

Utjecaj koncentracije natrijeva acetata na metabolizam organizama koji akumuliraju polifosfat

Mrkonjić, Valerija

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:159:883023>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Valerija Mrkonjić

957/BPI

Utjecaj koncentracije natrijeva acetata
na metabolizam organizama koji
akumuliraju polifosfat

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vode na Zavodu za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Josipa Čurka, Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć prof. dr. sc. Marina Matošića i Vlade Crnka, mag. ing.

Veliko hvala mami, tati, bratu i sestri, na svim godinama podrške i strpljenja tijekom mog studiranja. Mami za mnogobrojne molitve koje je izmolila tijekom mog studiranja i utjehu nakon nepoloženih ispita, tati za financijsku podršku i riječi ohrabrenja kada su bile najviše potrebne. Sestri i dečku za slušanje svih problema tijekom studiranja, a bratu za vjerovanje u mene u svakom trenutku.

Ovaj diplomski rad posvećujem upravo vama, jer bez vas on ne bi bio moguć.

Hvala i mom mentoru, doc. dr. sc. Josipu Ćurku, komentoru, prof. dr. sc. Marinu Matošiću i asistentu, mag. ing. Vladi Crneku, na ukazanom povjerenju i za sve stručne savjete i pomoć prilikom izrade diplomskog rada. Bilo je lijepo učiti od vas i surađivati s vama..

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju vode

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

UTJECAJ KONCENTRACIJE NATRIJEVA ACETATA NA METABOLIZAM ORGANIZAMA KOJI AKUMULIRAJU POLIFOSFAT

Valerija Mrkonjić, 957/BPI

Sažetak: *U ovom radu ispitivan utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata na metabolizam organizama koji akumuliraju polifosfat (PAO) uzgojem na sintetičkoj otpadnoj vodi u SBR uređaju. Uvjeti rada u SBR uređaju prilagođeni su rastu PAO-a (prosječno $t=15^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8,4$) te je SBR uređaj radio u ciklusima od 6 h s izmjenom aerobne i anaerobne faze. Tijekom pokusa napravljeno je devet testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a različitim koncentracijama natrijeva acetata izraženim kao KPK vrijednost. Visoke koncentracija natrijeva acetata pokazuju utjecaj na metabolizam PAO-a i promjenu metabolizma u asimilaciju natrijeva acetata za aerobni rast uz smanjenje pohrane fosfata, što uzrokuje smanjenje asimilacije fosfora tijekom obrade otpadne vode.*

Gljučne riječi: *fosfor akumulirajući organizmi (PAO), natrijev acetat, inhibicija, fosfor*

Rad sadrži: 51 stranica, 18 slika, 5 tablica, 41 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Josip Ćurko

Pomoć pri izradi: prof. dr.sc. Marin Matošić, Vlado Crnek, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Marin Matošić
2. doc. dr. sc. Josip Ćurko
3. prof. dr. Sc. Tibela Landeka Dragičević

Datum obrane: 19. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Graduate Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department for Food Engineering

Laboratory for Water Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

IMPACT OF SODIUM ACETATE CONCENTRATION ON THE METABOLISM OF POLY- PHOSPHATE ACCUMULATING ORGANISMS

Valerija Mrkonjić, 957/BPI

Abstract: *The aim of this study was to investigate the impact of sodium acetate concentration on the metabolism of poly-phosphate accumulating organisms (PAO) during the enhanced biological phosphorus removal (EBPR) treatment of synthetic wastewater in a laboratory SBR. Conditions in the SBR were adjusted to promote the growth of PAO (average $t=15^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8.4$) and the SBR worked in 6 h treatment aerobic/anaerobic cycles to ensure the most efficient EBPR. During the experiment, nine biological activity inhibition testing's were carried out, with different concentrations of sodium acetate, the only carbon source in the SBR and expressed as COD values. The results show the impact of high sodium acetate concentration on the metabolism of PAO and the shift in PAO metabolism to mostly accumulating sodium acetate, which lowers the accumulation of phosphorus during the wastewater treatment process.*

Keywords: *poly-phosphate accumulating microorganisms (PAO), sodium acetate, inhibition, phosphorus*

Thesis contains: 51 pages, 18 figures, 5 tables, 41 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Josip Ćurko, Assistant professor

Technical support and assistance: PhD. Marin Matošić, Vlado Crnek, mag. eng.

Reviewers:

1. PhD. Marin Matošić, Full professor
2. PhD. Josip Ćurko, Assistant professor
3. PhD. Tibela Landeka Dragičević, Full professor

Thesis defended: 19 July 2018

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. VRSTE I SASTAV OTPADNIH VODA	3
2.2. BIOLOŠKE METODE OBRADNE OTPADNIH VODA.....	4
2.3. NAPREDNO BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA (EBPR).....	7
2.3.1. Utjecaj pH na učinkovitost EBPR procesa	8
2.3.2. Utjecaj temperature na učinkovitost EBPR procesa.....	9
2.3.3. Utjecaj izvora ugljika na učinkovitost EBPR procesa	9
2.3.4. Utjecaj spojeva dušika na učinkovitost EBPR procesa	10
2.4. ORGANIZMI KOJI AKUMULIRAJU POLIFOSFAT (PAO).....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. OBRADA OTPADNE VODE U LABORATORIJSKOM SBR – UREĐAJU.....	15
3.2. KARAKTERISTIKE I SASTAV SINTETIČKE OTPADNE VODE.....	19
3.3. ODREĐIVANJE UKUPNE SUSPENDIRANE TVARI (TSS), UKUPNE ORGANSKE SUSPENDIRANE TVARI (VSS) I ANORGANSKE SUSPENDIRANE TVARI (ISS).....	20
3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNOG I OTOPLJENOG FOSFORA	22
3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE AMONIJAKA.....	23
3.7. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE UKUPNOG DUŠIKA	23
3.8. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE NITRATA.....	24
3.8. ODREĐIVANJE pH-VRIJEDNOSTI	24
3.9. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE OTOPLJENOG KISIKA	25
3.10. ODREĐIVANJE I REGULIRANJE TEMPERATURE	25
3.11. ODREĐIVANJE MAKSIMALNE BRZINE ANAEROBNOG OTPUŠTANJA FOSFORA, MAKSIMALNE SPECIFIČNE BRZINE ASIMILACIJE KPK I MAKSIMALNE SPECIFIČNE BRZINE AEROBNOG UKLANJANJA FOSFORA	26
3.12. PROUČAVANJE UZORAKA AKTIVNOG MULJA OD MIKROSKOPOM	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.2. ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI PAO-A MIKROSKOPIRANJEM	38
4.3. REZULTATI TESTIRANJA INHIBICIJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI PAOA	39
5. ZAKLJUČCI	47
6. LITERATURA	48

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Valerija Mrkonjić

1. UVOD

Ekološka održivost jedno je od najvažnijih pitanja 21. stoljeća, u kojem čovjek postaje svjestan iskoristivosti prirodnih bogatstava i važnosti očuvanja istih, te počinje brinuti o zaštiti okoliša i vodenih sustava. Jedno od najvažnijih prirodnih bogatstava svakako je voda jer je njen značaj za ljudski organizam i okoliš nezamjenjiv, a potreba za vodom neophodna. Svakodnevnim korištenjem vode, uzete iz prirode, dolazi do promjene njenog kemijskog, fizikalnog i biološkog sastava. Otpadna voda se obogaćuje organskim spojevima, dušikom i fosforom, te njenim ispuštanjem u prirodne vodotokove dolazi i do promjene prirodnih vodenih sustava. Ove promjene narušavaju vodeni eko – sustav, djeluju negativno na organizme prisutne u vodi, ali i na samog čovjeka koji dolazi s njom u dodir. Najvidljivija promjena koja se događa u vodenim sustavima je eutrofikacija koja nastaje kao posljedica prekomjernog rasta algi i biljaka, te dovodi do tzv. cvjetanja mora, a nastaje ponajviše kao posljedica visoke koncentracije fosfora u vodi. Zbog toga je neophodno vodu, koja se upotrebljava u svakodnevnom životu i industriji, skupiti i pročistiti prije ponovnog vraćanja u prirodu.

Potaknuti ovim problemima, znanstvenici istražuju metode i mogućnosti obrade otpadnih voda, koji bi osiguravali odgovarajuću obradu uz visoku učinkovitost i niske troškove odvijanja procesa s ciljem dobivanja vode koja se, po svom sastavu, minimalno razlikuje od vode koju smo uzeli iz prirode. Metode obrade otpadnih voda mogu biti fizikalne, kemijske i biološke metode, pri čemu je najčešće korištena metoda biološke obrade otpadnih voda aktivnim muljem.

Biološke metode obrade vode uključivale su na početku samo uklanjanje organskih tvari, no kako zakonske regulative i propisi postaju sve stroži te zahtijevaju sve višu kakvoću dobivene vode, razvijene su i metode uklanjanja dušika i fosfora, odnosno različiti stupnjevi pročišćavanja otpadnih voda. Fosfor je ključni nutrijent koji stimulira rast algi i ostalih fotosintetskih mikroorganizama (npr. cijanobakterije) te ga je potrebno uklanjati iz vode, radi sprječavanja eutrofikacije vodenih sustava (Oehmen i sur., 2007). Visoka koncentracija fosfora može dovesti do poskupljenja postupaka pročišćavanja otpadnih voda, redukcije biološke raznolikosti, cvjetanja algi, i posljedično negativnog utjecaja na ljude i životinje, koji tu vodu koriste (Mullan i sur., 2006).

Najčešće korištena metoda uklanjanja fosfora, zbog svoje cijene i učinkovitosti, je napredna biološka metoda uklanjanja fosfora, u kojoj fosfor uklanjaju mikroorganizmi koji

akumuliraju polifosfat. Iako metoda zadovoljava uvjete ekološke i ekonomske održivosti, još uvijek nije do kraja istražena biološka aktivnosti organizama koji akumuliraju polifosfat, te njihova osjetljivost na visoke koncentracije organskog opterećenja.

U ovom rad istraživao se utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata, kao jedinog izvora ugljika, na metabolizam organizama koji akumuliraju polifosfat (PAO). U tu svrhu proveden je pokus obrade sintetičke otpadne vode u laboratorijskom SBR – uređaju gdje je testirana biološka aktivnosti PAO-a pri različitim koncentracijama natrijeva acetata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Vrste i sastav otpadnih voda

Otpadne vode se, s obzirom na podrijetlo, dijele na: kućanske, industrijske otpadne vode, otpadne vode stočnih uzgajališta i otpadne vode odlagališta otpada. Osim po podrijetlu, navedene otpadne vode, se razlikuju i prema svom sastavu, pa tako kućanske otpadne vode sadrže otpatke iz kućanstva, uključujući fekalije i vodu od pranja. Industrijske otpadne vode nastaju različitim tehnološkim i pomoćnim procesima u industriji i mogu se dalje dijeliti na otpadne vode koje potječu iz prehrambene i fermentativne industrije, koji sadrže biološki lako razgradive sastojke, te na otpadne vode koje potječu iz kemijske, farmaceutske i celulozne industrije, koje sadrže biološki teško razgradive sastojke. Otpadne vode stočnih uzgajališta većinom sadrže biorazgradive sastojke, a najčešće potječu s farmi svinja, goveda, peradi i drugih životinja. Otpadne vode odlagališta otpada nazivaju se još i „prokapne otpadne vode“ i sadrže visoke koncentracije različitih biološki teško razgradivih sastojaka. Osim navedenih, postoje još i vode koje se mogu uvjetno nazvati otpadnim vodama, a one podrazumijevaju: oborinske vode (padaline) i rashladne vode. Oborinske vode sadrže onečišćenja iz atmosfere i zemljišta, a rashladne vode se upotrebljavaju u industriji za hlađenje postrojenja odnosno za odvodnju viška topline i u njima su prisutna tzv. toplinska onečišćenja.

Industrijske otpadne vode i kućanske otpadne vode sadrže velike količine onečišćenja organskog i anorganskog podrijetla (tablica 1), pa ih je potrebno obraditi i pročistiti prije ispuštanja u okoliš. Za razliku od njih, oborinske i rashladne vode se uglavnom mogu izravno ispuštati u vodene tokove jer ne sadrže značajne količine opasnih tvari (Matošić, 2015).

Tablica 1. Sastav otpadne vode (Henze i sur., 2002)

Spojevi	Od posebnog značaja	Učinak na okoliš
Mikroorganizmi	Patogene bakterije, virusi i jajašca crva	Rizik tijekom kupanja i konzumiranja školjaka
Biorazgradivi organski materijal	Trošenje kisika u rijekama, jezerima i fjordovima	Promjene života u vodi (manja raznolikost)

Ostali organski materijal	Deterdženti, pesticidi, masti, ulja, boje, otapala, fenoli, cijanidi	Toksičnost, loša estetika, bioakumulacija
Nutrijenti	Dušik, fosfor, amonijak	Eutrofikacija, trošenje kisika, toksičnost
Metali	Hg, Pb, Cd, Cr, Cu, Ni	Toksičnosti, bioakumulacija
Ostali anorganski materijal	Kiseline (npr. H ₂ SO ₄), lužine	Korozija, toksičnost
Termalni učinak	Vruća voda	Promjena uvjeta flore i faune
Miris (i okus)	H ₂ SO ₄	Loša estetika, toksičnost
Radioaktivnost		Toksičnost, akumulacija

2.2. Biološke metode obrade otpadnih voda

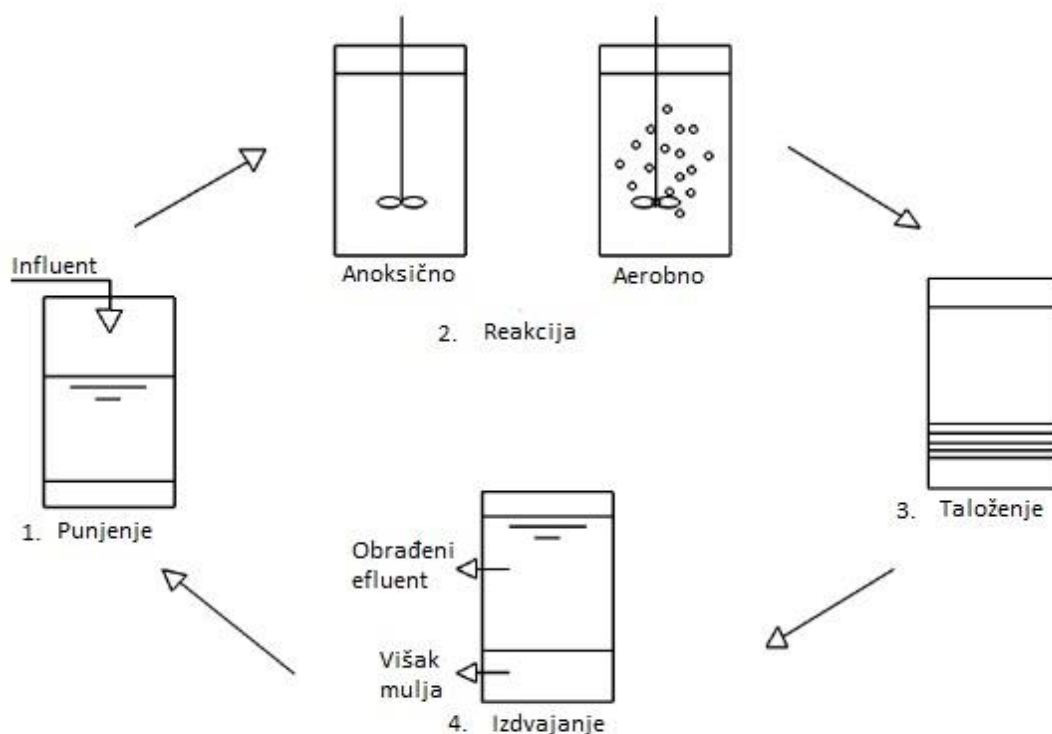
Svrha postupaka obrade otpadnih voda je uklanjanje onečišćujućih tvari koji bi, dospijevanjem u vodene tokove, mogli štetno utjecati na vodeni ekosustav. Niska koncentracija otopljenog kisika (engl. *dissolved oxygen* – DO) je jedan od faktora štetnog utjecaja, te se zbog toga iz vode uklanjaju spojevi koji uvjetuju rast mikroorganizama koji troše kisik i na taj način smanjuju njegovu koncentraciju u vodi. Većinom su to organski spojevi, a uz njih velik utjecaj ima i anorganski amonijak (NH₃-N). Zbog toga su prvi procesi obrade otpadnih voda bili dizajnirani za uklanjanje organskih spojeva, te se povremeno uz to provodila i oksidacija amonijaka do nitrata (NH₃-N → NO₃-N). S porastom industrijalizacije i broja stanovnika pojavili su se dodatni problemi, a najznačajniji među njima bila je eutrofikacija koja je posljedica prekomjernog rasta algi i biljaka (Grady i sur., 2011). Pojava značajnih eutrofikacija vodenih sustava potaknula je interes za uklanjanjem fosfora, jer su istraživanja utvrdila da je, u većini kopnenih voda, upravo fosfor limitirajući nutrijent (Vollenweider, 1968).

Uporaba aktivnog mulja najčešći je proces biološke obrade, kako kućanskih, tako i industrijskih otpadnih voda. Konfiguracije ovog procesa protežu se od malih uređaja za kućnu upotrebu, pa sve do velikih postrojenja namjenjenih obradi otpadnih voda velikih gradova. Aktivnim muljem nazivamo sve suspendirane tvari u bioreaktoru, uključujući žive i nežive mikroorganizme, organske i anorganske tvari (Matošić, 2015), a prvi znanstvenici koji su istraživali mogućnosti i potencijal aktivnog mulja u obradi otpadnih voda bili su Arden, E. i

Lockett, W. (1914). Njihovo je istraživanje potaknulo i druge znanstvenike, koji su potvrdili da su mikroorganizmi, prisutni u aktivnom mulju, ključni za proces obrade (Jenkins i Wanner, 2014). Bioreaktore za obradu otpadnih voda možemo podijeliti u dvije skupine ovisno o načinu rasta mikroorganizama: na reaktore u kojima su mikroorganizmi suspendirani u otopini i reaktori s mikroorganizma koji rastu na čvrstoj podlozi, u obliku biofilma.

