Utjecaj sadržaja željeza u zemlji crvenici na metabolizam fosfat-akumulirajućih bakterija

Pirija, Marica

Master's thesis / Diplomski rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:132750

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Marica Pirija

UTJECAJ SADRŽAJA ŽELJEZA U ZEMLJI CRVENICI NA METABOLIZAM FOSFAT-AKUMULIRAJUĆIH BAKTERIJA

Diplomski rad

Zagreb, 2012.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović te predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zbog stjecanja zvanja profesora biologije i kemije

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Jasni Hrenović na svesrdnoj pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, majci Milki i ocu Stipanu, te bratu Mati na ljubavi, strpljenju, potpori i velikoj pomoći tijekom cijelog mog školovanja.

Hvala i svim prijateljima uz čije se društvo i potporu lakše prolazilo kroz studentske dane.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Utjecaj sadržaja željeza u zemlji crvenici na metabolizam fosfat-akumulirajućih bakterija

Marica Pirija

Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

U tercijarnom stupnju biološkog pročišćavanja otpadnih voda koriste se fosfat-akumulirajuće bakterije. Danas se proučavaju različiti prirodni nosači na koje bi se imobilizirale bakterije kako bi se postiglo što bolje pročišćavanje otpadnih voda. Crvenica se pokazala kao dobar nosač za fosfat-akumulirajuću bakteriju *Acinetobacter junii*. Kapacitet uklanjanja fosfata za samu crvenicu je dobar (do 32,4%), ali se dodatkom *A. junii* značajno povećava (do 51,9%). Crvenica sadrži različite željezne okside i hidrokside od kojih joj i potječe crvena boja. Usporedba rezultata dobivenih s originalnom crvenicom i crvenicom u kojoj je uklonjeno površinsko ili površinsko i oktaedarsko željezo nisu pokazali značajne razlike u broju imobiliziranih bakterija te njihove sposobnosti uklanjanja fosfata. Sadržaj željeza u crvenici nije utjecao na imobilizaciju i metabolizam fosfat-akumulirajućih bakterija.

(41 stranica, 18 slika, 6 tablica, 47 literarnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Crvenica, željezo, fosfat-akumulirajuće bakterije, *Acinetobacter junii*

voditelj: Dr. sc. Jasna Hrenović, prof.
ocjenitelji: Dr. sc. Jasna Hrenović, prof.
Dr. sc. Zdravko Dolenec, prof.
Dr. sc. Vesna Petrović-Peroković, prof.
Doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: Svibanj, 2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

Influence of iron contents in red soil on metabolism of phosphate-accumulating bacteria

Marica Pirija
Roosveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Phosphate-accumulating bacteria are used in the process of enhanced biological phosphorus removal from wastewater. There is huge interest for different natural carriers in which is possible to immobilize bacteria to achieve a better purification of wastewater. Red soil is good carrier of phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii*. Red soil has a good capacity of phosphorus removal (to 32,4%) which is significantly improved with addition of *A. junii* (to 51,9%).Red soil contains different kinds of iron oxides and hydroxides which give her a red colour. Comparison of results in original red soil and red soil with removed surface iron or surface and octahedron iron indicate that there is no significant difference in the number of immobilizing bacteria and their ability of phosphorus removal. Contents of iron in red soil, has no influence on metabolism of phosphate-accumulating bacteria.

(41 pages, 18 images, 6 tables, 47 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biology library

Key words: red soil, iron, phosphate-accumulating bacteria, *Acinetobacter junii*

Mentor: Dr. sc. Jasna Hrenović, prof.
Evaluators: Dr. sc. Jasna Hrenović, prof.
Dr. sc. Zdravko Dolenec, prof.
Dr. sc. Vesna Petrović-Peroković, prof.
Doc. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Thesis accepted: May, 2012.

Sadržaj:

1. UVOD 1

1.1. Fosfat-akumulirajuće bakterije 1

1.1.1. *Acinetobacter* sp. 4

1.2. Elementarno željezo i njegovi spojevi 6

1.3. Crvenica 11

2. CILJ RADA ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3. MATERIJALI I METODE ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3.1. Crvenica ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3.2. *Acinetobacter junii* ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3.3. Sintetska otpadna voda ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3.4. Izvedba eksperimenta ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3.5. Analitičke metode ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3.5.1. Mjerenje pH vrijednosti i koncentracije fosfata **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3.5.2. Mjerenje broja slobodnih i imobiliziranih bakterija **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

3.6. Postupak uklanjanja željeznih oksida iz crvenice ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

4. REZULTATI ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

4.1. Uklanjanje fosfata s crvenicom u abiotskom pokusu **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

4.2. Uklanjanje fosfata s crvenicom i *A. junii* 21

5. RASPRAVA ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

6. ZAKLJUČAK ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

7. LITERATURA ..... **Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.**

1. UVOD

1.1. Fosfat-akumulirajuće bakterije

Uklanjanje fosfata iz otpadnih voda može se vršiti fizikalno-kemijskim i biološkim postupcima. Fizikalno-kemijski postupci uklanjanja fosfata uključuju adsorpciju, ionsku izmjenu, percipitaciju teškim metalima ili vapnom.

Posljednjih 40-ak godina prednost se daje biološkom uklanjanju fosfata iz otpadnih voda. Prednosti ove metode su manji troškovi, visoka učinkovitost te umjerena produkcija mulja koji nije opterećen metalima poput aluminija i željeza ili vapnom.

Postupci temeljeni na biološkom mehanizmu uklanjanja fosfata poznati su pod nazivom „poboljšano biološko uklanjanje fosfora“ (eng. Enhanced Biological Phosphorus Removal – EBPR). EBPR se temelji na sposobnosti nekih vrsta bakterija, tzv. fosfat-akumulirajućih bakterija, da u aerobnim ili čak anoksičnim uvjetima iz otpadnih voda uzimaju veće količine fosfata od onih koje su im potrebne za normalan rast i metabolizam.

Fosfor je biogeni element koji direktno utječe na povećanu produkciju algi i biljaka. Fosfor je neophodan za sva živa bića, a često je limitirajući faktor za rast alga i biljaka.

Ispuštanje otpadnih voda s fosfatima u prirodne vode ubrzava proces eutrofikacije vodenih ekosustava (Slika 1). Eutrofikaciju vodenih sustava uzrokuju koncentracije fosfora koje prelaze 0,1 mg L^{-1} (Ivanković i Hrenović, 2011.).

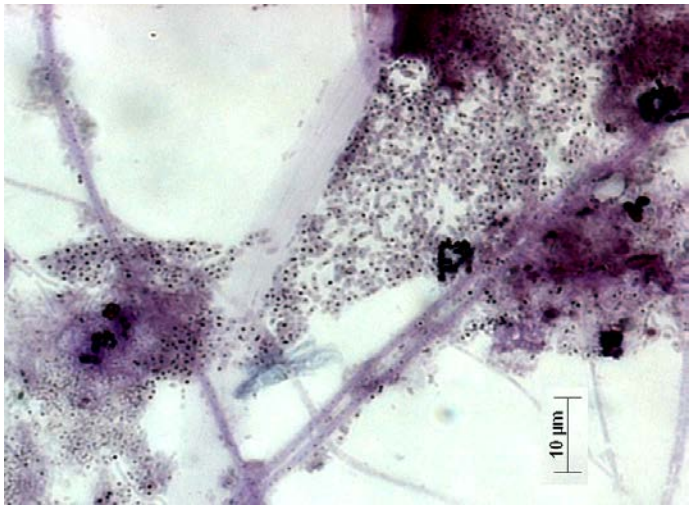


Slika 1. Eutrofikacija vodenih tokova

(Izvor: http://www.chem.bg.ac.rs/primenjena/hemija_zivotne_sredine.html)

Glavni izvor fosfata u podzemnim i površinskim vodama su umjetna gnojiva. Daljnji izvori fosfata su deterdženti, kemikalije, ljudi i životinje, itd. Prosječno po stanovniku ispušta se 2-3 grama fosfora.
U svrhu očuvanja površinskih voda, sve se više pažnje posvećuje uklanjanju fosfata iz otpadnih voda do vrlo niskih koncentracija od 0,1 mg L^{-1}.

Kao što je već spomenuto, za proces biološkog uklanjanja fosfata iz otpadnih voda odgovorne su fosfat-akumulirajuće bakterije (PAB) koje u aerobnim uvjetima rasta akumuliraju otopljene fosfate prisutne u otpadnoj vodi u obliku netopivih unutarstaničnih zrnaca polifosfata (Slika 2). PAB smatraju se oni sojevi koji mogu akumulirati više od 10^{-12} mg fosfata po stanici (Hrenović, 2011.).

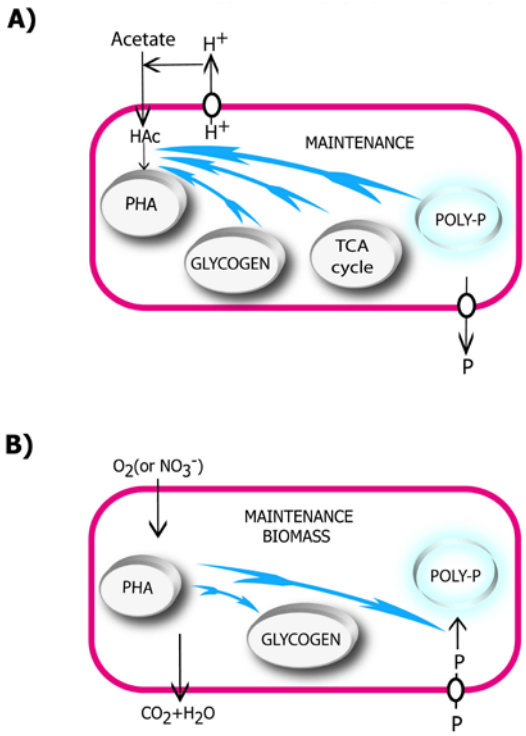


Slika 2. Fosfat-akumulirajuće bakterije s akumuliranim zrncima polifosfata (modro) u aktivnom mulju, bojano po Neisseru
(Izvor: Ivanković i Hrenović, 2009.)

Postoje dvije skupine PAB: klasične koje kao akceptor elektrona koriste kisik te denitrificirajuće PAB koje koriste nitrat kao akceptor elektrona. Ako otpadna voda sadrži veću koncentraciju nitrita dolazi do inhibitornog djelovanja na anaerobno otpuštanje fosfata i aerobno uzimanje fosfata (Meinhold i sur., 1999.). Koncentracije nitrata od 4-5 mg NO_2-N L^{-1} i niže ne utječu na uzimanje i otpuštanje fosfata, dok one preko 8 mg NO_2-N L^{-1} djeluju inhibitorno, stoga je kritična granica između 5 i 8 mg NO_2-N L^{-1} (Meinhold i sur., 1999.).

Da bi PAB mogle akumulirati fosfate moraju se nalaziti u aerobnoj sredini s malo organskih tvari. Za postizanje brojnosti bakterijske populacije koriste se naizmjenično aerobni i anaerobni uvjeti kako bi se bakterije izvrgnule stresu pri čemu akumuliraju veće količine fosfata. Kod anaerobnih uvjeta u bakterijske stanice transportiraju se hlapljive masne kiseline (npr. acetatna, butiratna, izobutiratna, propionatna) iz otpadnih voda te skladište u obliku poli-hidroksialkanoata (PHA). Energija za taj transport i skladištenje dobiva se hidrolizom polifosfata do ortofosfata koji se ispuštaju iz stanice u okoliš, zatim razgradnjom glikogena i iz anaerobnog Krebsovog ciklusa (Slika 3A). U aerobnim uvjetima kataboliziraju anaerobno dobiveni PHA pri čemu kisik ima važnu ulogu kao akceptor elektrona. Pri tom se generira energija potrebna za rast stanice, za sintezu i korištenje glikogena te sintezu polifosfata (Slika 3B). Rezultat toga je uzimanje većih količina fosfata nego što ih je otpušteno u anaerobnoj fazi (Kortstee i sur., 2000., Mino, 2000.)

Za uspješno provođenje EPBR potrebno je da otpadna voda u anaerobnoj fazi sadrži mnogo hlapljivih masnih kiselina te da u aerobnoj fazi nije prisutan izvor ugljika za bakterije.



Slika 3. Shematski prikaz metabolizma fosfat-akumulirajućih bakterija

A) anaerobni uvjeti; B) aerobni ili anoksični uvjeti

(Izvor: Hrenović, 2011.)

