

Biološko uklanjanje fosfora iz otpadne vode pri niskom omjeru dušik/fosfor

Prskalo, Ana Marija

Master's thesis / Diplomski rad

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:159:295154>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2023.

Ana Marija Prskalo

**BIOLOŠKO UKLANJANJE
FOSFORA IZ OTPADNE VODE PRI
NISKOM OMJERU DUŠIK/FOSFOR**

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Dijani Grgas na uloženom trudu, znanju, pruženom vodstvu i pomoći pri izradi ovog rada. Hvala i prof. dr. sc. Tibeli Landeka Dragičević na motivaciji, savjetima i pomoći.

Veliko hvala Mariji i Marini na pruženoj moralnoj podršci pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se najboljem bratu, obitelji, svim prijateljima i kolegama.

Zahvaljujem se svojim roditeljima koji su me podržavali i motivirali u svakom trenutku, bez njihove ljubavi, podrške i žrtve ne bih bila osoba koja sam danas.

Najveća hvala Bogu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA IZ OTPADNE VODE PRI NISKOM OMJERU DUŠIK/FOSFOR

Ana Marija Prskalo, univ. bacc. ing. biotehn.
0058213665

Sažetak: U ovom radu istražen je proces denitrificirajuće defosfatacije s acetatom kao izvorom ugljika i nitritom kao akceptorom elektrona pri omjeru N/P 1 i pri omjeru C/N 2, 3 i 4. Organski sastojci su uklonjeni u svim pokusima pri sličnoj brzini. Nitrit je potpuno denitrificiran u svim pokusima, a uklanjanje nitrita se odvijalo pri dvije brzine: pri višoj brzini s acetatom kao vanjskim izvorom ugljika, i pri nižoj brzini s unutarstaničnim zalihama ugljika. Uklanjanje fosfata se također odvijalo pri dvije brzine. Učinkovitost uklanjanja fosfata je rasla s porastom omjera C/N, međutim, istraženi omjeri C/N nisu osigurali dovoljnu količinu organskih sastojaka za potpuno uklanjanje fosfata.

Ključne riječi: denitrificirajuća defosfatacija, DPAO, C/N omjer, nitrit

Rad sadrži: 47 stranica, 18 slika, 83 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Dijana Grgas

Pomoć pri izradi:

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

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

Datum obrane: Svibanj 2023

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for the Biological Wastewater Treatment

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

BIOLOGICAL PHOSPHORUS REMOVAL FROM WASTEWATER AT A LOW NITROGEN/PHOSPHORUS RATIO

Ana Marija Prkslao, univ. bacc. ing. biotehn.
0058213665

Abstract: In this thesis, the process of denitrifying dephosphatation with acetate as a carbon source and nitrite as an electron acceptor was investigated at an N/P ratio of 1 and at a C/N ratio of 2, 3 and 4. Organic compounds were removed in all experiments at a similar rate. Nitrite was completely denitrified in all experiments, and nitrite removal occurred at two rates: at a higher rate with acetate as an external carbon source, and at a lower rate with intracellular carbon storage. Phosphate removal also occurred at two rates. Phosphate removal efficiency increased with increasing C/N ratio, however, the investigated C/N ratios did not provide a sufficient amount of organics for complete phosphate removal.

Keywords: Denitrifying dephosphatation, DPAO, C/N ratio, nitrite

Thesis contains: 47 pages, 18 figures, 83 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Dijana Grgas, PhD, Assistant Professor

Technical support and assistance:

Reviewers:

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

Thesis defended: May, 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA	3
2.2 BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA	7
2.2.1. Polifosfat akumulirajući organizmi	7
2.2.2. Glikogen akumulirajući organizmi.....	9
2.3. DENITRIFICIRAJUĆA DEFOSFATACIJA	10
2.3.2. Procesi denitrificirajuće defosfatacije	12
2.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA DENITRIFICIRAJUĆU DEFOSFATACIJU	15
2.4.1. Nitrit kao akceptor elektrona	15
2.4.1.1. Inhibicija slobodnom dušičnom kiselinom.....	15
2.4.2. KPK/N omjer.....	16
2.4.3. Vrijednost pH.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. OTPADNA VODA	18
3.2. POSTAVKE REAKTORA	18
3.3. AKTIVNI MULJ	18
3.4. ANALITIČKI POSTUPCI	19
3.4.1. Određivanje nitrita.....	19
3.4.2. Izračun slobodne nitritne kiseline.....	19
3.4.3. Određivanje koncentracije fosfata.....	20
3.4.4. Određivanje kemijske potrošnje kisika	20
3.4.5. Određivanje MLSS.....	22
3.4.6. Određivanje vrijednosti pH	23
3.4.7. Određivanje temperature	23
3.4.8. Određivanje koncentracije otopljenog kisika	23
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	39

1. UVOD

Ispuštanjem otpadnih voda koje sadrže amonijak i nitrat u površinske vode nastaju ekološki problemi kao što je smanjena koncentracija otopljenog kisika zbog oksidacije amonijaka u nitrata i nitrite čime dolazi do pomora riba. Također, nitrati i fosfor potiču rast algi što dovodi do eutrofikacije rijeka i jezera (Wiesmann, 1994). Eutrofikacija negativno utječe na bioraznolikost i kvalitetu vode (Xu i sur., 2011). Za uklanjanje dušika iz otpadne vode na uređajima za biološku obradu otpadnih voda primjenjuju se kombinacija procesa nitrifikacije i denitrifikacije (Henze i sur., 2008; Ekama i Wentzel, 2008; Gerardi, 2002).

Fosfor prisutan u otpadnim vodama dolazi iz kućanskih i industrijskih izvora. U komunalnim otpadnim vodama fosfor se pojavljuje u otopljenom obliku, najčešće kao ortofosfat, te kao kondenzirani fosfat i organski fosfat. Uobičajena ukupna koncentracija fosfora u komunalnim otpadnim vodama je između 6 do 8 mg/L (Parsons i Smith, 2008). Fosfor se iz otpadne vode uklanja biološkim postupkom koji se zove napredno biološko uklanjanje fosfora (engl. *enhanced biological phosphorus removal, EBPR*) (Tian i sur., 2017; Vargas i sur., 2011).

Uklanjanje ugljika, dušika i fosfora iz otpadnih voda i dalje je ključno pitanje u zaštiti okoliša. Mnoga postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda suočavaju se s nedovoljnom količinom organskih spojeva u otpadnoj vodi za učinkovito uklanjanje dušika i fosfora (Hu i sur., 2019). Obično se taj problem rješava dodavanjem vanjskog izvora ugljika, no to povećava operativne troškove postrojenja. Denitrificirajuća defosfatacija ističe se kao alternativa konvencionalnim procesima uklanjanja nutrijenata, dušika i fosfora, jer se primjenom procesa denitrificirajuće defosfatacije postiže istovremeno uklanjanje organskih sastojaka, nitrata i fosfata. Također, primjenom procesa denitrificirajuće defosfatacije ostvaruju se uštede na potrebnoj količini organskih sastojaka, otopljenog kisika, te nastaje manje viška aktivnog mulja u odnosu na konvencionalne metode uklanjanja dušika i fosfora iz otpadne vode (Zeng i sur., 2003; Ahn i sur., 2001; Meinhold i sur., 1999b; Kuba i sur., 1996a). Denitrificirajuća defosfatacija se uglavnom provodi s nitratom kao akceptorom elektrona, iako se i nitrit (intermedijer procesa nitrifikacije i denitrifikacije) može koristiti kao akceptor elektrona (Wang i sur., 2009; Kuba i sur., 1996a).

Izazovi koji se javljaju u provedbi procesa denitrificirajuće defosfatacije su postavljanje optimalnih uvjeta za rast denitrificirajućih fosfor akumulirajućih organizama (DPAO) odnosno postavljanje uvjeta koji sprječavaju rast drugih bakterija koje se mogu natjecati s njima, poput glikogen akumulirajućih organizama (GAO) (Gnida i sur., 2020; Oehmen i sur., 2005; Pijuan i sur., 2003). Dodatan izazov u provedbi procesa denitrificirajuće defosfatacije s nitritom kao

akceptorom elektrona je inhibicijski učinak nitrita na brojne skupine mikroorganizama prisutnih u aktivnom mulju (Ahn i sur., 2001; Meinhold i sur., 1999b; Kern-Jespersen i sur., 1994; Comeau i sur., 1989).

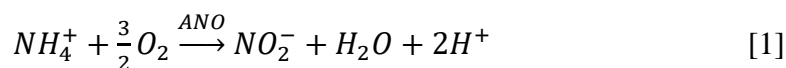
Cilj ovog rada bio je ispitivanje učinkovitosti denitrificirajuće defosfatacije sintetske otpadne vode pri niskom omjeru N/P i pri omjerima C/N 2, 3 i 4 s nitritom kao akceptorom elektrona.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIOLOŠKO UKLANJANJE DUŠIKA

Ispuštanjem prekomjernih koncentracija dušika i fosfora u površinske vode nastaju ekološki problemi poput eutrofikacije, koja uzrokuje cvjetanje algi, ali i onečišćenje izvora vode za piće. Zbog toga se u cijelom svijetu postavljaju sve strože granice za ispuštanje obrađene vode u prirodu (Xu i sur., 2011).

Uklanjanje dušika iz otpadne vode biološkim putem provodi se kombinacijom procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Nitrifikacija je proces u kojem se amonijak oksidira u nitrit i nitrat, provode ga aerobne autotrofne bakterije koje se zovu nitrifikanti. U procesu s aktivnim muljem najzaslužniji mikroorganizmi za nitrifikaciju su *Nitrosomonas* (provode oksidaciju amonijaka do nitrita) i *Nitrobacter* (provode oksidaciju nitrita do nitrata). Heterotrofni organizmi potrebu za ugljikom (anabolizam) i energijom za sintezu biomase (katabolizam) dobivaju iz organskih spojeva. Autotrofni nitrificirajući organizmi, nitrifikanti, potrebu za ugljikom dobivaju iz otopljenog CO₂, a potrebu za energijom za sintezu biomase od oksidacije amonijaka do nitrita, i nitrita do nitrata. Zbog toga je prirast biomase heterotrofnih bakterija znatno viši od prirasta biomase autotrofnih bakterija. Nitrifikaciju provode dvije skupine autotrofnih nitrificirajućih bakterija, i to su organizmi koji oksidiraju amonijak (engl. *ammonia oxidizing organisms*, ANO) i organizmi koji oksidiraju nitrit (engl. *nitrite oxidizing organisms*, NNO). U procesu nitrifikacije odvijaju se dva uzastopna oksidacijska koraka, oksidacija amonijaka u nitrit pomoću ANO organizmima, ili nitritacija, i oksidacija nitrita u nitrat pomoću NNO organizama, ili nitratacija (Ekama i Wentzel, 2008; Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002). Enzimi odgovorni za proces nitrifikacije su amonijak monooksigenaza i hidoksilamin oksidoreduktaza (nitritacija), i nitrit oksidoreduktaza (nitratacija) (Zhu i sur., 2008). Nitrifikanti koriste amonijak i nitrit za potrebe katabolizma, ali postoji i anabolička sinteza dušika potrebna za staničnu masu samih nitrifikanata. Formule [1] i [2] prikazuju stehiometrijske redoks reakcije nitrifikacije (Ekama i Wentzel, 2008).



Čimbenici koji utječu na nitrifikaciju su kakvoća otpadne vode kao supstrata, koncentracija otopljenog kisika, temperatura, pH vrijednost, alkalitet, koncentracija i aktivnost nitrifikanata (Xu i sur., 2011; Ekama i Wentzel, 2008; Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002).

Amonijak se u bioreaktoru može nalaziti u molekularnom i u ionskom obliku, ovisno o temperaturi i pH vrijednosti miješane tekućine. Tako primjerice, u većini procesa s aktivnim muljem pH vrijednost je u rasponu 7-8,5 i temperatura 10-20 °C, i pri tome je oko 95 % amonijaka u ionskom obliku, kojeg nitrifikanti mogu koristiti kao supstrat. Što je viša vrijednost pH, to je veći udio amonijaka u molekularnom obliku, koji se otplinjuje iz bioreaktora, i nitrifikanti ne mogu koristiti molekularni amonijak kao supstrat. Prilikom nitrifikacije dolazi do proizvodnje vodikovih iona, što je više izraženo tijekom oksidacije amonijaka do nitrita, što pridonosi smanjenju vrijednosti pH miješane tekućine (Gerardi, 2002; Anthonisen i sur., 1976). Smatra se da je za aktivnost *Nitrosomonas* sp. i *Nitrobacter* sp. optimalna pH vrijednost između 7,2 – 8,5. Pri vrijednosti pH 6,0 proces nitrifikacije prestaje (Gerardi, 2002).

Za uspješnu provedbu u procesu nitrifikacije potrebno je nitrifikantima osigurati visoku koncentraciju otopljenog kisika od 3-7 mg O₂/L. Za postizanje takve koncentracije otopljenog kisika primjenjuju se odgovarajuća aeracija ili unos čistog kisika u reaktor (Henze i sur., 2002). U literaturi se navodi i da se učinkovita nitrifikacija može provoditi pri koncentraciji otopljenog kisika 2-3 mg/L. Ukoliko se nitrifikacija provodi pri koncentraciji otopljenog kisika između 0,5-2,5 mg/L, nitrifikacija može biti ograničena, dok pri koncentraciji otopljenog kisika ispod 0,5 mg/L nitrifikacija prestaje (EPA, 2003).

Udio nitrifikanata za učinkovitu nitrifikaciju bi trebao iznositi 0,34 % u aktivnom mulju (Dionisi i sur., 2002), 6-18 % u kombiniranom aktivnom mulju (You i sur., 2003; Wagner i sur., 1996) te do 50 % u autotrofno nitrificirajućem biofilmu (Kindaichi i sur., 2004). U različitim sustavima je različit udio amonijak, odnosno nitrit oksidirajućih bakterija. Tako primjerice rodovi *Nitrosomonas* i *Nitrobacter* imaju niži afinitet za supstrat i pokazuju veće brzine rasta, i dominiraju pri višim koncentracijama supstrata, a rodovi *Nitrospira* i *Nitrosospira* imaju viši afinitet za supstrat i pokazuju manje brzine rasta te dominiraju u uvjetima nižih koncentracija supstrata. Amonijak oksidirajuće i nitrit oksidirajuće bakterije su dvije filogenetički nepovezane skupine bakterija, a koje provode proces nitrifikacije (Noguera i sur., 2002; Schramm i sur., 2000; Manz i sur., 1996). Amonijak oksidirajućim i nitrit oksidirajućim bakterijama zajedničko je to da imaju nisku specifičnu brzinu rasta i da se nakupljaju u aktivnom mulju koji ima veliku starost (Kroiss, 1996).

Ponekad se može favorizirati samo prvi korak nitrifikacije (nitritacija), što se zove parcijalna nitrifikacija. U tom slučaju amonijak se oksidira do nitrita i zatim se uklanja denitrifikacijom, odnosno denitritacijom. Prednost uklanjanja dušika preko nitritacije-denitritacije u odnosu na nitrifikaciju-denitrifikaciju su ušteda na aeraciji oko 25 %, ušteda na organskim sastojcima oko 40-60 % potrebnima za proces denitrifikacije te manja investicijska ulaganja zato što se proizvodi manje aktivnog mulja, pa je potreban manji volumen bioreaktora. Čimbenici koji utječu na parcijalnu nitrifikaciju su temperatura, vrijednost pH, koncentracija otopljenog kisika, koncentracija slobodnog amonijaka i koncentracija slobodne nitritne kiseline (Sinha i Annachhatre, 2007).

