

# Potencijal različitih izvora ugljika u promociji biološke denitrifikacije

---

**Smetiško, Anamaria**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:159:948448>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-26**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Anamaria Smetiško**  
0058212925

**Potencijal različitih izvora ugljika u promociji biološke  
denitrifikacije**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija u zaštiti okoliša

**Mentor:** prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

**Zagreb, 2021.**

## 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**

### **Potencijal različitih izvora ugljika u promociji biološke denitrifikacije**

Anamaria Smetiško, 0058212925

**Sažetak:** Potencijal otpadnih voda za proces denitrifikacije uglavnom ovisi o raspoloživom biorazgradivom organskom ugljiku, izraženom kao omjer C/N. Za pročišćavanje otpadnih voda u kućanstvima minimalni omjer C/N iznosi 3,5-4,5 g KPK/gN, a vrijednosti C/N od približno 6-11 g KPK/g N mogu omogućiti uklanjanje N (na temelju izračuna). Kako bi se poboljšala učinkovitost uklanjanja N na uređaja za obradu otpadnih voda kućanstva, upotreba vanjskog izvora C za denitrifikaciju često je jedina mogućnost. Korištenjem mješovitog izvora C postiže se bolja učinkovitost uklanjanja N u usporedbi s konvencionalnim postupkom s jednim izvorom C, vjerojatno zbog heterogenosti heterotrofnih denitrificirajućih populacija i njihovih različitih brzina metaboliziranja pojedinog izvora C. Komercijalni izvori C omogućuju potpunu denitrifikaciju kako bi se postigli potrebni standardi otpadnih voda, ali predstavljaju značajan dodatni trošak. Stoga se nusproizvodi i otpadni materijali proizvedeni u velikim količinama i s visokim udjelom biorazgradivog organskog ugljika istražuju kao jeftiniji alternativni izvori C.

**Ključne riječi:** denitrifikacija, izvori ugljika, čimbenici denitrifikacije

**Rad sadrži:** 33 stranice, 10 slika, 1 tablicu, 60 literaturna navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici**

**Prehrambeno biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10000 Zagreb**

**Mentor:** prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

**Datum obrane:** 13. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for biological wastewater treatment**

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

### **POTENTIAL OF DIFFERENT CARBON SOURCE IN DENITRIFICATION PROMOTION**

Anamaria Smetiško, 0058212925

**Abstract:** The denitrification potential of wastewater is mainly governed by the available biodegradable organic carbon, expressed as the C/N ratio. For domestic wastewater treatment, the minimum C/N ratio is 3.5–4.5 g COD/gN and C/N values of approximately 6–11 g COD/gN could allow a proper N removal (based on calculations). To improve the N-removal efficiency in domestic wastewater treatment plants (WWTPs) the use of an external C source for denitrification is often the sole possibility. By using a mixed C source better N-removal efficiencies are obtained, when compared with the conventional procedure with a single C source, probably due to the heterogeneity of heterotrophic denitrifying populations and their different metabolic rates for each C source. Commercial C sources allow complete denitrification to reach the required effluent standards but represent a significant added cost. Therefore, by-products and waste materials produced in large amounts and containing high biodegradable organic carbon content are explored as less costly alternative C sources.

**Keywords:** denitrification, carbon sources, parameters of denitrification process

**Thesis contains:** 33 pages, 10 figures, 1 tables, 60 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD Tibela Landeka Dragičević, Full Professor*

**Thesis delivered:** September 13th 2021.

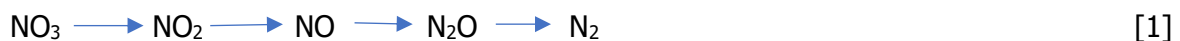
# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Dušikovi spojevi u otpadnoj vodi – podrijetlo i učinak na okoliš.....	2
3. Biološka denitrifikacija.....	2
4. Kinetika denitrifikacije .....	4
5. Mikroorganizmi u procesu denitrifikacije .....	5
6. Čimbenici procesa denitrifikacije .....	7
6.1. Temperatura .....	7
6.2. pH.....	7
6.3. Koncentracija otopljenog kisika .....	8
6.4. Izvor ugljika .....	9
7. Potencijalni izvori ugljika za denitrifikaciju.....	11
8. Autotrofna i heterotrofna denitrifikacija .....	25
9. Zaključak .....	27
10. Literatura .....	28

## 1. Uvod

Onečišćenje vodnih tijela dušikom doprinosi eutrofikaciji, a zbog ubrzanog napretka industrije, poljoprivrede i domaćinstva posljednjih desetljeća raste, i zakonski propisi su iz tog razloga sve stroži (NN 26/2020).

Izvori nitrata u okolišu su otpadne vode industrije, kućanstva, farme životinja i odlagališta otpada. Biološka denitrifikacija je najčešće korištena metoda uklanjanja nitrata iz otpadnih voda, to je postupak redukcije nitrata i/ili nitrita do plinovitog dušika uz donor elektrona – izvor ugljika, u anoksičnim uvjetima. Reakcije redukcije nitrata uključuju mikrobni put redukcije nitrata do nitrita, dušikovog oksida, didušikovog oksida te kao krajnji produkt nastaje bezopasan plinoviti dušik [1] (Naik i Setty, 2011.)



Postupak transformacije je redoks proces te je u prirodi iniciran mikrobno. Tri važne komponente moraju biti prisutne kako bi se omogućio postupak denitrifikacije, a to su: biomasa, donori elektrona i akceptori elektrona odnosno dušikovi oksidi (Johari i Abdul-Talib, 2005).

U većini bioloških denitrifikacijskih sustava otpadne vode onečišćene nitratima sadrže dovoljno izvora ugljika kako bi se osigurao izvor energije za pretvorbu nitrata u plinoviti dušik pomoću denitrificirajućih bakterija. U vodama s niskom koncentracijom organskih spojeva, za provedbu procesa denitrifikacije potrebno je osigurati donore elektrona dodavanjem vanjskog izvora ugljika. Većina postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda koriste metanol kao vanjski izvor ugljika zbog ekonomskih razloga u procesu denitrifikacije. Ostali spojevi koji se mogu koristiti u postupku denitrifikacije uključuju, između ostalog: acetat, etanol, metan, glukoza, pepton, piljevina, glicerol, mliječna kiselina, melasa te još mnogi drugi (Naik i Setty, 2012).

Cilj ovog rada je kroz pregled najnovije literature istaknuti spoznaje o učinku pojedinih izvora ugljika na provedbu i učinkovitost procesa denitrifikacije i istaknuti čimbenike procesa.

## **2. Dušikovi spojevi u otpadnoj vodi – podrijetlo i učinak na okoliš**

Obrada industrijskog otpada s visokim udjelom nitrata smatra se jednim od glavnih problema u tehnologiji pročišćavanja otpadnih voda. Spojevi koji sadrže dušik su zagađivači koji mogu uzrokovati ozbiljne probleme u okolišu. Višak nitrata u površinskim vodama može dovesti do eutrofikacije rijeka, a mogu i neizravno uzrokovati nedostatak kisika i smanjenje biološke raznolikosti. Nitrati prisutni u većim koncentracijama u vodi za piće također predstavljaju potencijalni rizik za zdravlje ljudi i životinja. Svjetska zdravstvena organizacija odredila je maksimalnu koncentraciju nitrata u vodi za piće koja iznosi 10 mg NO<sub>3</sub>-N/L što odgovara oko 50 mg NO<sub>3</sub>/L (Horova i sur., 2020), a za ispuštanje obrađene otpadne vode u površinske vode hrvatsko zakonodavstvo je odredilo granične vrijednosti za ukupni dušik od 15 mg/L, 10 mg NH<sub>4</sub>-N /L, 1 mg NO<sub>2</sub>-N /L i 2 mg NO<sub>3</sub>-N/L (NN 26/2020).

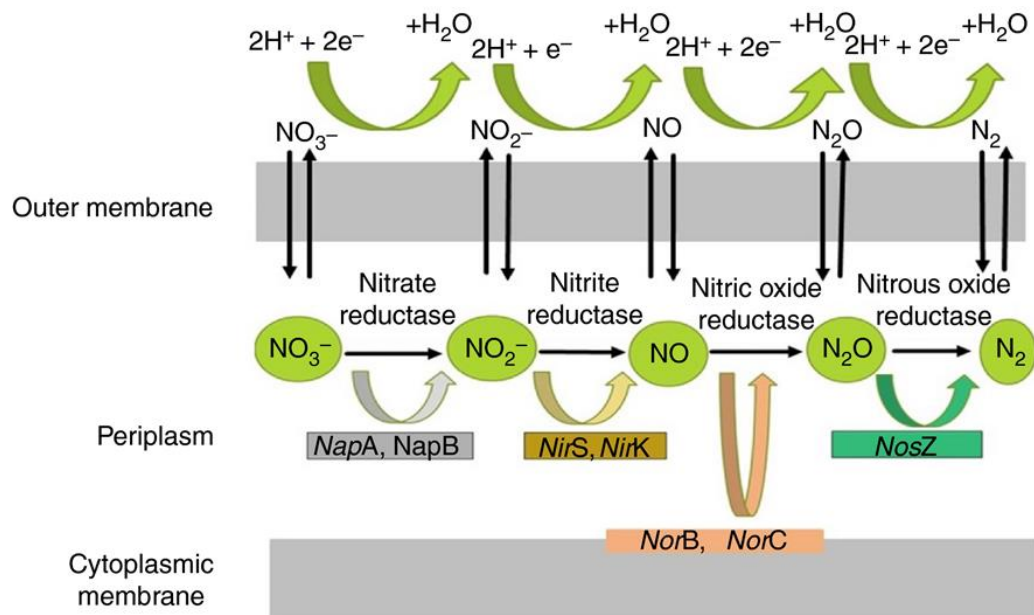
Otpadne vode koje sadrže visoke koncentracije nitrata generiraju se u velikim industrijama, poput: farmaceutske industrije, industrije obrade metala, proizvodnje eksploziva, mliječnih proizvoda. Ekstremne koncentracije nitrata također su zabilježene u otpadnim vodama iz nuklearne industrije, podrijetlom iz dušične kiseline koja se koristi za čišćenje metala, također pri pakiranju mesa, u rafinerijama i proizvodnji sintetičkih vlakana.

Glavni uzrok antropogene emisije N<sub>2</sub>O, koji je međuprodukt procesa denitrifikacije, je poljoprivreda, sagorijevanje fosilnih goriva, upravljanje gnojem te postupci pročišćavanja otpadnih voda. U pročišćavanju otpadnih voda, N<sub>2</sub>O se uglavnom emitira kao rezultat nepotpune heterotrofne denitrifikacije. Didušikov oksid (N<sub>2</sub>O) snažan je staklenički plin s 300 puta većim potencijalom globalnog zagrijavanja od ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>) te se smatra jednim od spojeva koji najviše uništava ozon. Emisija N<sub>2</sub>O konstantno se povećava u posljednja dva desetljeća. Stoga je procjena učinka čimbenika denitrifikacije, poput izvora ugljika, omjera C/N, početna koncentracija nitrata, temperatura i pH, važna za kontrolu emisije N<sub>2</sub>O (Yeong Lee i sur., 2018).

## **3. Biološka denitrifikacija**

Denitrifikacija je anoksičan heterotrofan respiracijski proces u kojem se zbiva redukcija nitrata (NO<sub>3</sub>-N) preko nitrita (NO<sub>2</sub>-N), dušikovog monoksida (NO) i didušikovog oksida (N<sub>2</sub>O) do plinovitog dušika (N<sub>2</sub>), kojeg provode denitrificirajuće bakterije u četiri koraka katalizirano

s četiri reduktaze, uz organski ugljik kao donor elektrona (Slika 1) (Ribera-Guardia i sur., 2014; Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002).



Slika 1. Shematski prikaz respiratornog lanca u procesu denitrifikacije (preuzeto i prilagođeno iz Albina i sur., 2019).

Tri važne komponente moraju biti prisutne kako bi se omogućio postupak denitrifikacije, a to su biomasa, prisutnost donora elektrona i prisutnost odgovarajućeg akceptora elektrona, odnosno dušikovih oksida. Kada u otpadnoj vodi nema raspoložive organske tvari denitrifikacija je ograničena nedostatkom donora elektrona i potrebno ih je dodati u sustav. Odabir prikladnog donora elektrona ovisi o nekoliko čimbenika, poput: dostupnost, kapitalni troškovi i brzina reakcije. Iskustva sa sustavom aktivnog mulja pokazala su da lako biorazgradivi izvori ugljika rezultiraju velikom brzinom reakcije i većim troškovima, dok teško razgradivi endogeni izvori ugljika rezultiraju malom brzinom reakcije (Christensen i Harremoes, 1977).

