



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Andrijana Brozinčević

**UTJECAJ PROCESNIH UVJETA NA
UČINKOVITOST DENITRIFIKACIJE MODELNE
OTPADNE VODE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Andrijana Brozinčević

**THE EFFECT OF PROCESS CONDITIONS ON
DENITRIFICATION EFFICIENCY OF MODEL
WASTEWATER**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2005



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Andrijana Brozinčević

**UTJECAJ PROCESNIH UVJETA NA
UČINKOVITOST DENITRIFIKACIJE MODELNE
OTPADNE VODE**

DOKTORSKI RAD

Mentor(i): prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević
prof. dr. sc. Bruno Zelić

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Andrijana Brozinčević

**THE EFFECT OF PROCESS CONDITIONS ON
DENITRIFICATION EFFICIENCY OF MODEL
WASTEWATER**

DOCTORAL THESIS

Supervisor(s): PhD Tibela Landeka Dragičević, Tenure Professor
PhD Bruno Zelić, Tenure Professor

Zagreb, 2025

Bibliografska stranica

- ❖ Bibliografski podaci: (ovi podaci navode se na donjoj polovici stranice jedan ispod drugoga)
- ❖ UDK: (univerzalna decimalna klasifikacija – saznaje se u BIC-u)
- ❖ Znanstveno područje: Tehničke znanosti
- ❖ Znanstveno polje: Kemijsko inženjerstvo
- ❖ Znanstvena grana: Zaštita okoliša u kemijskom inženjerstvu
- ❖ Institucija: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije i Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda
- ❖ Voditelj rada: prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet (1. mentor) i prof. dr. sc. Bruno Zelić, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2. mentor)
- ❖ Broj stranica: 160
- ❖ Broj slika: 47
- ❖ Broj tablica: 24
- ❖ Broj priloga:
- ❖ Broj literaturnih referenci: 314
- ❖ Datum obrane: (može se naknadno unijeti rukom)
- ❖ Sastav povjerenstva za obranu:
 1. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (predsjednik povjerenstva)
 2. prof. dr. sc. Šime Ukić, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
 3. doc. dr. sc. Dijana Grgas, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet

- ❖ Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb;

Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Marulićev trg 20.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 30. siječnja 2017. godine, te odobrena na 9. sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu održanoj 14. ožujka 2017. godine.

MENTORI DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević, redoviti je profesor u trajnom zvanju na Sveučilištu u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

Prof. dr. sc. Bruno Zelić, redoviti je profesor u trajnom zvanju na Sveučilištu u Zagrebu, Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

ZAHVALA

SAŽETAK

Učinkovitost i brzina denitrifikacije kao i razumijevanje mikrobnih i metaboličkih mehanizama denitrifikacije ovisi o strukturi mikrobne zajednice, identitetu i brojnosti funkcionalnih mikroorganizama i procesnim čimbenicima.

Uz vanjski izvor ugljika za denitrifikaciju $\text{NO}_3\text{-N}$ potrebno je osigurati omjer C/N 3,8 a za denitrifikaciju $\text{NO}_2\text{-N}$ omjer C/N 2,4 iz natrijeva acetata kao izvora ugljika, za početnih 30 mg $\text{NO}_x\text{-N}$ i 2 g MLSS/L. Endogena denitrifikacija je znatno sporija od denitrifikacije uz vanjski izvor ugljika. Brzina ednogene denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ je 2,8 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$. Brzina autotrofne nitrifikacije povećava se s povećanjem početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$, količine mikrobne biomase, i pH. Brzina nitrifikacije 500 mg $\text{NH}_4\text{/L}$ je $32,9 \pm 0,9$ mg N/Lh pri pH $7,2 \pm 0,2$ s $4,2 \pm 0,2$ g MLSS/L, odnosno $40,7 \pm 0,4$ mg N/Lh pri pH $8,0 \pm 0,1$ s $3,9 \pm 0,3$ g MLSS/L. Brzina parcijalne nitrifikacije povećava se s povećanjem početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ i količine mikrobne biomase. S 3,0 g MLSS/L postignute su brzine parcijalne nitrifikacije 19,6-34,3 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ za početnih 30-100 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$. Učinkovitost parcijalne nitrifikacije iznosila je oko 68%. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija sporija je od autotrofne nitrifikacije a rezultirala je gubitkom N od 72,2-81,8 %. U procesu istovremene denitrifikacije i uklanjanja P pri anoksičnim uvjetima uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptor elektrona, 80 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ nije imalo inhibicijski učinak na proces. Minimalni omjer C/N za određeni N/P pri kojem se postiže 100 % uklanjanje $\text{NO}_2\text{-N}$, 100 % uklanjanje organskih sastojaka i unos $\text{PO}_4\text{-P}$ do 84% je C/N 4 za N/P 2, C/N 3 za N/P 3 i C/N 2 za N/P 4, za početnih 20 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$. Veći omjer C/N od minimalno potrebnog narušavao je uklanjanje P i preostalo je KPK u obrađenoj vodi. Istovremena denitrifikacija i uklanjanje P u procesu anerobno/aerobno/anoksične konfiguracije uz endogenu denitrifikaciju u režimu 1h anaerobno, 1 h aerobno, 5 h anoks uvjeta, pri C/N 6 rezultirala je u 100% uklanjanju N i 65% uklanjanju P, uz brzinu endogene denitrifikacije 1,6 mg $\text{NO}_x\text{-N/Lh}$. Režim rada, 1 h anaerobno, 2 h aerobno i 4 h anoksično, pri omjeru C/N 4 rezultira 100% uklanjanjem N i 61% uklanjanjem P uz brzinu endogene denitrifikacije 1,4 mg $\text{NO}_x\text{-N/Lh}$, odnosno pri omjeru C/N 6 rezultira 100% uklanjanjem N i 83% uklanjanjem P uz brzinu endogene denitrifikacije 1,5 mg $\text{NO}_x\text{-N/Lh}$. FISH metodom dokazani su mikrobni klasteri AOB, NOB, PAOs, DPAOs, DGAOs. Dokazani su i poliP i PHA.

Ključne riječi: denitrifikacija, DGAOs, DPAOs, nitrifikanti, procesni čimbenici

EXTENDED ABSTRACT

The denitrification, also known as dissimilatory nitrate reduction, is a biological process of reducing $\text{NO}_3\text{-N}$ to nitrogen gas, by the action of 4 reductases under anoxic conditions with organic compounds as electron donors, which are provided either from organic compounds in wastewater or as added external carbon sources or intracellularly stored carbon sources. The efficiency and rate of denitrification as well as the understanding of the microbial and metabolic mechanisms of denitrification depend on the structure of the microbial community, the identity and abundance of functional microorganisms, and on process factors, such as dissolved oxygen concentrations, types and concentrations of available organic compounds, C/N ratio, temperature, pH, and others. Denitrification usually forms part of a N removal system achieved by a combination of nitrification and denitrification processes, or C, N and P removal processes at different management regimes/process factors, with the activity of among other nitrifying, denitrifying, denitrifying phosphate-accumulating and denitrifying glycogen-accumulating species, and the challenge from both the ecological and economic aspects is the treatment of low C/N wastewater to achieve an efficient and stable output stream quality. For $\text{NO}_3\text{-N}$ denitrification with an external carbon source, it is necessary to provide 1.58x more C source from sodium acetate compared to $\text{NO}_2\text{-N}$ denitrification, initial concentration 30 mg $\text{NO}_x\text{/L}$ with 2 ± 0.1 g MLSS/L. A minimum C/N ratio of 3.8 is required for denitrification of 30 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ and a minimum C/N ratio of 2.4 is required for denitrification of 30 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, from sodium acetate as the carbon source. The $\text{NO}_3\text{-N}$ denitrification rate with an external carbon source, of 15.5 ± 0.3 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ at COD/N 10 and 16 ± 0.6 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ at COD/N 20, was achieved with an initial 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$, and 17.8 ± 0.6 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ at COD/N 10 and 20.9 ± 0.4 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ at COD/N 20, respectively, and an initial 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$, with 3 ± 0.3 g MLSS/L. The denitrification rate of $\text{NO}_2\text{-N}$ with an external carbon source was 20.7 ± 0.9 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ at KPK/N 10 and 21.3 ± 0.7 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ at KPK/N 20, for the initial 30 ± 5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ with 1.5 ± 0.2 g MLSS/L, i.e. 27.6 ± 0.5 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ at COD/N 10 and 36.5 ± 0.6 mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ at COD/N 20 at initial 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, with 3 ± 0.2 g MLSS/L. Endogenous denitrification of $\text{NO}_3\text{-N}$ took place at a rate of 2.8 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$, a significantly lower rate than denitrification with an external carbon source, lower by about 2.86x. The rate of autotrophic nitrification increases with increasing initial $\text{NH}_4\text{-N}$ concentration, microbial biomass, and pH. Higher rates of both $\text{NH}_4\text{-N}$ oxidation and nitrification were achieved at pH 8.0 ± 0.1 compared to pH 7.2 ± 0.2 . The nitrification rate of 500 mg $\text{NH}_4\text{/L}$ was 32.9 ± 0.9 mg N/Lh at pH 7.2 ± 0.2 with 4.2 ± 0.2 g MLSS/L, and 40.7 ± 0.4 mg N/Lh at pH 8.0 ± 0.1 with 3.9 ± 0.3 g

MLSS/L. The efficiency of partial nitrification was about 68%, and the rate of partial nitrification increased with increasing initial $\text{NH}_4\text{-N}$ concentration and microbial biomass. Partial nitrification rates of 12.4-20.9 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ with 1.5 g MLSS/L and 19.6-34.3 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ with 3.0 g MLSS/L were achieved, for initial 30-100 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$. Simultaneous nitrification and denitrification resulted in N loss of 72.2-81.8%, slower than autotrophic nitrification. In the process of simultaneous denitrification and P removal, denitrifying dephosphatation, under anoxic conditions with $\text{NO}_2\text{-N}$ as an electron acceptor, with 40, 60 and 80 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ and at an initial concentration of 20 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, the corresponding minimum C/N ratios were determined for N/P in which 100% removal of $\text{NO}_2\text{-N}$, 100% removal of organic ingredients is achieved and at the same time achieves a maximum intake of $\text{PO}_4\text{-P}$ up to 84%. These results are achieved at C/N 4 and N/P 2, C/N 3 and N/P 3, respectively C/N 2 and N/P 4. $\text{NO}_2\text{-N}$ in a concentration of 80 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ does not inhibit the process of simultaneous denitrification and P removal in anoxic conditions. More organic constituents than the minimum required C/N ratio in denitrifying dephosphatation via $\text{NO}_2\text{-N}$ under anoxic conditions impairs P removal efficiency, while N removal efficiency remains 100%, but at excessive C/N ratios unused COD remains. Simultaneous denitrification and removal of P in the process of anaerobic/aerobic/anoxic configuration with endogenous denitrification in a time sequence of 1 h anaerobic phase, 1 h aerobic phase and 5 h anoxic phase of the process, at C/N 2, 4, 6 shows the efficiency of N removal 69.5%, 98.5% and 100%, and the rate of endogenous denitrification was 2.2, 1.5 and 1.6 mg $\text{NO}_x\text{-N/Lh}$, respectively. P removal rates of 57%, 55% and 65% were achieved. Simultaneous denitrification and removal of P in the process of anaerobic/aerobic/anoxic configuration with endogenous denitrification in the configuration of 1 h anaerobic phase, 2 h aerobic phase and 4 h anoxic phase of the process at C/N 2, 4, 6, gives an efficiency of N removal of 75%, 100% and 100%, a rate of endogenous denitrification of 3.8, 1.4 and 1.5 mg $\text{NO}_x\text{-N/Lh}$ and a P removal of 63%, 61% and 83%, respectively. Microbial clusters for the processes of nitrification (AOB), nitrification (NOB), denitrification (denitrificants), phosphorus removal (PAOs and DPAOs) and endogenous denitrification (DGAOs) were detected, visualized and documented using the FISH method. Intracellularly stored polymers, PolyP and PHA, were detected.

Keywords: denitrification, DGAOs, DPAOs, nitrifying organisms, operational parameters

POPIS KRATICA

ANAMMOX (engl. *ANaerobic AMMonium OXidation*) – Proces anaerobne oksidacije amonijaka

A/O (engl. *Anoxic/Aerobic*) – Anoksično/aerobno

A2/O (engl. *Anaerobic/Anoxic/Aerobic*) – Anaerobno/anoksično/aerobno

A/O SBR (engl. *Anoxic/Aerobic SBR*) – Anoksično/aerobno SBR

A/O/A (engl. *Anaerobic/Aerobic/Anoxic*) – Anaerobno/aerobno/anoksično

A/O/A with ED (engl. *Anaerobic/Oxic/Anoxic with Endogenous Denitrification*) – Anaerobno/aerobno/anoksično s endogenom denitrifikacijom

AOB (engl. *Ammonium Oxidizing Bacteria*) - Amonijak oksidirajuće bakterije

ATP – Adenozin trifosfat

BNR (engl. *Biological Nitrogen Removal*) - Biološko uklanjanje dušika

BPK – Biološka potrošnja kisika

CANON (engl. *Completely Autotrophic Nitrogen removal Over Nitrite*) – Proces potpunog autotrofnog uklanjanja dušika preko nitrita

CLMS (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*) - Konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija

DGAOs (eng. *Denitrifying glycogen-accumulating organisms*) - Denitrificirajući glikogen akumulirajući organizmi

DPAOs (engl. *Denitrifying Dephosphatation Organisms*) - Denitrificirajući defosfatirajući organizmi

DO (engl. *Dissolved Oxygen*) - Otopljeni kisik

EBPR (engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*) - Poboljšano biološko uklanjanje fosfora

ED (engl. *Endogenous Denitrification*) – Endogena denitrifikacija

EPS (engl., *Extracellular Polymeric Substances*) - Ekstracelularne polimerne tvari

FA (engl. *Free Ammonia*) - Slobodni amonijak

FISH (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*) - Fluorescentna in situ hibridizacija

FNA (engl. *Free Nitrous Acid*) - Slobodna nitratna kiselina

FNR (engl. *Fumarate and Nitrate Reductase Regulatory*) – Transkripcijski faktor fumarat i nitrat reduktaze

GAOs (engl. *Glycogen Accumulating Organisms*) - Glikogen akumulirajući organizmi

HNAD (engl. *Heterotrophic Nitrification and Aerobic Denitrification*) - Heterotrofna nitrifikacija i aerobna denitrifikacija

HRT (engl. *Hydraulic Retention Time*) - Hidrauličko vrijeme zadržavanja

ISS (engl. *Inorganic Suspended Solids*) - Anorganske čestice

KPK - Kemijska potrošnja kisika

MLSS (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*) - Suspendirane čestice u miješanoj tekućini

MLVSS (engl. *Mixed Liquor Volatile Suspended Solids*) - Hlapljive suspendirane čestice u miješanoj tekućini

NLR (engl. *Nitrogen Load Rate*) - Brzina opterećenja dušikom

NOB (engl. *Nitrite Oxidizing Bacteria*) - Nitrit oksidirajuće bakterije

OHOs (engl. *Ordinary Heterotrophic Organisms*) - Uobičajeni heterotrofni organizmi

PAOs (engl. *Phosphate Accumulating Organisms*) - Fosfor akumulirajući organizmi

PBS (engl. *Phosphate-buffered saline*) - Fosfatni pufer

PHA (eng. *Polyhydroxyalkanoate*) - Polihidroksialkanoat

PHB (engl. *Polyhydroxybutyrate*) - Polihidroksibutirat

PHBV/PLA - Poli-3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat/poli-laktat

PN (engl. *Partial Nitrification*) - Parcijalna ili djelomična nitrifikacija

PND (engl. *Partial Nitrification and Denitrification*) – Djelomična nitrifikacija i denitrifikacija

SBR (eng. *Sequencing Batch Reactor*) - Šaržni reaktor s pritokom supstrata

SBNR (engl. *Shortcut Biological Nitrogen Removal*) - Skraćeni proces biološkog uklanjanja dušika

SND (engl. *Simultaneous Nitrification and Denitrification*) - Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija

SRT (engl. *Sludge Retention Time*) - Vrijeme zadržavanja mulja

TN (eng. *Total Nitrogen*) - Ukupni dušik

qPCR (engl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) - Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORETSKI DIO	2
2.1.	Dušik	2
2.2.	Uklanjanje dušika iz otpadne vode.....	4
2.3.	Nitrifikacija	5
2.4.	Denitrifikacija.....	6
2.5.	Čimbenici procesa denitrifikacije.....	10
2.5.1.	Izvori ugljika za denitrifikaciju i omjer C/N	10
2.5.2.	Koncentracija otopljenog kisika.....	14
2.5.3.	Denitrifikanti	15
2.5.4.	pH vrijednost.....	19
2.5.5.	Temperatura.....	19
2.5.6.	Hidrauličko vrijeme zadržavanja	20
2.5.7.	Učinak nitrata na denitrifikaciju.....	20
2.5.8.	Učinak nitrita na denitrifikaciju	21
2.5.9.	Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija	23
2.6.	Parcijalna nitrifikacija i denitrifikacija.....	27
2.7.	Istovremeno uklanjanje N i P procesom denitrificirajuće defosfatacije	28
2.8.	Endogena denitrifikacija	30
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	32
3.1.	Materijali	32
3.1.1.	Aktivni mulj	32
3.1.2.	Modelna otpadna voda, donori elektrona – izvor ugljika i akceptori elektrona – NO ₂ -N i NO ₃ -N	34
3.1.3.	Aparatura i pribor	35
3.2.	Metode rada.....	39
3.2.1.	Prilagodba aktivnog mulja za uklanjanje sastojaka s N	39
3.2.2.	Aktivni mulj za pokuse istovremene denitrifikacije i uklanjanje fosfora pri anoksičnim uvjetima – umnažanje PAOs/DPAOs	40
3.2.3.	Aktivni mulj za pokuse u anaerobno/aerobno/anoksičnom režimu uz endogenu denitrifikaciju.....	41

3.2.4.	Dizajn pokusa nitrifikacije do $\text{NO}_3\text{-N}$ i parcijalne nitrifikacije do $\text{NO}_2\text{-N}$, i pokusa istovremene nitrifikacije i denitrifikacije	41
3.2.5.	Dizajn pokusa denitrifikacije	41
3.2.6.	Dizajn pokusa istovremene denitrifikacije i uklanjanja P pri anoksičnim uvjetima	42
3.2.7.	Dizajn pokusa uklanjanja N i P u anaerobno/aerobno/anoksičnom pokusu uz endogenu denitrifikaciju	42
3.3.	Analitičke metode	43
3.3.1.	Određivanje nitrata	43
3.3.2.	Određivanje nitrita	43
3.3.3.	Određivanje aminijakalnog dušika	44
3.3.4.	Određivanje ukupnog dušika	44
3.3.5.	Određivanje kemijske potrošnje kisika	44
3.3.6.	Određivanje MLSS	46
3.3.7.	Određivanje koncentracije fosfata	46
3.3.8.	Određivanje pH vrijednosti	47
3.3.9.	Određivanje temperature	47
3.3.10.	Određivanje koncentracije otopljenog kisika	47
3.3.11.	Određivanje polihidroksialkanoata	47
3.4.	Mikrobiološke metode	47
3.4.1.	Fluorescenija in situ hibridizacija (FISH)	48
3.4.2.	Metoda bojanja po Neisseru – određivanje poliP [214]	50
3.5.	Statistička obrada	50
4.	REZULTATI	51
4.1.	Mikrobni procesi u funkciji uklanjanja dušika	51
4.2.	Aktivnost aktivnog mulja prilagođenog za uklanjanje N procesom nitrifikacije	52
4.2.1.	Autotrofna nitrifikacija u ovisnosti o koncentraciji $\text{NH}_4\text{-N}$, koncentraciji mikrobnog biomase i pH	53
4.3.	Parcijalna nitrifikacija	57
4.4.	Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija	60
4.5.	Denitrifikacija – učinak odabranih procesnih čimbenika	67
4.5.1.	Denitrifikacija $\text{NO}_3\text{-N}$ u ovisnosti o omjeru KPK/N i količini mikrobnog biomase	67

4.5.2.	Denitrifikacija NO ₂ -N u ovisnosti o omjeru KPK/N i količini mikrobne biomase	71
4.5.3.	Minimalno potrebni omjer C/N za denitrifikaciju nitrita i nitrata kao akceptora elektrona	75
4.5.4.	Endogena denitrifikacija	78
4.6.	Istovremena denitrifikacija i uklanjanje P, denitrificirajuća defosfatacija, s NO ₂ -N kao akceptorom elektrona pri anoksičnim uvjetima.....	81
4.7.	Poboljšano uklanjanje N endogenom denitrifikacijom u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju u obradi otpadne vode niskog omjera C/N s ciljem uklanjanja N i P.....	83
4.8.	FISH analiza mikrobnih klastera aktivnog mulja i dokazivanje poliP.....	89
5.	RASPRAVA.....	93
5.1.	Učinkovitost aktivnog mulja za uklanjanje N procesima nitrifikacije i denitrifikacije	93
5.1.1.	Učinak koncentracije NH ₄ -N na aktivnosti aktivnog mulja za proces nitrifikacije.....	93
5.1.2.	Vrijednost pH u funkciji aktivnosti aktivnog mulja za proces nitrifikacije	97
5.1.3.	Količina mikrobne biomase u funkciji učinkovitosti nitrifikacije	97
5.2.	Učinkovitost parcijalne nitrifikacije.....	98
5.3.	Učinkovitost istovremene nitrifikacije i denitrifikacije - Heterotrofna nitrifikacija i aerobna denitrifikacija.....	99
5.4.	Učinkovitost denitrifikacije NO ₃ -N u ovisnosti o omjeru KPK/N i količini mikrobne biomase	102
5.5.	Učinkovitost denitrifikacije NO ₂ -N u ovisnosti o omjeru KPK/N i količini mikrobne biomase	109
5.6.	Minimalni omjer C/N za denitrifikaciju nitrita i nitrata.....	112
5.7.	Unutarstanični izvor ugljika za denitrifikaciju – endogena denitrifikacija	113
5.8.	Učinkovitost istovremene denitrifikacije i uklanjanja P s NO ₂ -N kao akceptorom elektrona pri anoksičnim uvjetima	114
5.9.	Učinkovitost endogene denitrifikacije u poboljšanom uklanjanju N u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju pri obradi otpadne vode niskog omjera C/N s ciljem uklanjanja N i P.....	119
5.10.	Mikrobni klasteri funkcionalnih mikrobnih skupina u ciljanim biološkim procesima uklanjanja C, N i P i dokazivanje unutarstaničnih polimera poliP.....	122

6. ZAKLJUČCI.....	124
7. LITERATURA.....	127
ŽIVOTOPIS	I

1. UVOD

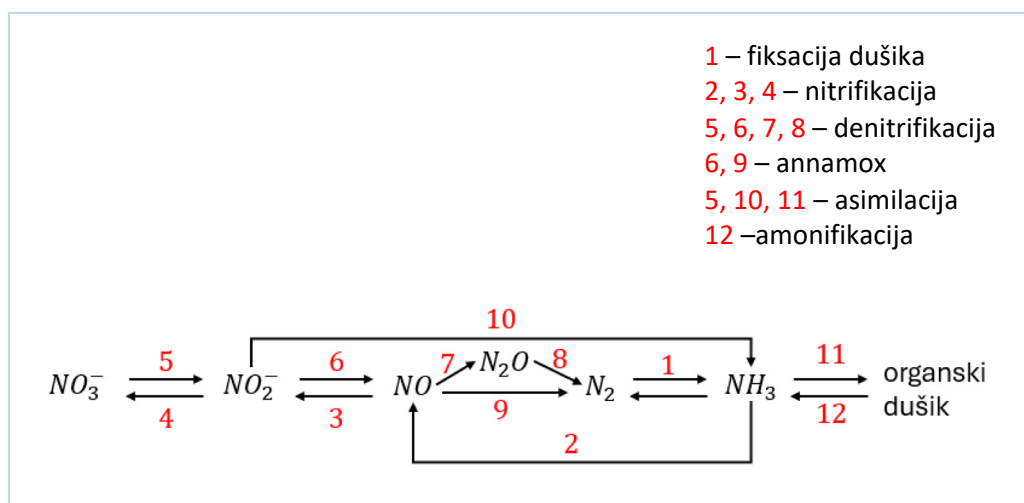
Antropogene aktivnosti poput poljoprivrede i industrije doprinose globalnom onečišćenju voda s hranjivim tvarima (N i P), koje u prekomjernoj količini doprinose eutrofikaciji vodnih tijela. Proces biološkog uklanjanja dušika uključuje kombinaciju procesa nitrifikacije u aerobnim uvjetima u kojima se zbiva oksidacija amonijaka do nitrata, i procesa denitrifikacije u anoksičnim uvjetima u kojima se zbiva redukcija nitrata i/ili nitrita do plinovitog dušika. Biološka denitrifikacija ekonomski je održiva i pouzdana tehnologija za uklanjanje nitrata ($\text{NO}_3\text{-N}$) i nitrita ($\text{NO}_2\text{-N}$) iz otpadne vode, i važan je korak u ciklusu kruženja dušika u prirodi i u inženjerskim sustavima [1,2,3]. Denitrifikacija se zbiva u okolišu pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika kada su prisutni elektron donori (izvor C) i denitrificirajuće bakterije [4]. Denitrifikaciju provodi skupina mikroorganizama – denitrificirajuće bakterije koje mogu koristiti nitrat i/ili nitrit kao terminalni akceptor elektrona u odsustvu otopljenog kisika a zahtijevaju organski sastojke – ugljik kao donore elektrona za redukciju nitrata i/ili nitrita i stanični rast [2]. U procesu uklanjanja dušika optimizacija procesnih čimbenika je ključna, a odabir elektron donora i strategija hranjenja imaju važnu ulogu u poboljšanju denitrifikacije [2,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14]. U obradi otpadnih voda posebice niskog omjera C/N primjena vanjskog izvora ugljika za denitrifikaciju postaje neophodna da bi se postigli strogi zahtjevi za ispušt dušika [15]. Kao izvori ugljika, donori elektrona, za biološku denitrifikaciju – redukciju nitrata i/ili nitrita, mogu se uporabiti: (i) organski sastojci iz otpadne vode, (ii) vanjski izvori ugljika [5,6,13] i (iii) unutarstanično pohranjeni/skladišteni ugljik [7,9,11,12,14]. Karakteristike izvora ugljika koje se koriste za biološku denitrifikaciju utječu na strukturu mikrobne zajednice, aktivnost uklanjanja nitrata, arhitekturu bioflokule/biofilma, brzinu denitrifikacije, i međuprodukte. Biološka denitrifikacija uključuje sekvencijalne reakcije redukcije nitrata do konačnog produkta, plinovitog dušika (N_2), djelovanjem nekoliko reduktaza.

Da bi se istaknula uloga funkcionalnih organizama u procesu biološke denitrifikacije i učinak procesnih čimbenika na denitrifikaciju postavljeni su ciljevi disertacije: (i) vrednovati kapacitet mikrobne zajednice aktivnog mulja za proces denitrifikacije, (ii) odrediti učinkovitost procesa denitrifikacije (iii) definirati potreban/povoljan omjer C/N, (iv) definirati limitirajuće čimbenike procesa, (v) istražiti i odrediti doprinos unutarstanično pohranjenih zaliha ugljika u poboljšanju uklanjanja N, (vi) odrediti mikrobne klastere konkurentnih mikroorganizama u mikrobnoj zajednici i istaknuti ulogu tih funkcionalnih populacija u uklanjanju N.

2. TEORETSKI DIO

2.1. Dušik

Dušik (N) je jedan od najraširenijih elemenata u prirodi [16]. Spojevi s dušikom uključuju organske i anorganske oblike, a i jedni i drugi su neophodni za život. Najznačajniji anorganski oblici dušika su amonijev ion (NH_4^+), nitrat (NO_3^-) i nitrit (NO_2^-). Plinoviti dušik se nalazi u oblicima didušika (N_2), didušikovog oksida (N_2O), dušikov dioksida (NO_2), didušikovog tetraoksida (N_2O_4) i amonijaka (NH_3). Organski dušikovi oblici uključuju otopljen i čestični organski dušik [17]. Dušik se nalazi u litosferi, hidrosferi i atmosferi, a upravo je atmosfera najveći rezervoar dušika. U zemlji se nalazi mala količina litosferskog dušika, od čega je mali dio izravno dostupan biljkama, uglavnom u obliku NO_3^- i NH_4^+ . Dušik kruži između živih organizama, zemlje i atmosfere, pri čemu su uključeni brojni čimbenici i procesi, biološki i fizikalno-kemijski. Relativno stabilan atmosferski dušik N_2 se fiksira i konvertira u NH_3 u procesu fiksacije dušika kojeg provode brojni različiti prokarioti. U prirodi, dušik se može uključiti u šest različitih procesa koji kontroliraju pretvorbu dušika iz organskog u anorganski oblik i obrnuto, i dio su biogeokemijskog ciklusa kruženja dušika (Slika 1): (i) fiksacija dušika ($\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$), (ii) nitrifikacija ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$), (iii) denitrifikacija ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$), (iv) anaerobna oksidacija amonijaka (ANAMMOX) ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2$), (v) asimilacija ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$), i (vi) amonifikacija (organski dušik $\rightarrow \text{NH}_3$) [16].



Slika 1. Ciklus kruženja dušika (preuzeto i prilagođeno [16])

Na globalni ciklus dušika značajno utječe upotreba gnojiva. Od sredine 20. stoljeća snažno je porasla proizvodnja gnojiva zbog povećane proizvodnje hrane i energije za kontinuirano

rastuću globalnu populaciju [18]. U područjima gustog prometa dolazi do značajnog dodatnog fiksiranja N u tlo i vodu, i predstavlja opasnost za okoliš, tako što tijekom sagorijevanja goriva u motoru nastaju dušikovi oksidi koji mogu tvoriti dušičnu kiselinu. Zanimljiva količina fiksacije atmosferskog N_2 se događa prilikom električnog pražnjenja (munje) [16]. Dušik je esencijalan nutrijent za rast i funkcioniranje biljaka, životinja i ljudi, i esencijalan element za sigurnost hrane [19,20], te je uobičajeno ograničavajući čimbenik prilikom proizvodnje hrane. Zbog toga je razvijena proizvodnja sintetskog gnojiva na osnovi procesa Haber-Bosch [21]. Iako je industrijska fiksacija N_2 nužna za proizvodnju hrane, ima posljedice na okoliš i zdravlje ljudi [22]. Agrikultura doprinosi proizvodnji atmosferskih emisija amonijaka, dušikovih oksida (NO_x) i dušikov (I) oksida u zrak, i nitrata u podzemne vode [23]. Istovremeno, za vrijeme procesa spaljivanja tijekom proizvodnje energije, transporta i industrijskih aktivnosti dolazi do formiranja dodatnih količina emisije NO_x kao nenamjernog otpadnog produkta [22]. Spojevi s dušikom se nalaze u otpadnim vodama podrijetlom iz industrije, poput otpadne vode mljekarske industrije, mesne industrije, otpadne vode iz proizvodnje boja, kemikalija, lijekova [24,25,26]. Budući da je količina proizvedenog dušika veća od količine dušika koja se konvertira u N_2 , dušik se akumulira u okolišu i ima štetan učinak na zdravlje ljudi (Tablica 1), ekosustav, bioraznolikost i klimatske promjene [23,27,28]. Širom svijeta se uočava značajno onečišćenje dušikom u vodnim tijelima, a očekuje se i daljnje povećanje onečišćenja zbog buduće upotrebe tla [29]. Sva tri dušikova iona, NH_4^+ , NO_3^- i NO_2^- su toksični za vodeni život, osobito za ribe, a najtoksičniji među njima je NO_2^- [26]. Onečišćenje podzemnih voda nitratima predstavlja rizik za zdravlje ljudi. Standard svjetske zdravstvene organizacije za pitku vodu je 50 mg NO_3^- /L (kao NO_3^-) za kratkotrajno izlaganje i 3 mg NO_3^- /L za kroničan učinak [30]. Agrikultura je najveći izvor onečišćenja podzemnih i površinskih voda [31,32]. Osim putem vode, dušik ljudi unose u svoje tijelo i putem hrane. Visoki unos proteina može dovesti do visoke proizvodnje uree i povišene pH vrijednosti krvi, što dovodi do prevelike reakcije imunološkog sustava. Također, bubrezi mogu biti preopterećeni što uzrokuje moguće zatajenje bubrega. Visoka pH vrijednost krvi dovodi do gubitka mase kostiju. Giht je također povezan s hranom koja ima visoku vrijednost purina, poput mesa [33]. Ljudi uobičajeno konzumiraju više nitrata iz povrća nego iz suhomesnatih proizvoda. Špinat, cikla, rotkvica, celer i kupus su među povrćem koje općenito sadrži vrlo visoku koncentraciju nitrata [34]. Nitrati se mogu reducirati u nitrite pomoću određenih mikroorganizama prisutnih u hrani i gastrointestinalnom traktu, i rezultira nitritnom toksičnošću kod male djece koja su hranjena s povrćem koje sadrži visoku razinu nitrata (methemoglobinemija) [35]. Dušik može zakiseliti i eutroficirati ekosustav. Dušik uglavnom djeluje indirektno na organizme preko čimbenika poput obogaćenje nutrijentima,

iscrpljenje kisika (u vodenim ekosustavima), zakiseljenje vode ili tla, mijenjanje omjera nutrijenata ili pojačavajući učinak drugih stresora poput patogena ili klimatske promjene [22].

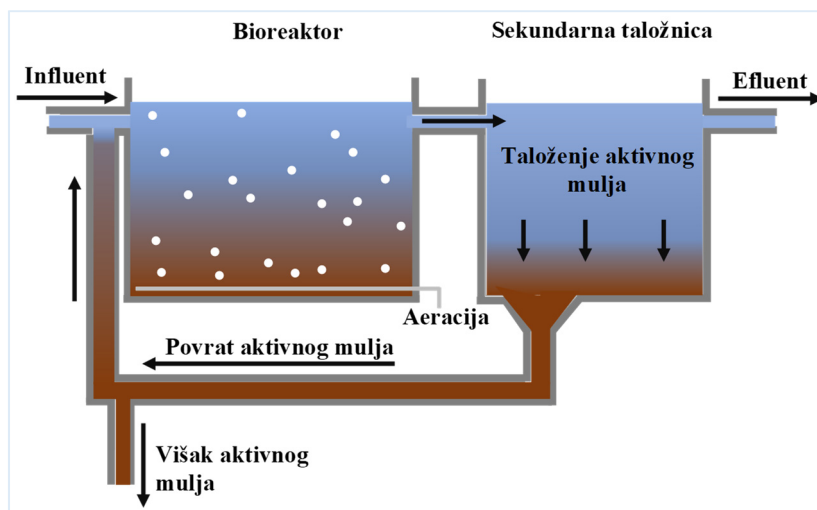
Tablica 1. Pregled učinaka na zdravlje povezanih s emisijom N u zrak [22].

Emisija	Pravac/Put djelovanja	Učinak na zdravlje	Indikator
NO_x	Inhalacija: - izravan učinak NO ₂ - učinci preko O ₃ - učinci preko lebdećih čestica	astma, respiratorni poremećaj, upala dišnih puteva, smanjene funkcije pluća, bronhitis, rak	NO _x O ₃
NH₃	Inhalacija: - izravni učinci (zanemarivo) - učinci preko lebdećih čestica	vidi NO _x umjeren doprinos mirisu	
N₂O	Učinak na zdravlje zbog globalnog zatopljenja, često povećano eutrofikacijom Učinak na zdravlje zbog gubitka stratosferskog ozona	pojačanje vektora za infektivne bolesti (pr. malarija) i učestalosti zaraze (pr. insekti, cvjetanje algi)	

Eutrofikacija (obogaćenje nutrijentima) statkovodnog i obalnog ekosustava uglavnom potječe iz površinskih izvora poput otjecanja gnojiva, erozije sedimenata bogatih nutrijentima ili ispusta kanalizacije. Zbog povećane koncentracije nutrijenata, N i fosfora (P), dolazi do cvjetanja algi i cijanobakterija, što dovodi do hipoksije površinske vode i oslobađanja toksičnih spojeva, što zatim utječe na osjetljive organizme više trofične razine, poput beskralježnaka i riba [36]. Sedimentacija i razgradnja biomase od cvjetanja fitoplanktona može iscrpiti kisik pri dnu vodenog stupca/na površini sedimenta, posebno kod ekosustava s niskom brzinom izmjene vode [37], što posljedično uzrokuje promjene bentoske zajednice i cirkuliranja nutrijenata što se odražava i na ostatak vodenog ekosustava [38].

2.2. Uklanjanje dušika iz otpadne vode

Spojevi s dušikom iz otpadne vode mogu se ukloniti fizikalno-kemijskom i biološkom obradom [2,39,40]. Proces s aktivnim muljem (Slika 2) se uobičajeno koristi za smanjenje koncentracije spojeva s dušikom u efluentu.



Slika 2. Proces s aktivnim muljem [2,26]

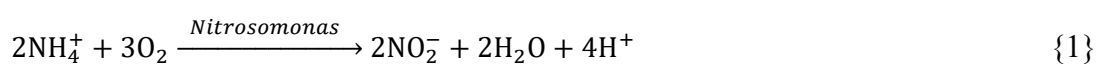
Biološka obrada je ekonomična, a sastoji se od kombinacije procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Postoje različite konfiguracije procesa za biološko uklanjanje dušika (BNR) [2,26]: prednitrifikacija, postdenitrifikacija i istovremena nitrifikacija i denitrifikacija i drugi procesi. U procesu biološkog uklanjanja dušika, konverzija dušika se oslanja na biološki metabolizam, i brojni fizikalno-kemijski parametri utječu na izvedbu BNR sustava. Tako, otopljeni kisik (DO), pH vrijednost, temperatura, koncentracija mikrobne biomase kao suspendirane čestice u miješanoj tekućini (MLSS), dostupnost biorazgradivog ugljika (C), omjer ugljika i dušika, C/N, i toksičnost influenta imaju učinak na učinkovitost uklanjanja dušika [2,41,42].

Proces s aktivnim muljem (Slika 2) se koristi za biološku obradu otpadne vode grada i industrije. Nove tehnologije, poput biofilm reaktora, membranskih reaktora, šaržnih reaktora s pritokom supstrata (SBR) i drugi, su temeljno derivirani iz procesa s aktivnim muljem. Postoji velika varijacija izvedbi procesa s aktivnim muljem, a osnovne komponente su aerobni reaktor (odvijaju se biološke reakcije), sekundarna taložnica (odvajanje obrađene vode i aktivnog mulja) i sustav za odvođenje čestica (odvođenje viška aktivnog mulja i povrat aktivnog mulja) [2,26].

2.3. Nitrifikacija

Biološka nitrifikacija je konverzija ili oksidacija amonijevog iona do nitrita i zatim do nitrata pomoću skupine aerobnih autotrofnih bakterija koje se zovu nitrificirajuće bakterije, jednadžbe {1 i 2}. Među nitrificirajućim bakterijama najvažnije su bakterije roda *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*. Prvi korak nitrifikacije, oksidaciju amonijevog iona do nitrita provode bakterije s

prefiksom *Nitroso*-, amonijak oksidirajuće baterije (AOB), a drugi korak nitrifikacije, oksidaciju nitrita do nitrata provode bakterije s prefiksom *Nitro*-, nitrit oksidirajuće bakterije (NOB). U procesu s aktivnim muljem u aerobnom reaktoru u aktivnom mulju 90-97% bakterija su organotrofi, a preostalih 3-10% nitrifikanti. Nitrifikanti su striktni aerobi. Nitrifikanti kao izvor ugljika koriste CO₂ za sintezu staničnog materijala, a amonijev i nitritni ion za dobivanje energije. Dio amonijevog iona nitrifikanti asimiliraju u novu staničnu biomasu. Nitrifikanti trebaju oksidirati otprilike oko 30 molekula amonijevog iona ili 100 molekula nitritnog iona za svaku molekulu CO₂ koju su asimilirali u stanični materijal. Zbog toga nitrifikanti imaju vrlo nisku brzinu reprodukcije [2,26].



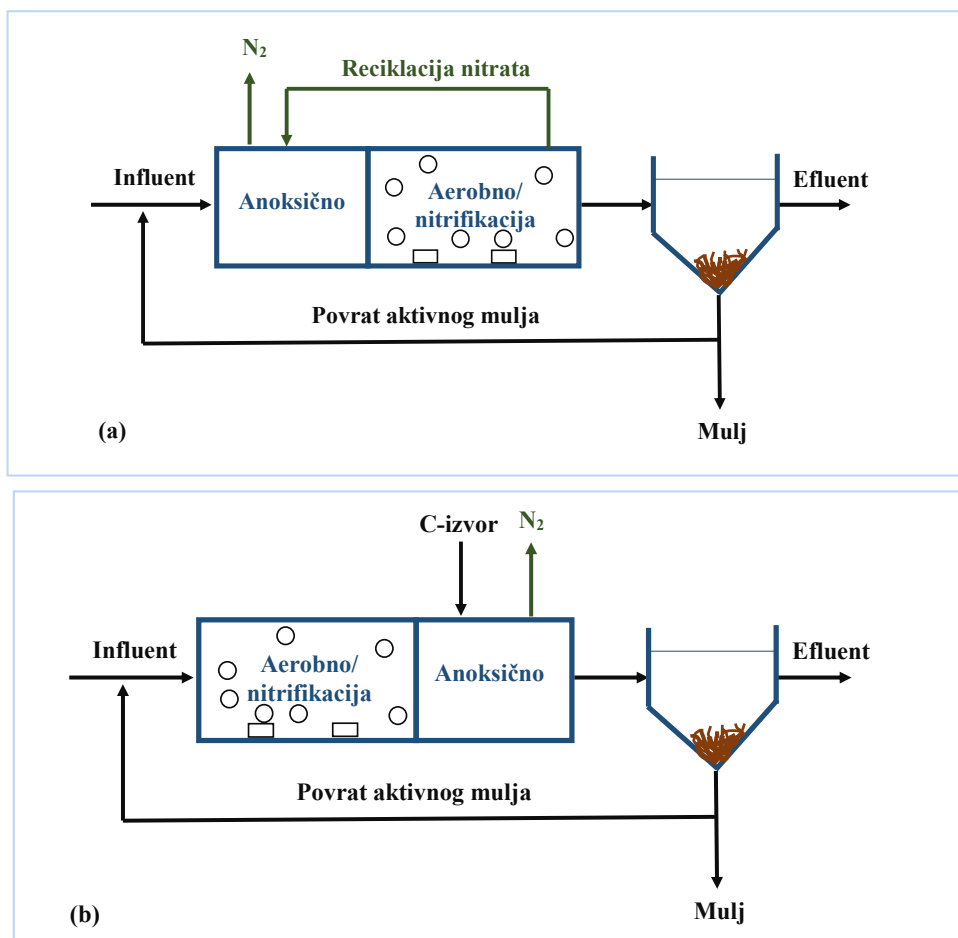
Ukoliko dođe do djelomične inhibicije enzimske aktivnosti nitrifikanata javlja se akumulacija nitritnog iona. Inhibicija sprječava brzu oksidaciju nitritnog iona do nitrata. Operativni čimbenici koji utječu na inhibiciju su niska temperatura, nedostatak ključnih nutrijenata, visoka koncentracija amonijevog iona u influentu, inhibicijski i toksični spojevi, promjena pH vrijednosti, kratko vrijeme zadržavanja u aerobnom reaktoru, privremeno niska koncentracija otopljenog kisika [2,26]. Nitrati nakupljeni u procesu nitrifikacije uklanjaju se u procesu denitrifikacije.

2.4. Denitrifikacija

Redukcija nitrata se može provesti asimilatornim, disimilatornim ili denitrifikacijskim putem. U literaturi se mogu naći različite definicije asimilatorne i disimilatorne redukcije nitrata, i denitrifikacije [1,2,26]. Asimilatorna redukcija nitrata uključuje anaboličke reakcije u kojima se nitrat konvertira u biomasu. Disimilatorna redukcija nitrata do amonijaka uključuje izravnu konverziju nitrata do amonijaka. Denitrifikacija je stupnjevita redukcija nitrata do plinovitog dušika [1]. Anoksična respiracija ili denitrifikacija se naziva „disimilatorna“ redukcija nitrita ili nitrata jer se nitritni i nitratni ioni reduciraju do molekularnog dušika. Dušik u nitritnom i nitratom ionu se ne ugrađuje u mikrobnu biomasu, nego odlazi u atmosferu kao plin. „Asimilatorna“ redukcija nitrata ili nitrita se naziva redukcija nitrata i nitritnog iona do amonijeva iona u bakterijskoj stanici, koji se ugrađuje u stanični materijal, i ovim procesom se ne uklanja dušik iz otpadne vode [2,26]. Bakterijska respiracija nitrata je prirodan proces

redukcije nitrata, koji je industrijaliziran da bi se uklonilo antropogeno onečišćenje nitratom. Mikrobna denitrifikacija je ekonomičnija i učinkovitija pri visokoj koncentraciji nitrata u usporedbi s fizikalo-kemijskim metodama za uklanjanje nitrata, poput reverzne osmoze, izmjene iona, elektrodijalize, kemijske denitrifikacije i metode adsorpcije [39].

Dva osnovna dijagrama toka denitrifikacije i uvjeti koji pokreću brzinu denitrifikacije su prikazani na slici 3.



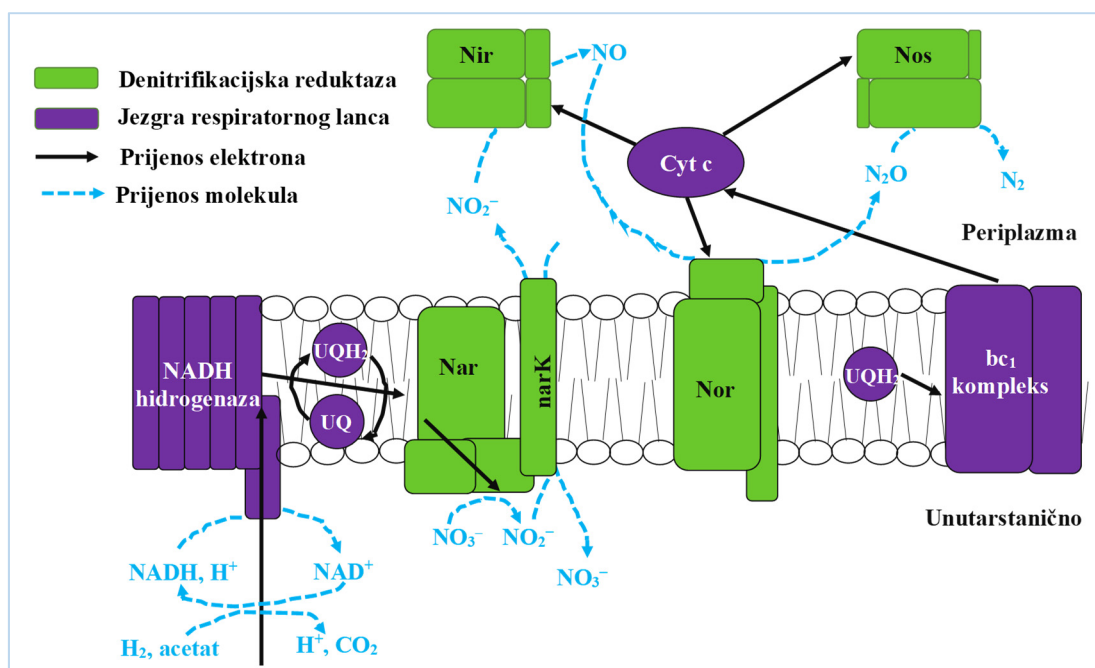
Slika 3. Proces denitrifikacije: (a) prednitrifikacija i (b) postdenitrifikacija (pruzeto i prilagođeno [2])

Najčešće korišteni proces za biološko uklanjanje dušika u obradi gradske otpadne vode je modificirani Ludzak-Ettinger (MLE) proces [43] (Slika 3a). Proces se sastoji od anoksičnog reaktora za proces denitrifikacije nakon kojeg slijedi aerobni reaktor u kojem se odvija nitrifikacija. Aktivni mulj iz nitrifikacijskog reaktora koji sadrži NO_3-N recirkulira visokom brzinom protoka u anoksični prednitrifikacijski reaktor zbog uklanjanja nitrata iz otpadne vode. Budući da organski supstrat u influentu otpadne vode omogućava/donosi elektron donore

za oksidacijsko redukcijske reakcije korištenjem nitrata, proces se naziva denitrifikacija supstratom. Također, budući da anoksični proces prethodi aerobnom reaktoru, proces je poznat kao preanoksična denitrifikacija [2]. Niska koncentracija DO je konstantno prisutna u biološkom predenitrifikacijskom reaktoru. Dnevne prosječne koncentracije izmjerene u postrojenjima punog mjerila su uglavnom 0,2-0,4 mg DO/L, s višim pikovima tijekom dana, posebno u malim postrojenjima za biološku obradu otpadnih voda [44,45]. Stoga, koncentracija DO unutar anoksičnog bioreaktora je rezultat dva oprečna čimbenika: potrošnje kisika od strane heterotrofnih bakterija i unosa kisika iz sirove kanalizacije, recirkulacije mulja, i većinom, recirkulacijom miješane tekućine. Dizajn biološkog predenitrifikacijskog reaktora se provodi na temelju brzine denitrifikacije, pretpostavljajući kinetiku nultog reda (u vezi s koncentracijom $\text{NO}_3\text{-N}$ i organskih spojeva) i uzimajući u obzir učinak temperature [46,47,48].

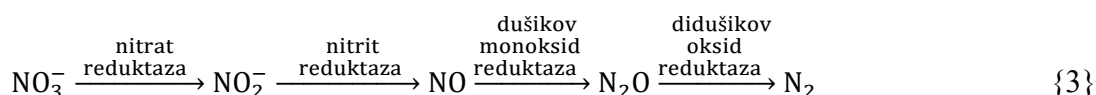
U drugom procesu (Slika 3b) denitrifikacija se odvija nakon nitrifikacije, a izvor elektron donora je endogeno raspadanje, i proces se općenito zove postanoksična denitrifikacija jer se uklanjanje organskih sastojaka izraženih kao BPK zbilo ranije u procesu i BPK iz otpadne vode nije dostupan/raspoloživ za pokretanje reakcije redukcije nitrata. Kada proces postanoksične denitrifikacije ovisi jedino o endogenoj respiraciji za energiju, ima znatno nižu brzinu reakcije od preanoksičnog procesa koji koristi BPK iz otpadne vode. Često se dodaje egzogeni (vanjski) izvor ugljika poput metanola ili acetata u postanoksičan proces da se osigura dovoljno BPK za redukciju nitrata i da se poveća brzina denitrifikacije [2].

Denitrifikacija je respiracijski proces u kojem se nitrat reducira a elektron donor, organski spoj, oksidira. Respiracija nitrata je proces u kojem se odvija prijenos elektrona od donora, organskog spoja, do akceptora, nitrata odnosno nitrita (Slika 4). Ta redoks reakcija skupa s respiratornim lancem kogenerira gradijent protona kroz staničnu membranu bakterija, što se u konačnici konvertira u energiju u obliku ATP-a pomoću ATP sintetaze [10].



Slika 4. Shematski prikaz kanonskog respiratornog lanca u denitrifikaciji (preuzeto i prilagođeno [10,49,50])

U procesu denitrifikacije odvija se niz reakcija, jednađžba {3}: nitrat se reducira preko nitrita, didušikovog monoksida, dušikovog monoksida, didušik oksida do plinovitog dušika, pomoću četiri uzastopne reakcije koju kataliziraju četiri mikrobne reduktaze (Slika 4).



U procesu denitrifikacije redukcija nitrata je katalizirana nitrat reduktazom (*nar*), redukcija nitrita nitrit reduktazom (*nir*), zatim redukcija dušikovog monoksida je katalizirana dušikov monoksid reduktazom (*nor*), i posljednji korak denitrifikacije, redukcija didušikovog oksida je katalizirana didušik oksid reduktazom (*nos*) [51]. Upravo je redukcija nitrita do dušikovog monoksida ključni korak koji ograničava brzinu denitrifikacije, kao i korak u kojem se denitrifikacija razlikuje od drugih metaboličkih reakcija nitrata [52]. U tom koraku je aktivan enzim *nir*, pa se *nir* geni, *nirS* i *nirK*, koriste za analizu denitrifikanata kada se istražuje struktura i raznolikost mikrobne populacije [8,52,53]. Visoka koncentracija nitrita inhibira *nir*, što smanjuje brzinu denitrifikacije nitrita, i *nos*, što dovodi do povećanja emisije N₂O [54,55,56].

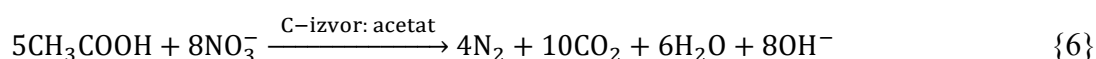
Postoji nekoliko operativnih čimbenika koji snažno utječu na denitrifikaciju: supstrat (BPK), odsutnost slobodnog molekularnog kisika, prisutnost odgovarajuće i aktivne populacije denitrificirajućih bakterija, vrijednost pH, temperatura, nutrijenti, i redoks potencijal. Najvažniji čimbenici su prisutnost supstrata ili lako dostupnog ugljika i odsutnost slobodnog molekularnog kisika [26].

2.5. Čimbenici procesa denitrifikacije

Na učinkovitost i brzinu denitrifikacije utječu brojni čimbenici, poput: funkcionalna mikroba populacija denitrificirajućih bakterija, vrsta i koncentracija izvora ugljika, omjer C/N, pH vrijednost, koncentracija otopljenog kisika, temperatura, hidrauličko vrijeme zadržavanja [57,58,59].

2.5.1. Izvori ugljika za denitrifikaciju i omjer C/N

Izvori ugljika (elektron donori) za denitrifikaciju mogu biti: (i) biorazgradivi organski sastojci prisutni u otpadnoj vodi, (ii) vanjski (egzogeni) izvori ugljika, i (iii) unutarstanične rezerve ugljika poput polihidroksialkanoata (PHA) [2,14]. Stehiometrijske reakcije uz različite izvore ugljika (otpadna voda, metanol, acetat) u procesu denitrifikacije su prikazane jednadžbama {4-6}, a $C_{10}H_{19}O_3N$ se obično koristi za opis biorazgradivih organskih sastojaka u otpadnoj vodi [2,43].



Postoje dva općenita slučaja kada brzina korištenja supstrata kontrolira brzinu denitrifikacije (Slika 3). Prvi je anoksično/aerobni proces gdje je organski supstrat (elektron donor) iz influenta otpadne vode koji se prihranjuje u anoksičan reaktor (Slika 3a). Drugi je slučaj postanoksična denitrifikacija, gdje se odvija nitratna redukcija nakon aerobne obrade u reaktoru u koji se dodaje vanjski izvor ugljika (Slika 3b). Budući da je biorazgradivi organski materijal iz otpadne vode iscrpljen u aerobnoj obradi, kao pokretač reakcije redukcije nitrata se koristi egzogeni izvor ugljika. Endogena respiracija stvara potrebu za nitratima uzrokovanoj korištenjem i oksidacijom supstrata. Ta reakcija se javlja u miješanoj tekućini anoksičnog reaktora i pri znatno je nižoj brzini od brzine denitrifikacije uzrokovano korištenjem supstrata. Postanoksična

denitrifikacija se može provoditi sa ili bez egzogenog izvora ugljika. Bez egzogenog izvora, postanoksičan proces ovisi o endogenoj respiraciji aktivnog mulja da se osigura elektron donor za redukciju nitrata i pri tome je potrebno osigurati dugo hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT) da se postigne visoka učinkovitost uklanjanja nitrata [2]. U slučaju kada je otpadna voda elektron donor, anoksični reaktor prima influent otpadne vode i nakon njega slijedi aerobni reaktor u kojem se odvija nitrifikacija. Heterotrofni bakterijski rast se javlja i u anoksičnoj i u aerobnoj zoni s utroškom nitrata i kisika [2]. Denitrifikanti mogu koristiti organske spojeve koji se uobičajeno nalaze u otpadnoj vodi kućanstva. Kada je u otpadnoj vodi nizak udio biorazgradivih organskih sastojaka odnosno mali omjer C/N potrebno je dodati egzogeni izvor ugljika, donor elektrona, da bi se odvijala redukcija nitrata i/ili nitrita do molekularnog dušika. Vrsta egzogenog izvora ugljika utječe na brzinu denitrifikacije, proizvodnju i nakupljanje međuprodukata denitrifikacije, proizvodnju aktivnog mulja i kvalitetu efluenta [13,58].

Egzogeni izvori ugljika dijele se, prema Wang i sur. [58], na:

(i) izvore ugljika u tekućoj fazi

- komercijalni izvori ugljika – metanol, etanol, acetat, octena kiselina
- nusprodukti fermentacije otpadne tekućine bogati ugljikom

(ii) izvore ugljika u čvrstoj fazi

- biorazgradivi polimerni izvori ugljika
 - dobiveni mikrobnom fermentacijom – polihidroksialkanoati (*PHA*)
 - sintetizirani iz biomase – poput proteini, polisaharidi
 - petrokemijski proizvodi – polikaprolakton, poliglikolna kiselina i polibuten

(iii) izvore ugljika u čvrstoj fazi biomase bogate ugljikom

- lignoceluloza – drvena biomasa, poljoprivredni otpad (riža, pšenica, ječam, kukuruzna slama)
- razni celulozni otpad – čvrsti komunalni otpad, pulpa i drveni biljni otpad.

U heterotrofnoj denitrifikaciji se tradicionalno kao izvori ugljika primjenjuju jednostavni niskomolekularni organski spojevi, poput acetata, etanola, metanola i glukoze, koje bakterije mogu lako iskoristiti i uz koje se postiže visoka učinkovitost redukcije nitrata. Acetat se lako može konvertirati u acetil Co-A koji ulazi u citratni ciklus a elektroni otpušteni tijekom oksido-redukcijskih reakcija mogu se iskoristiti za denitrifikaciju [59].

U istraživanju učinka acetata, glukoze, etanola i askorbinske kiseline na proces denitrifikacije u ovisnosti o temperaturi, kao najučinkovitiji izvor ugljika pri 10 °C pokazao se etanol, dok su pri sobnoj temperaturi brzine denitrifikacije uz glukozu i uz acetat bile puno više u usporedbi s

brzinama pri 10 °C. Askorbinska kiselina se pokazala kao neučinkovita u procesu denitrifikacije [60].

Istraživanje učinka acetata, propionata, glukoze, glicerola, etanola i metanola na proces denitrifikacije, funkcionalne denitrificirajuće gene i emisiju N_2O je pokazalo da se potpuna denitrifikacija nitrata do plinovitog dušika dogodila pri uporabi etanola i metanola kao izvora ugljika, i pri tome nisu detektirani međuprodukti NO_2^- -N i N_2O -N. Od ostalih istraženih izvora ugljika, učinkovitost je bila najbolja uz glicerol > propionat > acetat > glukoza, a N_2O je proizveden samo pri uporabi glicerola. Najučinkovitiji se pokazao metanol što se može pripisati prisutnosti metilotrofnih denitrificirajućih bakterija u inokulumu, a koje koriste spojeve s jednim ugljikom kao izvor supstrata [59].

Acetat kao izvor ugljika rezultira većom brzinom denitrifikacije i boljom učinkovitošću uklanjanja dušikovih spojeva (NO_x -N) u odnosu na druge izvore ugljika (metanol, etanol, glukoza) [13,61,62].

Osim vrste izvora ugljika važna je i količina dodanog ugljika, odnosno omjer C/N [63]. Ukoliko nema dovoljno raspoloživog ugljika protok elektrona ne može zadovoljiti potrebe energije za stanični rast, te su narušeni staničan rast i denitrifikacija koja je nepotpuna i nakupljaju se međuprodukti denitrifikacije. Također, prekomjerna količina raspoloživog ugljika, veća od optimalne, uzrokuje gubitak skupih izvora elektrona, povećanjem KPK u efluentu [58,64].

Visoki omjer KPK/ NO_3 -N (KPK/ NO_3 -N 4, 5 i 6), pri kojemu je količina organskih sastojaka prekomjerna, potiče rast potpunih denitrifikanata smanjujući nakupljanje nitrita i povećavajući emisiju N_2O . Niski omjer KPK/ NO_3 -N (KPK/ NO_3 -N 1, 2 i 3) rezultira niskom učinkovitošću denitrifikacije (54,45 %) i povećanom koncentracijom nitrata u efluentu (do 200 mg NO_3 -N/L), zbog nedostatne količine izvora ugljika [65].

Pri omjeru C/N 0 zbog izostanka elektron donora ne zbiva se redukcija nitrata, a uz dodatak natrijeva acetata kao izvora ugljika, pri omjerima C/N 1,28 i 2,57 nakuplja se N_2O zbog ograničene opskrbe elektronima, dok pri omjerima C/N 5,14 i 12,85 došlo je do potpune denitrifikacije. Pri omjerima C/N < 2,5 može doći do nakupljanja nitrita ili N_2O tijekom denitrifikacije zbog kompeticije za elektrone između reakcija redukcije nitrata i nitrita [59].

Smatra se da je odgovarajući omjer organskog ugljika za proces denitrifikacije izražen kao topivi BPK prema nitritnom i nitratnom ionu oko 3:1. Za potpunu denitrifikaciju nitratnih iona potrebno je 2,5 mg metanola kao supstrata/mg nitratnog iona (Tablica 2) [26]. U literaturi se navodi potreban omjer C/N 16 za citrat kao izvor ugljika [66], za glukozu kao izvor ugljika omjer C/N 15 za *Bacillus* sp. i *Pseudomonas taiwanesis* [67] i [68], odnosno omjer C/N 10 za *Pseudomonas* sp. [69].

Tablica 2. Potpuna denitrifikacija nitritnih i nitratnih iona s metanolom kao izvorom ugljika [26]

Dušikov ion	Potrebno metanola po mg/L dušikovog iona	Proizvedene stanice	Dušik u proizvedenim stanicama
NO_2^-	1,5 mg/L	0,3 mg	0,04 mg
NO_3^-	2,5 mg/L	0,5 mg	0,06 mg

Komunalne otpadne vode karakterizira niski omjer KPK/N, što često nije dovoljno za učinkovito uklanjanje dušika, pa se svakodnevno u postrojenjima za biološku obradu otpadnih voda troše velike količine vanjskog izvora ugljika što predstavlja znatan trošak [14,70]. Budući da su većina denitrificirajućih bakterija heterotrofi, vanjski izvor ugljika se često dodaje kao elektron donor za stanični rast i redukciju nitrata odnosno nitrita [14,71,72], a metanol, etanol i natrijev acetat se obično koriste u laboratorijskim i industrijskim procesima za biološku obradu otpadnih voda [14,73,74]. Različite vrste izvora organskih supstrata, ovisno o njihovoj biorazgradivosti, su glavni čimbenici koji utječu na varijacije u brzini stanične proizvodnje, brzini denitrifikacije i bakterijske zajednice [13,18,24,25,75,76,77]. Budući da vanjski, dodani izvor ugljika za proces denitrifikacije predstavlja trošak u postrojenju za biološku obradu otpadnih voda, istražuju se alternativni izvori ugljika poput otpadne vode iz mljekarske industrije, mulj, drveni peleti, pšenična slama, drvene strugotine, biorazgradiva plastika [18,25,75,78,79,80,81].

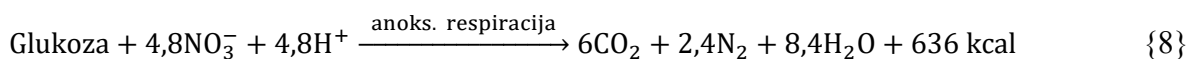
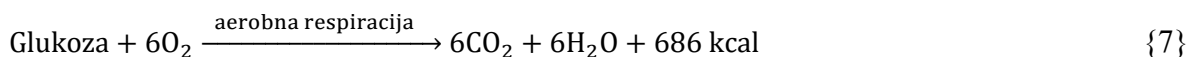
Kako su katabolički i respiratorni geni različito raspoređeni duž genoma, tako određeni izvor ugljika može favorizirati različite respiratorne procese. U istraživanju učinka 94 izvora ugljika na konačne produkte mikrobiološke respiracije nitrata u mikrobnim kulturama istaknuto je da neki izvori ugljika favoriziraju akumulaciju nitrita ili denitrifikaciju, dok drugi izvori ugljika favoriziraju disimilatornu redukciju nitrata do amonijaka. Tako primjerice *Klebsiella* bilo s L-sorbozom ili D-celobiozom akumulira nitrite, *Escherichia* s drugim šećerima amonificira nitrate, dok sa citratom ili formijatom kao izvorom C *Pseudomonas* denitrificira, a *Sulfurospirillum* amonificira nitrate. Istaknuto je da više koncentracije ugljika uvijek favoriziraju disimilatornu redukciju nitrata do amonijaka prije nego denitrifikaciju ili akumulaciju nitrita, i da ponekad sastav izvora ugljika može biti jednako važan kao i koncentracija ugljika u određivanju konačnih produkata nitratne redukcije [78].

