

# Uklanjanje dušika iz otpadne vode primjenom granuliranoga aktivoga mulja

---

**Galant, Mirjana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*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:159:366691>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Mirjana Galant

**UKLANJANJE DUŠIKA IZ OTPADNE  
VODE PRIMJENOM GRANULIRANOGA  
AKTIVNOGA MULJA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND  
BIOTECHNOLOGY

Mirjana Galant

**NITROGEN REMOVAL FROM  
WASTEWATER USING GRANULATED  
ACTIVATED SLUDGE**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023



Sveučilište u Zagrebu  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Mirjana Galant

**UKLANJANJE DUŠIKA IZ OTPADNE  
VODE PRIMJENOM GRANULIRANOGA  
AKTIVNOGA MULJA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Zagreb, 2023



University of Zagreb

FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY AND  
BIOTECHNOLOGY

Mirjana Galant

**NITROGEN REMOVAL FROM  
WASTEWATER USING GRANULATED  
ACTIVATED SLUDGE**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Full Professor Tibela Landeka Dragičević, PhD

Zagreb, 2023

Rad je izrađen u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Tibeke Landeka Dragičević, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo pri Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tema doktorskog rada naziva *Uklanjanje dušika iz otpadne vode primjenom granuliranoga aktivoga mulja* prihvaćena je temeljem izvješća Povjerenstva za ocjenu teme i imenovanje mentora na 1. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2017/2018 održanoj 26. listopada 2017. godine, te potvrđena na 8. sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2017/2018 održanoj 27. veljače 2018.

## **Informacije o mentoru**

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

Tibela Landeka Dragičević redoviti je profesor u trajnom zvanju na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Znanstveni interes prof. dr. sc. Tibeke Landeka Dragičević obuhvaća biološke procese obrade otpadnih voda, biokemiju i mikrobiologiju uklanjanja organskih i anorganskih spojeva iz otpadne vode, istraživanje strukture mikrobnih zajednica i metaboličke značajke bakterija odgovornih za uklanjanje dušika i fosfora, primjenu tehnika molekularne biologije u razmatranju mikrobnih zajednica, rad sa flokuliranim i granuliranim muljem u obradi otpadne vode, metode zbrinjavanja, obrade i oporabe otpada. Znanstveni rad je publicirala u znanstvenim časopisima i prezentirala na međunarodnim znanstvenim konferencijama. Znanstveno se usavršavala na sustavima za obradu otpadnih voda u Austriji, Češkoj i Sloveniji. Nastavu izvodi na preddiplomskim, diplomskim i doktorskom studiju na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, i na Sveučilišnom interdisciplinarnom poslijediplomskom studiju Ekoinženjerstvo. Mentor je više od 50 završnih radova, više od 50 diplomskih radova i 6 doktorskih disertacija.

Kao istraživač, voditelj i suradnik, sudjelovala je u realizaciji domaćih i međunarodnih znanstveno-istraživačkih projekata iz područja mikrobne ekologije u zaštiti okoliša u biološkoj obradi otpadnih voda i znanstveno-istraživačkih projekata suradnje s gospodarstvom.



Mentorici, prof. dr. sc. Tibeli Landeka Dragičević, pod čijim znanstvenim vodstvom je napravljen ovaj rad, zahvaljujem na predloženoj temi, nesebičnoj podršci i energiji u pomoći tijekom izrade i pisanja ovoga rada. Zahvaljujem na ugodnoj atmosferi rada u Laboratoriju, na inspirativnim zajedničkim komentarima i raspravama.

Hvala doc. dr. sc. Dijani Grgas iz Laboratorija za biološku obradu otpadnih voda na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, za svu pomoć u izradi ove disertacije, i u eksperimentalnom dijelu rada i tijekom pisanja.

Hvala prof. dr. sc. Ireni Landeka Jurčević sa Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za provođenje FISH metoda na velikom broju uzoraka.

Dokumentiranje slika na CLSM za FISH analizu obavljeno je na Institutu Ruđer Bošković i za to hvala dr. sc. Igoru Weberu, znanstvenom savjetniku sa Instituta Ruđer Bošković, i Luciji Horvat, dipl. ing. sa Instituta Ruđer Bošković.

Najveću zahvalnost dugujem mojem Celestinu i sinovima Matiji i Martinu koji su najbolje iskusili sve muke mojeg profesionalnog razvoja. Hvala vam što ste me uvijek bezrezervno podržavali i vjerovali u mene. Hvala na strpljivom podnošenju mojeg odsustvovanja i zauzetosti, a osobito na ohrabrenju kad bih posustala te radovanju svakom mom uspjehu. Njihov osmijeh davao mi je snage da ustrajem u ostvarenju željenog cilja.

Svim suradnicima i prijateljima hvala na svakom obliku pomoći.

Mirjana

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo  
UDK: 628.3:628.356:661.938:681.5.037(043.3)  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Doktorski rad

### UKLANJANJE DUŠIKA IZ OTPADNE VODE PRIMJENOM GRANULIRANOGA AKTIVOGA MULJA Mirjana Galant, dipl.ing.

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Mentor: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević

Aerobni granulirani mulj formiran je iz aktivnog mulja u SBR reaktoru, uz acetat kao izvor ugljika. Povećanje omjera KPK/N povoljno djeluje na uklanjanje KPK, N i P. Učinkovitost uklanjanja N s povećanjem omjera KPK/N od 1 do 23 se povećala od 40% do 80%. S povećanjem omjera KPK/N do vrijednosti omjera KPK/N 17 zabilježen je trend povećanja učinkovitosti uklanjanja P te je pri omjeru KPK/N 17 određena najveća učinkovitost uklanjanja P od 69,3%, a daljnjim povećanjem omjera KPK/N učinkovitost uklanjanja P se smanjivala. S porastom protoka zraka postiže se veća koncentracija otopljenog kisika, raste učinkovitost uklanjanja KPK, međutim, učinkovitost uklanjanja N i P raste s povećanjem koncentracije otopljenog kisika do 2 mg/L dok se daljnjim povećanjem koncentracije otopljenog kisika učinkovitost uklanjanja N i P snižava. Rezultati pokazuju trend smanjenja promjera granule s povećanjem protoka zraka. Povećanje saliniteta negativno djeluje na učinkovitost uklanjanja KPK, N i P. U anoksično/aerobnom procesu, pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi, povećanje omjera C/N povoljno djeluje na uklanjanje N i P. U anoksično/aerobnom procesu pri < 1 mg DO/L u aerobnoj fazi procesa, zabilježen je trend povećanja učinkovitosti uklanjanja organskih i anorganskih sastojaka do omjera KPK/N 14, a pri omjeru KPK/N 17 zabilježeno je smanjenje učinkovitosti uklanjanja NH<sub>4</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P. Pohranjivanjem AGS na +4 °C u vodovodnoj vodi tijekom 12 mjeseci granule ne mijenjaju boju, veličina se malo smanji, i imaju blago eliptični oblik. Nakon 12 dana granule se reaktiviraju, a nakon 16 dana pokazale aktivnost kao prije pohranjivanja. Primjenom FISH metode u aerobnom granuliranom mulju dokazani su mikrobn klasteri odgovorni za procese nitritacije, nitratacije, denitrifikacije, uklanjanje fosfora (PAOs), anoksično uklanjanje fosfora uz NO<sub>2</sub>-N i NO<sub>3</sub>-N kao akceptore elektrona (DPAOs), i pohranjivanje glikogena (GAOs).

**Broj stranica:** 164

**Broj slika:** 39

**Broj tablica:** 4

**Broj literaturnih navoda:** 330

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** aerobni granulirani mulj, uklanjanje dušika, stabilnost, aktivnost

**Datum obrane:** 13. rujna 2023.

#### **Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. doc. dr. sc. Dijana Grgas, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
2. prof. dr. sc. Božidar Šantek, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet
3. prof. dr. sc. Mirna Habuda-Stanić, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, Zagreb i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering**  
**UDK: 628.3:628.356:661.938:681.5.037(043.3)**  
**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Biotechnology**

**Doctoral thesis**

### **NITROGEN REMOVAL FROM WASTEWATER USING GRANULATED ACTIVATED SLUDGE**

**Mirjana Galant, MSc**

**Thesis performed at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb**

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

Aerobic granular sludge was formed from activated sludge in an SBR reactor, with acetate as a carbon source. Increasing the COD/N ratio has a favorable effect on COD, N and P removal. N removal efficiency with increasing COD/N ratio from 1 to 23 increased from 40% to 80%. With the increase of the KPK/N ratio to the KPK/N ratio value of 17, a trend of increasing P removal efficiency was recorded, and at the KPK/N ratio of 17, the highest P removal efficiency of 69.3% was determined, and with a further increase in the KPK/N ratio, the P removal efficiency was reduced. With an increase in air flow, a higher concentration of dissolved oxygen is achieved, the COD removal efficiency increases, however, the N and P removal efficiency increases with an increase in the dissolved oxygen concentration up to 2 mg/L, while a further increase in the dissolved oxygen concentration decreases the N and P removal efficiency. The results show a trend of decreasing granule diameter with increasing air flow. Increasing salinity has a negative effect on COD, N and P removal efficiency. In the anoxic/aerobic process, at 2 mg DO/L in the aerobic phase, an increase in the C/N ratio has a favorable effect on the removal of N and P. In the anoxic/aerobic process, at < 1 mg DO/L in the aerobic phase of the process, an increasing trend was recorded of organic and inorganic constituents removal efficiency up to a COD/N ratio of 14, and at a COD/N ratio of 17, a decrease in NH<sub>4</sub>-N and PO<sub>4</sub>-P removal efficiency was recorded. By storing AGS at +4 °C in tap water for 12 months, the granules do not change color, their size decreases slightly, and they have a slightly elliptical shape. After 12 days, the granules are reactivated, and after 16 days they showed activity as before storage. Using the FISH method in aerobic granular sludge, microbial clusters responsible for nitrification, denitrification, phosphorus removal (PAOs), anoxic phosphorus removal with NO<sub>2</sub>-N and NO<sub>3</sub>-N as electron acceptors (DPAOs), and glycogen storage (GAOs) were proven.

**Number of pages:** 164

**Number of figures:** 39

**Number of tables:** 4

**Number of references:** 330

**Original in:** Croatian

**Keywords:** aerobic granulated sludge, N removal, AGS stability

**Date of the thesis defense:** September 13, 2023

#### **Reviewers:**

1. Assistant Professor, Dijana Grgas, PhD, University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology
2. Full Professor, Božidar Šantek, PhD, University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology
3. Full Professor, Mirna Habuda-Stanić, PhD, University J.J. Strossmayer Osijek, Faculty of Food Technology

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, Zagreb and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb

## Sažetak

Istraživanja AGS (AGS, engl. *Aerobic Granulated Sludge*) usmjerena su ka poboljšanju učinkovitosti uklanjanja N i P kao i mikrobne bioraznolikosti granula, a pri tome veliki izazov je kako održati strukturnu i funkcionalnu stabilnost u primjeni, kako izbjeći dezintegraciju granula a time i smanjenu učinkovitost uklanjanja C, N i P. Temeljem dosadašnjih spoznaja iz recentne relevantne literature u disertaciji je postavljen cilj istražiti aktivnost i stabilnost aerobnog granuliranog mulja u uklanjanju dušika u ovisnosti o nekoliko čimbenika. Povećanjem omjera KPK/N povećava se učinkovitost uklanjanja KPK, od 57% pri KPK/N 1 do 96% pri KPK/N 23, povećava se učinkovitost uklanjanja N od 40% pri KPK/N 1 do 80% pri omjeru KPK/N 23, kao i povećanje učinkovitosti uklanjanja P do vrijednosti omjera KPK/N 17 od 69,3%, a daljnjim povećanjem omjera KPK/N učinkovitost uklanjanja P se smanjivala. Porastom protoka zraka – povećanjem koncentracije otopljenog kisika, raste učinkovitost uklanjanja KPK, dok učinkovitost uklanjanja N i P raste s povećanjem koncentracije otopljenog kisika do 2 mg DO/L a daljnjim povećanjem koncentracije otopljenog kisika učinkovitost uklanjanja N i P se smanjuje. Povećanje protoka zraka rezultira trendom smanjenja promjera granule. Niži omjer KPK/N, do omjera KPK/N 17, rezultirao je čvrstim granulama jasnih rubova, dok je omjer KPK/N 23 rezultirao velikim, paperjastim i labavim granulama. Povećanje saliniteta negativno djeluje na učinkovitost uklanjanja KPK, N i P. U anoksično/aerobnom procesu, pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi, povećanje omjera C/N povoljno djeluje na uklanjanje N i P. U anoksično/aerobnom procesu pri < 1 mg DO/L u aerobnoj fazi procesa, zabilježen je trend povećanja učinkovitosti uklanjanja organskih i anorganskih sastojaka do omjera KPK/N 14, a pri omjeru KPK/N 17 zabilježeno je smanjenje učinkovitosti uklanjanja NH<sub>4</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P. Pohranjivanjem AGS na +4 °C u vodovodnoj vodi tijekom 12 mjeseci granule ne mijenjaju boju, veličina se malo smanji, i imaju blago eliptični oblik. Nakon 12 dana granule se reaktiviraju, a nakon 16 dana pokazale aktivnost kao prije pohranjivanja. Primjenom FISH metode u AGS su dokazani mikrobni klasteri odgovorni za uklanjanje dušika, za procese nitritacije (AOB), nitratacije (NOB) i denitrifikacije (denitrifikanti), za uklanjanje fosfata (PAOs i DPAOs) i pohranjivanje glikogena (GAOs).

Ključne riječi: aerobni granulirani mulj, uklanjanje N i P

## Summary

Research on aerobic granulated sludge (AGS) is aimed at improving the efficiency of N and P removal as well as the microbial biodiversity of the granules, and the challenge is how to maintain structural and functional stability in practice, how to avoid disintegration of the granules and thus reduced removal efficiency of C, N and P. Based on the current knowledge from recent relevant literature, the goal of the dissertation was to investigate the activity and stability of aerobic granular sludge in nitrogen removal depending on several factors. By increasing the COD/N ratio, COD removal efficiency increases, from 57% at COD/N 1 to 96% at COD/N 23, N removal efficiency increases from 40% at COD/N 1 to 80% at COD/N ratio 23, as well as an increase in the efficiency of P removal up to the KPK/N ratio of 17 of 69.3%, and with a further increase in the KPK/N ratio, the P removal efficiency decreased. With an increase in air flow - an increase in dissolved oxygen concentration, COD removal efficiency increases, while N and P removal efficiency increases with an increase in dissolved oxygen concentration up to 2 mg DO/L, and with a further increase in dissolved oxygen concentration, N and P removal efficiency decreases. An increase in air flow results in a trend of decreasing granule diameter. A lower COD/N ratio, up to a COD/N ratio of 17, resulted in strong granules with clear edges, while a COD/N ratio of 23 resulted in large, fluffy and loose granules. An increase in salinity has a negative effect on the removal efficiency of COD, N and P. In the anoxic/aerobic process, at 2 mg DO/L in the aerobic phase, an increase in the C/N ratio has a favorable effect on the removal of N and P. In the anoxic/aerobic process at < 1 mg DO/L in the aerobic phase of the process, a trend of removal efficiency increasing of organic and inorganic components was recorded up to a COD/N ratio of 14, and at a COD/N ratio of 17, a decrease in the removal efficiency of NH<sub>4</sub>-N and PO<sub>4</sub>-P was recorded. By storing AGS at +4 °C in tap water for 12 months, the granules do not change color, their size decreases slightly, and they have a slightly elliptical shape. After 12 days, the granules are reactivated, and after 16 days they showed activity as before storage. Using the FISH method in AGS, microbial clusters responsible for nitrogen removal, nitrification (AOB), nitrification (NOB) and denitrification processes (denitrificants), phosphate removal (PAOs and DPAOs) and glycogen storage (GAOs) were proven.

Keywords: aerobic granular sludge, N and P removal

# SADRŽAJ

	str.
<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b>	<b>4</b>
2.1. Formiranje, morfologija i definicija aerobnih granula	4
2.2. Svojstva aerobnih granula	12
2.2.1. Fizikalna svojstva aerobnih granula	12
2.2.2. Kemijska svojstva aerobnih granula	14
2.2.3. Biološka svojstva aerobnih granula	16
2.3. Razlike aerobnog granuliranog mulja i aktivnog mulja	18
2.4. Mikrobna zajednica aerobnih granula	21
2.5. Čimbenici kontrole formiranja aerobnih granula	22
2.6. Proces formiranja aerobnog granuliranog mulja	24
2.7. Okolišni i procesni čimbenici formiranja i strukturne stabilnosti aerobnih granula	25
2.7.1. Sjeme mulja	25
2.7.2. Izvor ugljika i omjer C/N – Vrsta supstrata i stopa organskog opterećenja	29
2.7.3. Dizajna i radni uvjeti reaktora	31
2.7.4. Hidrodinamičke sile smicanja	32
2.7.5. Strategija hranjenja	34
2.7.6. Otopljeni kisik, temperatura i pH	34
2.7.7. Omjer PN/PS	37
2.7.8. Veličina čestica	37
2.8. Stabilnost aerobnog granuliranog mulja	37
2.9. SBR reaktor	41
2.10. Biološko uklanjanje dušika	42
2.10.1. Nitrifikacija i denitrifikacija	44
2.10.1.1. Mikroorganizmi nitrifikacije i denitrifikacije	46
2.10.1.2. Čimbenici procesa nitrifikacije i denitrifikacije	48
2.10.1.3. Izvori ugljika za denitrifikaciju	49
2.10.2. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija	50
2.10.2.1. Čimbenici kontrole SND procesa	51
2.10.3. Djelomična nitrifikacija i denitrifikacija	52
2.11. Biološko uklanjanje fosfora	54
2.11.1. Denitrificirajuća defosfatacija	54
2.12. Uklanjanje N iz otpadne vode primjenom aerobnog granuliranog mulja	56
2.13. FISH metoda analize mikrobne zajednice	58
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	<b>60</b>
3.1. Materijal i metode	60
3.1.1. Aerobne granule – od flokule do granule	60
3.1.2. Supstrat – sintetska otpadna voda	62
3.1.3. Instrumenti i pribor	62
3.2. Metode rada	64
3.2.1. Priprema granula	64
3.2.2. Konfiguracije SBR	65

3.2.3. Šaržni pokusi – kinetika uklanjanja N, C i P sa aerobnim granulama	65
3.3. Fizikalno-kemijske analitičke metode	66
3.3.1. Određivanje ukupnog dušika	66
3.3.2. Određivanje amonijakalnog dušika	66
3.3.3. Određivanje koncentracije nitrita	67
3.3.4. Određivanje koncentracije nitrata	67
3.3.5. Određivanje koncentracije fosfata	67
3.3.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK)–zatvorena reflux metoda	68
3.3.7. Određivanje MLSS	69
3.3.8. Određivanje temperature	70
3.3.9. Određivanje pH vrijednosti	70
3.3.10. Određivanje koncentracije otopljenog kisika	70
3.3.11. Veličina i zastupljenost granula	70
3.4. Mikrobiološke metode	70
3.4.1. Fluorescencija <i>in situ</i> hibridizacija (FISH)	70
<b>4. REZULTATI</b>	<b>73</b>
4.1. Uklanjanje dušika iz otpadne vode – izazovi u primjeni aerobnog granuliranog mulja	73
4.2. Učinak omjera KPK/N na učinkovitost uklanjanja N	75
4.3. Učinak koncentracije otopljenog kisika na učinkovitost uklanjanja N	81
4.4. Veličina i zastupljenost granula pri različitim protocima zraka	82
4.5. Promjena koncentracije MLSS u ovisnosti o omjeru KPK/N	84
4.6. Učinak slanosti na stabilnost i aktivnost aerobnih granula	85
4.7. Uklanjanje N u anaoksično/aerobnom režimu rada, pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi procesa	87
4.8. Uklanjanje N u anoksično/aerobnom režimu rada pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika	93
4.9. Učinak pohranjivanja aerobnoga granuliranog mulja na +4 °C tijekom dužeg vremenskog perioda	98
4.10. Mikrobni agregati – FISH analiza	99
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>103</b>
5.1. Učinkovitost uklanjanja N, C i P i stabilnost granula ovisno o omjeru KPK/N	103
5.2. Učinkovitost uklanjanja N, C i P ovisno o koncentraciji otopljenog kisika	112
5.3. Učinak protoka zraka na veličinu granula	116
5.4. Koncentracija mikrobne biomase u ovisnosti o omjeru KPK/N	120
5.5. Stabilnost aerobnih granula i učinkovitost uklanjanja N, C i P u uvjetima slanosti	122
5.6. Uklanjanje N, C i P u anoksično/aerobnom režimu rada SBR	128
5.7. Uklanjanje N, C i P u anoksično/aerobnom režimu pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika	132
5.8. FISH analiza mikrobnih agregata	134
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>135</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>137</b>

## 1. UVOD

Tehnologija aerobnoga granuliranoga mulja (AGS, engl. *Aerobic Granulated Sludge*) smatra se nadolazećim novim standardom za obradu kućanskih i industrijskih otpadnih voda, a opsežno je proučavana tijekom posljednjih 20 godina (Sharma i sur., 2019; Franca i sur., 2018; Li i sur., 2014a; Yilmaz i sur., 2008; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b).

Aerobne granule (AG, engl. *Aerobic Granules*) su agregati-nakupine mikroorganizama, vrsta biofilma koji se uglavnom sastoji od bakterija samoimobiliziranih bez nosača u guste čvrste kompaktne mikrobne nakupine sferičnog oblika (Yae i sur., 2019; Gao i sur., 2011; Liu i sur., 2007; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b; Liu i Tay, 2004). AGS karakterizira mogućnost održavanja različitih redoks sustava unutar granule, veliko zadržavanje biomase zbog boljeg odvajanja biomase mulja od vode, mogućnost podnošenja iznenadnog visokog organskog i hidrauličkog opterećenja i tolerancija toksičnih sastojaka, u odnosu na uobičajene agregate aktivnog mulja (flokule). U okolišnoj biotehnologiji to donosi potencijalne praktične prednosti u pogledu potrošnje energije, investicijskih troškova i okolišnog otiska. AGS tehnologija ima potencijal smanjenja infrastrukture i operativnih troškova pročišćavanja otpadnih voda za 25%, potrebe za prostorom za 75% i potrebe za energijom za 30% (Kent i sur., 2018; Sarma i Tay, 2018).

AGS omogućuje istovremenu nitrifikaciju, denitrifikaciju i uklanjanje fosfora u jednom reaktoru, u jednomuljnom sustavu obrade otpadne vode, zbog slojevite strukture granula s vanjskim aerobnim i prema središtu s anoksičnim i anaerobnim zonama i zbog velikog difuzijskog gradijenata između donora i akceptora elektrona čime se stvaraju različiti redoks uvjeti unutar granula što omogućuje rast različitih mikroorganizama u različitim dijelovima granule, odnosno prisutnost i koegzistenciju različitih funkcionalnih skupina mikroorganizama različitih metaboličkih aktivnosti (Nancharairah i Kiran Kumar Reddy, 2018; Cydzik-Kwiatkowska et al., 2014; Li i sur., 2014a; Li i sur., 2008; Yilmaz i sur., 2008; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b; Tay i sur., 2002a).

Istraživanje AGS-a provodi se primjenom sekvencijalnog šaržnog reaktora (SBR, engl. *Sequencing Batch Reactor*) (Gao i sur., 2011; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b) koji ima važnu ulogu u unaprijeđivanju AGS tehnologije zbog fleksibilnosti u radu i brzog i pouzdanog uzgoja AGS (Nancharairah i Kiran Kumar Reddy, 2018).



Brojni okolišni i procesni čimbenici utječu na formiranje i stabilnost granula, poput: sastav supstrata, organsko opterećenje, vrsta izvora ugljika, strategija hranjenja, dizajn reaktora, vrijeme taloženja, intenzitet aeracije, period gladovanja, hidrodinamičke posmične sile, izvanstanične polimerne tvari (EPS, engl. *Extracellular Polymeric Substances*), brzina rasta mikroorganizama, gradijent supstrata u granuli i drugo (Franca i sur., 2018; Wilén i sur., 2018; Gao i sur., 2011).

Morfologija granula, njihova veličina i gustoća povezana je sa silama smicanja i odvajanjem brzotaložive mikrobne biomase (Sharma i sur., 2019; Tay i sur., 2004a; Liu i Tay, 2002; van Loosdrecht i sur., 1995). U agregaciji mikroorganizma - interakciji stanica-stanica, formiranju granula i stabilnosti strukture važnu ulogu ima ekstracelularni polimerni matriks (Seviour i sur., 2010; McSwain i sur., 2005). Režim hranjenja obilje-glad i hidrodinamičke sile smicanja su također važni čimbenici formiranja granula. Hidrodinamičke sile imaju učinak na strukturalni i funkcionalni aspekt biofilma i odabir sojeva koji se udružuju u biofilm. Brzina odnosno vrijeme taloženja, omjer izmjene volumena (engl. *Volumetric Exchange Ratio*) kao i vrijeme ispuštanja mulja su također bitni čimbenici formiranja granula (Qin i sur., 2004a,b; Tay i sur. 2004a,b; Tay i sur., 2003; Tay i sur., 2001b). Brže je formiranje granula pri većem omjeru izmjene volumena, istraženo pri 20-80% (Wang i sur., 2006).

Israživanja aerobnoga granuliranoga mulja usmjerena su ka poboljšanju učinkovitosti uklanjanja N i P i otpornosti na udarna opterećenja, kao i mikrobne bioraznolikosti granula, a pri tome veliki izazov je spora brzina granulacije i dezintegracija granula (Hou i sur., 2021). Gubitak stabilnosti i aktivnosti granula tijekom dugotrajnog rada i tijekom pohrane (čuvanja) može biti ozbiljna prepreka njihovoj praktičnoj primjeni (Franca i sur., 2018; Adav i sur., 2008a; Zhang i sur., 2005).

Znanstveni doprinos razumijevanju procesa uklanjanja dušika primjenom aerobnoga granuliranoga mulja te narušavanja/održavanja aktivnosti i stabilnosti aerobnih granula je ovaj rad u kojem je postavljen cilj istražiti kako održati funkcionalnu i strukturnu stabilnost AGS u praktičnoj primjeni a kako bi se izbjegla dezintegracija – raspadanje granula i time smanjeni učinak obrade, kroz provedbu pokusa u kojima će se istražiti:

- ✓ učinkovitost uklanjanja N, C i P pri različitom omjeru KPK/N i dugotrajnom vođenju procesa obrade u režimu aerobne obrade uz kratko vrijeme anoksičnog punjenja (5 min)

- ✓ učinak koncentracije otopljenog kisika na učinkovitost uklanjanja N i veličinu i zastupljenost granula
- ✓ učinak slanosti na aktivnost granuliranoga mulja
- ✓ učinkovitost uklanjanja C, N i P pri anoksično/aerobnom režimu vođenja procesa, u dvije konfiguracije procesa i to: (i) pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi procesa, i (ii) pri  $DO < 1$  mg DO/L u aerobnoj fazi procesa
- ✓ učinak dužeg vremenskog perioda pohranjivanja aerobnog granuliranog mulja na +4 °C na stabilnost granula i aktivnost u uklanjanju dušika iz otpadne vode

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Formiranje, morfologija i definicija aerobnih granula

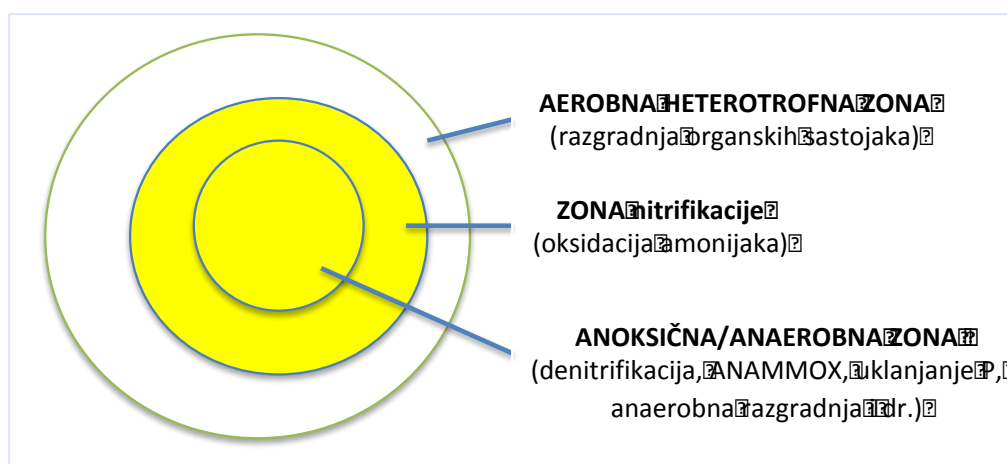
Formiranje granula je kompleksan proces na kojeg utječu fizikalni, kemijski i stanični mehanizmi. Granulacija mulja rezultat je biotičkih i abiotičkih interakcija između mikroorganizama i čestica mulja, što rezultira razvojem vrlo kompaktnih agregata sferičnog oblika promjera približno 1-3 mm u kojem su mikrobnе stanice samoimobilizirane u matriksu ekstracelularnih polimernih tvari (EPS, engl. *Extracellular Polymer Substances*) (Wilén i sur., 2018).

Više je hipoteza modela granulacije (Hou i sur., 2021; Bengtsson i sur., 2018): "hipoteza izvanstaničnih polimernih tvari (EPS)" (Liu i Tay, 2004), "hipoteza metalnih iona" (Yang i sur., 2020) i "hipoteza signalnih molekula" (Winkler i sur., 2018) koje naglašavaju da mikroorganizmi mogu lučiti viskozni EPS, nadopunjen keliranjem metalnih iona, kako bi formirali AGS tipa "zoogloea", koji su granulirani na temelju bakterija koje tvore pahuljice; "hipoteza filamentnih bakterija" (Winkler i sur., 2018; Liu i Tay, 2004) predlaže da filamentozne bakterije, koje jedva izlučuju EPS, mogu formirati AGS "filamentoznog" tipa s kosturom omatajući jedna drugu kroz posebne filamentne oblike; "hipoteza kristalne jezgre" i "hipoteza o samokondenzaciji" (Xin i sur., 2016) sugeriraju da filamentozne bakterije i bakterije koje stvaraju pahuljice mogu formirati AGS "integriranog" tipa svojim kombiniranim djelovanjem u prikladnom reakcijskom sustavu s odgovarajućim uvjetima okoline.

Početni stadij granulacije određuju različite sile i svojstva biomase, poput: hidrodinamičke sile, pokretljivost stanica, svojstva staničnih površina, difuzija i dr. (Liu i sur., 2009; Liu i Tay, 2002). Ovisno o uvjetima u reaktoru formirani prvi mikrobnі agregati dalje rastu i formiraju guste kompaktne nakupine u kojima mogu biti različite mikrobnе zajednice u ekološkim nišama različitih specifičnih funkcija (Slika 1) (Sharma i sur., 2019; Winkler i sur., 2013; Liu i sur., 2004a).

Međusobna adhezija stanica zbiva se zbog hidrofobne površine stanica i van der Waalsovih sila, a interakcija različitih iona sa EPS kao i hidrodinamičko smicanje zbog protoka zraka i vode omogućava granulaciju mikrobnih kolonija koje tvore kompleks više granula a koje se odvajaju u slobodne granule pri smanjenoj opskrbi kisikom zbog sila smicanja između granula (Liu i Tay, 2008).

Sharma i sur. (2019) navode strukturu potpuno zrele granule podjeljenu u tri zone (Slika 1): centralna zona načinjena od mrtvih stanica prekrivenih anoksično anaerobnim kontaktnim područjem rastuće mikrobne biomase, i vanjski sloj načinjen od potpuno aktivnih bakterijskih stanica koji čine debljinu sloja  $600 \pm 50 \mu\text{m}$  (Toh i sur., 2003) i u izravnom su kontaktu sa aerobnim okolišem u reaktoru.



Slika 1. Slojevita struktura granule (preuzeto i prilagođeno iz Sharma i sur., 2019)

Morfološki, AGS je sferičnog oblika sa >68% granula veličine 700–1900  $\mu\text{m}$  (Zhou i sur., 2016), velike gustoće i kompaktne strukture. Gustoća zrelih granula hranjenih glukozom je 1,048 g/L a brzina taloženja je 2,0 cm/s (Etterer i Wilderer, 2001). Granule dijametra 2,4 mm, brzine taloženja 35 m/h, gustoće biomase 41,1, g/L, fizičke snage 98% i hidrofobnosti 68% mogu preživjeti i do 4 mjeseca pri 4 °C (Tay i sur., 2002b).

Mehanizam aerobne granulacije, kroz 4 koraka, predložili su Liu i Tay (2002):

- I. kontakt stanica-stanica fizičkim pokretima – različite sile uključene su u fizičku interakciju: hidrodinamičke, termodinamičke odnosno Brownovo gibanje, prirodna mobilnost stanica (cilije, flagele, pseudopodi), sile difuzije, sila gravitacije.
- II. djelovanje privlačnih sila – fizikalne, kemijske i biokemijske sile, koje uzrokuju nakupljanje stanica.
  - a. fizičke sile: van der Waals-ove sile, privlačenje suprotnih naboja, termodinamičke sile koje uključuju slobodnu energiju površine i površinsku napetost, hidrofobnost, filamentozne bakterije koje stvaraju mostove i povezuju pojedinačne stanice.

U stvaranju granula hidrofobnost stanica ima glavnu ulogu. Povećanje hidrofobnosti stanične površine smanjuje slobodnu Gibbsovu energiju površine i pojačava agregaciju stanica.

- b. kemijske sile: vodikove veze, ionsko uparivanje, stvaranje ionskih tripleta i formiranje mostova između čestica. Te interakcije tvore ionsku vezu između nabijenih molekula i jačaju složenost granule.
- c. biokemijske sile: fuzija staničnih membrana i dehidracija stanične površine.

III. sazrijevanje mikrobnih nakupina koje rezultiraju stvaranjem zrelih mikrobnih agregata formiranjem matriksa EPS na koji se stanice mogu pričvrstiti i razmnožavati (rast staničnog klastera i metaboličke promjene povećavaju staničnu strukturu koja postaje kompaktnija i zrelija).

IV. stvaranje trodimenzionalne strukture koja je oblikovana djelovanjem hidrodinamičkih sila smicanja i uključenim mikroorganizmima. Smicanje potiče proizvodnju polisaharida i omogućuje veću stabilnost strukture granula.

Zabilježeno je da su za konformaciju granularne strukture važne nitaste-filamentozne gljive i vezane protozoe, povećavajući površinu na koju se bakterije mogu pričvrstiti (Weber i sur., 2007; Beun i sur., 1999). Granulacija je opisana i kao posljedica dinamičke agregacije pahuljica/čestica i lomljenja (Zhou i sur., 2014; Verawaty i sur., 2012) ili izrastanja mikrokolonije (Barr i sur., 2010a).

Važan i dobro istražen mehanizam uključen u granulaciju je sofisticirana organizacija koja je u nekim organizmima pod nadzorom komunikacijskog sustava stanica-stanica poznat kao «osjet kvoruma», QS (engl. *Quorum Sensing*). Višestanična koordinacija i «quorum sensing» su čimbenici koji doprinose i pomažu razvoju aerobnih granula (Sarma i sur., 2017). Nedavna istraživanja pokazala su važnost QS-a za granulaciju i stabilnost granula, i nekoliko studija pokazalo je da je veća QS aktivnost povezana s većim potencijalom za vezanje mikroba. Čini se da je veća QS aktivnost tijekom granulacije povezana s većom proizvodnjom EPS za oblikovanje gela, s većom hidrofobnošću, te je uključena u povećanu agregaciju i stabilnost granula. QS je dobro istražen mehanizam formiranja biofilma. Preko signalnih molekula zvanih samopokretači (Miller i Bassler, 2001) zbiva se međusobni kontakt između stanica.

Granule se opisuju kao višeslojne kugle s opadajućim gradijentom kisika i supstrata prema središtu – jezgri granule. Razvoj veličine granule ovisi o interakciji različitih

čimbenika okoliša i relativno je nekontrolirano. Veličina granula određena je ravnotežom između rasta granula, istrošenosti i lomljenja, kao posljedica procesnih uvjeta poput smicanja (Nancharaiah i Kiran Kumar Reddy, 2018; Wilén i sur., 2018; Winkler i sur., 2013).

Okolišni i procesni čimbenici koji imaju učinak na formiranje granula su: sastav supstrata, organsko opterećenje, strategija hranjenja, dizajn reaktora, vrijeme taloženja, intenzitet aeracije, omjer hrana/mikroorganizam (F/M, engl. *Food to Microorganisms*) i drugo (Wu i sur., 2018; Thanh i sur., 2009; Adav i sur., 2008a; Qin i sur., 2004a; Liu i Tay, 2002; Beun i sur., 1999).

Važan preduvjet za proces formiranja granula je selektivni pritisak na mikrobnu populaciju (Zhou i sur., 2014; Zhu i sur., 2013; Chen i sur., 2008; Liu i sur., 2005). Selektivni pritisak može biti fizikalni, koji uzrokuje hidrauličko zadržavanje granulirane biomase dok, s druge strane mikrobni pritisak selektivno djeluje na učinkovitost mikrobne populacije (Adav i sur., 2009a). Zhou i sur. (2014) su pokazali da ključnu ulogu u formiranju aerobnih granula ima hidraulička sila smicanja, a da je učinak mikrobne selekcije slab. Isto tako, utjecaj ostalih čimbenika poput strategije hranjenja, vremena taloženja i drugo u granulaciji nije od presudne važnosti. Wu i sur. (2012) su utvrdili da je za uspješan proces aerobne granulacije važan odabir umjerene koncentracije supstrata koja djeluje kao inicijalni selektivni pritisak. Mishima i Nakamura (1991) su istaknuli da su za proces granulacije od velike važnosti filamentozne bakterije koje se međusobno isprepleću čime tvore aerobne granule.

Istaknuto je i da taloženje kalcija pri alkalnom pH inducira proces formiranja granula. U takvim uvjetima formira se anorganska jezgra koja sadrži različite kristale kalcija i fosfata. Na jezgru se vezuju bakterije, rastu i formiraju egzopolisaharidni matriks. U zrelim granulama se nalazi jezgra i dva sloja, matrični i obodni (rubni sloj) bogat mikrobnim sojevima (Wan i sur., 2015).

Granule se formiraju iz aktivnog mulja u šaržnom reaktoru primjenom režima hranjenja obilje/glad, ispiranjem negranulirane biomase i djelovanjem hidrodinamičkih sila smicanja. Procesom granulacije čestice aktivnog mulja mijenjaju morfologiju formirajući zrele granule kroz (i) prilagodbu aktivnog mulja, (ii) granulaciju i (iii) stabilizaciju – period i do 9 mjeseci (Wang i sur., 2009). Režim hranjenja (obilje/glad) i hidrodinamičke sile smicanja povećavaju hidrofobnost površine stanica i ubrzavaju agregaciju biomase. Ispiranje negranulirane biomase odnosno ispiranje manje zastupljenih mikrobnih vrsta zbiva se kao posljedica erozije dok se vrste unutar granula

dalje razvijaju (Szabó i sur., 2017a). Pravilno proveden proces granulacije rezultira postizanjem uspješnog uklanjanja nutrijenata i postizanje niskih koncentracija suspendiranih čestica u obrađenoj vodi (Wilén i sur., 2018).

U formiranju nitrificirajućih aerobnih granula značajnu ulogu ima omjer KPK/N (Wu i sur., 2012), niži omjer KPK/N (200/200 i 400/200) pospješuje proces granulacije, dok visok omjer KPK/N (800/200) ima negativan učinak na formiranje aerobnih granula, odnosno granulacija je neuspješna.

Raznovrsni supstrati korišteni su za uzgoj (kultivaciju) aerobnih granula i pokazalo se da vrsta izvora C ima važnu ulogu u procesu aerobne granulacije (Liu i sur., 2009).

Većina istraživanja procesa granulacije provedena je sa visoko opterećenim industrijskim otpadnim vodama vinarija, pivovara, mljekara, klaonica: 2,5 - 15,0 kg KPK m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Lee i sur., 2010; Liu i sur., 2003a; Moy i sur., 2002), 2,7 - 2,5 kg KPK m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Lee i sur., 2010; Lopez i sur., 2009), 3,0 - 4,5 kg/ m<sup>3</sup> d<sup>-1</sup> (Liu i sur., 2009), 2,4 - 3,0 (Liu i sur., 2009), a zadnjih desetak godina većinom su granule hranjene sintetičkim otpadnim vodama (Li i sur., 2014; Shi i sur., 2011; Yuan i Gao, 2010; Liu i sur., 2009; Holman i Wareham, 2005).

O uspješnom procesu granulacije aktivnog mulja sa nisko opterećenim otpadnim vodama kućanstva izvjestili su Ni i sur. (2009). Aerobne granule su bile heterogene sa visokom sposobnošću uklanjanja ugljika i amonijaka. Ustanovljeno je da su za proces granulacije u SBR reaktoru sa niskim opterećenjem (KPK <200 mg/L) važna dva čimbenika, vrijeme taloženja i omjer izmjene volumena.

Vrijeme potrebno da se iz labilnih flokula uzgoje čvrste i stabilne granule (te start-up period) je različito: 21-33 dana (Zhou i sur., 2014), 19-35 dana (Dahalan i sur., 2015), 40 dana (Coma i sur., 2012a), 25 dana (Xu i sur., 2010), 300 dana (Ni i sur., 2009) ovisno o operativnim uvjetima i supstratu. Kraće vrijeme je potrebno ukoliko se granule uzgajaju u sintetičkoj otpadnoj vodi, nego otpadnoj vodi domaćinstva.

Granulaciju pospješuje dodatak smrvljenih granula (Coma i sur., 2012a; Verawaty i sur. 2012). Dodatak smrvljenih granula u flokulirani mulj smanjuje start – up period i gubitak biomase tijekom procesa granulacije, uz uspješno zadržavanje aktivnosti mikroorganizama, ustvari smrvljene granule imaju ulogu jezgre na koju se pričvršćuje flokulirani mulj (Verawaty i sur., 2012).

Temeljni mehanizmi granulacije još uvijek su nepoznati (Wilén i sur., 2018), premda je napravljeno nekoliko studija procjene operativnih parametara presudnih za

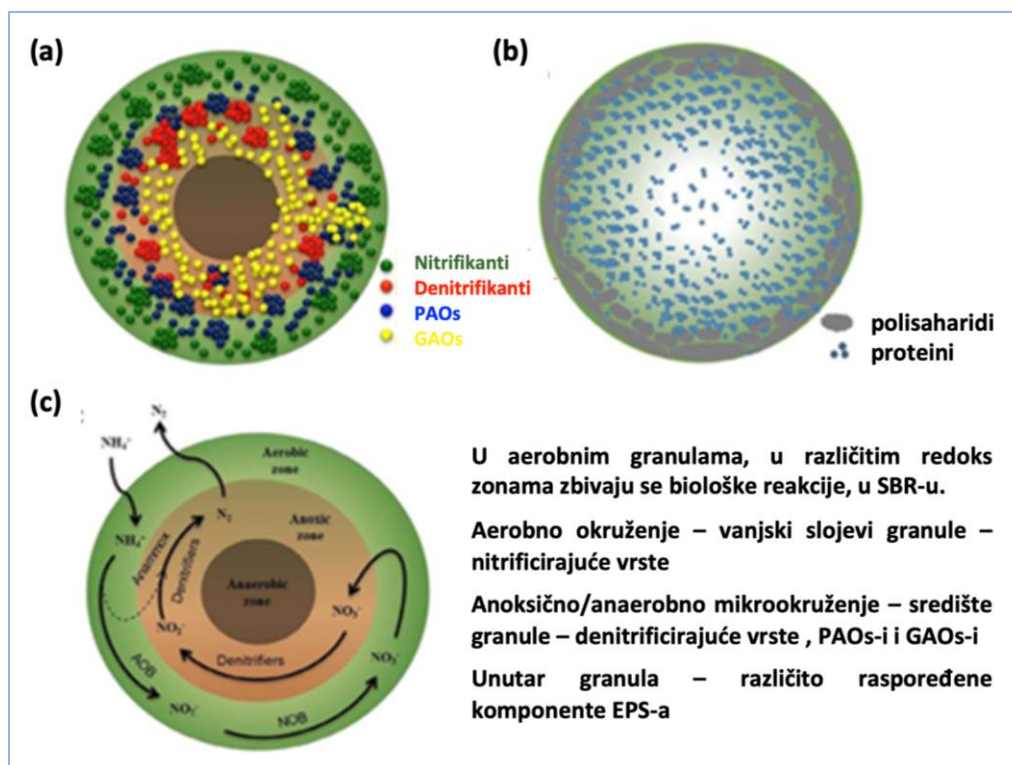
optimizaciju granulacije. Formiranje granula iz aktivnog mulja zbiva se pri određenim uvjetima okoliša (Wilén i sur., 2018):

- velike hidrodinamičke sile smicanja
- veliki omjer visine i promjera reaktora
- kratko vrijeme taloženja
- šaržni rad sustava s periodima obilnog hranjenja/gladovanja

Na morfologiju granula, koje su sfernog ili eliptičnog oblika, mogu utjecati brojni operativni čimbenici, poput: mikrobna populacija, operativna strategija, organsko opterećenje. Aerobne granule su uglavnom žute, ali mogu biti i crne boje, a boja ovisi o kemijskom sastavu i mikrobnoj populaciji (Zheng i sur., 2006). Važna fizikalna karakteristika aerobnih granula je veličina granula. Prosječni promjer aerobne granule je širokog raspona veličine, od 0,2 do najviše 16 mm (Gao i sur., 2011). AGS se uspješno uzgaja u rasponu od 0,02 mm do 9,0 mm. Granule veličine <4mm imaju bolju sposobnost taloženja i gustoću, dok promjer granula >4mm može dovesti do pogoršanja sposobnosti taloženja i gustoće (Toh i sur., 2003). Predložena je optimalna veličina aerobnih granula, manja od 0,5 mm, zbog najboljih svojstava prijenosa mase (Lin i sur., 2005).

Struktura zrelih aerobnih granula podijeljena je u tri zone (Sharma i sur., 2019), s opadajućim gradijentom kisika i supstrata prema središtu granule (Winkler i sur., 2013). S vanjske strane granule prema unutrašnjosti zastupljeni su nitrificirajući mikroorganizmi, potom denitrificirajući i fosfor akumulirajući organizmi (PAOs, engl. *Phosphate Accumulation Organisms*), a prema središtu granule u najvećoj koncentraciji se nalaze glikogen akumulirajući mikroorganizmi (GAOs, engl. *Glycogen Accumulating Organisms*). Također, polisaharidi su više zastupljeni s vanjske strane granule, a proteini s unutrašnje strane (Nancharaiyah i Kiran Kumar Reddy, 2018). Neka istraživanja pokazuju da granule uzgojene na različitim izvorima ugljika mogu imati različite mikrobne zajednice, morfologiju granula i unutarnju strukturu. Raspodjela mikroorganizama, ugljikohidrata i proteina EPS matriksa, te put uklanjanja dušika u granuli prikazan je slikom 2.





Slika 2. Grafički prikaz: a) raspodjele mikroorganizama; b) ugljikohidrata i proteina EPS matriksa; c) put uklanjanja dušika u granuli (preuzeto i prilagođeno iz Nancharaiah i Kiran Kumar Reddy, 2018)

Definicija aerobnoga granuliranoga mulja koja glasi: «Granule koje čine aerobni granulirani mulj su agregati mikrobnog podrijetla koji se ne združuju pri smanjenom hidrodinamičkom smicanju i znatno se brže talože od aktivnog mulja», donesena je tijekom prve radionice o aerobnom granuliranom mulju održane 2004. godine pod pokroviteljstvom Međunarodnog udruženja za vode (IWA, engl. *International Water Association*). Objašnjenje aerobnog granuliranog mulja (de Kreuk i sur., 2007) dogovoreno je na 2. radionici o aerobnom granuliranom mulju održanoj 2006. godine u Delftu, Nizozemska, i glasi:

- (i) agregati mikrobnog podrijetla: govoreći o granuliranom (zrnatom) aktivnom mulju podrazumijeva se da aerobne granule moraju sadržavati aktivne mikroorganizme i ne mogu se sastojati samo od komponenata mikrobnog podrijetla (poput bjelančevina, EPS itd.). Očekuje se da će populacija mikroba u aerobnom granuliranom mulju biti manje ili više slična onima u aktivnom

mulju i/ili biofilmu, tako da u definiciji ne treba opisivati određene skupine mikroorganizama. Nadalje, granule se formiraju bez dodavanja nosača.

- (ii) pri smanjenom hidrodinamičkom smicanju nema povezivanja mikroorganizama: ovo opisuje razliku u ponašanju između aktivnog mulja i aerobnoga granuliranoga mulja. Flokule aktivnog mulja se povezuju u veće nakupine kad se talože (kada se miješana tekućina mulja ne prozračuje ili ne miješa), dok se granule ne povezuju i talože se kao zasebne jedinice.
- (iii) granule se talože znatno brže od aktivnog mulja: to znači da  $SVI_{10}$  (engl. *Sludge volume indeks*, indeks taloženja mulja,  $SVI$  nakon 10 minuta taloženja) u kombinaciji sa  $SVI_{30}$  treba koristiti za karakterizaciju taloživosti granuliranog aktivnog mulja, kako su predložili Schwarzenbeck i sur. (2004). Razlika između vrijednosti  $SVI_{10}$  i  $SVI_{30}$  je izvrstan pokazatelj formiranja granula i ukazuje na stupanj zadebljanja nakon taloženja.
- (iv) minimalna veličina granula trebala bi biti takva da biomasa i dalje ispunjava navode točke 3. Minimalna veličina postavljena je na 0,2 mm, što je odlučeno na temelju mjerenja u prošlosti. Ova se granica može prilagoditi prema vrsti granule, sve dok su ispunjeni ostali zahtjevi definicije.
- (v) prosijavanje se smatra ispravnom metodom za skupljanje granula iz spremnika aktivnog mulja ili iz reaktora aerobnih granula, što također određuje određenu čvrstoću potrebnog matriksa za biomasu.

Mikrobni agregat može se nazvati aerobnim granuliranim (zrnatim) muljem kad ispuni sve opisane karakteristike. Na taj način pojednostavljuje se tumačenje eksperimentalnih rezultata i pojašnjava kada treba govoriti o aerobnom granuliranom (zrnatom) mulju, o aktivnom mulju ili o biofilmu.

Izraz aerobni granulirani mulj dolazi od prvih sustava koji su u potpunosti radili u aerobnim uvjetima, dok se danas različiti redoks sustavi (aerobni, anoksični i anaerobni) primjenjuju za učinkovito uklanjanje organskih i hranjivih tvari pomoću granuliranog mulja (Wilén i sur., 2018). Velika većina AGS omogućuje istovremenu nitrifikaciju, denitrifikaciju i uklanjanje fosfora u jednom reaktoru zbog velikih difuzijskih gradijenata donora i akceptora elektrona, stvarajući različite redoks uvjete unutar granule, što omogućuje rast različitih skupina mikroorganizama u različitim dijelovima granule (Szabó i sur., 2017a; de Kreuk i van Loosdrecht, 2005). Aerobne granule, funkcionalne, i stabilne strukture, dobivene su s nizom različitih otpadnih voda

zasijanih različitim izvorima mulja u različitim radnim uvjetima, ali razvijene mikrobne zajednice značajno su se razlikovale, i unatoč svemu dolazi do nestabilnosti granula (Wilén i sur., 2018). AGS karakterizira: izvrsna svojstva taloženja koja omogućuju visoke koncentracije suspendiranih čestica u aerobnom spremniku i rad uz kraća hidraulička vremena zadržavanja (HRT, engl. *Hdraulic Retention Time*). Prvi laboratorijski šaržni reaktori primijenjeni su od sredine 1990-tih godina (Mishima i Nakamura, 1991; Morgenroth i sur., 1997), te su daljnje studije pokazale da je relativno lako proizvesti granule i da one pokazuju dobru učinkovitost uklanjanja organskog materijala (Beun i sur., 1999), dušika (Beun i sur., 2001; Dangcong i sur., 1999) i fosfora (de Kreuk i van Loosdrecht, 2005). Općenito, laboratorijski reaktori sa sintetičkom otpadnom vodom daju stabilne granule unutar nekoliko tjedana, ili čak i brže (Szabó i sur., 2016), dok pilotni i reaktori punog opsega zahtijevaju duža razdoblja pokretanja i nestabilnost granula je uobičajena. Do danas je dokumentirano nekoliko cjelovitih primjena aerobnog granuliranog mulja (Świątczak i Cydzik-Kwiatkowska 2018; Liu i sur., 2017; Pronk i sur., 2015; Li i sur., 2014a).

## **2.2. Svojstva aerobnih granula**

Svojstva granula opisuju se kao fizikalna, kemijska i biološka.

### **2.2.1. Fizikalna svojstva aerobnih granula**

Pokazatelji koji karakteriziraju fizikalna svojstva aerobnih granula su:

I. **struktura i veličina** – istraživanja su pokazala da je za stabilan rad sustava sa aerobnim granuliranim muljem od presudne važnosti odgovarajuća struktura i veličina granula. Manje granule imaju veću čvrstoću od većih granula (Show i sur., 2012; Yang i sur. 2004; Toh i sur. 2003), a optimalna veličina granula je 600-800  $\mu\text{m}$  (Verawaty i sur., 2013). Sugerirano je da je optimalna veličina aerobnih granula  $<0,5$  mm, povezano s prijenosom mase (Li i sur., 2008). Aerobne granule  $<4$ mm imaju bolja svojstva taloženja, gustoću i čvrstoću (Toh i sur., 2003). Prosječan promjer aerobne granule iznosi 0,1 - 3,0 mm (Li i sur., 2014a; Abdullah i sur., 2013; Verawaty i sur., 2013; Liu i sur., 2012; Li i sur., 2008a), odnosno u širokom rasponu od 0,2-16 mm (Gao i sur., 2011; Li i sur., 2008a,b; Zheng i sur., 2006; Toh i sur., 2003; Beun i sur., 1999). Velike granule su sklonije raspadanju, a male imaju slabiju sposobnost taloženja (Dahalan i sur., 2015). S porastom veličine granula aerobnoga

mulja povećava se brzina taloženja i gustoća biomase, dok istovremeno dolazi do smanjenja čvrstoće granula, specifične hidrofobnosti i volumnog indeksa mulja (SVI, engl. *Sludge Volume Index*). Kod aerobnih granula dijametra  $<0,4$  mm nema ograničenja difuzije supstrata, a glavni ograničavajući čimbenik metaboličke aktivnosti aerobnih granula  $>0,5$  mm je otopljeni kisik. Kod granula veličine  $0,5$  mm brzina uklanjanja supstrata je tri puta veća u usporedbi s granulama veličine  $1$  mm. Ni i sur. (2009) su istaknuli da je veličina aerobnih granula uzgojenih u nisko opterećenim otpadnim vodama relativno manja, veličine  $0,2-0,8$  mm, u odnosu na aerobne granule koje su uzgojene u visoko opterećenim otpadnim vodama, no imaju dobru taloživost. Kompaktna struktura granula i velika brzina taloženja omogućava obradu otpadne vode i odvajanje biomase od obrađene otpadne vode u istom spremniku. Time se omogućava održavanje odgovarajuće retencije biomase u bioreaktoru, i dva do četiri puta veća koncentracija granulirane biomase u usporedbi s postupkom aktivnog mulja (Nancharaiyah i sur., 2019). Aerobne granule su kompaktne strukture, velike gustoće.

- II. **poroznost** – istraživanja su pokazala da veličina granule utječe na fiziološka i fizička svojstva granula, odnosno da može ograničiti transport i difuziju mase zbog poroznosti strukture koja se smanjuje s porastom veličine granula. Poroznost aerobnih granula određuje dostupnost hranjivih tvari te prodiranje nepoželjnih tvari kao i ograničenja otopljenog kisika (Dahalan i sur., 2015). Začepljene pore dovode do smanjenja difuzije supstrata što negativno utječe na bioaktivnost aerobnih granula. Pozitivna je korelacija između poroznosti i bioaktivnosti aerobnih granula (Zheng i Yu, 2007; Tay i sur., 2002a). Aerobne granule imaju relativno malu poroznost, dok aktivni mulj uobičajeno ima poroznost veću od  $0,95$ . Poroznost aerobnih granula varira od  $0,68$  do  $0,93$  i smanjuje se s veličinom (Zheng i Yu, 2007).
- III. **sadržaj vode** – u aerobnim granulama iznosi oko  $94-97\%$  (Lin i sur., 2005), a aktivni mulj sadrži  $>99\%$  vode
- IV. **fizička čvrstoća** – aerobne granule obično imaju dovoljno fizičke snage kako bi se održala stabilnost zrnatog oblika i strukture. Zbog čvrstoće, izražene kao koeficijent integriteta, granule mogu podnijeti visoku abraziju i smične sile (Show i sur., 2012; Tay i sur., 2002b).
- V. **specifična gravitacija** – aerobnih granula je u rasponu  $1,04-1,1$  kg suhe tvari/ $m^3$  (Shi i sur., 2009; Zheng i sur., 2005), aerobne granule su velike gustoće i kompaktne

strukture što doprinosi razdvajanju kruto-tekuće i zadržavanju mikrobne biomase mulja

- VI. **oblik** – aerobne granule su sferičnog ili eliptičnog oblika, jasnih vanjskih linija. Procesni čimbenici o kojima ovisi oblik granula su: mikrobna populacija, strategija procesa, kakvoća supstrata, organsko opterećenje (Gao i sur., 2011). Aerobne granule su uobičajeno žute, ali mogu biti i crne boje, ovisno o supstratu i mikrobnim vrstama u populaciji (Zheng i sur., 2006)
- VII. **svojstvo taloženja** – aerobne granule karakterizira velika brzina taloženja koja prema Show i sur., 2012; Qin i sur., 2004b iznosi od 25 do 70 m/h, prema Ni i sur., 2009 od 18 do 40 m/h, odnosno čak i do 130 m/h prema Gao i i sur. (2011). Brzina taloženja aerobnog granuliranog mulja ovisi o veličini i gustoći granula (Gao i sur., 2011). Brzina taloženja je, uz ostalo, u procesu obrade otpadnih voda vrlo važan čimbenik za poboljšanje kvalitete efluenta zbog boljeg odvajanja tekuće i krute faze – obrađene vode i aktivnog mulja (Liu i sur., 2009).
- Svojstva taloženja se kvantificiraju prema vrijednosti volumnog indeksa mulja (SVI, engl. *Sludge Volume Index*), koji definira volumen (mL) koji zauzima 1 g mulja nakon 30 minuta taloženja. SVI<sub>30</sub> aktivnog mulja najčešće je >100 mL/g, a za aerobne granule iznosi između 80 mL/g i 20 mL/g (Gao i sur., 2011). Granule karakterizira pojačano svojstvo taloženja s nižim vrijednostima SVI, često ispod 50 mL/g, i veće brzine taloženja. Li i sur. (2006) odredili su vrijednosti SVI<sub>30</sub> od 20 do 40 mL/g, te su predložili da se za opisivanje brzine taloženja aerobno granuliranog mulja određuje SVI<sub>10</sub>, odnosno primjeni kratko vrijeme taloženja od 10 min, odnosno SVI<sub>30</sub> je revidiran do SVI<sub>5</sub> (vrijeme taloženja 5 minuta) za granulirane sustave budući je za aerobne granulirane sustave vrijednost SVI<sub>5</sub> slična SVI<sub>30</sub> (Nancharaiah i sur., 2019).

### 2.2.2. Kemijska svojstva aerobnih granula

Čimbenici koji opisuju kemijska svojstva aerobnih granula su:

- I. **Hidrofobnost površine aerobnih granula** – važan je čimbenik za inicijaciju razvoja granula i više nego dvostruko je veća nego hidrofobnost površine flokula aktivnog mulja (Show i sur., 2012; Liu i sur. 2004b; Qin i sur., 2004a). Tijekom granulacije biomasa postaje sve više hidrofobna. Na hidrofobnost površine aerobnih granula utječe više čimbenika, kao što su: organsko opterećenje, EPS, odnosno metabolički produkti stanice i smične sile (Show i sur., 2012; Liu i sur. 2004b).

Povećanje omjera protein/polisaharid u granulama smanjuje negativni naboj na površini granula, što bi trebalo dovesti do smanjene elektrostatske odbojnosti između bakterijskih stanica i time poboljšati granulaciju (Wilén i sur., 2018). Qin i sur. (2004a) otkrili su da je hidrofobnost stanične površine granula za 2,5 do 3,5 puta veća u odnosu na aktivni mulj. Vanjski sloj aerobnih granula je veće hidrofobnosti od jezgre granula (Wang i sur., 2005). Formiranjem granuliranoga mulja iz aktivnog mulja u SBR reaktoru hidrofobnost površine stanice povećala se od 43,2% na oko 78,2% (Zhang i sur., 2007). Povećanjem smičnih sila povećava se i hidrofobnost površine (Show i sur., 2012; Liu i sur. 2004b). Osim toga, veće smične sile mogu djelovati stimulirajuće na respiraciju aerobnih mikroorganizama (Show i sur., 2012; Tay i sur., 2001a) te pogoduju formiranju kompaktnijih i čvršćih granula (Show i sur., 2012; Liu i Tay, 2002). Tay i sur. (2003) dokazali su postojanje proporcionalnih odnosa između smičnih sila i taloženja, gustoće i mehaničke čvrstoće aerobnih granula. Također, omjer polisaharida i proteina u mulju značajno se povećava s posmičnom silom. I kohezija i agregacija posreduju u staničnim polisaharidima. Činilo se da polisaharidi stanica igraju presudnu ulogu u održavanju granuliranog (zrnatog) mulja. Veća posmična sila potiče proizvodnju više polisaharida u usporedbi s proteinima, a stanični polisaharidi pogodovali su kompaktnoj strukturi i stabilnosti zrnatog mulja (Liu i Tay, 2004).

Promjene u okolišu dopuštaju modifikacije u stanicama i oslobađanje – otpuštanje vezikula vanjske membrane što povećava hidrofobnost stanice i poboljšava formiranje biofima. U stresnom stanju samoagregacija započinje sa smanjenjem slobodne stanične energije zbog povećanja hidrofobnosti. Tako kod *Pseudomonas putida* DOT-T1E visoki osmotski stres soli unutar 10 min oslobađa vezikule iz vanjske membrane i povećava staničnu hidrofobnost (Baumgarten i sur., 2012).

Isto tako, primjena više faza gladovanja između rasta povećava hidrofobnost stanice. Sugerirano je da mikrobi mijenjaju svoja strukturna svojstva i više se zbližuju i više su u interakcijama tijekom stanja gladovanja (Liu i sur., 2004b) i da to nakupljanje stanica – združivanje – agregacija stvara granule. Adav i sur. (2008a) su istaknuli pozitivne i negativne aspekte staničnih interakcija poput vezivanja i razdvajanja stanica u biotičkim i abiotičkim uvjetima. Liu i sur. (2009) su pokazali pristup identifikacije stabilnosti granula u neprikladnim stanjima okoliša.

- II. **Ekstracelularne polimerne tvari** (EPS, engl. *Extracellular Polymeric Substances*) se akumuliraju na površini bakterija te mogu utjecati na promjenu hidrofobnosti i

druge fizikalno kemijske osobine stanične površine. To su ljepljive bakterijske izlučevine, organski makromolekulski polimeri koji sadrže proteine, polisaharide, lipide, nukleinske kiseline i druge tvari, te omogućavaju udruživanje bakterija u veće agregate u prvim koracima procesa formiranja granula (Gao i sur., 2011; Lee i sur., 2010; Liu i sur. 2004b; Tay i sur. 2001; Schmidt i Ahring, 1994). I same bakterije bi mogle iskoristiti EPS, budući je najmanje 50% polisaharida i 30% proteina u EPS-u koji se proizvodi u aerobnim granulama biorazgradivo. EPS u aerobnim granulama uključuje dvije glavne komponente: biorazgradive i nebiorazgradive frakcije EPS-a (Gao i sur., 2011). U aerobnim granulama prosječna brzina biorazgradnje EPS-a je 5x sporija od razgradnje acetata i 50x brža od nebiorazgradivog EPS-a (Wang i sur., 2007b; Zhang i Bishop, 2003). Jezgra aerobnih granula sadrži veću količinu EPS i to biorazgradivog, za razliku od vanjskog sloja koji sadrži manju količinu EPS. U vanjskom je sloju aerobnih granula prisutan nerazgradivi EPS koji pridonosi njihovoj strukturnoj stabilnosti (Wang i sur., 2005).

