

# Biološko uklanjanje fosfora uz nitrit kao akceptor elektrona

---

Kučević, Hana

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:159:692535>

*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**

**Hana Kučević**

7432/PT

**BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA UZ NITRIT 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 nitrit kao akceptor elektrona

*Hana Kučević, 0119027960*

### Sažetak:

U ovom radu je opisana denitrificirajuća defosfatacija s nitritom kao akceptorom elektrona. Denitrificirajuća defosfatacija je proces biološkog uklanjanja fosfora iz otpadne vode pomoću denitrificirajućih fosfor akumulirajućih organizama (DPAO) u anaerobno-anoksičnoj konfiguraciji. U anaerobnim uvjetima DPAO troše hlapive masne kiseline te ih pohranjuju kao polihidroksi alkanoate (PHA), pri čemu se troše rezerve glikogena i otpušta fosfor iz stanica. Zatim, u anoksičnim uvjetima DPAO troše PHA za unos i pohranu fosfata, nadopunjavaju rezerve glikogena, i odvija se stanični rast. Zbog inhibitornog učinka nitrita na mikroorganizme aktivnog mulja važno je održavati balans između primijenjene koncentracije nitrita i prilagođenosti aktivnog mulja. Kao povoljna koncentracija aktivnog mulja za proces denitrificirajuće defosfatacije navodi se 3-4 g/L, a povoljan izvor ugljika propionat, od istraženih izvora ugljika propionata, acetata, glukoze i butanske kiseline. U anaerobnoj fazi denitrificirajuće defosfatacije pri pH vrijednosti 8,0 su postigute najveće brzine otpuštanja fosfora, a iznad pH 8,0 je zabilježeno kemijsko taloženje fosfora.

**Ključne riječi:** *denitrificirajuća defosfatacija, DPAO, nitrit*

**Rad sadrži:** 24 stranice, 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:** 10. srpnja 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 nitrite as electron acceptor**

***Hana Kučević, 0119027960***

### **Abstract:**

In this thesis, denitrifying dephosphatation with nitrite as an electron acceptor is described. Denitrifying dephosphatation is the process of biological phosphorus removal from wastewater by denitrifying phosphorus accumulating organisms (DPAO) in an anaerobic-anoxic configuration. Under anaerobic conditions, DPAO consume volatile fatty acids and store them as polyhydroxy alkanoates (PHA), depleting glycogen reserves and releasing phosphorus from the cells. Then, under anoxic conditions, DPAO consume PHA for phosphate uptake and storage, replenish glycogen reserves, and cell growth takes place. Due to the inhibitory effect of nitrite on activated sludge microorganisms, it is important to maintain a balance between the applied nitrite concentration and the acclimatization of activated sludge. As a favorable concentration of activated sludge for the process of denitrifying dephosphating, 3-4 g/L is recommended, and a favorable carbon source is propionate, among the investigated carbon sources propionate, acetate, glucose and butanoic acid. In the anaerobic phase of denitrifying dephosphatation at pH 8.0, the highest phosphorus release rate was achieved, and above pH 8.0, chemical precipitation of phosphorus was recorded.

**Keywords:** *denitrifying dephosphatation, DPAO, nitrite*

**Thesis contains:** 24 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:** 10 July 2020

## **SADRŽAJ:**

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. Zašto se fosfor uklanja iz otpadne vode .....	2
2.2. Napredno biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode.....	2
2.2.1. Tko su PAO? .....	5
2.3. Denitrificirajuća defosfatacija .....	5
2.3.1. Tko su DPAO? .....	6
2.3.2. Denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita.....	7
2.3.2.1. Učinak koncentracije nitrita na denitrificirajuću defosfataciju.....	7
2.3.2.2. Učinak koncentracije mikrobne biomase na denitrificirajuću defosfataciju.....	11
2.3.2.3. Učinak pH na denitrificirajuću defosfataciju.....	12
2.3.2.4. Učinak izvora ugljika na denitrificirajuću defosfataciju.....	14
2.3.2.5. Inhibicijski učinak nitrita/slobodne nitritne kiseline.....	16
3. ZAKLJUČCI.....	18
4. POPIS LITERATURE .....	19

## 1. UVOD

Fosfor dospijeva u vodene ekosustave zbog sve intenzivnijih antropogenih aktivnosti što uzrokuje eutrofikaciju (Goel i Motlagh, 2014). Fosfor se može ukloniti iz otpadne vode pomoću kemijskog taloženja i procesa naprednog biološkog uklanjanja fosfora (EBPR, engl. Enhanced Biological Phosphorus Removal), koji se temelji na aktivnosti fosfor akumulirajućih organizama (PAO, engl. Phosphate Accumulating Organisms). Zbog brojnih prednosti biološkog uklanjanja fosfora u odnosu na kemijsko taloženje, biološko uklanjanje fosfora je privuklo zanimanje brojnih znanstvenika, i primijenjuje se u nekim postrojenjima za biološku obradu otpadnih voda (Tchobanoglous i sur., 2003).

Posljednjih godina se intenzivno proučavaju različite konfiguracije EBPR procesa, poput anaerobno-aerobne i anaerobno-anoksične konfiguracije (Tchobanoglous i sur., 2003; Vargas i sur., 2011; Smolders i sur., 1994; Kuba i sur., 1996). Anaerobno-anoksična konfiguracija EBPR procesa je privukla značajan interes, jer se u takvoj konfiguraciji osim fosfora, uklanja i dušik. U anaerobno-anoksičnoj konfiguraciji kao akceptor elektrona se može koristiti nitrat odnosno nitrit (Kern-Jesperen i sur., 1994; Saito i sur., 2004; Zhang i sur., 2010).

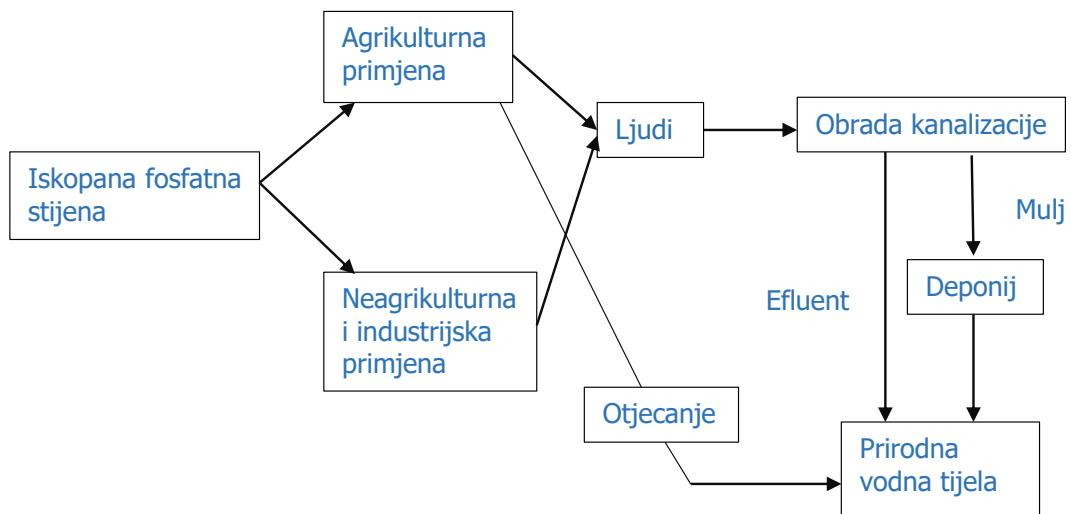
Budući da EBPR proces prvenstveno počiva na aktivnosti i metaboličkim sposobnostima PAO, vrlo je važno poznavati mogućnosti PAO, i podešavati procesne čimbenike u svrhu optimiranja procesa (Carvalho i sur., 2007; Oehmen i sur., 2010; He i sur., 2007; Flowers i sur., 2009; Martín i sur., 2006).