Još uvijek nije jasno da li su polifosfatna zrnca smještena u citoplazmi bakterijskih stanica u asocijaciji s unutarstaničnim membranama (Hill i sur., 1989., Mino i sur., 1985.) ili dolaze u kompleksu s proteinima, DNA i RNA (Bond i sur., 1999., Kornberg i sur., 1999.). Fosfat-akumulirajuće bakterije su filogenetski i taksonomski različite grupe kultivabilnih i nekultivabilnih bakterija (Mino, 2000.). Prosječno uklanjanje fosfata iz otpadne vode ovisi o kapacitetu soja PAB da unutarstanično akumulira fosfate i o brojnosti tog soja u aktivnom mulju (Hrenović i sur., 2010.).

U aktivnom mulju pronađene su različite grupe PAB. Muljevi sadrže α-, β- i γ-subklase koljena Proteobacteria i Actinobacteria - Gram-pozitivne bakterije s visokim udjelom C + G DNA (Mino, 2000.). Kultivabilne PAB su Gram-negativni rodovi kao što su *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Lampropedia*, *Moraxella*, *Pseudomonas* (Fuhs i Chen, 1975., Stante i sur., 1997., Sidat i sur., 1999.) te Gram-pozitivni rodovi kao što su *Bacillus*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Staphylococcus*, *Streprococcus* (Nakamura i sur., 1995., Sidat i sur., 1999.).

1.1.1. *Acinetobacter* sp.

Bakterije roda *Acinetobacter* su široko rasprostranjene u prirodi. *Acinetobacter* sp. dolaze u tlima, na suhim i vlažnim staništima, u vodi, kanalizacijama, mogu se izolirati iz živih bića te s ljudske kože (Warskow i Juni, 1972.). Bakterije roda *Acinetobacter* su nepokretne, aerobne, katalaza pozitivne i oksalaza negativne (Henriksen, 1973., Juni, 1978.).

Acinetobacter sp. su Gram-negativne bakterije, štapićaste koje su često grupirane kao diplokoki. Većina vrsta ovog roda može se uzgajati na relativno jednostavnim medijima.

Veličina bakterija roda *Acinetobacter* varira između 1-2,5 μm po dužini, a između 1-1,5 μm po širini (Bouvet i Grimont, 1986.).

Općenito se smatraju nepatogenim bakterijama, ali kod težih bolesnika i bolesnika s oslabljenim imunološkim sustavom mogu izazvati infekcije koje mogu biti opasne po život. Infekcije rodom *Acinetobacter* najčešće napadaju organske sustave kao što su dišni sustav, urinarni sustav, itd. (Bergogne-Bérézin i Towner, 1996.). *Acinetobacter* sp. najčešće su izolirane kod pacijenata s upalom pluća, urinarnim infekcijama, sepsama, meningitisom i endokarditisom. Infekcije se mogu javiti i kod zdravih ljudi. Danas je sve veći problem njihova široka rasprostranjenost u bolničkim ustanovama te rezistentnost na

brojne antibiotike. Među češćih vrstama izoliranih u bolničkim ustanovama su *A. baumanii* i *A. lwoffii* (Constantiniu i sur., 2004.).

PAB roda *Acinetobacter* su *A. baumanii, A. baylyi, A. bouvetii, A. calcoaceticus, A. gerneri, A. jonsonii, A. junii, A. lwoffi, A. tandoii, A. tjernbergiae, A. towneri* (Carr i sur., 2003.). Nijedna od ovih vrsta nema metabolizam tipičan za PAB.

Bakterije iz ovog roda mogu akumulirati do 100 mg fosfata po gramu suhe biomase u aerobnim uvjetima (Timmerman, 1984., van Groenestijn i sur., 1989.) Vrste roda *Acinetobacter* imaju najveći kapacitet za akumulaciju fosfata među svim vrstama PAB. Ove bakterije akumuliraju fosfate u obliku polifosfata (poli-P) i glikogen koji služi kao izvor ugljika, a samim time i energije u bakterijskoj stanici.

Acinetobacter junii koristi se kao modelni organizam za EPBR (Slika 4).

Klasifikacija:

Carstvo: Bacteria

Koljeno: Proteobacteria

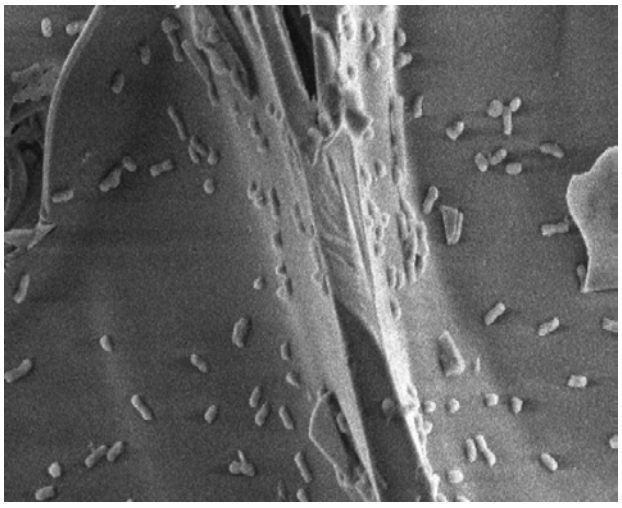
Razred: Gammaproteobacteria

Red: Pseudomonadales

Porodica: Moraxellaceae

Rod: *Acinetobacter*

Vrsta: *Acinetobacter junii*



Slika 4. *Acinetobacter junii* snimljena elektronskom mikroskopijom (Izvor: Ivanković i Hrenović, 2011.)

A. junii prvi put je izolirana iz ljudskog urina. Vrlo rijetko je patogena.

A. junii je kao i ostale bakterije ovog roda striktno aerobna, nepokretna, katalaza pozitivna i oksidaza negativna bakterija. Boji se Gram-negativno. Ne formira spore. U logaritamskoj fazi rasta je štapićastog izgleda, a u stacionarnoj fazi sferičnog. Širina bakterijske stanice je od 0,9 do 1,6 μm, a dužina od 1,5 do 2,5 μm (Hrenović, 2011.). Optimalno raste pri temperaturama između 25 i 41 ºC, ali ne raste pri 44 ºC (Bouvet i Grimont, 1986.)

Akumulacija fosfata događa se u stacionarnoj fazi rasta. Koristi kisik kao terminalni akceptor elektrona.

1.2. Elementarno željezo i njegovi spojevi

Željezo je element 8. skupine u periodnom sustavu elemenata i ubraja se u prijelazne elemente (Slika 5). Redni broj željeza je 26, a relativna atomska masa mu iznosi 55,845. Potpuno čisto željezo je metal srebrnkaste boje, mekan i kovak.



Slika 5. Elementarno željezo (Fe)
(Izvor:http://www.chemistry-reference.com/pdictable/q_elements.asp?Symbol=Fe)

U prirodi je vrlo rasprostranjen, maseni udio željeza u Zemljinoj kori je 5%. Dolazi u oksidnim, karbonatnim, sulfidnim i silikatnim rudama. Danas se za dobivanje željeza isključivo koriste karbonatne i oksidne rude. Najvažnije oksidne rude su magnetit (Fe_3O_4), hematit (α-Fe_2O_3) i limonit (α- i γ-FeOOH). Najvažnija karbonatna ruda je siderit ($FeCO_3$).

Željezo je tehnički najvažniji metal, a dobiva se u visokim pećima. Visoke peći naizmjenično se pune slojevima koksa i rude s dodacima. Rude osim željeza sadrže i jalovinu, uglavnom alumosilikate, koji se uklanjaju u obliku troske pomoću tvari bazičnog karaktera kao što je vapnenac. Pri dnu peći koks izgara s pregrijanim zrakom i daje ugljik (II) oksid (CO). Oksidi željeza se reduciraju s CO. Pri vrhu peći oksidi željeza se vjerojatno reduciraju do Fe_3O_4, a u nižim slojevima do FeO. U još nižim slojevima dobiva se spužvasto željezo pri čemu se oslobađa ugljikov dioksid (CO_2) koji reagira s koksom i daje CO. Ove reakcije odvijaju se u gornjoj polovici peći i to u rasponu temperature od 300 do 800 ºC.

U manje vrućim dijelovima peći nastali ugljik (II) oksid raspada se na ugljik (IV) oksid i fino dispergirani ugljik koji se otapa u spužvastom željezu. Spužvasto željezo reducira ugljik (II) oksid i pritom ovisno o temperaturi nastaje oksid željeza FeO ili karbid željeza Fe_3C. Ovako dobiveno željezo onečišćeno je ugljikom i tali se pri 1 100 - 1 200 ºC. U rastaljenom stanju skuplja se na dnu peći.

Paralelno s ovim reakcijama odvija se i disocijacija vapnenca na kalcijev (II) oksid (CaO) i ugljik (IV) oksid (CO_2). Nastali CO_2 reagira s koksom i opet daje CO koji reducira željezne okside, a nastali CaO reagira s oksidima silicija i aluminija te daje lako taljivu trosku, uglavnom kalcij-alumosilikat, koji se skuplja na dnu peći i pliva na rastaljenom željezu. Na taj način troska štiti rastaljeno željezo od oksidacijskog djelovanja zraka koji se upuhuje u peć.

Niz reakcija koji se odvijaju u visokim pećima prilikom dobivanja sirovog željeza:

$$C_{(s)} + O_{2(g)} \rightarrow CO_{2(g)}$$
$$CO_{2(g)} + C_{(s)} \leftrightarrow 2CO_{(g)}$$
$$Fe_2O_{3(s)} + CO_{(g)} \rightarrow 2Fe_3O_{4(s)} + CO_{2(g)}$$
$$Fe_3O_{4(s)} + CO_{(g)} \rightarrow 3FeO_{(s)} + CO_{2(g)}$$
$$FeO_{(s)} + CO_{(g)} \rightarrow Fe_{(s)} + CO_{2(g)}$$
$$Fe_2O_{3(s)} + 3CO_{(g)} \rightarrow Fe_{(s)} + CO_{2(g)}$$
$$CO_{2(g)} + C_{(s)} \leftrightarrow 2CO_{(g)}$$
$$Fe_{(s)} + CO_{(g)} \rightarrow FeO_{(s)} + C_{(s)}$$
$$3Fe_{(s)} + 2CO_{(g)} \rightarrow Fe_3C_{(s)} + CO_{2(g)}$$
$$CaCO_{3(s)} \leftrightarrow CaO_{(s)} + CO_{2(g)}$$

Ovako dobiveno sirovo željezo sadrži oko 4,5% ugljika te primjese silicija, mangana i fosfora.

Najveće količine sirovog željeza koriste se za dobivanje čelika koji se odlikuje velikom čvrstoćom, tvrdoćom, žilavošću, elastičnošću te dobrom mogućnosti lijevanja i mehaničke obrade. Dobivanje čelika iz sirovog željeza zapravo se svodi na oksidaciju svih nečistoća. U čeliku maseni udio ugljika mora biti ispod 1,7%, a sve ostale nečistoće moraju se potpuno ukloniti kako ne bi utjecale na svojstva čelika.

Željezo je vrlo važan biogeni element jer je sastavni dio hemoglobina i kao takav ima važnu ulogu u prijenosu kisika. Manjak željeza dovodi do anemije, stoga su preparati željeza poznati od davnina kao lijek. Prevelike količine željeza mogu oštetiti jetru i bubrege. Također je čest kofaktor neophodan za normalno funkcioniranje enzima.

Željezo je neplemeniti metal. Otapa se u neoksidirajućim kiselinama.
U oksidirajućim kiselina (koncentrirana dušična i sumporna kiselina) se ne otapa jer vrlo brzo stvara zaštitni sloj na površini te postaje pasivno. Nije stabilan na zraku i vrlo brzo ga prekrije sloj hrđe koji nema zaštitna svojstva pa se proces nastavlja dalje. Hrđa je najvjerojatnije hidratizirani oksid željeza koja ne sadrži uvijek istu količinu vode. Ako nema vode ili zraka proces hrđanja se zaustavlja (Filipović i Lipanović, 1995.).

