

# Učinak porasta koncentracije elektron akceptora na denitrifikaciju

---

Nikin, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:901614>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2024.

Lucija Nikin

**UČINAK PORASTA KONCENTRACIJE  
ELEKTRON AKCEPTORA NA  
DENITRIFIKACIJU**

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

## **ZAHVALA**

*Ovim putem zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Dijani Grgas na izdvojenom vremenu, pomoći i savjetima pri izradi i pisanju ovog diplomskog rada.*

*Također, hvala prijateljima koji su mi pružili podršku i bili tu za mene.*

*Za kraj se želim zahvaliti obitelji i dečku na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

UČINAK PORASTA KONCENTRACIJE ELEKTRON AKCEPTORA NA DENITRIFIKACIJU

Lucija Nikin, univ. bacc. ing. biotechn.

0058215467

**Sažetak:** U ovom radu istražena je denitrifikacija sintetske otpadne vode pri omjeru KPK/N 10 uz natrijev acetat kao izvor ugljika i početnim koncentracijama dušika od  $20 \pm 3$  mg N/L,  $40 \pm 3$  mg N/L i  $60 \pm 3$  mg N/L. Pokusi su provedeni s koncentracijom mikrobne biomase  $1,8 \pm 0,2$  g MLSS (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*, hrv. suspendirane čestice miješane tekućine)/L, dok su kao akceptori elektrona korišteni  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$ . Učinkovitost uklanjanja nitrata i nitrita iznosila je 100 % za sve početne koncentracije dušika. Omjer  $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{N}$  i učinkovitost uklanjanja KPK bili su neovisni o početnim koncentracijama dušika. Omjer  $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{N}$  za nitrata iznosio je 4,3-4,4, a za nitrite 3,1-3,3. Brzina denitrifikacije i brzina oksidacije KPK rastle su porastom početne koncentracije dušika te su obje brzine bile više kada je kao akceptor elektrona korišten  $\text{NO}_3\text{-N}$ , u odnosu na  $\text{NO}_2\text{-N}$  za 12-25 %, odnosno 34-46 %.

**Glavne riječi:** denitrifikacija, acetat, nitrat, nitrit

**Rad sadrži:** 45 stranica, 14 slika, 5 tablica, 78 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Dijana Grgas (mentor)
3. izv. prof. dr. sc. Antonija Trontel (član)
4. izv. prof. dr. sc. Marina Svetec Miklenić (zamjenski član)

**Datum obrane:** 19. prosinca 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

**Graduate university study programme:** Bioprocess Engineering

EFFECT OF INCREASE IN ELECTRON ACCEPTOR CONCENTRATION ON DENITRIFICATION

Lucija Nikin, univ. bacc. ing. biotechn.

0058215467

**Abstract:** In this paper the denitrification of synthetic wastewater at a COD/N ratio of 10 using sodium acetate as the carbon source and initial nitrogen concentrations of  $20 \pm 3$  mg N/L,  $40 \pm 3$  mg N/L and  $60 \pm 3$  mg N/L was investigated. The experiments were conducted with a microbial biomass concentration of  $1.8 \pm 0.2$  g MLSS/L, utilizing  $\text{NO}_2\text{-N}$  and  $\text{NO}_3\text{-N}$  as electron acceptors. The removal efficiency of nitrates and nitrites was 100 % for all initial nitrogen concentrations. The  $\Delta\text{COD}/\Delta\text{N}$  ratio and COD removal efficiency were independent of the initial nitrogen concentrations. The  $\Delta\text{COD}/\Delta\text{N}$  ratio for nitrates was 4.3-4.4, while for nitrites, it was 3.1-3.3. The denitrification rate and COD oxidation rate increased with the initial nitrogen concentration, and both rates were higher when  $\text{NO}_3\text{-N}$  was used as the electron acceptor compared to  $\text{NO}_2\text{-N}$  by 12-25 % and 34-46 %, respectively.

**Keywords:** denitrification, acetate, nitrate, nitrite

**Thesis contains:** 45 pages, 14 figures, 5 tables, 78 references

**Original in:** Croatian

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

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

**Reviewers:**

1. Tibela Landeka Dragičević, PhD, Full professor (president)
2. Dijana Grgas, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Antonija Trontel, PhD, Associate professor (member)
4. Marina Svetec Miklenić, PhD, Associate professor (substitute)

**Thesis defended:** December 19<sup>th</sup>, 2024

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. METABOLIZAM DUŠIKA.....	3
2.2. NITRIFIKACIJA I DENITRIFIKACIJA.....	4
2.3. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PROCES DENITRIFIKACIJE.....	7
2.3.1. Izvor ugljika za denitrifikaciju .....	7
2.3.2. pH vrijednost.....	9
2.3.3. Temperatura .....	11
2.3.4. Omjer KPK/N (C/N).....	11
2.3.5. Koncentracija otopljenog kisika.....	12
2.3.6. Hidrauličko vrijeme zadržavanja .....	12
2.3.7. Denitrificirajuće bakterije.....	13
2.4. NAKUPLJANJE MEĐUPRODUKATA DENITRIFIKACIJE .....	14
2.5. NOVE METODE BIOLOŠKE DENITRIFIKACIJE .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>18</b>
3.1. AKTIVNI MULJ AKLIMATIZIRAN NA NO <sub>3</sub> -N I NO <sub>2</sub> -N KAO AKCEPTORE ELEKTRONA 18	
3.2. SINTETSKA OTPADNA VODA .....	20
3.3. ORGANIZACIJA POKUSA DENITRIFIKACIJE.....	20
3.4. ANALITIČKE METODE .....	22
3.4.1. Određivanje MLSS.....	22
3.4.2. Određivanje kemijske potrošnje kisika (KPK).....	23
3.4.3. Određivanje koncentracije nitrata (NO <sub>3</sub> -N).....	24
3.4.4. Određivanje koncentracije nitrita (NO <sub>2</sub> -N) .....	25
3.4.5. Određivanje vrijednosti pH.....	25
3.4.6. Određivanje koncentracije otopljenog kisika .....	25
3.4.7. Određivanje temperature .....	26
3.4.8. Izračun slobodne nitritne kiseline (FNA).....	26
3.4.9. Mikroskopiranje aktivnog mulja .....	26
3.4.10. Određivanje volumena istaložene biomase.....	26
3.4.11. Određivanje indeksa mulja.....	27
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>28</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>37</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>38</b>



## 1. UVOD

Brzom industrijalizacijom i urbanizacijom došlo je do prekomjerne emisije dušika proizvodnjom industrijske, komunalne i poljoprivredne otpadne vode, izgaranjem fosilnih goriva i biomase i upotrebom dušičnih gnojiva (Holmes i sur., 2018). Onečišćenje dušikom globalni je problem koji pridonosi ekološkim problemima poput eutrofikacije i povećanja populacije fitoplanktona, neugodnih mirisa i smanjenja kvalitete površinskih i podzemnih voda (Huang i sur., 2023; Dyagelev i sur., 2019).

Prisutnost nitrata ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) u pitkoj vodi negativno utječe na ljudsko zdravlje. Visoke koncentracije nitrata u pitkoj vodi pri konzumaciji u dojenčadi povećavaju rizik od methemoglobinemije te mogu dovesti do probavnih i respiratornih zatajenja. Također, nitrata unesene vodom ljudsko tijelo može pretvoriti u kancerogene N-nitroso-spojeve (Holmes i sur., 2018). Prema Direktivi o kvaliteti vode namijenjene za ljudsku potrošnju i Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji koncentracija nitrata u pitkoj vodi ne smije premašiti koncentraciju od 50 mg  $\text{NO}_3\text{/L}$  (Ward i sur., 2018). U mnogim područjima koncentracije nitrata u podzemnim i površinskim vodama daleko su iznad granica utvrđenih propisima o pitkoj vodi, a glavni uzrok je prekomjerna uporaba dušičnih gnojiva u poljoprivredi jer se višak dušika koji biljke ne apsorbiraju ispire u podzemne vode u obliku nitrata (Ortmeyer i sur., 2023).

Vodonosnici imaju prirodni kapacitet za razgradnju nitrata zbog svog sastava koji uključuje sulfidne minerale i organski ugljik. Taj kapacitet razgradnje nitrata je ograničen i s vremenom opada zbog čega se očekuje dodatni porast koncentracije nitrata i njegov proboj u izvore pitke vode, a zbog klimatskih promjena očekuje se dodatno smanjenje kvalitete i kvantitete različitih izvora vode (Ortmeyer i sur., 2021).

Uklanjanje dušika jedan je od glavnih zadataka tijekom obrade vode. Metode obrade otpadne vode obuhvaćaju fizikalno-kemijske i biološke metode. U fizikalno-kemijske metode ubrajaju se ionska izmjena, adsorpcija, kemijsko taloženje i redoks reakcije, međutim ove metode imaju nedostatke kao što su dugo vrijeme obrade, potreba za velikim površinama zemljišta, velika potrošnja energije te visoki operativni i investicijski troškovi. Nasuprot tome, ekološki prihvatljivija metoda je biološka denitrifikacija čije je vrijeme obrade kraće, troškovi održavanja i operacijski troškovi su manji, a učinkovitost denitrifikacije je veća (Huang i sur., 2023).

Za uklanjanje dušika iz otpadne vode konvencionalnim putem se najčešće koristi proces s aktivnim muljem. Biološko uklanjanje dušika iz otpadne vode provodi se procesima nitrifikacije i denitrifikacije, primjenom specifičnih skupina mikroorganizama koji sudjeluju u kruženju dušika u prirodi i konverziji amonijaka ( $\text{NH}_4\text{-N}$ ) iz otpadne vode u plinoviti dušik ( $\text{N}_2$ ). Nitrifikacija je aeroban autotrofan proces, a denitrifikacija heterotrofan anoksičan proces. Na proces

denitrifikacije utječu čimbenici poput izvora ugljika, pH vrijednosti, temperature, omjera C/N (ugljik/dušik) i koncentracije otopljenog kisika (engl. *Dissolved Oxygen*, DO). Podešavanjem čimbenika procesa može se utjecati na sastav i aktivnost mikroorganizama aktivnog mulja, aktivnost enzima odgovornih za ciljane biološke procese, učinkovitost i brzinu procesa (Fu i sur., 2022; Lee i sur., 2018). Denitrifikacija ima važnu ulogu u uklanjanju fiksiranog dušika iz ekosustava vraćajući ga u atmosferu u obliku plinovitog dušika (Holmes i sur., 2018). Prilikom istraživanja u segmentu biološke obrade otpadne vode vodi se računa o učinkovitosti obrade otpadne vode i o cijeni vođenja i održavanja procesa.

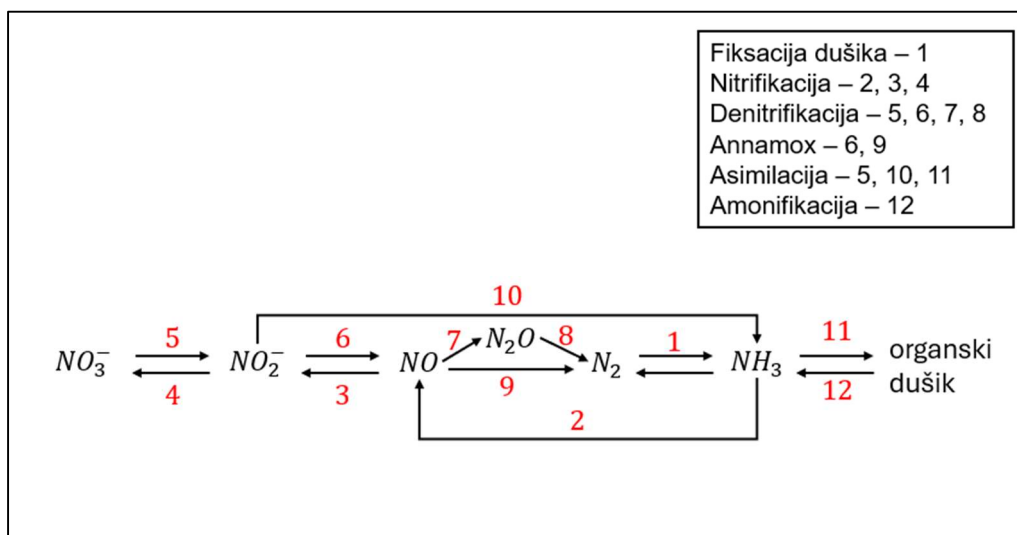
Cilj ovog rada bio je istražiti kako povećanje koncentracije elektron akceptora, nitrata i nitrita ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) utječe na denitrifikaciju, s acetatom kao izvorom ugljika i s mikrobnom kulturom aktivnog mulja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. METABOLIZAM DUŠIKA

Dušik je bitna komponenta strukture proteina i nukleinskih kiselina svih živih stanica, koju organizmi mogu koristiti samo kada se nalazi u reaktivnom obliku. Molekularni dušik je inertan plin koji čini 78 % zraka u atmosferi, a koji većina organizama ne može iskoristiti. Prevođenjem dušika u reaktivne oblike dušika poput amonijaka, nitrata i nitrita omogućava se korištenje dušika organizmima. Fiksacija dušika može biti biološka, mikrobna, ne-biološka te uzrokovana antropogenim izvorima. Biološku fiksaciju dušika provode određene skupine bakterija i arheja koje imaju enzimske puteve za pretvorbu elementarnog dušika do amonijaka. Ne-biološki načini fiksacije dušika su izgaranje, spaljivanje biomase i udari munje, dok su antropogeni izvori fiksacije dušika proizvodnja dušičnih gnojiva, izgaranje goriva u automobilima, spaljivanje drvene biomase ili krčenje šuma i travnjaka za potrebe poljoprivrede (Holmes i sur., 2018).

Dušik se u prirodi može uključiti u šest različitih procesa, koji kontroliraju pretvorbu dušika iz organskog u anorganski oblik i obrnuto i dio su biogeokemijskog ciklusa kruženja dušika prikazanog na slici 1. Šest procesa metabolizma dušika su: fiksacija dušika ( $N_2 \rightarrow NH_3$ ), nitrifikacija ( $NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ ), denitrifikacija ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ ), anaerobna oksidacija amonijaka (engl. *Anaerobic Ammonium Oxidation, Anammox*) ( $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2$ ), asimilacija ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_3$ ) i amonifikacija (*organski dušik*  $\rightarrow NH_3$ ) (Kuypers i sur., 2018).



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

Proces disimilacijske redukcije nitrata u amonijak ( $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+$  (Holmes i sur., 2018)) nije uključen u glavni proces pretvorbe dušika zbog manje zastupljenosti u odnosu na ostalih šest procesa pretvorbe dušika (Kuypers i sur., 2018). Disimilacijska redukcija nitrata

obično se javlja pri niskim koncentracijama kisika, u anoksičnim uvjetima, kao zamjena za aerobnu respiraciju pri čemu dolazi do kompeticije za raspoloživ nitrat između amonificirajućih i denitrificirajućih bakterija (Srinandan i sur., 2012). U uvjetima visokih omjera C/N, visokih koncentracija sulfida, niskih koncentracija željeza i visokih temperatura, disimilacijska redukcija nitrata u amonijak prevladava denitrifikaciju te umjesto redukcije nitrata do elementarnog dušika, dolazi do redukcije nitrata do amonijaka (Holmes i sur., 2018).

