

# Nitrit kao akceptor elektrona u denitrifikaciji

---

Frketić, Mihaela

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:340653>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2023.

Mihaela Frketić

**NITRIT KAO AKCEPTOR  
ELEKTRONA U  
DENITRIFIKACIJI**

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

## **ZAHVALA**

*Osobito se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Dijani Grgas na izdvojenom vremenu, velikoj pomoći i savjetima pri pisanju i izradi ovog diplomskog rada. Također, zahvaljujem se i prof. dr. sc. Tibeli Landeki Dragičević na prenesenom znanju i pruženim savjetima za pisanje diplomskog rada.*

*Hvala mojim kolegicama, prijateljicama i prijateljima koji su bili velika podrška tijekom studiranja.*

*I na kraju, najveća hvala mojim roditeljima i sestri.*

# 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

## NITRIT KAO AKCEPTOR ELEKTRONA U DENITRIFIKACIJI

Mihaela Frketić, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058214727

**Sažetak:** Uklanjanje dušika iz otpadne vode preko nitrita (denitritacija) pruža prednosti u usporedbi s denitrifikacijom. U ovom radu istražena je denitritacija korištenjem visoke početne koncentracije nitrita,  $70 \pm 5$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ . Pokusi su vođeni u anoksičnim uvjetima pri  $3 \pm 0,2$  g MLSS (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*, MLSS, hrv. Suspendirane čestice miješane tekućine)/L dok je kao izvor ugljika korišten acetat pri omjerima C/N (ugljik/dušik) 1, 2, 3 i 4. Praćene su promjene vrijednosti KPK (Kemijska potrošnja kisika), nitrita, slobodne nitritne kiseline, nitrata, pH vrijednosti, temperature, koncentracije otopljenog kisika. Izračunate su brzine uklanjanja nitrita i KPK te omjer utrošene količine KPK za redukciju nitrita. Omjeri C/N 1 i 2 rezultirali su nepotpunom denitritacijom, uklonjeno je 46,5 % i 83,6 % nitrita zbog limitacije elektron donorima (organskim sastojcima), dok je pri omjerima C/N 3 i 4 postignuta potpuna denitritacija. Raspon vrijednosti unutar kojeg se kretala brzina redukcije nitrita pri svim ispitanim omjerima C/N iznosi 26,4 – 27,6 mg  $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ .

**Ključne riječi:** denitritacija, acetat, C/N omjer, nitrit

**Rad sadrži:** 48 stranica, 16 slika, 93 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. prof. dr. sc. Tonči Rezić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (zamjenski član)

**Datum obrane:** 20. prosinca 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

### NITRITE AS AN ELECTRON ACCEPTOR IN DENITRIFICATION

*Mihaela Frketić*, univ. bacc. ing. biotechn.  
0058214727

#### **Abstract:**

The removal of nitrogen from wastewater via nitrite offers advantages compared to denitrification. In this work, denitrification was investigated using a high initial concentration of nitrite,  $70 \pm 5$  mg NO<sub>2</sub>-N/L. The experiments were conducted under anoxic conditions at  $3 \pm 0.2$  g MLSS/L, while acetate was used as a carbon source at C/N ratios of 1, 2, 3 and 4. Changes in COD values, nitrite, free nitrous acid, nitrate, pH value, temperature, dissolved oxygen were monitored. Removal rates of nitrite and COD, and the ratio of the amount of COD used for nitrite reduction, were calculated. C/N ratios of 1 and 2 resulted in incomplete denitrification due to limitation of electron donor (organics), 46.5% and 83.6% of nitrite was removed, while complete denitrification was achieved at C/N ratios of 3 and 4. The achieved nitrite reduction rates at all C/N ratios were in the range 26.4 – 27.6 mg NO<sub>2</sub>-N/Lh.

**Keywords:** *denitrification, acetate, C/N ratio, nitrite*

**Thesis contains:** 48 pages, 16 figures, 93 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. Tonči, Rezić, PhD, Full professor (member)
4. Antonija, Trontel, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** December 20<sup>th</sup>, 2023

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. SPOJEVI DUŠIKA U OTPADNIM VODAMA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. BIOLOŠKA DENITRIFIKACIJA</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3. KINETIKA PROCESA DENITRIFIKACIJE</b> .....	<b>8</b>
<b>2.4. MIKROORGANIZMI U PROCESU DENITRIFIKACIJE</b> .....	<b>10</b>
<b>2.5. ČIMBENICI BIOLOŠKE DENITRIFIKACIJE</b> .....	<b>12</b>
2.5.1. Izvori ugljika .....	13
2.5.2. Omjer KPK/N (C/N) .....	14
2.5.3. pH vrijednost .....	15
2.5.4. Temperatura.....	16
2.5.5. Koncentracija otopljenog kisika (DO) .....	16
<b>2.6. UKLANJANJE DUŠIKA PREKO NITRITA</b> .....	<b>17</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. RADNI MIKROORGANIZMI – MIKROBNA KULTURA AKTIVNOG MULJA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2. SINTETSKA OTPADNA VODA</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3. KORIŠTENA APARATURA U POKUSIMA DENITIFIKACIJE</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4. ANALITIČKE METODE</b> .....	<b>19</b>
3.4.1. Određivanje koncentracije nitrata (NO <sub>3</sub> -N).....	20
3.4.2. Određivanje koncentracije nitrita (NO <sub>2</sub> -N) .....	21
3.4.3. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK).....	21
3.4.4. Određivanje MLSS.....	23
3.4.5. Određivanje koncentracije otopljenog kisika .....	23
3.4.6. Određivanje vrijednosti pH .....	24
3.4.7. Određivanje temperature .....	24
3.4.8. Izračun slobodne nitritne kiseline (FNA) .....	24
<b>3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA</b> .....	<b>24</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>38</b>



# 1. UVOD

Porast broja svjetskog stanovništva, razvoj i značajno širenje industrije dovelo je do nastanka velikih količina otpadnih voda kućanstva i industrije, bogatih brojnim nepoželjnim i toksičnim spojevima, čije bi ispuštanje bez prethodne obrade moglo imati kobne učinke po ljude i okoliš. Prilikom odabira metoda obrade otpadne vode treba voditi računa o njihovoj učinkovitosti, isplativosti s ekoloških kao i ekonomskih aspekata. Biološka obrada otpadnih voda predstavlja najprihvatljiviji i najučinkovitiji način uklanjanja organskih spojeva i nutrijenata (dušika i fosfora) iz otpadnih voda (Lemaire i sur., 2008).

Dušik je jedan od glavnih zagađivača površinskih i podzemnih voda. Osim poljoprivrede, uzrok onečišćenja voda dušikom su i različite druge vrste otpada poput industrijskog, životinjskog i komunalnog. Dušik se u otpadnim vodama može nalaziti u različitim oksidacijskim stanjima, što dodatno doprinosi složenosti procesa njegova uklanjanja (Ritter i sur., 2002).

Uklanjanje dušika iz otpadne vode na uređajima za biološku obradu otpadnih voda uobičajeno se provodi kombinacijom procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Nitrifikaciju provode kemolitotrofne bakterije koje koriste kao donore elektrona anorganske dušikove spojeve pri čemu se amonijak prevodi preko nitrita do nitrata. Neke od bakterija koje provode nitrifikaciju spadaju u rodove: *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* i *Nitrospina* (Gerardi, 2002). Biološka denitrifikacija metoda je ekonomski isplativija te ekološki prihvatljivija za uklanjanje nitrata u usporedbi s fizikalno-kemijskim procesima poput ionske izmjene, adsorpcije i reverzne osmoze (Park i Yoo, 2009). Biološka denitrifikacija je proces koji omogućava prevođenje nitrata do bezopasnog plinovitog dušika kao krajnjeg produkta (Rezvani i sur., 2019). Denitrifikacija zahtjeva nekoliko ključnih čimbenika: anoksični uvjeti, izvor ugljika, odgovarajući omjer C/N, prisutnost i aktivnost denitrifikanata, odgovarajuću temperaturu i vrijednost pH (Rahimi i sur., 2020). Neki od bakterija koje provode denitrifikaciju su: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Hyopomicrobium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* (Gerardi, 2002).

Nitrit je intermedijer u biokemijskim putevima nitrifikacije i denitrifikacije. Denitrifikacija provedena s pomoću denitrifikacijskih bakterija koje kao akceptor elektrona koriste nitrit, ekonomičan je način biološkog uklanjanja dušika iz otpadne vode, s manjom potrošnjom izvora

ugljika i energije, i manjom proizvodnjom mulja čime se smanjuje potreban volumen reaktora (manja investicijska ulaganja), u usporedbi s denitrifikacijom preko nitrata (Gerardi, 2002; Zumft, 1997). Uklanjanje dušika preko nitrita predstavlja izazov jer nitrit inhibira brojne skupine mikroorganizama u aktivnom mulju, poput nitrit oksidirajućih bakterija i fosfor akumulirajućih organizama (Gerardi, 2002).

Cilj ovog rada bio je istražiti provođenje denitrifikacije u šaržnim pokusima korištenjem visoke početne koncentracije nitrita ( $70 \pm 5$  mg NO<sub>2</sub>-N/L) s acetatom kao izvorom ugljika pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4.

## 2. TEORIJSKI DIO

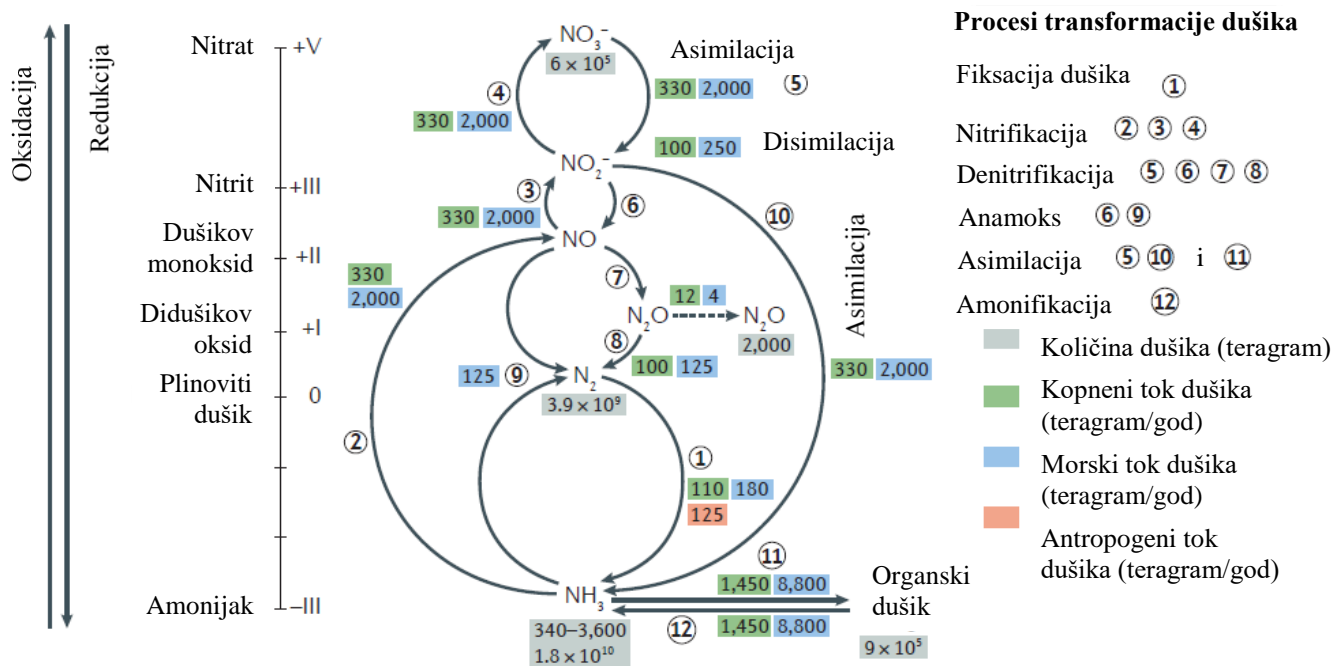
### 2.1. SPOJEVI DUŠIKA U OTPADNIM VODAMA

Dušik je jedan od makroelemenata neophodan za život i nužan za sintezu ključnih staničnih komponenti (Arredondo i sur., 2015). Najveći izvor dušika u biosferi čini atmosferski dušik ( $N_2$ ) (Kuypers i sur., 2018) s udjelom od oko 78 % svih prisutnih plinova. S obzirom da je dušik u ovoj formi inertan i nedostupan za iskorištavanje živim organizmima, prevodi se iz atmosferskog oblika u reaktivnije oblike poput nitrata ( $NO_3^-$ ), nitrita ( $NO_2^-$ ) i amonijaka ( $NH_4^+$ ). Akumulacija navedenih reaktivnih spojeva dušika može uzrokovati ozbiljne ekološke probleme poput eutrofikacije i acidifikacije. Iz tog razloga potrebno ih je ukloniti iz otpadnih voda prije ispuštanja u vodne prijemnike (Arredondo i sur., 2015).

Dušik se u prirodi javlja u obliku različitih spojeva prilikom čega mu se oksidacijska stanja kreću u rasponu od  $-3$  do  $+5$  (Wong i sur., 2003). Ovaj makroelement prolazi kroz šest osnovnih faza koje kontroliraju njegovu uzajamnu transformaciju između organskog i anorganskog oblika te upravljaju migracijskim putevima i već postojećim oblicima. Spomenutih šest faza čine ciklus pod nazivom biogeokemijski ciklus dušika i čine ga reakcije (slika 1) (Kuypers i sur., 2018):

- Anaerobna oksidacija amonijaka:  $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2$
- Amonifikacija: *organski dušik*  $\rightarrow NH_3$
- Nitrifikacija:  $NH_3 \rightarrow NO \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$
- Denitrifikacija:  $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$
- Asimilacija:  $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_3 \rightarrow$  *organski dušik*
- Fiksiranje dušika:  $N_2 \rightarrow NH_3$

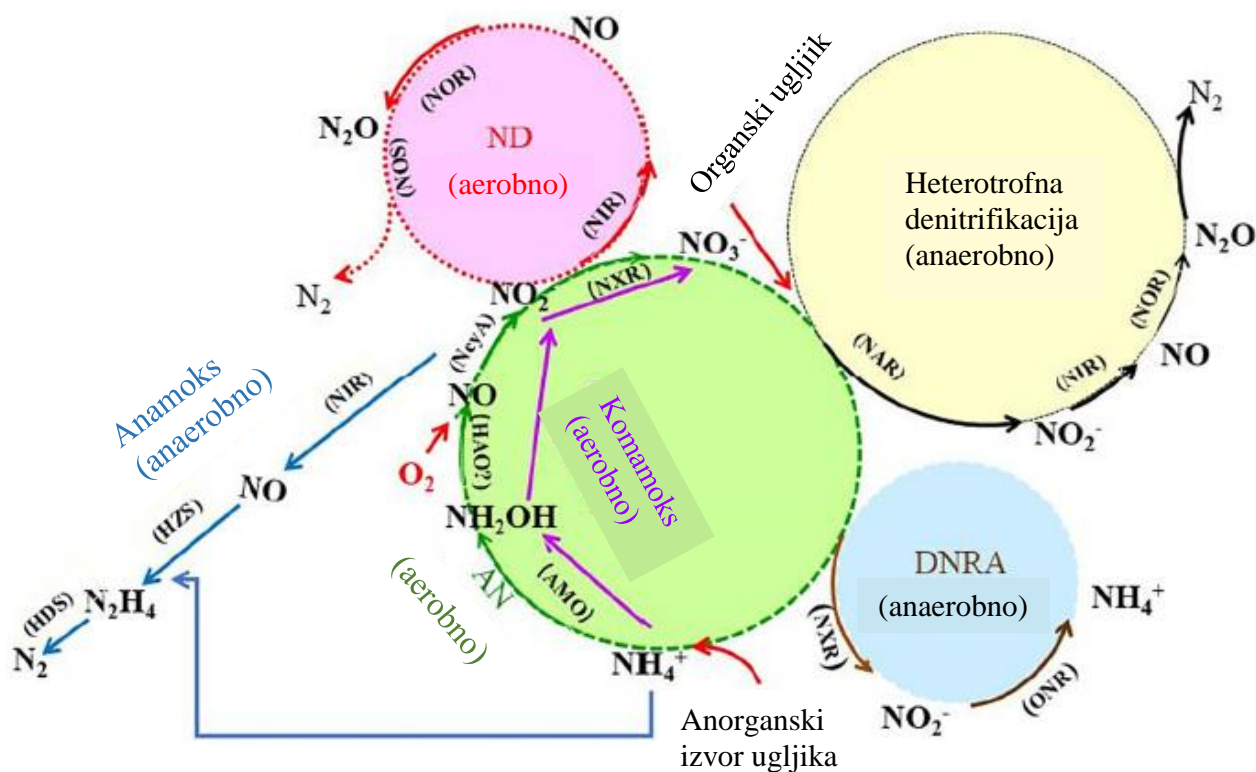
Kako je proces fiksiranja dušika (proces nitratne disimilatorne redukcije do amonijaka (engl. *Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium, DNRA*) značajno manje zastupljen od ostalih šest procesa konverzije dušika, on nije uključen u osnovni proces konverzije dušika (Kuypers i sur., 2018).