Trijada željeza (Fe, Co i Ni) pokazuje svojstvo feromagnetizma tj. privlači ih magnetsko polje, a magnetizam ostaje i kad prestane djelovanje magnetskog polja. Jedino ovi elementi pokazuje feromagnetizam pri običnoj temperaturi. Uvjeti koje metali moraju imati kako bi bili feromagnetični su prisutnost nesparenih elektrona te udaljenost između atoma i iona u kristalnoj rešetki metala mora biti takva da njihovim međusobnim djelovanjem može doći do istosmjerne orijentacije pojedinačnih magnetskih momenata u određenom području.
Djelovanjem magnetskog polja metali pokazuju magnetska svojstva jer se njihovi pojedinačni magnetski momenti orijentiraju u istom smjeru, a prestankom njegovog djelovanja momenti se orijentiraju bez ikakvog reda i metal gubi magnetičnost. Kod željeza, nikla i kobalta prestankom djelovanja magnetskog polja pojedinačni magnetski momenti ostaju orijentirani u istom smjeru te i dalje zadržavaju magnetska svojstva dok nešto ne naruši njihovu usmjerenost.
Talište željeza je pri 1 535 ºC, a vrelište pri 2 750 ºC.
Gustoća željeza je 7,9 g/cm³.
Elementarno željezo se javlja u tri alotropske modifikacije – α, γ i δ. α-željezo je stabilno do 907 ºC i kristalizira se u prostorno centriranoj kocki. Pri 768 ºC željezo gubi

feromagnetična svojstva pa se temperaturno područje između 768 i 907 ºC označavalo kao β-željezo. Danas se zna da pri toj temperaturi ne dolazi do promjene kristalne strukture, pa se ta oznaka više ne koristi. Između 907 i 1 400 ºC javlja se γ-željezo sa strukturom plošno centrirane kocke. Iznad 1400 ºC pa do temperature tališta stabilno je δ-željezo koje opet kristalizira u prostorno centriranoj kocki (Filipović i Lipanović, 1995.).
Željezo čine spojevi stupnja oksidacije +2, +3 i +6. Najveći broj njegovih spojeva pripada oksidacijskim stupnjevima +2 i +3, pri čemu su spojevi oksidacijskog stupnja uglavnom ionski, a spojevi oksidacijskog stupnja +3 kovalentni.

Željezo oksidacijskog stupnja +2 daje sva 4 dihalogenida (FeF_2, $FeCl_2$, $FeBr_2$, FeI_2). $FeBr_2$ i FeI_2 dobivaju se direktnom sintezom odgovarajućih elemenata. Kod dobivanja $FeBr_2$ treba pripaziti jer se s viškim broma i uz jače zagrijavanje dobiva $FeBr_3$. FeF_2 i $FeCl_2$ ne mogu se dobiti direktno sintezom jer su fluor i klor dovoljno jaka oksidacijska sredstva te oksidiraju Fe^{2+} u Fe^{3+}.
FeO je oksid koji pripada ovom oksidacijskom stupnju. Ovaj oksid gotovo nikad nema stehiometrijski sastav, te uvijek sadrži nešto Fe^{3+} - iona, vjerojatno zato što lako oksidira. U vrlo finom razdijeljenju spontano se zapali na zraku. Ima bazični karakter.
Hidroksid koji pripada stupnju oksidacije +2 je $Fe(OH)_2$. To je bijeli talog koji se dobiva taloženjem Fe^{2+} - iona s lužinama, ali samo bez prisutnosti kisika. Ako je prisutan kisik nastaje zelenkasti talog zbog prisutnosti +2 i +3 oksidacijskih stanja (Filipović i Lipanović, 1995.).
Među važnijim spojevima željeza (II) su željezo (II) sulfid (FeS), željezo (II) disulfid (FeS_2) koji u prirodi dolazi kao mineral pirit, zatim željezo (II) sulfat ($FeSO_4$) koji iz vodene otopine kristalizira kao heptahidrat ($FeSO_4 \times 7H_2O$) i još se naziva zelena galica, amonijev željezo (II) sulfat heksahidrat (Mohrova sol - $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \times 6H_2O$) i drugi. Željezo (II) nitrat ($Fe(NO_3)_2$) koristi se u medicini protiv krvarenja u želucu i crijevima. Kompleksni spojevi stupnja oksidacije +2 su uglavnom oktaedarske strukture.

Željezo oksidacijskog stupnja +3 čini tri trihalogenida (FeF_3, $FeCl_3$, $FeBr_3$), dok FeI_3 ne postoji jer je Fe^{3+} dovoljno jako oksidacijsko sredstvo da oksidira jodid u elementarni jod. Sva tri trihalogenida mogu se dobiti izravnom sintezom iz elemenata.
Taloženjem Fe^{3+} s lužinama dobiva se hidratizirani željezo (III) oksid, $Fe_2O_3 \times H_2O$ koji stajanjem pod vodom prelazi u nestabilni γ-FeOOH (lepidokrokit) koji kasnije prelazi u

stabilniji α-FeOOH (getit). Hidratizirani željezo (III) oksid, $Fe_2O_3 \times H_2O$ ima amfoterna svojstva i teško se otapa u koncentriranim lužinama i to samo uz zagrijavanje.

γ-Fe_2O_3 i Fe_3O_4 su paramagnetični.

Fero-feri-oksid ($Fe_3O_4 \times Fe_2O_3$), nastaje kao crveni prah kad se žari $Fe(OH)_3$, $Fe(NO_3)_2$ ili $Fe_2(SO_4)_3$ (Slika 6).



Slika 6. Fero-feri oksid ($Fe_3O_4 \times Fe_2O_3$)
(Izvor:http://rainbowpigment.en.made-in-china.com/offer/xeqQDtNUJHWl/Sell-Superfine-Red-Iron-Oxide-Fe2o3-Pigment.html)

Među važnije spojeve ovog oksidacijskog stupnja spadaju željezo (III)-sulfid (Fe_2S_3), željezo (III)-sulfat ($Fe_2(SO_4)_3$) koji iz vodenih otopina najčešće kristalizira sa 6 ili 12 molekula vode, željezo (III)-nitrat ($Fe(NO_3)_3$), itd.

Kompleksni spojevi +3 oksidacijskog stanja su većinom oktaedarske strukture (Filipović i Lipanović, 1995.).

Oksidacijskom stanju +6 pripada ferat - ion (FeO_4^{2-}) koji je postojan samo u lužnatom mediju, a u kiselom se raspada na Fe^{3+} i kisik uz nešto ozona. U kiselom mediju je vrlo jako oksidacijsko sredstvo. FeO_4^{2-} - ion ima tetraedarsku strukturu.

1.3. Crvenica

Crvenica (crljenica) je naziv za crvena rezidualna tla, posebno raširena u području krša oko Mediterana (Slika 7). Smatra se da je crvenica tip reliktnog tla nastala u toplijim klimatskim uvjetima od današnjih. U geološkom smislu crvenica je naziv za crvenkasta, smeđe-crvena i žućkasto-crvena glinovito-prašinasta tla koja pokrivaju vapnence i dolomite. Karakteristična crvenkasta boja potječe od amorfnih željeznih hidroksida i oksida. Mineralni sastav crvenice u mediteranskoj regiji može biti vrlo raznolik.



Slika 7. Crvenica
(Izvor: http://www.panoramio.com/photo/19544628)

Nastanak crvenica je dugotrajan proces. Za nastanak 1 cm tla potrebno je otopiti 5 m stijena što traje oko 10 000 godina. Crvenica se formirala kao rezultat dekalcifikacije, rezidualne akumulacije netopljivog ostatka i rubifikacije te stvaranja glinenih minerala karakteristične crvene boje. O postanku crvenice postoji više objašnjenja. Neki smatraju da je nastala u procesu okršavanja iz netopivog ostatka karbonatnih stijena, drugi da je nastala iz materijala nanesenih na karbonatne stijene, a danas najveći broj znanstvenika smatra da je poligenetske prirode (Durn, 2003.).

Crvenice su propusna i topla tla, stabilne poliedrične strukture. Imaju visok stupanj zasićenosti adsorpcijskog kompleksa tla bazama (70-96%). Sadrže vrlo male količine humusa (1-3%), a one pod šumama su nešto bogatije humusom (3-5%).
Crvenice su tla dobrih pedofizikalnih i slabijih pedokemijskih svojstava. Dobro su opskrbljene dušikom (0,11-0,41) dok je fiziološki aktivan fosfor na minimumu (0,2-9,6 mg

na 100 g tla). Količina kalija na 100 grama tla iznosi 15 mg. Za uzgoj poljoprivrednih kultura potrebno je dodati fosfor i kalcij.

Crvenice su krška stjenovita tla s diskontinuiranim pokrovom.

Djelovanjem vjetra i vode na pojedinim mjestima taložila se veća količina crvenice, pa su danas prisutna plića i dublja tla te im dubina varira od nekoliko centimetara do nekoliko metara. Često se događa da se tlo zadrži samo u pukotinama stijena tzv. „džepovima“.

Plitka primorska crvenica je slabo kiselo do neutralno tlo (pH 5,6-7,7).

Crvenice su često skeletna tla i to skeletno ilovaste gline do gline, a sadržaj koloidne gline povećava se s dubinom. Strukturu crvenice čine glina (čestice manje od 0,002 mm), sitni i krupni pijesci (od 0,002 do 2 mm) te čestice praha koje su po veličini između čestica gline i pijeska. Takva struktura tla je lako obradiva.

Porozitet crvenica je visok, a kapacitet za zrak je zadovoljavajući.

U Hrvatskoj crvenice pokrivaju 245 000 ha ili 4,4% površine. Najčešće su raširene u asocijaciji sa smeđim tlima na vapnencima i dolomitima. Naše crvenice su često crveno-smeđe boje što može stvarati problem pri razlikovanju crvenica i smeđih tala.

Na crvenicama se može uzgajati većina poljoprivrednih kultura, ali najčešće se sade drvenaste vrste. Duboke crvenice su pogodne za uzgoj voćnjaka i vinove loze, a srednje duboke za uzgoj drvenastih i ratarskih kultura. Nedostaci crvenica su kamenitost, skeletnost, geomorfološka pozicija, uslojenost, položaj slojeva vapnenca i dolomita, dubina, itd. Zato su crvenice uglavnom šumska tla (http://www.medp.unist.hr/moduli/pedologija/predavanja/Klasa-Kambicna_tla.pdf).

2. CILJ RADA

Iz literature vidljivo je da je za uspješan rast i metabolizam *A. junii* dovoljna prisutnost Fe^{2+} u tragovima ($\leq$ 0,02 mg L^{-1}). U otpadnoj vodi, koncentracije Fe^{2+} - iona od 1,31 mg L^{-1} pokazuju negativan utjecaj na rast i metabolizam bakterija, a koncentracije veće od 24,16 mg L^{-1} uzrokuju odumiranje bakterijske biomase. Postoji mogućnost da povišene koncentracije Fe^{2+} djeluju toksično prema PAB i drugim mikroorganizmima u aktivnom mulju i tako dugoročno naruše sposobnost uređaja za tercijarno pročišćavanje da uspješno uklanjaju fosfate iz otpadnih voda (Ivanković i Hrenović, 2011.).

Danas se posebna pažnja posvećuje imobilizaciji bakterija na pogodne nosače kako bi se postigla što veća koncentracija poželjnih stanica u bioreaktorima i time poboljšao proces obrade otpadnih voda.

Cilj ovog rada je utvrditi kako željezo iz zemlje crvenice utječe na kapacitet imobilizacije i metabolizam PAB *A. junii*. Zbog toga smo uklonili površinsko željezo iz originalnog uzorka crvenice obradom s citratom i ditionatom, a oktaedarsko željezo oksalatnom metodom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Crvenica

Uzorci crvenice uzeti su u Savudriji (uzorak 3686), na dubini 10-30 cm. Ti uzorci su sterilizirani u autoklavu 15 minuta pri 120 ºC.

3.2. *Acinetobacter junii*

Kultura fosfat – akumulirajućih bakterija *Acinetobacter junii* soja DSM 1532 kupljena je od banke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (Hrenović i sur., 2003.).

3.3. Sintetska otpadna voda

Kemijski dobivena vodena otopina koristi se kako bi simulirala stvarnu otpadnu vodu. Korišteno je 300 mg natrijevog propinata. 100 mg peptona, 10 mg magnezijevog sulfata ($MgSO_4$), 6 mg kalcijevog klorida ($CaCl_2$), 30 mg kalijevog klorida (KCl), 10 mg ekstrakta kvasca te 88 mg KH_2PO_4 po litri destilirane vode.
pH vrijednost namještena je na 7,00 ± 0,04 prije autoklaviranja. Za podešavanje pH korištene su 1M otopina natrijevog hidroksida (NaOH) i 1M otopina klorovodične kiseline (HCl).

