Utjecaj omjera C/P na biološko uklanjanje fosfora u anoksično/aerobnom procesu

Šipalo, Toni

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:519108

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 18. srpnja 2018. Toni Šipalo, 953/BPI

UTJECAJ OMJERA C/P NA BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA U ANOKSIČNO/AEROBNOM PROCESU

Rad je izrađen je u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Tibele Landeka Dragičević, red. prof.

Mentorici, prof. dr. sc. Tibeli Landeka Dragičević zahvaljujem na ukazanom povjerenju, na strpljivom svakodnevnom stručnom tumačenju rezultata rada, kao i za sve stručne savjete pri izradi diplomskog rada.
Bilo je vrlo inspirativno raditi u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda.

Asistentici mag.ing. Tei Štefanac hvala na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem se obitelji i dragoj Emi na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i ljubavi tijekom mojeg studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ OMJERA C/P NA BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA U ANOKSIČNO/AEROBNOM PROCESU

Toni Šipalo, 953/BPI

SAŽETAK: Poboljšano biološko uklanjanje fosfora (EBPR) je važna strategija u sprječavanju eutrofikacije. U EBPR procesu fosfat akumulirajući organizmi (PAOs) uklanjaju P više od svojih anaboličkih zahtjeva unutarstaničnim akumuliranjem u obliku polifosfata (poliP). U anoksično/aerobnom procesu kapacitet i potencijal PAOs za uklanjanje P je istražen pri različitim omjerima C/P (1, 3, 5, 7, 10). Natrijev acetat je uporabljen kao jedini izvor ugljika. Anoksično/aerobni EBPR proces rezultira simultanim uklanjanjem C, N i P, s konfiguracijom: 2 sata anoksičnog procesa (unutarstanično pohranjivanje PHA u PAOs, nema otpuštanja PO_4-P) i, u slijedu aerobni proces (aktivnost PAOs –> unutarstanično nagomilavanje PO_4-P u obliku poliP); aktivnost nitrifikanata i denitrifikanata (NI/DNI) –> istovremena nitrifikacija i denitrifikacija, i aktivnost heterotrofnih organizama (OHO) –> uklanjanje KPK preostalog nakon anoksične obrade pri C/P≥3). Povećanje omjera C/P rezultira povećanjem anoksičnog unosa KPK i aerobnog unosa P. Neto uzimanje PO_4-P iznosi 4,86 mgPO_4-P/gVSS (pri C/P 10) i 3,61 mgPO_4-P/gVSS (pri C/P 1). FISH metodom je dokazan mikrobni klaster odgovoran za uklanjanje P (PAOs). Također, dokazan je unutarstanično pohranjen poliP.

Ključne riječi: Poboljšano biološko uklanjanje fosofra (EBPR), anoksično/aerobno, PAOs, istovremena nitrifikacija i denitrifikacija, C, N and P removal

Rad sadrži: 55 stranica, 15 slika, 7 tablica, 94 literaturnih navoda
Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević*
Pomoć pri izradi: *mag. ing. Tea Štefanac, asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1.izv. prof. dr. sc. *Mirela Ivančić Šantek*
2. prof. dr. sc. *Tibela Landeka Dragičević*
3. doc. dr. sc. *Ana Jurinjak Tušek*
4. prof. dr. sc. *Marin Matošić* (zamjena)

Datum obrane: 18. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology
Laboratory for biological wastewater treatment
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

THE EFFECT OF C/P RATIO ON BIOLOGOCAL PHOSPHORUS REMOVAL IN ANOXIC/OXIC PROCESS

Toni Šipalo, 953/BPI

ABSTRACT: Enhanced biological phosphorus removal (EBPR) is an important strategy in preventing eutrophication. In EBPR phosphate accumulating organisms (PAOs) remove phosphorus beyond its anabolic requirements by accumulating intracellular polyphosphates (polyP).

In an anoxic/oxic process the capacities and potential of PAOs for P removal was investigated at different C/P (1, 3, 5, 7, 10). Sodium acetate was used as the sole source of carbon. The anoxic/aerobic EBPR process resulted in a simultaneous removal of C, N and P, with the following configuration: 2h anoxic phase (intracellular PHA storage in PAOs; no release of PO_4-P), followed by aerobic phase (PAOs activity –> intracellular PO_4-P accumulation in the form of polyP; nitrifiers/denitrifiers (NI/DNI) activity –> simultaneous nitrification denitrification (SND) and, ordinary heterotrophic organisms (OHO) activity –> removal of COD remaining after the anoxic phase in experiments at C/P≥3). The increase in the C/P ratio results in an increase in anoxic intake of COD and aerobic intake of P. The net intake of PO_4-P was 4.86 mgPO_4-P/gVSS (at C/P 10) and 3.61 mgP/gVSS (at C/P 1). Using the FISH method, a microbial cluster responsible for P removal (PAOs) was proven. Also, intracellular stored polyP was proven.

Key words: Enhanced biological phosphorus removal (EBPR), anoxic/aerobic, PAOs, simultaneous nitrification, denitrification

Thesis contains: 55 pages, 15 figures, 7 tables, 94 references
Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD, Tibela Landeka Dragičević, Full Professor*
Technical support and assistance: *Tea Štefanac, MSc, Scientific Assistant*

Reviewers:
1. PhD. *Mirela Ivančić Šantek*, Associate Professor
2. PhD. *Tibela Landeka Dragičević*, Full Professor
3. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant Professor
4. PhD. *Marin Matošić*, Full Professor (substitute)

Thesis defended: 18 July 2018.

Sadržaj

1. **UVOD** ... 1
2. **TEORIJSKI DIO** ... 3
2.1. NUTRIJENTI U OKOLIŠU I NJIHOV UČINAK NA OKOLIŠ ... 3
2.2. BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA ... 5
2.2.1. Čimbenici procesa nitrifikacije i denitrifikacije ... 6
2.2.2. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija ... 8
2.3. EBPR ... 9
2.4. STRATEGIJE BIOLOŠKOG UKLANJANJA P ... 13
2.4.1. Bioaugumentacija PAOs organizmima ... 13
2.4.2. Uklanjanje P u anoksičnim uvjetima ... 14
2.4.3. Uklanjanje P u aerobnim uvjetima ... 14
3. **EKSPERIMENTALNI DIO** ... 17
3.1. MATERIJALI I METODE ... 17
3.1.1. Reaktor i uvjeti rada ... 17
3.1.2. Sintetski medij ... 17
3.1.3. Instrumenti i pribor ... 18
3.2. ANALITIČKE METODE ... 20
3.2.1. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK) ... 20
3.2.2. Određivanje ukupnog dušika ... 21
3.2.3. Određivanje amonijakalnog dušika ... 22
3.2.4. Određivanje koncentracije nitrata ... 22
3.2.5. Određivanje koncentracije nitrita ... 23
3.2.6. Određivanje koncentracije fosfata ... 23
3.2.7. Određivanje pH vrijednosti ... 24
3.2.8. Određivanje koncentracije otopljenog kisika ... 24
3.2.9. Određivanje temperature ... 24
3.2.10. Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS) i ukupne organske suspendirane tvari (VSS) ... 25
3.3. MIKROBIOLOŠKE METODE ... 26
3.3.1. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) ... 26
3.3.2. Metoda bojanja po Neisseru za određivanje poliP ... 28
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA ... 29
4. **REZULTATI I RASPRAVA** ... 30
4.1. ANOKSIČNO/AEROBNO UKLANJANJE P PRI RAZLIČITIM OMJERIMA C/P ... 33
4.2. OVISNOST UKLANJANJA P U ANOKSIČNO/AEROBNOM PROCESU O pH, DO I TEMPERATURI ... 38
4.3. UČINAK OMJERA KPK/P (C/P) NA UKLANJANJE P U ANOKSIČNO/AEROBNOM PROCESU ... 40
4.4. UČINAK N SPOJEVA NA UKLANJANJE P ... 42
4.5. BILANCA UKLANAJNJA P U ANOKSIČNO/ARAEROBNOM PROCESU ... 43
4.6. FISH ANALIZA MIKROBNE POPULACIJE IZ PROCESA ANOKSIČNO/AEROBNOG UKLANJANJA P ... 44
5. **ZAKLJUČCI** ... 46
6. **LITERATURA** ... 47

1. UVOD

Poboljšano biološko uklanjanje fosfora (EBPR, engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*) je proces koji predstavlja ekonomičnu i održivu metodu uklanjanja fosfora u obradi otpadnih voda i koji ima potencijal postizanja vrlo niskog izlaznog fosfora (P< 0,1 mg/L) uz minimalnu produkciju mulja, ali stabilnost i pouzdanost procesa predstavljaju izazov (Oehmen i sur., 2007; Metcalf & Eddy, 2003).

Rad EBPR sustava se temelji na aktivnom mulju obogaćenom sa fosfat akumulirajućim organizmima (PAOs, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*) koji pohranjuju polifosfat (poliP) kao energetsku rezervu u intracelularne granule, u anaerobnim i aerobnim/anoksičnim uvjetima u slijedu, više od anaboličkih zahtjeva. Pri anaerobnim uvjetima PAOs uzimaju hlapive masne kiseline (VFA, engl. *Volatile Fatty Acid*) i prevode ih u unutarstanične polihidroksialkanoate (PHAs, engl. *Polyhydroxyalkanoates*) hidrolizom unutarstanično pohranjenog polifosfata (poliP) i glikogena (van Loosdrecht i sur., 1997). Pri aerobnim uvjetima PAOs oksidiraju PHA a dobivenu energiju koriste za rast, obnovu glikogena i unos P. Iz bilance puno većeg aerobnog unosa P u stanicu i anaerobnog otpuštanja P iz stanice, postiže se uklanjanje P ispuštanjem (odvođenjem) mulja sa fosfatima (Pijuan i sur., 2005). U EBPR procesu fosfat se uklanja sa otpadnim muljem, čije uklanjanje može iznositi više od 5 % uklonjenog P izraženog kao suha tvar, dok se u ne-EBPR procesima uklanja 2-3% fosfora (Metcalf & Eddy, 2003).

Skupine bakterija poput *Accumulibacter*, *Pseudomonas* (Lin i sur., 2003; Kim i Pagilla, 2000) i *Candidatus accumulibacter phosphatis* (Ahn i sur., 2007) su predstavnici PAOs i predominantne vrste za uklanjanje P u cijeloj bakterijskoj populaciji aktivnog mulja.

Primjenom FISH metode (engl. *Fluorescence in situ hybridization*) karakteriziraju se skupine mikroorganizama, poput PAOs, GAOs (glikogen akumulirajući organizmi, engl. *Glycogen Accumulating Organisms*), nitrificirajuće i denitrificirajuće vrste (NI/DNI), ukupne bakterije (Amann, 1995).

Temeljeno na konvencionalnoj teoriji EBPR procesa, brojna istraživanja su provedena sa ciljem poboljšanja učinkovitosti procesa i istraživanja učinka okolišnih uvjeta na uklanjanje P (Hu i sur., 2002; Mino i sur., 1998; Kuba i sur., 1994).

Uklanjanje P u jednom stupnju u aerobnim uvjetima bez nakupljanja PHA koji je konvencionalno potvrđen kao ključna energija za uklanjanje P, su istražili Wang i sur., (2008).

Brojna istraživanja provedena su s ciljem poboljšanja procesa biološkog uklanjanja nutrijenata (BNR, engl. *Biological Nutrient Removal*) (Coma i sur., 2012), primjene aerobno granuliranog mulja u istovremenom uklanjanju organskih sastojaka, N i P (de Kreuk i sur., 2005), poboljšanja procesa uklanjanja fosfora sa aerobno granuliranim muljem (Bassin i sur., 2012).

Omjer organskih sastojaka i ukupnog fosfora, KPK/TP, (ulazni KPK/P ili ulazni C/P) je krucijalan za dizajn i rad sustava za uklanjanje P. PAOs imaju tendenciju dominiranja pri omjeru KPK/P 10-20 mgKPK/mgP, dok GAOs dominiraju pri omjeru KPK/P>50 mgKPK/mgP (Oehmen i sur., 2007). U radu Jiang i sur. (2015) istraživan je učinak omjera KPK/P na izvedbu EBPR u anaerobno/aerobnom procesu i određeno je da uz acetat kao izvor ugljika minimalni omjer KPK/P za potpuno uklanjanje P je 8,24 gKPK/gP. Također, pokazali su da pri niskom omjeru KPK/P (KPK/P 5) smanji se zaliha glikogena ali preostaje dovoljno za anaerobni VFA unos. To sugerira da PAOs znatno preferiraju održavanje nivoa uskladištenog glikogena negoli dodatno generiranje poliP (Jiang i sur., 2015).

S ciljem boljeg razumijevanja procesa uklanjanja P u EBPR procesu, odnosno definiranja učinka različitih koncentracija natrijeva acetata kao jedinog izvora ugljika na metabolizam PAOs, definirani su ciljevi istraživanja:

- istražiti biološku aktivnost PAOs pri anoksično/aerobnim uvjetima pri različitom omjeru C/P (KPK/P),
- istražiti učinak različite koncentracije natrijeva acetata, kao jedinog izvora ugljika, na metabolizam PAOs,
- istražiti učinak N spojeva na uklanjanje P,
- definirati potrebu KPK za unos P (mg KPK/mg P),
- odrediti neto unos P u mikrobnu stanicu PAOs (mg PO_4-P/g VSS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. NUTRIJENTI U OKOLIŠU I NJIHOV UČINAK NA OKOLIŠ

U zaštiti okoliša i prevenciji onečišćenja ključna strategija je uklanjanje nutrijenata iz otpadne vode čime se sprječava eutrofikacija i drugi učinci dospijevanja dušika i fosfora u vodna tijela, poput bujanja vodenog bilja, iscrpljivanja otopljenog kisika, toksični učinci na organizme vodenog okoliša, učinak na globalno zatopljenje i drugi (Ward i sur., 2011).

Prema važećim zakonskim propisima (NN 80/2013; NN 3/2016) definirane su maksimalne vrijednosti nutrijenata (dušika i fosfora) u obrađenoj vodi (Tablice 1-3). Zbog toga se istražuju procesi biološke obrade otpadne vode s ciljem boljeg razumijevanja, razvoja novih procesa i poboljšanja bioloških procesa obrade otpadne vode, a istraživanja su usmjerena ka postizanju učinkovite obrade, niske cijene izvedbe procesa i održavanja/vođenja procesa obrade.

Tablica 1. Granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama (NN 80/2013), za neke odabrane pokazatelje.

Pokazatelji i mjerne jedinice	Izraženi kao	Jedinica	Površinske vode	Sustav javne odvodnje
FIZIKALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI				
1. pH vrijednost		°C	6,5-9,0	6,5-9,5
2. Temperatura			30,0	40,0
4. Boja			bez	–
5. Miris			bez	–
6. Taložive tvari		mL/Lh	0,5	10,0
7. Suspendirana tvar		mg/L	35,0	
ORGANSKI POKAZATELJI				
10. BPK_5	O_2	mg/L	25,0	članak 5. ovoga Pravilnika
11. KPK_{Cr}	O_2	mg/L	125,0	članak 5. ovoga Pravilnika
12. Ukupni organski ugljik (TOC)	C	mg/L	30,0	–
ANORGANSKI POKAZATELJI				
56. Ukupni fosfor	P	mg/L	2,0 (1,0 jezera)	sukladno članku 5. ovoga Pravilnika
59. Ortofosfati	P	mg/L	1,0 (0,5 jezera)	–
60. Ukupni dušik	N	mg/L	15,0	sukladno članku 5. ovoga Pravilnika
61. Amonij	N	mg/L	10,0	–
62. Nitriti	N	mg/L	1,0	10,0
63. Nitrati	N	mg/L	2,0	–

Tablica 2. Granične vrijednosti emisija komunalnih otpadnih voda pročišćenih na uređaju drugog (II) stupnja pročišćavanja (NN 80/2013).

Pokazatelji	Granična vrijednost	Najmanji postotak smanjenja opterećenja
Suspendirane tvari	35 mg/L	90
BPK_5 (20°C)	25 mgO_2/L	70
KPK_{Cr}	125 mgO_2/L	75

Tablica 3. Granične vrijednosti emisija komunalnih otpadnih voda pročišćenih na uređaju trećeg (III) stupnja pročišćavanja (NN 80/2013).

Pokazatelji	Granična vrijednost	Najmanji postotak smanjenja opterećenja
Ukupni fosfor	2 mgP/L (10000-100000 ES) 1 mgP/L (> 100000 ES)	80
Ukupni dušik (organski $N+NH_4-N+NO_2-N+NO_3-N$)	15 mgN/L (10000-100000 ES) 10 mgN/L (> 100000 ES)	70

Napomena: Granična vrijednost za ukupni dušik primjenjuje se kada je temperatura otpadne vode na izlazu iz aeracijskog bazena jednaka ili veća od 12°C.

Dušik u otpadnu vodu dospijeva od ljudskog otpada, prehrambenog otpada, industrije, proizvodnje gnojiva i detergenata, a prisutan je u obliku organskog dušika (proteini, urea) ili ionskom obliku (NH_4^+, NO_3^-, NO_2^-). NH_4-N, NO_3-N i NO_2-N su izvori dušika za rast vodenog bilja, a prisutni u vodi recipijentu izazivaju eutrofikaciju (intenzivan rast vodenog bilja i smanjenje količine kisika). NH_3, kao i ionski oblici NO_3-N i NO_2-N, su vrlo toksični za vodeni živi svijet, posebno za ribe. Najtoksičniji, među dušikovim ionima, je NO_2-N, a NO_3-N uzrokuje methemoglobinemiju (Metcalf & Eddy, 2003).

Fosfor (P) je neobnovljivi izvor energije a glavni izvor su fosfatne stijene. Smatra se da će se fosfatni pik dogoditi 2035. godine i da će nakon toga potreba biti veća od raspoloživih zaliha fosfata u stijenama (Cordell i sur., 2009). U okoliš (otpadne vode) fosfor dospijeva putem detergenata, umjetnih gnojiva, organofosfornih insekticida, pesticida, boja, iz septičkih jama, kanalizacije, industrijskog otpada, kućanskog otpada, prirodnom erozijom tla, i drugo. Fosfor je prisutan u otpadnoj vodi u nekoliko oblika, uključujući ortofosfate, polifosfate i organofosfate. U vodnim tijelima fosfati limitiraju fotosintezu i u visokim koncentracijama doprinose eutrofikaciji i pretjeranom razvoju modro-zelenih algi što može biti opasno po ljudsko zdravlje te uzrokovati narušavanje ekosustava.