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

Onečišćenje vodenog okoliša nitratom je u sve većem porastu zbog rastuće populacije, i posljedično rastuće potrebe za vodom, hranom i energijom, kao i gnojivima i pesticidima, koji na kraju završavaju u okolišu. Onečišćenje nitratom izravno uzrokuje cvjetanje algi (eutrofikacija) i neizravno oštećuje ljudsko zdravlje jer uzrokuje bolesti (tumori) (Wang i sur., 2021). Osim nitrata, prisutnost nitrita u vodi za piće također je nepoželjna i štetna. Njihova prisutnost u izlaznoj vodi iz jedinica za biološko uklanjanje hranjivih tvari (nutrijenata) u uređajima za obradu otpadnih voda, pokazatelj je nepotpunog uklanjanja dušika (Oh i Silverstein, 1999b). Svjetska zdravstvena organizacija propisala je preporučenu vrijednost NO<sub>2</sub><sup>-</sup> u vodi za piće od 3 mg/L, što je ekvivalentno 0,9 mg/L nitritog dušika (NO<sub>2</sub>-N). Preporučena vrijednost za NO<sub>3</sub><sup>-</sup> iznosi 50 mg/L, odnosno 11 mg/L kao nitratni dušik (NO<sub>3</sub>-N) (WHO, 2016).

Na uređajima za biološku obradu otpadnih voda za uklanjanje dušika primjenjuju se razni procesi, i njihova kombinacija, kao što su nitrifikacija – denitrifikacija, nitritacija – denitritacija, anamoks. Na slici 2 su prikazani putevi transformacije dušika tijekom obrade otpadnih voda (Xi i sur., 2022).



**Slika 2.** Putevi dušika tijekom biološke obrade otpadnih voda (prema Xi i sur., 2022)

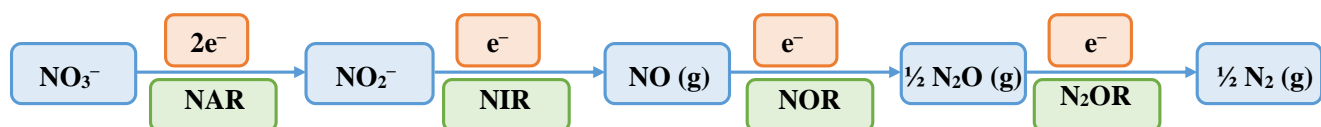
Nitrifikacija (engl. *autotrophic nitrification*, AN) je aeroban autotrofan proces oksidacije amonijaka preko nitrita (ovaj korak provodi skupina mikroorganizama koji se zovu amonijak oksidirajuće bakterije (engl. *Ammonia-Oxidizing Bacteria*, AOB)) do nitrata (ovaj korak provodi skupina mikroorganizama koji se zovu nitrit oksidirajuće bakterije (engl. *Nitrite-Oxidizing Bacteria*, NOB)). AOB i NOB se skupa nazivaju nitrifikanti. Nitritacija je prvi korak nitrifikacije, oksidacija amonijaka do nitrita. Nitratacija je drugi korak nitrifikacije, oksidacija nitrita do nitrata. Denitritacija je denitrifikacija koja započinje s redukcijom nitrita, a denitratacija je denitrifikacija koja započinju s redukcijom nitrata. Anamoks je kemoautotrofni proces u kojem se nitrit reducira do NO, zatim kombinira s  $NH_4^+$  i tvori hidrazin, i zatim konvertira do plinovitog dušika. Komamoks je potpuna oksidacija amonijaka do nitrata u jednom organizmu. Nitrificirajuću denitrifikaciju (engl. *nitrifier denitrification*, ND) provodi skupina mikroorganizama, amonijak oksidirajuće bakterije, koje imaju sposobnost amonijak oksidirati do nitrita, zatim reducirati nitrit do NO,  $N_2O$  i moguće do  $N_2$ . Disimilatorna redukcija nitrata do amonijaka je proces u kojem se nitrat reducira do amonijaka (ne konvertira se do

plinovitog dušika). Bakterije koje provode ovaj proces su sveprisutne u brojnim ekosustavima, uključujući i otpadne vode (Xi i sur., 2022; Gerardi, 2002).

Za redukciju nitrata na raspolaganju su brojne metode: elektrokemija, ionska izmjena, redukcija metala, te autotrofna denitrifikacija i heterotrofna denitrifikacija, a među njima se kao najučinkovitija metoda ističe upravo heterotrofna (biološka) denitrifikacija (Rezvani i sur., 2019; Lu i sur., 2014).

## 2.2. BIOLOŠKA DENITRIFIKACIJA

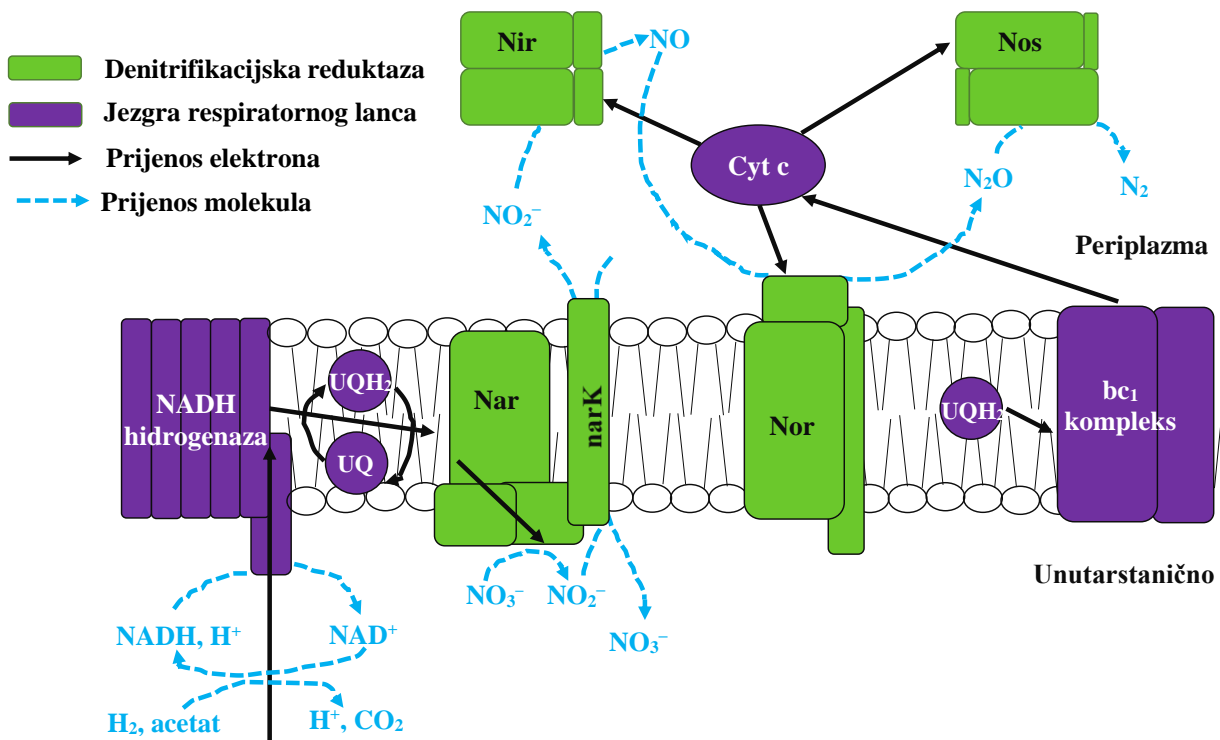
Denitrifikacija je anoksičan proces koji se provodi djelovanjem heterotrofnih denitrificirajućih bakterija (Fernández-Nava i sur., 2010) i odvija se u četiri koraka koja kataliziraju četiri mikrobne reduktaze (slika 3) (Albina i sur., 2019).



Slika 3. Koraci denitrifikacije (prema Wang i sur., 2021)

U procesu denitrifikacije odvijaju se četiri uzastopna koraka (slike 3 i 4) (Hu i sur., 2020; Pan i sur., 2019):

- redukcija nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) do nitrita ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) koju katalizira enzim nitrat reduktaza (engl. *Nitrate Reductase*, *NAR*) kodirana genom *nar*
- redukcija nitrita do dušikovog monoksida ( $\text{NO}$ ) koju katalizira enzim nitrit reduktaza (engl. *Nitrite Reductase*, *NIR*) za koju kodira gen *nir*
- redukcija dušikovog monoksida do didušikovog oksida ( $\text{N}_2\text{O}$ ) koju katalizira enzim dušikov monoksid reduktaza (engl. *Nitric Oxide Reductase*, *NOR*) kodirana genom *nor*
- redukcija didušikovog oksida do molekularnog dušika ( $\text{N}_2$ ) koju katalizira enzim didušikov oksid reduktaza (engl. *Nitrous Oxide Reductase*, *N<sub>2</sub>OR*) koja je pod kontrolom gena *nosZ*.



**Slika 4.** Shematski prikaz respiratornog lanca u procesu denitrifikacije (prema Albina i sur., 2019)

Prijenos elektrona s molekule donora na molekulu akceptora, prilikom odvijanja reakcije redukcije nitrata do nitrita, zajedno s respiratornim lancem kogenerira gradijent protona kroz staničnu membranu bakterija, što se na kraju prevodi u energiju pohranjenu u obliku molekula adenozin trifosfata (ATP) (slika 4) (Chen i Strous, 2013). Idući korak u kojem se odvija redukcija nitrita do dušikova monoksida, ograničava brzinu denitrifikacije (Braker i sur., 2000). Ukoliko su prisutne visoke koncentracije nitrita, gen *nir* je inhibiran, što dovodi do smanjenja brzine denitrifikacije nitrita kao i povećanja emisije N<sub>2</sub>O uslijed inhibicije gena *nosZ* (Zhou i sur., 2008).

Denitrifikacija je važna iz tri razloga:

- denitrifikacija je važan dio biogeokemijskog ciklusa dušika tijekom kojeg se reaktivan dušik vraća u atmosferu i održava globalna količina dušika (slika 1) (Mike, 2008)
- denitrifikacija, uz nitrifikaciju, je dio biološkog uklanjanja nutrijenata i široko je primijenjena u sustavima za biološku obradu otpadnih voda (slika 2) (Grady i sur.,

1999)

- biološka denitrifikacija doprinosi stakleničkim plinovima preko emisije N<sub>2</sub>O (slike 1-3) (IPCC, 2000).

Za procjenu izvedbe denitrifikacije koriste se slijedeći pokazatelji (Sage i sur., 2006):

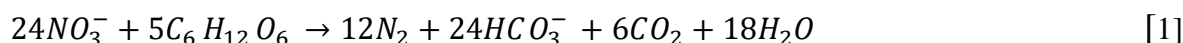
- brzina denitrifikacije
- potencijal denitrifikacije
- brzina uklanjanja nitrata
- učinkovitost uklanjanja nitrata

### 2.3. KINETIKA PROCESA DENITRIFIKACIJE

Kako bi se kvalitetno dizajnirao sustav za obradu otpadnih voda koji će primjenjivati denitrifikaciju kao dio sustava uklanjanja dušika potrebno je poznavati kinetiku ovog procesa. Kinetički modeli koriste se kako bi se ukazalo na promjene metabolizma mikroorganizama koji čine zajednicu aktivnog mulja (Glass i Silverstein, 1998).

U anoksičnom okruženju denitrificirajući mikroorganizmi uz prisutnost organskog ugljika koriste nitrat kao akceptor elektrona (Glass i Silverstein, 1998).

Ukoliko se kao izvor organskog ugljika koristi glukoza, reakcija se stehiometrijski može prikazati jednadžbom (1), prilikom čega su nitrat i glukoza limitirajući supstrati (Shah i Coulman, 1978):



Veliki broj provedenih istraživanja uglavnom je koristio mješovitu i pritom nedovoljno dobro definiranu mikrobnu kulturu aktivnog mulja u kojoj dolazi do različitih interakcija mikrobnih vrsta i supstrata kao i varijacija populacije mikroba u vremenu (Kornaros i sur., 1996). Iz tog razloga modeliranje sustava temeljeno na ovakvim eksperimentima predstavlja poteškoće i vrlo lako može dovesti do kvara sustava. Kako bi razvili kinetički model koji će dovoljno dobro opisati temeljne principe biološke denitrifikacije i odredili povezane kinetičke parametre, Kornaros i sur. (1996) koristili su čistu kulturu Gram negativne bakterije *Pseudomonas denitrificans* u definiranom sintetskom mediju. Ova bakterija ima sposobnost korištenja nitrata/nitrita kao krajnje akceptore elektrona u anoksičnim uvjetima. Pretpostavljeno



je kako je kinetika denitrifikacije povezana s rastom stanica te je opisana Monodovim izrazom s dva ograničavajuća supstrata, krajnjim akceptorom elektrona i organskim ugljikom. Navedeni model ima sposobnost predviđanja rasta biomase, brzine redukcije nitrata i nitrita te nakupljanja intermedijera (Kornaros i sur., 1996).