U ovom radu je obrađeno biološko uklanjanje fosfora u anaerobno-anoksičnoj konfiguraciji s nitritom kao akceptorom elektrona. Istaknuti su neki od čimbenika procesa, poput odgovornih mikrobnih skupina, PAO, zatim glikogen akumulirajući organizmi (GAO), koncentracija nitrita, inhibitorni učinak nitrita na mikroorganizme aktivnog mulja, koncentracija mikrobne biomase, pH vrijednost i izvor ugljika.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Zašto se fosfor uklanja iz otpadne vode

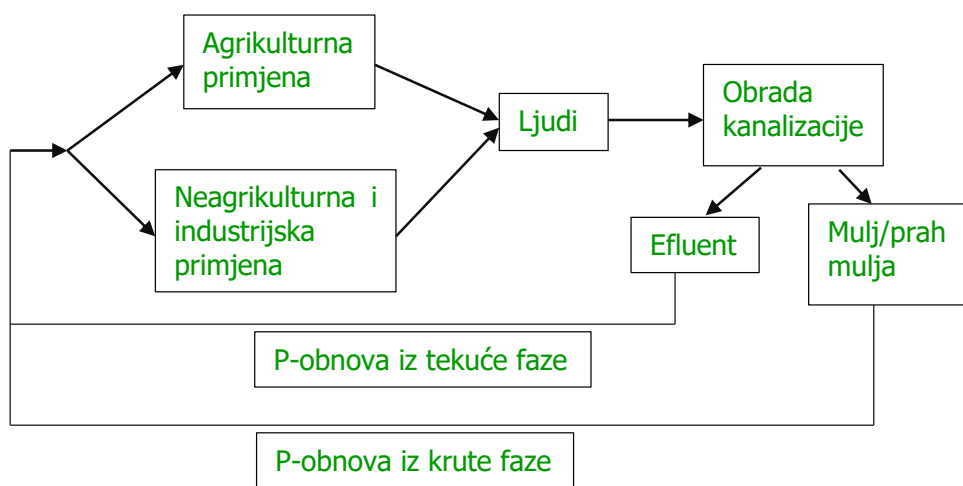
Fosfor (P) je neobnovljiv resurs, trenutno se dobiva iz fosfatnih stijena, primjenjuje se u agrikulturi, uglavnom za gnojiva (Cisse i Mrabet, 2004). Prije industrijalizacije ciklus fosfora je bio zatvoren, međutim razvojem industrijalizacije ciklus fosfora je pukao i znatno veće količine fosfora dospijevaju u prirodna vodna tijela sa zemlje (Slika 1) (Desmidt i sur., 2015).



Slika 1. Otvoreni ciklus fosfora (Desmidt i sur., 2015)

Eutrofikacija, koju uzrokuje prekomjerno ispuštanje dušika (N) i fosfora u vodni sustav, je već godinama problem širom svijeta. Karakterizira je intenzivan rast algi što rezultira mutnoćom vodnog sustava i smanjenom koncentracijom otopljenog kisika. Iako su dušik i fosfor potrebni za rast algi, unos fosfora je kritičniji jer brojne cianobakterije mogu namiriti svoje potrebe za dušikom iz atmosferskog dušika pomoću fiksacije dušika (Goel i Motlagh, 2014). Fosfor se nalazi u vodenom okolišu u organskom obliku, anorganskom topivom u vodi, i netopivom anorganskom obliku, a najvažniji je anorganski fosfor topiv u vodi jer ga mogu koristiti fitoplanktoni (Ahlgren i sur., 2006). Uzrok prekomjernoj količini fosfora u površinskoj vodi su kanalizacija, industrijski ispusti, agrikulturno otjecanje, te urbana područja (Slika 1) (Goel i Motlagh, 2014). Fosfor se u komunalnoj otpadnoj vodi nalazi u obliku ortofosfata, polifosfata i organski vezanog fosfora (Moore, 2009). U posljednje vrijeme istražuju se tehnike za obnovu (engl. Recover) fosfora iz različitih otpadnih tokova (Slika 2) (Cordell i sur., 2009).

Danas se fosfor iz otpadne vode uglavnom uklanja pomoću procesa naprednog biološkog uklanjanja fosfora. EBPR proces se temelji na ugradnji fosfora u mikrobnu biomasu aktivnog mulja te na ispuštanju viška aktivnog mulja bogatog fosforom iz bioreaktora (Tchobanoglous i sur., 2003). Upravo kombinacija EBPR procesa, u kojem se iz otpadne vode uklanja fosfor, i korištenje aktivnog mulja bogatog fosforom kao alternativnim izvorom fosfora, može poslužiti za zatvaranje ciklusa fosfora, kao održiva tehnika obnove fosfora iz tekućeg i krutog otpada (Slika 2) (Desmidt i sur., 2015).



Slika 2. Zatvoreni ciklus fosfora, uključujući proces obnove (Desmidt i sur., 2015)

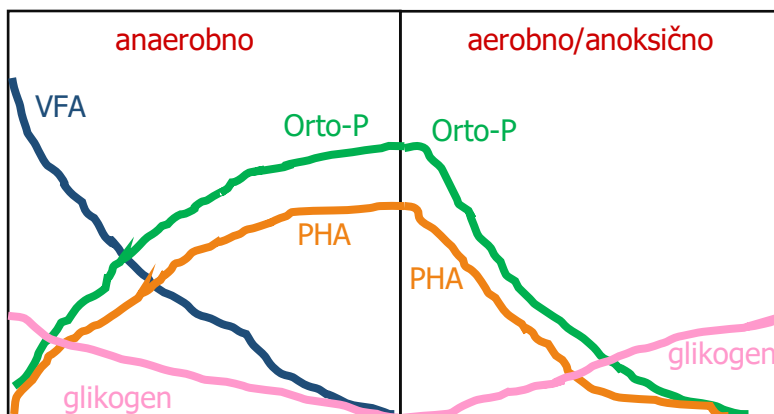
## 2.2. Napredno biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode

Proces naprednog biološkog uklanjanja fosfora se temelji na obogaćenju aktivnog mulja s polifosfat akumulirajućim organizmima. U konvencionalnom EBPR procesu, obogaćenje aktivnog mulja sa PAO se postiže recirkulacijom mulja kroz anaerobne i aerobne uvjete. U anaerobnim uvjetima PAO pohranjuju lako razgradive organske spojeve poput hlapljivih masnih kiselina (VFA, engl. Volatile Fatty Acids) kao polihidroksi alkanoate (PHA), i pri tome stvaraju potrebne reducirajuće ekvivalente ( $\text{NADH}_2$ ) tako što konvertiraju glikogen u PHA. Taj fermentacijski put također stvara dio energije u obliku ATP, a ostatak potrebne energije se dobiva hidrolizom polifosfata. Kada PAO hidroliziraju polifosfate, dolazi do otpuštanja orto-P iz stanice u miješanu tekućinu (ML, engl. Mixed Liquor). Zatim, u aerobnim uvjetima, PAO oksidiraju pohranjene PHA da dobiju energiju za nadopunu rezervi polifosfata i glikogena, te za rast i održavanje stanica (Slika 3). PAO nadopunjavaju rezerve polifosfata tako što unose orto-P iz miješane tekućine u svoje stanice i sintetiziraju polifosfate (Smolders i sur., 1994; Kuba i sur., 1996). Glikogen je unutarstanični polimer koji omogućava redukcijske



ekvivalente i dio energije potrebnu za anaeroban unos organskih sastojaka (Vargas i sur., 2011). PAO se mogu selektirati među drugim mikroorganizmima upravo zahvaljujući svojoj sposobnosti unosa i pohrane organskih sastojaka u anaerobnim uvjetima (Mino i sur., 1998). Budući da se tijekom aerobne faze unese više fosfora nego što se otpusti tijekom anaerobne faze, postiže se ukupno uklanjanje fosfora iz miješane tekućine (Goel i Motlagh, 2014).

Uklanjanje fosfora se postiže uklanjanjem viška biomase aktivnog mulja iz reaktora, koji je bogat polifosfatima (Grady i sur., 1999).



Slika 3. Karakteristične promjene VFA, orto-P, PHA i glikogena u konfiguraciji anaerobno-aerobno/anoksično EBPR procesa (Zhou i sur., 2010a).

Smatra se da je potpuni unos VFA tijekom anaerobne faze ključan za EBPR proces, i preporučeni omjeri za učinkovito uklanjanje fosfora su KPK/P (KPK, Kemijska Potrošnja Kisika) najmanje 35 i BPK/P (BPK, Biokemijska Potrošnja Kisika) najmanje 20 (Moore, 2009). 1 g fosfora se može ukloniti sa 10 g lako biorazgradivog organskog spoja. Za svrhu dizajniranja EBPR procesa u literaturi se preporuča omjer 50 mg KPK po mg uklonjenog P (Randall i sur., 1998).

### 2.2.1. Tko su PAO?

Dugo se vjerovalo da su *Acinetobacter*-povezani organizmi dominantni PAO (Fuhs i Chen, 1975), međutim, kasnije je pokazano da oni ne mogu anaerobno asimilirati acetat (Seviour i sur., 2003) i da ne dominiraju u procesima uklanjanja fosfora (Mino i sur., 1998). Danas se vjeruje da su odgovorni PAO *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, *Rhodocyclaceae* obitelj  $\beta$ -proteobakterija, koji su pronađeni u reaktorima laboratorijskog mjerila, u kojima su korišteni acetat i/ili propionat kao izvori ugljika (Hesselmann i sur., 1999; Crocetti i sur., 2000; Oehmen i sur., 2005a; Lemos i sur., 2003) i u EBPR postrojenjima punog mjerila (Zilles i sur., 2002a, 2002b). Cole i sur. (2007) su originalnu sekvencu *Candidatus Accumulibacter phosphatis* svrstali u rod *Propionivibrio*, unutar *Rhodocyclaceae* obitelji.

