

# Denitrifikacija sintetske otpadne vode s visokom koncentracijom nitrata

---

**Ugrina, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:159:217813>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Marina Ugrina

**DENITRIFIKACIJA SINTETSKE  
OTPADNE VODE S VISOKOM  
KONCENTRACIJOM NITRATA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Dijane Grgas.

ZAHVALA

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Dijani Grgas na pruženom vodstvu te izdvojenom vremenu, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala mag. ing. Tei Štefanac na pomoći i ugodno provedenom vremenu u laboratoriju te prof. dr. sc. Tibli Landeka Dragičević na savjetima i prenesenom znanju.*

*Zahvaljujem se svim svojim prijateljima i kolegicama koje su bile vjerna podrška tokom izrade ovog diplomskog rada.*

*I na kraju mojoj obitelji, najčvršćem osloncu i najsigurnijoj luci. Hvala vam na beskonačnoj količini podrške i ljubavi.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

## DENITRIFIKACIJA SINTETSKE OTPADNE VODE S VISOKOM KONCENTRACIJOM NITRATA

*Marina Ugrina, univ. bacc. ing. biotechn.  
005821015*

**Sažetak:** U ovom radu istražena je denitrifikacija sintetske otpadne vode s visokom koncentracijom nitrata  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjerima C/N 1, 2 i 3 uz natrijev acetat kao izvor ugljika. Omjeri C/N 1 i 2 nisu bili dovoljni za potpunu denitrifikaciju, pri čemu je postignuto 26,2 % i 78,7 % smanjenje koncentracije  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Također, pri omjerima C/N 1 i 2, nakon utroška acetata, s unutarstaničnim rezervama je postignuta sveukupno 40,9 % i 91,2 % redukcija nitrata. Pri omjeru C/N 3 ostvareno je 99,2 % smanjenje koncentracije nitrata. Ostvarene brzine denitrifikacije su iznosile 33 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ , 32,7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  i 33,6 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  pri omjerima C/N 1, 2 i 3, a pri omjerima C/N 1 i 2 brzine denitrifikacije s unutastaničnim zalihama su iznosile 6,7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  i 20,7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ . Nitrit, iako se nakupljao pri sva tri omjera, nije se pokazao kao limitirajući faktor jer su mikroorganizmi aktivnog mulja bili aklimatizirani na visoke koncentracije nitrata.

**Ključne riječi:** *denitrifikacija, visoka koncentracija nitrata, C/N omjer, otpadna voda, izvor ugljika*

**Rad sadrži:** 44 stranice, 12 slika, 62 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc. dr. sc. Dijana Grgas

**Pomoć pri izradi:**

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Dijana Grgas (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Davor Valinger (član)
4. doc. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (zamjenski član)

**Datum obrane:** 21. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for the Biological Waste Water Treatment**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### DENITRIFICATION OF SYNTHETIC WASTEWATER WITH HIGH NITRATE CONCENTRATION

*Marina Ugrina, univ. bacc. ing. biotechn.*  
*005821015*

**Abstract:** In this paper the denitrification of synthetic wastewater with high nitrate concentration of  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  at C/N ratios of 1, 2 and 3 with sodium acetate as a carbon source was investigated. C/N ratios 1 and 2 were not sufficient for complete denitrification, whereby 26.2 % and 78.7 % reduction in  $\text{NO}_3\text{-N}$  concentration was achieved. Also, at C/N ratios 1 and 2, after acetate consumption, a total of 40.9 % and 91.2 % nitrate reduction was achieved with intracellular reserves. At the C/N ratio of 3, a 99.2 % reduction in nitrate concentration was achieved. The achieved denitrification rates were 33 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ , 32.7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  and 33.6 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  at C/N ratios 1, 2 and 3, and at C/N ratios 1 and 2 denitrification rates with intracellular reserves were 6.7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  and 20.7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ . Although nitrite accumulated at all three ratios, it did not prove to be a limiting factor because the microorganisms in the activated sludge were acclimatized to high concentrations of nitrite.

**Keywords:** *denitrification, high nitrate concentration, C/N ratio, wastewater, carbon source*

**Thesis contains:** 44 pages, 12 figures, 62 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Dijana Grgas PhD, Assistant professor

**Technical support and assistance:**

#### **Reviewers:**

1. Tibela Landeka Dragičević, PhD, Full professor (president)
2. Dijana Grgas, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Davor Valinger, PhD, Associate professor (member)
4. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** September 21<sup>st</sup>, 2022

## Sadržaj

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. CIKLUS KRUŽENJA DUŠIKA U PRIRODI.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. BIOLOŠKA DENITRIFIKACIJA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. KINETIKA PROCESA DENITRIFIKACIJE.....</b>	<b>6</b>
<b>2.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PROCES DENITRIFIKACIJE .....</b>	<b>8</b>
2.4.1. Egzogeni izvori ugljika .....	9
2.4.2. Egzogeni izvori ugljika u tekućoj fazi .....	9
2.4.3. Egzogeni izvori ugljika u čvrstoj fazi .....	11
2.4.4. KPK/N omjer.....	12
2.4.5. Vrijednost pH.....	13
2.4.6. Temperatura.....	13
2.4.7. Koncentracija otopljenog kisika (DO).....	14
2.4.8. Hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT) .....	14
2.4.9. Denitrificirajući mikroorganizmi.....	14
<b>2.5. NAKUPLJANJE N-OKSID INTERMEDIJERA U PROCESU DENITRIFIKACIJE .....</b>	<b>16</b>
<b>2.6. ZAKONSKA REGULATIVA.....</b>	<b>17</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. SINTETSKA OTPADNA VODA I MIKROBNA KULTURA AKTIVNOG MULJA .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. POSTAVKE REAKTORA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3. ANALITIČKE METODE .....</b>	<b>19</b>
3.3.1. Određivanje MLSS .....	19



3.3.2. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK) .....	20
3.3.3. Određivanje koncentracije nitrata (NO <sub>3</sub> -N) .....	21
3.3.4. Određivanje koncentracije nitrita (NO <sub>2</sub> -N) .....	21
3.3.5. Određivanje temperature.....	22
3.3.6. Određivanje koncentracije otopljenog kisika.....	22
3.3.7. Određivanje vrijednosti pH .....	22
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>23</b>
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>38</b>

# 1. UVOD

Ubrzani razvoj urbanizacije doveo je do značajnog povećanja količine otpadne vode koju je potrebno obraditi na odgovarajući način prije ispuštanja u sustave javne odvodnje ili u površinske vode, a s tim je porastao i broj uređaja za obradu otpadne vode diljem svijeta (Chen i sur., 2021b). Moderni uređaji za obradu otpadnih voda su dizajnirani za uklanjanje dušikovih i fosfornih spojeva, nutrijenata, iz komunalnih te industrijskih otpadnih voda (Hoshino i sur., 2005).

Fizikalne i kemijske metode obrade otpadne vode kao što su ionska izmjena, membranska filtracija i elektrodijaliza učinkovito uklanjaju dušikove spojeve iz otpadne vode, ali su skupe te rezultiraju nakupljanjem sekundarnog onečišćenja koje zahtjeva dodatnu obradu i zbrinjavanje. S druge strane, biološka denitrifikacija se pokazala kao ekonomski isplativa i ekološki prihvatljiva metoda uklanjanja dušikovih spojeva u otpadnoj vodi, uz vanjski izvor ugljika (Du i sur., 2019; Kapoor i Viraraghavan, 1997).

Danas su u primjeni tehnologije biološkog uklanjanja dušika na otpadne vode podrijetlom iz raznih industrija koje karakterizira vrlo raznolik kemijski sastav. Biološka denitrifikacija se pokazala kao uspješna metoda za uklanjanje nitrata u otpadnim vodama iz rafinerije metala kao što su čelik i željezo, proizvodnje nuklearne energije, metalurgije, kemijske industrije primjerice proizvodnje celofana, proizvodnje eksploziva i slično (Chen i sur., 2021b; Du i sur., 2019; Osaka i sur., 2008) pri čemu koncentracije nitrata u nekim slučajevima dosežu i do 1000 mg N/L (Lu i sur., 2014). Povišena koncentracija nitratnih spojeva u otpadnoj vodi nastaje također kao posljedica povećane uporabe pesticida i gnojiva u poljoprivredi (Wang i Chu, 2016). Komunalna otpadna voda pretežito sadrži između 0 i 40 mg N/L u obliku amonijaka ili organskog dušika (Lu i sur., 2014).

Otpuštanje otpadnih voda koje sadrže visoke koncentracije nitrata bez adekvatne obrade uzrokuje zabrinjavajuće povećanje koncentracije nitrata u podzemnim vodama i izvorima pitke vode što predstavlja ekološki, ali ujedno i zdravstveni rizik za ljude i životinje (Du i sur., 2019). Prekomjerna koncentracija nitrata u vodi uzrokuje eutrofikaciju vodenih tijela te smanjenje koncentracije otopljenog kisika što narušava bioraznolikost vodenog ekološkog sustava. Nitrat je identificiran kao jedan od opasnijih kontaminanta u pitkoj vodi zato što se u ljudskoj slini reducira u nitrit koji može stvarati kancerogene spojeve nitrozamine i nitrozamide. Također, nitriti u reakciji s hemoglobinom iz krvi stvaraju methemoglobine te krv gubi kapacitet za transport kisika što dovodi do methemoglobinemije, trovanja, a može imati i po život opasne posljedice (Chen i sur., 2021a).

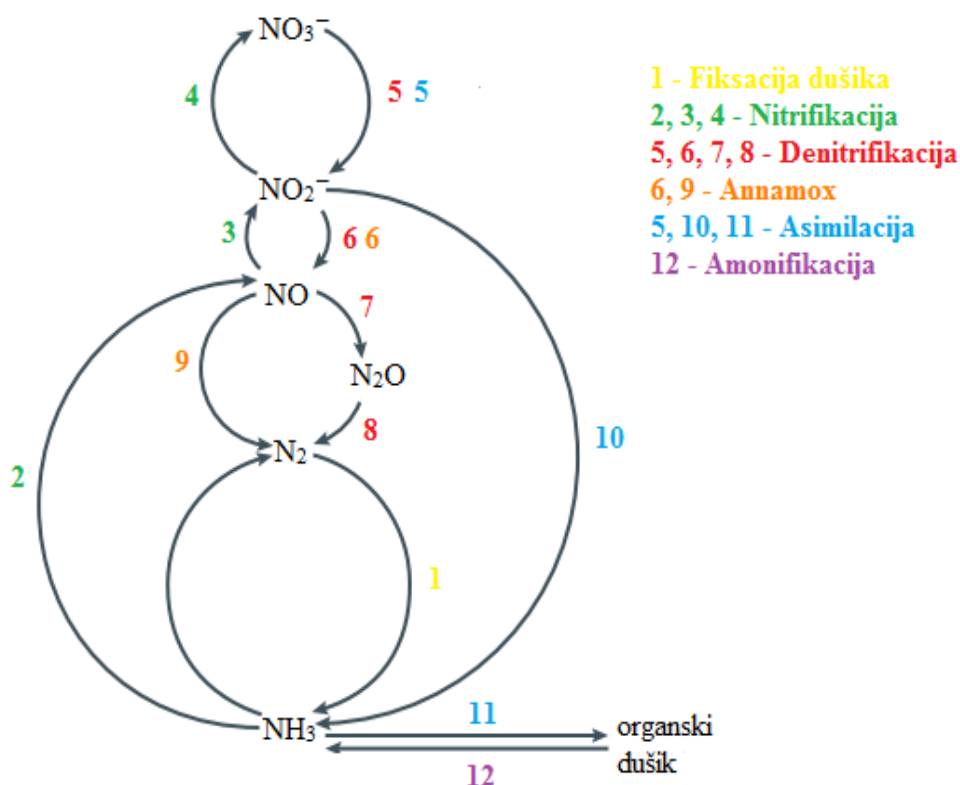
Upravo zbog opasnosti koju predstavljaju dušikovi spojevi, znanstvena zajednica na globalnoj razini aktivno radi na istraživanju i razvoju modernih sustava za uklanjanje dušika za primjenu u industriji (Kim i sur., 2017).

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti učinkovitost denitrifikacije sintetske otpadne vode s visokom koncentracijom nitrata ( $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ) pri C/N omjerima 1, 2 i 3 u laboratorijskom mjerilu uz acetat kao vanjski, lako razgradivi izvor ugljika.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. CIKLUS KRUŽENJA DUŠIKA U PRIRODI

Dušik (N), kao jedan od najvažnijih biogenih elemenata, neophodan je za sintezu ključnih staničnih građevnih jedinica. Atmosferski dvovalentni dušik ( $N_2$ ) predstavlja najveću rezervu dušika u biosferi, dok je nitrat ( $NO_3^-$ ) važan oblik dušičnih minerala (Wang i sur., 2021). Dušik u prirodi prolazi kroz šest glavnih reakcijskih pretvorbi unutar biogeokemijskog ciklusa kruženja dušika kako je prikazano na slici 1 (Kuypers i sur., 2018).



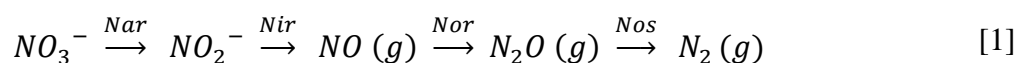
**Slika 1.** Biogeokemijski ciklus kruženja dušika (prema Kuypers i sur., 2018)

Prema Kuypers i sur. (2018) šest glavnih procesa su: (i) fiksacija dušika ( $N_2 \rightarrow NH_3$ ), (ii) nitrifikacija ( $NH_3 \rightarrow NO \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ ), (iii) denitrifikacija ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ ), (iv) anaerobna oksidacija amonijaka (Annamox engl. *Anaerobic Ammonium Oxidation*) ( $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2$ ), (v) asimilacija ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_3 \rightarrow$  organski dušik) i (vi) amonifikacija (organski dušik  $\rightarrow NH_3$ ). Važno je napomenuti da proces disimilacijske redukcije nitrata u amonijak (DNRA engl. *Dissimilatory Reduction to Ammonium*) ne ulazi u glavni ciklus kruženja dušika zato što je znatno manje zastupljen proces u usporedbi s ostalih šest navedenih

procesa (Kuypers i sur., 2018). Nizom biokemijskih reakcija dolazi do mijenjanja valencija i reaktivnosti dušika koji se na taj način transformira između organskih i anorganskih stanja te prelazi u oblike koje većina organizama može metabolizirati (Johnson i sur., 2010). Nitrifikacija i denitrifikacija su dvije glavne redoks reakcije unutar ciklusa kruženja dušika te one održavaju ravnotežu dušikovih spojeva u prirodi (Adouani i sur., 2015).

## 2.2. BIOLOŠKA DENITRIFIKACIJA

Biološka denitrifikacija je heterotrofan proces anoksične mikrobne respiracije u kojem dolazi do redukcije nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) preko nitrita ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ), dušikovog monoksida ( $\text{NO}$ ) i didušikovog oksida ( $\text{N}_2\text{O}$ ) do molekularnog dušika ( $\text{N}_2$ ) pri čemu organski ugljik služi kao donor elektrona koji se oksidira. Reakcije koje čine proces denitrifikacije provodi skupina heterotrofnih denitrificirajućih bakterija pomoću četiri mikrobne reduktaze (jednadžba 1): nitrat reduktaza (Nar, engl. *Nitrate reductase*), nitrit reduktaza (Nir, engl. *Nitrite reductase*), dušikov monoksid reduktaza (Nor, engl. *Nitrit oxide reductase*) i didušikov oksid reduktaza (Nos, engl. *Nitrous oxide reductase*) (Metcalf & Eddy, 2003; Zumft, 1997).