CSTR (engl. *continuous stirred tank reactor*) je najjednostavniji mogući bioreaktor sa suspendiranim mikroorganizmima. To je reaktor s kontinuiranim miješanjem, koji se sastoji od dobro miješane posude u koju dotječe influent, bogat zagađivačima, a iz koje izlazi efluent koji sadrži mikroorganizme. Zbog dobre homogenizacije unutar reaktora, CSTR se još naziva i potpuno miješani reaktor. Povezivanje nekoliko CSTR uređaja u seriju omogućuje dodatnu fleksibilnost procesa, jer je moguće, ovisno o potrebama, prihranjivati samo jedan uređaj ili cijelu seriju (Grady i sur., 2011).

Šaržni reaktor je potpuno miješani reaktor bez kontinuiranog toka. U reaktor, koji sadrži odgovarajuću biomasu, dodaje se šarža otpadne vode za obradu i odvija se rast mikroorganizama. Na kraju procesa, obrađena šarža se izdvaja iz bioreaktora, te je on spreman za sljedeću šaržu (slika 1.)



Slika 1. Shematski prikaz procesa u SBR-u (Bribian i sur., 2018)

Šaržni reaktori mogu biti vrlo fleksibilni, te je privremenom promjenom elektron akceptora moguće postići uklanjanje pojedinih nutrijenata u reaktoru. S obzirom da se u ovom reaktoru odvija niz procesa, često se naziva i sekvencijski šaržni reaktor (engl. *sequencing batch reactor* – SBR) (Gardy i sur., 2011). Prednosti i mane ovog sustava su (Bribian i sur., 2018):

Prednosti:

- + Potrebna je mala površina
- + Visoka kvaliteta efluenta
- + U potpunosti automatiziran
- + Otporan na šok opterećenja i primjenjiv je za širok raspon organskog i hidrauličnog opterećenja

Mane:

- Zahtjeva kontinuirani dovod energije
- Visoko mehanizirana oprema (upravljačka ploča)
- Efluent i mulj mogu zahtijevati dodatnu obradu

Optimalan plug-flow reaktor (PFR) je onaj u kojem se elementi fluida kreću u istom redoslijedu u kojem ulaze u reaktor, bez međusobnog miješanja elemenata. Iz tog razloga se može reći da PFR sadrži bezbroj šaržnih kultura u pokretu, u kojem se promjene događaju u vremenu i prostoru. S obzirom da je u praksi teško postići optimalan PFR, on se aproksimira s određenim brojem CSTR-a, povezanih u seriju (Grady i sur., 2011).

Zajedničko svim ovim procesima je:

1. flokulirajuća suspenzija mikroorganizama koja se koristi za uklanjanje topljive organske tvari i čestica organske tvari iz influenta,
2. razdvajaju se tekuća i kruta faza radi uklanjanja suspendiranih krutina u mješavini vode i mulja (engl. *mixed liquor suspended solids* – MLSS) iz toka strujanja i proizvodnje efluenta s niskom koncentracijom suspendiranih tvari,
3. koncentrirane krutine iz tekuće-kruto separatora se ponovo koriste u bioreaktoru,
4. višak krutih tvari izdvaja se iz procesa kako bi se osiguralo odgovarajuća starost mulja (engl. *solids retention time* – SRT).

2.3. Napredno biološko uklanjanje fosfora (EBPR)

Napredno biološko uklanjanje fosfora (engl. *enhanced biological phosphorus removal* – EBPR) predstavlja mikrobnim proces uklanjanja visokih koncentracija fosfora, njegovom akumulacijom s biomasom i bez upotrebe kemijskih taložnih sredstava. U osnovi se ovaj proces sastoji od izmjenjivanja aerobne/anoksične i anaerobne faze kako bi se mulj obogatio organizmima koji akumuliraju polifosfat (engl. *poly-phosphate accumulating organisms* – PAO), bakterijama odgovornim za odvijanje EBPR procesa. Tijekom anaerobne faze procesa dolazi do asimilacije organske tvari i otpuštanja fosfora, a tijekom aerobne faze do asimilacije fosfora. Pri tome se fosfor akumulira u aktivnom mulju, te se iz sustava uklanja sedimentacijom, zajedno s aktivnim muljem. Za razliku od drugih mikroorganizama, PAO-i mogu koristiti hlapive masne kiseline (engl. *volatile fatty acids* – VFA) kao izvore ugljika u anaerobnim uvjetima i skladištiti ih intracelularno u obliku ugljikovih polimera, odnosno poli- β -hidroksi-alkanoata (PHA). Energija za ove biotransformacije uglavnom se osigurava razgradnjom polifosfata i otpuštanjem fosfata iz stanice, a energija redukcije, potrebna za sintezu PHA, većinski se proizvodi glikolizom intracelularno skladištenog glikogena (Mino i sur., 1998). Kod učinkovitog korištenja, EBPR sustav je relativno jeftina i ekološki održiva opcija za uklanjanje fosfora. Međutim, na stabilnost i pouzdanost EBPR sustava mogu utjecati: visoka količina padalina koja dolazi u sustav, visoka koncentracija nitrata u anaerobnom reaktoru, limitacija nutrijenata i mikrobna kompeticija između PAO-a i druge skupine mikroorganizama, poznate kao glikogen (nopolifosfatni) akumulirajući organizmi (engl. *glycogen accumulating organisms* - GAO). GAO skupina organizama natječe se s PAO-ima za anaerobnu asimilaciju hlapivih masnih kiselina (VFA), a pri tome ne pridonosi uklanjanju fosfora (Oehmen i sur., 2007). Zbog toga je potrebno kontrolirati PAO – GAO kompeticiju, kako bi se optimizirao EBPR proces. Oehmen i sur. (2007) istaknuli su da su temperatura, pH-vrijednost i izvor ugljika, važni faktori koji utječu na PAO – GAO kompeticiju, a to su potvrdili i Lopez – Vazquez i sur. (2009b).

Prednosti EBPR procesa, u usporedbi s kemijskim postupcima uklanjanja fosfora, prvenstveno su smanjena potreba za kemikalijama, a time i smanjeni operativni troškovi procesa. Osim toga, tijekom EBPR procesa nastaje manje mulja, te je proizvedeni mulj iskoristiviji u poljoprivredi, jer je fosfor, u ovom obliku, dostupniji biljkama (Janssen i sur., 2002).

Posljednjih godina razvijene su različite konfiguracije EBPR procesa te one često podrazumijevaju istovremeno uklanjanje dušika i fosfora (Urdalen, 2013). Noviji trend u EBPR

sustavima je upotreba membranskih biorekatora (MBR). Upotreba MBR-a ima prednosti u redukciji koncentracije suspendiranih čvrstih tvari u efluentu, što je posebno značajno u slučajevima kada su strogo zadani standardi kakvoće efluenta. Osim navedenih postupaka, postoje i konfiguracije sustava za uklanjanje fosfora, a povezane s istovremenom nitrifikacijom i denitrifikacijom (Oehmen i sur. 2007).

2.3.1. Utjecaj pH na učinkovitost EBPR procesa

pH-vrijednost ima jak utjecaj na PAO-GAO kompeticiju te brojna istraživanja pokazuju da viša pH-vrijednosti u aktivnom mulju, obogaćenom PAO-ima, povećava učinkovitost EBPR sustava. Smolders i sur. (1994a) pronašli su da se odnos anaerobnog otpuštanja fosfora i asimilacije acetata kreće linearno između 0,25 do 0,75 mol P (mol C)⁻¹, kada se pH povisi sa 5,5 na 8,5. Rezultat je objašnjen na način da, pod pretpostavkom da je pH unutar stanice konstantan, nastaje povećani pH gradijent, što rezultira i povećanjem razlike električnog potencijala duž stanične membrane te je zbog toga potrebno više energije za transport acetata kroz membranu. Veća potreba za energijom osigurava se povećanim otpuštanjem fosfora iz stanice. Nasuprot tome, istraživanja su pokazala i da se brzina asimilacije acetata kod GAO-a smanjuje s povećanjem pH-vrijednosti, a prati ju i povećanje anaerobne potrošnje glikogena i akumulacije poli-β-hidroksivalerata (PHV) (Filipe i sur., 2001a). Iz ovoga bi se moglo zaključiti da viša pH-vrijednost ne dovodi samo do povećanja energije potrebne za asimilaciju acetata kod PAO-a, nego i negativno djeluje na sposobnost asimilacije acetata kod GAO-a. Filipe i sur. (2001b) istraživali su PAO-GAO kompeticiju, uspoređujući brzinu asimilacije acetata kod PAO-a i GAO-a. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da GAO-i brže asimiliraju acetate pri pH < 7,25, dok PAO-i brže asimiliraju acetate pri pH > 7,5. Osim toga, pronašli su i da je potpuno uklanjanje fosfora moguće samo kada je minimalna pH-vrijednost ≥ 7,25. U nekim istraživanjima promatran je pad brzine asimilacije VFA, anaerobnog otpuštanja fosfora i aerobne asimilacije fosfora pri pH > 8. Stoga je bitno uzeti u obzir i maksimalnu pH-vrijednost tijekom EBPR procesa (Schuler i Jenkins, 2002; Liu i sur., 1996; Oehmen i sur., 2005).

2.3.2. Utjecaj temperature na učinkovitost EBPR procesa

Različiti autori dokazali su da smanjenje temperature može povećati učinkovitost EBPR procesa (Oehmen i sur., 2007). Jedno takvo istraživanje proveli su i Lopez – Vazquez i sur. (2009a), koji su istraživali utjecaj temperature na učinkovitost EBPR procesa. Zaključak njihovog rada jest da visoke temperature potiču rast GAO-a u odnosu na PAO-e. Ova pretpostavka dokazana je izvođenjem istog pokusa u dva reaktora, pri čemu je temperatura u jednom reaktoru iznosila 20 °C, a u drugom 30 °C. Tijekom istraživanja promatran je omjer otpuštanja P/asimilacija KPK. Proces uklanjanja fosfora bio je uspješniji pri temperaturi od 20 °C ($0,37 \pm 0,05 \text{ mol P (mol C)}^{-1}$), u odnosu na proces pri 30 °C ($0,22 \pm 0,08 \text{ mol P (mol C)}^{-1}$). Prema ovom istraživanju, GAO-i imaju sposobnost kompeticije s PAO-ima tek na temperaturama višim od 20°C te dobiveni rezultati ukazuju na smanjen utjecaj PAO-a na anaerobnu asimilaciju supstrata pri povišenoj temperaturi (30 °C).

2.3.3. Utjecaj izvora ugljika na učinkovitost EBPR procesa

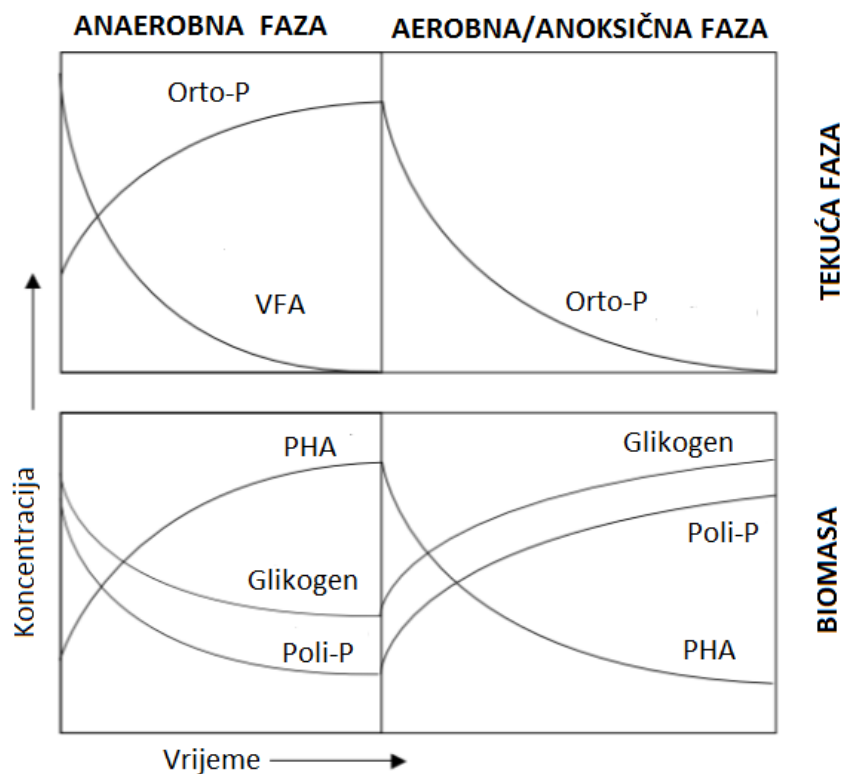
Vrsta izvora ugljika u otpadnoj vodi također je jedan od faktora koji utječu na kompeticiju između fosfat akumulirajućih organizama - PAO i glikogen akumulirajućih organizama - GAO, odnosno na učinkovitost EBPR sustava (Carvalheira i sur., 2014). Dvije kratkolančane kiseline, acetatna i propionska kiselina, najprisutnije su hlapive masne kiseline u otpadnim vodama kućanstva, a osim njih, u otpadnoj vodi prisutni su, ili nastaju predfermentacijom, i drugi izvori ugljika, kao npr. butirati i valerati (Oehmen, 2004). Lopez – Vazquez i sur. (2009b) razvili su metabolički model koji inkorporira acetate (HAc) i propionate (HPr), kao izvore ugljika, te su istraživali njihov utjecaj na PAO – GAO kompeticiju. Ovim modelom dokazano je da PAO-i prevladavaju kada se kultura simultano prehranjuje s HAc i HPr (75 % PAO – 25 % GAO, pri 50 – 50 % HAc – HPr), što je slučaj u većini realnih EBPR sustava. Na temperaturi od 20°C, simultano prihranjivanje HAc i HPr, trebalo bi poticati rast PAO-a, neovisno o pH-vrijednosti mulja, a u slučaju da se kao izvor ugljika koriste samo HAc ili HPr, pH-vrijednost bi trebala biti iznad 7,5 za poticanje rasta PAO-a.

2.3.4. Utjecaj spojeva dušika na učinkovitost EBPR procesa

Neke PAO vrste, zajedničkim imenom nazvani denitrificirajući PAO-i (engl. *denitrifying PAO* – DPAO) mogu oksidirati unutarstanični PHA, s nitratima i/ili nitritima kao krajnjim akceptorima elektrona i na taj način osigurati energiju za asimilaciju fosfora (Meinhold i sur., 1999; Ahn i sur., 2001; Zeng i sur., 2003). Iz toga proizlazi da se izvor ugljika, kojeg PAO-i asimiliraju tijekom anaerobne faze, koristi za denitrifikaciju, ali i za uklanjanje fosfora. Zhou i sur. (2007) proučavali su BNR (engl. *biological nutrient removal* – biološko uklanjanje nutrijenata) sustav u kojem je denitrifikacija prvenstveno provođena korištenjem DPAO. Prednost ovakvog sustava je to da zahtjeva minimalnu količinu organskog ugljika za biološko uklanjanje nutrijenata. Međutim, tijekom istraživanja uočeno je da je asimilacija fosfora značajno inhibirana prisutnošću visoke količine nitrita ($>40 \text{ mgN L}^{-1}$). Saito i sur. (2004) istraživali su inhibitorni učinak u EBPR sustavu, u kojem se nalazio mulj obogaćen PAO-ima, a jedini izvor ugljika bio je acetat. Uočili su da inhibitorni učinak nitrita na anoksičnu asimilaciju fosfora započinje već kod koncentracije nitrita od 3 mgN L^{-1} , a iznosi 35% kada je koncentracija nitrita 12 mgN L^{-1} .

2.4. Organizmi koji akumuliraju polifosfat (PAO)

PAO su heterotrofne bakterije, koji imaju sposobnost skladištenja tri vrste unutarstaničnih rezervi: poli-P (rezerve P i energije), čije skladištenje rezultira učinkovitim uklanjanjem fosfora iz otpadnih voda, te dva oblika rezervi ugljika, poli- β -hidroksialkanoata i glikogena (slika 2) (Jenkins i Wanner, 2014). Osim toga, ovi organizmi imaju i jedinstvenu sposobnost korištenja unutarstanično pohranjenog poli-P za proizvodnju potrebne energije (adenozin trifosfat, ATP) u anaerobnim uvjetima, radi pohrane biološki lako razgradive organske tvari, kao što su hlapive masne kiseline (VFA), poput acetata (Ac) i propionata (Pr), u obliku unutarstaničnih poli- β -hidroksialkanoata (PHA).