U EBPR procesu osim PAO, prisutni su i glikogen akumulirajući organizmi. GAO poput *Candidatus Competibacter phosphatis* i *Defluvicoccus* se uobičajeno nalaze u EBPR sustavima. GAO imaju vrlo sličan metabolizam kao PAO, s razlikom da GAO nemaju mogućnost pohrane polifosfata u aerobnim uvjetima niti otpuštanja fosfora u anaerobnim uvjetima. GAO troše glikogen za proizvodnju potrebnog ATP i  $\text{NADH}_2$  koji im je potreban za unos VFA i pohranu kao PHA. Budući da GAO, poput PAO, u anaerobnim uvjetima koriste VFA kao organski supstrat, u anaerobnim uvjetima se odvija kompeticija za VFA između PAO i GAO. Ukoliko GAO postanu brojniji od PAO, dolazi do narušavanja procesa biološkog uklanjanja fosfora iz otpadne vode (Rubio- Rincón i sur., 2017; Oehmen i sur., 2005a).

### 2.3. Denitrificirajuća defosfatacija

EBPR proces se može voditi osim u anaerobno-aerobnom, i u anaerobno-anoksičnom režimu jer osim kisika kao akceptor elektron mogu poslužiti i nitriti odnosno nitrati (Kern-Jesperen i sur., 1994). U anaerobno-anoksičnom režimu proces se oslanja na aktivnost i brojnost denitrificirajućih fosfor akumulirajućih organizmama (DPAO). DPAO imaju isti metabolizam kao i PAO, s razlikom da DPAO koriste nitrite/nitrate kao akceptore elektrona, a PAO kisik (Slika 3). Budući da DPAO u anoksičnim uvjetima koriste nitrat i/ili nitrit kao akceptor elektrona, u toj fazi se istovremeno odvijaju denitrifikacija i unos fosfora s istim donatorom elektrona, KPK, što je od velike važnosti jer je u većini komunalnih otpadnih voda upravo nedostatak ugljika limitirajući faktor za uklanjanje dušika i fosfora. Budući da mikroorganizmi u anoksičnim uvjetima imaju nižu brzinu rasta, u anaerobno-anoksičnom režimu nastaje i manje viška biomase aktivnog mulja. Također, budući da nema aerobnih uvjeta, ostvaruje se

i ušteda na aeraciji. Dakle, vođenje EBPR procesa u anaerobno-anoksičnom režimu rezultira smanjenom potrebom na organskim spojevima, smanjenim troškovima za aeracijom i manjom količinom proizvedenog viška aktivnog mulja, u odnosu na anaerobno-aeroban režim. Kako se u anaerobno-anoksičnom procesu istovremeno uklanjaju dušik i fosfor, taj proces se naziva i denitrificirajuća defosfatacija (Copp i Dold, 1998).

U sustavima za biološku obradu otpadnih voda dušik se uklanja tako što se u aerobnim uvjetima amonijak konvertira u nitrit, a nitrit zatim u nitrat (nitrifikacija). Nastali nitrati se zatim u anoksičnim uvjetima uz izvor ugljika konvertiraju preko nitrita do plinovitog dušika (denitrifikacija) (Metcalf i Eddy, 2003). Turk i Mavinic (1986) su pokazali da uklanjanje dušika iz otpadne vode preko nitrita (dakle, u aerobnim uvjetima se favorizira oksidacija amonijaka do nitrita, a zatim u anoksičnim uvjetima se denitrificira nakupljeni nitrit do plinovitog dušika) rezultira 40% smanjenjem potrebnog KPK tijekom denitrifikacije (jer se KPK ne troši za denitrifikaciju nitrata do nitrita, nego samo od nitrita nadalje), 63% višom brzinom denitrifikacije (kako se denitrifikacija provodi od nitrita nadalje, nema utroška vremena na denitrifikaciju od nitrata do nitrita, pa denitrifikacija traje kraće) i 300% nižim iskorištenjem biomase tijekom anaerobnog rasta. Iako nitrit pokazuje prednosti pred nitratom kao akceptor elektrona u procesu denitrificirajuće defosfatacije, nitrit također djeluje i kao inhibitor na brojne mikroorganizme aktivnog mulja (Wang i sur., 2007; Kuba i sur., 1993; Saito i sur., 2004).

U sustavu za biološku obradu otpadnih voda ugljik je potreban za PAO i za denitrifikante, što često rezultira u pomanjkanju organskih sastojaka kod otpadnih voda koje imaju nizak omjer KPK/N (Kuba i sur., 1996). Denitrificirajuća defosfatacija može biti alternativa konvencionalnom uklanjanju dušika i fosfora i riješiti problem limitacije organskih sastojaka (Zhang i sur., 2010).

### **2.3.1. Tko su DPAO?**

DPAO su frakcija PAO, imaju sposobnost unijeti fosfor u svoje stanice i pohraniti ih kao polifosfate u anoksičnim uvjetima kada nema kisika (Vargas i sur., 2011). Pokazano je da se *Accumulibacter* može podijeliti u dva tipa, koji imaju nekoliko skupina različitih denitrificirajućih sposobnosti (He i sur., 2007; Flowers i sur., 2009). Sposobnost DPAO da koriste nitrat ili nitrit tijekom denitrificirajuće defosfatacije ovisi o tipu PAO skupine (Ahn i sur., 2001). Hu i sur. (2003) su podijelili DPAO u dvije skupine, DPAO preko nitrata koji mogu koristiti kisik i nitrat kao akceptor elektrona, i DPAO preko nitrita koji mogu koristiti

kisik, nitrat i nitrit kao akceptor elektrona. Pomoću 16SrRNA i gena za polifosfat kinazu kao genetičkog markera, McMahon i sur. (2002) su pokazali da se *Accumulibacter* sastoji od dvije glavne skupine, *Accumulibacter phosphatis* skupina I (PAOI) i *Accumulibacter phosphatis* skupina II (PAOII), a obe skupine se sastoje od nekoliko različitih podskupina. Skupina IA može spojiti redukciju nitrata odnosno nitrita s unosom fosfora, dok skupina IIA ne može provoditi unos fosfata s nitratom kao akceptorom elektrona, nego samo s nitritom (Carvalho i sur., 2007; Oehmen i sur., 2010; He i sur., 2007; Flowers i sur., 2009). Martín i sur. (2006) su proveli metagenomnu studiju s EBPR muljem iz dva različita sustava laboratorijskog mjerila obogaćenih s *Accumulibacter* skupinom IIA i pokazali da ta skupina nema gen odgovoran za kodiranje respiratorne nitrat reduktaze, i stoga, te bakterije ne bi trebale biti sposobne reducirati nitrat u nitrit. Ipak, budući da su geni koji kodiraju put denitrifikacije nitrita bili prisutni, sugerirali su da *Accumulibacter* skupina IIA može denitrificirati od nitrita nadalje. Miyauchi i sur. (2007) su sugerirali da *Accumulibacter* može koristiti nitrit kao akceptor elektrona, skupa s kisikom, kada su proučavali raznolikost gena nitrit reduktaza u *Accumulibacter*.

Rubio-Rincón i sur. (2017) su bacili novo svjetlo na sposobnost PAOI. Napravili su iste pokuse s dvije različite kulture, visoko obogaćenu PAOI i PAOI-GAO kulture. Visoko obogaćena PAOI kultura je zabilježila neznačajan anoksični unos fosfata i redukciju nitrata, a PAOI-GAO kultura je zabilježila visoku anoksičnu aktivnost unosa fosfata. Obje kulture su pokazale dobru anoksičnu aktivnost unosa fosfata s nitritom. Ovi autori sugeriraju da druge mikrobne skupine, poput GAO, provode redukciju nitrata do nitrita u njihovom EBPR sustavu, a da PAOI koriste nastali nitrit za anoksični unos fosfata. Kontradiktorne rezultate su postigli Camejo i sur. (2016) koji su pronašli da PAOI imaju potrebne enzime za denitrifikaciju od nitrata nadalje.

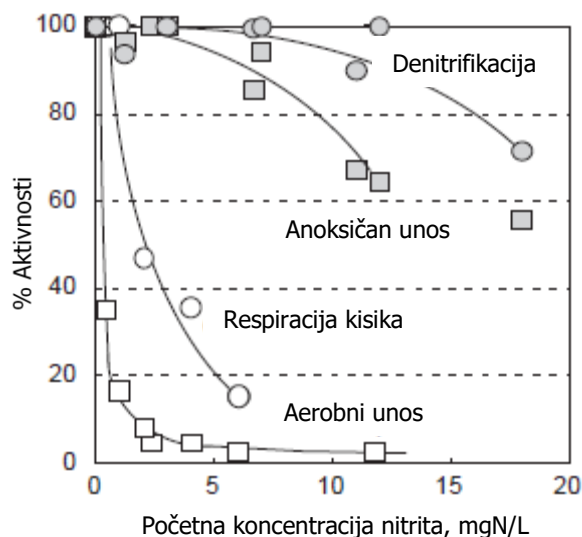
Isto kao što u anaerobno-aerobnom režimu rada uz PAO postoje GAO, tako i u anaerobno-anoksičnom režimu uz DPAO postoje i DGAO (Denitrificirajući Glikogen Akumulirajući Organizmi) (Rubio-Rincón i sur., 2017).

