	74,5 %	100 %	36,9 % – suvišak KPK
C/N 7	17 %	75,6 %	100 %	37 % – suvišak KPK

U statičkom uvjetu vođenja procesa, tijekom 4 sata, zbiva se smanjenje koncentracije KPK od 15-18% u odnosu na početnu vrijednost, a daljnjim vođenjem procesa u anoksičnim uvjetima, tijekom daljnjih 1,5 sati procesa zbiva se daljnje uklanjanje KPK istovremeno uz uklanjanje N i P (Tablica 5).

Unos P je neovisan o omjeru C/N, i kada je utrošen sav raspoloživi elektron akceptor (NO₂-N) zabilježen je unos P od 74,5-75,8%, za istražene omjere C/N 3, 5 i 7 (Tablica 5).

U pokusima pri C/N 5 i 7 izvor C (organski sastojak) je dodan u suvišku i preostaje u obrađenoj otpadnoj vodi nakon provedenog procesa (Tablica 5).

O važnosti provođenja anaerobne faze procesa biološkog uklanjanja P u procesu EBPR tijekom koje se generira – nakuplja PHB, i koji proliferira PAOs vrste, ukazuju brojni autori (Jena i sur., 2016; Kapagiannidis i sur., 2013; Peng i sur., 2011; Metcalf & Eddy, 2003)

Wong i sur. (2015), svojim su eksperimentima utvrdili da je tijekom anoksičnih uvjeta unos fosfora 1,31 mg/mg NO₃-N. Pokazali su u rezultatima da se iz otpadnih voda uklanja 83% fosfora i 64% dušika.

López-Vázquez i sur. (2008), navode da se postiže različiti unos fosfata ovisno o uvjetima, anoksični i aerobni uvjeti, u kojima se mikroorganizmi nalaze. Prosječni unos fosfata tijekom

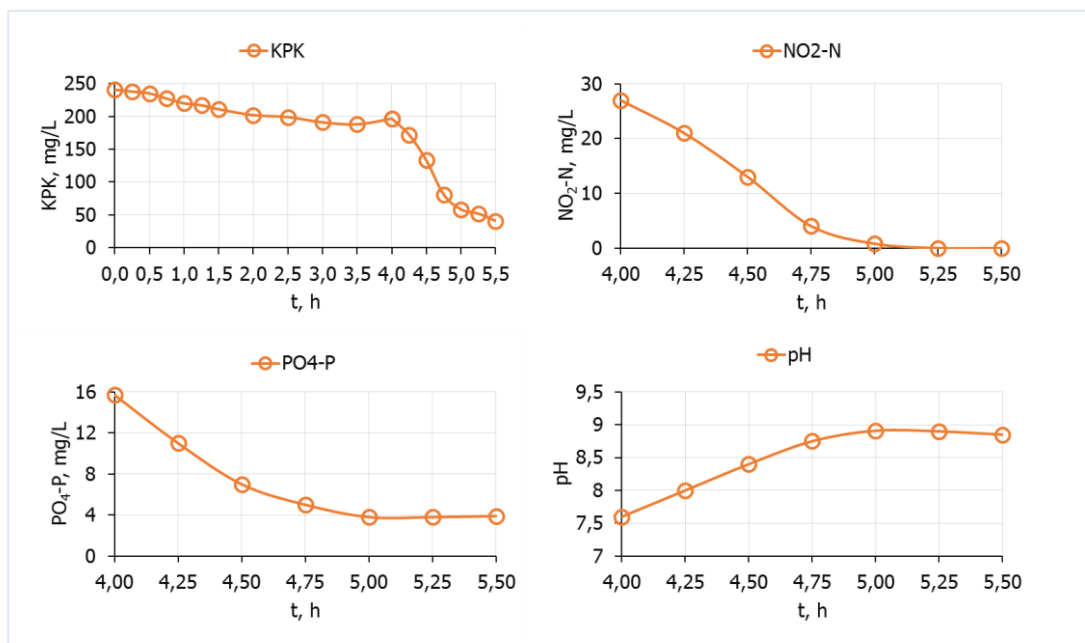
aerobnih uvjeta iznosio je 10 ± 4 mgPO₄-P/gVSS/h, dok je pri anoksičnim uvjetima on iznosio 3 ± 2 mgPO₄-P/gVSS/h. Na temelju tih podataka izračunat je omjer unosa fosfata u anoksičnim/aerobnim uvjetima te je fluktuirao između 48% do nižih vrijednosti od 9% pa čak i dosegnuo 0% (prosječan unos fosfata u anoksičnim/aerobnim uvjetima iznosio je $24\% \pm 16\%$).

Jena i sur. (2016), utvrdili su da je tijekom 10 dana provođenja eksperimenta 58,4% (~17 mg/L) fosfata uklonjeno unosom u bakterijske stanice tijekom duge anoksične faze. Daljnjim provođenjem procesa reaktor je poprimio stabilnu vrijednost unosa fosfata u bakterijske stanice koji je iznosio 86,7% (~27 mg/L). Uklanjanje nitrata tijekom anoksične faze u danima 1.-10. iznosio je oko 80%, a postepeno se povećavao do 98% (~995 mg/L).