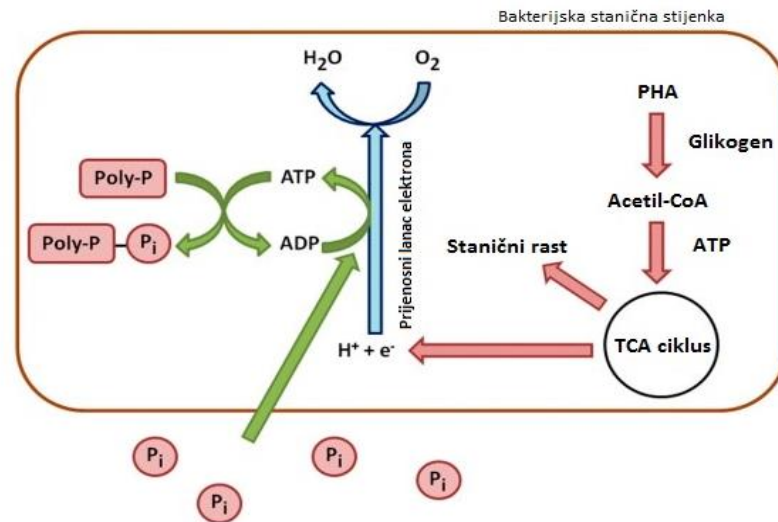


Slika 2. Promjena koncentracije spojeva tijekom anaerobnog i aerobnog/anoksičnog metabolizma u PAO (Tarayre i sur., 2016)

U većini istraživanja vezanim uz EBPR proces uklanjanja fosfora, *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, smatran je najvažnijim PAO (Bassin i sur., 2012). S obzirom na metaboličke sposobnosti, PAO-i su razvrstani u četiri glavne vrste (Oehmen i sur., 2010). PAO1 su denitrifikanti, koji imaju sposobnost korištenja otopljenog kisika ili, u slučaju njegove odsutnosti, mogu reducirati nitrate do plinovitog N_2 . PAO2 su parcijalni denitrifikanti koji mogu koristiti otopljeni kisik, ili u slučaju njegove odsutnosti, mogu denitrificirati nitrite do plinovitog N_2 . PAO3 su striktni aerobi koji mogu koristiti isključivo DO. PAO4 su aerobni i fermentativni organizmi koji mogu koristiti otopljeni kisik, ili u slučaju njegove odsutnosti, mogu fermentirati organsku tvar u VFA (Jenkins i Wanner, 2014).

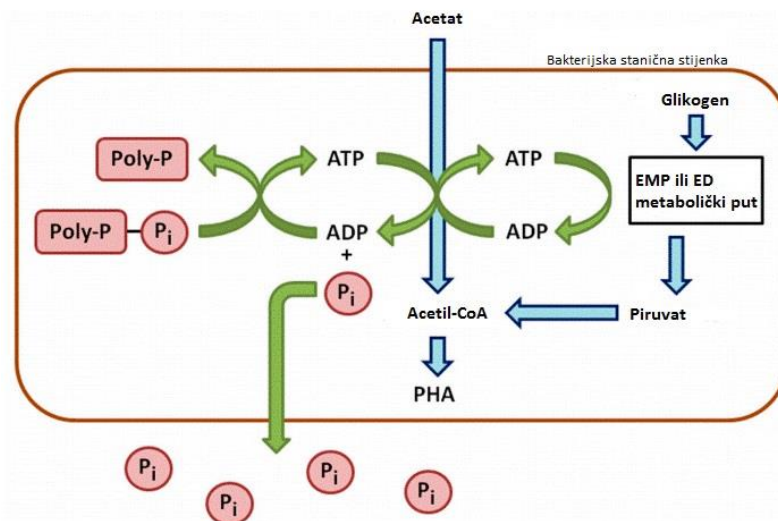
U aerobnim uvjetima, PAO-i oksidiraju pohranjeni PHA, kako bi osigurali energiju za rast, poboljšano apsorbiranje fosfora i sintezu glikogena (slika 3) (Oehmen i sur., 2006). Rezerve poli-P se razgrađuju, što dovodi do sinteze acetil – CoA, koji ulazi u ciklus trikarboksilnih kiselina (TCA ciklus). U TCA ciklusu se energija proizvodi oksidacijom, a osim

energije, proizvodi se i ugljik, koji je potreban za novi ciklus rasta stanica. Dio dobivene energije koristi se za asimilaciju otopljenog fosfora iz okoline, te njegovu ugradnju u poli-P, a drugi dio dobivene energije koristi se za regeneraciju glikogena (Tchobanoglous i sur., 2013).



Slika 3. Aerobni metabolizam u PAO (Tarayre i sur., 2016)

Anaerobna faza se može smatrati stresnim uvjetom za PAO. Tijekom ove faze, bakterije asimiliraju izvore ugljik i skladište ih kako bi svladali potencijalno dugotrajnu odsutnost kisika (slika 4) (Tarayre i sur., 2016). Najčešći izvor ugljika za PAO u obradi otpadnih voda su HAc, koji se prevode u acetil – CoA. Energija, potrebna za ovu reakciju, osigurava se hidrolizom ATP-a, pri čemu nastaju ADP i orto - P, koji se otpuštaju u okolni medij. Acetil – CoA se zatim metabolizira do poli- β -hidroskialkanoata (PHA) (Oehmen i sur., 2007). Energija redukcije (u obliku NADH₂), potrebna za sintezu PHA, osigurava se razgradnjom skladištenog glikogena (Oehmen i sur., 2007; Seviour i sur., 2003; Yuan i sur., 2012).



Slika 4. Anaerobni metabolizam u PAO (Tarayre i sur., 2016)

Razna laboratorijska istraživanja pokazala su da PAO-i, osim TCA ciklusa, imaju sposobnost korištenja i glikolize za dobivanje potrebne energije redukcije. Zhou i sur. (2009) pronašli su da obogaćena *Accumulibacter* kultura ima sposobnost korištenja TCA ciklusa u anaerobnim uvjetima za proizvodnju energije (NADH) u slučaju nedostatka glikogena, hidrolizom dodatnih poli-P. U slučaju potpunog izostanka glikogena, TCA ciklus bio je jedini način osiguravanja energije redukcije, što se slagalo sa stehiometrijom Comeau – Wentzel modela (Comeau i sur., 1986; Wentzel i sur., 1986). U uvjetima kada ima dovoljno glikogena dominirao je Mino model (Mino i sur., 1998). Prema Mino modelu TCA ciklus ne doprinosi proizvodnji energije redukcije, ali Zhou i sur. (2009) utvrdili su da TCA ciklus ipak doprinosi proizvodnji energije redukcije tijekom nelimitirajućih uvjeta, i to s cca. 25% potrebnog NADH.

2.5. Istraživačka pitanja i radne hipoteze

Na temelju pregledane literature ustanovljeno je da do sada nije dovoljno detaljno istražen utjecaj visokih koncentracija acetata na metabolizam organizama koji akumuliraju polifosfat (PAO). Inhibicija biološkog uklanjanja fosfora octenom kiselinom (Randall i Chapin, 1997) posljednji je rad o inhibitornom utjecaju acetata na biološke metode uklanjanja fosfora. Zbog toga je u ovom radu provedeno istraživanje kako bi se odgovorilo na pitanja:

1. Postoji li inhibitorni utjecaj acetata na metabolizam PAO-a?
2. Pri kojoj koncentraciji acetat počinje inhibitorno djelovati na metabolizam PAO-a?

Radne hipoteze u ovom radu bile su da postoji inhibitorno djelovanje acetata na metabolizam PAO-a, te da inhibitorno djelovanje započinje pri koncentracijama acetata iznad 600 mg L^{-1} . Prema ovim radnim hipotezama dizajniran je pokus i osmišljena su testiranja koja su se provodila tijekom pokusa.

Tijekom pokusa i provođenjem testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a, s visokim koncentracijama natrijeva acetata, razvila su se još neka pitanja na koja je bilo zanimljivo potražiti odgovor. Nova hipoteza, razvijena tijekom pokusa, a koja se može dodati prethodno navedenim, bila je:

1. Dolazi li do promjene metabolizma PAO-a pri visokim koncentracijama natrijeva acetata u aerobnoj fazi?

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Obrada otpadne vode u laboratorijskom SBR – uređaju

Laboratorijski SBR nacijepljen je aktivnim muljem dopremljenim iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda Velika Gorica u vlasništvu VG Vodoopskrba d.o.o (slika 5). Za pokuse prikazane u ovom radu, mulj je prethodno uzgajan 68 dana da bi se u njemu namnožili PAO-i postepeno povećavajući koncentraciju acetata u sintetičkoj otpadnoj vodi. Sintetička otpadna voda (influent) obrađivala se u laboratorijskom SBR uređaju tvrtke Applikon, a volumen reaktora iznosio je 2 L (slika 6). Influent, odgovarajuće KPK vrijednosti, pripreman je u posudi iz koje se direktno dovodio u SBR uređaj pomoću peristaltičke pumpe, a dnevni protok influenta postavljen je na 1 L dan⁻¹. Procesi u reaktoru bili su pod kontrolom zadanog računalnog programa, a za praćenje procesa obrade sintetičke otpadne vode u reaktor su ugrađene pH i kisikova elektroda te termometar za praćenje temperature u reaktoru. Obje elektrode i termometar su bile spojene na računalo preko kontrolno – upravljačke jedinice.

Satnica odvijanja ciklusa prikazana je u tablici 2. Ovisno o fazi ciklusa, miješalica reaktora programirana je da radi pri brzinama od 200 o min⁻¹ tijekom aerobne, odnosno 100 o min⁻¹ tijekom anaerobne faze. Po završetku jednog ciklusa obrade otpadne vode, obrađena voda (efluent) se, nakon taloženja mulja, pomoću crpke odvodila u posudu predviđenu za njeno prikupljanje. Iz navedene posude uzimao se uzorak za analizu. Za postizanje odgovarajuće starosti mulja, jednom dnevno, na kraju aerobne faze, uzimao se odgovarajući volumen viška mulja, prikazan u tablici 3.



Slika 5. Uredaj za obradu otpadnih voda grada Velike Gorice (aeracijski reaktor)



Slika 6. Laboratorijski SBR s kontrolno-upravljačkom jedinicom

Laboratorijski SBR (slika 6) sastojao se od:

- 1) kontrolno – upravljačke jedinice, koja je bila ključna za funkcioniranje uređaja. Preko kontrolno – upravljačke jedinice pratile su se pH-vrijednost, temperatura, brzina miješanja te postotak aeracije uređaja.
- 2) SBR reaktor s dvostrukim plaštom, u kojem se odvijala biološka obrada sintetičke otpadne vode. Kroz plašt uređaja stalno je recirkulirala destilirana voda, ohlađena na odgovarajuću temperaturu pomoću hladila. SBR uređaj imao je integrirano dvostruku lopatastu miješalicu, kojom se održavala homogenost sustava.

- 3) Računalo sa računalnim programom za kontrolu i vođenje procesa, na kojem su se pohranjivale informacije o stanju u SBR – uređaju.
- 4) Posuda za influent, koja je sadržavala sintetičku otpadnu vodu odgovarajuće KPK vrijednosti, spojena na SBR preko peristaltičke pumpe.
- 5) Posuda za skupljanje obrađene otpadne vode, odnosno efluenta.
- 6) Posuda i pumpa za skupljanje i izbacivanje viška mulja iz SBR-a.

Tablica 2. Satnica odvijanja jednog ciklusa u SBR uređaju u trajanju 6 h

AKTIVNOST	VRIJEME (min.)
ANAEROBNO DODAVANJE INFLUENTA	165
AEROBNA FAZA	160
TALOŽENJE	20
ODVOĐENJE EFLUENTA	10

Tablica 3. Vrijednosti KPK u sintetičkoj otpadnoj vodi, starosti mulja (SRT) i volumen viška mulja koji se izdvajao

KPK [mg L⁻¹]	1000	1400	1800
SRT [dan]	22	14	10
Volumen viška mulja [mL dan⁻¹]	91	143	200

3. 2. Karakteristike i sastav sintetičke otpadne vode

Sintetička otpadna voda (influent), čiji je sastav prikazan u tablici 4, pripremao se jednom tjedno u količini od 9 L. Sastav influenta pripremljen prema uzoru na influent iz rada Smolders i sur. (2014). Najprije su pripravljene stoke otopine minerala (izvori makro- i mikro -nutrijenata), koje su se, u određenom volumenu, dodavale u bocu za pripremu influenta. Kao izvori mikro- i makro – nutrijenata korišteni su: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), Na_2MoO_4 p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), CuSO_4 p.a. (Merck – Alkaloid, Skopje, Makedonija), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska), H_3BO_3 p.a. (Gram – mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), KI (Gram – mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska), NaHCO_3 p.a. (Lach-Ner, Tovarni 157 · 277 11 Neratovice, Češka), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), CaCl_2 p.a. (Kemika, Zagreb, Hrvatska), NH_4Cl p.a. (Gram – mol d.o.o., Črnovečka 4, Zagreb, Hrvatska) i KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Za postizanje željene KPK vrijednosti influenta korišten je natrijev acetat, jedini izvor ugljika tijekom pokusa (bezvodni, Fisher Bioreagents, Fisher Scientific International Inc., New Jersey, SAD), u obliku krutine, te je boca naposljetku nadopunjena destiliranom vodom. Nakon pripreme influent je autoklaviran.

Svakodnevno se još, tijekom odvijanja pokusa, ručno dodavalo 2 mL alil-N tiouree (98 % ATU; Acros organics, Fisher Scientific International, Inc., Pittsburgh, SAD), kao inhibitora rasta nitrificirajućih bakterija.

Tablica 4. Koncentracije spojeva u 1 L sintetičke otpadne vode (influenta) odgovarajuće KPK vrijednosti

KPK [mg L^{-1}]	1800	1400	1000
NaHCO_3	90,00	50,83	36,31
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	240,00	18,42	13,15
CaCl_2	60,00	16,85	12,04

NH ₄ Cl	503,96	102,67	73,33
KH ₂ PO ₄	395,43	70,00	50,00
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,600		
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,048		
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,024		
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,012		
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,048		
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,060		
H ₃ BO ₃	0,060		
KI	0,072		

3.3. Određivanje ukupne suspendirane tvari (TSS), ukupne organske suspendirane tvari (VSS) i anorganske suspendirane tvari (ISS)

TSS predstavlja koncentraciju ukupne suspendirane tvari u aktivnom mulju, te omogućuje procjenu koncentracije biomase (Cano i sur., 2014). U ukupnu suspendiranu tvar spadaju sve organske tvari, razgradive i nerazgradive, koje su prisutne u otpadnoj vodi (žive bakterije, ostaci odumrlih bakterija, anorganske suspendirane tvari) (Matošić, 2015). TSS se sastoji od organskog i anorganskog dijela.

Za određivanje ukupne suspendirane i ukupne organske suspendirane tvari korišten je stakleni filter papir (1µm, GF/C, Whatman) koji je prije upotrebe pripremljen filtriranjem 10 mL destilirane vode i sušenjem na 105 °C do konstante mase. Masa staklenog filter papira određena je prije filtracije na analitičkoj vagi (Mettler, Type H 15). Nakon filtracije uzorka, filter papir s uzorkom sušen je na 105 °C, u metalnoj posudi, do konstantne mase. Osušeni filter papir s talogom dosušen je zatim u eksikatoru i izvagan. Iz razlike mase čistog filter papira i mase filter papira s talogom izračunata je ukupna suspendirana tvar (engl. *Total suspended solids* - TSS).

Nakon određivanja TSS, određivana je ukupna organska suspendirana tvar (engl. *Volatile suspended solids* - VSS). Filter papir s talogom, nakon određivanja TSS, spaljen je na

plameniku, te žaren u mufolnoj peći na 550 °C 15 min, nakon čega je izvađen, ohlađen u eksikatoru, te ponovo žaren na isti način. Ovaj postupak ponavljan je tri puta. Razlika masa čistog filter papira i filter papira s talogom nakon žarenja jednaka je ukupnoj anorganskoj suspendiranoj tvari (engl. *Inorganic suspended solids* - ISS). Ukupna organska suspendirana tvar (VSS) jednaka je razlici dobivenih vrijednosti za ukupnu suspendiranu tvar (TSS) i anorgansku suspendiranu tvar (ISS).

Pribor:

- Analitička vaga (Mettler, Type H 15)
- Metalna posuda
- Stakleni filter papir (1 µm, GF/C, Whatman)
- Vakuum sisaljka
- Sušionik
- Eksikator
- Mufolna peć

3.4. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

Kemijska potrošnja kisika (KPK) određivana je pomoću kivetnih testova LCK 514 i LCK 314 tvrtke Hach Lange. Varijabilnom ručnom pipetom s nastavcima (Eppendorf) dodano je 2 mL uzorka u kivetu, nakon čega je kiveta dobro zatvorena i promiješana. Kiveta s uzorkom je zatim postavljena u digestor (HT 200 S, Hach Lange), u kojem se provodila digestija 15 min na 175 °C. Nakon digestije, kiveta je dobro promiješana i ostavljena na hlađenje pri sobnoj temperaturi, nakon čega je određena KPK vrijednost pomoću spektrofotometra Hach Lange DR3900.

Pribor:

- Kivetni test LCK 514 (100 – 2000 mg O₂ L⁻¹; Hach Lange) i LCK 314 (15 – 150 mg O₂ L⁻¹; Hach Lange)
- Varijabilna ručna pipeta s nastavcima (Eppendorf)
- Digestor (HT 200 S, Hach Lange)

- Spektrofotometar (DR3900; Hach Lange)

3.5. Određivanje koncentracije ukupnog i otopljenog fosfora

Tijekom testiranja određivana je koncentracija ukupnog i otopljenog fosfora u uzorcima mulja i efluenta. Za određivanje koncentracije ukupnog fosfora korišten je kivetni test LCK 350 (Hach Lange). Fosfatni ioni reagiraju s molibdatom i antimonijskim ionima u kiseljoj otopini kako bi se formirao kompleks antimon fosfomolibdat koji se, askorbinskom kiselinom, reducira do fosfomolibdena plave boje.