## 2.2. NITRIFIKACIJA I DENITRIFIKACIJA

Proces uklanjanja dušika iz otpadne vode biološkim putem provodi se kombinacijom procesa nitrifikacije i denitrifikacije (Dyagelev i sur., 2019). Ukoliko se procesi nitrifikacije i denitrifikacije učinkovito provode moguće je postići kvalitetu obrađene vode koja vrijednostima za organske sastojke i sastojke s dušikom zadovoljava za ispušt u površinske vode, odnosno u sustav javne odvodnje. Maksimalne dopuštene koncentracije organskih sastojaka izraženih kao kemijska potrošnja kisika (KPK), biokemijska potrošnja kisika (BPK), ukupnog organskog ugljika, vrijednosti ukupnog dušika, NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N, temperature i vrijednosti pH su pokazane u tablici 1 (NN 26/2020).

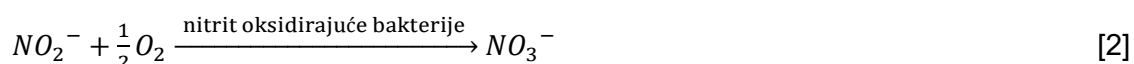
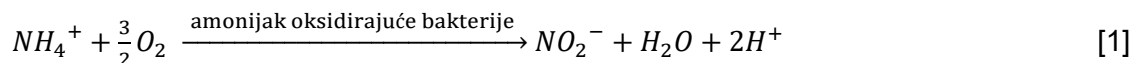
**Tablica 1.** Granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama za neke odabrane pokazatelje (NN 26/2020)

Pokazatelji	Zabrana ispuštanja u podzemne vode	Izraženi kao	Jedinica	Površinske vode	Sustav javne odvodnje
<b>FIKIZALNO-KEMIJSKI POKAZATELJI</b>					
pH-vrijednost				6,5-9,0	6,5-9,5
Temperatura			°C	30	40
<b>ORGANSKI POKAZATELJI</b>					
BPK <sub>5</sub>		O <sub>2</sub>	mg/L	25	sukladno čl. 5. ovog Pravilnika
KPK <sub>Cr</sub>		O <sub>2</sub>	mg/L	125	sukladno čl. 5. ovog Pravilnika
Ukupni organski ugljik (TOC)		C	mg/L	30	-
<b>ANORGANSKI POKAZATELJI</b>					
Ukupni dušik		N	mg/L	15	sukladno čl. 5. ovog Pravilnika
Amonij		N	mg/L	10	-

**Tablica 1.** Granične vrijednosti emisija onečišćujućih tvari u otpadnim vodama za neke odabrane pokazatelje (NN 26/2020) - nastavak

Nitriti		N	mg/L	1	10
Nitrati		N	mg/L	2	-

Nitrifikacija je aerobni proces oksidacije amonijaka do nitrita (reakcija nitritacije) koji se zatim oksidira do nitrata (reakcija nitratacije), pri čemu kao akceptor elektrona u oba koraka služi kisik (jednadžbe 1 i 2) (Dyagelev i sur., 2019).

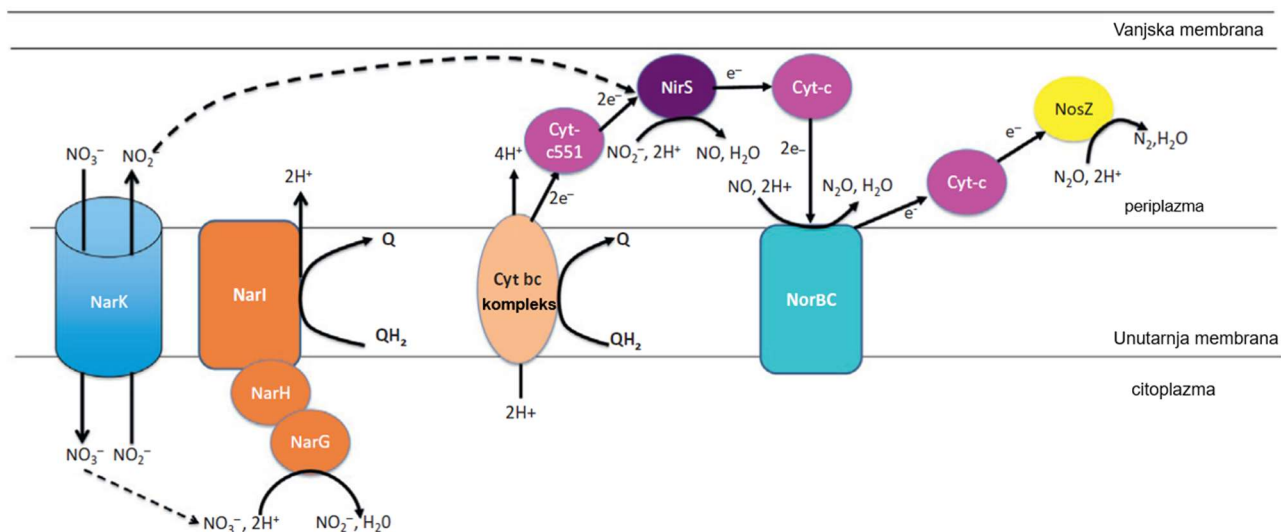
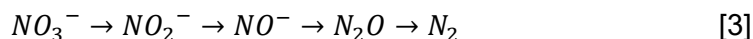


Reakciju oksidacije amonijaka do nitrita provode amonijak oksidirajuće bakterije (AOB), dok oksidaciju nitrita do nitrata provode nitrit oksidirajuće bakterije (NOB) (Huang i sur., 2023; Ruiz i sur., 2003). Amonijak oksidirajuće bakterije mogu biti autotrofne ili heterotrofne, a osim amonijak i nitrit oksidirajućih bakterija, u procesu nitrifikacije otpadne vode mogu sudjelovati amonijak oksidirajuće arheje, anaerobne amonijak oksidirajuće bakterije i bakterije koje u potpunosti oksidiraju amonijak do nitrata (engl. *Complete Ammonia Oxidizers, Commamox*) (Holmes i sur., 2018). Anaerobne amonijak oksidirajuće bakterije oksidiraju amonijak do elementarnog dušika pritom koristeći nitrit kao akceptor elektrona ( $NO_2^- + NH_4^+ \rightarrow N_2 + 2H_2O$ ) (Holmes i sur., 2018). Primjeri autotrofnih amonijak oksidirajućih bakterija (Guo i sur., 2013) i kemolitoautotrofnih nitrit oksidirajućih baterija (Daims i sur., 2016) su prikazani u tablici 2.

**Tablica 2.** Amonijak oksidirajuće bakterije i nitrit oksidirajuće baterije

Amonijak oksidirajuće bakterije	Nitrit oksidirajuće baterije
<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrospira</i>
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospina</i>
<i>Nitrosococcus</i>	<i>Nitrococcus</i>
<i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrobacter</i>
<i>Nitrosovibrio</i>	<i>Nitrotoga</i>
	<i>Nitrolancea</i>
	<i>Candidatus Nitromaritima</i>

Denitrifikacija je proces redukcije nitrata do plinovitog elementarnog dušika preko niza reakcija (jednadžba 3, slika 2) (Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002).



**Slika 2.** Denitrifikacijski put koji koristi *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (prema Holmes i sur., 2018; Moreno-Vivián i sur., 1999)

NarK – transporter nitrata; NarGHI – nitrat reduktaza; NirS – nitrit reduktaza; Cyt-c551 – citokrom c-551 protein; Cyt-c – citokrom c; Cyt bc kompleks – citokrom bc kompleks; NorBC - dušikov monoksid reduktaza; NosZ - didušikov oksid reduktaza

Nitrat se reducira u nitrit (reakcija denitratacije), zatim se nitrit reducira do dušikovog (II) oksida (NO) (reakcija denitritacije), dušikovog (I) oksida (N<sub>2</sub>O) te na kraju elementarni dušik pri čemu tijekom svake od reakcija dolazi do potrošnje KPK (Ruiz i sur., 2003). Ovaj proces odvija se u anoksičnim uvjetima uz pomoć denitrificirajućih bakterija pri čemu je donor elektrona izvor ugljika (KPK), a nitrat i nitrit su akceptori elektrona umjesto kisika (Dyagelev i sur., 2019).

Enzimi koji sudjeluju u denitrifikaciji (tablica 3) su nitrat reduktaza (engl. *Nitrate Reductase*, *Nar*) za koju kodiraju *nas*, *nar* ili *nap* geni, nitrit reduktaza (engl. *Nitrite Reductase*, *Nir*) za koju kodira *nir* gen, dušikov monoksid reduktaza (engl. *Nitric Oxide Reductase*, *Nor*) za koju kodira *nor* gen i didušikov oksid reduktaza (engl. *Nitrous Oxide Reductase*, *Nos* ili *N2OR*) za čiju Z podjedinicu kodira *nosZ* gen (Wang i sur., 2021).

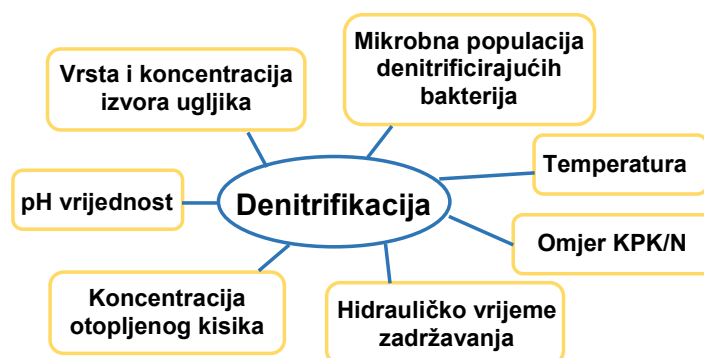
**Tablica 3.** Koraci, enzimi i geni u procesu denitrifikacije

Korak denitrifikacije	Enzim	Gen
$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	nitrat reduktaza Nar	<i>nas, nar</i> ili <i>nap</i>
$NO_2^- \rightarrow NO^-$	nitrit reduktaza, Nir	<i>nir</i>
$NO^- \rightarrow N_2O$	dušikov monoksid reduktaza, Nor	<i>nor</i>
$N_2O \rightarrow N_2$	didušikov oksid reduktaza, Nos ili N2OR	<i>nosZ</i>

Iz jednadžbi 1 i 2 je vidljivo da je za potpunu oksidaciju 1 mola amonijaka do nitrata potrebno 2 mola kisika. Zbog ove visoke potrebe za kisikom, aeracija je jedan od glavnih troškova procesa nitrifikacije. Potrošnja kisika može se smanjiti provedbom parcijalne nitrifikacije do nitrita (jednadžba 1) i postdenitrifikacijom pri čemu se preskaču reakcije nitratacije i denitratacije te se smanjuje i potrošnja KPK (Ruiz i sur., 2003).

### 2.3. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA PROCES DENITRIFIKACIJE

Na uspješnost procesa denitrifikacije, brzinu denitrifikacije, uklanjanje nitrata i nakupljanje međuprodukata utječu mnogi čimbenici (Wang i sur., 2021), koje je potrebno optimirati u svrhu što veće učinkovitosti. Čimbenici koji utječu na proces denitrifikacije su prikazani su na slici 3 (Fu i sur., 2022; Wang i sur., 2021; Lee i sur., 2018):



**Slika 3.** Čimbenici koji utječu na denitrifikaciju (prema Fu i sur., 2022; Wang i sur., 2021; Lee i sur., 2018)

#### 2.3.1. Izvor ugljika za denitrifikaciju

Kako bi proces biološke denitrifikacije neometano tekao potreban je izvor ugljika kao donor elektrona. Izvori ugljika mogu biti biorazgradivi organski spojevi koji se nalaze u otpadnoj vodi, unutarstanične zalihe ugljika i vanjski, odnosno egzogeni izvori ugljika (Cherchi i sur., 2009).

Kada je KPK otpadne vode nizak potrebno je dodati egzogeni izvor ugljika, donor elektrona, kako bi se bi se nitrati/nitriti mogli reducirati do molekularnog dušika. Izbor egzogenog izvora ugljika bitan je za denitrifikaciju i utječe na brzinu denitrifikacije, proizvodnju i nakupljanje međuprodukata denitrifikacije, proizvodnju aktivnog mulja i kvalitetu efluenta (Wang i sur., 2021; Cherchi i sur., 2009).

Egzogeni izvori ugljika dijele se na (Wang i sur., 2021):

- Izvore ugljika u tekućoj fazi
  - ✓ Komercijalni izvori ugljika – metanol, etanol, acetat, octena kiselina
  - ✓ Nusprodukti fermentacije otpadne tekućine bogati ugljikom
- Izvore ugljika u čvrstoj fazi
  - ✓ Biorazgradivi polimerni izvor ugljika
    - Sintetizirani iz biomase - proteini, polisaharidi i polilaktačna kiselina
    - Petrokemijski proizvodi - polikaprolakton, poliglikolna kiselina i polibuten
    - Dobiveni mikrobnom fermentacijom – polihidroksialkanoati (*PHA*) poput primjerice polihidroksibutirata
  - ✓ Izvori 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 drvni biljni otpad

Organski izvori ugljika koji se tradicionalno primjenjuju za heterotrofnu denitrifikaciju su jednostavni spojevi poput acetata, etanola, metanola i glukoze. Ove niskomolekularne organske spojeve bakterije mogu lako iskoristiti i pridobiti elektrone potrebne za denitrifikaciju zbog čega se postiže visoka učinkovitost redukcije nitrata. Acetat se lako može konvertirati u acetil Co-A koji onda ulazi u citratni ciklus i elektroni otpušteni tijekom oksido-redukcijskih reakcija mogu se iskoristiti za denitrifikaciju (Lee i sur., 2018). Lee i sur. (2018) istražili su utjecaj 6 različitih izvora ugljika na proces denitrifikacije, funkcionalne denitrificirajuće gene i emisiju  $N_2O$  koji nastaje tijekom denitrifikacije. Koristili su izvore ugljika: acetat, propionat, glukoza, glicerol, etanol i metanol. Potpuna denitrifikacija nitrata do plinovitog elementarnog dušika dogodila se samo pri korištenju etanola i metanola kao izvora ugljika, pri čemu nisu detektirani međuprodukti  $NO_2^-$ -N i  $N_2O$ -N. Učinkovitost uklanjanja nitrata kod preostalih izvora ugljika bila je najbolja prilikom korištenja glicerola, zatim propionata, acetata i najmanja učinkovitost bila je kod upotrebe glukoze. Štetni  $N_2O$ -N proizveden je samo prilikom korištenja glicerola kao izvora



ugljika. Metanol se pokazao kao najučinkovitiji izvor ugljika za denitrifikaciju zbog potencijalne prisutnosti metilotrofni denitrificirajućih bakterija u inokulumu koje koriste spojeve s jednim ugljikom kao izvor supstrata (Lee i sur., 2018).

Ortmeyer i sur. (2021) usporedili su utjecaj četiri izvora ugljika (acetat, glukoza, askorbinska kiselina i etanol) na proces denitrifikacije. Najučinkovitiji izvor ugljika bio je etanol pri 10 °C te je redukcija nitrata bila viša nego pri sobnoj temperaturi (21,5 °C). Brzine denitrifikacije pri upotrebi glukoze bile su puno više pri sobnoj temperaturi, nego pri 10 °C, što je bio slučaj i za acetat. Primjena askorbinske kiseline dovela je do nakupljanja biomase i čepjenja što je povezano s niskim brzinama reakcija i neučinkovitom denitrifikacijom, što se nije dogodilo kod primjene etanola. Iz tih razloga askorbinska kiselina nije pogodna za obradu voda s visokim koncentracijama nitrata (Ortmeyer i sur., 2021).