U istraživanju učinka natrijevog acetata, glukoze i polimera poli-3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat/poli-laktat (PHBV/PLA) na brzinu denitrifikacije, pokazano je da se veće brzine denitrifikacije postižu uz glukozu i natrijev acetat kao izvor ugljika u odnosu na PHBV/PLA polimer. Također, istaknuto je da na denitrifikaciju utječu kemijska svojstva izvora ugljika, pri čemu se acetat i glukoza lako uključuju u reakcije metabolizma mikroorganizama dok primjena PHBV/PLA polimera rezultira sporom brzinom denitrifikacije [82] jer se polimer zbog velike molekulske mase prvo treba razgraditi na jednostavnije spojeve, a potom asimilirati i uporabiti kao izvor energije, za rast stanica i za primarne i sekundarne metabolite [58].

2.5.2. Koncentracija otopljenog kisika

Denitrifikanti preferiraju aerobnu respiraciju ili korištenje slobodnog molekularnog kisika za razgradnju BPK jer je energija dobivena aerobnom respiracijom BPK veća od energije dobivene anoksičnom respiracijom BPK. Stoga, u prisutnosti visoke koncentracije otopljenog kisika ($>1,0$ mg DO/L), denitrifikanti aktiviraju enzimski sustav za korištenje slobodnog molekularnog kisika i deaktiviraju enzimski sustav za korištenje nitritnih i nitratnih iona. Aerobna respiracija je učinkovitija i bakterije će je preferirati u donosu na denitrifikaciju [7,79]. Na sustavima za obradu otpadnih voda jedan od problema procesa denitrifikacije je osiguravanje anoksičnih uvjeta u zoni denitrifikacije. U anoksičnu zonu otopljeni kisik dospijeva s recikliranim muljem pa se dio organskih spojeva u anoksičnoj zoni oksidira uz raspoloživi s reciklacijom dospjeli otopljeni kisik [7].

Međutim, ako postoji gradijent otopljenog kisika duž flokule, denitrifikacija se odvija u središtu flokule, odnosno, denitrifikacija se javlja u prisutnosti mjerljivog otopljenog kisika. Flokule >100 μm veličine su dovoljno velike da proizvedu gradijent otopljenog kisika. Pod gradijentom otopljenog kisika, bakterijske stanice unutar flokule istovremeno respiriraju korištenjem kisika, nitritnih i nitratnih iona. Bakterijske stanice na periferiji flokule koriste otopljeni kisik za respiraciju, a bakterije u središtu flokule koriste nitritne i nitratne ione za respiraciju. Ipak, energija dobivena anoksičnom respiracijom je usporediva s aerobnom respiracijom, jednadžbe {7 i 8}. Poput aerobne respiracije, tijekom denitrifikacije dolazi do potpune oksidacije organskih sastojaka do CO_2 . Oko 25% BPK razgrađenog tijekom anoksične respiracije se koristi za staničnu sintezu ili proizvodnju mulja. Količina stanica ili mulja koji su proizvedeni tijekom aerobne respiracije je veća zbog veće količine energije koja je dobivena tijekom aerobne respiracije u usporedbi s anoksičnom respiracijom [26].



U istraživanju primjene biorazgradive plastike (škrob 60% i polipropilen 30%) kao izvora ugljika u procesu denitrifikacije u aerobnim (6,8 mg DO/L na početku pokusa), anoksičnim uvjetima (propuhano dušikom i zatvoreno) i uvjetima niske koncentracije otopljenog kisika (bez aeracije, otvoreno, na početku pokusa 4,8 mg DO/L, DO brzo pala na vrlo nisku vrijednost), pokazano je da se brzina denitrifikacije značajno smanji u prisutnosti DO u denitrificirajućem reaktoru [79]. Pokusi su vođeni pri 110 mg NO₃-N/L, 1375 mg VSS/L, 30±2 °C, a tijekom pokusa je vrijednost pH iznosila 6,5-7,8. Veća brzina uklanjanja nitrata postignuta je u anoksičnim uvjetima (30,6 g NO₃-N/m³d) s 98% učinkovitosti uklanjanja, i pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika (30,8 g NO₃-N/m³d) s 97% učinkovitosti uklanjanja nitrata, u odnosu na aerobne uvjete (20,6 g NO₃-N/m³d) s učinkovitosti uklanjanja 65%. Iako u pokusima pri svim istraživanim koncentracijama otopljenog kisika nisu zabilježeni nitriti na kraju pokusa, zabilježena je akumulacija nitrita, i to veća u pokusima pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika (4,4 mg NO₂-N/L) nego u anoksičnim i aerobnim uvjetima (1,5 mg NO₂-N/L). Tijekom pokusa su zabilježili formiranje do 1 mg NH₄-N/L, kao posljedicu disimilatorne redukcije nitrata do amonijaka [79].

Inhibicija brzine denitrifikacije s DO također ovisi o veličini i strukturi flokule [2]. Prisutnost 0,2 mg DO/L može smanjiti brzinu denitrifikacije do 40% u odnosu na maksimalnu vrijednost [2,83,84]. Koncentracija otopljenog kisika u anoksičnom reaktoru bi trebala biti ispod 0,2 mg/L jer kisik ima trenutni inhibitorski učinak na denitrifikaciju [84,85]. Također, ekspresija i aktivnost skoro svih dušik oksid reduktaza je suprimirana u prisutnosti kisika [86].

2.5.3. Denitrifikanti

Otprilike 80% bakterija u procesu s aktivnim muljem su fakultativni anaerobi i sposobni su za denitrifikaciju [26]. Razni mikroorganizmi sposobni su provoditi heterotrofnu denitrifikaciju, i to su bakterije [87], arheje [51] i protisti [88], dok redukciju nitrata primarno provode bakterije [41]. Denitrificirajuće bakterije su vrlo raznolika skupina heterotrofnih fakultativnih anaerobnih bakterija koje preferiraju aerobnu respiraciju, i mogu se prebaciti s aerobne respiracije s kisikom kao terminalnim akceptorom elektrona na anaerobnu respiraciju s nitratom, nitritom i dušikovim oksidima kao terminalnim elektron akceptorima i pri tome je kisik inhibitor procesa denitrifikacije [7,60]. Nekoliko ključnih enzima uključenih u

respiratorni put disimilatorne redukcije nitrata su karakteristični za proces denitrifikacije (Slika 4) i mogu se kvalificirati za analize raznolikosti denitrificirajućih bakterija. Većina pažnje je posvećena membranski vezanoj nitrat reduktazi (*nar*) i periplazmatskoj nitrat reduktazi (*nap*) i dvije vrste nitrit reduktaza (*nirK* i *nirS*) [89]. Ipak, nemaju sve denitrificirajuće bakterije sposobnost potpune denitrifikacije nitrata do elementarnog dušika jer im nedostaju *nirS*, *norB* ili *nosZ* geni koji kodiraju za nitrit, dušikov monoksid i didušikov oksid reduktaze te ne može doći do redukcije NO_2 do NO , NO do N_2O , kao niti N_2O do N_2 . Potpuna denitrifikacija pri obradi otpadne vode postiže se suradnjom različitih denitrificirajućih bakterija iz mikrobne zajednice aktivnog mulja [90,91]. U tablici 3 prikazana je podjela denitrificirajućih bakterija [65,92].

Tablica 3. Podjela denitrificirajućih bakterija [65,92]

Vrsta denitrificirajućih bakterija			Korak denitrifikacije koji provode
potpuni denitrifikanti			bakterije koje reduciraju $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$ do N_2
nepotpuni denitrifikanti			bakterije koje mogu samo reducirati $\text{NO}_3\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$
nepotpuni	nitrit	reducirajući	bakterije koje mogu reducirati $\text{NO}_3\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$, ali reakcija je inhibirana supstratom ($\text{NO}_3\text{-N}$)
denitrifikanti			
isključivi	nitrit	reducirajući	bakterije koje mogu reducirati samo $\text{NO}_2\text{-N}$
denitrifikanti			
nedenitrifikanti			bakterije koje ne mogu reducirati ni $\text{NO}_3\text{-N}$ ni $\text{NO}_2\text{-N}$

Brojni denitrifikanti su fakultativni anaerobi, u prisutnosti kisika inhibiran je put denitrifikacije, i preostaje samo aerobna respiracija jer ima najučinkovitije očuvanje Gibbsove slobodne energije. Pri niskoj koncentraciji otopljenog kisika i kada ima nitrata, dolazi do inicijacije denitrifikacije. Intermedijeri denitrifikacije, nitrit i NO , su toksični spojevi za bakterije [93], njihove unutarnje koncentracije su regulirane ispod citotoksične razine do mM i nM [10,50]. Posljedično, kisik, nitrat, nitrit i NO su među ključnim signalima koji utječu na regulaciju denitrifikacije. Regulacija mikrobne denitrifikacije na razini transkripcije je intenzivno proučavana na modelu denitrificirajućih sojeva *Paracoccus denitrificans* i *Pseudomonas aeruginosa*. Kod denitrifikanata, regulacija transkripcije gena denitrifikacijske reduktaze se postiže pomoću transkripcijskih faktora FNR obitelji [94].

U miješanoj bakterijskoj populaciji, dva različita bakterijska fenotipa mogu utjecati na ravnotežu nitrata i nitrita: nitrat respirirajuće bakterije koje ne mogu reducirati nitrit, i prave denitrificirajuće bakterije koje reduciraju nitrat i nitrit do plinovitog dušika [95,96]. Nitrat

respirirajuće bakterije imaju tri puta veću brzinu rasta, pa brzo postanu dominantne [97]. Posljedično, u prisutnosti nitrata, dominacija nitrat respirirajućih bakterija uzrokuje akumulaciju nitrita. Nakon utroška nitrata, pravi denitrifikanti se nastavljaju razvijati korištenjem nitrita i postanu dominantne. Glavni čimbenici koji utječu na rast denitrifikanata su temperatura, pH vrijednost, vrsta izvora ugljika, omjer KPK/N, koncentracija otopljenog kisika i koncentracija nitrita [13,77,98,99,100].

Udio bakterijskih zajednica u aktivnom mulju je jedan od glavnih čimbenika varijacije brzine bioloških reakcija, što se reflektira na obradu otpadnih voda [101]. Do sada je identificirano skoro 130 bakterijskih vrsta unutar više od 50 rodova kao denitrifikanti [102]. Većina denitrifikanata spada u rodove *Alcaligenes*, *Bacillus*, i *Pseudomonas* [26]. Unatoč tome što struktura denitrificirajuće zajednice značajno varira među postrojenjima za biološku obradu otpadnih voda zbog obradnih procesa i operativnih uvjeta, izolirani bakterijski rodovi iz denitrificirajućih reaktora su bili usko povezani s vrstama u *Proteobacteria* [103,104], uključujući *Thauera* spp., *Paracoccus* spp., i *Pseudomonas* spp. [105]. Mikroorganizmi *Pseudomonas*, *Dechloromonas*, *Flavobacterium*, *Thauera*, *Rhodobacter*, i *Zoogloea* se obično povezuju s denitrifikacijom [106,107,108,109].

Identifikacija i analiza različitih populacija denitrificirajućih bakterija pomaže u shvaćanju strukture mikrobne zajednice, funkcionalnih gena i prilagodljivosti zajednice okolišu u kojem se nalazi. Za taksonomsku identifikaciju i proučavanje filogenetske strukture zajednica denitrificirajućih bakterija koriste se molekularna metoda genskog sekvenciranja pri čemu se kao filogenetički i funkcionalni biomarkeri koriste 16S rRNA geni ili geni koji kodiraju za denitrifikacijske reduktaze. Za analizu strukture mikrobne zajednice i njenog denitrificirajućeg potencijala od molekularnih metoda primjenjuju se također denaturirajuća gel elektroforeza, polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata, fluorescentna *in situ* hibridizacija i sondiranje DNA stabilnim izotopima [41].

Mnoge vrste denitrificirajućih bakterija identificirane su primjenom molekularnih metoda, a neke od denitrificirajućih bakterija svrstavaju se u rodove: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Dechloromonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hyphomicrobium*, *Klebsiella*, *Methylomonas*, *Moraxella*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodanobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Spirillum*, *Thauera*, *Thiobacillus* i *Xanthomonas* [91]. Budući su inženjerske prakse obrade otpadne vode obično bazirane na cjelokupnom funkcioniranju procesa, bi bilo prikladnije fokusirati se na predominantne organizme odgovorne za denitrifikaciju nego identificirati sve bakterije koje sadrže skupinu

gena za denitrifikaciju [105]. U denitrifikaciji, nitrat reduktaza je prvi enzim u procesu (Slika 4, jednadžba {3}). Membranski vezana nitrat reduktaza (*narG*) i periplazmatski vezana nitrat reduktaza (*napA*) su prepoznate kao široko raspršene kroz rodove koji pripadaju Bacteria i Archaea kraljevstvima [110].

U proučavanju rodova denitrifikanata *Paracoccus* spp., *Thauera* spp., *Pseudomonas*-slične spp., i dva funkcionalna gena nitrat reduktaze, *narG* i *napA* kao potencijalnih biomarkera za ukupno uklanjanje dušika pomoću kvantitativne lančane reakcije polimerazom (qPCR), istaknuto je da su ti bakterijski rodovi i funkcionalni geni pokazali značajnu negativnu korelaciju s ukupnim dušikom u efluentu [105]. U Pearsonovoj korelaciji i analizi kanoničke redundancije pokazano je da su varijable koje najviše objašnjavaju kombinacija konstituenata, a kao najvažnija se ispostavila temperatura, a zatim i pH vrijednost, vrijeme zadržavanja čestica (SRT), ukupni dušik i organski sastojci u influentu (BPK i KPK). Rezultati su potvrdili da su glavni 16S rRNA geni denitrifikanata i geni nitrat reduktaza bolji biomarkeri od koncentracije biomase, i bilo koji od biomarkera bi mogao pratiti denitrifikaciju u stvarnom vremenu. *Thauera* spp. je činila oko 16% ukupnih bakterija u aktivnom mulju, *Paracoccus* spp. 0,09% i *Pseudomonas*-slične bakterije 0,02%. Količina *narG*-sličnih genskih stanica je bila oko 20-90 puta veća nego *napA* gena, ovisno o datumu uzorkovanja [105]. Neka istraživanja sugeriraju da je *Proteobacteria* dominantan red u procesu aktivnog mulja i vjerojatno odgovoran za denitrifikaciju [103]. Rodovi *Thauera* (*Betaproteobacteria*), *Paracoccus* (*Alphaproteobacteria*) i *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) su česti denitrifikanti zapaženi u aktivnom mulju [111,112,113]. Može se dogoditi da genski bazirana analiza 16S rRNA ne opiše točno bakterijsku biokemijsku razinu jer je denitrifikacija generalizirani proces, i genetska razlika unutar funkcionalnih gena koji kodiraju različite korake je velika [114]. Iz tog razloga bilo bi prikladnije koristiti funkcionalne gene, koji odgovaraju jednom koraku u procesu, kao pokazatelj cjelokupne denitrifikacije kao točniji način za ispitivanje ukupnih denitrifikanata [105].

Raznolikost i sastav mikrobne zajednice u snažnoj je ovisnosti o izvoru ugljika. U istraživanju mikrobne zajednice denitrifikanata uz izvore ugljika: drveni peleti (prešana piljevina), pšenična slama i drvene strugotine raznolikost zajednice je opadala u nizu: drvene strugotine, pšenična slama i drveni peleti, a uzrok bi mogao biti rastuća homogenost materijala [18]. Bakterije koljena *Proteobacteria* (*β-Proteobacteria*), *Bacteroidetes* i *Firmicutes* su dominantne, kao i rodovi *Thauera*, *Pauidibacter* i *Pseudomonas*, identificirane pri korištenju acetata kao izvora ugljika [61,62,115].

2.5.4. pH vrijednost

Denitrifikacija se može odvijati u širokom rasponu pH vrijednosti [26], i za većinu denitrificirajućih bakterija optimalna vrijednost pH je u rasponu od 7,5 do 9,5, [96,116], a odstupanje pH od tog raspona rezultira usporavanjem denitrifikacijske aktivnosti i nakupljanjem nitrita [117]. Alkalni okoliš snažno utječe na mikrobnu denitrifikaciju. U denitrifikaciji, u reakciji redukcije nitrita do dušikovog monoksida, nastaju OH^- ioni koji utječu na pH vrijednost miješane tekućine, ako sustav nije puferiran. Vrijednost pH utječe na aktivnost svih enzima pa i na četiri denitrificirajuće reduktaze te može doći do neravnoteže redukcijske kinetike između reduktaza. Nitrit reduktazu inhibira alkalna vrijednost pH što dovodi do nakupljanja nitrita, a inhibicija redukcije nitrita jedan je od načina kako bakterije izbjegavaju daljnji porast pH vrijednosti. Na bakterijsku aktivnost i aktivnost enzima, osim jako kiselih ili lužnatih uvjeta, utječe prisutnost slobodne nitritne kiseline (HNO_2) (FNA) [49,118], koja je protonirani oblik nitrita [119], citotoksična je i lako prolazi kroz bakterijske membrane [118]. Vrijednost pH se tijekom heterotrofne denitrifikacije snižava zbog razgradnje izvora ugljika do organskih kiselina, a potom raste uslijed uporabe tih izvora C i potom na kraju procesa stabilizira. Ako se u denitrifikaciji koristi jednostavan, niskomolekularni izvor C, poput acetata, izostaje korak razgradnje organskih sastojaka pa tako i snižavanje vrijednosti pH, a acetat izravno ulazi u proces denitrifikacije i odmah je vidljiv porast vrijednosti pH [120]. Pri nižim vrijednostima pH (pH 6,5 i 7,0) dolazi do značajne inhibicije denitrifikacije, brzine redukcije nitrata i nitrita su beznačajne, a to je povezano s toksičnošću nitrita pri gotovo neutralnom pH. Pri višim vrijednostima pH (pH 7,5, 8,5 i 9,0) ne dolazi do inhibicije denitrifikacije, ali se nakuplja nitrit zbog kompeticije za elektrone između nitrata i nitrit reduktaze, koja je izraženija pri višim pH vrijednostima. Redukcija nitrita učinkovitija je nakon potpune potrošnje nitrata jer nema više kompeticije za elektrone [96]. U denitrifikaciji pH vrijednost utječe na reduktaze ili elektron transportere. Pod utjecajem pH vrijednosti, elektron transporteri mogu preferencijalno dati elektrone određenim reduktazama [49]. Pri pH vrijednosti nižoj od 6,5 postoji tendencija emisije N_2O [121].

2.5.5. Temperatura

Optimalna temperatura za proces denitrifikacije je u rasponu 20-30 °C [41], a razlikuje se ovisno o izvoru ugljika i ovisi o sastavu bakterijske zajednice koja katalizira biološku denitrifikaciju, a čiji sastav ovisi o odabranom izvoru ugljika [60,122]. Denitrifikacija je inhibirana pri temperaturi otpadne vode ispod 5 °C, te se za kompenzaciju smanjene

denitrifikacije pri niskoj temperaturi sugerira povećanje hlapljivih suspendiranih čestica u miješanoj tekućini (MLVSS) što može povećati broj denitrificirajućih bakterija. Povećanjem temperature dolazi do povećanja brzine denitrifikacije. Pri nižim temperaturama (15 °C) brzina i učinkovitost redukcije nitrata su niže [100], dok optimalna temperatura (25-35 °C) poboljšava redukciju nitrata, ali također dovodi do povećanja nakupljanja nitrita i didušikovog oksida [59]. Učinak temperature na aktivnost aktivnog mulja, između ostalog i na denitrifikante, uz istraživanje gena ključnih enzima uključenih u denitrifikaciju, uključujući nitrat reduktaze (*narB*, *narG* i *nxrA*), nitrit reduktaze (*nirK*, *nirS*, *nirA*, *nirB* i *nrfA*), dušikov monoksid reduktazu (*norB* i *norC*) i didušikov oksid reduktazu (*nosZ*), pokazao je da su pri porastu temperature sa 20 °C na 35 °C svi enzimski geni povezani s denitrifikacijom bili reducirani, moguće zbog nedostatka izvora ugljika [123]. S porastom temperature moguć je nedostatak izvora ugljika zbog brzog rasta mikroorganizama, pa mikroorganizmi mogu koristiti samo ekstracelularne polimerne tvari (EPS) kao izvor ugljika [124], a smanjenje EPS je i određeno pri 35 °C [123]. S druge strane, pri sniženju temperature sa 20 °C na 5 °C količina enzimskih gena uključenih u denitrifikaciju je porasla, količina nitrit reduktaze (*nrfA*) je porasla za 230,6%.

2.5.6. Hidrauličko vrijeme zadržavanja

Hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT) je veličina koja je izravno povezana s učinkovitošću uklanjanja nitrata, predstavlja potrebno vrijeme kontakta između biomase (denitrificirajućih bakterija) i supstrata (nitrata) u otpadnoj vodi [125].

Smanjenje HRT dovodi do povećanja koncentracije nitrata i nitrita u efluentu zbog nepotpune redukcije, dok povećanje HRT vrijednosti potiče denitrificirajuće bakterije na učinkovitiju razgradnju organskih spojeva što povećava brzinu uklanjanja nitrata zbog dovoljnog vremena kontakta između denitrificirajućih bakterija i otpadne vode, ali istodobno dovodi do povećanja koncentracije otopljenog organskog ugljika i amonijevih soli u efluentu [57,125].

2.5.7. Učinak nitrata na denitrifikaciju

Neke industrije proizvode efluent i otpad visoke koncentracije nitrata, obično uz alkalni pH i nedostatak organskih sastojaka. Odlaganje radioaktivnog otpada duboko u zemlju predstavlja problemom otjecanja nitrata u alkalni okoliš. U blizini radioaktivnog otpada se očekuje visoka koncentracija nitrata (10 mM do 1 M), koji može pojačati mobilnost radionuklida [126,127]. Efluent iz postrojenja nehrđajućeg čelika sadrži do 80 mM nitrata [128], a otpadna voda iz industrije eksploziva može sadržavati do 500 mM nitrata [129]. Visoka koncentracija nitrata je

štetna za mikrobnu denitrifikaciju. Maksimalna koncentracija nitrata ispitana u literaturi je do 1 M [130]. Također, visoka koncentracija nitrata uzrokuje akumulaciju nitrita, koja djeluje inhibirajuće ili čak toksično za bakterije [93]. Istražena je denitrifikacija s visokom koncentracijom nitrata od nekoliko stotina mM [97,131,132,133]. Tako je potpuna denitrifikacija 645 mM nitrata ostvarena tijekom jedne godine u laguni [134], a *Bacillus halodenitrificans* može preživjeti pri koncentraciji 1,06 M nitrata [130]. Također su objavljena istraživanja o obradi otpadne vode koja je sadržavala 100-1000 mM nitrata pomoću aktivnog mulja [128,131,135,136,137]. Tijekom aklimatizacije bakterije su se prilagodile visokoj koncentraciji nitrata pomoću stupnjevitog povećavanja koncentracije nitrata. U svim tim istraživanjima nitrat je u potpunosti reduciran, a distribucija bakterijskih zajednica u aktivnom mulju se promijenila u korist nitrat respirirajućih bakterija [131]. Kada je koncentracija nitrata bila ispod 100 mM, akumulacija nitrita nije premašila 90% ukupne koncentracije nitrata. U pokusima između 100 i 300 mM nitrata, akumulacija nitrita je bila u rasponu 40-70%. Pri koncentraciji nitrata 300 mM ili višoj, nitrit nije dalje reduciran osim u [137]. Budući da su ta istraživanja imala dugi eksperimentalni period, moguće je da je došlo do proliferacije pravih denitrifikanata koji su reducirali nitrit [49].

2.5.8. Učinak nitrita na denitrifikaciju

Nitrit može biti toksičan za mikroorganizme a kada koncentracija nitrita dosegne visoke vrijednosti dolazi do inhibicije procesa denitrifikacije [55,56]. Ipak, neka istraživanja pokazala su da postoje sojevi denitrifikanata koji mogu koristiti nitrit kao akceptor elektrona [138]. Akumulacija nitrita je izazov za denitrifikante, ali i za druge bakterije, poput nitrifikanata [93]. Čak i pri niskoj koncentraciji nitrita poput desetak mM, dolazi do inhibicije i usporavanja aktivnosti bakterija [139]. Kod *Bacillus cereus* nitrit aktivira sintezu bakteriostatičkih molekula [140]. S druge strane, bakterije poput *P. denitrificans* mogu razviti rezistenciju na nitrit, koja tolerira 140 mM nitrita u prisutnosti kisika [118].

Kod denitrifikanata na razini genoma postoji regulacija supstratom s nitratom i regulacija produktom s NO i nitritom, čiji je cilj izjednačiti unutarnju koncentraciju citotoksičnih spojeva poput nitrita i NO [50]. Na razini metabolizma, kompeticija među reduktazama može uzrokovati akumulaciju nitrita ili N₂O, što je pod utjecajem okolišnih uvjeta poput pH vrijednosti, i transporteri elektrona mogu transferirati elektrone radije jednoj reduktazi nego drugoj [141,142]. Tako je pri vrijednosti pH 5,5 kod *P. denitrificans* uočena djelomična denitrifikacija, s nakupljanjem nitrita i N₂O zbog transfera elektrona preferencijalno nekim

reduktazama, dok pri vrijednosti pH 8,5 nije bilo akumulacije jer se transfer elektrona odvijao istovremeno svim reduktazama [141]. Vrsta elektron donora također utječe na akumulaciju nitrita. Tako je kod *Pseudomonas stutzeri* zabilježena akumulacija nitrita pri 5 mM acetata, koji sadrži 2 C-atoma, ali nije bilo akumulacije pri istoj koncentraciji butirata, koji ima četiri C-atoma [132]. Kako se tijekom oksidacije butirata oslobađa 20 elektrona, a kod acetata 8, butirat omogućava dovoljno elektrona i ne dolazi do kompeticije među reduktazama za prihvaćanje elektrona. Da bi bakterije spriječile akumulaciju nitrita unutar stanice, koriste transportere poput *narK* za izlučivanje nitrita (Slika 4) [143].

Skraćena nitrifikacija-denitrifikacija je ekonomična alternativa biološkog uklanjanja dušika preko nitrita iz otpadne vode jer zahtjeva manje organskog ugljika i energije u usporedbi s uklanjanjem dušika preko nitrata [144].

U pokusima koji su imali za cilj obogatiti denitrificirajuću bakterijsku zajednicu za denitrifikaciju preko nitrita, pokusi su provedeni s acetatom kao izvorom ugljika u SBR reaktoru, pri 20 ± 2 °C i pH $7,5 \pm 0,2$ [145]. Brzina denitrifikacije je rasla tijekom 12 dana, s 10 mg/Lh na 273,35 mg/Lh, pri čemu je specifična brzina denitrifikacije porasla s 3,83 mg/gh na 51,80 mg/gh. Omjer KPK/N je smanjen s početnih 7,9 na 2,7, čime je pokazano da je moguće provesti denitrifikaciju preko nitrita pri niskom omjeru KPK/N. Ukazano je da i nitrit i nitrat mogu biti korišteni kao elektron akceptori za denitrifikaciju. Udio glavne bakterijske kulture povezan s denitrifikacijom, određen metodom «high-throughput sequencing», je na početku pokusa bio 2,16%, a do kraja pokusa je porastao na 84,26%. U početnom mulju su određeni udjeli *Rhodobacter* 1,27%, *Dechloromonas* 0,43%, *Thauera* 0,24%, *Pseudomonas* 0,11%, *Zoogloea* 0,07%, i *Flavobacterium* 0,04%, odnosno njihov udio je iznosio 2,16% u ukupnoj populaciji. Nakon 12 dana mulj je imao drugačiji sastav: *Pseudomonas* 56,13%, *Flavobacterium* 11,70%, *Thauera* 7,76%, *Dechloromonas* 5,19%, *Rhodobacter* 3,48%, *Zoogloea* < 2%, odnosno, sumarno *Pseudomonas*, *Dechloromonas*, *Flavobacterium*, *Thauera*, i *Rhodobacter* su činili 84,26% bakterija u aktivnom mulju [145]. Postigli su značajan prirast denitrifikanata jer heterotrofi imaju kratko generacijsko vrijeme [146].

Veza između koncentracije nitrita i brzine denitrifikacije je takva da što je viša postignuta brzina denitrifikacije nitrita, to je viša vrijednost praga inhibicije nitritom na denitrifikante (iz prethodnih neuspjeha). Također, doseg inhibicije kao rezultat relativno visoke koncentracije nitrita može se umanjiti uklanjanjem supernatanta, pranjem mulja i prekidom hranjenja tijekom nekoliko dana. Inhibicija ključnih enzima u denitrifikaciji se može izbjeći niskom koncentracijom nitrita u sustavu tijekom anoksičnog perioda u svakom ciklusu, a što se postiže

uzastopnim prilagođavanjem brzine dotoka nitrita dodanog u reaktor od ciklusa do ciklusa u ovisnosti o brzini denitrifikacije nitrita u prethodnom ciklusu [145].

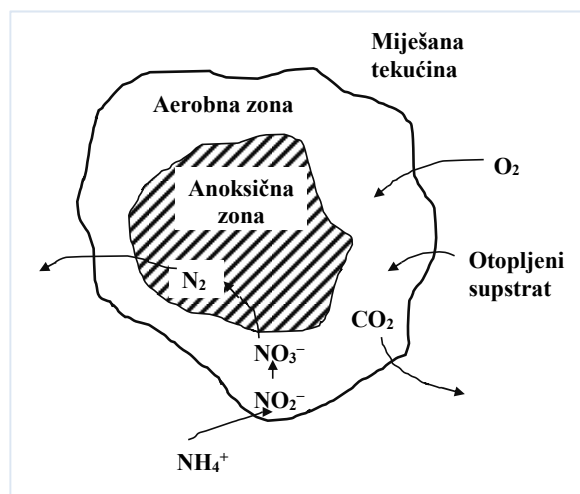
U istraživanju učinka niskog omjera C/N na denitrifikaciju preko nitrita provedeni su pokusi predenitrifikacije i post nitrifikacije u dvo-muljnom sustavu, s visokom koncentracijom amonijaka od 800 mg/L u sintetskoj otpadnoj vodi i uz natrijev acetat kao izvor ugljika [147]. U predenitrifikaciji je kao izvor ugljika poslužila sirova otpadna voda, a u post nitrifikaciji se favorizirala nitritacija (oksidacija amonijaka do nitrita). U post nitrifikaciji je postignuta nitritacija s učinkovitosti akumulacije nitrita 97,8%. Tijekom denitrifikacije s nitritom kao akceptorom elektrona porasla je brzina denitrifikacije, a s porastom omjera C/N faktor emisije N₂O se smanjio. Istražen je učinak omjera C/N na emisiju N₂O tijekom denitrifikacije, pri C/N 1, 2 i 4, pri 100 mg NO₂-N/L i KPK 100 mg/L, 200 mg/L i 400 mg/L. Istaknuto je da denitrifikacija s NO₂-N kao akceptorom elektrona može uzrokovati visoku emisiju N₂O. Faktor emisije N₂O je bio relativno visok što bi moglo biti zbog toga što je NO₂-N akceptor elektrona. Za smanjenje emisije N₂O sugerirano je kontinuirano prihranjivanje zbog kontrole koncentracije NO₂-N. Pri omjerima C/N 1, 2 i 4, postignute su brzine denitrifikacije 6,52 mg NO₂-N/gh, 12,96 mg NO₂-N/gh i 18,35 mg NO₂-N/gh i brzine proizvodnje N₂O 1,72 mg N₂O/gh, 2,27 mg N₂O/gh i 2,17 mg N₂O/gh, pri tome je omjer brzina N₂O-N/NO₂-N iznosio 26,63%, 17,55% i 11,98%. Od početnih 800 mg NH₄-N/L u influentu, uklanjanje dušika je iznosilo 43,3% [147].

2.5.9. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija

Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (SND) je poznati fenomen u BNR sustavima aktivnog mulja. Ovisi o konfiguraciji bioreaktora (makrookolišu povezano s miješanjem), koncentraciji otopljenog kisika i veličini flokula (mikrookoliš i učinak difuzije kisika u flokuli) [148,149], kao i raspoloživom organskom ugljiku za denitrifikaciju [149,150,151]. SND ima brojne potencijalne prednosti primjene pred konvencionalnim sustavom uklanjanja dušika, i od interesa je dizajnerima i operaterima za primjenu na sustavima za obradu otpadnih voda jer nitrifikacija i denitrifikacija se zbivaju u istom reaktoru, SND eliminira potrebu za izgradnjom odvojenih reaktora, pojednostavljen je dizajn procesa, manja je potreba za ugljikom, kisikom i alkalitetom u odnosu na konvencionalne procese [117,149,151,152], manja je emisija N₂O [153]. Proces SND ovisi o ravnoteži u koncentraciji DO za odvijanje dvije kinetičke reakcije, nitrifikacije i denitrifikacije, koje se zbivaju istovremeno u istom reaktoru. Koncentracija otopljenog kisika za nitrifikaciju treba biti >1 mg DO/L, a 2 mg DO/L osigurava brže reakcije

nitrifikacije, dok $DO < 0,2$ mg/L je kritičan za nitrifikaciju [154], a brzina denitrifikacije je najveća pri koncentraciji DO oko 0 mg DO/L [155]. Koncentracija otopljenog kisika od 0,5 mg DO/L bila je povoljna za postizanje jednake brzine nitrifikacije i denitrifikacije a time i postizanje SND, u šaržnim pokusima pri oko 20 °C pri SRT od 15 dana [152]. Niski DO zahtijevan za SND proces nije povoljan za konvencionalne procese obrade otpadne vode jer pogoduje razvoju bujanja mulja, voluminoznosti mulja (engl. *Sludge bulking*) zbog prekomjernog rasta filamentoznih bakterija [156,157]. To je jedan od glavnih nedostataka procesa SND. Na sustavima obrade otpadne vode, takvo vođenje rezultira također marginalnim karakteristikama taloženja mulja. Raspoloživi ugljik i koncentracija DO su istaknuti kao važni procesni čimbenici u provedbi SND [150]. Omjer KPK/N 10 je zahtijevan za postizanje značajne denitrifikacije, dok je optimalna koncentracija DO u rasponu 0,3-0,7 mg DO/L za maksimiziranje aktivnosti SND. Koncentracija $DO < 0,3$ ne osigurava nitrifikaciju, dok $DO > 0,7$ mg/L ne osigurava denitrifikaciju [150]. Iako je mehanizam odgovoran za provođenje DNS poznat, teško je kontrolirati SND jer ovisi o limitirajućim čimbenicima procesa, poput veličine flokula, unutarnjeg skladištenja/pohrane KPK i profila DO unutar flokule [149,158].

Istraživanja su pokazala da aerobnu denitrifikaciju provode brojni mikrobi, posebno u okolišu s promjenjivom koncentracijom otopljenog kisika i dostupnim reduciranim ugljikom, premda se dugo smatralo da se denitrifikacija ne odvija u prisutnosti kisika [14,63,79,159]. U sustavu s aktivnim muljem (Slika 2) često izmjerena koncentracija DO u reaktoru ne predstavlja stvarnu koncentraciju DO unutar pahuljice aktivnog mulja. U uvjetima niske koncentracije DO, denitrifikacija se može odvijati u unutrašnjosti flokule, a nitrifikacija na vanjskom dijelu flokule. Također, u reaktorima s aktivnim muljem u kojima je niska koncentracija DO, aerobna i anoksična zona postoje ovisno o uvjetima miješanja i udaljenosti od točke aeracije, tako da se nitrifikacija i denitrifikacija mogu odvijati u istom reaktoru (Slika 5). U tim uvjetima, u kojima se uklanjanje dušika odvija u jednom aerobnom reaktoru se zove istovremena nitrifikacija i denitrifikacija. Iako se i nitrifikacija i denitrifikacija odvijaju pri nižim brzinama zbog učinka DO na oba procesa, ako je dovoljno dugo vrijeme zadržavanja mulja (SRT) i hidrauličko vrijeme zadržavanja, τ (HRT), cjelokupno uklanjanje dušika može biti značajno [2,14,63].



Slika 5. Prikaz pahuljice aktivnog mulja u kojoj su prikazane aerobna i anoksična zona [2]

Enzim nitrat reduktaza kod aerobnih denitrifikanata nalazi se u periplazmi, a kod anoksičnih denitrifikanata je membranski vezan [110]. Neki od poznatih aerobnih denitrifikanata su *Pseudomonas stutzeri*, *Agrobacterium* sp., *Halomonas campisalis*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter junii*, *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus versutus*, *Zoogloea* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas mendocina*, *Ochrobactrum rhizosphaerae*, *Bacillus salmalya*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter* sp., *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Cupriavidus* sp. PDN31, *Janthinobacterium*, *Photobacterium* sp., *Pseudomonas putida* [63].

Koncentracija otopljenog kisika, omjer C/N, veličina flokule, temperatura, izvor ugljika, vrijednost pH, brzina opterećenja nitratom i HRT utječu na proces aerobne denitrifikacije [14,63,79,160,161,162,163].

Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija se mogu objasniti sa dva moguća mehanizma. Prvo, regije niske koncentracije DO ili regije nula koncentracije DO mogu biti prisutne unutar reaktora kao funkcija režima miješanja. Kako miješana tekućina putuje od površine mehaničkih aeratora, DO je iscrpljen, stvarajući uvjete koji su povoljniji za anoksične reakcije [164]. Drugo, pahuljice aktivnog mulja mogu sadržavati i aerobnu i anoksičnu zonu (Slika 5). Otopljeni kisik i otopljeni supstrat van flokule difundiraju u aerobnu zonu, i, ovisno o koncentraciji DO i koncentraciji amonijaka i BPK, kisik može biti iscrpljen pri značajnoj brzini unutar flokule, tako da DO ne može ući u cijelu dubinu flokule. Nitrati proizvedeni nitrifikacijom u aerobnoj zoni mogu difundirati u unutarnju anoksičnu zonu duž supstrata tako da se denitrifikacija odvija u dubini flokule.

Postojanje anoksične zone u flokuli aktivnog mulja podrputo je pokusima u kojima je pokazano da je brzina nitrifikacije povezana ne samo s koncentracijom DO u miješanoj tekućini nego i s količinom prisutnog BPK [165]. Veća brzina unosa kisika zabilježena je pri višoj koncentraciji organskih sastojaka izraženih kao BPK, kao i manja brzina nitrifikacije za istu koncentraciju DO u miješanoj tekućini, što sugerira da je smanjena aerobna zona flokule aktivnog mulja. I brzina nitrifikacije i denitrifikacije bi trebale biti manje od optimalne razine za proces istovremene nitrifikacije i denitrifikacije. Samo dio biomase je korišten za svaku od tih reakcija. Brzina nitrifikacije je niža zbog niske koncentracije DO, a brzina denitrifikacije je niža zbog koncentracije supstrata u aerobnom dijelu flokule. Ipak, sustavi s vrlo dugim vremenom zadržavanja, imaju dovoljan volumen da se prilagode nižim brzinama nitrifikacije i denitrifikacije [2].

Prednosti aerobne denitrifikacije/istovremene nitrifikacije i denitrifikacije su to što nema potrebe za odvojenim reaktorima kao u konvencionalnim uređajima za obradu otpadnih voda, što znači uštedu na prostoru i trošku za izradu, kao i na kemikalijama za korekciju vrijednosti pH [63,149,166,167,168]. Aerobna denitrifikacija/istovremena nitrifikacija i denitrifikacija se mogu primijeniti na otpadne vode koje imaju nizak omjer KPK/N [14,63].

Brojni mikroorganizmi imaju mogućnost sintetiziranja polihibroksibutirata (PHB). Većina pohrane PHB se događa u anaerobno-aerobnim uvjetima kada je količina raspoloživog egzogenog izvora ugljika u suvišku obzirom na potrebe stanice [14]. U pokusima aerobne denitrifikacije s acetatom kao izvorom ugljika i bez acetata (autotrofno), biomasa aktivnog mulja je akumulirala 0,35 g PHB/gVSS ($f_{PHB}=0,27$ Cmol/Cmol) u SBR reaktoru. SBR je imao jedan ciklus po danu, pri 20 °C i vrijednost pH 7-7,5, s acetatom kao dodanim izvorom ugljika otpadnoj vodi grada. U autotrofnim pokusima (60 mg NH_4-N/L) je zabilježena redukcija 4,54 mg N_{red}/L , a u pokusima s acetatom (60 mg NH_4-N/L i 100 mg KPK/L) 22,5 mg N_{red}/L . U autotrofnim pokusima je kao izvor ugljika služio unutarstanično pohranjeni PHB. Istaknuto je da aerobna denitrifikacija s unutaršnjim izvorom C nije učinkovita kao aerobna denitrifikacija s vanjskim izvorom ugljika [14].

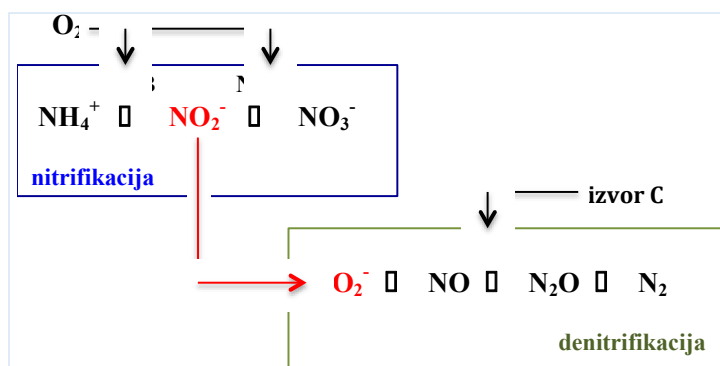
Učinak koncentracije otopljenog kisika na aerobnu denitrifikaciju ovisi o korištenom mikroorganizmu u procesu denitrifikacije [63]. Čak i unutar iste vrste aerobni denitrifikanti mogu se razlikovati po sposobnosti denitrifikacije pri različitim koncentracijama otopljenog kisika. Potpuno uklanjanje ukupnog dušika tijekom aerobne denitrifikacije postignuto je pri 6,08 mg DO/L s *Marinobacter* kao denitrifikantom [169]. Za *Citrobacter diversus* je objavljena optimalna koncentracija 5 mg DO/L [64]. Potpuno uklanjanje dušika prilikom aerobne

denitrifikacije pri 3-10 mg DO/L je zabilježeno kod *Achromobacter*, *Acinetobacter* i *Pseudomonas*, a *Bacillus* provodi denitrifikaciju pri 3,93-7,65 mg DO/L [170,171].

2.6. Parcijalna nitrifikacija i denitrifikacija

Proces nitrifikacije do $\text{NO}_2\text{-N}$ (nitritacija), a potom denitrifikacija $\text{NO}_2\text{-N}$ (denitritacija), takozvana nitritna zamjena (engl. *nitrite-shunt*), je skraćeni proces biološkog uklanjanja dušika (SBNR) [2,172], parcijalna ili djelomična nitrifikacija i denitrifikacija (PND), (Slika 6).

U parcijalnoj nitrifikaciji, oksidaciji $\text{NH}_4\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$ (nitritacija), favorizira se aktivnost amonijak oksidirajućih bakterija (AOB) a limitira/inhibira/ispiru nitrit oksidirajuće bakterije (NOB) [173,174,175], ili je potrebno postići takvu prostornu distribuciju AOB da NOB više nemaju odgovarajuće uvjete. Konvencionalni proces nitrifikacije i denitrifikacije znači primjenu procesa potpune nitrifikacije, oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ preko $\text{NO}_2\text{-N}$ do $\text{NO}_3\text{-N}$, i potom redukcije $\text{NO}_3\text{-N}$ preko $\text{NO}_2\text{-N}$ do plinovitog dušika. Korak oksidacije $\text{NO}_2\text{-N}$ do $\text{NO}_3\text{-N}$ (nitratacija) u nitrifikaciji i korak redukcije $\text{NO}_3\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$ (denitratacija) u denitrifikaciji nije potreban budući je moguće izravno denitrificirati $\text{NO}_2\text{-N}$ do plinovitog dušika (Slika 6) [176,177,178].



Slika 6. Shematski prikaz koraka parcijalne nitrifikacije (nitritacije i denitritacije) [176].

Akumulacija nitrita se može postići kontrolom: pH, DO, temperature, SRT i reakcijskog vremena. Veliki izazov u parcijalnoj nitrifikaciji je postići stabilni izostanak aktivnosti NOB kroz duži period [179].

Prednosti procesa parcijalne nitrifikacije/denitrifikacije (nitritacije-denitritacije) (Slika 6) u usporedbi s tradicionalnom nitrifikacijom i denitrifikacijom preko $\text{NO}_3\text{-N}$, su: (i) brzina denitrifikacije $\text{NO}_2\text{-N}$ je 1,5-2 puta veća od brzine denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$, (ii) za 25% je manja potrošnja kisika u aerobnom stupnju, (ii) za 40% je manja potreba za elektron donorima u

anoksičnom stupnju, (iii) za 20% je manja emisija CO₂, (iv) oko 33-35% je manja proizvodnja mulja u nitrifikaciji i oko 55% u procesu denitrifikacije, (v) manji je volumen reaktora zbog kraćeg hidrauličkog vremena zadržavanja pa time i manji investicijski troškovi. [97,172,180,181,182] Parcijalna nitrifikacija i denitrifikacija tehnički je izvediva i ekonomski pogodna za obradu otpadne vode s niskim omjerom C/N ili visokom koncentracijom NH₄-N [172,183]. Neki od procesa koji primjenjuju parcijalnu nitrifikaciju su: ANAMMOX proces, SHARON proces, kombinacija SHARON-ANAMMOX procesa, OLAND proces i CANON proces.

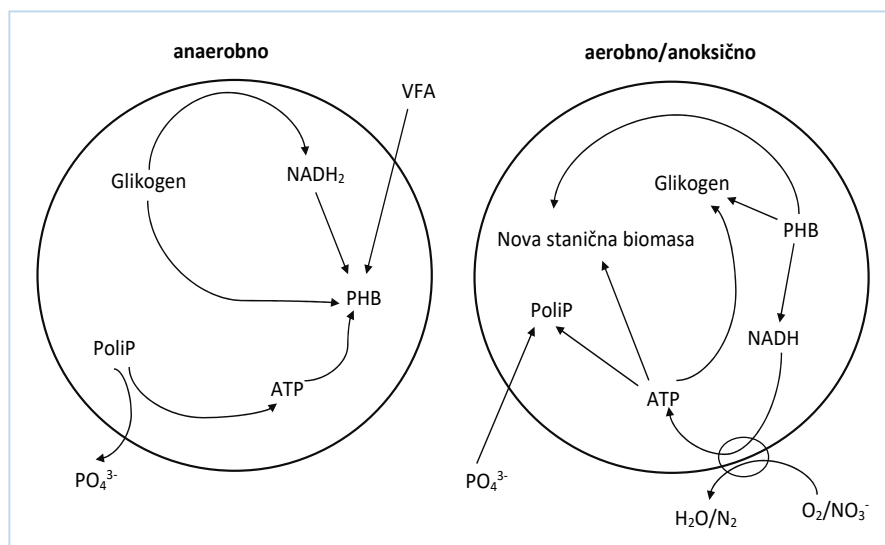
U biološkom uklanjanju dušika djelomična/parcijalna nitrifikacija je od velike važnosti s gledišta operativnih troškova (ovisno o usklađenosti sa zakonodavstvom), a napori i izazovi u razmatranju i straživanju različitih operativnih strategija za održavanje akumulacije nitrita na visokim razinama su vidljivi i prepoznati u brojnim istraživanjima. Novi izazovi koje će trebati razmotriti i prevladati u ovom području istraživanja su primjena napredne automatske kontrole temeljene na simulaciji procesa i praćenju AOB/NOB pomoću molekularnih alata kako bi se postigla stabilna djelomična nitrifikacija na dugoročnoj osnovi. [176]

2.7. Istovremeno uklanjanje N i P procesom denitrificirajuće defosfatacije

Za istovremeno uklanjanje N i P iz otpadnih voda koriste se procesi koji se baziraju na aktivnosti nitrifikanata i denitrifikanata i fosfat akumulirajućih organizama (PAOs). Denitrifikantima je organski ugljik potreban kao donor elektrona za reakcije redukcije NO_x-N do plinovitog dušika, a PAOs-ima za unutarstaničnu pohranu polihidroksialkanoata (PHAs), za otpuštanje fosfata, i potom za unutarstanični unos i pohranu P. U otpadnim vodama koje imaju niski omjer KPK/N može doći do manjka organskog ugljika potrebnog i za denitrifikaciju i za PAOs unos ugljika. [184,185,186,187,188] Primjenom procesa denitrificirajuće defosfatacije (Slika 7), alternative konvencionalnom uklanjanju N i P, problem niske koncentracije raspoloživog organskog ugljika bi mogao biti riješen. [189]

Denitrificirajuća defosfatacija se temelji na aktivnosti denitrificirajućih defosfatirajućih akumulirajućih organizama (DPAOs), koji se mogu podijeliti u dvije skupine [190,191,192,193]:

- I. DPAOs preko NO₃-N, mogu koristiti i O₂ i NO₃-N kao elektron akceptore za uklanjanje P
- II. DPAOs preko NO₂-N, mogu koristiti O₂, NO₃-N i NO₂-N kao elektron akceptor za uklanjanje P



Slika 7. Shematski prikaz metabolizma PAOs u anaerobnim i aerobnim ili anoksičnim uvjetima [189]

Denitrificirajuća defosfatacija u usporedbi s konvencionalnim procesima ima prednosti za 30% manjom potrebom na kisiku i 50% manjom proizvodnjom mulja. Brzina unosa P putem PAOs u anoksičnim uvjetima je općenito manja nego u aerobnim uvjetima, jer je učinkovitost proizvodnje energije PAOs s $\text{NO}_3\text{-N}$ oko 40% manja nego s O_2 kao elektron akceptorom.

Za proces denitrificirajuće defosfatacije značajno je manja potreba na KPK u usporedbi s odvojenim uklanjanjem N i P [186,187,188], što zajedno s uštedom na potrebi na kisiku/aeraciji jer se koristi $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptor elektrona umjesto kisika, čini taj proces ekonomski opravdanim.

Pokazano je da $\text{NO}_2\text{-N}$ inhibira aeroban i anoksičan P unos [186,187,188,194], ali je također pokazano da DPAOs mogu koristiti $\text{NO}_2\text{-N}$ kao elektron akceptor do koncentracije 5-10 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, nakon aklimatizacije. [184,185,195] Aktivnost PAOs inhibirana je i pri niskoj koncentraciji $\text{NO}_2\text{-N}$ [196], 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ uzrokovalo je ozbiljnu inhibiciju aerobnog unosa fosfata a više od 6 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ je rezultiralo skoro potpunom inhibicijom. [194] Aerobni unos fosfata je osjetljiviji na $\text{NO}_2\text{-N}$ od anoksičnog unosa fosfata. $\text{NO}_2\text{-N}$ ima negativan učinak na unos P i formiranje poliP u enzimskom sustavu.

2.8. Endogena denitrifikacija

Strogi zahtjevi za izlaznom kakvoćom obrađene otpadne vode s uređaja za obradu otpadnih voda propisuju dopuštenu koncentraciju ukupnog dušika (TN) $<15 \text{ mg/L}$, za ispušt u površinske vode [15]. Konvencionalne tehnologije biološkog uklanjanja dušika (BNR) temelje se na procesima nitrifikacije i denitrifikacije, koje uključuju procese prednitrifikacije (A/O), anaerobno/anoksično/aerobni proces (A²/O), stupnjevito hranjen anoksično/aerobni proces, anoksično/aerobni SBR (A/O SBR) [2]. Ti procesi imaju i operativne i izvedbene nedostatke za postizanje naprednog uklanjanja N bez dodatka vanjskog izvora ugljika [197]. Tradicionalni proces denitrifikacije provodi se aktivnošću uobičajenih heterotrofnih denitrificirajućih bakterija u anoksičnim ili aerobnim uvjetima.

Organizmi koji nakupljaju glikogen (GAOs), koji mogu apsorbirati i pohraniti organske tvari kao poli- β -hidroksi-alkanoate (PHA) u anaerobnom razdoblju i koristiti akumulirane PHA za ponovnu sintezu glikogena i rast stanica u sljedećem aerobnom razdoblju imaju sposobnost denitrifikacije [198] i igraju važnu ulogu u endogenoj denitrifikaciji (ED) [199]. U sustavima poboljšanog biološkog uklanjanja fosfora (EBPR) GAOs su se smatrali konkurentima organizmima koji akumuliraju fosfate (PAOs) [12,200,201].

U usporedbi s konvencionalnim procesom denitrifikacije, proces ED može u potpunosti iskoristiti izvore ugljika u sirovoj otpadnoj vodi i poboljšati uklanjanje dušika. Endogena denitrifikacija (ED) je karakterizirana korištenjem unutarnjih izvora ugljika za denitrifikaciju. Nekoliko prednosti se ostvaruje u biološkim sustavima za obradu otpadnih voda primjenom endogene denitrifikacije: (i) uklanjanje dušika kada su vanjski izvori ugljika ograničeni, (ii) povećanje ukupne učinkovitosti uklanjanja dušika, i (iii) smanjenje operativnih troškova povezanih s osiguravanjem vanjskih izvora ugljika za denitrifikaciju. Endogena denitrifikacija može biti ograničena dostupnošću unutarstanične organske tvari i čimbenicima poput sastava otpadne vode, temperature i hidrauličkog vremena zadržavanja. Bakterije koje provode endogenu denitrifikaciju posjeduju enzime potrebne za denitrifikaciju i mogu koristiti unutarnje zalihe organske tvari za energiju, a pripadaju različitim rodovima, poput: *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, i drugi. Glavni unutarnji izvori ugljika za biološku denitrifikaciju su unutarstanični polimeri, polihidroksialkanoati (PHA) i glikogen, koji nastaju tijekom različitih bioloških procesa, poput anaerobne fermentacije organskih tvari. Ključno za poticanje endogene denitrifikacija su uvjeti niske koncentracije otopljenog kisika ili anaerobni uvjeti, kao i prisutnost nitrata/nitrita i unutarnjih izvora ugljika [9].

GAOs ima sposobnost asimilacije izvora ugljika koji se mogu pohraniti i kao polihidroksialkanoati (PHA) i kao glikogen [202]. GAOs poboljšano uzimaju ugljik pri omjeru KPK/N 100 ili bez prisustva N, a doziranje N do omjera KPK/N 60 ili više demonstrira strategiju kontroliranja prekomjernog rasta GAOs u sustavima obrade otpadne vode s visokim KPK [203]. Učinak omjera C:P na proliferaciju GAOs je pokazao da su niži omjeri C:P izazvali pomak u mikrobnj zajednici, smanjujući populaciju GAOs. GAOs se obogaćuje u reaktorima laboratorijskih razmjera pri uvjetima visokog omjera COD:P [204,205].

U obradi otpadne vode niskog omjera C/N ključni čimbenik je balansiranje između DGAOs i DPAOs vrsta za postizanje poboljšanog uklanjanja N i P, odnosno stabilnog i učinkovitog uklanjanja N i P [206].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Aktivni mulj

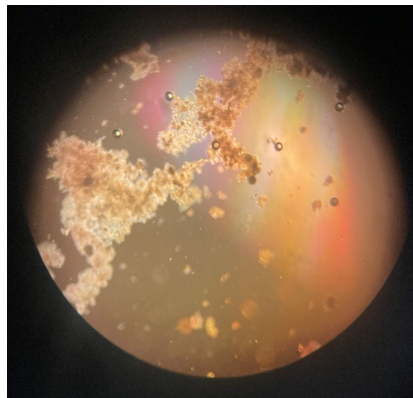
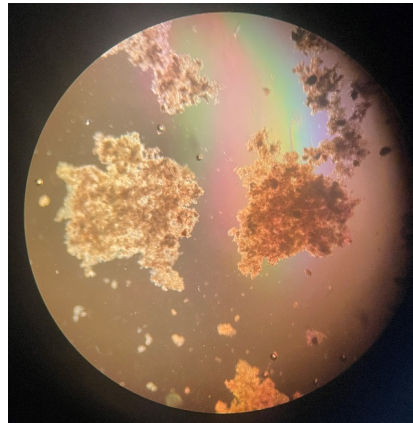
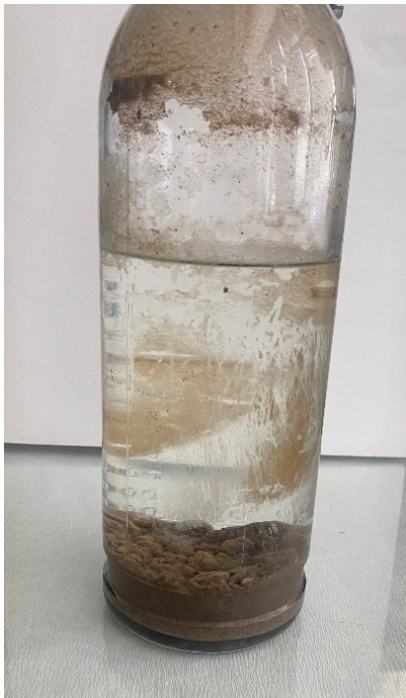
Aktivni mulj s lokalnog uređaja za obradu otpadnih voda nakon prilagodbe za uklanjanje sastojaka s dušikom (N) uporabljen je u pokusima uklanjanja dušika iz otpadne vode procesom denitrifikacije, nitrifikacije, istovremene nitrifikacije i denitrifikacije, parcijalne nitrifikacije i denitrifikacije, i endogene denitrifikacije, a nakon umnažanja fosfor akumulirajućih organizama (PAOs) i denitrificirajućih glikogen akumulirajućih organizama (DGAOs) uporabljen je u pokusima istovremene denitrifikacije i uklanjanja P.

Pokusi uklanjanja N provedeni su s ciljem da se ovisno o procesnim čimbenicima – koncentraciji otopljenog kisika, koncentraciji mikrobne biomase, početnoj koncentraciji $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ i raspoloživoj koncentraciji organskih sastojaka – omjeru C/N kao vanjskom dodanom izvoru ugljika (natrijev acetat) i unutarstanično pohranjenom/skladištenom ugljiku odredi minimalni omjer C/N za proces denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$, brzina denitrifikacije, limitirajući čimbenici procesa denitrifikacije, nitrifikacije i denitrificirajuće defosfatacije, odnosno kapacitet mikrobne kulture denitrifikanata za uklanjanje N i mikrobna raznolikost u ciljanim mikrobnim procesima, kao i učinak produžene anoksične faze za odvijanje endogene denitrifikacije.

Također, kroz mikrobne reakcije, kao rezultat mikrobnih aktivnosti, istaknut će se kompeticija za kisik između uobičajenih heterotrofa (OHOs), nitrifikanata (AOB i NOB vrsta), i aerobnih denitrifikanata, za organske sastojke – izvor ugljika kao donore elektrona između OHOs, denitrifikanata, fosfat akumulirajućih organizama (PAOs)/denitrificirajućih fosfat akumulirajućih organizama (DPAOs) i glikogen akumulirajućih organizama (GAOs), i denitrificirajućih glikogen akumulirajućih organizama (DGAOs).

Procesni čimbenici utječu i na zastupljenost i aktivnost funkcionalnih mikroorganizama za ciljani mikrobni proces. FISH metodom u aklimatiziranom mulju dokazani su funkcionalni mikroorganizmi: amonijak oksidirajuće bakterije (AOB), nitrit oksidirajuće bakterije NOB), denitrifikanti, PAOs, DPAOs i DGAOs.

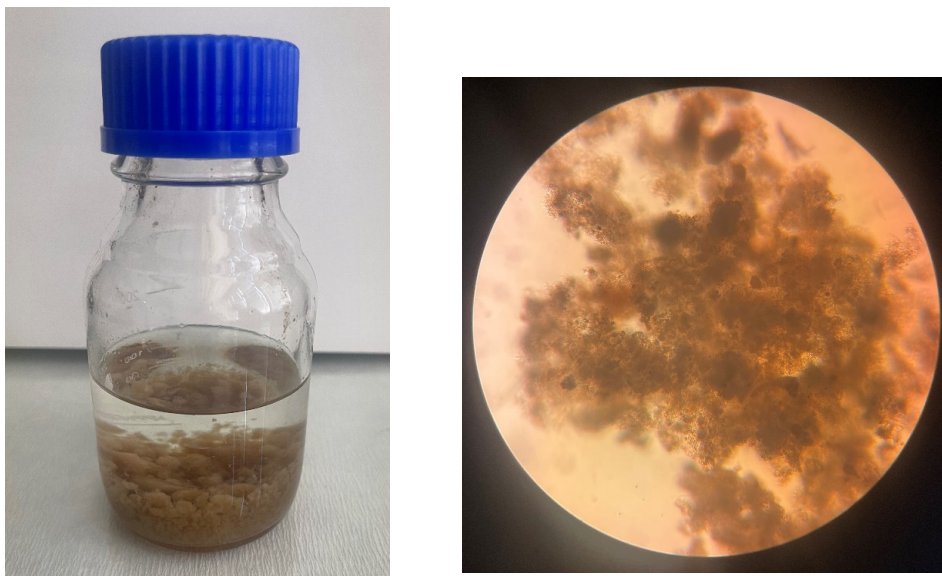
Aktivni mulj prilagođen za uklanjanje N (Slika 8) je imao karakteristike dobrog i brzog taloženja, a uobičajeno nakon denitrifikacije, u mirovanju, bio je flotiran djelomično ili u potpunosti (Slika 9). Mikroskopski izgled aktivnog mulja iz procesa denitrifikacije prikazan je slikom 10.



Slika 8. Izgled i mikroskopski izgled aktivnog mulja aklimatiziranog za uklanjanje N, uporabljenog u pokusima disertacije (svjetlosni mikroskop, P 100X)



Slika 9. Aktivni mulj iz pokusa denitrifikacije



Slika 10. Izgled i mikroskopski izgled aktivnog mulja iz procesa denitrifikacije (svjetlosni mikroskop, P 400X)

3.1.2. Modelna otpadna voda, donori elektrona – izvor ugljika i akceptori elektrona – $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$

Modelna otpadna voda – sintetska otpadna voda priređena je otapanjem soli u vodovodnoj vodi: 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 g/L KH_2PO_4 ; 0,4 g/L FeSO_4 ; 0,5 g/L MgSO_4 ; 0,4 g/L NaCl ; 1 g/L MgCO_3 ; 1 g/L CaCO_3 . Nakon 24 sata stajanja pri sobnoj temperaturi modelna otpadna voda filtrirana je kroz filter papir veličine pora 0,45 μm i korištena tijekom prilagodbe mulja na uklanjanje N u pokusima nitrifikacije, a kao nitrificirana otpadna voda u pokusima denitrifikacije uz dodatak izvora ugljika (natrijeva acetata) u odgovarajućoj količini za željeni omjer C/N. Za ugađanje pH tijekom nitrifikacije uporabljena je 2M NaOH.

Pokusi denitrifikacije i uklanjanja P provedeni su uz ciljani supstrat kao izvor nitrata, nitrita i fosfata, dodavanjem odgovarajućeg volumena priređenih otopina soli u vodovodnoj vodi, i to KNO_3 , NaNO_2 , i KH_2PO_4 .

Kao izvor ugljika uporabljen je natrijev acetat, dodan u odgovarajućoj količini za odabrani ciljani omjer C/N.

U pokusima prilagodbe mulja za uklanjanje N i uklanjanja N i P je dodano i 1mL/L otopine elemenata u tragovima: EDTA 10 g/L, FeCl_3 1,5 g/L, H_3BO_3 0,15 g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,06 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12 g/L, KI 0,18 g/L.

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparati uporabljeni u izradi disertacije prikazani su u tablici 4, a kemikalije u tablici 5.