## **2.3.2. Denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita**

### **2.3.2.1. Učinak koncentracije nitrita na denitrificirajuću defosfataciju**

Ahn i sur. (2001) su pokazali da aktivni mulj obogaćen nitrat-DPAO populacijom može koristiti nitrit kao akceptor elektrona pri mnogo višim vrijednostima nego što je objavljen prag toksičnosti za aeroban unos fosfora. Kuba i sur. (1993) su zabilježili da 5–10 mg NO<sub>2</sub>-N/L inhibira unos fosfata u anaerobno-anoksičnom režimu.

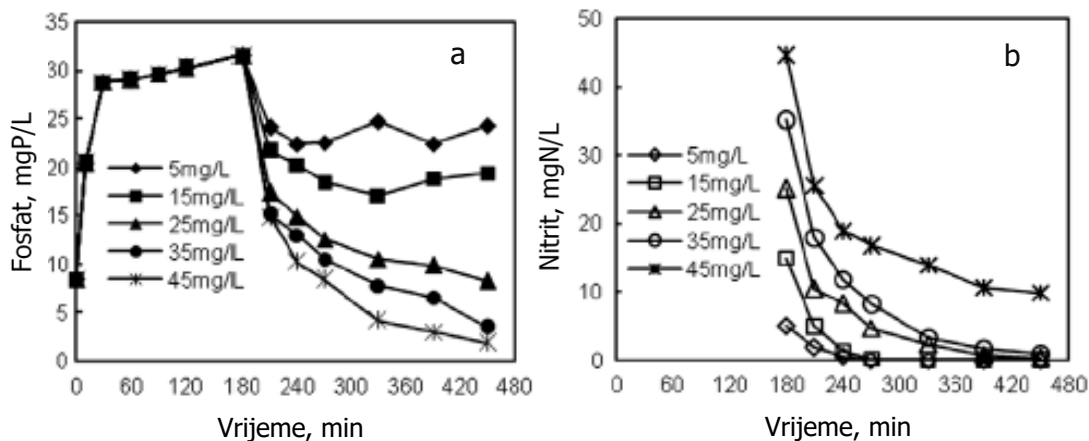
Wang i sur. (2007) su proveli pokuse denitrificirajuće defosfatacije s acetatom kao izvorom ugljika u SBR reaktoru (engl. Sequencing Batch Reactor, hrv. Šaržni reaktor koji radi po fazama) pri početnim koncentracijama nitrita 5,5 mg/L, 9,5 mg/L i 15 mg/L, i s početnih 10 mg PO<sub>4</sub>-P/L. Pokuse su proveli pri omjerima P/N (mmol/mmol) 0,9, 0,48 i 0,31 i pri tome ostvarili brzine unosa fosfora 2,26 mgP/gMLSSh (MLSS, engl. Mixed Liquor Suspended Solids, hrv. Suspendirane čestice u miješanoj tekućini, koristi se kao mjera koncentracije mikroorganizama aktivnog mulja), 0,86 mgP/gMLSSh i 0 mgP/gMLSSh, te brzine denitrifikacije 3,86 mgN/gMLSSh, 2,56 mgN/gMLSSh i 2,23 mgN/gMLSSh. Njihovi rezultati pokazuju da su i brzina unosa fosfora i brzina redukcije nitrita u pokusu s početnih 9,5 mg NO<sub>2</sub>-N/L bile sporije nego u pokusu vođenom pri 5,5 mg NO<sub>2</sub>-N/L. U pokusu vođenom pri 15 mg NO<sub>2</sub>-N/L, anoksičan unos fosfora nije zabilježen, a redukcija nitrita se dovijala sporo. Denitrificirajuća defosfatacija se uspješno odvijala pri koncentracijama nitrita 5,5 i 9,5 mg/L, a 15 mg/L nitrita je imalo inhibicijski učinak. Njihovi pokusi su pokazali da nitrit ne djeluje kao inhibitor na unos fosfora sve dok ne dođe do praga inhibicije. Saito i sur. (2004) smatraju da nitrit nema negativan učinak na enzimski sustav povezan s denitrifikacijom nego na enzimski sustav povezan s unosom fosfata i potencijalnom sintezom polifosfata (Slika 4). Slika 4 prikazuje osjetljivost unosa fosfata i respiraciju (izraženu kao % aktivnosti) prema početnoj koncentraciji nitrita. Nitrit do 4 mgN/L nema utjecaja na anoksični unos fosfata, dok je postotak aktivnosti aerobnog unosa fosfata pri 1 mgNO<sub>2</sub>-N/L na 20%. Nitrit snažno inhibira aerobnu aktivnost PAO čak pri niskoj koncentraciji. Inhibicijski učinak nitrita je izraženiji u aerobnim nego u anoksičnim uvjetima. Pri 12 mg NO<sub>2</sub>-N/L aerobni unos fosfata je skoro potpuno izgubljen, dok je anoksični unos fosfata na 65%. Sličan učinak je vidljiv i na respiracijskoj aktivnosti. Oko 2 i 5 mg NO<sub>2</sub>-N/L rezultira s 50 i 20% respiracijske aktivnosti, dok je nitratna respiracija pri tim uvjetima normalno održavana. Razlog bi mogao biti da je nitrit metaboliziran u anoksičnim uvjetima. Wang i sur. (2007) smatraju da prag koncentracije nitrita koji uzrokuje inhibiciju ovisi o tome koliko je mulj aklimatiziran na nitrit.



Slika 4. Učinak nitrita na aktivnost PAO (Saito i sur., 2004)

Zhang i sur. (2010) su proučavali učinak koncentracije nitrita 5 mg N/L, 15 mg N/L, 25 mg N/L, 35 mg N/L i 45 mg N/L na denitrificirajuću defosfataciju s acetatom kao izvorom ugljika. Pokusi su započeli s 8,5 mg P/L i 350 mg KPK/L. Profil anaerobnog otpuštanja P je bio isti u svim pokusima, i svi su do kraja anaerobne faze dosegli oko 31,5 mgP/L, a anoksičan unos fosfora je rastao s porastom početne koncentracije nitrita (Slika 5). Pri koncentracijama nitrita 5 i 15 mg N/L zabilježen je niski unos P, a sav dodan nitrit je denitrificiran, pa se nakon utroška nitrita javilo sekundarno otpuštanje fosfora. Pri početnoj koncentraciji nitrita 25 mg/L i višoj nije zabilježeno sekundarno otpuštanje fosfora. Pri početnoj koncentraciji nitrita 45 mg/L zabilježen je unos fosfata 12,9 mgP/gMLSS. Ahn i sur. (2001) su uspjeli održavati anoksičan unos fosfata pri koncentracijama nitrita 20-40 mg N/L. Zhang i sur. (2010) nisu zabilježili inhibitorni učinak nitrita na denitrificirajuću defosfataciju čak ni pri 45 mg N/L, koji su zabilježili koncentraciju slobodne nitritne kiseline 0,007 mg HNO<sub>2</sub>-N/L. Inhibitorni učinak na anoksičan unos fosfata se zapravo ne pripisuje nitritima nego slobodnoj nitritnoj kiseline, koja pri koncentraciji 0,02 mg HNO<sub>2</sub>-N/L ili višoj u potpunosti zaustavlja unos fosfata (Zhou i sur., 2007). Zhang i sur. (2010) smatraju da je mulj korišten u njihovom istraživanju mogao tolerirati tako visoku koncentraciju slobodne nitritne kiseline jer je dugotrajno kultiviran s nitritom kao jedinim elektron akceptorom. Pri koncentracijama nitrita 5 mg N/L, 15 mg N/L, 25 mg N/L, 35 mg N/L i 45 mg N/L zabilježili su brzine unosa fosfata 6,43 mgP/gMLSSh, 8,61 mgP/gMLSSh, 12,26 mgP/gMLSSh, 14,26 mgP/gMLSSh i 14,43 mgP/gMLSSh, a izračunati omjeri P/N su iznosili 1,8 mgP/mgN, 0,97 mgP/mgN, 0,94

mgP/mgN, 0,82 mgP/mgN, i 0,85 mgP/mgN. Od ispitivanih koncentracija nitrita za početnih 8,5 mg P/L i KPK 350 mg/L istaknuli su 35 mg N/L kao povoljnu koncentraciju za uspješno provođenje denitrificirajuće defosfatacije.