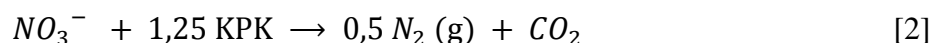
Denitrificirajuće bakterije se klasificiraju kao fakultativni anaerobi (Carrera i sur., 2003) koji umjesto kisika koriste nitrat kao akceptor elektrona pri čemu dolazi do elektrokemijskog gradijenta na citoplazmatskoj membrani (slika 2). Bakterijska stanica raspolaže elektronima pomoću niza oksidoreduktaza koje koriste različite N–okside te njihovo usklađeno djelovanje rezultira uzastopnim transformacijama nitrata u  $\text{N}_2$  (Zumft, 1997). Elektroni se tijekom procesa denitrifikacije prenose od donora elektrona, koji je najčešće organski supstrat, do akceptora elektrona odnosno nitrata. Teoretski gledano bilo koji organski spoj, kojeg mikroorganizmi mogu razgraditi u aerobnim uvjetima, može se koristiti kao donor elektrona u procesu denitrifikacije. Međutim, ovisno o vrsti odabranog organskog spoja mijenjat će se brzina denitrifikacije (Carrera i sur., 2003). Brzina denitrifikacije (brzina uklanjanja nitrata) se računa kao razlika između koncentracije nitrata u influentu (ulazni tok) i efluentu (izlazni tok) podijeljena sa hidrauličkim vremenom zadržavanja (HRT, engl. *Hydraulic Retention Time*) (Wang i Chu, 2016). Redoks reakcije respiracije nitrata zajedno s reakcijama respiratornog lanca (slika 2) stvaraju gradijent protona kroz bakterijsku staničnu membranu što u konačnici rezultira konvertiranjem energije u molekule adenozin trifosfata (ATP) zahvaljujući djelovanju



### 2.3. KINETIKA PROCESA DENITRIFIKACIJE

Matematičko modeliranje te određivanje kinetike primjenjuje se za procjenu djelovanja sustava za pročišćavanje otpadne vode pri čemu je fokus prvenstveno stavljen na predviđanje uklanjanja nitrata odnosno proces denitrifikacije (Pan i sur., 2015).

Prema Brian i sur. (2009) biološka denitrifikacija može se opisati reakcijom (jednadžba 2):



gdje KPK (kemijska potrošnja kisika) predstavlja organske sastojke.

Na temelju bilance mase može se zaključiti da je stehiometrijski gledano potrebno 2,68 kg KPK za konverziju 1 kg nitrata u plinoviti dušik (Adouani i sur., 2015). Matematički model Monodove kinetike koja opisuje supstrat limitirani rast koristi se za opisivanje rasta biomase na izvoru nitrata. Prema istraživanju Foglar i Briški (2003) koncentracija nitrata o vremenu i modelu Monodove kinetike je pokazala visok stupanj linearne ovisnosti ( $R^2 > 0,99$ ) što potvrđuje da se denitrifikacijski proces može dobro opisati koristeći Monodovu jednadžbu (jednadžba 3):

$$r_{v,Xb} = \mu_{max} \times \frac{S}{(K_S + S)} \times X_{bh} \quad [3]$$

gdje je  $r_{v,Xb}$  volumetrijska brzina rasta biomase ( $\text{g/m}^3/\text{dan}$ ),  $\mu_{max}$  maksimalna specifična brzina rasta denitrificirajuće biomase ( $1/\text{dan}$ ),  $S$  koncentracija supstrata (nitrat) ( $\text{mg N/L}$ ), a  $K_S$  konstanta zasićenja suspratom ( $\text{mg N/L}$ ).

Monodova jednadžba [3] opisuje brzinu rasta biomase ( $X_{bh}$ ), ali u slučaju obrade otpadne vode koriste se brzina trošenja organskog ugljika i utrošak kisika ili trošenje nitrata kako bi se procijenila kvaliteta efluenta. Kako bi se definirao odnos brzine rasta biomase i trošenja supstrata, prinos biomase ( $Y_h$ ) se uvrštava u Monodovu jednadžbu [3] te se dobije izraz [4] (Brian i sur., 2009). Teoretski gledano, u anoksičnim uvjetima uz zadovoljavajuću dostupnost izvora ugljika, količina elektrona potrebnih za redukciju nitrata u plinoviti dušik jednaka je količini elektrona dobivenih od izvora ugljika kao donora elektrona. Međutim, u praksi često osim denitrificirajućih mikroorganizama izvor ugljika koriste i drugi sojevi prisutni u mješovitoj mikrobnoj kulturi što rezultira smanjenjem KPK i opisuje se kao prinos biomase (Zhang i sur., 2016).

$$r_{v,COD} = \frac{\mu_{max}}{Yh} \times \frac{S}{(K_S + S)} \times X_{bh} \quad [4]$$

Tijekom heterotrofnog rasta ugljik se istovremeno koristi kao izvor energije te za rast novih stanica. Vezu između tih dviju funkcija predstavlja razlika između ukupno dostupnog supstrata i količine koja je potrošena na rast. Zbog toga se brzina korištenja nitrata može izraziti preko jednadžbe [5] (Brian i sur., 2009).

$$r_{v,N} = \frac{(1 - Yh)}{2.86} \times \frac{\mu_{max}}{Yh} \times \frac{S}{(K_S + S)} \times X_{bh} \quad [5]$$

Međutim, u slučaju kada je koncentracija nitrata ( $S$ ) puno veća od  $K_S$  tada je potrošnja nitrata definirana kao reakcija nultog reda (Brian i sur., 2009) s obzirom na početnu koncentraciju biomase (jednadžba 6) kako je definirano i u istraživanju Rossi i sur. (2015).

$$r_{v,N} = \frac{(1 - Yh)}{2.86} \times \frac{\mu_{max}}{Yh} \times X_{bh} \quad [6]$$

Promjena koncentracije biomase ( $X_{bh}$ ) rezultat je rasta i odumiranja biomase (Brian i sur., 2009) (jednadžba 7):

$$\frac{dX_{bh}}{dt} = \mu_{max}X_{bh} - bX_{bh} \quad [7]$$

Nakon preuređenja i integracije (od vremena 0 do vremena  $t$ ) jednadžbe [7] dobije se oblik (jednadžba 8) (Brian i sur., 2009):

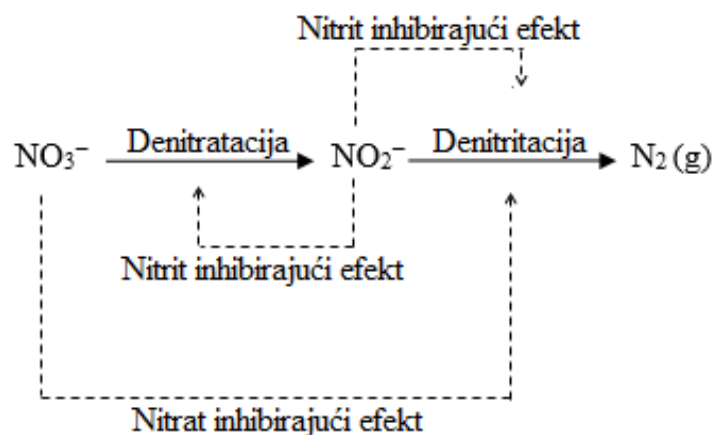
$$X_{bh,t} = X_{bh,0}e^{(\mu-b)t} \quad [8]$$

Uvrštavanjem [8] u [6] dobije se konačni oblik jednadžbe [9] koji definira promjenu koncentracije nitrata u vremenu (Brian i sur., 2009).

$$\frac{dS_N}{dt} = \frac{(1 - Yh)}{2.86} \times \frac{\mu_{max}}{Yh} \times X_{bh,0}e^{(\mu-b)t} \quad [9]$$



Denitrifikacija uključuje dva biološka procesa, a to su denitratacija (redukcija nitrata do nitrita) i denitritacija (redukcija nitrita do plinovitog dušika). U literaturi se redukcija nitrata obično opisuje modelom Monodove kinetike što znači da supstrat djeluje limitirajuće na reakciju, a ne inhibirajuće, dok se redukcija nitrita opisuje modelom Haldane kinetike gdje supstrat djeluje inhibirajuće kako je prikazano na slici 3. Većina kinetičkih modela empirijske su prirode te opisuju modele enzimske inhibicije. Glavni cilj ovakvih modela je korigirati brzinu potrošnje supstrata faktorom koji je definiran koncentracijom inhibitora. Kako bi se učinkovito definirali operacijski uvjeti i sam dizajn denitrifikacijskog sustava za obradu otpadne vode bitno je precizno procijeniti inhibitorne interakcije između spojeva (Soto i sur., 2007).



**Slika 3.** Denitrifikacijski proces s inhibicijom denitritacije i denitratacije (prema Soto i sur., 2007)

## 2.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PROCES DENITRIFIKACIJE

Biološka denitrifikacija otpadne vode s velikom količinom dušikovih spojeva zahtjevan je i spor proces. Kako bi se povećala brzina denitrifikacije potrebno je optimirati procesne čimbenike koji su prema Chen i sur. (2021a) te Fernández-Nava i sur. (2010) :

- koncentracija supstrata u influentu: izvor ugljika, KPK/N omjer, koncentracija nitrata
- okolišni čimbenici: vrijednost pH, temperatura, koncentracija otopljenog kisika (DO, engl. *dissolved oxygen*), hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT);
- mikroba populacija
- vrsta bioreaktorskog sustava.

#### 2.4.1. Egzogeni izvori ugljika

Za učinkovito odvijanje redukcije nitrata u procesu biološke denitrifikacije nužno je prisustvo organskih sastojaka koji služe kao donori elektrona.

Prema Lu i sur. (2014) te Cherchi i sur. (2009) izvore ugljika dijelimo na :

- biorazgradive organske spojeve izražene kao KPK otpadne vode
- unutarstanične rezerve ugljika tj. KPK dobiven endogenom respiracijom
- vanjski dodani odnosno egzogeni izvor ugljika.

Prema Wang i sur. (2021) egzogeni izvori ugljika dijele se na izvore ugljika u tekućoj i čvrstoj fazi. Karakteristike dodanog izvora ugljika izravno su povezane s parametrima učinkovitosti denitrifikacije kao što su brzina denitrifikacije te sastav i prinos biomase. Prilikom odabira dodatnog izvora ugljika bitno je uzeti u obzir cijenu, brzinu denitrifikacije, proizvodnju aktivnog mulja, kinetiku procesa, stupanj iskorištenja, sigurnost prilikom korištenja i skladištenja, sadržaj toksičnih spojeva te potencijal za potpunu denitrifikaciju bez potrebe adaptacije mikroflore (Fernández-Nava i sur., 2010; Lee i Welander, 1996).

#### 2.4.2. Egzogeni izvori ugljika u tekućoj fazi

Prema Wang i sur. (2021) dodatni izvori ugljika koji se nalaze u tekućoj fazi dijele se na:

- komercijalne izvore ugljika kao što su metanol, etanol, octena kiselina, acetat i glukoza
- tekuće nusproizvode fermentacije supstrata bogatih izvorom ugljika.

Korištenje komercijalnih izvora ugljika kao heterotrofnog donora elektrona za proces denitrifikacije se dugi niz godina primjenjuje u sustavima za obradu otpadnih voda. To su male molekule jednostavne kemijske strukture što ih čini pogodnim za korištenje denitrificirajućim mikroorganizama. Prirodno agregatno stanje komercijalnih izvora ugljika pridonosi bržoj denitrifikaciji i kraćoj *lag* fazi mikroorganizama s obzirom da tekuće stanje omogućava veću kontaktnu površinu i kraće vrijeme kontakta između izvora ugljika i onečišćenja u otpadnoj vodi. Međutim, korištenje dodatnog izvora ugljika u tekućoj fazi zahtjeva precizno doziranje i nadzor procesa s obzirom da nedovoljna količina rezultira nepotpunom denitrifikacijom, a prevelika količina uzrokuje prisutnost organskih sastojaka u obrađenoj vodi i zahtjeva dodatne stupnjeve obrade otpadne vode zbog uklanjanja organskih sastojaka. Također, potrebno je prisustvo sojeva mikroorganizama koji imaju sposobnost korištenja komercijalnih izvora ugljika (Wang i sur., 2021).

U laboratorijskim i industrijskim postrojenjima za obradu otpadne vode koriste se jako velike količine komercijalnih izvora ugljika. S obzirom da dodatak izvora ugljika zajedno s upravljanjem otpadom čini 50 % ukupnih troškova obrade otpadne vode denitrifikacijom, jako je bitno pronaći ekonomski isplativ izvor ugljika (Fernández-Nava i sur., 2010). Metanol je najkorišteniji dodatni izvor ugljika upravo zbog niske cijene koja iznosi 0,33 \$/kg. Iza njega slijedi etanol s cijenom od 0,84 \$/kg i acetat s cijenom od 1,03 \$/kg (Sun i sur., 2010). Osim niske cijene, visoka učinkovitost denitrifikacije (definirano relativno niskim omjerom metanola kao donora elektrona i nitrata kao akceptora elektrona) te široka zastupljenost na tržištu čine metanol najčešće korištenim donorom elektrona u procesu biološke denitrifikacije (Cherchi i sur., 2009; Foglar i Briški, 2003). Glavni nedostaci metanola su toksičnost i reaktivnost zbog kojih mogu nastati sigurnosni problemi tijekom rukovanja, transporta i skladištenja. Procjenjuje se da je potrebno 25 do 31 % dodatnih kapitalnih troškova za sustav skladištenja, nadziranja, dopremanja i doziranja metanola kako bi se zadovoljili sigurnosni standardi (Cherchi i sur., 2009). Također, kako bi se uspješno provodila denitrifikacija potreban je duži period adaptacije denitrificirajućih mikroorganizama koji imaju sposobnost korištenja metanola kao izvora ugljika (Zumft, 1997). Foglar i Briški (2003) su istraživali uklanjanje nitrata iz sintetske otpadne vode s metanolom kao izvorom ugljika u šaržnom bioreaktoru s mješovitom kulturom denitrificirajućih mikroorganizama. Postignuta je visoka brzina denitrifikacije odnosno kompletna denitrifikacija (200 mg NO<sub>3</sub>-N/L) uz malo nakupljanje nitrita (do 1,2 mg NO<sub>2</sub>-N/L) tijekom 6 sati za MeOH/NO<sub>3</sub>-N omjer 2,5 u sintetskoj otpadnoj vodi (Foglar i Briški, 2003).

U pogledu cijene i učinkovitosti procesa etanol predstavlja dobru alternativu uporabi metanola zato što se može dobiti kao relativno jeftini otpadni proizvod kemijskih i farmaceutskih industrija (Peng i sur., 2007). Peng i sur. (2007) su uspoređivali učinkovitost metanola, etanol i acetata kao dodatnih izvora ugljika pri čemu se etanol pokazao kao najbolji izvor ugljika za denitrifikaciju. Etanol se pokazao kao tri puta učinkovitiji izvor ugljika za denitrifikaciju od metanola s brzinom denitrifikacije od 9,6 mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS h, dok je za metanol brzina denitrifikacije iznosila 3,2 mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS h. Iako je najveća brzina denitrifikacije zabilježena kod uporabe acetata i iznosila je 12 mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS h, metanol i etanol su znatno jeftinija sredstva od acetata. U slučaju etanola i acetata bio je potreban manji volumen dodanog izvora ugljika zbog veće brzine denitrifikacije. Također, vrijeme adaptacije denitrifikanata na etanol i acetat je bilo znatno kraće u usporedbi s vremenom adaptacije denitrifikanata na metanol (Peng i sur., 2007).