0,4 mL uzorka odgovarajućeg razrjeđenja, dodano je varijabilnom ručnom pipetom s nastavcima (Eppendorf) u kivetu LCK 350 (Hach Lange) i zatvoreno s DosiCap Zip čepom, te snažno promiješano. Kiveta s uzorkom digestirana je u digestoru (HT 200 S, Hach Lange) 15 min na 175 °C, nakon čega je ohlađena do sobne temperature. Sadržaj kivete ponovno je promiješan, te je u kivetu dodano 0,5 mL reagensa B i kiveta je zatvorena s DosiCap C. Nakon zatvaranja, sadržaj kivete je još jednom promiješan okretanjem kivete nekoliko puta, te je zatim ostavljena na mirovanje 10 min. Koncentracija ukupnog fosfora očitana je na spektrofotometru i preračunata s obzirom na upotrijebljeno razrjeđenje.

Pribor:

- Kivetni test LCK 350 (2,0 – 20,0 mg P L⁻¹; Hach Lange)
- Varijabilna ručna pipeta s nastavcima (Eppendorf)
- Digestor (HT 200 S, Hach Lange)
- Spektrofotometar (DR3900; Hach Lange)

Koncentracija otopljenog fosfora određivana je pomoću Sepetroquant phosphates testa (Merck, Njemačka). U kivetu je varijabilnom ručnom pipetom s nastavcima (Eppendorf) dodano 5 mL razrijeđenog uzorka, jedna žličica PO₄²⁻ reagensa i 5 kapi PO₄¹⁻ reagensa. Sadržaj kivete je snažno promiješan, nakon čega se reakcija odvijala 5 min. Uzorak je prenešen u spektrofotometrijsku 10mm kivetu, a koncentracija otopljenog fosfora određivana je spektrofotometrijski, te je dobivena vrijednost preračunata s obzirom na upotrijebljeno razrjeđenje.

Pribor:

- Sepctroquant phosphates (0,1 – 5,0 mg PO₄-P L⁻¹; Merck)
- Varijabilna ručna pipeta s nastavcima (Eppendorf)
- Spektrofotometar (DR3900; Hach Lange)

3.6. Određivanje koncentracije amonijaka

Za određivanje koncentracije amonijevih iona korišten je LCK 304 kivetni test (Hach Lange). Amonijevi ioni u uzorku reagiraju, u prisutnosti natrijeva nitroprusida, s hipokloritnim ionima pri pH 12,6 i daju plavo obojenje. Varijabilnom ručnom pipetom s nastavcima (Eppendorf) dodano je 0,2 mL uzorka u kivetu, te je ona zatvorena s DosiCap Zip čepom, u kojem se nalaze reagensi troklose natrij i natrijev nitroprusid. Reakcija se odvija tijekom 5 minuta, nakon čega se koncentracija amonijaka određivala spektrofotometrijski (Hach Lange).

Pribor:

- Kivetni test LCK 304 (0,015 – 2 mg NH₄-N L⁻¹ ; Hach Lange)
- Varijabilna ručna pipeta s nastavcima (Eppendorf)
- Spektrofotometar (DR3900; Hach Lange)

3.7. Određivanje koncentracije ukupnog dušika

Za određivanje koncentracije ukupnog dušika korišten je LCK 238 LATON kivetni test (Hach Lange). Digestijom se organski i anorganski dušik uz pomoć preoksidisulfata, kao oksidansa, prevode do nitrata. Nitratni ioni, u otopini sumporne i fosfatne kiseline, reagiraju s 2,6 – dimetilfenolom pri čemu nastaju nitrofenoli koji daju crveno obojenje.

Varijabilnom ručnom pipetom s nastavcima (Eppendorf) u reakcijsku kivetu dodano je 0,5 mL uzorka, 2 mL reagensa A (natrijev hidroksid) i jedna tableta B (dinatrijev peroksidisulfat, dinatrijev tetraborat). Digestija se provodila u digestoru, 15 min na 175 °C. Nakon digestije, reakcijska kiveta je hladena na sobnu temperaturu, te je u nju dodan MicroCap C, čep s natrijevim azidom. Sadržaj kivete je promiješan, kako bi se otopio natrijev azid, te je 0,5 mL digestiranog uzorka otpipetirano i preneseno u kivetu, koja sadrži 60 % sumporne

kiseline i 33 % fosfatne kiseline, zajedno s reagensom D (2 - propranol). Reakcija se odvijala 15 min, nakon čega je koncentracija ukupnog dušika određivana spektrofotometrijski.

Pribor:

- LCK 238 LATON kivetni test (5 – 40 mg N L⁻¹; Hach Lange)
- Varijabilna ručna pipeta s nastavcima (Eppendorf)
- Digestor (HT 200 S, Hach Lange)
- Spektrofotometar (DR3900; Hach Lange)

3.8. Određivanje koncentracije nitrata

Za određivanje koncentracije nitrata korišten je LCK 339 kivetni test (Hach Lange). Nitratni ioni reagiraju s 2,6-dimetilfenolom, u otopini sumporne i fosfatne kiseline, i tvore 4-nitro-2,6-dimetilfenol, koji daje crveno obojenje.

Varijabilnom ručnom pipetom s nastavcima (Eppendorf) u kivetu je otpipetiran 1 mL uzorka i 0,2 mL reagensa A (2 – propranol). Reakcija se odvijala 15 min, te je koncentracija nitrata određena spektrofotometrijski.

Pribor:

- LCK 339 kivetni test (0,23 – 13,50 mg NO₃-N L⁻¹; Hach Lange)
- Varijabilna ručna pipeta s nastavcima (Eppendorf)
- Spektrofotometar (DR3900; Hach Lange)

3.8. Određivanje pH-vrijednosti

pH-vrijednost mulja u reaktoru određivana je pomoću staklene elektrode AppliSens pH+, stalno uronjene u reaktor. pH-vrijednost je stalno praćena i mjerena te je elektroda bila spojena na kontrolno – upravljačku jedinicu laboratorijskog SBR uređaja. Elektroda je kalibrirana uranjanjem u pufer otopinu, pH=7. Tijekom cijelog pokusa pH-vrijednost se nije regulirala.

Pribor: AppliSens pH+ elektroda (Applikon)

Kemikalije: Pufer otopina CertiPUR, Buffer solution pH 7 (Merck)

3.9. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Za određivanje koncentracije otopljenog kisika korištena je elektroda tipa AppliSens DO (Applikon). Elektroda je spojena na kontrolno – upravljačku jedinicu laboratorijskog SBR uređaja, te je koncentracija otopljenog kisika stalno praćena i mjerena. Kalibracija elektrode provedena je njenim uranjanjem u otopinu kroz koju je propuhivan zrak.

Pribor: AppliSens DO elektroda (Applikon)

3.10. Određivanje i reguliranje temperature

Za određivanje temperature u bioreaktoru korišten je termometar, koji je spojen na kontrolno – upravljačku jedinicu laboratorijskog SBR uređaja, te je temperatura praćena i mjerena u intervalima od pola sata. Za reguliranje temperature korišten je protoćni termostat (Krüss), koje je hladilo vodu koja je ulazila u plašt bioreaktora. Tijekom pokusa temperatura je održavana u rasponu od 9 do 19,5°C, s prosjećnom temperaturom od 15°C.

Pribor: Protoćni termostat PT31 (Krüss)

Termometar

3.11. Određivanje maksimalne brzine anaerobnog otpuštanja fosfora, maksimalne specifične brzine asimilacije KPK i maksimalne specifične brzine aerobnog uklanjanja fosfora

Prosječno jednom tjedno provedeno je testiranje utjecaja natrijeva acetata na biološku aktivnost PAO-a. Testiranje je počinjalo s ubacivanjem 250 mL influenta s odgovarajućom početnom koncentracijom natrijeva acetata, izraženog kao KPK u $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, te odgovarajućim koncentracijama drugih makro- i mikro- nutrijenata. Neposredno nakon dodavanja influenta, povećana je brzina reaktorske mješalice na 500 o min^{-1} tijekom 30 s, kako bi se sadržaj unutar SBR uređaja što bolje homogenizirao. Nakon 30 s, miješanje je vraćeno na uobičajenih 200 o min^{-1} te je uzet prvi uzorak, nakon kojeg su svakih 5 min do pola sata uzimani uzorci izravno iz SBR uređaja. U nefiltriranom uzorku mulja određivane su TSS, VSS i ISS vrijednosti, a u uzorku suspenzije mulja, filtriranom kroz $0,45 \mu\text{m}$ filter, određivane su KPK vrijednost i koncentracija orto-fosfata (PO_4^{3-}). Iz grafičkog prikaza ovisnosti koncentracije otopljenog fosfora u suspenziji mulja o vremenu, računalnim programom MS Excel, izračunat je koeficijent smjera krivulje iz podataka na početku mjerenja otpuštanja fosfora, kada je njegova brzina bila najveća. Tako je dobivena maksimalna brzina anaerobnog otpuštanja fosfora u $\text{mg PO}_4\text{-P (Lh)}^{-1}$, podijeljena je s koncentracijom VSS, kako bi se dobila specifična maksimalna brzina anaerobnog otpuštanja fosfora u $\text{mg PO}_4\text{-P (gVSSh)}^{-1}$.

Na isti način dobivena je i maksimalna brzina asimilacije KPK (mg KPK (Lh)^{-1}), odnosno specifična maksimalna brzina asimilacije KPK ($\text{mg KPK (gVSSh)}^{-1}$).

Vrijednost maksimalne specifične brzine vezanja fosfora u aerobnim uvjetima dobivena je iz grafičkog prikaza ovisnosti koncentracije otopljenog fosfora u suspenziji mulja o vremenu, pri čemu su korišteni podaci koncentracije otopljenog fosfora na početku aerobne faze, kada je brzina uklanjanja najveća. Na ovaj način dobivene su maksimalna brzina aerobnog vezanja fosfora u $\text{mg PO}_4\text{-P (Lh)}^{-1}$, odnosno maksimalna specifična brzina aerobnog vezanja fosfora u $\text{mg PO}_4\text{-P (gVSSh)}^{-1}$.

Na osnovu izračunatih vrijednosti maksimalne brzine anaerobnog otpuštanja fosfora, maksimalne specifične brzine asimilacije KPK i maksimalne specifične brzine aerobnog uklanjanja fosfora, pratila se inhibicija biološke aktivnosti PAO-a. Kada je aktivnost znatno pala, u cilju sprječavanja moguće potpune inhibicije, u SBR je dodan influent razrijeđen na KPK $1000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, te je proces nastavljen do povećanja biološke aktivnosti PAO-a. Nakon

nekoliko dana, najčešće 2 do 3 dana, influent je postpuno povećan na KPK 1400 mgO₂ L⁻¹ odnosno na 1800 mgO₂ L⁻¹.

Tablica 5. Prikaz dana testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a i korištenih KPK vrijednosti

TESTIRANJA INHIBICIJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI PAO-a									
Dan pokusa	6	9	20	22	28	47	57	61	62
Testirana KPK vrijednost [mgO ₂ L ⁻¹]	238	336	508	560	741	298	268	245	930

3.12. Proučavanje uzoraka aktivnog mulja od mikroskopom

Bojanje po Neisseru jedna je od metoda otkrivanja prisutnost volutinskih tjelešaca, u koja spadaju i poli-P, unutar PAO-a. Ova metoda se koristi za otkrivanje prisutnosti metakromatsih granula u stanicama bakterija, a zasniva se na tome da će se, pri odgovarajućem pH, bojila metilensko plavilo i kristalviolet, vezati za negativno nabijene materijale u staničnim stijenkama i granulama, odnosno uz polarna tjelešca, ali ne i uz ostatak stanice bakterije. Mikroskopiranjem nakon bojanja uočavamo tamne točke, koje predstavljaju polarna tjelešca, pri čemu Neisser – pozitivne stanice izgledaju plavo/sivo ili ljubičasto, a Neisser – negativne stanice izgledaju žuto/smečkasto (Nielsen i sur., 2016).

Pribor:

- Mikroskop
- Otopina metilenskog plavila
- Otopina kristalvioleta
- Otopina kontrastnog bojila (npr. Bismarckova smeđa)
- Radna otopina (svježa mješavina koja sadrži 2/3 otopine metilenskog plavila i 1/3 otopine kristalvioleta)

Procedura:

- 1) Pripremljen je fiksni razmaz tako da se uzorak u tankom sloju razmazao na predmetnicu, nakon čega je razvučen pomoću pipete. Preparat je ostavljen na zraku kako bi se osušio pri sobnoj temperaturi.
- 2) Uzorak je zaliven svježe pripremljenom radnom otopinom i ostavljen 15 s.
- 3) Bojilo je nakon toga nježno isprano vodovodnom vodom s obje strane
- 4) Preparat je zaliven otopinom kontrastnog bojila i ostavljen 1 min.
- 5) Bojilo je ponovno nježno isprano vodovodnom vodom s obje strane .
- 6) Predmetnica je ostavljena na sušenje na zraku.
- 7) Uzorak je pregledan pod mikroskopom s inverzijskim uljem koristeći objektiv visokog povećanja sa svijetlim vidnim poljem, izravno osvjetljenje i bez pokrovnice.

4. REZULTATI I RASPRAVA

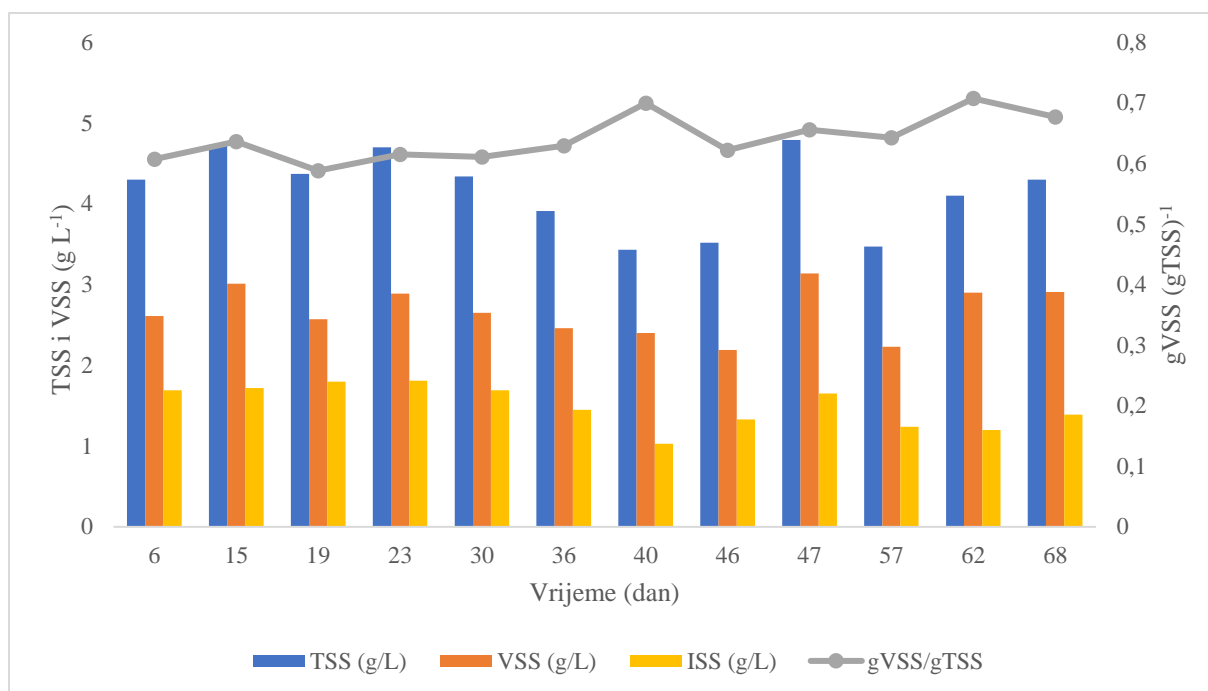
Optimiziran EBPR proces je ekološki održiv i ekonomski isplativ način uklanjanja fosfora iz otpadnih voda tijekom njene obrade. Međutim, na učinkovitost EBPR procesa utječu različiti vanjski i unutarnji faktori, koji mogu usporiti ili čak potpuno zaustaviti proces. Neki od proučavanih faktora su: visoka količina padalina koja dolazi u sustav obrade, visoka koncentracija nitrata u anaerobnom reaktoru, limitacija nutrijenata i mikrobna kompeticija između PAO i GAO skupina mikroorganizama (Zhou i sur., 2007; Oehmen i sur., 2004; Pehmen i sur., 2005; Heinhold i sur., 1999; Lopez-Vazquez i sur., 2009a; Lopez-Vazquez i sur., 2009b; Filipe i sur., 2001d; Filipe i sur., 2014). Brojna istraživanja proučavala su kako navedeni utjecaji mogu štetiti procesu, a jedan od zanimljivijih utjecaja je utjecaj izvora ugljika na metabolizam PAO-a (Oehmen i sur., 2006; Lopez-Vazquez i sur., 2009b; Carvalheira i sur., 2014).

Ovaj rad usmjeren je na istraživanje utjecaja natrijeva acetata, kao jedinog izvora ugljika, na učinkovitost EBPR procesa i neto količinu uklonjenog fosfora. U ovom radu praćena je obrada sintetičke otpadne vode, odnosno influenta, s ciljem uklanjanja fosfora pomoću aktivnog mulja, obogaćenog PAO-ima. Pokus je proveden u laboratorijskom SBR uređaju u kojem su izmjenjivane aerobna i anaerobna faza tijekom 4 ciklusa dnevno. Svaki ciklus trajao je 6 h i sastojao se od: punjenja SBR uređaja pripremljenim influentom, anaerobna faza obrade, aerobna faza obrade, uzimanja mulja, taloženja mulja i uzimanja efluenta. Osnovna ideja pri programiranju faza bila je osigurati anaerobne uvjete procesa kojima bi se favorizirao rast PAO-a, potaknulo njihovo razmnožavanje te osiguralo dobro uklanjanje fosfora iz sintetičke otpadne vode. Izmjena aerobnih i anaerobnih faza omogućila je uvid u promjene u metabolizmu PAO-a u slučajevima kada je tijekom aerobne faze prisutna visoka koncentracija izvora ugljika, odnosno natrijeva acetata. Ispitivan je utjecaj različitih koncentracija natrijeva acetata (izraženih kao KPK vrijednost) na aktivnost i metabolizam PAO-a.