Izvanstanične polimerne tvari, EPS, obično se definiraju kao kombinacija visokomolekularnih izlučevina mikroorganizama, proizvoda stanične lize i hidrolize makromolekula i adsorbirane organske tvari iz aktivnog mulja (AS). Opisano je da EPS ima značajan utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva mikrobnih agregata, utječući na njihovu strukturu, površinski naboj, flokulaciju, svojstva taloženja, svojstva odvodnje i sposobnost sorpcije. EPS može poslužiti kao izvor ugljika ili energije tijekom nedostatka hranjivih tvari i pomoći u stvaranju mikrobnih nakupina tijesnim vezanjem stanica (Sheng i sur., 2010a).

### **2.2.3. Biološka svojstva aerobnih granula**

Mikrobna struktura aerobnih granula istraživana je pomoću svjetlosnog mikroskopa, skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM, engl. *Scanning Electron Microscope*), konfokalnog laserskog skenirajućeg mikroskopa (CLSM, engl. *Confocal Laser Scanning Microscope*) i molekularno citogenetičke metode, FISH analize (engl. *Fluorescent in Situ Hybridization*) (Lee i sur., 2010; Adav i sur. 2008a; Tsuneda i sur., 2003; Yi i sur., 2003).

U strukturi granula prisutne su i koegistiraju različite funkcionalne skupine mikroorganizama (Winkler i sur., 2013), aerobnih i anaerobnih metaboličkih aktivnosti (Li i sur., 2014b; Yilmaz i sur., 2008; de Kreuk i sur., 2005a; de Kreuk i sur., 2005b).

Raznovrsnost mikrobne zajednice i dominantne bakterijske vrste u njoj ovise o izvoru ugljika (Lee i sur., 2010; Liu i Tay, 2004; Tay i sur., 2001a). Mikrobnu zajednicu aerobnih granula mogu činiti svega nekoliko specifičnih vrsta ili vrlo raznolika mikrobiološka zajednica, ovisno o sastavu inokuluma, sastavu otpadne vode, procesnih i okolišnih čimbenika, poput: redoks uvjeti, vrijeme taloženja, koncentracija otopljenog kisika (DO, engl. *Dissolved Oxygen*), organsko opterećenje (OLR, engl. *Organic Loading Rate*) (Wilén i sur., 2018).

Pokazalo se da je mikrobna zajednica aerobnoga granuliranoga mulja slična mikrobnjoj zajednici flokuliranog mulja nakon određenog perioda granulacije, cca 35. dan (Zhou i sur., 2014). U mikrobnjoj zajednici aerobnih granula dominiraju vrste skupine  $\beta$  – *Proteobacteria* (Li i Li, 2009).

U flokuliranom i granuliranom mulju prisutne su iste skupine mikroorganizama, razlika je u omjeru na razini reda ili razreda, iako se smatralo da je mikrobna struktura aerobnoga granuliranoga mulja raznovrsnija od flokuliranog mulja zbog gradijenta supstrata unutar granule koji osigurava različite ekološke niše (Winkler i sur., 2013; Gao i sur., 2011). Većina bakterija u granuliranom i flokuliranom mulju pripada rodovima:  $\beta$ -*Proteobacteria*, *Sphingobacteria* i *Flavobacteria* (Zhou i sur., 2014), dok su u aerobnom granuliranom mulju količine  $\beta$ -*proteobacteria*,  $\delta$ -*proteobacteria*, *Flavobacteria* i *Cytophagia* znatno povećane (Świątczak i Cydzik-Kwiatkowska, 2018). Moguća pozitivna uloga protozoa i gljivica kao i njihove interakcije s bakterijama u procesu formiranja biofilma zanemarivala se u istraživanjima aerobnih granula. Ipak, neka istraživanja protozoa i gljivica u procesima s aktivnim muljem pokazuju da ti eukarioti imaju znatnu ulogu u procesima pretvorbe biomase i pročišćavanja vode (Weber i sur., 2007). U početnom stadiju granulacije nitaste gljivice i protoze su važne za konformaciju granula jer povećavaju dodirnu površinu na koju se bakterije mogu pričvrstiti i tako stvoriti gustu trodimenzionalnu strukturu (Weber i sur., 2007; Beun i sur., 1999). Na mikrobnu raznolikost utječe i postupak ispiranja biomase tijekom granuliranja, a rodovi bakterija zastupljeni u ispranoj biomasi slični su bakterijama prisutnim u granuliranom mulju (Szabó i sur., 2017a).

Doprinos formiranju kompaktne guste strukture aerobnih granula imaju i dvovalentni ioni prisutni u otpadnoj vodi, posebice ioni kalcija,  $\text{Ca}^{2+}$  i ioni magnezija,  $\text{Mg}^{2+}$  koji olakšavaju povezivanje ekstracelularnih komponenti i doprinose stabilnosti strukture na način da neutraliziraju negativni naboj na površini mikroorganizama i olakšavaju

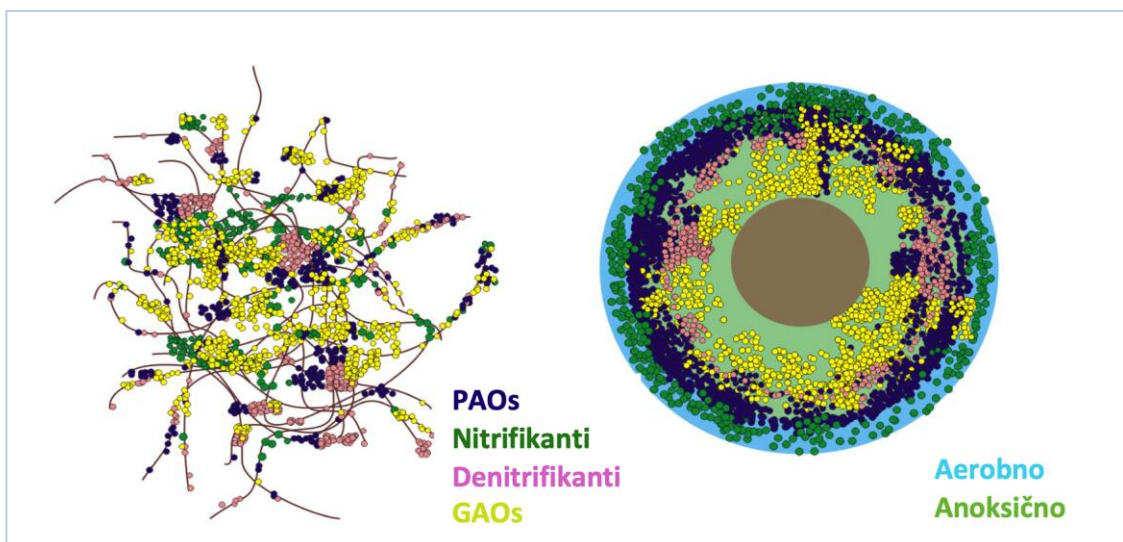


povezivanje mikroorganizama, doprinose proizvodnji EPS-a i formiranju matriksa – okosnice na koju se bakterije mogu pričvrstiti (Sarma i sur., 2017).

### 2.3. Razlike aerobnoga granuliranoga mulja i aktivnog mulja

U usporedbi s flokuliranim aktivnim muljem aerobni granulirani mulj ima brojne prednosti, poput: dobra svojstva taloženja (Gao i sur., 2011); veliko zadržavanje biomase (Gao i sur., 2011); održavanje različitih redoks okruženja, postojanje oksičnih, anoksičnih i anaerobnih zona u granulama (Nancharaiah i sur., 2019); podnošenje velikog opterećenja zbog jedinstvene zrnaste strukture i velike koncentracije biomase u reaktoru (Moy i sur., 2002) kao i primjena u obradi različitih vrsta otpadnih voda; manji kapitalni, odnosno investicijski i operativni troškovi jer nema potrebe za taložnikom (Nancharaiah i Kiran Kumar Reddy, 2018), manji je utrošak energije (Nancharaiah i sur., 2019).

Strukturne i funkcionalne razlike aerobnoga granuliranoga mulja i flokuliranog mulja (Slika 3) istaknuli su Winkler i sur. (2013).



Slika 3. Strukturne i funkcionalne razlike aerobnoga granuliranoga mulja i flokuliranog mulja (preuzeto i prilagođeno iz Winkler i sur., 2013)

Po funkcionalnosti mikrobne zajednice sustavi su usporedivi (Slika 3). U aerobnim uvjetima zbiva se nitrifikacija ( $\text{NH}_4\text{-N}$  se prevodi u  $\text{NO}_3\text{-N}$ ), u anoksičnim uvjetima uz

donore elektrona denitrifikacija (redukcija  $\text{NO}_3\text{-N}$  do plinovitog dušika). Pri anaerobno-aerobnim uvjetima uklanja se fosfat. U flokulama sve bakterije su podjednako izložene posmičnom naprežanju i koncentraciji supstrata. Flokulirani mulj se u konvencionalnom sustavu obrade recikliranjem kroz različite dijelove sustava podvrgava aerobnim i anaerobnim uvjetima i različitoj dostupnosti supstrata. U granulama, u različitim slojevima, u SBR-u u naizmjeničnim aerobnim i anaerobnim uvjetima zbivaju se sve pretvorbe. Nitrifikanti su u vanjskom aerobnom sloju a denitrifikanti i PAOs-i u unutarnjem anoksičnom sloju. Veliko zadržavanje biomase selektira spororastuće vrste (Winkler i sur., 2013).

*In-situ* mikroskopske i *ex-situ* kemijske analize flokuliranog i aerobnoga granuliranoga mulja pokazale su znatne razlike u koncentraciji i raspodjeli proteina i polisaharida EPS-a (Seviour i sur., 2010; McSwain i sur., 2005). Više proteina nego ugljikohidrata je prisutno kod aerobnog granuliranog mulja, a također sadržaj proteina u EPS-u aerobnog granuliranog mulja je 50% veći u usporedbi s flokuliranim aktivnim muljem. Za tvorbu trodimenzionalnog matriksa – kalupa u koji se mogu ugraditi bakterije odgovorne su ekstracelularne polimerne tvari (EPS). U aerobnoj granulama mikrobne stanice i polisaharidi su smješteni u vanjskom sloju, dok središnji dio granula je bez stanica i uglavnom su prisutni proteini kojima se pripisuje važna uloga u formiranju i stabilnosti aerobnog granuliranog mulja (McSwain i sur., 2005). Distribucija EPS-a unutar aerobne granule ovisi o vrsti hranjenja (Gao i sur., 2011).

Komponente EPS-a dijele se na:

- ✓ biorazgradive, većinom prisutne u središnjem dijelu granule
- ✓ bio-nerazgradive, uočene u drugim slojevima aerobnih granula

Samo bio-nerazgradivi EPS doprinosi stabilnosti aerobne granule.

Karakteristike aerobnoga granuliranoga i flokuliranog aktivnog mulja dane su u tablici 1 (Nancharaiah i Kiran Kumar Reddy, 2018).

Tablica 1. Karakteristike aerobnoga granuliranoga i flokuliranog mulja (preuzeto i prilagođeno iz Nancharaiah i Kiran Kumar Reddy, 2018 i Nancharaiah i sur., 2019)

Parametar	Flokulirani mulj	Granulirani mulj	Opaska
<b>oblik i prosječna veličina</b>	nepравilan oblik; < 0,2 mm	milimetarske granule sferičnog oblika, > 0,2 mm	veći promjer granula, uz gustoću omogućava brzo taloženje u uvjetima mirovanja
<b>mikrostruktura</b>	labava i flokulentna	gusta i kompaktna	kompaktna struktura i velika gustoća granula omogućava dobro odvajanje biomase od obrađene vode i zadržavanje biomase u reaktoru
<b>specifična težina</b>	0,997-1,01	1,010-1,017	aerobne granule s većom specifičnom težinom omogućavaju brže odvajanje od obrađene vode
<b>brzina taloženja</b>	manja brzina taloženja, < 10 m/h	veće brzine taloženja, > 10 m h <sup>-1</sup> (oko 90 m/h)	aerobne granule se samostalno talože, bez obzira na vanjske utjecaje
<b>volumni indeks mulja - SVI</b>	> 100 mL/g	< 50 mL/g	
<b>SVI<sub>5</sub> i SVI<sub>30</sub></b>	SVI <sub>5</sub> ≠ SVI <sub>30</sub>	SVI <sub>5</sub> = SVI <sub>30</sub>	izvršna svojstva taloženja, omogućavaju mjerenje SVI <sub>5</sub>
<b>mikrookolina – slojevita struktura; prisutnost aerobne, anoksične i anaerobne faze</b>	minimalna mogućnost za postojanje anaerobne regije	postojanje aerobne, anoksične i anaerobne regije u milimetarskim granulama aerobnog mulja	prisutnost različitih redoks uvjeta u granulama omogućava provedbu oksidacijskih i redukcijskih reakcija
<b>EPS</b>	manji udio EPS	veći udio EPS	EPS ima važnu ulogu u razvoju, stabilnosti i funkcionalnosti granula
<b>tolerancija prema toksičnim tvarima</b>	manja tolerancija prema toksičnim tvarima	veća tolerancija prema toksičnim tvarima	AGS, vrsta biofilma veće tolerancije prema toksičnim tvarima

Neke od prednosti primjene aerobnoga granuliranoga mulja nad flokuliranim aktivnim muljem su: (i) značajno smanjenje potrebne površine za izgradnju sustava za obradu otpadnih voda; smanjenje volumena bioreaktora provođenjem istovremene nitrifikacije i denitrifikacije i uklanjanja fosfora kao i smanjenjem vremena taloženja; (ii) značajno smanjenje potrošnje električne energije jer nema potrebe za sustavima za recirkulaciju biomase i vode (recirkulacijske crpke), dodatnim pročišćivačima i miješalicama (Yae i sur., 2019; Bengtsson i sur., 2018; Pronk i sur., 2015a; de Kreuk i sur., 2005b).

## 2.4. Mikrobna zajednica aerobnih granula

Mikrobnu zajednicu aerobnih granula čine: amonijak oksidirajuće (AOB, engl. *Ammonium Oxidizing Bacteria*), nitrificirajuće, denitrificirajuće, fosfat akumulirajuće bakterije (PAOs, engl. *Phosphate Accumulating Bacteria*), sumpor uklanjajuće bakterije i bakterije koje uklanjaju teške metale (Sharma i sur., 2019).

Raspodjela bakterija koje provode nitrifikaciju u zrelim granulama je da su filamentoznog oblika na vanjskoj površini dok su oblika koka sa unutarnje strane (Shi i sur., 2009). Analizom FISH (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*) pokazano je prisustvo 16,2-18,3% *Nitrobacter* vrsta i 69,4-70,8% amonijak oksidirajućih bakterija. Spororastuće nitrificirajuće vrste poboljšavaju stabilnost granule (Liu i sur., 2004c). Granule male brzine rasta su visoko stabilne, velike hidrofobnosti, što im daje dobru taloživost i gustu strukturu.

Adav i sur. (2010a) su istraživali mikrobnu zajednicu denitrifikanata u aerobnom mulju i našli raznolikost s rodovima  $\beta$ -proteobakterija, uključujući *Comamonas*, *Nitromonas*, *Alcaligenes* i *Rhodocyclus* pri konverziji 100-700 mg/L nitrita u dušik.

Denitrificirajući fosfat akumulirajući organizmi (DPAOS, engl. *Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms*) uklanjaju fosfat i dušik, prisutni su u anoksičnom okruženju i koegzistiraju sa nitrificirajućim bakterijama u aerobnoj zoni. Kishida i sur. (2006) su pokazali da pri obradi sintetske otpadne vode u SBR-u nakon 30 dana procesa formirane su granule veličine 500  $\mu\text{m}$  a izlazne vrijednosti N i P su  $<1\text{mg/L}$  za ulaznih  $\text{NH}_4\text{-N}$  60 mg/L i  $\text{PO}_4\text{-P}$  10 mg/L. Zhang i sur. (2011) su našli štapičaste filamentozne bakterije u početku granulacije a u zrelim granulama kuglaste bakterije i veću raznolikost. Mikroorganizmi poput *Thauera*, *Accumulibacter*, *Rhodocyclus* i dr. su istraživani u zrelim granulama (Zhang i sur., 2011a).

Sumpor oksidirajuće (engl. *Sulfur-oxidizing bacteria*) i sumpor-reducirajuće bakterije (engl. *Sulfur-reducing bacteria*) su nađene u aerobnim granulama, uklanjaju sumpor i provode denitrifikaciju otpadne vode, pripadaju rodovima *Thiobacillus*, *Sulfurimonas* i *Arcobacter* (Yang i sur., 2016).

Aerobne granule mogu učinkovito uklanjati metale bio-sorpcijskim mehanizmom, poput nikla, cinka i druge metale. Sorpcijski kapacitet granula za kadmij ( $\text{Cd}^{2+}$ ), bakar ( $\text{Cu}^{2+}$ ) i cink ( $\text{Zn}^{2+}$ ) je 172,7; 59,6 i 164,5 mg/g granulirane biomase (Liu i sur., 2003b). EPS je dobar biosorpcijski materijal za teške metale. Zbog polianionske prirode EPS-a, on tvori kompleks s metalnim ionima preko elektrostatskih interakcija i naposljetku

taloženjem u polimernu masu (Pal i Paul, 2008). Nađeno je da povećanje temperature od 25 do 55 °C povećava biosorpciju, i sorpcija je u prirodi endotermna i može difundirati u granuli jednolično (Liu i Xu, 2007).

U granulama se obično nalaze tri vrste bakterija s obzirom na morfologiju, štapičaste, nitaste i okrugle (Ni i sur., 2009).

Nitrificirajuće granule se sastoje od amonijak oksidirajućih bakterija (AOB, engl. *Ammonium Oxidizing Bacteria*) i nitrit oksidirajućih bakterija (NOB, engl. *Nitrit Oxidizing Bacteria*), kao i drugih heterotrofnih bakterija, stabilne su na kolebljive okolišne uvjete (Kim i Seo, 2006). Amonijak oksidirajuće bakterije koncentriraju se bliže površini granule, gdje im je dostupniji otopljeni kisik zbog čega imaju dobru sposobnost nitrifikacije, a u unutrašnjosti, odnosno jezgri granula, u većoj se mjeri odvija proces denitrifikacije. Što je granula veća proces denitrifikacije je uspješniji zbog manje koncentracije otopljenog kisika u njezinoj unutrašnjosti gdje su smještene denitrifikacijske bakterije.

Nitrificirajuće granule su različitih veličina granula, vremena granulacije, sposobnosti taloženja, provođenja nitrifikacije kao i raznovrsnosti mikrobne zajednice u kojima prevladavaju različite vrste bakterija pri aerobnim uvjetima, a ovise o uzgoju granula sa i bez organskog opterećenja (Liu i sur., 2007; Kim i Seo, 2006; Moy i sur., 2002). Organsko opterećenje je važan procesni čimbenik koji ima učinak na bioraznolikost i raspodjelu vrsta unutar mikrobne zajednice i na fizikalno-kemijska svojstva nitrificirajućih granula.

Nitrificirajuće granule uzgojene na anorganskoj kemijski definiranoj podlozi pokazuju znatnu nitrifikacijsku aktivnost, ali zahtijevaju dugi start-up period (Kim i Seo, 2006). Suprotno tome, visoko organsko opterećenje može doprinijeti nestabilnosti ili čak isprati aerobne granule iz sustava.

## **2.5. Čimbenici kontrole formiranja aerobnih granula**

Proces formiranja aerobnih granula je kompleksan, a čimbenici kontrole tog procesa su konfiguracija reaktora i okolišni i procesni čimbenici:

- a) organsko opterećenje – formiranju granula doprinosi organsko opterećenje koje se održava kroz periode obilja hrane i gladi. Aerobna granulacija zbiva se pri širokom rasponu organskog opterećenja, od 2,5-15 kg KPK/m<sup>3</sup>. Stvaranju većih i rahlijih granula u kraćem periodu doprinosi veća brzina organskog

opterećenja, dok manja brzina organskog opterećenja rezultira stvaranjem manjih i čvrsto zbijenih granula kroz duže razdoblje. Veće organsko opterećenje daje manju raznolikost vrsta u granulama i obrnuto (Liu i Tay, 2004; Tay i sur., 2004b)

- b) aerobno izgladnjivanje – kontrola aerobnog izgladnjivanja ubrzava proces granulacije, s time da dugi period izgladnjivanja može ubrzati granulaciju. Također, pri dužem periodu izgladnjivanja granule su znatno manje (Liu i Tay, 2008). Duži period aerobnog izgladnjivanja može povećati proizvodnju EPS-a i time pomoći granulaciji (Li i sur., 2006; Tay i sur., 2001a). Prekratko ili predugo vrijeme izgladnjivanja utječe na omjer polisaharidi/proteini u EPS, čineći granule slabe taloživosti i male gustoće (Liu i sur., 2007). Bakterije tijekom izgladnjivanja postaju više hidrofilne (Tay i sur., 2001a). Aeracijski stupanj u radu SBR obuhvaća razgradnju supstrata koju slijedi faza aerobnog izgladnjivanja.
- c) prisustvo dvovalentnih iona metala – pozitivan je učinak dvovalentnih iona metala na granulaciju (Liu i sur., 2010). Kationi metala (osobito iona kalcija,  $\text{Ca}^{2+}$  i iona magnezija,  $\text{Mg}^{2+}$ ) utječu na mehanizam granulacije tako što (i) neutraliziraju negativni naboj na površini mikroorganizama čime olakšavaju međusobno povezivanje mikroorganizama, (ii) unaprjeđuju proizvodnju EPS i (iii) formiraju okosnicu na koju se bakterije mogu pričvrstiti. Osim što ubrzava odvijanje procesa formiranja granula, prisutnost iona utječe na nastanak kompaktne i guste mikrobne strukture (Sarma i sur., 2017).
- d) temperatura – nestabilne granule formiraju se pri 8 °C i 15 °C (de Kreuk i sur., 2005c), dok se pri 30 °C formiraju granule kompaktne strukture, boljih svojstava taloženja i veće bioaktivnosti. Temperatura 30 °C smatra se optimalnom temperaturom za formiranje granula.
- e) otopljeni kisik – putem aeracije koncentracija otopljenog kisika može imati učinak na održavanje pravilne sile smicanja. Prema McSwain i Irvine (2008) aerobne granule ne formiraju se pri  $\text{DO} < 5 \text{ mg/L}$ , dok Viaeminck i sur. (2008) navode formiranje granula pri nižem DO pa i u aerobnim uvjetima koji slijede nakon anoksičnih.
- f) selekcijski pritisak – vrijeme taloženja i hidraulička sila smicanja. Vrijeme taloženja pomaže u selekciji čestica mulja boljih svojstava taloženja i uklanjanja flokuliranog mulja iz reaktora. Procesu formiranju granula i nastanku granula

većeg promjera doprinosi kratko vrijeme taloženja (McSwain i sur., 2004; Qin i sur., 2004a,b). Također, kratko vrijeme taloženja pogoduje stanicama s većom hidrofobnosti površine (Liu i sur., 2010a). Velike granule nastaju pri vremenu taloženja između 5 i 10 min dok pri vremenu taloženja >15 min granulirani mulj se teško razvija (Gao i sur., 2011; Lei i sur., 2004). Jedan od ključnih čimbenika formiranja granula je i velika sila smicanja (Dulekgurgen i sur., 2008). I površinska hidrofobnost stanica i EPS povećani su pri većoj sili smicanja (Zhu i sur., 2012; Wang i sur., 2005; Tay i sur., 2002a).

## **2.6. Proces formiranja aerobnoga granuliranoga mulja**

Proces formiranja aerobnoga granuliranoga mulja odvija se u laboratoriju pri kontroliranim uvjetima, vodeći računa o organskom opterećenju i/ili operativnoj strategiji. Za razvoj AGS primjenjuje se SBR (Beun i sur., 2002; Morgenroth i sur., 1997).

Aerobni granulirani mulj razvija se iz flokuliranog mulja, ima karakteristike i suspendiranog aktivnog mulja i biofilma. Formira se iz flokuliranog mulja te nastaju suspendirane mikrobne nakupine bez potpornih medija, granule – zrnate forme. Po prijenosu mase AGS je sličan biofilmu, sa aerobnom, anoksičnom i anaerobnom zonom duž gradijenta prijenosa mase (de Kreuki sur., 2005a) što daje povoljno okruženje za rast različitih mikrobnih vrsta za istovremeno uklanjanje C, N i P: amonijak oksidirajućih, denitrificirajućih, PAOs, GAOs i DPAOS vrsta.

U brojnim dosadašnjim istraživanjima za formiranje aerobnih granula koristio se aktivni mulj sa uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u kojem se nalaze različite mikrobne zajednice različitih sposobnosti aglomeracije – kao sjeme mulja (engl. „*seed sludge*“), i otpadna voda sa realnih sustava za obradu otpadne vode ili sintetička otpadna voda različitog sastava (Dahalan i sur., 2015; Li i sur., 2014a; Zhou i sur., 2014; Verawaty i sur., 2012; Wu i sur., 2012; Yuan i Gao, 2010; Wang i sur., 2009; Holman i Wareham, 2005; Bos i sur., 1999).

Koncentracija suspendiranih čestica mješane tekućine (MLSS, engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*), odnosno količina mikrobne biomase aktivnog mulja korištenog za inokulaciju iznosila je 1-3,5 g/L, (Yongmei i sur, 2014; Wu i sur, 2012; Yuan i Gao, 2010; Holman i Wareham, 2005).

## **2.7. Okolišni i procesni čimbenici formiranja i strukturne stabilnosti aerobnih granula**

Brojni čimbenici utječu na granulaciju, odnosno inicijalnu agregaciju mikroorganizama u granule, kao i stabilnost granula, poput: „sjemenski“ mulj (seed sludge), vrsta supstrata, stopa organskog opterećenja, izvor ugljika, dizajn reaktora, početno vrijeme granulacije u bioreaktoru, hidrodinamika, intenzitet aeracije i vrijeme taloženja, strategija hranjenja, polimerne tvari i drugo (Wilén i sur., 2018; Wang i sur., 2004).

### **2.7.1. Sjeme mulja**

U većini istraživanja se za uzgoj aerobnih granula koristi aktivni mulj sa uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u kojem se nalaze različite mikrobne zajednice različitih sposobnosti aglomeracije ovisno o fizikalno kemijskim svojstvima koje su specifične za pojedinu vrstu ili soj ili su rezultat stanične aktivnosti različitih vrsta (Lee i sur., 2010; Martienssen i sur., 2001; Bos i sur. 1999; Zita i Hermansson, 1997).

Sheng i sur. (2010b) su iz aktivnog mulja pripremili granulirani mulj i istražili karakteristike sjemena mulja i učinak selektivnog ispuštanja mulja na aerobnu granulaciju. Aktivni mulj razdvojili su u dvije frakcije: (i) male rastresite, sporo taložive flokule mulja (3,2% mulja, brzina taloženja manja od 1 m/h) s većim omjerom MLVSS/MLSS (MLVSS, engl. *Mixed Liquor Volatile Suspended Solids*; hlapljive suspendirane čestice u miješanoj tekućini; MLSS, engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*; suspendirane čestice u miješanoj tekućini) i (ii) veće kompaktnije, brzo taložive flokule (12,4% mulja, brzina taloženja >6 m/h) s manjim omjerom MLVSS/MLSS.

Dva bioreaktora radnog volumena 0,2L zasijali su manjim početnim flokulama (R1) i većim početnim flokulama (R2) s identičnim početnim MLSS od 2g/L. Manje flokule su imale veći volumni indeks mulja (SVI, engl. *Sludge Volume Index*) i EPS u odnosu na veće flokule, dok je sastav EPS-a bio sličan izvornom mulju, i sporo i brzo taloživom, i pokazivao je vrlo slične promjene tijekom granulacije. Sadržaj EPS-a se tijekom procesa granulacije povećavao a kad su se formirale zrele granule sadržaj EPS bio je konstantan. Na početku 12-satnog ciklusa provedeno je hranjenje dodavanjem acetata u koncentraciji 1000 mg KPK/L. Na kraju ciklusa, nakon taloženja od 2 minute ispušteno je 30 mL suspenzije mulja i na taj način uklonjene su male sporo taložive flokule. Ideja je bila svakodnevno uklanjati 10% mulja koji je sadržavao uglavnom sporotaložive flokule. Uslijedilo je 30 minutno taloženje preostale suspenzije mulja,



ispuštanje supernatanta i punjenje do početnog volumena od 0,2 L. Nakon 9 dana uzgoja prosječna veličina granula u R1 zasijanom malim flokulama iznosila je 0,44 mm, a u R2 zasijanom velikim flokulama 0,66 mm. Nakon 50 dana uzgoja formirane su zrele granule, s veličinom  $1,0 \pm 0,2$  mm u R1 zasijanom malim flokulama i  $2,2 \pm 0,4$  mm u R2 zasijanom velikom flokulama. U oba reaktora učinkovitost uklanjanja organskih tvari se povećala, s početnih 80-90% na 96-98%, s većom učinkovitosti uklanjanja u R1 što je pripisano ograničenju prijenosa mase u R2 zbog većih granula. Analiza mikrobne strukture granula je pokazala sličnost u obje istražene vrste mulja. Ovo istraživanje pokazalo je da vrsta sjemena mulja utječe na brzinu granulacije, da je za postupak granulacije presudno 10% dnevno odvođenje biomase kao i polagano taloženje, kao i da se sporotaloživi mulj selektivnom strategijom ispuštanja mulja može granulirati (Sheng i sur., 2010b).

Verawaty i sur. (2012) su istražili mehanizame aerobne granulacije, temeljeno na četiri hipoteze: (i) povezivanje flokula u granule koje čine jezgre granulacije, (ii) povezivanje flokula doprinosi stvaranju većih čestica, (iii) rast mikroorganizama na zdrobljenim granulama, (iv) povezivanje zdrobljenih malih granula koje se pričvršćuju jedna za drugu i nastajanje većih granula.

Granulirani mulj su zdrobili-usitnili prešanjem kroz sito veličine otvora 500  $\mu$ m i označili ga zelenim fluorescentnim mikrokuglicama, a flokulirani mulj su obilježili crvenim fluorescentnim mikrokuglicama i pomiješali s označenim zdrobljenim granulama u omjeru 7:3, s tim da su 20%-40% površine područja flokula i granula činile mikrokuglice. Pripremljena smjesa flokule-granule uporabljena je za inokulaciju SBR-a za rad u 8 satnom ciklusu: hranjenje, anaerobni, aerobni, anoksični uvjeti, taloženje i ispuštanje, a pokusi su provedeni s otpadnom vodom klaonice sastava: topljivi KPK od 862-1137 mg/L,  $\text{NH}_4\text{-N}$  od 200-254 mg/L i 31-40 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ , uz postupno smanjenje vremena taloženja od 20 min na 5 min. Postignuta je učinkovitost uklanjanja N od 82-93%.

Uzorci mulja su prikupljeni i analizirani tijekom operativnog razdoblja od 80 dana, a rezultati su pokazali da je ključni mehanizam granulacije agregacija granula i flokula. Manje usitnjene granule nisu se same agregirale u veće granule, a udio flokula je doprinjeo nastajanju većih agregata. Flokule su se obično pričvršćivale na nazubljene i hrapave dijelove površine granula, što implicira da sile smicanja utječu na mjesta agregacije, s cilijama uočenim u pukotinama na površini koje su također pridonijele vezivanju flokula. Većina vezivanja flokula na granule dogodila se tijekom prvih 20

dana, s malim povećanjem veličine granula, međutim, najveće povećanje veličine zabilježeno je nakon 45 dana. U to vrijeme zabilježen je prirast biomase od 2-4 g/L, što podrazumijeva novi rast biomase na tim nakupinama. Ovo istraživanje sugerira da usitnjene-zdrobljene granule imaju pozitivan utjecaj na zadržavanje flokula tijekom pokretanja granuliranog bioreaktora. Također, neravne površine zdrobljenih granula omogućile su veće nepravilnije područje koje je doprinijelo vezivanju flokula tijekom rane faze stvaranja granula (Verawaty i sur., 2012).

Long i sur. (2014) postigli su brzi uzgoj aerobnih granula sa dobrim karakteristikama uklanjanja onečišćenja tijekom 18 dana u pilotnom SBR sustavu u koji je inokulirano oko 25% zrelih aerobnih granula, kada je vrijeme taloženja aktivnog mulja smanjeno na 10 minuta. Inokulirane zrele granule održavale su stabilnost i poslužile kao jezgra i nosači za nove čestice bez njihove dezintegracije i ponovnog ujedinjenja, čime se skraćuje vrijeme aerobne granulacije. Također, implementirani anaerobni biološki selektor imao je ulogu spriječavanja prekomjernog rasta filamentoznih vrsta bakterija, pri maksimalnoj vrijednosti KPK 1703 mg/L. Uzgojeni granulirani mulj bio je prosječne veličine čestica 1,59 mm, SVI 67,64 mL/g, 268,9 mg EPS/g MLSS, sadržaj vode 98,16%, nepravilan i blijedožute boje.

Mehanizam brze granulacije obuhvaća hipotezu o nukleaciji ili hipotezu o selekcijskom pritisku – hidraulička selekcija putem reaktora i hidrauličkih uvjeta poput visoka hidraulička sila smicanja, kratko vrijeme taloženja, izmjenični rad, i biološku selekciju – različit sastav medija rezultira odabirom/preživljenjem određenih vrsta mikroorganizama, kao i implementacija selektora (Liu i sur., 2005).

Coma i sur. (2012a) su istražili poboljšanje aerobne granulacije i pročišćavanje otpadnih voda kućanstva u pokusima istraživanja učinkovitosti uklanjanja hranjivih tvari (nutrijenata) tijekom 120 dana. Pokuse su provodili u dva SBR reaktora a SBR ciklus je radio u konfiguraciji: prvo hranjenje (75% volumena), anaerobno, aerobno, anoksično, drugo hranjenje (25% volumena), anaerobno, aerobno, anoksično, taloženje, dekantiranje i faza praznog hoda.

Jedan SBR reaktor, 100% floc SBR, zasijan je samo flokuliranim muljem a drugi SBR reaktor, 90% floc SBR, zasijan je smjesom od 10% usitnjenih granula dobivenih na način da su netaknute granule protisnute kroz sito veličine otvora 300  $\mu$ m i 90% flokula. Kakvoća otpadne vode kućanstva je bila ukupni KPK  $326 \pm 7$  mg/L, amonijak  $51 \pm 9$  mg/L i fosfor  $11 \pm 1$  mg/L, uz acetat kao izvor ugljika. U oba SBR reaktora granulacija je postignuta smanjenjem vremena taloženja. SBR reaktori su radili pri različitim

opterećenjima, 100%-floc SBR djelovao je pri 78 g N/m<sup>3</sup>d i 13,5 g P/m<sup>3</sup>d, dok je 90%-floc SBR radio pri opterećenju 122 g N/m<sup>3</sup>d i 20,8 g P/m<sup>3</sup>d.

Prosječna veličina čestica od 0,2 mm postignuta je oko 40-og dana procesa, kada je vrijeme taloženja bilo manje od 10 minuta, u oba istražena SBR reaktora. Puna granulacija postignuta je do 80. dana pokusa. Koncentracija MLSS u 100% floc SBR-u do 40. dana procesa bila je niža od 1 g/L, za razliku od 5,8 g MLSS/L u 90 % floc SBR-u. Ovo istraživanje pokazalo je da dodavanje usitnjenih granula nije imalo učinka na brže pokretanja granulacije, ali je bilo korisno za zadržavanje biomase i postizanje pune granulacije.

Postignuta je učinkovitost uklanjanja KPK 80%, uklanjanja N 84% i uklanjanja P 99% u 90% floc SBR-u, odnosno u 100% floc SBR-u postignuto je uklanjanje KPK 85% (Coma i sur., 2012a).

Stabilnost aerobnih granula tijekom skladištenja istražili su Xu i sur. (2010). Aerobne granule uzgajali su u dva SBR-a, jedan SBR zasijan flokulama aktivnog mulja (granula A), a drugi peletima (granula B). SBR reaktori su radili u ciklusu od 4 sata, konfiguracije: punjenje 5 min, prozračivanje 227 min, taloženje 3 min, ispuštanje obrađene vode 5 min, uz acetat kao izvor ugljika i pri površinskoj brzini aeracije od 2,5 cm/s u oba reaktora. Nakon 25 dana u oba reaktora uzgojene su stabilne granule, a potom su zrele granule čuvane 3 tjedna pri sobnoj temperaturi (25±1 °C) bez hranjivih sastojaka i prozračivanja. Nakon perioda skladištenja od 3 tjedna zabilježene su promjene u granulama: u granulama A prevladavali su koki i bacili, granule su dobile nepravilan morfolofip s pukotinama i naborima; granula B zadržala je sferni morfolofip, glatke i kompaktne strukture. Također, tijekom skladištenja granule A otpuštale su više organskog materijala i veći sadržaj proteina i polisaharida EPS-a je nađen u supernatantu granula A u usporedbi s granulama B. Granula A je tijekom skladištenja-pohrane bez supstrata koristila EPS kao izvor energije, a smanjenje koncentracije EPS-a dovelo je do smanjenja stabilnosti i utjecalo je na prostornu strukturu granula A. U granulama A se tijekom skladištenja omjer proteina i polisaharida EPS-a smanjio, za razliku od granule B koja je bila konstantna tijekom razdoblja skladištenja, što ukazuje na značaj proteina za stabilnost granula. Proteini su u skladištenim granulama pronađeni samo na vanjskim slojevima granulama, za razliku od originalnih granula, što sugerira da je raspadanje strukture proteina utjecalo na narušavanje stabilnosti. Tijekom skladištenja i hlapljive suspendirane tvari (VSS) i ukupne suspendirane tvari (TSS) u granulama A su se smanjile više u odnosu na granulu B, što je rezultiralo većom

stabilnosti i boljom taloživosti granule B, što je vidljivo u hidrofobnosti i SVI vrijednostima (Xu i sur., 2020).

### **2.7.2. Izvor ugljika i omjer C/N - Vrsta supstrata i stopa organskog opterećenja**

Za uzgoj aerobnih granula koriste se različiti sintetički supstrati te izvori ugljika za mikroorganizme, kao što su: glukoza, saharoza, acetat, fenol, etanol, melasa i druge sintetičke otpadne vode, otpadne vode različitih industrija, komunalne, miješane sintetičke i razrijeđene realne otpadne vode (Szabó i sur., 2017b; He i sur., 2016; Yang i sur., 2016; Dahalan i sur., 2015; Li i sur., 2014a,b; Verawaty i sur., 2012; Wu i sur., 2012; Feng i sur., 2012; Shi i sur., 2011; Yuan i Gao, 2010; Liu i sur., 2009; Ni i sur., 2009; Shi i sur., 2009; Wang i sur., 2009; Liu i sur., 2007; Weber i sur., 2007; Li i sur., 2006; Holman i Wareham, 2005; Zheng i sur., 2005; Liu i sur., 2003a; Jiang i sur., 2002; Moy i sur., 2002; Morgenroth i sur., 1997).

AGS može izdržati organsko opterećenje (OLR, engl., *Organic Loading Rate*) od 2,5-15 kg KPK/m<sup>3</sup>d (Long i sur., 2015). Prenizak OLR ili OLR koji jako fluktuiraju u vrijednosti u kratkom vremenu može dovesti do proliferacije filamentoznih bakterija u granulama što rezultira labavom i poroznom strukturom granula slabe stabilnosti i utječe na izvedbu sustava. Visoki OLR daje granule nestabilne strukture, a nakon dugotrajnog rada događa se dezintegracija granula. Pokazano je da se samo pri OLR < 9 kgKPK/m<sup>3</sup>d može dugoročno održati strukturna stabilnost granula (Zhang i sur., 2019). To je iz razloga jer se funkcionalne bakterije koje mogu lučiti EPS lako obogaćuju u mulju pri uvjetima niskog opterećenja (Chen i sur., 2019).

Za granulaciju mulja i održavanje strukture su korisne i dinamičke promjene OLR, pa je tako istaknuto da pri progresivnom padu OLR sa 5,5 na 3,5 kg KPK/m<sup>3</sup>d omjer granulacije i strukturna stabilnost čestica su značajno poboljšani (Zhang i sur., 2019).

Aerobne granule uzgajane su pri različitim vrijednostima organskog opterećenja: 8 kg KPK/m<sup>3</sup>d (Li i sur., 2006), 6 – 15 (Moy i sur., 2002), 0,6 – 1,0 kg KPK/m<sup>3</sup>d (Ni i sur., 2009), 1,68 – 4,20, odnosno 1,05 – 1,68 kg KPK m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Wang i sur., 2009), 0,9 – 3,7 kg KPK m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> te 0,2 kg NH<sub>4</sub>-N m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Szabo i sur., 2017a), 2,2 – 3,6 kg KPK m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Weber i sur., 2007), 1 – 8 kg KPK m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> (Tay i sur., 2004b).

Moy i sur. (2002) poručuju da stopa organskog opterećenja (OLR, engl. *Organic Loading Rate*) od 9-15 kg KPK m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup> doprinosi nižem SVI (31 ml/g, s glukozom kao izvorom ugljika, odnosno 42 ml/g s acetatom kao izvorom ugljika) te boljem taloženju. Pri višem OLR, 15 kg KPK m<sup>-3</sup> d<sup>-1</sup>, SVI je niži, 31 ml/g. Brzina taloženja je u korelaciji

sa SVI. Brzina taloženja raste od 53 m/h pri OLR 6 kg KPK  $m^{-3} d^{-1}$  do 84 m/h pri 15 kg KPK  $m^{-3} d^{-1}$ .

Iz brojnih istraživanja nedvojbeno je da OLR ima velik utjecaj na formiranje aerobnih granula. Tay i suradnici (2004b) poručuju da je za uspješno formiranje granula optimalan OLR 4 kg KPK/ $m^3d$ , a Kim i sur., (2008) poručuju da je optimalan OLR 2,52 kg KPK/ $m^3d$ , iako Weber i sur. (2007) nisu postigli uspješnu kultivaciju pri OLR 3,6 kg KPK/ $m^3d$ . Tay i sur. (2004) nisu uspjeli postići uspješno formiranje aerobnih granula pri niskom OLR, <2 kg fenola/ $m^3d$ , dok su Wang i suradnici (2009) postigli pri OLR 1,05-1,68 kg KPK/ $m^3d$  nakon duljeg vremena, nakon godinu dana.

OLR ima utjecaj i na strukturu aerobnih granula, iako to ovisi i o vrsti izvora ugljika. Aerobne granule uzgojene pri nižem OLR, te glukozi kao izvor ugljika imaju labavu strukturu (Wang i sur., 2009; Moy i sur., 2002), dok aerobne granule uzgojene pri nižem OLR, te uz acetat kao izvor ugljika imaju kompaktnu strukturu (Moy i sur., 2002). Pri višem OLR, 15 kg KPK/ $m^3d$ , aerobne su granule nepravilnog oblika ili dolazi do njihovog raspadanja (Liu i sur., 2009; Moy i sur., 2002).

Organsko opterećenje (OLR, engl., *Organic Loading Rate*) važan je operativni čimbenik i pokazatelj za procjenu procesne sposobnosti-kapaciteta reaktora. Također, OLR ima značajni utjecaj na makroskopske značajke granula i unutarnju raspodjelu bakterija (Thanh i sur., 2009). Za aerobnu granulaciju najveći ORL je 22,5 kgKPK/ $m^3d$  (Lopez i sur., 2009), iako, u brojnim radovima je pokazano da AGS pri visokom OLR vrlo lako gubi stabilnost (Adav i sur., 2010b; Zheng i sur., 2006).

Tay i sur. (2002b) ustanovili su da aerobne granule imaju slične sposobnosti taloženja, veličinu, čvrstoću, mikrobnu aktivnost i druge osobine, neovisno o tome jesu li uzgojene sa glukozom ili acetatom kao izvorom ugljika. Navedeno je u suprotnosti sa rezultatima koje su dobili Moy i sur. (2002), koji su ustanovili da je kao izvor ugljika adekvatniji acetat te niža stopa organskog opterećenja (OLR, engl., *Organic Loading Rate*) za aerobne granule hranjene acetatom, i to OLR od 6 i 9 kg KPK/ $m^3 d$ .

Stopa organskog opterećenja je važan operativni parametar koji utječe na proces formiranja aerobnih granula, njihove fizikalne osobine, bioraznolikost te distribuciju mikrobnih zajednica (Show i sur., 2012; Liu i Tay, 2004; Liu i sur., 2003a).

Long i sur. (2015) istražili su učinak organskog opterećenja na aktivnost aerobnih granula u kontinuiranom protočnom reaktoru za granulaciju, uz postupno povećanje ulaznog KPK uz natrijev acetat kao izvor ugljika. Aerobni granulirani mulj zadržao je stabilnost pri  $OLR \leq 15 \text{ kg/m}^3$  tijekom 65 dana, pri čemu su određene vrijednosti:

prosječna veličina čestica 1,8 mm i sadržaj vode 97,2%, brzina granulacije 98% i SVI 21 mL/g. Nakon 66. dana pokus je vođen pri OLR od 18 kg/m<sup>3</sup> što se odrazilo na kakvoću granula - aerobni granulirani mulj se postupno raspadao i u kratkom vremenu su se svojstva granula narušila-pogoršala uz značajno smanjenje učinkovitosti procesa obrade. Povećanjem OLR-a povećala se veličina granula, a time se povećala i anaerobna jezgra od brojnih mrtvih stanica i nestabilnost anaerobne jezgre dovela je do kolapsa sustava.

Omjer C/N je važan čimbenik rasta mikroorganizama, a izvor ugljika je donor elektrona za metabolizam mikroba. Pokazano je da omjer C/N ima značajan učinak na strukturnu morfologiju granuliranog mulja. Zhao i sur. (2012) uzgajali su AGS pri omjeru C/N od 100:5 do 100:50 i zabilježene su karakteristike AGS: pri malom omjeru C/N velike granule, labava struktura i slabo taloženje; pri višem omjeru C/N male granule, gusta struktura, slabo taloženje; pri omjeru C/N 100:10 granule guste strukture, ujednačene veličine čestica, dobrog taloženja i dobre izvedbe istovremene nitrifikacije i denitrifikacije. U istraživanju Zhang i sur. (2018) pri omjeru C/N 5 i 15, postignut je AGS s najboljom strukturnom stabilnošću pri C/N 5.

U obradi voda s niskim omjerom C/N slojevita struktura AGS može osigurati provedbu procesa, a zreli AGS i pri niskom C/N može pokazati dobru strukturnu stabilnost i sposobnost denitrifikacije u obradi otpadne vode visoke koncentracije NH<sub>4</sub>-N s omjerom C/N<1 (Sarvajith i sur., 2020).

### **2.7.3. Dizajn i radni uvjeti reaktora**

Većina aerobnih granula uzgojena je u SBR reaktorima, zbog rada sustava na principu napuni-isprazni i faze aerobnog gladovanja koje može činiti i do 75% ukupnog ciklusa, te kratkog vremena taloženja što pogoduje granulaciji AGS (Carrera i sur., 2019).

Tijekom aerobnog izgladnjivanja mikroorganizmi troše znatne količine EPS, pri čemu se smanjuje površinski negativni naboj i povećava hidrofobnost mulja, što može potaknuti mulj na stvaranje gustog i stabilnog AGS (Yarlagadda i Manjunath, 2019).

Proces obrade otpadne vode u SBR reaktoru provodi se u ciklusima, a jedan ciklus se sastoji od slijednih koraka: punjenje, aeracija, taloženje i ispuštanje efluenta. Vrijeme trajanja ciklusa je od 1,8 do 8 sati (1,8-2; 2,5-4; 4; 6; 8) (Szabo i sur., 2017a,b; Zhou i sur., 2014; Coma i sur., 2012a; Xu i sur., 2010; Wang i sur., 2009; Weber i sur., 2007).

Vrijeme trajanja ciklusa u korelaciji je sa hidrauličkim vremenom zadržavanja (HRT, engl. *Hydraulic Retention Time*). Granulacija se brže odvija kad je vrijeme trajanja ciklusa kraće (Show i sur., 2012).

Radni uvjeti, kao što su vrijeme taloženja i stopa izmjene volumena na kraju svakog od ciklusa uzrokuju uklanjanje negranulirane biomase iz reaktora. Kratko vrijeme taloženja djeluje selekcijski, u reaktoru ostaju samo aerobne granule koje imaju veću sposobnost taloženja, dok se slabo taloživa suspendirana biomasa ispire (Show i sur., 2012; McSwain i sur., 2004; Qin i sur., 2004b; Liu i sur., 2003a; Yang i sur., 2003; Jiang i sur., 2002). Vrijeme taloženja u trajanju od 5 minuta pospješuje proces granulacije, no granule koje nastaju pokazuju promjene u sastavu mikrobne zajednice zbog utjecaja kratkog vremena taloženja kao jakog selekcijskog pritiska (Adav i sur., 2009a).

Smatra se da veliki omjer širine i visine reaktora, omjer H/D 15-30, pogoduje sazrijevanju AGS guste strukture (Liang i sur., 2019), iako je pokazano da se može formirati AGS guste strukture i pri niskom omjeru H/D (Santo i sur., 2017).

#### **2.7.4. Hidrauličke smične sile**

O intenzitetu aeracije ovisi jačina smičnih sila koje djeluju na proces formiranja aerobnih granula. Hidraulička smična sila je karakterizirana prividnom brzinom plina, a istraživanja su pokazala da se AGS može formirati tek pri prividnoj brzini plina većoj od 1,2 cm/s, dok preniske hidrauličke sile smicanja mogu dovesti do pretjeranog razvoja filamentoznih bakterija (Tay i sur., 2001b).

Djelovanjem hidrauličkog smičnog stresa stimuliraju se stanice na više lučenja EPS-a te se pospješuje stvaranje čestica mulja guste strukture, kao i povećava hidrofobnost zrnate površine što dodatno poboljšava stabilnost AGS-a.

Nasuprot tome, previsoko hidrauličko smično naprezanje povećava abrazivost čestica što rezultira uništavanjem mehaničke čvrstoće čestica (Zhou i sur., 2016), a nosi i visoke operativne troškove.

Visoke smične sile koje nastaju zbog visoke stope aeracije potpomažu u formiranju kompaktne i guste strukture granula te jačanju integriteta stanice stimuliranjem produkcije ekstracelularnih polisaharida, uzrokuju eroziju površine granula čineći je glatkom, smanjuju rezistenciju prijenosa supstrata iz tekuće okoline na površinu granula i omogućavaju dovoljnu količinu kisika za razgradnju supstrata (Lee i sur.,

2010; Tay i sur., 2004; Tay i sur., 2003; Liu i Tay, 2002). Sa smičnim silama povezane su brzina taloženja, gustoća, čvrstoća i kompaktnost aerobnih granula.

Devlin i sur. (2017) su na temelju rezultata istraživanja uloge hidrodinamičkih sila smicanja na stvaranje i strukturnu stabilnost granuliranog mulja predložili i procijenili mehanizam uloge sila smicanja u granulaciji, ovisno o koncentraciji supstrata. U pokusima je uporabljeno pet SBR reaktora i pri stalno niskim površinskim brzinama uzlaznog protoka zraka uz različita opterećenja ugljika provedeni su pokusi biološkog uklanjanja hranjivih tvari sa granuliranim muljem. Istražene su otpadne vode koje karakterizira visoko, srednje i nisko onečišćenje. Tijekom razdoblja 3-4 mjeseca motrene su fizičke promjene, mikroskopska analiza, kakvoća efluenta te kinetika biomase. Hidrodinamička sila smicanja kvantificirana je površinskim brzinama uzlaznog toka zraka (omjer protoka zraka i površine poprečnog presjeka prozračene zone). Mehanizam dobrog učinka sila smicanja na granulaciju je vjerojatno u razdvajanju vremena zadržavanja krutih čestica (SRT, engl. *Solid Retention Time*), spororastućih vrsta fiksiranih u matriksu granule i vrsta koje brže rastu i imaju tendenciju nakupljanja u površinskom sloju. Prema Devlin i sur. (2017) mehanizam sugerira da sile smicanja djeluju na manje obraštanje-čepljenje površine granula, i da do granulacije dolazi i pri malim silama smicanja ali samo ako je postojala mala mogućnost obraštanja-čepjenja granula. Istaknuli su da otpadna voda s niskim koncentracijama KPK (<300 mg/L) stvara stabilan granulirani mulj čak i pri niskoj površinskoj brzini plina od 0,41 m/s, ali kada se koncentracija KPK poveća na 600 mg/L i više, pri istoj hidrauličkoj smičnoj sili ne dolazi do formiranja AGS.

Chen i sur. (2007) su u pokusima u SBR reaktoru hranjenom acetatom, pri brzinama zraka 0,8, 1,6, 2,4 i 3,2 cm/s opazili rast granula ali su granule pri 0,8 i 1,6 cm/s bile nestabilne.

Također, Tay i Liu (2001d) su primjetili granulaciju pri 1,2 cm/s ali ipak najgušće i najstabilnije granule su bile pri površinskim brzinama protoka zraka 3,6 cm/s.

Henriet i sur. (2016) su suprotno tim spoznajama u SBR-u uz acetat pri površinskim brzinama protoka zraka od 0,42 cm/s postigli stabilne granule, s time da kada acetat nije isrcpljen u anaerobnoj fazi procesa primjećen je rast nitastih vrsta.

Veće hidrodinamičke sile smicanja mogu biti korisne za granulaciju na način da «oribaju-odstružu» sloj mikroorganizama koji rastu brže na površinama granula, kao što bi to mogao biti slučaj sa običnim heterotrofima (OHO, engl. *Ordinary Heterophilic Organisms*). Taj problem se prepoznaje pri radu sa velikim opterećenjem u sustavima



s malim hidrauličkim vremenom zadržavanja (HRT, engl. *Hydraulic Retention Time*) bez reciklacije biomase a to su uvjeti tipični za SBR konfiguracije koje se trenutno koriste za uzgoj granuliranog mulja (Pronk i sur., 2015a,b). Dakle postoji mogućnost da se slobodni uobičajeni heterotrofi akumuliraju u suspenziji i/ili po površinskom sloju granula. Inače, minimalni SRT za uobičajene heterotrofe može biti samo 9 sati ako se uzme u obzir njihova neto stopa rasta pri uvjetima bez ograničenja – kada je velika dostupnost otopljenog kisika, hranjivih sastojaka i elemenata u tragovima, kao i dovoljno niske koncentracije inhibirajućih spojeva poput amonijaka i dušične kiseline (Pronk i sur., 2015a,b).

### **2.7.5. Strategija hranjenja**

Optimalan omjer hrana mikroorganizam (F/M, engl. *Food/Microorganisms*) postignut kvantitativnim ispuštanjem mulja (0,4-0,5 KPK/g SS d) pozitivno utječe - pospješuje rast mikroorganizama, stabilnost procesa aerobne granulacije, raznolikost mikroorganizama i proces uklanjanja onečišćenja iz otpadne vode (Wu i sur., 2018).

Liu i Tay (2007a) su istražili učinak duljine vremena aerobnog gladovanja (0,8; 3,3 i 7,3 h) na stabilnost aerobnih granula tijekom duljeg vremena rada. Došli su do spoznaje da su aerobne granule nestabilnije tijekom kraćeg vremena aerobnog gladovanja (0,8 h), dok su pri duljem vremenu gladovanja (3,3 i 7,3 h) stabilnije, ali je njihova učinkovitost manja. Iz navedenog su zaključili da vrijeme gladovanja treba kontrolirati u umjerenom opsegu. I druge studije postavile su hipotezu da proces granulacije može biti poboljšan kontroliranjem faze aerobnog gladovanja (Gao i sur., 2011).

Aerobne granule se mogu uspješno uzgojiti postepenim povećavanjem organskog opterećenja od 0,96, 1,92, i 3,84 kg KPK/m<sup>3</sup>d. Takav je način granulacije lakši kada su amonijak oksidirajuće bakterije (AOB, engl. AOB, *Ammonium Oxidizing Bacteria*) prisutne u vanjskom sloju granula, a nitrit oksidirajuće bakterije (NOB, engl. NOB, *Nitrite Oxidizing Bacteria*) u unutarnjem i vanjskom (Li i sur., 2010).

### **2.7.6. Otopljeni kisik, temperatura i pH**

**Otopljeni kisik** (DO, engl. *Dissolved Oxygen*) utječe na proces obrade otpadne vode – metabolizam mikroba i formiranje zrnate strukture i stabilnost granula (He i sur., 2018a). Preniska vrijednost koncentracije DO rezultirat će anaerobnim metabolizmom i proliferacijom filamentoznih bakterija što rezultira dezintegracijom granula, a

dugotrajna aeracija rezultirat će prekomjernom hidrauličkom silom smicanja koja će dovesti do dezintegracije granula (Yu i sur., 2014).

Granule se formiraju i pri niskom DO od 0,7-1,0 mg/L kao i pri visokim koncentracijama otopljenog kisika u reaktoru, pri DO 2-6 mg/L (Coma i sur., 2012a; Show i sur., 2012; Qin i sur., 2004a; Yang i sur., 2003; Tsuneda i sur., 2003; Dangcong i sur., 1999).

de Kreuk i van Loosdrecht (2004) navode da je stvaranje gustih aerobnih granula koje sadrže sporo rastuće bakterije moguće i pri niskim koncentracijama DO, međutim kada se zasićenje otopljenog kisika u miješanoj tekućini smanji na 40% biomasa se ispere zbog izrastanja nitastih bakterija i nekonzistentnosti granula. Suprotno, Sturm i Irvine (2008) su istaknuli da je za aerobno stvaranje granula značajna razina otopljenog kisika od najmanje 5 mg/L.

Također, de Kreuk i van Loosdrecht (2004) su istaknuli da na učinkovitost procesa istovremene nitrifikacije i denitrifikacije (SND, engl. *Simultaneous Nitrification and Denitrification*) utječe veličina aerobnih granula, jer utječe na aerobni i anoksični dio granule. de Kreuk i sur. (2007a) su definirali minimalnu veličinu granula od 0,2 mm. Istaknuto je da za učinkovitu istovremenu nitrifikaciju i denitrifikaciju granule trebaju biti veličine između 0,5 mm i 1,6 mm zbog gradijenta otopljenog kisika i inhibicije difuzije supstrata kao i zbog lize stanica u dubljim slojevima granula posebice kada su granule veće od 1,6 mm (Cyzdik-Kwiatkowska i sur., 2014; Li i Liu, 2005; Toh i sur., 2003). Na ograničenja prijenosa mase utječu promjer granula, hidrodinamičke sile smicanja i rast mikroorganizama (Liu i Tay, 2007b).

Yuan i Gao (2010) su istaknuli da bi optimalna koncentracija otopljenog kisika za aerobne granule bila 2,5 mg/L. Istraživali su učinkovitost uklanjanja N preko nitrita sa aerobnim granulama pri koncentraciji otopljenog kisika 4,5 mg/L, 3,5 mg/L, 2,5 mg/L i 1 mg/L. Granule su bile promjera 0,5 – 1 mm, a SBR ciklus je radio u konfiguraciji: trenutno punjenje, aerobna faza, anoksična faza, 5 min taloženja i 5 min ispuštanja. Za sve odabrane istražene vrijednosti koncentracije otopljenog kisika postignuta je učinkovitost uklanjanja KPK > 88%. Povećanje koncentracija otopljenog kisika od 1 mg/L do 4,5 mg/L rezultiralo je smanjenjem trajanja procesa nitrifikacije ali se pri tome i učinkovitost uklanjanja N smanjila sa 94,88% na 56,13%.

U istraživanju utjecaja **vremena prozračivanja** u trajanju od 120 min, 90 min i 60 min na učinkovitost aerobnih granula prosječnog promjera granula 1,1-1,2 mm, za proces istovremene nitrifikacije, denitrifikacije i uklanjanja fosfora, uz acetat kao izvor ugljika

pri omjeru KPK/N 10 He i sur. (2018a) su proveli pokuse u SBR reaktoru u 6 satnom ciklusu, konfiguracije: punjenje 2 min, anaerobni uvjeti 180 minuta, aerobni uvjeti (120 min, 90 min i 60 min), anoksični uvjeti (54 min, 84 min i 114 min), taloženje 2 min i 2 min pražnjenja. U aerobnoj fazi procesa koncentracija otopljenog kisika iznosila je 7-8 mg/L pri čemu je ostvareno 90% zasićenje kisikom, i pri površinskoj brzini aeracije 0,59 cm/s. Proces je rezultirao učinkovitim i stabilnim uklanjanjem organskih i anorganskih sastojaka (C, N i P). Ostvareno je uklanjanje KPK > 94% od ulaznog KPK 200 mg/L i uklanjanje NH<sub>4</sub>-N > 97%, pri svim istraženim odabranim vremenima aeracije-prozračivanja. Skraćivanje trajanja aerobne faze od 120 min na 60 min je rezultiralo smanjenjem NO<sub>3</sub>-N u efluentu, jer je na kraju pokusa određeno pri 120 min aerobne faze 7,85 mg NO<sub>3</sub>-N/L, pri 90 min aerobne faze 6,18 mg NO<sub>3</sub>-N/L i pri 60 min aerobne faze 3,05 mg NO<sub>3</sub>-N/L. Skraćivanje trajanja aeracije doprinijelo je i većoj proizvodnji izvanstaničnih polimernih tvari, boljoj taloživosti biomase, zadržavanju biomase, a što u konačnici znači i smanjenje investicijskih i operativnih troškova uz dobru kakvoću obrađene otpadne vode.

**Temperatura** ima važnu ulogu za rast i aktivnost mikroorganizama, a pogodna temperatura za preživljenje većine mikroorganizama je 20-25 °C, i granule su najčešće uzgojene pri sobnoj temperaturi, 20-25°C (Coma i sur., 2012a; Li i sur., 2010; Wang i sur., 2009). Temperatura ispod 10 °C dovodi do prekomjernog rasta filamentoznih vrsta u AGS-u što rezultira dezintegracijom granula i gubitkom biomase, a temperatura viša od 30 °C može izazvati denaturaciju proteina, inaktivaciju enzima, i u konačnici nestabilnosti sustava (Muñoz-Palazón i sur., 2019).

Zabilježeno je da su aerobne granule uspješno uzgojene i pri temperaturi od 8 °C, no, granule su bile nepravilnog oblika sa pretjeranim rastom nitastih bakterija što je uzrokovalo gubitak biomase i poremećaj u procesu obrade otpadne vode, odnosno neučinkovito uklanjanje nutrijenata (de Kreuk i sur., 2005c). Liu i sur. (2007) pokazali su da se granule uzgojene pri 25 °C mogu uspješno prilagoditi na temperaturu od 35 °C te da su pri višoj temperaturi i nakon četiri mjeseca rada stabilne. Zabilježili su da je uklanjanje dušika veće pri višoj temperaturi. Proces granulacije ovisi o temperaturi koja ima velik utjecaj na stopu razgradnje supstrata, stopu rasta biomase i bioraznolikost.

Vrijednost **pH** ima veliki utjecaj na mikrobnii rast, regulira metabolizam bakterija i mijenja sastav i sadržaj EPS-a a rezultat je fluktuacija u strukturnoj stabilnosti i učinkovitosti uklanjanja onečišćenja (Jiang i sur., 2019; Bagheri i sur., 2015).

Aerobne granule su uspješno uzgajane pri vrijednosti pH u rasponu od 7,2-8,2 (Coma i sur., 2012a), pri pH 7,0-7,5 (Li i sur., 2010) ili pri pH 8 (Weber i sur., 2007). Niski pH (pH 4,0) pogoduje rastu gljivica, a viši pH (pH 8,0) pogoduje rastu bakterija. Granule u kojima dominiraju gljivice brže se formiraju od granula u kojima dominiraju bakterije, skoro dvostruko su veće (7 mm naprema 4,8 mm), ali imaju slabiju unutarnju čvrstoću, odnosno labavu i mekanu unutarnju strukturu (Yang i sur., 2008).