3.4. Izvedba eksperimenta

Bakterija *A. junii* prvo je uzgajana na hranjivom agaru 16 sati pri 30 ± 0,1 ºC. Zatim je biomasa suspendirana u sterilnoj 0,05 M otopini natrijevog klorida (NaCl). Jedan mL suspendirane biomase unesen je u Schottove boce koje su sadržavale 100 mL sintetske otpadne vode. U svaku bocu dodan je 1,0 g zemlje crvenice. Boce su začepljene sterilnim gumenim čepom i aerobno su inkubirane u vodenoj kupelji uz potresanje pri 30 ± 0,5 ºC tijekom 24 sata. Rata opskrbe filtriranim zrakom iznosila je 1 L/min.

Na isti način je provođen postupak za određivanje uklonjene količine fosfata iz zemlje crvenice, ali bez dodatka bakterija.

3.5. Analitičke metode

3.5.1. Mjerenje pH vrijednosti i koncentracije fosfata

pH vrijednosti mjerene su WTW 330 pH-metrom.

Koncentracija fosfata u sintetskoj otpadnoj vodi mjerena je pomoću DR/2500 Hach spektrofotometra koji se koristi molibdovanadat metodom (metoda 8114).
Uzeto je 10 mL sintetske vode iz svake Schottove boce te 1 mL reagensa uz nadopunu do 25 mL destilirane vode u svakoj kiveti spektrofotometra. Prije mjerenja koncentracije fosfata uzorci su filtrirani preko Sartoriusovih nitroceluloznih filtara s porama promjera 0,2 µm. Prva proba je slijepa i sadrži samo destiliranu vodu. Nakon dodatka molibdovanadatnog reagensa razvija se žuta boja koja je proporcionalna koncentraciji fosfata. Na spektrofotometru smo očitavali koncentraciju fosfata u mg $P\text{-}PO_4^{3-}$ L^{-1}.

3.5.2. Mjerenje broja slobodnih i imobiliziranih bakterija

Nakon inkubacije određen je broj slobodnih i imobiliziranih bakterija. Za određivanje slobodnih bakterija 1 mL supernatanta serijski je razrijeđen od 10^{-1} do 10^{-9}. Zatim su volumeni od 0,1 mL naneseni na hranjivi agar. Nakon inkubacije pri 30 ± 0,1 ºC tijekom 24 sata izbrojene su bakterijske kolonije. Za brojanje bakterijskih kolonija koristili smo brojač kolonija Stuart Colony Counter SC6. Broj kolonija preračunat je kao CFU L^{-1}.

Za određivanje broja imobiliziranih stanica pojedini nosači (uzorci crvenica) uzeti su iz boca i isprani tri puta sa sterilnom 0,05 M otopinom natrijevog klorida (NaCl) i preneseni u epruvetu koja sadrži 9 mL 0,05 M otopine natrijevog klorida (NaCl). Uzorci su smrvljeni sterilnim staklenim štapićem i snažno protreseni u mehaničkoj miješalici (40 Hz/3 min.,

Kartell TK3S homogenizator). Ovim postupkom odvajaju se imobilizirane stanice s nosača odnosno crvenice. Od ove suspenzije napravljena su serijska razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-8}. Metodom širenja razmaza inokulirani smo 0,1 mL na hranjivi agar. Nakon inkubacije koja je trajala 24 sata pri 30 ± 0,1 ºC kolonije su prebrojene, a uzorci crvenice su prethodno osušeni u sušioniku tijekom 2 sata pri 105 ºC i izvagani. Broj stanica označen je kao imobilizirani CFU po jednom gramu suhog nosača odnosno crvenice.

3.6. Postupak uklanjanja željeznih oksida iz crvenice

Željezni oksidi iz crvenice uklanjani su ditionat-citrat metodom uz korištenje sode bikarbone (DCB analiza) te oksalatnom metodom.

Uzorak zemlje crvenice (uzorak 3686) podijeljen je na dva dijela.
Prvi dio uzorka (**uzorak A**) stavljen je u plastičnu kivetu i tretiran s 0,3 molarnom otopinom tri-natrijevog citrata dihidrata ($C_6H_5Na_3O_7$ x $2H_2O$) i 1 molarnom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$). Zatim se postepeno dodaje 1 g natrijevog ditionata ($Na_2S_2O_4$) uz zagrijavanje pri 80 ºC u vodenoj kupelji.
Djelovanjem natrijevog ditionata ($Na_2S_2O_4$) na uzorak zemlje crvenice dolazi do redukcije Fe^{3+} - iona u Fe^{2+} - ione koji su topljivi. Naknadnim ispiranjem topivi željezni oksidi se uklanjaju iz crvenice. Postupak se ponavlja tako dugo dok se odvija reakcija redukcije.

$$\text{Reakcija redukcije: } Fe^{3+}{}_{(aq)} + e^- \rightarrow Fe^{2+}{}_{(aq)}$$

Ditionat i produkti reakcije ispiru se destiliranom vodom.
Nakon završetka reakcije uzorak se centrifugira 10 minuta pri 3 800 okretaja/min. Za ubrzanu sedimentaciju čestica dodaje se nekoliko kapi magnezijevog klorida ($MgCl_2$). Prisutnost SO_4^{2-} - iona u supernatantu provjerava se pomoću barijevog klorida ($BaCl_2$). Ispiranje se ponavlja sve dok se reakcija na sulfate ne pokaže negativnom.

$$\text{Reakcija za dokazivanje sulfata: } Ba^{2+}{}_{(aq)} + SO_4^{2-}{}_{(aq)} \rightarrow BaSO_{4(s)}$$

Rezultat je pokazao da je bilo prisutno 87,66% netopivog ostatka te 12,34% topivog ostatka iz čega možemo zaključiti da su željezni oksidi sačinjavali 12,34% mase uzorka A. Uzorak sadrži vrlo fine čestice koje usporavaju sedimentaciju tijekom centrifugiranja. Zato se uzorak tretira sa što manjom količinom koagulacijskog sredstva odnosno magnezijevog klorida ($MgCl_2$) koji je zbog toga prisutan i u finalnom uzorku.

Uzorak crvenice A u radu označava crvenicu kojoj je uklonjeno površinsko željezo.

Drugi dio uzorka 3686 (**uzorak B**) raspodijeljen je u tri tamne LDPE bočice namijenjene za fotosenzitivne kemikalije te je tretiran s 250 mL smjese koja se sastoji od 0,13 M otopine amonijevog oksalata ($NH_4C_2O_4$) i 0,12 M otopine oksalne kiseline ($H_2C_2O_4$). Otopina je dodana uzorku u tamnoj prostoriji. Djelovanjem smjese amonijevog oksalata i oksalne kiseline na uzorak zemlje crvenice dolazi do aktivacije površine minerala (H^+) i dolazi do nastanka koordinatne veze između oksalatnog liganda i iona željeza. Bez svjetlosti onemogućena je foto-elektrokemijska kataliza te oksalat reagira sa slabo kristaliziranim oblicima oksida željeza. Kompleks je desorbiran iz površine minerala te su otopljeni slabo kristalizirani željezni oksidi ispiranjem uklonjeni iz uzorka.

Zatvoreni spremnici miješani su dva sata na planetarnoj miješalici. Zatim su filtrirani kroz filtar plave vrpce u tamnoj prostoriji. Uzorci se ispiru tri puta s destiliranom vodom. Prvo ispiranje se vrši u tamnoj komori, a drugo i treće uz prirodnu svjetlost. Nakon trećeg ispiranja uzorak se prebaci u kivetu i centrifugira. Za bržu sedimentaciju dodaje se nekoliko kapi 1 M otopine magnezijevog klorida ($MgCl_2$) koji je prisutan i u konačnom uzorku. Ne može se odrediti postotak topivog i netopivog ostatka.

Udio amorfnih željeznih oksida nije moguće utvrditi jer je tijekom filtracije u tamnoj komori došlo do vidljivog gubitka sitne frakcije koja prolazi kroz filtar.
Uzorak sadrži vrlo fine čestice koje prolaze kroz filtar plave vrpce. Ispiranje je otežano zbog začepljivanja filtar papira te stvaranja fine suspenzije.

Uzorak crvenice B u radu označava crvenicu kojoj je uklonjeno površinsko i oktaedarsko željezo.

4. REZULTATI

4.1. Uklanjanje fosfata s crvenicom u abiotskom pokusu

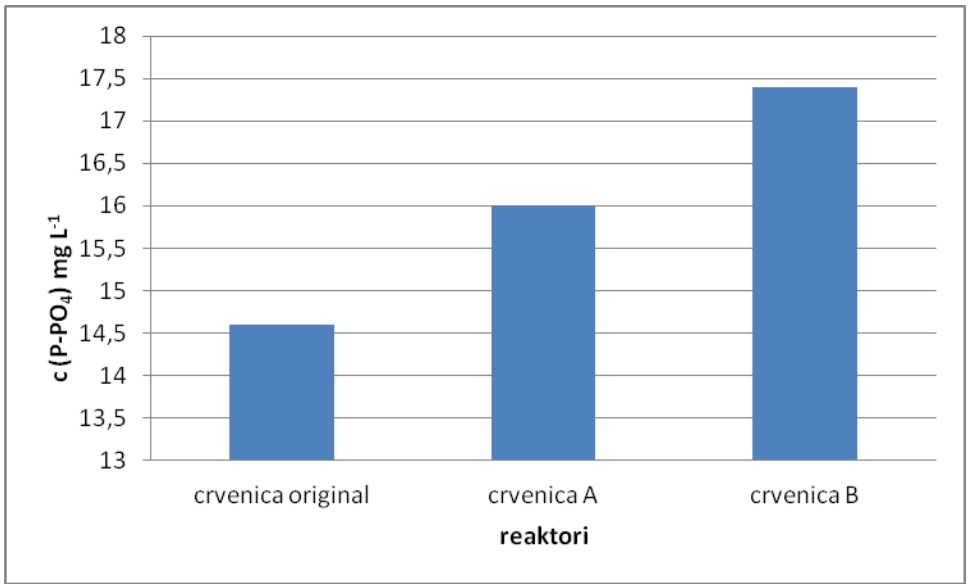
Početna koncentracija fosfata iznosila je 21,6 ± 0,3 mg L^{-1} (Tablica 1). Nakon 24 sata inkubacije koncentracija fosfata bila je niža jer je crvenica uklonila dio fosfata. U reaktoru s originalnom crvenicom iznosila je 14,6 mg L^{-1}, u reaktoru s crvenicom A 16,0 mg L^{-1}, a u reaktoru s crvenicom B 17,4 mg L^{-1} (Tablica 1). Ovi podaci pokazuju da je originalna crvenica uklonila najviše fosfata, zatim crvenica A te naposljetku crvenica B (Slika 8).

Originalna crvenica ukupno je uklonila 7,0 mg L^{-1} fosfata, crvenica A 5,6 mg L^{-1} fosfata, a crvenica B 4,2 mg L^{-1} fosfata. Iz ovih rezultata također vidimo da je originalna crvenica uklonila najviše fosfata, zatim crvenica A te crvenica B (Tablica 1).

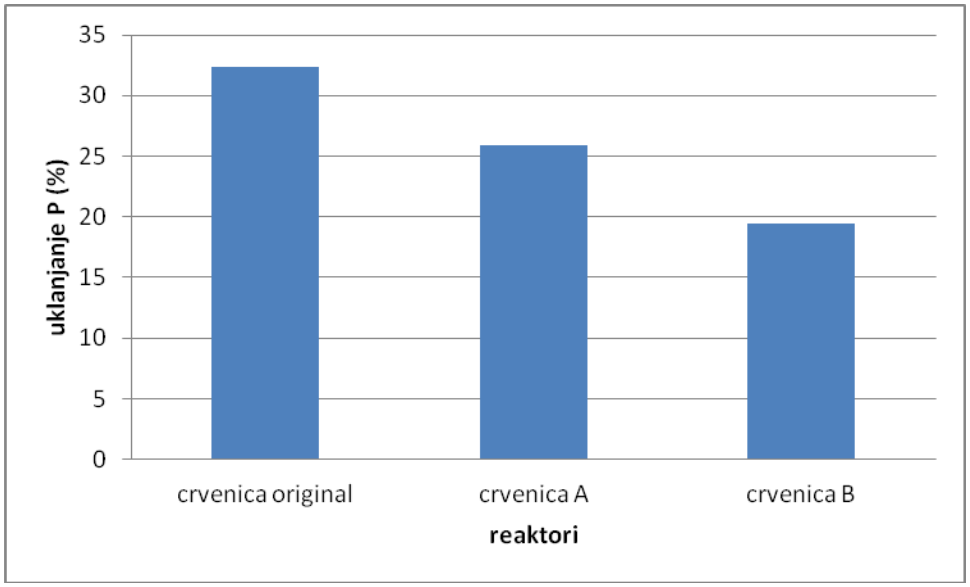
Postotak uklonjenih fosfata nakon 24 sata inkubacije u reaktoru iznosio je 32,4%, u reaktoru s crvenicom A 25,9% te u reaktoru s crvenicom B 19,4% (Tablica 1). Vidimo da je najveći postotak fosfata uklonila originalna crvenica što je u skladu s prethodnim rezultatima (Slika 9).

