Karakteristike aerobnih granula i proces aerobne granulacije u obradi otpadnih voda

Krznar, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:480123

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Katarina Krznar

6712/PT

KARAKTERISTIKE AEROBNIH GRANULA I PROCES AEROBNE GRANULACIJE U OBRADI OTPADNIH VODA

Modul: Biotehnologija u zaštiti okoliša
Mentor: Izv. prof. dr. sc. *Tibela Landeka Dragičević*

Zagreb, 2015

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za biološku obradu otpadnih voda

KARAKTERISTIKE AEROBNIH GRANULA I PROCES AEROBNE GRANULACIJE U OBRADI OTPADNIH VODA

Katarina Krznar 6712/PT

Sažetak: Aerobne su granule samo-imobilizirani sferični agregati mikroorganizama. Ovi gusti mikrobni agregati načinjeni su od različitih bakterijskih vrsta i obično sadrže milijune organizama po gramu biomase. Od ovih se bakterija očekuje da imaju različite uloge u razgradnji otpadnih voda koje sadrže različite organske tvari.

Na karakteristike aerobne granulacije utječu mnogi faktori: sastav supstrata, količina organskog utovara, hidrodinamička sila smicanja, vrijeme taloženja, hidrauličko vrijeme zadržavanja, aerobno gladovanje i sadržaj Ca^{2+} iona.

Prednosti aerobnih granula formiranih u SBR reaktorima jesu gušća i čvršća mikrobna struktura, dobra sposobnost taloženja i sposobnost rada pri velikom organskom opterećenju. Aerobne granule mogu se koristiti u pročišćavanju visoko onečišćenih otpadnih voda sa organskim sastojcima i toksičnim tvarima**.**

Ključne riječi: aerobne granule, aerobna granulacija, SBR, mikrobna struktura

Rad sadrži: 26 stranica, 6 slika, 2 tablice, 55 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Tibela Landeka Dragičević*

Rad predan: rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for the Biological Waste Water Treatment

CHARACTERISTICS OF AEROBIC GRANULES AND AEROBIC GRANULATION PROCESS FOR WASTE WATER TREATMENT

Katarina Krznar 6712/PT

Abstract: Aerobic granules are self-immobilized spherical aggregates of microorganisms. These dense microbial aggregates consist of various bacterial species and typically contain millions of organisms per gram of biomass. These bacteria are expected to play different roles in degrading wastewater containing various organic chemicals.

Characteristics of aerobic granulation are affected by many factors: composition of substrate, organic loading rate, hydrodynamic shear force, settling time, hydraulic retention time, aerobic starvation and content of Ca^{2+}.

The advantages of aerobic granules formed in SBRs are dense and strong microbial structure, good settling ability and ability to withstand a high organic loading rate. Aerobic granules can be used in treating high-strength wastewaters containing organics and toxic substances.

Keywords: aerobic granules, aerobic granulation, SBR, microbial structure
Thesis contains: 26 pages, 6 figures, 2 tables, 55 references
Original in: Croatian
Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb
Mentor: *PhD. Tibela Landeka Dragičević, Associate Professor*
Thesis delivered: September, 2015

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 2

2.1. Aerobne granule 2

2.1.1. Veličina aerobnih granula 2

2.1.1.1. Profil razvoja veličine aerobnih granula 3

2.1.2. Morfologija aerobnih granula 10

2.1.3. Gustoća i čvrstoća aerobnih granula 11

2.1.4. Specifična stopa iskorištavanja kisika 11

2.1.5. Stabilnost aerobnih granula tijekom skladištenja 11

2.1.6. Mikrobna struktura aerobnih granula 11

2.2. Aerobna granulacija 13

2.2.1. Faktori koji utječu na aerobnu granulaciju 14

2.2.1.1. Sastav supstrata 14

2.2.1.2. Količina organskog opterećenja 14

2.2.1.3. Hidrodinamička sila smicanja 14

2.2.1.4. Vrijeme taloženja 16

2.2.1.5. Hidrauličko vrijeme zadržavanja 16

2.2.1.6. Aerobno gladovanje 16

2.2.1.7. Povećana količina Ca^{2+} iona 17

2.2.2. Postupak formiranja aerobnih granula – mehanizam granulacije 18

3. ZAKLJUČAK 19

4. LITERATURA 20

1. UVOD

U posljednje se vrijeme pridaje sve više pozornost aerobnoj granulaciji, koja je važan dio biotehnologije u zaštiti okoliša u cilju pročišćavanja otpadnih voda.

Aerobna granulacija kombinacija je kemijskog inženjerstva i bioloških procesa u cilju razvoja kompaktne forme aktivnog mulja s dobrim svojstvima taloženja.

Aerobne su granule kompaktne i guste mikrobne zajednice, u kojima svaka individualna vrsta obavlja određenu radnju u cilju pročišćavanja otpadnih voda koje sadrže organske i toksične tvari. Formiranje aerobnih granula iz aktivnog mulja proces je koji ovisi o fizikalnim, kemijskim i biološkim uvjetima.

U ovom radu dat će se uvid u aerobne granule i njihove karakteristike te u proces aerobne granulacije i čimbenike koji utječu na nju. Osim toga, detaljnije će biti pojašnjen profil razvoja veličine aerobnih granula pod dva različita fizikalno kemijska uvjeta: fototrofni i ne-fototrofni uvjeti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Aerobne granule

Aerobne su granule guste mikrobne zajednice, formirane auto-imobilizacijom raznolikih mikroorganizama te obično sadrže milijune mikroorganizama po gramu biomase. Ni jedna od individualnih vrsta u ovim mikro-ekosustavima nije sposobna kompletno razgraditi određenu količinu otpadne vode. Okupljeni u granule, ovi mikroorganizmi imaju različite uloge u razgradnji složenih industrijskih otpadnih voda koje sadrže različite organske sastojke, nitrat i fosfor.

Suvremena tehnologija aerobnih granula mulja daje doprinos i poboljšanje biološkoj obradi otpadnih voda. Aerobne granule mogu se koristiti u pročišćavanju visoko onečišćenih otpadnih voda sa organskim sastojcima i toksičnim tvarima**.**

U usporedbi s konvencionalnim aktivnim muljem, aerobne granule imaju mnogobrojne prednosti: bolju sposobnost taloženja, jaču mikrobnu strukturu, bolje zadržavanje biomase i bolju sposobnost rada s toksičnim spojevima (Adav i sur., 2008a; Beun i sur., 1999; Liu i Tay, 2002; Morgenroth i sur., 1997).

2.1.1. Veličina aerobnih granula

Veličina granule bitan je čimbenik u oblikovanju fizikalnih svojstava i u određivanju karakteristika aerobnih granula.

Aerobne granule mulja bile su uspješno kultivirane u rasponu veličina od 0,02 mm (Liu i sur., 2005) do 9,0 mm (Wang i sur., 2004). U prosjeku, promjer aerobne granule mulja iznosi između 0,1 i 3,0 mm (Li i sur., 2008; Verawaty i sur., 2013; Liu i sur., 2012; Abdullah i sur., 2013; Li i sur., 2014).

Istraženo je da s porastom veličine granula biomase rastu i parametri poput brzina taloženja i gustoća biomase, dok istovremeno dolazi do smanjenja jačine granula, specifične hidrofobnosti i indeksa volumena mulja (SVI, eng. *Sludge Volume Index*).

Veličina granule utječe na njezina fiziološka i fizička svojstva. Veličina granule može ograničiti transport i difuziju mase zbog poroznosti strukture koja se smanjuje s porastom veličine granula. Poroznost granula bitan je faktor jer određuje dostupnost hranjivih tvari, kao i prodiranje nepoželjnih tvari. Osim toga, manje su aerobne granule više učinkovite za aerobnu obradu otpadne vode ukoliko imaju više živih stanica u određenom volumenu granula.