Denitrifikacija je biološka redukcija nitrata u plinoviti dušik pomoću fakultativnih heterotrofnih organizama koji u aerobnim uvjetima mogu koristiti kisik kao akceptor elektrona, a u nedostatku kisika reducirati nitrata (anoksični metabolizam). Denitrifikaciju provodi skupina mikroorganizama koji se nazivaju denitrificirajuće bakterije ili denitrifikanti. Denitrifikacija se sastoji od četiri uzastopna koraka kojeg provode mikrobne reduktaze (Metcalf & Eddy, 2003; Zumft, 1997):

- nitrati se reduciraju do nitrita pomoću nitrat reduktaze
- nitriti se reduciraju do dušikovog monoksida pomoću nitrit reduktaze
- dušikov monoksid reducira se do didušikovog oksida pomoću dušikov monoksid reduktaze
- didušikov oksid reducira se do molekularnog dušika pomoću didušikov oksid reduktaze

Redukcija nitrata do nitrita naziva se denitratacija, a redukcija nitrita denitritacija (Soto i sur., 2007). Da bi se provodila denitrifikacija, odnosno redukcija nitrata i nitrita, potrebno je osigurati biološki razgradive organske sastojke kao donore elektrona. Kao donori elektrona za provedbu procesa denitrifikacije mogu poslužiti biorazgradivi organski spojevi koji se nalaze u otpadnoj vodi, unutarstanične rezerve ugljika i vanjski dodani izvor ugljika. Kao vanjski izvor ugljika najčešće se koriste metanol, glukoza, acetat i propionat. Kada otpadna voda ne sadrži dovoljnu količinu organskih sastojaka potrebno je dodati vanjski izvor ugljika. Prilikom dodavanja organskih sastojaka potrebno je, u ovisnosti o izvoru organskih sastojaka, dodati minimalnu potrebnu koncentraciju organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju, tako da na kraju procesa ne preostane organskih sastojaka. Kada nema dovoljno izvora organskog ugljika, dolazi do nepotpune denitrifikacije (uklonjeni su organski sastojci, ali ne i nitrati/nitriti). Kada ima previše organskih sastojaka, denitrifikacija je potpuna, međutim u obrađenoj vodi preostaju

organski sastojci koji se trebaju ukloniti dodatnim postupcima. Potrebno je provesti prilagodbu mikroorganizama na svaki izvor ugljika (Lu i sur., 2014; Cherchi i sur., 2009). Omjer KPK/N (kemijska potrošnja kisika/dušik) ovisi o izvoru ugljika, i iznosi između 4 i 15 g KPK/g N (Peng i sur., 2007; Metcalf & Eddy, 2003; Zumft, 1997).

Denitrifikanti većinom spadaju u fakultativno anaerobne bakterije, koje u procesu s aktivnim muljem čine oko 80 % bakterija. Neki od rodova denitrifikanata su *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Paracoccus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Spirillum* i *Vibrio* (Matějů i sur., 1992). Denitrifikanti se mogu podijeliti na (Sperl i Hoare, 1971):

- Prave denitrifikante – mogu reducirati nitrat i nitrit do plinovitog dušika
- Nitrit reducirajuće denitrifikante – mogu reducirati nitrit do plinovitog dušika
- Nepotpune denitrifikante – mogu reducirati nitrat i nitrit do N-oksid intermedijera
- Nepotpune nitrit denitrifikante – mogu reducirati nitrit do N-oksid intermedijera
- Nedenitrifikante – ne mogu reducirati nitrat ni nitrit

Čimbenici koji utječu na proces denitrifikacije su kakvoća otpadne vode kao supstrata, hranjive tvari, temperatura, redoks potencijal, pH vrijednost, nedostatak otopljenog kisika, koncentracija i aktivnost denitrifikanata (Lu i sur., 2014; Cherchi i sur., 2009; Soto i sur., 2007; Gerardi, 2002). Za razliku od nitrifikacije, tijekom koje dolazi do nakupljanja vodikovih iona, tijekom denitrifikacije dolazi do nakupljanja OH^- iona, pa vrijednost pH u bioreaktoru raste (Adouani i sur., 2015).

Prisutnost otopljenog kisika (čak i 1,0 mg/L) uzrokuje inhibiciju denitrifikacije zato što se odvija kompeticija s nitratima/nitritima kao akceptorom elektrona za razgradnju organskih sastojaka. Denitrifikanti preferiraju molekularni kisik u odnosu na nitrate/nitrite za respiraciju jer tako dobiju više energije (Cheremisinoff, 1998). Iako se denitrifikacija uglavnom provodi kao anoksičan proces, također se može provoditi i aerobna denitrifikacija. Aerobna denitrifikacija uglavnom se provodi u procesima s biomasom aktivnog mulja u obliku granula odnosno biofilma, jer tada, u ovisnosti o veličini granule odnosno biofilma, dolazi do otpora difuzije supstrata. U takvim procesima, na površini granule/biofilma obitavaju aerobni organizmi, a u dubljim slojevima anoksični organizmi, pa je omogućeno odvijanje istovremene nitrifikacije i denitrifikacije (Lu i sur., 2014; Cherchi i sur., 2009; Soto i sur., 2007; Gerardi, 2002).

2.2 BIOLOŠKO UKLANJANJE FOSFORA

Fosfor se iz otpadne vode može ukloniti kemijskim i biološkim putem. Kemijske metode uklanjanja fosfora uključuju dodatak kemikalija za taloženje fosfora. Nedostatak kemijskih metoda je kemijski mulj, kojeg je teško ukloniti i potrebno zbrinuti, te cijena procesa. Biološki postupak u kojem se koriste mikroorganizmi za uklanjanje fosfora naziva se proces naprednog biološkog uklanjanja fosfora (*EBPR*) (Parsons i Smith, 2008).

EBPR proces je najučinkovitiji i najekonomičniji proces za uklanjanje fosfora iz otpadne vode. EBPR proces temelji se na obogaćivanju aktivnog mulja organizmima koji akumuliraju polifosfat u suvišku svojih metaboličkih potreba, koji se zovu polifosfat akumulirajući organizmi (engl. *polyphosphate accumulating organisms, PAO*). EBPR proces najčešće se provodi u uzastupnim anaerobnim i aerobnim (anoksičnim) uvjetima u slijedu gdje su organska tvar kao donor elektrona i akceptor elektrona, najčešće kisik (nitrat), fizički odvojeni. PAO su mikroorganizmi koji mogu koristiti/unositi organske spojeve u anaerobnim uvjetima. Konačno uklanjanje fosfora iz sustava postiže se uklanjanje viška aktivnog mulja, koji je bogat s polifosfatima (Vargas i sur., 2011).

2.2.1. Polifosfat akumulirajući organizmi

Polifosfat akumulirajući organizmi koriste kisik (anaerobno-aerobni uvjeti) i nitrat (anaerobno-anoksični uvjeti) kao akceptor elektrona u procesu naprednog biološkog uklanjanja fosfora u aerobnim i anoksičnim uvjetima. Ovisno o konačnom akceptoru elektrona PAO se mogu podijeliti u tri skupine (Tian i sur., 2017):

- PAO koji mogu koristiti samo kisik kao akceptor elektrona
- PAO koji mogu koristiti kisik i nitrat
- PAO koji mogu koristiti nitrat, nitrit i kisik.

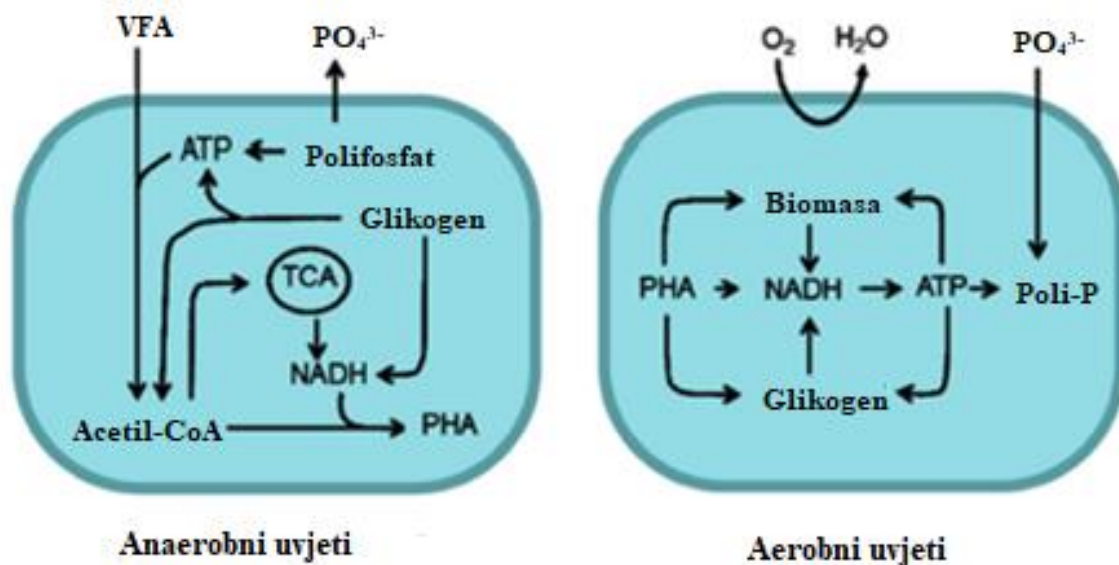
Na temelju polifosfat kinaze kao genetskog markera, PAO se mogu podijeliti u dvije skupine (Tian i sur., 2017):

- *Accumulibacter* I (PAO I) – mogu koristiti nitrat/ili nitrit kao akceptor elektrona
- *Accumulibacter* II (PAO II) – mogu koristiti samo nitrit za uklanjanje fosfora u anoksičnim uvjetima.

Prije nego što je *Accumulibacter* identificiran kao najčešći dominantni PAO u EBPR sustavu, smatralo se da je *Acinetobacter* sp. organizam koji je odgovoran za EBPR proces. Smatra se da *Acinetobacter* sp. ima učinkovit sustav za uklanjanje fosfora, ali manje je razumljiv

metabolički put u usporedbi s *Accumulibacter*. Poznato je da *Acinetobacter* sp. akumuliraju složenije izvore ugljika kao što su aminokiseline i proteine te ih pohranjuju kao neidentificirane tvari (Bunce i sur., 2018).

Predloženi metabolički model koji opisuje djelovanje PAO u ciklusnima anaerobne i aerobne/anoksične faze opisali su Comeau i sur. (1986), prikazan na slici 1.



Slika 1. Metabolički put polifosfat akumulirajućih organizama u anaerobnim i aerobnim uvjetima (prema Bunce i sur., 2018)

U anaerobnim uvjetima PAO sekundarnim transportom unose hlapljive masne kiseline (engl. *volatile fatty acids*, VFA) i pohranjuje ih kao polihidroksialkanoate (PHA), a hidrolizom unutarnje pohranjenog polifosfata i/ili razgradnjom glikogena dobiva se potrebna energija u obliku ATP-a (adenozin trifosfat) (Li i sur., 2017). Sinteza PHA u anaerobnim uvjetima zahtjeva redukcijski ekvivalent nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) koji se osigurava glikolizom ili TCA ciklusom (engl. *tricarboxylic acid*, TCA) (Vargas i sur., 2011; Comeau i sur., 1986). Polimer koji osigurava redukcijske ekvivalente i dio energije potrebne za anaerobni unos organskih tvari je glikogen. Glikogen se glikolitičkim putem razgrađuje do piruvata i istovremeno se proizvodi NADH. Dio nastalog piruvata ulazi u TCA ciklus i na kraju prevodi u ugljikov dioksid, a dio piruvata prevodi se u acetil koenzim A za sintezu PHA. NADH u TCA ciklusu nastaje nizom oksidacijskih reakcija, a acetil koenzim A nastaje nizom redukcijskih reakcija (Li i sur., 2017; Mino i sur., 1998; Comeau i sur., 1986). Zbog razgradnje polifosfata dolazi do otpuštanja ortofosfata izvan stanice (Vargas i sur., 2011; Comeau i sur., 1986).

Zatim, u aerobnoj/anoksičnoj fazi unutarstanični PHA oksidira se pomoću dostupnog akceptora elektrona što može biti kisik u aerobnim ili nitrat/nitrit u anoksičnim uvjetima, a oslobođena energija koristi se za unos fosfora i sintezu glikogena. Oksidacijom PHA dobiva se acetil koenzim A koji služi kao izvor ugljika potreban za rast stanice i ATP koji se djelomično koristi za proliferaciju i održavanje životnih funkcija stanice, a ostatak za unos fosfata u stanicu i sintezu polifosfata. Potrošnjom PHA potaknut je protok protona, a za njegovu stabilizaciju PAO unose ortofosfate u suvišku metaboličkih potreba i sintetiziraju polifosfat, a istovremeno se nitrat i nitrit reduciraju do plinovitog dušika koji se ispušta iz sustava (anoksični uvjeti), odnosno u aerobnim uvjetima kisik je akceptor elektrona (Li i sur., 2017). Veća koncentracija fosfora unosi se u stanicu u aerobnim/anoksičnim uvjetima nego što se u anaerobnim uvjetima otpušta ortofosfata izvan stanice. Konačno uklanjanje fosfora iz bioreaktora odvija se ispuštanjem viška mikrobne biomase aktivnog mulja koja je bogata polifosfatima (Vargas i sur., 2011; Comeau i sur., 1986).

2.2.2. Glikogen akumulirajući organizmi

Glikogen akumulirajući organizmi (GAO) u pravilu se nalaze u bioreaktorima u kojima se primjenjuje EBPR proces jer imaju metabolizam sličan PAO. GAO imaju metaboličke sposobnosti za anaerobni unos VFA i konverziju u PHA, međutim GAO ne otpuštaju fosfor u anaerobnim uvjetima, niti ga unose u aerobnim/anoksičnim uvjetima i ne doprinose uklanjanju fosfora iz otpadne vode. GAO hidroliziraju glikogen kao jedini izvor energije za anaerobni unos VFA. Problem prisutnosti GAO u aktivnom mulju je što GAO, kao i PAO, koriste VFA, međutim, bez unosa fosfora u svoje stanice i time troše supstrat (organske sastojke) koji je namjenjen PAO i koji su zaslužni za uklanjanje fosfora iz otpadne vode. Odabir procesnih čimbenika koji pogoduju PAO umjesto GAO može rezultirati učinkovitijim i pouzdanijim procesom uklanjanja fosfora iz otpadne vode. Istraživanja su sugerirala da bi sastav organskih sastojaka u otpadnoj vodi, posebno acetata i propionata, mogao utjecati na selekciju PAO odnosno GAO (Oehmen i sur., 2005; Pijuan i sur., 2003).

Glavna razlika između PAO i GAO je ta što PAO dobivaju energiju iz hidrolize polifosfata, a GAO iz glikolize glikogena. Ren i sur. (2014) navode da je važan faktor u kompeticiji PAO i GAO omjer ugljika i fosfora (C/P) u ulaznoj otpadnoj vodi (influentu). Prema njihovim saznanjima, PAO zahtijevaju veću količinu izvora ugljika za potrebnu energiju u metaboličkim procesima te zbog toga ulazna otpadna voda s niskim udjelom ugljika može negativno utjecati na kapacitet uklanjanja fosfora u sustavu obrade otpadne vode. S druge strane, visoka

koncentracija izvora ugljika nije povoljna za rast PAO jer dolazi do proliferacije i dominacije GAO u odnosu na PAO. GAO koriste manje fosfora za rast i zbog toga se mogu bolje prilagoditi uvjetima s višim C/P omjerima. Zbog toga je kontroliranje omjera C/P u ulaznoj otpadnoj vodi važan čimbenik u održavanju učinkovitog i stabilnog uklanjanja fosfora u sustavima obrade otpadne vode. Temperatura ima značajnu ulogu u kompeticiji između PAO i GAO u sustavima za uklanjanje fosfora. Wang i sur. (2005) su uočili da su PAO dominantni soj na temperaturi od 20 °C, dok na temperaturi od 30 °C GAO je dominantni soj u sustavu.

