



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Tomislav Ivanković

**ALUMOSILIKATNI MATERIJALI KAO
NOSAČI FOSFAT-UKLANJAJUĆIH
BAKTERIJA U OBRADI OTPADNIH
VODA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Tomislav Ivanković

**ALUMINOSILICATE MATERIALS AS
CARRIERS OF PHOSPHATE-
ACCUMULATING BACTERIA IN
WASTEWATER TREATMENT**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Bakteriološkom laboratoriju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Hrenović, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prvenstveno se želim zahvaliti svojoj mentorici, profesorici Jasni Hrenović. Zaposlivši me kao znanstvenog novaka u svom laboratoriju, profesorica Hrenović mi je dala životnu priliku raditi istraživanje iz kojeg je na kraju proizašao ovaj rad. Tijekom pet godina rada uvijek je pokazivala veliku količinu strpljenja te me je učila, upozoravala i nadasve mi je pomagala u obavljanju pokusa. Također me je učila kako se pišu znanstveni radovi i nadam se da ovaj doktorski rad pokazuje kako je dobra učiteljica bila. Za sve to joj najiskrenije zahvaljujem.

Zahvaljujem se i našoj suradnici Renati Horvat bez čije pomoći ne bih mogao obaviti sve pokuse koji su bili potrebni za izradu ovog doktorskog rada.

Želim se zahvaliti i svojim fakultetskim kolegama, na posuđenim skriptama i knjigama, na tisućama sati telefonskih razgovora i pojašnjavanja gradiva, na svom vremenu zajedničkog učenja. Bez njihove nesebične pomoći nikada ne bih diplomirao.

Zahvaljujem se i svojim roditeljima Mariji i Zvonku te sestri Katarini. Oni su me podržavali i usmjeravali tijekom studiranja, a kad je bilo potrebno znali su me natjerati da učim više.

Ovaj doktorski rad posvećujem svojim najdražima, sinu Juraju i kćeri Giti, te mojoj prekrasnoj ženi Ivi. Oni su uvijek uz mene.

ALUMOSILIKATNI MATERIJALI KAO NOSAČI FOSFAT-UKLANJAJUĆIH BAKTERIJA U OBRADI OTPADNIH VODA

TOMISLAV IVANKOVIĆ

Zavod za mikrobiologiju, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Biološko uklanjanje fosfata (P) iz otpadnih voda temelji se na metabolizmu P-uklanjajućih bakterija prisutnih u aktivnom mulju. Imobilizacija P-uklanjajućih bakterija na materijale koji služe kao nosači bakterija jedna je od mogućnosti unaprjeđenja ovog procesa jer se imobilizacijom postiže veća koncentracija željenih bakterija te pojačana metabolička aktivnost u bioreaktoru. U ovom radu kao nosači P-uklanjajuće bakterije *Acinetobacter junii* ispitani su prirodni alumosilikatni materijali (zeolitni tufovi, bentonit i perlit), jedan prirodni magnezijev-silikat (sepiolit) te jedan sintetski alumosilikat (sintetski zeolit A). U radu su utvrđeni fizikalno-kemijski čimbenici koji utječu na rast i metabolizam bakterije *A. junii* i na proces imobilizacije bakterija na nosače. Svi prirodni materijali pokazali su se kao dobri nosači bakterija, a sintetski zeolit A nije bio prihvatljiv nosač. Bakterije imobilizirane na nosač zadržale su metaboličku aktivnost u pokusima sa sintetskim i realnim otpadnim vodama što ukazuje na mogućnost njihovog korištenja u postrojenjima za pročišćavanje otpadne vode.

Stranica 138, slika 39, tablica 27, literaturnih navoda 154, jezik izvornika Hrvatski

Ključne riječi: *Acinetobacter junii*, alumosilikati, bakterija, fosfati, otpadna voda

Mentor: Jasna Hrenović, prof. dr. sc.

Ocjenjivači: Tibela Landeka Dragičević, prof. dr. sc.

Darko Tibljaš, prof. dr. sc.

ALUMINOSILICATE MATERIALS AS CARRIERS OF PHOSPHATE- ACCUMULATING BACTERIA IN WASTEWATER TREATMENT

TOMISLAV IVANKOVIĆ

Department of Microbiology, Rooseveltov trg 6, Zagreb

The enhanced biological phosphate (P) removal is based on the metabolism of P-accumulating bacteria present in the activated sludge. One of the possibilities of improving this process is the immobilization of P-accumulating bacteria on suitable carriers, which offers higher concentration of bacteria and enhanced metabolic activity in the bioreactors. Natural aluminosilicate materials (natural zeolitized tuffs, bentonite and perlite), magnesium-silicate (sepiolite) and synthetic aluminosilicate (synthetic zeolite A), were tested as carriers of P-accumulating bacterium *Acinetobacter junii*. The physicochemical factors influencing the growth and metabolism of *A. junii* as well as the process of bacterial immobilization on carriers were determined. All of the natural materials proved to be good carriers of bacteria while synthetic zeolite A was not acceptable as carrier. Bacteria immobilized on the carrier remained metabolically active when experiments with synthetic and real wastewaters were performed which demonstrated their possible usage in wastewater treatment plants.

Pages 138, figures 39, tables 27, references 154, original in Croatian.

Keywords: *Acinetobacter junii*, aluminosilicates, bacteria, phosphate, wastewater

Supervisor: Jasna Hrenović, prof. dr. sc.

Reviewers: Tibela Landeka Dragičević, prof. dr. sc.

Darko Tibljaš, prof. dr. sc.

Sadržaj

1. Uvod	2
2. Literaturni pregled	4
2.1. Uklanjanje P iz otpadnih voda	4
2.2. P-akumulirajuće bakterije	7
2.2.1. Bakterije roda <i>Acinetobacter</i>	10
2.3. Imobilizacija bakterija na nosače	12
2.4. Nosači bakterija	17
2.4.1. Prirodni zeoliti	17
2.4.2. Bentonit	18
2.4.3. Sepiolit	20
2.4.4. Perlit	21
2.5. Cilj istraživanja	23
3. Materijali i metode	25
3.1. Bakterija <i>Acinetobacter junii</i>	25
3.2. Otpadna voda	26
3.2.1. Standardna simulirana otpadna voda	26
3.2.1.1. Simulirana otpadna voda s različitim izvorima dušika	27
3.2.1.2. Simulirana otpadna voda s različitim koncentracijama Fe, Mg, Ca i K	27
3.2.1.3. Simulirana otpadna voda različitih vrijednosti pH	28
3.2.1.4. Tekući medij Nutrient Broth	28
3.2.1.5. Simulirana otpadna voda s benzalkonijevim kloridom	28
3.2.1.6. Simulirana otpadna voda za uzgoj u anaerobnim uvjetima	29
3.2.2. Realne otpadne vode	29
3.2.2.1. Komunalna otpadna voda	29
3.2.2.2. Procijedna otpadna voda	29
3.3. Nosači bakterija	29
3.3.1. Zeoliti	29
3.3.2. Gline	30

3.3.3. Perlit	30
3.3.4. Nosači izmijenjeni Mg	31
3.3.5. Granulometrijska, mineraloška i kemijska analiza nosača	31
3.4. Izvedba pokusa	32
3.4.1. Pokusi s čistom kulturom bakterije <i>A. junii</i> u simuliranoj otpadnoj vodi	32
3.4.2. Pokusi s čistom kulturom <i>A. junii</i> u simuliranoj otpadnoj vodi uz dodatak nosača bakterija	33
3.4.2.1. Priprema biočestica	33
3.4.3. Pokusi s čistom kulturom <i>A. junii</i> u svježoj komunalnoj i procijednoj otpadnoj vodi	33
3.4.4. Uzgoj čiste kulture <i>A. junii</i> u anaerobnim uvjetima	34
3.5. Analitičke metode	34
4. Rezultati	38
4.1. Utjecaj fizikalno-kemijskih čimbenika na bakteriju <i>A. junii</i>	38
4.1.1. Dokazivanje poli-beta-hidroksibutirata u stanicama <i>A. junii</i>	38
4.1.2. Utjecaj različitih molekulskih vrsta dušika na rast i metabolizam bakterije <i>A. junii</i>	39
4.1.3. Utjecaj željeza, magnezija, kalcija i kalija na rast i metabolizam bakterije <i>A. junii</i>	41
4.1.4. Utjecaj vrijednosti pH na rast i metabolizam bakterije <i>A. junii</i>	47
4.1.5. Utjecaj NaCl na rast i metabolizam bakterije <i>A. junii</i>	49
4.2. Imobilizacija bakterije <i>A. junii</i>	53
4.2.1. Analiza materijala	53
4.2.2. Imobilizacija <i>A. junii</i> na nosače	55
4.2.3. Imobilizacija <i>A. junii</i> na prirodni zeolitni tuf	60
4.2.3.1. Imobilizacija <i>A. junii</i> na prirodni zeolitni tuf različite veličine čestica	61
4.2.4. Ovisnost imobilizacije <i>A. junii</i> o vremenu inkubacije	62
4.2.5. Imobilizacija <i>A. junii</i> na bentonit i sepiolit	67
4.2.6. Imobilizacija <i>A. junii</i> na perlit	69

4.2.7. Imobilizacija <i>A. junii</i> na sintetski zeolit A	71
4.3. Pokusi s biočesticama	72
4.3.1. Biočestice u uvjetima nepovoljnog pH	74
4.3.2. Biočestice u uvjetima visoke toksičnosti	76
4.3.3. Biočestice u uvjetima nedostatka Mg, Ca i K	79
4.4. Pokusi s čistom kulturom bakterije <i>A. junii</i> i alumosilikatnim nosačima u realnoj otpadnoj vodi	80
4.4.1. Pokusi sa steriliziranom komunalnom otpadnom vodom	81
4.4.2. Pokusi s nesteriliziranom komunalnom otpadnom vodom	85
4.4.3. Pokusi sa steriliziranom procijednom otpadnom vodom	88
4.4.4. Pokusi s nesteriliziranom procijednom otpadnom vodom	90
5. Rasprava	94
5.1. Utjecaj fizikalno-kemijskih čimbenika na bakteriju <i>A. junii</i>	94
5.2. Imobilizacija bakterije <i>A. junii</i> na nosače	100
5.3. Pokusi s biočesticama	106
5.4. Pokusi s realnom komunalnom i procijednom otpadnom vodom	108
5.5. Pokusi s nesteriliziranom komunalnom i procijednom otpadnom vodom	111
6. Zaključak	113
7. Literatura	116
8. Životopis	133
9. Prilozi	135

Popis korištenih kratica

Kratica	Značenje
DPAO	denitrificirajući fosfat akumulirajući organizmi (<i>engl. Denitrifying Phosphate Accumulating Organisms</i>)
EBPR	pojačano biološko uklanjanje fosfora (<i>engl. Enhanced Biological Phosphorus Removal</i>)
EPS	izvanstanične polimerne tvari (<i>engl. Extracellular Polymeric Substances</i>)
FISH	fluorescentna in situ hibridizacija
GAO	glikogen akumulirajući organizmi (<i>engl. Glycogen Accumulating Organisms</i>)
KPK	kemijska potrošnja kisika
P	fosfat
PAO	fosfat akumulirajući organizmi (<i>engl. Phosphate Accumulating Organisms</i>)
PHA	poli- β -hidroksialkanoati
poli-P	polifosfati
SSA	specifična površina nosača (<i>engl. Specific Surface Area</i>)
VFA	hlapljive masne kiseline (<i>engl. Volatile Fatty Acids</i>)

UVOD

1. Uvod

Uklanjanje fosfora iz komunalnih i industrijskih otpadnih voda neophodno je kako bi se spriječilo njegovo dospijevanje u površinske vode. Prekomjerne količine fosfora, koji je esencijalni i često limitirajući nutrijent u prirodnim vodama, uzrokuju bujanje vodnih organizama, prvenstveno algi i bakterija, što uzrokuje pojavu eutrofikacije. Takve vode s prekomjernom količinom biomase primarnih producenata predstavljaju ozbiljni ekološki problem te postaju neupotrebljive za daljnje korištenje od strane čovjeka.

U posljednjih pedeset godina prednost se daje procesima naprednog biološkog uklanjanja fosfata (engl. *Enhanced Biological Phosphate Removal* – EBPR) koji se temelje na metabolizmu fosfat (P)-uklanjajućih bakterija prisutnih u aktivnom mulju. Ovi organizmi uzimaju otopljeni orto-P iz otpadne vode u količinama većim od potrebnih za normalni metabolizam, te ga skladište u volutinskim zrnima unutar stanica u obliku netopivih poli-P.

Jedna od mogućnosti poboljšanja procesa EBPR je imobilizacija P-uklanjajućih bakterija na materijale koji služe kao nosači bakterija. Procesom imobilizacije postiže se veća gustoća bakterijskih stanica te pojačana metabolička aktivnost u bioreaktoru, a pokazano je da se imobilizirane bakterije dobro uklapaju u biomasu aktivnog mulja.

Zadovoljavajući bakterijski nosač mora imati veliki afinitet za imobilizaciju bakterija, treba biti neškodljiv prema okolišu te ekonomski isplativ za korištenje. Prirodni alumosilikatni materijali se zbog svoje pristupačnosti i niske cijene smatraju potencijalno zadovoljavajućim nosačima bakterija. U ovom radu testiran je niz alumosilikatnih materijala te je određen najpodobniji nosač fosfat-uklanjajuće bakterije *Acinetobacter junii*. Utvrđeni su čimbenici koji utječu na proces imobilizacije *A. junii* na alumosilikatne nosače, što je imalo za cilj pridonijeti razumijevanju procesa imobilizacije bakterija na minerale općenito.

LITERATURNI PREGLED

2. Literaturni pregled

2.1. Uklanjanje P iz otpadnih voda

Uklanjanje P iz površinskih vodnih tijela ključno je za sprečavanje nekontroliranog rasta algi i vodnog bilja odnosno za sprečavanje pojave ubrzane eutrofikacije. Znatno povećane količine P u vodnim tijelima mogu se nakupljati jedino antropogenim djelovanjem i to otpuštanjem velikih koncentracija P uzvodno u prirodne tokove rijeka, u jezera ili more. Raspršeni izvori P su poljoprivredna dobra gdje se višak P koji preostaje iz gnojidbe ispire u rijeke i jezera putem oborinskih voda. Točkasti izvori onečišćenja P su nepročišćene otpadne vode naseljenih mjesta, gradovi te efluenti iz uređaja za pročišćavanje otpadnih voda (Wentzel i sur. 2008). Koncentracije P u otpadnoj vodi ovise o vrsti otpadne vode (**Tablica 1**) i uglavnom su između 4 i 15 g P po m³ otpadne vode (Henze i Comeau, 2008).

Tablica 1. Tipične količine ukupnog fosfora i ortofosfata prisutnih u komunalnoj otpadnoj vodi, prilagođeno iz Henze i Comeau (2008).

Vrsta otpadne vode	Opterećenost	Ukupni fosfor (g m ⁻³)	Ortofosfati (g m ⁻³)
Komunalna otpadna voda s malim udjelom industrijskih otpadnih voda	Visoka	25	15
	Srednja	15	10
	Niska	6	4

Jedini učinkovit način sprečavanja onečišćenja P iz točkastih izvora je uklanjanje P u postrojenjima za obradu otpadne vode do zakonski određenih granica. U Hrvatskoj, dopuštena količina ukupnog fosfora u efluentu uređaja za pročišćavanje komunalne otpadne vode trećeg stupnja pročišćavanja iznosi 2 mg L⁻¹ za uređaje veličine 10 000 – 100 000 ekvivalent stanovnika, odnosno 1 mg L⁻¹ za uređaje veće od 100 000 ekvivalent stanovnika, dok za uređaje drugog stupnja pročišćavanja ukupni fosfor nije obvezni parametar mjerenja (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 87/10). *Drugim stupnjem pročišćavanja* definira se „obrada komunalnih otpadnih voda postupkom koji općenito obuhvaća biološku obradu sa sekundarnim taloženjem kojim se uklanja 70 – 90% BPK₅ ulaznih otpadnih voda i 75% KPK ulaznih otpadnih voda“. Trećim stupnjem pročišćavanja definira se „obrada komunalnih otpadnih voda postupkom kojim se uz drugi stupanj pročišćavanja još dodatno uklanja fosfor za 80% i/ili dušik za 70 – 80%“ (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 87/10).

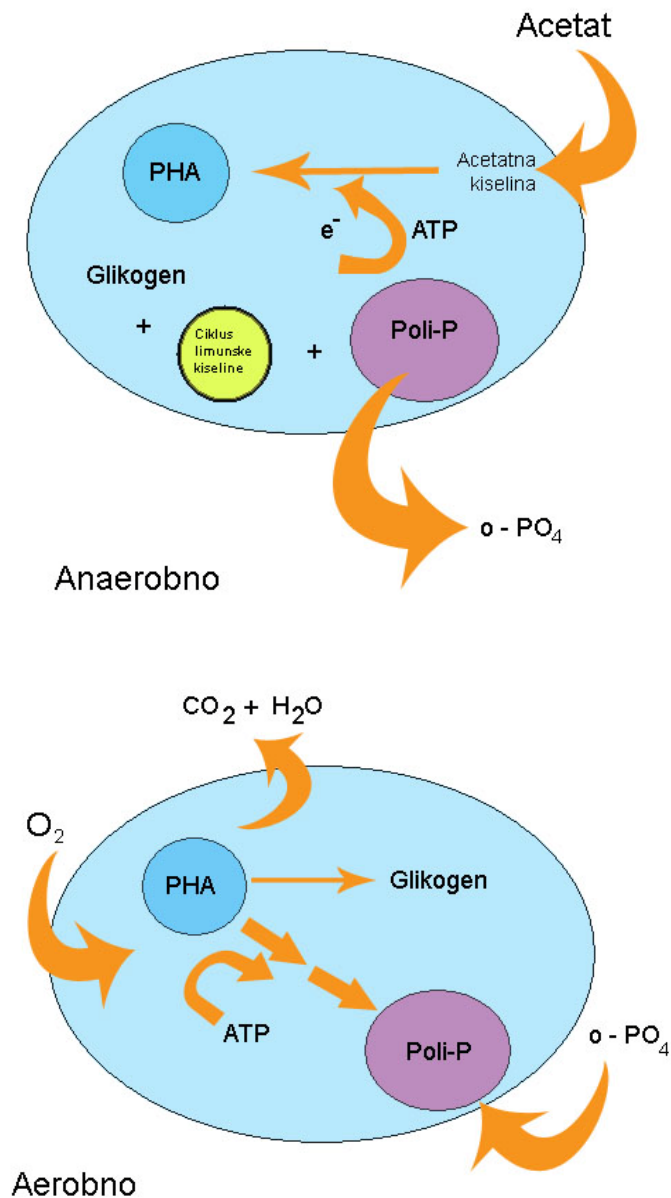
Treći stupanj pročišćavanja otpadne vode uključuje tehnologiju biološkog uklanjanja P za koju se uvriježila skraćenica EBPR (*engl. Enhanced Biological Phosphorus Removal*). Tehnologija EBPR razvijala se od 60-ih godina XX. stoljeća usporedo s prepoznavanjem P kao glavnog čimbenika koji uzrokuje ubrzanu eutrofikaciju. Naime od 50-ih godina primijećeno je gomilanje P u rijekama i jezerima, prvenstveno u Velikim jezerima Sjedinjenih Američkih Država. Gomilanje P bilo je rezultat ekstenzivnog korištenja deterdženata u kojima su P služili za smanjenje tvrdoće vode budući da precipitiraju s Mg^{2+} i Ca^{2+} ionima, a čija prisutnost u vodi smanjuje učinkovitost deterdženata.

Fenomen EBPR je prvi puta opisan u radovima istraživačkih grupa Srinath i sur. (1959) i Alarcon (1961). Obje grupe su primijetile da u nekim slučajevima u sustavima za pročišćavanje otpadne vode s aktivnim muljem dolazi do povećanog uklanjanja P iz otpadne vode. Srinath i sur. (1959) su naveli da je nestašica kisika u nekim dijelovima aeracijskih spremnika povezana s ovim „problemom“ te da se on može riješiti pojačanom aeracijom. Danas se zna da povećano uklanjanje P čine posebni mikroorganizmi u aktivnom mulju koji akumuliraju P u količinama koje premašuju njihove anaboličke zahtjeve i akumuliraju ih unutar svojih stanica u obliku netopljivih zrnaca poli-P. Uvriježeni naziv za mikroorganizme koji mogu akumulirati P je PAO (*engl. Phosphate Accumulating Organisms*). Dobivanje aktivnog mulja s EBPR karakteristikama postiže se povećanjem udjela PAO u odnosu prema drugim „normalnim“ heterotrofnim organizmima prisutnima u mulju pravilnim dizajniranjem i optimiziranjem rada uređaja za pročišćavanje otpadne vode. Najjednostavnija optimizacija rada uređaja podrazumijeva režim rada u kojem se aktivni mulj uzgaja u naizmjeničnim anaerobno-aerobnim uvjetima. U potpuno aerobnom režimu rada sustava za pročišćavanje otpadne vode s aktivnim muljem, količina P ugrađenog u biomasu mulja tipično iznosi 0,02 mgP/mgVSS (*engl. Volatile Suspended Solids* – biomasa aktivnog mulja). Tako se u klasičnim uređajima za pročišćavanje s biološkim stupnjem pročišćavanja uklanjanjem viška mulja postiže uklanjanje od 15-25% P iz otpadne komunalne vode. U uređajima koji su optimizirani za EBPR količina P koja se ugrađuje u biomasu aktivnog mulja povećana je na 0,06-0,15 mgP/mgVSS. Sami PAO mogu u svoju biomasu ugraditi do 0,38 mgP/mgVSS (Wentzel i sur. 2008).

Iz navedenog proizlazi da je najveći izazov u optimizaciji uređaja za pročišćavanje sa svojstvima EBPR povećati relativnu količinu PAO u odnosu prema drugim „normalno“ prisutnim heterotrofnim organizmima u aktivnom mulju.

Povećanjem količine PAO u aktivnom mulju povećat će se kapacitet mulja za akumulaciju P, a posljedično i učinkovitost u uklanjanju fosfora iz otpadne vode cijelog uređaja za pročišćavanje. U primjereno dizajniranom uređaju s EBPR svojstvima PAO mogu činiti do 40% ukupne populacije aktivnog mulja, a sustav može uklanjati 10-12 mgP L⁻¹ po 500 mg vrijednosti KPK L⁻¹ u ulaznoj vodi (Wentzel i sur. 2008).

Povijesno gledano bilo je više istraživačkih grupa koje su objavile bitna saznanja o samom EBPR mehanizmu pa se tako došlo i do općeprihvaćenog biokemijskog modela metabolizma PAO koji je u detalje prikazan u nekoliko preglednih radova (Mino i sur. 1998; Seviour i sur. 2003; Oehmen i sur. 2007). Po tom modelu (**Slika 1**) pretpostavljeno je aktivni mulj u EBPR sustavu prolazi kroz naizmjenične anaerobno/aerobne uvjete rasta, te da su u anaerobnom reaktoru prisutne VFA (*engl. Volatile Fatty Acids* – hlapljive masne kiseline). U anaerobnim uvjetima PAO uzimaju VFA iz okolnog medija te ih u svojim stanicama povezuju u dugačke ugljikohidratne molekule poli-β-hidroksialkanoata (PHA). PHA služe kao zaliha energije za rast bakterijske stanice, a bitno je naglasiti da bakterije koje nisu PAO ne mogu koristiti VFA na ovaj način, te iz njih dobivati energiju. Na ovaj način se u anaerobnim uvjetima stvara kompetitivna prednost PAO pred drugim bakterijama prisutnim u aktivnom mulju. Energiju potrebnu za stvaranje PHA bakterije dobivaju razgradnjom poli-P uskladištenih u stanicama. Pri tom se u okolni medij otpuštaju P pa se njihova koncentracija u otpadnoj vodi povećava u anaerobnim reaktorima. U aerobnim uvjetima PAO koriste akumulirane PHA za rast bakterijske biomase, ali i za obnavljanje zaliha poli-P unutar stanica. Pri tom se iz okolnog medija uzimaju P u količinama većim od onih koje su prethodno otpuštene što znači da je neto količina P u otpadnoj vodi na izlasku iz uređaja manja nego na ulasku u uređaj, odnosno da je došlo do uklanjanja P iz otpadne vode.



Slika 1. Predloženi biokemijski mehanizam metabolizma fosfat-akumulirajućih bakterija u anaerobnim i aerobnim uvjetima, prilagođeno iz Seviour i sur. (2003).

2.2. P-akumulirajuće bakterije

U prvotnim istraživanjima o mikroorganizmima vezanim uz EBPR kultivirano je nekoliko vrsta bakterija za koje se smatralo da su odgovorne za ovaj proces. Prve bakterije koje su prepoznate kao PAO bile su iz roda *Acinetobacter* (Fuhs i Chen, 1975; Buchan, 1983; Wentzel i sur. 1986). U sljedećim studijama kao PAO su navedene bakterija *Microthrix phosphovorans* (Nakamura i sur. 1995), *Lamprospira* (Stante i sur. 1997) te *Tetrasphaera* (Maszenan i sur. 2000). U novijim istraživanjima koja se ne

temelje na bakterijskim izolatima nego na određivanje bakterijskih vrsta pomoću FISH metode (Fluorescentna In Situ Hibridizacija) kao PAO je identificirana bakterija *Acumulibacter phosphatis*, pripadnik roda *Rhodocyclus* (Wagner i sur. 1994; Martin i sur. 2006).

Mino (2000) u preglednom radu naglašava kako nijedna bakterija izolirana iz sustava s EBPR karakteristikama dotad, ne posjeduje sve ključne osobine svojstvene za aktivni mulj koji posjeduje EBPR svojstva te da nijedna izolirana čista kultura bakterije nije prvenstveno odgovorna za uspješnu provedbu EBPR procesa u anaerobno-aerobnim sustavima. Većina istraživanja provodila se u laboratorijski prilagođenim reaktorima s aktivnim muljem obogaćenim PAO, a koji su radili u anaerobno-aerobnim uvjetima te punjeni sintetskom otpadnom vodom. Bakterije roda *Acinetobacter* koje su prve predložene kao organizmi odgovorni za EBPR proces su intenzivno istraživane pomoću metoda koje se temelje na uzgoju bakterijskih izolata te se došlo do važnih saznanja vezanih uz sam metabolizam bakterije (Mino, 2000). No, naknadna istraživanja su pokazala da su klasične metode izolacije i uzgoja bakterija iz aktivnog mulja snažno selektivne za *Acinetobacter* spp. te da bakterije ovog roda nisu primarno odgovorne za provedbu EBPR procesa (Mino i sur. 1998). Mino (2000) dalje navodi kako je bakterija *Microlunatus phosphovorus* izolirana iz laboratorijskog sustava s aktivnim muljem te da je fiziološki slična drugim PAO nađenim u aktivnom mulju, no ovoj bakteriji nedostaju neke ključne osobine kao što je uzimanje VFA i akumulacija PHA u anaerobnim uvjetima. Istraživanjima na bakteriji *Microlunatus phosphovorus* došlo se do zaključka da možda enzimatski sustav za metabolizam akumulacije P u bakterijskoj stanici možda nije konstitutivni već inducibilni mehanizam, odnosno da bakterija pokazuje svojstvo PAO tek kada se podvrgne naizmjeničnim anaerobno/aerobnim uvjetima (Ubukata i Takii, 1994). Mino (2000) spominje kako izolati bakterije *Lamproedia* spp. posjeduju sve ključne osobine svojstvene PAO, no da svojim jedinstvenim morfološkim karakteristikama (stanice posložene u obliku listova papira) odudara od bakterija uobičajeno nađenim u EBPR procesu. Kao najvjerojatnijeg kandidata za bakteriju koja je odgovorna za EBPR Mino (2000) navodi rod *Rhodocyclus*. Tehnikama molekularne biologije kao što su FISH, kloniranje i direktno sekvencioniranje ribosomske RNA, određena je prisutnost bakterija iz roda *Rhodocyclus* u sustavu s EBPR svojstvima (Bond i sur. 1995) u značajnoj količini naspram ostalih bakterija prisutnih u aktivnom mulju (Hesselmann i sur. 1999) te je pokazano da *Rhodocyclus* spp. posjeduje ključne osobine metabolizma PAO (Hesselmann i sur. 1999).

Seviour i sur. (2003) u preglednom radu o mikrobiološkom aspektu EBPR procesa u sustavima s aktivnim muljem kao kandidate za reprezentativni PAO također navode bakterije roda *Acinetobacter*, *Tetrasphaera*, *Lamproedia* te *Rhodocyclus*. Naglašava kako je po dostupnim podacima vidljivo da su organizmi u EBPR zajednici filogenetski vrlo različiti te da još uvijek postoje značajne praznine u razumijevanju uspješnog funkcioniranja EBPR sustava. Izražava sumnju da predloženi biokemijski model metabolizma PAO možda nije u potpunosti točan ili je nepotpun, te polemizira da ključnu ulogu u EBPR procesu mogu imati i bakterije koje po svojim osobinama ne odgovaraju biokemijskom modelu. Također navodi da za uspješno vođenje EBPR procesa možda nisu neophodni izmjenični anaerobno/aerobni uvjeti rasta i kao primjer navodi postojanje stabilnih EBPR sustava koji rade samo u aerobnom režimu rada, a u kojima je kao dominantna bakterijska vrsta identificirana bakterija *Acinetobacter* spp.

U recentnom preglednom radu Oehme i sur. (2007) kao PAO navode već spomenute bakterije te pridodaju i novu bakteriju nazvanu *Accumulibacter phosphatis*. Ova bakterija je identificirana pomoću tehnika molekularne biologije te je svrstana u skupinu bakterija koje su bliski srodnici s već spomenutim bakterijama roda *Rhodocyclus* (Hesselmann i sur. 1999). Značajne količine *Accumulibacter* spp. (4-22% ukupnih bakterija) nađene su u industrijskim postrojenjima za obradu otpadne vode s aktivnim muljem u nizu studija (Kong i sur. 2004; Gu i sur. 2005; Wong i sur. 2005). U studiji na šest australskih postrojenja za obradu otpadne vode s EBPR svojstvima nađena je dobra korelacija između učinkovitog uklanjanja P i koncentracije *Accumulibacter* spp. prisutnih u mulju (Saunders i sur. 2003). Oehme i sur. (2007) također naglašavaju važnost takozvanih glikogen-akumulirajućih organizama (GAO). GAO su definirani kao organizmi čije je fenotipsko svojstvo da u aerobnim uvjetima nakupljaju glikogen, koji u anaerobnim uvjetima troše kao primarni izvor energije za uzimanje ugljika koji akumuliraju kao PHA (Mino i sur. 1995). Ove bakterije rastu u aktivnom mulju u istim uvjetima kao i PAO, no nemaju sposobnost akumulacije poli-P. Kako žive u istom okolišu tako čine kompeticiju prema PAO u aktivnom mulju pa postoji mogućnost da smanjuju njihov broj i na taj način smanjuju učinkovitost EBPR sustava.

Treba spomenuti da u aktivnom mulju mogu biti prisutne i P-akumulirajuće denitrificirajuće bakterije (DPAO). DPAO mogu u anoksičnim uvjetima, umjesto kisika, koristiti oksidirani oblik dušika (nitrat – NO_3^-) kao akceptor elektrona za stvaranje energije i akumulaciju poli-P. Tako se u anoksičnim reaktorima uređaja za

pročišćavanje otpadne vode s EBPR svojstvima vrši i denitrifikacija i akumulacija P, odnosno istodobno se uklanjaju i dušik i fosfor iz otpadne vode (Comeau i sur. 1987; Kern-Jespersen i Henze, 1993; Kuba i sur. 1996). Da bi se postiglo istodobno uklanjanje dušika i fosfora djelovanjem DPAO potrebno je da aktivni mulj prolazi kroz naizmjenične anaerobno/anoksične/aerobne uvjete rasta, što se postiže dodatkom anoksičnog reaktora. Bitno je da u anoksični reaktor ne dolazi otpadna voda koja ima veliku količinu biološki razgradivih organskih tvari jer se na taj način potiče rast normalno prisutnih denitrificirajućih bakterija koje nemaju sposobnost akumulacije P. Ove bakterije onda stječu kompetitivnu prednost te smanjuju broj DPAO u aktivnom mulju (Comeau i sur. 1986; Kortstee i sur. 2000). Iz aktivnog mulja anaerobno/anoksičnog sustava s EBPR svojstvima izolirane su bakterije koje mogu koristiti nitrat kao terminalni akceptor elektrona i akumulirati P. Predložene DPAO činile su 31% ukupne bakterijske populacije, a pripadali su rodovima *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Aquaspirillum*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Shewanella* i *Xantomonas* (Merzouki i sur. 1999). Rijetka istraživanja su pokazala mogućnost da bakterije roda *Acinetobacter* izolirane iz aktivnog mulja mogu vršiti denitrifikaciju (Yang i sur. 2011; Lu i sur. 2011).

Po Seviour (2003) jedan od načina kako bi se mogla poboljšati učinkovitost EBPR sustava je bioaugmentacija, što podrazumijeva unos željenih bakterija u sustave s aktivnim muljem. Iako je ova metoda bila predmet istraživanja (Bouchez i sur. 2000; Watanabe i sur. 2000) obično nije uspijevala u sustavima s aktivnim muljem zbog nedostatka znanja o organizmima uključenim u EBPR. Drugi način je iskoristiti znanja stečena o mikroorganizmima uključenima u proces EBPR i sukladno tome dizajnirati uređaje za pročišćavanje koji će pogodovati rastu i metabolizmu PAO, čime se stvoriti veća stabilnost sustava za pročišćavanje otpadne vode te smanjiti mogućnost iznenadnog prestanka rada sustava s EBPR svojstvima. U oba slučaja potrebna su nova saznanja vezana uz bakterije uključene u proces EBPR.

2.2.1. Bakterije roda *Acinetobacter*

Bakterije roda *Acinetobacter* detaljno su prikazane u radu Bouvet i Grimont (1986) gdje je i prvi put opisana nova vrsta *Acinetobacter junii*. U radu se naglašava potreba za razvrstavanje bakterija roda *Acinetobacter* koji do tada ima opisane samo dvije vrste; *A. calcoaceticus* i *A. lwoffii*, iako su neke studije pretpostavile da je vjerojatna značajna heterogenost ovog roda (Baumann i sur. 1968; Johnson i sur. 1970).

Korištenjem metode DNA hibridizacije, niza testova na biokemijske osobine te detaljnim istraživanjem fenotipskih i morfoloških svojstava bakterijskih izolata, Bouvet i Grimont (1986) su potvrdili i detaljnije opisali dvije već poznate vrste *A. calcoaceticus* i *A. lwoffii* te su predložili imenovanje 4 nove vrste; *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* i *A. junii*. Sve četiri nove vrste bakterija bili su klinički izolati. Naveli su i kako je vjerojatno prepoznavanje novih vrsta bakterija iz roda *Acinetobacter* u budućnosti.

Iako je bilo poznato da su bakterije roda *Acinetobacter* sveprisutne u prirodi, većina opisanih vrsta bila je od kliničkih izolata. Kako je prije dokazano prisutstvo bakterija roda *Acinetobacter* u aktivnom mulju, Carr i sur. (2003) su se prihvatili određivanja i razlikovanja novih vrsta od bakterija izoliranih iz aktivnog mulja postrojenja za obradu otpadne vode. Koristeći metodu 16S rDNA sekvencioniranja i filogenetsku analizu, DNA-DNA hibridizaciju te fenotipsku karakterizaciju, opisali su i predložili nazive sedam novih vrsta: *A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandooi*, *A. gernerii*.

Bakterije roda *Acinetobacter* su saprofitske bakterije koje se mogu naći u tlu, vodi, kanalizaciji ili hrani. Također su sveprisutne u prostorima bolnica gdje se mogu izolirati sa kože bolničkog osoblja i pacijenata. Bakterije ovog roda su prepoznate kao oportunistički patogeni, a mogu uzrokovati teške infekcije, posebno u prostorima intenzivne bolničke njege. Poznato je da vrlo brzo razvijaju otpornost na antibiotike (Towner, 2006). U okolišu *Acinetobacter* se mogu naći u tlu i vodi, i to čak kao 0,001% ukupne populacije heterotrofnih bakterija. U čistim vodama nađene su bakterije roda *Acinetobacter* u koncentracijama preko 10^4 bakterija u 100 ml vode, a u kanalizaciji preko 10^6 bakterija u 100 ml vode. Bakterije roda *Acinetobacter* se mogu naći u hrani, posebno u pilećem mesu. Smatra se da su bakterije ovog roda jedni od uzročnika kvarenja pilećeg mesa, jaja, slanine i ribe, čak i kada su namirnice pravilno skladištene u hladnim uvjetima (Towner, 2006). Zbog svoje sveprisutnosti u prirodi, te činjenice da se *Acinetobacter* lako izolira, uzgaja te genetski transformira u laboratorijskim uvjetima, raširena je upotreba ovih bakterija u industrijskim procesima (**Tablica 2**). Tako je pokazano da bakterije roda *Acinetobacter* imaju veliki potencijal u bioremedijaciji, odnosno uklanjanju onečišćivača kao što su salicilati, aromatski ugljikovodici i fenol, iz okoliša (Schirmer i sur. 1997). Neki sojevi su sposobni proizvoditi i izlučivati vanstanične polimere kao što je „emulsan“ (poli-anionski stanični heteropolisaharid) koji ima svojstvo da emulgira masti i ulja te tako pripomaže uklanjanju tih tvari iz

okoliša (Towner, 2006). Drugi važan polimer koji proizvode neke vrste roda *Acinetobacter* je „biodispersan“ koji ima svojstvo da se veže na vapnenac i raspršuje ga u vodenom mediju (Rosenberg i sur. 1998).

Tablica 2. Moguće primijene bakterija roda *Acinetobacter* i njihovih proizvoda u industriji, prilagođeno iz Towner (2006).

Bioremedijacija i pročišćavanje otpadnih voda
Uklanjanje fosfata iz otpadnih voda
Razgradnja petrokemikalija (masti i ulja)
Biodegradacija organskih onečišćivača
Prizvodnja biopolimera i biosurfaktanata
Sprečavanje nastanka zubnog plaka
Korištenje u papirnoj i drugoj industriji
Efikasija emulzifikaciju uljnih onečišćivača
Korištenje u kozmetičkoj industriji, šamponima i deterdžentima
Stvaranje biomase
Proizvodnja staničnih proteina
Izluživanje mangana iz rudača
Proizvodnja imunoloških preparata
Klinička upotreba
Proizvodnja glutaminaze-asparaginaze
Proizvodnja L(-) karnitina

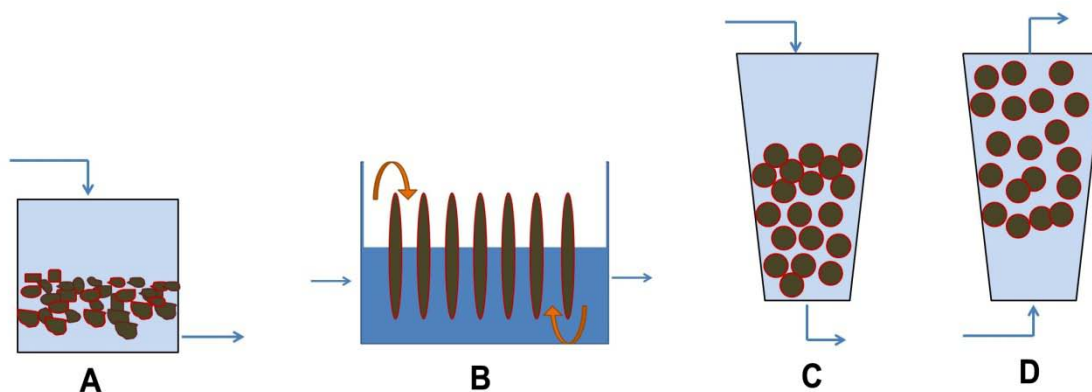
2.3. Imobilizacija bakterija na nosače

Tehnologija imobiliziranih bakterija podrazumijeva bakterije koje su u obliku biofilma vezane na pogodne materijale koji se nazivaju nosačima bakterija. Biofilm je posebna struktura gdje bakterije tvore funkcionalnu masu povezujući se međusobno i s podlogom pomoću izvanstaničnih polimernih tvari (EPS – *engl. Extracellular Polymeric Substances*). Takav sluzavi omotač sastavljen je od polisaharida, proteina, slobodnih nukleinskih kiselina i vode (Sutherland 2001). EPS pojednostavljeno možemo zamisliti kao ljepilo koje služi kao zaštita bakterijskih stanica, ali i kao vezivno tkivo unutar kojeg dolazi do izmijene hranjivih tvari pa čak i genetskog materijala.

U pročišćavanju otpadnih voda raširena je upotreba bioreaktora s bakterijskim biofilmom, koji mogu postići jednake rezultate kao i klasični sustavi s aktivnim muljem; uklanjanje organskog onečišćenja, nitrifikacija, denitrifikacija te biološko uklanjanje fosfora (Morgenroth, 2008). U odnosu na klasične bioreaktore sa suspendiranim bakterijama, bioreaktori s imobiliziranim bakterijama nude prednosti kao što su veća koncentracija stanica u reaktoru, smanjeno ispiranje biomase, zaštita bakterija od

proždiranja od strane praživotinja, manja osjetljivost na hidrauličke udare, te smanjena produkcija mulja.

Uobičajeni sustavi za pročišćavanje otpadnih voda koji se temelje na imobiliziranim bakterijama su prokapnici, okretni biološki nosači (biodiskovi), protočni reaktori s ispunom (*engl. fixed bed reactor*) ili protočni reaktori s ispunom u fluidiziranom sloju (*engl. fluidized bed reactor*) (**Slika 2**). U prokapnicima se kao nosači bakterija koriste prirodni materijali kao što je kamenje promjera 5-20 cm ili posebno izrađeni plastični nosači. Prokapnici su u upotrebi od početka 20. stoljeća. Biodiskovi koji nose bakterijski biofilm su napravljeni od lagane plastike, a upotrebljavaju se za pročišćavanje otpadne vode od 60-ih godina 20. stoljeća (Morgenroth, 2008). Od 80-ih godina 20. stoljeća u upotrebi su protočni reaktori s ispunom gdje se kao nosači počinju koristiti materijali manje veličine čestica od onih korištenih u prokapnicima. Manjom veličinom čestica postiže se veća specifična površina nosača (SSA – *engl. Specific Surface Area*) što omogućuje veću količinu imobiliziranih bakterija u reaktorima. Kao nosači koriste se prirodni materijali kao što su pijesak, bazalt ili glina (SSA od 1000 do 3000 m² m⁻³) ili posebno dizajnirani umjetni nosači kao što su Biofor[®], Biostyr[®], Biocarbhone[®] te razni drugi komercijalno dostupni materijali (Morgenroth, 2008).



Slika 2. Shematski prikaz bioreaktora s imobiliziranim bakterijama; prokapnik (a), biodiskovi (b), protočni reaktor s ispunom (c), protočni reaktor s ispunom u fluidiziranom sloju (d), prilagođeno iz Morgenroth (2008).

Kako se upotreba bioreaktora s imobiliziranim nosačima širila tako su se brojna istraživanja usmjerila ka pronalasku novih materijala koji bi služili kao nosači bakterija,

a koji bi spojili niske troškove materijala s visokim kapacitetom za imobilizaciju. Iz raznih istraživanja alumosilikatni prirodni materijali izdvajaju se kao dobri nosači bakterija jer objedinjuju visoki kapacitet za imobilizaciju s relativno niskim troškovima.

Durham i sur. (1994) su prvi opisali anorganski alumosilikatni nosač koji su nazvali Type-Z bionosač. Type-Z nosač sastavljen je od alumosilikatnog matriksa koji ima svojstva zeolitnog molekulskog sita. U istraživanju biorazgradnje fenola u bioreaktoru s imobiliziranim bakterijama *Pseudomonas aeruginosa*, Type-Z nosač se pokazao pogodnijim od dijatomejske zemlje i plastike (Flexirings), koji su također korišteni kao nosači bakterija. Dostignuta je velika količina imobiliziranih bakterija od 10^9 vijabilnih bakterijskih stanica po gramu Type-Z nosača. U pokusnim bioreaktorima, bakterije koje su bile imobilizirane na Type-Z uspješno su podnijele nagle promjene okolišnih uvjeta karakterističnih za uređaje za pročišćavanje otpadnih voda: naglu promjenu vrijednosti pH, nedostatak kisika, te nestašicu nutrijenata. Bakterije koje su bile imobilizirane na dijatomejsku zemlju i Flexirings nisu pokazale takvu otpornost prema nepovoljnim vanjskim utjecajima.

Shindo i sur. (2001) su u istraživanju mogućnosti etanolne fermentacije imobiliziranih kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* testirali nekoliko različitih nosača; keramička i staklena zrnca, zrnca alginatnog gela te zrnca prirodnog zeolita. Prirodni zeolit se pokazao kao najbolji nosač za imobilizaciju stanica kvasca sa $3,6 \times 10^8$ stanica po mL nosača. U protočnom reaktoru s ispunom u fluidiziranom sloju zrnca zeolita su pokazala dobru mehaničku stabilnost te otpornost na trošenje. Imobilizirane stanice kvasca su zadržale svoju metaboličku aktivnost te je u bioreaktoru provedena kontinuirana stabilna alkoholna fermentacija u trajanju od 21 dana bez narušavanja dobrih svojstava nosača.

U istraživanju Montalva i sur. (2005) prirodni zeolit je dodavan u anaerobne digestore za obradu otpada i sintetske otpadne vode iz svinjogojstva. U reaktorima s dodatkom zeolita došlo je do značajnog poboljšanja u smislu smanjenja vrijednosti KPK i koncentracije ukupnog dušika pročišćene otpadne vode u odnosu na kontrolne reaktore bez dodatka zeolita. U radu je pokazano kako je do poboljšanja anaerobne digestije došlo zbog velikog kapaciteta zeolita za imobilizaciju bakterija.

Zeolit kao nosač bakterija pokazao je dobre karakteristike i kad je korišten u anaerobnom protočnom reaktoru s ispunom za obradu industrijske otpadne vode (Fernández i sur. 2007).

I drugi prirodni alumosilikatni materijali pokazali su se kao dobri nosači bakterija. Lyew i sur. (2007) su koristili niz materijala (perlit, treset, pucolan, plovuĉac i aktivni ugljen) za imobilizaciju bakterije *Mycobacterium austroafricanum*. Namjena bakterije imobilizirane na nosaĉ bila je *in situ* uklanjanje metil tert-butil etera iz otpadne vode putem biobarijere. Zbog velike specifiĉne površine i visoke poroznosti kao najpogodniji materijal za imobilizaciju pokazao se perlit (ekspandirano vulkansko staklo). Osim što je imao najveću koliĉinu imobilizirane mase perlit je odabran kao najpoželjniji nosaĉ jer zbog visoke poroznosti nije usporavao protok vode kroz sustav.