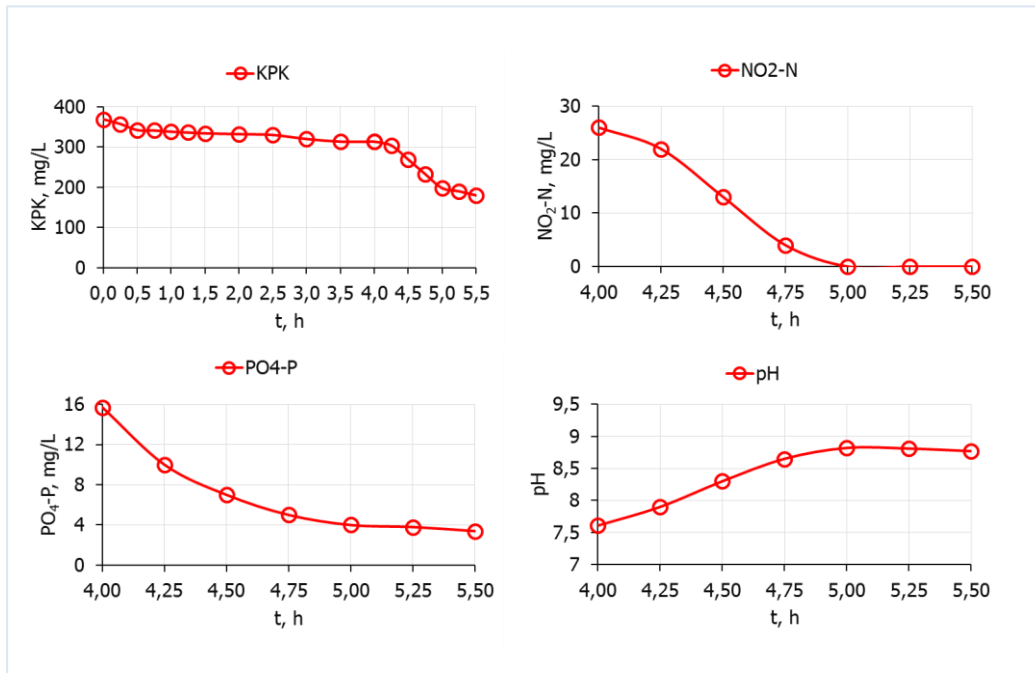
Rezultati eksperimenata ovog rada prikazali su sličan unos fosfata u bakterijske stanice. U našim je eksperimentima taj unos bio do 76% (NO₂-N akceptor elektrona) i do 50% (NO₃-N akceptor elektrona). Također, postignuti rezultati su slični i u uklanjanja nitrita i nitrata.

Promjene KPK, PO₄-P, NO₂-N, kao i pH za istražene odabrane omjere C/N 3, 5 i 7 u procesu denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu su prikazani slikama 3-5.

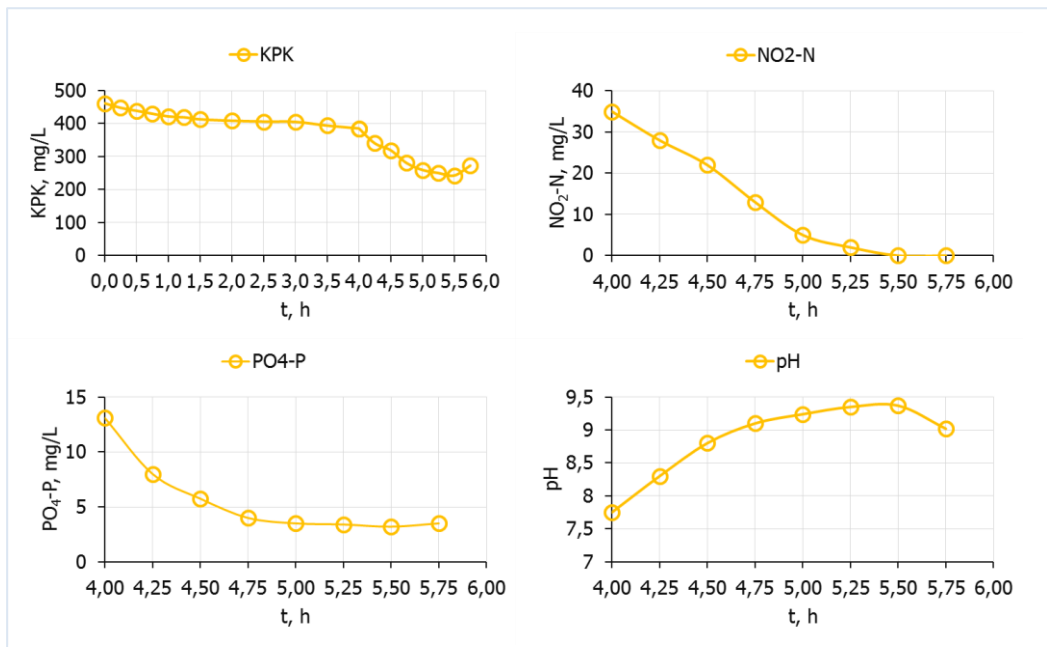
Promjene KPK su prikazane tijekom statičkog i anoksičnog perioda procesa, a promjene NO₂-N, PO₄-P i pH tijekom anoksičnog perioda procesa (Slike 3-5).