2.3. DENITRIFICIRAJUĆA DEFOSFATACIJA

U većini sustava za biološku obradu otpadnih voda, uklanjanje dušika i fosfora uglavnom je integrirano u jedan sustav s aktivnim muljem. Kada se primjenjuje kombinacija konvencionalnih bioloških metoda uklanjanja dušika, odnosno nitrifikacija i denitrifikacija, i EBPR proces, često se događa da je uklanjanje dušika u denitrifikaciji i uklanjanje fosfora u EBPR procesu ograničeno nedovoljnom koncentracijom organskih sastojaka u otpadnoj vodi. Međutim, ukoliko se za uklanjanje nutrijenata, dušika i fosfora, koriste organizmi koji mogu istovremeno provoditi denitrifikaciju i unos fosfora u anoksičnim uvjetima, niska koncentracija organskih sastojaka više ne predstavlja ograničenje učinkovitom uklanjanju nutrijenata (Meinhold i sur., 1999a; Kuba i sur., 1996a). Takvi mikroorganizmi zovu se denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (engl. *denitrifying phosphate accumulating organisms*, DPAO). Metabolizam DPAO sličan je metabolizmu PAO, u anaerobnoj fazi odvijaju se isti procesi i kod PAO i kod DPAO, a razlika je ta da DPAO u anoksičnoj fazi koriste nitrate i nitrite (koji su nastali oksidacijom amonijaka u aerobnim uvjetima) kao akceptore elektrona u anoksičnoj fazi (umjesto kisika), pri čemu se postiže istovremeno uklanjanje dušika i fosfora iz otpadne vode. DPAO oksidiraju unutarstanične rezerve PHA s nitratom/nitritom kao akceptorom elektrona i tako dobivaju energiju potrebnu za unos i pohranu fosfora u svoje stanice, i zato DPAO ne trebaju vanjski izvor organskih sastojaka. Denitrificirajuća defosfatacija smatra se alternativom konvencionalnim metodama uklanjanja dušika i fosfora iz otpadne vode (Zeng i sur., 2003; Ahn i sur., 2001; Meinhold i sur., 1999b).

DPAO mogu se podijeliti u dvije skupine s obzirom na akceptore elektrona. DPAO koji mogu koristiti kisik i nitrat kao akceptore elektrona, dok DNPAO (engl. *denitrifying phosphate accumulating organisms over nitrite*) uz kisik i nitrat kao akceptor elektrona mogu koristiti i nitrit (Zhang i sur., 2010; Hu i sur., 2003).

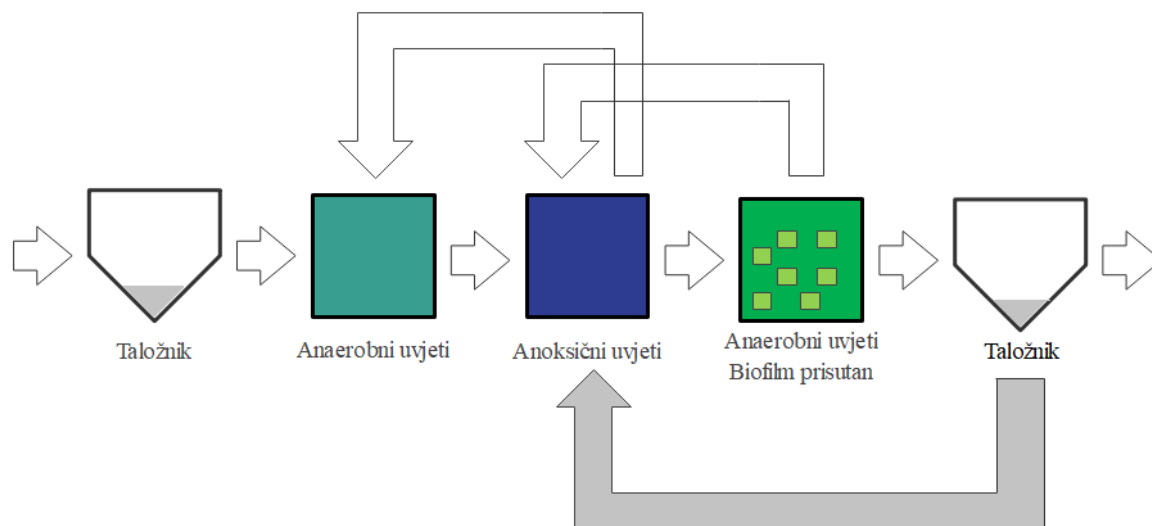
Najčešće tehnike identifikacije mikrobne raznolikosti u otpadnoj vodi su denaturirajuća gradijentna gel elektroforeza (engl. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, DGGE) i fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl. *Fluorescence in situ hybridization*, FISH). Tian i sur. (2011) istraživali su vezu između strukture mikrobnih zajednica i učinkovitosti denitrificirajuće defosfatacije te su utvrdili da varijacije u mikrobnim zajednicama imaju relativno dinamičku vezu sa uspješnosti procesa. Uočeno je da je učinkovitost uklanjanja ukupnog fosfora bila niža kad su α -proteobakterije bile dominantne što ustvari znači da nisu pogodne za proces biološkog uklanjanja dušika. Nadalje, *Bacteroidetes* je bila dominantna vrsta bakterija u fazama kada je uklanjanje ukupnog fosfora i denitrificirajuća defosfatacija bila najučinkovitija. Također, smatra se da su *Sphingobacteriaceae* jedan od DPAO. *Alphaproteobacteria* je klasa bakterija koja ima mogućnosti denitrificirajuće defosfatacije. *Paracoccus* je rod iz *Alphaproteobacteria* koji istovremeno uklanja fosfat i nitrat u sustavima za obradu otpadnih voda u anoksičnim uvjetima, koristi kratkolančane masne kiseline i skladišti ih u obliku polihidroksibutirata i za unos fosfora preferira TCA ciklus, a ne glikolitički put što smanjuje otpuštanje fosfora u anaerobnim uvjetima (Jyotsnarani i sur., 2011). Rodovi *Azoarococcus*, *Azonexus* i *Thaurea*, pripadnici porodice *Rhodocyclaceae*, često se nalaze u komunalnim postrojenjima za obradu otpadne vode koji uklanjaju dušik i fosfor (Thomsen i sur., 2007).

Prednosti u uklanjanju fosfora i dušika pomoću denitrificirajuće defosfatacije u usporedbi sa tradicionalnim procesima su manja potreba za kisikom, niska potrošnja energije i niski troškovi rada (Li i sur., 2017). DPAO se mogu lako namnožiti u naizmjeničnim anaerobnim i anoksičnim uvjetima, ukoliko je osigurana odgovarajuća količina lako razgradivog organskog supstrata (poput acetata) u anaerobnim uvjetima (Oehmen i sur., 2010; Carvalho i sur., 2007). Koncentracija biološki razgradivih organskih sastojaka mora biti dovoljno visoka da osigura učinkovito oslobađanje ortofosfata i da osigura dovoljnu količinu supstrata unutar stanice (PHA) za daljnje procese uz prisutnost akceptora elektrona. Pokazano je da se brzina unosa fosfata i brzina denitrifikacije povećavaju s povećanjem početne koncentracije PHA u stanicama DPAO (Kern-Jespersen i Henze, 1993). Kompletan organski supstrat mora se iskoristiti u anaerobnim uvjetima i ne smije biti dostupan u anoksičnim uvjetima. Također, svi nitrati i/ili nitriti moraju se iskoristiti u anoksičnim uvjetima i ne smiju ući u anaerobnu zonu. Nedostatak organskih spojeva u anaerobnoj fazi i nitratnih/nitritnih iona u anoksičnoj fazi ograničava rast heterotrofnih bakterija koje ne akumuliraju PHA, što je ključni mehanizam za uklanjanje fosfora i dušika (Gnida i sur., 2020).

2.3.2. Proces denitrificirajuće defosfatacije

Proces denitrificirajuće defosfatacije može se provoditi kao jednomuljni ili kao dvomuljni sustav, odnosno u sustavu s jednim muljem gdje DPAO, nitrificirajuće bakterije i ostale heterotrofne bakterije ostaju u istom reaktoru, dok su u sustavu s dva mulja DPAO i nitrifikacijske bakterije odvojene u bioreaktorima s imobiliziranim membranama ili aerobnim nitrificirajućim šaržnim reaktorima koji rade u slijedu (Li i sur., 2017).

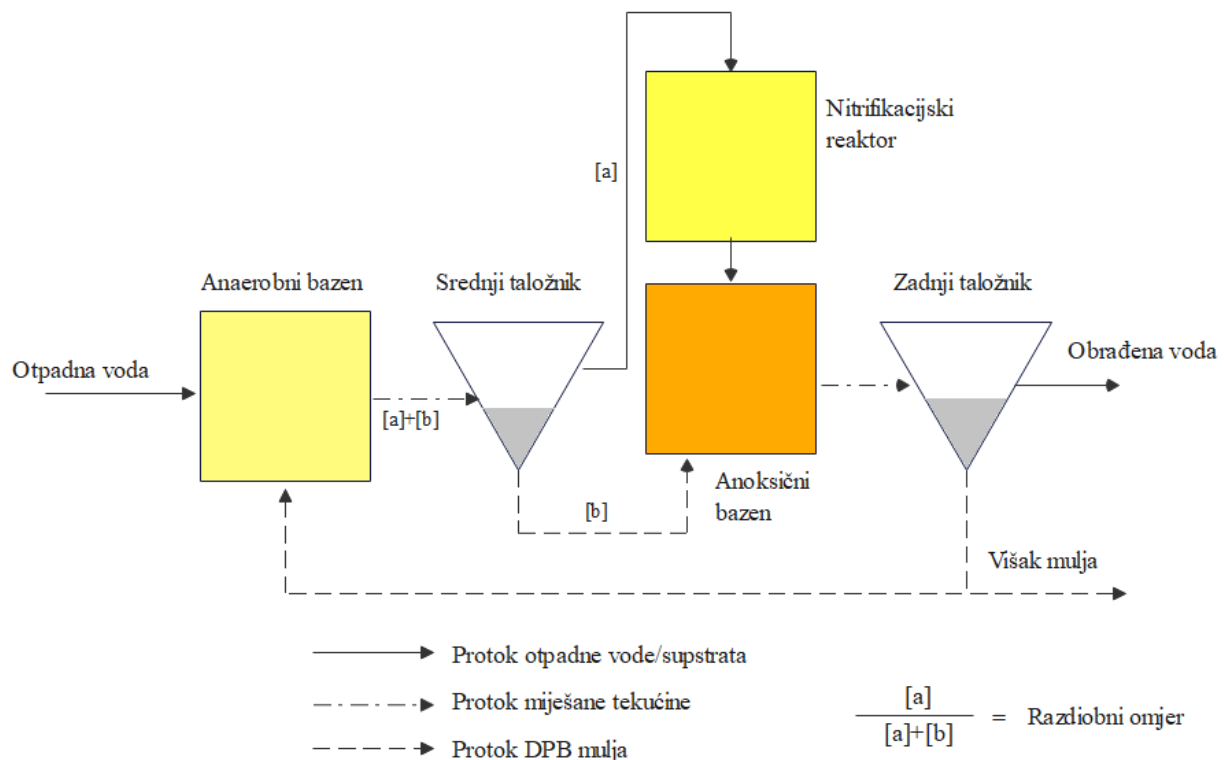
U jednomuljne sustave svrstani su procesi Sveučilišta u Cape Townu (engl. *University of Cape Town*, UCT) i procesi biološko-kemijskog uklanjanja fosfora i dušika (engl. *biological-chemical phosphorus and nitrogen removal*, BCFS). Svi organizmi suspendirani su u jednom mulju te je zbog toga potrebno duže hidrauličko vrijeme zadržavanja (engl. *hydraulic retention time*, HRT) kako bi se zadržala zadovoljavajuća aktivnost nitrifikanata. Produživanjem HRT dolazi do trošenja unutarstaničnog PHA u PAO što je moguće smanjiti uvođenjem biofilma u aerobni reaktor. Primjenom UCT procesa mogu se akumulirati DPAO u aktivnom mulju i može se provoditi denitrificirajuća defosfatacija. UCT proces može poboljšati biološko uklanjanje fosfora tako što bi se izbjegao utjecaj nitrata u recirkulacijskom mulju na anaerobni unos fosfora. Temelji se na tradicionalnom procesu biološkog uklanjanja dušika i fosfora, samo sa promijenjenim povratom mulja (Li i sur., 2017; Zang, 2016; Wang i Li, 2015; Hamada i sur., 2006). Slika 2. pokazuje tijek UCT procesa i problem takvog procesa je premali povrat mulja, cirkularna konfiguracija te natjecanje DPAO, nitrificirajućih bakterija i drugih heterotrofnih bakterija u istom okolišu. BCFS proces koristi princip UCT procesa i sastoji se od 5 reaktora sa neovisnim funkcijama i tri cirkulacijska sustava. Sastoji se od anaerobnog bazena, kontaktnog bazena, anoksičnog bazena, anoksično/aerobnog bazena i aerobnog bazena. Nakon anoksičnog bazena prvom cirkulacijom vraća se mulj na početak procesa, nitratni dušik nakon aerobne faze vraća se u anoksični bazen što predstavlja drugu cirkulaciju, a treća cirkulacija je vraćanje mulja u anoksično/aerobni bazen nakon aerobnog bazena čime se povećava učinkovitost nitrifikacije ili istovremene nitrifikacije i denitrifikacije. Glavni nedostatak ovog procesa je prevelika površina koju zauzima anoksično/aerobni reaktor (Li i sur., 2017).



Slika 2. Tijek UCT procesa (prema Hamada i sur., 2006)

Sustavi s jednim muljem napravili su velik iskorak u biološkoj obradi otpadne vode. Problemi kod te vrste procesa je prevelika starost mulja koja je potrebna za potpunu nitrifikaciju pri niskim temperaturama, kompeticija za organski supstrat između denitrificirajućih heterotrofa i PAO, voluminoznost mulja (Ekama i Wentzel, 1999) i aerobna oksidacija organskih sastojaka (Hao i sur., 2001).

U sustavima s dva mulja potpuno su odvojeni procesi nitrifikacije i denitrificirajuće defosfatacije i svaki proces ima optimalne uvjete za rast organizama koji provode te procese što dovodi do učinkovitijeg uklanjanja fosfora i dušika. Vrijeme zadržavanja mulja (engl. *Solid retention time*, SRT) u procesu nitrifikacije više nije dominantno u procesu denitrificirajuće defosfatacije. U anaerobnim uvjetima DPAO koriste većinu organskog supstrata, a nitrat je akceptor elektrona u anoksičnim uvjetima što dovodi do dominacije DPAO i ne događa se aerobni gubitak KPK (Kuba i sur., 1996a; Hao i sur., 1996). Pomoću predtaložnika preostali KPK prevodi se u metan. Kontrola nakupljenog mulja moguća je zbog same izvedbe sustava s dva mulja jer anaerobni reaktori služe kao selektori u sustavima s čepolikim protokom (Hao i sur., 2001). Primjer sustava s dva mulja su A²N SBR i DEPHANOX. Proces A²N-SBR predložili su Kuba i sur. (1996a). A² označava šaržni reaktor koji radi u slijedu (engl. *sequencing batch reactor*, SBR) s anaerobnim/anoksičnim uvjetima, a slovo N nitrifikacijski SBR (Xu i sur., 2011). Slika 3. prikazuje tijek A²N procesa gdje u anaerobni bazen ulaze otpadna voda i ostatak iz zadnjeg taložnika i metabolizmom DPAO otpušta se fosfor. U srednjem taložniku odvaja se supernatant bogat amonijakom u aerobnom/nitrifikacijskom SBR, a mulj ide direktno u anoksični bazen gdje se za proces denitrificirajuće defosfatacije koristi nitrat kao akceptor elektrona (Li i sur., 2017).



Slika 3. Tijek procesa A²N (prema Hao i sur., 2001)

Nedostatci ovog procesa su prevelika količina zaostalog amonijaka, dugotrajnost procesa i otežana kontrola stabilnosti. Naime, u mulju, koji ulazi izravno u anoksičnu fazu, prisutan je amonijak koji se u daljnjim koracima obrade ne uklanja u potpunosti. Također, u anoksičnoj fazi ako je premalo nitrata smanjuje se učinkovitost uklanjanja fosfora, a ako je previše u mulju bi zaostajao nitrat (Li i sur., 2017; Wang i Li, 2015; Kuba i sur., 1997).

Anoksična defosfatacija (engl. *anoxic dephosphation*, DEPHANOX) je sustav s dva mulja sa kontinuiranim protokom (Kim i sur., 2009; Bortone i sur., 1996) koji se sastoji od najmanje četiri bioreaktora i dva taložnika. Ovim procesom nastaje manje mulja jer je niža brzina rasta DPAO (Tsuneda i sur., 2006), troši se manje kisika aeracijom zbog čega su i manji troškovi proizvodnje (Zafiriadis i sur., 2011) te je manja potreba za izvorom ugljika jer se koriste DPAO (Lee i Yun, 2014). U DEPHANOX sustavu moguće je održavanje visokog unosa fosfata uz povećanje potencijala denitrifikacije što je izrazito dobro za obradu otpadne vode sa niskim omjerom KPK/ukupni dušik, no zbog velikog broja reaktora i tokova reciklacije teško je vidljiva njegova široka primjena (Chen i sur., 2021; Xu i sur., 2011).