Arnaiz i sur. (2006) su koristili komercijalno dostupni perlit i sepiolit kao nosaĉe bakterija u anaerobnom protoĉnom bioreaktoru. Oba materijala su se pokazala kao zadovoljavajući nosaĉi bakterija s velikom koliĉinom imobilizirane biomase, mjerene putem koncentracije suhe tvari i koncentracije fosfolipida vezanih na nosaĉ. Sepiolit je pokazao bolje vezivanje bakterijske biomase, pretpostavljeno je zbog veće specifiĉne površine nosaĉa.

Usporedo s istraŹivanjima koja su testirala nove materijale kao nosaĉe bakterija objavljen je i niz istraŹivanja u kojima su imobilizirani mikroorganizmi bili iz skupine P-akumulirajućih bakterija. Nakamura i sur. (1995) su uspješno imobilizirali P-akumulirajuću bakteriju *Microlunatus phosphovorus* soj NM-1 u poliakrilamidni gel. Tako imobilizirane bakterije zadržale su svoja metaboliĉka svojstva u aktivnom mulju s EBPR aktivnošću; u anaerobnim uvjetima imobilizirane stanice su trošile unutarnje zalihe poli-P i otpuštale slobodne P u okolni medij. U aerobnim uvjetima bakterije su spremno uzimale prethodno otpuštene P po prosjeĉnoj stopi od 10-20 mgP po gramu bakterijske biomase u satu. Ovo istraŹivanje je pokazalo kako imobilizirane bakterije zadržavaju biokemijska metaboliĉka svojstva PAO te je moguće njihovo korištenje u uklanjanju P iz otpadnih voda.

Srodan eksperiment proveli su Muyima i Cloete (1995) gdje su pokazali da stanice P-uklanjajuće bakterije *Acinetobacter johnsonii* preŹivljavaju i rastu unutar zrnaca alginata. Bakterije su rasle u kolonijama meĊusobno vezane ekstracelularnom tvari te su bile metaboliĉki aktivne u uklanjanju P iz otpadne vode.

Bakterije roda *Acinetobacter* imobilizirane su pomoću vakuuma na keramiĉki nosaĉ i korištene su za proĉišćavanje otpadne vode prehrambeno-preraĊivaĉke industrije u sustavu prokapnika (Kariminiaae-Hamedani i sur. 2002). Nosaĉ je bio proizveden od α -kvarca, a konaĉni produkt bili su keramiĉki cilindri vanjskog i unutarnjeg promjera 6,2; 4,3 i 1,1 mm. Bakterije su adsorbirane na keramiĉki nosaĉ u velikom broju ($2,9 \times 10^9$

vijabilnih stanica po gramu suhog nosača), a njihov broj se vremenom povećavao te su stanice prekrile čitavu površinu nosača. Sustav je u vremenu od 160 dana uspješno snižavao KPK vrijednost otpadne vode i postao tolerantiji na nagle promjene uvjeta rada. Također je zaključeno da uspješnost biološkog pročišćavanja otpadne vode najviše ovisi o koncentraciji bakterijskih stanica u bioreaktoru.

Zeolitni tuf i glina korišteni su kao nosači P-uklanjajuće bakterije *Acinetobacter calcoaceticus* u studiji Hrenović i sur. (2003a). Pokazano je da dodatak mineralnog nosača znatno povećava količinu uklonjenog P iz sintetske otpadne vode. Kako sami minerali nisu pokazali afinitet za vezanje P, a određen je i limit akumulacije poli-P po bakterijskoj stanici, povećanje uklonjenog P bio je rezultat znatno većeg broja bakterijskih stanica u reaktorima sa zeolitnim tufom i glinom u usporedbi s reaktorima bez dodanog nosača. Također je pokazano da količina imobiliziranih bakterija ovisi o vrsti i veličini čestica materijala. Predloženo je da bi prirodni zeolitni tuf i glina zbog dostupnosti i komercijalne isplativosti bili zadovoljavajući nosači P-uklanjajućih bakterija u unaprjeđenju procesa EBPR.

U sljedećoj studiji Hrenović i sur. (2003b) prirodni zeolitni tuf dodan je u laboratorijski sustav za pročišćavanje otpadne vode s aktivnim muljem bioaugmentiranim P-uklanjajućom bakterijom *A. calcoaceticus*. Rezultati su pokazali da se dodatkom zeolitnog tufa znatno poboljšalo uklanjanje P iz sintetske i komunalne otpadne vode. U reaktorima sa zeolitnim tufom došlo je do znatno većeg smanjenja kemijske potrošnje kisika, amonijaka i nitrata te poboljšanja kvalitete mulja (smanjenje indeksa i povećanje koncentracije mulja) u usporedbi s reaktorima bez dodatka nosača. Uklanjanje P bilo je znatno veće u reaktorima s dodatkom 15 g L⁻¹ zeolitnog tufa u odnosu na 5 g L⁻¹. Znatno povećanje broja bakterija u reaktorima s većom količinom zeolitnog tufa posljedica je veće površine materijala dostupnog za biosorpciju.

Kroz praćenje literature došlo se do zaključka da bi prirodni alumosilikatni materijali zbog svoje dostupnosti, relativno niske cijene te velikog kapaciteta za imobilizaciju bakterija mogli biti dobri nosači P-akumulirajućih bakterija te bi se korištenjem tehnologije imobilizacije mogli unaprijediti sustavi za obradu otpadne vode s EBPR svojstvima. Za to je potrebno istražiti dostupne alumosilikatne materijale u interakciji s P-akumulirajućim bakterijama te odrediti osnovne čimbenike koji utječu na imobilizaciju bakterija.

2.4. Nosači bakterija

Kao potencijalni nosači bakterija ovom radu testirano je osam alumosilikatnih materijala i jedan magnezijev-silikat. Prirodni alumosilikati su zeolitni tuf, bentonit i perlit; umjetni alumosilikat je sintetski zeolit A, a magnezijev-silikat je sepiolit.

2.4.1. Prirodni zeoliti

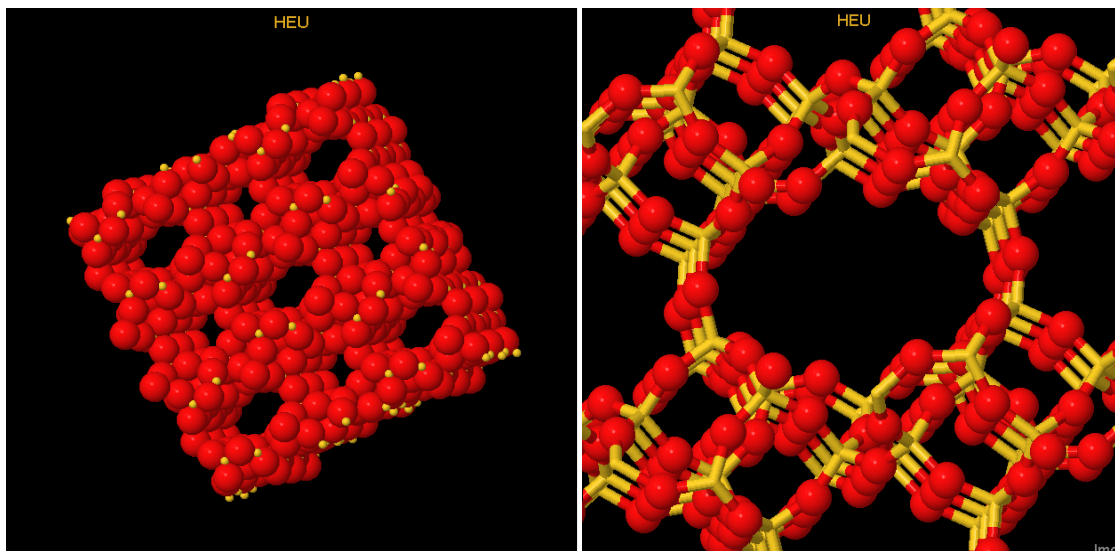
Zeoliti su alumosilikatni minerali koji se pojavljuju u izmijenjenim bazičnim magmatskim stijenama i tufovima odnosno vulkanskim pepelima očvrslim procesima alteracije, dijagenese i niskog stupnja metamorfizma.

Ležišta prirodnog zeolita su rasprostranjena širom svijeta; Sjeverna Amerika, Kuba, Japan, Sjeverna Koreja, Kina, Italija, Turska, Grčka, Danska, Češka, Bugarska, Mađarska, Srbija, Rusija, Armenija, Azerbajdžan (Gevorkyan i sur. 2001). U Hrvatskoj su veća nalazišta zeolita u Donjem Jesenju (Macelj, Hrvatsko Zagorje) (Tibljaš i Šćavničar, 2007).

Prirodni zeoliti se svrstavaju prema habitusu u tri skupine: kockasti (habazit, philipsit), vlaknasti (natrolit, laumontit) i listićasti (heulandit, stilbit). Kristaliziraju u kubičnom, rompskom i monoklinskom sustavu. Zeoliti sadrže adsorpcijsku vodu koja je raspoređena po šuplinama i kanalima kristalne rešetke. Zagrijavanjem voda lako izlazi iz rešetke bez narušavanja strukture, a isto tako se i lako prima natrag.

Najučestalija vrsta zeolita koja se uglavnom nalazi u sedimentnim stijenama vulkanskog podrijetla je klinoptilolit, zeolit iz skupine heulandita, za kojeg je svojstven odnos $Si/Al \geq 4,0$ (Coombs i sur. 1997). U nalazištima zeolita kraj Donjeg Jesenja, u Hrvatskoj, upravo je klinoptilolit najzastupljeniji zeolitni mineral (Tibljaš i Šćavničar, 2007).

Zeoliti imaju osobitu mikroporoznu strukturu koja sadrži mnogobrojne kanale molekularnih dimenzija koji variraju u veličini (**Slika 3**), što dopušta molekulama ili ionima da prolaze kroz šupljine ili budu zadržane u njima. Zbog takve strukture zeoliti imaju svojstva selektivnog katalizatora, ionskog izmjenjivača, adsorbenta i molekulskog sita (Ribeiro i sur. 1995).



Slika 3. Shematski prikaz mikroporozne strukture zeolita (<http://www.iza-online.org/>).

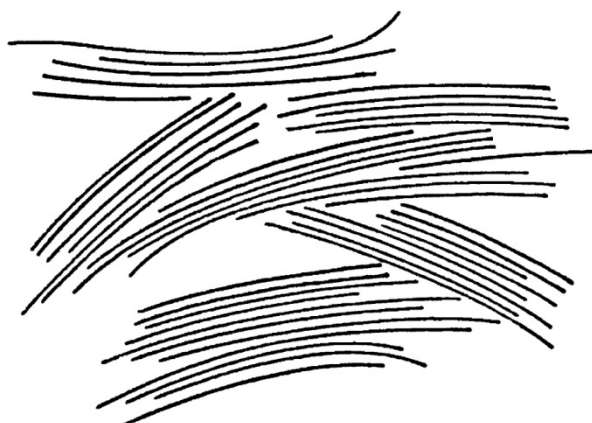
Zbog takvih svojstava široka je primjena zeolita u agrikulturi, industriji, okolišu i drugdje. Tako se zeoliti koriste kao hortikulturni produkti za zadržavanje vlage u tlu, zemljišna gnojiva, koriste se u higijenskim proizvodima, proizvodima za kontrolu mirisa, kao mineralna punjenja, mediji za filtraciju zraka i sredstva za ionsku izmjenu. Koriste se i kao adsorbensi u proizvodnji naftnih derivata, na odlagalištima radioaktivnog otpada, za uklanjanje ulja s vodenih površina i za obradu otpadnih voda (Armbruster, 2001). Cijene prirodnog zeolita na tržištu variraju od 50 – 450 \$ po toni (www.alibaba.com/showroom/zeolite-price.html, veljača 2012.).

Vrlo je raširena i upotreba sintetskih zeolita koji imaju ista svojstva kao i prirodni zeoliti (adsorbensi, ionski izmjenjivači, molekulsko sito), a koriste se najviše u industriji deterdženata (Hrenovic i sur. 2010b). Količina zeolita A, jednog od sintetskih zeolita, u deterdžentima za pranje rublja iznosi prosječno 20-34% ukupne mase, a godišnje se u Europi za industriju deterdženata utroši 650 000 tona sintetskih zeolita (HERA, 2004).

2.4.2. Bentonit

Bentonit je materijal iz skupine glina koji nastaje alteracijom vulkanskog pepela, a sastoji se uglavnom od montmorillonita, jednog od minerala iz skupine glina. Glina se definira kao prirodni materijal sastavljen od vrlo sitnih koloidnih čestica, koji ima plastična svojstva kada je vlažan, a stvrdne se pri sušenju ili zagrijavanju. Gline obično sadržavaju minerale iz grupe filosilikata, ali mogu sadržavati i druge materijale koji nemaju svojstvo plastičnosti i stvrdnjavanja te organske tvari (Guggenheim i Martin,

1995). Mineral glina označava u pravilu filosilikatni mineral koji daje glini plastična svojstva, a stvrdnjava se prilikom sušenja ili zagrijavanja (Guggenheim i Martin, 1995). Zbog svoje listićaste strukture minerali glina imaju osobita svojstva kao što su bubrenje i „listanje“ materijala u vodi, stvaranje čestica nepravilne strukture te stvaranje koloida. Čestice montmorilonita (**Slika 4**) nikad ne posjeduju pravilnu strukturu kristala, nego izgledaju poput listova papira izderanog u nepravilne komadiće (Lagaly, 2006). Postoji nekoliko vrsta bentonita koji se označavaju kao K-bentonit, Na-, Al- i Ca-bentonit, ovisno o tome koji je element dominantan u sastavu.



Slika 4. Shematski prikaz čestica montmorilonita, preuzeto iz Lagaly (2006).

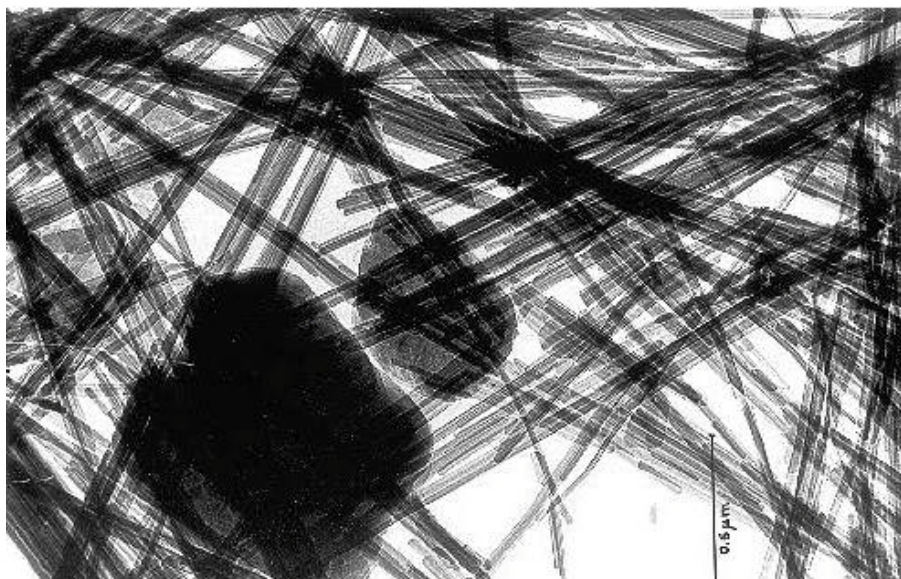
Korištenje bentonita u industrijske svrhe je vrlo rašireno, najviše u rudarskoj industriji i industriji nafte (koristi se kao podmazivač i brtvilo pri bušenju naftnih i plinskih bušotina). Ostale primjene bentonita u industriji navedene su u **Tablici 3**. Procjenjuje se da je proizvodnja bentonita oko 13 milijuna tona godišnje (Harvey i Lagaly, 2006). Ovisno o vrsti i uvjetima poslovanja cijene bentonita na tržištu kreću se između 80-1000 \$, a prosječno oko 300 \$ po toni (www.alibaba.com/showroom/bentonite-clay-price.html, veljača 2012.).

Tablica 3. Primjena bentonita u industriji, prilagođeno iz Harvey i Lagaly (2006).

Agrikultura i hortikultura
Pospješivač svojstava tla
Građevinska industrija
Brtvilo
Dodatak betonu i žbuci
Podmazivač pri bušenju i postavljanju cijevi
Proizvodnja keramike
Plastificirajuće sredstvo za organske mase
Kao dodatak za veću čvrstoću keramike
Kao zgušnjivač
Boje i lakovi
Zgušnjivač i stabilizator
Sredstvo protiv taloženja
Dodatak u raznim voskovima i ljepilima
Farmaceutska i kozmetička industrija
Baza za kreme, pomade i kozmetičke preparate
Industrija katrana
Kao emulgator za mješavinu vode i katrana
Premazno sredstvo za katran i asfalt
Dodatak bitumenima

2.4.3. Sepiolit

Sepiolit je jedan od minerala glina, po svom sastavu je Mg-silikat, a u prirodi se može naći u obliku vrlo sitnih ili vlaknastih čestica ili u masivima. Zbog vrlo sitne veličine čestica i velike specifične površine sepiolit ima velik kapacitet adsorpcije i adsorpcije tekućina zbog čega se koristi u mnogim granama industrije. Zbog osobite građe čestica, koje su u obliku tankih, izduženih iglica (**Slika 5**), dodatkom sepiolita u bilo koju tekućinu znatno se povećava viskozitet te tekućine. Kako je to povećanje isključivo fizikalno, a ne kemijsko, sepiolit se koristi kao izvrstan aditiv za povećanje viskoznosti (Murray, 2007). Zbog igličastog oblika čestice sepiolita ne flokuliraju kao drugi minerali glina, što omogućuje korištenje u raznim jedinstvenim industrijskim područjima (**Tablica 4**).



Slika 5. Čestica sepiolita slikana skenirajućim elektronskim mikroskopom, preuzeto iz Galan (1996).

Najveća nalazišta sepiolita su u Anatoliji, Turska, pokrajini Ceelbur u Somaliji, južnoj i središnjoj Kini te Španjolskoj. U Španjolskoj (Vicalvaro pored Madrida) su najveća komercijalna nalazišta sepiolita u svijetu (Murray, 2007) te je Španjolska, s preko 1 300 000 tona godišnje, najveći svjetski proizvođač sepiolita (Alvarez-Ayuso i Garcia-Sanchez, 2003). Tržišna cijena sepiolita je prosječno od 100-500 \$ po toni (www.alibaba.com/Sepiolite_pid100003563, veljača 2012.).

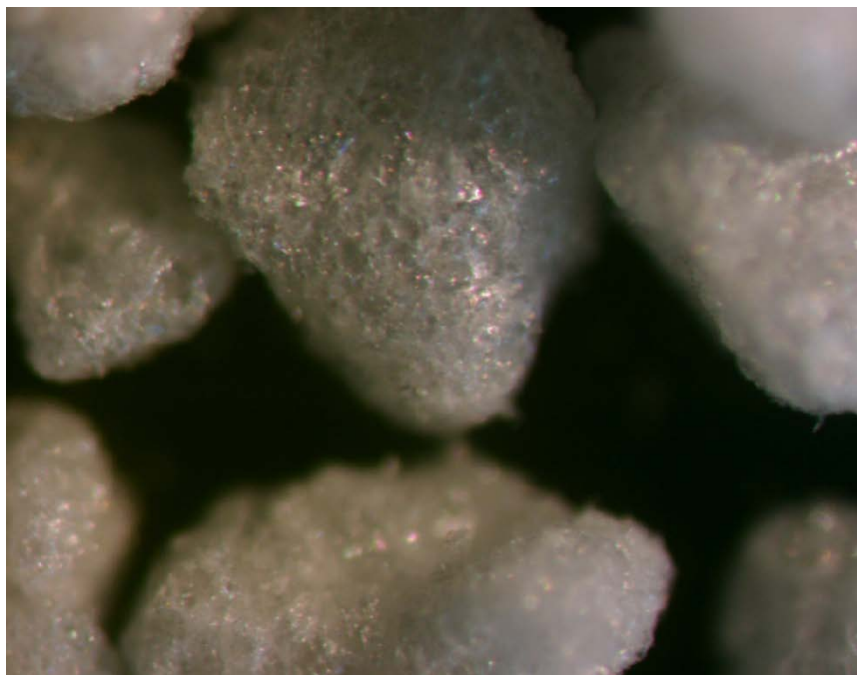
Tablica 4. Primjena sepiolita u industriji, prilagođeno iz Murray (2007).

Podmazivač i brtvilo za bušenje nafte, plina i ruda
Adsorbent mirisa u pijesku za mačke
Nosač pesticida, insekticida i herbicida u agrikulturi
Aditiv za smjese kojima se kitaju zidovi i fasade
Aditiv za zgušnjavanje i emulzifikaciju boja i lakova
Adsorbent koji se dodaje sredstvima za čišćenje industrijskih postrojenja
Aditiv
proizvodnja asfalta
keramika
kozmetička industrija
industrija deterdženata

2.4.4. Perlit

Perlit je alumosilikatni materijal koji je po svom sastavu vulkansko staklo. Osobito svojstvo perlita je da unutar sirovog materijala sadrži 2-5% vezane vode. Kada se sirovi

perlit zagrijava na temperature preko 870°C , vezana voda isparava i stvara mjehure unutar čestica perlita što dovodi do njihove ekspanzije. Ekspandirane čestice (**Slika 6**) povećavaju svoj volumen za 15-20 puta u odnosu na sirovi materijal (Pichór i Janiec, 2009). Naziv perlit se obično upotrebljava za ekspanzirani perlit, a za materijal iz kojeg se zagrijavanjem dobiva perlit se posebno naglasi sirovi perlit.



Slika 6. Čestice ekspaniranog perlita gledane pod svjetlosnim mikroskopom pri povećanju od $40\times$.

Zbog takve spužvaste strukture čestica perlit posjeduje za prirodne aluminosilikatne materijale jedinstvena svojstva; niska gustoća što znači da je materijal vrlo lagan u odnosu na druge aluminosilikatne materijale te velika poroznost. Perlit je također kemijski inertan materijal, otporan na vatru i ima veliki kapacitet adsorpcije zvukova. Zbog ovih svojstava perlit se uvelike upotrebljava u građevinskoj industriji kao izolator zvuka, topline te u protupožarnim elementima. Također se koristi kao dodatak za izradu raznih građevinskih blokova male težine. Vrlo je raširena upotreba perlita u hortikulturi gdje se koristi kao dodatak tlu zato što čuva vlagu u tlu te rahli i prozračuje tlo. Također se u manjoj mjeri koristi kao abrazivno sredstvo i aditiv u industriji boja i lakova te industriji plastike (Pichór i Janiec, 2009).

Godišnje se proizvodi oko 1,7 milijuna tona perlita, a najveći proizvođači su Grčka, SAD, Turska te Kina (izvor: U.S. Geological Survey, Mineral Commodity Summaries,

January 2011). Cijena perlita na tržištu kreće se između 70 i 100\$ po toni, a oko 50-60\$ po m³ (www.alibaba.com/countrysearch/CN/perlite-price.html, veljača 2012.).

2.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj fizikalno-kemijskih čimbenika na rast i metabolizam P-uklanjajuće bakterije *Acinetobacter junii* te biološko i fizikalno-kemijsko međudjelovanje između niza izvornih i modificiranih alumosilikatnih materijala i bakterije. Istražit će se pogodnost pojedinih materijala da posluže kao nosači bakterije *A. junii*, odredit će se utjecaj dodatka pojedinih materijala na umnažanje i metabolizam bakterije, te najpodobnija vrsta, veličina čestica i masena koncentracija za imobilizaciju bakterija. Pretpostavka je da bi zeolitni tuf bio idealan izbor za imobilizaciju *A. junii* u svrhu postizanja što većeg broja poželjnih stanica u bioreaktoru te samim time i poboljšanja biološkog uklanjanja P iz otpadnih voda.

MATERIJALI I METODE

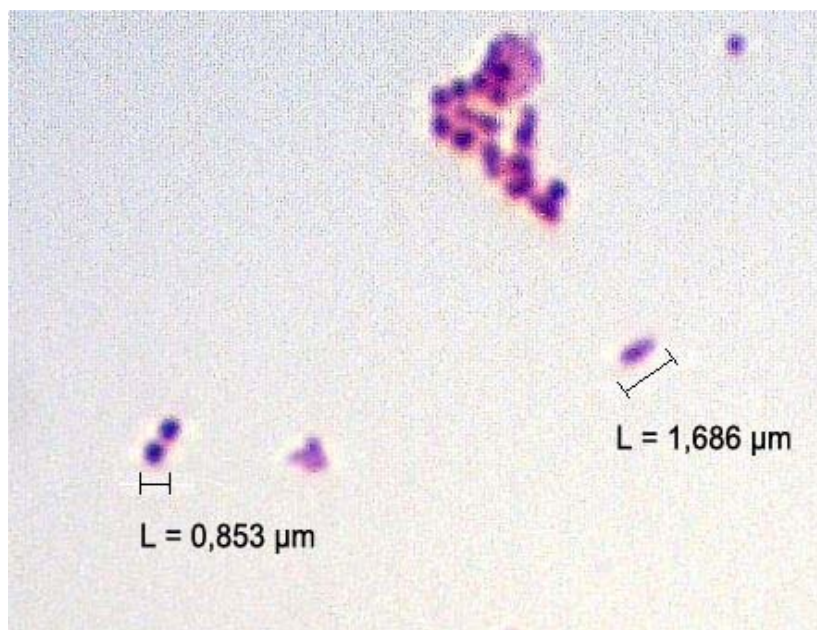
3. Materijali i metode

3.1. Bakterija *Acinetobacter junii*

U radu je korištena čista kultura bakterije *Acinetobacter junii* DSM 1532 (Bouvet i Grimont, 1986) nabavljena iz banke mikroorganizama Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH. Kultura bakterije je izolirana iz aktivnog mulja s osobinama poboljšanog biološkog uklanjanja P te je opisana kao P-uklanjajuća bakterija (United States Patent 3,980,557). Kultura je mjesečno precjepljivana na mediju hranjivi agar (Biolife, Italija) i čuvana na temperaturi od 4°C. Sastav hranjivog agara bio je (g L⁻¹ destilirane vode): pepton 5,0; mesni ekstrakt 3,0; agar 20,0; pH 7,0.

U rod *Acinetobacter* spadaju Gram-negativne bakterije koje ne posjeduju fermentativni metabolizam. U okolišu su sveprisutne u tlu, vodi, kanalizaciji i hrani. Također su široko rasprostranjene u bolničkom okruženju gdje su prepoznate kao uzročnici bolničkih infekcija. Po obliku su kratki štapići u logaritamskoj fazi rasta koji prelaze u bobičaste oblike u stacionarnoj fazi rasta (**Slika 7**). Stanična stjenka pokazuje tipičnu strukturu Gram-negativnih bakterija, a bakterije su često obavijene kapsulom koja se dokazuje metodom negativnog bojenja. Ne tvore spore, i ne posjeduju strukture za aktivno pokretanje, iako se može javljati pokretanje u obliku trzanja i kliženja. Sve bakterije roda *Acinetobacter* su striktni aerobi i mogu rasti u širokom temperaturnom rasponu (Towner, 2006).

Vrsta *Acinetobacter junii* nazvana je tako u čast američkog bakteriologa Elliota Junia, a opisana je u radu Bouvet i Grimont (1986). Tamo se navodi da *A. junii* na krutoj podlozi tvori okrugle, konveksne kolonije, glatke s jasno izraženim granicama. Kolonije su promjera 1,0-1,5 mm i napola providne nakon 24 h te promjera 2,0-2,5 mm i lagano neprovidne nakon 48 h rasta na 30°C (**Slika 8**). Dobro rastu na temperaturi 15-37°C, a rasta nema na temperaturi od 44°C. Od ostalih bakterija roda *Acinetobacter* razlikuju se po tome što ne stvaranju kiseline od D-glukoze, ne koriste glutarat i azalat, a koriste DL-laktat i L-histidin.



Slika 7. Bakterijske stanice *A. junii* obojane metodom po Gramu (metoda opisana u Prilogu 1). U logaritamskoj fazi rasta su kratki štapići dok u stacionarnoj fazi rasta prelaze u bobice.



Slika 8. Kolonije *A. junii* porasle na hranjivom agaru nakon 48 h inkubacije

3.2. Otpadna voda

3.2.1. Standardna simulirana otpadna voda

U radu je korištena kemijski definirana otopina koja simulira realnu otpadnu vodu (u daljnjem tekstu otpadna voda), sastava (mg L^{-1} deionizirane vode): Na-propionat 300,

pepton 100, kvašćev ekstrakt 20, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 10, CaCl_2 6, KCl 30, KH_2PO_4 88 (Hrenović i sur. 2005). Vrijednost pH namještena je na 7,0 s 1M NaOH ili 1M HCl prije autoklaviranja (121°C/20 min).

3.2.1.1. Simulirana otpadna voda s različitim izvorima dušika

Za ispitivanje utjecaja različitih molekulskih vrsta dušika na rast i metabolizam bakterije *A. junii* korištena je simulirana otpadna voda u kojoj su pepton i kvašćev ekstrakt, kao izvori dušika, zamijenjeni s različitim koncentracijama amonijaka, nitrata i nitrita. Izvor amonijaka je bio NH_4Cl , nitrata NaNO_3 , a nitrita NaNO_2 . Ove soli su u otpadnu vodu dodavane tako da se dobiju koncentracije dušika od 5, 50 i 500 mg L^{-1} . Koncentracija P u otpadnoj vodi namještena je na $\sim 10 \text{ mg L}^{-1}$ dodavanjem KH_2PO_4 . Vrijednost pH namještena je na 7,0 s 1M NaOH ili 1M HCl prije autoklaviranja (121°C/20 min).

3.2.1.2. Simulirana otpadna voda s različitim koncentracijama Fe, Mg, Ca i K

Za ispitivanje utjecaja željeza na rast i metabolizam *A. junii* u standardnu simuliranu otpadnu vodu dodan je FeSO_4 u koncentracijama od 5, 50, 100, 500, 1000 i 5000 mg L^{-1} . Vrijednost pH namještena je na 7,0 s 1M NaOH ili 1M HCl prije autoklaviranja (121°C/20 min).

Za ispitivanje utjecaja Mg, Ca i K bakterija je uzgajana u tri različite vrste simulirane otpadne vode. Sastav otpadnih voda prikazan je u **Tablici 5**. Vrijednost pH svih otpadnih voda namještena je na 7,0 s 1M NaOH ili 1M HCl prije autoklaviranja (121°C/20 min). Za pokuse s biočesticama korištena je simulirana otpadna voda iz Tablice 5 ali bez dodavanja Mg, Ca i K.

Tablica 5. Sastav triju različitih otpadnih voda korištenih za pokazivanje utjecaja Mg, Ca i K na rast i metabolizam *A. junii*. *Sastav otopine elemenata u tragovima (mg L⁻¹ deionizirane vode): FeSO₄ 50; MnSO₄ 5; ZnSO₄ 0,5; CuSO₄ 0,5; CoSO₄ 0,05; MoSO₄ 0,05.

Sastojak (mg L ⁻¹)	Vrsta vode		
	A	B	C
Na-propionat	300	300	300
(NH ₄) ₂ SO ₄	400	400	400
Na ₂ HPO ₄	92	92	92
MgCl ₂ ×7H ₂ O	0-836	84	84
CaCl ₂	37	0-367	37
KCl	19	19	0-191
*otopina elementata u tragovima (ml L ⁻¹)	10	10	10

3.2.1.3. Simulirana otpadna voda različitih vrijednosti pH

Za ispitivanje utjecaja vrijednosti pH na rast i metabolizam *A. junii* korištena je standardna simulirana otpadna voda, a prije autoklavanja (121°C/20 min) vrijednosti pH su namještene na 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 10 s 1M HCl i 1M NaOH.

3.2.1.4. Tekući medij Nutrient Broth

Utjecaj NaCl na bakteriju *A. junii* ispitivan je u tekućem hranjivom mediju Nutrient Broth (NB). Sastav NB je (g L⁻¹ deionizirane vode): goveđi ekstrakt 3, pepton 5. Korišten je i razrijeđeni NB (NB/100) koji je razrijeđen deioniziranom vodom u omjeru 1:100. U medije je dodavan analitički NaCl da bi se postigle koncentracije od 0; 0,4; 3,5; 5,0; 7,0; 10, 20 i 30%. Prije pokusa mediji su autoklavirani (121°C/20 min) a vrijednost pH je namještena na 7,0.

3.2.1.5. Simulirana otpadna voda s benzalkonijevim kloridom

Za ispitivanje biočestica u uvjetima visoke toksičnosti korištena je standardna simulirana otpadna voda u koju je dodavan benzalkonijev klorid (BAC, CAS-broj 8001-54-5) do koncentracija od 0,1; 1; 10; 50 i 100 mg L⁻¹. BAC je u boce sa simuliranom otpadnom vodom dodavan u aseptičkim uvjetima nakon autoklavanja (121°C/20 min) da ne bi došlo do raspadanja kemikalije pri visokoj temperaturi. Vrijednost pH bila je 7,0.

3.2.1.6. Simulirana otpadna voda za uzgoj u anaerobnim uvjetima

Za uzgoj čiste kulture *A. junii* u anaerobnim uvjetima koristila se simulirana otpadna voda bogata izvorom ugljika, a siromašna P. Sastav vode je bio (g L⁻¹ deionizirane vode): Na-propionat 1000, pepton 100, kvašćev ekstrakt 20, MgSO₄×7H₂O 10, CaCl₂ 6, KCl 30, KH₂PO₄ 20. Vrijednost pH namještena je na 7,0 s 1M NaOH ili 1M HCl prije autoklaviranja (121°C/20 min).

3.2.2. Realne otpadne vode

3.2.2.1. Komunalna otpadna voda

Realna komunalna otpadna voda korištena u pokusima uzeta je sa Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadnih voda Zagreba (CUPOVZ) kojim upravlja društvo Zagrebačke otpadne vode d.o.o. CUPOVZ pročišćava miješanu oborinsku i komunalnu otpadnu vodu grada Zagreba. Otpadna voda je uzeta iz odvodnog kanala nakon sekundarnog stupnja pročišćavanja te predstavlja efluent uređaja, odnosno vodu koja bi dolazila na treći stupanj pročišćavanja (uklanjanje N i P). Svježa otpadna voda korištena je u pokusima neposredno nakon donošenja u laboratorij ili je čuvana na 4°C maksimalno 4-6 h prije korištenja u eksperimentima. Svježa otpadna voda sterilizirana je filtriranjem preko sterilnih Sartorius nitroceluloznih filtara promjera pora 0,2 µm ili autoklaviranjem (121°C/20 min).

3.2.2.2. Procijedna otpadna voda

Procijedna otpadna voda korištena u pokusima uzeta je iz sabirnih bazena za procijednu otpadnu vodu zagrebačkog komunalnog odlagališta otpada Prudinec/Jakuševac, kojim gospodari ZGOS, Zagrebački holding d.o.o. Procijedna otpadna voda nastaje cijedenjem oborinskih voda kroz slojeve deponiranog otpada na odlagalištu. Procijedna otpadna voda korištena je u pokusima neposredno nakon donošenja u laboratorij ili je čuvana na 4°C maksimalno 4-6 h prije korištenja u eksperimentima. Svježa otpadna voda sterilizirana je filtriranjem preko sterilnih Sartorius nitroceluloznih filtara promjera pora 0,2 µm ili autoklaviranjem (121°C/20 min).

3.3. Nosači bakterija

3.3.1. Zeoliti

U pokusima su korištene tri vrste prirodnog zeolitnog tufa.

Zeolitni tuf iz Bigadica, Turska (Ztur), zeolitni tuf iz Igroša, Srbija (Zsrb) i zeolitni tuf iz Donjeg Jesenja, Hrvatska (Zhrv). Također je korišten i sintetski zeolit A (Zsin) koji je komercijalni produkt tvrtke Silkem d.o.o., Slovenija. Zsin je registriran pod CAS brojem 1318-02-1, a koristi se u industriji deterdženata i kemijskoj industriji. Za zeolitne tufove rađene su mineraloške, kemijske i granulometrijske analize. U pokusima su korištene slijedeće veličine čestica Ztur; <0,125 mm, 0,125-0,25 mm, 0,25-0,5 mm i >0,5 mm. Zsrb i Zhrv korišten u pokusu bio je veličine čestica od 0,125-0,25 mm. Veličina kubičnih mikrokristala Zsin bila je 3,550 μm u promjeru.

3.3.2. Gline

Terrana[®] (Ter) je komercijalno dostupni bentonit, nabavljen od tvrtke Süd-Chemie AG, Njemačka. Analiza Ter dostavljena je putem tehničko-sigurnosnog lista. Veličina čestica Ter bila je <0,125 mm.

Sepiolit (Sep) je komercijalni produkt nabavljen od tvrtke Shijiazhuang World Imp&Exp Trade Co, Ltd., Kina. Za Sep je rađena kemijska i mineraloška analiza. Uzorak Sep tretiran je kiselinom da bi se dobio pročišćeni oblik minerala s većim udjelom sepiolita (SepP). Tretiranje je vršeno na način da je 50g Sep inkubirano na sobnoj temperaturi ($22\pm 2^\circ\text{C}$) kroz 24h u tikvici s 1200 ml 0,15M otopine HCl-a. Uzorak je zatim opran demineraliziranom vodom te je isti postupak još jednom proveden. Nakon toga uzorak je inkubiran u 500 ml 0,5M NH_4Cl kroz 1 sat na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja demineraliziranom vodom postupak je ponovljen s 500 ml 0,5M $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Slijedilo je ispiranje demineraliziranom vodom dok test na kloridne ione s otopinom AgNO_3 nije bio negativan. Veličina čestica uzoraka Sep i SepP korištenih u pokusu bila je 0,044-0,149 mm.

U radu je testiran i uzorak sepiolita iz iskopa Gornje Oresje, Hrvatska (SepHrv). Veličina čestica uzorka korištenog u pokusu bila je 0,100-0,212 mm.

3.3.3. Perlit

U pokusima su korištene tri vrste perlita različitog stupnja ekspanzije.

Neekspandirani perlit (Pnex) je neobrađeno vulkansko staklo od kojeg se termalnom ekspanzijom dobiva ekspandirani perlit, a proizveden je u tvrtci Silver&Baryte Ores Mining Co, S.A., Grčka.

Poluekspandirani perlit (P600) je tvornički proizvela tvrtka KGM Ozalj d.o.o. zagrijavanjem Pnex na temperaturu od 600°C .

Ekspandirani perlit (Pexp) je komercijalno dostupan materijal kojeg proizvodi tvrtka KGM Ozalj, a dobiva se zagrijavanjem Pnex na temperaturama iznad 800°C. Detalje tvorničkog procesa dobivanja P600 i Pexp zadržava tvrtka KGM Ozalj. Analize uzoraka perlita dostavljene su putem tehničko-sigurnosnog lista. Veličine čestica Pnex, P600 i Pexp korištenih u pokusu bila je 0,122-0,263 mm. U pokusima je korišten i Pexp veličine čestica 0,1-1,0 i 0,1-2,0 mm.

Alumosilikatni materijali koji su korišteni kao nosači bakterija su iz raznih izvora dopremljeni u laboratorij te su čuvani u plastičnim spremnicima u mraku uz najmanji utjecaj vlage. Netom prije korištenja u pokusima uzorci su sterilizirani sušenjem na 105°C/16 h (Ztur, Zsrb, Zhrv, Zsin, Pnexp, P600, Pexp) ili na 70°C/24 h (Ter, Sep).

3.3.4. Nosači izmijenjeni Mg

Putem ionske izmjene Ztur, Zsrb i Ter su obogaćeni Mg te su takvi materijali s većim udjelom Mg na površini označeni kao ZturMg, ZsrbMg i TerMg. Izmjena materijala Mg rađena je procedurom opisanom u Hrenovic i sur. (2005). U Erlenmeyer-ove tikvice volumena 500 mL s 250 ml 1M otopine $MgCl_2$ dodano je 10 g nosača. Tikvice su inkubirane uz miješanje na mehaničkoj miješalici (200rpm) na $30 \pm 0,2^\circ C$ kroz 48 h. Nakon inkubacije izmijenjeni nosači su oprani demineraliziranom vodom dok test na kloridne ione nije bio negativan što znači da su potpuno isprani od otopine $MgCl_2$. Prije pokusa su izmijenjeni nosači sterilizirani sušenjem na 105°C/16 h.

3.3.5. Granulometrijska, mineraloška i kemijska analiza nosača

Granulometrijska analiza uzoraka Ztur, Zsrb i Zhrv napravljena je prosijavanjem materijala kroz sita s različitim promjerom pora. Uzorci su prethodno usitnjeni u ahatnom tarioniku do potrebne granulacije.

Mineraloška analiza pojedinih materijala napravljena je röntgenskom difrakcijskom analizom na praškastim uzorcima koristeći Philipsov vertikalni röntgenski goniometar s grafitnim monokromatorom i proporcionalnim brojačem uz zračenje bakarne cijevi s finim fokusom. Snimljeni röntgenogrami praha identificirani su usporedbom s JCPDS bazom podataka. Na temelju toga načinjena je semikvantitativna analiza kod koje je zastupljenost pojedinih minerala u uzorku određena na temelju visine refleksa.

Kemijskom analizom utvrđen je udio glavnih sastojaka i mikroelemenata u uzorcima materijala. Kemijsku analizu Ztur, Zsrb, i Sep napravila je tvrtka ACME Analytical Laboratory, Canada. Pojedini elementi analizirani su ICP-emisijskom spektrometrijom koja je slijedila litij metaborat/tetraborat fuziju i digestiju razrijeđenom nitratnom kiselinom. Jedino je ugljik određen pomoću LECO analizatora. Za uzorak Zhrv napravljena je SEM/EDS (*Scanning Electrone Microscopy / Energy Dispersive Spectroscopy*) analiza pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa JEOL JSM-6610LV. Pri ovoj analizi se slika skenirajućeg elektronskog mikroskopa prenosi u računalo gdje se mogu vršiti dodatne kemijske analize pomoću energetsko-disperzivne röntgenske spektrometrije te se može odrediti kvantitativna i kvalitativna kemijska analiza na točno određenom mjestu na uzorku.

Kemijski sastavi Zsin, Ter, Pnex, P600 i Pexp dobiveni su u sigurnosno-tehničkim listovima ili izravno od proizvođača.

3.4. Izvedba pokusa

3.4.1. Pokusi s čistom kulturom bakterije *A. junii* u simuliranoj otpadnoj vodi

Prije svakog pokusa čista kultura *A. junii* uzgojena je na hranjivom agaru (30°C/16h). Svježa kultura je zatim resuspendirana u 9 ml sterilne 0,3% otopine NaCl-a (u daljnjem tekstu sterilna voda) do koncentracije od 10^8 bakterija po ml. Po 1 ml suspendirane čiste kulture *A. junii* je zatim dodavano u Schottove boce volumena 300 ml koje su sadržavale 100 ml otpadne vode. Prije dodavanja bakterije, iz reaktora je uzeto po 10 ml otpadne vode za određivanje koncentracije P. Iz boce je zatim uzeto po 1 ml suspenzije za određivanje početnog broja bakterija, nakon čega je kroz 24 h slijedila aerobna inkubacija u vodenoj kupelji (Memmert, Njemačka) na $30 \pm 0.1^\circ\text{C}$ uz trešnju (70 rpm). Sterilni zrak je upuhivan stopom od 1 L min^{-1} pomoću akvarijskih pumpi na koje je nataknuta sterilna serološka pipeta s vatenim filtrom koji sprečava unos mikroorganizama iz zraka u reaktore.

Nakon inkubacije iz svakog reaktora uzet je po 0,1 ml suspenzije za pripravu mikroskopskih preparata. Zatim su uzeti uzorci za određivanje konačnog broja bakterija i koncentracije P u otpadnoj vodi. Nakon toga je izmjerena vrijednost pH.

Vrsta simulirane otpadne vode razlikovala se ovisno o pokusu, a sukladno tome rađena su i određivanja željenih parametara prije i poslije inkubacije.

3.4.2. Pokusi s čistom kulturom *A. junii* u simuliranoj otpadnoj vodi uz dodatak nosača bakterija

Pokusi s dodatkom nosača bakterija su provedeni na isti način kako je opisano u prethodnom poglavlju s tim da je u svaki reaktor dodana određena masa pojedinog materijala koji će poslužiti kao potporni materijal za imobilizaciju bakterija. Materijal je dodat u reaktor nakon što su dodane bakterije i uzet uzorak za određivanje početnog broja bakterija. Osim ako nije posebno naglašeno, masa materijala u pokusu bila je 1,0 g. Nakon inkubacije određen je broj bakterija imobiliziranih na materijal.

U pokusima s biočesticama, u reaktore sa simuliranom otpadnom vodom dodavani su materijali s prethodno imobiliziranim bakterijama i inkubirani su pod uvjetima opisanim u prethodnom poglavlju. Nakon inkubacije određen je konačan broj planktonskih i imobiliziranih bakterija u reaktorima.

3.4.2.1. Priprema biočestica

Optimalna koncentracija nosača za pripremu biočestica određena je tako da je u Schottove boce od 300 mL s 100 mL NB dodavano po 1 ml suspenzije *A. junii* (koncentracije 10^8 CFU mL⁻¹) te Ztur u koncentracijama od 1, 10, 20, 60 i 100 g L⁻¹. Boce su zatim 6 h aerobno inkubirane na 30°C. Nakon inkubacije određen je broj bakterija imobiliziranih na nosač i prikazan kao CFU imobiliziranih bakterija po g⁻¹.

Za pripremu biočestica pripremljene su Schott-ove boce od 300 mL s 100 mL NB i dodavano je 1,0 g Ztur te 1 ml suspenzije *A. junii* (koncentracije 10^8 CFU mL⁻¹). U prethodnom pokusu određeno je da je količina od 1,0 g nosača na 100 ml medija optimalna za dobivanje maksimalne koncentracije bakterijskih stanica imobiliziranih na nosač. Slijedila je aerobna inkubacija na 30°C u trajanju od 6 h. Nakon inkubacije supernatant je odliven iz boce tako da su na dnu ostale samo biočestice koje su isprane dva puta sterilnom otopinom NaCl. Tako pripremljene biočestice su onda dodavane u pokus.

3.4.3. Pokusi s čistom kulturom *A. junii* u svježoj komunalnoj i procijednoj otpadnoj vodi

U pokusima sa realnom otpadnom vodom steriliziranom filtracijom ili autoklaviranjem te nesteriliziranom otpadnom vodom, u Schott-ove boce koje su sadržavale 100 mL komunalne ili procijedne otpadne vode dodavana je čista kultura bakterije *A. junii*, čista kultura *A. junii* i 1,0 g nosača Ztur, ili 1,0 g biočestica

pripremljenih na gore opisani način. Boce su zatim aerobno inkubirane 24 h na 30°C. U abiotskim kontrolnim reaktorima aerirana je samo sterilizirana otpadna voda, bez dodatka čiste kulture *A. junii*, nosača ili biočestica. U kontrolnom reaktoru s nesteriliziranim vodom provedena je samo aeracija.