2.2. BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA

Biološko uklanjanje dušika temelji se na provedbi procesa aerobne nitrifikacije (Slika 1) [jednadžbe 1-3] i anoksične denitrifikacije (Slika 2) [jednadžbe 4-6].

Nitrifikacija je dvostupnjeviti proces, u prvom koraku nitrifikacije (nitritaciji) amonijak-oksidirajuće bakterije (AOB, engl. *Ammonia-oxidizing bacteria*) oksidiraju amonijeve ione preko hidroksilamina do nitrita [jednadžba 1], pomoću enzima amonijak monooksigenaze (AMO, engl. *Ammonia monooxygenase*) i hidroksilamin oksidoreduktaze (HAO, engl. *Hydroxylamine oxidoreductase*) [jednadžba 2]. U drugom koraku, nitrataciji, nitrit-oksidirajuće bakterije (NOB, engl. *Nitrite-oxidizing bacteria*) oksidiraju nitrit do nitrata djelovanjem nitrit oksidoreduktaza (NOR, engl. *Nitrite oxydoreductase*) [jednadžba 3] (Zhu i sur., 2008, Metcalf & Eddy, 2003).

$$NH_3 + O_2 + 2H^+ \longrightarrow NH_2OH + H_2O \qquad [1]$$

$$NH_2OH + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NHO_2 + 2H^+ + 2e^- \qquad [2]$$

$$NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NO_3^- \qquad [3]$$

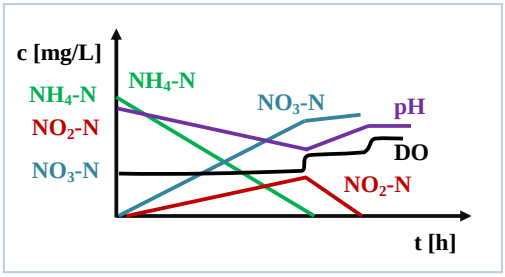
U anoksičnoj denitrifikaciji (Slika 2), NO_3^- i NO_2^- se reduciraju do plinovite forme dušika, pomoću različitih elektron donora, poput metanola, acetata i dr., i organskih sastojaka u otpadnoj vodi [jednadžbe 4 i 5] (Metcalf & Eddy, 2003).

$$2NO_3^- + 10H^+ + 10e^- \longrightarrow N_2 + 2OH^- + 4H_2O \qquad [4]$$

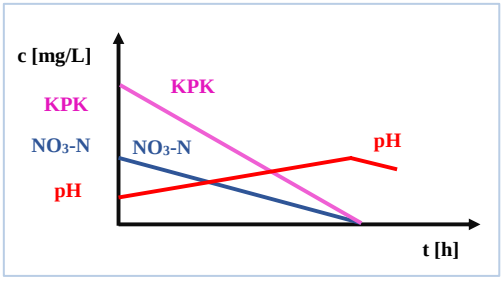
$$2NO_2^- + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow N_2 + 2OH^- + 2H_2O \qquad [5]$$

Biološka denitrifikacija se odvija u četiri koraka, [jednadžba 6]: (i) redukcija NO_3-N u NO_2-N pomoću enzima nitrat reduktaze (NAR, engl. *Nitrate reductase*) (Stouthamer, 1998); (ii) redukcija NO_2-N u dušikov monooksid (NO) pomoću enzima nitrit reduktaze (NIR, engl. *Nitrite reductase*); (iii) redukcija NO u didušikov oksid (N_2O) pomoću enzima dušik monooksid reduktaze (NOR, engl. *Nitric oxide reductase*); (iv) redukcija N_2O do molekularnog dušika (N_2) pomoću enzima didušik oksid reduktaze (NOS, engl. *Nitrous oxide reductase*), koji se otpušta u atmosferu (Parés i Juárez, 1997).

$$NO_3^- \xrightarrow{NAR} NO_2^- \xrightarrow{NIR} NO \xrightarrow{NOR} N_2O \xrightarrow{NOS} N_2 \qquad [6]$$



Slika 1. Nitrifikacija – vremenski tijek relativnih promjena NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N, pH i DO kao rezultat mikrobnih reakcija



Slika 2. Denitrifikacija – vremenski tijek relativnih promjena NO_3-N, KPK i pH kao rezultat mikrobnih reakcija

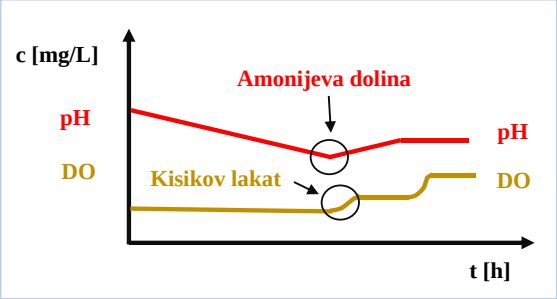
2.2.1. Čimbenici procesa nitrifikacije i denitrifikacije

Nitrifikanti kao strogi aerobi mogu nitrificirati samo u prisutnosti otopljenog kisika. Optimalna koncentracija otopljenog kisika (DO, engl. *Dissolved Oxygen*) za nitrifikaciju je 2-3 mg/L. Pri DO<0,5 mg/L zbiva se zanemariva nitrifikacija jer je koncentracija otopljenog kisika premala za difuziju kisika kroz flokulu te dolazi do kompeticije za kisik s drugim mikroorganzimima. Pri DO 0,5-1,9 mg/L nitrifikacija se ubrzava ali nije učinkovita, dok se značajna nitrifikacija postiže pri koncentraciji DO 2,0-2,9 mg/L, a maksimalna pri DO 3,0 mg/L. Prekomjerna aeracija nije poželjna jer značajno poskupljuje proces aktivnog mulja te narušava konzistentnost flokula i izaziva pjenjenje (Metcalf & Eddy, 2003).

Za provedbu procesa nitrifikacije, pH vrijednost vodenog okoliša je, ovisno o vrsti bakterija, u području 6,8-9,5. Pri pH vrijednosti 5,8-6,0 brzina nitrifikacije je 10-20% od brzine nitrifikacije pri pH 7,0. Optimalni raspon pH vrijednosti za nitrifikaciju je 7,2-8,0, u tom rasponu brzina nitrifikacije je konstantna. Pri neutralnim pH vrijednostima dominiraju nitrifikanti, a u alkalnom pH području nitrifikaciju provode samo nitrifikanti.

Niski pH u otpadnoj vodi inhibira enzimsku aktivnost nitrifikanata, te ima učinak na dostupnost alkaliteta (Metcalf & Eddy, 2003).

Profili DO i pH se zbog različitog afiniteta AOB i NOB prema kisiku (Garrido i sur., 1997), mogu koristiti kao neizravni pokazatelji za online praćenje tijeka nitrifikacije u stvarnom vremenu, tzv. „real-time“ kontrola, budući da daju karakteristične točke u krivuljama (Slika 3) a koje upućuju na kraj nitrifikacije (Slika 1). Točke u profilu DO “kisikov lakat”, a u profilu pH “amonijeva dolina” (najniža vrijednost pH koja odgovara potpunoj oksidaciji amonijaka) su točke završetka oksidacije amonijaka (Slika 3). U točki potpune oksidacije amonijaka zapaža se i iznenadan porast DO, „kisikov lakat“, jer se tijekom oksidacije amonijaka troši velika količina raspoloživog otopljenog kisika u mediju a po završetku tog procesa utrošak kisika je manji, što se vidi u porastu koncentracije DO. Ako je u sustavu podešena stalna koncentracija otopljenog kisika, ne može se zapaziti „kisikov lakat“, pa se onda niti ne može koristiti profil DO za „real time“ kontrolu nitrifikacije (Gao i sur., 2009; Casellas i sur., 2006; Puig i sur., 2005).



Slika 3. Profili pH i DO u procesu nitrifikacije i kritične točke koje ukazuju na kraj nitrifikacije, „amonijeva dolina“ u profilu pH i „kisikov lakat“ u profilu DO.

Brzina rasta nitrifikanata ovisi o temperaturi, s porastom temperature ubrzava se rast nitrifikanata i nitrifikacija se lakše postiže. Temperaturno područje u kojem obitavaju nitrifikanti je 8-30 °C, a optimalna temperatura za nitrifikante i optimalnu brzinu nitrifikacije je u rasponu 25-30 °C. Pri temperaturi ispod 5 °C i iznad 45 °C nitrifikacija prestaje, pri 10 °C postiže se brzina nitrifikacije oko 20% od brzine nitrifikacije pri 30 °C. Pri 16 °C brzina nitrifikacije je oko polovice brzine pri 30 °C (Metcalf & Eddy, 2003).

U procesu denitrifikacije omjer ugljika i dušika (C/N), mjera količine elektron donora po elektron akceptoru, značajno utječe na brzinu denitrifikacije. Ako nema rasta, u anoksičnim

uvjetima, s biorazgradivim organskim supstratom prisutnim u otpadnoj vodi, taj omjer bi bio 2,86 g KPK/g N, što se smatra teoretskim minimumom. Ipak, taj omjer je obično oko 3,5-4,5 g KPK/g N za potpunu denitrifikaciju, uzimajući u obzir i rast bakterija (Henze i sur., 1994).

Na mikrobnu aktivnost u biološkoj obradi otpadnih voda u smislu inhibicijskog učinka utječe i koncentracija NO_2-N, koji u relativno niskoj koncentraciji može biti toksičan za brojne vodene organizme, organizme u otpadnoj vodi, uključujući bakterije koje formiraju flokule. Koncentracija NO_2-N je u nitritaciji često iznad 20 mg/L, što je mnogo više od koncentracije NO_2-N u konvencionalnim sustavima uklanjanja dušika (Zeng i sur., 2009), a NO_2-N je jedan od inhibitora mikrobnog metabolizma. Istraženo je da visoke koncentracije NO_2-N inhibiraju mikrobnu aktivnost u biološkoj obradi otpadnih voda, poput inhibicije heterotrofnih bakterija, nitrificirajućih bakterija (Vadivelu i sur., 2006; Anthonisen i sur., 1976) i fosfat akumulirajućih organizama (Zhou i sur., 2007). Stoga, u procesima koji uključuju uklanjanje dušika preko nitritnog puta, akumulacija NO_2-N vjerojatno ima štetan učinak na biološko uklanjanje nutrijenata.

2.2.2. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija

Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (SND, engl. *Simultaneous Nitrification and Denitrification*), poznata i kao „aerobna denitrifikacija“, znači istovremeno odvijanje nitrifikacije i denitrifikacije u istom reaktoru u identičnim operativnim uvjetima zbog gradijenta kisika koji se uspostavlja kroz biomasu unutar flokule i mikrobnog biofilma (von Munch i sur., 1996).

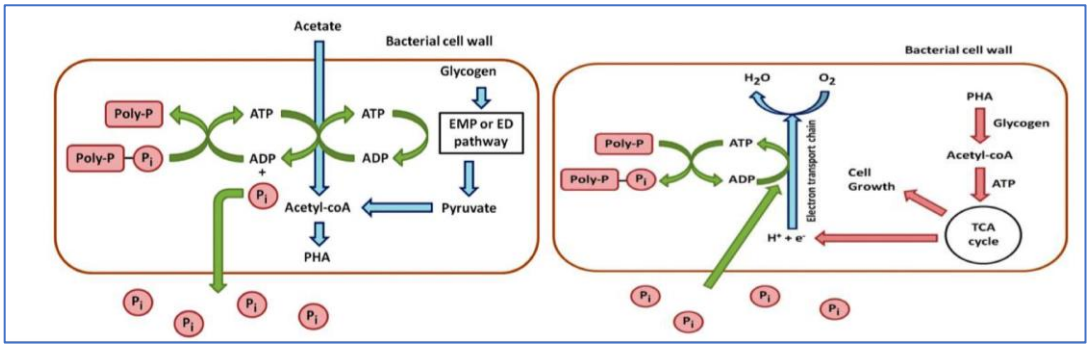
Brzine nitrifikacije i denitrifikacije tijekom SND su manje od optimalnih a funkcija su reakcijske kinetike, veličine flokule, gustoće flokule, strukture flokule, količine lako biorazgradivog KPK i koncentracije otopljenog kisika (Metcalf & Eddy, 2003). Zbog niske koncentracije otopljenog kisika jer su flokule aktivnog mulja samo djelomično aerobne pa je samo dio nitrifikanata u flokuli aktivan brzina nitrifikacije je manja, a manja je i brzina denitrifikacije zbog potrošnje supstrata u aerobnom dijelu flokule. Mehanizam aerobne denitrifikacije je istovremena upotreba kisika i nitrita/nitrata, odnosno korespiracija.

Pri DO 0,1-1,0 mg/L u vanjskim dijelovima flokula se zbiva nitrifikacija a u unutarnjim dijelovima denitrifikacija zbog anoksičnih uvjeta (Liu i sur., 2010). Istaknuto je da pri DO<1,6 mg/L sav nitrat formiran u nitrifikaciji je denitrificiran (Beun i sur., 2001). Nitrifikanti bez DO mogu preživjeti relativno kratko vrijeme, nema štetnog učinka na aktivnost nitrifikanata za manje od 4 sata bez DO, dok više od 4 sata bez DO štetno utječe na aktivnost nitrifikanata, a

ukoliko su nitrifikanti u uvjetima bez DO tijekom 24 sata ili više može doći do uništenja populacije nitrifikanata (Liu i sur., 2010).

2.3. EBPR

Poboljšano biološko uklanjanje fosfora (EBPR) je široko primjenjiv proces za uklanjanje fosfora (Seviour i McIlroy, 2008). U EBPR su dominantne bakterije koje pripadaju polifosfat akumulirajućim organizmima (PAOs) ili denitrificirajućim PAO (dPAOs, engl. *Denitrifying phosphorus accumulating organisms*). Uz izmjene anaerobnih i aerobnih/anoksičnih uvjeta, PAOs i dPAOs su u mogućnosti ukloniti fosfor iz otpadnih voda (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz metabolizma PAOs, u anaerobnim i aerobnim uvjetima (Tarayre i sur. 2016).

Glavna razlika između aerobnog i anoksičnog unosa P je ta da dPAOs za formiranje ATP u anoksičnim uvjetima koriste nitrat i/ili nitrit. Ostatak metabolizma PAOs u aerobnim i anoksičnim uvjetima je isti. No, u anoksičnim uvjetima formira se oko 40% manje ATP po količini $NADH_2$ nego u aerobnim uvjetima, a nizak omjer ATP/$NADH_2$ znači manju proizvodnju biomase u anoksičnim uvjetima. Metabolizam PAOs se može karakterizirati kao ciklički proces pohrane i potrošnje glikogena i polifosfata. U anaerobnim uvjetima PAOs/dPAO koriste kratkolančane organske kiseline(VFA) i pohranjuju ih u obliku poli-β-hidroksialkanoata (PHA), dok hidrolizom polifosfata dobijaju dovoljno energije za iskorištavanje VFA (van Loosdrecht i sur., 1997). Kao rezultat, fosfat se oslobađa iz stanice i time se koncentracija fosfora u otpadnoj vodi povećava (Seviour i McIlroy, 2008). Tijekom sljedeće, aerobne ili anoksične faze, intracelularni PHA se oksidira i omogućava stanici energiju za rast i asimilaciju

fosfora. Biomasa bogata fosforom se uklanja, a time i ukupna suma fosfora iz otpadne vode (Harper i sur., 2006; Mullan i sur., 2006; Pijuan i sur., 2005). Otpadni mulj iz EBPR procesa se može koristiti kao obnovljiva sirovina za industriju gnojiva i obnovu P i pruža mogućnost rješenja za oskudicu fosfatnih stijena u bliskoj budućnosti (Hirota i sur., 2010).

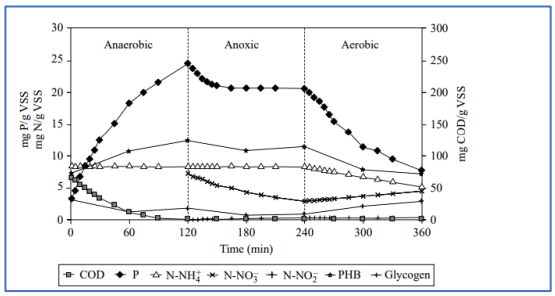
2.3.1. Vrste fosfat akumulirajućih mikroorganizama

Skupine bakterija *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (Lin i sur., 2003; Kim i Pagilla, 2000) i *Candidatus accumulibacter phosphatis* (Ahn i sur., 2007; Cai i sur., 2007) se smatraju predstavnicima PAOs i predominantne su vrste za uklanjanje P u cijeloj bakterijskoj populaciji aktivnog mulja.

Iz razlike u bilanci, puno većeg aerobnog unosa P u stanicu i znatno manjeg anaerobnog otpuštanja P iz stanice, uklanjanjem viška mulja bogatog P provodi se uklanjanje P (Harper i sur., 2006; Mullan i sur., 2006; Pijuan i sur., 2005).

Prema sposobnosti ili nesposobnosti akumuliranja fosfora mikroorganizmi u aktivnom mulju se općenito klasificiraju kao PAOs ili nePAOs. U literaturi se navode dvije različite grupe mikroorganizama odgovorne za procese uklanjanja P: dPAOs – koriste kisik i/ili nitrat kao elektron akceptore, i PAOs – koriste samo kisik kao elektron akceptor. Ove hipoteze potvrđene su anaerobno/anoksično/aerobnim eksperimentima (Freitas i sur., 2005; Meinhold i sur., 1999; Kerrn Jespersen & Henze 1993), prikazano Slikom 5.

Premda su PAOs, poput *Acinetobacter*, općeprihvaćeni kao učinkovite bakterije za BPR, i drugi mikroorganizmi pokazuju sposobnost aerobnog akumuliranja poliP u aktivnom mulju, poput *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp., *Aeromonas* spp. Aerobno pohranjuju poliP i *Microthrix parvicella* (Erhart i sur., 1997; Blackall i sur., 1995) i *Nostocoida limicola* (Blackall i sur., 2000).



Slika 5. Transformacije fosfora (P), KPK, poli-β-hidroksibutirata (PHB), glikogena i dušika tijekom anaerobno/anoksično/aerobnog procesa (preuzeto iz Freitas, 2004).