Pri niskom pH (pH = 3) može doći do hidrolize EPS-a, i nestabilnosti i dezintegracije AGS-a (Corsino i sur., 2018), dok alkalni pH može izazvati nepovratno negativan učinak. Neutralno okruženje kao i slabo kiseli uvjeti okoliša (pH = 5,5) doprinose održavanju dobre strukturne stabilnosti AGS-a kao i dobru taloživost (Jiang i sur., 2019).

#### **2.7.7. Omjer proteini/polisaharidi (PN/PS)**

Niža vrijednost omjera proteini/polisaharidi, PN/PS (PN/PS  $\approx$ 1) pogodnija je za stabilnu strukturu AGS (He i sur., 2018a). Smanjenje omjera PN/PS značajno poboljšava hidrofobnost stanične površine i stabilnost čestica (He i sur., 2017a). Drugi znanstvenici smatraju da PN može poboljšati hidrofobnost mulja i poboljšati strukturnu stabilnost čestica promjenom površinskog naboja stanica (Wang i sur., 2018a).

#### **2.7.8. Veličina čestica**

Optimalni raspon veličine čestica AGS je 2-3 mm (Wang i sur., 2018b). Manje čestice AGS su lošeg svojstva taloženja i imaju manje biomase (Liu i Tay, 2015), dok velike čestice AGS imaju manji prijenos DO i hranjivih tvari unutar granula što rezultira prekomjernim rastom filamentoznih vrsta zbog nedovoljnog DO, lošije taloženje i narušenu strukturnu stabilnost granula, kao i smanjenje biološke aktivnosti (Zhang i sur., 2018).

### **2.8. Stabilnost aerobnog granuliranog mulja**

Primjena aerobno granuliranoga aktivnog mulja predstavlja obećavajuću tehnologiju u obradi otpadnih voda (Verawaty i sur., 2012; Coma i sur., 2012a,b; Ni i sur., 2009; Zhang i sur., 2005). Za dugoročnu primjenu granuliranog mulja problem predstavlja održavanje stabilnosti granula aktivnog mulja. Isto tako, granule mogu lako izgubiti stabilnost i aktivnost tijekom pohrane (čuvanja), što može činiti ozbiljnu prepreku

njihovoj praktičnoj primjeni (Adav i sur., 2008a; Zhang i sur., 2005). Tay i sur. (2002b) ustanovili su da nakon 8 tjedana skladištenja granule postaju nepravilnije i manje te otpuštaju topljive organske materijale.

Stabilnost aerobnih granula može biti povezana sa jednom ili više njihovih karakteristika, kao što su morfologija, taložljivost, čvrstoća, hidrofobnost površine, specifični unos kisika, mikrobna struktura, mikrobna raznovrsnost i EPS (Lee i sur., 2010).

Mikrobna raznovrsnost, prevladavajuće bakterijske vrste u mikrobnjoj zajednici, površina i struktura granula ovise o izvoru ugljika (Lee i sur., 2010; Liu i Tay, 2004; Tay i sur., 2001a).

Tay i sur. (2002b) navode da aerobne granule koje su bile hranjene glukozom gube oko 60% metaboličke aktivnosti, a aerobne granule hranjene acetatom gube 90% metaboličke aktivnosti, nakon 4 mjeseca skladištenja na temperaturi od 4 °C u vodi iz slavine. No, neka su istraživanja pokazala da nakon dvije godine skladištenja u vodi iz slavine pri sobnoj temperaturi granule mogu ostati stabilne (Zhu, 2004).

Lee i sur. (2010) su pokazali da tijekom duljeg vremena obrade otpadne vode u laboratorijskim uvjetima dolazi do raspadanja aerobnih granula, a razlog mogu biti: pretjerani rast nitastih organizama (Li i Wang, 2008; Liu i Liu, 2006), hidroliza anaerobne jezgre (Adav i sur., 2009c; Zheng i sur., 2006), gubitak funkcije sojeva (Adav i sur., 2010a,b), uloga EPS.

Brzi rast bakterijskih sojeva dovodi do povećanja veličine aerobne granule, a usporedno s veličinom struktura i čvrstoća granule slabe, dok zbog pretjeranog rasta nitastih organizama granula postaje pahuljasta te dolazi do njezinog ispiranja iz sustava (Liu i Liu, 2006).

Zheng i sur. (2006) su predložili da u velikim granulama ograničenje prijenosa mase može uzrokovati nastanak anaerobne jezgre čime se stimulira aktivnost anaeroba, s jedne strane, a s druge strane to vodi do raspada granula.

Gubitak funkcionalnosti sojeva djeluje na stabilnost aerobnih granula. Lee i sur. (2010) pretpostavljaju da do gubitka funkcionalnosti sojeva dolazi zbog gubitka sposobnosti stanica da produciraju proteine ili polisaharide u specifičnim uvjetima.

EPS su ljepljivi metabolički produkti koje stanice izlučuju na svojoj površini, a sadrže proteine, polisaharide, huminske kiseline i lipide koji utječu na početak formiranja granula tako što međusobno povezuju bakterije u agregate (Lee i sur., 2010; Liu i Tay., 2004; Tay i sur., 2001a; Schmidt i Ahring, 1994). Neki istraživači (Adav i sur., 2010b;

Adav i sur., 2008b) selektivnom hidrolizom proteina, lipida te  $\alpha$  i  $\beta$ - polisaharida su ustanovili da obogaćivanje određenih EPS pospješuje stabilnost granula.

Xu i sur. (2010) poručuju da su aerobne granule koje su uzgojene sa peletima kao inokulumom, nakon tri tjedna pohrane na sobnoj temperaturi ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) stabilnije od granula uzgojenih sa aktivnim muljem. Struktura površine granula je ostala kompaktna i glatka, a koncentracija biomase i taložljivost pokazali su manji pad.

Različiti omjeri KPK/N pokazuju utjecaj na proces granulacije, fizikalne karakteristike, sposobnost nitrifikacije i mikrobnu strukturu aerobnih granula (Wu i sur., 2012). Pri nižim omjerima KPK/N (200/200 i 400/200) uspješno su uzgojene aerobne granule. Pri KPK/N omjeru 200/200 pokazuju visoku sposobnost nitrifikacije, što indicira da pri tako niskom omjeru KPK/N sporo rastuće nitrifikacijske bakterije mogu uspješno preživjeti i nadmašiti heterotrofne bakterije. Pri omjeru KPK/N 400/200 postignuta je dvostruko viša koncentracija MLVSS (3000 mL/g) i niži SVI (30-35 mL/g) u odnosu na omjer KPK/N 200/200 (891-1700 mL/g; 40-45 mL/g) te bolja taložljivost. Isto tako, pri omjeru KPK/N 200/200 aerobne granule imale su kompaktnu strukturu i glatku površinu i u njima je bila prisutna ograničena količina nitastih bakterija. U aerobnim granulama koje su uzgojene pri omjeru KPK/N 400/200 prevladavaju nitaste bakterije, struktura granula je labava, a njihova površina nepravilna. Nasuprot tome, pri omjerima KPK/N 0/200 i 800/200 nije postignuto formiranje aerobnih granula, a biološko uklanjanje  $\text{NH}_4\text{-N}$  je nisko, jer je došlo do ispiranja bakterija zbog nedostatka organskog supstrata (organskog opterećenja), odnosno zbog visokog organskog opterećenja.

Otopljeni kisik je jedan od najvažnijih procesnih čimbenika koji imaju utjecaj na proces nitrifikacije i denitrifikacije (Pochana i Keller, 1999). U aerobnim granulama, zbog veličine i kompaktne strukture, postoji ograničen prijenos otopljenog kisika. Yuan i Gao (2010) su ustanovili da je za učinkovito uklanjanje dušika optimalna koncentracija otopljenog kisika 2,5 mg/L, budući da je u usporedbi sa koncentracijama otopljenog kisika 4,5 mg/L, 3,5 mg/L i 1,0 mg/L manja potrošnja energije za aeraciju i kraće trajanje procesa.

Heterotrofne, nitrifikacijske i denitrifikacijske bakterije žive u različitim slojevima u većim i kompaktnijim aerobnim granulama (Liu i Tay, 2004). Ni i sur. (2009) ističu da su pri diskontinuiranom režimu hranjenja u SBR reaktoru, u aerobnim granulama mikroorganizmi raspoređeni od vanjskog prema unutarnjem sloju na slijedeći način: heterotrofi–autotrofi–heterotrofi. Između autotrofa i heterotrofa u vanjskom sloju

dolazi do kompeticije zbog raspoloživog otopljenog kisika, odnosno kada je razina otopljenog kisika niska, tj. ispod dostatne razine. U toj kompeticiji, zbog niže maksimalne stope rasta nitrificirajućih bakterija, heterotrofi imaju prednost, odnosno nitrificirajuće bakterije nikako ne mogu nadmašiti heterotrofe.

Umjesto supstrata ograničavajući čimbenik u aerobnim granulama može biti koncentracija otopljenog kisika, jer supstrat prodire dublje od otopljenog kisika (Li i sur., 2008aib). U unutarnjem dijelu aerobnih granula veličine 0,5 - 1,0 mm postoji anoksična zona (Yuan i Gao, 2010).

Koncentracija otopljenog kisika značajno utječe kako na učinkovitost nitrifikacije tako i na profile otopljenog kisika, pH i oksidacijsko-redukcijskog potencijala (ORP, engl. *Oxidation Reduction Potential*) ustanovili su Yuan i Gao (2010). Viša koncentracija otopljenog kisika, 2,5-4,5 mg DO/L, poboljšava proces nitrifikacije i povećava uklanjanje  $\text{NH}_4\text{-N}$ , dok niža koncentracija otopljenog kisika, 1 mg DO/L, produljuje vrijeme trajanja procesa nitrifikacije, ali pospješuje uklanjanje TIN (engl. *Total Inorganic Nitrogen*), odnosno nitritnog, nitratnog i amonijskog oblika dušika. Za uspješno uklanjanje dušika, te kraći proces nitrifikacije optimalna koncentracija otopljenog kisika, u reaktoru sa aerobno granuliranim muljem, je 2,5 mg/L. Porast pH vrijednosti ukazuje na završetak procesa nitrifikacije.

Ni i sur. (2009) ističu da je nakon formiranja granula učinkovitost uklanjanja KPK 85-95%, a učinkovitost uklanjanja  $\text{NH}_4\text{-N}$  od 90-99%.

Wu i sur. (2012) nisu ustanovili jasnu korelaciju između omjera KPK/N i veličine aerobnih granula, iako se uobičajeno pri većem omjeru KPK/N formiraju veće granule. Granule, s porastom organskog opterećenja, pokazuju bolju sposobnost taloženja. Granule koje su uzgojene pri omjeru KPK/N 200/200 imaju jaču i kompaktniju strukturu, fizikalne karakteristike te bolju sposobnost nitrifikacije od granula uzgojenih pri omjeru KPK/N 400/200. Kao razlog učinkovitijeg procesa nitrifikacije pri nižem omjeru KPK/N predlažu sposobnost nitrifikacijskih bakterija da u takvim uvjetima prevladaju u kompeticiji sa heterotrofnim bakterijama. Učinkovitost uklanjanja KPK pri različitim je omjerima KPK/N je različita, tako pri omjeru KPK/N 200/200 iznosi 59%, 400/200 80% i pri KPK/N 800/200 iznosi 82%. Samo pri odgovarajućem omjeru KPK/N aerobne granule pokazuju visoku nitrifikacijsku aktivnost i sposobnost taloženja. Omjer KPK/N ima važnu ulogu procesu granulacije (formiranja granula) nitrificirajućeg mulja. Pri niskom omjeru spororastuće

nitrificirajuće bakterije mogu preživjeti i nadmašiti heterotrofe, dakle veća je mikrobna populacija nitrificirajućih bakterija.

Do istog su zaključka došli Kim i Seo (2006). Omjer KPK/N predstavlja mikrobni selektivni pritisak koji pri različitom opsegu (rangu) može izvršiti selekciju i pospješiti rast ili heterotrofni ili nitrifikacijskih bakterija.

## 2.9. SBR reaktor

SBR (engl. *Sequencing Batch Reactor*) ima značajnu ulogu u unaprijeđenju AGS tehnologije (Li i sur., 2014a; Choi, 2011; Gao i sur., 2011; de Kreuk i sur., 2007b; Wang i sur., 2006a; Lin i sur., 2005; Toh i sur., 2003; Beun i sur., 2001; Beun i sur., 1999) zbog fleksibilnosti u radu i brzog i pouzdanog uzgoja AGS (Nancharairah i Kiran Kumar Reddy, 2018). Neke od prednosti primjene SBR reaktora za uzgoj AGS su (Li i sur., 2022; Yuan i sur., 2019; He i sur., 2017b; Wagner i sur., 2015; Li i sur., 2014a; Di Bella i Torregrosa, 2013; Zhao i sur., 2013; Barr i sur., 2010a; Li i sur., 2008a,b; Liu i sur., 2004a):

- (i) odabir spororastućih mikroorganizama ključnih za uzgoj stabilnog AGS, i
- (ii) istovremeno uklanjanje ugljika, dušika i fosfora iz otpadne vode

U procesu formiranja AGS šaržni reaktor (SBR, engl. *Sequencing Batch Reactor*) uobičajeno radi uz period taloženja 2-10 min (Adav i sur., 2008a).

Biološka obrada otpadnih voda primjenom aerobnog granuliranog mulja najčešće se provodi primjenom SBR tehnologije. SBR radi po principu „napuni i isprazni“ (engl. *fill and draw*), obrada otpadne vode provodi se šaržno unutar jednog bioreaktora, bez sekundarnog taložnika. SBR reaktori omogućavaju izmjenu redoks uvjeta (aerobni, anaerobni i anoksični) kako bi se zadovoljile potrebe mikroorganizama za rast i aktivnosti te omogućilo provođenje biološkog uklanjanja C, N i P iz otpadne vode (Winkler i sur., 2018; Nancharaiah i sur., 2016; Pronk i sur., 2015a; Lochmatter i Hollinger, 2014; Li i Li, 2009; Ni i sur., 2009; de Kreuk i sur., 2007b; Beun i sur., 1999).

SBR radi u ciklusima, a jedan ciklus obuhvaća vremenski slijedne faze: punjenje, reakcija, taloženje, dekantiranje, odmaranje tijekom kojeg se odvodi višak mulja (Li i Li, 2009; de Kreuk i sur., 2007b):

- 1) punjenje/dotok vode, može se zbivati kao:



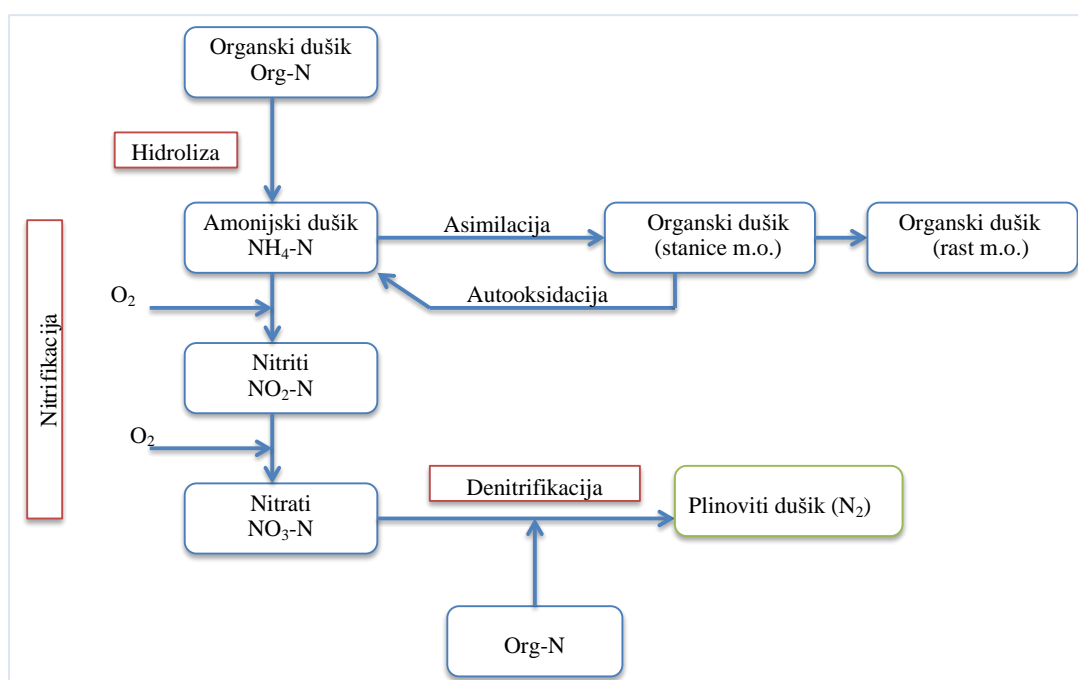
- i. statičko punjenje: tijekom punjenja nema niti miješanja niti aeracije. Nema potrošnje energije, na kraju punjenja visoka je koncentracija supstrata.
  - ii. punjenje uz miješanje: tijekom punjenja provodi se miješanje; nastaju anaerobni-anoksični uvjeti; zbiva se denitrifikacija i otpuštanje fosfora iz biomase; smanjuje se koncentracija organskih sastojaka. Troši se energija za miješanje.
  - iii. punjenje uz aeraciju: zbiva se nitrifikacija i/ili uklanjanje organskih sastojaka.
- 2) reakcija/miješanje: uz prozračivanje i/ili miješanje; zbivaju se procesi uklanjanja organskih i anorganskih sastojaka. Opskrba kisikom (prozračivanje) osigurava se mlaznim aeratorom ili difuzorima, a miješanje pomoću mješalica.
  - 3) taloženje/razdvajanje čvrsto-tekuće: nema niti aeracije niti miješanja.
  - 4) dekantiranje/odlijevanje: putem ventila ili crpke ili plutajućeg dekantera, koji se otvaraju i uslijed gravitacije se zbiva ispuštanje tekućine iznad istaloženog mulja kroz otvor pozicioniran iznad razine istaložene biomase. Vrijeme predloženo za dekantiranje je 5-30% ukupnog vremena procesa; u protivnom počne izlaziti mulj.
  - 5) mirovanje/stabilnost: mulj je u stabilnom stanju a da bi se održala konstantna količina mulja dio mulja se odvodi iz sustava, naziva se otpadni mulj.

## 2.10. Biološko uklanjanje dušika

Uklanjanje N iz otpadne vode je bitno iz razloga jer je amonijak toksičan za vodene vrste i uzrokuje eutrofikaciju u prirodnom vodenom okolišu (Metcalf & Eddy, 2003).

U otpadnoj vodi dušik je prisutan u (i) ionskom obliku kao amonijev ion ( $\text{NH}_4^+$ ), nitritni ion ( $\text{NO}_2^-$ ) i nitratni ion ( $\text{NO}_3^-$ ), i kao (ii) organski dušik: proteini, urea, nukleinske kiseline. Spojevi sa dušikom u otpadnoj vodi grada zastupljeni su oko 40% u obliku  $\text{NH}_4\text{-N}$  a ostatak uglavnom u obliku organskog N. Uobičajeno u kanalizaciji nisu prisutni  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  jer ne postoje odgovarajući uvjeti za njihovu proizvodnju, međutim industrijska otpadna voda može doprinositi značajnim količinama  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  budući se nitriti koriste kao inhibitori korozije u industrijskim procesnim vodama (Zhu i sur., 2008; Gerardi, 2002).

Biološki pristup uklanjanju N spojeva iz otpadne vode je učinkovit (Metcalf & Eddy, 2003; Henze i sur., 2002; Gerardi, 2002) i najčešće se postiže kombinacijom procesa nitrifikacije i denitrifikacije koji se u prirodi javljaju kao dio biogeokemijskog ciklusa N (Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002). Denitrifikacijom se reaktivni dušik vraća u atmosferu i održava se ravnoteža globalnog dušika (Slika 4) (Ward i sur., 2011). Konvencionalno biološko uklanjanje dušika temelji se na autotrofnoj aerobnoj nitrifikaciji i heterotrofnoj anoksičnoj denitrifikaciji.



Slika 4. Temeljne reakcije mikrobnog uklanjanja dušika (preuzeto i prilagođeno iz Metcalf & Eddy, 2003)

Temeljeno na ciklusu dušika (Slika 4) razvijeni su i primijenjeni biološki procesi za uklanjanje dušika iz otpadnih voda, poput:

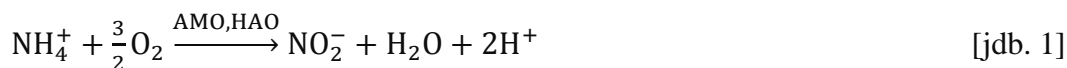
- simultana nitrifikacija i denitrifikacija (SND, engl. *Simultaneous Nitrification and Denitrification*)
- preddenitrifikacija (A/O, engl. *Anoxic/Oxic*, anoksično/aerobni proces)
- postdenitrifikacija
- modificirani Ludzak Ettinger sustav
- Bardenpho postupak u 4 stupnja
- modificirani Bardenpho postupak

- sekvencijski šaržni reaktor (SBR, engl. *Sequencing Batch Reactor*)
- anaerobno/anoksično/aerobni proces (A<sup>2</sup>O, engl. *Anaerobic/Anoxic/Aerobic*)

### 2.10.1. Nitrifikacija i denitrifikacija

Nitrifikacija je dvostupanjski biološki proces, provode je prokarioti koji su aerobni autotrofni – koriste anorganske izvore ugljika, kemolitotrofi – koriste anorganske donore elektrona.

Prvi korak nitrifikacije, nitritacija, je oksidacija amonijaka (NH<sub>4</sub>-N) do nitrita (NO<sub>2</sub>-N) pomoću amonijak oksidirajućih bakterija (AOB, engl. *Ammonium Oxidizing Bacteria*), preko hidroksilamina (NH<sub>2</sub>OH), opisano jednačicom [1]. Ovu reakciju kataliziraju membranski vezani enzimi amonijak monooksigenaza (AMO) koja u citoplazmi transformira amonijak u hidroksilamin (Juliette i sur., 1995) koji se potom u periplazmi prevodi u NO<sub>2</sub>-N pomoću hidroksilamin oksidoreduktaze (HAO) (Hooper i sur., 1997; Hendrich i sur., 1994). Amonijak oksidirajuće bakterije su *Nitrosobakterije*, poput: *Nitrosovibrio*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosomonas*.



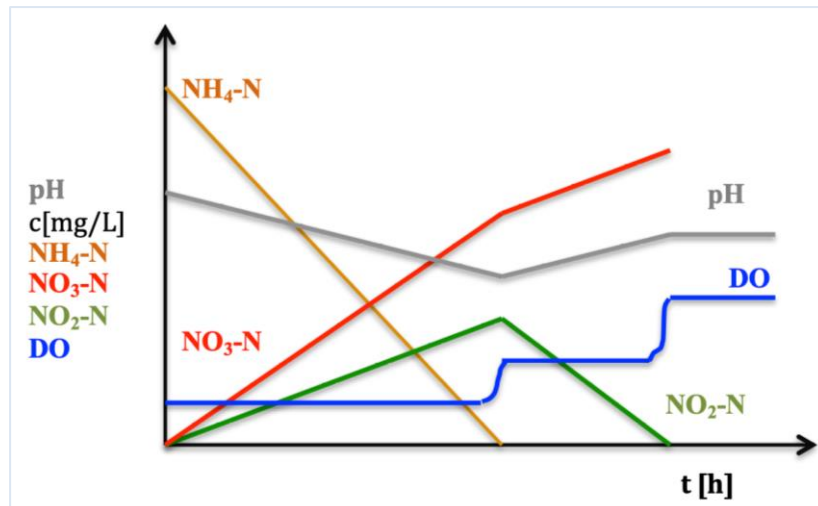
Drugi korak nitrifikacije, nitratacija, je oksidacija NO<sub>2</sub>-N do NO<sub>3</sub>-N pomoću nitrit oksidirajućih bakterija (NOB, engl. *Nitrite Oxidizing Bacteria*), prefiksa *Nitro-*, poput *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina*, u koje su uključene membranski vezani enzimi nitrit oksidoreduktaze (NOR), jednačica [2].



Ukupna reakcija nitrifikacije može se opisati jednačicom [3]



Promjene koncentracije NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, te pH i koncentracije otopljenog kisika kao rezultat vremenskog tijeka mikrobnih reakcija nitrifikacije prikazane su slikom 5.



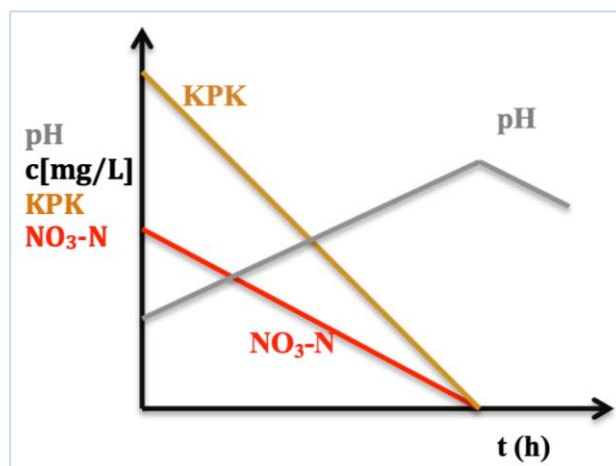
Slika 5. Promjene koncentracije  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$  te pH i otopljenog kisika tijekom vremena u procesu nitrifikacije

U biološkoj denitrifikaciji, u anoksičnim ili anaerobnim uvjetima, dušikovi oksidi,  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  kao krajnji akceptori elektrona se reduciraju do plinovitog dušika, uz organske spojeve kao donore elektrona (Metcalf & Eddy, 2003), jednačba [4], u četiri koraka, katalizirano sa 4 reduktaze, i to:

- redukcija  $\text{NO}_3\text{-N}$  u  $\text{NO}_2\text{-N}$  pomoću enzima nitrat reduktaze (NaR)
- redukcija  $\text{NO}_2\text{-N}$  u dušikov monooksid (NO) pomoću enzima nitrit reduktaze (NiR)
- redukcija NO u didušikov oksid ( $\text{N}_2\text{O}$ ) pomoću enzima dušik monooksid reduktaze (NoR)
- redukcija  $\text{N}_2\text{O}$  do molekularnog dušika ( $\text{N}_2$ ) koji se otpušta u atmosferu, pomoću enzima didušik oksid reduktaze (NoS).



Promjene koncentracije organskih sastojaka kao izvora ugljika – donora elektrona, koncentraciji  $\text{NO}_3\text{-N}$  i pH tijekom denitrifikacije prikazane su slikom 6.



Slika 6. Krivulje promjena KPK,  $\text{NO}_3\text{-N}$  i pH kao odraz mikrobnih reakcija tijekom biološke denitrifikacije

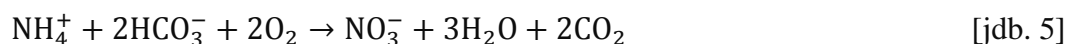
Brzina redukcije  $\text{NO}_2\text{-N}$  relativno je sporija od brzine redukcije  $\text{NO}_3\text{-N}$  i zato se redukcija  $\text{NO}_2\text{-N}$  do  $\text{NO}$  smatra korakom koji ograničava brzinu denitrifikacije, što uglavnom rezultira akumulacijom  $\text{NO}_2\text{-N}$  (Almeida i sur., 1995).

#### 2.10.1.1. Mikroorganizmi nitrifikacije i denitrifikacije

Nitrifikacija i denitrifikacija se provode sa različitim mikroorganizmima pri različitim uvjetima, u dvomuljnom sustavu, u odvojenim reaktorima za nitrifikaciju i denitrifikaciju, a za postizanje uklanjanja N potrebno je dugo vrijeme zadržavanja ili veliki volumeni reaktora, kao i koncentracija otopljenog kisika  $4,2 \text{ g O}_2/\text{g NH}_4^+\text{-N}$  za nitrifikaciju i organski sastojci kao izvor ugljika  $2,86 \text{ gKPK}/\text{gNO}_3^-\text{-N}$  za denitrifikaciju. Gotovi svi nitrifikanti su obligatni kemolito-autotrofi, odnosno svoje potrebe za ugljikom ispunjavaju preko fiksacije  $\text{CO}_2$ , preko Calvin-ovog ciklusa, za biosintezu do organskog ugljika (auto-), a energiju za rast dobivaju iz oksidacije amonijaka ili nitrita kao jedinog izvora energije (kemolito-).

Nitrifikanti kao izvor ugljika za sintezu staničnog materijala koriste  $\text{CO}_2$  koji je dostupan u obliku bikarbonatnog alkaliteta koji nastaje otapanjem  $\text{CO}_2$  u otpadnoj vodi, a  $\text{NH}_4\text{-N}$  koriste kao izvor energije i dio kao izvor dušika za asimilaciju u novu staničnu biomasu ( $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N}$ ). Potrošnjom  $\text{CO}_2$  kao izvora ugljika i  $\text{NH}_4\text{-N}$  odnosno  $\text{NO}_2\text{-N}$  kao izvora energije smanjuje se alkalitet i pH. Oksidacijom  $\text{NH}_4^+$  u  $\text{NO}_2^-$  nastaju  $2\text{H}^+$  iona (jednadžba [1]), i medij se zakiseljava.

Količina alkaliteta potrebnog za odvijanje reakcije (jednadžba [3]) može se opisati jednadžbom [5],:



Prema jednadžbi [5], za svaki konvertirani gram amonijaka (izražen kao N) potrebno je 7,14 g alkaliteta kao  $\text{CaCO}_3$  (izračunato preko  $\frac{2 \cdot (50 \text{ g CaCO}_3/\text{eq})}{14}$ ) (Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002).

U odnosu na heterotrofe, brzina rasta nitrifikanata je vrlo mala budući da autotrofne bakterije za fiksaciju  $\text{CO}_2$  troše oko 80% energije dobivene oksidacijom supstrata i nitrifikanti za svaki fiksirani atom ugljika trebaju oksidirati oko 30 molekula  $\text{NH}_4^+$  ili 100 molekula  $\text{NO}_2^-$  (Wood i sur., 1986). U usporedbi s organotrofima generacijsko vrijeme nitrifikanata je puno dulje. Generacijsko vrijeme većine organotrofa je 15-30 minuta, a ageneracijsko vrijeme nitrifikanata je u povoljnim uvjetima 48-72 sata. Oko 90-97% bakterija u procesu aktivnog mulja su organotrofi, a preostalih 3-10% bakterija nitrifikanti, čak i pri relativno visokom vremenu zadržavanja stanica (>8 dana). Iako veličina populacije nitrifikanata ovisi o količini dostupnog supstrata ( $\text{NH}_4\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$ ), rast i reprodukcija populacije snažno ovisi o procesnim čimbenicima: koncentraciji otopljenog kisika, alkalitetu i pH, temperaturi, inhibiciji, toksičnosti i načinu vođenja procesa (Gerardi, 2002).

Mikroorganizmi koji imaju sposobnost nitrifikacije su *Actinomycetes*, *Algae*, *Bacteria*, *Fungi* i *Protozoa*.

Sposobnost denitrifikacije imaju brojne bakterije, i heterotrofi i autotrofi. Heterotrofi pripadaju rodovima: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Spirillon*, *Vibrio*, *Halobacterium* i *Methanomonas* (Gayle, 1989; Payne, 1981).

Mikroorganizmi posjeduju potpunu, djelomičnu ili nikakvu denitrifikacijsku aktivnost, i mogu se podijeliti u pet skupina:

- potpuni denitrifikanti (mogu reducirati i  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  do  $\text{N}_2$ )
- nitrit reduktanti (mogu reducirati samo  $\text{NO}_2\text{-N}$  (ne i  $\text{NO}_3\text{-N}$ ) do  $\text{N}_2$ )
- nepotpuni denitrifikanti (reduciraju  $\text{NO}_3\text{-N}$  ili  $\text{NO}_2\text{-N}$  do intermedijera dušikovih oksida umjesto do  $\text{N}_2$ )

- nepotpuni nitrit reduktanti (mogu reducirati samo  $\text{NO}_2\text{-N}$  do intermedijera dušikovih oksida)
- nedenitrifikanti (ne mogu reducirati ni  $\text{NO}_3\text{-N}$  ni  $\text{NO}_2\text{-N}$ ).

U procesu konvencionalne denitrifikacije potrebno je osigurati raspoloživi organski izvor ugljika za rast heterotrofnih denitrifikanata, dodatkom vanjskog izvora ugljika poput metanola, etanola, melase, itd.

Elektron donori kao organski supstrati mogu biti:

- (i) lako biorazgradivi KPK u influentu otpadne vode
- (ii) proizveden tijekom endogenog odumiranja
- (iii) vanjski izvor ugljika, poput metanola ili acetata

Oko 25% razgrađenog KPK u anoksičnoj respiraciji mikroorganizmi utroše za staničnu sintezu ili proizvodnju mulja (Gerardi, 2002).

Po ekvivalentu reduciranog  $\text{NO}_3\text{-N}$  proizvede se jedan ekvivalent alkaliteta, što odgovara 3,57 g alkaliteta (kao  $\text{CaCO}_3$ ) proizvedenog po gramu reduciranog dušika u obliku nitrata. Kako se tijekom nitrifikacije utroši 7,14 g alkaliteta (kao  $\text{CaCO}_3$ ) po gramu oksidiranog  $\text{NH}_4\text{-N}$ , tijekom denitrifikacije može se obnoviti oko polovica alkaliteta utrošena nitrifikacijom (Metcalf & Eddy, 2003).

### 2.10.1.2. Čimbenici procesa nitrifikacije i denitrifikacije

Nitrifikanti su strogi aerobi a kao optimalna koncentracija DO za nitrifikaciju navodi se DO 2-3 mg/L. Zanimariva nitrifikacija zbiva se pri  $\text{DO} < 0,5$  mg/L, pri DO 0,5-1,9 mg/L nitrifikacija se ubrzava ali nije učinkovita, dok se značajna nitrifikacija postiže pri DO 2-2,9 mg/L. Prekomjerna aeracija nije poželjna jer značajno poskupljuje proces a narušava flokule i pojačava pjenjenje (Gerardi, 2002). Za oksidaciju  $\text{NH}_4\text{-N}$  do  $\text{NO}_2\text{-N}$  potrebno je 3,43 mg  $\text{O}_2/\text{mg NH}_3\text{-N}$ , a za oksidaciju  $\text{NO}_2\text{-N}$  do  $\text{NO}_3\text{-N}$  1,14 mg  $\text{O}_2/\text{mg NO}_2\text{-N}$ , u procesu nitrifikacije. Teoretska potreba za kisikom za potpunu oksidaciju amonijaka je 4,57 mg  $\text{O}_2/\text{mg NH}_3\text{-N}$ , a stvarna potrošnja kisika je 4,2 mg  $\text{O}_2/\text{mg NH}_3\text{-N}$  jer se dio  $\text{NH}_4\text{-N}$  asimilira u staničnu biomasu ( $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_2$ ) (Metcalf & Eddy, 2003). Brzina rasta nitrifikanata ovisi o temperaturi, s porastom temperature ubrzava se rast nitrifikanata i nitrifikacija se lakše postiže. Pri temperaturi  $< 5$  °C i  $> 45$  °C nitrifikacija prestaje, pri 10 °C brzina nitrifikacije čini oko 20% od brzine nitrifikacije pri 30 °C, a pri 16 °C brzina nitrifikacije je oko polovice brzine pri 30 °C. Optimalna temperatura

za nitrifikante i optimalnu brzinu nitrifikacije je u rasponu 25-30 °C, a temperaturno područje u kojem obitavaju nitrifikanti je 8-30 °C (Gerardi, 2002).

Vrijednost pH vodenog okoliša za proces nitrifikacije je u rasponu 6,8-9,5, a optimalni pH je 7,2-8,0, a optimalni raspon pH vrijednosti za nitrifikaciju je 7,2-8,0 i pri tome je brzina nitrifikacije konstantna (Gerardi, 2002).

Minimalno generacijsko vrijeme za AOB je 7-8 h, a za NOB 10-13 h.

Optimalni pH za denitrifikaciju je u rasponu 7,0-7,5 dok je prihvatljiv raspon pH za denitrifikaciju 6,5-8,5 (Gerardi, 2002; Grady i sur., 1999).

S porastom temperature povećava se brzina denitrifikacije, a optimalna temperatura za denitrifikaciju je u rasponu 20-30 °C. Pri temperaturi <5 °C denitrifikacija je inhibirana. Usporena denitrifikacija pri niskoj temperaturi kompenzira se povećanjem hlapivih suspendiranih čestica u miješanoj tekućini (MLVSS, engl. *Mixed Volatile Suspended Solids*) jer se tako povećava broj denitrifikanata (Gerardi, 2002; Grady i sur., 1999).

Većina denitrifikanata je osjetljivija na varijacije temperature od varijacija pH vrijednosti (Saleh-Lakha i sur., 2009).

Denitrifikanti preferiraju aerobnu respiraciju ili slobodni molekularni kisik za razgradnju KPK, pred anoksičnom respiracijom, budući se aerobnom respiracijom KPK dobiva više energije nego anoksičnom respiracijom. Tako, pri >1 mg DO/L denitrifikanti aktiviraju enzime za korištenje slobodnog molekularnog kisika i deaktiviraju enzime za korištenje nitrita i nitrata (Gerardi, 2002). Anoksična denitrifikacija zahtijeva gotovo kompletno iscrpljenje kisika (0,2-0,5 mg/L), a aerobne denitrificirajuće bakterije toleriraju visoke koncentracije otopjenog kisika (5-6 mg/L). Na učinkovitost procesa denitrifikacije i ekspresiju i aktivnost pojedinačnih reduktaza u procesu denitrifikacije utječu NO<sub>3</sub>-N i intermedijeri procesa denitrifikacije jer služe kao elektron akceptori u denitrifikacijskom elektron transportnom lancu. U odsutnosti bilo kojeg dušikovog oksida sama anaerobiza ne može inducirati četiri reduktaze do značajnih koncentracija (Körner i Zumft, 1989). U odnosu na druge dušikove okside, NO<sub>3</sub>-N kao preferirani elektron akceptor, jednoliko inducira sve reduktaze (Glass i sur., 1997; Almeida i sur., 1995).

### **2.10.1.3. Izvori ugljika za denitrifikaciju**

Omjer količine elektron donora po elektron akceptoru (omjer C/N) značajno utječe na brzinu denitrifikacije. U anoksičnim uvjetima s biorazgradivim organskim supstratom prisutnim u otpadnoj vodi, ako nema rasta, taj omjer bi bio 2,86 g supstrata KPK/g N,



što se smatra teoretskim minimumom. Uzimajući u obzir i rast bakterija, za potpunu denitrifikaciju taj omjer iznosi oko 3,5-4,5 g KPK/g N (Henze i sur., 2002; Henze i sur., 1994).

Izvori ugljika za denitrifikaciju mogu biti (Metcalf & Eddy, 2003; Henze i sur., 1994):

- (i) organski sastojci prisutni u otpadnoj vodi
- (ii) vanjski izvor ugljika – otpadne vode koje su malog omjera KPK/N ili su organski sastojci iscrpljeni u ranijem koraku obrade zahtijevaju dodavanje vanjskog izvora ugljika za postizanje uklanjanja N. Vanjski izvori ugljika mogu se podijeliti na: čiste kemikalije (acetat, etanol, metanol, butanol, šećer, itd.); pročišćeni industrijski i agroindustrijski nusproizvodi (otpadni kukuruzni sirup); sirovi industrijski/agrikolturni nusproizvodi (melasa, otpada iz pivovare, otpadni glicerol od biodizela i drugi procesni otpadi); proizvodi fermentacije mulja; drugi spojevi poput vodika, metana, H<sub>2</sub>S i elementarnog S. Priroda i količina vanjskog izvora ugljika imaju učinak na brzinu denitrifikacije i strukturu denitrificirajuće zajednice, a time i učinkovitost denitrifikacije.

Poželjne karakteristike vanjskog izvora ugljika su: niska cijena proizvoda, visoka brzina denitrifikacije, visoka koncentracija da se smanji cijena skladištenja, pouzdana opskrba, bez dodatnih zahtjeva pri skladištenju, nisko iskorištenje biomase da se smanji obrada mulja, da sadrži minimalne količine N i P, da ne sadrži onečišćujuće tvari kao inhibitore procesa.

- (iii) unutarnji izvor ugljika – tri glavne skupine mikrobni skladišnih spojeva su: polisaharidi (pr. glikogen), polihidroksialkanoati (PHA, engl. *Polyhydroxyalkanoates*; pr. polihidroksibutirat i polihidroksivalerat, PHB, engl. *Polyhydroxybutyrate* i PHV, engl. *Polyhydroxyvalerate*) i polifosfati (poliP). Do pohrane PHB dolazi kada unos supstrata premaši konverzijski kapacitet asimilacije stanice. Anoksični uvjeti pogoduju sintezi polimera. Nagomilavanje elektron donora unutar stanice kao skladišnog spoja važno je za uklanjanje dušika (Third i sur., 2003; Zhao i sur., 2018; Beun i sur., 2000a; Beun i sur., 2000b; van Loosdrecht i sur., 1997).

### **2.10.2. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija**

Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (SND, engl. *Simultaneous nitrification and denitrification*), poznata i kao “aerobna denitrifikacija”, je proces u kojem se nitrifikacija i denitrifikacija zbivaju u istom reaktoru u identičnim operativnim

uvjetima, a sa mikrobiološkog gledišta SND je proces u kojem se zbiva oksidacija amonijaka sa heterotrofnim nitrifikantima i redukcija nitrata ili nitrita sa aerobnim denitrifikantima. SND se zbiva unutar biofilma zbog gradijenta kisika, pa nejednaka distribucija DO unutar biofilma ili flokule omogućuje proliferaciju nitrificirajućih i denitrificirajućih vrsta. Nitrifikanti su aktivni u području visoke koncentracije DO a denitrifikanti u području niske koncentracije DO (Pochana i Keller, 1999; von Munch i sur., 1996). Mehanizam aerobne denitrifikacije je istovremena upotreba kisika i nitrita/nitrata, odnosno korespiracija.

Dva su mehanizma istovremene nitrifikacija i denitrifikacije:

- (i) fizička SND – Konvencionalni fizički mehanizam znači da se SND zbiva kao posljedica gradijenta koncentracije otopljenog kisika (DO, engl. *Dissolved oxygen*) unutar flokule aktivnog mulja ili biofilma zbog difuzijske limitacije. Nitrifikanti egzistiraju u aerobnim uvjetima pri  $DO > 1-2$  mg/L, dok denitrifikanti žive u uvjetima anoksične zone, pri  $DO < 0,5$  mg/L.
- (ii) biološka SND – Biološki mehanizam SND je u suprotnosti sa konvencionalnim “inženjerskim” procesima autotrofne aerobne nitrifikacije i heterotrofne anoksične denitrifikacije. Tijekom SND brzine nitrifikacije i denitrifikacije su manje od optimalnih, jer se samo dio biomase koristi za pojedine reakcije. Brzina nitrifikacije manja je zbog niske koncentracije otopljenog kisika a brzina denitrifikacije je manja zbog potrošnje supstrata u aerobnom dijelu flokule. Brzine nitrifikacije i denitrifikacije su funkcija reakcijske kinetike, strukture, veličine i gustoće flokule, koncentracije otopljenog kisika i količine lako biorazgradivog KPK (Metcalf & Eddy, 2003).

Nekoliko vrsta heterotrofnih nitrifikanata (*Alcaligenes* sp., *Corynebacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Xanthomonas* sp. i *Bacillus*) i aerobnih denitrifikanata (*Paracoccus denitrificans*, *Microvirgula aerodenitrificans*, *Thauera mechernichensis*) je identificirano u sustavima obrade otpadne vode. *Thiosphaera pantotropha* je identificirana i kao heterotrofni nitrifikant i aerobni denitrifikant (Gupta, 1997).

Proces SND je posebno značajan kod obrade otpadnih voda s niskim omjerom C/N (pri  $C/N < 5$ ), jer uštedjet će se trošak dodatnog izvora ugljika (Guo i sur., 2005).

#### **2.10.2.1. Čimbenici kontrole SND processa**

SND se zbiva pri  $DO 0,5$  mg/L i pri tome su brzine nitrifikacije i denitrifikacije slične (Dangcong i sur., 2001; Munch i sur., 1996), dok je široki raspon ORP, od -60 do -198

mV, pri kojem se zbiva SND (Hu i sur., 2005; Fuerhacker i sur., 2000). Značajan učinak na SND proces imaju i drugi čimbenici procesa, poput: vrijeme zadržavanja mulja (SRT, engl. *Sludge Retention Time*), hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT, engl. *Hydraulic Retention Time*) i pH. Kraći SRT i kiseli okoliš su povoljni za rast heterotrofnih nitrifikanata koji rastu brže i tolerantniji su na kiselo od autotrofnih nitrifikanata (Killham 1986). pH i slobodni amonijak su kritični čimbenici SND procesa preko  $\text{NO}_2^-$  jer značajno utječu na kompeticiju AOB i NOB vrsta. Niska DO supresira nitrifikaciju a visoka DO inhibira denitrifikaciju. Visoka koncentracija raspoloživog organskog ugljika inhibira autotrofne nitrifikante a niska koncentracija dovodi do nedostatka elektron donora za denitrifikaciju (Holman i Wareham, 2005; Tam i sur., 1992).

### 2.10.3. Djelomična nitrifikacija i denitrifikacija

Djelomična nitrifikacija denitrifikacija (engl. *Short cut nitrification and denitrification*) ili parcijalna nitrifikacija-denitrifikacija (engl. *partial nitrification-denitrification*) je proces koji se provodi preko  $\text{NO}_2\text{-N}$  a ne preko  $\text{NO}_3\text{-N}$ , odnosno provodi se nitritacija i denitritacija. Nitritacija se provodi do  $\text{NO}_2\text{-N}$  favoriziranjem aktivnosti AOB a inhibiranjem NOB, a zatim se  $\text{NO}_2\text{-N}$  reducira do plinovitog dušika u slijednom procesu denitritacije. Parcijalna nitrifikacija-denitrifikacija, ili uklanjanje dušika putem tzv. *nitritne rute*, donosi određene prednosti pred konvencionalnim procesom nitrifikacije i denitrifikacije, i to: (i) 25% niža potrošnja kisika u aerobnoj fazi procesa što odgovara oko 60% očuvanja energije; (ii) oko 40% manji zahtjev za elektron donorima u anoksičnoj fazi procesa; (iii) brzina denitrifikacije  $\text{NO}_2\text{-N}$  je 1,5-2 puta veća od brzine denitrifikacije  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Parcijalna nitrifikacija preko  $\text{NO}_2\text{-N}$  je tehnički izvediva i ekonomski povoljna, posebice kad se obrađuje otpadna voda sa visokom koncentracijom amonijaka ili niskim omjerom C/N (Turk i Mavinic, 1989; Villaverde i sur., 1997).

Za proces parcijalne nitrifikacije-denitrifikacije ključno je inhibirati NOB vrste, a nekoliko čimbenika ih selektivno inhibira poput: koncentracija DO, temperatura, SRT, koncentracija supstrata, aeracija, kemijski inhibitori. NOB u usporedbi sa AOB zahtijevaju višu **koncentraciju DO**. Vrijednost poluzasićenja kisikom koja predstavlja afinitet za kisik iznosi 62  $\mu\text{m}$  za NOB, odnosno 16  $\mu\text{m}$  za AOB (lit). Zbog toga, pri niskoj koncentraciji DO, AOB dominiraju nad NOB i zbiva se parcijalna nitrifikacija-denitrifikacija preko  $\text{NO}_2\text{-N}$ . Niska vrijednost DO (<1,5 mg/L) povoljna je za parcijalnu

nitrifikaciju ali smanjuje brzinu nitrifikacije, smanjuje učinkovitost uklanjanja KPK i uzrokuje pjenjenje mulja. Navedene su različite DO koncentracije za parcijalnu nitrifikaciju, u rasponu 0,3-2,5 mg/L. Visoka koncentracija DO (>2 mg/L) može prevesti parcijalnu u potpunu nitrifikaciju, dok niska DO koncentracija (<0,5 mg/L) može smanjiti brzinu nitrifikacije. DO 1-1,5 mg/L je povoljna za parcijalnu nitrifikaciju i denitrifikaciju u obradi realne otpadne vode kućanstva. Brzina rasta AOB i NOB varira ovisno o temperaturi. AOB imaju maksimalnu specifičnu brzinu rasta od 0,801 d<sup>-1</sup> a NOB 0,788 d<sup>-1</sup> pri 20 °C, dok pri 15 °C specifična brzina rasta AOB (0,523 d<sup>-1</sup>) je niža od NOB (0,642 d<sup>-1</sup>). Zbog toga NOB dominiraju nad AOB pri temperaturi <15 °C. Više temperature ne promoviraju rast AOB, ali mogu povećati razliku u brzini rasta AOB i NOB. AOB (*Nitrosomonas*) trebaju duže vrijeme zadržavanja od NOB (*Nitrobacter*) pri temperaturi <15°C. Stoga, AOB i NOB se mogu selektivno akumulirati podešavanjem odgovarajućeg SRT u suspendiranom sustavu rasta.

Turk i Mavinic (1987) su opazili akumulaciju NO<sub>2</sub> tijekom prijelaza iz anoksičnog u aerobni sustav rada a taj akumulirajući period u aerobnim uvjetima traje 2-3 sata. Intermitentna aeracija je povoljna za parcijalnu nitrifikaciju.

AOB su podijeljene u dvije skupine: sporo- i brzo-rastuće. Sporo-rastuće bakterije imaju visoki afinitet prema supstratu i dominantne su pri niskoj **koncentraciji supstrata**, dok brzo-rastuće bakterije imaju niski afinitet prema supstratu i napreduju pri visokoj koncentraciji supstrata. Brzo rastuće bakterije su dominantne u parcijalnoj nitrifikaciji pri visokoj koncentraciji (>50 mg/L).

Nekoliko inhibitora supresira NOB i podržava parcijalnu nitrifikaciju. Ag, Hg, Ni, Cr, Zn, Cu i Pb su nabrojani-navedeni u rastućem slijedu toksičnosti, inhibiraju nitrifikaciju. Organski spojevi poput anilina, orto-krezola i fenola jače inhibiraju NOB nego AOB. Otpadne vode sa tim spojevima mogu inhibirati NOB i uzrokovati akumulaciju nitrita. Oksidansi poput ClO<sub>2</sub> i klorata također inhibiraju NOB. Morska voda ili slane vode koje sadrže visoki nivo ClO<sub>2</sub> može postići parcijalnu nitrifikaciju (Peng i sur., 2004). Visoka količina slobodne nitritne kiseline (HNO<sub>2</sub>) i slobodnog amonijaka (FA, engl. *Free Ammonia*) također utječu na nitrifikaciju. HNO<sub>2</sub>-N inhibira oksidaciju nitrita. NOB se inhibiraju pri 0,1-1 mg FA/L, dok AOB mogu tolerirati više od 10-150 mg NH<sub>3</sub>/L. FA koncentracija ovisi o pH i temperaturi otpadne vode.

## 2.11. Biološko uklanjanje fosfora

Fosfor se u otpadnoj vodi pojavljuje u nekoliko oblika, kao ortofosfat, polifosfat, fosforat, organski fosfatni ester i organski fosfonat, a najvećim dijelom, 50-70 %, prisutan je u obliku ortofosfata. Bakterije, alge i biljke fosfor mogu koristiti samo u obliku ortofosfata, pa je za biološko uklanjanje fosfora nužna pretvorba svih oblika fosfora u ortofosfate kako bi se fosfor mogao biološkim putem ukloniti iz otpadne vode (Bitton, 2005).

U primjeni tehnologije aktivnog mulja fosfor se uklanja zajedno sa viškom aktivnog mulja koji se odvodi iz sustava, i na taj način moguće je postići učinkovitost uklanjanja fosfora i do 90 %, ali je nužno produžiti vrijeme zadržavanja aktivnog mulja u sustavu na 4 dana (Shao i sur., 2020).

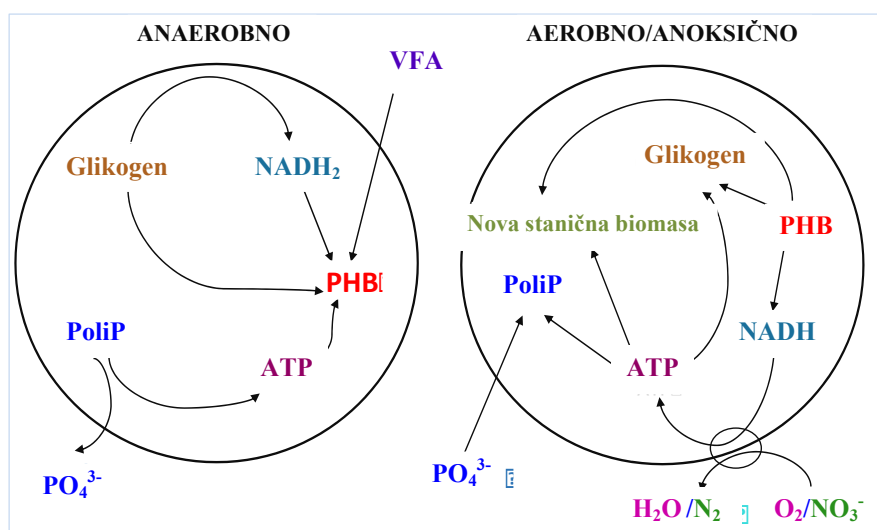
Održivija tehnologija biološkog uklanjanja fosfora iz otpadnih voda je napredno/poboljšano biološko uklanjanje fosfora (EBPR, engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*). Temelji se na primjeni anaerobnih i aerobnih uvjeta pri čemu polifosfat akumulirajući organizmi (PAOs, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*) aktivnog mulja u anaerobnim uvjetima unose u stanice hlapljive masne kiseline (VFA, engl. *Volatile Fatty Acids*) iz vodenog medija i pohranjuju ih u obliku polihidroksialkanoata (PHAs, engl. *Polyhydroxyalkanoates*) za što im je potrebna energiju koju ostvaruju trošenjem glikogena i otpuštanjem fosfata iz stanice u vodeni medij. U slijednim aerobnim uvjetima PAOs troše PHAs, uskladištene tijekom anaerobnih uvjeta, za unos fosfata iz vodenog medija u stanice u znatno većoj mjeri od metaboličkih potreba i akumuliraju ih u obliku polifosfata, za obnavljanje zaliha glikogena i za rast novih stanica i održavanje.

Odvođenjem viška mulja bogatog fosfatima uklanja se fosfor iz otpadne vode. Tijekom aerobne faze puno je veći unos fosfora u stanice nego što je u anaerobnoj fazi njegovo otpuštanje u vodeni medij – bilanca reakcije je na strani aerobnog unosa fosfata.

### 2.11.1. Denitrificirajuća defosfatacija

Denitrificirajuća defosfatacija temelji se na aktivnosti denitrificirajućih fosfat akumulirajućih organizama (DPAOs, engl. *Denitrifying Phosphorus Accumulating Organisms*), čiji metabolizam je sličan metabolizmu fosfat akumulirajućih organizama (PAOs, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*) u poboljšanom biološkom procesu uklanjanja fosfora (EBPR, engl. *Enhanced biological phosphorus removal*) s razlikom

da DPAOs koriste  $\text{NO}_2\text{-N}$  odnosno  $\text{NO}_3\text{-N}$  kao akceptore elektrona, umjesto kisika (Slika 7).



Slika 7. Metabolizam PAOs/DPAOs u EBPR procesu (preuzeto i prilagođeno prema Smolders i sur., 1994)

DPAOs se mogu koristiti u jednomuljnim sustavima s naizmjeničnim anaerobno-anoksično-aerobnim uvjetima za istovremeno uklanjanje C, N i P ili u dvomuljnom sustavu gdje je  $\text{NH}_4\text{-N}$  nitrificiran u odvojenom reaktoru, a DPAOs koriste proizvedene  $\text{NO}_3\text{-N}$  za anoksičan unos P (Kuba i sur., 1996a; Kuba i sur., 1996b; Kuba i sur., 1996c). Nejasno je jesu li isti organizmi odgovorni za uklanjanje P i u aerobnim i u anoksičnim uvjetima.

DPAOs se mogu svrstati u dvije skupine (Hu i sur., 2003; Kerrn-Jeppesen i Henze, 1993; Kuba i sur., 1993):

- I. DPAOs preko  $\text{NO}_2\text{-N}$ , mogu koristiti  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  kao elektron akceptor za uklanjanje P
- II. DPAOs preko  $\text{NO}_3\text{-N}$ , mogu koristiti i  $\text{O}_2$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  kao elektron akceptore za uklanjanje P

DPAOs preko  $\text{NO}_2\text{-N}$  i DPAOs preko  $\text{NO}_3\text{-N}$  imaju metaboličke karakteristike slične kao i PAOs (Slika 7) (Ahn i sur., 2001; Kuba i sur., 1996a; Kuba i sur., 1996b; Kuba i sur., 1996c). U naizmjeničnim anaerobnim i anoksičnim uvjetima, DPAOs unose vanjski organski ugljik za sintezu intracelularnih PHA osiguravajući energiju otpuštanjem fosfata i razgradnjom glikogena u anaerobnim uvjetima, a potom DPAOs koriste  $\text{NO}_2\text{-N}$  ili  $\text{NO}_3\text{-N}$  kao elektron akceptor umjesto  $\text{O}_2$ , za unutarstanični unos

fosfata veći od metaboličkih potreba i istovremeno uklanjanje dušika pri anoksičnim uvjetima, pri čemu se zbiva regeneracija glikogena, oksidacija PHA, rast i održavanje biomase. U odnosu na konvencionalne procese denitrificirajuća defosfatacija ima oko 30% manju potrebu za kisikom i 50% manju proizvodnju mulja.

Brzina unosa P u anoksičnim uvjetima općenito je manja nego u aerobnim uvjetima iz razloga što PAOs s  $\text{NO}_3\text{-N}$  proizvode oko 40% manje energije nego s  $\text{O}_2$  kao elektron akceptorom. Značajno je manja potreba na KPK za denitrificirajuću defosfataciju u usporedbi s odvojenim uklanjanjem N i P, što rezultira uštedom na aeraciji zbog upotrebe  $\text{NO}_3\text{-N}$  ili  $\text{NO}_2\text{-N}$  umjesto  $\text{O}_2$  i čini denitrificirajuće P uklanjanje ekonomski vrlo atraktivno. U usporedbi s konvencionalnim EBPR procesom denitrificirajuća defosfatacija zbog zbivanja pomoću istovremene denitrifikacije i uklanjanja P čini uštedu na aeraciji, manje je odlaganje mulja i manja je potreba za izvorima ugljika (Kuba i sur., 1996a; Kuba i sur., 1996b; Kuba i sur., 1996c).

## **2.12. Uklanjanje N iz otpadne vode primjenom aerobnoga granularanoga mulja**

Onečišćenje otpadnih voda dušikom i fosforom predstavlja ozbiljan ekološki problem i globalnu prijetnju održivom razvoju, a postizanje strogih zahtjeva za kakvoćom obrađene vode za ispust u okoliš kada je otpadna voda karakterizirana malim omjerom C/N je veliki izazov na sustavima za obradu otpadnih voda.

Pri niskom omjeru C/N potrebno je ili osigurati dodatni izvor ugljika za postizanje učinkovitog uklanjanja N (Mokhayeri i sur., 2009) ili razvijati procese i konfiguracije procesa s ciljem poboljšanja učinkovitosti iskorištenja ulaznog izvora ugljika za denitrifikaciju, poput: proces istovremene nitrifikacije-denitrifikacije (Zhao i sur., 2018), proces stupnjevito dodavanja hrane (Ge i sur., 2012), proces endogene denitrifikacije (Zhao i sur., 2018), proces istovremene nitrifikacije, denitrifikacije i uklanjanja fosfora (Wu i sur., 2022).

Poboljšano uklanjanje dušika pri obradi otpadnih voda malog omjera C/N može se postići endogenom denitrifikacijom (Zhao i sur., 2018), ali primjena je još uvijek ograničena zbog male brzine redukcije nitrata. Kujawa i Klapwijk (1999) navode brzinu redukcije nitrata 0,2-0,6 mgN/gVSSh, odnosno 0,1 kgN/m<sup>3</sup>d uz dugo vrijeme zadržavanja od 7-16 sati. Wang i sur. (2016) su postigli povećanje uklanjanja ukupnog

dušika od 77,7% na 92,1% u obradi otpadne vode grada u SBR reaktoru dodavanjem post-anoksičnog stupnja odnosno provođenjem endogene denitrifikacije.

Wu i sur. (2022) istaknuli su da je proces istovremene nitrifikacije, denitrifikacije i uklanjanja fosfora (SNDPR, engl. *Simultaneous Nitirifcation, Denitirifcation and Phosphorus Removal*) najviše obećavajući proces istovremenog uklanjanja N i P, da je sekvencijalni šaržni način rada bitan za postizanje SNDPR, da je balansiranje kompetitivnosti DGAOs i DPAOs ključno za proces SNDPR i da proces SNDPR predstavlja značajan potencijal za oporavak P. Prema Wu i sur. (2022) buduća istraživanja primjene SNDPR procesa trebaju se usredotočiti na: (i) balansiranje konkurentnosti između denitrifikacijskih organizama koji nakupljaju glikogen (DGAO) i DPAO, te protumjere za rješavanje učinaka nepovoljnih uvjeta na izvedbu SNDPR; (ii) postizanje SNDPR u radu s kontinuiranim protokom; i (iii) maksimiziranje oporavka P tijekom SNDPR kako bi se postigla održivost resursa.

Važan parametar koji utječe na stabilnost i istovremeno uklanjanje dušika i fosfora primjenom AGS tehnologije je omjer C/N.

Su i sur. (2023) su istraživali učinak omjera C/N (20, 15, 10, 5) i promjene u mikrobnjoj zajednici u procesu poboljšanog istovremenog uklanjanja dušika i fosfora u AGS-SBR reaktoru. Rezultati su pokazali da različiti omjeri C/N imaju značajan učinak na brzinu uklanjanja dušika AGS-om, ali imaju mali učinak na brzinu uklanjanja organske tvari i fosfora. Kada je omjer C/N smanjen na 10, to je pogodovalo stabilnosti AGS-SBR sustava s malim opterećenjem. Učinkoviti C/N omjer pospješio je izlučivanje EPS-a od strane mikroorganizama, a povećanje PN vrijednosti pridonijelo je stabilnosti granuliranog mulja, koji je postao gladak i kompaktan.

Feng i sur. (2012) su istražili učinak glukoze i mješavine glukoza-acetat (1:1), pri KPK/N 20, na aerobne granule u 4 satnom ciklusu SBR, konfiguracije: hranjenje 5 min, aeracija 229 minuta, taloženje 3 minute, ispuštanje 3 minute.

Uz glukožu kao izvor ugljika postignut je dijаметar granula 2,5 mm a filamentozne vrste su doprinjele mekoj-paperjastoj strukturi granula, dok su uz mješavinu glukoze i acetata proizvedene granule dijametara 1 mm, sastavljene uglavnom od koka i bacila, vrlo guste i kompaktne strukture. Razvoju filamentoznih vrsta u reaktoru hranjenom glukozom pogodovalo je smanjenje pH, dok je u reaktoru hranjenom mješavinom glukoze i acetata, neutralni ili alkalni pH pogodovao rastu koka i bacila. Postignuto je uklanjanje KPK >96%, ukupnog dušika 83% i istovremena nitrifikacija/denitrifikacija 40,1% sa granulama hranjenim mješavinom glukoze i acetata, dok su granule hranjene



glukozom kao jedinim izvorom ugljika rezultirale sa 34% učinkovitosti istovremene nitrifikacije i denitrifikacije i 74,6% uklanjanja ukupnog dušika i uklanjanjem KPK >96% (Feng i sur., 2012).

I Zhou i sur. (2010) sugeriraju da oksidacija različitih izvora ugljika rezultira različitim vrijednostima pH, što se odražava na mikrobnu raznolikost.