Slika 3. Promjene KPK (statički i anoksični period procesa), PO₄-P, NO₂-N i pH (anoksični period procesa) tijekom procesa denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu, pri N/P 2 i C/N 3.



Slika 4. Promjene KPK (statički i anoksični period procesa), PO₄-P, NO₂-N i pH (anoksični period procesa) tijekom procesa denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu, pri N/P 2 i C/N 5.



Slika 5. Promjene KPK (statički i anoksični period procesa), PO₄-P, NO₂-N i pH (anoksični period procesa) tijekom procesa denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu, pri N/P 2 i C/N 7.

Pokusi denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona, u konfiguraciji statički/anoksični uvjet pri omjeru C/N 3, 5 i 7 su pokazali da je tijekom statičke faze utrošeno 18%, 15% odnosno 17% početne KPK vrijednosti (Tablica 5, Slike 3-5).

Budući da jedino DPAOs i GAOs imaju sposobnost unosa VFA u svoje stanice u anaerobnim uvjetima, količina utrošenog acetata ukazuje na njihov udio u aktivnom mulju.

Xu i sur. (2013) su u svojim pokusima pokazali da je statična faza analogna anaerobnoj fazi EBPR procesa obzirom na promjene acetata, PHB i poliP.

U pokusima završnog rada je u statičkoj fazi zabilježen unos acetata, međutim bez otpuštanja ortofosfata u ML. U anoksičnoj fazi je dalje utrošeno 70,3%, 36,9% i 37% KPK pri odabranim omjerima C/N 3, 5 i 7, pri tome je na kraju pokusa preostalo 41,3 mg KPK/L, 183,7 mg KPK/L odnosno 272,4 mg KPK/L. U pokusima pri sva tri istražena odabrana omjera C/N postignuto je potpuno uklanjanje $\text{NO}_2\text{-N}$.

Denitritacija se odvijala brzinom od 26,2 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ (Slika 3), 26 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ (Slika 4) i 23 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ (Slika 5) za odabrane omjere C/N 3, 5 i 7. Unos $\text{PO}_4\text{-P}$ u DPAOs je neovisan o početnom omjeru C/N, za istražene omjere C/N 3, 5 i 7, i nalazi se u uskom rasponu vrijednosti 74,5-75,8% (Slike 3-5, Tablica 5).

Pri C/N omjeru 3 (Slika 3, Tablica 5) je u istom trenutku, u 5. satu, utrošen raspoloživi KPK, denitrificiran je nitrit i time je završio i unos P u stanice DPAOs. Rezultati su pokazali da je taj omjer C/N 3, za istražen odabran omjer N/P 2, minimalan omjer C/N potreban za potpunu denitritaciju 30 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, a pri tome je ostvareno 75,8% uklanjanje $\text{PO}_4\text{-P}$.

Omjeri C/N 5 i 7 (Slike 4 i 5, Tablica 5) su osigurali raspoloživu količinu organskih sastojaka dodanih u suvišku potreba, i nakon završene denitritacije preostaje KPK u obrađenoj vodi. KPK dodan u suvišku pri C/N 5 i 7 ima učinak na denitritaciju na način da se brzina denitritacije smanjuje s povećanjem omjera C/N, a naravno zbiva se potpuna denitritacija. Istovremeno, raspoloživa količina KPK dodana u suvišku nema učinka na uklanjanje $\text{PO}_4\text{-P}$.

Unos $\text{PO}_4\text{-P}$ uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona pri istraženim odabranim omjerima C/N 3, 5 i 7 je bio najintenzivniji tijekom prvih 30 minuta anoksičnih uvjeta, te je u prvih pola sata anoksičnih uvjeta postignuto čak 55,4%, 55,4% i 56,1% unos P. I u rezultatima Jena i sur., (2016) je vidljivo najintenzivnije uklanjanje P u prvoj trećini anoksične faze, a zatim se uklanjanje P odvijalo manjim intenzitetom.

Brzine uklanjanja P su iznosile 11,9 mg P/Lh, 11,7 mg P/Lh i 9,2 mg P/Lh pri C/N omjerima 3, 5 i 7 (Slike 3-5).