Uvjeti pokusa bili su optimirani za EBPR odnosno za rast PAO-a. Temperatura u bioreaktoru regulirana je tijekom cijelog procesa, s ciljem održavanja temperature ispod 20°C odnosno u granicama pogodnim za rast PAO-a, a istovremeno nepovoljnim za rast GAO-a (Lopez-Vazquez i sur., 2009a). Filipe i sur. (2001b) dokazali su da GAO-i brže asimiliraju acetate pri $\text{pH} < 7,25$, dok PAO-i brže asimiliraju acetate pri $\text{pH} > 7,5$, te da je potpuno uklanjanje fosfora moguće samo kada je minimalna pH-vrijednost $\geq 7,25$. Osim temperature, iz istog razloga praćena je i pH-vrijednost u bioreaktoru. Promjene pH-vrijednosti bile su u

granicama od 7,3 do 9,1 s prosječnom pH-vrijednosti 8,4, što je bilo pogodno za rast PAO-a. Uspješnost odvijanja procesa praćeno je mjerenjem procesnih parametara u izlaznoj vodi (efluentu) i aktivnom mulju. U efluentu su mjereni KPK, ukupna suspendirana tvar (TSS), nitrat, nitrit, amonijak i ukupni dušik te otopljeni i ukupni fosfor. Sastav aktivnog mulja praćen je mjerenjem ukupnog dušika i fosfora, ukupne suspendirane tvari (TSS) te njenog organskog (VSS) i anorganskog (ISS) dijela.

Koncentracija mulja ovisi o volumenu bioreaktora, učinkovitosti biološke obrade i prijenosu kisika (Matošić, 2015). Prema tome bi učinkovitost biološkog procesa obrade otpadne vode trebala biti veća ukoliko je koncentracija mulja viša. U koncentriranom mulju prisutan je veći broj bakterija koje sudjeluju u procesu biološke obrade, a osim toga, tada je i difuzija otpadnih tvari u bakterijsku stanicu brža. Difuzija će biti brža i pri većoj koncentraciji mulja u manjem bioreaktoru, zbog više koncentracije otopljenih organskih tvari. Zadnji faktor koji utječe na koncentraciju mulja, a time i na učinkovitost procesa obrade, je brzina prijenosa kisika. Aktivni mulj i njegove komponente negativno utječu na brzinu prijenosa kisika, što znači da je za otapanje iste količine kisika potrebno više zraka ukoliko ga se otapa u mulju nego u vodi (Matošić, 2015). Tijekom pokusa koncentracija aktivnog mulja u bioreaktoru volumena 2L iznosila je prosječno $4,16 \text{ g L}^{-1}$, dok je koncentracija otopljenog kisika u aktivnom mulju u aerobnoj fazi bila uvijek iznad 2 mg L^{-1} , čime su zadovoljeni osnovni uvjeti za učinkovit proces obrade otpadne vode.



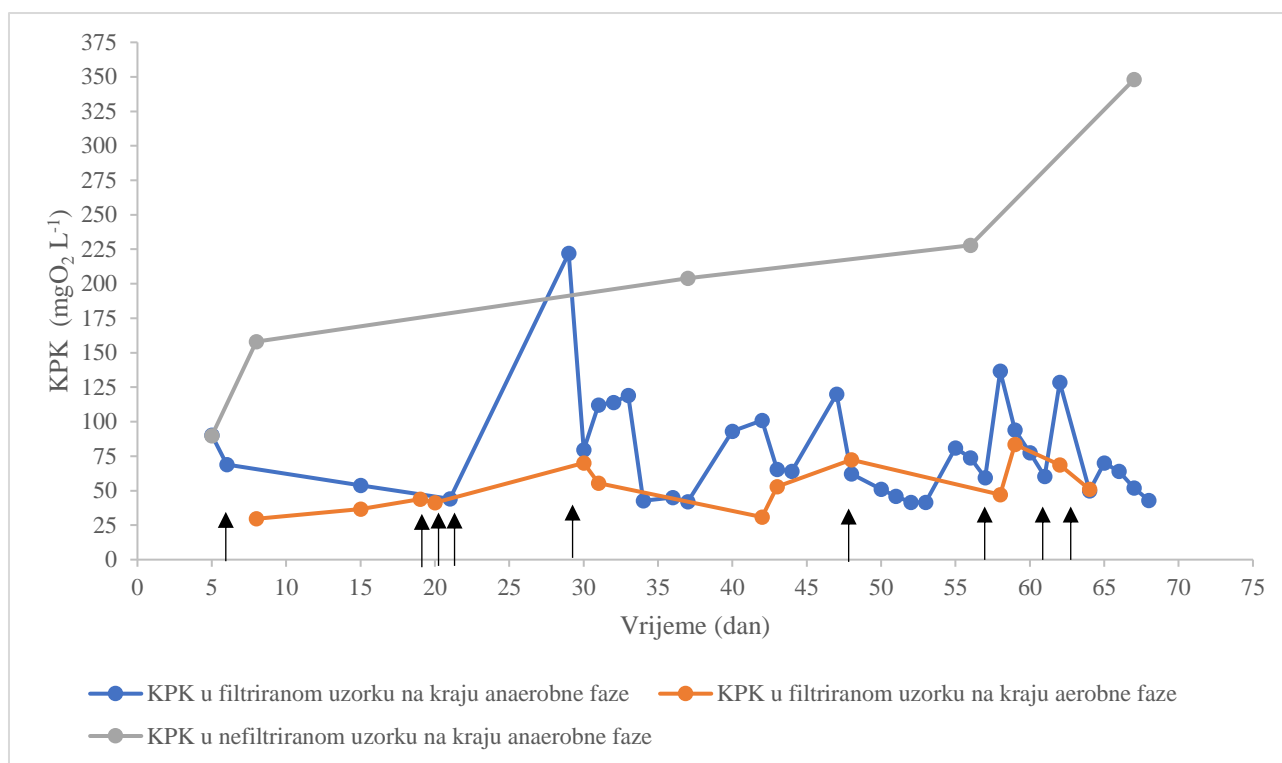
Slika 7. Koncentracije TSS, VSS i ISS te omjer $gVSS (gTSS)^{-1}$ tijekom pokusa

Slika 7 prikazuje promjenu TSS, VSS i ISS vrijednosti u mulju tijekom trajanja pokusa. TSS vrijednost koncentracija je ukupne suspendirane tvari, a sastoji se od organskog (VSS) i anorganskog dijela (ISS). Važan je parametar procesa jer prikazuje količinu aktivne biomase koja troši organske sastojke i vrši učinkovitu obradu otpadnih voda. Visoka TSS vrijednost ukazuje na povećanu količinu krutih tvari koje uzrokuju pad prijenosa kisika i time smanjuju učinkovitost uklanjanja fosfora i taloženja mulja. Niska vrijednost TSS-a ukazuje na nemogućnost sustava da ukloni dovoljnu količinu organske tvari iz otpadnih voda. Tijekom EBPR procesa prosječna vrijednosti TSS-a bila je $4,16 \pm 0,73 \text{ g L}^{-1}$, što je omogućavalo dobar kontakt biomase i otopljenih tvari i brzo odvijanje bioloških procesa..

U VSS spadaju žive stanice, ostaci odumrlih stanica i biološki nerazgradive organske tvari iz otpadne vode (Matošić, 2015). Vrijednost VSS-a određuje se jer prikazuje točniju koncentraciju biomase u aktivnom mulju koja provodi procese degradacije organske tvari. VSS ukazuje na stabilnost biomase, koja se povezuje s preostalim biorazgradivim tvarima u aktivnom mulju. Viša vrijednost VSS-a ukazuje na povišenu koncentraciju preostale biorazgradive tvari te mogućnosti dobivanja više energije tijekom procesa. Vrijednost VSS-a tijekom pokusa iznosila je od $2,19 \text{ g L}^{-1}$ do $3,14 \text{ g L}^{-1}$, a prosječno $2,66 \text{ g L}^{-1}$ (slika 7). Proporcionalnost između TSS, VSS i ISS vrijednosti tijekom odvijanja pokusa ukazuje na prilično ujednačenu koncentraciju živih organizama i anorganskog dijela u ukupnoj

suspendiranoj tvari tijekom cijelog pokusa. Omjer gVSS (gTSS)^{-1} prikazuje koliko ima organske tvari u ukupnoj suspendiranoj tvari te se on tijekom pokusa kreće između $0,59 \text{ gVSS (gTSS)}^{-1}$ i $0,71 \text{ gVSS (gTSS)}^{-1}$. Osim toga, omjer gVSS (gTSS)^{-1} , grubi je pokazatelj količine skladištenog poli-P s obzirom da se polifosfatne granule ne mogu spaliti. Niža vrijednost omjera VSS/TSS ukazuje na povećan udio fosfora skladištenog u stanicama PAO-a, veći broj PAO-a i učinkovitiji EBPR proces (Wentzel i sur., 1989).

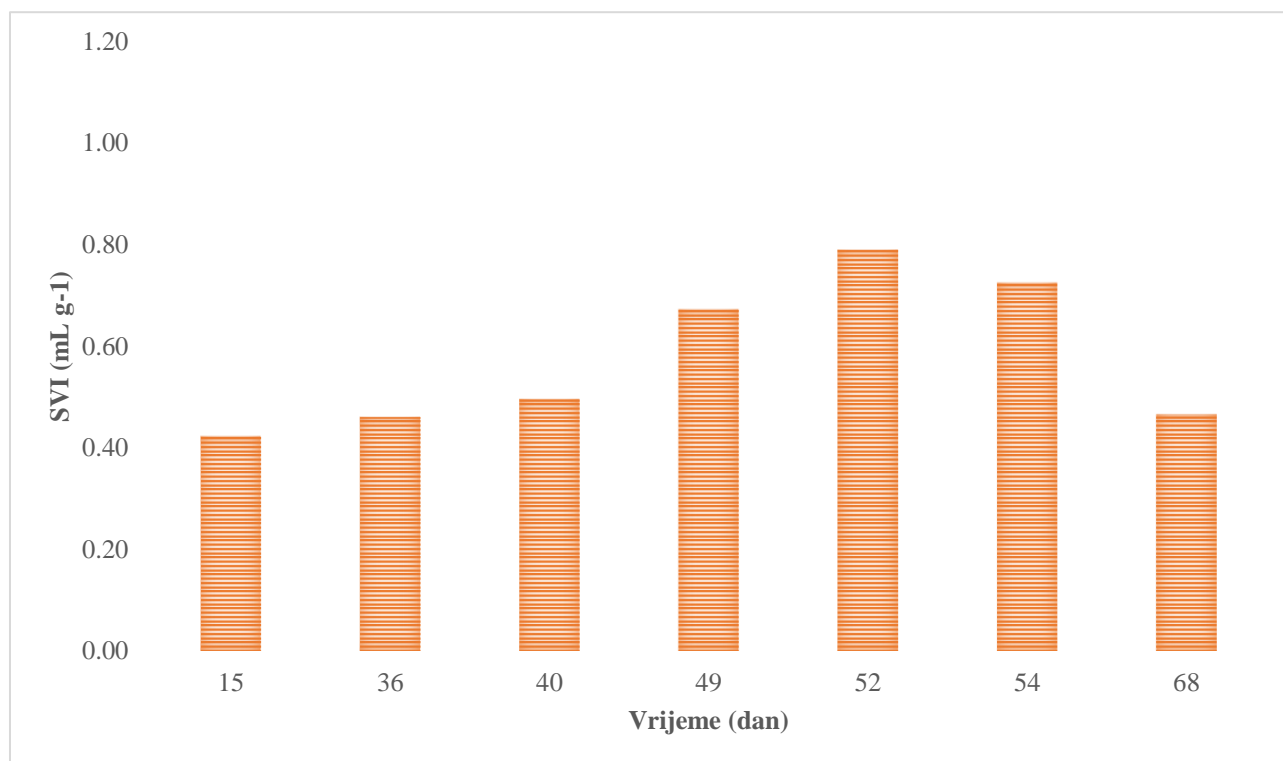
Kemijska potrošnja kisika (KPK) jednaka je utrošku $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ potrebnog za oksidaciju organske tvari u vodi, te 95 do 100 % organskih tvari prisutnih u vodi podliježe toj oksidaciji. KPK se, radi jednostavnosti, u praksi izražava kao teoretski utrošak kisika (O_2) za oksidaciju, odnosno u $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, jer bakterije tijekom obrade otpadne vode koriste kisik za oksidaciju. Važan je pokazatelj kvalitete vode jer omogućuje procjenu učinka koji će voda imati na prirodu u koju ju vraćamo nakon obrade. Visoka razina KPK u uzorku ukazuje na prisutnost velike količine oksidirajućeg organskog materijala koji će smanjiti razinu otopljenog kisika u vodi. Redukcija otopljenog kisika uzrokuje anaerobne uvjete koji su štetni za više oblike života prisutne u vodi. Zbog toga je prvi stupanj u obradi otpadnih voda upravo smanjenje KPK vrijednosti, prije njenog ispuštanja u prirodu. KPK vrijednost u sintetičkoj otpadnoj vodi u pokusu potječe isključivo od natrijeva acetata prisutnog u influentu.



Slika 8. Koncentracije KPK u nefiltriranom efluentu te u filtriranom efluentu na kraju aerobne i anaerobne faze testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a (znak → označava dan testiranja)

Tijekom trajanja pokusa i testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a praćene su KPK vrijednosti u filtriranom efluentu, na kraju anaerobne i aerobne faze, te KPK vrijednosti u nefiltriranom efluentu, koje su služile kao pokazatelji uspješnosti procesa uklanjanja KPK tijekom obrade sintetičke otpadne vode. Zbog visoke količine KPK koja je zaostajala na kraju aerobne faze nakon testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a, a čija je koncentracija određivana u filtriranom efluentu, bilo je neophodno u kratkom razdoblju nakon testiranja smanjiti ulaznu KPK vrijednost influenta, kako bi se mulj ponovo adaptirao na zadane uvjete i kako bismo izbjegli moguću potpunu inhibiciju procesa kao rezultat preduge izloženosti mulja stresnim uvjetima. Koncentracija KPK u influentu snižena je u tu svrhu 34. i 35., te ponovno 47.-49. dan na $1000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, odnosno 36. 37., te 50.-54. dan pokusa na $1400 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Na početku pokusa, aktivni mulj je uspješno uklanjao KPK te je njegova vrijednost u nefiltriranom i filtriranom efluentu bila $<100 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ (slika 8). Nakon početka testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a, u kojem su u bioreaktor dodavane visoke koncentracije natrijeva acetata, izraženog preko KPK vrijednosti, vidljivo je da aktivni mulj nije bio u mogućnosti asimilirati povećanu količinu natrijeva acetata u anaerobnoj fazi ciklusa. Zbog toga je visoka količina (do $350 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$) prenesena u aerobnu fazu ciklusa. Iz rezultata testiranja inhibicije biološke

aktivnosti PAO-a, bit će prikazano kasnije u tekstu (poglavlje 4.3.) da visoka koncentracija natrijeva acetata na početku aerobne faze dovodi do smanjene asimilacije fosfora i do negativne vrijednosti neto uklonjenog fosfora.