2.4. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA DENITRIFICIRAJUĆU DEFOSFATACIJU

Da bi se postigla što veća učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora, potrebno je postići optimalne uvjete denitrificirajuće defosfatacije. Čimbenici koji potiču rast i aktivnost DPAO u aktivnom mulju te omogućavaju denitrificirajući unos ortofosfata imaju ključan utjecaj na povećanje učinkovitosti denitrifikacijske defosfatacije. Također, potrebno je inhibirati rast drugih bakterija, primjerice GAO, koje se mogu natjecati s DPAO kako bi proces bio učinkovitiji (Gnida i sur., 2020).

2.4.1. Nitrit kao akceptor elektrona

Primjenom procesa denitrificirajuće defosfatacije preko nitrata istovremeno se može uklanjati dušik i fosfor samo u kombinaciji s potpunom nitrifikacijom (Kuba i sur., 1996a), dok denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita može postići istovremeno uklanjanje dušika i fosfora u kombinaciji s djelomičnom (parcijalnom) nitrifikacijom – nitritacijom. Takav način vođenja procesa dovodi do smanjenja troškova aeracije i smanjene proizvodnje mulja (Zhang i sur., 2010; Peng i Zhu, 2006). Nitrit se pojavljuje kao intermedijer u procesima nitrifikacije i denitrifikacije, a njegovo korištenje kao akceptora elektrona nije dovoljno istraženo zbog činjenice da u biološkoj obradi vode nitrit ima inhibitorne učinke na unos fosfora te da izloženost velikoj koncentraciji nitrita (iznad 8 mg/L) potpuno inhibira aktivnost anoksičnog unosa fosfora (Ahn i sur., 2001; Meinhold i sur., 1999b; Kerrn-Jespersen i sur., 1994; Comeau i sur., 1989). Da DNPAO mogu koristiti nitrit kao akceptor elektrona pri koncentraciji nitrita puno većoj od objavljenog praga toksičnosti pokazali su Ahn i sur. (2001).

2.4.1.1. Inhibicija slobodnom dušičnom kiselinom

U ovisnosti o vrijednosti pH i temperature miješane tekućine, nitrit se može nalaziti u molekularnom i ionskom obliku. Molekularan oblik nitrita zove se slobodna nitritna kiselina, HNO_2 . Slobodna dušična kiselina (engl. *Free nitrous acid*, FNA) i nitrit su inhibitor i supstrat anoksičnog metabolizma DPAO. Pri iznimno niskim koncentracijama FNA od 0,01 mg HNO_2 -N/L utvrđeni su inhibitorni učinci na sve anoksične metabolizme u aktivnom mulju. Koncentracija nitrita od 0,22 mg/L pri pH 7 u postrojenjima za obradu otpadnih voda može inhibirati unos fosfora, a koncentracija nitrita od 50 mg/L može nepovoljno utjecati na sve ključne procese (Pijuan i Yuan, 2010). Freitas i sur. (2009) ukazuju da je učinkovitost uklanjanja fosfora inhibirana pri koncentraciji od 0,00005 mg HNO_2 -N/L. Otpuštanje fosfora i potrošnja

glikogena odvija se i kada koncentracije FNA prelaze 0,044 mg $\text{HNO}_2\text{-N/L}$. Zhou i sur. (2010) zabilježili su da je aktivnost razgradnje PHA bila konstantna te da se otpuštanje fosfora i potrošnja glikogena pri visokim koncentracijama FNA nisu dogodili zbog odumiranja stanica jer u tom slučaju PHA bi bio otpušten odjednom. PHA razgradnja i redukcija nitrita povezuju se s procesom stvaranja energije i bili su manje inhibirani visokom koncentracijom FNA što može značiti da FNA ima veći inhibitorni utjecaj na procese koji troše energiju u DPAO. Prisutnost FNA značajno je utjecala na smanjenje razine ATP-a u DPAO kulturi i osim što to može biti posljedica njegove potrošnje, također može ukazati na inhibiciju procesa generiranja energije. Proces inhibicije nakon dodatka FNA brzo se postiže i nakon toga ostaje na istoj razini dok je FNA prisutna u miješanoj tekućini. Uklanjanjem FNA iz miješane tekućine, proces generiranja ATP-a vraća se na normalnu razinu.

2.4.2. KPK/N omjer

Omjer KPK/N u procesu denitrificirajuće defosfatacije je važan zato što nitriti odnosno nitriti predstavljaju akceptore elektrona u anoksičnoj fazi. Ukoliko je omjer KPK/N nizak, tijekom anaerobne faze dodaje se izvor ugljika. Dodavanjem izvora ugljika tijekom anaerobne faze omogućuje se PAO/DPAO da sintetiziraju unutarstanične rezerve PHA, što povećava učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora. Važno je uzeti u obzir da pretjerano visok omjer KPK/N može rezultirati neiskorištenim KPK u anoksičnoj fazi. Takvi uvjeti daju prednost denitrifikacijskim heterotrofnim organizmima nad DNPAO u korištenju dijela KPK za denitrifikaciju. Takvim postupkom smanjuje se dostupnost elektron donora (KPK) za DPAO, što konačno dovodi do pogoršanja sposobnosti uklanjanja fosfora (Wang i sur., 2009; Grady i sur., 1999).

2.4.3. Vrijednost pH

Vrijednost pH koja je prikladna za biološku obradu otpadne vode uobičajeno iznosi između 6 i 8. U EBPR procesu visoke vrijednosti pH mogu uzrokovati kemijsko taloženje fosfora, što može narušiti biološko otpuštanje fosfora i uništiti aktivnost mulja (Zhang i sur., 2010; Wang i sur., 2005b). U rasponu vrijednosti pH 6-8, povećanjem pH vrijednosti povećavalo se anaerobno otpuštanje fosfora, dok je maksimalna vrijednost unosa fosfata u anoksičnim uvjetima bila pri pH vrijednosti od 7,0. U anaerobnoj fazi EBPR procesa, pH vrijednost ima važnu ulogu u otpuštanju fosfata i unosa organskog ugljika (Liu i sur., 1996). Smolders i sur.

(1994) sugeriraju da bakterije zahtijevaju više energije za apsorpciju organskog aniona pri višim pH vrijednostima što dovodi do dodatnog oslobađanja fosfora. Također, postoji hipoteza da anaerobna razgradnja polifosfata ima dodatnu ulogu u regulaciji intracelularne pH vrijednosti i da povećanje ekstracelularnog pH može dovesti do povećanja intracelularne pH vrijednosti te do dodatnog oslobađanja fosfata (Bond i sur., 1999).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. OTPADNA VODA

Pokusi u ovom radu provedeni su sa sintetskom otpadnom vodom s acetatom kao elektron donorom i nitritom kao akceptorom elektrona. Kao izvor ugljika korišten je natrijev acetat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$, Gram-Mol d.o.o.) dodan u odgovarajućoj količini za postizanje omjera C/N 2, 3 i 4. Pripremljene su mineralne podloge sa nitritima i fosfatima otapanjem soli odgovarajuće količine NaNO_2 (Merck) i KH_2PO_4 (Merck) u vodi za postizanje koncentracije 1 g N/L i 1 g P/L. Pokusi su vođeni pri N/P omjeru 1 pri početnoj koncentraciji $\text{NO}_2\text{-N} = \text{PO}_4\text{-P} = 20 \pm 2$ mg/L.

3.2. POSTAVKE REAKTORA

Aklimatizirani aktivni mulj je uzet iz roditeljskog reaktora i podijeljen na 3 jednaka dijela. Pokusi su vođeni u staklenim laboratorijskim čašama volumena 600 mL, radnog volumena 500 mL. Pokusi su vođeni pri koncentraciji otopljenog kisika 0,2-0,3 mg/L, temperaturi 21,1-21,3 °C i početnoj vrijednosti pH $7,4 \pm 2$. Kontakt mikroorganizama aktivnog mulja i otpadne vode, te anoksični uvjeti osigurani su miješanjem reaktorskog sadržaja na magnetskoj miješalici (IKA RH basic 2) pri 100 o/min. Laboratorijske čaše bile su opremljene elektrodama za praćenje koncentracije otopljenog kisika, vrijednosti pH i temperature.

3.3. AKTIVNI MULJ

Za provedbu pokusa denitrificirajuće defosfatacije korišten je aktivni mulj koncentracije 3 g MLSS/L. Mulj je porijeklom s uređaja za biološku obradu otpadne vode grada. Nizom naizmjeničnih pokusa aerobne nitrifikacije i anoksične denitrifikacije/denitrificirajuće defosfatacije u aktivnom mulju su namnožene mikrobne vrste odgovorne za oksidaciju amonijaka, nitrifikanti, redukciju nitrata i nitrita, denitrifikanti, i za napredno biološko uklanjanje fosfora, PAO/DPAO. Također, dugotrajnim vođenjem procesa denitrificirajuće defosfatacije u anoksičnim uvjetima s nitritom kao jedinim akceptorom elektrona DPAO su aklimatizirani na nitrit kao akceptor elektrona te se povećala tolerancija mikroorganizama aktivnog mulja na koncentraciju nitrita do oko 20 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$.

Svi eksperimenti provedeni su u 3 ponavljanja, a rezultati predstavljaju srednju vrijednost \pm standardna devijacija

3.4. ANALITIČKI POSTUPCI

Uzorci za analizu su uzimani svakih 15 minuta tijekom pokusa koji su trajali 2 sata, i filtrirani kroz grubi filter papir veličine pora 0,45 µm prije analize za određivanje KPK, NO₂-N, PO₄-P, a za analizu miješane tekućine suspendiranih čestica (engl. *mixed liquor suspended solids*, MLSS) uzorak se ne filtrira.

3.4.1. Određivanje nitrita

Za određivanje nitrita (NO₂-N) korišteni su kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776, a metoda se temelji na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli, koja reagira s N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorom pri čemu nastaje crveno-ljubičasta azo boja. Intenzitet obojenja se mjeri fotometrijski. Ova metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500-NO₂-B, i EN 26 777.

Postupak:

U staklenu kivetu doda se 5 mL uzorka i jedna žličica NO₂-1 reagensa, kiveta se zatvori i miješa dok se ne otopi reagens. Nakon reakcijskog vremena od 10 minuta u fotometru (Spectroquant VEGA 400, Merck) izmjeri se koncentracija NO₂-N u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776 za raspon koncentracija 0,002-1 mg NO₂-N/L

Staklene kivete s čepovima

Pipete volumena 2, 5, 10 mL

Kvarcne kivete, Merck

Spektrofotometar (Spectroquant VEGA 400, Merck)

3.4.2. Izračun slobodne nitritne kiseline

Slobodna nitritna kiselina (FNA) se računa prema jednadžbi [3] (Anthonisen i sur., 1976).

$$\text{FNA} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{[\text{NO}_2^- - \text{N}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{\frac{-2300}{e^{273+T(^{\circ}\text{C})}} \times 10^{\text{pH}}} \quad [3]$$

3.4.3. Određivanje koncentracije fosfata

Za određivanje fosfata u obliku ortofosfata (PO₄-P) korišteni su kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14842, 1.00673.0001 i 1.14729.0001. Temelj metode je reakcija iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom pri čemu se razvija žuto obojena molibdovanadat fosforna kiselina, čija se koncentracija određuje fotometrijski. Ova metoda je analogna APHA 4500-P C.

Postupak:

U staklenu kivetu otpipetira se 5 mL uzorka, dodaje se 1,2 mL reagensa PO₄-1, kiveta se zatvori i promiješa. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena u spektrofotometru (Spectroquant VEGA 400, Merck) izmjeri se koncentracija PO₄-P u mg/L.

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1,14842 za raspon koncentracija 0,5-30 mg PO₄-P/L, 1.00673.0001 za raspon koncentracija 3-100 mg PO₄-P/L i 1.14729.0001 za raspon koncentracija 0,5-25 mg PO₄-P/L

Staklene kivete s čepovima

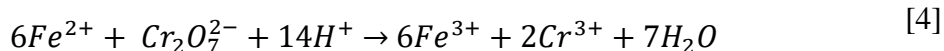
Pipete volumena 2, 5, 10 mL

Kvarcne kivete, Merck

Spektrofotometar(Spectroquant VEGA 400, Merck)

3.4.4. Određivanje kemijske potrošnje kisika

Vrijednost KPK određivana je titrimetrijski prema Standard Methods (APHA, 2005), po metodi 5220C (Closed Reflux, Titrimetric method). Uzorak se spaljuje u kiseloj sredini uz srebro sulfat (Ag₂SO₄, Kemika) kao katalizator i živin sulfat (HgSO₄, Kemika) da bi se izbjegle interferencije nekih anorganskih spojeva, primjerice klorida. Suvišak kalijeva bikromata (K₂Cr₂O₇, Kemika) se titrira otopinom feroamonijeva sulfata, FAS ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, Kemika), uz dodatak ferroina kao indikatora [jednadžba 4]



Postupak:

U staklenu pipetu otpipetira se 2 mL uzorka, doda se 1,2 mL otopine $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$, i 2,8 mL otopine $Ag_2SO_4 + H_2SO_4$ (Gram-Mol d.o.o.), zatvori se čepom, promiješa i spaljuje u termoreaktoru (Thermoreactor TR 300, Merck) na 150 °C tijekom 1 h. Zatim se uzorak hladi na sobnoj temperaturi u tami. Ohlađeni uzorak se titrira (Digitalna bireta Solarus, Hirschman-Laborgeräte) otopinom FAS (0,1 mol/L) uz dodatak ferroina kao indikatora. Prilikom titracije boja otopine se mijenja iz plavo-zelene do smeđe-crvene. Slijepa proba se određuje na isti način uz razliku da je dodani uzorak destilirana voda. Faktor otopine feroamonijevog sulfata se određuje na isti način kao i slijepa proba, s razlikom da se uzorak ne spaljuje. Faktor otopine se računa prema jednadžbi 5:

$$f = \frac{1,2}{V_{fas}} \quad [5]$$

gdje je:

1,2 – volumen (mL) otopine $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$

V_{fas} – volumen (mL) FAS otopine utrošene za titraciju

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi 6:

$$KPK \left[\frac{mgO_2}{L} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \cdot f \cdot 8000}{V_{uzorka}} \quad [6]$$

gdje je:

V_1 – volumen [mL] FAS utrošen za filtraciju slijepa probe

V_2 – volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

c – koncentracija FAS (0,1 mol/L)

f – faktor otopine FAS

Pribor:

Staklene kivete s čepovina

Pipete volumena 2, 5, 10 mL

Digestor

Dispenzeri

Titратор

3.4.5. Određivanje MLSS

MLSS je korišten kao mjera koncentracije aktivnog mulja, a određuje se na način da se izračuna razlika filter papira s talogom aktivnog mulja i čistog suhog filter papira, oba sušena do konstantne mase na 105 °C u sušioniku (Instrumentaria ST-05).

Postupak:

Prilikom postavljanja pokusa određivana je koncentracija aktivnog mulja na način da je uzet poznati volumen homogene suspenzije aktivnog mulja i filtriran kroz čist, osušen i prethodno izvagan filter papir. Filter papir s uzorkom aktivnog mulja je sušen na 105 °C do konstantne mase, i zatim ostavljen u eksikatoru na hlađenje. Ohlađeni suhi filter papir s uzorkom mulja je izvagan i iz razlike mase suhog filter papira s uzorkom aktivnog mulja i čistog, suhog filter papira, podijeljeno s volumenom uzete suspenzije aktivnog mulja dobije se koncentracija aktivnog mulja, izražene u g/L.

Formula (7) za računanje MLSS:

$$MLSS \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{m_{om} - m_f}{mL \text{ uzorka}} \times 1000 \quad [7]$$

gdje je:

m_{om} [g] – masa osušenog filter papira s uzorkom aktivnog mulja

m_f [g] – masa čistog osušenog filter papira

mL uzorka – volumen suspenzije aktivnog mulja

Pribor:

Pipeta volumena 25 mL

Lijevak

Čaša volumena 50 mL

Osušeni i izvagani filter papir

Sušionik

Eksikator

3.4.6. Određivanje vrijednosti pH

Za određivanje vrijednosti pH korišten je pH metar (WTW 330i) i pH elektroda (SenTix41). Prije pokusa napravljena je kalibracija tako što se pH elektroda uranjala u pufer otopine s pH 4, pH 7 i pH 10 prema uputama proizvođača. Tijekom pokusa pH elektroda je bila uronjena u miješanu tekućinu i vrijednost pH je očitavana sa zaslona pH metra. Nakon završetka mjerenja, pH elektroda je isprana destiliranom vodom i čuvana u otopini elektrolita, zasićenoj otopini kalijeva klorida, KCl (Alkaloid).