Potvrda da dPAOs i PAOs pripadaju grupi *Accumulibacter* ali se svrstavaju u zasebne podgrupe unutar te grupe zbog morfoloških razlika je dokazana u eksperimentima sa različitim izvorom ugljika: kod sustava s propionatom dominantne su štapičaste bakterije, dok je oblik kokobacila prisutan u sustavu i sa propionatom i sa acetatom (Carvalho i sur., 2007). Koristeći gen polifosfat kinazu 1 kao biomarker, otkriveno je da se *Accumulibacter* dijeli na 2 tipa (I i II), svaki podijeljen u još podgrupa (IA-E i IIA-G) (Peterson i sur., 2008; He i sur., 2007). Flowers i sur. (2009) su također dizajnirali FISH probe da bi mogli podijeliti sve podgrupe.
U nePAOs se svrstavaju glikogen akumulirajući organizmi (GAO) koji su sposobni unositi VFA bez doprinosa u uklanjanju fosfora te su u izravnoj kompeticiji sa PAOs.

Kompeticija između PAO-GAO je intenzivno istraživana zbog utjecaja na rad i učinkovitost uklanjanja fosfora tijekom dužeg vremena (McIlroy i Seviour, 2009; Oehmen i sur., 2007; Mino i sur., 1994; Cech i sur., 1993). Nekoliko ključnih čimbenika ima utjecaj, a to su pH, temperatura i izvor ugljika (Lopez-Vazquez i sur., 2009; Schuler i Jenkins, 2002; Filipe i sur., 2001). Nužno je identificirati i karakterizirati mikroorganizme aktivnog mulja sa sposobnosti uklanjanja P u procesu BPR.

2.3.2. Čimbenici EBPR procesa

2.3.2.1. *Učinak pH na EBPR*

Kontrolom pH u anaerobnoj fazi procesa moguće je postići pouzdanost EBPR odnosno minimizirati akumulaciju GAOs. Pri pH <7,25 u anaerobnoj zoni GAOs dominiraju nad PAOs jer GAOs unose acetat brže od PAOs pri tom pH. Pri pH ≥7,5 PAOs su dominantniji (Oehmen i sur., 2005a; Filipe i sur., 2001). U aerobnim uvjetima unos fosfora, korištenje PHA i rast biomase nije moguć kod niskih pH vrijednosti. Asimilacija fosfora iz okoliša bila je optimalna pri pH 8 i temperaturi 25 ^{o}C, dok je ispuštanje (release) P u okoliš bilo optimalno pri 20°C pri čemu pH nije imao veliki utjecaj (Nittami i sur., 2011). Viši pH rezultira većim anaerobnim otpuštanjem P u mulju obogaćenom PAOs. Brzine unosa acetata, razgradnje glikogena i akumulacije PHA u PAOs-ima su neovisne o pH rasponu 6,5-8,0 (Filipe i sur., 2001).

2.3.2.2. *Učinak temperature na EBPR*

Pri višim temperaturama (T>20 ^{o}C) narušeni rad EBPR nije rezultat proliferacije GAOs nego GAOs učinkovitije koriste glikolitički put od PAOs što rezultira većom pohranom glikogena i manjim unosom P, te se narušava EBPR (Erdal i sur., 2003).

Optimum aktivnosti PAOs je pri temperaturi 20 ^{o}C (Panswad i sur., 2003; Whang i Park, 2002). Dokazano je da povećanje temperature do 30 ^{o}C ne utječe na aktivnost PAOs u anaerobnim uvjetima (Panswad i sur., 2003; Brdjanović i sur., 1998a).

Povećanjem temperature, pri 30-35 ^{o}C, dolazi do ukupnog smanjenja anaerobnog ispuštanja fosfora, aerobnog unosa fosfora, te anaerobnog unosa kratkolančanih organskih kiselina.

2.3.2.4. Učinak NO_3-N i NO_2-N na EBPR

NO_2-N i NO_3-N imaju negativan učinak na aktivnost PAOs i uspješnost EBPR. Istaknuto je da prije anaerobnog otpuštanja P koncentracija NO_3-N mora biti ispod 1 mg/L, budući da denitrifikanti reduciraju NO_3-N s KPK koji je potreban za rast PAOs i tako se narušava uklanjanje P. U anaerobnoj fazi NO_3-N potiče kompeticiju za VFA između PAOs i denitrifikanata (Barker i Dold, 1996), ali kada se provodi anaerobno/anoksično/aerobno uklanjanje P može se postići istovremena denitrifikacija i uklanjanje P i uz prisutan NO_3-N i PAOs (Kerrn-Jeppesen i Henze, 1993).

NO_2-N ima negativan učinak na EBPR proces jer inhibira metabolizam PAOs, ali dPAOs mogu koristiti NO_2-N kao elektron akceptor do koncentracije 5-10 mg NO_2-N/L nakon aklimatizacije (Lee i sur., 2001). Inhibicija aerobnog unosa PAOs se zbivala uz 2 mg NO_2-N/L, a više od 6 mg NO_2-N/L je rezultiralo gotovo potpunom inhibicijom. Aerobni unos fosfata je osjetljiviji na NO_2-N od anoksičnog unosa (Freitas i sur., 2009). Anoksični unos fosfata se zbivao pri koncentraciji NO_2-N<5 mg/L, a više koncentracije NO_2-N su inhibirale proces (Coma i sur., 2012). U istraživanju je pokazano da je nitritna inhibicija reverzibilna, a brzina obnove ovisi o koncentraciji kojoj je biomasa bila izložena. NO_2-N narušava taloživost, stabilnost i integritet biomase u obliku granula, a struktura mikrobne zajednice se znatno promijenila zbog NO_2-N i nije se mogla obnoviti (Zeng i sur., 2013).

2.3.2.5. Učinak DO na EBPR

Otkriveno je da visoke koncentracije otopljenog kisika u aerobnoj fazi (DO 4,5-5 mg/L) pogoršavaju uklanjanje fosfora, dok pri DO 2,5-3 mg/L dolazi do povećanja udjela PAOs u mulju (Brdjanovic i sur., 1998b).

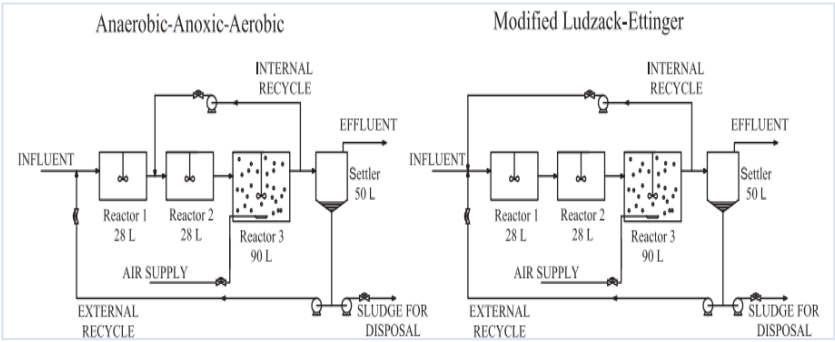
2.4. STRATEGIJE BIOLOŠKOG UKLANJANJA P

2.4.1. Bioaugumentacija PAOs organizmima

Novu strategiju u uklanjanju fosfora (EBPR) su demonstrirali Taya i sur. (2011), u konvencionalnom sustavu nitrifikacije i denitrifikacije koristili su metodu bioaugumentacije sa obogaćenom kulturom fosfor akumulirajućih organizama (PAOs). Vođena su dva SBR, SBR_{PAO} obogaćen kulturom PAOs (4 ciklusa po 6 sati: anaerobna faza 2 sata; aerobna faza 3,5 sata; sedimentacija 25 minuta i vađenje 5 L supernatanta 5 minuta). DO tijekom aerobne faze je održavan u rasponu 3 do 4 mg/L. Hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT) je bilo 12 sati. Vrijeme zadržavanja mulja (SRT) je bilo 15 dana sa periodičkim izbacivanjem dijela nakon aerobne faze. Početna koncentracija fosfora je bila 20 mg $P\text{-}PO_4^{3-}$/L. Aliltiourea (ATU, engl. *Allylthiourea*) je dodana za inhibiciju nitrifikacije (Zeng i sur., 2003). Izvor ugljika je dodan iz posebne koncentrirane otopine. Temperatura je podešena na 25±1°C. Drugi reaktor, SBR_N, je bio obogaćen nitrificirajućim i denitrificirajućim organizmima. Ovaj reaktor je imao ciklus od 8 sati sa 2 različite prihrane i dvije različite konfiguracije vođenja. HRT za obje konfiguracije je bio 24 sata, dok je SRT bio 15 dana. Izvor ugljika je etanol i propionat. Sastav priređene sintetičke otpadne vode bio je KPK/N/P=1300/100/30 (mg/L). pH je podešavan na 7,5±0,05. U eksperimetu s SRB_{PAO} uspješno je uklonjen P (20 mg $P\text{-}PO_4^{3-}$/L) izmjenjivajući anaerobne i aerobne uvijete. FISH analiza dala je podatke da se nalazi oko 82% PAOs u ukupnoj mikrobnoj biomasi, od čega je 90% PAOs identificirano kao PAO tipa 1 i 10% PAO tipa 2. U eksperimentima sa dva SBR_N došlo je do povećanja koncentracije amonijaka kao rezultat slabe nitrifikacijske aktivnosti i zato slabog nakupljanja nitrata u aerobnim uvijetima i zbog toga se nisu postigli anoksični uvjeti. Ovakav tijek okolnosti prilikom PAOs bioaugumentacije nije bio očekivan. Također neuspjeh EBPR u takvom sustavu je bio i prije zabilježen (Henze i sur., 2008). S obzirom da je anoksična faza bila zapravo anaerobna koja favorizira EBPR, neuspjeh prilikom uklanjanja fosfora je bio isto neočekivan. Ovaj fenomen se može objasniti pojavom nepotpunog unosa fosfora u aerobnoj fazi, što vodi do pojave PAOs sa visokom koncentracijom PHA u stanicama nakon aerobne faze (u taložniku). Pohranjeni PHA može biti iskorišten kao elektron donor za denitrifikaciju, reducirajući nitrat proizveden u aerobnoj fazi do plinovitog dušika. Ovaj plin uzrokuje flotaciju i smanjenje taloživosti biomase, što znači da je dio biomase ispiran vodeći do neuspjeha EBPR-a. Međutim, iz rada Taya i sur. (2011) može se zaključiti da se anoksični/aerobni SBR sa bioaugumentacijom PAOs obogaćenog mulja sa dužom aerobnom fazom može uspješno provoditi nitrifikaciju/denitrifikaciju sa uklanjanjem fosfora tijekom 2 mjeseca, što dovodi do novih primjena ovog sustava u obradi otpadnih voda.

2.4.2. Uklanjanje P u anoksičnim uvjetima

Guerrero i sur. (2011) su promijenili pogled na dosadašnja saznanja da je za uspješno uklanjanje fosfora (EPBR) potrebna isključivo anaerobna faza, te da nitrati i nitriti imaju negativan utjecaj na EBPR (Henze i sur., 2008; Van Niel i sur., 1998; Simpkins i Mclaren, 1978). Istraživali su kompeticiju PAOs i heterotrofnih bakterija (OHO, engl. *Ordinary Heterotrophic Organisms*) za ulaznim KPK u anoksičnim uvjetima, te utjecaj nitrata na EBPR (Guerrero i sur., 2011). Postignuto je visoko učinkovito uklanjanje dušika i fosfora (oko 80% i 98%) konvencionalnom A^2/O (anaerobno-anoksično-aerobno) konfiguracijom (Slika 6). Pri anaerobnim uvjetima 13,6% ukupnog KPK je bilo potrošeno za denitrifikaciju recikliranog nitrata, dok je 53% potrošeno od strane PAOs za ispuštanje fosfora u okolni medij. FISH analiza aktivnog mulja pokazala je 72% PAOs u ukupnom mulju,a na početku manje od 2% ukupne biomase, potvrđujući da PAOs mogu koegzistirati sa denitrificirajućim OHO u A^2/O konfiguraciji bez obzira na ulazni nitrat. U konfiguraciji MLE (modificirani Ludzack-Ettinger), Slika 6, koja se najčešće isključivo koristi za biološko uklanjanje C i P, motren je utjecaj nitrata na uklanjanje P pri anaerobno/anoksičnim uvjetima. Povećanje interne reciklacije nije rezultiralo smanjenjem NO_x u efluentu jer je KPK postao limitirajući faktor pri anoksičnim uvjetima. Učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora je pala na 74% i 97%, a populacija PAOs se nije mijenjala, zaključeno je da nitrat nema inhibirajući utjecaj na EBPR. U dodatnom pokusu s limitiranim KPK u anoksičnim uvjetima PAOs su dominirali nad OHO.

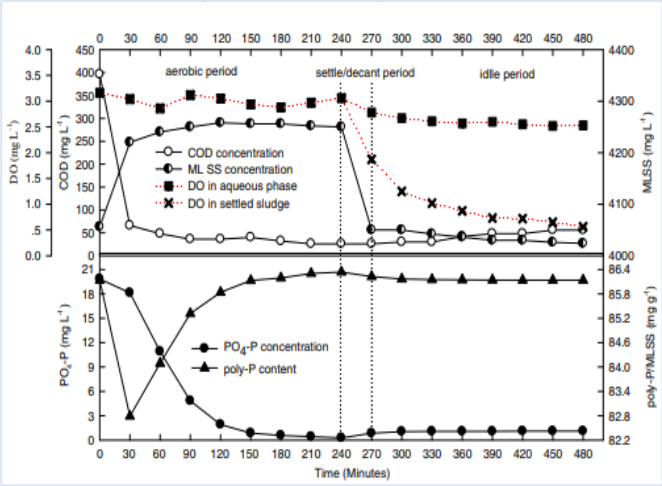


Slika 6. A^2/O i MLE konfiguracija (Guerrero i sur., 2011).

2.4.3. Uklanjanje P u aerobnim uvjetima

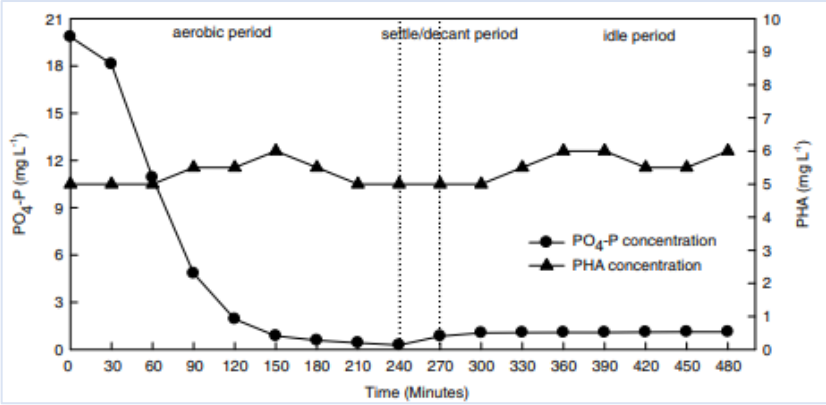
U radu Wang i sur. (2008) uklanjanje fosfora u aerobnoj fazi provedeno je u SBR-u u 8h ciklusu: 4 sata aerobno i 4 sata sedimentacija/mirovanje (Slika 7). Korištena je sintetska otpadna voda, glukoza kao izvor C, fosfat u obliku K_2HPO_4, u aerobnoj fazi DO 3±0,2 mg/L

uz HRT 12 sati. Koncentracija aktivnog mulja je bila 4000 mg/L. U prihrani je KPK 400 mg/L i 20 mg PO_4-P/L, dakle omjer KPK/P je bio 20 mg KPK/mg PO_4-P (Wang i sur., 2008).



Slika 7. Aerobno uklanjanje P u SBR – promjene motrenih pokazatelja (Wang i sur., 2008).

Od 27. dana pokusa učinkovitost uklanjanja P je 90% (P u efluentu 0,22-1,79 mg/L). Nije bilo nakupljanja PHA (tijekom cijelog pokusa PHA je 5-6 mg/L). Ovaj fenomen se nije mogao objasniti i pet puta se ponavljao isti eksperiment uklanjanja fosfora u aerobnoj fazi u SBR-u da bi se potvrdili rezultati istraživanja (Slika 8).



Slika 8. Uklanjanje P i nakupljanje PHA u aerobnom ciklusu SBR-a (Wang i sur., 2008).

Uklanjanje P u ovim eksperimentima nije bilo pomoću tradicionalnih PAOs, već vjerojatno pomoću drugih polifosfat organizama poput *M. parvicella*, koji su u mogućnosti unositi fosfor u aerobnoj fazi za akumulaciju polifosfata bez anaerobnog ispuštanja fosfora i unosa supstrata

(Janssen i sur., 2002), a ti mikroorganizmi se gomilaju u uvjetima niskog omjera hrana/mikroorganizmi (F/M, engl. *Food/Microorganisms*) (Xue i sur., 2007; Casey i sur., 1992, 1994). Fosfor je bio uglavnom uklonjen u obliku polifosfata. Rezultati tih istraživanja potvrđuju da je moguće uklanjanje fosfora samo sa aerobnom fazom u SBR bez akumulacije PHA što se mislilo da je ključna energetska komponenta za uklanjanje fosfora.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Reaktor i uvjeti rada

U SBR reaktoru je proveden uzgoj PAOs-a u aktivnom mulju podrijetlom sa uređaja za obradu otpadne vode grada Velika Gorica, a početna koncentracija mulja u pokusima je iznosila 3,6±0,1 gVSS/L. Serija pokusa je provedena koristeći mulj iz trenutno aktivnog SBR sustava tijekom "steady state" na kraju aerobne faze. Pokusi u kojima je istraženo uklanjanje P pri anoksično/aerobnim uvjetima su provedeni kao diskontinuirani u laboratorijskom reaktoru radnog volumena 2 L. Pri anoksičnim uvjetima sadržaj u reaktoru (mješana tekućina, ML, engl. *Mixed Liquor*) je miješan primjenom magnetske mješalice pri 100 o/min. Tijekom anoksične faze izmjerena koncentracija otopljenog kisika je bila DO≤0,3 mg/L. Procesi u reaktoru su bili motreni određivanjem pH, DO i temperature na način da su u reaktor postavljene pH i kisikova elektroda. Reaktor je opremljen sustavom za prozračivanje: preko difuzora sa donje strane reaktora zrak se upuhivao u reaktor iz kompresora preko filtera za zrak i mjerača protoka zraka. U aerobnim uvjetima otopljeni kisik je osiguran prozračivanjem sa zrakom iz kompresora. Prije svakog pokusa biomasa je "prana" s vodovodnom vodom u tri uzastopna ponavljanja, samotaloženjem brzo odijeljena od tekućine te odliven supernatant, kako bi se izbjegao učinak nekog od mogućih produkata/međuprodukata ranijeg biološkog procesa na planirani pokus, te su ostvareni istovjetni uvjeti započinjanja ciljanih pokusa. Tijekom pokusa iz reaktora je u određenim vremenskim intervalima uzimana određena količina ML za analitičko određivanje KPK, Ntotal, NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N, PO_4-P, a koncentracija biomase izražena kao TSS (engl. *Tolal Suspended Solids*) i VSS (engl. *Volatile Suspended Solids*) je određivana povremeno, dok su stalno motreni pH, DO i temperatura. Napravljena je mikrobna karakterizacija aktivnog mulja na prisutnost PAOs, primjenom FISH metode (FISH, engl. *Fluorescence in situ hybridization*) (Amann, 1995). Za dokazivanje polifosfata provedeno je bojanje po Neisseru (Eikelboom i van Buijsen, 1983). Svi eksperimenti su provedeni u 3 ponavljanja, a rezultati predstavljaju srednju vrijednost ±standardna devijacija.