Tablica 4. Aparati uporabljeni u izradi disertacije

Aparat	Proizvođač
Bioreaktori (pleksiglas)	izrađeni po narudžbi
Kompresor	HIBLOW HP 40, Njemačka
Mjerač protoka zraka	
Kisikova elektroda i mjerni aparat	WTW FDO 925; Multi 3420 SET KS1, Njemačka
pH elektroda i mjerni aparat	SenTix 940-3; Multi 3420 SET KS1, Njemačka
Magnetska mješalica	Thermo Scientific, Super-Nuova, Švicarska
Peristaltička crpka	
Spektrofotometar	Spectroquant VEGA 400 Merck, Njemačka
Fotometar	SQ200 Merck, Njemačka
Centrifuga	Beckman, Njemačka
Konfokalni laser skenirajući mikroskop	Leica, Švicarska
Svjetlosni mikroskop	Carl Zeiss Jena, Njemačka; Meiji, Japan
KPK reaktor	HACH COD Reactor, Njemačka
Termo blok	Thermoreactor TR 300, Merck, Njemačka
Određivanje suhe tvari, vlagomjer	KERN MLS-D, Njemačka
Vakuum sustav filtracije	Sartorius, Hrvatska
Vodena kupelj	Hum Aqua 5, Njemačka
Analitička vaga	METTLER AJ150, Švicarska
Vortex	BIOSAN, Njemačka
Autoklav	Inako, Njemačka
Termostat	Sutjeska, Jugoslavija
Hladnjak	Electrolux, Njemačka
Sterilizator	Instrumentaria, Njemačka

U provedbi disertacije, organizaciji i provedbi pokusa i analitičkih metoda uporabljen je i sitni laboratorijski materijal i pribor, poput: laboratorijske čaše, lijevci, stakleni štapići, kivete, filter papiri, pipete, propipete, automatske birete, i ostali laboratorijski pribor.

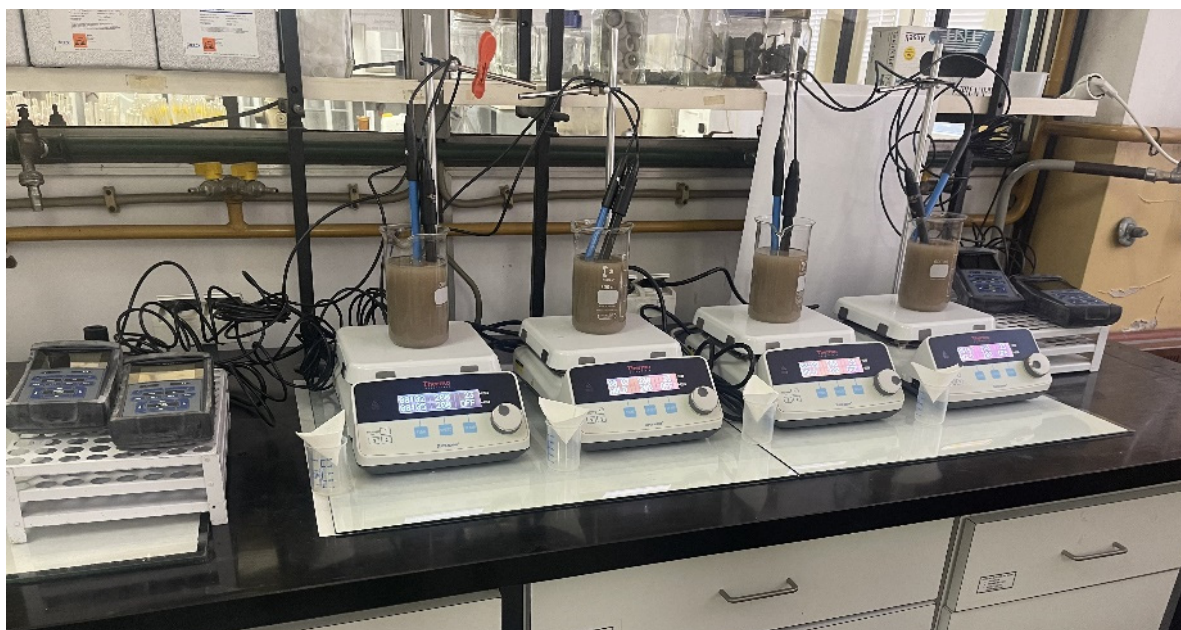
Tablica 5. Kemikalije uporabljene u izradi disertacije

Kemikalija	Proizvođač
$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	GRAM-MOL
NaNO_2	Merck
KNO_3	Merck
KH_2PO_4	Merck
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck
H_2SO_4	GRAM-MOL
HCl	Merck
NaOH	Kemika
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Kemika
HgSO_4	Kemika
Ag_2SO_4	Kemika
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Kemika
1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat	Kemika
KCl	Alkaloid
CaCO_3	Kemika
MgCO_3	Kemika
MgSO_4	Merck
Na_2HPO_4	Fisher Scientific
NaCl	Merck
$\text{K-Na-C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$	GRAM-MOL
NaH_2PO_4	Merck
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck
NH_4Cl	Merck
K_2HPO_4	Kemika
Nesslerov reagens	Kemika
DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol)	BioChemica
Etanol	Kemika
Formamid	Merck
Imerziona ulje	Merck
Krisiodin	SIGMA-ALDRICH
Kristal violet	SIGMA-ALDRICH
Metilen plavo	SIGMA-ALDRICH
Nile Blue	Merck
Octena kiselina	Merck
Paraformaldehid	Merck
Probe FISH	GOREA PLUS
ProLong Gold antifade mountant	Biosistemi
SDS (natrijev dodecil-sulfat)	Merck
Tris/HCl	Merck
NaNO_2	Merck

3.1.3.1. Aparatura za pokuse denitrifikacije

Pokusi denitrifikacije provedeni su kao diskontinuirani, u laboratorijskim čašama volumena 800 mL, radnog volumena 600 mL, postavljenim na magnetske mješalice, pri 200 o/min pri čemu su osigurani i održavani anoksični uvjeti (Slika 11).

U laboratorijske čaše postavljene su elektrode za mjerenje koncentracije otopljenog kisika, pH i temperature koji su neprekidno motreni u svi pokusima. Pokusi denitrifikacije istraženi su uz akceptor elektrona $\text{NO}_2\text{-N}$ ili $\text{NO}_3\text{-N}$ osigurani dodatkom vodene otopine soli NaNO_2 ili KNO_3 u odgovarajućoj količini i uz izvor ugljika odnosno donor elektrona natrijev acetat dodan u odgovarajućoj količini za ciljani omjer C/N. Za analitičko motrenje tijeka mikrobnih reakcija u procesu denitrifikacije u određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci koji su profiltrirani i u alikovotu je određivana koncentracija KPK, $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$. Određenom dinamikom uziman je i uzorak za određivanje koncentracije mikrobne biomase izražene kao MLSS. Kakvoća mulja motrena je i mikroskopiranjem, kao i uzimanjem uzoraka za FISH analizu. Svi pokusi provedni su u 3 ponavljanja a rezultati predstavljaju srednju vrijednost $\pm$ standardna devijacija.



Slika 11. Aparatura uporabljena za šaržne pokuse denitrifikacije i istovremene denitrifikacije i uklanjanja fosfora pri anoksičnim uvjetima

3.1.3.2. Aparatura za pokuse istovremene denitrifikacije i uklanjanja P u anoksičnom uvjetu i u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju

Pokusi istovremene denitrifikacije i uklanjanja P u anoksičnom uvjetu provedeni su kao diskontinuirani u laboratorijskim čašama volumena 600 mL, radnog volumena 400 mL, postavljenim na magnetske mješalice, pri 100 o/min (Slika 11).

Pokusi u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju provedeni su kao diskontinuirani, u laboratorijskim čašama volumena 1000 mL radnog volumena 600 mL postavljenim na magnetske mješalice, pri 200 o/min za anoksične uvjete i uz prozračivanje putem kompresora preko sintera postavljenog pri dnu čaše za aerobne uvjete, a anaerobni uvjeti ostvareni su propuhivanjem s dušikom.

Uzorkovanje je provedeno u određenim vremenskim intervalima i analitički je određivano, ovisno o ciljanom pokusu, KPK, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, PHA i povremeno MLSS.

3.1.3.3. Aparatura za pokuse autotrofne i heterotrofne nitrifikacije, parcijalne nitrifikacije i istovremene nitrifikacije i denitrifikacije

Nitrifikacija (autotrofna i heterotrofna) i parcijalna nitrifikacija (nitrificacija), su istražene u diskontinuiranim pokusima, u staklenoj boci radnog volumena 1,2 L, u aerobnim uvjetima ostvarenim upuhivanjem zraka preko kompresora i filtera za zrak preko difuzora smještenog pri dnu boce (Slika 12). Odabirom procesnih čimbenika favoriziran je proces parcijalne nitrifikacije (nitrificacije), odnosno nitratacije (potpune nitrifikacije), odnosno istovremene nitrifikacije i denitrifikacije. Pokusi su provedeni uz stalno motrenje pH, DO i temperature očitanjem vrijednosti na zaslonu mjernih aparata određeno putem elektroda za mjerenje pH, DO i temperature uronjenih u miješanu tekućinu. Za željenu koncentraciju $\text{NH}_4\text{-N}$ dodana je odgovarajuća količina modelne otpadne vode, a za pokuse uz izvor ugljika dodana je određena količina natrijeva acetata za željeni omjer C/N. Tijek bioloških procesa motren je uzorkovanjem određenom dinamikom te analitičkim određivanjem KPK, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ i ukupnog dušika, kao i koncentracija mikrobne biomase izražena kao MLSS. Pokusi su provedeni u 3 ponavljanja a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija.



Slika 12. Aparatura za pokuse nitrifikacije

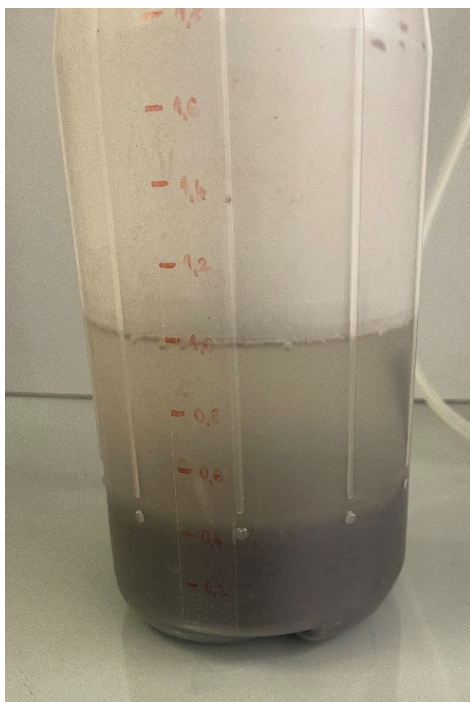
3.2. Metode rada

3.2.1. Prilagodba aktivnog mulja za uklanjanje sastojaka s N

Prilagodba aktivnog mulja s lokalnog uređaja za biološku obradu otpadnih voda za uklanjanje sastojaka s dušikom provedena je u laboratorijskom reaktoru radnog volumena 6 L, naizmjeničnim pokusima nitrifikacije u aerobnim uvjetima i denitrifikacije u anoksičnim uvjetima. Nitrifikacija je provedena u aerobnim uvjetima pri koncentraciji otopljenog kisika ≥ 2 mg/L, ostvareno upuhivanjem zraka iz kompresora kroz filter za zrak i mjerač protoka zraka preko difuzora smještenog pri dnu bioreaktora. Nakon završene nitrifikacije isključena je aeracija i dodan je izvor ugljika (natrijev acetat) te je uključena mehanička mješalica postavljena u reaktor, pri 300 o/min, koja je imala uloga miješanja miješane tekućine u reaktoru i ostvarivanje i održavanje anoksičnih uvjeta ($DO \sim 0,5$ mg/L). U reaktor su postavljene kisikova i pH elektroda za stalno mjerenje vrijednosti otopljenog kisika, temperature i pH. U određenim vremenskim razmacima uzimani su uzorci za analize, te profiltrirani preko filter papira veličine pora $0,45 \mu m$, te je određivana aktivnost mikrobne kulture aktivnog mulja za uklanjanje N procesima nitrifikacije i denitrifikacije tijekom prilagodbe.

Mulj prilagođen za uklanjanje N uporabljen je u šaržnim pokusima denitrifikacije, endogene denitrifikacije, autotrofne i heterotrofne nitrifikacije, parcijalne nitrifikacije i istovremene nitrifikacije i denitrifikacije.

U kraćim periodima neprovođenja pokusa miješana tekućina – suspenzija aktivnog mulja i modelne otpadne vode, nakon pokusa nitrifikacije, je pospremljena u hladnjak pri +4 °C, te kod ponovnog uspostavljanja pokusa spontano temperirana uz prozračivanje. Puna aktivnost je bila ponovno uspostavljena nakon cca 7-10 dana pokusa nitrifikacije i denitrifikacije. U periodu dugotrajnijeg stajanja kulture u mirovanju pri +4 °C (Covidom nametnute aktivnosti), kultura je pospremljena u hladnjak “pod nitratom” (nakon pokusa nitrifikacije) i uslijed dugog stajanja je potamnila (Slika 13), no nakon prolagodbe tijekom 30 dana uspostavljena je puna aktivnost mikrobne kulture.



Slika 13. Izgled mulja nakon dugotrajnijeg stajanja/pohrane u hladnjaku pri +4 °C

3.2.2. Aktivni mulj za pokuse istovremene denitrifikacije i uklanjanje fosfora pri anoksičnim uvjetima – umnažanje PAOs/DPAOs

U SBR reaktoru radnog volumena 3 L, u 24 satnom ciklusu uz cca 12 sati anoksičnih i 12 sati aerobnih uvjeta tijekom 6 mjeseci priređen je aktivni mulj za pokuse istovremene denitrifikacije i uklanjanja P – obogaćivanje mulja s PAOs/DPAOs. Mulj je tijekom obogaćivanja mulja s PAOs/DPAOs bio izložen uvjetima obilja i gladi, uz natrijev acetat kao izvor ugljika i NO₂-N/NO₃-N kao elektron akceptore.

Sustav SBR je potom prilagođen za rad u 3 ciklusa (8-satni): 3 sata anoksični uvjeti, 4,5 sata aerobni uvjeti, 0,5 h taloženje i dekantiranje, tijekom 4 mjeseca.

Mulj obogaćen PAOs/DPAOs vrstama uporabljen je u šaržnim pokusima istovremene denitrifikacije i uklanjanja P pri anoksičnim uvjetima uzet iz roditeljskog reaktora pri ustaljenom stanju vođenja procesa.

3.2.3. Aktivni mulj za pokuse u anaerobno/aerobno/anoksičnom režimu uz endogenu denitrifikaciju

Anaerobno/aerobno/anoksični proces uz endogenu denitrifikaciju vođen je u SBR-u radnog volumena 3 L, pri dva režima rada (1 h anaerobno, 1 h aerobno, 5 h anoksično, 1 h taloženja i dekantiranja, i 1 h anaerobno, 2 h aerobno, 4 h anoksično i 1 h taloženja i dekantiranja), tijekom 8 mjeseci.

Anaerobni uvjeti osigurani su propuhivanjem s dušikom započeto cca 10 min prije početka hranjenja, aerobni uvjeti su osigurani propuhivanjem zraka iz kompresora preko filtera za zrak i mjerača protok zraka i difuzora na dnu bioreaktora, a anoksični uvjeti isključivanjem aeracije i miješanjem sadržaja u reaktoru.

Mulj priređen u anaerobno/aerobno/anoksičnim režimu vođenja pri ustaljenom stanju vođenja procesa uporabljen je u šaržnim pokusima uklanjanja N i P u anaerobno/aerobno/anoksičnim procesu uz endogenu denitrifikaciju.

3.2.4. Dizajn pokusa nitrifikacije do $\text{NO}_3\text{-N}$ i parcijalne nitrifikacije do $\text{NO}_2\text{-N}$, i pokusa istovremene nitrifikacije i denitrifikacije

Pokusi autotrofne nitrifikacije, heterotrofne nitrifikacije (istovremene nitrifikacije i denitrifikacije) i parcijalne nitrifikacije provedeni su kao šaržni u staklenim bocama radnog volumena 1,2 L u koje je dodan aktivni mulj prilagođen za uklanjanje N i modelna otpadna voda, te je pri ≥ 2 mg DO/L vođen pokus nitrifikacije, odnosno pri oko 1 mg DO/L i pH oko 8,0 pokus nitrificacije – parcijalne nitrifikacije, i pri 0,3-0,8 mg DO/L pokusi istovremene nitrifikacije i denitrifikacije uz dodatak i izvora ugljika.

Odabrani pH održavan je dodavanjem 2M NaOH ili 2M HCl.

3.2.5. Dizajn pokusa denitrifikacije

Pokusi denitrifikacije uz vanjski izvor ugljika provedeni su kao šaržni pri anoksičnim uvjetima (pri $\text{DO} \leq 0,5$ mg/L) koji su ostvareni miješanjem suspenzije aktivnog mulja i vodene otopine

nitrata ili nitrita u laboratorijskim čašama radnog volumena 600 mL postavljenim na magnetske mješalice pri 200 o/min. Suspenziji aktivnog mulja ovisno o ciljanom pokusu dodana je odgovarajuća količina priređenih vodenih otopina KNO_3 ili NaNO_2 ovisno o početnoj koncentraciji $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ i odgovarajuća količina $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ za odabrane početne omjere C/N.

Pokusi endogene denitrifikacije provedeni su kao šaržni, produženjem trajanja anoksičnih uvjeta nakon iscrpljivanja dodanog izvora ugljika za denitrifikaciju $\text{NO}_x\text{-N}$, uz daljnju denitrifikaciju $\text{NO}_2\text{-N}$ i/ili $\text{NO}_3\text{-N}$ uz unutarstanične zalihe ugljika.

Biomasa za pokuse denitrifikacije je prana vodovodnom vodom u 4 ponavljanja da se izbjegne eventualni učinak nusprodukata i proizvoda prethodnih pokusa nitrifikacije/denitrifikacije.

Istraženi su pokusi denitrifikacije $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ s ciljem određivanja minimalno potrebnog omjera C/N za učinkovitu denitrifikaciju, uloge unutarstaničnih izvora C za denitrifikaciju, kao i učinka procesnih čimbenika na aktivnost mikrobne kulture za denitrifikaciju.

3.2.6. Dizajn pokusa istovremene denitrifikacije i uklanjanja P pri anoksičnim uvjetima

Istovremena denitrifikacija i uklanjanje P pri anoksičnim uvjetima, provedeni su kao šaržni s aktivnim muljem iz roditeljskog SBR-a u kojem je priređen aktivni mulj obogaćen s PAOS/DPAOS vrstama uz $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptore elektrona, uzet pri ustaljenom stanju vođenja reaktora. Pokusi su provedeni u laboratorijskim čašama od 600 mL radnog volumena 400 mL pri 100 o/min. U laboratrijske čaše je dodan mulj iz roditeljskog SBR i izvori $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ i ugljika za ciljane odabrane omjere N/P i C/N, dodavanjem otopina NaNO_2 , KH_2PO_4 i odvagom natrijeva acetata.

3.2.7. Dizajn pokusa uklanjanja N i P u anaerobno/aerobno/anoksičnom pokusu uz endogenu denitrifikaciju

Pokusi uklanjanja N i P u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju provedeni su kao diskontinuirani sa aktivnim muljem iz roditeljskog SBR-a vođenog u anaerobno/aerobno/anoksičnom režimu, uzetom pri ustaljenom stanju vođenja procesa, pri dva režima rada (1 h anaerobno, 1 h aerobno, 5 h anoksično i 1 h anaerobno, 2 h aerobno i 4 h anoksično), u laboratorijskim čašama od 1000 mL radnog volumena 600 mL, pri 200 o/min. U laboratorijske čaše dodan je aktivni mulj i na početku anaerobne faze procesa izvor C i $\text{NH}_4\text{-N}$ kao modelna otpadna voda. Anaerobni uvjeti osigurani su propuhivanjem s dušikom započeto

cca 10 min prije dodavanja izvora N i C. Slijedni aerobni uvjeti osigurani su upuhivanjem zraka iz kompresora preko sintera postavljenog pri dnu čaše, a slijedni anoksični uvjeti isključivanjem aeracije i uključivanjem magnetske mješalice.

Dinamika mikrobnih promjena motrena je određivanjem KPK, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$, PHA, i mjerenjem pH, DO i temperature u određenim vremenskim intervalima.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Određivanje nitrata

Određivanje nitrata, $\text{NO}_3\text{-N}$, provedeno je spektrofotometrijski sa kivetnim testom Merck Spectroquant 1.14773. Metoda se temelji na reakciji nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline uz nastanak nitro spoja koji je crvene boje i određuje se fotometrijski.

Postupak: U staklenu kivetu dodati 1,5 mL uzorka (prethodno profiltriranog i po potrebi razrijeđenog s destiliranom vodom do koncentracijskog raspona metode) i 1 žličicu $\text{NO}_3\text{-1}$ reagensa. Kivetu dobro zatvoriti, miješati dok se reagens ne otopi u uzorku. Potom dodati 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, dobro zatvoriti kivetu, pažljivo promiješati. Nakon 10 min odvijanja reakcije očitava se apsorbanca u fotometru.

3.3.2. Određivanje nitrita

Određivanje nitrita, $\text{NO}_2\text{-N}$, provedeno je pomoću Merck Spectroquant 1.14776 seta. Metoda se temelji na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom uz nastanak diazonijeve soli, koja reagira s N-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorom i tvori crveno-ljubičastu azo boju. Obojenje se mjeri fotometrijski. Metoda je analogna EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500- $\text{NO}_2\text{-B}$, i EN 26 777.

Postupak: U staklenu kivetu otpipetirati 5 mL uzorka (prethodno profiltriranog i po potrebi razrijeđenog s destiliranom vodom do koncentracijskog raspona metode) i dodati 1 žličicu $\text{NO}_2\text{-1}$ reagensa. Kivetu zatvoriti i miješati dok se reagens ne otopi u uzorku. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena izmjeri se apsorbanca u fotometru.

FA i FNA su računati prema Anthonisen i sur. (1976), jednadžbe {9} i {10}

$$\text{FA kao NH}_3 \left(\frac{\text{mg N}}{\text{L}} \right) = \frac{\text{ukupni amonijak kao N (mg/L)} \times 10^{\text{pH}}}{\frac{6344}{e^{273+T(^{\circ}\text{C})} + 10^{\text{pH}}}} \quad \{9\}$$

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

3.3.3. Određivanje amonijakalnog dušika

Amonijakalni dušik, $\text{NH}_4\text{-N}$, određivan je metodom po Nessleru, i spektrofotometrijski primjenom Merck Spectroquant seta. Nesslerov reagens u prisustvu $\text{NH}_4\text{-N}$ daje žuto do žuto smeđe obojenje uzorka ovisno o količini prisutnog $\text{NH}_4\text{-N}$, a intenzitet obojenja se određuje pri valnoj duljini 425 nm, te očita vrijednost iz baždarnog dijagrama.

Baždarni dijagram načinjen je određivanjem absorbancijskih vrijednosti pri 425 nm za poznate koncentracije standardne otopine NH_4Cl .

Postupak Nesslerova metoda: U odmjernu tikvicu od 50 mL staviti 50 mL filtriranog uzorka, razrijeđenog po potrebi, i 2 kapi K-Na-tartarata. Promiješati, dodati 1 mL Nesslerovog reagensa, promiješati. Nakon 10 min mjeriti absorbancu pri 425 nm.

3.3.4. Određivanje ukupnog dušika

Ukupni dušik, N_{total} , određivan je pomoću Merck Spectroquant 1.14763 seta. Prema Koroleff-ovoj metodi organski i anorganski dušikovi spojevi u reakciji s oksidirajućim reagensom u termoreaktoru prevode su u nitrat. U otopini zakiseljenoj sumpornom i fosforom kiselinom, nitrati reagiraju s 2,6-dimetilfenolom (DMP) i tvore 4-nitro-2,6-dimetilfenol koji se određuje fotometrijski.

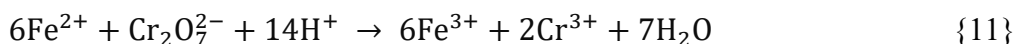
Digestija je analogna EN ISO 11905-1, a određivanje nitrata je analogno ISO 7890/1.

Postupak: U praznu kivetu otpipetirati 9 mL destilirane vode, 1 mL prethodno profiltriranog i po potrebi razrijeđenog uzorka, te promiješati. Dodati 1 žličicu reagensa N-1K i promiješati. Potom dodati 6 kapi reagensa N-2K, dobro zatvoriti kivetu, promućkati i sadržaj spaljivati (digestirati) jedan sat pri 120 °C. Nakon spaljivanja sadržaj kivete ohladiti pri sobnoj na sobnu temperaturu. Nakon 10 minuta sadržaj kivete promućkati. U reakcijsku kivetu otpipetirati 1 mL ohlađenog spaljenog/digestiranog uzorka (koristiti bistri supernatant ili filtrat u slučaju mutnoće ili taloga). dodati 1 mL reagensa N-3K, zatvoriti kiveta i dobro promućkati. Nakon 10 minuta reakcijskog vremena očitati apsorbancu u spektrofotometru, odnosno koncentraciju u mg/L.

3.3.5. Određivanje kemijske potrošnje kisika

Kemijska potrošnja kisika (KPK) predstavlja količinu oksidansa (kalijeva bikromata, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) potrebnog za oksidaciju organskih sastojaka u vodi. Izražava se u mg O_2/L . $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ oksidira 95-100% prisutnih organskih sastojaka, a ne može oksidirati amonijak, pirol i derivate piridina,

te neke ugljikovodike poput benzena i njegovih homologa. Za potpunu oksidaciju organskih spojeva koji se teže oksidiraju, poput octene kiseline, alkohola, aminokiselina, dodaje se srebro-sulfat (Ag_2SO_4) kao katalizator reakcije. Za sprečavanje oksidacije nekih anorganskih spojeva, poput klorida, dodaje se živin sulfat (HgSO_4). Višak kalijeva bikromata preostao nakon oksidacije titrira se otopinom feroamonijeva sulfata (FAS) $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$, prikazano jednačom {11}.



Zbog nestabilnosti otopine feroamonijeva sulfata potrebno je odrediti faktor otopine titracijom standardne otopine kalijeva bikromata s feroamonijevim sulfatom, prije određivanja KPK. Faktor otopine (f) je omjer volumena otopine $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HgSO}_4$ i otopine $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Priprema se tako da se u staklenu kivetu otpipetira 2 mL destilirane vode i doda 1,2 mL otopine kalijeva bikromata + HgSO_4 i 2,8 mL otopine $\text{Ag}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$. Staklena kiveta se pažljivo zatvori, promiješa i stavi na tamno mjesto da se ohladi. Uzorak se potom titrira otopinom FAS uz dodatak feroin indikatora do promjene boje iz narančasto/smeđe u tirkizno plavo/zelenu te iz tirkizno plavo/zelene do smeđe/crvene. Faktor otopine se računa prema jednačbi {12}.

$$f = \frac{1,2}{V_{\text{fas}}} \quad \{12\}$$

gdje je:

1,2 - volumen (mL) otopine $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HgSO}_4$

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

Postupak: U staklenu kivetu otpipetirati 2 mL uzorka, dodati 1,2 mL otopine $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{HgSO}_4$ i 2,8 mL otopine $\text{Ag}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$. Staklenu kivetu dobro zatvoriti, promućkati sadržaj, te i promućka spaljivati (digestirati) u termoreaktoru pri 150 °C sat vremena. Kiveta se potom stavlja na tamno mjesto da se sadržaj ohladi na sobnu temperaturu. Ohlađeni uzorak titrira se otopinom FAS ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) uz feroin kao indikator do promjene boje iz narančasto/smeđe u tirkizno plavo/zelenu te iz tirkizno plavo/zelene u smeđe/crvenu (ponovno vraćanje tirkizne boje nakon kraćeg vremena je prihvatljivo).

Slijepa proba se priprema isto kao uzorak, jedina je razlika što se umjesto 2 mL uzorka dodaje 2 mL destilirane vode.

KPK vrijednost se računa prema jednadžbi {13}.

$$\text{KPK} \left[\frac{\text{mgO}_2}{\text{L}} \right] = \frac{(V_{\text{FAS(SP)}} - V_{\text{FAS(UZ)}}) \times c \times f \times 8000}{V_{\text{uzorka}}} \quad \{13\}$$

gdje je:

$V_{\text{FAS(SP)}}$ – volumen [mL] FAS utrošen za titraciju slijepe probe

$V_{\text{FAS(UZ)}}$ – volumen [mL] FAS utrošen za titraciju uzorka

c – koncentracija FAS (0,1 mol/L)

f – faktor otopine FAS

3.3.6. Određivanje MLSS

Koncentracija mikrobne biomase određivana je kao ukupne suspendirane čestice u miješanoj tekućini (MLSS), gravimetrijskom metodom, sušenjem pri 105 °C do konstantne mase.

Postupak: Poznati volumen uzorka uzet tijekom aeracije (homogeni uzorak suspenzije aktivnog mulja), filtrira se preko filter papira (stakleni filter papir, Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, Njemačka) poznate mase, te suši pri 105 °C do konstantne mase, hladi, te se odredi masa filter papira i taloga. MLSS se izražava u g/L, a izračunava prema jednadžbi {14}.

$$\text{MLSS} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] = \frac{m_{\text{om}} - m_{\text{f}}}{\text{mL uzorka}} \times 1000 \quad \{14\}$$

gdje je:

m_{om} [g] = masa osušenog aktivnog mulja i filter papira

m_{f} [g] = masa čistog filter papira

3.3.7. Određivanje koncentracije fosfata

Za potencijalne pokuse denitrifikacije u funkciji uklanjanja P u denitrificirajućoj defosfataciji u EBPR procesu onda treba odrediti i $\text{PO}_4\text{-P}$.

Fosfat u obliku ortofosfata ($\text{PO}_4\text{-P}$) određivan je primjenom Merck Spectroquant 1.14842 seta. Metoda se temelji na reakciji iona ortofosfata s amonijevim vanadatom i amonijevim heptamolibdatom pri čemu nastaje žuto obojeni molibdovanadat fosforna kiselina čija koncentracija se određuje fotometrijski.

Metoda je analogna APHA 4500-P C.

Postupak: U staklenu kivetu otpipetirati 5 mL profiltriranog i po potrebi s destiliranom vodom razrijeđenog uzorka do koncentracijskog raspona metode, te dodati 1,2 mL PO₄-1 reagensa. Kivetu dobro zatvoriti, promiješati sadržaj, te nakon 10 minuta reakcijskog vremena izmjeriti apsorbanacija u fotometru ili koncentraciju u mg/L.

3.3.8. Određivanje pH vrijednosti

Vrijednost pH mjerena je uporabom pH-metra WTW 330i i pH elektrode SenTix41 (WTW, Njemačka), kao i primjenom mjernog aparata Multi Set KS1 (Merck, Njemačka).

Tijekom pokusa pH elektroda je bila uronjena u miješanu tekućinu u bioreaktoru. Svakodnevno je prije mjerenja pH vrijednosti provođeno umjeravanje elektrode uranjanjem u pufer otopinu s pH 4 i 7, prema uputama proizvođača. Nakon završetka mjerenja, elektroda se ispre destiliranom vodom te čuva u otopini elektrolita, zasićenoj otopini kalijeva klorida.

3.3.9. Određivanje temperature

Temperatura je tijekom procesa mjerena pomoću temperaturnog senzora s kisikove elektrode (WTW Oxi3210 i DurOx, Merck, Njemačka) i pH elektrode (WTW 330i i SenTix41, Merck Njemačka), ili primjenom mjernog aparata Multi Set KS1 (Merck, Njemačka), očitavanjem vrijednosti sa zaslona mjernog aparata.

3.3.10. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Koncentracija otopljenog kisika mjerana je primjenom kisikove elektrode DurOx i mjerača otopljenog kisika WTW Oxi3210 (Merck, Njemačka), ili primjenom mjernog aparata Multi Set KS1 (Merck, Njemačka). Instrument je prije upotrebe umjeren prema uputama proizvođača. Elektroda je tijekom trajanja procesa bila uronjena u mješanu tekućinu u bioreaktoru, a vrijednost koncentracije otopljenog kisika kao mg/L ili %zasićenja je prikazana na zaslonu mjernog uređaja.

3.3.11. Određivanje polihidroksialkanoata

Polihidroksialkanoati (PHA) su određivani metodom po Oehmen i sur. [200].

3.4. Mikrobiološke metode

3.4.1. Fluorescenija in situ hibridizacija (FISH)

Molekularna citogenetska tehnika, FISH metoda, zasniva se na hibridizaciji određene genske sekvence i odgovarajućeg niza nukleotida vezanog za fluorescentni marker – probu (Amann, 1995). FISH može biti direktna i indirektna, prema načinu vezivanja fluorescentnog markera. U direktnoj analizi proba je vezana za fluorokrom, dok u indirektnoj analizi nukleotidi probe se najprije vezuju za biotin ili digoksigenin a potom vizualiziraju pomoću antitijela na biotin ili digoksigenin vezanih na fluorokrom. Uporabljeno je 13 oligonukleotidnih proba označenih fluorescentnim bojama cianin 3 i cianin 5, sintetizirane prema naruždbi od firme GOREA PLUS (Hrvatska). Oligonukleotidne probe korištene u FISH analizi prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Probe korištene za FISH

Naziv probe		Ciljana skupina	Sekvenca (5'-3')	Forma mid %	Literatura
Nso190		AOB	CGATCCCCTGCTTTTCTCC	55	[207]
NIT3		NOB	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40	
DEN124		DEN	CGACATGGGCGCGTTCCGAT	40	[208]
PAO462	PAOmixon	PAOs	CCGTCATCTACWCAGGGTATTAAC	35	[209]
PAO651			CCCTCTGCCAAACTCCAG	35	
PAO846			GTTAGCTACGGCACTAAAAGG	35	
Acc-I-444	DPAOmixon	DPAOs	CCCAAGCAATTTCTTCCCC	35	[210]
Acc-II-444			CCCGTGCAATTTCTTCCCC	35	
GAOQ431	GAOmixon	GAOs	TCCCCGCCTAAAGGGCTT	35	[211]
GAOQ989			TTCCCCGGATGTCAAGGC	35	
EUB338	EUBmixon	Sve bakterije	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	0-50	[212]
EUB338-II			GCAGCCACCCGTAGGTGT	0-50	[213]
EUB338-III			GCTGCCACCCGTAGGTGT	0-50	

Uzorci mulja periodično su fiksirani u 4% paraformaldehidu. Uzorci mulja uzeti su na početku/kraju pokusa denitrifikacije te analizirani FISH metodom, za određivanje denitrifikanata u ukupnim bakterijama aktivnog mulja. FISH preparati vizualizirani su na konfokalnom skenirajućem laserskom mikroskopu (engl. *Confocal Laser Scanning Microscopy*, CLSM). U svim pokusima ciljana molekula je bila 16S rRNA i temperatura hibridizacije 46 °C. EUB338, EUB338-II i EUB338-III (EUBmixon, označavale su sve bakterije),

su skupa korištene, Acc-I-444 i Acc-II-444 (DPAOmix, denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi), GAOQ431 i GAOQ989 (GAOmix, glikogen akumulirajući organizmi). EUBmix probe su bile označene Cianin 5 bojom na 5' kraju, a sve ostale probe Cianin 3 bojom također na 5' kraju.

FISH metoda - postupak:

(i) Priprema fiksativa (4% paraformaldehid): Zagrijati 65 mL destilirane vode na 60 °C. Dodati 4 g paraformaldehida. Dodati 1 kap 2M NaOH. Brzo miješati dok se otopina gotovo ne razbistri (1-2 minute). Ukloniti izvor topline. Dodati 33 mL 3 × PBS. Podesiti pH na 7,2 s HCl. Filtrirati otopinu kroz filter papir 0,2 µm. Brzo ohladiti na 4 °C i čuvati u hladnjaku.

(ii) Fiksacija suspenzije mikrobnih stanica 4% paraformaldehidom: Dodati 3 volumena paraformaldehid fiksativa na 1 volumen uzorka. Čuvati 1-3 sata na 4 °C. Peletirati fiksirane stanice centrifugiranjem pri 5 000 g, te ukloniti fiksativ. Oprati stanice u 1 × PBS i resuspendirati stanice u 1 × PBS do konačne koncentracije 10⁸-10⁹ stanica/mL. Dodati 1 volumen ledeno hladnog etanola, promiješati. Fiksirane stanice se potom mogu staviti na stakalca ili pohraniti na – 20 °C na nekoliko mjeseci.

(iii) Imobilizacija fiksiranih mikrobnih stanica na stakalca: Staviti oko 3 µL fiksirane stanične suspenzije na stakalce, u promjeru oko 5 mm. Osušiti na zraku. Dehidrirati stanice umakanjem u 50%, 80% i 98% etanol, po 3 minute svaki. Nakon toga stakalca se, suha, mogu neograničeno čuvati pri sobnoj temperaturi.

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

3.4.2. Metoda bojanja po Neisseru – određivanje poliP [214]

Na čisto i odmašćeno predmetno stakalce (provlačenje predmetnice kroz plamen) stavi se kapljica aktivnog mulja i preparat se ostavi da se osuši pri sobnoj temperaturi. Osušeni razmaz se fiksira provlačenjem predmetnice tri puta kroz plamen. Na fiksirani razmaz nanese se svježe pripremljena mješavina 2 dijela otopine A i 1 dio otopine B kroz 10-15 sekundi. Zatim se pusti da višak boje oteče sa stakalca. Nakon toga nanese se otopina C na 45 sekundi te ispere vodom. Stakalce se ostavi da se osuši i gleda pod svjetlosnim mikroskopom.

Nakupljeni poliP vide se kao tamno-ljubičasto obojana volutinska zrnca unutar bakterijske stanice.

Reagensi uporabljeni za metodu bojanja po Neisseru:

Otopina A	
Metilen plavo	0,1 g
Etanol 96%	5,0 mL
Octena kiselina (glaciale)	5,0 mL
Destilirana voda	100,0 mL
Otopina B	
Kristal-violet (10% u 96% etanolu)	3,3 mL
Etanol 96%	6,7 mL
Destilirana voda	100,0 mL
Nakon pripreme pomiješati dva dijela otopine A i jedan dio otopine B	
Otopina C	
Krisoidin Y (1% vodena otopina)	33,3 mL
Destilirana voda	100,0 mL

3.5. Statistička obrada

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ili aritmetička sredina ($\bar{x}$) $\pm$ standardna devijacija (σ), izračunato prema jednadžbama {15} i {16}:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \{15\}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \{16\}$$

pri čemu je:

n = ukupan broj mjerenja (broj članova niza)

x_i = pojedinačne vrijednosti mjerenja.

4. REZULTATI

4.1. Mikrobni procesi u funkciji uklanjanja dušika

Denitrifikacija na sustavima za obradu otpadnih voda uobičajeno čini dio sustava uklanjanja N koji se postiže kombinacijom procesa nitrifikacije i denitrifikacije [2,3]. Izazovi u uklanjanju

dušika su obrada otpadnih voda niskog omjera C/N, posebice kad je cilj ukloniti i N i P iz otpadne vode, pa se istražuje i poboljšava proces istovremene denitrifikacije i uklanjanja P - proces denitrificirajuće defosfatacije, odabirom povoljne konfiguracije procesa kroz probir procesnih čimbenika s ciljem postizanja učinkovite obrade i što manjih troškova.

Obrada otpadne vode je dinamičan proces, ovisi o nizu čimbenika, poput: sastav i koncentracija funkcionalnih organizama za ciljane biološke procese, sastav-kakvoća otpadne vode – koncentracija organskih i anorganskih sastojaka, koncentracija otopljenog kisika, pH, omjer C/N, HRT i dr. [2,3].

Za postizanje ciljeva disertacije – analiziranje aktivnosti mikrobnih vrsta za denitrifikaciju u ovisnosti o procesnim čimbenicima – provedeni su pokusi u kojima je istražena aktivnost aktivnog mulja prilagođenog za uklanjanje N određivanjem brzine i učinkovitosti kao i zastupljenosti funkcionalnih organizama za ciljane procese:

- (i) nitrifikacije
- (ii) denitrifikacije
- (iii) parcijalne nitrifikacije i denitrifikacije
- (iv) istovremene nitrifikacije i denitrifikacije – heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije
- (v) istovremene denitrifikacije i uklanjanja P procesom denitrificirajuće defosfatacije preko $\text{NO}_2\text{-N}$, pri anoksičnim uvjetima
- (vi) istovremene denitrifikacije i uklanjanja P u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju
- (vii) endogene denitrifikacije

4.2. Aktivnost aktivnog mulja prilagođenog za uklanjanje N procesom nitrifikacije

Biološko uklanjanje dušika (BNR) na sustavu za obradu otpadnih voda postiže se kombinacijom procesa: (i) nitrifikacije otpadne vode u aerobnim uvjetima pri čemu se prevodi $\text{NH}_4\text{-N}$ u $\text{NO}_2\text{-N}$ i/ili $\text{NO}_3\text{-N}$, i (ii) denitrifikacije u anoksičnim uvjetima uz donore elektrona (organski ugljik) pri čemu se zbiva redukcija dušikovih oksida ($\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$) do plinovitog dušika (N_2).

Potreba za provođenjem nitrifikacije otpadne vode proizlazi iz zabrinutosti za kvalitetu voda s obzirom na (i) učinak amonijaka na prijemne vode s obzirom na koncentraciju otopljenog kisika i toksičnosti za ribe, (ii) potrebe za uklanjanjem dušika radi kontrole eutrofikacije, (iii) potrebe

za osiguravanjem kontrole dušika zbog primjene ponovne uporabe vode, uključujući i obnavljanje zaliha podzemne vode [2,3].

U provedbi disertacije pokusi nitrifikacije provedeni su s ciljem da se istraži učinak odabranih procesnih čimbenika na učinkovitost i brzinu nitritacije (prevođenje $\text{NH}_4\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$) i/ili nitratacije (prevođenje $\text{NO}_2\text{-N}$ do $\text{NO}_3\text{-N}$).

Primjenom FISH metode u mulju aklimatiziranom za uklanjanje N u procesu nitrifikacije dokazano je prisustvo nitrificirajućih vrsta, amonijak oksidirajućih (AOB) i nitrit oksidirajućih bakterija (NOB). Nitrifikacija je istražena u ovisnosti o koncentraciji $\text{NH}_4\text{-N}$, koncentraciji mikrobne biomase, koncentraciji otopljenog kisika (DO), koncentraciji organskih sastojaka i pH vrijednosti.

4.2.1. Autotrofna nitrifikacija u ovisnosti o koncentraciji $\text{NH}_4\text{-N}$, koncentraciji mikrobne biomase i pH

Rezultati pokusa autotrofne nitrifikacije u ovisnosti o početnoj koncentraciji $\text{NH}_4\text{-N}$, početnoj koncentraciji mikrobne biomase i pri odabranoj vrijednosti pH $7,2 \pm 0,2$ i ≥ 2 mg DO/L, pri ambijentnim uvjetima temperature (23 ± 1 °C) prikazani su u tablici 7, a pri odabranoj vrijednosti pH $8,0 \pm 0,1$ i ≥ 2 mg DO/L, pri ambijentnim uvjetima temperature (22 ± 1 °C) u tablici 8.

Vrijednosti pH 7,2-8,0 kao i koncentracija otopljenog kisika 2-3 mg DO/L i temperatura 25-30 °C u literaturi se navode kao povoljni (optimalni) za proces nitrifikacije [2,3,43]. Tijekom nitrifikacije postoji potreba za korekcijom pH budući se snižava pH vrijednost, pa su u pokusima odabrane vrijednosti pH $7,2 \pm 0,2$ i pH $8,0 \pm 0,1$ a koje ne inhibiraju i ne usporavaju proces nitrifikacije, samo je veća ili manja potreba/potrošnja na kemikaliji za korekciju pH.

Tablica 7. Brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$, brzina nitrifikacije i specifična brzina nitrifikacije do 500 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri pH $7,2 \pm 0,2$ i $\text{DO} \geq 2$ mg/L, pri početnoj koncentraciji mikrobne biomase $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L, $2,8 \pm 0,2$ g MLSS/L i $4,2 \pm 0,2$ g MLSS/L i ambijentalnoj temperaturi 23 ± 1 °C

NH ₄ -N [mg/L]	NO ₂ -N [mg/L]	NO ₃ -N [mg/L]	MLSS [g/L]	rNH ₄ -N _{oksid.} [mg NH ₄ - N/Lh]	rNI [mg N/Lh]	spec rNI [mg N /gMLSSh]	pH
100±5	<1	≤3	1,5±0,3	17,9±0,5	10,4±0,9	6,9±0,7	7,2±0,2
			2,8±0,2	30,4±0,4	15,2±0,5	5,4±0,4	7,2±0,2
			4,2±0,2	38,4±1,1	21,7±0,4	5,2±0,2	7,2±0,2
200±9	<1	≤3	1,5±0,3	20,7±0,4	15,5±0,2	10,3±0,2	7,2±0,2
			2,8±0,2	30,5±0,8	18,3±0,5	6,5±0,3	7,2±0,2
			4,2±0,2	41,7±1,0	25,6±0,4	6,1±0,2	7,2±0,2
300±11	<1	≤3	1,5±0,3	21,9±0,9	17,4±0,7	11,6±0,5	7,2±0,2
			2,8±0,2	32,4±0,4	23,9±0,3	8,5±0,3	7,2±0,2
			4,2±0,2	44,1±0,5	27,7±0,4	6,6±0,4	7,2±0,2
400±7	<1	≤3	1,5±0,3	25,4±0,6	19,4±0,3	12,9±0,2	7,2±0,2
			2,8±0,2	33,5±1,0	26,2±0,2	9,3±0,3	7,2±0,2
			4,2±0,2	49,8±0,4	30,7±0,6	7,3±0,5	7,2±0,2
500±14	<1	≤3	1,5±0,3	31±0,3	22,6±0,7	15,1±0,4	7,2±0,2
			2,8±0,2	38,5±0,6	27,9±0,6	9,9±0,5	7,2±0,2
			4,2±0,2	54,2±0,7	32,9±0,9	7,8±0,4	7,2±0,2

Rezultati autotrofne nitrifikacije pri pH 7,2±0,2 i ≥2 mg DO/L pokazuju da se s povećanjem početne koncentracije NH₄-N povećava i brzina oksidacije NH₄-N i brzina nitrifikacije, za istražene početne količine mikrobne biomase. Također, nitrifikacija s povećanjem koncentracije NH₄-N rezultira u konačnici većim koncentracijama nakupljenih NO₂-N i NO₃-N u točki oksidacije NH₄-N. Povećanje koncentracije mikrobne biomase ima pozitivan učinak i na brzinu oksidacije NH₄-N i na brzinu nitrifikacije (Tablica 7).

Tablica 8. Brzina oksidacije NH₄-N, brzina nitrifikacije i specifična brzina nitrifikacije do 500 mg NH₄-N/L pri pH 8,0±0,1 i DO≥2 mg/L, pri početnoj količini mikrobne biomase 1,4±0,2 g MLSS/L, 2,6±0,3 g MLSS/L i 3,9±0,3 g MLSS/L i ambijentalnoj temperaturi 22±1 °C

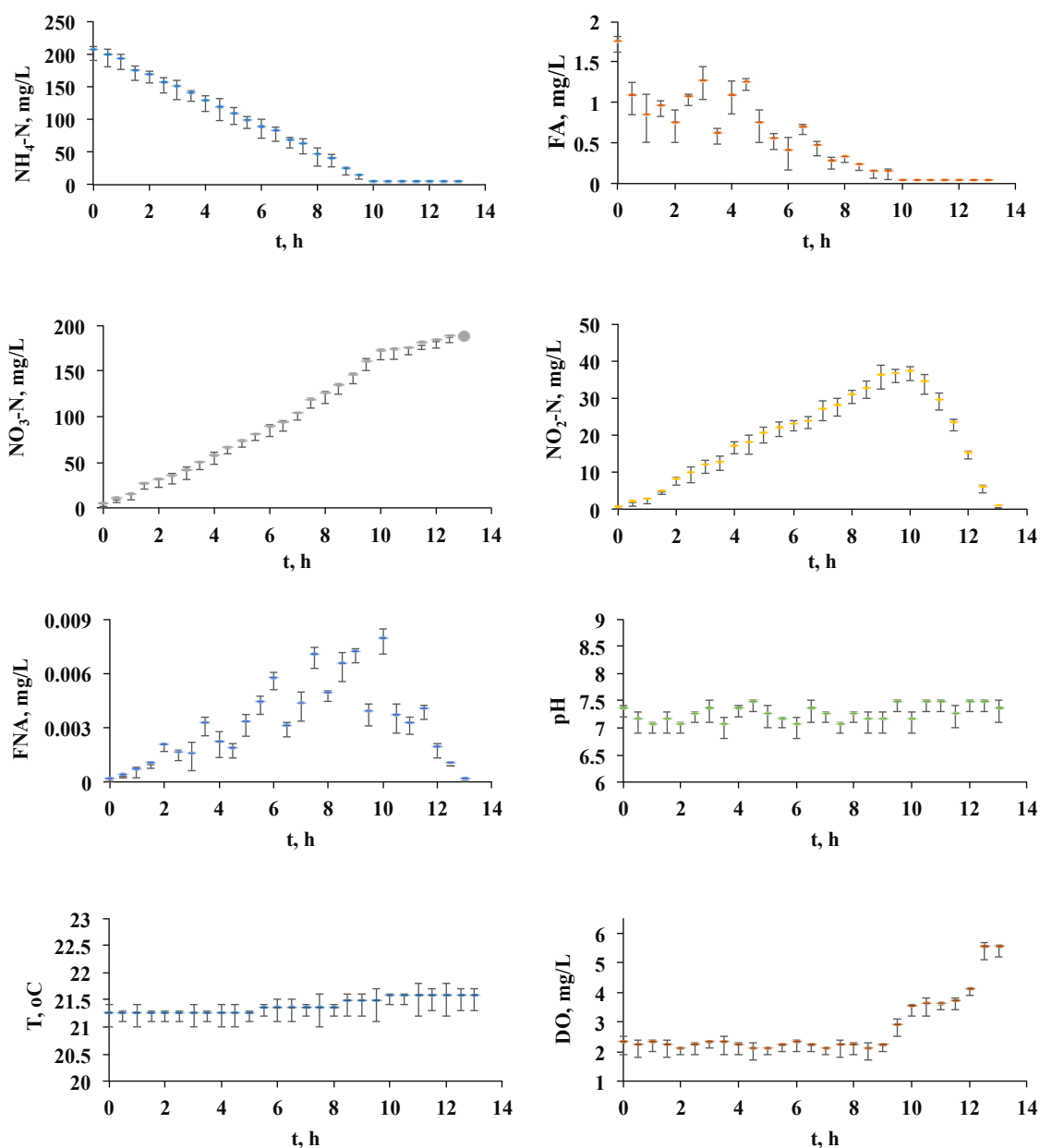
NH ₄ -N [mg/L]	NO ₂ -N [mg/L]	NO ₃ -N [mg/L]	MLSS [g/L]	rNH ₄ -N _{oksid.} [mg NH ₄ -N /Lh]	rNI [mg N/Lh]	spec rNI [mg N /gMLSSh]	pH
			1,4±0,2	18,8±0,2	11,5±0,4	8,2±0,3	8,0±0,1

100±7	<1	≤3	2,6±0,3	30,9±0,8	20,0±0,5	7,7±0,4	8,0±0,1
			3,9±0,3	42,1±1,0	29,4±0,7	7,54±0,5	8,0±0,1
200±13	<1	≤3	1,4±0,2	19,8±1,1	17,2±0,4	12,3±0,2	8,0±0,1
			2,6±0,3	30,7±1,0	23,8±0,8	8,8±0,6	8,0±0,1
			3,9±0,3	44,2±1,0	33,3±0,6	8,5±0,5	8,0±0,1
300±6	<1	≤3	1,4±0,2	23,6±0,6	20,4±0,4	14,6±0,4	8,0±0,1
			2,6±0,3	33,5±0,6	29,4±0,5	11,3±0,5	8,0±0,1
			3,9±0,3	47,9±0,5	36,1±0,3	9,3±0,1	8,0±0,1
400±8	<1	≤3	1,4±0,2	27,4±1,0	22,5±0,7	16,1±0,4	8,0±0,1
			2,6±0,3	36,0±0,7	30,0±0,5	11,5±0,5	8,0±0,1
			3,9±0,3	53,1±0,8	38,0±0,6	9,7±0,4	8,0±0,1
500±9	<1	≤3	1,4±0,2	32,8±0,2	25,0±0,2	17,9±0,2	8,0±0,1
			2,6±0,3	39,6±0,5	30,3±0,3	11,7±0,1	8,0±0,1
			3,9±0,3	59,9±0,6	40,7±0,4	10,4±0,3	8,0±0,1

Autotrofna nitrifikacija pri pH 8,0±0,1 (Tablica 8) s povećanjem početne koncentracije NH₄-N također rezultira povećanjem i brzine oksidacije NH₄-N i brzine nitrifikacije, pri ≥2 mg DO/L, za svaku istraženu početnu količinu mikrobne biomase, poput rezultata pri pH 7,2±0,2 (Tablica 7). Također, s povećanjem količine mikrobne biomase povećava se brzina oksidacija NH₄-N i brzina nitrifikacije (Tablica 8).

Učinak pH na autotrofnu nitrifikaciju (Tablice 7 i 8) se prepoznaje kao čimbenik koji utječe na brzinu procesa, i oksidacije NH₄-N i nitrifikacije, kao i na nakupljenu količinu NO₂-N i NO₃-N na kraju procesa oksidacije NH₄-N. Viša vrijednost pH, pH 8,0±0,1, u usporedbi s pH 7,2±0,2 ide u prilog većeg nakupljanja NO₂-N i bržeg procesa oksidacije NH₄-N (Tablice 7 i 8).

Uobičajene promjene motrenih pokazatelja kakvoće ciljanog biološkog procesa autotrofne nitrifikacije pri pH 7,2±0,2 i ≥2 mg DO/L prikazane su za odabrani pokus 200±9 mg NH₄-N/L, s 1,5 g MLSS/L (Slika 14).



Slika 14. Varijacije $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{HNO}_2\text{-N}$, DO, pH i temperature tijekom autotrofne nitrifikacije 200 ± 9 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri pH $7,2 \pm 0,2$ i ≥ 2 mg DO/L

Tijekom autotrofne nitrifikacije (Slika 14) mogu se opaziti uobičajene promjene u profilu DO kao točka povećanja vrijednosti DO koja korelira s točkom potpune oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i u krivulji $\text{NO}_2\text{-N}$ se prepoznaje kao točka najveće vrijednosti $\text{NO}_2\text{-N}$.

4.3. Parcijalna nitrifikacija

Pokusi parcijalne nitrifikacije provedeni su s ciljem da se istraži aktivnost mikrobne kulture za nitritaciju, oksidaciju $\text{NH}_4\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$ (prvi korak nitrifikacije) pri odabranim procesnim čimbenicima pH 8,0 i $\text{DO} < 1$ mg/L, povoljnim za proces nitritacije [2]. Nitritacija doprinosi uštedom u procesu uklanjanja N, do 25% za manjom potrebom za energijom za opskrbu otopljenim kisikom jer je izostavljen drugi korak nitrifikacije – nitratacija, odnosno oksidacija $\text{NO}_2\text{-N}$ do $\text{NO}_3\text{-N}$, nego se favorizira prvi korak nitrifikacije favoriziranjem aktivnosti AOB i inhibiranjem aktivnosti NOB, kao i u procesu denitrifikacije, redukcije $\text{NO}_2\text{-N}$ do plinovitog dušika, N_2 , do 40 % za manjom potrebom za dodani izvor ugljika – donorima elektrona jer je izostavljen korak redukcije $\text{NO}_3\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$.

Brzina nitrifikacije raste s povećanjem koncentracije DO do 3-4 mg DO/L. Značajno je brzina nitrifikacije inhibirana pri $< 0,5$ mg DO/L, pri čemu se provodi parcijalna nitrifikacija, nitritacija, odnosno prevođenje $\text{NH}_4\text{-N}$ do $\text{NO}_2\text{-N}$. U rasponu pH 7,0-7,2 ostvaruje se dobra brzina nitrifikacije dok je optimalna pH u rasponu pH 7,5-8,0 [2]. Nepovoljni učinak na nitrifikaciju imaju neionizirani amonijak (NH_3) ili slobodni amonijak i neionizirana dušična kiselina (HNO_2) koji inhibiraju nitrifikaciju, a učinak inhibicije ovisi o temperaturi i pH [43].

Parcijalna nitrifikacija istražena je pri početnih 30 ± 1 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, 50 ± 3 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 100 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri pH $8,0 \pm 0,1$, koncentraciji otopljenog kisika 0,8-1 mg DO/L i koncentraciji mikrobne biomase $1,5 \pm 0,1$ g MLSS/L (Tablice 9, 10 i 11) i $3,0 \pm 0,1$ g MLSS/L (Tablice 12, 13 i 14).

Tablica 9. Varijacije $\text{NH}_4\text{-N}$, FA, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA, pH, DO i temperaturi u parcijalnoj nitrifikaciji 30 ± 1 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ s $1,5 \pm 0,1$ g MLSS/L

t h	$\text{NH}_4\text{-N}$ mg/L	FA mg/L	$\text{NO}_3\text{-N}$ mg/L	$\text{NO}_2\text{-N}$ mg/L	FNA mg/L	pH	T °C	DO mg/L
0	30 ± 1	$0,9 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,3$	$9,2\text{E-}06 \pm 0,4\text{E-}06$	$8 \pm 0,1$	$22 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
0,5	$22,2 \pm 1,6$	$0,7 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,9$	$3,8 \pm 1,4$	$0,0001 \pm 0,00004$	$8 \pm 0,1$	$22 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1	$17,9 \pm 1,4$	$0,7 \pm 0,2$	$3,1 \pm 1,5$	$6,3 \pm 1,7$	$0,0002 \pm 0,00003$	$8 \pm 0,1$	$22 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1,5	$11,6 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,1$	$6,6 \pm 2,4$	$12,3 \pm 1,9$	$0,0003 \pm 0,00002$	$8 \pm 0,1$	$22 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2	$5,1 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,1$	$8,3 \pm 1,4$	$15,1 \pm 0,5$	$0,0005 \pm 0,00006$	$8 \pm 0,1$	$22 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2,5	0	0	$10,4 \pm 0,6$	$20,3 \pm 0,6$	$0,0004 \pm 0,00002$	$8 \pm 0,1$	$20 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$

Tablica 10. Varijacije $\text{NH}_4\text{-N}$, FA, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA, pH, DO i temperature u parcijalnoj nitrifikaciji $50 \pm 3 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ s $1,5 \pm 0,1 \text{ g MLSS/L}$

t h	$\text{NH}_4\text{-N}$ mg/L	FA mg/L	$\text{NO}_3\text{-N}$ mg/L	$\text{NO}_2\text{-N}$ mg/L	FNA mg/L	pH	T °C	DO mg/L
0	50 ± 3	$2,0 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$2,4\text{E-}06 \pm 0,6\text{E-}06$	$8 \pm 0,1$	$22,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
0,5	$44,7 \pm 3,6$	$1,7 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,7$	$3,8 \pm 1,4$	$9,2\text{E-}05 \pm 0,4\text{E-}05$	$8 \pm 0,1$	$22,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
1	$38,3 \pm 3,1$	$1,5 \pm 0,3$	$2,2 \pm 1,3$	$7,2 \pm 2,5$	$0,0002 \pm 0,00002$	$8 \pm 0,1$	$22,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
1,5	$29,6 \pm 2,7$	$0,9 \pm 0,2$	$7 \pm 2,6$	$12,3 \pm 3,8$	$0,0004 \pm 0,00003$	$8 \pm 0,1$	$22,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
2	$24,8 \pm 2,2$	$0,9 \pm 0,2$	$8 \pm 3,3$	$14,3 \pm 3,2$	$0,0003 \pm 0,00004$	$8 \pm 0,1$	$22,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
2,5	$16,3 \pm 1,8$	$0,8 \pm 0,1$	$10,4 \pm 2,9$	$20,3 \pm 2,6$	$0,0004 \pm 0,00002$	$8 \pm 0,1$	$22,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
3	$10,7 \pm 0,7$	$0,4 \pm 0,1$	$11,2 \pm 2,1$	$25,4 \pm 2,1$	$0,0006 \pm 0,00001$	$8 \pm 0,1$	$22,3 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
3,5	$2,9 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,03$	$12,4 \pm 1,4$	$29,1 \pm 1,3$	$0,0009 \pm 0,0001$	$8 \pm 0,1$	$22,3 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
4	0	0	$14,2 \pm 0,8$	$32,9 \pm 0,9$	$0,0009 \pm 0,0006$	$8 \pm 0,1$	$22,3 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$

Tablica 11. Varijacije $\text{NH}_4\text{-N}$, FA, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA, pH, DO i temperature u parcijalnoj nitrifikaciji $100 \pm 5 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ s $1,5 \pm 0,1 \text{ g MLSS/L}$

t h	$\text{NH}_4\text{-N}$ mg/L	FA mg/L	$\text{NO}_3\text{-N}$ mg/L	$\text{NO}_2\text{-N}$ mg/L	FNA mg/L	pH	T °C	DO mg/L
0	100 ± 5	$5,1 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$	$7,7\text{E-}06 \pm 0,7\text{E-}06$	$8 \pm 0,1$	$22,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
0,5	$93,2 \pm 2,6$	$2,9 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,9$	$6,3 \pm 0,8$	$0,0002 \pm 0,00006$	$8 \pm 0,1$	$22,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1	$85,8 \pm 3,8$	$2,7 \pm 0,9$	$5,3 \pm 2,8$	$12,3 \pm 0,9$	$0,0004 \pm 0,0001$	$8 \pm 0,1$	$22,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1,5	$77,1 \pm 3,1$	$2,9 \pm 0,6$	$7 \pm 3,2$	$18,8 \pm 1,4$	$0,0005 \pm 0,00005$	$8 \pm 0,1$	$22,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2	$67,6 \pm 2,9$	$3,3 \pm 0,8$	$10,8 \pm 2,7$	$24,8 \pm 2,6$	$0,0005 \pm 0,00009$	$8 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2,5	$58,3 \pm 2,1$	$2,3 \pm 0,8$	$12,5 \pm 3,1$	$30,9 \pm 3,7$	$0,0007 \pm 0,0002$	$8 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
3	$47,7 \pm 1,4$	$1,5 \pm 0,6$	$15,4 \pm 2,5$	$36,4 \pm 3,5$	$0,001 \pm 0,0006$	$8 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
3,5	$36,4 \pm 1,7$	$1,4 \pm 0,4$	$17,7 \pm 2,7$	$42,1 \pm 3,1$	$0,001 \pm 0,0007$	$8 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
4	$28,3 \pm 1,3$	$0,9 \pm 0,3$	$20,6 \pm 2,2$	$48,7 \pm 2,8$	$0,001 \pm 0,0005$	$8 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
4,5	$25,8 \pm 0,8$	$1,3 \pm 0,3$	$22,8 \pm 1,6$	$54,1 \pm 2,3$	$0,001 \pm 0,0003$	$8 \pm 0,1$	$22,4 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
5	$8,1 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,1$	$26,9 \pm 1,2$	$60,3 \pm 1,4$	$0,001 \pm 0,0004$	$8 \pm 0,1$	$22,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
5,5	0	0	$28,2 \pm 0,5$	$66,1 \pm 0,8$	$0,001 \pm 0,0004$	$8 \pm 0,1$	$22,5 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$

Tablica 12. Varijacije $\text{NH}_4\text{-N}$, FA, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA, pH, DO i temperature u parcijalnoj nitrifikaciji $30 \pm 1 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ s $3 \pm 0,1 \text{ g MLSS/L}$

t h	$\text{NH}_4\text{-N}$ mg/L	FA mg/L	$\text{NO}_3\text{-N}$ mg/L	$\text{NO}_2\text{-N}$ mg/L	FNA mg/L	pH	T °C	DO mg/L
0	30 ± 1	$1,4 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,4$	$1,4\text{E-}05 \pm 0,4\text{E-}05$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
0,5	$21,7 \pm 2,1$	$1,0 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,8$	$4,1 \pm 1,8$	$9,7\text{E-}05 \pm 0,6\text{E-}05$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1	$12,2 \pm 1,6$	$0,7 \pm 0,1$	$5 \pm 1,1$	$10,5 \pm 2,7$	$0,0002 \pm 0,00006$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1,5	$1,2 \pm 0,7$	$0,05 \pm 0,01$	$8,4 \pm 1$	$17,7 \pm 2,4$	$0,0005 \pm 0,00004$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2	0	0	$9,7 \pm 0,7$	$18,7 \pm 0,9$	$0,0004 \pm 0,00007$	$8 \pm 0,1$	$23,2 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$

Tablica 13. Varijacije $\text{NH}_4\text{-N}$, FA, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA, pH, DO i temperature u parcijalnoj nitrifikaciji $50 \pm 3 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ s $3 \pm 0,1 \text{ g MLSS/L}$

t h	$\text{NH}_4\text{-N}$ mg/L	FA mg/L	$\text{NO}_3\text{-N}$ mg/L	$\text{NO}_2\text{-N}$ mg/L	FNA mg/L	pH	T °C	DO mg/L
0	50 ± 3	$1,9 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,3$	$1,2\text{E-}05 \pm 0,6\text{E-}05$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
0,5	$40,6 \pm 2$	$2,4 \pm 0,6$	$3,8 \pm 0,9$	$6,1 \pm 2,1$	$0,0001 \pm 0,9\text{E-}05$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1	$27,9 \pm 2,3$	$1,1 \pm 0,8$	$7,1 \pm 1,2$	$15,7 \pm 3,1$	$0,0005 \pm 0,00007$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1,5	$13,2 \pm 2,1$	$0,8 \pm 0,3$	$9,4 \pm 1,8$	$23,7 \pm 2,8$	$0,0004 \pm 0,00004$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2	$0,4 \pm 0,3$	$0,02 \pm 0,01$	$12,9 \pm 1,6$	$34,0 \pm 2,5$	$0,0008 \pm 0,00009$	$8 \pm 0,1$	$23,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2,5	0	$0,4 \pm 0,2$	$13,1 \pm 1,6$	$34,6 \pm 2,5$	$0,001 \pm 0,00005$	$8 \pm 0,1$	$23,2 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$

Tablica 14. Varijacije $\text{NH}_4\text{-N}$, FA, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA, pH, DO i temperature u parcijalnoj nitrifikaciji $100 \pm 5 \text{ mg NH}_4\text{-N/L}$ s $3 \pm 0,1 \text{ g MLSS/L}$

t h	$\text{NH}_4\text{-N}$ mg/L	FA mg/L	$\text{NO}_3\text{-N}$ mg/L	$\text{NO}_2\text{-N}$ mg/L	FNA mg/L	pH	T °C	DO mg/L
0	100 ± 5	$4,8 \pm 1,2$	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$2,1\text{E-}05 \pm 0,1\text{E-}05$	$8 \pm 0,1$	$23 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
0,5	$82,3 \pm 1,5$	$3,9 \pm 0,9$	$3,2 \pm 0,4$	$13,6 \pm 0,3$	$0,0003 \pm 0,00002$	$8 \pm 0,1$	$23 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1	$64,7 \pm 2,2$	$3,8 \pm 0,7$	$10,3 \pm 1,1$	$23,5 \pm 1,7$	$0,0004 \pm 0,00002$	$8 \pm 0,1$	$23 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
1,5	$41,9 \pm 3$	$2,4 \pm 0,5$	$17,9 \pm 2,1$	$35,3 \pm 2,6$	$0,0007 \pm 0,00001$	$8 \pm 0,1$	$23 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2	$20 \pm 2,7$	$0,9 \pm 0,4$	$22,2 \pm 3,5$	$52,1 \pm 1,9$	$0,001 \pm 0,00003$	$8 \pm 0,1$	$23 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
2,5	$2,8 \pm 1,1$	$0,1 \pm 0,4$	$26,5 \pm 2,7$	$66,8 \pm 2,1$	$0,002 \pm 0,0004$	$8 \pm 0,1$	$23 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
3	0	0	$27,8 \pm 3,1$	$67,3 \pm 2,2$	$0,002 \pm 0,0003$	$8 \pm 0,1$	$23 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$

Rezultati parcijalne nitrifikacije (Tablice 9-14) pokazuju aktivnost AOB kroz mikrobne reakcije usmjerene u produkciju $\text{NO}_2\text{-N}$, s ostvarenim različitim brzinama nitrifikacije (Tablica 15).

