

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2019.

Kristina Čondić Galiničić

1171/BPI

**BIOLOŠKO UKLANJANJE
FOSFORA I DUŠIKA PRI NISKOJ
KONCENTRACIJI OTOPLJENOG
KISIKA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Tibeke Landeke Dragičević, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr. sc. Dijane Grgas.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Tibeli Landeki Dragičević na ukazanom povjerenju, tumačenju rezultata te pomoći i savjetima pri izradi diplomskog rada.

Asistentici dr. sc. Dijani Grgas zahvaljujem na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Željela bih se zahvaliti svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i strpljenju tijekom cijelog školovanja.

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

BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA I DUŠIKA PRI NISKOJ KONCENTRACIJI OTOPLJENOG KISIKA

Kristina Čondić Galiničić, 1171/BPI

Sažetak:

U procesu biološkog uklanjanja hranjivih tvari (BNR) pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$ postiže se istovremeno uklanjanje C, N i P, provođenjem procesa istovremene nitrifikacije i denitrifikacije (SND) i aktivnosti PAOs. Učinkovitost procesa SND se povećava s povećanjem organskih sastojaka izraženih kao KPK, omjera KPK/P odnosno KPK/N i pri omjeru KPK/P 32 koji odgovara omjeru KPK/N 11 učinak SND je 86 %. Za istražene omjere KPK/P 18, 25 i 32 postignuto je uklanjanje $PO_4\text{-P}$ od 54 %, 61 % i 42 % od početne koncentracije $20 \text{ mg } PO_4\text{-P L}^{-1}$ pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$.

Ključne riječi: denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi, fosfor akumulirajući organizmi, istovremena nitrifikacija i denitrifikacija

Rad sadrži: 41 stranica, 15 slika, 2 tablice, 98 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: *dr. sc. Dijana Grgas, asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. *Mirjana Čurlin*
2. prof. dr. sc. *Tibela Landeka Dragičević*
3. doc. dr. sc. *Andreja Leboš Pavunc*
4. prof. dr. sc. *Marin Matošić* (zamjena)

Datum obrane: 11. prosinca 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Technology
Laboratory for the Biological Waste Water Treatment
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

BIOLOGICAL PHOSPHORUS AND NITROGEN REMOVAL AT LOW DISSOLVED OXYGEN

Kristina Čondić Galiničić, 1171/BPI

Abstract:

In the process of biological nutrient removal (BNR) at $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, simultaneous removal of C, N and P is achieved by carrying out the process of simultaneous nitrification and denitrification (SND) and activity of PAOs. The efficiency of the SND process increases with the increase of the organic compounds expressed as COD, the COD/P ratio (COD/N ratio), and at a ratio of COD/P 32 corresponding to the COD/N 11 ratio, the SND effect is 86 %. For the investigated COD/P ratios of 18, 25 and 32, a $\text{PO}_4\text{-P}$ removal of 54 %, 61 % and 42 % from the initial concentration of $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$ at $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$ was achieved.

Keywords: denitrifying phosphorus accumulating organisms, phosphorus accumulating organisms, simultaneous nitrification and denitrification

Thesis contains: 41 pages, 15 figures, 2 tables, 98 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: *Dijana Grgas, PhD, Senior Assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Mirjana Čurlin*, Associated Professor
2. PhD. *Tibela Landeka Dragičević*, Full Professor
3. PhD. *Andrea Leboš Pavunc*, Assistant Professor
4. PhD. *Marin Matošić*, Full Professor (substitute)

Thesis defended: 11 December 2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA.....	2
2.2. BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA.....	3
2.3. MIKROORGANIZMI U UKLANJANJU N I P.....	4
2.3.1. PAOs.....	4
2.3.2. DPAOs.....	6
2.3.3. GAOs.....	7
2.3.4. Mikroorganizmi u uklanjanju fosfora u konfiguraciji procesa anaerobno/aerobni uvjeti (A/O) i anaerobno/anoksični uvjeti (A/A).....	7
2.4. ČIMBENICI PROCESA UKLANJANJA P.....	9
2.4.1. Supstrat.....	9
2.4.2. Ioni.....	10
2.4.3. Koncentracija mikrobne biomase.....	10
2.4.4. Otopljeni kisik.....	10
2.4.5. Temperatura.....	11
2.4.6. pH.....	11
2.4.7. Koncentracija NO ₂ -N i NO ₃ -N.....	11
2.4.8. Koncentracija organskih spojeva.....	12
2.5. ISTOVREMENO UKLANJANJE FOSFORA I DUŠIKA – DOSADAŠNJE SPOZNAJE.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1.1. Sintetski medij – izvor C, N i P.....	14
3.1.2. Dizajn pokusa.....	14
3.1.3. Aparatura i pribor.....	15
3.2. FIZIKLNO-KEMIJSKE ANALITIČKE METODE.....	16
3.2.1. Određivanje koncentracije fosfata.....	16
3.2.2. Određivanje koncentracije nitrita.....	16
3.2.3. Određivanje koncentracije nitrata.....	16
3.2.4. Određivanje koncentracije amonijaka.....	17
3.2.5. Određivanje ukupnog dušika.....	17
3.2.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK).....	17
3.2.7. Određivanje koncentracije otopljenog kisika.....	18
3.2.8. Određivanje temperature.....	18
3.2.9. Određivanje pH vrijednosti.....	19
3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
5. ZAKLJUČCI	31
6. LITERATURA	32

1. UVOD

Eutrofikacija vodnih tijela jedan je od vrlo izazovnih ekoloških problema u svijetu. Glavni čimbenici koji utječu na eutrofikaciju vode uključuju obogaćivanje hranjivim tvarima (dušikom i fosforom), zatim hidrodinamiku, okolišne čimbenike poput temperature, slanosti, ugljičnog dioksida, ravnoteže elemenata i dr., kao i mikrobnu i biološku raznolikost. Pojava eutrofikacije vode je složena funkcija svih mogućih utjecajnih čimbenika. Iz tog razloga, maksimalna koncentracija dušika (N) i fosfora (P) u vodama za ispušt u okoliš definirana je zakonom (Pravilnik, 2013).

Biološko uklanjanje P iz otpadnih voda temelji se na aktivnosti fosfat akumulirajućih organizama (PAOs, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*), koji u anaerobnim uvjetima uzimaju lakorazgradive organske sastojke iz otpadne vode i pohranjuju ih u obliku polihidroksialkanoata (PHAs, engl. *Polyhydroxyalkanoates*), a u aerobnom uvjetu koriste PHAs za generiranje energije potrebne za unos P, koji se u aerobnom uvjetu unosi puno više nego li se otpušta u anaerobnom uvjetu (engl. *Luxury uptake*).

Denitrificirajući fosfat akumulirajući organizmi (DPAOs, engl. *Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms*), frakcija PAOs, mogu unositi P u stanice pri anoksičnim uvjetima (Kuba, 1993; Hu i sur., 2002; Zhou i sur., 2010), koristeći nitrate ($\text{NO}_3\text{-N}$) ili nitrite ($\text{NO}_2\text{-N}$) kao elektron akceptore i tako provoditi uklanjanje i N i P. Denitrificirajuća defosfatacija u odnosu na konvencionalni EBPR proces rezultira manjim generiranjem mulja, a provođenje procesa u anoksičnim uvjetima rezultira smanjenjem troškova za aeraciju. Za DPAOs je istaknuto da mogu koristiti i kisik kao akceptor elektrona (Hu i sur., 2002).

Kako i denitrifikacija i proces unosa P zahtijevaju organske sastojke, postoji kompeticija za organskim sastojcima između PAOs i dušik uklanjajućih organizama.

Nitrit se u procesu biološkog uklanjanja N pojavljuje kao intermedijer i u procesu nitrifikacije (oksidacija amonijaka do nitrita, koji se dalje oksidira do nitrata), i u procesu denitrifikacije (redukcija nitrata u četiri koraka: $\text{NO}_3\text{-N} \rightarrow \text{NO}_2\text{-N} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), (Tchobanoglous i sur., 2004).

Učinkovitost biološkog procesa uklanjanja hranjivih tvari (N i P) ovisi o nizu čimbenika, poput dostupnosti izvora ugljika i elektron akceptora (Smolders i sur., 1994; Pijuan i sur., 2005).

Doprinos stjecanju spoznaja o biološkom procesu uklanjanja P i N pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika je ovaj rad s ciljem određivanja učinka omjera KPK/P i N/P pri $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ na učinkovitost uklanjanja C, N i P.

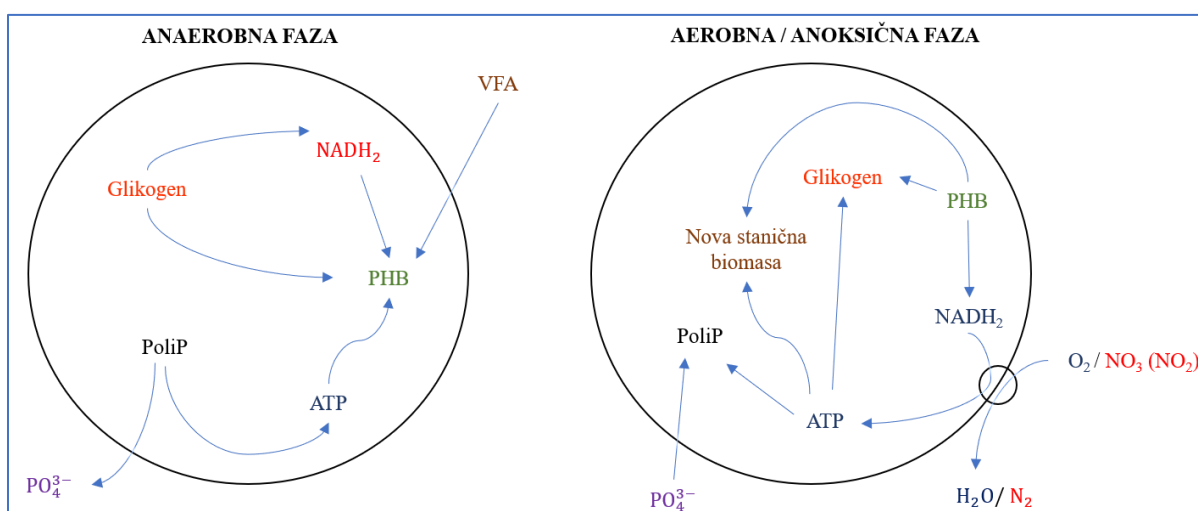
2. TEORIJSKI DIO

Proces biološkog uklanjanja hranjivih tvari iz otpadne vode (BNR, engl. *Biological nutrient removal*) predstavlja ekonomičnu i održivu tehnologiju istovremenog uklanjanja N i P.

U provođenju procesa jedan od ključnih čimbenika je dostupnost raspoloživih elektron donora za proces denitrifikacije i energije za napredno biološko uklanjanje fosfora (EBPR, engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*), kao i prisutnost elektron akceptora za unos P. Acetat je učinkoviti izvor ugljika i za denitrifikaciju i za EBPR proces (Peng i sur., 2007; Li i sur., 2008), dok u anoksičnom P unosu nitrat ($\text{NO}_3\text{-N}$) i nitrit ($\text{NO}_2\text{-N}$) su akceptori elektrona (Kuba, 1993; Hu i sur., 2002; Zhou i sur., 2010).

2.1. BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA

Biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode temelji se na aktivnosti PAOs prisutnih u aktivnom mulju. Odvođenjem viška mulja iz sustava s PAOs u kojima je unutarstanično pospremljen fosfat u obliku polifosfata (poliP) uklanja se fosfor iz otpadne vode (Mino i sur., 1998; Seviouri sur., 2003). Metabolizam PAOs prikazan je slikom 1.



Slika 1. Metabolizam PAOs u anaerobnim i aerobnim/anoksičnim uvjetima (Yuan i sur., 2012).

U anaerobnoj fazi (Slika 1) PAOs koriste lakorazgradive organske izvore ugljika iz vodenog medija te ih unutarstanično skladište u obliku polihidroksialkanoata (PHA, engl. *Polyhydroxyalkanoate*) (Wang i sur., 2009).

Energija za ovaj proces dobivena je hidrolizom intracelularnog polifosfata i glikolizom glikogena uslijed čega mikroorganizmi otpuštaju ortofosfat iz stanice u okolnu otopinu (Lee i sur., 2001; Tchobanoglous i sur., 2004).

U aerobnim uvjetima PAOs troše skladištene PHA kao izvor energije za unos ortofosfata u stanicu i njegovo pospremanje u obliku polifosfata, za obnavljanje zaliha glikogena, i za stanični rast (Wei i sur., 2014). U aerobnim uvjetima akceptor elektrona je kisik, a u anoksičnim uvjetima $\text{NO}_2\text{-N}$ i/ili $\text{NO}_3\text{-N}$.

Glavna razlika između aerobnog i anoksičnog unosa fosfata je da PAOs za formiranje ATP u anoksičnim uvjetima koriste nitrat ili nitrit. Ostatak metabolizma PAOs u aerobnim i anoksičnim uvjetima je isti. Međutim, u anoksičnim uvjetima se formira oko 40 % manje ATP po količini NADH_2 , nego u aerobnim uvjetima, a nizak omjer ATP/NADH_2 u konačnici znači manju proizvodnju biomase u anoksičnim uvjetima.