3.4.7. Određivanje temperature

Tijekom pokusa temperatura je motrena očitavanjem sa zaslona uređaja pomoću temperaturnog senzora na kisikovoj elektrodi (WTW Oxi3210 i DurOx) i pH elektrodi (WTW 330i i SenTix 41) uronjenih u miješanu tekućinu.

3.4.8. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Za određivanje koncentracije otopljenog kisika korišten je mjerač otopljenog kisika (WTW Oxi3210) i kisikova elektroda (DurOx). Prije pokusa instrument je umjeren prema uputama proizvođača. Tijekom pokusa elektroda je bila uronjena u miješanu tekućinu i koncentracija otopljenog kisika je očitavana sa zaslona uređaja izražena u mg/L.

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) pojedinačnog parametra i izračunato je prema jednadžbi (8):

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [8]$$

Pripadajuće standardne pogreške $S_{\bar{x}}$ su izračunate prema jednadžbi (9):

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [9]$$

Pri čemu je N=ukupan broj mjerenja, x_i =pojedinačne vrijednosti mjerenja.

Statistički značajnim smatraju se razlike za koje je stupanj vjerojatnosti $p < 0,05$.

Za statističku analizu korišten je Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjene Ameičke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulsa, Sjedinjene Američke Države). Dobiveni podaci su

izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba provedena je ANOVA analizom varijance s određenim intervalom pouzdranosti $p \leq 0,05$.

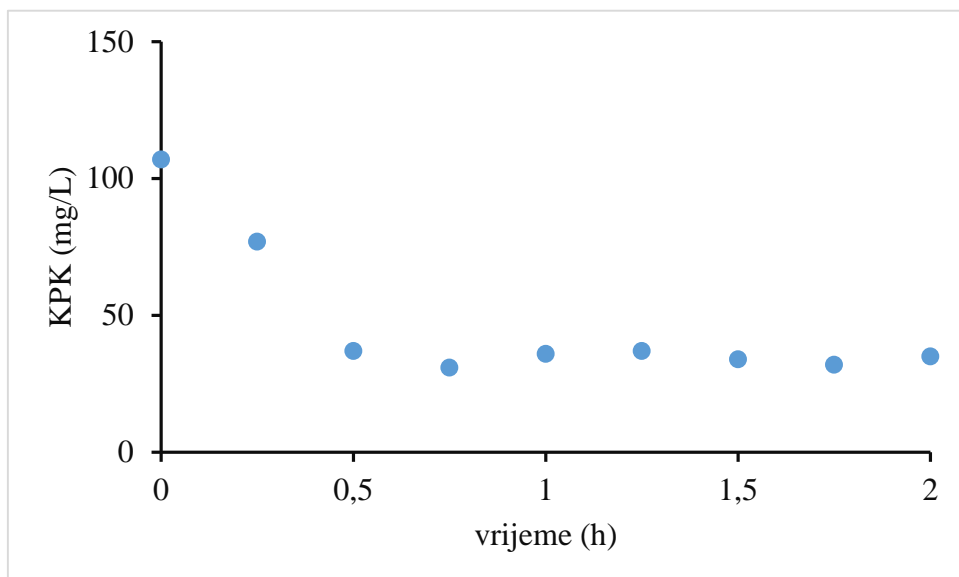
4. REZULTATI I RASPRAVA

Istraživanje učinka omjera C/N, elektron donora, pri niskom omjeru N/P, elektron akceptora, na denitrificirajuću defosfataciju provedeno je s natrijevim acetatom kao izvorom ugljika pri anoksičnim uvjetima, pri čemu su elektron donor, acetat, elektron akceptor, nitriti, i fosfati dodani istovremeno. Istraženi su omjeri C/N 2, 3 i 4, pri omjeru N/P 1. Pokusi su vođeni pri sobnoj temperaturi, 21,1 °C i pri koncentraciji otopljenog kisika (engl. *Dissolved oxygen*) DO = 0,2-0,3 mg DO/L. Kontakt mikroorganizama aktivnog mulja i sintetske otpadne vode ostvaren je miješanjem reaktorskog sadržaja na magnetskoj miješalici.

Denitrificirajuća defosfatacija može se provoditi s NO₃-N odnosno s NO₂-N kao akceptorima elektrona. Iako denitrificirajuća defosfatacija preko NO₂-N ima prednosti, kao što su manja potreba na organskim sastojcima (KPK), manji prirast biomase i ušteda na kisiku (Hu i sur., 2003; Kuba i sur., 1996a; Kuba i sur., 1996b; Kuba i sur., 1996c; Kuba i sur., 1994), denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita može biti vrlo nestabilna zbog učinka slobodne nitritne kiseline na fosfor akumulirajuće organizme i denitrificirajuće fosfor akumulirajuće organizme, ali i na ostale mikroorganizme prisutne u aktivnom mulju (Zhou i sur., 2012; Pijuan i sur., 2010; Freitas i sur., 2009; Hu i sur., 2003).

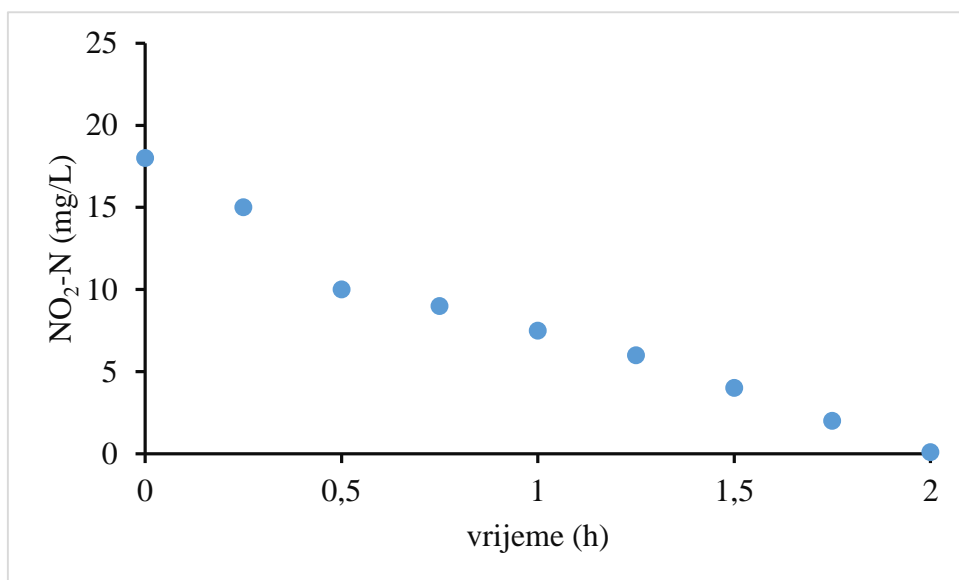
Za proces denitrificirajuće defosfatacije odgovorni su denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (Metcalf & Eddy, 2003; Mino i sur., 1998; Smolders i sur., 1994). Da bi se proces denitrificirajuće defosfatacije uspješno provodio, potrebno je DPAO osigurati dovoljnu količinu organskih sastojaka (elektron donora) i nitrata odnosno nitrita (elektron akceptora) (Metcalf & Eddy, 2003; Mino i sur., 1998; Smolders i sur., 1994).

U ovom radu provedeni su pokusi denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru N/P 1 i pri omjerima C/N 2, 3 i 4 s nitritom kao akceptorom elektrona. Dinamika pokusa denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 2 za promjene vrijednosti KPK prikazano je na slici 4, NO₂-N na slici 5, FNA na slici 6, PO₄-P na slici 7 i pH vrijednosti na slici 8. Rezultati pokusa pri omjeru C/N 3 su prikazani na slici 9 za promjene vrijednosti KPK, na slici 10 za NO₂-N, slici 11 za FNA, slici 12 za PO₄-P i slici 13 za vrijednosti pH. Dobiveni rezultati pokusa provedog pri omjeru C/N 4 su prikazani na slici 14 za vrijednosti KPK, slici 15 za za NO₂-N, slici 16 za FNA, slici 17 za PO₄-P i slici 18 za vrijednosti pH.

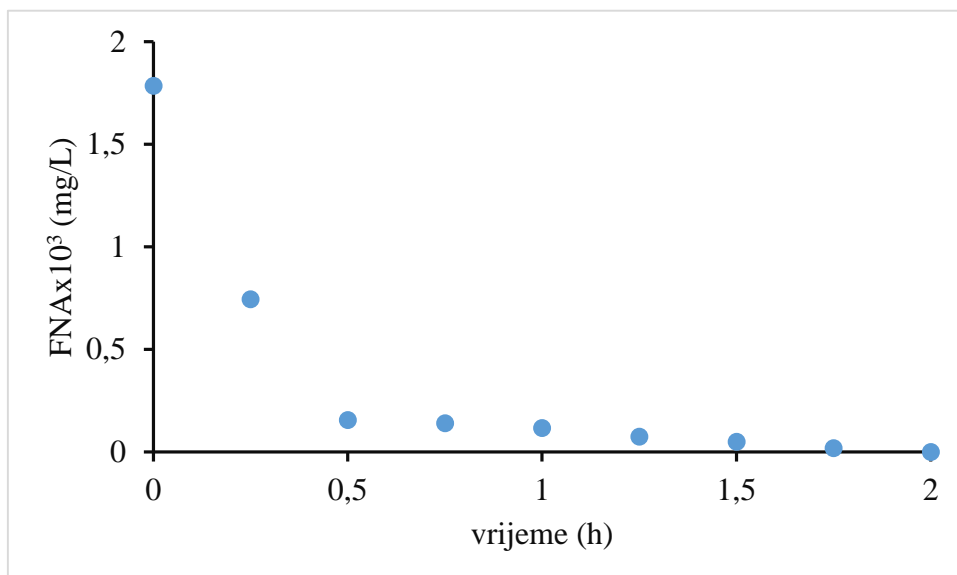


Slika 4. Promjena KPK vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N

2

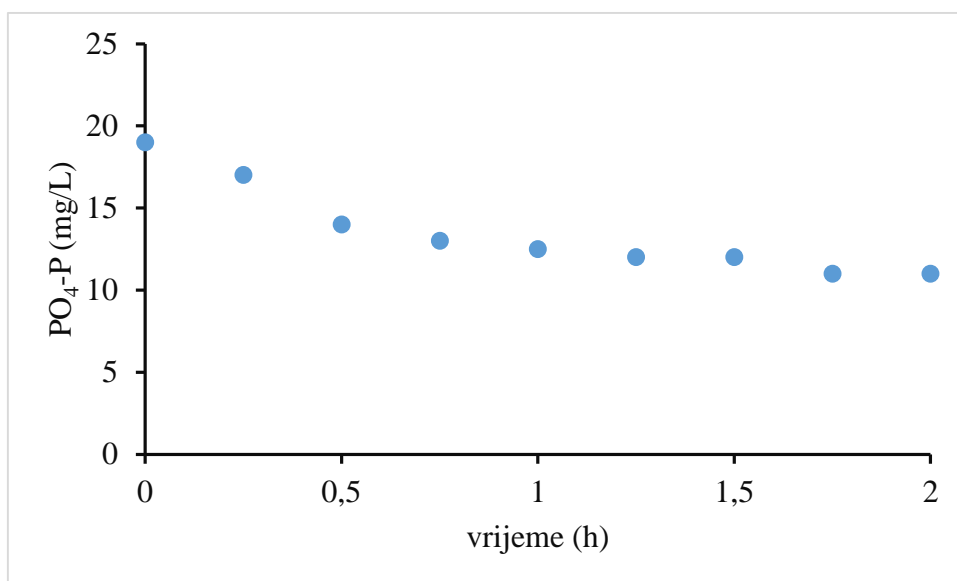


Slika 5. Promjena NO₂-N vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 2



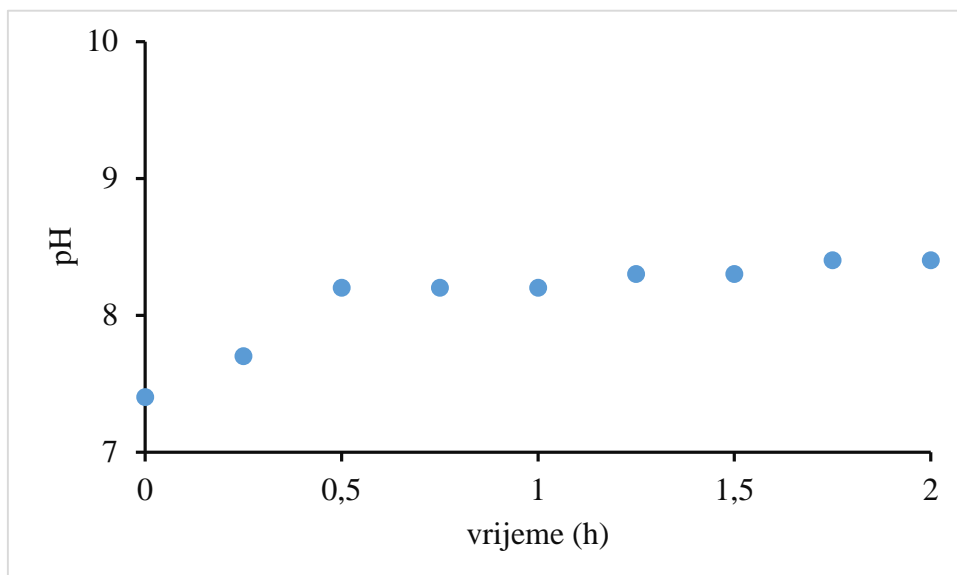
Slika 6. Promjena FNA vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N