Tablica 1. Uklanjanje P iz sintetske otpadne vode u reaktorima s crvenicom bez bakterija.

Parametri	**Crvenica original**	**Crvenica A**	**Crvenica B**
start			
pH	7,0	7,0	7,0
P-PO_4 (mg L^{-1})	21,6	21,6	21,6
nakon 24h inkubacije			
pH	7,86	6,23	7,22
P-PO_4 (mg L^{-1})	14,6	16,0	17,4
ukupno uklonjeni P (mg L^{-1})	7,0	5,6	4,2
uklonjeni P (%)	32,4	25,9	19,4

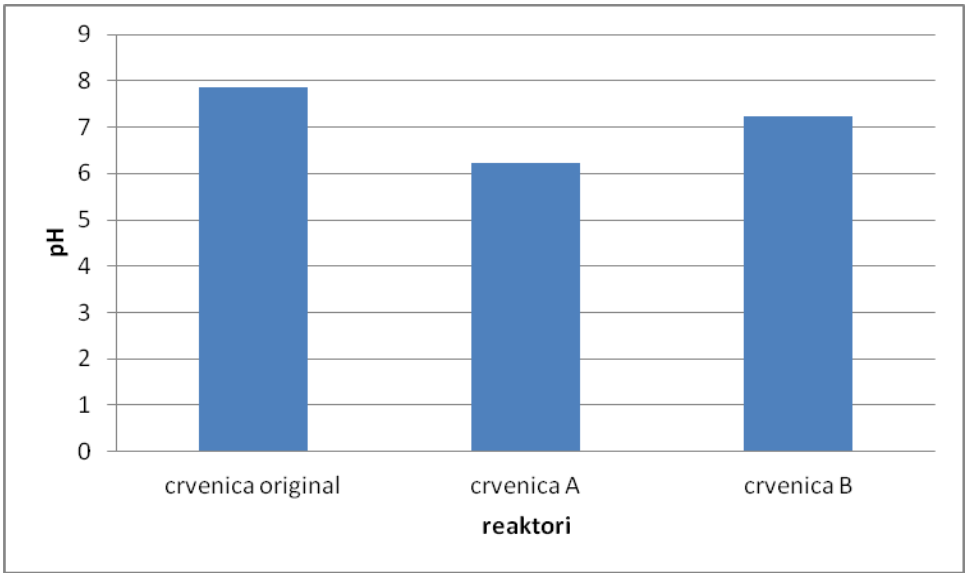


Slika 8. Promjena koncentracije fosfata u pojedinim reaktorima nakon 24 sata inkubacije.



Slika 9. Postotak uklanjanja fosfata u reaktorima nakon 24 sata inkubacije.

Početni pH namješten je na 7,00 ± 0,04. Nakon 24 sata inkubacije, u reaktoru s originalnom crvenicom pH je iznosio 7,86, u reaktoru s crvenicom A 6,23 te u reaktoru s crvenicom B 7,22 (Tablica 1, Slika 10).



Slika 10. Promjena pH vrijednosti u reaktorima nakon 24 sata inkubacije.

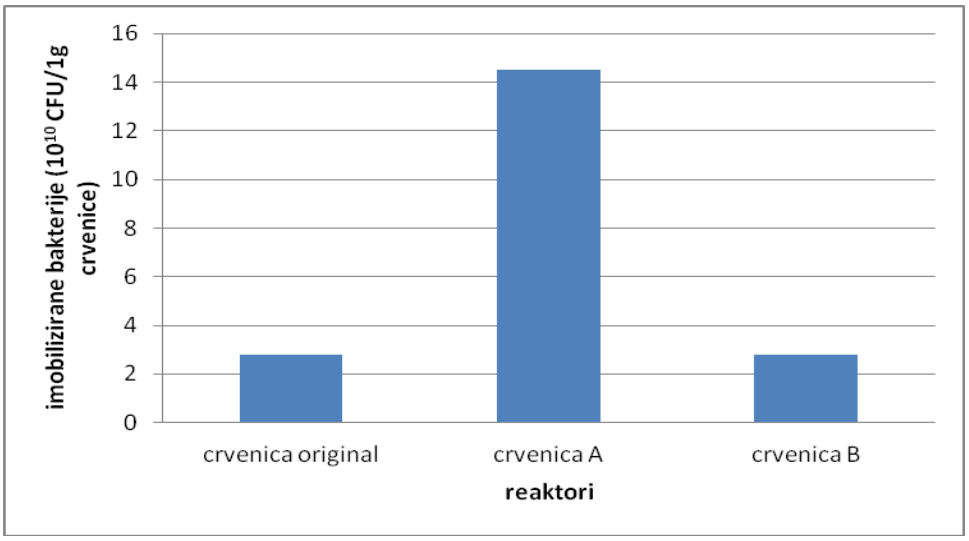
4.2. Uklanjanje fosfata s crvenicom i *A. junii*

Početna vrijednost broja bakterija iznosila je c_0 (10^6 CFU mL^{-1}) = 7,99 ± 2,10 (Tablica 2). Nakon 24-satne inkubacije uzoraka broj bakterijskih stanica se znatno povećao u odnosu na početne vrijednosti.

Najveći broj slobodnih bakterijskih stanica nalazio se u reaktoru s crvenicom A ($9,2\times10^8$ CFU mL^{-1}) te u reaktoru s originalnom crvenicom ($8,8\times10^8$ CFU mL^{-1}).
Najveći broj bakterijskih stanica imobilizirao se na crvenicu A i iznosi $1,45\times10^{11}$ CFU po 1g crvenice, nakon čega su slijedili reaktori s originalnom crvenicom i crvenicom B s vrijednošću od $2,8\times10^{10}$ CFU/g crvenice (Tablica 2). Postoji značajna razlika u broju imobiliziranih bakterija kod crvenice A u odnosu na originalnu crvenicu i crvenicu B (Slika 11).

Tablica 2. Uklanjanje P iz sintetske otpadne vode i broj bakterija *A. junii* u reaktorima s crvenicom i PAB *A. junii*.

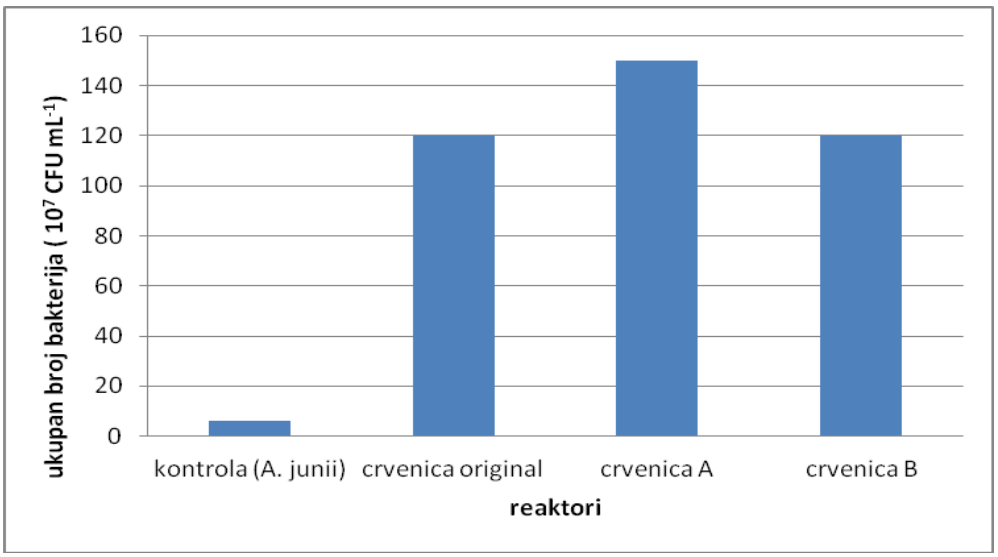
Parametar	**kontrola (*A. junii*)**	**crvenica original**	**crvenica A**	**crvenica B**
start				
pH	7,0	7,0	7,0	7,0
P-PO_4 (mg L^{-1})	22,2	21,6	21,6	21,6
10^6 CFU mL^{-1}	8,0	2,4	2,1	2,5
nakon 24h inkubacije				
pH	6,79	8,17	8,12	8,36
P-PO_4 (mg L^{-1})	17,4	10,4	11,3	13,0
ukupno uklonjeni P (mg L^{-1})	4,8	11,2	10,3	8,6
bakterijama uklonjeni P (mg L^{-1})	4,8	4,2	4,7	4,4
slobodne bakterije (10^7 CFU mL^{-1})	6,2	88,0	2,0	92,0
imobilizirane bakterije (10^{10} CFU/1g crvenice)	-	2,8	14,5	2,8
ukupne bakterije (10^7 CFU mL^{-1})	6,2	120,0	150,0	120,0
stopa uklanjanja P (10^{-11} mg P CFU^{-1})	7,74	36,0	32,0	37,0
CFU 24h/CFU start	7,75	485	702	481
uklonjeni P (%)	21,6	51,9	47,7	39,8
CFU imobilizirane/ CFU slobodne	-	32	7658	31



Slika 11. Broj imobiliziranih bakterija po gramu crvenice u pojedinim reaktorima nakon 24 sata inkubacije.

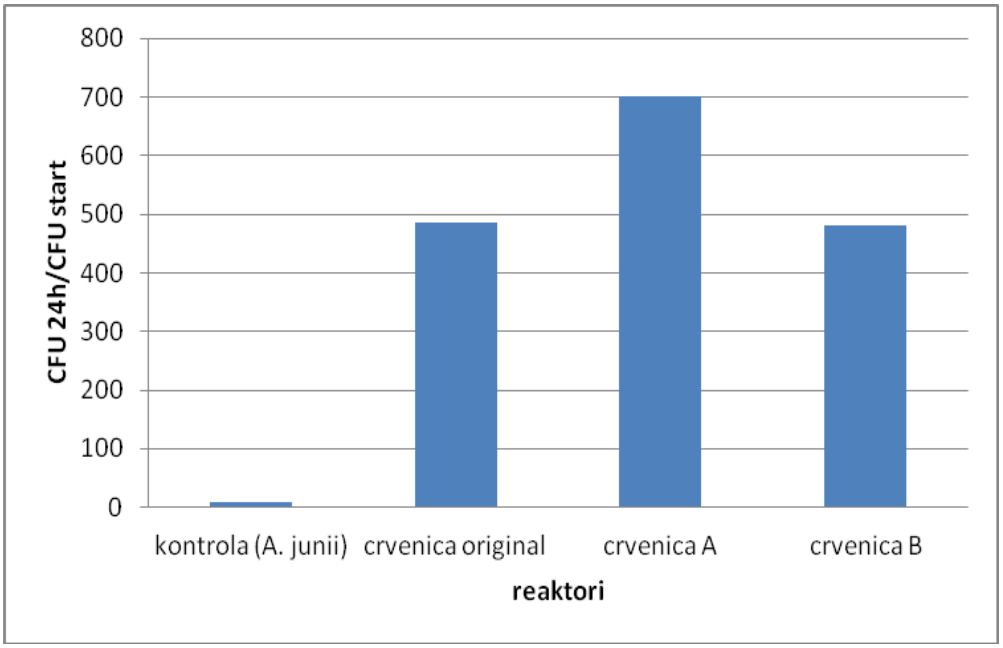
Najveći ukupan broj bakterija bio je u reaktoru s crvenicom A.

U kontrolnom reaktoru iznosio je $6{,}2\times10^{7}$ CFU mL^{-1}, u reaktoru s originalnom crvenicom i *A. junii* $1{,}2\times10^{9}$ CFU mL^{-1}, u reaktoru s crvenicom A $1{,}5\times10^{9}$ CFU mL^{-1} te u reaktoru s crvenicom B $1{,}2\times10^{9}$ CFU mL^{-1} (Tablica 2). Vidimo da ne postoji značajna razlika u broju bakterija u reaktorima s crvenicom, dok je kontrolni uzorak imao znatno manji broj ukupnih bakterija (Slika 12).