Acetat se pokazao kao lako razgradiv izvor ugljika za veliki broj denitrificirajućih mikroorganizama što ga čini široko rasprostranjenim u praktičnoj primjeni (Peng i sur., 2007).

U istraživanju Osaka i sur. (2008) uspoređivani su rezultati uspješnosti denitrifikacije pri povišenoj koncentraciji soli (NaCl) koristeći metanol i acetat kao dodatni izvor ugljika. Acetat se, za razliku od metanola, pokazao kao učinkovitiji izvor ugljika te je zabilježena visoka učinkovitost uklanjanja nitrata pri koncentraciji soli do 10 % NaCl.

U posljednje vrijeme se sve više istražuje uporaba tekućih nusproizvoda fermentacije prehrambenih proizvoda te industrijske i poljoprivredne otpadne vode kao ekonomičan i ekološki poželjan dodatni izvor ugljika. Prilikom odabira supstrata koriste se oni koji u svom sastavu imaju visoku koncentraciju hlapivih masnih kiselina (VFA, engl. *Volatile Fatty Acids*), alkohola te mliječne kiseline, kao što su primjerice tekući nusproizvodi fermentacije industrije mliječnih proizvoda, otpadna voda iz proizvodnje sladoleda, nusproizvodi iz proizvodnje negaziranih pića, otpadna voda iz procesa reciklacije otpadne hrane i slično (Wang i sur., 2021; Kim i sur., 2017; Zhang i sur., 2016; Fernández-Nava i sur., 2010). Međutim, uporaba tekućih nusproizvoda fermentacije pretežito nije zastupljena u praktičnoj primjeni zbog nedostatka kao što su uporaba velike količine dodatnih kemikalija (uglavnom za podešavanje pH vrijednosti), dugotrajnost procesa (5 – 10 dana) te visoka razgradnja organskih supstrata (preko 50 %) u obliku ispušnih plinova (Zhang i sur., 2016).

#### 2.4.3. Egzogeni izvori ugljika u čvrstoj fazi

Prema Wang i Chu (2016) dodatni izvori ugljika koji se nalaze u čvrstoj fazi podijeljeni su na:

- prirodne biljne materijale kao što su drvene strugotine, slama i pamuk
- sintetske biorazgradive polimere kao što su polihidroksialkanoati (PHA), poli-3-hidroksibutirat (PHB), poli-3-hidroksibutirat-ko-hidroksivalerat (PHBV), polikarbolakton (PVB), polibutilen sukcinat (PBS) i polilaktična kiselina (PLA)

pri čemu ovi materijali služe kao donori elektrona, ali također i kao nosači biofilmova denitrificirajućih mikroorganizama.

Iako su različiti prirodni materijali bili predmet istraživanja denitrifikacije s izvorom ugljika u čvrstoj fazi, drvene strugotine su pokazale dobre rezultate u praktičnoj primjeni zbog učinkovitosti, niske cijene, dugog životnog vijeka i manje štetnih utjecaja. U usporedbi s prirodnim biljnim materijalima, sintetski biorazgradivi polimeri pokazali su se kao bolji i stabilniji dodatni izvor ugljika za proces denitrifikacije. U sustavima koji koriste biorazgradive polimere kao dodatni izvor ugljika, denitrifikaciji prethodi hidroliza. Hidrolitički enzimi razgrađuju polimere do organskih kiselina i malih molekula koje onda djeluju kao donori

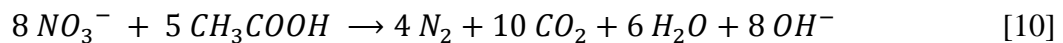
elektrona za redukciju nitrata (Wang i Chu, 2016). Među biorazgradivim polimerima najviše se koriste PHA zato što su oni sastavni dio rezervnog mikrobnog materijala što znači da ih većina mikroorganizama može jednostavno razgraditi u denitrificirajućim uvjetima. PHB kao najzastupljeniji bakterijski poliestar koji je ujedno izvor biorazgradive plastike, te kopolimer PHBV su također dobri kandidati za primjenu u procesu denitrifikacije s izvorom ugljika u čvrstoj fazi (Hiraishi i Khan, 2003). PHBV polimer se pokazao kao prihvatljiv dodatni izvor ugljika zbog visoke brzine denitrifikacije (Xu i sur., 2018). Postignuta je brzina denitrifikacije od 0,55 g N/L d s koncentracijom nitrata u influentu od 100 mg/L uz HRT od 2 h. Također, zabilježena je iskoristivost 80 % ukupnog PHBV od strane denitrificirajućih mikroorganizama. Zadnjih godina uočena je sve veća uporaba komercijalnih biorazgradivih polimera koji nastaju kao nusproizvod industrije bioplastike zbog njihove dostupnosti i relativno niske cijene (Wang i Chu, 2016), ali je takav denitrifikacijski sustav i dalje 10 puta skuplji od tradicionalnog koji koristi metanol ili etanol (Hiraishi i Khan, 2003).

#### 2.4.4. KPK/N omjer

KPK vrijednost definira ukupnu koncentraciju oksidativnih sastojaka u otpadnoj vodi. S obzirom da u procesu denitrifikacije dolazi do oksidacije izvora ugljika može se reći da je KPK pokazatelj dostupnosti izvora ugljika. Tijekom biološke denitrifikacije istovremeno se odvija redukcija nitrata i oksidacija organskih sastojaka što uzrokuje smanjenje KPK vrijednosti otpadne vode (Metcalf & Eddy, 2003). Omjer kemijske potrošnje kisika (KPK) i izvora dušika ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) usko je povezan s procesom nepotpune denitrifikacije (Du i sur., 2019). U procesu nepotpune denitrifikacije odvija se samo prvi korak denitrifikacije odnosno redukcija nitrata do nitrita koji se nakuplja što rezultira niskom brzinom denitrifikacije (Chen i sur., 2021a). Proces uklanjanja nitrata limitiran je nedostatkom izvora ugljika u otpadnoj vodi koja se obrađuje (Zhang i sur., 2016). Denitrifikacijski potencijal otpadne vode primarno je funkcija omjera KPK/N tj. omjera kemijske potrošnje kisika i izvora dušika ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) ili BPK/N tj. biokemijske potrošnje kisika i izvora dušika ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ). Mnoga znanstvena istraživanja pokazuju širok raspon KPK/N omjera, koji iznosi između 4 i 15 KPK/g N, unutar kojih je uspješno provedena potpuna denitrifikacija. Ako je u influentu tj. otpadnoj vodi koja se obrađuje KPK/N omjer nizak (ispod 4) potreban je dodatak egzogenog izvora ugljika kako bi se postigli zadovoljavajući rezultati denitrifikacije (Peng i sur., 2007; Metcalf & Eddy, 2003; Zumft, 1997). Stoga, odabir dodatnog izvora ugljika za denitrifikaciju ovisi o karakteristikama otpadne vode koju se želi obraditi (Lee i Welander, 1996).

#### 2.4.5. Vrijednost pH

Kemijska reakcija [10] prikazuje reakciju masene bilance procesa denitrifikacije u kojem se acetat koristi kao izvor ugljika. Iz prikazane reakcije vidljivo je da dolazi do nakupljanja  $\text{OH}^-$  iona što rezultira povećanjem pH vrijednosti medija tj. stvaranjem lužnatog okruženja tijekom procesa (Adouani i sur., 2015). Optimalna pH vrijednost za pojedine denitrificirajuće enzime varira (Chen i sur., 2021a), ali je poznato da denitrificirajući mikroorganizmi preferiraju neutralno do slabo lužnato (pH 7 – 9) područje zato što je pri tim vrijednostima enzimska aktivnost reduktaza najizraženija. Tijekom procesa heterotrofne denitrifikacije uočeno je da se pH mijenja na način da raste te se stabilizira na kraju (Chen i sur., 2021b). Do ovog fenomena dolazi zbog razgradnje izvora ugljika do organskih kiselina, tijekom početne faze procesa, koje kasnije denitrificirajuće bakterije koriste za redukciju nitrata (stvara se lužnato područje) te na kraju dolazi do stabilizacije pH vrijednosti (Wang i sur., 2021).



#### 2.4.6. Temperatura

Denitrifikacija je proces kojeg provode mezofilni mikroorganizmi s optimalnom temperaturom oko 30 °C. Aktivnost denitrificirajućih bakterija je jako niska ispod 5 °C, linearano se povećava do maksimuma koji se nalazi u rasponu 25 – 30 °C te zatim povećanjem temperature aktivnost denitrifikata pada na minimalne vrijednosti. Kod temperature oko 65 °C aktivnost denitrifikata prestaje zbog denaturacije enzima (Zumft, 1997). Utjecaj temperature na brzinu denitrifikacije predstavlja bitan čimbenik prilikom dizajna sustava denitrifikacije te ga se prema Metcalf & Eddy (2003) može opisati pomoću Arrheniusove jednadžbe (11):

$$r_{D,T1} = r_{D,T2} \times \theta^{(T1-T2)} \quad [11]$$

gdje je  $r_{D,Ti}$  brzina denitrifikacije kod temperature  $Ti$ , (mg  $\text{NO}_3\text{-N}$ /mg VSS d (VSS, engl. *Volatile Suspended Solids*)), a  $\theta$  temperaturni koeficijent.

U istraživanju Carrera i sur. (2003) o utjecaju temperature na brzinu denitrifikacije u dvomuljnom sustavu sugeriraju da brzina denitrifikacije ovisi o rasponu temperatura pri čemu temperaturni koeficijent iznosi  $1,10 \pm 0,01$  za temperature između 10 i 25 °C, a  $1,37 \pm 0,01$  za temperature između 6 i 10 °C. Istraživanje Cherchi i sur. (2009) potvrdilo je činjenicu da se brzina denitrifikacije smanjuje sa smanjenjem temperature. Pri smanjenju temperature s 20 °C

na 10 °C zabilježen je pad brzine denitrifikacije za 60 % u sustavu koji koristi metanol kao dodatni izvor ugljika (Cherchi i sur., 2009).

#### 2.4.7. Koncentracija otopljenog kisika (DO)

Proces denitrifikacije se može odvijati u anaerobnim (bez prisustva kisika) ili anoksičnim (uz nisku koncentraciju otopljenog kisika) uvjetima (Zumft, 1997). Većina denitrificirajućih mikroorganizama su fakultativni anaerobi koji u uvjetima nedostatka kisika koriste nitrat kao krajnji akceptor elektrona. Kisik je energetski gledano učinkovitiji akceptor elektrona, pa prisutnost otopljenog kisika može potisnuti proces denitrifikacije izravnom kompeticijom ili inhibicijom denitrificirajućih reduktaza (Wang i Chu, 2016). Istraživanje Sun i sur. (2009) pokazalo je da je Nir reduktaza znatno osjetljivija na DO od Nar reduktaze što bi značilo da u uvjetima kada imamo otopljeni kisik dolazi do znatnog nakupljanja NO<sub>2</sub>-N. U uvjetima kada je koncentracija kisika ispod 0,2 mg/L nije uočeno nakupljanje NO<sub>2</sub>-N u denitrifikacijskom sustavu (Zumft, 1997). Znanstvena istraživanja su pokazala da je odvijanje denitrifikacije moguće do koncentracija od 4 do 5 mg O<sub>2</sub>/L s tim da je u takvim uvjetima zabilježen pad brzine denitrifikacije. Također, prisustvo DO smanjuje potrošnju dodatnog izvora ugljika za denitrifikaciju s obzirom da se preferira utrošak ugljika za proces aerobne respiracije (Gutierrez-Wing i sur., 2012).

#### 2.4.8. Hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT)

Hidrauličko vrijeme zadržavanja određuje vrijeme kontakta između denitrificirajućih mikroorganizama i supstrata (nitrata) iz otpadne vode što ga čini bitnim čimbenikom za određivanje brzine denitrifikacije. Povećanje HRT vrijednosti omogućuje bakterijskoj populaciji bolju razgradnju organskog supstrata što dovodi do povećanja brzine uklanjanja nitrata, ali također rezultira visokom koncentracijom otopljenog organskog ugljika (DOC, engl. *Dissolved Organic Carbon*) i amonijaka koji predstavljaju organsko onečišćenje vode. Stoga je bitno, prilikom dizajniranja bioreaktorskog sustava za denitrifikaciju, optimirati vrijednosti HRT kako bi se postigli što veća učinkovitost procesa (Wang i Chu, 2016).

#### 2.4.9. Denitrificirajući mikroorganizmi

Iako razni mikroorganizmi (bakterije, arhea i eukarioti tj. fungi) pokazuju denitrificirajući potencijal, kada govorimo o prirodnim i industrijskim sustavima za denitrifikaciju otpadne

vode, primarno dominiraju bakterije. Denitrificirajuće bakterije su najčešće fakultativni anaerobi koji imaju sposobnost preusmjerenja metabolizma tako da umjesto kisika koriste dušikove spojeve kao akceptore elektrona (Lu i sur., 2014; Zumft, 1997). Denitrificirajuće kulture su mješoviti kompleksni ekosustavi, a identifikacija i karakterizacija mikroorganizama bitni su za bolje razumijevanje samog procesa denitrifikacije otpadne vode (Lu i sur., 2014). Metode detekcije mikroorganizama koje ovise o kulturi ne mogu precizno pokazati pravu strukturu denitrificirajuće kulture zbog selektivnosti rasta na čvrstoj hranjivoj podlozi (Hoshino i sur., 2005). Međutim, napredak molekularnih metoda koje ne ovise o kulturi poboljšalo je proces identifikacije i kvantifikacije denitrificirajućih kultura ciljajući filogenetičke i funkcionalne biomarkere (16S rRNA gene ili denitrificirajuće gene). Metoda 16S rRNA genskog sekvencioniranja koristi gene (*nar*, *nir*, *nor* i *nos*) koji kodiraju za denitrificirajuće reduktaze kao funkcionalne biomarkere prilikom detekcije denitrificirajućeg potencijala pojedine mješovite kulture (Lu i sur., 2014).

Druge molekularne tehnike kao što su fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH, engl. *Flourescence in situ hybridization*), denaturirajuća gradijent gel elektroforeza (DGGE, engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) i polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (t-RFLP, engl. *terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) koriste se za detaljnu analizu strukture kulture denitrifikanata (Hoshino i sur., 2005). Zahvaljujući razvoju molekularnih tehnika identificirano je preko 130 bakterijskih vrsta unutar više od 50 rodova denitrifikanata. Neki od denitrifikanata koji su se pokazali dominantnima u mješovitim kulturama su *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acidovorax*, *Halobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Kingella*, *Methanonas*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Axotobacter*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Denitrobacillus*, *Propionicbacterium*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Enterobacter*, *Spirillum*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas*, *Paracoccus*, *Azoarcus* (Shapleigh, 2006).

Denitrificirajuće mikroorganizme prema Sperl i Hoare (1971) dijelimo na prave denitrifikante (imaju sposobnost redukcije nitrata i nitrita do  $N_2$ ), nitrit reducirajuće denitrifikante (reduciraju samo nitrit do  $N_2$ ), nepotpune denitrifikante (reduciraju nitrat i nitrit samo do N-oksid intermedijera), nepotpune nitrit denitrifikante (reduciraju nitrit do N-oksid intermedijera) i nedenitrifikante (nemaju sposobnost redukcije nitrata i nitrita). Primjerice *Hyphomicrobium* spp. spadaju u prave denitrifikante, *Methyloversatilis* spp. se klasificiraju kao nepotpuni denitrifikanti, a neki rodovi *Pseudomonas* spp. su nepotpuni nitrit denitrifikanti (Lu i sur., 2014).



