

# Biološko uklanjanje fosfora uz kisik kao akceptor elektrona

---

**Bošnjak, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:459940>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Ivana Bošnjak**

7524/PT

**BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA UZ KISIK KAO  
AKCEPTOR ELEKTRONA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biotehnologija u zaštiti okoliša**

**Mentorica: dr. sc. Dijana Grgas, poslijedoktorand**

**Zagreb, 2020.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo**  
**Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

## **Biološko uklanjanje fosfora uz kisik kao akceptor elektrona**

***Ivana Bošnjak, 0058211697***

### **Sažetak:**

Konvencionalno biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode se provodi pomoću fosfor akumulirajućih organizama (engl., PAO, *Phosphate Accumulating Organisms*) u anaerobno-aerobnim uvjetima. Uklanjanje fosfora biološkim putem je moguće i u striktnim aerobnim uvjetima, u kojima su elektron donor (izvor ugljika) i elektron akceptor (kisik) istovremeno prisutni. Cilj ovog rada je pregled dosadašnjih spoznaja o uklanjanju fosfora u striktnim aerobnim uvjetima, bez prethodne anaerobne faze, za koju se smatralo da je neophodna. U striktnim aerobnim uvjetima su vidljive faza obilja (engl. feast) i faza gladovanja (engl. famine), koje su istovjetne konvencionalnim anaerobno-aerobnim uvjetima vezano za promjene u koncentraciji hlapljivih masnih kiselina, glikogena, polihidroksi alkanoata i polifosfata. Vođenje procesa u striktnim aerobnim uvjetima rezultira manjom količinom pohranjenog glikogena, sintetiziranih polihidroksi alkanoata, te cjelokupnoj količini hidroliziranih polifosfata. PAO su vrlo široka skupina organizama s različitim metaboličkim mogućnostima, a za uklanjanje fosfora u striktnim aerobnim uvjetima su vjerojatno odgovorni netradicionalni PAO, poput *Microthrix parvicella*.

**Ključne riječi:** *aerobni uvjeti, EBPR, PAO*

**Rad sadrži:** 25 stranica, 9 slika, 56 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** dr. sc. Dijana Grgas, poslijedoktorand

**Datum obrane:** 15. lipnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study Food technology**

**Department of Food-technology engineering**  
**Laboratory for biological wastewater treatment**

**Scientific area: Biotechnical Science**  
**Scientific field: Food Technology**

**Biological phosphorus removal with oxygen as an electron acceptor**

***Ivana Bošnjak, 0058211697***

### **Abstract:**

Conventional biological phosphorus removal from wastewater is performed under anaerobic-aerobic conditions using phosphate-accumulating organisms (PAO). Biological phosphorus removal is also possible under strict aerobic conditions, in which the electron donor (carbon source) and the electron acceptor (oxygen) are present at the same time. The aim of this paper is to review the current knowledge on phosphorus removal under strict aerobic conditions, without the previous anaerobic phase, which was considered essential. Under strict aerobic conditions, feast and famine phases are visible, which are analogous to conventional anaerobic-aerobic conditions regarding changes in the concentration of volatile fatty acids, glycogen, polyhydroxy alkanoates, and polyphosphate pools. The performance of the process under strict aerobic conditions results in less glycogen stored, polyhydroxy alkanoates synthesized, and a total amount of hydrolyzed polyphosphates. PAO are a very broad group of organisms with different metabolic capabilities, and non-traditional PAO, such as *Microthrix parvicella*, are probably responsible for phosphorus removal under strict aerobic conditions.

**Keywords:** *aerobic conditions, EBPR, PAO*

**Thesis contains:** 25 pages, 9 figures, 56 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Senior researcher Dijana Grgas, PhD

**Defence date:** 15 June 2020

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Fosfor .....	2
2.2. Fosfor u otpadnoj vodi.....	2
2.3. Napredno biološko uklanjanje fosfora.....	3
2.3.1. Fosfat akumulirajući organizmi i njihov metabolizam .....	5
2.3.2. Glikogen akumulirajući mikroorganizmi .....	7
2.3.3. SBR reaktor (engl. <i>Sequencing Batch Reactor</i> ) .....	8
2.4. Uklanjanje P iz otpadne vode u aerobnim uvjetima.....	10
2.4.1. Acetat kao izvor ugljika .....	11
2.4.2. Glukoza kao izvor ugljika .....	14
2.4.3. Propionat kao izvor ugljika.....	16
2.4.4. Učinak temperature, pH i koncentracije otopljenog kisika na uklanjanje fosfora u striktnim aerobnim uvjetima.....	18
3. ZAKLJUČCI .....	19
4. POPIS LITERATURE .....	20

## 1. UVOD

Fosfor dospijeva u vode većinom zbog njegove zastupljenosti u poljoprivrednoj industriji, uglavnom u obliku gnojiva. Povećana koncentracija fosfora uzrokuje eutrofikaciju vode (Cisse i Mrabet, 2004; Desmidt i sur., 2015; Khan i Ansari, 2005; Zhang i sur., 2011).

Jedan od načina uklanjanja fosfora iz otpadnih voda je biološko uklanjanje fosfora u anaerobno-aerobnim uvjetima. Biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode temelji se na aktivnosti polifosfat akumulirajućih organizama (PAO, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*) prisutnih u aktivnom mulju. Odvođenjem viška mulja iz sustava uklanja se fosfor iz otpadne vode (Mino i sur., 1998).

Osim biološkog uklanjanja fosfora u anaerobno-aerobnim uvjetima provedena su istraživanja biološkog uklanjanja fosfora u aerobnim uvjetima bez anaerobne faze (Ahn i sur., 2002; Beun i sur., 2000; Dircks i sur., 2001; Guisasola i sur., 2004; Pijuan i sur., 2005; Pijuan i sur., 2006; Wang i sur., 2008; Vargas i sur., 2009).

U ovom radu dan je prikaz biološkog uklanjanja fosfora u striktnim aerobnim uvjetima. Obrađeni su procesni čimbenici poput izvora ugljika, pH vrijednosti, temperature i koncentracije otopljenog kisika. Naglasak u radu je stavljen na promjene unutarstaničnih polimera: glikogena, polihidroksi alkanoata i polifosfata.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Fosfor

Fosfor (P) je nemetal, u periodnom sustavu elemenata se nalazi u dušikovoj skupini i esencijalan je za cijeli živi svijet na Zemlji (Pfitzner i sur., 2004). U prirodi se fosfor ne nalazi u slobodnom obliku zbog svoje izrazite reaktivnosti, ali je široko rasprostranjen u mnogim mineralima, uglavnom fosfatima, u obliku fosfatnih stijena ili fosforita (Cisse i Mrabet, 2004). Osim u stijenama, fosfor se nalazi i u živim organizmima (Werner i Ami, 2014). Fosfor je jedan od najvažnijih biogenih elemenata u živom svijetu, makronutrijent, te je kao i dušik uključen u glavne fiziološke procese (Zhang i sur., 2011). Male količine dušika i fosfata nalaze se u svim vodenim ekosustavima te održavaju biološku ravnotežu u ekosustavima (Khan i Ansari, 2005). Fosfor je ključan sudionik biokemijskih reakcija, uključujući genetski materijal (DNA, RNA) i prijenos energije unutar stanice kroz molekulu adenozin trifosfat (ATP), te kao strukturna membranska potpora organizmu u obliku fosfolipidnih mebrana. Uz kalcij, drugi je najzastupljeniji mineral u ljudskom organizmu (Westheimer, 1987).

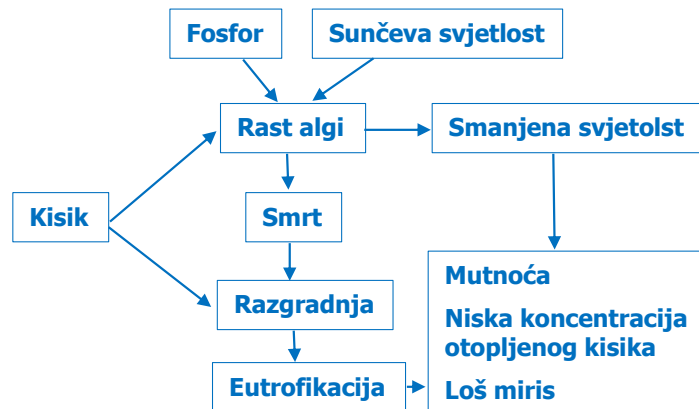
Poizvodi na bazi fosfata se mogu podijeliti u dvije glavne skupine: poljoprivredni i nepoljoprivredni. Većina proizvodnje fosfata u svijetu (oko 95%) se koristi u poljoprivredi, uglavnomu industriji gnojiva, ali i u proizvodnji pesticida i kao dodatak hrani za životinje. Zbog sve veće svjetske populacije povećava se potražnja za gnojivima, visokokvalitetnom hranom i uporabom biljnih biogoriva čiji je jedan od glavna tri makronutrijenta (uz dušik i kalij) upravo fosfor. Nepoljoprivredne primjene uključuju prehrambenu industriju, kućanstvo i ostale industrijske primjene (Cisse i Mrabet, 2004; Desmidt i sur., 2015).