2

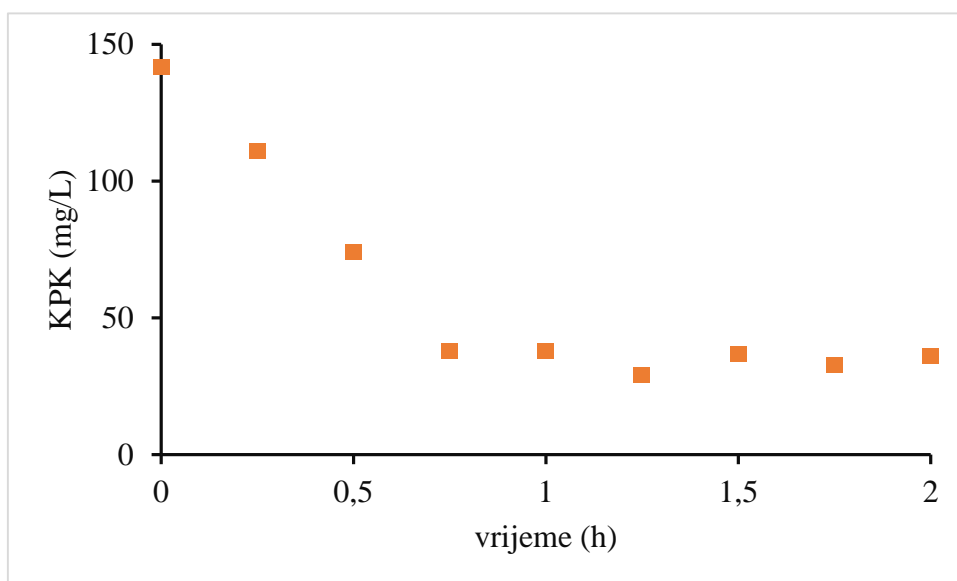


Slika 7. Promjena PO₄-P vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru

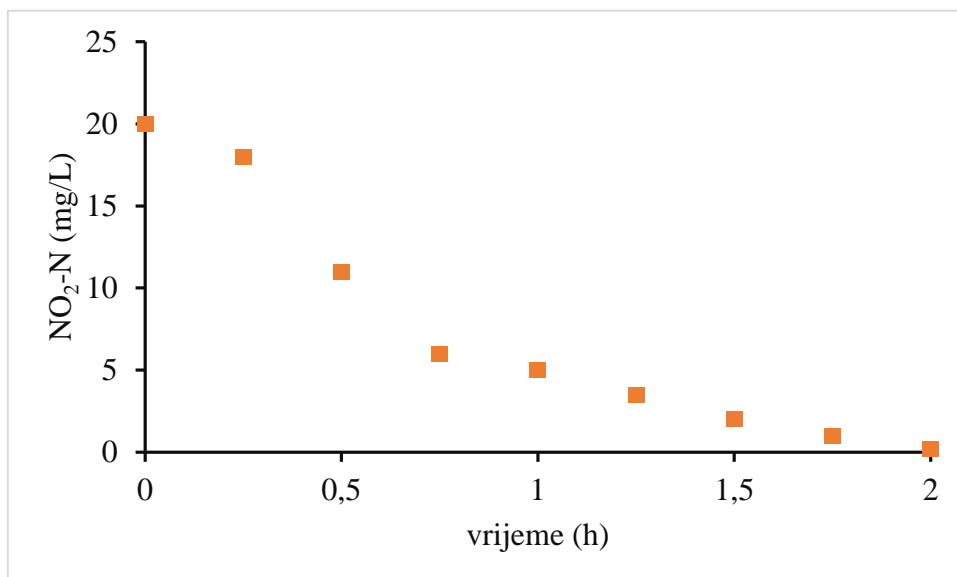
C/N 2



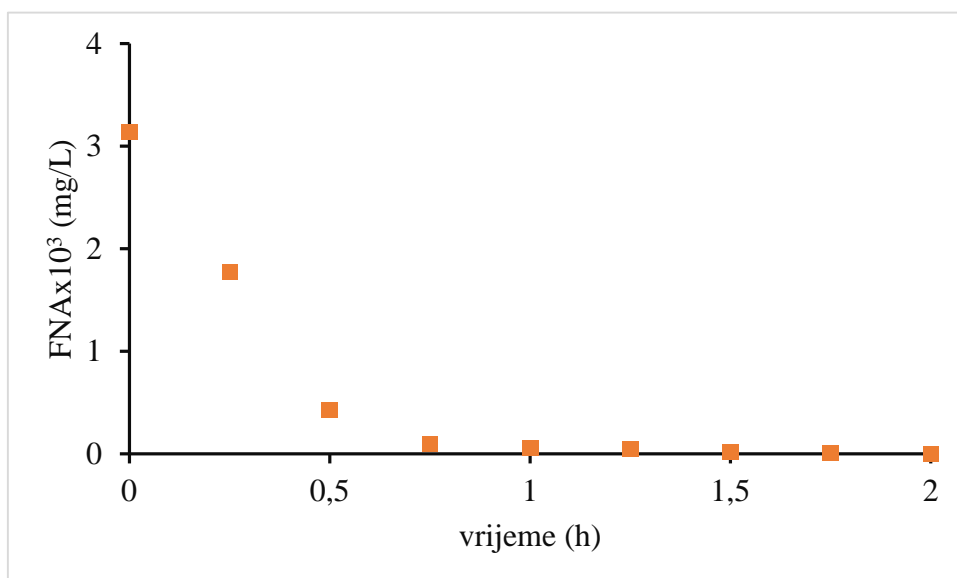
Slika 8. Promjena pH vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 2



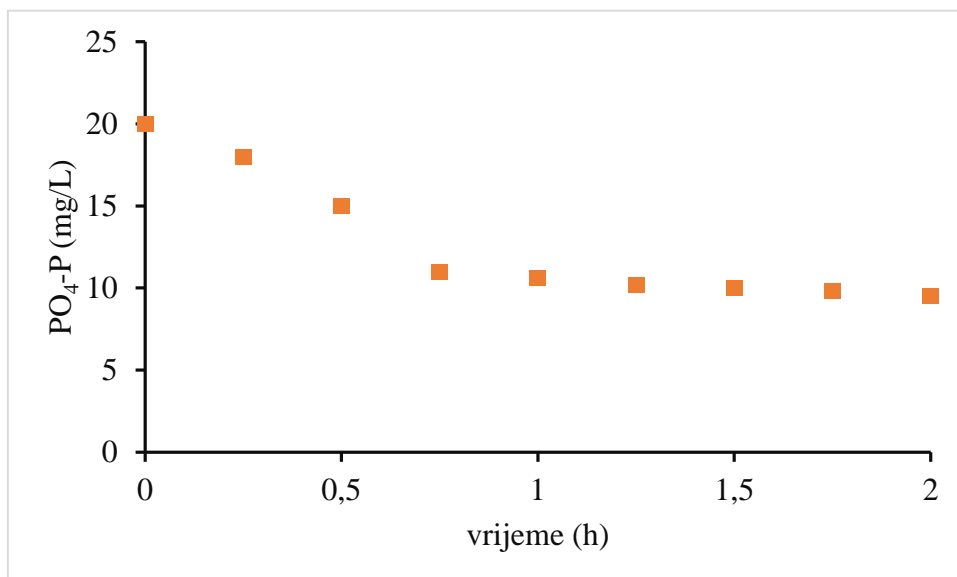
Slika 9. Promjena KPK vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N



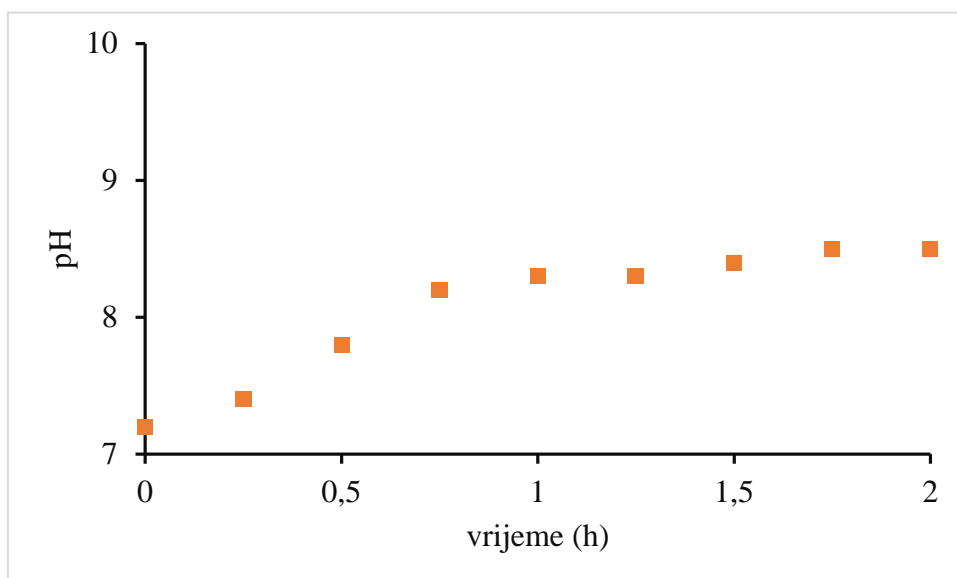
Slika 10. Promjena NO₂-N vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 3



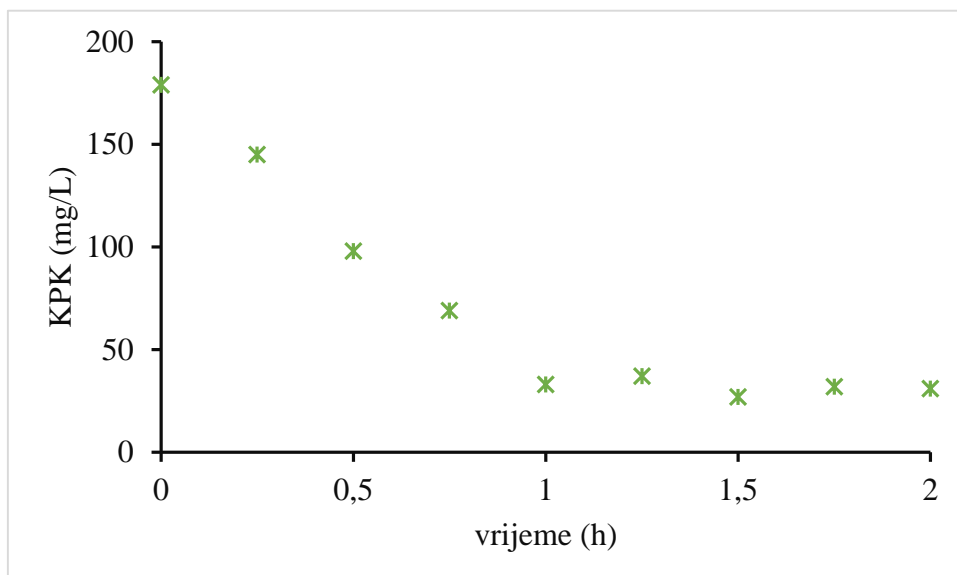
Slika 11. Promjena FNA vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 3



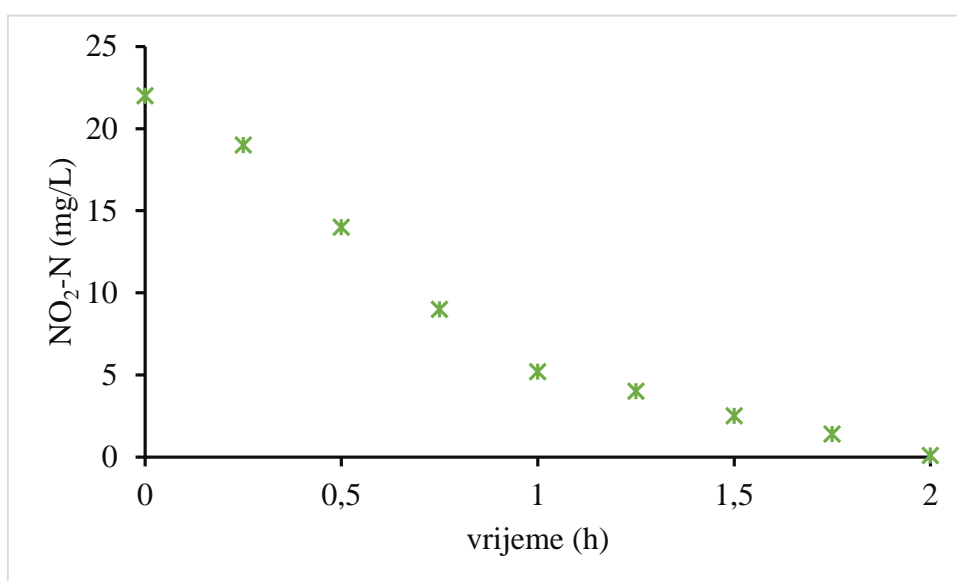
Slika 12. Promjena PO₄-P vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 3



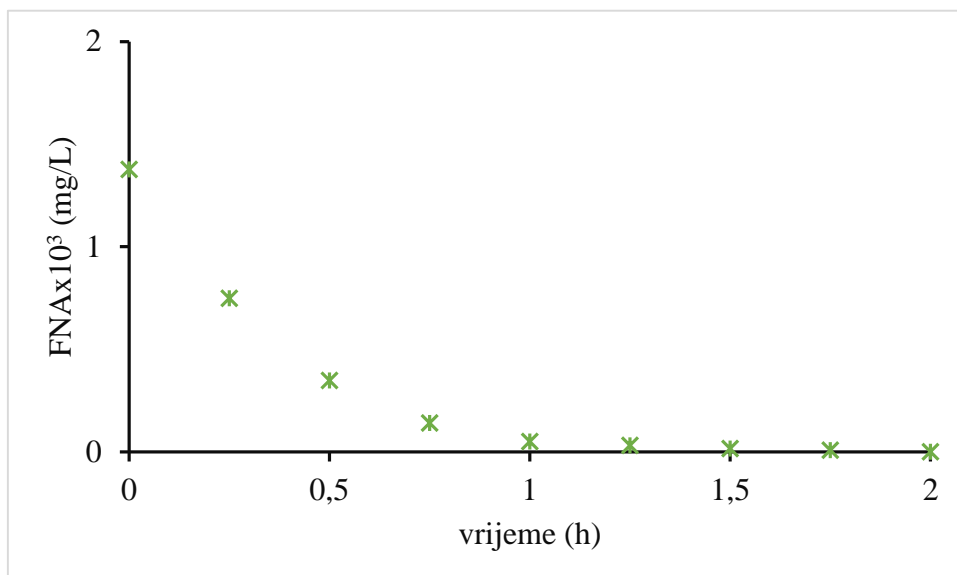
Slika 13. Promjena pH vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N



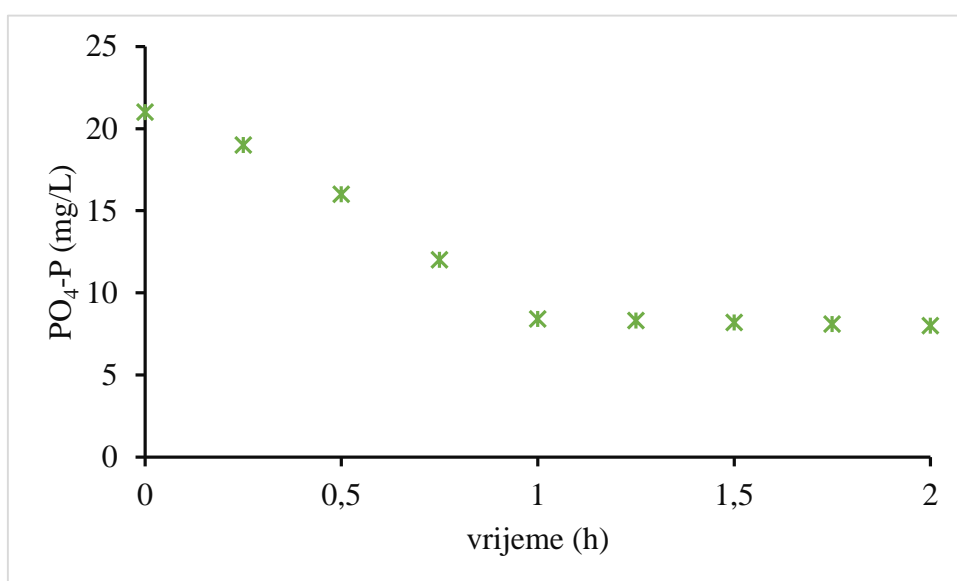
Slika 14. Promjena KPK vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 4



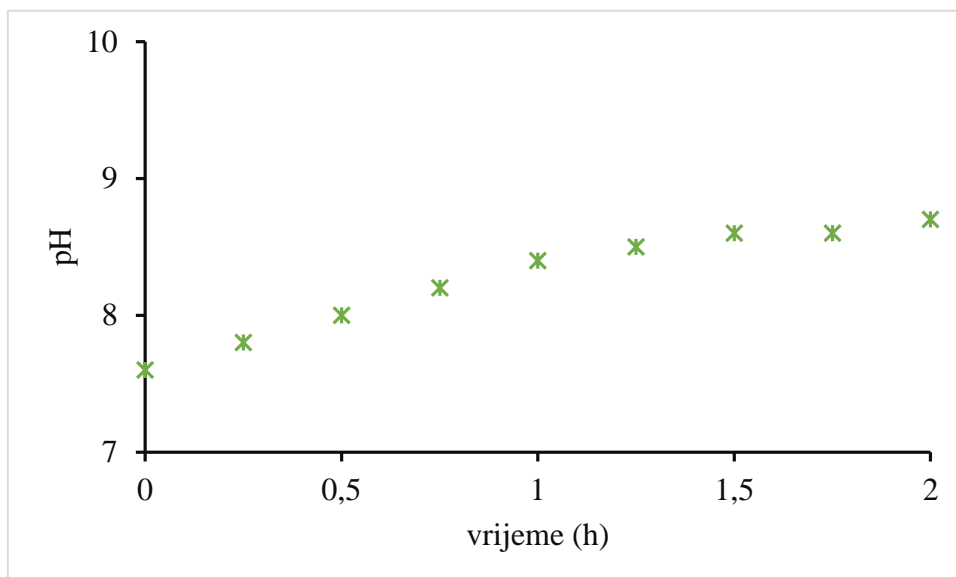
Slika 15. Promjena NO₂-N vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 4



Slika 16. Promjena FNA vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 4



Slika 17. Promjena PO₄-P vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 4



Slika 18. Promjena pH vrijednosti u pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N