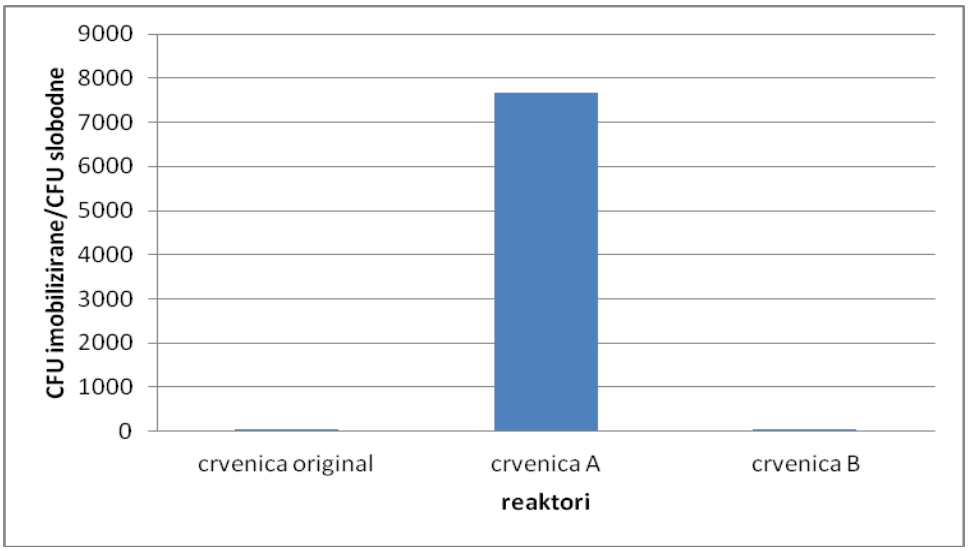
Slika 12. Ukupan broj bakterija u reaktorima nakon 24-satne inkubacije.

Slika 13 prikazuje omjer između početnih vrijednosti CFU i onih nakon 24-satne inkubacije uzoraka. Najveći omjer početnih i konačnih vrijednosti CFU bio je u reaktoru s crvenicom A te je iznosio 702, zatim u reaktoru s originalnom crvenicom gdje je iznosio 485 te u uzorku crvenice B gdje je bio 481. U kontrolnom uzorku taj omjer je iznosio 7,75 (Tablica 2). Ovi podaci su u skladu s prethodno već navedenim podacima te i iz njih također vidimo da se najveći broj bakterija razvio u uzorku crvenice A.



Slika 13. Omjer CFU vrijednosti nakon i prije inkubacije u pojedinim reaktorima.

Najveći omjer imobiliziranih i slobodnih bakterija također se nalazio u reaktoru s crvenicom A i iznosio je 7 658, dok je taj omjer za originalnu crvenicu i crvenicu B bio gotovo identičan, te je iznosio 32 odnosno 31 (Tablica 2, Slika 14).



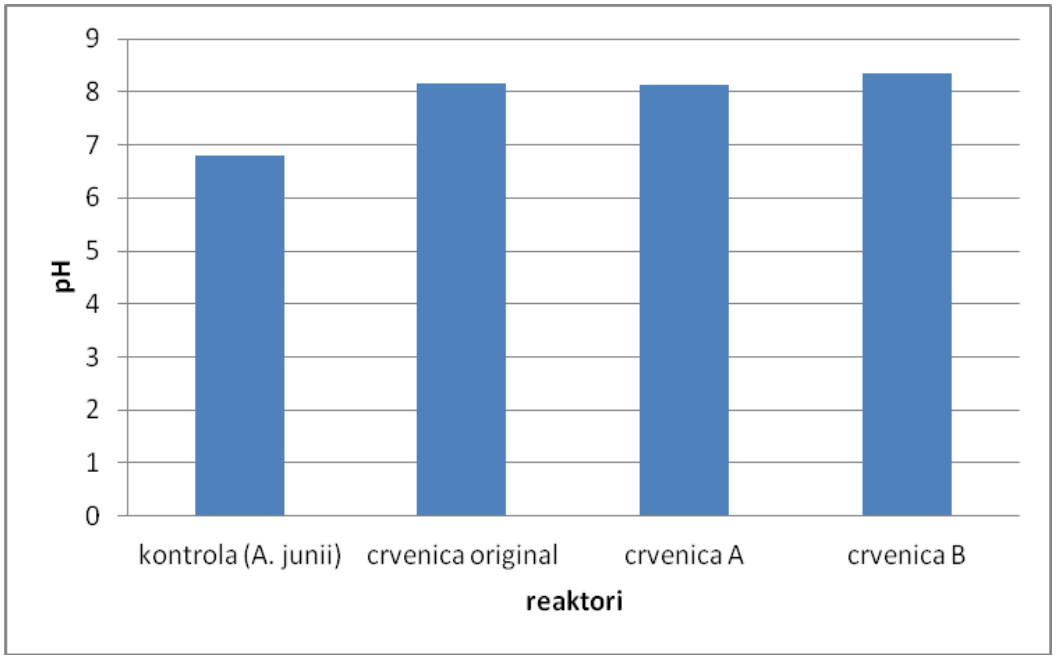
Slika 14. Omjer broja imobiliziranih i slobodnih bakterija nakon 24 sata inkubacije.

Početni pH (prije inkubacije) namješten je na 7,00 ± 0,04 (Tablica 2).

Većina uzoraka nakon 24-satne inkubacije uzoraka imala je pH vrijednost u lužnatom području što odgovara *A. junii*.

U reaktoru s originalnom crvenicom i *A. junii* pH je iznosio 8,17, u reaktoru s crvenicom A i *A. junii* 8,12 te u reaktoru s crvenicom B i *A. junii* 8,36.

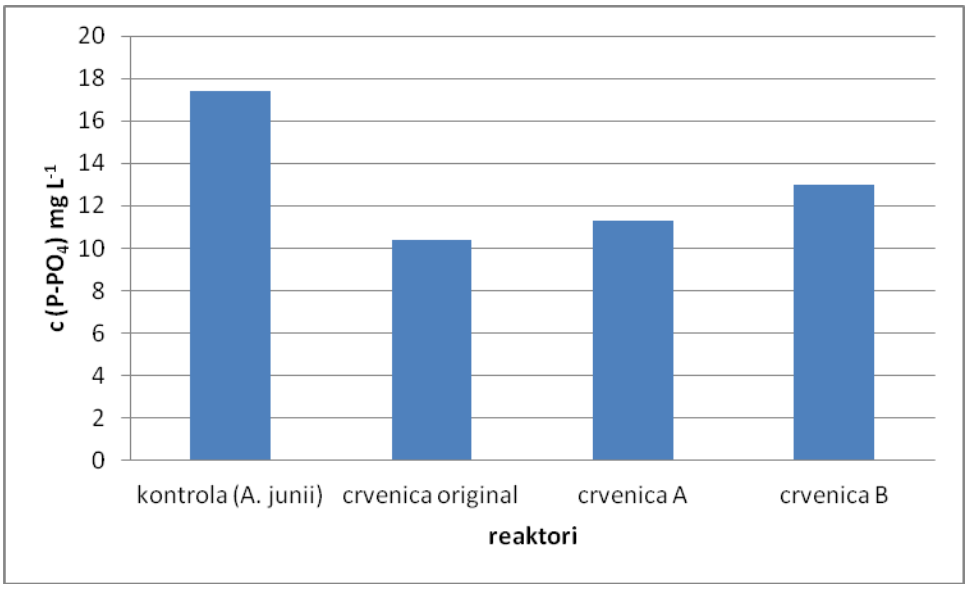
Kontrolni uzorak koji sadrži samo *A. junii* imao je blago kiseli pH i iznosio je 6,79 (Tablica 2, Slika 15).



Slika 15. Promjene pH vrijednosti nakon 24-satne inkubacije unutar pojedinih reaktora.

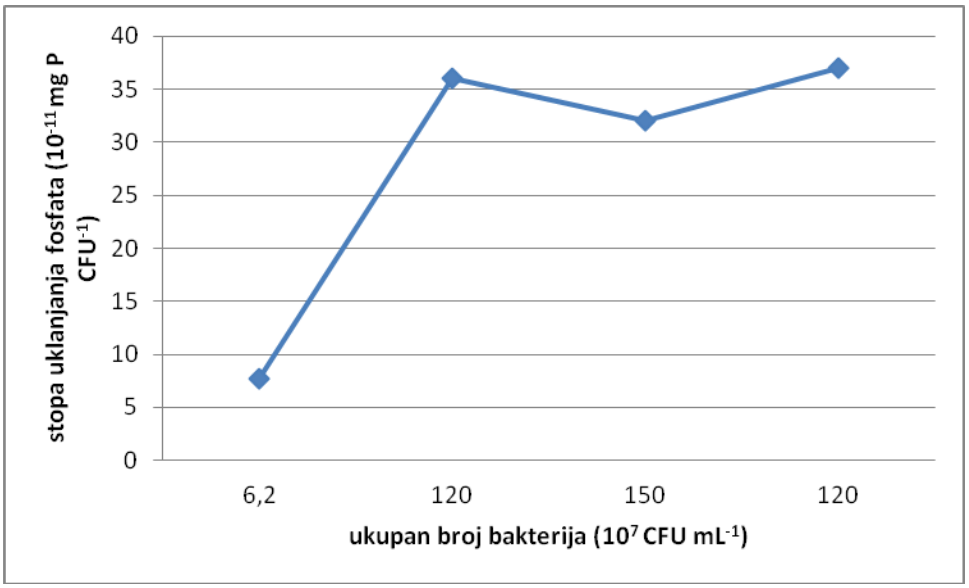
Početna koncentracija fosfata, prije 24-satne inkubacije, iznosila je 21,6mg L^{-1} ± 0,3 (Tablica 2). Nakon 24 sata inkubacije uzoraka koncentracija fosfata je padala, što smo i očekivali, jer je došlo do uklanjanja fosfata.

U kontrolnom reaktoru s *A. junii* koncentracija fosfata iznosila je 17,4 mg L^{-1}, u reaktoru s originalnom crvenicom 10,4 mg L^{-1}, u reaktoru s crvenicom A 11,3 mg L^{-1} te u reaktoru s crvenicom B 13,0 mg L^{-1} (Tablica 2). Najniža koncentracija fosfata bila je u reaktoru s originalnom crvenicom i *A. junii*, te u reaktoru crvenice A i *A. junii* (Tablica 2). Na temelju toga možemo pretpostaviti da je u tim uzorcima došlo do najvećeg ukupnog uklanjanja fosfata (Slika 16).



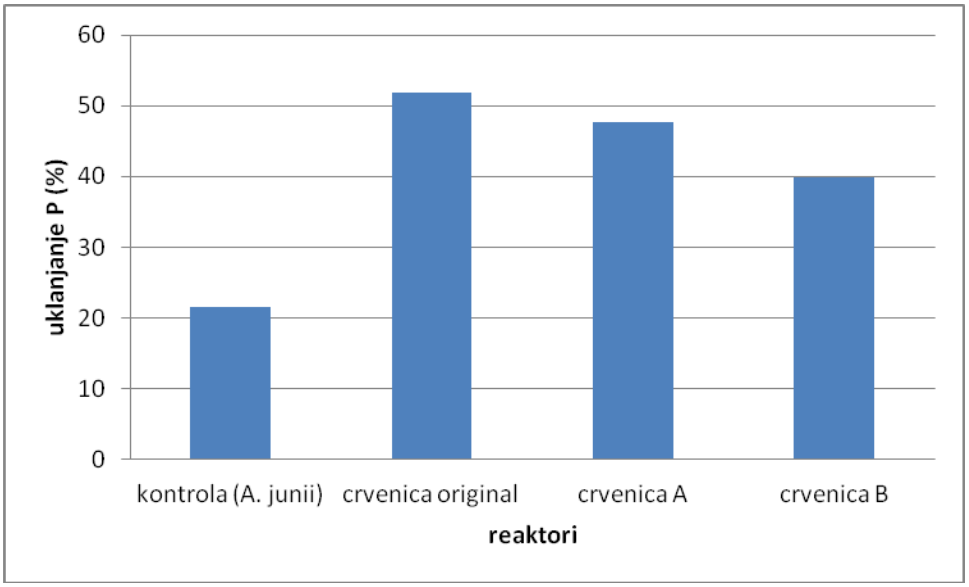
Slika 16. Promjena koncentracije fosfata u reaktorima nakon 24-satne inkubacije.