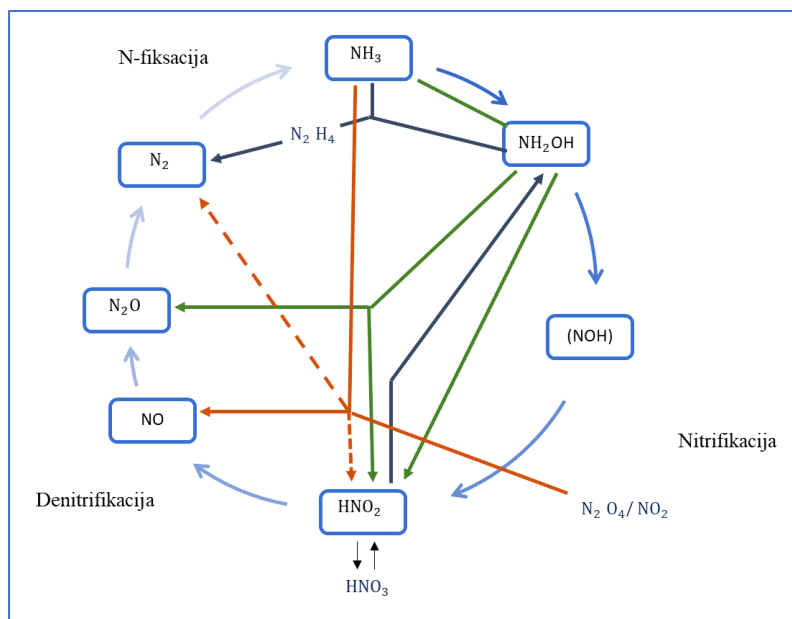
Istraživanja su pokazala da je bilanca anaerobnog otpuštanja $\text{PO}_4\text{-P}$ manja od aerobnog unosa $\text{PO}_4\text{-P}$ u stanice PAOs. Postotak unutarstaničnog poliP gotovo je tri puta veći u aerobnim, nego u anaerobnim uvjetima (Saia i sur., 2017).

PAOs su sposobni akumulirati P u koncentracijama većim od staničnih potreba za rast. Organizmi prisutni u „običnom“ aktivnom mulju mogu akumulirati približno 2 % fosfora u suhoj biomasi, a EBPR organizmi mogu akumulirati 4-8 % fosfata (Gebremariam i sur., 2011). Ukupno uklanjanje fosfora se postiže uklanjanjem viška aktivnog mulja koji je bogat poliP (Kuba i sur., 1993; Hu i sur., 2002; Tchobanoglous i sur., 2004; Zhou i sur., 2010).

PoliP je polimer koji se sastoji od lanca fosfata i kationa koji održavaju ravnotežu, kationa poput vodika, magnezija, kalija, kalcija (Gu i sur., 2005). Pokazano je da su dužina, oblik i kationi koji povezuju različite frakcije polifosfata ovisne o konfiguraciji EBPR procesa i količini nitrata vraćenih u anaerobnu fazu (Lockwood i sur., 1900; Lindrea i sur., 1994). Primjerice dugolančani polifosfati povezani su sa stabilnijom izvedbom s manje recikliranih nitrata (Lindrea i sur., 1994). Sva ta zapažanja ukazuju na to da struktura i sastav poliP mogu varirati između različitih EBPR sustava i mogu utjecati na izvedbu uklanjanja fosfata.

2.2. BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA

Biološko uklanjanje dušika provodi se kombinacijom procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Nitrifikaciju provode autotrofni i heterotrofni mikroorganizmi. Autotrofni mikroorganizmi koriste CO_2 kao izvor ugljika, a energiju dobivaju oksidacijom amonijaka u nitrite, te nitrita u nitrate, dok heterotrofni potrebe za ugljikom i energijom zadovoljavaju iz istog organskog supstrata (Henze i sur., 2008). Ciklus kruženja dušika prikazan je slikom 2.



Slika 2. Ciklus kruženja dušika, prilagođeno iz Henze i sur., (2008).

Za oksidaciju amonijaka u nitrite potrebno je $3,43 \text{ mg O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ N}$, a za oksidaciju nitrita u nitrate $1,1 \text{ mg O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ N}$ (Henze i sur., 2008). Za denitrifikaciju 1 mg NO_3^- u anoksičnoj zoni potrebno je $8,6 \text{ mg KPK}$ (Henze i sur., 2008).

2.3. MIKROORGANIZMI U UKLANJANJU N I P

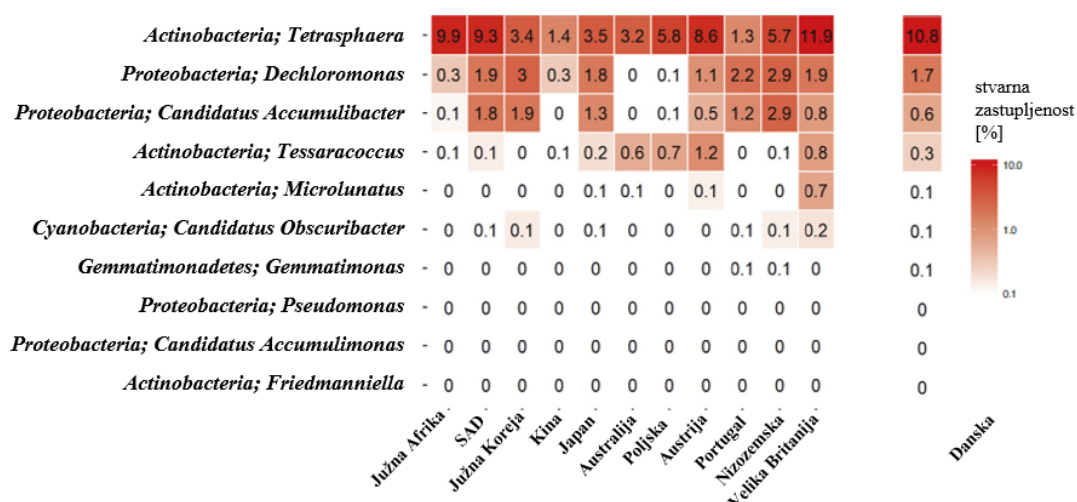
2.3.1. PAOs

Većina istraživanja aktivnosti PAOs u aktivnom mulju provedena su u laboratorijskom mjerilu ili pilot postrojenjima (Oehmen i sur., 2007; Muszyński i sur., 2013).

U laboratorijskom mjerilu uglavnom se koristi acetat kao jedini izvor ugljika te tada dominira „*Candidatus Accumulibacter phosphatis*“ (Lu i sur., 2006). Ova skupina PAOs može imati važnu ulogu u postrojenjima za obradu otpadne vode (*full-scale*) gdje čine 5-22 % biomase (Kong i sur., 2005a). U postrojenjima za obradu otpadne vode u velikom broju (25-35 %) pronađeni su pripadnici roda *Tetrasphaera* (Kong i sur., 2005b; McIlroy i sur., 2010; Nguyen i sur., 2011). U pilot postrojenjima rod *Tetrasphaera* prisutan je u malim količinama ili se uopće ne nalazi u aktivnom mulju (Keene i sur., 2017).

Istraživanja provedena na trideset danskih postrojenja za obradu otpadne vode (Slika 3) dokazala su kako *Candidatus Halomonas phosphatis* čine 0,5-5,7 % mikrobne biomase što je najčešće veći udio od *Accumulibacter* (Nguyen i sur., 2012).

Uzorci s postrojenja za obradu otpadne vode sadrže 30 % PAOs u ukupnom aktivnom mulju (Mielczarek i sur., 2013).



Slika 3. Relativni broj PAOs u aktivnom mulju s uređaja za obradu otpadne vode iz 12 zemalja s 5 kontinenata. Prosječne vrijednosti za svaku zemlju, osim Danske, su temeljene na 3-9 uzoraka uzetih s 2-4 EBPR uređaja, sakupljeni tijekom 2011.-2014. godine (Nielsen i sur., 2019).

Istraživanja dinamike mikrobne populacije u aktivnom mulju u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda tijekom dvogodišnjeg razdoblja pokazala su da su varijacije mikrobe zajednice posljedica različite bakterijske fiziologije i afiniteta prema različitim supstratima (Muszyński i sur., 2015). Tako, *Tetrasphaera* može koristiti raznovrsnije supstrate kao što su aminokiseline i glukoza u anaerobnim i aerobnim uvjetima (Kong i sur., 2005b), a neki pripadnici ovog roda mogu koristiti i glutamat i acetat u anaerobnim uvjetima (Nguyen i sur., 2011).

Accumulibacter primarno kao supstrat koristi lakohlapive masne kiseline (acetat i propionat) i u manjoj mjeri aminokiseline (Kristiansen i sur., 2013).

Halomonas mogu koristiti samo supstrate s niskom molekulskom masom kao što su acetat, propionat i etanol (Nguyen i sur., 2012).

Važan čimbenik koji utječe na PAOs je omjer ugljika i fosfora, a nizak omjer KPK/P potiče rast PAOs u flokulama i granulama u laboratorijskim uvjetima (Kong i sur., 2002; Muszyński i sur., 2015). Neka postrojenja sadrže i veće udjele rodova *Dechloromonas* i *Tessaracoccus*. Istaknuto je da se do danas jedino rodovi *Tetrasphaera* i *Accumulibacter* konstantno pronalaze u sustavima za biološko uklanjanje fosfora (Nielsen i sur., 2019).

2.3.2. DPAOs

Denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (DPAOs, engl. *Denitrifying Phosphorus Accumulating Organisms*) imaju potencijal istovremenog uklanjanja dušika i uzimanja fosfora iz otpadne vode (Ahn i sur., 2002; Freitas i sur., 2005; Baeza i sur., 2014). DPAOs imaju sposobnost korištenja nitrata ili nitrita kao elektron akceptora, umjesto kisika, odnosno uklanjanja dušika i fosfora iz otpadnih voda izmjenom anaerobnih i anoksičnih uvjeta.

Kuba i sur. (1996) sugeriraju da DPAOs moraju biti izloženi NO_3^- -N kako bi se potaknuo denitrificirajući biokemijski put proizvodnjom potrebnih enzima (nitrat reduktaza). U uvjetima bez uklanjanja dušika enzim nitrat reduktaza je prisutan u ograničenim količinama. Za razliku od kompleksa enzima odgovornih za oksidativnu fosforilaciju kojima je krajnji akceptor elektrona kisik koji su uvijek prisutni, što ukazuje na to da je aktivnost DPAOs inducirana izlaganjem mulja anoksičnim uvjetima.

Kinetika i stehiometrija DPAOs je uglavnom istraživana pri anoksičnim uvjetima s nitratom kao akceptorom elektrona i određivani su uvjeti koji stimuliraju rast PAOs u anoksičnim uvjetima. Rezultati pokazuju da u sustavu biološkog uklanjanja nutrijenata aktivnim muljem PAOs mogu koristiti nitrat kao elektron akceptor umjesto kisika, ali rast PAOs u anoksičnim uvjetima je za 70 % manji u odnosu na aerobne uvjete. Nadalje, rezultati tog istraživanja ukazuju da je značajan čimbenik pojavljivanja DPAOs i anoksičnog unosa P opterećenje s nitratom koje treba biti dovoljno veliko odnosno premašiti denitrifikacijski potencijal potencijalnih uobičajenih heterotrofnih organizama (OHO, engl. *Ordinary Heterotrophic Organisms*) odnosno ne-PAOs organizama kako bi i DPAOs u suvišku prisutnog NO_3^- -N imali priliku razviti se u sustavu. Ostali čimbenici koji imaju učinak na DPAOs u sustavu su aerobna frakcija procesa, slijed reakcija u reaktoru, frekvencija izmjena aerobne i anaerobne faze procesa (Hu i sur., 2002). Prema Hu i sur. (2002) PAOs se mogu podijeliti u dvije skupine: (i) aerobni PAOs koji koriste samo kisik kao elektron akceptore, i (ii) denitrificirajući PAOs (DPAOs) koji mogu koristiti i kisik i nitrat kao elektron akceptore.

Carvalho i sur. (2007) u procesu anaerobno-anoksične konfiguracije s nitratom kao akceptorom elektrona i acetatom kao donorom elektrona su pokazali da dolazi do progresivnog smanjenja učinkovitosti uklanjanja P zbog limitacije glikogena ili inhibicije nitritom. No, uklanjanje P uz nitrit moguće je provoditi sa vrijednostima koncentracije nitrita puno većim od onih koje su inhibicijskog učinka za aerobni P unos (Ahn i sur., 2001).

„*Candidatus accumulibacter phosphatis*“, dominantna bakterija u EBPR sustavu, se može podijeliti u dvije skupine, svaka s nekoliko razreda s različitim sposobnostima denitrifikacije (Flowers i sur., 2009). Nađeno je da skupina IA može reducirati nitrat i unositi P, dok IIA ne može koristiti nitrat, nego nitrit.

2.3.3. GAOs

Glikogen akumulirajući organizmi (GAOs, engl. *Glycogen Accumulating Organisms*) izravno konkuriraju PAOs vrstama jer poput PAOs uzimaju organski susstrat, ali ne uklanjaju (akumuliraju) fosfat te ih to čini nepoželjnim u ovim sustavima (Oehmen i sur., 2007). Kultura obogaćena GAOs ima mogućnost denitrifikacije međutim konačni proizvod denitrifikacije je dušikov oksid koji se smatra nepoželjnim stakleničkim plinom (Zeng i sur., 2003), što bi moglo predstavljati problem ukoliko GAOs prevladaju u aktivnom mulju.

Trenutno su prihvaćene dvije skupine GAOs: gamaproteobakterijska *Candidatus Competibacter phosphatis* i alfavroteobakterijski *Deffluviicoccus vanus* koje povećavaju broj mikroorganizama koji sudjeluju u EBPR i čine ga kompleksnijim za istraživanje odnosno postavljanje modela (Oehmen i sur., 2010).

Istraživanja u laboratorijskom mjerilu su pokazala kako temperatura oko 30 °C pogoduje GAOs nad PAOs (López-Vázquez i sur., 2009a). Međutim, novija istraživanja su pokazala kako je ova pretpostavka netočna, EBPR procesi u velikom mjerilu dobro funkcioniraju na temperaturama od 28 °C do 32 °C (Ong i sur., 2014; Cokro i sur., 2017; Qiu i sur., 2019).