### 2.2. Fosfor u otpadnoj vodi

Koncentracija fosfora u čistoj vodi je generalno jako niska. Prema Pravilniku o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013) maksimalna dozvoljena koncentracija ukupnog fosfora u za ispust u površinske vode je 2 mg/L. Ukupni fosfor je mjera svih oblika fosfora (suspendiranog ili otopljenog) koji se nalazi u nekom uzorku vode.

U otpadnoj vodi hranjivih sastojaka ima u izobilju u obliku fosfata, nitrata, amonijaka ili kombiniranih organskih dušika. Višak takvih spojeva uglavnom se javlja otjecanjem sa poljoprivrednih zemljišta na kojima je prekomjerna uporaba umjetnih gnojiva, također, iz otpadnih voda domaćinstava i industrije (Khan i Ansari, 2005). Povećana koncentracija fosfora

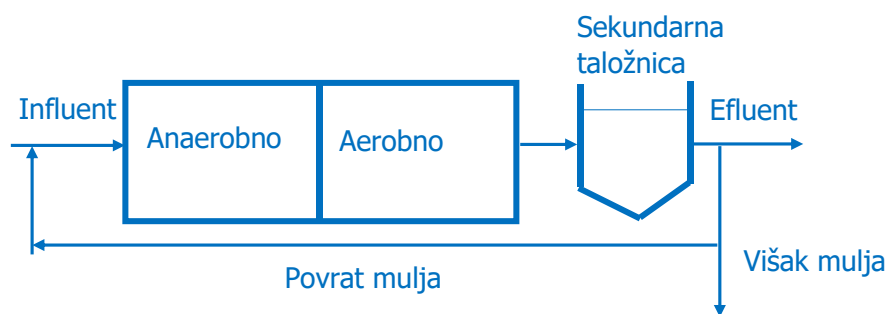
u otpadnoj vodi uzrokuje eutrofikaciju (Slika 1), a taj se rizik smanjuje uklanjanjem fosfora iz otpadnih voda (Zhang i sur., 2011).



Slika 1. Učinak fosfora na eutrofikaciju (Goel i Motlagh, 2013).

U konvencionalnim postrojenjima za obradu otpadnih voda, preostali fosfor se uklanja na dva načina:

- a) kemijskim taloženjem s metalnim solima
- b) pomoću naprednog biološkog uklanjanja fosfora (EBPR, engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*), prikazano na slici 2 (Tchobanoglous i sur., 2003).



Slika 2. Shema biološkog uklanjanja fosfora iz otpadne vode u konfiguraciji anaerobno-aerobno (Arvin i Jenkins, 1985).

### 2.3. Napredno biološko uklanjanje fosfora

Proces naprednog biološkog uklanjanja fosfora postiže se recikulacijom aktivnog mulja kroz anaerobne i aerobne uvjete (Barnard, 1975). Anaerobna i aerobna faza su razdvojene, elektron donori su organski sastojci iz otpadne vode, a elektron akceptor je najčešće kisik (u anoksičnoj



fazi su elektron akceptori nitrati ili nitriti) (Mino i sur., 1998). EBPR proces je implementiran u mnoga postrojenja za pročišćavanja otpadnih voda širom svijeta. Smatra se ekonomičnom i održivom tehnologijom koja ispunjava potrebe sve strožih procesa pročišćavanja otpadnih voda u postrojenjima za obradu otpadnih voda (Broughton i sur., 2008). Proces naprednog biološkog uklanjanja fosfora prvi put je uspostavljen 1950-ih godina, a intenzivno se istražuje i unaprijeđuje već više od 40 godina kako bi bio što prikladniji za postrojenja za obradu otpadnih voda (Hirota i sur., 2010; Wentzel i sur., 2008). Biološko uklanjanje fosfora se temelji na unosu fosfora u mikrobne stanice te uklanjanju viška aktivnog mulja obogaćenog polifosfatima (poliP) iz bioreaktora. U aktivnom mulju P se nalazi u tri oblika: biološki P, metalni P kroz fizikalno kemijske procese i poliP (Janssen i sur., 2002). Prednosti biološkog uklanjanja fosfora u odnosu na kemijsko uklanjanje fosfora su:

- ✓ ne dolazi do povećanja saliniteta obrađivane vode
- ✓ proizvodnja mulja raste od 10 do 15%
- ✓ cijena je puno prihvatljivija
- ✓ sustav je jednostavniji.

Nedostaci biološkog uklanjanja fosfora su varijabilnost i manja pouzdanost u usporedbi s kemijskim metodama uklanjanja. S druge strane, kemijsko uklanjanje fosfora je složenije i iz procesa izlazi znatno više mulja, a troškovi postrojenja su veći (Oehmen i sur., 2007).

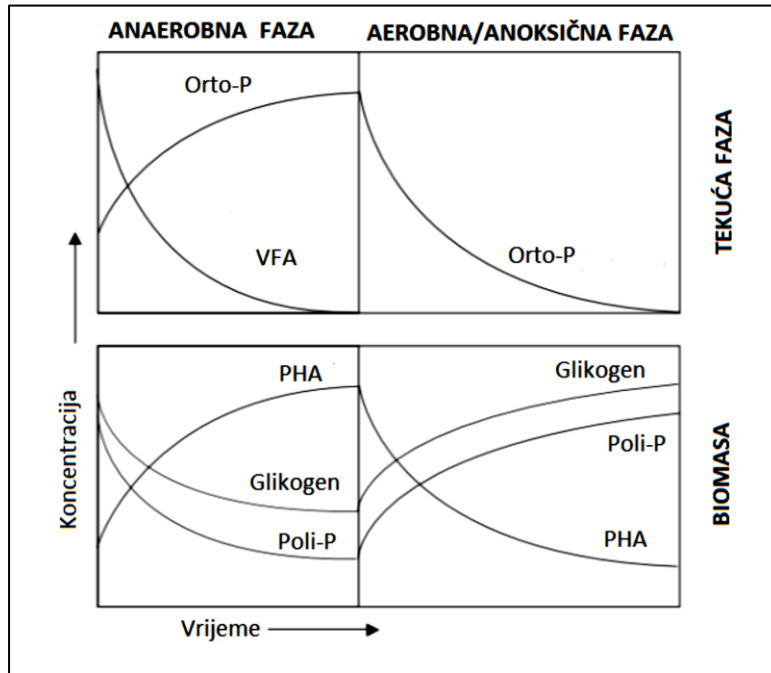
EBPR proces se temelji na obogaćivanju aktivnog mulja polifosfat akumulirajućim organizmima (Oehmen i sur., 2007). EBPR proces se vodi na način da se postigne što veći udio PAO u aktivnom mulju u odnosu na obične heterotrofne organizme (OHO, engl. *Ordinary Heterotrophic Organisms*) i glikogen akumulirajuće organizme (GAO, engl. *Glycogen Accumulating Organisms*), a odvođenjem viška aktivnog mulja iz bioreaktora obogaćenog s PAO uklanja se fosfor iz otpadne vode (Wentzel i sur., 2008).

Prema Wentzel i sur. (2008), PAO imaju sposobnost pohrane 0,38 mgP/mgVSS, (VSS, engl. *Volatile Suspended Solids*, hrv. Hlapljive suspendirane čestice) za razliku od OHO koji imaju sposobnost unosa P u znatno manjoj količini, 0,03 mgP/mgVSS. U praksi su te brojke manje zbog toga što PAO koegzistiraju sa GAO i običnim heterotrofnim organizmima, pa se koncentracija fosfora u aktivnom mulju obogaćenim s PAO kreće između 0,06 i 0,15 mgP/mgVSS, te količina uklonjenog fosfora ovisi o udjelu PAO u aktivnom mulju. U dobro postavljenim postrojenjima taj udio može biti čak i do 40% ukupne aktivne biomase.

### 2.3.1. Fosfat akumulirajući organizmi i njihov metabolizam

Organizmi koji su zaslužni za uklanjanje fosfora iz otpadne vode su fosfat akumulirajući organizmi. Imaju sposobnost akumulirati orto-fosfate (orto-P) iz otpadne vode i spremati ih u obliku netopivih unutarstaničnih polifosfatnih zrnaca. Polifosfat je polimer sastavljen od puno monomera, ortofosfata ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), povezanih fosfoanhidridnim vezama koje su bogate energijom (Mino i sur., 1998). U EBPR procesu se izmjenjuju dvije faze, ovisno o akceptoru elektrona, anaerobna i aerobna, odnosno anaerobna i anoksična faza (Slike 2 i 3). PAO u anaerobnim uvjetima koriste organske sastojke odnosno lako hlapljive masne kiseline (VFA, engl. *Volatile Fatty Acids*) kao izvor ugljika i spremaju ih unutar stanica kao polimere ugljika polihidroksi alkanoate (PHA). PAO najčešće koriste organske lako hlapive masne kiseline poput acetata (HAc) i propionata (HPr). Acetat kao izvor ugljika rezultira sa PHA pohranjenim u obliku poli- $\beta$ -hidroksi butirata (PHB), a propionat kao izvor ugljika rezultira sa PHA pohranjenim u obliku PHV (poli- $\beta$ -hidroksi valerata) i poli- $\beta$ -hidroksi-2-metilbutirat (PH2MV) (Randall i Liu., 2002). Energija (u obliku ATP-a) potrebna za unos VFA unutar stanice dobiva se hidrolizom unutarstaničnih polifosfata, a glikolizom glikogena se dobiva reducirajuća snaga ( $\text{NADH}_2$ ). Hidrolizom polifosfata ortofosfati se otpuštaju u tekući medij (Mino i sur., 1998).