U ovako vođenoj konfiguraciji procesa statički/anoksični uvjet denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona dodan za omjer N/P 2 (Slike 3-5, Tablica 5), uz početnih 15 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, unos $\text{PO}_4\text{-P}$ u stanice DPAOs nije bio limitiran niti količinom elektron donora (natrijev

acetat dodan pri omjeru C/N 3, 5 i 7), niti početnom koncentracijom elektron akceptora – NO₂-N (NO₂-N dodan da odgovara početnom omjeru N/P 2).

U literaturi je istaknuto da NO₂-N može imati inhibicijski učinak na aktivnost DPAOs u koncentraciji od 3-93,7 mg NO₂-N/L (Peng i sur. 2011; Zhou i sur., 2007; Saito i sur., 2004; Meinhold i sur., 1999), kao i da rješenje tog problema može biti u impulsnom dodavanju NO₂-N niske koncentracije (Tayà i sur., 2013; Ma i sur., 2013; Vargas i sur., 2011).

U pokusima završnog rada, uz NO₂-N kao akceptor elektrona je u statičkom periodu procesa postignuto uklanjanje KPK 15-18%, a u anoksičnoj fazi se odvijalo istovremeno uklanjanje KPK, N i P (Slike 3-5). Slične rezultate istraživanja su postigli Jena i sur. (2016) koji su provodili denitrificirajuću defosfataciju sa anoksično-aerobnom konfiguracijom sa NO₃-N kao elektron akceptorom u SBR reaktoru tijekom 180 dana i postigli istovremeno uklanjane KPK, N i P u anoksičnoj fazi.

Profil pH vrijednosti (Slike 3-5) je bio tipičan za anoksični period EBPR procesa, vrijednost pH je rasla s početnih 7,6-7,8 na maksimalnih 8,8-9,4. Po završetku denitrifikacije, vrijednost pH se lagano smanjila. Suprotno literaturnim navodima da se pri pH 8,5 odvija taloženje PO₄-P (Li i sur., 2018), u ovim pokusima je sav PO₄-P uklonjen mikrobnim unosom u stanice što se vidi po tome što je po završetku pokusa ostalo više od 3,4 mg PO₄-P/L iako je u ranoj fazi procesa pH>8,5 (Slike 3-5).

Provođenjem pokusa denitrificirajuće defosfatacije uz NO₂-N kao akceptor elektrona (Slike 3-5) vidljiva je sprega elektron akceptora i unosa P, jer iscrpljivanjem NO₂-N u točki potpune denitrifikacije postiže se maksimalni unos P.

Pitanje je što bi se postiglo dodatnim impulsnim dodavanjem NO₂-N u toj točki procesa.

4.2. Denitrificirajuća defosfatacija uz NO₃-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu

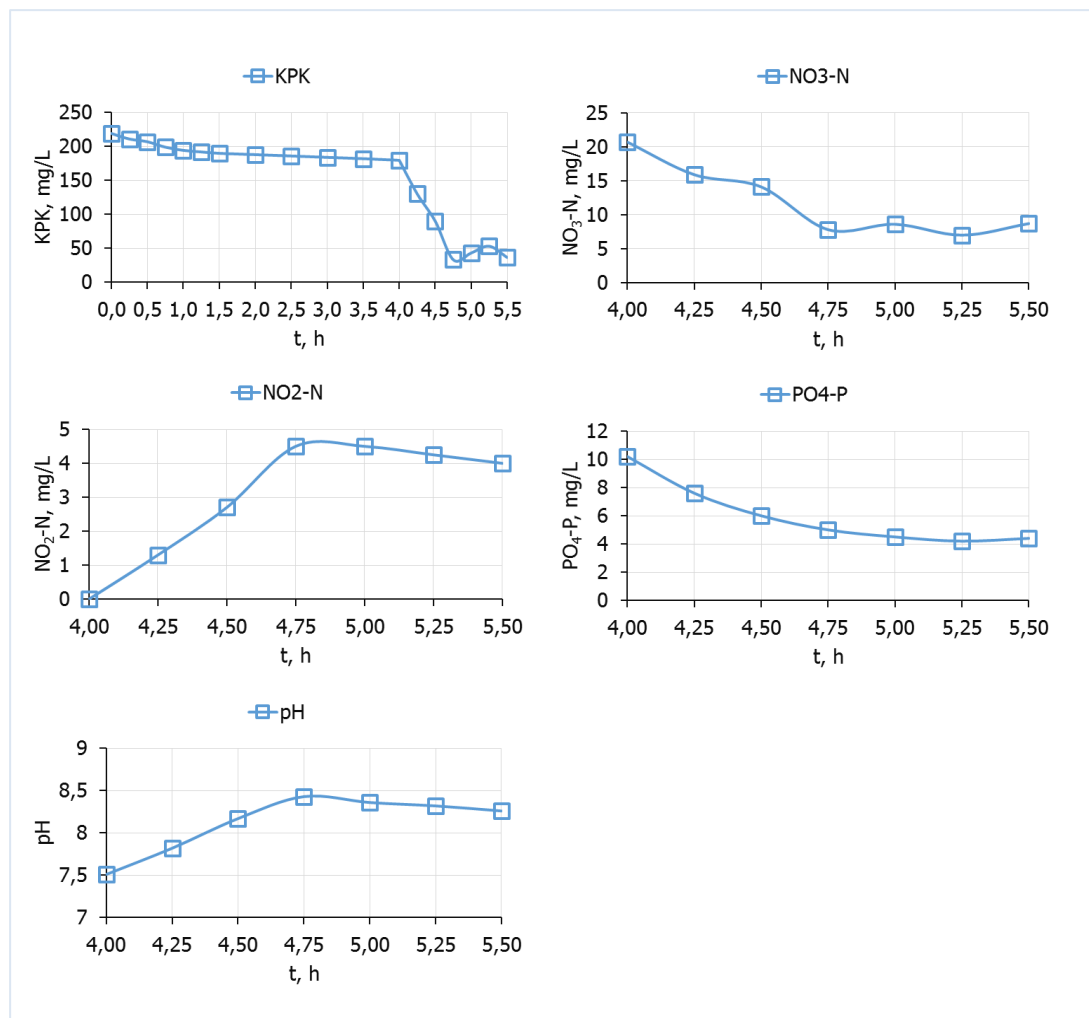
Pokusi denitrificirajuće defosfatacije uz NO₃-N kao akceptor elektrona su provedeni pri omjeru N/P 2, uz početnu koncentraciju 10 mg PO₄-P/L, i pri odabranom omjeru C/N 3 i 5 (Tablica 6).