Stopa uklanjanja fosfata bila je najveća u reaktoru s crvenicom B i iznosi $3,7\times10^{-12}$ mg P CFU^{-1}, ali vrlo sličan rezultat bio je i u reaktoru s crvenicom A gdje je ta stopa iznosila $3,6\times10^{-12}$ mg P CFU^{-1}. U reaktoru s originalnom crvenicom i bakterijom stopa uklanjanja fosfata iznosila je $3,2\times10^{-12}$ mg P CFU^{-1}, a kod kontrolnog uzorka iznosila je $7,74\times10^{-11}$ mg P CFU^{-1} (Tablica 2, Slika 17). Ovi podaci ukazuju da nema znatne razlike u stopi uklanjanja fosfata između uzoraka u kojima je iz crvenice uklonjeno željezo i onih u kojima nije. Na temelju toga možemo zaključiti da željezo prisutno u crvenici nema utjecaja na bakterijsko uklanjanje fosfata.



Slika 17. Ovisnost stope uklanjanja fosfata bakterijama o ukupnom broju bakterija.

U reaktoru originalne crvenice s *A. junii* bio je najveći postotak uklonjenih fosfata i to čak 51,9%, a vrlo blizu tome je i rezultat u reaktoru s crvenicom A i *A. junii* koji je iznosio 47,7%. U reaktoru s crvenicom B i *A. junii* uklonjeno je 39,8%, a u kontrolnom reaktoru 21,6% (Tablica 2). Iz navedenog vidimo da crvenica ima velik kapacitet uklanjanja fosfata koji se značajno povećava dodatkom fosfat-akumulirajuće bakterije (Slika 18).



Slika 18. Postotak uklonjenih fosfata unutar pojedinih reaktora nakon 24 inkubacije.

5. RASPRAVA

Rezultati ukazuju da je crvenica dobar nosač za PAB *A. junii* te da sama po sebi ima dobru sposobnost uklanjanja fosfata, koja se znatno povećava dodatkom bakterije, a to možemo potvrditi i usporedbom rezultata s drugim istraživanjima.

Hrenović i sur. (2010.) istraživali su sepiolit kao nosač *A. junii*. Koristili su originalni i pročišćeni sepiolit. Pokazalo se da je sepiolit dobar nosač za PAB *A. junii*. Bakterije koje su se imobilizirale bile su metabolički aktivne i uklanjale su fosfate iz otpadne vode. Sepiolit je bogat Mg^{2+} - ionima te je dobar izvor tih iona za *A. junii* koji doprinose povećanju bakterijske biomase.

Broj imobiliziranih bakterija kod originalnog sepiolita iznosio je $5,57\times10^{9}$ CFU/g nosača, a kod pročišćenog sepiolita $8,12\times10^{9}$ CFU/g nosača (Hrenović i sur., 2010.). Na originalnoj crvenici broj imobiliziranih bakterija iznosio je $2,8\times10^{10}$ CFU/g nosača, na crvenici A $14,5\times10^{10}$ CFU/g nosača te na crvenici B $2,8\times10^{10}$ CFU/g nosača.

Omjer između broja imobiliziranih i slobodnih bakterija kod originalnog sepiolita iznosio je 318, kod pročišćenog sepiolita 532 (Hrenović i sur., 2010.), kod originalne crvenice 32, kod crvenice A 7658, a kod crvenice B 31.

Omjer početnih i konačnih vrijednosti broja bakterija kod originalnog sepiolita iznosio je 6,37, a kod pročišćenog 7,91 (Hrenović i sur., 2010.). Kod originalne crvenice taj omjer je iznosio 485, kod crvenice A 702 te kod crvenice B 481.

Postotak uklonjenih fosfata kod originalnog sepiolita iznosio je 28,41%, a kod pročišćenog 34,59% (Hrenović i sur., 2010.). Postotak uklanjanja fosfata s crvenicom varirao je od 19,4% do 32,4% za samu crvenicu, te od 39,8 do 51,9% za crvenicu s imobiliziranim bakterijama. Stopa uklanjanja fosfata iznosila je $5,84\times10^{-11}$ mg P CFU^{-1} za originalni sepiolit, $5,87\times10^{-11}$ mg P CFU^{-1} za pročišćeni sepiolit (Hrenović i sur., 2010.), dok je za originalnu crvenicu ta stopa iznosila 36×10^{-11} mg P CFU^{-1}, za crvenicu A 32×10^{-11} mg P CFU^{-1}, te za crvenicu B 37×10^{-11} mg P CFU^{-1}.

Usporedbom ovih podataka za sepiolit i crvenicu (Tablica 3) možemo zaključiti da je broj imobiliziranih bakterija daleko veći kod crvenice nego kod obje forme sepiolita. Također se vidi da je stopa uklanjanja fosfata veća kod crvenice, kao i postotak ukupno uklonjenih fosfata u odnosu na sepiolit.

Tablica 3. Usporedba podataka dobivenih za sepiolit (Hrenović i sur., 2010.) i crvenicu kao nosača *A. junii*.

Parametri	**Originalni sepiolit**	**Pročišćeni sepiolit**	**crvenica original**	**crvenica A**	**crvenica B**
Imobilizirane bakterije(10^9CFU/g)	5,57	8,12	28,0	145,0	28,0
CFU imobilizirane/ CFU slobodne	318	532	32	7658	31
CFU 24h/ CFU start	6,37	7,91	485	702	481
stopa uklanjanja P (10^{-11} mg P CFU^{-1})	5,84	5,87	36,0	32,0	37,0
uklonjeni P (%)	28,41	34,59	51,9	47,7	39,8

U istraživanju Hrenović i sur. (2011.) proučavan je klinoptilolit kao prirodni nosač za *A. junii*. Koristili su Zn - klinoptilolit (Zn - CLI) i ZnO - klinoptilolit (ZnO - CLI).

Broj imobiliziranih bakterija na Zn - CLI iznosio je $0{,}39\times10^6$ CFU/g nosača, a kod ZnO - CLI $61{,}4\times10^6$ CFU/g nosača, što je vrlo malo u usporedbi s Mg - izmijenjenim klinoptilolitom gdje se imobiliziralo $9{,}5\times10^9$ CFU/g nosača, površinski izmijenjenim klinoptilolitom s $5{,}3\times10^9$ CFU/g nosača te prirodnim klinoptilolitom $2{,}3\times10^9$ CFU/g nosača. Omjer CFU 24 h/CFU start bio je znatno veći u kontrolnom uzorku i iznosio je 4,85 nego kod Zn - CLI gdje je iznosio 0,0 i Zn - CLI gdje je bio 0,01 (Hrenović i sur., 2011.). Ovi podaci sugeriraju da Zn - CLI i ZnO - CLI imaju snažno antibakterijsko djelovanje s vrlo visokim postotkom inhibicije *A. junii* od čak 99%. Unatoč vrlo niskom broju imobiliziranih bakterija postotak uklonjenih fosfata bio je mnogo veći nego u kontrolnom reaktoru. Nakon 24 sata inkubacije početna koncentracija fosfata smanjila se za 80% kod ZnO - CLI te 50% za Zn - CLI. Utjecaj bakterija pri uklanjanju fosfata bio je zanemariv i iznosio je manje od 0,06% (Hrenović i sur., 2011.).

Usporedba podataka za klinoptilolit i crvenicu (Tablica 4) pokazuje kako je crvenica daleko bolji nosač za *A. junii* od klinoptilolita. ZnO - klinoptilolit mnogo učinkovitije uklanja fosfate (80,89%) od originalne crvenice (51,9%), crvenice A (47,7%) te crvenice B (39,8%). Zn - klinoptilolit uklonio je nešto manje fosfata (50,12%) od originalne crvenice (51,9%), ali više od crvenice A i B.

Tablica 4. Usporedba podataka o broju imobiliziranih bakterija i postotku uklanjanja fosfata kod klinoptilolita sa sadržajem cinka (Hrenović i sur., 2011.) i crvenice kao nosača *A. junii*.

Parametri	**Zn - klinoptilolit**	**ZnO - klinoptilolit**	**crvenica original**	**crvenica A**	**crvenica B**
imobilizirane bakterije(10^6 CFU/g)	0,39	61,4	28000	145000	28000
CFU 24h/CFU start	0,0	0,01	485	702	481
uklonjeni P (%)	50,12	80,89	51,9	47,7	39,8

Bentonit je također istraživan kao nosač za *A. junii* (Hrenović i sur., 2009.). U tom istraživanju korišten je prirodni bentonit te bentonit modificiran s kvarternom amonijevom soli odnosno cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB).

CTA - bentonit 1 sadržavao je 0,063 mmol/g CTA, a CTA - bentonit 2 sadržavao je 0,500 mmol/g CTA.

Podaci iz tablice 5 ukazuju da je crvenica bolji nosač za *A. junii* od prirodnog i modificiranog bentonita. Na prirodnom bentonitu imobiliziralo se $4{,}79\times10^9$ CFU/g nosača, na CTA - bentonit 1 $2{,}95\times10^9$ CFU/g nosača te na CTA - bentonit 2 $7{,}78\times10^9$ CFU/g nosača (Hrenović i sur., 2009.). Te vrijednosti su bile znatno veće kod originalne crvenice ($28{,}0\times10^9$ CFU/g nosača) te crvenice A ($145{,}0\times10^9$ CFU/g nosača) i B ($28{,}0\times10^9$ CFU/g nosača). Stopa uklanjanja fosfata kod prirodnog bentonita iznosila je $0{,}75\times10^{10}$ mg P CFU^{-1}, kod CTA – bentonita 1 $1{,}54\times10^{10}$ mg P CFU^{-1} te kod CTA - bentonita 2 $1{,}48\times10^{10}$ mg P CFU^{-1} (Hrenović i sur., 2009.). Kod originalne crvenice stopa uklanjanja fosfata iznosila je $3{,}6\times10^{10}$ mg P CFU^{-1}, kod crvenice A $3{,}2\times10^{10}$ mg P CFU^{-1} te crvenice B $3{,}7\times10^{10}$ mg P CFU^{-1}. Očito je da crvenica ima bolju stopu uklanjanja fosfata od bentonita. Međutim, kod postotka uklonjenih fosfata situacija je drukčija. Crvenica je imala veći postotak uklonjenih fosfata od prirodnog bentonita, ali daleko manji od modificiranih bentonita. CTA - bentonit 1 imao je vrlo visok postotak uklonjenih fosfata od čak 92,23%, a slijedio ga CTA - bentonit 2 s 81,98%. Prirodni bentonit imao je mnogo niži postotak uklonjenih fosfata i

iznosio je 30,77%. Postoci uklanjanja fosfata kod originalne crvenice, crvenice A i B redom su iznosili 51,9%, 47,7% te 39,8%.

Tablica 5. Usporedba podataka o broju imobiliziranih bakterija, stopi i postotku uklanjanja fosfata kod bentonita (Hrenović i sur., 2009.) i crvenice.

Parametri	**prirodni bentonit**	**CTA-bentonit 1**	**CTA-bentonit 2**	**Originalna crvenica**	**Crvenica A**	**Crvenica B**
Broj imobiliziranih bakterija (10^9 CFU/g)	4,79	2,95	7,78	28,0	145,0	28,0
Stopa uklanjanja fosfata (10^{-10} mg P CFU^{-1})	0,75	1,54	1,48	3,6	3,2	3,7
Uklonjeni P (%)	30,77	92,23	81,98	51,9	47,7	39,8

Usporedbom podataka za različite vrste nosača možemo vidjeti da se na crvenici imobiliziralo više bakterija nego kod originalnog i pročišćenog sepiolita, Zn- i ZnO-klinoptilolita, prirodnog bentonita te CTA-bentonita 1 i 2. Zbog toga možemo zaključiti da je crvenica vrlo dobar nosač za *A. junii*.

Crvenica je imala veću stopu i postotak uklanjanja fosfata od originalnog i pročišćenog sepiolita te prirodnog bentonita. Zn-klinoptilolit i originalna crvenica imali su sličan postotak uklanjanja fosfata. ZnO-klinoptilolit, CTA-bentonit 1 i 2 imali su dosta veći postotak uklanjanja fosfata od crvenice. To pokazuju da crvenica u kombinaciji s *A. junii* ima dobar postotak uklanjanja fosfata, ali postoje zeoliti s boljom sposobnošću uklanjanja fosfata.

pH vrijednosti tijekom eksperimenta bile su uglavnom u lužnatom području što odgovara *A. junii* koja optimalno živi u neutralnom do blago lužnatom mediju (Garrity i sur., 2003.). Kiseli medij im ne odgovara te pri takvom pH pokazuju slab rast i odumiranje biomase. Bakterije odumiru ako pH vrijednosti padnu ispod 6 (Ivanković i Hrenović, 2011.).