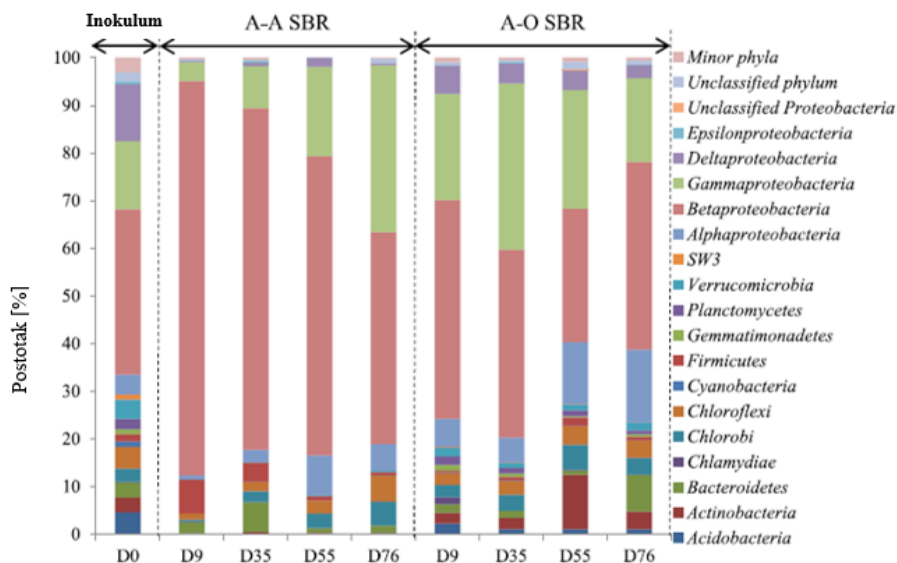
Prisutnost GAOs u procesima laboratorijskog mjerila dokazan je kao potencijalno štetan za normalno odvijanje EBPR procesa. Međutim još nije dokumentiran takav slučaj u velikom mjerilu (Nielsen i sur., 2019). Iako ne postoje dokazi koji bi sugerirali da su GAOs odgovorni za ometanje procesa biološkog uklanjanja fosfora i dalje postoji mogućnost njihove prisutnosti u većem udjelu aktivnog mulja što može utjecati na potrošnju izvora ugljika i hranjivih tvari.

2.3.4. Mikroorganizmi u uklanjanju fosfora u konfiguraciji procesa anaerobno/aerobni uvjeti (A/O) i anaerobno/anoksični uvjeti (A/A)

Još uvijek nije jasno jesu li isti organizmi odgovorni za uklanjanje fosfora u aerobnim i anoksičnim uvjetima (Lv i sur., 2014).

Pretpostavlja se da su DPAOs isti organizmi kao PAOs samo pri različitim uvjetima pokazuju različite aktivnosti (Wachtmeister i sur., 1997; Zeng i sur., 2003).

Stoga je istražena i uspoređena prisutnost mikroorganizama u konfiguraciji procesa pri anaerobno/aerobnim (A/O) uvjetima i anaerobno/anoksičnim uvjetima (A/A) (Slika 4).



Slika 4. Udio razreda i koljena *Proteobacteria* određenih pomoću *Global Alignment for Sequence Taxonomy* (GAST), u uzorcima aktivnog mulja 9., 35., 55. i 76. dana rada SBR sustava u konfiguraciji anaerobno/aerobni (A-O) i anaerobno/anoksični (A-A) uvjeti (Lv i sur., 2014).

Rezultati tog istraživanja (Lv i sur., 2014), (Slika 4) su slijedeći:

- *Proteobacteria* je najzastupljenije koljeno u svim uzorcima i čini od 65,8 % do 91,8 % ukupne bakterijske sekvence.
- Ostala dominantna koljena su *Chloroflexi* (1,27–5,54 %, prosječno 3,20 %), *Chlorobi* (0,47–5,27 %, prosječno 3,16 %), *Bakteroideti* (0,97–7,64 %, prosječno 2,89 %) i *Actinobacteria* (0,16–11,4 %, prosječno 2,64 %), dok su *Firmicutes* (1,97 %), *Acidobacteria* (1,16 %) i *Verrucomicrobia* (1,15 %) prosječno prisutnu u manjem udjelu.
- *Acidobacteria*, *Actinobacteria* i *Verrucomicrobia* predstavljaju glavne skupine (koljena) u aktivnom mulju anaerobno/aerobnih uvjeta dok se u anaerobno/anoksičnim uvjetima nalaze u vrlo niskom udjelu od 0,09 %, 0,24 % i 0,12 % (prosječno).
- Unutar koljena *Proteobacteria* najzastupljeniji razred u svih devet uzoraka je *Betaproteobacteria* zatim *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* i *Deltaproteobacteria*.
- U svim uzorcima aktivnog mulja u vrlo niskom udjelu od prosječno 0,16 % prisutna je i *Epsilonproteobacteria*. Osim navedena četiri razreda *Proteobacteria* u najmanje 50 %

uzoraka pronađene su i *Chlorobia*, *Actinobacteria*, *Anaerolineae*, *Sphingobacteria* i *Flavobacteria*.

- U anaerobno / anoksičnim (A/A) uvjetima tijekom 76 dana udio *Betaproteobacteria* u aktivnom mulju smanjio se s 82,7 % na 44,6 %, dok je udio *Gammaproteobacteria* porastao gotovo devet puta (s 3,99 % na 34,9 %). Udio *Alphaproteobacteria* i *Deltaproteobacteria* u aktivnom mulju blago je porastao nakon faze prilagodbe.
- Uzorci aktivnog mulja u anaerobno / aerobnim (A/O) uvjetima tijekom faze prilagodbe pokazali su blage promjena u udjelu *Betaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria*, udio *Alphaproteobacteria* je porastao, a *Deltaproteobacteria* se smanjio.
- Udio nitastih mikroorganizama kao što su *Caldilinea*, *Gordonia*, *Microthrix*, *Nostocoida*, *Trichococcus* i *Zoogloea* (Guo i Zhang, 2012) iznosi 1,76 % za defosfataciju s denitrifikacijom i 0,681 % za EBPR. To je mogući razlog slabijeg taloženja aktivnog mulja u anaerobno/anoksičnim uvjetima.

Rezultati su pokazali kako se mikrobna zajednica aktivnog mulja mijenja tijekom faze prilagodbe, posebice u anaerobno/anoksičnim uvjetima što je dovelo do značajnih promjena u mikrobnjoj zajednici kao posljedice izloženosti mikroorganizama anoksičnim uvjetima.

2.4. ČIMBENICI PROCESA UKLANJANJA P

2.4.1. Supstrat

Rezultati istraživanja primjene različitih izvora ugljika u procesu uklanjanja fosfora pokazali su da je vrsta izvora ugljika izuzetno važna za uklanjanje fosfata. Izvršna učinkovitost uklanjanja fosfata je dobivena korištenjem acetata kao izvora ugljika: najveća količina oslobođenog fosfata, najveća produkcija PHA i rast PAOs tijekom ciklusa rada. Izvor ugljika utječe ne samo na akumulaciju PHA, već i na učinak uklanjanja fosfata i populaciju mikroorganizma (Wei i sur., 2014).

Otpadne vode sadrže različite izvore ugljika što ima značajan utjecaja na postupke uklanjanja fosfora (Oehmen i sur., 2007). Acetat uz glukozu predstavlja najzastupljeniju lakohlapivu masnu kiselinu u EBPR postrojenjima.

Ukoliko je koncentracija biorazgradivog organskog supstrata ograničena mogu se dodavati supstrati, a izbor ovisi o ekonomičnosti procesa i učinkovitosti uklanjanja fosfora.

U svrhu tumačenja mehanizma EBPR procesa kao izvor ugljika koriste se hlapive masne kiseline poput acetata i propionata (Hesselmann i sur., 2000; Yagci i sur., 2003; Oehmen i sur., 2005a) i rijetko ostali izvori ugljika.

U radovima se sugerira kako korištenje propionata kao izvora ugljika osigurava željenu koncentraciju PAOs u aktivnom mulju (Oehmen i sur., 2005b), dok acetat kao izvor ugljika osigurava dobru učinkovitost uklanjanja ugljika i visoku proizvodnju polihidroksialanoata (PHA) (Hollender i sur., 2002; Pijuan i sur., 2009).

Kako bi se osigurala selektivna prednost PAOs kao izvor ugljika koristi se propionat (Pijuan i sur., 2009) acetat i butirat, kao podjednako dobri izvori ugljika za uklanjanje fosfora (Rustrian i sur., 1996). Korištenje etanola kao izvora ugljika dalo je slične rezultate kao korištenje propionata, a lošije od rezultata s acetatom (Puig i sur., 2007).

2.4.2. Ioni

Važno je i biotički kontrolirati cirkulaciju PO_4^{3-} . Promatran je K^+ čija koncentracija oponaša PO_4^{3-} , odnosno prati otpuštanje i unošenje ortofosfata. Taloženje K^+ s PO_4^{3-} nije vjerojatno jer K^+ ima veću tendenciju da ostane otopljen u vodi. Stoga koncentracija K^+ mora biti povezana mikrobnim staničnim procesima u biofilmu (Saia i sur., 2017).

Dvije važne točke kontrole cirkulacije fosfata su ioni Ca^{2+} i Mg^{2+} . Potencijalna kemijska kontrola taloženja Ca^{2+} s PO_4^{3-} uključuje promjene pH, jer se pri višim pH talože (Dodds, 2003). Osim Ca^{2+} uslijed aerobnih uvjeta, a time i povećanja pH PO_4^{3-} može taložiti i s Mg^{2+} .

2.4.3. Koncentracija mikrobne biomase

Na učinkovitost uklanjanja fosfora utječe i koncentracija biomase, otpuštanje fosfata raste tijekom aktivnog rasta, unošenje fosfora u stanicu započinje kada stanice uđu u stacionarnu fazu rasta (Momba i Cloete, 1996).

Eksperimenti su pokazali da je visoka koncentracija biomase rezultirala unošenjem fosfata tijekom cijelog trajanja pokusa, što dovodi do zadovoljavajuće količine uklonjenog fosfora (Sidat i sur., 1999).

Što je više održivih PAOs u mulju, veći je kapacitet uklanjanje PO_4^{3-} -P. Prilikom procjene učinkovitosti cjelokupnog procesa važno je uzeti u obzir temperaturnu ovisnost konstante brzine biološke reakcije (Mulkerrins i sur., 2004).

2.4.4. Otopljeni kisik

Istraživanja su pokazala potrebu za izbjegavanjem kisika i $\text{NO}_x\text{-N}$ u anaerobnim spremnicima jer sprječava korištenje VFA običnim heterotrofima. Uočene su veće koncentracije PAOs u rektorima u kojima je proveden proces prednitrifikacije u odnosu na postrojenja koja rade

bez definirane denitrificirajuće faze. U nekim postrojenjima ključno je kemijski ukloniti dio fosfora kako bi se izbjegao inhibicijski učinak na EBPR (López-Vázquez i sur., 2008).

2.4.5. Temperatura

Temperatura ne utječe samo na metabolizam mikrobne populacije, nego i na prijenos plinova i karakteristike taloženja krutih bioloških čestica (Crites i Tchobanoglous, 1998). Temperatura je ključni faktor koji utječe na proces EBPR (Brdjanović i sur., 1997, 1998; López-Vázquez i sur., 2009a, b). Optimalno oslobađanje i akumulacija fosfora u EBPR-u uočena je pri temperaturi od 20 °C što je povoljno za dominaciju PAOs među prisutnim mikroorganizmima (Wei i sur., 2014). Prema nekim autorima (López-Vázquez i sur., 2008) pri temperaturama nižim od 20 °C favoriziran je rast PAOs nad GAOs.

2.4.6. pH

Prilikom izmjene anaerobnih i aerobnih uvjeta dolazilo je do promjene pH tako je prilikom dodavanja mješavine plinova za postizanje anaerobnih uvjeta pH bio oko 6, a u aerobnim 8 što može utjecati na različite čimbenike uklanjanja fosfata. Pronađen je pozitivan linearan odnos između pH i otopljenog kisika (Saia i sur., 2017). Veće pH vrijednosti povoljne su za metabolizam PAOs i štetne za GAOs (Smolders i sur., 1994; Filipe i sur., 2001; Schuler i Jenkins, 2002). To znači da dobro provedena denitrifikacija uzrokuje povećanje pH vrijednosti što u anaerobnoj fazi povoljno djeluje na *Accumulibacter* (López-Vázquez i sur., 2008). U pojedinim ekperimentima kako bi se što bolje oponašali stvarni uvjeti obrade otpadnih voda u velikom mjerilu pH i koncentracija otopljenog kisika nisu održavani konstantnim (Wang i sur., 2012).

2.4.7. Koncentracija NO₂-N i NO₃-N

Na aktivnost PAOs istaknut je inhibicijski učinak NO₂-N i u aerobnim i u anoksičnim uvjetima. Pri koncentraciji 6-8 mg NO₂-N L⁻¹ potpuno prestaje anoksični unos P (Meinhold i sur., 1999), > 12 mg NO₂-N L⁻¹ smanjuje brzinu anoksičnog unosa P do 65 % (Saito i sur., 2004). Suprotno tome, Sin i sur. (2008) su istaknuli da nema inhibicijskog učinka na anoksičan unos P u SBR i membranskom reaktoru pri koncentraciji do 25 mg NO₂-N L⁻¹, dok su Ahn i sur. (2001) i Hu i sur. (2003) istaknuli da nema inhibicijskog učinka pri koncentraciji 40 odnosno 35 mg NO₂-N L⁻¹.