Tablica 6. Uklanjanje C, N i P tijekom denitrificirajuće defosfatacije uz NO₃-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu

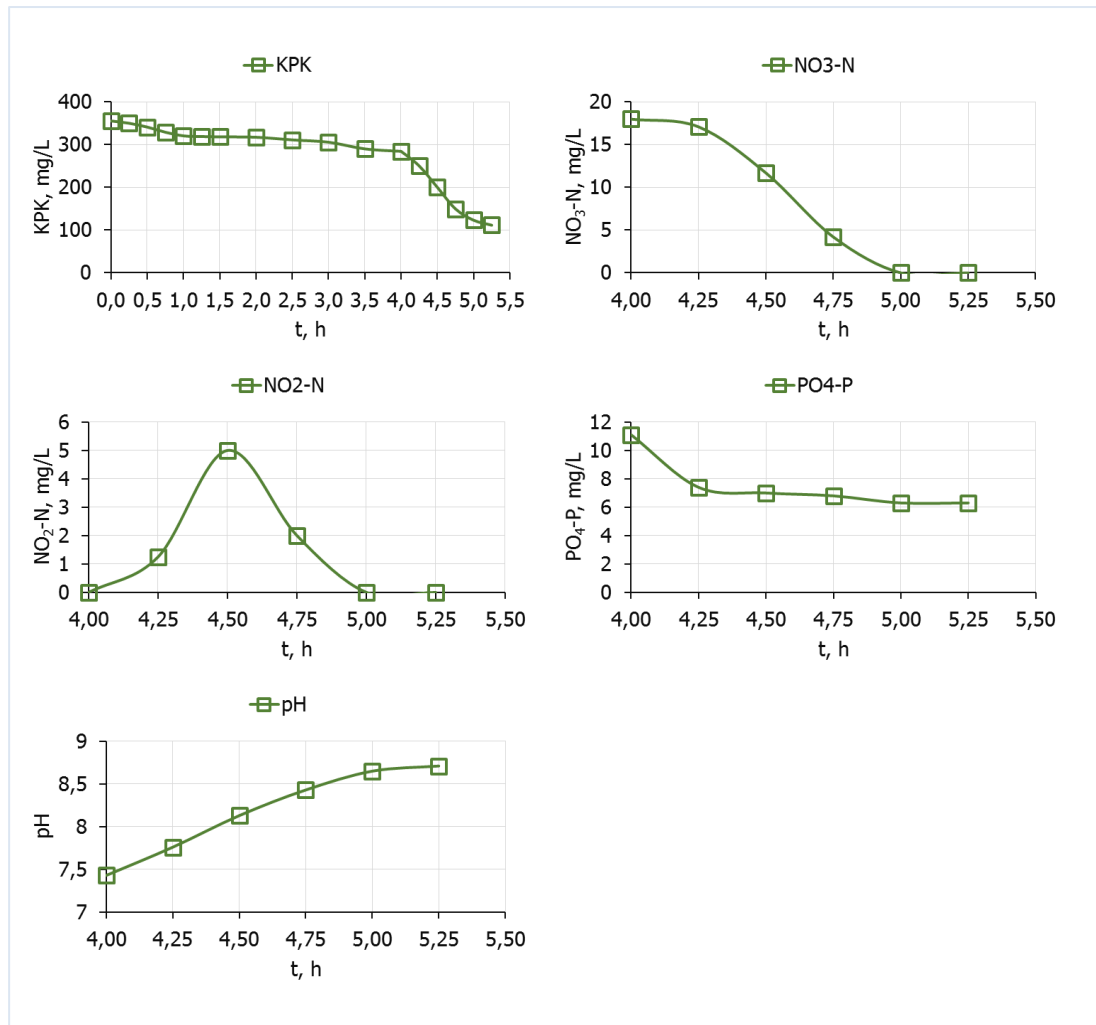
	statički uvjet	anoksičan uvjet – NO₃-N akceptor elektrona		
	KPK uklanjanje	P unos	N uklanjanje	KPK uklanjanje
C/N 3	18 %	50,9 %	40,6 % – nakupljen NO ₂ -N	81,5 %
C/N 5	20 %	43,2 %	100 % – nakupljen i utrošen NO ₂ -N	56,3 %