U aerobnoj fazi uz kisik kao akceptor elektrona, PAO koriste pohranjene PHA kao izvor energije za prirast biomase, nadoknadu rezervi glikogena i unos fosfata (Slike 2 i 3). Energija dobivena oksidacijom PHA koristi se za sintezu polifosfatnih veza u stanicama tako da PAO unose u stanice topljive ortofosfate i ugrađuju ih u polifosfate radi obnove polifosfata u stanici i sinteze glikogena. Ispuštanjem viška biomase iz reaktora uklanja se i dio fosfora ugrađenog u biomasu u obliku polifosfata. Budući da je količina ortofosfata koji su PAO otpustili iz svojih stanica u anaerobnoj fazi znatno manja od količine ortofosfata koju su PAO unijeli u svoje stanice u aerobnoj fazi, dolazi do značajnog uklanjanja fosfora iz otpadne vode, a fosfor se u konačnici ispušta iz bioreaktora na način da se ispušta aktivni mulj bogat fosfatima. Anaerobno-aeroban metabolizam je u suštini isti kao i anaerobno-anoksičan metabolizam PAO, s razlikom da je u aerobnim uvjetima akceptor elektrona kisik, a u anoksičnim uvjetima nitrati odnosno nitriti (Mino i sur., 1998; Oehmen i sur., 2007; Smolders i sur., 1994; Wentzel i sur., 1986).



Slika 3. Karakteristične promjene orto-P, VFA, PHA, glikogena i poli-P tijekom anaerobno-aerobnog odnosno anaerobno-anoksičnog metabolizma u PAO (Tarayre i sur., 2016).

Zbog sposobnosti pohrane polifosfata u aerobnoj fazi, PAO imaju energiju potrebnu u anaerobnoj fazi za fermentaciju složenih organskih spojeva iz otpadne vode kako bi dobili preferirani supstrat – hlapljive masne kiseline (acetat, propionat), koji asimiliraju i pohranjuju u obliku PHA. Metabolizam PAO karakterizira ciklički proces u kojem se pohranjuju i troše polihidroksi alkanoati, glikogen i polifosfati. Održavanje i provedba tog ciklusa zahtjevaju dodatnu energiju, stoga PAO trebaju više energije od ostalih heterotrofnih organizama. Brzi unos supstrata u anaerobnoj fazi je ključan faktor u održavanju tog cikličkog procesa. Zbog toga PAO imaju kompetitivnu prednost u odnosu na ostale aerobne heterotrofne bakterije. Iz tog razloga se smatralo da je anaerobna faza neophodna i ključna za EBPR proces (Janssen i sur., 2002).

Skupina mikroorganizama u aktivnom mulju koja ima sposobnost uklanjanja P iz otpadne vode, fosfor akumulirajući organizmi, su *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (Kim i Pagilla, 2000; Lin i sur., 2003) i *Candidatus Accumulibacter phosphatis* (Ahn i sur., 2007; Cai i sur., 2007). Na temelju zastupljenosti i aktivnosti u EBPR postrojenjima punog mjerila, pomoću kultura-neovisnih metoda, identificirani su *Candidatus Accumulibacter phosphatis* i Aktinobakterijski rod *Tetraspharea* kao odgovorni PAO za uklanjanje P (Nielsen i sur., 2012). Osim vrlo često spominjanih *Acinetobacter* kao ključnih organizama u procesu biološkog uklanjanja fosfora

(Kornberg i sur., 1999), *Pseudomonas* spp., *Moraxella* spp. i *Aeromonas* spp. također mogu aerobno uklanjati fosfor iz otpadne vode Lotter i Murphy (1985), kao i *Microthrix parvicella* (Blackall i sur., 1995; Erhart i sur., 1997) i *Nostocoida limicola* (Blackall i sur., 2000). Iako su neki znanstvenici sugerirali da bi *M. parvicella* mogla spadati u tradicionalne PAO koji imaju sposobnost pohrane i otpuštanja P (Wanner, 1994; Tandoi i sur., 1998) jer može unositi dugolančane masne kiseline u anaerobnim uvjetima i ima sličan mehanizam unosa P (Andreasen i Nielsen, 1997), *M. parvicella* ne može koristiti acetat u *in situ* uvjetima, pa se stoga ne može svrstati u tradicionalne PAO. Molekularnim tehnikama otkriveno je da bakterije *Candidatus Accumulibacter phosphatis* iz roda *Rhodocyclus* pokazuju karakteristike fosfat akumulirajućih organizama i da postoje dva osnovna soja *Accumulibacter* poznata kao PAO I i PAO II među kojima postoje određene razlike (Bond i sur., 1999). Prema istraživanjima Nielsen i sur. (2010) otkriveno je da aktinobakterijski rod *Tetrasphaera* (obitelj *Intrasporangiaceae*) sadrži vrste koje su PAO i da se u EBPR postrojenjima nalaze većim udjelom nego bakterije roda *Accumulibacter*. Fiziologija bakterija roda *Accumulibacter* i bakterija roda *Tetrasphaera* je različita. Primarni supstrati *Accumulibacter* su acetat, propionat i neke amino kiseline, a većina *Tetrasphaera* može hidrolizirati škrob i fermentirati glukozu, te rasti u anaerobnim uvjetima. Prema nekim istraživanjima samo određene podvrste *Tetrasphaera* mogu konzumirati acetat (Nielsen i sur., 2010). Unatoč velikom napretku metoda detekcije mikroorganizama, i dalje nisu točno identificirani niti karakterizirani organizmi koji provode uklanjanje P iz otpadne vode u aktivnom mulju (Mino i sur., 1998; Filipe i sur., 2001).

### 2.3.2. Glikogen akumulirajući mikroorganizmi

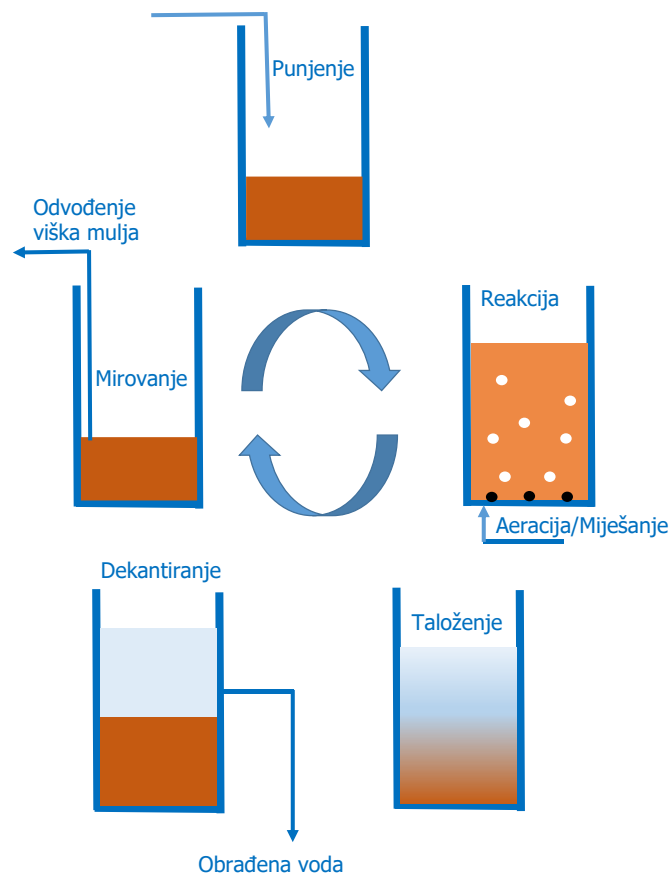
Dugo se vjerovalo (sve do početka 1990.-ih) da su PAO jedini organizmi koji mogu koristiti izvore ugljika u anaerobnim uvjetima što im je omogućavalo kompetitivnu prednost u odnosu na druge organizme u EBPR sustavima (Matsuo i sur., 1992). Kasnije istraživanje je pokazalo da postoji još jedna skupina organizama, glikogen akumulirajući organizmi, koji imaju sposobnost anaerobno skladištiti izvore ugljika kao i PAO (Liu i sur., 1996). GAO su nazvani *Candidatus Competibacter phosphatis* (Crocetti i sur., 2002). Međutim, za razliku od PAO, GAO ne otpuštaju fosfor u anaerobnim uvjetima niti ne uklanjaju fosfor iz otpadne vode u aerobnim uvjetima. GAO imaju sposobnost provoditi transformacije ugljika u naizmjeničnim anaerobno-aerobnim uvjetima. Važna razlika između PAO i GAO je ta da u anaerobnim uvjetima GAO koriste rezerve glikogena za anaeroban unos hlapljivih masnih kiselina u svoje stanice, i na taj način u anaerobnim uvjetima troše znatno više glikogena i zatim u aerobnim uvjetima obnavljaju znatno veću količinu rezervi glikogena u odnosu na PAO. U anaerobnim uvjetima

GAO glikolizom razgrađuju pohranjeni glikogen da bi osigurali dovoljnu količinu energije potrebnu za unos hlapljivih masnih kiselina i reducirajuću snagu za sintezu polihidroksi alkanoata. U anaerobnim uvjetima se odvija kompeticija između PAO i GAO za raspoložive izvora ugljika (Liu i sur., 1994). U aerobnim uvjetima GAO oksidiraju anaerobno skladištene PHA da osiguraju energiju za rast stanica i nadopunu rezervi glikogena. Takve metaboličke osobine im omogućuju da egzistiraju u anaerobno-aerobnim uvjetima. Zbog vrlo sličnog metabolizma PAO i GAO, lako se može dogoditi da GAO proliferiraju i budu značajno brojniji od PAO, što u konačnici rezultira narušavanjem uklanjanja P (Zhou i sur., 2008).