Učinak smjese acetata i glukoze u omjeru 3: 1, 1: 1 i 1: 3, na istovremeno uklanjanje ugljika, dušika i fosfora u procesu aerobne granulacije istražili su He i suradnici (2018b). Karakteristike ulaza su: 200 mg KPK/L, 20 mg NH<sub>4</sub>-N/L i 3 mg TP/L. Pokusi su provedeni u SBR reaktoru laboratorijskog mjerila konfiguracije anaerobno/aerobno/anoksični uvjeti, pri specifičnoj brzini uzlaznog toka zraka 0,04 cm/s, koncentraciji otopljenog kisika 0,8-1,2 mg/L u aerobnoj fazi, pri pH oko 7,5, temperaturi 20±2 °C, pri HRT 12 sati i SRT 2 dana. Postignuti su rezultati uklanjanja KPK 91,04±2,89%, 88,31±2,35% i 80,95±3,17% pri odabranim omjerima acetat/glukoza 3:1, 1:1 i 1:3. Povećanje udjela glukoze dovelo je do povećanja fosfata i nitrata u izlazu, do povećanja proizvodnje EPS-a, posebno polisaharida, ali i do smanjenja raznolikosti mikrobne biomase iako su dominantne mikrobne vrste ostale konstantne, što je pokazala filogenetska klasifikacija.

U radu Gao i sur. (2020) istraživano je poboljšanje učinkovitosti uklanjanja N putem endogene denitrifikacije u obradi otpadne vode malog omjera C/N. Razvili su novi proces dvostruke recirkulacije mulja pri konfiguraciji anaerobno/aerobno/anoksični proces. Pre-anaerobna zona je poboljšala unutarstaničnu pohranu ugljika, što je poboljšalo proces endogene denitrifikacije. Pri niskom omjeru C/N 2,67 uz hidrauličko vrijeme zadržavanja od 12 sati postignuta je učinkovitost uklanjanja N od 97,7% sa izlaznim vrijednostima ukupnog dušika 1,56 mg/L i brzina uklanjanja dušika od 0,14 kgN/m<sup>3</sup> d. Proces je vođen uz reciklaciju – povrat mulja u anoksičnu zonu čime je povećana količina suhe tvari (MLSS, engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*) u anoksičnoj zoni i poboljšano uklanjanje NO<sub>x</sub>-N.

### **2.13. FISH metoda analize mikrobne zajednice**

FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) je molekularna metoda koja se često koristi za izravnu identifikaciju i kvantifikaciju određenih ciljanih mikrobioloških skupina u laboratorijskim ili okolišnim uzorcima (Amann, 1995). FISH metoda u kombinaciji sa konfokal laser skenirajućom mikroskopijom (CLSM, eng. *Confocal Laser Scanning*

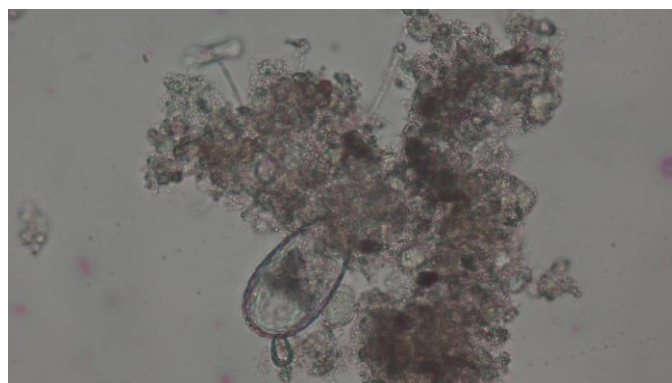
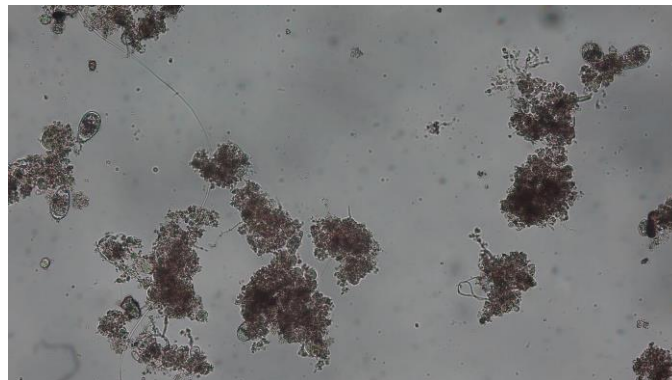
*Microscopy*) omogućuje uvid u strukturu mikrobne zajednice, daje točnu i preciznu rekonstrukciju prostornog rasporeda mikrobnih zajednica u njihovom okruženju – staništu (Amann i sur., 2001). Analizom sastava mikrobne zajednice kao kompleksne i visoko varijabilne mješavine različitih mikroorganizama dobiva se uvid u uključenost određenih mikroorganizama u procesima uklanjanja organskih (ugljika, C) i anorganskih sastojaka (dušika i fosfora, N i P) iz otpadne vode (Wagner i sur., 2002). U FISH metodi koriste se 16S rRNA ciljane oligonukleotidne probe koje se mogu dizajnirati za organizme na svim razinama taksonomske specifičnosti, od domene do podvrsta. Probe su duge 15-25 nukleotida i na 5' kraju kovalentno označene sa fluorescentnom bojom. Kombinacija 16S rRNA ciljanih oligonukleotidnih proba i fluorescentnih boja omogućava promatranjem pod fluorescentnim mikroskopom identifikaciju označene bakterije u kompleksnim prirodnim zajednicama (Amann i sur., 1995).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijal i metode

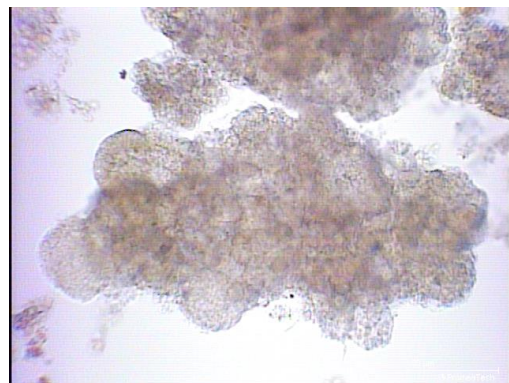
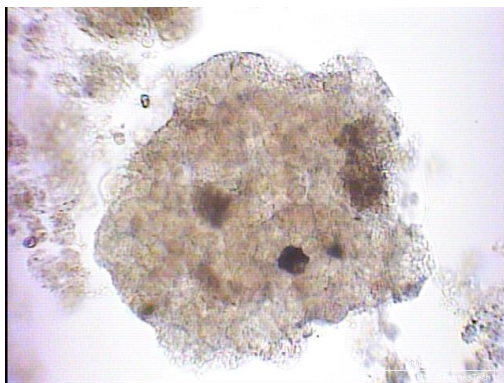
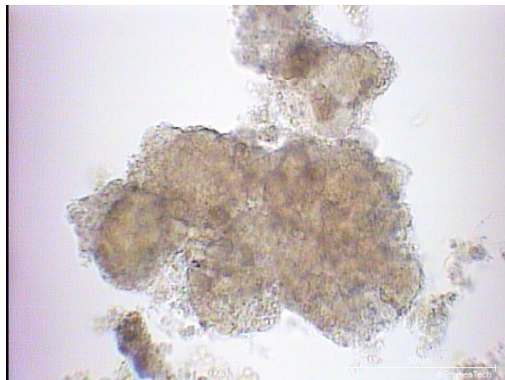
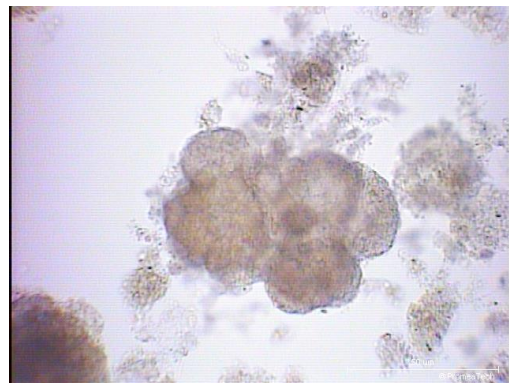
##### 3.1.1. Aerobne granule – od flokule do granule

Aktivni mulj sa Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba (CUPOVZ) poslužio je kao inokulum za razvoj granuliranog mulja (Slika 8).



Slika 8. Aktivnim mulj sa Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba koji je poslužio kao inokulum za uzgoj aerobnih granula i mikroskopska slika aktivnog mulja sa CUPOVZ iz aerobnog bioreaktora (povećanje 100x i 400x)

U laboratorijskom SBR reaktoru uzgojene su aerobne granule (Slika 9).



Slika 9. Aerobni granulirani mulj – izgled, i mikroskopska slika aerobnih granula, tijekom formiranja AGS (svjetlosni mikroskop, povećanje 640 x)

### 3.1.2. Supstrat – sintetska otpadna voda

Sintetska otpadna voda priređena je otapanjem soli u vodovodnoj vodi, i to: 2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{L}$ , 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{L}$ , 0,4 g  $\text{FeSO}_4/\text{L}$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4/\text{L}$ , 0,4 g  $\text{NaCl} /\text{L}$ , 1 g  $\text{MgCO}_3/\text{L}$ , 1 g  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ , i otopina elemenata u tragovima (0,3 mL/L): 1,5 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ , 0,15 g  $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{L}$ , 0,03 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ , 0,18 g  $\text{KI}/\text{L}$ , 0,12 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ , 0,06 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ , 0,12 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ , 0,15 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ , 10 g  $\text{EDTA}/\text{L}$  (Smolders i sur., 1994). Nakon 24 sata stajanja pri sobnoj temperaturi sintetska podloga filtrirana je kroz filter papir veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$ . Mineralna podloga čuvana je u plastičnom spremniku pri sobnoj temperaturi. Kao izvor ugljika korišten je natrijev acetat ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ). Za potrebe podešavanja pH u pokusima uporabljena je 1M NaOH. U šaržnim pokusima izvor N je otopina  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , a izvor P je otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , priređene sa demineraliziranom vodom.

### 3.1.3. Instrumenti i pribor

Popis aparature i kemikalija korištenih pri izradi disertacije dani su u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Aparatura uporabljena u izradi disertacije

Aparat	Proizvođač, zemlja pdrijetla
Bioreaktor -----	po narudžbi, Hrvatska
Kompresor -----	HIBLOW HP 40, Japan
Kisikova elektroda i mjerni aparat -----	DurOx, WTW Oxi3210, Engleska/USA
pH elektroda i mjerni aparat -----	SenTix41, WTW 330i, Engleska/USA
Mjerač protoka zraka -----	Dwyer, USA
Spektrofotometar -----	Spectroquant VEGA 400 Merck, Njemačka
Spektrofotometar -----	Spectroquant PROVE 300 Merck, Njemačka
Fotometar -----	SQ 200 Merck, Njemačka
KPK reaktor -----	HACH COD Reactor, Njemačka
Termo blok -----	Thermoreactor, Merck, Njemačka
Analizator vlage -----	Sartorius, USA, Njemačka
Vakuum sustav -----	Sartorius, USA, Njemačka
Analitička vaga -----	METTLER AJ150, Švicarska
Vortex -----	Biosan, Latvia
Svjetlosni mikroskop -----	Carl Zeiss Jena, Japan
Konfokalni laser skenirajući mikroskop -----	Leica, Švicarska
Centrifuga -----	Beckman, Njemačka
Magnetska miješalica -----	Thermo Scientific Cimarec, USA
Vodena kupelj -----	Hum Aqua 5, Engleska
Sterilizator/ Sušionik -----	Instrumentaria ST-05, Hrvatska
Termostat -----	Sutjeska, Jugoslavija
Peć za spaljivanje -----	Nebertherm, Njemačka
Autoklav -----	Inako, Hrvatska

Tablica 3. Kemikalije uporabljene u izradi disertacije

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvođač, zemlja podrijetla</b>
$\text{Na}_2\text{H}_3\text{O}_2$	Merck, Njemačka; GRAM-MOL, Hrvatska
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Kemika, Hrvatska
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck, Njemačka
1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat	Kemika, Hrvatska
$\text{Ag}_2\text{SO}_4$	Kemika, Hrvatska
$\text{CaCO}_3$	Kemika, Hrvatska
DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol)	BioChemica, Engleska
Etanol	Kemika, Hrvatska
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Kemika, Hrvatska
Formamid	Merck, Njemačka
$\text{H}_2\text{SO}_4$	GRAM-MOL, Hrvatska
HCl	Merck, Njemačka
$\text{HgSO}_4$	Kemika, Hrvatska
Imerziona ulje	Merck, Njemačka
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Kemika, Hrvatska
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Kemika, Hrvatska
KCl	Alkaloid, S. Makedonija
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Merck, Njemačka
$\text{K-Na-C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$	GRAM-MOL, Hrvatska
$\text{KNO}_3$	T.T.T., Hrvatska
Krisiodin	SIGMA-ALDRICH, USA
Kristal violet	SIGMA-ALDRICH, USA
$\text{MgCO}_3$	Kemika, Hrvatska
$\text{MgSO}_4$	Merck, Njemačka
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Thermo Fisher Scientific, USA
NaCl	Merck, Njemačka
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Merck, Njemačka
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck, Njemačka
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Merck, Njemačka
NaOH	Kemika, Hrvatska
Metilen plavo	SIGMA-ALDRICH, USA
Nesslerov reagens	Kemika, Hrvatska
Octena kiselina	Merck, Njemačka
Paraformaldehid	Merck, Njemačka
Probe FISH	GOREA PLUS, Hrvatska (Perkin Elmer, USA)
ProLong Gold antifade mountant	Biosistemi, Hrvatska
SDS (natrijev dodecil-sulfat)	Merck, Njemačka
Tris/HCl	Merck, Njemačka
$\text{NaNO}_2$	Merck, Njemačka

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Priprema granula

Granule su priređene granulacijom aktivnog mulja sa Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda grada Zagreba (CUPOVZ).

Aktivni mulj sa CUPOVZ je slijedećih karakteristika: prosječna vrijednost MLSS u aeracijskim spremnicima  $3,44 \pm 0,34$  g/L, volumen mulja kroz 30 min  $315,35 \pm 31,95$  mL/L što daje indeks mulja od  $92,3 \pm 10$  mL/g.

Aktivni mulj ima učinkovitost uklanjanja organskih sastojaka  $92 \pm 1\%$  KPK (prosječna vrijednost organskih sastojaka u otpadnoj vodi na CUPOVZ je  $305 \pm 81$  mg KPK/L), učinkovitost uklanjanja ukupnog dušika  $34,7 \pm 4,6\%$  (prosječna vrijednost ukupnog dušika u otpadnoj vodi na CUPOVZ je  $32 \pm 5$  mg N/L,  $19 \pm 2,9$  mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$ ,  $0,7 \pm 0,24$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  i  $0,2 \pm 0,1$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ ), a ukupnog fosfora  $44,9 \pm 1,6\%$  (prosječna vrijednost ukupnog fosfora u otpadnoj vodi na CUPOVZ je  $3,67 \pm 0,6$  mg P/L i  $1,74 \pm 0,29$  mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ ). Podaci su iskazani za 2018. godinu.

Ciljani pokusi u kojima je istražen učinak različitih konfiguracija vođenja procesa i odabranih procesnih čimbenika na uklanjanje dušika i stabilnost aerobnog granuliranog mulja provedeni su sa zrelim granulama iz roditeljskog reaktora, i to: (i) istražen je učinak omjera KPK/N, (ii) učinak koncentracije otopljenog kisika (iii) učinak slanosti; (iv) učinak koncentracije otopljenog kisika  $2\text{mg DO/L}$  u aerobnoj fazi anoksično/aerobnog procesa; i (v) učinak  $\text{DO} < 1$  mg/L u aerobnoj fazi anoksično/aerobnog procesa; (vi) učinak dužeg vremenskog perioda pohranjivanja aerobnog granuliranog mulja na  $+4$  °C.

Tim pokusima se, ovisno o režimu vođenja procesa istaknula mikrobna aktivnost u uklanjanju C, N i P, kao i kompetitivnost za: (i) raspoloživi otopljeni kisik – između nitrifikanata za proces nitrifikacije, PAOs za unutarstanični unos i pohranu  $\text{PO}_4\text{-P}$ , i OHOs za biorazgradnju organskih sastojaka; (ii) raspoloživi organski ugljik – između DNI vrsta za denitrifikaciju, PAOs i GAOs za pohranu PHA i potom unos P u stanice PAOs, i OHO za rast i aktivnost; (iii) za raspoložive dušikove okside –  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  – između DNI u provedbi procesa denitrifikacije, i DPAOs kojima N oksidi služe kao akceptori elektrona u uklanjanju P pa doprinose ukupnom uklanjanju N.

Također, različite konfiguracije vođenja procesa reflektirale su se na stabilnost granuliranog mulja.

Napravljena je i mikroba karakterizacija aerobnog granuliranog mulja na prisutnost nitrificirajućih bakterija (AOB i NOB), denitrifikanata, PAOs, GAOs i DPAOs.

### **3.2.2. Konfiguracije SBR**

Konfiguracija SBR-a u pokusima u kojima je istražen učinak omjera KPK/N tijekom dugotrajnog vođenja procesa, učinak DO i učinak slanosti na učinkovitost uklanjanja N, C i P je 4-satni ciklus pri anoksično/aerobnom režimu rada: punjenje 5 min, aeracija 220 min, taloženje 10 min i ispuštanje 5 min, uz omjer izmjene volumena 50%.

Konfiguracija SBR-a u pokusima u kojima je istražen učinak dužeg anoksičnog perioda u anoksično/aerobnom režimu pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi procesa, kao i pri DO < 1 mg/L u aerobnoj fazi procesa, je ciklus (4 sata): punjenje 5 min, anoksična faza 110 min, aeracija 110 min, taloženje 10 min i ispuštanje 5 min, uz omjer izmjene volumena 50%. Anoksični uvjeti su ostvareni propuhivanjem plina dušika.

### **3.2.3. Šaržni pokusi – kinetika uklanjanja N, C i P sa aerobnim granulama**

U biološkim procesima učinkovitost uklanjanja N ovisi o ravnoteži između aktivnosti različitih mikrobnih skupina, a izvođenje šaržnih testova aktivnosti kako bi se procijenila i odredila stehiometrija i kinetičke brzine ciljanih procesa biološke konverzije predstavlja koristan alat za motrenje i kontrolu procesa uklanjanja dušika (van Loosdrecht i sur., 2016).

Šaržni pokusi provedeni su u laboratorijskim čašama, radnog volumena 800 mL, postavljenim na magnetske mješalice (Thermo Scientific Super-Nuova, Model No SP88857195, China) pri 150 o/min za provedbu pokusa u anoksičnim uvjetima uz propuhivanje dušikom, u koje je u miješanu tekućinu uronjena kisikova i pH elektroda (WTW Multi 3420, Njemačka) za stalno motrenje DO, pH i temperature, kao i difuzor preko kojeg se upuhuje zrak putem kompresora (HIBLOW HP 40, Japan) za potrebne aerobne uvjete, odnosno plin dušik za anoksične uvjete.

Za analitičko određivanje tijeka procesa uklanjanja N, C i P, u određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci i provođeno je analitičko određivanje KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P, ukupni N, MLSS.

Kao izvor ugljika poslužio je natrijev acetat, dodan u odgovarajućoj količini da bi se postigao određeni odabrani omjer KPK/N, odnosno C/N, kao izvor N poslužila je otopina NH<sub>4</sub>Cl dodana u odgovarajućoj količini za odabranu početnu koncentraciju



NH<sub>4</sub>-N, a kao izvor P korištena je otopina KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> također dodana u određenoj količini za ciljani pokus.

Za šaržne pokuse aerobne granule su uzete na kraju aerobne faze zadnjeg dana vođenja procesa pri odabranom režimu rada.

Svi pokusi načinjeni su u 3 replike, a rezultati čine srednju vrijednost ± standardna devijacija.

### **3.3. Fizikalno-kemijske analitičke metode**

#### **3.3.1. Određivanje ukupnog dušika**

Merck Spectroquant 1.14763 set korišten je za određivanje ukupnog dušika. Organski i anorganski spojevi s dušikom prevode se u nitrat prema Koroleff-ovoj metodi u reakciji s oksidirajućim reagensom u termoreaktoru. U otopini zakiseljenoj sumpornom i fosfornom kiselinom, nitrati reagiraju s 2,6-dimetilfenolom (DMP) i tvore 4-nitro-2,6-dimetilfenol koji se određuje fotometrijski.

Digestija je analogna EN ISO 11905-1, a određivanje nitrata je analogno ISO 7890/1. U praznu kivetu otpipetira se 9 mL destilirane vode i 1 mL uzorka (prethodno profiltrirani i po potrebi razrijeđen uzorak) i promiješa. Doda se 1 žličica reagensa N-1K i promiješa. Potom se doda 6 kapi reagensa N-2K, dobro zatvori kiveta, promućka i spaljuje pri 120 °C/1 sat. Nakon spaljivanja kiveta se hladi na sobnu temperaturu (ne pod mlazom vode i ne u termoreaktoru). Nakon 10 minuta sadržaj u kiveti se promućka. U reakcijsku kivetu se otpipetira 1 mL ohlađenog spaljenog uzorka (koristi se bistri supernatant ili filtrat u slučaju mutnoće ili taloga) i doda 1 mL reagensa N-3K, kiveta zatvori i dobro promućka. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena očita se apsorbancu u spektrofotometru.

#### **3.3.2. Određivanje amonijakalnog dušika**

Metodom po Nessleru određivan je amonijakalni dušik (NH<sub>4</sub>-N). Dodatkom Nesslerovog reagensa u prisustvu NH<sub>4</sub>-N nastaje žuta do žuto smeđa boja, ovisno o količini NH<sub>4</sub>-N, čiji se intenzitet određuje pri valnoj duljini 425 nm. Iz baždarnog dijagrama za određenu apsorbancu pri 425 nm očita se količina NH<sub>4</sub>-N u mg/L. Baždarni dijagram načini se određivanjem absorbancijskih vrijednosti pri 425 nm za poznate koncentracije standardne otopine NH<sub>4</sub>Cl.

Postupak: U odmjernu tikvicu od 50 mL staviti 50 mL filtriranog uzorka (po potrebi razrijeđenog) i 2 kapi K-Na-tartarata. Promiješati, dodati 1 mL Nesslerovog reagensa, promiješati. Nakon 10 min preliterati u kivetu i mjeriti apsorbancu pri 425 nm u fotometru.

### 3.3.3. Određivanje koncentracije nitrita

Merck Spectroquant 1.14776 set uporabljen je za određivanja nitrita. Metod se temelji na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli, koja reagira s N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorom i tvori crveno-ljubičastu azo boju. Obojenje se mjeri fotometrijski i izražava kao mg NO<sub>3</sub>-N/L. Ova metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>B, i EN 26 777.

Postupak: U staklenu kivetu otpipetira se 5 mL uzorka (prethodno profiltriranog i po potrebi razrijeđenog s destiliranom vodom do koncentracijskog raspona metode) i doda se jedna žličica NO<sub>2</sub>-1 reagensa. Kiveta se zatvori i miješa dok se reagens ne otopi u uzorku. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena izmjeri se apsorbancu u fotometru.

FA i FNA su računati prema Anthonisen i sur. (1976), jednadžbe [6 i 7] .

$$\text{FA kao NH}_3 \left( \frac{\text{mg N}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{ukupni amonijak kao N (mg/L)} \times 10^{\text{pH}}}{e^{\frac{6344}{273+T(^{\circ}\text{C})}} + 10^{\text{pH}}} \quad [\text{jdb. 6}]$$

$$\text{FNA} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{[\text{NO}_2^- - \text{N}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{e^{\frac{-2300}{273+T(^{\circ}\text{C})}} \times 10^{\text{pH}}} \quad [\text{jdb. 7}]$$

### 3.3.4. Određivanje koncentracije nitrata

Merck Spectroquant 1.14773 set korišten je u određivanju NO<sub>3</sub>-.. Metoda se temelji na reakciji nitratnih iona u sumpornoj kiselinu s derivatom benzojeve kiseline uz nastanak nitro spoja koji je crvene boje i određuje se fotometrijski.

Postupak: U staklenu kivetu doda se 1,5 mL uzorka (prethodno profiltriran i po potrebi razrijeđen s destiliranom vodom do koncentracijskog raspona metode) i žličica NO<sub>3</sub>-1 reagensa. Kiveta se dobro zatvori i pažljivo miješa dok se reagens ne otopi u uzorku. Potom se dodaje 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, kiveta dobro zatvori i pažljivo promiješa (oprez, oslobađa se toplina). Reakcija se odvija 10 minuta nakon čega se apsorbancu mjeri u fotometru.

### 3.3.5. Određivanje koncentracije fosfata

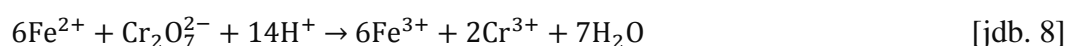
Merck Spectroquant 1.14842 set korišten je za određivanje fosfat u obliku ortofosfata (PO<sub>4</sub>-P). Metoda se temelji na reakciji iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i

amonijevim heptamolibdatom pri čemu nastaje žuto obojeni molibdovanadat fosforna kiselina čija se koncentracija određuje fotometrijski. Metoda je analogna APHA 4500-PC.

Postupak: U staklenu kivetu otpipetira se 5 mL prethodno profiltriranog i po potrebi s destiliranom vodom razrijeđenog uzorka do koncentracijskog raspona metode te se doda 1,2 mL PO<sub>4</sub>-1 reagensa. Kiveta se dobro zatvori i promiješa. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena izmjeri se apsorbancija u fotometru.

### 3.3.6. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK) – zatvorena reflux metoda

KPK vrijednost zraava se u mg O<sub>2</sub>/L a predstavlja količinu oksidansa utrošenog za oksidaciju organskih sastojaka, pri čemu kalijeva bikromata (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) treba biti dodan u suvišku. Za potpunu oksidaciju organskih spojeva dodaje se srebro-sulfat (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kao katalizator reakcije. Za sprečavanje oksidacije nekih anorganskih spojeva, poput klorida, dodaje se živin sulfat (HgSO<sub>4</sub>). Višak kalijeva bikromata, preostao nakon oksidacije, titrira se otopinom feroamonijeva sulfata (FAS) ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) po jednadžbi [8].



Faktor otopine (zbog nestabilnosti otopine feroamonijeva sulfata) potrebno je odrediti titracijom standardne otopine kalijeva bikromata s feroamonijevim sulfatom, prije određivanja KPK. Faktor otopine (f) je omjer volumena otopine K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + HgSO<sub>4</sub> i (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O.

Postupak određivanja faktora otopine: U staklenu kivetu otpipetira se 2 mL destilirane vode i doda 1,2 mL otopine kalijeva bikromata + HgSO<sub>4</sub> i 2,8 mL otopine Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Staklena kiveta se dobro začepi, promiješa i stavi na tamno mjesto da se ohladi. Nakon hlađenja uzorak se titrira otopinom FAS uz dodatak feroin indikatora do promjene boje iz plavo/zelene u smeđe/crvenu. Faktor otopine se računa prema jednadžbi [9].

$$f = \frac{1,2}{V_{\text{fas}}} \quad [\text{jdb. 9}]$$

gdje je:

1,2 - volumen (mL) otopine K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> + HgSO<sub>4</sub>

V<sub>fas</sub> - volumen (mL) FAS otopine utrošene za titraciju

Postupak određivanja KPK: U staklenu kivetu otpipetira se 2 mL uzorka, doda 1,2 mL otopine  $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$  i 2,8 mL otopine  $Ag_2SO_4 + H_2SO_4$ . Staklena kiveta se dobro zatvori i oprezno promućka, te se sadržaj spaljuje u termoreaktoru pri 150 °C/1 sat. Nakon spaljivanja kiveta se stavlja u tamu dok se ne ohladi na sobnu temperaturu (ne hladiti pod mlazom vode). Titrira se otopinom FAS ( $c = 0,1 \text{ mol/L}$ ) uz feroin kao indikator do promjene boje iz plavo/zelene u smeđe/crvenu.

Slijepa proba priprema se na isti način kao uzorak, uz 2 mL destilirane vode (umjesto uzorka).

KPK vrijednost računa se prema jednadžbi [10].

$$KPK \left[ \frac{\text{mgO}_2}{\text{L}} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times f \times 8000}{V_{\text{uzorka}}} \quad [\text{jdb. 10}]$$

gdje je:

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

$V_2$ -volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

c-koncentracija FAS (0,1 mol/L)

f-faktor otopine FAS

### 3.3.7. Određivanje MLSS

Koncentracija biomase određivana je kao MLSS, što predstavlja suspendiranu tvar u miješanoj tekućini i pokazuje koncentraciju biomase aktivnog mulja. Određena je kao razlika suhog čistog filter papira i filter papira s talogom aktivnog mulja sušenog pri 105 °C do konstantne mase.

Postupak: Uzorak tijekom faze aeracije poznatog volumena filtriran je kroz prethodno odvgan filter papir, te potom sušen pri 105 °C do konstantne mase. Nakon sušenja, u eksikatoru j eohlađen te izvagan. Iz razlike mase filter papira sa talogom mikrobne biomase i čistog filter papira podijeljene s volumenom suspenzije mikrobne biomase, odredi-izračuna se koncentracija biomase izražena u g/L, a računa se prema jednadžbi [11].

$$MLSS \left[ \frac{\text{g}}{\text{L}} \right] = \frac{m_{om} - m_f}{\text{mL uzorka}} \times 1000 \quad [\text{jdb. 11}]$$

gdje je:

$m_{om}$  [g]=masa osušenog aktivnog mulja na filter papiru

$m_f$  [g]=masa čistog filter papira

### **3.3.8. Određivanje temperature**

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

### **3.3.9. Određivanje pH vrijednosti**

Vrijednost pH motrena je i određivana uporabom pH-metra WTW 330i i pH elektrode SenTix41. pH elektroda je tijekom pokusa bila uronjena u bioreaktor te je očitavana vrijednost pH prikazana na zaslonu pH-metra. Svakodnevno, prije mjerenja pH vrijednosti provedeno je umjeravanje elektrode uranjanjem u pufer otopinu s pH 4 i 7 prema uputama proizvođača. Nakon završetka mjerenja elektroda je isprana destiliranom vodom te čuvana u otopini elektrolita, zasićenoj otopini kalijeva klorida.

### **3.3.10. Određivanje koncentracije otopljenog kisika**

Koncentracija otopljenog kisika određivana je pomoću kisikove elektrode DurOx i mjerača otopljenog kisika WTW Oxi3210. Instrument je prije upotrebe umjeren prema uputama proizvođača. Elektroda je tijekom trajanja procesa bila uronjena u bioreaktor te je vrijednost koncentracije otopljenog kisika prikazana na zaslonu uređaja.

### **3.3.11. Veličina i zastupljenost granula**

Veličina i zastupljenost granula određena je pomoću metode analize slike, pri čemu su uzorci za analizu granula uzeti iz bioreaktora po završetku aerobne faze SBR ciklusa.

## **3.4. Mikrobiološke metode**

### **3.4.1. Fluorescenija *in situ* hibridizacija (FISH)**

FISH, molekularna citogenetska tehnika koja se zasniva na hibridizaciji određene genske sekvence i odgovarajućeg niza nukleotida vezanog za fluorescentni marker – probu, provedena je prema Amann (1995). Prema načinu vezivanja fluorescentnog markera FISH može biti (i) izravna – proba je vezana za fluorokrom; i (ii) neizravna – nukleotidi probe najprije se vezuju za biotin ili digoksigenin a potom se vizualizira pomoću antitijela na biotin ili digoksigenin vezanih na fluorokrom.

FISH uzorci promatrani su i dokumentirani na konfokalnom laser skenirajućem mikroskopu (CLSM). Probe korištene u ovoj disertaciji (13 oligonukleotidnih proba

označenih fluorescentnim bojama cianin 3 i cianin 5), sintetizirane su po naruždbi od firme GOREA PLUS (Hrvatska) (Tablica 4).

Tablica 4. Probe korištene za FISH

Naziv probe		Ciljana skupina	Sekvenca (5'-3')	Forma mid %	Literatura
Nso190		AOB	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	55	Viancelli i sur. (2011)
NIT3		NOB	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	
DEN124		DEN	CGACATGGGCGCGTTCCGAT	40	Ginige i sur. (2005)
PAO462	PAOmix	PAOs	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	35	Crocetti i sur. (2000)
PAO651			CCCTCTGCCAAACTCCAG	35	
PAO846			GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	35	
Acc-I-444	DPAOmix	DPAOs	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	35	Flowers i sur. (2009)
Acc-II-444			CCCGTGCAATTTCTTCCCC	35	
GAOQ431	GAOmix	GAOs	TCCCCGCCTAAAGGGCTT	35	Crocetti i sur. (2002)
GAOQ989			TTCCCCGGATGTCAAGGC	35	
EUB338	EUBmix	Sve bakterije	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50	Amann i sur. (1990)
EUB338-II			GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50	Daims i sur. (1999)
EUB338-III			GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50	

U svim pokusima ciljana molekula je bila 16S rRNA i temperatura hibridizacije 46 °C. EUB338, EUB338-II i EUB338-III (EUBmix, označavale su sve bakterije), su skupa korištene, kao i probe PAO462, PAO651 i PAO846 (PAOmix, fosfor akumulirajući organizmi), Acc-I-444 i Acc-II-444 (DPAOmix, denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi), GAOQ431 i GAOQ989 (GAOmix, glikogen akumulirajući organizmi). EUBmix probe su bile označene Cianin 5 bojom na 5' kraju, a sve ostale probe Cianin 3 bojom također na 5' kraju.

FISH metoda provodi se kroz četiri koraka:

- (i) Priprema fiksativa (4% paraformaldehid)

Zagrijati 65 mL destilirane vode na 60 °C. Dodati 4 g paraformaldehida. Dodati 1 kap 2M NaOH i brzo miješati sve dok se otopina skoro ne razbistri (1-2 minute). Ukloniti izvor topline. Dodati 33 mL 3 × PBS (eng. *Phosphate-buffered saline*). Prilagoditi pH na 7,2 s HCl. Filtrirati otopinu kroz 0,2 µm filter. Brzo ohladiti na 4 °C i čuvati u hladnjaku.

- (ii) Fiksacija suspenzije mikrobnih stanica 4% paraformaldehidom

Dodati 3 volumena paraformaldehid fiksativa na 1 volumen uzorka. Čuvati 1-3 sata na 4 °C. Peletirati fiksirane stanice centrifugiranjem na 5 000 g te ukloniti fiksativ. Oprati stanice u 1 × PBS i resuspendirati stanice u 1 × PBS do konačne koncentracije 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> stanica/mL. Dodati 1 volumen ledeno hladnog etanola i promiješati. Fiksirane stanice se zatim mogu staviti na stakalca ili pohraniti na – 20 °C na nekoliko mjeseci.

(iii) Imobilizacija fiksiranih mikrobnih stanica na stakalca

Staviti oko 3 µL fiksirane stanične suspenzije na stakalce u promjeru oko 5 mm. Ostaviti da se osuši na zraku. Dehidrirati stanice umakanjem u 50%, 80% i 98% etanol, po 3 minute svaki. Nakon toga se stakalca mogu neograničeno čuvati suha na sobnoj temperaturi.

(iv) Hibridizacija

List Whatman 3MM papira umočiti u hibridizacijski pufer i staviti ga u tubu od 50 mL, te tubu na nekoliko minuta na hibridizacijskoj temperaturi (46 °C). Za svako mjesto za hibridizaciju izmiješati 8 µL hibridizacijskog pufera i 1 µL fluorescentne probe. Staviti 9 µL mješavine hibridizacijskog pufera i probe na svako mjesto fiksiranih stanica. Brzo postaviti stakalce u prethodno ugrijanu vlažnu tubu i hibridizirati 2 sata na 46 °C. Ukloniti stakalce iz vlažne tube i odmah prekinuti hibridizaciju tako što se ispiru probe sa stakala sa hibridizacijskim puferom prethodno ugrijanog na temperaturu hibridizacije. Zatim staviti stakalce u tubu koja je napunjena sa 50 mL hibridizacijskog pufera i inkubirati 20 minuta na hibridizacijskoj temperaturi. Ukloniti soli kratkim umakanjem stakalca u destiliranu vodu, otresti višak vode i osušiti na zraku. Staviti 1 kapljicu „mountanta“ na preparat i preko pokrovnicu. Ostaviti 24 sata u mraku pri sobnoj temperaturi na suhoj ravnoj površini.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Uklanjanje dušika iz otpadne vode – izazovi u primjeni aerobnog granuliranog mulja

Tehnologija aerobnog granuliranog mulja (AGS, engl. *Aerobic Granular Sludge*) ima veliku pozornost zbog: izvrsne taloživosti, velike količine biomase, visoke učinkovitosti pročišćavanja otpadnih voda, i manje zahtijevane površine te je postupno postala tradicionalna tehnologija aktivnog mulja u pročišćavanju otpadnih voda (Hamza i sur., 2021; Hou i sur., 2021; De Bruin i sur., 2004).

Međutim, spora granulacija, dugo razdoblje pokretanja i nedovoljna dugoročna stabilnost granula i dalje su usko grlo AGS tehnologije i glavni nedostaci koji ometaju potpunu komercijalizaciju AGS tehnologije (Hamza i sur., 2021; Hou i sur., 2021; Lin i sur., 2020; Nancharaiyah i Reddy, 2018).

Aerobni granulirani mulj (AGS, engl. *Aerobic Granulated Sludge*) samoagregacijom mikroorganizama pri određenim uvjetima formira zrnate strukture – granule, koje u usporedbi s aktivnim flokuliranim muljem (CAS, engl. *Conventional Activated Sludge*) imaju brojne prednosti, poput: bolja zastupljenost mikroorganizama, dobra taloživost, bolja otpornost na udarna opterećenja. U stvaranju slojevitog biofilma pomaže postojanje pora i pukotina unutar granula što omogućuje veće volumetrijsko opterećenje, povećano zadržavanje biomase, poboljšanu specifičnu brzinu uklanjanja, povećanu stabilnost procesa i istovremenu nitrifikaciju i denitrifikaciju (Hamza i sur., 2021; Hou i sur., 2021; De Briun i sur., 2004).

Istraživanja AGS usmjerena su ka poboljšanju učinkovitosti uklanjanja N i P i otpornosti na udarna opterećenja kao i mikrobne bioraznolikosti granula, a pri tome veliki izazov je spora brzina granulacije i dezintegracija granula, odnosno izazov je kako održati strukturnu i funkcionalnu stabilnost u primjeni, kako izbjeći dezintegraciju granula a time i smanjenu učinkovitost uklanjanja C, N i P (Hamza i sur., 2021; Hou i sur., 2021; Lin i sur., 2020).

Temeljem dosadašnjih spoznaja iz recentne relevantne literature u disertaciji je postavljen cilj:

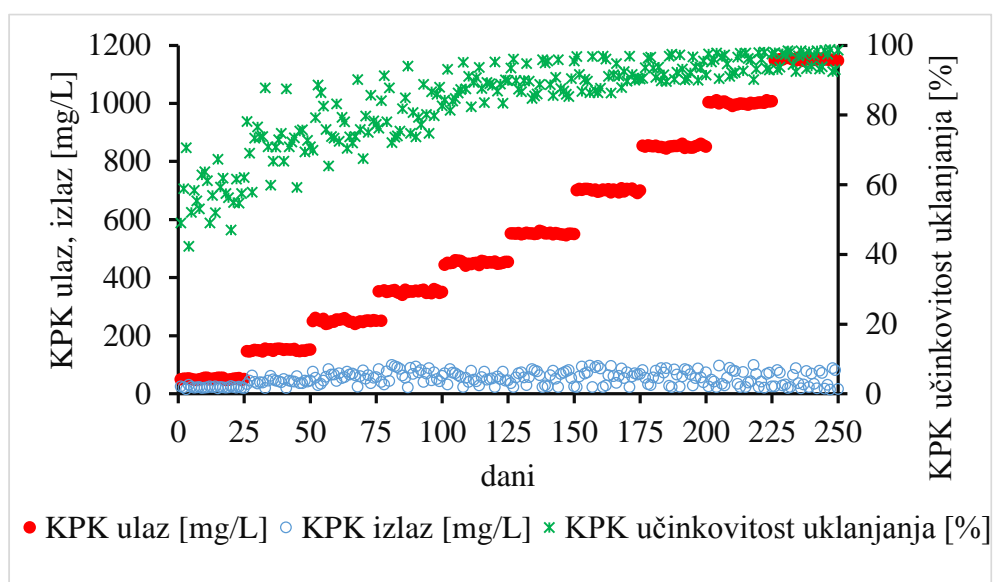
- istražiti stabilnost aerobnog granuliranog mulja i uklanjanja dušika u ovisnosti o nekoliko čimbenika, provođenjem pokusa u kojima će se istražiti/odrediti:



- ✓ učinkovitost uklanjanja N, C i P pri različitom omjeru KPK/N i dugotrajnom vođenju procesa obrade u režimu aerobne obrade uz kratko vrijeme anoksičnog punjenja
- ✓ učinak koncentracije otopljenog kisika na učinkovitost uklanjanja N i veličinu i zastupljenost granula
- ✓ učinak slanosti na aktivnost granuliranog mulja
- ✓ učinkovitost uklanjanja C, N i P pri anoksično/aerobnom režimu vođenja procesa, u dvije konfiguracije procesa i to: (i) pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi procesa, i (ii) pri  $DO < 1$  mg DO/L u aerobnoj fazi procesa
- ✓ učinak dužeg vremenskog perioda pohranjivanja aerobnog granuliranog mulja na +4 °C na stabilnost granula i aktivnost u uklanjanju dušika iz otpadne vode

#### 4.2. Učinak omjera KPK/N na učinkovitost uklanjanja N

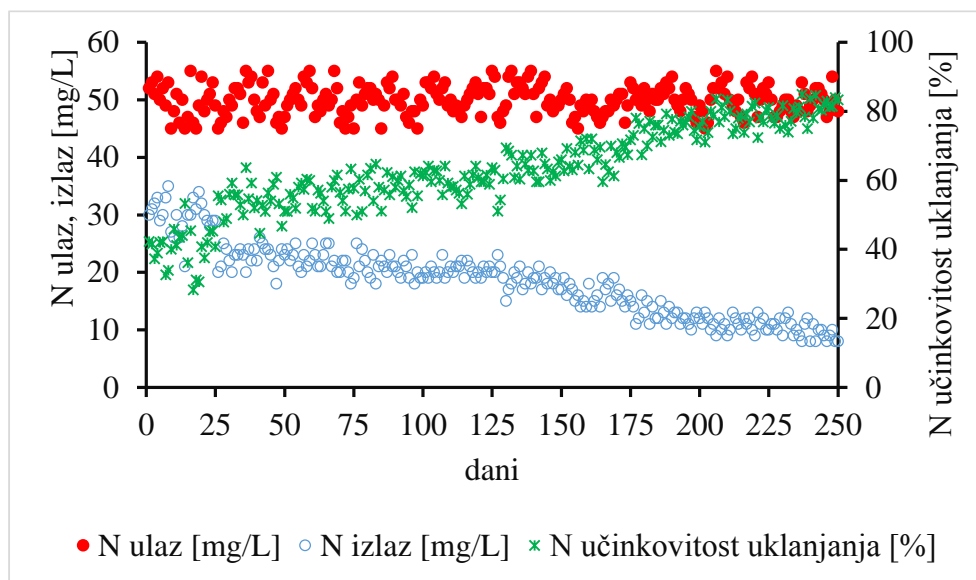
Učinak omjera KPK/N na učinkovitost uklanjanja i organskih (KPK) i anorganskih sastojaka (N i P) istražen je pri omjeru KPK/N 1-23 (Slike 10-12) u režimu anoksično/aerobnog procesa uz anoksični period punjenja od 5 min. U pokusima su korištene zrele aerobne granule koncentracije 3,5 g MLSS/L, a istraženi su omjeri KPK/N 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20 i 23. Početna koncentracija N je iznosila  $50 \pm 5$  mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  a početna koncentracija P je iznosila  $25 \pm 5$  mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ . Sav N na početku pokusa je bio u obliku  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Kao izvor ugljika korišten je natrijev acetat. Pokusi su vođeni pri koncentraciji otopljenog kisika 2 mg/L. Vrijednost pH je održavana u rasponu 7-8. Pokusi su vođeni 25 dana za svaki odabrani omjer KPK/N.



Slika 10. Promjena koncentracije KPK u ulazu, izlazu i učinkovitost uklanjanja KPK pri omjerima KPK/N 1-23.

S povećanjem omjera KPK/N rasla je prosječna učinkovitost uklanjanja KPK od 57% pri omjeru KPK/N 1 do 96% pri omjeru KPK/N 23. Najveći porast prosječne učinkovitosti uklanjanja KPK zabilježen je pri omjeru KPK/N 3 i iznosio je 72%. Daljnjim povećanjem omjera KPK/N prosječna učinkovitost uklanjanja KPK je rasla polagano, te je pri omjeru KPK/N 11 prosječna učinkovitost uklanjanja KPK iznosila 90%, odnosno pri omjeru KPK/N 23 porasla za još 6% te iznosila 96% (Slika 10).

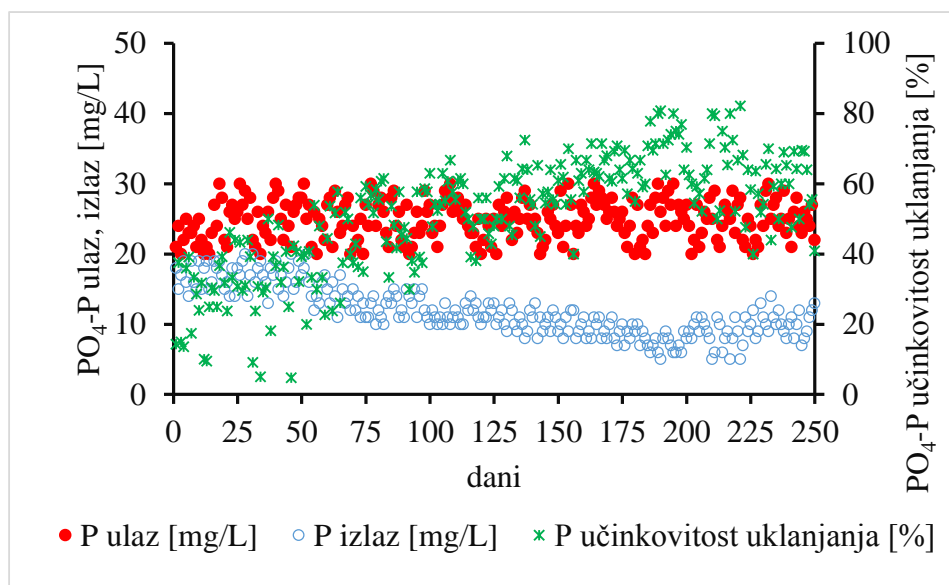
S porastom omjera KPK/N povećavala se i učinkovitost uklanjanja N od 40% do 80%, za odabrane omjere KPK/N 1, odnosno KPK/N 23 (Slika 11).



Slika 11. Promjene koncentracije N u ulazu, izlazu i učinkovitost uklanjanja N pri omjerima KPK/N 1-23.

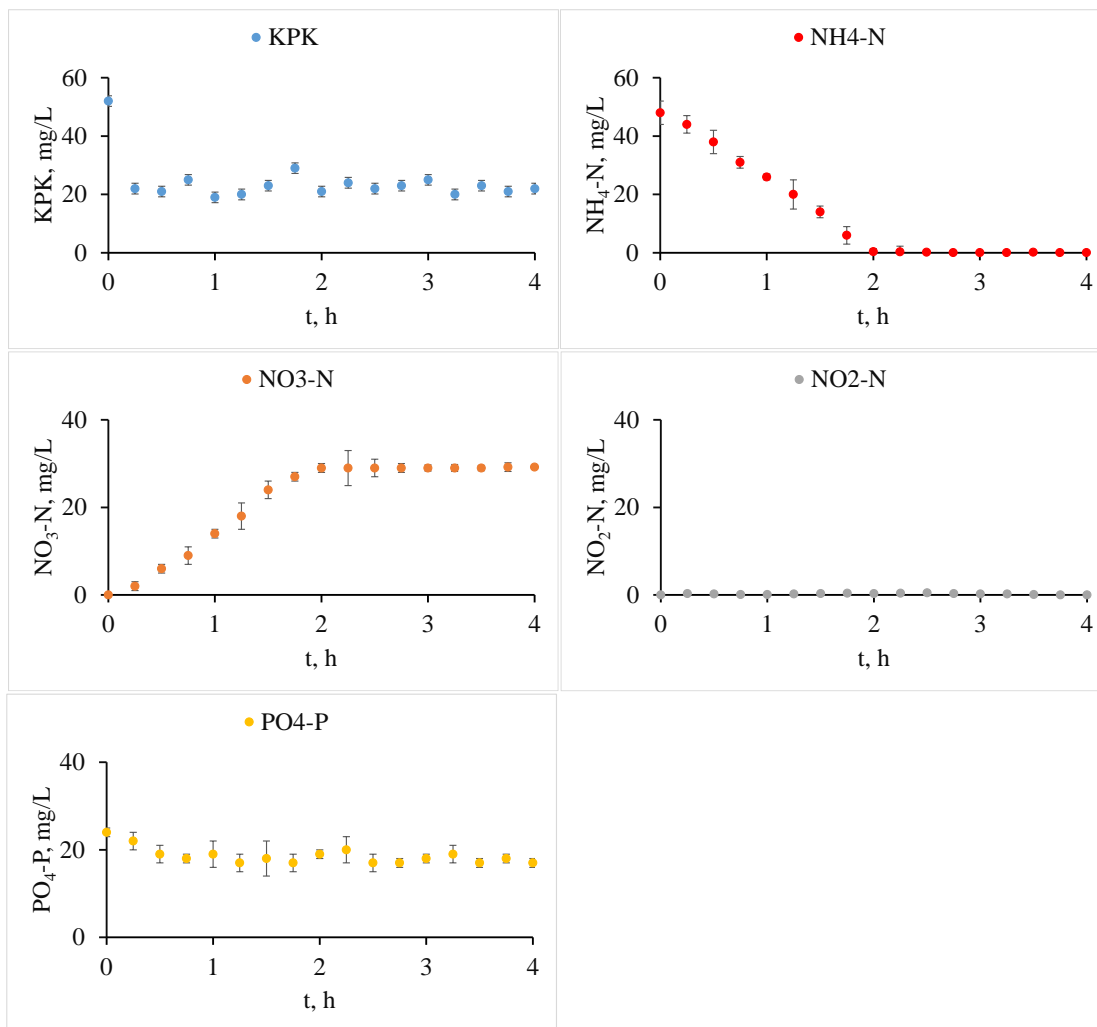
Najveće povećanje prosječne učinkovitosti uklanjanja N ostvareno je pri omjeru KPK/N 3 kada je postignuto uklanjanje N 54%, što čini povećanje od 14% u odnosu na omjer KPK/N 1 (postignuto uklanjanje N 40%). Daljnjim povećanjem omjera KPK/N prosječna učinkovitost uklanjanja N je rasla ujednačenim tempom (Slika 11).

Također, s povećanjem omjera KPK/N do vrijednosti omjera KPK/N 17 zabilježen je trend povećanja učinkovitosti uklanjanja P te je pri omjeru KPK/N 17 određena najveća učinkovitost uklanjanja P od 69,3%, a daljnjim povećanjem omjera KPK/N učinkovitost uklanjanja P se smanjivala (Slika 12).

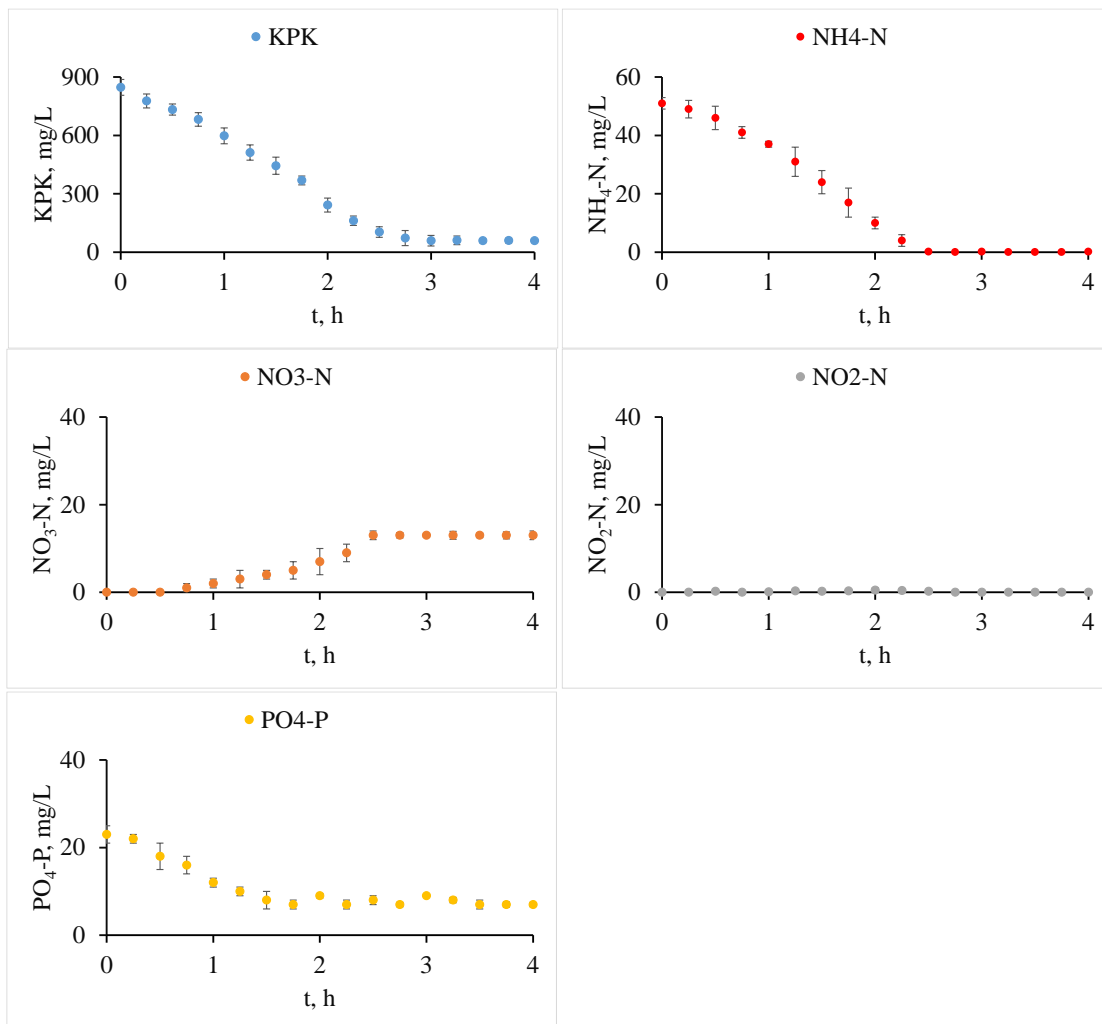


Slika 12. Promjene koncentracije  $\text{PO}_4\text{-P}$  u ulazu, izlazu i učinkovitost uklanjanja  $\text{PO}_4\text{-P}$  pri omjerima KPK/N 1-23.

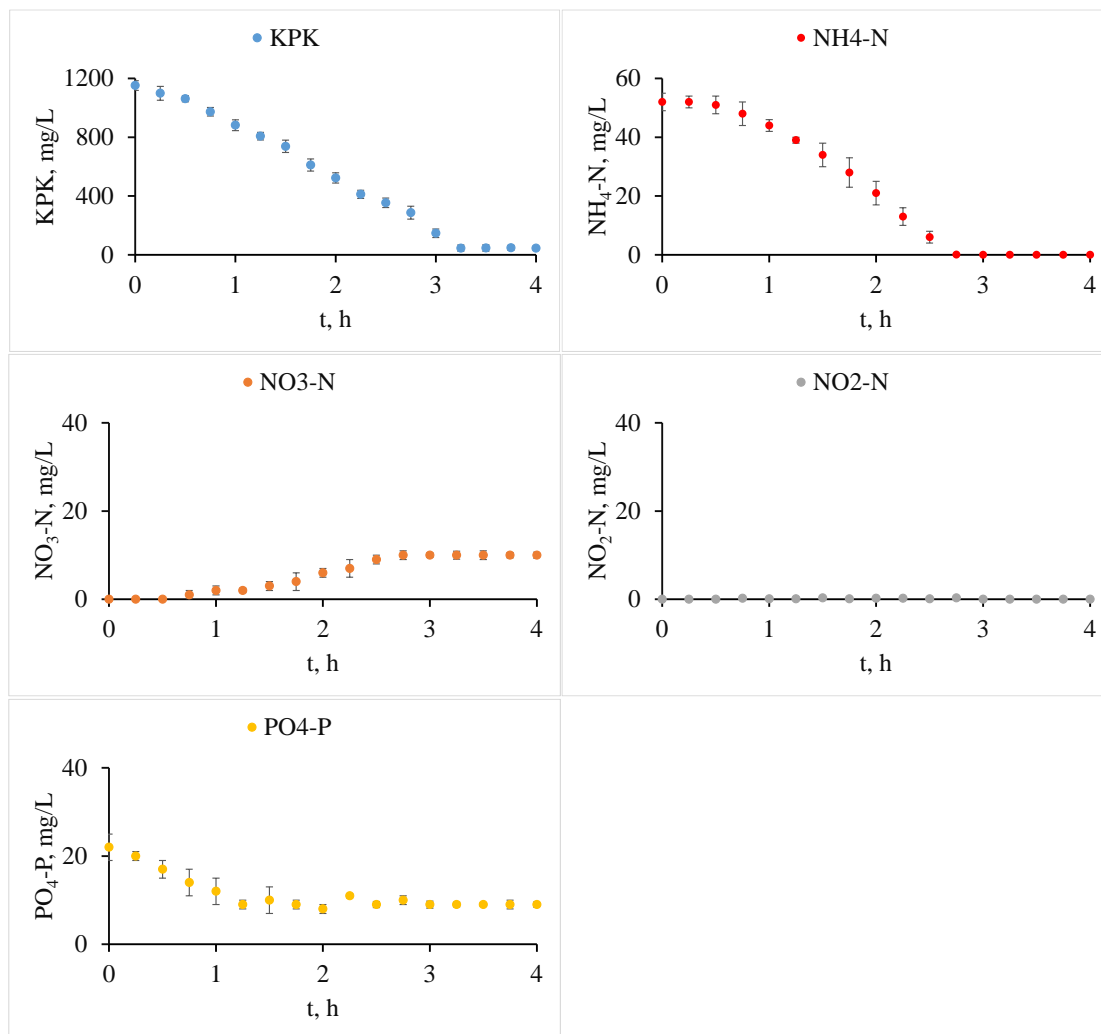
Metaboličke aktivnosti unutar reaktora izražene kroz učinkovitost uklanjanja C, N i P provjerene su provedbom šaržnih pokusa koji reflektiraju mikrobne aktivnosti u ciljanim pokusima, pa je u pokusima pri režimu anoksično/aerobni proces i pri tome se odvija 5 min anoksično punjenje, za odabrane omjere KPK/N 1, KPK/N 17 i KPK/N 23 prikazana kinetika procesa (Slike 13-15), a biomasa odnosno miješana tekućina je izuzeta iz reaktora na kraju pokusa za svaki odabrani omjer KPK/N. Postignuti rezultati provedbe tih ciljanih šaržnih pokusa prikazani su slikama 13-15. Šaržnim testovima određuje se stehiometrija i kinetičke brzine u procesima biološke konverzije i koristan su alat za motrenje i kontrolu procesa uklanjanja dušika koje ovisi o ravnoteži između aktivnosti različitih mikrobnih skupina (van Loosdrecht i sur., 2016).



Slika 13. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P u šaržnom pokusu pri KPK/N 1, u anoksično/aerobnom procesu, pri čemu je 5 min anoksično punjenje



Slika 14. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P u šaržnom pokusu pri KPK/N 17, u anoksično/aerobnom procesu, pri čemu je 5 min anoksično punjenje

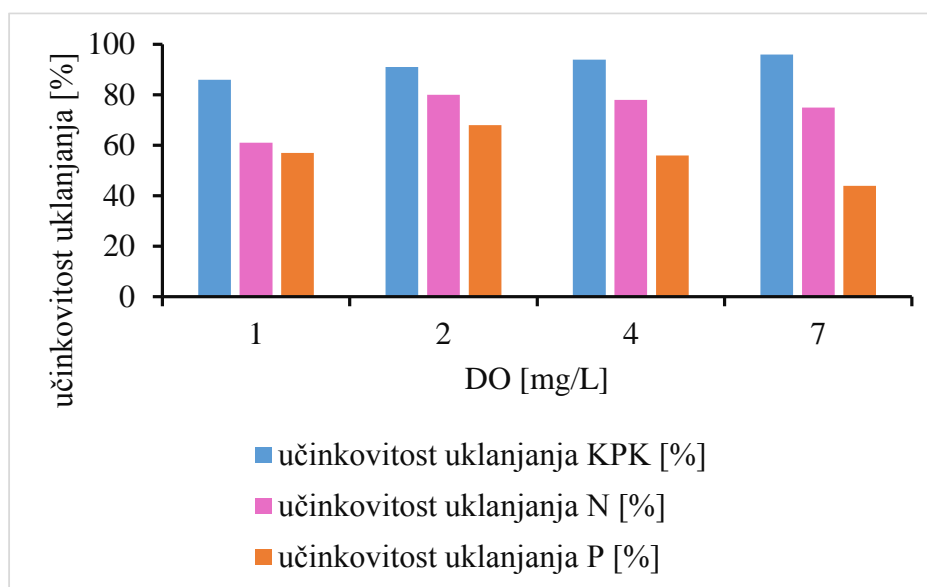


Slika 15. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P u šaržnom pokusu pri KPK/N 23, u anoksično/aerobnom procesu, pri čemu je 5 min anoksično punjenje

### 4.3. Učinak koncentracije otopljenog kisika na učinkovitost uklanjanja N

Učinak protoka zraka na zrele granule, na njihovu stabilnost i učinkovitost uklanjanja KPK, N i P istražena je pri koncentraciji otopljenog kisika: 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L i 7 mg/L, koja je postignuta protokom zraka 0,4 L/min, 0,8 L/min, 1,7 L/min i 2,9 L/min (Slika 16).

Pokusi su provedeni pri odabranom omjeru KPK/N 17 pri kojem je postignuto najveće uklanjanje P, i pri omjeru N/P 2 na način da je nakon 25 dana pokusa određena učinkovitost uklanjanja KPK, N i P, kao i veličina i zastupljenost granula pri istraživanim protocima zraka, pri čemu je na početku pokusa bilo 340 mg KPK/L, 20 mg NH<sub>4</sub>-N/L i 10 mg PO<sub>4</sub>-P/L.



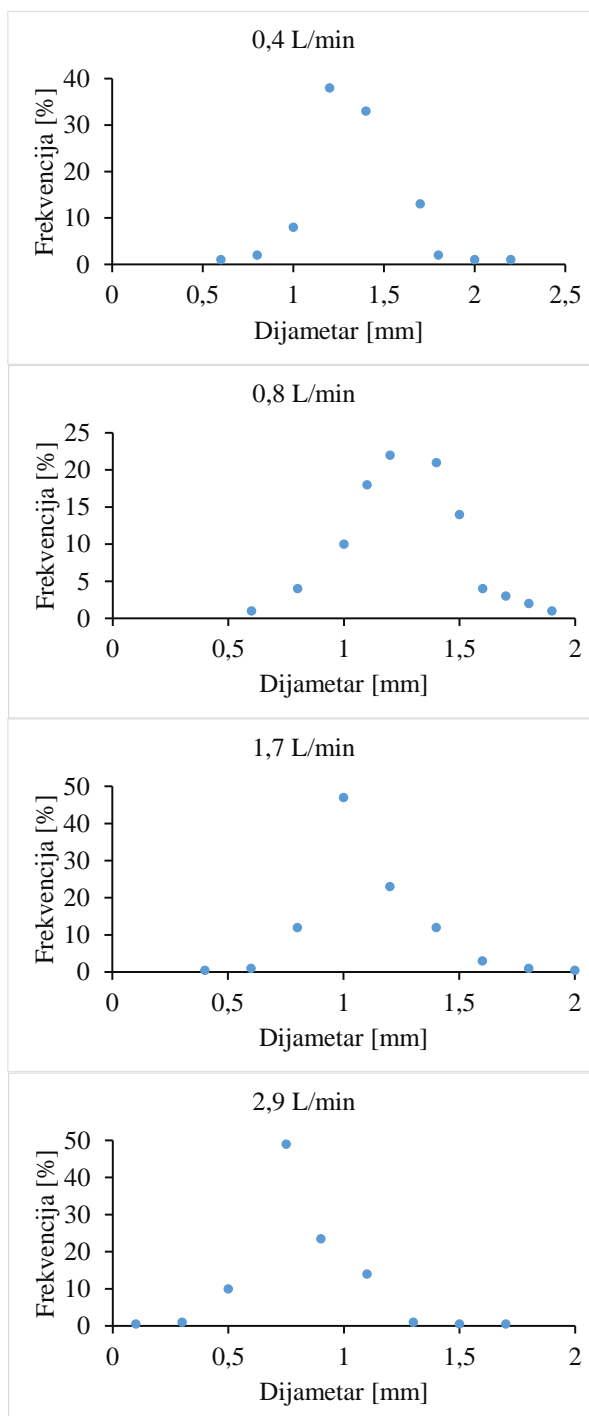
Slika 16. Učinak koncentracije otopljenog kisika na učinkovitost uklanjanja organskih i anorganskih sastojaka (KPK, N i P)

S porastom protoka zraka postiže se veća koncentracija otopljenog kisika, raste učinkovitost uklanjanja KPK, međutim, učinkovitost uklanjanja N i P raste s povećanjem koncentracije otopljenog kisika do 2 mg/L dok se daljnjim povećanjem koncentracije otopljenog kisika učinkovitost uklanjanja N i P snižava (Slika 16).