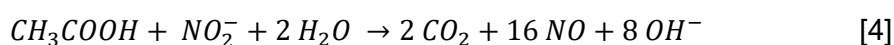
Kemijske karakteristike izvora ugljika povezane su s načinom na koji ga denitrificirajući mikroorganizmi koriste, što može utjecati na brzinu denitrifikacije (Xu i sur., 2018). Xu i sur. (2018) istražili su utjecaj glukoze, natrijevog acetata i PHBV/PLA (poli-(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat)/poli-laktat) polimera na proces denitrifikacije. Brzine denitrifikacije bile su više kod glukoze i natrijevog acetata, u odnosu na polimer. Acetat se lako uključuje u reakcije metabolizma mikroorganizama, kao i glukoza, dok je PHBV/PLA polimer, zbog velike molekulske mase, potrebno razgraditi na jednostavnije spojeve što usporava brzinu denitrifikacije. Visoko-molekularni spojevi poput biorazgradivih polimera prvo se moraju razgraditi do nisko-molekularnih spojeva, oligomera, dimera i monomera kako bi se mogli asimilirati i koristiti kao izvor energije, za rast stanica te za primarne i sekundarne metabolite (Wang i sur., 2021). Primjenom glukoze došlo je do povećane proizvodnje amonijaka što utječe na kvalitetu efluenta. Prisutnost glukoze potiče rast bakterija koje sadrže enzime za provođenje disimilacijske redukcije nitrata do amonijaka zbog čega se koncentracija amonijaka u efluentu povećava (Xu i sur., 2018). U istraživanju Srinandan i sur. (2012) također je došlo do nakupljanja amonijaka kada je kao izvor ugljika korištena glukoza, a došlo je i do nakupljanja nitrita zbog rasta nitrat amonificirajućih bakterija.

Mnoga istraživanja pokazala su da je primjena acetata kao izvora ugljika u različitim sustavima za obradu otpadnih voda rezultirala višom brzinom denitrifikacije i boljom učinkovitošću uklanjanja dušikovih spojeva (NO<sub>x</sub>-N) u odnosu na druge korištene izvore ugljika (metanol, etanol, glukoza) (Sun i sur., 2016; Srinandan i sur., 2012; Cherchi i sur., 2009).

### 2.3.2. pH vrijednost

Vrijednost pH znatno utječe na preživljavanje bakterija i denitrifikaciju. Tijekom denitrifikacije, u reakciji redukcije nitrita do dušikovog monoksida, nastaju OH<sup>-</sup> ioni koji utječu na pH vrijednost miješane tekućine ako sustav nije puferiran (reakcija 4). Vrijednost pH utječe

na aktivnost svih enzima pa tako i na četiri denitrificirajuće reduktaze (slika 2, tablica 3) koje sudjeluju u denitrifikaciji te može doći do neravnoteže redukcijske kinetike između reduktaza. Alkalna pH vrijednost inhibira nitrit reduktazu što dovodi do nakupljanja nitrita. Inhibicija redukcije nitrita jedan je od načina kako bakterije izbjegavaju daljnji porast pH vrijednosti. Za većinu denitrificirajućih bakterija optimalna pH vrijednost nalazi se u rasponu od 7,5 do 9,5, a odstupanje pH vrijednosti od tog raspona rezultira usporavanjem denitrifikacijske aktivnosti i nakupljanjem nitrita. Osim jako kiselih ili lužnatih uvjeta, na bakterijsku aktivnost i aktivnost enzima utječe prisutnost slobodne nitritne kiseline ( $\text{HNO}_2$ ) (engl. *Free Nitrous Acid, FNA*) (Albina i sur., 2019). Slobodna nitritna kiselina je protonirani oblik nitrita (Zhao i sur., 2015), citotoksična je i lako prolazi kroz bakterijske membrane (Hartop i sur., 2017).



Tijekom heterotrofne denitrifikacije pH vrijednost opada, zatim raste te se na kraju procesa stabilizira. Do fluktuacije pH dolazi zbog razgradnje izvora ugljika do organskih kiselina, u početnoj fazi procesa, koje denitrificirajuće bakterije naknadno koriste za redukciju nitrata, pri čemu se stvara lužnato područje, te se na kraju postiže stabilno stanje. Ukoliko se kao izvor ugljika u denitrifikaciji koristi niskomolekularan i jednostavan spoj poput acetata, izostaje korak razgradnje organskih sastojaka pa tako i pad pH vrijednosti, a acetat izravno ulazi u proces denitrifikacije i odmah je vidljiv porast vrijednosti pH (Xu i sur., 2019).

Saleh-Lakha i sur. (2009) proučavali su utjecaj pH vrijednosti na denitrifikaciju kod bakterije *Pseudomonas mandelii*. Pri pH vrijednosti 5 denitrifikacijska aktivnost bila je zanemariva zbog niske ekspresije denitrifikacijskih gena, dok je ekspresija gena pri pH vrijednostima 6, 7 i 8 bila konstantna i nije se mijenjala povećanjem pH, ali je aktivnost enzima varirala. Brzina denitrifikacije je bila najbolja pri pH 7 i 8, nakupljanje nitrita bilo je smanjeno. Smanjenje ili povećanje pH vrijednosti izvan optimalnog raspona rezultiralo je smanjenom brzinom denitrifikacije i nakupljanjem međuprodukata denitrifikacije (Saleh-Lakha i sur., 2009).

Glass i Silverstein (1998) također su uočili da pri nižim pH vrijednostima (6,5 i 7,0) dolazi do značajne inhibicije denitrifikacije te su vrijednosti brzine redukcije nitrata i nitrita beznačajne što je povezano s toksičnošću nitrita pri gotovo neutralnom pH. S druge strane, pri višim pH vrijednostima (7,5, 8,5 i 9,0) nije došlo do inhibicije denitrifikacije, ali je došlo do nakupljanja nitrita zbog kompeticije za elektrone između nitrat i nitrit reduktaze koja je izraženija pri višim pH vrijednostima. Redukcija nitrita učinkovitija je nakon potpune potrošnje nitrata jer nema više kompeticije za elektrone (Glass i Silverstein, 1998).

### 2.3.3. Temperatura

Optimalna temperatura za provođenje procesa denitrifikacije je u rasponu od 20 °C do 30 °C (Lu i sur., 2014). Povećanjem temperature dolazi do povećanja brzine denitrifikacije. Pri nižim temperaturama (15 °C) brzina i učinkovitost redukcije nitrata su niže, dok optimalna temperatura (25-35 °C) poboljšava redukciju nitrata, ali također dovodi do povećanja nakupljanja nitrita i didušikovog oksida (Lee i sur., 2018).

Saleh-Lakha i sur. (2009) proučavali su utjecaj temperature na denitrifikaciju kod bakterije *Pseudomonas mandelii*. Pri temperaturi od 10 °C ekspresija denitrificirajućih gena bila je usporena rezultirajući usporenom redukcijom nitrata i nakupljanjem nitrita. Pri višoj temperaturi, 20 °C i 30 °C, enzimska aktivnost bila je veća što je dovelo do bržeg iskorištenja nitrata i više brzine denitrifikacije. Niže temperature rezultirale su nižim brzinama enzimskih reakcija što je utjecalo na brzinu rasta i metabolizam bakterija (Saleh-Lakha i sur., 2009).

Optimalna temperatura razlikuje se ovisno o izvoru ugljika i ovisi o sastavu bakterijske zajednice koja katalizira biološku denitrifikaciju, a čiji sastav ovisi o odabranom izvoru ugljika (Ortmeyer i sur., 2023; Ortmeyer i sur., 2021).

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

Omjer C/N definiran je omjerom mase dostupnog izvora ugljika i mase dušikovih spojeva koji se reduciraju te je za potpunu denitrifikaciju potrebno osigurati odgovarajuću količinu izvora ugljika kao donora elektrona (Krishna Mohan i sur., 2016). Kako bi se rast i metabolizam mikroorganizama nesmetano odvijao bitni su ugljik i dušik pri čemu ugljik služi kao građevna jedinica i izvor energije, dok dušik sudjeluje u sintezi aminokiselina, proteina i nukleinskih kiselina (Xi i sur., 2022). Prekomjerna količina izvora ugljika uzrokuje gubitak skupih izvora elektrona i sekundarno onečišćenje, odnosno povećanje KPK u efluentu, dok nedovoljna količina donora elektrona uzrokuje nepotpunu denitrifikaciju i nakupljanje međuprodukata denitrifikacije (Wang i sur., 2021; Krishna Mohan i sur., 2016).

Chen i sur. (2023) zamijetili su kako visoki KPK/NO<sub>3</sub>-N omjer (4, 5, 6) (prekomjerna koncentracija izvora ugljika) potiče rast potpunih denitrifikanata smanjujući nakupljanje nitrita i povećavajući emisiju N<sub>2</sub>O. S druge strane, niski KPK/NO<sub>3</sub>-N omjer (1, 2 i 3) rezultirao je niskom učinkovitošću denitrifikacije (54,45 %) i povećanom koncentracijom nitrata u efluentu (do 200 mg NO<sub>3</sub>-N/L) zbog nedostatne koncentracije izvora ugljika. Lee i sur. (2018) su pokazali da pri C/N omjeru 0, nije došlo do redukcije nitrata zbog nedostatka donora elektrona, pri C/N omjerima 1,28 i 2,57 došlo je do nakupljanja N<sub>2</sub>O zbog ograničene opskrbe elektronima te je pri C/N omjerima 5,14 i 12,85 došlo do potpune denitrifikacije. Za promatranje utjecaja C/N omjera, kao izvor ugljika korišten je natrijev acetat. Pri C/N omjerima nižim od 2,5 može doći

do nakupljanja nitrita ili  $N_2O$  tijekom denitrifikacije zbog kompeticije za elektrone između reakcija redukcije nitrata i nitrita (Lee i sur., 2018).

### 2.3.5. Koncentracija otopljenog kisika

Koncentracija otopljenog kisika bitan je čimbenik u procesu denitrifikacije jer prisutnost kisika inhibira reakcije denitrifikacije. Bakterije koje provode denitrifikaciju također mogu provoditi aerobnu respiraciju te radije koriste kisik kada je dostupan. Aerobna respiracija je učinkovitija te će ju zbog toga bakterije preferirati u donosu na denitrifikaciju (Dyagelev i sur., 2019; Zhang i Zhang, 2018)

Jedan od glavnih problema procesa denitrifikacije na uređajima za biološku obradu otpadnih voda je osiguravanje striktno anoksičnih uvjeta (potpuno odsustvo otopljenog kisika) u zoni denitrifikacije. Otopljeni kisik najčešće ulazi u anoksičnu zonu recikliranjem aktivnog mulja te će dio organskih spojeva koji ulaze u anoksičnu zonu biti oksidirani otopljenim kisikom, a najprije će se oksidirati lako oksidirajuće tvari (Dyagelev i sur., 2019).

Uklanjanje kisika predtretmanima predstavlja dodatan trošak. Zhang i Zhang (2018), u pokušaju nalaska rješenja za problem dodatnih troškova, istražili su utjecaj biorazgradive plastike kao izvora ugljika pri anoksičnim uvjetima i uvjetima niske koncentracije kisika na proces denitrifikacije i otkrili da su navedeni uvjeti kisika povoljni za denitrifikaciju te da niska koncentracija otopljenog kisika nije limitirala proces denitrifikacije. Iako je tijekom eksperimenata došlo do naglog nakupljanja nitrita, do kraja eksperimenta njihova koncentracija se u potpunosti smanjila te nisu detektirani po završetku eksperimenta. Zhang i Zhang (2018) također su zaključili kako bi se predobrada otpadne vode mogla izbjeći uporabom biorazgradive plastike kao izvora ugljika te kako bi se time smanjili troškovi predobrade.

### 2.3.6. Hidrauličko vrijeme zadržavanja

Hidrauličko vrijeme zadržavanja (engl. *Hydraulic Retention Time, HRT*) je potrebno vrijeme kontakta između biomase (denitrificirajućih bakterija) i supstrata (nitrata) prisutnog u otpadnoj vodi (Guo i sur., 2017). HRT izravno je povezan s učinkovitošću uklanjanja nitrata zbog čega je potrebno odrediti odgovarajuću HRT vrijednost. Smanjenje HRT do određene vrijednosti dovodi do povećanja koncentracije nitrata i nitrita u efluentu zbog nepotpune redukcije. Suprotno tome, 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 (Fu i sur., 2022; Guo i sur., 2017).

### 2.3.7. Denitrificirajuće bakterije

Razni mikroorganizmi sposobni su provoditi heterotrofnu denitrifikaciju, a to su bakterije (Devol, 2015), arheje (Zumft, 1997) i protisti (Risgaard-Petersen i sur., 2006), ali redukciju nitrata primarno provode bakterije (Lu i sur., 2014). Denitrificirajuće bakterije su heterotrofni fakultativni anaerobi koje preferiraju aerobnu respiraciju, ali u uvjetima smanjene koncentracije otopljenog kisika ili potpune odsutnosti kisika i u prisutnosti organskog supstrata provode proces denitrifikacije te je u tom slučaju kisik inhibitor procesa denitrifikacije (Ortmeyer i sur., 2021; Dyagelev i sur., 2019). 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 (slika 2, tablica 3) te ne može doći do redukcije nitrita do NO, NO do N<sub>2</sub>O, ni N<sub>2</sub>O do N<sub>2</sub>. Tijekom procesa uklanjanja dušika iz otpadne vode potpuna denitrifikacija provodi se suradnjom različitih denitrificirajućih bakterija prisutnih u mikrobnj kulturi aktivnog mulja (Han i sur., 2020; Holmes i sur., 2018). Podjela denitrificirajućih bakterija je prikazana u tablici 4 (Chen i sur., 2023; Drysdale i sur., 2001).

**Tablica 4.** Podjela denitrificirajućih bakterija (Chen i sur., 2023; Drysdale i sur., 2001)

Vrsta denitrificirajućih bakterija	Korak denitrifikacije koji provode
Potpuni denitrifikanti	bakterije koje reduciraju NO <sub>3</sub> -N i NO <sub>2</sub> -N do N <sub>2</sub>
Nepotpuni denitrifikanti	bakterije koje mogu samo reducirati NO <sub>3</sub> -N do NO <sub>2</sub> -N
Nepotpuni nitrit reducirajući denitrifikanti	bakterije koje mogu reducirati NO <sub>3</sub> -N do NO <sub>2</sub> -N, ali reakcija je inhibirana supstratom (NO <sub>3</sub> -N)
Isključivi nitrit reducirajući denitrifikanti	bakterije koje mogu reducirati samo NO <sub>2</sub> -N
Nedenitrifikanti	bakterije koje ne mogu reducirati ni NO <sub>3</sub> -N ni NO <sub>2</sub> -N

Identifikacija i analiza različitih populacija denitrificirajućih bakterija pomažu u shvaćanju strukture mikrobne zajednice, funkcionalnih gena i prilagodljivosti zajednice okolišu u kojem se nalazi. Molekularna metoda genskog sekvencioniranja koristi se za taksonomsku identifikaciju i proučavanje filogenetske strukture zajednica denitrificirajućih bakterija pri čemu se kao filogenetički i funkcionalni biomarkeri koriste 16S rRNA geni ili geni koji kodiraju za denitrifikacijske reduktaze. Neke od molekularnih metoda koje se također koriste za analizu strukture mikrobne zajednice i njenog denitrificirajućeg potencijala su denaturirajuća gel elektroforeza, polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata, fluorescentna *in situ* hibridizacija i sondiranje DNA stabilnim izotopima (Lu i sur., 2014). Zahvaljujući molekularnim metodama

identificirane su mnoge vrste denitrificirajućih bakterija, a neke od denitrificirajućih bakterija spadaju u slijedeće 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* (Holmes i sur., 2018).