2.4.8. Koncentracija organskih spojeva

PAOs imaju tendenciju dominiranja u sustavu pri KPK/P 10-20 mg KPK mg⁻¹ P (Oehmen i sur., 2007). Dokazano je da je minimalni omjer KPK/P uz acetat kao izvor ugljika u anaerobno/aerobno vođenom sustavu za potpuno uklanjanje P 8,24 g KPK g⁻¹ P (Jiang i sur., 2015). Također, pokazali su da pri niskom omjeru KPK/P 5 zaliha glikogena se smanji, ali preostaje dovoljno za anaerobni VFA unos što sugerira da PAO znatno preferiraju održavanje nivoa uskladištenog glikogena negoli dodatno generiranje poliP (Jiang i sur., 2015).

2.5. ISTOVREMENO UKLANJANJE FOSFORA I DUŠIKA – dosadašnje spoznaje

Procesom denitrificirajuće defosfatacije postiže se istovremeno uklanjanje dušika i fosfora iz otpadne vode aktivnošću DPAOs pri čemu se u anoksičnim uvjetima uporabljaju nitrat ili nitrit kao akceptori elektrona (Arbabi i sur., 2012).

U istraživanju uklanjanja N i P za niz postavljenih pokusa postignuto je prosječno uklanjanje fosfora od 78 % i dušika od 72 % (Arbabi i sur., 2012). Sličan proces proveden u laboratorijskom mjerilu uz početnu koncentraciju 90 mg PO₄-P L⁻¹ i 900 mg amonijaka L⁻¹, a postignuto je uklanjanje 99,8 % dušika i 97,8 % fosfora, koristeći isključivo izvor ugljika koji se nalazio u otpadnoj vode farmi svinja (Obaja i sur., 2005).

Neka istraživanja su pokazala da anaerobno/anoksična faza u laboratorijskom mjerilu SBR-a rezultira uklanjanjem oko 80 % PO₄-P, 98 % NH₄-N i 97 % KPK tijekom 25 dana vođenja procesa. U fazi punjenja reaktora i dekantiranja ukoliko su prevladavali anoksični i anaerobni uvjeti uklonjena je velika količina nitrata. Zaključili su da je za učinkovito uklanjanje dušika i fosfora neophodna kratka anoksična faza prije anaerobne (Akin i Ugurlu, 2004).

Za učinkovito biološko uklanjanje dušika i fosfora važan je omjer KPK i ukupne koncentracije fosfora (TP). Za Arbabi i sur. (2012) omjer KPK/TP iznosi 40, dok drugi autori navode kao potreban omjer KPK/TP 33 (Tchobanoglous i sur., 2004).

Ukoliko je vrijednost KPK u otpadnoj vodi niska neće se postići zadovoljavajuće uklanjanje fosfora zbog kompeticije za elektron donore između PAOs i ostalih heterotrofa u anaerobnom rektoru. Problem bi se mogao riješiti dodavanjem vanjskog izvora ugljika u anaerobni spremnik kako bi se osigurala dovoljna količina lako biorazgradive organske tvari za poboljšanje EBPR i procesa denitrifikacije (Olsson i sur., 2005).

U radovima se ističu čimbenici koji imaju učinka na proces uklanjanja N i P, poput limitirana raspoloživost NO₃-N i NO₂-N u anoksičnoj fazi procesa (Kuba i sur., 1993; Smolders i sur., 1994; Brdjanović i sur., 1997), kao i velike vrijednosti NO₃-N i NO₂-N u anaerobnoj fazi procesa.

Ukoliko tijekom anoksične faze prilikom unosa fosfata u stanicu nema dovoljno $\text{NO}_x\text{-N}$ može doći do sekundarnog otpuštanja fosfata. Do ove pojave dolazi razgradnjom polifosfata što osigurava ATP za anaerobno održavanje kada koncentracija $\text{NO}_x\text{-N}$ dosegne nulu (Kuba i sur., 1993; Smolders i sur., 1994; Brdjanović i sur., 1997).

Većina postrojenja u kojima se istovremeno uklanjaju fosfor i dušik imaju aerobnu fazu prije sekundarnog taložnika što rezultira prisutnošću nitrata i nitrita prilikom recikliranja. Zaostali nitrati i nitriti vanjskom reciklacijom ulaze u anaerobnu fazu što rezultira neuspješnim uklanjanjem fosfora (Henze i sur., 2008). Neuspješno uklanjanje fosfora u ovom slučaju je pripisano prisutnošću $\text{NO}_x\text{-N}$ koji pokreću kompeticiju za elektron donore između PAOs i ostalih heterotrofnih organizama. Istraživanja su pokazala da prilikom kompeticije ovih organizama ostali heterotrofi imaju prednost ukoliko je elektron donor kompleksni spoj ugljika, a PAOs prevladava kada je visok udjel lakohlapivih masnih kiselina (Guerrero i sur., 2011). Sigurno je da će dio $\text{NO}_x\text{-N}$ završiti u anaerobnoj fazi međutim radi se na otklanjanju tog problema, primjerice uvođenjem dodatne anoksično-aerobne zone koja limitira količinu recikliranog $\text{NO}_x\text{-N}$ i pospješuje uklanjanje dušika (Guerrero i sur., 2013). Ukoliko je $\text{NO}_x\text{-N}$ prisutan u anaerobnim uvjetima ostali heterotrofni organizmi imaju prednost nad PAOs za izvor ugljika. U sustavima gdje je koncentracija $\text{NO}_x\text{-N}$ smanjena uklonjeno je više fosfata, dok su u ostalim sustavima heterotrofi provodili denitrifikaciju (umjesto EBPR) (Guerrero i sur., 2013).

Hu i sur. (2018) su istražili s neaklimatizirnom biomasom aktivnog mulja učinak izvora ugljika (acetat i etanol) i elektron akceptora (otopljeni kisik, nitrat i nitrit) pri aerobnim i anoksičnim uvjetima na interakciju denitrifikacije i uklanjanja fosfora. Istaknuli su značajne razlike u aktivnosti PAOs i običnih denitrificirajućih heterotrofa (engl. denitrifying „ordinary“ heterotrophs) u procesu biološkog uklanjanja nutrijenata. Određene su brzine otpuštanja P od 1,7, 7,8 i 3,5 $\text{mg P g}^{-1} \text{MLVSS}^{-1} \text{h}^{-1}$ uz kisik, $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$, kada je uporabljen acetat kao elektron donor. Uz etanol, nije se zbivalo otpuštanje P kada su prisutni i elektron akceptori. Rezultati su pokazali da oko 25 $\text{mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$ inhibira anoksični unos P neovisno o koncentraciji vanjskog izvora ugljika. Najveća brzina denitrifikacije postignuta je s acetatom (1,4 i 0,8 $\text{mg N g}^{-1} \text{MLVSS}^{-1} \text{h}^{-1}$) u usporedbi s etanolom (1,1 i 0,7 $\text{mg N g}^{-1} \text{MLVSS}^{-1} \text{h}^{-1}$) za $\text{NO}_3\text{-N}$ odnosno $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptore elektrona (Hu i sur., 2018).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

3.1.1. Sintetski medij – izvor C, N i P

Fosfat je priređen kao vodena otopina kalijeva dihidrogen fosfata (KH_2PO_4) i dodan u ciljani pokus u odgovarajućoj količini za početnu koncentraciju $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

Pokusi su vođeni pri različitoj koncentraciji KPK, pri odabranim omjerima C/N 3, 4 i 6, ostvareno dodatkom natrijeva acetata, a eksperimentalno je određeno da to odgovara omjeru KPK/P 18, 25 i 32. Izvor ugljika - natrijev acetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) dodan je u odgovarajućoj količini za odabrani omjer C/P, neposredno pred početak pokusa. Eksperimentalno je određeno da 1 g $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ odgovara 0,55 g KPK.

Sintetska otpadna voda dodavana je u odgovarajućoj količini na početku pokusa, za očekivanu početnu koncentraciju $50 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}$.

Sintetska otpadna voda priređena je otapanjem soli u vodovodnoj vodi (g L^{-1}): 2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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 $0,45 \mu\text{m}$.

Sintetskoj otpadnoj vodi dodana je otopina elemenata u tragovima (Smolders i sur., 1994), u količini $0,3 \text{ mL L}^{-1}$, sastava (po L^{-1}): 1,5 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g H_3BO_3 , 0,03 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,18 g KI , 0,12 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 10 g EDTA.

3.1.2. Dizajn pokusa

Pokusi u kojima je istraženo uklanjanje N i P provedeni su kao diskontinuirani s muljem iz trenutno aktivnog SBR sustava u kojem su namnoženi PAOs, u laboratorijskim SBR reaktorima radnog volumena 1 L. Vrijednost $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ ostvareno je prozračivanjem miješanje tekućine (ML, engl. Mixed liquor) zrakom iz kompresora preko difuzora na dnu SBR. U reaktore su postavljene pH i kisikova elektroda kako bi se motrili pH, DO i temperatura tijekom cijelog trajanja pokusa.

U određenim vremenskim intervalima uziman je uzorak, određena količina ML, za analitičko određivanje motrenih pokazatelja biološkog procesa – $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, ukupni N i KPK.

Svi eksperimenti su provedeni u 3 ponavljanja, a rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna devijacija.

Pokusi su provedeni bez korekcije pH, pri ambijentalnim uvjetima temperature ($18\text{-}22 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura uporabljena u pokusima biološkog uklanjanja hranjivih tvari iz otpadne vode pri DO < 1 mg L⁻¹, prikazana je u tablici 1.

Tablica 1. Aparatura uporabljena u pokusima BNR

Aparat	Proizvođač
Spektrofotometar	Spectroquant VEGA 400 Merck
Fotometar	Photometer SQ 200 Merck
Termo blok	Thermoreactor TR 300, Merck; HACH COD reactor
Kvarcne kivete	Merck
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
Dispenser (CeramusClassic)	Hirschman-Laborgeräte
Titratore - Digitalna biretaSolarus	Hirschman-Laborgeräte
Sterilizator/ Sušionik	Instrumentaria ST-05
Analitička vaga	METTLER AJ150
Svjetlosni mikroskop	Meiji
Sustav za vakuum filtraciju	Sartorius
Vlagomjer	Kern MLS-D

Kemikalije uporabljene u pokusima BNR prikazane su u tablici 2.

Tablica 2. Kemikalije uporabljene u izvedbi pokusa (sve p.a. čistoće):

Kemikalija	Proizvođač
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	Kemika
K ₂ Cr ₂ O ₇	Kemika
H ₂ SO ₄	GRAM-MOL
HgSO ₄	Kemika
Ag ₂ SO ₄	Kemika
1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat	Kemika
(NH ₄) ₂ SO ₄	Merck
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Kemika
K ₂ HPO ₄	Kemika
MgSO	Merck
NaCl	Merck
MgCO ₃	Kemika
CaCO ₃	Kemika
KH ₂ PO ₄	Merck
KCl	Alkaloid
Nesslerov reagens	Kemika
K-Na-C ₄ H ₄ O ₆ · 4H ₂ O	GRAM-MOL
NaC ₂ H ₃ O ₂	GRAM-MOL

3.2. FIZIKLNO-KEMIJSKE ANALITIČKE METODE

Za analitičko određivanje fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima, filtrirani kroz filter papir veličine pora 0,45 μm te su analizirani $\text{PO}_4\text{-P}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, N total i KPK.

3.2.1. Određivanje koncentracije fosfata

Spektrofotometrijski, pomoću testa Spectroquant 1.14842 (Merck, Njemačka) za područje raspona koncentracije od 1-30 $\text{mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$ određivan je fosfat u obliku ortofosfata ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$). Metoda se bazira na reakciji iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom pri čemu nastaje žuto obojena molibdovanadat fosforna kiselina. Intenzitet obojenja, odnosno koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$ se određuje fotometrijski i izražava u $\text{mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

Postupak: U staklenu kivetu doda se 5 mL filtriranog i po potrebi destiliranom vodom razrijeđenog uzorka, 1,2 mL $\text{PO}_4\text{-1}$ reagensa te se kiveta dobro zatvori i sadržaj promiješa. Tijekom reakcijskog vremena od 10 minuta nastaje žuto obojenje, a apsorbancija se određuje mjerenjem u fotometru.

3.2.2. Određivanje koncentracije nitrita

Spektrofotometrijski je određivan nitrit, primjenom Merck Spectroquant 1.14776 seta, a metoda se temelji na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli, koja reagira s N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorom i tvori crveno-ljubičastu azo boju. Metoda je u rasponu koncentracija od 0,02 do 1,00 $\text{mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$. Intenzitet obojenja se određuje fotometrijski i izražava u $\text{mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$.

Postupak: U staklenu kivetu otpipetira se 5 mL uzorka (filtriranog i po potrebi razrijeđenog s destiliranom vodom) i doda jedna žličica $\text{NO}_2\text{-1}$ reagensa. Kiveta se zatvori, sadržaj miješa dok se ne otopi reagens. Apsorbancija se očitava nakon reakcijskog vremena od 10 min.

3.2.3. Određivanje koncentracije nitrata

Spektrofotometrijski, primjenom Merck Spectroquant 1.14773 seta za područje koncentracije 0,5-20 $\text{mg NO}_3\text{-N L}^{-1}$ određivan je nitrat. Metoda se temelji na reakciji nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline pri čemu nastaje crveni nitro spoj čiji intenzitet obojenja se određuje fotometrijski.

Postupak: U staklenu kivetu doda se 1,5 mL uzorka (filtriranog i po potrebi razrijeđenog s destiliranom vodom) i 1 žličica $\text{NO}_3\text{-1}$ reagensa. Kiveta se dobro zatvori i mućka dok se reagens ne otopi. Zatim se doda 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, kiveta se dobro zatvori i

promućka da se otopi reagens (pažljivo jer se oslobađa toplina). Reakcija se odvija 10 minuta nakon čega se izmjeri apsorbancija crvenog obojenja.