U procesu denitrifikacije, redukciji nitrata do plinovitog dušika, sudjeluju četiri enzima [2-5], (Ribera-Guardia i sur., 2014, Rajta i sur.,2019.), i to:

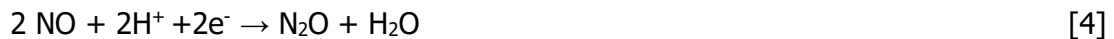
1. nitrat reduktaza (NaR) odgovorna za redukciju nitrata ( $\text{NO}_3^-$ ) do nitrita ( $\text{NO}_2^-$ )  

$$\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \quad [2]$$
2. nitrit reduktaza (NiR) odgovorna za redukciju  $\text{NO}_2^-$  do dušikovog monoksida (NO)  

$$\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{NO} + \text{H}_2\text{O} \quad [3]$$



3. reduktaza dušikovog (II) oksida (NOR) odgovorna za redukciju NO do didušikovog oksida (N<sub>2</sub>O)



4. reduktaza dušikovog (I) oksida (NoS) potrebna za redukciju N<sub>2</sub>O u molekularni dušik (N<sub>2</sub>)



U procesu respiracije nitrata zbiva se prijenos elektrona od donora – organskog spoja, do akceptora elektrona – nitrata i nitrita (Slika 1). Ključni korak u procesu denitrifikacije koji ograničava brzinu denitrifikacije je redukcija nitrita do dušikovog monoksida. Pri tome je aktivan enzim nitrit reduktaza (*Nir*), pa se geni *NirS* i *NirK* koriste za analizu denitrifikanata kada se istražuje raznolikost i struktura mikrobne populacije (Li i sur., 2019). Visoka koncentracija nitrita inhibira *Nir* što ima za posljedicu smanjenje brzine denitrifikacije nitrita, kao i didušik oksid reduktazu (*nos*) što ima za posljedicu povećanje emisije N<sub>2</sub>O (Zhou i sur., 2008; Soto i sur., 2007).

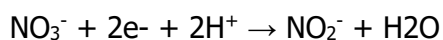
Anoksičnom denitrifikacijom ili disimilirajućom redukcijom nitrata ili nitrita nastaju molekularni dušik i dušikov (I) oksid koji se ne otapa u otpadnoj vodi i odlazi u atmosferu (Gerardi, 2002).

#### 4. Kinetika denitrifikacije

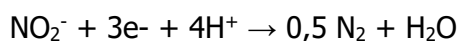
Razvijeno je nekoliko modela koji opisuju kinetiku denitrifikacije i u otvorenom i u zatvorenom sustavu.

Put redukcije u sustavima biološke denitrifikacije uključuje mehanizam u dva koraka:

- I. u prvom koraku dolazi do redukcije nitrata u nitrit:



- II. u drugom koraku zbiva se redukcija nitrita u molekularni dušik:



Objee reakcije zahtijevaju izvor ugljika kao donor elektrona. Ograničavajući supstrat je nitrat ili koncentracija ugljika pri pH u rasponu između 8 i 8,5 i koncentraciji otopljenog kisika manjoj od 0,5 mg/L. U takvim uvjetima denitrifikacija slijedi Monodovu kinetiku, a specifična brzina denitrifikacije  $vd$  može se prikazati izrazom [6], (De Filippis i sur., 2013).

$$vd = vdT_{max} \times \frac{S_n}{K_{AT} + S_n} \times \frac{S_c}{K_{CT} + S_c} \quad [6]$$

gdje je:  $v_{dT_{max}}$  specifična brzina denitrifikacije,  $S_n$  koncentracija nitrata,  $K_{dT}$  Monodova konstanta za nitrate,  $K_{cT}$  Monodova konstanta za ugljik,  $S_c$  koncentracija biorazgradivog ugljika.

## 5. Mikroorganizmi u procesu denitrifikacije

U bakterijskoj populaciji aktivnog mulja oko 80% bakterija su fakultativni anaerobi sposobni za proces denitrifikacije (Gerardi, 2002). Identificirano je oko 130 bakterijskih vrsta unutar više od 50 rodova kao denitrifikanti, a neki od njih su: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Halobacterium*, *Hypomicrobium*, *Kingella*, *Methanonas*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Axotobacter*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Denitrobacillus*, *Propionicbacterium*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Spirillum*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas* (Shapleigh, 2006). Većina denitrifikanata su fakultativni anaerobni heterotrofi, razne gram pozitivne i gram negativne bakterije. Većina denitrifikanata svrstava se u rodove *Alcaligenes*, *Bacillus* i *Pseudomonas* (Gerardi 2002).

Denitrifikaciju mogu provoditi i arhebakterije, tj. neki halofilni i hipertermofilni mikroorganizmi. Organizmi sa sposobnošću denitrifikacije pripadaju različitim skupinama i obuhvaćaju razna fiziološka svojstva. Rodovi denitrificirajućih vrsta grupirani prema principu rasta ili njihovim dominantnim fiziološkim karakteristikama, od kojih su najčešći denitrifikanti iz roda *Pseudomonasa*, a između ostalih tu su rodovi: *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Paracoccus*, *Flavobacterium*, *Moraxealla*, *Thiobacillus* navedeni su u tablici 1. Mnogi rodovi mogu koristiti i  $NO_3$  i  $NO_2$  za razgradnju, dok rodovi poput *Enterobacter* i *Escherichia* mogu koristiti samo  $NO_3$  (Kumar i Lin, 2010).

U miješanoj bakterijskoj populaciji dva bakterijska fenotipa mogu utjecati na ravnotežu nitrata i nitrita: (i) prave denitrificirajuće bakterije koje provode redukcija nitrata i nitrita do plinovitog dušika, i (ii) nitrat respirirajuće bakterije koje ne mogu reducirati nitrit (Szekeres i sur, 2002).

Ključni signali koji utječu na regulaciju denitrifikacije su kisik, nitrat, nitrit i dušikov monoksid. Nekoliko enzima respiratornog puta disimilatorne redukcije nitrata (Slika 1) mogu se kvantificirati za analize raznolikosti denitrificirajućih vrsta bakterija, poput: membranski vezana nitrat reduktaza (*Nar*) i periplazmatska nitrat reduktaza (*Nap*) kao i dvije vrste nitrit reduktaza (*NirK* i *NirS*) (Petri, 2000).

Tablica 1. Metabolička raznolikost bakterija koje sudjeluju u procesu denitrifikacije (preuzeto i prilagođeno iz Kumar i Lin, 2010).

<b>Archaea</b>	<b>Bacteria (gram-negative)</b>
Organotrophic	Diazotrophic
Halophilic	<i>Aquaspirillum</i>
<i>Haloarcula</i> ,	<i>Azospirillum</i>
<i>Halobacterium</i>	<i>Azoarcus</i>
<i>Haloferax</i>	<i>Bacillus</i>
Hyperthermophilic	<i>Bradyrhizobium</i>
<i>Pyrobaculum</i>	<i>Pseudomonas</i>
	<i>Rhodobacter</i>
<b>Bacteria (gram-positive)</b>	<i>Rhodopseudomonas</i>
Organotrophic	<i>Sinorhizobium</i>
Spore forming	Thermophilic
<i>Bacillus</i>	<i>Aquifex</i>
Nonspore forming	<i>Bacillus</i>
<i>Jonesis</i>	<i>Thermothrix</i>
	Psychrophilic
<b>Bacteria (gram-negative)</b>	<i>Aquaspirillum</i>
Phototrophic	<i>Halomonas</i>
<i>Rhodobacter</i>	Halophilic
<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Halomonas</i>
<i>Rhodoplanes</i>	<i>Bacillus</i>
Lithotrophic	Pigment-forming
S oxidizing	<i>Chromobacterium</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Thiobacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Thioploca</i>	Budding
H <sub>2</sub> oxidizing	<i>Blastobacter</i>
<i>Ralstonia</i>	<i>Hyphomicrobium</i>
<i>Paracoccus</i>	Gliding
<i>Pseudomonas</i>	<i>Cytophaga</i>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> or NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> oxidizing	<i>Flexibacter</i>
<i>Nitrobacter</i>	Magnetotactic
<i>Nitrosomonas</i>	<i>Magnetospirillum</i>
Organotrophic	Pathogenic
Carboxidotrophic	<i>Achromobacter</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Zavarzinia</i>	<i>Agrobacterium</i>
Oligocarbophilic	<i>Campylobacter</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Eikenella</i>
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Flavobacterium</i>
Fermentative	<i>Kingella</i>
<i>Empedobacter</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Morococcus</i>
Facultative anaerobic	<i>Neisseria</i>
<i>Alteromonas</i>	<i>Ochrobacterium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Oligella</i>
Aerobic	<i>Pseudomonas</i>
<i>Paracoccus</i>	<i>Sphingobacterium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Tsukamurella</i>

Mnogi mikroorganizmi razvili su jedinstvena svojstva koja im pomažu u preživljavanju u ekstremnim uvjetima. Jedan od primjera takvih mikroorganizama su halofili. Halofili održavaju osmotsku ravnotežu u slanom okruženju akumulirajući velike količine anorganskih iona. Halofilni mikroorganizmi dijele se na slabe halofile (3% NaCl), umjerene halofile (3-5% NaCl), ekstremne (razvijaju se čak i pri 25% NaCl) i super ekstremne halofile (zahtijevaju najmanje 25% NaCl). Za dobivanje energije sve aerobne bakterije koriste respiratorni lanac koji im omogućuje prijenos elektrona putem sustava transporta proteina do akceptora kisika. Na taj način se dobivena energija akumulira unutar stanice u obliku ATP-a. Budući da halofilne bakterije žive u okruženju s malim udjelom kisika ili bez kisika, razvile su mehanizam transporta elektrona na druge akceptore, najčešće sulfate i nitrate.

## **6. Čimbenici procesa denitrifikacije**

Brojni čimbenici su važni za aktivnost denitrificirajućih bakterija kao i za proces denitrifikacije, a najvažniji su izvor i koncentracija ugljika, koncentracija nitrata i nitrita, koncentracija otopljenog kisika, temperatura, pH i otrovne tvari (Yao i sur., 2020; Albina i sur., 2019; Zhang i Zhang, 2018; Metcalf & Eddy, 2003)

### **6.1. Temperatura**

Brzina denitrifikacije ovisi o temperaturi, povećava se s porastom temperature, i obrnuto. Maksimalna brzina denitrifikacije može se postići pri 35 °C i pri tome je za 50% veća od prosječne brzine denitrifikacije. Optimalna temperatura za denitrifikaciju je u rasponu 20-30 °C, a pri <5 °C denitrifikacija je inhibirana. Pri niskoj temperaturi usporena denitrifikacija kompenzira se povećanjem koncentracije mikrobne biomase (MLVSS, engl. *Mixed Liquor Volatile Suspended Solids*) (Gerardi, 2002). Denitrifikaciju je moguće provesti i pri temperaturama nižim od 5°C, ali proces je pri tome izrazito usporen ( Henze Christensen i Harremoes, 1997). Temperatura može imati nekoliko indirektnih utjecaja na proces denitrifikacije budući da utječe na mikrobiološku aktivnost kao i topljivost i difuziju kisika.

### **6.2. pH**

U reakcijama denitrifikacije pH je povišen. Nije zabilježen značajniji utjecaj pH na brzinu denitrifikacije pri vrijednosti pH između 7,0 i 8,0, dok su Dawson i Murphy (1972) pokazali smanjenje brzine denitrifikacije kada je pH smanjen sa 7,0 na 6,0 (Metcalf i Eddy, 1991). Najveća brzina denitrifikacije se postiže pri pH između 7 i 9 . Ako se tijekom procesa

denitrifikacije pH smanji  $<7$  nastaju toksični produkti dušikov (I) oksid –  $N_2O$  i dušikov(II) oksid –  $NO$ . Većina denitrifikanata osjetljivija je na varijacije temperature od varijacija pH (Saleh-Lakha i sur., 2009).

### **6.3. Koncentracija otopljenog kisika**

Da bi započeo proces denitrifikacije koncentracija kisika u ekosustavu mora biti  $\leq 0,2$  mg/L (Raboni i sur., 2014; Seitzinger, 1988). Kisik potiskuje stvaranje nitrat-reduktaze ili djeluje samo kao akceptor elektrona sprječavajući redukciju nitrata. Iako je kisik inhibitor denitrifikacije, povoljni učinci kisika uočeni su u denitrificirajućim sustavima. Aktivnost denitrificirajućih organizama bila je pojačana nakon izlaganja kisiku. Ovaj učinak može se pripisati prisutnosti hema u elektronskom transportnom sustavu jer je nekim organizmima potreban kisik da bi sintetizirali hem.

Denitrifikanti preferiraju aerobnu respiraciju ili korištenje slobodnog molekularnog kisika za razgradnju lako razgradivih organskih spojeva jer je energija dobivena aerobnom respiracijom veća od energije dobivene anoksičnom respiracijom organskih spojeva. Iz tog razloga denitrifikanti u prisutnosti otopljenog kisika u koncentraciji  $> 1,0$  mg/L aktiviraju enzimski sustav za korištenje slobodnog molekularnog kisika i deaktiviraju enzimski sustav za korištenje nitritnih i nitratnih iona. U flokulama veličine  $> 100$   $\mu m$  prisutan je gradijent otopljenog kisika te bakterijske stanice unutar flokule respiriraju istovremenim korištenjem kisika, nitratnih i nitritnih iona na način da bakterijske stanice na periferiji flokule koriste otopljeni kisik dok bakterije u središtu flokule koriste nitratne i nitritne ione za respiraciju. Energija ostvarena anoksičnom respiracijom je usporediva s aerobnom respiracijom. Oko 25% organskih sastojaka izraženih kao biološka potreba na kisiku (BPK) razgrađenih tijekom anoksične respiracije koristi se za staničnu sintezu ili proizvodnju mulja.