3.4.4. Uzgoj čiste kulture *A. junii* u anaerobnim uvjetima

Za dokazivanje zrnaca poli-hidroksi-butirata unutar stanica *A. junii*, čista kultura bakterije uzgajana je u anaerobnim uvjetima. U Schott-ove boce od 300 ml s 250 ml simulirane otpadne vode za uzgoj u anaerobnim uvjetima dodano je 1,0 ml suspenzije *A. junii* (koncentracije 10^8 CFU ml⁻¹). Boce su zatim hermetički zatvorene i inkubirane 24 h na 30°C u vodenoj kupelji uz trešnju (70 rpm). Preliminarni pokusi su pokazali da se trošenjem kisika od strane bakterije anaerobni uvjeti (0,0 mg O₂ L⁻¹) unutar boce spontano stvaraju za 2-3 h.

3.5. Analitičke metode

Koncentracija P (P-PO₄³⁻) u otpadnoj vodi određivana je spektrofotometrijski na Hach (SAD) DR2500 spektrofotometru koristeći molibdovanadatnu metodu (Hach metoda 8114). Metoda se temelji na stvaranju P/molibdat kompleksa reakcijom orto-P s molibdatom u kiselom mediju. U prisutnosti vanadija dolazi do stvaranja žute molibdovanadofosforne kiseline. Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji P u mediju i mjeri se na 430 nm. Prije određivanja koncentracije P uzorci su profiltrirani preko Sartorius nitroceluloznog filtra promjera pora 0,2 µm. U pokusima s procijednom otpadnom vodom nije bilo moguće koristiti molibdovanadatnu metodu 8114 jer sama voda ima jaku žutu boju pa je koncentracija P mjerena Hach metodom 8048 gdje u reakciji P/molibden kompleksa s askorbinskom kiselinom dolazi do stvaranja intenzivne plave boje.

Koncentracije NH₃-N u otpadnoj vodi određene su spektrofotometrijski po Hach metodi 8039, a koncentracije NO₃-N i NO₂-N po Hach metodama 8039 i 10019 na Hach DR2500 spektrofotometru

Koncentracija Fe²⁺ u otpadnoj vodi određivana je spektrofotometrijski na Hach DR2500 spektrofotometru po Hach metodi 8008, a koncentracije Mg²⁺, Ca⁺ i K⁺ mjerene su na atomskom apsorpcijskom spektrometru AA-6800, Shimadzu, Japan.

Koncentracije ukupnog dušika (T-N), ukupnog fosfora (T-P) i kemijska potrošnja kisika (KPK) realne otpadne vode određene su također spektrofotometrijski na Hach

DR2500 spektrofotometru. Korištene metode su bile sljedeće; T-N – metoda digestije persulfatom (Hach metoda 10072); T-P – molibdovanadatna metoda s kiselim digestijom persulfatom (Hach metoda 10127); KPK – metoda digestije u reaktoru (Hach metoda 8000). Prije mjerenja T-N i T-P uzorci su filtrirani preko filtra promjera 0,2 μm , a prije mjerenja KPK preko tehničkog filter papira (Munktell Papir Plava vrpca).

Broj bakterija *A. junii* određivan je kao broj jedinica koje formiraju kolonije (u daljnjem tekstu CFU – *engl. Colony Forming Units*). Prvo se iz određenog reaktora uzme 1 mL bakterijske suspenzije i naprave decimalna razrjeđenja uzorka (-1 do -9). Iz razrjeđenja se uzme po 0,1 mL uzorka i nacijepi na Petrijeve ploče s hranjivim agarom metodom širenja razmaza. Ploče se stave na inkubaciju ($30,0 \pm 0,1^\circ\text{C}/24\text{ h}$), odredi se broj poraslih kolonija i izračuna broj CFU. Broj bakterija se iskaže kao CFU mL^{-1} ili L^{-1} suspenzije.

Broj bakterija imobiliziranih na nosač određivan je po utvrđenoj proceduri (Durham i sur. 1994). Iz reaktora se nakon inkubacije uzme bakterijski nosač i opere s 300 mL sterilne vode. Nakon toga se nosač prebaci u sterilnu plastičnu epruvetu koja sadrži 9 mL sterilne vode. Uzorak se zdrobi pomoću sterilnog staklenog štapića i zatim 3 minute energično trese na mehaničkoj miješalici (40 Hz, Kartell TK3S, Italija). Ovaj postupak odvaja imobilizirane stanice od površine nosača i one postaju planktonski živuće bakterije u supernatantu. Iz takve suspenzije se naprave decimalna razrjeđenja i nacijepe na Petrijeve ploče s hranjivim agarom na način kako je prethodno opisano. Nakon inkubacije ($30,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) odredi se CFU i broj imobiliziranih bakterija se prikaže kao CFU g^{-1} . Određivanja broja bakterija su rađena u duplikatu ili triplikatu.

Određivanje broja prirodno prisutnih heterotrofnih bakterija u pokusima s nesteriliziranim komunalnom i procijednom otpadnom vodom rađeno je na gore opisani način s tim da su ploče hranjivog agara inkubirane na 22°C kroz 72 h. Na taj način pogodovano je rastu prirodno prisutnih bakterija, a ne bakterije *A. junii*.

Imobilizacija bakterija potvrđivana je pregledom mikroskopskih preparata koji su bojani metodom po Gramu (Prilog 1) i pregledom uzoraka snimljenih skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM). Prisutnost akumuliranih zrnaca poli-P unutar bakterijskih stanica potvrđivana je pregledom mikroskopskih preparata obojenih metodom po Neisseru (Prilog 2). Za dokazivanje zrnaca PHB unutar stanica *A. junii* preparati su obojeni metodom bojenja s Nile blue A i pregledavani pod fluorescentnim mikroskopom. Obojana zrnca PHB emitiraju sjajnu narančastu svjetlost kad ih se pobudi svjetlošću valne duljine od 460 nm (Prilog 3). Mokri preparati gledani su

direktnom mikroskopijom na fazno-kontrastnom mikroskopu (Yxiovert 200 MAT, Carl Zeiss Microimaging, Inc. Njemačka).

Uzorci nosača s imobiliziranim bakterijama pripremljeni su za SEM (*Scanning Electrone Microscopy*) analizu sušenjem u seriji etanolnih otopina različite koncentracije. Nakon inkubacije, iz boce u kojoj se provodio pokus dio nosača je uzet i aseptički prenesen u drugu bocu u koju su onda dodavan etanol različite koncentracije po utvrđenom protokolu (Prilog 4). Osušeni uzorci su spremljeni u sterilne plastične spremnike i čuvani u eksikatoru do analize. Skenirajuća elektronska mikroskopija rađena je na uređaju Jeol JSM 7000F, Field Emission Scanning Electron Microscope, Japan.

Mjerenje zeta-potencijala materijala i bakterije *A. junii* rađeno je na instrumentu Zetasizer 3000 (Malvern Instruments Ltd, UK) po opisanoj proceduri (Hrenovic i sur. 2009; van Merode i sur. 2006). Za mjerenje zeta-potencijala materijala 0,01 g je raspršeno u 50 mL demineralizirane vode. Prije mjerenja uzorci su odstajali minimalno 5 minuta da se veće čestice slegnu na dno epruvete. Supernatant je zatim pomoću plastične šprice ubrizgavan u instrument koji automatski izračunava elektroforetičku pokretljivost čestica i preračunava u zeta-potencijal koristeći jednadžbu Smoluchowskog. Zeta-potencijal *A. junii* određen je na isti način s tim da je korištena suspenzija bakterije (10^6 CFU ml⁻¹) u 10 mM KH₂PO₄ puferu pH vrijednosti 7,0.

Specifična površina (*eng. Specific Surface Area – SSA*) mjerena je tehnikom adsorpcije dušika (BET-analiza) na Micromeritics FlowSorb II 2300 instrumentu (Ivanković i sur. 2010).

Statističke analize rađene su pomoću računalnog programa Statistica (verzija 8 i 9, StatSoft, Inc. Tulsa, USA). Nulta hipoteza je bila da se ispitivane jedinice (reaktori) nisu razlikovali u radu, niti da je do promjena u radu reaktora došlo tijekom mjerenog vremena. Uz ove pretpostavke pojedini su reaktori tretirani kao nezavisne varijable. Za usporedbu nezavisnih varijabli korišten je Studentov *t*-test. Za usporedbu triju ili više varijabli korištena je analiza varijanci (ANOVA) za kojom slijedi Duncanov post-hoc test. Korelacije među varijablama određivane su metodom po Spearmanu. Kao statistički značajna uzeta je razlika od 5% ($p = 0,05$).

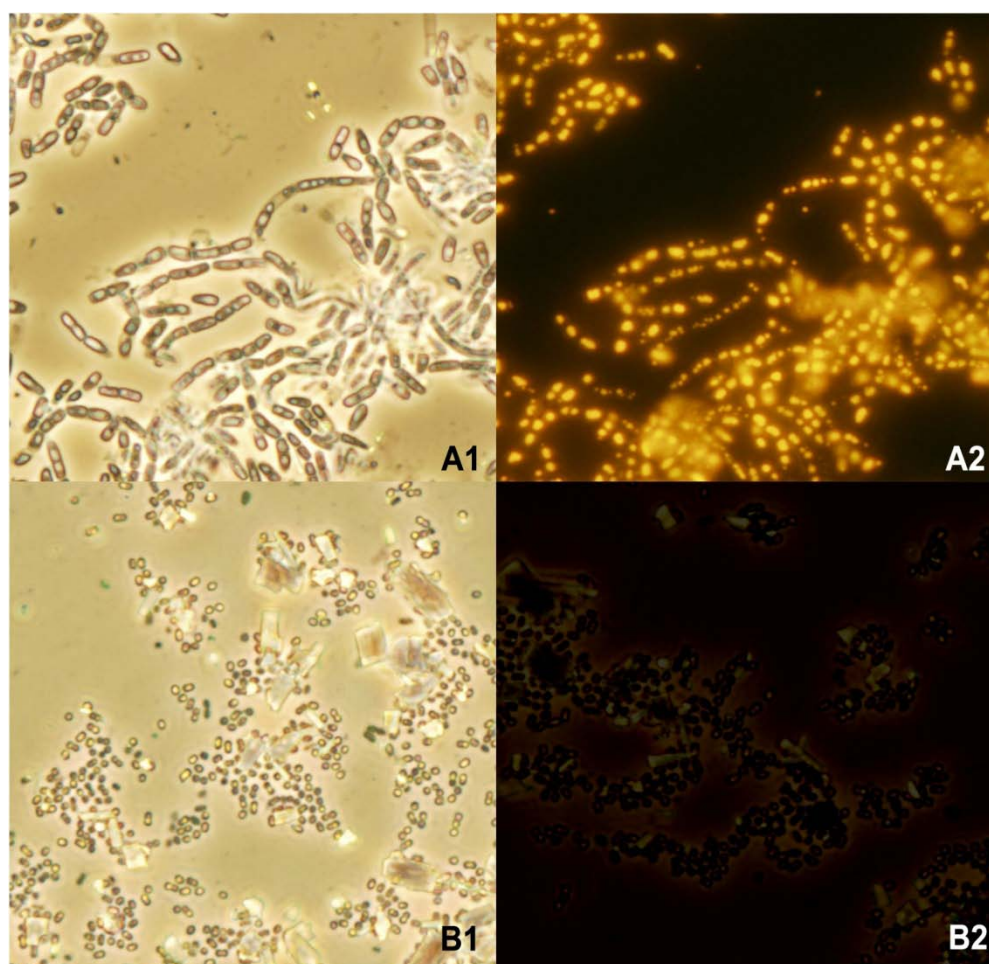
REZULTATI

4. Rezultati

4.1. Utjecaj fizikalno-kemijskih čimbenika na bakteriju *A. junii*

4.1.1. Dokazivanje poli-beta-hidroksibutirata u stanicama *A. junii*

Nakon 24 h inkubacije u anaerobnim uvjetima mikroskopski preparati su obojani metodom bojanja s Nile Blue A. Kao kontrolni uzorak bojani su preparati bakterije *Bacillus megaterium* (DSM 32). Nakon pregleda preparata pod fluorescencijskim mikroskopom na pobuđujućoj valnoj duljini od 460 nm lijepo su se vidjela zrnca PHB unutar stanica *B. megaterium* dok unutar stanica *A. junii* zrnca PHB nisu bila vidljiva (Slika 9).



Slika 9. Stanice bakterije *B. megaterium* (A1) sa zncima PHB koja fluoresciraju narančasto kada se preparat gleda pod fluorescencijskim mikroskopom (A2) i stanice *A. junii* (B1) bez jasno vidljivih zrnaca PHB (B2).

4.1.2. Utjecaj različitih molekulskih vrsta dušika na rast i metabolizam bakterije *A. junii*

Nakon 24h inkubacije u kontrolnom reaktoru *A. junii* je pokazala tipično ponašanje P-akumulirajuće bakterije. Stopa uzimanja P iznosila je $8,90 \times 10^{-10}$ mg P CFU⁻¹ (**Tablica 6**). Sojevi bakterija koji su sposobni uzimati više od 10^{-12} mg P CFU⁻¹ svrstavaju se u P-akumulirajuće bakterije (Sidat i sur. 1999).

Bakterija *A. junii* koristila je kao izvor dušika amonijak (NH₃-N) i nitrat (NO₃-N), ali ne i nitrit (NO₂-N) (**Tablica 6**). U slučaju najmanje koncentracije NH₃-N i NO₃-N od 5 mg L⁻¹ omjer ugljika i dušika (optimalno 10:1) u otpadnoj vodi ukazivao je na nedostatak dušika potrebnog za rast bakterija. U ovim reaktorima bakterija je potrošila sav NH₃-N i NO₃-N tijekom inkubacije, no koncentracija NO₂-N se nije smanjila (Tablica dušik), što ukazuje da *A. junii* NO₂-N ne koristi kao izvor dušika čak ni u uvjetima kada je to jedini izvor dušika.

Usporedbom ključnih parametara kao što su CFU i postotak uklanjanja P testnih i kontrolnih reaktora može se pratiti rast i metabolizam *A. junii*. U reaktorima s NH₃-N, s porastom koncentracije NH₃-N rastao je i broj bakterija i postotak uklonjenog P (Tablica dušik) što pokazuje da *A. junii* koristi NH₃-N kao jedini izvor dušika te da povećanje koncentracije pozitivno utječe na rast i metabolizam bakterije. U usporedbi s kontrolnim reaktorom CFU je pri svim koncentracijama NH₃-N bio niži, a postotak uklanjanja P bio je nešto viši tek pri najvećoj koncentraciji NH₃-N od 500 mg L⁻¹. U kontrolnom reaktoru koncentracija dušika otopljenog iz peptona i kvašćevog ekstrakta ne može biti viša od 120 mg L⁻¹. Rezultati ukazuju da iako *A. junii* koristi NH₃-N kao jedini izvor dušika, puno bolji rast postiže korištenjem prirodnih izvora dušika kao što su pepton i kvašćev ekstrakt.

Tablica 6. Utjecaj različitih molekulskih vrsta dušika na rast i metabolizam *A. junii*.

	Kontrol a	c NH ₃ -N (mg L ⁻¹)			c NO ₃ -N (mg L ⁻¹)			c NO ₂ -N (mg L ⁻¹)		
		5	50	500	5	50	500	5	50	500
start										
pH	6,97	7,01	7,03	6,98	7,02	7,01	6,98	7,01	7,07	7,02
NH ₃ -N (mg L ⁻¹)	27,66	8,79	53,40	503,00	0,17	1,11	0,76	0,03	0,03	0,03
NO ₃ -N (mg L ⁻¹)	28	1,3	1,0	1,2	6,8	55,8	529,6	1,5	1,6	1,5
NO ₂ -N (mg L ⁻¹)	0,018	0,018	0,010	0,012	0,008	0,012	0,010	6,69	50,80	511,42
P (mg L ⁻¹)	11,20	13,00	12,82	13,41	10,22	10,81	9,60	9,73	10,67	10,11
CFU (10 ⁹ L ⁻¹)	2,55	2,77	2,62	2,68	2,00	2,50	2,25	2,20	2,29	2,09
24 h inkubacije										
pH	7,66	7,14	7,38	7,54	7,48	7,53	7,68	7,34	7,09	6,85
NH ₃ -N (mg L ⁻¹)	0,20	0,30	29,30	431,98	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01
NO ₃ -N (mg L ⁻¹)	7,2	0,4	0,6	1,2	0,7	40,0	481,3	0,2	0,3	0,8
NO ₂ -N (mg L ⁻¹)	0,024	0,010	0,014	0,013	0,032	0,036	0,038	7,16	52,93	525,30
P (mg L ⁻¹)	4,79	10,71	7,43	4,94	8,96	7,64	3,89	9,46	10,58	10,80
CFU (10 ⁹ L ⁻¹)	54,20	14,43	32,21	49,11	10,61	24,10	42,65	3,63	1,45	0,14
Stopa uzimanja P (mg P CFU ⁻¹)	8,90 ×10 ⁻¹⁰	1,59 ×10 ⁻¹⁰	1,67 ×10 ⁻¹⁰	1,72 ×10 ⁻¹⁰	1,19 ×10 ⁻¹⁰	1,32 ×10 ⁻¹⁰	1,34 ×10 ⁻¹⁰	7,49 ×10 ⁻¹¹	6,14 ×10 ⁻¹¹	-7,25 ×10 ⁻⁹
Uklanjanje P (%)	57,2	17,6	42,0	63,2	12,3	29,3	59,5	2,8	0,8	-6,8

Gotovo isti rezultati dobiveni su i korištenjem $\text{NO}_3\text{-N}$ kao jedinog izvora dušika; povećanjem koncentracije povećavao se broj bakterija i postotak uklanjanja P, no broj bakterija je pri svim koncentracijama $\text{NO}_3\text{-N}$ bio manji nego u kontrolnom reaktoru. Uklanjanje P nije bilo značajno veće od kontrole pri najvećoj koncentraciji $\text{NO}_3\text{-N}$ od 500 mg L^{-1} . Može se zaključiti da je $\text{NO}_3\text{-N}$ zadovoljavajući izvor dušika za *A. junii*.

U reaktorima s najmanjom koncentracijom $\text{NO}_2\text{-N}$ došlo je tek do neznatnog umnožavanja bakterija dok su u ostalim reaktorima bakterije odumirale budući da je broj bakterija bio manji nego na startu (**Tablica 6**). Sukladno tome i uklanjanje P je bilo zanemarivo, što je za očekivati budući da je postotak uklanjanja P izravno ovisan o broju *A. junii* u reaktoru. Pri najvećoj koncentraciji $\text{NO}_2\text{-N}$ došlo je čak do povećanja količine otopljenog P u otpadnoj vodi što se može objasniti otpuštanjem organskog P od strane umrlih stanica. Može se zaključiti da $\text{NO}_2\text{-N}$ nisu odgovarajući izvor dušika za *A. junii*, te da pri većim koncentracijama djeluju toksično prema bakteriji te na taj način sprečavaju učinkovitu provedbu procesa EBPR.

4.1.3. Utjecaj željeza, magnezija, kalcija i kalija na rast i metabolizam bakterije *A. junii*

Utjecaj mikronutrijenata, magnezija, kalcija, kalija i željeza, na rast i metabolizam čiste kulture *A. junii* ispitivan je uzgojem bakterije u sintetskoj otpadnoj vodi s različitim koncentracijama ovih elemenata.

U kontrolnom reaktoru sa standardnom simuliranom otpadnom vodom, bez dodatka željeza, čista kultura bakterije *A. junii* je normalno rasla i uklanjala P iz otpadne vode (**Tablica 7**). Broj bakterija nakon 24 h bio je znatno veći nego na početku, a stopa uklanjanja P od $2,06 \times 10^{-11} \text{ mg P CFU}^{-1}$ odgovara metabolizmu P-akumulirajuće bakterije (Sidat i sur. 1999). Možemo zaključiti da je za bakteriju *A. junii* dovoljna prisutnost Fe^{2+} kao mikronutrijenta u tragovima. U tragovima se željezo nalazi u peptonu i kvašćevom ekstraktu, te u destiliranoj vodi.

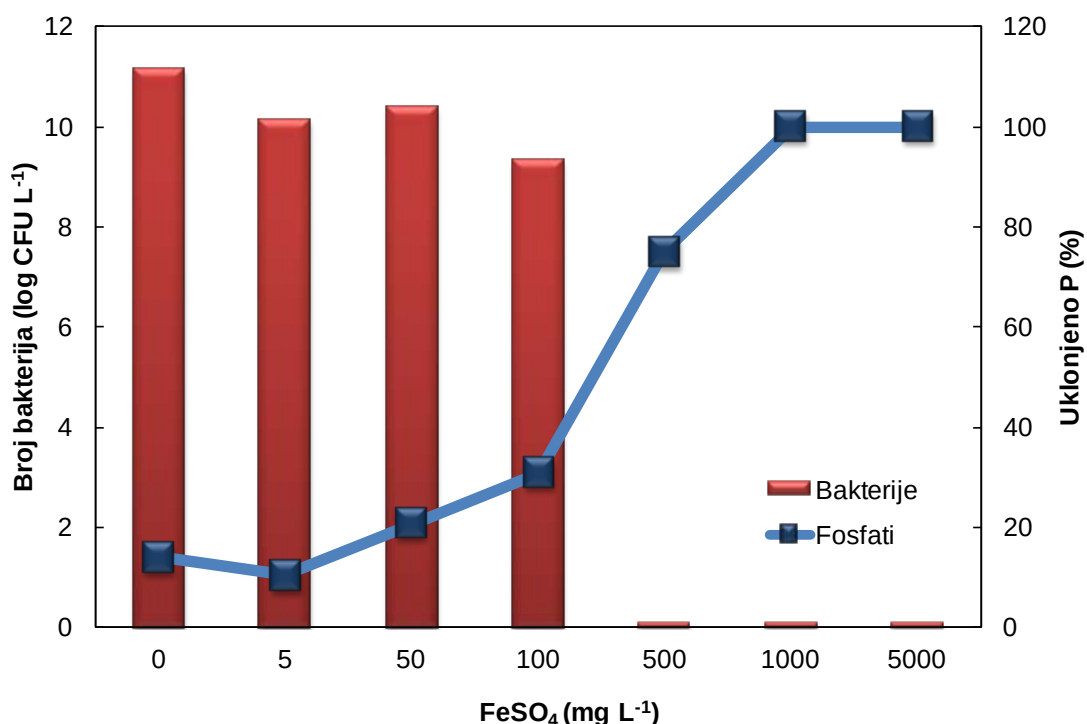
Dodavanjem željeza (Fe^{2+} iz FeSO_4) nije postignuto nikakvo poboljšanje u radu bakterije *A. junii*. Naprotiv, nakon inkubacije, broj bakterija u reaktoru s koncentracijom Fe^{2+} od $1,31 \text{ mg L}^{-1}$ bio je za 9 % manji nego u kontrolnom reaktoru (**Tablica 7**). Fe^{2+} u koncentraciji od $24,16 \text{ mg L}^{-1}$ djelovalo je toksično prema bakteriji; broj bakterija nakon 24 h inkubacije bio je manji nego na početku pokusa što ukazuje da je počelo odumiranje bakterijske biomase. Pri koncentraciji Fe^{2+} od $108,82 \text{ mg L}^{-1}$ odumiranje

biomase bilo je potpuno i na kraju inkubacije nije bilo vijabilnih bakterija u reaktorima (**Slika 10**).

Pri koncentracijama FeSO_4 od 50 mg L^{-1} i višim dolazi do kemijske precipitacije Fe^{2+} sa P otopljenim u vodi. Tako pri koncentracijama Fe^{2+} višim od $108,82 \text{ mg L}^{-1}$ uopće nema slobodnih P u otpadnoj vodi nego je sav P precipitirao u obliku P-Fe kompleksa (**Slika 10**). Kad su koncentracije FeSO_4 bile 500 mg L^{-1} i više P su precipitirali već na početku pokusa, pri samom procesu pripreme otpadne vode i autoklaviranja. Praćenje koncentracije Fe^{2+} na početku i na kraju pokusa potvrđuje precipitaciju (**Tablica 7**). Do znatnije razlike dolazi u reaktorima s dodatkom 100 mg L^{-1} FeSO_4 gdje je razlika oko 15 mg L^{-1} . Ovdje uz značajnu precipitaciju počinje odumiranje bakterijske biomase (**Slika 10**). U reaktorima s višim koncentracijama dodanog FeSO_4 razlika u koncentraciji Fe^{2+} prije i poslije inkubacije je iznimno velika što korelira s potpunim uklanjanjem P koji su precipitirali s Fe^{2+} (**Slika 10**). Treba napomenuti i da je zbog aeracije i autoklaviranja dio Fe^{2+} vjerojatno oksidirao do Fe^{3+} iona čija koncentracija nije mjerena pa je i zato velika razlika u koncentraciji Fe^{2+} prije i poslije inkubacije.

Tablica 7. Utjecaj iona željeza na rast i metabolizam *A. junii*. * Inhibicija rasta bakterija izračunata je kao smanjenje logaritma broja bakterija u odnosu na kontrolni reaktor bez dodatka iona željeza. $t_0 \text{ P} = 19,9 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$; $t_0 \text{ CFU} = 15 \pm 2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$.

start	Kontrola			Dodatak FeSO_4			
Dodano FeSO_4 (mg L^{-1})	0	5	50	100	500	1000	5000
Fe^{2+} (mg L^{-1})	< 0,02	1,31	11,45	24,16	108,82	199,3	1230,0
24 h inkubacije							
pH	7,45	5,75	6,88	5,94	5,44	5,18	5,15
P (mg L^{-1})	17,7	18,0	15,6	13,2	0,1	0,0	0,0
CFU (10^9 L^{-1})	141	14	25	2	0	0	0
Fe^{2+} (mg L^{-1})	< 0,02	1,09	8,53	9,86	32,46	99,7	1052,8
Ukupno uklonjeno P (%)	14,1	10,5	20,8	30,9	75,0	100,0	100,0
*Inhibicija CFU (%)	0	9	7	16	100	100	100



Slika 10. Broj bakterija *A. junii* i ukupno uklanjanje P u kontrolnom reaktoru (0 mg FeSO₄ L⁻¹) i reaktorima s dodatkom FeSO₄ (5-5000 mg L⁻¹) nakon 24 h inkubacije.

U **Tablici 7** su vidljive razlike u pH vrijednosti medija u kontrolnom reaktoru i reaktorima s dodanim FeSO₄ nakon 24 h inkubacije. U kontrolnom reaktoru pH vrijednost je ostala u neutralnom, blago lužnatom području dok je u reaktorima s dodanim FeSO₄ vrijednost pH prešla u kiselo područje.

Utjecaj Mg, Ca, i K na bakteriju ispitan je u kombiniranom pokusu gdje su u standardnu otpadnu vodu dodani navedeni elementi u različitim koncentracijama. Pokus je osmišljen tako da se ispita utjecaj svakog pojedinog elementa, ali i utjecaj sva tri elementa zajedno.

Uzgojem čiste kulture *A. junii* u simuliranoj otpadnoj vodi vrste A (3.2.1.2.) ispitan je utjecaj različitih koncentracija Mg na rast i metabolizam bakterije s tim da su Ca i K dostupni u dovoljnoj količini. Kao najbitniji pokazatelji praćeni su broj bakterija (CFU) i % uklonjenog P. U uvjetima manjka Mg došlo je do odumiranja bakterija što se vidi po smanjenju broja bakterija u odnosu na početni broj (**Tablica 8**). Posljedično je došlo i do izostanka uspješnog uklanjanja P iz otpadne vode. Povećanjem početne koncentracije Mg na 11,61 mg L⁻¹ dobiveno je umnožavanje bakterija i sukladno tome povećanje uklanjanja P iz vode. Daljnjim povećavanjem koncentracije Mg povećavao se broj bakterija u reaktorima, postotak uklonjenog P te stopa uklanjanja P (**Tablica 8**).

Uzgojem čiste kulture *A. junii* u simuliranoj otpadnoj vodi vrste B (3.2.1.2.) ispitan je utjecaj različitih koncentracija Ca na rast i metabolizam bakterije s tim da su Mg i K dostupni u dovoljnoj količini. Za razliku od reaktora s manjkom Mg, manjak Ca u reaktoru nije imao negativan utjecaj na rast i metabolizam *A. junii* te se broj bakterija i postotak uklanjanja P pri koncentracijama Ca od 0,16 i 12,41 mg L⁻¹ nisu značajno razlikovali (**Tablica 9**). Daljnje povećanje koncentracije Ca imalo je pozitivan utjecaj na bakteriju pa su broj bakterija, umnožavanje bakterije i uklanjanje P bili značajno veći u odnosu na manje početne koncentracije Ca. Pokazatelj koji nije pokazao nikakvu značajnu razliku s obzirom na koncentracije Ca je stopa uzimanja P pa možemo zaključiti da Ca kao mikronutrijent u otpadnoj vodi nema utjecaj na metabolizam uzimanja P i nije neophodan za rast i umnožavanje bakterije *A. junii*.

Tablica 8. Učinak različitih koncentracija Mg na rast i metabolizam bakterije *A. junii* pri konstantnoj koncentraciji Ca i K. ^A – značajno se razlikuje od reaktora B1. ^B – značajno se razlikuje od reaktora B2. ^C – značajno se razlikuje od reaktora B3. ^D – značajno se razlikuje od reaktora B4.

Pokazatelj	Otpadna voda vrste A				
	A1	A2	A3	A4	A5
t ₀ CFU (10 ⁹ CFU L ⁻¹)			40,25±2,55		
t ₀ P (mg L ⁻¹)			18,82±0,44		
t ₀ Ca (mg L ⁻¹)			11,70±1,17		
t ₀ K (mg L ⁻¹)			9,56±0,66		
t ₀ Mg (mg L ⁻¹)	0,13	11,61	23,21	54,30	109,70
CFU (10 ⁹ L ⁻¹)	9,73	49,33 ^A	56,00 ^A	79,33 ^{A,B,C}	85,00 ^{A,B,C}
Stopa uzimanja P (10 ⁻¹¹ mg P CFU ⁻¹)	4,17	5,50 ^A	6,63 ^{AB}	7,46 ^{AB}	7,68 ^{AB}
CFU 24h/CFU startni	0,23	1,21 ^A	1,46 ^{A,B}	1,90 ^{A,B,C}	2,20 ^{A,B,C,D}
Uklanjanje P (%)	2,1	14,8 ^A	19,9 ^{A,B}	30,7 ^{A,B,C}	33,8 ^{A,B,C,D}

Tablica 9. Učinak različitih koncentracija Ca na rast i metabolizam bakterije *A. junii* pri konstantnoj koncentraciji Mg i K. ^A – značajno se razlikuje od reaktora B1. ^B – značajno se razlikuje od reaktora B2. ^C – značajno se razlikuje od reaktora B3. ^D – značajno se razlikuje od reaktora B4.

Pokazatelj	Otpadna voda vrste B				
	B1	B2	B3	B4	B5
t ₀ CFU (10 ⁹ CFU L ⁻¹)			38,73±2,18		
t ₀ P (mg L ⁻¹)			18,78±0,08		
t ₀ Mg (mg L ⁻¹)			12,30±1,07		
t ₀ K (mg L ⁻¹)			9,28±0,48		
t ₀ Ca (mg L ⁻¹)	0,16	12,41	24,64	57,02	104,90
CFU (10 ⁹ L ⁻¹)	53,33	61,17	126,33 ^{A,B}	155,67 ^{A,B,C}	339,67 ^{A,B,C}
Stopa uzimanja P (10 ⁻¹¹ mg P CFU ⁻¹)	4,52	4,65	4,76	4,77	4,83
CFU 24h/CFU startni	1,38	1,46	3,41 ^{A,B}	4,11 ^{A,B,C}	8,90 ^{A,B,C,D}
Uklanjanje P (%)	12,5	15,4	31,9 ^{A,B}	39,8 ^{A,B,C}	86,8 ^{A,B,C,D}

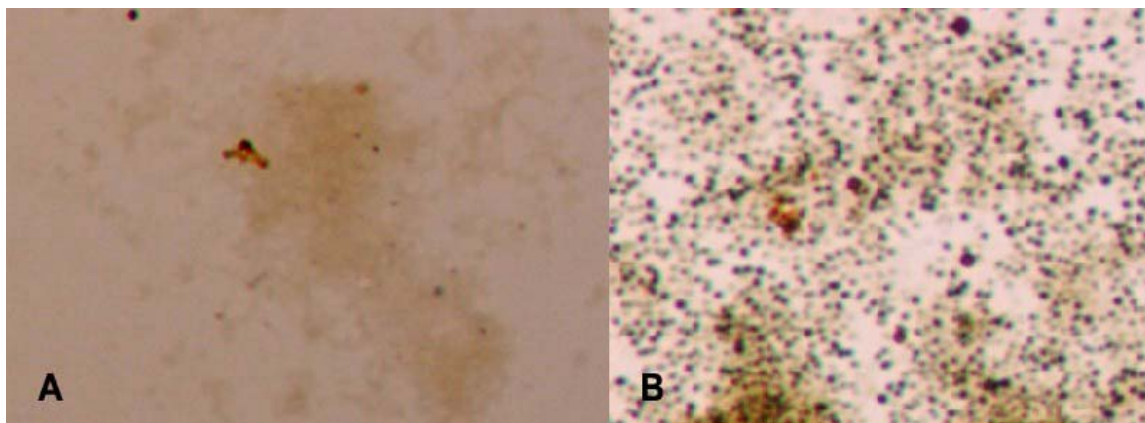
Uzgojem čiste kulture *A. junii* u simuliranoj otpadnoj vodi vrste C (3.2.1.2.) ispitan je utjecaj različitih koncentracija K na rast i metabolizam bakterije s tim da su Mg i Ca dostupni u dovoljnoj količini. Isto kao i s Mg, nedostatak K u otpadnoj vodi uzrokovao je odumiranje bakterija što se vidi po smanjenju broja bakterija u odnosu na početni broj (**Tablica 10**). Kako je uklanjanje P izravno ovisno o količini bakterija onda je u reaktoru s najmanjom koncentracijom K uklanjanje P bilo zanemarivo. Povećanjem početne koncentracije K s 0,27 na 9,53 mg L⁻¹ dobiven je porast bakterijske biomase i značajno poboljšanje u uklanjanju P. Povećavanjem koncentracije K značajno se poboljšavalo uklanjanje P i umnožavanje bakterija (**Tablica 10**). Stopa uklanjanja P po bakterijskoj stanici bila je značajno viša u reaktoru gdje je K bilo dovoljno u usporedbi s reaktorom gdje je bio nedostatak K, a daljnjim povećanjem količine K nije se značajnije mijenjala. Možemo zaključiti da je K kao mikronutrijent u otpadnoj vodi neophodan za rast i metabolizam uklanjanja P čiste kulture bakterije *A. junii*.

Tablica 10. Učinak različitih koncentracija K na rast i metabolizam bakterije *A. junii* pri konstantnoj koncentraciji Mg i Ca. ^A – značajno se razlikuje od reaktora C1. ^B – značajno se razlikuje od reaktora C2. ^C – značajno se razlikuje od reaktora C3. ^D – značajno se razlikuje od reaktora C4.

Pokazatelj	Otpadna voda vrste C				
	C1	C2	C3	C4	C5
t_0 CFU (10^9 CFU L ⁻¹)			38,67±2,73		
t_0 P (mg L ⁻¹)			19,00±0,65		
t_0 Mg (mg L ⁻¹)			11,16±1,42		
t_0 Ca (mg L ⁻¹)			10,83±1,75		
t_0 K (mg L ⁻¹)	0,27	9,53	18,96	48,92	96,38
CFU (10^9 L ⁻¹)	25,00	51,33 ^A	62,33 ^{A,B}	86,67 ^{A,B,C}	129,67 ^{A,B,C,D}
Stopa uzimanja P (10^{-11} mg P CFU ⁻¹)	2,86	5,49 ^A	5,63 ^A	5,79 ^A	5,86 ^A
CFU 24h/CFU startni	0,62	1,38 ^A	1,56 ^A	2,22 ^{A,B,C}	3,51 ^{A,B,C,D}
Uklanjanje P (%)	3,6	14,7 ^A	18,6 ^{A,B}	26,4 ^{A,B,C}	38,4 ^{A,B,C,D}

Povećanje koncentracije svih triju elemenata uzrokovalo je značajno povećanje u broju bakterija u bioreaktorima te značajno poboljšanje u uklanjanju P. Iako se pokazalo da Ca nije neophodan za uspješan rast i metabolizam bakterije, njegovo povećanje dovelo je do najvećeg poboljšanja uklanjanja P i povećanja broja bakterija kad se usporedi s Mg i K. Poboljšano uklanjanje P bilo je posljedica povećanja broja bakterija; uklanjanje P značajno je koreliralo s ukupnim brojem bakterija ($R=0,978$) dok sa stopom uzimanja P nije bilo statistički značajne korelacije ($R=0,227$).

Utjecaj pojedinih elemenata na metabolizam *A. junii* potvrđen je pregledom mikroskopskih preparata gdje se nakon bojanja metodom po Neisseru lijepo mogu vidjeti zrnca poli-P unutar bakterijskih stanica. U slučaju nedostatka Mg primijećen je nedostatak zrnaca poli-P unutar stanica *A. junii* (**Slika 11**) dok je veliki broj zrnaca bio kad je Mg u suvišku (**Slika 11**). Slični rezultati vidjeli su se i na preparatima s K, dok su u slučaju Ca zrnca poli-P bila i na preparatima iz reaktora gdje je bio manjak Ca. Kad je Ca bilo u suvišku zrnca poli-P bila su izražena i u većem broju.

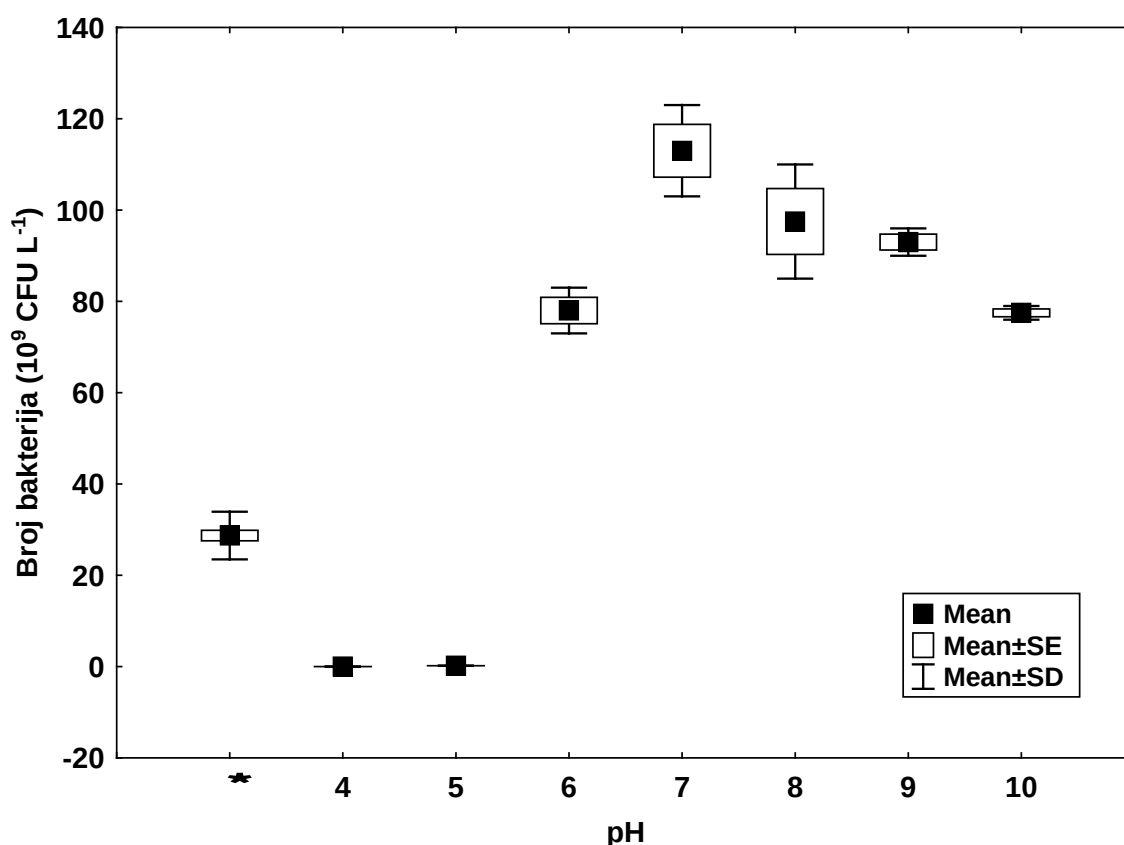


Slika 11. Nedostatak zrnaca poli-P u bakterijama *A. junii* inkubiranim u vodi bez iona Mg (A) i mnoštvo zrnaca poli-P u bakterijama *A. junii* inkubiranim u vodi sa suviškom iona Mg (B).

4.1.4. Utjecaj pH na rast i metabolizam bakterije *A. junii*

Utjecaj pH na *A. junii* istražen je uzgojem čiste kulture bakterije u simuliranoj otpadnoj vodi s pH od 4 – 10. U vodi s početnom vrijednosti pH 4 potpuno je izumrla bakterijska populacija te nakon 24 h inkubacije nije bilo vijabilnih bakterija u reaktoru (**Slika 12**). U reaktoru s početnom vrijednošću pH 5 bakterije su također odumirale budući da je broj bakterija nakon inkubacije ($2,05 \pm 0,05 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$) bio znatno manji nego početni broj ($32,0 \pm 0,2 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$). Pri pH 6 bakterije su se umnožavale pa se može zaključiti da je vrijednost pH 6 granična vrijednost za rast bakterije *A. junii*. Broj bakterija u reaktoru pH 7 bio je značajno veći od svih ostalih reaktora te se može reći da je pH 7 optimalna za rast i umnožavanje *A. junii*. Povišenjem pH smanjivao se broj vijabilnih stanica, ali nije se značajno razlikovao za reaktore pH vrijednosti 8, 9 i 10. Lužnati medij nije imao štetan utjecaj na *A. junii* i nije uzrokovao odumiranje bakterijske biomase.

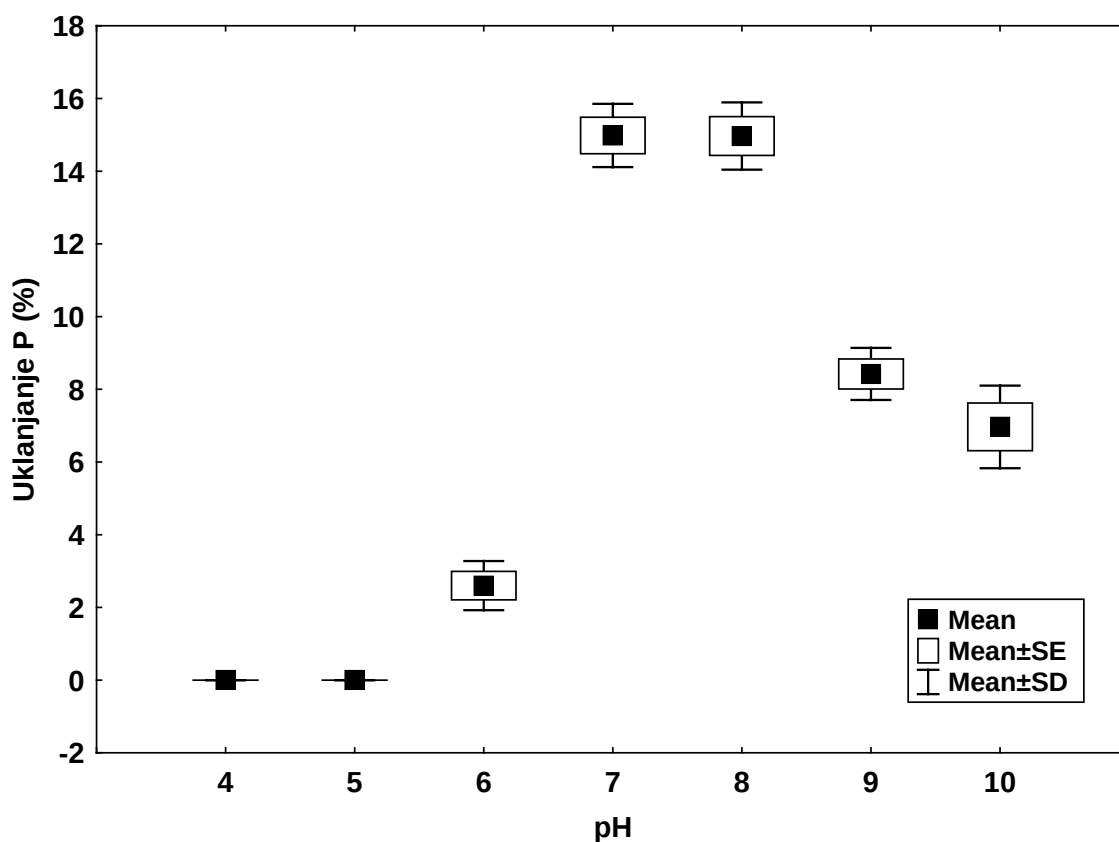
Vrijednost pH u reaktorima nakon 24 h inkubacije razlikovala se od početne vrijednosti. U reaktorima pH 4 i 5 gdje nije bilo znatne bakterijske aktivnosti iznosila je redom 4,27 i 5,12. No, u reaktorima gdje je došlo do umnožavanja bakterije konačni pH se znatno razlikovala od početne vrijednosti i iznosila je $7,54 \pm 0,16$ (u reaktorima s početnim pH 6, 7, 8, 9 i 10). Uslijed intenzivnog metabolizma bakterije pH se pomiče prema neutralnom, gdje je i optimalna vrijednost za rast bakterije. Bakterijska populacija *A. junii* bila je sposobna samo-regulirati vrijednost pH, ukoliko ona nije bila toksična prema bakteriji.



Slika 12. Broj bakterija *A. junii* u reaktorima s otpadnom vodom različitog pH nakon 24h inkubacije. * - početni broj bakterija ($t_0 = 2,87 \pm 0,58 \times 10^{10}$ CFU L⁻¹).