Glavni čimbenici koji definiraju sastav mješovite kulture denitrifikanata su egzogeni izvor ugljika, pH vrijednost miješane tekućine, temperatura vođenja procesa, koncentracija otopljenog kisika i prisustvo N-oksid intermedijera (Albina i sur., 2019; Lu i sur., 2014). Bakterijska populacija sustava za biološku denitrifikaciju usko je povezana s izvorom ugljika s obzirom da različiti izvori ugljika uzrokuje promjene u strukturi bakterijskih zajednica te rast specifičnih mikroorganizama (Kim i sur., 2017). Istraživanje Lu i sur. (2014) pokazalo je da je izvor ugljika temeljni kontrolirajući čimbenik za strukturu i funkciju denitrificirajuće zajednice. Na temelju rezultata mikrobioloških analiza rodovi koji se često pojavljuju kod sustava koji koriste dodatne izvore ugljika u tekućem stanju su *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Alcaligenes* i *Bacillus* (Wang i Chu, 2016), a rodovi *Comamonas*, *Acidovorax* i *Dechloromonas* su se pokazali dominantni u denitrificirajućim sustavima koji koriste dodatni izvori ugljika u čvrstoj fazi (Xu i sur., 2018).

## **2.5. NAKUPLJANJE N-OKSID INTERMEDIJERA U PROCESU DENITRIFIKACIJE**

Akumulacija N-oksid intermedijera predstavlja operativni problem u procesu biološke denitrifikacije otpadnih voda. Dušikov monoksid (NO) i nitrit (NO<sub>2</sub>-N) toksični su spojevi te njihovo nakupljanje djeluje inhibitorno na aktivnost denitrifikanata (Zumft, 1997). Didušikov oksid (N<sub>2</sub>O) je staklenički plin koji je, prema štetnosti za okoliš, treći po redu odnosno iza ugljikova dioksida (CO<sub>2</sub>) i metana (CH<sub>4</sub>). U posljednjih 150 godina povećana koncentracija atmosferskog N<sub>2</sub>O doprinijela je oštećenju stratosferskog ozonskog omotača i nepoželjnim klimatskim promjenama s trenutnom stopom povećanja koja se procjenjuje na 2 % po desetljeću. Iako je N<sub>2</sub>O odgovoran za tek 0,03 % ukupne emisije stakleničkih plinova, ako ga se prema Međunarodnom povjerenstvu za klimatske promjene izrazi u jedinici koja je CO<sub>2</sub> ekvivalent, onda je odgovoran za 10 % ukupne emisije (Bates i sur., 2008). Prema istraživanju Tian i sur. (2020) koncentracija N<sub>2</sub>O je u razdoblju od 1980. do 2016. godine narasla za oko 30 % odnosno sa 270 ppb (engl. *parts per billion*) do 350 ppb što je najveći uočeni rast u zadnjih pet desetljeća. Obrada otpadne vode procesima nitrifikacije i denitrifikacije odgovorna je za 3,2 – 10 % ukupne emisije N<sub>2</sub>O što na globalnoj razini odgovara oko 94 % sektora otpada (Adouani i sur., 2015). Reakcije procesa denitrifikacije se odvijaju paralelno te zbog međusobnog utjecaja elektronske kompeticije dušikovih reduktaza dolazi do različite distribucije elektrona među denitrificirajućim reduktazama što posljedično dovodi do nakupljanja intermedijernih spojeva (Wang i sur., 2021). Kao još jedan od razloga nakupljanja N-oksid intermedijera ističe se manjak izvora ugljika koji služi kao donor elektrona za odvijanje potpune denitrifikacije.

Istraživanje Pan i sur. (2013) je pokazalo da u uvjetima kad se izvor ugljika nalazi u suvišku također dolazi do kompeticije za elektrone između reduktaza s obzirom da svi denitrificirajući enzimi imaju zajednički izvor elektrona koji je rezultat respiratornog transportnog lanca. Također, uočeno je da pri nižim temperaturama i u prisutnosti više koncentracije DO dolazi do emisije N<sub>2</sub>O zbog odvijanja nepotpune denitrifikacije (Elgood i sur., 2010). Nadalje, značajan dio mikroorganizama denitrifikacijske zajednice nema gen koji kodira za didušikov oksid reduktazu (*nos* gen) te kao krajnji produkt denitrifikacije nastaje toksični N<sub>2</sub>O koji se na taj način nakuplja (Philippot i sur., 2011).

## 2.6. ZAKONSKA REGULATIVA

U posljednjem desetljeću, diljem svijeta se uvode sve stroži ekološki zahtjevi s ciljem smanjenja opasnosti koju uzrokuje prekomjerna količina dušikovih spojeva u tehnološkim otpadnim vodama (efluentu) koje se nakon obrade ispuštaju u površinske vode ili sustave javne odvodnje (Wang i Chu, 2016). Iako je Svjetska zdravstvena organizacija definirala limit od 50 mg NO<sub>3</sub>/L (11,3 mg NO<sub>3</sub>-N/L) za nitrate u pitkoj vodi, granične vrijednosti u različitim državama se razlikuju. Tako je primjerice Američka Agencija za zaštitu okoliša postavila limit na 10 mg NO<sub>3</sub>/L (2,3 mg NO<sub>3</sub>-N/L) (Fernández-Nava i sur., 2008).

Koncentracija dušikovih spojeva u obrađenoj vodi ovisi o okolišu u koji se ispušta. Ako se obrađena otpadna voda ispušta u slatku vodu onda koncentracija iznosi između 10 i 30 mg NO<sub>3</sub>-N/L, a kada se ispušta u slanu vodu onda iznosi 50 mg NO<sub>3</sub>-N/L. Granične vrijednosti mogu biti drugačije u slučaju kada se obrađena otpadna voda ispušta u područja koja se definiraju kao “osjetljiva područja“ te u tom slučaju dopuštena koncentracija iznosi između 10 i 15 mg N/L za ukupni dušik (Direktiva 91/271/EEZ). Republika Hrvatska, kao sastavni dio Europske Unije, ima definirane granične vrijednosti u skladu s direktivama koje su propisala nadležna tijela Europske Unije. Granične vrijednosti za ispuštanje obrađene vode u površinske vode iznose 15 mg N/L za ukupni dušik, 1 mg NO<sub>2</sub>-N/L, 2 mg NO<sub>3</sub>-N/L te 25 mg BPK/L i 125 mg KPK/L (NN 26/2020).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. SINTETSKA OTPADNA VODA I MIKROBNA KULTURA AKTIVNOG MULJA

Za pokuse denitrifikacije priređena je sintetska otpadna voda koncentracije  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  i 0 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  otapanjem soli  $\text{KNO}_3$  u vodi. Kao izvor organskih sastojaka korišten je natrijev acetat,  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$ , dodan u odgovarajućoj koncentraciji da bi se postigao početan omjer C/N 1, 2 i 3. Početne koncentracije KPK vrijednosti su iznosile 470 mg KPK/L, 944 mg KPK/L i 1444 mg KPK/L pri početnim omjerima C/N 1, 2 i 3.

Aktivni mulj uporabljen u pokusima denitrifikacije je porijeklom s uređaja za biološku obradu otpadne vode grada. U prethodnim pokusima pokazano je da aktivni mulj ima sposobnost provođenja denitrifikacije, što sugerira prisutnost denitrificirajućih organizama. Pokusi su provedeni s muljem u ustaljenom stanju koji je vođen u SBR (*engl. Sequencing batch reactor, hrv. šaržni reaktor koji radi u slijedu*) reaktoru.

Aktivni mulj je aklimatiziran na visoke koncentracije nitrata, do  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , te su namnožene odgovorne skupine mikroorganizama za provedbu procesa denitrifikacije. Također, denitrifikanti su aklimatizirani na acetat kao izvor ugljika.

#### 3.2. POSTAVKE REAKTORA

Zbog određivanje kinetike denitrifikacije i minimalnog potrebnog omjera C/N za provođenje denitrifikacije visoke koncentracije nitrata ( $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ), iz roditeljskog SBR reaktora je uzet aktivni mulj i podijeljen na tri jednaka dijela. Pokusi denitrifikacije su vođeni u laboratorijskim staklenim čašama u funkciji bioreaktora ukupnog volumena 0,6 L, radnog volumena 0,5 L. Miješanje reaktorskog sadržaja, anoksični uvjeti vođenja procesa i kontakt mikroorganizama aktivnog mulja i supstrata je osigurano na način da je u čaše stavljen magnetič, a čaše su postavljene na magnetske miješalice pri 100 o/min. Pokusi su vođeni pri 3 g MLSS/L (*engl. Mixed liquor suspended solids, hrv. miješana tekućina suspendiranih čestica*). Tijekom pokusa denitrifikacije koncentracija otopljenog kisika je iznosila  $\leq 0,3$  mg/L. Pokusi su vođeni pri sobnoj temperaturi  $22 \pm 2$  °C.

Pokusni su vođeni pri početnoj koncentraciji nitrata  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjerima C/N 1, 2 i 3.

### 3.3. ANALITIČKE METODE

Koncentracija otopljenog kisika, pH vrijednost i temperatura su motreni kisikovom elektrodom i pH elektrodom. Uzorci miješane tekućine su uzimani periodično za određivanje koncentracije MLSS, a za analizu KPK, NO<sub>3</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N su uzorci filtrirani kroz grubi filter papir.

Prilikom izvođenja eksperimenata korištene su kemikalije: kalijev nitrat, KNO<sub>3</sub> (T.T.T.); natrijev acetat, NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O (GRAM-MOL); srebro sulfat, Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kemika); živin sulfat, HgSO<sub>4</sub> (Kemika); kalijev bikromat, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Kemika); otopina feroamonijeva sulfata, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Kemika), FAS; feroin, 1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat (Kemika); otopina K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + HgSO<sub>4</sub>; otopina Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (GRAM-MOL); kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14773 (raspon koncentracije 0,2 – 20 mg NO<sub>3</sub>-N/L); kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776 (raspon koncentracije 0,002 – 1 mg NO<sub>2</sub>-N/L); pufer otopine s pH 4, pH 7 i pH 10 te zasićena otopini kalijeva klorida, KCl (Alkaloid).

Za izvođenja eksperimenata korišten je standardni laboratorijski pribor: laboratorijske slaklene čaše, magnetič, pipete, odmjerne tikvice, Erlenmayerove tikvice, stalak za kivete, propipeta, stakleni lijevak, čašica, pinceta, boca štrcaljka, grubi filter papir veličine pora 0,45 μm, staklene kivete s čepovima, dipenzeri te kvarcne kivete promjera 10 mm i čepovi, Merck.

Za potrebe izvođenja eksperimenata u korištenu laboratorijsku opremu spadaju: magnetska miješalica (IKA RH basic 2), sušionik (Instrumentaria ST-05), eksikator, termoreaktor (Thermoreactor TR 300, Merck), digitalna bireta Solarus, Hirschman-Laborgeräte, digestor, spektrofotometar (Spectroquant VEGA 400, Merck), pH elektroda (SenTix 41), pH metar (WTW 330i), kisikova elektroda (DurOx) te mjerač otopljenog kisika (WTW Oxi3210).

#### 3.3.1. Određivanje MLSS

MLSS je korišten kao mjera koncentracije aktivnog mulja, a određuje se na način da se izračuna razlika filter papira s talogom aktivnog mulja i čistog suhog filter papira, oba sušena do konstantne mase na 105 °C u sušioniku.

##### Postupak:

Prilikom postavljanja pokusa određivana je koncentracija aktivnog mulja na način da je uzet poznati volumen homogene suspenzije aktivnog mulja i filtriran kroz čist, osušen i prethodno

izvagan filter papir. Filter papir s uzorkom aktivnog mulja je sušen na 105 °C do konstantne mase, i zatim ostavljen u eksikatoru na hlađenje. Ohlađeni suhi filter papir s uzorkom mulja je izvagan i iz razlike mase suhog filter papira s uzorkom aktivnog mulja i čistog, suhog filter papira, podijeljeno s volumenom uzete suspenzije aktivnog mulja dobije se koncentracija aktivnog mulja, izražene u g/L.

Formula (12) za računanje MLSS:

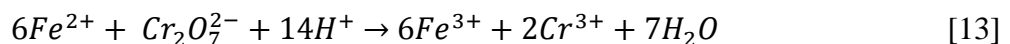
$$MLSS \left[ \frac{g}{L} \right] = \frac{m_{om} - m_f}{mL \text{ uzorka}} \times 1000 \quad [12]$$

gdje je  $m_{om}$  masa osušenog filter papira s uzorkom aktivnog mulja (g),  $m_f$  masa čistog osušenog filter papira (g), a  $mL \text{ uzorka}$  volumen suspenzije aktivnog mulja.

### 3.3.2. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)

Vrijednost KPK je određivana titrimetrijski prema Standard Methods (APHA, 2005), po metodi 5220C (Closed Reflux, Titrimetric method).

Uzorak se spaljuje u kiseloj sredini pri čemu srebro sulfat,  $Ag_2SO_4$ , služi kao katalizator, i živin sulfat,  $HgSO_4$ , se dodaje da bi se spriječila interferencija nekih anorganskih spojeva, primjerice kloridi. Suvišak kalijeva bikromata,  $K_2Cr_2O_7$ , se titrira otopinom feroamonijeva sulfata,  $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ , FAS, uz dodatak feroina, 1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat kao indikatora, prikazano jednadžbom 13:



#### Postupak:

U staklenu pipetu otpipetira se 2 mL uzorka, doda se 1,2 mL otopine  $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$ , i 2,8 mL otopine  $Ag_2SO_4 + H_2SO_4$  (GRAM-MOL), zatvori se čepom, promiješa i spaljuje u termoreaktoru na 150 °C tijekom 1 h. Zatim se uzorak hladi na sobnoj temperaturi u tami. Ohlađeni uzorak se titrira otopinom FAS (0,1 mol/L) uz dodatak feroina kao indikatora. Prilikom titracije boja otopine se mijenja iz plavo-zelene do smeđe-crvene. Slijepa proba se određuje na isti način uz razliku da je dodani uzorak destilirana voda. Faktor otopine feroamonijevog sulfata se određuje na isti način kao i slijepa proba, s razlikom da se uzorak ne spaljuje. Faktor otopine se računa prema jednadžbi 14:

$$f = \frac{1,2}{V_{fas}} \quad [14]$$

gdje je 1,2 volumen otopine  $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$  (mL), a  $V_{fas}$  volumen FAS otopine utrošene za titraciju (mL).

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi 15:

$$KPK \left[ \frac{mgO_2}{L} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times f \times 8000}{V_{uzorka}} \quad [15]$$

gdje je  $V_1$  volumen FAS utrošen za filtraciju slijepe probe (mL),  $V_2$  volumen FAS utrošen za titraciju uzorka (mL),  $c$  koncentracija FAS (0,1 mol/L), a  $f$  faktor otopine FAS.

### 3.3.3. Određivanje koncentracije nitrata ( $NO_3-N$ )

Za određivanje koncentracije nitrata korišteni su kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14773. Temelj metode je reakcija nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline pri čemu nastaje nitro spoj crvene boje koji se određuje fotometrijski.

#### Postupak:

U staklenu kivetu se doda 1,5 mL uzorka i žličica  $NO_3-1$  reagensa. Kiveta se dobro zatvori i miješa zbog otapanja reagensa. Zatim se doda 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, zatvori kiveta i promiješa. Trajanje reakcije je 10 minuta i nakon toga se očita koncentracija nitrata na spektrofotometru u mg/L.