Nakon provedenih istraživanja istaknuto je da koncentracija otopljenog kisika 1-2 mg/L ne utječe na denitrifikaciju u biofilm sustavima (biofiltrima), kao i da bi u suspendiranim kulturama koncentracija otopljenog kisika trebala biti ispod 0,5 mg/L (Henze Christensen i Harremoes, 1997).

Brzina denitrifikacije može se značajno smanjiti u prisutnosti otopljenog kisika, a inhibicija brzine denitrifikacije ovisi o veličini i strukturi flokule (Metcalf & Eddy, 2003).

Brzina denitrifikacije se može smanjiti i za 40% u odnosu na maksimalnu vrijednost, u prisutnosti otopljenog kisika od 0,2 mg/L (Metcalf & Eddy, 2003).

Ekspresija i aktivnost skoro svih dušikovih oksid reduktaza suprimirana je u prisutnosti kisika (Hernandez i Rowe, 1988).

#### 6.4. Izvor ugljika

Za provedbu procesa denitrifikacije važna je količina i vrsta izvora ugljika. Izvori ugljika za denitrifikaciju (donori elektrona) mogu biti: (i) razgradivi organski sastojci iz otpadne vode, (ii) dodani vanjski (egzogeni) izvori ugljika, i (iii) unutarstanične rezerve ugljika poput polihidroksialkanoata (PHA) (Bernat i Wojnowska-Baryla, 2007; Metcalf & Eddy, 2003). Kada nema dovoljno raspoloživog ugljika nisu zadovoljene potrebe ni staničnog rasta ni denitrifikacije, a isto tako količina raspoloživog ugljika veća od optimalne ograničava porast brzine denitrifikacije (Huang i Tseng, 2001). Smatra se da je za proces denitrifikacije povoljni – odgovarajući omjer topivog BPK i/ili nitratnog i nitritnog iona oko 3.

U literaturi su istaknute vrijednosti omjera organskih sastojaka i nitrata ili nitrita kao povoljne za proces denitrifikacije, te je istaknuto da je potreban omjer C/N 16 za citrat kao izvor ugljika (Zhang i sur., 2019), omjer C/N 15 za glukozu kao izvor ugljika za *Bacillus* sp. i *Pseudomonas taiwanesis* (He i sur., 2018), odnosno omjer C/N 10 za glukozu kao izvor ugljika i *Pseudomonas* sp. (Prasetyo i sur., 2018), kao i da je za potpunu denitrifikaciju nitratnih iona potrebno 2,5 mg metanola/1 mg nitratnog iona i 1,5 mg metanola/1 mg nitritnog iona (Gerardi, 2002).

Komunalne otpadne vode karakterizirane su malim omjerom KPK/N koji često nije dovoljan za učinkoviti proces denitrifikacije te je potrebno osigurati potrebnu količinu ugljika dodavanjem vanjskog izvora ugljika, što predstavlja znatan trošak. Metanol, etanol i natrijev acetat se uglavnom koriste u laboratorijskim i industrijskim procesima biološke obrade otpadne vode (Grgas i sur., 2017; Bernat i Wojnowska-Baryla, 2007). Većina postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda koriste metanol kao vanjski izvor ugljika zbog ekonomskih razloga u proces denitrifikacije. Ostali spojevi koji se mogu koristiti u postupku denitrifikacije uključuju acetat, etanol, metan, glukozu, pepton, piljevinu, glicerol, mliječnu kiselinu, melasu i drugo (Naik i Setty, 2012).

Alternativni izvori ugljika za proces denitrifikacije su otpadna voda mljekarske industrije, otpadna voda iz procesa konzerviranja ribe, iz mesne industrije, mulj, drvene strugotine i drugo (Štefanac i sur., 2021; Grgas i sur., 2020; Guo i sur., 2018; Zhang i Zhang, 2018).

Učinak 94 izvora ugljika na konačne produkte respiracije nitrata u mikrobnim kulturama istražili su Carlsoni sur. (2020). Istaknuli su da različiti izvori ugljika favoriziraju različite respiratorne procese budući su katabolički i respiratorni geni različito raspoređeni duž genoma. Tako, neki izvori ugljika favoriziraju akumulaciju nitrita ili denitrifikaciju dok drugi izvori ugljika favoriziraju disimilatornu redukciju nitrata do amonijaka. Također, navode da više koncentracije ugljika uvijek favoriziraju disimilatornu redukciju nitrata do amonijaka prije

nego denitrifikaciju ili akumulaciju nitrita, te također da je sastav izvora ugljika ponekad jednako važan kao i koncentracija ugljika u određivanju konačnih produkata nitratne redukcije (Carlson i sur., 2020).

Uz ugljik moguće je koristiti i neke anorganske spojeve kao donore elektrona, primjerice natrijev sulfid. Kao izvor ugljika najčešće se koristi metanol za kojeg se pretpostavlja da daje najveću brzinu denitrifikacije.

Unutarnji ugljik (endogeni ugljik) je na drugom mjestu kao važan izvor ugljika za praktičnu upotrebu. Ako je dostupan industrijski otpad bogat ugljikom mogao bi se koristiti kao izvori ugljika. Primjeri su otpadne vode iz proizvodnje škroba i šećera te iz pivarske industrije. Među različitim izvorima ugljika koristi se i octena kiselina ili acetat da se postigne visoka brzina reakcije. Troškovi etanola malo su veći od metanola, ali etanol ne pokazuje toliku toksičnost kao metanol (Henze Christensen i Harremoes, 1997).

U teoriji, za redukciju 1 g  $\text{NO}_3\text{-N}$  u anoksičnim uvjetima potrebno je osigurati 2,86 g KPK ukoliko nema staničnog rasta (Henze, 1991). Iskustveno, za redukciju 1 g  $\text{NO}_3\text{-N}$  nužno je osigurati 3,5-4,5 g KPK, pa čak i do 7 g KPK (Her i Huang, 1995).

U denitrifikaciji preko nitrita nekoliko je prednosti u odnosu na denitrifikaciju preko nitrata, a to su: (i) 40% manji zahtjevi za ugljikom, (ii) 25% manja potreba na energiji za aeraciju jer se favorizira samo prvi korak nitrifikacije – oksidacija  $\text{NH}_4\text{-N}$  do  $\text{NO}_2\text{-N}$ , i (iii) niži kapitalni troškovi (Badia i sur., 2021; Yao i sur., 2020).

Na razini genoma kod denitrifikanata postoji regulacija supstratom – nitratom i regulacija produktom – nitritom i NO, čiji cilj je izjednačiti unutarnju koncentraciju citotoksičnih spojeva poput nitrita i NO (van Spanning i sur., 2007).

Na razini metabolizma kompeticija među reduktazama može uzrokovati akumulaciju nitrita ili  $\text{N}_2\text{O}$ , a što je pod utjecajem uvjeta okoliša poput pH pa transporteri elektrona mogu preferirati transfer elektrona radije jednoj reduktazi nego drugoj. Tako je kod *Paracoccus denitrificans* pri pH 5,5 uočena djelomična denitrifikacija uz nakupljanje nitrita i  $\text{N}_2\text{O}$  zbog transfera elektrona nekim reduktazama, dok pri pH 8,5 nije bilo akumulacije jer se transfer elektrona odvijao istovremeno svim reduktazama (Thomsen i sur., 1994).

Na akumulaciju nitrita utječe i vrsta izvora ugljika – donora elektrona. U istraživanju van Rijn i sur. (1996) pokazano je da se u denitrifikaciju s *Pseudomonas stutzeri* uz 5 mM acetat kao izvor ugljika zbiva akumulacija nitrita budući se tijekom oksidacije acetata koji ima 2 C-atoma oslobađa 8 elektrona, dok uz 5 mM butirat kao izvor ugljika akumulacije nitrita nema jer se tijekom oksidacije butirata koji ima 4 C-atoma oslobađa 20 elektrona i ne dolazi do kompeticije među reduktazama.

## 7. Potencijalni izvori ugljika za denitrifikaciju

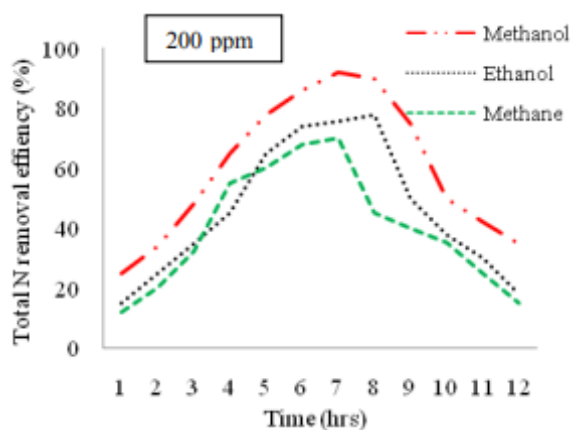
Izvori ugljika koji potencijalno mogu podržati denitrifikaciju mogu se svrstati u nekoliko kategorija, (Onnis-Hayden i Gu, 2008):

- a. čiste kemikalije poput metanola, etanola, acetata, šećera, butanola...
- b. pročišćeni poljoprivredni ili industrijski nusproizvodi
- c. sirovi industrijski/poljoprivredni nusproizvodi kao kukuruzni sirup, melasa, otpad iz pivovara i ostali tehnološki otpad;
- d. proizvodi fermentacije mulja i
- e. ostali, kao što je vodik, metan i H<sub>2</sub>S

Fass i sur. (1994) su istraživali učinak različitih hlapivih masnih kiselina (VFA, engl. *Volatile Fatty Acid*) na brzinu denitrifikacije s mješovitom bakterijskom populacijom u aktivnom mulju. Tri od četiri istražene VFA, i to **acetat**, **butirat** i **valerat** daju slične brzine denitrifikacije, dok je uz **propionat** brzina denitrifikacije najmanja. U sličnoj studiji, Ganaye i sur. (1996) su pokazali da su slične brzine denitrifikacije postignute također uz tri od četiri istražene VFA, i to acetat, butirat i valerat, ali različita je proizvodnja stanične biomase za svaku VFA (Johari i Talib, 2005). Metanol je izvor ugljika koji se najčešće koristi u procesu denitrifikacije zbog dostupnosti i ekonomske učinkovitosti.

Etanol i metan se također koriste kao vanjski izvori ugljika, a u istraživanju Naik i Setty (2012) su odabrali istražiti parametre koji imaju velik utjecaj na brzinu denitrifikacije, odnosno značajno utječu na brzinu uklanjanja nitrata, poput: brzina protoka zraka, temperatura, izvor ugljika, pH i početna koncentracija nitrata. Učinak izvora ugljika na denitrifikaciju i rast konkurentskih bakterija ispitivali su tijekom 12 sati, a kao izvore ugljika uporabili su metanol, etanol i metan za biološku denitrifikaciju otpadnih voda s imobiliziranim bakterijama *Pseudomonas stutzeri* a postignuti rezultati učinkovitosti uklanjanja dušika prikazani su Slikom 2. Najveća učinkovitost uklanjanja nitrata od 96% ostvarena je uz metanol kao izvor ugljika, zatim slijedi etanol te metan s najmanjom učinkovitosti uklanjanja dušika (Naik i Setty, 2011).