De Filippis i sur. (2013) u uvjetima pH raspona 8 – 8,5 i koncentracije otopljenog kisika (engl. *Dissolved Oxygen, DO*) manjoj od 0,5 mg/L opisali su kinetiku denitrifikacije (jednadžba 2) koja slijedi Monodov izraz za specifičnu brzinu denitrifikacije:

$$v_d = v_{dTmax} * \frac{S_n}{K_{dT} + S_n} * \frac{S_c}{K_{cT} + S_c} \quad [2]$$

gdje je:  $v_{dTmax}$  specifična brzina denitrifikacije [mg NO<sub>3</sub>-N/g VSS (engl. *Volatile Suspended Solids, VSS*; hrv. Hlapive suspendirane čestice) d],  $S_n$  koncentracija nitrata [mg NO<sub>3</sub>-N/L],  $K_{dT}$  Monodova konstanta za nitrate [mg NO<sub>3</sub>-N/L],  $S_c$  koncentracija biorazgradivog organskog supstrata [mg KPK/L],  $K_{cT}$  Monodova konstanta za ugljik [mg KPK/L].

Lin i sur. (2009) navode Monodov izraz (jednadžba 3) koji povezuje specifičnu brzinu rasta denitrificirajućih bakterija s koncentracijom nitrata:

$$\mu_D = \mu_{Dmax} * \frac{S_{NO_3}}{K_D + S_{NO_3}} \quad [3]$$

Jednadžba (3) se može svesti na kinetiku nultog reda ako je  $K_D$  znatno manji od  $S_{NO_3}$ , a na kinetiku prvog reda ukoliko je  $S_{NO_3}$  znatno manji od  $K_D$ .

U inženjerstvu zaštite okoliša, neto specifična brzina rasta ( $\mu$ ) mikroorganizama (jednadžba 4) obrnuto je proporcionalna vremenu zadržavanja mulja (engl. *Sludge Retention Time, SRT*):

$$\frac{1}{SRT} = \dot{\mu}_D \quad [4]$$

Proces denitrifikacije jako je ovisan o koncentraciji organskog supstrata (donoru elektrona) te otopljenom kisiku u sustavima za biološku obradu otpadnih voda. Stoga, razmjerno Monodovoj jednadžbi (3) predložen je višeparametarski kinetički model (jednadžba 5) kojim se opisuje brzina uklanjanja nitrata procesom denitrifikacije (Batchelor, 1982):

$$q_{NO_3} = q_{NO_3,max} * \frac{S_{NO_3}}{K_{NO_3} + S_{NO_3}} * \frac{S_c}{K_c + S_c} * \frac{1}{K_O + DO} \quad [5]$$

## 2.4. MIKROORGANIZMI U PROCESU DENITRIFIKACIJE

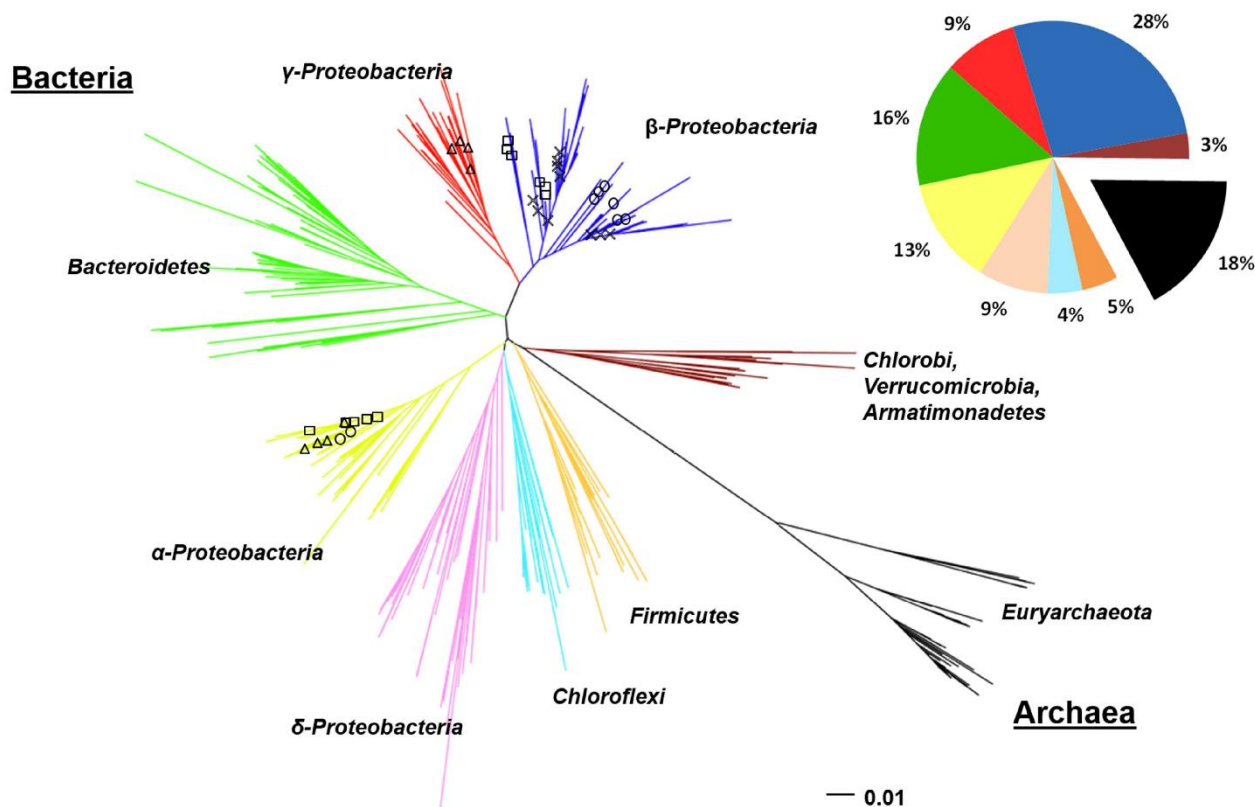
Da bi bakterija bila okarakterizirana kao denitrifikant mora ispuniti sljedeća četiri uvjeta. Primarni uvjet je postojanje povećanog prinosa rasta zbog redukcije nitrata, nitrita ili dušikovog oksida. Preostali kriteriji su: najmanje 80 % nitrata ili nitrita koje je mikroorganizam reducirao mora se prevesti u plinoviti dušik i dušikov oksid, pretvorba nitrata u dušikov oksid i plinoviti dušik mora se odvijati velikom brzinom, odnosno proces mora biti centralni za stanični intermedijarni metabolizam, a ne sporedna reakcija kojom se osigurava manji put za transport elektrona. Posljednji uvjet je dokazana prisutnost citokroma cd ili disimilatorne nitrit reduktaze u mikrobnim stanicama (slika 4) (Tate, 2000). Lu i sur. (2014) su mikroorganizme s obzirom na sposobnost provođenja denitrifikacije svrstali u jednu od pet različitih skupina:

- potpuni denitrifikanti – imaju sposobnost redukcije i nitrata i nitrita do plinovitog dušika, poput primjerice *Hyphomicrobium* spp.
- denitrifikanti koji mogu denitrificirati isključivo nitrit – mogu reducirati nitrit do plinovitog dušika, ali ne i nitrat
- nepotpuni denitrifikanti – reduciraju nitrat ili nitrit do intermedijata dušikovih oksida, ali ne do plinovitog dušika, poput primjerice *Methyloversatilis* spp.
- denitrifikanti koji nepotpuno reduciraju nitrit – imaju sposobnost reducirati nitrit do intermedijata dušikovih oksida, poput primjerice nekih sojeva *Pseudomonas* spp.
- nedenitrifikanti – nemaju sposobnost redukcije nitrata niti nitrita.

U sustavima za biološku obradu otpadnih voda se obično nalaze mikroorganizmi koji imaju različite denitrificirajuće sposobnosti i skupa doprinose sveukupnom uklanjanju dušikovih oksida (Lu i sur., 2014).

Sposobnost provođenja denitrifikacije karakteristika je rasprostranjena među pripadnicima domena bakterija te arhea, a istraživanja utemeljena na 16sRNA pokazuju kako je raznolikost kao i bogatstvo vrsta denitrificirajućih mikroorganizama u otpadnim vodama relativno visoka, što je prikazano na slici 5 (Throbäck, 2006). Iz denitrifikacijskih bioreaktora izolirane su vrste rodova *Hyphomicrobium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas* i *Comamonas* koji pripadaju koljenu Proteobacteria (Martineau i sur., 2013; Chakravarthy i sur., 2011;

Gumaelius i sur., 2001; Su i sur., 2001). Neki od sojeva izoliranih iz stvarnih sustava za denitrifikaciju otpadnih voda pripadali su rodovima *Azoarcus*, *Zoogloea* i *Comamonadaceae* te je većina njih bila dio koljena Proteobacteria (59 %) i Bacteroidetes (16 %). Na slici 5 također se može primijetiti kako su podklase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$  značajno zastupljenije u odnosu na podklasu  $\epsilon$ -proteobakterija (Zhang i sur., 2012).



**Slika 5.** Filogenetsko stablo glavnih koljena bakterija za denitrifikaciju otpadnih voda konstruirano metodom pridruživanja na temelju 1003 parcijalne 16S rRNA sekvence (> 500 pb) preuzete iz GenBank (Lu i sur., 2014)

Zastupljenost i brojnost dominantnih populacija varira od jednog do drugog postrojenja za biološku obradu otpadnih voda, ovisno o karakteristikama otpadne vode kao supstrata te procesnim čimbenicima (Lu i sur., 2014).

Denitrificirajuće bakterije naziv je za veoma raznoliku skupinu fakultativnih anaerobnih bakterija koje imaju sposobnost preusmjerenja aktivnosti aerobne respiracije na anaerobnu u kojoj je krajnji akceptor elektrona nitrat, nitrit i dušikov oksid, a ne kisik kao što je to slučaj kod

aerobne respiracije (Petri, 2000). Do preusmjeravanja aktivnosti na aerobnu respiraciju dolazi u aerobnim uvjetima kod denitrifikanata zbog učinkovitosti očuvanja Gibbsove slobodne energije. Niska koncentracija otopljenog kisika i prisutnost nitrata su inicijatori denitrifikacije (Cua i Stein, 2011).

Intermedijarni spojevi nastali tijekom denitrifikacije,  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{NO}$ , štetni su za bakterije (Cua i Stein, 2011) te im se unutarstanične koncentracije održavaju ispod citotoksične razine do mM i nM (Chen i Strous, 2013).

U procesu s aktivnim muljem oko 80 % prisutnih bakterija spadaju u fakultativne anaerobne organizme koji imaju sposobnost provođenja procesa denitrifikacije (Gerardi, 2002). Oko 130 denitrificirajućih bakterijskih vrsta je identificirano unutar preko 50 rodova, a neki od njih su: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Halobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Kingella*, *Methanonas*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Axotobacter*, *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Denitrobacillus*, *Propionicbacterium*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Spirillum*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas* (Shapleigh, 2006).

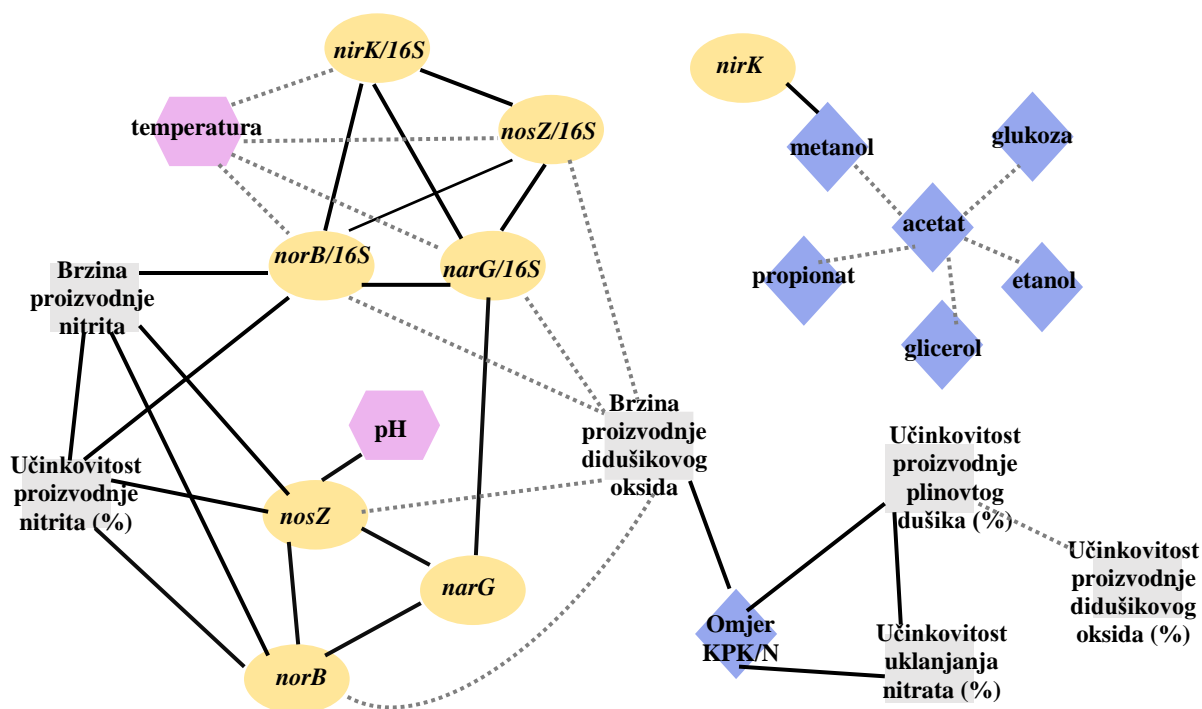
Budući da se inženjerske prakse obrade otpadne vode uglavnom temelje na funkcioniraju procesa u cjelini, umjesto identifikacije svih bakterija koje sadrže skupinu gena za denitrifikaciju, prikladnije je fokusirati se na predominantne organizme zaslužne za denitrifikaciju (Fang i sur., 2019). Za analizu raznolikosti denitrificirajućih bakterija kvalificirano je nekoliko ključnih enzima koji su dio respiratornog puta (slika 4) disimilatorne redukcije nitrata. Najviše pozornosti usmjereno je na membranski vezanu nitrat reduktazu (*nar*) i perioplazmatsku nitrat reduktazu (*nap*) te dvije nitrit reduktaze (*nirK* i *nirS*) (Petri, 2000).

Različiti izvori ugljika doprinose uspostavljanju specifične strukture mikrobne zajednice. Članovi tih zajednica mogu imati različite afinitete za elektronske receptore te proizvoditi različite količine  $\text{NO}_x$  reduktaze, što posljedično uzrokuje nakupljanje drugačijih međuprodukata (Zhao i sur., 2020).

## 2.5. ČIMBENICI BIOLOŠKE DENITRIFIKACIJE

Uspješnost provođenja procesa biološke denitrifikacije ovisi o brojnim čimbenicima. Neki od važnijih, koji kontroliraju funkciju denitrifikacijske zajednice su dodatni (vanjski) izvori ugljika, omjer  $\text{KPK/N}$ , pH vrijednost, temperatura, DO (slika 6). Proučavani su njihovi utjecaji

na ukupno uklanjanje nitrata, brzinu denitrifikacije te nakupljanje intermedijera (Lu i sur., 2014).