4

U pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru C/N 2 organski sastojci utrošeni su u 0,5. satu pokusa, pri čemu se vrijednost KPK smanjila za 70 ± 16 mg KPK/L, odnosno, za $65,4 \pm 15$ %, pri čemu je brzina uklanjanja organskih sastojaka iznosila 140 ± 45 mg KPK/Lh (slika 4). Na slici 5 prikazana je promjena koncentracije nitrita, na kojoj su vidljiva dva nagiba, a koji pokazuju da su se $\text{NO}_2\text{-N}$ uklanjali pri dvije brzine. Tijekom prvih 30 minuta pokusa koncentracija nitrita se smanjila za $44,4 \pm 11$ %, ili 8 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, a brzina uklanjanja nitrita je iznosila 16 ± 4 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$. Tijekom narednih 90 minuta pokusa, nitriti su se potpuno reducirali, pri brzini $6,6 \pm 1,4$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$. Sveukupno gledano, tijekom cijelog pokusa brzina uklanjanja nitrita je iznosila $8,7 \pm 0,2$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ (slika 5). Promjena koncentracije FNA pri omjeru C/N 2 je prikazana na slici 6. FNA se s početnih $1,8 \pm 0,3$ $\mu\text{g FNA/L}$ tijekom prvih 30 min pokusa smanjila na $0,2 \pm 0,1$ $\mu\text{g FNA/L}$ i do kraja pokusa se potpuno uklonila (slika 6). Slično kao i nitriti, i uklanjanje $\text{PO}_4\text{-P}$ se odvijalo pri dvije brzine (slika 7). Tijekom prvih 30 minuta pokusa koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$ se smanjila za $26,3 \pm 5,3$ %, uklonjeno je 5 ± 1 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, pri brzini 10 ± 2 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$. Tijekom narednih 90 minuta pokusa uklonjeno je dodatnih $21,4 \pm 4,5$ % $\text{PO}_4\text{-P}$, ili $3 \pm 1,5$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, pri brzini $2 \pm 0,7$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$. Sveukupno tijekom 2 sata pokusa uklonjeno je $8 \pm 0,5$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, odnosno $42,1 \pm 4,7$ % $\text{PO}_4\text{-P}$, pri brzini $5,5 \pm 1,6$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ (slika 7). Promjene vrijednosti pH su prikazane na slici 8. Vrijednost pH je porasla s početnih $7,4 \pm 0,2$ na $8,2 \pm 0,3$ u trenutku kada su utrošeni svi organski sastojci, tijekom prvih 30 minuta pokusa, i nakon toga je blago rasla do završnih pH $8,4 \pm 0,1$ u 2. satu pokusa (slika 8).

S povećanjem omjera C/N na 3 raspoloživi organski sastojci su utrošeni u 0,75. satu pokusa, pri čemu je utrošeno 104 ± 9 mg KPK/L, početna vrijednost KPK se smanjila za $73,2 \pm 6,4$ %, a brzina uklanjanja KPK je iznosila $138,7 \pm 12$ mg KPK/Lh (slika 9). Tijekom prvih 45 minuta pokusa utrošeno je 14 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, smanjila se početna koncentracija za 70 ± 10 % pri brzini $18,7 \pm 2,7$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ (slika 10). Tijekom narednih 1 h i 15 min nitriti su se potpuno utrošili, pri brzini $4,6 \pm 1,6$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$. U ovom pokusu je sveukupna brzina uklanjanja nitrita iznosila $9,9 \pm 0,6$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ (slika 10). Koncentracija FNA je s početnih $3,1 \pm 0,1$ $\mu\text{g FNA/L}$ u 0,75. satu pala na $0,1 \pm 0,06$ $\mu\text{g FNA/L}$ i s utroškom nitrita do kraja pokusa u 2. satu, utrošila se i FNA (slika 11). Uklanjanje fosfata se odvijalo pri dvije brzine, prvih 45 minuta pokusa uklonjeno je 9 ± 1 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, odnosno 45 ± 5 % $\text{PO}_4\text{-P}$, pri brzini $12 \pm 1,3$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$. Tijekom narednih 1 h i 15 min uklonjeno je još $1,5 \pm 0,6$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, odnosno $13,6 \pm 0,7$ % $\text{PO}_4\text{-P}$, pri brzini $1,2 \pm 0,4$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$. Tijekom cijelog pokusa sveukupno je uklonjeno $10,5 \pm 0,7$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, ili $52,5 \pm 8,5$ %, pri brzini $5,3 \pm 0,3$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ (slika 12). Vrijednost pH je rasla s početnih $7,3 \pm 0,1$ na $8,2 \pm 0,2$ u 0,75. satu pokusa, i do kraja pokusa u 2. satu je dosegla vrijednost pH $8,5 \pm 0,3$ (slika 13).

Pri istraživanom omjeru C/N 4 organski sastojci su utrošeni u 1. satu pokusa, uklonjeno je $81,6 \pm 3,3$ % KPK, ili 146 ± 6 mg KPK/L pri brzini 146 ± 6 mg KPK/Lh (slika 14). Uklanjanje nitrita se odvijalo pri dvije brzine: prvih sat vremena pokusa brzina je iznosila $16,8 \pm 1,8$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, uklonjeno je $16,8 \pm 1,8$ mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, ili $76,4 \pm 8,2$ % nitrita. Drugih sat vremena pokusa nitriti su potpuno uklonjeni, pri brzini $5,1 \pm 1,8$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$. Sveukupno gledano, brzina uklanjanja nitrita je iznosila $10,9 \pm 0,4$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ (slika 15). FNA je s početnih $1,4 \pm 0,4$ $\mu\text{g FNA/L}$ u prvom satu pokusa pala na $0,1 \pm 0,03$ $\mu\text{g FNA/L}$, i do kraja pokusa u 2. satu je potpuno uklonjena (slika 16). I u ovom pokusu uklanjanje fosfora se odvijalo pri dvije brzine. Prvih sat vremena uklonjeno je $60 \pm 2,9$ % $\text{PO}_4\text{-P}$, ili $16,8 \pm 4,8$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, pri brzini $16,8 \pm 4,8$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$. Idućih sat vremena pokusa uklonjeno je dodatnih $16,7 \pm 16,6$ % $\text{PO}_4\text{-P}$ ili $2,2 \pm 1,8$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ pri brzini $2,2 \pm 1,8$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$. Sveukupno je uklonjeno $13 \pm 0,4$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ ili $61,9 \pm 1,9$ % pri brzini $6,5 \pm 0,9$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ (slika 17). Vrijednost pH je rasla s početnih $7,6 \pm 0,4$ na $8,4 \pm 0,4$ u prvom satu pokusa, i do kraja pokusa u 2. satu je iznosila pH $8,7 \pm 0,3$ (slika 18).

U procesu denitrificirajuće denitrifikacije aktivni su DPAO, koji tijekom anaerobne faze unose u svoje stanice raspoložive hlapljive masne kiseline i pospremaju ih kao polihidroksialkanoate. Energiju za taj proces dobivaju od razgradnje glikogena i cijepanjem unutarstaničnih polifosfata, pri čemu dolazi do lučenja fosfata iz stanica DPAO u miješanu tekućinu. Zatim, u anoksičnoj fazi, DPAO koriste unutarstanične rezerve PHA za obnovu rezervi glikogena, za stanični rast,

te za unos fosfata u stanicu i sintezu polifosfata, a kao akceptor elektrona služe nitrati odnosno nitriti (Oehmen i sur., 2007; Metcalf & Eddy, 2003; Mino i sur., 1998; Smolders i sur., 1994). Pokusi u ovom radu su vođeni bez anaerobne faze. Denitrificirajuću defosfataciju bez anaerobne faze istraživali su autori Jena i sur. (2016) i Jena i sur. (2013).

Pokusi su vođeni pri omjerima C/N 2, 3 i 4 (slike 4-18). Za omjer N/P 1 pri svim istraživanim omjerima C/N nije bilo dovoljno organskih sastojaka. Tako su organski sastojci iscrpljeni u 0,5. satu pri omjeru C/N 2 pri brzini 140 ± 45 mg KPK/Lh (slika 4), u 0,75. satu pri omjeru C/N 3 pri brzini $138,7 \pm 12$ mg KPK/Lh (slika 9) i u 1. satu pri omjeru C/N 4 pri brzini 146 ± 6 mg KPK/Lh (slika 14). Količina utrošenih organskih sastojaka je iznosila 70 ± 16 mg KPK/L (slika 4), 104 ± 9 mg KPK/L (slika 9) i 146 ± 6 mg KPK/L (slika 14) pri omjerima C/N 2, 3 i 4. Organske sastojke troše DPAO, ali i denitrifikanti. Također, kako u aktivnom mulju uobičajeno uz DPAO obitavaju GAO, vjerojatno su dio organskih sastojaka trošili i GAO, pa se odvijala kompeticija za organske sastojke. Ukoliko dođe do proliferacije GAO, dolazi do narušavanja učinkovitosti uklanjanja $PO_4\text{-P}$ iz otpadne vode jer u tom slučaju DPAO ne preostane dovoljno organskih sastojaka za unos i pohranu $PO_4\text{-P}$ kao unutarstanične zalihe polifosfata (Wang i sur., 2015). Jedan od načina da se spriječi odnosno ograniči proliferacija GAO je vođenje procesa denitrificirajuće defosfatacije pri niskom C/P omjeru (Liu i sur., 1996).

Budući da nije bilo dovoljno raspoloživog vanjskog izvora ugljika, u pokusima pri svim istraživanim C/N omjerima vidljive su dvije brzine uklanjanja nitrata (slike 5, 10 i 15) i fosfata (slike 7, 12 i 17). Prva, viša brzina uklanjanja nitrata i fosfata je brzina ostvarena s vanjskim raspoloživim izvorom ugljika (acetatom), a druga, niža brzina s unutarstanično pohranjenim rezervama ugljika u obliku PHA.

Tako su ostvarene brzine uklanjanja nitrata s vanjskim raspoloživim izvorom ugljika iznosile 16 ± 4 mg $NO_2\text{-N/Lh}$ pri omjeru C/N 2 (slika 5), $18,7 \pm 2,7$ mg $NO_2\text{-N/Lh}$ pri omjeru C/N 3 (slika 10) i $16,8 \pm 1,8$ mg $NO_2\text{-N/Lh}$ pri omjeru C/N 4 (slika 15). Brzina uklanjanja nitrata s unutarstaničnim zalihama organskih sastojaka su iznosile $6,6 \pm 1,4$ mg $NO_2\text{-N/Lh}$, $4,6 \pm 1,6$ mg $NO_2\text{-N/Lh}$ i $5,1 \pm 1,8$ mg $NO_2\text{-N/Lh}$ pri omjerima C/N 2 (slika 5), C/N 3 (slika 10) i C/N 4 (slika 15). Pri svim istraživanim omjerima postignuta je potpuna denitritacija. Ipak, da je bilo više organskih sastojaka (veći omjer C/N), vjerojatno bi brzina denitritacije bila ujednačena, i viša. Za uklanjanje nitrata odgovorni su DPAO koji koriste $NO_2\text{-N}$ kao izvor elektron akceptora, ali i denitrifikanti. Nitrit se može koristiti kao akceptor elektrona u procesu naprednog biološkog uklanjanja fosfora sve dok njegova koncentracija ne premaši inhibicijsku razinu, a koja ovisi o vrsti mulja i primijenjenim operativnim uvjetima (Hu i sur., 2003).

Pri omjerima C/N 2, 3 i 4 ostvarene brzine uklanjanja PO₄-P s vanjskim raspoloživim izvorom ugljika su iznosile 10±2 mg PO₄-P/Lh (slika 7), 12±1,3 mg PO₄-P/Lh (slika 12) i 16,8±4,8 mg PO₄-P/Lh (slika 17). S unutarstaničnim zalihama organskih sastojaka ostvarene su brzine 2±0,7 mg PO₄-P/Lh (slika 7), 1,2±0,4 mg PO₄-P/Lh (slika 12) i 2,2±1,8 mg PO₄-P/Lh (slika 17). S povećanjem omjera C/N rasla je raspoloživa količina organskih sastojaka pa je i rasla mogućnost DPAO da pohrane veće količine organskih sastojaka, pa je postignuto sveukupno uklanjanje PO₄-P 42,1±4,7 % (slika 7), 52,5±8,5 % (slika 12) i 61,9±1,9 % (slika 17) pri omjerima C/N 2, 3 i 4. Istraženi omjeri C/N 2, 3 i 4 nisu bili dovoljni za postizanje potpunog uklanjanja PO₄-P, pa je uklanjanje PO₄-P bilo limitirano raspoloživom količinom elektron donora (KPK) pri istraženom omjeru N/P 1. Uklanjanje PO₄-P nije bilo limitirano količinom elektron akceptora (NO₂-N) što se vidi po tome da je uklanjanje PO₄-P prestalo s utroškom KPK, a pri svim istraženim omjerima C/N je preostalo još NO₂-N (elektron akceptora). Preostale NO₂-N nakon utroška PO₄-P dalje su trošili denitrifikanti. Daljnim povećanjem omjera C/N vjerojatno bi se postiglo veće uklanjanje PO₄-P. U ovim pokusima nije zabilježeno otpuštanje fosfata. Proces naprednog biološkog uklanjanja fosfora provodi skupina bakterija koja se može podijeliti prema afinitetu za elektron akceptore na: (i) fosfor akumulirajuće bakterije koje koriste samo kisik kao akceptor elektrona, (ii) kisik i nitrat ali ne i nitrit, i (iii) kisik, nitrat i nitrit (Hu i sur., 2003).

Najviše izmjerene koncentracije FNA izmjerene su na početku pokusa i iznosile su 1,8±0,3 µg FNA/L (slika 6), 3,1±0,1 µg FNA/L (slika 11) i 1,4±0,4 µg FNA/L (slika 16) pri omjerima C/N 2, 3 i 4. Na koncentraciju FNA od 1,7 µg FNA/L pa nadalje su osjetljivi PAO (Wang i sur., 2013; Zhou i sur., 2010). Koncentracija FNA je u ovisnosti o koncentraciji NO₂-N, vrijednosti pH izvanstaničnog okoliša i temperature miješane tekućine. Što je viša koncentracija NO₂-N, viša je i koncentracija FNA. Što je niža vrijednost pH, viša je koncentracija FNA (Anthonisen i sur., 1976). Kako se tijekom pokusa smanjivala koncentracija NO₂-N (slike 5, 10 i 15), tako se smanjivala i koncentracija FNA (slike 6, 11 i 16). Također, kako tijekom denitrifikacije dolazi do obnove puferskog kapaciteta miješane tekućine, dolazi do povišenja vrijednosti pH (slike 8, 13 i 18), tako se i smanjivala koncentracija FNA (slike 6, 11 i 16). Zbog smanjenja štetnog učinka FNA na denitrificirajući defosfataciju često se NO₂-N dodaje u reaktor u više navrata radije nego cjelokupna koncentracija odjednom na početku anoksične faze pokusa (Vargas i sur., 2011).