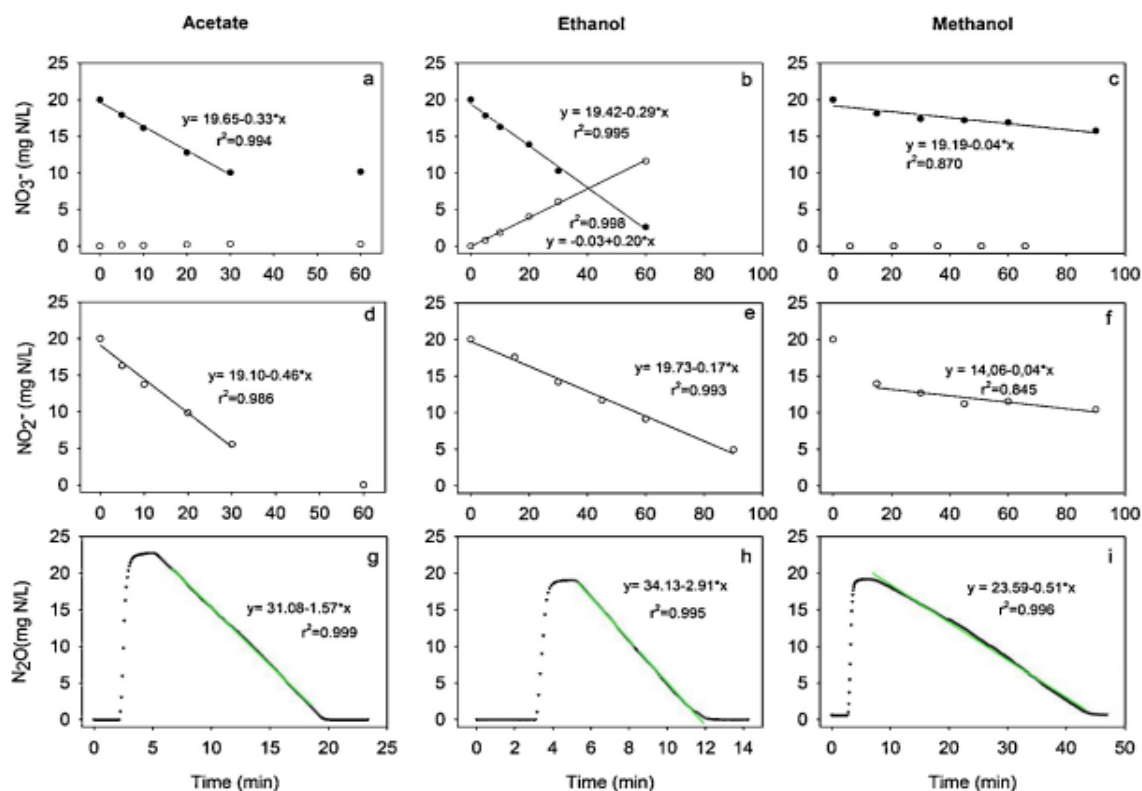


Slika 2. Učinkovitost uklanjanja nitrata početne koncentracije 200ppm uz metanol, etanol i metan kao izvore ugljika (preuzeto i prilagođeno iz Naik i Setty, 2011)

Acetat se često koristi kao izvor ugljika za denitrifikaciju, lakše se metabolizira od metanola, pokazuje visok stupanj denitrifikacije pri niskim temperaturama, ima visok stupanj učinkovitosti denitrifikacije, dobru biorazgradivost, nisku potrošnju (mg C/mg N) i nisku toksičnost (**Brian i sur., 2007**).

Ribera-Gyardia i sur. (2014) su istražili učinak izvora ugljika i kompeticiju za elektron donore u redukciji  $N_2O$ ,  $NO_2-N$  i  $NO_3-N$  sa miješanom mikrobnom denitrificirajućom zajednicom, sa tri izvora ugljika, **acetatom, metanolom i etanolom**.  $N_2O$  je intermedijer procesa denitrifikacije i uobičajeno  $N_2O$  se neće nakupljati (akumulirati) sve dok je brzina redukcije  $N_2O$  veća od brzine redukcije ostalih dušikovih oksida.  $N_2O$  je staklenički plin sa oko 265 puta većim stakleničkim učinkom od  $CO_2$  a uključen je i u uništavanje ozonskog omotača. Zbog takvog učinka na okoliš i godišnje brzine porasta od oko 0,31%  $N_2O$  uzima značajnu pažnju znanstvenika i istraživača. U sustavima za obradu otpadnih voda vanjski izvor ugljika se često dodaje da se provede potpuno uklanjanje N kada u otpadnoj vodi nema dovoljno organskih sastojaka. Diskontinuirani pokusi su provedeni na način da su elektron akceptori i to pojedinačno  $NO_3-N$ ,  $NO_2-N$  i  $N_2O$  dodani u reaktor u koncentraciji 20 mg N/L te je uslijedilo dodavanje elektron donora u koncentraciji 100 mg KPK/L, kao i set pokusa u kojima su sumarno dodani zajedno elektron donori u podjednako koncentraciji. Najveća brzina redukcije  $N_2O$  je postignuta uz etanol kao jedini izvor ugljika, a najniža uz metanol kao jedini izvor ugljika (Slika 3) (Ribera-Gyardia i sur., 2014). Također, najveća brzina redukcije je određena za  $N_2O$  u usporedbi s  $NO_2-N$  i  $NO_3-N$ . Uz acetat kao jedini izvor ugljika redukcija nitrata je bila najsporija, a slijedile su je brzine redukcije nitrita i didušikovog oksida. Također

je bitno napomenuti da redukcija nitrata nije bila dovršena kad se acetat koristio kao izvor ugljika, iako je dodana dovoljna količina acetata na početku reakcije. Uzrok tome bi mogao biti da se sav acetat nije koristio u svrhe denitrifikacije, nego se pretpostavlja da je dio acetata skladišten u obliku unutarstaničnog polimera polihidroksialkanoata (PHA, engl. *Polyhydroxyalkanoates*). Dokazano je da mnogi mikroorganizmi pohranjuju acetat u obliku PHA u anaerobnim uvjetima. Najveća brzina redukcije N<sub>2</sub>O postignuta je uz etanol kao izvor ugljika. Postoji mogućnost da svaki izvor ugljika pomaže u razvoju specifične mikrobne zajednice koja bi mogla imati razlike u pogledu afiniteta prema različitim akceptorima elektrona ili čak imaju različite količine gena koji kodiraju za svaki enzim koji sudjeluje u redukciji dušikovih oksida (Ribera-Guardia i sur., 2014).



Slika 3. Profili nitrata, nitrita i didušikovog oksida s odgovarajućim regresijskim linijama za aceton, etanol i metanol s različitim akceptorima elektrona (preuzeto i prilagođeno iz Ribera-Guardia i sur., 2014)

Slične rezultate postigao je Mokhayeri (2008) koji je također pokazao znatno veće brzine redukcije nitrata s acetatom i etanolom nego s metanolom. Brzina redukcije nitrata bila je slična kada su acetat i etanol korišteni neovisno. U denitrifikaciji uz etanol kao izvor ugljika

nakupljen je nitrit tijekom redukcije nitrata, zato što je brzina redukcije nitrita manja od brzine redukcije nitrata

Hu i sur. (2018.) su istražili učinak **acetata i etanola** kao vanjskih izvora ugljika na denitrifikaciju uz akceptore elektrona – otopljeni kisik, nitrat i nitrit. Pokuse su provodili u aerobnim i anoksičnim uvjetima s neaklimatiziranom biomasom iz sustava za biološku obradu otpadnih voda sa aktivnim muljem za biološko uklanjanje hranjivih tvari. U otpadnoj vodi koncentracija ukupnog dušika i fosfora iznosila je oko 80 mg N/L i 15 mg P/L. Pokusi su provedeni u dva paralelno vođena reaktora radnog volumena 4L, pri temperaturi oko 20 °C i uz održavanje koncentracije otopljenog kisika od oko 6 mg O<sub>2</sub>/L (za aerobnu reakciju). Miješanje je provedeno pri 180 o/min (za anoksične uvjete). Koncentracija suspendirane tvari u mješanoj tekućini je iznosila 4000 mg MLSS/L, a koncentracije biomase je iznosila 3000 mg MLVSS/L. Jednostupnjeviti pokusi su provedeni pri anaerobnim, aerobnim i anoksičnim uvjetima, dok su dvostupnjeviti procesi provedeni pri anaerobno/anoksičnim i anaerobno/aerobnim uvjetima. Također pri aerobnim uvjetima dodana je alitiourea kao inhibitor procesa nitrifikacije (10 mg/L). Svakih 5-60 min uzimani su uzorci, filtrirani kroz 1,2 µm i analizirani na NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, KPK i PO<sub>4</sub>-P.

Jednostupnjeviti pokusi provedeni su kao: test anaerobnog otpuštanja fosfata uz acetat i etanol pri KPK 500 mg/L tijekom 4 sata; test aerobnog uzimanja fosfata uz dodanih 10 g KPK/g PO<sub>4</sub>-P na početku test, tijekom 4 sata; te kao test anoksičnog uzimanja fosfata uz dodanih 10 g KPK/g NO<sub>3</sub>-N ili 6 g KPK/g NO<sub>2</sub>-N motreno kroz vrijeme 4 sata. Za usporedbu je proveden i anoksični test bez vanjskog izvora ugljika. U anoksičnim uvjetima otopine kalijeva nitrata ili kalijeva nitrita kao izvori nitrata i nitrita su dodane za podešavanje koncentracije NO<sub>3</sub>-N ili NO<sub>2</sub>-N od 25 mg N/L.

Dvostupnjeviti pokusi su provedeni na način da su biomasa i acetat miješani i držani pri anaerobnim uvjetima tijekom 2,5 sata. Potom je dodan acetat ili etanol. Aerobni pokus trajao je 4,5 sata a anoksični 3,5 sata.

U pokusima u kojima je istražen učinak izvora ugljika na anaerobno ponašanje fosfat akumulirajućih vrsta (PAOs, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*), Hu i sur. (2018) su pokazali da uz acetat gotovo sav P (84 mg/L) se otpušta nakon 4 h zbog male razine polifosfata u biomasi PAOs. Omjer otpuštanja P i uzimanja acetata iznosio je 0,43 gP/gCOD (odnosi se na cijeli pokus). U pokusima s etanolom određeno je otpuštanje P od samo 6,92 mgP/L.

Iz tog razloga za dvostupnjevite pokuse korišten je se samo acetat za induciranje anaerobnog otpuštanja P. Prosječni omjer otpuštanja P i uzimanja acetata u tim pokusima

iznosio je 0,42 gP/gCOD (ti rezultati potvrđuju rezultate jednostupnjevutih anaerobnih eksperimenata).

U pokusima u kojima je istraživana učinkovitost izvora ugljika na aerobno „ponašanje“ PAOs i uobičajenih heterotrofa (OHOs, engl. *Ordinary Heterotrophic Organisms*), Hu i sur. (2018) su u aerobnom dijelu dvostupnjevitog procesa dodavali acetat ili etanol, i istaknuli da uz etanol PO<sub>4</sub>-P profil prati slične trendove kao i kod eksperimenta bez dodanog izvora ugljika uz niske koncentracije PO<sub>4</sub>-P na kraju aerobne faze, dok uz acetat prisutna je lag faza (30 min) zbog efekta simultanog uzimanja P zbog aerobnih uvjeta i otpuštanja P zbog uzimanja acetata. Dodatak etanola pojačava aerobno uzimanje P pomoću PAOs što je moguće zbog zahtjeva za P za rast OHOs, a dodatak acetata negativno utječe na unos P do određene mjere.

Provedeni su i jednostupnjeviti pokusi pri aerobnim uvjetima kako bi se proučilo ponašanje PAOs u aerobnim uvjetima uz elektron donore (acetat ili etanol). U slučaju s etanolom nije došlo do PO<sub>4</sub>-P otpuštanja i finalna koncentracija PO<sub>4</sub>-P bila je 0,29 mgP/L. U slučaju s acetatom otpuštanje P primijećeno je u prvih 45 min do iscrpljivanja acetata (maksimum PO<sub>4</sub>-P bio je 12,7 mg/L). Nakon iscrpljivanja acetata došlo je do uzimanja P i finalna koncentracija PO<sub>4</sub>-P iznosila je 2,5 mgP/L. Takvo ponašanje potvrdilo je da je skladištenje PHA moguće i pri aerobnim uvjetima ukoliko su dostupne hlapljive masne kiseline, a PO<sub>4</sub>-P nije u potpunosti otpušten iz PAOs stanica. U prisutnosti acetata u aerobnim uvjetima PAOs se ponašaju slično kao u klasičnom EBPR (anaerobno/aerobni uvjeti).

Zaključili su da uz acetat kao izvor ugljika dolazi do otpuštanja P u prisutnosti DO, nitrata i nitrita kao akceptora elektrona (1,7; 7,8 i 3,5 mgP/gMLVSS h). Uz etanol, pri istim akceptorima elektrona ne dolazi do otpuštanja P. Neovisno o izvoru ugljika, nitrit inhibira anoksični unos P uz početnu konc 25 mgN/L. Veća je brzina uzimanja nitrata ili nitrita (NUR, engl. *Nitrogen Uptake Rate*) uz acetat nego uz etanol, neovisno o elektron akceptoru (nitrat/nitrit). Najveći NUR od 2,3±0,1 mgN/gMLVSSh je određen u dvostupnjevitom procesu s acetatom iz razloga jer se acetat može direktno asimilirati, a etanol se mora pretvoriti u acetat. Veće brzine denitrifikacije i to 1,4 i 0,8 mg N/g MLVSS h su postignute uz acetat kao izvor ugljika, u usporedbi s brzinama denitrifikacije od 1,1 i 0,7 mg N/g MLVSS h postignute uz etanol, određeno uz nitrat odnosno nitrit kao akceptore elektrona (Hu i sur., 2018).

Xu i sur. (2018) su istražili učinkovitost **glukoze, natrijeva acetata i biorazgradivih sintetičkih polimera PHBV/PLA** (engl. poly-hydroxi butirate-valerate/poly lactic acid) na izvedbu denitrifikacije i strukturu mikrobne zajednice. Uporabili su sintetsku otpadnu vodu, mulj je uzet iz sekundarnog taložnika, a pokusi su provedeni u laboratorijskim pack-bed reaktorima s gornjim pritokom, radnog volumena 706 mL, uz 800 mg MLSS/L. Packed-bed

reaktori su bioreaktori cjevastog tipa koji su ispunjeni slojem imobiliziranih enzima ili mikrobnih stanica kao biokatalizatora, a za imobilizaciju se uobičajeno koriste tehnike poput inkapsulacija, umrežavanje, kovalentno vezivanje i adsorpcija. Budući su reakcije provedene u reaktorima s napunjenim slojem heterogene, katalitičke biokemijske reakcije i otpor prema prijenosu mase mogu imati dominantnu ulogu u određivanju kinetike reakcije, te se reakcije provedene u ovim bioreaktorima mogu odvijati u režimu kontroliranom prijenosom mase ili u režimu kontroliranom reakcijom. Prednosti bioreaktora s napunjenim slojem u odnosu na druge bioreaktore su ponovna uporaba enzima, kontinuirani način rada, niska inhibicija supstrata i proizvoda, veliki prinos željenog proizvoda.