**Slika 6.** Mreža povezanosti operativnih parametara, učinkovitosti denitrifikacije, i funkcionalnih denitrificirajućih gena. Neprekinuta linija pokazuje pozitivnu vezu, a točkasta linija negativnu vezu ( $P < 0,05$ ) (prema Lee i sur., 2018)

### 2.5.1. Izvori ugljika

Za odvijanje heterotrofne denitrifikacije nužna je prisutnost organskog izvora ugljika (donora elektrona). Izvori ugljika za denitrifikaciju mogu se podijeliti u tri skupine: biorazgradive organske sastojke prisutne u otpadnoj vodi, vanjske tj. dodatne izvore ugljika te unutarstanične rezerve ugljika kao što su to polihidroksialkanoati (PHA) (Bernat i Wojnowska-Baryła, 2007). Nizak omjer KPK/N te veliki utrošak KPK u prethodnim koracima obrade vode, neki su od razloga zašto otpadna voda koja se obrađuje ne sadrži dovoljnu koncentraciju KPK potrebnu za denitrifikaciju. U tim slučajevima poseže se za dodatkom vanjskih izvora ugljika, poput acetata, glukoze, metanola, etanola, saharoze, octene kiseline i drugih (Carrera i sur., 2004; Æsøy i sur., 1998; Kim i sur., 1997; Błaszczuk i sur., 1981). Izbor vanjskog izvora ugljika ključan je za proces denitrifikacije (Cao i sur., 2020), a faktori koje je pritom potrebno uzeti u

obzir su: cijena, brzina denitrifikacije, kinetika, stupanj iskorištenja, proizvodnja mulja, sigurnost prilikom rukovanja i skladištenja te sadržaj nepoželjnih i toksičnih tvari (ÆsØy i sur., 1998).

### 2.5.2. Omjer KPK/N (C/N)

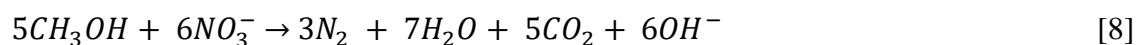
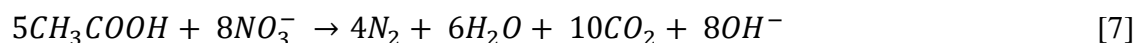
Za učinkovito odvijanje denitrifikacije (slika 4) nužno je osigurati odgovarajuću količinu organskih sastojaka (donora elektrona) pri čemu je potrebno voditi računa da se doda ona količina organskih sastojaka koja će osigurati potpunu denitrifikaciju nitrata/nitrita i da nakon procesa denitrifikacije u obrađenoj vodi ne zaostaju organski sastojci (omjer C/N) jer u protivnom zaostali organski sastojci predstavljaju sekundarno onečišćenje i zahtijevaju dodatne stupnjeve obrade vode da bi se postigla zakonom zahtijevana kakvoća vode za ispust u površinske vode odnosno u sustav javne odvodnje (prevelik omjer C/N). Ukoliko nema dovoljno organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju, tada će se svi organski sastojci utrošiti tijekom denitrifikacije i u obrađenoj vodi će biti prisutni zaostali nitrati/nitriti, što također zahtijeva dodatne stupnjeve obrade vode do postizanja zadovoljavajuće kvalitete obrađene vode (premali omjer C/N) (Wang i sur., 2021).

KPK/N značajno utječe na aktivnost biomase (slika 6) (Ruiz i sur., 2006). Xia i sur. (2010) su praćenjem sastava i dinamike populacije denitrificirajućih bakterija uočili pozitivnu korelaciju između omjera KPK/N i mikrobne raznolikosti. Zamijećeno je povećanje kapaciteta denitrifikacije s povećanjem KPK/N u anoksičnim uvjetima bioreaktora koji je obrađivao procjedne vode. Korelacija ova dva parametra poklapa se s pomakom primarnih denitrifikanata s autotrofnih *Thiobacillus* vrsta na heterotrofne *Azoarcus* spp. (Sun i sur., 2012).

Provedena su razna istraživanja koja su dala različite vrijednosti optimalnih omjera KPK/N koristeći različite dodatne izvore ugljika. Za uklanjanje ukupnog dušika putem denitrifikacije u istraživanju koje su proveli Carrera i sur. (2004) gdje je kao dodatni izvor ugljika korišten etanol, optimalni KPK/N iznosio je 7,1. Kim i sur. (1997) izvijestili su o vrijednosti omjera KPK/N od 7,06 korištenjem saharoze kao dodatnog izvora ugljika dok je vrijednost navedenog omjera uz dodatak octene kiseline prema Błaszczuk i sur. (1981) bila 5,74. Stoga se optimalni omjer C/N, odnosno KPK/N potreban za proces denitrifikacije s ciljem obrade određene otpadne vode pod posebnim uvjetima mora odrediti eksperimentalno (Chiu i Chung, 2003).

Ovisno o odabranom izvoru ugljika mijenja se minimalan potreban omjer C/N za potpunu

denitrifikaciju, kao što je prikazano na primjerima kada su kao izvori ugljika korišteni saharoza, octena kiselina i metanol (Boaventura i Rodrigues, 1997) (jednadžbe 6-8):



U prisutnosti plinovitog dušika nastalog denitrifikacijom zajedno s organskom tvari, može se odvijati metanogeneza i DRNA, a omjer KPK/N ključan je u regulaciji ekspresije navedenih metaboličkih puteva. Istraživanje je pokazalo kako niski omjeri dovode do velike aktivnosti denitrifikacije dok visoke vrijednosti KPK/N utječu na povećanje metanogene aktivnosti (Ruiz i sur., 2006).

### 2.5.3. pH vrijednost

Osim što je važan čimbenik o kojem ovisi cjelokupno uklanjanje dušika i denitrifikacijska aktivnost, pH vrijednost utječe na sukcesiju strukture kao i raznolikost zajednice mikroorganizama (Wang i sur., 2012). Denitrifikacija nije toliko osjetljiva na varijacije pH u rasponu od 6,5 – 8,5. U pokusima provedenima u denitrificirajućem reaktoru s fluidiziranim slojem došlo je do pomaka sastava mikrobnih zajednica na povećanu raznolikost i ujednačenost kada je pH vrijednost smanjena s preko 9,0 na optimalni raspon 6,5 – 7,5; određeno pomoću filogenetske analize (Hwang i sur., 2006). Vrijednost pH ima bitnu ulogu u nakupljanju nitrita prilikom denitrifikacije budući da utječe na aktivnost enzima (Zhou i sur., 2007). Glass i Silverstein (1998) zamijetili su inhibiciju denitrifikacije pri pH vrijednosti između 6,5 – 7. Postupnim povećanjem vrijednosti pH sa 7,5 na 9 postupno se povećavala i akumulacija nitrita. Jie (2006) je proučavajući denitrifikaciju u anoksičnim uvjetima s piridinom kao izvorom ugljika pokazao da se koncentracija akumuliranog nitrita poveća s porastom pH od 6,5 na 9,5. Suprotni trend zamijetili su Thomsen i sur. (1994) prilikom denitrifikacije koristeći bakteriju *Paracoccus denitrificans*. U ovom slučaju, nitrat se akumulirano do koncentracije od 40  $\mu$ M pri pH 8,5; a koncentracija od 250  $\mu$ M doseguta je smanjenjem pH na 5,5. Na temelju navedenih rezultata različitih istraživanja vidljivo je da se učinci vrijednosti pH na akumulaciju nitrita tijekom denitrifikacije razlikuju (Cao i sur., 2013). Albina i sur. (2019) ističu kako je optimalni pH za

bakterijsku aktivnost između 7,5 i 9,5, a maksimalne granične vrijednosti do kojih određene alkalofilne bakterije provode denitrifikaciju su oko pH 11,5 do 12. Alkalno okruženje izvan optimalnog raspona pH uzrokuje usporavanje denitrifikacije i nakupljanje nitrita, što može inhibirati bakterijsku aktivnost i na kraju dovesti do smrti stanice. Mikrobna denitrifikacija, heterotrofna ili hidrogenotrofna, uvijek je ostvarena uz nastajanje OH<sup>-</sup> iona, koji mijenja pH okoline ukoliko se reakcija ne provodi u puferiranom mediju (Albina i sur., 2019).

#### 2.5.4. Temperatura

Temperaturni optimum za provođenje denitrifikacije kreće se između 20 – 30 °C. Rast temperature i brzina denitrifikacije u proporcionalnom su odnosu. Do inhibicije denitrifikanta dolazi pri temperaturama ispod 5 °C. Za kompenzaciju smanjenja brzine denitrifikacije pri nižim temperaturama primjenjuje se povećanje koncentracije mikrobne biomase (Gerardi, 2002). Saleh-Lakha i sur. (2009) usporedili su utjecaj vrijednosti pH i temperature pomoću RT-PCR-a (engl. *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR*) na ekspresiju gena *nirS* i *nirB* u denitrifikacijskih baterija. Uočeno je kako je temperaturni utjecaj značajniji s obzirom da razlike u razinama ekspresije navedenih gena pri pH 6 – 8 nisu bile značajnije. Bakterije uzgajane na 30 °C imale su puno veću ekspresiju *nirS* i *nirB* od onih uzgajanih na 10 ili 20 °C (Saleh-Lakha i sur., 2009).

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

U procesu razgradnje organske tvari, kisik je isplativiji akceptor elektrona jer je količina energije proizvedene aerobnom respiracijom veća u odnosu na anoksične/anaerobne uvjete. Koncentracija kisika veća od 0,2 mg O<sub>2</sub>/L uzrokuje pad denitrifikacijske aktivnosti i akumulaciju dušikovih intermedijera (Oh i Silverstein, 1999a). Prisutnost kisika dovodi do inhibicije ekspresije i aktivnosti reduktaza koje kataliziraju denitrifikacijske reakcije, prilikom čega je nitrat reduktaza osjetljivija na prisutnost otopljenog kisika u odnosu na nitrit reduktazu čiji je inhibitorni prag tolerancije na kisik 2,5 mg DO/L (Körner i Zumft, 1989). Visoke koncentracije otopljenog kisika djeluju inhibirajuće na reduktazu dušikova oksida, što dovodi do nepoželjnog nakupljanja N<sub>2</sub>O (Sabba i sur., 2017). U prisutnosti dovoljne količine kisika, flokule aktivnog mulja veće od 100 µm imaju dovoljnu veličinu da unutar njih dođe do stvaranja



gradijenta koncentracije otopljenog kisika. U tim uvjetima kroz flokulu se stvaraju različite zone u kojima bakterijske stanice koriste kisik, nitratne i nitritne ione kao akceptore elektrona. Bakterije smještene uz površinu flokule za respiraciju koriste otopljeni kisik dok one u središnjem dijelu flokule koriste nitratne i nitritne ione (Gerardi, 2002). Zhang i Zhang (2018) proveli su istraživanje utjecaja koncentracije otopljenog kisika na učinkovitost uklanjanja nitrata procesom denitrifikacije pri tri različita uvjeta: aerobnim, anoksičnim te niskoj koncentraciji otopljenog kisika. Kao izvor ugljika korištena je biorazgradiva plastika sastavljena od 60 % škroba i 30 % polipropilena. Anoksični uvjeti dali su najbolje rezultate od 98 % uklanjanja nitrata. Pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika učinkovitost je iznosila > 97 % dok su aerobni uvjeti dali rezultate od > 65 % uklanjanja nitrata (Zhang i Zhang, 2018).

## **2.6. UKLANJANJE DUŠIKA PREKO NITRITA**

Na uređajima za biološku obradu otpadnih voda se uobičajeno primjenjuje kombinacija procesa nitrifikacije i denitrifikacije, dakle, oksidacija amonijaka do nitrita, i zatim do nitrata (potpuna nitrifikacija) u aerobnim uvjetima, i denitrifikacija od nitrata preko nitrita dalje do plinovitog dušika u anoksičnim uvjetima uz izvor organskog ugljika kao donora elektrona. Na trošak aeracije na uređajima za biološku obradu otpadnih voda odlazi čak i do 75 % troška energije. Kako je nitrit intermedijer i u procesu nitrifikacije i u procesu denitrifikacije, onda bi se uklanjanje dušika moglo provoditi preko nitrita, umjesto preko nitrata. Uklanjanjem dušika preko nitrita moguće je ostvariti 25 % niži utrošak kisika tijekom aerobnog stupnja, i predstavlja 60 % uštede energije. Također, potreba za donatorom elektrona tijekom anoksičnog stupnja je manja i do 40 %. Dodatna prednost je to što je brzina denitrifikacije nitrita 1,5 – 2 puta veća od brzine denitrifikacije nitrata. Nadalje, emisija CO<sub>2</sub> je manje za 20 %. Konačno, ostvaruje se manja proizvodnja mulja 33 – 35 % tijekom procesa nitrifikacije i 55 % tijekom procesa denitrifikacije (Glass i sur., 1997; Surmacz-Górska i sur., 1997; Turk i Mavinic, 1987).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. RADNI MIKROORGANIZMI – MIKROBNA KULTURA AKTIVNOG MULJA

Pokusi u ovom radu su napravljeni s mikrobnom kulturom aktivnog mulja (slika 7). Mulj je uzet iz aerobnog bazena bioreaktora s uređaja za biološku obradu otpadne vode grada. Po dopremanju mulja u laboratorij, mulj je podvrgnut naizmjeničnim aerobnim i anoksičnim uvjetima za provođenje nitrifikacije i denitrifikacije. Aktivni mulj je aklimatiziran na natrijev acetat kao izvor ugljika (sintetsku otpadnu vodu). Šaržnim testovima je pokazano da aktivni mulj ima sposobnost provođenja nitrifikacije i denitrifikacije, što upućuje na prisustvo mikrobnih skupina odgovornih za te procese, nitrifikante i denitrifikante. Pokusi su provedeni s  $3 \pm 0,2$  g MLSS/L. MLSS se koristi kao mjera koncentracije aktivnog mulja.



**Slika 7.** Mikrobna kultura aktivnog mulja korištena u pokusima denitrifikacije

#### 3.2. SINTETSKA OTPADNA VODA

U pokusima denitrifikacije korištena je sintetska otpadna voda koja je pripremljena

otapanjem soli u destiliranoj vodi. Kao jedini izvor ugljika je uporabljen natrijev acetat bezvodni,  $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$  (GRAM-MOL), dodan u odgovarajućoj koncentraciji za odabrane početne omjere C/N 1, 2, 3 i 4. Pokusi denitrifikacije su provedeni s nitritom kao akceptorom elektrona s početnih  $70 \pm 5$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ . Otopina nitrita je priređena otapanjem  $\text{NaNO}_2$  (Merck) u destiliranoj vodi. Pokusi su započeli s početnih 0 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ .

Aktivni mulj uporabljen u pokusima denitrifikacije je bio aklimatiziran na koncentraciju  $70 \pm 5$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  te su tijekom vremena namnožene mikrobne vrste koje mogu tolerirati i koristiti toliku koncentraciju nitrita.

### **3.3. KORIŠTENA APARATURA U POKUSIMA DENITIFIKACIJE**

Pokusi su provedeni u laboratorijskim čašama volumena 600 mL, radnog volumena 500 mL. Čaše su postavljene na magnetske miješalice (IKA RH basic 2) pri 100 o/min za osiguravanje anoksičnih uvjeta i za miješanje reaktorskog sadržaja čime se osigurao kontakt mikroorganizama i sintetske otpadne vode. Iz roditeljskog reaktora je uzet mulj prilagođen na acetat kao izvor ugljika i nitrit kao akceptor elektrona i stavljen u laboratorijske čaše. U čaše su uronjene elektrode za određivanje temperature, vrijednosti pH i otopljenog kisika, čije su se vrijednosti očitavale s mjernog aparata. Pokusi su vođeni pri koncentraciji otopljenog kisika 0,1-0,2 mg  $\text{DO/L}$  i sobnoj temperaturi. Pokusi su vođeni pri početnih  $70 \pm 5$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i 0 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ . Sav nitrit je dodan na početku pokusa u jednom pulsu. Tijekom pokusa vrijednost pH i temperatura su motrene, nisu korigirane.