2.1.1.1. Profil razvoja veličine aerobnih granula

Istaknuto je u literaturi (Nor-Anuar i sur., 2007) da se profil razvoja veličine aerobnih granula zbiva pri dva različita fizikalno-kemijska uvjeta:

- ✓ Ne-fototrofni uvjeti
- ✓ Fototrofni uvjeti

Ta istraživanja provedena su u dva identična bioreaktora, nazvana Rnp i Rp, koji su radili u ne-fototrofnim odnosno fototrofnim uvjetima. Reaktor Rp bio je pod stalnim djelovanjem svjetla koje je podržavalo rast fotosintetskih mikroorganizama, dok reaktor Rnp nije bio osvijetljen. Razvijena je shema kako bi se shvatio mehanizam razvoja veličine aerobne granule tijekom procesa granulacije.

Reaktori unutarnjeg promjera 65 mm i radnog omjera visina/promjer (H/D, eng. *Height/Diameter*) 17, nazvani Rnp odnosno Rp, bili su postavljeni i djelovali u ne-autotrofnim odnosno autotrofnim uvjetima sa radnim volumenom 3 L.

Reaktori su bili opremljeni sa cijevi za dotok tekućine koja se nalazila na dnu reaktora, otvora za otpadnu vodu lociranog na sredini visine reaktora i otvora za uzorkovanje miješane tekućine i granuliranog mulja.

Kompresor za zrak opskrbljivao je sustav s kisikom iz zraka preko difuzora. Brzina protoka zraka bila je 4 L/min kako bi potaknula formiranje finih mjehurića u cilju nastajanja homogeniziranog mulja. Otopljeni je kisik (DO, eng. *Dissolved Oxygen*) bio u reaktoru konstantno promatran tijekom perioda aeracije SBR ciklusa.

Temperatura i pH motreni su i određivani pH metrom, a sonde su bile postavljene u sredini visine oba reaktora.

Osvjetljenje reaktora Rp bilo je pod konstantnom opskrbom svjetlo/mrak u ciklusu od 16/8 h.

Reaktori su radili u uzastopnim SBR ciklusima, u kontinuiranom radu od 24h.

Operativno razdoblje i faze SBR-ova u granulaciji aerobnih granula mulja u fototrofnim uvjetima (AGSp, eng. *Aerobic Granular Sludge under phototrophic condition*) i ne-fototrofnim uvjetima (AGSnp, eng. *Aerobic Granular Sludge under non-phototrophic condition*) prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Operacije SBR za aerobnu granulaciju AGS_p odnosno AGS_{np} (Nor-Anuar i sur., 2007)

FAZE RADA BIOREAKTORA	**AGS_p**	**AGS_{np}**
	Vrijeme (min)	Vrijeme (min)
aeracija	120	110
taloženje	5	5
pražnjenje	5	5
hranjenje	10	60
mirovanje	35-40	0
Ukupno ciklusi po danu	8	8

U oba reaktora, Rp i Rnp, dobavljana je sintetiska otpadna voda s dna rektora.

Opterećenje s KPK iznosilo je 1,6 g KPK/Ld, a omjer KPK/N je iznosio 8,3.

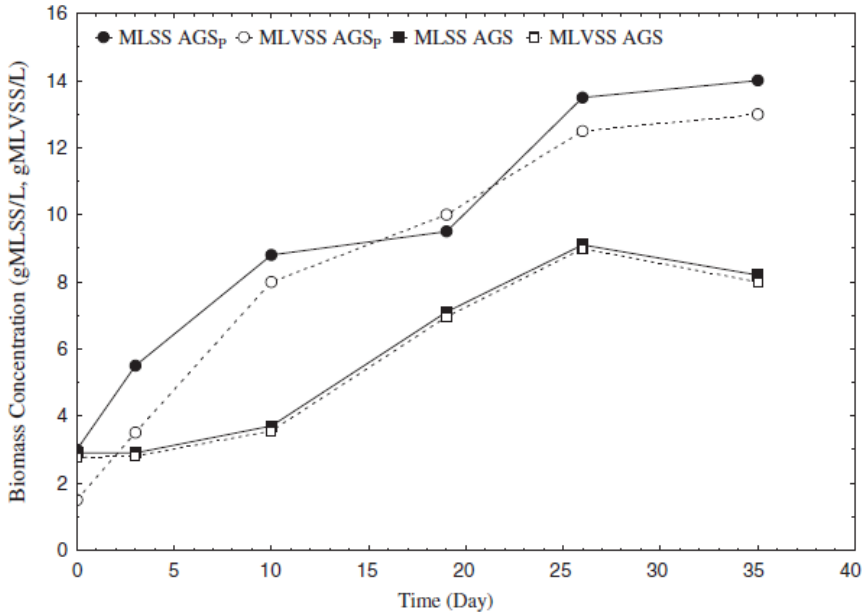
Sastav sintetske otpadne vode naveden je u Tablici 2.

Tablica 2. Sastav sintetske otpadne vode za uzgoj aerobnih granula (Nor-Anuar i sur., 2007).

Medij	**sastav**	**opaske**
Medij O	65,1 mM NaAc	
	3,7 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O	KPK = 1,6 g
	4,8 mM KCl	L^{-1} d
Medij N	35,2 mM NH_4Cl	
	2,2 mM K_2HPO_4	KPK = 8,3
	4,4 mM KH_2PO_4	
Elementi u tragovima (10 ml L^{-1})	1 g $FeSO_4$ x $7H_2O$	L^{-1}
	3 g $CuSO_4$ x $5H_2O$	
	3 g $CoCl_2$ x 6 H_2O	
	16,4 g $CaCl_2$ x 2 H_2O	
	10,1 g $MnCl_2$ x 4 H_2O	
	4,5 g $ZnSO_4$ x 7 H_2O	
	100 g EDTA	
Voda	1200 ml destilirane vode	Totalni pritok 1500 ml po ciklusu

Formiranje aerobnih granula bilo je pozorno motreno pomoću elektronskog mikroskopa. Određivane su morfološke i strukturne promjene granula, pomoću sustava analize slika. Prije mikroskopskih pregleda, granule su bile raspoređene na temelju veličina pomoću sita (0,2; 0,4 i 0,6 mm) i temeljem toga raspoređene u 3 skupine: male, srednje i velike granule.

Koncentracija mikrobne biomase izražđena kao MLSS (MLSS, eng. *Mixed Liquor Suspended Solids*) i MLVSS (MLVSS, eng. *Mixed Liquor Volatile Suspended Solids*) u AGSnp i AGSp bila je uspoređena. AGSnp se odnosi na aerobne granule mulja koje su bile razvijene pod ne-fototrofnim uvjetima, a AGSp podrazumijeva da su granule bile uzgojene pod fototrofnim uvjetima. Profil koncentracije biomase tijekom procesa granulacije za AGSp i AGSnp prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Profil koncentracije biomase za AGSp i AGSnp ukazuje na porast biomase tijekom procesa granulacije. AGSp granule pokazuju veću sposobnost nakupljanja i porasta koncentracije biomase u odnosu na AGSnp (Nor-Anuar i sur., 2007).

Početne koncentracije bimase bile su 3 g MLSS/L za oba tipa aerobnih granula. Nakon 4 dana reakcije u Rp bio je uočen porast koncentracije biomase kod AGSp do 5,5 g MLSS/L, dok je kod AGSnp ostao na istoj razini (3 g MLSS/L). Nakon 10 dana reakcije koncentracija je biomase u slučaju AGSp porasla na 8,8 g MLSS/L, a kod AGSnp porast je i dalje neznatan. U

periodu između 10. i 19. dana zabilježen je porast biomase kod AGSnp s 3,7 gMLSS/L na 7,1 gMLSS/L, dok je u istom razdoblju kod AGSp prirast biomase bio povećan za samo 0,4 gMLSS/L. Od 19. dana eksperimenta, koncentracija je biomase kod AGSnp nastavila rasti sporijom brzinom, kako bi se omogućili uvjeti granulacije u cilju uspješnog razvoja granula (Lee i sur., 2010).