Sastav mikrobne zajednice aktivnog mulja koji se koristi za proces denitrifikacije ovisi o izvoru ugljika, temperaturi, pH vrijednosti, koncentraciji otopljenog kisika i međuproduktima denitrifikacije (Miao i sur., 2017; Lu i sur., 2014). Prilikom korištenja metanola kao izvora ugljika detektirane su bakterije rodova *Hyphomicrobium* i *Paracoccus* kao dominantni rodovi, dok je prilikom korištenja acetata dominantni rod denitrificirajućih bakterija bio *Halomonas* (Lee i sur., 2018).

Xu i sur. (2018) detektirali su bakterije koljena *Proteobacteria* koje su bile dominantne kada su koristili PHBV/PLA polimer, glukozu i acetat ako izvore ugljika. U prisutnosti acetata najzastupljenije su bile denitrificirajuće bakterije, pretežno roda *Thauera*. Sustavi u kojima su korišteni glukoza i PHBV/PLA polimer poticali su rast hidrolizirajućih i fermentativnih bakterija koje imaju metaboličke puteve bitne za razgradnju organskih tvari visoke molekulske mase. Prisutnost glukoze poticao je i rast bakterija koje provode disimilacijsku redukciju nitrata u amonijak, zbog čega je bila povećana proizvodnja amonijaka.

Prilikom korištenja acetata kao izvora ugljika identificirane su bakterije koljena *Proteobacteria* ( $\beta$ -*Proteobacteria*), *Bacteroidetes* i *Firmicutes* bile su dominantne, kao i rodovi *Thauera*, *Pauidibacter* i *Pseudomonas* (Miao i sur., 2017; Sun i sur., 2016; Srinandan i sur., 2012).

## 2.4. NAKUPLJANJE MEĐUPRODUKATA DENITRIFIKACIJE

Tijekom procesa denitrifikacije nastaju međuprodukti dušikov monoksid (NO) i didušikov oksid (N<sub>2</sub>O), bezbojni, toksični plinovi koji pridonose efektu staklenika, pri čemu je N<sub>2</sub>O 300 puta jači od ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>) (Wang i sur., 2021; Wu i sur., 2014). Uzroci antropogene emisije N<sub>2</sub>O su poljoprivreda, izgaranje fosilnih goriva, upravljanje stajskim gnojem i procesi obrade otpadne vode, odnosno denitrifikacija (Lee i sur., 2018). NO je citotoksin koji negativno utječe na metabolizam mnogih prokariota i eukariota (Wang i sur., 2016) te pridonosi i uništavanju ozonskog omotača (Lu i Chandran, 2010).

Nakupljanje N<sub>2</sub>O u procesu denitrifikacije ovisi i o vrsti i koncentraciji izvora ugljika, početnoj koncentraciji nitrata, C/N omjeru, koncentraciji otopljenog kisika, temperaturi i pH vrijednosti (Lee i sur., 2018; Wu i sur., 2014).

Reakcije denitrifikacije odvijaju se paralelno (jednadžba 3), a nakupljanje različitih međuprodukata ovisi o kompeticiji za elektrone koja rezultira različitom distribucijom elektrona između reduktaza (Wang i sur., 2021). Za biološku denitrifikaciju potrebni su donori elektrona kako bi se nitrat mogao reducirati do molekularnog dušika zbog čega denitrificirajuće bakterije metaboliziraju izvore ugljika pri čemu se proizvodi NADH (nikotinamid adenin dinukleotid). Putem transportnog lanca elektrona NADH predaje svoje elektrone do odgovarajućih reduktaza (slika 2) koje sudjeluju u procesu denitrifikacije (Wang i sur., 2021). Smanjenjem omjera C/N (C/N omjer 2,57 i 1,28) dolazi po povećanja emisije N<sub>2</sub>O zbog ograničene dostupnosti organskog ugljika, nema donora elektrona i kompeticija za elektrone je izraženija (Lee i sur., 2018).

Wu i sur. (2014) uočili su da je emisija N<sub>2</sub>O tijekom endogene denitrifikacije bila puno manja kada je kao akceptor elektrona korišten NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N te je iznosila 0,8 %, u odnosu na NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N kada je emisija bila znatno veća i iznosila 11,8 %. Kao organski izvor ugljika koristili su acetat i metanol pri čemu je prilikom korištenja acetata kao izvora ugljika došlo do nakupljanja visoke koncentracije nitrita. Nitriti inhibiraju aktivnost didušik oksid reduktaze tijekom denitrifikacije pri čemu dolazi do nakupljanja didušikovog oksida i njegove emisije (Wu i sur., 2014; Alinsafi i sur., 2008). Osim nitrita, kisik ima velik utjecaj na inhibiciju aktivnosti didušik oksid reduktaze (Alinsafi i sur., 2008).

Neki denitrificirajući mikroorganizmi imaju sve potrebne gene koji kodiraju za enzime za redukciju nitrata do molekularnog dušika, dok drugim mikroorganizmima nedostaju određeni geni zbog čega dolazi do nakupljanja međuprodukata. Zbog toga nakupljanje međuprodukata i brzina razgradnje istih ovisi o razvijenoj mikrobnoj kulturi koja se koristi u procesu denitrifikacije (Han i sur., 2020).

Wang i sur. (2019) proučavali su utjecaj KPK/N omjera i početne vrijednosti pH na nakupljanje NO i N<sub>2</sub>O. Nakupljanje NO uvelike je ovisilo o omjeru KPK/N pri čemu se povećanjem KPK/N omjera do vrijednosti 6 povećalo nakupljanje NO do maksimalne vrijednosti od 0,665 mg/L zbog veće brzine redukcije nitrata. S druge strane, pri nižim omjerima KPK/N (KPK/N 1), nedostatak donora elektrona smanjuje brzinu redukcije nitrata i dolazi do manjeg nakupljanja NO pri čemu je maksimalna koncentracija NO iznosila 0,140 mg/L. Nakupljanje N<sub>2</sub>O ovisi o kompeticiji elektrona između denitrifikacijskih reduktaza. Kompeticija za elektrone je pojačana pri niskim KPK/N (KPK/N 1) omjerima zbog sporije opskrbe elektronima što pridonosi nakupljanju N<sub>2</sub>O jer didušik oksid reduktaza (Nos) ima manji afinitet za elektrone u odnosu na nitrat i nitrit reduktaze. Najveći elektronski afinitet ima nitrat reduktaza (Nar), zatim nitrit reduktaza (Nir), a najmanji didušik oksid reduktaza (Nos) (Han i sur., 2020).

Wang i sur. (2019) uočili su kako se nakupljanje N<sub>2</sub>O odvija u dvije faze: egzogena i endogena denitrifikacija. Tijekom egzogene denitrifikacije dostupan je vanjski izvor ugljika što

ubrzava denitrifikaciju i nakupljanje  $N_2O$ , dok tijekom endogene denitrifikacije nema vanjskog izvora ugljika, već denitrificirajući mikroorganizmi koriste unutarstanične izvore ugljika, odnosno polimere. Tijekom endogene denitrifikacije redukcija  $N_2O$  je sporija, ali dolazi do većeg nakupljanja zbog korištenja unutarstaničnog polimera kao donora elektrona čija razgradnja je sporija od razgradnje vanjskih izvora ugljika.

Nakupljanje  $NO$  i  $N_2O$  smanjuje se povećanjem početne vrijednosti pH tijekom procesa denitrifikacije. Pri pH vrijednosti 6 dolazi do značajnog nakupljanja  $NO$  zbog prisutnosti slobodne nitritne kiseline koja u visokim koncentracijama inhibira dušikov monoksid reduktazu (Nor) i time usporavajući redukciju  $NO$  što rezultira njegovim nakupljanjem. Nagli porast koncentracije  $NO$  pri niskom pH može biti povezan i s deprotonacijom  $HNO_2$ , ne samo s nakupljanjem zbog inhibitornog djelovanja visoke koncentracije  $HNO_2$ . Kada koncentracija  $NO$  poraste ona može djelovati inhibirajuće na Nor i Nos reduktaze i time produžujući nakupljanje  $NO$ . Smanjenjem koncentracije  $NO$ , putem emisije ili potencijalne dismutacije  $NO$ , pri čemu se  $NO$  razgrađuje na  $N_2$  i  $O_2$ , inhibicijsko djelovanje na reduktaze se smanjuje i denitrifikacija se nastavlja (Wang i sur., 2019).

Niske vrijednosti pH, ispod pH 6, inhibiraju aktivnost Nos reduktaze zbog čega dolazi do nakupljanja  $N_2O$ , dok se povećanjem pH inhibicijski učinak smanjuje (Wang i sur., 2019). Osim inhibicijskog djelovanja, pH utječe i na brzinu oksidacije ugljika tijekom denitrifikacije. Niski pH usporava brzinu oksidacije ugljika čime se pojačava kompeticija za elektrone između reduktaza (Nar, Nir, Nor i Nos). S obzirom na to da Nos ima najmanji afinitet za elektrone doći će do nakupljanja  $N_2O$ . Aktivnost Nos enzima također inhibiraju povećane koncentracije  $NO$  i  $HNO_2$  što pridonosi dodatnom nakupljanju  $N_2O$  (Wang i sur., 2019).

## 2.5. NOVE METODE BIOLOŠKE DENITRIFIKACIJE

Huang i sur. (2023) opisuju nove tehnologije denitrifikacije kao što su skraćena nitrifikacija denitrifikacija (engl. *Short-cut Nitrification Denitrification, SCND*), anaerobna oksidacija amonijaka, istovremena nitrifikacija i denitrifikacija te heterotrofna nitrifikacija – aerobna denitrifikacija.

SCND tehnologija temelji se na oksidaciji amonijaka u nitrit i redukciji nitrita u elementarni dušik procesom denitrifikacije. Prvi korak je regulacija procesa nitrifikacije kako bi proces stao nakon nitritacije, odnosno inhibicija oksidacije nitrita do nitrata, što se postiže regulacijom koncentracije otopljenog kisika i vrijednosti pH kako bi se akumulirale i namnožile amonijak oksidirajuće bakterije i isprale/inhibirale nitrit oksidirajuće bakterije. Tim korakom se ostvaruje ušteda na potrebnoj količini kisika.

Anaerobnu oksidaciju amonijaka provode anaerobne amonijak oksidirajuće bakterije pri čemu amonijak prevode od elementarnog dušika koristeći nitrite kao akceptore elektrona



(Kuenen, 2008). Zbog potrebnih striktno anaerobnih uvjeta smanjena je potreba za kisikom, time i potrošnja energije, a zbog autotrofnosti procesa nije potrebno dodavati izvore ugljika što čini ovu metodu prikladnom za denitrifikaciju otpadne vode s niskim C/N omjerom (Chini i sur., 2019).

Istovremena nitrifikacija i denitrifikacija uključuju odvijanje dvaju procesa u istom vremenu i prostoru čime se smanjuje potreban volumen reaktora (Masoudi i sur., 2018), kao i potreba za aeracijom i dodatkom izvora ugljika, a pH stabilnost procesa pridonosi smanjenju troškova budući da se tijekom procesa nitrifikacije nakupljaju vodikovi ioni koji snižavaju vrijednost pH miješane tekućine, a tijekom denitrifikacije dolazi do obnove puferskog kapaciteta (Huang i sur., 2023).

Heterotrofna nitrifikacija – aerobna denitrifikacija je metoda koja se temelji na primjeni bakterija koje imaju sposobnost provođenja heterotrofne aerobne nitrifikacije i denitrifikacije zbog čega mogu iskoristiti izvore ugljika za pretvorbu amonijaka, nitrata i nitrita do organskog ili elementarnog dušika (Huang i sur., 2023). Heterotrofni mikroorganizmi koji se koriste u ovoj metodi imaju visoku brzinu rasta i bolje sposobnosti denitrifikacije (Zhang i sur., 2019a; Zhang i sur., 2019b), ali proces zahtijeva više koncentracije izvora ugljika i višu brzinu aeracije u odnosu na tradicionalnu biološku denitrifikaciju zbog čega je ova metoda prikladna za denitrifikaciju otpadne vode s visokim C/N omjerom (Huang i sur., 2021; Chen i sur., 2014).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

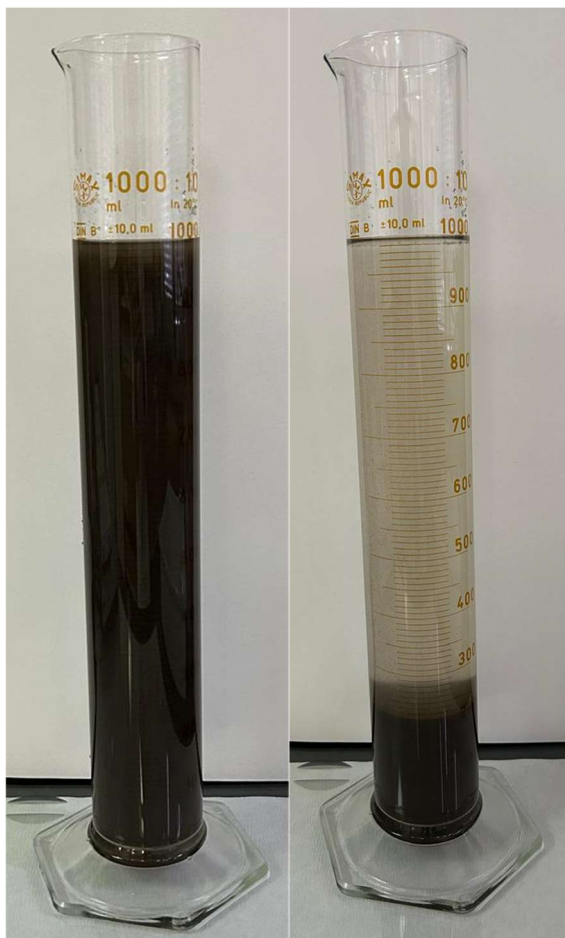
#### 3.1. AKTIVNI MULJ AKLIMATIZIRAN NA NO<sub>3</sub>-N I NO<sub>2</sub>-N KAO AKCEPTORE ELEKTRONA

Aktivni mulj korišten u pokusima denitrifikacije je podrijetlom s lokalnog uređaja za biološku obradu otpadne vode grada, uzet iz aerobnog bazena. Aktivni mulj je u roditeljskom reaktoru tijekom 6 mjeseci aklimatiziran na sintetsku otpadnu vodu s acetatom kao izvorom ugljika i nitrate, odnosno nitrite kao akceptore elektrona. Aklimatizacija se provodila naizmjeničnim pokusima aerobne nitrifikacije s kontrolom vrijednosti pH na 7,2, odnosno na 8,0 (slika 4), i anoksične denitrifikacije.