3.1.2. Sintetski medij

Kao izvor ugljika (KPK) korišten je natrijev acetat ($NaC_2H_3O_2$), dodan neposredno pred početak anoksične faze procesa, u odgovarajućoj količini odvagan za odabrani omjer C/P. Eksperimentalno je određeno da 1 g $NaC_2H_3O_2$ odovara 0,55 g KPK. Fosfat je priređen kao

vodena otopina kalijeva dihidrogen fosfata (KH_2PO_4), te u odgovarajućoj količini dodana po završetku anoksične faze, odnosno cca 30 sekundi nakon uključenog prozračivanja (aerobnog perioda procesa). Kako je pokus vođen pri različitom opterećenju sa KPK, pri omjerima C/P 1, 3, 5, 7 i 10, ostvareno dodatkom natrijeva acetata, eksperimentalo je određeno da to odgovara omjerima KPK/P 2 (pri C/P 1), KPK/P 6,3 (pri C/P 3), KPK/P 9,2 (pri C/P 5), KPK/P 15 (pri C/P 7) i KPK/P 23 (pri C/P 10). Sintetska otpadna voda priređena je otapanjem soli u vodovodnoj vodi, (mg/L): 2 $(NH_4)_2SO_4$, 1 KH_2PO_4, 0,4 $FeSO_4$, 0,5 $MgSO_4$, 0,4 NaCl, 1 $MgCO_3$, 1 $CaCO_3$, te nakon stajanja 24 sata na sobnoj temperaturi filtrirana kroz filter papir veličine pora 0,45 µm. Sintetska otpadna voda dodavana je na početku aerobne faze procesa u odgovarajućoj količini za očekivanu početnu koncentraciju od 30 mg NH_4-N/L, istovremeno kad i vodena otopina KH_2PO_4.

3.1.3. Instrumenti i pribor

Popis aparature korištene u pokusima anoksično/aerobnog uklanjanja P dan je tablicom 4.

Tablica 4. Aparatura uporabljena u pokusima anoksično/aerobnog uklanjanja P

Aparat	**Proizvođač**
Spektrofotometar	Spectroquant VEGA 400 Merck
Kvarcne kivete …….....	Merck
Fotometar	Photometer SQ 200 Merck
Termo blok	Thermoreactor TR 300, Merck; HACH COD reactor
Bioreaktor	
Kompresor	HIBLOW HP 40; Hagen Model40 A-10011
Mjerač protoka zraka	
Kisikova elektroda i mjerni aparat	DurOx, WTW Oxi3210
pH elektroda i mjerni aparat	SenTix41, WTW 330i
Titrator - Digitalna biretta Solarus	Hirschman-Laborgeräte
Dispenzer (Ceramus Classic) …..	Hirschman-Laborgeräte
Magnetska miješalica	Thermo Scientific SP88857195, Super-nuova
Vodena kupelj	Hum Aqua 5
Sterilizator/ Sušionik	Instrumentaria ST-05
Termostat	Sutjeska
Autoklav	Inako
Analitička vaga	METTLER AJ150
Vortex	BIOSAN
Vlagomjer ……..	Kern MLS-D
Sustav za vakuum filtraciju ….....	Sartorius
Centrifuga ……..….	Beckman
Svjetlosni mikroskop	Meiji
Konfokalni laser skenirajući mikroskop ……..	Leica

U tablici 5 dan je popis kemikalija korištenih u provedbi pokusa anoksično/aerobnog uklanjanja P.

Tablica 5. Kemikalije korištene u provedbi eksperimenata (sve p.a. čistoće):

Kemikalija	**Proizvođač**
$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \times 6H_2O$.....	Kemika
H_2SO_4.....	GRAM-MOL
$HgSO_4$.....	Kemika
Ag_2SO_4.....	Kemika
$K_2Cr_2O_7$.....	Kemika
1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat.....	Kemika
$(NH_4)_2SO_4$.....	Merck
$FeSO_4 \times 7H_2O$.....	Kemika
K_2HPO_4.....	Kemika
$MgSO_4$.....	Merck
NaCl.....	Merck
$MgCO_3$.....	Kemika
$CaCO_3$.....	Kemika
KH_2PO_4.....	Merck
KCl.....	Alkaloid
Nesslerov reagens.....	Kemika
K-Na-$C_4H_4O_6 \times 4H_2O$.....	GRAM-MOL
$NaC_2H_3O_2$.....	GRAM-MOL
DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol).....	BioChemica
Etanol.....	Kemika
Formamid.....	Merck
HCl.....	Merck
NaOH.....	Kemika
Imerziono ulje.....	Merck
Krisiodin.....	SIGMA-ALDRICH
Kristal violet.....	SIGMA-ALDRICH
Na_2HPO_4.....	Fisher Scientific
NaH_2PO_4.....	Merck
$NaH_2PO_4 \times H_2O$.....	Merck
Metilen plavo.....	SIGMA-ALDRICH
Paraformaldehid.....	Merck
Fosfatna puferna otopina	Merck
Probe FISH	GOREA PLUS
ProLong Gold antifade mountant.....	Biosistemi
SDS (natrijev dodecil-sulfat).....	Merck
Tris/HCl.....	Merck

3.2. ANALITIČKE METODE

Uzorci su prije provođenja analitičkih metoda filtrirani kroz filter papir veličine pora 0,45 µm. Uzorci za analizu su uzeti na početku i kraju anoksičnog perioda, te tijekom aerobnog perioda u određenim vremenskim intervalima.

3.2.1. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

KPK vrijednost određivana je titrimetrijski prema Standard Methods (APHA 1995), po metodi 5220C (Closed Reflux, Titrimetric method).

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), ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2x6H_2O$), uz dodatak feroina kao indikatora, [jednadžba 7].

$$6Fe^{2+} + Cr_2O_7^{2-} + 14H^+ \rightarrow 6Fe^{3+} + 2Cr^{3+} + 7H_2O \qquad [7]$$

<u>Postupak</u>:

U staklenu kivetu otpipetira se 2 mL uzorka, doda 1,2 mL otopine $K_2Cr_2O_7$ + $HgSO_4$ i 2,8 mL otopine Ag_2SO_4 + H_2SO_4, pažljivo zatvori, promiješa, te spaljuje u termoreaktoru pri 150 °C/1h. Ostavlja se u tamu dok se ne ohladi na sobnu temperaturu. Titrira se otopinom FAS (0,1 mol/L), uz feroin kao indikator, do promjene boje iz plavo/zelene u smeđe/crvenu. Slijepa proba se odredi na isti način, a uzorak je destilirana voda. Faktor otopine feroamonijeva sulfata se odredi poput slijepe probe, ali se ne digestira.

Faktor otopine računa se prema jednadžbi [8].

$$f = \frac{1,2}{V_{fas}} \qquad [8]$$

gdje je:

1,2 - volumen (mL) otopine $K_2Cr_2O_7$ + $HgSO_4$

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

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi [9].

$$KPK\left[\frac{mgO_2}{L}\right] = \frac{(V_1 - V_2)\times c\times f\times 8000}{V_{uzorka}} \qquad [9]$$

gdje je:

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

V_2-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, HACH COD reactor, Merck Thermoreactor TR 300

Dispenzeri

Titrator - Digitalna biretta Solarus, Hirschman-Laborgeräte

3.2.2. Određivanje ukupnog dušika

Ukupni dušik određivan je pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14763 i 1.14537. Organski i anorganski dušikovi spojevi se prevode u nitrat prema Koroleff-ovoj metodi u reakciji s oksidirajućim reagensom u termoreaktoru. U otopini zakiseljenoj sumpornom i fosfornom kiselinom, nitrati reagiraju s 2,6-dimetilfenolom (DMP) i tvore 4-nitro-2,6-dimetilfenol koji se određuje fotometrijski. Digestija je analogna EN ISO 11905-1, a određivanje nitrata je analogno ISO 7890/1.

Postupak:

U praznu kivetu se doda 9 mL destilirane vode i 1 mL filtriranog uzoraka i promiješa. Doda se 1 žličica reagensa N-1K i promiješa, 6 kapi reagensa N-2K, dobro zatvori, promućka i spaljuje pri 120 ^{o}C/1h. Nakon spaljivanja kiveta se izvadi iz termoreaktora, nakon 10 min promućka, te hladi na sobnu temperaturu. U reakcijsku kivetu otpipetira se 1 mL ohlađenog spaljenog uzorka (koristi se bistri supernatant ili filtrat u slučaju mutnoće ili taloga), doda 1 mL reagensa N-3K, zatvori kiveta i dobro promućka. Nakon reakcijskog vremena od 10 min u spektorfotometru se očita vrijednost ukupnog dušika u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14763 (10-150 mg N/L) i 1.1457 (0,5-15 mg N/L).

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Digestor tvrtke Hach COD Reactor

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

3.2.3. Određivanje amonijakalnog dušika

Amonijakalni dušik (NH_4-N) određivan je metodom po Nessleru. Dodatkom Nesslerovog reagensa u prisustvu NH_4-N nastaje žuta do žuto smeđa boja, ovisno o količini prisutnog NH_4-N, čiji se intenzitet određuje mjerenjem absorbance pri valnoj duljini 425 nm, te iz baždarnog dijagrama očita vrijednost NH_4–N u mg/L.

Baždarni dijagram načinjen je određivanjem absorbancijskih vrijednosti poznatih koncentracija standardne otopine NH_4Cl pri 425 nm.

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL doda se 50 mL filtriranog uzorka, po potrebi razrijeđenog, i 2 kapi K-Na-tartarata i promiješa, te doda 1 mL Nesslerovog reagensa i promiješa. Nakon 10 min izmjeri se absorbanca pri 425 nm.

Pribor:

Odmjerne tikvice od 50 mL

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Fotometar, SQ 200, Merck

3.2.4. Određivanje koncentracije nitrata

Određivanje NO_3-N je provedeno pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14773. Metoda se temelji na reakciji nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline uz nastanak nitro spoja koji je crvene boje i određuje se fotometrijski.

Postupak:

U staklenu kivetu se doda 1,5 mL uzorka (prethodno filtriranog i po potrebi razrijeđenog) i žličica NO_3-1 reagensa. Kiveta se dobro zatvori i miješa dok se reagens ne otopi. Potom se doda 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, kiveta pažljivo zatvori i promiješa. Reakcija se odvija 10 minuta, potom se očita vrijednost NO_3-N u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14773 (0,2-20 mg NO_3-N/L)

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Kvarcne kivete, Merck

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

3.2.5. 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.

Intenzitet obojenja se mjeri fotometrijski. Ova metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500-NO_2^-B, i EN 26 777.

Postupak:

U staklenu kivetu se doda 5 mL uzorka (prethodno filtriranog i po potrebi razrijeđenog) i jedna žličica NO_2-1 reagensa, kiveta se zatvori i miješa dok se reagens ne otopi. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena izmjeri se koncentracija NO_2-N u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776 (0,002-1 mg NO_2-N/L)

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Kvarcne kivete, Merck

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

3.2.6. Određivanje koncentracije fosfata

Fosfat u obliku ortofosfata (PO_4-P) određivan je pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14842, 1.00673.0001 i 1.14729.0001. Metoda se temelji na reakciji iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom pri čemu nastaje žuto obojeni molibdovanadat fosforna kiselina čija se koncentracija određuje fotometrijski. Ova metoda je analogna APHA 4500-P C.

Postupak:

U staklenu kivetu se otpipetira 5 mL prethodno filtriranog i po potrebi razrijeđenog uzorka te se doda 1,2 mL PO_4-1 reagensa. Kiveta se zatvori i promiješa. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena izmjeri se koncentracija PO_4-P u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14842 (0,5-30 mg PO_4-P/L), 1.00673.0001 (3-100 mg PO_4-P/L) i 1.14729.0001 (0,5-25 mg PO_4-P/L).

Staklene kivete s čepovima

Varijabilna ručna pipeta Eppendorf s nastavcima

Kvarcne kivete, Merck

Spektrofotometar, Spectroquant VEGA 400, Merck

3.2.7. Određivanje pH vrijednosti

Za motrenje i određivanje pH vrijednosti tijekom mikrobnih procesa uporabljen je pH-metar WTW 330i i pH elektroda SenTix41.

pH elektroda je tijekom pokusa bila uronjena u bioreaktor te je očitavana vrijednost prikazana na zaslonu pH-metra. Svakodnevno, prije uporabe pH elektrode, provođeno je umjeravanje elektrode (kalibracija) 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-metar WTW 330i

pH elektroda WTW SenTix41

Kemikalije:

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

3.2.8. 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 bioreaktor te je vrijednost koncentracije otopljenog kisika prikazana na zaslonu uređaja, u mg/L ili % zasićenja.

3.2.9. 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.

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

Uobičajeno se biomasa u bioreaktoru određuje kao (i) ukupne suspendirane čestice (TSS, engl. *Total Sespended 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 čine ostatak nakon što se uzorak upari i suši pri 103-105 ^{o}C. TSS je dio TS koji se zadržao na filter papiru specifične veličine pora, i sušen do konstantne mase pri 105 ^{o}C. 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 predstavljaju one čestice koje su hlapive i izgorene pri spaljivanju TSS (pri 500 ± 50 ^{o}C).

<u>Postupak I</u>:

Kroz prethodno izvagani stakleni filter papir filtrira se određeni poznati volumen uzorka, te suši pri 105 ^{o}C do konstantne mase, te opet važe. Iz razlike mase filter papira s talogom i čistog filter papira izračuna se TSS vrijednost, prema jednadžbi [10].

$$\mathrm{TSS}\left[\frac{\mathrm{g}}{\mathrm{L}}\right] = \frac{\mathrm{m_{om} - m_f}}{\mathrm{mL\ uzorka}} \times 1000 \qquad [10]$$

gdje je:

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

m_f [g] = masa čistog filter papira

<u>Postupak</u> II:

Pri korištenju vlagomjera u određivanju TSS, 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.

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 ^{o}C cca 3h. Nakon žarenja, ostatak (pepeo) se hladi u eksikatoru prije vaganja.

Razlika mase filter papira nakon žarenja i čistog filter papira predstavlja ukupnu anorgansku suspendiranu tvaru (ISS, engl. *Inorganic Suspended Solids*), prema jednadžbi [11].

$$\mathrm{ISS}\left[\frac{\mathrm{g}}{\mathrm{L}}\right] = \frac{\mathrm{m_{žareni\ m} - m_{čisti\ f}}}{\mathrm{V\ (mL)\ uzorka}} \times 1000 \qquad [11]$$

VSS predstavlja razliku TSS i ISS, prema jednadžbi [12]

$$\mathrm{VSS = TSS - ISS} \qquad [\mathrm{g\ L^{-1}}] \qquad [12]$$

Pribor:

Analitička vaga

Porculanska zdjelica

Filter papir (1,6 µm, GF/A, Whatman)

Aluminijske posudice, KERN MLB-A01

Sustav za vakuum filtraciju, Sartorius

Sušionik

Eksikator

Vlagomjer, Kern MLS-D

Mufolna peć

3.2.11. Određivanje neto uklonjenog fosfora

Vrijednost neto uklonjenog fosfora je dobivena iz razlike početne koncentracije fosfora i konačne koncentracije fosfora podijeljena s koncentracijom VSS, te je dobivena vrijednost izražena u mg PO_4-P/gVSS.

3.3. MIKROBIOLOŠKE METODE

3.3.1. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)

FISH je molekularna citogenetska tehnika, zasniva se na hibridizaciji određene genske sekvence i odgovarajućeg niza nukleotida vezanog za fluorescentni marker (proba) (Amann, 1995). FISH uzorci su promatrani na CLSM. Šest oligunkleotidnih proba (Tablica 6) označenih fluorescentnim bojama cianin 3 i cianin 5, korištenih u ovom radu su: EUB338, EUB338-II i EUB338-III (EUBmix, označavale su sve bakterije, skupa su korištene), i PAO462, PAO651 i PAO846 (PAOmix, fosfor akumulirajući organizmi, također skupa korištene). EUBmix probe su bile označene Cianin 5 bojom na 5' kraju, a PAOmix probe Cianin 3 bojom također na 5' kraju. Ciljana molekula je bila 16S rRNA.

FISH metoda se sastojala od četiri koraka:

(i) Priprema fiksativa (4% paraformaldehid)

Zagrijati 65 mL destilirane vode na 60 °C, dodati 4 g paraformaldehida, 1 kap 2M NaOH, brzo miješati 1-2 minute. Ukloniti izvor topline. Dodati 33 mL 3 × PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*). Podesiti pH na 7,2 s HCl. Filtrirati otopinu kroz 0,2 µm filter. Brzo ohladiti na 4 °C i čuvati u hladnjaku.

(ii) Fiksacija suspenzije mikrobnih stanica 4% paraformaldehidom

Dodati 3 volumena paraformaldehid fiksativa na 1 volumen uzorka. Čuvati 1-3 sata na 4 °C. Peletirati fiksirane stanice centrifugiranjem na 5000g te ukloniti fiksativ. Oprati stanice u 1 × PBS i resuspendirati stanice u 1 × PBS do konačne koncentracije 10^8-10^9 stanica/mL. Dodati 1 volumen ledeno hladnog etanola i promiješati. Fiksirane stanice se zatim mogu staviti na stakalca ili pohraniti na -20 °C na nekoliko mjeseci.

(iii) Imobilizacija fiksiranih mikrobnih stanica na stakalca

Staviti oko 3 µL fiksirane stanične suspenzije na stakalce u promjeru oko 5 mm i osušiti na zraku. Dehidrirati stanice umakanjem u 50%, 80% i 98% etanol, svaki po 3 minute. Nakon toga se stakalca mogu neograničeno čuvati suha pri sobnoj temperaturi.