Iz mikrobiološkog pogleda, ovaj period omogućuje mikroorganizmima da nadopune enzime za resinteze esencijalnih metabolita prije nego što dođe do mikrobnog eksponencijalnog rasta. Ono što je najvažnije jest da je pod ovim uvjetima poboljšana stabilnost granula za dugoročan rad.

Nadalje, usporavanje rasta je posljedica dezintegracije aerobnih granula gdje je došlo do ograničenja prijenosa kisika kao rezultat kompeticije između autotrofnog i heterotrofnog rasta što je konačno dovelo do deficita denitrifikacije u središtu granule (Wan i sur., 2009).

To bi vjerojatno uzrokovalo raspad i odvajanje aerobnih granula u manje fragmente.

Osim toga, uzrok manje produkcije biomase kod AGSnp u odnosu na AGSp mogao bi biti zbog konverzije supstrata do CO_2 i H_2O tijekom respiracije, gdje veća produkcija CO_2 u AGSnp kulturi objašnjava manji prinos biomase aerobnih granula (Liu i Tay, 2008).

Dezintegrirane aerobne granule bile su uklonjene ispiranjem otpadne vode iz Rp sustava.

Neke studije tvrde da dezintegrirane granule imaju ulogu nukleusa za novi ciklus granulacije (Lee i sur., 2010; Hu i sur., 2005).

U 26. danu koncentracija biomase kod AGSp naglo se povećala na 13,5 g MLSS/L (Slika 1). U toj se fazi vidjelo da zrele aerobne granule imaju formiranu dodatnu strukturu na površini granula zbog novih povezivanja među flokulama.

Neuobičajeno zrele AGSp s veličinom većom od 5 mm bile su otkrivene na dnu reaktora Rp koji je radio pod fototrofnim uvjetima. Te iste granule bile su u mogućnosti održati strukturne karakteristike čak i nakon 90 dana produljene granulacije.

Unatoč velikoj veličini, AGSp su bile ovalnog asimetričnog oblika, smeđe boje i s dobro definiranom vanjskom površinom. Nove se flokule nastoje pričvrstiti na AGSp i tako obavijati vanjsku površinu zrele granule.

Na temelju mikroskopskih istraživanja, zrele su se AGSnp razlikovale 2 mm od zrelih AGSp čija je veličina iznosila preko 5 mm.

To ukazuje na različitu morfologiju i strukturne karakteristike granula uzgojenih pod različitim fototrofnim uvjetima.

Uobičajene veličine aerobnih granula u rasponu su između 2 mm i 4 mm (Liu i sur., 2005). Iako je AGSnp bio u mogućnosti povećati veličinu granula do 5 mm, idealna veličina

aerobnih granula optimalnih svojstava i ekonomske učinkovitosti za SBR tretman nalazi se između 1,0 mm i 3,0 mm (Toh i sur., 2003a).
Song i sur. (2010) sugeriraju da bi se zrela aerobna granula mogla koristiti kao cijepivo kako bi služila kao supstrat za nove epizode granulacije.
Značajan pad koncentracije biomase kod AGSnp bio je viđen 35. dan eksperimenta. Do istog je došlo zbog dezintegracije granula, slično onom što se desilo tijekom granulacije AGSp.

Mikroskopska i vizualna zapažanja ukazala su da su dezintegracije zrelih granula rezultat cijepanja – raskidanja puknutih struktura granula. Cijepanje – raskidanje granula otkrilo je unutarnju strukturu koja se sastoji od središnje jezgre bakterija oko koje se nalazi šupljina okružena raznolikim bakterijskim morfotipovima. Dezintegracijom i cijepanjem zrelih granula nastaju manji fragmenti.
Ovaj profil strukture sugerira da je slično ponašanje slijedilo događaj koji se zbio kod AGSp između 10. i 18. dana eksperimenta.
Pošto je AGS imao kasnu fazu dezintegracije, to može sugerirati da je potreban duži period za razvoj granula. Nor-Anuar i sur. (2007) smatrali su kako je potrebno 90 dana granulacije da bi se uzgojio AGS.
Nakon 25. dana, brzina porasta koncentracije biomase kod AGSp postaje manja i ne dolazi do uočljivih promjena granula. U ovoj fazi aerobni mikroorganizmi počinju rasti i ukupni suspendirani mulj postiže najveću vrijednost koncentracije od 14 g MLSS/L. Kako se proces aerobne granulacije nastavlja, tako suspendirane flokule prelaze najprije u kompaktne agregate te potom u kompaktne granule. Dakle, pretpostavlja se da je granulacija završena u onom trenutku kada je formirana jasna granica i pravilan oblik granula kao što je opisao Liu i sur. (2008).

U usporedbi s AGSnp, sve formirane AGSp granule imale su stabilan, pravilan, gust i kompaktan oblik, te je bila olakšana sposobnost taloženja. Obje MLVSS koncentracije, i AGSp i AGSnp su se bitno povećale, što ukazuje na porast biomase tijekom granulacije mulja.
Nacijepljeni mulj razvio se u stabilne granule. Nakon nekog vremena, broj je fototrofnih fakultativno anaerobnih bakterija bio povećan i okupljen u unutarnjem dijelu granula zajedno s bakterijama koje su bile manje sposobne i nisko tolerantne na kisik. Bakterije koje su dobro tolerirale kisik bile su s vanjske strane granula. Potom su granule bile sklone raspadanju u oblik nepravilnih, malih flokula i čestica. Flokule i čestice iz raspadnutih granula

rekombinirale su se pod aerobnim uvjetima koji omogućuju granulama da porastu, rezultirajući formiranjem zrelog AGSp. Razvoj AGSnp tekao je na isti način samo što je bilo potrebno više vremena zbog različitih fizikalno-kemijskih okolnosti. Navedene procese uočili su Sturm i Irvine (2008) i Hu i sur. (2005).

Na temelju navedenog, postoji mogućnost uzgoja aerobnih granula u SBR pri fototrofnim uvjetima. Granule proizvedene u Rp pružaju prihvatljiviji ishod u odnosu na AGSnp. Faza mirovanja u trajanju od 35-40 min, primijenjena u bioreaktoru tijekom granulacije, pokazuje kako je dulje vrijeme gladovanja potrebno da bi nastale AGSp s većom koncentracijom biomase. Ovaj su fenomen potkrijepila istraživanja Liu i Tay (2004a,b) i Li i sur. (2006). Pošto je koncentracija biomase AGSp bila u konačnici viša od one u AGSnp, pretpostavlja se da su fototrofne fakultativno anaerobne bakterije živjele udobno u unutarnjem dijelu granula. Očito je da kraće vrijeme gladovanja vodi do produkcije manje koncentracije biomase kod AGSp te je razlika u trajanju formiranja također značajna, što su zapazili Pijuan i sur. (2009) i Li i sur. (2006).