Sukladno broju bakterija mijenjala se količina uklonjenog P. Koncentracija P je mjerena kao ukupni fosfor budući da zbog visokog ili niskog pH može doći do precipitacije ortoP te bi mjerenje pokazalo veliku pogrešku. Kako je u reaktorima bila prisutna čista bakterijska kultura onda se može smatrati da je čitava razlika u koncentraciji P na početku i na kraju inkubacije ugrađena u biomasu ili akumulirana od strane *A. junii*. Mikroskopski preparati su pokazali prisutnost zrnaca poli-P unutar stanica *A. junii* u svim reaktorima osim kod pH 4 i 5 što je potkrijepljeno i rezultatima mjerenja postotka uklonjenog P (**Slika 13**). Najveće uklanjanje, bez značajne razlike, je bilo pri pH 7 i 8, gdje je bio i najveći broj bakterija. U ostalim reaktorima količina uklonjenog P je bila značajno manja. Vrijednosti stopa uzimanja P nisu se značajno razlikovale među reaktorima. Povećana količina uklonjenog P korelirala je značajno pozitivno ($R=0,781$) s povećanim brojem bakterija u reaktorima. Može se zaključiti da vrijednosti pH medija uzgoja od 6-10 nemaju negativan utjecaj na metabolizam

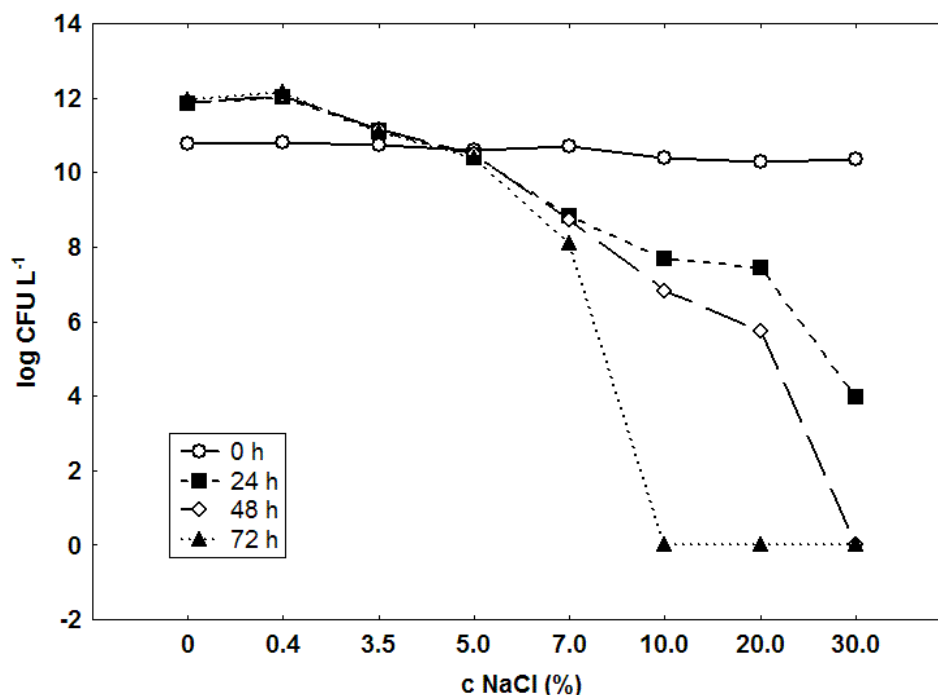
akumuliranja P bakterije *A. junii*, a manja količina uklonjenog P posljedica je manjeg broja vijabilnih bakterija.



Slika 13. Učinkovitost uklanjanja P čiste kulture *A. junii* u reaktorima s otpadnom vodom različitog pH nakon 24 h inkubacije. t_0 (P-ukupni) = $57,86 \pm 1,04$.

4.1.5. Utjecaj NaCl na rast i metabolizam bakterije *A. junii*

U kontrolnom reaktoru (0% NaCl) s NB medijem *A. junii* se intenzivno razmnožavala te je njihov broj bakterija nakon 24 h inkubacije porastao za jedan red veličine (**Slika 14**). Broj bakterija je i nakon 72 h inkubacije ostao značajno veći nego na početku pokusa, što ukazuje da su se bakterije intenzivno umnožavale prva 24 h te su onda ušle u stacionarnu fazu rasta te nakon 72 h još uvijek nije došlo do odumiranja bakterija.



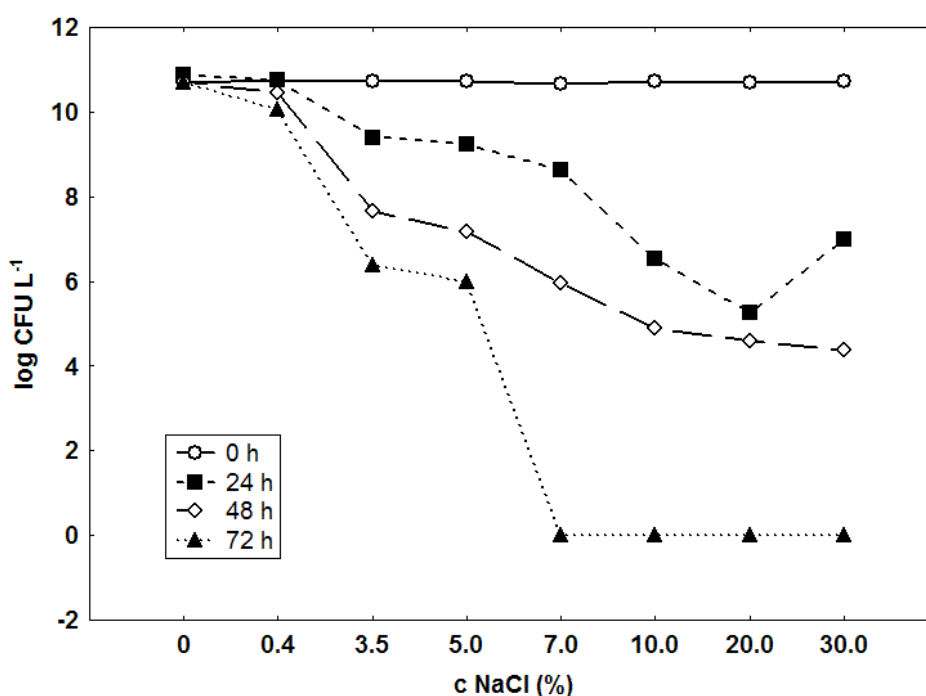
Slika 14. Broj bakterija *A. junii* u hranjivom mediju s rastućim koncentracijama NaCl nakon različitog razdoblja inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti triju mjerenja. t_0 CFU = $4,22 \pm 1,81 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$.

Sličan trend rasta bio je i u reaktorima s 0,4% NaCl dok je na 3,5% vidljivo smanjeno umnožavanje bakterije (**Slika 14**). U reaktorima s 5% soli nije došlo do povećanja broja bakterija u odnosu na početni broj te možemo zaključiti da pri toj koncentraciji nema bakterijske multiplikacije, ali ni značajnog odumiranja bakterija tijekom 72 h inkubacije. Pri koncentracijama NaCl od 7% i višim dolazi do odumiranja bakterijske biomase. Potpun nedostatak vijabilnih bakterija dostignut je pri 10% i 20% NaCl nakon 72 h inkubacije, a pri 30% NaCl nakon 48 h inkubacije (**Slika 14**).

Granična koncentracija NaCl za uspješan rast i razmnožavanje bakterije *A. junii* može se procijeniti na 3,5%. Više koncentracije uzrokuju sprječavanje umnožavanja bakterija, odumiranja bakterijske biomase i konačno smrt svih bakterija u reaktorima.

Isti pokus je proveden uzgojem bakterije u mediju siromašnom nutrijentima, a za to je NB razrijeđen 100 puta (NB/100). U kontrolnom reaktoru (0% NaCl) bakterija *A. junii* se umnožavala tijekom prva 24 h što se vidi po broju bakterija značajno većem od početnog broja (**Slika 15**). Nakon 48 h i 72 h inkubacije broj bakterija je bio manji nego nakon 24 h, iako ne značajno. Možemo zaključiti da su bakterije *A. junii* počele odumirati, i da u razrijeđenom hranjivom mediju nema umnožavanja nakon prvih 24 h

inkubacije. Pri koncentraciji NaCl od 0,4% jasno se vidi propadanje bakterijske biomase nakon 48 i 72 h inkubacije, dok je pri 3,5% odumiranje bakterija vidljivo već nakon 24 h inkubacije (**Slika 15**). Pri toj koncentraciji nakon 72 h inkubacije, broj bakterija je smanjen za 99,99% u odnosu na početni broj bakterija. Za usporedbu, broj *A. junii* u istim uvjetima, ali u hranjivom mediju, porastao je za 206% (**Tablica 11**). Pri koncentracijama soli od 7,10, 20 i 30% nije bilo vijabilnih bakterijskih stanica nakon trodnevne inkubacije. Negativan utjecaj visokih koncentracija NaCl bio je izražen kad je bakterija uzgajana u razrijeđenom mediju te se broj bakterija *A. junii* brzo smanjivao s vremenom i povećanjem koncentracije NaCl.



Slika 15. Broj bakterija *A. junii* u razrijeđenom hranjivom mediju s rastućim koncentracijama NaCl nakon različitog razdoblja inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti triju mjerenja. $t_0 \text{ CFU} = 5,21 \pm 0,52 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$.

Tablica 11. Preživljavanje bakterije *A. junii* tijekom 72 h inkubacije u medijima s različitim koncentracijama NaCl (0-30%) u odnosu na početni broj bakterija.

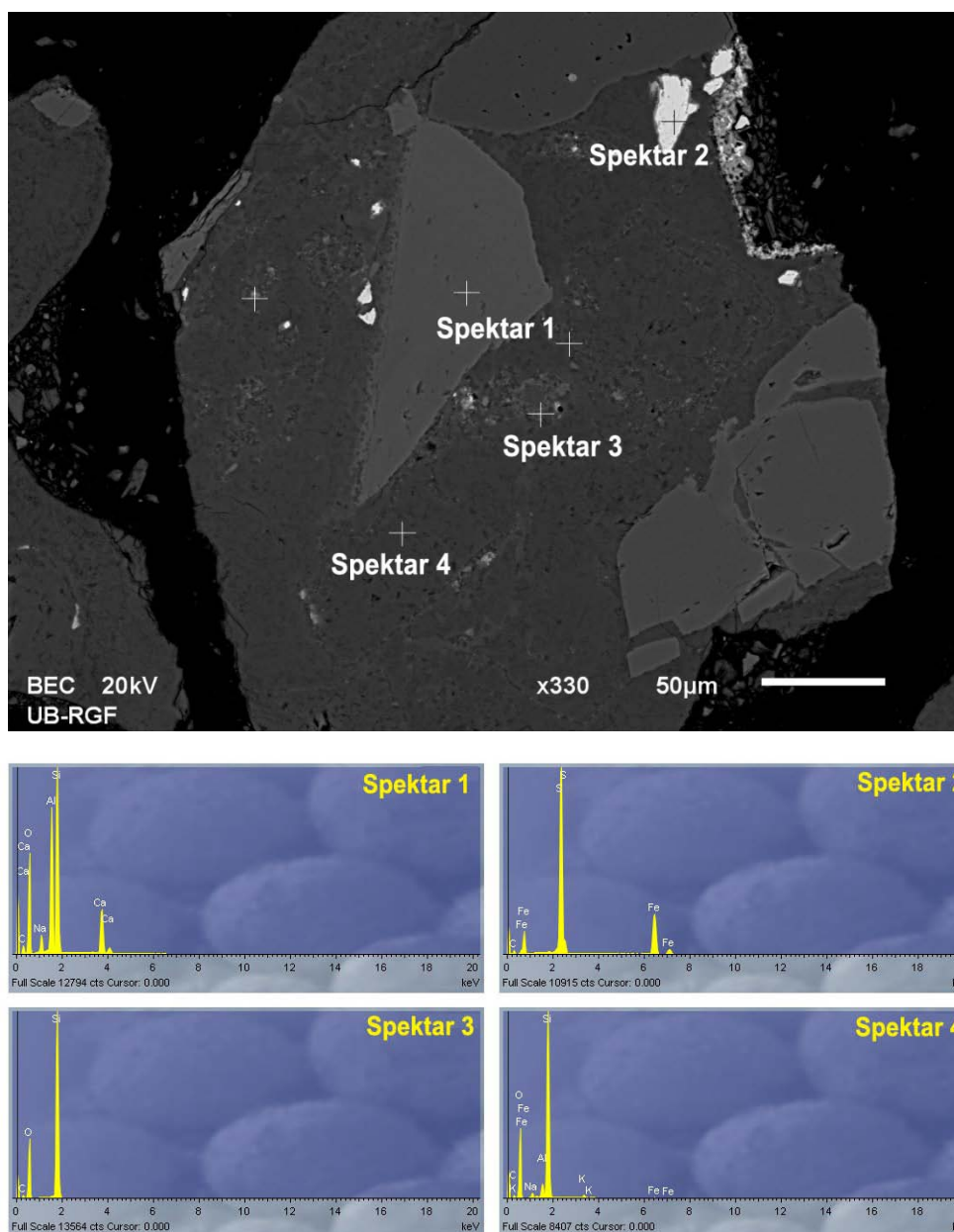
NaCl (%)	Vrijeme (dana)	Preživljavanje (%)	
		Hranjivi medij	Razrijeđeni hranjivi medij
0,0	1	1210,5	153,5
	2	1294,0	108,7
	3	1425,1	102,6
0,4	1	1686,9	100,4
	2	1736,9	51,1
	3	2368,8	20,4
3,5	1	273,3	4,6
	2	253,1	0,1
	3	205,8	0,0
5,0	1	75,3	3,3
	2	84,4	0,0
	3	66,4	0,0
7,0	1	1,4	0,9
	2	1,1	0,0
	3	0,3	0,0
10,0	1	0,2	0,0
	2	0,1	0,0
	3	0,0	0,0
20,0	1	0,2	0,0
	2	0,0	0,0
	3	0,0	0,0
30,0	1	0,0	0,0
	2	0,0	0,0
	3	0,0	0,0

Može se zaključiti da koncentracije soli koje odgovaraju salinitetu morske vode nemaju negativan utjecaj na rast i razmnožavanje bakterije *A. junii*, ukoliko u mediju uzgoja ima nutrijenata u suvišku. Ako je nestašica nutrijenata onda nema umnožavanja bakterije pri koncentraciji NaCl od 0,4% dok je pri 3,5% izraženo propadanje bakterijske biomase. Ovi rezultati su bitni iz biotehnološkog aspekta jer se može zaključiti da slučajno utjecanje morske vode u bioreaktore s aktivnim muljem ne bi trebalo dovesti do odumiranja bakterije *A. junii* i potpunog raspada EBPR sustava.

4.2. Imobilizacija bakterije *A. junii*

4.2.1. Analiza materijala

Prirodni zeolitni tuf je smjesa različitih mineralnih faza, kako se vidi na primjeru SEM-SED analize prirodnog zeolitnog tufa iz Hrvatske (Zhrv).



Slika 16. SEM snimak čestice prirodnog zeolitnog tufa iz Hrvatske (Zhrv). Vide se različite nehomogene faze za koje su napravljene pripadajuće kemijske analize.

Spektar 1 (**Slika 16**) pokazuje snimak minerala atomskog omjera Si i Al 7:5 te veće količine Ca i Na. Iz slike se vidi da je faza homogena te se pretpostavlja da je ovaj mineral plagioklas. Na spektru 2 prisutni su samo Fe i S što uz veliko „blještanje“ na slici ukazuje na pirit. Faza koju prikazuje spektar 3 je silicijev oksid pa se može pretpostaviti da je to kvarc, koji je uz plagioklas najčešće prisutan u zeolitnim tufovima. Spektar 4 pokazuje mineral s visokim atomskim omjerom Si i Al (11:1) što, u skladu s literaturnim podacima (Hrenovic i sur. 2011) ukazuje da je ovo zeolitna klinoptilolitna faza koja je ustvari heterogena faza gdje je klinoptilolit pomiješan s kvarcom. Od ostalih elemenata još je prisutan i Na te je ovo klinoptilolit u Na formi. Iz ovakve slike se također lijepo može vidjeti i način nastanka zeolitnog tufa gdje je vulkanski kamen okružio već prisutni plagioklas, pirit i kvarc te onda kristalizirao u klinoptilolit.

Ukupno, Zhrv sadrži 50-55% klinoptilolita, većinski sastojci su seladonit, plagioklas i opal-CT (10-15% svaki), a analcim i kvarc su prisutni u tragovima (Hrenovic i sur. 2011).

Ztur sadrži oko 70% klinoptilolita, važniji sastojci su opal-CT i kvarc (10-15% svaki), a K-feldspar i tinjci su prisutni u tragovima.

Zsrb sadrži oko 75% klinoptilolita a manjinski sastojci (oko 5% svaki) su kalcit, analcim (također zeolitni mineral), plagioklasni feldspati, tinjci (biotit i seladonit) i kvarc.

Ter je prirodni Ca-bentonit. Sep sadrži 40-50% sepiolita, bitni sastojci su smektit, talk, amfibol, dolomit i kalcit, a manjinski sastojci su od serpentinske grupe minerala. Metodom pročišćavanja Sep kiselinom dobiven je SepP gdje je udio sepiolita bio 50-55%. Veći udio sepiolita dobiven je otapanjem CaCO_3 kojeg je bilo u znatno većoj količini u uzorku Sep kad se usporedi s SepP (**Tablica 12**).

Uzorak SepHrv je čisti sepiolit s naznakama nečistoće u obliku željezom bogatih karbonata. Velika čistoća SepHrv postignuta je uzimanjem uzorka iz monomineralnih žila unutar serpentinskih stijena na iskopu.

Kemijski sastav pojedinih materijala prikazan je u **Tablici 12**.

Tablica 12. Kemijski sastav materijala korištenih kao nosača bakterije *A. junii*. (-) su označeni podatci koji nisu mjereni ili ih proizvođač nije ustupio. * prikazuje podatke koji su identični za Pnex, P600 i Pexp.

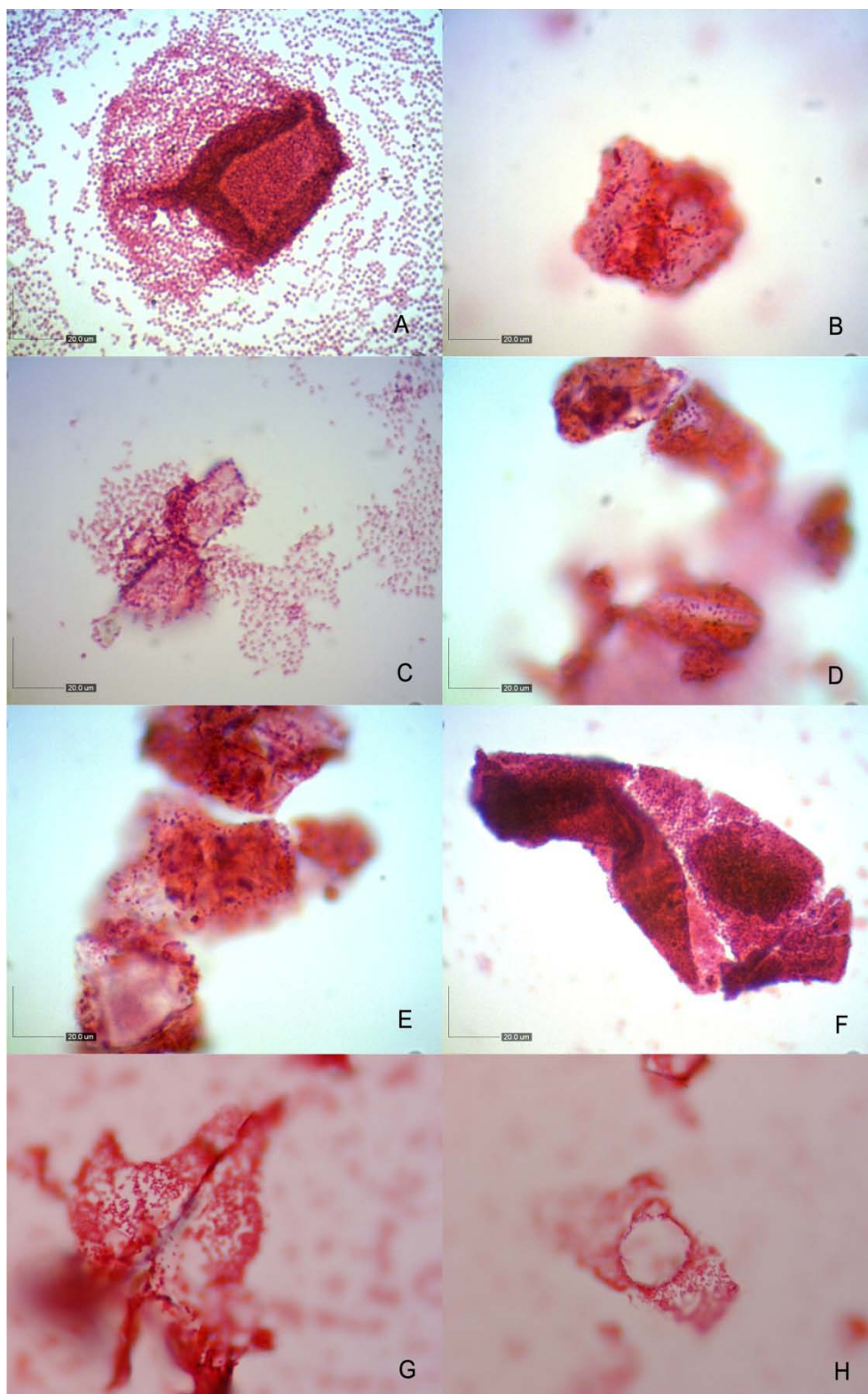
Maseni udio (%)	Ztur	Zsrb	Zhrv	Zsin	Ter	Sep	SepP	Pnex*
SiO ₂	68,5	57,7	83,10	31-34	58,0	33,4	47,5	74,0
Al ₂ O ₃	11,2	13,9	10,01	28-30	18,0	0,9	1,25	13,0
Fe ₂ O ₃	1,2	2,1	0,27	-	5,2	0,2	0,19	0,9
MnO	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1
MgO	0,7	-	0,19	-	3,3	18,9	22,65	0,3
CaO	1,9	6,5	0,60	-	3,7	19,4	9,62	1,1
Na ₂ O	0,3	0,7	3,71	17-19	0,8	0,1	0,13	3,5
K ₂ O	3,9	0,6	2,12	-	1,7	0,2	0,25	3,1
TiO ₂	0,1	-	0,00	-	-	0,1	0,03	0,2
P ₂ O ₅	0,0	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O ⁻	5,5	8,1	-	18-22	-	-	-	-
H ₂ O ⁺	5,6	6,6	-	-	-	-	-	-
Ukupno	99,2	96,2	100,00	-	-	99,7	99,6	98,6

4.2.2. Imobilizacija *A. junii* na nosače

U ovom dijelu doktorskog rada biti će opisani rezultati dobiveni u pokusima gdje je čista kultura *A. junii* imobilizirana na niz alumosilikatnih materijala.

Nakon 24h inkubacije stanice *A. junii* su bile imobilizirane na alumosilikatne materijale (u daljnjem tekstu nosači) u velikom broju. Na mikroskopskim preparatima se lijepo vide bakterije na površini nosača (**Slika 17**).

Stupanj imobilizacije, odnosno afinitet pojedinog materijala za imobilizaciju *A. junii* određen je praćenjem broja imobiliziranih bakterija (**Tablica 13**). Iz dobivenih podataka može se zaključiti da su svi prirodni nosači pogodni za imobilizaciju *A. junii*. Sintetski zeolit je jedini pokazao toksičnost prema čistoj kulturi bakterije *A. junii* i nemogućnost imobilizacije bakterije. Osim na ZSrb, broj bakterija imobiliziranih na nosače nakon 24 h inkubacije bio je veći od 10⁹ CFU g⁻¹ suhog nosača.



Slika 17. Stanice bakterije *A. junii* imobilizirane na čestice prirodnog zeolitnog tufa (a, b, c, d, e, f) i ekspandiranog perlita (g, h) nakon 24 h inkubacije u simuliranoj otpadnoj vodi. Preparati su pregledavani pod svjetlosnim mikroskopom nakon bojanja karbol-fuksinom.

Tablica 13. Kapacitet pojedinih alumosilikatnih materijala za imobilizaciju bakterije *A. junii* praćen putem broja imobiliziranih bakterija (CFU g⁻¹) i ostalih bitnih parametara određenih nakon 24 h inkubacije u simuliranoj otpadnoj vodi. *-označava manje od 10² CFU L⁻¹.

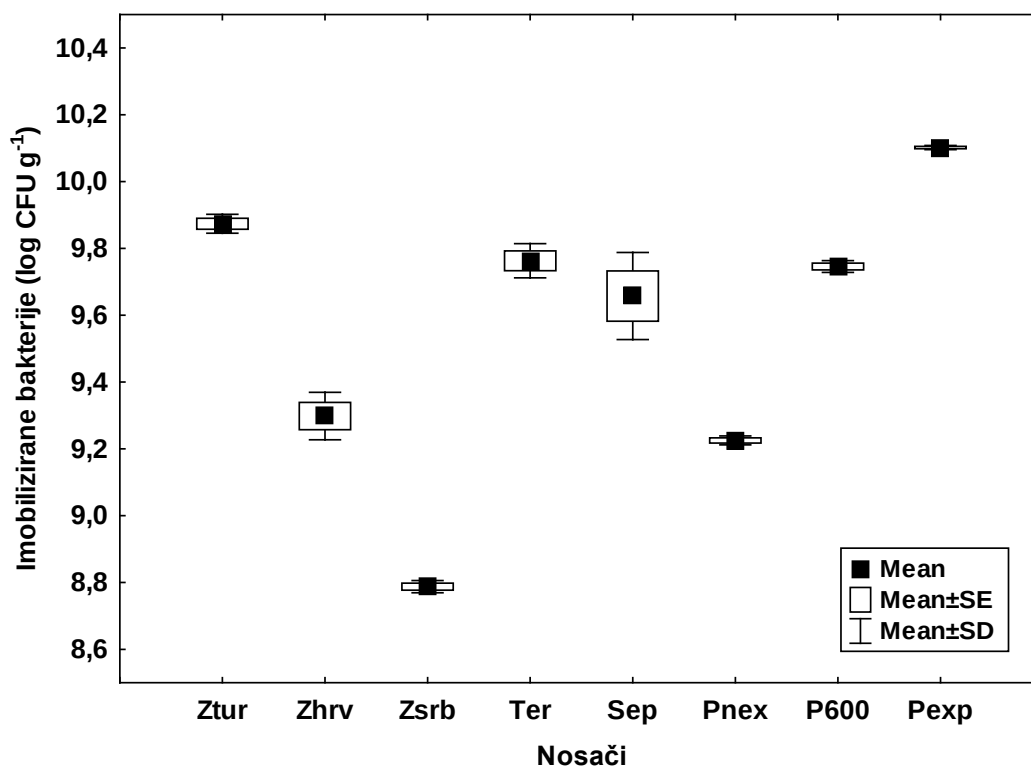
Parametar	ZTur	ZSrb	ZHrv
t ₀ CFU (10 ⁹ CFU L ⁻¹)	10,5±0,5	12,5±0,1	42,1±2,1
t ₀ P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	22,93±0,13	23,75±0,25	21,75±0,25
pH	7,89	7,92	7,69
CFU imobilizirane (10 ⁹ g ⁻¹)	7,49±0,49	0,61±0,03	2,0±0,32
CFU planktonske (10 ⁹ L ⁻¹)	49,95±2,95	148,5±1,5	47,5±0,5
CFU ukupne (10 ⁹ L ⁻¹)	124,86±1,94	154,64±1,75	67,55±2,74
Stopa uzimanja P (10 ⁻¹¹ mgP CFU ⁻¹)	8,45±0,13	6,18±0,03	1,28±0,05
CFU 24h/CFU početni	11,91±0,38	12,37±0,04	1,61±0,01
Uklanjanje P (%)	46,3±0,55	40,2±0,2	39,6±0,45

Parametar	Zsin	Ter	Sep
t ₀ CFU (10 ⁹ CFU L ⁻¹)	21,86±5,11	10,85±0,15	16,0±1,0
t ₀ P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	19,99±0,96	24,2±0,3	20,2±0,3
pH	8,20	7,98	7,82
CFU imobilizirane (10 ⁹ g ⁻¹)	0*	5,82±0,68	3,99±1,3
CFU planktonske (10 ⁹ L ⁻¹)	0*	80,95±2,95	33,83±7,36
CFU ukupne (10 ⁹ L ⁻¹)	0*	139,18±3,89	73,81±16,49
Stopa uzimanja P (10 ⁻¹¹ mgP CFU ⁻¹)	0	8,16±0,3	8,16±2,06
CFU 24h/CFU početni	0	12,83±0,18	2,21±0,4
Uklanjanje P (%)	0	46,9±0,37	27,3±1,39

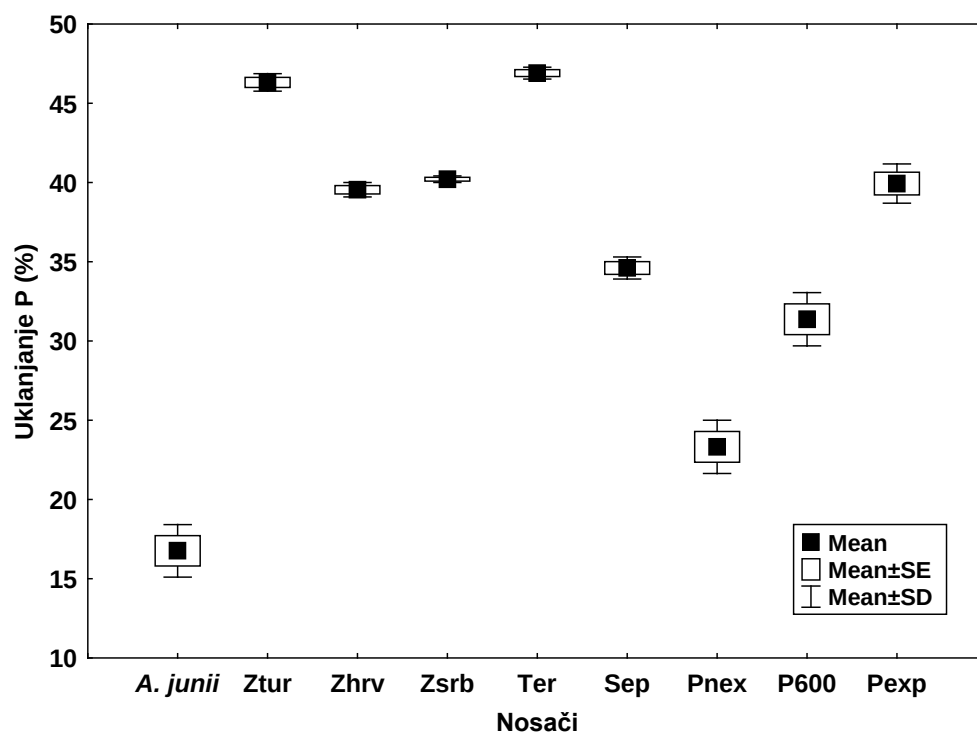
Parametar	Pnexp	P600	Pexp
t ₀ CFU (10 ⁹ CFU L ⁻¹)	59,50±0,15	23,4±0,5	50,5±1,5
t ₀ P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	23,55±0,45	48,0±2,0	23,4±0,4
pH	7,64	7,80	7,48
CFU imobilizirane (10 ⁹ g ⁻¹)	1,68±0,05	5,57±0,23	12,65±0,18
CFU planktonske (10 ⁹ L ⁻¹)	107,0±7,0	127,0±19,5	140,0±30,0
CFU ukupne (10 ⁹ L ⁻¹)	109,0±7,1	132,0±19,7	153,0±30,2
Stopa uzimanja P (10 ⁻¹¹ mgP CFU ⁻¹)	5,05±0,13	5,63±0,42	6,31±0,95
CFU 24h/CFU početni	1,82±0,07	2,74±0,3	3,01±0,5
Uklanjanje P (%)	23,3±1,68	31,4±1,68	39,9±1,24

Na **Slici 18** prikazan je broj imobiliziranih bakterija na pojedine nosače nakon 24h inkubacije u sintetskoj otpadnoj vodi. Na **Slici 19** prikazan je % uklonjenog P u reaktorima s dodatkom nosača nakon 24 h inkubacije u sintetskoj otpadnoj vodi, u usporedbi s kontrolnim reaktorom (čista kultura *A. junii*). Količina uklonjenog P bila je

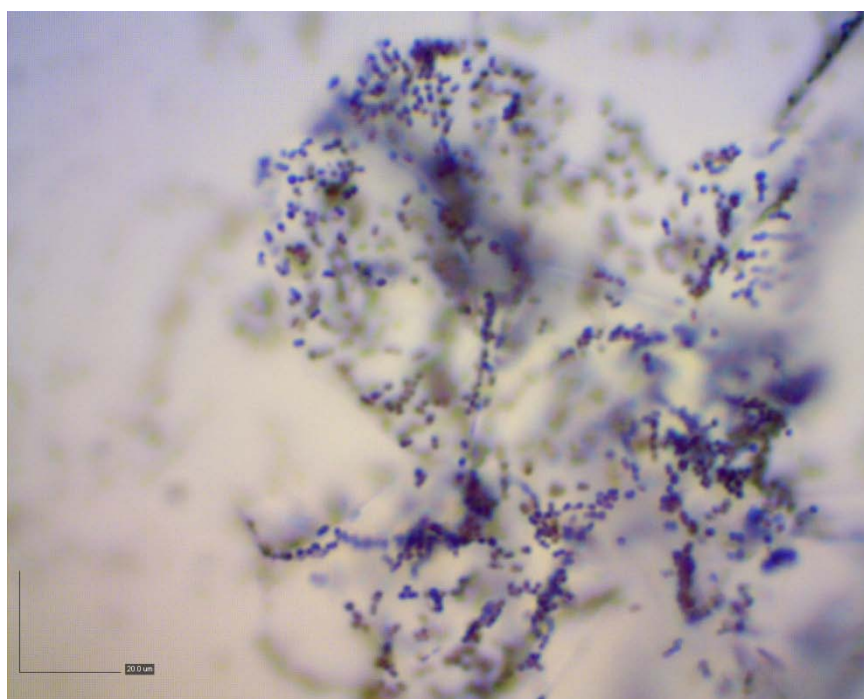
u svim reaktorima značajno veća nego u kontrolnom reaktoru zbog povećanog broja bakterija uslijed dodatka nosača. Da imobilizirane bakterije uklanjaju P pokazano je i pregledom mikroskopskih preparata gdje se vide zrnca poliP unutar stanica *A. junii* vezanih na nosače (Slika 20).



Slika 18. Broj bakterija *A. junii* imobiliziranih na pojedine nosače nakon 24 h inkubacije u sintetskoj otpadnoj vodi. Veličina čestica: Ztur, Zhrv, Zsrb 0,125-0,25 mm; Ter <0,125 mm; Sep 0,044-0,149 mm; Pnex, P600, Pexp 0,122-0,263 mm.



Slika 19. Uklanjanje P u reaktorima s dodatkom nosača nakon 24 h inkubacije u sintetskoj otpadnoj vodi, u usporedbi s kontrolnim reaktorom (čista kultura *A. junii*).



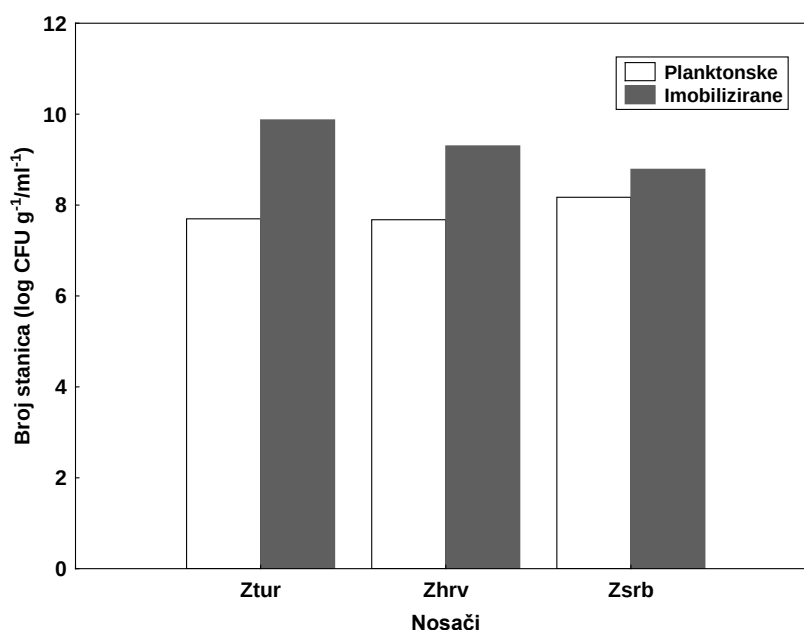
Slika 20. Zrnca poli-P unutar stanica bakterije *A. junii* imobiliziranih na Pexp nakon 24 h inkubacije.

4.2.3. Imobilizacija *A. junii* na prirodni zeolitni tuf

Pretpostavljeno je da su prirodni zeolitni tufovi zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava idealni nosači bakterije *A. junii*. U radu su ispitivane tri vrste zeolitnih tufova: Ztur, Zhrv i Zsrb. Nakon 24h inkubacije Ztur je imao najveći broj imobiliziranih stanica ($7,49 \pm 0,49 \times 10^9$ CFU g⁻¹), Zhrv je imao nešto manji broj ($2,0 \pm 0,32 \times 10^9$ CFU g⁻¹) dok je broj stanica imobiliziranih na Zsrb bio za jedan red veličine manji ($6,1 \pm 0,3 \times 10^8$ CFU g⁻¹).

U tri korištena zeolitna nosača maseni udio klinoptilolita bio je, redom, 70%, 50-55% i 75% za Ztur, Zhrv i Zsrb. Uzimajući u obzir broj bakterija imobiliziran na pojedine nosače, možemo reći da se ne zapaža nikakva povezanost među imobilizacijom bakterija i udjelom klinoptilolita u nosaču.

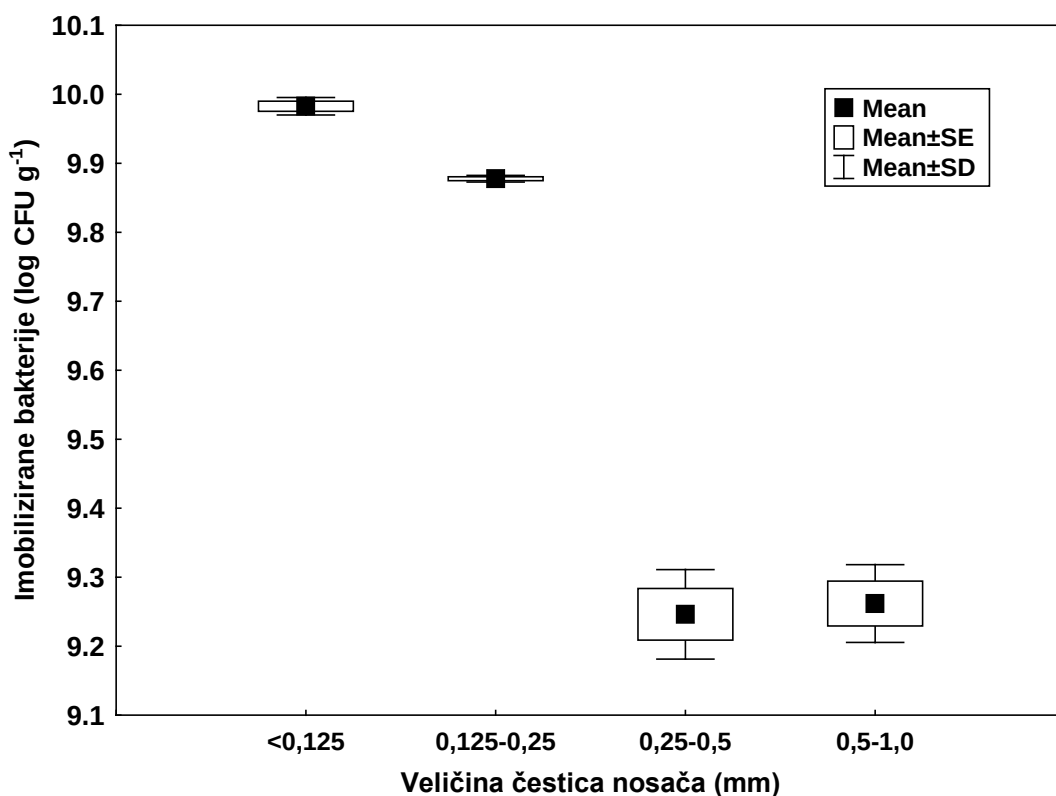
Još jedan podatak koji govori o pogodnosti nosača za imobilizaciju bakterija je omjer broja planktonskih i imobiliziranih bakterija, koji je bio najmanji za Zsrb (10,33) a znatno veći za Ztur (151,08) i Zhrv (42,29). Prema mehanizmu adsorptivnog rasta biofilma (Nicola i Lazazzera, 2004), na početku inkubacije bakterije se adsorbiraju na površinu nosača i onda nastavljaju svoj rast unutar biofilma. Što je nosač pogodniji to će više bakterija biti inicijalno vezano na njegovu površinu. Veći broj vezanih bakterija znači početni manji broj planktonskih bakterija što se na kraju inkubacije vidi kao razlika u broju imobiliziranih i planktonskih stanica (**Slika 21**).



Slika 21. Broj planktonskih i imobiliziranih stanica u reaktorima s *A. junii* i dodatkom zeolitnih nosača nakon 24 h inkubacije.

4.2.3.1. Imobilizacija *A. junii* na prirodni zeolitni tuf različite veličine čestica

Kako se pokazalo da je Ztur najpogodniji od zeolitnih nosača daljnji pokusi su rađeni s tim materijalom. Prvo se htjelo odrediti kako veličina čestica utječe na imobilizaciju bakterija. Nakon 24 h inkubacije najveći broj imobiliziranih bakterija bio je na nosaču najmanje veličine čestica, a broj bakterija je opadao s veličinom čestica nosača (**Slika 22**). No, na svim veličinskim frakcijama taj broj je bio veći od 10^9 CFU g⁻¹. Može se reći da je zeolitni tuf bilo koje veličine čestica zadovoljavajući nosač bakterija što je bitno iz biotehnološkog pogleda jer se onda kao nosač može koristiti onaj koji je u tehnološkom smislu najpogodniji za određeni bioreaktor. U laboratorijskim pokusima najboljom se pokazala frakcija čestica 0,125 – 0,25 mm gdje su čestice dovoljno lagane da miješanjem lebde u otpadnoj vodi, a dovoljno su teške da se brzo slegnu i ne zamućuju vodu.



Slika 22. Broj imobiliziranih bakterija na Ztur različitim veličinskim frakcijama nakon 24 h inkubacije.

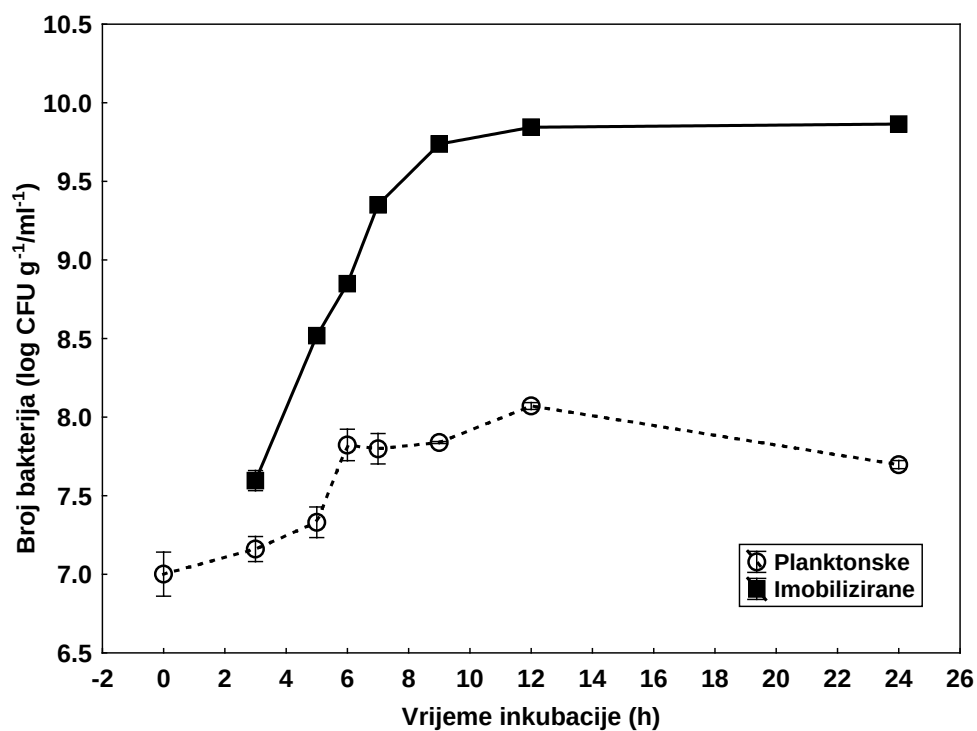
Broj bakterija je korelirao značajno negativno s veličinom čestica ($R = -0,798$). Možemo zaključiti da je broj bakterija imobiliziranih na nosač veći što je manja veličina

čestica te da je veličina čestica nosača jedno od bitnih svojstava koje određuje kapacitet materijala za imobilizaciju.

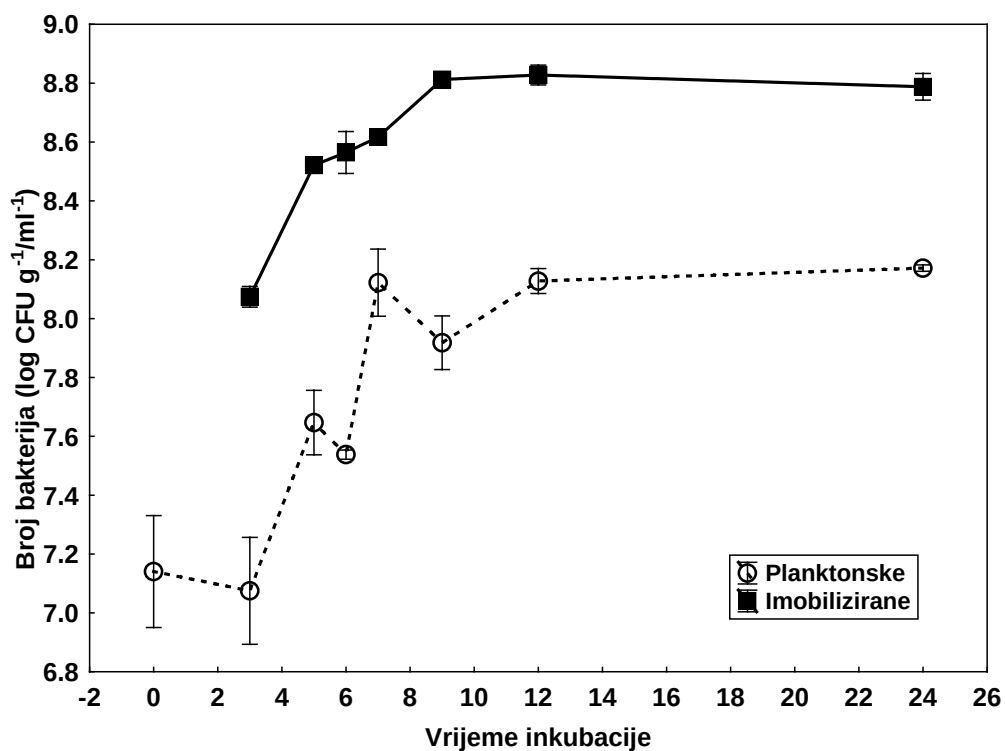
4.2.4. Ovisnost imobilizacije *A. junii* o vremenu inkubacije

U ovom pokusu praćena je dinamika imobilizacije bakterije *A. junii* na nosače kroz vremenski period. Broj imobiliziranih bakterija zajedno s ostalim bitnim pokazateljima određivani su nakon 3, 5, 6, 7, 9, 12 i 24 h inkubacije u simuliranoj otpadnoj vodi. U ovom pokusu kao nosači su korišteni Ztur, Zsrb i Ter.