Tablica 15. Brzine uklanjanja $\text{NH}_4\text{-N}$ – brzine nitrifikacije ($\text{rNH}_4\text{-N}$) i akumulacije $\text{NO}_2\text{-N}$ ($\text{rNO}_2\text{-N}$) i $\text{NO}_3\text{-N}$ ($\text{rNO}_3\text{-N}$) tijekom parcijalne nitrifikacije 30 ± 1 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, 50 ± 3 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 100 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri $0,8\text{-}1$ mg DO/L s $1,5\pm 0,1$ g MLSS/L i $3,0\pm 0,1$ g MLSS/L

mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$	mg DO/L	g MLSS/L	rNI mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$	r $\text{NO}_3\text{-N}$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$	r $\text{NO}_2\text{-N}$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$	nakupljeno $\text{NO}_3\text{-N}$ %	nakupljen o $\text{NO}_2\text{-N}$ %	N gub. %
30±1	0,8-1	1,5±0,1	12,4±0,3	4,1±0,2	8±0,7	32,8±2,4	64,3±3,3	2,3±0,1
50±3	0,8-1	1,5±0,1	13,1±0,5	3,5±0,1	8,2±0,5	26,9±1,7	62,7±2,6	10,3±0,4
100±5	0,8-1	1,5±0,1	20,9±0,4	5±0,3	11,9±0,8	26,3±2,1	62,7±3,8	10,7±0,6
30±1	0,8-1	3,0±0,1	19,6±0,2	5,1±0,4	11,4±0,6	26,2±2,3	58,2±2,9	15,6±0,5
50±3	0,8-1	3,0±0,1	24,8±0,4	6,3±0,2	16,8±0,7	25,4±1,9	67,7±2,8	6,9±0,7
100±5	0,8-1	3,0±0,1	34,3±0,3	9±0,4	26,3±1,1	26,3±2,2	64,5±3,8	9,1±0,4

S povećanjem početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ povećava se brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i prevođenje u $\text{NO}_2\text{-N}$, pri obje odabrane početne koncentracije mikrobne biomase (Tablica 15). Veća količina mikrobne biomase korelira s povećanjem brzine nitrifikacije s povećanjem početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$.

4.4. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija

Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (SND), proces poznat pod nazivom aerobna denitrifikacija kao i heterotrofna nitrifikacija i aerobna denitrifikacija ima veliki potencijal u obradi otpadnih voda niskog omjera C/N a bazira se na strategiji izvedbe istovremene nitrifikacije i denitrifikacije pri aerobnim i heterotrofnim uvjetima. Nekoliko biokemijskih procesa zbiva se istovremeno u procesu heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije (HNAD), istovremeno se uklanjaju N i KPK pri aerobnim uvjetima [63,215]. U usporedbi s konvencionalnim biološkim procesom uklanjanja N, proces HNAD ima nekoliko prednosti, poput: (i) u aerobnim uvjetima provođenje uklanjanja N i KPK, (ii) alkalnost potrošena tijekom nitrifikacije može se nadoknaditi denitrifikacijom koja se zbiva istovremeno, (iii) mogu se ostvariti uštede na prostoru i vremenu, i (iv) može se smanjiti potrošnja energije i emisija C. U procesu HNAD se većina N ukloni putem stanične asimilacije i nitrifikacije/denitrifikacije, a vrlo mala količina N se emitira putem NO i N_2O . Heterotrofna nitrifikacija – oksidacija bilo kojeg reduciranog oblika dušika u više oksidirani oblik [216,217], znatno je sporiji proces od autotrofne nitrifikacije, zahtijeva utrošak energije i nema značajnog doprinosa u procesima nitrifikacije [218].

Rezultati heterotrofne nitrifikacije 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 80 ± 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, uz organske sastojke pri omjeru KPK/N 10 i 20 (koji odgovaraju omjeru C/N ~ 5 i ~ 10), s $2,5 \pm 0,2$ g MLSS/L, pri nekontroliranom pH i ambijentalnim uvjetima temperature, prikazani su u Tablicama 16, 17, 18 i 19, a te odabrane i istražene vrijednosti organskih sastojaka i $\text{NH}_4\text{-N}$ uobičajeno karakteriziraju otpadnu vodu grada iz razdjelnog i mješovitog sustava kanalizacije.

Tim pokusima istražen je učinak organskih sastojaka na brzinu procesa nitrifikacije, odnosno kompetitivnost nitrifikanata i uobičajenih heterotrofa (OHOs) za otopljeni kisik, kao i kompetitivnost OHOs i denitrificirajućih organizama za raspoloživi organski ugljik za rast i aktivnost mikrobne biomase kao i proces denitrifikacije.

Tablica 16. KPK, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NH}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{NH}_3\text{-N}$, tijekom heterotrofne nitrifikacije 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri KPK/N 10, u aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s $2,5 \pm 0,2$ g MLSS/L

t, h	KPK, mg/L	$\text{NH}_4\text{-N}$, mg/L	$\text{NO}_3\text{-N}$, mg/L	$\text{NO}_2\text{-N}$, mg/L	$\text{NH}_3\text{-N}$, mg/L
0	431,7 $\pm$ 6	40 $\pm$ 5	0,2 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0	0,2 $\pm$ 0,05
0,5	401,2 $\pm$ 3	38,7 $\pm$ 2	0,5 $\pm$ 0	1,3 $\pm$ 0	0,7 $\pm$ 0,09
1	318,1 $\pm$ 2	36,7 $\pm$ 1,1	1,2 $\pm$ 0	2,8 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,4
1,5	168,3 $\pm$ 4	31,2 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,3
2	96,2 $\pm$ 1	27,5 $\pm$ 1	3,8 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3
2,5	12,3 $\pm$ 0,8	12,4 $\pm$ 0,9	5,6 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2
3	11,6 $\pm$ 1	3,1 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,2	6,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,04
3,5	13,3 $\pm$ 0,8	0	8,4 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 0,3	0
4	14,1 $\pm$ 0,9	0	8,9 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,1	0
4,5	10,4 $\pm$ 1	0	9 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	0
5	11,3 $\pm$ 0,4	0	9,2 $\pm$ 0,2	0 $\pm$	0

U pokusu heterotrofne nitrifikacije 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ (Tablica 16) pri KPK/N 10, pri aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s $2,5 \pm 0,2$ g MLSS/L, izračunata je brzina oksidacije KPK od 168 mg KPK/Lh, brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ od 11,4 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$, brzina nitrifikacije 8 mg N/Lh uz nakupljanje $\text{NO}_3\text{-N}$ (23% od početnog N) i gubitak N od 77%.

Tablica 17. KPK, NH₄-N, NH₃-N, NO₂-N, NO₃-N, tijekom heterotrofne nitrifikacije 40±5 mg NH₄-N/L, pri KPK/N 20, u aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s 2,5±0,2 g MLSS/L

t, h	KPK, mg/L	NH ₄ -N, mg/L	NO ₃ -N, mg/L	NO ₂ -N, mg/L	NH ₃ -N, mg/L
0	812,1±6	40±5	0,2±0	0,2±0	0,2±0,03
0,5	763,9±7	39,1±2	0,2±0	0,6±0	1,3±0,08
1	651,1±5	36,7±2	0,9±0	1,5±0,2	3,7±0,5
1,5	448,4±8	32,1±1	1,1±0,2	2,2±0,2	3,9±0,6
2	258,5±4	28,5±2	1,9±0,3	3,5±0,5	4,3±0,4
2,5	43,1±3	18,4±1	3,6±0,2	4±0,3	3,3±0,7
3	10,5±2	2,1±0,4	4,7±0,4	5,2±0,6	0,4±0,1
3,5	10,7±2	0	6,6±0,2	2,1±0,4	0
4	11,1±1	0	7±0,3	0	0

U pokusu heterotrofne nitrifikacije 40±5 mg NH₄-N/L (Tablica 17) pri KPK/N 20, pri aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s 2,5±0,2 g MLSS/L, izračunata je brzina oksidacije KPK od 267,2 mg KPK/Lh, brzina oksidacije NH₄-N od 12,6 mg NH₄-N/Lh, brzina nitrifikacije 9,5 mg N/Lh, uz nakupljanje NO₃-N (18,2% od početnog N) i gubitak N od 81,8%.

Tablica 18. KPK, NH₄-N, NH₃-N, NO₂-N, NO₃-N, tijekom heterotrofne nitrifikacije 80±2 mg NH₄-N/L, pri KPK/N 10, u aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s 2,5±0,2 g MLSS/L

t, h	KPK, mg/L	NH ₄ -N, mg/L	NO ₃ -N, mg/L	NO ₂ -N, mg/L	NH ₃ -N, mg/L
0	819,3±2	80±2	0,1±0	0,2±0	0,6±0,3
0,5	751,5±3	76,5±1,0	0,7±0,1	0,4±0	1,1±0,4
1	681,6±2	73,2±1,5	1,2±0,2	0,8±0	2,5±0,8
1,5	581,3±4	69,8±0,7	2,1±0,1	1±0,1	2,9±0,7
2	463,8±1	66,1±1,2	2,7±0,2	1,7±0,1	3,5±0,9
2,5	333,9±2	62,3±1,0	3,1±0,2	2,1±0,3	5,1±0,6
3	177,4±3	58,7±0,6	3,5±0,3	2,6±0,3	5,9±0,8
3,5	17,3±0,5	48,2±0,8	4,3±0,1	3,1±0,2	4,9±0,9
4	12,2±0,2	33,2±0,5	6,7±0,3	5,5±0,4	2,2±0,4
4,5	11,1±0,1	17,8±0,1	12,3±0,5	11,3±0,8	0,8±0,2
5	12,9±0,2	2,3±0,2	17,1±0,4	16,5±0,6	0,1±0,04

5,5	11,5±0,2	0	19,8±0,7	7,8±0,2	0
6	11,3±0,1	0	21,7±0,9	0,4±0	0

U pokusu heterotrofne nitrifikacije 80±2 mg NH₄-N/L (Tablica 18) pri KPK/N 10, pri aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s 2,5±0,2 g MLSS/L, izračunata je brzina oksidacije KPK od 201,8 mg KPK/Lh, brzina oksidacije NH₄-N od 15,6 mg NH₄-N/Lh, brzina nitrifikacije 13 mg N/Lh, uz nakupljanje NO₃-N (27,8% od početnog N) i gubitak N od 72,2%.

Tablica 19. KPK, NH₄-N, NH₃-N, NO₂-N, NO₃-N, tijekom heterotrofne nitrifikacije 80±2 mg NH₄-N/L, pri KPK/N 20, u aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s 2,5±0,2 g MLSS/L

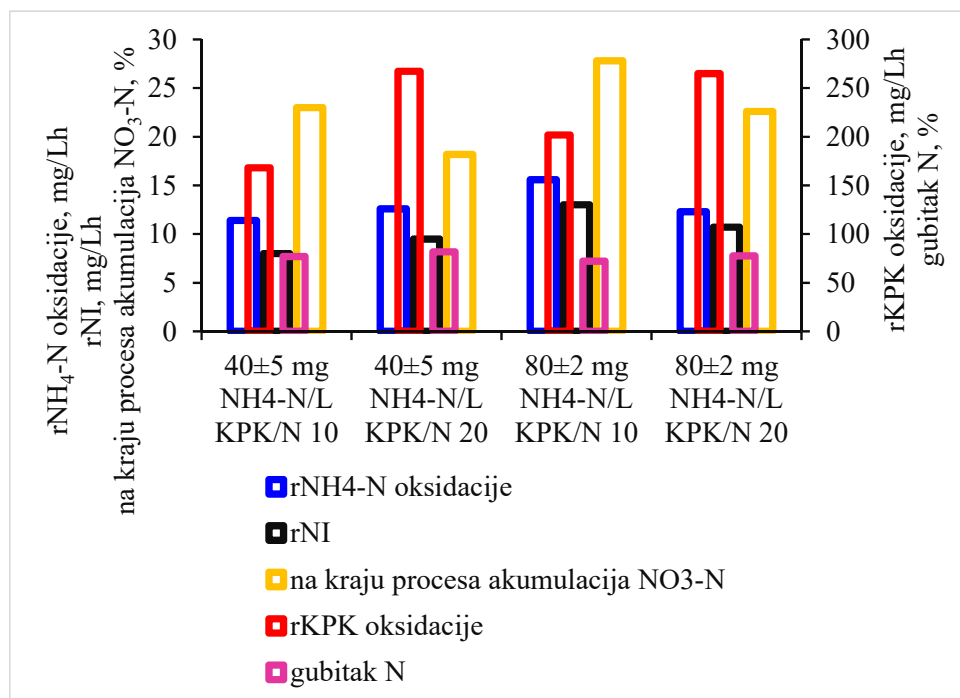
t, h	KPK, mg/L	NH₄-N, mg/L	NO₃-N, mg/L	NO₂-N, mg/L	NH₃-N, mg/L
0	1603,2±22	80,0±2	0,1±0	0,2±0	0,3±0,04
0,5	1512,7±17	74,5±2	0,5±0	0,3±0	0,8±0,4
1	1401,5±20	70,9±2	0,9±0	0,9±0	4,6±0,9
1,5	1321,8±11	64,3±1	1,1±0,2	1,4±0	4,2±1,4
2	1219,7±9	60,8±1	2,7±0,4	1,9±0,2	4,9±1,9
2,5	1060,5±10	54,1±1	3,5±0,2	2,2±0,1	5,4±2,1
3	904,6±6	50,6±0,7	4,1±0,6	2,6±0,3	5,0±1,8
3,5	746,8±8	45,2±1	4,7±0,5	2,8±0,3	5,5±1,7
4	611,9±7	41,4±1	5,3±0,4	3,2±0,2	6,2±2,0
4,5	463,2±5	37,6±0,9	5,7±0,5	3,7±0,4	5,6±1,5
5	308,8±5	33,7±0,7	6,1±0,4	4,1±0,3	6,1±1,6
5,5	154,3±4	23,1±1	6,5±0,3	4,4±0,3	4,2±1,1
6	13,2±1	6,1±1	11,3±0,2	8,7±0,5	1,3±0,3
6,5	11,2±2	0	15,2±0,3	13,2±0,4	0
7	14,3±1	0	17,6±0,2	6,4±0,2	0
7,5	11,8±1	0	18,1±0,2	0,5±0,2	0

U pokusu heterotrofne nitrifikacije 80±2 mg NH₄-N/L (Tablica 19) pri KPK/N 20, pri aerobnim uvjetima pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s 2,5±0,2 g MLSS/L, izračunata je brzina oksidacije KPK od 264,9 mg KPK/Lh, brzina oksidacije NH₄-N od 12,3 mg NH₄-N/Lh, brzina nitrifikacije 10,7 mgN/Lh, uz nakupljanje NO₃-N (22,6% od početnog N) i gubitak N od 77,4%.

U pokusima SND nije zabilježena ekvivalentna količina $\text{NO}_x\text{-N}$ s obzirom na početnu koncentraciju $\text{NH}_4\text{-N}$, određen je znatan gubitak N, što ukazuje na odvijanje aerobne denitrifikacije i heterotrofne nitrifikacije (Tablice 16, 17, 18 i 19).

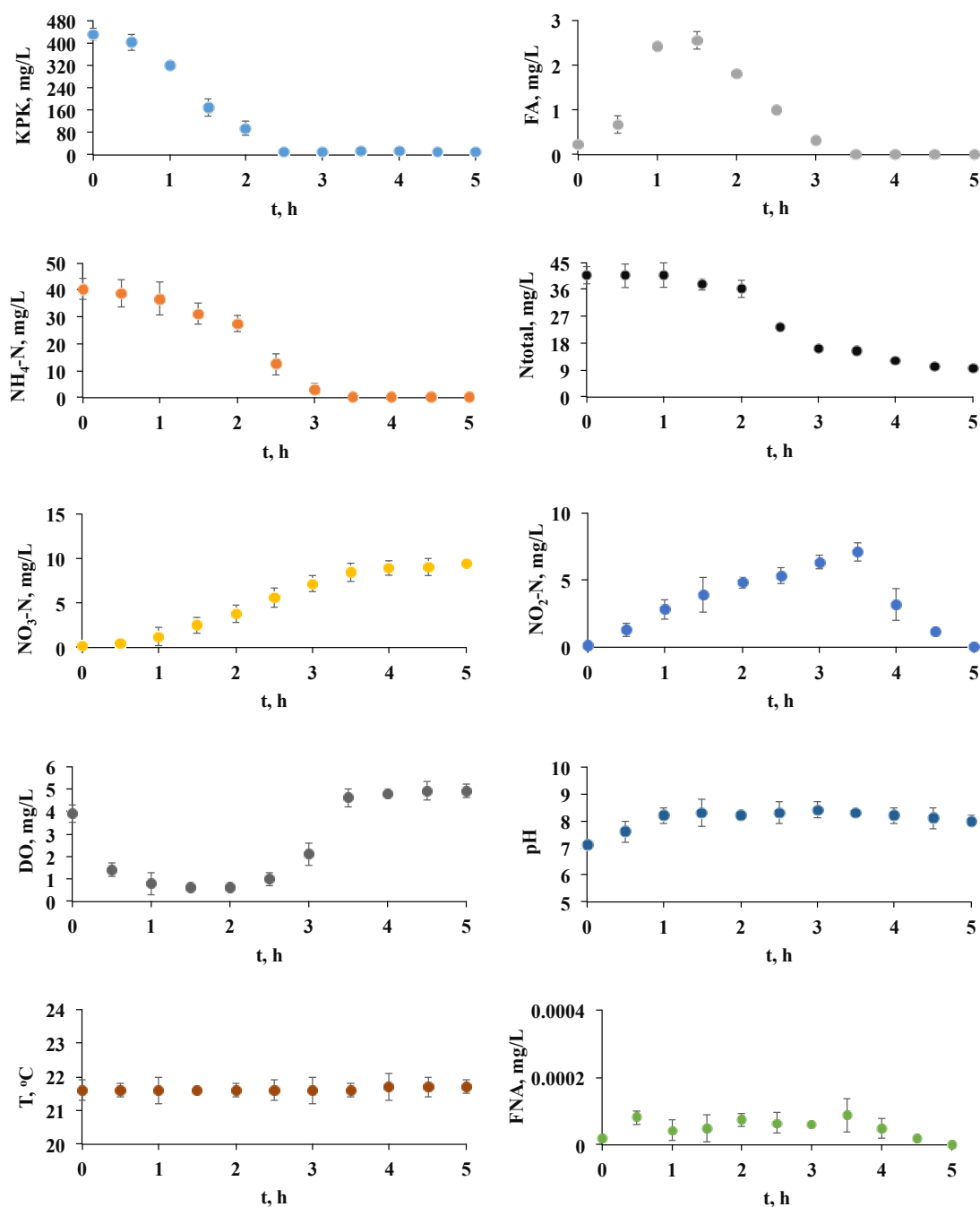
U usporedbi s konvencionalnim nitrificirajućim bakterijama, HNAD bakterije imaju veću brzinu rasta, bolju prilagodljivost na okoliš, sposobnost istovremenog uklanjanja N i KPK pri aerobnim uvjetima [63,215]. Većina HNAD bakterija zahtijeva viši omjer C/N za postizanje velike učinkovitosti uklanjanja N, a niski omjer C/N rezultira u slabij izvedbi HNAD [219].

Usporedni prikaz brzine oksidacije KPK, oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i nitrifikacije, akumulacije $\text{NO}_3\text{-N}$ na kraju procesa i gubitak N, u pokusima heterotrofne nitrifikacije 40 ± 5 i 80 ± 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri omjerima KPK/N 10 i 20 dan je slikom 15.



Slika 15. Usporedni prikaz brzine oksidacije KPK, oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i nitrifikacije, akumulacije $\text{NO}_3\text{-N}$ na kraju procesa i gubitak N, u pokusima heterotrofne nitrifikacije 40 ± 5 i 80 ± 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri omjerima KPK/N 10 i 20

Uobičajene promjene motrenih pokazatelja kakvoće ciljanog biološkog procesa heterotrofne nitrifikacije prikazane su za odabrani pokus 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri omjeru KPK/N 10, pri aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH s $2,5\pm 0,2$ g MLSS/L (Slika 16).

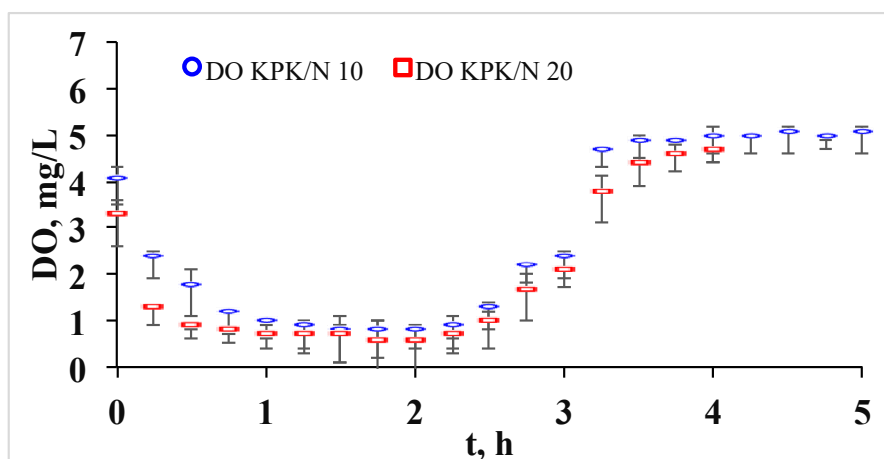


Slika 16. Varijacije KPK, N total, NH₄-N, NH₃-N, NO₂-N, FNA, NO₃-N, pH, temperature i DO u pokusu heterotrofne nitrifikacije 40±5 mg NH₄-N/L pri omjeru KPK/N 10, pri aerobnim uvjetima, pri ambijentalnim uvjetima temperature i nekontroliranom pH

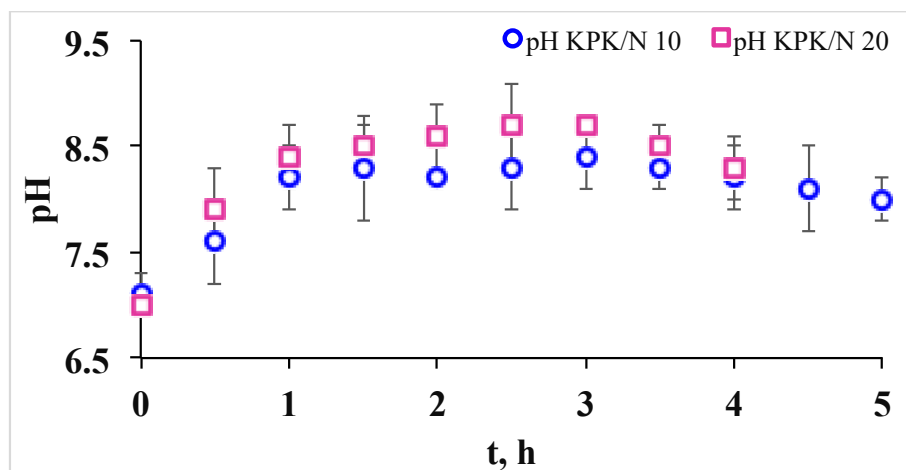
U heterotrofnoj nitrifikaciji-aerobnoj denitrifikaciji, za istražene početne vrijednosti 40±5 mg NH₄-N/L i 80±2 mg NH₄-N/L krivulje KPK, ukupnog dušika (N total), NH₄-N, NO₃-N, NO₂-N, FNA, NH₃-N, pH i DO pokazuju isti trend promjena, uz istovremenu oksidaciju KPK i

nitrifikaciju i denitrifikaciju, kao i u odabranom pokusu heterotrofne nitrifikacije 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri omjeru KPK/N 10 (Slika 16).

Odraž mikrobnih reakcija u profilu koncentracije otopljenog kisika i pH vrijednosti u funkciji omjera C/N odnosno KPK/N (KPK/N 10 i 20) prikazan je slikama 17 i 18 pri početnih 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$.



Slika 17. Profili DO u heterotrofnoj nitrifikaciji-aerobnoj denitrifikaciji 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ u ovisnosti o omjeru KPK/N 10 i 20



Slika 18. Profili pH u heterotrofnoj nitrifikaciji-aerobnoj denitrifikaciji 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ u ovisnosti o omjeru KPK/N 10 i 20

U profilu DO vidljiv je utrošak kisika za istovremenu oksidaciju KPK i $\text{NH}_4\text{-N}$. Veći je utrošak DO pri većem početnom omjeru C/N (Slika 17). U profilu pH opaža se u početku procesa ciljanih pokusa porast pH kao rezultat oksidacije organskih sastojaka, kao i viši pH pri većem omjeru C/N (Slika 18).

Za uklanjanje organskih sastojaka uobičajeni heterotrofi (OHOs) toleriraju pH od 6,0 do 9,0, uz optimalnu izvedbu procesa pri neutralnom pH, a koncentracija otopljenog kisika se uobičajeno u reaktoru održava >2 mg DO/L, ipak i pri $>0,5$ mg DO/L neznatni je učinak koncentracije otopljenog kisika na brzinu razgradnje organskih sastojaka. Također, heterotrofi su otporniji na toksične sastojke od nitrifikanata [2].

4.5. Denitrifikacija – učinak odabranih procesnih čimbenika

Denitrifikacija ovisi o nizu čimbenika, o strukturi mikrobne zajednice i konkurentnosti i brojnosti funkcionalne populacije kao i procesnim čimbenicima, poput: koncentracija otopljenog kisika, pH, temperatura, izvor i dostupnost organskih sastojaka, koncentracija i funkcionalnost mikrobne zajednice, vrijeme zadržavanja mulja, starost mulja, i dr. [41,220,221,222].

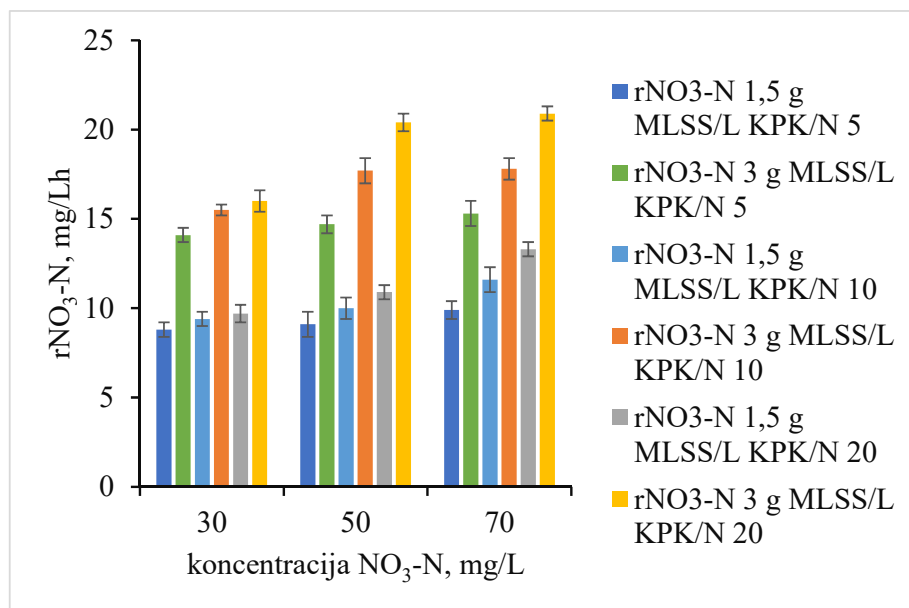
Pokusi denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$ provedeni su uz organske sastojke kao donore elektrona pri vrijednosti omjera KPK/N limitirajućim i nelimitirajućim za denitrificirajuće vrste, budući su organski sastojci nužni za redukciju $\text{NO}_x\text{-N}$. Također, istražen je potencijal mikrobne biomase sa dvije odabrane koncentracije MLSS u denitrifikaciji $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$. Istražena je i endogena denitrifikacija $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ uz unutarstanične zalihe ugljika. Određen je minimalni potrebni omjer C/N za denitrifikaciju $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ uz natrijev acetat kao izvor ugljika.

4.5.1. Denitrifikacija $\text{NO}_3\text{-N}$ u ovisnosti o omjeru KPK/N i količini mikrobne biomase

Pokusi denitrifikacije s nitratom kao akceptorom elektrona su provedeni pri:

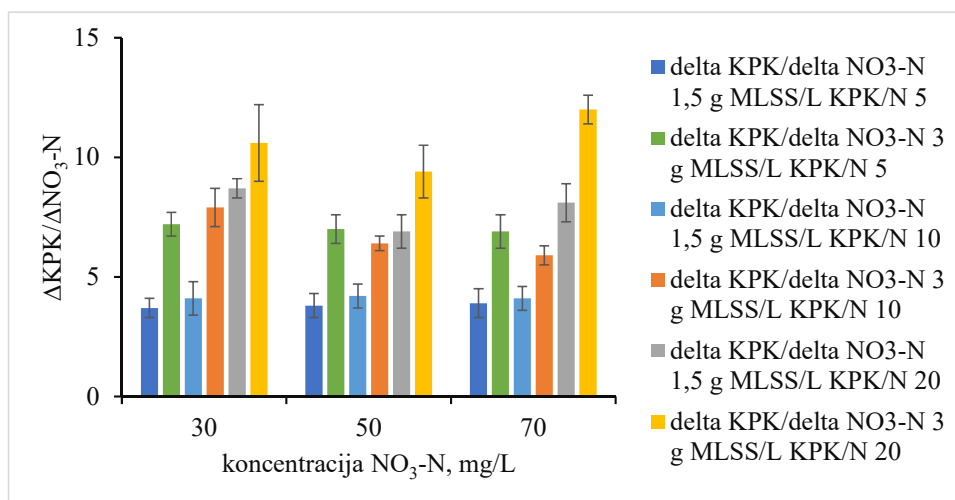
- koncentraciji nitrata 30 ± 4 , 50 ± 5 i 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$
- koncentraciji mikrobne biomase $1,5 \pm 0,3$ i $3 \pm 0,3$ g MLSS/L
- omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Ovisnost brzine denitrifikacije, omjera $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$, učinkovitosti uklanjanja $\text{NO}_3\text{-N}$, brzine oksidacije KPK, i učinkovitosti uklanjanja KPK o koncentraciji nitrata, koncentraciji mikrobne biomase i omjeru KPK/N je prikazano na slikama 19-24.



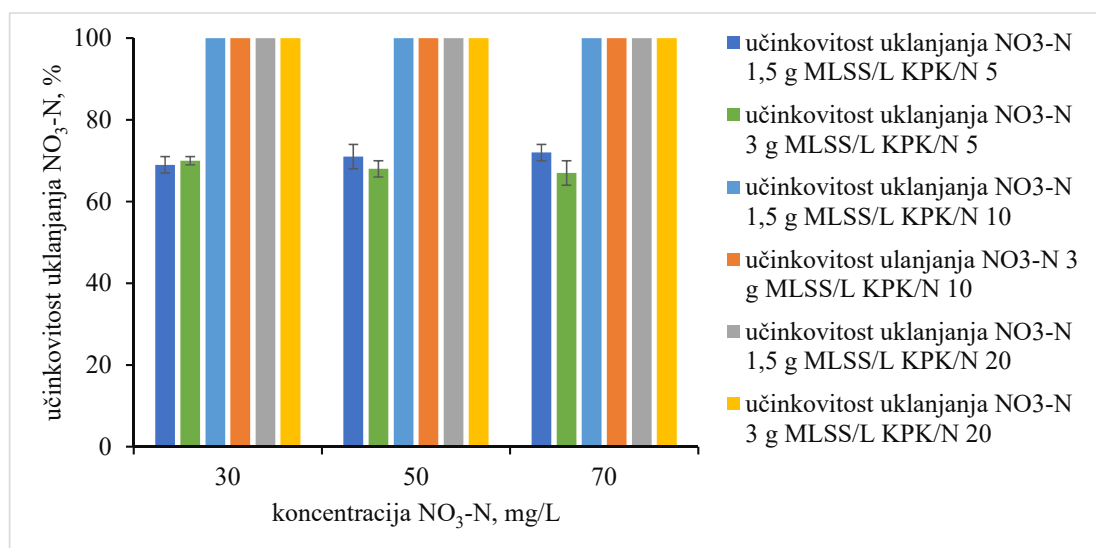
Slika 19. Brzina denitrifikacije u ovisnosti o koncentraciji nitrata, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30±4, 50±5 i 70±5 mg NO₃-N/L, s 1,5±0,3 i 3±0,3 g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Brzina denitrifikacije ima trend rasta s porastom koncentracije nitrata, kao i s porastom koncentracije mikrobne biomase (Slika 19).



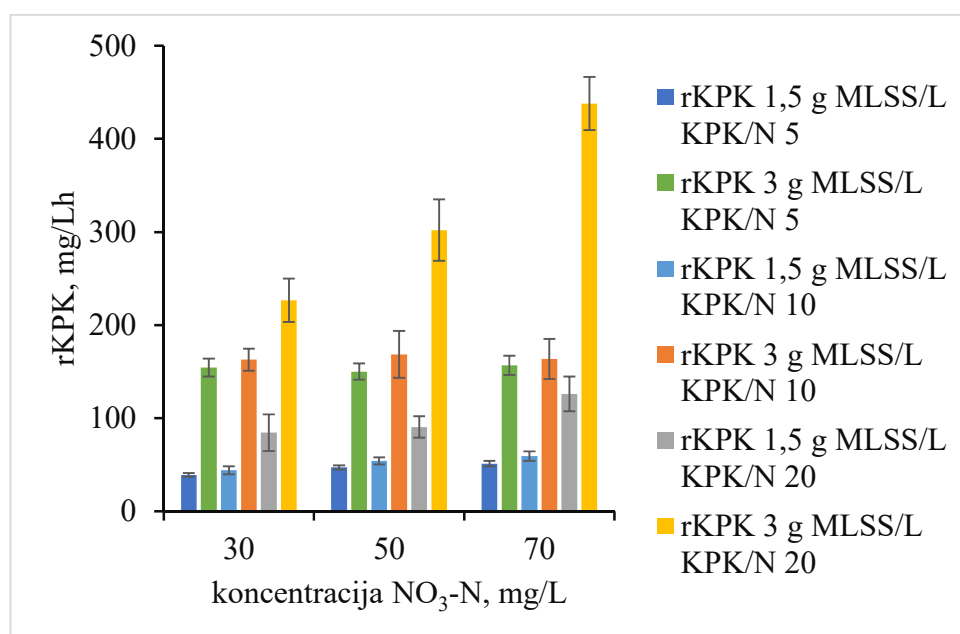
Slika 20. Omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ u ovisnosti o koncentraciji nitrata, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30±4, 50±5 i 70±5 mg NO₃-N/L, s 1,5±0,3 i 3±0,3 g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ raste s porastom koncentracije mikrobne biomase i s porastom omjera KPK/N (Slika 20).



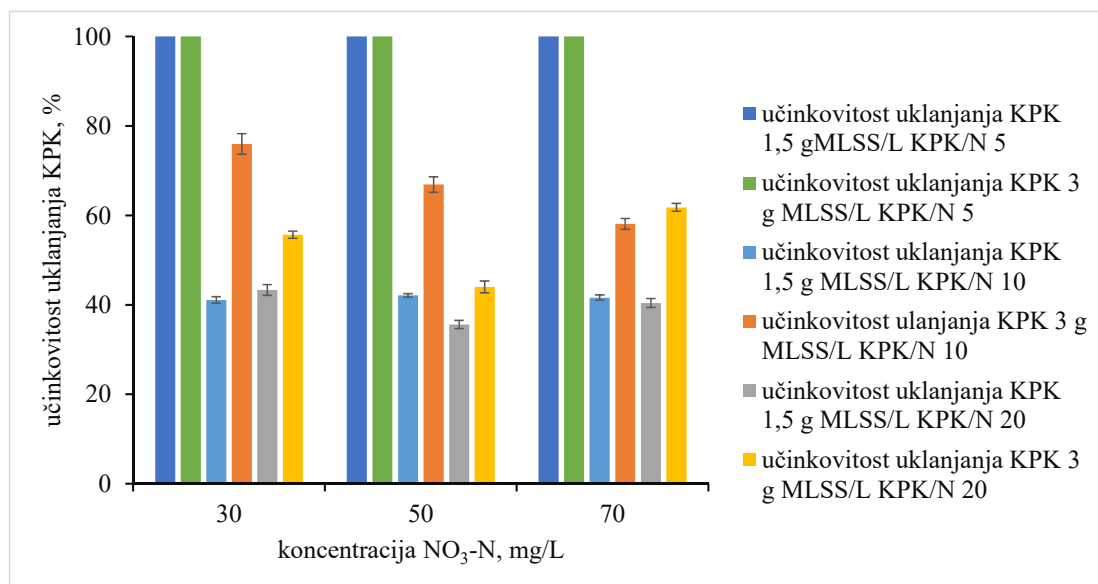
Slika 21. Učinkovitost uklanjanja NO₃-N u ovisnosti o koncentraciji nitrata, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30±4, 50±5 i 70±5 mg NO₃-N/L, s 1,5±0,3 i 3±0,3 g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Učinkovitost uklanjanja nitrata pri KPK/N 5 bila je oko 70%, odnosno 100% pri KPK/N 10 i 20 (Slika 21), pri obje istražene koncentracije mikrobne biomase.



Slika 22. Brzina oksidacije KPK u ovisnosti o koncentraciji nitrata, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30±4, 50±5 i 70±5 mg NO₃-N/L, s 1,5±0,3 i 3±0,3 g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

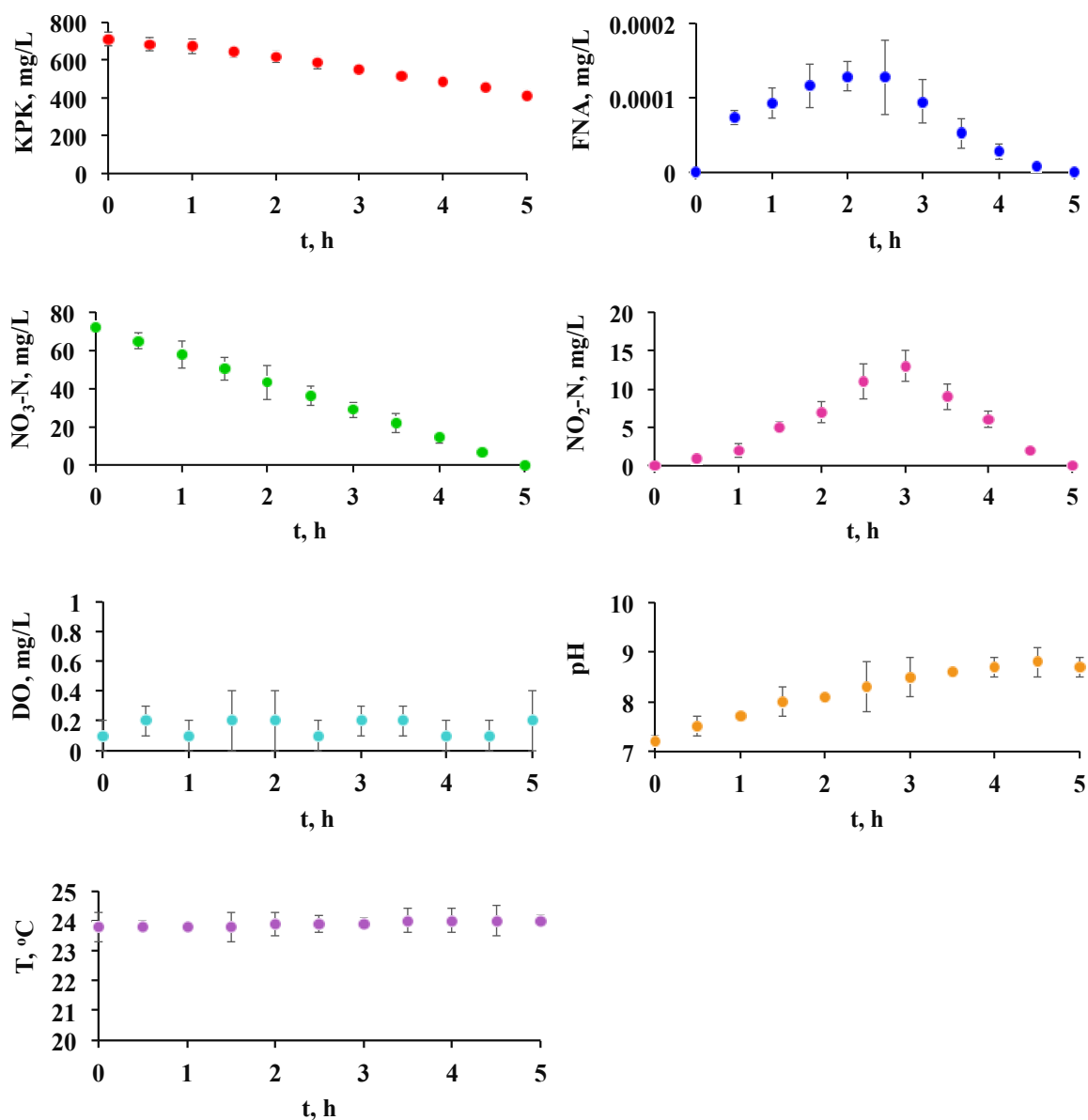
Brzina oksidacije KPK raste s porastom omjera KPK/N, koncentracije mikrobne biomase, i s porastom koncentracije nitrata (Slika 22).



Slika 23. Učinkovitost uklanjanja KPK u ovisnosti o koncentraciji nitrata, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30 ± 4 , 50 ± 5 i 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$, s $1,5 \pm 0,3$ i $3 \pm 0,3$ g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Učinkovitost uklanjanja KPK je bila u rasponu vrijednosti očekivano za istražene koncentracije nitrata, omjere KPK/N i mikrobne biomase, a pri omjeru KPK/N 5 učinkovitost uklanjanja KPK bila je 100% odnosno organski sastojci su bili prisutni u nedovoljnoj količini za denitrifikaciju (Slika 23).

Kinetika denitrifikacije 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ pri omjeru KPK/N 10 s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L je prikazana na slici 24.



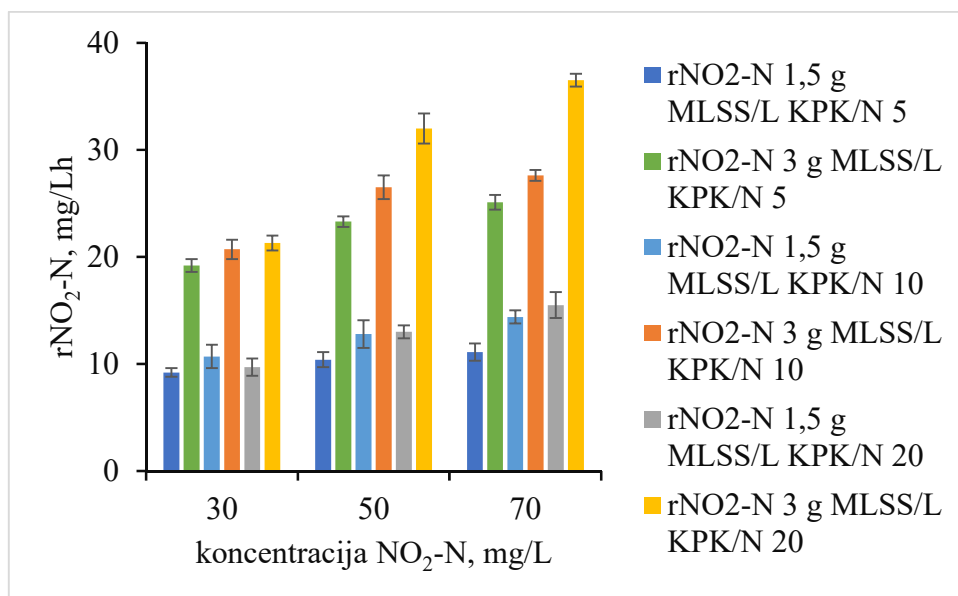
Slika 24. Kinetika denitrifikacije 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ pri KPK/N 10 s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L

4.5.2. Denitrifikacija $\text{NO}_2\text{-N}$ u ovisnosti o omjeru KPK/N i količini mikrobne biomase

Pokusi denitrifikacije s nitritom kao akceptorom elektrona su provedeni pri:

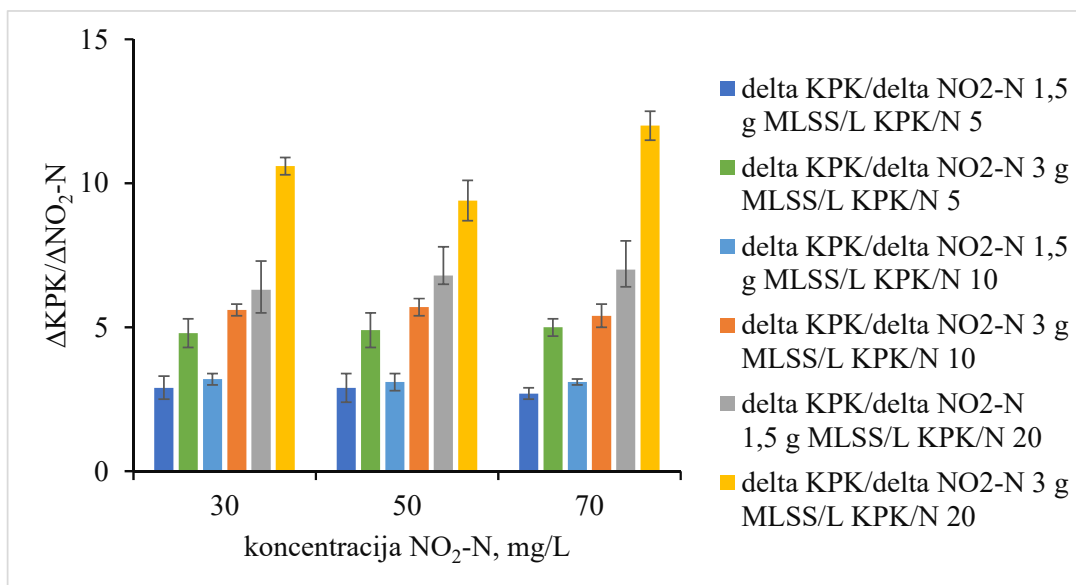
- koncentraciji nitrita 30 ± 5 , 50 ± 5 i 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$
- koncentraciji mikrobne biomase $1,5 \pm 0,2$ i $3 \pm 0,2$ g MLSS/L
- omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Ovisnost brzine denitrifikacije, omjera $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$, učinkovitosti uklanjanja $\text{NO}_2\text{-N}$, brzine oksidacije KPK, i učinkovitosti uklanjanja KPK o koncentraciji nitrita, koncentraciji mikrobne biomase i omjeru KPK/N je prikazana na slikama 25-30.



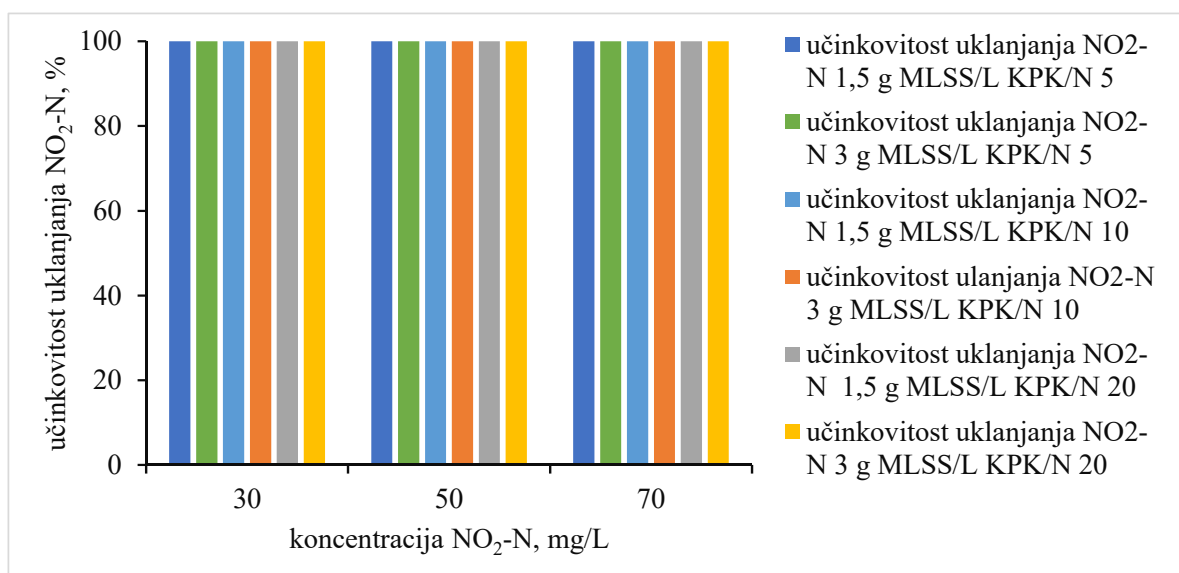
Slika 25. Brzina denitrifikacije u ovisnosti o koncentraciji nitrita, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30 ± 5 , 50 ± 5 i 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, s $1,5 \pm 0,2$ i $3 \pm 0,2$ g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Brzina denitrifikacije ima trend rasta s porastom koncentracije nitrita, kao i s porastom koncentracije mikrobne biomase, i s porastom omjera KPK/N (Slika 25).



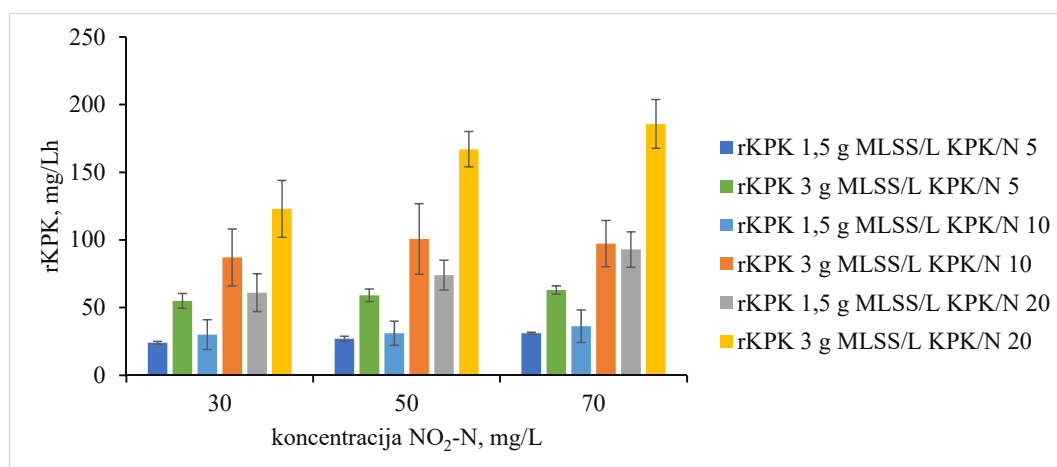
Slika 26. Omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ u ovisnosti o koncentraciji nitrita, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30 ± 5 , 50 ± 5 i 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, s $1,5\pm 0,2$ i $3\pm 0,2$ g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ raste s porastom koncentracije nitrita, s porastom koncentracije mikrobne biomase, i s porastom omjera KPK/N (Slika 26).



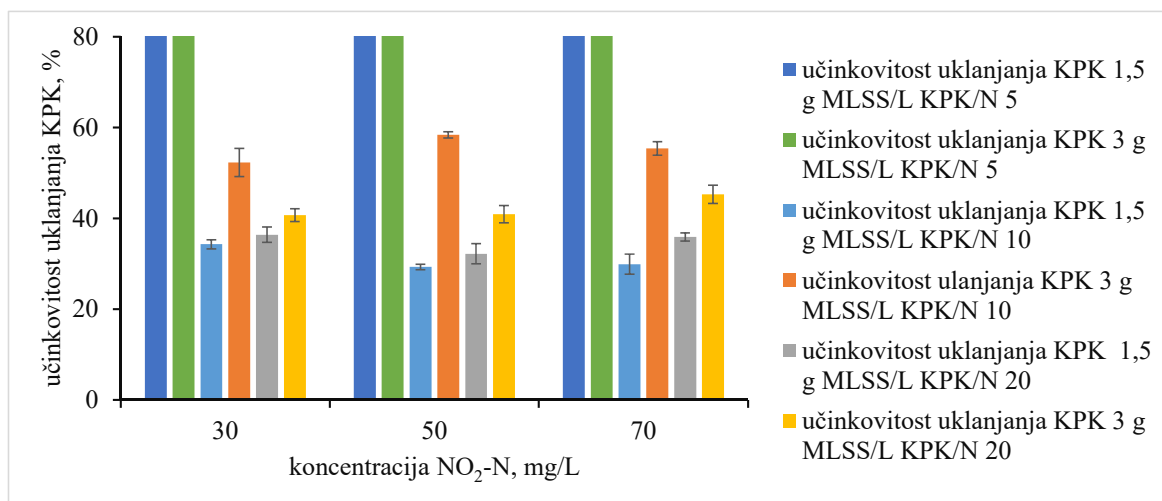
Slika 27. Učinkovitosti uklanjanja $\text{NO}_2\text{-N}$ u ovisnosti o koncentraciji nitrita, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30 ± 5 , 50 ± 5 i 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, s $1,5\pm 0,2$ i $3\pm 0,2$ g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Učinkovitost uklanjanja nitrita je bila 100% pri istraženim koncentracijama mikrobne biomase i omjerima KPK/N (Slika 27).



Slika 28. Brzina oksidacije KPK u ovisnosti o koncentraciji nitrita, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30 ± 5 , 50 ± 5 i 70 ± 2 mg NO₂-N/L, s $1,5 \pm 0,2$ i $3 \pm 0,2$ g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

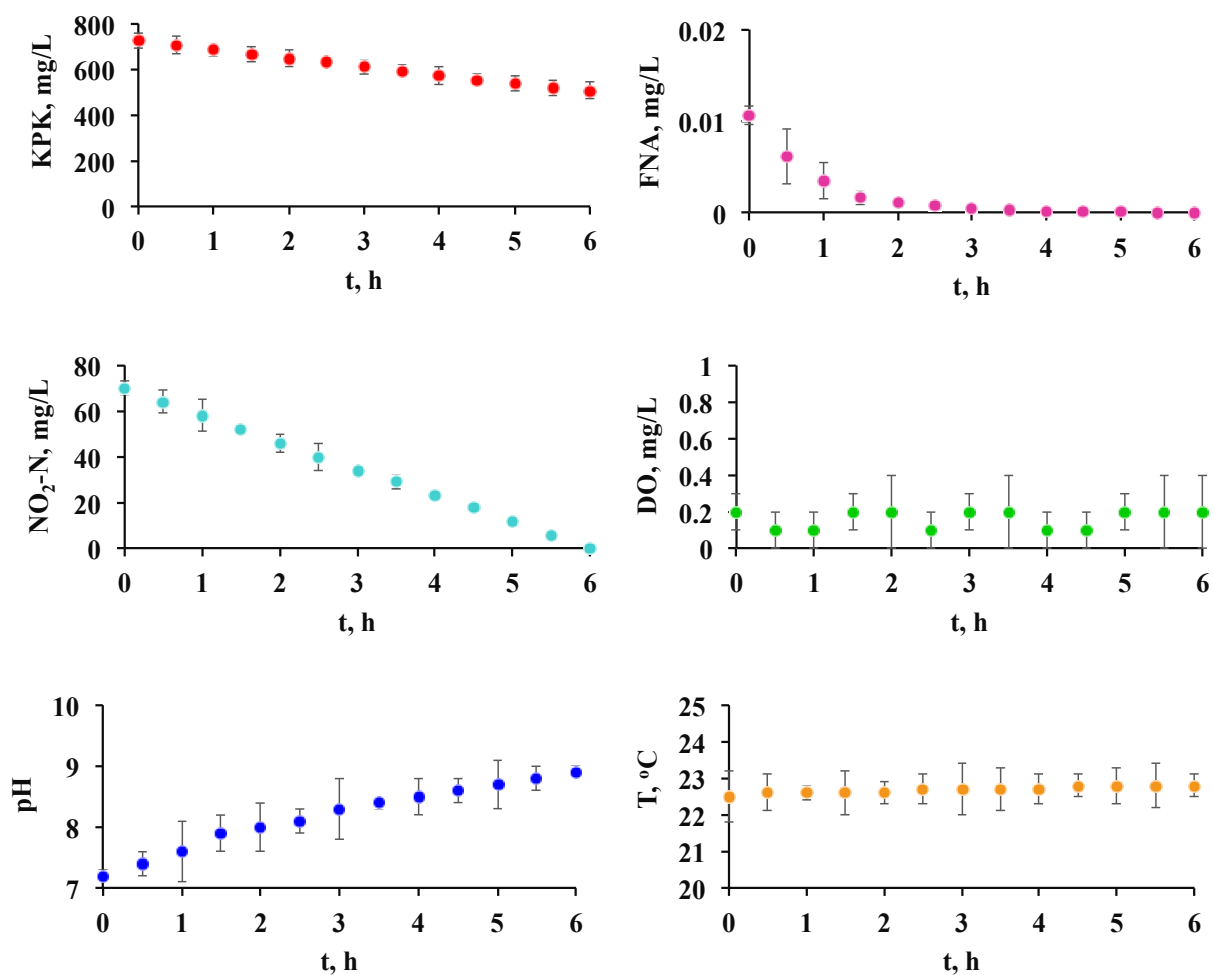
Brzina oksidacije KPK raste s porastom omjera KPK/N, koncentracijom mikrobne biomase, i s porastom koncentracije nitrita (Slika 28).



Slika 29. Učinkovitost uklanjanja KPK u ovisnosti o koncentraciji nitrita, koncentraciji biomase i omjeru KPK/N tijekom denitrifikacije 30 ± 5 , 50 ± 5 i 70 ± 2 mg NO₂-N/L, s $1,5 \pm 0,2$ i $3 \pm 0,2$ g MLSS/L, pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20

Učinkovitost uklanjanja KPK je bila u rasponu vrijednosti za istražene koncentracije nitrita, omjere KPK/N i mikrobne biomase, a za omjer KPK/N 5 bila je 100% (Slika 29).

Kinetika denitrifikacije 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ pri omjeru KPK/N 10 s $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L je prikazana na slici 30.



Slika 30. Kinetika denitrifikacije 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ pri KPK/N 10 i $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L

4.5.3. Minimalno potrebni omjer C/N za denitrifikaciju nitrita i nitrata kao akceptora elektrona

U svrhu određivanja minimalno potrebnog omjera C/N za denitrifikaciju 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ i 30 ± 4 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ provedeni su pokusi denitrifikacije pri C/N 1, 2, 3, 4 i 5 uz acetat kao izvor ugljika, pri $< 0,5$ mg DO/L i $2 \pm 0,1$ g MLSS/L (Tablice 20 i 21).

Tablica 20. Učinkovitost denitrifikacije 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ i 30 ± 4 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ pri $< 0,5$ mg DO/L i $2\pm0,1$ g MLSS/L u ovisnosti o raspoloživim organskim sastojcima (C/N 1-5)

Omjer C/N	Redukcija $\text{NO}_3\text{-N}$, %	Redukcija $\text{NO}_2\text{-N}$, %	Preostali KPK – $\text{NO}_3\text{-N}$ akceptor	Preostali KPK – $\text{NO}_2\text{-N}$ akceptor
1	$17\pm0,5$	37 ± 1	0%	0%
2	37 ± 2	68 ± 4	0%	0%
3	61 ± 2	100	0%	49 mg KPK/L (29%)
4	100	100	75 mg KPK/L (33%)	105 mg KPK/L (47%)
5	100	100	132 mg KPK/L (47%)	162 mg KPK/L (57%)

U denitrifikaciji 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ i 30 ± 4 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ uz natrijev acetat kao izvor ugljika postignuta je potpuna denitrifikacija $\text{NO}_3\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$ pri omjeru C/N 4 odnosno C/N 3, ali je u oba procesa preostalo C koji je dodan u suvišku (Tablica 19).