3.2.4. Određivanje koncentracije amonijaka

Metodom po Nessleru određuje se koncentracija amonijaka.

Postupak: U odmjernu tikvicu od 50 mL doda se uzorak poznatog volumena (masene koncentracije unutar zadanog opsega mjernog područja, 1-3 mg L⁻¹). Potom se dodaju 2 kapi K-Na tartarata i 1 kap Nesslerova reagensa (otopina HgI₂ u KI). Tijekom 10 min razvija se žuta boja. Izmjeri se apsorbancija.

3.2.5. Određivanje ukupnog dušika

Spektrofotometrijski je određivan ukupni dušik, pomoću testa Merck Spectrophotquant 1.14764, prema Koroleff-ovoj metoda koja se temelji na pretvorbi organskih i anorganskih spojeva dušika koji se prevode u nitrat reakcijom s oksidirajućim reagensom u termoreaktoru. Nastali nitrati u otopini zakiseljenoj sumpornom i fosfornom kiselinom reagiraju s 2,6-dimetilfenolom i daju 4-nitro-2,6-dimetilfenol, koji je crveno obojen, čiji se intenzitet obojenja određuje fotometrijski.

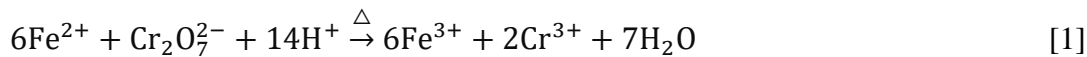
Postupak: U praznu kivetu doda se 9 mL destilirane vode i 1 mL filtriranog uzorka, promiješa, doda 1 žličica reagensa N-1K i promiješa, 6 kapi reagensa N-2K, pažljivo dobro zatvori, promiješa i spaljuje pri 120 °C/1 sat. Nakon spaljivanja sadržaj se hladi na tamnom, nakon 10 min promućka i dalje hladi na sobnu temperaturu.

U reakcijsku kivetu otpipetira se 1 mL ohlađenog spaljenog uzorka (bistri dio ili se profiltrira u slučaju замуćenja), doda 1 mL reagensa N-3K, zatvori kiveta, dobro promućka i nakon reakcijskog vremena od 10 minuta očita vrijednost ukupnog dušika u mg L⁻¹.

3.2.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

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

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



Postupak: U staklenu kivetu doda se 2 mL uzorka, 1,2 mL otopine $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HgSO}_4$ i 2,8 mL otopine $\text{Ag}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$, pažljivo zatvori, promiješa, te spaljuje u termoreaktoru pri $150\text{ }^\circ\text{C}$ / 1 h. Ostavlja se u tami dok se ne ohladi na sobnu temperaturu. Titrira se otopinom FAS ($0,1\text{ mol L}^{-1}$), 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 slijepa probe, ali se ne digestira.

Faktor otopine računa se prema jednadžbi [2].

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

gdje je:

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

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

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi [3].

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

gdje je:

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

V_2 - volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

c - koncentracija FAS ($0,1\text{ mol L}^{-1}$)

f - faktor otopine FAS

3.2.7. 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 procesa bila uronjena u bioreaktor te je vrijednost koncentracije otopljenog kisika prikazana na zaslonu uređaja, u mg L^{-1} ili % zasićenja.

3.2.8. Određivanje temperature

Temperatura je određivana pomoću temperaturnog senzora s kisikove elektrode (WTW Oxi3210 i DurOx) i pH elektrode (WTW 330i i SenTix41) očitavanjem sa zaslona elektroda.

3.2.9. Određivanje pH vrijednosti

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

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) pojedinačnog parametra, [jednadžba 4]:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [4]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$, [jednadžba 5]:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [5]$$

N = ukupan broj mjerenja

x_i = pojedinačne vrijednosti mjerenja

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

Statistička analiza podataka provedena je koristeći Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjene Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulsa, Sjedinjene Američke Države). Dobiveni podatci su izraženi u obliku srednja vrijednost \pm standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba provedena je ANOVA analizom varijance s određenim intervalom pouzdanosti $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Fosfor (P) i dušik (N) su hranjive tvari koje doprinose ubrzavanju procesa eutrofikacije i iz tog razloga propisane su stroge vrijednosti P i N u obrađenoj otpadnoj vodi za ispušt u okoliš (Pravilnik, 2013).

Rezultati pokusa u kojima je istražen proces uklanjanja N i P u ovisnosti o omjeru C/P i N/P pri limitiranoj vrijednosti otopljenog kisika ($DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$) za početnu koncentraciju $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$ uz natrijev acetat kao izvor ugljika prikazani su slikama 5-15.

U ovom istraživanju:

- izvor ugljika, natrijev acetat, je dodan za odabrani omjer C/N 3, 4 i 6 što eksperimentalno određeno odgovara omjeru KPK/P 18, 25 i 32 odnosno omjeru KPK/N 5, 7 i 11, kako bi se istražio učinak raspoložive količine organskih sastojaka na uklanjanje N i P, kroz biološke procese denitrifikacije i unosa P u stanice.

U literaturi je istaknuto da PAOs imaju tendenciju dominiranja u sustavu pri KPK/P 10-20 $\text{mg KPK mg}^{-1} \text{ P}$ (Oehmen i sur., 2007). Dokazano je da je minimalni omjer KPK/P uz acetat kao izvor ugljika u anaerobno/aerobno vođenom sustavu za potpuno uklanjanje P $8,24 \text{ g KPK g}^{-1} \text{ P}$ (Jiang i sur., 2015). Osim toga utvrđeno je da pri omjeru KPK/P većem od 50 $\text{mg KPK mg}^{-1} \text{ P}$ povećan rast nepoželjnih GAOs (Mino i sur., 1998). Također, istaknuto je da pri niskom omjeru KPK/P 5 zaliha glikogena se smanji, ali preostaje dovoljno za anaerobni VFA unos što sugerira da PAOs znatno preferiraju održavanje nivoa uskladištenog glikogena negoli dodatno generiranje poliP (Jiang i sur., 2015).

- proces uklanjanja P i N je vođen pri koncentraciji otopljenog kisika $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$. $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$ je uvjet povoljan za provođenje istovremene nitrifikacije i denitrifikacije, ali i aktivnost PAOs (Kuba, 1993; Hu i sur., 2002; Zhou i sur., 2010).
- pokusi su provedeni pri odabranom omjeru $N_{\text{NH}_4\text{-N}}/P$ 2,5, što tijekom mikrobnog procesa pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$ može rezultirati uklanjanjem N pa time i manjom koncentracijom raspoloživih $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$, budući $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$ je povoljan DO za proces istovremene nitrifikacije i denitrifikacije.
- U literaturi je istaknuto da je za aktivnost PAOs potrebno osigurati elektron akceptore, kao i da DPAOs mogu kao elektron akceptore koristiti kisik, $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ (Kuba, 1993; Hu i sur., 2002; Zhou i sur., 2010).

Istaknut je i inhibicijski učinak $\text{NO}_2\text{-N}$ na aktivnost PAOs i u aerobnim i u anoksičnim uvjetima. Pri koncentraciji $6\text{-}8 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$ potpuno prestaje anoksični unos P (Meinhold i sur., 1999), pri $> 12 \text{ mg NO}_2\text{-N L}^{-1}$ smanjuje se brzina anoksičnog unosa P do 65 % (Saito

i sur., 2004). Suprotno tome, Sin i sur. (2008) su istaknuli da nema inhibicijskog učinka na anoksičan unos P u SBR i membranskom reaktoru pri koncentraciji do 25 mg NO₂-N L⁻¹, dok su Ahn i sur. (2001) i Hu i sur. (2003) istaknuli da nema inhibicijskog učinka pri koncentraciji 40 odnosno 35 mg NO₂-N L⁻¹.

U sustavu biološkog uklanjanja nutrijenata aktivnim muljem PAOs mogu koristiti nitrat kao elektron akceptor umjesto kisika, ali rast PAOs u anoksičnim uvjetima je za 70 % manji u odnosu na aerobne uvjete. Značajan čimbenik pojavljivanja DPAOs i anoksičnog unosa P je opterećenje s nitratom koje treba biti dovoljno veliko odnosno premašiti denitrifikacijski potencijal potencijalnih uobičajenih heterotrofnih organizama (OHO, engl. *Ordinary Heterotrophic Organisms*) odnosno ne-PAOs organizama kako bi i DPAOs u suvišku prisutnog NO₃-N imali priliku razviti se u sustavu (Hu i sur., 2002). No, uklanjanje P uz nitrit moguće je provoditi s vrijednostima koncentracije nitrata puno većim od onih koje su inhibicijskog učinka za aerobni P unos (Ahn i sur., 2001).

U radu Saito i sur. (2004) istaknuto je da NO₂-N do koncentracije 12 mg N L⁻¹ kao početne koncentracije NO₂-N nema učinka na proces denitrifikacije odnosno nema negativan učinak na enzimski sustav procesa denitrifikacije nego samo na enzimski sustav povezan s P unosom i potencijalno formiranjem poliP.

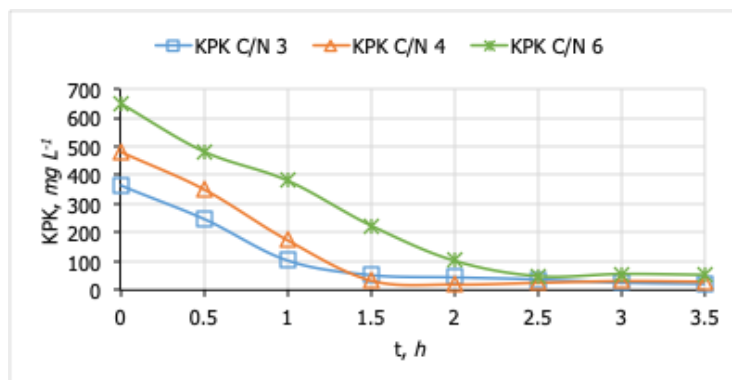
Aerobni unos P je osjetljiviji od anoksičnog na NO₂-N, tako da 2 mg NO₂-N L⁻¹ uzrokuje inhibiciju aerobnog P unosa (2,4 mg P mg⁻¹ VSS h⁻¹), dok 6 mg NO₂-N L⁻¹ rezultira potpunom inhibicijom P unosa (0,6 mg P mg⁻¹ VSS h⁻¹), dok je bez prisustva NO₂-N maksimalni unos P iznosio 24 mg P mg⁻¹ VSS h⁻¹ (Saito i sur., 2004).

- Proces je vođen bez kontrole pH, a poznato je da pri pH > 8,0 dolazi do taloženja PO₄-P (Ya-yi i sur., 2007; Vargas i sur., 2009) te pri tumačenju rezultata aktivnosti PAOs treba biti oprezan

- procesi su provedeni u ambijentanim uvjetima temperature (18-22 °C)

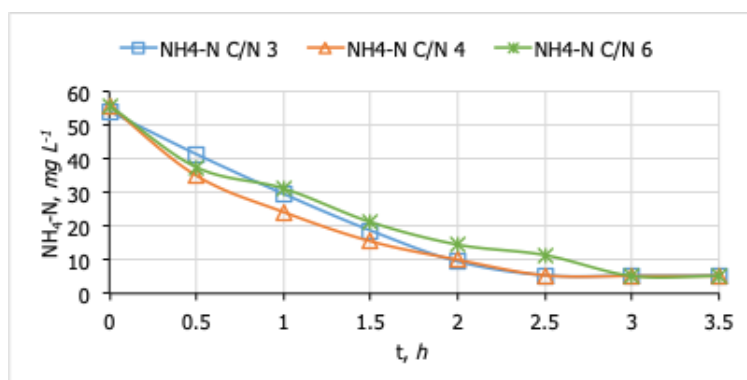
U literaturi je istaknuto da PAOs preferiraju niže temperature (5 °C) i dokazana je bolja učinkovitost uklanjanja P, a pokazalo se da GAOs nadvladava PAOs pri > 20 °C (Oehmen i sur., 2005a; Gebremariam i sur., 2011).

Mikrobna aktivnost u procesu denitrifikacije i unosa P u PAOs prikazana je promjenama koncentracije ukupnog dušika, NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N, PO₄-P, KPK, te DO i pH za odabrane omjere C/N 3, 4 i 6 (Slike 5-15). Pokusi su provedeni uz raspoloživi otopljeni kisik, DO < 1 mg L⁻¹, uz izvor ugljika natrijev acetat dodan za odabrane omjere C/N 3, 4 i 6, što je eksperimentalno određeno odgovaralo omjeru KPK/P 18, 25 i 32.



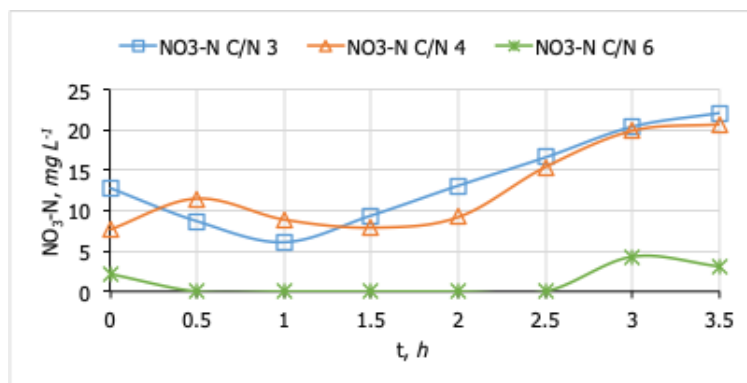
Slika 5. Usporedne promjene KPK u procesu biološkog uklanjanja P i N pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

U pokusu pri omjeru C/N 3, 4 i 6, a koji eksperimentalno određeno odgovara omjeru KPK/P 18, 25 i 32 (Slika 5), pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$ tijekom procesa zbiva se uklanjanje organskih sastojaka, KPK ostvarenih dodatkom natrijeva acetat za ciljani pokus, ustaljenom brzinom. Postignuto je uklanjanje 92-94% KPK, za odabrane omjere C/N 3, 4 i 6.