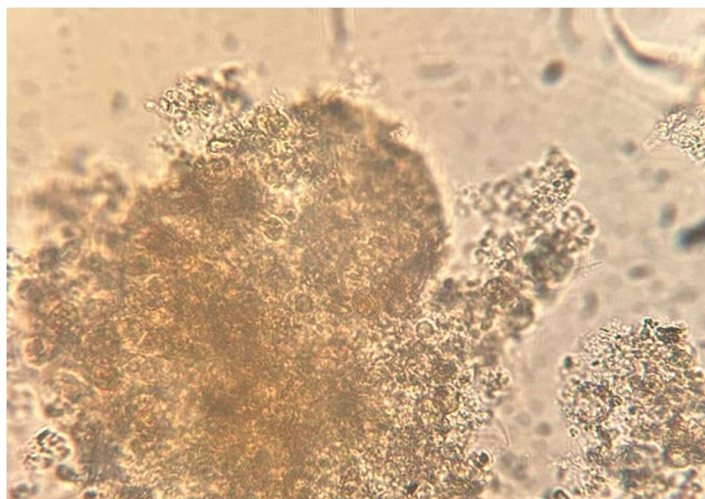
**Slika 4.** Vođenje procesa nitrifikacije s kontrolom pH vrijednosti na 7,2, odnosno na 8,0 pomoću 2 M NaOH

Volumen aktivnog mulja tijekom 30 minuta taloženja je iznosio 230 mL/L (slika 5).



**Slika 5.** Taloživost mikrobne kulture aktivnog mulja korištene u pokusima denitrifikacije

Tijekom perioda aklimatizacije namnožene su mikrobne vrste mikroorganizama odgovore za procese nitrifikacije, odnosno denitrifikacije (slika 6). Također, mikroorganizmi su se postepeno aklimatizirali na nitrate, odnosno nitrite kao akceptore elektrona. Pokusi su provedeni s  $1,8 \pm 0,2$  g MLSS/L. Veličina MLSS (engl. *Mixed Liquor Suspended Solids*, hrv. suspendirane čestice miješane tekućine) se uobičajeno koristi za određivanje koncentracije aktivnog mulja.



**Slika 6.** Mikroskopski prikaz kulture aktivnog mulja korištene u pokusima denitrifikacije, povećanje 100 puta, slikano svjetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss Jena, Njemačka; Meiji, Japan)

### 3.2. SINTETSKA OTPADNA VODA

Pokusni denitrifikacije su provedeni sa sintetskom otpadnom vodom. Kao izvor ugljika korišten je natrijev acetat (p.a., Merck, Njemačka) dodan na početku pokusa u jednom pulsu da bi se postigao omjer KPK/N 10. U pokusima s nitratom kao akceptorom elektrona dodana je otopina  $\text{KNO}_3$  (p.a., Merck, Njemačka), koja je priređena otapanjem soli  $\text{KNO}_3$  u destiliranoj vodi u koncentraciji 500 mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ , na početku pokusa u jednom pulsu za postizanje željene početne koncentracije  $\text{NO}_3\text{-N}$  ( $20 \pm 3$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ,  $40 \pm 3$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$  i  $60 \pm 3$  mg  $\text{NO}_3\text{-N/L}$ ). U pokusima s nitritom kao akceptorom elektrona je dodana odgovarajuća količina otopine  $\text{NaNO}_2$  (p.a., Merck, Njemačka), priređena otapanjem soli  $\text{NaNO}_2$  u destiliranoj vodi u koncentraciji 500 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ , za postizanje željene početne koncentracije  $\text{NO}_2\text{-N}$  ( $20 \pm 3$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ ,  $40 \pm 3$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  i  $60 \pm 3$  mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$ ).

### 3.3. ORGANIZACIJA POKUSA DENITRIFIKACIJE

Pokusni denitrifikacije su provedeni s biomasom iz roditeljskog bioreaktora koja je bila aklimatizirana na nitrit, odnosno nitrat kao akceptor elektrona. Pokusi su provedeni kao šaržni u staklenim čašama volumena 800 mL, radnog volumena 600 mL (slika 7). Čaše su bile postavljene na magnetske miješalice (Thermo Scientific, Super-Nuova, Švicarska) pri 200 okretaja u minuti. Tijekom pokusa motrene su vrijednosti pH, koncentracije otopljenog kisika i temperature (WTW FDO 925 i SenTix 940-3; Multi 3420 SET KS1, Njemačka). Anoksični uvjeti i kontakt mikroorganizama aktivnog mulja i sintetske vode su osigurani miješanjem miješane tekućine na magnetskoj miješalici, pri čemu je koncentracija otopljenog kisika praćena i tijekom

pokusa je bila  $\leq 0,2$  mg DO/L. Tijekom provođenja pokusa prevladavala je sobna temperatura. Pokusi su provedeni u tri ponavljanja pri čemu prikazani rezultati predstavljaju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Opis provedenih pokusa je prikazan u tablici 5. Provedene su dvije serije pokusa: (i) denitrifikacija s  $\text{NO}_3\text{-N}$  kao akceptorom elektrona; i (ii) denitrifikacija s  $\text{NO}_2\text{-N}$  kao akceptorom elektrona.



**Slika 7.** Aparatura korištena za šaržne pokuse denitrifikacije

**Tablica 5.** Shema pokusa denitrifikacije

Omjer KPK/N	Koncentracija mikrobne biomase, g MLSS/L	Početna koncentracija $\text{NO}_3\text{-N}$ , mg/L	Omjer KPK/N	Koncentracija mikrobne biomase, g MLSS/L	Početna koncentracija $\text{NO}_2\text{-N}$ , mg/L
10	$1,8 \pm 0,2$	$20 \pm 3$	10	$1,8 \pm 0,2$	$20 \pm 3$
10	$1,8 \pm 0,2$	$40 \pm 3$	10	$1,8 \pm 0,2$	$40 \pm 3$
10	$1,8 \pm 0,2$	$60 \pm 3$	10	$1,8 \pm 0,2$	$60 \pm 3$

### 3.4. ANALITIČKE METODE

Za vrijeme pokusa periodično su uzimani uzorci miješane tekućine za određivanje koncentracije MLSS, KPK, NO<sub>3</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N, pri čemu su svi uzorci, osim uzorka za određivanje MLSS, filtrirani kroz grubi filter papir veličine pora 0,45 μm (slika 8). Također, praćene su temperatura, koncentracija otopljenog kisika (WTW FDO 925; Multi 3420 SET KS1, Njemačka) i vrijednost pH (SenTix 940-3; Multi 3420 SET KS1, Njemačka) u miješanoj tekućini.



**Slika 8.** Filtracija uzorka za analizu KPK, NO<sub>3</sub>-N, NO<sub>2</sub>-N i PO<sub>4</sub>-P

#### 3.4.1. Određivanje MLSS

MLSS je način izražavanja koncentracije aktivnog mulja, a određuje se izračunom razlike mase filter papira s talogom aktivnog mulja i mase čistog suhog filter papira, pri čemu su oba filter papira sušena u sušioniku (Instrumentaria ST-05) do konstante mase pri 105 °C.

Postupak određivanja koncentracije aktivnog mulja provodi se na način da se uzme poznati volumen homogene suspenzije aktivnog mulja te se filtrira kroz čisti, osušeni, prethodno izvagani filter papir. Filter papir s uzorkom zatim se suši na 105 °C do konstante mase te se stavlja u eksikator na hlađenje. Ohlađeni, suhi filter papir s uzorkom se važe te se koncentracija aktivnog mulja, izražena u g/L, izračuna dijeljenjem razlike mase suhog filter papira s uzorkom i mase čistog, suhog filter papira, s volumenom uzete suspenzije aktivnog mulja (jednadžba 5).

$$MLSS \left[ \frac{g}{L} \right] = \frac{m_{om} - m_f}{mL \text{ uzorka}} \times 1000 \quad [5]$$

pri čemu je  $m_{om}$  masa osušenog filter papira s uzorkom aktivnog mulja (g),  $m_f$  masa čistog, osušenog filter papira (g) i mL uzorka volumen suspenzije aktivnog mulja.

Pribor:

Pipeta

Lijevak

Čašica

Osušeni i izvagani filter papir

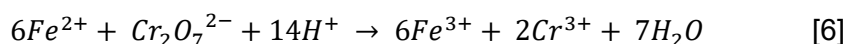
Sušionik

Eksikator

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

Kemijska potrošnja kisika predstavlja koncentraciju organskih sastojaka i određivana je titrimetrijski prema Standardnim Metodama (APHA, 2005), prema metodi 5220C (Closed Reflux, Titrimetric method).

Određivanje KPK provodi se tako da se uzorak spaljuje u kiseloj sredini, pri čemu se kao katalizator koristi srebro sulfat ( $Ag_2SO_4$ , p.a., Merck, Njemačka) te se za sprječavanje interferencije određenih anorganskih spojeva, kao što su kloridi, dodaje živin sulfat ( $HgSO_4$ , p.a., Merck, Njemačka). Suvišak kalijeva bikromata ( $K_2Cr_2O_7$ , p.a., Merck, Njemačka) titrira se otopinom feroamonijevog sulfata ( $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ , Kemika), FAS, uz dodatak feroina (1,10-fenantrolinij-klorid monohidrat, Kemika) kao indikatora, prema jednadžbi 6.



Postupak određivanja KPK provodi se na način da se 2 mL uzorka otpipetira u staklenu kivetu, zatim se doda 1,2 mL otopine  $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$ , i 2,8 mL otopine  $Ag_2SO_4 + H_2SO_4$  (GRAM-MOL), kiveta se zatvori čepom, promiješa i uzorak se spaljuje u termoreaktoru (Thermoreactor TR 300, Merck) na 150 °C jedan sat. Nakon toga se uzorak hladi u tami, na sobnoj temperaturi, a ohlađeni uzorak se titrira (Digitalna bireta Solarus, Hirschman-Laborgeräte) otopinom FAS (0,1 mol/L) uz dodatak indikatora feroina. Tijekom titracije dolazi do promjene boje iz plavo-zelene u smeđe-crvenu. Za slijepu probu umjesto uzorka se uzima destilirana voda te se provodi isti postupak određivanja KPK. Za određivanje faktora otopine feroamonijevog sulfata, koji se računa prema jednadžbi (7), provodi se isti postupak kao za slijepu probu uz iznimku izostavljanja koraka spaljivanja uzorka.

$$f = \frac{1,2}{V_{fas}} \quad [7]$$

U jednadžbi (7) 1,2 predstavlja volumen otopine  $K_2Cr_2O_7 + HgSO_4$  (mL), dok  $V_{fas}$  predstavlja volumen otopine FAS utrošene za titraciju (mL).

Vrijednost KPK računa se prema jednadžbi (8):

$$KPK \left[ \frac{mgO_2}{L} \right] = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times f \times 8000}{V_{uzorka}} \quad [8]$$

pri čemu  $V_1$  predstavlja volumen otopine FAS utrošen za titraciju slijepe probe (mL),  $V_2$  predstavlja volumen otopine FAS utrošen za titraciju uzorka (mL),  $c$  koncentraciju otopine FAS (0,1 mol/L) i  $f$  faktor otopine FAS.

Pribor:

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Digestor

Dispenzeri

Titратор

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

Određivanje koncentracije nitrata provedeno je pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14773. Metoda se temelji na reakciji nitratnih iona u sumpornoj kiselini s derivatom benzojeve kiseline pri čemu nastaje nitro spoj koji daje crveno obojenje te se određuje fotometrijski.

Postupak:

U staklenu kivetu otpipetira se 1,5 mL uzorka i žličica  $NO_3-1$  reagensa. Kiveta se dobro zatvori i miješa kako bi se reagens otopio. Zatim se dodaje 5 mL koncentrirane sumporne kiseline, kiveta se zatvori i promiješa pri čemu dolazi do zagrijavanja uzorka. Reakcijsko vrijeme je 10 minuta, nakon čega se koncentracija nitrata, izražena u mg/L, očita na fotometru (SQ200 Merck, Njemačka).

Pribor:

Kivetni testovi Merck Spectroquant 1.14773 (raspon koncentracije 0,2 - 20 mg  $NO_3-N/L$ )



Staklene kivete s čepovima

Pipete

Fotometar, SQ200 Merck, Njemačka

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

Određivanje koncentracije nitrita provedeno je pomoću kivetnih testova Merck Spectroquant 1.14776. Ova metoda ekvivalentna je EPA 354.1, US Standardnim metodama 4500-NO<sub>2</sub>-B, i EN 26 777, a temelji se na reakciji nitrita sa sulfanilnom kiselinom pri čemu nastaje diazonijeva sol, koja reagira s N-(1-naftil) etilendiamin dihidroklorom i nastaje crveno-ljubičasto azo obojenje. Intenzitet obojenja se određuje fotometrijski.

##### Postupak:

U staklenu kivetu otpipetira se 5 mL uzorka i jedna žličica reagensa NO<sub>2</sub>-1. Kiveta se dobro zatvori i miješa kako bi se reagens otopio. Reakcijsko vrijeme je 10 minuta, nakon čega se koncentracija nitrita, izražena u mg/L, očita na fotometru (SQ200 Merck, Njemačka).

##### Pribor:

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

Staklene kivete s čepovima

Pipete

Fotometar, SQ200 Merck, Njemačka

#### 3.4.5. Određivanje vrijednosti pH

Za određivanje vrijednosti pH korišten je pH metar (Multi 3420 SET KS1, Njemačka) i pH elektroda (SenTix 940-3, Njemačka). Prije pokusa napravljena je kalibracija tako što se pH elektroda uranjala u pufer otopine s pH 4, pH 7 i pH 10 prema uputama proizvođača. Tijekom pokusa pH elektroda je bila uronjena u miješanu tekućinu i vrijednost pH je očitavana sa zaslona pH metra. Nakon završetka mjerenja, pH elektroda je isprana destiliranom vodom i čuvana u otopini elektrolita, zasićenoj otopini kalijeva klorida, KCl (p.a., Merck, Njemačka).

#### 3.4.6. Određivanje koncentracije otopljenog kisika

Za određivanje koncentracije otopljenog kisika korišten je mjerač otopljenog kisika (Multi 3420 SET KS1, Njemačka) i kisikova elektroda (WTW FDO 925, Njemačka). Prije pokusa instrument je umjeren prema uputama proizvođača. Tijekom pokusa elektroda je bila uronjena

u miješanu tekućinu i koncentracija otopljenog kisika je očitavana sa zaslona uređaja izražena u mg/L.

#### 3.4.7. Određivanje temperature

Tijekom pokusa temperatura je motrena očitavanjem sa zaslona uređaja pomoću temperaturnog senzora na pH elektrodi (SenTix 940-3; Multi 3420 SET KS1, Njemačka) i kisikovoj elektrodi (WTW FDO 925; Multi 3420 SET KS1, Njemačka) uronjenih u miješanu tekućinu.

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

Slobodna nitritna kiselina se računa prema jednadžbi (9): (Anthonisen i sur., 1976) i izražava u mg/L.

$$\text{FNA} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{[\text{N}] \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{e^{\frac{-2300}{273+T(^{\circ}\text{C})} \times 10^{\text{pH}}}} \quad [9]$$

#### 3.4.9. Mikroskopiranje aktivnog mulja

Aktivni mulj je mikroskopiran i promatran pod svjetlosnim mikroskopom.

Pribor:

Mikroskop (Carl Zeiss Jena, Njemačka; Meiji, Japan)

Predmetno stakalce

Pokrovnica

Kapaljka

#### 3.4.10. Određivanje volumena istaložene biomase

Volumen istaložene biomase ( $SV_{30}$ , engl. *Sludge Volume*) je određen na način da je uzet homogeni uzorak miješane tekućine, dobro promiješan, i preliven u staklenu menzuru volumena 1 L. Nakon 30 minuta je očitana volumen istaložene biomase, izražava se u mL/L.