Slika 5. Anoksičan unos fosfata (a) i potrošnja nitrita (b) pri koncentracijama nitrita 5 mg N/L, 15 mg N/L, 25 mg N/L, 35 mg N/L, i 45 mg N/L (Zhang i sur., 2010)

Zhou i sur. (2010b) su ispitali učinak niske (4 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , 6 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , 8 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i 16 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ ) i visoke (20 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , 40 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i 80 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ ) koncentracije nitrita na denitrificirajuću defosfataciju, s acetatom kao izvorom ugljika. U pokusima pri 4 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , 6 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , 8 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i 16 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  ostvareni su početni omjeri N/P 0,09, 0,13, 0,18 i 0,36, a u pokusima pri 20 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , 40 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i 80 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  ostvareni su početni N/P omjeri 0,6, 1,2 i 2,4. Maksimalna brzina unosa P je rasla s porastom početne koncentracije nitrita, od početnih 4 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  (4,57 mg P/g MLSSh) do maksimalne brzine pri 20 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  (8,76 mg P/g MLSSh), a s daljnjim porastom koncentracije nitrita je opadala, i najniža maksimalna brzina unosa P je zabilježena pri najvišoj početnoj koncentraciji nitrita, 80 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  (3,65 mg P/g MLSSh). Maksimalna brzina denitrifikacije nitrita je imala isti trend, s porastom početne koncentracije nitrita je rasla, od početnih 4 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  (2,24 mg N/g MLSSh) do najviše maksimalne brzine denitrifikacije nitrita pri početnoj koncentraciji nitrita 20 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  (10,57 mg N/g MLSSh), a zatim je s daljnjim porastom koncentracije nitrita opadala, i pri najvišoj početnoj koncentraciji nitrita, 80 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  je iznosila 4,39 mg N/g MLSSh. Sav nitrit je denitrificiran pri početnoj koncentraciji nitrita 4-20 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , međutim pri 40 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i 80 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  preostalo je na kraju pokusa oko 18 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i oko 60 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ . U pokusima pri 4

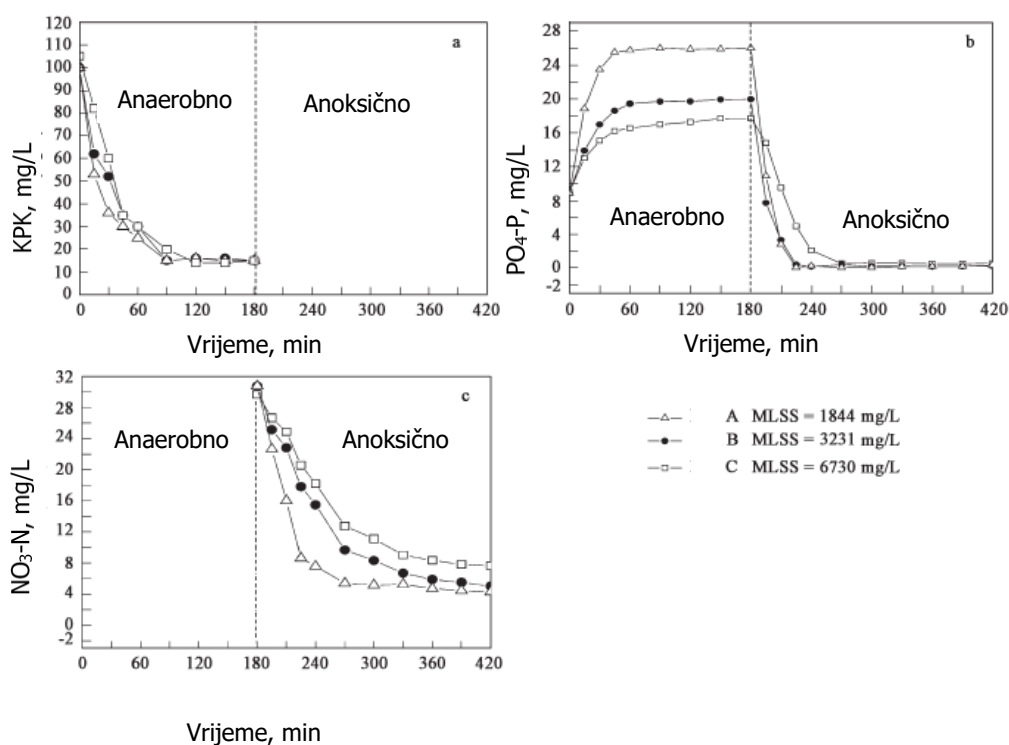
mg NO<sub>2</sub>-N/L, 6 mg NO<sub>2</sub>-N/L, 8 mg NO<sub>2</sub>-N/L i 16 mg NO<sub>2</sub>-N/L na kraju pokusa preostalo je oko 41 mg PO<sub>4</sub>-P/L, 38 mg PO<sub>4</sub>-P/L, 35 mg PO<sub>4</sub>-P/L i 15 mg PO<sub>4</sub>-P/L. U pokusima pri 20 mg NO<sub>2</sub>-N/L, 40 mg NO<sub>2</sub>-N/L i 80 mg NO<sub>2</sub>-N/L na kraju pokusa je preostalo oko 7,5 mg PO<sub>4</sub>-P/L, 18 mg PO<sub>4</sub>-P/L i 20 mg PO<sub>4</sub>-P/L. U svojim pokusima zabilježili su relativno malu količinu anoksičnog unosa fosfora s nitritom kao akceptorom elektrona u odnosu na nitrat. Istaknuli su optimalan omjer elektron akceptora za unos fosfora N/P 0,60 pri početnih 20 mg NO<sub>2</sub>-N/L. Ukoliko je početna koncentracija elektron akceptora ispod optimalnog omjera, količina unesenog fosfora će porasti s koncentracijom, u suprotnom će se smanjiti. DPAO u ovom istraživanju su izgubili sposobnost brzog otpuštanja i unosa fosfora u kontinuiranim anaerobno-anoksičnim uvjetima.

### **2.3.2.2. Učinak koncentracije mikrobne biomase na denitrificirajuću defosfataciju**

Wang i sur. (2007) su ispitali učinak koncentracije mikrobne biomase, izražene kao MLSS na denitrificirajuću defosfataciju: pokusi su vođeni pri početnim koncentracijama MLSS 1844 mg/L, 3231 mg/L i 6730 mg/L (Slika 6), te pri 33 mg NO<sub>3</sub>-N/L i s acetatom kao izvorom ugljika. Povećanje koncentracije MLSS sa 1844 mg/L na 6730 mg/L je imalo učinak na proces denitrificirajuće defosfatacije tako što je porasla brzina denitrifikacije i anoksičnog unosa fosfata, a smanjila se količina unesenog P po reduciranom N sa 2,1 mg PO<sub>4</sub>-P/mg NO<sub>3</sub>-N na 1,57 mg PO<sub>4</sub>-P/mg NO<sub>3</sub>-N. Sposobnost otpuštanja fosfora i unosa acetata u anaerobnim uvjetima je porasla s porastom koncentracije MLSS. Razlog bi mogao biti porast potrebne energije za održavanje stanica. Od ispitanih koncentracija aktivnog mulja, prva koncentracija mulja pri kojoj je postignuta stabilna koncentracija fosfora, zabilježen je plato, je 6730 mg MLSS/L. Povećanjem MLSS sa 1844 mg/L na 3231 mg/L je povećana učinkovitost uklanjanja fosfora. Povećanje MLSS do 6730 mg/L je rezultiralo malim promjenama u specifičnoj brzini denitrifikacije i specifičnoj brzini unosa fosfora. Brzina denitrifikacije i unosa P su porasle s porastom koncentracije MLSS. Količina fosfata unesena po denitrificiranom dušiku tijekom početnih 30 minuta je smanjena s 2,1 na 1,57 mg PO<sub>4</sub>-P/mg NO<sub>3</sub>-N, s porastom koncentracije MLSS. Veća koncentracija MLSS bi mogla dovesti do niže specifične brzine denitrifikacije i unosa P. Smanjenje brzine pri visokoj koncentraciji MLSS bi moglo biti uzrokovano kompeticijom među različitim trofičnim skupinama koje se nalaze u aktivnom mulju. U tom istraživanju povećanje koncentracije MLSS skraćuje reakcijsko vrijeme



otpuštanja P i anoksičnog unosa P, međutim, prekomjerna koncentracija MLSS smanjuje specifičnu brzinu denitrifikacije. Također sugeriraju da bi se koncentracija MLSS trebala održavati u rasponu 3-4 g/L za proces denitrificirajuće defosfatacije.