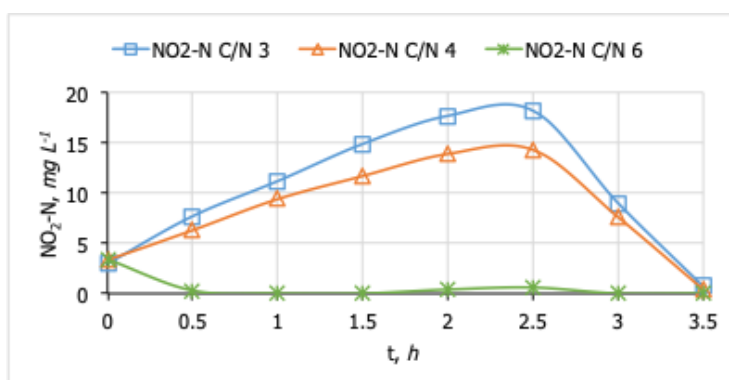
Slika 6. Usporedne promjene $\text{NH}_4\text{-N}$ u procesu biološkog uklanjanja P i N pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

U pokusima je na početku dodano $50 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1}$ i tijekom procesa $\text{NH}_4\text{-N}$ je potpuno oksidiran. Određena je brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ od $21,7 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pri C/N 3, $22,2 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pri C/N 4 i $18,6 \text{ mg NH}_4\text{-N L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pri C/N 6. Smanjenje brzine oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ pri C/N 6 odnosno KPK/P 32 može se pripisati natjecanju za otopljeni kisik između heterotrofa (uklanjanje KPK) i autotrofa (nitrifikacija), Slika 6.



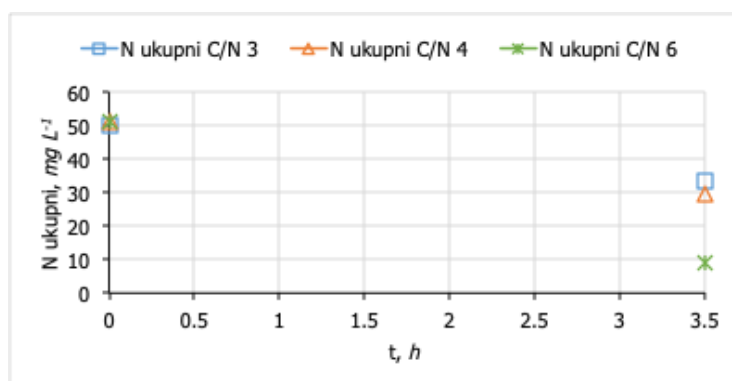
Slika 7. Usporedne promjene NO₃-N u procesu biološkog uklanjanja P i N pri DO < 1 mg L⁻¹, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih 20 mg PO₄-P L⁻¹.

Promjene koncentracije NO₃-N u procesu uklanjanja P i N pri DO < 1 mg L⁻¹ i različitim početnim koncentracijama organskih sastojaka, rezultat su raspoložive koncentracije KPK i DO, te se NO₃-N ne nakuplja u ekvivalentnoj količini s obzirom na početnu vrijednost NH₄-N (Slika 7).



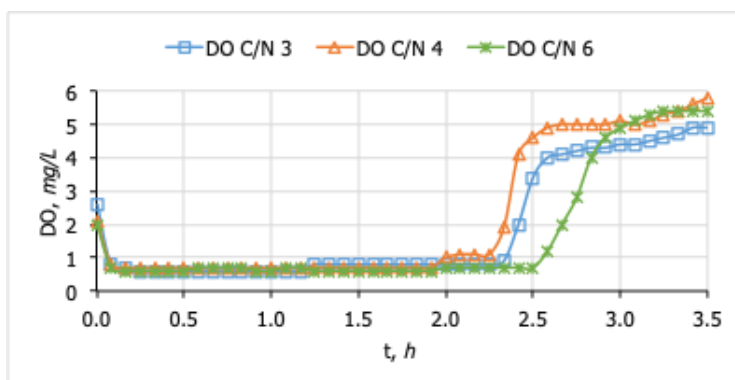
Slika 8. Usporedne promjene NO₂-N u procesu biološkog uklanjanja P i N pri DO < 1 mg L⁻¹, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih 20 mg PO₄-P L⁻¹.

Raspoloživa količina DO (DO < 1 mg L⁻¹) kao i raspoloživa količina KPK se odražava i na količinu NO₂-N nastalu u ciljanom procesu pri C/N 3, 4 i 6 (Slika 8). Povećanjem količine organskih sastojaka u procesu uzrokuje smanjenje nastalog NO₂-N.



Slika 9. Usporedne promjene ukupnog N u procesu biološkog uklanjanja P i N pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

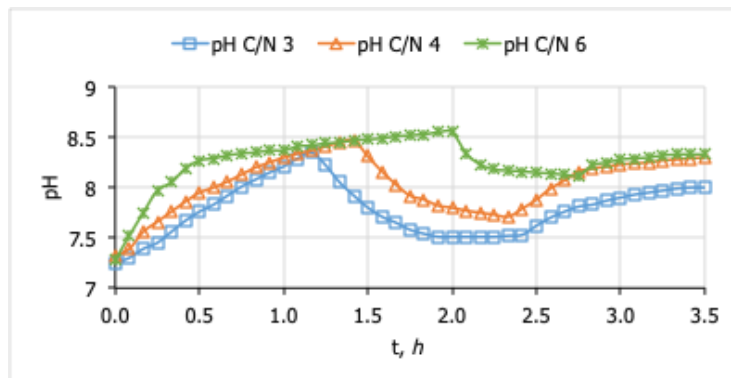
Procesni čimbenici, $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pH u procesu, raspoloživi KPK (natrijev acetat dodan za odabrane omjere C/N 3, 4 i 6) imaju znatan učinak na uklanjanje N, što je pri odabrani uvjetima rezultiralo smanjenjem količine ukupnog N, odnosno provođenjem procesa istovremene nitrifikacije i denitrifikacije (Slika 9). Uklonjeno je 33 %, 42 % odnosno 82 % ukupnog dušika pri C/N 3, 4 i 6 pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$.



Slika 10. Usporedne promjene DO u procesu biološkog uklanjanja P i N pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

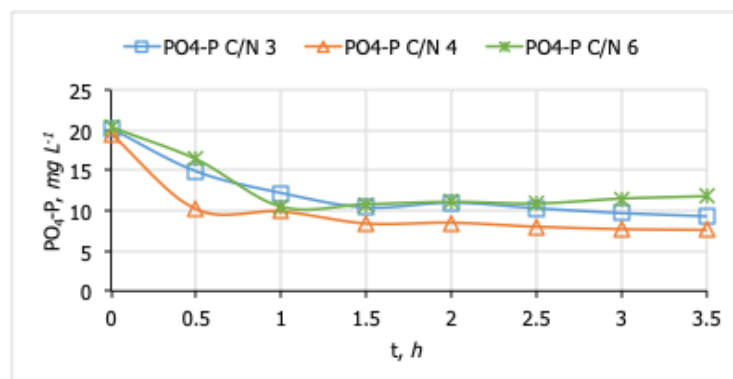
Profil DO je tipičan za biološki proces u kojem se provodi u heterotrofnim uvjetima i oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$ (Slika 10). Tijekom prvih 2,5 sata procesa upotrebljuje se raspoloživi DO za oksidaciju KPK, oksidaciju $\text{NH}_4\text{-N}$, sve povezano s uklanjanjem $\text{PO}_4\text{-P}$.

Nakon iscrpljivanja organskih sastojaka (KPK) i oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ mikrobnim vrstama je potrebna manja količina DO te se koncentracija raspoloživog DO povećava, a upotrebljava se u tom dijelu procesa samo za eventualnu oksidaciju $\text{NO}_2\text{-N}$ do $\text{NO}_3\text{-N}$.



Slika 11. Usporedne promjene pH u procesu biološkog uklanjanja P i N pri $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

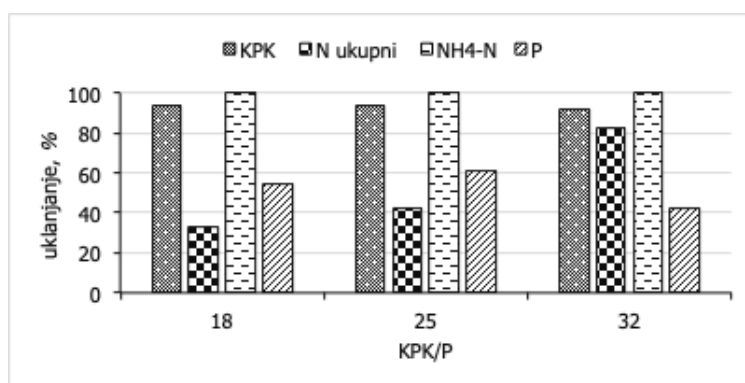
Profili pH daju krivulje uobičajene za mikrobnе reakcije koje su se zbivale u ciljanim pokusima uklanjanja P i N pri $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ (Slika 11). Prvo se pH povećava uslijed oksidacije organskih sastojaka, zatim se bilježi snižavanje pH zbog procesa oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$.



Slika 12. Usporedne promjene $\text{PO}_4\text{-P}$ u procesu biološkog uklanjanja P i N pri $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

Promjene koncentracije $\text{PO}_4\text{-P}$ u procesu pri $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$, uz raspoložive elektron donore i kisik, i $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$, su zapažene tijekom prvih pola do sat vremena procesa, kada je ostvareno uklanjanje P od 54 %, 61 % i 42 % pri C/N 3, 4 i 6 (Slika 12). Brzina unosa P je iznosila $3,1 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pri C/N 3, $3,4 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pri C/N 4 i $2,4 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pri C/N 6.

Učinkovitost uklanjanja KPK, ukupnog N, $\text{NH}_4\text{-N}$ i $\text{PO}_4\text{-P}$ u ovisnosti o omjeru KPK/P, pri $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ prikazana je slikom 13.



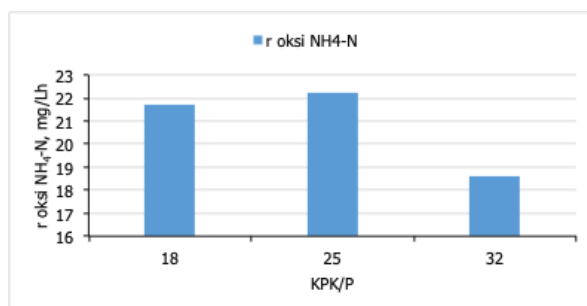
Slika 13. Učinkovitost uklanjanja KPK, ukupnog N, $\text{NH}_4\text{-N}$ i $\text{PO}_4\text{-P}$ u ovisnosti o KPK/P, pri $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$.

Rezultati procesa uklanjanja N i P pri $\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ su odraz mikrobnih reakcija nitrifikacije, denitrifikacije i uklanjanja P, praćeno smanjenjem koncentracije organskih sastojaka (KPK) kao i provođenjem procesa istovremene nitrifikacije i denitrifikacije (Slike 5-13).

$\text{DO} < 1 \text{ mg L}^{-1}$ tijekom prvih 2,5 sata procesa se može pripisati aktivnosti heterotrofnih vrsta, nitrifikanata kao i PAOs vrsta, a rezultira provođenjem istovremenog uklanjanja C, N i P. Pri svim odabranim omjerima C/P zbiva se uklanjanje ukupnog N, a najviše je izraženo pri najvećoj početnoj koncentraciji organskih sastojaka kad smanjenje ukupnog N iznosi 82 % (Slike 5-13).

Najveća brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ (Slika 14) postignuta je pri omjeru KPK/P 25 (C/N 4), dok je povećanje koncentracije izvora ugljika (C/N 6) imalo dodatni kompetitivni učinak za kisik između heterotrofa i autotrofa pa je i brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ nešto manja daljnjim povećanjem početne KPK vrijednosti, u odnosu na vrijednosti pri C/N 4. Za sve istražene omjere KPK/P postignuta je gotovo potpuna oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$ (Slika 6). Ostvarena je brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$

N od 21,7 mg NH₄-N L⁻¹ h⁻¹ pri C/N 3, 22,2 mg NH₄-N L⁻¹ h⁻¹ pri C/N 4 i 18,6 mg NH₄-N L⁻¹ h⁻¹ pri C/N 6.



Slika 14. Brzina oksidacije NH₄-N u ovisnosti o omjeru KPK/P, pri DO < 1 mg L⁻¹, pri C/N 3, 4 i 6 što odgovara omjeru KPK/P 18, 25 i 32, za početnih 20 mg PO₄-P L⁻¹

Uklanjanje P se intenzivno provodilo od početka pokusa tijekom pola sata do sat vremena, za sve istražene omjere KPK/P (Slika 12), što je pratilo istovremeno uklanjanje KPK ustaljenom brzinom i nakon uklanjanja P, do potpunog uklanjanja KPK (Slika 5).

Raspoložive vrijednosti NO₂-N (Slika 8) i NO₃-N (Slika 7) u tom periodu procesa su se također reflektirale na uklanjanje P (Slika 12).

Carvalho i sur. (2007) su opazili razlike u anoksičnom unosu P i postavili hipotezu o različitim *Accumulibacter* razredima s različitim metaboličkim sposobnostima.