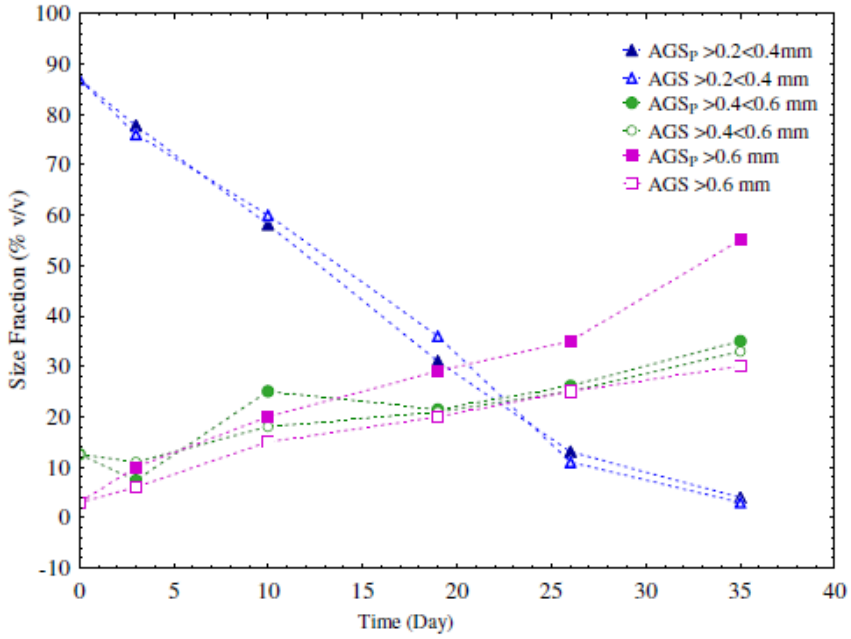
Profil razvoja veličine aerobnih granula u Rp odnosno Rnp prikazan je slikom 2.

I AGSp i AGSnp razvili su se iz mulja kojeg su činile nestabilne i labave flokule prosječne veličine manje od 0,4 mm.

Tijekom granulacije, AGSp i AGSnp imale su slične sheme razvoja veličine granula. Do smanjenja broja granula došlo je vjerojatno zbog formacije većih granula veličine između 0,4 i 0,6 mm. Na 10. dan eksperimenta dolazi do porasta veličine AGSnp. Unatoč prirastu veličine, dobro definirani AGSnp nisu još formirani već ostaju kao granule s istaknutom labavom mrežastom strukturom. Ta mrežasta struktura granula 19. dana prelazi u stabilne granule s glatkom vanjskom površinom. U ovoj fazi oba su tipa granula formirana, ali s loše definiranom strukturom.

Koncentracija biomase pokazuje nagli porast između 24. i 45. dana eksperimenta te se stabilizira između 45. i 70. dana.

Frakcije AGSp 26. dana nastavljaju rasti i 50% ukupnog volumena frakcija postiže veličinu iznad 0,6 mm. U tom trenutku AGSp ima oko 1,5 puta veći omjer veličine frakcija nego li AGSnp.



Slika 2. Razvoj veličine AGSp odnosno AGSnp (AGS) u SBRnp odnosno SBRp (Nor-Anuar i sur., 2007)

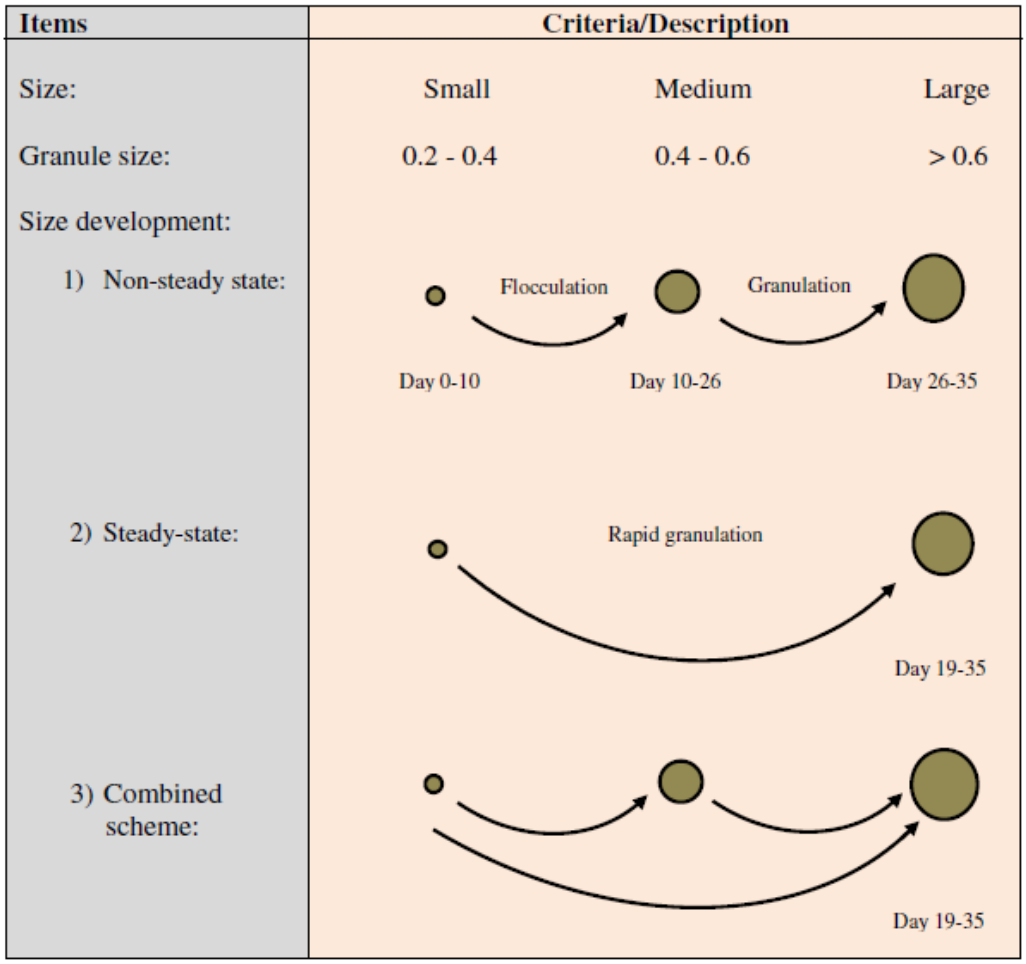
Tijekom ovih eksperimentalnih promatranja, razvijena je ilustrativna shema s prikazom mehanizma razvoja veličine aerobne granule (Slika 3).

Predložena shema pruža jednostavan koncept razvoja veličine aerobne granule u procesu granulacije.

Pokazatelj uspješne granulacije radije je kompaktnost i sposobnost sedimentacije granula nego li sama veličina granula.

Porast veličine AGSp dešava se vjerojatno zbog porasta koncentracije biomase, što vodi do naseljavanja fakultativno anaerobnih mikroorganizama koji preferiraju rast u unutarnjem dijelu granula i nakupljanja minerala formirajući taloge koji grade i jačaju strukturu granula (Juang i sur., 2010; D'Abzac i sur., 2010; Liu i sur., 2003a).

Različiti tipovi formiranja aerobnih granula slijede sličnu shemu razvoja veličine unatoč različitim fizikalno-kemijskim uvjetima.



Slika 3. Predložena shema razvoja veličine aerobnih granula (Nor-Anuar i sur., 2007)

2.1.2. Morfologija aerobnih granula

Aerobne granule imaju dobro definiran izgled i oblik.

Aerobne su granule tamnosmeđe boje s dodatnom strukturom žućkasto smeđih mrlja učvršćenih na površini granula.

Cijepanjem – raskidanjem granula može se postići uvid u unutarnju strukturu.

Unutrašnjost granule sastoji se od središnje jezgre bakterija oko koje se nalazi šupljina okružena raznolikim i mnogobrojnim bakterijskim morfotipovima.

2.1.3. Gustoća i čvrstoća aerobnih granula

Specifična gravitacija aerobnih granula iznosi 1,004 – 1,065 (Etterer i Wilderer, 2001; Tay i sur., 2001a). Granule s dobrom čvrstoćom podnose visok stupanj abrazije i smicanja. Aerobne

granule malih veličina više su kompaktne u usporedni s većim granulama (Toh i sur., 2003b; Yang i sur., 2004).