U ovom postupku korištene su biorazgradive granule PHBV/PLA (60%/40%, w/w). Nakon razdoblja pokretanja, bioreaktor s PHBV/PLA je radio pri različitim brzinama opterećenja s nitratom (NLR, engl. *Nitrate Loading Rates*) u rasponu od 0,15 do 0,78 g N/Ld, pri temperaturi  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $\text{HRT}_{\text{faza procesa 1-3}} = 2,5\text{h}$ ,  $\text{HRT}_{\text{faza procesa 4-6}} = 2\text{h}$ ,  $\text{HRT}_{\text{faza procesa 7}} = 1,5\text{h}$ ,  $\text{HRT}_{\text{faza procesa 8}} = 1\text{h}$ ,  $\text{HRT}_{\text{faza procesa 9}} = 0,5\text{h}$ ;  $\text{NO}_3\text{-N}$  u efluentu između  $15,49 \pm 0,55\text{ mg/L}$  i  $49,86 \pm 0,68\text{ mg/L}$

Sustavi s glukozom i acetatom vođeni su 49 dana (4 faze), pri omjeru C/N 6 i 3,6; NLR između 0,19 i 0,61 gN/Ld; temperatura  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ;  $\text{HRT}_{\text{faza procesa 1-3}} = 2\text{h}$ ,  $\text{HRT}_{\text{faza procesa 4}} = 2,5\text{h}$ ;  $\text{NO}_3\text{-N}$  u efluentu između  $15,55 \pm 0,36\text{ mg/L}$  i  $50,60 \pm 0,27\text{ mg/L}$  za glukozu i  $15,56 \pm 0,38\text{ mg/L}$  i  $50,43 \pm 1,38\text{ mg/L}$  za acetat.

Mulj, a posebno denitrificirajuće bakterije su se brzo prilagodile na sva 3 izvora ugljika (iako se razlikuju po kemijskoj strukturi i molekulskoj težini). Maksimalna denitrifikacija bila je niža u sustavu s polimerom, nego sa glukozom i acetatom zbog različitog mehanizma iskorištenja izvora ugljika pomoću denitrificirajućih bakterija. Koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  u efluentu bila je značajno veća uz glukozu nego uz polimer i acetat kao izvore ugljika, zbog preferiranog puta redukcije nitrata u amonijak. Izvori ugljika značajno utječu na proces denitrifikacije i time karakteristike efluenta. *Proteobacteria* je red koji dominira u sva tri istražena sustava (glukoza, acetat, polimer), međutim na razini roda postoje razlike. U PHBV/PLA sustavu dominantne su denitrificirajuće bakterije *Thauera* (13%), *Dechloromonas* (6%), *Zoogloea* (3%) i *Denitratisoma* (3%); u sustavu s glukozom dominantne su denitrificirajuće bakterije *Thauera* (11%), *Dechloromonas* (11%) i *Zoogloea* (7%); a u sustavu s acetatom dominantne su denitrificirajuće bakterije *Thauera* (38%).

U radu je istaknuto da izvori ugljika utječu na uklanjanje nitrata, mikrobnii sastav i funkcionalne gene u denitrifikacijskom sustavu. Kemijska karakteristika polimera odgovorna je za teži mehanizam iskorištenja i time niži stupanj denitrifikacije. Sustav s acetatom pokazuje najveće obilje denitrificirajućih bakterija.

Brzine denitrifikacije bile su niže u reaktoru s PHBV/PLA od onog s glukozom i  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Ukupna relativna brojnost denitrificirajućih bakterija bila je rangirana: PHBV/PLA (25%), glukoza (29%),  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (45%). Određene su maksimalne brzine denitrifikacije od 0,37 gN/Ld za PHBV/PLA, 0,39 g N/Ld za  $\text{CH}_3\text{COONa}$  i 0,46 g N/Ld za glukozu, iz čega se može vidjeti da glukoza ima najveću brzinu denitrifikacije, a PHBV/PLA najmanju (Xu i sur., 2018). Ovo je istraživanje pokazalo da se denitrificirajuće bakterije mogu vrlo brzo prilagoditi na sva tri istražena izvora ugljika, iako se molekularna masa i kemijska struktura ova tri izvora ugljika jako razlikuje. Dokazano je da se acetat može izravno uporabiti u metaboličkom procesu bez izmjena, dok glukoza zahtijeva neke enzimske pretvorbe prije nego što uđe u metabolizam većine denitrifikanata. Dok se PHBV/PLA polimer, kao tvar velike molekularne mase, prvo mora pomoću bakterija razgraditi na tvari manje molekularne mase. U usporedbi s  $\text{CH}_3\text{COONa}$  i glukozom, mehanizam uporabe polimera PHBV/PLA za denitrifikaciju je bio kompliciraniji upravo zbog njegove kompliciranije kemijske strukture (Xu i sur., 2018).

Biorazgradivi sintetički polimeri, kao što je polilaktična kiselina (PLA), poli-3-hidroksimaslačna kiselina (PHB) i polikaprolakton, također se koriste kao izvori ugljika, imaju visoku učinkovitost denitrifikacije i znatno manje oslobađanje otopljenih organskih ugljika nego prirodni izvori ugljika, ali njihova je upotreba prilično skupa (Rajta i sur., 2019).

Sheng i sur. (2018) su istražili učinak izvora ugljika i omjera C/N na istovremeni proces anaerobne oksidacije amonijaka (Anammox, engl. *Anaerobic Ammonium Oxidation*) i denitrifikaciju. Postupak anaerobne oksidacije amonijaka uključuje oksidaciju amonijaka ( $\text{NH}_4$ ) u dušik ( $\text{N}_2$ ), s nitritom ( $\text{NO}_2^-$ ) kao akceptorom elektrona. U usporedbi s klasičnim postupkom nitrifikacije i denitrifikacije postupak za uklanjanje dušika anaerobnom oksidacijom amonijaka zajedno s denitrifikacijom je održivija i ekonomičnija alternativa, posebno za pročišćavanje otpadnih voda s niskom koncentracijom ugljika. U ovoj studiji korištena su dva EGSB reaktora (engl. *Expanded Granular Sludge Bed Reactor*), radnog volumena 2 L, jedan s glukozom (R1), a drugi s acetatom (R2). Uporabljena je sintetska otpadna voda u kojoj je kao izvor  $\text{NH}_4\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  dodan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  odnosno  $\text{NaNO}_2$ , i elementi u tragovima. Reaktori su bili pokriveni crnim platnom da se spriječi rast fototrofnih organizama i inhibicija svjetlom. Pokusi su provedeni pri temperaturi  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , uz 16 gMLSS/L, i 10 gMLVSS/L (mulj dobiven iz laboratorijskog anammox EGSB reaktora). Dio supernatanta je recikliran u influent. Omjer KPK/N postupno se povećavao svakih 20 dana mijenjanjem koncentracije glukoze odnosno acetata, pokus je trajao 91 dan kroz 5 faza obzirom na C/N influenta i to: C/N 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6. Uzorci su uzimani svaka 2 dana i mjerena je koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ , pH i KPK.

Rezultati u R1 reaktoru, uz glukozu kao izvor ugljika (Sheng i sur., 2018): pokusi su trajali 90 dana, glukoza kao izvor ugljika, omjer C/N od 0,2 do 1,6, NO<sub>2</sub>-N/NH<sub>4</sub>-N 1,2 (kroz 5 faza). Faza 1: uklonjen skoro sav NH<sub>4</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N iz efluenta (>98%); NO<sub>3</sub>-N u efluentu pao s 37,91 mg/L na 18,74 mg/L (možda zbog velikog rasta denitrificirajućih bakterija); postignuto uklanjanje TN od 91,6%. Faza 2: koncentracija NO<sub>3</sub>-N u efluentu i dalje pada, ali sporije; efikasnost uklanjanja NO<sub>2</sub>-N i NH<sub>4</sub>-N u efluentu 99,7 i 99,4%; uklanjanje TN od 93,2%. Anammox bakterije prevladavaju kod niskog C/N omjera (<0,4 g KPK/gN). Niska koncentracija glukoza ima minimalni inhibitorni učinak na anammox proces. Faza 3: uklanjanje NH<sub>4</sub>-N 89%, NO<sub>2</sub>-N 98,2%, TN 91,2%. U fazama 4 i 5 primijećeno povećanje NH<sub>4</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N u efluentu možda zbog rasta denitrificirajućih bakterija pri većim omjerima C/N. anammox proces slabi u fazama 3, 4 i 5. Na kraju faze 5: uklanjanje TN od 82,1%. Suživot anammox mikroorganizama i heterotrofnih denitrificirajućih bakterija u prve 4 faze, a istovremeni proces anammox i denitrifikacija moguć s glukozom pri C/N < 1,6

Rezultati u R2 reaktoru, uz acetat kao izvor ugljika (Sheng i sur., 2018): acetat, C/N od 0,2 do 1,6, NO<sub>2</sub>-N/NH<sub>4</sub>-N 1,2 (kroz 5 faza). Faza 1: dobra anammox aktivnost pri C/N 0,2 (skoro nema NH<sub>4</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N u efluentu). Faza 2: uklanjanje NH<sub>4</sub>-N 99%, NO<sub>2</sub>-N 97%. Faza 3-5: NH<sub>4</sub>-N koncentracija u efluentu raste. U fazi 4 koncentracija NO<sub>2</sub>-N doseže 60,8 mg/L (maksimum u R1 bio je 28,51 mg/L), možda zbog inhibicijskog učinka acetata na anammox jer anammox bakterije radije troše acetat umjesto NH<sub>4</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N. U fazi 4 i 5 nezadovoljavajuće je uklanjanje N (74,3% i 73,3%). Jača je denitrifikacija u R2 nego u R1 (vidi se iz manje produkcije NO<sub>3</sub>-N u R2 nego u R1) i slabiji anammox (veća koncentracija NH<sub>4</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N u efluentu u R2). Nije jasno da li acetat inhibira anammox put i omogućava brži rast denitrifikanta ili se acetat lakše asimilira pa time stimulira heterotrofni put i inhibira anammox aktivnost. Pri omjeru C/N<1,2 istovremeni proces anammox i denitrifikacija ima zadovoljavajuće uklanjanje N (≥88,3%).

Učinak uklanjanja dušika, broj funkcionalnih gena, aktivnost biomase i strukture mikrobne zajednice analizirani su i uspoređeni u dva reaktora. Rezultati su pokazali da je poželjna učinkovitost uklanjanja dušika od 87% dobivena pri omjeru C/N 1,2 u reaktoru s glukozom (R1), dok bi se slična učinkovitost uklanjanja dušika mogla postići pri omjeru C/N 0,8 u reaktoru s acetatom (R2). Pri visokim omjerima C/N raznolikost mikrobnih vrsta u reaktoru s glukozom (R1) je bila veća od one u reaktoru s acetatom (R2). Među identificiranim mikroorganizmima (*Chloroflexi*, *Chlorobi*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* i *Planctomycetes*), količina Proteobakterija u oba reaktora povećavala su se zajedno s omjerom C/N. Anammox bakterije prevladavaju pri niskom KPK, a denitrificirajuće bakterije brže rastu pri većim omjerima C/N. Prethodne studije izvještavaju da su β-proteobakterije važne za

uklanjanje dušika u aktivnom mulju, mogu istodobno razgraditi organsku tvar i ukloniti dušik. Mnoge denitrificirajuće bakterije pripadaju  $\beta$ -proteobakterijama klase, poput *Rhodocyclaceae* sp., *Thauera* sp. i *Azoarcus* sp. To ukazuje na to da denitrificirajuće bakterije kontinuirano rastu s povećanje omjera C/N. Tijekom ovog istraživanja reaktor s glukozom kao izvorom ugljika pokazao se kao stabilniji i tolerantiji na visoke omjere C/N u istovremenom procesu anammox i denitrifikacije u usporedbi s reaktorom s acetatom. Pri višem omjeru C/N obilje *Candidatus Brocadia* (anammox bakterija) se smanjuje s 19,10% na 1,00% u reaktoru s glukozom a u reaktoru s acetatom s 21,20% na 0,13% (Sheng i sur., 2019).

Le i sur. (2019) su istražili učinak izvora ugljika i omjer KPK/N na konkurentnost izvedbe procesa denitrifikacije i anaerobne oksidacije amonijaka (anammox), u kratko- i dugo-trajno vođenim procesima. Pokuse su provodili uz izvore ugljika: **acetat, glicerol, metanol i etanol**, uz odabrani omjer KPK/NO<sub>3</sub>-N 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 i 2.

Proces je motren određivanjem NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, KPK (ukupni i topivi), PO<sub>4</sub>-P, TSS, VSS, FdN (potpune denitrifikacije), PdN (parcijane denitrifikacije).