#### 4.4. Veličina i zastupljenost granula pri različitim protocima zraka

Svrha pokusa bila je istražiti učinak protoka zraka na veličinu granula. Istraženi su protoci zraka 0,4 L/min, 0,8 L/min, 1,7 L/min i 2,9 L/min, a rezultati su prikazani na slici 17.

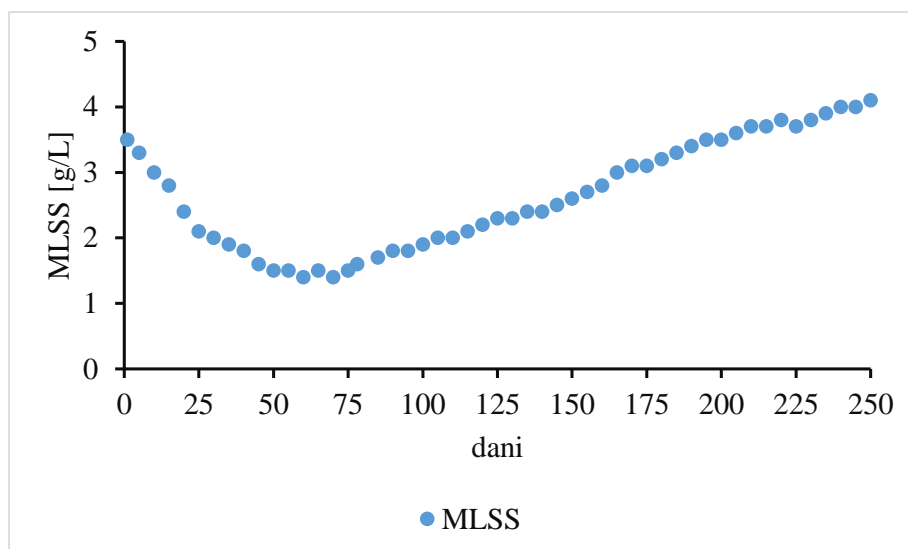


Slika 17. Veličina i zastupljenost granula pri protoku zraka 0,4 L/min, 0,8 L/min, 1,7 L/min i 2,9 L/min

Rezultati (Slika 17) pokazuju trend smanjenja promjera granule s povećanjem protoka zraka. Pri najnižem protoku zraka, 0,4 L/min, 71% granula je bilo u rasponu 1,2-1,4 mm. Povećanjem protoka zraka na 0,8 L/min, 43% granula je bilo u rasponu 1,2-1,4 mm, 18% granula je bilo promjera 1,1 mm i 14% granula je imalo promjer 1,5 mm. Daljnjim povećanjem protoka zraka, krivulja ovisnosti udjela i promjera granula je poprimila šiljastiji oblik. Tako je pri protoku zraka 1,7 L/min 47% granula bilo promjera 1 mm, a 23% granula 1,2 mm. Protok zraka 2,9 L/min je rezultirao s 49% udjelom granula promjera 0,75 mm i 23,5% granula promjera 0,9 mm.

#### 4.5. Promjena koncentracije MLSS u ovisnosti o omjeru KPK/N

Dinamika promjene koncentracije MLSS tijekom promjene omjera KPK/N tijekom 250 dana prikazana je na slici 18.



Slika 18. Promjena koncentracije MLSS tijekom 250 dana u ovisnosti o porastu omjera KPK/N

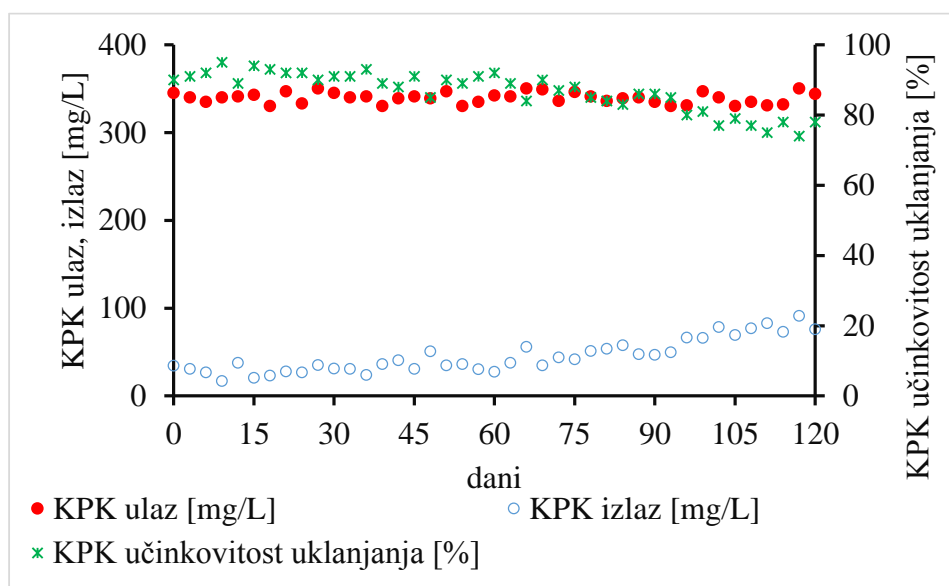
Pokusi su započeti sa zrelim granulama koncentracije 3,5 g MLSS/L. Omjeri KPK/N 1 i 3 nisu bili povoljni za održavanje aerobnih granula, te je tijekom tog perioda zabilježen pad koncentracije MLSS. Tijekom omjera KPK/N 5 je zabilježena stagnacija koncentracije MLSS, a od omjera KPK/N 7 do 23 koncentracija MLSS je rasla. Nakon 250 dana vođenja pokusa koncentracija biomase u bioreaktoru je iznosila 4,1 g MLSS/L, odnosno sveukupno je koncentracija biomase porasla za 0,6 g/L (Slika 18).

Omjer KPK/N 1 nije bio povoljan za formu granula, granule su bile vrlo male, i raspadale su se, što je i razlog gubitka biomase pri ovom omjeru, što je i pridonijelo niskoj učinkovitosti uklanjanja nutrijenata. O raspadanju granula i ispiranju biomase iz sustava pisali su i drugi autori Kim i sur. (2021), Kim i Ahn (2019), Kocaturk i Erguder (2016), Luo i sur. (2014). Pri omjeru KPK/N 17 granule su bile okrugle i čvrste, jasnih rubova. Omjer KPK/N 23 je rezultirao velikim, paperjastim i labavim granulama, što je dovelo do narušavanja uklanjanja P. Omjer KPK/N  $\geq 20$  pridonosi većim granulama, koje su paperjaste, i proliferaciji filamentoznih organizama (Kocaturk i Erguder, 2016).

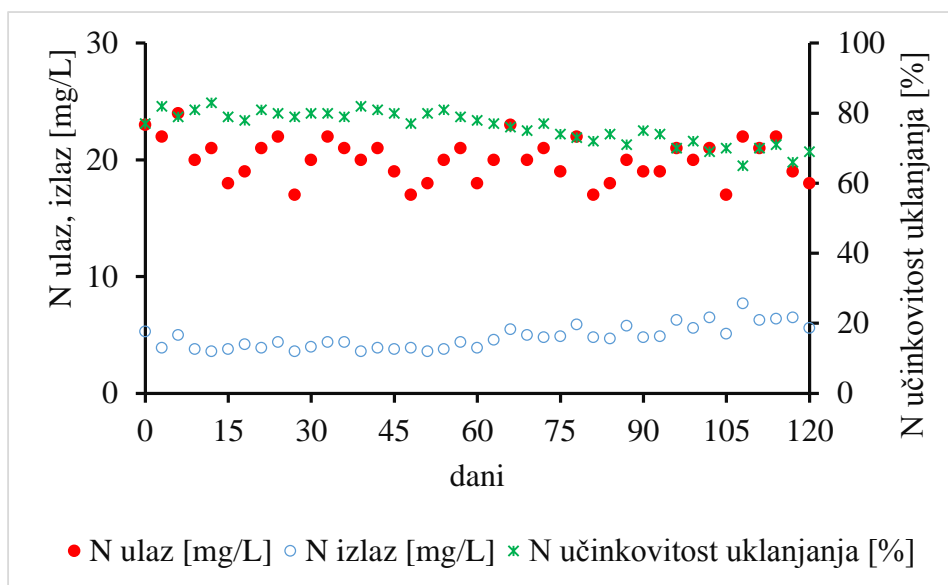
#### 4.6. Učinak slanosti na stabilnost i aktivnost aerobnih granula

Stabilnost aerobnih granula istražena je u uvjetima povišene slanosti, 0-4%, odnosno do 40 g NaCl/L. Ova serija pokusa je provedena pri 340 mg KPK/L, 20 mg NH<sub>4</sub>-N/L i 10 mg PO<sub>4</sub>-P/L, odnosno omjeru KPK/N 17 i N/P 2.

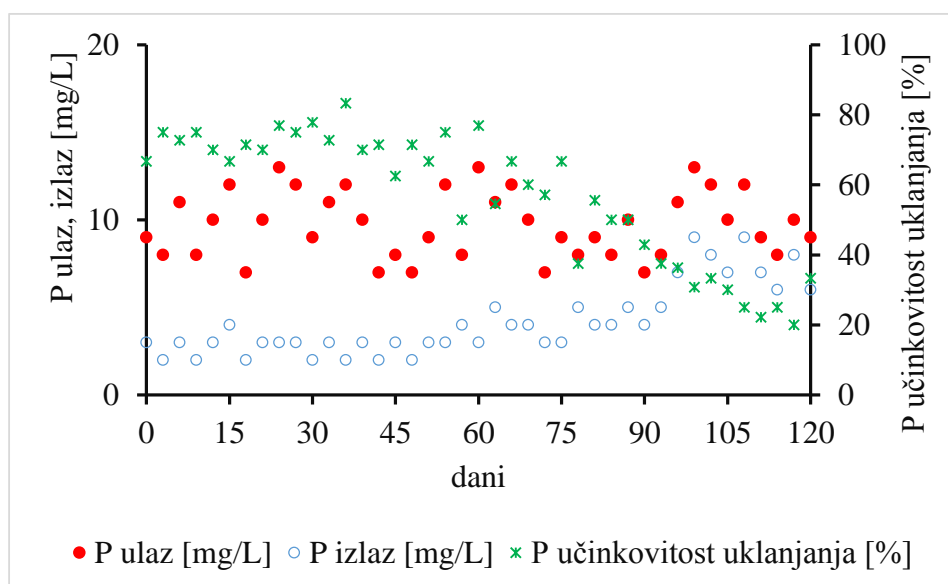
Učinak povećanja saliniteta na zrele granule i njihovu učinkovitost uklanjanja KPK, N i P je istražena pri koncentraciji otopljenog kisika 2 mg/L, koja je postignuta protokom zraka 0,8 L/min, pri čemu je 43% granula bilo u rasponu 1,2-1,4 mm, 18% granula je bilo promjera 1,1 mm i 14% granula je imalo promjer 1,5 mm. Pokusi su provedeni na način da su zrele granule postepeno podvrgavane rastućoj koncentraciji soli, i to 5 g NaCl/L, 10 g NaCl/L, 15 g NaCl/L, 20 g NaCl/L, 25 g NaCl/L, 30 g NaCl/L, 35 g NaCl/L i 40 g NaCl/L. Granule su aklimatizirane na svaku odabranu koncentraciju soli tijekom 15 dana. Rezultati istraživanja učinka slanosti na učinkovitost uklanjanja KPK, N i P su prikazani na slikama 19-21.



Slika 19. Dinamika uklanjanja KPK u ovisnosti o porastu saliniteta do 40 g NaCl/L



Slika 20. Dinamika uklanjanja N u ovisnosti o porastu saliniteta do 40 g NaCl/L

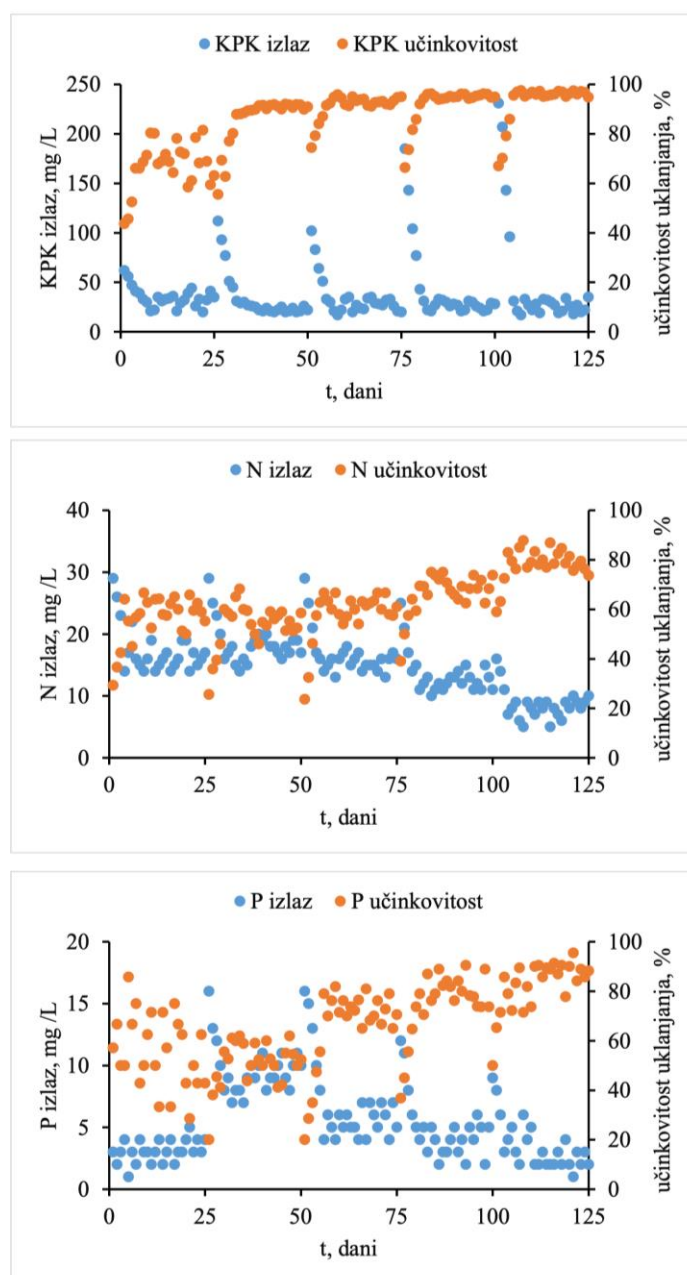


Slika 21. Dinamika uklanjanja P u ovisnosti o porastu saliniteta do 40 g NaCl/L

S povećanjem saliniteta od 5 g NaCl/L, 10 g NaCl/L, 15 g NaCl/L, 20 g NaCl/L, 25 g NaCl/L, 30 g NaCl/L, 35 g NaCl/L i 40 g NaCl/L, postiguto je prosječno uklanjanje KPK (Slika 19) 91,8%, 91,6%, 90,4%, 89,4%, 87,6%, 84,8%, 80,4% i 76,4%, prosječno uklanjanje N 80,2%, 79,6%, 80,4%, 79%, 75,8%, 73%, 71% i 68,2% (Slika 20), i prosječno uklanjanje P 71,01%, 74,23%, 72,00%, 68,00%, 61,00%, 47,18%, 33,59% i 25,11% (Slika 21).

#### 4.7. Uklanjanje N u anoksično/aerobnom režimu rada, pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi procesa

U anoksično/aerobnom režimu vođenja procesa, pri DO 2 mg/L u aerobnoj fazi procesa, provedeni su pokusi u kojima je istražena kinetika uklanjanja C, N i P, pri omjerima C/N 1, 3, 5, 7 i 9. Zrele granule su tijekom 25 dana za svaki odabrani omjer C/N podvrgnute režimu rada SBR-a: punjenje 5 min, anoksična faza 110 min, aeracija 110 min, taloženje 10 min i ispuštanje 5 min, a učinkovitost procesa prikazana je slikom 22).

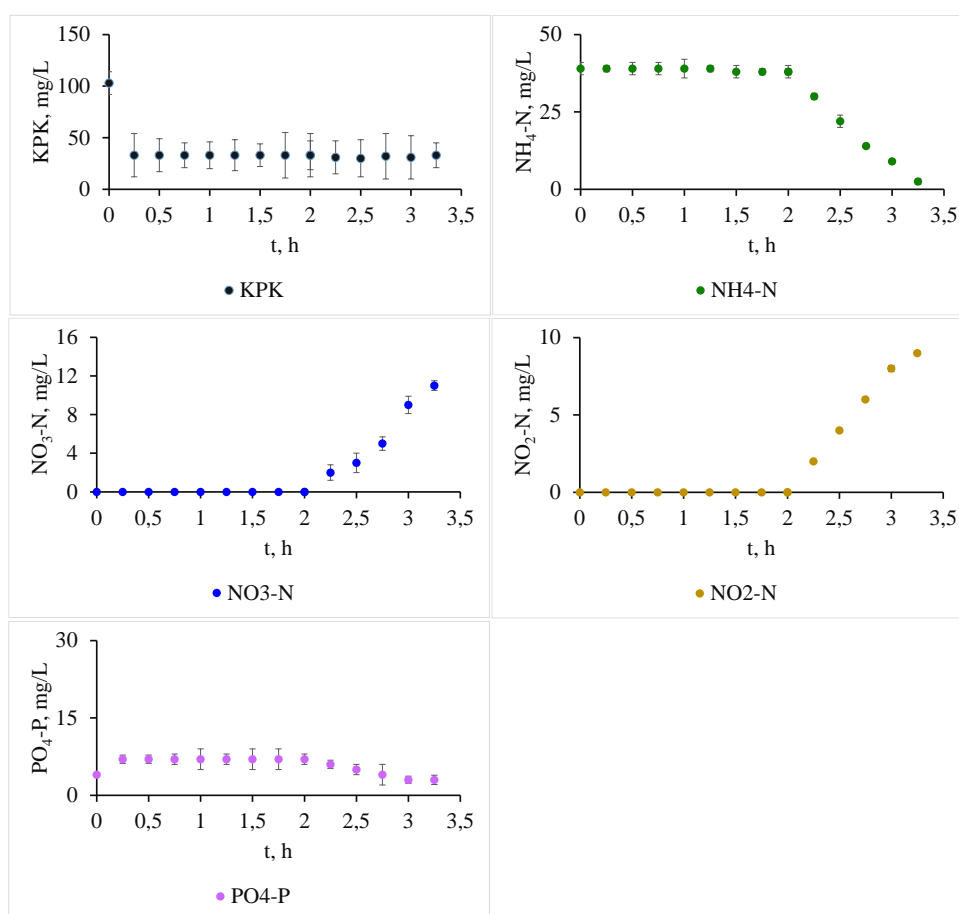


Slika 22. Izlazne vrijednosti i učinkovitost uklanjanja KPK, N i P tijekom anoksično/aerobnog procesa pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi procesa

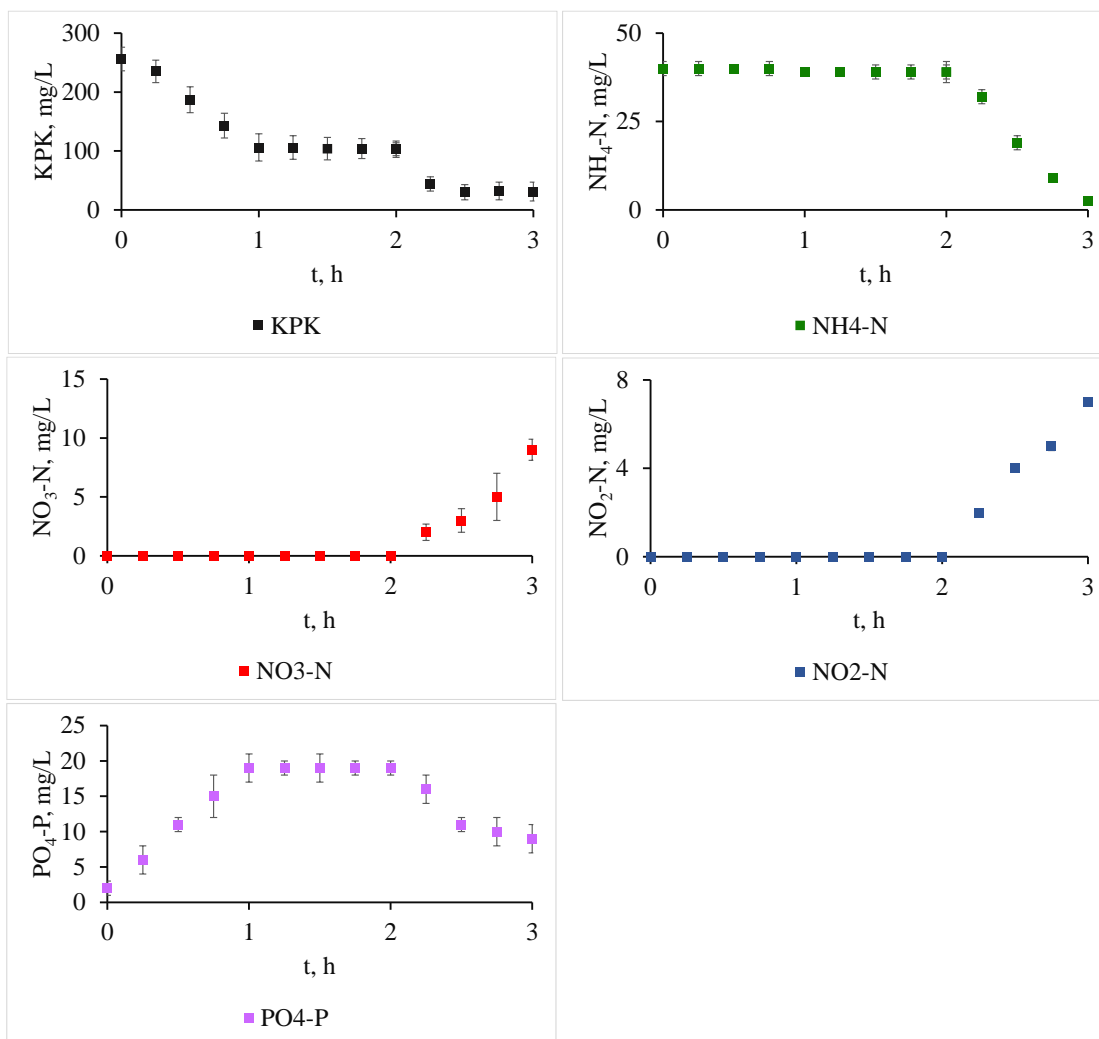
Za ciljane pokuse određivanja kinetike uklanjanja N, C i P granule su uzete na kraju aerobne faze procesa 25. dana procesa za svaki period provedbe procesa (Slike 23-27). Anoksična faza procesa provedena je uz početnih 40 mg NH<sub>4</sub>-N/L, 3±1 mg PO<sub>4</sub>-P/L ostvarenih dodavanjem odgovarajuće količine otopine NH<sub>4</sub>Cl i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Kao izvor ugljika dodan je natrijev acetat u odgovarajućoj količini za odabrani omjer C/N. Anoksični uvjeti ostvareni su propuhivanjem plina dušika i miješanjem na magnetskoj miješalici pri 150 o/min. Po završetku anoksične faze isključeno je propuhivanje dušika i uključena je aeracija za osiguravanje koncentracije otopljenog kisika 2 mg DO/L upuhivanjem zraka iz kompresora.

Pokusi su provedeni pri sobnoj temperaturi i početnoj vrijednosti pH 7,2. Tijekom pokusa nije korigirana vrijednost pH.

Rezultati pokusa kinetike su prikazani slikama 23-27, a obuhvaćaju varijacije koncentracije KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P.

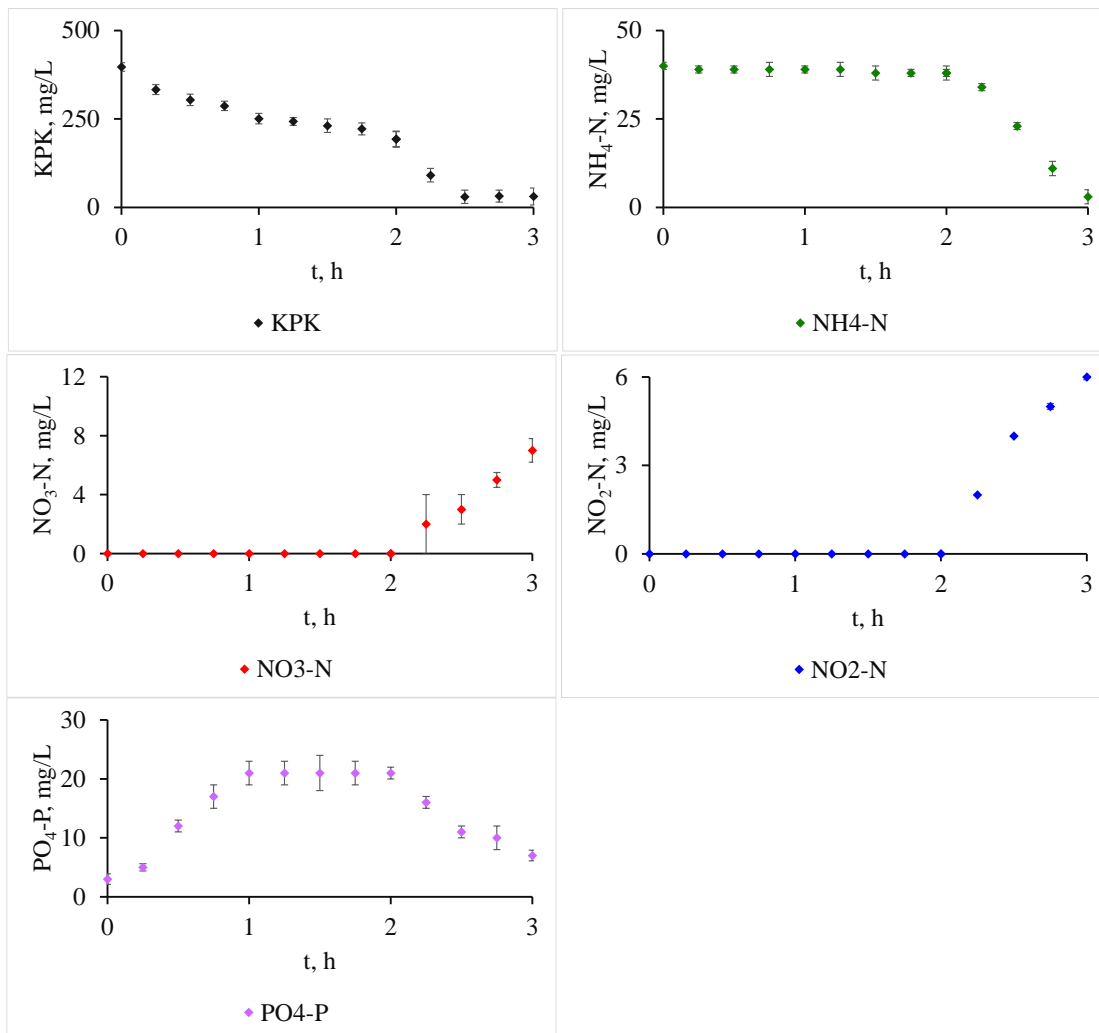


Slika 23. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P pri omjeru C/N 1 u anoksično/aerobnom režimu

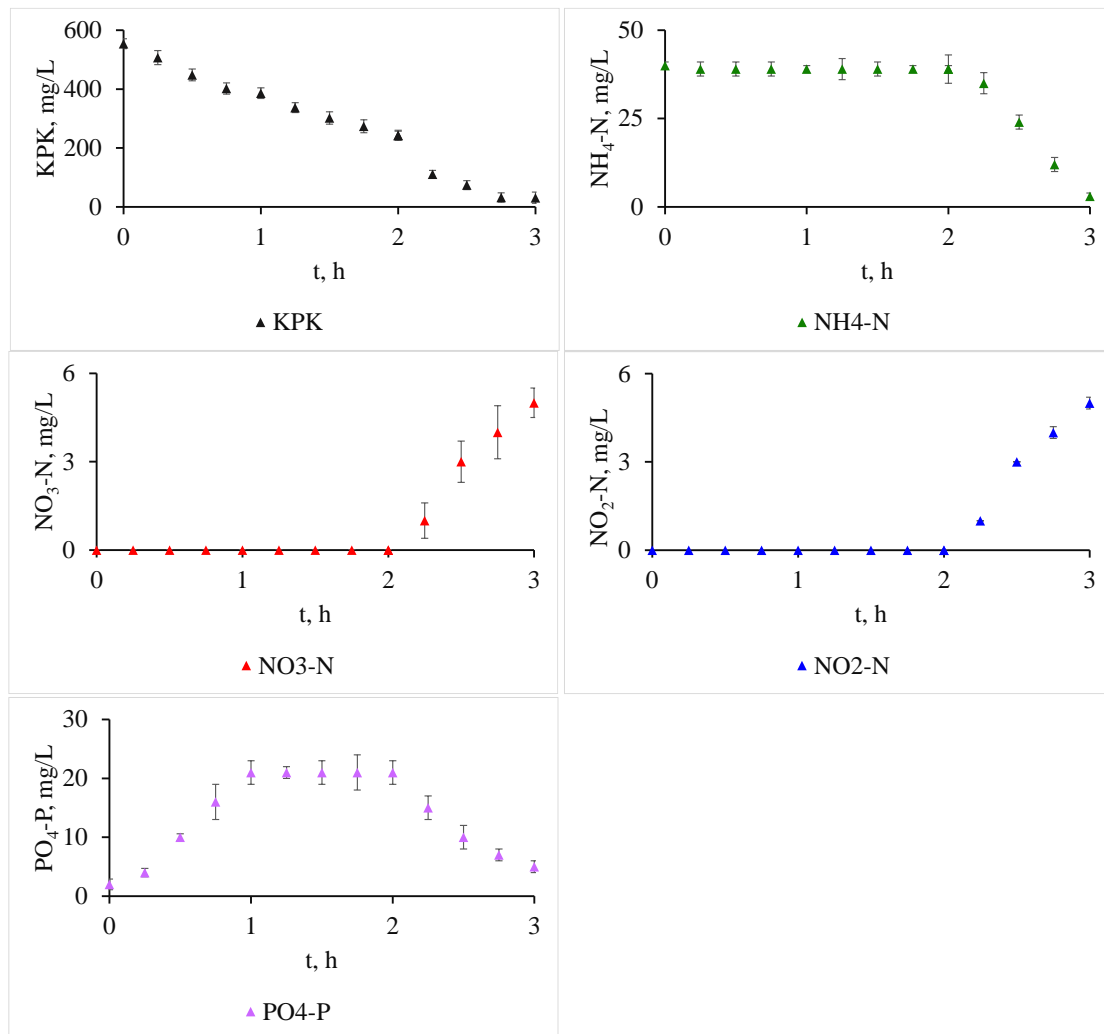


Slika 24. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P pri omjeru C/N 3 u anoksično/aerobnom režimu

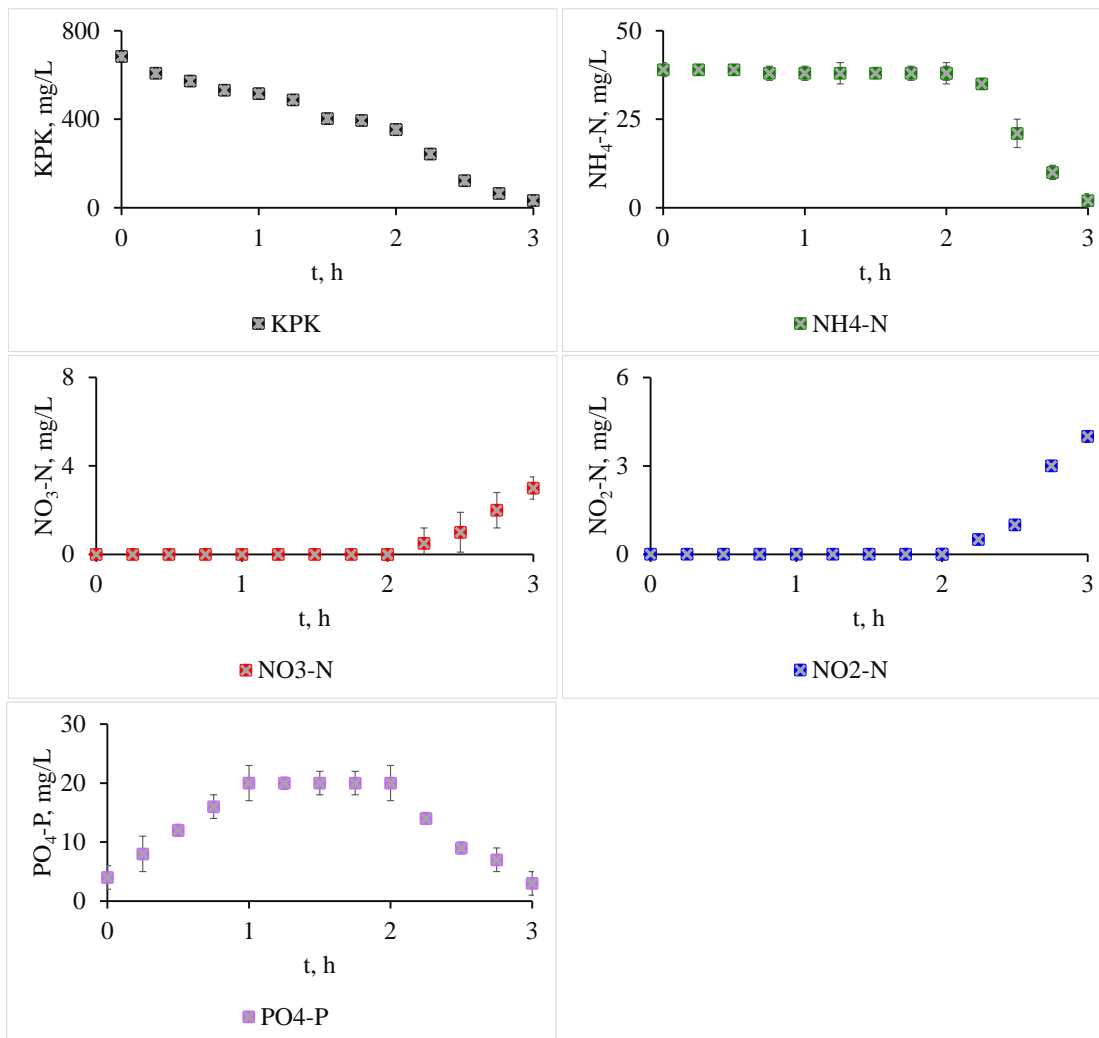




Slika 25. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P pri omjeru C/N 5 u anoksično/aerobnom režimu



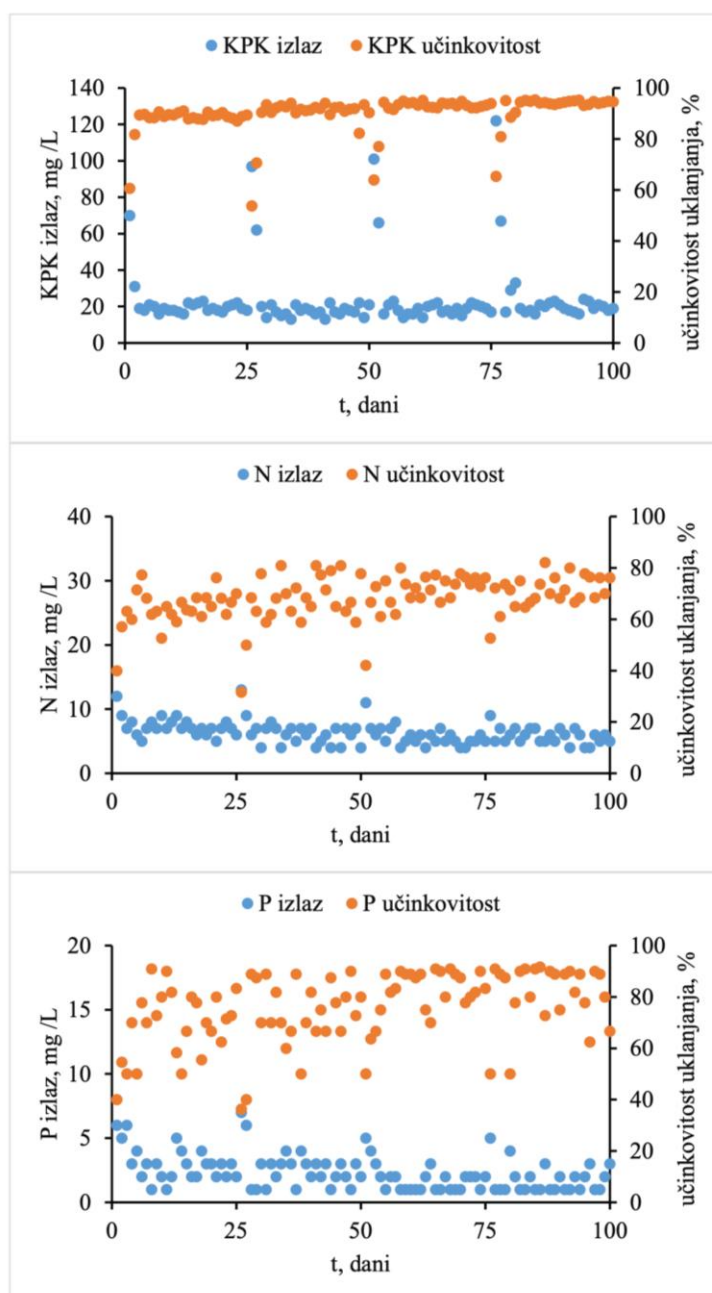
Slika 26. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P pri omjeru C/N 7 u anoksično/aerobnom režimu



Slika 27. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P pri omjeru C/N 9 u anoksično/aerobnom režimu

#### 4.8. Uklanjanje N u anoksično/aerobnom režimu rada pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika

U anoksično/aerobnom režimu vođenja procesa, pri  $DO < 1$  mg/L u aerobnoj fazi procesa, provedeni su pokusi u kojima je istražena kinetika uklanjanja C, N i P, pri omjerima KPK/N 9, 11, 14 i 17. Zrele granule su tijekom 25 dana za svaki odabrani omjer KPK/N podvrgnute režimu rada SBR-a: punjenje 5 min, anoksična faza 110 min, aeracija 110 min, taloženje 10 min i ispuštanje 5 min (Slika 28).



Slika 28. Izlazne vrijednosti i učinkovitost uklanjanja KPK, N i P tijekom anaerobno-aerobnog procesa pri  $DO < 1$  mg/L u aerobnoj fazi procesa

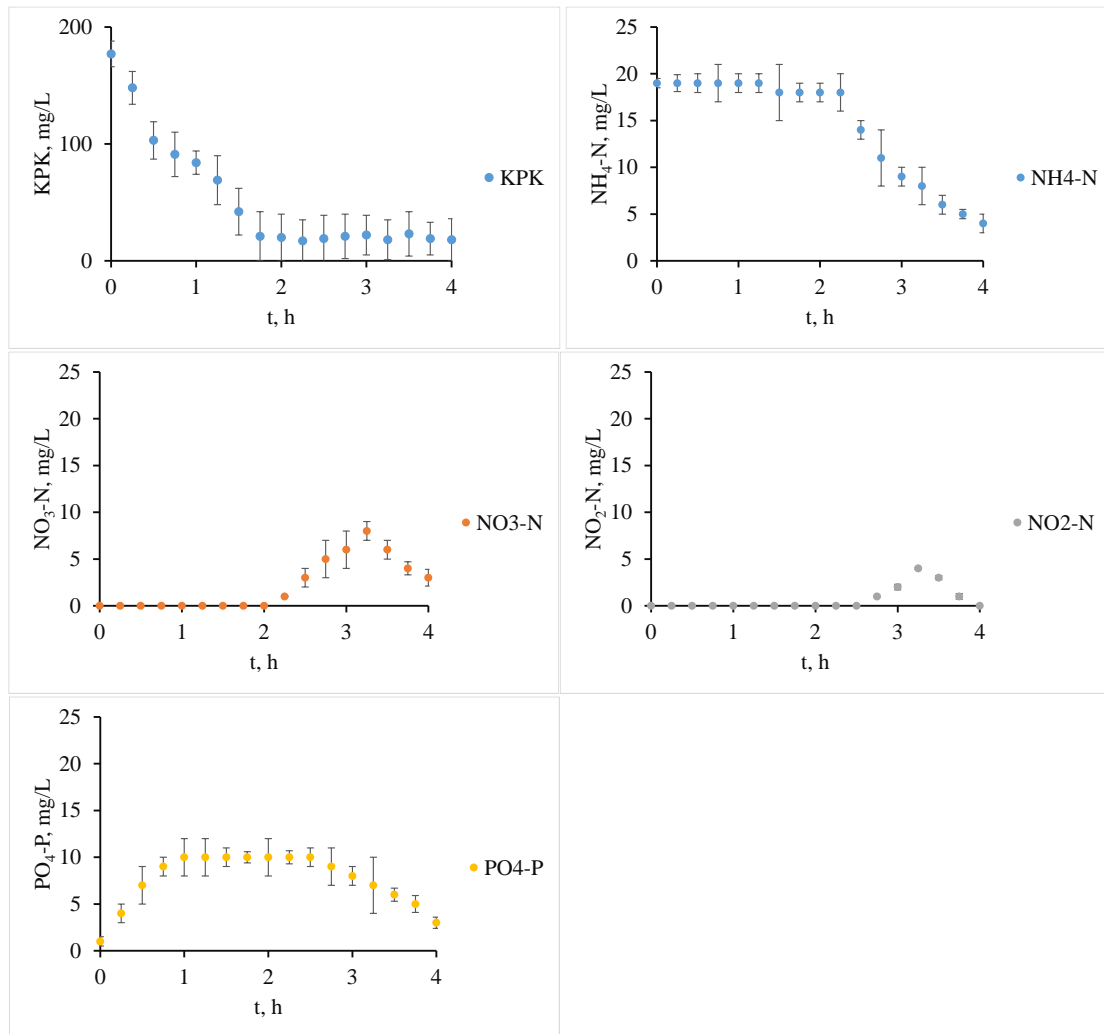
Za ciljane pokuse određivanja kinetike uklanjanja N, C i P granule su uzete na kraju aerobne faze procesa zadnjeg dana provedbe procesa za svaki odabrani omjer KPK/N (Slike 29-32).

Anoksična faza procesa provedena je uz početnih  $20 \pm 3$  mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$ ,  $2 \pm 1$  mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  ostvarenih dodavanjem odgovarajuće količine otopine  $\text{NH}_4\text{Cl}$  i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Kao izvor ugljika dodan je natrijev acetat u odgovarajućoj količini za odabrani omjer KPK/N. Anoksični uvjeti ostvareni su propuhivanjem plina dušika i miješanjem na magnetskoj miješalici pri 150 o/min. Po završetku anoksične faze isključeno je propuhivanje dušika i povremeno uključivana aeracija za osiguravanje koncentracije otopljenog kisika  $< 1$  mg DO/L.

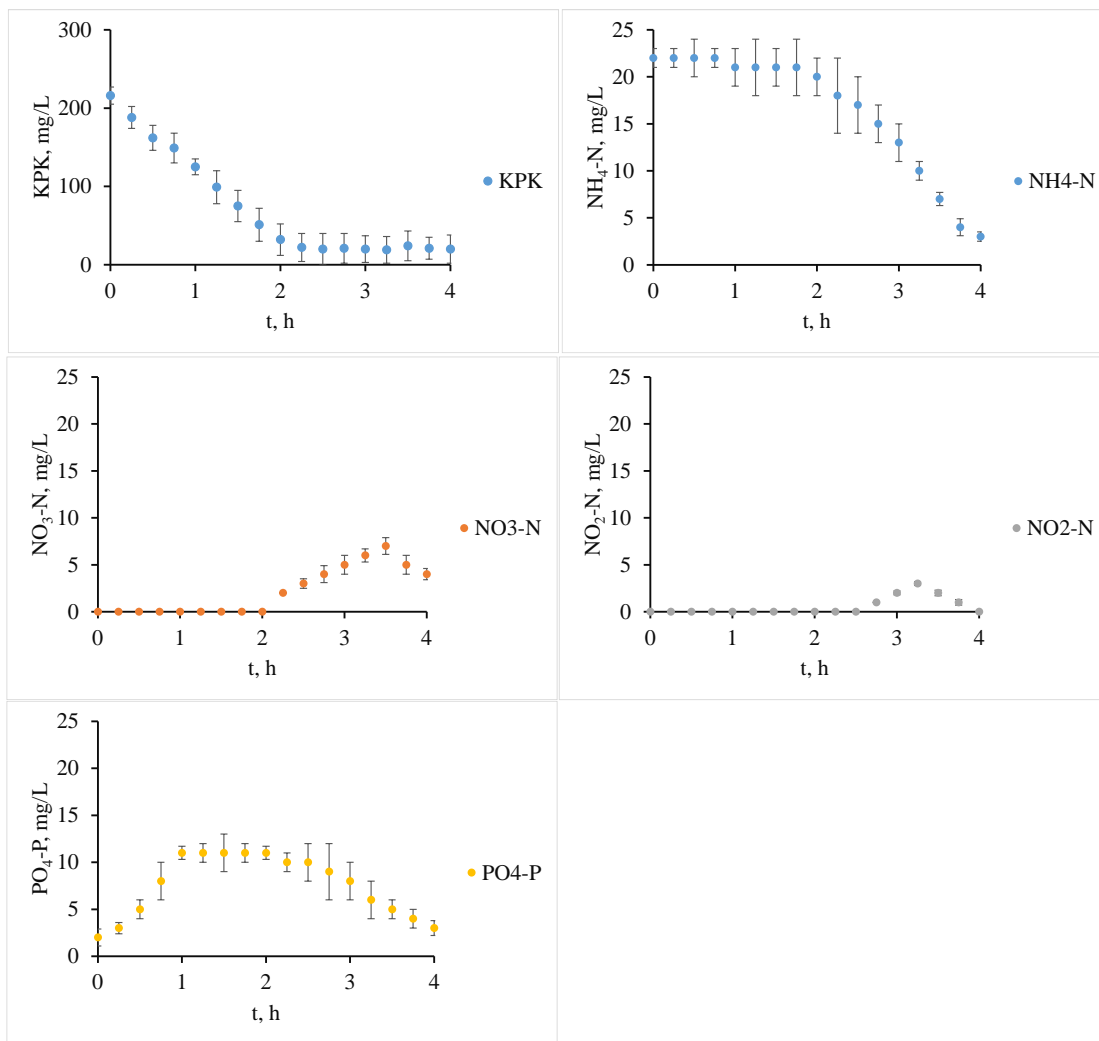
Pokusi su provedeni pri sobnoj temperaturi i početnoj vrijednosti pH 7,2. Tijekom pokusa nije korigirana vrijednost pH.

Pokusi su započeti sa zrelim granulama koncentracije 3,5 g MLSS/L. Tijekom prvih 9 dana učinkovitost uklanjanja nutrijenata je bila niska, a i došlo je do raspadanja granula i gubitka mikrobne biomase. Poznato je da je za održavanje forme aerobnih granula potreban otopljeni kisik (Yuan et al., 2019; Gao i sur., 2013). Također, kako su korištene zrele aerobne granule koje su bile u ustaljenom stanju pri režimu s aerobnom fazom reakcije, bilo je potrebno neko vrijeme prilagodbe mikroorganizama granula na nove uvjete. Do 14. dana je trajala faza stagnacije mikrobne biomase na 1,8 g MLSS/L, a zatim je krenula opet rasti. Tijekom sljedećih 40 dana procesa se koncentracija mikrobne biomase ustalila na 2,9 g MLSS/L, a i granule su se opet formirale. S formiranim granulama i učinkovitost uklanjanja organskih sastojaka i nutrijenata je porasla. Granule su bile velike 0,6 mm. Granule slične veličine, 0,3-0,5 mm, dobili su i Dangcong i sur. (1999) prilikom vođenja bioreaktora pri 0,7-1,0 mg DO/L.

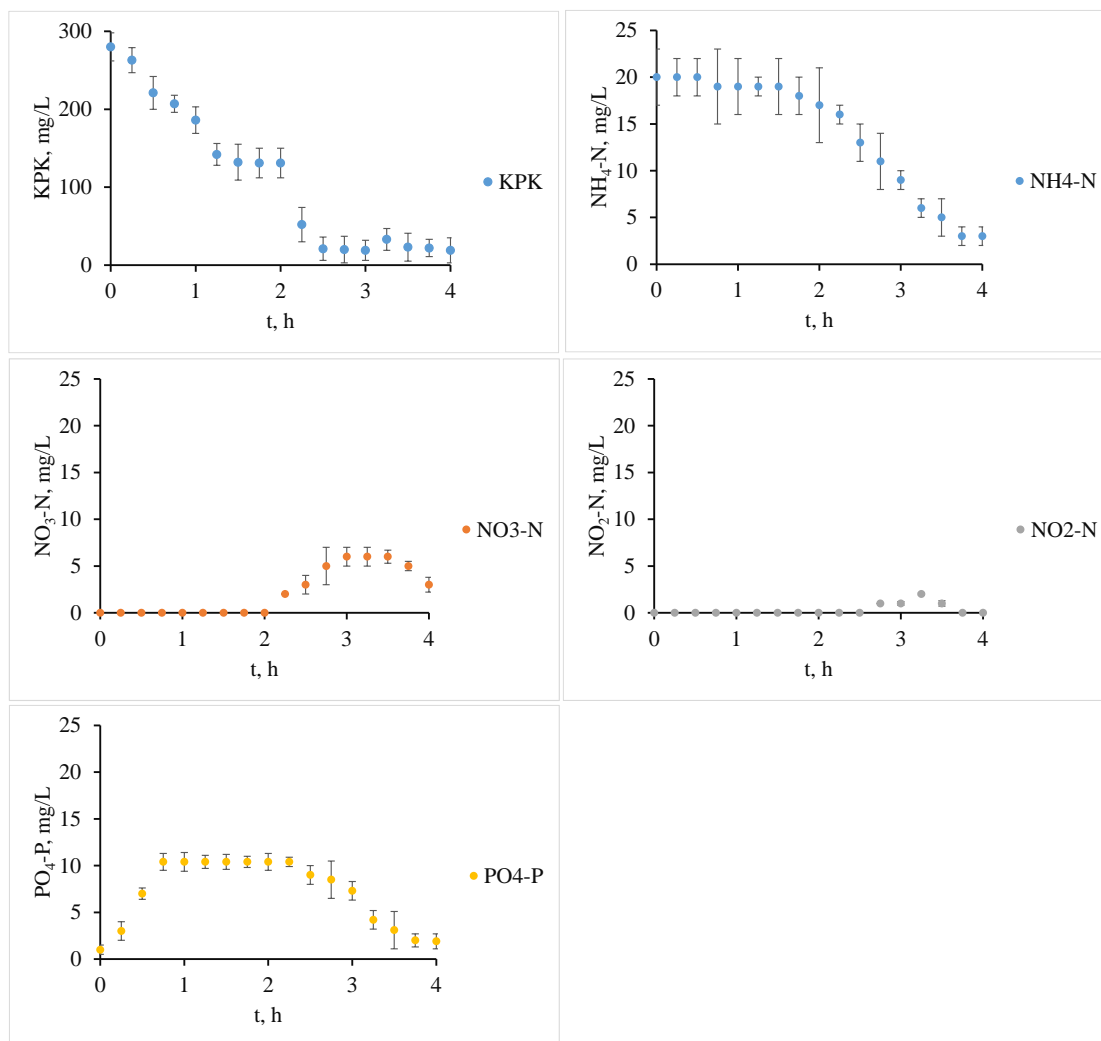
Rezultati pokusa kinetike su prikazani slikama 29-32, a obuhvaćaju varijacije koncentracije KPK,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{PO}_4\text{-P}$ .



Slika 29. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P u anoksično/aerobnom procesu pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika u aerobnoj fazi procesa, pri KPK/N  
9

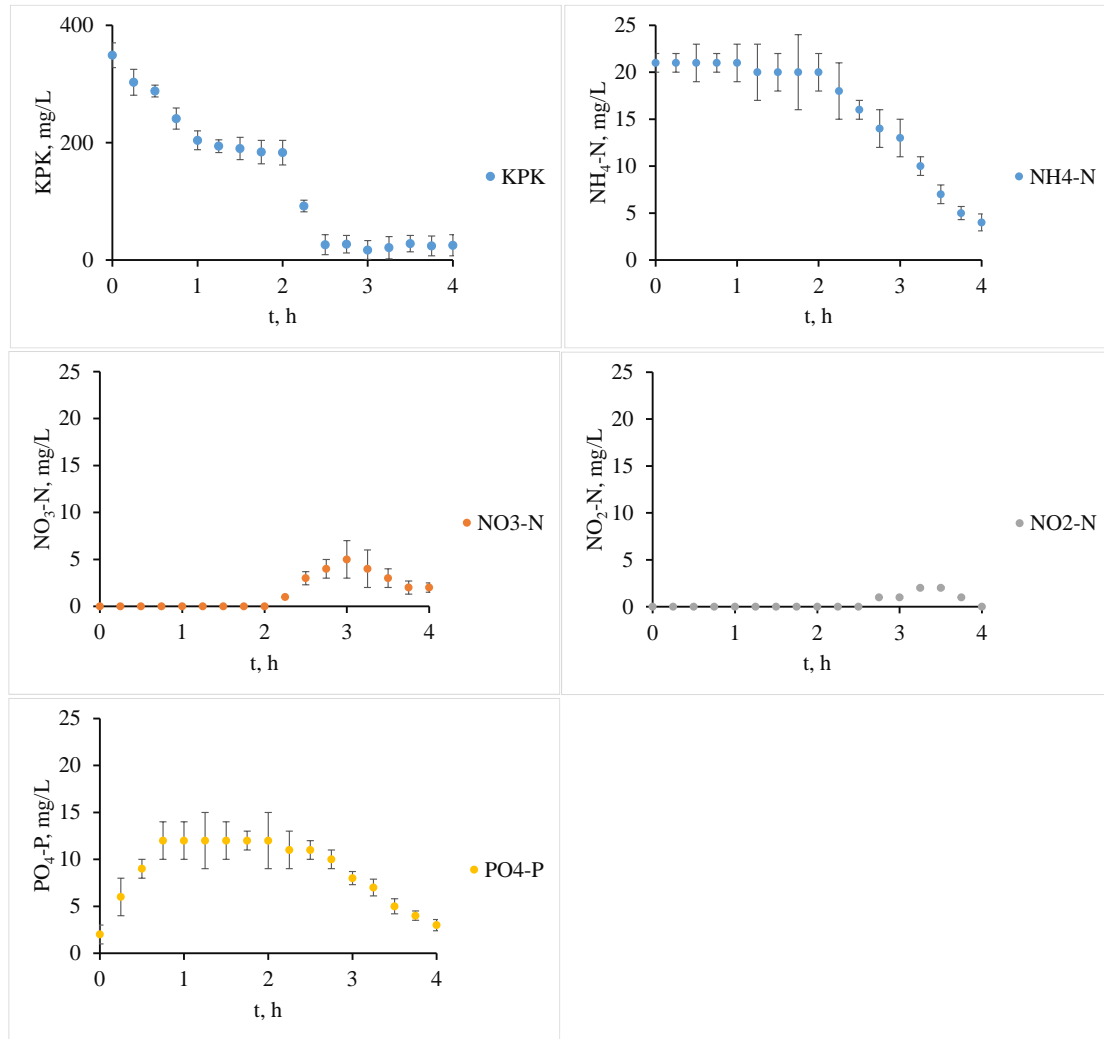


Slika 30. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P u anoksično/aerobnom procesu pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika u aerobnoj fazi procesa, pri KPK/N



Slika 31. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P u anoksično/aerobnom procesu pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika u aerobnoj fazi procesa, pri KPK/N





Slika 32. Promjene KPK, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P u anoksično/aerobnom procesu pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika u aerobnoj fazi procesa, pri KPK/N 17

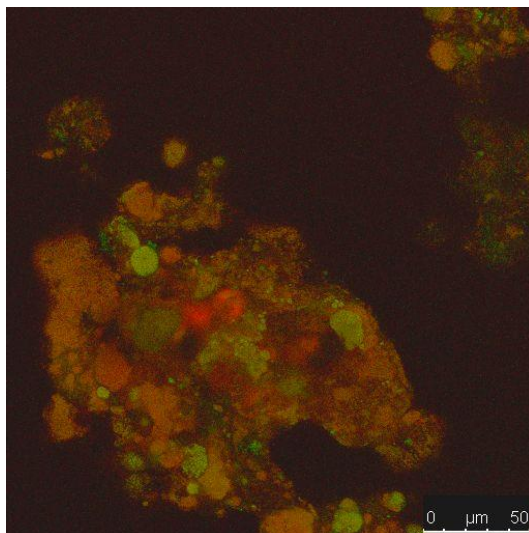
#### 4.9. Učinak pohranjivanja aerobnoga granularanog mulja na +4 °C tijekom dužeg vremenskog perioda

Aerobni granularani mulj je na 12 mjeseci pohranjen pri +4 °C u vodi iz slavine. Nakon 12 mjeseci granule su bile malo manje s lagano izraženim eliptičnim oblikom i nepromijenjene boje. Pohranjene granule su se obnovile i reaktivirale, i nakon 12 dana je zabilježeno 88% njihove aktivnosti uklanjanja ugljika, dušika i fosfora koju su imale prije pohrane. Nakon 16 dana granule su pokazale istu učinkovitost uklanjanja ugljika, dušika i fosfora kao i prije pohrane. Pohranjivanjem granula na +4 °C u vodi iz slavine ne narušavaju se strukturne i funkcionalne aktivnosti.

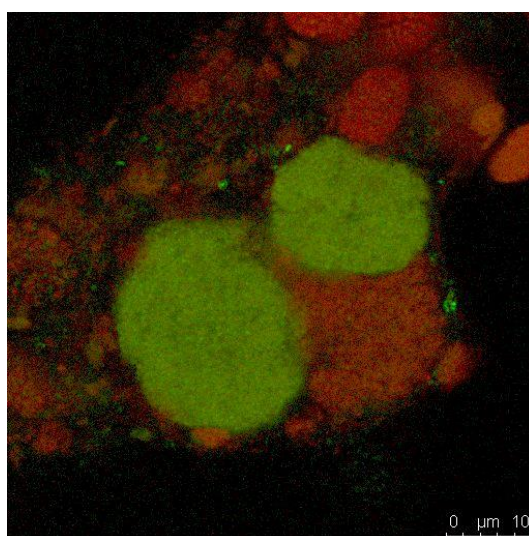
#### 4.10. Mikrobnii agregati – FISH analiza

Za karakterizaciju mikrobne biomase primjenjena je FISH metoda, a ciljanim bojanjem primjenom odgovarajućih proba u uzorcima iz ciljanih procesa su dokumentirani mikrobni klasteri odgovorni za određene mikrobne procese.

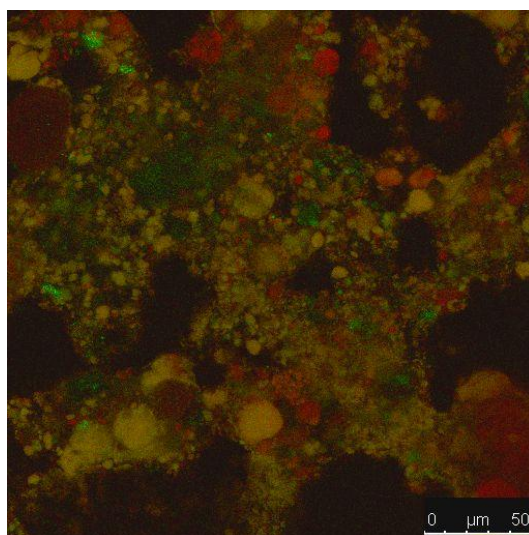
Za detekciju svih bakterija primjenjene su EUBmix probe (Daims i sur., 1999; Amann i sur., 1990), za detekciju AOB (Slika 33) odgovornih za provođenje prvog stupnja nitrifikacije – nitritaciju, oksidaciju  $\text{NH}_4\text{-N}$  do  $\text{NO}_2\text{-N}$ , korištena je proba Nso190 (Viancelli i sur., 2011), za detekciju NOB odgovornih za provođenje drugog stupnja nitrifikacije – nitrataciju, oksidaciju  $\text{NO}_2\text{-N}$  do  $\text{NO}_3\text{-N}$  (Slika 34) primjenjena je proba NIT3 (Viancelli i sur., 2011), za detekciju denitrifikanata (Slika 35) proba DEN124 dizajnirana za acetat-klaster denitrifikanata odgovornih za redukciju  $\text{NO}_3\text{-N}$  i/ili  $\text{NO}_2\text{-N}$  doplinovitog dušika (Ginige i sur., 2005). Također, PAOmix probe korištene su za detekciju *Accumulibacter* odnosno vrsta PAOs odgovornih za unutarsanični unos fosfata više od metaboličkih potreba (Slika 36) (Flowers i sur., 2009), a za detekciju GAOs hibridizacija uzoraka provedena je sa probama GAOmix označenim sa Cy3 (Slika 37).