Profil vrijednosti pH je imao karakterističan trend pri svim ispitivanim omjerima C/N: vrijednost pH je rasla dok je bilo raspoloživih organskih sastojaka, a nakon toga je slijedio blagi

rast ili stagnacija vrijednosti pH (slike 8, 13 i 18). Tako profil vrijednosti pH može služiti kao neizravan pokazatelj raspoloživih organskih sastojaka.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih iz eksperimenta, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Pri svim istraženim omjerima C/N uklonjeni su organski sastojci, pri sličnoj brzini
2. Postignuta je potpuna denitrifikacija pri svim istraženim omjerima C/N
3. Uklanjanje dušika i fosfora odvijalo se pri dvije brzine: s acetatom (vanjskim izvorom ugljika) i unutarstaničnim zalihama ugljika
4. S acetatom kao izvorom ugljika postižu se veće brzine uklanjanja i dušika i fosfora u odnosu na unutarstanične zalihe ugljika
5. Učinkovitost uklanjanja fosfora je rasla s rastom omjera C/N, međutim, nije postignuto potpuno uklanjanje
6. Viši omjer C/N bi vjerojatno pridonijeo većoj brzini uklanjanja i dušika i fosfora, kao i većoj učinkovitosti uklanjanja fosfora

6. LITERATURA

- Adouani N, Limousy L, Lendormi T, Sire O (2015) N₂O and NO emissions during wastewater denitrification step: Influence of temperature on the biological process. *Comptes Rendus Chim* **18**, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2014.11.005>
- 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**, 442–446. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(01\)80293-0](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(01)80293-0)
- Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasa TB, Srinath EG (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J Water Pollut Control Fed* **48**, 835-852.
- APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21. izd., American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation, Washington DC.
- Bond PL, Keller J, Blackall LL (1999) Anaerobic phosphate release from activated sludge with enhanced biological phosphorus removal. A possible mechanism of intracellular pH control. *Biotechnol Bioeng* **63**, 507–515. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19990605\)63:5<507::aid-bit1>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19990605)63:5<507::aid-bit1>3.0.co;2-a)
- Bortone G, Saltarelli R, Alonso V, Sorm R, Wanner J, Tilche A (1996) Biological anoxic phosphorus removal – the dephanox process. *Water Sci Technol* **34**, 119–128. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00501-X](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00501-X)
- Bunce JT, Ndam E, Ofiteru ID, Moore A, Graham DW (2018) A Review of Phosphorus Removal Technologies and Their Applicability to Small-Scale Domestic Wastewater Treatment Systems. *Front Environ Sci* **6**. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00008>
- Carvalho G, Lemos PC, Oehmen A, Reis MAM (2007) Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Res* **41**, 4383–4396. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.065>
- Chen P, Wu J, Lu X, Yu R (2021) Denitrifying phosphorus removal and microbial community characteristics of two-sludge DEPHANOX system: Effects of COD/TP ratio. *Biochem Eng J* **172**, 108059. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108059>

- Cherchi C, Onnis-Hayden A, El-Shawabkeh I, Gu AZ (2009) Implication of Using Different Carbon Sources for Denitrification in Wastewater Treatments. *Water Environ Res* **81**, 788–799. <https://doi.org/10.2175/106143009x12465435982610>
- Cheremisinoff NP (1998) *Biotechnology for Waste and Wastewater Treatment*, 1. izd., Noyes Publications, Westwood.
- Comeau Y, Hall K, Hancock R, Oldham W (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res* **20**, 1511–1521. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(86\)90115-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90115-6)
- Dionisi HM, Layton AC, Harms G, Gregory G, Robinson K, Sayler G (2002) Quantification of *Nitrosomonas oligotropha*-like ammonia-oxidizing bacteria of *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol* **68**, 245-253. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.245-253.2002>
- Ekama GA, Wentze MC (2008) Nitrogen Removal U: Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjanovic D (Ured.) *Biological Wastewater Treatment Principles, Modelling and Design*, IWA Publishing, London, str. 87-139.
- Ekama GA, Wentzel MC (1999) Difficulties and developments in biological nutrient removal technology and modeling. *Water Sci Technol* **39**, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00117-1](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00117-1)
- EPA (2003) *Oxygen control*. USEPA, Washington, DC.
- Freitas F, Temudo MF, Carvalho G, Oehmen A, Reis MAM (2009) Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Biores Technol* **100**, 1969–1976. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.031>
- Gnida A, Żubrowska-Sudoł M, Sytek-Szmeichel K, Podedworna J, Surmacz-Górska J, Marciocha D (2020) Effect of anaerobic phases length on denitrifying dephosphatation biocenosis – a case study of IFAS-MBSBBR. *BMC Microbiol* **20**. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01896-3>
- Grady CPL, Daigger GT, Lim HC (1999) *Biological Wastewater Treatment*, 2. izd., Marcel Dekker Inc., New York.

- Hamada K, Kuba T, Torrico V, Okazaki M, Kusuda T (2006) Comparison of nutrient removal efficiency between pre- and post-denitrification wastewater treatments. *Water Sci Technol* **53**, 169–175. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.272>
- Hao X, Doddema HJ, van Groenestijn JW (1996) Use of contact tank to enhance denitrification in oxidation ditches. *Water Sci Technol* **34**, 195–202. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00510-0](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00510-0)
- Hao X, van Loosdrecht MCM, Meijer SCF, Heijnen JJ, Qian Y (2001) Model-Based Evaluation of Denitrifying P Removal in a Two-Sludge System. *J Environ Eng* **127**, 112–118. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)0733-9372\(2001\)127:2\(112\)](https://doi.org/10.1061/(asce)0733-9372(2001)127:2(112))
- Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjanovic D (2008) Wastewater Treatment Development. U: Henze M, van Loosdrecht MCM, Ekama GA, Brdjanovic D (Ured.) Biological Wastewater Treatment Principles, Modelling and Design, IWA Publishing, London, str. 1-9.
- Henze M, Harremoës P, La Cour Jansen J, Arvin E (2002) Wastewater Treatment. U: Biological and Chemical Processes. 3. izd., (Förstner, U., Murphy, R.J., Rulkens, W.H., ur.) New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, str. 89-108.
- Hu JY, Ong SL, Ng WJ, Lu F, Fan XJ (2003) A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Res* **37**, 3463–3471. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00205-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00205-7)
- Hu X, Sobotka D, Czerwionka K, Zhou Q, Xie L, Makinia J (2018) Effects of different external carbon sources and electron acceptors on interactions between denitrification and phosphorus removal in biological nutrient removal processes. *J Zhejiang Univ Sci* **19**, 305–316. <https://doi.org/10.1631/jzus.b1700064>
- Jena J, Kumar R, Saifuddin M, Dixit A, Das T (2016) Anoxic-aerobic SBR system for nitrate, phosphate and COD removal from high-strength wastewater and diversity study of microbial communities. *Biochem Eng J* **105**, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.007>
- Jena J, Ray S, Pandey S, Das T (2013) Effect of COD/N ratio on simultaneous removal of nutrients and COD from synthetic high strength waste water under anoxic conditions. *J Sci Ind Res* **72**, 127-131.

- Kern-Jespersen JP, Henze M (1993) Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Res* **27**, 617–24. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90171-D](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90171-D)
- Kern-Jespersen JP, Henze M, Strube R (1994) Biological phosphorus release and uptake under alternating anaerobic and anoxic conditions in a fixed-film reactor. *Water Res* **28**, 1253-1255. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90215-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90215-1)
- Kim D, Kim KY, Ryu HD, Min KK, Lee SI (2009) Long term operation of pilotscale biological nutrient removal process in treating municipal wastewater. *Bioresour Technol* **100**, 3180–3184. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.062>
- Kindaichi T, Ito T, Okabe S (2004) Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1641-1650. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1641-1650.2004>
- Kroiss H (1996) Design and operation of large wastewater treatment plants. VII-selected proceeding of the 7th IAWQ Conference on design and operation of large wastewater treatment plants. *Water Sci Tech* **33**, RS.
- Kuba T, Murnleitner E, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1996b) A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnol Bioeng* **52**, 685-695. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19961220\)52:6<685::AID-BIT6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19961220)52:6<685::AID-BIT6>3.0.CO;2-K)
- Kuba T, van Loosdrecht MCM Heijnen JJ (1997) Biological dephosphatation by activated sludge under denitrifying conditions: pH influence and occurrence of denitrifying dephosphatation in a full-scale waste water treatment plant. *Water Sci Tech* **36**, 75-82. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00713-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00713-0)
- Kuba T, van Loosdrecht MCM, Heijnen, JJ (1996a). Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of nitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. *Water Res* **30**, 1702–1710. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00050-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00050-4)
- Kuba T, Wachtmeister A, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1994) Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal systems. *Water Sci Technol* **30**, 263-269. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0277>

- Kuba T, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1996c) Effect of cyclic oxygen exposure on the activity of denitrifying phosphorus removing bacteria. *Water Sci Technol* **34**, 33-40. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00492-1](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00492-1)
- Lee H, Yun Z (2014) Comparison of biochemical characteristics between PAO and DPAO sludges. *J Environ Sci* **26**, 1340–1347. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(13\)60609-9](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(13)60609-9)
- Li W, Sun HZ, Wei W, Liu J, Fu JX, Wang J (2017) Study on denitrifying dephosphatation process, influence factors and mechanism. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **82**, 012090. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/82/1/012090>
- Liu WT, Mino T, Matsuo T, Nakamura K (1996) Biological phosphorus removal processes - effect of pH on anaerobic substrate metabolism. *Water Sci Technol* **34**, 25–32. <https://doi.org/10.2166/wst.1996.0352>
- Lu H, Chandran K, Stensel D (2014) Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Res* **64**, 237–254. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.042>
- Manz W, Amman R, Ludwig W, Vancanneyt M, Schleifer KHA (1996) application of a suite of 16s rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophage-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment. *Microbiology* **142**, 1097-1106. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-5-1097>.
- Matějů V, Čížinská S, Krejčí J, Janoch T (1992) Biological water denitrification—A review. *Enzyme MicrobTech* **14**, 170–183. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90062-S](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(92)90062-S)
- Meinhold J, Arnold E, Issacs S (1999b) Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Res* **33**, 1871-1883. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00411-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00411-4)
- Meinhold J, Filipe CDM, Daigger GT, Isaacs S (1999a) Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological phosphate removal. *Water Sci Technol* **39**, 31–42. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00773-2](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00773-2)
- Metcalf & Eddy (2003) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4. izd., Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (ured.), McGraw-Hill Education, New York.

- Mino T, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res* **32**, 3193-3207. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(98\)00129-8](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(98)00129-8)
- Noguera R, Melo L, Purkhold U, Wuertz S, Wagner M (2002) Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon. *Water Res* **36**, 469-481. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00229-9](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00229-9)
- Oehmen A, Carvalho G, Lopez-Vazquez CM, van Loosdrecht MCM, Reis MAM (2010) Incorporating microbial ecology into the metabolic modelling of polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Water Res* **44**, 4992–5004. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.071>.
- Oehmen A, Lemos PC, Carvalho G, Yuan Z, Keller J, Blackall LL, Reis MAM (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res* **41**, 2271-2300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.030>
- Oehmen A, Yuan Z, Blackall LL, Keller J (2005) Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnol Bioeng* **91**, 162–168. <https://doi.org/10.1002/bit.20500>
- Parsons SA, Smith JA (2008) Phosphorus Removal and Recovery from Municipal Wastewaters. *Elements* **4**, 109–112. <https://doi.org/10.2113/gselements.4.2.109>
- Peng Y, Ma Y, Wang S (2007) Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process. *J Environ Sci* **19**, 284–289. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60046-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60046-1)
- Peng Y, Zhu G (2006) Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 15–26. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0534-z>
- Pijuan M, Saunders AM, Guisasola A, Baeza JA, Casas C, Blackall LL (2003) Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source. *Biotechnol Bioeng* **85**, 56–67. <https://doi.org/10.1002/bit.10813>
- Pijuan M, Ye L, Yuan Z (2010) Free nitrous acid inhibition on the aerobic metabolism of polyphosphate accumulating organisms. *Water Res* **44**, 6063-6072. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.075>

- Pijuan M, Yuan Z (2010) Development and optimization of a sequencing batch reactor for nitrogen and phosphorus removal from abattoir wastewater to meet irrigation standards. *Water Sci Technol* **61**, 2105–2112. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.973>
- Ren L, Xing LZ, Sun FF, i sur. (2014) Research progress of affecting factors of competition between phosphate accumulating organism and glycogen accumulating organism in biological phosphorus removal. *J Shandong Jianzhu Univ* **29**, 170-5.
- Schramm A, de Beer D, Gieseke A, Amman R (2000) Microenvironments and distribution of nitrifying bacteria in a membrane-bound biofilm. *Environ Microbiol* **2**, 680-686. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00150.x>
- Sinha B, Annachhatre AP (2007) Partial nitrification–operational parameters and microorganisms involved. *Environ Sci Biotechnol* **6**, 285-313. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9116-x>
- Smolders GJF, van der Meij J, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence. *Biotechnol Bioeng* **43**, 461–470. <https://doi.org/10.1002/bit.260430605>
- Soto O, Aspé E, Roeckel M (2007) Kinetics of cross-inhibited denitrification of a high load wastewater. *Enzyme Microb Technol* **40**, 1627–1634. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.014>
- Sperl GT, Hoare DS (1971) Denitrification with methanol: a selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. *J Bacteriol* **108**, 733–736. <https://doi.org/10.1128/jb.108.2.733-736.1971>
- Thomsen TR, Kong Y, Nielsen PH (2007) Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 370–382. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00309.x>
- Tian WD, Li WG, An KJ, Kang XR, Ma C, Ran ZL (2011) Denitrifying Dephosphatation Performance Link to Microbial Community Structure. *J Water Sustain* **1**, 11-20.
- Tian WD, Ma C, Lin Y, Ran ZL (2017) Effect of Mg/Ca molar ratios on characteristics of anaerobic-anoxic denitrifying dephosphatation. *Bioresour Technol* **240**, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.063>

- Tsuneda S, Ohno T, Soejima K, Hirata A (2006) Simultaneous nitrogen and phosphorus removal using denitrifying phosphate-accumulating organisms in a sequencing batch reactor. *Biochem Eng J* **27**, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.07.004>
- Vargas M, Guisasola A, Artigues A, Casas C, Baeza JA (2011) Comparison of a nitrite-based anaerobic–anoxic EBPR system with propionate or acetate as electron donors. *Process Biochem* **46**, 714–720. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.11.018>
- Wagner MR, Koops G, Flood PH, Aman R (1996) In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Water Sci Technol* **34**, 237-244.
- Wang JY, Li WG (2015) Technology and research progress of denitrifying dephosphatation. *J Shandong Jianzhu Univ* **3**, 271-276
- Wang Y, Guo G, Wang H, Stephenson T, Guo J, Ye L (2013) Long-term impact of anaerobic reaction time on the performance and granular characteristics of granular denitrifying biological phosphorus removal systems. *Water Res* **47**, 5326–5337. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.013>
- Wang Y, Jiang X, Wang H, Guo G, Guo J, Qin J, Zhou S (2015) Comparison of performance, microorganism populations, and biophysiochemical properties of granular and flocculent sludge from denitrifying phosphorus removal reactors. *Chem Eng J* **262**, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.09.065>
- Wang Y, Peng Y, Stephenson T (2009) Effect of influent nutrient ratios and hydraulic retention time (HRT) on simultaneous phosphorus and nitrogen removal in a two-sludge sequencing batch reactor process. *Bioresour Technol* **100**, 3506–3512. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.026>
- Xu X, Liu G, Zhu L (2011) Enhanced denitrifying phosphorous removal in a novel anaerobic/aerobic/anoxic (AOA) process with the diversion of internal carbon source. *Bioresour Technol* **102**, 10340–10345. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.108>
- You SJ, Hsu CL, Chuang SH, Ouyang CF (2003) Nitrification efficiency and nitrifying bacteria abundance in combined AS-RBC and A2O systems. *Water Res* **37**, 2281-2290. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00636-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00636-X)
- Zafiriadis I, Ntougias S, Nikolaidis C, Kapagiannidis AG, Aivasidis A (2011) Denitrifying polyphosphate accumulating organisms population and nitrite reductase gene diversity

- shift in a DEPHANOX-type activated sludge system fed with municipal wastewater. *J Biosci Bioeng* **111**, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.09.016>
- Zeng RJ, Lemaire R, Yuan Z, Keller, J (2003) Simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in a lab-scale sequencing batch reactor. *Biotechnol Bioeng* **84**, 170–178. <https://doi.org/10.1002/bit.10744>
- Zhang SH, Huang Y, Hua YM (2010) Denitrifying dephosphatation over nitrite: Effects of nitrite concentration, organic carbon, and pH. *Bioresour Technol* **101**, 3870–3875. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.134>
- Zhou Y, Ganda L, Lim M, Yuan Z, Kjelleberg S, Ng WJ (2010) Free nitrous acid (FNA) inhibition on denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DPAOs). *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 359–369. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2780-3>
- Zhou Y, Lim M, Harjono S, Ng WJ (2012) Nitrous oxide emission by denitrifying phosphorus removal culture using polyhydroxyalkanoates as carbon source. *J Environ Sci* **24**, 1616–1623. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(11\)60996-0](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(11)60996-0)
- Zhu GB, Peng Y, Li B, Guo J, Yang Q, Wang S (2008) Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev Environ Contam Toxicol* **192**, 159–195. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1_5
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 533–616. <https://doi.org/10.1128/membr.61.4.533-616.1997>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja ANA MARIJA PRSKALO izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Marija Prskalo

Ana Marija Prskalo