Kratkotrajno vođeni procesi (engl. *Short-term*) provedeni su u reaktoru volumena 1L, u anoksičnim uvjetima, uz mulj koji je činio mješavinu AnAOB mulja i denitrifikacijskog mulja s različitim udjelima AnAOB uz 0-70 mgNH<sub>4</sub>-N/gVSS dan i bez AnAOB uz 70-158 mgNH<sub>4</sub>-N/gVSS dan, uz početnu koncentraciju 5 mg NH<sub>4</sub>-N/L; 10 mg NO<sub>3</sub>-N/L i 200 mg natrijevog bikarbonata/L, pri 21-25 °C i pH 7-7,5.

Rezultati učinka KPK i omjera KPK/NO<sub>3</sub>-N u kratkotrajnom procesu su pokazali da se samo uz acetat postiže akumulacija nitrita (parcijalna denitrifikacija) u odsutnosti AnAOB. Uz AnAOB i uz sve izvore ugljika postiže se PdN i uklanjanje amonijaka. Uz acetat i glicerol i povećanje omjera C/N uz veliku aktivnost AnAOB vodi do veće PdN i većeg uklanjanja amonijaka. Uz metanol nije uočena poveznica. Stupanj PdN uz acetat i glicerol pri niskom AnAOB je sličan, dok je pri visokom AnAOB uz acetat stupanj PdN veći. Veći udio AnAOB je potreban za postizanje uklanjanja amonijaka. Pri niskom omjeru KPK/N postiže se bolja PdN zbog limitacije sa KPK, ali to ne garantira optimalno uklanjanje amonijaka. Acetat se pokazao kao dobar izvor ugljika za akumulaciju nitrita.

Dugotrajno vođeni procesi (engl. *Long-term*) provedeni su u reaktoru volumena 20 L, pri anoksičnim uvjetima, pri 20 °C i pH 7-7,5, uz HRT 15 h, uz sintetsku otpadnu vodu. Za inokulaciju reaktora uporabljene su AnAOB granule i nitrifikacija/denitrifikacija mulj. Koncentracije amonijaka i nitrata nisu bile limitirajući faktor kako bi se odredio utjecaj COD koncentracije.



Rezultati istraživanja učinka izvora KPK su doprinijeli spoznajama da acetat pokazuje veći potencijal za akumulaciju nitrita od glicerola u short-term eksperimentima. U periodu 1 long-term eksperimenta glicerol daje veću PdN selekciju u usporedbi s acetatom. Uz metanol se PdN postiže u low-term eksperimentima, dok u long-term ne. Za low-term eksperimente korišten je ne aklimatizirani mulj, dok je za long-term korišten mulj aklimatiziran na metanol. Acetat i glicerol skladište PHB intracelularno što može biti razlog za bolju PdN (metanol ne skladišti PHB). Uz sva 3 izvora ugljika postiže se različito uklanjanje nitrata. Još jedan razlog učinkovitije PdN uz acetat i glicerol u usporedbi s metanolom može biti i zbog različite donacije elektrona. Još jedna hipoteza je da metanol inhibira AnAOB aktivnost (Le i sur., 2019).

Rezultati istraživanja učinka omjera KPK/NO<sub>3</sub>-N su pokazali da u short-term eksperimentima pri C/N<2 nije uočen utjecaj na selekciju parcijalne denitrifikacije, ali omjer C/N je utjecao na održavanje uklanjanja nitrata. Jednom kada bakterije za parcijalnu denitrifikaciju čine većinu u zajednici, omjer KPK/N nije bitan faktor za dostupnost nitrita za AnAOB. Ostaci topivog KPK u efluentu pojavljuju se od kad se akumulira nitrit u periodu 2 u reaktorima s glicerolom i acetatom (Le i sur., 2019).

Rezultati istraživanja konkurentnosti mikrobnih vrsta PdN i AnAOB su kako slijedi: Short-term eksperimenti su pokazali važnost balansiranja AnAOB potencijala s uklanjanjem nitrata kako bi došlo do kompeticije AnAOB za nitrit i poticanje selekcije parcijalne denitrifikacije; Glicerol je pokazao veći udio parcijalne denitrifikacije u usporedbi s acetatom; Kontrola SRT je potreba za pokuse s glicerolom za bolje upravljanje populacijom denitrifikanata i odvojeno upravljanje AnAOB masom; Acetat pokazuje najbolji potencijal za selekciju parcijalne denitrifikacije neovisno o AnAOB potencijalu (Le i sur., 2019).

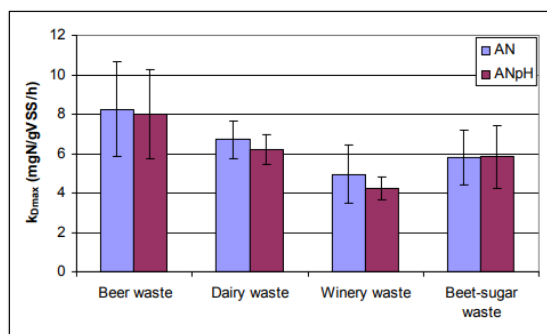
Le i sur. (2019) su istaknuli slijedeće: uz sve ispitivane izvore ugljika: acetat, glicerol, metanol i etanol postiže se parcijalna denitrifikacija dok god ima dovoljno AnAOB za kompeticiju za nitrit; acetat je pokazao najveći potencijal za generiranje nitrita; veću efikasnost za PdN su pokazali acetat i glicerol; metanol ima veću tendenciju provoditi potpunu denitrifikaciju; omjer KPK/N ne utječe izravno na učinkovitost parcijalne denitrifikacije ali može služiti za balansiranje brzine procesa parcijalne denitrifikacije (PdN) i anaerobne oksidacije amonijaka (anammox).

Uporaba **industrijskog ili poljoprivrednog otpada** kao vanjskog izvora ugljika za denitrifikaciju istražena je u brojnim radovima ( Skrinde i sur., 1982, Monteith i sur., 1980). Utvrđeno je da se neki organski otpad poput otpada formaldehida i dekstroze slabije razgrađuje od destilerijskih ulja ili metanola, ali većina otpada u prehrambenoj industriji

pokazuje vrlo visoke stope denitrifikacije pri omjeru C/N od 2 do 6. Kao izvor ugljika u denitrifikaciji uporabljeni su ostaci iz mliječne industrije, industrije bezalkoholnih pića i otpadne vode iz tvornice slatkiša (Nava i sur., 2010) i istaknuto je da ovi izvori ugljika bogati šećerom daju bolje rezultate od metanola u procesu denitrifikacije. Brojne studije pokazale su dobre karakteristike korištenja industrijskog otpada za denitrifikaciju, kao što su povoljna kinetika i visoka biorazgradivost, međutim neke od studija su istaknule nedostatke poput dostupnosti tih otpada, primjerice ostatke iz prehrambene industrije često karakteriziraju privremene varijabilnosti u količini i sastavu (Cappai i sur., 2004). Dodatno se preporučuje i predobrada otpada kao što je odmašćivanje, podešavanje pH ili uklanjanje boje. Primjerice, otpad iz mljekare analiziran u radu Cappai i sur. (2004) sadržavao je lako biorazgradive komponente, poput laktoze i laktata, ali prisutnost velike količine masti, uzrokovane neispravnim radom prethodne obrade u industrijskom pogonu uzrokovale su stvaranje pjene, a samim tim i lošu kvalitetu otpadnih voda.

Uporaba otpadnih proizvoda kao izvora ugljika nudi ekonomsku prednost u usporedbi s drugim izvorima ugljika, koji su relativno skupi (Rajta i sur., 2019).

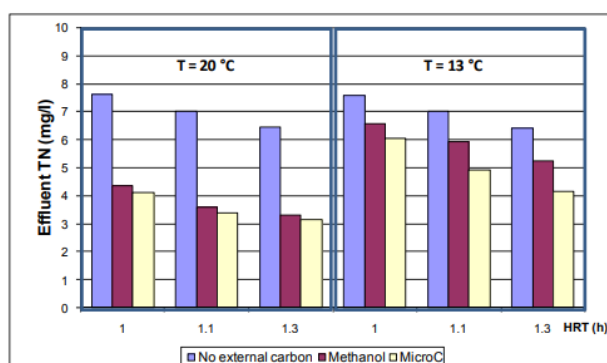
Rezultati primjene različitog industrijskog otpada kao izvora ugljika u procesu denitrifikacije, i to za otpad iz industrije piva, mlijeka, vina i prerade šećerne repe u industriji proizvodnje šećera izraženi kao maksimalna specifična brzina uklanjanja N izraženo kao mg N/gVSS,h prikazano je slikom 4 (Hayden i Gu, 2008).



Slika 4. Brzine denitrifikacije uz industrijske otpade: iz industrije piva, iz industrije mlijeka, iz vinarije i prerade šećerne repe (preuzeto i prilagođeno iz Hayden i Gu, 2008)

Zbog visokog udjela šećera **kukuruzni sirup**, koji ima široku primjenu u prehrambenoj industriji, predložen je kao alternativni izvor ugljika za proces denitrifikacije. Hayden i Gu, (2008) proveli su istraživanje dodavanja kukuruznog sirupa što je rezultiralo poboljšanjem uklanjanja dušika. Mane ovog izvora ugljika su visoka cijena kukuruznog sirupa i promjena sadržaja KPK. Brzina nitrifikacije iznosila je 4,4 mgN/gVSS,h.

Kemikalija komercijalnog naziva **MicroC™** koju je razvila tvrtka Environmental Operating Solutions je dizajnirana za upotrebu kao donor elektrona za biološku denitrifikaciju otpadnih voda. MicroC je razvijen kao održiva alternativa metanolu, bez opasnosti za sigurnost. Koristi se u SAD-u od 2003. godine za pročišćavanje otpadnih voda u komunalnim i industrijskim postrojenjima. Kinetika denitrifikacije s MicroC (Slika 5) usporediva je s metanolom, međutim utvrđeni su veći prinosi biomase. U istraživanju Cherchi i sur. (2008) primijećeno je da biomasa koja se prilagođava MicroC-u sadrži relativno veliku raznolikost mikroorganizama te ima visoku razgradivost (Hayden i Gu, 2008).

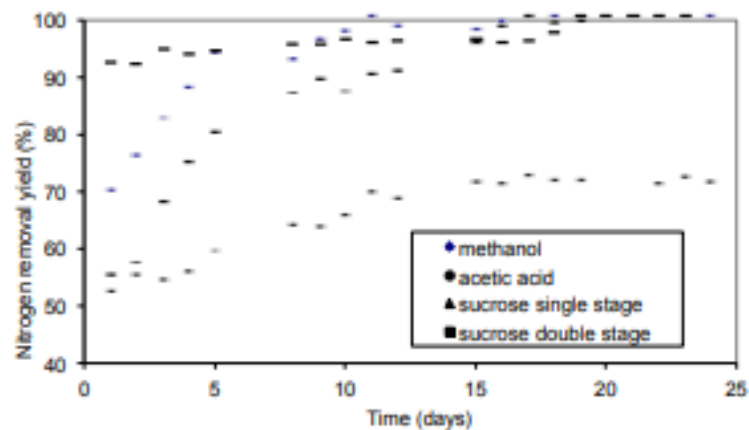


Slika 5. Učinkovitost uklanjanja dušika uz MicroC i metanol kao izvore ugljika u ovisnosti o HRT i temperaturi (preuzeto i prilagođeno iz Hayden i Gu, 2008)

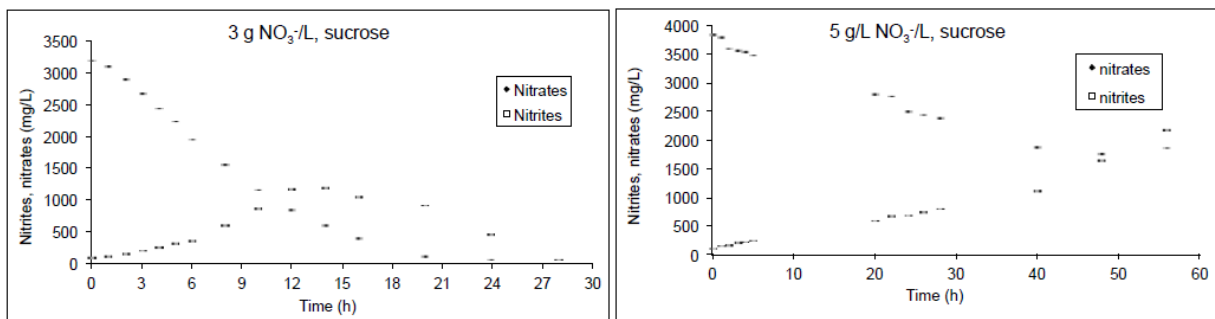
De Filippis i sur. (2013) istražili su tri izvora ugljika **saharozu, metanol i octenu kiselinu** u procesu denitrifikacije početne koncentracije  $3\text{g NO}_3^-/\text{L}$ . Kinetička ispitivanja su uslijedila nakon što su postignute konstantne vrijednosti dušikovitih spojeva i koncentracije biomase u reaktoru. Za sva tri izvora ugljika bilo je potrebno razdoblje od dva tjedna kako bi se postigla konstantna koncentracija nitrata u efluentu. Nakon tri dana uklonjeno je 67,4% ukupnog dušika korištenjem octene kiseline kao izvora ugljika, 53,9% korištenjem saharoze, dok je s metanolom uklonjeno 82,2% ukupnog dušika (Slike 6 i 7). Potpuno uklanjanje dušika primijećeno je kod metanola i octene kiseline kao izvora ugljika, dok kod saharoze nije došlo do potpunog uklanjanja dušika (70%). Razlog tome bi mogao biti što je u reaktoru s metanolom i octenom kiselinom pH tijekom pokusa bio u rasponu 8,0-8,2, dok je u reaktoru sa saharozom pH bio u rasponu 7,5-7,8.