2.1.4. Specifična brzina iskorištavanja kisika aerobnih granula

Mikrobna aktivnost mikroorganizama karakterizirana je specifičnom brzinom iskorištavanja kisika (SOUR, eng. *Specific Oxygen Utilization Rate*).

Biokemijske reakcije povezane s bakterijskom metabolizmom pokazuju aproksimirani linearni odnos između iskorištenja kisika i produkcije ugljikovog dioksida.

SOUR je bitna karakteristika za procjenu sposobnosti aerobnih granula za obradu industrijskih otpadnih voda velikih opterećenja.

2.1.5. Stabilnost aerobnih granula tijekom skladištenja

Primjena aerobnih granula bila je smatrana kao jedna od obećavajućih biotehnologija u obradi otpadnih voda (Adav i sur., 2008b).

Nažalost, aerobne granule mogu lako izgubiti stabilnost i aktivnost tijekom skladištenja, koje može biti ozbiljna barijera za njihovu praktičnu primjenu (Adav i sur., 2008a; Zhang i sur., 2005).

Tay i sur. (2002a) napominju da granule postaju nepravilnije i manje te otpuštaju topljive organske materijale nakon 8 tjedana skladištenja.

Tay i sur. (2002b) objašnjavaju da aerobne granule koje su bile hranjene glukozom gube oko 60% metaboličke aktivnosti, a aerobne granule hranjene acetatom gube 90% metaboličke aktivnosti, nakon 4 mjeseca skladištenja na temperaturi od 4 °C u vodi iz slavine.

2.1.6. Mikrobna struktura i raznolikost aerobnih granula

Aerobne se granule sastoje od različitih bakterijskih vrsta i obično sadrže milijune organizama po gramu biomase.

Aerobne granule karakterizirane su kao gusti i čvrsti mikrobni agregati sa sferičnim vanjskim oblikom.

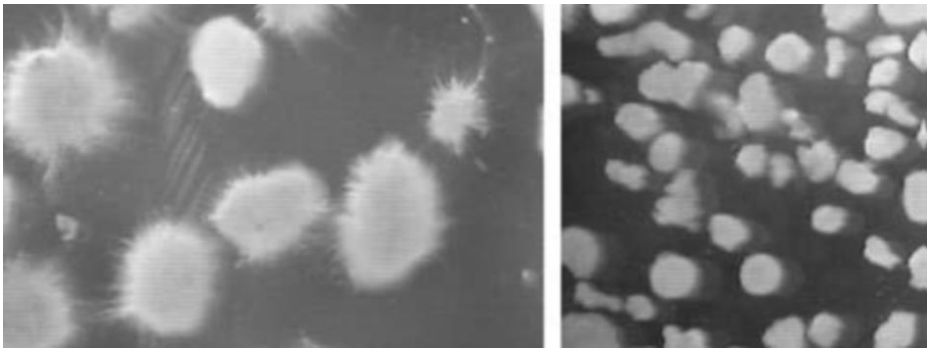
Mikrobna raznolikost aerobnih granula bila je istražena tehnikama molekularne biotehnologije (Yi i sur., 2003; Tay i sur., 2002c; Jiang i sur., 2003; Meyer i sur., 2003; Tsuneda i sur., 2003). Heterotrofne, nitrificirajuće, denitrificirajuće, fosfor-akumulirajuće i glikogen-akumulirajuće bakterije bile su identificirane u aerobnim granulama razvijenim pod

različitim uvjetima (Jiang i sur., 2003; Meyer i sur., 2003; Tsuneda i sur., 2003; Lin i sur., 2003; Yang i sur., 2003).

Obligatne aerobne amonij-oksidirajuće bakterije *Nitrosomonas* spp. nalaze se uglavnom u unutrašnjosti, na dubini od 70 do 100 μm od površine granule, a aerobne granule sadržavaju pore i kanale koji prodiru do 900 μm dubine ispod površine granule. Pore i kanali olakšavaju transport kisika i hranjivih tvari u granule, a metabolita van granula. Za potpuno iskorištenje aerobnih mikroorganizama u granulama, optimalni dijametar aerobnih granula trebao bi biti manji od 1,6 mm.

Mikrobna je raznolikost aerobnih granula usko povezana sa sastavom podloge – medija u kojem su one bile razvijene i strukturom aerobnih granula.

Tay i sur. (2001) istraživali su formiranje aerobnih granula iz nacijepljenog mulja. Uspoređivali su mikroskopskim tehnikama granule koje su bile kultivirane u dva SBR reaktora. U jednom su reaktoru bile hranjene s glukozom, a u drugom s acetatom. Nitaste su bakterije prevladavale u nacijepljenom mulju koji je imao labavu, nepravilnu i paperjastu strukturu. Aerobne su granule sazrele u oba SBR reaktora nakon 3 tjedna. U usporedni s granulama hranjenim s acetatom, dominantne nitaste bakterije u granulama hranjenim s glukozom učinile su vanjsku površinu granula paperjastom (Slika 4). Granule koje su bile hranjene s glukozom sadržavale su i neke koki bakterije.

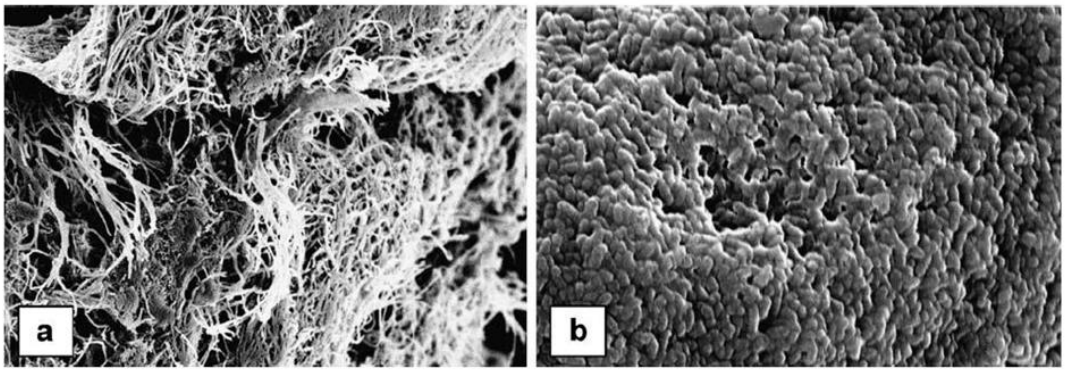


Slika 4. Mikrostrukture aerobnih granula hranjenih: a) glukozom, b) acetatom (Tay i sur., 2001).

Analizom, skenirajućim elektornskim mikroskopom (SEM, eng. *Scanning Electron Microscope*), uočeno je da nitasti mikroorganizmi dominiraju na vanjskoj površini aerobnih granula koje su bile hranjene glukozom.

Aerobne granule hranjene acetatom imale su veoma kompaktnu mikrostrukturu te su prevladavale bakterije štapićastog oblika (Slika 5).

To podrazumijeva da je aerobna granulacija graduirani proces koji uključuje prijelaz nacijepljenog mulja u kompaktne nakupine, zatim u granulirani mulj i u konačnici do zrelih granula.



Slika 5. Mikrostrukture aerobnih granula hranjenih: a) glukozom, b) acetatom (Tay i sur., 2001).

Promjene u mikrobnoj strukturi pripisane su fiziološkoj prilagodbi raznolikih mikroorganizama tijekom procesa aerobne granulacije. Do promjena u bakterijskom sastavu i obilju vrsta došlo je zbog interakcija među različitim grupama bakterija i mikronišama koje one zauzimaju.

2.2. Aerobna granulacija

Aerobna granulacija kombinacija je kemijskog inženjerstva i bioloških procesa u cilju razvoja kompaktne forme aktivnog mulja s dobrim svojstvima taloženja.