### 3.3.4. Određivanje koncentracije nitrita ( $NO_2-N$ )

Nitriti su određivani pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14776, a metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500- $NO_2^-B$ , i EN 26 777. Metoda se temelji na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom pri čemu nastaje diazonijeva sol, koja reagira s N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorom i nastaje crveno-ljubičasta azo boja. Intenzitet obojenja se određuje spektrofotometrijski.

#### Postupak:

U staklenu kivetu se doda 5 mL uzorka i jedna žličica reagensa NO<sub>2</sub>-1. Kiveta se zatvori i miješa kako bi se reagens otopio. Reakcijsko vrijeme je 10 minuta, i nakon toga se izmjeri koncentracija nitrita na spektrofotometru u mg/L.

#### 3.3.5. Određivanje temperature

Tijekom pokusa denitrifikacije temperatura je motrena očitavanjem sa zaslona uređaja pomoću temperaturnog senzora na pH elektrodi i kisikovoj elektrodi uronjenih u miješanu tekućinu.

#### 3.3.6. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Za određivanje koncentracije otopljenog kisika korišten je mjerač otopljenog kisika i kisikova elektroda. Prije pokusa instrument je umjeren prema uputama proizvođača. Tijekom pokusa elektroda je bila uronjena u miješanu tekućinu i koncentracija otopljenog kisika je očitavana sa zaslona uređaja izražena u mg/L.

#### 3.3.7. Određivanje vrijednosti pH

Za određivanje vrijednosti pH korišten je pH metar i pH elektroda. Prije pokusa napravljena je kalibracija tako što se pH elektroda uranjala u pufer otopine s pH 4, pH 7 i pH 10 prema uputama proizvođača. Tijekom pokusa pH elektroda je bila uronjena u miješanu tekućinu i vrijednost pH je očitavana sa zaslona pH metra. Nakon završetka mjerenja, pH elektroda je isprana destiliranom vodom i čuvana u otopini elektrolita, zasićenoj otopini kalijeva klorida, KCl).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Pokusi denitrifikacije su provedeni pri visokoj koncentraciji nitrata,  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjerima C/N 1, 2 i 3 s natrijevim acetatom kao izvorom ugljika. Vođeni su u anoksičnim uvjetima pri koncentraciji otopljenog kisika  $\leq 0,3$  mg DO/L, a kontakt mikroorganizama aktivnog mulja i supstrata ostvaren je miješanjem miješane tekućine u staklenim čašama na magnetskoj miješalici. Temperatura vođenja procesa je iznosila  $22 \pm 2$  °C.

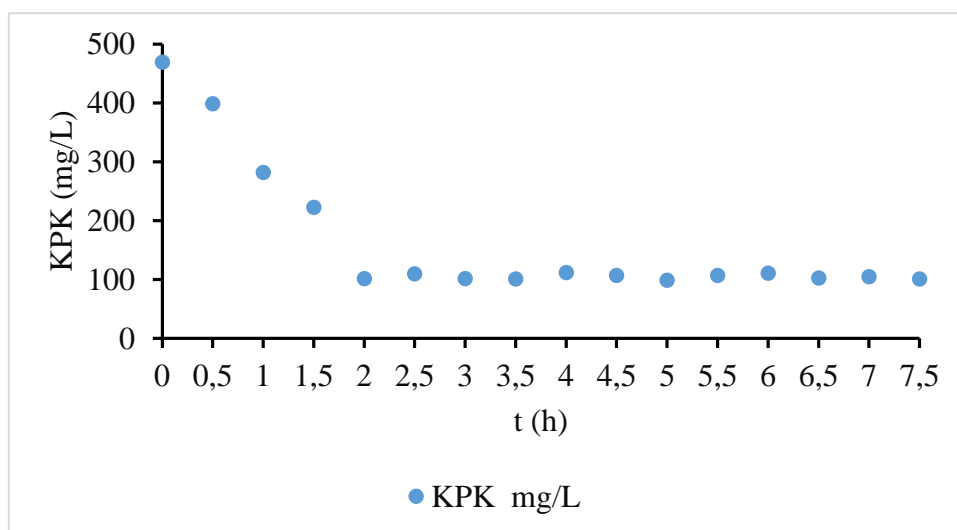
Acetat kao izvor ugljika se vrlo često koristi u procesu denitrifikacije zato što je lako razgradiv izvor ugljika, te zbog veće brzine denitrifikacije u odnosu na primjerice metanol ili etanol. Također, denitrifikantima je potrebno kraće vrijeme prilagodbe na acetat u odnosu na metanol. Nedostatak acetata je njegova cijena, pa tako acetat primjerice ima višu cijenu od etanola i metanola (Osaka i sur., 2008; Peng i sur., 2007).

Denitrifikaciju provode denitrifikanati, i molekularnim tehnikama identificirano je preko 130 vrsta unutar više od 50 rodova, poput: *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Acidovorax*, *Halobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Kingella*, *Methanonas*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Axotobacter*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Denitrobacillus*, *Propionicbacterium*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Enterobacter*, *Spirillum*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas*, *Paracoccus*, *Azoarcus* (Shapleigh, 2006).

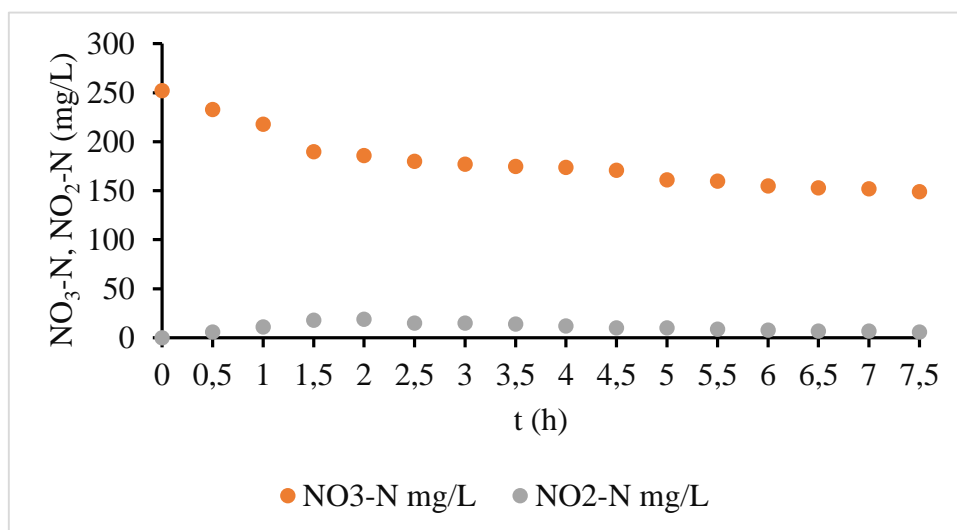
Otpadne vode koje sadrže visoke koncentracije nitrata proizlaze iz raznih industrija poput eksploziva, gnojiva, nuklearne energije, proizvodnja nehrđajućeg čelika i metalno dovršavanje. Neke otpadne vode sadrže i do 1000 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ . Nitrati koji dospiju u vodna tijela uzrokuju eutrofikaciju, a mogu uzrokovati i povećanje koncentracije nitrata u podzemnim vodama. Izazov obrade otpadne vode koja sadrži visoku koncentraciju nitrata je inhibitorni učinak nitrata na denitrifikante i posljedično nisku aktivnost denitrifikanata, zatim inhibirajući učinak nitrita odnosno slobodne nitritne kiseline na mikroorganizme aktivnog mulja, te velika količina viška mulja i proizvedenih topljivih mikrobnih produkata koji posljedično zahtijevaju dodatne korake obrade vode (Du i sur., 2019; Xu i sur., 2018; Fernández-Nava i sur., 2010; Fernández-Nava i sur., 2008; Soto i sur., 2007; Carrera i sur., 2003).

Promjene vrijednosti KPK,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ , koncentracije DO i vrijednosti pH su prikazane slikama 4-6 (omjer C/N 1), slikama 7-9 (omjer C/N 2) i slikama 10-12 (omjer C/N 3).

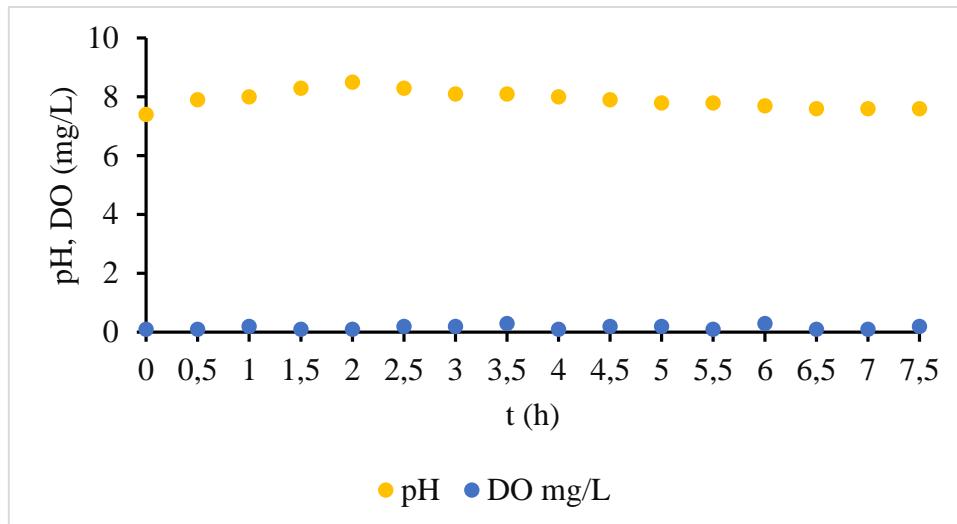




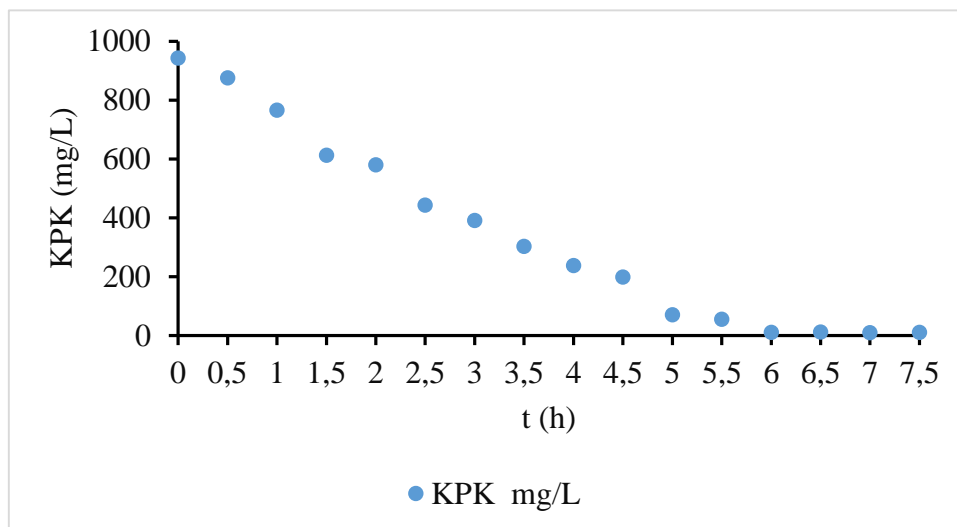
**Slika 4.** Promjene KPK tijekom denitrifikacije  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjeru C/N 1



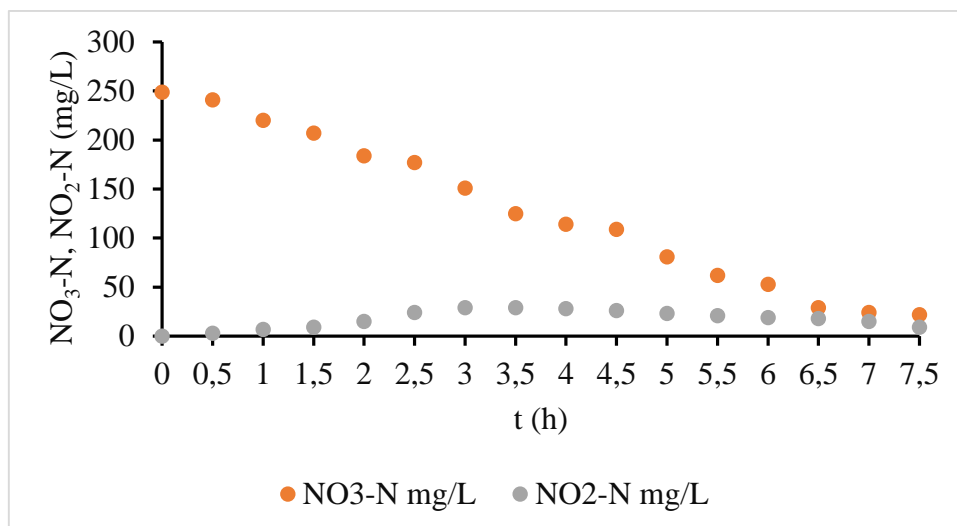
**Slika 5.** Promjene  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  tijekom denitrifikacije  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjeru C/N 1



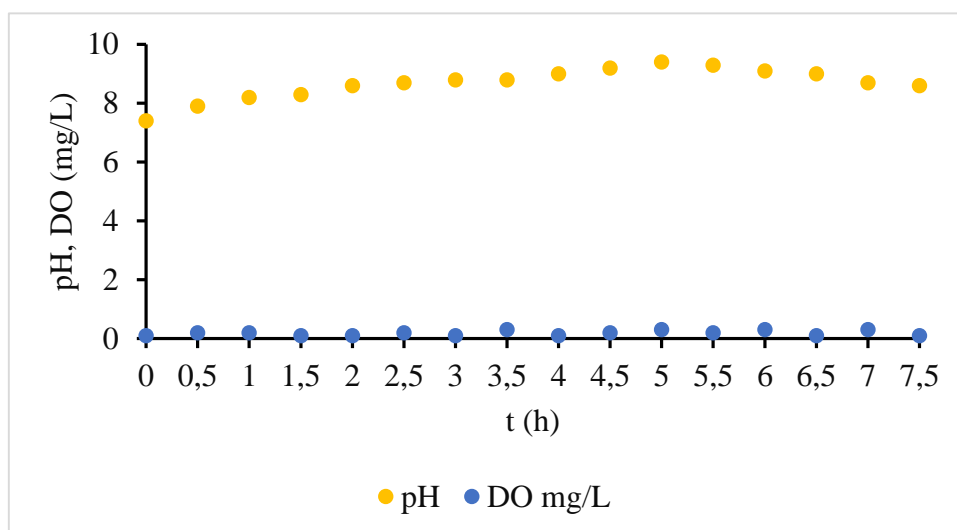
**Slika 6.** Promjene vrijednosti pH i koncentracije otopljenog kisika tijekom denitrifikacije  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjeru C/N 1