Budući je pretvorba nitrita ograničavajući korak cjelokupnog puta denitrifikacije, za povećanje učinkovitosti uklanjanja dušika dodan je drugi reaktor koji je napajan efluentom iz prvog (De Filippis i sur., 2013), a što je rezultiralo vrlo visokim uklanjanjem dušika (Slika 6). Dva koraka denitrifikacijskog puta su podijeljena i odabrane su dvije specifične biomase,

svaka za svoj bioreaktor. Potpuno uklanjanje dušikovih spojeva zabilježeno je nakon tri tjedna rada dvostupnjevito sustava. Povećanjem koncentracije nitrata u reaktoru (Slika 7) saharoza nije osigurala provođenje potpune denitrifikacije u istraživanju provedenom pri početnoj koncentraciji nitrata od 5g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L (ravnoteža nikad nije postignuta) (De Fillips i sur., 2013).



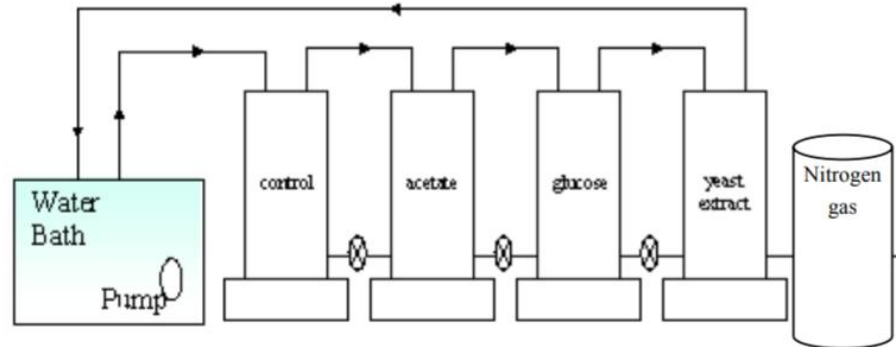
Slika 6. Učinkovitost uklanjanja dušika početne koncentracije 3g NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/L uz metanol, octenu kiselinu, i saharozu u jedno i dvostupnjevito procesu (preuzeto i prilagođeno iz De Filippis i sur.,2013)



Slika 7. Denitrifikacija uz saharozu kao izvor ugljika, pri 3 g NO<sub>3</sub>/L i 5 g NO<sub>3</sub>/L (preuzeto i prilagođeno iz De Filippis i sur., 2013)

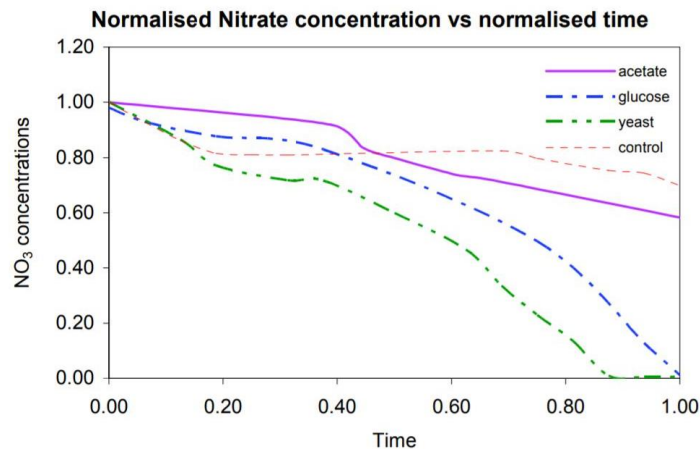
U istraživanju učinka **ekstrakta kvasca, glukoze i acetata** kao donora elektrona na brzinu denitrifikacije sirove kanalizacijske otpadne vode (Slika 8) pokusi su provedeni u uvjetima viška donora elektrona i viška akceptora elektrona. Pokusi su izvedeni na sedam različitih uzoraka otpadnih voda (Johari i Abdul-Talib, 2005), a rezultati daju smjernice za odabir prikladnog izvora ugljika u stvaranju i održavanju anoksičnosti uvjeti u kanalizacijskim mrežama - čime se suzbija nastajanje sumporovodika.

Da bi se postigao uvjet viška donora elektrona u zasebne reaktore su dodani acetat, glukoza i ekstrakt kvasca, dok je 6-8 mg  $\text{NO}_3\text{-N}$  dodan u sve reaktore kako bi se osigurao višak akceptora elektrona. Koncentracije nitrata/nitrita u otpadnoj vodi u reaktoru tijekom trajanja pokusa utvrđene ionskom kromatografijom. Brzine iskorištenja nitrita i nitrata uporabljene su kao mjera za određivanje brzine denitrifikacije.



Slika 8. Shematski prikaz provedbe pokusa u istraživanju učinka različitih donora elektrona na denitrifikaciju (preuzeto i prilagođeno iz Johari i Abdul-Talib,2005)

Varijacija koncentracije nitrata tijekom procesa denitrifikacije prikazane su slikom 9.



Slika 9. Koncentracija nitrata tijekom procesa denitrifikacije uz acetat, glukozu i ekstrakt kvasca (preuzeto i prilagođeno iz Johari i Abdul-Talib, 2005)

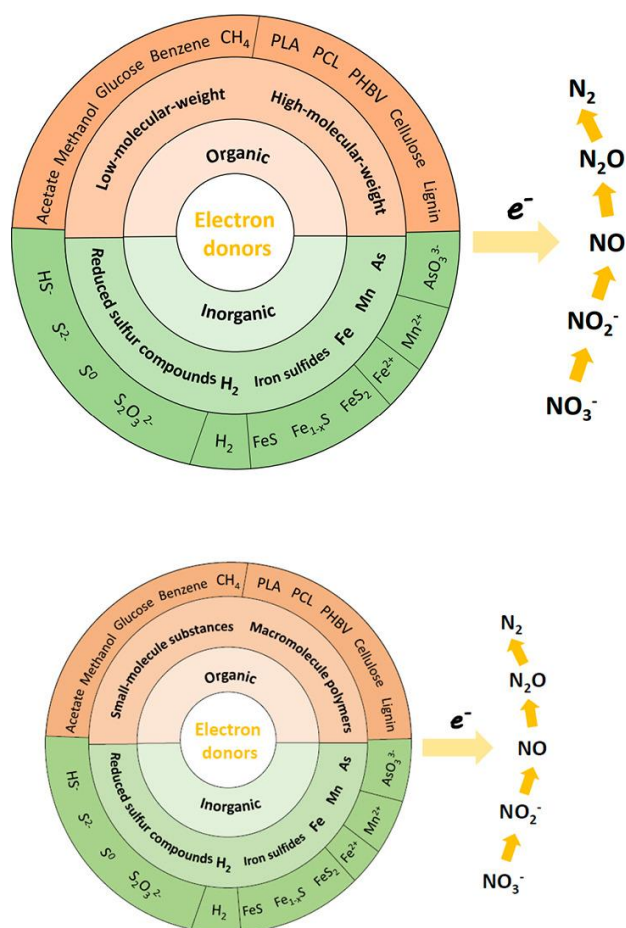
## 8. Autotrofna i heterotrofna denitrifikacija

U preglednom radu Pang i Wang (2021) su prikazali različite elektron donore za biološko uklanjanje nitrata. Ovisno o vrsti elektron donora denitrifikacija se može klasificirati kao: (i) heterotrofna koja koristi organske spojeve kao donore elektrona, uključujući nisko-molekularne organske spojeve (acetat, metanol, glukoza, benzen, metan i drugo), i visoko-molekularne organske spojeve (celuloza, polikaprolakton i drugo), i (ii) autotrofna denitrifikacija koja koristi anorganske spojeve kao donore elektrona, uključujući vodik ( $H_2$ ) reducirane sumporne spojeve (sulfide, elementarni sumpor i tiosulfat), ione željeza ( $Fe^{2+}$ ), željezove sulfide ( $FeS$ ,  $Fe_{1-x}S$  i  $FeS_2$ ), arsen ( $As(III)$ ) i mangan ( $Mn(II)$ ).

Smatra se da je biološka denitrifikacija najbolji izbor za uklanjanje nitrata uspoređujući s ostalim metodama poput fizikalno-kemijskih, budući da se nitrati pomoću bakterija mogu svesti na bezopasne dušikove plinove.

Nedostatak izvora ugljika u otpadnim vodama često uzrokuje nedovoljnu denitrifikaciju. Za otpadne vode s nedostatkom organskih tvari, potrebno je dodati vanjski izvor ugljika kako bi se povećala učinkovitost denitrifikacije (Wen i sur., 2003). Međutim, dodatak vanjskog organskog izvora ugljika povećava troškove procesa i složenost tehnoloških operacija.

Alternativa heterotrofnoj denitrifikaciji je autotrofna denitrifikacija gdje se koriste spojevi sumpora kao donori elektrona za uklanjanje dušikovih oksida. Autotrofna denitrifikacija se posebno primjenjuje za otpadne vode s nedostatkom organskih tvari te visokom koncentracijom nitrata.

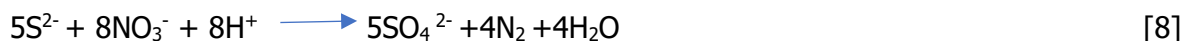
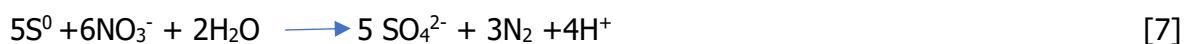


Slika 10. Različiti elektron donori za biološko uklanjanje nitrata (preuzeto i prilagođeno iz Pang i Wang, 2021)

Vanjski organski izvori ugljika poput metanola, etanola, glukoze, glicerola, octene kiseline koriste se u heterotrofnim denitrifikacijskim procesima za pročišćavanje vode. Učinkovitost heterotrofne denitrifikacije relativno je veća, međutim, većina istraživanja zanemaruje probleme brzog rasta bakterija koje izazivaju poteškoće u odlaganju mulja, prisutnost toksičnih ostataka i stvaranje nusproizvoda u tretiranoj vodi (Ghafari i sur., 2008).

S druge strane, autotrofna denitrifikacija izbjegava te nedostatke primjenom ugljičnog dioksida ili bikarbonata kao izvor ugljika, te koristeći sumpor, željezo ili vodik kao izvore elektrona za biosintezu. U usporedbi s heterotrofnom denitrifikacijom autotrofna denitrifikacija ima dvije prednosti, a to su uporaba anorganskih izvor ugljika, a ne izvora organskog ugljika i manja proizvodnja mulja nego kod procesa heterotrofne denitrifikacije. U nekim industrijama, primjerice naftnoj ili farmaceutskoj otpadna voda uz nitrata sadrži spojeve sa sumporom koji se koriste kao donori elektrona, stoga nije potrebno dodavati vanjske izvore sumpora.

Proces autotrofne denitrifikacije (Karanasios i sur., 2010) može se prikazati stehiometrijski pomoću jednadžbi [6-8]:



## 9. Zaključak

Hranjive tvari (dušik i fosfor) u vodenom mediju uzrokuju eutrofikaciju, smanjuju bioraznolikost, pa su postavljeni strogi zahtjevi za ispuštanje hranjivih tvari u okoliš. Ti strogi zahtjevi – ograničenja za ispuštanje dušika, za kakvoćom efluenta, zahtijevaju definiranje/ tumačenje izvedbe/dizajna procesa kao i uvjeta rada bioloških sustava za uklanjanje dušika. Najčešća se za postizanje zahtijevanih količina dušika i fosfora u okolišu primjenjuje biološko uklanjanje hranjivih tvari (BNR, engl. *Biological nutrient removal*). Za postizanje visoke učinkovitosti BNR procesa, primjena vanjskih izvora ugljika za proces denitrifikacije postaje potrebna kod sustava u kojima je otpadna voda slabo opterećena organskim sastojcima i/ili su vrlo stroge granice kakvoće za ispuštanje obrađenih otpadnih voda u okoliš.

Mikrobno uklanjanje nitrata ( $NO_3^-$ -N) se provodi asimilacijskim i disimilacijskim procesima. Dva su puta disimilacijske redukcije nitrata: (i) denitrifikacija – redukcija nitrata do plinovitog dušika, i (ii) disimilacijska redukcija nitrata u amonijak.