Svi pokusi su napravljeni u tri ponavljanja i prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

### **3.4. ANALITIČKE METODE**

Tijekom pokusa motreni su pH vrijednost, koncentracija otopljenog kisika i temperatura pH elektrodom (SenTix41, WTW 330i) i kisikovom elektrodom (DurOx, WTW Oxi3210). Također su tijekom pokusa uzimani uzorci miješane tekućine za određivanje koncentracije MLSS, KPK,  $\text{NO}_3\text{-N}$  i  $\text{NO}_2\text{-N}$ . Svi su uzorci filtrirani kroz grubi filter papir veličine pora  $0,45 \mu\text{m}$  osim uzorka za određivanje MLSS (slika 8).



**Slika 8.** Uzorak za analizu KPK,  $\text{NH}_4\text{-N}$ ,  $\text{NO}_3\text{-N}$ ,  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{PO}_4\text{-P}$

#### 3.4.1. Određivanje koncentracije nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ )

Koncentracija nitrata je određivana pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14773. Metoda se temelji na reakciji nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline pri čemu nastaje nitro spoj crvene boje koji se određuje fotometrijski.

##### Postupak:

U staklenu kivetu otpipetira se 1,5 mL uzorka i žličica  $\text{NO}_3\text{-1}$  reagensa. Kiveta se dobro zatvori i miješa zbog otapanja reagensa. Nakon toga doda se 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, zatvori kiveta i promiješa. Nakon reakcijskog vremena od 10 minuta očita se koncentracija nitrata na spektrofotometru (Spectroquant VEGA 400, Merck) izražena u mg/L.

##### Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14773 (raspon koncentracije 0,2 – 20 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ )

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Kvarcne kivete promjera 10 mm, Merck

Spektrofotometar

#### 3.4.2. Određivanje koncentracije nitrita (NO<sub>2</sub>-N)

Za određivanje koncentracije nitrita uporabljeni su kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776. Metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500-NO<sub>2</sub>-B, i EN 26 777. Temelj metode je reakcija nitrita sa sulfanilnom kiselinom pri čemu nastaje diazonijeva sol, koja reagira s N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorom i nastaje crveno-ljubičasta azo boja. Intenzitet obojenja se određuje spektrofotometrijski.

##### Postupak:

U staklenu kivetu otpipetira se 5 mL uzorka i doda jedna žličica reagensa NO<sub>2</sub>-1. Kiveta se zatvori i miješa do otapanja reagensa. Nakon reakcijskog vremena od 10 minuta izmjeri se koncentracija nitrita na spektrofotometru (Spectroquant VEGA 400, Merck) izražena u mg/L.

##### Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14776 (raspon koncentracije 0,002 – 1 mg NO<sub>2</sub>-N/L)

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Kvarcne kivete promjera 10 mm, Merck

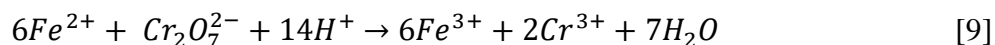
Spektrofotometar

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

Koncentracija organskih sastojaka izražena je kao KPK vrijednost. Koncentracija KPK je određivana titrimetrijski prema Standardnim Metodama (APHA, 2005), po metodi 5220C (Closed Reflux, Titrimetric method).

Uzorak se spaljuje u kiseloj sredini pri čemu srebro sulfat, Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kemika), služi kao katalizator, i živin sulfat, HgSO<sub>4</sub> (Kemika), se dodaje da bi se spriječila interferencija nekih anorganskih spojeva, primjerice kloridi. Suvišak kalijeva bikromata, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Kemika), se titrira otopinom feroamonijeva sulfata, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O (Kemika), FAS, uz dodatak

feroina, 1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat (Kemika) kao indikatora, prikazano jednadžbom (9):



Postupak:

U staklenu pipetu otpipetira se 2 mL uzorka, doda se 1,2 mL otopine  $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$ , i 2,8 mL otopine  $Ag_2SO_4 + H_2SO_4$  (GRAM-MOL), zatvori se čepom, promiješa i spaljuje u termoreaktoru (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 feroina kao indikatora. Prilikom titracije boja otopine se mijenja iz plavo-zelene do smeđe-crvene. Slijepa proba se određuje na isti način uz razliku da je dodani uzorak destilirana voda. Faktor otopine feroamonijevog sulfata se određuje na isti način kao i slijepa proba, s razlikom da se uzorak ne spaljuje. Faktor otopine se računa prema jednadžbi (10):

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

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

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi (11):

$$KPK \left[ \frac{mgO_2}{L} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c \cdot f \cdot 8000}{V_{uzorka}} \quad [2]$$

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

Pribor:

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Digestor

Dispenzeri

Titратор

#### 3.4.4. Određivanje MLSS

Koncentracija aktivnog mulja izražena je kao MLSS, 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 (12) za računanje MLSS:

$$MLSS \left[ \frac{g}{L} \right] = \frac{m_{om} - m_f}{mL \text{ uzorka}} \times 1000 \quad [3]$$

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

##### Pribor:

Pipeta

Lijevak

Čašica

Osušeni i izvagani filter papir

Sušionik

Eksikator

#### 3.4.5. 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.

#### 3.4.6. 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 pH elektrodi (WTW 330i i SenTix 41) i kisikovojoj elektrodi (WTW Oxi3210 i DurOx) uronjenih u miješanu tekućinu.

#### 3.4.8. Izračun slobodne nitritne kiseline (FNA)

Slobodna nitritna kiselina (engl. *Free nitrous acid*, *FNA*) se računa prema jednadžbi (13): (Anthonisen i sur., 1976).

$$\text{FNA} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{[\text{N}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{e^{\frac{-2300}{273+T(^{\circ}\text{C})}} \times 10^{\text{pH}}} \quad [13]$$

### 3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) pojedinačnog parametra i izračunato je prema jednadžbi (14):



$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [14]$$

Pripadajuće standardne pogreške  $S_{\bar{x}}$  su izračunate prema jednadžbi (15):

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [15]$$

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

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

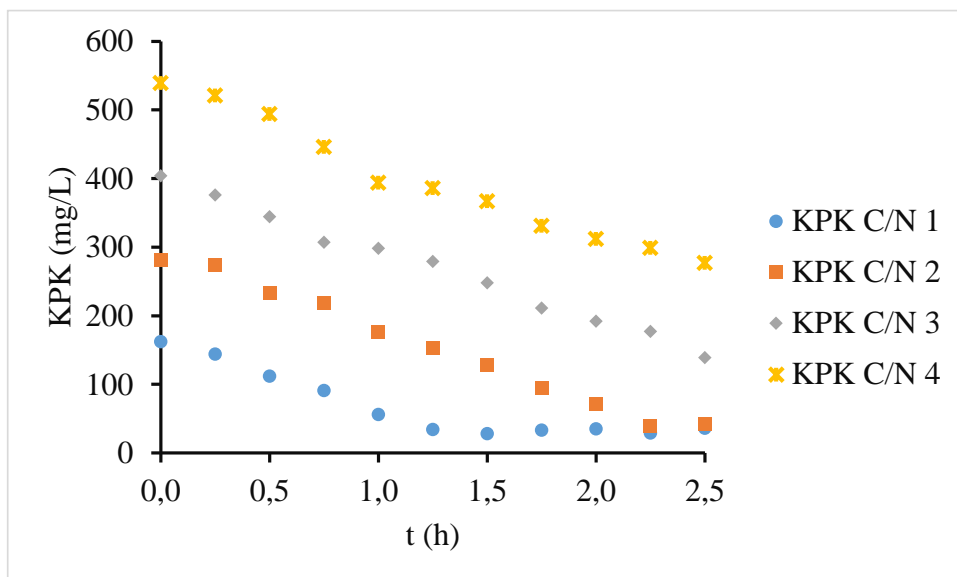
Za statističku analizu korišten je Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjene Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulsa, Sjedinjene Američke Države). Dobiveni podaci su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba provedena je ANOVA analizom varijance s određenim intervalom pouzdanosti  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

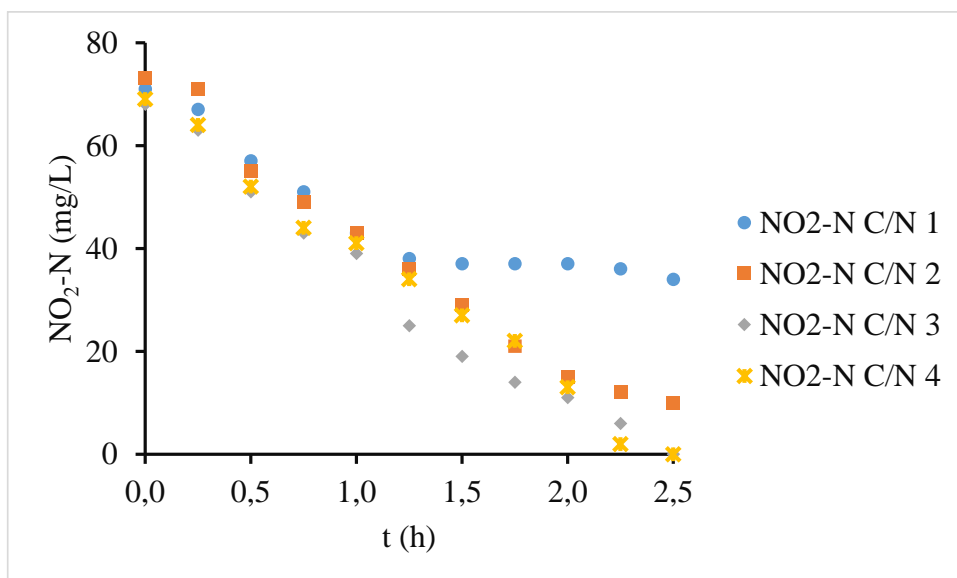
Denitrifikacija preko nitrita (denitritacija) ima prednosti u uklanjanju dušika iz otpadne vode u odnosu na uklanjanje dušika preko nitrata jer se ostvaruju uštede u potrebnoj količini organskih sastojaka za denitrifikaciju (nije potreban organski ugljik za redukciju nitrata do nitrita), količini otopljenog kisika (jer se amonijak tijekom nitrifikacije oksidira do nitrita a ne do nitrata), kao i manja proizvodnja mikrobne biomase (Glass i sur., 1997; Surmacz-Górska i sur., 1997; Turk i Mavinic, 1987). Ipak, uklanjanje dušika preko nitrita je izazovno jer je nitrit inhibitor brojnih skupina mikroorganizama prisutnih u aktivnom mulju (Lu i sur., 2014; Gerardi, 2002; Glass i sur., 1997; Anthonisen i sur., 1976). Pokazano je da je nedisocirana nitritna kiselina ( $\text{HNO}_2$ ), ili slobodna nitritna kiselina (FNA), uzrok nitritne inhibicije, a prag inhibicije je u ovisnosti o mikrobnjoj kulturi, vrijednosti pH i dostupnosti ugljika (Glass i sur., 1997). Koncentracija slobodne nitritne kiseline je u ovisnosti o vrijednosti pH, koncentraciji nitrita i temperaturi. Što je vrijednost pH niža to se ravnoteža između  $\text{NO}_2^-$  i  $\text{HNO}_2$  pomiče prema  $\text{HNO}_2$ , i obrnuto (Gerardi, 2002; Anthonisen i sur., 1976).

Cilj ovog rada bio je istražiti denitritaciju visoke početne koncentracije nitrita,  $70 \pm 5$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , s acetatom kao izvorom ugljika pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4. Sav nitrit je dodan na početku pokusa u jednom pulsu. Pokusi su vođeni u anoksičnim uvjetima pri  $3 \pm 0,2$  g MLSS/L. Kontakt mikroorganizama aktivnog mulja i otpadne vode je osiguran miješanjem na magnetskoj miješalici.

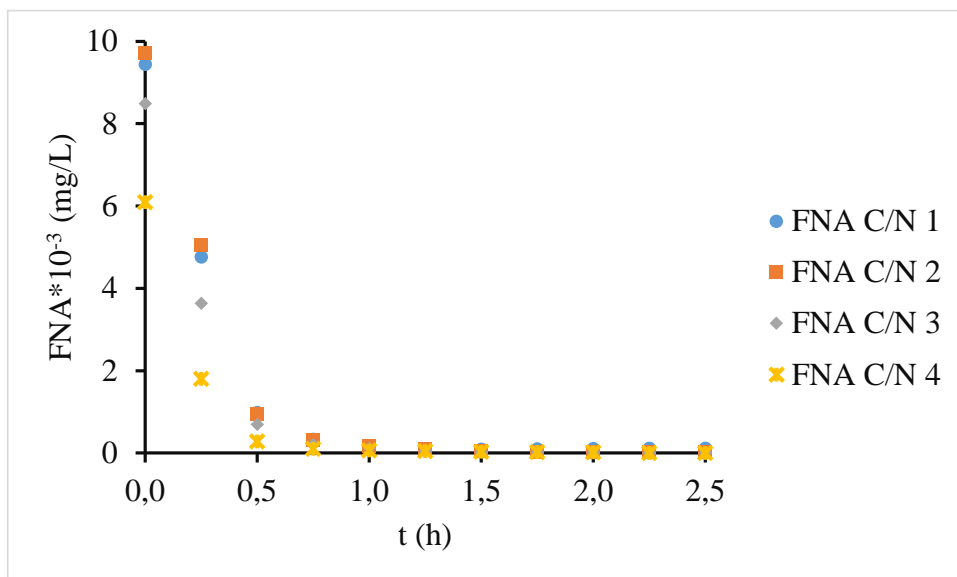
Rezultati su prikazani na slikama 9-16: promjene vrijednosti KPK su prikazane na slici 9, dinamika kretanja nitrita na slici 10 i pripadajuće vrijednosti FNA na slici 11, koncentracije nitrata tijekom pokusa na slici 12, kretanja vrijednosti pH, temperature i koncentracije otopljenog kisika na slikama 13, 14 i 15. Brzina uklanjanja nitrita i KPK, kao i omjer utrošene količine KPK za redukciju nitrita su prikazani na slici 16.