Tijekom statičkog perioda procesa (4 sata), uz natrijev acetat dodan na početku procesa za odabrani omjer C/N 3 i 5, ostvareno je smanjenje KPK od 18% odnosno 20% (Tablica 6), slično kao i u pokusima sa nitritom kao akceptorom elektrona kad je zabilježeno smanjenje KPK 15-18% (Tablica 5, Slike 3-5).

Promjene KPK, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, kao i pH za istražene odabrane omjere C/N 3 i 5 u procesu denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu su prikazani slikama 6 i 7. U anoksičnom periodu procesa zbivao se istovremeno unos P, denitrifikacija uz prevođenje $\text{NO}_3\text{-N}$ u $\text{NO}_2\text{-N}$ kao i smanjenje koncentracije $\text{NO}_2\text{-N}$ i smanjenje koncentracije KPK (Tablica 6, Slike 6 i 7).



Slika 6. Promjene KPK (statički i anoksični period procesa), $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ i pH (anoksični period procesa) tijekom procesa denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu, pri N/P 2 i C/N 3.



Slika 7. Promjene KPK (statički i anoksični period procesa), NO₃-N, PO₄-P, NO₂-N i pH (anoksični period procesa) tijekom procesa denitrificirajuće defosfatacije uz NO₃-N kao akceptor elektrona u statičko/anoksično vođenom procesu, pri N/P 2 i C/N 5.

U procesu denitrificirajuće defosfatacije uz NO₃-N kao akceptor elektrona, pri omjeru C/N 3 i N/P 2, tijekom anoksičnog perioda procesa pri početnoj koncentraciji 10 mg PO₄-P/L omjer C/N 3 ne osigurava dovoljno organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju. Zbiva se prevođenje NO₃-N u NO₂-N i njihovo trošenje uz istovremeno iscrpljivanje KPK i unos P. Preostaje NO₃-N u procesu, a ostvaruje se unos P od 50,9% (Slika 6, Tablica 6). Pri omjeru C/N 3 u 4,75. satu procesa je utrošen raspoloživi KPK, preostalo je svega 33,2 mg KPK/L. Denitrifikacija i unos P u stanice DPAOs su se odvijali dok je bilo raspoloživog ugljika, i pri tome je ostvareno 62,3% uklanjanje NO₃-N uz nakupljanje 4,5 mg NO₂-N/L, što čini 40,6% uklanjanja N, uz 50,9% uklonjenog P.

Brzina uklanjanja $\text{NO}_3\text{-N}$ je iznosila 17,2 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$. Pri omjeru C/N 3 i denitrifikacija i uklanjanje P su bili limitirani nedovoljnom količinom elektron donora. Uklanjanje P se odvijalo brzinom 6,9 mg P/Lh (Slika 6).

U pokusu denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona pri omjeru C/N 5 organski sastojci su dodani u suvišku potreba, jer je tijekom anoksičnog perioda procesa uklonjeno svega 56,3% KPK preostalog nakon statičkog perioda. Na kraju anoksične faze preostalo je 122,9 mg KPK/L. Organski sastojci dodani u suvišku osigurali su potpunu denitrifikaciju ali pri tome je ostvaren unos P od svega 43%. Tijekom denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ se prevodio u $\text{NO}_2\text{-N}$, te tijekom procesa utrošio sav $\text{NO}_2\text{-N}$ (Slika 7, Tablica 6).

Brzina denitrifikacije je iznosila 18 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$. Tijekom procesa, redukcijom $\text{NO}_3\text{-N}$ nakupljeno je maksimalno zabilježene vrijednosti 5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, koji su se zatim potpuno reducirali (Slika 7). Uklanjanje P se odvijalo pri 2 brzine, tijekom prvih 15 min anoksičnog uvjeta uklonjeno je 33,3% P, a u narednih 45 min još 17,6%. Ukupna brzina uklanjanja P je iznosila 4,8 mg P/Lh.