Na profil iskorištenja ugljika i redukciju nitrata utječu sastav mikrobne zajednice, vrsta organskog spoja – izvora C i omjer C/N. Da bi se proces denitrifikacije mogao provesti moraju biti prisutni akceptor elektrona, donor elektrona i biomasa. Mikroorganizmi koji se koriste za denitrifikaciju su fakultativni anaerobni heterotrofi, odnosno gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, najčešće iz rodova *Pseudomonas*, te *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Paracoccus*. Denitrifikacija je proces u kojem se dušikovi oksidi nastali procesom nitrifikacije (nitrati i nitriti) reduciraju u plinoviti dušik. Denitrifikacija se provodi pri anaerobnim ili anoksičnim uvjetima. Na denitrifikaciju utječu razni parametri kao što su temperatura, pH, koncentracija kisika, koncentracija nitrata te izvor i koncentracija ugljika. Za proces heterotrofne denitrifikacije neophodan je izvor ugljika. Potencijalni izvori ugljika svrstavaju se u skupine: čiste kemikalije (metanol, etanol, acetat, šećer, butanol), pročišćeni poljoprivredni ili industrijski nusproizvodi, sirovi industrijski/poljoprivredni nusproizvodi (kukuruzni sirup, melasa, otpad iz pivovara i ostali tehnološki otpad, proizvodi fermentacije mulja. Izbor izvora ugljika utječe na brzinu denitrifikacije, učinkovitost procesa, stvaranje mulja i mikrobni sastav biomase. Lako biorazgradivi izvori ugljika rezultiraju većom brzinom reakcije za razliku od teško razgradivih endogenih izvora ugljika.



## 10. Literatura

1. Albina P., Durban N., Bertron A., Albrecht A., Robinet J. C., Erable B. (2019) Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* **20**: 5163.
2. Badia A., Kim M., Dagneu M. (2021) Nitrite denitrification using biomass acclimatized with methanol as complementary carbon source: long-term performance and kinetics study. *Environmental Science: Water Research & Technology* **7**: 93-106.
3. Bernat K., Wojnowska-Baryła I. (2007) Carbon source in aerobic denitrification. *Biochemical Engineering Journal* **36**: 116–122.
4. Cappai G., Carucci A., Onnis A. (2004) Use of industrial wastewaters for the optimization and control of nitrogen removal processes. *Water Science and Technology* **50**(6): 17-24
5. Carlson H. K., Lui L. M., Price M. N., Kazakov A. E., Carr A. V., Kuehl J. V., Owens T. K., Nielsen T., Arkin A.P., Deutschbauer A. M. (2020) Selective carbon sources influence the end products of microbial nitrate respiration. *The ISME Journal* **14**: 2034 - 2045.
6. Cherchi C., Onnis-Hayden A., El-Shawabkeh I., Gu A. (2008) Implication of using different carbon sources for denitrification in wastewater treatments. *Water Environment Research* **81**: 788-799.
7. Christensen M.H., Harremoës P. (1977) Biological denitrification of sewage: a literature review. *Prog. Water Technology* **8**: 509-555.
8. Constantin H., Fick M. (1997), Influence of C-sources on the denitrification rate of a high-nitrate concentrated industrial wastewater. *Water Res.* **31**: 538–589.
9. Dawson R.N., Murphy K.L. (1972) The temperature dependency of biological denitrification, *Water Research* **6**: 71-83.
10. De Filippis P., Di Palma L., Scarsella M., Verdona N. (2013) Biological Denitrification of High-Nitrate Wastewaters: a Comparison Between Three Electron Donors. *Chemical Engineering Transactions* **32**: 319-324.
11. Fass S., Ganaye V., Manem J., Block J.C. (1994) Volatile fatty acids as organic carbon sources in denitrification. *Environmental Technology* **15**: 459-467.

12. Ganaye V., Fass S., Urbain V., Manem J., Block J.C. (1996). Biodegradation of volatile fatty acids by three species of nitrate-reducing bacteria. *Environmental Technology* **17**: 1145-1149.
13. Ghafari S., Hasan M., Aroua M.K. (2008) Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater – a review. *Bioresour Technology* **99**: 3965–3974.
14. Glass C., Silverstein J. (1998) Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH Effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research* **32**: 831–839.
15. Grgas D., Širac T., Prodan M., Brozinčević A., Landeka Dragičević T. (2017) Denitrifikacija: Učinak omjera C/N. 16th Ružička days („Today science – tomorrow industry“), Jukić A., Šubarić D. (ur.). Zagreb, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 277–288, Vukovar, 21–23.09.2016. ISSN broj zbornika 2459–9387.
16. Grgas D., Ugrina M., Toromanović M., Ibrahimpašić J., Štefanac T., Landeka Dragičević T. (2020) Fish canning wastewater treatment in sequencing batch reactor with activated sludge. *Holistic Approach to Environment* **10** :29-34.
17. Guo L., Guo Y., Sun M., Gao M., Zhao Y., She Z. (2018) Enhancing denitrification with waste sludge carbon source: the substrate metabolism process and mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* **25**:13079–13092.
18. He T., Ye Q., Sun Q., Cai X., Ni J., Li Z., Xie D. (2018) Removal of nitrate in simulated water at low temperature by a novel psychrotrophic and aerobic bacterium, *Pseudomonas taiwanensis* strain J. *Bio-Med Research International* **2018**: 1–9.
19. Henze M. (1991) Capabilities of biological nitrogen removal processes from wastewater. *Water Science and Technology* **23**: 669-679.
20. Her J. J., Huang J. S. (1995) Influences of carbon source and C/N ratio on nitrate/nitrite denitrification and carbon breakthrough. *Bioresource Technology*, **54**: 45-51.
21. Hernandez D., Rowe J. J. (1988) Oxygen inhibition of nitrate uptake is a general regulatory mechanism in nitrate respiration. *Journal of Biological Chemistry* **263**: 7937–7939.
22. Horová D., Bezucha P., Růžičková I.(2020)- Effect of carbon source and nitrate concentration on denitrification of high-nitrate wastewater, *Environment Protection Engineering* **46**: 73-89
23. Hu B., Wang T.,Ye J., Zhao J., Yang L., Wu P., Duan J., Ye G., (2019) Effects of carbon sources and operation modes on the performances of aerobic denitrification

- process and its microbial community shifts. *Journal of Environmental Management* **239**: 299-305.
24. Huang H. K., Tseng S. K. (2001) Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**: 90–94.
  25. Johari N.S., Abdul-Talib, S. (2005) The effect of different electron donor on denitrification rate of municipal wastewater. *Jurnal Sains dan Teknologi*
  26. Karanasios K.A., Vasiliadou I.A., Pavlou S., Vayenas D.V. (2010) Hydrogenotrophic denitrification of potable water: a review. *Journal of Hazardous Materials* **180**:20–37.
  27. Kumar M., Lin J-G. (2010) Co-existence of anammox and denitrification for simultaneous nitrogen and carbon removal – Strategies and issues, *Journal of Hazardous Materials* **178**: 1-9.
  28. Lee Y.Y., Choi H., Cho K.S. (2018) Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N<sub>2</sub>O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification, *Journal of Environmental Science and Health*, **54**(1) 16-29.
  29. Li S. S., Peng C. R., Cheng T. S., Wang C. H., Guo L. L., Li D. H. (2019) Nitrogen-cycling microbial community functional potential and enzyme activities in cultured biofilms with response to inorganic nitrogen availability. *Journal of Environmental Sciences* **76**: 89–99.
  30. Metcalf & Eddy Inc. (2003) Tchobanoglous G., Burton F. L., Stensel H. D. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4.izd. McGraw-Hill, str.1-24.
  31. Mokhayeri Y., Riffat R., Takacs I., Dold P., Bott C., Hinojosa J., (2008) Characterizing denitrification kinetics at cold temperature using various carbon sources in lab-scale sequencing batch reactors. *Water Sci Technol* **58**: 233–8.
  32. Monteith H. D., Bridle T.R., Suthon P.M. (1980) Industrial waste carbon sources for biological denitrification. *Progress in Water Technology*, **12**(6): 127-141.
  33. Naik S., Setty Y.P. (2011) Effect of Carbon Sources on Biological Denitrification of Wastewater by Immobilized *Pseudomonas Stutzeri* Bacteria in a Fluidized Bed Bioreactor (FBBR), 2nd International Conference on Chemical Engineering and Applications IPCBEE **23**:114-118.
  34. Naik S., Setty, Y.P. (2012) Biological denitrification of wastewater-A Mini Review on Carbon Source, International Conference on Chemical, Environmental Science and Engineering ICEEBS **2012**:47-51.
- Narodne Novine **26** (NN 26/2020).

35. Obaja D., Mace S., Mata-Alvarez, J. (2005) Biological nutrient removal by a sequencing batch reactor (SBR) using an internal organic carbon source in digested piggery wastewater. *Bioresourch Technology* **96**: 7–14.
36. Onnis-Hayden A., Gu A. Z. (2008) Comparisons of Organic Sources for Denitrification: Biodegradability, Denitrification Rates, Kinetic Constants and Practical Implication for Their Application in WWPTS. *Water Environment Federation* **17**: 253-273.
37. Pang Y., Wang J. (2021) Various electron donors for biological nitrate removal: A review. *Science of The Total Tnvironment* **794**: 148699
38. Petri R. (2000) Diversität Nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee und Untersuchungen zur Phylogenie der Respiratorischen Nitratreduktase. Ph.D. Thesis, University Kiel, Kiel, Germany, str. 148.
39. Prasetyo R. A., Pertiwinigrum A., Erwanto Y., Yusiati L. M., Fitriyanto N. A. (2018) Characterization of *Pseudomonas* sp. LS3K as nitrate removal agent at different C/N ratios under aerobic condition. U: *Proceeding of the 2nd International Conference on Tropical Agriculture*, Springer. str.185–194.
40. Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2020)
41. Raboni M., Torretta V., Viotti P., Urbini G. (2014) Pilot experimentation with complete mixing anoxic reactors to improve sewage denitrification in treatment plants in small communities. *Sustainability* **6**: 112–122
42. Rajta A., Bhatia R., Setia H., Pathania P. (2019) Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. *Journal of Applied Microbiology* **128**: 1261–1278.
43. Ribera-Guardia A., Kassotaki E., Gutierrez O., Pijuan M. (2014) Effect of carbon source and competition for electrons on nitrous oxide reduction in a mixed denitrifying microbial community. *Process Biochemistry* **49**(12): 2228-2234.
44. Saleh-Lakha S., Shannon K.E., Henderson S.L., Goyer C., Trevors J.T., Zebarth B.J., Burton, D.L. (2009) Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelli*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 3903-3911.
45. Seitzinger, S.P. (1988) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: Ecological and geochemical significance, *Limnol. Oceanogr.* **33**: 702-724.
46. Shapleigh J. P. (2006) The Denitrifying Prokaryotes. In *The Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*, 2.izd., Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, str. 769–792.

47. Sheng S. Liu B. , Hou X., Liang Z., Sun X., Du L., Wang D. (2018) Effects of different carbon sources and C/N ratios on the simultaneous anammox and denitrification process. *International Biodeterioration & Biodegradation* **127**: 26-34.
48. Skrinde J., Bhagat R., Surinder K. (1982) Industrial wastes as carbon sources in biological denitrification. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **54**(4), 370-377.
49. Soto O., Aspé E., Roeckel M. (2007) Kinetics of cross-inhibited denitrification of a high load wastewater. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 1627–1634
50. Szekeres S., Kiss I., Kalman M., Soares M. I. M. (2002) Microbial population in a hydrogen-dependent denitrification reactor. *Water Research* **36** 4088–4094
51. Štefanac T., Grgas D., Landeka Dragičević T. (2021) Metode obrade otpadne vode mesne industrije. *Meso* **1**: 54-66.
52. Thomsen J. K., Geest T., Cox R. P. (1994) Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 536–541.
53. van Rijn J., Tal Y., Barak Y. (1996) Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2615–2620.
54. van Spanning R. J. M., Richardson D. J., Ferguson S. J. (2007) Chapter 1 - Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. Editor(s): Bothe H., Ferguson S. J., Newton W. E. *Biology of the nitrogen cycle*, 1.izd. Elsevier, str. 3–20.
55. Wen J., Pan L., Du L., Mao G. (2003)-The denitrification treatment of low C/N ratio nitrate-nitrogen wastewater in a gas–liquid–solid fluidized bed bioreactor. *Reviews in Chemical Engineering* **94**(2):155–159
56. Xu Z., Dai X., Chai X. (2018) Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes. *Science of the Total Environment* **634**:195-204.
57. Yao R., Yuan Q., Wang K. (2020) Enrichment of denitrifying bacterial community using nitrite as an electron acceptor for nitrogen removal from wastewater. *Water* **12**: 1-48.
58. Zhang N., Chen H., Lyu Y., Wang Y. (2019) Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **94**: 1165–1175.

59. Zhang X., Zhang J. (2018) Effect of dissolved oxygen on biological denitrification using biodegradable plastic as the carbon source. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science **121**: 032015
60. Zhou Y., Pijuan M., Zeng R. J., Yuan Z. (2008) Free nitrous acid inhibition on nitrous oxide reduction by a denitrifying-enhanced biological phosphorus removal sludge. Environmental Science & Technology **42**: 8260–8265

## 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.

Anamaria Smetiško

Ime i prezime studenta