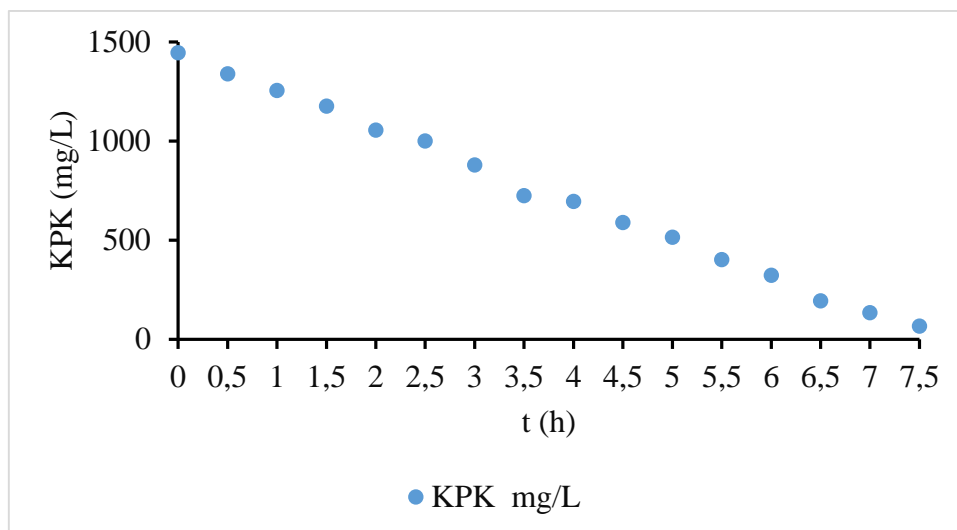
**Slika 7.** Promjene KPK tijekom denitrifikacije  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjeru C/N 2



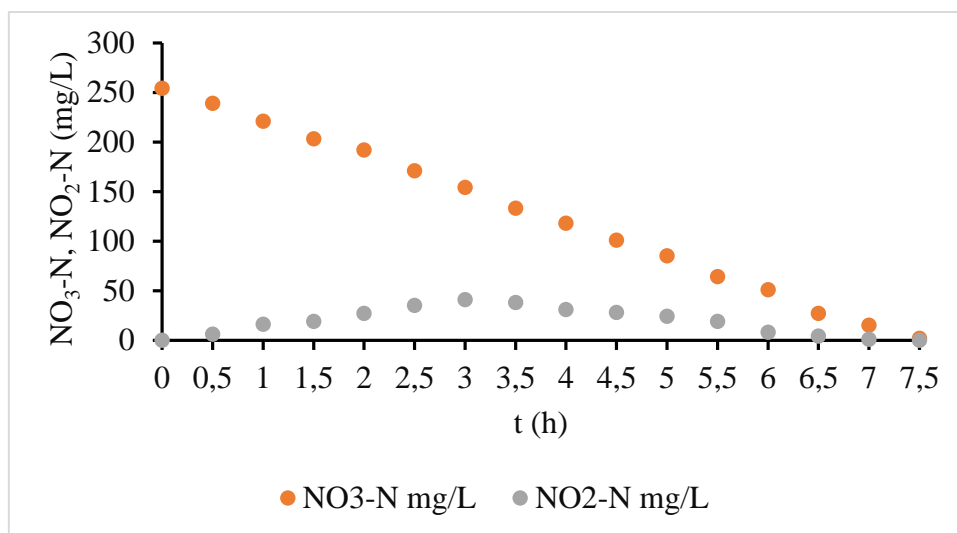
**Slika 8.** Promjene NO<sub>3</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N tijekom denitrifikacije 250±5 mg NO<sub>3</sub>-N/L pri omjeru C/N 2



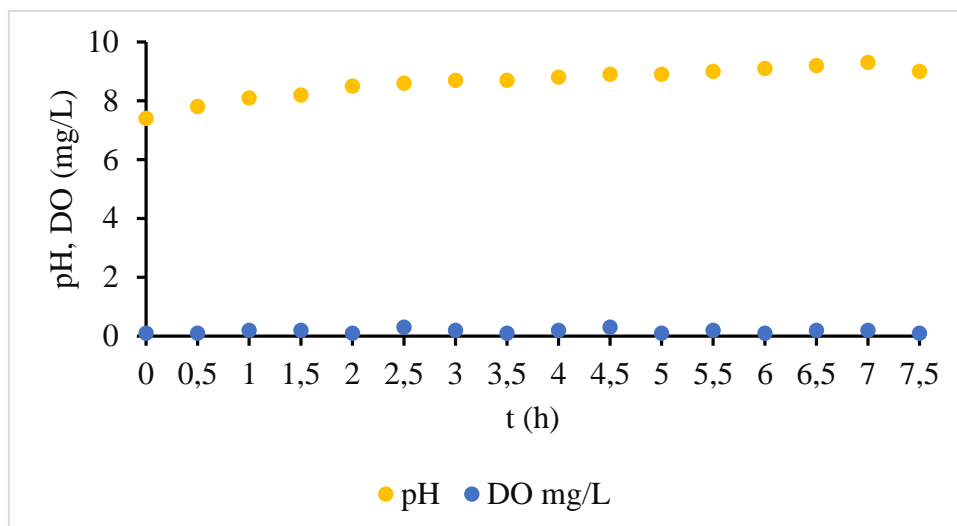
**Slika 9.** Promjene vrijednosti pH i koncentracije otopljenog kisika tijekom denitrifikacije 250±5 mg NO<sub>3</sub>-N/L pri omjeru C/N 2



**Slika 10.** Promjene KPK tijekom denitrifikacije  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjeru C/N 3



**Slika 11.** Promjene  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  tijekom denitrifikacije  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjeru C/N 3



**Slika 12.** Promjene vrijednosti pH i koncentracije otopljenog kisika tijekom denitrifikacije  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  pri omjeru C/N 3

Denitrifikacija vođena pri omjeru C/N 1 je provedena djelomično (nepotpuno) jer nije bilo dovoljno organskih sastojaka (elektron donora) za redukciju  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ . Organski sastojci izraženi kao KPK vrijednost su utrošeni u drugom satu pokusa, te je ostvareno smanjenje 78,5 % početne KPK vrijednosti, odnosno, utrošeno je 369 mg KPK. Brzina utroška KPK tijekom prva dva sata pokusa je iznosila 184 mg KPK/Lh (slika 4). Tijekom dva sata pokusa, dok je bilo raspoloživih organskih sastojaka, acetata, zabilježena je redukcija 66 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , odnosno, koncentracija nitrata se smanjila 26,2 %, pri čemu je brzina uklanjanja nitrata iznosila 33 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ . Tijekom narednih 5,5 sati pokusa, koncentracija nitrata se smanjila za dodanih 37 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , odnosno, ostvareno je sveukupno smanjenje 40,9 %  $\text{NO}_3\text{-N}$  pri brzini redukcije nitrata 6,7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ . Redukcija nitrata ostvarena tijekom 5,5 sati pokusa se odvijala s unutarstaničnim zalihama ugljika. Denitrifikacija s vanjskim, lakorazgradivim izvorom ugljika, poput acetata, je brža (33 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ ) u odnosu na denitrifikaciju s unutarstaničnim zalihama ugljika (6,7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ ) (slika 5). U ovom pokusu je zabilježeno nakupljanje nitrita (slika 5), koji su dosegli maksimalnu vrijednost 19 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  u drugom satu pokusa, i nakon toga su se postepeno reducirali, te je pokus završio sa 6 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  u 7,5. satu. Redukcija nitrita od 2. do 7,5. sata pokusa se također odvijala s unutarstaničnim zalihama ugljika kao donorom elektrona (slika 5). Vrijednost pH je rasla s početnih 7,4 na maksimalnih 8,5 u drugom satu pokusa, a nakon toga, kako je iscrpljen vanjski izvor ugljika, vrijednost pH je postepeno padala i na kraju pokusa u 7,5. satu pokusa je iznosila 7,6 (slika 6).

Omjer C/N 2 je osigurao 98,8 % smanjenje vrijednosti KPK i 78,7 % smanjenje početne koncentracije nitrata tijekom prvih šest sati pokusa (također nepotpuna denitrifikacija). Sveukupno je uklonjeno 933 mg KPK pri brzini 155,5 mg KPK/Lh (slika 7). Istovremeno je uklonjeno 196 mg NO<sub>3</sub>-N pri brzini 32,7 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh s vanjskim, lako razgradivim izvorom ugljika (acetatom). Tijekom narednih 1,5 sati pokusa uklonjeno je dodatnih 31 mg NO<sub>3</sub>-N/L s unutarstaničnim rezervama ugljika pri brzini 20,7 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh, što je rezultiralo sveukupnim smanjenjem 91,2 % nitrata. Tijekom pokusa je zabilježeno nakupljanje nitrita, uz maksimalnu koncentraciju 29 mg NO<sub>2</sub>-N/L u 3. i 3,5. satu pokusa, koji su se dalje reducirali. Organski sastojci koji su dodani da bi se ostvario omjer C/N 2 nisu bili dovoljni za potpunu denitrifikaciju nitrata, niti za denitrifikaciju akumuliranih nitrita. Na kraju pokusa, u 7.5 satu preostalo je 22 mg NO<sub>3</sub>-N/L i 9 mg NO<sub>2</sub>-N/L (slika 8). Vrijednost pH je rasla s početnih 7,4 na maksimalnih 9,4 u 5. satu pokusa, i nakon toga je lagano opadala, te je na kraju pokusa pH vrijednost iznosila 8,6 (slika 9).

Za redukciju 250±5 mg NO<sub>3</sub>-N/L je omjer C/N 3 osigurao minimalnu potrebnu količinu organskih sastojaka (slike 10-12) da bi se zadovoljili zakonski propisi za ispuštanje u površinske vode (NN 26/2020). Pri istraživanom omjeru zabilježeno je 95,5 % smanjenje KPK (slika 10) i 99,2 % smanjenje NO<sub>3</sub>-N (slika 11). Pokus je završio u 7,5. satu, a postignute vrijednosti KPK, NO<sub>3</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N su iznosile 65 mg KPK/L, 2 mg NO<sub>3</sub>-N/L i 0 mg NO<sub>2</sub>-N/L. Sveukupno je utrošeno 1379 mg KPK pri brzini 183,9 mg KPK/Lh (slika 10) i 252 mg NO<sub>3</sub>-N pri brzini 33,6 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh. I u ovom pokusu je zabilježeno nakupljanje nitrita, i to maksimalnih 41 mg NO<sub>2</sub>-N/L u 3. satu pokusa, koji su se potpuno reducirali do kraja pokusa u 7,5. satu (slika 11). Vrijednost pH je rasla s početnih 7,4 na maksimalnih 9,3 u 7. satu pokusa i na kraju pokusa, u 7,5. satu je iznosila 9 (slika 12).

Da bi se odvijala denitrifikacija potrebno je osigurati izvor ugljika. Kao izvor ugljika mogu poslužiti (Lu i sur., 2014; Cherchi i sur., 2009) :

- biološki razgradivi organski sastojci prisutni u otpadnoj vodi
- vanjski izvor ugljika, poput primjerice acetata, glukoze, metanola, etanola
- unutarstanične rezerve ugljika.

U ovom radu korišten je vanjski izvor ugljika, acetat. Organski sastojci u denitrifikaciji služe kao donori elektrona i kao izvor energije za rast nove stanične biomase (Rossi i sur., 2015). U procesu denitrifikacije se istovremeno oksidiraju organski sastojci i reduciraju nitrati, pa je za potpunu denitrifikaciju nužno osigurati dovoljnu količinu organskih sastojaka (elektron donora) za redukciju nitrata i nitrita (elektron akceptora) (Chen i sur., 2021a; Du i sur., 2019; Metcalf & Eddy, 2003).

Omjeri C/N 1 i 2 nisu osigurali dovoljnu količinu organskih sastojaka za potpunu redukciju  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  (slike 4, 5, 7 i 8), što je u suglasju s Chen i sur. (2021a) i Metcalf & Eddy (2003). Minimalna potrebna količina organskih sastojaka u ovom radu se postiže pri omjeru C/N 3 (slike 10 i 11). Veća količina organskih sastojaka (omjer C/N > 3) bi također osigurala potpunu denitrifikaciju (Wang i sur., 2021; Zhang i sur., 2016), međutim, u obrađenoj vodi bi preostalo organskih sastojaka u suvišku koji bi zahtijevali daljnje stupnjeve obrade otpadne vode za postizanje maksimalne dozvoljene koncentracije za ispust u površinske vode od 125 mg KPK/L (NN 26/2020). Postignute vrijednosti KPK na kraju pokusa pri omjerima C/N 1, 2 i 3 su iznosile 101 mg KPK/L, 11 mg KPK/L i 65 mg KPK/L. Zabilježene brzine uklanjanja organskih sastojaka su bile slične i iznosile su 184 mg KPK/Lh, 155 mg KPK/Lh i 183,9 mg KPK/Lh pri omjerima C/N 1, 2 i 3 (slike 4, 7 i 10). Vrijednosti postignute u ovom istraživanju bliske su literaturi koja navodi omjere KPK/N 4-15 kao potrebne za potpunu denitrifikaciju, a sam omjer KPK/N ovisi o karakteristikama uporabljenog izvora ugljika za denitrifikaciju (Peng i sur., 2007; Metcalf & Eddy, 2003; Zumft, 1997). Također, postignuti rezultati u ovom radu su slični s Foglar i Briški (2003) koji su zabilježili minimalan potreban omjer  $\text{MeOH/NO}_3\text{-N}$  2,5 za potpunu denitrifikaciju 200 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , nešto niže od rezultata ostvarenih u ovom radu (C/N 3, slike 10 i 11) jer minimalan potreban omjer C/N za potpunu denitrifikaciju ovisi o korištenom izvoru ugljika, a poznato je da se s metanolom kao izvorom ugljika ostvaruje potpuna denitrifikacija pri nižim omjerima C/N (Cherchi i sur., 2009; Foglar i Briški, 2003).

U procesu aktivnog mulja su tri osnovne skupine skladišnih spojeva unutar mikrobnih stanica (Beun i sur., 2000; van Loosdrecht i sur., 1997):

- polisaharidi, primjerice glikogen
- polihidroksialkanoati (PHA)
- polifosfati.

U procesima biološke obrade otpadnih voda, koji su vrlo dinamički sustavi, uloga koju imaju skladišni spojevi unutar mikrobnih stanica je vrlo važna, i utječe na učinkovitost pojedinih procesa (Beun i sur., 2000; van Loosdrecht i sur., 1997).

Postoje tri kriterija po kojima se spoj može svrstati u spoj zalihe energije (Bernat i sur., 2008):

- akumulacija u uvjetima kada je dobava energije iz vanjskog izvora energije u suvišku potreba za stanični rast
- korištenje kada vanjski izvor više nije dovoljan za održavanje stanice
- razgradnja zbog proizvodnje energije i upotreba kao elektron donor za uklanjanje nutrijenata.

Ekstracelularne polimerne tvari (EPS, engl. extracellular polymeric substance) su osnovna komponenta organskih sastojaka aktivnog mulja, i vrlo su važne za adheziju, agregaciju stanica, stvaranje biofilma i flokulaciju (Wei i sur., 2019). Postoje dvije vrste EPS, i to labavo vezani EPS (LB-EPS, engl. loosely bound) i čvrsto vezani EPS (TB-EPS, engl. tightly bound). EPS se uglavnom sastoji od polisaharida (PS), proteina (PN), huminskih kiselina i drugih spojeva. EPS posjeduje funkcionalne skupine koje su važne za taloženje mulja, agregaciju mikroorganizama i nastajanje biofilma (Zhang i sur., 2021; Zhu i sur., 2015). Kada se mikroorganizmi nađu u stresnim uvjetima, kao što je primjerice niska koncentracija organskih sastojaka, odnosno nizak omjer C/N, mikroorganizmi proizvode dodatnu količinu EPS da bi se zaštitili na način da održavaju osmotski pritisak (Premnath i sur., 2020).