### 2.3.3. SBR reaktor (engl. *Sequencing Batch Reactor*)

SBR reaktor (šaržni reaktor koji radi po fazama) je vrlo često korišten bioreaktor u procesu biološke obrade otpadne vode, a radi po principu punjenje i ispuštanje. U ovakvom sustavu, otpadna voda se dodaje u jedan reaktor, obradi se obzirom na ciljane spojeve, i zatim se ispusti iz bioreaktora. Kaže se za SBR reaktor da je sustav aktivnog mulja koji radi u vremenu, a ne u prostoru. U SBR reaktoru je moguće postići različite stupnjeve obrade otpadne vode u jednom spremniku, uključujući i taloženje aktivnog mulja, na način da se odrede vremenski kontrolirane sekvence (US EPA, 1999).

Otpadna voda ulazi u SBR reaktor koji sadrži biomasu aktivnog mulja (Slika 4). Aktivni mulj se tijekom prethodnih ciklusa aklimatizirao na sastav otpadne vode. Jednom kada se napuni SBR reaktor, funkcionira isto kao i konvencionalni sustav aktivnog mulja, s razlikom da nema kontinuirani dotok influenta ni kontinuirani odljev obrađenog efluenta. Nakon što završe biološke reakcije, aeracija i miješanje se zaustavljaju, te se zatim odvija taloženje aktivnog mulja. Nakon taloženja aktivnog mulja odvodi se obrađeni supernatant, i ispušta se višak biomase aktivnog mulja. SBR reaktor nema sekundarnu taložnicu jer se i reakcija i taloženje odvijaju unutar istog spremnika (US EPA, 1999).



Slika 4. Shematski prikaz procesa obrade otpadne vode u SBR reaktoru (US EPA, 1999).

SBR reaktor radi u ciklusima, a svaki ciklus se sastoji od faza punjenje, reakcija, taloženje, ispuštanje i mirovanje (Slika 4). Duljina pojedine faze kao i dužina cjelokupnog ciklusa ovisi o cilju biološkog procesa, primjerice uklanjanja ugljika, dušika, odnosno fosfora iz otpadne vode.

Punjenje SBR reaktora otpadnom vodom se odvija tijekom faze punjenje, a može se odvijati na jedan od tri načina: statičko punjenje, punjenje s miješanjem i punjenje s aeracijom. Statičko punjenje se odvija na način da je biomasa aktivnog mulja već prisutna u bioreaktoru, a otpadna voda se dodaje u bioreaktor. Tijekom statičkog punjenja nema ni aeracije ni miješanja, što znači da kada započne faza reakcije, u SBR reaktoru će biti visoka koncentracija supstrata (hrane). Visoki omjer hrane prema mikroorganizmima više pogoduje formiranju pahuljica aktivnog mulja, nego filamentoznim mikroorganizmima, te omogućuje učinkovitije taloženje aktivnog mulja. Statičko punjenje je vrlo dobar odabir kada nam je cilj favorizirati organizme koji imaju sposobnost unutarstanične pohrane spojeva tijekom visoke koncentracije raspoloživog supstrata, poput fosfor akumulirajućih organizama. Tijekom punjenja s miješanjem miješa se otpadna voda koja ulazi u bioreaktor s aktivnim muljem, čime započinju

biološke reakcije. Za vrijeme punjenja s miješanjem mikroorganizmi razgrađuju organske spojeve i pri tome koriste preostali kisik ili alternativne akceptore elektrona, poput nitrata odnosno nitrita. Uvjeti kada mikroorganizmi nemaju kisik ali imaju nitrat odnosno nitrit kao akceptor elektrona se nazivaju anoksični uvjeti. Osim anoksičnih uvjeta, u fazi punjenja s miješanjem je moguće postići i anaerobne uvjete, a koje karakterizira odsustvo kisika i sulfata kao akceptora elektrona. Aerirana faza punjenja se odvija kada je uključena aeracija za vrijeme punjenja SBR reaktora. Tijekom aerirane faze punjenja odvijaju se aerobne reakcije koje se dalje nastavljaju tijekom faze reakcije. Faza aeriranog punjenja može skratiti vrijeme aeracije tijekom faze reakcije.

Tijekom faze reakcije, ovisno o odabranom načinu punjenja, nastavljaju se već započete reakcije tijekom faze punjenja, odnosno započinju i završavaju se reakcije. Tijekom faze reakcije se može podesiti miješanje odnosno aeracija, pa možemo imati fazu reakcije u aerobnim uvjetima, anoksičnim ili anaerobnim uvjetima, ovisno o cilju biološke obrade otpadne vode.

Fazu taloženja karakterizira taloženje aktivnog mulja na dnu reaktora odnosno odvajanje istaloženog mulja i obrađenog supernatanta. Tijekom faze taloženja nema dotoka influenta u reaktor niti odlijevanja obrađenog efluenta kao u konvencionalnom sustavu aktivnog mulja.

Obrađeni efluent se odvodi iz SBR reaktora tijekom faze dekantiranja pomoću crpke ili dekantera.

Tijekom faze mirovanja iz SBR reaktora se uklanja višak aktivnog mulja čime se održava određena starost aktivnog mulja (US EPA, 1999).

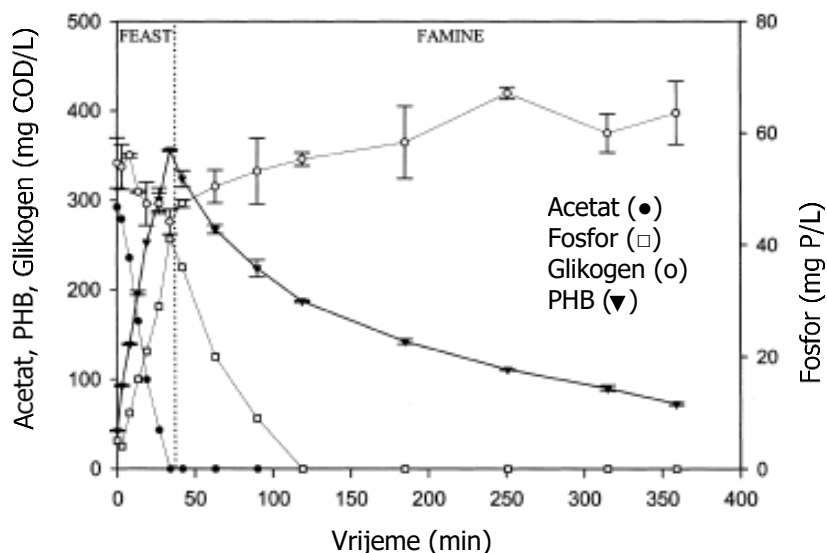
#### 2.4. Uklanjanje P iz otpadne vode u aerobnim uvjetima

Osim biološkog uklanjanja fosfora u konfiguraciji anaerobno-aerobno i anaerobno-anoksično, provedena su istraživanja biološkog uklanjanja fosfora u aerobnim uvjetima (Ahn i sur., 2002; Guisasola i sur., 2004; Pijuan i sur., 2005; Pijuan i sur., 2006; Wang i sur., 2008; Vargas i sur., 2009). Tako je pokazano da PAO imaju sposobnost unosa hlapljivih masnih kiselina u aerobnim uvjetima, i za to vrijeme se događa otpuštanje fosfata, sinteza polihidroksi alkanoata i razgradnja glikogena. Zatim, nakon iscrpljenja hlapljivih masnih kiselina, zabilježen je unos fosfata u stanice, razgradnja polihidroksi alkanoata te sinteza glikogena i rast PAO (Ahn i sur., 2002; Guisasola i sur., 2004; Pijuan i sur., 2005; Pijuan i sur., 2006; Vargas i sur., 2009). U takvim uvjetima, u kojima su PAO podvrgnuti istovremenom prisustvu elektron donora

(hlapljive masne kiseline) i elektron akceptora (kisik), vidljive su dvije različite faze: faza kada je dostupan vanjski supstrat - faze obilja (engl. *feast*), i kada nije dostupan vanjski supstrat – faza gladovanja (engl. *famine*) (Beun i sur., 2000; Dircks i sur., 2001). Promjene u koncentraciji hlapljivih masnih kiselina, fosfata, polihidroksi alkanoata i glikogena tijekom feast i famine faze su analogne anaerobno-aerobnim fazama EBPR procesa (Guisasola i sur., 2004). U procesu aerobnog uklanjanja fosfora istraženi su različiti izvori ugljika, poput acetata (Guisasola i sur., 2004; Pijuan i sur., 2005; Pijuan i sur., 2006), propionata (Vargas i sur., 2009) i glukoze (Wang i sur., 2008).