(iv) Hibridizacija

Umočiti list Whatman 3MM papira u hibridizacijski pufer i staviti u tubu od 50 mL. Izjednačiti tubu nekoliko minuta na hibridizacijskoj temperaturi (46 °C). Za svako mjesto za hibridizaciju izmiješati 8 µL hibridizacijskog pufera i 1 µL fluorescentne probe. Staviti 9 µL mješavine hibridizacijskog pufera i probe na svako mjesto fiksiranih stanica. Brzo staviti stakalce u prethodno ugrijanu vlažnu tubu i hibridizirati 2 sata na 46 °C. Ukloniti stakalce iz vlažne tube i odmah prekiniti hibridizaciju tako što se ispiru probe sa stakala sa hibridizacijskim puferom prethodno ugrijanog na temperaturu hibridizacije. Zatim staviti stakalce u tubu koja je napunjena sa 50 mL hibridizacijskog pufera i inkubirati 20 minuta na hibridizacijskoj temperaturi. Ukloniti soli kratkim umakanjem stakalca u destiliranu vodu, otresti višak vode i osušiti na zraku. Staviti 1 kapljicu „mountanta“ na preparat i preko pokrovnicu. Ostaviti na sobnoj temperaturi na suhoj ravnoj površini 24 sata u mraku.

Tablica 6. Probe korištene za FISH analize

Naziv probe		Ciljana skupina	Sekvenca (5'-3')	Formamid %	Literatura
PAO462	PAOmix	PAOs	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	35	Crocetti i sur. (2000)
PAO651			CCCTCTGCCAAACTCCAG	35	
PAO846			GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	35	
EUB338	EUBmix	Sve bakterije	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50	Amann i sur. (1990)
EUB338-II			GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50	Daims i sur. (1999)
EUB338-III			GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50	

3.3.2. Metoda bojanja po Neisseru za određivanje poliP

Na čisto i odmašćeno predmetno stakalce (provlačenje predmetnice kroz plamen) stavi se kapljica aktivnog mulja. Preparat se ostavi da se osuši na sobnoj temperaturi, zatim se osušeni razmaz fiksira provlačenjem predmetnice tri puta kroz plamen. Na fiksirani razmaz se nanese svježe pripremljena mješavina 2 dijela otopine A i 1 dio otopine B 10-15 sekundi. Višak boje pustimo da oteče sa stakalca. Nakon toga se nanese otopina C na 45 sekundi te ispere vodom. Stakalce se ostavi da se osuši i gleda 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. Potrebni reagnesi za provedbu bojanja po Neisseru navedeni su u tablici 7.

Tablica 7. 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 srednje vrijednosti $(\bar{x})$ pojedinačnog parametra:

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i \qquad [13]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \qquad [14]$$

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 je provedena koristeći Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjenje 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

EBPR je ekonomičan i ekološki održiv proces kada se dobro vodi i smatra se ključnom strategijom u prevenciji eutrofikacije i prepoznaje kao napredno područje istraživanja u obradi otpadnih voda, ali stabilnost i pouzdanost procesa predstavljaju izazov (Oehmen i sur., 2007; Metcalf & Eddy, 2003).

U EBPR procesu PAOs akumuliraju P u suvišku metaboličkih potreba i pohranjuju ih kao unutarstanični biopolimer poliP (Metcalf & Eddy, 2003).

Zbog male brzine rasta PAOs su prisutni u aktivnom mulju u malom broju (Seviour, 2008; Metcalf & Eddy, 2003). Da bi se omogućila selekcija PAOs u aktivnom mulju EBPR proces se vodi u anaerobnim i aerobnim uvjetima u slijedu, tako da su elektron donor (organski sastojci) i elektron akceptor (obično kisik) fizički odvojeni, pa se na taj način PAOs selektiraju među drugim mikroorganizmima koji ne mogu koristiti organske sastojke u takvim uvjetima (Mino i sur., 1998).

EBPR proces ima tri karakteristike: (i) anaerobni unos organskih sastojaka i njihovo pohranjivanje, (ii) anaerobno otpuštanje fosfora i (iii) aerobni unos fosfora koji znatno premašuje potrebe staničnog rasta. U metabolizmu EBPR procesa važnu ulogu imaju skladišni spojevi: polifosfati, glikogen i polihidroksialkanoati (PHA) koji su prisutni u obliku polihidroksibutirata (PHB) ili polihidroksivalerata (PHV) (Metcalf & Eddy, 2003, Smolders i sur., 1994).

Na važnost anaerobne faze kao puno značajnije od aerobne faze u sposobnosti PAOs za pohranjivanje-skladištenje P ukazuju Chiou i Yang (2007).

U radu Li i sur., (2010) istraženo je u full-scale anoksično/aerobnom SBR sustavu istovremeno uklanjanje N i P iz gradske otpadne vode. Sustav je radio 290 dana i postigao stabilan učinak obrade organskih spojeva i nutrijenata. Ciklus se sastojao od: punjenja, reakcije (anoksično 210 min – aerobno 210 min – anoksično 150 min – aerobno 60 min), taloženja i dekantiranja. Postignut je učinak uklanjanja: 90,1% KPK, 89,3% TP, 87,3% NH_4-N i 60,2%TN. Pokusi su vođeni na način da je DO održavan pri 2-3 mg/L, MLSS = 3000-4000 mg/L, SRT = 20-25 dana.

, aktivnost PAOs tijekom anoksično/aerobnog procesa uklanjanja P, odnosno učinak različite koncentracije natrijeva acetata kao jedinog izvora ugljika na metabolizam PAOs (Slike 9-13), istražena je pri različitim omjerima C/P s natrijevim acetatom kao jedinim izvorom ugljika, bez provođenja anaerobnog dijela obrade, uz istovremeno provođenje procesa uklanjanja N (dodan NH_4-N prema PO_4-P u omjeru N/P 1).

Prisutnost PAOs dokazana je primjenom FISH metode po Amann (1995), a bojanjem mulja po Neisseru (Eikelboom i van Buijsen, 1983) dokazano je unutarstanično pohranjivanje poliP.

Provedeni su diskontinuirani pokusi, u slijedu anoksično/aerobna obrada, i to: 2 sata anoksičnog procesa uz dodatak natrijeva acetata pri omjeru C/P 1, 3, 5, 7 i 10, pri DO≤0,3 mg/L na magnetskoj mješalici pri 100 o/min, i u slijedu aerobni proces uz dodatak PO_4-P za očekivanu početnu koncentraciju 30 mg PO_4-P/L i uz dodatak NH_4-N za očekivanu početnu koncentraciju 30 mg NH_4-N/L, uz VSS 3,6±0,1 g/L.

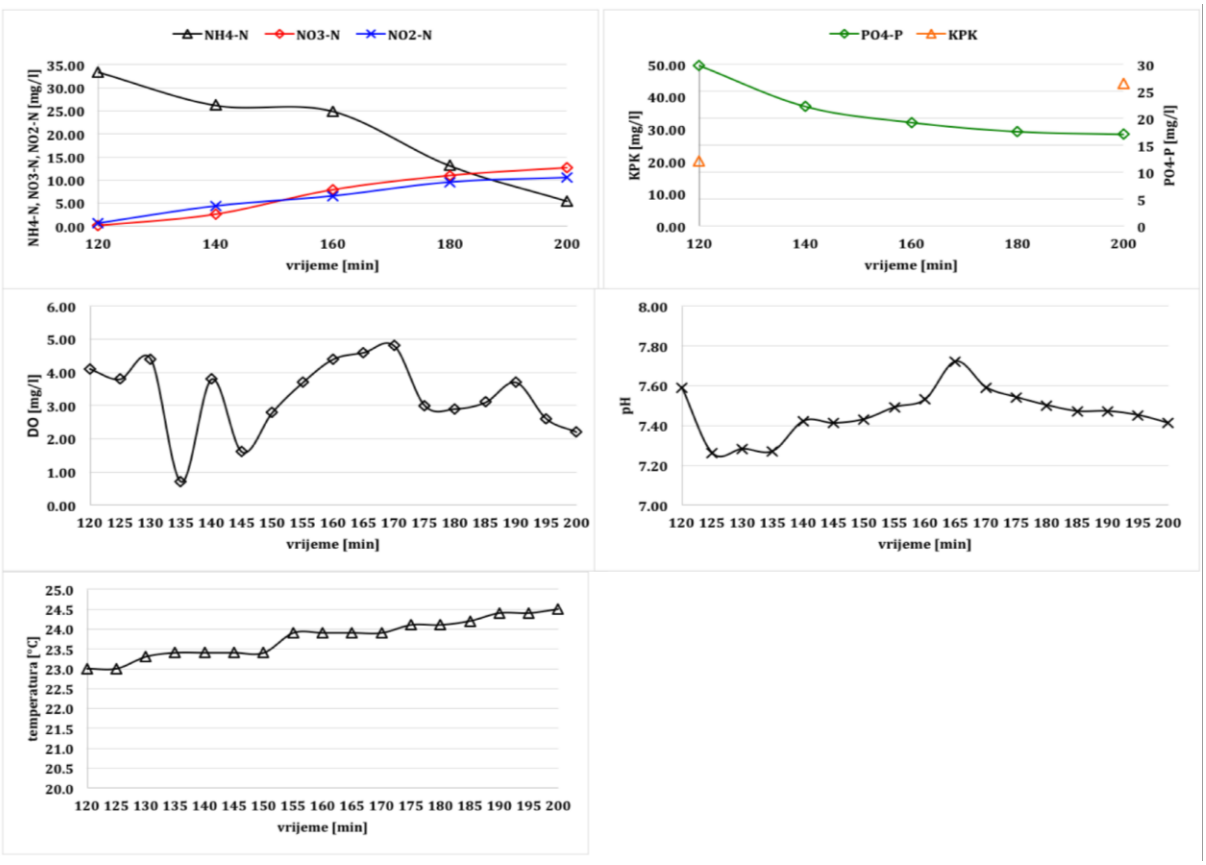
Provedba ovih istraživanja učinka odabranih varijabli na: metabolizam PAOs, učinkovitost procesa i mikrobnu dominantnost u ciljanim biološkim procesima, a sve ovisno o dabranim čimbenicima procesa, je razmatrana s ciljem:

- Ovakvim vođenjem procesa, izostanak anaerobne faze, pojednostavljuje se vođenje procesa.
- Odabrano je vrijeme trajanja anoksične faze od 2 sata jer je prethodnim istraživanjima pokazano da duže anoksično vrijeme (istraženo 4 sata) nije imalo učinka na veće iskorištenje KPK iz vodenog medija.
- Acetat je odabran kao izvor ugljika jer PAOs (i GAOs) vrste preferiraju masne kiseline (VFA) kao izvor ugljika, a acetat i propionat prevladavaju u otpadnim vodama (Lv i sur., 2014). Omjer organskih sastojaka i ukupnog fosfora, KPK/TP, (ulazni KPK/P ili ulazni C/P) je krucijalan za dizajn i rad sustava za uklanjanje P. PAOs imaju tendenciju dominiranja pri omjeru KPK/P 10-20 mgKPK/mgP, dok GAOs dominiraju pri omjeru KPK/P>50 mgKPK/mgP (Oehmen i sur., 2007).
- Učinak N spojeva na uklanjanje P je istraženo jer je poznato da se u aerobnim uvjetima PO_4-P unosi u stanicu ali se DO istovremeno koristi i u procesu nitrifikacije, a poznato je i da NO_x-N imaju štetan učinak na unos P. Aerobni unos fosfata je osjetljiviji na NO_2-N od anoksičnog unosa (Freitas i sur., 2009). Aerobni unos P je inhibiran pri 2 mg NO_2-N/L a pri 6 mg NO_2-N/L zbiva se potpuna inhibicija, dok u anoksičnim uvjetima inhibicija unosa P se javlja pri NO_2-N>5 mg/L (Coma i sur., 2012). U istraživanju Zhou i sur. (2007) je pokazano da je nitritna inhibicija reverzibilna, a brzina obnove ovisi o koncentraciji kojoj je biomasa bila izložena.

- Istražen je učinak različitog omjera KPK/P (C/P) na metabolizam PAOs u rasponu vrijednosti C/P 1–10 što odgovara omjeru KPK/P 2–23 (eksperimentalno određeno). Isto tako, učinak C/P na proces anoksično/aerobnog uklanjanja P je istražen kako bi se definirala potreba na KPK za unos P, odnosno mgKPK/mgP. U literaturi je navedeno da omjer KPK/P 15 je dovoljan za postizanje 100% uklanjanja P anaerobno/aerobnim uvjetima (Broughton i sur.,2008). Učinak omjera KPK/P na izvedbu EBPR uz acetat kao izvor ugljika u anaerobno/aerobnom procesu istraživali su Jiang i sur. (2015), te su definirali da je minimalni omjer KPK/P za potpuno uklanjanje P 8,24 gKPK/gP. Također, pokazali su da pri niskom omjeru KPK/P dolazi do smanjenja zaliha glikogena ali preostaje dovoljno za anaerobni VFA unos. To sugerira da PAOs znatno preferiraju održavanje nivoa uskladištenog glikogena negoli dodatno generiranje poliP (Jiang i sur., 2015).
- Vezano za DO, u literaturi (Metcalf & Eddy, 2003) je istaknuto da pri DO 2,5-3 mg/L dolazi do povećanja udjela PAOs u mulju, a visoke koncentracije otopljenog kisika u aerobnoj fazi, pri DO 4,5-5 mg/L, pogoršavaju uklanjanje fosfora. DO utječe i na aktivnost nitrifikanata, nema štetnog učinka za manje od 4 sata bez DO, dok više od 4 sata bez DO štetno utječe na aktivnost nitrifikanata (Brdjanović i sur., 1998b).

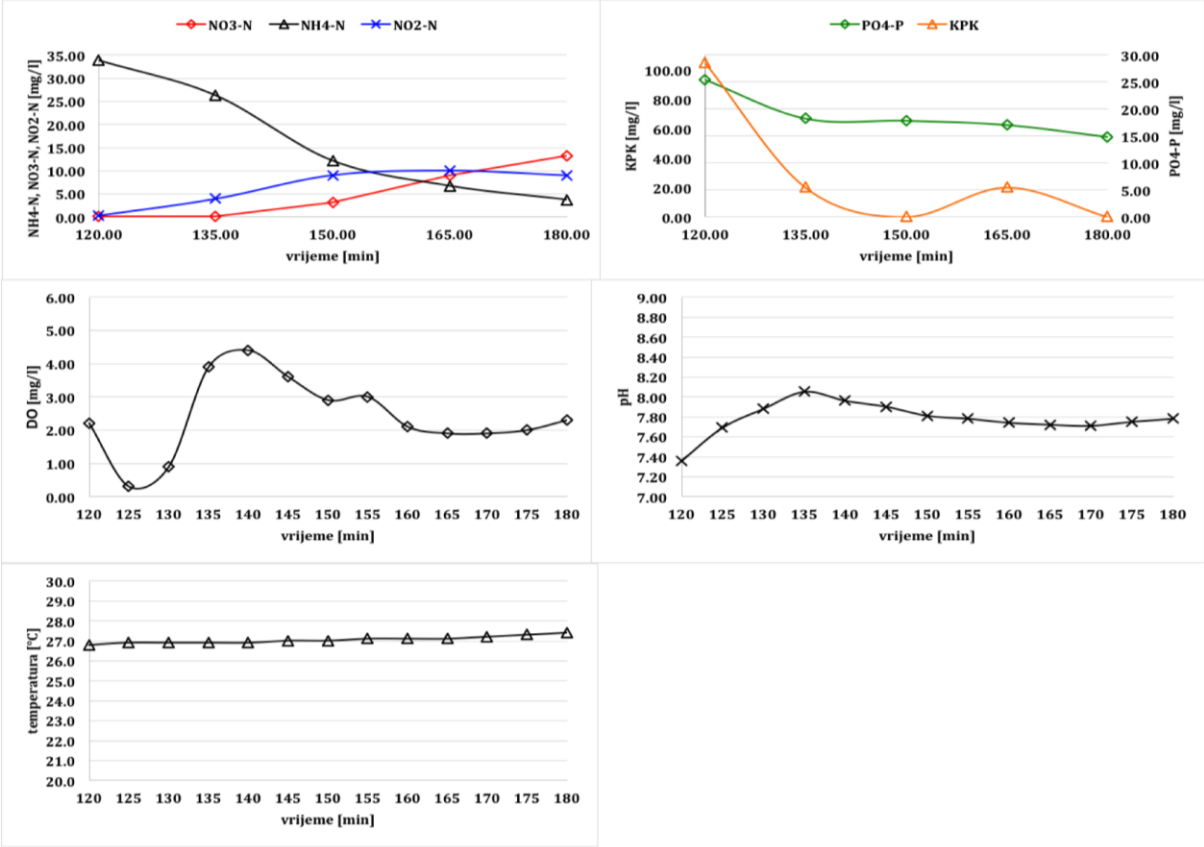
4.1. ANOKSIČNO/AEROBNO UKLANJANJE P PRI RAZLIČITIM OMJERIMA C/P

Promjene koje su se zbivale tijekom procesa uklanjanja C, N i P a odraz su mikrobnih reakcija pri odabranim procesnim uvjetima i uvjetima okoliša, prikazane su slikama 9-13 za odabrane omjere C/P 1, 3, 5, 7, i 10.