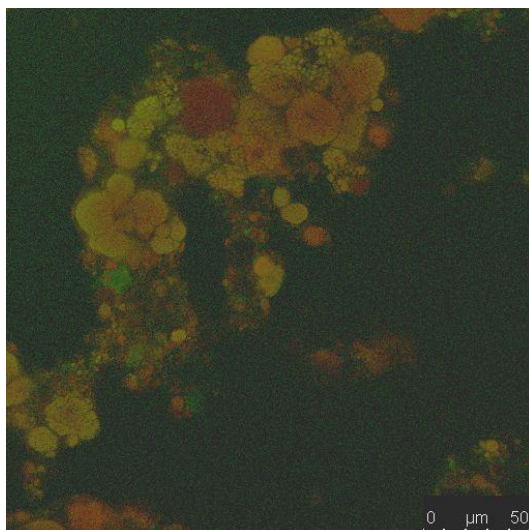
Slika 33. CLSM vrsta AOB označenih probom Nso190 (crveno). Sve bakterije označene su probama EUBmix i obojane zeleno



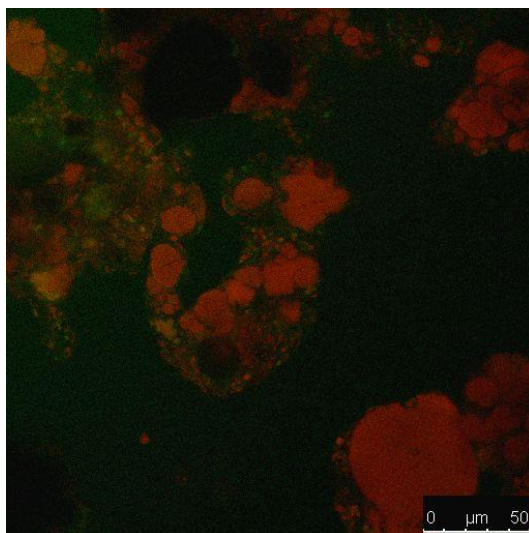
Slika 34. CLSM vrsta NOB obojanih crveno, označenih probom NIT3, a sve bakterije označene su probama EUBmix i obojane zeleno



Slika 35. CLSM denitrifikanata iz procesa anoksično/aerobnog režima dualno hibridiziran sa probom DEN124 označenom Cy3 i EUBmix probama označenim Cy5. Stanice denitrifikanata su crveno obojane, a sve bakterije zeleno



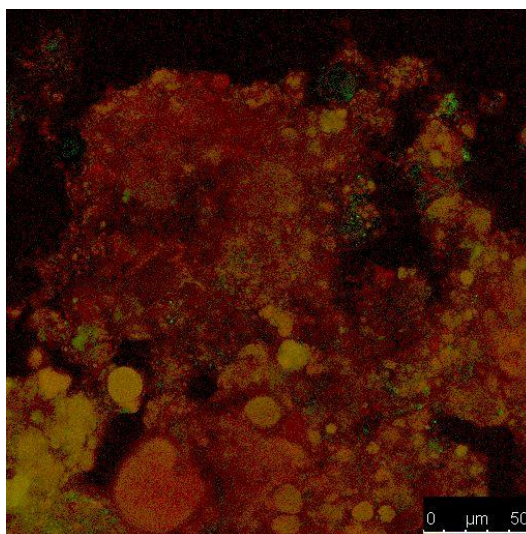
Slika 36. CLSM uzorka iz procesa anoksično/aerobnog režima vođenja, hibridiziranog sa Cy3 označenim PAOmix probama i Cy5 označenim EUBmix probama. PAOs su prikazani crveno, sve bakterije zeleno



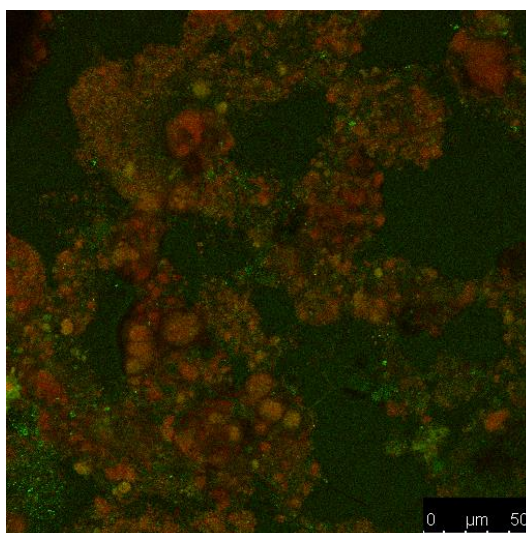
Slika 37. CLSM uzorka iz procesa anoksično/aerobnog režima vođenja, hibridiziranog sa Cy3 označenim GAOmix probama i Cy5 označenim EUBmix probama. GAOs su prikazani crveno, sve bakterije zeleno

U pokusima u konfiguraciji anoksično/aerobno pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika, analizom mikrobne populacije pomoću FISH metode korištene su probe DPAOmix za detekciju *Accumulibacter* grana IA i *Accumulibacter* grana IIA (Flowers i sur., 2009) (Slika 38), GAOmix za detekciju *Competibacter* (Crocetti i sur., 2002)

(Slika 39) a za detekciju svih bakterija probe EUBmix (Daims i sur., 1999; Amann i sur., 1990).



Slika 38. CLSM DPAOs iz procesa pri režimu anoksično/aerobno pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika. DPAOs su obojani crveno, a sve bakterije zeleno. Uzorci su hibridizirani sa DPAOmix probama označenima sa Cy3 za detekciju DPAOs i EUBmix probama za detekciju svih bakterija označenima sa Cy5



Slika 39. CLSM pokazuje GAOs detektirane pomoću FISH u uzorcima iz anoksično/aerobnog procesa pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika. Stanice GAOs su crveno obojane, hibridizirane sa Cy3 označenim GAOmix probama, dok su sve bakterije obojane zeleno, hibridizirane sa Cy5 označenim EUBmix probama

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Učinkovitost uklanjanja N, C i P i stabilnost granula ovisno o omjeru KPK/N

Aerobni granularni mulj koristi se za obradu otpadnih voda grada, ali i industrijskih otpadnih voda različitog podrijetla, koje karakterizira različit sastav, pa tako i različiti omjeri KPK/N. Odgovarajući omjer KPK/N je važan za dugotrajan stabilan rad uređaja za biološku obradu otpadnih voda u smislu učinkovitosti uklanjanja ciljanih spojeva iz otpadne vode, i integriteta granula (He i sur., 2017). Niži omjeri KPK/N karakteriziraju otpadnu vodu grada (Ren i sur., 2017; Corsino i sur., 2017; He i sur., 2019).

Omjer KPK/N jedan je od čimbenika koji utječe na strukturnu stabilnost aerobne granule, razgradnju nutrijenata i rast mikroorganizama (Wu i sur., 2012; Wang i sur., 2018c; Hamza i sur., 2019). Omjer KPK/N utječe na sastav mikrobiološke zajednice prisutne u aerobnim granulama, i određeni KPK/N omjeri više pogoduju proliferaciji nitrifikanata ili aerobnih odnosno anaerobnih heterotrofa, i tako utječe na učinkovitost uklanjanja organskih spojeva i nutrijenata (Wu i sur., 2012; Kocaturk i Erguder, 2016). Kao povoljan omjer KPK/N obzirom na učinkovitost uklanjanja KPK, N i stabilnosti granula se navodi omjer KPK/N 7,5 (Kocaturk i Erguder, 2016). Niži omjeri KPK/N, poput  $\text{KPK/N} \leq 3,3$  odgovaraju nitrifikantima, a viši omjeri KPK/N poput  $\text{KPK/N} 20$  odgovaraju heterotrofima (Wu i sur., 2012; Kocaturk i Erguder, 2016; Kim i sur., 2021). Nizak omjer KPK/N se povezuje s raspadanjem granula tijekom dugotrajnog rada bioreaktora, poput omjera  $\text{KPK/N} 1$  (Luo i sur., 2014),  $\text{KPK/N} 2,5$  (Kim i Ahn, 2019),  $\text{KPK/N} 5$  (Kim i sur., 2021; Kocaturk i Erguder, 2016). Kocaturk i Erguder (2016) sugeriraju da se fragmentacija granula događa zbog nedostatka organskih sastojaka (nizak omjer  $\text{KPK/N}$ ) što dovodi do smanjenog gradijenta koncentracije između vanjskog i unutrašnjeg dijela granule i difuznog transporta KPK do unutrašnjosti granule u kojoj se nalaze denitrifikanti. Razgradnja denitrifikanata nakon perioda gladovanja uzrokuje fragmentaciju tako što se formiraju praznine u strukturi granule. Kako su denitrifikanti iz unutrašnjosti granule uklonjeni, dolazi do smanjenja veličine granule i formiranja manjih i gušćih granula. Smanjenje veličine granula se događa i zbog smanjenja količine aerobnih heterotrofa, zbog manje količine dostupnih organskih spojeva a što se zbiva pri nižem  $\text{KPK/N}$  omjeru (Kocaturk i Erguder, 2016).

U istraživanju učinka raspoložive količine organskih sastojaka na uklanjanje organskih sastojaka, dušika i fosfora provedeni su ciljani pokusi sa AGS uz povećanje omjera  $\text{KPK/N} 1-23$  (Slike 10-12), u anoksično/ aerobnom režimu rada SBR-a, pri pH 7-8. Tim

pokusima želi se pokazati učinak povećanja omjera KPK/N na metaboličku aktivnost vrsta u granuliranom mulju kroz učinkovitost uklanjanja C, N i P i učinak dugotrajnog vođenja procesa pri odabranom operativnom režimu, kao i strukturnu stabilnost AGS. Postignuto je prosječno uklanjanje KPK 57%, 72%, 77%, 81%, 88%, 90%, 91%, 93%, 95% i 96% pri odabranim omjerima KPK/N 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20 i 23. Pri najnižem omjeru KPK/N 1 postignuta prosječna učinkovitost uklanjanja KPK je iznosila 57%, a koncentracija KPK u efluentu je bila u rasponu 15-26 mg KPK/L. Pri najvišem ispitanom omjeru KPK/N 23, postignuta je prosječna učinkovitost uklanjanja KPK 96%, s izlaznim koncentracijama KPK u efluentu u rasponu od 14 mg KPK/L do 87 mg KPK/L. Kako je rastao omjer KPK/N, tako je rasla i učinkovitost uklanjanja KPK. Pri omjeru  $\text{KPK/N} \geq 11$  postignuto je prosječno uklanjanje  $\text{KPK} \geq 90\%$ . Koncentracija KPK u efluentu je bila niža od 100 mg KPK/L, neovisno o postavljenom početnom odabranom omjeru KPK/N (Slika 10), odnosno, postignuta je kvaliteta obrađene vode obzirom na koncentraciju KPK koja zadovoljava za ispušt u površinske vode (NN 26/2020). Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020) propisuje granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u industrijskim otpadnim vodama prije njihova ispuštanja u sustav javne odvodnje i u svim pročišćenim ili nepročišćenim otpadnim vodama koje se ispuštaju u vode. Kod ispuštanja pročišćenih komunalnih otpadnih voda u vode pored koncentracija onečišćujućih tvari i/ili opterećenja u otpadnim vodama, potrebno je utvrditi i postotak smanjenja onečišćenja na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda. Tako Pravilnik (NN 26/2020) propisuje granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama: ukupni dušik 15 mg N/L, amonij 10 mg N/L, nitriti 1 mg N/L, nitrati 2 mg N/L, ukupni fosfor 2 mg P/L (1 mg P/L za jezera), ortofosfati 1 mg P/L (0,5 mg P/L za jezera),  $\text{BPK}_5$  25 mg/L, KPK 125 mg/L za površinske vode, a za sustav javne odvodnje nitriti 10 mg N/L, ukupni dušik 50 mg N/L, ukupni fosfor 10 mg P/L,  $\text{BPK}_5$  250 mg/L i KPK 700 mg/L.

Rezultati postignuti u ovom radu su u suglasju s Kocaturk i Erguder (2016), Kim i sur. (2021) i Kim i Ahn (2019). Kocaturk i Erguder (2016) su zabilježili pri omjeru  $\text{KPK/N} \leq 7,5$  učinkovitost uklanjanja KPK 63-79%, pri omjeru  $\text{KPK/N} 10$  su postigli 76-90%, a pri omjeru  $\text{KPK/N} 20$  i  $\text{KPK/N} 30$  postigli su 94% i 93% učinkovitost uklanjanja KPK. Smanjenje  $\text{KPK/N}$  omjera je rezultiralo stabilnim, malim i gustim granulama bogatim nitrifikantima. Autori su koristili octenu kiselinu kao izvor ugljika i pokuse su vodili u anoksično/aerobnom režimu. Istaknuli su da su s povećanjem  $\text{KPK/N}$  omjera,

od KPK/N 7,5 na KPK/N 30, zabilježili povećanje učinkovitosti uklanjanja KPK zbog dominacije heterotrofnih bakterija, a koja je dovela do porasta koncentracije biomase. Ipak, pred kraj pokusa, pri omjeru KPK/N 30 se dogodilo smanjenje učinkovitosti uklanjanja KPK sa 95% na 87% zbog prekomjernog rasta filamenata što je narušilo strukturalni integritet granula. Također, povećanje KPK/N omjera dovodi do bijelih, velikih i flafastih granula (Kocaturk i Erguder, 2016).

Kim i Ahn (2019) su u pokusima s acetatom kao izvorom ugljika u aerobnom režimu pri omjeru KPK/N 10, 7,5, 5 i 2,5 postigli učinkovitost uklanjanja KPK 93,7%, 90,8%, 82,4% i 70,7%. U pokusima, također u aerobnom režimu s acetatom kao izvorom ugljika Kim i sur. (2021) su pri omjerima KPK/N 5, 10, 15 i 20 zabilježili učinkovitost uklanjanja KPK 78,9%, 86,7%, 92,7% i 95,9%. S druge strane, u istraživanju Choi (2011) postignuta je visoka učinkovitost uklanjanja KPK od 89,4% do 95,6% i pri omjeru C/N < 2, s tim da su pokusi provedeni pri visokoj koncentraciji MLSS, sa 8 g MLSS/L. Uklanjanje organskih sastojaka iz otpadne vode se može pripisati postojanju i aktivnosti heterotrofnih bakterija, pri čemu viši omjer KPK/N pogoduje uklanjanju organskih sastojaka (Kocaturk i Erguder, 2016). U ovom radu zabilježen je postepen porast učinkovitosti uklanjanja KPK (Slika 10), koji upućuje na dominaciju heterotrofnih bakterija.

Kim i sur. (2021) su pokazali da je raznolikost mikroorganizama opala s porastom omjera KPK/N od 5 do 20. S porastom KPK/N omjera došlo je do postepene dominacije heterotrofnih bakterija i tako se smanjila brojnost i raznovrsnost mikroorganizama (Zhao i sur., 2013). Kim i sur. (2021) su pomoću pirosekvenciranja odredili da je udio roda *Thauera* u zajednici mikroorganizama aerobnog granularnog mulja porastao s početnih 0,01% pri omjeru KPK/N 5 na 63,7% pri omjeru KPK/N 20. Ti autori sugeriraju da je zbog visokog udjela *Thauera* u aerobnom granuliranom mulju došlo do porasta učinkovitosti uklanjanja KPK, poboljšanja učinkovitosti denitrifikacije i sadržaja EPS s porastom KPK/N omjera od 5 do 20. Rod *Thauera* doprinosi proizvodnji EPS, te formiranju i stabilnosti aerobnog granuliranog mulja (Cyzdik-Kwiatkowska, 2015), kao i aerobnoj denitrifikaciji (Scholten i sur., 1999). Kim i sur. (2021) su pokazali da je s porastom omjera KPK/N od 5 do 20 mikroskopski prikaz pokazao jasniji kružni oblik granula, omjer PS/PN je porastao s 0,55 na 0,79, kao i omjer AGS/MLSS sa 78,1% na 86,3%. Također su zabilježili raspad granula pri nižim omjerima KPK/N. Ističu da porast KPK/N omjera ima izravan učinak na stabilnost aerobnih granula (Kim i sur., 2021).



U pokusima disertacije povećanje raspoloživog udjela organskih sastojaka ostvareno s povećanjem omjera KPK/N rezultiralo je povećanjem učinkovitosti uklanjanja N, te je određeno da je pri omjerima KPK/N 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20 i 23 ostvarena prosječna učinkovitost uklanjanja N 40%, 54%, 56%, 58%, 60%, 63%, 67%, 75%, 78% i 80% (Slika 11). Prosječne vrijednosti N u efluentu su zadovoljavale za ispust u sustav javne odvodnje pri svim ispitanim odabranim omjerima KPK/N budući su u efluentu određene vrijednosti N < 50 mg/L, a pri omjerima KPK/N > 14 vrijednosti N u efluentu su bile zadovoljavajuće za ispust u površinske vode budući su određene vrijednosti N < 15 mg N/L (NN 26/2020). Povećanje omjera KPK/N rezultiralo je povećanjem prosječne učinkovitosti uklanjanja N (Slika 11).

U aerobnim uvjetima, pri istovremenoj prisutnosti NH<sub>4</sub>-N i organskih sastojaka, dolazi do kompeticije za raspoloživi otopljeni kisik između heterotrofa koji oksidiraju organski ugljik i nitrifikanata koji oksidiraju NH<sub>4</sub>-N do NO<sub>2</sub>-N i zatim NO<sub>2</sub>-N do NO<sub>3</sub>-N (nitrifikacija). Budući da su aerobni heterotrofi nadmoćniji u kompeticiji za otopljeni kisik, često se događa da prvo kisik utoše heterotrofi za oksidaciju organskih sastojaka, i nakon utroška organskih sastojaka, nitrifikanti koriste otopljeni kisik za nitrifikaciju (Gerardi, 2002).

Ipak, kako su aerobne granule gusta i kompaktna struktura aktivnog mulja, duž radijusa granule dolazi do gradijenta koncentracije otopljenog kisika, organskih sastojaka i amonijaka, kao i otpora difuzije supstrata. Na taj način na površini granule se odvijaju aerobni procesi, poput aerobne razgradnje organskih sastojaka i nitrifikacije, a u unutrašnjosti granule anoksični procesi, poput denitrifikacije (Gao i sur., 2011; Gerardi, 2002; Yuan i sur., 2019). Također, zbog toga dolazi i do različite zastupljenosti bakterijskih vrsta u granulama, pa su na površini granule prisutni nitrifikanti i aerobni heterotrofi, a u unutrašnjosti granule denitrifikanti. Zbog strukture granule događa se da se na površini granule odvija nitrifikacija, a u isto vrijeme u unutrašnjosti denitrifikacija. Takav proces se naziva istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (Yuan i sur., 2019; Gao i sur., 2011; Gerardi, 2002).

Ostvarene vrijednosti uklanjanja N u disertaciji (Slika 12) su u suglasju s Kim i sur. (2021) koji su postigli pri omjerima KPK/N 5, 10, 15 i 20 uklanjanje N 57,5%, 61,6%, 69,6% i 79,1% (pokusi vođeni u aerobnom režimu), i sa Kim i Ahn (2019) koji su pri omjerima KPK/N 10, 7,5, 5 i 2,5 postigli uklanjanje N 72,3%, 65,3%, 61,7% i 52,3% (pokusi također vođeni u aerobnom režimu). Kim i sur. (2021) sugeriraju tri moguća razloga povećanja učinkovitosti uklanjanja N s povećanjem KPK/N omjera u sustavu

koji je vođen u aerobnom režimu: (i) denitrifikacija koja se odvijala tijekom 10 min punjenja reaktora zbog dovoljne količine organskih sastojaka, (ii) istovremena nitrifikacija i denitrifikacija, i (iii) dominacija aerobnih ili fakultativnih anaeroba.

Također, zapažanja slična rezultatima prikazanim u disertaciji (Slika 12) su istaknuli Luo i sur. (2014) koji su prilikom smanjenja omjera KPK/N od KPK/N 4 do KPK/N 1 zabilježili smanjenje brzine i učinkovitosti nitrifikacije. Ističu da se prilikom smanjenja omjera KPK/N sa 4 na 1 dogodio značajan pomak u mikrobnj zajednici i smanjenju sadržaja EPS, što je dovelo do smanjenja taloživosti, veličine i fizičke snage aerobnih granula. Iako je smanjenje KPK/N omjera sa 4 na 1 rezultiralo većom količinom amonijak oksidirajućih bakterija (*Nitrosomonas*), količina nitrit oksidirajućih bakterija (*Nitrospira* i *Nitrobacter*) se također smanjila pri KPK/N omjeru 1, zbog inhibicije rasta od prisutnog slobodnog amonijaka i smanjenja vrijednosti SRT (Luo i sur., 2014).

Drugačije rezultate učinkovitosti uklanjanja N pri vođenju pokusa u anoksično/aerobnom režimu postigli su Kocaturk i Erguder (2016). Pri omjeru KPK/N 1 postigli su 75% uklanjanja amonijaka, a pri omjerima KPK/N 2, 3, 5,5 i 7,5 postigli su > 90% uklanjanja amonijaka, a daljnjim povećanjem KPK/N omjera učinkovitost uklanjanja amonijaka je opadala do 37% što je zabilježeno pri omjeru KPK/N 30. Učinkovitost uklanjanja N pri omjerima KPK/N 10-30 je iznosila 17-18%, pri KPK/N omjeru 1 iznosila je 26%, a pri KPK/N omjerima 2-7,5 bila je u rasponu 35-54%. Autori (Kocaturk i Erguder, 2016) ističu da je porast KPK/N omjera od 7,5 do 30 imao štetan učinak na uklanjanje amonijaka i tumače da je uzrok tome porast pH vrijednosti preko 8,6, koja nije odgovarajuća ni za nitrifikaciju niti za denitrifikaciju, i toksičnom učinku slobodnog amonijaka (FA, engl. *Free Ammonia*). Što je veća vrijednost pH, to je veći udio slobodnog amonijaka,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , a manji udio  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Koncentracija slobodnog amonijaka u rasponu 10-150 mg/L inhibira *Nitrosomonas*, i u rasponu 0,1-1,0 mg/L inhibira *Nitrobacter* (Anthonisen i sur., 1976). Zbog dugotrajnog visokog pH i inhibirajućeg učinka slobodnog amonijaka, došlo je do ispiranja nitrifikanata pri visokim vrijednostima omjera KPK/N (Kocaturk i Erguder, 2016).

U pokusima u ovom radu pri odabranom omjeru KPK/N 1-23, vrijednost pH je održavana u rasponu 7-8, koja pogoduje nitrifikaciji i denitrifikaciji. Zbog povoljne vrijednosti pH, koncentracija slobodnog amonijaka je održavana ispod praga inhibicije za nitrifikante.

Kocaturk i Erguder (2016) objašnjavaju nisku učinkovitost uklanjanja N pri visokim omjerima KPK/N ograničenjem prijenosa mase nitrata, koji je već bio nizak zbog niske

učinkovitosti uklanjanja  $\text{NH}_4\text{-N}$ , i visoke koncentracije organskih sastojaka, koja je pak pridonijela razvoju filamenatoznih struktura. Pri omjeru KPK/N 5 zapaženo je raspadanje granula i formacija manjih granula. Pri omjeru KPK/N < 5 prevladavali su nepovoljni uvjeti za heterotrofe, koji su se mogli i isprati, te je smanjena relativna količina heterotrofa. U tim pokusima, smanjenje omjera KPK/N sa KPK/N 3,5 na KPK/N 2 je dovelo do smanjenja veličine granule sa 2,1 mm na 1,4 mm, a to je omogućilo odgovarajući anoksični volumen. Ipak, unatoč tome zbog niskog udjela denitrifikanata, uklanjanje N je bilo nisko. Uklanjanje N pri omjerima KPK/N 7,5-2 je bilo u rasponu 35-46%, jer pri nižem KPK/N omjeru je povećan udio nitrifikanata. Zbog većeg udjela nitrifikanata, veća količina amonijaka je oksidirana do nitrita i/ili nitrata, koji su se zatim denitrificirali u unutrašnjosti granule (Kocaturk i Erguder, 2016).

Yuan i sur. (2019) ističu važnost anaerobne faze (60 min) tijekom faze punjenja reaktora jer značajno pridonosi uklanjanju dušika (91,7%) i pravilnom sfernom vanjskom obliku granule, kao i kompaktnoj strukturi granule, u odnosu na kratku anaerobnu fazu (5 min) tijekom faze punjenja, kada je postignuto 58,8% uklanjanja N, a granule su bile flafaste, nepravilne i labave strukture.

U ovoj disertaciji (Slika 11) pokusi su vođeni u aerobnim uvjetima, bez anaerobne/anoksične faze, i zbog toga učinkovitost uklanjanja N nije prelazila 80%. U ovim pokusima se odvijala istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (Slike 11 i 12). Koncentracija nitrita je bila na vrlo niskim razinama, a nitrat je bio glavni oblik N u efluentu. Na površini granule se odvijala oksidacija amonijaka do nitrita i/ili nitrata, a u unutarnjim slojevima granule denitrifikacija (Gao i sur., 2011; Gerardi, 2002; Yuan i sur., 2019).

Yuan i sur. (2019) sugeriraju istovremenu nitrifikaciju i denitrifikaciju kao dominantan proces uklanjanja N u sustavu aerobnih granula. Niži omjeri KPK/N više pogoduju proliferaciji nitrifikanata, pa se odvijala nitrifikacija, međutim, pri nižim omjerima KPK/N nije bilo dovoljno organskih sastojaka za denitrifikaciju nakupljenih nitrita i/ili nitrata, i zato su postignute niže vrijednosti uklanjanja N (Slike 11 i 12). Viši omjeri KPK/N više pogoduju proliferaciji heterotrofa, pa iako je pri višim vrijednostima omjera KPK/N bilo dovoljno raspoloživih organskih sastojaka za denitrifikaciju nakupljenih nitrata i postignute su više vrijednosti uklanjanja N (Slike 11 i 12), heterotrofi su bili nadmoćniji u kompeticiji za otopljeni kisik (Wu i sur., 2012;

Kocaturk i Erguder, 2016; Kim i sur., 2021). U aerobnim granulama vjerojatno je rod *Thauera* pridonio uklanjanju dušika aerobnom denitrifikacijom (Scholten i sur., 1999). Porast omjera KPK/N od 1 do 17 imao je povoljan učinak na uklanjanje PO<sub>4</sub>-P jer je prosječna učinkovitost uklanjanja PO<sub>4</sub>-P rasla od 28,24% do 69,30% (Slika 12). Daljnjim povećanjem omjera KPK/N na 20 i 23 ostvarena je niža prosječna učinkovitost uklanjanja PO<sub>4</sub>-P od 64,26% i 58,34% (Slika 12). Postignute vrijednosti u obrađenoj vodi nisu zadovoljile kriterij za ispust u površinske vode pri svim istraživanim omjerima KPK/N. Za ispust u sustav javne odvodnje pri omjerima KPK/N 1-9 vrijednosti su bile iznad maksimalne dopuštene koncentracije, a postignute prosječne vrijednosti u obrađenoj vodi za omjere KPK/N 11, 14, 17, 20 i 23 su iznosile 10,4 mg P/L, 9,48 mg P/L, 7,6 mg P/L, 8,6 mg P/L i 10,28 mg P/L. Dakle, pri omjerima KPK/N 14, 17 i 20 su postignute zadovoljavajuće vrijednosti za ispust u sustav javne odvodnje, a pri omjerima KPK/N 11 i 23 su vrijednosti PO<sub>4</sub>-P neznatno iznad maksimalne dopuštene koncentracije za isoust u sustav javne odvodnje (Slika 12).

Biološko uklanjanje PO<sub>4</sub>-P iz otpadne vode provodi se pomoću EBPR procesa pri čemu se koristi sposobnost fosfor akumulirajućih organizama (PAO) da akumuliraju PO<sub>4</sub>-P u suvišku svojih metaboličkih potreba. Za učinkovito uklanjanje PO<sub>4</sub>-P iz otpadne vode potrebno je za PAOs osigurati naizmjenične anaerobno-aerobne uvjete. U anaerobnim uvjetima PAO unose hlapljive masne kiseline u svoje stanice i pohranjuju ih kao polihidroksialkanoate (PHA), s energijom od razgradnje glikogena i hidrolize unutarstaničnih rezervi polifosfata, pri čemu se ortofosfati ispuštaju iz stanice u miješanu tekućinu. Zatim, u slijednim aerobnim uvjetima, s kisikom kao akceptorom elektrona, PAOs koriste unutarstanične rezerve PHA za nadopunu rezervi glikogena, stanični rast i unos ortofosfata iz miješane tekućine u stanicu te njihovu pohranu kao polifosfate (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017).

Pokusi u ovom radu su vođeni u aerobnim uvjetima sa zrelim aerobnim granulama. Kako se punjenje reaktora odvijalo bez aeracije, vjerojatno su tijekom faze punjenja vladali anaerobni/anoksični uvjeti pri čemu su PAOs unijeli acetat u svoje stanice i pohranili ga kao PHA. Također, kako su pokusi vođeni sa zrelim aerobnim granulama, u kojima postoji gradijent koncentracije otopljenog kisika (Li i Liu, 2005), moguće je da su u središnjem dijelu granula vladali anaerobni uvjeti koji su omogućili unos i pohranu acetata u stanice PAOs i sintezu PHAs, koji je potreban za unos PO<sub>4</sub>-P u stanice PAO.

Kako je za uklanjanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  iz otpadne vode nužno osigurati izvor ugljika za PAOs (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017), tako je s porastom omjera KPK/N rasla raspoloživa količina organskih sastojaka za PAO, kao i učinkovitost uklanjanja  $\text{PO}_4\text{-P}$ . Tako je pri omjerima KPK/N 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 20 i 23 ostvarena prosječna učinkovitost uklanjanja  $\text{PO}_4\text{-P}$  od 28,24%, 32,05%, 41,03%, 49,23%, 53,01%, 57,33%, 63,19%, 69,30%, 64,26% i 58,34% (Slika 12). Kako je pri omjerima KPK/N 20 i 23 rastao promjer granula, te su granule postajale veće, flafastije, i više nisu bile toliko kompaktne/guste, vjerojatno je došlo do smanjenja anoksičnog/anaerobnog volumena (povećanje aerobnog volumena granula), i pri tim uvjetima PAO više nisu imali dovoljnu zalihu PHA za unos  $\text{PO}_4\text{-P}$ , zbog toga je pri omjerima KPK/N 20 i 23 došlo do smanjenja učinkovitosti uklanjanja  $\text{PO}_4\text{-P}$ . Također, kako su vladali aerobni uvjeti u bioreaktoru i u influentu je bilo amonijaka, odvijala se oksidacija amonijaka preko nitrita do nitrata, nitrifikacija (Lochmatter i sur., 2014; Mosquera-Corral i sur., 2005; Gerardi, 2002), te su u reaktoru bili prisutni i nitrati.

Denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (DPAOs) su skupina PAOs koji mogu koristiti umjesto kisika nitrite i/ili nitrate kao akceptore elektrona, odnosno, DPAOs odgovaraju anaerobno-anoksični uvjeti. Metabolizam PAOs i DPAOs je isti, razlika je jedino u akceptoru elektrona (kisik, ili nitrati i/ili nitriti (Hu i sur., 2003; Kern-Jeppesen i Henze, 1993; Kuba i sur., 1993). Zbog toga je moguće da su za uklanjanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  iz otpadne vode bili odgovorni i DPAOs, koji osim što su uklanjali  $\text{PO}_4\text{-P}$ , su pridonjeli i uklanjanju  $\text{NO}_3\text{-N}/\text{NO}_2\text{-N}$ , odnosno provedbi procesa denitrifikacije.

Nadalje, u aktivnom mulju postoji skupina mikroorganizama koja se naziva glikogen akumulirajući organizmi (GAOs). Metabolizam GAO je sličan PAO, s razlikom da GAO nemaju metabolizam unosa  $\text{PO}_4\text{-P}$  i pohranu kao polifosfate (aerobni/anoksični uvjeti), i otpuštanja  $\text{PO}_4\text{-P}$  (anaerobni uvjeti). Kako i PAOs i GAOs u anaerobnim uvjetima unose hlapljive mase kiseline u svoje stanice i pohranjuju ih kao PHAs, dolazi do kompeticije između PAOs i GAOs za izvor ugljika (Hollender i sur., 2002; Mino i sur., 1998, 1995). Unatoč sličnostima u metabolizmu PAOs i GAOs, podešavanjem određenih procesnih čimbenika moguće je postići da PAOs budu brojniji od GAOs, i tako se osigura učinkovito uklanjanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  iz otpadne vode (Oehman i sur., 2006; Oehman i sur., 2005). Neki od čimbenika su izvor ugljika (Carvalho i sur., 2007; Liu i sur., 2007; Oehmen i sur., 2006), temperatura (Erdal i sur., 2003), pH vrijednost (Oehman i sur., 2005; Filipe i sur., 2001), omjer C/P (Liu i sur., 1997). Kako je rastao omjer KPK/N, tako je i rastao omjer KPK/P. Poznato je da viši omjer KPK/P pridonosi

proliferaciji GAO (Liu i sur., 1997), te zbog toga dolazi do smanjenja učinkovitosti uklanjanja PO<sub>4</sub>-P. Moguće je da su omjeri KPK/N 20 i 23 pridonijeli proliferaciji GAO i da je i zbog toga smanjena učinkovitost uklanjanja PO<sub>4</sub>-P.

Iako su omjeri KPK/N 20 i 23 doprinjeli povećanju promjera granule, pri čemu su granule postale flafaste i nisu više bile kompaktne kao pri nižim omjerima KPK/N, te je posljedično došlo do povećanja aerobnog volumena u granuli, što je negativno djelovalo na uklanjanje PO<sub>4</sub>-P (Slika 12), to nije narušilo učinkovitost uklanjanja N (Slika 11), iako je i za denitrifikaciju potrebno osigurati anoksične uvjete. Vjerojatno razlog visokog uklanjanja N čak i pri tim uvjetima bila aerobna denitrifikacija (Yuan i sur., 2019; Scholten i sur., 1999). Duža faza punjenja pri čemu bi bili osigurani duži anaerobni uvjeti potrebni za osiguravanje unutarstaničnih zaliha ugljika bi vjerojatno pridonijelo većoj učinkovitosti uklanjanja i N i P.

Ostvarene učinkovitosti uklanjanja KPK, N i P u šaržnim pokusima (Slike 13-15). su u skladu s prosječnim učinkovitostima uklanjanja pri omjerima KPK/N 1, 17 i 23. S porastom omjera KPK/N rasla je brzina uklanjanja KPK od 120 mg KPK/Lh pri omjeru KPK/N 1 na 340 mg KPK/Lh pri omjeru KPK/N 23, kao i brzina unosa PO<sub>4</sub>-P u stanice, s početnih 5,6 mg PO<sub>4</sub>-P/Lh pri omjeru KPK/N 1 do 10,4 mg PO<sub>4</sub>-P/Lh pri omjeru KPK/N 23. Brzina oksidacije amonijaka je imala obrnuti trend, tako je pri omjeru KPK/N 1 ostvarena najveća brzina oksidacije 23,8 mg NH<sub>4</sub>-N/Lh, a pri omjeru KPK/N 23 najniža brzina oksidacije 18,9 mg NH<sub>4</sub>-N/Lh. Amonijak se najvećim dijelom oksidirao do nitrata, a nitriti su zabilježeni pri vrlo niskim koncentracijama.

Izračunate su brzine oksidacije amonijaka i učinkovitost uklanjanja KPK, unosa PO<sub>4</sub>-P, i oksidacije NH<sub>4</sub>-N, tijekom provedbe šaržnih pokusa (Slike 13-15) su kako slijedi:

	<b>KPK/N 1</b>	<b>KPK/N 17</b>	<b>KPK/N 23</b>
Brzina uklanjanja KPK, mg KPK/Lh	120	262	340
Brzina oksidacije NH <sub>4</sub> -N, mg NH <sub>4</sub> -N/Lh	23,8	20,3	18,9
Brzina unosa PO <sub>4</sub> -P, mg PO <sub>4</sub> -P/Lh	5,6	9,1	10,4
Učinkovitost uklanjanja KPK, %	57,7	93,00	96,00
Učinkovitost uklanjanja N, %	38,9	74,3	80,8
Učinkovitost uklanjanja NH <sub>4</sub> -N, %	100	100	100
Učinkovitost uklanjanja PO <sub>4</sub> -P, %	29,2	69,6	59,1

## 5.2. Učinkovitost uklanjanja N, C i P ovisno o koncentraciji otopljenog kisika

Prilikom granuliranja aerobnog mulja, jedan od važnih čimbenika je intenzitet aeracije, koji ima dvojak ulogu: osigurava otopljeni kisik i hidrauličke sile smicanja (Tay i sur., 2004; Dulekgurgen i sur., 2008; He i sur., 2019). Intenzitet hidrauličkih sila smicanja i vrijeme trajanja sila smicanja na granulama dovode do promjene strukture pora, zastupljenosti mikrobnih vrsta, te promjene u mikrobnom metabolizmu, morfologiji i veličini granula (He i sur., 2019). Otopljeni kisik utječe na stabilnost aerobne granule, te na učinkovitost uklanjanja organskih sastojaka, N i P (Yuan et al., 2019; He i sur., 2018; Gao i sur., 2013). Zasićena koncentracija otopljenog kisika se često primjenjuje za kultivaciju stabilnih aerobnih granula (Beun i sur., 2002), a pri umjerenoj koncentraciji otopljenog kisika (40% zasićenja kisika) granule se raspadaju, i ne postiže se stabilna granulacija pri 40% zasićenja kisikom (Mosquera-Corral i sur., 2005). Ipak, kombinacija uvjeta koji pogoduju selekciji spororastućih mikroorganizama (poput nitrifikanata), i niske koncentracije otopljenog kisika je dovela do gustih aerobnih granula (de Kreuk i van Loosdrechr, 2004). Aerobne granule su uzgojene pri brzini uzlaznog toka zraka 1,0 cm/s pri čemu je koncentracija otopljenog kisika bila u rasponu 1,8-4,2 mg/L (Yuan i sur., 2019), pri površinskoj brzini uzlaznog toka zraka 0,58 cm/s i 0,14 cm/s, pri čemu je koncentracija otopljenog kisika iznosila 5,5-6,6 mg/L i 4,8 mg/L (Gao i sur. 2013), pri površinskoj brzini uzlaznog toka zraka 0,8 cm/s, 1,6 cm/s, 2,4 cm/s i 3,2 cm/s (Chen i sur., 2007). Kombinacija niske koncentracije otopljenog kisika i viših sila smicanja se nije pokazala uspješna za formiranje aerobnih granula (Tay i sur., 2001).

Sturm i Irvine (2008) ističu da je za formiranje aerobnih granula važnija koncentracija DO od sila smicanja jer se ne može postići aerobna granulacija pri koncentraciji otopljenog kisika ispod 5 mg/L, te da se pri brzini uzlaznog toka zraka ispod 1 cm/s aerobne granule raspadaju u flokule. Suprotno, Liu i Tay (2007b) su pri istoj površinskoj brzini uzlaznog toka zraka u airlift reaktoru uzgojili granule koje su imale dobru stabilnost tijekom 151 dana. Više sile smicanja uzrokuju veću hidrofobnost površine stanica, veću količinu EPS, te manje, gušće i kompaktnije granule (Tay i sur., 2001; 2002). Niže sile smicanja (0,8 cm/s i 1,6 cm/s) dovode do narušavanja strukture granule, takve granule su velike, filamentozne, labave, porozne, nepravilne strukture, karakterizira ih loša učinkovitost uklanjanja i operacijska nestabilnost, a više sile smicanja (2,4 cm/s i 3,2 cm/s) dovode do formiranja snažnih, kompaktnih, robustnih granula koje imaju potencijal za dugotrajnu operaciju (Chen i sur., 2007). He i sur.

(2019) su postigli najgušće granule pri intenzitetu aeracije 0,9 L/min tijekom 90 min, od istraženih kombinacija 1,5 L/min, 0,9 L/min i 0,6 L/min tijekom 90 min, 120 min i 150 min, a u kombinaciji 1,5 L/min tijekom 150 min je došlo do gubitka biomase. Gao i sur. (2013) ukazuju da niži intenzitet aeracija (4,8 mg DO/L) rezultira većim i labavijim granulama, a viši intenzitet aeracije (5,5-6,8 mg DO/L) rezultira manjim i kompaktnijim granulama i objašnjavaju: (i) zbog hidrauličkih karakteristika viši intenzitet aeracije dovodi do češće kolizije i trenja među granulama, odnosno snažnije trenje među granulama i tekućina/mjehurić, što ograničava formiranje velikih granula, i (ii) viši intenzitet aeracije dovodi do više koncentracije otopljenog kisika i produljenog vremena gladovanja, zbog čega se događa duža endogena respiracija i niža brzina rasta mikroorganizama, što ograničava veličinu aerobnih granula (Gao i sur., 2013).

U ovoj disertaciji porast koncentracije otopljenog kisika djeluje povoljno na učinkovitost uklanjanja KPK. Koncentracija otopljenog kisika u pokusima je iznosila 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L i 7 mg/L, a protoci zraka pri kojima je postignuta koncentracija otopljenog kisika 0,4 L/min, 0,8 L/min, 1,7 L/min i 2,9 L/min. Učinkovitost uklanjanja KPK je rasla od 86%, 91%, 94% i 96% pri koncentraciji otopljenog kisika 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L i 7 mg/L. Istovremeno, učinkovitost uklanjanja N je pokazala drugačiji trend, ostvareno je uklanjanje N od 61%, 80%, 78% i 75%. Porast koncentracije otopljenog kisika se slično odrazio na učinkovitost uklanjanja P: pri koncentraciji otopljenog kisika 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L i 7 mg/L ostvarene su učinkovitosti uklanjanja P 57%, 68%, 56% i 44%. Najniža učinkovitost uklanjanja KPK i N je postignuta pri DO 1 mg/L, 86% uklanjanja KPK i 61% uklanjanja N, a najniža učinkovitost uklanjanja P od 44% pri 7 mg DO/L. S porastom koncentracije DO na 2 mg/L narasla je učinkovitost uklanjanja N i P do maksimalnih 80% i 68%, a daljnjim porastom koncentracije otopljenog kisika na 4 mg/L i 7 mg/L učinkovitost uklanjanja N i P je opadala, 78% i 75%, odnosno 56% i 44% (Slika 16).

Hidrodinamične sile smicanja inducirane aeracijom imaju značajan učinak na učinkovitost uklanjanja u procesu nitrifikacije i denitrifikacije. Dovoljna aeracija osigurava visoku učinkovitost oksidacije amonijaka, a ograničane hidrodinamičke sile smicanja mogu dovesti do nedovoljne učinkovitosti nitrifikacije, a doprinosti denitrifikaciji (He i sur., 2017).

Unatoč većoj postignutoj učinkovitosti uklanjanja KPK pri koncentraciji DO > 2 mg/L, zapravo je vrlo mala razlika u učinkovitosti uklanjanja KPK pri DO 2 mg/L i pri DO > 2 mg/L (Slika 16), pri čemu povećanje koncentracije otopljenog kisika narušava



učinkovitost uklanjanja N i P, a razlika u potrošnji/uštedi energije je značajna (Gao i sur., 2013), budući da potrošnja energije za aeraciju predstavlja 40-60% ukupnih troškova energije na uređaju za biološku obradu otpadnih voda (Olsson i Andrews, 1981). Visoka koncentracija otopljenog kisika pogoduje heterotrofima, postignute su visoke vrijednosti učinkovitosti uklanjanja KPK ( $> 90\%$ ) pri koncentraciji otopljenog kisika  $\geq 2$  mg/L odnosno pri protoku zraka  $\geq 0,8$  L/min (Slika 16). Visoka koncentracija otopljenog kisika pogoduje i nitrifikantima, za oksidaciju amonijaka do nitrata. Međutim, zbog visoke koncentracije otopljenog kisika, dio kisika je dospjeo i u unutrašnjost granula, i smanjio anoksičnu zonu. Zbog smanjene anoksične zone (povećane aerobne zone) granule, unatoč dovoljnoj koncentraciji organskih sastojaka za denitrifikaciju nakupljenih nitrata, denitrifikacija je bila inhibirana visokim koncentracijama otopljenog kisika, što je rezultiralo smanjenom učinkovitosti uklanjanja N pri koncentraciji DO  $> 2$  mg/L.

Niska koncentracija otopljenog kisika od 1 mg DO/L pogodovala je povećanju anoksične zone unutar granule, što je povoljno za PAOs jer u takvim uvjetima PAOs imaju priliku unijeti acetat u svoje stanice i pohraniti ga kao PHAs. Razlog zašto je bila niska učinkovitost uklanjanja P pri koncentraciji otopljenog kisika 1 mg/L je to što je za unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  u stanice PAOs potreban akceptor elektrona, bilo kisik, bilo  $\text{NO}_2\text{-N}$  odnosno  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Pri koncentraciji otopljenog kisika 1 mg/L nije bilo dovoljno kisika kao akceptora elektrona za unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  u mikrobne stanice, a zbog niske koncentracije otopljenog kisika, niti nitrifikacija nije bila potpuna jer nitrifikanti nisu imali dovoljnu količinu otopljenog kisika za oksidaciju  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Pri koncentraciji otopljenog kisika 1 mg/L se vjerojatno odvijala kompeticija za otopljeni kisik između aerobnih heterotrofa, nitrifikanata i PAOs. Također, vjerojatno su PAOs koristili dio  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  (produkte nitrifikacije) kao akceptore elektrona za unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  u svoje stanice.

Porast koncentracije otopljenog kisika na 2 mg/L je osigurano provođenje nitrifikacije i otopljeni kisik za PAOs. Moguće je da su PAOs i pri ovoj koncentraciji otopljenog kisika koristili  $\text{NO}_2\text{-N}/\text{NO}_3\text{-N}$  kao akceptore elektrona za unos  $\text{PO}_4\text{-P}$ .

Daljnje povećanje koncentracije otopljenog kisika je pogodovalo nitrifikaciji, ali je narušilo denitrifikaciju, i naročito uklanjanje P.

PAOs trebaju anaerobne uvjete, a ovi pokusi su vođeni pri aerobnim uvjetima, i anaerobni uvjeti su bili prisutni samo tijekom faze punjenja reaktora. Također, koncentracija otopljenog kisika 4 mg/L i 7 mg/L je vjerojatno proširila aerobnu zonu

unutar granule i smanjila anoksičnu zonu, pri čemu PAOs nisu imali odgovarajuće uvjete za pohranu acetata kao PHA pa je zbog toga narušena učinkovitost uklanjanja P. Rezultati u ovom radu (Slika 16) su u suglasju s Yuan i sur. (2019) koji su pri KPK/N omjeru 6 (300 mg KPK/50 mg NH<sub>4</sub>-N) pri koncentraciji otopljenog kisika 1,5 mg/L, 2,5 mg/L, 4,6 mg/L i 6,3 mg/L (protoci zraka 0,5 L/min, 1 L/min, 2 L/min i 3 L/min) postigli uklanjanje NH<sub>4</sub>-N  $\geq$  93,4% i uklanjanje TN 92,2%, 96,6%, 95,8% i 92,9%, i s He i sur. (2018). Više vrijednosti učinkovitosti uklanjanja KPK (preko 97%) i NH<sub>4</sub>-N (96% i 92%) su postigli Gao i sur. (2013), pri KPK/N omjeru oko 13 s glukozom kao izvorom ugljika pri aerobnom režimu rada, te koncentraciji otopljenog kisika 5,5-6,8 mg DO/L, i 4,8 mg DO/L. Ističu da kod zrelih granula intenzitet aeracije nije imao učinka na uklanjanje KPK, a viši intenzitet aeracije pogoduje uklanjanju NH<sub>4</sub>-N. Nije zabilježeno raspadanje granula pri oba intenziteta aeracija (5,5-6,8 mg DO/L i 4,8 mg DO/L), a granule su bile slične morfološke strukture, jasnih kontura bez izdanaka filamenata, ali različite veličine.

He i sur. (2019) su pri KPK/N omjeru 4 (200 mg KPK/50 mg NH<sub>4</sub>-N) pri intenzitetu aeracije 1,5 L/min, 0,9 L/min i 0,6 L/min u kombinacijama 90 min, 120 min i 150 min, u anaerobno-aerobno-anoksičnoj konfiguraciji postigli pouzdano i stabilno uklanjanje KPK i NH<sub>4</sub>-N neovisno o intenzitetu aeracije i vremenu aeracije, međutim, intenzitet i trajanje aeracije su utjecali na preostali dušik. Niži intenzitet aeracije čak pri duljem trajanju je doveo do više akumulacije NH<sub>4</sub>-N. Viši intenzitet aeracije dovodi do više koncentracije otopljenog kisika, što pridonosi učinkovitosti nitrifikacije i nižoj učinkovitosti denitrifikacije. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija, i brzina akumulacije nitrata su snažno porasli sa smanjenjem intenziteta aeracije (od 1,5 L/min do 0,9 L/min) i s produljenjem vremena (od 90 min na 120 min), a daljnje varijacije hidrodinamičnih sila smicanja su dovele do laganog porasta obje vrijednosti. Povećana istovremena nitrifikacija i denitrifikacija su doveli do pojačane učinkovitosti uklanjanja dušika sa 62,74% na 84,74%. To sugerira da je smanjenje brzine aeracije i produljenje vremena aeracije povoljno za povećanje učinkovitosti uklanjanja N. Za dugotrajan rad sustava s aerobnim granulama sugeriraju srednju hidrauličnu silu smicanja. Sve u svemu, umjeren intenzitet aeracije skupa s vremenom aeracije je pogodovalo najboljoj izvedbi sustava kao i drugim karakteristikama granula (He i sur., 2019).

U istraživanju He i sur. (2019) su postignute više vrijednosti učinkovitosti uklanjanja N u odnosu na rezultate postignute u ovom radu (Slika 16) jer je anaerobno-aerobno-anoksična konfiguracija povoljnija za uklanjanje N.

Franca i sur. (2019) ističu da su potrebne visoke koncentracije otopljenog kisika da se izbjegne ograničenje kisikom u aerobnim granulama i za održavanje stabilnosti aerobnih granula. Također, koncentraciju otopljenog kisika i intenzitet protoka zraka je potrebno optimirati zbog smanjenja potrošnje energije u sustavima aerobnih granula punog mjerila i zbog postizanja učinkovitog uklanjanja N. Zasad još ne postoje općenite vrijednosti za minimalnu brzinu aeracije ili koncentraciju otopljenog kisika za rad sustava aerobnih granula zato što potreba na kisiku u prisutnosti visoke koncentracije supstrata ovisi o specifičnim čimbenicima, poput koncentracije biomase, veličine aerobnih granula, vrsti supstrata i načinu punjenja bioreaktora, i mikrobnj zajednici unutar aerobne granule (Franca i sur., 2019).

He i sur. (2018) su u pokusima s acetatom kao izvorom ugljika, u anaerobno-aerobno-anoksičnom režimu rada, pri omjeru KPK/N 10 (200 mg KPK/20 mg NH<sub>4</sub>-N) pri brzini aeracije 4 L/min, površinskoj brzini uzlaznog toka zraka 0,59 cm/s, što je odgovaralo koncentraciji otopljenog kisika 7-8 mg/L, skraćivali duljinu aerobnog perioda (120 min, 90 min i 60 min). Istaknuli su da aerobne granule mogu održati integritet i stabilnost tijekom dugotrajnog rada pri aeraciji visokog intenziteta i različitoj duljini trajanja aeracije, a kraće vrijeme aeracije je pogodovalo zadržavanju biomase, boljoj taloživosti i većoj proizvodnji EPS. Postignuto je učinkovito uklanjanje organskih sastojaka, kao i uklanjanje N i P, pri skraćenom vremenu trajanja aeracije. Vrijeme aeracije je oblikovalo raznolikost bakterijske zajednice, njezin sastav i distribuciju funkcionalnih skupina za uklanjanje organskih sastojaka, N i P. Zabilježili su učinkovitost uklanjanja KPK pri sva tri istražena vremena aeracije > 94% i NH<sub>4</sub>-N > 97% i PO<sub>4</sub>-P > 96%, ali i različite vrijednosti NO<sub>3</sub>-N u efluentu. Smanjenje trajanja aeracije je dovelo do smanjenja NO<sub>3</sub>-N u efluentu, a učinkovitost uklanjanja N je iznosila 64,29%, 71,81% i 86,18% (He i sur., 2018).

### **5.3. Učinak protoka zraka na veličina granula**

Struktura aerobne granule se procjenjuje veličinom granule, morfologijom i mikroskopskim promatranjima (Chen i sur., 2007). Omjer KPK/N i brzina protoka zraka su neki od čimbenika koji utječu na veličinu i stabilnost granule. S porastom omjera KPK/N raste veličina granule, a s porastom protoka zraka veličina granule se smanjuje (He i sur., 2019; Franca i sur., 2019; He i sur., 2018; He i sur., 2017; Kocaturk i Erguder, 2016). U bioreaktorima oblika kolone, aeracija ima dvojak ulogu:

osiguravanje otopljenog kisika i glavni je uzrok hidrodinamične turbulencije i hidrauličke sile smicanja (Chen i sur., 2007).

Pokusi u ovom radu su provedeni pri omjeru KPK/N 17 i pri protoku zraka 0,4 L/min, 0,8 L/min, 1,7 L/min i 2,9 L/min (Slika 17). Protok zraka je utjecao na veličinu granula, i pri svakom ispitanom protoku zraka u bioreaktoru su nađene granule različitih promjera, a udio pojedine veličine granule je bio u izravnoj ovisnosti o protoku zraka. S porastom protoka zraka, krivulja ovisnosti udjela granula i promjera granula je mijenjala svoj oblik, od zaobljenog središnjeg dijela pri protocima zraka 0,4 L/min i 0,8 L/min, ka špicastom vrhu krivulje pri protocima zraka 1,7 L/min i 2,9 L/min. Pri tome se promjer granula smanjivao od 1,2-14 mm (71% granula) pri protoku zraka 0,4 L/min do 0,75 mm (49% granula) (Slika 17).

S porastom veličine granule uklanjanje supstrata postaje ograničeno transportom, i unutar granule organizmi se natječu za prostor i supstrat, pa složena unutrašnja struktura granule i veličina granule imaju značajan učinak na proces prijenosa mase i ozbiljno utječu na stabilnost aerobne granule (Liu i sur., 2010). Veličina aerobne granule je važna veza između mikrostrukture aerobnog granularnog mulja i njegovih makroskopskih svojstava (Long i sur., 2019).

Kocaturk i Erguder (2016) su pri KPK/N omjeru 20, s octenom kiselinom kao izvorom ugljika pri anoksično/aerobnom režimu rada, postigli prosječan dijаметar  $1,5 \pm 1,5$  mm (49% granulacije), a granule su bile flafaste, svijetlo smeđe boje. Za formiranje snažnih i kompaktnih granula potrebno je osigurati odgovarajuće hidrodinamične sile smicanja, a niske sile smicanja rezultiraju poroznim i slabim granulama (Wu i sur., 2015).

He i sur. (2019) su mijenjali intenzitet aeracije (1,5 L/min, 0,9 L/min i 0,6 L/min) i duljinu trajanja aeracije (90 min, 120 min i 150 min), pri omjeru C/N 4, pri anaerobno-aerobno-anoksičnom režimu rada i s acetatom kao izvorom ugljika. Granule podvrgnute takvim uvjetima su zadržale kompaktnu strukturu, s tim da se pri nižem protoku zraka – 0,6 L/min – granule bile kompaktnije i pravilnijeg oblika u odnosu na granule pri protocima zraka 1,5 L/min i 0,9 L/min, kada su granule bile nepravilnog oblika. Na vanjskoj površini granula su zapažene brojne poroznosti, koje mogu biti prolazi za transfer mase.

He i sur. (2019) su zabilježili granule najvećeg promjera 0,82 mm pri 0,9 L/min tijekom 120 min aeracije. U aerobnim granulama na dubini 0,8-0,9 mm od površine su zabilježene anaerobne zone s mrtvim mikrobnim stanicama, dok se aerobne granule

manje od 0,6 mm sastoje u potpunosti od žive biomase (Tay i sur., 2002; Toh i sur., 2003).

Liu i sur. (2005) ističu da je u granulama većim od 0,7 mm difuzija ograničavajući čimbenik za uklanjanje supstrata. Ipak, kompaktnija struktura malih aerobnih granula upućuje da velike molekule ne bi mogle ući u njihove pore (Liu i sur., 2010).

Yuan i sur. (2019) su proveli pokuse s acetatom i glukozom kao izvorom ugljika, i s dva različita režima hranjenja: anaerobno i aerobno (KPK vijednost je iznosila 400 mg/L tijekom perioda I – 0. – 42. dan, i 900 mg/L tijekom perioda II – 42. – 100. dan, s koncentracijom  $\text{NH}_4\text{-N}$  26 mg/L). Ti autori smatraju da je za postizanje kompaktnih granula nužan anaeroban način hranjenja i acetat kao izvor ugljika – granule su bile pravilnog i sferičnog oblika, a distribucija veličine granula na dan 50. je pokazala da je više od 50% granula bilo u rasponu 1-1,5 mm. Kada su pokuse vodili s aerobnim načinom hranjenja, granule su bile labave – uglavnom veće od 2 mm ili manje od 0,5 mm (50. dan). Veće granule su se počele raspadati, a manje ispirati. Glukoza kao izvor ugljika je dovela do značajnog rasta filamentoznih bakterija koje su rasle iz granula, distribucija veličine granula (50. dan) je pokazala da je više od 60% granula bilo u rasponu 1-1,5 mm (Yuan i sur., 2019). Dominacija filamentoznih organizama na površini aerobne granule dovodi do narušavanja strukture granule i taloživosti, i posljedično do ispiranja biomase iz sustava te do narušavanja rada sustava (Liu i Liu, 2006; Tay i sur., 2001). Filamenti imaju kompetitivnu prednost nad ne-filamentoznim mikroorganizmima koji tvore aerobnu granulu zbog svoje sposobnosti da unesu više nutrijenata iz medija pri niskoj koncentraciji supstrata, zbog visokog omjera površine i volumena i prefencijalnog rasta u jednom smjeru (Liu i Liu, 2006). Zbog toga pri nižoj koncentraciji supstrata filamentozni organizmi imaju višu brzinu rasta od organizama koji tvore aerobne granule, i na površini aerobne granule pri takvim uvjetima prekomjerni rast filamentoznih organizama povećava gradijent supstrata unutar granule, što dovodi do velikih i nestabilnih aerobnih granula (Peyong i sur., 2012; Zhang i sur., 2011).

Također, u radu sustava s aerobnim granulama pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika je zabilježeno narušavanje fizičke snage granule i filamentozni rast (Mosquera-Corral i sur., 2005). U vanjskim slojevima aerobne granule dolazi do brzog utroška kisika (Liu i sur., 2010), a u granulama većim od 0,5 mm dolazi do limitacije koncentracije otopljenog kisika u unutarnjim slojevima (Li i Liu, 2005).

Chen i sur. (2007) su proveli pokuse s acetatom (2000 mg KPK/L i 776 mg  $\text{NH}_4\text{Cl/L}$ ) kao izvorom ugljika u SBR reaktoru s 4 satnim ciklusom, pri brzini protoka zraka 1 L/min, 2 L/min, 3 L/min i 4 L/min, što je odgovaralo površinskoj uzlaznoj brzini zraka 0,8 cm/s, 1,6 cm/s, 2,4 cm/s i 3,2 cm/s, a koncentracija otopljenog kisika je tijekom aerobne faze bila u rasponu 3,5 mg DO/L do koncentracije zasićenja. Uzgojili su granule pri svim istraživanim protocima zraka, pri čemu su sile smicanja 2,4 cm/s i 3,2 cm/s rezultirale robustnim granulama s potencijalom za dugotrajan rad, granule su imale jasnu vanjsku morfologiju, bile su kompaktne i guste, te dobre izvedbe. Nakon 40. dana pri silama smicanja 2,4 cm/s i 3,2 cm/s nije bilo značajne promjene u veličini granula, pri silama smicanja 2,4 cm/s veličina granula je bila u rasponu 0,5-0,7 mm sa srednjim dijametrom od 0,557 mm, a pri silama smicanja 3,2 cm/s granule su bile manje, u rasponu 0,3-0,5 mm srednjeg dijametra 0,342 mm. Sile smicanja 0,8 cm/s i 1,6 cm/s narušile dobivene granule do velikih filamentoznih granula nepravilnog oblika, labave strukture loše izvedbe i operativne nestabilnosti. Pri silama smicanja 0,8 cm/s i 1,6 cm/s su se male granule pojavile prije nego pri višim silama smicanja, međutim, te male granule su prebrzo rastle da bi održale stabilnost, i potpuno su se narušile nakon kratkog vremena, zbog ograničenja prijenosa mase. Granule uzgojene pri niskim silama smicanja (0,8 cm/s i 1,6 cm/s) su imale žuti vanjski sloj i crnu anaerobnu unutrašnjost, u kojima su proizvedeni plinovi i organske kiseline tijekom anaerobne fermentacije bili uzrok narušavanja granule (Chen i sur., 2007). Ukoliko se ne ispušta aerobni granularni mulj iz reaktora, starost mulja u reaktoru će biti velika, što dovodi do starenja granula (Long i sur., 2019). Nakon nekoliko mjeseci bez selektivnog ispuštanja mulja nastaju brojne velike granule crne anaerobne jezgre, koje lako pucaju. Kada se istovremeno desintegrira puno velikih granula, zbog kratkog vremena taloženja velika količina mulja se ispušta iz bioreaktora, čime dolazi do narušavanja uklanjanja onečišćujućih tvari iz otpadne vode. Iako se starost mulja može održavati ispuštanjem mulja iz reaktora, takav pristup ne može spriječiti nastanak velikih granula koje imaju sklonost pucanju. Iz tog razloga Long i sur. (2019) ističu važnost održavanja optimalne veličine granule pomoću kontrole starosti mulja sa selektivnim ispuštanjem mulja. Ti autori su proveli pokuse u pilot postrojenju u anaerobno-aerobnom režimu (8.-131. dan), s kanalizacijom iz septičke jame od zgrade ureda (534,96-810,32 mg KPK/L, 58,72-86,06 mg TN/L, 48,96-73,92 mg  $\text{NH}_4^+\text{-N/L}$  i 4,94-11,87 mg TP/L) kao influentom, s 4 ciklusa po danu. Ističu da su granule veličine 2-3 mm povoljne za održavanje stabilnosti aerobnog granularnog mulja u pilot postrojenju (Long i sur., 2019). Da bi se prilikom

obrade otpadne vode niskog opterećenja zadržala dugotrajna operativna stabilnost i dobra taloživost preporuča se veličina aerobne granule manje od 1 mm (Zhang i sur., 2011; Toh i sur., 2003). Budući da bi u postrojenju punog mjerila u SBR reaktorima koji rade pri visokom OLR, za održavanje aerobnih granula te veličine bile potrebne vrlo visoke sile smicanja, što bi dovelo do visoke potrošnje energije, preporuča se da aerobne granule budu u rasponu 1-3 mm (Toh i sur., 2003; Wang i sur., 2007). Franca i sur. (2018) ukazuju da optimalna veličina aerobne granule ovisi o raznim fizikalnim i operativnim uvjetima reaktora, i o sastavu otpadne vode.

#### **5.4. Koncentracija mikrobne biomase u ovisnosti o omjeru KPK/N**

Koncentracija biomase u bioreaktoru, između ostalog, u ovisnosti je o raspoloživoj količini organskih sastojaka i o vrsti izvora ugljika, odnosno omjeru KPK/N (Yuan i sur., 2019; Long i sur., 2019; Kocaturk i Erguder, 2016; Kim i sur., 2021; Kim i Ahn, 2019; Luo i sur., 2014). Raspadanje granula, a time i ispiranje biomase iz bioreaktora, je zabilježeno pri niskim omjerima KPK/N, tako autori Kim i sur. (2021) i Kocaturk i Erguder (2016) navode omjer KPK/N 5, Kim i Ahn (2019) omjer KPK/N 2,5, i Luo i sur. (2014) omjer KPK/N 1.

U pokusima u ovom radu omjer KPK/N 1 je doveo do značajnog pada koncentracije biomase, sa 3,5 g MLSS/L na 2,1 g MLSS/L, odnosno, čak 1,4 g MLSS/L. Povećanje omjera KPK/N na 3 je i dalje bilo nepovoljno za koncentraciju biomase, te se nastavio manji pad, za 0,5 g MLSS/L. Pri omjeru KPK/N 5 koncentracija biomase se ustabilila i bila je u uskom rasponu vrijednosti 1,4-1,5 g MLSS/L. Daljnje povećanje omjera KPK/N je rezultirao porastom koncentracije biomase u reaktoru, te je pri istraženim odabranim omjerima KPK/N 7, 9, 11, 14, 17, 20 i 23 porast koncentracije biomase iznosio 0,3 g MLSS/L, 0,3 g MLSS/L, 0,3 g MLSS/L, 0,4 g MLSS/L, 0,3 g MLSS/L, 0,1 g MLSS/L i 0,3 g MLSS/L. Sumarno gledano, tijekom 250 dana vođenja pokusa koncentracija biomase je porasla za 0,6 g/L i na kraju pokusa je iznosila 4,1 g MLSS/L (Slika 18). U ovom radu pri omjerima KPK/N 1 i 3 su zabilježene niske učinkovitosti uklanjanja KPK i N (Slike 15 i 16), a dodatan razlog niskoj učinkovitosti se može pripisati i koncentraciji mikrobne biomase. Rezultati u ovom radu su u suglasju s Kocaturk i Erguder (2016), Kim i sur. (2021) i s Kim i Ahn (2019).