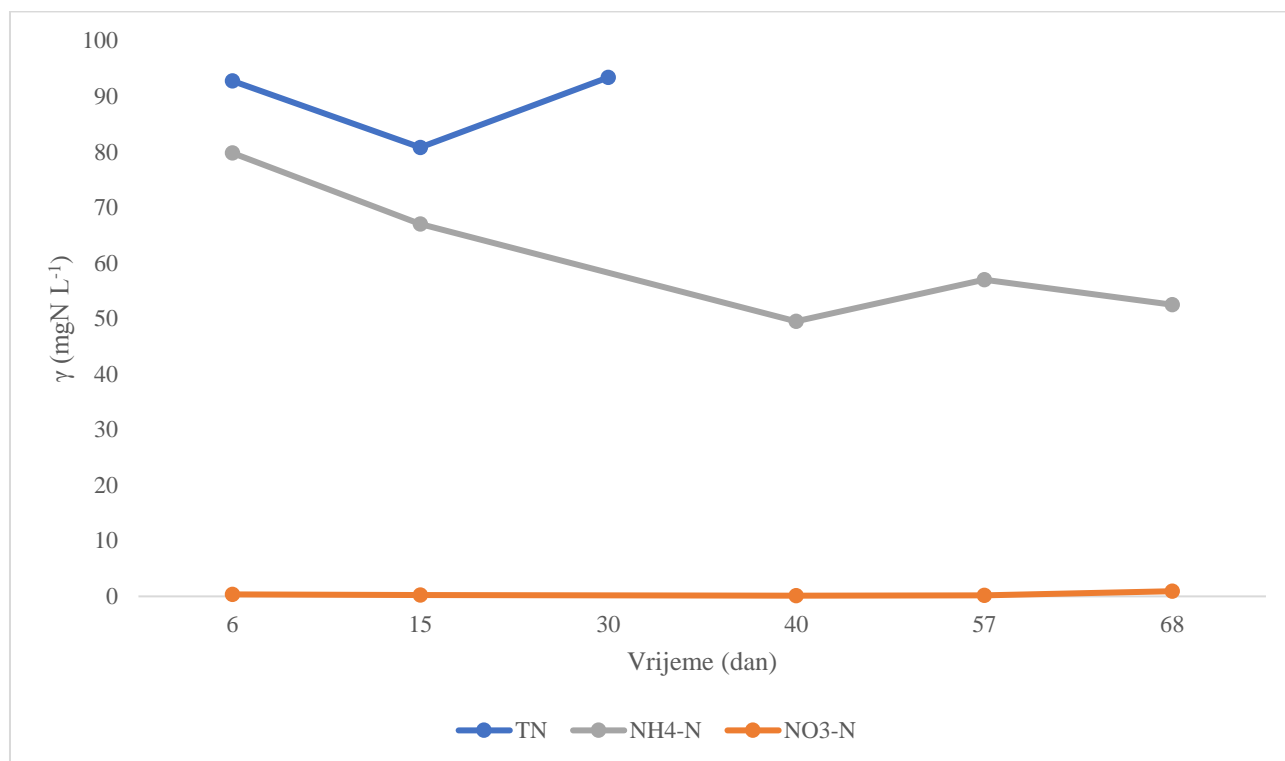
Slika 9. SVI mulja tijekom pokusa

Rezultati na slici 9 prikazuju kako se mijenjala vrijednost SVI tijekom trajanja pokusa. Indeks mulja (engl. *sludge volume index* – SVI) najčešće je korišten parametar kontrole procesa koji služi za određivanje karakteristike taloženja mulja. Pomoću ovog podatka kontroliraju se fizikalni uvjeti aktivnog mulja i njegova sposobnost taloženja, a dobra taloživost mulja preduvjet je za učinkovitu obradu otpadnih voda u klasičnim uređajima. SVI je definiran kao volumen (mL) koji zauzima 1 g svježeg aktivnog mulja nakon 30 minuta taloženja. Vrijednost SVI manja od 50 mL g⁻¹ ukazuje na dobru taloživost, a preporučene vrijednosti kreću se između 50 i 120 mL g⁻¹ (EPA, 1997). Na početku pokusa, nakon uspješno provedenog uzgoja, vrijednost SVI manja je od 50 g L⁻¹ što ukazuje na odličnu taloživost aktivnog mulja. Nakon testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a primijetimo povišenje SVI vrijednosti sa <50 g L⁻¹ na 80 g L⁻¹. Supernatant je bio bistar, mulj se brzo taložio te je bio izvrsne kvalitete, iz čega možemo zaključiti da je postojala dobra ravnoteža između žive i mrtve stanične biomase. Iako

se taloženje smatra dobrim do vrijednosti $SVI=120 \text{ g L}^{-1}$ ipak se primijetilo povećanje SVI mulja nakon njegova izlaganja stresu, odnosno visokim KPK vrijednostima.

Postavljeni uvjeti tijekom pokusa ne pogoduju isključivo rastu PAO-a, nego i rastu nitrificirajućih bakterija. Upravo zbog mogućnosti njihova rasta pri sličnim uvjetima, povremeno se u obradi otpadnih voda uklanjanje dušika i fosfora odvija u istom stupnju. S obzirom da je cilj ovog rada ispitivanje neto uklonjenog fosfora tijekom EBPR procesa, u bioreaktor je svakodnevno dodavana i alil-tiourea (ATU), kao inhibitor rasta nitrificirajućih bakterija čiji se rast zbog gore navedenih razloga htio spriječiti.

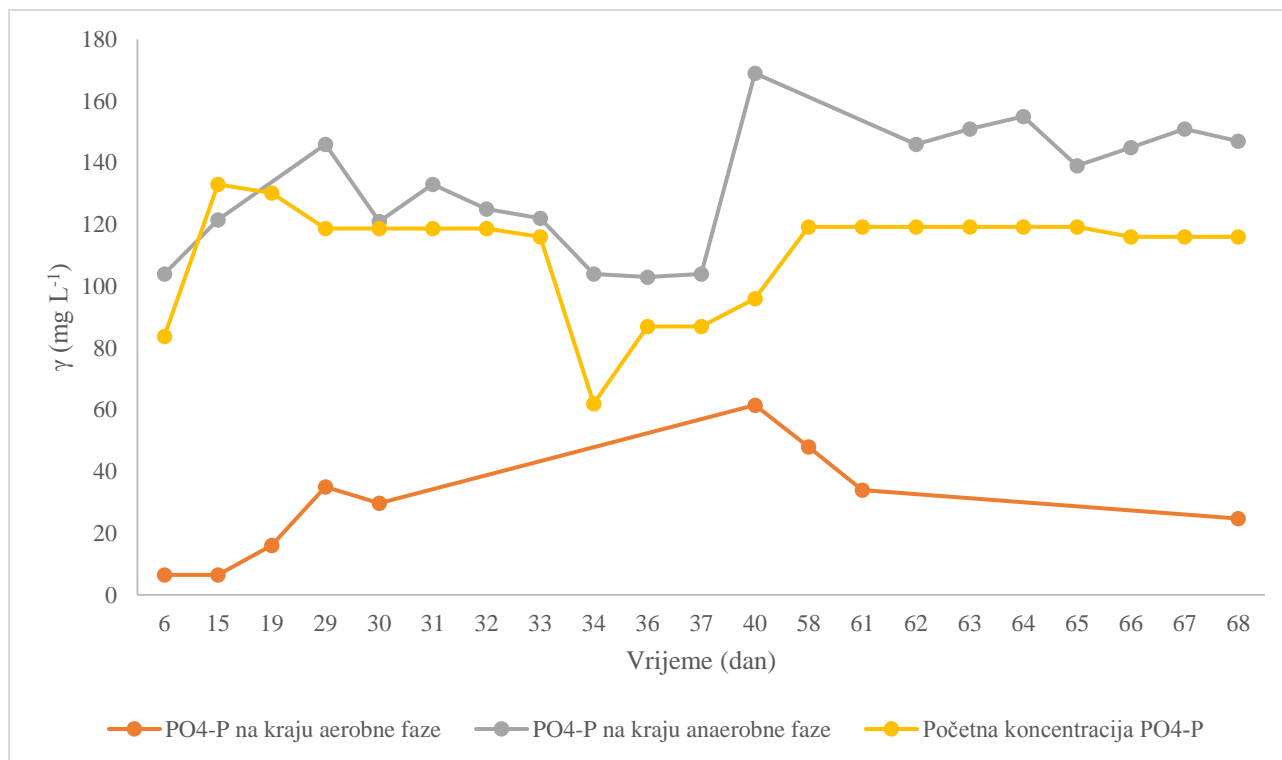
Tijekom pokusa praćena je koncentracija ukupnog dušika u nefiltriranom efluentu tijekom prvih 30 dana, te nitratnog i amonijakalnog dušika u filtriranom efluentu tijekom cijelog pokusa čiji su rezultati prikazani na slici 10. Dodavanjem ATU postignuta je inhibicija nitrificirajućih bakterija, što se može vidjeti i po niskoj koncentraciji nitrata tijekom pokusa, koja nikad nije bila viša od 1 mgN L^{-1} .



Slika 10. Koncentracija spojeva dušika u efluentu tijekom pokusa

Visoka koncentracija nitrata negativno utječe na odvijanje procesa EBPR, jer se pri visokoj koncentraciji nitrata u anaerobnim uvjetima, izvor ugljika uglavnom koristi za denitrifikaciju, te ne postizemo odgovarajuće uklanjanje fosfora. Niska koncentracija nitrata tijekom pokusa pokazuje da se dodavani natrijev acetat nije koristio za denitrifikaciju, nego gotovo isključivo za uklanjanje fosfora. Koncentracija amonijaka u efluentu je u stalnom padu tijekom pokusa, od početnih 80 mgN L^{-1} do $49,5 \text{ mgN L}^{-1}$. Dušik je makroelement, potreban za rast PAO-a, jer sudjeluje u važnim biološkim procesima sinteze proteina, aminokiselina, proteina, nukleotida, nukleinskih kiselina i slično. Prema literaturi, udio dušika u mulju trebao bi biti oko 10% po VSS (Henze i sur., 2008).

Prisutnost PAO u mulju osnovni je preduvjet za uspješno uklanjanje fosfora u obradi otpadnih voda, a povećanje broja prisutnih mikroorganizama, povećava i količinu uklonjenog fosfora. PAO uklanjaju fosfor na način da tijekom aerobne faze asimiliraju više fosfora za sintezu poli-P, nego što otpuštaju tijekom anaerobne faze (Oehmen i sur., 2007). Fosfor se iz procesa uklanja odvođenjem s viškom mulja na kraju aerobne faze. Za održavanje niže vrijednosti SRT-a potrebno je odvoditi više mulja iz bioreaktora, a time se iz reaktora izdvaja i više fosfora. Tijekom pokusa SRT je bio 10 dana, što se smatra optimalnom SRT vrijednosti za EBPR, a količina svakodnevno uklanjanog viška mulja iznosila je 200 mL dan^{-1} .



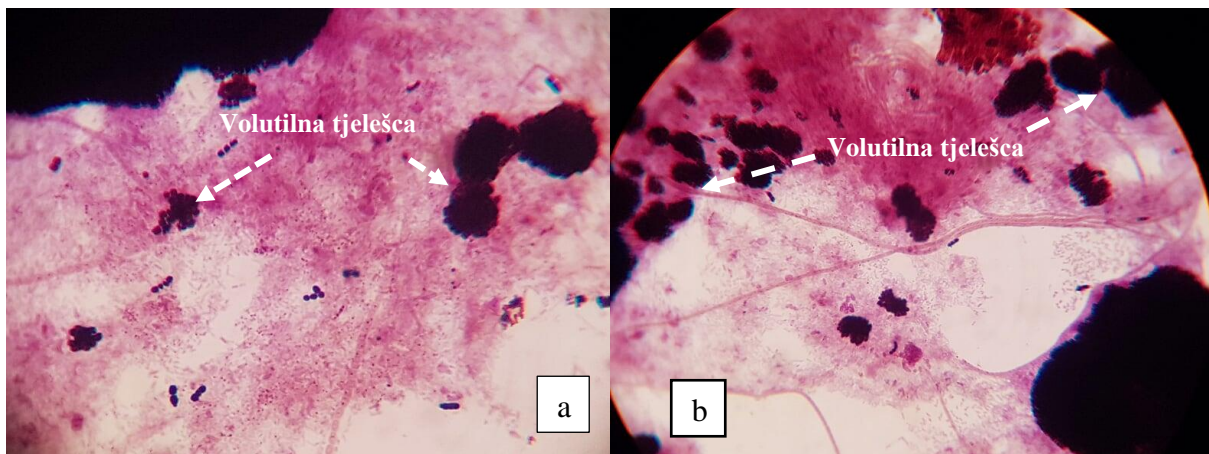
Slika 11. Koncentracija ukupnog P i orto-P nakon anaerobne i aerobne faze u filtriranom efluentu

Sukladno cilju ovog rada, pokus je bio usmjeren na praćenje utjecaja natrijeva acetata na metabolizam PAO-a. Zbog toga se tijekom pokusa u filtriranom efluentu pratila koncentracija ukupnog i otopljenog fosfora na kraju anaerobne i kraju aerobne faze ciklusa (slika 11). Prvih 15. dana koncentracija orto-P na kraju aerobne faze je stagnirala iako je povećana koncentracija orto-P na kraju anaerobne faze. To pokazuje da su na početku PAO-i uspješno uklanjali fosfor koji dopijeva u aerobnu fazu ciklusa. Daljnjim povećanjem koncentracije orto-P koji zaostaje na kraju anaerobne faze, PAO-i više nisu asimilirali fosfor, te primjećujemo i više koncentracije orto-P na kraju aerobne faze. Od 34. do 36. dana smanjena je koncentracija KPK na $1000 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ i fosfora na 50 mg L^{-1} u influentu, te 37. dan na $1400 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, odnosno 70 mg L^{-1} fosfora, kako bi se smanjila koncentracija KPK koja se prenosi u aerobnu fazu koja vjerojatno ometa asimilaciju fosfora tijekom aerobne faze i da bi PAO ponovno prilagodili na uvjete nedostatka KPK tijekom aerobne faze, te počeli asimilirati fosfor. Unatoč smanjenoj koncentraciji KPK i fosfora u influentu, trend povećanja koncentracije zaostalog fosfora na kraju aerobne faze, se nastavlja sve do 40. dana. Već tu primjećujemo promjene u metabolizmu PAO-a, koji više ne asimiliraju fosfat, nego se hrane KPK-om, točnije natrijevim acetatom (slika 8). Ponovna prilagodba, upotrebom influenta s nižim vrijednostima KPK i fosfora, provedena je ponovno od 47. do 54. dana. Ova prilagodba doprinijela je

ponovnom uspješnom uklanjanju fosfora tijekom pokusa, te koncentracija orto-P ponovno počinje padati od 40. dana, sve do kraja pokusa, tj. 68. dana, ali osjetno nižom brzinom.

4.2. Određivanje prisutnosti PAO-a mikroskopiranjem

Za utvrđivanje prisutnosti PAO-a u aktivnom mulju mogu se koristiti različite metode, a najčešće korištene su: FISH (fluorescentna *in situ* hibridizacija) i metode bojanja po Gramu i Neisseru. Metodom bojanja po Neisseru moguće je, pod mikroskopom, uočiti volutilna tjelešca, odnosno poli-P nakupine i zbog toga je u ovom radu korištena upravo ova metoda. Metoda po Neisseru zasniva se na vezanju bojila metilensko plavo i kristalviolet na metakromatska tjelešca, u koja spadaju i poli-P, pri čemu su ona pod mikroskopom vidljiva kao ljubičaste točke (slika 12).



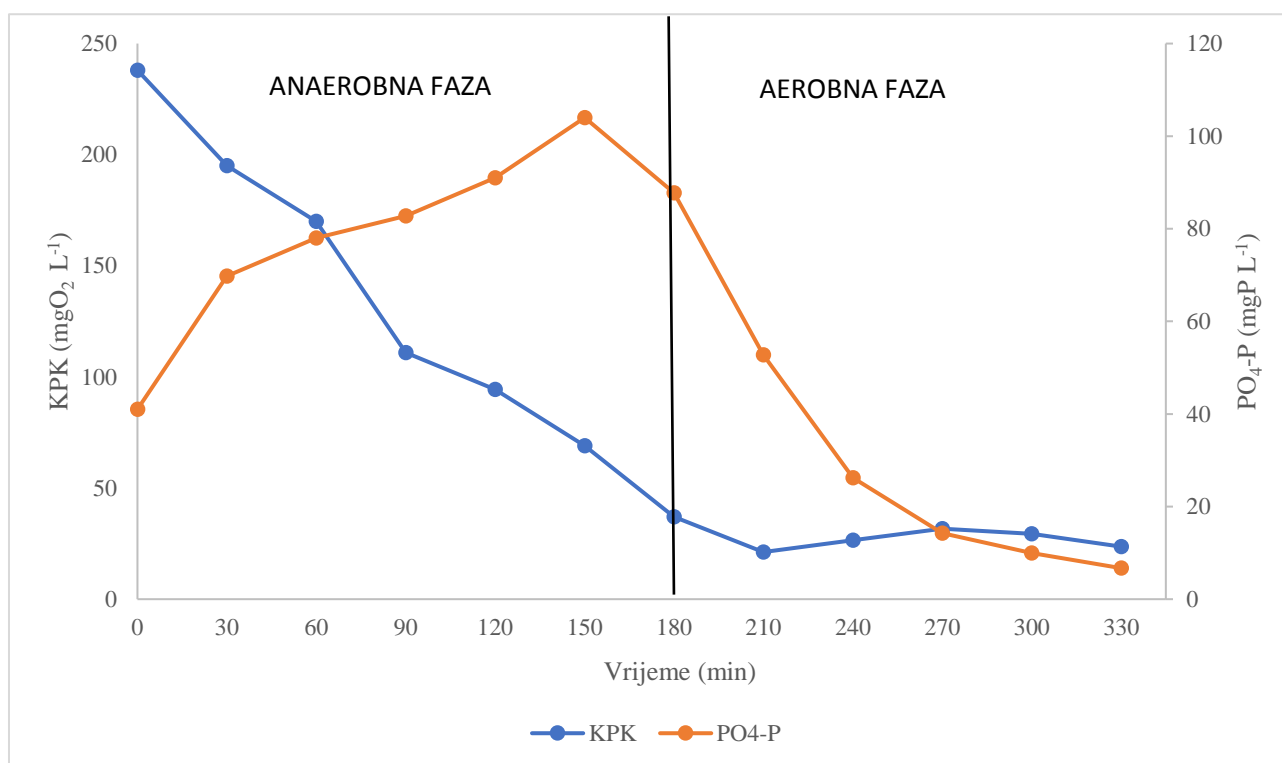
Slika 12. Mikroskopska slika uzorka mulja na kraju aerobne (a) i anaerobne faze (b)

Na slici 12 prikazane su mikroskopske slike uzorka aktivnog mulja uzetih na kraju aerobne (12a) i na kraju anaerobne (12b) faze. Metoda po Neisseru omogućuje viđenje poli-P nakupina u obliku ljubičastih točaka, koje možemo vidjeti i na navedenim slikama. Na kraju aerobne faze uočavamo poli-P u manjim nakupinama, dok na kraju anaerobne faze možemo primijetiti velike nakupine, tamno ljubičaste boje, odnosno visoku koncentraciju poli-P unutar PAO-a. Metabolizam PAO-a zasniva se na asimilaciji poli-P, i njihove sinteze u PHA lance tijekom anaerobne faze, te oksidacije pohranjenog PHA u aerobnoj fazi, radi osiguravanja energije za rast, poboljšano apsorpiranje fosfora i sintezu glikogena. Iz navedenih slika može se zamijetiti da PAO tijekom anaerobne faze sadrže značajno veće količine poli-P nakupina, u odnosu na količine prisutne tijekom aerobne faze ciklusa.