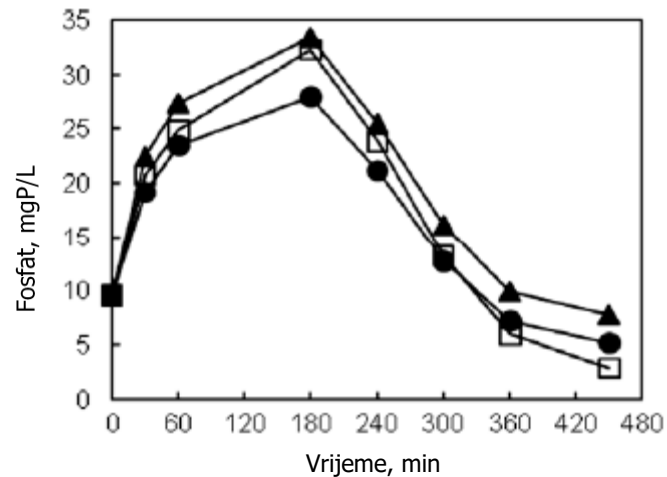
Slika 6. Učinak MLSS na unos i otpuštanje fosfata (Wang i sur., 2007)

### 2.3.2.3. Učinak pH na denitrificirajuću defosfataciju

Wang i sur. (2007) su ispitali učinak pH, i to 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 i 8,5 u anaerobnoj fazi, a u anoksičnoj fazi su ispitali unos fosfora u stanice DPAO pri pH 7,0 te pri početnom pH 7,0 koji se dalje nije kontrolirao nego samo mjerio. Brzina anaerobnog otpuštanja P je porasla s porastom pH vrijednosti. Vrijednost pH iznad 8,0 je uzrokovala kemijsko taloženje P pa je koncentracija otopljenog P pala. Tijekom anoksičnih uvjeta zabilježen je porast pH vrijednosti zbog denitrifikacije i anoksičnog unosa P. Ovi autori sugeriraju da bi se tijekom procesa denitrificirajuće defosfatacije pH trebao održavati ispod 8,0 da se spriječi taloženje P.

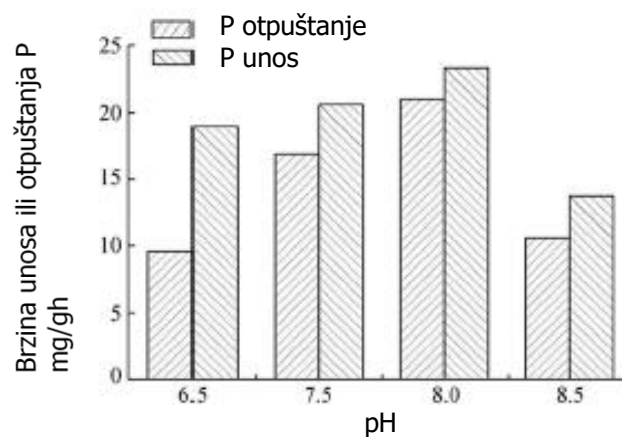
Zhang i sur. (2010) su ispitali učinak pH vrijednosti 6, 7 i 8 na denitrificirajuću defosfataciju (Slika 7). Anaerobno otpuštanje P je raslo s porastom pH vrijednosti, i maksimalno otpuštanje P je zabilježeno pri pH 8,0. U anoksičnim uvjetima maksimalan unos fosfata je zabilježen pri pH 7,0. Smolders i sur. (1994) sugeriraju da je razlog većem otpuštanju P to

što bakterije trebaju više energije pri višem pH za unos organskog aniona. Bond i sur. (1999) ukazuju da je mogući razlog većem otpuštanju P intracelularna kontrola pH, i povećanje vanstaničnog pH dovodi do povećanja intracelularnog pH i dodatnog otpuštanja P.



Slika 7. Varijacija fosfata pri pH 6,0 (●), 7,0 (□) i 8,0 (▲) (Zhang i sur., 2010)

Li i sur. (2018) su istraživali brzinu otpuštanja fosfora i unosa fosfora u mikrobne stanice pri vrijednostima pH 6,5, 7,5, 8,0 i 8,5. Pokusi su provedeni s 3,3 g MLSS/L, natrijevim acetatom kao izvorom ugljika i oko 10 mg PO<sub>4</sub>-P/L. U anoksičnu fazu je dodano 20 mg NO<sub>2</sub>-N/L. Na slici 8 su prikazane brzine anaerobnog otpuštanja fosfora i anoksičnog unosa fosfora pri pH vrijednostima 6,5, 7,5, 8,0 i 8,5.



Slika 8. Učinak pH na brzinu otpuštanja i unosa P (Li i sur., 2018)

S porastom pH vrijednosti od 6,5 do 8,0, brzine anaerobnog otpuštanja fosfora i anoksičnog unosa fosfora su također rasle (Slika 8). Brzina anaerobnog otpuštanja fosfora je rasla s 9,62 mg/gh na 20,95 mg/gh pri porastu pH vrijednosti s 6,5 na 8,0. Pri pH vrijednosti 8,5 dolazi do taloženja fosfora te je pala brzina otpuštanja fosfora, na 10,59 mg/gh. Pri vrijednostima pH 6,5, 7,5, 8,0 i 8,5 brzina anoksičnog unosa fosfora je iznosila 18,92 mg/gh, 20,55 mg/gh, 23,29 mg/gh i 13,73 mg/gh (Li i sur., 2018).

#### **2.3.2.4. Učinak izvora ugljika na denitrificirajuću defosfataciju**

U istraživanju denitrificirajuće defosfatacije uglavnom se u pokusima koriste kao izvor ugljika acetat i propionat jer su to dvije najzastupljenije hlapljive masne kiseline prisutne u otpadnim vodama grada (Vargas i sur., 2011). Jiang i sur. (2007) su vodili DPAO sustav s nitritom kao akceptorom elektrona i acetatom kao donatorom elektrona tijekom 35 dana. Zhang i sur. (2010) su uspješno vodili nitrit-DPAO SBR sustav u anaerobno-anoksičnom režimu s acetatom kao izvorom ugljika i nitritom kao akceptorom elektrona više od 6 mjeseci.

Vargas i sur. (2011) su istraživali učinak acetata i propionata kao izvora ugljika na aktivnost denitrificirajućeg uklanjanja P s nitritom kao akceptorom elektrona. Dodavali su nitrit u pulsevima, 4 pulsa kojima su dodali sveukupno 70 mg NO<sub>2</sub>-N/L, tijekom anoksične faze da izbjegnu inhibiciju nitritom. Vodili su anaerobno-anoksični SBR s propionatom kao izvorom ugljika i nitritom kao akceptorom elektrona tijekom 29 dana, i zatim se se prebacili na acetat kao izvor ugljika tijekom 37 dana, što je rezultiralo progresivnim smanjenjem defosfatacijskog kapaciteta. S oba izvora ugljika vrijednosti za omjere P otpušten/C unesen, 0,55±0,07 P-mol/C-mol za acetat i 0,38±0,08 P-mol/C-mol za propionat dobivene su slične teoretskim vrijednostima 0,50 P-mol/C-mol za acetat (Smolders i sur., 1994; Oehmen i sur., 2010) i 0,42 P-mol/C-mol za propionat (Oehmen i sur., 2005b). PHA u pokusima s acetatom je rezultirao visokim udjelom PHB (polihidroksi butirat), a u pokusima s propionatom PHA je bio u obliku PHV (polihidroksi valerat) i PH2MV (poli-β-hidroksi-2-metilbutirat). Omjer NUR/PUR (engl. Nitrite Uptake Rate, hrv. Brzina unosa nitrita i PUR, engl. Phosphate Uptake Rate, hrv. Brzina unosa fosfata) je bila 1,5 puta veća s propionatom nego s acetatom kao izvorom ugljika. Vargas i sur. (2011) tu razliku pripisuju različitom sastavu PHA. Omjer NUR/PUR govori koliko je NO<sub>2</sub>-N potrebno za unos mola P. Budući da je u anoksičnim uvjetima bila veća brzina unosa P s acetatom nego s propionatom, ukupan gubitak P-

uklanjanja s acetatom je bio djelomično zbog toga što je više P otpušteno u anaerobnim uvjetima, pa je i bio veći P/C omjer, i zato nije bilo dovoljno vremena za potpuni P unos u anoksičnim uvjetima.

Razlika u izvoru ugljika je vidljiva i u unutarstaničnim rezervama glikogena, s acetatom kao izvorom ugljika količina glikogena je bilo znatno smanjena u odnosu na razine glikogena postignute s propionatom kao izvorom ugljika. Carvalho i sur. (2007) su pripisali limitaciju glikogena niskoj anoksičnoj brzini proizvodnje glikogena s acetatom kao izvorom ugljika i sugerirali dodatak aerobne faze da se održi potrebna razina glikogena. Korištenje acetata zahtijeva više razgradnje glikogena nego propionat prema metaboličkom modelu (0,5 prema 0,23 C-mol/C-mol (Oehmen i sur., 2010)), što je u suglasju s Vargas i sur. (2011) koji su postigli nižu anoksičnu brzinu proizvodnje glikogena s acetatom nego s propionatom. Zhou i sur. (2009) su pokazali da *Accumulibacter* može koristiti i acetat i glikogen za dobivanje reducirajuće snage u anaerobnim uvjetima. Anaerobna proizvodnja reducirajuće snage s acetatom preko TCA (TCA, engl. Tricarboxylic Acid Cycle, hrv. Ciklus trikarboksilne kiseline) ciklusa ovisi o dostupnosti glikogena. Zhou i sur. (2009) su sugerirali da *Candidatus Accumulibacter phosphatis* koriste acetat za anaerobnu proizvodnju reducirajuće snage, i da se anaerobna proizvodnja reducirajuće snage vjerojatno provodi preko ciklusa trikarboksilne kiseline, i da upotreba TCA ciklusa za proizvodnju reducirajuće snage ovisi o dostupnosti razgradivog glikogena. Vargas i sur. (2011) sugeriraju da je smanjenje razine glikogena s acetatom kao izvorom ugljika rezultat ispiranja DF1MIX (FISH probe za određivanje *Defluviicoccus vanus* klastera, vrsta GAO) GAO iz sustava. S propionatom kao izvorom ugljika je zabilježeno povećanje PAOMIX (FISH probe za određivanje *Accumulibacter*) - vežućih stanica i smanjenje udjela DF1MX. S acetatom kao izvorom ugljika udio PAOMIX je smanjen, a DF1MIX-vežuće stanice su se isprale iz sustava. Izmjereno smanjenje DF1MIX GAO prilikom promjene izvora ugljika može objasniti smanjenje razine glikogena u anaerobno-anoksičnom režimu s acetatom kao izvorom ugljika.