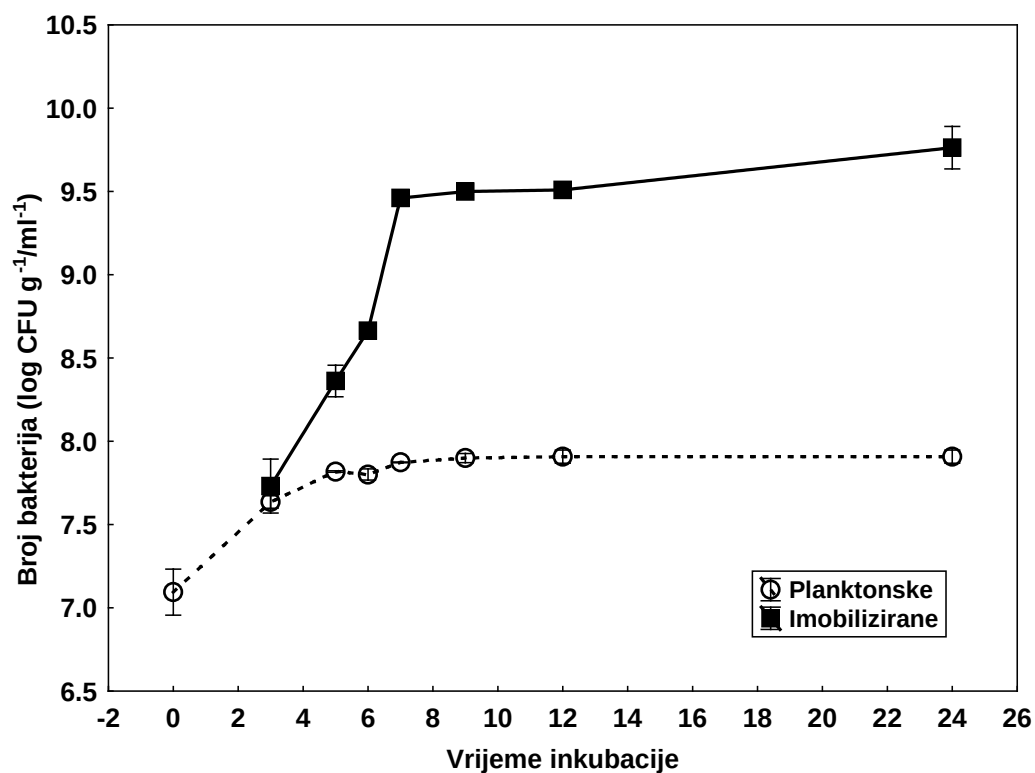
Broj imobiliziranih bakterija rastao je puno brže nego broj planktonskih bakterija (**Slike 23, 24 i 25**). Ovakva dinamika rasta potvrđuje pretpostavku da se biofilm formira umnožavanjem stanica koje su se adsorbirale na nosače odmah na početku inkubacije, a ne prihvatanjem planktonskih stanica iz okolnog medija. Nakon kraće faze prilagodbe (lag faze) u trajanju 3-5 h broj bakterija je intenzivno rastao do 12 h inkubacije. Nakon 12 h nije bilo intenzivnijeg umnožavanja biomase niti imobiliziranih (osim u reaktorima s Ter) niti planktonskih bakterija što se vidi po broju bakterija koji je bio ili isti ili manji nakon 24 h u odnosu na 12 h nakon početka inkubacije (**Slike 23, 24 i 25**). Po rezultatima se zaključuje da je 12 h inkubacije vrijeme dovoljno za završetak faze intenzivnog rasta bakterija (log faze) i formaciju stabilnog biofilma bakterije *A. junii* na alumosilikatne materijale korištene u pokusu. U reaktorima s Ter došlo je do porasta imobiliziranih bakterija i nakon 12 h inkubacije zbog prirode samog materijala. Ter je mineral koji spada u skupine glina te u vodenoj otopini dolazi do karakterističnog „listanja“ tj. dezintegracije čestica minerala. Kako je dolazilo do „bubrenja“ Ter tako su s vremenom postajale dostupne nove površine dostupne za imobilizaciju bakterija, što nije bio slučaj sa zeolitnim materijalima.



Slika 23. Dinamika rasta biofilma na Ztur praćena putem broja imobiliziranih i planktonskih bakterija *A. junii* u reaktorima tijekom 24 h inkubacije.

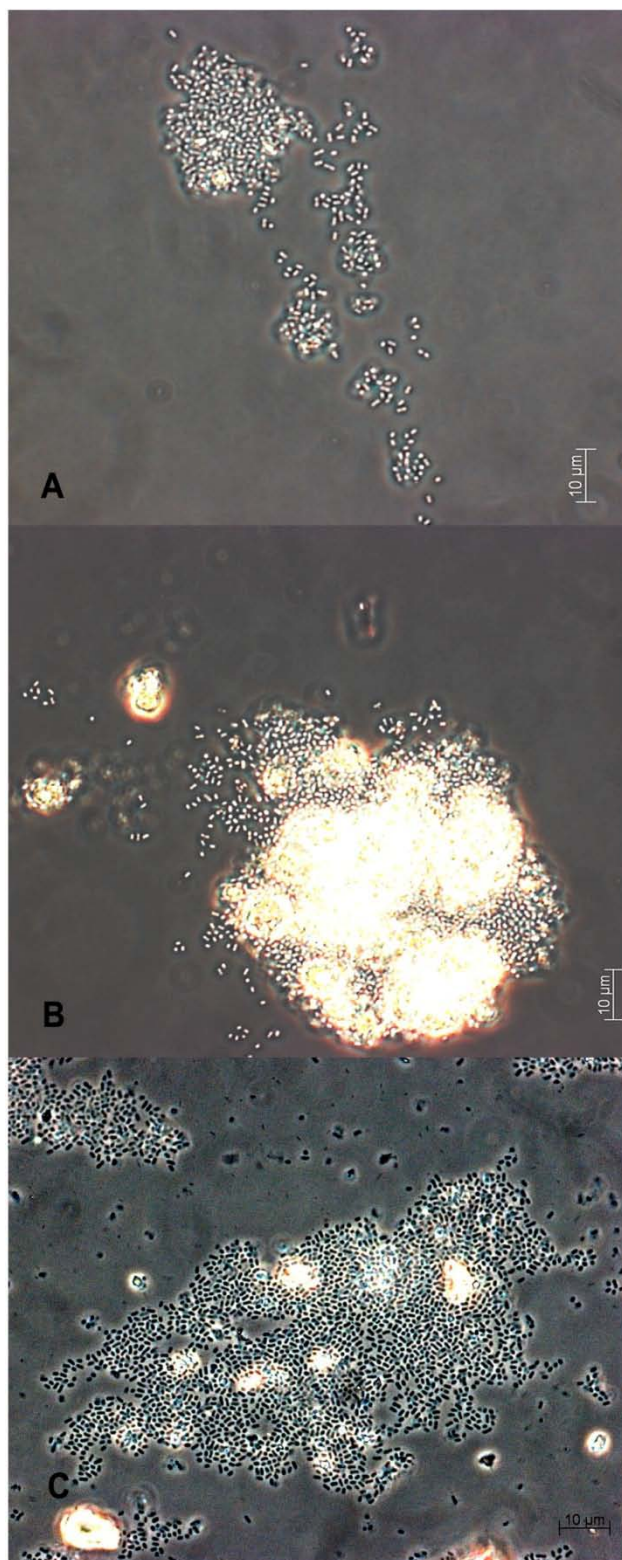


Slika 24. Dinamika rasta biofilma na Zsrb praćena putem broja imobiliziranih i planktonskih bakterija *A. junii* u reaktorima tijekom 24 h inkubacije.



Slika 25. Dinamika rasta biofilma na Ter praćena putem broja imobiliziranih i planktonskih bakterija *A. junii* u reaktorima tijekom 24 h inkubacije.

Različiti mehanizmi imobilizacije na Ter i zeolite (Ztur i Zsrb) se lijepo vide na mikroskopskim preparatima. Nakon 24 h inkubacije bio je prisutan debeli biofilm na površini Ztur i Zsrb, dok je kod Ter došlo do umrežavanja biofilma s koloidnim česticama minerala (**Slika 26**).



Slika 26. Stanice bakterije *A. junii* imobilizirane na; a) Ztur, b) Zsrb, c) Ter, nakon 24 h inkubacije.

U istom pokusu su testirani i nosači izmijenjeni Mg. Naime originalni nosači (Ztur, Zsrb i Ter) su obogaćeni Mg putem ionske izmijene i dobiveni su materijali s većim udjelom Mg na površini.

Nakon 24 h inkubacije broj imobiliziranih bakterija bio je znatno veći na svim nosačima izmijenjenim Mg kada se uspoređi s originalnim nosačima (**Tablica 14**). Najveći broj bakterija među nosačima izmijenjenim Mg bio je na ZturMg, nakon kojeg slijede TerMg i ZsrbMg. Sukladno većem broju bakterija, u reaktorima s izmijenjenim materijalima bilo je i bolje uklanjanje P (**Tablica 14**). Izmjena Mg nije utjecala na stope uzimanja P te u nijednom reaktoru nije došlo do povećanja stope po bakterijskoj stanici ako su korišteni izmijenjeni, a ne originalni nosači. Izmijenjeni nosači su pokazali pozitivan utjecaj samo na povećanje bakterijske biomase.

Tablica 14. Usporedba rasta i metabolizma *A. junii* u reaktorima s dodatkom originalnih nosača i nosača izmijenjenih Mg nakon 24 h inkubacije. * Zeta potencijal nosača mjeren je prije početka pokusa.

	Ztur	ZturMg	Zsrb
t_0 CFU (10^9 CFU L ⁻¹)	10,5±0,5	12,75±0,25	12,5±0,1
t_0 P (mg L ⁻¹)	22,93±0,13	23,65±0,15	23,75±0,25
pH	7,89	7,25	7,92
CFU imobilizirane (10^9 g ⁻¹)	7,49±0,49	9,52±0,61	0,61±0,03
CFU planktonske (10^9 L ⁻¹)	49,95±2,95	86,50±0,5	148,5±1,5
CFU ukupne (10^9 L ⁻¹)	124,86±1,94	181,72±5,65	154,64±1,75
Stopa uzimanja P (10^{-11} mgP CFU ⁻¹)	8,45±0,13	6,77±0,15	6,18±0,03
CFU 24h/CFU početni	11,91±0,38	14,12±0,57	12,37±0,04
Uklanjanje P (%)	46,3±0,55	51,9±0,11	40,2±0,2
Zeta potencijal (mV)*	- 23,12±0,57	-21,18±0,0	-17,60±2,52

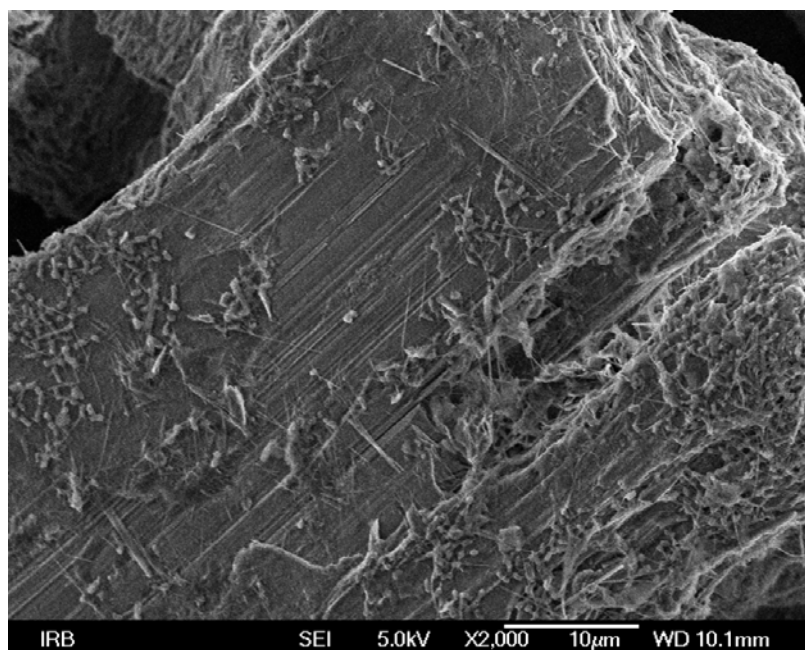
	ZsrbMg	Ter	TerMg
t_0 CFU (10^9 CFU L ⁻¹)	16,15±0,35	10,85±0,15	10,75±0,95
t_0 P (mg L ⁻¹)	22,85±0,05	24,2±0,3	23,65±0,25
pH	7,71	7,98	7,90
CFU imobilizirane (10^9 g ⁻¹)	1,87±0,05	5,82±0,68	7,40±0,29
CFU planktonske (10^9 L ⁻¹)	193±15,0	80,95±2,95	84,0±4,0
CFU ukupne (10^9 L ⁻¹)	211,50±15,25	139,18±3,89	157,91±1,10
Stopa uzimanja P (10^{-11} mgP CFU ⁻¹)	5,91±0,71	8,16±0,3	7,87±0,3
CFU 24h/CFU početni	13,08±0,66	12,83±0,18	14,80±1,21
Uklanjanje P (%)	54,3±2,5	46,9±0,37	52,5±1,86
Zeta potencijal (mV)*	-14,76±1,70	-15,38±1,32	-11,92±2,56

Određivanjem naboja površine nosača i bakterijskih stanica putem zeta potencijala ispitan je utjecaj elektrostatskih sila na imobilizaciju bakterije *A. junii* na ispitane alumosilikatne materijale. Zeta potencijal bakterije *A. junii* bio je -18,4 mV u logaritamskoj fazi i -21,3 mV u stacionarnoj fazi rasta. Površine svih nosača su bile negativno nabijene (**Tablica 14**). Zeta potencijal nosača izmijenjenih Mg bio je značajno pozitivniji od potencijala originalnih nosača. U usporedbi svih ispitivanih nosača zajedno smanjenje elektronegativnosti negativno je koreliralo s brojem bakterijskih stanica ($R = -0,334$; $p = 0,52$). Na primjer zeta potencijal Zsrb bio je značajno pozitivniji od Ter, a broj bakterija imobiliziranih na površinu je bio deseterostruko manji. Iako bi zeta potencijal mogao imati utjecaj na imobilizaciju bakterija, čini se da nije primarni čimbenik nego da je osnovni čimbenik koji određuje imobilizaciju bakterija vrsta materijala.

4.2.5. Imobilizacija *A. junii* na bentonit i sepiolit

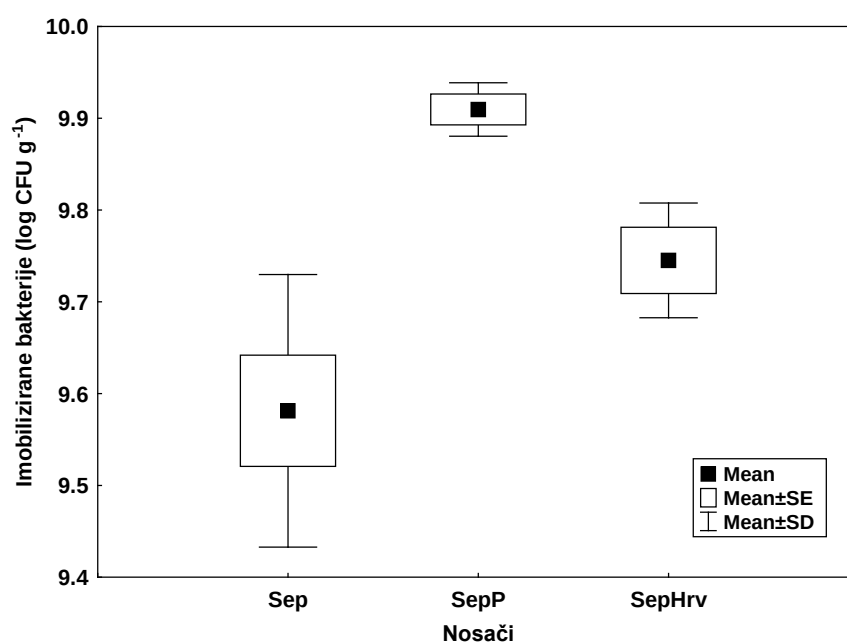
Bentonit i sepiolit su materijali koji spadaju u skupine glina. Gline imaju specifična svojstva „listanja“ materijala te je bilo potrebno istražiti kako minerali iz ove skupine podržavaju imobilizaciju bakterija. Pretvaranjem u koloide smanjuje se prvotna veličina čestica što pogoduje imobilizaciji. Sep je po svom sastavu magnezijev-silikat te je kao potencijalni nosač uzet u razmatranje budući da se pokazalo kako minerali izmijenjeni Mg pogoduju rastu i metabolizmu *A. junii*. Pokusima u kojima je korišten Sep htjelo se utvrditi pogoduju li nosači s prirodno većom koncentracijom Mg samom procesu imobilizacije bakterije.

Nakon 24 h *A. junii* je bila imobilizirana na čestice bentonita i sepiolita u velikom broju. Broj bakterija imobiliziranih na Ter bio je značajno veći od broja bakterija imobiliziranih na Sep (**Tablica 13**). Sukladno značajno većem broju bakterija u reaktorima s ter bilo je i značajno veće uklanjanje P (**Tablica 13**). U reaktorima s Ter bila je veća količina bakterija nego u reaktorima sa Sep zbog svojstva Ter da s vremenom u vodi dolazi do stvaranja koloida i „listanja“ materijala što povećava površinu dostupnu za imobilizaciju bakterija. Sep ima specifičnu kristalnu građu u obliku iglica (**Slika 27**), te ne dolazi do stvaranja koloida i bubrenja u vodi. Iz rezultata se može zaključiti da kemijski sastav i količina Mg u mineralu nemaju značajniji utjecaj na proces imobilizacije i metabolizam bakterije *A. junii*.



Slika 27. Čestica sepiolita s imobiliziranim bakterijama *A. junii*.

Kad se usporede uzorci koji su imali različit udio sepiolita u mineralnom sastavu (40-50% Sep, 50-55% SepP, >99% SepHrv), značajno veći broj bakterija nakon 24 h inkubacije u simuliranoj otpadnoj vodi bio je na SepP (**Slika 28**) nego na ostala dva uzorka. Broj imobiliziranih bakterija na Sep i SepHrv nije se značajno razlikovao.



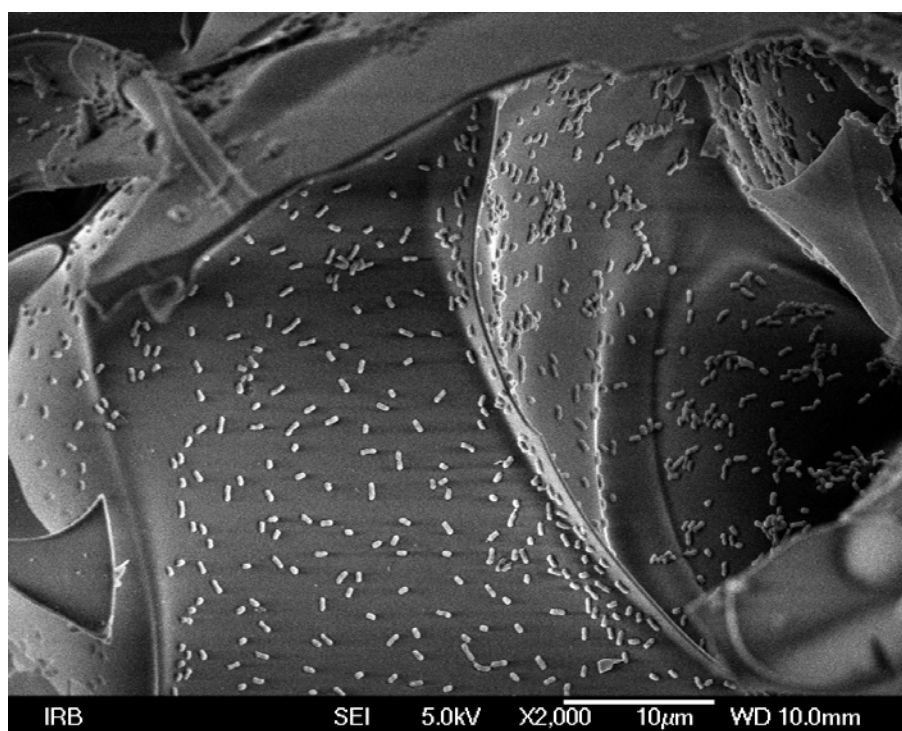
Slika 28. Broj bakterija *A. junii* imobiliziranih na različite uzorke sepiolita nakon 24 h inkubacije u simuliranoj otpadnoj vodi.

U pokusima je došlo do porasta pH u reaktorima tijekom inkubacije zbog metabolizma bakterija. Krajnji pH je bio unutar raspona (6-9) koji ne pokazuje štetan utjecaj na bakteriju.

4.2.6. Imobilizacija *A. junii* na perlit

Perlit je testiran u pokusima u tri forme koje su različite po stupnju ekspanzije. Ovakav pokus daje vrlo lijep uvid u utjecaj samog oblika čestice nosača na imobilizaciju bakterija budući da su materijali jednaki po svom kemijskom sastavu, a razlikuju se samo po obliku odnosno površini.

Najveći broj imobiliziranih bakterija bio je na Pexp (Tablica 13, Slika 29) nakon čega su slijedili P600 i Pnexp.

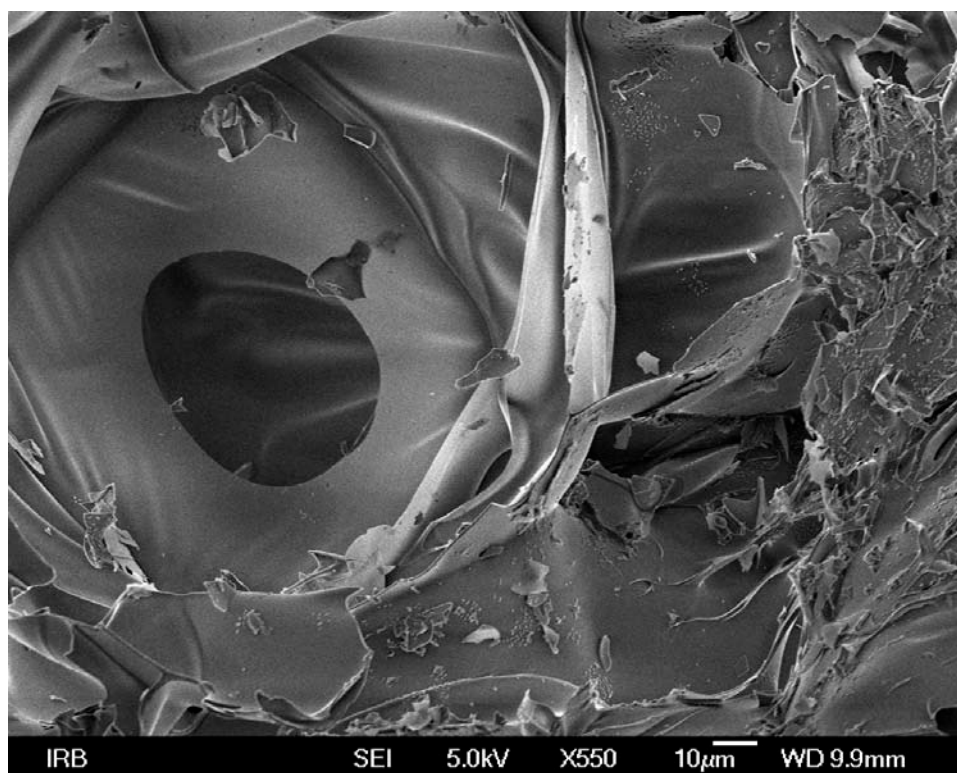


Slika 29. Stanice *A. junii* imobilizirane na površini Pexp.

Očito je da stupanj ekspanzije perlita, odnosno oblik čestice nosača, ima velik utjecaj na stupanj imobilizacije. Veličina čestica sva tri nosača bila je ista (~0,1-310 µm) budući da su prije pokusa bili samljeveni i prosijani kroz isto sito. Pexp ima najmanju relativnu gustoću od tri navedena materijala te po gramu materijala nudi najveću površinu za imobilizaciju. To potvrđuju i mjerenja specifične površine

materijala (SSA) gdje je najveću površinu imao Pexp ($1,70 \pm 0,02 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) dok su Pnexp i P600 imali gotove jednake površine ($0,77 \pm 0,01$ i $0,76 \pm 0,01 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Broj bakterija korelirao je značajno pozitivno ($R=0,801$) sa SSA.

Pregledom klasičnih mikroskopskih preparata i onih dobivenih elektronskom mikroskopijom utvrdilo se da bakterije nisu imobilizirane u makropore Pexp (**Slika 30**).



Slika 30. Bakterije *A. junii* imobilizirane na površini, ali ne i u makroporama Pexp.

Perlitni nosači bili su negativno nabijeni jednako kao i bakterija, a vrijednost zeta potencijala ($-3,8 \pm 1,6$; $-6,5 \pm 1,9$; $-11,9 \pm 2,5$ za Pnexp, P600 i Pexp) korelirala je značajno negativno s brojem imobiliziranih stanica. Rezultati potvrđuju tvrdnju da naboj, odnosno zeta potencijal materijala nije bitan čimbenik za imobilizaciju bakterija na nosače.

Stope uzimanja P nisu se razlikovale među pojedinim reaktorima (**Tablica 13**) dok je količina konačno uklonjenog P bila najveća u reaktorima s Pexp ($39,94 \pm 1,24\%$), a nešto manje s P600 ($31,37 \pm 1,68\%$) i Pnexp ($23,32 \pm 1,68\%$). Rezultati potvrđuju

tvrdnju da uklanjanje P iz otpadne vode ovisi o povećanju broja bakterija u reaktoru, a ne o poboljšanju samog metabolizma akumulacije P bakterije.

U pokusu su osim navedenih nosača testirani i komercijalno dobavljeni Pexp, i to u dvije veličinske frakcije (0,1-1,0 i 0,1-2,0 mm). Htjelo se istražiti koliko su dobri nosači bakterija materijali kakvi se mogu kupiti u slobodnoj prodaji, bez prethodnog mljevenja, prosijavanja i bilo kakve druge obrade. Obje vrste perlita su se pokazale kao zadovoljavajući nosači bakterija s velikim brojem imobiliziranih stanica (**Tablica 15**). Kao i u prethodnim pokusima (4.2.3.1.) veći broj imobiliziranih bakterija bio je na česticama manje veličinske frakcije (**Tablica 15**) što potvrđuje da je veličina čestica bitno svojstvo koje određuje imobilizaciju bakterija na nosače.

Vrijednost pH u svim pokusima bila je u rasponu koji nema negativan utjecaj na rast i razmnožavanje čiste kulture bakterije *A. junii*.

Tablica 15. Kapacitet imobilizacije dviju veličinskih frakcija komercijalno dobavljenog Pexp određen nakon 24h inkubacije. t_0 CFU= $27,7 \pm 2,0 \times 10^9$ L⁻¹. t_0 P= $23,37 \pm 0,2$ mg L⁻¹.

Parametar	Pexp	
	0,1-1,0 mm	0,1-2,0 mm
pH	7,33±0,02	6,95±0,02
Imobilizirane (10 ⁹ CFU g ⁻¹)	2,74±0,25	1,49±0,18
Planktonske (10 ⁹ CFU L ⁻¹)	148,0±35,0	149,0±51,0
Ukupne (10 ⁹ CFU L ⁻¹)	175,0±22,9	165,0±38,0
Stopa uzimanja P (10 ⁻¹¹ mgP CFU ⁻¹)	6,56±0,47	5,89±1,13
CFU 24h/CFU početni	6,30±0,27	5,91±0,77
Uklanjanje P (%)	49,2±2,55	41,6±2,37

4.2.7. Imobilizacija *A. junii* na sintetski zeolit A

Pokus s uzorkom Zsin je napravljen kao i sa svim ostalim materijalima. No, nakon inkubacije došlo je do gotovo potpunog odumiranja *A. junii* u reaktorima u odnosu na početni broj. Zato je određena toksičnost Zsin prema bakteriji *A. junii*. Pokus je proveden tako da je u simuliranu otpadnu vodu dodavan Zsin u koncentracijama od 0,1-2,0 g L⁻¹. Uvjeti inkubacije su opisani u poglavlju 3.4.

Zsin se pokazao toksičnim prema *A. junii*. Toksičnost je rasla s dodatkom većih koncentracija Zsin, vidljivo po većem postotku inhibicije rasta bakterija (**Tablica 16**) u usporedbi s kontrolom gdje nije dodavan Zsin. Sukladno smanjenju broja bakterija smanjeno je bilo i uklanjanje P iz otpadne vode. U reaktorima s 1 g L⁻¹ Zsin i dalje je

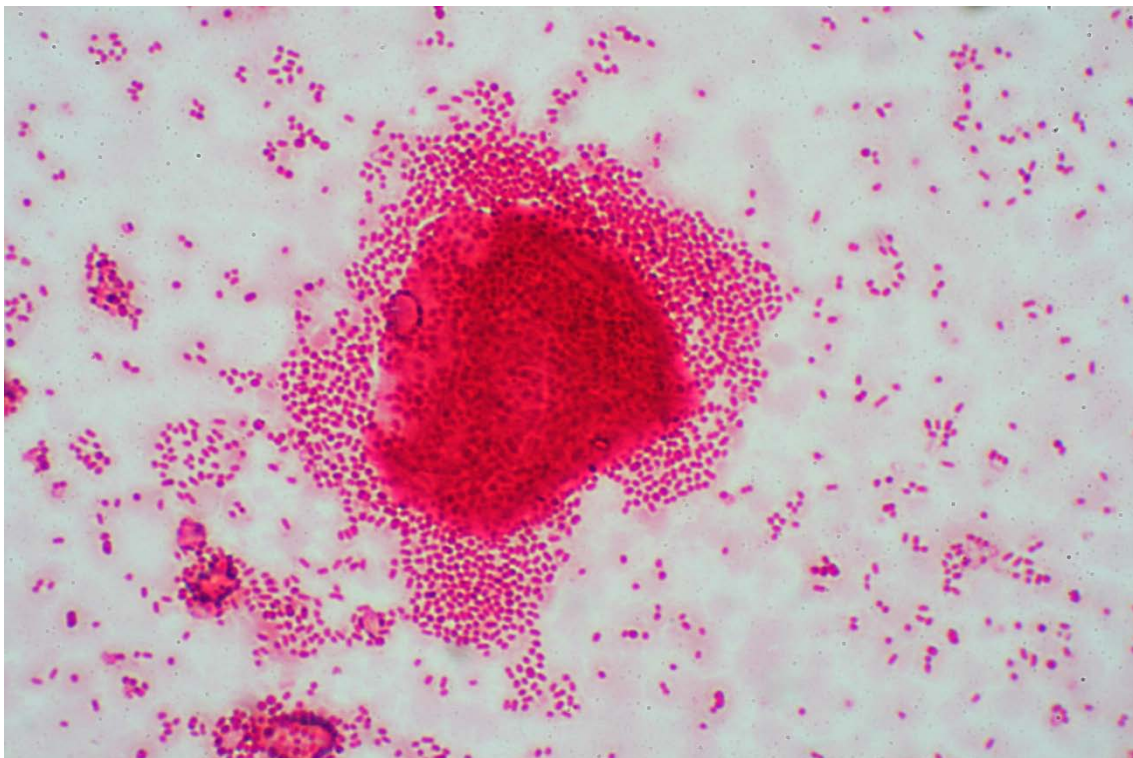
bio umjereno velik broj bakterija, no uklanjanje P je zanemarivo. Mogući razlog je vezanje iona Mg i K na Zsin što je i primarna funkcija ovog materijala u industriji deterdženata. Kako se već pokazalo Mg i K su neophodni za učinkovit metabolizam P-akumulirajućih bakterija pa je nedostatak iona u vodi mogući razlog za značajno lošije uklanjanje P.

Tablica 16. Toksičnost Zsin prema bakteriji *A. junii*. * Inhibicija rasta bakterija izračunata je kao smanjenje logaritma broja bakterija u odnosu na kontrolni reaktor bez dodatka Zsin. t_0 P = $20,02 \pm 0,44$ mg L⁻¹; t_0 CFU = $9,52 \pm 3,37 \times 10^9$ L⁻¹.

Koncentracija Zsin (g L ⁻¹)	Konačni pH	Uklonjeno P (%)	Ukupne bakterije (CFU L ⁻¹)	* Inhibicija (%)
0 (Kontrola)	7,70	51,7±1,54	1,84±0,43×10 ¹¹	0
0,1	7,77	45,1±4,48	1,62±0,34×10 ¹¹	0,5
0,2	7,84	39,4±2,67	1,12±0,23×10 ¹¹	1,9
0,5	7,88	25,3±5,90	6,63±2,5×10 ¹⁰	3,9
1,0	7,95	6,9±0,48	2,67±1,16×10 ⁸	25,2
1,5	7,99	5,0±0,5	6,73±1,42×10 ⁷	30,5
2,0	8,09	1,0±0,52	6,0±1,84×10 ⁶	39,8

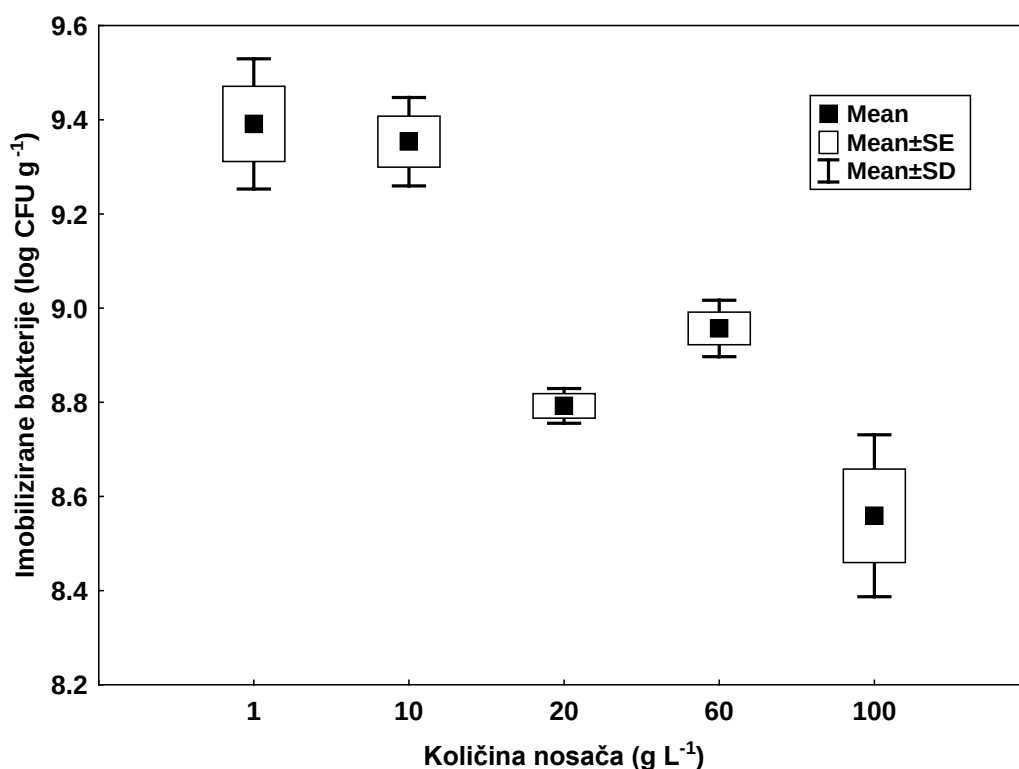
4.3. Pokusi s biočesticama

Biočesticama su nazvane čestice materijala koje na sebi imaju već uspostavljen biofilm (**Slika 31**). Pretpostavljeno je da bi u obradi otpadnih voda najpogodnije bilo dodavati u vodu već priređene biočestice koje na sebi imaju imobilizirane bakterije. Takve bakterije bi već pri dolasku u kontakt s vodom bile zaštićene unutar biofilma od nepovoljnih vanjskih utjecaja. Biofilm može sadržavati samo određenu željenu vrstu bakterije, što bi bilo teško provedivo ako se u bioreaktore s otpadnom vodom dodaje zasebno materijal i kultura bakterije jer onda na nosače dolazi i do imobilizacije prirodno prisutnih bakterija.



Slika 31. Biočestica – čestica nosača s uspostavljenim biofilmom bakterije *A. junii*.

Kao nosač uzet je Ztur veličinske frakcije (0,125-0,25 mm) budući se pokazalo da je ovaj materijal najpogodniji nosač za imobilizaciju *A. junii*. Najbolji omjer je 1g nosača na 100 mL tekućeg medija što je potvrdio pokus gdje su različite količine materijala dodavane u NB, te je određen broj imobiliziranih bakterija nakon 24 h inkubacije (3.4.2.1.). Kako je rasla količina nosača u reaktoru, tako se smanjivala koncentracija imobiliziranih bakterija po jediničnoj masi (**Slika 32**). Koncentracije nosača od 0,1 i 1,0 g u 100 mL medija nisu pokazale bitnu razliku u koncentraciji imobiliziranih bakterija dok je već pri koncentraciji od 2 g 100 mL⁻¹ broj imobiliziranih bakterija bio za jedan red veličine manji.



Slika 32. Broj imobiliziranih bakterija *A. junii* u reaktorima s različitom količinom dodanog Ztur nakon 24 h inkubacije.

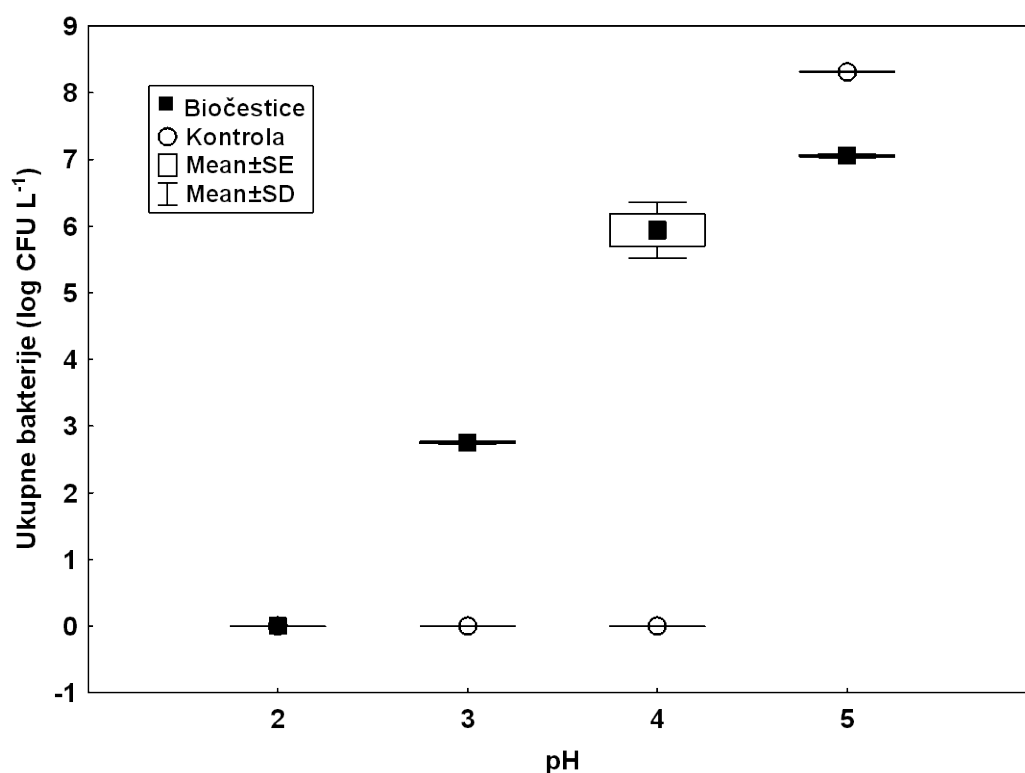
U pokusu opisanom u poglavlju 4.2.4. je pokazano da se u simuliranoj otpadnoj vodi zreli biofilm stvara već nakon 12 h. U hranjivom mediju vrijeme potrebno za stvaranje biofilma bilo je kraće jer bakterije pokazuju intenzivnije umnožavanje nego u otpadnoj vodi. Iz tog razloga kao medij za pripremu biočestica odabran je NB.

4.3.1. Biočestice u uvjetima nepovoljnog pH

U poglavlju 4.1.4. je pokazano da čista kultura *A. junii* odumire pri vrijednost pH otpadne vode od 5,0, a vrijednost pH 4,0 se pokazala toksičnom te u reaktorima nakon 24 h inkubacije nije bilo vijabilnih bakterija. Lužnate otopine nisu pokazale negativan utjecaj prema bakteriji pa su biočestice dodavane u reaktore gdje je pH vrijednost simulirane otpadne vode bila namještena na 2,0; 3,0; 4,0 i 5,0. Nakon dodavanja biočestica slijedila je aerobna inkubacija 24 h. Ovako dugotrajna inkubacija provedena je s namjerom da se istraži mogu li bakterije preživjeti i dugotrajnije izlaganje nepovoljnim uvjetima, a ne samo trenutno.

Pokazalo se da su bakterije u obliku biočestica znatno otpornije na negativan utjecaj pH od planktonskih bakterija. Početni broj bakterija bio je broj bakterija

imobiliziranih na biočestice, a iznosio je $2,2 \times 10^9$ CFU g⁻¹ što preračunato u volumen reaktora iznosi $2,2 \times 10^{10}$ CFU L⁻¹. Nakon 24 h u reaktoru s pH 5 ukupan broj bakterija iznosio je $1,13 \pm 0,09 \times 10^{10}$ CFU L⁻¹, a u reaktoru s pH 4 $1,13 \pm 0,83 \times 10^9$ CFU L⁻¹. Pri pH 3 broj bakterija je bio $5,68 \pm 0,34 \times 10^5$ CFU L⁻¹. U reaktorima s pH 2 nije bilo vijabilnih bakterija nakon 24 h inkubacije. Kao i u kontrolnom pokusu pri pH 5 primijećeno je odumiranje bakterijske biomase no pri ekstremno niskom pH 3 i 4 nije došlo do izumiranja bakterijske populacije, nego je broj bakterija u reaktorima ostao prilično visok (**Slika 33**). Na ovaj način biočestice bi mogle poslužiti kao siguran medij za preživljavanje bakterija u nepovoljnim uvjetima te bi služile kao klice za razvitak nove biomase nakon prestanka nepovoljnih uvjeta.



Slika 33. Ukupan broj bakterija u reaktorima različitih vrijednosti pH i biočesticama nakon 24 h inkubacije. Kontrolni reaktori su sadržavali planktonsku kulturu bakterije *A. junii*.

Pokazalo se da je biofilm na biočesticama stabilan. Tijekom 24 h inkubacije bakterije su se odvajale od biofilma te na taj način stvarale i biomasu planktonskih bakterija u reaktorima (**Tablica 17**). Bakterije su se odvajale od biofilma tijekom cijelog pokusa te onda odumirale u otpadnoj vodi budući da su pH vrijednosti na kraju pokusa

u svim reaktorima bile još uvijek u rasponu koji se pokazao toksičan prema planktonskim bakterijama *A. junii* (Tablica 17).

Tablica 17. Preživljavanje bakterije *A. junii* dodanih u bioreaktore s različitim pH vrijednostima u obliku biočestica nakon 24 h inkubacije. t_0 CFU = $2,2 \pm 0,12 \times 10^{10} \text{ L}^{-1}$

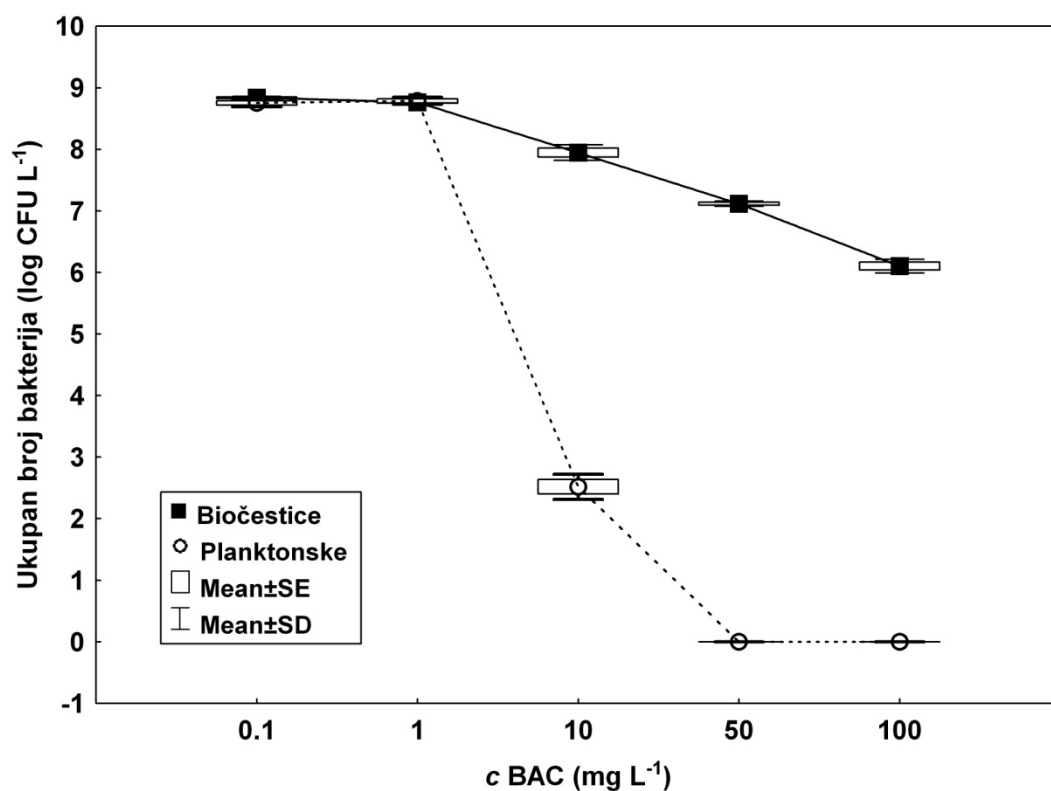
Parametar	pH			
	2	3	4	5
pH	2,16	3,64	4,5	5,25
Imobilizirane (CFU g ⁻¹)	0	$1,03 \pm 0,17 \times 10^4$	$8,97 \pm 7,03 \times 10^7$	$7,80 \pm 0,6 \times 10^8$
Planktonske (CFU L ⁻¹)	0	$4,45 \pm 0,55 \times 10^5$	$6,03 \pm 0,32 \times 10^7$	$1,44 \pm 0,06 \times 10^9$
Ukupne (CFU L ⁻¹)	0	$5,68 \pm 0,34 \times 10^5$	$1,13 \pm 0,83 \times 10^9$	$1,13 \pm 0,08 \times 10^{10}$
Preživljavanje bakterija (%)	0	37,6	82,4	96,1

Uzimanje P nije praćeno u pokusu već samo preživljavanje bakterija. Pri vrijednostima pH nižim od 6, P u vodi nije u obliku PO_4^{3-} te nije ni dostupan bakterijama za akumulaciju. Cilj ovog pokusa nije bio vidjeti može li čista kultura *A. junii* u ekstremnim uvjetima akumulirati P iz otpadne vode nego samo može li u obliku biočestica preživjeti takve uvjete, te nastaviti s normalnim metabolizmom po uspostavi normalnih vrijednosti pH u uređajima za pročišćavanje.