#### 2.4.1. Acetat kao izvor ugljika

Istraživanje ponašanja PAO kada su istovremeno prisutni elektron donor (acetat) i elektron akceptor (kisik) je započeto s acetatom kao izvorom ugljika u šaržnim pokusima. Guisasola i sur. (2004) su mulj koji je radio u konvencionalnom anaerobno-aerobnom režimu EBPR procesa podvrgli striktnim aerobnim uvjetima u šaržnim pokusima, s acetatom kao izvorom ugljika u SBR reaktoru. Zabilježili su feast i famine faze u kontekstu metabolizma fosfata, acetata, PHB i glikogena, a koje su bile analogne anaerobno-aerobnim fazama u konvencionalnom EBPR procesu. Na slici 5 je prikazano ponašanje acetata, PHB, fosfora i glikogena tijekom pokusa u kojem je mulj podvrgnuta aerobnim uvjetima, te se vide feast i famine faze.

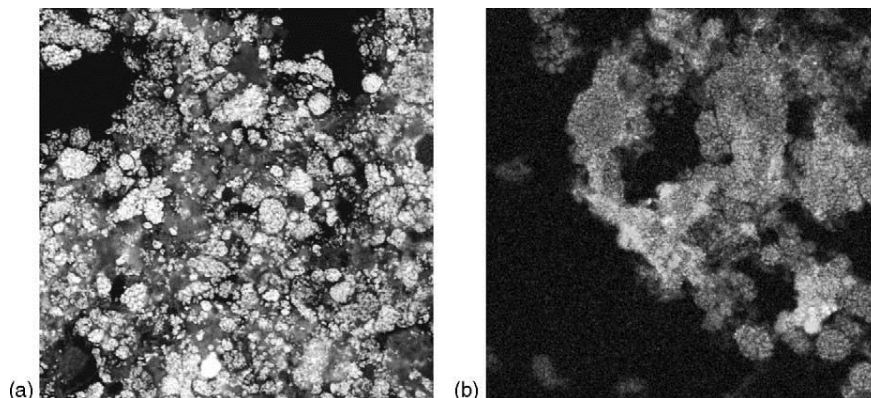


Slika 5. Promjene acetata, fosfora, glikogena i PHB u šaržnom aerobnom pokusu (Guisasola i sur., 2004).



Kada je započeo pokus, dodan je acetat u aerobnim uvjetima. Zabilježeno je smanjene koncentracije acetata, istovremeno s porastom koncentracije PHB. Također, u tom periodu, vidljivo je smanjenje glikogena i otpuštanje fosfata. Te promjene karakteriziraju feast fazu. Nakon što je iscrpljen acetat, započela je famine faza, tijekom koje se odvijalo trošenje PHB, rast biomase, obnova rezervi glikogena, te smanjenje koncentracije fosfata. Ovo ponašanje je karakteristično za PAO. Također, određivali su i brzinu unosa kisika (engl. *Oxygen Uptake Rate*, OUR). Najveća brzina unosa kisika je bila tijekom feast faze, dok su PAO trošili acetat zbog njegove pohrane u PHB. Niža brzina unosa kisika je zabilježena do kraja pokusa (do završetka famine faze). Tijekom famine faze PAO su koristili kisik za rast biomase, za razgradnju PHB, obnovu zalika glikogena i za unos ortofosfata u stanice.

Ponašanje karakterističnih polimera fosfor akumulirajućih organizama, polifosfata, i glikogena, u striktnim aerobnim uvjetima, s acetatom kao izvorom ugljika, u šaržnim pokusima u SBR reaktoru su istražili Pijuan i sur. (2005). Pokuse su proveli na način da su iz reaktora koji je radio u anaerobno-aerobnom režimu, u ustaljenom stanju, uzeli biomasu i proveli 3 šaržna pokusa. Slika 6 prikazuje FISH (engl. *Fluorescence in situ hybridisation*) analizu mulja koji je korišten u šaržnim pokusima. Pokusi su vođeni s 45% PAO i 1% GAO u ukupnoj bakterijskoj populaciji prisutnoj u aktivnom mulju.



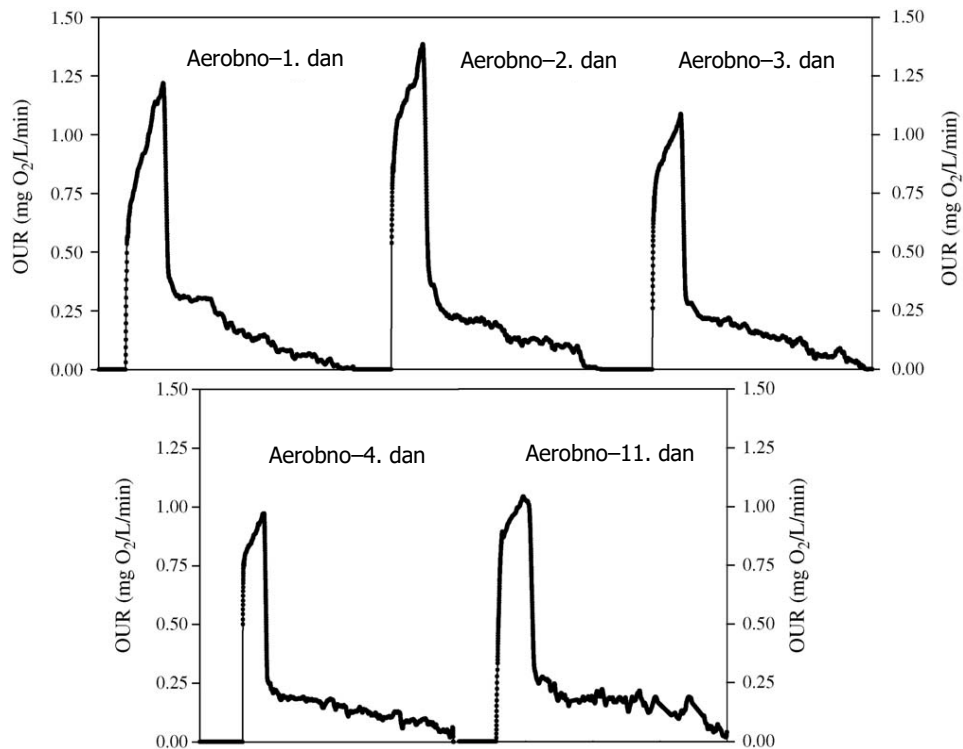
Slika 6. Konfokal laser skenirajući mikrografi mulja hibridiziran s: (a) Cy3-označenim PAOMIX probama, vidljive bijelo, za detekciju PAO i Cy5-označene EUBMIX probama, vidljivo sivo, za detekciju svih bakterija, i (b) Cy3-označenim GAOMIX probama, koje nisu detektirane, za detekciju GAO i Cy5-označene EUBMIX probama, vidljivo sivo, za detekciju svih bakterija (Pijuan i sur., 2005).

Prvi šaržni pokus je bio anaerobno-aerobni, a druga 2 su provedena u striktnim aerobnim uvjetima, s razlikom da je za jedan aerobni pokus biomasa uzeta na kraju anaerobne faze, a

za drugi na kraju aerobne faze EBPR procesa. U oba aerobna pokusa su zabilježili feast i famine faze. Određivali su brzinu unosa kisika, koja je bila najviša tijekom feast faze, a u famine faze je brzina unosa kisika bila niža, međutim, vidljive su dvije faze: tijekom unosa fosfata i nakon nestanka fosfata iz medija. Dok se dovijalo unošenje fosfata u PAO stanice, zabilježena je razgradnja PHA i proizvodnja glikogena, a kada je fosfat iscrpljen, proizvodnja glikogena je također završila, a PHA razgradnja se nastavila. U aerobnim pokusima, u feast fazi, je izmjerena manja količina otpuštenog P, proizvodnje PHA i razgradnje glikogena, u odnosu na te promjene tijekom anaerobne faze u klasičnom anaerobno-aerobnom EBPR procesu. U aerobnom pokusu s biomasom uzetom na kraju aerobnih uvjeta je zabilježen veći omjer P otpuštenog prema unesenom C kao i omjer razgrađenog glikogena prema unesenom C, u odnosu na pokus s biomasom uzetom na kraju anaerobnog perioda (Pijuan i sur., 2005).