Kim i sur. (2021) su s acetatom kao izvorom ugljika tijekom vođenja pokusa sa zrelim granulama pri C/N omjerima 5, 10, 15 i 20 zabilježili pri omjeru C/N 5 pad koncentracije biomase s 2,43 g/L na 2,19 g/L. Daljnjim porastom omjera C/N

koncentracija biomase je rasla, i pri omjeru C/N 20, na kraju pokusa nakon 120 dana, iznosila je 3,72 g MLSS/L. Ti autori ukazuju da se pad koncentracije biomase pri omjeru C/N 5 dogodio zbog dezintegracije granula zbog nedovoljne vrijednosti organskih sastojaka, pa se mulj ispirao iz reaktora. Sugeriraju da je omjer C/N veći od 5 nužan za održavanje granula (Kim i sur., 2021).

Kim i Ahn (2019) su s acetatom kao izvorom ugljika prilikom vođenja pokusa sa zrelim granulama pri omjerima C/N 10, 7,5, 5 i 2,5 također pri višim omjerima C/N zabilježili porast koncentracije biomase (omjeri C/N 10 i 7,5), a gubitak biomase pri nižim omjerima (C/N 5 i 2,5). Pokuse su započeli s 2,87 g MLSS/L. Tijekom omjera C/N 10 koncentracija biomase je narasla na oko 3,5 g MLSS/L, zatim tijekom omjera C/N 7,5 je zabilježen manji porast biomase, na oko 3,7 g MLSS/L, tijekom omjera C/N 5 zabilježen je značajan pad koncentracije biomase na oko 3 g MLSS/L, koji se nastavio i tijekom omjera C/N 2,5, te je na kraju pokusa na dan 120 iznosila oko 2,47 g MLSS/L (Kim i Ahn, 2019).

Sličan trend su zabilježili i Kocaturk i Erguder (2016), koji su proveli pokuse s octenom kiselinom kao izvorom ugljika i zrelim granulama pri omjerima KPK/N 7,5, 10, 20 i 30, te pri omjerima KPK/N 7,5, 5, 3,5, 2 i 1. Pri omjerima KPK/N 7,5 i višim uglavnom je rasla koncentracija biomase, a pri omjerima KPK/N 5 ili nižim došlo je do desintegracije granula i ispiranja biomase iz bioreaktora. Ipak, pri omjeru KPK/N 10 došlo je do formacije flafastih granula i narušavanja forme granule, zbog toksičnosti amonijaka i visoke vrijednosti pH. Pri omjeru KPK/N 20 granule su postale još više flafaste, a pri omjeru KPK/N 30 uočena je proliferacija filamentoznih organizama (Kocaturk i Erguder, 2016).

Yuan i sur. (2019) su zabilježili porast koncentracije biomase s porastom KPK/N omjera. Proveli su pokuse s acetatom i glukozom kao izvorom ugljika, s aerobnim i anaerobnim načinom hranjenja. Koncentracija  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  u influentu je iznosila 26 mg/L, i KPK tijekom perioda 1 (1.-41. dan) 400 mg/L, i tijekom perioda 2 (42.-102. dan) 900 mg/L. Tijekom perioda granulacije MLVSS se smanjila s 5 g/L na manje od 3 g/L zbog kratkog vremena taloženja, i zatim ostala stabilna tijekom perioda 1. U periodu 2 je porast vrijednosti KPK doveo do porasta koncentracije MLVSS. U reaktoru s acetatom kao izvorom ugljika i aerobnim načinom hranjenja je porast KPK doveo do velikih granula (granule su bile pretežno veće od 2 mm ili manje od 0,5 mm) koje su se počele raspadati, i posljedično došlo je do ispiranja biomase iz sustava, a koncentracija MLVSS je pala na manje od 5 g/L. U bioreaktoru s acetatom kao izvorom ugljika i



anaerobnim načinom hranjenja, s porastom koncentracije KPK u infuentu koncentracija MLVSS je rasla, i na dan 102 je iznosila 12.2 g/L, a na dan 50 više od 50% granula je bilo u rasponu 1 -1,5 mm. U reaktoru s glukozom kao izvorom ugljika i anaerobnim načinom hranjenja porast koncentracije KPK je doveo do brzog porasta koncentracije biomase, koja je iznosila 22,4 g MLVSS/L na dan 100, a 60% granula je bilo u rasponu 1-1,5 mm.

Long i sur. (2019) su u pilot postrojenju postigli granulaciju tijekom 40 dana s otpadnom vodom iz kanalizacije septičke jame od zgrade ureda koja je bila sastava 534,96-810,32 mg KPK/L, 58,72-86,06 mg TN/L, 48,96-73,92 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L. Kada je postignuta granulacija većine mulja, koncentracija MLSS je polagano rasla u periodu 39.-121. dana sa 2,35 g/L na 5,84 g/L, i nakon toga bila u rasponu 4,44-4,97 g/L.

### **5.5. Stabilnost aerobnih granula i učinkovitost uklanjanja N, C i P u uvjetima slanosti**

Neke industrije proizvode otpadne vode visoke slanosti, poput riblje industrije (Grgas i sur., 2020; Cristovao i sur., 2015), naftne industrije, kožne industrije, poljoprivredno-prehrambene industrije (DiBella i sur., 2015; Lefebvre i Moletta, 2006), industrije ulja, proizvodnje sira, kemijske proizvodnje (Wang i sur., 2015). Otpadna vode iz tvornice obrade ribe je vrlo varijabilnog sastava, i karakteriziraju je visoke koncentracije KPK, suspendiranih čestica, ukupnog dušika, i visoka slanost (Grgas i sur., 2020; Chowdhury i sur., 2010). Biološka obrada slane otpadne vode nije jednostavna zato što povišena koncentracija soli dovodi mikrobne stanice u stanje stresa, dolazi do plazmolize stanica, inhibicije brojnih enzima i smanjenja biološke aktivnosti (Taheri i sur., 2012). Stres uzrokovan soli dovodi do promjene morfologije stanica, poput produljenja, oticanja, i skupljanja stanica. Tako se zbog stresa stanice mogu izdužiti oko 5-6 puta i postati filamentozne (Zahran, 1997). Da bi biološka obrada otpade vode visoke slanosti bila učinkovita, potrebna je primjena halofilnih mikroorganizama (Corsino i sur., 2016; Lefebvre i Moletta, 2006) ili postepena aklimatizacija aktivnog mulja (Wang i sur., 2017; Corsino i sur., 2016; DiBella i sur., 2015; Lefebvre i Moletta, 2006). Aklimatizacija se provodi na način da se mikroorganizmi koji nisu adaptirani na sol postepeno izlažu sve višoj koncentraciji soli u cilju postizanja zadovoljavajuće kvalitete efluenta pri željenoj koncentraciji soli. Uspješnost adaptacije ovisi o nekoliko čimbenika, poput vrsti mikroorganizama, fazi rasta mikroorganizama, te o brzom ili postepenom dodavanju soli. Općenito se postepeno povećanje koncentracije soli

pokazalo znatno uspješnije od brzog dodavanja soli (Lefebvre i Moletta, 2006). Kada se nehalofilne bakterije koriste za obradu otpadne vode visoke slanosti, dolazi do plazmolize zbog pucanja stanica uslijed razlike osmotskog tlaka duž stanične membrane (Dincer i Kargi, 2001). Ipak, pokazana je umjerena aklimatizacija aktivnog mulja (nehalofilnih mikroorganizama) na visoku slanost (Grgas i sur., 2020; DiBella i sur., 2015; Lefebvre i Moletta, 2006), kao i da su stabilne aerobne granule uspješno uzgojene pri 10 g NaCl/L (Taheri i sur., 2012). Također, postignuta je adaptacija aerobnog granularnog mulja na salinitet 80 g NaCl/L (Wang i sur., 2015). U oba slučaja je korištena sintetska otpadna voda i glukoza kao izvor ugljika (Wang i sur., 2015; Taheri i sur., 2012).

U ovom radu je istražen učinak slanosti na učinkovitost uklanjanja KPK, N i P kod zrelih aerobnih granula. Slanost je postepeno rasla, od 5 g NaCl/L do 40 g NaCl/L. Slanost do 20 g NaCl/L nije imala učinka na uklanjanje KPK (Slika 19), N (Slika 20) i P (Slika 21). Pri slanosti 25 g NaCl/L prosječna učinkovitost uklanjanja KPK je pala s 91% na 87,6%, i daljnjim povećanjem slanosti do 40 g NaCl/L se smanjila na 76,4% (Slika 19). Učinkovitost uklanjanja N je bila također pogođena rastućom koncentracijom soli, tako je pri slanosti 25 g NaCl/L učinkovitost uklanjanja N pala s 80% na 75,8%, i pri 40 g NaCl/L je iznosila 68,2% (Slika 20). S porastom koncentracije soli do 20 g NaCl/L prosječna učinkovitost uklanjanja PO<sub>4</sub>-P je bila u uskom rasponu vrijednosti, 68-74,23%, a daljnjim rastom koncentracije NaCl je rapidno opadala učinkovitost uklanjanja PO<sub>4</sub>-P i pri najvišoj istraženoj koncentraciji soli prosječna učinkovitost uklanjanja PO<sub>4</sub>-P je iznosila 25,11% (Slika 21).

Ovi rezultati su u suglasju s Wang i sur. (2015), koji su zrele aerobne granule podvrgli koncentraciji saliniteta 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% i 8%. Wang i sur. (2015) su zabilježili pad učinkovitosti uklanjanja KPK s 92% pri 0% saliniteta na 25% pri 8% saliniteta, i pad učinkovitosti uklanjanja NH<sub>4</sub>-N s 93% pri 0% saliniteta na 21% pri 8% saliniteta. U njihovim pokusima salinitet 0-2% je neznatno smanjio učinkovitost uklanjanja KPK i NH<sub>4</sub>-N, ali od 3% saliniteta nadalje je učinkovitost uklanjanja KPK i NH<sub>4</sub>-N brzo opadala. Wang i sur. (2015) smatraju da visoki salinitet uzrokuje plazmolizu odnosno gubitak stanične aktivnosti. Povećanje saliniteta povećava energetske osmotske pritisak između bakterija i miješane tekućine, što može dovesti do visoke mikrobne potrošnje kisika (Panswad i Anan, 1999). Suprotno, Wang i sur. (2015) su zabilježili smanjenje specifične brzine iskorištenja kisika s povišenjem saliniteta od 3% do 8%.

Prilikom obrade otpadne vode visokog saliniteta pomoću aerobnih granula postiže se učinkovito uklanjanje organskih sastojaka (Corsino i sur., 2016; Taheri i sur., 2012; Figueroa i sur., 2008), a izazov pri obradi takve otpadne vode je učinkovito uklanjanje dušika (Corsino i sur., 2016; Wang i sur., 2015; Taheri i sur., 2012; Figueroa i sur., 2008) i fosfora (Wang i sur., 2017; Pronk i sur., 2014; Basin i sur., 2011), iako su Wang i sur. (2015) zabilježili smanjenje aktivnosti mikroorganizama prilikom uklanjanja i KPK i  $\text{NH}_4\text{-N}$  s porastom saliniteta. Nitrifikanti različito reagiraju na povišenu koncentraciju soli. Tako AOB mogu tolerirati koncentraciju soli do 33 g NaCl/L (Bassin i sur., 2011), u rasponu 50-75 g NaCl/L Corsino i sur., 2016), a NOB su u potpunosti inhibirani pri 20 g NaCl/L (Pronk i sur., 2014). Pokazana je potpuna parcijalna nitrifikacija, od skoro 100% nakupljanja nitrita pri koncentraciji NaCl do 50 g NaCl/L (Wan i sur., 2014). Tako se pri obradi slane otpadne vode uobičajeno nakupljaju amonijak ili nitrit (Grgas i sur., 2020; Corsino i sur., 2016). Pri obradi sintetske slane otpadne vode postiže se umjerena učinkovitost uklanjanja dušika koja je rijetko iznad 70% (Corsino i sur., 2016). Pri obradi realne slane vode iz konzerviranja riba pri čemu je koncentracija soli iznosila do 30 g NaCl/L postignuto je potpuno uklanjanje organskih sastojaka i uklanjanje dušika niže od 40% (Figueroa i sur., 2008). Za razliku od pokusa provedenih s ciljem istraživanja učinka omjera KPK/N na uklanjanje N, gdje se odvijala istovremena nitrifikacija i denitrifikacija, i gdje je koncentracija nitrita bila na vrlo niskim razinama, a nitrat je bio glavni oblik N u efluentu, u pokusima u ovom poglavlju pri salinitetu do 20 g NaCl/L odvijala se istovremena nitrifikacija i denitrifikacija. Salinitet nije inhibirao AOB, ali NOB je, pa je u ovoj seriji pokusa koncentracija nitrata bila na vrlo niskim razinama, a glavni oblik N u efluentu je bio nitrit. Daljnje povećanje saliniteta 25 g NaCl/L do 40 g NaCl/L je djelomično inhibiralo AOB i potpuno NOB, što se odrazilo i na učinkovitost uklanjanja N, te je pri 40 g NaCl/L iznosila 68,2% (Slika 20). Ovi rezultati (Slika 20) su u suglasju s Bassin i sur. (2011), Pronk i sur. (2014), Corsino i sur. (2016). Dodatak koncentracije soli od 15 g NaCl/L je inhibiralo AOB u aerobnim granulama pri 2,5 mg DO/L (Wang i sur., 2017). Oksidacija nitrita i denitrifikacija nisu bile značajno pogođene dodatkom soli (Wang i sur., 2017). Da bi se minimizirao štetan učinak soli na nitrifikaciju, Wang i sur. (2017) sugeriraju povišenje koncentracije DO do 8 mg DO/L ili adaptaciju granula postepenim povećanjem koncentracije soli.

Povećanje koncentracije soli iznad 20 g NaCl je djelovao inhibitorno na PAO (Slika 21). Wang i sur. (2017) sugeriraju da glikogen akumulirajući organizmi imaju veću

sposobnost tolerancije na sol nego denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi, koji su bili dominantni PAO u njihovom istraživanju. Također, zabilježeno je postepeno nestajanje PAO iz mulja pri visokim koncentracijama soli, 22 i 33 g NaCl/L (Bassin i sur., 2011). U odsutnosti nitrita uklanjanje P nije bilo znatno pod utjecajem koncentracije soli do 22 g NaCl/L, međutim, 33 g NaCl/L je znatno inhibiralo uklanjanje PO<sub>4</sub>-P (Pronk i sur., 2014).

Iako se u literaturi uglavnom navodi da salinitet ne utječe na učinkovitost uklanjanja organskih spojeva (Corsino i sur., 2016; Taheri i sur., 2012; Figueroa i sur., 2008), a samo rijetki autori navode smanjenje učinkovitosti uklanjanja KPK zbog povišenja saliniteta (Wang i sur., 2015), u pokusima provedenim u ovom radu (Slika 19) salinitet je ipak smanjio učinak uklanjanja KPK.

Kako se tijekom obrade otpadne vode visokog saliniteta često nakupljaju nitriti, primjenjuje se istovremena nitritacija denitritacija u tehnologiji aerobnog granularnog mulja za postizanje veće učinkovitosti uklanjanja dušika (Corsino i sur., 2016; Lochmatter i sur., 2014; Li-long i sur., 2014; Figueroa i sur., 2008). Pomoću tehnologije aerobnog granuliranog mulja postignuta je istovremna nitritacija denitritacija sintetske otpadne vode (Lochmatter i sur., 2014; Li-long i sur., 2014) i realne otpadne vode iz konzerviranja ribe (Corsino i sur., 2016; Figueroa i sur., 2008), kao i pomoću flokuliranog aktivnog mulja prilikom obrade realne otpadne vode iz konzerviranja ribe (Grgas i sur., 2020).

Corsino i sur. (2016) su proveli pokuse s realnom otpadnom vodom iz konzerviranja ribe tijekom 78 dana u airlift SBR reaktoru laboratorijskog mjera s aerobnim granulama pri čemu su postepeno podizali koncentraciju soli od 30 g NaCl/L, 38 g NaCl/L, 50 g NaCl/L do 75 g NaCl/L. Aerobne granule su kultivirali u sintetskoj slanoj vodi s acetatom kao izvorom ugljika i NaCl kao izvorom soli tijekom 6 mjeseci. Prilagodba aktivnog mulja je provedena postupno podizanjem koncentracije soli za 5 g NaCl/L do 25 g NaCl/L. Tako prilagođeni aktivni mulj su koristili za granulaciju. Postigli su uspješnu istovremenu nitritaciju denitritaciju (iskorištenje preko 90%) pri salinitetu do 50 g NaCl/L. Koncentracija preko 50 g NaCl/L je dovela do narušavanja nitritacije, i tada se uklanjanje dušika odvijalo preko utroška dušika od strane heterotrofnih mikroorganizama za sintezu. Na uklanjanje organskih sastojaka nije imao učinak salinitet, postignuta je učinkovitost uklanjanja KPK i BPK preko 90%, nego brzina organskog opterećenja (OLR). Također, preko 95% čestičnih/suspendiranih organskih sastojaka je uklonjeno pomoću aerobnih granula (Corsino i sur., 2016) što se

pripisuje adsorpcijskom fenomenu EPS (de Kreuk i sur., 2010). Taheri i sur. (2012) objašnjavaju sposobnost aerobnih granula da izdrže visoke koncentracije soli i organskih sastojaka potrebom mikroorganizama da prilagode metabolizam uvjetima visokog osmotskog tlaka. Neke bakterije imaju mehanizam učinkovitog transporta za neke osmolite, i bakterije trebaju više energije kada koriste taj mehanizam za prilagodbu na salinitet. Zato trebaju veću količinu organskih sastojaka (Taheri i sur., 2012). S porastom koncentracije soli, rastao je i udio sadržaja EPS u granulama, pri čemu je frakcija polisaharida bila uglavnom stabilna, frakcija proteina je postepeno rasla s porastom koncentracije soli (Corsino i sur., 2016). Wang i sur. (2017) su također zabilježili veću količinu EPS s porastom saliniteta. Wan i sur. (2014) tumače da mikroorganizmi proizvode velike količine EPS, uglavnom proteina, zbog porasta osmotskog tlaka. Proteini su važni proces granulacije jer su hidrofobni, pa tvore guste i ljepljive strukture koje su osnova granula (Zhu i sur., 2012), a polisaharidi u hidrofilne komponentne (Dignac i sur., 1998). Wang i sur. (2015) su također s povišenjem saliniteta 0%-8% zabilježili porast proteina i u LB-EPS i u TB-EPS, zbog velike količine proizvedenih egzoenzima (Dincer i Kargi, 1999). Lagana razgradnja lako razgradivih organskih sastojaka, poput acetata i glukoze, može dovesti do proizvodnje visoke koncentracije egzoenzima u EPS matriksu (Spona, 2003). Visoki salinitet zbog varijacija osmotskog tlaka između bakterija i miješane tekućine također može dovesti do veće bakterijske proizvodnje egzopolisaharida (Spona, 2003; Mishra i sur., 2008). Autori nadalje ističu da sustav može tolerirati visoki salinitet sve dok je osiguran dovoljno dugi period aklimatizacije za postizanje uvjeta ustaljenog stanja (Corsino i sur., 2016). Nadalje, ukazuju da je moguća postepena aklimatizacija autotrofnih bakterija na visoki salinitet čime se izbjegava njihova inhibicija (Corsino i sur., 2016). Pokusi u ovom radu su provedeni s aerobnim granulama koje su bile okrugle, kompaktne i čvrste, dimenzija: 43% granula je bilo u rasponu 1,2-1,4 mm, 18% granula je bilo promjera 1,1 mm i 14% granula je imalo promjer 1,5 mm. Tijekom 120 dana pokusa pri čemu je salinitet postepeno rastao za 5 g NaCl/L do 40 g NaCl/L, nije zabilježeno raspadanje granula, nego lagano povećanje granula. S porastom saliniteta, rastao je udio filamentoznih bakterija u granulama.

Slične rezultate su postigli Corsino i sur. (2016) i Wang i sur. (2015). Corsino i sur., 2016 su objavili da tijekom 78 dana, koliko je trajao pokus, nije se promijenila struktura granula. Granule su bile veličine između 1,9 i 2,2 mm, pri čemu su pri salinitetu 30 g NaCl/L bile veličine 1,82 mm, a pri 75 g NaCl/L 2,21 mm (Corsino i sur., 2016).

Morfologija se promijenila zbog adsorpcije inertnog/čestičnog materijala, od pravilnih žutih granula do nepravilnih smeđih granula. Porast koncentracije soli je utjecao na taloženje granula, pa su porasli sveukupna visokzonost i sile uzgona. Brzina taloženja se s početnih 34 m/h pri salinitetu 30 g NaCl/L smanjila na 21 m/h pri 75 g NaCl/L. Tijekom vremena, udio anorganskog materijala je postupno rastao unutar granula, uglavnom zbog velike količine suspendiranih čestica u otpadnoj vodi. Također je značajno porastao i udio inertnog materijala unutar granula (Corsino i sur., 2016). Wang i sur. (2017) su također zabilježili smanjenje brzine taloženja aerobnih granula pri 15 g NaCl/L u odnosu na 0 g NaCl/L. Brzina organskog opterećenja (OLR) viša od 4,4 kg KPK/m<sup>3</sup>d je dovela do raspadanja aerobnih granula prilikom obrade efluenta iz industrije morskih plodova (Val del Río i sur., 2013). Dodatak koncentracije soli od 15 g NaCl/L nije utjecalo na proces granulacije pri 2,5 mg DO/L (Wang i sur., 2017). Također, objavljeno je da kada su reaktori naciyepljeni flokuliranim muljem, granule su bile nepravilnog oblika i nisu bile glatke, za razliku od reaktora koji su naciyepljeni zrelim granulama (Wang i sur., 2017; Taheri i sur., 2012; Figueroa i sur., 2008).

Mikroorganizmi koji su se prilagodili na visoki salinitet su postepeno postali predominantni unutar mikrobne zajednice granula (Wang i sur., 2015). Sinteza nove biomase se odvijala unatoč visokoj koncentraciji soli (Corsino i sur., 2016), međutim, Wang i sur. (2017) su objavili da je mikroban rast bio inhibiran dodatkom soli. Corsino i sur. (2016) vjeruju da su se vjerojatno halofilni ili halotolerantni sojevi razvili i kolonizirali aerobne granule tijekom postepene aklimatizacije na visoke koncentracije soli. Niže iskorištenje rasta je obično rezultat dodatne potrošnje supstrata za održavanje stanica, primjerice da se natrij drži van stanice (Wang i sur., 2017).

Dominantna mikrobna vrsta u granulama pri 10 g NaCl/L određeno pomoću 16S rDNA sekvencioniranja je bila enterobakterija *Klebsiella oxitoca* (Taheri i sur., 2012), s glukozom kao izvorom ugljika i sintetskom otpadnom vodom. Pokusi su trajali 269 dana, a formiranje granula je započelo nakon 70 dana. Nakon 1 godine pokusa granule su bile veličine 3-7 mm, a bilo je i granula velikih 12 mm. Zamijetili su dvije vrste granula. Prva skupina je bila svijetlo smeđe boje, guste, glatke površine i lako su pucale pri korištenju, imale su brzinu taloženja 1,35 cm/s. Druga skupina granula su bile crne i flafaste granule, imale su grubu površinu, bile su velike i fragmentirane, ali nisu lako pucale prilikom korištenja. Njihova brzina taloženja je iznosila 0,97 cm/s. S formiranjem druge skupine granula došlo je do ispiranja mulja iz reaktora. Autori

smatraju da su flafaste granule varijacija svijetlo smeđih granula koje su otporne na sol (Taheri i sur., 2012).

Wang i sur. (2015) su pomoću denaturirajuće gradijent gel elektroforeze (DGGE) pokazali da su *Lactococcus* sp. YM05004, *Desulfopila* sp. PR5\_F09 i *Demequina oxidasica* bile prisutne pri svim ispitivanim slanostima, 0-8%, što upućuje da te bakterije mogu tolerirati do 8% saliniteta. Bakterije *Arcobacter defluvii*, *Halomonas hydrothermalis* i *Paracoccus denitrificans* bi mogle koristiti nitrat kao akceptor elektrona (Wang i sur., 2015).

Bassin i sur. (2011) su mikrobnom analizom aerobnih granula pri porastu saliniteta 0-33 g NaCl/L pokazali da skupine *Denitromonas* i *Nitrosomonas* sp. mogu tolerirati do 33 g NaCl/L.

Wang i sur. (2017) su pokazali pomoću qPCR analize da su AOB i NOB činili 1-3% populacije cjelokupne mikrobne zajednice, kada su reaktori dobro radili, pri slanosti 0-15 g NaCl/L, pri čemu je *Nitrospira* bila dominantan NOB, a *Nitrobacter* nije detektiran.

## **5.6. Uklanjanja N, C i P u anoksično/aerobnom režimu rada SBR**

Ispitivanje kinetike je pokazalo da povećanje omjera C/N povoljno djeluje na uklanjanje N i P (Slike 22-27). Tako je tijekom anoksične faze pri omjeru C/N 1 KPK potpuno utrošen, a pri višim omjerima C/N ostatak KPK je utrošen tijekom aerobne faze. U anoksičnoj fazi je utrošeno 70 mg KPK/L, 153 mg KPK/L, 204 mg KPK/L, 311 mg KPK/L, i 331 mg KPK/L pri omjerima C/N 1, 3, 5, 7 i 9. Tijekom anoksične faze zabilježen je utrošak acetata tijekom otpuštanja PO<sub>4</sub>-P, i to 70 mg KPK/L tijekom prvih 15 min pokusa pri omjeru C/N 1, 150 mg KPK/L tijekom prvih sat vremena anoksične faze pri omjeru C/N 3, 146 mg KPK/L tijekom prvih sat vremena pri omjeru C/N 5, 168 mg KPK/L tijekom prvih sat vremena pri omjeru C/N 7 i 168 mg KPK/L tijekom prvih sat vremena pri omjeru C/N 9. Nakon otpuštanja PO<sub>4</sub>-P zabilježen je dodatan utrošak acetata, koji je iznosio 3 mg KPK/L, 58 mg KPK/L, 143 mg KPK/L i 163 mg KPK/L pri omjerima C/N 3, 5, 7 i 9. Također, tijekom anoksične faze je zabilježeno otpuštanje PO<sub>4</sub>-P koje je iznosilo 3 mg PO<sub>4</sub>-P/L tijekom prvih 15 min pokusa, a pri ostalim omjerima se otpuštanje PO<sub>4</sub>-P odvijalo tijekom prvih sat vremena u iznosu 17 mg PO<sub>4</sub>-P/L pri omjeru C/N 3, 18 mg PO<sub>4</sub>-P/L pri omjeru C/N 5, 19 mg PO<sub>4</sub>-P pri omjeru C/N 7 i 16 mg PO<sub>4</sub>-P/L pri omjeru C/N 9. Nakon što je PO<sub>4</sub>-P otpušten, do kraja anoksične faze koncentracija PO<sub>4</sub>-P je bila konstantna. Zatim,

tijekom aerobne faze je utrošeno 92 mg KPK/L, 162 mg KPK/L, 212 mg KPK/L, i 320 mg KPK/L pri omjerima C/N 3, 5, 7 i 9 (Slika 24-27). Tijekom anoksične faze su za unos acetata u svoje stanice odgovorni PAO i GAO (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017). PAO pohranjuju acetat kao PHA, za čiji unos koriste energiju od razgradnje polifosfata i ispuštanje ortofosfata iz stanica u miješanu tekućinu, i od razgradnje glikogena. GAO za pohranu acetata i sintezu PHA koriste rezerve glikogena jer nemaju metabolizam ciklusa polifosfata (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017). Tijekom anoksične faze nisu bili aktivni denitrifikanti jer nije bilo raspoloživih akceptora elektrona, nitrita i nitrata. Tijekom aerobne faze za uklanjanje KPK su vjerojatno bili odgovorni uobičajeni heterotrofni organizmi, kao i denitrifikanti, PAO i GAO koji se nalaze u dubljim dijelovima granula, u kojima vladaju anoksični uvjeti (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017).

Tijekom anoksične faze utrošeno je 1-2 mg NH<sub>4</sub>-N/L pri svim istraživanim omjerima C/N, vjerojatno za stanične potrebe. Amonijak je potpuno uklonjen pri svim istraživanim omjerima C/N, pri čemu je najniža brzina oksidacije amonijaka ostvarena pri omjeru C/N 1, i iznosila je 28,4 mg NH<sub>4</sub>-N/Lh, a pri ostalim omjerima C/N je bila u uskom rasponu vrijednosti, 35-36,4 mg NH<sub>4</sub>-N/Lh. Za oksidaciju amonijaka (Slika 24) su odgovorni amonijak oksidirajući organizmi koji oksidiraju amonijak do nitritia, i nitrit oksidirajući organizmi, koji oksidiraju nitrit do nitrata (Lochmatter i sur., 2014; Mosquera-Corral i sur., 2005; Gerardi, 2002). Kada su u aerobnim uvjetima prisutni organski sastojci, dolazi do kompeticije za otopljeni kisik između aerobnih heterotrofa, koji su dominantniji, i autotrofnih nitrifikanata, što se vidi i na provedenim pokusima u ovom radu (Wang i sur., 2018c; Lochmatter i sur., 2014; Mosquera-Corral i sur., 2005; Gerardi, 2002). Tako se pri omjeru C/N 1, gdje su organski sastojci utrošeni tijekom anoksične faze, oksidacija amonijaka se odvijala ujednačeno, a pri višim omjerima C/N, gdje je ostatak organskih sastojaka utrošen tijekom aerobne faze, vide se dvija nagiba oksidacije amonijaka. Pri omjerima C/N  $\geq 3$  oksidacija amonijaka se odvijala prvo manjom brzinom, a zatim većom brzinom, upravo zbog kompeticije za otopljeni kisik (Slika 24).

Pri svim istraženim omjerima C/N zabilježeno je nakupljanje nitrita i nitrata u aerobnoj fazi, a s porastom omjera C/N, količina nakupljenih nitrita i nitrata se smanjivala (Slike 25 i 26). Koliko će se nakupiti nitrita (nitritacija, parcijalna nitrifikacija) odnosno nitrata (nitratacija, puna nitrifikacija) ovisi o čimbenicima, poput omjera C/N, koncentraciji DO, vrijednosti pH (Wang i sur., 2018c; Lochmatter i sur., 2014; Mosquera-Corral i



sur., 2005; Gerardi, 2002). Tako je količina nakupljenih NO<sub>x</sub>-N (suma NO<sub>3</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N) pri omjerima C/N 1, 3, 5, 7 i 9 iznosila 20 mg NO<sub>x</sub>-N/L, 16 mg NO<sub>x</sub>-N/L, 13 mg NO<sub>x</sub>-N/L, 10 mg NO<sub>x</sub>-N/L i 7 mg NO<sub>x</sub>-N/L. Drugim riječima, postignuto je uklanjanje dušika od 49%, 60%, 68%, 75% i 82% pri omjerima C/N 1, 3, 5, 7 i 9 (Slike 24-26). Nitrit, međuprodukt nitrifikacije, može imati inhibicijski učinak na brojne skupine mikroorganizama u aktivnom mulju (Gerardi, 2002; Anthonisen i sur., 1976). Nitrit u ovisnosti o vrijednosti pH prelazi iz ionskog u molekularni oblik, HNO<sub>2</sub>, slobodnu nitritnu kiselinu, koja se smatra pravim inhibitorom mikrobnog metabolizma. Tako se sa smanjivanjem vrijednosti pH povećava udio slobodne nitritne kiseline, a s povećanjem vrijednosti pH povećava se udio ionskog oblika. Koncentracija slobodne nitritne kiseline je u ovisnosti o koncentraciji nitrita, pH vrijednosti i temperature miješane tekućine (Anthonisen i sur., 1976). Koncentracija nitrita je izmjerena najviša pri omjeru C/N 1 i iznosila je 9 mg NO<sub>2</sub>-N/L u 3,25 satu pokusa (Slika 26), i u ovim pokusima nitrit nije imao inhibicijski učinak na uklanjanje N i P (Slike 24-27). Iako aerobni procesi, poput uklanjanje PO<sub>4</sub>-P pomoću PAO u aerobnoj fazi, pokazuju nižu toleranciju na koncentraciju nitrita od anoksičnih procesa, poput denitrifikacije/denitritacije i uklanjanje PO<sub>4</sub>-P pomoću DPAO u anoksičnoj fazi, moguća je postepena i dugotrajna aklimatizacija aktivnog mulja na više koncentracije nitrita. Također, kada se koristi mikrobnna biomasa u granuliranom obliku, dodatno je povećana tolerancija mikroorganizama aktivnog mulja na koncentraciju nitrita, a time je i povećana uspješnost i učinkovitost bioloških procesa (Wang i sur., 2018c).

Za uklanjanje nitrita odnosno nitrata, odgovorni su denitrifikanti, koji koriste ili vanjski raspoloživi izvor ugljika kao donore elektrona, ili unutarstanično pohranjene rezerve ugljika, pri čemu nitriti i nitrati služe kao akceptori elektrona (He i sur., 2018; He i sur., 2017; Lochmatter i sur., 2014; Mosquera-Corral i sur., 2005; Gerardi, 2002). Također, DPAO i DGAO isto mogu koristiti nitrite i nitrata kao akceptore elektrona, i time pridonositi uklanjanju N (Slike 23-27) (denitrificirajuća defosfatacija) (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017). Kako se tijekom aerobne faze odvijala istovremena oksidacija amonijaka i redukcija nitrita i nitrata (Slike 23-27), u reaktoru se odvijala istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (Lochmatter i sur., 2014; Mosquera-Corral i sur., 2005; Gerardi, 2002; Scholten i sur., 1999). Denitrifikanti, PAO i GAO u pokusu pri omjeru C/N 1 su kao izvor ugljika koristili unutarstanične rezerve ugljika. Pri omjeru C/N ≥ 3 su denitrifikanti, PAO i GAO vjerojatno koristili i vanjski raspoloživi izvor ugljika, acetat, ali i unutarstanične rezerve ugljika (Slike 23-

27). Poznato je da je redukcija nitrita i nitrata brža s vanjskim, lakorazgradivim izvorom ugljika, u odnosu na unutarstanične rezerve ugljika (He i sur., 2017; Gerardi, 2002). Istovremenoj nitrifikaciji i denitrifikaciji (Slike 22-27) pridonosi biomasa u obliku aerobnih granula, jer na površinskim, valjskim slojevima granula obitavaju aerobne vrste, nitrifikanti, a u dubljim slojevima granula, gdje zbog otpora difuzije (Li i Liu, 2005) vladaju anoksični uvjeti, obitavaju anoksični mikroorganizmi, poput denitrifikanata (Wang i sur., 2018c; Mosquera-Corral i sur., 2005).

U aerobnoj fazi ostvareno je uklanjanje  $PO_4\text{-P}$  od 55%, 53%, 67%, 76% i 85% pri omjerima C/N 1, 3, 5, 7 i 9 od koncentracije  $PO_4\text{-P}$  na kraju anoksične faze (Slika 27). Biološko uklanjanje P iz otpadne vode provodi skupina organizama, PAO, kojima odgovaraju uvjeti anaerobno-aerobni, i DPAO, kojima odgovaraju uvjeti anaerobno-anoksični (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017).

U pokusima provedenim u ovom radu (Slika 27) vjerojatno su bili aktivni i provodili uklanjanje P i PAO i DPAO. U aerobnoj fazi su PAO mogli koristiti otopljeni kisik kao akceptor elektrona za unos  $PO_4\text{-P}$  u svoje stanice i njihovu pohranu kao poliP. Potrebnu energiju PAO dobivaju od razgradnje unutarstaničnih zaliha PHA. Osim unosa  $PO_4\text{-P}$ , u aerobnoj fazi se odvija i obnova rezervi glikogena i stanični rast. Kako su aerobne granule gusta i kompaktna tvorevina, u dubljim slojevima granule dolazi do gradijenta koncentracije supstrata i otopljenog kisika (Li i Liu, 2005), pa u dubljim slojevima granule vjerojatno obitavaju DPAO koji koriste nitrate i nitrite za unos  $PO_4\text{-P}$  u svoje stanice (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017). Zbog toga je povećanje omjera C/N osiguralo veću količinu ugljika koja je PAO/DPAO potrebna za unos  $PO_4\text{-P}$  u stanice, a time je i ostvareno veće uklanjanje  $PO_4\text{-P}$  iz vode (Slika 27). PAO i DPAO imaju isti metabolizam, s razlikom da je u aerobnoj fazi akceptor elektrona kisik, a u anoksičnoj fazi nitriti odnosno nitrati (Wang i sur., 2018c; He i sur., 2018; He i sur., 2017).

Pokusi kinetike su vođeni kao šaržni i u režimu anoksični uvjeti i zatim aerobni uvjeti, za ralikom od dugotrajnih pokusa koji su vođeni tijekom 250 dana koji su vođeni kao aerobni, a anaerobna faza je postojala samo tijekom punjenja reaktora. Ipak, vidljivo je da je u šaržim pokusima (Slike 23-27), koji su vođeni u anoksično aerobnom režimu postignuta veća učinkovitost uklanjanja N i P (Slike 24-27) a o važnosti anaerobne faze za učinkovito uklanjanje N i P su sugerirali i Yuan i sur. (2019) i He i sur. (2018).

### **5.7. Uklanjanja N, C i P u anoksično/aerobnom režimu pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika**

Omjer KPK/N 9 je rezultirao ukupnom učinkovitosti uklanjanja KPK 89%,  $\text{NH}_4\text{-N}$  79%, ukupnog dušika 63% i  $\text{PO}_4\text{-P}$  70% (Slika 29). Tijekom anoksične faze potpuno je utrošen KPK, a tijekom prvog sata dok se odvijalo otpuštanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  uklonjeno je 93 mg KPK/L, a ostatak KPK od 64 mg KPK/L je uklonjen do kraja anoksične faze. Prvih sat vremena anoksične faze odvijalo se otpuštanje  $\text{PO}_4\text{-P}$ , i to 9 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  pri brzini 9 mg  $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ . Također, tijekom anoksične faze utrošeno je 1 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$ . Zatim, tijekom aerobne faze odvijala se oksidacija amonijaka koja je rezultirala s 3 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  i 0 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  na kraju pokusa. Istovremeno se odvijao i unos  $\text{PO}_4\text{-P}$  u stanice i uklonjeno je 7 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  pri brzini 3,5 mg  $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ .

Omjer KPK/N 11 je pogododovao uklanjanju nutrijenata, i zabilježeno je 91% uklanjanje KPK, 82% uklanjanje  $\text{NH}_4\text{-N}$ , 68% uklanjanje ukupnog dušika i 72% uklanjanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  (Slika 30). I pri ovom omjeru je KPK potpuno utrošen tijekom anoksične faze, a tijekom prvih sat vremena odvijalo se otpuštanje  $\text{PO}_4\text{-P}$ . Otpušteno je 9 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  i pri tome je utrošeno 91 mg KPK/L, a ostatak KPK od 93 mg KPK/L je utrošeno do kraja anoksične faze. Za vrijeme aerobne faze amonijak se oksidirao do 4 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  i 0 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  na kraju pokusa.  $\text{PO}_4\text{-P}$  se uklanjao pri brzini 4 mg  $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ .

Pri omjeru KPK/N 14 tijekom anoksične faze sveukupno uklonjeno je 149 mg KPK/L pri brzini 74,5 mg KPK/Lh (Slika 31). Tijekom prvih sat vremena anoksične faze uklonjeno je 94 mg KPK/L pri brzini 94 mg KPK/Lh, a tijekom drugih sat vremena još 55 mg KPK/L pri brzini 55 mg KPK/Lh. Također, tijekom anoksične faze zabilježeno je otpuštanje  $\text{PO}_4\text{-P}$ , i to tijekom prvih sat vremena, kada se odvijao intenzivan unos acetata. Otpušteno je 9,4 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  pri brzini 9,4 mg  $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ , a tijekom drugih sat vremena koncentracije  $\text{PO}_4\text{-P}$  je ostala konstantna. Zatim, tijekom aerobne faze uklonjeno je dodatnih 112 mg KPK/L pri brzini 220 mg KPK/Lh. Sveukupno je uklonjeno 93% KPK. Tijekom anoksične faze su KPK vjerojatno trošili DPAO i GAO, i pohranjivali ga kao PHA. Organski sastojci su iscrpljeni u 2,5. satu.

Tijekom anoksične faze koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  se neznatno smanjila, za 3 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$ , vjerojatno za metaboličke potrebe mikrobnih stanica. Kako tijekom anoksičnih uvjeta nije bilo otopljenog kisika, nitrifikanti nisu provodili nitrifikaciju. Zatim, tijekom aerobne faze je uklonjeno dodatnih 14 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$ , pri brzini 8 mg  $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ , pa je sveukupno uklonjeno 17 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  ili 85%  $\text{NH}_4\text{-N}$ . Oksidacija  $\text{NH}_4\text{-N}$  je bila spora

zbog niske koncentracije otopljenog kisika (0,1-0,6 mg DO/L) (Slika 31). Poznato je da je nitrifikantima za učinkovitu nitrifikaciju potrebna koncentracija otopljenog kisika oko 2 mg DO/L (Gerardi, 2002). Skoro potpunu nitrifikaciju pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika su zabilježili i Zheng i sur. (2009) pri koncentraciji otopljenog kisika u rasponu 0,15-0,45 mg DO/L. Ti autori su pri postavkama reaktora anaerobno-aerobno pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika postigli učinkovitost uklanjanja ukupnog dušika i ukupnog fosfora 61% i 61% kada su pokuse vodili s komunalnom otpadnom vodom bez dodanog izvora ugljika. Kada su dodali i octenu kiselinu kao izvor ugljika, učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora je iznosila 81% i 95%, a kada su kao izvor ugljika dodali alkalnu fermentacijsku tekućinu od aktivnog mulja učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora je iznosila 83% i 97% (Zheng i sur., 2009).

Tijekom nitrifikacije amonijak se oksidira preko nitrita do nitrata (Gerardi, 2002). Tijekom anoksične faze nije zabilježena akumulacija ni nitrita nitrata. Tijekom aerobne faze se  $\text{NH}_4\text{-N}$  prevodio do  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Tako je zabilježena najviša koncentracija  $\text{NO}_2\text{-N}$  od 2 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  u 3,25. satu, koji su se do kraja ciklusa potpuno denitrificirali. Najviša koncentracija  $\text{NO}_3\text{-N}$  od 6 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  je zabilježena u periodu 3.-3,5. sata, a do kraja ciklusa su pali na 3 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ . Kada se uzmu u obzir promjene  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$  tijekom ciklusa, učinkovitost uklanjanja ukupnog dušika je iznosila 70%. Da je bila viša koncentracija otopljenog kisika tijekom aerobne faze,  $\text{NH}_4\text{-N}$  bi se potpuno oksidirao do  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$ , pa bi vjerojatno i ukupna učinkovitost uklanjanja ukupnog dušika bila viša. Istovremeno s nitrifikacijom, odvijala se i denitrifikacija, djelomično s vanjskim raspoloživim izvorom ugljika – acetatom, i djelomično s unutarstaničnim rezervama ugljika kao donorima elektrona za denitrifikante.  $\text{NH}_4\text{-N}$  se oksidirao uglavnom do  $\text{NO}_3\text{-N}$ , a  $\text{NO}_2\text{-N}$  je zabilježen u niskim koncentracijama zbog niske koncentracije otopljenog kisika (Slika 31).

Tijekom anoksične faze zabilježeno je otpuštanje  $\text{PO}_4\text{-P}$  od 9,4 mg/L pri brzini 9,4 mg  $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ . U aerobnoj fazi je bila vrlo niska koncentracija otopljenog kisika, 0,1-0,6 mg DO/L, pa se tijekom aerobne faze vjerojatno odvijala kompeticija za otopljeni kisik između nitrifikanata i PAO koji koriste kisik kao akceptore elektrona. Uklanjanju  $\text{PO}_4\text{-P}$  su vjerojatno pridonijeli i DPAO, koji su koristili  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  kao akceptore elektrona za unos i pohranu  $\text{PO}_4\text{-P}$  u svoje stanice, te tako pridonijeli i uklanjanju ukupnog dušika. Tijekom aerobne faze uklonjeno je 9,5 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  pri brzini 4,3 mg  $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$  i ostvarena učinkovitost uklanjanja  $\text{PO}_4\text{-P}$  od 91% od koncentracije  $\text{PO}_4\text{-P}$  na kraju anoksične faze (Slika 31).

Omjer KPK/N 17 je rezultirao s 93% uklanjanjem KPK, 81% uklanjanja  $\text{NH}_4\text{-N}$ , 71% uklanjanja ukupnog dušika i 75% uklanjanja  $\text{PO}_4\text{-P}$  (Slika 32). Organski sastojci su većinom utrošeni tijekom anoksične faze, i to 166 mg KPK/L pri brzini 83 mg KPK/Lh, odnosno 47%, a ostatak KPK se uklonio tijekom aerobne faze, 158 mg KPK/L pri brzini 314 mg KPK/Lh. Tijekom prvih sat vremena anoksične faze otpušteno je 10 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$ . Oksidacija  $\text{NH}_4\text{-N}$  se provodila tijekom aerobne faze pri brzini 8 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$  i rezultirala je s 2 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  i 0 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ . Tijekom aerobne faze uklonjeno je 9 mg  $\text{PO}_4\text{-P/L}$  pri brzini 4,5 mg  $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ .

### **5.8. FISH analiza mikrobnih agregata**

U pokusima disertacije FISH metoda poslužila je za dokumentiranje – vizualizaciju i dokazivanje mikrobnih klastera ciljano obojanih odgovarajućim probama a odgovornih za procese uklanjanja dušika – za provođenje nitritacije (vrste AOB, Slika 33), nitratacije (vrste NOB, Slika 34) i denitrifikacije (denitrifikanti, Slika 35), kao i vrsta koje akumuliraju fosfate u aerobnim uvjetima (vrste PAOs, Slika 36), vrsta koje uklanjanju fosfate u anoksičnim vjetima (vrste DPAOs, Slika 38), i skladištenje glikogena (vrste GAOs, Slike 37 i 39).

U svim uzorcima bojanim ciljanim probama CLSM analizom je dokazano i fotografijama dokumentirano prisustvo mikrobnih klastera koji su odgovorni i provode mikrobne procese uklanjanja N i P.

Za detekciju svih bakterija korištene su EUBmix probe.

## 6. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata te kritičke analize i uspoređujući s recentnom relevantnom literaturom proizlaze slijedeći zaključci:

1. Povećanjem omjera KPK/N povećava se učinkovitost uklanjanja KPK, od 57% pri KPK/N 1 do 96% pri KPK/N 23, s većom brzinom povećanja uklanjanja KPK do omjera KPK/N 11 pri čemu je postignuto uklanjanje KPK 90%, a zatim je daljnje povećanje učinkovitosti uklanjanja KPK slabijeg intenziteta.
2. Povećanjem omjera KPK/N povećava se učinkovitosti uklanjanja N, te je ostvareno uklanjanje N od 40% pri KPK/N 1, od 54% pri KPK/N 3, te daljnje ujednačeno povećanje brzine uklanjanja N do vrijednosti 80% pri omjeru KPK/N 23.
3. S povećanjem omjera KPK/N do vrijednosti omjera KPK/N 17 zabilježen je trend povećanja učinkovitosti uklanjanja P te je pri omjeru KPK/N 17 određena najveća učinkovitost uklanjanja P od 69,3%, a daljnjim povećanjem omjera KPK/N učinkovitost uklanjanja P se smanjivala.
4. Porastom protoka zraka – povećanjem koncentracije otopljenog kisika raste učinkovitost uklanjanja KPK, međutim, učinkovitost uklanjanja N i P raste s povećanjem koncentracije otopljenog kisika do 2 mg DO/L, dok se daljnjim povećanjem koncentracije otopljenog kisika učinkovitost uklanjanja N i P smanjuje.
5. Povećanje protoka zraka rezultira trendom smanjenja promjera granule.
6. Niži omjer KPK/N, do omjera KPK/N 17, rezultirao je čvrstim granulama jasnih rubova, dok je omjer KPK/N 23 rezultirao velikim, paperjastim i labavim granulama.
7. Povećanje saliniteta negativno djeluje na učinkovitost uklanjanja KPK, N i P.
8. U anoksično/aerobnom procesu, pri 2 mg DO/L u aerobnoj fazi, povećanje omjera C/N povoljno djeluje na uklanjanje N i P, pa je pri C/N 1 tijekom anoksične faze KPK potpuno utrošen dok je pri višim odabranim omjerima C/N preostali dio KPK koji nije utrošen u anoksičnoj fazi procesa utrošen tijekom aerobne faze. U aerobnoj fazi ostvareno je uklanjanje  $PO_4\text{-P}$  od 55%, 53%, 67%, 76% i 85% pri omjerima C/N 1, 3, 5, 7 i 9. Tijekom aerobne faze odvijala se istovremena oksidacija amonijaka i redukcija nitrita i nitrata, odnosno u

reaktoru se odvijala istovremena nitrifikacija i denitrifikacija. Denitrifikanti, PAOs i GAOs u pokusu pri omjeru C/N 1 su kao izvor ugljika koristili unutarstanične rezerve ugljika, dok pri omjeru  $C/N \geq 3$  denitrifikanti, PAOs i GAOs koristili su i vanjski raspoloživi izvor ugljika, acetat, ali i unutarstanične rezerve ugljika.

9. U anoksično/aerobnom procesu pri  $< 1$  mg DO/L u aerobnoj fazi procesa, zabilježen je trend povećanja učinkovitosti uklanjanja organskih i anorganskih sastojaka do omjera KPK/N 14, a pri omjeru KPK/N 17 zabilježeno je smanjenje učinkovitosti uklanjanja  $NH_4-N$  i  $PO_4-P$ .
10. Pohranjivanjem AGS na  $+4$  °C u vodovodnoj vodi tijekom 12 mjeseci granule ne mijenjaju boju, veličina se malo smanji, i imaju blago eliptični oblik. Nakon 12 dana granule se reaktiviraju, a nakon 16 dana pokazale su aktivnost kao prije pohranjivanja.

## 7. LITERATURA

- Abdullah, N., Yuzir, A., Curtis, T.P., Yahya, A., Ujang, Z. (2013) Characterization of aerobic granular sludge treating high strength agro-based wastewater at different volumetric loadings. *Bioresour Technol.* **127**, 181-187. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.047
- Adav, S. S., Lee, D. J., Lai, J. Y. (2009b) Proteolytic activity in stored aerobic granular sludge and structural integrity. *Bioresour Technol.* **100**(1), 68-73. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.045
- Adav, S. S., Lee, D. J., Lai, J. Y. (2010b) Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic load rates. *Appl Microbiol Biotechnol.* **85**(5), 1601-1610. doi:10.1007/s00253-009-2317-9
- Adav, S. S., Lee, D. J., Lai, J. Y. (2010c) Aerobic granules with inhibitory strains and role of extracellular polymeric substances. *J Hazard Mater.* **174**(1-3), 424-428. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.09.070
- Adav, S.S., Lee D.J., Show K.Y., Tay J.H. (2008a) Aerobic granular sludge: recent advances. *Biotechnol Adv.* **26**(5), 411-423. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.05.002
- Adav, S.S., Lee, D.J., Tay, J.H. (2008b) Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Res.* **42**(6-7), 1644-1650. doi:10.1016/j.watres.2007.10.013
- Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J. Y. (2009a) Aerobic granulation in sequencing batch reactors at different settling times. *Bioresour Technol.* **100**(21), 5359-5361. doi:10.1016/j.biortech.2009.05.058
- Adav, S.S., Lee, D.J., Lai, J.Y. (2010a) Microbial community of acetate utilizing denitrifiers in aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol.* **85**(3), 753-762. doi:10.1007/s00253-009-2263-6
- Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2001) Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions. *J Biosci Bioeng.* **92**(5), 442-446. doi:10.1263/jbb.92.442
- Almeida, J.S., Reis, M.A., Carrondo, M.J. (1995) Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol Bioeng.* **46**(5), 476-484. doi:10.1002/bit.260460512
- Amann, R., Fuchs, B.M., Behrens, S. (2001) The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Curr Opin Biotechnol.* **12**(3), 231-236. doi:10.1016/s0958-1669(00)00204-4
- Amann, R.I. (1995) Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molec Ecol.* **4**(5), 543-554. doi:10.1111/j.1365-294X.1995.tb00255.x



- Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* **56**(6), 1919-1925. doi:10.1128/aem.56.6.1919-1925.1990
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**(1), 143-169. doi:10.1128/mr.59.1.143-169.1995
- Antoniou, P., Hamilton, J., Koopman, B., Jain, R., Holloway, B., Lyberatos, G., Svoronos, S.A. (1990) Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Res.* **24**(1), 97-101.
- Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B., Srinath, E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed.* **48**(5), 835-852.
- APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of Wastewater and Wastewater Treatment, 20th Edition, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington.
- Bagheri, M., Mirbagheri, S.A., Bagheri, Z., Kamarkhani, A.M. (2015) Modeling and optimization of activated sludge bulking for a real wastewater treatment plant using hybrid artificial neural networks-genetic algorithm approach. *Process Saf Environ Prot.* **95**, 12-25. doi:10.1016/j.psep.2015.02.008
- Barr, J.J., Cook, A.E., Bond, P.L. (2010a) Granule formation mechanisms within an aerobic wastewater system for phosphorus removal. *Appl Environ Microbiol.* **76**(22), 7588-7597. doi:10.1128/AEM.00864-10
- Bassin, J.P., Pronk, M., Muyzer, G., Kleerebezem, R., Dezotti, M., van Loosdrecht, M.C.M. (2011) Effect of elevated salt concentrations on the aerobic granular sludge process: linking microbial activity with microbial community structure. *Appl Environ Microbiol.* **77**(22), 7942-7953. doi:10.1128/AEM.05016-11
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L.Y., Heipieper, H.J. (2012) Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* **78**(17), 6217-6224. doi:10.1128/AEM.01525-12
- Bengtsson S., de Blois, M., Wilén, B.M., Gustavsson, D. (2018) A comparison of aerobic granular sludge with conventional and compact biological treatment technologies. *Environ Technol.* **40**(21), 2769-2778. doi:10.1080/09593330.2018.1452985
- Beun, J.J., Paletta, F., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2000a) Stoichiometry and kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures. *Biotechnol Bioeng.* **67**(4), 379-389. doi:10.1002/(sici)1097-0290(20000220)67:4<379::aid-bit>3.0.co;2-2

- Beun, J.J., Verhoef, E.V., van Loosdrecht, M.C.M. (2000b) Stoichiometry and kinetics of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism under denitrifying conditions in activated sludge cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 496-507.
- Beun, J.J., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2001) N-removal in a granular sludge sequencing batch reactor. *Biotechnol Bioeng.* **75**(1), 82-92. [doi:10.1002/bit1167](https://doi.org/10.1002/bit1167)
- Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J. (1999) Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* **33**(10), 2283-2290. [doi:10.1016/S0043-1354\(98\)00463-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00463-1)
- Beun, J.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2002) Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Res.* **36**(3), 702-712. [doi:10.1016/s0043-1354\(01\)00250-0](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00250-0)
- Bitton, G. (2005) *Wastewater microbiology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey 86, 226-252
- Bos, R., van de Mei, H. C., Busscher, H. J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Review*, **23**(2), 179-230. [doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00396.x)
- Carrera, P., Campo, R., Méndez, R., Bella, D.G., Campos, J.L., Corral, A.M., Rio, A.V. (2019) Does the feeding strategy enhance the aerobic granular sludge stability treating saline effluents. *Chemosphere* **226**, 865-873. [doi:10.1016/j.chemosphere.2019.03.127](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.127)
- Chen, Y., Jiang, W., Liang, D.T., Tay, J.H. (2007) Structure and stability of aerobic granules cultivated under different shear force in sequencing batch reactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* **76**(5), 1199-1208. [doi:10.1007/s00253-007-1085-7](https://doi.org/10.1007/s00253-007-1085-7)
- Chen, Y., Jiang, W.J., Liang, D.T., Tay, J.H. (2008) Aerobic granulation under the combined hydraulic and loading selection pressures. *Bioresour Technol.* **99**(16), 7444-7449. [doi:10.1016/j.biortech.2008.02.028](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.028)
- Chen, H., Li, A., Cui, D., Cui, C., Ma, F. (2019) Evolution of microbial community and key genera in the formation and stability of aerobic granular sludge under a high organic loading rate. *Bioresour Technol Rep.* **7**(5), 100280. [doi:10.1016/j.biteb.2019.100280](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100280)
- Choi, S.W. (2011) Bio-kinetic and design analysis of a sequencing batch reactor by aerobic granular sludge. *J Korean Soc Environ Eng.* **33**, 275-280. [doi:10.4491?KSEE.2011.33.4.275](https://doi.org/10.4491/KSEE.2011.33.4.275)
- Chowdhury, P., Viraraghavan, T., Srinivasan, A. (2010) Biological treatment process for fish processing wastewater - a review. *Bioresour Technol.* **101**(2), 439-449. [doi:10.1016/j.biortech.2009.08.065](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.065)

- Coma, M., Puig, S., Balaguer, M.D., Colprim, J. (2012b) The role of nitrate and nitrite in a granular sludge process treating low-strength wastewater. *Chem Eng J.* **164**(1), 208-213. doi:[10.1016/j.cej.2010.08.063](https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.08.063)
- Coma, M., Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P. L. (2012a) Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresour Technol.* **103**(1), 101-108. doi:[10.1016/j.biortech.2011.10.014](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.014)
- Corsino, S.F., Capodici, M., Morici, C., Torregrossa, M. (2016) Simultaneous nitrification-denitrification for the treatment of high-strength nitrogen in hypersaline wastewater by aerobic granular sludge. *Water Res.* **88**, 329-336. doi:[10.1016/j.watres.2015.10.041](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.041)
- Corsino, S.F., di Biase, A., Devlin, T.R., Munz, G., Torregrossa, M., Oleszkiewicz, J.A. (2017) Effect of extended famine conditions on aerobic granular sludge stability in the treatment of brewery wastewater. *Bioresour Technol.* **226**, 150-157. doi:[10.1016/j.biortech.2016.12.026](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.026)
- Corsino, S.F., Trapani, D.D., Torregrossa, M., Viviani, G. (2018) Aerobic granular sludge treating high strength citrus wastewater: Analysis of pH and organic loading rate effect on kinetics, performance and stability. *J Environ Manage.* **214**, 23–35. doi:[10.1016/j.jenvman.2018.02.087](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.02.087)
- Cristovao, R., Botelho, C.M., Martins, R.J.E., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A.R. (2015) Fish canning industry wastewater treatment for water reuse e a case study. *J Clean Prod.* **87**, 603-612. doi:[10.1016/j.jclepro.2014.10.076](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.10.076)
- Crocetti, G.R., Banfield, J.F., Keller, J., Bond, P.L., Blackall, L.L. (2002) Glycogen accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* **148**(11), 3353-3364. doi:[10.1099/002212287-148-11-3353](https://doi.org/10.1099/002212287-148-11-3353)
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackall, L.L. (2000) Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl Environ Microbiol.* **66**(3), 1175-1182. doi:[10.1128/AEM.66.3.1175-1182.2000](https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1175-1182.2000)
- Cydzik-Kwiatkowska, A. (2015) Bacterial structure of aerobic granules is determined by aeration mode and nitrogen load in the reactor cycle. *Bioresour Technol.* **181**, 312-320. doi:[10.1016/j.biortech.2015.01.101](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.101)
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Bernat, K., Zielińska, M., Wojnowska-Baryła, I. (2014) Cycle length and COD/N ratio determine properties of aerobic granules treating high-nitrogen wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng.* **37**(7), 1305-1313. doi:[10.1007/s00449-013-1102-4](https://doi.org/10.1007/s00449-013-1102-4)
- Dahalan, F. A., Abdullah, N., Yuzir, A., Olsson, G., Salmiati, Hamzah, M., Din, M. F. M., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Anuar, A. N., Noor, Z. Z., Ujang, Z. (2015) A proposed aerobic granules size development scheme for aerobic granulation process. *Bioresour Technol.* **181**(5), 291-296. doi:[10.1016/j.biortech.2015.01.062](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.062)

- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol.* **22**(3), 434-444. doi:10.1016/S0723-2020(99)80053-8
- Dangcong, P., Bernet, N., Delgenes, J.-P., Moletta, R. (1999) Aerobic granular sludge—a case report. *Water Res.* **33**(3), 890-893. doi:10.1016/S0043-1354(98)00443-6
- Dangcong, P., Bernet, N., Delgenes, J.P., Moletta, R. (2001) Simultaneous organic carbon and nitrogen removal in an SBR controlled at low dissolved oxygen concentration. *J Chem Technol Biotechnol.* **76**(6), 553-558. doi:10.1002/jctb.419
- De Bruin L., De Kreuk M., Van Der Roest H., Uijterlinde C., van Loosdrecht M. (2004) Aerobic granular sludge technology: an alternative to activated sludge? *Water Sci Technol.* **49**(11-12), 1-7. doi:10.2166/wst.2004.0790.
- de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2005a) Simultaneous COD, nitrogen and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnol Bioeng.* **90**(6), 761-769. doi:10.1002/bit.20470
- de Kreuk, M.K., Kishida, N., Tsuneda, S., van Loosdrecht, M.C.M. (2010) Behavior of polymeric substrates in an aerobic granular sludge system. *Water Res.* **44**(20), 5292-5983. doi:10.1016/j.watres.2010.07.033
- de Kreuk, M.K., Kishida, N., van Loosdrecht, M.C.M. (2007a) Aerobic granular sludge – state of the art. *Water Sci Technol.* **55**(8-9), 75-81. doi:10.2166/wst.2007.244
- de Kreuk, M.K., McSwain, B S., Bathe, S., Tay, J., Schwarzenbeck, S.T.L., Wilderer, P.A. (2005b) Aerobic granular sludge, water and environmental management series. *Munich: IWA Publishing:* 165-169.
- de Kreuk, M.K., Pronk, M., van Loosdrecht, M.C.M. (2005c) Formation of aerobic granules and conversion processes in an aerobic granular sludge reactor at moderate and low temperatures. *Water Res.* **39**(18), 4476-4484. doi:10.1016/j.watres.2005.08.031
- de Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Sci Technol.* **49**(11-12), 9-17. doi:10.2166/wst.2004.0792
- de Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M. (2005) Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge. *Biotechnol Bioeng.* **90**(6), 761-769. doi:10.1002/bit.20470
- de Kreuk, M.K., Picioreanu, C., Hosseini, M., Xavier, J.B., van Loosdrecht M.C.M. (2007b) Kinetic model of a granular sludge SBR: influences on nutrient removal. *Biotechnol Bioeng.* **97**(4), 801-815. doi:10.1002/bit.21196
- Devlin, T.R., di Biase, A., Kowalski, M., Oleszkiewicz, J.A. (2017) Granulation of activated sludge under low hydrodynamic shear and different wastewater

- characteristics. *Bioresour Technol.*, **224**, 229-235. doi:10.1016/j.biortech.2016.11.005
- Di Bella, G., Di prima, N., Di Trapani, D., Freni, G., Giustra, M.G., Torregrossa, M., Viviani, G. (2015) Performance of membrane bioreactor (MBR) systems for the treatment of shipboard slops: assessment of hydrocarbon biodegradation and biomass activity under salinity variation. *J Hazard Mater.* **300**, 765-778. doi:10.1016/j.hazmat.2015.08.021
- Di Bella, G., Torregrossa, M. (2013) Simultaneous nitrogen and organic carbon removal in aerobic granular sludge reactors operated with high dissolved oxygen concentration. *Bioresour Technol.* **142**, 706-713. doi:10.1016/j.biortech.2013.05.060
- Dignac, M.F., Urbrain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P. (1998) Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Sci Technol.* **38**(8-9), 45-53. doi:10.1016/S0273-1223(98)00676-3
- Dincer, A.R., Kargi, F. (2001) Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochem.* **36**(8-9), 901-906. doi:10.1016/S0032-9592(00)00287-9
- Dulekgurgen, E., Yilmaz, M., Wilderer, P.A. (2008) Shape and surface topology of anaerobic/aerobic granules influenced by shearing conditions. 4th IWA Specialized conference on sequencing batch reactor technology, Rome, Italy, pp. 311-320.
- Ekama, G., Wentzel, M.C., van Loosdrecht, M.C.M. (2020) Nitrogen removal u *Biological Wastewater Treatment* drugo izdanje (Chen, G, van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G., Brdjanovic, D. ured.), IWA Publishing, London, str.161-239
- Etterer, T., Wilderer, P.A. (2001) Generation and properties of aerobic granular sludge. *Water Sci Technol.* **43**(3), 19-26. doi:10.2166/wst.2001.0114
- Feng, Q., Cao, J., Chen, L.N., Guo, C.Y., Tan, J., Xu, H. (2012) Effect of carbon source on biological nitrogen removal of aerobic granules in sequencing batch reactors. *J Food Agric Environ.* **10**(2), 1110-1113.
- Figuroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R. (2008) Treatment of saline wastewater in SBR aerobic granular reactors. *Water Sci Technol.* **58**(2), 479-485. doi:10.2166/wst.2008.406
- Franca, R.G.D., Pinheiro, H.M., van Loosdrecht, M.C.M., Lourenço, N.D. (2018) Stability of aerobic granules during long-term bioreactor operation. *Biotechnol Adv.* **36**(1), 228-246. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.005
- Flowers, J.J., He, S., Yilmaz, S., Noguera, D.R., McMahon, K.D. (2009) Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different 'Candidatus accumulibacter' clades. *Environ Microbiol Rep.* **1**(6), 583-5888. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00090.x

- Fuerhacker, M., Bauer, H., Ellinger, R., Sree, U., Schmid, H., Zibuschka, F., Puxbaum, H. (2000) Approach for a novel control strategy for simultaneous nitrification and denitrification in activated sludge reactors. *Water Res.* **34**(9), 2499-2506. [doi:10.1016/S0043-1354\(00\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00016-6)
- Gao, D., Liu, L., Liang, H., Wu, W.M. (2011) Aerobic granular sludge: characterization, mechanism of granulation and application to wastewater treatment. *Crit Rev Biotechnol.* **31**(2), 137-152. [doi:10.3109/07388551.2010.497961](https://doi.org/10.3109/07388551.2010.497961)
- Gao, X., Zhang, T., Wang, B., Xu, Z., Zhang, L., Peng, Y. (2020) Advanced nitrogen removal of low C/N ratio sewage in a anaerobic/aerobic/anoxic process through enhanced post-endogenous denitrification. *Chemosphere* **252**, 126624. [doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126624](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126624)
- Gao, D.W., Liu, L., Liang, H. (2013) Influence of aeration intensity on mature aerobic granules in sequencing batch reactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**(9), 4213-4219. [doi:10.1007/s00253-012-4226-6](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4226-6)
- Gayle, B.P., Boardman, G.D., Sherrard, J.H., Benoit, R.E. (1989) Biological Denitrification of Water. *J. Environ. Eng.* **115**(5), 930-943. [doi:10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1989\)115:5\(930\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1989)115:5(930))
- Gerardi, M.H. (2002) Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process, 1st ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Ge, S., Zhu, Y., Lu, C., Wang, S., Peng, Y. (2012) Full-scale demonstration of step feed concept for improving an anaerobic/anoxic/aerobic nutrient removal process. *Bioresour Technol.* **120**, 305-313. [doi:10.1016/j.biortech.2012.06.030](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.030)
- Ginige, M.P., Keller, J., Blackall, L.L. (2005) Investigation of an Acetate-Fed Denitrifying Microbial Community by Stable Isotope Probing, Full-Cycle rRNA Analysis, and Fluorescent *In Situ* Hybridization-Microautoradiography. *Appl Environ Microbiol.* **71**(12), 8683-8691. [doi:10.1128/AEM.71.12.8683-8691.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8683-8691.2005)
- Glass, C., Silverstein, J., Oh, J. (1997) Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Water Environ Res.* **69**(6), 1086-1093.
- Gonzales-Gil, G., Holliger, C. (2011) Dynamics of microbial community structure of and enhanced biological phosphorus removal by aerobic granules cultivated on propionate and acetate. *Appl Environ Microbiol.* **77**(22), 8041-8051. [doi:10.1128/AEM.05738-11](https://doi.org/10.1128/AEM.05738-11)
- Gonzales-Gil, G., Holliger, C. (2014) Aerobic granules: Microbial landscape and architecture, stages, and practical implications. *ASM Journals, Appl Environ Microbiol.* **80**(11), 3433-3441. [doi:10.1128/AEM.00250-14](https://doi.org/10.1128/AEM.00250-14)
- Grady, C.P.L.Jr., Daigger, G.T., Lim, H.C. (1999) Biological Wastewater Treatment, 2nd, Marcel Dekker, Inc., New York.