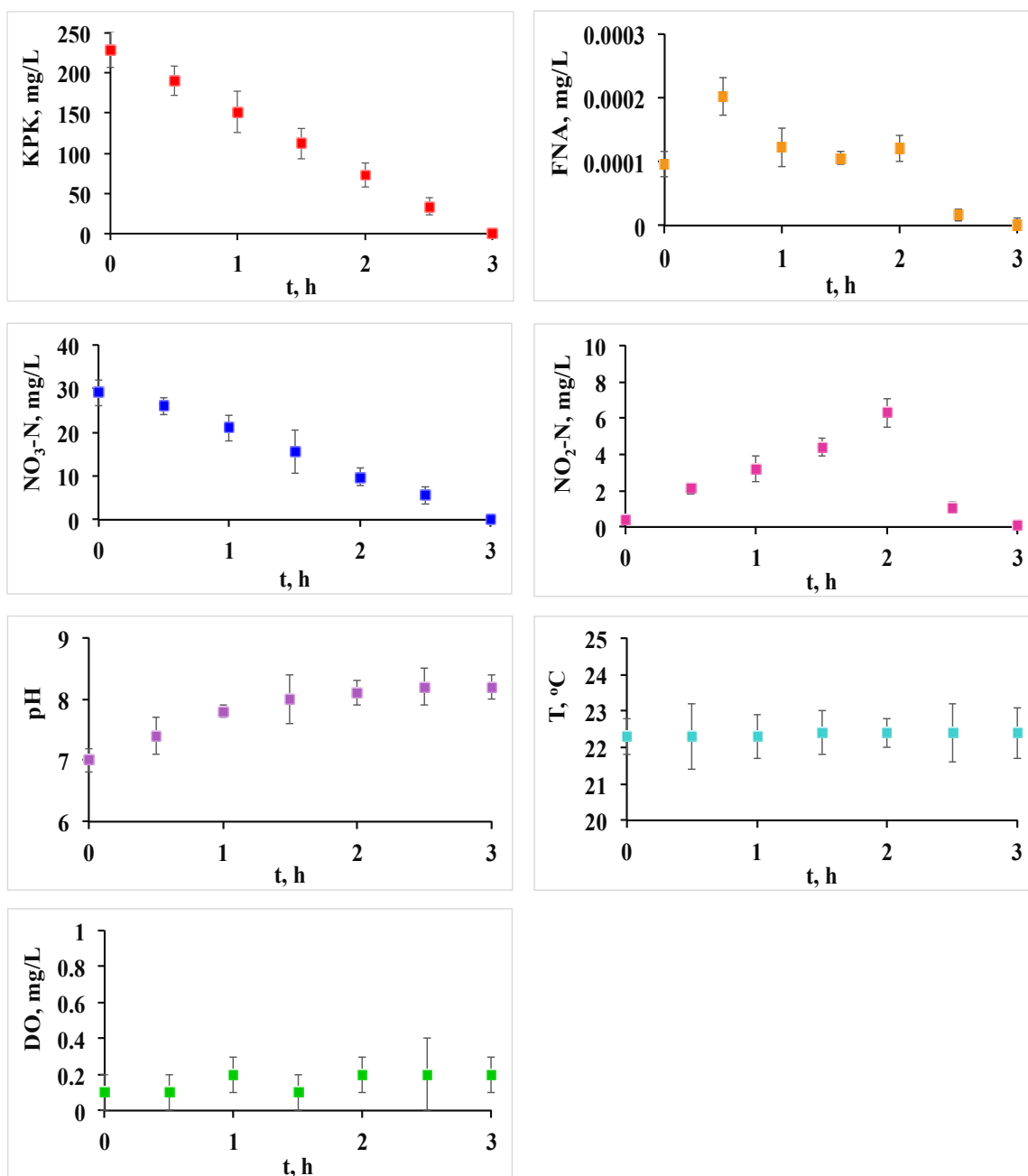
Da bi se odredio minimalni potreban omjer C/N provedeni su dodatni pokusi denitrifikacije pri uskom rasponu omjera C/N a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 21.

Tablica 21. Minimalno potrebni omjer C/N za denitrifikaciju 30 ± 4 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ i 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ pri $< 0,5$ mg DO/L i $2\pm0,1$ g MLSS/L

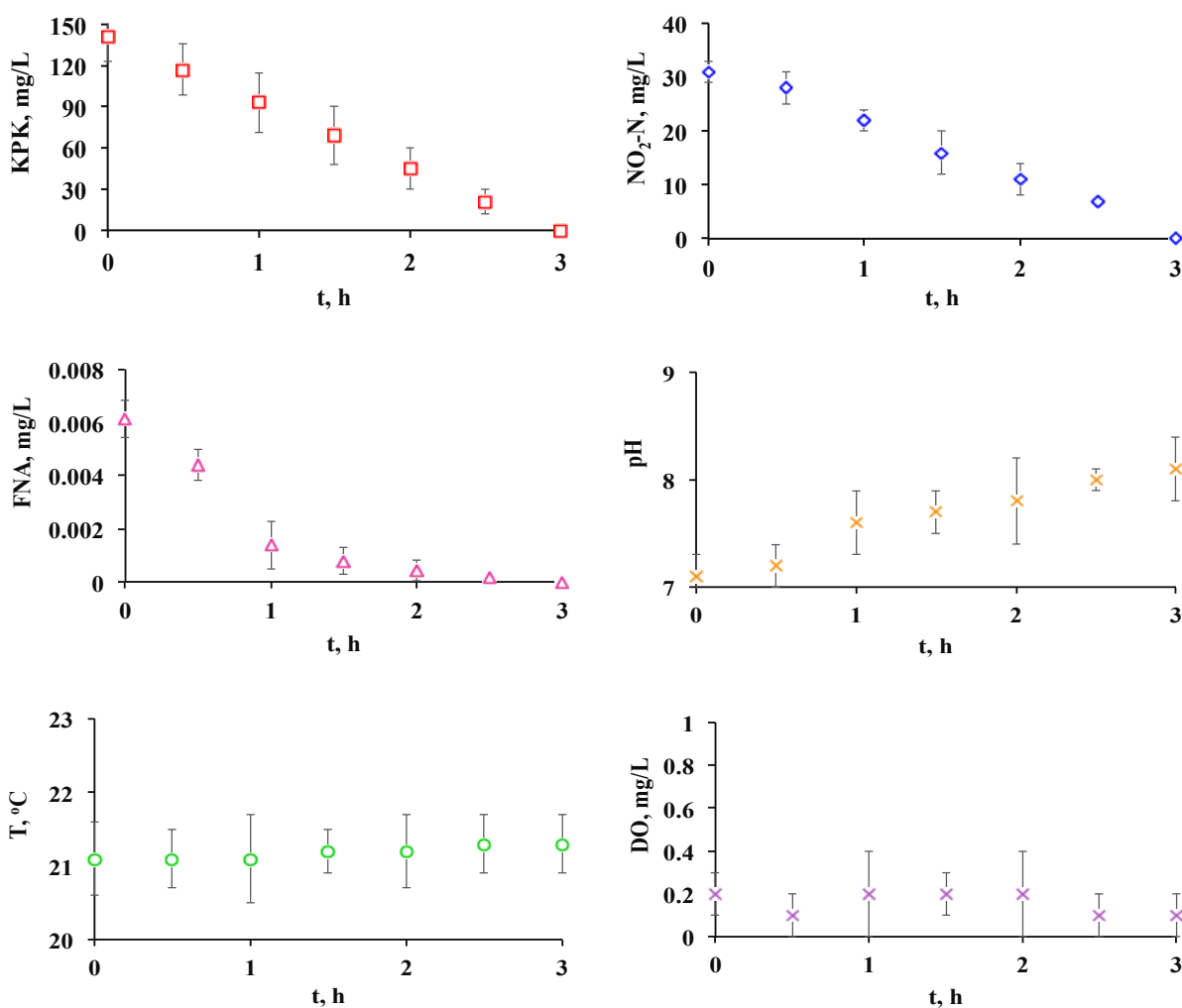
Omjer C/N	Redukcija $\text{NO}_2\text{-N}$, %	Preostali KPK – $\text{NO}_2\text{-N}$ akceptor	Omjer C/N	Redukcija $\text{NO}_3\text{-N}$, %	Preostali KPK – $\text{NO}_3\text{-N}$ akceptor
2,2	82 ± 4	0%	3,2	68 ± 3	0%
2,4	100	0%	3,4	74 ± 2	0%
2,6	100	27 mg KPK/L (18%)	3,6	89 ± 3	0%
2,8	100	38 mg KPK/L (24%)	3,8	100	0%
3	100	49 mg KPK/L (29%)	4	100	75 mg KPK/L (33%)

Rezultati pokazuju veću potrebu za ugljikom pri denitrifikaciji $\text{NO}_3\text{-N}$ u odnosu na $\text{NO}_2\text{-N}$, i to 1,58x više C treba za denitrifikaciju $\text{NO}_3\text{-N}$ u odnosu na $\text{NO}_2\text{-N}$ (Tablica 21).

Uobičajene promjene KPK, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA, vrijednosti pH, temperature i DO u denitrifikaciji 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ pri određenom minimalno potrebnom omjeru C/N 3,8 prikazane su na slici 31, a u denitrifikaciji 30 ± 4 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ pri određenom minimalno potrebnom omjeru C/N 2,4 na slici 32.



Slika 31. Varijacije koncentracije KPK, NO₃-N, NO₂-N, FNA, vrijednosti pH, temperature i DO u denitrifikaciji 30±4 mg NO₃-N/L pri omjeru C/N 3,8



Slika 32. Varijacije koncentracije KPK, NO₂-N, FNA, vrijednosti pH, temperature i DO u denitrifikaciji 30±4 mg NO₂-N/L pri omjeru C/N 2,4

4.5.4. Endogena denitrifikacija

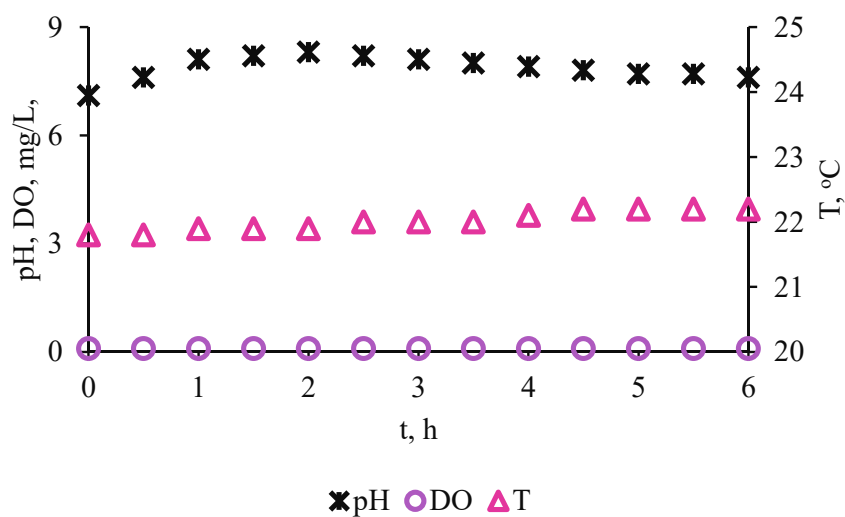
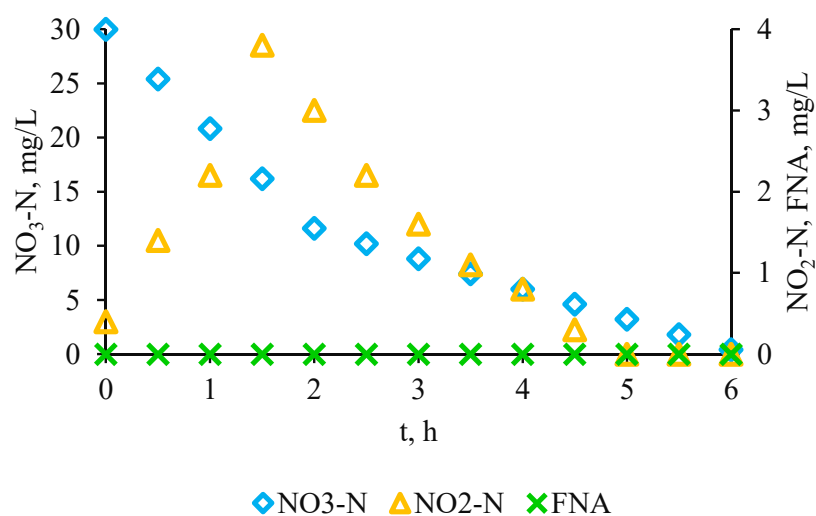
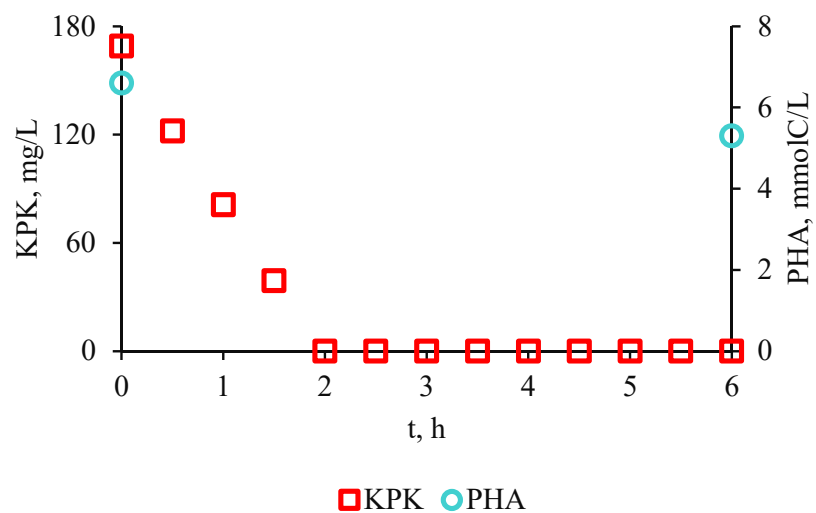
U endogenoj denitrifikaciji mikroorganizmi upotrebljavaju unutarstanične zalihe ugljika uz manju brzinu denitrifikacije u usporedbi s procesom denitrifikacije uz vanjske izvore ugljika. Endogenu denitrifikaciju provode uobičajeni heterotrofni denitrifikanti i DGAOs. Pri tome je važno osigurati procesne čimbenike i za pohranjivanje/skladištenje unutarstaničnih rezervi ugljika i za provedbu endogene denitrifikacije [9,198,199,202].

Pokusi denitrifikacije uz endogene izvore ugljika provedeni su s ciljem da se istraži aktivnost mikrobne biomase u korištenju unutarstaničnih rezervi ugljika za redukciju nitrata i/ili nitrita (endogena denitrifikacija). Provedeni su pokusi s 30±4 mg NO₃-N/L i 30±4 mg NO₂-N/L pri omjerima C/N 1-3, pri 2±0,1 g MLSS/L a rezultati su prikazani u tablici 22. Kinetika

denitrifikacije 30 mg NO₃-N/L uz unutarstanične rezerve ugljika, nakon iscrpljivanja vanjskog izvora ugljika dodanog u proces denitrifikacije kao limitirajući čimbenik pri omjeru C/N 3, prikazana je slikom 33.

Tablica 22. Učinkovitost denitrifikacije 30±4 mg NO₂-N/L i 30±4 mg NO₃-N/L pri < 0,5 mg DO/L i 2±0,1 g MLSS/L u ovisnosti o raspoloživim organskim sastojcima (C/N 1-3) – endogena denitrifikacija

Omjer C/N	Izvor ugljika	Redukcija NO ₃ -N, %	Redukcija NO ₂ -N, %	Preostali KPK uz NO ₃ -N akceptor e ⁻ ; utrošak PHA, mmolC/L	Preostali KPK uz NO ₂ -N akceptor e ⁻ ; utrošak PHA, mmolC/L
1	KPK	17±0,5%	37±1%	0%	0%
	PHA	37 %	53 %	ΔPHA 2,5	ΔPHA 3,1
2	KPK	37±2	68±4	0%	0%
	PHA	82 %	100 %	ΔPHA 5,5	ΔPHA 0,9
3	KPK	61±2		0%	
	PHA	100 %		ΔPHA 1,3	



Slika 33. Endogena denitrifikacija 30 mg NO₃-N/L pri C/N omjeru 3

4.6. Istovremena denitrifikacija i uklanjanje P, denitrificirajuća defosfatacija, s NO₂-N kao akceptorom elektrona pri anoksičnim uvjetima

Budući da nitrit djeluje inhibirajuće na aktivnost DPAOs, denitrificirajuća defosfatacija je manje stabilna u usporedbi s konvencionalnim biološkim uklanjanjem P, te stoga predstavlja izazov za korištenje tehnologije denitrificirajuće defosfatacije u stvarnim sustavima [223,224]. Zbog kontradiktornih zaključaka o utjecaju nitrita na istovremenu denitrifikaciju i uklanjanje P - denitrificirajuće uklanjanje P, izazovno je procijeniti učinkovitost i stabilnost denitrificirajućeg uklanjanja P s nitritom kao akceptorom elektrona.

Stoga je glavni cilj ove serije pokusa bio ispitati denitrificirajuću defosfataciju kroz provođenje procesa istovremene denitrifikacije i unutarstaničnog unosa P u anoksičnim uvjetima s istovremeno prisutnim donorom (acetatom) i akceptorom elektrona (nitritom), te istražiti učinak ograničavajuće i neograničavajuće koncentracije raspoloživih organskih sastojaka - izvora ugljika na aktivnost DPAOs i brzinu i učinkovitost uklanjanja N i P.

Za bolje razumijevanje metaboličkog ponašanja DPAOs u anoksičnim uvjetima uz NO₂-N kao akceptore elektrona, za koje se navodi da mogu narušavati aktivnost DPAOs [55,170,190,194,225,226], istražena je aktivnost DPAOs za istovremeno uklanjanje N i P u anoksičnim uvjetima uz NO₂-N kao akceptore elektrona pri koncentraciji do 80 mg NO₂-N/L. Pokusi su provedeni pri odabranim operativnim uvjetima N/P 2, 3 i 4 i uz raspoložive organske sastojke (C/N) iz natrijeva acetata u ograničavajućoj i neograničavajućoj koncentraciji, za početnih 20±1 mg PO₄-P/L, s ciljem da se odredi minimalni omjer C/N pri kojem se postiže maksimalni učinak uklanjanja N i P, kao i učinkovitost i brzina uklanjanja N i P pri istraženim operativnim uvjetima.

Šaržni pokusi aktivnosti DPAOs za istovremenu denitrifikaciju i unos P, pri anoksičnim uvjetima, pri (nizom pokusa) određenom minimalno potrebnom omjeru C/N kao i prekomjernom omjeru C/N, prikazani su u tablici 23.

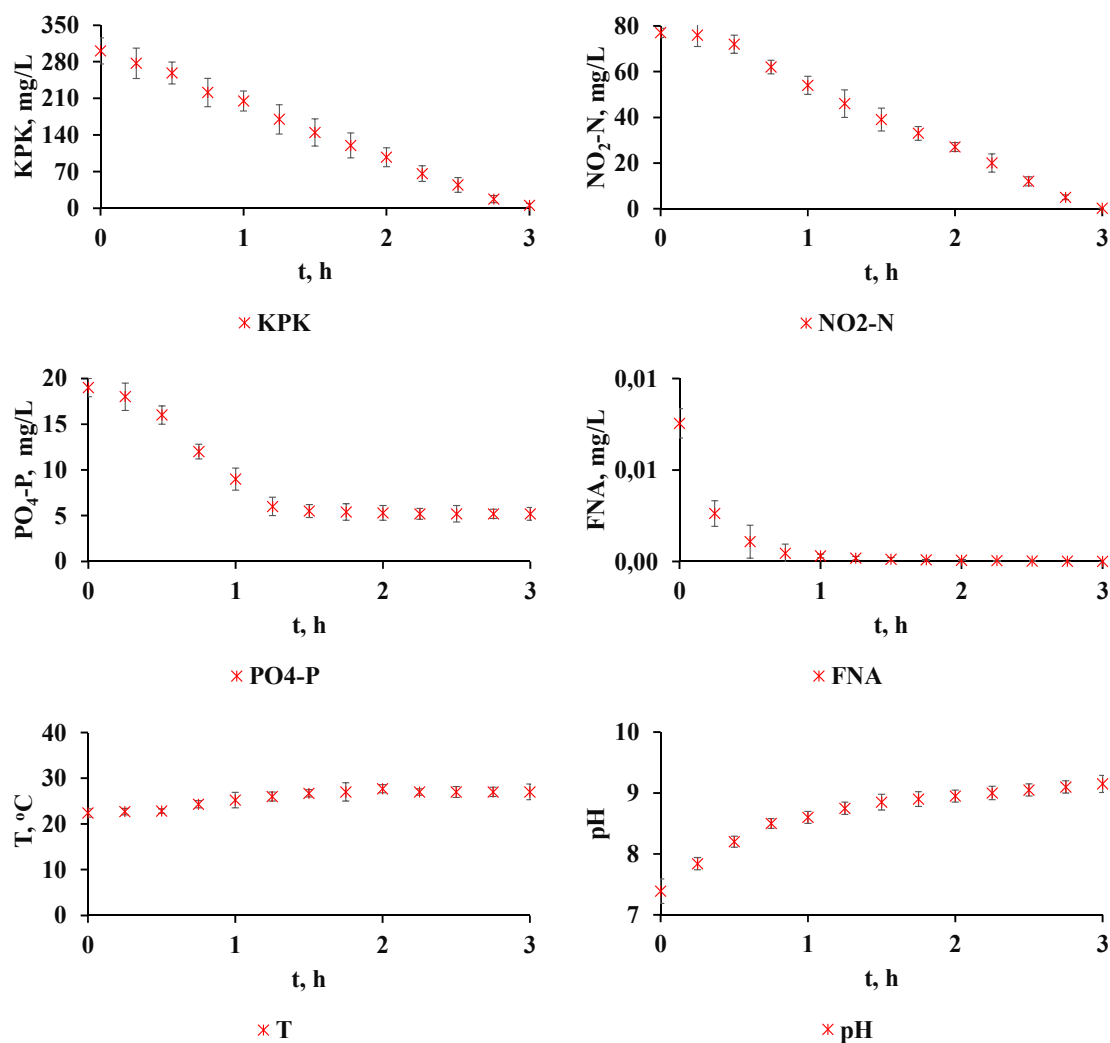
Tablica 23. Učinkovitost uklanjanja KPK, N i P i brzine uklanjanja N i P pri anoksičnim uvjetima pri minimalno potrebnom i prekomjernom omjeru C/N, tijekom istovremene denitrifikacije i unosa P pri anoksičnim uvjetima

PO ₄ -P, mg/L	NO ₂ -N, mg/L	N/P	C/N	rN, mgN/Lh	rP, mgP/Lh	N _{ukl} , %	P _{ukl} , %	KPK _{ukl} , %
20±1	40±2	2	4	20±1,3	8,3±0,5	100	84±1,2	> 97
		2	7	26±2	7±1	100	75±3	45±8
20±1	60±3	3	3	23,7±2,0	6,7±0,7	100	83±1	> 97
		3	7	27±3	4,9±0,9	100	68±2	49±10
20±1	80±3	4	2	25,9±1,7	4,8±0,7	100	74±2	> 97
		4	7	29±2	3,5±0,4	100	62±4	55±11

U svim šaržnim pokusima, pri omjerima N/P 2, 3, 4 za početnih 20 mg PO₄-P/L, istraženo je povećanje omjera C/N 1-7 a rezultiralo je povećanjem brzine i učinkovitosti uklanjanja NO₂-N i P do određenog minimalno potrebnog omjera C/N (Tablica 23), a pri kojem je ostvarena najveća najveća brzina denitrifikacije i najveća brzina unosa fosfata, i to pri 40±2 mg NO₂-N/L i C/N 4 (N/P 2), pri 60±3 mg/L NO₂-N i C/N 3 (N/P 3), te pri 80±3 mg NO₂-N/L i C/N 2 (N/P 4) (Tablica 23).

Istovremena denitrifikacija i unos P, denitrificirajuća defosfatacija, s većom količinom raspoloživog ugljika od minimalno potrebnog - prekomjernom količinom organskih sastojaka, pri C/N 7 (Tablica 23), pokazuje daljnji trend laganog povećanja brzine denitrifikacije s porastom početne koncentracije nitrita ali i smanjenje brzine anoksičnog unosa P. Učinkovitost uklanjanja N pri prekomjernom omjeru C/N 7 je potpuna za sve istražene početne koncentracije nitrita (40-80 mg NO₂-N/L), dok se učinkovitost uklanjanja P smanjuje za oko 13% s porastom početne koncentracije nitrita, i također preostaju neiskorišteni organski sastojci izraženi kao KPK od 45 do 55% (Tablica 23).

Uobičajene promjene KPK, NO₂-N, PO₄-P, FNA, temperature i pH vrijednosti tijekom procesa istovremene denitrifikacije i unosa P pri anoksičnim uvjetima, denitrificirajuće defosfatacije, pri određenoj minimalno potrebnj količini ugljika (C/N 2) za denitrifikaciju 80±3 mg NO₂-N/L, pri N/P 4, prikazani su na slici 34.



Slika 34. Varijacije KPK, NO₂-N, PO₄-P, temperature, FNA i pH u šaržnom pokusu denitrificirajuće defosfatacije pri 80±3 mg NO₂-N/L i pri N/P 4 i C/N 2

4.7. Poboljšano uklanjanje N endogenom denitrifikacijom u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju u obradi otpadne vode niskog omjera C/N s ciljem uklanjanja N i P

U obradi otpadne vode niskog omjera C/N (KPK/N) raspoloživi KPK (organski sastojci) djeluje kao ograničavajući čimbenik za denitrifikaciju i otpuštanje fosfora [184,185,186,187,188,193]. Rješenje tog problema je primjena procesa u kojima aktivnost ispoljavaju DPAOs, denitrificirajući organizmi koji akumuliraju fosfate uz NO₃-N i/ili NO₂-N kao akceptore elektrona, čime se istovremeno uklanja N i P bez izvanstaničnog izvora ugljika [186,187,188,227], a u produženoj anoksičnoj fazi procesa endogena denitrifikacija aktivnošću DGAOs. DPAOs imaju metabolička svojstva slično PAOs vrstama [228,229,230], aktiviraju se

u naizmjeničnim anaerobnim/anoksičnim uvjetima, te koriste $\text{NO}_2\text{-N}$ i /ili $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptore elektrona, umjesto O_2 kojeg koriste PAOs [187,188,189,193,227].

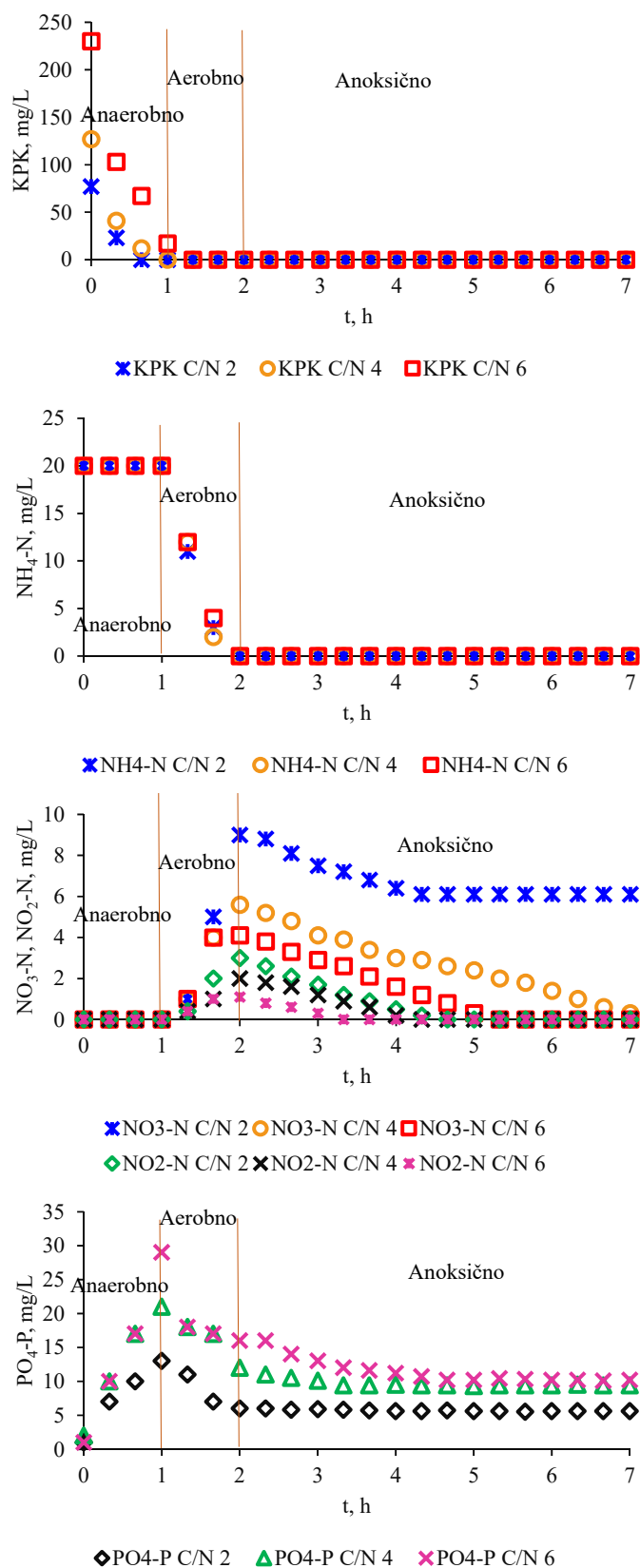
Benefiti primjene DPAOs u BNR procesima je moguća ušteda energije do 30%, KPK do 50%, s manjom proizvodnjom mulja do 50% [191].

Proces koji promovira primjenu i aktivnost DPAOs i DGAOs u svrhu učinkovitog uklanjanja N i P i prikladan je za pročišćavanje otpadnih voda s niskim KPK, je anaerobno/aerobno/anoksični proces uz endogenu denitrifikaciju (A/O/A with ED).

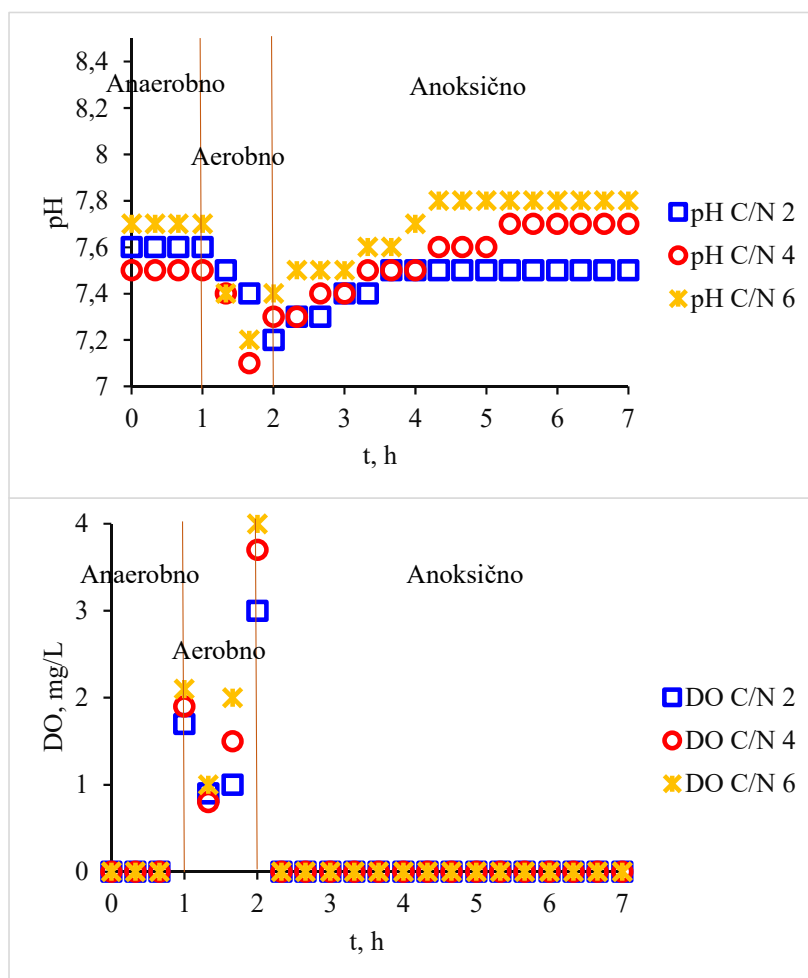
Pokusi istovremene denitrifikacije i uklanjanja P u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju provedeni su s ciljem da se istraži potencijal mikrobne kulture za poboljšano uklanjanje N i P iz otpadne vode niskog omjera C/N.

Pokusi su provedeni u dva režima.

Pokusi anaerobno/aerobno/anoksične konfiguracije uz endogenu denitrifikaciju provedeni pri 1 h anaerobne faze, 1 h aerobne faze i produžene anoksične faze od 5 h, pri omjerima C/N 2, 4 i 6 i pri početnih 20 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, su u šaržnim pokusima dali rezultate prikazane na slikama 35 i 36.

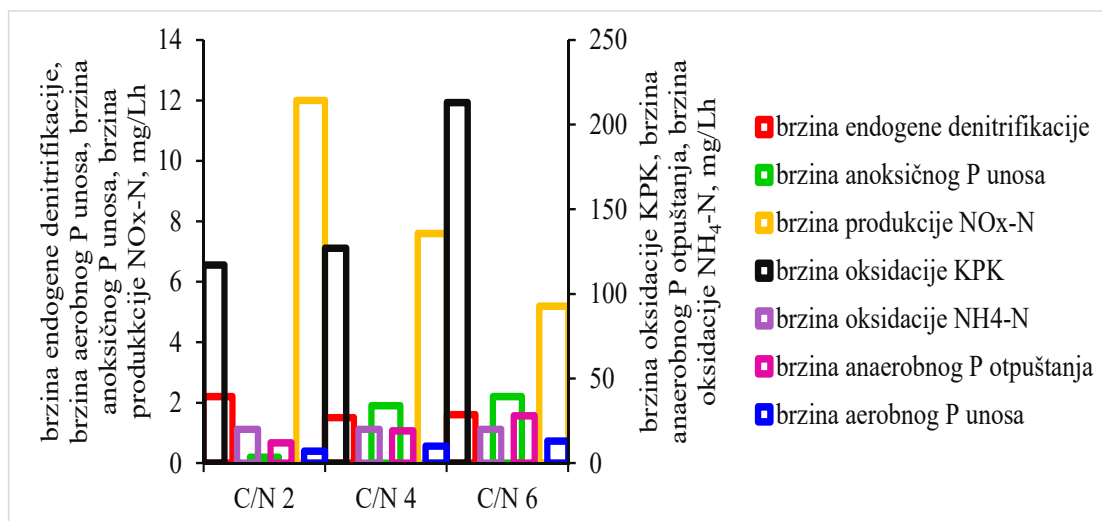


Slika 35. Varijacije KPK, NH₄-N, NO₃-N, NO₂-N i PO₄-P u pokusu uklanjanja N i P u A/O/A procesu uz endogenu denitrifikaciju pri C/N 2, 4 i 6 iz natrijeva acetata, za početnih 20 mg NH₄-N/L

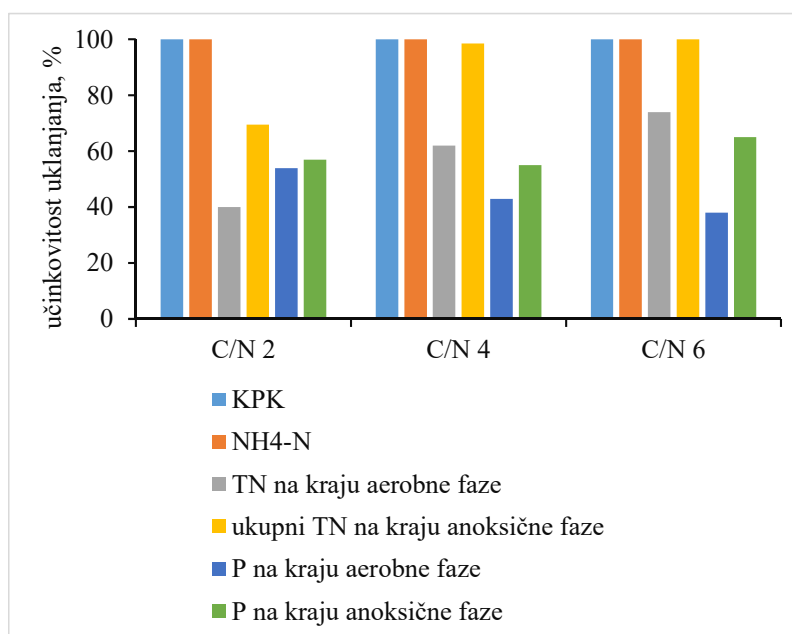


Slika 36. Vrijednosti pH i DO u pokusu uklanjanja N i P u A/O/A procesu uz endogenu denitrifikaciju pri C/N 2, 4 i 6 iz natrijeva acetata, za početnih 20 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$

Pri toj konfiguraciji vođenja procesa ostvarene brzine učinkovitosti uklanjanja KPK, $\text{NH}_4\text{-N}$, ukupnog dušika i P, kao i brzine oksidacije KPK, $\text{NH}_4\text{-N}$, otpuštanja P, unosa P i redukcije N prikazane su na slikama 37 i 38.



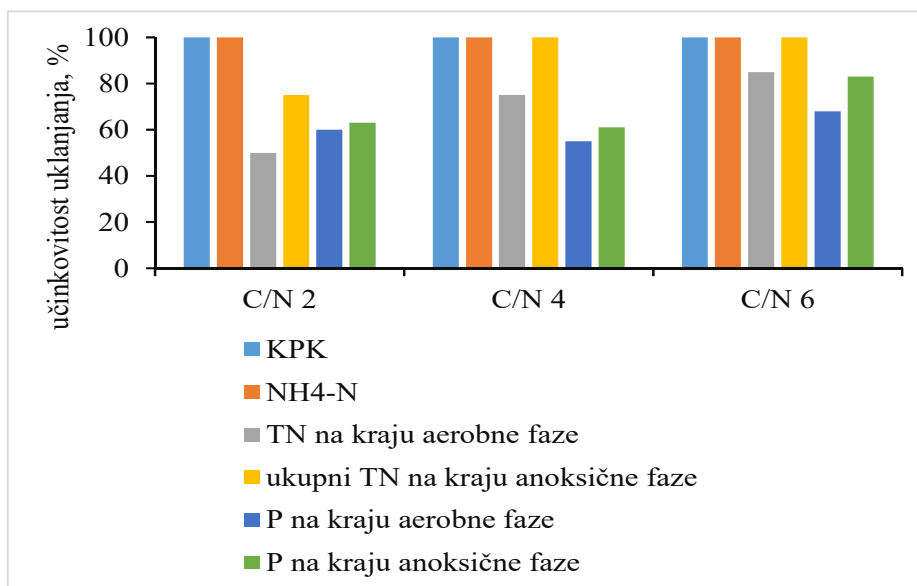
Slika 37. Brzina endogene denitrifikacije, otpuštanja P, aerobnog i anoksičnog unosa P, produkcije NOx-N i oksidacije NH4-N tijekom šaržnog pokusa pri konfiguraciji A/O/A uz endogenu denitrifikaciju pri C/N 2, 4 i 6 iz natrijeva acetata, za početnih 20 mg NH4-N/L



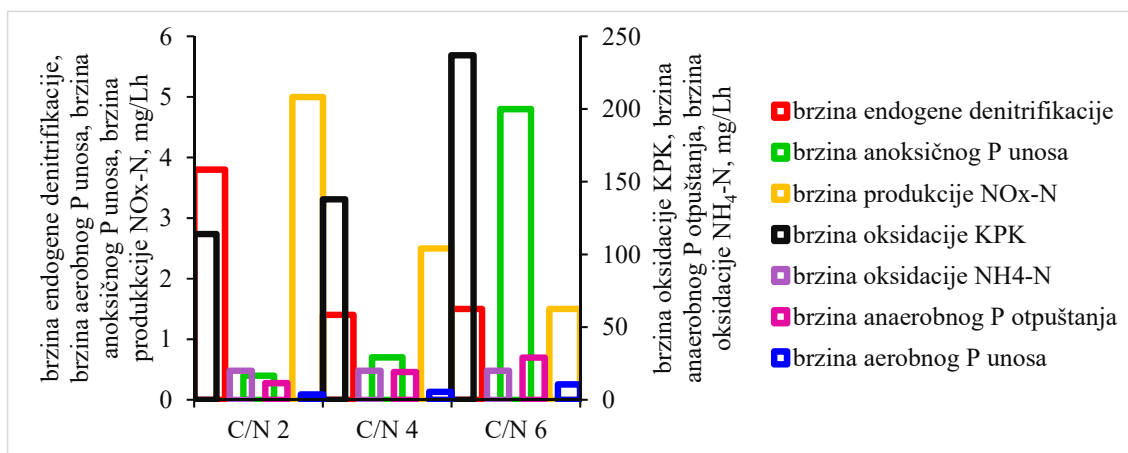
Slika 38. Učinkovitost uklanjanja KPK, NH4-N, dušika i fosfora na kraju aerobne/početku anoksične faze i na kraju anoksične faze, u konfiguraciji A/O/A procesa uz endogenu denitrifikaciju, pri C/N 2, 4 i 6, za početnih 20 mg NH4-N/L

U svrhu poboljšanja učinkovitosti uklanjanja P, u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju, provedeni su pokusi pri režimu u kojem je produljena aerobna faza za sat vremena i skraćena anoksična faza za sat vremena, pa je vrijeme anaerobne, aerobne i

anoksične faze iznosilo 1 h, 2 h i 4 h. Rezultati učinkovitosti procesa pri toj konfiguraciji su prikazani slikama 39 i 40.



Slika 39. Učinkovitost uklanjanja KPK, NH₄-N, ukupnog dušika na kraju aerobne faze, ukupnog dušika na kraju anoksične faze, uklanjanja P na kraju aerobne faze i uklanjanje P na kraju anoksične faze



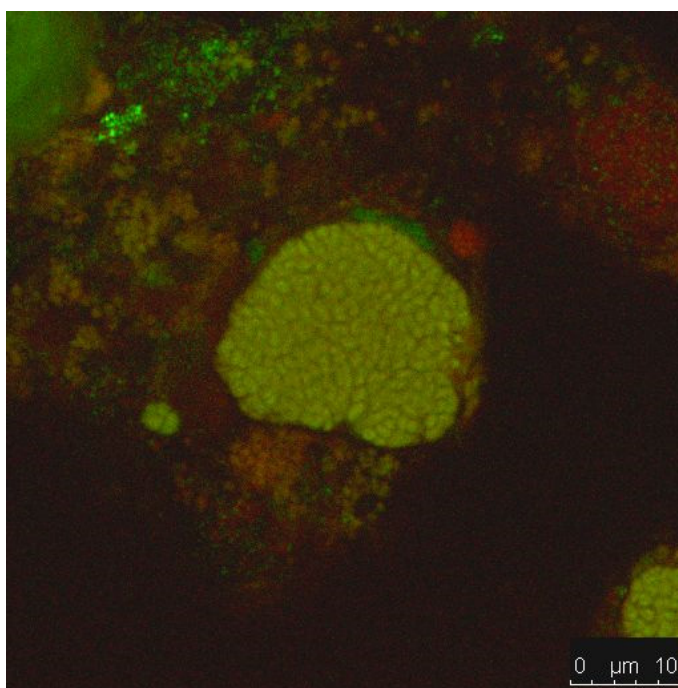
Slika 40. Brzine endogene denitrifikacije, brzine anoksičnog P unosa, brzine produkcije NO_x-N, brzine oksidacije KPK, brzine oksidacije NH₄-N, brzine anaerobnog P otpuštanja i brzine aerobnog P unosa

Produljenje aerobne faze za sat vremena i skraćivanje anoksične faze za sat vremena je rezultiralo višim uklanjanjem i N i P (Slike 39 i 40), u odnosu na ranije opisanu konfiguraciju (Slike 35-38).

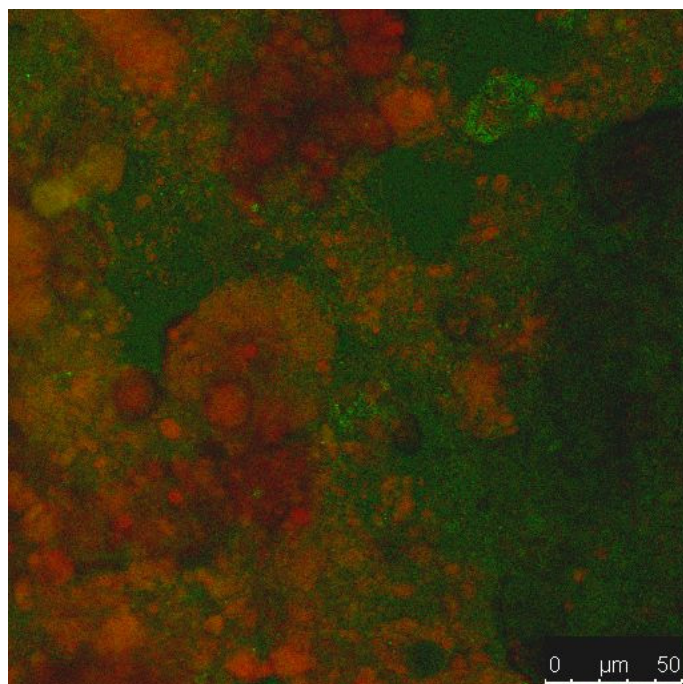
4.8. FISH analiza mikrobnih klastera aktivnog mulja i dokazivanje poliP

Aktivni mulj je analiziran FISH metodom [212] za dokazivanje skupina mikroorganizama prisutnih u aktivnom mulju koji mogu provoditi procese nitrifikacije, denitrifikacije i istovremene denitrifikacije i uklanjanja P (denitrificirajuće defosfatacije), i poboljšanog uklanjanja N endogenom denitrifikacijom, te primjenom konfokalne laserske skenirajuće mikroskopije (CLSM) i vizualizirani i dokumentirani.

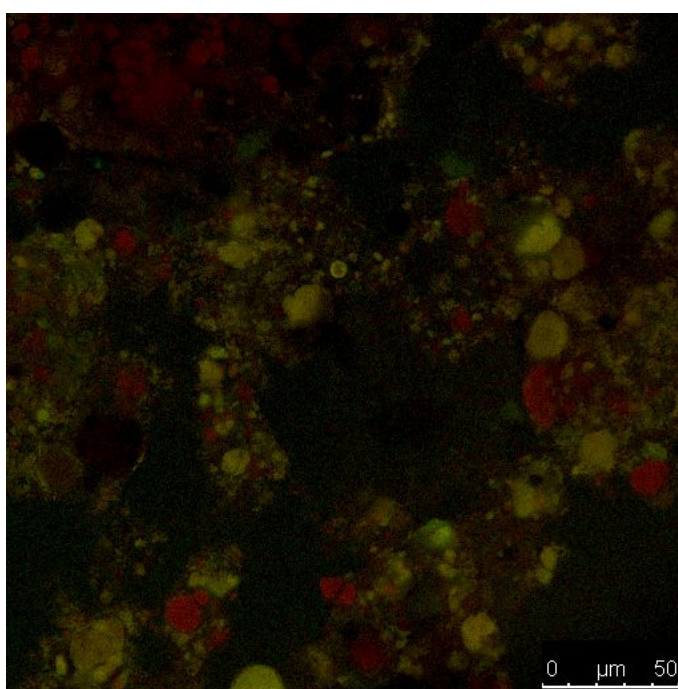
Uzorak aktivnog mulja tijekom procesa nitrifikacije je testiran na prisustvo amonijak- i nitrit-oksidirajućih bakterija, a dokazane ciljane mikrobne skupine su prikazane na slikama 41 i 42. Rezultat testiranja uzorka aktivnog mulja na denitrifikante je prikazan na slici 43. U procesu denitrificirajuće defosfatacije aktivan mulj je testiran na PAOs i DPAOs (Slika 44) a u procesu endogene denitrifikacije na DGAOs (Slika 45).



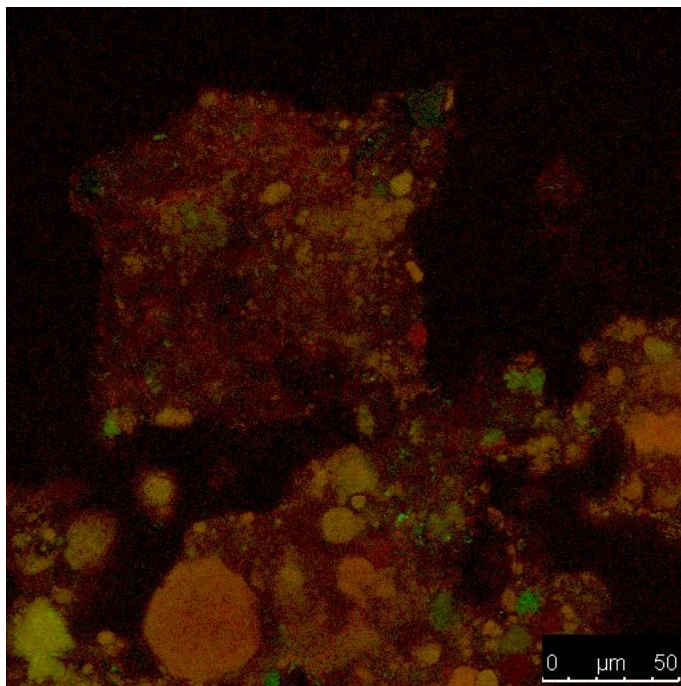
Slika 41. CLSM amonijak oksidirajućih bakterija označenih probom Nso190 prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno



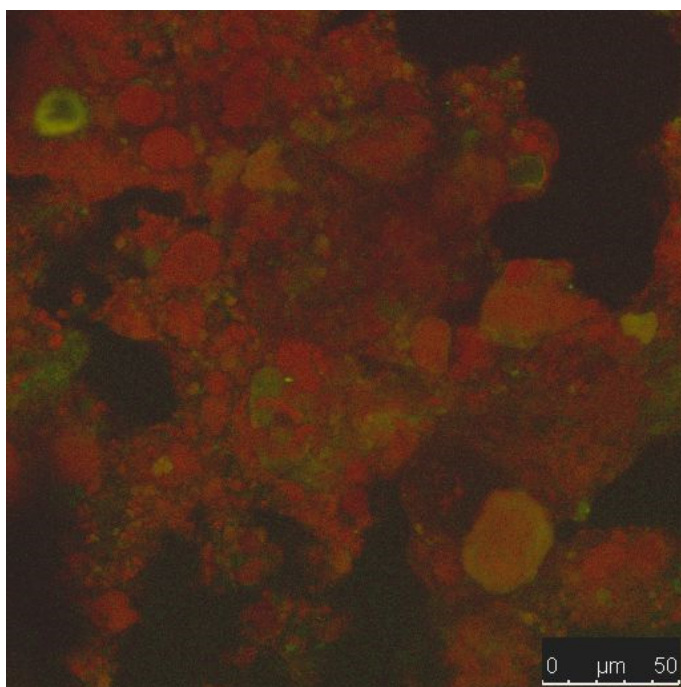
Slika 42. CLSM nitrit oksidirajućih bakterija označenih probom NIT3 prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno



Slika 43. CLSM denitrificirajućih bakterija označenih probom DEN124 prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno



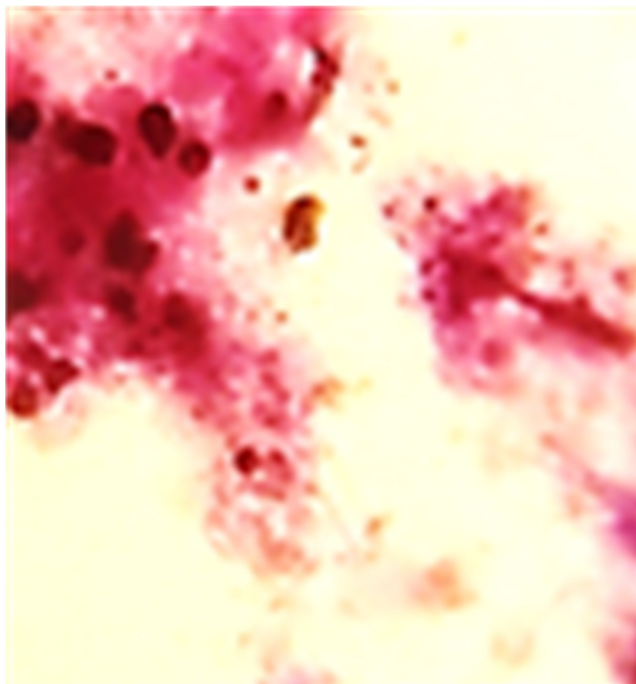
Slika 44. CLSM denitrificirajućih fosfor akumulirajućih organizama označenih probom DPAOmex prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno



Slika 45. CLSM denitrificirajućih glikogen akumulirajućih organizama označenih probom GAOmex prikazani crveno i svih bakterija označenih probom EUBmix prikazani zeleno

Fosfat akumulirajući organizmi (PAOs) su dominantan soj u EBPR sustavima, a kroz metabolizam unutarstanično nakupljaju/nagomilavaju fosfate, više od metaboličkih potreba, u obliku poliP [231].

Bojanjem po Neisseru [214], dokazani su unutarstanični polimeri fosfata u obliku poliP, vidljivi kao tamnoljubičaste granule (Slika 46).



Slika 46. PoliP obojan po Neisseru, povećanje 400x

5. RASPRAVA

5.1. Učinkovitost aktivnog mulja za uklanjanje N procesima nitrifikacije i denitrifikacije

U otpadnoj vodi dušikovi spojevi uobičajeno se uklanjaju kombinacijom procesa nitrifikacije i denitrifikacije, a ovisno o konfiguraciji procesa i procesnih čimbenika ispoljava se aktivnost funkcionalnih organizama za ciljne biološke procese, poput autotrofnih i heterotrofnih nitrifikanata, aerobnih i anoksičnih denitrifikanata i denitrificirajućih defosfatirajućih organizama u njihovoj aktivnosti kroz mikrobne procese nitrifikacije i denitrifikacije, nitritacije-denitritacije, istovremene nitrifikacije i denitrifikacije, denitrificirajuće defosfatacije, endogene denitrifikacije i drugo [2].

Aktivni mulj s lokalnog uređaja za obradu otpadnih voda prilagođen je za uklanjanje N provođenjem niza naizmjeničnih pokusa nitrifikacije u aerobnim uvjetima pri čemu je amonijak oksidiran do $\text{NO}_2\text{-N}$ i/ili $\text{NO}_3\text{-N}$ i denitrifikacije pri anoksičnim uvjetima uz natrijev acetat kao donor elektrona pri čemu je $\text{NO}_2\text{-N}$ i/ili $\text{NO}_3\text{-N}$ reduciran do plinovitog dušika (Slike 8-10).

Pokusi određivanja aktivnosti aktivnog mulja za uklanjanje N provedeni su s ciljem da se ovisno o odabranim procesnim čimbenicima istraži/odredi (i) kapacitet funkcionalnih mikroorganizama za uklanjanje N procesima nitrifikacije i denitrifikacije određivanjem učinkovitosti i brzine nitrifikacije i denitrifikacije, (ii) mikrobna kompetitivnost za kisik i/ili donore elektrona između uobičajenih heterotrofa (engl. *Ordinary Heterotrophic Organisms*, OHOs), nitrifikanata i denitrifikanata, kao i PAOs-a/DPAOs, GAOs-a/DGAOs i (iii) aktivnost mikroorganizma za uklanjanje N ovisno o stresnim/povoljnim uvjetima (limitirajući i nelimitirajući učinak raspoloživog C, otopljenog kisika, količine mikrobne biomase, početne koncentracije dušikovih spojeva, pH), (iv) doprinos unutarstanično pohranjenih zaliha ugljika u poboljšanju uklanjanja N, (v) mikrobni klasteri konkurentnih mikroorganizama u mikrobnoj zajednici i istaknuta uloga tih funkcionalnih populacija u uklanjanju N.

5.1.1. Učinak koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ na aktivnosti aktivnog mulja za proces nitrifikacije

Za učinkoviti proces nitrifikacije potrebno je osigurati u mikrobnoj kulturi namnožavanje spororastućih nitrifikanata, AOB vrsta koje u aerobnim uvjetima $\text{NH}_4\text{-N}$ prevode u $\text{NO}_2\text{-N}$, kao i NOB vrsta koje u aerobnim uvjetima prevode $\text{NO}_2\text{-N}$ u $\text{NO}_3\text{-N}$ [2,3,181]. U aktivnom mulju zbog velike brojnosti populacije i brzog rasta organotrofa koji čine 90-97% bakterija, u usporedbi s malom spororastućom populacijom nitrifikanata koji čine svega 3-10% bakterija u

aktivnom mulju, veličina populacije nitrifikanata postupno se smanjuje što rezultira otežanim i postizanjem i održavanjem nitrifikacije.

Veličina populacije nitrifikanata ovisi o količini raspoloživog – dostupnog supstrata ($\text{NH}_4\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$) a rast i reprodukcija o procesnim čimbenicima: koncentraciji otopljenog kisika, temperaturi, pH, alkalitetu, inhibiciji, toksičnosti, kao i načinu vođenja procesa [26]. Povoljni uvjeti za proces nitrifikacije su koncentracija otopljenog kisika oko 3 mg/L, vrijednost pH oko 8 i temperatura oko 30 °C [2,3,181], a potpuna nitrifikacija, prevođenje $\text{NH}_4\text{-N}$ u $\text{NO}_3\text{-N}$, postiže se pri $\text{DO} > 2$ mg/L i pH do 8,0 [2,181].

Aerobni autotrofi odgovorni su za nitrifikaciju u sustavu aktivnog mulja. Nitrifikacija, dvostupnjeviti proces, uključuje dvije skupine autotrofnih bakterija, amonijak oksidirajuće vrste prefiksa *Nitroso-*, rodova: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* i *Nitrosovibrio*, i nitrit oksidirajuće vrste prefiksa *Nitro-*, rodova: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* i *Nitroeystis* [232].

Nitrifikaciju provode dva roda nitrificirajućih bakterija *Nitrosomonas* i *Nitrobacter*, aerobni autotrofi koji posjeduju enzime potrebne za značajnu nitrifikaciju. U aktivnom mulju brojniji su *Nitrosomonas* koji imaju kraće generacijsko vrijeme i brže se umnože u usporedbi s *Nitrobacter*, budući se oksidacijom $\text{NH}_4\text{-N}$ dobiva više energije nego oksidacijom $\text{NO}_2\text{-N}$, a što u procesu aktivnog mulja osigurava veću sposobnost oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ nego $\text{NO}_2\text{-N}$ i što u nepovoljnim operativnim uvjetima može rezultirati provođenjem nitrifikacije (prvog koraka nitrifikacije) odnosno akumulacijom $\text{NO}_2\text{-N}$. U literaturi je istaknuto da se u procesu aktivnog mulja inhibicija supstratom zbiva pri koncentraciji 400 – 500 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ ili kada se ioni $\text{NH}_4\text{-N}$ oksidiraju u nitritne ione ($\text{NO}_2\text{-N}$) [26].

Također, stehiometrija biološke nitrifikacije pokazuje da je za potpunu reakciju oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ zahtijev za kisikom 4,57 g $\text{O}_2/\text{g N}_{\text{oksidiranog}}$ sa 3,43 g $\text{O}_2/\text{g NH}_4\text{-N}_{\text{oksidiranog}}$ uporabljenog za produkciju nitrita i 1,14 g $\text{O}_2/\text{g NO}_2\text{-N}_{\text{oksidiranog}}$. Kada se uzme u obzir i sinteza mikrobnih stanica manja je potreba na kisiku od 4,57 g $\text{O}_2/\text{g N}$. Također, za svaki gram $\text{NH}_4\text{-N}$ oksidiranog potrebno je osigurati 7,14 g alkaliteta kao CaCO_3 . Tako iz stehiometrijske jednadžbe u kojoj je obuhvaćena oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$, utrošak alkaliteta i sinteza mikrobne biomase proizlazi da za svaki konvertirani g $\text{NH}_4\text{-N}$ (izraženo kao N) se utroši 4,25 g O_2 , formira se 0,16 g novih stanica, ukloni se 7,07 g alkaliteta kao CaCO_3 i 0,08 g anorganskog ugljika se uporabi za formiranje novih stanica. Brzina nitrifikacije ovisi o koncentraciji otopljenog kisika i raste s povećanjem koncentracije DO do 3-4 mg DO/L [2]. Optimalna vrijednost pH za proces nitrifikacije je u rasponu pH 7,5-8,0. Vrijednost pH 7,0-7,2 se uobičajeno primjenjuje za održavanje dobre brzine nitrifikacije [2].

Nitrifikaciju inhibira neionizirani amonijak (NH_3) ili slobodni amonijak i neionizirana dušična kiselina (HNO_2). Učinak inhibicije ovisi o koncentraciji ukupnih dušikovih spojeva, temperaturi i pH. Koncentracija od 100 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 20 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri 20 °C i pH 7,0 može inhibirati oksidaciju $\text{NH}_4\text{-N}$ i $\text{NO}_2\text{-N}$, kao i koncentracija $\text{NO}_2\text{-N}$ od 280 mg/L može inhibirati oksidaciju $\text{NO}_2\text{-N}$ [43].

Pokusi nitrifikacije vođeni su pri koncentraciji otopljenog kisika ≥ 2 mg DO/L (Tablice 7 i 8) što nije bio ograničavajući čimbenik. Korekcija pH je provođena za postizanje i održavanje odabranih ciljanih vrijednosti pH $7,2 \pm 0,2$ i pH $8,0 \pm 0,1$ (Tablice 7 i 8) što također nije ograničavajući čimbenik te se po odabranim vrijednostima i pH i DO mogao istražiti puni kapacitet mikrobne kulture za ciljane procese učinka početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ na učinkovitost nitrifikacije.

U istraživanju učinka početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ na nitrifikaciju (Tablice 7 i 8) za sve istražene vrijednosti koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ rezultati pokazuju da se s povećanjem koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ povećava brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i za početnih 100 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ iznosi od $17,9 \pm 0,5$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $38,4 \pm 1,1$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ odnosno za početnih 500 ± 14 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ iznosi od $31 \pm 0,3$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $54,2 \pm 0,7$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ postignuto pri koncentraciji mikrobne biomase $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L odnosno $4,2 \pm 0,2$ g MLSS/L , pri pH $7,2 \pm 0,2$ (Tablica 7). Isti trend povećanja brzine oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i nitrifikacije opaža se i pri povećanju koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ istraženo pri pH $8,0 \pm 0,1$, pri čemu je za početnih 100 ± 7 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ određena brzina oksidacije od $18,8 \pm 0,2$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $42,1 \pm 1,0$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ odnosno pri početnih 500 ± 9 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ iznosi od $32,8 \pm 0,2$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $59,9 \pm 0,6$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ ostvareno pri koncentraciji mikrobne biomase $1,4 \pm 0,2$ g MLSS/L odnosno $3,9 \pm 0,3$ g MLSS/L (Tablica 8). U svim pokusima određeno je povećanje brzine nitrifikacije s povećanjem koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ (Tablice 7 i 8).

Tijek procesa nitrifikacije prati istovremeno nakupljanje i $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ i daljnju oksidaciju $\text{NO}_2\text{-N}$ do $\text{NO}_3\text{-N}$ (Slika 14).

Povećanje početne koncentracije $\text{NH}_4\text{-N}$ bilježi više nakupljanje $\text{NO}_2\text{-N}$ koji se prevodi u $\text{NO}_3\text{-N}$. Nakupljeni $\text{NO}_2\text{-N}$ je činio oko 16% od početne vrijednosti 500 ± 14 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri pH $7,2 \pm 0,2$, odnosno oko 19% od početne vrijednosti 500 ± 9 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri pH $8,0 \pm 0,1$ kao i oko 20% od početne vrijednosti 200 ± 9 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri pH $7,2 \pm 0,2$ (Slika 14).

U literaturi je istaknuto da je najvažniji parametar akumulacije $\text{NO}_2\text{-N}$ omjer amonijaka i kisika i da se značajno akumulira $\text{NO}_2\text{-N}$ pri omjeru $\text{NH}_3/\text{O}_2 < 5$ [233]. Omjer NH_3/O_2 nije bio ograničavajući čimbenik u pokusima nitrifikacije u ovoj disertaciji (Tablice 7 i 8, Slika 14).

Rezultati uobičajenih promjena tijekom procesa nitrifikacije, a koje su odraz mikrobnih reakcija nitritacije i nitratacije za odabrani pokus sa 200 ± 9 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri pH $7,2 \pm 0,2$, pri ≥ 2 mg DO/L sa 1,5 g MLSS/L , pokazuju da su tijekom oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ akumulirani $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$, oksidacija je provedena tijekom 10 sati, uz maksimalno nakupljanje 36,6 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ i daljnjom provedbom procesa u aerobnim uvjetima $\text{NO}_2\text{-N}$ je preveden u $\text{NO}_3\text{-N/L}$ (Slika 14). Tijekom oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i nakupljanja $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ snižavala se pH vrijednosti i bilo je potrebno činiti korekciju pH vrijednosti na odabrani pH. Nije bilo potrebno provoditi korekciju pH u procesu nitratacije, oksidacije $\text{NO}_2\text{-N}$ u $\text{NO}_3\text{-N}$.

U profilu otopljenog kisika lako se može prepoznati kada je završena oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$, prepoznaje se u profilu DO «kisikov lakat» - točka naglog porasta vrijednosti DO (Slika 14), budući je veća potreba na kisiku tijekom procesa oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ za aktivnost AOB vrsta, dok se oksidacija $\text{NO}_2\text{-N}$ zbiva uz znatno manju potrebu na kisiku za aktivnost NOB vrsta [224,234,235].

Tijekom oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ koncentracija otopljenog kisika je iznosila oko 2,1 mg/L, a po završetku oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ koncentracija otopljenog kisika je naglo porasla na 3,2 mg/L i pri tome se zbivala nitratacija, daljnja oksidacija preostalih $\text{NO}_2\text{-N}$ (Slika 14). U procesu nitrifikacije za oksidaciju amonijaka do $\text{NO}_2\text{-N}$ potreba na kisiku je 3,43 mg $\text{O}_2/\text{mg NH}_3\text{-N}$, a za oksidaciju $\text{NO}_2\text{-N}$ do $\text{NO}_3\text{-N}$ 1,14 mg $\text{O}_2/\text{mg NO}_2\text{-N}$ [2,26].