Porast koncentracije biomase rezultat je dinamičnog povezivanja mikroorganizama i agregacije minerala u obilk gustih, jakih i sferičnih agregata biomase (Simoes i sur., 2009). Istraženo je da povezivanje mikroorganizama povećava otpornost biofilma tijekom kemijskih i mehaničkih tretmana.

Većina je aerobnih granula uzgojena u SBR reaktorima.

SBR reaktori koriste se za pročišćavanje otpadnih voda iz industrija i otpadnih voda iz domaćinstva.
U SBR reaktoru, u istom spremniku, se provode faze ciklusa obrade, i to: punjenje, aeracija, taloženje i odlijevanje-dekantiranje obrađene otpadne vode.

U usporedbi s konvencionalnim aktivnim muljem, prednosti aerobnih granula formiranih u SBR reaktoru jesu gusta i čvrsta mikrobna struktura, dobra svojstva taloženja, dobro zadržavanje biomase te sposobnost da izdrže veliku količinu organskog opterećenja.

Proučavanjem modela aerobne granulacije zaključuje se da su glavni čimbenici koji utječu na aerobnu granulaciju: karakteristike aerobnih granula, mikrobna struktura i raznolikost, te njihova industrijska primjena, i važni su za cjelovito razumijevanje aerobne granulacije.

2.2.1. Faktori koji utječu na aerobnu granulaciju

U literaturi su navedeni brojni čimbenici koji utječu na aerobnu granulaciju:

- ✓ Sastav supstrata
- ✓ Organsko opterećenje
- ✓ Hidrodinamička sila smicanja
- ✓ Vrijeme taloženja
- ✓ Hidrauličko vrijeme zadržavanja
- ✓ Aerobno gladovanje
- ✓ Povećana količina Ca^{2+}

2.2.1.1. Sastav supstrata

Uzgoj aerobnih granula istražen je korištenjem različitih supstrata, uključujući glukozu, acetat, etanol, fenol i sintetičku otpadnu vodu (Beun i sur., 1999; Peng i sur., 1999; Tay i sur., 2001; Moy i sur., 2002; Jiang i sur., 2002).
Aerobne su granule također bile uzgojene s nitrificirajućim bakterijama i neorganskim izvorom ugljika (Tay i sur., 2002d; Tsuneda i sur., 2003). Ove su nitrificirajuće granule pokazale izvrsnu sposobnost nitrifikacije.
Aerobne granule koje su bile hranjene glukozom imale su nitastu strukturu, dok aerobne granule hranjene acetatom nisu imale nitastu, već vrlo kompaktnu strukturu gdje su

prevladavale štapićaste vrste. Iz navedenog se zaključuje da mikrostruktura granule i raznolikost vrsta ovise o vrsti izvora ugljika.

2.2.1.2. Količina organskog opterećenja

Istraživanja na biofilmu pokazala su da je struktura biofilma blisko povezana sa organskim opterećenjem (OLR, eng. *Organic Loading Rate*) (Liu i sur., 2007).

OLR jedan je od najkritičnijih faktora u formiranju aerobnih granula. Aerobne granule formiraju se u vrlo širokom rasponu OLR, od 2,5 do 15 kg KPK/m^3d (Moy i sur., 2002; Liu i sur., 2003a). Tay i sur. (2004) obrazlažu da je jako teško formirati granule kada je OLR manji od 2 kg KPK/ m^3d.

Studija o učincima OLR na formiranje i stabilnost granula pokazuju da niski OLR rezultira sporijim formiranjem granula, te je potrebno dulje vrijeme za postizanje stabilnog stanja.

Iako OLR značajno ne utječe na formiranje aerobnih granula, o OLR ovise fizikalne karakteristike, poput primjerice: srednja veličina aerobnih granula. Liu i sur. (2003a) objašnjavaju da je srednja veličina aerobnih granula raste s povećanjem OLR.

2.2.1.3. Hidrodinamička sila smicanja

Formiranje aerobnih granula i stabilnost granula poboljšano je pri visokim silama smicanja (Shin i sur., 1992; Tay i sur., 2001).

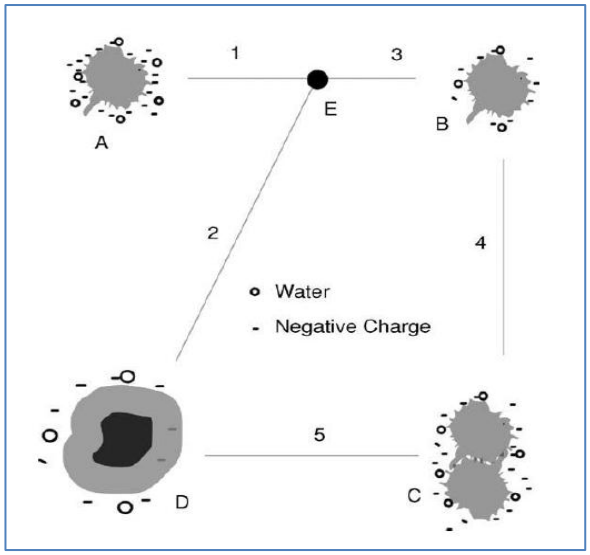
Utjecaj sile smicanja na granule smatran je jednim od najvažnijih faktora koji utječu na formiranje aerobnih granula.

Više lokalne sile smicanja u SBR rezultirale su gušćim granulama manjeg promjera (De Kreuk i van Loosdrecht, 2006).

Pri višim silama smicanja bile su razvijene pravilnije, okruglije i kompaktnije aerobne granule.

Istaknuto je da je proizvodnja izvanstaničnih polisaharida blisko povezana sa silom smicanja, a stabilnost aerobnih granula ovisi o produkciji izvanstaničnih polisaharida (Tay i sur., 2001).

Pošto su ekstracelularne polimerne tvari (EPS, eng. *Extracellular Polymeric Substances*) glavna komponenta flokula i biofilmova, pretpostavlja se da te tvari igraju dominantnu ulogu u svim tipovima formiranja biofilma, uključujući flokulaciju i granulaciju (Slika 6).



Slika 6. Ilustracija efekta EPS na formiranje i rast aerobnih granula (Li i sur., 2006).

Aerobne granule imaju veću hidrofobnost površine stanica u odnosu na nacijepljeni mulj. Neka istraživanja sugeriraju da polisaharidi u EPS igraju glavnu ulogu u formiranju tih mikrobnih agregata. Povećana produkcija ekstracelularnih polisaharida pri visokim silama smicanja može doprinijeti kompaktnijoj i čvršćoj strukturi aerobnih granula. Zhang i sur. (2007) izvještavaju da ekstarcelularni proteini mogu imati najvažniju ulogu u kontroliranju formiranja i stabilnosti aerobnih granula. Osim toga, pošto protein sadrži veliku količinu negativno nabijenih aminokiselina, protein se više upliće u elektrostatske veze s viševalentnim kationima negoli šećeri, te postaje ključni faktor u stabiliziranju strukture agregata.

2.2.1.4. Vrijeme taloženja

Kratko vrijeme taloženja selektira rast bakterija koje se brzo talože, dok se mulj s lošim svojstvima taloženja ispire iz sustava.

Qin i sur. (2004) obrazložili su da su aerobne granule bile uspješno kultivirane i postale dominantne samo u SBR koji je radio pri vremenu taloženja 5 min.

Smjese aerobnih granula i suspendiranog mulja bile su promatrane u SBR reaktorima pri vremenima taloženja od 20, 15 i 10 min. Bila je potaknuta produkcija ekstracelularnih polisaharida, a hidrofobnost površine stanica je pri kratkim vremenima taloženja značajno porasla.

Ova otkrića ilustriraju činjenicu da je aerobna granulacija vođena selektivnim pritiskom, te da formiranje i karakteristike granula mogu biti kontrolirani manipuliranjem vremena taloženja.
Izbor optimalnog vremena taloženja vrlo je važan faktor u procesu aerobne granulacije. Granule s izvrsnim svojstvima taloženja neophodne su za učinkovito funkcioniranje biološkog sustava obrade otpadnih voda.