He i sur., (2007) i Flowers i sur. (2009) su potvrdili da je «*Candidatus accumulibacter phosphatis*», dominantna bakterija u EBPR sustavu, prisutna u dva tipa s različitim sposobnostima denitrifikacije: (i) IA sposobne reducirati nitrat i unositi P u stanice, i (ii) IIA koje su sposobne reducirati nitrit i provoditi unos P (ne mogu reducirati NO₃-N jer nemaju gene za redukciju nitrata).

O drugim brojnim čimbenicima koji utječu na proces denitrificirajuće defosfatacije, poput vrsta i koncentracija izvora C, koncentracija NO₂-N i NO₃-N, pH-vrijednost, DO, koncentracija GAOs, vrste PAOs i drugo pisali su brojni autori (Hu i sur., 2002; Ya-yi i sur., 2007; Freitas i sur., 2009; Frison i sur., 2013; Pan i sur., 2013; Tayà i sur., 2013; Liu i sur., 2014; Wang i sur., 2015; Jena i sur., 2016; Li i sur., 2017).

Učinak povećanja koncentracije KPK ostvareno dodatkom natrijeva acetata pri odabranim omjerima C/N 3, 4 i 6 najviše je vidljiv u povećanju učinka SND s povećanjem omjera KPK/P, a u pokusu pri KPK/P 32 sav NH₄-N je oksidiran, a rezultat je svega 4 mg NO₃-N L⁻¹ (Slika 7) i pri tome je postignuto uklanjanje 82 % ukupnog dušika.

Rezultati (Slike 5-13) su u suglasju s literaturom u kojoj se ističe da je za učinkovito biološko uklanjanje dušika i fosfora potreban omjer KPK/TP 33 (Tchobanoglous i sur., 2004), za razliku od Arbabi i sur. (2012) koji navode da je potreban omjer KPK/TP 40.

U svim pokusima (Slike 6-9) po učinjenoj bilanci dušika, nedostaje N. Takva aktivnost se može pripisati aktivnosti NI/DNI vrsta i PAOs.

Rezultati u ovim pokusima (Slike 5-13) u suglasju su s navodima u literaturi u kojoj se ističe da su povoljni uvjeti za provođenje SND vrijednosti $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri čemu se u unutrašnjosti flokule u tim anoksičnim uvjetima zbivala denitrifikacija, a u vanjskom sloju flokule nitrifikacija (Liu i sur., 2010).

Denitrifikacija je rezultirala povećanjem koncentracije $\text{NO}_2\text{-N}$ posebice u pokusima s nižim omjerom KPK/P, a povezano sa pH vrijednosti u procesu (Slike 5 i 6).

S povećanjem omjera KPK/P povećava se učinak uklanjanja ukupnog N i iznosi 33 %, 42 %, odnosno 82 % za omjere KPK/P 18, 25 i 32. Također, za sve odabrane omjere KPK/P postignuto je uklanjanje KPK s vrijednosti na kraju procesa za ispus u okoliš, kao i potpuna oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$.

No, s povećanjem koncentracije organskih sastojaka do KPK/P 25 povećava se uklanjanje P s 54 % pri KPK/P 18 na 61 % P uklonjenog pri KPK/P 25, ali daljnjim povećanjem početne koncentracije C za istraženih KPK/P 32 smanjuje se učinak uklanjanja P i iznosi 42 % P uklonjenog (Slike 5, 12 i 13).

Mehanizam unosa P u aerobnim i u anoksičnim uvjetima može se pripisati vrstama DPAOs, uz kisik, $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona.

Također, kako su pokusi vođeni pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$ oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$ nije rezultirala ekvivalentnom količinom nakupljenog $\text{NO}_x\text{-N}$ ($\text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$), Slike 6-9 i 13, nego se zbivao proces istovremene nitrifikacije i denitrifikacije najviše izražen pri omjeru KPK/P 32 i u tom pokusu gubitak N odnosno učinak SND iznosi 82 % (Slika 9).

DO (Slika 10) je, poput pH (Slika 11), neizravni pokazatelj zbivanja u mikrobnom procesu, a uz dostupan raspoloživi KPK odgovoran je za provođenje SND (Slike 6-9, Slika 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 s 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). U ovim pokusima (Slika 11) pH nije bila ispod pH 7,25.

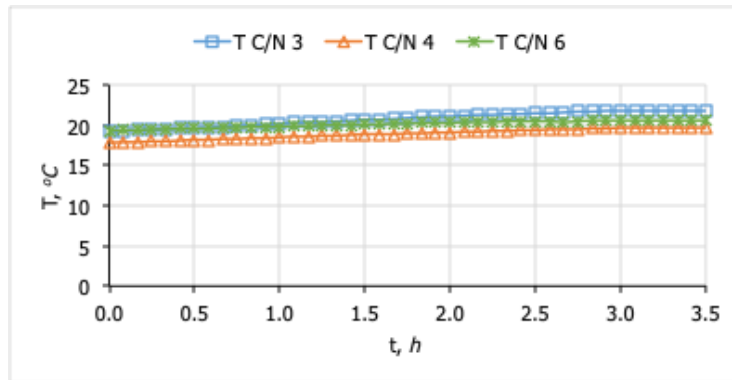
U literaturi (Ya-yi i sur., 2007; Vargas i sur., 2009) se navodi da pri pH > 8 dolazi do reakcije kemijskog taloženja PO₄-P, te treba biti oprezan u tumačenju rezultata uklanjanja PO₄-P koji bi se mogli pripisati aktivnosti mikroorganizama ili procesu taloženja. U diplomskom radu pokusi su vođeni bez kontrole pH vrijednosti. Vrijednosti pH > 8,0 su zabilježene rano u procesu pri svim istraženim C/N omjerima (Slika 11). Ipak, postignuto uklanjanje P se može pripisati PAOs vrstama jer je i nakon perioda intenzivnog uklanjanja P i dalje PO₄-P prisutan u preostaloj količini te se uklanjanje P ne može povezati s reakcijom taloženja.

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

Profili pH u svim pokusima (Slika 11) su odraz aktivnosti mikrobnih vrsta u ciljanom procesu, i to aktivnosti PAOs, nitrifikanata i denitrifikanata i OHO. Postiže se povećanje pH za sve odabrane početne omjere KPK/P povezano s razgradnjom – uklanjanjem KPK i aktivnosti PAOs, do vrijednosti pH oko 8,4. Nakon iscrpljivanja KPK i znatno manje aktivnosti PAOs daljnjim provođenjem procesa zbiva se sniženje pH koje je izraženije što je manji omjer KPK/P (Slika 11).

U literaturi se navodi da je i temperatura uz pH-vrijednost vodenog okoliša limitirajući čimbenik aktivnosti PAOs vrsta. Istaknuto je (Whang i Park, 2002; Panswad i sur., 2003) da je temperatura 17-22 °C povoljna za aktivnost PAOs, i da pri tim uvjetima temperature prevlada biomasa PAOs nad GAOs, budući GAOs odgovara viša temperatura.

Svi pokusi u kojima je istraživano uklanjanje N i P pri DO < 1 mg L⁻¹ su provedeni u ambijentalnim uvjetima temperature, pri 18-22 °C (Slika 15), što nije imalo negativnog učinka na PAOs niti na nitrifikante i denitrifikante i u literaturi je istaknuto da je povoljna temperatura za uklanjanje P 17-22 °C (Panswad i sur., 2003; Whang i Park, 2002).



Slika 15. Usporedne promjene temperature vodenog medija u procesu biološkog uklanjanja P i N pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, pri C/N 3, 4 i 6, za početnih $20 \text{ mg PO}_4\text{-P L}^{-1}$

U pokusima pri svim odabranim omjerima KPK/P (Slike 5-13) zbivala se potpuna oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$ koja nije rezultirala nakupljanjem $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$ u ekvivalentnoj (stehiometrijskoj) količini. Po bilanci N, nedostaje N cca 33-82 % (Slika 9), ovisno o početnom omjeru KPK/P (Slike 5, 12 i 13). Povećanje koncentracije raspoloživog ugljika (KPK) što prati povećanje omjera KPK/P, ima učinak na povećanje učinkovitosti procesa uklanjanja N, dok je učinak na unos $\text{PO}_4\text{-P}$ povezan s raspoloživom količinom elektron akceptora. Organski sastojci (KPK) su u svim pokusima uklonjeni do vrijednosti dopuštenih za ispust u okoliš (Pravilnik, 2013).

Biološko uklanjanje nutrijenata smatra se ekonomski isplativim i održivim načinom uklanjanja N i P iz otpadne vode (Tchobanoglous i sur., 2004).

U karakteriziranju udjela DPAOs (frakcije PAOs) u sustavu BNR, prema Wachtmeister i sur. (1997) rezultat aerobnog/anoksičnog P unosa provođenjem „batch“ testa pokazuje da je specifična brzina aerobnog P unosa u anaerobno/aerobnom SBR sustavu (A/O SBR) oko $70 \text{ mg P g}^{-1} \text{ VSS h}^{-1}$, dok je specifična brzina anoksičnog unosa P oko $10 \text{ mg P g}^{-1} \text{ VSS h}^{-1}$ što čini oko 15 % aerobnog P unosa. Anoksični unos P i aerobni unos P dobiven u dva paralelna „batch“ pokusa pri aerobnim i anoksičnim uvjetima može dati procjenu relativnog udjela DPAOs (Wachtmeister i sur., 1997).

5. ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata prikazanih u ovom radu mogu se donijeti zaključci:

1. pri nižoj koncentraciji otopljenog kisika, $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$, postiže se istovremeno uklanjanje C, N i P, provođenjem procesa istovremene nitrifikacije i denitrifikacije i aktivnosti PAOs
2. učinkovitost procesa SND se povećava s povećanjem omjera KPK/P odnosno KPK/N i pri omjeru KPK/P 32 koji odgovara omjeru KPK/N 11 učinak SND je 82 %
3. za istražene omjere KPK/P 18, 25 i 32 postignuto je uklanjanje $PO_4\text{-P}$ od 54 %, 61 % i 42 % od početne koncentracije $20 \text{ mg } PO_4\text{-P/L}$ pri $DO < 1 \text{ mg L}^{-1}$.

6. LITERATURA

Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2001) Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 442-446.

Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2002) Characterization of denitrifying phosphate accumulating organisms cultivated under different electron acceptor conditions using polymer as echain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Water Res.* **36**, 403–412.

Akin, B. S., Ugurlu, A. (2004) The effect of anoxic zone on biological phosphorus removal by a sequential batch reactor. *Bioresourc Technol.* **94**, 1-7.

Arbabi, M., Akbarzadeh, A., Khodabakhshi, A. (2012) Optimization of SBR system for enhanced biological phosphorus and nitrogen removal. *Int. J. Env. Health Eng.* **1**, 21-26.

Baeza, J. A., Guisasola, A., Guerrero, J. (2014, 7. rujun) Can Nitrogen Removal And Enhanced Biological Phosphorus Removal Coexist? – Guest Column, <<https://www.wateronline.com/doc/can-nitrogen-removal-and-enhanced-biological-phosphorus-removal-coexist-0001>>. Pristupljeno 20. kolovoza 2019.

Brdjanovic, D., van Loosdrecht, M. C. M., Hooijmans, C. M., Alaerts, G. J., Heijnen, J. J. (1997) Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal. *J. Environ. Eng.-ASCE.* **123**, 144-154.

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

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

Cokro, A. A., Law, Y., Williams, R. B. H., Cao, Y., Nielsen, P. H., Wuertz, S. (2017) Non-denitrifying polyphosphate accumulating organisms obviate requirement for anaerobic condition. *Water Res.* **111**, 393-403.

Crites, R., Tchobanoglous, G. (1998) Biological treatment and nutrient removal. U: Small and decentralised wastewater management systems (Kane, K. T., Munson, E., Haag, G., Tchobanoglous, G., ured.), WCB McGraw Hill, New York , str. 397-526.

Dodds, W. K. (2003) The role of periphyton in phosphorus retention in shallow fresh water aquatic systems. *J. Phycol.* **39**, 840–849.

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., He, S., Yilmaz, S., Noguera, D., McMahon, K. D. (2009) Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different '*Candidatus accumulibacter*' clades. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**(6), 583-588.

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

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.

Frison, N., Di Fabio, S., Cavinato, C., Pavan, P., Fatone, F. (2013) Best available carbon source to enhance the via-nitrite biological nutrients removal from supernatants of anaerobic co-digestion. *Chem. Eng. J.* **215-216**, 15 – 22.

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

Gu, A. Z., Takács, I., Benisch, M., Stensel, H. D., Neethling, J. B. (2005) The Importance of Modeling Metal Uptake and Release in the EBPR Processes. Water Environment Federation Technical Exhibition and Conference 05, Washington.

Guerrero, J., Guisasola, A., Baeza, J. A. (2011) The nature of the carbon source rules the competition between PAO and denitrifiers in systems for simultaneous biological nitrogen and phosphorus removal. *Water Res.* **45**(16), 4793–4802.