Pribor:

Staklena menzura volumena 1 L

Štoperica

### 3.4.11. Određivanje indeksa mulja

Indeks mulja (SVI, engl. *Sludge Volume Index*) se određuje tako da se volumen istaložene biomase tijekom 30 minuta podijeli s koncentracijom mikrobne biomase, računa se prema jednadžbi 10 i izražava se u mL/g.

$$SVI = \frac{SV_{30}}{MLSS} \quad [10]$$

## 3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) pojedinačnog parametra i izračunato je prema jednadžbi (11):

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad [11]$$

Pripadajuće standardne pogreške  $S_{\bar{x}}$  su izračunate prema jednadžbi (12):

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad [12]$$

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

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

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

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Na proces denitrifikacije značajni utjecaj imaju operativni čimbenici poput vrste izvora ugljika, nedostatka slobodnog molekularnog kisika, vrijednosti pH, koncentracije organskih sastojaka, temperature, redoks potencijala, populacije denitrifikanata i njezine aktivnosti, nutrijenti, a među njima su najvažniji koncentracija slobodnog molekularnog kisika te vrsta i koncentracija organskih sastojaka (Gerardi, 2002). Mikrobna populacija denitrificirajućih bakterija kao izvor ugljika za proces denitrifikacije može koristiti organske spojeve koji se nalaze u otpadnoj vodi, unutarstanične rezerve ugljika poput primjerice polihidroksialkanoata, i vanjski dodani izvor ugljika (Bernat i Wojnowska-Baryła, 2007; Metcalf & Eddy, 2003). Da bi se mogao odvijati proces denitrifikacije s otpadnom vodom koja u svom sastavu nema dovoljnu količinu organskih sastojaka potrebno je dodati vanjski izvor ugljika. Kao vanjski, dodani izvor ugljika mogu se koristiti razni organski spojevi, poput melase, etanola, octene kiseline, metanola i glukoze, a u praksi se najčešće koriste acetat, metanol i etanol u laboratorijskim i industrijskim sustavima za obradu otpadnih voda biološkim putem (Grgas i sur., 2017; Bernat i Wojnowska-Baryła, 2007). Količina dodanog izvora ugljika ima izravan utjecaj na učinkovitost i brzinu denitrifikacije, mikrobni sastav aktivnog mulja i međuprodukte (Sun i sur., 2017; Liu i sur., 2013; Cherchi i sur., 2009). U slučaju kada je količina raspoloživog donora elektrona veća od optimalne, porast brzine denitrifikacije je ograničen. U suprotnom slučaju, kada je količina donora elektrona nedovoljna, protok elektrona ne može zadovoljiti potrebe za rast stanica, pa su narušeni i denitrifikacija i rast stanica (Huang i Tseng, 2001).

Jedna od otpadnih voda s niskim omjerom KPK/N je komunalna otpadna voda. Kako bi se postigao zadovoljavajući učinak obrade i postigle zakonom propisane maksimalne dopuštene vrijednosti parametara za ispušt u površinske vode i sustav javne odvodnje, potrebno je dodati vanjski izvor ugljika na dnevnoj bazi, što predstavlja dodatan trošak na uređaju za obradu otpadne vode (Liu i sur., 2017; Bernat i Wojnowska-Baryła, 2007).

Kanalizacija može biti izvedena na dva načina: mješoviti i razdjelni sustav kanalizacije. U mješovitom sustavu kanalizacije, starijem tipu kanalizacije, otpadne i oborinske vode s područja grada se odvođe istim odvodnim sustavom u uređaj za obradu otpadnih voda. Mješoviti tip kanalizacije je uobičajen za veliki dio starih kanalizacija u Republici Hrvatskoj. Razdjelni sustav kanalizacije je noviji i rjeđi u Republici Hrvatskoj, i podrazumijeva odvojeno sakupljanje oborinskih voda i komunalnih otpadnih voda.

U komunalnoj otpadnoj vodi s razdjelnim sustavom kanalizacije omjer KPK/N iznosi oko 20, a ulazna koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  oko 80 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$ . U komunalnoj otpadnoj vodi koja ima mješoviti sustav kanalizacije omjer KPK/N obično iznosi oko 10, a ulazna koncentracija  $\text{NH}_4\text{-N}$  u bioaeracijskom bazenu iznosi oko 40 mg  $\text{NH}_4\text{-N/L}$ .  $\text{NH}_4\text{-N}$  se u aerobnim uvjetima oksidira do

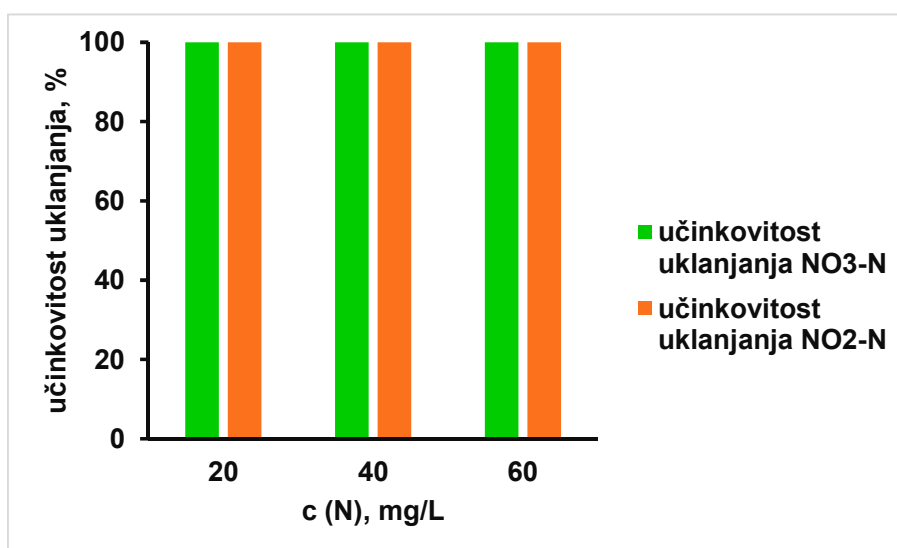
NO<sub>2</sub>-N i/ili NO<sub>3</sub>-N, ovisno o uvjetima vođenja procesa – nitrifikacija (oksidacija NH<sub>4</sub>-N do NO<sub>2</sub>-N) ili nitratacija (oksidacija NH<sub>4</sub>-N do NO<sub>3</sub>-N). Zbog toga su uvjeti omjer KPK/N 10 i početna koncentracija N, 20 ± 3 mg N/L, 40 ± 3 mg N/L i 60 ± 3 mg N/L, odabrani za pokuse denitrifikacije s NO<sub>2</sub>-N i NO<sub>3</sub>-N kao akceptorom elektrona.

Pokusi su provedeni s koncentracijom mikrobne biomase 1,8 ± 0,2 g MLSS/L, volumen aktivnog mulja tijekom 30 minuta taloženja je iznosio 230 mL/L (slika 5), a SVI 127,8 mL/g. SVI na uređajima za obradu otpadnih voda uglavnom varira u rasponu 50 – 150 mL/g, pri čemu se mulj koji ima SVI vrijednost u rasponu 100-200 mL/g malo sporije taloži i zadržava više čestica tijekom taloženja.

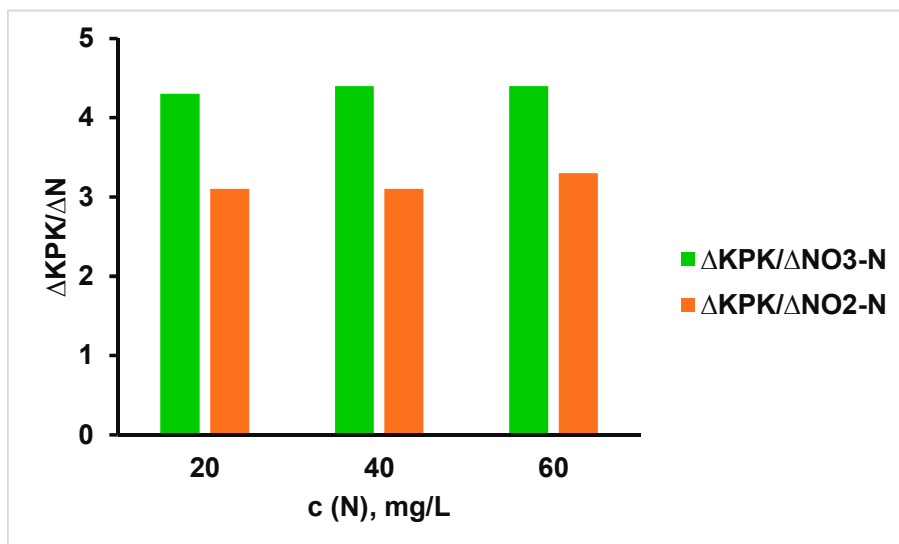
Rezultati pokusa denitrifikacije s NO<sub>3</sub>-N i NO<sub>2</sub>-N kao akceptorima elektrona i acetatom kao izvorom ugljika pri omjeru KPK/N 10 su prikazani slikama 9-14, koje prikazuju ovisnost koncentracije nitrata, odnosno nitrita o:

- učinkovitosti uklanjanja nitrata, odnosno nitrita (slika 9)
- omjeru  $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{N}$  (slika 10)
- učinkovitosti uklanjanja KPK (slika 11)
- brzini denitrifikacije (slika 12)
- brzini oksidacije organskih sastojaka (slika 13),

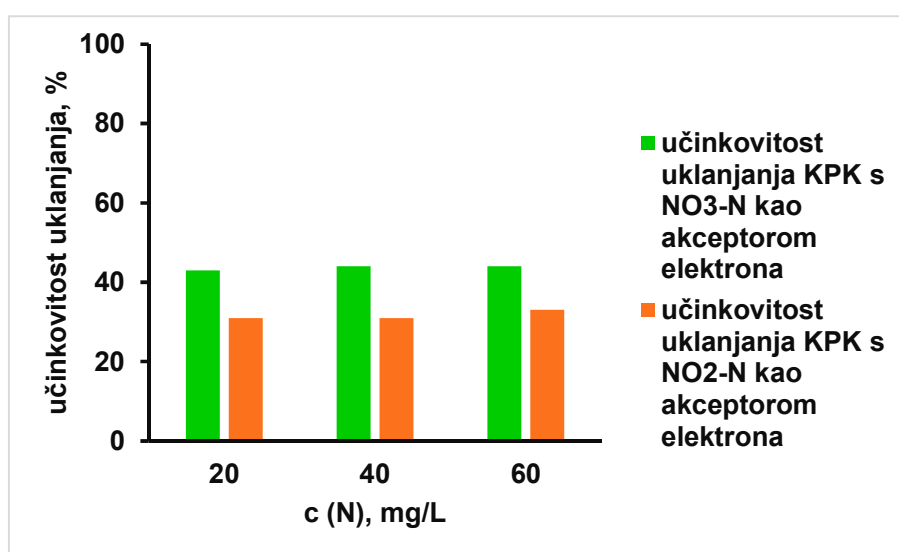
i kinetikom denitrifikacije početnih 60 mg NO<sub>3</sub>-N/L i 60 mg NO<sub>2</sub>-N/L pri omjeru KPK/N 10 (slika 14).



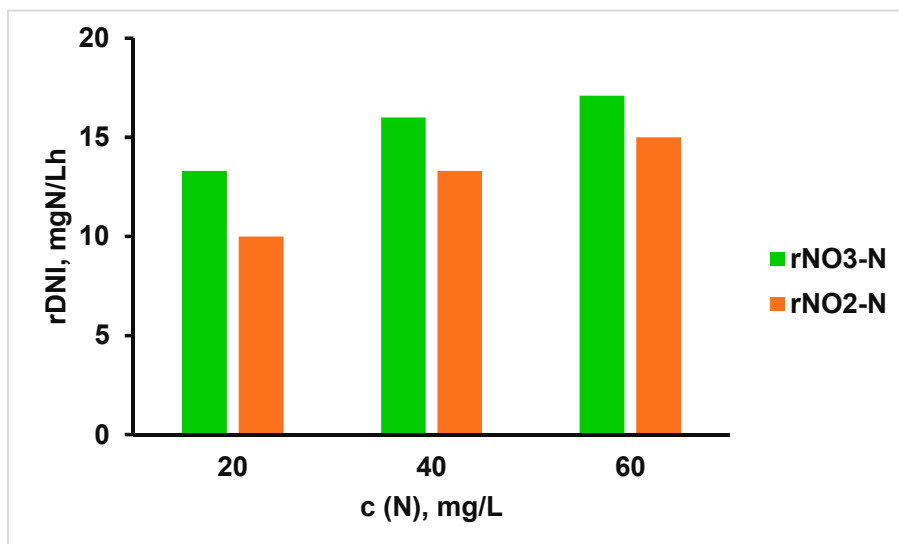
**Slika 9.** Prikaz učinkovitosti uklanjanja NO<sub>3</sub>-N, odnosno NO<sub>2</sub>-N tijekom denitrifikacije nitrata, odnosno nitrita početne koncentracije 20 ± 3 mg N/L, 40 ± 3 mg N/L i 60 ± 3 mg N/L



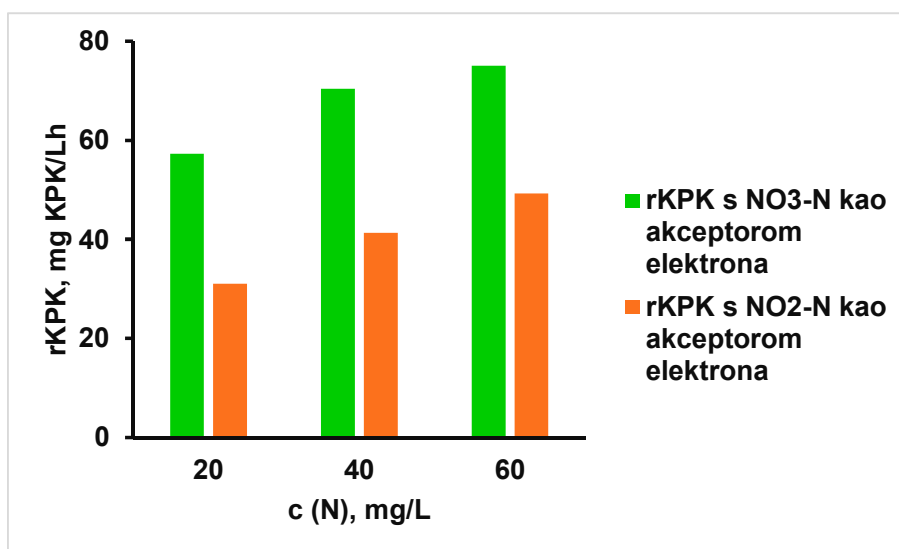
**Slika 10.** Prikaz omjera  $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{N}$  tijekom denitrifikacije nitrata, odnosno nitrita početne koncentracije  $20 \pm 3 \text{ mg N/L}$ ,  $40 \pm 3 \text{ mg N/L}$  i  $60 \pm 3 \text{ mg N/L}$