Nakon provedenih šaržnih pokusa, u kojima je ispitano ponašanje PAO tijekom jednog ciklusa, nametnulo se pitanje mogu li PAO provoditi uklanjanje P u striktnim aerobnim uvjetima duže od jednog ciklusa. Pijuan i sur. (2006) su istražili ponašanje PAO u striktnim aerobnim uvjetima s acetatom kao izvorom ugljika tijekom 11 dana. Proveli su pokuse u SBR reaktoru sa sintetskom otpadnom vodom, koji je radio 4 ciklusa na dan u konfiguraciji 2 h anaerobno, 3,5 sati aerobno, 25 min taloženje i 5 min dekantiranje. FISH analizom je pokazano da je aktivni mulj bio sastava: 50% svih bakterija su bili *Accumulibacter*, a manje od 1% svih bakterija su bili GAO. Nakon 90 dana ustaljenog EBPR rada prebacili su se na striktno aerobne uvjete sljedeće konfiguracije: 5,5 sati aerobna faza, 25 min taloženja i 5 min taloženja. FISH analiza napravljena nakon 11 dana isključivo aerobnog vođenja pokusa su pokazali da nije došlo do promjene u udjelu PAO i GAO u ukupnim bakterijama. Njihovi pokusi su pokazali da PAO mogu preživjeti u striktnim aerobnim uvjetima, tijekom 11 dana. Ovi autori su u svojim pokusima zabilježili feast i famine faze, koje odgovaraju karakterističnom ponašanju PAO u anaerobno-aerobnim uvjetima, vezano za promjene acetata, PHA, glikogena i fosfora. Također, mjerili su i potrošnju kisika u pokusima. Najveća potrošnja kisika je zabilježena tijekom feast faze, dok je bilo prisutnog acetata u mediju. Tijekom famine faze, zabilježena je manja potrošnja kisika, u periodu dok su PAO unosili fosfor u svoje stanice. Kada su PAO iscrpili fosfor iz tekućeg medija, potrošnja kisika je opet opala, i kisik se u tom periodu trošio na razgradnju PHA za rast biomase i za procese održavanja stanica. Tijekom 11 dana aerobnih pokusa, proizvodnja PHB je bila konstantna, međutim, zabilježeno je smanjenje razgradnje i formiranja glikogena. Promjene u metabolizmu glikogena su se odrazile na smanjenje omjera unosa P i otpuštanja P, i povećanje otpuštanja P tijekom feast faze su negativno utjecale na cjelokupno uklanjanje P. Činjenica da tijekom 11 dana nije došlo do promjene u proizvodnji PHB i da se smanjila ukupna količina glikogena pokazuju da PAO u aerobnim uvjetima mogu sintetizirati sličnu

količinu PHB bez korištenja iste količine glikogena kao u anaerobnim uvjetima u konvencionalnom EBPR procesu. U aerobnim uvjetima, PAO više koriste TCA ciklus (ciklus limunske kiseline), pa su zato smanjili količinu glikogena jer im je glikogen manje koristan u aerobnim uvjetima. Došlo je do smanjenja sposobnosti uklanjanja PAO unatoč konstantnom udjelu PAO i GAO u ukupnom broju bakterija. Promjene su bile vidljive i u profilu potrošnje kisika: zabilježeno je smanjenje potrošnje kisika tijekom feast faze i povećanje potrošnje kisika tijekom famine faze (Slika 7).



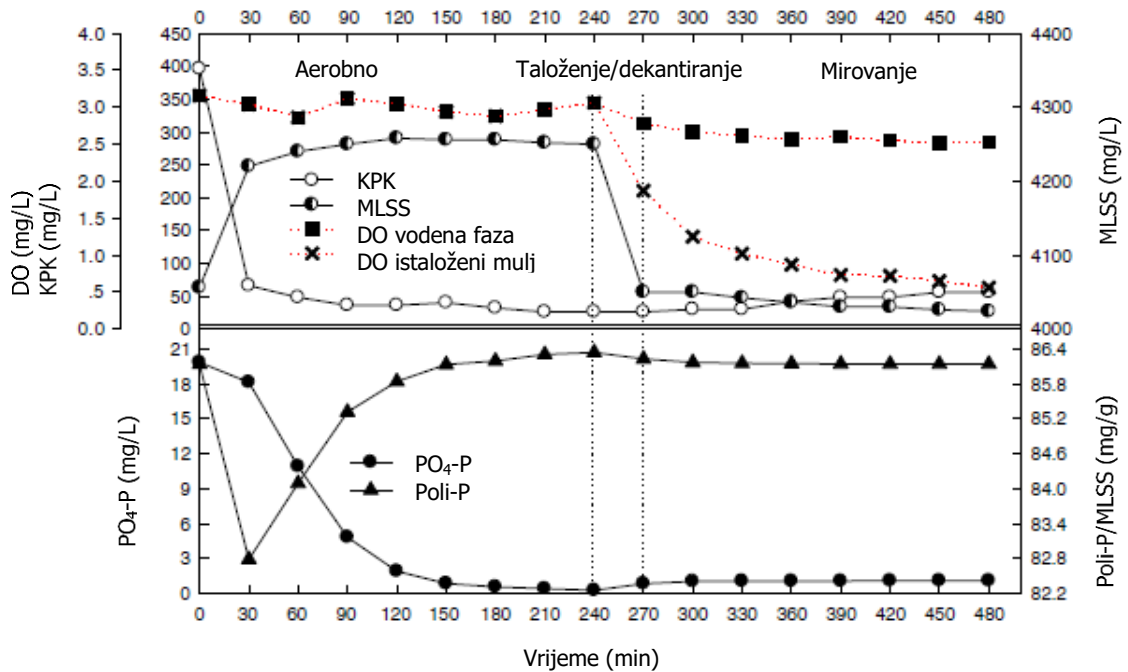
Slika 7. OUR profili izmjereni u danima 1-4 i u danu 11 (Pijuan i sur., 2006).

Tijekom feast faze dio acetata je oksidiran, a dio je spremljen kao PHB. PAO su uspjeli u striktnim aerobnim uvjetima s acetatom kao izvorom ugljika uklanjati P, iako je njihova sposobnost tijekom vremena opadala.

#### 2.4.2. Glukoza kao izvor ugljika

Osim acetata, PAO mogu kao izvor ugljika lako koristiti i glukozu. Nedostatak korištenja glukoze kao izvora ugljika u procesu biološkog uklanjanja fosfora je što učestalo dolazi do prekomjerne proliferacije GAO i smanjenja udjela populacije PAO, te narušavanja procesa uklanjanja P (Zhang i sur., 2005; Oehmen i sur., 2005). Učinak glukoze kao izvora ugljika na PAO kada su

istovremeno prisutni elektron donor i elektron akceptor u aerobnim uvjetima je privuklo zanimanje Wang i sur. (2008). Proveli su pokuse u SBR reaktoru s 3 ciklusa po danu koji su se sastojali od 4 sata aerobnog perioda i 4 sata taloženja/dekantiranja/mirovanja. Nakon 27 dana, sustav je postigao ustaljeno stanje, te su u ustaljenom stanju motreni KPK (Kemijska potrošnja kisika), ortofosfat, poliP, koncentracija aktivnog mulja izražena kao MLSS (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*), te koncentracija otopljenog kisika u vodenoj fazi i istaloženom mulju (DO, engl. *Dissolved Oxygen*) (Slika 8). Glikogen nisu određivali.



Slika 8. Karakteristične promjene KPK, MLSS, DO, PO<sub>4</sub>-P i poli-P tijekom jednog ciklusa u 135. danu (Wang i sur., 2008).

U ovakvoj konfiguraciji procesa, PHA je bio više-manje konstantan, na niskim razinama. Iako su imali dugu fazu taloženja/dekantiranja/mirovanja, u toj fazi nije došlo do otpuštanja P u medij (hidrolize poliP), kao što se inače događa u tradicionalnom anaerobno-aerobnom režimu. Razlog zašto nije zabilježeno otpuštanje P tijekom faze taloženja/dekantiranja/mirovanja je da nije bilo raspoloživog vanjskog izvora ugljika (glukoza), a koji je utrošen tijekom aerobne faze. U aerobnoj fazi KPK je utrošen tijekom prvih 30 minuta procesa. Dok su PAO trošili glukozu, tijekom prvih 30 min procesa, zabilježen je porast MLSS, mali unos ortofosfata u PAO stanice, te pad količine poliP u PAO stanicama. Nakon utroška glukoze, vidljivo je smanjenje ortofosfata u mediju i porast poliP sadržaja u stanicama, što sugerira da su PAO ortofosfat unosili u svoje stanice i pospremali ih u unutarstanični polimer poliP. Nakon aerobne faze, zbivala se faza