Profil pH u pokusu denitrificirajuće defosfatacije uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona je pri omjerima C/N 3 i 5 pokazao trend porasta vrijednosti pH tijekom denitrificirajuće defosfatacije. Budući da su pri omjeru C/N 3 organski sastojci utrošeni u 4,75. satu, upravo tada je zabilježen vrhunac pH vrijednosti od pH 8,4, a nakon toga se pH vrijednost lagano smanjivala (Slika 6). Pri omjeru C/N 5 vrijednost pH je rasla od početka anoksičnih uvjeta do kraja pokusa, kada je zabilježena vrijednost pH 8,7 (Slika 7).

Rezultati pokusa denitrificirajuće defosfatacije u statičko-anoksičnom režimu sa $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptorima elektrona pokazuju da je manja potreba na organskim sastojcima sa nitritom kao akceptorom elektrona u odnosu na nitrat (Tablice 5 i 6, Slike 3-7), što je u suglasju sa literaturom (Pan i sur., 2017; Rubio-Rincón i sur., 2017; Zeng i sur., 2016; Zhou i sur., 2010). U pokusima denitrificirajuće defosfatacije u statičko/anoksičnom režimu vođenja procesa uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona i pri odabranom omjeru N/P 2 (Slike 3-7), potpuno uklanjanje N je ostvareno pri omjeru C/N 3 sa $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptorom elektrona, odnosno pri omjeru C/N 5 sa $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptorom elektrona. Također, sa nitritom je postignuto veće uklanjanje P od $75\pm 1\%$, a sa nitratom je ostvareno 43,2%-50,9% uklanjanje P.

Ti ostvareni rezultati su u suprotnosti sa Zhou i sur. (2010) koji su postigli veće uklanjanje P sa nitratom kao akceptorom elektrona u odnosu na nitrit.

Nadalje, u pokusima sa $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptorom elektrona su zabilježene veće brzine uklanjanja i N i P: 26,2 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, 26 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ i 23 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, te 11,9 $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$, 11,7 $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ i 9,2 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ pri istraženim odabranim omjerima C/N 3, 5 i 7, u odnosu na $\text{NO}_3\text{-N}$

kao akceptor elektrona kada je postignuto: 17,2 mg NO₃-N/Lh i 18 mg NO₃-N/Lh, te 6,9 mg PO₄-P/Lh i 4,8 mg PO₄-P/Lh za istražene odabrane omjere C/N 3 i 5 (Slike 3-7).

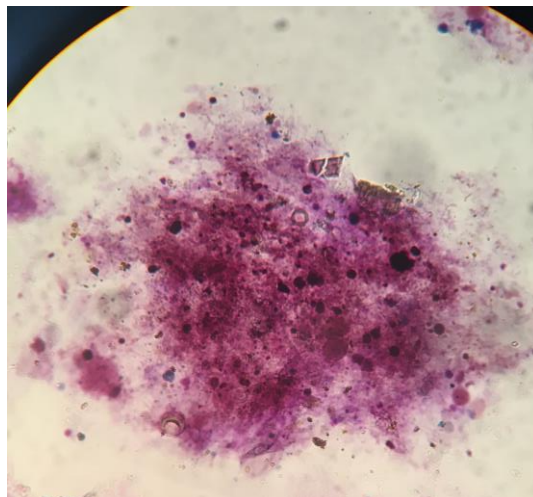
Ovi rezultati sugeriraju da je nitrit povoljniji akceptor elektrona u procesu denitrificirajuće defosfatacije u statičko-anoksičnoj konfiguraciji.

Jena i sur. (2016) su u anoksično-aerobnoj konfiguraciji procesa zabilježili istovremeno uklanjanje KPK, NO₃-N i PO₄-P u anoksičnim uvjetima, pri KPK/NO₃-N omjeru 4, i postigli uklanjanje NO₃-N, PO₄-P i KPK od 98%, 86% i 72% na kraju anoksične faze. I u njihovim rezultatima je vidljivo najintenzivnije uklanjanje P u prvoj trećini anoksične faze, a zatim se uklanjanje P odvijalo manjim intenzitetom.

Rubio-Rincón i sur. (2017) ističu važnost GAOs u procesu denitrificirajuće defosfatacije. Sugeriraju da druge mikrobne populacije, poput GAOs, reduciraju nitrat do nitrita, a da PAOsI koriste nitrit za unos P u svoje stanice. Prethodna istraživanja su se usuglasila da PAOsI koriste nitrat i/ili nitrit kao akceptor elektrona, a PAOsII koriste samo nitrit (Oehmen i sur., 2010; Flowers i sur., 2009; Carvalho i sur., 2007).

4.3. Dokazivanje poliP – bojanjem po Neisseru

Bojanjem po Neisseru (Eikelboom i van Buijsen, 1983) dokazan je poliP (Slika 8). PoliP se vidi ljubičasto, a ostale stanične komponente su žućkasto-smeđe.