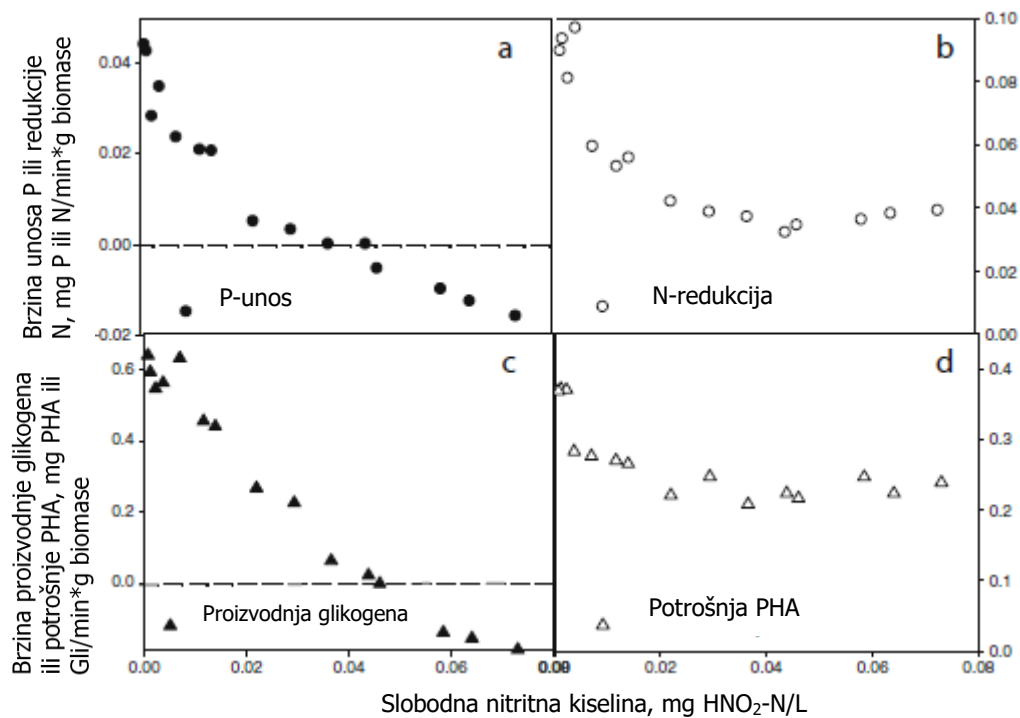
Zhang i sur. (2010) su ispitali acetat, glukozu i butansku kiselinu kao izvore ugljika u procesu denitrificirajuće defosfatacije s nitritom kao akceptorom elektrona. Zabilježeno je anaerobno otpuštanje fosfata slijedećim trendom: acetat>butanska kiselina>glukoza, a taj isti trend je zabilježen i kod anaerobnog unosa KPK. Unatoč razlici u količini unesenog organskog ugljika u stanice, u narednoj anoksičnoj fazi zabilježen je unos fosfata. Carvalho i sur. (2007) ističu da različiti izvori ugljika rezultiraju obogaćenjem različitih PAO koji imaju različite sposobnosti. Anaerobno otpuštanje fosfora je bilo najniže s glukozom kao izvorom ugljika jer je mulj bio aklimatiziran na acetat, a anaeroban put razgradnje glukoze je drugačiji od

acetata. Otpuštanje P s butanskom kiselinom, kao i unos butanske kiseline je bio viši nego kod glukoze jer je anaerobna razgradnja butanske kiseline slična acetatu.

### **2.3.2.5. Inhibicijski učinak nitrita/slobodne nitritne kiseline**

Akumulacija nitrita ili nitritne kiseline djeluje inhibirajuće na rast i/ili proizvodnju energije kod različitih mikroorganizama u sustavu biološke obrade otpadne vode, uključujući amonijak i nitrit oksidirajuće bakterije (Anthonisen i sur., 1976; Hellinga i sur., 1999; Vadivelu i sur., 2006), denitrifikante (Sijbesma i sur., 1996), Candidatus *Accumulibacter* phosphatis (Zhou i sur. 2007), i *Acinetobacter* sp. (Weon i sur., 2002). Vrijednost pH i koncentracija slobodne nitritne kiseline su obrnuto proporcionalni, pa što je niži pH u bioreaktoru, to je viša koncentracija slobodne nitritne kiseline. Slobodna nitritna kiselina je vrlo reaktivna molekula sposobna za interakciju sa širokim rasponom supstrata i za induciranje mutagenih učinaka (Burge i Pfefferkorn, 1964).

Zhou i sur. (2010c) su proveli pokuse sa 150 mg KPK/L s acetatom kao izvorom ugljika, 20 mg P/L i 5 mg NH<sub>4</sub>-N/L, a istraživane koncentracije nitrita su bile u rasponu 20-100 mgN/L. Vrijednost pH u anaerobnoj fazi se održavala na 7,5, a u anoksičnoj fazi su se pokusi provodili pri vrijednostima pH 6, 6,5, 6,8, 7, 7,5 i 8. Ističu da slobodna nitritna kiselina ima mnogo snažniji inhibicijski učinak na unos fosfora i proizvodnju glikogena nego na razgradnju PHA i redukciju nitrita (Slika 9). Pri koncentraciji slobodne nitritne kiseline iznad 0,044 mg HNO<sub>2</sub>-N/L, anaerobni metabolizam DPAO je bio aktivan unatoč prisutnosti nitrita, a dokaz tome je bilo otpuštanje fosfora i potrošnja glikogena. Metabolizam DPAO se nije potpuno obnovio od inhibicije slobodnom nitritnom kiselinom u narednim uvjetima bez slobodne nitritne kiseline. Brzina obnove je ovisila o primijenjenoj koncentraciji slobodne nitritne kiseline u prethodnom anoksičnom periodu. Ti autori sugeriraju da su inhibitorni učinci različiti i mogu se pripisati različitim mehanizmima koji rade istovremeno. Nitrit, odnosno slobodna nitritna kiselina su i supstrat, ali i inhibitor u anoksičnom metabolizmu DPAO.



Slika 9. Inhibitorni učinak slobodne nitritne kiseline na aktivnost DPAO: a) unos P; b) redukciju N; c) proizvodnju glikogena; i d) potrošnju PHA (Zhou i sur., 2010c)

### 3. ZAKLJUČCI

- Nitrit može služiti kao akceptor elektrona u procesu denitrificirajuće defosfatacije
- Biološko uklanjanje fosfora u anaerobno-anoksičnom režimu rezultira manjom potrebom na organskim sastojcima, uštedi na aeraciji i manjom količinom viška aktivnog mulja, u usporedbi s provođenjem procesa u anaerobno-aerobnim uvjetima
- Nitrit kao akceptor elektrona u procesu denitrificirajuće defosfatacije rezultira kraćim trajanjem procesa te dodatnim uštedama na količini organskih sastojaka u odnosu na nitrat kao akceptor elektrona
- Inhibicijski učinak nitrita na mikroorganizme aktivnog mulja u procesu denitrificirajuće defosfatacije ovisi o koncentraciji nitrita, načinu dodavanja nitrit u reaktor (u više pulseva ili odjednom), te o razini adaptacije mikroorganizama na nitrit
- Primjena denitrificirajuće defosfatacije je u otpadnim vodama koje karakterizira nizak omjer C/N

#### 4. POPIS LITERATURE

- Ahlgren J., Reitzel K., Danielsson R., Gogoll A., Rydin E. (2006) Biogenic phosphorus in oligotrophic mountain lake sediments: Difference in composition measured with NMR spectroscopy. *Water Research* **40**: 3705-3712.
- Ahn J., Daidou T., Tsuneda S., Hirata A. (2001) Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **92**: 442-446.
- Anthonisen A. C., Loehr R. C., Prakasam T. B. S., Shinath E. G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **48**: 835-852.
- Bond P. L., Keller J., Blackall L. L. (1999) Anaerobic phosphate release from activated sludge with enhanced biological phosphorus removal. A possible mechanism of intracellular pH control. *Biotechnology and Bioengineering* **63**: 507-515.
- Burge B. W., Pfefferkorn E. R. (1964) Conditional lethal mutants of an RNA animal virus. *Virology* **24**: 126-128.
- Camejo P. Y., Owen B. R., Martirano J., Ma J., Kapoor V., Santo Domingo J., McMahon K. D., Noguera D. R. (2016) *Candidatus* Accumulibacter phosphatis clades enriched under cyclic anaerobic and microaerobic conditions simultaneously use different electron acceptors. *Water Research* **102**: 125-137.
- Carvalho G., Lemos P. C., Oehmen A., Reis M. A. M. (2007) Denitrifying phosphorus removal: Linking the process performance with the microbial community structure. *Water Research* **41**: 4383-4396.
- Cisse L., Mrabet T. (2004) World phosphate production: overview and prospects. *Phosphorus Research Bulletin* **15**: 21-25.
- Cole J. R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell D. M., Bandela A. M., Cardenas E., Garrity G. M., Tiedje J. M. (2007) The ribosomal database project (RDP-II): Introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* **35**: 169-172.