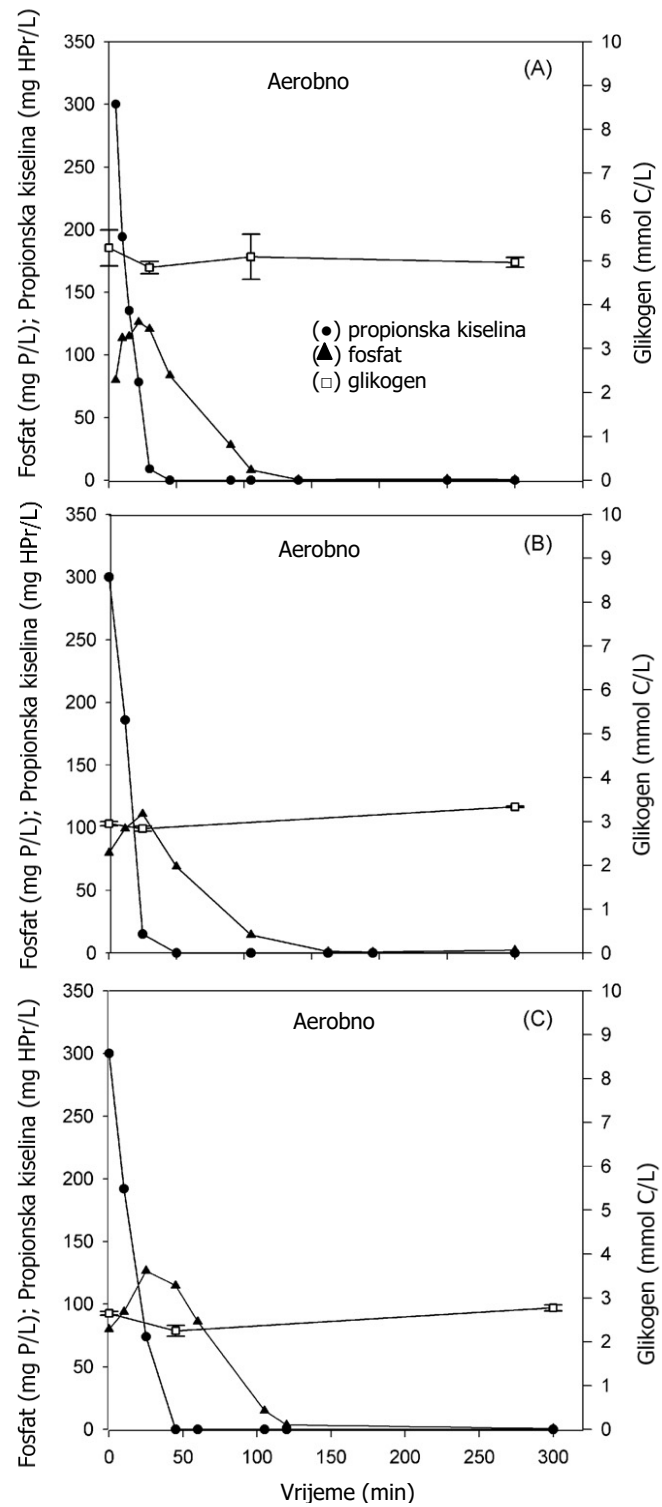
taloženja/dekantiranja/mirovanja, tijekom koje se mulj istaložio na dno reaktora, te je koncentracija otopljenog kisika mjerena u tekućoj fazi i u istaloženom mulju. U tekućoj fazi je koncentracija otopljenog kisika bila nešto niža nego tijekom aerobne faze, međutim, u istaloženoj biomasi je koncentracija otopljenog kisika pala do 0,55 mg/L. Unatoč tako niskoj koncentraciji otopljenog kisika u istaloženom mulju, tijekom tog perioda nisu zabilježene promjene koncentracije ortofosfata u mediju niti promjene koncentracije poliP u mikrobnj biomasi.

Dokazali su da je moguće postići uklanjanje P bez anaerobne faze (bez nakupljanja zaliha PHA), za koju se smatralo da je ključna i neophodna u procesu biološkog uklanjanja P, jer se u tradicionalnom EBPR procesu u anaerobnoj fazi akumuliraju unutarstanične zalihe PHA. Wang i sur. (2008) smatraju da zabilježeno biološko uklanjanje P u njihovom istraživanju nije rezultat tradicionalnih PAO te ukazuju na druge PAO poput *Microthrix parvicella* (Janssen i sur., 2002).

#### 2.4.3. Propionat kao izvor ugljika

U otpadnoj vodi su najviše zastupljene dvije hlapljive masne kiseline, acetat i propionat, pa je biološko uklanjanje P u aerobnim uvjetima istraženo i s propionatom kao izvorom ugljika u SBR reaktoru (Vargas i sur., 2009). Ti autori su primijenili 4 ciklusa na dan konfiguracije 2 h anaerobne faze, 3 h aerobne faze, 55 min taloženja i 5 min dekantiranja. FISH analiza je pokazala da je 70% svih bakterija *Accumulibacter*, a manje od 1% *Competibacter*. Nakon 5 mjeseci stabilnog P uklanjanja prebacili su se na striktno aerobne uvjete konfiguracije: 5 h aerobne faze, 55 min taloženja i 5 min dekantiranja, koje su vodili 46 dana. Postigli su stabilno uklanjanje P tijekom 46 dana. Tijekom biološkog uklanjanja P u aerobnim uvjetima, zabilježili su feast i famine faze. U usporedbi s konvencionalnim anaerobno-aerobnim ciklusima, zabilježili su smanjeno korištenje glikogena u striktnim aerobnim uvjetima. Količina pohranjenog glikogena je značajno opala što ukazuje da su manje potrebe za reducirajućom snagom iz glikogena u aerobnim uvjetima. TCA ciklus je aktivniji u aerobnim uvjetima, proizvodio je reducirajuće ekvivalente i tako smanjio potrebu za glikogenom. FISH analiza je pokazala da je u ukupnim bakterijama udio *Competibacter* populacije ostao nepromijenjen, međutim udio *Accumulibacter* je pao na 50%. Sposobnost uklanjanja P u striktnim aerobnim uvjetima je povezana s adaptacijom njihovog metabolizma na stalne aerobne uvjete, te su zadržali tu sposobnost tijekom 46 dana. Količina pohranjenog PHA je bila veća tijekom anaerobno-aerobnih uvjeta nego u striktnim aerobnim uvjetima. Vođenje biološkog uklanjanja P u striktnim aerobnim uvjetima se najviše odrazilo na PHA i glikogen. Cjelokupna količina

hidroliziranog poliP u striktnim aerobnim uvjetima je bila manja nego u anaerobno-aerobnim uvjetima (Slika 9).



Slika 9. Eksperimentalni profili tijekom stalno aerobnog ciklusa motrenog u SBR: (A) dan 4; (B) dan 8 i (C) dan 13 (Vargas i sur., 2009).

Ovi rezultati, kao i manja potrošnja glikogena sugeriraju da korištenje TCA ciklusa u stalnim aerobnim uvjetima je omogućila više energije nego manje učinkovita razgradnja glikogena koja je predominantna u anaerobnim uvjetima. Aerobni uvjeti su omogućili da dio VFA bude izravno oksidiran, istovremeno kao i pohrana PHA (Guisasola i sur., 2004; Sin i sur., 2005), zbog čega je bila manja potreba za otpuštanjem P. Sve u svemu, postigli su stabilno P uklanjanje u oba slučaju, u striktnim aerobnim uvjetima i u anaerobno-anoksičnim uvjetima.

Zatim su se prebacili na konvencionalne anaerobno-aerobne uvjete tijekom 59 dana. FISH analiza je pokazala da se udio *Accumulibacter* u ukupnim bakterijama opet vratio na 72%, s neznatnom količinom *Competibacter*. Nakon vraćanja na konvencionalne anaerobno-aerobne uvjete, i dalje su održavali uklanjanje P (Vargas i sur., 2009).

U istraživanju biološkog uklanjanja P u striktnim aerobnim uvjetima razlika između acetata i propionata kao izvora ugljika je sastav PHA: acetat se uglavnom skladišti u obliku polihidroksi butirata (PHB), dok se propionat skladišti kao polihidroksi valerata (PHV) i poli- $\beta$ -hidroksi-2-metilbutirat (PH2MV) (Randall i Liu., 2002). Najveća razlika između acetata i propionata kao izvora ugljika je ta da u slučaju kada se koristi acetat kao izvor ugljika vrijednost unosa fosfora u *famine* fazi se progresivno smanjuje odnosno gubi (Pijuan i sur., 2006).

#### 2.4.4. Učinak temperature, pH i koncentracije otopljenog kisika na uklanjanje fosfora u striktnim aerobnim uvjetima

Nittami i sur. (2011) su istražili kako utječu temperatura (10, 15, 20, 25 i 30 °C), pH (6, 7, 8 i 9), i koncentracija otopljenog kisika (0,5, 2,0 i 3,5 mg/L) na sposobnost uklanjanja P tijekom striktnih aerobnih uvjeta, s acetatom kao izvorom ugljika. Postigli su otpuštanje i unos P pri svim aerobnim ciklusima osim pri pH 6 i 9. Za unos P u stanice su se pokazali optimalni 25 °C i pH 8, a za otpuštanje P 20 °C. Vrijednosti ispitivanih pH nisu imale učinak na količinu otpuštenog P. Koncentracija otopljenog kisika 0,5 mg/L i 2,0 mg/L je rezultirala s maksimalnom količinom otpuštenog i unesenog P, a minimalne količine su zabilježene pri koncentraciji otopljenog kisika 3,5 mg/L.

### 3. ZAKLJUČCI

- Biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode moguće je postići i bez anaerobne faze, za koju se vjerovalo da je ključna i neophodna.
- U striktnim aerobnim uvjetima postoje faza obilja i faza gladovanja, koje su istovjetne konvencionalnim anaerobno-aerobnim uvjetima vezano za promjene u koncentraciji hlapljivih masnih kiselina, glikogena, polihidroksi alkanoata i unutarstaničnih zaliha polifosfata.
- Za biološko uklanjanje fosfora u striktnim aerobnim uvjetima vjerojatno su odgovorni netradicionalni PAO, poput *Microthrix parvicella*.
- Uklanjanje fosfora u striktnim aerobnim uvjetima rezultira manjom količinom pohranjenog glikogena, sintetiziranih polihidroksi alkanoata, te cjelokupnoj količini hidroliziranih polifosfata.
- Izvor ugljika je vrlo važan, a kao povoljan izvor ugljika istaknut je propionat. S acetatom kao izvorom ugljika vrijednost unosa fosfora u *famine* fazi progresivno se gubi.



#### 4. POPIS LITERATURE

Ahn J., Daidou T., Tsuneda S., Hirata A. (2002) Transformation of phosphorus and relevant intracellular compounds by phosphorus accumulating enrichment culture in the presence of both the electron acceptor and electron donor. *Biotechnology and Bioengineering* **79**: 83-93.