Osim EPS, mikroorganizmi mogu koristiti kao izvor ugljika i unutarstanične zalihe ugljika u obliku PHA. Nekada se vjerovalo da se PHA akumulira kada je rast ograničen esencijalnim nutrijentom, poput dušika, fosfora ili sumpora u anoksičnim uvjetima. Međutim, kasnija istraživanja pokazuju da se PHA može akumulirati i bez limitacije rasta (Bernat i sur., 2008). Mikroorganizmi pohranjuju PHA u postrojenju za biološku obradu otpadnih voda uglavnom zbog toga što se nađu u promjenjivim uvjetima dostupnosti odnosno nedostupnosti elektron donora i elektron akceptora. U takvim uvjetima, bakterije koje imaju sposobnost pohrane ugljika, dobivaju kompetitivnu prednost u odnosu na bakterije koje nemaju sposobnost pohrane supstrata (Van Loosdrecht i sur., 1997). Postoje dvije osnovne skupine bakterija koje imaju sposobnost pohrane PHA: polifosfat akumulirajući organizmi (PAO) koji provode uklanjanje fosfata iz otpadne vode u procesu naprednog biološkog uklanjanja fosfora, i glikogen akumulirajući organizmi (GAO). I PAO i GAO osim što pohranjuju PHA, pohranjuju i glikogen (Oehmen i sur., 2005). Rast mikroorganizama na unutarstaničnim zalihama PHA može biti i do 6 puta sporiji u odnosu na vanjski izvor KPK (Karahan i sur., 2008).

Uklanjanje nitrata pri omjerima C/N 1 i 2 (slike 5 i 8) se odvijalo pri dvije brzine, koje su reflektirale korišteni izvor ugljika – acetat (vanjski, lako razgradivi organski spoj) odnosno unutarstanične zalihe ugljika. Redukcija nitrata pri omjeru C/N 3 (slika 11) se odvijala ujednačenom brzinom jer denitrifikacija nije bila limitirana (slika 10) količinom elektron donora (Zhang i sur., 2016). Zabilježene brzine redukcije nitrata s acetatom kao izvorom ugljika su bile u uskom rasponu vrijednosti i iznosile su 33 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh, 32,7 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh i 33,6 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh pri omjerima C/N 1, 2 i 3 (slike 5, 8 i 11). Vrlo sličnu brzinu denitrifikacije zabilježili su Foglar i Briški (2003), odnosno potpunu denitrifikaciju 200 mg NO<sub>3</sub>-N/L za šest sati s metanolom kao izvorom ugljika. Denitrifikacijom visoke koncentracije nitrata su se bavili



i drugi autori, poput Fernández-Nava i sur. (2010), Fernández-Nava i sur. (2008), Soto i sur. (2007) i Carrera i sur. (2003).

Fernández-Nava i sur. (2010) su proveli pokuse denitrifikacije otpadne vode koja je sadržavala 2500 mg NO<sub>3</sub>-N/L s izvorima ugljika: otpadna voda iz čišćenja reaktora koji su bili korišteni za proizvodnju slatkiša, ostatak bogat saharozom iz proizvodnje bezalkoholnih pića i ostatak bogat mliječnom kiselinom iz tvornice mlijeka. Pokusi su postavljeni s početnih oko 600 mg NO<sub>3</sub>-N/L. Postigli su maksimalne specifične brzine denitrifikacije 42 i 48 mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS h. Tijekom reakcijskog vremena 4-6 sati dobili su obrađenu vodu koja je sadržavala vrlo niske koncentracije KPK i koja je bila bez nitrata. Optimalni omjeri KPK/N su bili 4,6 za otpadnu vodu iz industriju mlijeka i 5,5-6,5 za druga dva istraživana izvora ugljika (Fernández-Nava i sur., 2010).

Fernández-Nava i sur. (2008) su istraživali denitrifikaciju početnih oko 600 mg NO<sub>3</sub>-N/L s metanolom kao izvorom ugljika pri omjeru KPK/NO<sub>3</sub>-N 4 s aktivnim muljem porijeklom s biološke obrade otpadne vode deponija, i s aktivnim muljem porijeklom s uređaja za obradu otpadnih voda grada. S aktivnim muljem porijeklom s obrade otpadne vode deponija postigli su potpuno uklanjanje nitrata tijekom šest sati procesa. Autori sugeriraju da je denitrifikacija provedena kinetikom nultog reda obzirom na koncentraciju nitrata, te su zabilježili brzinu uklanjanja nitrata 22,8 mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS h. Tijekom prvih nekoliko ciklusa zabilježili su akumulaciju nitrita do 35 mg/L, međutim, u daljnjim ciklusima je akumulacija nitrita bila oko 2 mg NO<sub>2</sub>-N/L. S aktivnim muljem porijeklom s uređaja za obradu otpadnih voda grada bilo je potrebno 10 sati za potpunu denitrifikaciju. I u ovom slučaju je kinetika bila nultog reda, a brzina redukcije nitrata je bila niža i iznosila je 7,3 mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS h. Viša brzina denitrifikacije je ostvarena s muljem s obrade otpadne vode deponija jer je taj mulj bio aklimatiziran na visoke koncentracije nitrata, za razliku od mulja s uređaja za obradu otpadne vode grada. Istraživali su također učinak koncentracije kalcijevih iona na denitrifikaciju; 50, 150, 450 i 550 mg Ca/L; jer otpadna voda iz proizvodnje nehrđajućeg čelika osim što ima visoku koncentraciju nitrata, ima i visoku koncentraciju kalcija. Pri koncentraciji kalcija od 150 mg/L postigli su najvišu brzinu denitrifikacije, 22,8 mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS h, a niže i više koncentracije kalcija su djelovale nepovoljno na brzinu denitrifikacije (Fernández-Nava i sur., 2008).

Carrera i sur. (2003) su također istraživali denitrifikaciju s visokom koncentracijom nitrata, i to 700-1900 mg NO<sub>3</sub>-N/L s izvorom ugljika koji je bio nusproizvod kemijske tvornice slijedećeg sastava: 60 % metanol, 10 % aceton, 10 % izopropil alkohol i 20 % voda, u dvomuljnom sustavu (odvojen stupanj nitrifikacije i denitrifikacije), pri čemu su pokuse vodili pri temperaturama 6, 8, 10, 15, 20 i 25 °C. Svaki pokus je trajao 24 h. Maksimalna brzina

denitrifikacije je rasla s porastom temperature, pa je najniža bila pri 6 °C, a najviša pri 25 °C. Postigli su maksimalnu brzinu denitrifikacije 0,28 mg N/mg VSS d pri 25 °C, koja je bila viša od brzina denitrifikacije u jednomuljnom sustavu sa sličnim izvorom ugljika. Potreban omjer KPK/N za potpunu denitrifikaciju u dvomuljnom sustavu su odredili stehiometrijski i iznosi  $3,7 \pm 0,9$  mg KPK/mg N (Carrera i sur., 2003).

Soto i sur. (2007) su istraživali denitrifikaciju visoke koncentracije nitrata (100 mg/L), ali pri visokoj koncentraciji soli, 24 g NaCl/L sa sintetskom otpadnom vodom i octenom kiselinom kao izvorom ugljika pri omjerima C/N 30-300. Pokuse su vodili s muljem porijeklom s anaerobnog postrojenja koje je obrađivalo otpadnu vodu riblje industrije. Postigli su maksimalnu specifičnu brzinu denitrifikacije (denitratacije) 12,7 mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS h i maksimalnu specifičnu brzinu denitritacije 13,8 mg NO<sub>2</sub>-N/ g VSS h (Soto i sur., 2007).

U ovom radu brzina redukcije nitrata s unutarstaničnim zalihama ugljika je iznosila 6,7 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh i 20,7 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh pri omjerima C/N 1 i 2 (slike 5 i 8). Razlog razlike u brzini (6,7 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh i 20,7 mg NO<sub>3</sub>-N/Lh) denitrifikacije s unutarstaničnim izvorom ugljika vjerojatno je količina dodanog ugljika na početku pokusa. Naime, pri omjeru C/N 2 je dodana veća količina acetata (944 mg KPK/L) (slika 7) u odnosu na omjer C/N 1 (470 mg KPK/L) (slika 4) pa su denitrifikanti vjerojatno pri omjeru C/N 2 stvorili veću količinu unutarstaničnih zaliha koje su onda dalje mogli koristiti u uvjetima nedostatka vanjskog izvora ugljika, pa je postignuta i veća brzina denitrifikacije s unutarstaničnim zalihama ugljika (slike 5, 8 i 11). Denitrifikaciju s unutarstaničnim zalihama ugljika proučavali su također Chen i sur. (2021a).

Chen i sur. (2021a) su proveli pokuse denitrifikacije pri niskom omjeru C/N 1, 2 i 3 s *Pseudomonas stutzeri* GF2 i s natrijevim acetatom kao izvorom ugljika. Pokuse su vodili pri početnoj koncentraciji nitrata 15, 25 i 35 mg/L pri vrijednostima pH 6, 7 i 8. Svaki pokus je trajao 24 h. Taj soj je pokazao vrlo visoku učinkovitost uklanjanja nitrata, do 92,41 % pri brzini 1,85 mg/Lh, pri čemu su autori zabilježili akumulaciju nitrita od 0,88 mg/L. Denitrifikacija je uspješno provedena pri omjeru C/N 2 jer je soj *Pseudomonas stutzeri* GF2 koristio EPS kao izvor ugljika. Autori su pomoću PCR analize potvrdili da istraživani soj ima tri denitrificirajuća gena, *nir*, *nor* i *nos*, koji kodiraju za ključne enzime u procesu denitrifikacije: nitrit reduktaza (*Nir*), dušikov monoksid reduktaza (*Nor*) i didušikov oksid reduktaza (*Nos*). Omjer C/N utječe na količinu PN, PS i omjer PN/PS unutar EPS. Sa smanjenjem omjera C/N sa 3 na 2, u LB-EPS sadržaj PS se značajno smanjio, a količina PN narasla, što je dovelo do porasta omjera PN/PS. Autori sugeriraju da smanjenje PS sadržaja u LB-EPS ukazuje na to da mikroorganizmi radije koriste PS u LB-EPS u uvjetima nedostatka izvora ugljika (Chen i sur., 2021a). U TB-EPS su porasle količine i PN i PS, i rezultirajući omjer PN/PS je bio visok, što ukazuje na stabilan

biofilm (Wang i sur., 2019). U ukupnom EPS, kako omjer C/N pada, PS lagano opada, a PN sadržaj raste, što upućuje na to da ekstremni uvjeti, poput niskog omjera C/N, potiču lučenje PN i PS da bi se osigurao izvor ugljika (Wang i sur., 2006). Mikroorganizmima je proizvodnja PN veći prioritet od PS, zbog strukture i stabilnosti matriksa (Lu i sur., 2019). EPS ima sposobnost da apsorbira organske sastojke što omogućava mikroorganizmima korištenje organskih sastojaka u uvjetima iscrpljenja organskih sastojaka iz miješane tekućine (Sheng i sur., 2010).

Nitriti su intermedijeri denitrifikacije (Metcalf & Eddy, 2003; Zumft, 1997). Nakupljanje nitrita ukazuje na količinu denitrifikanata koji imaju nitrit reduktazu (provodi redukciju nitrita do dušikovog monoksida). Što je veća količina skupine denitrifikanata koji imaju nitrit reduktazu, to će biti manja količina nakupljenih nitrita tijekom procesa (Heylen i sur., 2006; Almeida i sur., 1995). Također, količina nakupljenih nitrita ovisi i o količini elektron donora (izvora ugljika), odnosno, o omjeru C/N. Nitrit može imati inhibirajući učinak na brojne skupine mikroorganizama u aktivnom mulju (Soto i sur., 2007), iako se smatra da je slobodna nitritna kiselina (*FNA*, engl. *Free nitrous acid*), protonirani oblik nitrita, pravi inhibitor mikrobnog metabolizma (Gerardi, 2002; Anthonisen i sur., 1976). Slobodna nitritna kiselina se može izračunati po formuli (16) i ovisi o koncentraciji nitrita, pH vrijednosti miješane tekućine i temperaturi vođenja procesa. Kiseli pH pomiče ravnotežu između  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{HNO}_2$  prema  $\text{HNO}_2$ , i obrnuto (Gerardi, 2002; Anthonisen i sur., 1976).

$$FNA \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{[\text{NO}_2^- - N] \left( \frac{mg}{L} \right)}{\frac{-2300}{e^{273+T(^{\circ}C)} \times 10^{pH}}} \quad [16]$$

U ovom radu maksimalne izmjerene koncentracije nitrita su iznosile 19 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  u 2. satu pokusa, 29 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  u 3. i 3,5. satu pokusa i 41 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  u 3. satu pokusa pri omjerima C/N 1, 2 i 3 (slike 5, 8 i 11). Budući da su pokusi vođeni s biomasom aktivnog mulja koja je aklimatizirana na visoke koncentracije nitrata  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  i koja je bila u ustaljenom stanju, došlo je do namnažanja denitrifikanata, i do njihove aklimatizacije na nakupljene nitrite tijekom denitrifikacije. Zbog toga nitriti u ovim pokusima nisu imali inhibirajući učinak na denitrifikaciju.

Niže koncentracije nakupljanja nitrita (do 1,2 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ ) su zabilježili Foglar i Briški, (2003) tijekom denitrifikacije 200 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , vjerojatno zbog metanola kao izvora ugljika uporabljenog za proces denitrifikacije.

Moguće je da je do akumulacije nitrita u ovim pokusima (slike 5, 8 i 11) došlo jer je koncentracija otopljenog kisika tijekom pokusa bila  $\leq 0,3$  mg DO/L (slike 6, 9 i 12) (Zumft, 1997). Denitrificirajuće reduktaze imaju različite odgovore na koncentraciju otopljenog kisika. Tako je primjerice Nir reduktaza snažnije reagira na otopljeni kisik od Nar reduktaze, pa dolazi do nakupljanja nitrita (Sun i sur., 2009). Također, kako se sva četiri koraka denitrifikacije odvijaju paralelno, zbog kompeticije dušikovih reduktaza za elektrone dolazi do različite raspodjele elektrona između reduktaza i tako dolazi do nakupljanja intermedijera (Wang i sur., 2021).

Kako su denitrifikanti skupina bakterija koje imaju različite metaboličke sposobnosti, vjerojatno su u aktivnom mulju koji je korišten za pokuse denitrifikacije u ovom radu (slike 4-12) bili prisutni pravi denitrifikanti koji imaju sposobnost redukcije nitrata do  $N_2$ , nitrit reducirajući denitrifikanti koji reduciraju nitrit do  $N_2$ , zatim nepotpuni denitrifikanti koji reduciraju nitrat i nitrit do N-oksid intermedijera, nepotpuni nitrit denitrifikanti koji reduciraju nitrit do N-oksid intermedijera, kao i nedenitrifikanti koji nemaju sposobnost redukcije ni nitrata niti nitrita (Sperl i Hoare, 1971) jer je aktivni mulj korišten u ovim pokusima (slike 4-12) bio aklimatiziran na visoke koncentracije nitrata ( $250 \pm 5$  mg  $NO_3-N/L$ ) i bio u ustaljenom stanju.

Profil vrijednosti pH je bio karakterističan za proces denitrifikacije, i bio je sličan pri sva tri istraživana omjera C/N: vrijednost pH je rasla dok je bilo vanjskog izvora ugljika (acetata), i nakon utroška acetata, vrijednost pH je lagano opadala (slike 6, 9 i 12). Tijekom denitrifikacije dolazi do obnavljanja puferskog kapaciteta miješane tekućine (Chen i sur., 2021b; Adouani i sur., 2015) jer se akumuliraju ioni  $OH^-$  (jednadžba 10) (Adouani i sur., 2015). Vrijednost pH zabilježena tijekom pokusa u ovom radu (slike 6, 9 i 12) je bila pogodna za denitrifikante, jer denitrifikantima odgovara pH vrijednost u rasponu 7-9 zbog najizraženije enzimске aktivnosti reduktaza u tom intervalu (Chen i sur., 2021b).