Slika 8. PoliP unutarstanično pohranjen u DPAOs (bojanje po Neisseru, optički mikroskop)

5. ZAKLJUČCI

Temeljeno na rezultatima prikaznim u ovom radu i provedene rasprave proizlaze zaključci:

1. DPAOs provode proces denitrificirajuće defosfatacije u konfiguraciji statički/anoksični uvjet uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona i natrijev acetat kao donor elektrona dodan u omjeru C/N 3, 5 i 7, pri omjeru N/P 2, pri početnoj koncentraciji 15 mg $\text{PO}_4\text{-P}$ uz $\text{NO}_2\text{-N}$, odnosno početnih 10 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona
2. Tijekom statičkog perioda procesa denitrificirajuće defosfatacije (tijekom prvih 4 sata procesa) zbiva se unos organskih sastojaka, smanjuje se koncentracija KPK za 15-20% ali nema otpuštanja $\text{PO}_4\text{-P}$
3. U anoksičnom periodu procesa unos $\text{PO}_4\text{-P}$ i uz $\text{NO}_2\text{-N}$ i uz $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona je intenzivniji tijekom prvih 15-30 minuta anoksičnih uvjeta, a zatim se uklanjanje P odvijalo manjim intenzitetom
4. Veće uklanjanje P od $75\pm 1\%$ postignuto je s $\text{NO}_2\text{-N}$, dok je s $\text{NO}_3\text{-N}$ ostvareno 43,2%-50,9% uklanjanje P
5. Bojanjem po Neisseru dokazan je unutarstanično pohranjen poliP
6. U pokusima sa $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptorom elektrona su zabilježene veće brzine uklanjanja i N i P: 26,2 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, 26 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ i 23 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, te 11,9 $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$, 11,7 $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ i 9,2 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ pri istraženim odabranim omjerima C/N 3, 5 i 7, u odnosu na $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona kada je postignuto: 17,2 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ i 18 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$, te 6,9 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ i 4,8 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ za istražene odabrane omjere C/N 3 i 5

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, 21. izd., American Public Health Association, Washington, DC

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.

Carvalho, G., Lemos, P.C., Oehmen, A., Reis, M.A. (2007) Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Research* **41**: 4383 – 4396.

Eikelboom D.H., van Buijsen H.J.J. (1983) Microscopic sludge investigation manual. 2. izd., TNO Research Institute of Environmental Hygiene, Delft

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.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. *Chemical Engineering Journal* **215-216**: 15 – 22.

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., 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.
- 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.
- Kuba, T., Wachtmeister, A., van Loosdrecht, 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, 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: 012090.
- Li, W., Zhang, H.-y., Sun, H.-z., Zeng, F., Gao, Y.-n., Zhu, L. (2018) Influence of pH on short-cut denitrifying phosphorus removal. *Water Science Engineering* **11**: 17 – 22.
- 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* **95**: 135 – 138.
- López-Vázquez, C., Hooijmans, C., Brdjanovic, D., Gijzen, H. and van Loosdrecht, M. (2008). Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands. *Water Research* **42**(10-11): 2349 – 2360.
- Ma, B., Wang, S., Zhu, G., Ge, S. (2013) Denitrification and phosphorus uptake by DPAOs using nitrite as an electron acceptor by step-feed strategies. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* **7**(2): 267 – 272.
- 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*, 4. izd., Mc-Graw-Hill, USA.

- Oehmen, A., Carvalho, G., Lopez-Vazquez, C., van Loosdrecht, M.C., Reis, M.A.M. (2010) Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Research* **44**: 4992 – 5004.
- Oehmen, A., Saunders, A., Vives, M., Yuan, Z. and Keller, J. (2006) Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources. *Journal of Biotechnology* **123**(1): 22 – 32.
- 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 Technology* **68**: 400 – 405.
- Pan, M., Huang, X., Wu, G., Hu, Y., Yang, Y., Zhan, X. (2017) Performance of Denitrifying Phosphate Removal via Nitrite from Slaughterhouse Wastewater Treatment at Low Temperature. *Water* **9**: 818.
- 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 (2016) *Narodne novine* 16 (NN 3/2016).
- 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.
- 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.
- 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., 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 Biochemistry* **46**: 714 – 720.
- 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.

- Wong, P., Cheng, K., Kaksonen, A., Sutton, D. and Ginige, M. (2013) A novel post denitrification configuration for phosphorus recovery using polyphosphate accumulating organisms. *Water Research* **47**(17): 6488 – 6495.
- Xu, D., Chen, H., Li, X., Yang, Q., Zeng, T., Luo, K., Zeng, G. (2013) Enhanced biological nutrient removal in sequencing batch reactors operated as static/oxic/anoxic (SOA) process. *Bioresource Technology* **143**: 204 – 211.
- 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 80/2013).
- Zeng, W., Li, B., Wang, X., Bai, X., Peng, Y. (2016) Influence of nitrite accumulation on “*Candidatus Accumulibacter*” population structure and enhanced biological phosphorus removal from municipal wastewater. *Chemosphere* **144**: 1018 – 1025.
- 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.

Ivan Mikac

ime i prezime studenta