Ahn J., Schroeder S., Beer M., McIlroy S., Bayly R.C., May J.W., Vasiliadis G., Seviour R.J. (2007) Ecology of the microbial community removing phosphate from wastewater under continuously aerobic conditions in a sequencing batch reactor. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 2257-2270.

Andreasen K., Nielsen P. H. (1997) Application of microautoradiography to study substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3662-3668.

Arvin E., Jenkins D. (1985) Biological removal of phosphorus from wastewater. *Critical Reviews in Environmental Control* **15**: 25-64.

Barnard J. L. (1975) Biological nutrient removal without the addition of chemicals. *Water Research* **9(5-6)**: 485-490.

Beun J. J., Paletta F., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (2000) Stoichiometry and kinetics of PHB metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **67**: 379-389.

Blackall L. L., Seviour E. M., Bradford D., Rossetti S., Tandoi V., Seviour R. J. (2000) Candidatus *Nostocoida limicola*, a filamentous bacterium from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**: 703-709.

Blackall L. L., Seviour E. M., Cunningham M. A., Seviour R. J., Hugenholtz P. (1995) "*Miclothrix parvicella*" is a novel, deep branching member of the acinetomycetes subphylum. *Systematic and Applied Microbiology* **17**: 513-518.

Bond P. L., Erhart R., Wagner M., Keller J., Blackall L. L. (1999) Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4077-4084.

Broughton A., Pratt S., Shilton A. (2008) Enhanced biological phosphorus removal for high-strength wastewater with a low rbCOD:P ratio. *Bioresource Technology* **99(5)**: 1236–

1241.

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

Cisse L., Mrabet T. (2004) World Phosphate Production: Overview and Prospects. *Phosphorus Research Bulletin* **15**: 21–25.

Crocetti G. R., Banfield J. F., Keller J., Bond P. L., Blackall L. L. (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* **148**: 3353-3364.

Desmidt E., Ghyselbrecht K., Zhang Y., Pinoy L., van der Bruggen B., Verstraete W., Rabaey K., Meesschaert B. (2015) Global Phosphorus Scarcity and Full-Scale P-Recovery Techniques: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **45**: 336–384.

Dircks K., Henze M., van Loosdrecht M. C. M., Mosbaek H., Aspegren H. (2001) Storage and degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in activated sludge under aerobic conditions. *Water Research* **35**: 2277-2285.

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

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

Goel R. K., Motlagh A. M. (2013) Comprehensive Water Quality and Purification, Edition: 1, Chapter: Biological Phosphorus Removal, Publisher: Elsevier Inc., pp.150-162.

Guisasola A., Pijuan M., Baeza J. A., Carrera J., Casas C., La-fuente J. (2004) Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake in bio-P sludge: process modelling using oxygen uptake rate. *Biotechnology and Bioengineering* **85**: 722–733.

Hirota R., Kuroda A., Kato J., Ohtake H. (2010) Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **109(5)**: 423–432.

Janssen P. M. J., Meinema K., van der Roest H. F. (2002) Biological Phosphorus Removal:

Manual for design and Operation. IWA Publishing, London.

Khan F. A., Ansari A. A. (2005) Eutrophication: An ecological vision. *The Botanical Review* **71(4)**: 449-482.

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

Kornberg A., Rao N. N., Ault-Riche D. (1999) Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* **68**: 89-125.

Lin C. K., Katayama Y., Hosomi M., Murakami A., Okada M. (2003) The characteristics of the bacterial community structure and population dynamics for phosphorus removal in SBR activated sludge process. *Water Research* **37**: 2944-2952.

Liu W.-T., Mino T., Nakamura K., Matsuo T. (1996) Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal. *Water Research* **30(1)**: 75-82.

Liu W.-T., Mino T., Nakamura K., Matsuo T. (1994) Role of glycogen in acetate uptake and polyhydroxyalkanoate synthesis in anaerobic-aerobic activated sludge with a minimized polyphosphate content. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **77(5)**: 535-540.

Lotter L. H., Murphy M. (1985) The identification of heterotrophic bacterial in an activated sludge plant with particular reference to polyphosphate accumulation. *Water SA* **11**: 179-184.

Matsuo T., Mino T., Sato H. (1992) Metabolism of organic substances in anaerobic phase of biological phosphate uptake process. *Water Science Technology* **25(6)**: 83-92.

Mino T., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Research* **32(11)**: 3193-3207.

Nielsen P. H., Mielczarek A. T., Kragelund C., Nielsen J. L., Saunders A. M., Kong Y., Hansen A. A., Vollertsen J. (2010) A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants. *Water Research* **44(17)**: 5070-5088.

Nielsen P. H., Saunders A. M., Hansen A. A., Larsen P., Nielsen J. L. (2012) Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater – a model system in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **23**: 452-459.

- Nittami T., Oi H., Matsumoto K., Seviour R. J. (2011) Influence of temperature, pH and dissolved oxygen concentration on enhanced biological phosphorus removal under strictly aerobic conditions. *New Biotechnology* **29**: 2-8.
- 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 Research* **41**: 2271-2300.
- Oehmen, A., Teresa Vives, M., Lu, H., Yuan, Z., Keller, J. (2005) The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organism. *Water Research* **39**, 3727-3737.
- Pfützner A., Bräu M. F., Zweck J., Brunklaus G., Eckert H. (2004) Phosphorus nanorods - Two allotropic modifications of a long-known element. *Angewandte Chemie - International Edition* **43(32)**: 4228–4231.
- Pijuan M., Guisasola A., Baeza J. A., Carrera J., Casas C., Lafuente J. (2005) Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake: influence of PAO intracellular storage compounds. *Biochemical Engineering Journal* **26**: 184–190.
- Pijuan M., Guisasola A., Baeza J. A., Carrera J., Casas C., Lafuente J. (2006) Net P-removal deterioration in enriched PAO sludge subjected to permanent aerobic conditions. *Journal of Biotechnology* **123**: 117-126.
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013) *Narodne novine* **80** (NN 80/2013).
- Randall A. A., Liu Y. H. (2002) Polyhydroxyalkanoates form potentially a key aspect of aerobic phosphorus uptake in enhanced biological phosphorus removal. *Water Research* **36(14)**: 3473–3478.
- Sin G., Guisasola A., De Pauw D. J. W., Baeza J. A., Carrera J., Vanrolleghem P. A. (2005) A new approach for modelling simultaneous storage and growth processes for activated sludge systems under aerobic conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **92**: 600-613.
- Smolders G. J. F., 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. *Biotechnology and Bioengineering* **43**: 461–470.
- Tandoi V., Rosseti S., Blackall L., Majone M. (1998) Some physiological properties of an Italian isolate of "*Microthrix parvicella*". *Water Science and Technology* **37**: 1-8.

- Tarayre C., Nguyen H., Brognaux A., Delepierre A., De Clercq L., Charlier R., Michels E., Meers E., Delvigne F. (2016) Characterisation of Phosphate Accumulating Organisms and Techniques for Polyphosphate Detection: A Review. *Sensors* **16(6)**: 797.
- Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D. (2003) Wastewater Engineering: Treatment and reuse. McGraw-Hill Series in Civil and Environmental Engineering New York: McGraw-Hill.
- US EPA (1999) Wastewater Technology Fact Sheet Sequencing Batch Reactors, 932-F-99-073.
- Vargas M., Casas C., Baeza J. A. (2009) Maintenance of phosphorus removal in an EBPR system under permanent aerobic conditions using propionate. *Biological Engineering Journal* **43**: 288-296.
- Wang D.-b., Li X.-m., Yang Q., Zeng G.-m., Liao D.-m., Zhang J. (2008) Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. *Bioresource Technology* **99**: 5466-5473.
- Wanner J. (1994) Activated sludge Bulking and Foaming Control. Technomic Publishing Company, Inc.
- Wentzel M. C., Lotter L. H., Loewenthal R. E., Marais G. V. R. (1986) Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal – A biochemical model. *Water SA* **12**: 209-224.
- Wentzel M. C., Comeau Y., Ekama G., van Loosdrecht M. C. M., Brđanovic D., (2008) Enhanced Biological Phosphorus Removal. U: Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design, IWA Publishing, London, str. 155-220.
- Werner E., Ami N. (2014) The phosphorus cycle. *Aquatic Ecology*, **6**: 347–363.
- Westheimer F. H. (1987) Why nature chose phosphates. *Science* **235**: 1173–1178.
- Zhang T., Liu Y., Fang H. H. P. (2005) Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process. *Biotechnology and Bioengineering* **92**: 173-182.
- Zhang Z., Li H., Zhu J., Weiping L., Xin X. (2011) Improvement strategy on enhanced biological phosphorus removal for municipal wastewater treatment plants: Full-scale operating parameters, sludge activities, and microbial features. *Bioresource Technology* **102(7)**: 4646–4653.

Zhou Y., Pijuan M., Zeng R. J., Lu H., Yuan Z. (2008) Could polyphosphate-accumulating organisms (PAOs) be glycogen-accumulating organisms (GAOs)? *Water Research* **42**: 2361- 2368.

## Izjava o izvornosti

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

Ivana Bošnjak

Ime i Prezime studenta