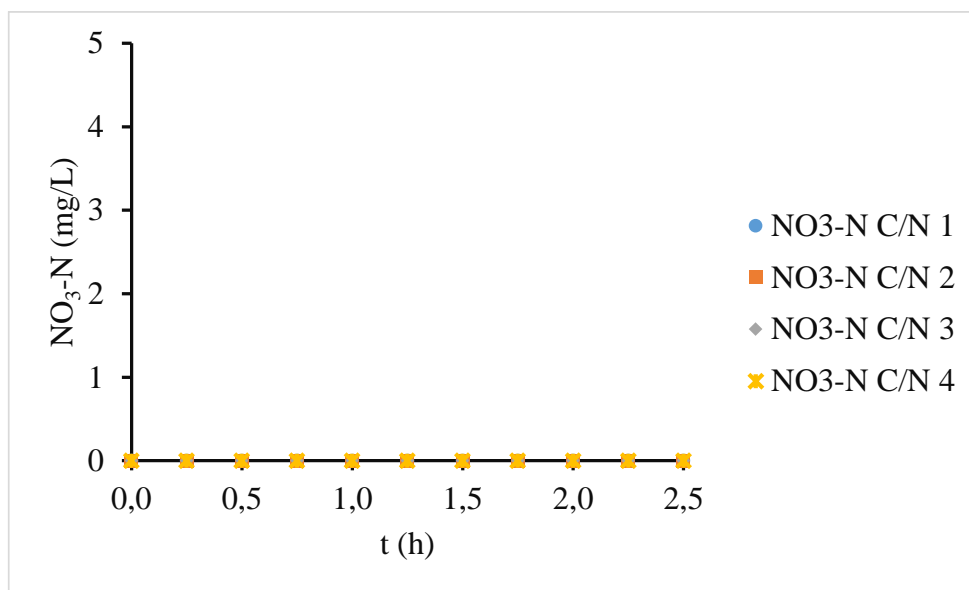
**Slika 9.** Promjene vrijednosti KPK (Kemijska potrošnja kisika) u pokusima denitracije pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4



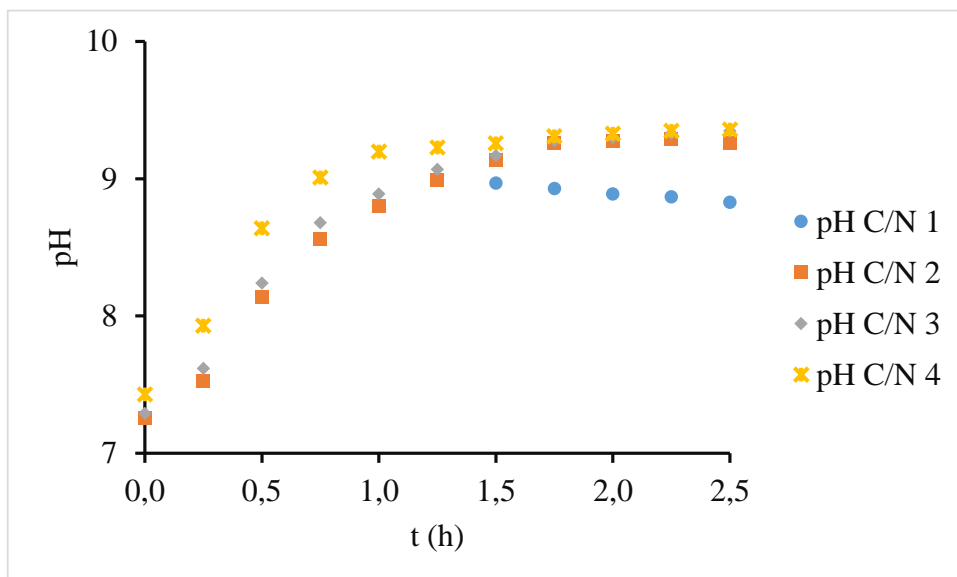
**Slika 10.** Promjene vrijednosti NO<sub>2</sub>-N u pokusima denitracije pri omjerima C/N 1, 2, 3 i



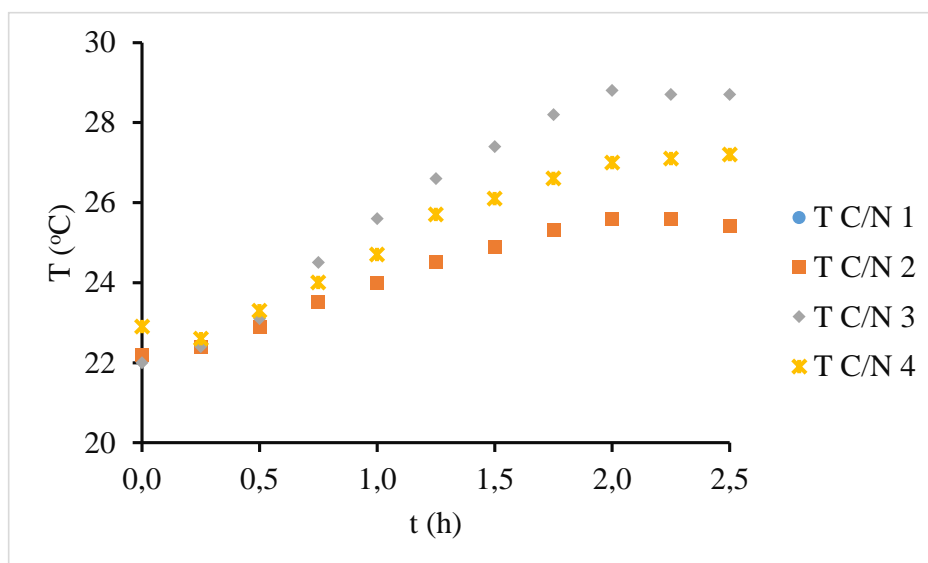
**Slika 11.** Promjene vrijednosti FNA (engl. *Free nitrous acid*, FNA, hrv. Slobodna nitritna kiselina) u pokusima denitracije pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4



**Slika 12.** Promjene vrijednosti NO<sub>3</sub>-N u pokusima denitracije pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4

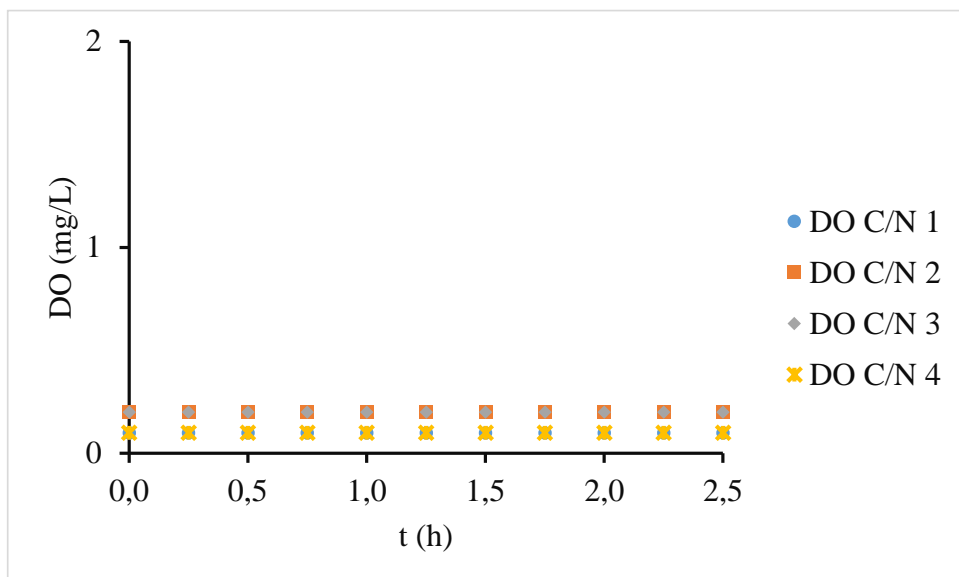


**Slika 13.** Promjene vrijednosti pH u pokusima denitritacije pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4

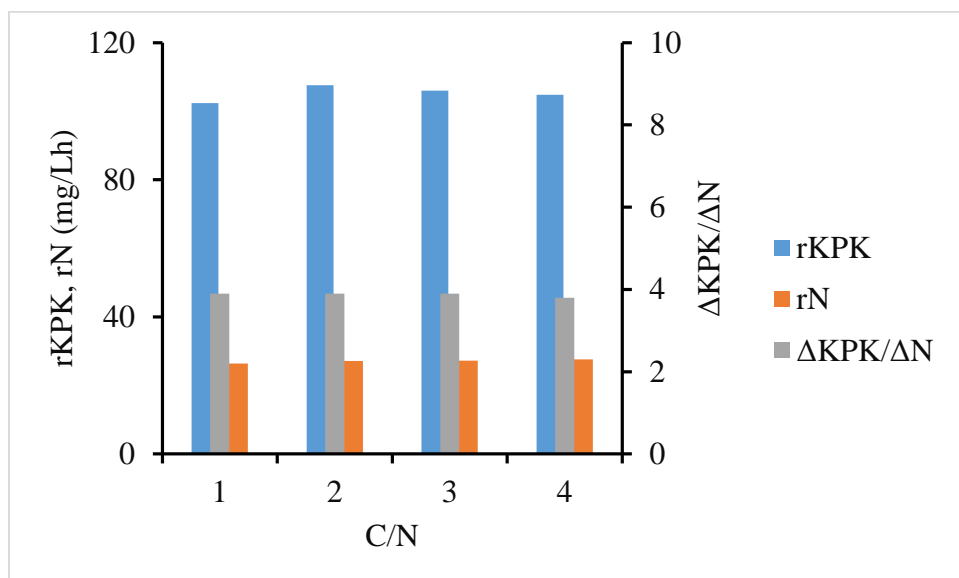


**Slika 14.** Promjene vrijednosti temperature u pokusima denitritacije pri omjerima C/N 1, 2,

3 i 4



**Slika 15.** Promjene vrijednosti DO (engl. *Dissolved Oxygen*, *DO*, hrv. Otopljeni kisik) u pokusima denitracije pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4



**Slika 16.** Brzina uklanjanja KPK i N, te omjer  $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{N}$ , pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4

Za odvijanje denitracije potrebno je osigurati dovoljnu količinu donora elektrona (organskih sastojaka) denitrifikantima za redukciju nitrita. U ovim pokusima su istraženi omjeri C/N 1, 2, 3 i 4 kojima su odgovarale početne koncentracije KPK 162 mg KPK/L, 281 mg KPK/L, 404 mg KPK/L i 539 mg KPK/L (slika 9).

Pri omjeru C/N 1 nije bilo dovoljno organskih sastojaka za potpunu denitraciju. Uklonjeno je 79 % KPK pri brzini 102,4 mg KPK/Lh (slike 9 i 16). Povećanje omjera na C/N 2 također nije osiguralo dovoljnu količinu organskih sastojaka za potpunu denitraciju. Pri omjeru C/N 2 uklonjeno je 86 % KPK pri brzini 107,6 mg KPK/Lh. Omjer C/N 3 je rezultirao potpunom denitracijom, međutim, preostalo je 139 mg KPK/L u obrađenoj vodi, što je više od dozvoljenih 125 mg KPK/L za ispust u površinske vode (Pravilnik, 2020). Pri omjeru C/N 3 uklonjeno je 65,6 % KPK pri brzini 106 mg KPK/Lh. Vjerojatno je minimalan potreban omjer C/N za potpunu denitraciju  $70 \pm 5$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  između 2 i 3. Pri omjeru C/N 4 također je postignuta potpuna denitracija međutim i u ovom slučaju je preostalo organskih sastojaka u obrađenoj vodi, 277 mg KPK/L. Pri omjeru C/N 4 uklonjeno je 48,6 % KPK pri brzini 104,8 mg KPK/Lh. Prilikom denitrifikacije potrebno je dodati minimalnu potrebnu količinu organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju i da po završetku procesa u obrađenoj vodi ne preostane organskih sastojaka. Nedovoljna količina organskih sastojaka u procesu denitrifikacije rezultira uklanjanjem organskih sastojaka i preostalom količinom nitrita (nitrata). Suprotno, prevelika količina organskih sastojaka rezultira potpunom denitrifikacijom i preostalim organskim sastojcima. U oba slučaju su potrebni dodatni procesi za uklanjanje preostalih nitrata/nitrita, odnosno organskih sastojaka kako bi obrađena voda svojom kvalitetom zadovoljila zakonske propise za ispust u površinske vode.

Izračunata teoretska optimalna vrijednost C/N za denitrifikaciju s acetatom kao izvorom ugljika i nitratom kao akceptorom elektrona iznosi 3,74 (Matějů i sur., 1992). Lee i sur. (2018) su postigli potpunu denitrifikaciju pri omjerima C/N 5, 14 i 12,85 također s acetatom kao izvorom ugljika. Taj viši potrebni omjer C/N su objasnili kompeticijom s drugim heterotrofima za organske sastojke (Lee i sur., 2018).

Izvori ugljika se mogu podijeliti na tekuće izvore ugljika (komercijalni izvori ugljika i tekući nusproizvodi fermentacije otpada bogatog na ugljiku) i izvore ugljika u čvrstoj fazi (biorazgradivi organski polimeri i biomasa bogata na ugljiku u čvrstoj fazi). U komercijalne izvore ugljika se ubrajaju, između ostalih, acetat, etanol, metanol, octena kiselina. Korištenje tekućeg izvora ugljika ima prednost jer tekuća faza omogućava kratak lag period i odvijanje brze

denitrifikacije. Tekući nusproizvodi fermentacije otpada bogatog na ugljiku se uglavnom sastoje od organskih spojeva niske molekulske mase (alkoholi, organske kiseline, anorganske soli), šećera (glukoza, saharoza, fruktoza) i fermentacijske otopine (fermentacijska tekućina od taloženja mulja s uređaja za biološku obradu otpadnih voda, otpatci hrane, reciklirajuća otpadna voda od otpadaka hrane, čvrsti otpad mariklture, otpadna voda od soje i tako dalje) (Wang i sur., 2021).

Od vanjskih dodanih izvora ugljika najčešći je metanol (Cherchi i sur., 2009). Kada se denitrifikacija provodi s metanolom kao izvorom ugljika, potrebna je skupina mikroorganizama koja se naziva metilotrofne bakterije (Mokhayeri i sur., 2006). U denitrificirajućim reaktorima s metanolom kao izvorom ugljika identificirane su populacije povezane s *Methylophilus*, *Paracoccus*, *Methyloversatilis* i *Hyphomicrobium* spp., koje pripadaju  $\beta$ -Proteobacteria (Lu i sur., 2014). Prednost korištenja metanola kao izvora ugljika za denitrifikaciju je njegova dostupnost, povoljna cijena, nisko iskorištenje mulja, nizak potencijal emisije hlapivog organskog ugljika te nedostatak dušika i fosfora. Nedostatak metanola je visoka operativna cijena i cijena održavanja u velikim uređajima za biološku obradu otpadnih voda (Swinarski i sur., 2009). Drugi nedostatak metanola je njegova potencijalna toksičnost (Mohseni-Bandpi i sur., 2013). Stehiometrijski, tijekom asimilacije metanola dolazi do značajnog gubitka energije pa metilotrofni denitrifikanti imaju niže iskorištenje biomase u odnosu na denitrifikante na drugim izvorima ugljika (McCarty, 2007). S acetatom kao izvorom ugljika se postiže viša brzina denitrifikacije nego s metanolom (Cherchi i sur., 2009).

Denitrifikanti koji koriste acetat kao izvor ugljika su usko povezani s *Comamonas*, *Acidovorax* i *Thauera* spp. unutar obitelji *Comamonadaceae* i *Rhodocyclaceae* (Osaka i sur., 2006; Ginige i sur., 2005). Populacija koja može koristiti acetat kao izvor ugljika za denitrifikaciju je pronađena u originalnom denitrificirajućem mulju koji nije bio obogaćen niti s jednim izvorom ugljika (Lu i sur., 2014).

Fermentacijski produkti, otpadne vode industrije i agrikulture su također mogući izvori ugljika. Njihovom fermentacijom nastaju hlapive masne kiseline, mliječna kiselina i alkoholi, te stoga predstavljaju ekonomsku i ekološku prednost za vanjske dodane izvore ugljika, jer se njihovom upotrebom u isto vrijeme smanjuje količina otpada i obrađuje otpadna voda bogata na nitratu (Wang i sur., 2021).