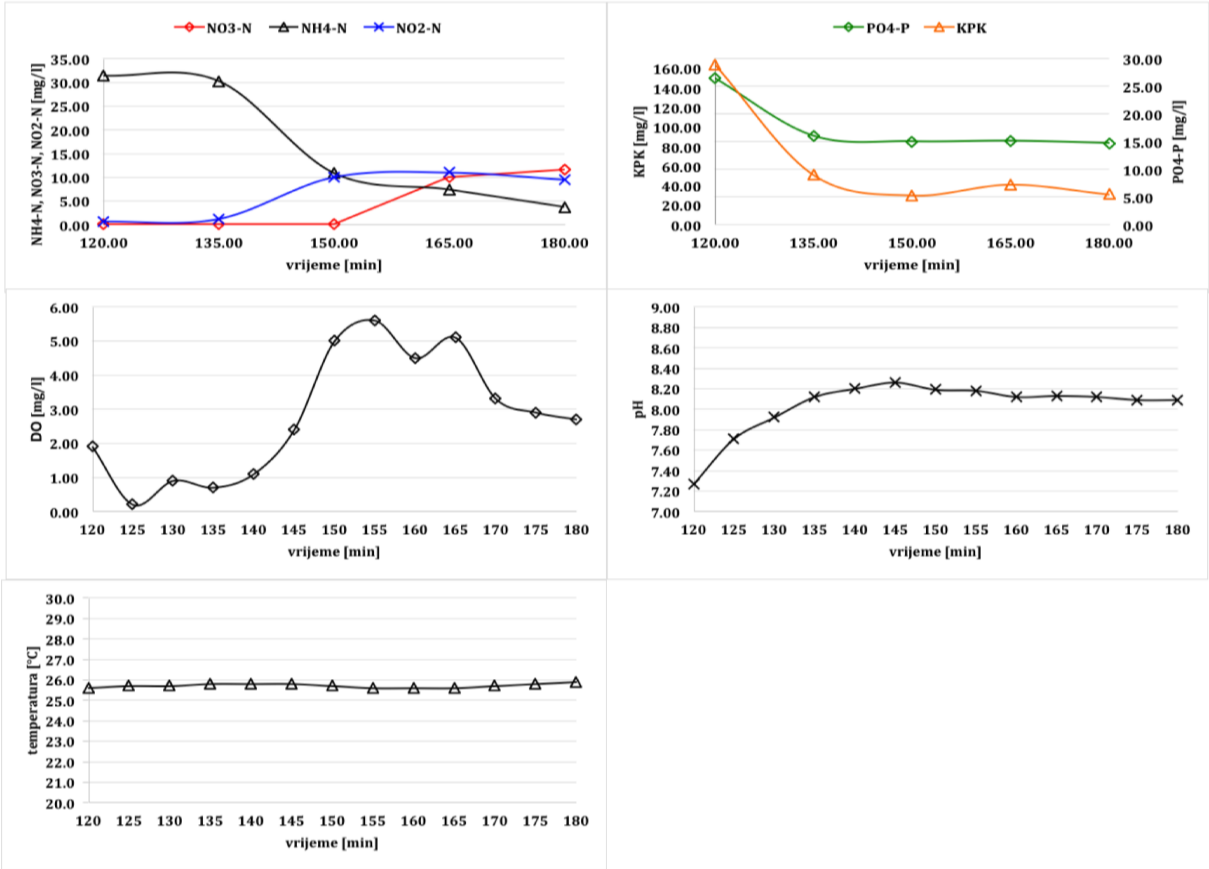
Slika 9. Promjene KPK, PO_4–P, NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N, te pH, DO i temperature tijekom aerobnog perioda anoksično/aerobnog procesa uklanjanja P, pri C/P 1

U pokusu pri C/P 1 što odgovara omjeru KPK/P 2 (Slika 9) tijekom 2 sata anoksičnih uvjeta sav raspoloživi KPK je utrošen, te je tijekom aerobnog uvjeta mikrobna biomasa provodila proces akumulacije P i istovremene oksidacije NH_4-N do NO_3-N i NO_2-N. Brzina oksidacije amonijaka je iznosila 21 mg NH_4-N/Lh, a brzina uklanjanja P je iznosila 9,6 mg PO_4-P/Lh. U aerobnim uvjetima uklonjeno je 29% PO_4-P tijekom 80 min (26% tijekom prvih 20 min).



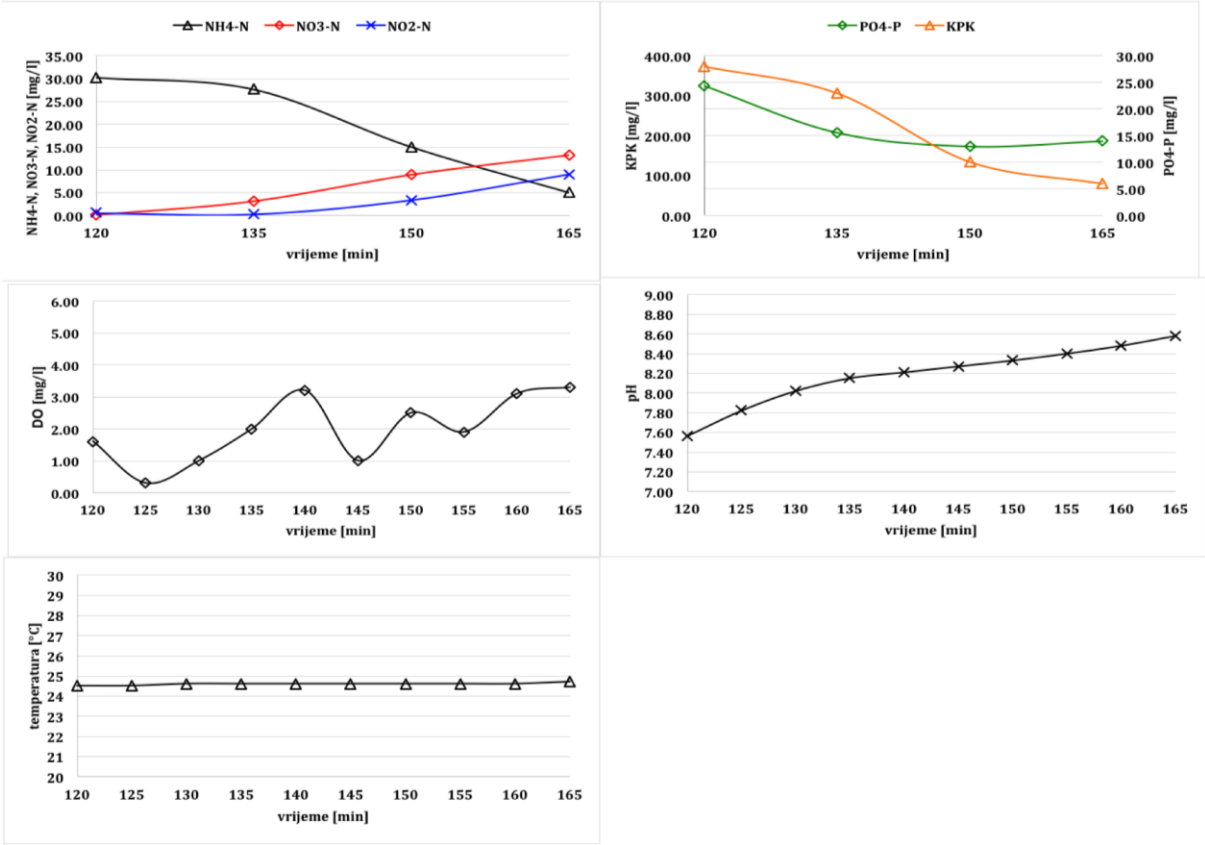
Slika 10. Promjene KPK, PO_4–P, NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N, te pH, DO i temperature tijekom aerobnog perioda anoksično/aerobnog procesa uklanjanja P, pri C/P 3

Pokus pri omjeru KPK/P 6,3 odgovara omjeru C/P 3 (Slika 10) je proveden uz smanjenje koncentracije KPK za 85 mg/L tijekom 2 sata anoksičnog procesa. U aerobnom dijelu procesa preostali KPK od 103 mg/L je oksidiran, uz istovremenu oksidaciju NH_4-N (nakupljanje NO_3-N i NO_2-N) te uklanjanje P. Pokus je proveden uz brzinu oksidacije amonijaka 30 mg NH_4-N/Lh, i brzinu uklanjanja P od 10,6 mg PO_4-P/Lh. Uklonjeno je u aerobnim uvjetima 42% PO_4-P tijekom 60 min (28% tijekom prvih 15 min).



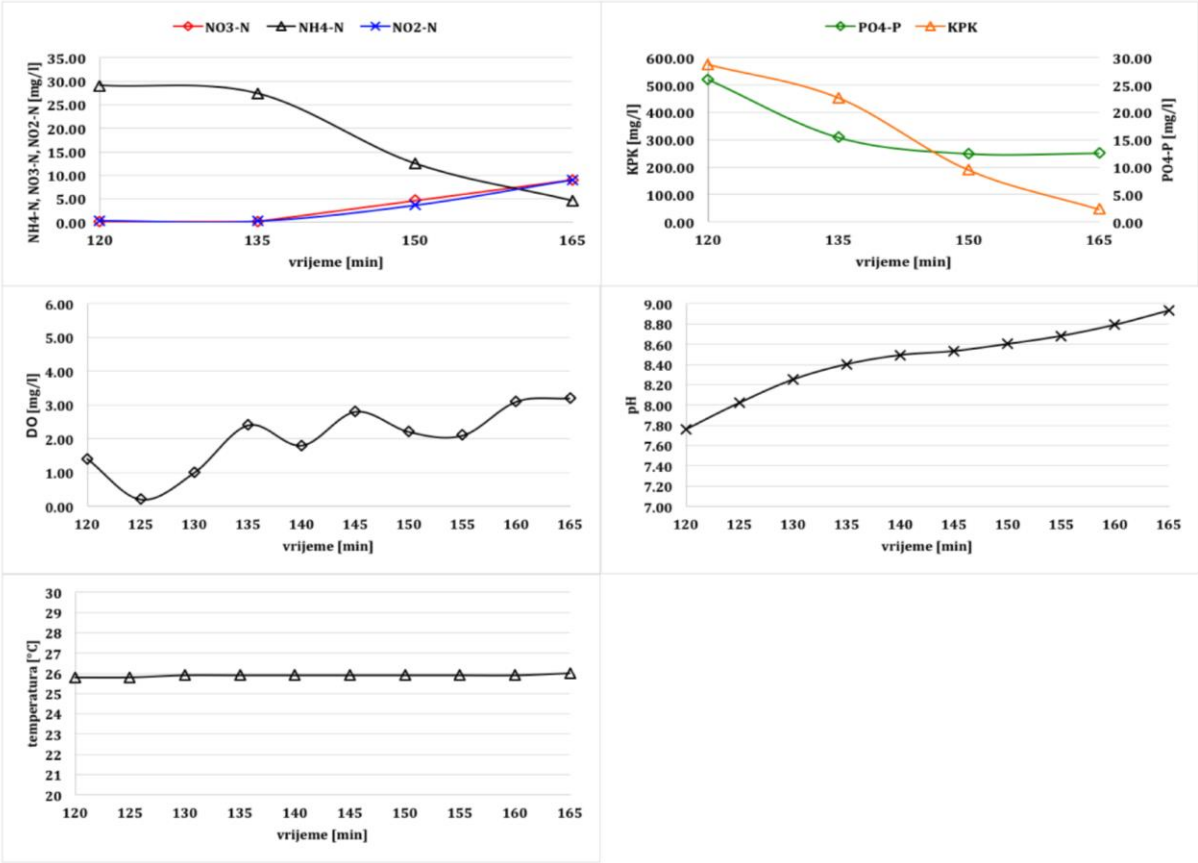
Slika 11. Promjene KPK, PO_4–P, NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N, te pH, DO i temperature tijekom aerobnog perioda anoksično/aerobnog procesa uklanjanja P, pri C/P 5

Pokus uz omjer KPK/P 9,2 odgovara omjeru C/P 5 (Slika 11) u kojem je tijekom 2 sata anoksičnih uvjeta uklonjeno 112 mg KPK/L, dok je preostalih 131 mg KPK/L potpuno uklonjeno u aerobnim uvjetima. Brzina oksidacije amonijaka je iznosila 28 mg NH_4-N/Lh, a brzina uklanjanja P je iznosila 11,7 mg PO_4-P/Lh. U aerobnim uvjetima uklonjeno je 44% PO_4-P tijekom 60 min (tijekom prvih 15 min 38%).



Slika 12. Promjene KPK, PO_4–P, NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N, te pH, DO i temperature tijekom aerobnog perioda anoksično/aerobnog procesa uklanjanja P, pri C/P 7

U pokusu pri omjeru KPK/P 15 a što je ostvareno dodatkom natrijeva acetata pri C/P 7 (Slika 12) tijekom 2 sata anoksičnih uvjeta postignuto je uklanjanje KPK od 76 mg/L. Preostali KPK je potpuno oksidiran u aerobnim uvjetima tijekom 45 min, kao i proveden proces oksidacije NH_4-N. Brzina oksidacije amonijaka je iznosila 30 mg NH_4-N/Lh, a brzina uklanjanja P je iznosila 13,8 mg PO_4-P/Lh. U aerobnim uvjetima uklonjeno je 42,6% PO_4-P tijekom 45 min (tijekom prvih 15 min 35%).



Slika 13. Promjene KPK, PO_4–P, NH_4-N, NO_3-N, NO_2-N, te pH, DO i temperature tijekom aerobnog perioda anoksično/aerobnog procesa uklanjanja P, pri C/P 10

Pokus pri omjeru C/P 10 odgovara omjeru KPK/P 23 (Slika 13) je rezultirao u anoksičnom dijelu procesa uklanjanjem 130 mg KPK/L, a preostali KPK je oksidiran u aerobnom dijelu procesa tijekom 45 min do 45 mg KPK/L. Istovremeno je, u aerobnom dijelu procesa, oksidiran KPK, oksidiran NH_4-N te uklonjen P. Brzina oksidacija amonijaka je iznosila 32 mg NH_4-N/Lh, a brzina uklanjanja P je iznosila 18 mg PO_4-P/Lh. U aerobnim uvjetima uklonjeno je ukupno 51,9% PO_4-P tijekom 45 min (40,7% PO_4-P uklonjeno tijekom prvih 15 min aerobnog procesa). U literaturi je istaknuto da je potpuno P uklanjanje (100%) postignuto pri omjeru KPK/P 15 i uz početnu koncentraciju 50 mg PO_4-P/L (Broughton i sur., 2008), a također visoka učinkovitost uklanjanja P od 97% je ostvarena pri omjeru 2/1 propionska/octena kiselina kao organski sastojak (Li i sur., 2008).

4.2. OVISNOST UKLANJANJA P U ANOKSIČNO/AEROBNOM PROCESU O pH, DO I TEMPERATURI

Temperatura i pH-vrijednost vodenog okoliša su limitirajući čimbenici aktivnosti PAOs vrsta. U literaturi (Panswad i sur., 2003; Whang i Park, 2002.) se ističe da je temperatura 17-22 ^{o}C povoljna za aktivnost PAOs, i da pri tim uvjetima temperature prevlada biomasa PAOs nad GAOs, budući GAOs odogovara viša temperatura.

Svi pokusi u kojima je istraživano uklanjanje P u anoksično/aerobnim uvjetima (Slike 9-13) su provedeni u ambijentalnim uvjetima temperature (bez kontrole – održavanja odabrane temperature procesa – vodenog medija). Pokusi su započeti pri uvjetima temperature oko 23±1 ^{o}C te je tijekom procesa u anoksičnim uvjetima temperatura u svim pokusima porasla za 2-2,5 ^{o}C, te su pokusi u aerobnom dijelu procesa vođeni pri 24±1 ^{o}C (C/P 1), 26±1 ^{o}C (C/P 3); 25,5±0,5 ^{o}C (C/P 5), 24,5±0,5 ^{o}C (C/P 7), 25,5±0,5 ^{o}C (C/P 10). Ovakvim vođenjem procesa nije se utjecalo na aktivnost PAOs u anaerobnim uvjetima, istaknuto je u literaturi da povećanje temperature do 30 ^{o}C ne utječe na aktivnost PAOs u anaerobnim uvjetima (Panswad i sur., 2003; Brdjanović i sur., 1998). Iako je istaknuto da je povoljna temperatura za uklanjanje P 17-22 ^{o}C (Panswad i sur., 2003; Whang i Park, 2002.) izmjerene vrijednost temperature u aerobnom dijelu procesa nisu imale učinka na aktivnost PAOs (Slike 9-13).

pH ima znatan učinak na anaerobni metabolizam PAOs i GAOs, na kompeticiju između PAOs i GAOs, tako da više vrijednosti pH daju metaboličke prednosti PAOs nad GAOs, odnosno PAOs mogu poboljšati uklanjanje fosfora u EBPR sustavima zbog obogaćivanja mulja sa fosfat akumulirajućim vrstama. Povoljna pH-vrijednost za aktivnost PAOs je u rasponu pH 7,5-8,5, a granična (kritična) vrijednost je pH 7,25, jer pri pH>7,25 dominiraju PAOs, odnosno pri pH<7,25 dominiraju GAOs, pa se sugerira kontrola pH kao čimbenik kojim se manipulira neprisutnost GAOs u SBR sustavima (Filipe i sur., 2001).

Profili pH u svim pokusima (Slike 9-13) su odraz aktivnosti mikrobnih vrsta u ciljanom procesu, i aktivosti OHO, i NI/DNI vrsta kao i PAOs vrsta.

U pokusima sa nižim omjerom C/P (pri C/P 1, 3 i 5, Slike 9-11) u profilu pH u aerobnom dijelu procesa u početku se zbiva porast pH kao rezultat oksidacije organskih sastojaka (smanjenje KPK vrijednosti, aktivnost OHO vrsta). Nakon potpune oksidacije KPK preostalog nakon anoksičnog procesa (KPK preostao u maloj količini) dolazi do pada pH vrijednosti kao rezultat oksidacije NH_4-N i nakupljanja NO_3-N + NO_2-N, i to znatno u pokusu u kojem nije preostalo

KPK nakon anoksičnih uvjeta (C/P 1 kao i u pokusu pri C/P 3 kada je nakon anoksičnih uvjeta preostalo malo KPK koji se oksidirao u aerobnom dijelu procesa).

Pokus pri C/P 5 ima profil pH koji pokazuje porast pH tijekom oksidacije KPK i aktivnosti PAOs, a tijekom nitrifikacije snižava se pH ali slabo izraženo (Slika 11).
U pokusima sa većim omjerom C/P (C/P 7 i 10, Slike 12 i 13) u profilu pH se ne bilježi pad pH iako se zbiva oksidacija NH_4-N i nakupljanje NO_3-N + NO_2-N. Pri C/P 7 i C/P 10 neprestani je rast pH vrijednosti kao rezultat oksidacije KPK koji je u znatnoj količini preostao nakon anoksičnih uvjeta procesa.
Manipuliranjem pH-vrijednosti i temperature može se favorizirati aktivnost PAOs i suzbijati aktivnost GAOs (koji u anaerobnim uvjetima uzimaju organske sastojke ali ne doprinose na uklanjanju P).

Koncentracija otopljenog kisika, DO, također izravno utječe na aktivnost mikrobnih vrsta u ciljanom procesu (Slike 9-13). U anoksičnim uvjetima provođenim tijekom 2 sata, po dodatku organskog izvora ugljika (natrijeva acetata) u odgovarajućoj količini za odabrani omjer C/P koncentracija otopljenog kisika je već nakon 5 min bila DO≤0,3 mg/L, ostvareno miješanjem na magnetskoj mješalici pri 100 o/min (Slike 9-13). Takvi uvjeti vođenja procesa su rezultirali smanjenjem koncentracije organskih sastojaka izraženih kao KPK vrijednost u vodenom mediju kao rezultat aktivnosti PAOs koji su unutarstanično pohranili (skladištili) organske sastojke u obliku PHB za kasnije aerobno unošenje fosfata iz vodenog medija i njegovu unutarstaničnu akumulaciju u obliku poliP. Unutarstanično spremanje fosfata u obliku poliP u volutinskim zrncima je dokazano bojanjem po Neisseru (Eikelboom i van Buijsen, 1983), a prisutnost PAOs-a u aktivnom mulja je dokazana FISH metodom (Amann, 1995).