2.2.1.5. Hidrauličko vrijeme zadržavanja

Ispiranje flokula jedan je od neophodnih operativnih uvjeta za aerobnu granulaciju, pošto se flokule mogu lako opskrbiti supstratom, te zatim potisnuti granule.
Kratko vrijeme ciklusa stimulira mikrobnu aktivnost i proizvodnju stanica polisaharida te također poboljšava hidrofobnost stanica.
Kratko vrijeme taloženja i hidrauličko vrijeme zadržavanja (HRT, eng. *Hydraulic Retention Time*) obično se koriste kao čimbenici koji su selektivnog učinka na formiranje granula.

2.2.1.6. Aerobno gladovanje

Faza gladovanja igra značajnu ulogu u formiranju aerobnih granula.
Uzastopni koraci hranjenja, prozračivanja, taloženja i pražnjenja bili su provedeni u SBR. Mikroorganizmi u SBR trebali su doživjeti periodične fluktuacije. Kako je rastao broj radnih ciklusa, vrijeme potrebno za razgradnju otpadnih tvari se smanjivalo.
Gladovanje je potaknulo formiranje aerobnih granula. Bakterije su postajale hidrofobnije što je unaprijedilo granulaciju iz flokula (Tay i sur., 2001; Li i sur., 2006).
Agregacija je smatrana strategijom stanica u borbi protiv gladi.
U literaturi se navodi da bakterija postaje hidrofobnija što olakšava adheziju ili agregaciju u uvjetima gladovanja (Bossier i Verstraete., 1996; Tay i sur., 2001).
Ove promjene, gladovanje, rezultiraju proces mikrobne agregacije te granule postaju jače i gušće.

2.2.1.7. Povećana količina Ca^{2+} iona

Prisutnost kalcijevog iona u hrani pospješuje proces aerobne granulacije. U aerobnim granulama u kojima ima više Ca^{2+} iona poboljšane su karakteristike taloženja i jačine granula, te ima više polisaharida (Jiang i sur., 2003).

Ion Ca^{2+} može se vezati na negativne grupe koje su prisutne na površini bakterija i na ekstracelularnim molekulama polisaharida te na taj način djeluje kao most za unaprjeđenje bakterijskih agregacija.

2.2.2. Postupak formiranja aerobnih granula – mehanizam granulacije

Mehanizmi aerobne granulacije su, (Chisti, 1999):

1. Fizikalni pokreti koji potiču kontakte među bakterijama.
   Čimbenici koji su uključeni u ovaj korak jesu hidrodinamika, gravitacija, difuzijski prijenos tvari, termodinamički učinci i pokretljivost stanice
2. Stabilizacija višestaničnih kontakata koji su rezultat prvotnih sila privlačenja.
   Spomenute sile privlačenja jesu: fizikalne sile (npr. Van der Waalsove sile, privlačne sile između suprotno nabijenih iona, napetost površine, hidrofobnost, nitaste bakterije koje mogu premostiti pojedinačne stanice); kemijske, i biokemijske sile, uključujući dehidraciju površine stanice, stapanje staničnih membrana te kolektivno djelovanje u bakterijskoj zajednici
3. Sazrijevanje agregacije stanica kroz proizvodnju ekstracelularnog polimera, rast staničnih klastera, metaboličke promjene, okolišno –izazvane genetičke učinke koji olakšavaju interakcije među stanicama i dovode do vrlo organizirane mikrobne strukture. Oblikovanje ustaljenog stanja trodimenzionalne strukture mikrobnih agregata zahvaljujući hidrodinamičkim silama smicanja

3. ZAKLJUČAK

Na temelju činjenica istaknutih u ovome radu, može se zaključiti:

1. Aerobne su granule guste mikrobne zajednice, formirane auto-imobilizacijom raznolikih mikroorganizama te obično sadrže milijune mikroorganizama po gramu biomase
2. Promjer aerobnih granula može biti u rasponu između 0,02 i 9,0 mm dok prosječni promjer iznosi 0,1 – 3,0 mm
3. Pokazatelj uspješne granulacije radije je kompaktnost i sposobnost taloženja granula nego li veličina granula
4. Različiti tipovi formiranja aerobnih granula slijede sličnu shemu razvoja veličine unatoč različitim fizikalno-kemijskim uvjetima
5. U aerobnim su granulama identificirane heterotrofne, nitrificirajuće, denitrificirajuće , fosfor-akumulirajuće i glikogen-akumulirajuće bakterije
6. Čimbenici procesa aerobne granulacije su sastav supstrata, organsko opterećenje, hidrodinamička sila smicanja, vrijeme taloženja, hidrauličko vrijeme zadržavanja, aerobno gladovanje, povećana količina Ca^{2+} iona

4. LITERATURA

1. Abdullah, N., Yuzir, A., Curtis, T.P., Yahya, A., Ujang, Z. (2013) Characterization of aerobic granular sludge treating high strength agro-based wastewater at different volumetric loadings. *Bioresour. Technol*. **127**, 181–187.
2. Adav, S.S., Lee, D.J., Show, K.Y., Tay, J.H. (2008a). Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnol. Adv*. **26**, 411–423.
3. Adav, S.S., Lee, D.J., Tay, J.H., (2008b) Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Res*. **42**, 1644–1650.
4. Beun, J.J., Hendriks, A., van Loosdrecht, M.C.M., Morgenroth, E., Wilderer, P.A., Heijnen, J.J. (1999) Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Res.* **33**, 283–291.
5. Bossier, P., Verstraete, W. (1996) Triggers for microbial aggregation in activated sludge? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 1-12.
6. Chisti, Y. (1999) Shear sensitivity. U: Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation. Flickinger, MC., Drew, SW. (Eds), vol. 5. New York, Wiley, 379–406.
7. D'abzac, P., Bordas, F., Joussein, E., Hullebusch, E.V., Lens, P.N.L., Guibaud, G. (2010) Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Environ. Sci. Technol*. **44**, 412–418.
8. De Kreuk, M.K., van Loosdrecht, M.C.M. (2006) Formation of Aerobic Granules with Domestic Sewage. *Journal of Environmental Engineering*, **132**, 694–702.
9. Etterer, T., Wilderer, PA. (2001) Generation and properties of aerobic granular sludge. *Water Sci. Technol*. **43**, 19-28.
10. Hu, L.L., Wang, J.L., Wen, X.H., Qian, Y. (2005) The formation and characteristics of aerobic granules in sequencing batch reactor (SBR) by seeding anaerobic granules. *Process Biochem.* **40**, 5–11.
11. Jiang , H.L., Tay, J.H., Liu, Y., Tay, S.T.L. (2003) Ca2 + augmentation for enhancement of aerobically grown microbial granules in sludge blanket reactors. *Biotechnol. Lett*. **25**, 95–104.
12. Jiang, H.L., Tay, J.H., Tay, S.T.L. (2002) Aggregation of immobilized activated sludge cells into aerobically grown microbial granules for the aerobic biodegradation of phenol. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**, 439-448.