Iako oksidacijsko stanje izvora ugljika ima niski utjecaj na sintezu denitrificirajućih reduktaza, razina ekspresije ugljikovih oksidaza značajno varira u ovisnosti o vrsti ugljika (Lu i



sur., 2011). Iz tog razloga je razlika u kinetici denitrifikacije posljedica neravnoteže između cjelokupne opskrbe elektronima i brzini potrošnje. Akumulacija intermedijata denitrifikacije (nitrita, NO i N<sub>2</sub>O) se događa zbog natjecanja za dostupne elektrone između četiri dušikove reduktaze (NAR, NIR, NOR i N<sub>2</sub>OR) (Pan i sur., 2012). Kako je brzina obrtaja elektrona od NIR niža od NAR, nitrat se brže reducira od nitrita pa dolazi do akumulacije nitrita u slučajevima nekih izvora ugljika, poput otpada biodizela, ili ukoliko nema dovoljno donora elektrona, pa je još izraženija kompeticija za elektrone između NAR i NIR (Uprety, 2013; Oh i Silverstein, 1999b).

Izvor ugljika za denitrifikaciju ima potencijalno snažniji učinak na strukturu denitrificirajuće zajednice od drugih čimbenika poput primjerice omjera C/N i akceptora elektrona zato što organski ugljik i energetske metabolizam s različitim putevima čine osnovu populacije heterotrofa (Lu i sur., 2014).

Koncentracija nitrata u svim pokusima pri svim istraživanim omjerima C/N je iznosila 0 mg NO<sub>3</sub>-N/L (slika 12) jer su pokusi vođeni s nitritom kao akceptorom elektrona (slika 10).

Omjeri C/N 1 i 2 su rezultirali nepotpunom denitritacijom, uklonjeno je 46,5 % i 83,6 % nitrita (slike 10 i 16). Ipak, po iscrpljenju acetata u 1,25. satu odnosno u 2,25. satu pri omjerima C/N 1 i 2, do kraja pokusa u 2,5. satu se nastavilo uklanjanje nitrita, ali po puno nižoj brzini. Denitrifikanti su vjerojatno koristili unutarstanične rezerve ugljika za denitritaciju. Denitritacija s unutarstaničnim zalihama ugljika je znatno sporija od denitritacije s vanjskim raspoloživim izvorom ugljika. Tako je ostvarena brzina redukcije nitrita pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4 bila u uskom rasponu vrijednosti i iznosi 26,4 – 27,6 mg NO<sub>2</sub>-N/Lh. Brzina uklanjanja nitrita pri omjerima C/N 1 i 2 s unutarstaničnim zalihama ugljika je iznosila 3,2 mg NO<sub>2</sub>-N/Lh i 8 mg NO<sub>2</sub>-N/Lh. Pri omjerima C/N 3 i 4 postignuta je potpuna denitritacija (slike 10 i 16).

Među dušikovim oksidima nitrat je preferirani akceptor elektrona pa nitrat inducira sve reduktaze. Nitrit može inhibirati mikroorganizme prisutne u aktivnom mulju (Lu i sur., 2014). Istraživanja su pokazala da je slobodna nitritna kiselina pravi uzrok inhibicije nitritom, a inhibicijski prag je u ovisnosti o upotrebljenoj mikrobnjoj kulturi, vrijednosti pH u miješanoj tekućini i dostupnosti organskog donora elektrona (Glass i sur., 1997). Koncentracija slobodne nitritne kiseline ovisi o vrijednosti pH, koncentraciji nitrita i temperaturi. Tako niža pH vrijednost pomiče ravnotežu između NO<sub>2</sub><sup>-</sup> i HNO<sub>2</sub> prema HNO<sub>2</sub>, i obrnuto (Gerardi, 2002; Anthonisen i sur., 1976).

Dušikov monoksid inhibira skoro sve dušikove reduktaze (Zumft, 1993). Na nakupljanje nitrita ne utječe početna koncentracija nitrata, ali utječe na nakupljanje  $N_2O$ . Tako su Lee i sur. (2018) objavili da učinkovitost uklanjanja nitrata opada s rastućom početnom koncentracijom nitrata. Postigli su potpunu denitrifikaciju s početnom koncentracijom nitrata 75,8 mg  $NO_3-N/L$  i 151,6 mg  $NO_3-N/L$ , međutim, s početnih 303,2 mg  $NO_3-N/L$ , 606,4 mg  $NO_3-N/L$  i 1516 mg  $NO_3-N/L$  su postigli učinkovitost uklanjanja nitrata  $55,2 \pm 15,95 \%$ ,  $56,4 \pm 4,82 \%$  i  $34,2 \pm 8,55 \%$  ( $P < 0,05$ ). Pri svim ispitivanim početnim koncentracijama nitrata nisu zabilježili nakupljanje nitrita. Pri početnih 303,2 mg  $NO_3-N/L$  uklonjenih  $55,2 \pm 15,92 \%$  se konvertiralo u  $N_2O-N$  a ne u  $N_2-N$ . Pri početnih 606,4 mg  $NO_3-N/L$  proizvedeno je  $17,2 \pm 0,00 \%$   $N_2O-N$  i  $39,2 \pm 6,85 \%$   $N_2-N$ , a pri početnih 1516 mg  $NO_3-N/L$  proizvedeno je  $10,8 \pm 1,43 \%$   $N_2O-N$  i  $23,4 \pm 9,02 \%$   $N_2-N$  (Lee i sur., 2018).

U istraživanju učinka temperature na akumulaciju nitrita, temperatura od 15 °C nije pridonijela akumulaciji nitrita, sav nitrat se denitrificirao do dušika, a u pokusima denitrifikacije pri temperaturama u rasponu 20 – 35 °C zabilježeno je nakupljanje nitrita, ali bez značajne razlike među istraživanim temperaturama ( $P < 0,05$ ) (Lee i sur., 2018).

Slobodna nitritna kiselina je pri svim istraživanim omjerima bila najviša na početku pokusa (slika 11) i iznosila je 6,1-9,7  $\mu g$  FNA/L jer je tad bila i najviša koncentracija nitrita. Već u 0,5. satu iznosila je  $< 1 \mu g$  FNA/L. Kako je padala koncentracija nitrita, tako je i padala koncentracija FNA, i time se smanjivao njezin inhibitorski učinak. Padu koncentracije FNA je dodatno pridonio i rast vrijednosti pH, koji je uobičajen za proces denitrifikacije (slika 13). Kako je brzina denitrifikacije bila ujednačena tijekom cijelog trajanja pokusa (slika 10), onda koncentracija FNA na početku pokusa nije imala inhibitorski učinak na proces denitrifikacije (slika 11).

Tijekom pokusa denitrifikacije promjene vrijednosti pH (slika 13) su bile karakteristične za proces denitrifikacije. Svi pokusi su započeti s vrijednosti pH  $7,3 \pm 0,1$ . S potrošnjom KPK (slika 9) rasla je vrijednost pH (slika 13), a nakon iscrpljenja organskih sastojaka (po prestanku njihove potrošnje), vrijednost pH je ili stagnirala ili blago padala. Tako su iscrpljeni organski sastojci, ili su ih denitrifikanti prestali trošiti, pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4 u 1,25. satu, 2,25. satu, 2,5. satu i 2,5. satu. Upravo u tom trenutku su zabilježene najviše vrijednosti pH koje su iznosile 8,99, 9,29, 9,35 i 9,36 pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4.

Za učinkovito odvijanje denitrifikacije potrebno je održavati vrijednost pH u miješanoj tekućini u rasponu 6,5 – 8,5 (Lu i sur., 2014) odnosno 7 – 9 (Grady i sur., 1999). Kada se

vrijednost pH nalazi u suboptimalnom području često dolazi do nakupljanja intermedijata denitrifikacije – nitrita i dušikovih oksida. Sa smanjenjem vrijednosti pH dolazi i do smanjenja brzine denitrifikacije (Glass i Silverstein, 1998). Lee i sur. (2018) su istraživali učinak vrijednosti pH 5, 6, 7, 8 i 9 na denitrifikaciju i pokazali da viša pH vrijednost djeluje povoljno na denitrifikaciju. Tako su pri vrijednostima pH postigli učinkovitost uklanjanja nitrata: pH 9 ( $68,7 \pm 0,35$  %) > pH 8 ( $65,2 \pm 2,34$  %) > pH 7 ( $62,4 \pm 5,90$  %) > pH 6 ( $50,0 \pm 5,71$  %) > pH 5 ( $47,5 \pm 4,95$  %). Većina uklonjenog nitrata se reducirala do plinovitog dušika. Također, brzina uklanjanja nitrata raste s porastom vrijednosti pH (Lee i sur., 2018).

Pokusi denitrifikacije pri svim istraživanim omjerima C/N su započeli pri temperaturi  $22,5 \pm 0,5$  °C (slika 14). Tijekom pokusa rasla je temperatura, i na kraju pokusa je zabilježena temperatura  $25,4 - 28,7$  °C. Izmjerena temperatura je bila povoljna za aktivnosti denitrifikanta.

Većina denitrifikanta je osjetljivija na varijacije u temperaturi nego na varijacije vrijednosti pH (Lu i sur., 2014). Smanjenje temperature dovodi do smanjenja brzine denitrifikacije (Saleh-Lakha i sur., 2009). Lee i sur. (2018) su ispitivali učinak temperature, i to  $15$  °C,  $20$  °C,  $25$  °C,  $30$  °C i  $35$  °C na denitrifikaciju. Temperaturi raspon  $20 - 35$  °C je imao sličan učinak na denitrifikaciju, a pri  $15$  °C je učinkovitost uklanjanja nitrata bila niža nego pri višim ispitivanim temperaturama. Učinkovitost uklanjanja nitrata je bila kako slijedi:  $25$  °C ( $75,8 \pm 2,40$  %) >  $30$  °C ( $75,7 \pm 6,02$  %) >  $35$  °C ( $73,4 \pm 5,73$  %) >  $20$  °C ( $68,5 \pm 9,80$  %) >  $15$  °C ( $53,9 \pm 8,08$  %) (Lee i sur., 2018).

Pokusi u ovom radu su vođeni pri anoksičnim uvjetima, pri koncentraciji otopljenog kisika  $0,1-0,2$  mg DO/L (slika 15).

Iako je za učinkovito odvijanje biološke denitrifikacije potrebno osigurati anoksične uvjete, a to znači skoro potpuni nedostatak otopljenog kisika, dakle raspon  $0,2 - 0,5$  mg DO/L, postoje i aerobni denitrifikanti koji su izolirani iz raznih prirodnih i inženjerskih ekosustava, koji mogu tolerirati koncentraciju otopljenog kisika oko  $5 - 6$  mg DO/L (Patureau i sur., 2000). Budući da se većina sustava za biološko uklanjanje nutrijenata temelji na reciklaciji mikrobne biomase između aerobnih i anoksičnih zona, ne postoji specifična ekološka niša za aerobne denitrifikante u sustavima za obradu otpadnih voda (Lu i sur., 2014). Kada su denitrifikanti podvrgnuti uvjetima u kojima vladaju povišene koncentracije otopljenog kisika dolazi do inhibicije denitrifikacije zato što je kisik povoljniji akceptor elektrona za denitrifikante za proizvodnju energije, zbog čega dolazi do narušavanja denitrificirajuće aktivnosti i akumulacije intermedijata dušikovih oksida. U praksi se pokazala koncentracija otopljenog kisika  $0,1$  mg DO/L kao prag

prilikom denitrifikacije otpadne vode (Oh i Silverstein 1999a). Otopljeni kisik supresira ekspresiju i aktivnost skoro svih dušikovih reduktaza (Zumft, 1997; Körner i Zumft, 1989). Inhibitorski učinak kisika na respiraciju nitrata je trenutačan i reverzibilan pri čemu se maksimalna inhibicija postiže pri 0,2 % zasićenja kisika (Hernandez i Rowe, 1988). S druge strane, nitrit reduktaza je manje osjetljiva na koncentraciju otopljenog kisika i njezin prag inhibicije se postiže pri 2,5 mg DO/L (Körner i Zumft, 1989). Dušikov monoksid reduktaza ima oko 10 puta veću aktivnost od nitrit reduktaze pa dolazi do vrlo niske akumulacije NO, koji je toksičan (Otte i sur., 1996). Kako je didušikov oksid reduktaza najosjetljivija dušikova reduktaza na kisik uključena u proces denitrifikacije, dolazi do akumulacije N<sub>2</sub>O pri aerobnim uvjetima (Lu i Chandran, 2010).

Bez obzira na odabrani omjer C/N, pri svim istraženim omjerima C/N 1, 2, 3 i 4 izračunati omjer utrošenog KPK za redukciju nitrita je bio u uskom rasponu vrijednosti i iznosio je 3,8-3,9 (slika 16).

## 5. ZAKLJUČCI

1. Omjeri C/N 1 i 2 rezultirali su nepotpunom denitracijom zbog limitacije organskim sastojcima. Uklonjeno je 46,5 % nitrita pri omjeru C/N 1 i 83,6 % nitrita pri omjeru C/N 2.
2. Omjeri C/N 3 i 4 omogućili su postizanje potpune denitracije. No, preostale koncentracije KPK više su od zakonom propisanih vrijednosti za ispust u površinske vode. Pri omjeru C/N 3 uklonjeno je 65,6 % KPK i 48,6 % KPK pri omjeru C/N 4.
3. Brzina uklanjanja nitrita pri omjerima C/N 1 i 2 s unutarstaničnim zalihama ugljika je iznosila 3,2 mg NO<sub>2</sub>-N/Lh i 8 mg NO<sub>2</sub>-N/Lh.
4. Brzine redukcije nitrita pri omjerima C/N 1, 2, 3 i 4 kretale su se u rasponu vrijednosti 26,4 – 27,6 mg NO<sub>2</sub>-N/Lh.
5. Izračunati omjer utrošenog KPK za redukciju nitrita pri svim istraženim omjerima C/N 1, 2, 3 i 4 bio je u uskom rasponu vrijednosti 3,8-3,9.

## 6. LITERATURA

Æsøy A, Ødegaard H, Bach K, Pujol R, Hamon M (1998) Denitrification in a packed bed biofilm reactor (BIOFOR)—Experiments with different carbon sources. *Water Res* **32**, 1463-1470. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00358-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00358-8)

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

Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam 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.

Arredondo MR, Kuntke P, Jeremiase AW, Sleutels THJA, Buisman CJN, Ter Heijne A (2015) Bioelectrochemical systems for nitrogen removal and recovery from wastewater. *Environ Sci Water Res Technol* **1**, 22-33. <https://doi.org/10.1039/C4EW00066H>

Batchelor B (1982) Kinetic analysis of alternative configurations for single-sludge nitrification/denitrification. *J Water Pollut Control Fed* **54**, 1493-1504.

Bernat K, Wojnowska-Baryła I (2007) Carbon source in aerobic denitrification. *Biochem Eng J* **36**, 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.02.007>

Błaszczuk M, Przytocka-Jusiak M, Kruszewska U, Mycielski R (1981) Denitrification of high concentrations of nitrites and nitrates in synthetic medium with different sources of organic carbon. I. Acetic acid. *Acta Microbiol Pol* **30**, 49-58.