Koncentracija slobodnog amonijaka, $\text{NH}_3\text{-N}$ bila je najveća na početku pokusa i iznosila je 1,7 mg $\text{NH}_3\text{-N/L}$ a kroz proces oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ smanjivala se i koncentracija $\text{NH}_3\text{-N}$ i bila je ispod inhibitornog praga vrijednosti [236]. Akumulaciju $\text{NO}_2\text{-N}$ pratila je akumulacija $\text{HNO}_2\text{-N}$, koja je porasla s početnih 0 $\mu\text{g/L}$ na maksimalnih 7,1 $\mu\text{g/L}$ u trenutku maksimalne koncentracije $\text{NO}_2\text{-N}$ od 36,6 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ u 10. satu, a nakon toga se smanjivala kao i koncentracija $\text{NO}_2\text{-N}$. $\text{HNO}_2\text{-N}$ nije uzrokovala inhibiciju procesa, jer nije bila u rasponu koncentracija za koje se u literaturi navodi da ima inhibicijski učinak [236]. Istraživanja su pokazala da nema inhibicije nitrifikacije pri koncentraciji slobodnog amonijaka manjoj od 0,1-1,0 mg/L (kod nas je bila 1,7 mg FA/L u 0., 1,0 mg FA/L u 0,5.satu. 0,8 mg FA/L u 1. satu) i pri koncentraciji slobodne nitritne kiseline manjoj od 0,2-2,8 mg/L, a pri koncentraciji slobodne nitritne kiseline većoj od 0,2-2,8 mg/L inhibirani su samo NOB [236]. Pri pH $>8,0$ inhibitor procesa nitrifikacije je slobodni amonijak, za niže koncentracije slobodnog amonijaka u odnosu na HNO_2 inhibiraju se nitrifikanti, a pri pH $<7,5$ glavni inhibitor je HNO_2 . Za provođenje procesa nitrifikacije važno je da koncentracija slobodnog amonijaka bude ispod 1 mg/L [236].

5.1.2. Vrijednost pH u funkciji aktivnosti aktivnog mulja za proces nitrifikacije

pH ima snažan učinak na proces nitrifikacije jer utječe na brzinu rasta bakterija i modificira kiselobazne ravnoteže $\text{NO}_2^-/\text{HNO}_2$ i $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ i time utječe na dostupnost supstrata za AOB i NOB [2,3]. U literaturi je istaknuto da je brzina nitrifikacije konstantna pri rasponu pH 7,2-8,0 [2,26].

U istraženim pokusima nitrifikacije pri pH $7,2 \pm 0,2$ (Tablica 7) i pH $8,0 \pm 0,1$ (Tablica 8) učinak pH na brzinu oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i nitrifikacije prepoznaje se na način da viši odabrani pH rezultira većom brzinom oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ i većom brzinom nitrifikacije (Tablice 7 i 8). Odabrane i istražene vrijednosti pH nisu imale ograničavajući čimbenik na proces nitrifikacije.

5.1.3. Količina mikrobne biomase u funkciji učinkovitosti nitrifikacije

Nitrifikacija do 500 mg $\text{NH}_4\text{-N}$ istražena je pri koncentraciji mikrobne biomase $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L, $2,8 \pm 0,2$ g MLSS/L i $4,2 \pm 0,2$ g MLSS/L pri pH $7,2 \pm 0,2$ (Tablica 7), i $1,4 \pm 0,2$ g MLSS/L, $2,6 \pm 0,3$ g MLSS/L i $3,9 \pm 0,3$ g MLSS/L pri pH $8,0 \pm 0,1$ (Tablica 8), s ciljem određivanja učinka koncentracije mikrobne biomase na brzinu uklanjanja N kao i određivanja i dokazivanja aktivnost nitrificirajućih vrsta, AOB i NOB. Odabrane pH vrijednosti, pH $7,2 \pm 0,2$ i pH $8,0 \pm 0,1$ nisu imale inhibirajući –ograničavajući učinak na aktivnost nitrificirajućih vrsta. Povećanjem koncentracije mikrobne biomase povećavala se brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$, brzina nitrifikacije kao i specifična brzina nitrifikacije, neovisno o početnoj koncentraciji $\text{NH}_4\text{-N}$ pri odabranim/istraženim vrijednostima pH (Tablice 7 i 8).

Brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ pri pH $7,2 \pm 0,2$ za istraženih početnih 100 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 500 ± 14 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ povećala se od $17,9 \pm 0,5$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $31,0 \pm 0,3$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ (pri $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L), pri $2,8 \pm 0,2$ g MLSS/L od $30,4 \pm 0,4$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $38,5 \pm 0,6$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$, odnosno pri $4,2 \pm 0,2$ g MLSS/L povećala se od $38,4 \pm 1,1$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $54,2 \pm 0,7$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ (Tablica 7).

Povećanje brzine oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ pri pH $8,0 \pm 0,1$ za istraženih početnih 100 ± 7 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i 500 ± 9 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ iznosilo je od $18,8 \pm 0,2$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $32,8 \pm 0,2$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ (pri $1,4 \pm 0,2$ g MLSS/L), iznosilo je od $30,9 \pm 0,8$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $39,6 \pm 0,5$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ (pri $2,6 \pm 0,3$ g MLSS/L), odnosno pri $3,9 \pm 0,3$ g MLSS/L povećanje od $42,1 \pm 1,0$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ do $59,9 \pm 0,6$ mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ (Tablica 8).

Ostvarene su brzine nitrifikacije pri pH $7,2 \pm 0,2$ s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L od $10,4 \pm 0,9$ mg N/Lh pri početnih 100 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ i $22,6 \pm 0,7$ mg N/Lh pri početnih 500 ± 14 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, kao i

15,2±0,5 mg N/Lh pri početnih 100±5 mg NH₄-N/L i 27,9±0,6 mg N/Lh pri početnih 500±14 mg NH₄-N/L s 2,8±0,2 g MLSS/L, odnosno s 4,2±0,2 g MLSS/L od 21,7±0,4 mg N/Lh pri početnih 100±5 mg NH₄-N/L i 32,9±0,9 mg N/Lh pri početnih 500±14 mg NH₄-N/L (Tablica 7).

Određene su brzine nitrifikacije pri pH 8,0±0,1 od 11,5±0,4 mg N/Lh pri početnih 100±7 mg NH₄-N/L i 25,0±0,2 mg N/Lh pri početnih 500±9 mg NH₄-N/L s 1,4±0,2 g MLSS/L, kao i 20,0±0,5 mg N/Lh pri početnih 100±7 mg NH₄-N/L i 30,3±0,3 mg N/Lh pri početnih 500±9 mg NH₄-N/L s 2,6±0,3 g MLSS/L, odnosno 29,4±0,7 mg N/Lh pri početnih 100±7 mg NH₄-N/L i 40,7±0,4 mg N/Lh pri početnih 500±9 mg NH₄-N/L s 3,9±0,3 g MLSS/L (Tablica 8).

Izračunata specifična brzina nitrifikacije također se povećavala s povećanjem koncentracije mikrobne biomase za sve istražene početne koncentracije NH₄-N (Tablice 7 i 8).

U procesu nitrifikacije profili pH i DO su uobičajeni za proces nitrifikacije. U točki potpune oksidacije NH₄-N bilježi se najveća količina nakupljenog NO₂-N, kao i točka porasta DO. Nakon završetka oksidacije NH₄-N, koncentracija otopljenog kisika je naglo porasla i pri tome se odvijala daljnja oksidacija akumuliranih NO₂-N do NO₃-N (Slika 14). U pokusima je opaženo da je utrošak kisika proporcionalan količini mikrobne biomase.

5.2. Učinkovitost parcijalne nitrifikacije

Otpadne vode niskog omjera KPK/N, poput otpadnih voda grada, zahtijevaju dodatak vanjskog izvora ugljika za učinkovito uklanjanje N što značajno povećava operativne troškove. Parcijalna nitrifikacija (PN) i potom denitrifikacija, nitritacija–denitritacija, je alternativa u rješavanju takvih izazova budući da je potreba na otopljenom kisiku manja za 25% a potreba na organskim sastojcima kao donorima elektrona manja za 40% u odnosu na nitrifikaciju–denitrifikaciju. Također, u procesu nitritacije–denitritacije manja je produkcija mulja što čini uštetu i pri rukovanju s muljem, odlaganju/zbrinjavanju mulja [237,238,239].

Dušik u otpadnoj vodi predstavlja ozbiljan ekološki problem i izazov za prijemne vode, zbog toksičnog učinka na vodene organizme i eutrofikacije. Prisutan je kao otopljeni amonijak (NH₄⁺), nitrit (NO₂⁻), nitrat (NO₃⁻) i organski spojevi (aminokiseline, CN) [240]. Spajanje nitritacije s denitritacijom zahtijeva kontrolu parametara za uspješnu implementaciju, uključujući kontrolu pH, DO, temperature i SRT/HRT, s ciljem suzbijanja rasta NOB i promicanja rasta AOB. Općenito, zabilježeno je da temperatura (30 °C–40 °C), pH (7–8), DO (<0,5 mg/L) i HRT/SRT (~1 dan) suzbijaju rast NOB [241].

Pri 5-20 °C brže rastu NO₂-N oksidirajuće vrste od NH₄-N oksidirajućih vrsta što ide u prilog produkciji NO₃-N [183], dok temperature 30-40 °C promiču aktivnost AOB a supresuju aktivnost NOB. Aktivnost NOB ograničavaju i visoke koncentracije NH₄⁺ i NO₂⁻ jer se disociraju na FA (slobodni amonijak) odnosno FNA (slobodnu nitratnu kiselinu), a toksičniji su za NOB u sporedbi s AOB [236,242]. Inhibitorne koncentracije FA i FNA za NOB su 0,10-1,00 mg/L i 0,011-0,07 mg/L, dok je za AOB 10,00-150,00 mg/L odnosno cca 0,40 mg/L [236,243].

Čimbenici koji su povoljni za proces parcijalne nitrifikacije su pH>8,0 i koncentracija DO <2 mg/L [244,245,246].

Koeficijenti zasićenja kisikom za proces nitritacije i nitratacije iznose 0,3 mg/L, odnosno 1,1 mg/L, te se održavanjem niske koncentracije otopljenog kisika mogu postići uvjeti povoljni za akumulaciju nitrita [247]. Kontroliranjem određenih kritičnih varijabli procesa nitrifikacije poput DO, pH, brzine opterećenja dušikom (NLR) ili koncentracije supstrata i inhibitora procesa moguće je postići nitritaciju.

U istraživanju parcijalne nitrifikacije početne koncentracije 30±1 mg NH₄-N/L, 50±3 mg NH₄-N/L i 100±5 mg NH₄-N/L pri pH 8,0±0,1, koncentraciji otopljenog kisika 0,8-1 mg DO/L i koncentraciji mikrobne biomase 1,5±0,1 g MLSS/L i 3,0±0,1 g MLSS/L uočava se da s porastom koncentracije NH₄-N raste brzina uklanjanja NH₄-N za obje istražene početne koncentracije mikrobne biomase (Tablice 9-15). Također, zabilježena je izražena aktivnost AOB vrsta u provođenju nitritacije, te je prosječno postignuto od 58-68% prevođenje NH₄-N u NO₂-N, odnosno znatno je manje zabilježeno nakupljanje NO₃-N (prosječno oko 25-32%) (Tablice 9-15).

Biološko uklanjanje dušika putem parcijalne nitrifikacije od velikog je interesa jer je ekonomski isplativiji proces u odnosu na konvencionalne procese nitrifikacije i denitrifikacije.

5.3. Učinkovitost istovremene nitrifikacije i denitrifikacije - Heterotrofna nitrifikacija i aerobna denitrifikacija

U obradi otpadnih voda odabir i optimizacija bioprocesa izazovan je zadatak za istraživače, znanstvenike i inženjere, posebice za provedbu procesa uklanjanja N iz otpadnih voda s niskim udjelom KPK i visokim udjelom dušika. Uobičajeno se uklanjanje dušika u tradicionalnim sustavima za obradu otpadnih voda postiže ili u više faza obrade pri različitim koncentracijama DO, ili primjenom naizmjeničnih aerobnih i anoksičnih uvjeta u istom reaktoru [2,181,215].

Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (SND) prvi put je opisana kada je zapažen gubitak dušika iz sustava za obradu otpadne vode a zbiva se kada se nitrifikacija i denitrifikacija provode u isto vrijeme u istom reaktoru. Poznata je i pod nazivom aerobna denitrifikacija. U istovremenoj nitrifikaciji i denitrifikaciji koncentracija kisika održava se u stalno kontroliranim uvjetima u istom reaktoru, u vremenu i prostoru, kako bi se postigla aktivnost heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije [2].

Heterotrofni nitrifikanti imaju brojne prednosti u odnosu na autotrofne nitrifikante, poput: brži rast i održavanje aktivne biomase tijekom procesa obrade, sposobnost iskorištavanja širokog raspona supstrata, bolja tolerancija na niske temperature, niži kapacitet puferiranja zbog lužnatosti proizvedene tijekom denitrifikacije koja djelomično nadoknađuje lužnatost potrošenu u nitrifikaciji i čime se dodatno rješava problem dodatnih troškova za podešavanje pH, u efluentu procesa SND nisu prisutni $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ zbog istovremene heterotrofne nitrifikacije i aerobne denitrifikacije, te općenito jednostavnost postupka koji rezultira uklanjanjem amonijaka i organskih tvari u kraćem vremenu [26,181,215,216].

Obrada otpadnih voda kao zahtijevan dinamički proces ovisi i o operativnim čimbenicima i o sastavu i strukturi mikrobne zajednice. U dosadašnjim istraživanjima procesa SND istražena je i istaknuta uloga brojnih čimbenika, poput: izvor ugljika, omjer C/N, temperatura, osjetljivost procesa s obzirom na DO, akumulacija nitrita, veličina flokula i drugo [178,215,248]. Proces SND karakteriziran je gradijentom DO u mikrobnoj flokuli [178,249,250], pri čemu se u mikrobnoj zajednici flokule kreiraju mikro-okolišni uvjeti i difuzijska limitacija kisikom prema centru flokule, a time i raspored nitrifikanata u aerobnom dijelu flokula koji karakterizira DO 1-2 mg/L i denitrifikanata u anoksičnoj zoni u uvjetima $<0,5$ mg DO/L, koji osiguravaju istovremenu nitrifikaciju i denitrifikaciju [251].

Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija podrazumijeva da se nitrifikacija i denitrifikacija provode istovremeno u identičnim operativnim-procesnim uvjetima [252]. Na sustavima za obradu otpadnih voda uklanjanje dušika putem SND nije uobičajeno, unatoč brojnim prednostima SND u odnosu na konvencionalne procese uklanjanja dušika, iz razloga što se proces SND smatra nepredvidljivim [253].

Brojni čimbenici utječu na proces SND: koncentracija otopljenog kisika, temperatura, omjer C/N, izvor ugljika, pH, vrijeme zadržavanja mulja (SRT) i veličina i struktura flokula. Zbog gradijenta kisika u mikrobnim flokulama odnosno ograničenja difuzije stvaraju se anoksične zone unutar flokula koje osiguravaju uvjete istovremene nitrifikacije i denitrifikacije. Pri tome, u unutrašnjosti flokule se zbiva denitrifikacija a u vanjskom dijelu flokule nitrifikacija [148,158,168,254].

Za provedbu SND povoljni su uvjeti koncentracije otopljenog kisika u rasponu od 0,1-1 mg DO/L i niži omjer C/N sve dok su spojevi sa ugljikom dostupni za denitrificirajuće bakterije. Koncentracija otopljenog kisika od 0,1-1 mg DO/L se mora održavati na odgovarajućoj razini u SND reaktoru zbog postizanja ravnoteže između procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Ipak, u konvencionalnom procesu aktivnog mulja smanjenje koncentracije otopljenog kisika do tih razina koncentracije nije poželjno jer potiče filamentozni rast i narušava stabilnost procesa [156,255].

U procesu SND procesi nitrifikacije i denitrifikacije se zbivaju pri manjim brzinama, ali uz odgovarajuće hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT) i zadržavanje mulja (SRT) moguće je postići značajno cjelokupno uklanjanje dušika [2].

Operativni čimbenici koji su povoljni za SND su: pH neutralne do slabo lužnate vrijednosti, temperatura u rasponu 20-30 °C, izvor ugljika kao jedan od glavnih limitirajućih čimbenika nitrifikacije/denitrifikacije koji rezultira niskim uklanjanjem N uz neodgovarajući izvor ugljika, omjer C/N, a kao optimalni omjer C/N se navodi između 2 do >15 [99], i otopljeni kisik za kojeg se navode različiti rasponi DO kao povoljni za proces SND.

U istraživanju uloge omjera C/N u ravnoteži dušika i rastu bakterija utvrđeno je da se metabolička podjela između asimilacije i disanja dogodila tijekom aerobne denitrifikacije zajedno s povećanim omjerom C/N, a omjer C/N 5-7,5 mogao bi biti područje preokreta [256]. Na sustavima za obradu otpadne vode influent obično sadrži organske sastojke koji mogu poslužiti za redukciju NO₂-N i NO₃-N, a za poboljšanje izvedbe procesa denitrifikacije primjenjuje se dodavanje lako biološki razgradivog organskog sastojka kao vanjskog izvora ugljika. Manje je ugljika potrebno u sustavu SND u usporedbi s konvencionalnim procesima uklanjanja N jer se nitrifikacija i denitrifikacija postižu u istom reaktoru. Mikroorganizmi mogu pohraniti unutar stanice organski supstrat i zatim ga koristiti kao izvor ugljika za heterotrofnu nitrifikaciju i aerobnu denitrifikaciju [249].

Da bi se istaknuo značaj procesa SND u obradi otpadnih voda bitno je razumijevanje (i) mehanizama uključenih u proces SND, (ii) učinka bioprocesnih čimbenika poput pH, DO, temperature, izvora ugljika, omjera C/N, primijenjenih reaktora, (ii) uloge strukture mikrobne zajednice i mikrookolišnih karakteristika u sustavu uklanjanja N.

Rezultati istraživanja procesa SND u kojima je istražena aktivnost heterotrofnih nitrifikanata - aerobnih denitrifikanata u pokusima sa 40±5 mg NH₄-N/L i 80±2 mg NH₄-N/L, uz organske sastojke pri omjeru KPK/N 10 i 20 što odgovara omjeru C/N 5 i 10 (Tablice 16, 17, 18 i 19 i Slike 15, 16, 17 i 18), pokazuju da uz acetat kao odabrani vanjski izvor ugljika dodan za odabrani omjer C/N odnosno KPK/N brzina oksidacije NH₄-N raste s povećanjem omjera

KPK/N (Tablice 16, 17, 18 i 19). Brzine oksidacije 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ su iznosile 11,5 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ i 11,7 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ pri omjerima KPK/N 10 i 20 (Tablice 16 i 17), a za početnih 80 ± 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ su iznosile 14,4 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ odnosno 12,1 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ (Tablice 18 i 19).

Brzine oksidacije KPK u točki potpune oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$, za početnih 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri KPK/N 10 i 20, su iznosile 168 mg KPK/Lh odnosno 267,2 mg KPK/Lh. Za početnih 80 ± 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ za odabrane omjere KPK/N 10 i 20 brzine oksidacije KPK u točki potpune oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ su iznosile 201,8 mg KPK/Lh odnosno 264,9 mg KPK/Lh (Tablice 16, 17, 18 i 19).

U pokusima heterotrofne nitrifikacije-aerobne denitrifikacije oksidacijom $\text{NH}_4\text{-N}$ nije nastala ekvivalentna količina $\text{NO}_x\text{-N}$ ($\text{NO}_2\text{-N} + \text{NO}_3\text{-N}$), a gubitak N je iznosio 77% pri KPK/N 10, odnosno 81,8 % pri omjeru KPK/N 20 za početnih 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ (Tablice 16 i 17). U pokusu s početnih 80 ± 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ postignuto je uklanjanje N od 72,2% pri KPK/N 10 i 77,4% pri KPK/N 20 (Tablice 18 i 19).

Tijek procesa SND prikazan za odabrani pokus 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri omjeru KPK/N 10 (Slika 16) prati istovremena redukcija KPK i $\text{NO}_2\text{-N}$ odnosno $\text{NO}_3\text{-N}$, što prati porast pH vrijednosti. Denitrifikacijom $\text{NO}_3\text{-N}$ nastaje i nestaje $\text{NO}_2\text{-N}$.

Profil otopljenog kisika u pokusu heterotrofne nitrifikacije-aerobne denitrifikacije (Slika 17) je odraz mikrobnih reakcija, u kojima se bilježi intenzivni utrošak otopljenog kisika tijekom istovremene oksidacije KPK i $\text{NH}_4\text{-N}$. U profilu DO jasno se može prepoznati trenutak kada je KPK potpuno oksidiran jer je tada naglo porasla koncentracija DO. Daljnjom oksidacijom preostalog $\text{NH}_4\text{-N}$ i nakupljenog $\text{NO}_2\text{-N}$ vrijednost koncentracije DO se održavala ustaljenom, a u trenutku potpune oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ otopljeni kisik u profilu DO se prepoznaje kao točka porasta DO.

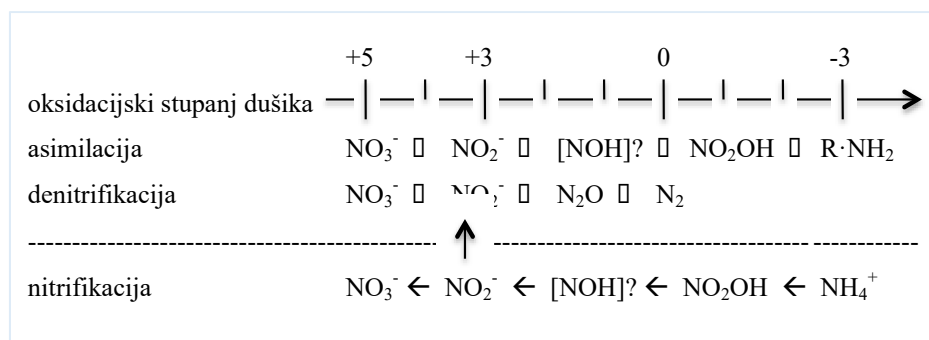
Profil pH tijekom heterotrofne nitrifikacije-aerobne denitrifikacije (Slika 18) je isti u svim pokusima a odražavao je promjene tijekom mikrobnih reakcija. Na početku svakog pokusa nitrifikacije pH je porastao što je povezano s oksidacijom KPK.

5.4. Učinkovitost denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ u ovisnosti o omjeru KPK/N i količini mikrobne biomase

Proces denitrifikacije, poznat i kao disimilatorna redukcija nitrata, zbiva se u slijednim koracima, pri anoksičnim uvjetima koji označavaju biološki proces u kojem su $\text{NO}_3\text{-N}$ i/ili $\text{NO}_2\text{-N}$ akceptor elektrona a donori elektrona se osiguravaju ili iz organskih sastojaka iz otpadne

vode ili kao dodani vanjski izvori ugljika ili unutarstanično pohranjeni izvori ugljika [2,10,26,257,258].

Slijed reakcija u mikrobnoj konverziji dušika prikazan je slikom 47.



Slika 47. Slijed reakcija u mikrobnoj konverziji dušika (preuzeto i prilagođeno [3])

Učinak početne koncentracije nitrata, količine mikrobne biomase i raspoložive koncentracije organskih sastojaka kao donora elektrona (omjer KPK/N) na brzinu i učinkovitost denitrifikacije istražen je pri koncentracijama nitrata 30 ± 4 , 50 ± 5 i 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$, s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L i $3 \pm 0,3$ g MLSS/L, pri KPK/N 5, 10 i 20 (Slika 19).

Brzina denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ povećava se s porastom koncentracije nitrata, i s porastom koncentracije mikrobne biomase. Tako je u pokusima s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L brzina denitrifikacije porasla s $9,4 \pm 0,4$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ (za početnih 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$) na $11,6 \pm 0,7$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ (za početnih 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$) pri omjeru KPK/N 10, odnosno s $9,7 \pm 0,5$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ (za početnih 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$) na $13,3 \pm 0,4$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ (za početnih 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$) pri omjeru KPK/N 20. Porast omjera KPK/N rezultirao je **blagim porastom brzine** denitrifikacije (Slika 19). Isti trend povećanja brzine denitrifikacije s povećanjem početne koncentracije $\text{NO}_3\text{-N}$ zabilježen je i u pokusima s većom količinom mikrobne biomase. Tako, u pokusima s $3 \pm 0,3$ g MLSS/L brzina denitrifikacije je porasla s $15,5 \pm 0,3$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ (za početnih 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$) na $17,8 \pm 0,6$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ (za početnih 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$) pri omjeru KPK/N 10, odnosno pri omjeru KPK/N 20 brzina denitrifikacije se povećala s $16 \pm 0,6$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ (za početnih 30 ± 4 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$) na $20,9 \pm 0,4$ mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$ (za početnih 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$) (Slika 19). Brzina denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ s $3 \pm 0,2$ g MLSS/L je bila veća u prosjeku za 1,7 puta u odnosu na brzinu denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ s $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L (Slika 19).

U pokusima denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$ pri KPK/N 5 količina raspoloživih organskih sastojaka je limitirajući čimbenik, nije bilo dostatno KPK i s tom raspoloživom količinom KPK ostvareno

je oko 70% denitrifikacije $\text{NO}_3\text{-N}$, te pri KPK/N 5 nije izračunata brzina denitrifikacije (Slika 19).

Lee i sur. [59] su zabilježili porast brzine denitrifikacije s nitratom kao akceptorom elektrona i s natrijevim acetatom kao izvorom ugljika koja je rasla s porastom omjera C/N i iznosila: $\text{C/N } 0$ ($59 \mu\text{g N/g VSS,d}$) < $\text{C/N } 2,57$ ($1379 \mu\text{g N/g VSS,d}$) < $\text{C/N } 1,28$ ($2186 \pm 143,8 \mu\text{g N/g VSS,d}$) < $\text{C/N } 12,85$ ($2345 \pm 680,6 \mu\text{g N/g VSS,d}$) < $\text{C/N } 5,14$ ($3017 \pm 44,7 \mu\text{g N/g VSS,d}$).

Brzina i učinkovitost denitrifikacije ovise o koncentraciji nitrata i/ili nitrita, koncentraciji funkcionalnih mikroorganizama kao i raspoloživom topljivom organskom ugljiku [259]. Razlike u kinetici denitrifikacije rezultat su neravnoteže između raspoložive sveukupne količine elektron donora i brzine potrošnje, pa se akumulacija intermedijera denitrifikacije pripisuje kompeticiji za dostupne elektron donore između četiri dušikove reduktaze. U uvjetima kada je dovoljno elektron donora $\text{NO}_3\text{-N}$ se brže reducira od $\text{NO}_2\text{-N}$, jer je brzina katalize NaR veća od NiR [221].

Primjena vanjskog izvora ugljika za denitrifikaciju postaje neophodna u obradi otpadnih voda, posebice otpadnih voda niskog omjera C/N, da bi se postigle stroge zakonske regulative [15] izlaznih vrijednosti spojeva s dušikom (Tablica 24).

Tablica 24. Granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama za neke odabrane pokazatelje [15]

Pokazatelji	Zabrana ispuštanja u podzemne vode	Izraženi kao	Jedinica	Površinske vode	Sustav javne odvodnje
FIKIZALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI					
pH-vrijednost				6,5-9,0	6,5-9,5
Temperatura			°C	30	40
ORGANSKI POKAZATELJI					
BPK ₅		O ₂	mg/L	25	sukladno čl. 5. ovog Pravilnika
KPK _{Cr}		O ₂	mg/L	125	sukladno čl. 5. ovog Pravilnika
Ukupni organski ugljik (TOC)		C	mg/L	30	-
ANORGANSKI POKAZATELJI					
Ukupni fosfor		P	mg/L	2 (1 jezera)	sukladno čl. 5. ovog Pravilnika
Ortofosfati		P	mg/L	1 (0,5 jezera)	-

Ukupni dušik		N	mg/L	15	sukladno čl. 5. ovog Pravilnika
Amonij		N	mg/L	10	-
Nitriti		N	mg/L	1	10
Nitrati		N	mg/L	2	-

Prilikom odabira valjskog izvora ugljika za denitrifikaciju potrebno je uzeti u obzir brzinu i učinkovitost denitrifikacije, sigurnost pohrane izvora ugljika, cijenu i količinu proizvedenog mulja [260], međutim, ukoliko se kao vanjski izvor ugljika dodaje kemikalija, poput primjerice acetata, to predstavlja trošak procesa denitrifikacije, posebice na uređajima za biološku obradu otpadnih voda [257]. Granične vrijednosti emisija otpadnih voda koje se ispuštaju u vode ili u sustav javne odvodnje, utvrđuju se dozvoljenim koncentracijama onečišćujućih tvari i/ili opterećenjima u otpadnim vodama. Kod ispuštanja pročišćenih komunalnih otpadnih voda, pored koncentracija onečišćujućih tvari i/ili opterećenja u otpadnim vodama, potrebno je utvrditi i postotak smanjenja onečišćenja na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda [15].

Količina utrošenih raspoloživih organskih sastojaka u ciljanim pokusima denitrifikacije početnih koncentracija nitrata 30 ± 4 - 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$, izražena je kao omjer utrošenog KPK za redukciju $\text{NO}_3\text{-N}$, $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$, a pozitivno korelira sa količinom mikrobne biomase, kao i s povećanjem omjera KPK/N (Slika 20).

Tako je pri koncentraciji mikrobne biomase $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L i omjeru KPK/N 5 omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ bio $3,7 \pm 0,4$ - $3,9 \pm 0,6$ (za ostvarenih 70% denitrifikacije), a pri $3 \pm 0,3$ g MLSS/L i omjeru KPK/N 5 omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ iznosio je $6,9 \pm 0,7$ - $7,2 \pm 0,5$ (za ostvarenih 70% denitrifikacije) (Slika 20).

Pri koncentraciji mikrobne biomase $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L i omjeru KPK/N 10 omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ bio je u uskom rasponu vrijednosti, $4,1 \pm 0,7$ - $4,2 \pm 0,5$, a povećanje mikrobne biomase na $3 \pm 0,3$ g MLSS/L pri omjeru KPK/N 10 rezultiralo je porastom omjera $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ koji je bio u rasponu $5,9 \pm 0,4$ - $7,9 \pm 0,8$, odnosno povećao se u prosjeku za oko 1,66 puta s povećanjem mikrobne biomase pri KPK/N 10 (Slika 20).

Daljnje povećanje omjera KPK/N na 20, s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L je rezultiralo omjerom $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ koji je bio u rasponu $6,9 \pm 0,7$ - $8,7 \pm 0,4$, a s $3 \pm 0,3$ g MLSS/L pri omjeru KPK/N 20 omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ je bio u rasponu $9,4 \pm 1,1$ - $12 \pm 0,6$, što je povećanje u prosjeku za oko 1,37 puta s povećanjem mikrobne biomase pri KPK/N 20 (Slika 20).

Povećanje omjera KPK/N je rezultiralo povećanjem utroška KPK za denitrifikaciju $\text{NO}_3\text{-N}$ izraženo omjerom $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$, a taj omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ u pokusima s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L je veći u prosjeku za oko 1,88 puta pri KPK/N 20 u odnosu na KPK/N 10, a u pokusima s

$3 \pm 0,3$ g MLSS/L omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ veći je u prosjeku za oko 1,56 puta pri KPK/N 20 u odnosu na KPK/N 10 (Slika 20).

Povećanje koncentracije mikrobne biomase je dovelo do porasta utroška organskih sastojaka, izraženo preko omjera $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$, jer veća količina mikrobne biomasa ima veću potrebu na organskim sastojcima, a mikroorganizmi u uvjetima obilja organskih sastojaka dio organskih sastojaka utroše za rast i održavanje mikrobnih stanica, dio za denitrifikaciju, a dio pospreme kao unutarstanične rezerve ugljika, primjerice u obliku polihidroksialkanoata (PHA). Ako se acetat koristi kao izvor ugljika, tada su polihidroksialkanoati u obliku polihidroksibutirata (PHB).

Unutarstanični poliesteri, PHA, mogu biti donori elektrona u anaerobnim i aerobnim uvjetima [261]. PHA djeluje kao kanal za unutarstaničnu reducirajuću snagu i osigurava izvor ugljika za metaboličke intermedijere da balansira pohranu i korištenje ugljika i energije [262,263]. Kada se mikroorganizmi nađu u stresnim uvjetima, poput primjerice u režimu hranjenja obilje-gladovanje (engl. *feast-famine*), mikroorganizmi u fazi obilja pohranjuju PHA, i zatim u fazi gladovanja troše unutarstanične rezerve PHA. Ipak, endogena oksidacija PHA je sporija šest puta od oksidacije vanjskog izvora ugljika [263].

Cilj biološke denitrifikacije je redukcija $\text{NO}_3\text{-N}$ i/ili $\text{NO}_2\text{-N}$ za čiju je uspješnu i učinkovitu provedbu potrebno osigurati odgovarajuću količinu KPK odnosno odgovarajuću količinu elektron donora za redukciju $\text{NO}_x\text{-N}$. U procesu uklanjanja dušika odvija se kombinacija asimilacije i disimilacije dušika. Korištenje dušika zbog staničnog rasta predstavlja asimilaciju dušika, a nitrifikacija i denitrifikacija predstavljaju disimilaciju dušika. Dovoljna količina dušika se osigurava pri omjeru KPK/N 20. Niski omjer KPK/N, $< 5\text{-}10$, ne osigurava dovoljno organskih sastojaka za denitrifikaciju ili rast stanica, a pri visokom omjeru KPK/N, $> 20\text{-}30$, nema dovoljno izvora dušika za stanični rast [264]. U literaturi se navode različite vrijednosti potrebne količine organskih sastojaka za redukciju $\text{NO}_x\text{-N}$, izraženih kao omjer KPK/N odnosno C/N, tako Barth i sur. [265] navode potrebu od 4 g BPK po gramu reduciranog NO_3^- , dok Gerardi [26] navodi potreban omjer KPK/N 3 za redukciju nitrata i nitrita. Lee i sur. [266] su postigli potpunu denitrifikaciju s natrijevim acetatom kao izvorom ugljika s početnom koncentracijom nitrata 75,9 i 151,6 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ pri omjerima C/N 5,14 i 12,85, a omjeri C/N 0, 1,28, 2,57 nisu bili dovoljni za potpunu denitrifikaciju. Potpuna denitrifikacija, bez uzimanja u obzir rasta mikroorganizama, zahtijeva 2,853 g $\text{KPK}_{\text{PHA}}/\text{g N}$ za hidroksibutirat, i 2,855 g $\text{KPK}_{\text{PHA}}/\text{g N}$ za hidroksivalerat [263]. Santorio i sur. [263] navode da je u šaržnim pokusima koji su optimizirani za određivanje specifične denitrificirajuće aktivnosti mulja sa unutarstaničnim rezervama PHA kao izvorom ugljika pokazano da su optimalni uvjeti

koncentracija mikrobne biomase 0,5-2,0 g VSS/L, koncentracija nitrata 40-60 mg NO₃-N/L i omjer KPK_{PHA}/N veći od 5,4. Autori ističu da ukoliko je koncentracija PHA u biomasi manja od 5%, mikroorganizmi neće koristiti PHA za denitrifikaciju nego će sačuvati PHA kao izvor ugljika.

Kao izvor elektrona za denitrifikaciju, izvor C, uporabljen je natrijev acetat, dodan u odgovarajućoj količini za odabrani početni omjer KPK/N odnosno C/N, prema početnoj vrijednosti nitrita odnosno nitrata. Stvarna vrijednost potrebnog KPK za redukciju NO_x-N izraženo kao omjer KPK/NO_x-N ovisi o vrsti elektron donora uporabljenog za denitrifikaciju i operativnim čimbenicima [26,41].

Istraženi omjeri KPK/N 10 i 20 su osigurali dovoljnu količinu organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju 30±4, 50±5 i 70±5 mg NO₃-N/L, pri 1,5±0,3 i 3±0,3 g MLSS/L (Slika 21). Omjer KPK/N 5 je osigurano organskih sastojaka za oko 70% redukcije nitrata. U pokusima pri omjerima KPK/N, 10 i 20 je preostalo organskih sastojaka nakon potpune denitrifikacije i tako obrađena otpadna voda zahtijeva dodatni stupanj obrade. U svim pokusima koji su vođeni pri omjeru KPK/N 20 je preostalo znatno više organskih sastojaka u vodi nakon završene denitrifikacije u odnosu na pokuse koji su vođeni pri omjeru KPK/N 10. U pokusima pri omjeru KPK/N 5 utrošeni su svi organski sastojci, nedostatni su i čine ograničavajući čimbenik procesa denitrifikacije, s kojima je ostvarena oko 70% redukcija NO₃-N (Slika 21).

Brzina oksidacije KPK rasla je s porastom koncentracije nitrata, s porastom koncentracije mikrobne biomase, i s porastom omjera KPK/N (Slika 22). Pri omjeru KPK/N 10 i 1,5±0,3 g MLSS/L brzina oksidacije KPK rasla je s 44±4,3 mg KPK/Lh (za početnih 30±4 mg NO₃-N/L) na 59,2±5,1 mg KPK/Lh (za početnih 70±5 mg NO₃-N/L), pri 1,5±0,3 g MLSS/L i omjeru KPK/N 20 rasla je s 84,3±19,8 mg KPK/Lh (za početnih 30±4 mg NO₃-N/L) na 126±18,7 mg KPK/Lh (za početnih 70±5 mg NO₃-N/L), pri omjeru KPK/N 10 i 3±0,3 g MLSS/L rasla je s 162,7±11,7 mg KPK/Lh (za početnih 30±4 mg NO₃-N/L) na 163,6±21,6 mg KPK/Lh (za početnih 70±5 mg NO₃-N/L), i pri 3±0,3 g MLSS/L i KPK/N 20 brzina oksidacije KPK je porasla s 226,5±23,4 mg KPK/Lh (za početnih 30±4 mg NO₃-N/L) na 438±28,6 mg KPK/Lh (za početnih 70±5 mg NO₃-N/L). Pri omjeru KPK/N 5 i 1,5±0,3 g MLSS/L brzina oksidacije KPK rasla sa 39±2,1 mg KPK/Lh (za početnih 30±4 mg NO₃-N/L) na 51±2,8 mg KPK/Lh (za početnih 70±5 mg NO₃-N/L) (Slika 22).

Učinkovitost uklanjanja KPK je također rasla s porastom koncentracije mikrobne biomase (Slika 23), s porastom koncentracije nitrata kao i s porastom omjera KPK/N bila je unutar uskog raspona vrijednosti,.

Tako je učinkovitost uklanjanja KPK bila u rasponu $41,1 \pm 0,7$ - $42,1 \pm 0,4\%$ s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L pri omjeru KPK/N 10 za koncentracije nitrata 30 ± 4 - 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$. Slična učinkovitost uklanjanja KPK u rasponu $35,6 \pm 0,9$ - $43,3 \pm 1,2\%$ je zabilježena s $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L pri omjeru KPK/N 20 za koncentracije nitrata 30 ± 4 - 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ (Slika 23). Pri koncentraciji mikrobne biomase $3 \pm 0,3$ g MLSS/L i omjeru KPK/N 10 postignuta je učinkovitost uklanjanja KPK u rasponu $58,1 \pm 1,2$ - $76 \pm 2,3\%$, a s $3 \pm 0,3$ g MLSS/L i omjeru KPK/N 20 učinkovitost uklanjanja KPK iznosila je $44 \pm 1,3$ - $61,8 \pm 0,9\%$. Učinkovitost uklanjanja KPK pri omjeru KPK/N 5 je bila 100% (Slika 23).

Natrijev acetat je jedan od najčešće korištenih izvora ugljika za denitrifikaciju jer je niskomolekularni spoj s kojim se postižu više brzine denitrifikacije u odnosu na druge izvore ugljika poput primjerice etanola i glicerola, ali njegov nedostatak je to što ukoliko se doda u prekomjernoj koncentraciji, acetat čini organsko opterećenje i narušava kvalitetu efluenta [82]. Prednost korištenja acetata kao izvora ugljika je to što acetat omogućava dovoljno elektrona za denitrifikaciju koje denitrifikanti mogu lako koristiti [267,268] u obliku preferiranog puta redukcije nitrata – denitrifikacijom [269]. Acetat tvori acetyl Co-A koji se može izravno, bez modifikacija, koristiti u denitrifikaciji jer je acetyl Co-A esencijalni dio i ciklusa trikarboksilne kiseline, i glikolitičkog puta [222].

Varijacije koncentracije KPK, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA, temperature, pH i DO su prikazane za pokus 70 ± 5 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$ pri omjeru KPK/N 10 i $1,5 \pm 0,3$ g MLSS/L (Slika 24). Denitrifikanti su ujednačeno trošili KPK kao donore elektrona za redukciju nitrata i nitrita, i nakon potpune redukcije nitrata i nitrita, KPK je preostao u obrađenoj vodi. Nitrati su se također ujednačeno reducirali jer su denitrifikanti imali dovoljno donora elektrona (KPK), a temperatura, vrijednost pH i koncentracija otopljenog kisika su bili povoljni za proces denitrifikacije. Tijekom denitrifikacije došlo je do nakupljanja nitrita od $13 \pm 2,1$ mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ u 3. satu pokusa, koji su se potpuno reducirali do kraja pokusa. Maksimalna koncentracija slobodne nitritne kiseline od $0,0001 \pm 0,00002$ mg FNA/L je zabilježena u 2. satu pokusa, i nakon toga se smanjivala. Koncentracija FNA ovisi o koncentraciji nitrita, vrijednosti pH i o temperaturi. Što je vrijednost pH viša, to je niža koncentracija FNA, a što je viša koncentracija nitrita, to je viša koncentracija FNA. Kako se tijekom procesa denitrifikacije obnavlja puferski kapacitet tekućine, i kako dolazi do rasta vrijednosti pH, to utječe na pad koncentracije FNA. Moguće je da bi brzina denitrifikacije bila viša da je bila niža koncentracija FNA. Koncentracija otopljenog kisika je bila povoljna za proces denitrifikacije, iznosila je $\leq 0,4$ mg DO/L, pa nije došlo do inhibicije reduktaza uključenih u proces denitrifikacije. Vrijednost pH je rasla s početnih $7,2 \pm 0,1$ na maksimalnih $8,8 \pm 0,3$ u 4,5. satu pokusa, i onda se lagano smanjila (Slika 24).

U denitrifikacijskom transportnom lancu elektrona, $\text{NO}_3\text{-N}$ i intermedijeri denitrifikacije služe kao akceptori elektrona i utječu na učinkovitost denitrifikacije i ekspresiju i aktivnost pojedinih reduktaza. Lee i sur. [59] nisu zabilježili akumulaciju nitrita u pokusima s natrijevim acetatom kao izvorom ugljika s mikrobnom biomasom izoliranom iz humusnog tla. $\text{NO}_3\text{-N}$ podjednako inducira sve reduktaze, i preferirani je elektron akceptor u odnosu na ostale dušikove okside. $\text{NO}_2\text{-N}$ ovisno o koncentraciji određuje aktivnost NaR i NiR čime izravno utječe na izvedbu denitrifikacije [270,271]. Akumulacija $\text{NO}_2\text{-N}$ rezultat je kompeticije između NaR i NiR za elektrone koji nastaju oksidacijom donora elektrona [272]. Kisik kontrolira sintezu i aktivnost sva četiri denitrificirajuća enzima, a među njima najosjetljiviji je didušikov oksid reduktaza kojeg inhibira $<2 \text{ mg DO/L}$ [102]. U uvjetima bez otopljenog kisika ili pri limitirajućim vrijednostima koncentracije otopljenog kisika u elektron transportnom respiratornom lancu inducira se enzim nitrat reduktaza koja pomaže pri prijenosu vodika i elektrona do $\text{NO}_3\text{-N}$ kao konačnog akceptora elektrona [43]. Kako je brzina redukcije nitrita niža od brzine redukcije nitrata, redukcija nitrita do NO predstavlja ograničavajući korak brzine denitrifikacije, koji često dovodi do nakupljanja nitrita [272]. Na nakupljanje nitrita tijekom procesa denitrifikacije utječu omjer C/N, vrijednost pH, mikrobiološki sastav i aktivnost aktivnog mulja, izvor ugljika [24,96,270,273,274], i početna koncentracija nitrata [24,93,275]. Na razini genoma denitrificirajućih bakterija djeluje regulacija supstratom s nitratom te regulacija produktom s nitritom i NO, u svrhu izjednačavanja unutarnje koncentracije citotoksičnih spojeva – NO i nitrita [50]. Na razni metabolizma denitrificirajućih bakterija kompeticija između reduktaza može dovesti do nakupljanja N_2O ili nitrita i transporteri elektrona mogu transferirati elektrone radije jednoj reduktazi nego drugoj [141].

5.5. Učinkovitost denitrifikacije $\text{NO}_2\text{-N}$ u ovisnosti o omjeru KPK/N i količini mikrobne biomase

Denitrifikacija koja započinje redukcijom nitrita (denitritacija) je povoljnija od denitrifikacije koja započinje redukcijom nitrata (denitratacija) zato što se na taj način osiguravaju niži kapitalni troškovi, potrebna količina donora elektrona (organskih sastojaka) je 40% niža, i zbog oko 25% manje potrebe na aeraciji [145,147,273]. Da bi se mogla odvijati denitrifikacija preko nitrita, u aktivnom mulju trebaju postojati denitrifikanti koji koriste nitrit kao akceptor elektrona [145].

Brzina denitrifikacije $\text{NO}_2\text{-N}$ povećava se s porastom koncentracije mikrobne biomase i s porastom koncentracije nitrita, kao i s povećanjem udjela raspoložive koncentracije organskih

sastojaka (s porastom omjera KPK/N). Porast koncentracije nitrita od 30 ± 5 do 70 ± 2 mg NO₂-N/L pri $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L i omjeru KPK/N 10 je doveo do porasta brzine denitrifikacije s $10,7 \pm 1,1$ mg NO₂-N/Lh na $14,4 \pm 0,6$ mg NO₂-N/Lh. Pri istoj koncentraciji mikrobne biomase, $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L, ali pri dvostruko višoj koncentraciji organskih sastojaka, omjeru KPK/N 20 porast brzine denitrifikacije je bio sličan, porastao je s $9,7 \pm 0,8$ mg NO₂-N/Lh (za početnih 30 ± 5 mg NO₂-N/L) na $15,5 \pm 1,2$ mg NO₂-N/Lh (za početnih 70 ± 2 mg NO₂-N/L) (Slika 25).

Brzina denitrifikacija s $3 \pm 0,2$ g MLSS/L i pri omjeru KPK/N 10 je bila $20,7 \pm 0,9$ mg NO₂-N/Lh pri početnih 30 ± 5 mg NO₂-N/L i $27,6 \pm 0,5$ mg NO₂-N/Lh pri početnih 70 ± 2 mg NO₂-N/L. Povećanje omjera KPK/N na 20 s $3 \pm 0,2$ g MLSS/L je rezultiralo najvećom brzinom denitrifikacije, koja je porasla s $21,3 \pm 0,7$ mg NO₂-N/Lh pri početnih 30 ± 5 mg NO₂-N/L na $36,5 \pm 0,6$ mg NO₂-N/Lh pri početnih 70 ± 2 mg NO₂-N/L (Slika 25).

Pri omjeru KPK/N 5 i $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L brzina denitrifikacije je porasla s $8,8 \pm 0,4$ mg NO₂-N/Lh (za početnih 30 ± 5 mg NO₂-N/L) na $9,9 \pm 0,5$ mg NO₂-N/Lh (za početnih 70 ± 2 mg NO₂-N/L), a pri $3 \pm 0,2$ g MLSS/L brzina denitrifikacije pri KPK/N 5 je porasla s $19,5 \pm 1$ mg NO₂-N/Lh (za početnih 30 ± 5 mg NO₂-N/L) na 25 ± 1 mg NO₂-N/Lh (za početnih 70 ± 2 mg NO₂-N/L) (Slika 25). Brzina denitrifikacije NO₂-N s $3 \pm 0,2$ g MLSS/L je bila veća u prosjeku za 2,1 puta u odnosu na brzinu denitrifikacije NO₂-N s $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L (Slika 25).

U usporedbi s brzinom denitrifikacije ostvarenom s nitratom kao akceptorom elektrona (Slika 19), brzina denitrifikacije s nitritom kao akceptorom elektrona je veća za oko 1,5 puta (Slika 25).

U pokusima denitrifikacije preko nitrita s acetatom kao izvorom ugljika nakon 12 dana pokusa zabilježen je porast brzine denitrifikacije s 10 mg NO₂-N/Lh na 275,35 mg NO₂-N/Lh, i u tom periodu je smanjen omjer KPK/N sa 7,9 na 2,7 [145]. Autori ističu povezanost koncentracije nitrita i brzine denitrifikacije – pri višoj brzini denitrifikacije viši je prag inhibicije denitrifikanta nitritom, iz prošlih neuspjeha. Doseg inhibicije koji je proizašao iz relativno visoke koncentracije nitrita bio bi umanjn pranjem biomase, odlijevanjem supernatanta, i prekidom hranjenja tijekom nekoliko dana. Inhibicija ključnih denitrificirajućih enzima postiže se niskom koncentracijom nitrita u sustavu za vrijeme anoksične faze svakog ciklusa, tako što se provodi uzastopno prilagođavanje brzine dotoka nitrita u bioreaktor od ciklusa do ciklusa ovisno o brzini denitrifikacije ostvarenoj u prošlom ciklusu [145].

Količina utrošenog KPK za redukciju NO₂-N, izraženo kao omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$, je bila unutar uskog raspona vrijednosti za pokuse vođene pri istoj koncentraciji mikrobne biomase i pri istom omjeru KPK/N bez obzira na povećanje koncentracije NO₂-N (Slika 26). Omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ je rastao kako slijedi: $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ $2,7 \pm 0,2$ – $2,9 \pm 0,5$ pri KPK/N 5 i $1,5 \pm 0,2$

g MLSS/L < $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ $3,1\pm0,3$ - $3,2\pm0,2$ pri KPK/N 10 i $1,5\pm0,2$ g MLSS/L < $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ $4,8\pm0,5$ - $5\pm0,3$ pri KPK/N 5 i $3\pm0,2$ g MLSS/L < $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ $5,4\pm0,4$ - $5,6\pm0,2$ pri KPK/N 10 i $3\pm0,2$ g MLSS/L < $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ $6,3\pm0,8$ - $7\pm0,6$ pri $1,5\pm0,2$ g MLSS/L i omjeru KPK/N 20 < $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ $9,4\pm0,7$ - $12\pm0,5$ pri $3\pm0,2$ g MLSS/L i KPK/N 20 (Slika 26).

Povećanje omjera KPK/N s 10 na 20 pri $1,5\pm0,2$ g MLSS/L je dovelo do oko dvostrukog povećanja omjera $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$, a isti trend je zabilježen i pri $3\pm0,2$ g MLSS/L. Povećanje koncentracije mikrobne biomase s $1,5\pm0,2$ na $3\pm0,2$ g MLSS/L pri omjeru KPK/N 10 je dovelo do povećanja omjera $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ u prosjeku za oko 1,78 puta, odnosno u prosjeku za oko 1,59 puta pri omjeru KPK/N 20 (Slika 26).

Omjer $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_2\text{-N}$ (Slika 26) je u prosjeku oko 1,3 puta manji od omjera $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{NO}_3\text{-N}$ (Slika 20).

Pri omjeru KPK/N 5, 10 i 20 raspoloživi organski sastojci kao donori elektrona osigurali su potpunu denitrifikaciju 30 ± 5 , 50 ± 5 i 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ pri koncentraciji mikrobne biomase $1,5\pm0,2$ g MLSS/L i $3\pm0,2$ g MLSS/L (Slika 27). Kako se denitrifikacijom preko nitrita ostvaruje ušteda na potrebnim organskim sastojcima, jer je izostavljen prvi korak denitrifikacije, redukcija nitrata do nitrita, tako je u obrađenoj vodi nakon potpune denitrifikacije preostajalo organskih sastojaka, i to u koncentraciji koja je bila viša od maksimalno dopuštene vrijednosti za ispušt u površinske vode [15]. Količina organskih sastojaka, dodana u suvišku, koja je preostala nakon potpune denitrifikacije nitrita je bila viša nego u pokusima s nitratom kao akceptorom elektrona. Pri omjeru KPK/N 5 svi organski sastojci su bili uklonjeni/iskorišteni u denitrifikaciji $\text{NO}_2\text{-N}$.

Preveliki omjer C/N dovodi do ograničenja porasta brzine denitrifikacije [64], a također pri nedovoljnom omjeru C/N protok elektrona nije dovoljan za potrebe energije za stanični rast te dolazi do narušenog staničnog rasta i denitrifikacije.

Na brzinu oksidacije KPK povoljno je djelovao porast koncentracije nitrita, tako je pri omjeru KPK/N 10 i $1,5\pm0,2$ g MLSS/L brzina oksidacije KPK porasla s 30 ± 11 mg KPK/Lh (za početnih 30 ± 5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) na $36,2\pm12$ mg KPK/Lh (za početnih 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$). Pri omjeru KPK/N 10 i $3\pm0,2$ g MLSS/L brzina oksidacije KPK je porasla s 87 ± 21 mg KPK/Lh (za početnih 30 ± 5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) na $97,3\pm17$ mg KPK/Lh (70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$). Nešto niža brzina denitrifikacije je zabilježena pri omjeru KPK/N 20 i $1,5\pm0,2$ g MLSS/L, koja je porasla s 61 ± 14 mg KPK/Lh (za početnih 30 ± 5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) na $92,9\pm13$ mg KPK/Lh (za početnih 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$). Najviša brzina oksidacije KPK je zabilježena pri omjeru KPK/N 20 i $3\pm0,2$ g MLSS/L, koja je porasla s 123 ± 21 mg KPK/Lh (za početnih 30 ± 5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) na $185,7\pm18$

mg KPK/Lh (za početnih 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) (Slika 28). Pri KPK/N 5 i $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L brzina oksidacije KPK je porasla s $24 \pm 1,1$ mg KPK/Lh (za početnih 30 ± 5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) na $31 \pm 0,8$ mg KPK/Lh (za početnih 70 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$).

Brzina oksidacije KPK s nitritom kao akceptorom elektrona je bila manja (Slika 28) od brzine oksidacije KPK ostvarene s nitratom kao akceptorom elektrona (Slika 22).

Učinkovitost uklanjanja KPK je bila manja s nitritom kao akceptorom elektrona (Slika 29) u odnosu na učinkovitost uklanjanja KPK s nitratom kao akceptorom elektrona (Slika 23) zato što je za redukciju nitrita potrebna manja količina KPK. Učinkovitost uklanjanja KPK je bila unutar uskog raspona vrijednosti za pokuse provedene pri istoj koncentraciji mikrobne biomase i pri istom omjeru KPK/N bez obzira na porast koncentracije nitrita. Tako je učinkovitost uklanjanja KPK rasla kako slijedi: $29,3 \pm 0,6$ - $34,3 \pm 1\%$ pri $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L i KPK/N 10 < $32,2 \pm 2,2$ - $36,4 \pm 1,7\%$ pri $1,5 \pm 0,2$ g MLSS/L i KPK/N 20 < $40,7 \pm 1,4$ - $45,3 \pm 2$ pri KPK/N 20 i $3 \pm 0,2$ g MLSS/L < $52,3 \pm 3,1$ - $58,4 \pm 0,7\%$ pri KPK/N 10 i $3 \pm 0,2$ g MLSS/L. Pri omjeru KPK/N 5 uklonjeni su svi organski sastojci.

Kinetika pokusa denitrifikacije s $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptorom elektrona pokazuje ujednačenu oksidaciju KPK za vrijeme redukcije $\text{NO}_2\text{-N}$ (Slika 30). S iscrpljenjem nitrita, KPK preostaje u obrađenoj vodi. Tijekom pokusa je dolazilo do nakupljanja slobodne nitritne kiseline koja je dosegla maksimalnu koncentraciju u 1,5. satu i iznosila je $0,0016 \pm 0,0007$ mg FNA/L, a nakon toga je opadala i na kraju pokusa je više nije bilo. Moguće je da bi brzina denitrifikacije bila veća da je koncentracija FNA bila niža. Vrijednost pH je rasla s početnih $7,2 \pm 0,1$ do maksimalnih $8,8 \pm 0,2$ u 5,5. satu pokusa, i zatim se blago smanjila. Koncentracija otoljenog kisika je bila niska, povoljna za proces denitrifikacije, i iznosila je do 0,4 mg DO/L. Temperatura je bila sobna, u rasponu $22,5$ - $22,8$ °C.

Nedostatak nitrita kao akceptora elektrona za denitrifikaciju je to što visoke koncentracije nitrita dovode do inhibicije denitrifikacije [56,93,276]. Koncentracija FNA u rasponu 0,0007-0,001 mg $\text{HNO}_2\text{-N/L}$ je dovela do 50% inhibicije, a koncentracija FNA veća od 0,004 mg $\text{HNO}_2\text{-N/L}$ je rezultirala potpunom inhibicijom [276].

5.6. Minimalni omjer C/N za denitrifikaciju nitrita i nitrata

Da bi se odredio minimalan potreban omjer C/N za potpunu denitrifikaciju napravljena je serija pokusa pri omjerima C/N 1, 2, 3, 4 i 5 s nitritom odnosno s nitratom kao akceptorom elektrona. Rezultati su pokazali da je za nitrit potreban omjer $2 < \text{C/N} < 3$ a za nitrat $3 < \text{C/N} < 4$ (Tablica 20). Kako je za nitrit reducirano $68 \pm 4\%$ $\text{NO}_2\text{-N}$ i sav KPK utrošen pri omjeru C/N 2, a pri omjeru

C/N 3 je reduciran sav $\text{NO}_2\text{-N}$ ali je ostao KPK u suvišku, napravljeni su pokusi s nitritom kao akceptorom elektrona pri omjerima C/N 2,2, 2,4, 2,6, 2,8 i 3. Ti pokusi su pokazali da je za potpunu redukciju nitrita i za potpuni utrošak KPK potreban omjer C/N 2,4 (Tablica 21).

Za nitrat kao akceptor elektrona se pokazao kao povoljan omjer C/N između 3 i 4 (Tablica 20). Kako je pri omjeru C/N 3 reducirano $61 \pm 2\%$ nitrata i utrošen je sav KPK, a pri omjeru C/N 4 su reducirani svi nitrata, ali je preostao KPK u obrađenoj vodi, napravljeni su pokusi s nitratom kao akceptorom elektrona pri omjerima C/N 3,2, 3,4, 3,6, 3,8 i 4. Rezultati su pokazali da je za potpunu redukciju nitrata uz potpuni utrošak KPK potreban omjer C/N 3,8 (Tablica 21).

Kinetika denitrifikacije uz minimalno potreban omjer C/N za nitrata (3,8) odnosno nitrite (2,4), prikazana je slikama 31 i 32. U tako provedenim pokusima nitrati odnosno nitriti su potpuno reducirani, i potpuno su oksidirani organski sastojci, pa u obrađenoj vodi ne preostaju ni organski sastojci ni $\text{NO}_x\text{-N}$.

5.7. Unutarstanični izvor ugljika za denitrifikaciju – endogena denitrifikacija

Potreba za postizanjem graničnih vrijednosti kakvoće otpadnih voda s obzirom na hranjive tvari (N i P) predstavlja izazov u istraživanju i provedbi denitrifikacije. Raspoloživi lako biorazgradivi organski sastojci izraženi kao rbKPK vrijednost u otpadnoj vodi pokreću brzu denitrifikaciju, ali neoptimalnim dizajnom sustava za obradu i radnim uvjetima lako se može narušiti kakvoća izvedbe procesa, i bitno je u dizajnu/projektiranju sustava obrade otpadne vode uzeti u obzir kakvoću ulaza kao i omjer rbKPK/TN [277]. U provedbi denitrifikacije na sustavima za obradu otpadnih voda opažaju se u krivulji redukcije $\text{NO}_x\text{-N}$ tri brzine denitrifikacije: **prva, najveća brzina denitrifikacije**, kao rezultat denitrifikacije s lako biorazgradivom kemijskom potrebom na kisiku (rbKPK); **druga brzina denitrifikacije** je rezultat hidrolize biorazgradivih čestica KPK adsorbiranih na bakterijskim flokulama, a **treća brzina denitrifikacije** je endogena brzina denitrifikacije [278]. Ove pojedinačne brzine mogu zasebno ovisiti o temperaturi. U praktičnom smislu, anoksične zone moraju biti dimenzionirane mnogo veće za obradu otpadnih voda s niskom koncentracijom rbKPK, u usporedbi s obradom otpadnih voda sa visokom koncentracijom rbKPK koji podržavaju brzu denitrifikaciju [277]. Iz rezultata pokusa denitrifikacije nitrata i nitrita koji su limitirani izvorom ugljika (Tablica 22) vidljivo je da je uz nitrat kao akceptor elektrona s vanjskim raspoloživim izvorom ugljika pri omjerima C/N 1, 2 i 3 ostvarena redukcija nitrata od $17 \pm 0,5$, 37 ± 2 i $61 \pm 2\%$, a s unutarstaničnim zaliham (PHA) ostvareno je ukupno uklanjanje nitrata od 37, 82 i 100 %, pri čemu je utrošak PHA iznosio 2,5, 5,5 i 1,3 mmolC/L.

Sličan trend je vidljiv i u denitrifikaciji preko nitrita (Tablica 22). Pri omjerima C/N 1 i 2 postignuta je redukcija nitrita 37 ± 1 i 68 ± 4 % s vanjskim izvorom ugljika, a s unutarstaničnim zaliham ostvarena je sveukupna redukcija nitrita od 53 i 100 %, pri čemu je utrošeno PHA 3,1 i 0,9 mmol C/L.

Rezultati pokazuju da je za endogenu denitrifikaciju $\text{NO}_3\text{-N}$ potrebo oko 16% više PHA u odnosu na endogenu denitrifikaciju $\text{NO}_2\text{-N}$, što je u suglasju s literaturom, u kojoj je istaknuto da endogena denitrifikacija preko nitrita troši manje PHA (50%) od endogene denitrifikacije preko nitrata [310].

Detaljan prikaz kinetike denitrifikacije nitrata pri čemu su kao donori elektrona korišteni vanjski izvor ugljika (acetat) i unutarstanične zalihe (PHA) je prikazan na slici 33. Organski sastojci su utrošeni tijekom dva sata pri čemu je ostvarena brzina oksidacije KPK od 84,5 mg KPK/Lh. Za to vrijeme došlo je do redukcije nitrata 61,3 %, a nitrati su se reducirali brzinom 9,2 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$. Tijekom naredna četiri sata (produženi anoksični uvjeti) nitrati su se u potpunosti reducirali pri čemu je kao donor elektrona služio PHA, odnosno odvijala se endogena denitrifikacija. Endogena denitrifikacija je znatno sporija od denitrifikacije s vanjskim izvorom ugljika, iznosila je 2,8 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$. Tijekom redukcije nitrata došlo je do nakupljanja nitrita, koji su maksimalnu vrijednost dosegli u 1,5. satu pokusa, i iznosili su 3,8 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, a nakon toga su se potpuno reducirali do kraja pokusa. Koncentracija FNA je bila vrlo niska tijekom cijelog pokusa, s najvišom zabilježenom koncentracijom od $8,6 \cdot 10^{-5}$ mg FNA/L u 0.5 satu pokusa, i zatim se smanjivala do kraja pokusa. Tijekom denitrifikacije zabilježen je utrošak PHA od 1,3 mmol C/L. Vrijednost pH je rasla od početka pokusa (pH 7,1) do trenutka potpunog utroška vanjskog izvora ugljika (pH 8,3), a nakon toga je lagano opadala (pH 7,6 na kraju pokusa). Koncentracija otopljenog kisika je iznosila 0,1 mg DO/L, a temperatura je bila sobna (Slika 33).

5.8. Učinkovitost istovremene denitrifikacije i uklanjanja P s $\text{NO}_2\text{-N}$ kao akceptorom elektrona pri anoksičnim uvjetima

Većina DPAOs ima anaerobno-anoksični metabolizam [186,187,188,191,210,279], međutim, postoje DPAOs koji postižu uklanjanje fosfora u anoksičnim uvjetima bez potrebe za anaerobnom fazom s $\text{NO}_3\text{-N}$ kao akceptorom elektrona [280] ili u anoksično-aerobnim uvjetima [279,281], pri čemu je aerobna faza u funkciji oksidacije preostalih organskih sastojaka i unosa P.