4.3. Rezultati testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAOa

Tijekom pokusa napravljeno je nekoliko testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a s različitim KPK vrijednostima prikazanim u tablici 5. Testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a je započeto s relativno niskom vrijednosti KPK od $238 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ te nastavljeno s višim KPK vrijednostima do $930 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Povremeno se između testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a s visokim KPK vrijednostima, provodilo ponovno testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a s KPK vrijednostima od oko $250 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ kako bi se provjerila aktivnost PAO-a u odnosu na početnu aktivnost pri prvom testiranju. U ovom poglavlju bit će navedeni rezultati nekoliko testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a iz kojih se mogu uočiti promjene zamijećene tijekom istraživanja.

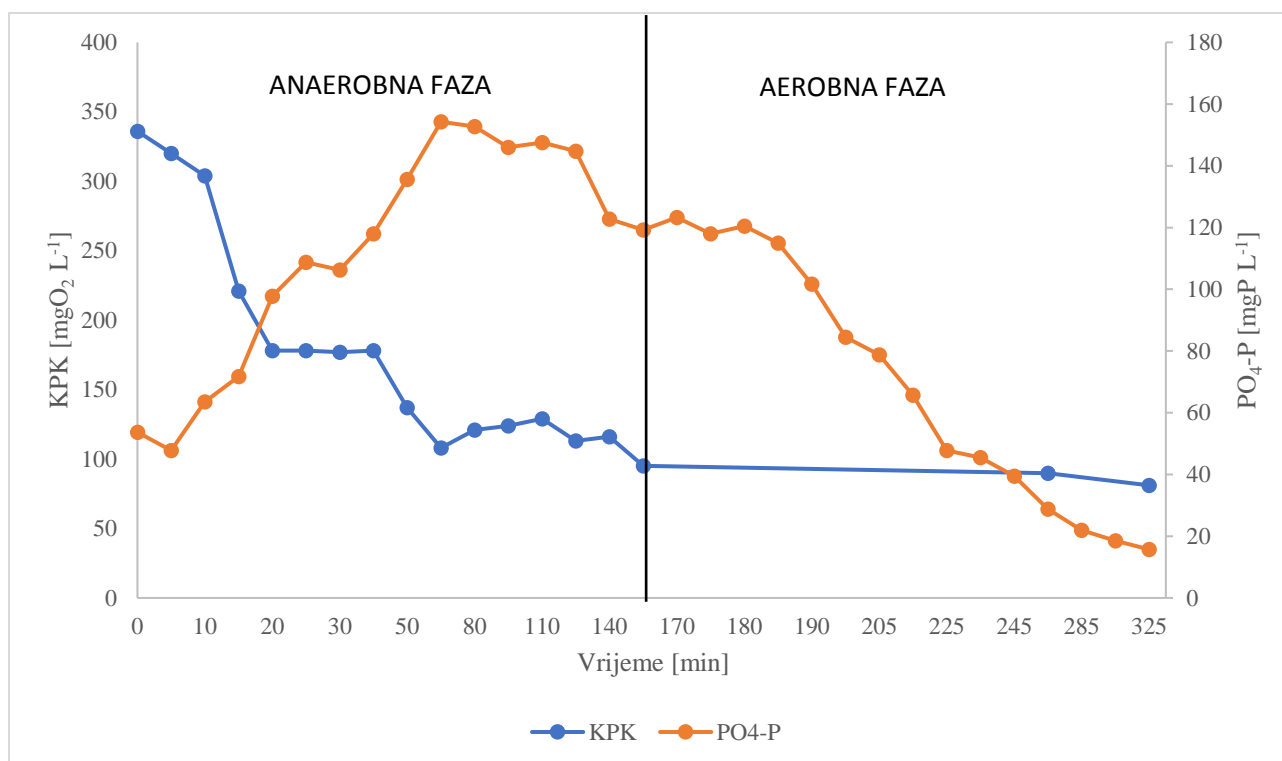
Tijekom testiranja praćene su promjene KPK vrijednosti i koncentracije $\text{PO}_4\text{-P}$ tijekom anaerobne i aerobne faze, određivane maksimalne specifične brzine asimilacije KPK i otpuštanja $\text{PO}_4\text{-P}$ tijekom anaerobne faze, te asimilacije $\text{PO}_4\text{-P}$ tijekom aerobne faze i izračunavane neto količine uklonjenog fosfora.



Slika 13. Testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a (6. dan)

(vrijednost koncentracije acetata na početku testiranja, KPK=238 mgO₂ L⁻¹)

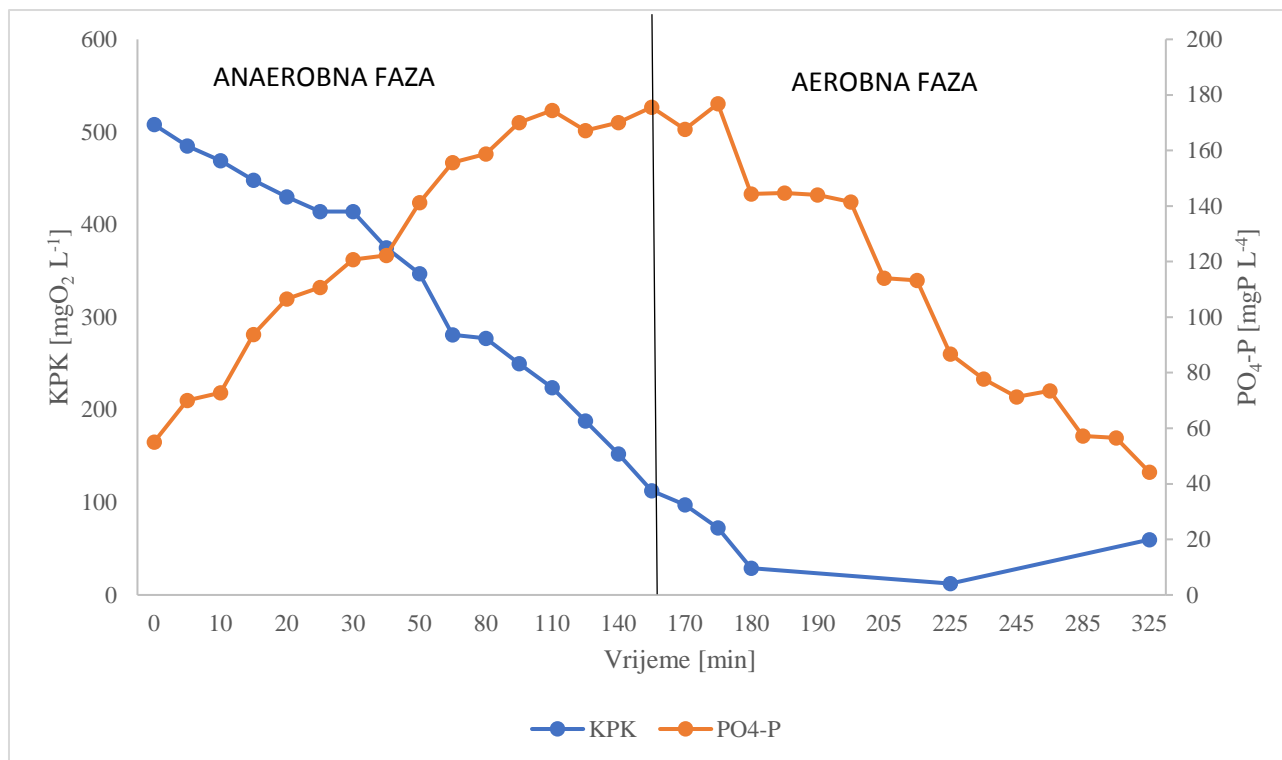
Prvo testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a provedeno je 6. dan pokusa, nakon uspješno provedenog uzgoja PAO-a u SBR uređaju tijekom 68 dana. Tijekom anaerobne faze primjećujemo gotovo proporcionalnu brzinu otpuštanja fosfora i asimilacije acetata, izraženog preko KPK vrijednosti, koji se pohranjuje kao poli-β-hidroksialkanoati i koristi za rast PAO-a. Asimilacija KPK nastavlja se i tijekom aerobne faze ciklusa, do određene konstante vrijednosti, ali je brzina asimilacija sporija. Za razliku od KPK, koji se asimilira i tijekom anaerobne i tijekom aerobne faze, fosfor se tijekom anaerobne faze otpušta iz bakterijskih stanica, a u aerobnoj fazi PAO-i asimiliraju otpušteni fosfor, kojeg koriste za sintezu poli-P. Ovi rezultati potvrđuju prisutnost PAO-a u aktivnom mulju i pokazuju učinkovit EBPR proces, s neto količinom uklonjenog fosfora od 13,14 mgPO₄-P (gVSS)⁻¹ (slika 13), što je više u odnosu na 10,9 mgP (gVSS)⁻¹ uklonjenih tijekom istraživanja Freitas i sur. (2009).



Slika 14. Testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a (19. dan)

(vrijednost koncentracije acetata na početku testiranja, $KPK=336 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$)

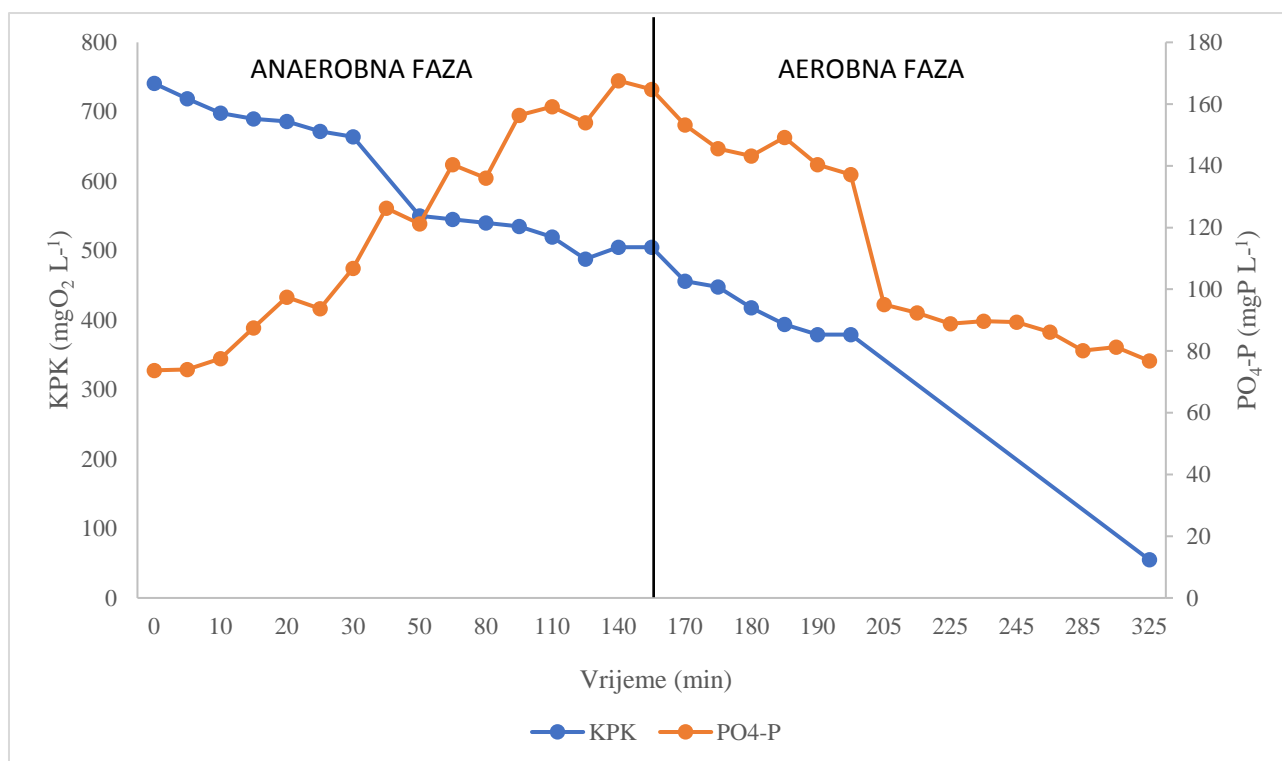
Drugo testiranje inhibicije biološke aktivnosti provedeno je 15. dan pokusa, sa početnom KPK vrijednosti $336 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Uzorci su u ovom slučaju ispitivani češće, točnije svakih 5 min na početku testiranja, te svakih pola sata kasnije tijekom testiranja. Možemo uočiti nešto sporiju asimilaciju KPK tijekom aerobne faze, te gotovo stagnaciju KPK vrijednosti do kraja aerobne faze (slika 14). Za razliku od KPK vrijednosti, $\text{PO}_4\text{-P}$ se brzo otpušta tijekom anaerobne i brzo asimilira tijekom aerobne faze. I u ovom testiranju inhibicije biološke aktivnosti PAO-a imamo pozitivnu količinu neto uklonjenog fosfora, koja iznosi $14,78 \text{ mgPO}_4\text{-P (gVSS)}^{-1}$. Prema maksimalnoj specifičnoj brzini otpuštanja fosfora i neto količini uklonjenog fosfora, možemo primijetiti da koncentracija od $336 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ nema negativnog utjecaja na metabolizam PAO-a. Naprotiv, povišena koncentracija u ovom slučaju potiče bržu asimilaciju fosfora tijekom aerobne faze te veće ukupno uklanjanje fosfora.



Slika 15. Testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a (20. dan)

(vrijednost koncentracije acetata na početku testiranja, $KPK=508 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$)

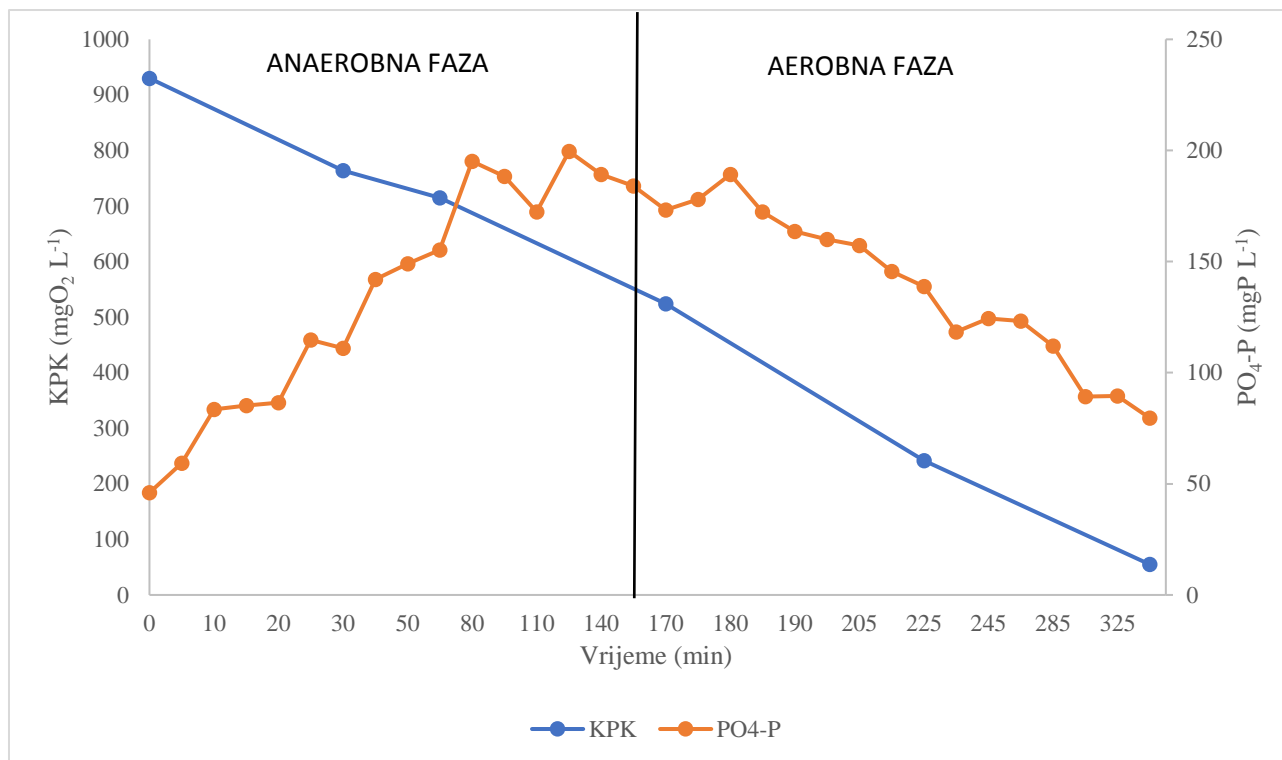
Rezultati trećeg testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a pokazuju rezultate slične rezultatima 2. testiranja. Brzina asimilacije KPK nastavlja se jednako i na početku aerobne faze, nakon čega se brzina polako smanjuje te uočavamo na kraju aerobne faze malo povećanje KPK vrijednosti u filtriranom uzorku (slika 15). Razlog ovog povećanja može biti greška prilikom analize posljednjeg uzorka ili odumiranje manjeg broja bakterija u aktivnom mulju koji doprinose povećanju KPK vrijednosti. I u ovom je testiranju inhibicije biološke aktivnosti PAO-a, neto količina uklonjenog fosfora je pozitivna, ali izmjerene su značajno manje vrijednosti u odnosu na prethodna dva testiranja i iznosile su tek $4,18 \text{ mgPO}_4\text{-P (gVSS)}^{-1}$. Brzina otpuštanja fosfora tijekom anaerobne faze nešto je brža od brzine asimilacije fosfora tijekom aerobne faze, što također doprinosi manjoj vrijednosti neto količine uklonjenog fosfora. Ni u ovom testiranju inhibicije biološke aktivnosti PAO-a ne možemo primijetiti značajan negativan utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata, na metabolizam PAO-a.