4.3.2. Biočestice u uvjetima visoke toksičnosti

Kao toksikant uzet je kationski surfaktant BAC koji spada u grupu kvartarnih amonijevih soli (QAC – *Quaternary Ammonium Compound*). QAC su poznati po svojem antimikrobnom djelovanju i koriste se kao sastavni dijelovi komercijalnih dezinficijensa. Putem kanalizacije ove kemikalije mogu doći u sustave za obradu otpadne vode te je BAC uzet kao predstavnik toksikanta koji može u realnom sustavu iskazati negativan utjecaj na modelnu bakteriju *A. junii*. Rezultati ovog pokusa su primjenjivi i na drugim bakterijama budući da QAC pokazuju antimikrobno djelovanje i na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.

U sustavu s planktonskim bakterijama primijećeno je odumiranje biomase pri koncentraciji BAC od 10 mg L^{-1} gdje je došlo do smanjenja broja bakterija za približno 50% (Slika 34).



Slika 34. Ukupan broj bakterija u sustavu s planktonskim bakterijama i biočesticama uz dodatak različitih koncentracija BAC nakon 24 h inkubacije.

Pri koncentracijama od 50 i 100 mg BAC L⁻¹ nije bilo vijabilnih bakterija u reaktorima nakon 24 h inkubacije. Kada su u otpadnu vodu s BAC dodane biočestice nije došlo do potpunog odumiranja biomase čak ni pri 100 mg BAC L⁻¹. Štoviše, gotovo 90% početnih bakterija ostalo je vijabilno nakon 24 h inkubacije. Pri 50 mg BAC L⁻¹ postotak preživljavanja *A. junii* iznosio je 97% (**Tablica 18**).

Tablica 18. Preživljavanje *A. junii* dodanih kao planktonske bakterije i u obliku biočestica u bioreaktorima s različitim koncentracijama BAC nakon 24 h inkubacije.

Sustav planktonske bakterije	BAC (mg L ⁻¹)				
	0,1	1,0	10	50	100
t ₀ ukupne bakterije (CFU L ⁻¹)			1,29±0,26 ×10 ¹⁰		
pH	7,10	7,03	7,28	7,21	7,21
Ukupne bakterije (CFU L ⁻¹)	5,70±0,8 ×10 ¹¹	6,17±0,83 ×10 ¹¹	3,55±1,55 ×10 ²	0	0
Preživljavanje bakterija (%)	116,3	116,6	54,9	0,0	0,0
Sustav biočestice	BAC (mg L ⁻¹)				
	0,1	1,0	10	50	100
t ₀ ukupne bakterije (CFU L ⁻¹)			2,44±0,88 ×10 ¹⁰		
pH	8,11	8,02	7,55	6,93	6,97
Imobilizirane bakterije (CFU g ⁻¹)	7,22±1,11 ×10 ⁹	6,33±0,46 ×10 ⁹	1,78±0,87 ×10 ⁹	5,86±0,06 ×10 ⁸	8,88±3,42 ×10 ⁷
Planktonske bakterije (CFU L ⁻¹)	6,18±0,22 ×10 ¹¹	5,20±0,30 ×10 ¹¹	7,30±1,70 ×10 ¹⁰	7,25±1,25 ×10 ⁹	4,09±0,18 ×10 ⁸
Ukupne bakterije (CFU L ⁻¹)	6,90±0,33 ×10 ¹¹	5,83±0,35 ×10 ¹¹	9,08±2,57 ×10 ¹⁰	1,31±0,13 ×10 ¹⁰	1,30±0,32 ×10 ⁹
Preživljavanje bakterija (%)	113,9	113,3	105,5	97,4	87,7

Može se zaključiti da su bakterije u obliku biočestica u velikoj mjeri zaštićene od toksičnog djelovanja BAC. Biofilm je ostao stabilan te je i pri najvišim koncentracijama BAC broj bakterija bio velik kroz cijeli pokus. Do smanjenja broja imobiliziranih bakterija na nosaču došlo je pri koncentracijama od 50 i 100 mg BAC L⁻¹, ali u isto vrijeme je došlo do povećanja broja planktonskih bakterija kojih na početku pokusa nije bilo u reaktorima (**Tablica 18**). Bakterije u biofilmu su se intenzivno razmnožavale i odljepljivale od površine biofilma te nastavile svoj rast u mediju kao planktonske bakterije.

Vrijednost pH u svim reaktorima nakon 24 h inkubacije bila je u rasponu koji nema negativan utjecaj na rast i metabolizam *A. junii* (**Tablica 18**), tako da se sav toksični učinak može pripisati BAC.

U pokusu nisu rađena mjerenja P zbog velike smetnje pri mjerenju budući da se negativno nabijeni P veže na pozitivno nabijene molekule BAC. Cilj pokusa je bio utvrditi može li čista kultura *A. junii* u obliku biočestica preživjeti ekstremne uvjete, te

nastaviti s normalnim metabolizmom kada ekstremna situacija prođe. Biočestice bi služile kao klice iz kojih bi se razvila nova bakterijska populacija unutar uređaja za pročišćavanje.

4.3.3. Biočestice u uvjetima nedostatka Mg, Ca i K

Kako je pokazano u poglavlju 4.1.3. ioni Mg i K su neophodni za normalan rast i metabolizam *A. junii*, dok Ca nije neophodan, ali njegovo prisutnost povoljno utječe na bakteriju. Kako bi se simulirali ekstremno nepovoljni uvjeti pripremljena je simulirana otpadna voda bez dodatka ijednog od ova tri elementa.

U kontrolnom reaktoru s otpadnom vodom (3.2.1.) i čistom kulturom *A. junii* bakterije su se umnožavale tijekom 24 h inkubacije, a na kraju je bakterijskom aktivnošću uklonjeno oko 17% početne koncentracije P (**Tablica 19**).

U reaktor s vodom bez dodatka iona Mg, Ca i K također je dodana čista kultura *A. junii*. Bakterije su se umnožavale tijekom inkubacije, no konačni broj je bio znatno manji nego u kontrolnom reaktoru (**Tablica 19**). Iako je u reaktoru bila velika količina bakterija došlo je do potpunog izostanka uklanjanja P. Potvrđeno je da su, kao i u pokusu 4.1.3., Mg i K neophodni za normalan metabolizam P-uklanjajućih bakterija te da prisutnost ovih elemenata pozitivno utječe na rast bakterijske biomase.

Biočestice koje su dodane u vodu bez iona ponašale su se kao i u prethodna dva pokusa; zadržale su stabilan biofilm što pokazuje veliki broj imobiliziranih bakterija nakon 24 h inkubacije. Stanice *A. junii* su se odvajale sa površine nosača i nastavile živjeti u vodi kao planktonske bakterije (**Tablica 19**). Ukupan konačni broj bakterija bio je značajno veći nego u reaktoru gdje je bila čista kultura bakterije. Ono što je jasno vidljivo je sposobnost biočestica da uklanjaju P iz otpadne vode čak i u uvjetima gdje to čista kultura bakterije ne može. S ukupno uklonjenih 17,5 % početne koncentracije P ponašanje biočestica u vodi bez iona bilo je usporedivo s ponašanjem kulture planktonskih bakterija u kontrolnom reaktoru. Kroz 24 h inkubacije bakterije su sav Mg i K potreban za normalan metabolizam uzimale iz nosača (Ztur), budući da drugih izvora ovih elemenata nije bilo u reaktoru.

Pokazalo se da kroz 24 h biočestice mogu poslužiti kao „spremnik“ sa zalihom Mg, Ca i K neophodnim za normalan rast i metabolizam P-uklanjajuće bakterije *A. junii* u slučajevima nestašice ovih elemenata i nepovoljnog omjera Mg, Ca, K /P u otpadnoj vodi.

Tablica 19. Rast i sposobnost uklanjanja P bakterije *A. junii* u sustavu sa standardnom simuliranom otpadnom vodom (kontrola) i u sustavima sa simuliranom otpadnom vodom bez iona Mg, Ca i K (sustav s planktonskom kulturom bakterije i sustav s biočesticama). t_0 ukupne bakterije = $2,19 \pm 0,5 \times 10^{10}$ CFU L⁻¹. t_0 P = $19,96 \pm 0,95$ mg L⁻¹.

Parametar	Kontrola	Sustav planktonske bakterije	Sustav biočestice
Imobilizirane bakterije (10 ⁹ CFU g ⁻¹)			1,49±0,04
Planktonske bakterije (10 ¹¹ CFU L ⁻¹)	9,15±0,15	1,45±0,45	1,23±0,33
Ukupne bakterije (10 ¹¹ CFU L ⁻¹)	9,15±0,15	1,45±0,45	2,72±0,37
P (mg L ⁻¹)	17,4	19,1	16,5
Uklonjeno P (%)	16,7	0,0	17,5

4.4. Pokusi s čistom kulturom bakterije *A. junii* i alumosilikatnim nosačima u realnoj otpadnoj vodi

Nakon utvrđivanja kapaciteta alumosilikatnih materijala za imobilizaciju bakterije *A. junii* u laboratorijskim uvjetima i sa simuliranom otpadnom vodom pokusi su usmjereni ka istraživanju rasta, imobilizacije i metabolizma bakterije u realnoj otpadnoj vodi. Na ovaj način istraživanja se žele usmjeriti prema pilot i industrijskim istraživanjima.

U pokusima je korištena komunalna otpadna voda uzeta iz sekundarnog taložnika (efluent) CUPOV Grada Zagreba i procijedna voda uzeta iz sabirnih bazena odlagališta otpada Jakuševac, Zagreb. Osnovni kemijski parametri uzoraka otpadnih voda prikazani su u **Tablici 20**. Svojstva komunalne otpadne vode ukazuju na relativno dobru kvalitetu nakon obrade vode biološkim pročišćavanjem, dakle na izlazu iz uređaja. Posebno treba spomenuti nisku razinu ukupnog P koja ipak još uvijek ne zadovoljava zakonsku granicu (1,0 mg L⁻¹, iz Pravilnika o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 87/10) za ispušt u vodni prijemnik. Procijedna voda je očekivano znatno opterećenija hranjivima, posebno N-NH₃ i ukupnim N koji predstavlja i najveći problem u tretmanu procijedne vode. Količina P je također znatno veća od količine P u komunalnoj vodi te bi u obradi ovakve vode tehnologija korištenja imobiliziranih P-akumulirajućih bakterija bila od potencijalno velike koristi.

Tablica 20. Osnovni kemijske značajke komunalne i procijedne otpadne vode. Datum uzorkovanja i kemijske analize: 13.6.2011. komunalna otpadna voda; 5.7.2011. procijedna otpadna voda.

Parametar	Komunalna voda (effluent)	Procijedna voda
Boja	bezbojna	tamno smeđa
Miris	bez mirisa	snažan
KPK (mg O ₂ L ⁻¹)	157	161
N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	25,15	290
Ukupni N (mg L ⁻¹)	28,3	700
P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	1,2	5,6
Ukupni P (mg L ⁻¹)	2,3	13,1
pH	7,96	9,16

Pokusi su rađeni tako da su istovremeno postavljena 4 bioreaktora s realnom otpadnom vodom; u prvom je primjenjivana samo aeracija, u drugi je dodana čista kultura *A. junii*, u treći čista kultura *A. junii* i 1g nosača, a u četvrti su dodavane prethodno pripremljene biočestice u koncentraciji od 1g na 100 ml⁻¹ otpadne vode. Kao optimalni nosač korišten je ZTur veličinske frakcije 0,125-0,25 mm. Biočestice su pripremane po opisanoj proceduri (4.3.).

4.4.1. Pokusi sa steriliziranom komunalnom otpadnom vodom

Komunalna otpadna voda korištena u pokusima sterilizirana je membranskom filtracijom i autoklaviranjem. Prije pokusa pH je namješten na 7,0. Kako su koncentracije P u sirovoj vodi bile male (**Tablica 20**) P je dodavan u suvišku u obliku KH₂PO₄ do koncentracije od ~20 mg L⁻¹. Već u samom početku javili su se problemi s određivanjem koncentracije P u vodi jer je dolazilo do spontane precipitacije P u filtriranoj vodi, a ovaj fenomen je bio još izraženiji u autoklaviranoj vodi. Ona količina P koja nije precipitirala već u pripremi pokusa je precipitirala u kontrolnim reaktorima samo provođenjem aeracije, tako da je bilo nemoguće odrediti metabolizam uklanjanja P same bakterije. Precipitat je bio vidljiv golim okom u obliku bijelog neprozirnog taloga. Kao razlog precipitacije isključen je pH budući da je vrijednost bila namješтана na neutralnih 7,0 i prije izvođenja pokusa, i prije samog spektrofotometrijskog mjerenja koncentracije P. Precipitacija je pripisana vezanju P s neodređenim kemikalijama, najvjerojatnije iz sastava deterdženata, ili ionima Mg i Ca prisutnim u komunalnoj otpadnoj vodi. U **Tablici 21** je kombinirani prikaz mjerene koncentracije P prije i

poslije inkubacije u filtriranoj komunalnoj otpadnoj vodi s dodatkom KH_2PO_4 iz nekoliko pokusa gdje je vidljivo da samom aeracijom dolazi do znatnog smanjena koncentracije P u vodi.

Tablica 21. Prikaz koncentracija P mjerenih u filtriranoj komunalnoj otpadnoj vodi prije i nakon 24 h inkubacije. Prikazane su srednje vrijednosti više pokusa. Abiotska kontrola označava reaktore s komunalnom otpadnom vodom koja je aerirana bez dodavanja *A. junii*, nosača ili biočestica.

P (mg L ⁻¹)	Reaktor			
	Abiotska kontrola	<i>A. junii</i>	<i>A. junii</i> + Ztur	biočestice
Start	19,7±3,05	22,10±4,99	18,25±1,55	21,30±0,7
24 h	6,30±2,35	3,90±0,52	8,65±1,35	7,25±0,25

Realna komunalna voda, filtrirana ili autoklavirana, nije bila toksična prema *A. junii* te se sama bakterija lijepo umnožavala tijekom 24 h inkubacije. U sustavu gdje je bila čista kultura *A. junii* broj bakterija se tijekom 24 h udeseterostručio (**Tablica 22**). Kad je u komunalnu vodu dodan Ztur bakterije su se spontano imobilizirale na materijal tijekom inkubacije te je dobiven velik broj imobiliziranih bakterija. Ipak, taj broj je bio znatno manji od broja imobiliziranih bakterija na biočesticama nakon 24 h, a posljedično je u sustavu s biočesticama bio i znatno veći broj ukupnih bakterija nego u sustavu s Ztur (**Tablica 22**). Rezultati pokazuju da je na biočesticama bio prisutan stabilan biofilm koji je kroz 24 h održavao velik broj imobiliziranih bakterija, ali je i obogaćivao otpadnu vodu bakterijama koje su se odvajale od površine materijala. Iz rezultata se također vidi da bitnog utjecaja na rast i razmnožavanje *A. junii* nema izbor medija, odnosno je li korištena filtrirana ili autoklavirana voda. Umnožavanje bakterija u reaktoru s čistom kulturom *A. junii* bilo je značajno bolje u filtriranoj vodi, u reaktorima gdje je dodan Ztur u autoklaviranoj vodi dok u reaktoru s biočesticama nije bilo značajne razlike u umnožavanju s obzirom na filtriranu ili autoklaviranu vodu (**Tablica 22**). Pokazalo se da je u sustavu s biočesticama bio značajno veći broj bakterija *A. junii* (imobiliziranih, planktonskih, ukupnih) nego u sustavima s kulturom *A. junii* i dodatkom Ztur. Također se pokazalo da su bakterije u sustavu s biočesticama neosjetljive na vrstu medija budući da nije bilo značajne razlike u svim parametrima kad se uspoređi uzgoj u filtriranoj i autoklaviranoj vodi (**Tablica 22**).

Tablica 22. Broj bakterija *A. junii* u reaktorima s filtriranom (Ft) i autoklaviranom (Ak) komunalnom otpadnom vodom uz dodatak KH_2PO_4 do 20 mgP L^{-1} nakon 24 h inkubacije. ^A – značajna razlika u odnosu na reaktor s *A. junii*; ^B – značajna razlika u odnosu na reaktor s *A. junii* + Ztur; ^C – značajna razlika u odnosu na reaktore s autoklaviranom vodom.

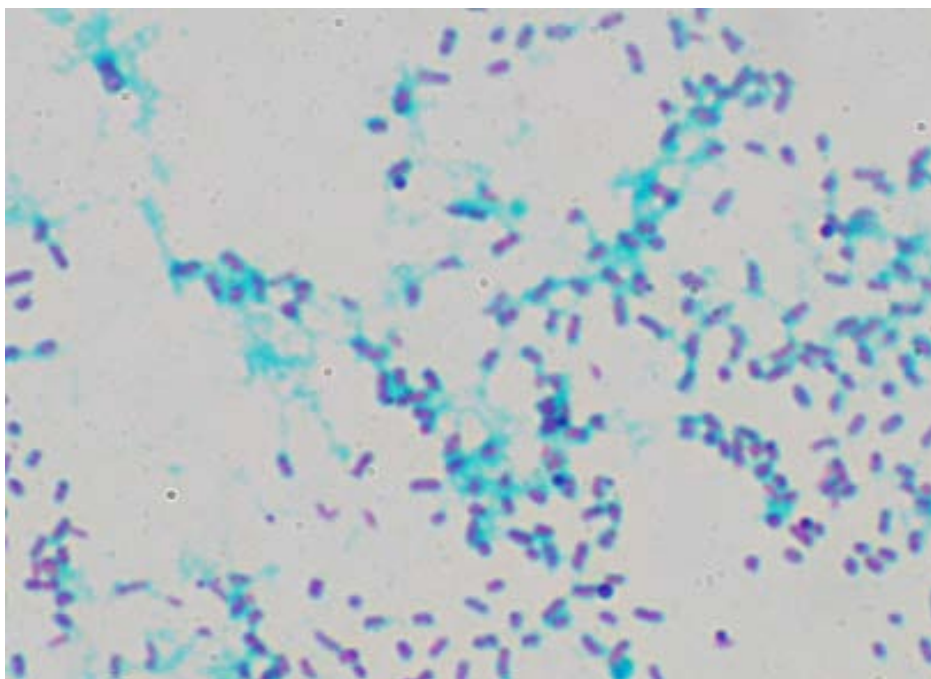
Broj bakterija	Vrsta vode	Reaktor		
		<i>A. junii</i>	<i>A. junii</i> + Ztur	biočestice
t_0 (CFU L^{-1})		$6,75 \pm 2,49 \times 10^9$		$2,44 \pm 0,88 \times 10^{10}$
Imobilizirane (CFU g^{-1})	Ft	-	$5,01 \pm 1,39 \times 10^7$ ^C	$3,45 \pm 0,42 \times 10^9$ ^B
	Ak	-	$6,33 \pm 0,33 \times 10^6$	$3,52 \pm 0,33 \times 10^9$
Planktonske (CFU L^{-1})	Ft	$6,65 \pm 0,35 \times 10^{10}$ ^C	$3,40 \pm 0,4 \times 10^{10}$ ^C	$1,21 \pm 0,39 \times 10^{11}$ ^{A,B}
	Ak	$3,65 \pm 0,65 \times 10^{10}$	$7,95 \pm 0,95 \times 10^{10}$	$7,15 \pm 1,85 \times 10^{10}$
Ukupne (CFU L^{-1})	Ft	$6,65 \pm 0,35 \times 10^{10}$ ^C	$3,45 \pm 0,39 \times 10^{10}$ ^C	$1,56 \pm 0,35 \times 10^{11}$ ^{A,B}
	Ak	$3,65 \pm 0,65 \times 10^{10}$	$7,96 \pm 0,95 \times 10^{10}$	$1,07 \pm 0,22 \times 10^{11}$

U sljedećem pokusu korištena je komunalna otpadna voda sterilizirana filtracijom i nije dodavan P u obliku KH_2PO_4 . Samom aeracijom nije došlo do nikakvog uklanjanja P za razliku od pokusa gdje je P dodavan u suvišku (**Tablica 23**). Čini se da u testiranoj komunalnoj vodi dolazi do smanjenja količine P samim procesom aeracije, ali maksimalno do razine od oko $1,5$ do $2,5 \text{ mg L}^{-1}$. Manje od ove količine ne može se postići samo aeracijom. Uz dodatak čiste kulture *A. junii* u otpadnu vodu koncentracija P smanjila se na $1,0 \text{ g mg L}^{-1}$ što je uklanjanje od 17% što je značajno poboljšanje od uklanjanja P u reaktorima gdje je bila samo aeracija. Bakterije su se lijepo razmnožavale u otpadnoj vodi (**Tablica 23**), gotovo jednako kao i u prethodnom pokusu gdje je dodavan P u suvišku (**Tablica 22**). Čini se da su rast i razmnožavanje *A. junii* u realnoj otpadnoj vodi neovisni o količini P u vodi.

Tablica 23. Rast i metabolizam bakterije *A. junii* u reaktorima s filtriranom komunalnom otpadnom vodom bez dodatka KH_2PO_4 , nakon 24 h inkubacije. ^A – značajna razlika u odnosu na reaktor s *A. junii*; ^B – značajna razlika u odnosu na reaktor s *A. junii* + Ztur.

	Aeracija	Reaktor		
		<i>A. junii</i>	<i>A. junii</i> + Ztur	Biočestice
t_0 (CFU L ⁻¹)			$4,85 \pm 1,35 \times 10^9$	$2,44 \pm 0,88 \times 10^{10}$
t_0 P (mg L ⁻¹)			$1,23 \pm 0,17$	
pH	8,53	8,54	8,44	8,30
P-PO ₄ (mg L ⁻¹)	1,30	1,00	0,70	1,10
Imobilizirane bakterije (CFU g ⁻¹)			$4,21 \pm 0,70 \times 10^7$	$4,41 \pm 1,45 \times 10^9$ ^B
Planktonske bakterije (10 ¹⁰ CFU L ⁻¹)		$6,20 \pm 0,2$	$6,10 \pm 1,10$	$5,37 \pm 1,13$
Ukupne bakterije (10 ¹⁰ CFU L ⁻¹)		$6,20 \pm 0,2$	$6,14 \pm 1,09$	$9,78 \pm 2,58$ ^{A,B}
Uklonjeno P (%)	0,0	17,4	30,1 ^A	20,9 ^{A,B}

U reaktorima s dodatkom Ztur nije došlo do značajnog povećanja broja bakterija u odnosu na reaktore s čistom kulturom *A. junii*, ali je došlo do većeg uklanjanja P, koji je na kraju iznosio 0,70 mgP L⁻¹, što je uklanjanje od 30% (**Tablica 23**). Mogući razlog za značajno veće uklanjanje P od onog u reaktoru s čistom kulturom *A. junii* bio je što imobilizirane bakterije tvore biofilm od vanstaničnih tvari (**Slika 35**) koji pomaže u procesu akumulacije P (Cloete i Oosthuizen, 2001). Bakterije su se umnožavale i spontano imobilizirale na površinu nosača pa je dobiven broj od $4,21 \pm 0,70 \times 10^7$ CFU g⁻¹ Ztur, što je manje od broja imobiliziranih bakterija na zeolitne nosače u sintetskoj vodi određeno u ovom radu, ali i opisano u literaturi (Hrenovic i sur. 2005). Najvjerojatnije objašnjenje je da se bakterije slabije umnožavaju u realnoj nego u sintetskoj otpadnoj vodi, ili realna voda jednostavno ne pogoduje stvaranju biofilma zbog nepoznatih razloga. Slični rezultati su dobiveni u radu Hrenovic i sur. (2011) gdje je broj imobiliziranih bakterija *A. junii*, *Enterococcus faecalis* i *E. coli* na zeolitnim tufovima bio tri reda veličina veći kada su bakterije inkubirane u hranjivom mediju nego kada su inkubirane u filtriranoj komunalnoj otpadnoj vodi.



Slika 35. Stanice bakterije *A. junii* (obojene crveno) povezane u biofilm vanstaničnom tvari (obojeno plavo) vidljive pod svjetlosnim mikroskopom kada se preparat oboji metodom ancijan blue.

Biočestice su pokazale dobro ponašanje u otpadnoj vodi, bakterije su se odvajale od biofilma tijekom inkubacije što je rezultiralo konačnim brojem bakterija usporedivim s prethodna dva reaktora (**Tablica 23**). Broj bakterija koje su ostale imobilizirane na biočestice nakon 24 h inkubacije bio je gotovo 100 puta veći od broja bakterija imobiliziranih na nosač u reaktoru gdje su zasebno dodavani *A. junii* i Ztur. Rezultati ukazuju da je biofilm na ovako pripremljenim biočesticama stabilan te da može održavati visoku razinu bakterija u bioreaktoru kroz duže vrijeme. Uklanjanje P je bilo 21% od početne koncentracije što je značajno poboljšanje u odnosu na reaktor gdje je bila čista kultura *A. junii*.

U svim reaktorima došlo je do značajnog povećanja pH vrijednosti tijekom inkubacije (**Tablica 23**), no nije bilo negativnog utjecaja na rast i razmnožavanje bakterije *A. junii*.

4.4.2. Pokusi s nesteriliziranom komunalnom otpadnom vodom

U kontrolnom reaktoru s nesteriliziranom komunalnom otpadnom vodom gdje je provedena aeracija bez dodavanja *A. junii* došlo je do umnožavanja prirodno prisutnih

heterotrofnih bakterija te je njihov broj na kraju inkubacije bio za jedan red veličine veći nego na početku (**Tablica 24**). Usporedo s povećanjem broja bakterija došlo je i do uklanjanja P od 61% te je količina P u kontrolnom reaktoru nakon inkubacije bila ispod važećim zakonom propisane granice od 1,0 mgP L⁻¹ (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 87/10).

Tablica 24. Rast i metabolizam bakterija u nesterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi (H - heterotrofne bakterije; A – bakterija *A. junii*) nakon 24 h inkubacije. U kontrolnom reaktoru provedena je samo aeracija.

^A – značajno se razlikuje od kontrolnog reaktora; ^B – značajno se razlikuje od reaktora *A. junii*; ^C – značajno se razlikuje od reaktora *A. junii*+Ztur; ^D – broj heterotrofnih bakterija značajno se razlikuje od broja bakterija *A. junii*.

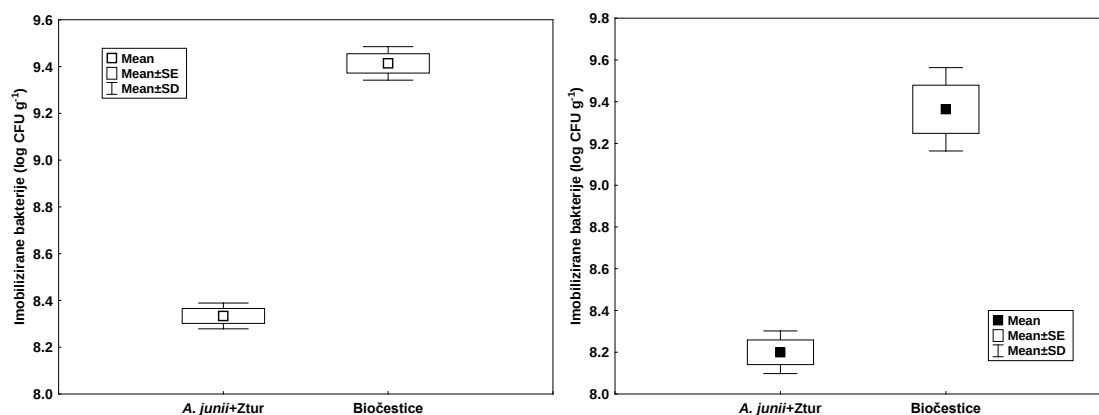
		Kontrola	<i>A. junii</i>	Reaktor <i>A. junii</i> + Ztur	Biočestice
t ₀ (CFU L ⁻¹)	H			3,33±1,27×10 ⁷	
	A			2,14±0,53×10 ⁹	2,78±0,99×10 ¹⁰
t ₀ P (mg L ⁻¹)				2,30±0,19	
pH		8,81	8,53	8,48	8,17
P (mg L ⁻¹)		0,9	0,9	0,6	0,4
Imobilizirane bakterije (CFU g ⁻¹)	H			2,17±0,27×10 ⁸	2,61±0,43×10 ⁹ C
	A			1,21±0,86×10 ⁸	2,48±0,98×10 ⁹ C
Planktonske bakterije (CFU L ⁻¹)	H	5,60±1,10 ×10 ⁸	4,50±0,60 ×10 ⁹ A, D	5,97±0,68 ×10 ¹⁰ A, B, D	1,39±0,02 ×10 ¹¹ A, B, C
	A		1,96±0,06 ×10 ¹⁰	1,32±0,19 ×10 ¹¹ B	1,11±0,45 ×10 ¹¹ B, C
Ukupne bakterije (CFU L ⁻¹)	H	5,60±1,10 ×10 ⁸	4,50±0,60 ×10 ⁹ A, D	5,97±0,67 ×10 ¹⁰ A, B, D	1,39±0,18 ×10 ¹¹ A, B, C
	A		1,96±0,06 ×10 ¹⁰	1,32±0,19 ×10 ¹¹ B	1,11±0,45 ×10 ¹¹ B
Uklonjeno P (%)		60,87	60,87	73,91 ^{A, B}	82,61 ^{A, B, C}

U reaktoru sa nesterilnom komunalnom otpadnom vodom i čistom kulturom *A. junii* umnožavanje bakterija, heterotrofni i *A. junii*, tijekom inkubacije bilo je intenzivno pa je broj heterotrofni bakterija porastao za dva reda veličine u odnosu na početni broj (**Tablica 24**). Tako je broj heterotrofni bakterija nakon 24 h inkubacije bio značajno veći u reaktoru gdje je dodana čista kultura *A. junii* od broja u kontrolnom reaktoru. Broj bakterija *A. junii* se također povećao za jedan red veličine tijekom inkubacije pa se moglo zaključiti da nesterilna komunalna otpadna voda nije toksična

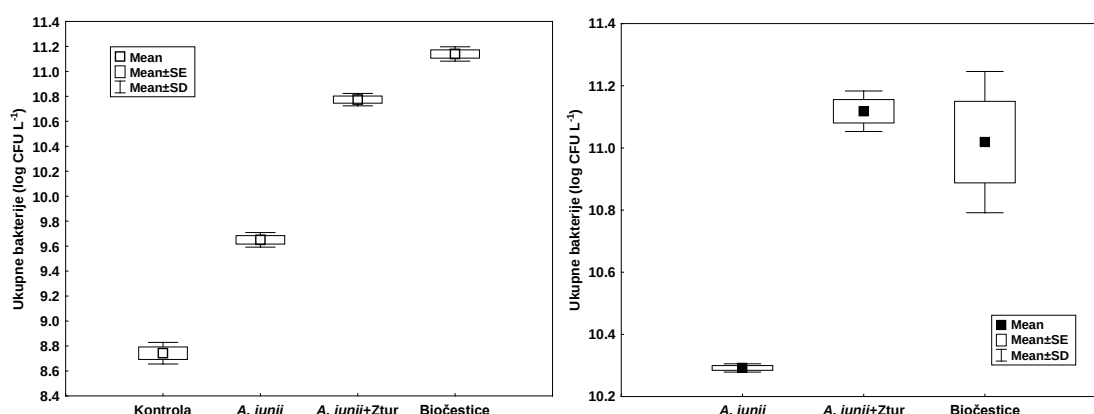
prema *A. junii* te je bilo moguće umnažanje bakterije tijekom 24 h inkubacije. Uklanjanje P bilo je jednako u reaktoru s dodatkom *A. junii* kao i u kontrolnom reaktoru te dodavanje čiste kulture *A. junii* u nesterilnu otpadnu vodu nije značajno poboljšalo uklanjanje P iz vode.

Dodatkom nosača u reaktor s nesterilnom komunalnom otpadnom vodom došlo je do još intenzivnijeg umnažanja bakterija tijekom 24 h inkubacije pa je broj bakterija, i heterotrofnih i *A. junii*, bio značajno veći kad se usporedi s dva prethodno opisana reaktora (**Tablica 24**). I heterotrofne bakterije i *A. junii* su se spontano imobilizirale na nosač u velikom broju, a količina imobiliziranih heterotrofnih bakterija i *A. junii* nije se značajno razlikovala. Dodatkom nosača poboljšano je uklanjanje P iz otpadne vode koje je iznosilo 74% što je značajno poboljšanje u odnosu na kontrolni reaktor i reaktor s dodatkom čiste kulture bakterije *A. junii*.

Dodavanje biočestica značajno je poboljšalo uklanjanje P iz otpadne vode koje je iznosilo 83% te je koncentracija P u otpadnoj vodi nakon 24 h inkubacije iznosila 0,4 mg L⁻¹. Biočestice su bile postojane u nesterilnoj vodi; nakon 24 h inkubacije broj imobiliziranih bakterija *A. junii* bio je $2,61 \pm 0,43 \times 10^9$ što je značajno veće nego broj imobiliziranih *A. junii* u reaktoru gdje je dodan nosač i čista kultura (**Slika 36**). S biočesticama su se odvajale stanice *A. junii* i obogaćivale otpadnu vodu te je ukupni broj bakterija *A. junii* nakon inkubacije bio jednak kao i u reaktoru s dodatkom *A. junii* i nosača (**Tablica 24**). Tijekom inkubacije heterotrofne bakterije su se intenzivno umnožavale i spontano imobilizirale na biočestice. Tako je broj imobiliziranih heterotrofnih bakterija nakon 24 h inkubacije bio statistički jednak broju imobiliziranih *A. junii*, a ukupni broj heterotrofnih bakterija bio je za četiri reda veličina veći od početnog broja, i značajno veći kad se usporedi s prethodna tri reaktora (**Slika 37**).



Slika 36. Broj imobiliziranih heterotrofnih bakterija (prazne oznake) i imobiliziranih bakterija *A. junii* (pune oznake) u reaktorima s nesteriliziranom komunalnom otpadnom vodom nakon 24 h inkubacije.



Slika 37. Broj ukupnih heterotrofnih bakterija (prazne oznake) i ukupnih bakterija *A. junii* (pune oznake) u reaktorima s nesteriliziranom komunalnom otpadnom vodom nakon 24 h inkubacije.

4.4.3. Pokusi sa steriliziranom procijednom otpadnom vodom

U skladu s rezultatima dobivenim sa steriliziranom komunalnom otpadnom vodom, urađeni su pokusi s filtriranom procijednom vodom bez dodatka P. Vrijednost pH procijedne vode prije pokusa je namještena na 7,0.

Prirodno prisutna koncentracija P bila je relativno velika i iznosila 5,6 mgP L⁻¹. Do znatnog smanjenja količine P došlo je već u abiotskim kontrolnim reaktorima gdje je bila samo aeracija; nakon 24h inkubacije uklonjeno je 91% od početne koncentracije P (Tablica 25). Procijedna voda nije bila pogodna za rast bakterije *A. junii*. U reaktorima

gdje je bila planktonska kultura bakterije nije došlo do umnažanja, nego čak do odumiranja biomase budući da je broj bakterija nakon 24 h inkubacije bio manji od početnog broja (**Tablica 25**). Također je došlo do značajnog uklanjanja P (89%) što se može pripisati aeraciji, a ne metabolizmu bakterije.

U reaktorima gdje je uz kulturu *A. junii* dodan i Ztur došlo je do značajnog rasta bakterijske biomase (**Tablica 25**) te je umnožavanje bilo usporedivo s pokusima u sterilnoj komunalnoj otpadnoj vodi (**Tablica 23**). Kad usporedimo reaktore s dodanim nosačem i one s planktonskom kulturom bakterije vidimo da nosač pogoduje rastu bakterije jer se spontano imobiliziraju na površinu nosača gdje tvore stabilni biofilm i povećava se ukupan broj *A. junii* u reaktoru. Uklanjanje fosfata bilo je nešto veće (94%) nego u prethodna dva reaktora što se može pripisati povećanju bakterijske biomase.

Tablica 25. Rast i metabolizam bakterije *A. junii* u reaktorima s filtriranom procijednom otpadnom vodom nakon 24 h inkubacije. ^A - značajna razlika u odnosu na reaktor s aeracijom; ^B - značajna razlika u odnosu na reaktor s *A. junii*; ^C - značajna razlika u odnosu na reaktor s *A. junii*+Ztur.

	Aeracija	<i>A. junii</i>	Reaktor <i>A. junii</i> + Ztur	Biočestice
t_0 (CFU L ⁻¹)			$2,92 \pm 1,06 \times 10^9$	$2,44 \pm 0,88 \times 10^{10}$
t_0 P (mg L ⁻¹)			$5,59 \pm 0,73$	
pH	7,60	6,93	7,38	7,27
P (mg L ⁻¹)	0,58	0,62	0,3	0,21
Imobilizirane bakterije (10 ⁸ CFU g ⁻¹)			$0,23 \pm 0,06$	$9,39 \pm 5,26$ ^C
Planktonske bakterije (10 ¹⁰ CFU L ⁻¹)		$0,13 \pm 0,02$	$3,34 \pm 0,56$ ^B	$2,09 \pm 0,51$ ^{B,C}
Ukupne bakterije (10 ¹⁰ CFU L ⁻¹)		$0,13 \pm 0,02$	$3,36 \pm 0,55$ ^B	$3,03 \pm 1,04$ ^B
CFU 24h/CFU start		0,53	12,47	1,24
Uklonjeno P (%)	90,9	88,6	93,6 ^B	96,4 ^{A, B}

Biočestice su se pokazale postojanima i u procijednoj vodi. Iako se pokazalo da sama voda nije pogodna za rast i razmnožavanje *A. junii*, bakterije u biofilmu su se održale u velikom broju tijekom 24 h inkubacije (**Tablica 25**). Sa biofilma su se odvajale planktonske stanice *A. junii* i obogaćivale procijednu vodu što je rezultiralo velikim brojem ukupnih bakterijskih stanica koji se nije razlikovao od broja ukupnih

stanica u reaktoru s dodatkom Ztur. Uklanjanje P u reaktoru s biočesticama bilo je nešto više nego u reaktoru s *A. junii*+Ztur no ne značajno.

4.4.4. Pokusi s nesteriliziranom procijednom otpadnom vodom

U kontrolnom reaktoru s nesteriliziranom procijednom otpadnom vodom gdje je provedena samo aeracija prirodno prisutne heterotrofne bakterije su se umnožavale te je njihov broj nakon 24 h inkubacije bio tri reda veličina veći od početnog broja (**Tablica 26**). Uklanjanje P bilo je neznatno i iznosilo je 6,5% za razliku od reaktora s filtriranom procijednom otpadnom vodom gdje je samo aeracijom uklonjeno 91% P (**Tablica 25**).

Tablica 26. Rast i metabolizam bakterija u nesterilnoj procijednoj otpadnoj vodi (H - heterotrofne bakterije; A – bakterija *A. junii*) nakon 24 h inkubacije. U kontrolnom reaktoru provedena je samo aeracija.

^A – značajno se razlikuje od kontrolnog reaktora; ^B – značajno se razlikuje od reaktora *A. junii*; ^C – značajno se razlikuje od reaktora *A. junii*+Ztur; ^D – broj heterotrofnih bakterija značajno se razlikuje od broja bakterija *A. junii*

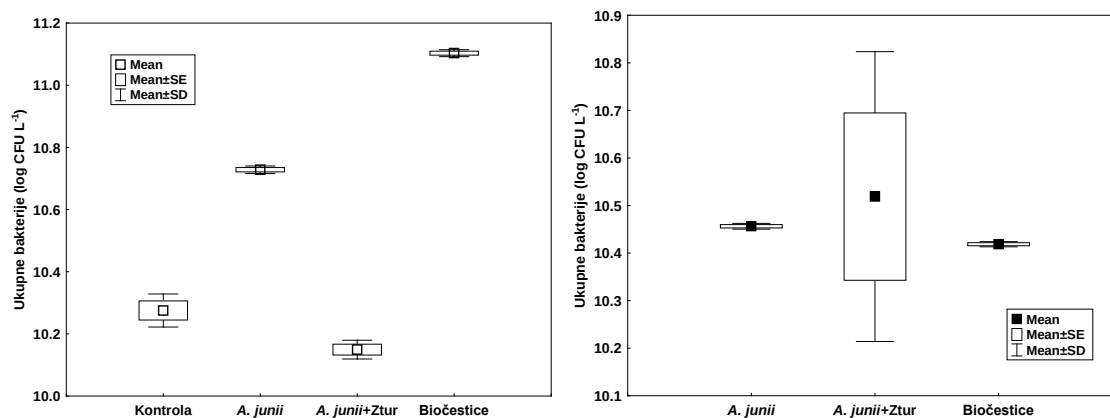
		Reaktor			Biočestice
		Kontrola	<i>A. junii</i>	<i>A. junii</i> + Ztur	
t_0 (CFU L ⁻¹)	H			$2,43 \pm 1,52 \times 10^7$	
	A		$2,53 \pm 0,23 \times 10^9$		$2,44 \pm 0,88 \times 10^{10}$
t_0 P (mg L ⁻¹)				$4,11 \pm 0,16$	
pH		8,90	8,90	8,67	8,74
P (mg L ⁻¹)		3,84	1,96	0,93	0,68
Imobilizirane bakterije (10 ⁷ CFU g ⁻¹)	H			$1,29 \pm 0,20$	$78,91 \pm 0,26$ ^{C, D}
	A			$1,67 \pm 0,17$	$15,23 \pm 0,03$ ^C
Planktonske bakterije (10 ¹⁰ CFU L ⁻¹)	H	$1,89 \pm 0,23$	$5,35 \pm 0,15$ ^{A, D}	$1,40 \pm 0,1$ ^{B, D}	$11,91 \pm 0,03$ ^{A, B, C, D}
	A		$2,86 \pm 0,04$	$3,81 \pm 2,29$	$2,47 \pm 0,03$
Ukupne bakterije (10 ¹⁰ CFU L ⁻¹)	H	$1,89 \pm 0,23$	$5,35 \pm 0,15$ ^{A, D}	$1,41 \pm 0,1$ ^{B, D}	$12,71 \pm 0,04$ ^{A, B, C, D}
	A		$2,86 \pm 0,04$	$3,83 \pm 2,29$	$2,62 \pm 0,03$
Uklonjeno P (%)		6,5	52,78 ^A	77,3 ^{A, B}	83,5 ^{A, B, C}

U reaktoru s dodanom čistom kulturom *A. junii* bakterija se umnožavala (**Tablica 26**) što je bilo različito od pokusa s filtriranom procijednom vodom gdje nije došlo do umnožavanja *A. junii* nakon 24 h inkubacije (**Tablica 25**). Heterotrofne bakterije su se također intenzivno umnožavale tijekom inkubacije. Iako je početni broj heterotrofa bio dva reda veličina manji od početnog broja *A. junii*, tijekom 24 h inkubacije heterotrofi

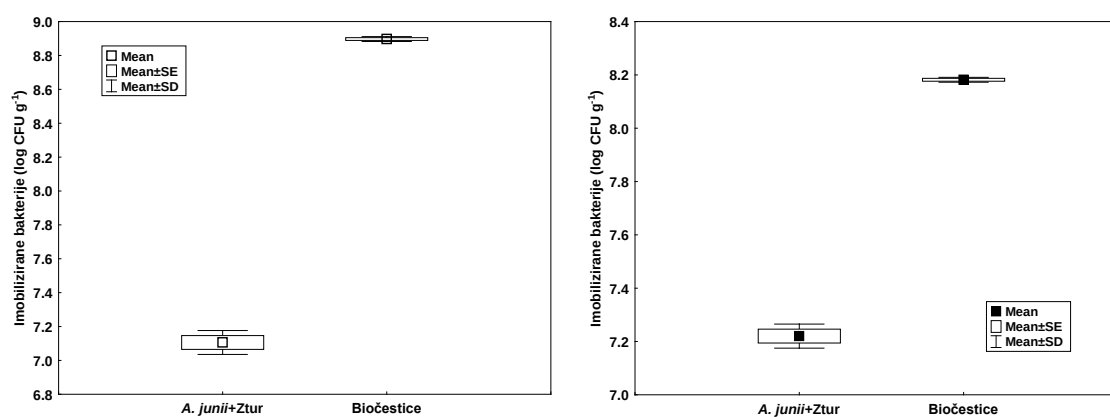
su povećali svoj broj u odnosu na *A. junii* i konačni broj bio je značajno veći. Dodavanje čiste kulture *A. junii* značajno je poboljšalo uklanjanje P (53%) u odnosu na kontrolni reaktor (**Tablica 26**).

U reaktoru s dodanim nosačem bakterije su se spontano imobilizirale te je broj imobiliziranih *A. junii* i heterotrofa nakon 24 h inkubacije bio jednak (**Tablica 26**). Bakterije su se imobilizirale u manjoj količini nego u pokusima s nesterilnom komunalnom otpadnom vodom (**Tablica 24**). Ukupan broj heterotrofnih bakterija u reaktorima s dodanim nosačem bio je značajno manji kad se uspoređi s reaktorom gdje je dodana čista kultura *A. junii* i jednak kao u kontrolnom reaktoru (**Slika 38**). Ukupan broj bakterija *A. junii* bio je statistički jednak kao u reaktoru s dodanom čistom kulturom bakterije *A. junii*. Unatoč jednakom broju *A. junii* i manjem broju heterotrofa u reaktoru, uklanjanje P (77%) bilo je značajno bolje.

Kad su u reaktor s nesterilnom procijednom otpadnom vodom dodane biočestice došlo je do značajnog povećanja broja heterotrofnih bakterija (ukupnih i imobiliziranih) u odnosu na prethodno opisane reaktore (**Slika 38 i 39**). Broj imobiliziranih *A. junii* bio je značajno veći kad se uspoređi s reaktorom gdje je dodana čista kultura i nosač, a broj ukupnih *A. junii* bio je statistički jednak kad se uspoređi s reaktorima gdje je dodavana ili čista kultura bakterija ili čista kultura i nosač. Biočestice su kao i u pokusima s filtriranom procijednom vodom pokazale postojanost te je odvajanjem planktonskih bakterija iz biofilma biočestica postignuta bioaugmentacija procijedne vode. Čini se da dodavanje već formiranog biofilma u obliku biočestica znatno pogoduje i imobilizaciji prirodno prisutnih heterotrofa koji se vjerojatno lakše adsorbiraju na vanstanične supstance već postojećeg biofilma nego na čistu površinu nosača. Iako ukupan broj bakterija *A. junii* nije bio značajno veći u usporedbi s drugim reaktorima postignuto je znatno poboljšanje uklanjanja P što se može pripisati znatno većem broju prirodno prisutnih heterotrofnih bakterija. Koncentracija P nakon 24 h inkubacije iznosila je 0,68 mg L⁻¹ što je bilo daleko ispod zakonski propisane granice za ispust u recipient (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 87/10).