Istraženi su mnogi čimbenici koji utječu na DPAOs poput izvora ugljika, pH vrijednosti, anaerobno-aerobnog reakcijskog vremena, anaerobno-anoksičnog reakcijskog vremena, temperature, otopljenog kisika i drugih [187,191,224,282,283,284]. U denitrificirajućem uklanjanju fosfora nitrit je prepoznat kao jedan od inhibitora mikrobnog metabolizma [285,286,287]. Također, kao inhibitor unosa fosfora predložena je slobodna nitritna kiselina umjesto nitrita [287]. Pretpostavlja se da bi nešto veća tolerancija anoksične aktivnosti PAOs za nitrit mogla biti zbog anoksičnog metabolizma nitrita koji osigurava nižu koncentraciju nitrita u blizini stanice [194]. Za prevladavanje inhibicije nitritom predložene su dvije strategije vođenja procesa: (i) dodatak nitrata - pokazano je u šaržnim pokusima da dodatak nitrata (45-200 mg $\text{NO}_3\text{-N/L}$) smanjuje toksičnost nitrita (5-100 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) [288]; (i) strategija postupnog hranjenja, uz strategiju postupnog unosa nitrita kao akceptora elektrona i održavanje koncentracije nitrita nižom od 15 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ [289].

Kontradiktorni je učinak $\text{NO}_2\text{-N}$ na anoksični unos fosfora. Istaknuto je da >10 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ inhibira anoksičan unos fosfora s biomasom koja nije prilagođena na nitrit [290], da je pri 12 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ anoksičan unos fosfora smanjen na 65% [194], da je 20 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ inhibiralo anoksičan unos fosfora za 64,85% i DPAOs denitrifikaciju za 61,25% [289], da je 25 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ inhibiralo anoksičan unos fosfora bez obzira na koncentraciju istraženih vanjskih izvora ugljika, s neaklimatiziranom biomasom [291], a prag nitrita za anoksičan unos fosfora je oko 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/gVSS}$ [184]. S druge strane, koncentracija nitrita od 4-5 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ [184,194], 20 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ [285], do 115 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ [292] nisu bili štetni za anoksičan unos fosfora.

U anoksično-aerobno vođenim SBR pokusima [281] su pokazali da je moguće postići istovremeno uklanjanje KPK, nitrata i P u anoksičnim uvjetima, bez anaerobne faze. Suvišak elektron donora i akceptora u anoksičnim uvjetima se pokazalo kao prednost za obogaćivanje DPAO-a u odnosu na obične heterotrofne organizme (OHO). Prisutnost akceptora elektrona u obje faze (anoksično-aerobna) dovelo je do eliminacije anaerobne faze [281].

U šaržnim pokusima (Tablica 23) s 40 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 2) učinkovitost denitrifikacije iznosila je 100% pri C/N 4 i $84\pm 1,2\%$ učinkovitosti uklanjanja P, u pokusima sa 60 ± 3 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 3) učinkovitost denitrifikacije iznosila je 100% pri C/N 3 i $83\pm 1\%$ učinkovitosti uklanjanja P, a u pokusima s 80 ± 3 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 4) učinkovitost denitrifikacije iznosila je 100% pri C/N 2, s učinkovitošću uklanjanja P od $74\pm 2\%$.

Denitrificirajuća defosfatacija s 40 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 2) pri C/N 4 rezultirala je brzinom denitrifikacije od $20\pm 1,3$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$ i brzinom unosa P od $8,3\pm 0,5$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$, sa 60 ± 3 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 3) pri C/N 3 brzina denitrifikacije bila je $23,7\pm 2$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, a brzina

unosa P od $6,7 \pm 0,7$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$, a s 80 ± 3 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 4) pri C/N 2 brzina denitrifikacije bila je $25,9 \pm 1,7$ mg $\text{NO}_2\text{-N/Lh}$, sa brzinom unosa P od $4,8 \pm 0,7$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ (Tablica 23).

Dostupan KPK za denitrifikaciju 40 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, 60 ± 3 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ i 80 ± 3 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ i istovremeni unos P u ovim pokusima pri omjerima C/N 4 i N/P 2, C/N 3 i N/P 3, C/N 2 i N/P 4 nije bio ograničavajući čimbenik ni procesa denitrifikacije ni uklanjanja P, niti je dodan u suvišku. Povećanje koncentracije $\text{NO}_2\text{-N}$ od 40 ± 2 - 80 ± 3 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 2-4) smanjuje brzinu unosa P i učinkovitost uklanjanja P. Povećanjem koncentracije $\text{NO}_2\text{-N}$ s 40 ± 2 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ na 80 ± 3 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 2-4) učinak uklanjanja P smanjen je s $84 \pm 1,2\%$ na $74 \pm 2\%$ kao i brzina unosa P od $8,3 \pm 0,5$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ na $4,8 \pm 0,7$ mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ (Tablica 23).

Organski ugljik potreban je za denitrifikaciju ali i za otpuštanje P, pa je potrebno omogućiti/osigurati dovoljnu količinu organskog ugljika za učinkovit proces denitrificirajuće defosfatacije [293]. U anaerobnim uvjetima s istovremeno prisutnim acetatom (360 mg KPK/L), nitritom (0-10 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) i fosfatom (9,7 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$), provedbom šaržnih pokusa zabilježeno je s povećanjem početne koncentracije nitrita smanjeno otpuštanje fosfata [293]. Istovremena prisutnost acetata, nitrita i fosfata je djelovala na DPAOs na način da nije zabilježeno otpuštanje fosfata, nego potrošnja KPK, redukcija nitrita i unos fosfata od početka pokusa. DPAOs koegzistiraju s običnim heterotrofnim denitrifikantima i u prisutnosti nitrita obje skupine mikroorganizama se natječu za organski ugljik u anaerobnoj fazi, što dovodi do manje količine organskih tvari dostupnih za DPAOs, zbog čega je otpuštanje fosfata bilo neučinkovito, a naknadni anoksični P unos smanjen. Također, nitrit je inhibirao anaerobno P otpuštanje te je istaknuto da bi koncentracija nitrita u anaerobnoj fazi trebala biti ispod 2 mg N/L da bi se osiguralo učinkovito P otpuštanje i kasniji unos P [293].

U denitrificirajućoj defosfataciji s $\text{NO}_3\text{-N}$ u anoksično-aerobnom režimu sugerirano je da je dio acetata korišten za intracelularno skladištenje PHB, dio za redukciju $\text{NO}_3\text{-N}$, kao i za održavanje i rast biomase. Pokazali su da unos P tijekom anoksičnog uvjeta ne ovisi o metabolizmu PHB [281].

Anoksičan unos P putem DPAOs je moguć kada je u anoksičnim uvjetima prisutan višak nitrata kako bi se premašio denitrifikacijski potencijal drugih heterotrofnih organizama [292].

U pokusima biološkog uklanjanja nutrijenata u anaerobno-aerobnom SBR-u, pokazalo se da je omjer KPK/ PO_4 110 fosfat-ograničavajući, a omjer KPK/ PO_4 140 kao deficitaran, te se pokazalo ne samo nepovoljnim za unos acetata, nego je i potaknulo nakupljanje GAOs [294].

Pokazalo se da DPAOs mogu podnijeti visok omjer KPK/ PO_4 137 [295]. Visoki KPK smatra se ključnim za obogaćivanje DPAOs u odnosu na uobičajene denitrificirajuće heterotrofe [296].

Još jedna prednost organskog ugljika dodanog u suvišku je potpuna denitrifikacija bez nakupljanja nitrita [297].

U svim pokusima s ograničavajućom i neograničavajućom koncentracijom KPK, s povećanjem omjera C/N, brzina unosa P pokazala je dva nagiba pravca – dvije brzine: pri prvoj, većoj brzini zabilježeno je uklanjanje $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{PO}_4\text{-P}$ oko 70%, a pri drugoj, značajno nižoj brzini unosa P odvijalo se daljnje uklanjanje P uz istodobnu daljnju redukciju $\text{NO}_2\text{-N}$ pri istoj brzini denitrifikacije (Slika 34). Rezultati postignuti u ovom radu su u suglasju s Zhang i sur. [293] koji su također zabilježili visoku brzinu unosa fosfata i brzinu redukcije nitrita na početku anoksične faze tijekom prvih 30 minuta, koja je zatim usporena.

Omjer P/N, omjer anoksičnog unosa fosfata i denitrificiranog dušika, jako ovisi o brzini unosa fosfata [194]. U slučaju kada se adenzin trifosfat (ATP) akumulira tijekom denitrifikacije isključivo koristi za unos fosfata, maksimalni P/N omjer bi iznosio oko 3 [188]. Omjer anoksičnog unosa fosfata i denitrificiranog dušika ($\text{NO}_2\text{-N}$) izražen kao P/N bio je 1,5 [285], a za granulirani mulj s nitritom omjer P/N iznosio je 1,68 [225].

Koncentracija FNA ovisi o koncentraciji nitrita, pH vrijednosti i temperaturi. Promjene krivulje FNA pokazale su isti trend u svim pokusima: na početku pokusa, s početnom koncentracijom $\text{NO}_2\text{-N}$, FNA je bila najveća, i tijekom pokusa, kako se koncentracija $\text{NO}_2\text{-N}$ smanjivala, a pH povećavao, FNA se smanjivala (Slika 34). Najveća koncentracija FNA, $0,008 \pm 0,0008$ mg/L, zabilježena je u pokusu s 20 ± 1 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ pri omjeru N/P 4 i C/N 2. Razlog zašto tako visoka koncentracija FNA nije imala inhibitorski učinak na denitrificirajuću defosfataciju mogao bi biti dugotrajna izloženost mulja nitritu kao akceptoru elektrona.

U procesu denitrificirajućeg uklanjanja P za biomasu koja nije prilagođena nitritu $2,25 \mu\text{g HNO}_2\text{-N/L}$ bilo je inhibitorski za anoksični P unos [290], a zabilježeno je da je $0,02$ mg $\text{HNO}_2\text{-N/L}$ potpuno zaustavilo anoksični P unos [287].

U pokusima u ovom radu profil pH (Slika 34) bio je karakterističan za proces denitrificirajuće defosfatacije: od početka procesa, tijekom potrošnje raspoloživog KPK, pH vrijednost je rasla. U svim pokusima početni pH bio je $7,2 \pm 0,2$. Od trenutka sveukupne potrošnje KPK, pH vrijednost je bila konstantna, ili blago smanjena do kraja pokusa, tako da se pH vrijednost može koristiti kao neizravni pokazatelj procesa. Mogući razlog za anoksični P unos pri dvije brzine mogla bi biti pH vrijednost. Kritična pH vrijednost za anoksični unos P bila je $8,75 \pm 0,05$: pri pH $8,75 \pm 0,05$ ili nižem došlo je do značajnog uklanjanja P, a pri višem pH od $8,75 \pm 0,05$ zabilježen je dodatni unos fosfora (Slika 34). Na kraju svih šaržnih pokusa zabilježena je koncentracija $\text{PO}_4\text{-P} \geq 3$ mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, tako da se uklanjanje P može u potpunosti pripisati aktivnosti DPAOs, a ne taloženju P.

Karakterističan profil pH u EBPR procesu je smanjenje pH tijekom anaerobne faze i zatim povećanje pH tijekom aerobne/anoksične faze. Vrijednost pH je važan čimbenik EBPR procesa jer utječe na membranu mikrobne stanice u smislu površinskog naboja i propusnosti, mikrobni rast, reprodukciju [298,299,300]. U anaerobnim uvjetima pri višim vrijednostima pH niže otpuštanje fosfora moglo bi biti posljedica taloženja fosfata koji se adherirao na površinu zooglea i blokirao apsorpciju ugljika i PAOs P otpuštanje [301]. Budući da viša pH vrijednost može smanjiti pokretačku silu protona i stoga PAOs moraju hidrolizirati više poliP, viši pH dovodi do većeg P otpuštanja [302].

U istraživanju stabilnosti procesa uklanjanja N i P, u anaerobnim uvjetima s povećanjem pH vrijednosti od 6,5-8 oslobađa se više fosfora, a kada pH poraste na 8,5, smanjuje se oslobođeni fosfor [303]. Octena kiselina aktivno difundira kroz stanične membrane i zatim se konvertira u PHB. Budući da razgradnja octene kiseline troši energiju, energija se obnavlja raskidanjem unutarstanično pohranjenog poliP, koji se zatim u obliku orto fosfata oslobađa iz stanice. U naknadnim anoksičnim uvjetima s povećanjem pH od 6,5 na 8,0 unos P se povećao, a s porastom pH na 8,5 unos P se smanjio. Naglasili su da je brzina otpuštanja P superiornija brzini unosa P kao odgovor na promjenu pH vrijednosti, a pH u intervalu 6,5-8,0 utječe na stabilnost procesa, brzinu anaerobnog oslobađanja P i brzinu anoksičnog P unosa [303].

Pokusi provedeni s obogaćenim PAOs muljem uzgojenim u anaerobno-anoksičnim uvjetima i bez kontrole pH (pH u rasponu 7,0-8,3) nisu pokazali negativan odgovor na anoksičan unos fosfata pri 35 mg NO₂-N/L [190]. U tom pH rasponu fosfat se mogao kemijski istaložiti [304]. Pokusi s obogaćenom PAOs kulturom provedeni u SBR-u i pod kontroliranim pH od oko 7 pokazali su snažnu inhibiciju anoksičnog unosa P pri 5-10 NO₂-N/L [187].

U šaržnim pokusima s prekomjernom koncentracijom KPK (Tablica 23) vidljivo je blago povećanje brzine denitrifikacije NO₂-N i istovremeno smanjenje brzine i učinkovitosti unosa P. Kako je KPK dodan u prekomjernoj koncentraciji, organski sastojci su prisutni u obrađenoj vodi.

Visok omjer KPK/N mogao bi uzrokovati dominaciju heterotrofa koji nisu DPAOs [280]. Štetno djelovanje na denitrificirajuću defosfataciju ima i vrlo visok i vrlo nizak početni KPK [293]. Viši početni KPK ima učinak na denitrificirajuću defosfataciju na način da su obični heterotrofni denitrifikanti favorizirani u odnosu na DPAOs, pa dolazi do potpune redukcije nitrita, međutim, unos P je nizak. S druge strane, u denitrificirajućoj defosfataciji pri niskom početnom KPK DPAOs utroše većinu KPK, pa je za anoksičan unos P pohranjena nedovoljna količina PHA, a obični denitrifikanti nisu koristili KPK.

Istaknuto je da bi za denitrificirajuću defosfataciju početni KPK trebao biti dovoljno visok da osigura odgovarajuće zalihe PHA [293].

5.9. Učinkovitost endogene denitrifikacije u poboljšanom uklanjanju N u anaerobno/aerobno/anoksičnom procesu uz endogenu denitrifikaciju pri obradi otpadne vode niskog omjera C/N s ciljem uklanjanja N i P

Konfiguracija anaerobno/aerobno/anoksičnog (A/O/A) procesa uz endogenu denitrifikaciju u režimu 1 h anaerobno, 1 h aerobno, 5 h anoksično, se pokazala kao obećavajući način za postizanje visoke učinkovitosti uklanjanja N i P za otpadne vode niskog omjera C/N (Slike 35-38). Sustavi A/O/A u laboratorijskim i pilot mjerilima zabilježili učinkovitost uklanjanja N 85,86-91,40% i P 89,87-90,40% [305,306].

Anaerobna faza od 1 h je bila dovoljna za potpuni unos KPK. Brzina uklanjanja KPK je iznosila 117, 127 i 213 mg KPK/Lh pri odabranim C/N 2, 4 i 6. Pri omjeru C/N 6 je preostalo 17 mg KPK/L iz anaerobne faze koji su se u aerobnoj fazi oksidirali tijekom prvih 20 min pokusa, pa je sveukupna brzina oksidacije KPK pri omjeru C/N 6 iznosila 173 mg KPK/Lh. Tijekom anaerobne faze odvijalo se i otpuštanje P, koje je iznosilo 12, 19 i 28 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ pri omjerima C/N 2, 4 i 6. Tijekom anaerobne faze su DPAOs/PAOs unosili acetat i pohranjivali ga unutarstanično u obliku PHA i pri tome je došlo do otpuštanja $\text{PO}_4\text{-P}$. Dio acetata su koristili i DGAOs, koji su aktivnost ispoljili u produženoj anoksičnoj fazi pri čemu su doprinjeli poboljšanom uklanjanju N putem endogene denitrifikacije trošenjem unutarstaničnih rezervi ugljika (Slike 35-38).

Tijekom aerobne faze procesa odvijala se oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$, potpuna oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$, a brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ je iznosila 20 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ za sve istražene omjere C/N. Tijekom aerobne faze oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$ je rezultirala s nakupljenih 12, 7,6 i 5,2 mg $\text{NO}_x\text{-N/L}$, odnosno, došlo je do istovremene nitrifikacije i denitrifikacije, pri čemu je uklonjeno 40, 62 i 74 % N pri omjerima C/N 2, 4 i 6.

Brzina produkcije $\text{NO}_x\text{-N}$ je iznosila 12, 7,6 i 5,2 mg $\text{NO}_x\text{-N/Lh}$. Također, tijekom aerobne faze uklonjeno je 7, 9 i 11 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, odnosno, uklonjeno je 54, 43 i 38 % $\text{PO}_4\text{-P}$ pri omjerima C/N 2, 4 i 6. Brzina aerobnog unosa P je iznosila 7, 9 i 11 mg $\text{PO}_4\text{-P/Lh}$ pri omjerima C/N 2, 4 i 6 (Slike 35-38).

Tijekom aerobne faze se odvija kompeticija za otopljeni kisik između nitrifikanata, PAOs i GAOs što može dovesti do povećane potrošnje unutarstaničnih zaliha ugljika pa je tako postaje upitna učinkovitost endogene denitrifikacije [307]. Kako je u aerobnoj fazi vidljiv gubitak N, i

unos P, donori elektrona za denitrifikaciju i unos P su unutarstanične zalihe PHA koje su mikroorganizmi pohranili u prethodnoj anaerobnoj fazi. Kako je rastao omjer C/N, tako je na kraju aerobne faze nakupljeno manje NO_x-N jer je bio izraženiji učinak SND. Također, s porastom omjera C/N u anaerobnoj fazi procesa, odvijao se i veći aerobni unos P u stanice PAOs/DPAOs (Slike 35-38).

U slijednoj produženoj anoksičnoj fazi uklonjeno je dodatnih 5,9, 7,3 i 5,2 mg NO_x-N/L pri čemu je postignuto ukupno uklanjanje N od 69,5%, 98,5 % i 100 %, a brzina endogene denitrifikacije je iznosila 2,2, 1,5 i 1,6 mg NO_x-N/Lh pri omjerima C/N 2, 4 i 6. U ovoj fazi je također došlo i do dodatnog unosa P od 0,4, 2,6 i 5,8 mg PO₄-P/L i ostvareno uklanjanje P u odnosu na P na kraju anaerobne faze/početku aerobne faze od 57, 55 i 65 % pri omjerima C/N 2, 4 i 6 (Slike 35-38). DGAOs tijekom endogene denitrifikacije za redukciju NO_x-N koriste unutarstanične donore elektrona glikogen i PHA [308,309].

Brzina anoksičnog unosa P je iznosila 0,2, 1,9 i 2,2 mg PO₄-P/Lh pri omjerima C/N 2, 4 i 6.

Pri omjeru C/N 2 je aktivnost DPAOs prestala već u 2,33. satu, a aktivnost endogene denitrifikacije u 4,66. satu što ukazuje na nedovoljnu količinu unutarstaničnih zaliha za endogenu denitrifikaciju i anoksičan unos P (limitacija ugljikom). Pri omjeru C/N 4 endogena denitrifikacija se odvijala tijekom svih 5 sati, a aktivnost DPAOs je prestala u 3,33. satu jer su DPAOs bili limitirani ugljikom i elektron akceptorima. Pri omjeru C/N 6 je endogena denitrifikacija završila u 5,33. satu, pa je tada prestala i aktivnost DPAOs jer više nije bilo elektron akceptora. Pri omjeru C/N 6 bi produljenje aerobne faze vjerojatno imalo povoljan učinak na uklanjanje P (Slike 35-38).

Na slici 36 su prikazani profili pH i DO tijekom A/O/A konfiguracije. Tijekom anaerobne i anoksične faze koncentracije otopljenog kisika je iznosila 0 mg DO/L. tijekom aerobne faze se vidi pad koncentracije otopljenog kisika tijekom oksidacije amonijaka i unosa P, a pred kraj aerobne faze se vidi porast koncentracije otopljenog kisika zbog završetka oksidacije amonijaka i unosa P.

Tijekom anaerobne faze u krivulji pH vrijednosti nije bilo promjena. Tijekom aerobne faze se uočava pad vrijednosti pH zbog odvijanja nitrifikacije i produkcije H⁺ iona. Budući da se u aerobnoj fazi odvijala istovremeno i denitrifikacija, pad vrijednosti pH nije bio toliki da padne ispod vrijednosti pH koje su optimalne za odvijanje nitrifikacije. U anoksičnoj fazi je vidljiv blagi rast pH vrijednosti zbog odvijanja endogene denitrifikacije. Po završetku denitrifikacije pH vrijednost je bila konstantna (Slika 36).

Profili pH i DO se mogu koristiti kao neizravni pokazatelji tijeka nitrifikacije i denitrifikacije. Tako se i u ovim pokusima može uočiti amonijeva dolina u krivulji pH – trenutak kada pH

vrijednost dosegne najnižu vrijednost i zatim krene rasti, a to je točka koja se poklapa sa završetkom oksidacije amonijaka i najvišom koncentracijom nitrita. Tijekom nitrifikacije je izraženija produkcija H^+ iona u prvom koraku nitrifikacije, tijekom oksidacije amonijaka do nitrita, nego tijekom drugog koraka nitrifikacije, oksidacije nitrita do nitrata. Nakon toga trenutka se odvija samo oksidacija nitrita do nitrata, pa je smanjena produkcija H^+ iona i vrijednost pH blago raste. U krivulji DO je vidljiva točka koja se podudara sa amonijevom dolinom, kisikov lakat, a koja predstavlja porast koncentracije otopljenog kisika. Tijekom nitrifikacije je veća potrošnja otopljenog kisika tijekom prvog koraka nitrifikacije jer se istovremeno odvijaju i oksidacija amonijaka do nitrita i nitrita do nitrata. U točki kisikovog lakta oksidacija amonijaka je gotova pa otopljeni kisik troše samo nitrit oksidirajuće bakterije i zato dolazi do skoka DO. Tijekom denitrifikacije raste pH vrijednost zbog produkcije OH^- iona, i po završetku denitrifikacije pH vrijednost stagnira ili blago pada.

Funkcionalne bakterije uključene u proces endogene denitrifikacije su denitrifikacijski organizmi koji nakupljaju glikogen (DGAOs), koji su sposobni sintetizirati PHA u anaerobnom uvjetu i koristiti PHA u anoksičnom uvjetu kao donore elektrona za denitrifikaciju [115,199].

DGAOs su dokazani primjenom FISH metode.

Konfiguracija A/O/A uz endogenu denitrifikaciju u režimu 1h anaerobno, 2 h aerobno, 4 h anoksično, se pokazala kao bolji režim vođenja procesa pri čemu je postignuto poboljšanje uklanjanja N i P (Slike 39 i 40) u odnosu na ranije istraženi režim (Slike 35- 38).

I u ovoj konfiguraciji tijekom anaerobne faze su se zbivale vrlo slične promjene – ostvareno je potpuno uklanjanje KPK pri brzinama 114, 138 i 237 mg KPK/Lh. Pri tome se zbivalo otpuštanje P od 11,5, 19 i 29 mg P/L pri brzinama 11,5, 19 i 29 mg P/Lh, pri omjerima C/N 2, 4 i 6 (Slike 39 i 40).

Učinak produljenja aerobne faze je vidljiv na nitrifikaciji i SND – aerobna faza je rezultirala manjom količinom NO_x-N – nakupljeno je 10, 5 i 3 mg NO_x-N/L , odnosno bio je izraženiji učinak SND pri čemu je ostvareno uklanjanje ukupnog N od 50, 75 i 85 % pri omjerima C/N 2, 4 i 6. Tijekom 2 sata aerobne faze brzina oksidacije amonijaka iznosila je 20 mg NH_4-N/Lh , kao u prethodnoj konfiguraciji, s razlikom da su se u aerobnoj fazi tijekom 2 sata nakupljeni nitriti oksidirali do nitrata. Također, tijekom aerobne faze je zabilježeno i veće uklanjanje P, uklonjeno je 7,2, 11 i 21 mg P/L pri brzini 3,6, 5,5 i 10,5 mg P/Lh, pri omjerima C/N 2, 4 i 6 (Slike 39 i 40).

Zatim, tijekom anoksične faze odvijala se endogena denitrifikacija koja je rezultirala s 75, 100 i 100 % uklonjenog N, a brzina endogene denitrifikacije je iznosila 3,8, 1,4 i 1,5 mg NO_x-N/Lh , pri omjerima C/N 2, 4 i 6 (Slike 39 i 40).

Endogena denitrifikacija preko nitrita troši 50 % manje PHA od endogene denitrifikacije preko nitrata [310]. U anoksičnoj fazi se također ispoljila i aktivnost DPAOs, koji su doprinjeli uklanjanju P koji je na kraju anoksične faze iznosio 63, 61 i 83 % pri omjerima C/N 2, 4 i 6. Tijekom anoksične faze brzina unosa P je iznosila 0,4, 0,7 i 4,8 mg P/Lh pri omjerima C/N 2, 4 i 6. Uklanjanje P je pri omjerima C/N 2 i 4 bilo limitirano i elektron akceptorima i elektron donorima. Pri omjeru C/N 6 je bio najizraženiji doprinos produljene aerobne faze – viši omjer C/N je omogućio veću količinu unutarstaničnih donora elektrona i jer su PAOs tijekom aerobne faze imali duže vrijeme na raspolaganju otopljeni kisik (elektron akceptore), pa je uklonjeno više P, a tijekom anoksične faze su DPAOs koristili preostale unutarstanične zalihe kao donore elektrona i preostale NO_x-N kao akceptore elektrona na unos P u stanice (Slike 39 i 40).

Sumarno, produljenje aerobne faze za sat vremena i skraćivanje anoksične faze za sat vremena je rezultiralo višim uklanjanjem i N i P (Slike 39 i 40).

Rezultati su u skladu s [9] koji su u A/O/A konfiguraciji postigli koncentraciju PO₄-P i ukupnog N u izlazu 0,4 mg PO₄-P/L i 3,9 mg N/L, s učinkovitosti uklanjanja ukupnog N 92,1 % nakon 115 dana vođenja procesa. Pri koncentraciji otopljenog kisika od 0,5±0,1 mg DO/L su postigli redukciju PO₄-P od 98,3 % i ukupnog N od 59 %, i zatim u anoksičnoj fazi dodatnih 24 % N. Pokusi su provedeni s otpadnom vodom grada prosječnog omjera C/N 3,5 s početnim KPK u rasponu 203,8-281,6 mg/L i ukupnim N 61,4-79,5 mgN/L. U A/O/A konfiguraciji je trajanje anaerobne, aerobne i anoksične faze iznosilo 150 min, 180 min i 120 min pri čemu je koncentracija otopljenog kisika tijekom aerobne faze iznosila 0,5±0,1 mg DO/L [9].

Gong i sur. [311] su u A/O/A konfiguraciji prilikom obrade otpadne vode grada pri omjeru C/N 8 i pri SRT od 30 d postigli učinkovitost uklanjanja KPK 92,80±2,24 %, NH₄-N od 97,38±0,89%, ukupnog N od 88,97±2,47% i PO₄-P od 94,33±3,27 %. Koncentracija otopljenog kisika tijekom aerobne faze je iznosila oko 2 mg DO/L, a pokusi su vođeni pri omjerima C/N 8, 6 i 4. Omjeri C/N 4 i 6 su rezultirali nižim učinkovitostima uklanjanja svih promatranih parametara [311].

5.10. Mikrobní klasteri funkcionalnih mikrobnih skupina u ciljanim

biološkim procesima uklanjanja C, N i P i unutarstanični polimeri poliP

Razumijevanje mikrobnih i metaboličkih mehanizama denitrifikacije ovisi o nizu čimbenika poput: struktura mikrobne zajednice koju definiraju identitet i brojnost funkcionalne populacije, i procesni čimbenici (pH, temperatura, otopljeni kisik, koncentracija i funkcionalnost mikrobne zajednice, raspoloživi-dostupni topljivi organski ugljik, i dr.) [41,82,220,221,222,260].

U procesu aktivnog mulja oko 80% bakterija su fakultativni anaerobi i imaju sposobnost denitrifikacije [26]. U denitrificirajućim zajednicama količina dominantnih populacija varira i to značajno među sustavima obrade otpadne vode što ovisi i rezultat je izvedbe-konfiguracije sustava, procesnih čimbenika i karakteristika ulazne otpadne vode [41]. Izvor ugljika utječe na sastav mikrobne zajednice. U sustavima koji su koristili acetat kao izvor ugljika nađeni su dominantni mikroorganizmi *Halomonas* [312], *Rhodobacteraceae* iz *Alpha-proteobacteria* skupine, te *Rhodocyclaceae* i *Comamonadaceae* iz *Betaproteobacteria* [313,314]. Mikroorganizmi s obzirom na sposobnost denitrifikacije, koji ili posjeduju ili ne denitrifikaciju aktivnost, svrstavaju se u pet skupina: (i) potpuni denitrifikanti koji mogu reducirati i $\text{NO}_2\text{-N}$ i $\text{NO}_3\text{-N}$ do N_2 ; (ii) nitrit reduktanti koji mogu reducirati samo $\text{NO}_2\text{-N}$ do N_2 (ne mogu reducirati $\text{NO}_3\text{-N}$); (iii) nepotpuni denitrifikanti koji reduciraju $\text{NO}_2\text{-N}$ ili $\text{NO}_3\text{-N}$ do intermedijera denitrifikacije – dušikovih oksida, umjesto do N_2 ; (iv) nepotpuni nitrit reduktanti koji mogu reducirati samo $\text{NO}_2\text{-N}$ do intermedijera denitrifikacije – dušikovih oksida; (v) nedenitrifikanti koji ne mogu reducirati niti $\text{NO}_2\text{-N}$ niti $\text{NO}_3\text{-N}$.

U endogenoj denitrifikaciji odgovorni funkcionalni organizmi su denitrifikacijske bakterije koje nakupljaju glikogen (DGAOs) [198,199].

U mikrobnjoj ekologiji denitrifikacije u procesima biološke obrade otpadnih voda fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je molekularna tehnika koja povezuje strukturu mikrobne zajednice s funkcijom identificiranjem i kvantificiranjem populacija sa specifičnim metaboličkim značajkama [41].

U ovom radu FISH analiza aktivnog mulja korištena je u svrhu dokazivanja prisustva skupina mikroorganizama odgovornih za procese nitrifikacije (Slike 41 i 42), denitrifikacije (Slika 43), biološkog uklanjanja fosfora (Slika 44) i endogenu denitrifikaciju (Slika 45). Unutarstanični polimeri fosfata u obliku poliP, vidljivi kao tamnoljubičaste granule, dokazani su bojanjem po Neisseru (Slika 46).

6. ZAKLJUČCI

Kritička analiza rezultata disertacije kroz usporedbu sa relevantnim recentnim spoznajama iz istraživnog područja rezultirala je novim spoznajama iz kojih su proizašli zaključci, kao i buduće preporuke istraživanja, kako slijedi:

1. Minimalni omjer C/N 3,8 iz natrijeva acetat kao izvora ugljika nužno je osigurati za denitrifikaciju 30 mg NO₃-N/L, dok je za denitrifikaciju 30 mg NO₂-N/L potrebno osigurati minimalni omjer C/N 2,4 iz natrijeva acetat kao izvora ugljika.
Za denitrifikaciju NO₃-N je potrebno 1,58x više izvora C iz natrijeva acetata u odnosu na denitrifikaciju NO₂-N, početne koncentracije 30 mg NO_x/L.
2. Brzina oksidacije NH₄-N i nitrifikacije u procesu autotrofne nitrifikacije se povećava s povećanjem početne koncentracije NH₄-N (istraženo 100-500 mg NH₄-N/L) i količine mikrobne biomase (istraženo 1,4-4,2 g MLSS/L) pri pH 7,2±0,2 i pH 8,0±0,1. Veće brzine i oksidacije NH₄-N i nitrifikacije su ostvarene pri pH 8,0±0,1 u usporedbi s pH 7,2±0,2.
3. U procesu autotrofne nitrifikacije pri pH 7,2 određene su brzine oksidacije NH₄-N od 17,9-31 mg NH₄-N/Lh s 1,5 g MLSS/L, od 30,4-38,5 mg NH₄-N/Lh s 2,8 g MLSS/L, i od 38,4-54,2 mg NH₄-N/Lh s 4,2 g MLSS/L, odnosno brzine nitrifikacije od 10,4-22,6 mg N/Lh, od 15,2-27,9 mg N/Lh i od 21,7-32,9 mg N/Lh s koncentracijama mikrobne biomase 1,5 g MLSS/L, 2,8 g MLSS/L, odnosno 4,2 g MLSS/L.
U procesu autotrofne nitrifikacije pri pH 8,0 određene su brzine oksidacije NH₄-N od 18,8-32,8 mg NH₄-N/Lh s 1,4 g MLSS/L, od 30,9-39,6 mg NH₄-N/Lh s 2,6 g MLSS/Lh, i od 42,1-59,9 mg NH₄-N/Lh s 3,9 g MLSS/L, odnosno brzine nitrifikacije od 11,5-38 mg N/Lh, od 20-30,3 mg N/Lh i od 29,4-40,7 mg N/Lh s 1,5 g MLSS/L, 2,8 g MLSS/L, odnosno 4,2 g MLSS/L.
4. Parcijalna nitrifikacija, oksidacija NH₄-N do NO₂-N, pri 0,8-1 mg DO/L rezultirala je povećanjem brzine oksidacije NH₄-N s povećanjem početne koncentracije NH₄-N, kao i s povećanjem količine mikrobne biomase. Učinkovitost parcijalne nitrifikacije (nitritacije) je iznosila 58-68%
5. Određene su brzine parcijalne nitrifikacije 12,4-20,9 mg NH₄-N/Lh s 1,5 g MLSS/L, odnosno 19,6-34,3 mg NH₄-N/Lh s 3,0 g MLSS/L, za početnih 30-100 mg NH₄-N/L.

6. Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija (heterotrofna nitrifikacija) sporija je od autotrofne nitrifikacije i rezultirala je gubitkom N od 72,2-81,8% nakupljanjem ne ekvivalentne količine $\text{NO}_x\text{-N}$
7. U procesu istovremene nitrifikacije i denitrifikacije brzine oksidacije KPK iznosile su 168 mg KPK/Lh odnosno 267,2 mg KPK/Lh, a brzine oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ 11,4 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ i 12,6 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ za početnih 40 ± 5 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ pri omjerima C/N 5 i 10 (KPK/N 10 i 20), dok je pri početnih 80 ± 2 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$ ostvarena brzina oksidacije KPK 201,8 mg KPK/Lh i 264,9 mg KPK/Lh, a brzina oksidacije $\text{NH}_4\text{-N}$ 16,6 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ i 12,3 mg $\text{NH}_4\text{-N/Lh}$ pri omjerima C/N 5 i 10 (KPK/N 10 i 20)
8. Endogena denitrifikacija $\text{NO}_3\text{-N}$ pri C/N 1, 2 i 3 je rezultirala sveukupnom učinkovitošću uklanjanja nitrata od 37, 82 i 100%, odnosno endogena denitrifikacija $\text{NO}_2\text{-N}$ pri C/N 1 i 2 je rezultirala sveukupnom učinkovitošću uklanjanja nitrata od 53 i 100%
9. Endogena denitrifikacija $\text{NO}_3\text{-N}$ se odvijala pri brzini 2,8 mg $\text{NO}_3\text{-N/Lh}$, znatno manjoj brzini od denitrifikacije uz vanjski izvor ugljika, manjoj za oko 2,86x. Veći je utoršak PHA za denitrifikaciju nitrata nego nitrata.
10. U denitrificirajućoj defosfataciji pri anoksičnim uvjetima, sa početnih 40, 60 i 80 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$ (N/P 2, 3 i 4), i početnih 20 ± 1 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, određeni su minimalno potrebni omjeri C/N iz natrijeva acetata kao izvora ugljika pri kojima se postiže 100% uklanjanje organskih sastojaka i pri tome maksimalni unos $\text{PO}_4\text{-P}$ i to pri C/N 4 za N/P 2 (40 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$), C/N 3 za N/P 3 (60 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$) i C/N 2 za N/P 4 (80 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$). Pri tome je ostvareno 100% uklanjanje $\text{NO}_2\text{-N}$ i maksimalno do 84% uklanjanje P, aktivnošću DPAOs.
11. Visoka koncentracija nitrata, 80 mg $\text{NO}_2\text{-N/L}$, nije inhibirala proces istovremene denitrifikacije i uklanjanja P u anoksičnim uvjetima, proces denitrificirajuće defosfatacije preko $\text{NO}_2\text{-N}$
12. Veći udio organskih sastojaka, od minimalno potrebnog, u denitrificirajućoj defosfataciji preko $\text{NO}_2\text{-N}$ pri anoksičnim uvjetima, je narušavao učinkovitost procesa uklanjanja P, dok je i dalje učinkovitost uklanjanja N 100%, ali je pri tim prekomjernim omjerima C/N preostalo neiskorištenog KPK.
13. Istovremena denitrifikacija i uklanjanje P u procesu anerobno/aerobno/anoksične konfiguracije uz endogenu denitrifikaciju, pokazuje važnost (i) sprege raspoloživih organskih sastojaka u anaerobnoj fazi procesa, dužine trajanja anaerobne faze kao i aktivnosti i zastupljenosti PAOs/DPAOs, GAOs/DGAOs i uobičajenih heterotrofnih

denitrifikanata; (ii) sprege dužine trajanja aerobne faze procesa kao i aktivnosti i zastupljenosti PAOs/DPAOs; kao i raspoložive koncentracije otopljenog kisika za odvijanje parcijalne nitrifikacije ili SND i aktivnosti i zastupljenosti AOB i NOB vrsta (iii) sprege dužine trajanja anoksične faze procesa i aktivnosti i zastupljenosti DGAOs – funkcionalnih organizama odgovornih za proces endogene denitrifikacije, a time i ukupno na učinkovitosti uklanjanja N i P kroz procese denitrifikacije/endogene denitrifikacije i aerobnog/anoksičnog unosa P.

14. Istovremena denitrifikacija i uklanjanje P u procesu anerobno/aerobno/anoksične konfiguracije uz endogenu denitrifikaciju u vremenskom slijedu od 1 h anaerobne faze, 1 h aerobne faze i 5 h anoksične faze procesa, pri C/N 2, 4, 6 pokazuje učinkovitost uklanjanja N 69,5%, 98,5 % i 100 %, a brzina endogene denitrifikacije je iznosila 2,2, 1,5 i 1,6 mg NO_x-N/Lh. Pri tome ostvareno je uklanjanje P od 57%, 55% i 65%.
15. Istovremena denitrifikacija i uklanjanje P u procesu anerobno/aerobno/anoksične konfiguracije uz endogenu denitrifikaciju u vremenskom slijedu od 1 h anaerobne faze, 2 h aerobne faze i 4 h anoksične faze procesa pri C/N 2, 4, 6, pokazuje učinkovitost uklanjanja N 75%, 100% i 100%, a brzina endogene denitrifikacije je iznosila 3,8, 1,4 i 1,5 mg NO_x-N/Lh. Ostvareno je uklanjanje P od 63%, 61% i 83%.
16. Endogena denitrifikacija u produženoj anoksičnoj fazi procesa doprinosi dodatnom uklanjanju N, aktivnošću DGAOs
17. Primjenom FISH metode dokazani su, vizualizirani i dokumentirani mikrobnih klasteri za procese nitrifikacije (AOB), nitratacije (NOB), denitrifikacije (denitrifikanti), uklanjanje fosfora (PAOs i DPAOs) i endogene denitrifikacije (DGAOs)
18. Dokazani su unutarstanično pohranjeni polimeri, poliP i PHA

Budući da postoje praznine u znanju o populacijskoj dinamici, strukturi zajednice i metabolizmu različitih izvora ugljika u procesu denitrifikacije, preporuke daljnjih istraživanja bi bile:

- dopuna održivijih izvora ugljika
- procjena strukture i funkcije zajednice za denitrifikaciju
- primjena različitih molekularno genetičkih tehnika s ciljem proučavanja funkcionalnih mikroorganizama, funkcionalnih gena i metaboličkih putova.

7. LITERATURA

- [1] Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C., Klemetsson, L. (2011) Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences* **8**, 1779–1791. <https://doi.org/10.5194/bg-8-1779-2011>
- [2] Metcalf & Eddy Inc. (2003) Wastewater Engineering: Treatment, Disposal and Reuse; 4th ed; Revised by George Tchobanoglous, Franklin L. Burton; McGraw-Hill: New York, NY, USA
- [3] Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J.I.C., Arvin, E. (2002) Wastewater treatment: Biological and Chemical Processes, 3rd ed., Springer, Berlin.
- [4] Knowles, R. (1982) Denitrification. *Microbiol. Rev.* **46**, 43-70. <https://doi.org/10.1128/mr.46.1.43-70.1982>
- [5] Wu, X., Yu, Z., Yuan, S., Tawfik, A., Meng, A. (2023) An ecological explanation for carbon source-associated denitrification performance in wastewater treatment plant. *Water Res.* **247**, 120762. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120762>
- [6] Sanjrani, M.A., Nefees, A., Sakina, R., Xue, G. (2022) A review on application of external carbon sources for denitrification for wastewater treatment. *Global NEST Journal* **24**, 105-118. <https://doi.org/10.30955/gnj.004248>
- [7] Dyagelev, M.Y., Isakov, V.G., Grakhova, E.V. (2019) Denitrification rates determination in the process of removing nitrogen from wastewater. *IOP Conf. Ser: Mater. Sci. Eng.* **687**, 066072
- [8] Li, S.S., Peng, C.R., Cheng, T.S., Wang, C.H., Guo, L.L., Li, D.H. (2018a) Nitrogen-cycling microbial community functional potential and enzyme activities in cultured biofilms with response to inorganic nitrogen availability. *J. Environ. Sci.* **76**, 92-102. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.03.029>
- [9] Wang, X., Wang, S., Zhao, J., Dai, X., Peng, Y. (2016a) Combining simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal with post-denitrification for low carbon/nitrogen wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **220**, 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.132>
- [10] 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.bbabbio.2012.10.002>

- [11] Mikami, Y., Nittami, T., Kurisu, F. (2013) Effect of endogenous carbon source on biological denitrification rate. *JWET* **11**, 1-9 <https://doi.org/10.2965/jwet.2013.1>
- [12] Winkler, M., Coats, E.R., Brinkman, C.K. (2011) Advancing post-anoxic denitrification for biological nutrient removal. *Water Res.* **45**, 6119-6130. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.006>
- [13] Cherchi, C., Onnis-Hayden, A., Gu, A.Z. (2009) Ability of specific enriched denitrifying culture to utilize other carbon sources. *Proc. Water Environ. Fed.* **4**, 799-814. <https://doi.org/10.2175/193864709793901185>
- [14] 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>
- [15] Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2020) Narodne novine 26, broj dokumenta 622. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_03_26_622.html
- [16] Kuypers, M.M.M., Marchant, H.K., Kartal, B. (2018) The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol* **16**, 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- [17] Kaushal, S.S., Lewis, W.M., McCutchan, J.H. (2006) Land use change and nitrogen enrichment of a Rocky mountain watershed. *Ecol. Appl.* **16**, 299-312. <https://www.jstor.org/stable/40061800>
- [18] Griebmeier, V., Gescher, J. (2018) Influence of the potential carbon sources for field denitrification beds on their microbial diversity and the fate of carbon and nitrate. *Front. Microbiol.* **9**:1313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01313>
- [19] Hatfield, J.L., Follett, R.F. (eds.) (2008) Nitrogen in the environment: sources, problems, and management, 702 pp. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier.
- [20] Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants, 889 pp., 2nd edn. London, UK: Academic Press.
- [21] Stoumann, J.L., Schjoerring, J.K., van der Hoek, K.W., Poulsen, H.D., Zevenbergen, J.F., Pallière, C., Lammel, J., Brentrup, F., Jongbloed, A.W., Willems, J., van Grinsven, H. (2011) Benefits of nitrogen for food, fibre and industrial production. In The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives (eds Sutton, M.A., Howard, C.M., Erisman, J.W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., van Grinsven, H., Grizzetti, B.), pp. 32–62. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

- [22] Erisman, J.W., Galloway, J.N., Seitzinger, S., Bleeker, A., Dise, N.B., Petrescu, A.M.R., Leach, A.M., de Vries, W. (2013) Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. *Philos. Trans. R. Soc. B.* **368**, 20130116. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0116>
- [23] Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., Sutton, M.A. (2008) Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* **320**, 889–892. <https://doi.org/10.1126/science.1136674>
- [24] Grgas, D., Ugrina, M., Toromanović, M., Ibrahimpašić, J., Štefanac, T., Landeka Dragičević, T. (2020) Fish canning wastewater treatment in sequencing batch reactor with activated sludge. *Holistic Approach Environ.* **10**, 29-34. <https://doi.org/10.33765/thate.10.2.1>
- [25] Landeka Dragičević, T., Zanoški Hren, M., Grgas, D., Buzdum, I., Čurlin, M. (2010) The potential of dairy wastewater for denitrification. *Mljekarstvo* **60**, 191-197.
- [26] Gerardi, M.H. (2002) Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process, 1st ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471216682>
- [27] Erisman, J.W., Galloway, J.A., Sutton, M.S., Klimont, Z., Winiwater, W. (2008) How a century of ammonia synthesis changed the world. *Nat. Geosci.* **1**, 636–639. <https://doi.org/10.1038/ngeo325>
- [28] Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J. (2003) The nitrogen cascade. *BioScience* **53**, 341–356. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)
- [29] Gobler, C.J., Burkholder, J.M., Davis, T.W., Harke, M.J., Johengen, T., Stow, C.A., Van de Waal, D.B. (2016) The dual role of nitrogen supply in controlling the growth and toxicity of cyanobacterial blooms. *Harmful Algae.* **54**, 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.01.010>
- [30] WHO. (2011) Global health observatory map gallery. <http://www.who.int>.
- [31] United Nations Environment Programme (UNEP). (2007) Global Environmental Outlook-4 (GEO-4). Nairobi, Kenya: UNEP.
- [32] European Environment Agency (EEA). (2005) The European environment: State and outlook 2005, 576 pp. Copenhagen, Denmark: European Environment Agency.

- [33] WHO. (2007) Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. WHO technical report series no. 935. Geneva, Switzerland: WHO.
- [34] Schuster, B., Lee, K. (1987) Nitrate and nitrite methods of analysis and levels in raw carrots, processed carrots and in selected vegetables and grain products. *J. Food Sci.* **52**, 1632–1641. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb05893.x>
- [35] Van Grinsven, H.J.M., Ward, M.H., Benjamin, N., de Kok, T.M. (2006) Does the evidence about health risks associated with nitrate ingestion warrant an increase of the nitrate standard for drinking water? *Environ. Health* **5**, 26. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-5-26>
- [36] Camargo, J.A., Alonso, A. (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environ. Int.* **32**, 831–849. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.002>
- [37] Rabalais, N.N., Turner, R.E., Scavia, D. (2002) Beyond science into policy: Gulf of Mexico hypoxia and the Mississippi River. *BioScience* **52**, 129–142. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0129:BSIPGO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0129:BSIPGO]2.0.CO;2)
- [38] Grizzetti, B., Bouraoui, F., Billen, G., van Grinsven, H., Cardoso, A.C., Thieu, V., Garnier, J., Curtis, C., Howarth, R., Johnes, P., Sutton, M.A., Howard, C.M., Erisman, J.W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., van Grinsven, H. (2011) Nitrogen as a threat to European water quality. In: The European nitrogen assessment: sources, effects and policy perspectives (eds Sutton, M.A., Howard, C.M., Erisman, J.W., Billen, G., Bleeker, A., Grennfelt, P., van Grinsven, H., Grizzetti, B.), pp. 379–404. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- [39] Mohsenipour, M., Shahid, S., Ebrahimi, K. (2014) Removal techniques of nitrate from water. *Asian J. Chem.* **26**, 7881–7886. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.17136>
- [40] Moghaddam, A.H., Sargolzaei, J. (2013) A review over diverse methods used in nitrogen removal from wastewater. *Recent Pat. Chem. Eng.* **6**, 133–139. <https://doi.org/10.2174/2211334711306020007>
- [41] Lu, H.J., 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>
- [42] Bitton, G. (2011) Wastewater Microbiology, 4th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA.

- [43] EPA (1993) Manual Nitrogen Control, EPA/625/R-93/010, Office of Research and development, Office of Water, Washington D.C.
- [44] Raboni, M., Torretta, V., Viotti, P., Urbini, G. (2014a) Pilot experimentation with complete mixing anoxic reactors to improve sewage denitrification in treatment plants in small communities. *Sustainability* **6**, 112-122. <https://doi.org/10.3390/su6010112>
- [45] Raboni, M., Torretta, V., Urbini, G. (2013) Influence of strong diurnal variations in sewage quality on the performance of biological denitrification in small community wastewater treatment plants (WWTPs). *Sustainability* **5**, 3679-3689. <https://doi.org/10.3390/su5093679>
- [46] Torretta, V., Ragazzi, M., Trulli, E., de Feo, G., Urbini, G., Raboni, M., Rada, E.C. (2014) Assessment of biological kinetics in a conventional municipal WWTP by means of the oxygen uptake rate method. *Sustainability* **6**, 1833-1847. <https://doi.org/10.3390/su6041833>
- [47] Ekama, G.A., Wilderer, P. (2011) Biological nutrient removal. In: Treatise on Water Science; Elsevier: Oxford, UK, Chapter 4.14, pp. 409-526.
- [48] Ekama, G.A., Wentzel, M.C. (1999) Denitrification kinetics in biological N and P removal activated sludge systems treating municipal wastewaters. *Water Sci. Technol.* **39**, 69-77. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00124-9)
- [49] Albina, P., Durban, N., Bertron, A., Albrecht, A., Robinet, J.C., Erable, B. (2019) Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5163. <https://doi.org/10.3390/ijms20205163>
- [50] van Spanning, R.J.M., Richardson, D.J., Ferguson, S.J. (2007) Introduction to the biochemistry and molecular biology of denitrification. In: Biology of the nitrogen cycle, pp 3-20. <https://doi.org/10.1016/B978-044452857-5.50002-3>
- [51] Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 533-616. <https://doi.org/10.1128/mmlr.61.4.533-616.1997>
- [52] Lipsewiers, Y.A., Hopmans, E.C., Meysman, F.J., Sinninghe Damste, J.S., Villanueva, L. (2016) Abundance and diversity of denitrifying and anammox bacteria in seasonally hypoxic and sulfidic sediments of the saline lake Grevelingen. *Front. Microbiol.* **7**, 1661. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01661>
- [53] Braker, G., Zhou, J.Z., Wu, L.Y., Devol, A.H., Tiedje, J.M. (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>
- [54] Onley, J.R., Ahsan, S., Sanford, R.A., Loeffler, F.E. (2018) Denitrification by *Anaeromyxobacter dehalogenans*, a common soil bacterium lacking the nitrite reductase genes nirS and nirK. *Appl. Environ. Microb.* **84**, 1-14. <https://doi.org/10.1128/AEM.01985-17>
- [55] Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Yuan, Z. (2008) Free nitrous acid inhibition on nitrous oxide reduction by a denitrifying-enhanced biological phosphorus removal sludge. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 8260-8265. <https://doi.org/10.1021/es800650j>
- [56] Soto, O., Aspe, E., Roeckel, M. (2007) Kinetics of cross-inhibited denitrification of a high load wastewater. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1627-1634. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.11.014>
- [57] Fu, X., Hou, R., Yang, P., Qian, S., Feng, Z., Chen, Z., Wang, F., Yuan, R., Chen, H., Zhou, B. (2022) Application of external carbon source in heterotrophic denitrification of domestic sewage: A review. *Sci. Tot. Environ.* **817**, 153061. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153061>
- [58] 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/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146521>
- [59] Lee, Y.Y., Choi, H., Cho, K.S. (2018) Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N₂O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification. *J. Environ. Sci. Heal. A* **54**, 16–29. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1503903>
- [60] Ortmeyer, F., Begerow, D., Guerreiro, M.A., Wohnlich, S., Banning, A. (2021) Comparison of Denitrification Induced by Various Organic Substances—Reaction Rates, Microbiology, and Temperature Effect. *Water Resour. Res.* **57**. <https://doi.org/10.1029/2021WR029793>
- [61] Sun, Y., Shen, D., Zhou, X., Shi, N., Tian, Y. (2016) Microbial diversity and community structure of denitrifying biological filters operated with different carbon sources. *Springerplus* **5**. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3451-3>
- [62] Srinandan, C.S., D'souza, G., Srivastava, N., Nayak, B.B., Nerurkar, A.S. (2012) Carbon sources influence the nitrate removal activity, community structure and

- p biofilm architecture.
- Bioresour. Technol.*
- 117**
- , 292–299.
-
- <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.079>
- [63] Rajta, A., Bhatia, R., Setia, H., Pathania, P. (2019) Role of heterotrophic aerobic denitrifying bacteria in nitrate removal from wastewater. *J. Appl. Microbiol.* **128**, 1261–1278. <https://doi.org/10.1111/jam.14476>
- [64] Huang, H.K., Tseng, S.K. (2001) Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 90–94.
<https://doi.org/10.1007/s002530000363>
- [65] Chen, G., Lin, L., Wang, Y., Zhang, Z., Cao, W., Zhang, Y. (2023) Unveiling the interaction mechanisms of key functional microorganisms in the partial denitrification-anammox process induced by COD. *Front Environ. Sci. Eng.* **17**.
<https://doi.org/10.1007/s11783-023-1703-3>
- [66] Zhang, N., Chen, H., Lyu, Y. and Wang, Y. (2019) Nitrogen removal by a metal-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* ZN1, capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **94**, 1165–1175.
<https://doi.org/10.1002/jctb.5863>
- [67] Zhao, B., He, Y.L. and Zhang, X.F. (2010) Nitrogen removal capability through simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by *Bacillus* sp. LY. *Environ. Technol.* **31**, 409–416. <https://doi.org/10.1080/09593330903508922>
- [68] He, T., Ye, Q., Sun, Q., Cai, X., Ni, J., Li, Z. and Xie, D. (2018) Removal of nitrate in simulated water at low temperature by a novel psychrotrophic and aerobic bacterium, *Pseudomonas taiwanensis* strain. *Biomed. Res. Int.* 2018, 1–9.
<https://doi.org/10.1155/2018/4984087>
- [69] Prasetyo, R.A., Pertiwinigrum, A., Erwanto, Y., Yusiati, L.M. and Fitriyanto, N.A. (2018) Characterization of *Pseudomonas* sp. LS3K as nitrate removal agent at different C/N ratios under aerobic condition. In *Proceeding of the 2nd International Conference on Tropical Agriculture* pp. 185–194. Cham: Springer.
- [70] Liu, J.J., Yuan, Y., Li, B.K., Zhang, Q., Wu, L., Li, X.Y., Peng, Y.Z. (2017) Enhanced nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater in an anaerobic-aerobic-anoxic sequencing batch reactor with sludge fermentation products as carbon source. *Bioresour. Technol.* **244**, 1158–1165.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.055>

- [71] Van Rijn, J., Tal, Y., Schreier, H.J. (2006) Denitrification in recirculating systems: theory and applications. *Aquac. Eng.* **34**, 364-376. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.04.004>
- [72] Lee, K.C., Rittmann, B.E. (2003) Effects of pH and precipitation on autohydrogenotrophic denitrification using the hollow-fiber membrane-biofilm reactor. *Water Res.* **37**, 1551-1556. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00519-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00519-5)
- [73] Grgas, D., Širac, T., Prodan, M., Brozinčević, A., Landeka Dragičević, T. (2017) Denitrifikacija: Učinak omjera C/N. 16th Ružička days („Today science – tomorrow industry“), Jukić, A., Šubarić, D. (ur.). Zagreb, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. 277-288, Vukovar, 21-23.09.2016. ISSN broj zbornika 2459-9387.
- [74] Lee, N.M., Welander, T. (1996) The effect of different carbon sources on respiratory denitrification in biological wastewater treatment. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 277-285. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)88820-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)88820-9)
- [75] Guo, L., Guo, Y., Sun, M., Gao, M., Zhao, Y., She, Z. (2018) Enhancing denitrification with waste sludge carbon source: the substrate metabolism process and mechanisms. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **25**, 13079–13092. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0836-y>
- [76] Kurniawan, A., Kwon, S.Y., Shin, J.-H., Hur, J., Cho, J. (2016) Acid fermentation process combined with post denitrification for the treatment of primary sludge and wastewater with high strength nitrate. *Water* **8**, 117, <https://doi.org/10.3390/w8040117>
- [77] Liu, B., Mao, Y., Bergaust, L., Bakken, L.R., Frostegård, Å. (2013) Strains in the genus *Thauera* exhibit remarkably different denitrification regulatory phenotypes. *Environ. Microbiol.* **15**, 2816-2828. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12142>
- [78] Carlson, H.K., Lui, L.M., Price, M.N., Kazakov, A.E., Carr, A.V., Kuehl, J.V., Owens, T.K., Nielsen, T., Arkin, A.P., Deutschbauer, A.M. (2020) Selective carbon sources influence the end products of microbial nitrate respiration. *ISME J.* **14**, 2034–2045. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0666-7>
- [79] Zhang, X., Zhang, J. (2018) Effect of dissolved oxygen on biological denitrification using biodegradable plastic as the carbon source. IOP Conf. Series: Earth and

- Environmental Science 121, 032015. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/121/3/032015>
- [80] Hagman, M., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Jansen, J.I.C. (2008) Mixed carbon sources for nitrate reduction in activate sludge-identification of bacteria and process activity studies. *Water Res.* **42**, 1539-1546. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.034>
- [81] Elefsiniotis, P., Wareham, D.G., Smith, M.O. (2004) Use of volatile fatty acids from an acid-phase digester for denitrification. *Journal of Biotechnology* **114**, 289-297. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.016>
- [82] Xu, Z., Dai, X., Chai, X. (2018a) Effect of different carbon sources on denitrification performance, microbial community structure and denitrification genes. *Sci. Total Environ.* **634**, 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.348>
- [83] Plósz, B.G., Jobbágy, A., Grady, C.P.L.Jr. (2003) Factors influencing deterioration of denitrification by oxygen entering an anoxic reactor through the surface. *Water Res.* **37**, 853-863. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00445-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00445-1)
- [84] Oh, J., Silverstein, J. (1999a) Oxygen inhibition of activated sludge denitrification. *Water Res.* **33**, 1925-1937. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00365-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00365-0)
- [85] Raboni, M., Torretta, V., Viotti, P., Urbini, G. (2014b) Calculating specific denitrification rates in pre-denitrification by assessing the influence of dissolved oxygen, sludge loading and mixed-liquor recycle. *Environ. Technol.* **35**, 2582-2588. <https://doi.org/10.10180/09593330.2014.913690>
- [86] Hernandez, D., Rowe, J.J (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)
- [87] Devol, A.H. (2015) Denitrification, anammox, and N₂ production in marine sediments. *Annu. Rev. Mar. Sci.* **7**, 403–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135040>
- [88] Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A.M., Ingvarsdén, S., Schmid, M.C., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H.J.M., Derksen, J.W.M., Piña-Ochoa, E., Eriksson, S.P., Nielsen, L.P., Revsbech, N.P., Cedhagen, T., van der Zwaan, G.J. (2006) Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* **443**, 93–96. <https://doi.org/10.1038/nature05070>

- [89] Petri, R. (2000) Diversität Nitratreduzierender Bakteriengemeinschaften in den Sedimenten der Ostsee und Untersuchungen zur Phylogenie der Respiratorischen Nitratreduktase. Ph.D. Thesis, University Kiel, Kiel, Germany, p. 148.
- [90] Han, K., Yoon, J., Yeum, Y., Park, S., Kim, H.K., Kim, M., Chung, H.M., Kwon, S.Y., Yun, S.T., Kim, Y. (2020) Efficacy of *in situ* well-based denitrification bio-barrier (WDB) remediating high nitrate flux in groundwater near a stock-raising complex. *J. Environ. Manage* **258**. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.110004>
- [91] Holmes, D.E., Dang, Y., Smith, J.A. (2018) Nitrogen cycling during wastewater treatment. U: Gadd GM, Sariaslani S (ured.) *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press Inc., str. 113–192.
- [92] Drysdale, G.D., Kasan, H.C., Bux, F. (2001) Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in an NDBEPR activated sludge sytem. *Water Sci. Technol.* **43**, 147–154. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wst.2001.0036>
- [93] Cua, L.S., Stein, L.Y. (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>
- [94] Crack, J.C., Hutchings, M.I., Thomson, A.J., Le, N.E. (2016) Biochemical properties of *Paracoccus denitrificans* FnrP: Reactions with molecular oxygen and nitric oxide. *J. Biol. Inorg. Chem.* **21**, 71-82. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1326-7>
- [95] Szekeres, S., Kiss, I., Kalman, M., Soares, M.I.M. (2002) Microbial population in a hydrogen-dependent denitrification reactor. *Water Res.* **36**, 4088-4094. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00130-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00130-6)
- [96] Glass, C.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)
- [97] Turk, O., Mavinic, D.S. (1987) Benefits of using selective inhibition to remove nitrogen from highly nitrogenous wastes. *Environ. Technol. Lett.* **8**, 419-426. <https://doi.org/10.1080/09593338709384500>
- [98] Sun, H., Wu, Q., Yu, P., Zhang, L., Ye, L., Zhang, X.-X., Ren, H. (2017) Denitrification using excess activated sludge as carbon source: Performance and the microbial community dynamics. *Bioresour. Technol.* **238**, 624-632. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.105>

- [99] Yang, X., Wang, S., Zhou, L. (2012) Effect of carbon source, C/N ratio, nitrate and dissolved oxygen concentration on nitrite and ammonium production from denitrification process by *Pseudomonas stutzeri* D6. *Bioresour. Technol.* **104**, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.026>
- [100] Misiti, T.M., Hajaya, M.G., Pavlostathis, S.G. (2011) Nitrate reduction in a simulated free-water surface wetland system. *Water Res.* **45**, 5587-5598. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.019>
- [101] Johnson, D.R., Lee, T.K., Park, J., Fenner, K., Helbling, D.E. (2015) The functional and taxonomic richness of wastewater treatment plant microbial communities are associated with each other and with ambient nitrogen and carbon availability. *Environ. Microbiol.* **17**, 4851-4860. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12429>
- [102] Shapleigh, J.P. (2006) The Denitrifying Prokaryotes. U: The Prokaryotes a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, Volume 2, pp. 769-792. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_71
- [103] Chakravarthy, S.S., Pande, S., Kapoor, A., Nerurkar, A.S. (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>
- [104] 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>
- [105] Fang, H., Olson, B.H., Asvapathanagul, P., Wang, T., Tsai, R., Rosso, D. (2020) Molecular biomarkers and influential factors of denitrification in a full-scale biological nitrogen removal Plant. *Microorganisms* **8**, 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010011>
- [106] Du, C., Cui, C.W., Qiu, S., Shi, S.N., Li, A., Ma, F. (2017) Nitrogen removal and microbial community shift in an aerobic denitrification reactor bioaugmented with a *Pseudomonas* strain for coal-based ethylene glycol industry wastewater treatment. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **24**, 11435-11445. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8824-9>
- [107] Yong, Y.C., Wu, X.Y., Sun, J.Z., Cao, Y.X., Song, H. (2015) Engineering quorum sensing signaling of *Pseudomonas* for enhanced wastewater treatment and

- electricity harvest: A review. *Chemosphere* **140**, 18-25.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.020>
- [108] Thomsen, T.R., Kong, Y., Nielsen, P.H. (2007) Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**, 370-382.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00309>
- [109] Pierru, B., Grosse, S., Pignol, D., Sabaty, M. (2006) Genetic and biochemical evidence for the involvement of a molybdenum-dependent enzyme in one of the selenite reduction pathways of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp *denitrificans* IL106. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3147-3153. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3147-3153.2006>
- [110] Philippot, L. (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1577**, 355-376. [https://doi.org/10.1016/s0167-4781\(02\)00420-7](https://doi.org/10.1016/s0167-4781(02)00420-7)
- [111] Heylen, K., Vanparys, B., Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N., De Vos, P. (2006) Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2637-2643.
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2637-2643.2006>
- [112] You, S.J. (2005) Identification of denitrifying bacteria diversity in an activated sludge system by using nitrite reductase genes. *Biotechnol. Lett.* **27**, 1477-1482.
<https://doi.org/10.1007/s10529-005-1314-z>
- [113] Neef, A., Zaglauer, A., Meier, H., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K.H. (1996) Population analysis in a denitrifying sand filter: Conventional and in situ Identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4329-4339. <https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4329-4339-1996>
- [114] Philippot, L., Hallin, S. (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 234-239. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.003>
- [115] Miao, J., Zhao, Y., Wu, G. (2017) Effect of organic carbons on microbial activity and structure in denitrifying systems acclimated to nitrite as the electron acceptor. *Int Biodeter Biodegr* **118**, 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.025>
- [116] Vasiliadou, I.A., Pavlou, S., Vayenas, D.V. (2006) A kinetic study of hydrogenotrophic denitrification. *Process Biochem.* **41**, 1401-1408.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.002>