13. Juang, Y.C., Adav, S.S., Lee, D.J., Tay, J.H. (2010) Stable aerobic granules for continuous-flow reactors, precipitating calcium and Iron salts in granular interiors. *Bioresour. Technol*. **101**, 8051–8057.
14. Lee, D.J., Chen, Y.Y., Show, K.Y., Whiteley, C.G., Tay, J.H. (2010) Advances in aerobic granule formation and granule stability in the course of storage and reactor operation. *Biotechnol. Adv*. **28,** 919–934.
15. Li, Y., Liu, Y., Shen, L., Chen, F. (2008) DO diffusion profile in aerobic granule and its microbiological implications. *Enzyme Microb. Technol*. **43**(34), 9–354.
16. Li, Y., Zou, J., Zhang, L., Sun, J. (2014) Aerobic granular sludge for simultaneous accumulation of mineral phosphorus and removal of nitrogen via nitrite in wastewater. *Bioresour. Technol*. **154**, 178–184.
17. Li, Z.H., Kuba, T., Kusuda, T. (2006) The influence of starvation phase on the properties and the development of aerobic granules. *Enzyme Microb. Technol*. **38**, 670–674.
18. Lin, Y.M., Liu, Y., Tay, J.H. (2003) Development and characteristics of phosphorous-accumulating granules in sequencing batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **62**, 430.
19. Liu, H., Li, Y., Yang, C., Pu, W., He, L., Bo, F. (2012) Stable aerobic granules in continuous-flow bioreactor with self-forming dynamic membrane. *Bioresour. Technol*. **121**, 111–118.
20. Liu, Q.S., Tay, J.H., Liu, Y. (2003b) Substrate concentration-independent aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *Environ. Technol*. **24**, 1235-1247.
21. Liu, Y., Tay, J.H. (2002) The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* **36**, 1653–1665.
22. Liu, Y., Tay, J.H. (2004a) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. Biotechnol. Adv. **22**, 533–563.
23. Liu, Y., Tay, J.H. (2004b) Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochem. Eng. J*. **21**(1), 47–52.
24. Liu, Y., Yang, S.F., Tay, J.H. (2003a) Elemental compositions and characteristics of aerobic granules cultivated at different substrate N/C ratios. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **61**, 556–561.
25. Liu, Y., Moy, B.Y.P., Tay, J.H. (2007) COD Removal and Nitrification of Low-strength Domestic Wastewater in Aerobic Granular Sludge Sequencing Batch Reactors. *Enzyme and Microbial Technology*, (in press).

26. Liu, Y.Q., Liu, Y., Tay, J.H. (2005) Relationship between size and mass transfer resistance in aerobic granules. *Lett. Appl. Microbiol*. **40**, 312–315.
27. Liu, Y.Q., Tay, J.H. (2008) Influence of starvation time on formation and stability of aerobic granules in sequencing batch reactors. Bioresour. *Technol.* **99**, 980–985.
28. Meyer, RL.; Saunders, AM.; Zeng, RJ.; Keller, J.; Blackall, LL. (2003) Microscale structure and function of anaerobic–aerobic granules containing glycogen accumulating organisms. *FEMS Microbiol Ecol*, **45**, 253–263.
29. Morgenroth, E., Sherden, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., Wilderer, P.A. (1997) Aerobic granular sludge in a sequencing batch reactor. *Water Res*. **31**, 3191–3194.
30. Moy, BYP.; Tay, JH.; Toh, SK.; Liu, Y.; Tay, STL. (2002) High organic loading influences the physical characteristics of aerobic sludge granules. *Lett Appl Microbiol*, **34**, 407-415.
31. Nor-Anuar, A., Ujang, Z., Van Loosdrecht, M.C.M., De Kreuk, M.K., Ollson, G. (2007) Settling behaviour of aerobic granular sludge (AGS). *Water Sci. Technol*. **56**, 55–61.
32. Peng D, Bernet N, Delgenes JP, Moletta R. (1999) Aerobic granular sludge—a case report. *Water Res*. **33**, 890–899.
33. Pijuan, M., Werner, U., Yuan, Z. (2009) Effect of long term anaerobic and intermittent anaerobic/aerobic starvation on aerobic granules. *Water Res*. **43**, 3622–3632.
34. Qin L, Tay JH, Liu Y. (2004) Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Process Biochem*. **39**, 579–587.
35. Shin HS, Lim KH, Park HS. (1992) Effect of shear stress on granulation in oxygen aerobic upflow sludge reactors. *Water Sci Technol*. **26**, 601.
36. Simoes, M., Simoes, L.C., Vieira, M.J. (2009) Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Res*. **43**, 229–237.
37. Song, Z., Pan, Y., Zhang, K., Ren, N., Wang, A. (2010) Effect of seed sludge on characteristics and microbial community of aerobic granular sludge. *J. Environ. Sci*. **22**, 1312–1318.
38. Sturm, B.S.M., Irvine, R.L. (2008) Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. *Water Sci. Technol*. **58**, 781–787.
39. Sun, X.F., Ma, Y., Li, X.W., Wang, S.G., Gao, B.Y., Li, X.M. (2010) Sorption and detoxification of chromium by aerobic granules functionalized with polyethylenimine. *Water Res*. **44**, 2517–2524.

40. Tay JH, Ivanov V, Pan S, Tay STL. (2002d) Specific layers in aerobically grown microbial granules. *Lett Appl Microbiol*. **34**, 254-265.
41. Tay JH, Liu QS, Liu Y. (2001) Microscopic observation of aerobic granulation in sequential aerobic sludge blanket reactor. *J Appl Microbiol*. **91**, 168–178.
42. Tay JH, Yang SF, Liu Y. (2002c) Hydraulic selection pressure-induced nitrifying granulation in sequencing batch reactors. *Appl Microbiol Biotechnol*. **59**, 332–341.
43. Tay, J.H., Liu, Q.S., Liu, Y. (2002b) Characteristics of aerobic granules grown on glucose and acetate in sequential aerobic sludge blanket reactors. *Environ. Technol*. **23**, 931–936.
44. Tay, JH.; Pan, S.; He, YX.; Tay, STL. (2004) Effect of organic loading rate on aerobic granulation. I: reactor performance. *J Environ Eng*. **130**, 1094–1105.
45. Tay, S.T.L., Ivanov, V., Yi, S., Zhuang, W.Q., Tay, J.H. (2002a). Presence of anaerobic bacteroides in aerobically grown microbial granules. *Microbiol. Ecol*. **44**, 278– 285.
46. Toh, SK.; Tay, JH.; Moy, BYP.; Ivanov, V.; Tay, STL. (2003) Size-effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR. *Appl Microbiol Biotechnol*. **60**, 687–695.
47. Tsuneda, S.; Nagano, T.; Hoshino, T.; Ejiri, Y.; Noda, N.; Hirata A. (2003) Characterization of nitrifying granules produced in an aerobic upflow fluidized bed reactor. *Water Res*. **37**, 965–972.
48. Verawaty, M., Tait, S., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P.L. (2013) Breakage and growth towards a stable aerobic granule size during the treatment of wastewater. *Water Res*. **47**, 5338–5349.
49. Wan, J., Bessiere, Y., Sperandio, M. (2009) Alternating anoxic feast/aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate. *Water Res*. **4**, 5097–5108.
50. Wang, Q., Du, G., Chen, J. (2004) Aerobic granular sludge cultivated under the selective pressure as a driving force. *Process Biochem*. **39**, 557–563.
51. Yang , SF.; Liu, Y.; Tay, JH. (2003) A novel granular sludge sequencing batch reactor for removal of organic and nitrogen from wastewater. *J Biotechnol*. **106**, 77–87.
52. Yang, SF.; Liu, QS.; Tay, JH.; Liu, Y. (2004) Growth kinetics of aerobic granules developed in sequencing batch reactors. *Lett Appl Microbiol*. **38**, 106–113.
53. Yi, S.; Tay, JH.; Maszenan, AM.; Tay, STL. (2003) A culture-independent approach for studying microbial diversity in aerobic granules. *Water Sci Technol*. **47**, 283–292.

54. Zhang, L.; Feng, X.; Zhuc, N.; Chena, J. (2007) Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*. **41**, 551–560.
55. Zhang, L.L., Zhang, B., Huang, Y.F., Cai, W.M. (2005) Re-activation characteristics of preserved aerobic granular sludge. *J. Environ. Sci*. **17**, 655–658.