- Grgas, D., Ugrina, M., Toromanović, M., Ibrahimpašić, J., Štefanac, T., Landeka Dragičević, T. (2020) Fish canning wastewater treatment in sequencing batch reactor with activated sludge. *Holistic Approach Environ.* **10**(2), 29-34. [doi:10.33765/thate.10.2.1](https://doi.org/10.33765/thate.10.2.1)
- Guo, H.Y., Zhou, J.T., Su, J., Zhang, Z.Y. (2005) Integration of nitrification and denitrification in airlift bioreactor. *Biochem Eng J.* **23**(1), 57–62. [doi:10.1016/j.bej.2004.05.010](https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.05.010)
- Gupta, A.B. (1997) *Thiosphaera pantotropha*: a sulphur bacterium capable of simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Enzyme Microb Technol* **21**(8), 589-595. [doi:10.1016/S0141-0229\(97\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00070-7)
- Hamza R., Rabii A., Ezzahraoui F.-Z., Morgan G., Iorhemen O.T. (2021) A review of the state of development of aerobic granular sludge technology over the last 20 years: Full-scale applications and resource recovery. *Case Stud Chem Environ Eng.* **5**, 100173. [doi:10.1016/j.cscee.2021.100173](https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100173).
- Hamza, R.-A., Zaghloul, M.S., Iorhemem, O.T., Sheng, Z., Tay, J.H. (2019) Optimization of organics to nutrients (COD:N:P) ratio for aerobic granular sludge treating high-strength organic wastewater. *Sci Total Environ.* **650**(2), 3168-3179. [doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.026](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.026)
- He, Q., Chen, L., Zhang, S., Chen, R., Wang, H. (2019) Hydrodynamic shear force shaped the microbial community and function in the aerobic granular sequencing batch reactors for low carbon to nitrogen (C/N) municipal wastewater treatment. *Bioresour Technol.* **271**, 48-58. [doi:10.1016/j.biortech.2018.09.012](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.012)
- He, Q., Chen, L., Zhang, S., Wang, L., Liang, J., Xia, W., Wang, H., Zhou, J. (2018a) Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in aerobic granular sequencing batch reactors with high aeration intensity: impact of aeration time. *Bioresour Technol.* **263**, 214-222. [doi:10.1016/j.biortech.2018.05.007](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.007)
- He, Q., Song, Q., Zhang, S., Zhang, W., Wang, H. (2018b) Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sequencing batch reactor with mixed carbon sources: reactor performance, extracellular polymeric substances and microbial successions. *Chem Eng J.* **331**, 841-849. [doi:10.1016/j.cej.2017.09.060](https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.060)
- He, Q., Zhang, W., Zhang, S., Wang, H. (2017b) Enhanced nitrogen removal in an aerobic granular sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, endogenous denitrification and phosphorus removal with low superficial gas velocity. *Chem Eng J.* **326**, 1223-1231. [doi:10.1016/j.cej.2017.06.071](https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.06.071)
- He, H., Chen, Y., Li, X., Cheng, Y., Yang, C., Zeng, G. (2017a) Influence of salinity on microorganisms in activated sludge processes: A review. *Int Biodeterior Biodegrad.* **119**, 520–527. [doi:10.1016/j.ibiod.2016.10.007](https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.007)
- He, Q.L., Zhang, S.L., Zou, Z.C., Wang, H.Y. (2016) Enhanced formation of aerobic granular sludge with yellow earth as nucleating agent in a sequencing batch reactor.

*IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 39, 012025.  
[doi:10.1088/1755-1315/39/1/012025](https://doi.org/10.1088/1755-1315/39/1/012025).

- Hendrich, M., Logan, K., Andersson, D., Arciero, J. (1994) The active site of hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: evidence for a new metal cluster in enzymes. *J Am Chem Soc.* **116**, 11961-11968.
- Henriet, O., Meunier, C., Henry, P., Mahillon, J. (2016) Improving phosphorus removal in aerobic granular sludge processes through selective microbial management. *Bioresour Technol.* **211**, 298-306. [doi:10.1016/j.biortech.2016.03.099](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.099)
- Henze, M., Kristensen, G.H., Strube, R. (1994) Rate-capacity characterization of wastewater for nutrient removal processes. *Water Sci Technol.* **29**(7), 101-102. [doi:10.2166/wst.1994.0318](https://doi.org/10.2166/wst.1994.0318)
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J.I.C., Arvin, E. (2002) *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes.*, 3rd ed., Springer, Berlin.
- Henze, M., van Loosdrecht, M.C.M., Ekama, G.A., Brdjanovic, D. (2008) *Biological wastewater treatment: Principles, modelling and design.* IWA Publishing
- Holman, J.B., Wareham, D.G. (2005) COD, ammonia and dissolved oxygen time profiles in the simultaneous nitrification/denitrification process. *Biochemical Engineering Journal*, **22**(2), 125-133. [doi:10.1016/j.bej.2004.09.001](https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.001)
- Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., Arciero, D.M. (1997) Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **71**, 59-67. [doi:10.1023/A:1000133919203](https://doi.org/10.1023/A:1000133919203)
- Hou Y., Gan C., Chen R., Chen Y., Yuan S., Chen Y. (2021) Structural characteristics of aerobic granular sludge and factors that influence its stability: A mini review. *Water* **13**, 2726. [doi:10.3390/w13192726](https://doi.org/10.3390/w13192726).
- Hu, J.Y., Ong, S.L., Ng, W.J., Lu, F., Fan, X.J. (2003) A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Res.* **37**(14), 3463-3471. [doi:10.1016/S0043-1354\(03\)00205-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00205-7)
- Hu, L., Wang, J., Wen, X., Qian, Y. (2005) Study on performance characteristics of SBR under limited dissolved oxygen. *Process Biochem* **40**(1), 293-296. [doi:10.1016/j.procbio.2004.01.015](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.015)
- Jiang, H.L., Tay, J.L., Tay, S.T.L. (2002) Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Lett Appl Microbiol.* **35**(5), 439-445. [doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01217.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01217.x)
- Jiang, Y., Yang, K., Shang, Y., Zhang, H., Wei, L., Wang, H. (2019) Response and recovery of aerobic granular sludge to pH shock for simultaneous removal of aniline and nitrogen. *Chemosphere* **221**, 366-374. [doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.207](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.207)



- Juliette, L., Hyman, M., Arp, D. (1995) Roles of bovine serum albumin and copper in the assay and stability of ammonia monooxygenase activity *in vitro*. *J Bacteriol.* **177**(17), 4908-4913. doi:10.1128/jb.177.17.4908-4913.1995
- Kent, T.R., Bott, C.B., Wang, Z.-W. (2018) State of the art of aerobic granulation in continuous flow bioreactors. *Biotechnol Adv.* **36**(4), 1139-1166. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.03.015
- Kern-Jespersen, J.P., Henze, M. (1993) Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Res.* **27**, 617-624. doi:10.1016/0043-1354(93)90171-D
- Killham, K. (1986) Heterotrophic nitrification. In: Prosser JI (ed) Nitrification. IRL Press, Oxford, pp 117-126.
- Kim, D.J., Seo, D. (2006) Selective enrichment and granulation of ammonia oxidizers in a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochemistry* **41**(5), 1055-1062. doi:10.1016/j.procbio.2005.11.018
- Kim, H.G., Ahn, D.H. (2019) Effects on the stability of aerobic granular sludge (AGS) at different carbon/nitrogen ratio. *J Environ Sci Int.* **28**(9), 719-727. doi:10.5322/jesi.2019.28.9.719
- Kim, H.G., Kim, J.T., Ahn, D.H. (2021) Effects of carbon to nitrogen ratio on the performance and stability of aerobic granular sludge. *Environ Eng Res.* **26**(1), 190284. doi:10.4491/eer.2019.284
- Kim, I.S., Kim, S.M., Jang, A. (2008) Characterization of aerobic granules by microbial density at different COD loading rates. *Bioresour Technol.* **99**(1), 18-25. doi:10.1016/j.biortech.2006.11.058
- Kishida, N., Kim, J., Tsuneda, S., Sudo, R. (2006) Anaerobic/oxic/anoxic granular sludge process as an effective nutrient removal process utilizing denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. *Water Res.* **40**(12), 2303-2310. doi:10.1016/j.watres.2006.04.037
- Kocaturk, I., Erguder, T.H. (2016) Influent COD/TAN ratio affects the carbon and nitrogen removal efficiency and stability of aerobic granules. *Ecol Eng.* **90**, 12-24. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.01.077
- Körner, H., Zumft, W.G. (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol.* **55**(7), 1670-1676. doi:10.1128/aem.55.7.1670-1676.1989
- Kuba, T., Smolders, G., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1993) Biological phosphorus removal from waste-water by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Sci Technol.* **27**(5-6), 241-252. doi:10.2166/wst.1993.0504
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Brandse, F.A., Heijnen, J.J. (1996a) A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnol*

*Bioeng.* **52**(6), 685-694. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19961220)52:6<685::AID-BIT>3.0.CO;2-K

- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1996b) Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. *Water Res.* **30**(7), 1702-1710. doi:10.1016/0043-1354(96)00050-4
- Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1996c) Effect of cyclic oxygen exposure on the activity of denitrifying phosphorus removing bacteria. *Water Sci Technol.* **34**(1-2), 33-40. doi:10.1016/0273-1223(96)00492-1
- Kujava, K., Klapwijk, B. (1999) A method to estimate denitrification potential for predenitrification system using NUR batch test. *Water Res.* **33**(10), 2291-2300. doi:10.1016/S0043-1354(98)00459-X
- Lee, D. J., Chen, Y. Y., Show, K. Y., Whiteley, C. G., Tay, J.H. (2010) Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. *Biotechnol Adv.* **28**(6), 919-934. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.08.007
- Lefebvre, O., Moletta, R. (2006) Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water Res.* **40**(20), 3671-3682. doi:10.1016/j.watres.2006.08.027
- Lei, Q., Liu, Y., Tay, J.H. (2004) Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochem Eng J.* **21**(1), 47-52. doi:10.1016/j.bej.2004.03.005
- Lemaire, R., Yuan, Z., Blackall, L.L., Crocetti, G.R. (2008b) Microbial distribution of *Accumulibacter* spp. and *Competibacter* spp. in aerobic granules from a lab-scale biological nutrient removal system. *Environ Microbiol.* **10**(2), 354-363. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01456.x
- Lemaire, R., Webb, R.I., Yuan, Z. (2008a) Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater. *ISME J.* **2**(5), 528-541. doi:10.1038/ismej.2008.12
- Li-long, Y., Yu, L., Yuan, R., Ying, Z. (2014) Analysis of the characteristics of short-cut nitrifying granular sludge and pollutant removal processes in a sequencing batch reactor. *Bioprocess Biosyst Eng.* **37**(2), 125-132. doi:10-1007/s00449-013-1006-3
- Li, A. J., Li, X. Y. (2009) Selective sludge discharge as determining factor in SBR aerobic granulation: numerical modeling and experimental verification. *Water Res.* **43**(14), 3387-3396. doi:10.1016/j.watres.2009.05.004
- Li, A. J., Zhang, T., Li, X. Y. (2010) Fate of aerobic bacterial granules with fungal contamination under different organic loading conditions. *Chemosphere* **78**(5), 500-509. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.040

- Li, J., Ding, L. B., Cai, A., Huang, G. X., Horn, H. (2014a) Aerobic sludge granulation in a full-scale sequencing batch reactor. *Biomed Res Int.*, **2014**, 268789. doi:10.1155/2014/268789
- Li, Y., Liu, Y. (2005) Diffusion of substrate and oxygen in aerobic granule. *Biochem. Eng. J.* **27**(1), 45-52. doi:10.1016/j.bej.2005.06.012
- Li, Y., Liu, Y., Shen, L., Chen, F. (2008a) DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications. *Enzyme Microb. Technol.* **43**(4-5), 349-354. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.04.005
- Li, A.-J., Yang, S.-F., Li, X.-Y., Gu, J.-D. (2008b) Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. *Water Res.* **42**(13), 3552–3560. doi:10.1016/j.watres.2008.05.005
- Li, Y., Zou, J., Zhang, L., Sun, J. (2014b) Aerobic granular sludge for simultaneous accumulation of mineral phosphorus and removal of nitrogen via nitrite in wastewater. *Bioresour Technol.* **154**, 178-184. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.033
- Li, Z. H., Wang, X. C. (2008) Effects of salinity on the morfological characteristics of aerobic granules. *Water Sci Technol.* **58**(12), 241-246. doi:10.2166/wst.2008.838
- Li, Z.H., Kuba, T., Kusuda, T. (2006) Aerobic granular sludge: a promising technology for decentralised wastewater treatment. *Water Sci Technol.* **53**(9), 79-85. doi:10.2166/wst.2006.278
- Li, Z.H., Kuba, T., Kusuda, T. (2006) The influence of starvation phase on the properties and the development of aerobic granules. *Enzyme Microb Technol.* **38**(5), 670-674. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.07.020
- Li, D., Guo, W., Liang, D., Zhang, J., Li, J., Li, P., Wu, Y., Bian, X., Ding, F. (2022) Rapid start-up and advanced nutrient removal of simultaneous nitrification, endogenous denitrification and phosphorus removal aerobic granular sequence batch reactor for treating low C/N domestic wastewater. *Environ Res.* **212**, 113464. doi:10.1016/j.envres.2022.113464
- Liang, Z., Tu, Q., Su, X., Yang, X., Chen, J., Chen, Y., Li, H., Liu, C., He, Q. (2019) Structural characteristics of different enhanced aerobic granules. *J Civ Environ Eng.* **41**(6), 167-173. doi:10.11835/j.issn.2096-6717.2019.119
- Lin H., Ma R., Hu Y., Lin J., Sun S., Jiang J., Li T., Liao Q., Luo J. (2021) Reviewing bottlenecks in aerobic granular sludge technology: Slow granulation and low granular stability. *Environ Pollut.* **263**,114638. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114638.
- Lin L.H., Jian L.W., Xiang H.W., Yi Q. (2005) The formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactor (SBR) by seeding anaerobic granules. *Process Biochemistry* **40**(1), 1-7. doi:10.1016/j.procbio.2003.11.033
- Liu Y., Yang S.F., Tay J.H. (2004a) Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. *J Biotechnol.* **108**(2), 161-169. doi:10.1016/j.biotech.2003.11.008

- Liu, H., Li, Y., Yang, C., Pu, W., He, L., Bo, F. (2012) Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane. *Bioresour Technol.* **121**, 111-118. doi:10.1016/j.biortech.2012.07.016
- Liu, J., Li, J., Tao, Y., Sellamuthu, B., Walsh, R. (2017) Analysis of bacterial, fungal and archaeal populations from a municipal wastewater treatment plant developing an innovative aerobic granular sludge process. *World J Microbiol Biotechnol.* **33**(1), 14. doi:10.1007/s11274-016-2179-0
- Liu, L., Gao, D. W., Zhang, M., Fu, Y. A. (2010) Comparison of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> enhancing aerobic granulation in SBR. *J Hazard Mater.* **181**(1-3), 382-387. doi:10.1016/j.hazmat.2010.05.021
- Liu, L., Li, W.W., Sheng, G.P., Liu, Z.F., Zeng, R.J., Liu, J.X., Yu, H.Q., Lee, D.J. (2010a) Microscale hydrodynamic analysis of aerobic granules in the mass transfer process. *Environ Sci Technol.* **44**(19), 7555-7560. doi:10.1021/es1021608
- Liu, L., Sheng, G.-P., Liu, Z.-F., Li, W.-W., Zeng, R.J., Lee, D.-J., Liu, J.-X., Yu, H.-Q. (2010b) Characterization of multiporous structure and oxygen transfer inside aerobic granules with the percolation model. *Environ Sci Technol.* **44**(22), 8535-8540. doi:10.1021/es102437a
- Liu, Q.S., Tay, J.H., Liu, Y. (2003a) Substrate concentration-independent aerobic granulation sequential aerobic sludge blanket reactor. *Environ Technol.* **24**(10), 1235-1243. doi:10.1080/09593330309385665
- Liu, X-W., Sheng, G-P., Yu, H-Q. (2009) Physicochemical characteristics of microbial granule. *Biotechnol Adv.* **27**(6), 1061-1070. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.05.020
- Liu, Y., Liu, Q.-S. (2006) Causes and control of filamentous growth in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Biotechnol Adv.* **24**(1), 115-127. doi:10.1016/j.biotechadv.2005.08.001
- Liu, Y., Tay, J. H. (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* **36**(7), 1653-1665. doi:10.1016/s0043-1354(01)00379-7
- Liu, Y., Tay, J.H. (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Adv.* **22**(7), 533-563. doi:10.1016/j.biotechadv.2004.05.001
- Liu, Y., Wang, Z.W., Qin, L., Liu, Y.Q., Tay, J.H. (2005) Selection pressure-driven aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Appl Microbiol Biotechnol.* **67**(1), 26-32. doi:10.1007/s00253-004-1820-2
- Liu, Y., Xu, H. (2007) Equilibrium, thermodynamics and mechanisms of Ni<sup>2+</sup> biosorption by aerobic granules. *Biochem Eng J.* **35**(2), 174-182. doi:10.1016/j.bej.2007.01.020

- Liu, Y., Xu, H., Yang, S.F., Tay, J.H. (2003b) A general model for biosorption of  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  by aerobic granules. *J Biotechnol.* **102**(3), 233-239. doi:10.1016/s0168-1656(03)00030-0
- Liu, Y., Yang, S. Y., Tay, J. H., Liu, Q. S., Qin, L., Li, Y. (2004b) Cell hydrophobicity is triggering force of biogranulation. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**(5), 371-379. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.009
- Liu, Y., Yang, S.F., Qin, L., Tay, J.H. (2004c) A thermodynamic interpretation of cell hydrophobicity in aerobic granulation. *Appl Microbiol Biotechnol.* **64**(3), 410-415. doi:10.1007/s00253-003-1462-9
- Liu, Y.G., Tay, J.H. (2007a) Characteristics and stability of aerobic granules cultivated with different starvation time. *Appl Microbiol Biotechnol.* **75**(1), 205-210. doi:10.1007/s00253-006-0797-4
- Liu, Y.Q., Liu, Y., Tay, J. H. (2005) Relationship between size and mass transfer resistance in aerobic granules. *Lett Appl Microbiol.* **40**(5), 312-315. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01695.x
- Liu, Y.Q., Moy, B.Y.P., Tay, J.H. (2007) COD removal and nitrification of low-strength domestic wastewater in aerobic granular sludges sequencing batch reactors. *Enz Microb Technol.* **42**(1), 23-28. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.07.020
- Liu, Y.Q., Tay, J.H. (2007) Cultivation of aerobic granules in a bubble column and airlift reactor with divided draft tubes at low aeration rate. *Biochem Eng J.* **34**(1), 1-7. doi:10.1016/j.bej.2006.11.009
- Liu, Y.Q., Tay, J.H. (2008) Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. *Bioresour Technol.* **99**(5), 980-985. doi:10.1016/j.biortech.2007.03.011
- Liu, Y.-Q., Tay, J.-H. (2015) Fast formation of aerobic granules by combining strong hydraulic selection pressure with overstressed organic loading rate. *Water Res.* **80**, 256–266. doi:10.1016/j.watres.2015.05.015
- Lochmatter, S., Maillard, J., Holliger, C. (2014) Nitrogen removal over nitrite by aeration control in aerobic granular sludge sequencing batch reactors. *Int J Environ Res Public Health* **11**(7), 6955-6978. doi:10.3390/ijerph110706955
- Lochmatter S., Holliger C. (2014) Optimization of operation condition for the startup of aerobic granular sludge reactors biologically removing carbon, nitrogen, and phosphorus. *Water Res.* **59**, 58-70. doi:10.1016/j.watres.2014.04.011
- Long, B., Yang, C., Pu, W., Yang, J., Jiang, G., Dan, J., Li, C., Liu, F. (2014) Rapid cultivation of aerobic granular sludge in a pilot scale sequencing batch reactor. *Bioresour Technol.* **166**, 57-63. doi:10.1016/j.biortech.2014.05.039
- Long, B., Yang, C., Pu, W., Yang, J., Liu, F., Zhang, L., Zhang, J., Cheng, K. (2015) Tolerance to organic loading rate by aerobic granular sludge in a cyclic aerobic

- granular reactor. *Bioresour Technol.* **182**, 314-322. doi:10.1016/j.biortech.2015.02.029
- Lopez, A., Dosta, J., Mata-Alvarez, J. (2009) Start-up of an aerobic granular sequencing batch reactor for the treatment of winery wastewater. *Water Sci Technol.* **60**(4), 1049-1054. doi:10.2166/wst.2009.554
- Luo, J., Hao, T., Wei, L., Mackey, H.R., Lin, Z., Chen, G.H. (2014) Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge. *Water Res.* **62**, 127-135. doi:10.1016/j.watres.2014.05.037
- Martienssen, M., Reichel, M., Kohlweyer, U. (2001) Surface properties of bacteria from different wastewater treatment plants. *Acta Biotechnology*, **21**(3), 207-225. doi:10.1002/1521-3846(200108)21:3<207::AID-ABI0207>3.CO;2-O
- McSwain, B. S., Irvine, R. L., Wilderer, P. A. (2004) The influence of settling time on the formation of aerobic granules. *Water Sci Technol.* **50**(10), 195-202. doi:10.2166/wst.2004.0643
- McSwain, B.S., Irvine, R.L., Hausner, M., Wilderer, P.A. (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl Environ Microbiol* **71**(2), 1051-1057. doi:10.1128/AEM.71.2.1051-1057.2005
- McSwain, B.S., Irvine, R.L. (2008) Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. *Water Sci Technol.* **58**(4), 781-787. doi:10.2166/wst.2008.393
- Metcalf & Eddy (2003) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 4th Ed, McGraw Hill Inc., New York, NY.
- Miller, M.B., Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* **55**(1), 165-199. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.165
- Mishima, K., Nakamura, M. (1991) Self-immobilization of aerobic activated sludge-a pilot study of the aerobic upflow sludge blanket process in municipal sewage treatment. *Water Sci Technol.* **23**(4-6), 981-990. doi:10.2166/wst.1991.0550
- Mishra, A., Mandoli, A., Jha, B. (2008) Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **35**(10), 1093-1101. doi:10.1007/s10295-008-0387-9
- Morgenroth, E., Sherden, T., van Loosdrecht M. C. M., Heijnen, J. J., Wilderer, P. A. (1997) Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Res.* **31**(12), 3191-3194. doi:10.1016/S0043-1354(97)00216-9
- Mosquera-Corral, A., de Kreuk, M.K., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2005) Effects of oxygen concentration on N-removal in an aerobic granular sludge reactor. *Water Res.* **39**(12), 2676-2686. doi:10.1016/j.watres.2005.04.065
- Moy, B.Y.P., Tay, J.H., Toh, S.K., Liu, Y., Tay, S.T.L. (2002) High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. *Lett Appl Microbiol.* **34**(6), 407-412. doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01108.x

- Mokhayeri, Y., Riffat, R., Murthy, S., Bailey, W., Takacs, I., Bott, C. (2009) Balancing yield, kinetics and cost for three external carbon source used for suspended growth post-denitrification. *Water Sci Technol.* **60**(10), 2485-2491. [doi:10.2166/wst.2009.623](https://doi.org/10.2166/wst.2009.623)
- Munch, E.V., Lant, P.A., Keiler, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* **30**(2), 277-284. [doi:10.1016/0043-1354\(95\)00174-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00174-3)
- Muñoz-Palazón, B., Rodriguez-Sanchez, A., Hurtado-Martínez, M., Santana, F., Gonzalez-Lopez, J., Mack, L., Gonzalez-Martinez, A. (2019) Polar Arctic Circle biomass enhances performance and stability of aerobic granular sludge systems operated under different temperatures. *Bioresour Technol.* **300**, 122650. [doi:10.1016/j.biortech.2019.122650](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122650)
- Nancharaiah Y.V., Sarvajith M., Mohan T. K. (2019) Aerobic granular sludge: the future of wastewater treatment. *Curr Sci* **117**(3), 395-404. [doi:10.18520/cs/v117/i3/395-404](https://doi.org/10.18520/cs/v117/i3/395-404)
- Nancharaiah, Y.V., Kiran Kumar Reddy, G. (2018) Aerobic granular sludge technology: Mechanisms of granulation and biotechnological applications. *Bioresour. Technol.* **247**, 1128-1143. [doi:10.1016/j.biortech.2017.09.131](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.131)
- Nancharaiah Y. V., Venkata Mohan S., Lens P. N. (2016) Recent advances in nutrient removal and recovery in biological and bioelectrochemical systems. *Bioresour Technol.* **215**, 173-185. [doi:10.1016/j.biortech.2016.03.129](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.129)
- Neu, T. R., Manz, B., Volke, F., Dynes, J. J., Hitchcock, A. P., and Lawrence, J. R. (2010). Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* **72**, 1-21. [doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00837.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00837.x)
- Ni, B.J., Xie, W.M., Liu, S.G., Yu, H.Q., Wang, Y.Z., Wang, G., Dai, X.L. (2009) Granulation of activated sludge in a pilot-scale sequencing batch reactor for the treatment of low-strength municipal wastewater. *Water Res.* **43**(3), 751-761. [doi:10.1016/j.watres.2008.11.009](https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.009)
- Olsson, G., Andrews, J.F. (1981) Dissolved oxygen control in the activated sludge process. *J Wat Sci Tech.* **13**, 341-347.
- Pal, A., Paul, A.K. (2008) Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J Microbiol.* **48**(1), 49. [doi:10.1007/s12088-008-0006-5](https://doi.org/10.1007/s12088-008-0006-5)
- Panswad, T., Anan, C. (1999) Impact of high chloride wastewater on an anaerobic/anoxic/aerobic process with and without inoculation of chloride acclimated seeds. *Water Res.* **33**, 1165-1172. [doi:10.1016/S0043-1354\(98\)00314-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00314-5)

- Park, S., Bae, W., Chung, J., Baek, S.-C. (2007) Empirical model of the pH dependence of the maximum specific nitrification rate, *Process Biochemistry*, 42(12), 1671-1676, doi:10.1016/j.procbio.2007.09.010
- Payne, W.J. (1981) Denitrification, Wiley-Interscience, New York.
- Peng, Y.Z., Yu, D.S., Liang, D.W., Zhu, G.B. (2004) Nitrogen removal via nitrite from seawater contained sewage. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* **39**(7), 1667-1680. doi:10.1081/ese-120037868
- Peyong, Y.N., Zhou, Y., Abdullah, A.Z., Vadivelu, V. (2012) The effect of organic loading rates and nitrogenous compounds on the aerobic granules developed using low strength wastewater. *Biochem. Eng. J.* **67**, 52-59. doi:10.1016/j.bej.2012.05.009
- Pochana, K., Keller, J. (1999) Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND). *Water Sci Technol.* **39**(6), 61-68. doi:10.1016/S0273-1223(99)00123-7
- Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (NN 26/2020). Narodne Novine 2020, 26.
- Pronk, M., Bassin, J.P., De Kreuk, M.K., Kleerebezem, R., Van Loosdrecht, M.C.M. (2014) Evaluating the main and side effects of high salinity on aerobic granular sludge. *Appl Microbiol Biotechnol.* **98**(3), 1339-1348. doi:10.1007/s00253-013-4912-z
- Pronk, M., de Kreuk M.K., de Bruin B., Kamminga P., Kleerebezem R., van Loosdrecht M.C.M. (2015a) Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment. *Water Res.* **84**, 207-217. doi:10.1016/j.watres.2015.07.011
- Pronk, M., Abbas, B., Kraan, R., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M. (2015b) Effect and behaviour of different substrates in relation to the formation of aerobic granular sludge. *Appl Microbiol Biotechnol.* **99**(12), 5257-5268. doi:10.1007/s00253-014-6358-3
- Qin, L., Liu, Y., Tay, J.H. (2004b) Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochem Eng J.* **21**(1), 47-52. doi:10.1016/j.bej.2004.03.005
- Qin, L., Tay, J.H., Liu, Y. (2004a) Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Process Biochem.* **39**(5), 579-584. doi:10.1016/S0032-9592(03)00125-0
- Ren, Y., Ferraz, F., Lashkarizadeh, M., Yuan, Q. (2017) Comparing young landfill leachate treatment efficiency and process stability using aerobic granular sludge and suspended growth activated sludge. *J Water Proc Eng.* **17**, 161-167. doi:10.1016/j.jwpe.2017.04.006



- Rick, W.Y., Stuart, M.T. (2001) Microbial nitrogen cycles: physiology, genomics and applications. *Curr Opin Microbiol.* **4**(3), 307-312. doi:10.1016/s1369-5274(00)00208-3
- Saleh-Lakha, S., Shannon, K.E., Henderson, S.L., Goyer, C., Trevors, J.T., Zebarth, B.J., Burton, D.L. (2009) Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*. *Appl Environ Microbiol.* **75**(12), 3903-3911. doi:10.1128/AEM.00080-09
- Santo, F.C., Alessandro, B., Tanner, R.D., Giulio, M., Michele, T., Jan, A.O. (2017) Effect of extended famine conditions on aerobic granular sludge stability in the treatment of brewery wastewater. *Bioresour Technol.* **226**, 150-157. doi:10.1016/j.biortech.2016.12.026
- Sarvajith, M., Kiran Kumar Reddy, G., Nancharaiah, Y.V. (2020) Aerobic granular sludge for high-strength ammonium wastewater treatment: Effect of COD/N ratios, long-term stability and nitrogen removal pathways. *Bioresour Technol.* **306**, 123150. doi:10.1016/j.biortech.2020.123150
- Sarma, S.J., Tay, J.-H. (2018) Carbon, nitrogen and phosphorus removal mechanisms of aerobic granules. *Crit Rev Biotechnol* **38**(7), 1077-1088. doi:10.1080/07388551.2018.1451481
- Sarma, S.J., Tay, J.H., Chu, A. (2017) Finding knowledge gaps in aerobic granulation Technology. *Trends Biotechnol.* **35**(1), 66-78. doi:10.1016/j.tibtech.2016.07.003
- Schmidt, J. E., Ahring, B. K. (1994) Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* **42**, 457-462. doi:10.1007/BF00902757
- Scholten, E., Lukow, T., Auling, G., Kroppenstedt, R.M., Rainey, F.A., Diekmann, H. (1999) *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. *Int Syst Evol Bacteriol.* **49**(3), 1045-1051. doi:10.1099/00207713-49-3-1045
- Schwarzenbeck, N., Erley, R., McSwain, B.S., Wilderer, P.A., Irvine, R.I. (2004) Treatment of malting wastewater in a granular sludge sequencing batch reactor (SBR). *Acta Hydrochim Hydrobiol.* **32**, 16-24.
- Seviour, R.J. (1999) The normal microbial communities of activated sludge plants. U: The Microbiology of Activated Sludge, ur. Seviour, R.J., Blackall, L.L. Dordrecht: Kluwer, Springer.
- Seviour, T.W., Lambert, L.K., Pijuan, M., Yuan, Z. (2010) Structural determination of a key exopolysaccharide in mixed culture aerobic granules using NMR spectroscopy. *Environ Sci Technol.* **44**(23), 8964-8970. doi:10.1021/es102658s
- Shao, Y., Liu, G.-H., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, H., Qi, L., Xu, X., Wang, J., He, Y., Li, Q., Fan, H., Zhang, J. (2020) Sludge characteristics, system performance and

- microbial kinetics of ultra-short-SRT activated sludge process. *Environ Int* **143**, 105973. doi:10.1016/j.envint.2020.105973
- Sharma, S., Sarma, S.J., Tay, J.-H. (2019) Aerobic Granulation in Wastewater Treatment. U: *Microbial Wastewater Treatment*, Elsevier Inc., 57-81.
- Sheng, G.P., Li, A.J., Li, X.Y., Yu, H.Q. (2010) Effects of seed sludge properties and selective biomass discharge on aerobic sludge granulation. *Chem Eng J* **160**(1), 108-114. doi:10.1016/j.cej.2010.03.017
- Shi, X.Y., Yu, H.Q., Sun, Y.J., Huang, X. (2009) Characteristics of aerobic granules rich in autotrophic ammonium-oxidizing bacteria in a sequencing batch reactor. *Chem Eng J* **147**(2-3), 102-109.
- Shi, Y.-J., Wang, X.-H., Yu, H.-B., Xie, H.-J., Teng, S.-X., Sun, X.-F., Tian, B.-H., Wang, S.-G. (2011) Aerobic granulation for nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor and emission of nitrous oxide. *Bioresour Technol.* **102**(3), 2536-2541. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.081
- Show, K. Y., Lee, D. J., Tay, J. H. (2012) Aerobic Granulation: Advances and Challenges. *Appl Biochem Biotechnol.* **167**(6), 1622-1640. doi:10.1007/s12010-012-9609-8
- Smolders, G.J., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotechnol Bioeng* **43**(6), 461-470. doi:10.1002/bit.260430605
- Spona, D.T. (2003) Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme Microb Technol.* **32**(3-4), 375-385. doi:10.1016/S0141-0229(02)00309-5
- Sturm, B.S.M., Irvine, R.L. (2008) Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. *Water Sci Technol.* **58**(4), 781-787. doi:10.2166/wst.2008.393
- Świąteczak, P., Cydzik-Kwiatkowska, A. (2018) Performance and microbial characteristics of biomass in a full-scale aerobic granular sludge wastewater treatment plant. *Environ Sci Pollut Res Int.* **25**(2), 1655-1669. doi:10.1007/s11356-017-0615-9
- Szabó, E., Hermansson, M., Modin, O., Persson, F., Wilén, B.-M. (2016) Effects of wash-out dynamics on nitrifying bacteria in aerobic granular sludge during start-up at gradually decreased settling time. *Water* **8**(5), 172. doi:10.3390/w8050172
- Szabó, E., Liébana, R., Hermansson, M., Modin, O., Persson, F., Wilén, B.M. (2017b) Microbial Population Dynamics and Ecosystem Functions of Anoxic/Aerobic Granular Sludge in Sequencing Batch Reactors Operated at Different Organic Loading Rates. *Front Microbiol.* **8**, 770. doi:10.3389/fmicb.2017.00770

- Szabó, E., Liébana, R., Hermansson, M., Modin, O., Persson, F., Wilén, B.M. (2017a) Comparison of the bacterial community composition in the granular and the suspended phase of sequencing batch reactor. *AMB Express* **7**, 168. doi:10.1186/s13568-017-0471-5
- Su, K.Z., Yu, H.Q. (2006) A generalized model for aerobic granule-based sequencing batch reactor. 2. Parametric sensitivity and model verification. *Environ Sci Technol.* **40**(15), 4709-4713. doi:10.1021/es060142e
- Taheri, E., Khiadani Hajian, M.H., Amin, M.M., Nikaeen, M., Hassanzadeh, A. (2012) Treatment of saline wastewater by a sequencing batch reactor with emphasis on aerobic granule formation. *Bioresour Technol.* **111**, 21-26. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.164
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., Leung, G. (1992) Effect of exogenous carbon sources on removal of inorganic nutrients by the nitrification denitrification process. *Water Res.* **26**(9), 1229-1236. doi:10.1016/0043-1354(92)90183-5
- Tay J.H., Ivanov V., Pan S. (2002a) Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Lett Appl Microbiol.* **34**(4), 254-257. doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01099.x
- Tay, J. H., Jiang, H. L., Tay, S. T. L. (2004) High – rate biodegradation of phenol by aerobically grown microbial granules. *J Environ Eng.* **130**(12), 1415-1423. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2004)130:12(1415)
- Tay, J. H., Liu, Q. S., Liu, Y. (2001a) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Lett Appl Microbiol.* **33**(3), 222-226. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00986
- Tay, J. H., Liu, Q. S., Liu, Y. (2002b) Characteristics of aerobic granules grown on glucose and acetate in sequential aerobic sludge blanket reactors. *Environ Technol.* **23**(8), 931-936. doi:10.1080/09593332308618363
- Tay, J. H., Liu, Q. S., Liu, Y. (2003) Shear force influences the structure of aerobic granules cultivated in sequencing batch reactor. 5th International conference of biofilm systems, 14-19 September, Cape Town, South Africa.
- Tay, J. H., Pan, S., He, Y. X., Tay, S. T. L. (2004b) Effect of organic loading rate on aerobic granulation. I: reactor performance. *J Environ Eng.* **130**(10), 1094-1101. doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2004)130:10(1094)
- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y. (2001b) The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol.* **57**, 227-233. doi: 10.1007/s002530100766
- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y. (2004a) The effect of upflow air velocity on the structure of aerobic granules cultivated in a sequencing batch reactor. *Water Sci Technol.* **49**(11-12), 35-40. doi:10.1128/AEM.00864-10

- Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y. (2001c) Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic blanket reactor. *J Appl Microbiol.* **91**(1), 168-175. [doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01374.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01374.x)
- Tay, H., Liu, S. (2001d) The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol.* **57**(1-2), 227-233. [doi:10.1007/s002530100766](https://doi.org/10.1007/s002530100766)
- Thanh, B.X., Visvanathan, C., Ben, R. (2009) Characterization of aerobic granular sludge at various organic loading rates. *Process Biochemistry*, **44**(2), 242-245. [doi:10.1016/j.procbio.2008.10018](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10018)
- Third, K.A., Burnett, N., Cord-Ruwisch, R. (2003) Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (PHB) as the electron donor in a SBR. *Biotechnol Bioeng.* **83**(6), 706-720. [doi:10.1002/bit.10708](https://doi.org/10.1002/bit.10708)
- Toh, S.K., Tay, J.H., Moy, B.Y.P., Ivanov, V., Tay, S.T.L. (2003) Size - effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR. *Appl Microbiol Biotechnol.* **60**(6), 687-695. [doi:10.1007/s00253-002-1145-y](https://doi.org/10.1007/s00253-002-1145-y)
- Tsuneda, S., Nagano, T., Hoshino, T., Noda, N., Hirata, A. (2003) Characterization of nitrifying granules produced in aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Res.* **37**(20), 4965-4973. [doi:10.1016/j.watres.2003.08.017](https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.08.017)
- Turk, O., Mavinic, D.S. (1987) Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environ Technol Lett* **8**(1-12), 419-426. [doi:10.10180/09593338709384500](https://doi.org/10.10180/09593338709384500)
- Turk, O., Mavinic, D.S. (1989) Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Water Res.* **23**(11), 1383-1388. [doi:10.1016/0043-1354\(89\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90077-8)
- Val del Río, A., Figueroa, M., Mosquera-Corral, A., Campos, J.L., Méndez, R. (2013) Stability of aerobic granular biomass treating the effluent from a seafood industry. *Int J Environ Res.* **7**(2), 265-276. [doi:10.22059/IJER.2013.606](https://doi.org/10.22059/IJER.2013.606)
- van Loosdrecht, M.C.M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., Heijnen, J.J. (1995) Biofilm structures. *Water Sci Technol.* **32**(8), 35-43. [doi:10.1016/0273-1223\(96\)00005-4](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00005-4)
- van Loosdrecht, M.C.M., Pot, M.A., Heijnen, J.J. (1997) Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses. *Water Sci Technol.* **35**(1), 41-47. [doi:10.1016/S0273-1223\(96\)00877-3](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(96)00877-3)
- van Loosdrecht, M.C.M., Nielsen, P.H., Lopez-Vazquez, C.M., Brdjanovic, D. (2016) Experimental methods in wastewater treatment. IWA Publishing
- Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P. L. (2012) Determining the mechanisms for aerobic granulation from mixed seed of floccular and crushed granules in activated sludge wastewater treatment. *Water Res.* **46**(3), 761-771. [doi:10.1016/j.watres.2011.11.054](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.054)

- Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P.L. (2013) Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Res.* **47**(14), 5338-5349. doi:10.1016/j.watres.2013.06.012
- Viaeminck, S.E., Cloetens, L.F.E., Carballa, M., Boon, N., Verstraete, W. (2008) Granular biomass capable of partial nitrification and anammox. *Water Sci Technol.* **58**(5), 1113-1120. doi:10.2166/wst.2008.731
- Viancelli, A., Kunz, A., Esteves, P.A., Viçosa Bauermann, F., Furukawa, K., Fujii, T., Vasconcellos Antônio, R., Vanotti, M. (2011) Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. *Braz Arch Biol Technol.* **54**(5), 1035-1041.
- Villaverde, S., Garcia-Encina, P.A., Fdz-Polanco, F. (1997) Influence of pH over nitrifying biofilm activity in submerged biofilm. *Water Res.* **31**(5), 1180–1186. doi:10.1016/S0043-1354(96)00376-4
- von Munch, E., Lant, P., Keller, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* **30**(2), 277-284. doi:10.1016/0043-1354(95)00174-3
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Manz, W., and Schleifer, K. H. (1994). Probing activated sludge with fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotides. *Water Sci Technol.* **29**, 15-23. doi:10.2166/wst.1994.0294
- Wagner, M., Loy, A., Nogueira, R., Purkhold, U., Lee, N., Daims, H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**, 665-680. doi:10.1023/a:1020586312170
- Wagner, J., Guimarães, L.B., Akaboci, T.R.V., Costa, R.H.R. (2015) Aerobic granular sludge technology and nitrogen removal from domestic wastewater treatment. *Water Sci Technol.* **17**(7), 1040-6. doi:10.2166/wst.2015.064
- Wan, C., Lee, D.-J., Yang, X., Wang, Y., Wang, X., Liu, X. (2015) Calcium precipitate induced aerobic granulation. *Bioresour Technol.* **176**, 32-37. doi:10.1016/j.biortech.2014.11.008
- Wan, C., Yang, X., Lee, D.J., Liu, X., Sun, S., Chen, C. (2014) Partial nitrification of wastewaters with high NaCl concentrations by aerobic granules in continuous flow reactor. *Bioresour Technol.* **152**, 1-6. doi:10.1016/j.biortech.2013.10.112
- Wang Z.W., Liu Y., Tay J.H. (2005) Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol.* **69**, 469-473. doi:10.1007/s00253-005-1991-5
- Wang, X., Wang, S., Zhao, J., Dai, X., Peng, Y. (2016) Combining simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal with post-denitrification for low carbon/nitrogen wastewater treatment. *Bioresour Technol.* **220**, 17-25. doi:10.1016/j.biortech.2016.06.132

- Wang, H., Song, Q., Wang, J., Zhang, H., He, Q., Zhang, W., Song, J., Zhou, J., Li, H. (2018c) Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in an aerobic granular sludge sequencing batch reactor with high dissolved oxygen: Effects of carbon to nitrogen ratios. *Sci Total Environ.* **642**, 1145-1152. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.06.081
- Wang, Y., Wang, W., Feng, D., Cheng, L. (2018a) Aerobic granulation of activated sludge to treat the comprehensive municipal wastewater. *J Arid Land Resour Environ.* **32**, 150-155.
- Wang, X., An, Q., Zhao, B., Guo, J.S., Huang, Y.S., Tian, M. (2018b) Auto-aggregation properties of a novel aerobic denitrifier *Enterobacter* sp. strain FL. *Appl Microbiol Biotechnol.* **102**(4), 2019-2030. doi:10.1007/s00253-017-8720-8
- Wang, Q., Du, G., Chen, J. (2004) Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force. *Process Biochem.* **39**(5), 557-563. doi:10.1016/S0032-9592(03)00128-6
- Wang, S. G., Gai, L. H., Zhao, L. J., Fan, M. H., Gong, W. X., Gao, B. Y., Ma, Y. (2009) Aerobic granules for low-strength wastewater treatment: formation, structure, and microbial community. *J Chem Technol Biotechnol.* **84**, 1015-1020. doi:10.1002/jctb.2127
- Wang, X., Hu, M., Xia, Y., Wen, X., Ding, K. (2012) Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Appl Environ Microbiol.* **78**(19), 7042-7047. doi:10.1128/AEM.01617-12
- Wang, X.H., Zhang, H.M., Yang, F.L., Xia, L.P., Gao, M.M. (2007) Improved stability and performance of aerobic granules under stepwise increased selection pressure. *Enzyme Microb Technol.* **41**, 205–211. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.005
- Wang Z.W., Liu Y., Tay J.H. (2007b) Biodegradability of extracellular polymeric substances produced by aerobic granules. *Appl Microbiol Biotechnol.* **74**(2), 462-466. doi:10.1007/s00253-006-0686-x
- Wang, Z. W., Liu, Y., Tay, J. H. (2005) Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Appl Microbiol Botechnol.* **69**, 469-473. doi:10.1007/s00253-005-1991-5
- Wang, Z., Gao, M., She, Z., Wang, S., Jin, C., Zhao, Y., Yang, S., Guo, L. (2015) Effect of salinity on performance, extracellular polymeric substances and microbial community of an aerobic granular sequencing batch reactor. *Sep Purif Technol.* **144**, 223-231. doi:10.1016/j.seppur.2015.02.042
- Wang, Z., van loosdrecht, M.C.M., Saikaly, P.E. (2017) Gradual adaptation to salt and dissolved oxygen: Strategies to minimize adverse effect of salinity on aerobic granular sludge. *Water Res.* **124**, 702-712. doi: 10.1016/j.watres.2017.08.026

- Wang, Z.M., Liu, Y., Tay, J.H. (2006a) The role of SBR mixed liquor volume exchange ratio in aerobic granulation. *Chemosphere* **62**(5), 767-771. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.04.081
- Wang, Z.W., Li, Y., Zhou, J.Q., Liu, Y. (2006b) The influence of short-term starvation on aerobic granules. *Process Biochem.* **41**(12), 2373-2378. doi:10.1016/j.procbio.2006.06.009
- Ward, B.B., Arp, D.J., Klotz, M.G. (2011) Nitrification. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Weber, S. D., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Fried, J. (2007) Microbial Composition and Structure of Aerobic Granular Sewage Biofilms. *Appl Environ Microbiol.* **73**(19), 6233-6240. doi:10.1128/AEM.01002-07
- Weissbrodt, D.G., Neu, T.R., Kuhlicke, U., Rappaz, Y., Holliger, C. (2013) Assessment of bacteria and structural dynamics in aerobic granular biofilms. *Front Microbiol.* **4**, 1-18:175. doi: 10.3389/fmicb.2013.00175
- Verawaty M., Pijuan M., Yuan Z., Bond P.L. (2012) Determining the mechanisms for aerobic granulation from mixed seed of floccular and crushed granules in activated sludge wastewater treatment. *Water Res.* **46**(3), 761-771. doi:10.1016/j.watres.2011.11.054
- Wilén B. M., Liébana R., Persson F., Modin O., Hermansson M. (2018) The mechanisms of granulation of activated sludge in wastewater treatment, its optimization, and impact on effluent quality. *Appl Microbiol Biotechnol.* **102**(12), 5005-5020. doi:10.1007/s00253-018-8990-9.
- Winkler, M.K.H., Kleerebezem, R., de Bruin, L. M., Verheijen, P.J., Abbas, B., Habermacher, J., van Loosdrecht, M.C.M. (2013) Microbial diversity differences within aerobic granular sludge and activated sludge flocs. *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**(16), 7447-7458. doi:10.1007/s00253-012-4472-7
- Winkler M. K. H., Meunier C., Henriot O., Mahillon J., Suárez-Ojeda M. E., DelMoro G., De Sanctis M., Di Iaconi C., Weissbrodt D. G. (2018) An integrative review of granular sludge for the biological removal of nutrients and recalcitrant organic matter from wastewater. *Chemical Engineering Journal* **336**, 489-502. doi:10.1016/j.cej.2017.12.026
- Wood, P.M. (1986) Nitrification as a bacterial energy source. U: Prosser, J.I. (ur.) Nitrification. IRL Press, Oxford, UK.
- Wu, D., Zhang, Z., Yu, Z, Zhu, L. (2018) Optimization of F/M ratio for stability of aerobic granular process via quantitative sludge discharge. *Bioresour Technol.* **252**, 150-156. doi:10.1016/j.biortech.2017.12.094
- Wu, J., Zhang, J., Poncin, S., Li, H.Z., Jiang, J., Rehman, Z.U. (2015) Effects of rising biogas bubbles on the hydrodynamic shear conditions around anaerobic granule. *Chem. Eng. J.* **273**, 111-119. doi:10.1016/j.cej.2015-03.057

- Wu, L., Peng, C., Peng, Y., Li, L., Wang, S., Ma, Y. (2012) Effect of wastewater COD/N ratio on aerobic nitrifying sludge granulation and microbial population shift. *J Environ Sci.* **24**(2), 234-241. doi:10.1016/s1001-0742(11)60719-5
- Wu, T., Yang, S.-S., Zhong, L., Pang, J.-W., Zhang, L., Xia, X.-F., Yang, F., Xie, G.-J., Liu, B.-F., Ren, N.-Q., Ding, J. (2022) Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal: What have we done so far and how do we need to do in the future? *Sci Total Environ.* **856**(1):158977. doi:10.1016/j.scitotenv.2022.158977
- Xiao, F., Yang, S.F., Li, X.Y. (2008) Physical and hydrodynamic properties of aerobic granules produced in sequencing batch reactors. *Separation Purification Technol.* **63**(3), 634-641. doi:10.1016/j.seppur.2008.07.002
- Xin, X., Lu, H., Yao, L., Leng, L., Guan, L. (2016) Rapid formation of aerobic granular sludge and its mechanism in a continuous-flow bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol.* **181**(1), 424-433. doi:10.1007/s12010-016-2221-6
- Xu, H. C., He, P. J., Wang, G. Z., Yu, G. H., Shao, L. M. (2010) Enhanced storage stability of aerobic granules seeded with pellets. *Bioresour Technol.* **101**(21), 8031-8037. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.062
- Yae, J., Ryu, J., Van Tuyen, N., Kim, H., Hong, S., Ahn, D. (2019) An aerobic granular sludge process for treating low carbon/nitrogen ratio sewage. *Environ Eng Res.* **24**(2), 238-245. doi:10-4491/eer.2017.181
- Yang, H. G., Li, J., Liu, J., Ding, L. B., Chen, T., Huang, G. X., Shen, J. Y. (2016) A case for aerobic sludge granulation: from pilot to full scale. *Journal of Water Reuse and Desalination* **6**(1), 188-194. doi:10.2166/wrd.2015.188
- Yang, S. F., Li, X. Y., Yu, H. Q. (2008) Formation and characterisation of fungal and bacterial granules under different feeding alkalinity and pH conditions. *Process Biochemistry* **43**(1), 8-14. doi:10.1016/j.procbio.2007.10.008
- Yang, S. F., Liu, Q. S., Tay, J. H., Liu, Y. (2004) Growth kinetics of aerobic granules developed in sequencing batch reactors. *Lett Appl Microbiol.* **38**(2), 106-112. doi:10.1111/j.1472-765x.2003.01452.x
- Yang, S. F., Liu, Y., Tay, J. H. (2003) A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater. *J Biotechnol.* **106**(1), 77-86. doi:10.1016/j.biotech.2003.07.007
- Yang, W., Lu, H., Khanal, S.K., Zhao, Q., Meng, L., Chen, G.H. (2016a) Granulation of sulfur-oxidizing bacteria for autotrophic denitrification. *Water Res.* **104**, 507-519. doi:10.1016/j.watres.2016.08.049
- Yang, G., Zhang, N., Yang, J., Fu, Q., Wang, Y., Wang, D., Tang, L., Xia, J., Liu, X., Li, X., Yang, Q., Liu, Y., Wang, Q., Ni, B.-J. (2020) Interaction between perfluorooctanoic acid and aerobic granular sludge. *Water Res.* **169**, 115249. doi:10.1016/j.watres.2019.115249



- Yarlagadda, V.N., Manjunath, S. (2019) Aerobic granular sludge process: A fast growing biological treatment for sustainable wastewater treatment. *Curr Opin Environ Sci Health* **12**, 57-65. doi:10.1016/j.coesh.2019.09.011
- Yi, S., Tay, J. H., Maszenan, A. M., Tay, S. T. L. A. (2003) A culture-independent approach for studying microbial diversity in aerobic granules. *Water Sci Technol.* **47**(1), 283-290. doi:10.2166/wst.2003.0068
- Yilmaz, G., Lemaire, R., Keller, J., Yuan, Z. (2008) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal from nutrient-rich industrial wastewater using granular sludge. *Biotechnol Bioeng.* **100**(3), 529-541. doi:10.1002/bit.21774
- Yongmei, L., Zou, J., Zhang, L., Sun, J. (2014) Aerobic granular sludge for simultaneous accumulation of mineral phosphorus and removal of nitrogen via nitrite in wastewater. *Bioresour Technol.* **154**, 178-184. doi:10.1016/j.biortech.2013.12.033
- Yu, Y., Yu, H.J., Ma, C.C. (2014) Study on the impact of do and organic matter on aerobic granular sludge treating municipal sewage. *Adv Mater Res.* **989–994**, 603-606. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.989-994.603
- Yuan, Q., Gong, H., Xi, H., Xu, H., Jin, Z., Ali, N., Wang, K. (2019) Strategies to improve aerobic granular sludge stability and nitrogen removal based on feeding mode and substrate. *J Environ Sci.* **84**, 144-154. doi: 10.1016/j.jes.2019.04.006
- Yuan, X., Gao, D. (2010) Effect of dissolved oxygen on nitrogen removal and process control in aerobic granular sludge reactor. *J Hazard Mater.* **178**(1-3), 1041-1045. doi:10.1016/j.hazmat.2010.02.045
- Zahran, H. (1997) Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biology and Fertility of Soils* **25**, 211-223. doi: 10.1007/s003740050306
- Zaman, M., Kim, M., Nakhla, G. (2021) Simultaneous nitrification-denitrifying phosphorus removal (SNDPR) at low DO for treating carbon-limited municipal wastewater. *Sci Total Environ.* **760**:143387. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143387
- Zhang L., Feng X., Zhu N., Chen J. (2007) Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology* **41**(5): 551-557. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.05.001
- Zhang, B., Ji, M., Qiu, Z., Liu, H., Wang, J., Li, J. (2011a) Microbial population dynamics during sludge granulation in an anaerobiceaerobic biological phosphorus removal system. *Bioresour Technol.* **102**(3), 2474-2480. doi:10.1016/j.biortech.2010.11.017
- Zhang, H., Dong, F., Jiang, T., Wei, Y., Wang, T., Yang, F. (2011b) Aerobic granulation with low strength wastewater at low aeration rate in A/O/A SBR reactor. *Enzyme Microb. Technol.* **49**, 215-222. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.05.006

- Zhang, L.L., Zhang, B., Huang, Y.F., Cai, W.M. (2005) Re-activation characteristics of preserved aerobic granular sludge. *J Environ Sci.* **17**(4), 655-658. doi:10.1016/j.biotechady.2004.05.001
- Zhang X.Q., Bishop P.L. (2003) Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere* **50**(1), 63-69. doi:10.1016/s0045-6535(02)00319-3
- Zhang, B., Lens, P.N.L., Shi, W., Zhang, R., Zhang, Z., Guo, Y., Bao, X., Cui, F. (2018) Enhancement of aerobic granulation and nutrient removal by an algal-bacterial consortium in a lab-scale photobioreactor. *Chem Eng J.* **334**, 2373-2382. doi:10.1016/j.cej.2017.11.151
- Zhang, Z., Qiu, J., Xiang, R., Yu, H., Xu, X., Zhu, L. (2019) Organic loading rate (OLR) regulation for enhancement of aerobic sludge granulation: Role of key microorganism and their function. *Sci Total Environ.* **653**, 630-637. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.418
- Zhao, Y., Huang, J., Zhao, H., Yang, H. (2013) Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates. *Bioresour Technol.* **143**, 439-446. doi:10.1016/j.biortech.2013.06.020
- Zhao, W., Huang, Y., Wang, M., Pan, C., Li, X., Peng, Y., Li, B. (2018) Post-endogenous denitrification and phosphorus removal in an alternating anaerobic/oxic/anoxic (A/O/A) system treating low carbon/nitrogen (C/N) domestic wastewater. *Chem Eng J.* **339**, 450-458. doi:10.1016/j.cej.2018.01.096
- Zhao, X., Feng, H.X., Jiang, F., Chen, N.L., Wang, X.C. (2012) Research of carbon and nitrogen ratio and sludge stability in aerobic granular sludge bioreactor. *Adv Mater Res.* **518-523**, 473-477. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.518-523.473
- Zhao, H.W., Mavinic, D.S., Oldham, W.O., Koch, F.A. (1999) Controlling factors for simultaneous nitrification and denitrification in a two-stage intermittent aeration process treating domestic sewage. *Water Res.* **33**, 961-970. doi:10.1016/S0043-1354(98)00292-9
- Zheng Y.M., Yu H.Q. (2007) Determination of the pore size distribution and porosity of aerobic granules using size-exclusion chromatography. *Water Res.* **41**(1), 39-46. doi:10.1016/j.watres.2006.09.015
- Zheng, Y. M., Yu, H. Q., Liu, S. J., Liu, X. Z. (2006) Formation and instability of aerobic granules under high organic loading conditions. *Chemosphere*, **63**(10), 1791-1800. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.08.055
- Zheng, Y. M., Yu, H. Q., Sheng, G. P. (2005) Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochemistry*, **40**(2), 645-650. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.056
- Zheng, X., Tong, J., Li, H., Chen, Y. (2009) The investigation of effect of organic carbon sources addition in anaerobic-aerobic (low dissolved oxygen) sequencing

- batch reactor for nutrients removal from wastewaters. *Bioresour Technol.* **100**, 2515-2520. doi:10.1016/j.biortech.2008.12.003
- Zhou, D., Niu, S., Xiong, Y., Yang, Y., Dong, S. (2014) Microbial selection pressure is not a prerequisite for granulation: Dynamic granulation and microbial community study in a complete mixing bioreactor. *Bioresour Technol.* **161**, 102-108. doi:10.1016/j.biortech.2014.03.001
- Zhou, J.H., Zhang, Z.M., Zhao, H., Yu, H.T., Alvarez, P.J., Xu, X.Y., Zhu, L. (2016) Optimizing granules size distribution for aerobic granular sludge stability: effect of a novel funnel-shaped internals on hydraulic shear stress. *Bioresour Technol.* **216**, 562-570. doi:10.1016/j.biortech.2016.05.079
- Zhou, J.Y., Yu, X.J., Wang, Z.P., Ding, C., Cai, W.M. (2010) A potential explanation for the effect of carbon source on the characteristics of acetate-fed and glucose-fed aerobic granules. *Afr J Biotechnol.* **9**(33), 5357-5365.
- Zhu, J. (2004) Reply to comment by J. Zhu. *Water Res.* **38**, 3467-3469.
- Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S. (2008). *Biological Removal of Nitrogen from Wastewater. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 159-195. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1_5)
- Zhu, L., Qi, H.Y., Lv, M.L., Kong, Y., Yu, Y.W., Xu, X.Y. (2012) Component analysis of extracellular polymeric substances (EPS) during aerobic sludge granulation using FTIR and 3D-EEM technologies. *Bioresour Technol.* **124**, 455-459. doi:10.1016/j.biortech.2012.08.059
- Zhu, L., Yu, Y., Dai, X., Xu, X., Qi, H. (2013) Optimization of selective sludge discharge mode for enhancing the stability of aerobic granular sludge process. *Chem Eng J.* **217**(5), 442-446. doi:10.1016/j.cej.2012.11.132
- Zita, A., Hermansson, M. (1997) Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater *in situ*. *FEMS Microbiology Letter* **152**(2), 299-306. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10443.x

## ŽIVOTOPIS

Mirjana Galant, dipl. ing. biol., rođena je u Pazinu. Završila je Biotehnički fakultet – smjer biologija, na Univerzitetu u Ljubljani, Slovenija.

Svoj radni opus započinje kao nastavnik te niz godina radi kao profesor biologije u osnovnoškolskim i srednjoškolskim ustanovama.

Nakon dovršetka izgradnje Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda Grada Pazina zapošljava se na radnom mjestu laborantice, a zatim voditeljice uređaja, a od 2022. radi na poslovima voditeljice Uređaja za pročišćavanje otpadnih voda u Poreču.

Rad sa otpadnim vodama pobudio je veliko zanimanje za širenjem znanja o procesima bioremedijacije, o biološkoj obradi otpadnih voda. Stoga upisuje postdiplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Publicirala je znanstvene i stručne radove, te aktivno sudjelovala na više međunarodnih i domaćih znanstveno-stručnih skupova.

Udata je, majka dvojice sinova.