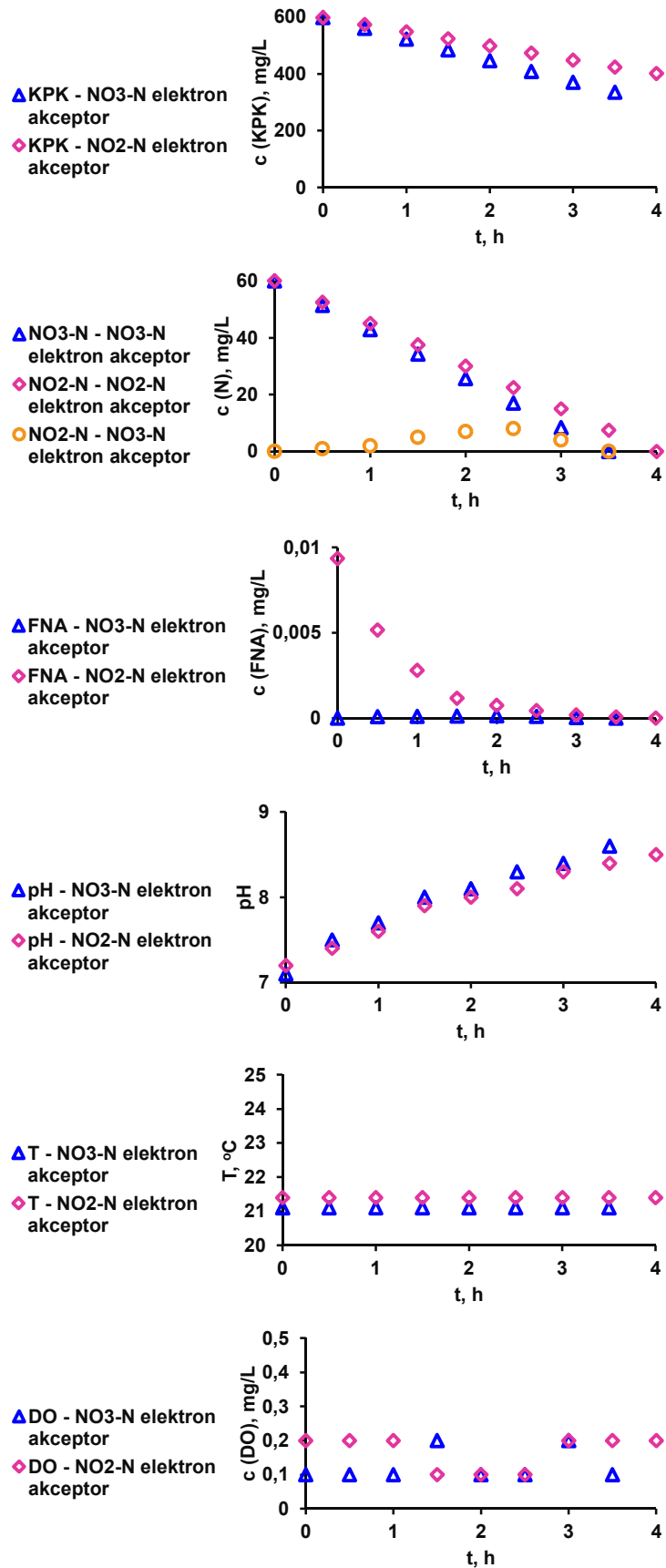
**Slika 11.** Prikaz učinkovitosti uklanjanja KPK tijekom denitrifikacije nitrata, odnosno nitrita početne koncentracije  $20 \pm 3 \text{ mg N/L}$ ,  $40 \pm 3 \text{ mg N/L}$  i  $60 \pm 3 \text{ mg N/L}$



**Slika 12.** Prikaz brzine denitrifikacije tijekom denitrifikacije nitrata, odnosno nitrita početne koncentracije  $20 \pm 3$  mg N/L,  $40 \pm 3$  mg N/L i  $60 \pm 3$  mg N/L



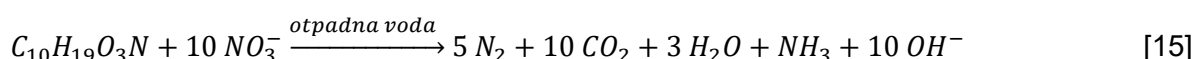
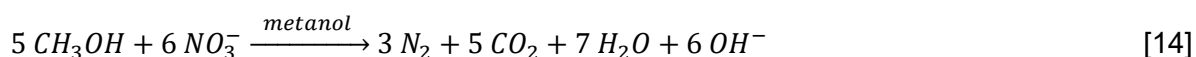
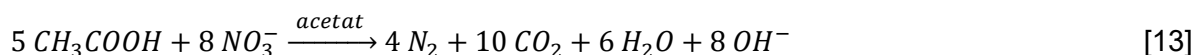
**Slika 13.** Prikaz brzine oksidacije organskih sastojaka izraženih kao KPK vrijednost tijekom denitrifikacije nitrata, odnosno nitrita početne koncentracije  $20 \pm 3$  mg N/L,  $40 \pm 3$  mg N/L i  $60 \pm 3$  mg N/L



**Slika 14.** Usporedni prikaz kinetike 60 mg NO<sub>3</sub>-N/L i 60 mg NO<sub>2</sub>-N/L pri omjeru KPK/N 10



Učinkovitost uklanjanja NO<sub>2</sub>-N i NO<sub>3</sub>-N je bila 100 % za sve istražene koncentracije N, 20 mg N/L, 40 mg N/L i 60 mg N/L, pri omjeru KPK/N 10 (slika 9). Minimalan potreban omjer KPK/N za potpunu redukciju nitrata, odnosno nitrita ovisi o korištenom izvoru ugljika. Razlike u potrebnom omjeru KPK/N za različite izvore ugljika su vidljive na primjerima stehiometrijskih reakcija za acetat (jednadžba 13), etanol (jednadžba 14) i otpadnu vodu (jednadžba 15), pri čemu se C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N uglavnom koristi kao prikaz biorazgradivih organskih spojeva koji se nalaze u otpadnoj vodi (Metcalf & Eddy, 2003; EPA, 1993):



Nadalje, He i sur. (2018) i Zhao i sur. (2010) ističu omjer C/N 15 za *Bacillus* sp. i *Pseudomonas taiwanesis* za glukozu kao izvor ugljika, Prasetyo i sur. (2018) za *Pseudomonas* sp. omjer C/N 10. Zhang i sur. (2019a) ističu za citrat potreban omjer C/N 16. Također, u literaturi se ukazuje na omjer topivog BPK/nitritni i nitratni ion oko 3. S metanolom potrebno je 2,5 mg metanola/L po mg nitratnog iona/L (Gerardi, 2002). Pokazano je da više koncentracije organskih spojeva uvijek favoriziraju disimilatornu redukciju nitrata do amonijaka prije nego denitrifikaciju ili akumulaciju nitrita. Također, ponekad sastav organskih spojeva može biti jednako važan kao i koncentracija ugljika u određivanju konačnih produkata redukcije nitrata (Carlson i sur., 2020).

U realnim sustavima biološki razgradivi organski sastojci iz otpadne vode uglavnom su potrošeni tijekom ranijih, aerobnih stupnjeva obrade pa je za denitrifikaciju nakupljenih nitrata i/ili nitrita potrebno dodati vanjski izvor ugljika (postanoksična denitrifikacija). Osim postanoksične denitrifikacije, u primjeni je i anoksično/aerobni proces, u kojem organski sastojci iz otpadne vode služe kao donori elektrona za denitrifikaciju, a nakon toga slijede aerobni procesi (Metcalf & Eddy, 2003).

Utrošena količina organskih sastojaka za redukciju nitrata, odnosno nitrita prikazana je omjerom ΔKPK/ΔN (slika 10). Kako je omjer KPK/N 10, koji odgovara omjeru C/N 5,3 za acetat kao izvor ugljika, bio dovoljan za redukciju nitrata i nitrita, organski sastojci nisu bili limitirajući čimbenik u procesu denitrifikacije. Utrošena količina organskih spojeva za redukciju nitrata je bila u uskom rasponu vrijednosti, i iznosila je 4,3-4,4, i bila je neovisna o početnoj koncentraciji nitrata. Isti trend je zapažen i u denitrifikaciji nitrita, pri čemu je omjer ΔKPK/ΔN bio niži, bio je u rasponu vrijednosti 3,1-3,3, i također neovisan o početnoj koncentraciji nitrita. Omjer

$\Delta\text{KPK}/\Delta\text{N}$  je viši za denitrataciju zbog veće potrebne količine organskih sastojaka za potpunu denitrifikaciju, nego za denitritaciju jer je u tom slučaju denitrifikacija krenula od nitrita. Potreban omjer C/N za denitrataciju i denitritaciju iste početne koncentracije N se razlikuje. Za denitrataciju je potreban veći omjer C/N nego za denitritaciju zato što je preskočen korak redukcije nitrata u nitrite pa je time i manja potrebna količina donora elektrona za redukciju. Ta ušteda na potrebnoj količini organskih sastojaka za denitritaciju jedan je od načina na koji se može riješiti problem otpadne vode s niskim omjerom C/N (Kosgey i sur., 2022), međutim, denitritacija nije jednostavna zbog inhibitornog djelovanja  $\text{NO}_2\text{-N}$ , odnosno  $\text{HNO}_2\text{-N}$  na neke mikroorganizme aktivnog mulja poput denitrifikanata (Hartop i sur., 2017; Zhou i sur., 2008).

Učinkovitost uklanjanja KPK je bila podjednaka i neovisna o početnoj koncentraciji N (slika 11). Kako je rasla početna koncentracija N, tako je u pokusima rasla i početna koncentracija KPK, međutim učinkovitost uklanjanja KPK je bila više-manje slična. Učinkovitost uklanjanja KPK je bila viša u denitrifikaciji s nitratima kao akceptorom elektrona jer je za denitrataciju potrebna veća količina organskih sastojaka nego za denitrifikaciju preko nitrita. Cilj denitrifikacije je reducirati nitrate, odnosno nitrite i pri tome dodati minimalnu potrebnu količinu organskih sastojaka tako da po završetku denitrifikacije nema preostalih organskih sastojaka, ili da njihova koncentracija bude u skladu s maksimalnim dopuštenim koncentracijama za ispušt u površinske vode ili u sustav javne odvodnje (tablica 1) (NN 26/2020). Ovi rezultati sugeriraju da je omjer KPK/N 10 prevelik za acetat kao izvor ugljika u denitrifikaciji početnih koncentracija nitrata i nitrita  $20 \pm 3$  mg N/L,  $40 \pm 3$  mg N/L i  $60 \pm 3$  mg N/L.

Porast početne koncentracije N je djelovao povoljno na brzinu denitrifikacije, koja je također rasla, i u denitrifikaciji preko nitrata, i u denitrifikaciji preko nitrita (slika 12). Brzina denitrifikacije preko nitrata je bila viša od denitrifikacije preko nitrita za oko 12-25 %. Brzine bioloških reakcija znatno variraju tijekom biološke obrade otpadnih voda, a jedan od osnovnih čimbenika koji utječu na varijacije je udio odgovornih bakterijskih skupina i njihova aktivnost u aktivnom mulju (Johnson i sur., 2015). Danas je poznato oko 50 rodova denitrifikanata, i unutar njih oko 130 vrsta bakterija (Shapleigh i sur., 2006). Neki od denitrifikanata su *Paracoccus*, *Flavobacterium*, *Thauera*, *Zoogloea*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* i *Dechloromonas* (Fang i sur., 2020; Du i sur., 2017; Yong i sur., 2015; Thomsen i sur., 2007). Na ravnotežu između nitrita i nitrata mogu utjecati dva različita bakterijska fenotipa među mikroorganizmima u aktivnom mulju, pravi denitrifikanti koji imaju sposobnost redukcije i nitrata i nitrita do plinovitog dušika, i nitrat respirirajuće bakterije koje nemaju sposobnost redukcije nitrita (Glass i Silversten, 1998). Kako se nitrat respirirajuće bakterije odlikuju većom brzinom rasta i do tri puta, dolazi do njihove dominacije (Turk i Mavinic, 1987) i zbog dominacije nitrat reducirajućih bakterija u prisutnosti nitrata dolazi do akumulacije nitrita. Jednom kad su nitrati iscrpljeni, pravi denitrifikanti koriste raspoloživi nitrit i tako preuzmu dominaciju. Na rast denitrificirajućih bakterija imaju utjecaj

koncentracija otopljenog kisika, omjer KPK/N, koncentracija nitrita, vrsta izvora ugljika, vrijednost pH i temperatura (Sun i sur., 2017; Liu i sur., 2013; Cherchi i sur., 2009). Što je viša brzina denitrifikacije nitrita viši je i prag inhibicije nitritom za denitrifikante, zbog prethodnih neuspjeha (Yao i sur., 2020).

S porastom početne koncentracije N, rasla je i početna koncentracija KPK, što je dovelo i do porasta brzine oksidacije KPK (slika 13). Brzina oksidacije KPK u denitrifikaciji preko nitrata je bila viša nego u denitrifikaciji preko nitrita za oko 34-46 %. Natrijev acetat je vrlo čest odabir kao vanjski izvor ugljika za denitrifikaciju zato što se s njim postižu više brzine denitrifikacije u usporedbi s drugim izvorima ugljika kao što su glicerol i etanol, međutim, ukoliko se pretjera s količinom dodanog acetata onda višak dodanog acetata predstavlja organsko opterećenje i zahtjeva dodatan stupanj obrade (Xu i sur., 2018). Acetat je niskomolekularni spoj koji tvori acetil Co-A i može se izravno bez potrebe za modifikacijama koristiti u denitrifikaciji zato što je acetil Co-A esencijalni dio ciklusa trikarboksilne kiseline, ali i glikolitičkog puta (Onnis-Hayden i Gu, 2008).

Na slici 14 je prikazana usporedna kinetika denitrifikacije preko nitrita i nitrata pri početnoj koncentraciji 60 mg N/L. Oksidacija KPK je bila ujednačena i po iscrpljenju  $\text{NO}_2\text{-N}$ , odnosno  $\text{NO}_3\text{-N}$  je prestala. U obrađenoj vodi je preostalo KPK vrijednosti i takva voda zahtjeva dodatno uklanjanje organskih sastojaka do postizanja zakonom dozvoljenih vrijednosti za ispust. U denitrifikaciji preko nitrata redukcija nitrata se odvijala ujednačenom brzinom, pri čemu je došlo do nakupljanja  $\text{NO}_2\text{-N}$  do maksimalne koncentracije 8 mg  $\text{NO}_2\text{-N/L}$  u 2,5. satu pokusa koji su se potpuno reducirali do kraja pokusa. Redukcija nitrita u denitrifikaciji preko nitrita se odvijala ujednačenom brzinom. Koncentracija slobodne nitritne kiseline u denitrifikaciji preko nitrata je bila niska zbog niske vrijednosti nitrita, dosegla je maksimalnu vrijednost 0,000138 mg  $\text{HNO}_2\text{-N/L}$  u 2. satu pokusa, i zatim se smanjila do kraja pokusa. Koncentracija FNA u denitrifikaciji preko nitrita je bila maksimalna na početku pokusa, iznosila je 0,00935 mg  $\text{HNO}_2\text{-N/L}$  i tijekom pokusa se smanjivala. Koncentracija FNA ovisi o koncentraciji nitrita, temperaturi i vrijednosti pH. Što je viša koncentracija nitrita, to je viša koncentracija FNA. Što je viša vrijednost pH to je koncentracija FNA niža. U denitrifikaciji preko nitrita, nitriti su se počeli reducirati odmah od početka pokusa pa je i koncentracija FNA opadala. Smanjenju koncentracije FNA pridonio je i porast vrijednosti pH tijekom pokusa. Za denitrifikaciju je karakterističan porast pH vrijednosti i obnavljanje puferskog kapaciteta miješane tekućine (Gerardi, 2002), a do porasta pH vrijednosti dolazi tijekom redukcije nitrita do NO pri čemu se proizvode  $\text{OH}^-$  ioni (Tang i sur., 2011). Vrijednost pH također utječe na ionski ( $\text{NO}_2^-$ ) i molekularni oblik ( $\text{HNO}_2$ ) nitrita (Gerardi, 2002). Trend vrijednosti pH je bio sličan za denitrifikaciju preko nitrita i nitrata, s blago višim vrijednostima u denitrifikaciji preko nitrata. Vrijednosti pH tijekom pokusa denitrifikacije su bile povoljne za proces denitrifikacije (Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002; Grady i sur., 1999). pH