Budući da su denitrifikanti uglavnom fakultativni anaerobi koji mogu preusmjeriti svoj metabolizam na korištenje otopljenog kisika (aerobni uvjeti) kao krajnjeg akceptora elektrona ili na korištenje dušikovih oksida kao akceptora elektrona (anoksični uvjeti) (Wang i Chu, 2016; Lu i sur., 2014; Zumft, 1997), pokusi u ovom radu (slike 4-12) su vođeni pri koncentraciji otopljenog kisika  $\leq 0,3$  mg DO/L (slike 6, 9 i 12) te je taj način metabolizam denitrifikanata usmjeren na denitrifikaciju (anoksični uvjeti) (slike 4, 5, 7, 8, 10 i 11) umjesto na aerobnu razgradnju organskih sastojaka (Gutierrez-Wing i sur., 2012). Povišena koncentracija otopljenog kisika djeluju na denitrifikaciju na način da inhibira denitrificirajuće reduktaze, odnosno inhibira proces denitrifikacije (Wang i Chu, 2016).

Pokusi u ovom radu (slike 4-12) su vođeni pri temperaturi  $22\pm 2$  °C, temperaturi koja je pogodna za aktivnost denitrifikanata (Cherchi i sur., 2009; Carrera i sur., 2003; Metcalf & Eddy, 2003; Zumft, 1997).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Minimalna potrebna količina organskih sastojaka iz acetata kao izvora ugljika za potpunu denitrifikaciju visoke koncentracije nitrata,  $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , je omjer C/N 3.
2. Brzine uklanjanja organskih sastojaka u procesu denitrifikacije pri omjeru C/N 1, 2 i 3 uz acetat kao izvor ugljika su bile u rasponu 155 mg KPK/Lh - 184 mg KPK/Lh.
3. Uklanjanje nitrata pri omjerima C/N 1 i 2 odvijalo se pri dvije brzine kao odraz korištenog egzogenog te unutarstaničnog izvora ugljika, dok je pri omjeru C/N 3 postignuta ujednačena brzina s obzirom da denitrifikacija nije bila limitirana izvorom ugljika.
4. Brzine redukcije nitrata su bile u rasponu 32,7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  - 33,6 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  pri omjerima C/N 1, 2 i 3. Brzina redukcije nitrata s unutarstaničnim zalihama iznosila je 6,7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  pri omjeru C/N 1, odnosno 20,7 mg  $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$  pri omjeru C/N 2.
5. Maksimalne izmjerene koncentracije nitrita u pokusima denitrifikacije su iznosile 19 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , 29 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i 41 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  pri omjerima C/N 1, 2 i 3.
6. Aktivni mulj korišten za istraživanje bio je prethodno aklimatiziran na visoke koncentracije nitrata ( $250 \pm 5$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ) te u ustaljenom stanju što je omogućilo uspješnu provedbu procesa denitrifikacije.

## 6. LITERATURA

Adouani N, Limousy L, Lendormi T, Sire O (2015) N<sub>2</sub>O and NO emissions during wastewater denitrification step: Influence of temperature on the biological process. *Comptes Rendus Chim* **18**, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2014.11.005>

Albina P, Durban N, Bertron A, Albrecht A, Robinet JC, Erable B (2019) Influence of Hydrogen Electron Donor, Alkaline pH, and High Nitrate Concentrations on Microbial Denitrification: A Review. *Int J Mol Sci*, **20**, 5163. <https://doi.org/10.3390/ijms20205163>

Almeida JS, Reis MA, Carrondo MJ (1995) Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol Bioeng* **46** (5), 476–484. <https://doi.org/10.1002/bit.260460512>

Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TB, Srinath EG (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* **48** (5), 835-852.

APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21. izd., American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation, Washington DC.

Bates BC, Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP (2008) Climate Change and Water. U: IPCC Technical Paper VI, Intergovernmental Panel on Climate Change.

Berks BC, Ferguson SJ, Moir JWB, Richardson DJ (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *BBA - Bioenerg* **1232**, 97–173. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00092-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00092-5)

Bernat K, Wojnowska-Baryła I, Dobrzyn A (2008) Denitrification with endogenous carbon source at low C/N and its effect on P (3HB) accumulation. *Bioresour Technol* **99**, 2410–2418. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.008>

Beun JJ, Verhoef E V, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (2000) Stoichiometry and kinetics of polyβ-hydroxybutyrate metabolism under denitrifying conditions in activated sludge cultures. *Biotechnol Bioeng* **68**, 496-507. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000605\)68:5<496::AID-BIT3>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000605)68:5<496::AID-BIT3>3.0.CO;2-S)

Brian K, Pratt S, Gapes D, Shilton AN (2009) Investigation Into Methanol As a Carbon Source for Denitrification in Wastewater Treatment. 49th Annual Conference of New Zealand Water

and Water Association, Rotorua.

Carrera J, Vicent T, Lafuente FJ (2003) Influence of temperature on denitrification of an industrial high-strength nitrogen wastewater in a two-sludge system. *Water SA* **29**, 11–16. <https://doi.org/10.4314/wsa.v29i1.4939>

Chen C, Ali A, Su J, Wang Y, Huang T, Gao J (2021a) *Pseudomonas stutzeri* GF2 augmented the denitrification of low carbon to nitrogen ratio: Possibility for sewage wastewater treatment. *Bioresour Technol* **333**, 125169. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125169>

Chen H, Tu Z, Wu S, Yu G, Du C, Wang H, i sur. (2021b) Recent advances in partial denitrification-anaerobic ammonium oxidation process for mainstream municipal wastewater treatment. *Chemosphere* **278**, 130436. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130436>

Chen J, Strous M (2013) Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1827**, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.10.002>

Cherchi C, Onnis-Hayden A, El-Shawabkeh I, Gu AZ (2009) Implication of Using Different Carbon Sources for Denitrification in Wastewater Treatments. *Water Environ Res* **81**, 788–799. <https://doi.org/10.2175/106143009x12465435982610>

Direktiva (1991) Direktiva o pročišćavanju komunalnih otpadnih voda. Službeni list Europske unije 15. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A31991L0271>  
Pristupljeno 30. lipnja 2022.

Du R, Cao S, Peng Y, Zhang H, Wang S (2019) Combined Partial Denitrification (PD)-Anammox: A method for high nitrate wastewater treatment. *Environ Int* **126**, 707–716. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.007>

Elgood Z, Robertson WD, Schiff SL, Elgood R (2010) Nitrate removal and greenhouse gas production in a stream-bed denitrifying bioreactor. *Ecol Eng* **36**, 1575–1580. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.03.011>

Fernández-Nava Y, Marañón E, Soons J, Castrillón L (2008) Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. *Bioresour Technol* **99**, 7976–7981. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.048>

Fernández-Nava Y, Marañón E, Soons J, Castrillón L (2010) Denitrification of high nitrate



concentration wastewater using alternative carbon sources. *J Hazard Mater* **173**, 682–688. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.140>

Foglar L, Briški F (2003) Wastewater denitrification process - The influence of methanol and kinetic analysis. *Process Biochem* **39**, 95–103. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00318-7](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00318-7)

Gerardi MH (2002) *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*, 1. izd., John Wiley & Sons, Inc., New York.

Gutierrez-Wing MT, Malone RF, Rusch KA (2012) Evaluation of polyhydroxybutyrate as a carbon source for recirculating aquaculture water denitrification. *Aquac Eng* **51**, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.07.002>

Han B, Butterly C, Zhang W, He J zheng, Chen D (2021) Adsorbent materials for ammonium and ammonia removal: A review. *J Clean Prod* **283**, 124611. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124611>

Heylen K, Gevers D, Vanparys B, Wittebolle L, Geets J, Boon N, i sur. (2006) The incidence of nirS and nirK and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environ Microbiol* **8**, 2012–2021. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01081.x>

Hiraishi A, Khan ST (2003) Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 103–109. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1198-y>

Hoshino T, Terahara T, Tsuneda S, Hirata A, Inamori Y (2005) Molecular analysis of microbial population transition associated with the start of denitrification in a wastewater treatment process. *J Appl Microbiol* **99**, 1165–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02698.x>

Johnson PTJ, Townsend AR, Cleveland CC, Glibert PM, Howarth RW, Mckenzie VJ, i sur. (2010) Linking environmental nutrient enrichment and disease emergence in humans and wildlife. *Ecol Appl* **20**, 16–29. <https://doi.org/10.1890/08-0633.1>

Kapoor A, Viraraghavan T (1997) Nitrate removal from drinking water-review. *J Environ Eng* **123**, 371–380. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1997\)123:4\(371\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1997)123:4(371))

Karahan O, Orhon D, van Loosdrecht MCM (2008) Simultaneous storage and utilization of polyhydroxyalkanoates and glycogen under aerobic conditions. *Water Sci Technol* **58** (4), 945–

951. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.403>

Kim E, Shin SG, Jannat MAH, Tongco JV, Hwang S (2017) Use of food waste-recycling wastewater as an alternative carbon source for denitrification process: A full-scale study. *Bioresour Technol* **245**, 1016–1021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.168>

Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B (2018) The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol* **16**, 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>

Lee NM, Welander T (1996) The effect of different carbon sources on respiratory denitrification in biological wastewater treatment. *J Ferment Bioeng* **82**, 277–285. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)88820-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)88820-9)

Lu H, Chandran K, Stensel D (2014) Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Res* **64**, 237–254. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.042>

Lu LL, Wang BJ, Zhang Y, Xia LJ, An D, Li HJ (2019) Identification and nitrogen removal characteristics of *Thauera* sp. FDN-01 and application in sequencing batch biofilm reactor. *Sci Total Environ* **690**, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.453>

Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4. izd., Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (ured.), McGraw-Hill Education, New York.

Oehmen A, Keller-Lehmann BJ, Zeng R, Yuan Z, Keller J (2005) Optimization of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems. *J Chromatogr A* **1070**, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.020>

Osaka T, Shirotani K, Yoshie S, Tsuneda S (2008) Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process. *Water Res* **42**, 3709–3718. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.06.007>

Pan Y, Ni BJ, Bond PL, Ye L, Yuan Z (2013) Electron competition among nitrogen oxides reduction during methanol-utilizing denitrification in wastewater treatment. *Water Res* **47**, 3273–3281. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.054>

Pan Y, Ni BJ, Lu H, Chandran K, Richardson D, Yuan Z (2015) Evaluating two concepts for the modelling of intermediates accumulation during biological denitrification in wastewater treatment. *Water Res* **71**, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.029>

Peng Y, Ma Y, Wang S (2007) Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process. *J Environ Sci* **19**, 284–289. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60046-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60046-1)

Philippot L, Andert J, Jones CM, Bru D, Hallin S (2011) Importance of denitrifiers lacking the genes encoding the nitrous oxide reductase for N<sub>2</sub>O emissions from soil. *Glob Chang Biol* **17**, 1497–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2010.02334.x>

Pravilnik (2020) Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. Narodne novine 26, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020\\_03\\_26\\_622.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_03_26_622.html) Pristupljeno 30. lipnja 2022.

Premnath N, Mohanrasu K, Rao RGR, Dinesh GH, Prakash GS, Pugazhendhi A, i sur. (2020) Effect of C/N substrates for enhanced extracellular polymeric substances (EPS) production and poly cyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation. *Environ Pollut* **275**, 116035. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116035>

Rossi F, Motta O, Matrella S, Proto A, Vigliotta G (2015) Nitrate removal from wastewater through biological denitrification with OGA 24 in a batch reactor. *Water* **7**, 51–62. <https://doi.org/10.3390/w7010051>

Shapleigh JP (2006) The Denitrifying Prokaryotes. U: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt T (ured). *The Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*; 2. izd., Springer, Berlin/Heidelberg, str. 769–792.

Sheng GP, Yu HQ, Li XY (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnol Adv* **28**, 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>

Soto O, Aspé E, Roedel M (2007) Kinetics of cross-inhibited denitrification of a high load wastewater. *Enzyme Microb Technol* **40**, 1627–1634. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.014>

Sperl GT, Hoare DS (1971) Denitrification with methanol: a selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. *J Bacteriol* **108**, 733–736. <https://doi.org/10.1128/jb.108.2.733-736.1971>

- Sun H, Yang Q, Peng Y, Shi X, Wang S, Zhang S (2009) Nitrite Accumulation during the Denitrification Process in SBR for the Treatment of Pre-treated Landfill Leachate. *Chinese J Chem Eng* **17**, 1027–1031. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(08\)60312-2](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(08)60312-2)
- Sun SP, Nàcher CPI, Merkey B, Zhou Q, Xia SQ, Yang DH, i sur. (2010) Effective biological nitrogen removal treatment processes for domestic wastewaters with low C/N ratios: A review. *Environ Eng Sci* **27**, 111–126. <https://doi.org/10.1089/ees.2009.0100>
- Tian H, Xu R, Canadell JG, Thompson RL, Winiwarter W, Suntharalingam P, i sur. (2020) A comprehensive quantification of global nitrous oxide sources and sinks. *Nature* **586**, 248–256. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2780-0>
- Van Loosdrecht MCM, Pot MA, Heijnen JJ (1997) Importance of bacterial storage polymers in bioprocess. *Water Sci Technol* **35**, 41–47. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(96\)00877-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00877-3)
- Wang H, Chen N, Feng C, Deng Y (2021) Insights into heterotrophic denitrification diversity in wastewater treatment systems: Progress and future prospects based on different carbon sources. *Sci Total Environ* **780**, 146521. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146521>
- Wang J, Chu L (2016) Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process. *Biotechnol Adv* **34**, 1103–1112. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.07.001>
- Wang S, Qian K, Zhu Y, Yi X, Zhang G, Du G, i sur. (2019) Reactivation and pilot-scale application of long-term storage denitrification bio film based on flow cytometry. *Water Res* **148**, 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.10.072>
- Wei L, Li J, Xue M, Wang S, Li Q, Qin K, i sur. (2019) Adsorption behaviors of Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> onto proteins, humic acids, and polysaccharides extracted from sludge EPS: Sorption properties and mechanisms. *Bioresour Technol* **291**, 121868. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121868>
- Xu Z, Song L, Dai X, Chai X (2018) PHBV polymer supported denitrification system efficiently treated high nitrate concentration wastewater: Denitrification performance, microbial community structure evolution and key denitrifying bacteria. *Chemosphere* **197**, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.023>
- Zhang J, Peng Y, Zhang L, Li J, Wei J, Zheng Z, i sur. (2021) Improving the resistance of

Anammox granules to extreme pH shock: The effects of denitrification sludge EPS enhanced by a fluctuating C/N ratio cultivation on granules. *Sci Total Environ* **763**, 144610. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144610>

Zhang Y, Wang XC, Cheng Z, Li Y, Tang J (2016) Effect of fermentation liquid from food waste as a carbon source for enhancing denitrification in wastewater treatment. *Chemosphere* **144**, 689–696. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.036>

Zhu Y, Zhang Y, Ren H, Geng J, Xu K, Huang H, i sur. (2015) Physicochemical characteristics and microbial community evolution of biofilms during the start-up period in a moving bed biofilm reactor. *Bioresour Technol* **180**, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.006>

Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 533–616. <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.4.533-616.1997>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Marina Ugrina izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Marina Ugrina

Marina Ugrina