Boaventura RAR, Rodrigues AE (1997) Denitrification kinetics in a rotating disk biofilm reactor. *Chem Eng J* **65**, 227–235. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(97\)00019-3](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(97)00019-3)

Braker G, Zhou J, Wu L, Devol AH, Tiedje JM (2000) Nitrite reductase genes (nirK and nirS) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2096-2104. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2096-2104.2000>

Cao S, Wang L, Yan W, Zhou Y (2020) Primary sludge as solid carbon source for biological denitrification: system optimization at micro-level. *Environ Res* **191**, 110160. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110160>

Cao X, Qian D, Meng X (2013) Effects of pH on nitrite accumulation during wastewater denitrification. *Environ Technol* **34**, 45-51. <https://doi.org/10.1080/09593330.2012.679700>

Carrera J, Vicent T, Lafuente J (2004) Effect of influent COD/N ratio on biological nitrogen removal (BNR) from high-strength ammonium industrial wastewater. *Process Biochem* **39**, 2035-2041. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.005>

Chakravarthy SS, Pande S, Kapoor A, Nerurkar AS (2011) Comparison of denitrification between *Paracoccus* sp. and *Diaphorobacter* sp. *Appl Biochem Biotechnol* **165**, 260–269. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9248-5>

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

Cherchi C, Onnis-Hayden A, El-Shawabkeh I, Gu AZ (2009) Implication of using different carbon sources for denitrification in wastewater treatments. *Water Environ Res* **81**, 788–799. <https://doi.org/10.2175/106143009x12465435982610>

Chiu YC, Chung MS (2003) Determination of optimal COD/nitrate ratio for biological denitrification. *Int Biodeterior Biodegrad* **51**, 43-49. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00074-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00074-4)

Cua LS, Stein LY (2011) Effects of nitrite on ammonia-oxidizing activity and gene regulation in three ammonia-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **319**, 169-175. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02277.x>

De Filippis P, Di Palma L, Scarsella M, Verdone N (2013) Biological denitrification of high-nitrate wastewaters: a comparison between three electron donors. *Chem Eng Trans* **32**, 319-324. <https://doi.org/10.3303/CET1332054>

Fang H, Olson BH, Asvapathanagul P, Wang T, Tsai R, Rosso D (2019) Molecular biomarkers and influential factors of denitrification in a full-scale biological nitrogen removal plant. *Microorganisms* **8**, 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010011>

Fernández-Nava Y, Marañón E, Soons J, Castrillón L (2010) Denitrification of high nitrate concentration wastewater using alternative carbon sources. *J Hazard Mater* **173**, 682-688. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.140>

Gerardi MH (2002) *Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process*, 1. izd., John Wiley & Sons, Inc., New York. <https://doi.org/10.1002/0471216682>

Ginige MP, Keller J, Blackall LL (2005) Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent *in situ* hybridization microautoradiography. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8683–8691. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8683-8691.2005>

Glass C, Silverstein J (1998) Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Res* **32**, 831–839. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(97\)00260-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(97)00260-1)

Glass C, Silverstein J, Oh J (1997) Inhibition of denitrification in activated sludge by nitrite. *Wat Env Res* **69**, 1086–1093. <https://www.jstor.org/stable/25044966>

Grady CPL, Daigger GT, Lim HC (1999) *Biological Wastewater Treatment*, 2. izd., Marcel Dekker, Inc., New York.

Gumaelius L, Magnusson G, Pettersson B, Dalhammar G (2001) *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 999–1006. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-999>



Hernandez D, Rowe JJ (1988) Oxygen inhibition of nitrate uptake is a general regulatory mechanism in nitrate respiration. *J Biol Chem* **263**, 7937–7939. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68423-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68423-6)

Hu Y, Chen N, Liu T, Feng C, Ma L, Chen S, i sur. (2020) The mechanism of nitrate-Cr (VI) reduction mediated by microbial under different initial pHs. *J Hazard Mater* **393**, 122434. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122434>

Hwang C, Wu WM, Gentry TJ, Carley J, Carroll SL, Schadt C, i sur. (2006) Changes in bacterial community structure correlate with initial operating conditions of a field-scale denitrifying fluidized bed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 748–760. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0189-1>

IPCC (2000) Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Special Report on Emissions Scenarios. Cambridge University Press.

Kim DJ, Miyahara T, Noike T (1997) Effect of C/N ratio on the bioregeneration of biological activated carbon. *Water Sci Technol* **36**, 239-249. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00720-8](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00720-8)

Kornaros M, Zafiri C, Lyberatos G (1996) Kinetics of denitrification by *Pseudomonas denitrificans* under growth conditions limited by carbon and/or nitrate or nitrite. *Water Environ Res* **68**, 934-945. <https://doi.org/10.2175/106143096X127947>

Körner H, Zumft WG (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol* **55**, 1670–1676. <https://doi.org/10.1128/aem.55.7.1670-1676.1989>

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

Jie L (2006) Study on kinetics of degrading pyridine under anoxic conditions and process controlling factors (doktorski rad), Tongji University, Shanghai.

Lee YY, Choi H, Cho KS (2018) Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N<sub>2</sub>O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification, *J Environ Sci Health A* **54**, 16–29. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1503903>

Lemaire R, Webb RI, Yuan Z (2008) Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater. *ISME J* **2**, 528–541. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.12>

Lin YM, Tay JH, Liu Y, Hung YT (2009) Biological Nitrification and Denitrification Processes. U: Wang LK, Pereira NC, Hung YT (ured.) Biological Treatment Processes. Handbook of Environmental Engineering, Humana Press, New Jersey, str. 539–588.

Lu H, Chandran K (2010) Factors promoting emissions of nitrous oxide and nitric oxide from denitrifying sequencing batch reactors operated with methanol and ethanol as electron donors. *Biotechnol Bioeng* **106**, 390–398. <https://doi.org/10.1002/bit.22704>

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

Lu H, Nuruzzaman F, Ravindhar J, Chandran K (2011) Alcohol dehydrogenase expression as a biomarker of denitrification activity in activated sludge using methanol and glycerol as electron donors. *Environ Microbiol* **13**, 2930–2938. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02568.x>

Martineau C, Villeneuve C, Mauffrey F, Villemur R (2013) *Hyphomicrobium nitrativorans* sp. nov., isolated from the biofilm of a methanol-fed denitrification system treating seawater at the Montreal Biodome (Canada). *Int J Syst Evol Microbiol* **63**, 3777–3781. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048124-0>

Matějů V, Čížinská S, Krejčí J, Janoch T (1992) Biological Water Denitrification – A Review. *Enzyme Microb Technol* **14**, 170–183.

McCarty PL (2007) Thermodynamic electron equivalents model for bacterial yield prediction: Modifications and comparative evaluations. *Biotechnol Bioeng* **97**, 377–388. <https://doi.org/10.1002/bit.21250>

Mike SMJ (2008) The microbial nitrogen cycle. *Environ Microbiol* **10**, 2903-2909. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01786.x>

Mohseni-Bandpi A, Elliott DJ, Zazouli MA (2013) Biological nitrate removal processes from drinking water supply-a review. *J Environ Health Sci Eng* **11**, 1–46. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-11-35>

Mokhayeri Y, Nichols A, Murthy S, Riffat R, Dold P, Takacs I (2006) Examining the influence of substrates and temperature on maximum specific growth rate of denitrifiers. *Water Sci Technol* **54**, 155–162. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.854>

Oh J, Silverstein J (1999a) Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Wat Res* **33**, 1925–1937. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00365-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00365-0)

Oh J, Silverstein J (1999b) Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. *J Environ Eng* **125**, 234–242. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1999\)125:3\(234\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1999)125:3(234))

Osaka T, Yoshie S, Tsuneda S, Hirata A, Iwami N, Inamori Y (2006) Identification of acetate- or methanol-assimilating bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing. *Microb Ecol* **52**, 253–266. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9071-7>

Otte S, Grobbs NG, Robertson LA, Jetten MS, Kuenen JG (1996) Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2421–2426. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2421-2426.1996>

Pan Y, Liu Y, Peng L, Ngo HH, Guo W, Wei W, et al. (2019) Substrate diffusion within biofilms significantly influencing the electron competition during denitrification. *Environ Sci Technol* **53**, 261–269. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05476>

Pan Y, Ye L, Ni BJ, Yuan Z (2012) Effect of pH on N<sub>2</sub>O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers. *Water Res* **46**, 4832–4840. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.003>

Park JY, Yoo YJ (2009) Biological nitrate removal in industrial wastewater treatment: which electron donor we can choose. *Appl Microbiol Biotechnol* **82**, 415–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1799-1>

Patureau D, Zumstein E, Delgenes JP, Moletta R (2000) Aerobic denitrifiers isolated from diverse natural and managed ecosystems. *Microb Ecol* **39**, 145–152. <https://doi.org/10.1007/s002480000009>

Petri R (2000) Diversität nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee und Untersuchungen zur Phylogenie der respiratorischen Nitratreduktase, (doktorski rad), University Kiel, Kiel.

Pravilnik (2020) Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. Narodne Novine 26, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020\\_03\\_26\\_622.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_03_26_622.html) Pristupljeno 15. rujna 2023.

Rahimi S, Modin O, Mijakovic I (2020) Technologies for biological removal and recovery of nitrogen from wastewater. *Biotechnol Adv* **43**, 107570. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107570>

Rezvani F, Sarrafzadeh MH, Ebrahimi S, Oh HM (2019) Nitrate removal from drinking water with a focus on biological methods: a review. *Environ Sci Pollut Res* **26**, 1124–1141. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9185-0>

Ritter KS, Sibley P, Hall K, Keen P, Mattu G, Linton B (2002) Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. *J Toxicol Environ Health Part A*, **65**,1-142. <https://doi.org/10.1080/152873902753338572>

Ruiz G, Jeison D, Chamy R (2006) Development of denitrifying and methanogenic activities in USB reactors for the treatment of wastewater: Effect of COD/N ratio. *Process Biochem* **41**, 1338-1342. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.007>

Sabba F, Piciooreanu C, Nerenberg R (2017) Mechanisms of nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) formation and reduction in denitrifying biofilms. *Biotechnol Bioeng* **114**, 2753-2761. <https://doi.org/10.1002/bit.26399>

Sage M, Daufin G, Gésan-Guizieu G (2006) Denitrification potential and rates of complex carbon source from dairy effluents in activated sludge system. *Water Res* **40**, 2747–2755. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.005>

Saleh-Lakha S, Shannon KE, Henderson SL, Goyer C, Trevors JT, Zebarth BJ, i sur. (2009) Effect of pH and Temperature on Denitrification Gene Expression and Activity in *Pseudomonas mandelii*. *Appl Environ Microbiol* **2009**, 75, 3903–3911. <https://doi.org/10.1128/AEM.00080-09>

Shah DB, Coulman GA (1978) Kinetics of nitrification and denitrification reactions. *Biotechnol Bioeng* **20**, 43-72. <https://doi.org/10.1002/bit.260200105>

Shapleigh JP (2006) The denitrifying prokaryotes. U: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (ured.) The prokaryotes, 2. izd., Springer, New York, str. 769-792 [https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7\\_23](https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7_23)

Su JJ, Liu BY, Liu CY (2001) Comparison of aerobic denitrification under high oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system. *J Appl Microbiol* **90**, 457–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01265.x>

Sun F, Wu S, Liu J, Li B, Chen Y, Wu W (2012) Denitrification capacity of a landfilled refuse in response to the variations of COD/NO<sub>3</sub>--N in—he injected leachate. *Bioresour Technol* **103**, 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.032>

Surmacz-Górska J, Cichon A, Miksch K (1997) Nitrogen removal from wastewater with high ammonia nitrogen concentration via shorter nitrification and denitrification. *Water Sci Technol* **36**, 73–78. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00000-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00000-0)

Swinarski M, Makinia J, Czerwionka K, Chrzanowska M, Drewnowski J (2009) Comparison of the effects of conventional and alternative external carbon sources on enhancing the denitrification process. *Water Environ Res* **81**, 896–906. <https://doi.org/10.2175/106143009x407438>

Tate RL (2000) Soil microbiology, 2. izd., John Wiley & Sons, New York

Thomsen JK, Geest T, Cox RP (1994) Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 536-541. <https://doi.org/10.1128/aem.60.2.536-541.1994>

Throbäck IN (2006) Exploring denitrifying communities in the environment (doktorski rad), Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Turk O, Mavinic DS (1987) Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Water Res* **23**, 1383–1388. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(89\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(89)90077-8)

Uprety K (2013) Evaluation of Glycerol and Waste Alcohol as Supplemental Carbon Sources for Denitrification (doktorski rad), Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.

Wang H, Chen N, Feng C, Deng Y (2021) Insights into heterotrophic denitrification diversity in wastewater treatment systems: Progress and future prospects based on different carbon sources. *Sci Total Environ* **780**, 146521. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146521>

Wang X, Hu M, Xia Y, Wen X, Ding K (2012) Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in 14 wastewater treatment systems in China. *Appl Environ Microbiol* **78**, 7042-7047. <https://doi.org/10.1128/AEM.01617-12>

WHO (2016) Nitrate and nitrite in drinking-water: Background document for development of WHO. WHO-World Health Organization, <https://cdn.who.int/media/docs/default->

[source/wash-documents/wash-chemicals/nitrate-nitrite-background-jan17.pdf?sfvrsn=1c1e1502\\_4](source/wash-documents/wash-chemicals/nitrate-nitrite-background-jan17.pdf?sfvrsn=1c1e1502_4). Pristupljeno 3. studenoga 2023.

Wong CH, Barton GW, Barford JP (2003) The nitrogen cycle and its application in wastewater treatment. U: Mara D, Horan N (ured.) Handbook of water and wastewater microbiology, 1. izd., Academic press, An imprint of Elsevier, London, 427-439.

Xi H, Zhou X, Arslan M, Luo Z, Wei J, Wu Z, i sur. (2022) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification process: Promising but a long way to go in the wastewater treatment. *Sci Total Environ* **805**, 150212. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150212>

Xia S, Li J, Wang R, Li J, Zhang Z (2010) Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE and combining FISH with flow cytometry. *Biochem Bioeng J* **49**, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.01.013>

Zhang S, Su J, Zheng Z, Yang S (2020) Denitrification strategies of strain YSF15 in response to carbon scarcity: Based on organic nitrogen, soluble microbial products and extracellular polymeric substances. *Bioresour Technol* **314**, 123733. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123733>

Zhang T, Shao MF, Ye L (2012) 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *ISME J* **6**, 1137-1147. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.188>

Zhang X, Zhang J (2018) Effect of dissolved oxygen on biological denitrification using biodegradable plastic as the carbon source. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* **121**, 032015. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/121/3/032015>

Zhao S, Su X, Wang Y, Yang X, Bi M, He Q, i sur. (2020) Copper oxide nanoparticles inhibited denitrifying enzymes and electron transport system activities to influence soil denitrification and N<sub>2</sub>O emission. *Chemosphere* **245**, 125394. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125394>

Zhou M, Fu W, Gu H, Lei L (2007) Nitrate removal from groundwater by a novel three-dimensional electrode biofilm reactor. *Electrochim Acta* **52**, 6052-6059. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2007.03.064>

Zhou YAN, Pijuan M, Zeng RJ, Yuan Z (2008) Free nitrous acid inhibition on nitrous oxide reduction by a denitrifying-enhanced biological phosphorus removal sludge. *Environ Sci Technol* **42**, 8260-8265. <https://doi.org/10.1021/es800650j>

Zumft WG (1993) The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch Microbiol* **160**, 253–264. <https://doi.org/10.1007/BF00292074>

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



## IZJAVA O IZVORNOSTI

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



---

Vlastoručni potpis