vrijednost ima utjecaj na enzime odgovorne za proces denitrifikacije, te može dovesti do neravnoteže između redukcijske kinetike za sve četiri denitrifikacijske reduktaze. Alkalni pH može dovesti do akumulacije međuprodukata denitrifikacije poput nitrita (Sorokin, 2005). Vrijednost pH također utječe na elektron transportere, koji mogu dati preferencijalno elektrone nekim denitrificirajućim reduktazama (Albina i sur., 2019). Kinetika denitrifikacije se usporava pri vrijednosti pH iznad 9,5, te dolazi i do nakupljanja nitrita (Tang i sur., 2011). Pokusi su vođeni pri sobnoj temperaturi, koja je bila povoljna za proces denitrifikacije (Grady i sur., 1999). Koncentracija otopljenog kisika je bila odgovarajuća za proces denitrifikacije (Metcalf & Eddy, 2003; Gerardi, 2002; Oh i Silverstein, 1999) i u denitrifikaciji preko nitrita i u denitrifikaciji preko nitrata, i bila je  $\leq 0,2$  mg DO/L. Više koncentracije otopljenog kisika,  $> 1,0$  mg/L, dovode do preusmjeravanja enzimskog sustava denitrifikanta s korištenja nitrata i nitrita kao akceptora elektrona na korištenje otopljenog kisika kao akceptora elektrona pri čemu dolazi do deaktivacije denitrificirajućih reduktaza. Ukoliko denitrifikanti imaju na raspolaganju otopljeni kisik i nitrate/nitrite, denitrifikanti će preusmjeriti enzimski sustav prema otopljenom kisiku za oksidaciju organskih sastojaka zato što denitrifikanti prilikom aerobne respiracije organskih sastojaka dobivaju više energije nego prilikom anoksične respiracije. Također, tijekom aerobne respiracije dolazi i do veće količine proizvedene mikrobne biomase nego u anoksičnim uvjetima (Gerardi, 2002). Zbog toga je važno održavati nisku koncentraciju otopljenog kisika tijekom procesa denitrifikacije.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Učinkovitost uklanjanja  $\text{NO}_2\text{-N}$  i  $\text{NO}_3\text{-N}$  pri KPK/N omjeru 10 iznosila je 100 % za sve istražene početne koncentracije N i nije ovisila o porastu početne koncentracije N.
2. Omjer  $\Delta\text{KPK}/\Delta\text{N}$  i učinkovitost uklanjanja KPK također su bili neovisni o početnoj koncentraciji dušika. Vrijednosti oba parametra bile su više za  $\text{NO}_3\text{-N}$ , nego za  $\text{NO}_2\text{-N}$  kao akceptor elektrona zbog dodatnog koraka redukcije nitrata u nitrite tijekom denitracije, za koji je potrebna veća količina organskih spojeva.
3. Omjer KPK/N 10 prevelik je za acetat kao izvor ugljika u denitrifikaciji vode s početnim koncentracijama nitrata i nitrita od  $20 \pm 3$  mg N/L,  $40 \pm 3$  mg N/L i  $60 \pm 3$  mg N/L zbog zaostatka KPK u obrađenoj vodi nakon završetka procesa denitrifikacije.
4. Porastom početne koncentracije N porasla je brzina denitrifikacije za oba akceptora elektrona. Brzina denitrifikacije preko  $\text{NO}_3\text{-N}$  bila je viša od denitrifikacije preko  $\text{NO}_2\text{-N}$  za oko 12-25 %.
5. Brzina oksidacije KPK također je porasla porastom početne koncentracije N, pri čemu je brzina oksidacije KPK preko  $\text{NO}_3\text{-N}$  bila viša od brzine oksidacije KPK preko  $\text{NO}_2\text{-N}$  za oko 34-46 %, što je u skladu s većom potrebom za elektron donorima u procesu denitracije.

## 6. LITERATURA

Albina P, Durban N, Bertron A, Albrecht A, Robinet JC, Erable B (2019) Influence of hydrogen electron donor, alkaline pH, and high nitrate concentrations on microbial denitrification: A review. *Int J Mol Sci* **20**, 5163. <https://doi.org/10.3390/ijms20205163>

Alinsafi A, Adouani N, Béline F, Lendormi T, Limousy L, Sire O (2008) Nitrite effect on nitrous oxide emission from denitrifying activated sludge. *Process Biochem* **43**, 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.02.008>

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

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

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>

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>

Chen M, Wang W, Feng Y, Zhu X, Zhou H, Tan Z, i sur. (2014) Impact resistance of different factors on ammonia removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Aeromonas* sp. HN-02. *Bioresource Technol* **167**, 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.001>

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

Chini A, Bolsan AC, Hollas CE, Antes FG, Fongaro G, Treichel H, i sur. (2019) Evaluation of deammonification reactor performance and microorganisms community during treatment of digestate from swine sludge CSTR biodigester. *J Environ Manage* **246**, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.113>

Daims H, Lücker S, Wagner M (2016) A New Perspective on Microbes Formerly Known as Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Trends Microbiol* **24**, 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.05.004>

Devol AH (2015) Denitrification, anammox, and N<sub>2</sub> production in marine sediments. *Annu Rev Mar Sci* **7**, 403–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135040>

Drysdale GD, Kasan HC, Bux F (2001) Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in an NDBEPR activated sludge system. *Water Sci Technol* **43**, 147–154. <https://doi.org/https://doi.org/10.2166/wst.2001.0036>

Du C, Cui CW, Qiu S, Shi SN, 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 R* **24**, 11435–11445. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8824-9>

Dyagelev MY, Isakov VG, Grakhova E V. (2019) Denitrification rates determination in the process of removing nitrogen from wastewater. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* **687**, 066072. <https://doi.org/doi:10.1088/1757-899x/687/6/066072>

EPA (1993) Manual Nitrogen Control, EPA/625/R-93/010, Office of Research and development, Office of Water, Washington D.C.

Fang H, Olson BH, 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**. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010011>

Fu X, Hou R, Yang P, Qian S, Feng Z, Chen Z, i sur. (2022) Application of external carbon source in heterotrophic denitrification of domestic sewage: A review. *Sci Tot Environ* **817**. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153061>

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

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

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

Grgas D, Širac T, Prodan M, Brozinčević A, Landeka Dragičević T (2017) Denitrifikacija: Učinak omjera C/N. U: Jukić A, Šubarić D (ured.) Zbornik radova s kongresa 16. Ružičkine dani („Danas znanost – sutra industrija“), Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Prehrambeno-

tehnološki fakultet Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Zagreb/Osijek, str. 277-288.

Guo J, Peng Y, Wang S, Ma B, Ge S, Wang Z, i sur. (2013) Pathways and Organisms Involved in Ammonia Oxidation and Nitrous Oxide Emission. *Crit Rev Env Sci Tec* **43**, 2213–2296. <https://doi.org/10.1080/10643389.2012.672072>

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>

Han K, Yoon J, Yeum Y, Park S, Kim HK, Kim M, i sur. (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>

Hartop KR, Sullivan MJ, Giannopoulos G, Gates AJ, Bond PL, Yuan Z, i sur. (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>

He T, Ye Q, Sun Q, Cai X, Ni J, Li Z, i sur. (2018) Removal of Nitrate in Simulated Water at Low Temperature by a Novel Psychrotrophic and Aerobic Bacterium, *Pseudomonas taiwanensis* Strain J. *Biomed Res Int* **2018**. <https://doi.org/10.1155/2018/4984087>

Holmes DE, Dang Y, Smith JA (2018) Nitrogen cycling during wastewater treatment. U: Gadd GM, Sariaslani S (ured.) *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press Inc., str. 113–192.

Huang F, Pan L, He Z, Zhang M, Zhang M (2021) Heterotrophic nitrification-aerobic denitrification characteristics and antibiotic resistance of two bacterial consortia from *Marinomonas* and *Halomonas* with effective nitrogen removal in mariculture wastewater. *J Environ Manage* **279**. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111786>

Huang HK, Tseng SK (2001) Nitrate reduction by *Citrobacter diversus* under aerobic environment. *Appl Microbiol Biot* **55**, 90–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002530000363>

Huang S, Fu Y, Zhang H, Wang C, Zou C, Lu X (2023) Research progress of novel bio-denitrification technology in deep wastewater treatment. *Front Microbiol* **14**. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1284369>



- Johnson DR, Lee TK, Park J, Fenner K, Helbling DE (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>
- Kosgey K, Zungu PV, Bux F, Kumari S (2022) Biological nitrogen removal from low carbon wastewater. *Front Microbiol* **13**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.968812>
- Krishna Mohan TV, Nancharaiyah YV, Venugopalan VP, Satya Sai PM (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>
- Kuenen JG (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Microbiol* **6**, 320–326. <https://doi.org/doi:10.1038/nrmicro1857>
- Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B (2018) The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol* **16**, 263–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.9>
- Lee YY, Choi H, Cho KS (2018) Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N<sub>2</sub>O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification. *J Environ Sci Heal A* **54**, 16–29. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1503903>
- Liu B, Mao Y, Bergaust L, Bakken LR, 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>
- Liu JJ, Yuan Y, Li BK, Zhang Q, Wu L, Li XY i sur. (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>
- Lu H, Chandran K (2010) Factors promoting emissions of nitrous oxide and nitric oxide from denitrifying sequencing batch reactors operated with methanol and ethanol as electron donors. *Biotechnol Bioeng* **106**, 390–398. <https://doi.org/10.1002/bit.22704>
- Lu H, Chandran K, Stensel D (2014) Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Res* **64**, 237–254. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.042>
- Masoudi SMA, Hedayati Moghaddam A, Sargolzaei J, Darroudi A, Zeynali V (2018) Investigation and optimization of the SND–SBR system for organic matter and ammonium

nitrogen removal using the central composite design. *Environ Prog Sustain* **37**, 1638–1646. <https://doi.org/10.1002/ep.12847>

Metcalfe & Eddy Inc. (2003) Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, McGraw-Hill, New York.

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>

Moreno-Vivián C, Purificación C, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F (1999) Prokaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction among Bacterial Nitrate Reductases. *J Bacteriol* **181**, 6573–6584. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jb.181.21.6573-6584.1999>

Oh J, Silverstein J (1999) 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)

Onnis-Hayden A, Gu AZ (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>

Ortmeyer F, Begerow D, Guerreiro MA, 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>

Ortmeyer F, Guerreiro MA, Begerow D, Banning A (2023) Modified microbiology through enhanced denitrification by addition of various organic substances—temperature effect. *Environl Sci Pollut R* **30**, 60282–60293. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26784-x>

Prasetyo RA, Pertiwinigrum A, Erwanto Y, Yusiati LM, Fitriyanto NA (2018) Characterization of *Pseudomonas* sp. LS3K as nitrate removal agent at different C/N ratios under aerobic condition. U: Proceeding of the 2nd International Conference on Tropical Agriculture, Springer, str. 185–194.

Pravilnik (2020) Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. Narodne novine 26, Zagreb. [https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020\\_03\\_26\\_622.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2020_03_26_622.html) Pristupljeno 18. studenog 2024.

- Risgaard-Petersen N, Langezaal AM, Ingvarlsen S, Schmid MC, Jetten MSM, Op Den Camp HJM, i sur. (2006) Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* **443**, 93–96. <https://doi.org/10.1038/nature05070>
- Ruiz G, Jeison D, Chamy R (2003) Nitrification with high nitrite accumulation for the treatment of wastewater with high ammonia concentration. *Water Res* **37**, 1371–1377. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00475-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00475-X)
- Saleh-Lakha S, Shannon KE, Henderson SL, Goyer C, Trevors JT, Zebarth BJ, i sur. (2009) Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*. *Appl Environ Microb* **75**, 3903–3911. <https://doi.org/10.1128/AEM.00080-09>
- Shapleigh JP (2006) The denitrifying prokaryotes. U: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ured.) *The Prokaryotes*. Springer, New York, str. 405-425. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4\\_71](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30141-4_71)
- Sorokin DY (2005) Is there a limit for high-pH life? *Int J Syst Evol Micr* **55**, 1405-1406. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63737-0>
- Srinandan CS, D'souza G, Srivastava N, Nayak BB, Nerurkar AS (2012) Carbon sources influence the nitrate removal activity, community structure and biofilm architecture. *Bioresource Technol* **117**, 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.079>
- Sun H, Wu Q, Yu P, Zhang L, Ye L, Zhang X-X i sur. (2017) Denitrification using excess activated sludge as carbon source: Performance and the microbial community dynamics. *Bioresource Technol* **238**, 624-632. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.105>
- 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>
- Tang Y, Zhou C, Ziv-El M, Rittmann BE (2011) A pH-control model for heterotrophic and hydrogen-based autotrophic denitrification. *Water Res* **45**, 232-240. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.049>
- Thomsen TR, Kong Y, Nielsen PH (2007) Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 370-382. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00309.x>

- Turk O, Mavinic DS (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>
- 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>
- Wang S, Zhao J, Huang T (2019) High NO and N<sub>2</sub>O accumulation during nitrite denitrification in lab-scale sequencing batch reactor: influencing factors and mechanism. *Environ Sci Pollut R* **26**, 34377–34387. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06391-5>
- Wang Y, Lin X, Zhou D, Ye L, Han H, Song C (2016) Nitric oxide and nitrous oxide emissions from a full-scale activated sludge anaerobic/anoxic/oxic process. *Chem Eng J* **289**, 330–340. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.074>
- Ward MH, Jones RR, Brender JD, de Kok TM, Weyer PJ, Nolan BT, i sur. (2018) Drinking water nitrate and human health: An updated review. *Int J Env Res Pub He* **15**. <https://doi.org/10.3390/ijerph15071557>
- Wu G, Zhai X, Li B, Jiang C, Guan Y (2014) Endogenous Nitrous Oxide Emission for Denitrifiers Acclimated with Different Organic Carbons. *Procedia Environ Sci* **21**, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2014.09.004>
- Xi H, Zhou X, Arslan M, Luo Z, Wei J, Wu Z, i sur. (2022) Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification process: Promising but a long way to go in the wastewater treatment. *Sci Total Environ* **805**. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150212>
- Xu Z, Dai X, Chai X (2018) 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>
- 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>
- 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>

Yong YC, Wu XY, Sun JZ, Cao YX, 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>

Zhang H, Zhao Z, Li S, Chen S, Huang T, Li N, i sur. (2019a) Nitrogen removal by mix-cultured aerobic denitrifying bacteria isolated by ultrasound: Performance, co-occurrence pattern and wastewater treatment. *Chem Eng JI* **372**, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.04.114>

Zhang M, Pan L, Huang F, Gao S, Su C, Zhang M, i sur. (2019b) Metagenomic analysis of composition, function and cycling processes of microbial community in water, sediment and effluent of *Litopenaeus vannamei* farming environments under different culture modes. *Aquaculture* **506**, 280–293. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.038>

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

Zhao B, He YL, Zhang XF (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>

Zhao J, Wang D, Li X, Yang Q, Chen H, Zhong Y, i sur. (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>

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

Zumft WG (1997) Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiol Mol Biol R* **61**, 533–616. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mnbr.61.4.533-616.1997>

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

---

Vlastoručni potpis