Slika 38. Broj ukupnih heterotrofnih bakterija (prazne oznake) i ukupnih bakterija *A. junii* (pune oznake) u reaktorima s nesteriliziranom procijednom otpadnom vodom nakon 24 h inkubacije.



Slika 39. Broj imobiliziranih heterotrofnih bakterija (prazne oznake) i imobiliziranih bakterija *A. junii* (pune oznake) u reaktorima s nesteriliziranom procijednom otpadnom vodom nakon 24 h inkubacije.

RASPRAVA

5. Rasprava

5.1. Utjecaj fizikalno-kemijskih čimbenika na bakteriju *A. junii*

U prvom dijelu rada htjelo se doći do novih saznanja vezanih uz metabolizam P-akumulirajućih bakterija. Iako se o samom postupku EBPR-a zna puno, još je velika praznina u saznanjima vezanim uz sami proces akumulacije P od strane bakterija i organizme koji provode akumulaciju. Kako je objavljeno u radu autora Fuhs i Chen (1976), bakterije iz roda *Acinetobacter* izolirane iz aktivnog mulja pokazale su veliki kapacitet uklanjanja P pa su predložene kao prvi modelni organizam za EBPR. U preglednom radu Seviour i sur. (2003) detaljno je opisano kako su tekla istraživanja o bakterijama uključenim u ovaj proces. Ukratko, dosad su iz aktivnog mulja izolirane razne vrste bakterija od kojih nijedna u potpunosti ne zadovoljava biokemijski model. Mogućnosti su da je biokemijski model netočan ili nepotpun, da se bakterije ponašaju drukčije u aktivnom mulju i kao laboratorijski izolati te da nijedna od ovih bakterija nije glavni organizam odgovoran za EBPR. U preglednom radu Oehme i sur. (2007) navodi se da je korištenjem naprednih tehnika molekularne biologije kao što su FISH (*Fluorescentna In Situ Hibridizacija*) i mapiranje pomoću 16S rRNA otkriveno više novih vrsta bakterija koje su predložene kao P-akumulirajuće bakterije. Te vrste se pak ne mogu izolirati i uzgojiti u laboratoriju. Seviour i sur. (2003) navode primjer kako je korištenjem fluorescentnih antitijela specifičnih za rod *Acinetobacter*, nađeno da je u sustavu s aktivnim muljem s EBPR svojstvima od ukupne bakterijske populacije prisutno oko 3% bakterija iz ovog roda (Cloete i Steyn, 1988). To je naizgled vrlo mala količina, no Seviour i sur. (2003) naglašavaju da je 3% od ukupnog broja stanica ipak nekoliko milijuna vijabilnih stanica po gramu biomase. Ako sve te stanice akumuliraju P u velikim količinama koje su svojstvene bakterijama roda *Acinetobacter* onda to predstavlja značajan doprinos procesu EBPR (Hesselmann i sur. 1999).

Zato je u ovom radu korištena bakterija *A. junii* koja je još uvijek, u nedostatku boljeg, jedini modelni organizam za EBPR proces.

U prvom dijelu disertacije rađeni su pokusi s čistom kulturom gdje je cilj bio istražiti kako čimbenici poput vrijednosti pH, raznih izvora hranjiva, mikronutrijenti itd., a koji su djelomično spomenuti u literaturi u pokusima s aktivnim muljem, djeluju na čistu kulturu bakterije. Na ovaj način htjelo se steći neka osnovna saznanja o metabolizmu P-akumulirajućih bakterija, koja bi se mogla uopćiti i prenijeti na cjelovit proces EBPR.

Bakterija *A. junii* odstupa od prihvaćenog biokemijskog modela budući da nije akumulirala zrnca PHB unutar svojih stanica nakon anaerobne inkubacije (4.1.1.). Baumann i sur. (1968) su naveli da bakterije roda *Acinetobacter* ne akumuliraju PHB kao rezervu energije. U studiji Tandoi i sur. (1998) opisana je izolacija dviju vrsta roda *Acinetobacter* iz aktivnog mulja s osobinama EBPR koje akumuliraju poli-P u aerobnim uvjetima, rastu u anaerobno-aerobnim uvjetima, ali nemaju mogućnost asimilacije acetata i proizvodnje poli-hidroksi-alkanoata u anaerobnim uvjetima. U nekim radovima su ipak potvrđene male količine PHB u stanicama bakterija roda *Acinetobacter*. Tako su Vierkant i sur. (1990) našli 0,001% PHB suhe mase bakterija u osam sojeva roda *Acinetobacter*. U istraživanju na bakteriji *Acinetobacter* soj 210A nađeno je da stanice akumuliraju PHB u uvjetima kada je količina P u mediju minimalna, a sposobnost akumulacije se smanjuje s porastom koncentracije P u mediju uzgoja (Bonting i sur. 1992). Čini se da postoje razlike u biokemijskim osobinama među pojedinim vrstama bakterija roda *Acinetobacter*, ali i da postoji velik utjecaj vanjskih čimbenika na značajne promjene u metabolizmu bakterija.

U pokusima s različitim molekulskim vrstama dušika (4.1.2.) pokazalo se da su najbolji izvor dušika za bakteriju organski pepton i kvašćev ekstrakt, da bakterija spremno koristi N-NH_4 i N-NO_3 dok N-NO_2 nije odgovarajući izvor dušika. Dobiveni rezultati su potvrdili literaturne navode gdje su kao odgovarajući izvor dušika za bakterije roda *Acinetobacter* navedeni KNO_3 (Sidat i sur. 1999), NH_4Cl (Rustrian i sur. 1997) te pepton i kvašćev ekstrakt (Hrenović i sur. 2003a). Nitriti su opisani kao neodgovarajući izvor dušika te su Meinhold i sur. (1999) izvijestili o inhibiciji aerobnog uklanjanja P u EBPR sustavu s aktivnim muljem pri koncentracijama nitrita od 8 mg L^{-1} ili višim. Weon i sur. (2002) su pokazali 90% inhibicije u aerobnom rastu i uklanjanju P čiste kulture *Acinetobacter* sp. pri koncentraciji nitrita od 520 mg L^{-1} .

Željezo nije bilo potrebno dodavati u suvišku za normalan rast i metabolizam *A. junii* (4.1.3.). Uopćeno gledano, nedostatak željeza ne bi trebalo predstavljati problem u uspješnom provođenju EBPR procesa jer će bakterije svoje potrebe namiriti iz otpadne vode gdje je sigurna prisutnost mikronutrijenata te elemenata u tragovima. Pokazalo da željezo u suvišku djeluje negativno prema bakteriji, te pri visokim koncentracijama čak toksično. Ovo bi moglo predstavljati veliki problem pri obradi otpadnih voda koje su opterećene željezom kao što su industrijske i procijedne otpadne vode. Također je potrebno biti oprezan i pri korištenju željeznih soli kao sredstava za precipitaciju P što se nekad koristi kombinirano s EBPR procesom. Tako je u literaturi navedeno (He i sur.

1996) kako se čestice P-Fe precipitata u aktivnom mulju najvjerojatnije vežu u mrežu ekstracelularnih tvari nastalih bakterijskom aktivnošću (flokula mulja) ili izravno na bakterijsku stanicu. Predloženo je da ovakvo vezivanje može doprinijeti boljem slijeganju P-Fe čestica u sekundarnom taložniku te da na ovaj način biomasa doprinosi boljem obaranju P u obradi vode. Moguće je da je nedostatak P, koji je kemijski precipitirao u reaktorima s dodatkom FeSO_4 , bio razlog za odumiranje bakterijske biomase u reaktorima s povišenim koncentracijama Fe, no to je malo vjerojatno. Naime do odumiranja dolazi već u reaktoru s $100 \text{ mg FeSO}_4 \text{ L}^{-1}$ gdje ima sasvim dovoljno P. Također, bakterije za metabolizam i rast mogu koristiti i organski fosfor koji se nalazio u peptonu i kvašćevom ekstraktu. Vjerojatnije je da je došlo do vezivanja P-Fe precipitata na bakterijsku stanicu što je dovelo do odumiranja bakterija. Čestice vezanog Fe ili P-Fe mogu spriječiti normalnu izmjenu nutrijenata bakterije s okolnim medijem ili djelovati inhibitorno na enzimске reakcije u bakterijskoj stanici. U pokusima se također pokazalo da dodavanje željeza uzrokuje značajno snižavanje pH vrijednosti medija što nije poželjno za bakteriju *A. junii* čiji je optimalni pH za rast u neutralnom ili blago lužnatom području (Garrity i sur. 2005). Do smanjenja vrijednosti pH najvjerojatnije je došlo zbog precipitacije P što umanjuje pufersku sposobnost otopine, odnosno otpadne vode (Caravelli i sur. 2010). Također, dio iona Fe^{2+} koji se otpuste iz FeSO_4 u otpadnoj vodi stupaju u reakciju hidrolize što kao posljedicu ima smanjenje alkalnosti medija te snižavanje pH (de Haas i sur. 2000). Niske vrijednosti pH ne odgovaraju bakteriji *A. junii* koja odumire ispod pH 6 (Ivanković i Hrenović, 2011). Valjano je pretpostaviti da je niska vrijednost pH jedan od čimbenika koji su doveli do slabog rasta i odumiranja bakterijske biomase u slučajevima dodavanja FeSO_4 u otpadnu vodu. U studiji gdje se testirala precipitacija P u laboratorijskom sustavu s aktivnim muljem došlo je do pada vrijednosti pH otpadne vode ispod 3 (početna vrijednost je bila 7,0) kad je dodan željezni klorid. Tako niska vrijednost pH nije bila u skladu s biološkim potrebama aktivnog mulja te se puferska sposobnost sustava morala namješteni dodavanjem NaHCO_3 (Caravelli i sur. 2010). Bliss i sur. (1994) su također predložili da je snižavanje pH vrijednosti uslijed dodatka željeznih soli najvjerojatnije odgovorno za primijećeni negativan učinak na biološko uklanjanje N i P iz otpadne vode u sustavu za pročišćavanje s aktivnim muljem. I drugi istraživači (Barth i Ettinger, 1967; Eberhardt i Nesbit, 1968; Wuhrmann, 1968) su naveli kako dodavanje kemikalija snižava vrijednost pH reaktora s aktivnim muljem i do 5,5-6,5. Ovdje je opisan utjecaj željeza na P-akumulirajuću bakteriju, no valjano je pretpostaviti da negativan utjecaj željezo može

ispoljiti i na druge mikroorganizme prisutne u aktivnom mulju. Tako je nađeno da željezne soli i željezo-organski kompleksi djeluju inhibitorno na rast bakterija iz roda *Sphaerotilus* koje su također stanovnici aktivnog mulja (Chang i sur. 1979). Pokazano je i da je dodavanje željeznog klorida dovelo do gotovo potpunog nestanka praživotinja (*Protozoa*) u aktivnom mulju. Kako su praživotinje iznimno bitne za održavanje stabilnog mulja, ovo je dovelo do narušavanja kvalitete i slabog slijeganja mulja (Wuhrmann, 1968). Treba uzeti u obzir da željezo, osim na fosfat-akumulirajuće bakterije u terciarnom stupnju pročišćavanja, može negativno djelovati i na mikroorganizme u sekundarnom stupnju biološkog pročišćavanja osobito u slučaju ulijevanja industrijskih ili procijednih otpadnih voda s visokim koncentracijama željeza.

U sljedećim pokusima (4.1.3.) pokazalo se da je prisutnost Mg i K u mediju nužna za uspješan proces akumulacije P od strane *A. junii*, dok Ca nije neophodan, ali veće količine povoljno utječu na rast i metabolizam bakterije. Zadovoljavajuće uklanjanje P iz otpadne vode postignuto je pri omjeru Mg/P od 0,64 do 5,71 mg Mg/mg P, te pri omjeru Ca/P od 0,01 do 5,55 mg Ca/mg P. Naprotiv pri omjeru Mg/P od 0,01 uklanjanje P u reaktorima nije postignuto. Ovakva saznanja već su opisana u sustavima s aktivnim muljem (Rickard i McClintock, 1992) gdje se EBPR nije odvijao bez Mg i K, ali Ca nije bio nužan za provedbu procesa. U sustavima s EBPR svojstvima Mg^{2+} i K^{+} imaju funkciju protutežnih iona te se otpuštaju i uzimaju u bakterijsku stanicu istovremeno s P ionima (Schönbörn i sur. 2001). Magnezij je prepoznat kao najvažniji element za uspješan proces uklanjanja P iz otpadne vode (Rahmani i sur. 2004), a slično kao i u našem pokusu Imai i sur. (1988) su naveli 8 mg Mg L⁻¹ kao potrebnu koncentraciju za uspješnu provedbu EBPR u sustavu s aktivnim muljem. Povećanje koncentracije Mg iona pogodovalo je također povećanju bakterijske biomase i poboljšanom uklanjanju P iz otpadne vode čiste kulture bakterije *Acinetobacter calcoaceticus* (Hrenovic i sur. 2005). Brdjanovic i sur. (1996) su pak pokazali da je na sustavu s osobinama EBPR uklanjanje P izostalo u slučaju manjka K iako su Mg i Ca bili prisutni. U tom sustavu s aktivnim muljem potrošnja K pri K/P omjeru u influentu od 1,25 i 2,5 bila je redom 0,21 i 0,47 mg K/mg P. Sličan rezultat dobiven je i u pokusima u ovom radu gdje je potrošnja K u sustavu s čistom kulturom *A. junii* pri početnim omjerima K/P od 0,01; 0,50; 1,01; 2,59 i 4,87 mg K/mg P iznosila redom 0,27; 0,29; 0,37; 0,44 i 0,63 mg K/mg P. Uspješno uklanjanje P iz otpadne vode postignuto je pri omjeru K/P od 0,50 do 4,87 dok je pri K/P omjeru od 0,01 uklanjanje P izostalo. U sustavu s osobinama EBPR (Brdjanovic i sur. 1996) uklanjanje P izostalo je u slučaju nestašice K (0,013 mg K L⁻¹

što odgovara omjeru K/P od 0,0009 mg K/ mg P) iako su Mg i Ca bili prisutni u dostatnim količinama. U istom sustavu potpuno uklanjanje P postignuto je kad je K bilo u suvišku; 18,9 i 37,8 mg K L⁻¹ što odgovara K/P omjeru od 1,25 i 2,5 mg K/ mg P. Iz navedenih studija i rezultata pokusa može se zaključiti da je za uspješno odvijanje procesa EBPR potreban omjer Mg/P od >0,64 i omjer K/P od >0,5.

Utjecaj pH na proces uzimanja P je uglavnom istraživao na sustavima za EBPR, gdje je mješovita kultura bakterija, i gdje se izmjenjuju anaerobno/aerobni uvjeti. Nekoliko studija je pokazalo da, u anaerobnim uvjetima, količina otpuštenog P ovisi o vrijednosti pH i da je ta količina veća što je viša vrijednost pH (Liu i sur. 1996; Smolders i sur. 1994; Bond i sur. 1999). Smolders i sur. (1994) su pokazali da omjer otpuštenog P i uzetog acetata raste linearno od 0,25 do 0,75 mola P/mola C povišenjem pH od 5,5 na 8,5. Objašnjenje je da pri višem pH bakterijska stanica mora trošiti više energije za održavanje stalnog pH unutar stanice. Taj višak energije stanica dobiva intenzivnijom razgradnjom uskladištenog poli-P. No, pokazalo se da je sam proces uzimanja acetata neovisan o pH vrijednosti u rasponu od 6,5 – 8,0 (Filipe i sur. 2001a). Pokusi u aerobnim uvjetima su pokazali da je uzimanje P i rast biomase spriječeno pri niskom pH (6,5) te da su više vrijednosti pH (7,0 – 7,5) pogodnije za P-akumulirajuće organizme (Filipe i sur. 2001b).

Jedan od razloga boljeg uklanjanja P pri višem pH je i to što viši pH ne pogoduje glikogen-akumulirajućim organizmima (GAO) koji su u konkurenciji sa PAO u sustavima za EBPR. Naime GAO nemaju uskladištene rezerve energije u obliku poli-P pa je u uvjetima višeg pH u anaerobnim uvjetima za takve organizme smanjena mogućnost uzimanja acetata. Na ovaj način PAO postižu konkurencijsku prednost (Oehmen i sur. 2007). Kao granična vrijednost za ovaj odnos nađena je vrijednost pH 7,25. Pri nižem pH od ovog acetat brže uzimaju GAO, a pri višem PAO (Filipe i sur. 2001c). Naši pokusi (4.1.4.) su pokazali da je 6,0 granična vrijednost pH za rast čiste kulture *A. junii*, niži pH je negativno djelovao na rast i metabolizam bakterije dok više vrijednosti pH (8-10) nisu pokazale bitno negativan utjecaj na bakteriju.

Utjecaj NaCl na *A. junii* (4.1.5.) je istraživao zbog mogućnosti da veće količine dospiju u uređaje za pročišćavanje utjecanjem morske vode u uređaje primorskih krajeva ili ispiranjem s prometnicama u zimskom periodu. U ovom pokusu bakterija nije uzgajana u simuliranoj otpadnoj vodi, nego u hranjivom mediju NB i razrijeđenom hranjivom mediju (NB/100) zbog usporedivosti s literaturnim navodima. Razrijeđeni NB/100 ima vrijednost KPK od 90 mg O₂ L⁻¹ što je koncentracija organskih tvari koja

je dovoljna za nesmetan razvoj bakterija, ali hranjiva nisu u suvišku. ZoBell (1946) je naveo da su koncentracije raspoložive organske tvari od 10-100 mg L⁻¹ potrebne za uspješan rast i razmnožavanje heterotrofnih bakterija u morskoj vodi. Na ovaj način rezultati dobiveni uzgojem u uvjetima suviška i nestašice nutrijenata su usporedivi.

Pokazalo se da NaCl ne predstavlja veliku opasnost za *A. junii* jer toksični učinak izaziva tek pri koncentracijama od 3,5% i višim ukoliko je uzgoj proveden u hranjivom mediju. Dobiveni rezultati su u skladu s literaturnim navodima, tako je za bakteriju *Escherichia coli* soj O157:H7 navedeno da podnosi razine NaCl do 8% kada se uzgaja u hranjivom mediju (Jay, 1992; Stein, 2000). Hajmeer i sur. (2006) su zaključili da se stanice *E. coli* O157:H7 značajno oštećuju kada se koncentracija NaCl u hranjivom mediju poveća s 5 na 10%, a pri 10% NaCl šteta je tolika da bakterija gubi staničnu cjelovitost. *E. coli*, kao i *A. junii*, pripada skupini Gram negativnih heterotrofnih bakterija.

Carlucci i Pramer (1960a) su predložili da je salinitet bitan faktor koji pridonosi brzom odumiranju stanica *E. coli* u morskoj vodi. Iz pokusa s morskom vodom i deioniziranom vodom u koju je dodavana sol, su zaključili da jednake koncentracije soli u morskoj i deioniziranoj vodi polučuju jednaki učinak. To je u suprotnosti s rezultatima dobivenim u pokusima ovog rada gdje pri koncentracijama od 3,5% NaCl, što otprilike odgovara koncentraciji soli u morskoj vodi, nije došlo do znatnog odumiranja heterotrofne bakterije *A. junii*. Slične zaključke su donijeli i Nusbaum i Garver (1955) koji su rekli da količine soli u morskoj vodi nemaju antagonistički utjecaj prema heterotrofnim bakterijama. U Connerovom (1991) radu rast *E. coli* O157:H7 bio je inhibiran pri 28% (na 37°C) i 24% NaCl (na 10°C) kada je bakterija uzgajana u hranjivom tripton sojinom brothu.

U ovom radu, do izostanka znatno negativnog utjecaja na bakterije pri 3,5% koncentraciji NaCl došlo je vjerojatno zbog toga što su bakterije uzgajane u hranjivom mediju, gdje nije nestašica nutrijenata kao što je u morskoj vodi ili slanoj deioniziranoj vodi, a što može izazvati odumiranje heterotrofnih bakterija. Također je moguće da u hranjivom mediju dolazi do vezanja iona NaCl-a na organsku tvar, što može smanjiti negativan utjecaj soli prema bakteriji. Tu tvrdnju podupire i studija Krassilnikov (1938) gdje je navedeno da dodatak organskih nutrijenata u morsku vodu smanjuje stopu smrtnosti *E. coli*. Rosenfeld i ZoBell (1947) su naglasili da je smrtnost bakterija u morskoj vodi veća nego što ju uzrokuju samo salinitet i osmotski pritisak, a Burke i Baird (1931) su pokazali da mnoge slatkovodne bakterije rastu u morskoj vodi

dopunjenoj organskom tvari. Čini se da brzo odumiranje heterotrofnih bakterija u morskoj vodi nije samo posljedica visoke koncentracije soli, nego velik značaj ima i smanjena koncentracija nutrijenata u vodi. Ovakve zaključke potvrđuje studija u kojoj je došlo do preživljavanja i umnožavanja *E. coli* u morskoj vodi kad je u nju dodana profiltrirana svježa kanalizacija i pepton do koncentracije od 100 mg L⁻¹ (Carlucci i Pramer, 1960b). Vaccaro i sur. (1950) su pokazali da se dodatkom 50 mg peptona L⁻¹ povećava preživljavanje *E. coli* u morskoj vodi. Ogawa (1974) je naveo da odumiranje *E. coli* u morskoj vodi nije uzrokovano „samopročišćavanjem“ ili „antibiotskim“ djelovanjem morske vode i pokazao je da ova bakterija odumire najvećim dijelom zbog nestašice hrane u morskoj vodi.

5.2. Imobilizacija bakterije *A. junii* na nosače

Svi prirodni alumosilikatni materijali su se pokazali kao dobri nosači bakterija (4.2.2.). Jединi materijal koji nije bio zadovoljavajući je Zsin koji je čak pokazao toksično djelovanje prema bakteriji. Broj imobiliziranih bakterija za sve prirodne nosače ispitane u radu bio je u rasponu od $6,1 \pm 0,30 \times 10^8$ do $1,26 \pm 0,02 \times 10^{10}$ CFU g⁻¹ te je usporediv ili veći od dosad literaturno prikazanih brojeva imobiliziranih mikroorganizama na razne nosače, prikazano u komparativnoj **Tablici 27**.

Tablica 27. Broj mikroorganizama imobiliziranih na različite nosače koji su prikazani u literaturi. Broj bakterija *A. junii* imobiliziranih na nosače korištene u ovom istraživanju bio je u rasponu od $6,1 \pm 0,30 \times 10^8$ do $1,26 \pm 0,02 \times 10^{10}$ CFU g⁻¹.

Nosač	Mikroorganizam	Broj imobiliziranih stanica (CFU g ⁻¹)	Literatura
Zeolitni tuf		$2,33 \times 10^9$	Hrenović i sur. 2005.
Zeolitni tuf izmijenjen magnezijem	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	$6,86 \times 10^9$	
Kvarcni pijesak		$1,42 \times 10^9$	
Zeolitni tuf izmijenjen surfaktantom	<i>Acinetobacter junii</i>	$5,28 \times 10^9$	Hrenovic i sur. 2008.
Keramika	<i>Acinetobacter</i> spp.	$2,9 \times 10^9$	Kariminiaae-Hamedaani i sur.2003.
Kuglice Ca-alginata	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	$2,5 \times 10^8$	Muyima i Cloete 1995.
Bionosač Type-Z	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9×10^8	Durham i sur. 1994.
Zeolitni tuf	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$3,6 \times 10^8$	Bauman i sur. 2001.
Perlit	<i>Acinetobacter junii</i>	$3,16 \times 10^9$	Hrenovic i sur. 2007a.
Sintetski mordenit	<i>Acinetobacter junii</i>	$1,25 \times 10^9$	
Sepiolit	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	10^9	Albareda i sur. 2008.
	<i>Sinorhizobium fredii</i>	10^{10}	

Može se zaključiti da su svi prirodni materijali ispitani u ovom radu zadovoljavajući nosači bakterija što je vrlo bitno budući da se onda za imobilizaciju željene bakterije može koristiti onaj nosač koji svojim fizikalno-kemijskim osobinama najviše odgovara određenom tipu bioreaktora za koji će se koristiti.

Dodavanje nosača pridonijelo je boljem uklanjanju P u ispitivanim sustavima zbog povećanja broja bakterija u reaktorima.

Prirodni zeolitni tufovi su se u više studija pokazali kao obećavajući nosači bakterija (Hrenovic i sur. 2003a; Bauman i sur. 2001; Shindo i sur. 2001; Fernández i sur. 2007.). U ovom radu ispitani su zeolitni tufovi iskopani na različitim lokacijama jer se htjelo utvrditi kako varijacije u mineralnom sastavu prirodnih zeolitnih tufova utječe na sposobnost imobilizacije. Prirodni zeolitni tuf je smjesa različitih minerala s većim udjelom zeolita, u našem slučaju klinoptilolita (4.2.1.). Ako pretpostavimo da zeolitna

svojstva kao što su poroznost i ionska izmjena imaju pozitivan utjecaj na bakterije onda bi najveći broj bakterija trebao biti imobiliziran na nosač s najvećim udjelom kilinoptilolita, što nije bio slučaj (4.2.3.). Naprotiv, zeolitni tuf iz Srbije s najvećim udjelom klinoptilolita imao je najmanji broj imobiliziranih bakterija dok su turski i hrvatski zeolitni tufovi, koji su imali manji udio klinoptilolita, imali znatno više imobiliziranih bakterija. Može se zaključiti da mineraloški sastav nije bitno svojstvo koje određuje imobilizaciju *A. junii* na zeolitni tuf.

Svojstvo nosača koje je prepoznato kao bitno je veličina čestica. Što su čestice manje, broj imobiliziranih bakterija (gledano po jediničnoj masi) je veći (4.2.3.1.). U literaturi je opisano da se broj imobiliziranih bakterija smanjuje s porastom veličine čestica nosača (Hrenovic i sur. 2008; Hrenovic i sur. 2005), a razlog je što je površina nosača u jediničnoj masi uvijek veća što su čestice manje. Tako je bakterijama omogućena veća površina za imobilizaciju i uspostavu biofilma.

Kako se u pokusima s čistom kulturom *A. junii* pokazalo da je Mg nužan za akumulaciju P od strane *A. junii* i da veće količine Mg potiču rast bakterija tako su se i nosači izmijenjeni Mg očekivano pokazali boljima za imobilizaciju (4.2.4. i 4.2.5.). Kad su uspoređeni izmijenjeni nosači s originalnima nije se utvrdilo da Mg znatnije utječe na sam metabolizam akumulacije P, nego samo na povećanje biomase što je u skladu s literaturnim navodima za zeolitne i glinene nosače (Hrenovic i sur. 2005; Jiang i sur. 2007). Ne može se isključiti da Mg iz izmijenjenih nosača djeluje stimulativno i na sam metabolizam bakterije zato jer su pokusi u ovom radu rađeni kroz 24 h nakon kojih je većina bakterija još u logaritamskoj fazi rasta. Kako se akumulacija P odvija kad su bakterije u stacionarnoj fazi rasta, a Mg^{2+} se zajedno s K^{+} otpušta i uzima istovremeno s P u sustavima s osobinama EBPR (Schönbörn i sur. 2001), vjerojatno je da će višak iona Mg na nosačima djelovati pozitivno na sposobnost akumulacije P bakterije u dužem vremenskom roku kao što je slučaj u pravim sustavima za obradu otpadne vode. Korištenje nosača koji su izmijenjeni Mg ili nekim drugim elementom nije izgledno u stvarnim postrojenjima jer bi troškovi bili preveliki u odnosu na dobivena poboljšanja. Iako su se materijali izmijenjeni Mg pokazali boljim nosačima *A. junii* kada su se usporedili s originalnim neizmijenjenim dvojnicima, materijali koji imaju prirodno veće količine Mg u svom sastavu (Sep) nisu bili bitno bolji nosači bakterija kad se usporede s drugim nosačima (4.2.5.). Čini se da kemijski sastav i količina Mg u mineralu nemaju značajniji utjecaj na proces imobilizacije bakterije *A. junii* na prirodne materijale.

Praćenjem i usporedbom broja bakterija na nosačima koji su izmijenjeni Mg i originalnim nosačima mogao se pratiti utjecaj naboja površine nosača na proces imobilizacije bakterija budući da je zeta potencijal izmijenjenih nosača bio znatno manji od originalnih nosača. U procesu izmijene Mg^{2+} ioni izbijaju s površine nosača druge pozitivno nabijene ione kao što su Na^+ , Ca^{2+} ili K^+ . Ako nosač ima na površini većinom jednovalentne Na^+ ione onda veća količina dvovalentnih Mg^{2+} iona na površini izmijenjenih nosača ima za posljedicu znatno manje negativan zeta potencijal (Ersoy i Celik, 2009; Duman i Tunc, 2009). Kako su i bakterija i nosač negativno nabijeni, pri adsorpciji bakterije na površinu nosača očekuju se odbojne električne sile koje moraju biti prevladane privlačnim Lifshitz – van der Waals-ovim, hidrofobnim i drugim specifičnim interakcijama (van Merode i sur. 2006). Pošto je na izmijenjenim nosačima bio imobiliziran značajno veći broj bakterija nego na originalnim nosačima može se zaključiti da smanjenje elektronegativnosti na površini izmijenjenih nosača pozitivno utječe na imobilizaciju *A. junii*. Prema literaturi (Jiang i sur. 2007; Banks i sur. 2003), maksimalna adsorpcija bakterijskih stanica na površinu minerala postiže se unutar prvih 60 minuta kontakta. Smanjenje elektronegativnosti površine nosača izmijenjenih Mg smanjuje odbojne sile između bakterije i nosača te je prvotna adsorpcija bakterija favorizirana u odnosu na originalne nosače. Od adsorbiranih stanica formira se biofilm pa je zato veći broj bakterijskih stanica imobiliziran nakon 24 h na izmijenjene nosače. Po ovim zapažanjima može se zaključiti da je zeta potencijal jedan od bitnih čimbenika u imobilizaciji bakterija na alumosilikatne materijale. No, kada se usporede svi ispitivani nosači zajedno, ne samo izmijenjeni i originalni nosači, smanjenje elektronegativnosti negativno je koreliralo s brojem bakterijskih stanica ($R = -0,334$; $p = 0,52$).

U literaturi se mogu naći dvojake tvrdnje; Jiang i sur. (2007) navode kako su elektrostatske značajke površine nosača ključne za adsorpciju bakterije *Pseudomonas putida* na čestice tla. U navedenom radu pokusi su dijelom rađeni na vrlo niskom pH gdje bakterije više nisu vijabilne, a adsorpcija je praćena mjerenjem absorbancije supernatanta. Drugim riječima nemoguće je razlučiti jesu li stanice adsorbirane na nosač žive ili mrtve što je neophodno za praktičnu upotrebu nekog nosača. U drugoj studiji (van Merode i sur. 2006) pokazalo se da se klinički soj bakterije *Enterococcus faecalis* koji je imao manje negativan zeta potencijal znatno bolje vezao na polistirensku površinu. Rao i sur. (1993) su naveli da elektrostatske interakcije nisu bili primarni čimbenici u vezanju bakterija *Streptococcus sanguis* i *Actinomyces naeslundii* na

mineral apatit, a slično opažanje su zabilježili i Hrenovic i sur. (2008) u studiji o vezanju *A. junii* na zeolite izmijenjene surfaktantom. Za uzorke Sep i SepP određene su izoelektrične točke (Hrenovic i sur. 2010a) pri vrijednosti pH od 2,0 do 3,2. Pri neutralnom pH površina sepiolita je negativno nabijena kao i stanice *A. junii*, no broj imobiliziranih bakterija određen u ovom radu bio je velik (4.2.5.), unatoč odbojnim elektrostatskim silama. Kada se ovome pridoda i značajno negativna korelacija između zeta potencijala i broja imobiliziranih bakterija dobivena za uzorke perlita (4.2.6.) može se tvrditi da naboj površine nosača (naboj bakterija je uvijek negativan pri neutralnom pH) i elektrostatske interakcije nisu glavni čimbenici odgovorni za imobilizaciju bakterije *A. junii* na mineralne nosače.

Nosači iz skupine glina, Ter i Sep, su se pokazali kao dobri nosači bakterija (4.2.5.), no mogući problemi postoje kod tehničke primjene ovih materijala. Ter u vodi prelazi u koloide što je izazivalo teškoće u praktičnom radu, konkretno začepljivanje filtara i jako mućenje vode. Iako se pokazalo da je u laboratorijskim sustavima teško raditi s bentonitom kao nosačem bakterija, minerali glina kao nosači su testirani na realnim sustavima za obradu otpadne vode gdje su pridonijeli znatnom poboljšanju svojstava aktivnog mulja (Chudoba i Pannier 1994; Wimmer i Buhl 1998). Sep zbog prirode materijala (specifična kristalna građa u obliku vlakana) ne pokazuje ove poteškoće (Can i sur. 2010; Hrenović i sur. 2010a) te postoji potencijal za korištenje u realnim sustavima. Testiranjem uzoraka s različitim udjelom sepiolita u mineraloškom sastavu pokazalo se da materijali koji imaju više sepiolita nisu bili bolji nosači bakterija. Sep s 40-50% sepiolita imao je isti broj imobiliziranih bakterija kao i SepHrv s 99% sepiolita (4.2.5.), a SepP s 50-55% sepiolita imao je značajno veći broj imobiliziranih bakterija *A. junii* na površini. Vjerojatni razlog za povećanim kapacitetom imobilizacije SepP je povećanje specifične površine materijala uzrokovano tretiranjem materijala kiselinom u postupku pročišćavanja (Myriam i sur. 1998). Kao i u pokusima s različitim zeolitnim tufovima zaključak je da mineraloški sastav pojedinog materijala nije bitan čimbenik koji određuje kapacitete imobilizacije bakterija na nosač.

U pokusima s perlitom (4.2.6.) potvrđena su saznanja da je veličina čestica bitno svojstvo za imobilizaciju bakterija te da je povećano uklanjanje P u reaktorima s nosačima rezultat povećanja ukupne biomase u reaktorima usljed intenzivne imobilizacije. U pokusima s perlitom testirana su tri nosača koji se ne razlikuju po svom kemijskom sastavu nego samo po stupnju ekspanzije tako se moglo utvrditi da površina nosača u ovom radu prikazana kao SSA utječe na stupanj imobilizacije bakterija, ali nije

glavni čimbenik. To se najbolje vidi po tome što je imobilizacija na perlit (SSA od 0,76 do 1,70 m²g⁻¹) usporediva s imobilizacijom na druge nosače iako imaju čak stotine puta veću specifičnu površinu; aktivni ugljen 480 m²g⁻¹ (Yalçın i Sevinç, 2000), gline 25 do 393 m²g⁻¹ (Hepper i sur. 2006; Kaya i Oren, 2005), prirodni zeoliti 14-19 m²g⁻¹ (Korkuna i sur. 2006).

Pretpotavka je da se bakterije vežu na način da „okruže“ česticu nosača te onda stvaraju biofilm trodimenzionalno u visinu dok se stanice konačno ne počnu odvajati od biofilma i prelaziti u okolni medij. Mikro (< 2 nm), mezo (2 – 50 nm) i makropore (> 50 nm) koje povećavaju SSA nosača ne čine dostupno područje za adsorpciju bakterija, nego su bakterije vezane samo na površinu nosača. Mikro, mezo te dijelom i makropore nosača su manje nego što su bakterijske stanice (> 200 nm) tako da je za imobilizaciju bitna samo naboranost površine. U slučaju Pexp makropore su nastale iz amorfnе izotropne rešetke Pnexp. Ove pore ulaze u amorfnu matrix i ograničavaju nesmetan protok elektrolita u otopini te na taj način usporavaju ionsku i neionsku izmjenu. Ovo ograničava dostupnost nutrijenata i drugih elemenata potrebnih za rast bakterije oko makropore.

Jedini materijal koji se u ovom istraživanju nije pokazao kao dobar nosač bakterija je Zsin. Pokazalo se da ovaj materijal čak pokazuje toksičnost prema *A. junii*. Istraživanja sa svim materijalima su rađena na koncentraciju od 10 g nosača L⁻¹, a Zsin je pokazao jak toksičan utjecaj već pri koncentraciji od 2 g L⁻¹ (4.2.7.). Zsin je materijal čija je upotreba najraširenija u industriji deterdženata, ali se koristi i kao adsorbens, molekulsko sito i katalizator u raznim industrijskim procesima. Smatra se da Zsin nije štetna tvar te je niz istraživanja potvrdio da nije toksičan prema mnogostaničnim životinjama i da nije potencijalno kancerogen (HERA, 2004). Nekoliko studija je pokazalo i da ne iskazuje genetičku toksičnost prema bakterijama *Salmonella typhimurium*, *E. coli* i kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (HERA, 2004). Smatra se da neka tvar nije toksična ako ne pokazuje negativne učinke pri koncentracijama od 100 mg L⁻¹ ili većim tako da se ni u našim pokusima Zsin ne može opisati kao toksična tvar. Štetan utjecaj dolazi do izražaja pri većim koncentracijama pa se ne može koristiti kao nosač bakterija. Da Zsin pri visokim koncentracijama pokazuje štetnost pokazano je i u studijama sa zeolitom A i bakterijom *Pseudomonas putida* (vrijednost EC₅₀ 0,330-0,950 g L⁻¹, HERA 2004), kvascem *S. cerevisiae* (EC₅₀ 2,88-5,47 g L⁻¹, Hrenović i sur. 2010b) i slatkovodnim rakom *Ceriodaphnia dubia* (EC₅₀ 0,425 g L⁻¹, Warne i Schiffko 1999). Sam mehanizam toksičnosti zeolita A pri visokim koncentracijama je manje

poznat; pretpostavlja se da hidrolizom zeolita A u vodi dolazi do stvaranja više vrsta aluminijskih, silicijskih i alumosilikatnih kompleksa koje onda mogu djelovati toksično prema bakterijskim stanicama (Hrenović i sur. 2010b). Vjerojatno je i da bakterije *Zsin* prepoznaju kao ksenobiotike (tvar koja se prirodno ne može naći u organizmu) budući da u prirodi ne postoji analog *Zsin* u prirodnim mineralima. Upotreba sintetskog zeolita kao prihvatljivog nosača bakterija se može potpuno isključiti.

Istraživani prirodni materijali su se pokazali kao dobri nosači P-akumulirajuće bakterije *A. junii*. Iz pokusa je utvrđeno da se dodavanjem nosača postiže znatno veći broj vijabilnih bakterijskih stanica u bioreaktorima. Dodavanje nosača nije pridonijelo znatnom poboljšanju metabolizma akumulacije P od strane bakterije te se može utvrditi da prirodni materijali djeluju kao mehanička potpora, a u zanemarivoj mjeri utječu na sam metabolizam bakterije. Pokazalo se da je za nosač bitno da nije toksičan prema bakteriji te da ima naboranu površinu, a da se smanjenjem veličine čestica nosača postiže znatno bolja imobilizacija. Čimbenici kao što su naboj površine nosača, i mineraloško-kemijski sastav nosača nemaju značajniji utjecaj na proces imobilizacije. Zato se može predložiti da bi idealan nosač za imobilizaciju P-akumulirajućih bakterija bio obavezno prirodni alumosilikatni materijal koji svojim osobinama najbolje odgovara tipu reaktora za koji je predviđeno korištenje. Ako se bira među istim materijalima (npr. zeolitni tuf) bolji nosač je onaj koji ima manju veličinu čestica (odabirati prosijavanjem) i onaj (odabirati iskop) koji ima veću količinu Mg u svom sastavu.

5.3. Pokusi s biočesticama

Općeprihvaćena je činjenica da su bakterije u biofilmu otpornije na štetne vanjske utjecaje u odnosu na bakterije koje žive planktonski. To je pokazano u više studija u slučaju otpornosti bakterijskih biofilmova na antibiotike i dezinficijense (Stewart i Costerton, 2001; Kim i sur. 2007) pa je sasvim razumno pretpostaviti da bi sličnu otpornost bakterijski biofilmovi pokazali i u sustavima za pročišćavanje otpadnih voda. Ipak, pravih dokaza za potonju tvrdnju je vrlo malo. Trenutno se u istraživanjima biofilm opisuje uglavnom kao negativna pojava jer su bakterije koje tvore biofilm na medicinskim instrumentima uzrok teških infekcija u ljudi, koje je puno teže izliječiti. Pokusi s biočesticama u ovom radu žele prikazati bakterijski biofilm u pozitivnom svjetlu kao način održanja bakterijske populacije u slučaju ekstremno nepovoljnih vanjskih utjecaja svojstvenih uređajima za pročišćavanje otpadnih voda.

Za pripremu biočestica važno je optimizirati sam proces imobilizacije tako da se dobije što više bakterija na česticama uz što manji utrošak vremena i energije. Za laboratorijske pokuse pokazalo se da je najbolje koristiti omjer od 1g nosača na 100 mL medija uz aerobnu inkubaciju u trajanju od 6 h u hranjivom mediju (4.3.). Rezultati su potvrdili da imobilizacija nepokretne bakterije *A. junii* ovisi u najvećoj mjeri o kontaktu bakterije i nosača. Što je veća količina nosača u reaktoru, to veći dio nosača bude na dnu posude/reaktora i ne dolazi u kontakt s bakterijom pa se na taj način smanjuje koncentracija imobiliziranih bakterija. Za određivanje masene koncentracije nosača u pripremi biočestica u industrijskom postrojenju proces imobilizacije treba promatrati čisto iz praktične perspektive, odnosno mehanički optimizirati kontakt nosača i bakterije. Ovo se može postići korištenjem optimalne količine nosača – za Schott bocu volumena 300 mL to je 1g. Također se može i pojačati miješanje u reaktoru što je neophodno za veće volumene. Ovaj zaključak potvrđuje i velika količina bakterija imobiliziranih na Pexp, Sep i Ter koji ne tonu na dno nego su cijelo vrijeme raspršeni po cijelom volumenu reaktora.

U pokusu s ekstremnim vrijednostima pH (4.3.1.) biočestice su pokazale mogućnost da održe stabilan biofilm pri vrijednostima pH koje u potpunosti ubijaju planktonske bakterije *A. junii* u suspenziji, i to kroz vremensko razdoblje od 24 h. U literaturi je opisano kako biofilmovi imaju sposobnost održavanja optimalnih uvjeta pH te optimalnih lokaliziranih koncentracija otopine i redoks potencijala što omogućuje veliku gustoću bakterijskih stanica (Flemming 1995; Horn i Morgenroth 2006).

U uvjetima visoke toksičnosti biočestice su također pokazale sposobnost očuvanja bakterijske populacije unutar biofilma. Velik broj bakterija ostao je u biofilmu nakon 24 h inkubacije i pri koncentracijama toksikanta koji je u potpunosti uništio bakterijsku populaciju u suspenziji čiste kulture *A. junii* (4.3.2). Slično su i testovi osjetljivosti na antibiotike na in-vitro modelima biofilmova pokazali preživljavanje biofilma nakon tretiranja antibioticima u koncentracijama stotinu, pa čak i tisuću puta većim od minimalne inhibitorne koncentracije izmjerene za bakterije u suspenziji (Ceri i sur. 1999). Minimalna inhibitorna koncentracija za bakteriju *Klebsiella pneumoniae* iznosila je $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina u vodenoj suspenziji, a biofilm iste bakterije preživljavao je 4 h izloženosti antibiotiku u koncentraciji $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$, koncentraciji koja je u potpunosti uništila planktonske bakterije (Anderl i sur. 2000). Dezinficijensi su znatno manje učinkoviti prema bakterijama u biofilmu što je pokazala i studija o učinku 13 komercijalnih dezinfekcijskih sredstava prema sveprisutnoj

patogenoj bakteriji *Enterobacter sakazakii* (Kim i sur. 2007). Pokazalo se da su dezinficijensi najdjelotvorniji prema planktonskim bakterijama, manje djelotvorni prema bakterijama inokuliranim i osušenim na nehrđajućem čeliku, a najslabiji učinak je bio prema bakterijama u biofilmu na nehrđajućem čeliku. Logično je pretpostaviti da će bakterije u obliku biočestica biti otporne na veće koncentracije toksikanata koji potencijalno mogu dospjeti u uređaj za pročišćavanje otpadnih voda od planktonskih bakterija.

Isto tako se pokazalo i da prirodni materijali koji su korišteni kao nosači bakterija u biočesticama mogu poslužiti kao spremnik elemenata koji su neophodni za bakterijski metabolizam, a koji eventualno mogu biti u manjku i nepovoljnom omjeru prema P u uređaju za pročišćavanje s EBPR svojstvima. Tako su biočestice uspješno nadomjestile manjak Mg i K u otpadnoj vodi i omogućile normalnu akumulaciju P od strane *A. junii* (4.3.3.). U pokusu je potvrđeno da je za uspješno uklanjanje P bakterijama neophodan Mg i K, a kako je već pokazano i u pokusima s bakterijskom kulturom bez nosača (4.1.3.). U pokusu gdje su kao nosači bakterija korišteni zeolitni tufovi i bentonit izmijenjeni Mg, K i Ca pokazalo se da svih 9 testiranih nosača uspješno nadoknađuje nestašicu ovih minerala u otpadnoj vodi i omogućuje konstituiranje metabolički aktivne biomase bakterija (Hrenovic i sur. 2010c). U istom pokusu je pokazano i da dodatak mineralnog nosača uspješno nadoknađuje nestašicu ovih elemenata u sustavu s aktivnim muljem, te je pokazana potencijalna primjenljivost mineralnih nosača u industrijskim sustavima za obradu otpadne vode.

5.4. Pokusi s realnom komunalnom i procijednom otpadnom vodom

Laboratorijske pokuse s realnom otpadnom vodom je jako zahtjevno raditi zbog nepoznatog kemijskog sastava vode te prisutnosti raznih kemikalija, deterdženata, raznih lijekova, antibiotika, organskih otapala, bojila i svih drugih tvari koje na razne načine mogu utjecati na rezultate pokusa (Smital i sur. 2011). Zato se većina literaturno opisanih laboratorijskih pokusa provodila u simuliranoj otpadnoj vodi. Trenutno je sam proces EBPR poprilično objašnjen u industrijskim sustavima za obradu otpadne vode, a temeljne osobine koje se inače određuju u laboratorijskim pokusima su još uvijek neistražene.

Posebno je teško raditi s komunalnim otpadnim vodama velikih gradova kao što je Zagreb, gdje se u kombiniranom kanalizacijskom sustavu miješaju otpadne vode kućanstava, oborinske vode, otpadne vode bolnica, ali i industrijske vode. Također,

zagrebačka voda se može svrstati u skupinu umjereno tvrdih (8-18°D) do tvrdih voda (18-30°D) s relativno visokim koncentracijama Ca i Mg u vodi (Dadić, 2001). Simbol °D označava njemački stupanj tvrdoće vode, a 1°D iznosi 10 mg CaO u 1 L vode (Dadić, 2001).