Međutim, *A. junii* imobilizirane na prirodni zeolit mogu preživjeti ekstremne vrijednosti pH što su pokazali Ivanković i Hrenović (2011.) u svom istraživanju. U reaktorima s otpadnom vodom korištene su vrijednosti pH od 2, 3, 4 i 5 tijekom 24 sata. Pri pH 4 preživjelo je 82% bakterija, dok u kontrolnom reaktoru taj postotak je iznosio 0,0%. Pri pH 3 preživjelo je 38% bakterija, a pri pH 2 nije bilo živih bakterija nakon inkubacije. Ovi rezultati pokazuju da bakterija može preživjeti ekstremne vrijednosti pH ako je imobilizirana na prirodni nosač, dok slobodne bakterije ne mogu opstati pri takvom pH.

Uspoređujući pH vrijednosti kod različitih nosača vidimo da se one nalaze uglavnom u blago lužnatom području u kojem *A. junii* optimalno živi. Originalni sepiolit imao je pH vrijednost 7,82, a pročišćeni 7,86 (Hrenović i sur., 2010.). Zn- klinoptilolit imao je pH 5,99, što ne odgovara *A. junii*, dok je pH kod ZnO-klinoptilolita bio u blago lužnatom području i iznosio je 7,19 (Hrenović i sur., 2011.). Kod originalne crvenice, crvenice A i B pH nakon inkubacije bili su u lužnatom području i iznosili su 8,17, 8,12 te 8,36. Vidimo da se pH vrijednosti dobivene tijekom eksperimenta slažu s podacima dobivenim za druge nosače.

Tablica 6. Usporedba pH vrijednosti nakon 24 h inkubacije kod uporabe različitih nosača *A. junii*.

	Originalni sepiolit	**Pročišćeni sepiolit**	**Zn-klinoptilolit**	**ZnO-klinoptilolit**	**Crvenica original**	**Crvenica A**	**Crvenica B**
pH	7,82	7,86	5,99	7,19	8,17	8,12	8,36

Negativni utjecaj željeznih iona pripisuje se smanjenju pH vrijednosti jer Fe^{2+}-ioni u otpadnoj vodi stupaju u reakciju hidrolize, smanjuju alkalnost medija i snižavaju ukupan pH (de Haas i sur., 2000.).

Drugi mogući negativan učinak željeznih iona je nastanak čestica P-Fe precipitata u aktivnom mulju koje se najvjerojatnije vežu u mrežu ekstracelularnih tvari nastalih bakterijskom aktivnošću ili izravno na bakterijsku stanicu. Vezivanje P-Fe precipitata na bakterijsku stanicu dovodi do odumiranja bakterija. Čestice vezanog Fe ili P-Fe mogu spriječiti normalnu izmjenu nutrijenata bakterije s okolnim medijem ili djelovati inhibitorno na enzimske reakcije u bakterijskoj stanici.

Usporedbom rezultata u reaktorima u kojima je uklonjeno površinsko te površinsko i oktaedarsko željezo tretmanom s citratom odnosno ditionatom i onima u kojima nije uklonjeno nema značajnijih razlika u ukupnom broju bakterija i ratama uklanjanja fosfata te možemo zaključiti da željezo sadržano u crvenici nije utjecalo na metabolizam i umnožavanje *A. junii*.

6. ZAKLJUČAK

Crvenica se pokazala kao vrlo dobar nosač za *A. junii* te i sama ima veliku sposobnost uklanjanja fosfata koja se još značajnije povećava dodatkom bakterije.

Stoga nas je zanimalo kako će željezo, koje je prisutno u crvenici u obliku različitih željeznih oksida i hidroksida, utjecati na metabolizam fosfat-akumulirajućih bakterija. Zbog toga smo crvenicu tretirali citrat-ditionat metodom pomoću koje smo uklonili površinsko željezo te oksalatnom metodom kojom smo uklonili i oktaedarsko željezo. Usporedbom svih rezultata možemo vidjeti da su rezultati bili slični u reaktorima gdje je bilo prisutno željezo i tamo gdje je ono uklonjeno te možemo zaključiti da sadržaj željeza koji je prisutan u zemlji crvenici nema značajniji utjecaj na metabolizam *A. junii*.

7. LITERATURA:

1. Abdel El-Haleem, D. (2003.): Acinetobacter: Enviromental and biotechnological applications. African Journal of Biotechnology, 2: 71-74.

2. Bergogne-Bérézin, E., Towner, K. J. (1996.): Acinetobacter ssp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological fatures. Clinal Microbiology Reviews, 9: 148-165.

3. Blume, H. P., Schwertmann, U. (1969.): Genetic evaluation of Profile Distribution of Aluminium, Iron and Manganese oxides. Soil Science Society America Journal, 33: 438-444.

4. Bond, P. L., Rees, G. N. (1999.): Microbiological aspect of phosphorus removal in active sludge system. In: Microbiology of acivated sludge (Seviour, R. J., Blackall, L. L., Eds.). Kluwer Academic Publishers Dodrecht: 227-256.

5. Bouvet, P. J. M., Grimont, P. A. D. (1986.): Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov., and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwofii*, International Journal of Systematic Bacteriology, 199: 228-440.

6. Caravelli, A. H., Contreras, E. M., Zaritzky, N. E. (2009.): Phosphorus removal in batch systems using ferric chloride in the presence of activated sludge. Jurnal of Hazardous Material, 177: 199-208.

7. Carr, E. L., Kampfer, P., Patel, B. K. C., Gurtler, V., Seviour, R. J. (2003.): Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 953-963.

8. Constantiniu, S., Romanius, A., Iancu, L. S., Filimon, R., Tarasi, I. (2004.): Cultural and biochemical characteristics of Acinetobacter ssp. strains isolated from Hospital units. The Journal of Preventive Medicine, 12: 35-42.

9. de Haas, D. W., Wentzel, M. C., Ekama, G. A. (2000.): The use of simultaneous chemical precipitation in modified activated sludge systems exhibiting biological excess phosphate removal Part 1: Literature reviews *Water SA*, 26: 439-452.

10. Durham, D. R., Marshall, L. C., Miller, J. G., Chmurny, A. B. (1994.): Characterization of inorganic biocarriers that moderate system upsets during fixed-film biotreatment process, Applied and Environmental Microbiology, 60: 3329-3335.

11. Durn, G. (2003.): Terra Rossa in the Mediterranean Region: Parent Materials, Composition and Origin, 56: 83-100.

12. Filipović, I., Lipanović, S. (1995.): Opća i anorganska kemija, II. Dio-Kemijski elementi, njihove elementarne tvari i spojevi, IX. Izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 1015-1048.

13. Fuhs, G.W., Chen, M. (1975.): Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. Microbial Ecology 2,119-138.

14. Garrity, G. M., Bell J. A., Lilburn T. G. (2003.): Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York.

15. Grzmil, B., Wronkowski, J. (2006.): Removal of phosphates and flourides from industrial wastewater. Desalination, 189: 261–268.

16. Henriksen, S. D. (1973.): Moraxella, Acinetobacter and Mimeae. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 37: 522-561.

17. Hill, W. E., Beneceld, L. D., Jing, S. R. (1989.): 31P_NMR spectroscopy characterization of polyphosphates in activated sludge exhibiting enhaced phosphorus removal. Water Research, 23: 1177-1181.

18. Hrenović, J. (2011.): Bakterije odgovorne za biološko uklanjanje fosfata iz otpadnih voda. *Hrvatske vode*, 77: 195-200.

19. Hrenović, J., Tibljaš, D., Buyukgungor, H., Orhan, Y. (2003.): Influence of support materials on phosphate removal by the pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*. Food Technology and Biotechnology, 41: 331-338.

20. Hrenovic, J., Rozic, M., Ivankovic, T., Farkas, A. (2009.): Biosorption of phosphate from synthetic wastewater by biosolids, Central European Journal of Biology, 397-403.

21. Hrenović, J., Tibljaš, D., Ivanković, T., Kovačević, D., Sekovanović, L. (2010.): Sepiolite as carrier of the phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii*. Applied Clay Science, 50: 582-587.

22. Hrenović, J., Kovačević, D., Ivanković, T., Tibljaš, D. (2011.): Selective immobilization of Acinetobacter junii on the natural zeolitized tuff in municipal wastewater. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces, 88: 208-214.

23. Hrenovic, J., Stojakovic, D., Mazaj, M., Rajic, N. (2011.): On the zinc sorption by the Serbian natural clinoptilolite and the disinfecting ability and phosphate affinity of the exhausted sorbent, Journal of Hazardous Materials, 185: 409-414.

24. http://www.chem.bg.ac.rs/primenjena/hemija_zivotne_sredine.html

25. http://www.chemistry-reference.com/pdictable/q_elements.asp?Symbol=Fe

26. http://www.gradri.hr/adminmax/files/class/G-100-8-f.pdf

27. http://www.medp.unist.hr/moduli/pedologija/predavanja/Klasa-Kambicna_tla.pdf

28. http://www.panoramio.com/photo/19544628

29. http://rainbowpigment.en.made-in-china.com/offer/xeqQDtNUJHWl/Sell-Superfine-Red-Iron-Oxide-Fe2o3-Pigment.html

30. Ivanković, T., Hrenović, J. (2011.): Bacteria immobilized on natural zeolitized tuff are able to survive in the conditions of extreme pH. 4th Slovenian-Croatian Symposium on Zeolites, Ljubljanja 17.-18. October, Proceedings, 73-76.

31. Ivanković, T., Hrenović, J. (2011.): Biološko uklanjanje fosfata- pregled dosadašnjih istraživanja, 1087- 1096.

32. Juni, E. (1978.): Genetics and physiology of Acinetobacter. Annual Review of Microbiology, 32: 349-371.

33. Kornberg, A., Rao, N. N., Ault-Riche, D. (1999.): Inorganic polyphosphate: a molecul of many functions. Annual Review of Biochemistry, 68: 89-125.

34. Kortstee, G. J. J., Appeldorn, K. J., Bonting, C. F. C., van Niel, E. W. J., van Veen, H. W. (2000.): Recent developments in the biochemistry and ecology of enhanced biological phosphorus removal. *Biochem.-Moscow* 65, 332-340.

35. Kortsee, G. J. J., Appeldorn, K. J., Bonting, C. F. C., van Niel, E. W. J., van Veen, H. W. (1994.): Biology of phosphate-accumulating bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal. FEMS Microbiology Reviews, 15: 137-153.

36. Mehra, O. P., Jackson, M. L. (1960.).: Iron oxide removal from soils and clays by dithionate-citrate system buffered with sodium bicarbonate, Clays and Clays Mineral, 7: 317-327.

37. Meinhold, J., Arnold, E., Isaacs, S. (1999.): Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge. Water Research, 33: 1871-1883.

38. Mino, T. (2000.): Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. Biochemistry (Moscow), 65: 341-348.

39. Mino, T., Kawakami, T., Matsuo, T. (1985.): Behaviour of intracellular polyphosphate in biological phosphate removal process. Water Science Technology, 17: 11-21.

40. Nakamura, K., Hiraishi, A., Yoshimi, Y., Kawaharasaki, M., Masuda, K., Kamagata, Y. (1995.): *Microlunatus phosphorovorus* gen. nov., sp. nov., a new grampositive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 17-22.

41. Sidat, M., Bux, F., Kasan, H.C. (1999.): Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge. *Water SA* 25, 175-179.

42. Schwertmann, U. (1964.): Differenzierung der bisenoxide des Bodens dűrch Extraktion mit Ammoniumoxalat-Lŏsung. Zeitshrift Planzenrnährung Bodenkunde, 105: 194-202.

43. Stante, L., Cellamare, C.M., Malaspina, F., Bortone, G., Tilche, A. (1997.): Biological phosphorus removal by pure culture of *Lampropedia* spp. Water Research, 31: 1317-1324.

44. Timmerman, M. W. (1984.): Biological phosphorus removal in wastewater treatment. Microbiology, 1: 149-152

45. van Groenestijn, J. W., Bentvelsen, M. M., Deinema, M. H., Zehnder, A. J. (1989.): Polyphosphate-degrading enzymes in *Acinetobacter* spp. and activated sludge. Applied and Environmental Microbiology, 60: 792-800.

46. Warskow, A. L., Juni, E. (1972.): Nutritional requirements of Acinetobacter strains isolated from soil, water and sewage. Journal of Bacteriology, 112: 1014-1016.

47. Wentzel, M. C., Loewenthal, R. E., Ekama, G. A., Marais, G. V. R. (1988.): Enhanced polyphosphate organism cultures in activated slugde systems-Part 1: Enhanced culture development. Water SA, 14: 81-92