Utrošak KPK (smanjenje koncentracije u anoksičnom uvjetu, Slike 9-13) se pripisuje aktivnosti PAOs vrsta, a ne i procesu denitrifikacije koji bi se da su prisutni N oksidi zbivao u anoksičnim uvjetima. To je izbjegnuto jer je biomasa prije postavljanja pokusa “prana” vodovodnom vodom da se izbjegne učinak bilo kojeg mogućeg produkta/međuprodukta ranijih bioloških procesa, te su svi pokusi na početku anoksične faze imali 2>NO_3-N>1 mg/L i NO_2-N<0,02 mg/L.

DO je, poput pH, neizravni pokazatelj zbivanja u mikrobnom procesu, a uz dostupan raspoloživi KPK je odgovoran za provođenje SND. U pokusima pri svim odabranim omjerima C/P (Slike 9-13) zbivala se potpuna oksidacija NH_4-N koja nije rezultirala nakupljanjem NO_3-N i NO_2-N u ekvivalentnoj (stehiometrijskoj) količini. Po bilanci N, nedostaje N-oksida cca 15-30%, ovisno o početnom omjeru C/P.

4.3. UČINAK OMJERA KPK/P (C/P) NA UKLANJANJE P U ANOKSIČNO/AEROBNOM PROCESU

U aerobnim uvjetima u svim pokusima zbivalo se istovremeno uklanjanje N (istovremena nitrifikacija i denitrifikacija, ali ne 100%), defosfatacija i uklanjanje KPK (preostalog nakon anoksične faze u pokusima sa višim omjerom C/P), Slike 9-13.

Organski sastojci (KPK) su u svim pokusima uklonjeni do vrijednosti u obrađenoj vodi dopuštenih za ispust u okoliš (NN 80/13).

Učinak acetata na uklanjanje P se očituje u anoksičnom unosu i pohranjivanju acetata u stanicu PAOs u obliku PHB, te u aerobnim uvjetima unos P uz utrošak pohranjenog PHB.

Povećanjem omjera KPK/P (C/P) raste količina raspoloživih organskih sastojaka i količina uklonjenog KPK u anoksičnom uvjetu. Najveća redukcija KPK u anoksičnom dijelu procesa od 130 mg KPK/L je ostvarena u pokusu pri C/P 10 i u tom pokusu je ostvareno najveće uklanjanje PO_4-P u aerobnom uvjetu od 51,6 % (Slika 13).

Drugi autori (Ong i sur., 2013) navode da niži omjer KPK/P (C/P=3) više pogoduje uklanjanju fosfora nego veći omjer od C/P 10, pri temperaturi 28-32°C uporabom acetata kao jedinog izvora ugljika u EBPR sustavu u anaerobno/aerobnom procesu.

Također, u literaturi (Guerrero i sur., 2011) pri provođenju anaerobno/aerobnog procesa je istaknuto da je omjer P/C ključni čimbenik u kompeticiji PAOs i GAOs. Pri omjeru P/C=20/100 PAOs su dominirali nad GAOs, a pri omjeru P/C 2/100 GAOs su nadvladali PAOs. Veći omjer P/C pogoduje rastu a time i dominaciji PAOs vrsta, dok manji omjer P/C rezultira zamjenom dominantne populacije u GAOs.

Kako se u aerobnim uvjetima provodi oksidacija KPK preostalog iz anoksičnih uvjeta (u svim pokusima sa omjerom C/P≥3, Slike 10-13), a poznato je da heterotrofi imaju znatno veći afinitet za otopljeni kisik od autotrofa te se u aerobnim uvjetima zbiva intenzivno uklanjanje KPK (tijekom prvih 15-30 min aerobnog procesa, ovisno u koncentraciji KPK preostaloj nakon anoksične faze) i koje u tom vremenskom periodu prati istovremeno ali polagano smanjenje koncentracije NH_4-N (oksidacija NH_4-N), a što se prepoznaje i u profilu DO.

Krivulja DO u profilu koncentracije otopljenog kisika u aerobnom periodu procesa je odraz mikrobnih reakcija: tako u pokusu pri C/P 1 istovremeno se uklanja PO_4-P i provodi nitrifikacija, a nema aktivnosti OHO jer je sav KPK utrošen tijekom prethodnog anoksičnog perioda (Slika 9); u pokusu pri C/P 3 preostaje mala količina KPK koja se u aerobnom periodu

procesa aktivnošću OHO vrsta istovremeno uklanja uz unos PO_4-P (aktivnost PAOs) i proces nitrifikacije (aktivnost NI/DNI) (Slika 10); u pokusu pri C/P 5 tijekom prvih 15 min se ispoljava znatna aktivnost PAOs i OHO, a tek potom NI/DNI (Slika 11); u pokusu pri C/P 7 i 10 u kojima je nakon anoksičnih uvjeta preostalo puno KPK, DO se intenzivno tijekom prvih 15 min aerobnih uvjeta uporabljuje od strane PAOs, a tek potom od OHO i NI/DNI (Slike 12 i 13).

Intenzivno smanjenje DO tijekom prvih 15 min aerobnih uvjeta je obilježeno u svim pokusima unosom PO_4-P u stanice PAOs (Slike 9-13), a u pokusima u kojima je preostalo puno organskih sastojaka izraženih kao KPK, Slike 12 i 13, OHO vrste su istovremeno kad i PAOs ispoljile aktivnost (male brzine oksidacije organskih sastojaka), a tek po usporavanju aktivnosti PAOs djeluju intenzivno OHO i NI/DNI vrste.

Po iscrpljivanju KPK, u profilu DO lagano poraste vrijednost ali se DO i dalje troši, uporabljuje za oksidaciju NH_4-N koja u svim pokusima ne rezultira ekvivalntnoj količini nakupljenog NO_2-N + NO_3-N. Pokuse oksidacije NH_4-N prati daljnje neznatno pohranjivanje P u PAOs (Slike 10-13). U pokusu pri C/P 1 sav KPK je utrošen tijekom anoksične faze, te se u aerobnoj fazi istovremeno zbivaju procesi uklanjanja N i P (Slika 9).

U provedenim pokusima (Slike 9-13), u aerobnim uvjetima PAOs vrste su bile dominantne po aktivnosti nad OHO i NI/DNI vrstama, potom OHO vrste koje su uklanjale KPK, a tek potom NI/DNI vrste koje su provodile uklanjanje N.

U literaturi je istaknuto da nakon anaerobnih ili anoksičnih uvjeta NI/DNI vrste trebaju određeni period prilagodbe na aerobne uvjete za postizanje aktivnosti (Liu i sur., 2010).

U nadmetanju NI/DNI vrsta i PAOs vrsta u aerobnim uvjetima, u ovim pokusima (Slike 9-13) NI/DNI nije pokazala potrebu aklimatizacije na aerobne uvjete što je posebno vidljivo u pokusu pri C/P 1 (Slika 9) kad nije bilo preostalog KPK te se aktivnost NI/DNI ispoljila odmah po ostvarivanju aerobnih uvjeta, dok su u ostalim pokusima (C/P≥3, Slike 10-13) NI/DNI vrste kao autotrofi ispoljile aktivnost tek iscrpljivanjem (utroškom) KPK od strane OHO, ili istovremenom aktivnošću uz OHO kada nisu prisutne velike količine organskih sastojaka. Taj vremenski tijek procesa oksidacije NH_4-N popraćen je istovremenom aktivnošću PAOs vrsta ali znatno slabije aktivnosti (najveći unos PO_4-P u stanice PAOs se zbivao tijekom prvih 15 min aerobnog procesa), (Slike 9-13). Učinak NO_x-N se odrazio na aktivnost PAOs u aerobnim uvjetima na način da nakupljanje NO_2-N kao rezultat nitrifikacije smanjuje brzinu unosa P u PAOs – inhibira PAOs (Slike 9-13).

To je u suglasju sa literaturom (Zhou i sur., 2007) u kojoj je istaknuto da je aerobni unos P u PAOs inhibiran uz 2 mg NO_2-N/L, dok uz 6 mg NO_2-N/L zbiva se potpuna inhibicija PAOs. Iako je u ovim pokusima (Slike 9-13) određena vrijednost NO_2-N>6 mg/L nije se zbila potpuna inhibicija, ali je znatno smanjena brzina unosa P.

U svim pokusima (Slike 9-13) po učinjenoj bilanci dušika, nedostaje N, u pokusu pri C/P 10 fali oko 22% N. Takva aktivnost se može pripisati i raspoloživoj koncentraciji otopljenog kisika, koji je u isto vrijeme bio potreban i za aktivnost OHO, PAOs i NI/DNI vrsta.
Rezultati u ovim pokusima (Slike 9-13) su u suglasju sa navodima u literaturi u kojoj se ističe da su povoljni uvjeti za provođenje SND vrijednosti DO<1 mg/L, pri čemu se u unutrašnjosti flokule u tim anoksičnim uvjetima zbivala denitrifikacija a u vanjskom sloju flokule nitrifikacija (Liu i sur., 2010) pri pH>8,0 i temperaturi vodenog medija iznad 25 ^{o}C. Beun i sur., (2001) su istaknuli da je pri DO<1,6 mg/L sav nitrat formiran u nitrifikaciji denitrificiran.

Kako je navedeno u literaturi za otpuštanje P u anaerobnim uvjetima mora biti koncentracija NO_3-N<1mg/L (Zhou i sur., 2007), a u ovim pokusima u anoksičnim uvjetima je koncentracija 2>NO_3-N>1 mg/L i to je vjerojatno razlog neotpuštanja P iz PAOs u anoksičnim uvjetima.

4.4. UČINAK N SPOJEVA NA UKLANJANJE P

U svim pokusima u bilanci dušika nedostaje oko 10 mg NO_x-N/L što ukazuje da se zbivala aerobna denitrifikacija što potvrđuje i izmjerena vrijednost koncentracije ukupnog dušika. Dušikovi oksidi (NO_3-N + NO_2-N) nastali kao rezultat oksidacije NH_4-N nisu prisutni u ekvivalentnoj količini. U svim pokusima oksidacija NH_4-N ili aerobna denitrifikacija, odnosno smanjenje koncentracije NH_4-N u ovisnosti o vremenu, pokazuje u prvih 15-20 min dominaciju PAOs koja se očituje znatnim uklanjanjem PO_4-P iz vodenog medija i u tom periodu smanjenjem NH_4-N svega oko 13%. Kompeticija za kisik je odgovorna za takvu dinamiku promjena u mikrobnim procesima pri različitim omjerima C/P.

Također, raspoloživi kisik u aerobnom dijelu procesa je već po dodatku PO_4-P i NH_4-N intenzivno korišten u mikrobnoj aktivnosti PAOs, OHO, i NI/DNI vrsta, te je nakon 5 minuta aerobnih uvjeta određena vrijednost DO≤1 mg/L. U takvim uvjetima, u kompeticiji za kisik, dominantnu aktivnost su ispoljili PAOs, pa OHO i NI/DNI vrste.

Ovakva dinamika aktivnosti PAOs vrsta, intenzivnog unosa PO_4-P tijekom prvih 15 minuta aerobnog dijela procesa a tijekom kojeg je postignuto uklanjanje P od 26% (C/P 1), 28% (C/P 3), 38% (C/P 5), 35% (C/P 7) i 41% (C/P 10), odnosno i nakon tog vremena do kraja pokusa daljnje uklanjanje do ukupnog učinka u uklanjanju P od 29%, 42%, 44%, 43% i 51,9 % (pri C/P 1, 3, 5, 7 i 10) može se pripisati inhibicijskom učinku N-oksida na aktivnost PAOs i/ili iscrpljivanju PHB.

U literaturi se navodi da je aerobni unos P u PAOs inhibiran uz 2 mg NO_2-N/L, dok uz 6 mg NO_2-N/L zbiva se potpuna inhibicija PAOs (Zhouz i sur., 2007), što je u suglasju s rezultatima ovih istraživanja (Slike 9-13). Tako, tijekom prvih 15 min aerobnog procesa kad je zabilježena najveća aktivnost PAOs, nije bilo znatne aktivnosti NI/DNI vrsta pa time ni mogućnosti nastanka N-oksida koji bi negativno utjecali – inhibirali aktivnost PAOs, a i raspoloživi KPK u takvim uvjetima DO bi rezultirao SND procesom. Aktivnost NI/DNI vrsta manifestirala se nakupljanjem NO_2-N i NO_3-N u koncentraciji koje su istaknute kao inhibirajućeg učinka na PAOs (Zhou i sur., 2007).

U ovom istraživanju nije moguće tumačiti aktivnost PAOs vrsta – metabolizam PAOs, povezano s iscrpljivanjem unutarstanično pohranjenog PHB jer PHB nije analitički određivan.

4.5. BILANCA UKLANAJNJA P U ANOKSIČNO/AEROBNOM PROCESU

Metabolizam PAOs se opisuje kao ciklički proces pohrane i potrošnje PHA, glikogena i poliP.

PAOs energiju koriste za rast i za provedbu i održavanje svojih ciklusa, pa metabolizam PAOs zahtijeva više energije od heterotrofnih vrsta. U procesu BPR anaerobna faza u kojoj PAOs koriste KPK (PHA) se navodi kao ključna u održavanju PAOs (Seviour i McIlroy, 2008; Harper i sur., 2006; Mullan i sur., 2006; Pijuan i sur., 2005; van Loosdrecht i sur., 1997).

U procesu anoksično/aerobnog uklanjanja P (Slike 9-13), tijekom 2 sata anoksičnog procesa izvor ugljika (natrijev acetat) je korišten od strane PAOs i pohranjivan kao rezervna tvar u stanice, a u aerobnom dijelu procesa pulsno su dodani PO_4-P i NH_4-N u omjeru N/P 1, te je motrena aktivnost PAOs za uklanjanje P, odnosno učinak različite koncentracije natrijeva acetata kao jedinog izvora ugljika na metabolizam PAOs.

U anoksičnom dijelu procesa dolazi do smanjenja koncentracije KPK (unos organskih sastojaka i unutarstanično pohranjivanje u obliku PHB) i kako se navodi u literaturi otpuštanje PO_4-P (Seviour i McIlroy, 2008), što se nije zbivalo tijekom anoksične faze u ovim pokusima, a što se

može tumačiti negativnim učinkom NO_3-N na PAOs, koji je na početku anaerobne faze procesa iznosio 2>NO_3-N>1 mg/L a u literaturi se navodi da mora biti u anaerobnim uvjetima NO_3-N < 1 mg/L da bi se zbivalo otpuštanje PO_4-P (Barker i Dold, 1996).
Vrijednost neto unosa P u stanice PAOs je izračunata kao omjer razlike PO_4-P na početku i kraju procesa i ukupne organske suspendirane tvari, izraženo kao mgPO_4-P/gVSS.

Iz bilance P, neto unos PO_4-P je 4,86 mgPO_4-P/gVSS (C/P 10) a 3,61 mgP/gVSS (C/P 1), što ukazuje da je pri većem omjeru C/P bolji unos PO_4-P u aerobnom dijelu kao i najbolje iskorištenje KPK u anoksičnom dijelu (unos KPK u PAOs), Slike 9-13.

Također, u svim pokusima anoksično/aerobnog uklanjanja P u bilanci N je zapaženo da nedostaje N, u pokusu pri C/P 10 nedostaje cca 30% N, što ukazuje na istovremeno uklanjanje N provođenjem SND (aerobna denitrifikacija), Slike 9-13.

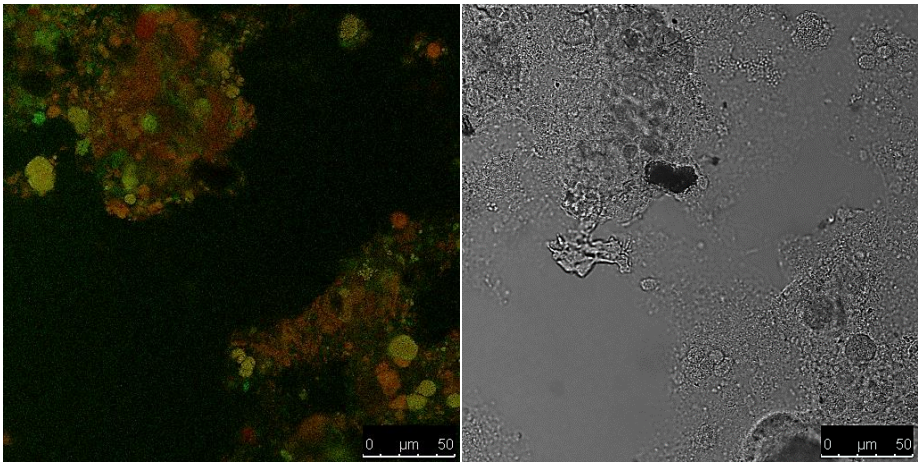
U definiranju potrebe KPK za uklanjanje P, pri omjeru C/P 10, odnosno KPK/P 23, iz razlike KPK utrošenog pri anoksičnim uvjetima kao i količine ukupno uklonjenog PO_4-P u aerobnim uvjetima, proizlazi potreba na KPK u količini 8,35mgKPK/mgPO_4-P za ostvarenu učinkovitost 51,9% uklanjanja P pri početnoj koncentraciji 30 mg PO_4-P/L (Slika 13).

4.6. FISH ANALIZA MIKROBNE POPULACIJE IZ PROCESA ANOKSIČNO/AEROBNOG UKLANJANJA P

Aktivni mulj predstavlja kompleksnu i visoko varijabilnu mješavinu različitih vrsta mikroorganizama. U svrhu razumijevanja raznolikosti bakterija, njihove uloge u aktivnom mulju, zastupljenosti i prostorne raspodjele u aktivnom mulju, koriste se različite molekularne tehnike s ciljem identifikacije i kvantifikacije određenih skupina bakterija.

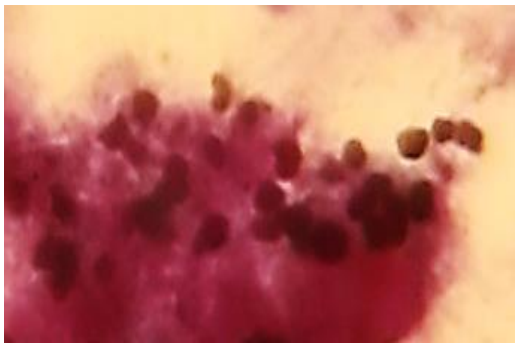
Primjenom FISH metode (Amann, 1995), koja je pogodna za analizu aktivnog mulja jer se većina stanica može lako detektirati pomoću proba, provedena je karakterizacija mikrobne populacije u uzorcima iz anoksično/aerobnog procesa uklanjanja P.