- Guerrero, J., Flores-Alsina, X., Guisasola, A., Baeza, J. A., Gernaey, K. V. (2013) Effect of nitrite, limited reactive settler and plant design configuration on the predicted performance of simultaneous C/N/P removal WWTPs. *Bioresour. Technol.* **136**, 680-688.
- Guo, F., Zhang T. (2012) Profiling bulking and foaming bacteria in activated sludge by high throughput sequencing. *Water Res.* **46**, 2772-2782.
- He, S., Gall, D., McMahon, K. D. (2007) «*Candidatus accumulibacter*» population structures in enhanced biological phosphorus removal sludge as revealed by polyphosphate kinase genes. *App. Environ. Microbiol.* **73**(18), 5865-5874.
- Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brjanovic, D. (2008) *Biological Wastewater Treatment*. IWA Publishing, London.
- Hesselmann, R. P. X., Von Rummell, R., Resnick, S. M., Hany, R., Zehnder, A. J. B. (2000) Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal. *Water Res.* **34**, 3487-3494.
- Hollender, J., Van der Krol, D., Kornberger, L., Gierden, E., Dott, W. (2002) Effect of different carbon sources on the enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor. *World J. Microb. Biot.* **18**, 359-364.
- Hu, Z., Wentzel, M. C., Ekama, G. A. (2002) Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge system. *Water Res.* **36**, 4927-4937.
- Hu, J. Y., Ong, S. L., Ng, W. J., Lu, F., Fan, X. J. (2003) A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Res.* **37**: 3463 – 3471.
- Hu, X., Sobotka, D., Czerwionka, K., Zhou, Q., Xie, L., Makinia, J. (2018) Effects of different external carbon sources and electron acceptors on interactions between denitrification and phosphorus removal in biological nutrient removal processes. *J. Zhejiang Univ-Sc. B.* **19**(4), 305-316.
- Jena, J., Kumar, R., Saifuddin, M., Dixit, A., Das, T. (2016) Anoxic-aerobic SBR system for nitrate, phosphate and COD removal from high-strength wastewater and diversity study of microbial communities. *Biochem. Eng. J.* **105**, 80-89.

- Jiang, T., He, J., Yang, X., Li, J. (2015) Effects of COD tophosphorus ratios on the metabolism of PAOs in Enhanced biological phosphorus removal with different carbon sources. *J. Harbin Inst. Tech.* **22** (4), 87-91.
- Keene, N. A., Reusser, S. R., Scarborough, M. J., Grooms, A. L., Seib, M., Santo Domingo, J., Noguera, D. R. (2017) Pilot plant demonstration of stable and efficient high rate biological nutrient removal with low dissolved oxygen conditions. *Water Res.* **121**, 72-85.
- Kong, Y. H., Beer, M., Rees, G. N., Seviour, R. (2002) Functional analysis of microbial communities in aerobic-anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios. *Microbiology.* **148**, 2299-2307.
- Kong, Y. H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2005a) Microautoradiographic study of *Rhodocyclus* - related polyphosphate-accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microb.* **70**, 5383-5390.
- Kong, Y. H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2005b) Identity and ecophysiology of uncultured actinobacterial polyphosphate-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Appl. Environ. Microb.* **71**, 4076-4085.
- Kristiansen, R., Nguyen, H. T., Saunders, A. M., Nielsen, J. L., Wimmer R., Le, V. Q., McIlroy, S. J., Petrovski, S., Seviour, R. J., Calteau, A., Nielsen, K. L., Nielsen, P. H. (2013) A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal. *ISME J.* **7**, 543-554.
- Kuba, T., Smolders, G., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1993) Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* **27**(5-6), 241-252.
- Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1996) Effect of cyclic oxygen exposure on the activity of denitrifying phosphorus removing bacteria. *Water Sci. Technol.* **34**, 33-40.
- 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, Q. H., Li, P., Zhu, P. P., Wu J. (2008) Effects of exogenous organic carbon substrates on nitrous oxide emissions during the denitrification process of sequence batch reactor. *Environ. Eng. Sci.* **25**(8), 1221-1228.

- Li, W., Sun, H. Z., Wei, W., Liu, J., Fu, J. X., Wang, J. (2017) Study on denitrifying dephosphatation process, influence factors and mechanism. 3rd International Conference on Water Resource and Environment (WRE 2017). IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 82 (2017) 012090.
- Lindrea, K. C., Pigdon, S. P., Boyd, B., Lockwood, G. A. (1994) Biomass characterization in a nitrification-denitrification biological enhanced phosphorus removal (NDBEPR) plant during startup and subsequent periods of good and poor phosphorus removal. *Water Sci. Technol.* **29**(7), 91–100.
- 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.
- Liu, Y., Li, X., Kang, X., Yuan, Y. (2014) Performance of denitrifying phosphorus removal of *Acinetobacteria* strain at low temperature. *Int. Biodeter. Biodegr.* **95**, 135 – 138.
- Lockwood, G. L., Lindrea, K. C., Seviour, R. J. (1990) The distribution of phosphorus and ions in the biological phosphorus removal process. U: *Proceedings of the First Australian Conference on Biological Nutrient Removal from Wastewater*, Bendigo, str. 195-204.
- López-Vázquez, C. M., Hooijmans, C. M., Brdjanovic, D., Gijzen, H. J., van Loosdrecht, M. C. M. (2008) Factors affecting the microbial populations at full-scale enhanced biological phosphorus removal (EBPR) wastewater treatment plants in The Netherlands. *Water Res.* **42**, 2349 – 2360.
- López-Vázquez, 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.
- López-Vázquez, C. M., Oehmen, A., Hooijmans, C. M., Brdjanovic, D., Gijzen, H. J., Yuan, Z. G., van Loosdrecht, M. C. M. (2009b) Modeling the PAO-GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature. *Water Res.* **43**, 450-462.
- Lu, H., Oehmen, A., Viridis, B., Keller, J., Yuan, Z. G. (2006) Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* through alternating carbon sources. *Water Res.* **40**, 3838-3848.

- Lv, X. M., Shao, M. F., Li, C. L., Li, J., Gao, X. L., Sun, F. Y. (2014) A comparative study of the bacterial community in denitrifying and traditional enhanced biological phosphorus removal processes. *Microbes Environ.* **29**, 261-268.
- McIlroy, S. J., Nittami, T., Seviour, E. M., Seviour, R. J. (2010) Filamentous members of cluster III *Defluviicoccus* have the in situ pheno type expected of a glycogen accumulating organism in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **74**, 248-256.
- 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.
- Mielczarek, A. T., Nguyen, H. T., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2013) Population dynamics of bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal in Danish wastewater treatment plants. *Water Res.* **47**, 1529-1544.
- Mino, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* **32**, 3193-3207.
- Momba, M. N. B., Cloete, T. E. (1996) The relationship of biomass to phosphate uptake by *Acinetobacter junii* in activated sludge mixed liquor. *Water Res.* **30**, 364-370.
- Mulkerrins, D., Dobson, A. D. W., Colleran, E. (2004) Parameters affecting biological phosphate removal from wastewaters. *Environ. Int.* **30**, 249-259.
- Muszyński, A., Łebkowska, M., Tabernacka, A., Miłobędzka, A. (2013) From macro to lab-scale: Changes in bacterial community led to deterioration of EBPR in lab reactor. *Cent. Eur. J. Biol.* **8**, 130-142.
- Muszyński, A., Tabernacka, A., Miłobędzka, A. (2015) Longterm dynamics of the microbial community in a full scale wastewater treatment plant. *Int. Biodeter. Biodegr.* **100**, 44-51.
- Nguyen, H. T., Le, V. Q., Hansen, A. A., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2011) High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **76**, 256-267.

- Nguyen, H. T., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H. (2012) „*Candidatus Halomonas phosphatis*”, a novel polyphosphate-accumulating organism in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Environ. Microbiol.* **14**, 2826-2837.
- Nielsen, P. H., McIlroy, S. J., Albertsen, M., Nierychlo, M. (2019) Re-evaluating the microbiology of the enhanced biological phosphorus removal process. *Curr. Opin. Biotechnol.* **57**, 111–118.
- Obaja, D., Macé, S., Mata-Alvarez, J. (2005) Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. *Bioresour. Technol.* **96**, 7-14.
- Oehmen, A., Zeng, R. J., Yuan, Z., Keller, J. (2005a) Anaerobic metabolism of propionate by polyphosphate-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems. *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 43-53.
- Oehmen, A., Yuan, Z., Blackall, L. L., Keller, J. (2005b) Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 162-168.
- 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**, 2271-2300.
- Oehmen, A., López-Vázquez, C. M., Carvalho, G., Reis, M. A. M., van Loosdrecht, M. C. M. (2010) Modelling the population dynamics and metabolic diversity of organisms relevant in anaerobic/anoxic/aerobic enhanced biological phosphorus: removal process. *Water Res.* **44**(15), 4474–4486.
- Olsson, G., Nielsen, M., Yuan, Z., Lynggaard-Jensen, A., Steyer, J. P. (2005) Scientific and Technical Report No. 11. U: Instrumentation, Control and Automation in Wastewater Systems, IWA Publishing, London.
- Ong, Y. H., Chua, A. S. M., Fukushima, T., Ngoh, G. C., Shoji, T., Michinaka, A. (2014) High-temperature EBPR process: the performance, analysis of PAOs and GAOs and the fine-scale population study of *Candidatus “Accumulibacter phosphatis”*. *Water Res.* **64**, 102-112.

- Pan, M., Chen, T., Hu, Z., Zhan, X. (2013) Assessment of nitrogen and phosphorus removal in an intermittently aeration sequencing batch reactor (IASBR) and a sequencing batch reactor (SBR). *Water Sci. Technol.* **68**, 400 – 405.
- Panswad, T., Doungchai, A., Anotai, J. (2003) Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system. *Water Res.* **37**, 409-415.
- Peng, Y. Z., Ma, Y., Wang, S. Y. (2007) Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process. *J. Environ. Sci.* **19**(3), 284-289.
- 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.
- Pijuan, M., Casas, C., Baeza, J. A. (2009) Polyhydroxyalkanoate synthesis using different carbon sources by two enhanced biological phosphorus removal microbial communities. *Process Biochem.* **44**, 97-105.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013) *Narodne novine* 80/13, Zagreb.
- Puig, S., Coma, M., van Loosdrecht, M. C. M., Colprim, J., Balaguer, M. D. (2007) Biological nutrient removal in a sequencing batch reactor using ethanol as carbon source. *J. Chem. Technol. Biot.* **82**, 898-904.
- Qiu, G., Zuniga-Montanez, R., Law, Y., Thi, S. S., Nguyen, T. Q. N., Eganathan, K., Liu, X., Nielsen, P. H., Williams, R. B. H., Wuertz, S. (2019) Polyphosphate-accumulating organisms in full-scale tropical waste water treatment plants use diverse carbon sources. *Water Res.* **149**, 496-510.
- Rustrian, E., Delgenes, J. P., Moletta, R. (1996) Effect of the volatile fatty acids on phosphate uptake parameters by pure cultures of *Acinetobacter*. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**, 245-248.
- 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.
- Saia, S. M., Sullivan, P. J., Regan, J. M., Carrick, H. J., Buda, A. R., Locke, N. A., Walter M. T. (2017) Evidence for polyphosphate accumulating organism (PAO) mediated phosphorus

cycling in stream biofilm under alternating aerobic/anaerobic conditions. *Freshw. Sci.* **36**(2), 284–296.

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**, 99–127.

Sidat, M., Kasan, H. C., Bux, F. (1999) Laboratory-scale investigation of biological phosphate removal from municipal wastewater. *Water SA.* **25**, 459-462.

Sin, G., Niville, K., Bachis, G., Jiang, T., Nopens, I., van Hulle, S., Vanrolleghem, P. A. (2008) Nitrite effect on the phosphorus uptake activity of phosphate accumulating organisms (APOs) in pilot-scale SBR and MBR reactors. *Water SA.* **34**, 249-260.

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.

Tayà, C., Garlapati, V. K., Guisasola, A., Baeza, J. A. (2013) The selective role of nitrite in the PAO/GAO competition. *Chemosphere.* **93**, 612-618.

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

Vargas, M., Casas, C., Baeza, J. A. (2009) Maintenance of phosphorus removal in an EBPR system under permanent aerobic condition using propionate. *Bioch. Eng. J.* **43**, 288-296.

Wachtmeister, A., Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1997) A sludge characterization assay for aerobic and denitrifying phosphate removing sludge. *Water Res.* **31**, 471–478.

Wang, W., Wang, S., Peng, Y., Zhang, S., Yin, S. (2009) Enhanced Biological Nutrients Removal in Modified Step-feed Anaerobic/Anoxic/Oxic Process. *Chin. J. Chem. Eng.* **17**, 840-848.

- Wang, D., Li, X., Yang, Q., Zheng, W., Wu, Y., Zeng, T., Zeng, G. (2012) Improved biological phosphorus removal performance driven by the aerobic/extended-idle regime with propionate as the sole carbon source. *Water Res.* **46**, 3868-3878.
- Wang, Y., Geng, J., Ren, Z., He, W., Xing, M., Wu, M., Chen, S. (2015) Effect of anaerobic reaction time on denitrifying phosphorus removal and N₂O production. *Bioresource Technol.* **102**: 5674 – 5684.
- Wei, J., Imai, T., Higuchi, T., Arfarita, N., Yamamoto, K., Sekine, M., Kanno, A. (2014) Effect of different carbon sources on the biological phosphorus removal by a sequencing batch reactor using pressurized pure oxygen. *Biotechnol. Equip.* **28**(3), 471-477.
- Whang, L. M., Park, J. K. (2002) Competition between polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in biological phosphorus removal systems - effect of temperature. *Water Sci. Technol.* **46**, 191-194.
- Yagci, N., Artan, N., Cokgör, E. U., Randall, C. W., Orhon, D. (2003) Metabolic model for acetate uptake by a mixed culture of phosphate- and glycogen-accumulating organisms under anaerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 359-373.
- Ya-yi, W., Mian-li, P., Yan Min, Y., Yong-zhen, P., Shu-ying, W. (2007) Characteristics of anoxic phosphorus removal in sequencing batch reactor. *J. Environ. Sci.* **19**, 776-782.
- 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. G., Blackall, L. L., Keller, J. (2003) Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 140–148.
- Zhang, S. H., Huang, Y., Hua, Y. M. (2010) Denitrifying dephosphatation over nitrite: Effects of nitrite concentration, organic carbon, and pH. *Bioresource Technol.* **101**, 3870-3875.
- Zhou, S., Zhang, X., Feng, L. (2010) Effects of different types of electron acceptors on the anoxic phosphorus uptake activity of denitrifying phosphorus removing bacteria. *Bioresource Technol.* **101**, 1603-1610.

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.

K Čondić

Ime i prezime studenta