Slika 16. Testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a (28. dan)

(vrijednost koncentracije acetata na početku testiranja, $KPK=741 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$)

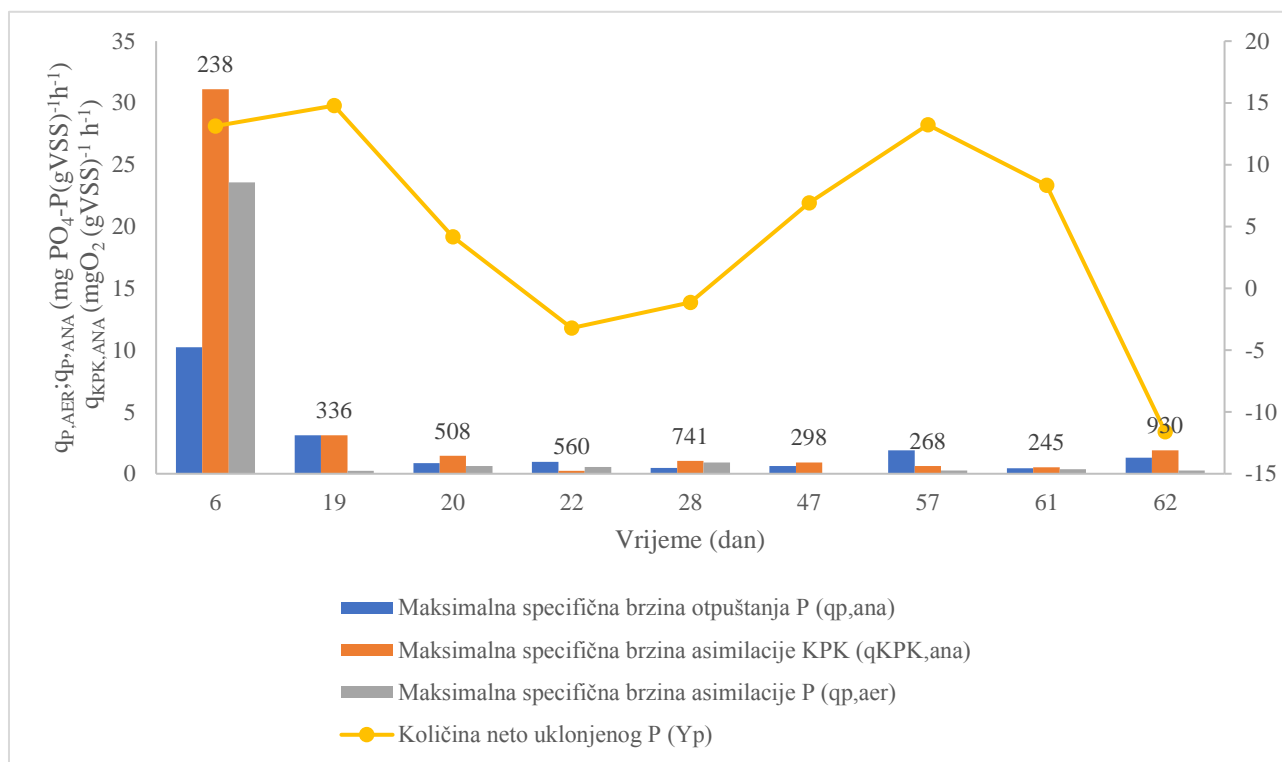
U ovom testiranju inhibicije biološke aktivnosti PAO-a možemo primijetiti razliku između provođenja EBPR procesa s koncentracijom KPK ispod i iznad $700 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Do sada je u svakom testiranju neto količina uklonjenog fosfora bila pozitivna, dok je u ovom testiranju očito, pri samom pogledu na graf (slika 16), neto količina uklonjenog fosfora negativna. Izračunata neto količina uklonjenog fosfora iznosi $-1,15 \text{ mgPO}_4\text{-P (gVSS)}^{-1}$, a brzina otpuštanja fosfora u anaerobnoj fazi brža je od asimilacije fosfora u aerobnoj fazi. Možemo također primijetiti da je visoka koncentracija KPK zaostala na kraju anaerobne faze, odnosno ušla u aerobnu fazu ciklusa. Do kraja aerobne faze ciklusa PAO-i, čiju smo dominaciju već dokazali mikroskopiranjem (slika 12) i testiranjima inhibicije biološke aktivnosti aktivnog mulja s $250 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ dodanog KPK na početku anaerobne faze (slika 13), asimiliraju gotovo sav prisutan acetat tijekom aerobne faze. Visoka vrijednost KPK koja zaostaje na kraju anaerobne faze mogla bi biti razlog zbog kojeg PAO-i više ne asimiliraju fosfor u značajnijoj količini, nego metabolizam usmjeravaju na asimilaciju acetata i rast u aerobnim uvjetima.



Slika 17. Testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a (62. dan)

(vrijednost koncentracije acetata na početku testiranja, $KPK=930 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$)

U ovom testiranju inhibicije biološke aktivnosti PAO-a koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$ praćena je svakih 5 do 30 min, dok je koncentracija KPK praćena svakih 30 do 60 min. I tijekom ovog testiranja na kraju anaerobne faze zaostaje visoka koncentracija KPK , koja ulazi u aerobnu fazu. PAO-i jednakom brzinom asimiliraju KPK tijekom cijelog ciklusa, dok je brzina asimilacije fosfora u aerobnoj fazi značajno manja u odnosu na brzinu otpuštanja fosfora u anaerobnoj fazi ciklusa (slika 17). Ovdje se potvrđuje pretpostavka iz prethodnog testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a (slika 16). Metabolizam PAO-a usmjeren je većinski na asimiliranje acetata te u slučaju njegova nedostatka u aerobnoj fazi, metabolizam će se usmjeriti na asimiliranje fosfora. PAO-i tijekom relativno kratke anaerobne faze nisu u mogućnosti asimilirati veće koncentracije acetata te kada je koncentracija acetata veća ili jednaka $500 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ na početku anaerobne faze, zaostali dio KPK dospije u aerobnu fazu i PAO-i onda usmjeravaju svoj metabolizam na asimiliranje acetata, kao glavnog izvora ugljika. Uz asimilaciju izvora ugljika, PAO-i i dalje asimiliraju fosfor, ali manjom brzinom jer imaju dostatne količine glavnog izvora ugljika kojeg pokušavaju asimilirati u što većoj količini. Neto količina uklonjenog fosfora i u ovom testiranju ima negativan predznak, točnije ona iznosi $-11,59 \text{ mgPO}_4\text{-P (gVSS)}^{-1}$.



Slika 18. Promjena maksimalnih specifičnih brzina asimilacije KPK i otpuštanja fosfora tijekom anaerobne faze, te maksimalne specifične brzine asimilacije fosfora tijekom aerobne faze u testiranjima inhibicije biološke aktivnosti PAO-a pri različitim koncentracijama KPK na početku anaerobne faze.

Već prema rezultatima testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a možemo primijetiti manju maksimalnu specifičnu brzinu asimilacije fosfora kada u aerobnoj fazi imamo visoku koncentraciju acetata. Na slici 18 prikazane su apsolutne vrijednosti maksimalnih specifičnih brzina asimilacije KPK i otpuštanja fosfora u anaerobnoj fazi tijekom pokusa, te maksimalnu specifičnu brzinu asimilacije fosfora tijekom aerobne faze. Povećanje koncentracije natrijeva acetata s 238 mgO₂ L⁻¹ na 336 mgO₂ L⁻¹ ima za posljedicu puno manju maksimalnu specifičnu brzinu otpuštanja i asimilacije fosfora, odnosno asimilacije KPK. Daljnjim povećanjem koncentracije natrijeva acetata u testiranju, maksimalna specifična brzina asimilacije KPK se značajnije ne mijenja, dok kod maksimalne specifične brzine otpuštanja fosfora primjećujemo manji pad pri povećanju koncentracije natrijeva acetata s 336 mgO₂ L⁻¹ na 508 mgO₂ L⁻¹, te povećanje maksimalne specifične brzine otpuštanja fosfora i maksimalne specifične brzine asimilacije KPK pri visokim koncentracijama KPK od 930 mgO₂ L⁻¹. Maksimalna specifična brzina asimilacije fosfora smanjuje se također pri povećanju

koncentracije natrijeva acetata sa $238 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ na $336 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$. Nakon toga maksimalna specifična brzina asimilacije fosfora tek je nešto viša od 0. Rezultati pokazuju negativan utjecaj visoke koncentracije natrijeva acetata na EBPR proces, te promjenu metabolizma PAO-a iz većinske asimilacije fosfora u većinsku asimilaciju KPK u aerobnoj fazi.

Na slici 18 prikazane su vrijednosti neto količine uklonjenog fosfora tijekom testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a. Možemo uočiti pad vrijednosti neto količine uklonjenog fosfora, kao posljedicu povećanja koncentracije natrijeva acetata u testiranju. Koncentracija KPK u influentu snižena je 34.-37., odnosno 47.-54. dan tijekom pokusa, radi prilagođavanja PAO na uvjete nedostatka KPK u influentu, a kako bi se potaknula povećana asimilacija fosfora. Prilagodba je uspješno provedena, što pokazuje i povećanje neto količine uklonjenog fosfora tijekom testiranja inhibicije biološke aktivnosti PAO-a, 57. dana pokusa. Testiranje inhibicije biološke aktivnosti PAO-a visokim koncentracijama natrijeva acetata, 61. i 62. dan, ponovno uzrokuje smanjenje neto količine uklonjenog fosfora, te povećanje maksimalne specifične brzine asimilacije KPK. Ovi rezultati potvrđuju hipotezu o promjeni metabolizma PAO-a iz većinske asimilacije fosfora u većinsku asimilaciju KPK u aerobnoj fazi, pri visokim koncentracijama natrijeva acetata.

5. ZAKLJUČCI

1. Visoke koncentracije natrijeva acetata u EBPR procesu uzrokuju smanjenje neto količine uklonjenog fosfora tijekom procesa, kao i samu učinkovitost EBPR procesa.
2. Pri visokim koncentracijama natrijeva acetata prilikom EBPR procesa ne dolazi do inhibicije rasta fosfor akumulirajućih organizama, nego samo do preusmjerenja metabolizma bakterija s asimilacije fosfora na povećanu asimilaciju izvora ugljika za rast.
3. Pri koncentraciji natrijeva acetata iznad $700 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$, u EBPR procesu, prestaje uklanjanje fosfora iz otpadne vode, što rezultira višom koncentracijom fosfora na kraju aerobne faze u odnosu na koncentraciju fosfora na početku anaerobne faze ciklusa i negativnom vrijednosti količine uklonjenog fosfora na kraju procesa.
4. Za uspješno uklanjanje fosfora u EPBR procesu važno je da se gotovo sav acetat potroši u anaerobnoj fazi da bi PAO u aerobnoj asimilirali fosfor.

6. LITERATURA

- Ahn, J., Daidou, T., Tsuned, S., Hirata, A. (2001) Metabolic behaviour of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 442–446.
- Bassin, J., Kleerebezem, R., Dezotti, M., van Loosdrecht, M. (2012) Simultaneous nitrogen and phosphate removal in aerobic granular sludge reactors operated at different temperatures. *Water Res.* **46(12)**, 3805-3816.
- Bribian, J., Magno, A., Zapata, P. (2018) *Sequence Batch Reactor (SBR) / SSWM*. [online] Sswm.info. Dostupno na: <https://www.sswm.info/node/8065> [Pristupljeno: 2. lipnja 2018].
- Cano, G., Mouahid, A., Carretier, E., Moulin, P. (2014) Biomass concentration by density measurement: activated sludge and membrane bioreactor. *JWS* **4**, 49-61.
- Carvalho, M., Oehmen, A., Carvalho, G., Reis, M. (2014) The effect of substrate competition on the metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water Res.* **64**, 149-159.
- Comeau, Y., Hall, K. J., Hancock, R. E. W., Oldham, W. K. (1986) Biochemical-model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.* **20(12)**, 1511-1521.
- Wastewater treatment manuals (1997) *Environmental Protection Agency*, Ireland
- Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001a) A metabolic model for acetate uptake under anaerobic conditions by glycogen accumulating organisms: Stoichiometry, kinetics, and the effect of pH. *Biotechnol. Bioeng.* **76(1)**, 17-31.
- Filipe, C. D. M., Daigger, G. T., Grady, C. P. L. (2001b) pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms. *Water Environ. Res.* **73(2)**, 223-232.
- Freitas, F., Temudo, M. F., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M. A. M. (2009) Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Bioresource Technol.* **100**, 1969-1976.
- Grady, C. P. L., Daigger, G. T., Love, N. G., Filipe, C. D. M. (2011) *Biological Wastewater Treatment*. 3. izdanje, IWA Publishing, Boca Raton.

- Henze, M., Harremoës, P., la Cour Jansen, J., Arvin, E. (2002) *Wastewater treatment: Biological and chemical processes* (Förlstner, U., Murphy, R. J., Rulkens, W. H.). 3. izdanje, Springer, Berlin Heidelberg.
- Janssen, P. M. J., Meinema, K., van der Roest, H. F. (2002) *Biological Phosphorus Removal: Manual for Design and Operation*. IWA Publishing
- Jenkins, D., Wanner, J. (2014) *Activated sludge*. London: IWA Pub., 33-47; 93-110.
- Liu W. T., Mino T, Matsuo T, Nakamura K. (1996) Biological phosphorus removal processes - Effect of pH on anaerobic substrate metabolism. *Water. Sci. Technol.* **34(1-2)**, 25-32.
- Lopez-Vazquez, C. M., Hooijmans, C. M., Brdjanovic, D., Gijzen, H. J., van Loosdrecht, M. C. M. (2009a) Temperature effects on glycogen accumulating organisms. *Water Res.* **43**, 2852-2864.
- Lopez-Vazquez, C., Oehmen, A., Hooijmans, C., Brdjanovic, D., Gijzen, H., Yuan, Z., van Loosdrecht, M. (2009b) Modeling the PAO–GAO competition: Effects of carbon source, pH and temperature. *Water Res.* **43(2)**, 450-462.
- Matošić. M. (2015) Membranski bioreaktori u zaštiti okoliša, Interna skripta PBF, Zagreb
- Meinhold, J., Arnold, E., Isaacs, S. (1999) Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Res.* **33**, 1871–1883.
- Mino, T., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* **32(11)**, 3193–3207.
- 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.
- Nielsen, J. L., Seviour, R. J., Nielsen, P. H. (2016) Mikroskopija. U: *Eskperimentalne metode u obradi otpadnih voda*, (van Loosdrecht, M. C. M., Nielsen, P. H., Lopez-Vazquez, C. M., Brdjanovic, D., ured.; prevela Jauk, T.) IWA Publishing, London, str. 272-276.
- Oehmen, A. (2004) *The competition between polyphosphate accumulating organisms and glycogen organisms in the enhanced biological phosphorous removal process*. Ph. D., The University of Queensland

- Oehmen A., Vives M. T., Lu H. B., Yuan Z. G., Keller J. (2005) The effect of pH on the competition between polyphosphate - accumulating organisms and glycogen – accumulating organisms. *Water Res.* **39**, 3727-3737.
- Oehmen, A., Saunders, A., Vives, M., Yuan, Z., Keller, J. (2006) Competition between polyphosphate and glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems with acetate and propionate as carbon sources. *J. Biotechnol.* **123**(1), 22-32.
- Oehmen, A., Lemos, P. C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L. L., Reis, M. A. M. (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale. *Water Res.* **41**(11), 2271-2300.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013) *Narodne novine* **80**, Zagreb.
- Saito, T., Brdjanovic, D., Van Loosdrecht, M. C. M. (2004) Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Res.* **38**, 3760–3768.
- 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., Mino T., Onuki, M. (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**(1), 99-127.
- Smolders, G. J. F., Vandermeij, 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**(6), 461- 470.
- Tarayre, C., Nguyen, H., Brognaux, A., Delepierre, A., De Clercq, L., Charlier, R., Michels, E., Meers, E., Delvigne, F. (2016) Characterisation of Phosphate Accumulating Organisms and Techniques for Polyphosphate Detection: A Review. *Sensors* **16** (6), str.797
- Tchobanoglous, G., Stensel, D., Tsuchihashi, R., Burton, F (2013) *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery* (Eddy, M., Ed.; McGraw-Hill). Education-Europe: London, UK
- Urdalen, I. (2013) *Polyphosphate Accumulating Organisms – recent advances in the microbiology of enhanced biological phosphorus removal*. Norwegian University of Science and Technology.

Vollenweider, R. A. (1968) Scientific Fundamentals of the Eutrophication of Lakes and Flowing Waters, with Particular Reference to Nitrogen and Phosphorus as Factors in Eutrophication. Paris: Organization for Economic Co-Operation and Development. 1968. Technical Report DAS/CS 1/68.27, str. 250.

Wentzel, M. C., Lötter, L. H., Loewenthal, R. E., Marais, G. v. R. (1986) Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal and a biochemical model. *Water SA* **12**, 209-224.

Wentzel, M. C., Ekama, G. A., Loewenthal, R. E., Dold, P. L., Marais, G. R. (1989) Enhanced polyphosphate organism cultures in activated sludge systems .2. Experimental behavior. *Water SA* **15** (2), 71– 88.

Yuan, Z., Pratt, S., Batstone, D. J. (2012) Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes. *Curr. Opin. Biotech.* **23(6)**, 878-883.

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**, 140-148.

Zhou, Y., Pijuan, M., Yuan, Z. (2007) Development of a 2-sludge, 3-stage system for nitrogen and phosphorus removal from high-strength wastewater using granular sludge and biofilms. Proceedings of the Nutrient Removal Conference-The State of Art 2007, March 4–7.

Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R. J., Yuan, Z. (2009) Involvement of the TCA cycle in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water Res.* **43(5)**, 1330-1340.