Korištene su probe EUBmix za detekciju svih bakterija (Daims i sur., 1999; Amann i sur., 1990), i PAOmix probe za detekciju *Accumulibacter* (Crocetti i sur, 2000), jer je zabilježeno aerobno uklanjanje P. Na CLSM mikrografima dokazana je prisutnost PAOs vezanih PAOmix probama (Slika 14).



Slika 14. CLSM aktivnog mulja hibridiziranog sa Cy3 označenim PAOmix probama i Cy5 označenim EUBmix probama. PAOs su prikazani crveno, sve bakterije zeleno

Budući da PAOs vrste karakterizira nagomilavanje PO_4-P unutar njihovih stanica, uzorci mulja uzeti iz procesa anoksično/aerobnog uklanjanja P, na kraju aerobne faze, bojani su metodom po Neisseru za dokazivanje polifosfata (Eikelboom i van Buijsen, 1983). Nagomilani poliP u mikrobnim stanicama prikazan je slikom 15.



Slika 15. Aktivni mulj obojan po Neisseru za dokazivanja poliP, povećanje 400x

5. ZAKLJUČCI

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

1. Anoksično/aeroban EBPR proces je rezultirao istovremenim uklanjanjem C, N i P, uz režim vođenja 2 h anoksičnih uvjeta (pohranjivanje PHA unutarstanično u PAOs) i u slijedu aerobni uvjeti (aktivnost PAOs – unos P i pohranjivanje u PAOs u obliku poliP; aktivnost NI/DNI – provođenje SND i aktivnost OHO – uklanjanje KPK preostalog nakon anoksične faze u pokusima pri C/P≥3).
2. U anoksičnim uvjetima smanjivala se koncentracija organskih sastojaka kao rezultat unosa i pohrane u PAOs kao rezervne tvari PHA, ali nije se otpuštao PO_4-P u vodeni medij iz PAOs jer je bilo prisutnog 2>NO_3-N>1 mg/L a koji u koncentraciji NO_3-N≥1 mg/L djeluje inhibirajuće na otpuštanje PO_4-P iz PAOs u anaerobnim uvjetima.
3. U aerobnim uvjetima procesa PAOs vrste su pokazale najveći afinitet prema raspoloživom kisiku i dominantnost u aktivnosti, a potom OHO i NI/DNI vrste.
4. Rastom omjera C/P (iz natrijeva acetata) raste unos C u anoksičnom dijelu procesa i P u aerobnom dijelu procesa. Iz bilance P, neto unos PO_4-P je 4,86 mgPO_4-P/gVSS (pri C/P 10) a 3,61 mgP/gVSS (pri C/P 1)
5. Određena je potreba na KPK za unos P u količini 8,35 mgKPK/mgPO_4-P za ostvarenu učinkovitost 51,9% uklanjanja P pri početnom PO_4-P 30 mg/L
6. Primjenom FISH metode u aktivnom mulju dokazan je mikrobni klaster za uklanjanje P (PAOs) ciljano obojan odgovarajućim probama za vizualizaciju i dokumentiranje primjenom CLSM
7. Dokazan je unutarstanično pohranjen poliP

6. LITERATURA

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. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (7), 2257-2270.

Amann, R.I. (1995) Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Mol. Ecol.* **4**, 543-554.

Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Dewereux, R., Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919-1925.

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

APHA (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition.

Barker, P.S., Dold, P.L. (1996) Denitrification behaviour in biological excess phosphorus removal activated sludge systems. *Water Res.* **30**, 769-780.

Bassin, J.P., Winkler, M.K.H., Kleerebezem, R., Dezotti, M., van Loosdrecht, M.C.M. (2012) Improved phosphate removal by selective sludge discharge in aerobic granular sludge reactors. *Biotechnol. Bioeng.* **109** (8), 1919-1928.

Beun, J.J., Paletta, F., van Loosdrecht, M.C.M. (2001) N removal in a granular sludge sequencing batch airlift reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 82-92.

Blackall, L.L., Seviour, E.M., Bradford, D., Rossetti, S., Tandoi, V., Seviour, R.J. (2000) Candidatus Nostocoida limicola, a filamentous bacterium from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 703-709.

Blackall, L.L., Seviour, E.M., Cunningham, M.A., Seviour, R.J., Hugenholtz, P. (1995) “Microthrix parvicella” is a novel, deep branching member of the actinomycetes subphylum. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 513-518.

Brdjanovic, D., Logemann, S., van Loosdrecht, M.C.M., Hooijmans, C.M., Alaerts, G.J., Heijnen, J.J. (1998a) Influence of temperature on biological phosphorus removal: process and molecular ecological studies. *Water Res.* **32** (4), 1035-1048.

Brdjanovic D, Slamet A, van Loosdrecht MCM, Hooijmans CM, Alaerts GJ, Heijnen JJ. (1998b) Impact of excessive aeration on biological phosphorus removal from wastewater. *Water Res.* **32**, 200-208.

Broughton, A., Pratt, S., Shilton, A. (2008) Enhanced biological phosphorus removal for high-strength wastewater with a low rbCOD:P ratio. *Bioresource Technol.* **99**, 1236-1241.

Cai, T.M., Guan, L.B., Chen, L.W., Cai, S., Li, X.D., Cui, Z.L., Li, S.P. (2007) Enhanced biological phosphorus removal with *Pseudomonad putida* GM6 from activated sludge. *Pedosphere* **17** (5), 624-629.

Carvalheira, M., Oehmen, A., Carvalho, G., Reis, M.A.M. (2014) The effect of substrate competition on the metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water Res.* **64**, 149-159.

Carvalho, G., Lemos, P.C., Oehmen, A., Reis, M.A.M. (2007) Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Res*. **41**(19), 4383–4396.

Casellas, M., Dagot, C., Baudu, M. (2006) Set up and assessment of a control strategy in a SBR in order to enhance nitrogen and phosphorus removal. *Process Biochem.* **41**, 1994-2001.

Casey, T.G., Wentzel, M.C., Loewenthal, R.E., Ekama, G.A., Marais, G.V.R. (1992) A hypothesis for the cause of low F/M filament bulking in nutrient removal activated sludge systems. *Water Res.* **26** (6), 867-869.

Casey, T.G., Wentzel, M.C., Loewenthal, R.E., Ekama, G.A., Marais, G.V.R. (1994) A hypothesis for the causes and control of anoxic-aerobic (AA) filament bulking in nutrient removal activated sludge systems. *Water Sci. Technol.* **29** (7), 203-212.

Cech, J.S., Hartman, P., Wanner, J. (1993) Competition between polyP and non-polyP bacteria in an enhanced phosphate removal system. *Water Environ. Res*. **65** (5), 690–692.

Chiou, R.-J., Yang, Y.-R. (2007) An evaluation of the phosphorus storage capacity of an anaerobic/aerobic sequential batch biofilm reactor. *Bioresource Technol.*, **99** (10) doi: 10.1016/j.biortech.2007.08.038.

Coma, M., Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P.L. (2012) Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresource Technol.* **103** (1), 101-108.

Cordell, D., Drangert, J., White, S. (2009) The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global Environ. Chang.* **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. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1175-1182.

Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB388 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 434-444.

de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2005) Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnol. Bioeng.* **90** (6), 761-769.

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

Erdal, U.G., Erdal, Z.K., Randall, C.W. (2003) The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance. *Water Sci. Technol.* **47**, 1-8.

Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R.J., Amann, R., Blackall, L.L. (1997) Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of *Microthrix parvicella* in activated sludge. Syst. *Appl. Microbiol.* **20**, 310-318.

Filipe, C.D.M., Daigger, G.T., Grady, C.P.L. (2001) pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms. *Water Environ. Res.* **73** (2), 223-232.

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. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 583-588

Freitas, F., Temudo, M., Reis, M.A. (2005) Microbial population response to changes of the operating conditions in a dynamic nutrient-removal sequencing batch reactor. Bioproc. *Biosyst. Eng.* **28**, 199-209.

Freitas, F. (2004) Remoçãobiológica de carbono, azoto e fósforopelaaplicação de cicloscurtos de arejamentonum reactor descontı´nuosequencial, PhD Thesis, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

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 Technol.* **100**, 1969-1976.

Gao, D.W., Peng, Y.Z., Li, B., Liang, H. (2009) Shortcut nitrification-denitrification by real-time control strategies. *Bioresource Technol.* **100**, 2298-2300.

Garrido, J.M., van Benthum, W.A.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1997) Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 168-178.

Gonzalez-Gil, G., Holliger, C. (2011) Dynamics of microbial community structure of and enhanced biological phosphorus removal by aerobic granules cultivated on propionate or acetate. *Appl. Environ. Microbiol.* **77** (22), 8041-8051

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

Harper, J.R., Willie, F., Anise, O., Brown, E. (2006) Polyphosphate buffering by biomass with different phosphorus contents. *Water Res.* **40**, 1599-1606.

He, S., Bishop F.I., McMahon K.D., (2010) Bacterial community and "*Candidatus Accumulibacter*" population dynamics in laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** (16), 5479-5487.

He, S., Gall, D.L., McMahon, K.D. (2007) *Candidatus Accumulibacter* population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** (18), 5865-5874.

Henze, M., Kristensen, G.H., Strube, R. (1994) Rate-capacity characterization of wastewater for nutrient removal processes. *Water Sci. Technol.* **29**, 101-102.

Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdjanovic, D. (2008) Biological wastewater treatment. IWA Publishing London. ISBN: 1843391880.

Hirota, R., Kuroda, A., Kato, J., Ohtake, H. (2010) Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. *J. Biosci. Bioeng*. **109**, 423-432.

Hu, Z.R., Wentzel, M.C., Ekama, G.A. (2002) Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. *Water Res.* **36**, 4927-4937.

Janssen, P.M.J., Meinema, K., van der Roest, H.F. (2002) Biological Phosphorus Removal – Manual for Design and Operation. IWA Publishing, London.

Jiang, T., He, J., Yang, X., Li, J. (2015) Effects of COD to phosphorus ratios on the metabolism of PAOs in Enhanced biological phosphorus removal with different carbon sources. *J. Harbin Inst. Tech*. **22** (4), 87-91.

Kerrn Jespersen, J. P., Henze, M. (1993) Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Res.* **27** (4), 617-624.

Kim, H., Pagilla, K.R. (2000) Competitive growth of Nocardia and Acinetobacter under anaerobic/aerobic batch operation. *Water Res.* **34**, 2667-2674.

Kuba, T., Wachameister, A., van Loosdrecht, M.C.M. (1994) Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal system. *Water Sci. Technol.* 30 (6), 263-269.

Lee, D.S., Jeon, C.O., Park, J.M. (2001) Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system. *Water Res.* **35**, 3968-3976.

Li, H., Chen, Y., Gu, G. (2008) The effect of propionic to acetic acid ratio on anaerobic-aerobic (low dissolved oxygen) biological phosphorus and nitrogen removal. *Bioresource Technol.* **99**, 4400-4407.

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 sRB activated sludge process. *Water Res.* **37**, 2944-2952.

Liu, Y., Shi, H., Xia, L., Shi, H., Shen, T., Wang, Z., Wang, G., Wang, Y. (2010) Study of operational conditions of simultaneous nitrification and denitrification in a Carrousel oxidation ditch for domestic wastewater treatment. *Bioresource Technol.* **101**, 901-906.

Lopez-Vazquez, C.M., Oehmen, A., Hooijmans, C.M., Brdjanovic, D., Gijzen, H.J., Yuan, Z.G., van Loosdrecht, M.C.M. (2009) Modeling the PAO–GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature. *Water Res.* **43** (2), 450-462

Lv, X.M., Shao, M.F., Li, C.L., Li, J., Xia, X., Liu, D.Y. (2014) Bacterial diversity and community structure of denitrifying phosphorus removal sludge in strict anaerobic/anoxic systems operated with different carbon sources. *J. Chem. Technol. Biot.* **89** (12), 1842-1849

McIlroy, S., Seviour, R.J. (2009) Elucidating further phylogenetic diversity among the Defluviicoccus-related glycogen-accumulating organisms in activated sludge. *Environ. Microbiol. Rep.* **1** (6), 563-568.

Meinhold, J., Filipe, C.D.M., Daigger, G.T., Isaacs, S. (1999) Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological phosphate removal. *Water Sci. Technol.* **39** (1), 31-42.

Metcalf & Eddy (2003) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 4th Ed, McGraw Hill Inc., New York, NY.

Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T. (1994) Metabolisms of different bacterial populations in enhanced biological phosphorus removal processes. *Water Sci. Technol.* **29** (7), 67-70.

Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* **32**, 3139-3207.

Mullan, A., Mcgrath, J.W., Adamson, T., Irwin, S., Quinn, J.P. (2006) Pilot-Scale evaluation of the application of low pH-inducible polyphosphate accumulation to the biological removal of phosphate from wastewaters. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 296-301.

Nittami, T., Hiroshi, O.I., Kanji M., Seviour, R.J. (2011) Influence of temperature, pH and dissolved oxygen concentration on enhanced biological phosphorus removal under strictly aerobic conditions *New Biotechnol.* **29** (1), 2-8.

Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z.G., Keller, J., Blackall, L.L., Reis, M.A.M. (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res.* **41** (11), 2271-2300.

Oehmen, A., Teresa,V. M., Lu, H., Yuan, Z., Keller, J. (2005a) The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water res.* **39**. 3727-37. doi: 10.1016/j.watres.2005.06.031.

Oehmen, A., Yuan, Z.G., Blackall, L.L., Keller, J. (2005b) Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **91** (2), 162-168.

Ong, Y.H., Chua, A.S.M., Lee, B.P., Ngoh, G.C. (2013) Long-term performance evaluation of EBPR process in tropical climate: start-up, process stability, and the effect of operational pH and influent C:P ratio. *Water Sci. Technol.* **67** (2), 340-346.

Panswad, T., Doungchai, A., Anotai, J. (2003) Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system. *Water Res.* **37**, 409-415.

Parés, R., Juárez, A. (1997) Bioquimica de los microorganismos. 1st ed. Editorial Reverté, Barcelona.

Peterson, S.B., Warnecke, F., Madejska, J., McMahon, K.D., Hugenholtz, P. (2008) Environmental distribution and population biology of Candidatus Accumulibacter, a primary agent of biological phosphorus removal. *Environ. Microbiol.* **10** (10), 2692-2703.

Pijuan, M., Baeza, J.A., Casas, C., Lafuente, J. (2004) Response of an EBPR population developed in an SBR with propionate to different carbon sources. *Water Sci. Technol.* **50** (10), 131-138.

Pijuan, M., Giusasola, A., Baeza, J.A., Carrera, J., Casas, C., Lafuente, J. (2005) Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake: Influence of PAO intracellular storage compounds. *Biochem. Eng. J.* ***26***, 184-190.

Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013) *Narodne novine* **80**, Zagreb

Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2016) *Narodne Novine* **3**, Zagreb

Puig, S., Corominas, L., Vives, M.T., Balaguer, M.D., Colprim, J. Colomer, J. (2005) Development and implementation of a real-time control system for nitrogen removal using OUR and ORP as end points. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**, 3367-3373.

Schuler, A.J., Jenkins, D.(2002) Effects of pH on enhanced biological phosphorus removal metabolisms. *Water Sci. Technol.* **46** (4-5), 171-178.

Seviour, R.J., McIlroy, S. (2008) The microbiology of phosphorus removal in activated sludge process – the current state of play. *J. Microbiol.* **46**, 115-124.

Simpkins, M.J., Mclaren, A.R. (1978) Consistent biological phosphate and nitrate removal in an activated sludge plant. *Progr. Water Tech.* **10** (56), 433-442.

Smolders, G.J., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 461-470.

Tarayre, C., Nguyen, H.T., Brognaux, A., Delepierre, A., Clercq, L., D., Charlier, R., Michels, E., Meers, E., Delvigne, F. (2016) Characterisation of Phosphate Accumulating Organisms and Techniques for Polyphosphate Detection: A Review, doi: 10.3390/s16060797, Objavljeno: 31. svibanj 2016

Taya, C., Guisasola, A., Baeza, J. (2011). Assessment of a bioaugmentation strategy with polyphosphate accumulating organisms in a nitrification/denitrification sequencing batch reactor. *Bioresour. Technol.* **102**. 10.1016/j.biortech.2011.05.041Tu YJ

Vadivelu, V.M., Yuan, Z.G., Fux, C., Keller, J. (2006) The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched nitrobacter culture. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4442-4448.

van Loosdrecht, M.C.M., Smolders, G.J., Kuba. T., Heijnen, J.J. (1997) Metabolism of microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Anthonie van Leewenhock* **71**, 109-116.

van Niel, E.W.J., Appeldoorn, K.J., Zehnder, A.J.B., Kortstee, G.J.J. (1998) Inhibition of anaerobic phosphate release by nitric oxide in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2925-2930.

von Munch, E., Lant, P., Keller, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* **30**, 277-284.

Wang, D.B., Li, X.M., Yang, Q., Zeng, G.M., Liao, D.X., Zhang, J. (2008) Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. *Bioresour. Technol.* **99**, 5466-5473.

Ward, B.B., Arp, D.J., Klotz, M.G. (2011) Nitrification. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Whang, L.M., Park, J.K. (2002) Competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in biological phosphorus removal systems - effect of temperature. *Wat. Sci. Technol.* **46**, 191-194.

Xue, B., Dai, X.C., Xu, Y.T.(2007) Cause and pre-alarm control of bulking and foaming by *Microthrix parvicella* – a case study in triple oxidation ditch at a wastewater treatment plant. *J. Hazard. Mater.* **143**, 184-191.

Zeng, R. J., Saunders, A.M., Yuan, Z., Blackall, L.L., Keller, J. (2003) Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **83** (2), 140-148.

Zeng, W., Li, B., Yang, Y., Wang, X., Li, L., Peng, Y. (2013) Impact of nitrite on aerobic phosphorus uptake by poly-phosphate accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal sludges. *Bioprocess Biosyst. Eng*. **23**, 1-11.

Zeng, W., Zhang, Y., Li, L., Peng, Y.Z., Wang, S.Y. (2009) Control and optimization of nitrifying communities for nitritation from domestic wastewater at room temperatures. *Enzyme Microb. Technol.* **45**, 226-232.

Zhou, Y., Pijuan, M., Yuan, Z.G. (2007) Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms. Biotechnol. Bioeng. 98, 903-912.

Zhu, G.B., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S. (2008) Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **192**, 159-195.