Tijekom izrade ovog rada najveći problem bilo je određivanje P u realnoj otpadnoj vodi. Naime, kako su koncentracije P u komunalnoj otpadnoj vodi bile niske, P je dodavan u suvišku do koncentracije od ~20 mgP L⁻¹. Kod tako pripremljene otpadne vode dolazilo je do spontane precipitacije P što je bilo vidljivo u obliku bijelog neprozirnog taloga. Vrijednost pH je isključena kao razlog precipitacije pa se čini da je P vezan s nekim kemikalijama u vodi, moguće deterdžentima. Isto tako je moguće da je P precipitirao u obliku Mg ili Ca netopivih soli što potvrđuje i literaturni navod (Hollender i sur. 2002) gdje je prilikom autoklaviranja sterilnog filtrata aktivnog mulja došlo do precipitacije uglavnom Ca i nešto Mg soli. Zbog relativno visoke koncentracije Ca i Mg u zagrebačkoj otpadnoj vodi, moguće je da dolazi do ovakve precipitacije, osobito što se zna da su P u deterdžentima upravo dodavani da bi vezivali Ca i Mg.

Sljedeći problem je korištenje autoklavirane otpadne vode koja je uvijek prvi izbor pred filtriranom vodom. No, neka su istraživanja pokazala da se uspješan proces EBPR teško postiže u laboratorijskim uvjetima zbog toga što realna otpadna voda sadrži jednu ili više neidentificiranih komponenti koje su odgovorne za ovaj proces, a vjerojatno su termolabilne pa se unište tijekom autoklaviranja. Tako je u istraživanju Hollander i sur. (2002) pokazano da izolati bakterija uspješno provode EBPR kad ih se uzgaja u filtratu aktivnog mulja, no proces izostaje kad se bakterije uzgajaju u autoklaviranom filtratu. Atomska absorpcijska spektroskopija je pokazala da autoklaviranjem precipitiraju Ca i Mg soli pa je moguća nestašica ovih elemenata. Kada su u takav medij nakon autoklaviranja ponovno dodani Ca i Mg, zajedno s metalima u tragovima i vitaminima, opet je došlo do izostanka uspješnog EBPR tako da je zaključak da mora postojati neka druga komponenta koja je osjetljiva na toplinu, a bitna je za uspješan proces uklanjanja P (Hollander i sur. 2002). Rad Hrenović i sur. (2011) je pokazao da je metabolizam i umnožavanje P-akumulirajuće bakterije *A. junii* bitno uspješnije u filtriranoj nego u autoklaviranoj komunalnoj otpadnoj vodi. Pokusi napravljeni u ovom radu nisu nedvosmisleno potvrdili gore opisane tvrdnje, ali su pokazali da autoklaviranje uzrokuje značajne promjene u sastavu realne otpadne vode. Zbog navedenih tvrdnji tijekom rada odustalo se od pokusa s autoklaviranom vodom.

Također se ustanovilo da dodavanje P u suvišku u otpadnu vodu ne pridonosi tumačenju rezultata pokusa (4.4.1.) pa su pokusi nastavljeni u filtriranoj vodi s količinom P koja je normalno prisutna. Pokazalo se da su koncentracije od 1-2 mgP L⁻¹ sasvim dovoljne za maksimalan rast bakterije *A. junii* u realnoj otpadnoj vodi.

Pokusi s filtriranom komunalnom otpadnom vodom pokazali su da dodavanje bakterije *A. junii* značajno poboljšava uklanjanje P iz vode i da se imobilizacijom bakterija postiže veća brojnost željenih bakterija u reaktoru.

Procijedna voda s odlagališta otpada je prepoznata kao velik ekološki problem. Sastav procijedne vode se znatno razlikuje od odlagališta do odlagališta, a ovisi o više čimbenika kao što su starost odlagališta, vrsta otpada koji se odlaže, količina oborina, klimatsko područje itd. (Renou i sur. 2008). Procijedna voda se uglavnom opisuje osnovnim svojstvima: KPK, BPK, odnos BPK/KPK, suspendirane čestice, amonijak (N-NH₃), ukupni dušik po Kjeldahl-u (TN) i teški metali. Procijedna voda odlagališta otpada Jakuševac se po svojim osobinama (4.4.) može svrstati u tipičnu procijednu vodu starog (>10 godina) odlagališta (Renou i sur. 2008). Otpadna voda ima relativno nisku KPK vrijednost te visoku koncentraciju N i P. Ako usporedimo mjerenja iz 2011.g. s mjerenjima iz 2007. (Hrenović i sur. 2007b) vidimo da se sastav procijedne vode Jakuševca u nekim parametrima znatno mijenjao; vrijednosti KPK i koncentracija P su 2011. skoro deseterostruko manje dok se koncentracija N nije bitno promijenila. Treba naglasiti i da sastav vode ovisi o količini oborina te godišnjem dobu kad su uzeti uzorci, iako su oba uzorkovanja provedena u ljetnom razdoblju.

Sterilizirana procijedna voda nije se pokazala kao medij pogodan za rast i razmnožavanje *A. junii* (4.4.2.). Ovo zapažanje je u skladu s literaturnim navodima gdje je u nekim slučajevima pokazana toksičnost procijedne vode, koja se uglavnom pripisuje velikim koncentracijama amonijaka u vodi, prema bakterijama, račićima, algama i praživotinjama; *Vibrio fischeri*, *Lemna minor*, *Ceriodaphnia dubia*, *Brachionus calyciflorus*, *Spiristomum ambiguum* (Bernard i sur. 1997); *Daphnia magna*, *Raphidocelis subcapitata* (Martinen i sur. 2002). To je još jedan razlog zašto se velika važnost pridaje pročišćavanju procijedne vode. Dodatak nosača, bilo u obliku biočestica ili samog materijala, znatno je poboljšao rast bakterija u reaktorima sa steriliziranom procijednom vodom te sukladno tome i uklanjanje P. Pokazalo se da su bakterije u biofilmu otporne na nepovoljne uvjete ne samo u strogo dizajniranim laboratorijskim pokusima (4.3.1. – 4.3.3.), nego i u stvarnim uvjetima otpadne vode.

5.5. Pokusi s nesteriliziranom komunalnom i procijednom otpadnom vodom

Pokusi s nesteriliziranom otpadnom vodom potvrdili su vjerodostojnost pokusa provedenih u sterilnim sintetskim i realnim otpadnim vodama. Kako je nesterilizirana realna otpadna voda najvjerniji prikaz stvarnih uvjeta industrijskih postrojenja za pročišćavanje otpadne vode, tako i pokusi provedeni u ovakvoj vodi najvjernije prikazuju mogućnosti korištenja tehnologije imobiliziranih bakterija u industrijskim postrojenjima.

I u komunalnoj i u procijednoj vodi dodavanje imobiliziranih bakterija *A. junii* značajno je poboljšalo uklanjanje P iz sustava do te mjere da su količine P nakon inkubacije bile daleko ispod zakonom dopuštene granice od 1 mg L^{-1} (Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda, NN 87/10). Primijećeno je da je uklanjanje P posebno izraženo kad su bakterije *A. junii* dodane u obliku biočestica s već formiranim biofilmom, a poboljšanje u uklanjanju P nije se moglo pripisati samo povećanju broja *A. junii* u reaktoru. Bakterije u obliku biofilma pokazale su značajno bolje uklanjanje P u nesterilnoj otpadnoj vodi.

I u komunalnoj i u procijednoj otpadnoj vodi dodavanje *A. junii*, posebno u obliku biočestica, imalo je sinergistički učinak na prirodno prisutne heterotrofne bakterije u vodi koje su se značajno bolje umnožavale te u velikoj mjeri imobilizirale na već postojeći biofilm biočestica. Nesumnjivo je da se na ovaj način dodatno pojačalo uklanjanje P iz otpadne vode budući da je i među prirodno prisutnim bakterijama veliki broj P-akumulirajućih bakterija, pa povećanjem njihovog broja dolazi do poboljšanog uklanjanja P.

Iako u ovom radu to nije dokazivano moguće je da biofilm *A. junii* na biočesticama dodanim u nesteriliziranu otpadnu vodu poboljšava uklanjanje P i procesom horizontalnog transfera ili indukcije gena za koji je poznato da se događa unutar biofilmova čak i među bakterijama različitih vrsta (Molin i Nielsen, 2003). Budući da je pokazano kako je genski mehanizam akumulacije P u bakterija induciran okolišnim uvjetima (Keasling i sur. 1999), biofilm uspostavljen od P-uklanjajućih bakterija i dodavan u otpadnu vodu mogao bi inducirati ekspresiju genskog mehanizma za uklanjanje P u drugih već prisutnih P-uklanjajućih bakterija u otpadnoj vodi.

ZAKLJUČAK

6. Zaključak

Svi prirodni materijali korišteni u pokusima (prirodni zeolitni tuf, bentonit, sepiolit i perlit) pokazali su se kao dobri nosači bakterija. Jedini materijal koji se nije mogao koristiti kao nosač bakterije *A. junii* bio je sintetski zeolit A, koji je bio toksičan prema bakteriji.

Čimbenici koji značajno utječu na proces imobilizacije bakterije *A. junii* na nosače bili su;

- 1) Veličina čestica – što su čestice nosača manje to je veći broj imobiliziranih bakterija po masenoj jedinici.
- 2) Toksičnost – bitno je da sam materijal ni na koji način ne djeluje toksično prema bakteriji, niti u interakciji sa imobiliziranim stanicama niti u vodenom mediju otpuštanjem toksičnih tvari.

Čimbenici koji značajnije ne utječu na proces imobilizacije bakterije *A. junii* na nosače bili su;

- 1) Mineraloški i kemijski sastav materijala – nije se pokazalo da mineraloški i kemijski sastav materijala značajnije povećavaju ili smanjuju broj bakterija imobiliziranih na čestice nosača
- 2) Naboj površine nosača – svi ispitani materijali bili su negativno nabijeni jednako kao i bakterija *A. junii*, no unatoč odbojnim elektrostatskim silama bakterije su se adsorbirale i imobilizirale na površinu nosača. Nije se pokazalo da elektronegativnost nosača značajno korelira s brojem imobiliziranih bakterija.
- 3) Površina nosača – nije se pokazalo da površina nosača, u ovom radu određena kao SSA (*engl. Specific Surface Area*), značajno utječe na broj bakterija *A. junii* imobiliziranih na nosač.

Iz pokusa s biočesticama i realnom komunalnom i procijednom vodom moglo se donijeti nekoliko ključnih zaključaka:

- 1) Biočestice s imobiliziranom bakterijom *A. junii* pokazivale su postojanost bez obzira na vrstu otpadne vode, biofilm je bio postojan tijekom 24 h inkubacije te je dolazilo do odvajanja bakterija s površine nosača, koje su obogaćivale okolni medij.
- 2) Biočestice su se pokazale postojanima i u uvjetima u kojima sama otpadna voda nije bila pogodna za rast i razmnožavanje bakterije *A. junii*.
- 3) Primijećena je velika razlika u rezultatima kad su pokusi rađeni u komunalnoj i procijednoj otpadnoj vodi steriliziranoj filtriranjem i nesteriliziranoj otpadnoj vodi.
- 4) Biočestice su pokazale postojanost i u pokusima s nesteriliziranom otpadnom vodom, što odgovara uvjetima kakvi se mogu naći u industrijskim postrojenjima za pročišćavanje vode. Unatoč velikom broju prirodno prisutnih heterotrofnih bakterija biofilm bakterija *A. junii* na biočesticama je ostao postojan tijekom 24 h inkubacije te je otpadna voda uspješno bioaugmentirana.
- 5) Dodavanje biočestica u velikoj mjeri povećava broj prirodno prisutnih heterotrofnih bakterija u nesterilnoj komunalnoj i procijednoj otpadnoj vodi.

Smatra se da bi za korištenje u realnim otpadnim vodama tehnologija dodavanja biočestica bila pogodnija od dodavanja zasebno čiste kulture bakterije i nosača jer bi s biočesticama u bioreaktor unijeli maksimalnu količinu željenih bakterija. Dodavanjem nosača i kulture bakterije zasebno imobilizirale su se i prirodno prisutne bakterije koje su bolje prilagođene za rast i razmnožavanje u realnoj vodi što je smanjivalo broj imobiliziranih stanica *A. junii* u odnosu na biočestice. Uz to, na biočesticama su bakterije u biofilmu bile zaštićene od štetnih vanjskih uvjeta, a uklanjanje P je u svim slučajevima bilo povećano kad su u vodu dodavane biočestice.

LITERATURA

7. Literatura

- Alarcon G.O. (1961). Removal of phosphorus from sewage, Neobjavljeni magistarski rad, John Hopkins University, Baltimore.
- Albareda M., Rodriguez-Navarro D.N., Camacho M., Temprano F.J. (2008). Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2771-2779.
- Alvarez-Ayuso A., Garcia-Sanchez A. (2003). Sepiolite as a feasible soil additive for the immobilization of cadmium and zinc, *Sci. Total Environ.* 305, 1-12.
- Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1818-1824.
- Armbruster T. (2001). Clinoptilolite-heulandite: applications and basic research. Zeolites and Mesoporous Materials at the Dawn of the 21st Century, Proceedings of the 13th International Zeolite Conference, Montpellier, France, Studies in Surface Science and Catalysis Vol.135, A. Galerneau, F. Di Renzo, F. Fajula and J. Viedrine eds., Elsevier Science B.V., Amsterdam, 13-27.
- Arnaiz C., Gutierrez J.C., Lebrato J. (2006). Support material selection for anaerobic fluidized bed reactors by phospholipid analysis, *Biochem. Eng. J.* 27, 240-245.
- Banks K.M., Wei Y., Govindaraju R.S. (2003). Bacterial adsorption and transport in saturated soil columns, *J. Environ. Sci. Health Part A: Toxic/Hazard. Subst.* 28, 2749-2758.
- Barth E.F., Ettinger M.B. (1967). Mineral controlled phosphorus removal in activated sludge process, *J. WPCF* 39, 1362.
- Bauman M., Mesaric M., Ribar S., Maric V., Tudja M. (2001). Natural zeolite clinoptilolite increases the concentrations of sphingoid bases in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *J. Basic. Microb.* 41, 7-16.
- Baumann P., Doudoroff M., Stainer R.Y. (1968). A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J. Bacteriol.* 95, 1520-1541.

- Bernard C., Colin J.R., Le Dû-Delepierre A. (1997). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates, *Chemosphere* 35, 2783-2796.
- Bliss P.J., Ostarcevic E.R., Potter A.A. (1994). Process optimization for simultaneous biological nitrification and chemical phosphorus removal, *Water. Sci. Technol.* 29, 107-115.
- Bond P.L., Hugenholtz P., Keller J., Blackall L.L. (1995). Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate removing activated sludges from sequencing batch reactors, *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1910-1916.
- Bond P.L., Keller J., Blackall L.L. (1999). Anaerobic phosphate release from activated sludge with enhanced biological phosphorus removal. A possible mechanism of intracellular pH control, *Biotechnol. Bioeng.* 63, 507-515.
- Bonting C.F.C., van Veen H.W., Taverne A., Kortstee G.J.J., Zehnder A.J.B. (1992). Regulation of polyphosphate metabolism in *Acinetobacter* strain 210A grown in carbon- and phosphate-limited continuous cultures, *Arch. Microbiol.* 158, 139-144.
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Juretschko S., Doré J., Delgenés P., Moletta R., Wagner M. (2000). Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* 2, 179-190.
- 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 lwoffii*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 228-240.
- Brdjanovic D., Hooijmans C.M., van Loosdrecht M.C.M., Alaerts G.J., Heijnen J.J. (1996). The dynamic effects of potassium limitation on biological phosphorus removal, *Water. Res.* 30, 2323-2328.
- Buchan L. (1983). Possible biological mechanism of phosphorus removal, *Wat. Sci. Tech.* 15, 87-103.

- Burke V., Baird L.A. (1931). Fate of fresh water bacteria in the sea, *J. Bacteriol.* 21, 287-298.
- Can M.F., Cinar M., Benli B., Ozdemir O., Celik M.S. (2010). Determining the fiber size of nano structured sepiolite using Atomic Force Microscopy (AFM). *Appl. Clay Sci.* 47, 217-222.
- Caravelli A.H., Contreras E.M., Zaritzky N.E. (2010). Phosphorus removal in batch systems using ferric chloride in the presence of activated sludges, *J. Haz. Mat.* 177, 199-208.
- Carlucci A.F., Pramer D. (1960a). An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater II, *Appl. Microbiol.* 8, 243-247.
- Carlucci A.F., Pramer D. (1960b). An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater I, *Appl. Microbiol.* 8, 243-247.
- Carr E.L., Kämpfer P., Patel B.K.C., Gürtler V., Seviour R.J. (2003). Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge, *Int. J. Syst. Evo. Microbiol.* 52, 953-963.
- Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret A. (1999). The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *J. Clin. Microbiol.* 37, 1771-1776.
- Chang Y., Pfeffer Y.T., Chian E.S. (1979). Comparative study of different iron compounds in inhibition of *Sphaerotilus* growth, *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 385-389.
- Chudoba P., Pannier M. (1994). Use of powdered clay to upgrade activated sludge process, *Environ. Technol.* 15, 863-870.
- Cloete T.E., Oosthuizen D.J. (2001). The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge, *Water Res.* 35, 3595-3598.
- Cloete T.E., Steyn P.L. (1988). Combined membrane filter-immunofluorescent technique for the in situ identification and enumeration of *Acinetobacter* in activated sludge, *Water Res.* 22, 961-969.

- Comeau Y., Hall K.J., Hancock R.E.W., Oldham W.K. (1986). Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal, *Wat. Res.* 20, 1511-1521.
- Comeau Y., Rabinowitz B., Hall K.J., Oldham W.K. (1987). Phosphate release and uptake in enhanced biological phosphorus removal from wastewater, *Journal WPCF* 59, 707-715.
- Conner D.E. (1991). Temperature and NaCl affect growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in poultry-based and laboratory media, *J. Food Sci.* 57, 532-533.
- Coombs D.S., Alberti A., Armbruster T., Artioli G., Colella C., Galli E., Grice J.D., Liebau F., Mandarino J.A., Minato H., Nickel E.H., Passaglia E., Peacor D.R., Quartieri S., Rinaldi R., Ross M., Sheppard R.A., Tillmanns E., Vezzadini G. (1997). Recommended nomenclature for zeolite minerals: report of the subcommittee on zeolites of the international mineralogical association, commission on new minerals and mineral names, *The Canadian Mineralogist* 35, 1571-1606.
- Dadić Ž. (2001). Priručnik o temeljnoj kakvoći vode u Hrvatskoj, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb.
- Duman O., Tunc S. (2009). Electrokinetic and rheological properties of Na-bentonite in some electrolyte solutions, *Micropor. Mesopor. Mat.* 117, 331-338.
- 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, *Appl. Environ. Microb.* 60, 3329-3335.
- Eberhardt W.A., Nesbitt J.B. (1968). Chemical precipitation of phosphorus in a high-rate activated sludge system, *J. WPCF* 40, 1239.
- Eikelboom D.H., van Buijsen H.J.J. (1983). Microscopic sludge investigation manual. (2nd edn.) TNO Research Institute of Environmental Hygiene, Delft.
- Ersoy B., Celik M.S. (2002). Elektrokinetic properties of clinoptilolite with mono- and multivalent electrolytes, *Micropor. Mesopor. Mat.* 55, 305-312.
- Fernández N., Montalvo S., Fernández-Polanco F., Guerrero L., Cortéz I., Borja R., Sánchez E., Travieso L. (2007). Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anaerobic fluidized bed reactors, *Process Biochem.* 42, 721-728.

- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady C.P.L. (2001a). Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs, *Biotechnol. Bioeng.* 76, 32-43.
- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady C.P.L. (2001b). Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms, *Water Environ. Res.* 73, 213-222.
- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady C.P.L. (2001c). pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms, *Water Environ. Res.* 73, 223-232.
- Flemming H.C. (1995). Sorption sites in biofilms, *Water Sci. Technol.* 32, 27-33.
- Fuhs G.W., Chen M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater, *Microbial Ecol.* 2, 119-138.
- Galan E. (1996). Properties and applications of palygorskite-sepiolite clays, *Clay Minerals* 31, 443-453.
- Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Volume 2. Part B, Springer, New York.
- Gevorkyan R., Guyumyan O., Djrbashyan R., Mnackanyan A., Michitaryan R., Petrosov I., Sadoyan A., Sargsyan H. (2001). Deposits of Armenian zeolites, 13th International Zeolite Conference, Recent research reports, Montpellier, France, 01-R-03.
- Gu A.Z., Saunders A.M., Neethling J.B., Stensel H.D., Blackall L. (2005). In: WEF (Ed.) *Investigation of PAOs and GAOs and their effects on EBPR performance at full-scale wastewater treatment plants in US*, October 29-November 2, WEFTEC, Washington DC, USA.
- Guggenheim S., Martin R.T. (1995). Definition of clay and clay mineral: joint report of the AIPEA nomenclature and CMS nomenclature committees, *Clays and Clay Minerals* 43, 255-256.

- 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 review, *Water SA* 26, 439-452.
- Hajmeer M., Ceylan E., Marsden J.L., Fung D.Y.C. (2006). Impact of sodium chloride on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* analysed using transmission electron microscopy, *Food Microbiol.* 23, 446-452.
- Harvey C.C., Lagaly G. (2006). Conventional applications, u *Handbook of Clay Science*, Edited by: Bergaya F., Theng B.K.G., Lagaly G., Elsevier Ltd. UK, ISSN: 1572-4352, pp. 501-540.
- He Q.H., Leppard G.G., Paige C.R., Snodgrass W.J. (1996). Transmission electron microscopy of a phosphate effect on the colloid structure of iron hydroxide, *Water Res.* 30, 1345-1352.
- Henze M., Comeau Y. (2008). Wastewater characterization, u Mark C. Wentzel; *Biological wastewater treatment: Principles Modelling and Design*. Edited by M. Henze, M.C.M. van Loosdrecht, G.A. Ekama and D. Brdjanovic. ISBN: 9781843391883. Published by IWA Publishing, London, UK.
- Hepper E.N., Buschiazzo D.E., Hevia G.G., Urioste A., Anton L. (2006), Clay mineralogy, cation exchange capacity and specific surface area of loess soils with different volcanic ash contents, *Geoderma* 135, 216-223.
- HERA 2004. – Human & Environmental Risk Assessment on ingredients of European household cleaning products, Zeolite A represented by CAS Number 1344-00-9 (Sodium Aluminium Silicate) and by CAS Number 1318-02-1 (Zeolites). Version 3.0, 2004.
- Hesselmann R.P., Werlen C., Hahn D., van der Meer J.R., Zehnder A.J. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge, *System Appl. Microbiol.* 22, 454-465.

- Hollender J., Dreyer U., Kornberger L., Kämpfer P., Dott W. (2002). Selective enrichment and characterization of a phosphorus-removing bacterial consortium from activated sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 106-111.
- Horn H., Morgenroth E. (2006). Transport of oxygen, sodium chloride, and sodium nitrate in biofilms, *Chem. Eng. Sci.* 62, 1347-1356.
- Hrenović J., Tibljaš D., Büyükgüngör H., Orhan Y. (2003a). Influence of support materials on phosphate removal by the pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*, *Food. technol. Biotechnol.* 41, 331-338.
- Hrenovic J., Büyükgüngör H., Orhan Y. (2003b). Use of natural zeolite to upgrade activated sludge process, *Food technol. Biotechnol.* 41, 157-165.
- Hrenovic J., Tibljas D., Orhan Y., Büyükgüngör H. (2005). Immobilisation of *Acinetobacter calcoaceticus* using natural carriers, *Water SA* 31, 261-266.
- Hrenovic J., Tibljas D., Sekovanic L. (2007a). Aluminosilicates as carriers of phosphate-accumulating bacteria, *Acta Chim. Slov.* 54, 661-666.
- Hrenović J., Ivanković T., Farkaš A., Tofant A., Rožić M., Sekovanić L., Tišma S. (2007b). Mogućnosti biološkog pročišćavanja procijednih voda odlagališta otpada Jakuševac, *Tehnologije obrade voda, Zadar, Zbornik sažetaka*, 9-14.
- Hrenovic J., Rozic M., Sekovanic L., Anic-Vucinic A. (2008). Interaction of surfactant modified zeolites and phosphate accumulating bacteria, *J. Haz. Mat.* 156, 576-582.
- Hrenovic J. (2009). Interaction of zeolites and phosphate accumulating bacteria, iz: U.T.W. Wong (Ed.), *Handbook of zeolites: Structure, Properties and Applications*, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge NY, USA, pp. 439-467.
- Hrenovic J., Ivankovic T., Tibljas D. (2009). The effect of mineral carrier composition on phosphate-accumulating bacteria immobilization, *J. Haz. Mat.* 166, 1377-1382.
- Hrenovic J., Tibljas D., Ivankovic T., Kovacevic D., Sekovanic L. (2010a). Sepiolite as carrier of the phosphate-accumulating bacteria *Acinetobacter junii*, *Appl. Clay Sci.* 50, 582-587.

- Hrenović J., Željezić D., Kopjar N., Sarpola A., Bronić J., Sekovanić L. (2010b). Antimicrobial activity of commercial zeolite A on *Acinetobacter junii* and *Saccharomyces cerevisiae*, J. Haz. Mat. 183, 655-663.
- Hrenovic J., Ivankovic T., Rozic M. (2010c). Requirement of *Acinetobacter junii* for magnesium, calcium and potassium ions, J. Biosci. Bioeng. 110, 180-186.
- Hrenovic J., Kovacevic D., Ivankovic T., Tibljas D. (2011). Selective immobilization of *Acinetobacter junii* on the natural zeolitized tuff in municipal wastewater, Coll. Surf. B. 88, 208-214.
- Imai H., Endoh K., Kozuka T. (1988). Magnesium requirement for biological removal of phosphate by activated sludge, J. Ferment. Technol. 66, 657-666.
- 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, Ljubljana 17.-18. October, Proceedings, 73-76.
- Ivankovic T., Hrenovic J., Sekovanic L. (2010). Influence of the degree of prelite expansion on immobilization of *Acinetobacter junii*, Biochem. Eng. J. 51, 117-123.
- Jay J.M. (1992). Modern Food Microbiology, Van Nostrand Reinhold Co., New York.
- Jiang D., Huang Q., Cai P., Rong X., Chen W. (2007). Adsorption of *Pseudomonas putida* on clay minerals and iron oxide, Colloids Surf. B. 54, 217-221.
- Johnson J.L., Anderson R.S., Ordal E.J. (1970). Nucleic acid homologies among oxidative-negative *Moraxella* species, J. bacteriol. 101, 568-573.
- Kariminiaae-Hamedani H.R., Kanda K., Kato F. (2003). Wastewater treatment with bacteria immobilized onto a ceramic carrier in an aerated system, J. Biosci. Bioeng. 95, 128-132.
- Kaya A., Oren A.H. (2005). Adsorption of zinc from aqueous solutions to bentonite, J. Haz. Mat. B 125, 183-189.

- Keasling J.D., van Dien S.J., Trelstad P., Renninger N., McMahon K. (1999). Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems, *Biochem. (Moscow)* 65, 324-331.
- Kern-Jespersen J.P., Henze M. (1993). Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions, *Wat. Res.* 27, 617-624.
- Kim H., Ryu J.H., Beuchat L.R. (2007). Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm, *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1256-1265.
- Kong Y.H., Nielsen J.L., Nielsen P.H. (2004). Microautoradiographic study of Rhodocyclus-related polyphosphate accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5383-5390.
- Korkuna O., Leboda R., Skubiszewska-Zieba J., Vrublevs'ka T., Gun'ko V.M., Ryczkowski J. (2006). Structural and physicochemical properties of natural zeolites; clinoptilolite and mordenite, *Micropor. Mesopor. Mater.* 87, 243-254.
- 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.
- Krassilnikov N.A. (1938). The bactericidal action of sea water, *Mikrobiologiya* 7, 329-334.
- Kuba T., Wachtmeister A., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1996). Metabolic model for biological phosphorus removal by denitrifying organisms, *Biotech. Bioeng.* 52, 685-695.
- Lagaly G. (2006). Colloid Clay Science, u Handbook of Clay Science, Edited by: Bergaya F., Theng B.K.G., Lagaly G., Elsevier Ltd. UK, ISSN: 1572-4352, pp. 141-245.
- Liu W.T., Mino T., Matsuo T., Nakamura K. (1996). Biological phosphorus removal process – effect of pH on anaerobic substrate metabolism, *Wat. Sci. Technol.* 34, 25-32.

- Lu C., Zhang F., Lu Y., Liu Y., Zhong S. (2011). Screening and identification of aerobic denitrifier with nitrite as substrate, Proceedings: 2nd Conference on Mechanic Automation and Control Engineering (MACE), 15-17 July, Hohhot, China, pp. 3418-3421.
- Lyew D., Guiot S.R., Monot F., Fayolle-Guichard F. (2007). Comparison of different support materials for their capacity to immobilize *Mycobacterium austroafricanum*, *Enzyme Microbiol. tech.* 40, 1524-1530.
- Martin H.G., Ivanova N., Kunin V., Warnecke F., Barry K.W., McHardy A.C., Yeates C., He S.M., Salamov A.A., Szeto E., Dalin E., Putnam N.H., Shapiro H.J., Pangilinan J.L., Rigoutsos I., Kyrpides N.C., Blackall L.L., McMahon K.D., Hugenholtz P. (2006). Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities, *Nature Biotech.* 24, 1263-1269.
- Marttinen S.H., Kettunen R.H., Sormunen K.M., Soimasuo R.M., Rintala J.A. (2002). Screening of physical-chemical methods for removal of organic material, nitrogen and toxicity from low strength landfill leachates, *Chemosphere* 46, 851-858.
- Maszenan A.M., Seviour R.J., Patel B.K.C., Schumann P., Burghardt J., Tokiwa Y., Stratton H.M. (2000). Three isolates of novel polyphosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov., *Internat. J. Systematic Evolutionary Microbiol.* 50, 593-603.
- Meinhold J., Arnold E., Isaacs S. (1999). Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge, *Water Res.* 33, 1871-1883.
- Merode van J.A.E., van der Mei C.H., Busscher H.J., Krom B.P. (2006). Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*, *J. Bacteriol.* 188, 2421-2426.
- Merzouki M., Delgenes J.P., Bernet N., Moletta R., Benlemlih M. (1999). Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactors, *Curr. Microbiol.* 38, 9-17.

- 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.
- Mino T., Liu W.T., Kurisu F., Matsuo T. (1995). Modeling glycogen-storage and denitrification capability of microorganisms in enhanced biological phosphate removal processes. *Water Sci. Technol.* 31, 25-34.
- Mino T., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1998). Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process, *Wat. Res.* 32, 3193-3207.
- Molin S., Tolker-Nielsen T. (2003). Genetransfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure, *Curr. opin. Biotechnol.* 14, 255-261.
- Montalvo S., Díaz F., Guerrero L., Sánchez E., Borja R. (2005). Effect of particle size and doses of zeolite addition on anaerobic digestion processes of synthetic and piggery wastes, *Process Biochem.* 40, 1475-1481.
- Morgenroth E. (2008). Biofilm reactors, u Mark C. Wentzel; Biological wastewater treatment: Principles Modelling and Design. Edited by M. Henze, M.C.M. van Loosdrecht, G.A. Ekama and D. Brdjanovic. ISBN: 9781843391883. Published by IWA Publishing, London, UK.
- Murray H.H. (2007). Applied clay mineralogy – Occurrences, processing and application of kaolines, bentonites, palygorskite-sepiolite, and common clays, Elsevier, UK, ISSN: 1572-4352.
- Muyima N.Y.O., Cloete T.E. (1995). Immobilization of *Acinetobacter johnsonii* within alginate beads, *Water SA* 21, 239-244.
- Myriam M., Suarez M., Martin Pozas J.M. (1998). Structural and textural modification of palygorskite and sepiolite under acid treatment, *Clays Clay Miner.* 46, 225-231.
- Nakamura K., Ishikawa S., Kawaharasaki M. (1995). Phosphate-uptake and release activity in immobilized polyphosphate-accumulating bacterium *Microlunatus phosphovorus* strain NM-1, *J. Ferment. Bioeng.* 80, 377-382.

- Nicola R.S., Lazazzera B.A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation, *Mol. Microbiol.* 52, 917-924.
- Nusbaum I., Garver R.M. (1955). Survival of coliform organisms in Pacific Coastal waters, *Sewage and Industry Wastes* 27, 1383-1390.
- Oehmen A., Lemos P.C., Carvalho G., Yuan Z., Keller J., Blackall L.L., Reis M.A.M. (2007). Advances in enhanced biological phosphorus removal: From micro to macro scale, *Wat. Res.* 41, 2271-2300.
- Ogawa K. (1974). Some factors affecting the survival of coliform bacteria in seawater, *J. Oceanograph.* 30, 54-60.
- Ostle A.G., Holt J.G. (1982). Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate, *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 238-241.
- Pichór W., Janiec A. (2009). Thermal stability of expanded perlite modified by mullite, *Ceramics Int.* 35, 527-530.
- Rahmani A.R., Mahvi A.H., Mesdaghinia A.R., Nasser S. (2004). Investigation of ammonia removal from polluted waters by clinoptilolite zeolite, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 1, 125-133.
- Rao M.K.Y., Somasundaran P., Schilling K.M., Carson B., Ananthapadmanabhan K.P. (1993). Bacterial adhesion onto apatite minerals-electrokinetic aspects, *Coll. Surf. A.* 79, 293-300.
- Renou S., Givaudan J.G., Poulain S., Dirassouyan F., Moulin P. (2008). Landfill leachate treatment: Review and opportunity, *J. Haz. Mat.* 150, 468-493.
- Ribeiro F.R., Alvarez F., Henriques C., Lemos F., Lopes J.M., Ribeiro M.F. (1995). Structure-activity relationship in zeolites, *J. Mol. Catal.* 96, 245-270.
- Rickard L.F., McClintock S.A. (1992). Potassium and magnesium requirements for enhanced biological phosphorus removal from wastewater, *Water Sci. Technol.* 26, 2203-2206.

- Rosenberg E., Rubinovitz C., Gottlieb A., Rosenhak S., Ron E.Z. (1988). Production of dispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. Appl. Environ. Microbiol. 54, 317-322.
- Rosenfeld W.D., ZoBell C.E. (1947). Antibiotic production by marine microorganisms, J. Bacteriol. 54, 393-398.
- Rustrian E., Delgenes J.P., Moletta R. (1997). Phosphate release and uptake by pure cultures of *Acinetobacter* sp. effect of the volatile fatty acid concentration, Curr. Microbiol. 34, 43-48.
- Saunders A.M., Oehmen A., Blackall L.L., Yuan Z., Keller J. (2003). The effect of GAOs (glycogen accumulating organisms) on anaerobic carbon requirements in full-scale Australian EBPR (Enhanced biological phosphorus removal) plants. Water Sci. Technol. 47, 37-43.
- Schirmer F., Ehrt S., Hillen W. (1997). Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250, J. Bacteriol. 179, 1329-1336.
- Schönbörn C., Bauer H.D., Röske I. (2001). Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules, Water Res. 35, 3190-3196.
- Seviour R.J., Mino T., Onuki M. (2003). The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems, FEMS Microbiol. Rev. 27, 99-127.
- Shindo S., Takata S., Taguchi H., Yoshimura N. (2001). Development of novel carrier using natural zeolite and continuous ethanol fermentation with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a bioreactor, Biotechnol. Lett. 23, 2001-2004.
- Sidat M., Bux F., Kusan H.V. (1999). Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge, Water SA 25, 175-179.
- Smital T., Terzic S., Zaja R., Senta I., Pivcevic B., Popovic M., Mikac I., Tollefsen K.E., Thomas K.V., Ahel M. (2011). Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays, Ecotox. Environ. Saf. 74, 844-851.

- Smolders G.J.F., Vandermeij J., Vanloosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (1994). Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process – stoichiometry and pH influence, *Biotechnol. Bioeng.* 43, 461-470.
- Srinath E.G., Sastry C.A., Pillai S.C. (1959). Rapid removal of phosphorus from sewage by activated sludge, *Experientia* 15, 339-340.
- Stante L., Cellamare C.M., Malaspina F., Bortone G., Tilche A. (1997). Biological phosphorus removal by pure culture of *Lamprospira* spp., *Wat. Res.* 31, 1317-1324.
- Stein R. (2000). Know the enemy: understanding the basis of foodborne pathogens, *Meat Poultry* 10, 46-51.
- Stewart P.S., Costerton J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet* 358, 135-138.
- Sutherland I.W. (2001). The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9, 222-227.
- Tandoi V., Majone M., May J., Ramadori R. (1998). The behaviour of polyphosphate accumulating acinetobacter isolates in an anaerobic-aerobic chemostat, *Water Res.* 32, 2903-2912.
- Tibljaš D., Šćavničar S. (2007). Nalazišta zeolitnog tufa na području Krapine, u *Prirodni zeolitni tuf iz Hrvatske u zaštiti okoliša*, izdavač: Institut za međunarodne odnose, zagreb – IMO, ISBN 978-953-6096-38-1.
- Towner K. (2006). The genus *Acinetobacter*, iz: *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Gamma Subclass*, Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, E. Stackebrandt. Springer, New York. Volume 6, pp. 746-758.
- Ubukata Y., Takii S. (1994). Induction method of excess phosphate accumulation for phosphate removing bacteria isolated from anaerobic/aerobic activated sludge, *Water Res.* 28, 247-249.
- Vaccaro R.F., Briggs M.P., Carey C.L., Ketchum B.H. (1950). Viability of *Escherichia coli* in sea water, *American J. Pub. Health* 40, 1257-1266.

- Vierkant M.A., Martin D.W., Stewart J.R. (1990). Poly- β -hydroxybutyrate production in eight strains of the genus *Acinetobacter*, Canadian J. Microbiol. 36, 657-663.
- Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D., Schleifer K.H. (1994). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge, Appl. Environ. Microbiol. 60, 792-800.
- Warne M.St.J., Schiffko A.D., Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity, Ecotoxicol. Environ. Saf. 44, 196-206.
- Watanabe K., Miyashita M., Harayama S. (2000). Starvation improves survival of bacteria introduced into activated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3905-3910.
- Wentzel M.C., Comeau Y., Ekama G.A., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. (2008). Enhanced biological phosphorus removal, u M. C. Wentzel; Biological wastewater treatment: Principles Modelling and Design. Edited by M. Henze, M.C.M. van Loosdrecht, G.A. Ekama and D. Brdjanovic. ISBN: 9781843391883. Published by IWA Publishing, London, UK.
- Wentzel M.C., Lötter L.H., Loewenthal R.E., Marais G.v.R. (1986). Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorus removal – A biochemical model, Water SA 12, 209-224.
- Weon S.Y., Lee C.W., Lee S.I., Koopman B. (2002). Nitrite inhibition of aerobic growth of *Acinetobacter* sp. Water Res. 36, 4471-4476.
- Wimmer J., Buhl R. (1998), Einsatz von Bleicherde zur Schlammbeschwerung auf einer Klaranlage der Milchindustrie, Luft und Boden, Wasser, 11-12
- Wong M.T., Mino T., Seviour R.J., Onuki M., Liu W.T. (2005). In situ identification and characterization of the microbial community structure of full-scale enhanced biological phosphorus removal plants in Japan, Water Res. 39, 2901-2914.
- Wuhrmann K. (1968). Objective, technology and results of nitrogen and phosphorus removal processes, Adv. Water Quality Improvement, Univ. of Texas Press., 21.

- Yalçın N., Sevinç V. (2000), Studies of the surface area and porosity of activated carbons prepared from rice husks, *Carbon* 38, 1943-1945.
- Yang X., Li W., Chen Y., Cao Y. (2011). Identification and denitrification of an aerobic bacterium, *Acta Microbiologica Sinica* 51, 1062-1070.
- ZoBell C.E. (1946). *Marine Microbiology*, Chronica Botanica Co., Waltham, SAD.

8. Životopis

Tomislav Ivanković rođen je 9.3.1981. u Zagrebu. U zagrebu je završio osnovnu i srednju školu te je diplomirao pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, smjer dipl. ing. biologije–molekularna biologija. Diplomski rad pod naslovom „Dimorfizam A/G gena za monoamin-oksidadu B u osoba oboljelih od autizma“ izradio je na Institutu Ruđer Bošković.

U akademskoj godini 2007/2008. upisao je sveučilišni znanstveni poslijediplomski doktorski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. U akademskoj godini 2009/2010. upisuje poslijediplomski doktorski studij Biologije pri PMF-u Sveučilišta u Zagrebu.

U razdoblju od veljače do srpnja 2007. volontirao je u Bakteriološkom laboratoriju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Uz to je kao vanjski suradnik bio voditelj praktičnih vježbi iz kolegija Mikrobiologija za studente preddiplomskih studija.

U srpnju 2007. Tomislav je zaposlen na radno mjesto znanstvenog novaka na Biološkom odsjeku PMF-a, na projektu financiranom od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa pod nazivom „Međudodnos mineralnih nosača i fosfat-uklanjajućih bakterija u otpadnim vodama“ šifra: 119-1191155-1203, pod vodstvom prof.dr.sc. Jasne Hrenović.

Voditelj je praktične nastave iz 4 kolegija preddiplomskih i diplomskih studija; Opća mikrobiologija, Mikrobiologija, Bakteriologija i virologija i Mikrobiologija, te 3 kolegija diplomskih studija; Bioremedijacija, Bakteriologija onečišćenih voda i Ekologija bakterija i virusa.

Do sada je objavio 13 znanstvenih radova, od toga 7 u časopisima citiranim u *Current Contents* bazi podataka (u dva rada je prvi autor), 5 u časopisima citiranim u *Science Citation Indeks* bazi podataka (u jednom radu je prvi autor) i 1 u časopisu s međunarodnom recenzijom.

Sudjelovao je na 5 međunarodnih i 5 domaćih znanstvenih skupova s međunarodnim sudjelovanjem.

PRILOZI

Prilog 1: Metoda bojanja po Gramu

Preparat se pripremi tako da se na čisto i odmašćeno predmetno stakalce (provlačenje predmetnice kroz plamen) steriliziranom bakteriološkom ušicom stavi nekoliko kapi vodovodne vode. U kapljici vode se prenese s agara mala količina bakterijske kolonije i razvuče po stakalcu u što tanjem sloju. Preparat se ostavi da se osuši na sobnoj temperaturi i onda se osušeni razmaz fiksira provlačenjem predmetnice tri puta kroz plamen.

Gram pozitivne bakterije su obojane tamno-ljubičasto, a Gram negativne bakterije su obojane ružičasto.

Postupak:

Kristal violet.....3-5 min

Lugol.....1-2 min

Ispiranje etanolom (96%)

Ispiranje vodom

Karbol fuksin.....0,5-1 min

Ispiranje vodom

Reagensi korišteni za metodu bojanja po Gramu

Reagens	Sastav
Kristal violet	Otopina A
	Kristal violet 2,0 g
	Etanol 96% 20,0 ml
	Otopina B
	Amonij-oksalat 0,8 g
	Destilirana voda 80,0 ml
	Nakon priprave pomiješati otopine A i B
Lugol	Jod 1,0 g
	Kalij-jodid 2,0 g
	Destilirana voda 300,0 ml
Karbol fuksin	Otopina A
	Bazični fuksin 0,3 g
	Etanol (96%) 10,0 ml
	Otopina B
	Fenol 5,0 g
	Destilirana voda 95,0 ml
	Nakon priprave pomiješati otopine A i B

Prilog 2: Metoda bojanja po Neisseru (Eikelboom i van Buijsen, 1983)

Preparat se pripremi tako da se na čisto i odmašćeno predmetno stakalce (provlačenje predmetnice kroz plamen) steriliziranom bakteriološkom ušicom stavi nekoliko kapi vodovodne vode. U kapljici vode se prenese s agara mala količina bakterijske kolonije i razvuče po stakalcu u što tanjem sloju. Preparat se ostavi da se osuši na sobnoj temperaturi i onda se osušeni razmaz fiksira provlačenjem predmetnice tri puta kroz plamen.

Nakupljeni poli-P se vide kao tamno-ljubičasto obojena volutinska zrnca unutar bakterijske stanice.

Postupak:

Neisser I.....1-2 min

Neisser II.....1-2 min

Ispiranje vodom

Reagensi korišteni za metodu bojanja po Neisseru

Reagens	Sastav
Neisser I	Otopina A
	Metilen-plavo 1,0 g
	Etanol 96% 20,0 ml
	Octena kiselina(glaciale) 50,0 ml
	Destilirana voda 1000,0 ml
	Otopina B
	Kristal-violet 1,0 g
	Etanol (96%) 10,0 ml
	Destilirana voda 300,ml
	Nakon pripreme pomiješati dva dijela Otopine A i jedan dio otopine B
Neisser II	Hrizoidin 1,0 g
	Destilirana voda 300,0 ml

Prilog 3: Metoda fluorescencijskog bojanja poli-beta-hidroksibutirata s Nile blue A (Ostle i Holt, 1982)

Preparat se pripremi tako da se na čisto i odmašćeno predmetno stakalce (provlačenje predmetnice kroz plamen) steriliziranom bakteriološkom ušicom stavi nekoliko kapi vodovodne vode. U kapljici vode se prenese s agara mala količina bakterijske kolonije i razvuče po stakalcu u što tanjem sloju. Preparat se ostavi da se osuši na sobnoj temperaturi i onda se osušeni razmaz fiksira provlačenjem predmetnice tri puta kroz plamen.

Obojana zrnca PHB unutar bakterijskih stanica emitiraju sjajnu narančastu svjetlost kad ih se pobudi svjetlošću valne duljine od 460 nm i pregledava pod fluorescencijskim mikroskopom.

Postupak:

Nile blue A.....10 min na 55°C

Ispiranje vodom

Ispiranje octenom kiselinom.....1 min

Ispiranje vodom

Napomena

Za pregledavanje preparata pod mikroskopom potrebno je koristiti pokrovno stakalce zato što imerziono ulje izaziva žutu fluorescenciju što ometa gledanje preparata. Pokrovno stakalce se stavi na obojeni preparat pomoću kapljice vode.

Reagensi korišteni za metodu bojanja s Nile blue A

Reagens		Sastav
Nile blue A	Nile blue A	1 g
	Destilirana voda	100 ml
Octena kiselina	Octena kiselina	8 ml
	Destilirana voda	92 ml

Prilog 4: Sušenje nosača s imobiliziranim bakterijama kao priprema za SEM (*Scanning Electron Microscopy*) analizu

Za slikanje pomoću SEM potrebno je da preparati budu potpuno suhi (dehidrirani). Zato su se nosači s imobiliziranim bakterijama sušili izlaganjem vodenim otopinama alkohola različitih koncentracija.

Postupak:

Nakon inkubacije iz Schott boce s nosačem i imobiliziranim bakterijama izlije se supernatant i zatim se u bocu dodaju otopine alkohola po opisanom protokolu (**Tablica**). Osušeni materijal se aseptički prenese u sterilnu petrijevu zdjelicu i čuva u eksikatoru do SEM analize.

Protokol za sušenje nosača s imobiliziranim bakterijama za SEM analizu.

Otopina etanola	Vrijeme (min)
30% etanol + 0,1% NaCl	2
50% etanol + 0,1% NaCl	2
70% etanol + 0,1% NaCl	5
96% etanol + 0,1% NaCl	5
100% etanol + 0,1% NaCl	5
100% etanol + 0,1% NaCl	5