- [117] Grady, C.P.L., Daigger, G.T., Lim, H.C. (1999) Biological Wastewater Treatment, 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, NY, USA.
- [118] Hartop, K.R., Sullivan, M.J., Giannopoulos, G., Gates, A.J., Bond, P.L., Yuan, Z., Clarke, T.A., Rowley, G., Richardson, D.J. (2017) The metabolic impact of extracellular nitrite on aerobic metabolism of *Paracoccus denitrificans*. *Water Res.* **113**, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.011>
- [119] Zhao, J., Wang, D., Li, X., Yang, Q., Chen, H., Zhong, Y., An, H., Zeng, G. (2015) An efficient process for wastewater treatment to mitigate free nitrous acid generation and its inhibition on biological phosphorus removal. *Sci. Rep.* **5**. <https://doi.org/10.1038/srep08602>
- [120] Xu, Z., Dai, X., Chai, X. (2019) Biological denitrification using PHBV polymer as solid carbon source and biofilm carrier. *Biochem. Eng. J.* **146**, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.019>
- [121] Hanaki, K., Hong, Z., Matsuo, T. (1992) Production of nitrous-oxide gas during denitrification of waste-water. *Water Sci. Technol.* **26**, 1027-1036. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0544>
- [122] Ortmeier, F., Guerreiro, M.A., Begerow, D., Banning, A. (2023) Modified microbiology through enhanced denitrification by addition of various organic substances—temperature effect. *Environ. Sci. Pollut. R.* **30**, 60282–60293. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26784-x>
- [123] Ai, C., Yan, Z., Zhou, H., Hou, S., Chai, L., Qiu, G., Zeng, W. (2019) Metagenomic insights into the effects of seasonal temperature variation on the activities of activated sludge. *Microorganisms* **7**, 713. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120713>
- [124] Aslam, S.N., Strauss, J., Thomas, D.N., Mock, T., Underwood, G.J.C. (2018) Identifying metabolic pathways for production of extracellular polymeric substances by the diatom *Fragilariopsis cylindrus* inhabiting sea ice. *ISME J.* **12**, 1237-1251. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0039-z>
- [125] Guo, Y., Guo, L., Sun, M., Zhao, Y., Gao, M., She, Z. (2017) Effects of hydraulic retention time (HRT) on denitrification using waste activated sludge thermal hydrolysis liquid and acidogenic liquid as carbon sources. *Bioresource Technol.* **224**, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.056>
- [126] Stroes-Gascoyne, S., Sergeant, C., Schippers, A., Hamon, C.J., Nèble, S., Vesvres, M.-H., Barsotti, V., Poulain, S., Le Marrec, C. (2011) Biogeochemical processes in

- a clay formation in situ experiment: PartD—Microbial analyses—Synthesis of results. *Appl. Geochem.* **26**, 980-989. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.03.007>
- [127] Francis, C.W., Hatcher, C.W. (1980) Biological Denitrification of High-Nitrates Wastes Generated in the Nuclear Industry; Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory: Oak Ridge, TN, USA.
- [128] Fernández-Nava, Y., Marañón, E., Soons, J., Castrillón, L. (2008) Denitrification of wastewaters containing high nitrate and calcium concentrations. *Bioresour. Technol.* **99**, 7976-7981. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.048>
- [129] Marecik, R., Biegańska-Marecik, R., Cyplik, P., Ławniczak, Ł., Chrzanowski, Ł. (2013) Phytoremediation of industrial wastewater containing nitrates, nitroglycerin, and nitroglycol. *Pol. J. Environ. Stud.* **22**, 773-780.
- [130] Denariáz, G., Payne, W.J., Gall, J.L.E. (1989) A halophilic denitrifier, *Bacillus halodenitrificans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microb.* **39**, 145-151. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-2-145>
- [131] Dhamole, P.B., Nair, R.R., Souza, S.F.D., Lele, S.S. (2007) Denitrification of high strength nitrate waste. *Bioresour. Technol.* **98**, 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.01.019>
- [132] van Rijn, J., Tal, Y., Barak, Y. (1996) Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2615-2620. <https://doi.org/10.1128/aem.62.7.2615-2620.1996>
- [133] Wilderer, P.A., Jones, W.L., Daub, U. (1987) Competition in denitrification systems affecting reduction rate and accumulation of nitrite. *Water Res.* **21**, 239-245. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(87\)90056-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(87)90056-X)
- [134] Napier, J., Bustamante, R.B. (1988) In-Situ biodenitrification of the S-3 ponds. *Environ. Prog.* **7**, 13-16.
- [135] Miao, Y., Liao, R., Zhang, X.X., Liu, B., Li, Y., Wu, B., Li, A. (2015a) Metagenomic insights into salinity effect on diversity and abundance of denitrifying bacteria and genes in an expanded granular sludge bed reactor treating high-nitrate wastewater. *Chem. Eng. J.* **277**, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.125>
- [136] Liao, R., Shen, K., Li, A.-M., Shi, P., Li, Y., Shi, Q., Wang, Z. (2013) High-nitrate wastewater treatment in an expanded granular sludge bed reactor and microbial

- diversity using 454 pyrosequencing analysis. *Bioresour. Technol.* **134**, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.057>
- [137] Glass, C.C., Silverstein, J. (1999) Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Res.* **33**, 223-229. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00177-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00177-8)
- [138] Peng, J.S., Liu, Y., Yan, L., Hou, T.T., Liu, H.C., Zhou, Y.G., Liu, Z.P. (2019) *Pseudomonas nitritolerans* sp. nov., a nitrite-tolerant denitrifying bacterium isolated from a nitrification/denitrification bioreactor. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **69**. <https://doi.org/10-1099/ijsem.0.003516>
- [139] Bollag, J.-M., Henninger, N.M. (1978) Effects of nitrite toxicity on soil bacteria aerobic and anaerobic conditions. *Soil Biol. Biochem.* **10**, 377-381.
- [140] Custer, M.C., Hansen, J.N. (1983) Lactoferrin and transferrin fragments react with nitrite to form an inhibitor of *Bacillus cereus* spore outgrowth. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 942-949. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.942-949.1983>
- [141] Thomsen, J.K., Geest, T., Cox, R.P. (1994) Mass spectrometric studies of the effect of pH on the accumulation of intermediates in denitrification by *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 536-541. <https://doi.org/10.1128/aem.60.2.536-541.1994>
- [142] Kucera, I., Dadak, V., Matyasek, R. (1986) The influence of pH on the kinetics of dissimilatory nitrite reduction in *Paracoccus denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* **848**, 1-7. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(86\)90153-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(86)90153-2)
- [143] Li, G., Vilcherrez, D., Carvajal-arroyo, J.M., Sierra-Alvarez, R., Field, J.A. (2016a) Exogenous nitrate attenuates nitrite toxicity to anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria. *Chemosphere* **144**, 2360-2367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.013>
- [144] Hosseini, D., Sartaj, M., Delatolla, R. (2019) Simultaneous anaerobic oxidation/partial nitrification-denitrification for cost-effective and efficient removal of organic carbon and nitrogen from highly polluted streams. *Environ. Technol.* **40**, 2114-2126. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1438522>
- [145] Yao, R., Yuan, Q., Wang, K. (2020) Enrichment of denitrifying bacterial community using nitrite as an electron acceptor for nitrogen removal from wastewater. *Water* **12**, 48. <https://doi.org/10.3390/w12010048>

- [146] Dvorák, L., Svojitka, J., Wanner, J., Wintgens, T. (2013) Nitrification performance in a membrane bioreactor treating industrial wastewater. *Water Res.* **47**, 4412-4421. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.053>
- [147] Wu, G., Zheng, D., Xing, L. (2014) Nitritation and N₂O emission in a denitrification and nitrification two-sludge system treating high ammonium containing wastewater. *Water* **6**, 2978-2992. <https://doi.org/10.3390/w6102978>
- [148] Daigger, G.T., Littleton, H.X. (2000) Characterization of simultaneous nutrient removal in staged, closed-loop bioreactors. *Water Environ. Res.* **72**, 330-338. <https://doi.org/10.2175/106143000X137554>
- [149] Pochana, K., Keller, J. (1999) Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification. *Wat. Sci. Tech.* **39**, 61-68. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00123-7](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00123-7)
- [150] Jimenez J.A., Dursun, D., Dold, P., Bratby, J. (2010) Simultaneous nitrification-denitrification to meet low effluent nitrogen limits: modelling, performance and reliability. *Proceedings of the Water Environment Federation* **15**, 2404-2421. <https://doi.org/10.2175/193864710798158968>
- [151] Peng, Z., Qi, Z. (2007) Simultaneous nitrification and denitrification in activated sludge system under low oxygen concentration. *Frontiers Env. Sci. & Eng.* **1**, 49-52. <https://doi.org/10.1007/s11783-007-0009-1>
- [152] von Münch, E., Lant, P.A., Keller, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Sci. Technol.* **30**, 277-284. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00174-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00174-3)
- [153] Ahn, J.H., Kim, S., Park, H., Rahn, B., Pagilla, K., Chandran, K. (2010) N₂O emissions from activated sludge processes, 2008-2009: Results of a national monitoring survey in The United States. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 4505-4511. <https://doi.org/10.1021/es903845y>
- [154] Bliss, P.J., Barnes, D. (1986) Modelling nitrification in plant scale activated sludge. *Water Sci. Technol.* **18**, 139-148. <https://doi.org/10.2166/wst.1986.0065>
- [155] Lie, E., Welander, T. (1994) Influence of dissolved oxygen and oxidation-reduction potential on the denitrification rate of activated sludge. Proceedings of the 17th Biennial Conference of the International Association on Water Quality, Budapest, Hungary, July 24-30. Water Quality International, Part 6: Nutrient Removal.

- [156] Martins A.M.P., Heijnen, J.J., van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Bulking sludge in biological nutrients removal systems. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 125-135. <https://doi.org/10.1002/bit.20029>
- [157] Jenkins, D., Richard, M.G., Daigger, G.T. (2003) Manuel on the causes and the control of activated sludge bulking and foaming, Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- [158] Daigger, G.T., Adams, C.D., Steller, H.K. (2007) Diffusion of oxygen through activated sludge flocs: Experimental measurement, modeling, and implications for simultaneous nitrification and denitrification. *Water Environ. Res.* **79**, 375-387. <https://doi.org/10.2175/106143006X111835>
- [159] Ji, B., Yang, K., Zhu, L., Jiang, Y., Wang, H., Zhou, J., Zhang, H. (2015) Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **20**, 643-651. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0009-0>
- [160] Hu, B., Wang, T., Ye, J., Zhao, J., Yang, L., Wu, P., Duan, J.L., Ye, G. (2019) Effects of carbon sources and operation modes on the performances of aerobic denitrification process and its microbial community shifts. *J. Environ. Manage.* **239**, 299-305. <https://doi.org/10.1016/j.envman.2019.03.063>
- [161] Lu, H., Wang, X., Zang, M., Zhou, J., Wang, J., Guo, W. (2019) Degradation pathways and kinetics of anthraquinone compounds along with nitrate removal by a newly isolated *Rhodococcus pyridinivorans* Gf3 under aerobic conditions. *Bioresour. Technol.* **285**, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121336>
- [162] Su, J., Shi, J., Ma, F. (2017) Aerobic denitrification and biomineralization by a novel heterotrophic bacterium, *Acinetobacter* sp. H36. *Mar. Pollut. Bull.* **116**, 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.014>
- [163] Liu, Y., Li, G., Chen, Z., Megharaj, M., Naidu, R. (2012) Removal of nitrate using *Paracoccus* sp. Yf1 immobilized on bamboo carbon. *J. Hazard. Mater.* **229**, 419-425. <https://doi.org/j.hazmat.2012.06.029>
- [164] van Huyssteen, J.A., Barnard, J.L., Hendriksz, J. (1990) The Olifantsfontein nutrient removal plant. *Water Sci. Technol.* **22**, 1-8. <https://doi.org/10.2166/wst.1990.0224>
- [165] Stenstrom, M., Song, S.S. (1991) Effects of oxygen transport limitation on nitrification in the activated sludge process. *Journal of Water Pollution Control Federation* **63**, 208-219.

- [166] Holman, J.B., Wareham, D.G. (2005) COD ammonia and dissolved oxygen time profiles in the simultaneous nitrification/denitrification process. *Biochem. Eng. J.* **22**, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.001>
- [167] Zhao, H.W., Mavinic, D.S., Oldham, W.K., Koch, F.A. (1999) Controlling factors for simultaneous nitrification and denitrification in a two-stage intermittent aeration process treating domestic sewage. *Water Res.* **33**, 961–969. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0836-y>
- [168] Munch, E.V., Lant, P., Keller, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* **30**, 277–284. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00174-3](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00174-3)
- [169] Liu, Y., Ai, G.M., Miao, L.L. and Liu, Z.P. (2016) *Marinobacter* strain NNA5, a newly isolated and highly efficient aerobic denitrifier with zero N₂O emission. *Bioresour. Technol.* **206**, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.066>
- [170] Zhou, Y., Ganda, L., Lim, M., Yuan, Z., Ng, W. J. (2012) Response of polyphosphate accumulating organisms to free nitrous acid inhibition under anoxic and aerobic conditions. *Bioresour. Technol.* **116**, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.111>
- [171] Yang, X.-P., Wang, S.-M., Zhang, D.-W. and Zhou, L.-X. (2011) Isolation and nitrogen removal characteristics of an aerobic heterotrophic nitrifying–denitrifying bacterium, *Bacillus subtilis* A1. *Bioresour. Technol.* **102**, 854–862. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.007>
- [172] Surmacz-Gorska, 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.
- [173] Kornaros, M., Dokianakis, S.N., Lyberatos, G. (2010) Partial nitrification/denitrification can be attributed to the slow response of nitrite oxidizing bacteria to periodic anoxic disturbances. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 7245–7253. <https://doi.org/10.1021/es100564j>
- [174] Jubany, I., Lafuente, J., Baeza, J.A., Carrera, J. (2009) Total and stable washout of nitrite oxidizing bacteria from a nitrifying continuous activated sludge system using automatic control based on Oxygen Uptake Rate measurements. *Water Res.* **43**, 2761–2772. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.03.022>
- [175] Zeng, W., Zhang, Y., Li, L., Peng, Y.Z., Wang, S.Y. (2009) Control and optimization of nitrifying communities for nitrification from domestic wastewater at

- room temperatures. *Enzyme Microb. Technol.* **45**, 226-232.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.011>
- [176] Jaramillo, F., Orchard, M., Muñoz, C., Zamorano, M., Antileo, C. (2018) Advanced strategies to improve nitrification process in sequencing batch reactor – A review. *Journal of Environmental Management* **218**, 154-164.
<https://doi.org/10.1016/j.envman.2018.04.019>
- [177] Claros, J., Serralta, J., Seco, A., Ferrer, J., Aguado, D. (2012) Real-time control strategy for nitrogen removal via nitrite in a SHARON reactor using pH and ORP sensors. *Process Biochem.* **47**, 1510-1515.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.020>
- [178] Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S. (2008) Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **192**, 159-195.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-71724-1_5
- [179] Guo, J., Wang, S., Huang, H., Peng, Y., Ge, S., Wu, C., Sun, Z. (2009) Efficient and integrated start-up strategy for partial nitrification to nitrite treating low C/N domestic wastewater. *Water Sci. Technol.* **60**, 3243-3251.
<https://doi.org/10.2166/wst.2009.619>
- [180] Wei, D., Xue, X., Yan, L., Sun, M., Zhang, G., Shi, L., Du, B. (2014) Effect of influent ammonium concentration on the shift of full nitrification to partial nitrification in a sequencing batch reactor at ambient temperature. *Chem. Eng. J.* **235**, 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.017>
- [181] Ward, B.B., Arp, D.J., Klotz, M.G. (2011) Nitrification, American Society for Microbiology
- [182] Blackburne, R., Yuan, Z., Keller, J. (2008) Demonstration of nitrogen removal via nitrite in a sequencing batch reactor treating domestic wastewater. *Water Res.* **42**, 2166-2176. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11029>
- [183] Hellings, C., Schellen, A.A.J.C., Mulder, J.W., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998) The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonia-rich wastewater. *Water Sci. Technol.* **37**, 135-142. <https://doi.org/>
- [184] Meinhold, J., Arnold, E., Isaacs, S. (1999a) Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. *Water Res.* **33**, 1871–1883. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00411-4](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00411-4)
- [185] Meinhold, J., Filipe, C.D.M., Daigger, G.T., Isaacs, S. (1999b) Characterization of the denitrifying fraction of phosphate accumulating organisms in biological

- phosphate removal. *Water Sci Technol.* **39**, 31-42. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00773-2](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00773-2)
- [186] Kuba, T., Murnleitner, E., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1996a) A metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **52**, 685–695. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19961220\)52:6<685::AID-BIT6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19961220)52:6<685::AID-BIT6>3.0.CO;2-K)
- [187] Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1996b) Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system. *Water Res.* **30**, 1702–1710. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(96\)00050-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(96)00050-4)
- [188] Kuba, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1996c) Effect of cyclic oxygen exposure on the activity of denitrifying phosphorus removal bacteria. *Water Sci. Technol.* **34**, 33–40. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00492-1](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00492-1)
- [189] Smolders, G.J., van der Meij, J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1994) Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 461-470. <https://doi.org/10.1002/bit.260430605>
- [190] Hu, J. Y., Ong, S. L., Ng, W. J., Lu, F., Fan, X. J. (2003) A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors. *Water Res.* **37**, 3463–3471. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00205-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00205-7)
- [191] Kuba, T., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1997) Biological dephosphatation by activated sludge under denitrifying conditions: pH influence and occurrence of denitrifying dephosphatation in a full-scale waste water treatment plant. *Water Sci. Technol.* **36**, 75–82. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223-\(97\)00713-0](https://doi.org/10.1016/S0273-1223-(97)00713-0)
- [192] Kern-Jespersen, J.P., Henze, M. (1993) Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Res.* **27**, 617-624. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90171-D](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90171-D)
- [193] Kuba, T., Smolders, G., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1993) Biological phosphorus removal from wastewater by anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Water Sci. Technol.* **27**, 241-252. <https://doi.org/10.2166/wst.1993.0504>

- [194] Saito, T., Brdjanović, D., van Loosdrecht, M. C. M. (2004) Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms. *Water Res.* **38**, 3760–3768. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.05.023>
- [195] Lee, D.S., Jeon, C.O., Park, J.M. (2001) Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system. *Water Res.* **35**, 3968-3976. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(01\)00132-4](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(01)00132-4)
- [196] Freitas, F., Temudo, F.M., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M.A. (2009) Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Bioresour Technol.* **100**, 1969-1976. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.10.031>
- [197] Shi, L., Ma, B., Li, X., Zhang, Q., Peng, Y. (2019) Advanced nitrogen removal without addition of external carbon source in an anaerobic/aerobic/anoxic sequencing batch reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **42**. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02148-z>
- [198] Wang, X., Zeng, R.J., Dai, Y., Peng, Y., Yuan, Z. (2008) The denitrification capability of cluster 1 *Defluviicoccus vanus*-related glycogen-accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 1329-1336. <https://doi.org/10.1002/bit.21711>
- [199] Miao, L., Wang, S., Li, B., Cao, T., Xue, T., Peng, Y. (2015b) Advanced nitrogen removal via nitrite using stored polymers in a modified sequencing batch reactor treating landfill leachate. *Bioresour. Technol.* **192**, 354-360. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.013>
- [200] Oehmen, A., Yuan, Z.G., Blackall, L. L., Keller, J. (2005) Comparison of acetate and propionate uptake by polyphosphate accumulating organisms and glycogen accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **91**, 162-168. <https://doi.org/10.1002/bit.20500>
- [201] Liu, W.T., Mino, T., Nakamura, K., Matsuo, T. (1996) Glycogen accumulating population and its anaerobic substrate uptake in anaerobic-aerobic activated sludge without biological phosphorus removal. *Water Res.* **1**, 75-82. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00121-Z](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00121-Z)
- [202] Oehmen, A., Lemos, P.C., Carvalho, G., Yuan, Z., Keller, J., Blackall, L.L., Reis, M.A. (2007) Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res.* **41**, 2271-2300. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.02.030>

- [203] Onetto, C.A. Eales, K.L. Guagliardo, P., Kilburn, M.R., Gambetta, J.M., Grbin, P.R. (2017) Managing the excessive proliferation of glycogen accumulating organisms in industrial activated sludge by nitrogen supplementation: A FISH-NanoSIMS approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **40**, 500-507. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.07.006>
- [204] Dai, Y., Yuan, Z., Wang, X., Oehmen, A., Keller, J. (2007) Anaerobic metabolism of *DeFluviicoccus* vanus related glycogen accumulating organisms (GAOs) with acetate and propionate as carbon sources. *Water Res.* **41**, 1885-1896. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.045>
- [205] Oehmen, A., Zeng, R.J., Saunders, A.M., Blackall, L.L., Keler, J., Yuan, Z. (2006) Anaerobic and aerobic metabolism of glycogen-accumulating organisms selected with propionate as the sole carbon source. *Microbiology* **152**, 2767-2778. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28065-0>
- [206] Lin, Y., Sun, Y., Zhang, L., Zhang, Q., Li, X., Sui, J., Peng, Y. (2023) Balancing denitrifying phosphorus-accumulating organisms and denitrifying glycogen-accumulating organisms for advanced nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater. *Bioresour. Technol.* **369**, 128444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128444>
- [207] Viancelli, A., Kunz, A., Esteves, P.A., Visçosa Bauermann, F., Furukawa, K., Fujii, T., Vasconcellos, A.R., Vanotti, M. (2011) Bacterial biodiversity from an anaerobic up flow bioreactor with ANAMMOX activity inoculated with swine sludge. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **54**, 1035-1041.
- [208] Ginige, M.P., Keller, J., Blackall, L.L. (2005) Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization- microaudiography. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8683-8691. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8683-8691.2005>
- [209] Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackall, L.L. (2000) Identification on polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1175-1182. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1175-1182.2000>
- [210] Flowers, J.J., He, S., Yilmaz, S., Noguera, D.R., McMahon, K.D. (2009) Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges

- dominated by different ‘*Candidatus accumulibacter*’ clades. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**, 583-588. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00090.x>
- [211] Crocetti, G.R., Banfield, J.F., Keller, J., Bond, P.L., Blackall, L.L. (2002) Glycogen-accumulating organisms in laboratory-scale and full-scale wastewater treatment processes. *Microbiology* **148**, 3353-3364. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3353>
- [212] Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with cytometry for analyzing mixed microbial population. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1919-1925. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1919-1925.1990>
- [213] Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 434-444. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80053-8)
- [214] Eikelboom, D.H., van Buijsen, H.J.J. (1983) Microscopic sludge investigation manual, 2nd ed., Delft: TNO Research Institute for Environmental Hygiene
- [215] Gupta, R.K., Poddar, B.J., Nakhate, S.P., Singh, A.K., Purohit, H.J., Khardenavis, A.A. (2021) Role of heterotrophic nitrifiers and aerobic denitrifiers in simultaneous nitrification and denitrification process: a nonconventional nitrogen removal pathway in wastewater treatment. *Appl. Microbiol.* **74**, 159-184. <https://doi.org/10.1111/lam.13553>
- [216] van Niel, E.W.J., Arts, P.A.M., Wesselink, B.J., Robertson, L.A., Kuenen, J.G. (1993) Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* **102**, 109-118. <http://resolver.tudelft.nl/uuid:798fb629-c4df-4548-898a-fcfac5d271b5>
- [217] Killham, K. (1986) Heterotrophic nitrification. U: Prosser, J.I. (ur.), Nitrification. IRL Press, Oxford.
- [218] Barraclough, D., Puri, G. (1995) The use of super ¹⁵N pool dilution and enrichment to separate the heterotrophic and autotrophic pathways of nitrification. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 17-22. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00141-M](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00141-M)
- [219] Gu, X., Leng, J., Zhu, J., Zhang, K., Zhao, J., Wu, P., Xing, Q., Tang, K., Li, X., Hu, B. (2022) Influence mechanism of C/N ration on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification process. *Bioresour. Technol.* **343**, 126116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126116>

- [220] Xu, Z., Dai, X., Xiaoli, C. (2018b) Effect of influent pH on biological denitrification using biodegradable PHBV/PLA blends as electron donor. *Biochem. Eng. J.* **131**, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.12.008>
- [221] Pan, Y., Ye, L., Ni, B.J., Yuan, Z. (2012) Effect of pH on N₂O reduction and accumulation during denitrification by methanol utilizing denitrifiers. *Water Res.* **46**, 4832-4840. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.06.003>
- [222] Onnis-Hayden, A., Gu, A.Z. (2008) Comparisons of Organic Sources for Denitrification: Biodegradability, Denitrification Rates, Kinetic Constants and Practical Implication for Their Application in WWTPs. *Proc. Water Environ. Fed.* **2008**, 253–273. <https://doi.org/10.2175/193864708788735510>
- [223] Wang, Y. Y., Gang, G., Wang, H., Stephenson, T., Guo, J. H., Ye, L. (2013) Long-term impact of anaerobic reaction time on the performance and granular characteristics of granular denitrifying biological phosphorus removal systems. *Water Res.* **47**, 5326–5337. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.013>
- [224] Wang, Y. Y., Peng, Y. Z., Peng, C. Y., Wang, S. Y., Zeng, W. (2004) Influence of ORP variation, carbon source and nitrate concentration on denitrifying phosphorus removal by DPB sludge from dephanox process. *Water Sci. Technol.* **50**, 153–161. <https://doi.org/10.2166/wst.2004.0632>
- [225] Coma, M., Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P. L. (2012) Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* **103**, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.014>
- [226] Hu, Z., Houweling, D., Dold, P. (2012) Biological nutrient removal in municipal wastewater treatment: new directions in sustainability. *J. Environ. Eng.* **138**, 307-317. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000462](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000462)
- [227] Kuba, T., Wachtmeister, A., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1994) Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal systems. *Water Sci. Technol.* **30**, 263-269. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0277>
- [228] Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2001) Metabolic behavior of denitrifying phosphate-accumulating organisms under nitrate and nitrite electron acceptor conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 442-446. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80293](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80293)
- [229] Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.* **32**, 3193-3207. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00129-8)

- [230] Mino, T., Liu, W.T., Kurisu, F., Matsuo, T. (1995) Modeling glycogen storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal processes. *Water Sci. Technol.* **31**, 25-34. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(95\)00177-O](https://doi.org/10.1016/0273-1223(95)00177-O)
- [231] Saad, S.A., Welles, L., Abbas, B., Lopez-Vazquez, C.M., van Loosdrecht, M.C.M., Brdjanovic, D. (2016) Denitrification of nitrate and nitrite by *Candidatus Accumulibacter phosphatis* clade IC. *Water Res.* **105**, 97-109. <https://doi.org/10.101/j.watres.2016.08.061>
- [232] Painter, H.A. (1970) A review of literature on inorganic nitrogen metabolism in microorganisms. *Water Res.* **4**, 393-450. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(70\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0043-1354(70)90051-5)
- [233] Cecen, F., Gonenc, I.E. (1995) Criteria for nitrification and denitrification of high-strength wastes in 2 upflow submerged filters. *Water Environ. Res.* **67**, 132-142. <https://doi.org/10.2175/106143095X131277>
- [234] Gao, D.W., Peng, Y.Z., Li, B., Liang, H. (2009) Shortcut nitrification-denitrification by real-time control strategies. *Bioresour. Technol.* **100**, 2298-2300. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.11.017>
- [235] Puig, S., Corominas, L., Vives, M.T., Balaguer, M.D., Colprim, J. Colomer, J. (2005) Development and implementation of a real-time control system for nitrogen removal using OUR and ORP as end points. *Ind. Eng. Chem. Res.* **44**, 3367-3373. <https://doi.org/10.1021/ie0488851>
- [236] Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B., Srinath, E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Control Fed.* **48**, 835–852.
- [237] Kosgey, K., Zungu, P.V., Bux, F., Kumari, S. (2022) Biological nitrogen removal from low carbon wastewater. *Front Microbiol.* **13**: 968812. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.968812>
- [238] Sinha, B., Annachhatre A. P. (2007) Assessment of partial nitrification reactor performance through microbial population shift using quinone profile, FISH and SEM. *Bioresour Technol.* **98**, 3602-3610. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.034>
- [239] Sinha, B., Annachhatre A. P. (2006) Partial nitrification – operational parameters and microorganisms involved. *Environ Sci Biotechnol* **6**, 285-313. <https://doi.org/10.1007/S11157-006-9116-X>

- [240] Wang, D.B., Li, X.M., Yang, Q., Zheng, W., Wu, Y., Zeng, T.J., Zeng, G.M. (2012) Improved biological phosphorus removal performance driven by the aerobic/extended-idle regime with propionate as the sole carbon source. *Water Res.* **46**, 3868-3878. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.04.036>
- [241] van Kempen, R., Mulder, J.W., Uijterlinde, C.A., van Loosdrecht, M.C.M. (2001) Overview: full scale experience of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. *Water Sci. Technol.* **44**, 145-152. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0035>
- [242] Duan, H., Le, L., Lu, X., Yuan, Z. (2019) Overcoming nitrite oxidizing bacteria adaptation through alternating sludge treatment with free nitrous acid and free ammonia. *Environ. Sci. Technol.* **53**, 1937-1946. <https://doi.org/10.1012/acs.est.8b06148>
- [243] Chen, H., Yang, Q., Li, X., Wang, Y., Luo, K., Zeng, G. (2013) Post-anoxic denitrification via nitrite driven by PHB in feast–famine sequencing batch reactor. *Chemosphere.* **92**, 1349-1355. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.052>
- [244] Antileo, C., Roeckel, M., Lindemann, J., Wiesmann, U. (2007) Operating parameters for high nitrite accumulation during nitrification in a rotating biological nitrifying contactor. *Water Environ. Res.* **79**, 151–162. <https://doi.org/10.2175/106143007x182755>
- [245] Garrido, J.M., van Benthum, W.A.J., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1997) Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 168-178. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970120\)53:2<168::AID-BIT6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2<168::AID-BIT6>3.0.CO;2-M)
- [246] Abeling, U., Seyfried, C. F. (1992) Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater nitrogen removal via nitrite. *Water Sci Technol.* **26** (5–6), 1007–1015. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0542>
- [247] Wiesmann, U. (1994) Biological nitrogen removal from waste water. *Adv. Biochem. Eng.* **51**, 113–154.
- [248] He, S., Xue, G., Wang, B. (2009) Factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND) and its kinetics model in membrane bioreactor. *J. Hazard. Mater.* **168**, 704-710. <https://doi.org/10.1016/j.hazmat.2009.02.099>
- [249] Liu, Y., Shi, H., Xia, L., Shi, H., Shen, T., Wang, Z., Wang, G., Wang, Y. (2010) Study of operational conditions of simultaneous nitrification and denitrification in

- a Carrousel oxidation ditch for domestic wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* **101**, 901-906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.015>
- [250] von Munch, E., Lant, P., Keller, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Res.* **30**, 277-284.
- [251] Han, Y., Liu, J., Guo, X., Li, L. (2012) Micro-environment characteristics and microbial communities in activated sludge flocs of different particle size. *Bioresour. Technol.* **124**, 252-258. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.008>
- [252] Yoo, H., Ahn, K.H., Lee, H.J., Lee, K.H., Kwak, Y.J., Song, K.G. (1999) Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (SND) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. *Water Res.* **33**, 145-154. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00159-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00159-6)
- [253] Third, K.A., Burnett, N., Cord-Ruwisch, R. (2003) Simultaneous nitrification and denitrification using stored substrate (PHB) as the electron donor in a SBR. *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 706-720. <https://doi.org/10.1002/bit.10708>
- [254] Chiu, Y.C., Lee, L.L., Chang, C.N., Chao, A.C. (2007) Control of carbon and ammonium ratio for simultaneous nitrification and denitrification in a sequencing batch bioreactor. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **59**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.08.001>
- [255] Hashemi, S.H., Azimi, A.A., Torabian, A., Nabi Bidhendi, G., Mahmoodkhani, R. (2005) Low dissolved oxygen sludge bulking in sequencing batch reactors. *Int. J. Environ. Stud.* **62**, 415-420. <https://doi.org/10.1080/00207230500118785>
- [256] Zhang, M., Lu, H., Cai, L., Sun, P., Ma, B., Li, J., Chen, G., Ruan, Y. (2023) C/N ratios inform sustainable aerobic denitrification for nitrogen pollution control: Insight into the key parameter from a view of metabolic division. *Journal of Cleaner Production* **414**, 137565. <https://doi.org/10.1016/j.clepro.2023.137565>
- [257] Brozinčević, A., Grgas, D., Štefanac, T., Habuda-Stanić, M., Zelić, B., Landeka Dragičević, T. (2024) Cost Reduction in the Process of Biological Denitrification by Choosing Traditional or Alternative Carbon Sources. *Energies* **17**, 3660. <https://doi.org/10.3390/en17153660>
- [258] Li, S.S., Peng, C.R., Cheng, T.S., Wang, C.H., Guo, L.L., Li, D.H. (2019) Nitrogen-cycling microbial community functional potential and enzyme activities in cultured biofilms with response to inorganic nitrogen availability. *J. Environ. Sci.* **76**, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.03.029>

- [259] Bergaust, L., Bakken, L.R., Frostegard, A. (2011) Denitrification regulatory phenotype, a new term for the characterization of denitrifying bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 207-212. <https://doi.org/10.1042/BST0390207>
- [260] 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>
- [261] Pan, Y., Ye, L., Yuan, Z. (2013) Effect of H₂S on N₂O Reduction and Accumulation during Denitrification by Methanol Utilizing Denitrifiers. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 8408–8415. <https://doi.org/10.1021/es401632r>
- [262] Li, T., Li, W., Chai, X., Dai, X., Wu, B. (2022) PHA stimulated denitrification through regulation of preferential cofactor provision and intracellular carbon metabolism at different dissolved oxygen levels by *Pseudomonas stutzeri*. *Chemosphere* **309**, 136641. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136641>
- [263] Santorio, S., Fra-Vázquez, A., Val del Rio, A., Mosquera-Corral, A. (2019) Potential of endogenous PHA as electron donor for denitrification. *Sci. Total Environ.* **695**, 133747. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133747>
- [264] Carrera, J., Baeza, J.A., Vicent, T., Lafuente, J. (2003) Biological nitrogen removal of high-strength ammonium industrial wastewater with two-sludge system. *Water Res.* **37**, 4211–4221. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00338-5](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00338-5)
- [265] Barthe, F., Brenner, R.C., Lewis, R.F. (1968) Chemical-Biological Control of Nitrogen and Phosphorus in Wastewater Effluent. *J. Water Pollut. Control Fed.* **40**, 2040-2054.
- [266] Lee, Y.Y., Choi, H., Cho, K.S. (2018) Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N₂O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification. *J. Environ. Sci. Health A* **54**, 16–29. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1503903>
- [267] Adouani, N., Lendormi, T., Limousy, L., Sire, O. (2010) Effect of the Carbon Source on N₂O Emissions during Biological Denitrification. *Resour. Conserv. Recycl.* **54**, 299–302. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2009.07.011>
- [268] Elefsiniotis, P., Li, D. (2006) The Effect of Temperature and Carbon Source on Denitrification Using Volatile Fatty Acids. *Biochem. Eng. J.* **28**, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.10.004>
- [269] Akunna, J.C., Bizeau, C., Moletta, R. (1993) Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: Glucose, glycerol, acetic acid, lactic

- acid and methanol. *Water Res.* **27**, 1303–1312. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90217-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90217-6)
- [270] Oh, J., Silverstein, J. (1999b) Acetate limitation and nitrite accumulation during denitrification. *J. Environ. Eng.* **125**, 234-242.
- [271] Körner, H., Zumft, W.G. (1989) Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1670-1676. <https://doi.org/10.1128/aem.55.7.1670-1676.1989>
- [272] Almeida, J.S., Reis, M.A., Carrondo, M.J. (1995) Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnol. Bioeng.* **46**, 476-484. <https://doi.org/10.1002/bit.260460512>
- [273] Badia, A., Kim, M., Dagnew, M. (2021) Nitrite denitrification using biomass acclimatized with methanol as complementary carbon source: long-term performance and kinetics study. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* **7**, 93-106. <https://doi.org/10.1039/D0EW00604A>
- [274] Ge, S.J., Peng, Y.Z., Wang, S.Y., Lu, C.C., Cao, X., Zhu, Y.P. (2012) Nitrite accumulation under constant temperature in anoxic denitrification process: the effect of carbon sources and COD/NO₃-N. *Bioresour. Technol.* **114**, 137-143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.016>
- [275] Mohan, T.K., Nanchaiah, Y.V., Venugopalan, V.P., Sai, P.S. (2016) Effect of C/N ratio on denitrification of high-strength nitrate wastewater in anoxic granular sludge sequencing batch reactors. *Ecol. Eng.* **91**, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.02.033>
- [276] Zhou, Y., Pijuan, M., Zeng, R.J., Yuan, Z. (2008b) 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/>
- [277] Philips, H.M., Barnard, J., Debarbadillo, C., Shaw, A.R. (2009) Denitrification rates: sampling, modeling and design considerations. *Proceedings of the Water Environment Federation* **4**, 252-276. <https://doi.org/10.2175/193864709793901301>
- [278] Barnard, J. (1973) Biological denitrification. *Wat. Pollut. Control* **72**(6), 705-720.
- [279] Ahn, J., Daidou, T., Tsuneda, S., Hirata, A. (2002) Transformation of phosphorus and Relevant Intracellular Compounds by a Phosphorus-Accumulating Enrichment

- Culture in the Presence of Both the Electron Acceptor and Electron Donor. *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 83–93. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.10292>
- [280] Jena, J., Ray, S., Pandey, S., Das, T. (2013) Effect of COD/N ratio on simultaneous removal of nutrients and COD from synthetic high strength waste water under anoxic conditions. *J. Sci. Ind. Res.* **72**, 127–131.
- [281] Jena, J., Kumar, R., Saifuddin, M., Dixit, A., Das, T. (2016) Anoxic-aerobic SBR system for nitrate, phosphate and COD removal from high-strength wastewater and diversity study of microbial communities. *Biochem. Eng. J.* **105**, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.09.007>
- [282] Wang, Y., Peng, Y., Stephenson, T. (2009) Effect of influent ratios and hydraulic retention time (HRT) on simultaneous phosphorus and nitrogen removal in a two-sludge sequencing batch reactor process. *Bioresour. Technol.* **100**, 3506–3512. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.026>
- [283] Soejima, K., Matsumoto, S., Ohgushi, S., Naraki, K., Terada, A., Tsuneda, S., Hirata, A. (2008) Modeling and experimental study on the anaerobic/aerobic/anoxic process for simultaneous nitrogen and phosphorus removal: the effect of acetate addition. *Process Biochem.* **43**, 605–614. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.01.022>
- [284] Merzouki, M., Bernet, N., Delgenes, J. P., Moletta, R., Benlemlih, M. (2001) Effect of operating parameters on anoxic biological phosphorus removal in anaerobic-anoxic sequencing batch reactor. *Environ. Technol.* **22**, 397–408. <https://doi.org/10.1080/09593332208618269>
- [285] Jabari, P., Munz, G., Oleszkiewicz, J.A. (2014) Selection of denitrifying phosphorous accumulating organisms in IFAS systems: comparison of nitrite with nitrate as an electron acceptor. *Chemosphere* **109**, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.002>
- [286] Zhou, Y., Ganda, L., Lim, M., Yuan, Z., Kjelleberg, W.J. (2010) Free nitrous acid (FNA) inhibition on denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DPAOs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 359–369. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2780-3>
- [287] Zhou, Y., Pijuan, M., Yuan, Z. (2007) Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by polyphosphate accumulating organisms. *Biotechnol. Bioeng.* **98**, 903–912. <https://doi.org/10.1002/bit.21458>

- [288] Zekker, I., Mandel, A., Rikmann, E., Jaagura, M., Salmar, S., Ghangrekar, M.M., Tenno, T. (2021) Ameliorating effect of nitrate on nitrite inhibition for denitrifying P-accumulating organisms. *Sci. Total Environ.* **797**, 149133. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149133>
- [289] Ma, B., Wang, S., Zhu, G., Ge, S. (2013) Denitrification and phosphorus uptake by DPAOs using nitrite as an electron acceptor by step-feed strategies. *Front. Env. Sci. Eng.* **7**, 267–272. <https://doi.org/10.1007/s11783-012-0439-2>
- [290] Zeng, W., Li, B., Yang, Y., Wang, X., Li, L., Peng, Y. (2014) Impact of nitrite on aerobic phosphorus uptake by poly-phosphate accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal sludges. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **37**, 277–287. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0993-4>
- [291] Hu, X., Sobotka, D., Czerwionka, K., Zhou, Q., Xie, L., Makinia, J. (2018) Effects of different external carbon sources and electron acceptors on interactions between denitrification and phosphorus removal in biological nutrient removal processes. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **19**, 305–316. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700064>
- [292] Hu, Z.R., Wentzel, M.C., Ekama, G.A. (2002) Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. *Water Res.* **36**, 4927–4937. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00186-0](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00186-0)
- [293] Zhang, S.-H., Huang, Y., Hua, Y.-M. (2010) Denitrifying dephosphatation over nitrite: Effects of nitrite concentration, organic carbon, and pH. *Bioresour. Technol.* **101**, 3870–3875. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.134>
- [294] Harper, W.F., Jenkins, D. (2003) The effect of an initial anaerobic zone on the nutrient requirements of activated sludge. *Water Environ. Res.* **75**, 216–224. <http://dx.doi.org/10.2175/106143003x140999>
- [295] Nawrocki, E.P., Eddy, S.R. (2007) Query-dependent banding (QDB) for faster RNA similarity searches. *PLoS Comput. Biol.* **3**. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.0030056>
- [296] Shi, J., Lu, X., Yu, R., Gu, Q., Zho, Y. (2014) Influence of wastewater composition on nutrient removal behaviors in the new anaerobic–anoxic/nitrifying/induced crystallization process. *Saudi J. Biol. Sci.* **21**, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.06.003>

- [297] Guven, D. (2009) Effects of different carbon sources on denitrification efficiency associated with culture adaptation and C/N ratio. *Clean* **7**, 565–573. <https://doi.org/10.1002/clen.200800198>
- [298] Zafiriadis, I., Ntougias, S., Nikolaidis, C., Kapagiannidis, A.G., Aivasidis, A. (2011) Denitrifying polyphosphate accumulating organisms population and nitrite reductase gene diversity shift in a DEPHANOX-type activated sludge system fed with municipal wastewater. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.biosc.2010.09.016>
- [299] Ding, W. C., Li, Q., Ji, F. Y., Tian, X. M., Wu, D., Du, Y. (2010) Shortcut nitrification-denitrification and denitrifying phosphorus removal in two sludge SBR system. *China Water & Wastewater* **26**, 11–14.
- [300] Yang, Y.Y., Zeng, W., Liu, J.R., Li, L., Wang, X.D. (2010) Effect of nitrite on biological phosphorus removal in wastewater. *Microbiol. China* **37**, 586–593. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.091>
- [301] Liu, Y., Chen, Y., Zhou, Q. (2007) Effect of initial pH control on enhanced biological phosphorus removal from wastewater containing acetic and propionic acids. *Chemosphere* **66**, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.004>
- [302] Peng, Y.Z. SBR Method for Sewage Biological Phosphorus Removal and Process Control. Science Press, 2011, pp. 188–190.
- [303] Li, W., Zhang, H., Sun, H., Zeng, F., Gao, Y.-N., Zhu, L. (2018b) Influence of pH on short-cut denitrifying phosphorus removal. *Water Sci. Eng.* **11**, 17–22. <https://doi.org/10.1016/J.WSE.2018.03.006>
- [304] Maurer, M., Abramovich, D., Siegrist, H., Gujer, W. (1999) Kinetics of biologically induced phosphorus precipitation in waste-water treatment. *Water Res.* **33**, 484–493. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00221-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00221-8)
- [305] Gao, X., Xue, X., Li, L., Peng, Y., Yao, X., Zhang, J., Liu, W. (2022) Balance nitrogen and phosphorus efficient removal under carbon limitation in pilot-scale demonstration of a novel anaerobic/aerobic/anoxic process. *Water Res.* **223**, 118991. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118991>
- [306] Zhao, W., Huang, Y., Wang, M., Pan, C., Li, X., Peng, Y., Li, B. (2018) Post-endogenous denitrification and phosphorus removal in an alternating anaerobic/oxic/anoxic (AOA) system treating low carbon/nitrogen (C/N) domestic wastewater. *Chem. Eng. J.* **339**, 450–458. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.096>

- [307] Wang, X., Wang, S., Xue, T., Li, B., Dai, X., Peng, Y. (2015) Treating low carbon/nitrogen (C/N) wastewater in simultaneous nitrification-endogenous denitrification and phosphorous removal (SNDPR) systems by strengthening anaerobic intracellular carbon storage. *Water Res.* **77**, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.019>
- [308] Coats, E. K., Mockos, A., Loge, F. J. (2011) Post-anoxic denitrification driven by PHA and glycogen within enhanced biological phosphorus removal. *Bioresour. Technol.* **102**, 1019–1027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.104>
- [309] Qin, L., Liu, Y., Tay, J.-H. (2005) Denitrification on poly-b-hydroxybutyrate in microbial granular sludge sequencing batch reactor. *Water Res.* **39**, 1503–1510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.025>
- [310] Wang, X., Wang, S., Zhao, J., Dai, X., Li, B., Peng, Y. (2016b) A novel stoichiometries methodology to quantify functional microorganisms in simultaneous (partial) nitrification-endogenous denitrification and phosphorus removal (SNDPR). *Water Res.* **95**, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.046>
- [311] Gong, B., Zhang, K., Su, M., Yang, J., Peng, C., Wang, Y. (2024) Efficient nitrogen and phosphorus removal performance and microbial community in a pilot-scale anaerobic/anoxic/oxic (AOA) system with long sludge retention time: Significant roles of endogenous carbon source. *Environ. Res.* **263**, 120164. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.120164>
- [312] Li, W., Lin, X.Y., Chen, J.J., Cai, C.Y., Abbas, G., Hu, Z.Q., Zhao, H.P., Zheng, P. (2016b) Enrichment of Denitrating Bacteria from a Methylophilic Denitrifying Culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 10203–10213. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7859-z>
- [313] Osaka, T., Yoshie, S., Tsuneda, S., Hirata, A., Iwami, N., Inamori, Y. (2026) 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>
- [314] Ginige, M.P., Keller, J., Blackall, L.L. (2005) Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8683–8691. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8683-8691.2005>

ŽIVOTOPIS

Andrijana Brozinčević rođena je 1. veljače 1976. godine u Vinkovcima gdje je završila Prirodoslovno – matematičku gimnaziju M. A. Reljkovića. Po završetku srednje škole, 1994. godine, upisuje Prehrambeno – biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer Biokemijsko inženjerstvo, na kojem diplomira 1999. godine.

Zapošljava se 2002. godine u Javnoj ustanovi Nacionalni park Plitvička jezera u kojoj radi do danas, najprije na radnom mjestu voditelj laboratorija – biokemičar, a zatim od 2007. godine na radnom mjestu voditeljice Odsjeka za ekologiju voda. U svom dugogodišnjem radu stječe veliko iskustvo u upravljanju zaštićenim područjima, zaštiti i očuvanju slatkovodnih ekosustava i sedrenih barijera. Sudjeluje u planiranju i provedbi znanstvenih i stručnih istraživanja vezanih uz limnologiju, kemiju okoliša, denitrifikaciju i biološku obradu otpadnih voda s naglaskom na praćenje kakvoće voda i ekološkog stanja slatkovodnih ekosustava.

Poslijediplomski doktorski studij Kemijsko inženjerstvo i primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2014. godine. Doktorski rad „Utjecaj procesnih uvjeta na učinkovitost denitrifikacije modelne otpadne vode“ izrađuje pod mentorstvom prof. dr. sc. Tibeke Landeka Dragičević i prof. dr. sc. Brune Zelića.

Uz stalan posao kontinuirano se stručno i znanstveno usavršava te sudjeluje na domaćim i međunarodnim znanstveno-stručnim konferencijama i radionicama. Tijekom svog profesionalnog razvoja, Andrijana Brozinčević bila je koautor na dva (2) poglavlja u knjigama, jedanaest (11) znanstvenih radova u časopisima te trideset (30) stručnih i znanstvenih radova u zbornicima s domaćom i međunarodnom recenzijom.

Članica je Hrvatskog društva za zaštitu voda (HDZV) i Hrvatskog udruženja slatkovodnih ekologa (HUSEk).

POPIS RADOVA

Ispis radova iz Informacijskog sustava znanosti RH (CRORIS)

Prilog u knjizi - Izvorni znanstveni rad

1. Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Frketić, Tea Water Chemistry// Plitvice Lakes. Cham: Springer, 2023. str. 65-94 . doi: 10.1007/978-3-031-20378-7_3
2. Vurnek, Maja; Brozinčević, Andrijana; Čulinović, Krešimir; Novosel, Anđelko Challenges in the Management of Plitvice Lakes National Park, Republic of Croatia // National Parks Management and Conservation. London: Delhi: IntechOpen, 2018. str. 55-72 . doi: 10.5772/intechopen.72375

1. Čačković, Andrea; Kajan, Katarina; Selak, Lorena; Marković, Tamara; Brozinčević, Andrijana; Pjevac, Petra; Orlić, Sandi Hydrochemical and Seasonally Conditioned Changes of Microbial Communities in the Tufa-Forming Freshwater Network Ecosystem // *mSphere*, 8 (2023), 3; e00602-22, 17. doi: 10.1128/msphere.00602-22
2. Bencetić Klaić, Zvezdana; Leiva-Guzmán, Manuel Andres; Brozinčević, Andrijana Influence of number of visitors and weather conditions on airborne particulate matter mass concentrations at the Plitvice Lakes National Park, Croatia during summer and autumn // *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 73 (2022), 1; 1-14. doi: 10.2478/aiht-2022-73-3610
3. Sironić, Andreja; Alegro, Antun; Horvatinčić, Nada; Barešić, Jadranka; Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Krajcar Bronić, Ines; Borković, Damir; Lovrenčić Mikelić, Ivanka
Carbon Isotope Fractionation in Karst Aquatic Mosses // *Isotopes in environmental and health studies*, 57 (2021), 2; 142-165. doi: 10.1080/10256016.2020.1852235
4. Vurnek, Maja; Brozinčević, Andrijana; Matoničkin Kepčija, Renata; Frketić, Tea Analyses of long-term trends in water quality data of the Plitvice Lakes National Park // *Fundamental and applied limnology*, 194 (2021), 3; 155-169. doi: 10.1127/fal/2020/1369
5. Radišić, Maja; Rubinić, Josip; Ružić, Igor; Brozinčević, Andrijana Hydrological System of the Plitvice Lakes—Trends and Changes in Water Levels, Inflows, and Losses // *Hydrology*, 8 (2021), 4; 174, 27. doi: 10.3390/hydrology8040174
6. Sironić, Andreja; Barešić, Jadranka; Horvatinčić, Nada; Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Kapelj, Sanja Changes in the geochemical parameters of karst lakes over the past three decades – The case of Plitvice Lakes, Croatia // *Applied geochemistry*, 78 (2017), 12-22. doi: 10.1016/j.apgeochem.2016.11.013
7. Vurnek, Maja; Brozinčević, Andrijana; Briški, Felicita; Matoničkin Kepčija, Renata Distributional patterns of fecal indicator bacteria in spring area of Plitvice Lakes National park // *Periodicum biologorum*, 118 (2016), 1; 37-44. doi: 10.18054/pb.2016.118.1.2849
8. Vukosav, Petra; Mlakar, Marina; Cukrov, Neven; Kwokal, Željko; Pižeta, Ivanka; Pavlus, Natalija; Špoljarić, Ivanka; Vurnek, Maja; Brozinčević, Andrijana; Omanović, Dario Heavy metal contents in water, sediment and fish in a karst aquatic ecosystem of the Plitvice Lakes National Park (Croatia) // *Environmental science and pollution*

research, 21 (2014), 5; 3826-3839. doi: 10.1007/s11356-013-2377-3

Ostalo

1. Vurnek, Maja; Brozinčević, Andrijana; Rendulić, Željko; Miculinić, Kazimir; Vukadin, Vesna; Škunca, Ognjen Management zonation and its implementation at a UNESCO World Heritage Site: a case study for the Plitvice Lakes National Park, Croatia // European journal of environmental sciences, 9 (2019), 2; 87-96. doi: 10.14712/23361964.2019.11

Pregledni rad (znanstveni)

1. Brozinčević, Andrijana; Grgas, Dijana; Štefanac, Tea; Habuda-Stanić, Mirna; Zelić, Bruno; Landeka Dragičević, Tibela Cost Reduction in the Process of Biological Denitrification by Choosing Traditional or Alternative Carbon Sources // Energies (Basel), 17 (2024), 15; 3660, 27. doi: 10.3390/en17153660
2. Grgas, Dijana; Štefanac, Tea; Galant, Mirjana; Brozinčević, Andrijana; Štrkalj, Anita; Landeka Dragičević, Tibela Biološka denitrifikacija // Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 16 (2021), 1-2; 28-34. doi: 10.31895/hcptbn.16.1-2.4
3. Grgas, Dijana; Galant, Mirjana; Štefanac, Tea; Ladavac, Adelina; Brozinčević, Andrijana; Štrkalj, Anita; Landeka Dragičević, Tibela Aerobni granulirani mulj u obradi otpadnih voda: mehanizam granulacije i svojstva aerobnih granula // Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 16 (2021), 1-2; 20-27. doi: 10.31895/hcptbn.16.1-2.3

Prilog sa skupa (u zborniku) - Izvorni znanstveni rad

1. Grgas, Dijana; Širac, Tea; Prodan, Morena; Brozinčević, Andrijana; Landeka Dragičević, Tibela Denitrifikacija: Učinak omjera C/N // 16th Ružička days "Today science - tomorrow industry". Vukovar, 2017. str. 277-288
2. Omanović, Dario; Cukrov, Neven; Kwokal, Željko; Cuculić, Vlado; Cmuk, Petra; Mlakar, Marina; Pižeta, Ivanka; Špoljarić, Ivanak; Vurnek, Maja; Brozinčević, Andrijana Raspodjela tragova metala u vodi i sedimentu NP Plitvička jezera // Zbornik radova. Plitvička jezera: JU Plitvička jezera, 2011. str. 275-287
3. Vurnek, Maja; Brozinčević, Andrijana; Bušelić, Gordana; Zwicker Kompar, Gordana; Rubinić, Josip Intra-Annual Dynamics Of Water Quality Changes In Plitvice Lakes

Spring Zone // Balwois 2010. Skoplje: Institut de Recherche pour le Developpement - France ; Hydrometeorological Service of Republic of Macedonia ; Hydrobiological Institute of Ohrid, 2010. str. 463-463

Ostalo

1. Radišić, Maja; Rubinić, Josip; Brozinčević, Andrijana; Markić, Nikola; Klemar, Željka; Ružić, Igor Vodni sustav Plitvičkih jezera - recentni hidrološki međudnosi i utjecaji // Hrvatske vode u zaštiti okoliša i prirode. Zagreb: Hrvatske vode, 2019. str. 201-210

Prošireni sažetak izlaganja sa skupa

1. Miculinić, Kazimir; Brozinčević, Andrijana Nanos drvenih i drugih biljnih ostataka u Nacionalnom parku Plitvička jezera // Nanos u vodnim sustavima - stanje i trendovi (Knjiga sažetaka), Varaždin 2020. str. 285-288

Sažetak izlaganja sa skupa

1. Čačković, Andrea; Brozinčević, Andrijana; Orlić, Sandi Diversity and Seasonal Variation of Microbial Communities in Karst Stream Tufa Deposits // 17th Symposium on Aquatic Microbial Ecology SAME17 "From isolation to collaboration": Abstract Book / SAME17 Organizing Committee (ur.). Tartu, Estonija: University of Tartu Press, 2023. str. 74-74
2. Čačković, Andrea; Selak, Lorena; Kajan, Katarina; Marković, Tamara; Brozinčević, Andrijana; Pjevac, Petra; Orlić, Sandi Stability of the freshwater network ecosystem despite seasonal and downstream changes in environmental conditions and diversity of microbial communities // 7th Faculty of science PhD student symposium: Book of Abstracts. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2023. str. 87-87
3. Frangen, Tihomir; Terzi, Josip; Boljat, Ivana; Lukač Reberski, Jasmina; Meaški, Hrvoje; Biondić, Ranko; Miculinić, Kazimir; Markić, Nikola; Brozinčević, Andrijana; Martinčić, Marina Simultaneous Tracing Test with three Different Tracers in the Plitvice Lakes National Park, Croatia // 7. HGK - Knjiga sažetaka (Book of Abstracts) / Fio Firi, Karmen (ur.). Zagreb: Hrvatski geološki institut, 2023. str. 52-53
4. Čačković, Andrea; Kajan, Katarina; Mitrović, Maja; Selak, Lorena; Brozinčević, Andrijana; Orlić, Sandi Seasonal changes of microbial community in Plitvice Lakes //

6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = 6th Faculty of Science PhD student symposium: book of abstracts. Zagreb, 2022. str. 256-257
5. Čačković, Andrea; Kajan, Katarina; Mitrović, Maja; Selak, Lorena; Brozinčević, Andrijana; Orlić, Sandi Bacterial diversity of Plitvice Lakes catchment area during the summer season // FEMS Conference on Microbiology: Electronic abstract book. Beograd, 2022. str. 607-607
6. Stanić, Ivana; Selak, Lorena; Kajan, Katarina; Čačković, Andrea; Brozinčević, Andrijana; Orlić, Sandi Microbial community comparison of two lake systems in Croatia // 6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = 6th Faculty of Science PhD student symposium : book of abstracts. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022. str. 224-225
7. Buj, Ivana; Marčić, Zoran; Miculinić, Kazimir; Špoljarić, Ivanka; Brozinčević, Andrijana; Žalac, Sanja; Maruškić Kulaš, Margarita; Jakšić, Goran; Kuri, Krešimir; Petravić, Juraj Removal of invasive fish species from the Plitvice Lakes water system helps increasing viability of native fish species and restoring natural habitat conditions // Knjiga sažetaka (Book of abstracts). Zagreb: Hrvatsko ekološko društvo, 2021. str. 37-37
8. Frketić, Tea; Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja Annual variation in water quality parameters on Plitvica stream, Plitvice Lakes National Park // SEFS11 Abstract book. Zagreb, 2019. str. 463-463
9. Miculinić, Kazimir; Markić, Nikola; Žalac, Sanja; Brozinčević, Andrijana Hydrological and morphological changes caused by natural breaking of tufa barrier in National Park Plitvice Lakes // Man and Karst 2019 in Sicily. Ragusa: CIRS Ragusa, 2019. str. 46-46
10. Kapelj, Sanja; Brozinčević, Andrijana; Meaški, Hrvoje; Vurnek, Maja; Frketić, Tea; Dogančić, Dragana Transport of Carbonates along the Plitvice Lakes System // Knjiga sažetaka 6. hrvatski geološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem / Horvat, Marija; Matoš, Bojan ; Wacha, Lara (ur.). Zagreb: Hrvatski geološki institut, 2019. str. 98-98
11. Vurnek, Maja; Brozinčević, Andrijana; Matonićkin Kepčija, Renata; Frketić, Tea Analysis of long-term trends in water quality data of the Plitvice Lakes National Park // SEFS11 Abstract Book. Zagreb: Hrvatsko udruženje slatkovodnih ekologa (HUSEk), 2019. str. 416-416
12. Sironić, Andreja; Barešić, Jadranka; Horvatinčić, Nada; Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Kapelj, Sanja Changes of the geochemical parameters in water of the Plitvice Lakes over the past 30 years // 25. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera

- s međunarodnim sudjelovanjem; 3. simpozij Vladimir Prelog: knjiga sažetaka = 25th Croatian Meeting of Chemist and Chemical Engineers with international participation. 3rd symposium "Vladimir Prelog": Book of Abstracts. Poreč: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI); Hrvatsko kemijsko društvo, 2017. str. 241-241
13. Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Terlević, Martina; Vukić Lušić, Darija; Rubinić, Josip Međudodnos stanja kakvoće voda i hidroloških prilika – primjeri s Plitvičkih jezera // Upravljanje jezerima i akumulacijama u Hrvatskoj - procesi, zaštita i valorizacija. Zagreb: Hrvatsko društvo za zaštitu voda, 2017. str. 49-53
 14. Sironić, Andreja; Horvatinčić, Nada; Barešić, Jadranka; Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Krajcar Bronić, Ines C-isotope composition od freshwater submerged mosses as an indicator of carbon during photosynthesis // 5th regional meeting on Quaternary geology dedicated to geohazards: abstracts. Zagreb: Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti (HAZU), 2017. str. 64-64
 15. Grgas, Dijana; Pudić, Iva; Stipetić, Tena; Brozinčević, Andrijana; Ibrahimpašić, Jasmina; Toromanović, Merima; Landeka Dragičević, Tibela Denitrification with Different Carbon Sources: The Effect of Different C/N Ratios on Denitrification Rate // 8th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Book of Abstracts. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014. str. 35-35
 16. Gudelj, Ivana; Senta Marić, Ankica; Runko Luttenberger, Lidija; Brozinčević, Andrijana Potreba za održivost hrvatskog krškog okoliša // XVII Znanstveno-stručni skup "Voda i javna vodoopskrba". Zagreb: Hrvatski zavod za javno zdravstvo; Županijski zavodi za javno zdravstvo, 2013. str. 137-137
 17. Rubinić, Josip; Višković, Nataša; Radišić, Maja; Kajtezović, Najla; Bušelić, Gordana; Rubinić, Andrija; Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja Modeliranje značajki vodnih sustava u kršu – primjeri s hrvatskog krša // Međunarodni znanstveno-stručni skup "Čovjek i krš" : knjiga sažetaka. Sarajevo: Centar za krš i speleologiju, 2013. str. 36-38
 18. Pavlus, Natalija; Brozinčević, Andrijana; Stojanovska, Maja Water quality monitoring results for the Plitvice Lakes // Second International Conference on Waters in Protected Areas; Proceedings. Zagreb: Hrvatsko društvo za zaštitu voda, 2007. str. 222-225

Stručni rad

1. Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Rendulić, Željko Mogućnosti primjene GIS-a u zaštiti vodnih ekosustava NP Plitvička jezera // 6. Hrvatska konferencija o vodama; Hrvatske vode na investicijskom valu. Zagreb: Hrvatske vode, 2015. str. 343-351
2. Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Zwicker Kompar, Gordana; Bušelić, Gordana; Rubinić, Josip Changes in dynamics of fluctuation in water level of Kozjak and Prošćansko lakes and possible influences // 3rd International Conference; Waters in sensitive & protected areas. Zagreb: Hrvatsko društvo za zaštitu voda, 2013. str. 136-140
3. Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja Program monitoringa kvalitete voda Nacionalnog parka Plitvička jezera // Znanstveno-stručni skup Nacionalnog parka Plitvička jezera ; Zbornik radova. Plitvička jezera: Javna ustanova Nacionalni park Plitvička jezera, 2011. str. 310-315
4. Pavlus, Natalija; Brozinčević, Andrijana; Stojanovska Maja Praćenje biokemijskih parametara u vodama Plitvičkih jezera u 2006. godini // 4. Hrvatska konferencija o vodama s međunarodnim sudjelovanjem ; Hrvatske vode i Europska unija – izazovi i mogućnosti. Zagreb: Hrvatske vode, 2007. str. 779-786

Prilog sa skupa (u časopisu)

1. Sironić, Andreja; Barešić, Jadranka; Horvatinčić, Nada; Brozinčević, Andrijana; Vurnek, Maja; Kapelj, Sanja Influence of global temperature change in the geochemical processes in the Plitvice Lakes waters – a case study // Geophysical research abstracts, 2016, EGU2016-13259, 2

Prilog sa skupa (neobjavljen)

1. Čačković, Andrea; Selak, Lorena; Kajan, Katarina; Mitrović, Maja; Marković, Tamara; Brozinčević, Andrijana; Pjevac, Petra; Orlić, Sandi The spatial-seasonal differences of microbial communities in the freshwater network ecosystem // 18th International Symposium on Microbial Ecology (ISME18) Lausanne, Švicarska, 14.08.2022-19.08.2022