Copp J. B., Dold P. L. (1998) Comparing sludge production under aerobic and anoxic conditions. *Water Science and Technology* **38**: 285-294.

Cordell D., Drangert J.-O., White S. (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change* **19**: 293-305.

Crocetti G. R., Hugenholtz P., Bond L. P., Schuler A., Keller J., Jenkins D., Blackall L. L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantification. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1175-1182.

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.

Flowers J. J., He S., Yilmaz S., Noguera D. R., McMahon K. D. (2009) Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different 'Candidatus accumulibacter' clades. *Environmental Microbiology Reports* **1**: 583-588.

Fuhs G. W., Chen M. (1975) Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbial Ecology* **2**: 119-138.

Goel R. K., Motlagh A. M. (2014) Biological phosphorus removal. *Comprehensive Water Quality and Purification. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. **3**: 150-162.

Grady C. P. L., Daigger G. T., Lim H. C. (1999) *Biological wastewater treatment* (2nd edn.). New York: Marcel Dekker, Inc.

He S., Gall D. L., McMahon K. D. (2007) "Candidatus accumulibacter" population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5865-5874.

Hellinga C., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (1999) Model based design of a novel process for nitrogen removal from concentrated flows. *Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems* **5**: 351-371.

Hesselmann R. P. X., Werlen C., Hahn D., van der Meer J. R., Zehnder A. J. B. (1999) Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced

biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* **22**: 454-465.

Hu J. Y., Ong S. L., Ng W. J., Lu F., Fan X. J. (2003) A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Research* **37**: 3463-3471.

Jiang Y., Wang B., Wang L., Chen J., He S. (2007) Dynamic response of denitrifying poly-P accumulating organisms batch culture to increased nitrite concentration as electron acceptor. *Journal of Environmental Science and Health* **41**: 2557-2570.

Kern-Jespersen J. P., Henze M., Strube R. (1994) Biological phosphorus release and uptake under alternating anaerobic and anoxic conditions in a fixed-film reactor. *Water Research* **28**: 1253-1255.

Kuba T., Murnleitner E., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen J. J. (1996) A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnology and Bioengineering* **52**: 685-695.

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 Science and Technology* **27**: 241-252.

Lemos P. C., Serafim L. S., Santos M. M., Reis M. A. M., Santos H. (2003) Metabolic pathway for propionate utilization by phosphorus-accumulating organisms in activated sludge: <sup>13</sup>C labelling and in vivo nuclear magnetic resonance. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 241-251.

Li W., Zhang H.-Y., Sun H.-Z., Zeng F., Gao Y.-N., Zhu L. (2018) Influence of pH on short-cut denitrifying phosphorus removal. *Water Science and Engineering* **11**: 17-22.

Martín H. G., Ivanova N., Kunin V., Warnecke F., Barry K. W., McArdy A. C., Yeats C., He S., Salamov A. A. Dzeto E., Dalin E., Putnam N. H., Shapiro H. J., Pangilinan J. L., Rigoutsos I., Kyrpides N. C., Blackall L. L., McMahon K. D., Hougenvoltz P. (2006) Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) communities. *Nature Biotechnology* **24**: 1263-1269.

McMahon K. D., Dojka M. A., Pace N. R., Jenkis D., Kesling J. D. (2002) Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 4971-4978.

Metcalf & Eddy (2003) Wastewater engineering, treatment, disposal and reuse. New York: McGraw-Hill.

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

Miyauchi R., Oki K., Aoi Y., Tsuneda S. (2007) Diversity of nitrite reductase genes in "Candidatus Accumulibacter phosphatis" – dominated cultures enriched by flow-citometric sorting. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5331-5337.

Moore G. T. (2009) Nutrient control design manual. State of Technology Review Report. Watertown, MA: United States Environmental Protection Agency, The Cadmus Group, Inc.

Oehmen A., Lopez-Vazquez 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 processes. *Water Research* **44**: 4473-4486.

Oehmen A., Vives M. T., Lu H., Yuan Z., Keller J. (2005a). The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms. *Water Research* **39**: 3727-3737.

Oehmen A., Zeng R. J., Yuan Z., Keller J. (2005b) Anaerobic metabolism of propionate by polyphosphate-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems. *Biotechnology and Bioengineering* **91**: 43-53.

Randall C. W., Barnard J. L., Stensel H. D. (1998) Design of activated sludge biological nutrient removal plants. Design and retrofit of wastewater treatment plants for biological nutrient removal, 17-18. CRC Press. Water Quality Management Library.

Rubio-Rincón F. J., Lopez-Vazquez C. M., Welles L., van Loosdrecht M. C. M., Brdjanovic D. (2017) Cooperation between *Candidatus* Competibacter and *Candidatus* Accumulibacter clade I, in denitrification and phosphate removal processes. *Water Research* **120**: 156-164.

- Saito T., Brdjanovic D., van Loosdrecht M. C. M. (2004) Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Research* **38**: 3760-3768.
- Seviour R. J., Mino T., Onuki M. (2003) The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Reviews* **27**: 99-127.
- Sijbesma W. F. H., Almeida J. S. , Reis M. A. M., Santos H. (1996) Uncoupling effect of nitrite during denitrification by *Pseudomonas fluorescens*: An in vivo <sup>31</sup>P-NMR study. *Biotechnology and Bioengineering* **52**:176-182.
- 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. *Biotechnology and Bioengineering* **43**: 461-470.
- 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.
- Turk O., Mavinic D. S. (1986) Preliminary assessment of a shortcut in nitrogen removal from wastewater. *Canadian Journal of Civil Engineering* **13**: 600-605.
- Vadivelu V. M., Yuan Z. G., Fux C., Keller J. (2006) The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched Nitrobacter culture. *Environmental Science and Technology* **40**: 4442-4448.
- Vargas M., Guisasola A., Artigues A., Casas C., Baeza J. A. (2011) Comparison of a nitrite-based anaerobic-anoxic EBPR system with propionate or acetate as electron donors. *Process Biochemistry* **46**: 714-720.
- Wang Y-Y., Pan M.-L., Yan M., Peng Y.-Z., Wang S.-Y. (2007) Characteristics of anoxic phosphorus removal in sequencing batch reactor. *Journal of Environmental Sciences* **19**: 776-782.
- Weon S. Y., Lee C. W., Lee S. I., Koopman B. (2002) Nitrite inhibition of aerobic growth of Acinetobacter Sp. *Water Research* **36**: 4471-4476.
- Zhang S. H., Huang Y., Hua Y. M. (2010) Denitrifying dephosphatation over nitrite: Effects of nitrite concentration, organic carbon, and pH. *Bioresource Technology* **101**: 3870-3875.

- Zhou S., Zhang X., Feng L. (2010b) Effect of different types of electron acceptors on the anoxic phosphorus uptake activity of denitrifying phosphorus removing bacteria. *Bioresource Technology* **101**: 1603-1610.
- Zhou Y., Ganda L., Lim M., Yuan Z., Kjelleberg S., Ng W. J. (2010c) Free nitrous acid (FNA) inhibition on denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DPAOs). *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**: 359-369.
- Zhou Y., Pijuan M., Oehmen A., Yuan Z. (2010a) The source of reducing power in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs) – a mini-review. *Water Science and Technology* **61**: 1653-1662.
- Zhou Y., Pijuan M., Yuan Z. (2007) Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering* **98**: 903-912.
- Zhou Y., Pijuan M., Zeng R. J., Yuan Z. (2009) Involvement of the TCA cycle in the anaerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms (PAOs). *Water Research* **43**: 1330-1340.
- Zilles J. L., Peccia J., Kim M. W., Hung C. H., Noguera D. R. (2002a) Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2763-2769.
- Zilles J. L., Peccia J., Noguera D. R. (2002b) Microbiology of enhanced biological phosphorus removal in aerated-anoxic Orbal processes. *Water Environment Research* **74**: 428-436.

## Izjava o izvornosti

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

---

ime i prezime studenta